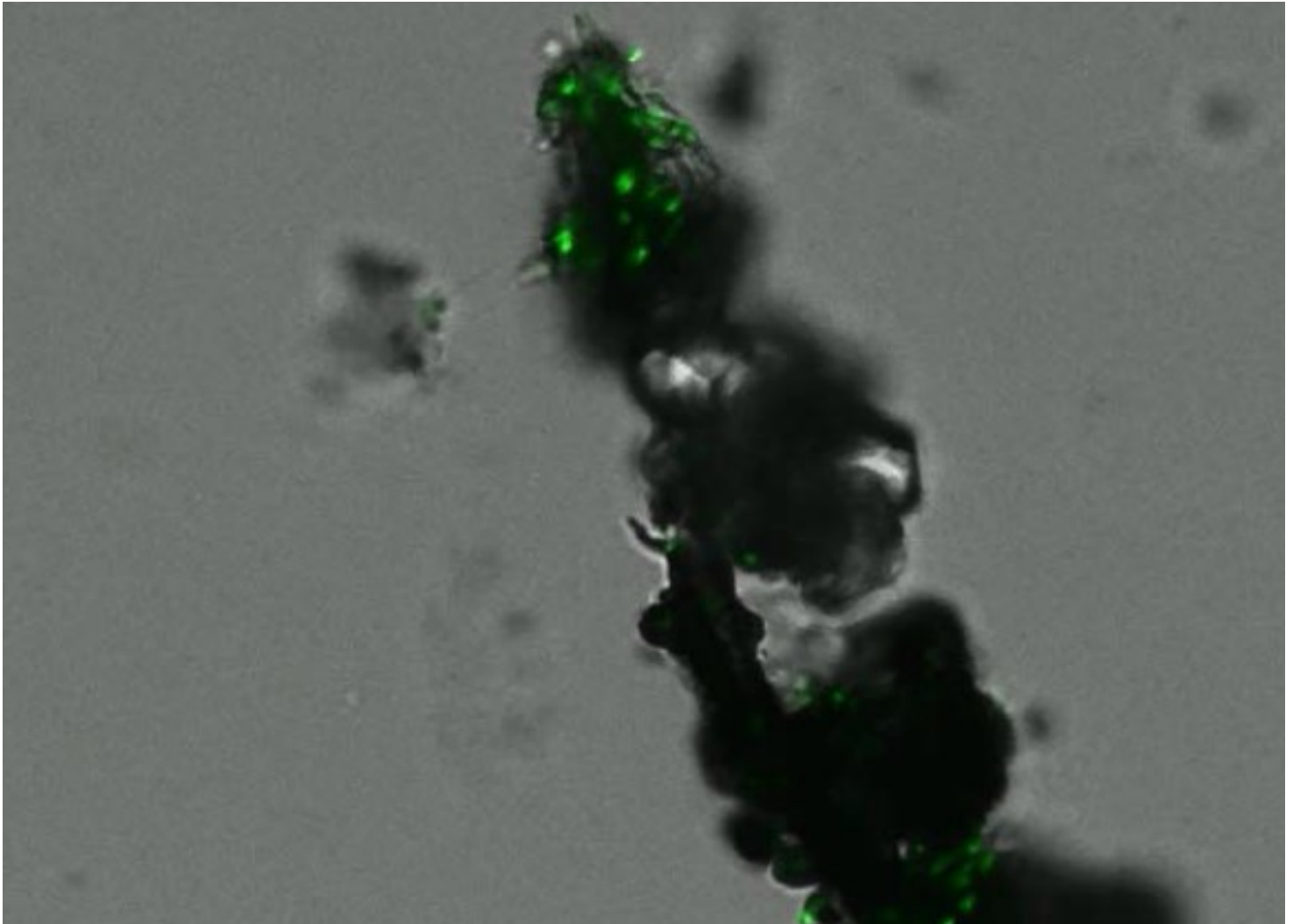




**DURCHFLUSSZYTOMETRIE
IN DER WASSERVERSORGUNG**
MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG
VON EINFLUSSFAKTOREN UND
ZUSTANDSVERÄNDERUNGEN BEI DER
WASSERVERSORGUNG

IMPRESSUM

Medieninhaber und Herausgeber:
BUNDESMINISTERIUM
FÜR NACHHALTIGKEIT UND TOURISMUS
Stubenring 1, 1010 Wien
www.bmnt.gv.at

Text und Redaktion: DI Dr. Marija Zunabovic-Pichler, DI Ernest Mayr, DI Christoph Schönher, DI Christina Fiedler, DI David Kerschbaumer,
DI Philipp Proksch und Priv.-Doz. DI Dr. Reinhard Perfler
Grafikdesign: Universität für Bodenkultur
Lektorat: Universität für Bodenkultur
Bildnachweis: BOKU/Marija Zunabovic-Pichler (Titelseite)
Gestaltungskonzept: WIEN NORD Werbeagentur

1. Auflage

	Gilt für Druckversion: Dieses Feld nicht löschen! Dieses Feld dient als Platzhalter für die Originalversionen von Umweltzeichen, Umweltzeichentext und PEFC-Siegel. Dieser Platzhalter zeigt deren Stand und wird von der Druckerei durch die entsprechenden Originalelemente ersetzt. Gilt für Onlineversion: Dieses Feld bitte löschen!	
UW 907		PEFC PEFC/06-39-364/27 www.pefc.at

Alle Rechte vorbehalten.
Wien, 30. 04. 2018

PROJEKTPARTNER UND DANKSAGUNG

DIE UNTERSTÜTZUNG des **Bundesministeriums für Nachhaltigkeit und Tourismus** hat die Möglichkeit zu detaillierten thematischen Auseinandersetzungen im Rahmen des FloWRes-Projektes eröffnet. Wir möchten uns für die sehr gute Zusammenarbeit in der Projektabwicklung herzlich bei allen Beteiligten bedanken.

Ohne die Kooperation mit der **Österreichischen Vereinigung für das Gas- und Wasserfach (ÖVGW)** und unterschiedlichen österreichischen Wasserversorgern wäre die Durchführung des Projektes nicht möglich gewesen. Für die ebenfalls sehr gute Zusammenarbeit bei der Bereitstellung von natürlichen Wasserproben und den Probenahmen sowie für die Ergebnisdiskussionen im ÖVGW-Fachausschuss „Wassergüte und Aufbereitung“ und im Gespräch mit den einzelnen Wasserversorgern möchten wir uns an dieser Stelle bei allen Beteiligten herzlich bedanken.

Weiters möchten wir und bei den Studierenden, die im Rahmen dieses Projektes ihre Masterarbeit durchgeführt haben, für die Unterstützung bei der Probenahme, für die vielen Stunden im Labor sowie für die unterstützende Datenauswertung herzlich bedanken.

Für das FloWRes Projektteam
Marija Zunabovic-Pichler & Ernest Mayr

INHALTSVERZEICHNIS

IMPRESSUM.....	2
PROJEKTPARTNER UND DANKSAGUNG	3
1 KURZZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT.....	8
2 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	10
AUSGANGSLAGE	10
PROJEKTZIELE	12
AUFBAU DES BERICHTS	13
3 GRUNDLAGEN.....	14
DURCHFLUSSZYTOMETRIE	14
3.1 MESSPRINZIP	14
3.2 GESAMTZELLZAHL, UNTERSCHIEDUNG LNA- UND HNA-ZELLEN.....	16
3.3 BEURTEILUNG DER MEMBRANINTEGRITÄT DER ZELLE.....	17
3.4 BIOLOGISCHE STABILITÄT	18
3.5 DATENAUSWERTUNG	19
3.5.1 GATING	19
3.5.1.1 LNA- und HNA-ABTRENNUNG	20
3.5.2 CYTOMETRIC FINGERPRINTING.....	20
3.5.3 CLUSTERANALYSE	21
MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	23
3.6 MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING	23
3.7 ATP-BESTIMMUNG	24
4 MATERIAL UND METHODEN.....	26
MESSPROGRAMM.....	26
4.1 LABORVERSUCHE	28
4.2 MESSKAMPAGNE NATÜRLICHER WÄSSER.....	28
4.2.1 MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING	29
DURCHFLUSSZYTOMETRIE	31
4.3 BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN DURCHFLUSSZYTOMETER	31
4.3.1 BD ACCURI® C6	31
4.3.1.1 Autoloader	31
4.3.1.2 Dynamic Range.....	31
4.3.1.3 Gemessene Parameter	31
4.3.1.4 Bestimmung des gemessenen Probenvolumens.....	32
4.3.2 SYSMEX (PARTEC) CyFLOW® CUBE 6	32
4.3.3 METANOR OBA	32
4.4 PROBENAHME FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	32
MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING	33
4.5 VORGEHENSWEISE MIKROBIOM-BESTIMMUNG (NGS)	33
4.6 PROBENAHMEVERFAHREN UND FILTRATION	33
4.6.1 DIREKTFILTRATION VOR ORT	34
4.7 DNA-EXTRAKTION	34
4.7.1 OPTIMIERUNG DER DNA-EXTRAKTION	34
4.7.1 INDEX-PCR.....	39
ATP-BESTIMMUNG.....	41
4.8 DURCHFÜHRUNG.....	41
SOFTWARE.....	42
4.9 PROGRAMMIERSPRACHE R.....	42

5	RESULTATE.....	43
	DURCHFLUSSZYTOMETRIE – METHODIK.....	43
5.1	QUALITÄTSSICHERUNG DURCHFLUSSZYTOMETRIE	43
5.1.1	PROBENAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG.....	43
5.1.1.1	Probenahmegebinde.....	43
5.1.1.2	Probenahme vor Ort.....	44
5.1.1.3	Transport.....	46
5.1.1.4	Einfluss der Lagerung	47
5.1.2	PROBENVORBEREITUNG UND MESSEINSTELLUNGEN.....	49
5.1.2.1	Durchmischung, Filtration und Verdünnung der Proben.....	49
5.1.2.2	Messgebinde	50
5.1.2.3	Lichtschutz.....	50
5.1.2.4	Inkubation.....	50
5.1.2.5	Einfluss des pH-Werts der Proben.....	51
5.1.2.6	Farbstoff.....	51
5.1.2.6.1	Farbstoffkonzentration	51
5.1.2.6.1.1	SYBR® Green 1	51
5.1.2.6.1.2	SYBR® Green 1 und Propidiumiodid	52
5.1.2.6.2	Farbstofflösungsmittel.....	52
5.1.2.6.3	Messung ungefärbter Proben.....	52
5.1.2.7	Messeinstellungen.....	53
5.1.2.7.1	Gemessenes Probenvolumen.....	53
5.1.2.7.2	Threshold-Setzung	54
5.1.2.7.3	Fluoreszenz-Kompensation.....	54
5.1.2.7.4	Flow-Rate.....	55
5.1.2.7.5	Waschschritte	55
5.1.2.7.6	Agitation Cycles.....	56
5.1.2.7.7	Messdauer	56
5.1.2.7.7.1	Färbung mit SYBR® Green 1.....	56
5.1.2.7.7.2	Färbung mit SYBR® Green 1 und Propidiumiodid.....	57
5.1.3	ÜBERPRÜFUNG DES GERÄTS UND DER MESSUNG	58
5.1.3.1	Überprüfung der Stabilität der Signalintensitäten.....	58
5.1.3.2	Überprüfung der Bestimmung des Probenvolumens	61
5.1.3.3	Überprüfung des Messvorgangs	61
5.1.3.4	Variation der Ergebnisse bei Mehrfachbestimmungen	67
5.1.3.4.1	Carry-Over	68
5.1.3.4.1.1	Carry-Over von Partikeln.....	69
5.1.3.4.1.2	Carry-Over von Farbstoff	72
5.1.3.5	Signalhintergrund.....	74
5.1.3.6	Sicherstellung der Detektion von Single-Cells	77
5.1.4	ONLINE-DURCHFLUSSZYTOMETRIE	78
5.1.4.1	Planung der Probenahmefrequenz	80
5.2	VIABILITY ASSAYS	80
5.2.1	PERMEABILISIERUNG DER ZELLMEMBRAN	80
5.2.1.1	SYBR® Green 1 und Propidiumiodid	80
5.2.1.2	SYBR® Green 1	81
5.2.2	BESCHÄDIGUNG DER NUKLEINSÄUREN	81
5.2.2.1	SYBR® Green 1	81
5.2.2.1.1	Chlorresistenz von SYBR® Green 1.....	83
5.2.3	ENZYM-AKTIVITÄT.....	85
5.2.3.1	5(6)-cFDA.....	85
5.3	WACHSTUMSPOTENTIAL	85
5.3.1	KONZEPT UND GENERELLES VORGEHEN.....	85
5.3.2	ÜBERPRÜFUNG DER REINHEIT DER GEBINDE.....	86
5.3.3	TEST ZU EINER MÖGLICHEN KONTAMINATION BEI DER PROBENAHME.....	87
5.3.4	SAUERSTOFFEINTRAG BEI PROBENAHME.....	87
5.3.5	ZUGABE VON NATRIUMTHIOSULFAT BEI GECHLORTEN WASSERPROBEN.....	87

5.4	VERGLEICHBARKEIT DER DFZ MIT ANDEREN METHODEN	88
5.4.1	KULTIVIERUNG	88
5.4.2	ATP-BESTIMMUNG	88
5.5	DATENAUSWERTUNG	91
5.5.1	DATENTRANSFORMATION	91
5.5.2	GATING	92
5.5.2.1	Festlegung eines fixen TCC-Gates	92
5.5.2.1.1	Analyse der Abstände der Detektionen zum Gate	93
5.5.2.2	Vorgehen bei der Festlegung des ICC-Gates	94
5.5.2.3	Verwendung der Streulichtkanäle	94
5.5.2.4	Messung von steril-filtrierte Proben	94
5.5.3	VORGEHENSWEISE BEI MEHRFACHBESTIMMUNGEN	95
5.5.3.1	Kombination der Messdaten	96
5.5.3.2	Mittelwertbildung aus TCC und Anzahl der HNA-Zellen	96
5.5.3.3	Distanzanalyse der Messungen zueinander	96
5.5.4	CYTOMETRIC FINGERPRINTING	97
5.5.5	CLUSTERANALYSE ZUR LNA-HNA-ABTRENNUNG	100
5.5.6	DETAILBETRACHTUNG VON MESSREIHENABSCHNITTEN	107
5.6	NACHWEIS EINZELNER BAKTERIENARTEN IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE... 111	
	MIKROBIOM (NGS) – METHODIK	112
5.7	REPRODUZIERBARKEIT DER ERGEBNISSE	112
	MESSKAMPAGNE BEI WASSERRESSOURCEN	114
5.8	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	114
5.8.1	ERGEBNISSE NACH RESSOURCENTYPEN	114
5.8.1.1	Cytometric Fingerprinting	117
5.8.2	ERGEBNISSE FÜR EINSATZ ALS PROZESSPARAMETER	118
5.8.2.1	Fallbeispiel Einfluss von Oberflächengewässern	118
5.8.2.2	Fallbeispiel biologische Stabilität	119
5.9	MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING	121
5.9.1	BAKTERIELLE DIVERSITÄT IN RESSOURCENTYPEN	121
5.9.2	BAKTERIELLE GEMEINSCHAFTEN IN RESSOURCENTYPEN	122
5.9.3	BAKTERIELLE GEMEINSCHAFTEN IN EINZELNEN PROBEN	123
5.9.3.1	Relative und hochgerechnete absolute Abundanzen	123
5.9.3.2	Zeitliche Varianz	124
5.9.3.3	Räumliche Varianz	125
5.9.4	VERTEILUNG AUSGEWÄHLTER TAXA	126
5.10	NGS UND DFZ – METHODENKOMBINATION	128
5.10.1	GEMEINSAME AUSWERTUNG DFZ UND NGS (WACHSTUMSPOTENTIAL)	130
6	DAS ÖSTERREICHISCHE PROTOKOLL	131
	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	131
6.1	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG VON GRUND- UND TRINKWASSER	131
6.1.1	KRITISCHE PUNKTE UND EMPFEHLUNGEN ZUM EINSATZ DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	132
6.1.2	ONLINE-DURCHFLUSSZYTOMETRIE (ONLINE-BACTERIA-ANALYZER, METANOR)	134
6.2	SOP DURCHFLUSSZYTOMETRIE	135
6.2.1	PROBENAHEME	135
6.2.2	TRANSPORT UND LAGERUNG	135
6.2.3	MESSVORBEREITUNGEN	135
6.2.3.1	Probenvorbereitung	135
6.2.3.2	Farbstoffvorbereitung	136
6.2.3.2.1	SYBR® Green 1 - Arbeitslösung	136
6.2.3.2.2	Farbstoffkombination SYBR® Green 1 und Propidiumiodid – Arbeitslösung	136
6.2.3.3	Farbstoffzugabe zur Probe und Inkubation	136
6.2.3.4	Mehrfachmessungen einer Probe	136
6.2.4	MESSEINSTELLUNGEN UND -DURCHFÜHRUNG	136
6.2.4.1	Fluoreszenz-Kompensation	137
6.2.4.2	Gemessenes Probenvolumen	137

6.2.4.3	Durchflussrate.....	137
6.2.4.4	Threshold	137
6.2.4.5	Messdauer	137
6.2.4.6	Probenabfolge und Zwischenreinigung	137
6.2.4.7	Lichtschutz.....	138
6.2.5	MESSUNGEN ZUR QUALITÄTSSICHERUNG.....	138
6.2.5.1	Beads.....	138
6.2.5.2	Vergleichsproben.....	138
6.2.5.3	Verdünnungsreihen.....	138
6.2.6	DATENAUSWERTUNG	138
6.2.6.1	Qualitätssicherung	138
6.2.6.1.1	Beads.....	138
6.2.6.1.2	Messverlauf.....	138
6.2.6.2	Gating	138
	MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING	139
6.3	OPTIMIERTES VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES MIKROBIOMS IN WASSERPROBEN AUF BASIS DES „NEXT-GENERATION-SEQUENCING“-VERFAHRENS (NGS).....	139
6.4	SOP SEQUENZIERUNG ZUR BESTIMMUNG DES WASSERMIKROBIOMS	140
6.4.1	PROBENAHE	140
6.4.2	FILTRATION.....	140
6.4.3	DNA-EXTRAKTION.....	140
6.4.4	AMPLIFIKATION DES 16S-RRNA-GENS	140
6.4.5	INDEX-PCR UND LIBRARY-ERSTELLUNG	141
7	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	142
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	147
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	147
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	148
11	LITERATURVERZEICHNIS	151

1 KURZZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT

DIE MIKROBIOLOGISCHE BEURTEILUNG VON GRUND- UND TRINKWASSER ist auf wenige aufwändig zu bestimmende meist kultivierungsabhängige Standardparameter beschränkt. Die technologischen Entwicklungen in den letzten Jahren und Jahrzehnten und die daraus gewonnenen Erkenntnisse zeigen deutlich, dass die tatsächliche Dynamik der Mikrobiologie aquatischer Systeme mit den konventionellen Messparametern nicht oder nur unvollständig abgebildet werden kann. Die Durchflusszytometrie (DFZ) ist eine Methode, die diesen blinden Fleck beseitigt, da sie die Anzahl aller in einer Wasserprobe enthaltenen Zellen in kürzester Zeit und ohne aufwändige Kultivierung durch Angabe der Totalzellzahl präzise quantifizieren kann. Die Möglichkeit, darüber hinaus qualitative Informationen über die mikrobielle Gemeinschaft einer Probe (z.B. den Anteil der lebenden Bakterien) zu erlangen, erweitert das Einsatzspektrum der Methode beträchtlich und kann etwa zur Beurteilung von Desinfektionsmaßnahmen angewandt werden.

Ziel dieses Projekts war es, das vielfältige Potential der DFZ zur mikrobiologischen Charakterisierung von Einflussfaktoren und Zustandsveränderungen in der Wasserversorgung zu erheben und eine Wissensplattform zur breiten Anwendung in der österreichischen Wasserversorgung zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden über die Gesamtprojektlaufzeit insgesamt über 40 000 Einzelmessungen gemacht, 4 700 Proben aus sieben Bundesländern gezogen sowie umfassende Untersuchungen zur methodischen Qualitätssicherung im Ablauf Probenahme-Messung-Datenauswertung durchgeführt. Die Mikrobiom-Bestimmung auf Basis der DNA-Sequenzierung („Next-Generation-Sequencing“) stellte einen weiteren Schwerpunkt im Projekt dar und erlaubt die Benennung der in einer Probe vorkommenden Bakterienarten.

Im Zuge einer Messkampagne zur Erhebung von Grundlagendaten wurden von verschiedenen Wasserversorgern Roh- und Reinwasserproben aus 58 Probenahmestellen unterschiedlicher Wasserressourcen über zumindest ein Jahr zur Verfügung gestellt. Dies stellt die erste umfassende Untersuchung zum Zustand österreichischer Wasserressourcen mittels DFZ dar. Dabei haben sich für die einzelnen Messstellen sehr charakteristische DFZ-Resultate in Abhängigkeit vom Ressourcentyp (Uferfiltrat, Porengrundwasser, Quellen) ergeben. Es hat sich klar herausgestellt, dass mittels DFZ eine sehr sensitive Erfassung von ungewöhnlichen Veränderungen des mikrobiologischen Zustandes möglich ist. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des zeitnah verfügbaren Ergebnisses – im Fall der online-DFZ nur wenige Minuten – kann die DFZ als Steuerungsparameter und Frühwarnsystem im Rahmen des Wasserwerksbetriebs eingesetzt werden.

In methodischer Hinsicht ist die Ermittlung der Totalzellzahl mittels DFZ eine äußerst robuste Größe, die einen hohen Probendurchsatz ermöglicht und damit im Monitoring für Zustandsveränderungen sehr gut angewendet werden kann. Auf Basis der in diesem Projekt erzielten Ergebnisse wurde ein „österreichisches Protokoll“ zur Anwendung der DFZ erstellt, um anwenderunabhängig exakte Ergebnisse zu erhalten.

Die Anwendung der DFZ als Schnellmethode gewinnt nicht nur in Österreich an Bedeutung und wird dabei kultivierungsabhängige Methoden sinnvoll ergänzen sowie in verschiedenen Bereichen eine wesentlich detaillierter mikrobiologischen Entscheidungsgrundlage bieten.

The microbiological assessment of ground water and drinking water is limited to a few laborious cultivation-based parameters. The technological developments of the recent years and resultant findings clearly show that the actual dynamics of the microbiology of aquatic systems can't be captured by the conventional parameters to its full extent. Flow cytometry (FC) is a method that eliminates this blind spot, because it can accurately quantify the number of cells in a sample (total cell count) quickly and without the need for time- and labor-intensive cultivations. Furthermore, the possibility of gaining qualitative information about the microbial community of a sample (e.g. the ratio of living bacteria) considerably broadens the range of application of the method.

The aim of this project was to assess the manifold potential of FC for the microbiological characterization of influencing factors and changes of state in the water supply and to establish a knowledge basis for a broader application in the Austrian water supply. To this end, a total of more than 40 000 individual measurements were performed, 4 700 samples were taken from seven federal states, and a comprehensive survey on methodological quality assurance for sampling, measurement and data analysis was conducted. The determination of the microbiome based on DNA sequencing ("Next Generation Sequencing") was an additional focus of the project and allows for the identification of the bacterial taxa occurring in a sample.

In the course of a measurement campaign for the collection of basic data raw water and pure water samples from 58 sampling points of different water resources were provided by various water utilities for the duration of at least one year. This is the first comprehensive study on the state of Austrian water resources using FC. The individual measuring points showed very characteristic results with a further dependence on the type of resource (bank filtrate, pore groundwater, springs). It has become clear that FC enables a very sensitive detection of unusual changes in the microbiological state of water resources. With additional consideration of the rapid availability of results - in the case of the online FC only a few minutes – FC can be used as a control parameter and early warning system within the scope of the waterworks operation.

From a methodological point of view, the determination of total cell counts using FC is an extremely robust parameter that enables a high sample throughput and can therefore be used well for monitoring for changes in the microbial status. On the basis of the results achieved in this project, an "Austrian protocol" for the application of the FC was created in order to ensure accurate results regardless of the user.

Not only in Austria rapid screening methods are gaining in importance. The use of FC will complement cultivation-based methods in a very useful way as well as offer a much more detailed microbiological decision-making basis in many areas.

2 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

AUSGANGSLAGE

DIE BEURTEILUNG DER MIKROBIOLOGISCHEN QUALITÄT von Grund- und Trinkwasser ist auf wenige aufwändig zu bestimmende Standardparameter (z.B. coliforme Bakterien, Koloniebildende Einheiten bei 22°C und 37°C, etc.) beschränkt. Die technologischen Entwicklungen in den letzten 30 Jahren und die daraus gewonnenen Erkenntnisse zeigen deutlich, dass die tatsächliche Dynamik der Mikrobiologie aquatischer Systeme mit den konventionellen Parametern nicht oder nur unvollständig abgebildet werden kann. Man schätzt, dass nur weniger als 1 % der Bakterien überhaupt in vitro kultiviert werden kann (Epstein 2013). Dies ist auch als „great plate count anomaly“ bekannt, nach der die Anzahl an Bakterienzellen unter dem Mikroskop höher ist als die Koloniezahl. Daneben hat sich gezeigt, dass sich prinzipiell kultivierbare und lebensfähige Bakterien in einem sogenannten VBNC-Zustand („viable but not cultivable“) befinden können, in dem sie eben nicht kultivierbar sind. Wenngleich eine erfolgreiche Kultivierung ein untrügliches Zeichen für die Viabilität des jeweiligen Bakteriums ist, wird aufgrund der beiden genannten Tatsachen, also der grundsätzlichen Nicht-Kultivierbarkeit von Bakterien und des Auftretens eines VBNC-Zustandes, die tatsächlich vorhandene Anzahl an Mikroorganismen weit unterschätzt (S. Van Nevel u. a. 2017). Zugleich wird die Komplexität von bakteriellen Gemeinschaften auf Basis der kulturellen Methode unterschätzt. Jene Bakterienarten, die das Ergebnis einer Kultivierung dominieren, sind meist nicht jene, die tatsächlich in einer Probe den größten Anteil ausmachen. Durch die Weiterentwicklung nicht-kultureller Verfahren, wie der Mikrobiom-Bestimmung auf Basis der Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens, wird ein wesentlich vertiefender Einblick in die tatsächlich vorhandene Diversität ermöglicht und etliche neue Phylotypen aus unterschiedlichsten Ökosystemen sind auf diesem Weg identifiziert worden.

Die Mikrobiologie entwickelt sich in immer stärkerem Maße zu einer Geräte-basierten-Technologie und ersetzt kultivierungsabhängige Methoden beispielsweise durch molekularbiologische Verfahren, Biosensoren oder fluoreszenzbasierte mikrobiologische Detektionsmethoden (siehe auch Tabelle 1). Allerdings werden diese Methoden derzeit noch nicht in der Routineanalytik oder im Rahmen eines In-house Monitorings angewendet, da einerseits der Standardisierungsansatz fehlt, andererseits aber auch die Investitionskosten für diese Geräte teilweise noch sehr hoch sind.

TABELLE 1: VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER METHODENPRINZIPIEN ZUR DETEKTION VON MIKROORGANISMEN (MODIFIZIERT NACH GRUDEN 2004)

Methodenprinzip	Detektionslimit KBE/ml oder KBE/g	Zeitaufwand [h]	Adaptierbarkeit	Beeinflussung durch Probenmatrix
Plattenverfahren	1	24 – 72	Sehr gut	Gering
Biolumineszenz	10^3 - 10^4	0.5	Gering	Mäßig
Piezoelektrisch	10^6	5	Gut	Hoch
Impedanz	1 - 10^5	6-24	Moderat bis Gut	Mäßig
Durchflussszytometrie	10^2-10^3	0.5	Gut	Mäßig
Akustik	5×10^4 - 10^6	3	Moderat	Hoch
Elektrochemisch	10^3	0.5 – 2	Gering	Gering

International wird die Entwicklung und Standardisierung umfassenderer und robuster Analysemethoden mit verlässlicheren Aussagen vorangetrieben. Die Durchflussszytometrie ist eine solche Methode. Sie erlaubt, mikrobielle Zellen in kürzester Zeit anwenderunabhängig ohne aufwändige Kultivierung zu quantifizieren und liefert so ein zeitnahes Ergebnis über den mikrobiologischen Zustand in unterschiedlichen Wasserressourcen.

Die mittels Durchflusszytometrie zu bestimmenden Parameter Totalzellzahl (TCC) und Anteil von Zellen mit niedrigem bzw. hohem Gehalt an Nukleinsäuren (LNA- bzw. HNA-Anteil) wurden 2012 in das Schweizerische Lebensmittelbuch aufgenommen und ein detailliertes Handbuch zu deren Bestimmung herausgegeben. Als Zweck der Anwendung wird die Erlangung mikrobiologischer Summenparameter zur Erfassung des allgemeinen mikrobiologischen Zustandes und betrieblicher Störungen genannt. In Österreich liegen bis dato nur wenige Erfahrungen vor, was mit ein Grund sein könnte, warum eine Umsetzung in ähnlicher Form bisher nicht erfolgt ist.

Für die Schweiz wurden im Rahmen einer Messkampagne mit insgesamt 50 Messstellen (zweimalige Beprobung) Totalzellzahlen im Bereich von 1 000 bis über 800 000 Zellen je ml ermittelt (Kötzsch und Sinreich 2014). Der Großteil der ermittelten Zellzahlen liegt dabei zwischen 1 000 und 50 000 Zellen je ml und dieser Bereich ist nach den Autoren als für Grundwässer üblich anzusehen (siehe Abbildung 1). Grundwasser-Proben mit sehr hohen TCC (mehrere 100 000) deuten auf eine unmittelbare Beeinflussung durch externe Faktoren hin. Hinsichtlich des Anteils von LNA-Zellen wurde ein Durchschnitt von 65 % ermittelt (bzw. ein HNA-Anteil von 35 %). Diese Größen gelten dabei als aussagekräftig für die Beurteilung der mikrobiologischen Stabilität einer Wasserressource. Ein höherer Anteil an LNA-Zellen steht in Zusammenhang mit einer geringen Verfügbarkeit von Nährstoffen – dementsprechend weisen Proben aus Oberflächengewässern typischerweise geringere LNA-Anteile auf. Vergleichbare Ergebnisse zeigten auch bisherige Untersuchungen der Universität für Bodenkultur mit TCC-Werten zwischen 10 000 und 60 000 Zellen je ml für Grundwasser und mehr als 250 000 bei Oberflächengewässern. Der Anteil der LNA-Zellen lag für Grundwasserproben bei etwa 70 % und in Oberflächengewässern bei rund 40 %.

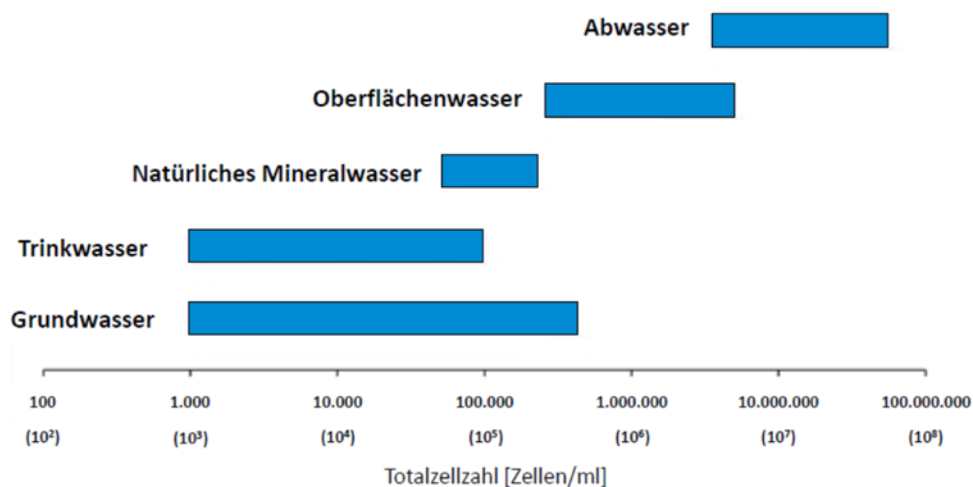


Abbildung 1: Übliche Werte der Totalzellzahl verschiedener Wasserressourcen (Kötzsch und Sinreich 2014)

PROJEKTZIELE

DAS HAUPTZIEL DES PROJEKTS ist die Aufbereitung des vielfältigen Potentials der mikrobiologischen Durchflussszytometrie zur Charakterisierung von österreichischen Grund- und Trinkwässer sowie dem Einsatz als Prozessparameter in der Wasserversorgung. Aufgrund der sehr bald nach der Probenahme zur Verfügung stehenden Ergebnisse soll der Einsatz der Durchflussszytometrie vor allem als Monitoringparameter zur sensitiven Beurteilung von mikrobiologischen Veränderungen überprüft werden. Um diese Methode in der Routineanalytik anzuwenden, ist es erforderlich eine strikte Qualitätssicherung der Analyse einzuhalten und auf Erfahrungswerte mit unterschiedlichen Probenmatrices aufzubauen.

Im Rahmen des Projektes wurde die Einsetzbarkeit der Durchflussszytometrie für verschiedene Rohwässer (Poren- und Kluftgrundwasser, Karstquellwasser, Uferfiltratwasser etc.) untersucht werden. Rohwässer weisen eine nicht vorhersehbare Variabilität hinsichtlich mikrobieller Diversität auf und erfordern daher spezifische Erfahrungswerte zu deren Untersuchung mittels Durchflussszytometrie. Im Vergleich dazu stoßen gerade in derartigen Habitaten kultivierungsabhängige Methoden sehr schnell an ihre Grenzen.

Als weiteres wichtiges Ziel wird der Wissenstransfer zur breiten Anwendung der Durchflussszytometrie für diverse Interessenspartner in der Wasserversorgung (Wasserversorger, Labors, zukünftige Fachkräfte etc.) im Rahmen des Projektes ausgearbeitet. Dies erfolgt in der Form von Arbeitsanweisungen (SOP).

Aufgrund der erwartbar großen Anzahl an Untersuchungsergebnissen in diesem Projekt (und gerade auch für ähnlich gelagerte Projektvorhaben), wurde das bestehende Datenmanagement bezüglich Automatisierung und Objektivität der Datenevaluierung optimiert. In weiterer Folge kann eine Vereinfachung der Auswertung und Interpretation der ermittelten Daten erfolgen, wodurch die Einsetzbarkeit der Durchflussszytometrie einem breiteren Anwenderfeld angeboten werden kann.

Die Bestimmung von Vitalitätsparametern („Viability Assessment“) mittels Kenngrößen wie der Membranintegrität, Energiehaushalt und Enzymaktivität vertiefen den Einblick in den Zustand der mikrobiellen Gemeinschaft und stellen einen weiteren wichtigen Punkt des untersuchten Methodenspektrums dar.

Durch die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften unterschiedlicher Habitate mittels Next Generations Sequencing (NGS) Verfahren wird ein vertiefender Einblick in die Diversität und Struktur der Bakterienpopulationen ermöglicht. Ziel dieser Mikrobiomanalyse ist es, einen umfassenden Überblick über die Zusammensetzung des Mikrobioms (DNA von lebenden und toten Bakterien) in den unterschiedlichen Wassermatrices zu erhalten.

Für die Bearbeitungen wurden die von den einzelnen Wasserversorgungen erfasste einzigartige Vielzahl an realen Wasserproben unterschiedlicher Wassermatrices unterschiedlicher Ressourcen dazu genutzt, um zusätzlich zur Bestimmung der einzelnen Summenparameter folgende praxisrelevanten Fragestellungen zu bearbeiten:

- Festlegung der wesentlichen Qualitäts-Kriterien einer erfolgreichen durchflussszytometrischen Analyse (Probenahme, Protokoll, Gerät, Datenauswertung)
- Vergleichbarkeit der durchflussszytometrischen Ergebnisse natürlicher Proben mit in der Literatur anerkannten Referenzmessungen (z.B. ATP, Kultivierung und Molekularbiologie)

- Charakterisierung von Reinkulturen unterschiedlicher Gattung, Spezies und Subspezies durch Analyse der quantitativen Signale des Durchflussszytometers im Labormaßstab
- Untersuchung der autochthonen LNA- und HNA-Bakterienpopulation, um mikrobiologische Fingerprints zu generieren.
- Vergleichsdaten aus der Literatur mit den im Projekt gesammelten Erfahrungswerten gegenüberstellen und bewerten
- Überblick über Rohwasserzellzahlen in relevanten österreichischen Rohwässern (einschl. Kommunitätenstruktur) mit dem Ziel das Verständnis der mikrobiellen Ökologie zu verbessern, um in einem weiteren längerfristigen Ziel Referenzzustände zu schaffen.
- Erstellung eines „österreichischen Protokolls“ mit Standardarbeitsanweisungen (SOP) für den Einsatz der Durchflussszytometrie in der Wasserversorgung.

In diesem Zusammenhang wurden von den teilnehmenden Wasserversorgern, Roh- und Reinwasserproben aus 58 Probenahmestellen unterschiedlicher Ressourcen zur Verfügung gestellt. Gesamt wurden durchflussszytometrisch sowohl Rohwasser wie auch unterschiedliche Einspeisestellen (Systempunkte) über einen längeren Zeitraum regelmäßig bestimmt und quantifiziert. Dadurch können Änderungen im Rohwasser, etwa bei bestimmten Betriebssituationen, und Einflussfaktoren erfasst sowie Ereignisse definiert werden, für welche ein signifikanter Einfluss auf das mikrobiologische Risiko zu erwarten ist.

AUFBAU DES BERICHTS

IN KAPITEL 3 sind die Grundlagen zu unterschiedlichen Untersuchungsmethoden der Durchflussszytometrie und der molekularbiologischen Methoden zur Erfassung der mikrobiologischen Zellpopulationen dargestellt. Aufbauend sind die im Projekt eingesetzten Methoden und die Durchführung der Laborversuche zum Aufbau der Qualitätssicherung sowie die Messkampagne der Feldversuche dargestellt (Kapitel 4). In Kapitel 5 sind die Ergebnisse der Qualitätssicherung, die Anwendung durchflussszytometrischer Parameter und die Möglichkeiten der Datenauswertung sowie die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen dargestellt. Weiters sind in Kapitel 6 die methodischen Erkenntnisse für die breite Anwendung der Durchflussszytometrie (Wissenstransfer) zusammengestellt. In Kapitel 7 erfolgt eine Zusammenfassung sowie ein Ausblick für mögliche weitere Schritte.

3 GRUNDLAGEN

DURCHFLUSSZYTOMETRIE

DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE (DFZ) ist eine Form der Zytometrie, wobei letztere eine Messmethode bezeichnet, die es erlaubt, physikalische oder chemische Information über einzelne Zellen oder andere ähnlich große Partikel zu erhalten. Für die Durchflusszytometrie ist nun charakteristisch, dass die zu erfassenden Zellen oder Partikel in einem flüssigen Medium den Messvorgang im Messgerät – dem Durchflusszytometer – durchlaufen (Shapiro 2003). Die Anwendungsgebiete der Durchflusszytometrie sind vielseitig und umfassen neben der Mikrobiologie insbesondere die medizinische Diagnostik.

3.1 MESSPRINZIP

Die Durchflusszytometrie beruht auf der strömungstechnischen Fokussierung von Zellen in einem flüssigen Medium und der anschließenden Abtastung mit einem Laserstrahl und der Detektion von gestreutem bzw. emittiertem Licht eines jeden einzelnen Partikels. Die Lichtemission beruht dabei zumeist auf einer im Zuge der Probenvorbereitung zugegeben Markierung auf Basis eines oder mehrerer fluoreszierender Farbstoffe. Die Detektion wiederum erfolgt auf mehreren Kanälen, die verschiedene Wellenlängenbereiche bzw. Streuwinkel repräsentieren und damit ein mehrdimensionales Bild der einzelnen Zelle vermitteln. Je nach verwendetem Protokoll zur Probenvorbereitung sind neben der Bestimmung der Anzahl von Zellen in einem Volumen – die im vorliegenden Projekt eine große Rolle spielt – eine große Bandbreite an „Assays“ vorhanden, die spezifische Aussagen über zelluläre Eigenschaften, beispielsweise die Stoffwechselaktivität oder Membranintegrität, ermöglichen.

Die wesentlichen Komponenten eines Durchflusszytometers sind (Picot u. a. 2012): im Folgenden dargestellt. Die Abläufe in einem herkömmlichen Durchflusszytometer sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

- **Fluidik:** zuständig für den Transport und die hydrodynamische Fokussierung der Zellen bzw. Partikel. Letzteres beschreibt den Vorgang der Einengung des Strömungsquerschnitts der Probe im Gerät und die genaue Ausrichtung der Probe im Zentrum des Detektionsbereichs unter Mithilfe einer sogenannten Hüllstromflüssigkeit. Die Einengung bewirkt dabei auch, dass sich Zellen mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit gleichzeitig im Detektionsbereich befinden. Wesentlichste Voraussetzung ist das Vorliegen von einer Einzel-Zell-Suspension, größere Zellaggregate können nicht analysiert werden.
- **Optik:** zuständig für die lasertechnische Abtastung bzw. Fluoreszenzlicht-Anregung der Zellen und die Weiterleitung sowie Filterung des gestreuten bzw. emittierten Lichts zu den Detektoren. Die optische Erfassung der Zellsuspension erfolgt dabei in der Durchflusszelle, einer sehr dünnen Glaskapillare, auf deren Zentrum der Probenstrom fokussiert wurde und der oder die Laser ausgerichtet sind. Beim Durchtritt eines Partikels durch den Laser wird dessen Licht gestreut und dieses Streulicht dann meist in zwei Richtungen erfasst – die Vorwärtsstreuung (FSC) annähernd in Richtung des Laserstrahls bzw. Seitwärtsstreuung (SSC) im rechten Winkel zum Laserstrahl. Daneben wird die Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, dessen Detektion durch die Vorschaltung optischer Filter letztendlich in verschiedenen Welllängenbereichen erfolgt.
- **Elektronische Signalerfassung und -verarbeitung:** zuständig für die Detektion des einfallenden Lichts, die Signalverstärkung sowie Pulsverarbeitung und Digitalisierung. Beim Durchtritt einer Zelle durch den Erfassungsbereich des Laserstrahls, der mitunter deutlich größer ist als die Zelle selbst, wird beständig Licht emittiert. Aus der resultierenden Signalkurve bzw. dem Signalpuls

wird nun meist lediglich die Fläche unter der Kurve („Area“) und die maximale Signalstärke („Height“) extrahiert. Durch die Festsetzung einer Mindestsignalstärke („Threshold“) wird versucht sogenanntes Signalrauschen zu minimieren – erst bei Überschreitung beginnt die Datenaufzeichnung.

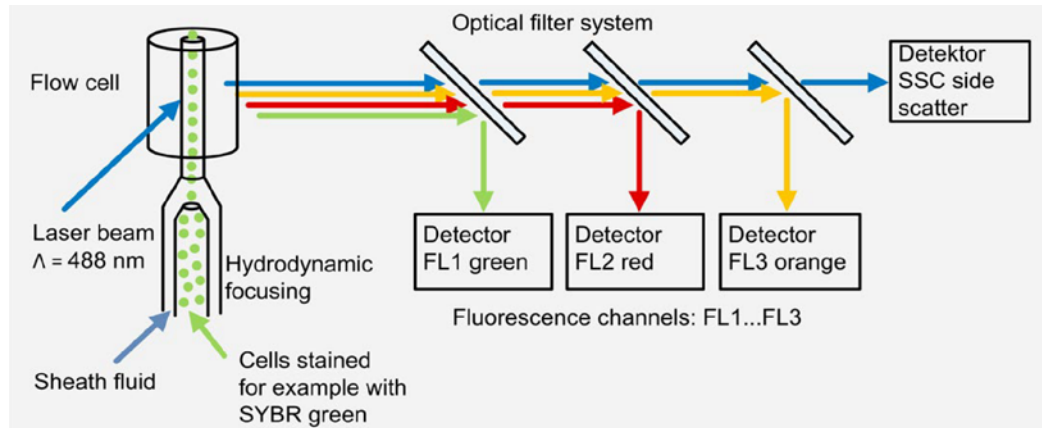


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (Metanor OBA, 2017).

Die schon erwähnte Verwendung verschiedener fluoreszierender Farbstoffe erweitert das Anwendungsspektrum der Durchflusszytometrie ganz erheblich. Die grundlegende Eigenschaft dieser Farbstoffe ist jene, dass sie durch Lichtabsorption in einen angeregten Zustand übergehen können, dessen Abbau durch Abgabe von Fluoreszenzlicht erfolgen kann. Letzteres ist dabei stets von geringerer Energie, also langwelliger. Durch die Verwendung von optischen Filtern kann das emittierte Licht von der Anregungslichtquelle, dem annähernd monochromatischen Laserlicht, unterschieden werden. In Abbildung 3 ist das Anregungs- und Emissionsspektrum des Farbstoffs SYBR® Green 1, der im vorliegenden Projekt überwiegend eingesetzt wurde, dargestellt. Idealerweise erfolgen Anregung und Detektion im Bereich der jeweiligen Maxima.

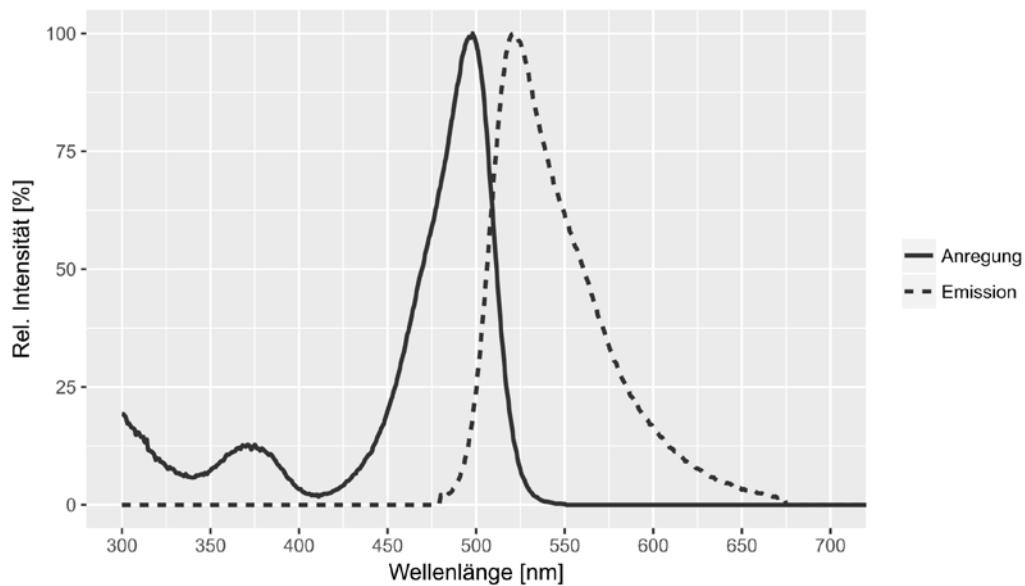


Abbildung 3: Anregungs- und Emissionsspektrum von SYBR® Green 1 (nach ThermoFisher Scientific, Fluorescence SpectraViewer)

3.2 GESAMTZELLZAHL, UNTERSCHIEDUNG LNA- UND HNA-ZELLEN

Im Bereich der Trinkwasserversorgung wird sehr häufig ein Messprotokoll nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch angewandt (SLMB 2012). Der Durchflusszytometrie kommt hier in erster Linie die Rolle eines quantifizierenden Schnelltests zu. Dabei wird den Wasserproben vor der Messung ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR® Green 1, kurz: SG1) zugegeben, der auch intakte Zellmembranen durchdringen kann. Erst nach Anlagerung an die Nukleinsäuren der Zellen entfaltet der Farbstoff sein Potential zur Abgabe von Fluoreszenzlicht und diese Eigenschaft erlaubt den quantitativen Nachweis von Zellen mit großer Zuverlässigkeit, sofern letztere noch weitestgehend intakt sind. Als Ergebnis erhält man damit die sogenannte Total- oder Gesamtzellzahl (TCC für „Total Cell Count“) – meist in Zellen pro ml angegeben. Die Nachweisgrenze wird mit 100 Zellen pro Milliliter, die Bestimmungsgrenze mit 1 000 Zellen pro Milliliter angegeben (SLMB 2012).

Sehr wesentlich ist aber, dass sich darüber hinaus auch qualitative Informationen über die jeweiligen Zellen ableiten lassen, da die Stärke des Fluoreszenzsignals von der Menge an Nukleinsäure in den detektierten Zellen abhängt. In diesem Zusammenhang ist in der Literatur der aquatischen Mikrobiologie das typische Auftreten von zumindest zwei gut unterscheidbaren Gruppen beschrieben. Diese werden entsprechend dem beschriebenen Mechanismus als Zellen mit niedrigem (LNA) und hohem (HNA) Nukleinsäuregehalt bezeichnet. Abbildung 4 zeigt ein typisches Messresultat einer Grundwasserprobe als Streudiagramm der Signalkombination von Grün- und Rot-Fluoreszenz mit sogenannten Gates. Letztere dienen der Abgrenzung bestimmter Signalbereiche im Zuge der Datenauswertung, etwa der Abtrennung von Zellsignalen vom Signalhintergrund.

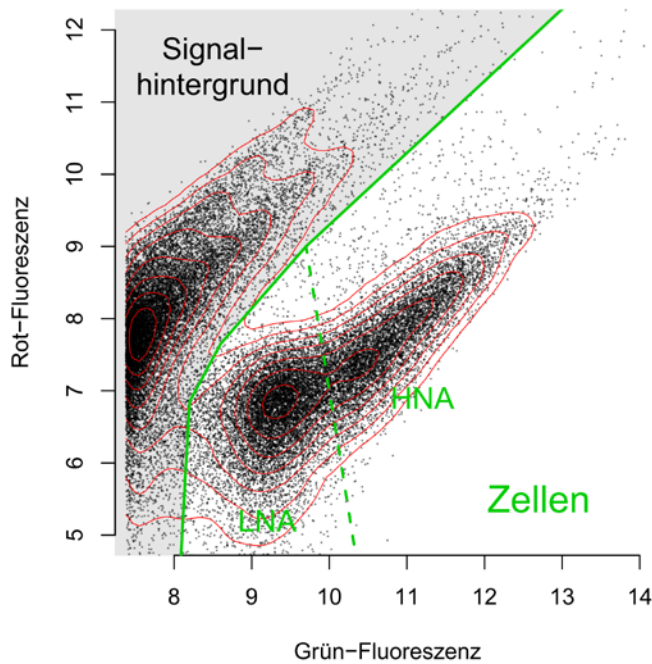


Abbildung 4: Streudiagramm der Grün- und Rot-Fluoreszenz einer DFZ-Messung mit überlagerter Dichteschätzung (rote Linien). Die Gates (grüne Linien) dienen der Abtrennung der Zellsignale vom Signalhintergrund und der Unterscheidung von LNA- und HNA-Zellen.

Schon auf Basis dieses recht einfachen, dafür aber umso robusteren Protokolls ist eine zuverlässige Charakterisierung verschiedener Wasserproben möglich. Die Verbindung der quantitativen (Zell-Konzentration) mit der qualitativen Information (Unterscheidung von LNA- und HNA-Zellen) verstärkt die Möglichkeit zur Charakterisierung der einzelnen Probe bzw. der Wasserressource.

Die Ableitung von qualitativer Information kann durch weiterführende Techniken der Datenauswertung - Cluster-Analysen und sogenannte Fingerprinting-Methoden - noch verbessert werden. Wie schon angedeutet, können insbesondere unter Verwendung mehrerer Messkanäle neben den LNA- und HNA-Zellen weitere Gruppen bzw. Cluster identifiziert werden. Daneben ist auch die Detektion sehr subtiler Signalverschiebungen möglich.

3.3 BEURTEILUNG DER MEMBRANINTEGRITÄT DER ZELLE

Neben dem genannten Protokoll unter Verwendung des Farbstoffes SG1 ist die kombinierte Verwendung der Farbstoffe SG1 und Propidiumiodid (PI) eine interessante Färbemethode. Dabei dient die letztgenannte Methode zur Untersuchung der Zellviabilität bzw. -lebensfähigkeit. Mit ihrer Hilfe lässt sich nun eine Aussage über den Zustand der Zellmembran gewinnen. Eine beschädigte Zellmembran ist dabei gleichbedeutend mit einer starken, wohl sogar letalen Schädigung der Zelle. Die Färbung basiert auf der oftmals bestätigten Beobachtung, dass PI - im Gegensatz zu SG1 - nur beschädigte Zellmembranen durchdringen kann. PI ist ebenfalls ein Nukleinsäurefarbstoff, der allerdings andere Fluoreszenzeigenschaften wie SG1 aufweist. Insbesondere ist das emittierte Licht ins Rote verschoben, wobei das Signal insgesamt auch weniger intensiv ist. Im Fall beschädigter Zellmembranen liegen nun also beide Farbstoffe in der Zelle vor und konkurrieren um die Bindungsstellen an den Nukleinsäuren. Das biochemische Resultat dieses Vorgangs, in dem SG1 von PI einerseits verdrängt wird und andererseits als Emissionsverstärker für PI dient (Stocks 2004), ist jedenfalls jenes einer deutlichen Rot-Verschiebung des Signals bei einer gleichzeitigen Abnahme der Grün-Intensität (Abbildung 5). Dies ist mit den Detektoren des DFZ sehr gut zu erfassen. Als Ergebnis erhält man analog zur Totalzellzahl die sogenannte Intaktzellzahl

(ICC für „Intact Cell Count“), die die Konzentration der noch intakten Zellen pro ml beschreibt und deren Signal quasi ausschließlich von SG1 herrührt.

Die Farbstoffkombination hat sich etwa bei der Untersuchung der Wirkung von Chlorungsmethoden bei der Desinfektion in der Wasseraufbereitung als sehr aussagekräftig erwiesen (Ramseier u. a. 2011). Die Beschädigung der Zelle kann unmittelbar nach der Behandlung sichtbar gemacht werden. Im Fall einer UV-Desinfektion liegt ein anderer Wirkmechanismus vor und daher kann zumindest unmittelbar nach der Behandlung noch keine Aussage über die Zellviabilität getroffen werden (Villarino u. a. 2000).

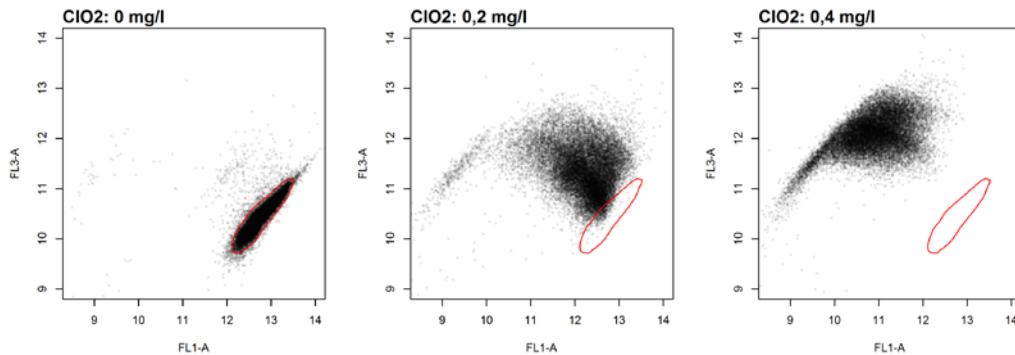


Abbildung 5: Streudiagramme der Grün- und Rot-Fluoreszenz dreier DFZ-Messungen der gleichen Probe (*E. faecium*) bei unterschiedlicher Zugabe von Chlordioxid und Färbung mit SG1 und PI. Rot markiert ist der Signalbereich der unbehandelten Probe. Die Beschädigung der Zellmembranen durch Chlordioxid zeigt sich durch eine Verschiebung des Signals in den Bereich höherer Rot-Fluoreszenz und geringere Grün-Fluoreszenz

3.4 BIOLOGISCHE STABILITÄT

Das Konzept der biologischen Stabilität im Rahmen der Trinkwasserversorgung basiert auf der Forderung, dass es während der Verteilung zu keinen negativen Veränderungen der mikrobiologischen Beschaffenheit des Wassers kommt. Negative Auswirkungen umfassen neben hygienischen Aspekten auch eine Verschlechterung ästhetischer Eigenschaften und betriebliche Probleme (Emmanuelle I. Prest u. a. 2016). Eine etwas eingeschränkte Definition sieht biologische Stabilität dann als vorhanden, wenn bei Abwesenheit eines Desinfektionsmittels weder das Wasser selbst bzw. seine Inhaltsstoffe, noch die Materialien, mit denen es in Kontakt kommt, mikrobielles Wachstum fördern (Rittmann und Snoeyink 1984) (Kooij 2000). Mit letztgenanntem ist auch eine Strategie der Wasseraufbereitung angedeutet, die den Einsatz von Desinfektionsmitteln reduziert und auf eine hohe Qualität der Wasserressourcen hinsichtlich ihrer wachstumsfördernden Eigenschaften setzt – beispielsweise auf einen geringen Gehalt an verwertbarem organischem Material (Hammes, Berger, u. a. 2010). Das Kriterium, wann von biologischer Stabilität gesprochen werden kann, stützt sich dabei auf das generelle Wachstum von Mikroorganismen. Trinkwasser, in dem es am Punkt der Verwendung zu einer starken Vermehrung (bzw. Wiederverkeimung nach abgeschlossener Desinfektion) letzterer kommt, kann nicht als biologisch stabil bezeichnet werden. Daneben kann aber auch eine Veränderung der Aktivität der Mikroorganismen und der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft als erweitertes Kriterium dienen (Emmanuelle I. Prest u. a. 2016) (Lautenschlager u. a. 2013). Letzteres ist gerade dann nützlich, wenn biologische Stabilität über die Beurteilung der bloßen Anzahl an Mikroorganismen hinaus auch als Konstanz der mikrobiellen Gemeinschaft verstanden wird.

Mit der biologische Stabilität ist ein Reihe von Faktoren verbunden, die die mikrobielle Zusammensetzung und das Wachstum direkt beeinflussen, unter anderem die Interaktionen innerhalb der Organismengemeinschaft, die Verfügbarkeit von Nährstoffen, die Verweilzeit des Wassers im Netz oder die Wassertemperatur. Für die Beurteilung der biologischen Stabilität hat sich eine ganze Reihe von Methoden bzw. Strategien entwickelt (Emmanuelle I. Prest u. a. 2016). Bekannt ist hier insbesondere die AOC-

Bestimmung (assimilierbarer organischer Kohlenstoff) im Laborversuch, aber auch die Untersuchung direkt im Verteilsystem ist möglich. Für beides spielt die DFZ als quantitative Methode zur Bestimmung der Anzahl an Organismen eine große Rolle. Sequenzierungsmethoden mit hohem Durchsatz, etwa zur Analyse der 16S-rRNA, erlauben die taxonomische Zuordnung oder zumindest eine Abschätzung der Verwandtschaftsgrade (mittels phylogenetischer Methoden) einzelner Organismen. Damit lassen sich Verschiebungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft genau nachzeichnen.

Mit der Bezeichnung „Pathogen Growth Potential (PGP)“ wiederum ist ein Ansatz umschrieben, der überprüft, ob sich ausgewählte pathogene Mikroorganismen in den Probewässern im Zuge einer Lagerung vermehren können (Vital u. a. 2010). Auch hier wird die DFZ eingesetzt. Das Bakterienvermehrungspotential ist eine Methode zur Ermittlung einer Wachstumskurve mittels Animpfung der steril-filtrierte Probe mit der autochthonen Bakteriengemeinschaft in definierter Menge (Hamsch und Werner 2008). Die mittels Streulichtmessung gewonnene Wachstumskurve lässt Rückschlüsse auf die wachstumsfördernden Eigenschaften (Substratkonzentration) des Probenwassers zu. Eine sehr ähnliche Methode ist die AOC-Bestimmung auf Basis der DFZ (Hammes und Egli 2007).

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Ansatz des sogenannten „Wachstumspotentials“ (WP) getestet, ein Ansatz, der den genannten Methoden gleicht, aber statt auf die Quantifizierung der mikrobiell verwertbaren organischen Substanz abzielen, eine auf der DFZ beruhende Methode zur Beschreibung der bakteriellen Wachstumsdynamik von Wasserproben im Zuge eines Lagerungsversuchs der (unbehandelten) Probe darstellt. Eine Beschreibung findet sich unter der Bezeichnung „Wachstumspotential“ in Abschnitt 5.3.

3.5 DATENAUSWERTUNG

3.5.1 GATING

Das sogenannte Gating beschreibt einen Vorgang bei der Analyse von DFZ-Messdaten, bei dem auf Basis von ein- oder zweidimensionalen Darstellungen von DFZ-Parametern bestimmte Detektionen mittels „Gates“ (im zweidimensionalen Fall geschlossene Polygone) isoliert werden (Hammes und Egli 2010). Diese Untermenge an Detektionen kann unter Verwendung einer anderen Parameter-Kombination weiter bearbeitet, spricht erneut einem Gating unterzogen werden (sequentielles Gating). Damit können im Falle von komplexen, multidimensionalen Datensätzen die in den verschiedenen DFZ-Parametern (Streulicht, Fluoreszenz) enthaltenen Informationen bzw. Unterscheidungsmöglichkeiten Schritt für Schritt abgearbeitet werden. Allerdings ist mit diesem Vorgehen u.U. mit einem Informationsverlust zu rechnen, da es sich um niederdimensionale Projektionen handelt, die die vollen multidimensionalen Zusammenhänge nicht abbilden können (Rogers u. a. 2008). Darüber hinaus basiert das beschriebene Gating meist auf einer subjektiven Einschätzung, die die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Bearbeiter einschränken kann (Mair u. a. 2016). Die Notwendigkeit zur Handhabung komplexer DFZ-Assays mit mehrdimensionalen Datensätzen sowie der Aufwand zur Bewältigung steigender Datenmengen hat zur Entwicklung automatisierter Gating-Methoden geführt (Aghaeepour u. a. 2013).

Für die Analyse von DFZ-Messdaten von Wasserproben unter Verwendung von SG1 (bzw. der Kombination von SG1 und PI) wird meist eine Auswertestrategie auf Basis von fixierten Gates gewählt (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012) (E. I. Prest u. a. 2013). Bei möglichst gleichbleibenden Messbedingungen führt dies zu einer guten Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei geringem Aufwand für die Auswertung, da keine Anpassung der Gates an die einzelne Messung erfolgt. Diese Strategie beruht dabei auf einer guten Abtrennbarkeit der Zell-Signale vom Signalhintergrund, der durch die Verwendung von SG1 meist gegeben ist, und der Verwendung für Proben mit eingeschränkter „Variation“, die bei oligotrophen Wasserressourcen vorliegen sollte. Gleichzeitig ist die Dimensionalität der Daten in der beschriebenen Anwendung auf vier beschränkt – Vorwärts- und Seitwärtsstreuung sowie Grün- und Rotfluoreszenz. In einzelnen Fällen können aber durchaus

Messsignale vorliegen, bei denen die Strategie eines einheitlichen Gates an ihre Grenzen stößt und die gewählte Abtrennung die Besonderheiten einer bestimmten Probe nicht angemessen berücksichtigt (Hammes und Egli 2010).

3.5.1.1 LNA- UND HNA-ABTRENNUNG

Laut (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012) kann bei der Analyse einer durchflusszytometrischen Messung neben der Totalzellzahl (TCC) auch die Abtrennung und Erfassung der LNA- und HNA-Zellzahlen bzw. deren Anteile an der TCC erfolgen. Diese Anteile, die für viele Probe sehr charakteristisch sind, stehen auch mit der Zellgröße in Zusammenhang - HNA-Zellen haben oft ein stärkeres Streulichtsignal. Die Anteile der beiden Gruppen werden auch als „Fingerabdruck“ einer Probe angesehen.

Nach Abtrennung des Hintergrundsignals von den als Zellen angesehenen Datenpunkten im Streudiagramm der Grün- und Rot-Fluoreszenz erfolgt die Unterscheidung zwischen LNA- und HNA-Zellen, wobei bezüglich der Vorgehensweise zwei Optionen genannt werden. Einerseits können die Signale im Streudiagramm der Grün-Fluoreszenz und der Seitwärtsstreuung oder andererseits (nur) im Histogramm der Grün-Fluoreszenz betrachtet werden. Die Aufteilung in die Gruppen LNA und HNA erfolgt anschließend manuell durch den Nutzer anhand von Erfahrungswerten und Beispielen aus der Literatur. Eine Gruppenstruktur sollte bei einem großen Teil der Proben als Orientierung erkennbar sein. Abschließend erfolgt die Konzentrationsberechnung in Zellen pro Volumseinheit bzw. die Berechnung der Anteile an der Totalzellzahl. Bei optimal gesetzten Einstellungen müssen die Gates nur in wenigen Fällen angepasst werden, da die Zellcluster auch bei der Messung von Proben unterschiedlicher Herkunft meist nicht ihre generelle Position verändern, sondern nur in Form und Größe variieren (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012).

3.5.2 CYTOMETRIC FINGERPRINTING

Das schon erwähnte Cytometric Fingerprinting (CF) bietet die Möglichkeit die (mehrdimensionale) Signalstruktur verschiedener DFZ-Messungen sehr detailreich zu vergleichen (Rogers u. a. 2008). Hier wird ausgenutzt, dass die einzelnen Detektionen einer DFZ-Messung sehr unterschiedliche Signalintensitäten auf mehreren Messkanälen aufweisen können und dass diese Unterschiedlichkeit mit bestimmten Eigenschaften der Partikel in Verbindung gebracht werden kann (darauf basiert etwa auch die Unterscheidung zwischen LNA- und HNA-Zellen). Auf dieser Basis lassen sich nun Gruppen definieren, die etwa für eine weiterführende Analyse oder den Vergleich mit anderen Datenquellen z.B. Betriebsdaten zur Erfassung der Wassereigenschaften (elektrische Leitfähigkeit, gelöster organischer Kohlenstoff, SAK bei 254 nm, etc.) nutzbar sind.

In methodischer Hinsicht beruht das CF im Wesentlichen auf der Anwendung eines einheitlichen, an die Dichte der Detektionen in auszuwählenden Signalkombinationen angepassten Modells bzw. Auszählrasters (siehe Abbildung 6). Die einzelnen Rasterzellen („Bins“) sollen im Durchschnitt aller zu vergleichender Datensätze gleich viele Datenpunkte enthalten. Anschließend werden die Datensätze anhand dieses Rasters ausgezählt. Wenn sich die betrachteten Datensätze nun unterscheiden, ergibt diese Auszählung Abweichungen vom durchschnittlichen Wert bzw. werden unterschiedliche Auszählungsergebnisse in einem oder mehreren Bins vorkommen. Gleichzeitig können auch die Datenbereiche identifiziert werden, in denen diese Unterschiede auftreten.

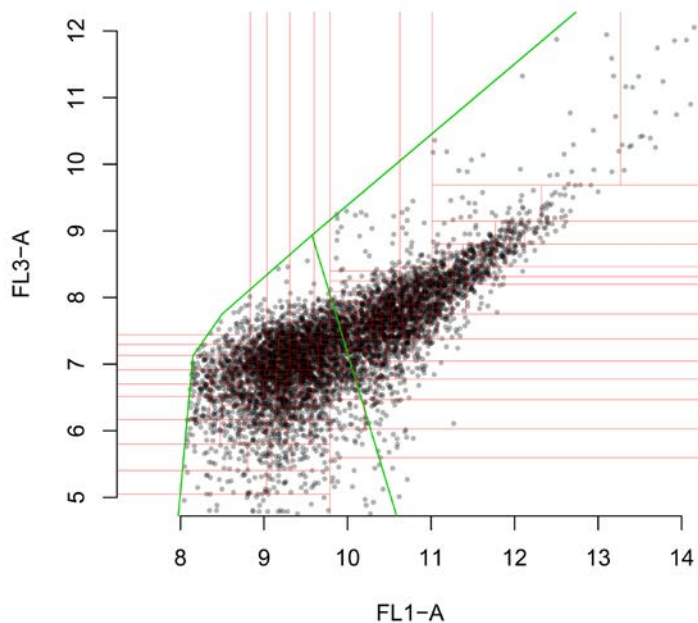


Abbildung 6: Streudiagramm der Grün- und Rot-Fluoreszenz einer DFZ-Messung mit Auszählraster (rote Linien) des Cytometric Fingerprintings und Gates (grüne Linien).

Eine grundlegende Beobachtung auf Basis des CF in nun etwa jene, dass sich Messungen, die eine hohe Anzahl an Zell-Detektionen aufweisen, hinsichtlich der Verteilung der Signalintensitäten auf den einzelnen Messkanälen (und in Kombination) nicht zwingend von Messungen derselben Messstelle unterscheiden, die wesentlich geringere Werte an Zell-Detektionen aufweisen. Demgegenüber lassen sich etwa verschiedene Wasserressourcen sehr deutlich unterscheiden (bspw. Uferfiltrate und Karstwässer). Eine weitere Anwendung besteht etwa in der Detektion von Ausreißern in einem Datensatz, der eine Vielzahl an Messungen umfasst - wie dies etwa bei der online-DFZ der Fall ist. Die potentiellen Ausreißer entsprechen dabei „seltenen“ Gruppen, deren Signalstruktur - aber nicht zwangsläufig deren Anzahl an Detektionen - stark vom Durchschnitt abweicht und aufgrund vieler Erfahrungswerte nicht als plausible Messungen eingestuft wird.

3.5.3 CLUSTERANALYSE

Bei einer durchflusszytometrischen Messung werden für jede Detektion Werte von einer Vielzahl von Parametern erfasst, welche Streulicht und Fluoreszenzemissionen (Spalten) umfassen. Dabei beinhalten die ausgegebenen Dateien, abhängig von der Wasserprobe, bis zu einigen Zehntausend Detektionen (Zeilen).

Mit einer größer werdenden Menge an verfügbaren Daten erhöht sich auch die Notwendigkeit von statistischen Hilfsmitteln um Strukturen in den Daten oder Teile davon, welche von Interesse sind, zu finden. Mit Hilfe von Clustering können die Daten in einzelne Gruppen unterteilt werden. Dabei sind die Daten innerhalb einer solchen Gruppe in einer Form ähnlich zu einander, während die Daten in unterschiedlichen Gruppen unähnlich zueinander sind (Wagner und Wagner 2007).

Die Art bzw. der Verlauf dieser Gruppenbildung lassen sich unterscheiden nach:

- Proximitätsmaß: statistisches Maß zur Bestimmung der erwähnten Ähnlichkeit und auch Unähnlichkeit von Daten.

- Verfahren der Gruppierung: Strategie der Gruppenbildung. Hier wird unterschieden in Algorithmen, die ähnliche Objekte zusammenfassen und solche die den Datensatz weiter aufteilen.

Die Clusteranalyse wird den explorativen Verfahren zugerechnet, d.h. vor der Anwendung der Methode besitzt der/die Nutzer/in keine Information zu den Gruppen (Backhaus u. a. 2015).

Für die Auswertung bzw. Analyse mit Clusteralgorithmen wurden im Projekt zwei Funktionen bzw. Packages der freien Programmiersprache „R“ verwendet. Dabei handelt es sich einerseits um agglomeratives (complete-linkage) hierarchisches Clustering und um den aus dem Bioconductor-package „flowClust“ stammenden gleichnamigen Clustering-Algorithmus.

- Beim hierarchisch agglomerativen Clustering stellt zu Beginn jeder der sich im Datensatz befindlichen Datenpunkte ein eigener Cluster bzw. eine eigenen Gruppe dar. Nach der erfolgten Erfassung der Distanzen bzw. Ähnlichkeiten der einzelnen Datenpunkte zueinander, werden die zwei Objekte, welche sich am ähnlichsten sind, zu einem Cluster zusammengefasst. Daraufhin folgend werden die Distanzen erneut berechnet und dieses Vorgehen solange wiederholt bis sich der gesamte Datensatz, also alle Datenpunkte in einem Cluster befinden. Die complete-linkage Methode definiert dabei die Art der Distanz- bzw. Ähnlichkeitsberechnung (Backhaus u. a. 2015).
- Der Clustering-Algorithmus „flowClust“ ist eine Funktion aus dem gleichnamigen Bioconductor-package. Dieser Algorithmus wird den Modell-basierten Clustering-Methoden zugerechnet. Während der meist verwendete Ansatz auf dem finiten Gaußschen Mischverteilungsmodell basiert, wird hier mit einem T-Mischverteilungsmodell gearbeitet um beim Auftreten von Ausreißern und der Form der Cluster wie sie bei durchflusszytometrischen Messungen oft beobachtet werden Rechnung zu tragen (Lo u. a. 2009). Jede der Verteilungen in dem Mischverteilungsmodell gehört dabei zu einem Cluster (Fraley und Raftery 2002).

MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.6 MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING

Um einen Überblick über die Zusammensetzung des Mikrobioms (DNA von lebenden und toten Bakterien) auf Basis der Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens in unterschiedlichen Wassermatrizes zu erhalten, kann das Next Generation Sequencing (NGS) angewendet werden.

Die NGS stellt eine neue Dimension zur Analyse von DNA mittels Hochdurchsatzsequenzierung dar. Sie umfasst keine Technik, sondern beschreibt eine neue Generation an Plattformen, die bereits kommerziellen Status erreicht haben. Wesentlicher Unterschied zur konventionellen kapillar-basierten Sequenzierung nach Sanger ist die hohe Leistung NGS basierter Geräte, welche Millionen Sequenzabschnitte parallel identifizieren können.

Bei der Sequenzierung werden im Wesentlichen folgende Schritte durchgeführt: Bibliothekserstellung (library preparation), Amplifikation (Vervielfältigung) der Fragmente und anschließende Sequenzierung. Während der library preparation wird die DNA auf enzymatischem oder mechanischem Weg auf eine definierte Länge fragmentiert. Anschließend werden an beide Enden der DNA Primer angehängt. Diese fertigen Abschnitte werden zusammen als DNA Bibliothek (library) bezeichnet. Hierbei wird die Leseart der NGS Plattform bestimmt. Man unterscheidet zwischen single- oder paired-end reads bzw. mate-pair reads. Dabei werden jeweils Abschnitte der DNA Moleküle, die Enden des Moleküls bzw. die beiden Enden eines sehr langen zirkularen Moleküls gelesen. Paired-end reads haben den Vorteil, dass jeweils forward und reverse read als ein Paar zugeordnet werden, wodurch einerseits die doppelte Datenmenge bei der Sequenzierung entsteht und ein erhebliches Mehr an Information generiert wird, andererseits die Genauigkeit der Methode erheblich verbessert werden kann, da Sequenzierfehler leichter entdeckt werden. Im Rahmen der Amplifikation soll eine große Anzahl identischer Moleküle pro DNA Einheit entstehen, um ein ausreichendes Messsignal zu erzeugen. Die Sequenziertechnologien können folgendermaßen gegliedert werden: (i) Pyrosequenzierung, (ii) sequencing by synthesis, (iii) sequencing by ligation.

Die Pyrosequenzierung wurde von Roche 2004 eingeführt und beruht auf der Messung von Licht aus Pyrophosphat, welches bei dem Einbau von Nukleotiden während der PCR emittiert wird. Die Anzahl der erzeugten Lichtsignale ist der Anzahl der eingebauten Nukleotide proportional und kann so gemessen werden (siehe auch Punkt 2.7 ATP Bestimmung).

Sequencing by synthesis stellt die heute am meisten verwendete Sequenziermethode dar und wird seit 2006 von Illumina durchgeführt. Dabei werden einzelsträngige, adaptergebundene DNA Fragmente (die library) auf eine mikrofluidische Glasmembran (glass flow cell) geladen. Dort lagern diese sich an vorhandene oberflächenassoziierte, den library Adaptoren komplementäre Oligonukleotide durch Hybridisierung an. Die Hybridisierung geschieht durch einen aktiven Aufwärmungs- und Kühlprozess. Jedes einzelne Fragment stellt ein DNA template dar, welches anschließend mittels „solid phase bridge amplification“ amplifiziert wird, wodurch Millionen auf der Membran immobilisierte doppelsträngige Kloncluster entstehen. Diese Cluster stellen die templates der darauffolgenden Sequenzierung dar. Bei der Sequenzierung werden vier fluoreszenzmarkierte Desoxyribonukleintriphosphate (dNTPs) verwendet, während jedes Zyklus der Sequenzierung wird in jedem Cluster eine einzelne, sich anlagernde dNTP durch einen Laser identifiziert (Abbildung 7). Da jeder Clusterklon identifiziert wird, ist die Genauigkeit der Methode durch die vielfache Identifizierung (deep coverage sequencing) erheblich gesteigert. Bei der Datenanalyse werden die erhaltenen Sequenzabschnitte mithilfe von verschiedener Bioinformatiksoftware mit bekannten Referenzsequenzen verglichen und zugeordnet (Alignment). So können z.B. phylogenetische Zuordnungen der Sequenzen zu bestimmten Bakterien gemacht werden (Illumina 2012).

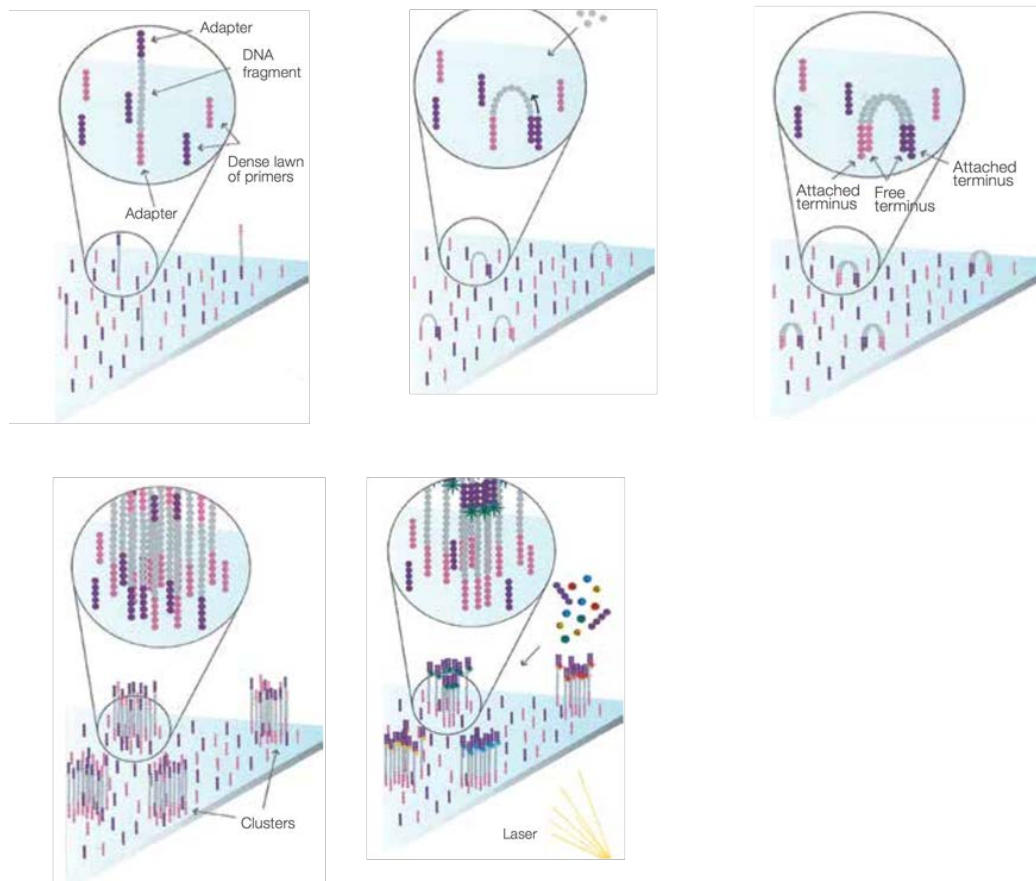


Abbildung 7: Ablaufschema Sequencing by synthesis (adaptiert von Illumina, 2017. *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*). Hybridisierung der einzelsträngigen Fragmente an die Flow cell Membran (oben links); Bridge amplification (oben Mitte); Doppelstrangbildung (oben rechts); Clusterbildung nach Amplifikation (unten links); Detektion der einzelnen Nukleotide während der Sequenzierung (unten Mitte).

Sequencing by ligation verwendet das Enzym DNA Ligase zur Identifizierung einzelner Nukleotide der zu identifizierenden Sequenz. Auch hier werden kurze DNA Fragmente, eine Flow cell zur Ligation der Proben, sowie fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide zur Identifizierung verwendet. Die SOLiD™ Plattform von Life Tech ist der größte Repräsentant dieser Technologie (Ho u. a. 2011).

3.7 ATP-BESTIMMUNG

Neben der durchflusszytometrischen Bestimmung intakter Zellen bietet die Adenosintriphosphat (ATP) Messung eine weitere Möglichkeit zellschädigende Einflüsse kultivierungsunabhängig zu beurteilen. Einerseits weist eine Reduktion von intrazellulärem ATP auf gehemmte Energieprozesse hin, andererseits tritt intrazelluläres ATP nach Membranschädigung aus den Zellen aus und ist infolgedessen als extrazelluläres ATP messbar. Vergleichsmessungen von ungeschädigten- und geschädigten Zellen (unbehandelte bzw. behandelte Proben) erlauben hierbei eine Beurteilung der Schädigung. ATP ist ein universeller Energieträger in Zellen und reguliert sämtliche metabolische Prozesse. Das Vorhandensein dieses Moleküls ist daher ein Indikator für die metabolische Aktivität von Zellen. Bei der Durchführung wird Licht bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen, das durch die Oxygenierung von Luciferin, Magnesiumionen und ATP mittels Luciferase zu Oxyluciferin reagiert und dabei Licht emittiert (Abbildung 8). Die Intensität des emittierten Lichts ist proportional zur ATP Konzentration und kann daher zur quantitativen Bestimmung intakter, metabolisch aktiver Zellen herangezogen werden. Die Lumineszenz wird in RLU (relative light units, hier counts per second (cps)) angegeben. Mittels Erstellung einer Kalibrierkurve kann auf die Zellzahl rückgeschlossen werden.

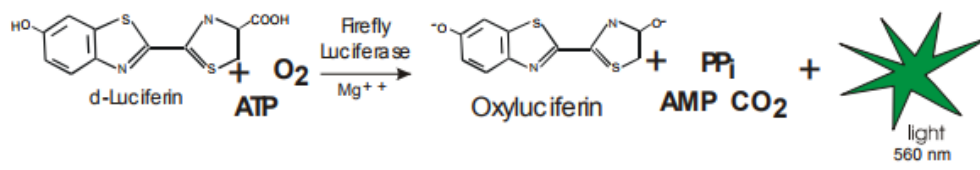


Abbildung 8: Reaktion von Luciferin und ATP zu Oxyluciferin und Licht. (BioTek: Luminescent Determination of ATP Concentrations using the Clarity™ Luminescence Microplate Reader; 2006)

4 MATERIAL UND METHODEN

MESSPROGRAMM

FÜR DIE EINZELNEN BEARBEITUNGEN IM PROJEKT wurden unterschiedliche Messprogramme und Messkampagnen durchgeführt. Diese Messprogramme beziehen sich sowohl auf Fragestellungen bei den einzelnen natürlichen Wässern als auch auf Fragestellungen bei künstlich hergestellten Probenmatrices im Labor. In Abbildung 9 und Abbildung 10 sind die Summenlinien der Gesamtanzahl der durchflussszytometrischen Einzelmessungen (rot), der Mehrfachbestimmungen (grün) und der Anzahl der Probenahmen (blau) im Zeitraum zwischen November 2015 und Dezember 2016 bzw. November 2015 und November 2017 gegenübergestellt.

Die dabei dargestellte Anzahl an Einzelmessungen beinhalten keine Messungen von Reinstwasser bzw. Milli-Q®-Wasser, keine Blindproben und keine Messungen mit Dekontamination da diese nicht als Messungen an sich angesehen werden. Die Analysen mittels Online-Durchflussszytometer wurden ebenfalls nicht in diese Zusammenstellung eingerechnet. Bei den Mehrfachmessungen wurden keine Beads-Messungen berücksichtigt. Diese gelten grundsätzlich als Messungen aber nicht im Sinne einer Mehrfachbestimmung. Die Anzahl der Probenahme beinhalten ausschließlich Probenahmen außerhalb des Labors bei den einzelnen Wasserversorgern. Proben die im Hauseigenen Uferfiltratbrunnen der BOKU (Brunnen Technikum) gezogen wurden, wurden ebenfalls nicht eingerechnet. Mehrfachbestimmungen können grundsätzlich zwischen zwei und der Anzahl der „Wells“ (24 bzw. 96) die auf einer Platte liegen (abzüglich der verwendeten Reinigungsschritte und Dekon) liegen.

Im Zeitraum des ersten Projektjahres zwischen November 2015 und Jahresende 2016 wurden insgesamt 17 915 Einzelmessungen und 3 546 Mehrfachbestimmungen sowie 2 952 Probenahmen in Kooperation mit den Projektpartner durchgeführt (Abbildung 9). Ab Februar 2016 wurden nach Implementierung der Mikrotiter-Platte (96e-rFormat) ausschließlich Mehrfachbestimmungen bei den natürlichen Wasserproben durchgeführt. Mit Unterstützung der einzelnen Projektpartner konnten über den gesamten Bearbeitungszeitraum Probenahmen bei unterschiedlichen Rohwässern durchgeführt werden. In der Summenlinie der Einzelmessungen sind ebenfalls Zeiträume mit geringerer Abwicklung im Labor (z.B. Weihnachten 2016) deutlich durch Bereiche mit geringerer Steigung der roten Linie zu erkennen.

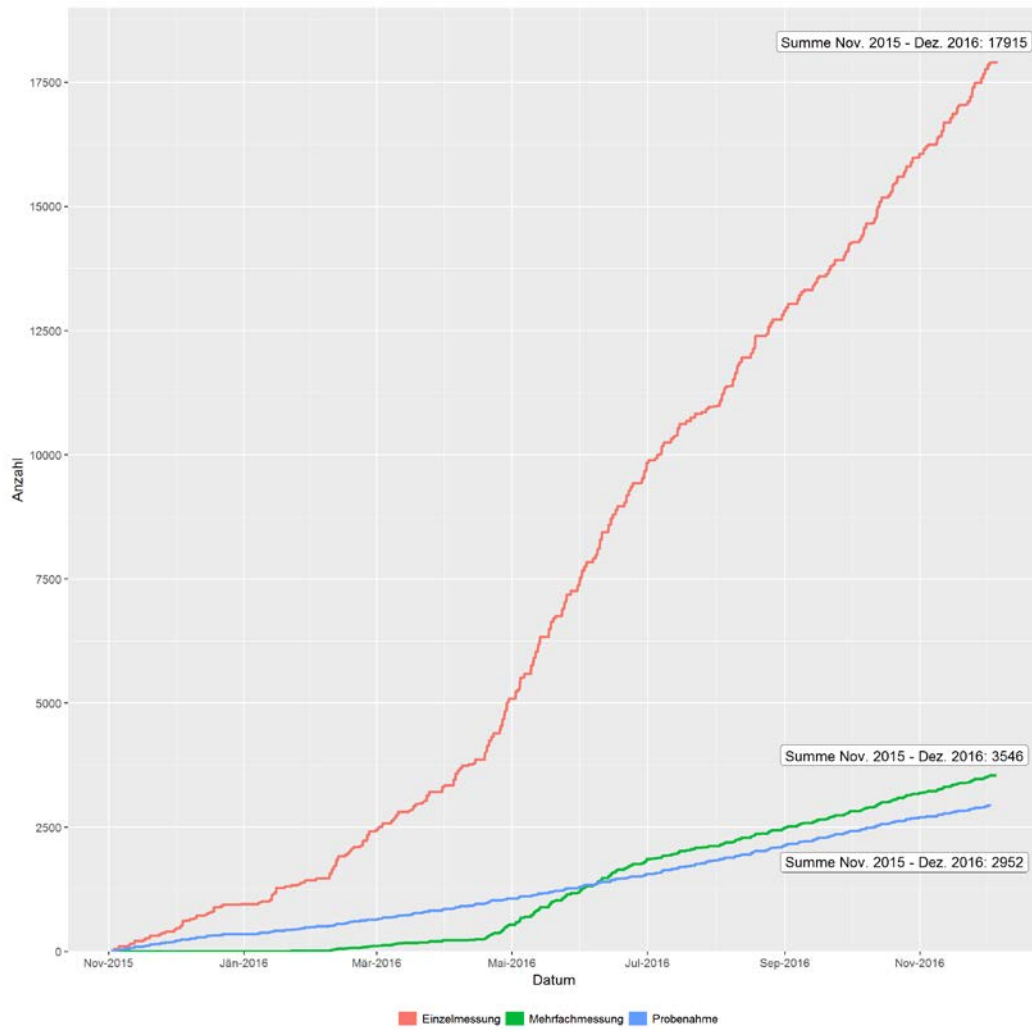


Abbildung 9: Gegenüberstellung der Summenlinien der Gesamtanzahl der Einzelmessungen (rot), der Mehrfachbestimmungen (grün) und der Anzahl der Probenahmen (blau) im Zeitraum zwischen November 2015 und Dezember 2016

Über die Gesamtprojektlaufzeit wurden insgesamt 41 799 Einzelmessungen, 10 734 Mehrfachbestimmungen und 4 739 Probenahmen durchgeführt.

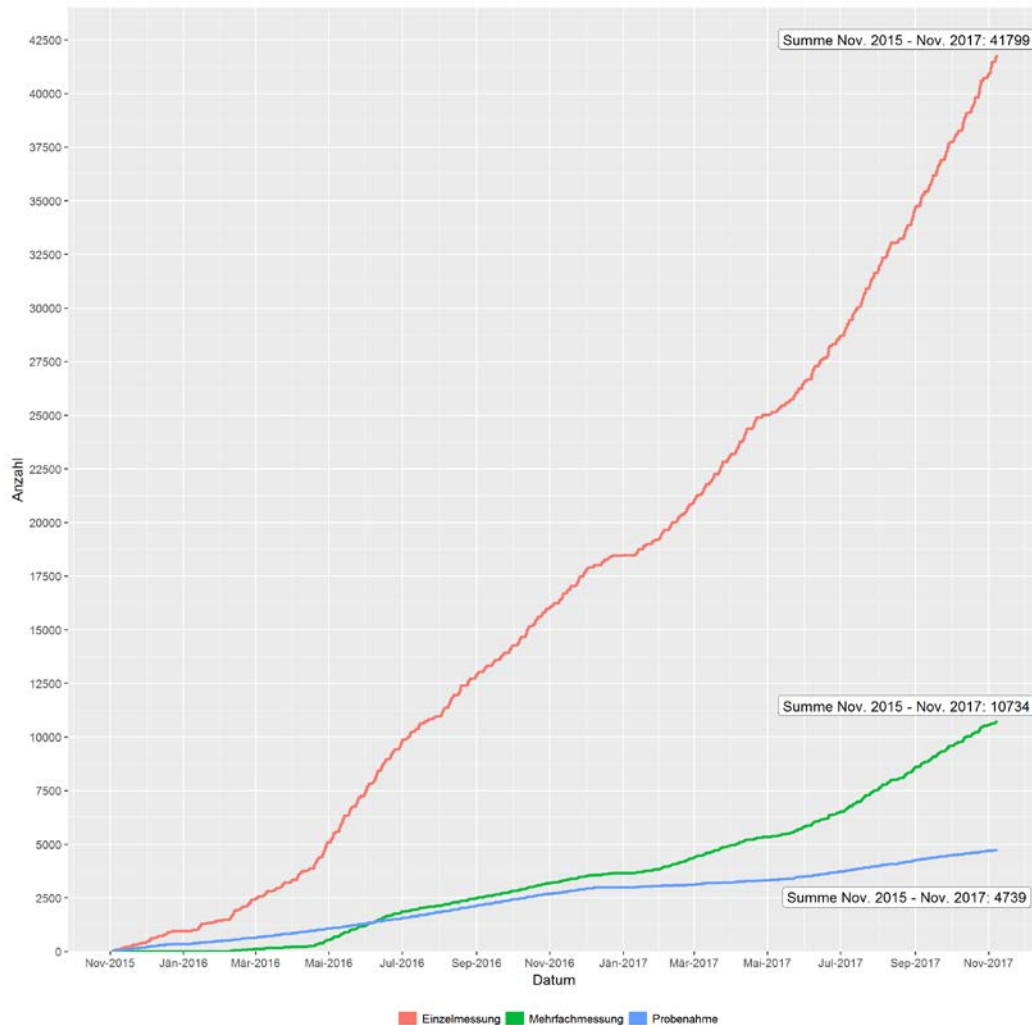


Abbildung 10: Gegenüberstellung der Summenlinien der Gesamtanzahl der Einzelmessungen (rot), der Mehrfachbestimmungen (grün) und der Anzahl der Probenahmen (blau) im Gesamtprojektzeitraum zwischen November 2015 und November 2017

4.1 LABORVERSUCHE

Für die Beurteilung unterschiedlicher Fragestellungen wurden jeweils Laborversuche durchgeführt. Im Großteil der Fälle wurden dazu natürliche Wässer der einzelnen Messstellen (siehe Kap. 3.2.1) herangezogen. Für Versuche, die eine (annähernd) gleichbleibende Wassermatrix voraussetzen bzw. für vergleichende Versuche, von bisher in der Literatur dargestellten Ergebnissen, wurden Matrices von Flaschenwasser wie z.B. Evian herangezogen. Der Versuchsaufbau der einzelnen Laborversuche ist in Kapitel 4 jeweils bei der Darstellung der methodischen Ergebnisse kurz beschrieben.

4.2 MESSKAMPAGNE NATÜRLICHER WÄSSER

Für die Auswertungen in diesem Bericht wurden insgesamt 59 Messstellen beprobt. Im Regelfall wurde jede Messstelle zumindest über ein Jahr kontinuierlich mit einem Probenahmeintervall von ein bis zwei Mal wöchentlich beprobt. Für einzelne Messstellen wurden tägliche Proben zur Verfügung gestellt. Die einzelnen Messstellen sind im Wesentlichen in fünf Bundesländern gelegen, in zwei weiteren Bundesländern wurden zusätzlich Messkampagnen mit verdichteten Probenahmeintervallen über mehrere Zeitperioden durchgeführt. Insgesamt wurden daher Proben aus sieben Bundesländern verwertet.

Im Rahmen der Probenahme von natürlichen Wässern wurden folgende Ressourcengruppen der Wasserversorgung herangezogen:

- 1 Oberflächenwasserentnahme
- 3 Schichtquellen
- 5 Karstquellen
- 1 Kluftquelle
- 2 Schlierkluftquellen
- 3 Tiefengrundwasserentnahmen
- 11 Porengrundwasserentnahmen
- 20 Uferfiltratstandorte
- 13 Einspeisestellen (Netzstellen)

Für die Darstellungen in diesem Bericht wurden auf Basis vergleichbarer Ergebnisse eine weitergehende Zusammenfassung der Messstellen in die Gruppen Quellen, Grundwasser, Uferfiltrat, Tiefengrundwasser, Oberflächenwasser und Einspeisestellen vorgenommen. In einzelnen Auswertungen wurde die Gruppe „Quellen“ in „Karstquellen“ und „Quellen“ geteilt.

4.2.1 MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING

Aufgrund der ermittelten sehr niedrigen DNA Konzentrationen ($<0,05 \text{ ng}/\mu\text{l}$) wurden Verfahren zur Erhöhung der DNA Konzentration bei gleichbleibender Qualität der Ergebnisse ausgearbeitet. Dabei wurde bei jedem Schritt der Probenvorbereitung (Probenvolumen, DNA Extraktion, PCR, Aufreinigung) eine Optimierung durchgeführt, um ein verbessertes, den Zuständen der Proben angepasstes Protokoll zur Durchführung einer erfolgreichen molekularbiologischen Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften im Wasser zu etablieren.

Insgesamt wurden im Zuge dieses Projektes die bakteriellen Gemeinschaften von 58 Probenahmestellen mittels Next Generation Sequencing untersucht. Es wurde darauf geachtet möglichst alle Ressourcentypen und Netzstellen abzudecken. Nach Möglichkeit wurden dies Proben auch zu unterschiedlichen Jahreszeiten (Frühling, Sommer, Herbst) durchgeführt. Tabelle 2 bietet eine Auflistung aller durchgeführten Probenahmen zur Sequenzierung, und der daraus folgenden Mikrobiom-Bestimmung.

TABELLE 2: PROBENAHMEN (PN) FÜR MIKROBIOMBESTIMMUNG MITTELS NGS

	PN-Stelle	1. PN	2. PN	3. PN	4. PN	5. P
1	GW_7	01.03.2016	24.05.2016	25.10.2016		
2	GW_12_B	01.06.2016				
3	GW_12_C	18.02.2016	01.06.2016			
4	GW_13_A	18.02.2016	01.06.2016			
5	GW_15_A	01.06.2016				
6	GW_18	16.02.2016	07.06.2016			
7	GW_20_C	07.06.2016				
8	KQ_16_B	18.02.2016	01.06.2016			

MATERIAL UND METHODEN

9	KQ_24_A	03.03.2016	31.05.2016	21.10.2016		
10	KQ_24_B	09.06.2016				
11	KQ_25	09.06.2016	08.05.2017	30.05.2017	13.06.2017	
12	N_1_G	17.02.2016				
13	N_3_B	29.02.2016	23.05.2016			
14	N_6_B	21.03.2017				
15	N_6_E	21.03.2017				
16	N_6_F	21.03.2017				
17	N_6_G	21.03.2017				
18	N_8_A	29.02.2016	23.05.2016			
19	N_13_C	18.02.2016				
20	N_20_B	07.06.2016				
21	N_21_A	13.06.2017				
22	N_21_E	13.06.2017				
23	N_21_F	13.06.2017				
24	N_21_G	13.06.2017				
25	N_21_J	13.06.2017				
26	N_21_M	13.06.2017				
27	N_21_N	08.05.2017				
28	N_21_O	13.06.2017				
29	N_21_P	13.06.2017				
30	N_21_T	13.06.2017				
31	Q_3_A	23.05.2016				
32	Q_9	23.05.2016				
33	Q_17	16.02.2016				
34	Q_19_H	16.02.2016	07.06.2016			
35	UF_1_A	17.02.2016	25.05.2016	19.10.2016		
36	UF_1_B	17.02.2016	25.05.2016	19.10.2016		
37	UF_1_C	17.02.2016	25.05.2016	19.10.2016		
38	UF_1_D	17.02.2016	25.05.2016	30.01.2017	09.03.2017	
39	UF_1_E	30.01.2017				
40	UF_1_F	30.01.2017				
41	UF_2_A	04.04.2017	07.04.2017	03.05.2017		
42	UF_2_B	04.04.2017	07.04.2017	03.05.2017		
43	UF_2_C	09.02.2017	04.04.2017	07.04.2017	03.05.2017	
44	UF_2_D	13.02.2017	04.04.2017	07.04.2017	03.05.2017	10.05.2017
45	UF_2_E	17.02.2017	04.04.2017	07.04.2017	03.05.2017	10.05.2017
46	UF_2_F	21.02.2017	04.04.2017	07.04.2017	03.05.2017	10.05.2017
47	UF_5_A	01.03.2016	24.05.2016	25.10.2016		
48	UF_5_B	01.03.2016	22.03.2016	19.04.2016	24.05.2016	25.10.2016
49	UF_5_C	01.03.2016	24.05.2016	25.10.2016		
50	UF_6_H	21.03.2017				
51	UF_22_A	03.03.2016	09.06.2016	19.10.2016		
52	UF_22_D	03.03.2016	09.06.2016	19.10.2016		
53	UF_23_A	10.03.2016	30.05.2016	27.10.2016		
54	UF_23_B	10.03.2016	30.05.2016	27.10.2016		
55	UF_23_D	10.03.2016	30.05.2016	27.10.2016		
56	UF_23_E	10.03.2016	30.05.2016	27.10.2016		
57	UF_23_F	10.03.2016	30.05.2016	27.10.2016		
58	UF_23_G	10.03.2016	30.05.2016	27.10.2016		

DURCHFLUSSZYTOMETRIE

4.3 BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN DURCHFLUSSZYTOMETER

Im Rahmen der Untersuchungen wurden insgesamt drei verschiedene Durchflusszytometer-Modelle verwendet. Der Aufbau der Detektionseinheit ist bei allen Geräten sehr ähnlich. Die Anregung erfolgt durch einen Laser mit 488 nm Wellenlänge, bei allen Geräten ist die Detektion der Grün- und Rotfluoreszenz sowie von Streulicht möglich. Die weitaus meisten Messungen des vorliegenden Projects wurden mit dem Accuri® C6 durchgeführt.

4.3.1 BD ACCURI® C6

Technische Beschreibung und Anwendungsmöglichkeiten bzw. -empfehlungen finden sich in verschiedenen Handbüchern und Broschüren der Firma BD („Becton, Dickinson and Company“) unter [bd-biosciences](#) sowie in einem Buchbeitrag (Rich und Howes 2010). Während ein Einsatz abseits von Laborräumlichkeiten durchaus möglich ist, wurde dies im vorliegenden Projekt nicht getestet. Die Probenvorbereitung erfolgt manuell.

4.3.1.1 AUTOLOADER

Der installierte „Autoloader“ ermöglicht die automatische Durchführung von bis zu 96 Einzelmessungen (Verwendung von Mikrotiterplatten mit einem Well-Volumen von 350 µl). Von dieser Möglichkeit wurde für den weit überwiegenden Teil aller Messungen im Labor Gebrauch gemacht. Daneben besteht auch die Alternative zur Verwendung eines sogenannten 24er-Tube-Racks (einer Vorrichtung zur Aufnahme von 3-ml-Röhrchen mit rundem Boden).

4.3.1.2 DYNAMIC RANGE

Ein wesentlicher Vorteil des Accuri® C6 zu älteren Geräten ist die große „Dynamic Range“, die eine Einstellung der sg. Voltage-Gains durch den Benutzer unnötig machen soll und daher auch mit der Standard-Software nicht möglich ist. Mithilfe letzterer lässt sich das Messfenster so verschieben, dass entweder schwache oder starke Fluoreszenzsignale erfasst werden. Bei gleichzeitigem Vorhandensein von schwachen und starken Signalen entsteht ein Verlust an Auflösung bzw. sogar ein Datenverlust (Signalintensität unterhalb des gesetzten Thresholds). Der Accuri® C6 ist also - prinzipiell - in der Lage einen weiten Signalbereich (0 bis 2^{24}) abzudecken

4.3.1.3 GEMESSENE PARAMETER

Beim Durchlauf eines Partikels durch den Laser werden mit einer gewissen Abtastrate mehrere Einzelsignale aufgenommen, die Verbindung dieser Punkte ergibt einen Signalverlauf. Die Form des Signalverlaufs beinhaltet Informationen über das jeweilige Partikel (Watson 1991). Aus diesem Signalverlauf werden im Fall des Accuri® C6 für jeden Messkanal zwei Parameter-Varianten abgeleitet, nämlich einerseits der sogenannte Height-Parameter (maximales Signal eines Partikels beim Durchlauf durch den Laser) und andererseits der Area-Parameter (Fläche unterhalb der Signalkurve). Die Kurzbezeichnungen lauten etwa im Fall des Messkanals der Vorwärtsstreuung FSC-H und FSC-A. Die genaue interne Berechnung (insbesondere von FSC-A) und insbesondere von möglichen Korrekturen ist vom Gerätehersteller nicht veröffentlicht.

4.3.1.4 BESTIMMUNG DES GEMESSENEN PROBENVOLUMENS

Beim Accuri® C6 erfolgt die Bestimmung des gemessenen Probenvolumens über die Peristaltikpumpen (Rich und Howes 2010). Beim Cube 6 basiert die genaueste Methode zur Bestimmung des Probenvolumens auf der Verwendung einheitlicher Messgebinde und einer Messung des Füllstandes mit Hilfe zweier Elektroden, deren vertikaler Versatz einer bestimmten Probenmenge entspricht (200 µl). Der Metanor OBA befördert Flüssigkeiten mit einem System von Spritzen, deren bekanntes Volumen und aktuelle Position eine genaue Bilanzierung der Flüssigkeitsmengen erlaubt.

4.3.2 SYSMEX (PARTEC) CYFLOW® CUBE 6

Messungen im Labor mit manueller Probenvorbereitung. Einzelmessungen. Gerätespezifische Informationen finden sich unter [sysmex-partec](#). Dieses Gerät wurde fallweise zur Vergleich mit den Messungen der anderen Geräte und bei Ausfall des Accuri® C6 verwendet.

4.3.3 METANOR OBA

Online-Durchflusszytometer für den Einsatz direkt an der Messstelle mit automatischer Probenvorbereitung. Gerätespezifische Informationen finden sich unter [metanor](#).

4.4 PROBENAHE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Für die Probenahme wurden sterile, konisch zulaufende Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss und einem Fassungsvermögen von 50 ml verwendet. Falls der Probenahmehahn nicht ständig durchflossen ist, muss der Hahn vor der Probenahme erst durch mehrmaliges vollständiges Öffnen und Schließen des Ventiles und anschließend bei reduziertem Durchfluss - je nach Länge der Zuleitung zum Hahn zumindest für einige Minuten - gespült werden. Eine Probenahme unter sterilen Bedingungen ist bei der Bestimmung der TCC (und weiterer Parameter) mittels SG1-Färbung nicht notwendig (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012). Schöpfproben wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht genommen.

Für die Bestimmung der ICC – gerade zur Beurteilung der Wirksamkeit von Desinfektionsmaßnahmen – und bei Versuchen, die eine Probenlagerung beinhalten sowie bei spezifischen Nachweisverfahren (in der vorliegenden Untersuchung nicht durchgeführt) sollten dagegen sterile Verhältnisse sichergestellt werden. Im Fall der ICC können auch schon einige wenige intakte Zellen die Interpretationen der Ergebnisse beeinflussen, falls der erwartete Wert der ICC gegen null geht. Sterile Verhältnisse werden daher durch Spülen und Abflämmen des Hahns, sowie die Verhinderung von Aerosolbildung (Spritzwasser) hergestellt. Die grundsätzlich zu beachtenden Punkte, inklusive der Vorbereitung der Gebinde, ist in der entsprechenden Literatur dargestellt (Feuerpfeil und Botzenhart 2008). Für Versuche, die eine Lagerung der Proben beinhalten, gilt ein besonderes Vorgehen zur Vorbereitung der Gebinde (Kap. 5.3).

Der Probentransport hat gekühlt (Kühltasche) zu erfolgen, wobei eine Lagerung bei 4-8 °C (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012) bzw. 5+/-3 °C (Feuerpfeil und Botzenhart 2008) ideal ist. Ein Gefrieren der Proben, etwa durch direkten Kontakt zu gefrorenen Kühlelementen ist unbedingt zu vermeiden. Die Messung der Proben für die Bestimmung der TCC (und weiterer Parameter) mittels SG1-Färbung sollte im Regelfall nicht später als 48 Stunden nach Probenahme erfolgen (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012). Im Einzelfall dürfte aber auch eine längere Lagerungszeit möglich sein. Im Fall der ICC-Bestimmung (Färbung mittels SG1 und PI) muss der Einfluss der Lagerungsdauer – gerade bei der Beurteilung von Desinfektionsmaßnahmen - jedenfalls genauestens abgeschätzt werden, im Regelfall ist jedoch eine sofortige Messung anzustreben.

MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING

4.5 VORGEHENSWEISE MIKROBIOM-BESTIMMUNG (NGS)

Aus den definierten Probenahmestellen wurden quartalsweise, sowie zusätzlich eventbasiert, fünf Liter (5 L) Wasserproben gezogen (aufgrund der Optimierungsmaßnahmen gibt es Abweichungen vom Volumen). Die Proben wurden unmittelbar nach Eintreffen im Labor über einen 0,2 µm Membranfilter filtriert. Der Filter wurde bis zur Extraktion der genomischen DNA bei -80 °C aufbewahrt. Nach der Extraktion wurde die DNA Konzentration fluorometrisch quantifiziert (Qubit® 2.0 Fluorometer, Abbildung 13). Aufgrund der teilweise sehr geringen ermittelten DNA Konzentrationen wurde in Folgeprobenahmen das Wasservolumen auf bis zu 20 Liter (4 Flaschen zu je 5 L) angepasst. Zusätzlich wurden vor Ort Filtrationen mit Volumina bis zu 200 L durchgeführt. Die Amplifikation der DNA musste aufgrund der teilweise sehr niedrigen DNA Gehalte adaptiert werden.

Der folgende Ablauf der molekularbiologischen Analysen wurde für diverse Probenahmestellen festgelegt (Abbildung 11). Die Abfolge im Detail ist weiter hinten im Text zusammengefasst.

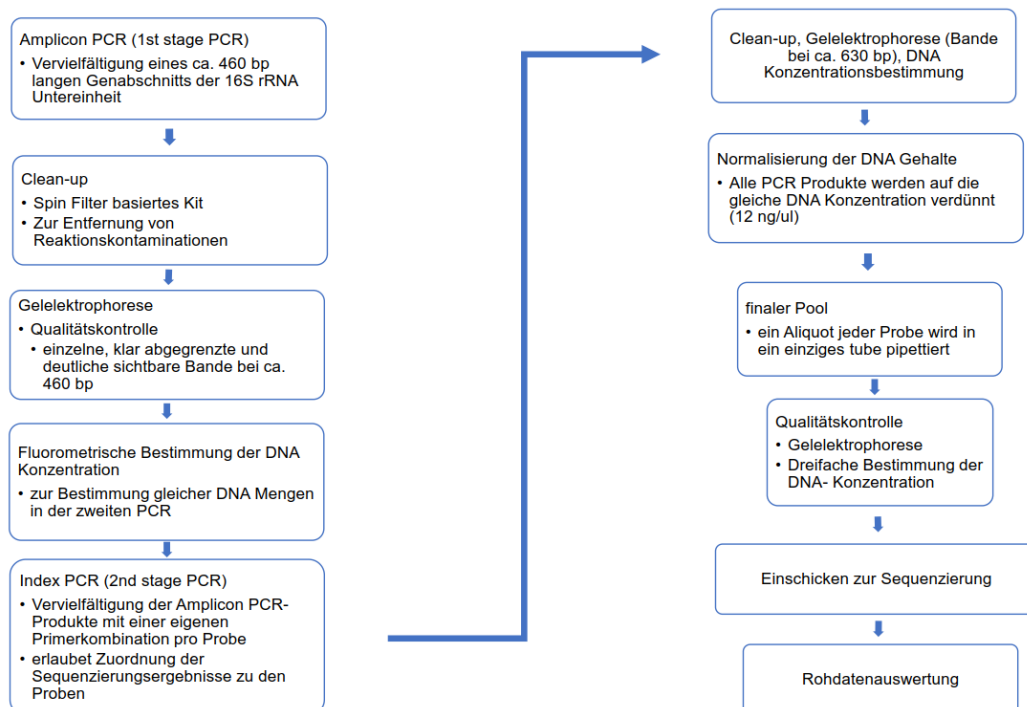


Abbildung 11: Prozessschema für die Durchführung einer NGS von Wasserproben

4.6 PROBENAHMEVERFAHREN UND FILTRATION

Die 5 L Glasflaschen wurden gereinigt, mit deionisiertem Wasser gespült, mit Alufolie verschlossen und drei Stunden bei 550 °C gemuffelt, um sämtliche vorhandene DNA zu zerstören. Nach der Probenahme erfolgte der Transport der Flaschen abgedunkelt in Kühlboxen.

Im Labor wurden die Proben sterilfiltriert: Eine Membranfiltrationseinheit und die dazugehörigen Trichter werden ausgiebig abgeflämmt, um sämtliche vorhandene DNA zu zerstören, anschließend an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, ein Membranfilter (PALL Supor® 200 PES Membranfilter, 0,2 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser) wird aufgelegt, der Trichter darauf befestigt und die Probe nach und nach aus den 5 L Flaschen eingefüllt. Hierfür wird jedes Mal die Alufolie abgenommen, der Flaschenrand sowie der innenliegende Teil der Alufolie abgeflämmt, das Wasser bis zur maximalen Füllmenge des Trichters

(500 ml) eingefüllt und die Alufolie anschließend wieder auf die Flasche gesteckt. Der Trichter darf dabei nie leerlaufen, um eine Kontamination durch angesaugte Luft zu vermeiden. Anschließend wird der Filter direkt in ein Extraktionsröhrchen (5 ml PowerWater® Bead Tube) überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.6.1 DIREKTFILTRATION VOR ORT

Um eine größere DNA Ausbeute zu erreichen, wurden große Mengen Wasser (>20 L) direkt vor Ort filtriert. Eine mobile Filtrationseinheit wurde hierfür mit Alkohol desinfiziert und drei Stunden bei 180 °C trocken sterilisiert. Alle verwendeten Schläuche und Anschlüsse wurden in Alkohol desinfiziert und anschließend bei 100 °C feucht autoklaviert. Ein Schlauch wurde mit dem Wasserhahn der zu untersuchenden Probe und der Filtrationseinheit verbunden und zunächst gründlich mit dem Wasser durchgespült, anschließend wurde ein steriler Filter (PALL Supor® PES Membranfilter, 0,2 µm Porengröße) in die Filtrationseinheit gelegt und das Wasser wurde durch die Einheit geleitet (der Aufbau der Filtrationseinheit ist in Abbildung 12 zu sehen). Je nach Wasserdruck am Hahn und Kontamination des Wassers dauerte der Durchfluss unterschiedlich lange. Die durchgeflossene Wassermenge wurde gemessen – es wurden bis zu 200 L filtriert. Anschließend wurde der Filter in einem sterilen Transportbeutel dunkel und gekühlt transportiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.



Abbildung 12: Darstellung einer Filtrationseinheit für die Vor-Ort-DNA-Aufkonzentration

4.7 DNA-EXTRAKTION

Die Extraktion der DNA aus den Filtern erfolgte mittels DNA-Isolations-Kit (DNeasy® PowerWaterKit, Qiagen, USA), welches durch mechanisches Ausschlagen der Filter mittels „Beads“ im Extraktionstube auf einem Vortexer geschieht, gefolgt von einer chemischen Ausfällung und Eluierung. Die Filter der Direktfiltration wurden mit sterilen Skalpellern zerschnitten und auf mehrere Extraktionsröhrchen aufgeteilt. Aufgrund der zusätzlich höheren Kontaminationswahrscheinlichkeit während einer Vor-Ort Filtration wurde das Extraktionsvolumen mit 5 L definiert und die Extraktion selbst optimiert, um eine höhere DNA Ausbeute zu erreichen und nur im Notfall auf eine Vor-Ort-Filtration zurückgegriffen.

4.7.1 OPTIMIERUNG DER DNA-EXTRAKTION

Die Tatsache, dass auch bei Filtration des bis zu 40-fachen Volumens die DNA Konzentration aus den Filtern nicht deutlich gesteigert werden konnte, legt nahe, dass im Filter durchaus mehr DNA vorhanden ist, dass diese jedoch nicht vollständig extrahiert wird. Untermuert wird diese Annahme dadurch, dass die durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen mit den DNA Konzentrationen korrelieren (Abbildung 14). Aus diesem Grund wurde die Extraktion hinsichtlich Reaktionszeiten und -volumina adaptiert, um eine höchstmögliche Ausgangs DNA für die nachfolgende PCR zu erhalten.

Das Ausschlagen der Filter durch die Beads stellt den wichtigsten Schritt zur Überführung der DNA vom Filter in die Reaktionslösung dar. Durch die anschließende Entfernung des Filters muss sämtliche DNA bereits in diesem Schritt aus dem Filter herausgelöst werden. Daher wurde die Dauer des Ausschlagens der Filter deutlich erhöht, statt laut Kit empfohlener 5 min. wurde der Filter mindestens 10 min. ausgeschlagen. Auch bei der nachfolgenden Aufreinigung und Eluierung wurden die Reaktionszeiten bzw. -volumina teilweise angepasst. Vergleichend ist in Tabelle 3 die vom Hersteller empfohlene Durchführung und die optimierte Durchführung der DNA Extraktion gegenübergestellt. Die angepassten Schritte sind Fett markiert.

TABELLE 3: VORGESCHLAGENE UND OPTIMIERTE DURCHFÜHRUNG DER DNA EXTRAKTION

Reagenz	Behandlungsschritt	Behandlungsdauer/ -volumen lt. Hersteller	Behandlungsdauer/ -volumen optimiert
PW 1	in 5 ml Extraktionstube pipettieren	1 ml	1 ml
	Vortexen	5 min.	10 min.
	Zentrifugieren	1 min.	4 min.
	Überschuss in frisches Tube überführen		
	Zentrifugieren	1 min. 13.000 g	
	Überstand in frisches Tube überführen		
IRS Lösung	hinzufügen, vortexen	200 µl	
	bei 4°C inkubieren	5 min.	10 min.
	Zentrifugieren	1 min. 13.000 g	
	Überstand in frisches Tube überführen		
PW3	hinzufügen, vortexen	650 µl	
	650 µl des Ansatzes auf die Spin Säule laden		
	zentrifugieren, Durchfluss verwerfen	1 min. 13.000 g	
	wiederholen, bis gesamter Ansatz auf Säule geladen ist		
	Spin Säule in neues Tube setzen		
PW4	auf die Spin Säule laden	650 µl	
	zentrifugieren, Durchfluss verwerfen	1 min. 13.000 g	
Ethanol	auf die Spin Säule laden	650 µl	
	zentrifugieren, Durchfluss verwerfen	1 min. 13.000 g	
	Erneut zentrifugieren, Durchfluss verwerfen	2 min. 13.000 g	
	Spin Säule in neues Tube setzen		
EB Lsg.	in die Mitte der Säule pipettieren	100 µl	50 µl
	Säule verwerfen, Durchfluss enthält extrahierte DNA.		

Die Konzentration der DNA Extrakte wurde fluorometrisch mittels Qubit® Fluorometer gemessen. Da die Konzentrationen der DNA Extrakte teilweise sehr gering sind (<0,05 ng/µl), ist die Vervielfältigung der DNA mit vom Hersteller vorgeschlagenen Methoden nicht erfolgreich. Die Konzentration der DNA befindet sich im Bereich von <0,05 ng/µl bis 67 ng/µl, wobei bis auf vereinzelte Ausnahmen ausschließlich oberflächenassoziiertes Wasser eine Konzentration >10 ng/µl aufweist. In Abbildung 13 ist das Gelelektrophoresebild von einigen Amplicon-PCR-Produkten zu sehen.



Abbildung 13: Qubit® 2.0 Fluorometer

Eine Optimierung der vorgegebenen PCR Durchführung wurde durch erhöhte DNA Volumina und eine höhere Primerkonzentration sowie durch die Anpassung der Temperatur, Dauer und Zyklanzahl während der PCR (32 bis 40 Zyklen) erzielt. In Tabelle 4 ist der optimierte PCR Ansatz dem Ansatz nach Hersteller gegenübergestellt. Die optimierte PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

– 95 °C	4 min.		anfängliche Denaturierung
– 98 °C	20	} sek.	32-40 Wiederholungen
– 67 °C	20		
– 72 °C	15		
– 72 °C	5 min.		finale Extension
– 4 °C	bis Abschalten		

TABELLE 4 ZUSAMMENSETZUNG DER PCR ANSÄTZE NACH HERSTELLER UND OPTIMIERT

Reagenz	ursprüngliche Zusammen- setzung des PCR Ansatzes	optimierte Zusammen- setzung des PCR Ansatzes
DNA Extrakt	2,5 μ l	3,5 μ l
Amplicon Primer (forward und reverse)	5 μ l (c = 1 μ M)	5 μ l (c = 2 μ M)
Mastermix „KAPA HiFi HotStart Ready Mix“	12,5 μ l	12,5 μ l

Grundsätzlich korrelieren die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit den erhaltenen DNA Konzentrationen Abbildung 14 sehr gut. Diese Auswertung kann als Kriterium für zukünftige Probenahmen herangezogen werden, um Volumina für einen ausreichenden DNA Ertrag festzulegen. Einschränkend muss jedoch darauf aufmerksam gemacht werden, dass sich die Ergebnisse aufgrund der sehr geringen DNA Konzentrationen auf einem niedrigen Niveau befinden.

Die Ergebnisse aus der vor Ort Filtration haben gezeigt, dass eine gesteigerte Ausbeute der DNA Extraktion aufgrund von stark erhöhtem Probenahmenvolumen nicht zwingend erfolgreich ist, was vermutlich auf Begleitstoffe zurückzuführen ist, die sich ebenfalls auf dem Filter absetzen und die Extraktion der DNA beeinträchtigen. 5 L sind daher bereits als obere Grenze des Probenvolumens zu betrachten.

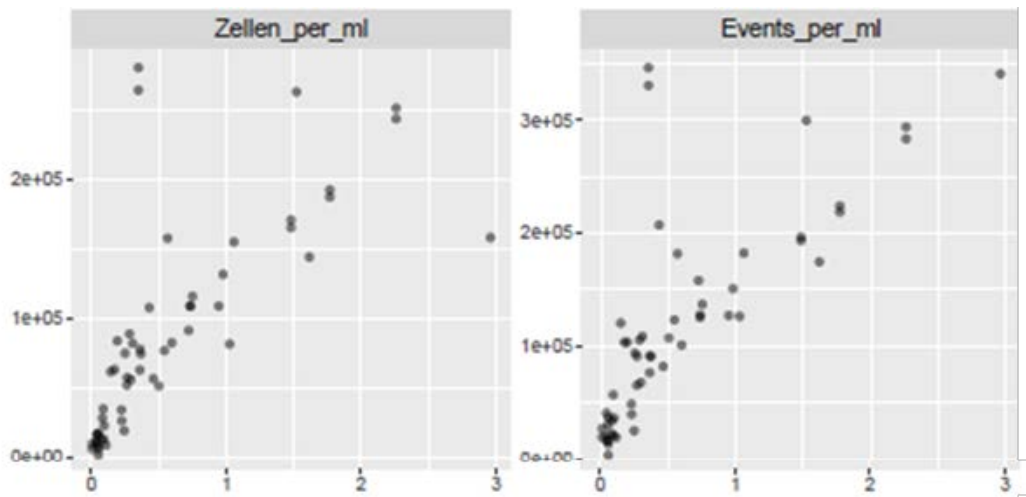


Abbildung 14: Zellzahl, Eventzahl gegenübergestellt mit DNA Konzentration (ng/μl)

Anhand der Gelelektrophoresebilder wurde entschieden, welche PCR Produkte zur Weiterverwendung für die Index PCR verwendet werden können (deutlich sichtbare einzelne Bande bei ca. 460 bp, ohne Schatten oder Doppelbanden). Diese wurden mit einem Clean-up Kit (PeqGOLD Cycle-Pure Kit) aufgereinigt, um Verunreinigungen zu entfernen (Abbildung 15 und Abbildung 16). Auch hier musste zunächst eine Optimierung der Durchführung stattfinden, da die Konzentration der PCR Produkte ansonsten nach der Aufreinigung zu gering war (siehe Abbildung 16). Zur Optimierung wurde zunächst die Gelelektrophorese zur Überprüfung der Qualität der PCR Produkte erst nach der Aufreinigung durchgeführt, um mehr Ausgangs DNA aufzureinigen zu können. Nach zweimaligem Waschen wurde die Säule 5 min. statt 1 min. trocken zentrifugiert, die Inkubationszeit der DNA mit Elutionspuffer wurde von 2 min. auf 5 min. erhöht und die Zentrifugationszeit nach der Inkubation wurde ebenfalls von 1 min. auf 2 min. gesteigert. Dadurch konnten deutlich geringere Verluste der DNA Konzentrationen vor und nach dem Clean-up erzielt werden, die Banden auf den Gelelektrophoresebildern zeigen dennoch eine erfolgreiche Aufreinigung (Verschwinden von Schatten, soweit vorhanden, sowie von Restriktionsfragmenten am Ende der Gele (siehe Abbildung 17).

Durchführung der Aufreinigung von PCR Produkten

- Volumen der PCR Reaktion mit gleichem Volumen CP-Puffer versetzen und gründlich vortexen
- Ansatz auf einen Spin Filter laden und 1 min. bei 10.000 g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 2 mal mit 750 μl Waschpuffer waschen, 1 min. bei 10.000 g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 5 min. bei 10.000g zum Trocknen zentrifugieren
- Spin Filter in ein neues Tube überführen, mit 40 μl Elutionspuffer versetzen und 5 min. inkubieren
- 2 min. bei 5.000 g zentrifugieren, Spin Filter entsorgen.

Nach der Aufreinigung der Amplicon PCR wurde erneut eine Gelelektrophorese durchgeführt (nach Optimierung des Protokolls wurde die vorherige Gelelektrophorese nicht mehr durchgeführt), um das Vorhandensein und die Qualität der PCR Produkte zu überprüfen. Außerdem wurde eine neue Konzentrationsbestimmung mittels Qubit® durchgeführt. Abhängig von der Konzentration der PCR Produkte wurde die Index PCR implementiert. Minimal notwendige Konzentration des Amplicon PCR Produkts beträgt 1 ng/μl, insgesamt sind die Konzentrationen der aufgereinigten Amplicon PCR Produkte 1 – 8 ng/μl. Bei geringeren Konzentrationen wurde die PCR mit erhöhter Zyklenzahl wiederholt.

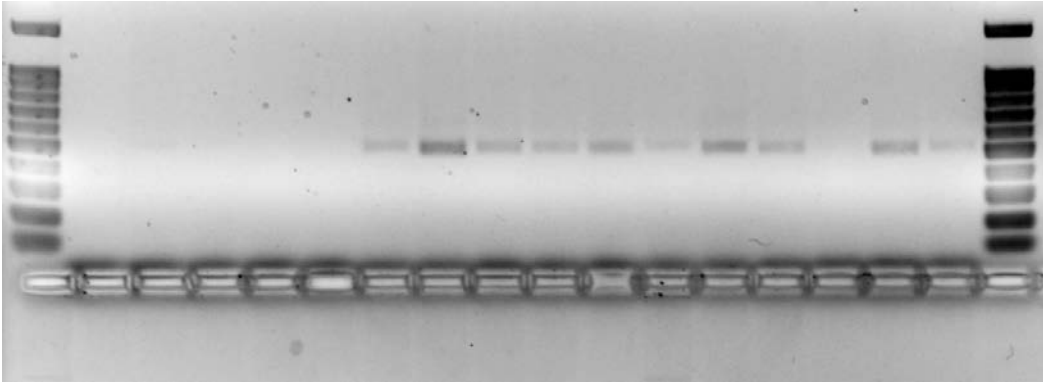


Abbildung 15: Amplicon PCR vor der Optimierung der Zusammensetzung der PCR. DNA Fragmente sind bereits in die Taschen des zweiten Gelkamms gelaufen und daher nicht zu sehen.

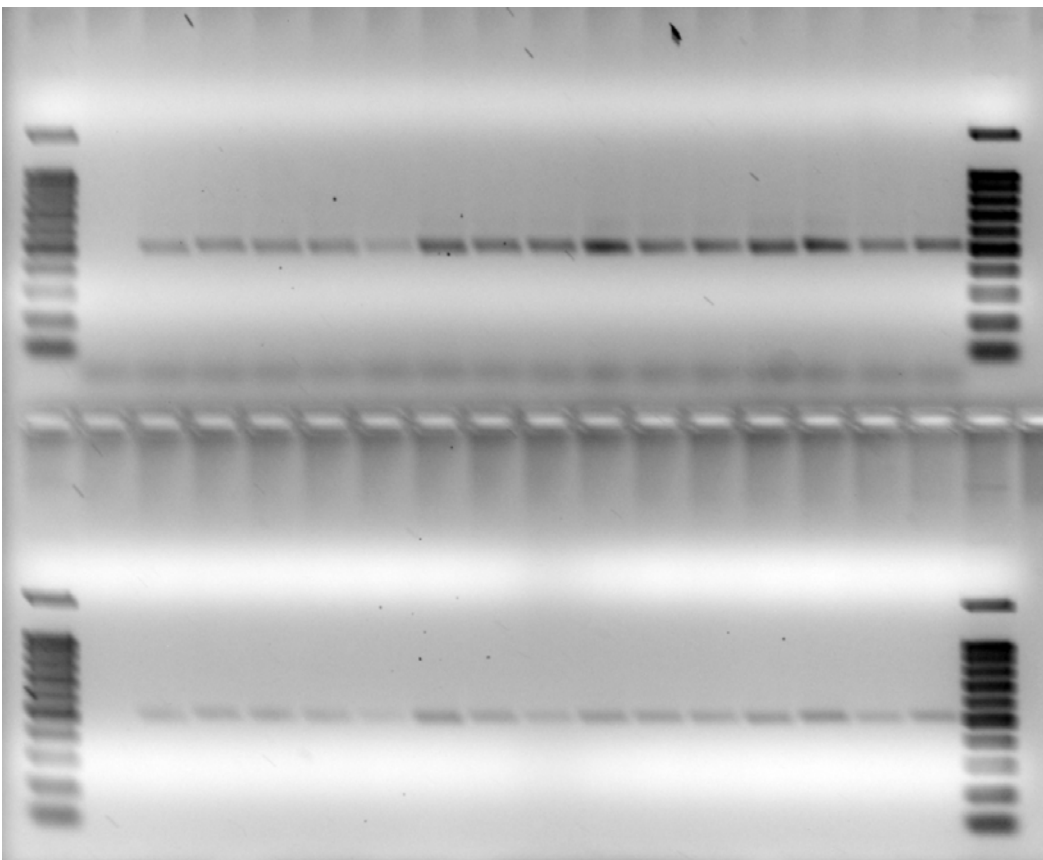


Abbildung 16: Unaufgeklärte, PCR optimierte (oben) und aufgereinigte (unten) Amplicon PCR Produkte vor der Clean-up Optimierung. DNA Verluste sind deutlich an der Abschwächung der Banden erkennbar, kleinere DNA Fragmente (Banden/Schatten am unteren Gelrand der unaufgeklärten DNA) sind durch das Clean-up entfernt worden.

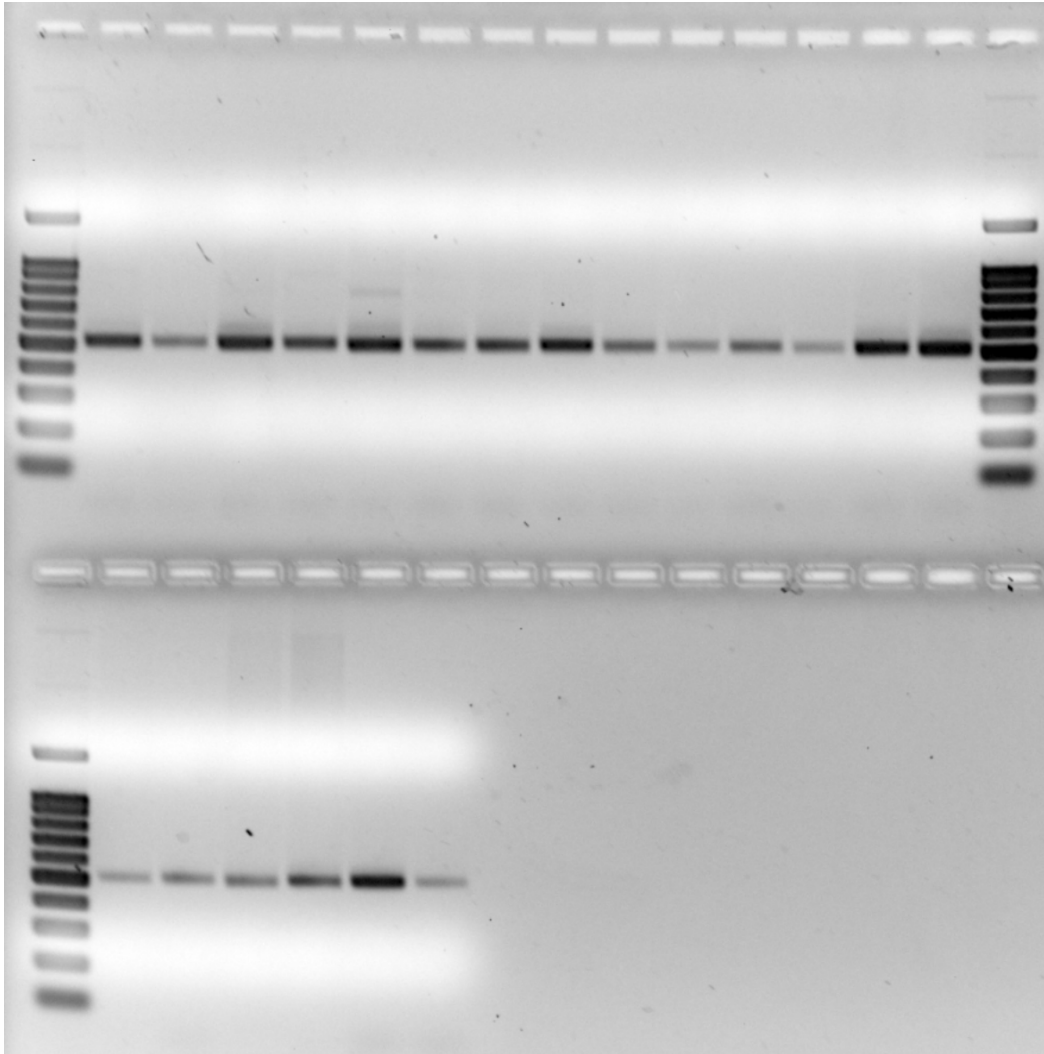


Abbildung 17: Aufgereinigte Amplicon PCR Produkte nach Clean-up Optimierung

4.7.1 INDEX-PCR

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Index PCR lautet wie folgt:

- 1 – 15 µl DNA aus aufgereinigter Amplicon PCR
- 5 µl Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)
- 5 µl Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)
- 25 µl KAPA HiFi Hot Start ReadyMix
- 0 – 14 µl Wasser, PCR-Grad

Für jede PCR wurde dabei eine andere Primerkombination verwendet. Es gibt 24 N7xx Primer und 8 S5xx Primer, welche für insgesamt 192 PCR Produkte verwendet werden können.

Die PCR wurde (nach geringfügigen Optimierungen) folgendermaßen durchgeführt:

- 95 °C 4 min. anfängliche Denaturierung

MATERIAL UND METHODEN

– 98 °C	20	} sek.	7 Wiederholungen
– 67 °C	20		
– 72 °C	15		
– 72 °C	5 min.		finale Extension
– 4 °C	bis Abschalten		

Abhängig von der DNA Konzentration wurde der verwendete DNA Gehalt erhöht und der Wassergehalt des Ansatzes laut Tabelle 3 verringert, um ähnliche Gehalte an Index PCR Produkten für alle Proben zu erhalten. Ziel hierbei war eine DNA Menge im Ansatz von ca. 20 ng.

TABELLE 5 ZUSAMMENSETZUNG WASSER UND DNA FÜR DEN PCR ANSATZ DER INDEX PCR

c DNA (ng/µl)	V DNA Ansatz (µl)	V Wasser Ansatz (µl)
1,0 - 1,5	15	0
1,6 - 1,8	13	2
1,9 - 2,2	11	4
2,3 - 2,8	9	6
2,9 - 3,9	7	8
4,0 - 6,6	5	10
6,7 - 9,9	3	12
10,0 - 13,3	2	13
13,4 - 19,9	1,5	13,5
>19,9	1	14

Nach Durchführung der Index PCR wurden die PCR Produkte erneut aufgereinigt und ihre Qualität in einer Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde die Konzentration der DNA gemessen (Qubit®) und ein Aliquot davon mit TRIS/HCl Puffer (10 mM) auf eine Konzentration von 12 ng/µl verdünnt. Bei einer DNA Konzentration von 10-12 ng/µl wurden die Proben unverdünnt verwendet. Bei einer DNA Konzentration <10 ng/µl wurde die PCR mit mehr DNA (und entsprechend weniger Wasser) wiederholt. Zuletzt wurde ein Aliquot von 5 µl der normalisierten Proben in ein einziges Tube pipettiert, dieses enthält den finalen Pool, welcher zur Sequenzierung zu Microsynth (Schweiz) eingeschickt und auf einem MiSeq (Reaktionskit V3, 2x300 bp) sequenziert wurde. Die erhaltenen Rohdaten wurden zur bioinformatischen Analyse wie nachfolgend beschrieben weiter verwendet.

Aufgrund der optimierten Durchführung war es für fast alle untersuchten Proben möglich, eine library zu erstellen und Sequenzierungsergebnisse zu erhalten. Sämtliche Triplikatuntersuchungen konnten zeigen, dass hinsichtlich der kritischen Durchführung aufgrund hoher PCR Zyklusanzahlen dennoch zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können. Details hierzu sind im Ergebnisteil nachzulesen.

ATP-BESTIMMUNG

DIE INDIREKTE MESSUNG DER ATP KONZENTRATION erfolgt mit dem ATP Kit „BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay“ (Promega, Deutschland). Für die Berechnung des ATP Gehalts wird vorerst eine ATP Standardkurve nach Herstelleranweisungen erstellt. Zusätzlich wurde für zwei Verdünnungsmedien (0,1 µm sterilfiltrierte 0,9%ige NaCl-Lösung sowie eine sterilfiltrierte Rohwasserprobe) jeweils eine Standardkurve erstellt.

Um eine Differenzierung zwischen lebenden (intakten) und toten (membrangeschädigten) Zellen vornehmen zu können, muss zwischen intrazellulärem und extrazellulärem ATP unterschieden werden. Aufgrund des geringen ATP Gehalts in aquatischen Proben muss das Standardprotokoll optimiert werden (Hammes, Goldschmidt, u. a. 2010). Ein Teil der zu untersuchenden Probe wird mittels 0,1 µm Membranfilter sterilfiltriert, wodurch alle Zellen zurückgehalten werden. Dadurch enthält die filtrierte Probe nur das extrazellulär vorhandene ATP, während die Messung der unfiltrierten Probe den totalen ATP Gehalt misst. Durch Subtraktion des extrazellulären ATP vom totalen ATP erhält man den Gehalt des intrazellulären ATPs.

Das BacTiter-Glo™ Reagenz wurde nach Anleitung des Promega Protokolls hergestellt. Dieses enthält einerseits Inhaltsstoffe für die Extraktion von ATP aus Bakterien und andererseits den Luciferin-Luciferase-Komplex, der zusammen mit ATP die Lumineszenz bei 560 nm bewirkt.

4.8 DURCHFÜHRUNG

Pro Probe werden drei Mal 50 µl des hergestellten Reagenzes in eine weiße Mikrotiterplatte vorgelegt (Dreifachbestimmung), und zusammen mit der zu untersuchenden Probe 1 min. bei 38 °C temperiert.

Anschließend werden je 250 µl der Probe zum Reagenz überführt, bei 38 °C für 20 Sek. inkubiert (= Reaktionszeit) und sofort in einem Luminometer (Victor2, Wallac) gemessen. Die Ergebnisse des Luminometers werden in cps angegeben und mittels Standardkurve in die ATP Konzentration umgerechnet.

SOFTWARE

4.9 PROGRAMMIERSPRACHE R

Für die Erfassung und Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte die Nutzung der Programmiersprache „R“ (www.R-Projekt.org).

Die Programmiersprache „R“ wurde von Ross Ihaka und Robert Gentleman entwickelt, wobei die Idee vorherrschte die Stärken der beiden bereits bestehenden Programmiersprachen „S“, von Becker, Chambers und Wilks, und „Scheme“, von Steele und Sussmann zu kombinieren. Die resultierende Sprache ist im Erscheinungsbild ähnlich zu „S“ wobei unter anderem die Implementierung von „Scheme“ abgeleitet ist (Ihaka und Gentleman 1996).

Dabei handelt es sich um Software, welche Datenmanipulationen, Berechnungen und grafische Darstellungen erlaubt. Insgesamt sind 25 sogenannter Packages vorinstalliert, welche Funktionen und Beispieldatensätze beinhalten. Eine Vielzahl an zusätzlichen Packages sind online frei erhältlich (Venables, Smith, und R Core Team 2018).

„R“ kann auf allen gängigen Betriebssystemen (z.B. Windows, Linux/Unix und Mac OS X) verwendet werden und ist kostenfrei (Fox 2009).

Neben der Software „R“ ist auch noch das Bioconductor-Projekt zu nennen. Dabei handelt es sich um eine Initiative um erweiterbare Software für den Bereich der Bioinformatik und der EDV-unterstützten Biologie im Sinne der gemeinschaftlichen Zusammenarbeit zu erstellen (Gentleman u. a. 2004). Bioconductor wird ebenfalls in Form von Packages vertrieben und beinhaltet unter anderem Pakete zu Themen wie Sequenzanalyse und Durchflusszytometrie (Carlson u. a. 2012).

5 RESULTATE

DURCHFLUSSZYTOMETRIE – METHODIK

DIE MEISTEN IN DEN FOLGENDEN ABSCHNITTEN dargelegten Ergebnisse beruhen auf der Anwendung der SG1-Färbung in Kombination mit Accuri® C6 (automatischer Messmodus, 96er-Mikrotiterplatten).

5.1 QUALITÄTSSICHERUNG DURCHFLUSSZYTOMETRIE

5.1.1 PROBENAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

5.1.1.1 PROBENAHMEGEBINDE

Für die Abfüllung der Proben vor Ort wurden aufgrund der einfachen Handhabung sterile, konisch zulaufende Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss und einem Fassungsvermögen von 50 ml als Einwegprodukt gewählt, die für biologische Analysen als geeignet eingestuft werden. Im Leitfaden zur Methodenschrift 333.1 des Schweizerischen Lebensmittelbuches (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012) werden gemuffelte Glasgebinde (kohlenstofffrei) empfohlen, da hier kein Nährstoffeintrag und folglich kein unkontrolliertes Zellwachstum stattfinden soll. Vor der Anwendung wurde überprüft, ob die verwendeten Gebinde für Bakterien verwertbare Stoffe in die Probe abgeben und wie schnell dies bei gegebener Lagerungstemperatur zu Zellvermehrung und einer Änderung der mikrobiellen Zusammensetzung führt. Diese Frage wird daher auch im Rahmen von Abschnitt 5.1.1.4 diskutiert, in dem es um die empfohlene maximale Lagerungsdauer der Proben geht. Für die Verwendung der im vorliegenden Projekt verwendeten Gebinde spricht jedenfalls die einfache Handhabbarkeit und Verfügbarkeit (auch für Wasserversorger) bei geringen Kosten.

In Abbildung 18 und Abbildung 19 sind die Ergebnisse zweier Messreihen (verschiedene Probenahmetage der gleichen Messstelle) dargestellt, die den Einfluss verschiedener Gebindetypen auf die Entwicklung der TCC und des HNA-Anteils im Zuge einer Lagerung bei 10 °C untersucht. Die Probenahme erfolgte dabei unter Verwendung eines gemuffelten 5-l-Glasgebundes. Die Probe wurde dann nach Ankunft im Labor auf die verschiedenen Lagerungsbehältnisse – Glasgebinde mit Schliffstopfen und Zentrifugenröhrchen – aufgeteilt und den gleichen Lagerungsbedingungen unterworfen. Dabei zeigt sich, dass am dritten Tag der Lagerung noch kein wesentlicher Unterschied zwischen den Materialien Glas und Polypropylen hinsichtlich der TCC auftritt (die Werte entsprechen jenen vom Tag der Probenahme). Lediglich der HNA-Anteil der Zentrifugenröhrchen der Messreihe in Abbildung 19 ist bereits etwas erhöht. Am siebten Tag der Lagerung sind die Unterschiede zwischen den Materialien bereits gut ersichtlich, insbesondere kommt es auch zu einem deutlichen Anstieg des HNA-Anteils in den Zentrifugenröhrchen. Diese Unterschiede verstärken sich am zehnten Tag der Lagerung, hier aber gerade auch in der TCC. Im Vergleich zum Ausgangswert ist eine Zunahme des HNA-Anteils bei allen Gebinde-Arten zu erkennen. Daneben ist interessant, dass es auch bei den Zentrifugenröhrchen verschiedener Hersteller bzw. Modelle Unterschiede zu geben scheint (Abbildung 18). Leichte Unterschiede bestehen hier auch zwischen den Glasgebunden mit verschiedenem Volumen. Die Ursache für letzteres ist unklar, vergleiche dazu auch (Hammes, Vital, und Egli 2010). Zusammenfassend lässt diese Messreihe den Schluss zu, dass die Zentrifugenröhrchen Stoffe abgeben, die wachstumsfördernd sind. Allerdings tritt dieser Effekt sogar bei dieser hohen Lagerungstemperatur erst spät ein – zu einem Zeitpunkt, an dem die Proben bereits analysiert wurden.

RESULTATE

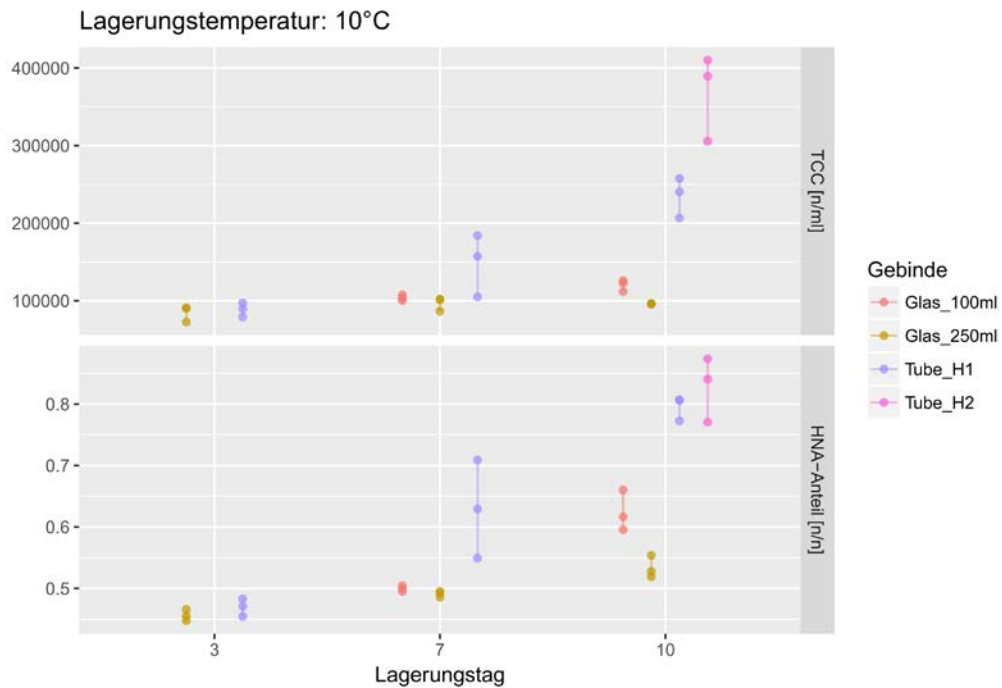


Abbildung 18: Vergleich des Einflusses verschiedener Gebinde (Glas mit Schliffstopfen sowie Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff zweier Hersteller) auf die TCC sowie den HNA-Anteil einer unbehandelten Uferfiltratprobe im Zuge einer Lagerung bei 10°C mit drei Replikaten.

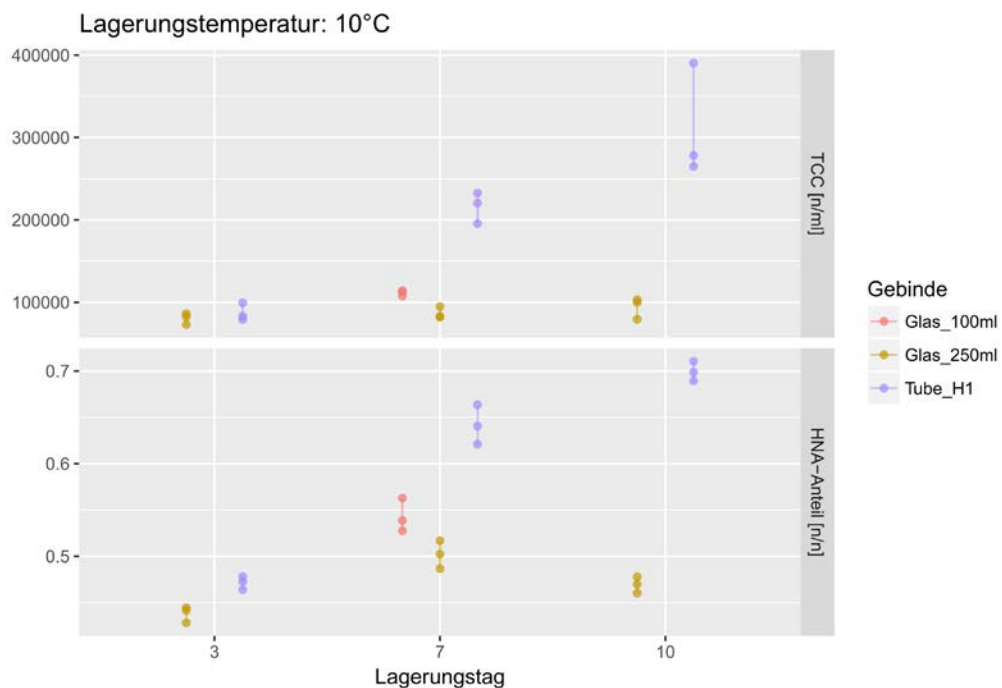


Abbildung 19: Vergleich des Einflusses verschiedener Gebinde (Glas mit Schliffstopfen sowie Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff) auf die TCC sowie den HNA-Anteil einer unbehandelten Uferfiltratprobe im Zuge einer Lagerung bei 10°C mit drei Replikaten.

5.1.1.2 PROBENAHEME VOR ORT

Nach dem Leitfaden zur Methodenschrift 333.1 des Schweizerischen Lebensmittelbuchs (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012) ist eine Probenahme unter sterilen Bedingungen nicht erforderlich, da die DFZ in der hier

angewandten Form kein spezifisches Nachweisverfahren für hygienisch relevante Keime handelt. Von entscheidendem Einfluss auf das Messergebnis ist allerdings die Dauer der Vorspülung des Probenahmehahns, wobei eine sehr kurze Vorspülung bei bestimmten Zielsetzungen auch gewünscht sein kann – etwa bei der Beurteilung von Hausinstallationen bzw. Armaturen (Feuerpfeil und Botzenhart 2008). Die meisten Probenahmepunkte des vorliegenden Projekts waren Hähne, die entweder ständig durchflossen wurden oder ein nur sehr kurzes Zuleitungsstück von der Transportleitung aufwiesen.

Abbildung 20 zeigt einen Vergleich zwischen sogenannten First-Flush-Proben (ohne Vorspülung des Probenahmehahns) und den zugehörigen Proben nach zumindest zwei Minuten Vorspülung des Hahns (das Zuleitungsstück zum Hahn ist jeweils nur wenige Meter lang) im Rahmen einer Probenahme für eine Uferfiltrat-Brunnenreihe. Die Proben ohne Vorspülung des Hahns weisen durchwegs erhöhte TCC-Werte und HNA-Anteile auf. Dies erklärt sich nicht zuletzt durch die eher seltene Nutzung der Hähne bei den jeweiligen Probenahmestellen.

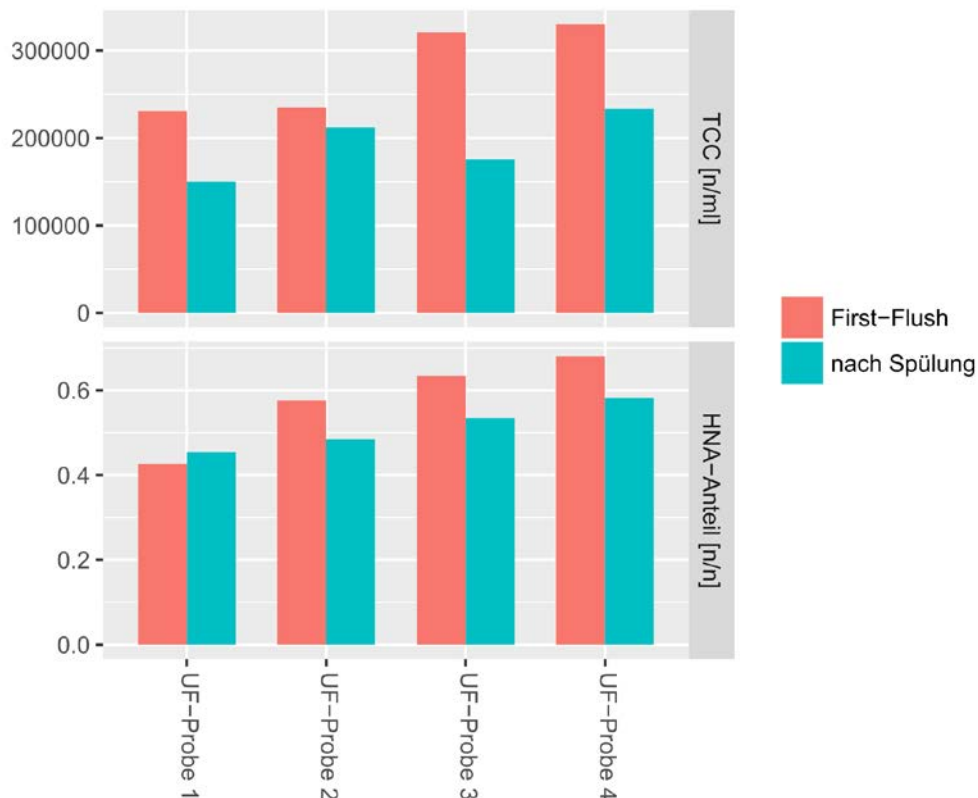


Abbildung 20: Vergleich von First-Flush-Proben und Proben nach Vorspülung des Probenahmehahns. Die Zuleitung zum Hahn ist jeweils nur wenige Meter lang.

Im Fall von Probenahmen in Gebäuden liegen meist weit längere Zuleitungen von Haupttransportleitungen zu den jeweiligen Probenahmepunkten vor. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse einer Beprobung von Hausinstallationen. Nur bei einem Teil der Proben weist der First-Flush deutlich erhöhte Werte auf. Dies lässt für die unauffälligen Proben u.U. auf eine zeitlich nicht allzu weit zurückliegende Hahn-Benutzung schließen.

RESULTATE

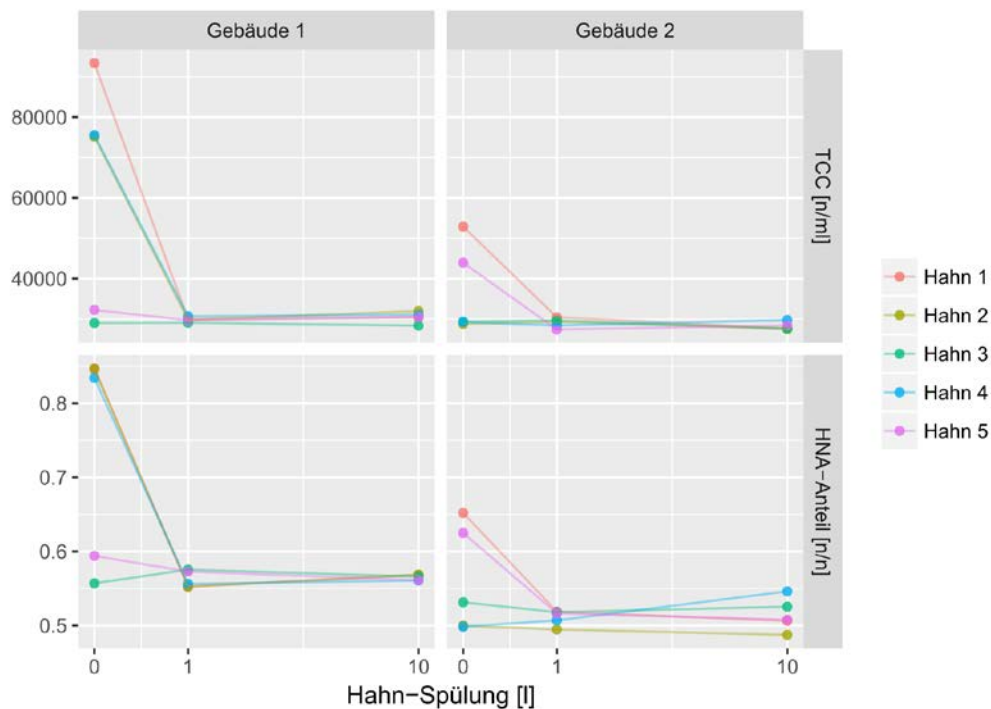


Abbildung 21: Vergleich von First-Flush-Proben und Proben nach Vorspülung mit einer definierten Wassermenge für je fünf Probenahmepunkte (WC-Anlagen) in zwei benachbarten, öffentlich zugänglichen Gebäuden (Probenahme erfolgte am gleichen Tag).

5.1.1.3 TRANSPORT

Im vorliegenden Projekt wurden für den Transport Kühlboxen mit Kühlelementen (Latentwärmespeicher) verwendet, wobei ein direkter Kontakt zwischen Probe und Kühlakku vermieden wurde. Gerade bei längeren Transporten oder hohen Umgebungstemperaturen besteht die Gefahr, dass die Kühlleistung nicht ausreichend ist und es zu einer unerwünschten Erwärmung der Proben kommt.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse eines Versuchs im Brutschrank zur Ermittlung der Probenerwärmung während des Transports dargestellt. Dabei wurde als Probentemperatur 10 °C gewählt, was einer durchschnittlichen Temperatur der beprobten Wässer nahekommt. Bei einer Umgebungstemperatur von 30 °C und einer recht geringen Masse der Kühlelemente (400 g) kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Temperatur der Probe. Nichtsdestoweniger ist die Kühlleistung für kürzere Transporte wohl noch ausreichend. Wesentlich schneller erwärmt sich die Probe bei Verzicht auf Kühlelemente und einer Umgebungstemperatur von 22 °C. Die Zugabe von Kühlelementen mit einer Masse von 400 g bewirkt nach einer anfänglichen Erwärmung annähernd eine Stabilisierung der Probentemperatur. Bei einer Verdoppelung der Kühlmasse kommt es zu einer Reduktion der Probentemperatur auf knapp 9 °C.

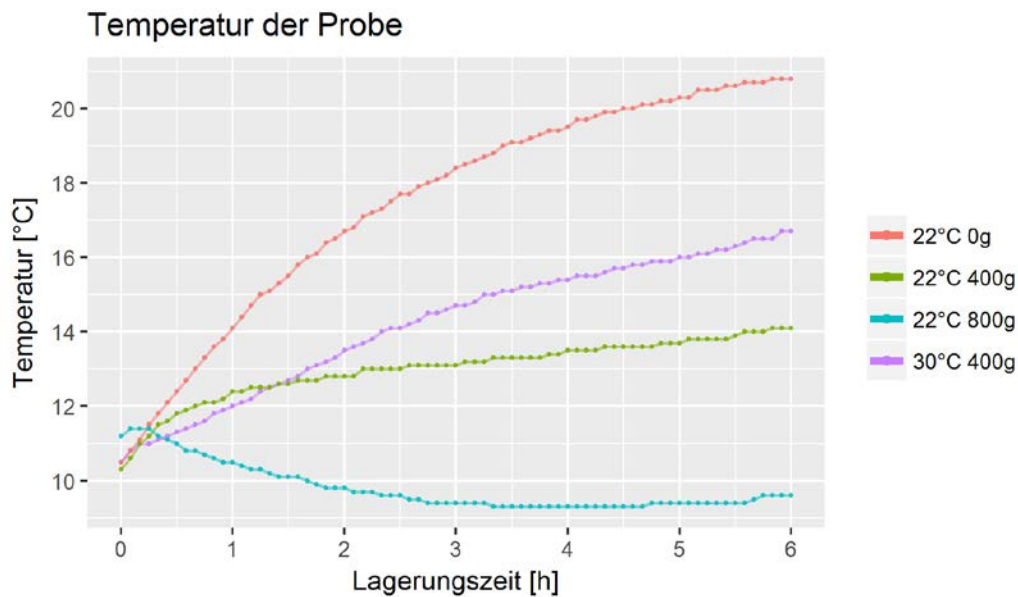


Abbildung 22: Versuche im Brutschrank zur Ermittlung der Probenerwärmung (Umgebungstemperatur 22 °C und 30 °C) beim Transport in Kühlboxen (Volumen ca. 10l) bei Verwendung unterschiedlicher Kühlmassen (-18 °C) für sechs Proben (Zentrifugenröhrchen, je 50 ml). Die Temperatur der Probe wurde mit einem in die Probe eingetauchten Temperaturfühler bestimmt.

Der Probentransport kann ansonsten als Teil der Probenlagerung angesehen werden, diese wird in Abschnitt 5.1.1.4 diskutiert.

5.1.1.4 EINFLUSS DER LAGERUNG

Idealerweise werden alle Proben zum frühestmöglichen Zeitpunkt gemessen. Bei umfassenden Probenahmekampagnen kann es abhängig von den personellen oder gerätetechnischen Kapazitäten des Labors zu einer Verzögerung der Analyse kommen. Nach (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012) ist eine Lagerung für bis zu 48 Stunden bei 4 bis 8 °C und bei Verwendung von gemuffelten Glasgebinden möglich, ohne dass es dabei zu einer wesentlichen Änderung der TCC oder des HNA-Anteils kommt.

In Abschnitt 5.1.1.1 wurde bereits dargelegt, dass es im Fall der im vorliegenden Projekt verwendeten Zentrifugenröhrchen im Zuge der Lagerung im Vergleich zu Glasgebinden zu zusätzlichen, wachstumsfördernden Effekten kommen kann. Die wesentliche Frage ist jene nach dem Zeitpunkt, ab dem mit einer wesentlichen Änderung der TCC und der Verteilung der Signalintensitäten (ausgedrückt etwa durch den HNA-Anteil) bei einer Probenlagerung zu rechnen ist. Dieser Zeitpunkt entspricht damit der maximal empfohlenen Lagerungsdauer.

In Abbildung 23 sind Ergebnisse eines Versuchs zur Lagerfähigkeit verschiedener Proben bei 4 °C in Zentrifugenröhrchen dargestellt. Hierzu wurden jeweils mehrere Gebinde (je eines für jeden Tag der Lagerung) nacheinander an den jeweiligen Probenahmestellen abgefüllt. Für die Änderung der TCC im Zuge der Lagerung lässt sich kein besonders eindeutiger Befund erzielen, wie etwa an der relativen Änderung bezogen auf den Tag der Probenahme zu sehen ist. Ein Teil der Unterschiede könnte dabei auch der sequentiellen Probenahme geschuldet sein. In der Tendenz liegt aber eher eine Zunahme der Parameter TCC und HNA-Anteil vor. Wenngleich also eine Messung unbestritten am besten direkt nach der Probenahme erfolgt, so enthalten Messergebnisse von Proben, die aufgrund besonderer Umstände erst nach Lagerung gemessen werden können, durchaus interpretierbare Information. Letzteres ist gerade bei Wasserressourcen der Fall, deren natürliche Schwankung der besagten Parameter deutlich über der zu erwartenden Beeinträchtigung durch die Lagerung liegt. Im Zweifelsfall – gerade auch bei längerfristigen Messprogrammen – kann die Lagerfähigkeit einer bestimmten Probe in einem Vorversuch getestet werden.

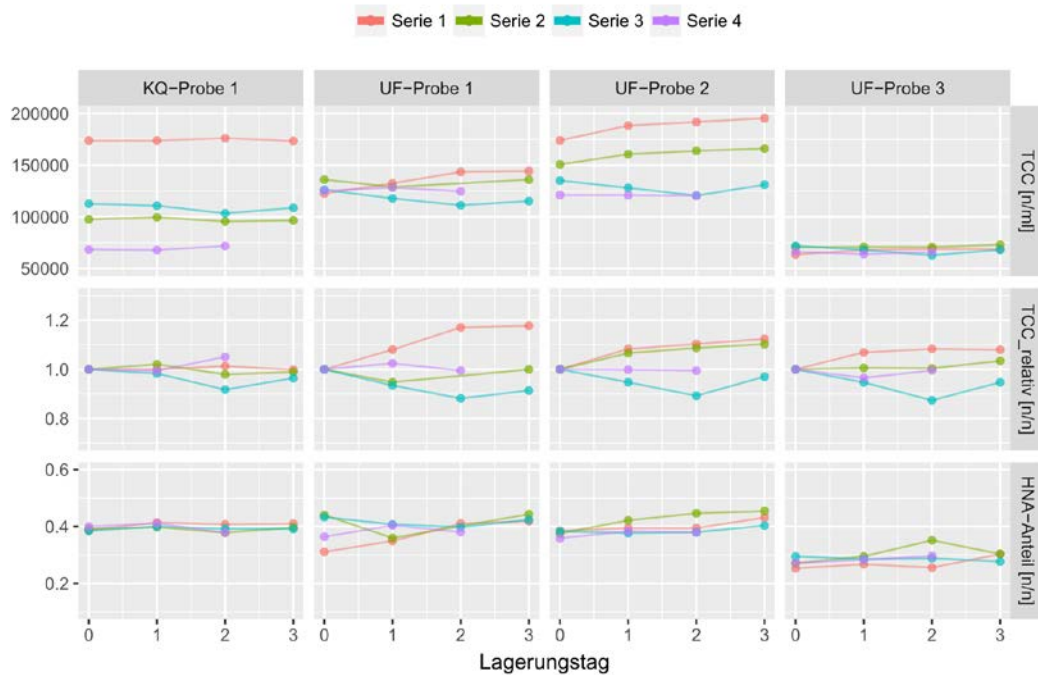


Abbildung 23: Versuch zur Lagerfähigkeit verschiedener Proben in Zentrifugenröhrchen bei 4 °C. Die Serien entsprechen verschiedenen Probennahmen im Zeitraum eines Monats (KQ = Karstquelle, UF = Uferfiltrat).

Im Zuge von Untersuchungen zur Biostabilität (Wachstumspotential, siehe auch Abschnitt 5.3) wurden Proben unterschiedlicher Herkunft in dicht verschlossenen, gemuffelten 100-ml-Glasgebinden bei 10 °C mehrere Tage gelagert. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse von zwei Messserien dargestellt, bei denen DFZ-Messungen am Tag der Probenahme sowie drei bzw. sieben Tage nach Probenahme (je zwei Replikate) gemessen wurden. Die Ergebnisse zeigen eine große Stabilität der Proben zumindest für drei Lagerungstage. Lediglich bei einer Probe aus der zweiten Versuchsreihe ist eine nennenswerte Zunahme der TCC zu beobachten. Der HNA-Anteil zeigt gleichfalls keine Zunahme am dritten Tag der Lagerung. Der fallweise Rückgang ist mit leichten Abweichungen im Messsetting erklärbar (Position auf der Mikrotiterplatte, siehe auch Abschnitt 5.1.2.7.7). Trotz einer untypisch hohen Lagerungstemperatur von 10 °C ist also nach drei Tagen noch keine eindeutige Veränderung der Proben zu erkennen. Manche der Proben weisen drüber hinaus auch nach einer Woche noch keine Änderung der DFZ-Messgrößen auf.

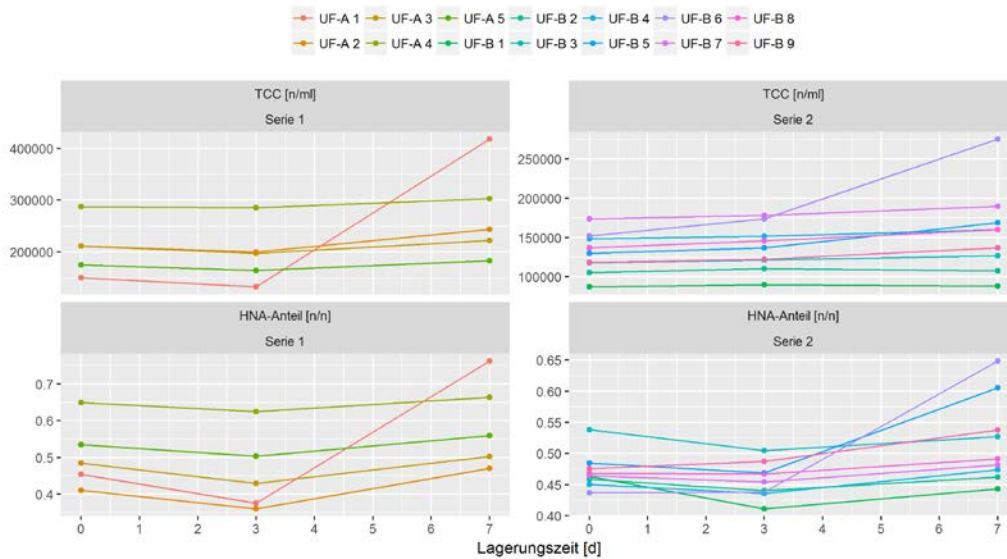


Abbildung 24: Veränderung der TCC und des HNA-Anteils verschiedener Rohwässer (Uferfiltrat) im Zuge einer Lagerung in gemuffelten 100-ml-Glasgebinden bei 10 °C.

Die hier gemachten Ausführungen gelten lediglich für die Bestimmung der TCC und des HNA-Anteils (bzw. weiterführender Analysen) auf Basis der SG1-Färbung von nicht-behandelten Proben mit geringen Gehalten an mikrobiell verwertbaren Substanzen. Gerade im Fall von Viabilitätsuntersuchungen (z.B. ICC) kann die Lagerungsdauer einen entscheidenden Einfluss ausüben (siehe auch Abschnitt 5.2.2), der im Einzelfall bewertet muss.

5.1.2 PROBENVORBEREITUNG UND MESSEINSTELLUNGEN

5.1.2.1 DURCHMISCHUNG, FILTRATION UND VERDÜNNUNG DER PROBEN

Die meisten Wasserproben, die im vorliegenden Projekt untersucht wurden, wiesen TCC-Werte auf, die ein Verdünnen der Proben nicht notwendig machen. Einzelne Proben hatten dagegen sogar eine eher zu geringe TCC. Grundsätzlich sind im Hinblick auf eine Verdünnung – die vor der Farbstoffzugabe erfolgen sollte (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012) – wohl mehrere Punkte zu bedenken, die im Folgenden erläutert werden.

- **Gerätespezifische Aspekte:** Im Fall des Accuri® C6 etwa wird die maximale Detektionsrate vom Hersteller mit 10 000 Detektionen pro Sekunde angegeben. Der ideale Messbereich entspricht 1 000 bis $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter (BD Biosciences 2011). Das genannte Limit bzw. der genannte Bereich wird durch die Proben der vorliegenden Untersuchung – mit Ausnahme einiger Proben sehr geringer TCC – nicht erreicht. Durch die Anpassung der „Thresholds“, also dem Grenzwert der Signalintensität, ab der Signale aufgezeichnet werden, kann bei Proben mit großem Signalhintergrund eine Reduktion der Anzahl an Detektionen erreicht werden.
- **Färbespezifische Aspekte:** Die Bandbreite möglicher TCC ist beträchtlich und umfasst zumindest zwei log-Stufen. Eine Anpassung der zugegebenen Farbstoffmenge ist dabei aber nicht vorgesehen. Hier stellt sich die Frage, ob das Verhältnis von Farbstoff zu Zellen einen Einfluss auf das Messergebnis ausübt. Die grundlegende Eigenschaft von SG1 – und auch PI –, die den Einsatz als Farbstoff im Rahmen der DFZ ermöglicht, ist jene der starken Zunahme der Fluoreszenz des Farbstoffs bei Bindung an Nukleinsäuren. Wenn es dabei relativ zur Umgebung zu keiner Konzentrationserhöhung des Farbstoffs an den Nukleinsäuren kommt, sollte der Einfluss variabler TCC gering sein (Shapiro 2003).

- Bildung von Zellaggregaten: Abhängig von der TCC kann es zu einer verstärkten Tendenz zur Bildung von unerwünschten Zellaggregaten kommen (BD Biosciences 2011).

Als Verdünnungsmedien kommen etwa steril-filtrierte (siehe dazu auch Abschnitt 5.1.2.1) Mineralwasser oder Reinstwasser in Frage (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012).

Proben wurden auch nur in jenen Fällen einer Filtration zur Verhinderung einer möglichen Verstopfung im Gerät (0,03 mm Schüttfilter) unterworfen, in denen eine Trübe oder Verfärbung der Probe vorlag. Im Zuge der DFZ-Messungen ist es auch nie zu einer Verstopfung des DFZ gekommen. Daher ist eine präventive Filtration von offensichtlich unauffälligen Grundwasserproben nicht notwendig.

Es ist bekannt, dass u.A. der pH-Wert Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften vieler Farbstoffe ausübt. Daneben sind wohl auch noch weitere Eigenschaften bzw. Inhaltsstoffe der Wassers vorstellbar, die mit der Anfärbung interagieren. Im Rahmen der umfassenden Messkampagne dieser Untersuchung wurden allerdings keine Proben angetroffen, die eine solcherart auffällige Signalverteilung (etwa schwache Fluoreszenzsignale) aufwiesen, dass keine typischen Zelldetektionen mehr erkennbar waren. Von einer etwaigen Beeinflussung der SG1-Färbung durch den pH-Wert sind wohl lediglich Proben betroffen, die einen für Trinkwasserressourcen untypisch sauren pH-Wert aufweisen (Baldock u. a. 2013). Durch die Zugabe von Puffer-Lösungen kann der pH-Wert im Zweifelsfall eingestellt werden.

5.1.2.2 MESSGEBINDE

Zur Ermittlung des Einflusses des Messgebindes wurden drei Messserien durchgeführt, die Messungen mit 96er-Mikrotiterplatte mit Messungen unter Verwendung von 3-ml-Tubes (24er-Halterung) verglichen. Bei jeder Serie wurden vier Proben je dreimal mit den jeweiligen Gebinden gemessen. Die Probenvorbereitung wurde für beide Varianten möglichst einheitlich durchgeführt. Für drei der Proben (Uferfiltrate) zeigten sich durchwegs leicht erhöhte Werte der TCC bei Messung im 24er-Format (Abweichung der TCC von knapp 10 % bezogen auf die Messungen im 96er-Format). Die vierte Probe (Karstquellwasser) zeigte dieses jedoch Muster nicht. Es ist unklar, ob diese Ergebnisse durch einen systematischen Unterschied in der Probenvorbereitung (thermisches Verhalten im Inkubator), einen Effekt bei der Messung selbst (etwas unterschiedliche Füllstände bei beiden Varianten) oder Interaktionen zwischen Bakterien und der Gebindeoberfläche (Anlagerung) hervorgerufen wurden. Jedenfalls wurde im vorliegenden Projekt darauf geachtet, sofern als möglich einheitliche Gebinde zu verwenden (Typ und Hersteller). Dieses Vorgehen empfiehlt sich für alle längerfristigen Messprogramme. Der Einfluss eines Wechsels des verwendeten Gebindes (bzw. auch des Grades der Befüllung) sollte mittels Vergleichsuntersuchungen bestimmt werden.

5.1.2.3 LICHTSCHUTZ

Zur Vermeidung etwaiger Risiken hinsichtlich einer Beeinflussung der Messergebnisse durch den Einfall von Umgebungslicht – fluoreszierende Farbstoffe sind in dieser Hinsicht sensibel und können ihre Wirksamkeit verlieren –, wird gerade bei lang andauernden Messsequenzen präventiv eine Abschattung empfohlen (Sam Van Nevel u. a. 2013). Auch abseits davon gilt es, den Lichteinfall so gering als möglich zu halten – etwa bei der Inkubation der Proben oder der (Zwischen-) Lagerung des Farbstoffes. Zumindest im Falle von SG1 hat sich erfahrungsgemäß keine besonders starke Anfälligkeit gegenüber Lichtexposition (Laborbeleuchtung, künstliche Lichtquelle) im Zuge der Probenvorbereitung ergeben.

5.1.2.4 INKUBATION

Um eine vollständige und stabile Anfärbung der Zellen zu gewährleisten, ist nach der Zugabe des Farbstoffs zur Probe eine definierte Einwirkzeit bzw. Inkubation – 13 Minuten im Heizblock bei 37 °C (+/- 2 °C) – bis zum Beginn der Messung vorgesehen (SLMB 2012). Nach letztgenannter Quelle beinhalten die 13 Minuten

einen dreiminütigen Zuschlag für die typische Dauer bis zur Erreichung der Zieltemperatur. Je nach Umgang mit der Probe (Ausgangstemperatur), verwendetem Messgebinde und Heizblock kann diese Zeitspanne als variabel vorausgesetzt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden im Regelfall Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Analyse von jenen Dreifachbestimmungen, die unmittelbar nach der Inkubation gemessen wurden (erste Messpositionen der Mikrotiterplatte), kann einen Hinweis darauf geben, ob gerade hier noch mit größeren Veränderungen der Ergebnisse gerechnet werden muss.

Auf Grundlage eines Datensatzes von 41 Dreifachbestimmungen verschiedener Proben mit Färbung durch SG1 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der ersten und der dritten Messung hinsichtlich Anzahl der Zell-Detektionen und mittlerer Signalintensität der Zellen gefunden werden (t-test des logarithmierten Verhältnisses). Demgegenüber konnte auf Basis von 40 Dreifachbestimmungen eine signifikante Zunahme der mittleren Signalintensität der Rot-Fluoreszenz bei Färbung mit der Kombination aus SG1 und PI gefunden werden. Letzteres ist wohl mit einer langsameren Aufnahme von PI begründet. Hierzu siehe auch die Versuche zum Einfluss der Messdauer auf die Ergebnisse der SG1-Färbung (Abbildung 28) und die Färbung mit SG1 und PI (Abbildung 30).

5.1.2.5 EINFLUSS DES PH-WERTS DER PROBEN

Der pH-Wert einer Probe beeinflusst die Ergebnisse vieler Fluoreszenzfarbstoffe. Im Fall von SG1 liegt das Optimum des pH bei 7,5 bis 8. Hier sollte die höchste Sensitivität des Farbstoffes zu erwarten sein (Molecular Probes 2006). Nichtsdestoweniger muss bedacht werden, dass lebendige Zellen ihren intrazellulären pH-Wert regulieren und damit von jenem der Probe abweichen können (SG1 kann in lebende Zellen eindringen). Die Beeinflussung der Fluoreszenzintensität lebender Zellen durch niedrige pH-Werte hat sich dementsprechend als gering herausgestellt (Baldock u. a. 2013). Interessanterweise fällt nach den Ergebnissen der letztgenannten Arbeit die Fluoreszenzintensität hitzebehandelter Zellen erst ab einem pH geringer als 4 deutlich ab, so dass also weder für lebende noch für tote Zellen eine stärker Beeinflussung bei typischen pH-Werten von Wasserressourcen zu erwarten ist. Die Farbstoffkombination aus SYTO 9 – der in der vorliegenden Arbeit durch SG1 ersetzt ist – und PI wurde für eine weites Spektrum an pH-Werten als einsetzbar befunden (Leuko u. a. 2004). Bei der Verwendung anderer Farbstoffe sollte aber genauestens geprüft werden, ob eine starke pH-Wert-Abhängigkeit besteht. Liegt diese vor, kann zwar u.U. noch die Anzahl an angefärbten Zellen (in einem großzügig gewählten Signalbereich) unbeeinflusst sein, die Fluoreszenzintensität lässt sich jedoch kaum mehr zwischen Proben mit unterschiedlichem pH-Wert vergleichen. Um dem entgegenzuwirken, kann der pH-Wert der Probe mittels Zugabe von steril-filtrierter Pufferlösung eingestellt werden.

5.1.2.6 FARBSTOFF

5.1.2.6.1 FARBSTOFFKONZENTRATION

5.1.2.6.1.1 SYBR® GREEN 1

SG1 wird im Regelfall in einer Konzentration von einem Zehntausendstel der Ausgangskonzentration des Farbstoffs (Herstellerangabe zur Konzentration: 10 000x) einer Probe beigegeben. Diese Konzentration wird von einer mittlerweile sehr großen Anzahl an einsehbaren Studien verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde ebenfalls diese Konzentration gewählt, nicht zuletzt um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

5.1.2.6.1.2 SYBR® GREEN 1 UND PROPIDIUMIODID

In Untersuchungen zur Detektion von membrangeschädigten Zellen wird häufig die genannte Kombination eingesetzt. Während die Konzentration von SG1 auch hier meist jener entspricht, die bei einer ausschließlichen SG1-Färbung Verwendung findet, existieren große Unterschiede hinsichtlich der eingesetzten PI-Konzentration in diversen Studien (Nescerecka, Hammes, und Juhna 2016). In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss der PI-Konzentration auf das Ergebnis der ICC-Bestimmung gemeinsam mit der Wahl des zugehörigen Farbstofflösungsmittels und dem Einfluss der Messdauer untersucht. Die diesbezüglichen Ergebnisse werden in Abschnitt 5.1.2.7.7 diskutiert.

5.1.2.6.2 FARBSTOFFLÖSUNGSMITTEL

Das Farbstofflösungsmittel muss geeignet sein den jeweiligen Farbstoff darin – auch über längere Zeit – zu lagern, sowie den Farbstoff in Lösung zu halten (keine Entmischung). Empfehlungen dazu sind bei jeweiligen Farbstoffherstellern zu finden. Daneben hat sich allerdings auch gezeigt, dass das Farbstofflösungsmittel Einfluss auf die DFZ-Resultate nehmen kann (Nescerecka, Hammes, und Juhna 2016). So kann Dimethylsulfoxid (DMSO), das normalerweise für die TCC-Bestimmung mittels SG1-Färbung Verwendung findet, einen erhöhten Anteil an membrangeschädigten Zellen bei der Färbekombination SG1 und PI hervorrufen. Letztendlich werden durch die Zugabe der Arbeitslösung des Farbstoffs im Verhältnis 1:100 zur Probe die in der Probe befindlichen Zellen dem Lösungsmittel exponiert. In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf das Ergebnis der ICC-Bestimmung gemeinsam mit der Wahl der PI-Konzentration und dem Einfluss der Messdauer untersucht. Die diesbezüglichen Ergebnisse werden in Abschnitt 5.1.2.7.7 diskutiert.

Daneben hat sich auch gezeigt, dass das Ausmaß des Signalhintergrunds durch die Wahl des Lösungsmittels beeinflusst werden kann. Die diesbezüglichen Ergebnisse werden in Abschnitt 5.1.3.5 dargestellt.

5.1.2.6.3 MESSUNG UNGEFÄRBTER PROBEN

Die Messung von ungefärbten Proben dient der Detektion von Partikeln mit Autofluoreszenz. Bakterielle Autofluoreszenz muss etwa bei Messmethoden beachtet werden, die auf Basis sehr schwacher Fluoreszenzsignale beruhen (Yang u. a. 2012). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung und der zugeordneten Messkampagne wurde eine Vielzahl an Proben unterschiedlicher Herkunft ohne -Zugabe von Farbstoff mittels DFZ gemessen. Dabei wurden die Geräte-Einstellungen wie im Fall der TCC-Bestimmung mittels SG1 gewählt (Threshold auf FL1-H: 800). In Abbildung 23 ist eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse dargestellt. Im Bereich der Zell-Detektionen bei SG1-Färbung wurden mit Ausnahme einzelner Messungen keine Detektionen erzielt. Die gesamten Detektionen entsprachen dabei im Median 20 Detektion pro ml, was einer einzelnen Detektion pro Messvorgang entspricht. Die Autofluoreszenz der Bakterien in den untersuchten Proben dürfte im Vergleich zur Intensität der SG1-Fluoreszenz jedenfalls gering sein, auf FL1-H ist sie jedenfalls kleiner als 800 (zum Vergleich, die Abtrennung der LNA-Zellen und HNA-Zellen erfolgt bei ca. 10 000). Nichtsdestoweniger könnten Unterschiede in der Autofluoreszenz innerhalb der bakteriellen Mischpopulation natürlicher Wasserproben zumindest einen Beitrag zur Streuung der Signalintensitäten bei Färbung mit SG1 leisten. Daneben wäre es prinzipiell möglich, dass die Rot-Fluoreszenz (FL3) deutlich größer ist, aber durch die Threshold-Setzung auf Basis der Grün-Fluoreszenz (FL1-H) unentdeckt bleibt. Dem ist entgegenzuhalten, dass jene chemischen Verbindungen, die für den Großteil der Autofluoreszenz in Bakterien verantwortlich sind (bestimmte Aminosäuren, Nicotinamidadenindinukleotide und Flavine), ihre Emissionsmaxima nicht im Bereich der Rot-Fluoreszenz, sondern im Bereich kürzerer Wellenlängen haben (Hill, Mayo, und Chang 2009).

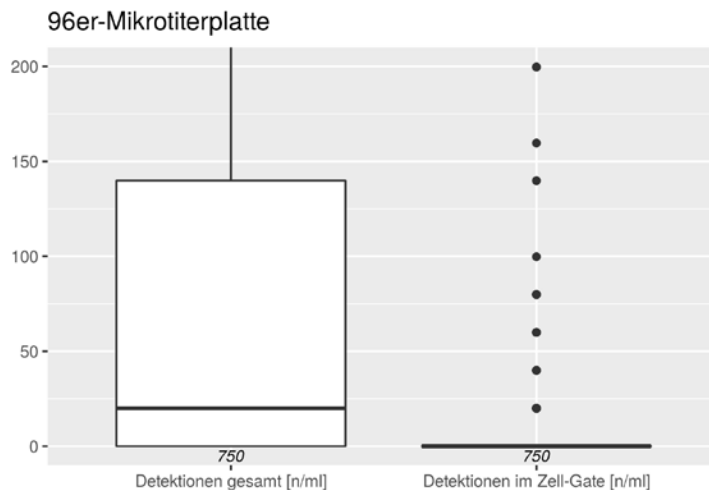


Abbildung 25: Messung von ungefärbten Wasserproben verschiedenster Herkunft (Threshold auf FL1-H: 800, gemessenes Volumen 50 μ l).

Das Auftreten von Autofluoreszenz bei DFZ-Messungen ist vor allem bei Proben aus Oberflächengewässern zu beachten. Hier können z.B. heterotrophe von phototrophen Prokaryoten unterschieden werden, da letztere Pigmente enthalten, die starke Fluoreszenz-Signale erzeugen können. Ein Beispiel für diese Beobachtung ist in Abbildung 26 zu sehen, die Streudiagramme von DFZ-Messungen ohne Zugabe eines Farbstoffs zeigt. Neben zwei Arten von Algen ist auch das Cyanobakterium *Synechococcus nidulans* dargestellt.

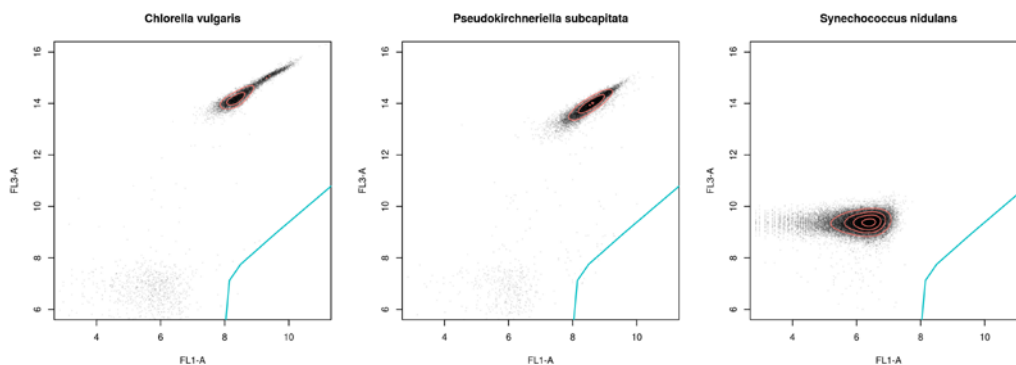


Abbildung 26: Streudiagramme der Grün- und Rot-Fluoreszenz von Messungen verschiedener im Labor gezüchteter Organismen (Algen: links und mittig; Cyanobakterien: rechts) ohne Zugabe von Farbstoff. Die roten Linien entsprechen einer Dichteschätzung, die blauen dem bekannten Zell-Gate (nur zur Orientierung dargestellt).

5.1.2.7 MESSEINSTELLUNGEN

5.1.2.7.1 GEMESSENES PROBENVOLUMEN

Am Accuri® C6 lässt sich das gemessene Probenvolumen in einem weiten Bereich in Abhängigkeit vom Messgebinde anpassen (BD Biosciences 2011). In dieser Hinsicht dürften Unterschiede zwischen verschiedenen DFZ-Herstellern bzw. Gerätemodellen bestehen. Die Erfassung eines größeren gemessenen Probenvolumens kann gerade im Fall von geringen TCC sinnvoll sein, nimmt aber entsprechend mehr Zeit in Anspruch. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Einstellungen in dieser Hinsicht im Regelfall gleich belassen (50 μ l).

5.1.2.7.2 THRESHOLD-SETZUNG

Die Setzung eines sogenannten Thresholds, also eines Grenzwerts eines oder mehrerer DFZ-Parameter, ab welchem Detektionen aufgezeichnet werden, dient der Reduktion von Signalhintergrund, also abiotischen Partikeln, Farbstoffresten und sogenanntem Geräterauschen (Hammes und Egli 2010), und damit auch der Sicherstellungen einer unter dem zulässigen Wert liegenden Detektionsrate (im Fall des Accuri® C6 liegt diese bei 10 000 Detektionen pro Sekunde). Gleichzeitig wird dadurch auch die Dateigröße und die anschließende Rechenzeit bei der Datenverarbeitung beeinflusst (siehe auch Abbildung 51). Im vorliegenden Projekt wurde der Threshold auf dem Parameter FL1-H (relative Signalstärke: 700 bzw. 800) gewählt, da hier das stärkste Signal (SG1-Färbung) mit der besten Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Signalhintergrund und Zellen zu erwarten ist. Bei Verwendung anderer Farbstoffe ist deren jeweiliges Emissionsmaximum zu berücksichtigen. Für bestimmte Analysen (Laborversuche mit gezüchteten Stämmen oder bei Verwendung anderer Farbstoffe) muss dies angepasst werden. Im Falle von Reinkulturen ist etwa eine Threshold-Setzung mittels Streulichtkanälen möglich und sinnvoll, da die Streulicht-Signale unabhängig von der Färbemethode relativ konstant bleiben. Eine nachträgliche Entfernung bzw. Adaption der Thresholds ist nur im Sinne einer Erhöhung möglich. Eine „Abschneiden“ von Zellsignalen durch eine zu hohe Festlegung des Thresholds kann nicht mehr rückgängig gemacht werden.

Die genaue Größe des Thresholds muss in einem Vorversuch (natürliche Wasserproben) getestet werden. Hierbei wird der Threshold-Wert ausgehend von sehr geringen Werten solange gesteigert, bis nur noch ein kleiner Anteil jenes Bereichs mit extrem hoher Detektionsdichte erfasst wird, der im Bereich geringer Fluoreszenzintensität typischerweise zu sehen ist (Hintergrundrauschen). Die Zelldetektionen bei der SG1-Färbung weisen davon typischerweise eine sichtbare Trennung durch erhöhte Fluoreszenzintensitäten auf.

Im Fall der Farbstoffkombination aus SG1 und PI kann der Threshold ebenfalls im Grün-Fluoreszenz-Kanal definiert werden. Dabei ist allerdings damit zu rechnen, dass einige Detektionen membranpermeabilisierter Zellen nicht mehr im Detektionsbereich liegen. Wenn es die jeweilige Geräte-Software erlaubt, mehrere Thresholds im Sinne einer Beibehaltung von Signale größer als der erste Threshold oder (logisch) größer als der zweite Threshold zu definieren, kann diese Option für die Grün- und Rot-Fluoreszenz gewählt werden. Damit können auch Detektionen geringer Grün-Fluoreszenz aber hinreichend starker Rot-Fluoreszenz beibehalten werden.

5.1.2.7.3 FLUORESZENZ-KOMPENSATION

Bei der gleichzeitigen Anwendung mehrere Fluoreszenzfarbstoffe kann eine (u.U. gegenseitige) Überlagerung der jeweiligen Fluoreszenz-Emissionsspektren auftreten, d.h., dass die Emission eines Farbstoffs (unerwünschterweise) auch in jenem Detektionsbereich erfasst wird, der eigentlich für die Erfassung der Emission eines anderen Farbstoffes vorgesehen ist (Shapiro 2003) (Roederer 2001). Wie in Abbildung 3 zu sehen ist das Emissionsmaximum von SG1 bei 520 nm (und hier erfolgt idealerweise die Detektion), allerdings ist die Emission nicht auf einen engen Bereich um das Emissionsmaximum beschränkt („fluorescence spillover“). Die Fluoreszenz-Kompensation bezeichnet ein Vorgehen zur Beseitigung der Signalüberlagerung mehrerer Farbstoffe auf Basis von separaten Messungen mit den einzelnen Farbstoffen, der darauf basierenden Definition von Kompensationswerten und der Anwendung linearer Gleichungssysteme. Idealerweise weist ein bestimmter Messkanal nach erfolgter Kompensation eine Signalintensität auf, die jener der separaten Messung mit dem betreffenden Farbstoff entspricht. Die genannte Kompensation erfolgt dabei nach einer Messung (und die Möglichkeit dazu ist in der Geräte-Software meist implementiert), d.h. der Messvorgang selbst bleibt davon unbeeinflusst.

Bei der Verwendung eines einzelnen Farbstoffes – etwa SG1 – ist dieses Vorgehen nicht notwendig und in der Literatur nicht beschrieben. Denkbar wäre die Kompensation der Autofluoreszenz, sollte diese in nennenswertem Ausmaß vorliegen. Bei der Verwendung der Farbstoffkombination aus SG1 und PI ist

zumindest in manchen Studien eine Kompensation angewandt worden (Grégori u. a. 2001) (Rüger u. a. 2012), bei anderen jedoch nicht (Falcioni, Papa, und Gasol 2008) (Nescerecka, Hammes, und Juhna 2016). Hier stellt sich insbesondere die Frage, inwiefern die Wechselwirkung der genannten Farbstoffe durch das beschriebene Vorgehen der Kompensation berücksichtigt werden kann (Stocks 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde daher von einer Kompensation abgesehen.

5.1.2.7.4 FLOW-RATE

Die sogenannte Flow-Rate bezeichnet das durch den DFZ gemessene Probenvolumen pro Zeiteinheit. Im Fall des Accuri® C6 im automatischen Messmodus wird dies durch eine Veränderung des Querschnitts der Kernströmung (die Probe) in der Durchflusszelle unter Beibehaltung der Fließgeschwindigkeit erreicht. Eine Erhöhung der Flow-Rate erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei oder mehrere Zellen gleichzeitig im Abtastbereich des Lasers befinden (Watson 1991). Daneben kann auch eine etwas höhere Streuung der Ergebnisse die Folge sein, da sich ein Partikel auch in weiter vom Zentrum der Durchflusszelle (maximale Bestrahlung durch den Laser) entfernt befindlichen Punkten befinden kann (Zucker 2008). Demgegenüber besteht eine mitunter erheblich verkürzte Messdauer.

In Abbildung 27 ist ein Vergleich verschiedener Flow-Rates (Accuri® C6, automatischer Messmodus) dargestellt. Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang der TCC bei zunehmender Flow-Rate, bei annähernd konstanten mittleren Signalintensitäten der Grün-Fluoreszenz der Zell-Detektionen. Da keine Verschlechterung der Ergebnisse (etwa schwächere Signale oder größere Streuung) mit zunehmender Flow-Rate zu erkennen ist, überwiegt der Vorteil der verkürzten Messdauer. Die erheblichen Unterschiede in der TCC dürften mit der Bestimmung des gemessenen Volumens verbunden sein und sind daher wohl gerätespezifisch. Der Hersteller des Accuri® C6 empfiehlt von der Verwendung der Flow-Rate „slow“ (14 µl pro Minute) dann abzusehen, wenn eine genaue Bestimmung der Partikelkonzentration erwünscht ist (BD Biosciences 2011). Nichtsdestoweniger ist der Unterschied zwischen den verbleibenden Flow-Rates (35 bzw. 66 µl pro Minute) aber ebenso beträchtlich. Es ist daher zu empfehlen, die Messeinstellungen stets beizubehalten bzw. die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Flow-Rate vorab genau zu bestimmen.

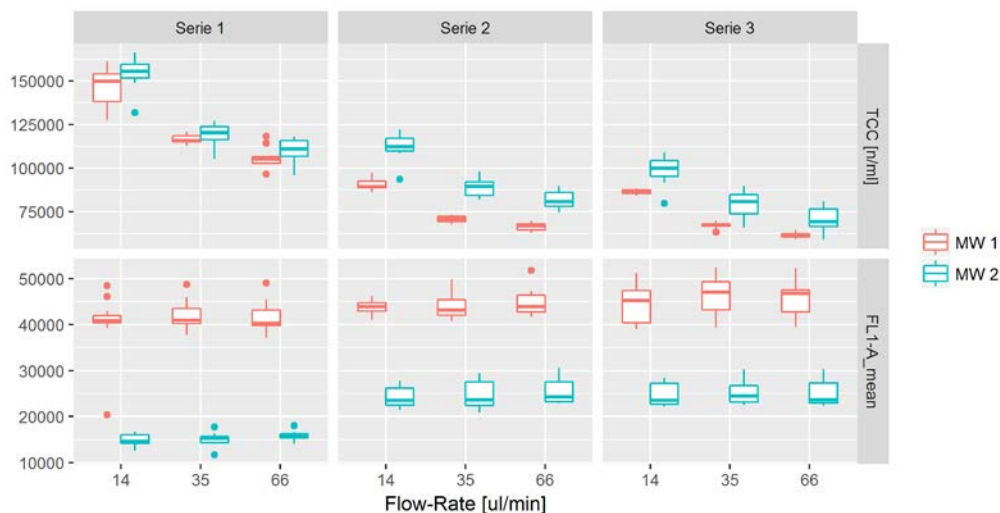


Abbildung 27: Vergleich von verschiedenen Flow-Rates (Accuri® C6, automatischer Messmodus) in drei Versuchsreihen mit zwei verschiedenen Proben (Mineralwässer). Jede Box fasst zwölf Einzelmessungen zusammen.

5.1.2.7.5 WASCHSCHRITTE

Neben der routinemäßig zu erfolgenden Dekontamination und intensiven Reinigung etwa nach Beendigung einer Messreihe, müssen u.U. auch Maßnahmen gesetzt werden, die einen möglichen Übertrag von Partikeln

(Carry-Over) von einer Messung auf die nachfolgende verringern. Im automatischen Messmodus des Accuri® C6 bestehen hierzu im Wesentlichen zwei Möglichkeiten. Einerseits durch eine „Messung“ von Reinstwasser (ev. mit angepassten Messeinstellungen), andererseits durch die Aktivierung von automatischen Waschzyklen (bis zu drei pro Messung möglich). Für die Durchführung von letzteren wird vom Accuri® C6 eine „Ruheposition“ angesteuert und durch mehrmaliges Auspressen bzw. Einsaugen von Reinstwasser (Hüllstromflüssigkeit) der Bereich der Probeaufnahme und die internen Schläuche gereinigt (Dauer ca. 20 Sekunden). Die Effektivität dieser Maßnahmen zur Verringerung von Carry-Over wird in Abschnitt 5.1.3.4.1 diskutiert.

5.1.2.7.6 AGITATION CYCLES

Für Messungen im automatischen Messmodus des Accuri® C6 besteht die Möglichkeit zur Aktivierung von „Agitation Cycles“ (Schütteln bzw. Schwenken der Messgebinde) zwischen den jeweiligen Einzelmessung zur Beibehaltung einer homogenen Probendurchmischung. Einerseits erfordert dies zusätzlich Zeit (etwa 15 Sekunden) und verlängert somit die Gesamtmessdauer, andererseits müssen bestimmte Typen von Mikrotiterplatten in Verbindung mit einer eingeschränkten Füllmenge verwendet werden. Versuche einer anderen Arbeitsgruppe haben zudem gezeigt, dass bei der Verwendung der beschriebenen Probenschwenkung eine starke Abnahme der TCC mit der Messdauer zu Tage getreten ist – ein Verhalten, dass mit verstärkter Anlagerung von Mikroorganismen an die Gebindewand erklärt wird (Sam Van Nevel u. a. 2013). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde daher von dieser Möglichkeit kein Gebrauch gemacht.

5.1.2.7.7 MESSDAUER

Für den Vergleich von DFZ-Ergebnissen ist es wünschenswert, dass diese mit einem einheitlichen Messprotokoll erzielt werden, in dem Unterschiede in der Probenvorbereitung, den Geräteeinstellungen und sonstigen Umgebungsbedingungen möglichst klein gehalten werden. Die Verwendung des automatischen Messmodus (Auto-Loader) bei einer Messung mit dem Accuri® C6 ermöglicht die relativ einfache Abarbeitung einer großen Anzahl an Proben. Als wesentliche Abweichung zu der eingangs erwähnten Forderung ist hier die relativ lange Dauer der Messsequenz zu sehen, wobei die Probenvorbereitung (Anfärbung und Inkubation) zu annähernd dem gleichen Zeitpunkt für alle Proben der Sequenz erfolgt. Damit einher geht eine verlängerte Farbstoff-Exposition der Zellen jener Proben, die zu späteren Zeitpunkten der Messsequenz gemessen werden. Dies ist mit möglichen Änderungen der Anfärbung der Zelle und deren Signalintensität verbunden (Sam Van Nevel u. a. 2013). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt, um den Einfluss der besagten Messdauer auf die DFZ-Ergebnisse – insbesondere TCC und HNA-Anteil (SG1-Färbung) sowie ICC (Färbung mit SG1 und PI) – zu ermitteln.

5.1.2.7.7.1 FÄRBUNG MIT SYBR® GREEN 1

In Abbildung 28 sind Ergebnisse von vier Versuchsreihen (mit je vier Wasserproben) zur Abhängigkeit der TCC und des HNA-Anteils bei Färbung mit SG1 von der Messdauer dargestellt. Der Startpunkt entspricht dabei dem Start der Messsequenz nach Färbung und Inkubation. Die Ergebnisse zeigen für alle Probe eine leicht zunehmende Tendenz für die TCC. Im Fall jener Probe, die als erste in der Messsequenz gemessen wurde (UF-Probe 1), ist gerade am Anfang eine starke Zunahme zu verzeichnen. Die Ursache dürfte hier in einer noch nicht vollständigen Anfärbung der Probe liegen, die im Bereich schwacher Signalintensitäten dazu führt, dass das verwendete Gate nicht alle LNA-Zellen umfasst (Abbildung 29). Im Gegensatz zu diesem Befund hat die Analyse von verschiedenen Dreifachbestimmungen, die am Beginn einer Messsequenz gemessen wurden, keinen signifikanten Unterschied zwischen der ersten und dritten Messung ergeben (siehe Abschnitt 5.1.2.4). In der schon erwähnten Studie unter Verwendung des gleichen

RESULTATE

Gerätemodells (Accuri® C6) mit Auto-Loader wird eine Messdauer von bis zu 80 Minuten für die Bestimmung der TCC als unproblematisch erachtet (Sam Van Nevel u. a. 2013).

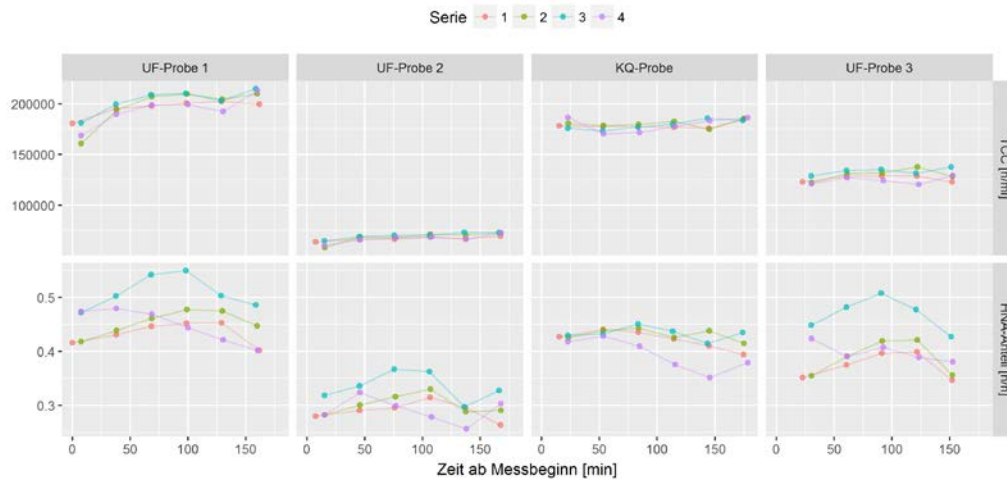


Abbildung 28: Versuchsreihen (vier Wiederholungen) zur Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Parameter TCC und HNA-Anteil bei Messung mit einer 96er-Mikrotiterplatte anhand von vier Wasserproben. Jeder Punkt entspricht einer Dreifachbestimmung.

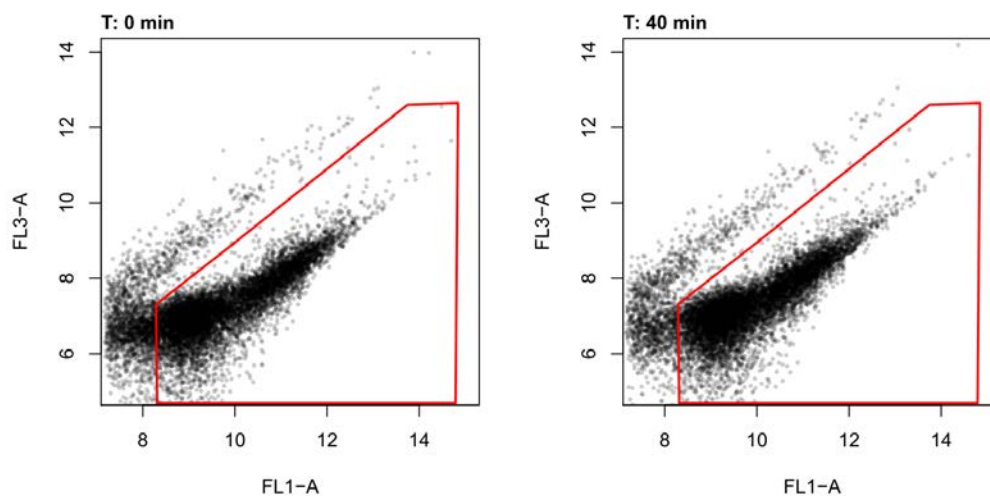


Abbildung 29: Vergleich von Streudiagrammen der Grün- und Rot-Fluoreszenz von zu unterschiedlichen Zeiten in der automatischen Messsequenz gemessenen Proben gleicher Herkunft.

5.1.2.7.2 FÄRBUNG MIT SYBR® GREEN 1 UND PROPIDIUMIODID

Neben dem Einfluss der Messdauer auf das Ergebnis einer Anfärbung mit SG1 und PI, wurden in mehreren Versuchsreihen gleichzeitig auch der Einfluss des Farbstofflösungsmittels und der PI-Konzentration untersucht (Abbildung 30). Diese Untersuchung hat dabei in erster Linie die Anwendung des automatischen Messmodus des Accuri® C6 (96er-Mikrotiterplatte) im Blick. Hinsichtlich des kurzfristigen Verhaltens des Farbstoffs unmittelbar nach Farbstoffzugabe sei auf die entsprechende Literatur verwiesen (Nescerecka, Hammes, und Juhna 2016). Es zeigt sich nun jedenfalls eine deutliche zeitliche Abhängigkeit der ICC und fallweise des HNA-Anteils von der Dauer der Messung. Die ICC-Werte fallen für alle Konzentrationsstufen von PI deutlich ab, lediglich bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel ist dieser Effekt weniger klar. Im Fall von letzterem sind die ICC-Werte von Beginn an deutlich niedriger. Eine weitere interessante

Beobachtung betrifft das Verhalten des HNA-Anteils der intakten Zellen. Dieser bleibt für die meisten Varianten annähernd konstant auf recht hohem Niveau. Nur im Fall der Zugabe von Chlordioxid zur Probe kommt es zu einem dramatischen Rückgang des HNA-Anteils. Letzteres deutet auf eine erhöhte Anfälligkeit der HNA-Zellen gegenüber einer Chlordioxid-Behandlung hin (Ramseier u. a. 2011).

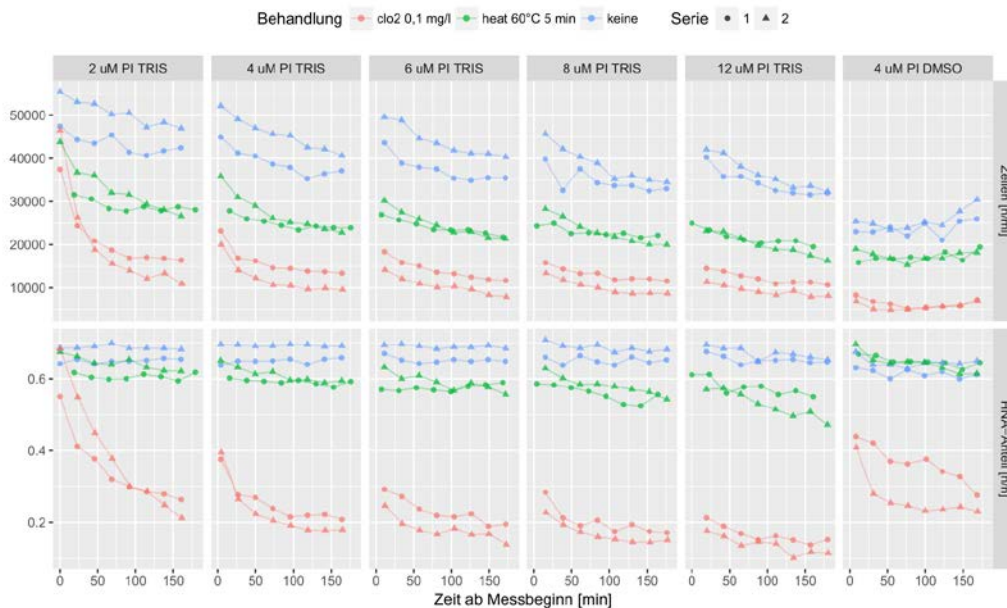


Abbildung 30: Versuchsreihen (zwei Wiederholungen) zur Ermittlung des zeitlichen Verlaufs des Parameters ICC und des HNA-Anteil bei Färbung mit SG1 und PI (Messung mit einer 96er-Mikrotiterplatte) anhand einer verschieden behandelten natürlichen Wasserprobe (keine Behandlung, Chlordioxid-Zugabe und Hitze-Behandlung). Zusätzlich erfolgte eine Variation der PI-Konzentration und des Lösungsmittels. Jeder Punkt entspricht einer Doppelbestimmung.

Aufgrund der gemachten Erfahrungen ist offensichtlich, dass das Ergebnis einer Färbung mit SG1 und PI von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist. Die Färbung verläuft wesentlich dynamischer als im Fall von SG1 (vergleiche Abschnitt 5.1.2.7.7.1). Vor einem Einsatz der Methode sollte man jedenfalls genau prüfen, wie sehr die Ergebnis-Interpretation von der genauen quantitativen Größe – etwa des ICC-Werts – abhängt. Im Fall einer erwartbar starken Zell-Schädigung kann es mitunter ausreichend zu zeigen, dass im normalen Detektionsbereich der Zellen keine Detektionen auftreten.

5.1.3 ÜBERPRÜFUNG DES GERÄTS UND DER MESSUNG

5.1.3.1 ÜBERPRÜFUNG DER STABILITÄT DER SIGNALINTENSITÄTEN

Eine stabile Messung hinsichtlich der Fluoreszenz- bzw. Streulichtintensitäten würde für gleichartige Partikel stets gleiche Werte erzielen. Allerdings bedingt die Komplexität der Messtechnik, dass selbst gleichartige Gerätemodelle leicht unterschiedliche Messergebnisse liefern (Mittag & Tárnok, 2009). Darüber hinaus ist bei langfristigen Messprogrammen mit Einflüssen der Gerätealterung zu rechnen. Um diesen Effekten entgegenwirken zu können, werden vielfältige sogenannte Beads eingesetzt – künstlich hergestellte, meist fluoreszierende Partikel mit möglichst dauerhaft gleichbleibenden Eigenschaften. Im vorliegenden Projekt wurde ein vom Gerätehersteller empfohlener Typ von Beads verwendet, nämlich „Rainbow Calibration Particles“ (bzw. „6 or 8-Peak Validation Beads“) der Firma Spherotech. Diese stellen eine Mischung verschiedener Beads dar, die sich in der Fluoreszenz-Intensität deutlich unterscheiden und dabei bis zu acht leicht erkennbare Signalpeaks erkennen lassen (Abbildung 31). Durch die regelmäßige Messung dieser Beads können technische Probleme am Gerät zuverlässig aufgedeckt werden. Im Fall des Accuri® C6 sind die Vorgaben zur Messung und Auswertung im Gerätehandbuch verzeichnet.

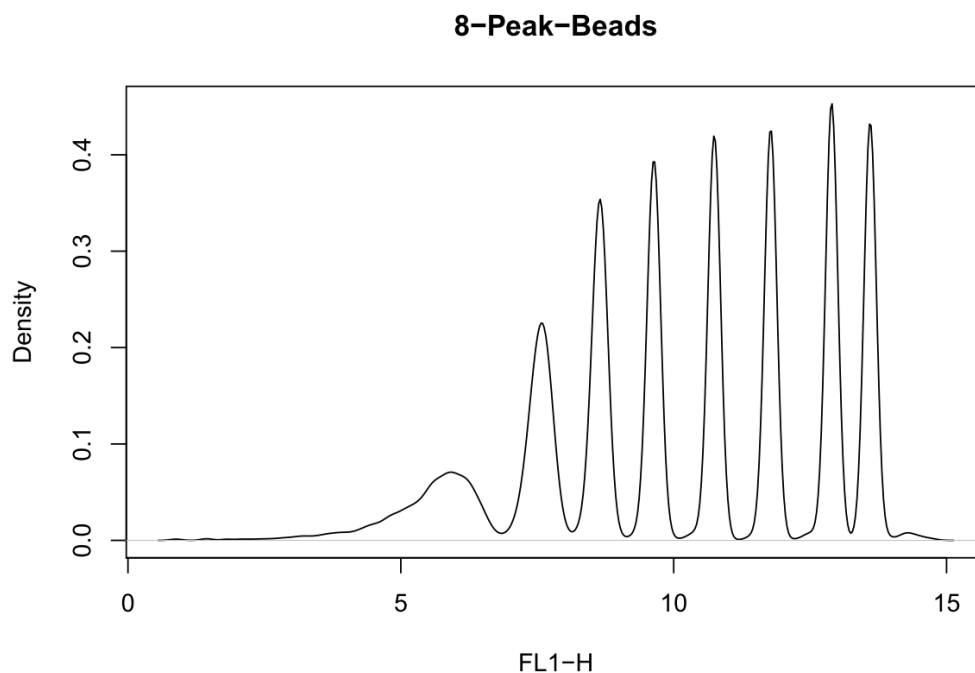


Abbildung 31: Dichteverteilung des FL1-H-Signals der Messung von 8-Peak Validation Beads.

Die Eigenschaft der guten Trennbarkeit der einzelnen Signalpeaks kann genutzt werden, um sie in einer erweiterten Datenauswertung zu isolieren und mit allen anderen Beads-Messungen zu vergleichen. So lassen sich nun etwa langfristige Ganglinien erstellen, wie in Abbildung 32 für FL1 und FL3 (jeweils H und A) dargestellt.

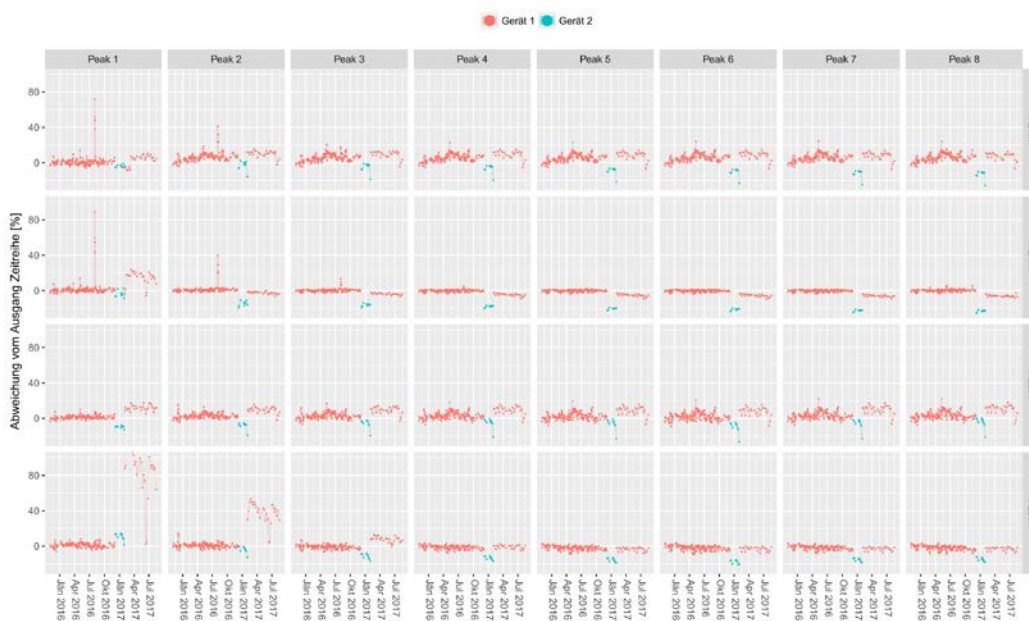


Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf des auf den Ausgangspunkt der Zeitreihe bezogenen Medians der Signalintensität von FL1 und FL3 der isolierten Peaks (8-Peak Validation Beads).

Die blauen Punkte in der Abbildung entsprechen der zwischenzeitlichen Verwendung eines Leihgeräts (ebenfalls ein Accuri® C6) aufgrund eines Defekts am eigenen Gerät. Es ist klar ersichtlich, dass vor dem besagten Defekt sehr stabile Beads-Messungen vorliegen. Das Leihgerät wiederum scheint einen deutlichen

Versatz aufzuweisen – wohl aufgrund einer nicht völlig übereinstimmenden Gerätekalibration. Nach der Reparatur des Defektes wiederum ist besonders im Fall der schwächsten beiden Peaks ein problematischer Signalverlauf zu erkennen – insbesondere bei FL1-H –, der aber interessanterweise bei FL1-A (dem Area-Signalparameter) kaum in gleichem Ausmaß auftritt. Die Ursache für letzteres kann nicht im Detail nachvollzogen werden, da die Berechnungsgleichung für den Area-Parameter vom Hersteller nicht bekannt gegeben wird.

Die durch die Beads aufgezeigten Abweichungen können anhand von gleichbleibenden Wassermatrices überprüft werden. In Abbildung 33 ist ein solcher Vergleich dargestellt. Die Messungen der Beads legen für den betrachteten Zeitraum einen deutlichen, wenngleich temporären Signalabfall nahe.

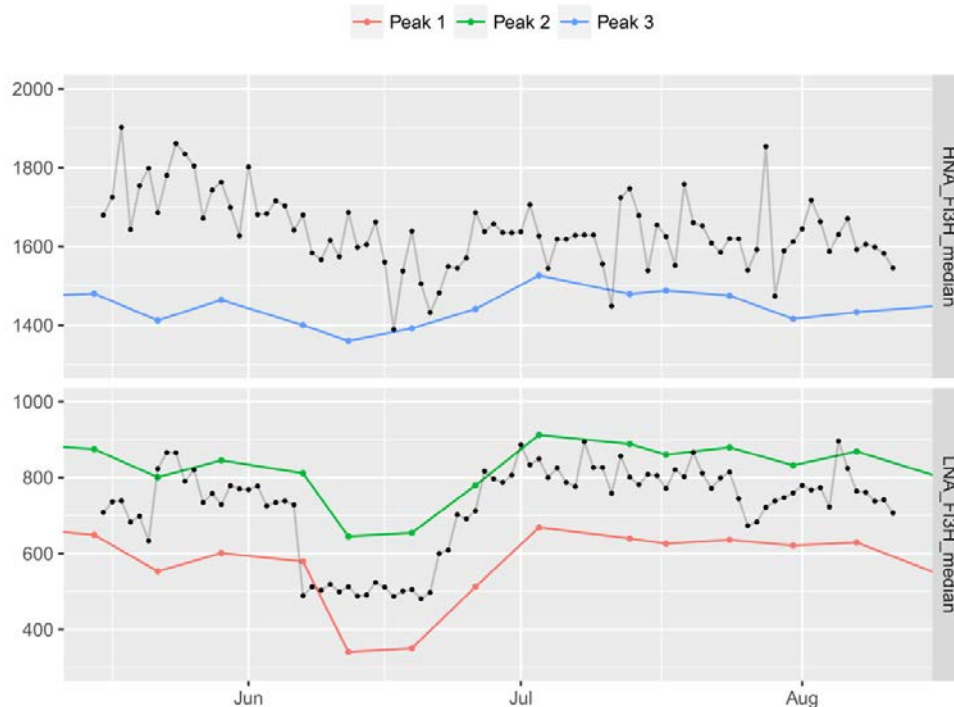


Abbildung 33: Vergleich des Verlaufs der Median-Signalintensität der LNA- und HNA-Zellen einer täglich gemessenen Probe mit jenem der isolierten Beads-Peaks im gleichen Intensitätsbereich.

Die Position der beiden schwächsten Beads-Peaks von FL3-H stimmt mit einem Signalabfall des LNA-Clusters der im Untersuchungszeitraum täglich gemessenen Probe überein. Auch hier ist die Ursache unbekannt. Wesentlich ist aber, dass es sich nicht um eine mikrobiologische Änderung in der untersuchten Ressource, sondern um einen gerätetechnischen Effekt handelt.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen erscheint es durchaus als angebracht diese Signalverschiebungen in einem weiteren Bearbeitungsschritt zu korrigieren. Der Nutzen einer solchen Korrektur beinhaltet neben einer besseren Vergleichbarkeit der TCC-Ergebnisse auch stabilere LNA- bzw. HNA-Anteile. Auch für weitergehende Analysen – wie etwa das Cytometric Fingerprinting –, sind stabile Messsignale unumgänglich. Für die Vereinheitlichung der TCC-Ergebnisse bzw. der HNA-Abtrennung würde eine Anpassung der Gates genügen. Eine Korrektur der Detektionen hat demgegenüber den Vorteil, dass auch für alle weitergehenden Auswertungen ein Ausgleich der Signalschwankungen bzw. -trends erfolgt. Im vorliegenden Projekt wurde dazu ein Ansatz verfolgt, der folgende Schritte umfasst:

- Anpassung einer Glättungsfunktion an die Zeitreihe der isolierten Peaks
- Ableitungen einer gemittelten Position der Peaks für alle Messtage

- Vergleich der Position der Peaks jedes Messtages mit einem Referenzwert (Ausgang der Zeitreihe, Auslieferungszustand) und Ableitung einer Korrekturbeziehung
- Anwendung dieser Korrekturbeziehung für jeden Datensatz des betreffenden Tages

Die bereits beschriebenen 8-Peaks sind für die Korrektur auch deshalb besonders gut geeignet, da ihre Signalpeaks einen weiten Bereich an Signalintensitäten abdecken. Insbesondere dürfte gerade auch der Bereich sehr schwacher Signale, der bei der Abtrennung von Zellsignalen vom Signalhintergrund eine große Rolle spielt, zuverlässig korrigierbar sein.

5.1.3.2 ÜBERPRÜFUNG DER BESTIMMUNG DES PROBENVOLUMENS

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung hat sich gezeigt, dass Messungen mit verschiedenen DFZ-Modellen, aber gerade auch mit verschiedenen Geräten der gleichen Modellreihe, merklich unterschiedliche TCC-Werte ergeben können. Die wahrscheinlichste Ursache – bei sonst unauffälligen Signalverteilungen – ist eine Abweichung bei der Bestimmung des gemessenen Probenvolumens. Beim Wechsel von Geräten sollten daher – wenn möglich – Vergleichsmessungen durchgeführt werden, bei denen eine gleiche Probenvorbereitung gewährleistet sein muss (z.B. Messgebinde). Neben normalen Wasserproben kann zu diesem Zweck auch eine Messung von sogenannten Beads – künstliche, meist fluoreszierende Partikel zur Gerätekontrolle (siehe Abschnitt 5.1.3.1) – dienen, die keine besondere Messvorbereitung erfordern und keinen biologischen Veränderung unterliegen. Falls mehrere DFZ zur Verfügung stehen, können regelmäßige Vergleichsmessungen zwischen beiden Geräten Hinweise auf längerfristige zeitliche Veränderungen geben. Eine weitere Möglichkeit zur längerfristigen Absicherung besteht in der Verwendung von sogenannten Counting-Beads, die dauerhaft (lagerfähig) sind und deren genaue Konzentration vom Hersteller gewährleistet ist.

5.1.3.3 ÜBERPRÜFUNG DES MESSVORGANGS

Das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung besteht in erster Linie aus einer Datenmatrix, in der die Detektionen den Zeilen und die verschiedenen Messparameter (Fluoreszenz- und Streulichtsignal) den Spalten entsprechen. Die Reihenfolge der Zeilen entspricht dabei der zeitlichen Reihenfolge der Detektionen im Messverlauf. Meist wird zusätzlich auch ein Zeitstempel für jede Detektionen als eigene Spalte angelegt (ab fcs-Version 3.0 jedenfalls vorgesehen). Aus diesen Informationen kann jede einzelne Messung in ihrem zeitlichen Verlauf analysiert werden (je nach Einstellung dauert dieser unterschiedlich lang, in der vorliegenden Untersuchung jedoch meist gut 80 Sekunden). So kann nun etwa nachvollzogen werden, ob die Anzahl der detektierten Partikel oder deren mittlere Signalintensität pro Zeitabschnitt (Unterteilung des Messvorgangs in kurze Abschnitte) konstant bleibt. Dies ist in Abbildung 34 anhand von 1 000 zufällig ausgewählten Messungen dargestellt (Zeitabschnitte von einer Sekunde). Dabei wurden die jeweiligen Messungen bzw. die Zeitreihen zur Vergleichbarkeit mit ihrem Mittelwert normalisiert. Im Fall der Anzahl an Detektionen zeigt sich für die Zusammenfassung aller Messungen (rote durchgezogene Linie, Median für den jeweiligen Zeitabschnitt) eine leichte Bogenform mit einem Maximum nach etwa 20 Sekunden Messdauer und zumindest am Ende der Messung ein geringfügig abfallender Trend. Im Fall des Verlaufs des Median von FL1-A (Grün-Fluoreszenz) ist eine solche generelle Abweichung nicht bzw. kaum auszumachen. Einzelne Messungen weisen in beiden Fällen – zumindest zeitweise – deutlich stärkere Abweichungen auf. In beiden Fällen ist die Streuung der Werte am Beginn der Messung erhöht (gestrichelte rote Linien entsprechen dem 5 bzw. 95 % Quantil). Für die Analyse dieser Zeitverläufe ist die Festlegung einer geeigneten Größe der Zeitabschnitte notwendig, um einerseits Messungen mit einer geringen Anzahl an Detektionen erfassen zu können, andererseits eine hohe Auflösung beizubehalten. Fallen etwa zu wenige Detektionen in einen bestimmten Zeitabschnitt, dürften Ausreißer wesentlich häufiger vorkommen.

RESULTATE

Neben den genannten ist auch die Betrachtung von extremen – gering wie stark – Signalintensitäten aufschlussreich. Beispielsweise erreichen einzelne Detektionen die maximal auflösbare Signalintensität, d.h., dass hier lediglich die Aussage getroffen werden kann, dass die Signalintensität zumindest so stark oder eben stärker ist. Im Zuge der Untersuchungen wurde festgestellt, dass Luftblasen ein solch starkes Signal auf den Streulichtkanälen erzeugen kann.

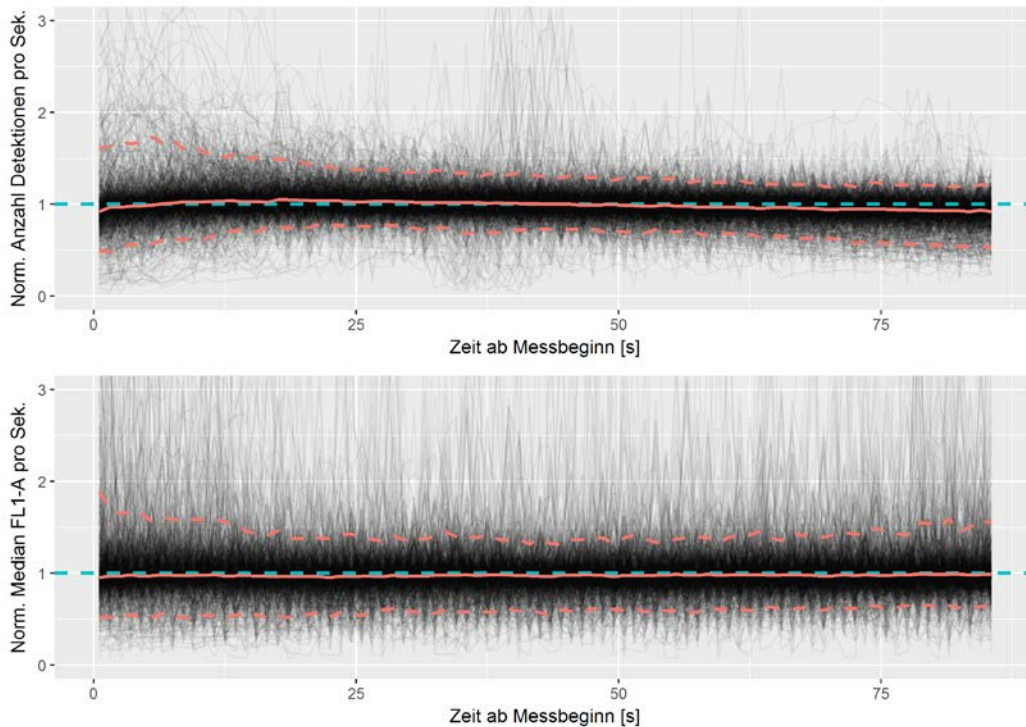


Abbildung 34: Darstellung des zeitlichen Messverlaufs für 1 000 zufällig ausgewählte Messungen der durchgeführten Messkampagne. Sowohl die Anzahl der Detektionen als auch der Median von FL1-A (Zeitabschnitte von einer Sekunde) wurden mit dem Mittelwert der jeweiligen Messung normalisiert. Die rote Linie (durchgezogen) entspricht dem Median der sekundlichen Zeitabschnitte, die rot gestrichelten Linien dem 5 bzw. 95 % Quantil

Der mögliche Einfluss der eingestellten Durchflussrate („flow rate“) auf das Messergebnis und den Messverlauf wurde anhand von mehreren Versuchsreihen getestet (siehe auch Abschnitt 5.1.2.7.4). In Abbildung 35 sind die Ergebnisse von drei Versuchsreihen zu sehen. Dabei wurden je 50 µl Probe gemessen, entsprechend der unterschiedlichen Durchflussrate dauerte eine Messung zwischen 45 und 225 Sekunden. Durch die einheitliche Einteilung in Zeitabschnitte von je einer Sekunde ist die Anzahl der Detektionen bei höherer Durchflussrate erhöht (nicht normalisiert). Für die erste Serie zeigt sich eine Störung des Verlaufs nach etwa 40 Sekunden (die sich auch im hier nicht dargestellten Verlauf des Median von FL1-A zeigt), dessen Ursache nicht bekannt ist. Davon abgesehen sind die Verläufe sehr einheitlich und weisen eine geringfügig abfallende zeitliche Tendenz auf. Insbesondere kann nicht von einem unstetere Verlauf bei höherem Probendurchsatz ausgegangen werden (der Variationskoeffizient ist sogar etwas geringer), womit einer Verwendung auch in dieser Hinsicht nichts entgegenzuhalten ist (vergleiche Abschnitt 5.1.2.7.4).

RESULTATE

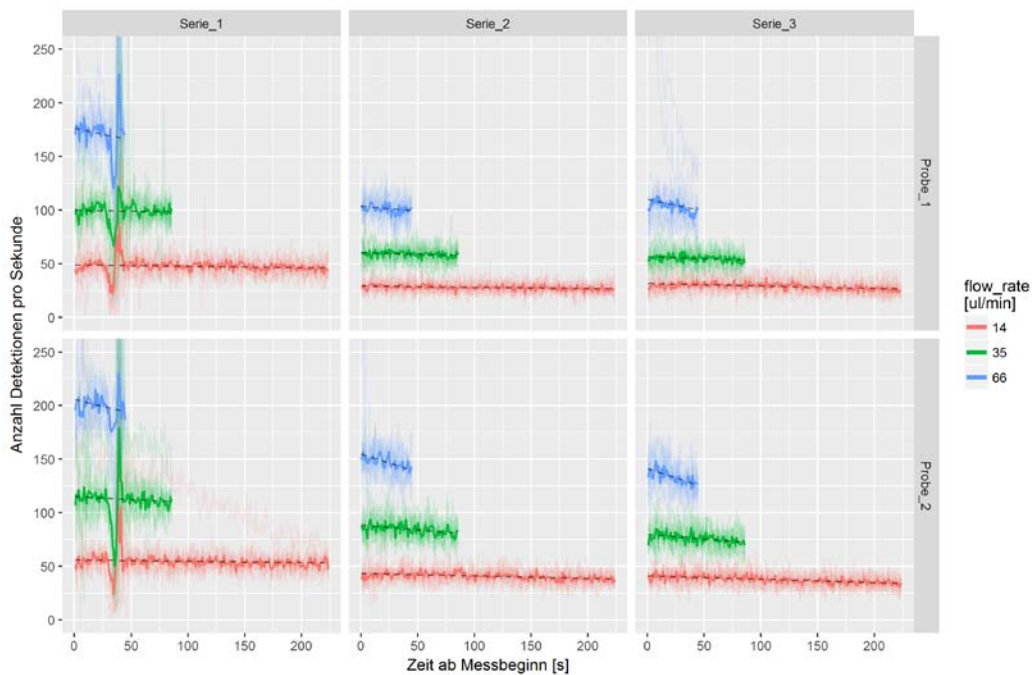


Abbildung 35: Darstellung des zeitlichen Messverlaufs der Anzahl der Detektionen (Zeitabschnitte von einer Sekunde) für Messungen mit unterschiedlicher Durchflussrate. Insgesamt erfolgten drei unabhängige Wiederholungen des Experiments auf je einer 96er-Mikrotiterplatte (in Summe je 72 Messungen) mit zwei unterschiedlichen Proben. Die stärkere farbige Linie entspricht dem Median der sekundlichen Zeitabschnitte, die gestrichelte Linie einer (robusten) linearen Regression.

Die nun folgenden Darstellungen basieren auf der Anwendung des R-Pakets „flowAI“ (Monaco u. a. 2016) zur Ermittlung bzw. Entfernung auffälliger Detektionen bzw. Abschnitte im Messverlauf. Dabei erfolgt die Berücksichtigung der oben schon angesprochenen Charakteristika einer Messung anhand der Kriterien: Änderung in der Anzahl der detektierten Partikel („flow rate“), Instabilitäten im Signalverlauf („signal acquisition“) und extreme Detektionen („dynamic range“). Erstgenanntes kann auf Schwankungen des Durchflusses durch die Messzelle zurückgeführt werden. Im Fall des instabilen Signalverlaufs (aller oder einer Auswahl an Parametern) gelten Schwankungen des Durchflusses ebenfalls als häufige Ursache, daneben werden Schwankungen der Laserleistung genannt. Für beides wäre als Ursache aber wohl ebenso eine inhomogene (schlecht durchmischte) Probe zusätzlich vorstellbar. Idealerweise sollte für alle Charakteristika ein stabiler, trendfreier Verlauf vorliegen. Das Paket ermöglicht neben einer visuellen Analyse einzelner Messungen auch die automatische Analyse (Ausreißer-Detektionsmethoden). Für die Auswertungen (automatische Detektion) wurden die Default-Einstellungen beibehalten (u.a. Zeitabschnitte von einer Zehntelsekunde).

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der automatischen Analyse von 4 720 Messungen der durchgeführten Messkampagne zu sehen. Die meisten auffälligen Detektionen werden nach dem Kriterium „flow rate“ ermittelt, die wenigsten nach dem Kriterium „dynamic range“. Am Ende des Untersuchungszeitraums besteht eine auffällige Häufung von Messungen mit einer hohen Anzahl an auffälligen Detektionen. Dies kann u.U. mit einem sich anbahnenden Defekt des verwendeten Geräts erklärt werden (Reparatur aufgrund von Flüssigkeitsaustritt im Messsystem).

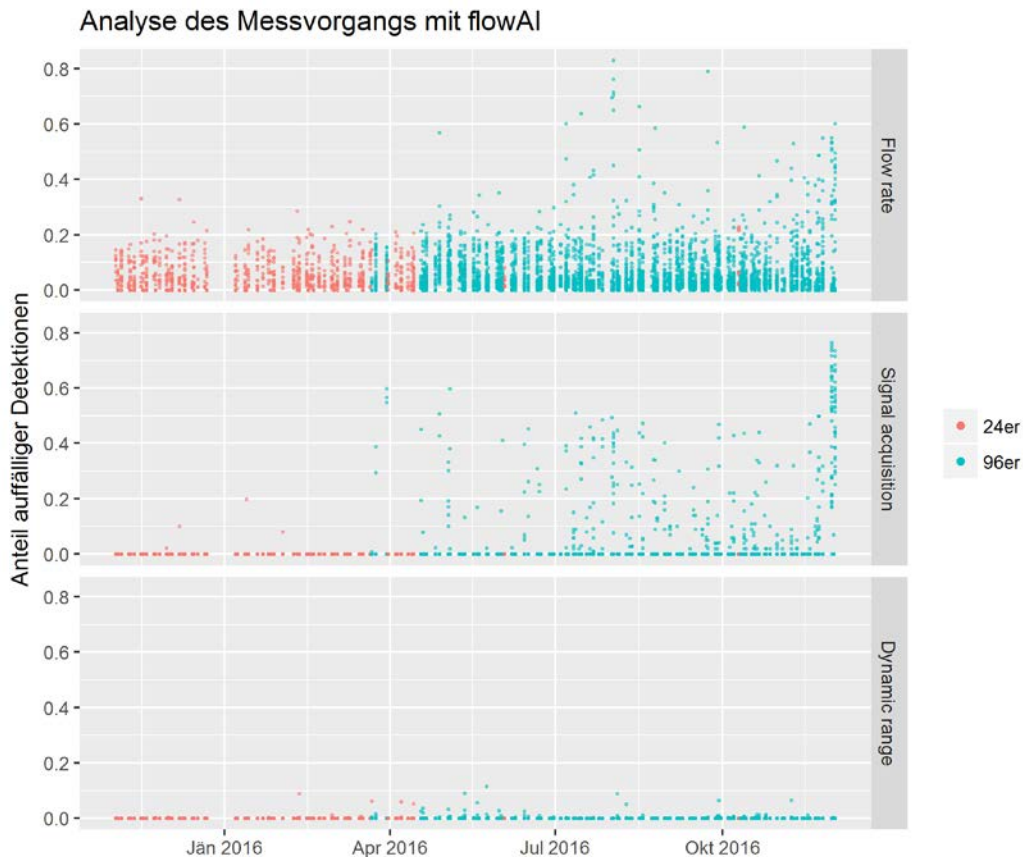


Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf des Anteils auffälliger Detektionen unterteilt nach drei Kriterien für 4 720 DFZ-Messungen (Farbstoff SG1, Zeitabschnitte von einer Zehntelsekunde) unterschiedlicher Proben im Rahmen der durchgeführten Messkampagne

In der Gegenüberstellung der Gesamtanzahl an Detektionen und des Anteils auffälliger Detektionen (Abbildung 37) erscheinen im Fall des Kriteriums „signal acquisition“ jene Messungen mit hoher Anzahl an Gesamtdetektionen auffällig, wobei anzumerken ist, dass die Detektionsrate für diese Messungen noch unter der vom Hersteller genannten maximalen Rate liegt. Zur gut erkennbaren Gruppenbildung im Fall der „flow rate“ besteht derzeit noch keine Hypothese, es ist aber nicht auszuschließen, dass hier Spezifika der Detektionsalgorithmen bzw. die Größe der gewählten Zeitabschnitte verantwortlich sind.

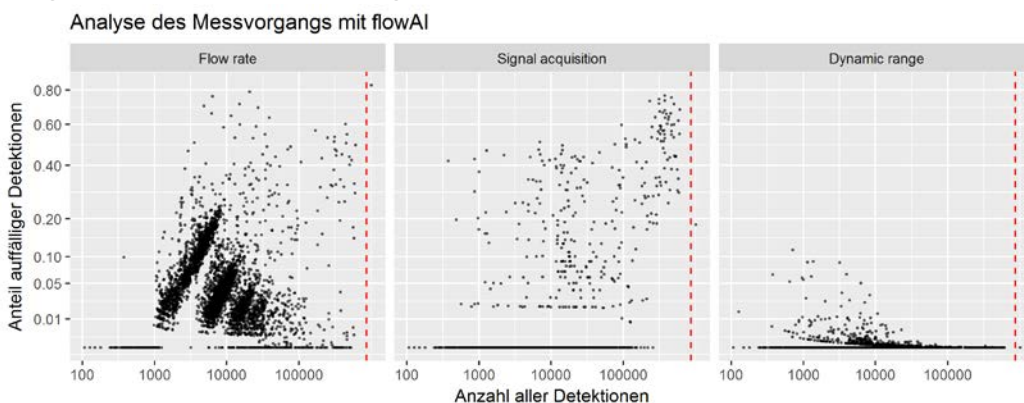


Abbildung 37: Gegenüberstellung der Gesamtanzahl an Detektionen und des Anteils auffälliger Detektionen unterteilt nach drei Kriterien (4 720 DFZ-Messungen, Farbstoff SG1, Zeitabschnitte von einer Zehntelsekunde). Die

RESULTATE

gestrichelte rote Linie entspricht der vom Hersteller angegebenen maximalen Detektionsrate bei einer durchschnittlichen Messdauer von 87 Sekunden

Abbildung 38 stellt den zeitlichen Messverlauf jener Messung mit dem höchsten ausgewiesenen Anteil an auffälligen Detektionen nach dem Kriterium „flow rate“ dar. Die Anzahl der Detektionen (Unterteilung der Gesamtmessdauer in Zehntelsekunden-Abschnitte) weist einen Verlauf auf, der zwischen zwei Niveaus pendelt. Im Fall dieser Messung wurde die vom Hersteller empfohlene maximale Detektionsrate überschritten, d.h. die Abstände zwischen einzelnen Detektion sind zu gering. Die Zuschreibung einer Auffälligkeit („schlecht“) ist hier als wenig aussagekräftig zu bezeichnen, nichtsdestoweniger weist das Ergebnis der automatischen Analyse auf eine auffällige Messung hin. Interessant ist hier zudem, dass der Verlauf des Median der Signalintensität von FL1-A keine vergleichbare Auffälligkeit zeigt.

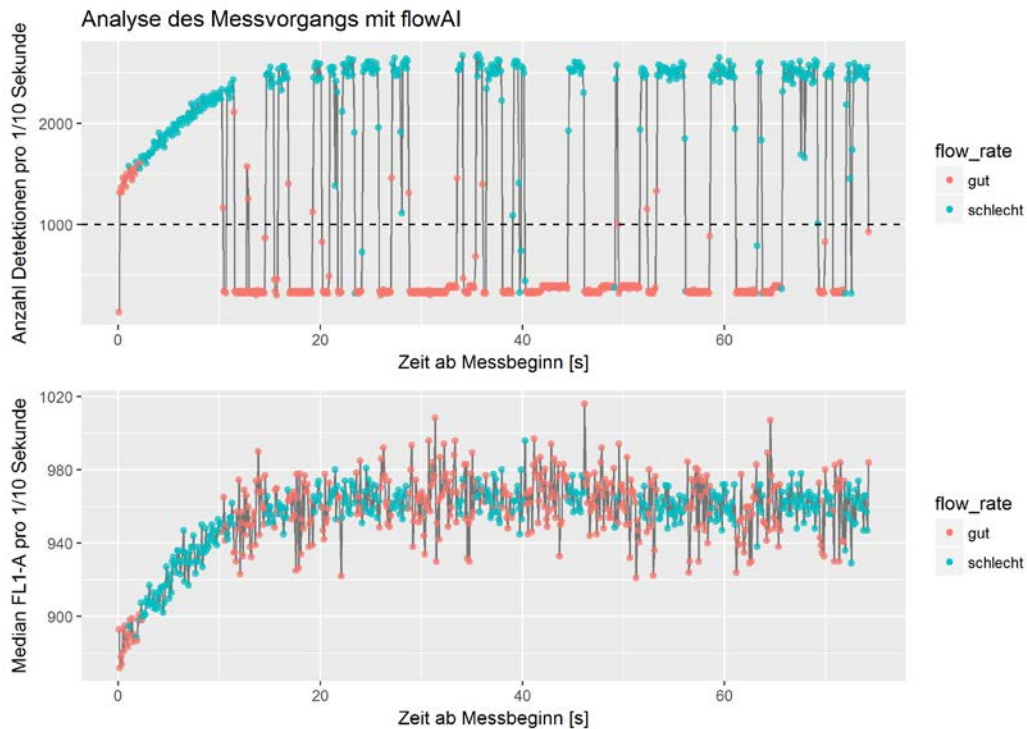


Abbildung 38: Darstellung des zeitlichen Messverlaufs (Anzahl der Detektionen und Median von FL1-A für Zeitabschnitte von einer Zehntelsekunde) jener Messung mit dem höchsten ausgewiesenen Anteil an auffälligen Detektionen nach dem Kriterium „flow rate“. Die gestrichelte Linie im oberen Teil der Abbildung stellt die vom Hersteller angegebene maximale Detektionsrate dar

Abbildung 39 stellt den zeitlichen Messverlauf jener Messung mit dem höchsten ausgewiesenen Anteil an auffälligen Detektionen nach dem Kriterium „signal acquisition“ dar. Die Ursache ist anhand des Median der Signalintensität von FL1-A zu erkennen, der einer steten Zunahme unterliegt. Lediglich ein kurzer Abschnitt am Beginn der Messung wird als „stabil“ eingestuft. Der Verlauf der Anzahl der Detektionen wird hingegen trotz beträchtlicher Unterschiede im Zeitverlauf nicht als auffällig bewertet.

RESULTATE



Abbildung 39: Darstellung des zeitlichen Messverlaufs (Anzahl der Detektionen und Median von FL1-A für Zeitabschnitte von einer Zehntelsekunde) jener Messung mit dem höchsten ausgewiesenen Anteil an auffälligen Detektionen nach dem Kriterium „signal acquisition“. Die gestrichelte Linie im oberen Teil der Abbildung stellt die vom Hersteller angegebene maximale Detektionsrate dar

Die in Abbildung 39 dargestellte Zunahme ist in Abbildung 40 in der Form von Dichteverteilung des Parameters FL1-A für lediglich vier Zeitabschnitte unterteilt nach Detektionen des Signalhintergrunds bzw. Zelldetektionen umgesetzt. Die besagte Zunahme lässt sich auf die Zunahme der Signalintensität des Signalhintergrunds zurückführen. Demgegenüber nimmt die Signalintensität der Zellen in diesem Beispiel interessanterweise sogar ab. Da die Anzahl der Detektionen des Signalhintergrundes deutlich überwiegt, kommt es insgesamt zu einer Zunahme der Signalintensität im Zeitverlauf der Messung.

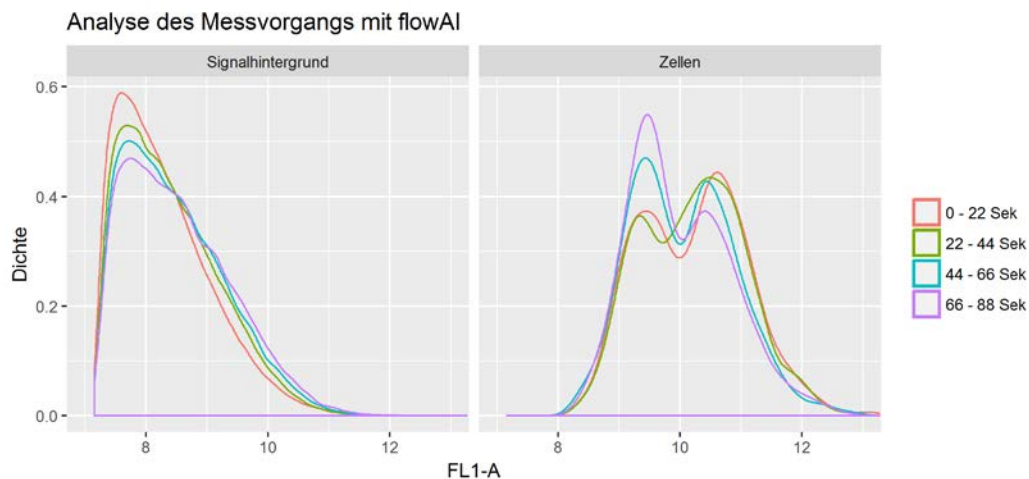


Abbildung 40: Darstellung der Dichte von FL1-A für vier Zeitabschnitte von je 22 Sekunden jener Messung mit dem höchsten ausgewiesenen Anteil an auffälligen Detektionen nach dem Kriterium „signal acquisition“ unterteilt nach Detektionen des Signalhintergrunds bzw. Zell-Detektionen

Die hier dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass zumindest in einzelnen Fällen mit einem auffälligen Messverlauf zu rechnen ist. Diese Aussage ist nicht spezifisch für die vorliegende Untersuchung, denn wie eine Studie basierend auf knapp 30 000 öffentlich zugänglichen durchflusszytometrischen Datensätzen

ermittelt hat, weisen über 13,7 % der Messungen Auffälligkeiten auf (Fletez-Brant u. a. 2016). Die Anwendung der Funktionalitäten des Pakets „flowAI“ ist als vielversprechend zu bezeichnen, wenngleich weitergehende Untersuchungen bzw. Optimierungen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Der in Abbildung 39 dargestellte Verlauf der Anzahl der Detektionen – hier hat der Algorithmus keine Auffälligkeiten festgestellt – deutet auch darauf hin, dass Verbesserungen durchaus lohnend sein könnten. Gerade auch die im Zuge der Untersuchungen festgestellte Abhängigkeit der Ergebnisse – mit der Ausnahme des Kriteriums „dynamic range“ (Extremwerte) – von der Größe der gewählten Zeitabschnitte gemahnt zur Vorsicht. Der Nutzen einer Anwendung besteht neben dem möglichen Erkennen von gerätetechnischen Problem, dem Verwerfen von Messungen schlechter Qualität insbesondere in der automatischen Verbesserung von Messergebnissen durch das Entfernen von auffälligen Anteilen. Letzteres erfordert aber jedenfalls die genaue Analyse der Auswirkungen etwa unter Heranziehung von Zeitreihen von Messungen einer als stabil zu bezeichnenden Wasserressource.

5.1.3.4 VARIATION DER ERGEBNISSE BEI MEHRFACHBESTIMMUNGEN

Für die Bestimmung der Variation der Ergebnisse für Mehrfachbestimmungen bei gleicher Probenvorbereitung steht eine große Anzahl an Datensätzen zur Verfügung, da bei der Messung mit Mikrotiterplatten im 96er-Format grundsätzlich eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Als Ursache für die Variation kommen mehrere Punkte in Frage. So ist denkbar, dass bei der Pipettierung von Probe und Farbstoff Abweichungen entstehen, insbesondere bei unvollständiger Durchmischung letzterer. Im Zuge der Messung im DFZ sind gleichfalls Variationen verschiedenster Herkunft zu erwarten – etwa bei der Bestimmung des Probenvolumens oder auch sogenannte Carry-Over-Effekte (Partikel-Übertrag von einer vorhergehenden Messung), um nur einige zu nennen.

Abbildung 41 zeigt eine Gegenüberstellung der Variationskoeffizienten mit und ohne automatischem Zwischenwaschschritt. Die Werte basieren auf einer großen Anzahl von im vorliegenden Projekt mit SG1 gefärbten Wasserproben und enthalten Werte zweier baugleicher Accuri® C6. Nur Proben mit mehr als 1 000 Zellen pro ml wurden einbezogen, dies entspricht bei den gewählten Einstellungen etwa 50 Detektionen im Signalfeld der Zellen.

Im Fall des TCC und bei Verzicht auf Waschzyklen beträgt der Median des Variationskoeffizienten 0,0244 und jener bei Aktivierung von Waschzyklen 0,0204. Ein Welch-Test (H_0 : gleiche Mittelwerte) unter Verwendung des logarithmierten Variationskoeffizienten ergibt einen p-Wert kleiner $2,2 \cdot 10^{-16}$ und ist damit zu einem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant. Die jeweiligen 90 %-Quantile betragen 0,0966 bzw. 0,0640. D.h. auch bei Verzicht auf Zwischenwaschschritte sind 90 % der Variationskoeffizienten kleiner als 0,1.

Im Fall der mittleren Fluoreszenzintensität der Zelldetektionen auf FL1-A beträgt der Median 0,0277 (ohne Waschzyklen) und 0,0257 (mit Waschzyklen). Auch hier ergibt der Welch-Test signifikante Mittelwertunterschiede ($p=1,75 \cdot 10^{-5}$).

Abbildung 42 zeigt die Abhängigkeit des Variationskoeffizienten der TCC von der TCC der Probe (Datensatz entspricht jenem von Abbildung 41). Im Bereich geringer TCC ist der Variationskoeffizient erhöht und bei etwa 10^5 Zellen erreicht er ein Minimum. Die anfänglich höheren Werte entsprechen den Angaben des Herstellers zum Detektionslimit des Geräts. Der Carry-Over von Partikeln dürfte gerade auch bei extremeren TCC-Werten eine besonders große Rolle spielen, da Vorgänger meist eine deutlich höhere oder geringere TCC aufweisen (siehe Abschnitt 5.1.3.4.1).

Die vorliegenden Daten zeigen also, dass die Verwendung von automatischen Zwischenwaschschritten die Variation der Dreifachbestimmungen etwas verringert. Wie in den folgenden Abschnitten noch dargelegt wird, ist der schon genannte Carry-Over eine wesentliche Quelle dieser Variation (Abbildung 47).

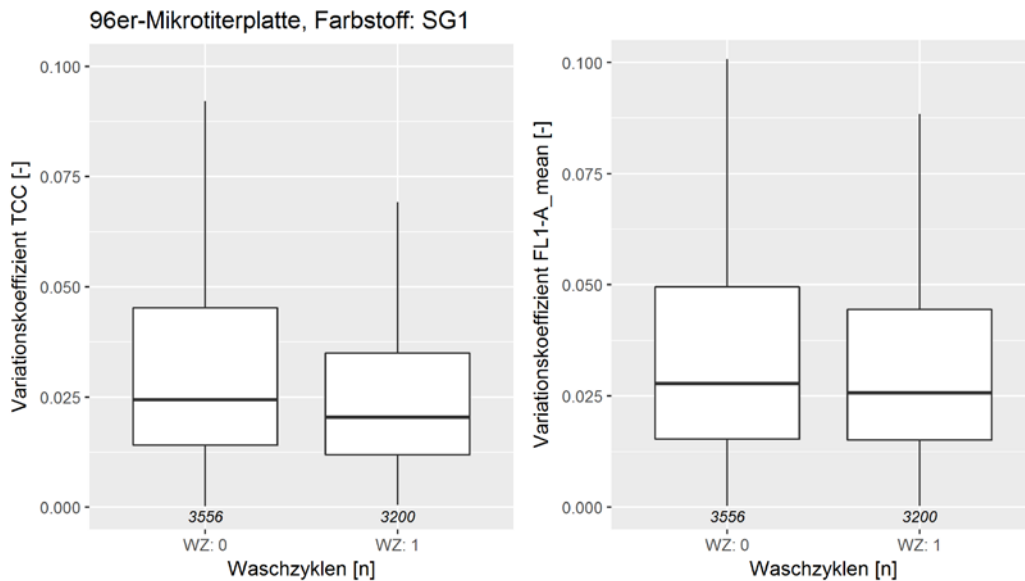


Abbildung 41: Variationskoeffizient (links: TCC; rechts: mittlere Fluoreszenzintensität der Zelldetektionen auf FL1-A) von Dreifachbestimmungen (Accuri® C6, automatischer Messmodus) mit und ohne automatischem Zwischenwaschschritt.

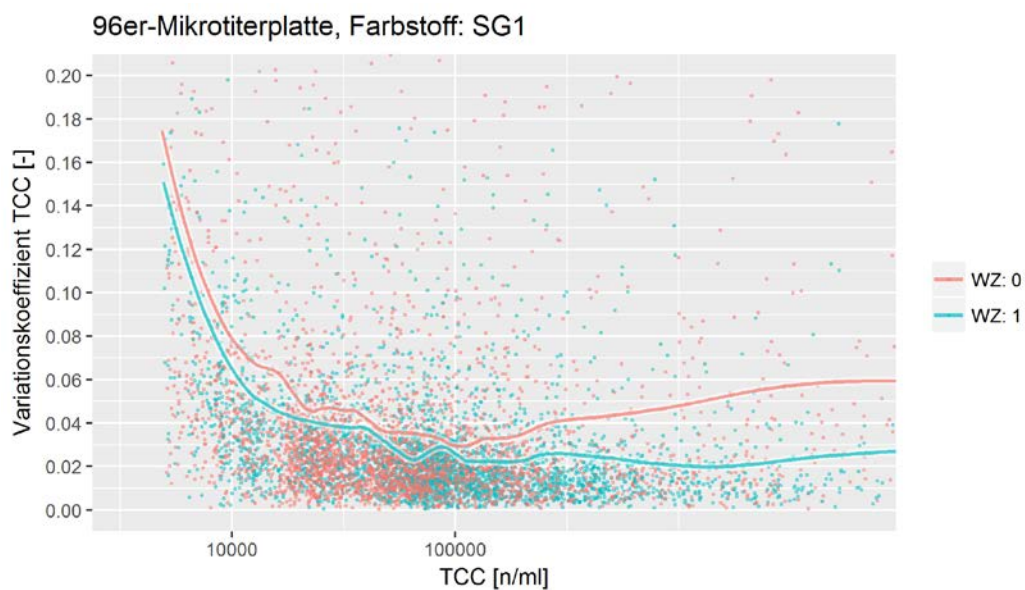


Abbildung 42: Darstellung der TCC der ersten Messung einer Dreifachbestimmung von gefärbten Wasserproben (Accuri® C6, automatischer Messmodus) und des Variationskoeffizienten der Dreifachbestimmung. Die Linien sind Resultat einer lokalen, polynomialen Kernel-Regression (R-Funktion „loess“). Nur Proben mit mehr als 1 000 Zellen pro ml wurden einbezogen.

5.1.3.4.1 CARRY-OVER

Mit dem Begriff „Carry-Over“ oder „Cross-Well Contamination“ ist der unerwünschte Übertrag von Rückständen aus einer vorangehenden Messung auf die nachfolgende angesprochen. Im Handbuch zur Benutzung des Accuri® C6 mit Autosampler ist die Rede von einer Reduktion des angesprochen Übertrags bei Aktivierung eines automatischen Waschzyklus zur Reinigung des „Sample Injection Port“ (SIP) auf weniger als 1 % (BD Biosciences 2012). Die zweifache Ausführung des Waschzyklus – bis zu drei sind möglich – sorgt für eine weitergehende Reduktion auf weniger als 0,1 %. Die Ausführung eines Zyklus benötigt allerdings etwa 30 Sekunden.

Durch den Verzicht auf die genannte Zwischenreinigung lässt sich in Summe also relativ viel Zeit einsparen. Es stellt sich nun also etwa die Frage, ob die genannten Zahlenwerte auch bei Proben mit geringer TCC zutreffen bzw. mit welcher Größenordnung an Übertrag gerechnet werden muss, wenn keine Zwischenreinigung aktiviert ist.

Die nachfolgend (Abschnitt 5.1.3.4.1.1 und 5.1.3.4.1.2) beschriebenen Untersuchungen beziehen sich auf ein gemessenes Probenvolumen von 50 µl. Der (relative) Übertrag von Partikeln oder Farbstoff könnte durch diese Einstellung durchaus beeinflusst werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da für alle Proben im Messprogramm das genannte Volumen eingestellt wurde.

5.1.3.4.1.1 CARRY-OVER VON PARTIKELN

Im Zuge der Untersuchung hat sich gezeigt, dass die schon genannten Carry-Over-Effekte im Sinne einer Übertragung von Partikeln bzw. Zellen von einer Messung auf die nächste durchaus beobachtet werden können.

In der folgenden Abbildung 43 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe dargelegt, bei der als Startmessung eine Probe mit sehr hohen TCC (Oberflächenwasser, Färbung mit SG1) gewählt wurde. Nachfolgenden wurden zwei Messungen von Reinstwasser platziert, dessen TCC gegen null geht. Falls kein automatischer Waschschrift zwischen den Messungen aktiviert wurde, entspricht der Übertrag etwa einem Hundertstel der TCC der vorhergehenden Messung. Im Fall einer Zwischenreinigung sinkt dieser Wert auf weniger als ein Zweihundertstel. Für die weiteren Messungen von Reinstwasser sind kaum noch Zellen nachweisbar.

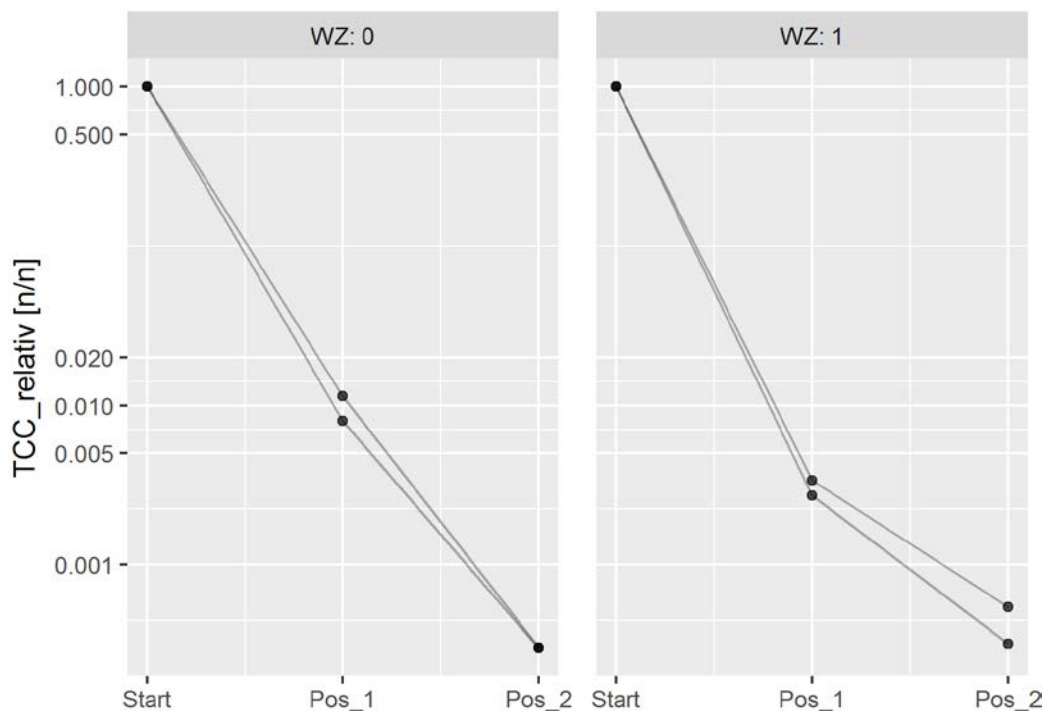


Abbildung 43: Test zur Effektivität von automatischen Waschzyklen (WZ) hinsichtlich der Verminderung von Carry-Over. Die TCC beziehen sich dabei auf den Start-Wert (ca. $4,35 \cdot 10^6$ Zellen pro ml) einer mit SG1 gefärbten Probe.

Die Analyse einer über längere Zeiträume ermittelten großen Anzahl von Messungen von Reinstwasser, die zum Zweck der Reinigung zwischen Messungen gefärbter Wasserproben gesetzt wurden, sollte ein zuverlässiges Resultat zur Frage des durchschnittlichen Carry-Over liefern.

In Abbildung 44 ist ein Vergleich zwischen verschiedenen Messgebinden für den Accuri® C6 ohne Verwendung automatischer Zwischenwaschschritte dargestellt. Die Proben entstammen der bereits beschriebenen Messkampagne. Interessanterweise ist der Übertrag bei Verwendung von 3-ml-Tubes (24er-Format) bei ansonsten gleichen Einstellungen geringer als bei Verwendung von 96er-Mikrotiterplatten und beträgt 0,5 % (Median). Die Ursache für dieses Verhalten ist dabei nicht klar, jedenfalls dürfte es nicht von der zu Grunde liegenden Stichprobe herrühren (vergleiche auch Abbildung 45).

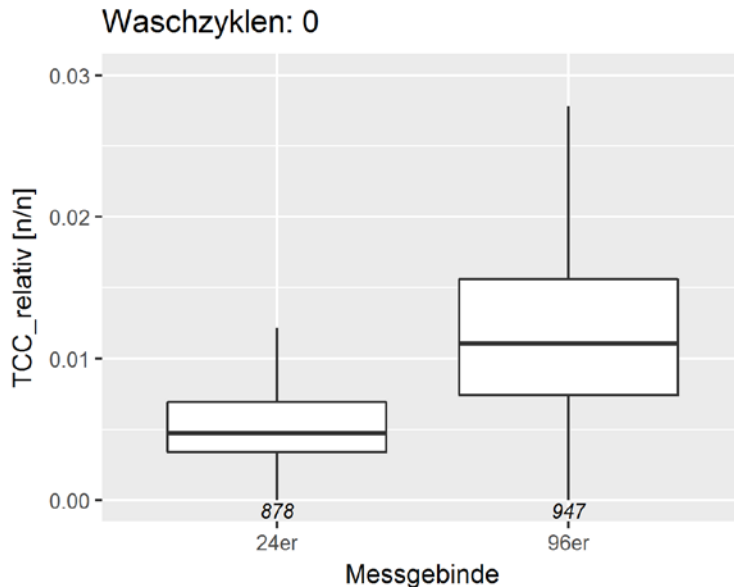


Abbildung 44: Auswertung von Messungen von Reinstwasser (Accuri® C6, automatischer Messmodus), die nach gefärbten Proben durchgeführt wurden, mit Unterscheidung nach Messgebinde mit Angabe der Stichprobengröße. TCC_relativ bezeichnet das Verhältnis von Zelldetektionen im Reinstwasser und jenen der vorangehenden Probe. Es wurde kein automatischer Zwischenwaschschritt gesetzt.

Die Abhängigkeit des relativen Übertrags von der absoluten TCC ist nicht besonders ausgeprägt, wie in Abbildung 45 dargestellt, wobei der relative Übertrag bei sehr geringer TCC hoch ist und sich mit zunehmender TCC bei leicht abfallender Tendenz stabilisiert. Das Verhalten bei sehr geringen TCC ist durch eine mögliche „Grundkontamination“ erklärbar, denn schon einzelne Detektionen im Signalbereich der Zellen beeinflussen hier das Ergebnis (relativer Übertrag) maßgeblich.

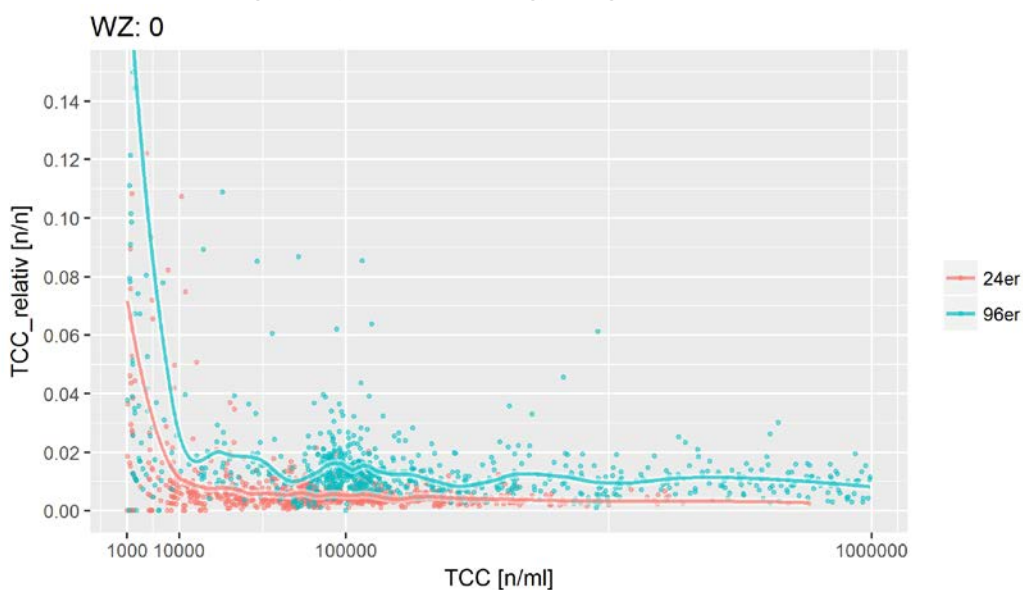


Abbildung 45: Darstellung der absoluten TCC einer Messung von gefärbten Wasserproben (Accuri® C6, automatischer Messmodus) und des Carry-Over (ausgedrückt als Verhältnis zur TCC der Probe) auf die

RESULTATE

nachfolgende Messung von Reinstwasser. Die Linien sind Resultat einer lokalen, polynomialen Kernel-Regression (R-Funktion „loess“). Nur Proben mit mehr als 1 000 Zellen pro ml wurden einbezogen.

Es zeigt sich, dass bei Verwendung eines Waschzyklus der Übertrag von Partikeln wesentlich sinkt, wie in Abbildung 46 dargestellt. Diese Vorgehensweise wird auch von den Herstellern empfohlen.

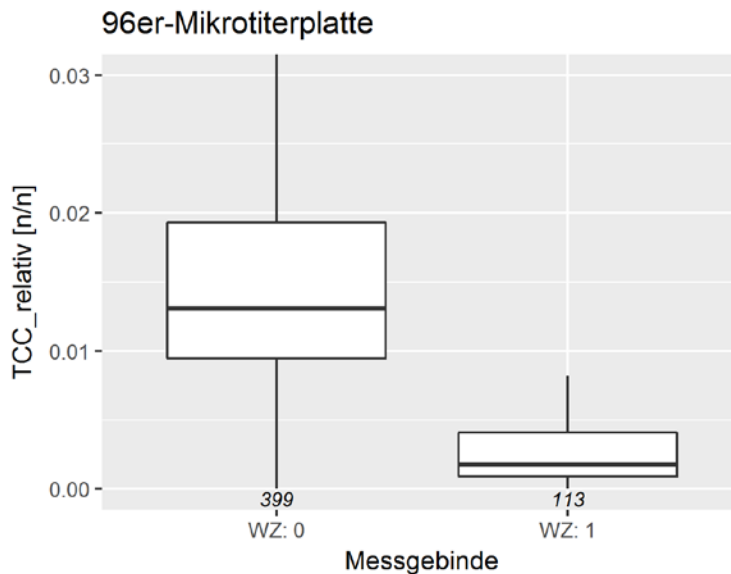


Abbildung 46: Auswertung von Messungen von Reinstwasser (Accuri® C6, automatischer Messmodus), die nach gefärbten Proben durchgeführt wurden, mit und ohne automatischem Zwischenwaschschritt. TCC_relativ bezeichnet das Verhältnis von Zelldetektionen im Reinstwasser und jenen der vorangehenden Probe.

Carry-Over hat immer dann negative Effekte, wenn unterschiedliche Proben nacheinander gemessen werden. Falls die vorhergehende Messung wesentlich mehr Zellen enthält, wird die Verfälschung des TCC-Ergebnisses der nachfolgenden Messung besonders stark ausfallen. Daneben können für eine bestimmte Probe sehr untypische Zell-Populationen übertragen werden, die im Falle von detaillierter Auswertung der Messungen berücksichtigt werden müssen. Falls die gleiche Probe nacheinander gemessen wird, ist letztgenanntes Problem nicht zu befürchten.

Wie beschrieben, ist mit Carry-Over von Partikeln zu rechnen. Die erste Messung einer Dreifachbestimmung einer Probe sollte daher, je nach TCC der vorangegangenen Messung, eine durchschnittlich etwas höhere Abweichung von den anderen Messungen aufweisen. In Abbildung 47 ist das Verhältnis der ersten zu den anderen Messungen einer Dreifachbestimmung gruppiert nach dem Verhältnis der ersten zu der vorhergehenden Messung sowie der Anwendung von automatischen Waschzyklen dargestellt. Der Grenzwert von 0,2 entspricht der Trennung an einem Dichteminimum der Verteilung des betreffenden Werts. Werte kleiner diesem Grenzwert umfassen insbesondere auch Reinstwasser-Messungen (zur Zwischenreinigung).

Es zeigt sich nun tatsächlich, dass im Falle des Ausbleibens von automatischen Zwischenwaschschritten die erste Messung im Fall einer „sauberen“ vorangegangenen Messung vergleichsweise etwas niedriger ist. Der Welch-Test (H_0 : gleiche Mittelwerte) unter Verwendung des logarithmierten Verhältnisses der TCC der ersten Messung und dem Mittelwert aus der zweiten und dritten Messung ergibt einen p-Wert von 0,0004 und ist damit zu einem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant. Bei der Anwendung von Zwischenwaschschritten hingegen ist kein Unterschied zu erkennen und der genannte Test behält die H_0 bei. Auch letzteres stimmt mit den bisher dargestellten Ergebnissen überein, da durch Zwischenwaschschritte der Carry-Over von Partikeln deutlich verringert wird.

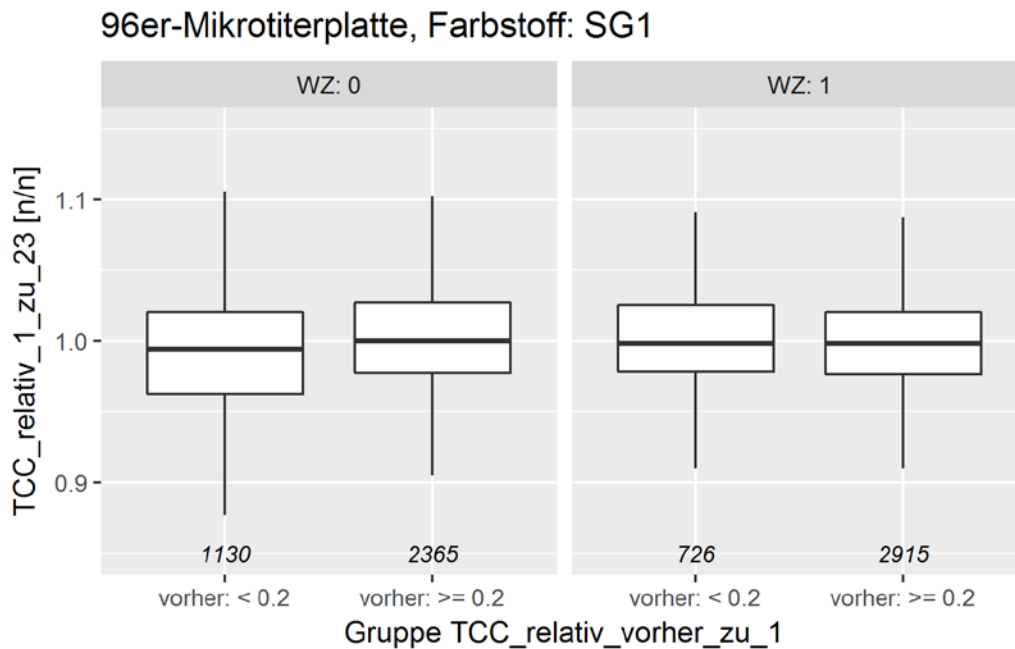


Abbildung 47: Auswertung der ersten Messung einer Dreifachbestimmung (Accuri® C6, automatischer Messmodus) gruppiert nach dem TCC-Verhältnis zur vorangehenden Messung mit und ohne automatischem Zwischenwaschschritt. TCC_relativ_vorher_zu_1 bezeichnet das Verhältnis von Zelldetektionen der vorhergehenden Messung zu jenen in der ersten Messung der Dreifachbestimmung. TCC_relativ_1_zu_23 bezeichnet das Verhältnis von Zelldetektionen der ersten Messung der Dreifachbestimmung zum Mittel der zweiten und dritten Messung.

Prinzipiell ließe sich auf Basis von Abbildung 47 auch spekulieren, dass es zu einer Verdünnung der ersten Probe der Dreifachbestimmung im Fall des „sauberen“ Vorgängers kommt. D.h. es werden nicht nur an Geräteteilen anhaftende Partikel übertragen, sondern auch Flüssigkeit (Tropfenbildung) der Vorgängermessung. Im vorliegenden Projekt wurden keine systematischen Untersuchungen hierzu gemacht. Im Fall des Cube-6-DFZ lässt sich bei Einzelmessung allerdings eine Tropfenbildung an der Probenaufnahme (SIP) beobachten. D.h. bei aufeinanderfolgenden Messung wird ein Tropfen in die jeweils folgende übertragen. Aus diesem Grund lässt sich auch nicht ohne weiteres ableiten, welche Messung einer Dreifachbestimmung die tatsächliche TCC am besten repräsentiert. So ist es durchaus auch möglich, dass dies jene Messungen sind, die ein Carry-Over aus der gleichen Probe enthalten.

5.1.3.4.1.2 CARRY-OVER VON FARBSTOFF

Der Begriff Carry-Over beschreibt einen Übertrag. Neben dem schon dargelegten Übertrag von Partikeln (Zellen) kann es auch zu einem Übertrag von Farbstoff kommen. Die folgenden Darstellungen, Abbildung 48 und Abbildung 49, zeigen die Ergebnisse von Versuchen mit dem Accuri® C6 unter Verwendung von Mikrotiterplatten im 96er-Format und automatischer Probenabarbeitung. Vor den Versuchsreihen wurde das Gerät besonders gründlich gereinigt. Ansonsten wurden normale Messeinstellungen gewählt.

In Abbildung 48 ist zu sehen, dass die ungefärbte Uferfiltrat-Probe keine Detektionen im Signalbereich der TCC auf Basis der SG1-Färbung aufweist – damit sollte keine nennenswerte Autofluoreszenz vorliegen. Die erste Messung von Reinstwasser mit SG1 ist dann gegenüber den nachfolgenden deutlich erhöht, da wohl Zellen aus der vorhergehenden ungefärbten Probe übertragen und sehr schnell angefärbt werden. Die erste Messung der Uferfiltrat-Probe nach den mit SG1 versetzten Reinstwasserproben zeigt eine sehr hohe TCC, die bereits in einer üblichen Größenordnung für diese Probennahmestelle liegt. Da es sich nicht um Autofluoreszenz handeln kann, liegt der Schluss nahe, dass lediglich der Übertrag von Farbstoff als Erklärung in Frage kommt. Da nicht davon auszugehen ist, dass dieser Übertrag quantitativ in auch nur annähernd vergleichbarem Maße wie eine normale Farbstoffzugabe stattfindet, lässt dies auf eine schon in

geringer Konzentration hoch wirksame und schnelle – die Messdauer beträgt etwa 87 Sekunden – Anfärbung schließen. Darüber hinaus ist der Übertrag auch noch einige Messungen später wirksam, wenngleich die TCC der Uferfiltrat-Probe abnimmt. Die darauf folgende Wiederholung der Abfolge von gefärbtem Reinstwasser und Uferfiltrat-Probe bei Aktivierung von automatischen Waschzyklen zwischen den Messungen ergibt kein unterschiedliches Resultat.

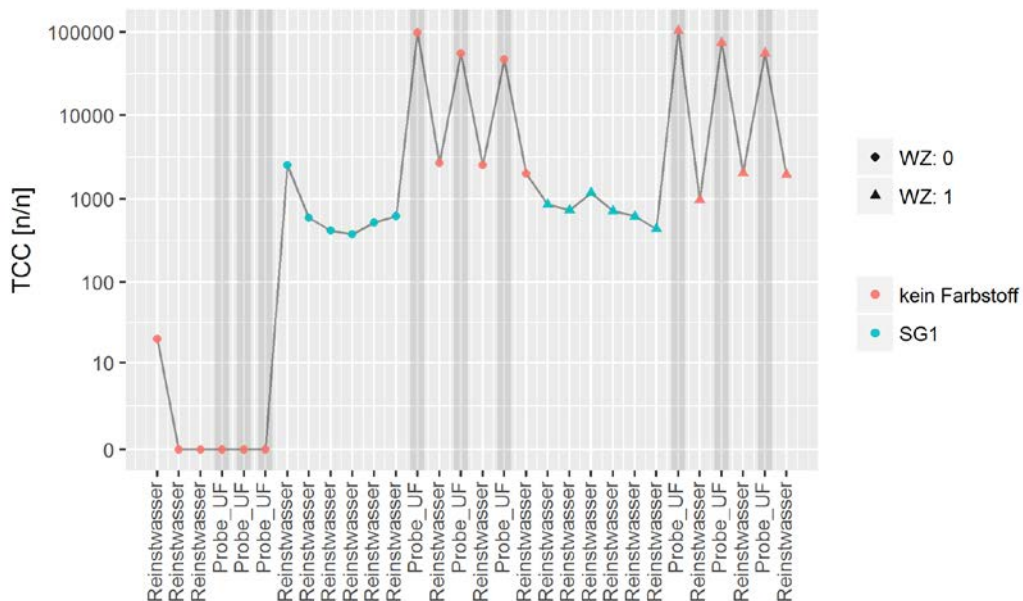


Abbildung 48: Untersuchung zur Bestimmung von Farbstoffübertrag bei Messung mit dem Accuri® C6 im automatischen Modus. Das Kürzel „WZ“ in der Legende steht für Waschzyklen. Die Messungen sind von links nach rechts in ihrer zeitlichen Messabfolge dargestellt

Die Abbildung 49 enthält Ergebnisse einer zweiten Versuchsreihe zum Farbstoffübertrag mit etwas geänderter Anordnung. Auch hier ist der schon genannte anfängliche Anstieg der TCC bei den ersten Reinstwasserproben mit SG1 zu erkennen. Ganz besonders bemerkenswert ist die Beobachtung, dass auch nach 18 Messung der ungefärbten Probe immer noch eine erhöhte TCC vorliegt (die am Beginn der Messreihe gemessenen ungefärbten Proben weisen keine Detektionen auf). Auch die Anwendung von je zwei automatischen Waschschritten zwischen den Messungen erbringt kein besseres Ergebnis.

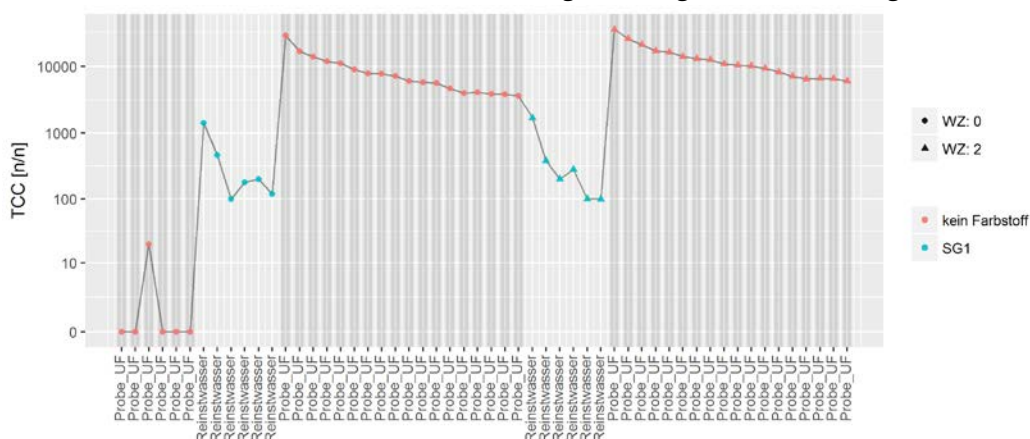


Abbildung 49: Untersuchung zur Bestimmung von Farbstoffübertrag bei Messung mit dem Accuri® C6 im automatischen Modus. Das Kürzel „WZ“ in der Legende steht für Waschzyklen. Die Messungen sind von links nach rechts in ihrer zeitlichen Messabfolge dargestellt.

Über die genaue Ursache der genannten Beobachtung – und dabei insbesondere die langandauernde Wirksamkeit – kann lediglich gemutmaßt werden. Von besonderer Relevanz sind die Ergebnisse bei

Messesequenzen, die unterschiedliche Farbstoffe umfassen. So ist der Übergang von einer Messung mit SG1+PI (ICC-Bestimmung) zu einer Messung mit SG1 allein (TCC-Bestimmung) nicht zu empfehlen, da membrangeschädigte Zellen bei der letztgenannten Färbemethode auch durch PI gefärbt und aus dem normalen Signalebereich geschoben werden könnten.

In Abbildung 50 ist ein sehr ähnlicher Fall exemplarisch dargestellt. Nach der Messung mit der Farbstoffkombination SG1 und gelRed, dessen Wirkungsweise ähnlich zu PI ist, erfolgten Messungen der gleichen hitzebehandelten Wasserprobe mit SG1. Gut zu erkennen ist bei der zweiten Messung (mittlere Darstellung) die für die Farbstoffkombination typische bogenförmige Signalverschiebung einzelner Cluster hin zu einer stärkeren Rot-Fluoreszenz bzw. schwächeren Grün-Fluoreszenz. Die Signalverschiebung ist bei der letzten Messung bereits wieder etwas schwächer ausgeprägt. Hier kommt es also zu einer unerwünschten Übertragung von Farbstoff und zu einer Verfälschung des Ergebnisses.

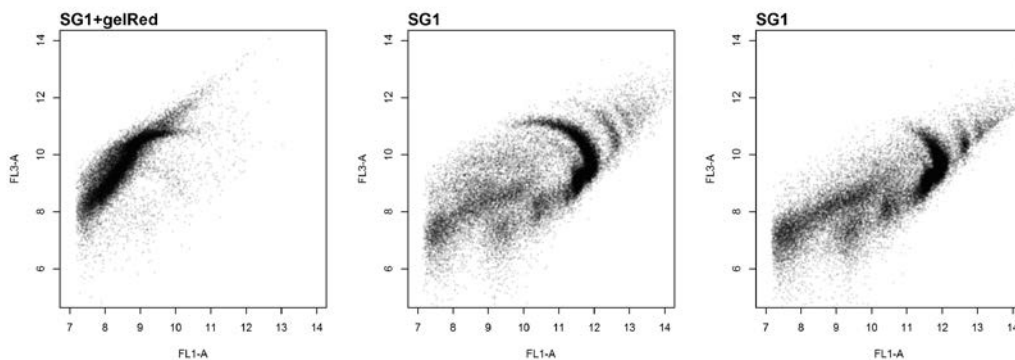


Abbildung 50: Streudiagramme der Grün- und Rot-Fluoreszenz von unmittelbar aufeinander folgenden DFZ-Messungen einer hitzebehandelten Wasserprobe mit unterschiedlichen Färbemethoden. Zwischen den Messungen wurde kein automatischer Waschschritt aktiviert.

Die beschriebene Problematik hat durchaus praktische Relevanz. Wenngleich dies möglicherweise vom jeweils verwendeten Gerätemodell abhängig ist, sollte die Reihenfolge der Messungen mit den zugehörigen Schritten zur Reinigung des Geräts stets genau bedacht werden.

5.1.3.5 SIGNALHINTERGRUND

Abbildung 51 zeigt eine Auswertung einer Vielzahl von Messungen unterschiedlichster Wasserproben (Farbstoff SG1) hinsichtlich des Verhältnisses der Zell-Detektionen zur Gesamtanzahl an Detektionen. Die Verringerung des Thresholds – im Verlauf des Projektes wurde er von 800 auf 700 (FL1-H) reduziert – führt zu einem starken Anstieg des Anteils von Detektionen aus dem Signalhintergrund (wie zu erwarten). Die genaue Festlegung sollte optimiert werden (zu bedenken sind etwa Geräte-Limits, Speicherbedarf und die Beschleunigung der Datenverarbeitung), wenngleich ein vollständiges Abschneiden des Signalhintergrunds nicht empfohlen ist, da er als Orientierungshilfe dienen kann (Kötzsch, Alisch, und Egli 2012).

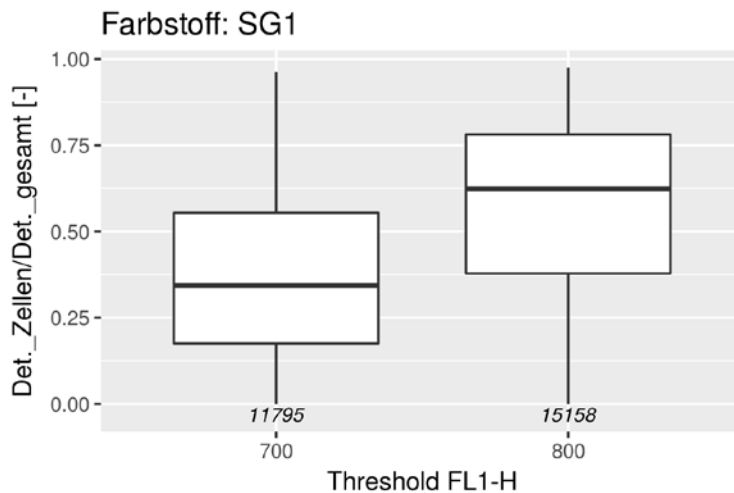


Abbildung 51: Darstellung des Verhältnisses der Detektionen im Zell-Gate zur Gesamtanzahl an Detektionen für eine große Anzahl an Messungen (Accuri® C6) von Wasserproben verschiedenster Herkunft mit Unterscheidung nach gewähltem Threshold.

Die Auswertung einer großen Anzahl an Dreifachbestimmungen (Abbildung 52) zeigt, dass der Signalhintergrund einen im Vergleich zu den Zell-Detektionen (Abbildung 46) wesentlich größeren Variationskoeffizienten (Detektionen im Signalhintergrund pro ml) aufweist. Gleichfalls ist keine Verringerung der Variation durch die Aktivierung von automatischen Waschzyklen zu verzeichnen, wie dies bei den Zell-Detektionen der Fall ist. Daneben ist auffällig, dass eine Verringerung des Thresholds – im Verlauf des Projektes wurde er von 800 auf 700 (FL1-H) reduziert – nicht zwangsläufig mit einer Erhöhung der Variation der Anzahl der Hintergrund-Detektionen einhergeht.

96er-Mikrotiterplatte, Farbstoff: SG1

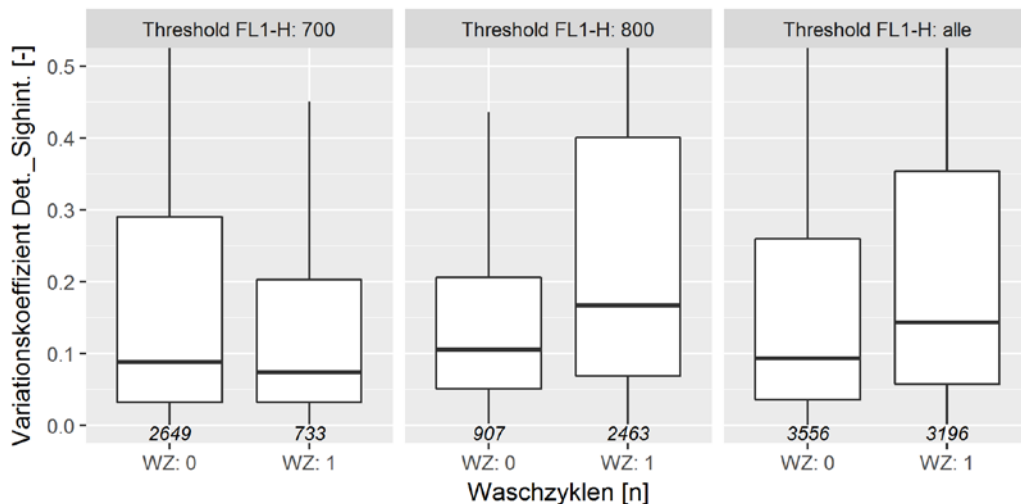


Abbildung 52: Variationskoeffizient von Dreifachbestimmungen (Accuri® C6, automatischer Messmodus) für die Anzahl der Detektionen im Signalhintergrund mit und ohne automatischem Zwischenwaschschritt sowie mit Unterscheidung nach Thresholds.

Die Messungen von ungefärbtem Reinstwasser – bei gleichen Geräte-Einstellungen wie bei der Messung mit SG1 – weisen bei einem gründlich gereinigten Gerät nur vereinzelte Detektionen auf. Wie in Abschnitt 5.1.3.4.1 ausgeführt, können unmittelbar nach gefärbten Proben gesetzte Messungen von Reinstwasser zur Abschätzung des Carry-Overs herangezogen werden. Der Median des so bestimmten Carry-Overs – ausgedrückt als das Verhältnis der Anzahl von Detektionen im Signalhintergrund des Reinstwassers zu jener der mit SG1 gefärbten vorangegangene Probe – ohne Aktivierung von automatischen Waschzyklen und bei Verwendung einer Mikrotiterplatte im 96er-Format beträgt 0,0132 und ist somit sehr ähnlich zum Carry-

Over von Partikeln (Zellen) im TCC-Gate (Abbildung 44). Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von Detektionen im Signalhintergrund des Reinstwassers zu jener der mit SG1 gefärbten vorangegangene Probe ist gegeben, wie Abbildung 53 zeigt. Die Steigung (lineare Regression der logarithmierten Anzahl) ist signifikant von null verschieden.



Abbildung 53: Gegenüberstellung des Signalhintergrunds gefärbter Wasserproben ($n=1059$) zu jenem in anschließenden Messungen von Reinstwasser zu Reinigungszwecken (Accuri® C6, automatischer Messmodus) mit Regressionsgeraden (lineare Regression, blaue Linie) und Konfidenzintervallen (grau hinterlegt).

Im Zuge von Tests verschiedener Farbstofflösungsmittel hat sich gezeigt, dass durch den Ersatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) durch TRIS-HCl-Puffer eine Verringerung des Signalhintergrundes zu verzeichnen war. Die Verwendung von DMSO verschiedener Herkunft hat dabei keinen Unterschied ergeben. Die Beobachtung einer Abhängigkeit des Signalhintergrundes vom Farbstoff-Lösungsmittel wurde sowohl bei SG1 als auch bei der Farbstoffkombination SG1 und PI gemacht. Für letztere gibt es eine Vielzahl an Messungen aus dem regulären Messprogramm (Abbildung 54), denn im Laufe des Projekts wurde entschieden, einen Wechsel von DMSO auf TRIS vorzunehmen. Dabei zeigt sich eine um mehr als das Zehnfache erhöhte Anzahl an Detektionen bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel des Farbstoffs.

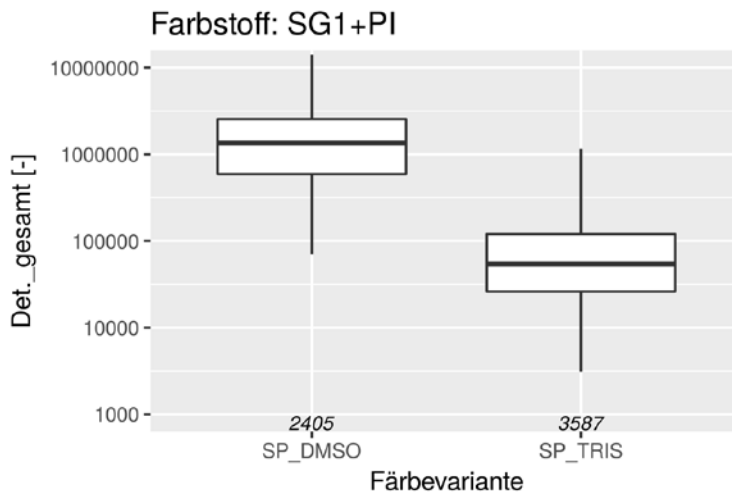


Abbildung 54: Vergleich der Gesamtanzahl an Detektionen anhand von Wasserproben verschiedenster Herkunft bei Verwendung verschiedener Farbstofflösungsmittel (DMSO und TROS-Puffer). Die Geräteeinstellungen, insbesondere die Threshold-Setzung (FL1-H: 800) sind für beide Gruppen gleich.

5.1.3.6 SICHERSTELLUNG DER DETEKTION VON SINGLE-CELLS

Die Bestimmung der TCC setzt voraus, dass die Bakterien in einer Wasserprobe als einzelne Zellen vorliegen ("Single Cell Suspension") und nicht etwa als Zellverbund. Daneben darf die Konzentration an Zellen nicht zu hoch sein, denn ansonsten steigt der Anteil an Zellen, die zufällig gleichzeitig mit einer oder mehreren Zellen den Detektionsbereich des Lasers passieren (Watson, 1991). Beides würde zu einer Unterschätzung der tatsächlich vorliegenden TCC führen. Das zufällige Passieren des Detektionsbereichs durch zwei oder mehrere Zellen lässt sich dabei statistisch als Poisson-Prozess beschreiben und gegebenenfalls korrigieren, ist aber unter normalen Rahmenbedingungen weniger beachtenswert. So beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder mehr Zellen bei einer Konzentration von 10^5 Zellen pro ml, einem Durchmesser der Kernströmung von $16 \mu\text{m}$ und einem Detektionsbereich von $10 \mu\text{m}$ gleichzeitig detektiert werden 10^{-4} . Bei einer Erhöhung der Durchflussrate (Vergrößerung des Durchmessers der Kernströmung), einer höheren Zell- bzw. Partikelkonzentration oder einem zu geringen Threshold (Verstärkung des Signalhintergrunds bzw. Rauschen) gewinnt dieser Effekt allerdings an Bedeutung.

Wesentlich mehr Unsicherheit besteht hinsichtlich des Vorliegens von Zellaggregaten. Hier nimmt wohl neben der Spezies und der TCC etwa auch die chemische Zusammensetzung der Probe Einfluss. Im Fall des Accuri® C6 besteht die vom Hersteller beschriebene Möglichkeit, die Kombination aus FSC-A und FSC-H zur Analyse heranzuziehen (BD Biosciences 2011). Die Idee dabei ist jene, dass sich das Verhältnis Pulse-Area zu Pulse-Height bei mehreren Zellen im Detektionsbereich in Richtung einer größeren Pulse-Area verschiebt, wie in der folgenden Abbildung angedeutet (Watson, 1992).

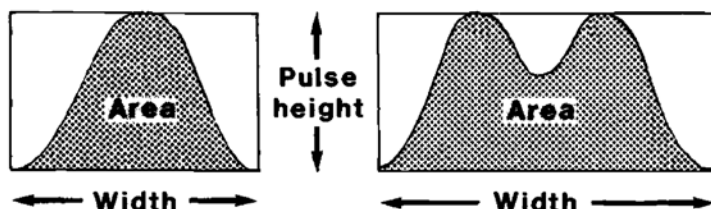


Abbildung 55: Pulse-Area und Pulse-Height bei sogenannten Singlets und Doublets (Watson 1991).

Es wichtig anzumerken, dass ein derartiges Vorgehen wohl eher nur bei Reinkulturen oder künstlichen Partikeln erfolgreich bzw. aufschlussreich sein kann, wie etwa für die in der folgenden Abbildung dargestellten Hefen (*Rhodotorula glutinis*).

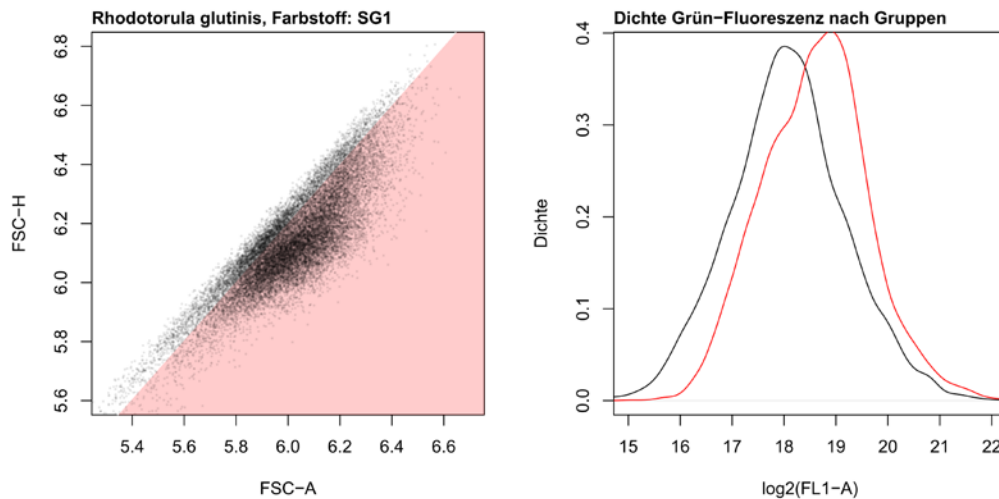


Abbildung 56: Streudiagramm (links) der Parameter FSC-A und FSC-H mit markiertem Bereich möglicher Zellaggregate (rot hinterlegt). Dichteverteilungen der Grün-Fluoreszenz beider Gruppen (rechts).

In der linken Abbildung ist zu sehen, dass sich ein Teil der Zellen entlang einer Geraden gruppiert, die nach links oben scharf begrenzt ist, während ein anderer Teil ein - relativ gesehen - stärkeres Area-Signal aufweist und nach unten rechts verschoben ist (rot unterlegt). Sollte es sich um Aggregate gleichartiger Zellen handeln, so müsste sich auch das Fluoreszenz-Signal zumindest verdoppeln und tatsächlich ist der Median der Grün-Fluoreszenz der rot unterlegten Zellen gut doppelt so groß (rechte Abbildung).

Bei Mischkulturen - wie sie etwa Wasserproben darstellen - kann aber kaum von einem einheitlichen Verhältnis von Pulse-Height und Pulse-Area ausgegangen werden. Bei den Wasserproben im Rahmen des vorliegenden Projekts kommt erschwerend dazu, dass die Signale sehr schwach sind - wesentlich schwächer als im Fall der eben gezeigten Hefen. Auch ist insbesondere die Größe der Zellen in Wasserproben so gering, dass der Abtastbereich des Lasers, den eine Zelle durchqueren muss, beim Accuri® C6 mit etwa 10 µm bedeutend größer als eine einzelne Zelle ist und daher nicht davon ausgegangen werden kann, dass ein Zellaggregat überhaupt „aufgelöst“ werden kann.

5.1.4 ONLINE-DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Im Rahmen der Untersuchungen konnte ein neu entwickeltes Online-Durchflussszytometer der Firma Metanor eingesetzt werden. Neben der hochauflösenden und weitgehend automatisierten Erfassung der mikrobiologischen Situation, ist gerade auch der Entfall der Probenahme, des Transports, einer etwaigen Probenlagerung und von Einflüssen möglicherweise leicht abweichender Messbedingungen im Labor ein großer Vorteil. Der Vergleich zwischen Messungen vor Ort (Online-DFZ) und im Labor kann daher auch dazu dienen, die genannten Unterschiedlichkeiten zu bewerten.

Bezüglich abweichender Messbedingungen im Labor ist anzumerken, dass die Anfärbung der Proben wird im Online-DFZ automatisch und stets in gleicher Weise vorgenommen wird. Sie orientiert sich aufgrund des Ziels einer hohen Messfrequenz an einer minimalen Dauer und kann daher von üblichen Vorgaben (SLMB 2012) abweichen. Dabei ist die Inkubation – bei der etwas höheren Temperatur von 40 °C – aufgrund der Bauweise des Geräts (Inkubationskammer bzw. Reaktor mit guter Durchmischung und Wärmeübertragung) als sehr effizient einzuschätzen. Im Labor besteht diese zeitliche Einschränkung nicht im gleichen Maße und durch die Verwendung eines Auto-Loaders mit sequentieller Messung einer großen Anzahl an Proben (96er-Mikrotiterplatte), die zum gleichen Zeitpunkt angefärbt wurden, ist die tatsächliche Einwirkzeit des Farbstoff u.U. deutlich länger.

Eine kürzere Anfärbung der Probe sollte nicht grundsätzlich in einer abweichenden TCC resultieren. Möglicherweise führt sie aber zu einer schlechteren Abtrennbarkeit schwacher Zellsignale vom Signalhintergrund und somit zu einer Erhöhung des Anteils falsch klassifizierter Detektionen. Auch eine Änderung der LNA- bzw. HNA-Anteile relativ zu Einstellungen mit längeren Anfärbezeiten ist. In dieser Hinsicht ist die Beibehaltung gleicher Geräteeinstellungen (gerade wenn sie sich am unteren Limit der Inkubationszeit bewegen) für die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Probenahmepunkten oder bei langen Zeitreihen sehr wünschenswert.

Während die Probenvorbereitung im Online-DFZ also sehr reproduzierbar ist, könnte eine erhöhte Anfälligkeit hinsichtlich biotischer und abiotischer Kontaminationen etwa aufgrund der Probenzuleitungsschläuche oder Schläuche im Gerät selbst vorliegen. Letztere sind nicht zuletzt wegen der zusätzlichen Aufgaben (Probenfärbung) als deutlich länger einzuschätzen wie in den Labor-Geräten, allerdings können diese Schläuche im Rahmen von automatischen Waschschritten (Hypochlorit-Lösung) in gewünschten Abständen gereinigt werden. Daneben kann sich auch die lange Lagerungszeit der Betriebsmittel, etwa des Reinstwassers, im Online-DFZ als mögliche Kontaminationsquelle erweisen.

Wenngleich die Ausführung der Messzelle und der Geräte-Optik des Online-DFZ vergleichbar zu den Laborgeräten sein sollte (insbesondere zu jener des Cube 6), können gerätetechnische Eigenheiten das Messergebnis systematisch unterschiedlich sein lassen. Denkbar ist hier etwa die durch das Gerät erfolgte Messung des Probenvolumens (die hier vorgestellten Geräte unterscheiden sich in der technischen Umsetzung), die unmittelbar die Bestimmung Zell-Konzentration beeinflusst.

In Abbildung 57 sind die Ergebnisse einer zweimonatigen Messreihe an einer Quellwasser-Probenahmestelle dargestellt. Dabei wurden Messungen sowohl direkt vor Ort mittels Online-DFZ in hoher Frequenz, als auch im Labor auf täglicher Basis durchgeführt. Der Vergleich der beiden Varianten zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der TCC mit nur einigen wenigen Abweichungen. Dies bezeugt gerade auch die Robustheit der Messmethode zur Bestimmung der Gesamtzellzahl (TCC) mittels Durchflusszytometrie. Denn weder der Einfluss des Transports und der Lagerung der Proben für die Messungen im Labor, der abweichenden Probenvorbereitung, und insbesondere der verschiedenen Bau- bzw. Betriebsweise der Geräte ist stark genug, um bedeutende Unterschiede hervorzurufen.

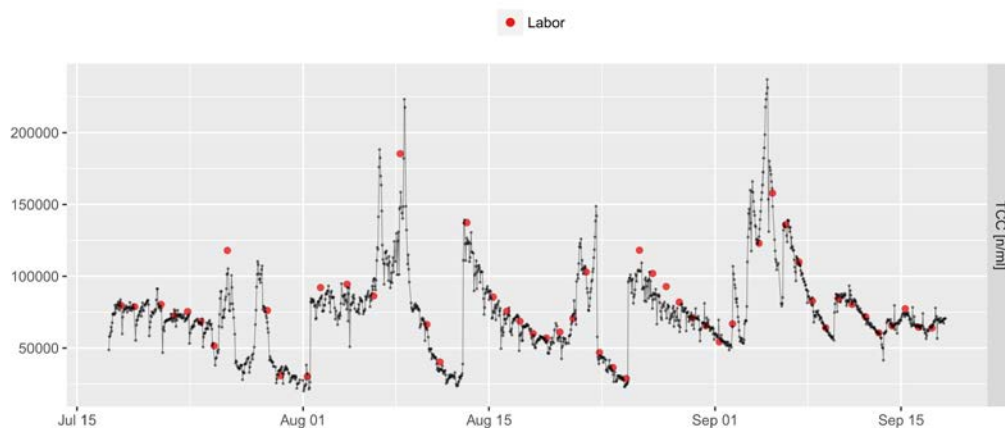


Abbildung 57: Vergleich einer zweimonatigen TCC-Zeitreihe auf Basis der Online-DFZ (Metanor OBA, schwarz) und von Labor-Messungen (Accuri® C6, rot). Für die Labor-Messungen wurden täglich Proben abgefüllt und nach spätestens drei Tagen gemessen.

Das regelmäßige Abfallen der Messwerte zu Beginn der Messreihe der Online-DFZ in Abbildung 57 lässt sich auf die schon genannten automatischen Waschzyklen zurückführen. Der genaue Mechanismus der Beeinflussung des Ergebnisses ist dabei allerdings noch nicht geklärt. Zumindest für das vorliegende

Gerätemodell sollten die Einstellung wohl für jede Probenahmestelle auch auf Basis von Vergleichsmessungen vorab überprüft werden (siehe optimierter Betrieb am Ende der Messreihe).

5.1.4.1 PLANUNG DER PROBENAHMEFREQUENZ

Die Möglichkeit sehr hochaufgelöste DFZ-Ergebnisse mittels Online-DFZ zu erhalten, kann auch dazu genutzt werden, für ein Messprogramm mit DFZ-Messungen im Labor ein optimales Probenahme-Intervall bzw. eine auf bestimmte Ereignisse abzielende Verdichtung des Intervalls festzulegen (Besmer, Hammes, u. a. 2017). So könnte etwa auf Basis einer zeitlich beschränkten Messreihe mittels Online-DFZ, die idealerweise auch besondere Vorkommnisse an der Ressource (Hochwasser, betriebliche Änderungen, etc.) umfasst, ermittelt werden, ob es überhaupt zu nennenswerten Änderung der DFZ-Parameter kommt und wie sprunghaft diese Änderungen ablaufen.

Der Verlauf der Ganglinie der TCC in Abbildung 57 lässt es – je nach Zielvorgabe – zumindest als diskussionswürdig erscheinen, ob mit einer täglichen Probenahme schon ein ausreichend genaues Bild der Verhältnisse erzielt wird. Geht es etwa um die Erfassung der maximalen TCC, so würde dies nur mit Abschlägen gelingen. Die kurzfristigen Spitzen der Online-DFZ sind dabei plausibel und können etwa auch mit zeitgleich auftretenden Spitzen des spektralen Absorptionskoeffizienten bei 254 nm (gemessen mit einer Online-Spektrometersonde) verglichen werden, wie in Abbildung 58 dargestellt. Gleichfalls gilt natürlich, dass auch die Messfrequenz und der Einsatzort des Online-DFZ selbst ressourcenschonend (Farbstoffverbrauch, Anschaffungskosten des Geräts) geplant werden kann.

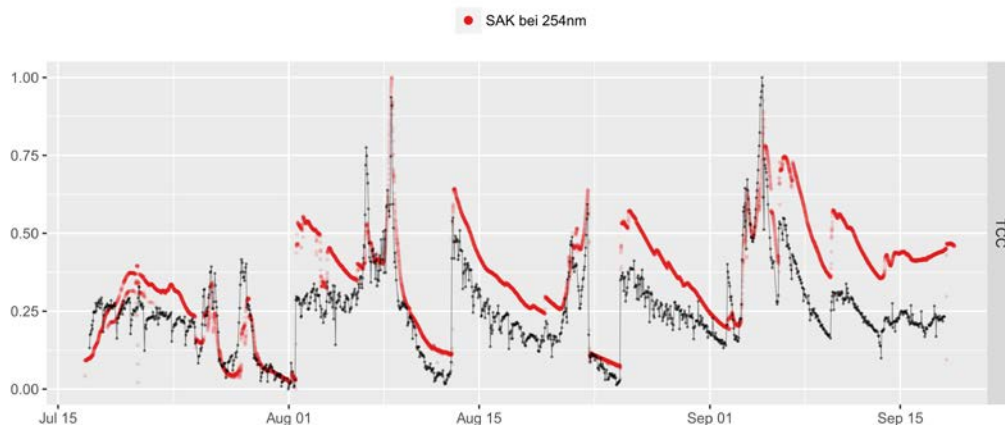


Abbildung 58: Überlagerung einer zweimonatigen TCC-Zeitreihe auf Basis der Online-DFZ (Metanor OBA, schwarz) mit dem gleichzeitig gemessenen spektralen Absorptionskoeffizienten (SAK, rot) bei 254 nm. Beide Zeitreihen sind dabei mit dem jeweils geringsten bzw. höchsten Wert linear auf den Wertebereich zwischen 0 und 1 transformiert worden.

5.2 VIABILITY ASSAYS

5.2.1 PERMEABILISIERUNG DER ZELLMEMBRAN

5.2.1.1 SYBR® GREEN 1 UND PROPIDIUMIODID

Die Farbstoffkombination aus SG1 und PI ist eine sehr häufig eingesetzte Farbstoffkombination zur Ermittlung einer Schädigung bzw. Permeabilisierung der Zell-Membran (Nescerecka, Hammes, und Juhna 2016). Eine solche Farbstoffkombination wird auch als NADS-Färbung bezeichnet („Nucleic Acid Double-Staining“), da beide Farbstoffe den gleichen Zielort – die Nukleinsäuren – in einer Zelle haben (Falcioni, Papa, und Gasol 2008). In Abschnitt 3.3 befindet sich eine Beschreibung zum Wirkmechanismus der besagten Färbung. Im Rahmen der durchgeführten Messkampagne hat sich die Farbstoffkombination aus SG1 und P1 besonders dabei bewährt, den Anteil der intakten Zellen (ICC) an der TCC zu bestimmen.

Weiters kann die Wirkung einer auf Chlorung basierenden Wasseraufbereitung (Desinfektion) sichtbar gemacht werden. Demgegenüber gibt es keine Hinweise darauf, dass diese Färbemethode Hinweise auf die Wirksamkeit einer UV-Behandlung (UV-C) – zumindest nicht bei den üblicherweise in einer Trinkwasserversorgung angewandten Dosen (Mindestanforderung 400 J/m^2) – unmittelbar nach einer Behandlung ergibt. Letzteres erklärt sich durch die Art der durch UV-C hervorgerufenen Schäden, die in erster Linie aus Mutationen der DNA der Zellen bestehen (Schenk u. a. 2011). Die wesentlichsten Ergebnisse zur Anwendung von SG1 und PI in der vorliegenden Untersuchung sind in Abschnitt 5.1.2.7.2 dargestellt.

5.2.1.2 SYBR® GREEN 1

Die Färbung mit einem membrangängigen Nukleinsäurefarbstoff – etwa SG1 – wird vom Zustand der Zellmembran beeinflusst (Berney u. a. 2007). Letztere stellt auch eine Barriere für die Farbstoffaufnahme grundsätzlich membrangängiger Farbstoffe in die Zelle dar und es dürften in dieser Hinsicht große Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienarten existieren. Bei einer Beschädigung bzw. Permeabilisierung der Zellmembran kann es daher zu einer verstärkten Anfärbung der Zellen kommen – mit der Folge einer höheren Signalintensität. Dieser Effekt ist etwa bei geringen Chlor-Zugaben zu beobachten (Ramseier u. a. 2011). Bei höheren Zugaben kommt es demgegenüber zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität aufgrund der starken Schädigung der Zelle.

5.2.2 BESCHÄDIGUNG DER NUKLEINSÄUREN

5.2.2.1 SYBR® GREEN 1

Auch SG1 ist unter manchen Umständen als Indikator des Viabilitäts-Zustands einer Zelle heranziehbar. Dies ist dann der Fall, wenn die Schädigung der Zellen ein solches Ausmaß erreicht, dass deren Nukleinsäuren – also die Bindungsstellen von SG1 – beeinträchtigt sind (Phe u. a. 2005).

Stellt man die TCC-Ganglinien vor bzw. nach Chlorung einer Wassermatrix gegenüber, zeigt sich einerseits, dass die TCC nach Chlorung jenen vor Chlorung folgen, aber gleichzeitig auch, dass die TCC-Werte nach Chlorung geringer sind und fallweise fast gegen null (Zugabe von $0,4 \text{ mg/l}$, Einwirkzeit ca. 12 Stunden) gehen.

Eine Chlorung greift (letztendlich) auch die Nukleinsäuren einer Zelle an, was wiederum Auswirkungen auf die Anfärbbarkeit mit Nukleinsäurefarbstoffen – etwa SG1 – hat. Denn nur wenn sich SG1 auf bestimmte Weise an Nukleinsäuren anlagert, entfaltet es sein Potential zur Abgabe von Fluoreszenzlicht (Zipper u. a. 2004).

Abbildung 59 zeigt die beiden Proben (vor und nach Chlorung) in der Form von Streudiagrammen der Grün- und Rot-Fluoreszenz. Dabei wurde ein zusammenfassender Datensatz durch Sampling der Ausgangsdatensätze erzeugt, der letztlich alle Messungen repräsentieren soll. Es zeigt sich hier insbesondere eine schlechte Abtrennbarkeit der vermeintlichen Zelldetektionen vom Signalhintergrund bei den Proben nach erfolgter Chlorung. Gleichzeitig nimmt der Signalhintergrund im Bereich eher schwacher Fluoreszenzintensitäten stark zu. Es ist unklar, um welche Art von Partikeln es sich dabei handelt. Darüber hinaus sind die Zell-Cluster nach Chlorung weniger scharf abgegrenzt – gut zu erkennen an Zelldetektionen mit höherer Signalintensität.

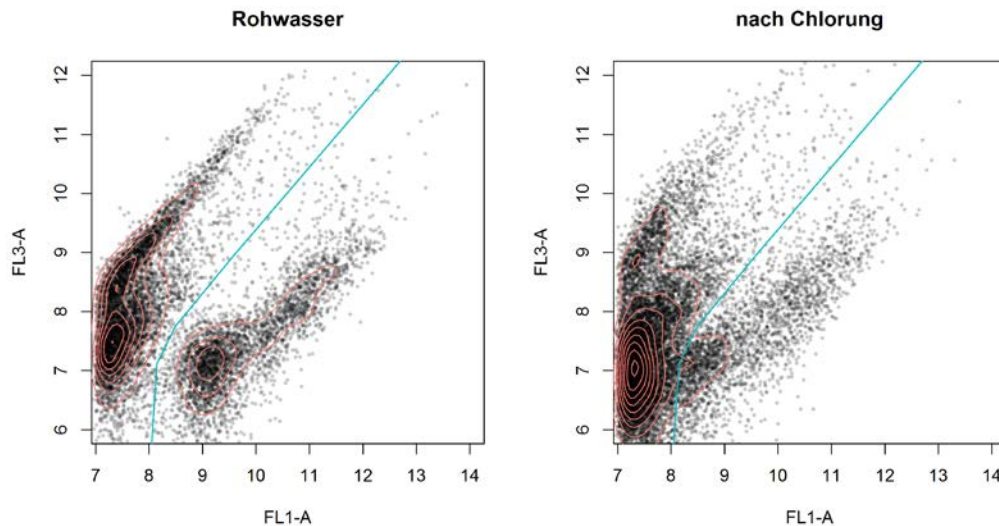


Abbildung 59: Gegenüberstellung von Streudiagrammen (Zusammenfassung mehrerer Datensätze durch Sampling) der Grün- und Rot-Fluoreszenz (Färbung mit SG1) für Proben vor und nach einer Chlorung (Karstquellwasser) mit überlagerter Dichteschätzung (rote Linien) und Zell-Gate (blaue Linien).

Abbildung 60 zeigt Ergebnisse einer Beprobung der gleichen Wasserressource vor und nach Chlorung, allerdings mit dem Unterschied, dass letztere unmittelbar nach Chlor-Zugabe gezogen wurde. Nach Eintreffen im Labor (3,5 Stunden) wurde Natriumthiosulfat zur Neutralisation des Chlors beigegeben. Dieses Vorgehen wurde an verschiedenen Probenahmetagen wiederholt. Die Streudiagramme weisen nun die gleichen Charakteristika auf wie jene in Abbildung 59. Daher ist auch davon auszugehen, dass mögliche (geringe) Restkonzentrationen an Chlor die Färbung – genauer gesagt den Farbstoff SG1 – nicht beeinflussen (siehe dazu auch Abschnitt 5.2.2.1.1).

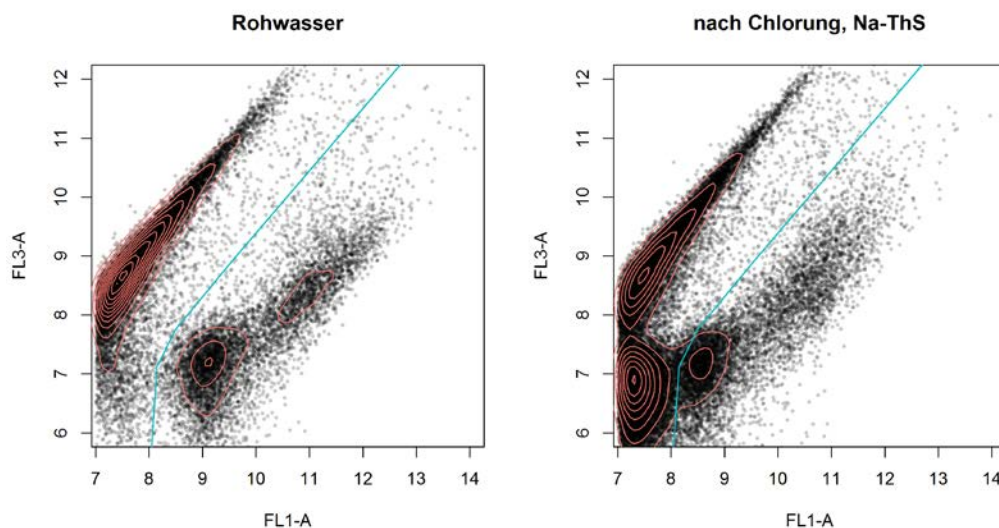


Abbildung 60: Gegenüberstellung von Streudiagrammen der Grün- und Rot-Fluoreszenz (Färbung mit SG1) für Proben vor und nach einer Chlorung (Karstquellwasser) mit überlagerter Dichteschätzung (rote Linien) und Zell-Gate (blaue Linien). Der Probe nach Chlorung wurde nach 3,5 h Chlor-Einwirkzeit Natriumthiosulfat beigegeben.

Der beobachtete Effekt einer wesentlich schlechteren Anfärbbarkeit nach Chlorung wird auch von der Lagerungszeit der Proben beeinflusst bzw. verstärkt. Fallweise lassen sich schon nach einem Lagerungstag (bei 4-6 °C) im Signalbereich der Zellen praktisch keine Detektionen mehr erkennen. Dies hat sich auch im Zuge von Wachstumspotential-Versuchen mit längeren Lagerungszeiten und höheren Lagerungstemperaturen bestätigt.

5.2.2.1.1 CHLORRESISTENZ VON SYBR® GREEN 1

Es besteht die Möglichkeit, dass die mittels SG1-Färbung beobachteten Veränderungen des Signals lediglich von einer (teilweisen) Zerstörung des Farbstoffes aufgrund einer Chlorwirkung herrühren und damit keine Aussage über Zellveränderung zulassen. Für die gezeigten Auswertungen (Abbildung 59) ist dies sehr unwahrscheinlich. Einerseits weil die Restkonzentrationen unter der Nachweisgrenze von 0,05 mg/l lagen, andererseits aufgrund von Ergebnissen mit gleichen Charakteristika, die bei Proben mit Natriumthiosulfat zur Chlornutralisation erzielt wurden (Abbildung 60).

Letztgenanntes, also die Zugabe von Natriumthiosulfat, ist also eine Option zur Neutralisation möglicher Restchlorkonzentrationen in die Probe. Auch die Verwendung einer Farbstofflösung, die Natriumthiosulfat beinhaltet, kann angedacht werden (Besmer, Sigrist, u. a. 2017).

Im vorliegenden Projekt wurde die Anfälligkeit von SG1 hinsichtlich Chlor, genauer Chlordioxid, in einem Laborversuch getestet. Hierzu wurde der Bakterienstamm *Enterococcus faecium* in physiologischer Kochsalzlösung auf etwa 10^6 Zellen pro ml verdünnt. Dabei wurde mittels einer UV-VIS-Spektrometer-Messung (SAK bei 254 nm) auch sichergestellt, dass die Probe keine nennenswerten Gehalte an organischem Material, etwa Rückstände des Nährmediums, beinhaltet. Letzteres würde zu einer ungewollt erhöhten Chlorzehrung führen. Nach Zugabe von Chlordioxid in verschiedenen Konzentrationen (0,1 mg/l, 0,3 mg/l und 0,5 mg/l) wurde eine Einwirkzeit von 30 bzw. 60 Minuten angestrebt. Dem einen Teil der Proben wurde daraufhin Natriumthiosulfat in ausreichender Menge (eine Konzentration von 18 mg/l in der Probe) zugegeben, um das vorhandene Chlor zu neutralisieren. Unmittelbar danach wurde allen Proben SG1 zugegeben und nach einer verkürzten Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Messung (ca. eine Minute Messdauer pro Einzelmessung) gestartet. Die recht lange Chlor-Einwirkzeit, sollte sicherstellen, dass das Ergebnis nicht durch den Unterschied in der Einwirkzeit – 5 Minuten nach Natriumthiosulfat – beeinflusst wird. Zur Kontrolle einer möglichen Wirkung von Natriumthiosulfat auf das Ergebnis, wurden ebenfalls Proben ohne Chlor-Zugabe in der genannten Weise behandelt (allerdings ohne Einwirkzeit).

Die beiden Versuchsreihen im Abstand einer Woche (Abbildung 61 und Abbildung 62) zeigen nun, dass der Median der Fluoreszenzintensität von FL1-A (Grün-Fluoreszenz) durch die alleinige Zugabe von Natriumthiosulfat nicht beeinträchtigt wird. Somit ist durch den Versuchsaufbau gewährleistet, dass eine Interaktion von Chlordioxid und SG1 zu entdecken sein sollte.

Bei sehr hohen Zugabemengen Chlordioxid (0,5 mg/l) zeigt sich ein starkes Abfallen der Grün-Fluoreszenz, falls die Chlorwirkung vor Zugabe des Farbstoffs nicht neutralisiert wird (Abbildung 62). Andernfalls erreicht sie ein den unbehandelten Proben vergleichbaren Wert. Zudem erscheint interessant, dass die Schädigung von *E. faecium* – genauer gesagt der Nukleinsäuren – trotz hoher Zugabemenge noch kein besonders hohes Maß erreicht hat. Es erscheint aber möglich, dass dies erst bei noch längerer Einwirkzeit der Fall sein könnte.

Bei einer Zugabe von 0,3 mg/l (Abbildung 61 und Abbildung 62) ist gleichfalls die besagte Wirkung auf die Fluoreszenzintensität zu erkennen, wenngleich schwächer (insbesondere in Abbildung 61).

Bei einer Zugabe von 0,1 mg/l lässt sich ein geringfügiger Effekt bei einer Einwirkzeit von 30 Minuten erkennen. Hier zeigen Proben mit Natriumthiosulfat-Zugabe eine etwas erhöhte Signalintensität. Die fallweise erkennbare Zunahme der Signalintensität im Messverlauf der je sechs gemessenen Proben lässt sich mit einer noch nicht ganz abgeschlossenen Anfärbung erklären.

RESULTATE

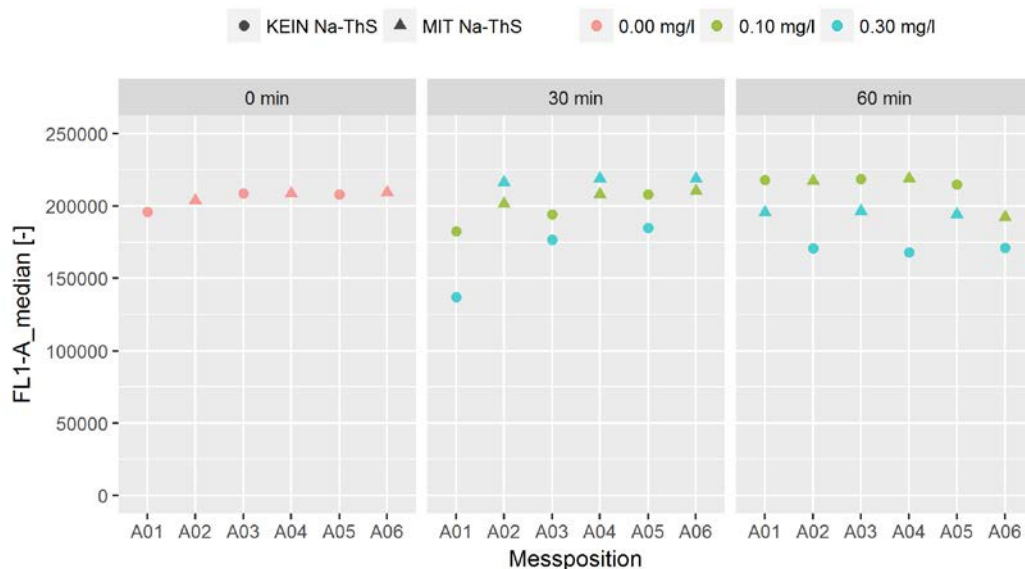


Abbildung 61: Versuch zur Ermittlung der Wirkung von Chlordioxid auf SG1 mittels *Enterococcus faecium* (TCC ca. 10^6 Zellen pro ml, verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung) und variabler Chlorzugabe bzw. Chloreinwirkzeit. Die Reihenfolge der Messungen (Accuri® C6, automatischer Messmodus) erfolgte von links nach rechts.

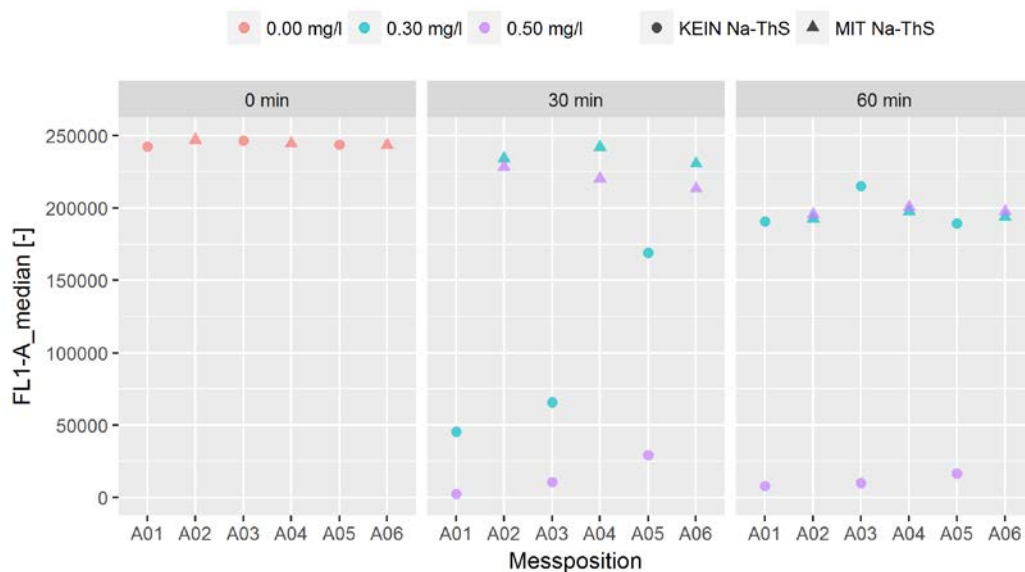


Abbildung 62: Versuch zur Ermittlung der Wirkung von Chlordioxid auf SG1 mittels *Enterococcus faecium* (TCC ca. 10^6 Zellen pro ml, verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung) und variabler Chlorzugabe bzw. Chloreinwirkzeit. Die Reihenfolge der Messungen (Accuri® C6, automatischer Messmodus) erfolgte von links nach rechts.

Die Versuche legen nahe, dass bei höheren Chlor-Konzentrationen mit einer Beeinflussung von SG1 gerechnet werden sollte. Dies rechtfertigt die Zugabe von Natriumthiosulfat bei Proben, bei denen eine erhöhte Chlor-Konzentration besteht oder vermutet wird (Besmer, Sigrist, u. a. 2017). Ob eine nennenswerte Beeinflussung schon bei noch geringeren als den getesteten Konzentration vorliegt ist nicht eindeutig, erscheint aber eher unwahrscheinlich.

5.2.3 ENZYM-AKTIVITÄT

5.2.3.1 5(6)-CFDA

Im Rahmen von verschiedenen Versuchsreihen wurde die Anwendbarkeit von 5(6)-CFDA (5-(and-6)-Carboxyfluoresceindiacetat) zur Ermittlung der Enzym-Aktivität von Bakterien getestet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann intakte Zellmembranen durchdringen und wird von unspezifischen Esterasen in Diacetat und Carboxyfluorescein aufgespalten (Hoefel u. a. 2003). Nur letzteres ist dabei fluoreszierend. Carboxyfluorescein hat gegenüber Fluorescein den Vorteil einer verbesserten Rückhaltung in der Zelle, d.h. einer verzögerten Ausscheidung. Die Akkumulation von Carboxyfluorescein durch fortdauernde Aufspaltung von CFDA führt zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals der Zelle und ist von der Aktivität der Zelle hinsichtlich ihrer Esterasen abhängig. Eine weitere Voraussetzung dafür, dass Zellen detektiert werden können, ist das Vorhandensein einer intakten Zell-Membran, ansonsten kann das Carboxyfluorescein – das bei noch vorhandener Enzymaktivität gebildet wird – aus der Zelle entweichen (Sträuber und Müller 2010). Damit gibt CFDA nicht nur Aufschluss über die Enzymaktivität sondern auch über den Zustand der Zell-Membran (siehe Abschnitt 5.2.1).

Da CFDA bei natürlichen Wasserproben erfahrungsgemäß wesentlich geringere Fluoreszenzsignale erzeugt, ist die Anwendung besonders durch eine schwierige Abtrennbarkeit der Zell-Signale vom Signalhintergrund eingeschränkt, wenngleich etwa die Auswirkungen einer Desinfektion deutlich sichtbar gemacht werden können (Abbildung 63). Die Anwendung bei Reinkulturen, die im Labor gezüchtet wurden, ist jedenfalls wesentlich besser möglich.

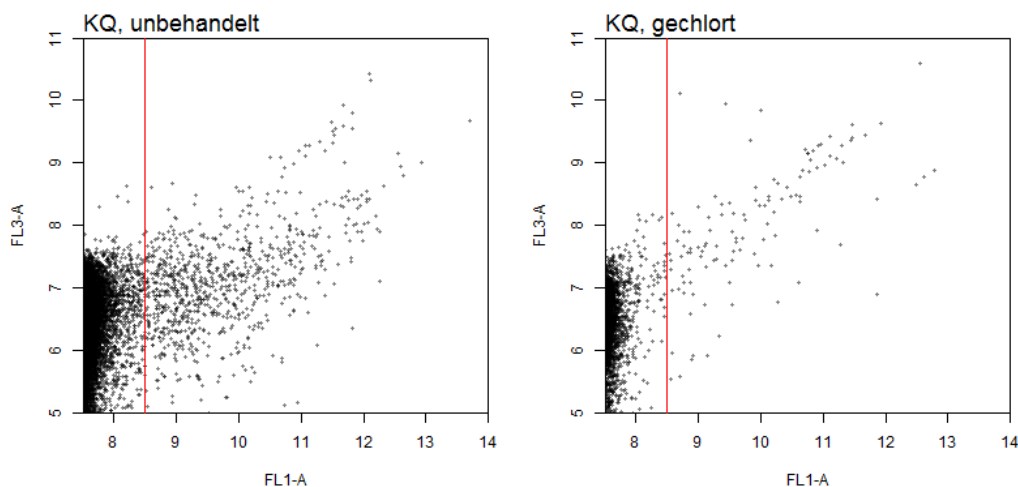


Abbildung 63: Gegenüberstellung von Streudiagrammen der Grün- und Rot-Fluoreszenz (Färbung mit CFDA) für Proben vor und nach einer Chlorung (Karstquellwasser). Die Anzahl an Detektion rechts der roten Linie beträgt 20 000 pro ml für die unbehandelte Probe (TCC mit SG1: 100 000) bzw. 3 000 pro ml für die gechlorte Probe (TCC mit SG1: 50 000)

5.3 WACHSTUMSPOTENTIAL

5.3.1 KONZEPT UND GENERELLES VORGEHEN

Mit „Wachstumspotential“ (WP) ist in der vorliegenden Untersuchung eine auf der DFZ beruhende Methode zur Beschreibung der bakteriellen Wachstumsdynamik von Wasserproben im Zuge eines Lagerungsversuchs bezeichnet. Im Wesentlichen besteht die Methode aus einer möglichst „sauberen“ Probenahme, einer Lagerung der Proben unter definierten Randbedingungen und der Bestimmung bzw. dem Vergleich der DFZ-Ergebnisse vor und nach der Lagerung.

Um unerwünschte Einflüsse der Probenahme, des Transports und der Lagerung zu vermeiden, werden an den gesamten Ablauf der Untersuchung besonders hohe Ansprüche gestellt. So müssen etwa die Glasgebinde (100 ml) mit Schliffstopfen nicht nur steril sondern auch frei von organischen Rückständen sein, die als Nahrungsquelle für Mikroorganismen dienen könnten. Schon geringste Mengen an organischem Kohlenstoff bieten Grundlage für eine beträchtliche Anzahl an neuen Zellen – 1 µg AOC ergibt größenordnungsmäßig 10^7 Zellen (Hammes 2008). Dies wird durch eine gründliche Reinigung (Labor-Spülmaschine) und Erhitzung der Glasgebinde bei 550 °C für mindestens fünf Stunden erreicht. Die Abfüllung der Probe – im Normalfall im Mehrfachansatz – erfolgt vor Ort, die randvoll gefüllten Gebinde werden mittels Schliffstopfen sofort (luftdicht) verschlossen und bis zum Ende der Lagerung im Kühlbrutschrank (u.U. bei verschiedenen Lagerungstemperaturen) nicht mehr geöffnet. Dabei muss stets penibel darauf geachtet werden, eine Berührung von mit der Probe in Kontakt kommenden Oberflächen zu vermeiden. Um mögliche Lichteinflüsse zu vermeiden, muss auf sehr geringe Lichtexposition der Proben bei Probenahme, Transport und Lagerung geachtet werden. Im Fall von Proben, die einer UV-Behandlung unterzogen wurde, dient dies konkret der Verhinderung der Anregung von DNA-Reparaturmechanismen. Die Probenahme für die Referenzmessung (vor Lagerung) kann mittels Zentrifugenröhrchen (50 ml) erfolgen, je nach Umfang der Untersuchungen ist hier ein Mehrfachansatz sinnvoll.

Bei biologischen Wachstumsvorgängen ist durchaus mit einer erheblichen Streuung der Messwerte zu rechnen. Im Regelfall sollten daher für jeden Messpunkt (Probe, Lagerungszeit und Lagerungstemperatur) mehrere Replikate vorgesehen werden.

Für die DFZ-Messung nach Lagerung sollte darauf geachtet werden, dass eine gute Durchmischung der Proben gewährleistet ist. Die Beurteilung der DFZ-Ergebnisse basiert in erster Linie auf dem Vergleich der TCC nach Lagerung mit jener des Probenahmetages. Daneben können auch eine Änderung des HNA-Anteils bzw. weiterführende Methoden zur Analyse von Signalveränderungen, wie das Cytometric Fingerprinting, aufschlussreich sein. Damit ist in erster Linie der Einsatz von SG1 als Farbstoff angesprochen. Darüber hinaus kann aber auch ein Einsatz weiterer Färbemethoden angedacht werden.

Die Versuchsanordnung erlaubt keine exakte Nachbildung des Verhaltens des beprobten Wasservolumens in seinem natürlichen Umfeld – also etwa dem Verteilnetz. Dazu ist ein Versuch unter Laborbedingungen aufgrund der komplexen nachzubildenden Einflussfaktoren (Biofilm, Sediment, Fließgeschwindigkeit, etc.) nur begrenzt geeignet (Lautenschlager u. a. 2013). Nichtsdestoweniger liegt ein Zusammenhang zwischen den beobachteten Wachstumsvorgängen, der Menge an mikrobiell verwertbaren Wasserinhaltsstoffen, der Lagerungstemperatur und der Zusammensetzung bzw. dem Zustand der autochtonen Bakteriengemeinschaft sehr nahe. Damit sollte zumindest in einfacheren Fällen eine Vorhersage prinzipiell möglich sein. Im Zentrum der Aufmerksamkeit liegt aber eher eine vergleichende Zustandsbeschreibung für einen konkreten Probenahmepunkt. Für den Vergleich kommen neben gleichartigen Messpunkten vor allem auch zeitlich versetzte Messungen der gleichen Probenahmestelle in Frage. Eine Veränderung in der Wasserressource muss sich nicht zwingend im Ergebnis einer DFZ-Messung vom Tag der Probenahme zeigen – etwa wenn die Beeinflussung in geringem zeitlichem Abstand erfolgt ist. So würde sich ein Eintrag an Nährstoffen wohl erst nach Tagen deutlich bemerkbar machen (Zunahme der TCC). Bei Desinfektionsmaßnahmen kann die Methode als Viabilitätsuntersuchung angewandt werden – einerseits ist eine absolute Zunahme der TCC, andererseits eine Erholung der ICC aufschlussreich.

5.3.2 ÜBERPRÜFUNG DER REINHEIT DER GEBINDE

Eine wesentliche Anforderung besteht in der Reinheit der verwendeten Gebinde. Interpretiert man eine deutliche Zunahme der TCC nach Lagerung als Hinweis auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen, so ist das Gebinde idealerweise vollständig frei von letzteren. Ein unkontrollierter Eintrag von Nährstoffen ist in jedem Fall unerwünscht. Um gereinigte Gebinde auf das Vorhandensein von Nährstoffen zu überprüfen, wurden sie mit einer nativen Wasserprobe (Uferfiltrat) befüllt und wie in einem normalen

Wachstumspotential-Versuch gelagert. Vorab wurde allerdings sichergestellt, dass sich die Probe in der stationären Wachstumsphase befindet. Zu diesem Zweck wurde sie vorab in einem gemuffelten 5-l-Gebinde – dem Probenahmegefäß – bei 22 °C gelagert und im Abstand einiger Tage wiederholt mit einer sterilen Pipette beprobt. Sobald keine Zunahme der TCC mehr zu verzeichnen war, wurde die Probe in die zu testenden 100-ml-Gebinde umgefüllt und anschließend gelagert. Die so behandelten Proben haben im Zuge der Lagerung nur ein geringes zusätzliches Wachstum gezeigt und insbesondere war der Zuwachs bei allen Proben in vergleichbarem Ausmaß. Daraus lässt sich ableiten, dass bei der beschriebenen Gebindevorbereitung mit keiner wesentlichen Kontamination (Nährstoffeintrag) gerechnet werden muss. Insbesondere erscheint eine Reinigung der Gebinde mit Salzsäure, wie im Zuge von AOC-Bestimmungen durchgeführt (Hammes und Egli 2007), für den beschriebenen Untersuchungszweck nicht zwingend notwendig, was den Arbeitsablauf erheblich erleichtert.

5.3.3 TEST ZU EINER MÖGLICHEN KONTAMINATION BEI DER PROBENAHEME

Im Zuge der Probenahme und ihrer Vorbereitung kann es zu einem ungewollten Eintrag von Bakterien kommen. Gerade im Fall einer Untersuchung von Desinfektionswirkungen ist dies problematisch, da die autochtone mikrobielle Gemeinschaft wohl meist nicht mehr vermehrungsfähig ist und sich die eingetragenen Bakterien ohne Konkurrenz vermehren können. Sollte die autochtone mikrobielle Gemeinschaft dagegen noch intakt sein, ist dagegen eher davon auszugehen, dass sie an die vorherrschenden Umgebungsbedingungen am besten angepasst ist. Eine einfache Möglichkeit zur Überprüfung wurde im vorliegenden Projekt getestet. Dabei wurde eine mit Acetat als Nährstoffquelle versetzte Wasserprobe hitzesterilisiert. Mit dieser Testprobe wurde am Ort der Probenahme eine Probenabfüllung simuliert, d.h. auch sie wurde in Glasgebinde abgefüllt, mit Schliffstopfen verschlossen und anschließend gelagert. Die Wachstumsbedingungen in der Testprobe sind aufgrund der Acetat-Zugabe verbessert, d.h. auch bei Einbringung nur weniger Organismen sollte sich bei einer Lagerung bei 22 °C recht bald eine deutliche Zellvermehrung zeigen. Das Ergebnis dieses Versuchs hat dabei keinen Hinweis auf eine bakterielle Kontamination erbracht.

5.3.4 SAUERSTOFFEINTRAG BEI PROBENAHEME

Im Rahmen der WP-Versuche kann es gewünscht sein, den natürlichen Sauerstoffgehalt der Probe möglichst wenig zu verändern. Im Zuge von Abfüllversuchen (Uferfiltrat-Probenahmestelle) mit Sauerstoffmessung hat sich gezeigt, dass dies bei raschem Vorgehen mit den verwendeten Gebinden (Schliffstopfen) einigermaßen gewährleistet werden kann. Der vor Ort gemessene Gehalt an gelöstem Sauerstoff (3 mg/l) hat sich im Zuge von Abfüllung und Transport (Messung nach Ankunft im Labor) sowie Lagerung um insgesamt nur knapp 1 mg/l erhöht.

5.3.5 ZUGABE VON NATRIUMTHIOSULFAT BEI GECHLORTEN WASSERPROBEN

Die Zugabe von Natriumthiosulfat zur Neutralisation von Restchlor hat im Rahmen der vorliegenden Untersuchung bei verschiedenen Wasserproben zu einer starken Zellvermehrung geführt. Dieser Effekt war dabei unabhängig von der Chlorwirkung, da er auch bei nicht-gechlorten Proben aufgetreten ist, die testweise mit Natriumthiosulfat versetzt wurden. Die Herstellung einer Natriumthiosulfat-Lösung aus einer ungeöffneten Abfüllung in gemuffelten Glasgebinden hat dabei keinen Unterschied ergeben (Ausschluss einer Kontamination). Im Zuge des bakteriellen Wachstums kam es darüber hinaus zu einem Verschwinden der typischerweise durch Natriumthiosulfat hervorgerufenen Lichtabsorption (UV-VIS-Spektrometrie), was einen Abbau der Substanz nahelegt.

5.4 VERGLEICHBARKEIT DER DFZ MIT ANDEREN METHODEN

5.4.1 KULTIVIERUNG

Generell ist der Zusammenhang zwischen der aerob mesophilen Keimzahl – der sogenannte Gesamtkeimzahl – und der Zellzahl der DFZ eher gering (S. Van Nevel u. a. 2017). Ein Grund dafür ist sicherlich, dass nur ein sehr geringer Anteil aller Bakterien überhaupt kultivierbar ist, wohingegen mit der DFZ alle Bakterien erfasst werden. Im Rahmen der durchgeführten Messkampagne hat sich allerdings gezeigt, dass zumindest bei bestimmten Messstellen und überaus starker Zusammenhang besteht. In Abbildung 64 sind TCC-Werte gegen die KBE bei 22°C für eine mehrmonatige Messreihe mit täglicher Probenahme dargestellt. Wesentlich für den beobachteten Zusammenhang ist sicher die Tatsache, dass das Niveau der KBE grundsätzlich eher erhöht ist und die meisten Werte größer null sind (dies ist bei vielen anderen Messstellen nicht der Fall).

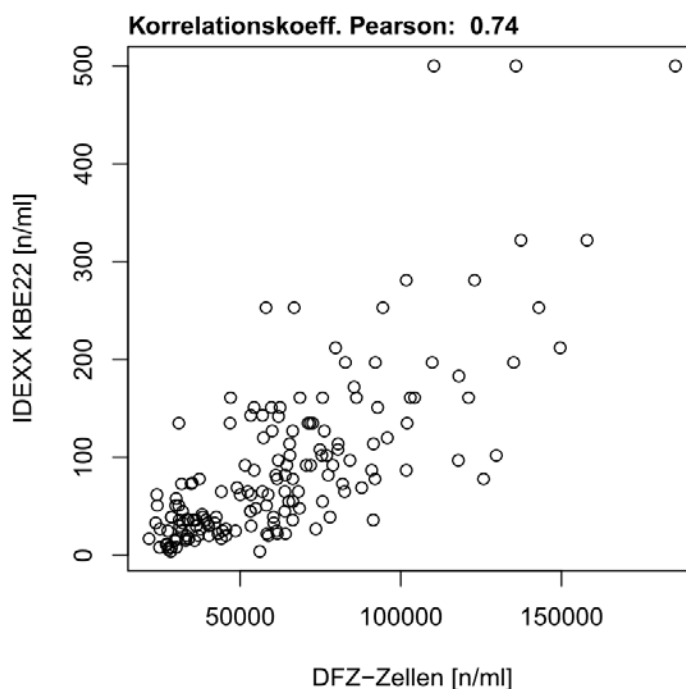


Abbildung 64: Gegenüberstellung von TCC und KBE (22 °C) für eine Messreihe mit täglicher Probenahme.

5.4.2 ATP-BESTIMMUNG

Um einen Vergleich der DFZ Methode mit der ATP Messung anzustellen, wurden zwei verschiedene Systeme untersucht. Zunächst wurde ein Inhibierungsversuch mit ClO₂ Zugabe durchgeführt, bei dem definierte Mengen von ClO₂ (0,05 mg/L – 0,6 mg/L, sowie komplette Abtötung mittels Hitzebehandlung) einer E.-faecium-Kultur, die sowohl in 0,9%iger NaCl-Lösung als auch in steril filtriertem Rohwasser eingebracht wurde (Verdünnung), zugesetzt wurden. Dabei wurden sowohl die ATP Gehalte ermittelt, als auch die ICC. Die Ergebnisse sind in Abbildung 65, Abbildung 66 und Abbildung 67 zu sehen. Es ist klar erkennbar, dass beide Methoden den gleichen Effekt darstellen, die Zugabe von ClO₂ bewirkt eine deutliche Reduktion der lebenden Zellen, welche in der Reduktion des intrazellulären ATPs, bzw. in der Abnahme der ICC zu sehen ist. Beide Untersuchungen konnten zeigen, dass die in Rohwasser kultivierten Organismen der ClO₂ Zugabe gegenüber resistenter sind, als die in NaCl kultivierten Organismen. Aufgrund der sehr geringen ATP Konzentrationen, insbesondere bei in Rohwasser kultivierten Organismen, ist die Abnahme hierbei nicht ganz so klar erkennbar, wie es der Fall für einerseits die in NaCl kultivierten Organismen ist

RESULTATE

(die ATP Ausgangskonzentration der unbehandelten NaCl Kultur ist etwa doppelt so hoch, wie in der Rohwasserkultur) und andererseits für die durchflusszytometrisch ermittelte ICC. Dass beide Methoden miteinander korrelieren ist dennoch erkennbar.

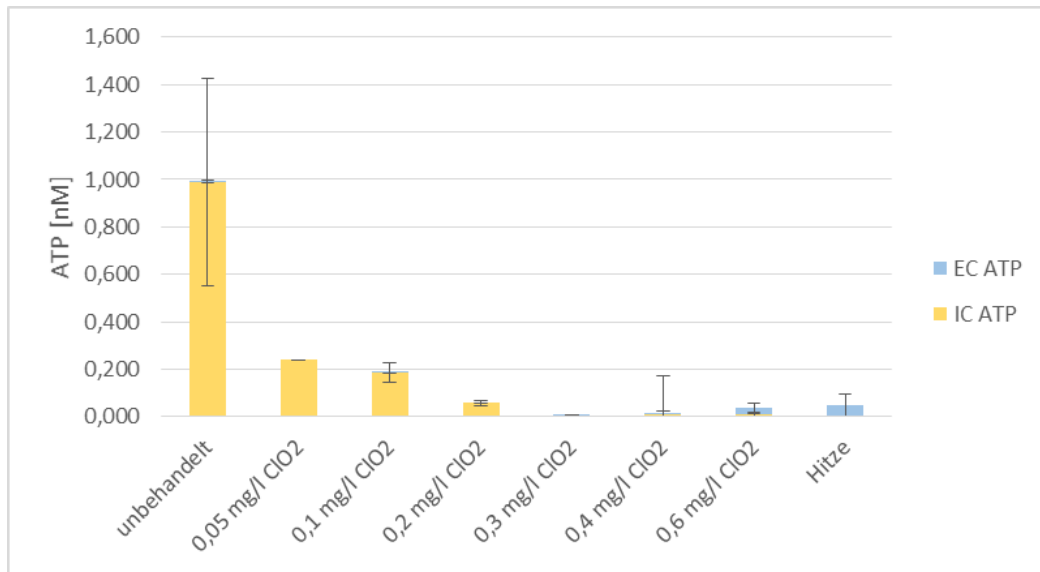


Abbildung 65: ATP-Bestimmung für eine in 0,9%iger NaCl-Lösung eingebrachte *E.-faecium*-Kultur nach ClO₂-Zugabe. EC ATP, extrazelluläres ATP; IC ATP, intrazelluläres ATP.

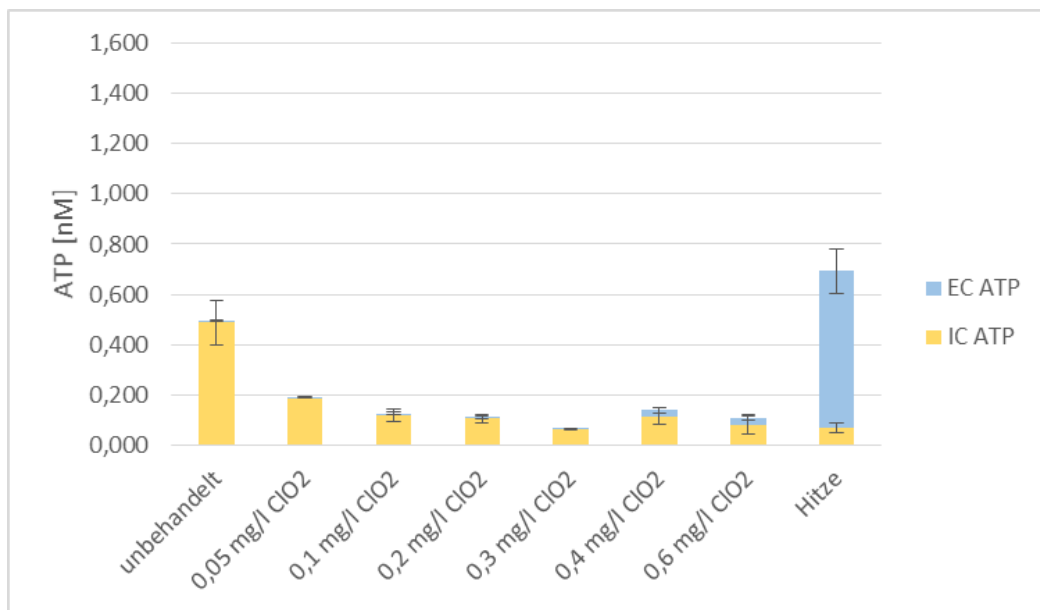


Abbildung 66: ATP-Bestimmung für eine in steril-filtriertes Rohwasser eingebrachte *E.-faecium*-Kultur nach ClO₂-Zugabe. EC ATP, extrazelluläres ATP; IC ATP, intrazelluläres ATP.

RESULTATE

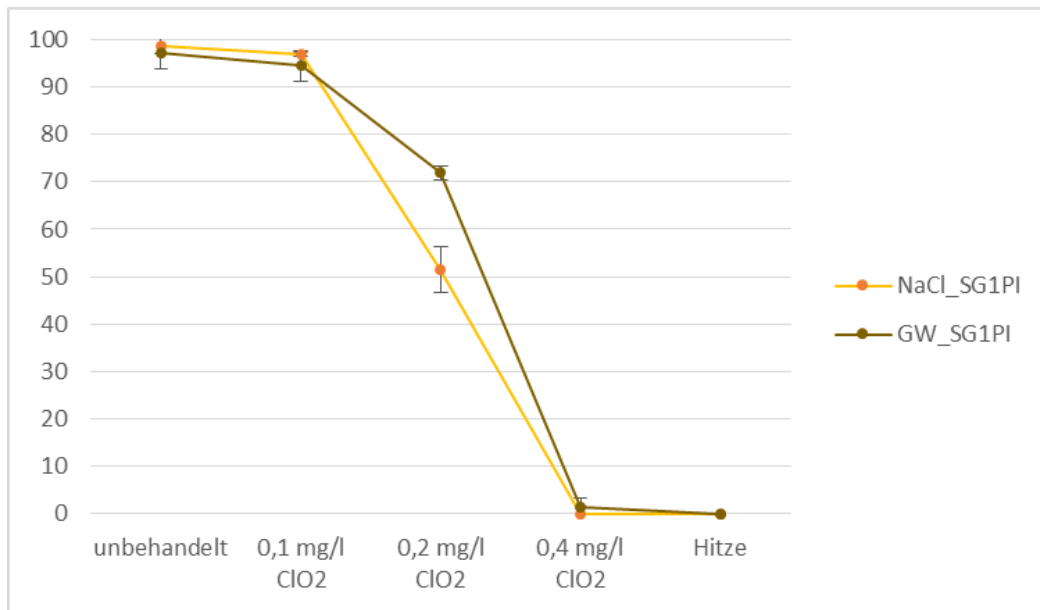


Abbildung 67: ICC (bezogen auf TCC der unbehandelten Probe) für eine mit ClO₂ behandelte *E.-faecium*-Kultur. NaCl_SG1PI, in 0,9%iger NaCl-Lösung eingebrachte Organismen; GW_SG1PI, in steril-filtrierte Rohwasser eingebrachte Organismen.

In einem weiteren Versuch wurde das Wachstumspotential einer Rohwasserprobe mittels ATP und DFZ nach 7 und 14 Tagen Standzeit untersucht (Lagerungstemperatur 15 °C). Ergebnisse sind in Abbildung 68 und Abbildung 69 zu sehen. Auch hierbei ist grundsätzlich eine ähnliche Entwicklung erkennbar, bei beiden Methoden ist zu sehen, dass die Zellzahl bzw. der intrazelluläre ATP-Gehalt mit andauernder Standzeit ansteigen. Die Art und Weise, mit der beide Parameter dies tun unterscheidet sich jedoch. Der Anstieg ist durch ATP Messungen sehr viel stärker erkennbar, als durch die Zellzahl.

Insgesamt ist bei beiden Versuchen erkennbar, dass die Zellzahlbestimmungen mit den ATP-Messungen vergleichbar sind, was die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (ICC-Bestimmung) bestätigt.

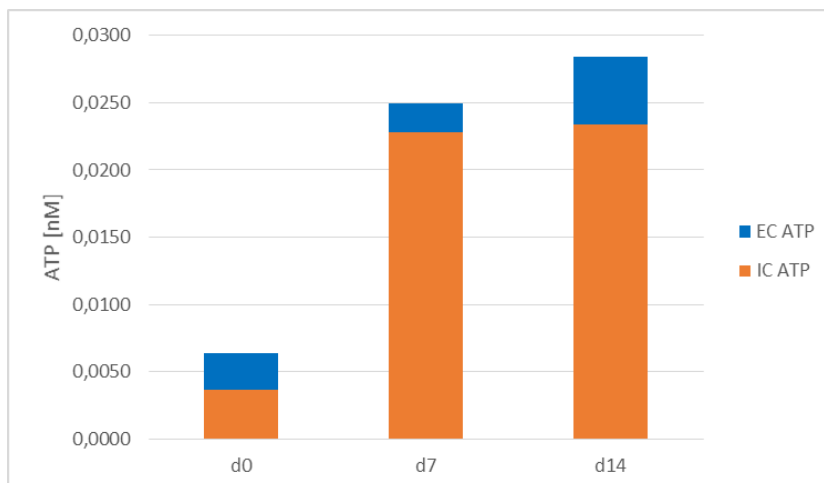


Abbildung 68: ATP-Bestimmung für eine Rohwasserprobe nach 0, 7 und 14 Tagen Standzeit. EC ATP, extrazelluläres ATP; IC ATP, intrazelluläres ATP.

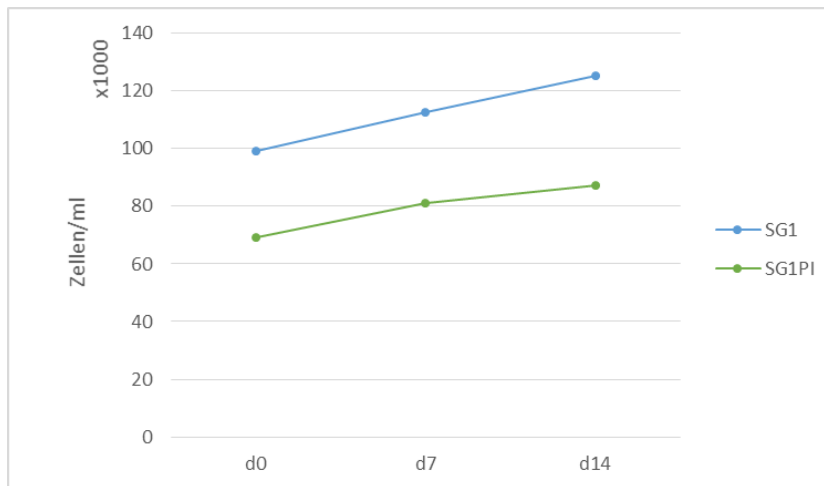


Abbildung 69: TCC und ICC für eine Rohwasserprobe nach 0, 7 und 14 Tagen Standzeit. SG1, SYBR®Green Färbung; SG1PI, SYBR®Green+Propidiumiodid Färbung.

5.5 DATENAUSWERTUNG

5.5.1 DATENTRANSFORMATION

Durchflusszytometrische Datensätze können, basiert auf Ausführungen von Finak, et al. (2010), unter anderem Ausreißer, asymmetrische und einander überlappende Zellgruppen, bzw. solche deren Varianz von der mittleren Fluoreszenzintensität abhängt, enthalten. Dies kann wiederum den Gatingvorgang komplizierter gestalten und beeinträchtigen wodurch auch Analysen bzw. Auswertungen die auf diesen Vorgang folgen beeinflusst werden. Um die Vergleichbarkeit von verschiedenen Proben zu wahren sollte eine einheitliche Transformation inklusive dazugehöriger Parameter gewählt werden. Es ist zu beachten dass gewisse automatische Clusteringmethoden bereits eine Art der Datentransformation inkludiert haben oder eine solche voraussetzen.

Um die eben beschriebenen Probleme und ihre Auswirkungen zu vermindern wurden verschiedene Transformationsarten vorgeschlagen. Grundsätzlich ist eine Transformationsart zu wählen die die angestrebten Arbeitsschritte wie die Erstellung von Darstellungen, Gating von Datenpunkten und ähnlichem erleichtert, wobei dabei gleichzeitig eine gute Auflösung der Zellgruppen über den gesamten erfassten Datenbereich erreicht wird.

Für Durchflusszytometrie Datensätze sind verschiedene Transformationsarten gebräuchlich, unter anderem verschiedene Arten der logarithmischen Transformation und die Areasinus hyperbolicus Transformation. Während die logarithmische Transformation zwar eine gute Auflösung über beinahe den kompletten Datenbereich liefert, können allfällige negative Werte nicht transformiert werden. Diese Einschränkung besteht nicht für die Areasinus hyperbolicus Transformation die in der Nähe des Nullwertes eine lineare Darstellung und eine logarithmische Darstellung für höhere Werte liefert.

Für die Auswertungen und Darstellungen kamen sowohl die logarithmische als auch die Areasinus hyperbolicus Transformation zum Einsatz.

Abbildung 70 zeigt die Datenpunkte einer durchflusszytometrischen Messung in der Kanalkombination FL1-H und FL3-H. Auf der linken Seite sind die Werte nicht transformiert. Da sich unter den Datenpunkten auch Ausreißer befinden, werden die Datenpunkte in der Darstellung nahe an den Koordinatenursprung gedrückt, wodurch eine sinnvolle Darstellung nicht möglich ist. Im Vergleich dazu stellt die rechte Darstellung in dieser Abbildung denselben Datensatz mit einer Areasinus hyperbolicus Transformation dar.

Der Bereich über den die Daten hier aufgespannt sind, ist hier weitaus kleiner. Zudem sind hier die LNA und HNA Gruppen bereits klar ersichtlich.

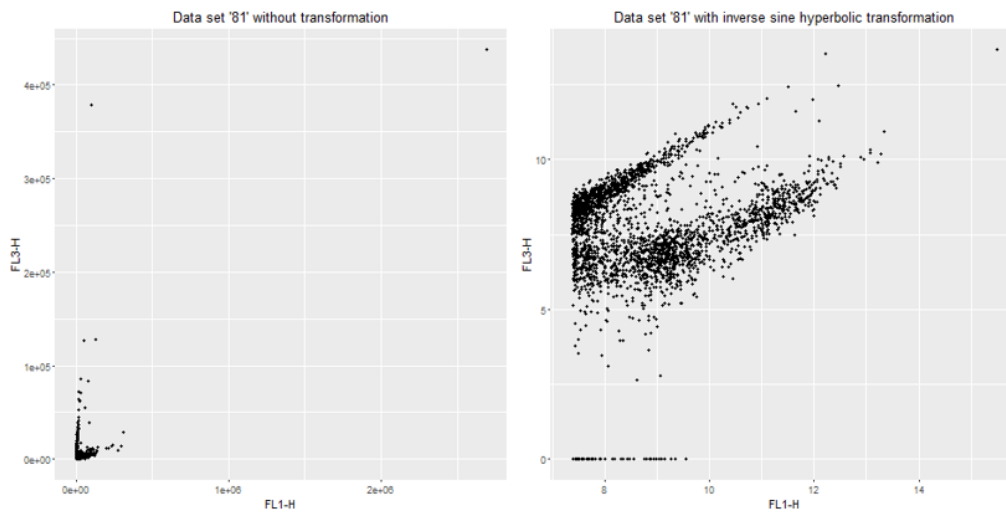


Abbildung 70: Untransformierter Datensatz (links) und gleicher Datensatz mit *Areasinus hyperbolicus* Transformation (rechts).

5.5.2 GATING

Die Grundlagen des sogenannten Gatings, also der Abtrennung von bestimmten Signalbereichen (etwa der Zell-Detektionen), wurden in Abschnitt 3.5.1 bereits erläutert. Hier sollen in erster Linie einige datentechnische Strategien vorgestellt werden, die bei der Festlegung dieser Gates helfen können. Daneben kann aber auch eine Steril-Filtration von Proben Hinweise auf die Positionierung des Gates liefern (siehe Abschnitt 5.5.2.4).

5.5.2.1 FESTLEGUNG EINES FIXEN TCC-GATES

Das hier vorgeschlagene Vorgehen beruht auf dem Vorhandensein von vielen repräsentativen DFZ-Messungen und einem zufälligen Sampling von Detektionen aus diesen Datensätzen. Auf diese Weise wird eine Zusammenfassung aller Datensätze zu einem einzelnen, repräsentativen Datensatz erreicht. Das Sampling kann hierbei entweder von jedem Datensatz eine fixe Anzahl an Detektionen umfassen, oder aber eine der Gesamtanzahl an Detektionen des jeweiligen Datensatzes proportionalen Anteil. In ersterem Fall geht jeder Datensatz mit gleichem Gewicht in die Zusammenfassung ein, in letzterem Fall wird die Summe aller Detektionen (aller Datensätze) besser berücksichtigt, was zu einer Dominanz von Proben mit einer hohen Anzahl an Detektionen führt. Die Anpassung einer Kerndichteschätzung an die Parameterkombination von FL1 und FL3 erleichtert die nachfolgende visuelle Anpassung des Gates (ein Polygon). In Abbildung 71 ist ein Beispiel für dieses Vorgehen zu sehen, wobei gleich mehrere verschiedene Signalbereiche abgegrenzt wurden (Datenreihe des Online-DFZ).

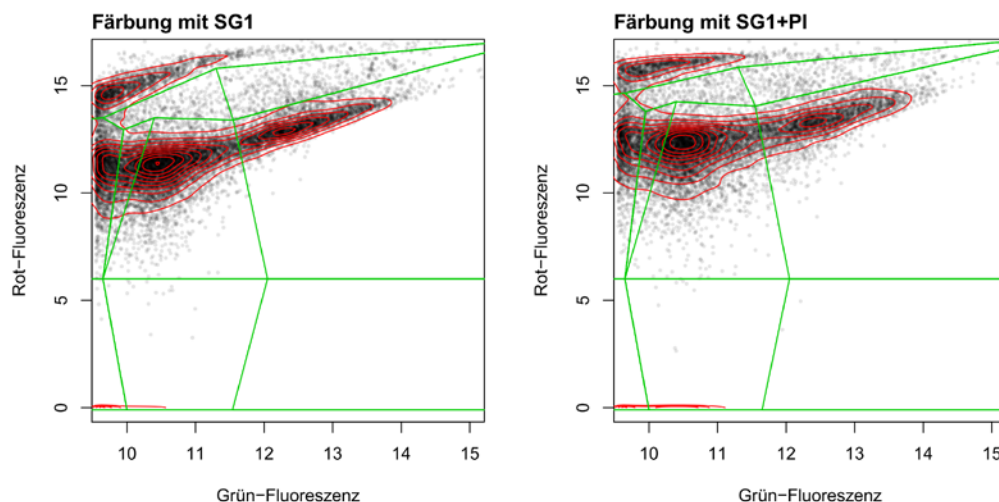


Abbildung 71: Streudiagramme der Grün- und Rotfluoreszenz (links: SG1, rechts: SG1+PI) mit überlagerter Kerndichteschätzung (rote Linien) und an diese angepasste Gates (grüne Linien). Die jeweiligen Datensätze repräsentieren eine Vielzahl an Datensätzen, die durch Sampling zusammengefasst wurden.

5.5.2.1.1 ANALYSE DER ABSTÄNDE DER DETEKTIONEN ZUM GATE

Eine Möglichkeit zur Beurteilung der Güte der Gate-Festlegung besteht in der Bestimmung des minimalen Abstandes der Datenpunkte zum Gating-Polygon (Abbildung 72). Als Kenngröße kann etwa ein bestimmtes Quantil der so bestimmten Abstände herangezogen werden. Liegt ein großer Anteil an Detektionen in unmittelbarer Nähe zum Gate, können diese Messungen identifiziert werden. So ist es durchaus möglich, dass Proben bestimmter Messstellen schlecht durch das gewählte Gate erfasst werden (siehe etwa Abbildung 73).

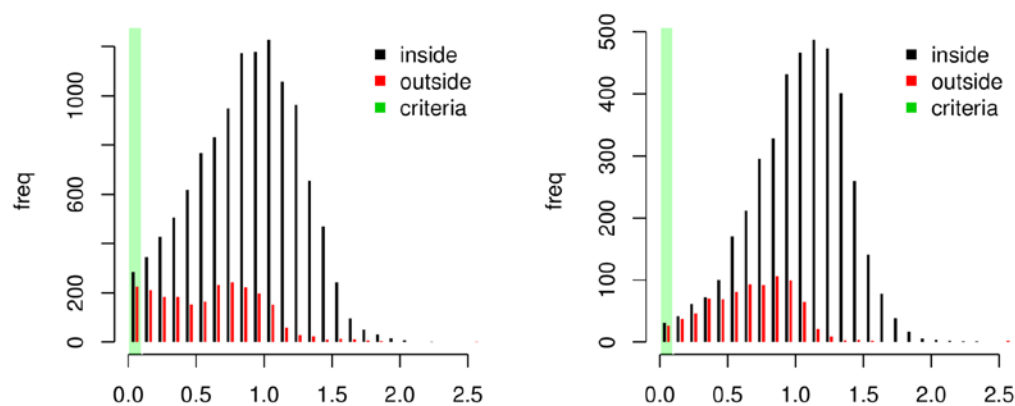


Abbildung 72: Histogramm der Minimal-Abstände der Detektionen zweier DFZ-Messungen zum Polygon des Zell-Gates.

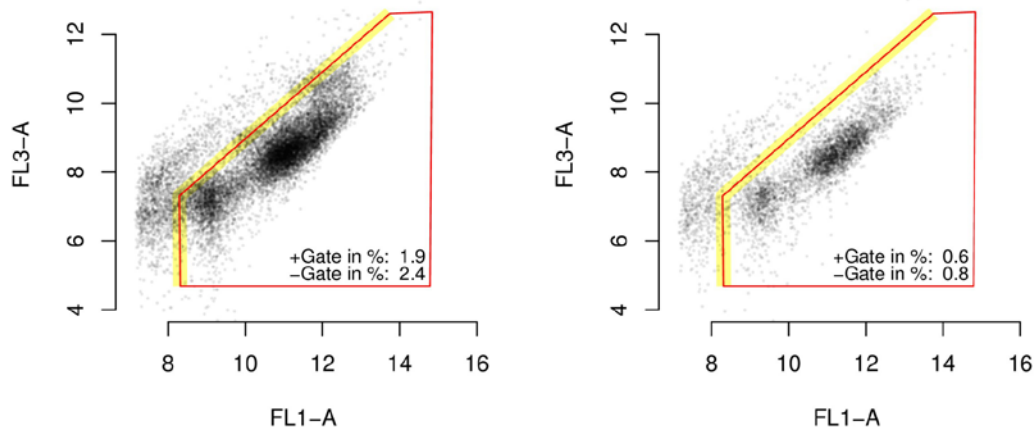


Abbildung 73: Streudiagramme der Grün- und Rot-Fluoreszenz zweier DFZ-Messungen. Die eingezeichneten Werte geben die Zu- bzw. Abnahme der TCC-Werte bei einer minimalen Verschiebung (gelber Bereich) der Gate-Grenzen wieder.

5.5.2.2 VORGEHEN BEI DER FESTLEGUNG DES ICC-GATES

Die grundsätzliche Überlegung zur Festlegung des Gates zur Abtrennung der intakten Zellen (ICC) ist jene, die Signalverteilung von unbeschädigten Zellen, in die PI nicht eindringen kann, als Referenz zu wählen. Bei der Messung von Laborstämmen ist dabei sichergestellt, dass es sich bei unbehandelten Referenzproben tatsächlich um vitale Zellen handelt, die auch vermehrungsfähig sind. Im Fall von natürlichen Wasserproben ist dies weniger eindeutig und der Nachweis einer Vermehrungsfähigkeit durch Kultivierung (gerade bei LNA-Zellen) kaum möglich. Betrachtet man die Streudiagramme der Grün- und Rot-Fluoreszenz von unbehandelten Proben (siehe Abbildung 71) erkennt man – insbesondere an den LNA-Zellen – ein verstärktes Rot-Signal bei der Färbung mit SG1 und PI. Eine Schädigung der Zellmembranen eines Großteils der Zellen ist dabei unwahrscheinlich, schließlich handelt es sich um eine natürliche Bakterienpopulation. Es erscheint durchaus möglich, dass der beschriebene Versatz von der Fluoreszenz des ungebundenen PI stammt. Aus diesem Grund sollten auch die Gate-Grenzen im Vergleich zum TCC-Gate so adaptiert werden, dass sie diesem Umstand Rechnung tragen. Eine genaue Festlegung der Grenzen kann durch den Vergleich der mittleren Fluoreszenz-Intensitäten (etwa des LNA-Clusters) zwischen SG1-Färbung und der Farbstoffkombination SG1 und PI erfolgen.

5.5.2.3 VERWENDUNG DER STREULICHTKANÄLE

Für das Gating stehen verschiedenen Signalkombinationen zur Verfügung. Im Zuge des Projekts hat sich gezeigt, dass im kritischen Bereich der LNA-Zellen, die neben einem nur sehr schwachen Fluoreszenzsignal, auch ein ebensolches Streulichtsignal aufweisen, eine Unterscheidung vom Signalhintergrund mithilfe letzterer kaum möglich ist. Davon abgesehen ist eine Unterstützung des TCC-Gatings jedoch gegeben. So weisen bei einzelnen Messungen manche Detektionen im Fluoreszenz-Signalebereich der Zellen sehr starke Streulichtsignale auf, die weit über jenen herkömmlicher Zellen (auch Labor-Stämme) liegen. Eine Ausscheidung dieser Detektionen scheint daher in diesen Extremfällen gerechtfertigt. Im Zuge der fortschreitenden Geräteentwicklung ist zu erwarten, dass die Signalauflösung und der daraus ableitbare Informationsgehalt zunehmen.

5.5.2.4 MESSUNG VON STERIL-FILTRIERTEN PROBEN

Die Messung von gefärbten, steril-filtrierte Proben (0,1 µm) kann einerseits dazu genutzt werden, zu ermitteln, ob Detektionen im Signalebereich der Zellen aufscheinen, obwohl dies aufgrund der bekannten Bakteriengrößen eher unwahrscheinlich ist (Duda u. a. 2012), andererseits lassen sich Informationen über

den Signalhintergrund (außerhalb des Signalebereichs der Zellen) erhalten. Im Umkehrschluss heißt das aber natürlich nicht, dass alles was durch die Filtration entfernt wurde, einem Organismus entspricht. Im Hinblick auf die Festlegung des Zell-Gates gilt dabei jedenfalls, dass dieses bei einer solcherart behandelten Wasserprobe idealerweise keine Detektionen enthält, da keine Bakterien in der Probe verbleiben sollten. Andererseits ist es möglich, dass Zellen im Bereich des Signalhintergrunds aufscheinen (schwache Signale), d.h., dass keine scharfe Abtrennung möglich ist.

In Abbildung 74 sind Streudiagramme exemplarischer DFZ-Messungen von Proben vor und nach einer Filtration (1 l gefiltertes Probenvolumen, Membranfilter PALL Supor® PES mit 47 mm Durchmesser) dargestellt. Es zeigt sich nun, dass eine Filtration mit einem Filter von 0,1 µm Porengröße die Detektionen im Bereich der Zell-Detektionen der ungefilterten Probe fast vollständig entfernt. Lediglich in den Randbereichen des eingezeichneten Zell-Gates sind einzelne Detektionen zu verzeichnen. Damit kann die Aussage getroffen werden, dass praktisch alle Detektionen im Zell-Gate der unfiltrierten Probe größer als 0,1 µm sein müssen. Im Fall einer Filtration mit einer Porengröße von 0,2 µm verbleiben bei der dargestellten Messung einige Detektion im Signalebereich der Zellen. Letzteres ist eine in der vorliegenden Untersuchung häufig gemachte Erfahrung – ein Partikel-Übertrag von vorangegangenen Messungen (Carry-Over) kann jedenfalls als Ursache ausgeschlossen werden – und ist auch in der Literatur beschrieben (Elhadidy u. a. 2016). Der Einfluss der Filtration auf den Signalhintergrund ist demgegenüber schwieriger festzumachen. Im Fall der Messungen aus Abbildung 74 zeigt sich für die 0,1-µm-Filtration keine Reduktion, im Fall der 0,2-µm-Filtration dagegen eine sehr deutliche Reduktion. Auch dies ist insofern eine typische Beobachtung, als dass sich der Signalhintergrund im Zuge der gesamten Messkampagne als sehr variabel mit bis dato nicht geklärter Ursache erwiesen hat.

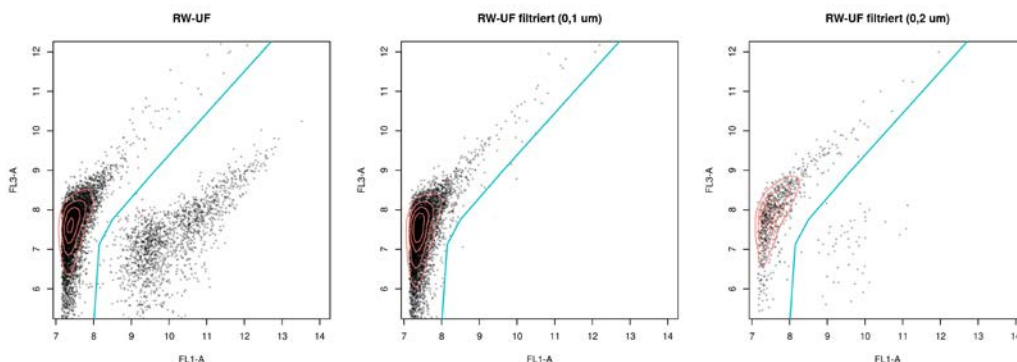


Abbildung 74: Streudiagramm der Grün- und Rot-Fluoreszenz von DFZ-Messungen eines Uferfiltrat-Rohwassers (ungefiltert, Filtration mit 0,1 µm sowie 0,2 µm Porengröße) mit überlagerter Dichteschätzung (rote Linien) und Zell-Gate (blaue Linien).

5.5.3 VORGEHENSWEISE BEI MEHRFACHBESTIMMUNGEN

Die durchflusszytometrischen Messungen werden grundsätzlich in einer Dreifachbestimmung und in selteneren Fällen in einer Zweifachbestimmung ausgeführt. Zudem bestehen fallweise aufgrund der Anzahl der abgefüllten Zentrifugenröhrchen bei der Probenahme mehrere Zwei- oder Dreifachbestimmungen. Für bestimmte Auswertungen und auch Darstellungen ist es erforderlich aus den vorhandenen Zwei- bzw. Dreifachbestimmungen eine Messung zu wählen, wobei hierfür drei Strategien vorgeschlagen werden.

Grundsätzlich ist darauf hinzuweisen, dass bei der Abfüllung mehrerer Zentrifugenröhrchen der Probenahmezeitpunkt nicht mehr ident ist, was unter anderem eine veränderte Wassermatrix bedeuten kann. Ferner besteht die Möglichkeit dass ein Teil der durchgeführten Messungen einer Dreifachbestimmung fehlerhaft ist. Um diesen Umständen Sorge zu tragen und um aufgrund der zur Auswertung gelangenden Anzahl der Messungen keinem Zentrifugenröhrchen und somit keiner Wasserprobe höheres Gewicht zuzusprechen, werden die einzelnen Dreifachbestimmungen zuerst isoliert voneinander betrachtet.

5.5.3.1 KOMBINATION DER MESSDATEN

Hierbei werden die bei den Messungen aufgenommenen Events zu einem Datensatz zusammengefasst. Anschließend erfolgt die Berechnung der Zellzahlen pro definiertem Volumen, wobei hier auf das geänderte Probenvolumen Rücksicht genommen werden muss. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass bezüglich Analysen in denen die Position der einzelnen Datenpunkte eine Rolle spielt, alle aufgenommenen Events zur Auswertung gelangen.

5.5.3.2 MITTELWERTBILDUNG AUS TCC UND ANZAHL DER HNA-ZELLEN

Diese Strategie findet beim Vorhandensein einer Zweifachbestimmung bzw. zweier Dreifachbestimmungen nach der Auswahl der Messungen, Anwendung. Hier wird der arithmetische Mittelwert der Zellzahlen der beiden Messungen gebildet, wodurch dem Nutzer für allfällige weitere Auswertungen diese Werte zur Verfügung stehen.

5.5.3.3 DISTANZANALYSE DER MESSUNGEN ZUEINANDER

Beim Vorliegen einer oder mehrerer durchflusszytometrischen Dreifachbestimmungen einer Wasserprobe, wird, wie zuvor beschrieben, zuerst jede dieser Dreifachbestimmungen isoliert betrachtet. Die Vorgehensweise zielt darauf ab jene Messung zu finden die in Summe die geringste skalierte Distanz zu den anderen Messungen aufweist. Dazu erfolgt zuerst die Berechnung der jeweiligen Total- und HNA-Zellzahlen pro definiertem Volumen. Im Anschluss werden sowohl die Totalzellzahlen und HNA-Zellzahlen getrennt voneinander skaliert, wodurch der Mittelwert null und die Varianz eins beträgt. Abbildung 75 zeigt beispielhaft die Positionen der Messungen und die jeweiligen Distanzen zueinander in zwei-dimensionaler Darstellung. Durch Berechnung der Distanzmatrix der Punkte zueinander ergeben sich für jede Messung die Distanzen zu den anderen Messungen. Anhand der Summenbildung und anschließender Wahl der kleinsten Summe erfolgt die Wahl der Messung.

Bestehen nun zum Beispiel zwei Dreifachbestimmungen, so wird der eben beschriebene Arbeitsablauf für beide Dreifachbestimmungen getrennt durchgeführt wobei anschließend für die zwei verbliebenen Messungen die Mittelwertbildung erfolgt. Im Falle von drei Dreifachbestimmungen erfolgt der Vorgang wiederum für jedes Triplet, wobei hier schlussendlich wiederum drei Messungen verbleiben. Dadurch kann hier auf die Mittelwertbildung verzichtet werden und wiederum die Distanzanalyse zum Einsatz kommen.

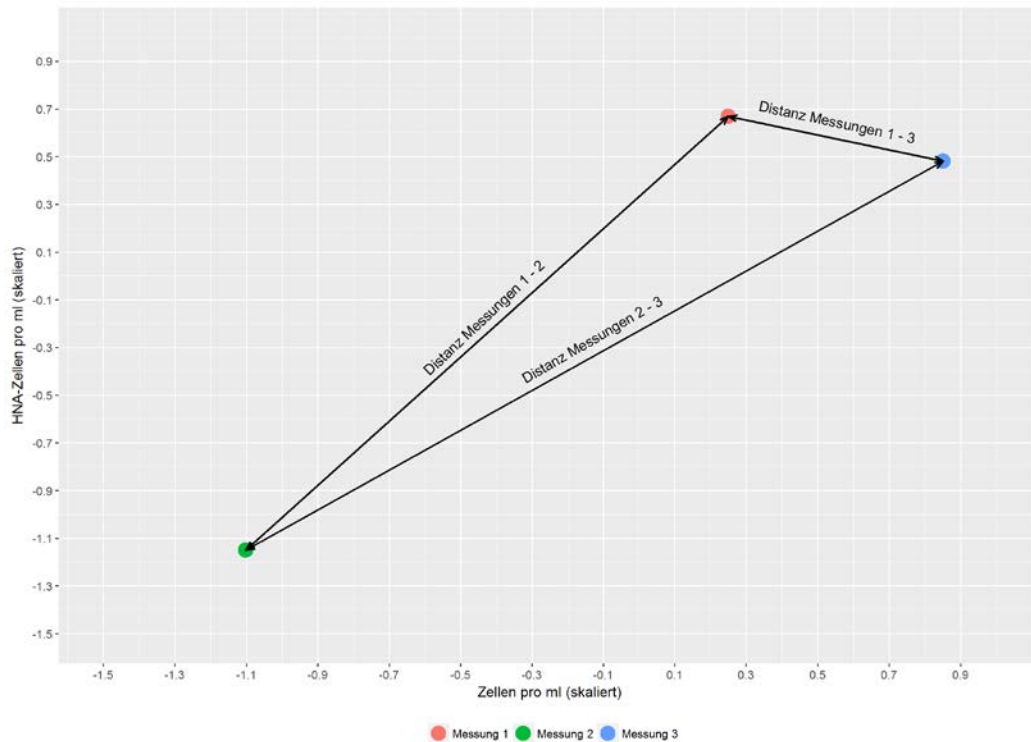


Abbildung 75: Distanzanalyse beim Vorliegen einer Dreifachbestimmung.

5.5.4 CYTOMETRIC FINGERPRINTING

In Abschnitt 3.5.2 wurden die Grundlagen des Cytometric Fingerprintings bereits vorgestellt. Die Methode erlaubt es, die multidimensionale Datenstruktur aus Einzeldetektionen in Form von sogenannten Fingerprints zusammenzufassen und zwischen verschiedenen Datensätzen vergleichbar zu machen. Die genannten Fingerprints sind somit auch eine weiterführende Datenverarbeitung geeignet und können somit als Zwischenschritt zwischen Rohdaten und statistischer Auswertung dienen (Rogers u. a. 2009).

Der erste Schritt in der Anwendung besteht in der Anpassung eines gemeinsamen Auszählrasters („Bin-Modell“) an die zu vergleichenden Datensätze (siehe Abbildung 6). Die wesentliche Eigenschaft ist jene, dass die einzelnen Bins im Schnitt die gleiche Anzahl an Detektionen enthalten. Der Algorithmus geht dabei in der Festlegung der Bin-Grenzen rekursiv vor, indem er in jedem Teilungsschritt jenen Parameter wählt, der die höchste Varianz enthält und eine Trennung im Median vornimmt. Die Bins sind dabei in der Anzahl der Dimensionen grundsätzlich nicht beschränkt. Für die Anpassung des Modells kann etwa aus allen Datensätzen eine bestimmte Anzahl an Detektionen gesammelt werden. Anhand des gemeinsamen Bin-Modells wird nun jeder Datensatz ausgezählt. Es wird also ermittelt, wie viele Detektionen in ein bestimmtes Bin fallen. Wenn ein Datensatz vom gemeinsamen Durchschnitt abweicht, dann enthält sein Auszählungsvektor (der Fingerprint) sehr unterschiedliche Werte (rote Linie in Abbildung 76). Stimmt er mit dem Bin-Modell, das einen gemeinsamen Durchschnitt repräsentiert, überein, enthält sein Fingerprint nur sehr ähnliche Werte.

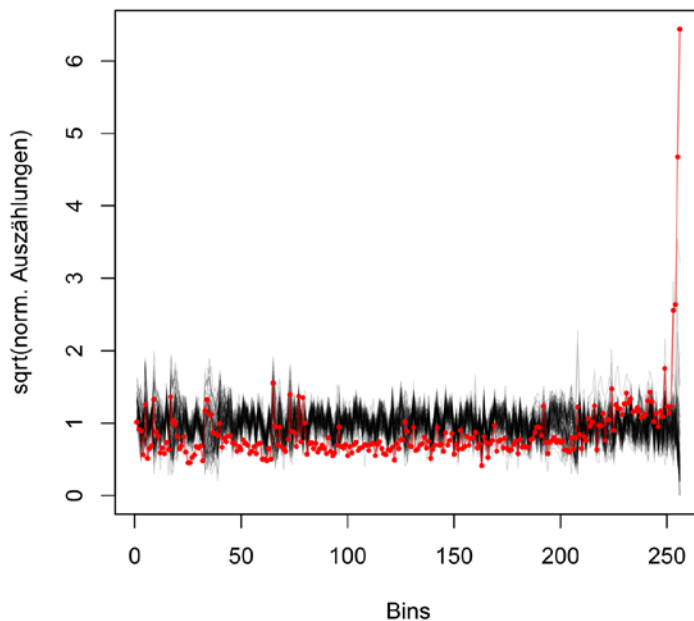


Abbildung 76: Darstellung der normalisierten Fingerprints – das Bin-Modell basiert auf den Parametern FL1 und FL3 der Zell-Detektionen – aller Datensätze einer Messreihe (Uferfiltrat-Standort, Färbung mit SG1). Jener Fingerprint mit der größten Abweichung ist rot dargestellt.

Durch eine Normalisierung der Auszählungen mit der jeweiligen Gesamtanzahl an Detektionen des Datensatzes lassen sich Unterschiede zwischen den Fingerprints als strukturelle Abweichung interpretieren. Zwei Datensätze, deren Signalverteilungen ident sind, die sich aber in der Gesamtanzahl an Detektionen unterscheiden, haben nach der Normalisierung einen gleichen Fingerprint.

In einem nächsten Schritt können die Fingerprints dazu verwendet werden, neue Gates zu definieren (Roederer und Hardy 2001). Dieses kann etwa aus den Bins mit den maximalen Abweichungen bestehen (Abbildung 77). Man kann es anschließend einsetzen, um in den anderen Datensätzen nach gleichartigen Abweichungen in diesem Signalbereich zu suchen.

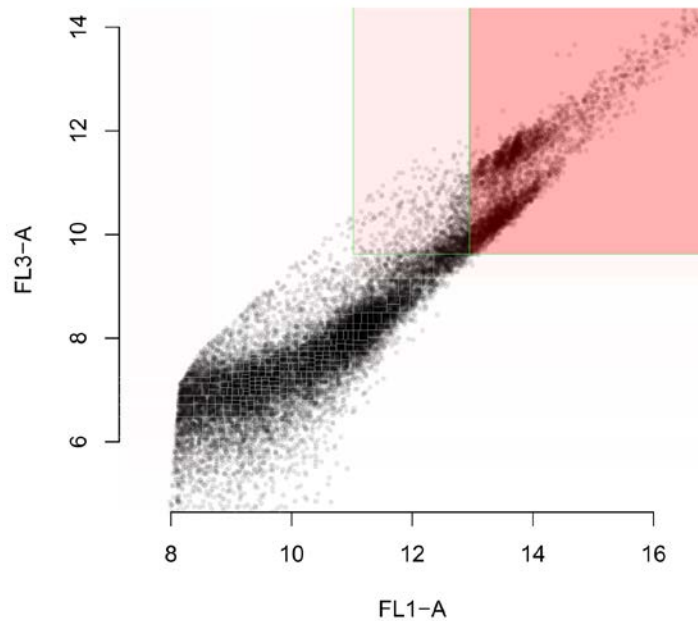


Abbildung 77: Streudiagramm der Grün- und Rot-Fluoreszenz jenes Datensatzes einer Messreihe, der die größte Bin-Abweichung enthält. Je stärker die Rotfärbung, desto größer die Abweichung vom durchschnittlichen Fingerprint.

Eine andere Möglichkeit die FPs zu verwenden, besteht darin mithilfe eines Clusterings – basierend auf den Distanzen der FPs zueinander – Gruppen zu finden. Das in Abbildung 78 dargestellte Dendrogramm legt nahe, dass die Datensätze der genannten Messreihe aus zwei große Gruppen und einem deutlich unterschiedlichen Datensatz bestehen. Letzterer entspricht dem rot dargestellten Fingerprint in Abbildung 76.

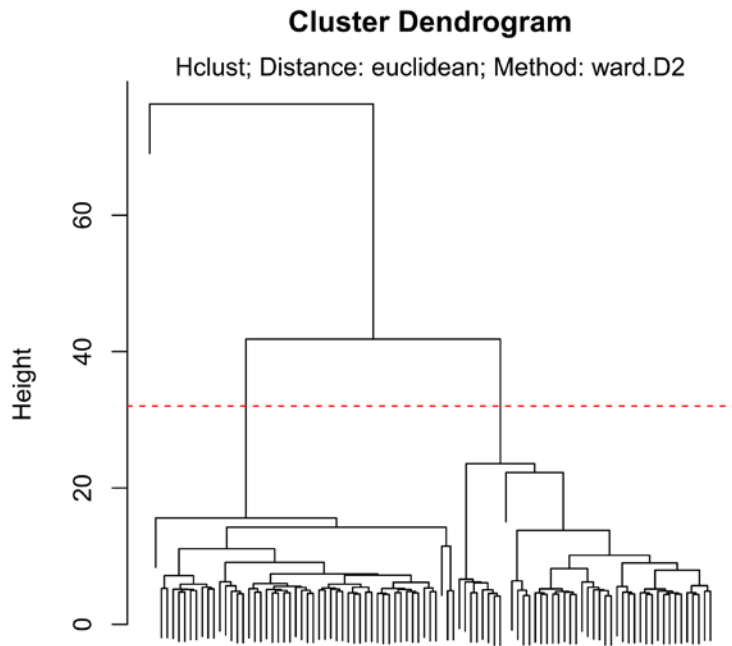


Abbildung 78: Darstellung eines auf den paarweisen Distanzen der Fingerprints beruhenden hierarchisch agglomerativen Clusterings in Form eines Dendrogramms.

Eine weitere Möglichkeit eine Gruppierung mithilfe der paarweisen Distanzen (hier sind verschiedene Distanzmaße möglich) zu ermitteln, sind Darstellungen auf Basis einer PCA (Hauptkomponentenanalyse) oder MDS (multidimensionale Skalierung). Zu letzterem siehe Abbildung 99.

Die Methode ist sehr sensitiv gegenüber nicht-biologischen Signaländerungen, etwa aufgrund einer Gerätealterung oder einer Änderung des Messprotokolls. Daher ist die Überprüfung von Auffälligkeiten bzw. eine Korrektur von Signaländerungen hier besonders sinnvoll (siehe Abschnitt 5.1.3.1).

5.5.5 CLUSTERANALYSE ZUR LNA-HNA-ABTRENNUNG

Wie in Kapitel 3.5.1 ausgeführt, ist es nach Köttsch, Alisch und Egli (2012) nur in seltenen Fällen erforderlich die Gates bzw. die Region Ranges zu korrigieren, da sich nur die Form und Größe der Zellcluster ändert nicht aber ihre Position.

Die Abtrennung der LNA-Zellen von den HNA-Zellen ist, neben den in Kapitel 3.5.1 vorgestellten Vorgehensweisen auch mittels der Software „R“ möglich, die eine automatische Abtrennung unter Berücksichtigung einer Vielzahl von durchflusszytometrischen Messungen erlaubt. Hierbei bedient man sich unter anderem der statistischen Methode des Clusterings, wodurch die sich innerhalb des Gates befindlichen Datenpunkte in Gruppen bzw. in sogenannte Cluster eingeteilt werden. Anschließend wird die Gerade welche die Zentren der erhaltenen Cluster verbindet mit der Geraden die die Gruppen abgrenzt geschnitten, wobei der FL1-H-Wert des erhaltenen Schnittpunktes die Position der Abtrennung festlegt. Diese Methode bietet im Vergleich zu der von Köttsch, Alisch und Egli (2012) beschriebenen Vorgehensweisen den Vorteil, dass nicht nur die in den Optionen zur Abtrennung der LNA- von den HNA-Zellen verwendeten Parameter FL1-H bzw. FL1-H und SSC-H genutzt werden können, sondern auch die Kanalkombination für das ursprüngliche Gating herangezogen werden kann. Somit stehen für die Abtrennung drei Kanäle zur Verfügung, nämlich FL1-H, FL3-H und SSC-H. Zudem erfolgt die Abtrennung im Vergleich objektiv, wobei hier darauf hingewiesen werden muss, dass die Art und die gewählten Einstellungen des gewählten

Clusteralgorithmus Einfluss auf die Abtrennung nehmen kann. Die automatische Abtrennung kann bei Wasserproben bei denen eine manuelle Abtrennung mit den von Kötsch, Alisch und Egli (2012) erläuterten Optionen auf Grund von zum Beispiel fehlenden Dichteveränderungen (Dichteminimum) im Übergang zwischen den zwei Gruppen durchaus zum Vorteil gereichen. Im Folgenden wird die Vorgehensweise zur Erlangung dieser Abtrennung mit der Software „R“ unter der Einsetzung des Clusteringalgorithmus „flowClust“ erläutert.

Als Datengrundlage für die Erfassung der Abtrennung wird eine durchflusszytometrische Messung herangezogen. Im Falle des Vorliegens einer Mehrfachmessung kann wie in Kapitel 5.5.3 ausgeführt, vorgegangen werden. Da für die weitere Vorgehensweise nur die als Zellen angesehenen Datenpunkte erforderlich sind, werden diejenigen die sich außerhalb des vorher bestimmten Gates (siehe Kapitel 3.5.1), in der Parameterkombination FL1-H – FL3-H, befinden vom Gesamtdatensatz getrennt (siehe Abbildung 79).

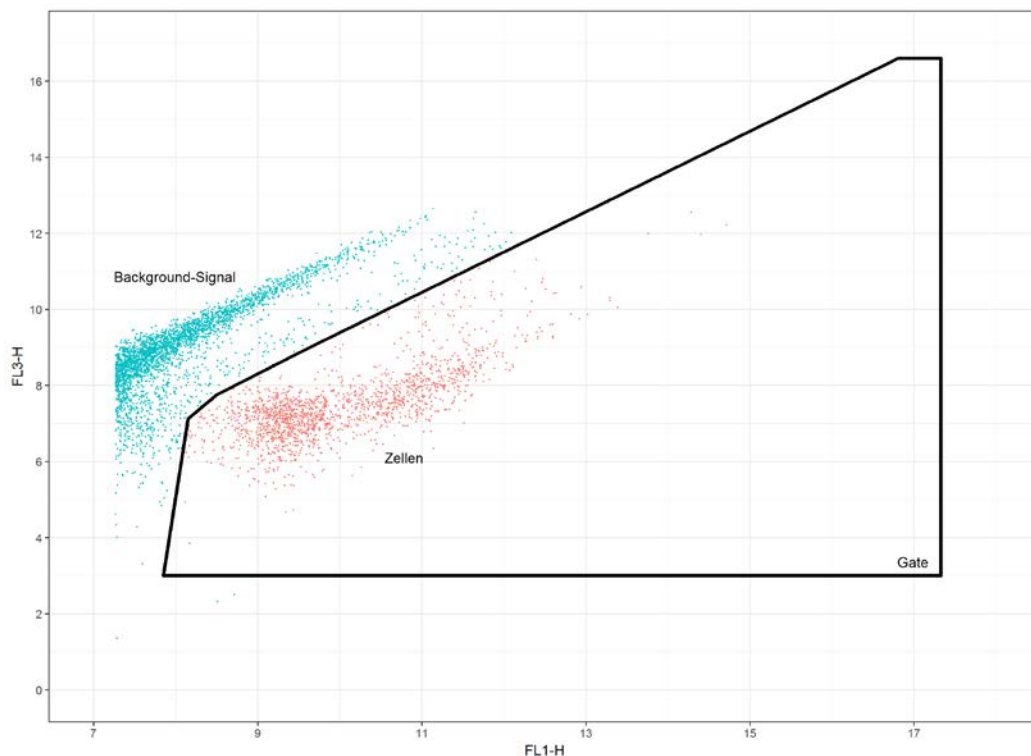


Abbildung 79: Abtrennen der Datenpunkte die sich außerhalb des Gates befinden, wobei die in Rot eingefärbten Punkte für die weitere Auswertung herangezogen werden..

Es sei darauf hingewiesen, dass auch hier eine vorhergehende Transformation der Daten und der Gate Grenzen mit der Areasinus hyperbolicus Transformation erfolgt. Zunächst werden die Datenpunkte mit Hilfe eines ausgewählten Clusteringalgorithmus in Gruppen eingeteilt. Da hier die Unterteilung zwischen LNA- und HNA-Zellen erfasst werden soll, ist es angebracht dem Algorithmus die Anzahl der gewünschten Gruppen bzw. Cluster, in diesem Fall zwei, vorzugeben. Das Ergebnis beinhaltet bei der Verwendung des oben erwähnten Algorithmus eine Zuteilung eines jeden Datenpunktes zu einer der zwei Gruppen (siehe Abbildung 80).

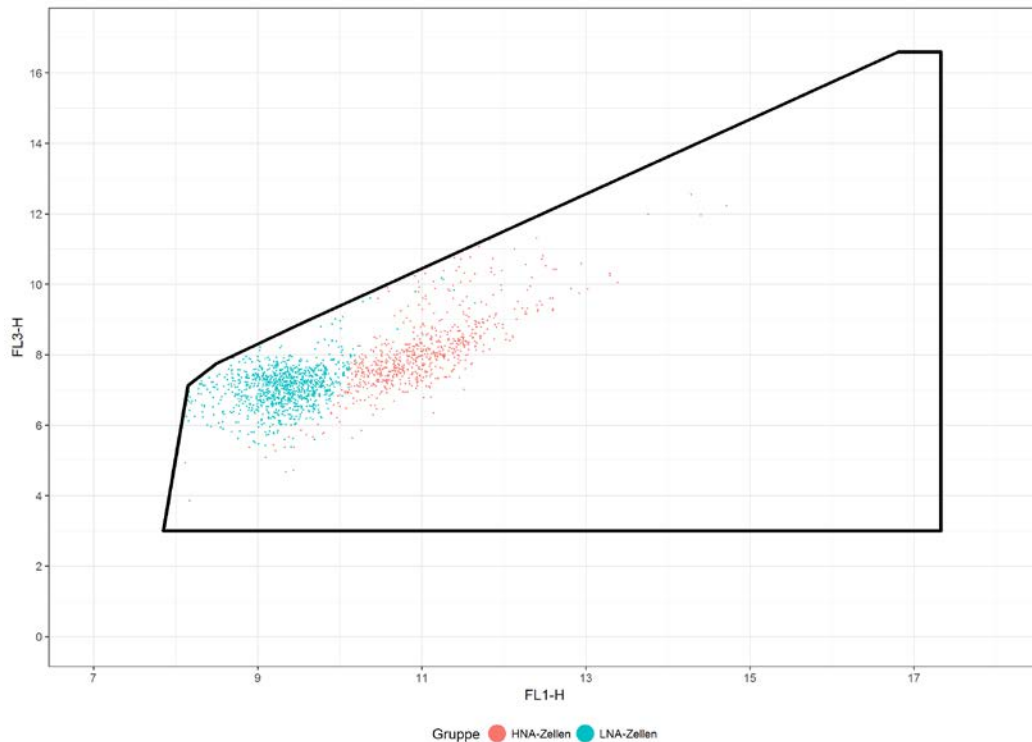


Abbildung 80: Einteilung der Datenpunkte in zwei Gruppen (Clustering).

Obwohl ab diesem Arbeitsschritt schon eine Abtrennung der LNA- von den HNA-Zellen erfolgt ist und durch die Gruppenzuteilung eines jeden Punktes auch die Konzentrationsberechnung hinfällig ist, kann aus Gründen der Vergleichbarkeit der Methoden und der Festlegung eines allgemein gültigen Trennungswertes ebendieser ermittelt werden.

Dazu ist, wie bereits oben angemerkt, die Ermittlung der diese Gruppen trennenden Geraden von Nöten, welche durch die Nutzung der linearen Diskriminanzanalyse erfolgt. Diese Methode bietet laut Fisher (1936) die Möglichkeit, unter Voraussetzung der Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit von Datenpunkten eine lineare Grenze zwischen den zwei Gruppen zu finden. Durch das Vorliegen dieser Grenze können im Anschluss wiederum Punkte deren Zugehörigkeit unbekannt ist, zu einer dieser Gruppen zugeteilt werden. Bei dieser Anwendung wird also eine lineare Diskriminanzanalyse der beiden Fluoreszenzkanäle in Abhängigkeit zur Gruppenzugehörigkeit durchgeführt. Um nun die trennende Gerade bzw. ihre beschreibenden Koeffizienten aus dem Ergebnis dieser R-Funktion zu ermitteln, wird zunächst ein feinmaschiges Punktenetz über den gesamten Datenbereich gelegt, wobei für jeden dieser Punkte die Zugehörigkeit zu einer dieser Gruppen bestimmt wird (Vergleiche Abbildung 81 und Abbildung 82).

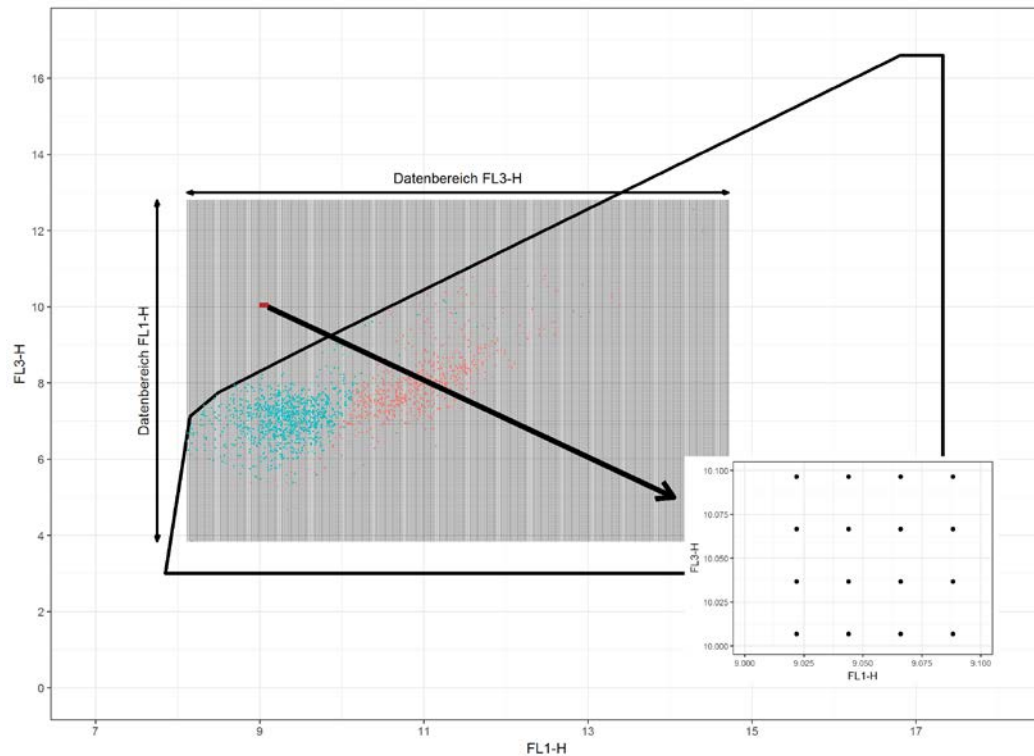


Abbildung 81: Vorgang der Ermittlung der abgrenzenden Gerade mittels linearer Diskriminanzanalyse. Das anschließend über den gesamten Datenbereich gelegte feinmaschige homogene Punktfeld dient zur Klassifizierung der einzelnen Bereiche und anschließender Ermittlung der Geradenkoeffizienten.

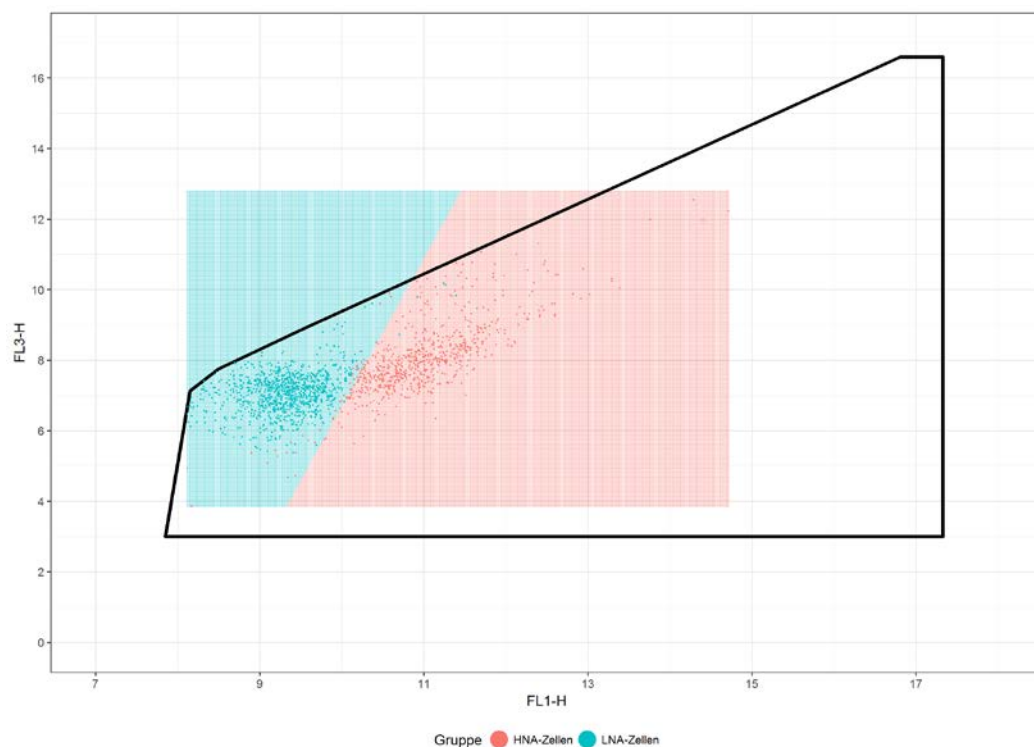


Abbildung 82: Ergebnis der Klassifizierung eines jeden Punktes des Punktfeldes zur Ermittlung der Geradenkoeffizienten.

Durch berechnen der Konturlinie zwischen den beiden Gruppen ergibt sich der Verlauf der Trenngerade in Form einer Vielzahl von Punkten, welche die Gerade beschreiben. Unter Anwendung eines linearen Modells können aus diesen wiederum die Koeffizienten der Gerade berechnet werden.

RESULTATE

Zudem werden mit Hilfe eines weiteren linearen Modells die Koeffizienten der Gerade berechnet welche die Zentren der LNA- und HNA Gruppen verbindet, wobei die Zentren ebenfalls aus dem Ergebnis der linearen Diskriminanzanalyse bezogen werden können. Mit der Berechnung des Schnittpunktes der beiden erhaltenen Geraden, ergibt sich der FL1-H-Wert welcher die Trennung der LNA- von der HNA-Gruppe definiert (siehe Abbildung 83).

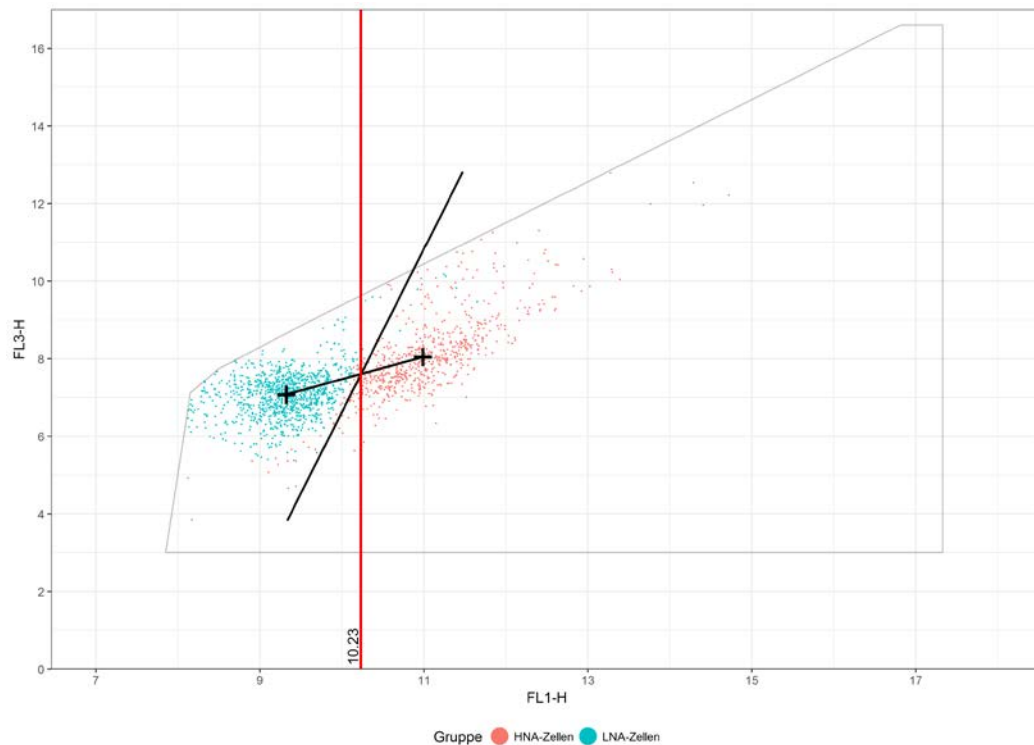


Abbildung 83: Beispiel eines Ergebnisses der automatischen LNA-HNA-Abtrennung. Durchgeführt für eine durchflusszytometrische Messung.

Wird diese Vorgehensweise nun für eine Vielzahl von durchflusszytometrischen Messungen durchgeführt, so erscheint es durchaus logisch dass die ermittelte Grenze auf dem Kanal FL1-H für jede dieser Messungen leicht unterschiedlich ist. Hierbei sollte jedoch darauf geachtet werden, dass diese Messungen mit dem gleichen Durchflusszytometer aber auch den identischen Geräte- und Messeinstellungen vorgenommen wurden, um etwaige Grenzverschiebungen durch unterschiedliche Gerätecharakteristika zu verhindern.

Da es jedoch durchaus sinnvoll ist nur einen Wert zur Abtrennung zu verwenden, besteht die Möglichkeit die Dichteverteilung der einzelnen Trennwerte zu betrachten und dass Dichtemaximum als Wert zu wählen (siehe Abbildung 84).

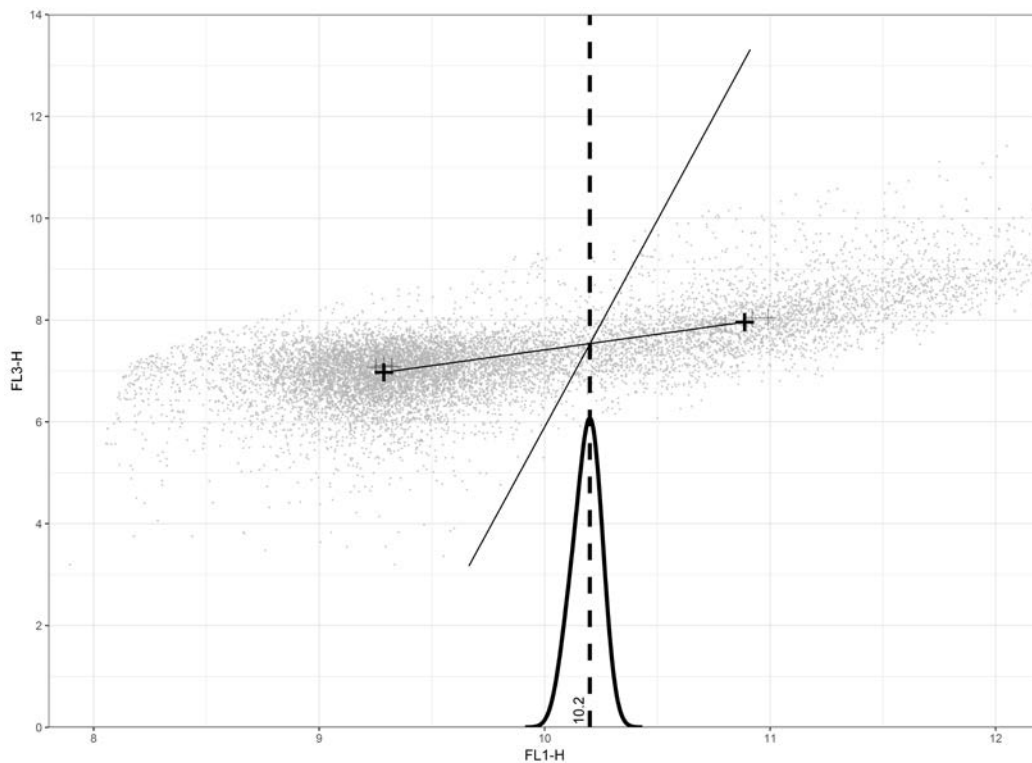


Abbildung 84: Ergebnis der LNA-HNA-Abtrennung für vier durchflusszytometrische Messungen. Wahl der Grenze durch Ermittlung des Dichtepicks der einzelnen errechneten Trennwerte.

Das Ergebnis solch einer Analyse für eine Vielzahl von durchflusszytometrischen Messungen kann auch in Form einer Darstellung der Dichteverteilungen der einzelnen Messungen erfolgen. Zwei solche Beispiele sind in Abbildung 85 und Abbildung 86 angeführt. Beim ersten Beispiel handelt es sich um Proben einer Quellmessstelle während es sich bei der zweiten um Proben einer Uferfiltrat-Messstelle handelt. Hier sei einerseits auf den Unterschied zwischen den Trennwerten der beiden Beispiele und andererseits auf die Unterschiede zwischen den Trennwerten der Beispiele und den von der EAWAG vorgeschlagenen Trennwert hingewiesen, der in Form eines Auswerte-Templates für den Accuri® C6 zur Verfügung steht (BD Biosciences 2018).

RESULTATE

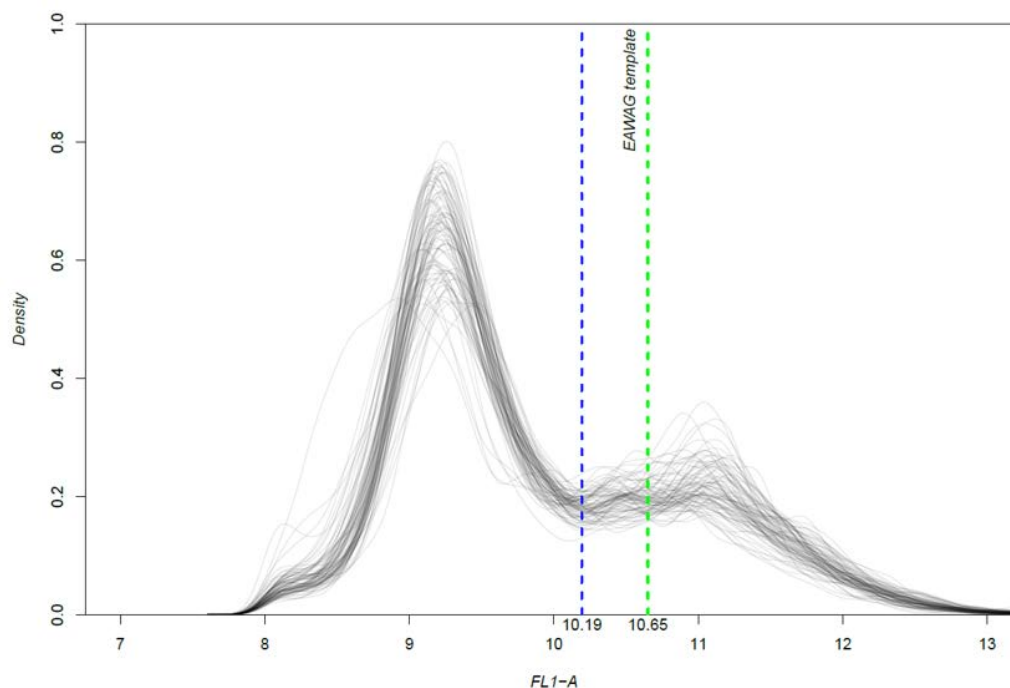


Abbildung 85: Beispiel einer Dichteverteilung (FL1-A) einer Vielzahl von DFZ-Messungen einer Quellen-Messstelle mit eingetragener LNA-HNA-Abtrennung nach der beschriebenen Methode (blau) und Vorschlag der Abtrennung nach EAWAG (grün).

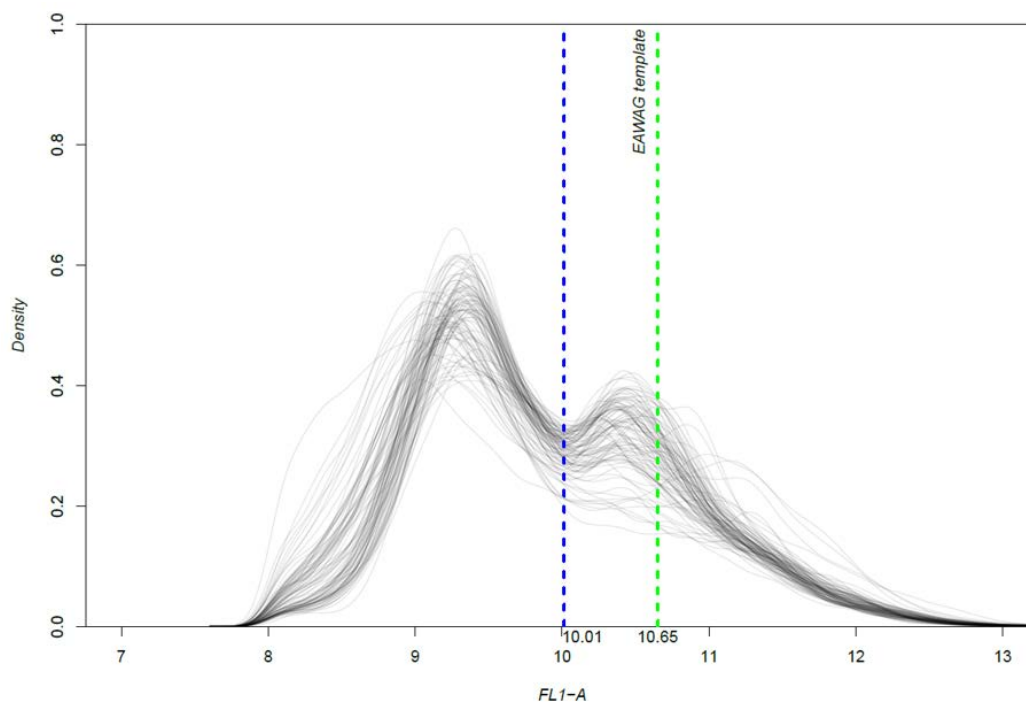


Abbildung 86: Beispiel einer Dichteverteilung (FL1-A) einer Vielzahl von DFZ-Messungen von Proben einer Uferfiltrat-Messstelle mit eingetragener LNA-HNA-Abtrennung nach der beschriebenen Methode (blau) und Vorschlag der Abtrennung nach EAWAG (grün).

5.5.6 DETAILBETRACHTUNG VON MESSREIHENABSCHNITTEN

Werden durchflusszytometrische Messungen über einen längeren Zeitraum durchgeführt, so besteht die Möglichkeit dass zum Beispiel die Totalzellzahl einen Peak aufweist. Die bereits vorgestellten Methoden des Cytometric Fingerprinting (Kapitel 3.5.2) und die Clusteranalyse (Kapitel 3.5.3) ermöglichen es, für den/die Nutzer/in interessanter Abschnitte einer Messreihe genauer zu analysieren. Üblicherweise steht der Zeitbereich, welcher genauer analysiert werden soll, am Beginn der Methode fest. Um die Vorgehensweise erklären zu können, wird jedoch ein vorhergehender Schritt eingefügt in welchem der Zeitabschnitt von Interesse gewählt wird.

Zu Beginn wird jeder der durchflusszytometrischen Datensätze der Messreihe dem Gating unterzogen, transformiert und Werte wie Totalzellzahl und HNA-Anteil erfasst. Abbildung 87 veranschaulicht sowohl Totalzellzahl als auch HNA-Anteil sowie den ausgewählten Zeitabschnitt.

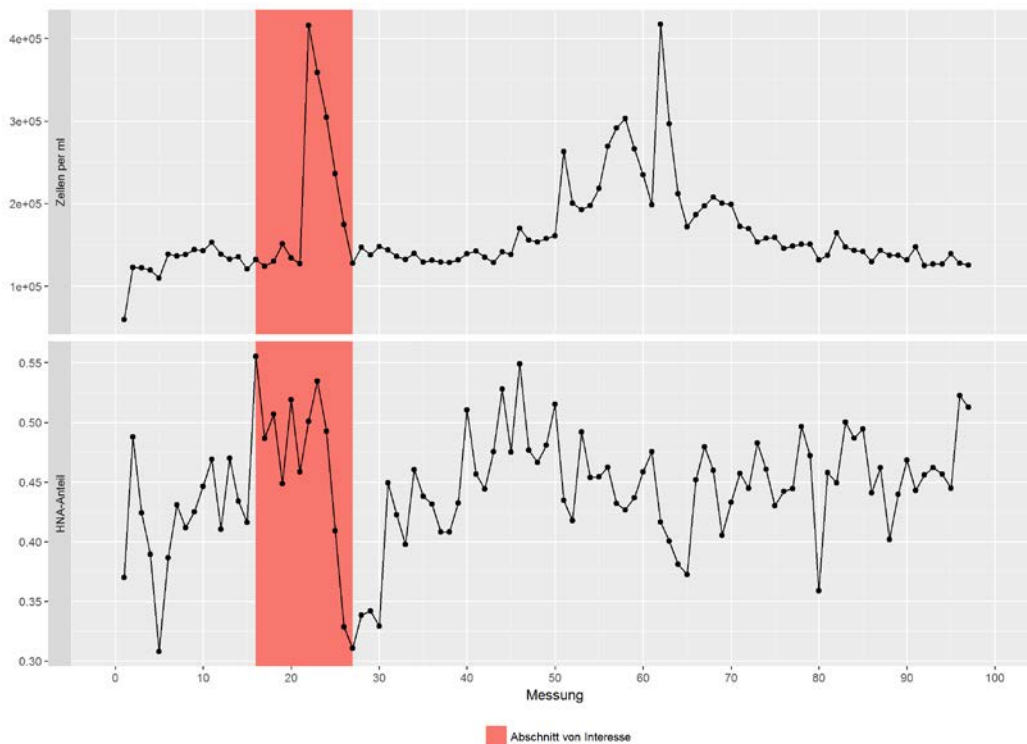


Abbildung 87: Zellzahlen pro Milliliter und HNA-Anteil einer Messreihe. In Rot hinterlegt der Abschnitt für den eine genauere Untersuchung erfolgen soll.

Für die weitere Auswertung werden ab diesem Zeitpunkt nur mehr die Datensätze benutzt die in den in der vorhergehenden Abbildung Rot hinterlegten Abschnitt fallen.

Da ein Modell benötigt wird um Fingerprints von einzelnen Messungen zu erstellen, wird ein solches mittels einer Funktion aus dem Package „flowFP“ erstellt (Rogers u. a. 2009). Bei dieser Vorgehensweise wurde dieses Modell für die Kanäle FL-A und FL3-A mit einer Gesamtanzahl von 32 Bins erstellt. Darauf folgend werden mittels der Funktion „flowFP“, des gleichen Packages, Fingerprints für die einzelnen Datensätze generiert. Ein Ergebnis das aus diesen Fingerprints weiterverwendet werden kann, sind die sogenannten Counts. Diese geben an, wie viele der Datenpunkte sich in jedem Bin befinden (Holyst und Rogers 2018).

Bei der multidimensionalen Skalierung handelt es sich um eine Darstellung von Ähnlichkeiten und Beziehungen von Daten, üblicherweise im zwei- oder dreidimensionalen Raum. Dabei handelt es sich bei jedem der Punkte in dieser Darstellung um ein Objekt in den Ausgangsdaten, wobei die Distanzen zwischen den Punkten die Ähnlichkeiten wiedergeben (Basalaj 2001).

Nach der Standardisierung der für jeden Datensatz vorliegenden Counts werden diese einer multidimensionalen Skalierung im zweidimensionalen Raum und einer hierarchischen agglomerativen Complete-Linkage-Clusteranalyse (siehe Kapitel 3.5.3) unterzogen, deren Ergebnis als Dendrogramm darstellbar ist. Durch die Betrachtung des Ergebnisses des Clusterings kann ein geeigneter Punkt gewählt werden, an der das Clusterdiagramm geschnitten wird. Im vorliegenden Fall scheint eine Aufteilung in drei Gruppen passend zu sein. Die Einzelmessungen die der jeweiligen Gruppe zugehörig sind, werden dementsprechend eingefärbt (siehe Abbildung 88).

Diese Abbildung zeigt die bisher erhaltenen Ergebnisse der Methode. Wie oben beschrieben, wurde das Ergebnis der Clusteranalyse in Form von einem Dendrogramm dargestellt. Für die Darstellung der multidimensionalen Skalierung wurde den einzelnen Datensätzen die Farbe der Gruppenzugehörigkeit aus der Clusteranalyse zugeteilt. Wie sich in der Abbildung zeigt, stimmt die gewählte Anzahl der Gruppen gut mit den dargestellten Gruppen der multidimensionalen Skalierung überein. Zudem wurden die Ganglinien der Totalzellzahl und des HNA-Anteils dargestellt wobei auch hier die gewählte Gruppenanzahl mit den jeweiligen Farben veranschaulicht wurde. Wie ersichtlich ist sind die Messungen die zur Roten Gruppe gehören vor dem TCC-Peak zu finden, während der Peak selbst bzw. der abfallende Ast zur Blauen bzw. zur Grünen Gruppe gehört.

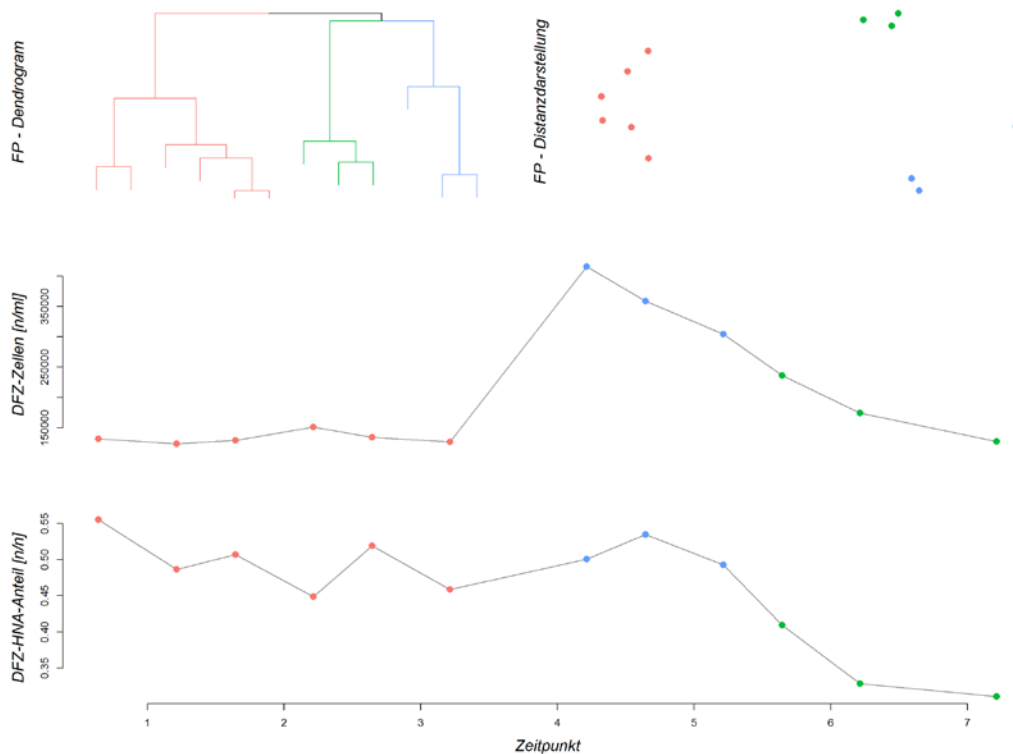


Abbildung 88: Darstellung der Clusterergebnisse, multidimensionaler Skalierung, sowie der Totalzellzahl und HNA-Anteil mit jeweiliger farblicher Zuordnung zu den bei der Clusteranalyse erhaltenen Gruppen..

Die standardisierten Counts können auch in Form von Ganglinien über die Anzahl der Bins dargestellt werden. Auch hier besteht die Möglichkeit die Farbgebung der durch die Clusteranalyse erhaltenen Gruppeneinteilung zu übernehmen. Um den grundsätzlichen Verlauf dieser einzelnen Ganglinien darstellen zu können wird für jede Gruppe und für jeden der Bins der Median ermittelt und dieser mit erhöhter Strichstärke den einzelnen Ganglinien überlagert (siehe Abbildung 89). Es ist ersichtlich, dass sich die Gruppen vor allem in einem Bereich in dem sich die höheren Bins-Zahlen befinden stärker unterscheiden. Beim Blick auf Abbildung 90 wird klar, dass sich diese Bins eher im Bereich rechts oben befinden und daher eher auf Unterschiede in den HNA-Zellzahlen reagieren.

RESULTATE

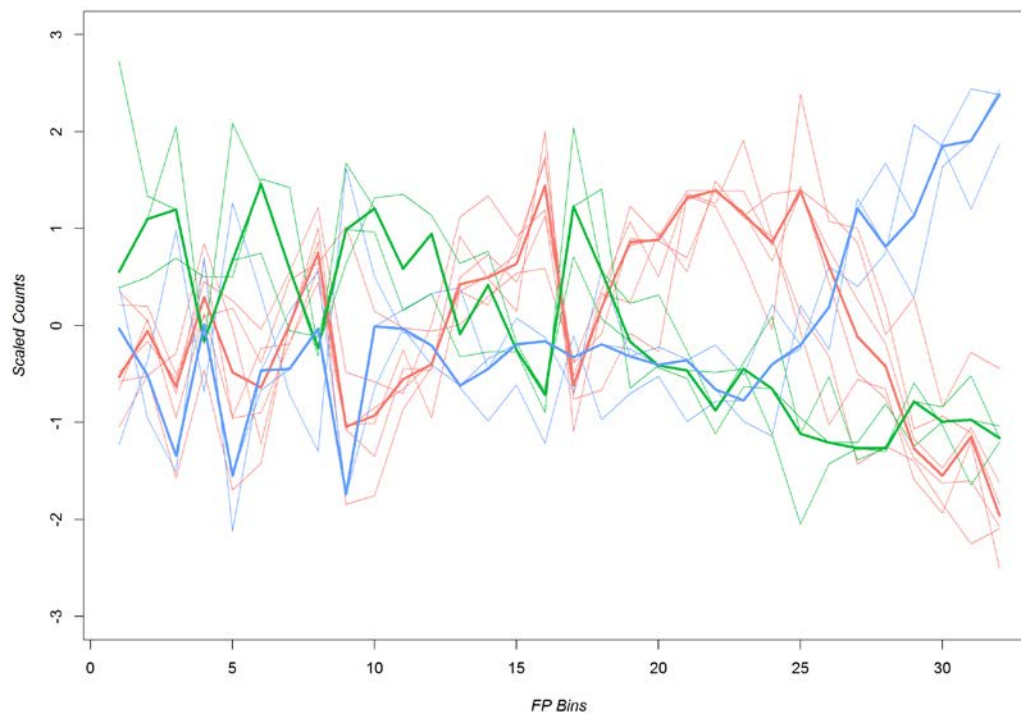


Abbildung 89: Skalierte Counts-Werte in Abhängigkeit der Bins. Farbeneinteilung aufgrund des Ergebnisses der Clusteranalyse.

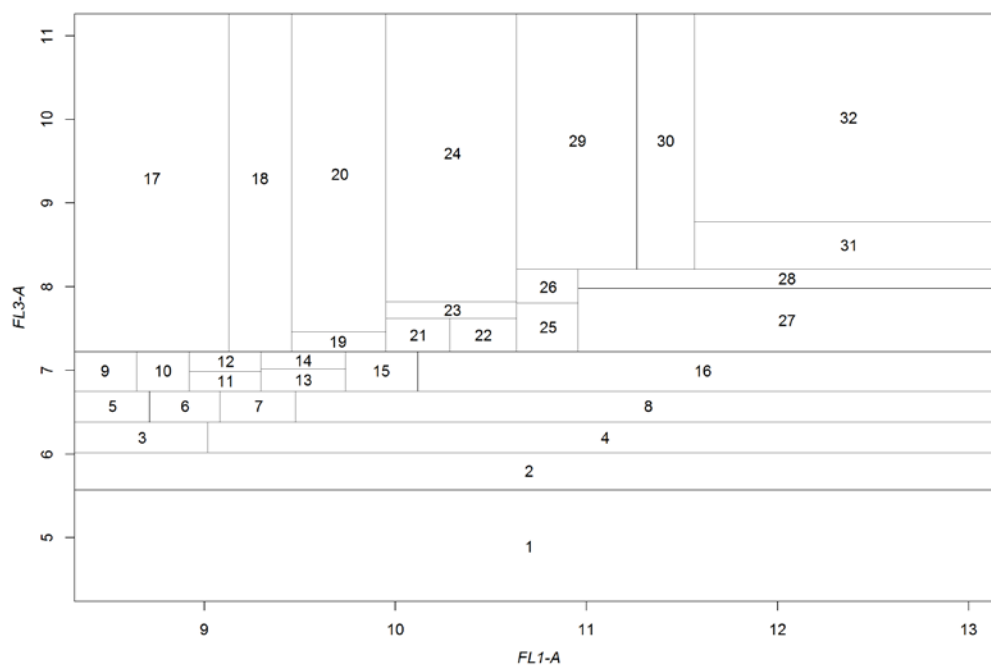


Abbildung 90: Verteilung und Nummerierung der Bins.

Einen weiteren Hinweis auf die Unterschiede zwischen den gefundenen Gruppen können zum Beispiel die Dichteverteilungen geben. Um die Dichteverteilung im Kanal FL1-A der einzelnen Gruppen darzustellen, muss darauf Rücksicht genommen werden, dass unterschiedliche Gruppen eine unterschiedliche Anzahl an durchflusszytometrischen Messungen beinhalten kann. Da keine der Messungen gegenüber anderen stärker

gewichtet werden soll, werden von jeder Messung exakt 1 000 Messpunkte zufällig gezogen und diese zu einem Datensatz zusammengefasst. Im Hinblick auf die Anzahl der Messungen in einer Gruppe (siehe Abbildung 88) besitzt die Gruppe „Rot“ sechs Messungen und somit 6 000 Datenpunkte, während Gruppe „Grün“ und Gruppe „Blau“ jeweils drei Messungen und somit 3 000 Datenpunkte haben. Die daraus resultierenden Dichteverteilungen sind in Abbildung 91 ersichtlich. Vergleicht man an dieser Stelle die Fingerprints in Abbildung 89, mit den Dichteverteilungen unter zu Hilfenahme der Binverteilung in Abbildung 90 so sind die Gruppen vor allem im höheren Bereich der Bins klar erkennbar.

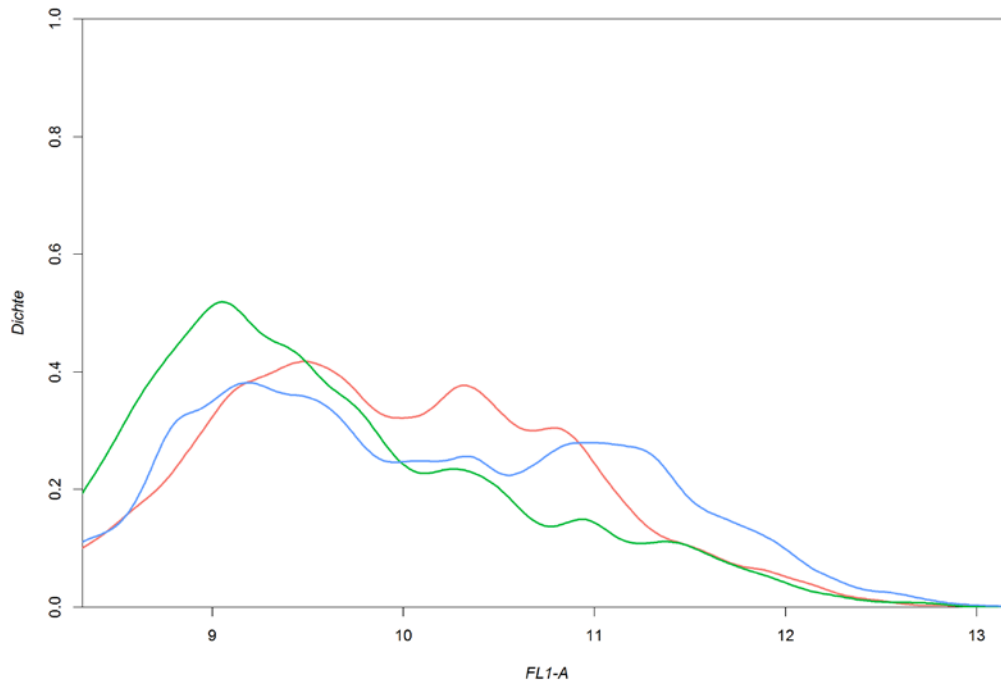


Abbildung 91: Dichteverteilungen der bei der Clusteranalyse festgelegten Gruppen.

Um den Verlauf der Veränderungen im gewählten Bereich der Messreihe an Hand der durch die Clusteranalyse gefundenen Gruppen darzustellen, wurden aus den Gruppendatensätzen nochmals aus jeder Gruppe wahllos 1 000 Datenpunkte herausgenommen. Zudem wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen an Hand der Datenpunkte die sich in den jeweiligen Bins befinden berechnet. Die Ergebnisse befinden sich in Abbildung 92, wobei sich in der ersten Zeile die Scatterplots der Gruppen, in der Kanalkombination FL1-A und FL3-A, befinden und zwar in der Anordnung des Auftretens im gewählten Bereich der Messreihe. In der zweiten Zeile der Abbildung werden die Unterschiede zwischen den Gruppen auf Bin-Ebene dargestellt. Dabei stellt zum Beispiel eine grüne Einfärbung eine Abnahme an Datenpunkten im jeweiligen Bin zwischen den zwei über dem Diagramm erwähnten Gruppen dar, während eine rote Einfärbung eine Zunahme darstellt. Je nach Farbsättigung kann somit zwischen einer schwächeren oder stärkeren Zu- bzw. Abnahme ausgegangen werden. Fehlt die Einfärbung, spricht der Bin bleibt weiß, so findet zwischen den Gruppen keine Veränderung der Anzahl der Datenpunkte in diesem Bin statt. Obwohl im ausgewählten Zeitabschnitt kein Wechsel der Gruppe „Grün“ auf Gruppe „Rot“ stattfindet, wurde dieses Diagramm aus Gründen der Vollständigkeit hinzugefügt um auch die Unterschiede zwischen diesen zwei Gruppen zu veranschaulichen.

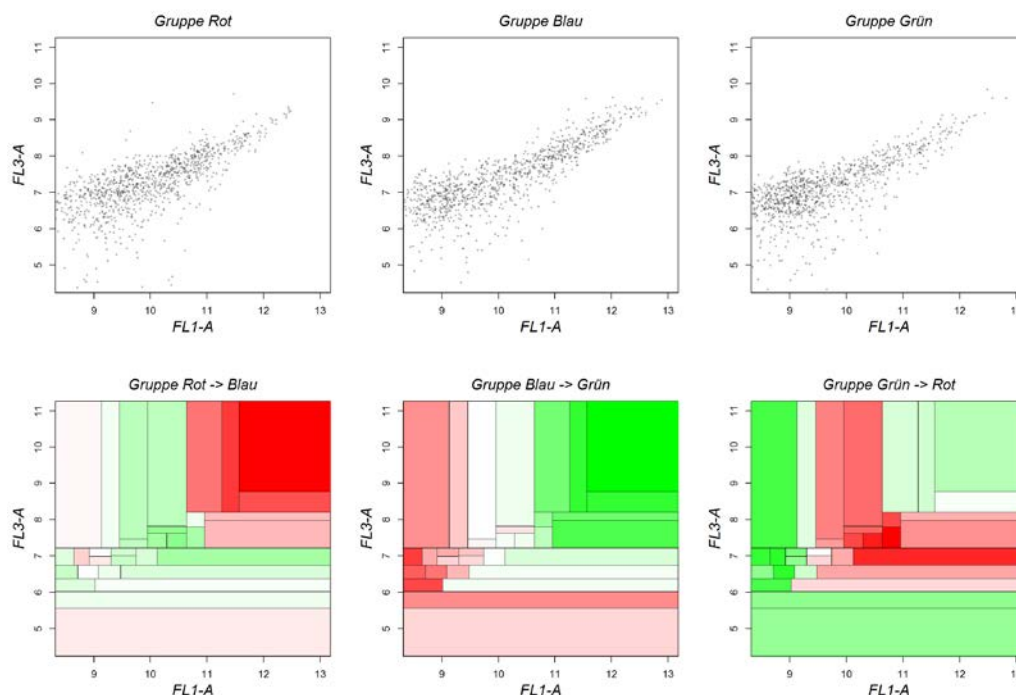


Abbildung 92: Scatterplots der einzelnen Gruppen bzw. Darstellung der Veränderung zwischen jeweils zwei Gruppen auf Bin-Ebene (rot: Zunahme; grün: Abnahme)

5.6 NACHWEIS EINZELNER BAKTERIENARTEN IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Versuchsreihen getesteten Bakterienstämme – *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus carnosus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Microbacterium lactium* –, Hefen – *Rhodotorula glutinis* –, Cyanobakterien – *Synechococcus nidulans* – bzw. Algen – *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* – sind auf Basis einer einfachen SG1-Färbung zumindest teilweise unterscheidbar. Einige der genannten Stämme lassen sich dabei aber nur schlecht anfärben, d.h. es wird entweder nur eine geringe Signalintensität erzielt bzw. ist diese sehr inhomogen über die Zellpopulation verteilt (etwa *E. coli*, Abbildung 93). Die Anfärbung ist dabei sicherlich auch vom physiologischen Zustand der Zelle abhängig. Eine Schädigung etwa durch Erhitzen kann dabei für die Anfärbbarkeit förderlich sein (beispielsweise für *E. coli*, Abbildung 93). Neben dem Fluoreszenzsignal kann auch das Streulichtsignal des DFZ charakteristisch für die verschiedenen Stämme sein. Da dieses von Größe und Granularität der Zelle abhängt und diese Eigenschaften wiederum nicht unabhängig von den Umständen der Kultivierung zu sehen sind, ist auch hier mit einer Bandbreite an Signalintensitäten zu rechnen, die die Abgrenzbarkeit zu anderen Stämmen erschwert.

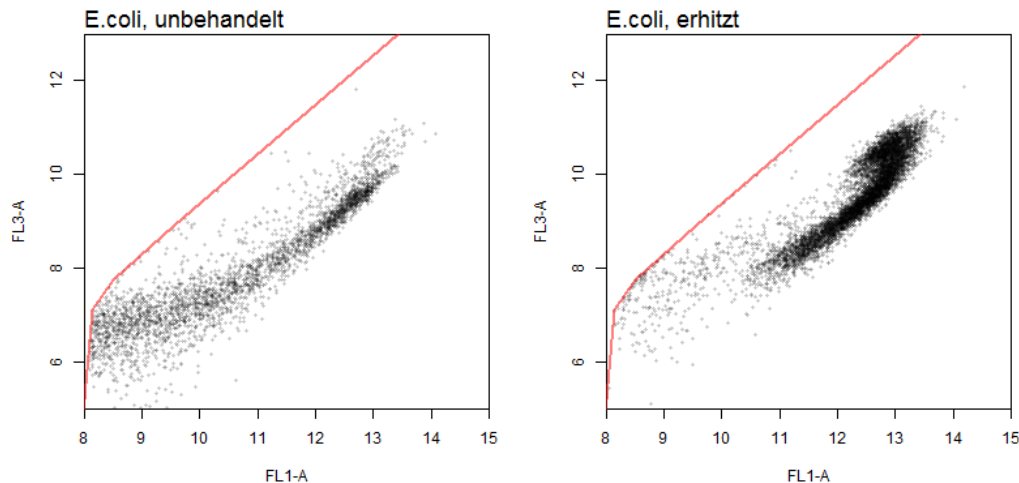


Abbildung 93: Streudiagramme der Grün- und Rot-Fluoreszenz zweier DFZ-Messungen eines *E.coli*-Stammes, sowohl unbehandelt als auch erhitzt (10 Minuten bei 70 °C). Rot eingezeichnet das TCC-Gate für normale Wasserproben

Auf Basis der derzeitigen Gerätetechnik und mit dem Färbeprotokoll unter Verwendung von SG1 kann daher wohl nicht davon ausgegangen werden, dass natürliche, sehr vielfältige Mischpopulationen aus oligotrophen Grundwässern quasi in ihre Bestandteile aufgelöst werden können. Dies ist aber etwa für biotechnologische Prozessabläufe, die nur auf einigen wenigen verschiedenen Arten basieren, vorstellbar und wurde auch bereits beschrieben. Gleichwohl können die Messungen als Rahmen fungieren, der etwa relative Aussagen über bestimmte Detektionen in natürlichen Wasserproben zulässt. So sind Signalintensitäten, die jene von unter optimalen Bedingungen kultivierten Laborstämmen übersteigen, durchaus als außergewöhnlich einzustufen.

MIKROBIOM (NGS) – METHODIK

DIE ANWENDUNG ERFOLGTE AUF BASIS der in Kap. 0 optimierten Vorgehensweise zur NGS-Methode.

5.7 REPRODUZIERBARKEIT DER ERGEBNISSE

An einem Uferfiltratstandort wurden im Frühjahr 2017 zu drei Zeitpunkten aus mehreren Brunnen NGS-Proben gezogen. In jeder dieser Proben wurde die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft dreifach bestimmt, um die Reproduzierbarkeit der Methode beurteilen zu können.

In Abbildung 94 ist die relative Zusammensetzung auf taxonomischer Phylum-Ebene für zwei dieser Triplikate (selber Brunnen, unterschiedliche Zeitpunkte) für jene Phyla die mehr als 1% der gesamten Gesellschaft ausmachen dargestellt. Dabei wurden für die Proben vom 10.05.2017 (Darstellung rechts) dieselben Phyla zwar in geringfügig unterschiedlichen Verhältnissen bestimmt (bis ca. 5% Unterschied), aber es kommt zu keiner Verschiebung der Rangfolge der einzelnen Phyla zueinander. Die Proben vom 07.04.2017 (Darstellung links) beinhalten wiederum alle drei dieselben Phyla, es sind ebenfalls Verschiebungen in den Verhältnissen zu erkennen, allerdings ist diesmal eine Verschiebung der Rangfolge erkennen, da das Phylum *Parcubacteria* in der mittleren Probe deutlich an relativen Anteil gewinnt.

RESULTATE

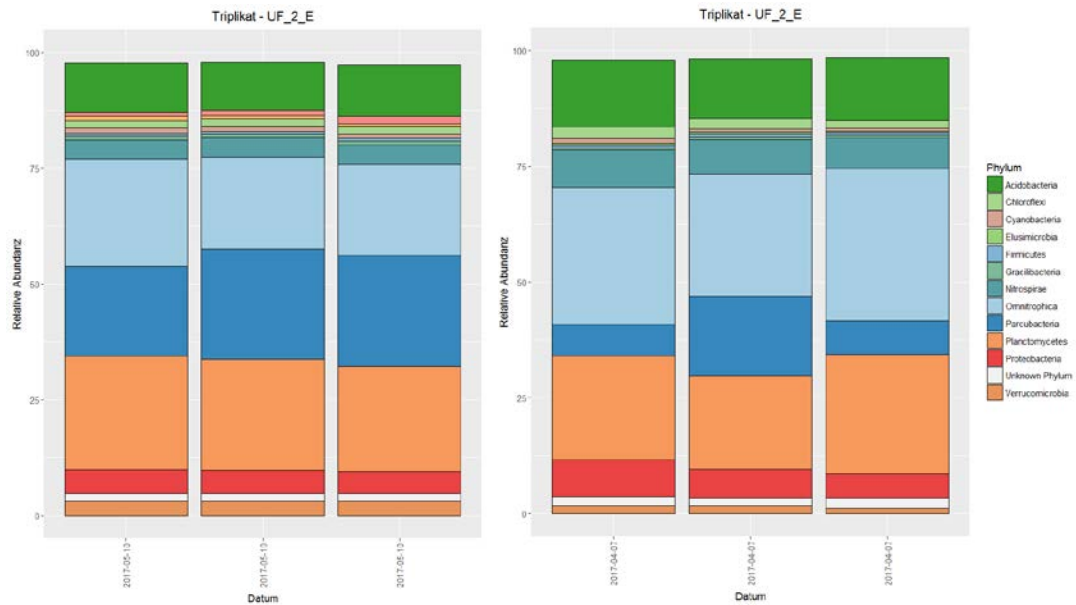


Abbildung 94: Balkendiagramme zweier Triplikate (selbe Messstelle, unterschiedlicher Zeitpunkt) auf Phylum-Ebene.

Stellt man alle Triplikate in einem NMDS-Plot (Non-Metric Multidimensional Scaling, Abbildung 95) gegenüber, so lässt sich die Ähnlichkeit der Triplikate zueinander zeigen. Es gruppieren sich alle 15 Triplikate eng beieinander, und bis auf drei dieser Triplikate, sind sich die Proben der Triplikate zueinander ähnlicher, als zu anderen Probenahmestellen bzw. Probenahmezeitpunkten.

Geringfügige Verschiebungen innerhalb der relativen Zusammensetzung innerhalb eine Probe lassen sich durch den semi-quantitativen Charakter der Methode erklären. Durch jeden Teilschritt der gesamten Probenaufbereitung (insbesondere Filtration, DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung) kann es zu geringen Verschiebungen der einzelnen taxonomischen Einheiten kommen. Insgesamt kann die Reproduzierbarkeit der angewandten Methode für die Bestimmung der bakteriellen Gemeinschaft aufgrund der dargestellten Ergebnisse dennoch als hoch eingestuft werden.

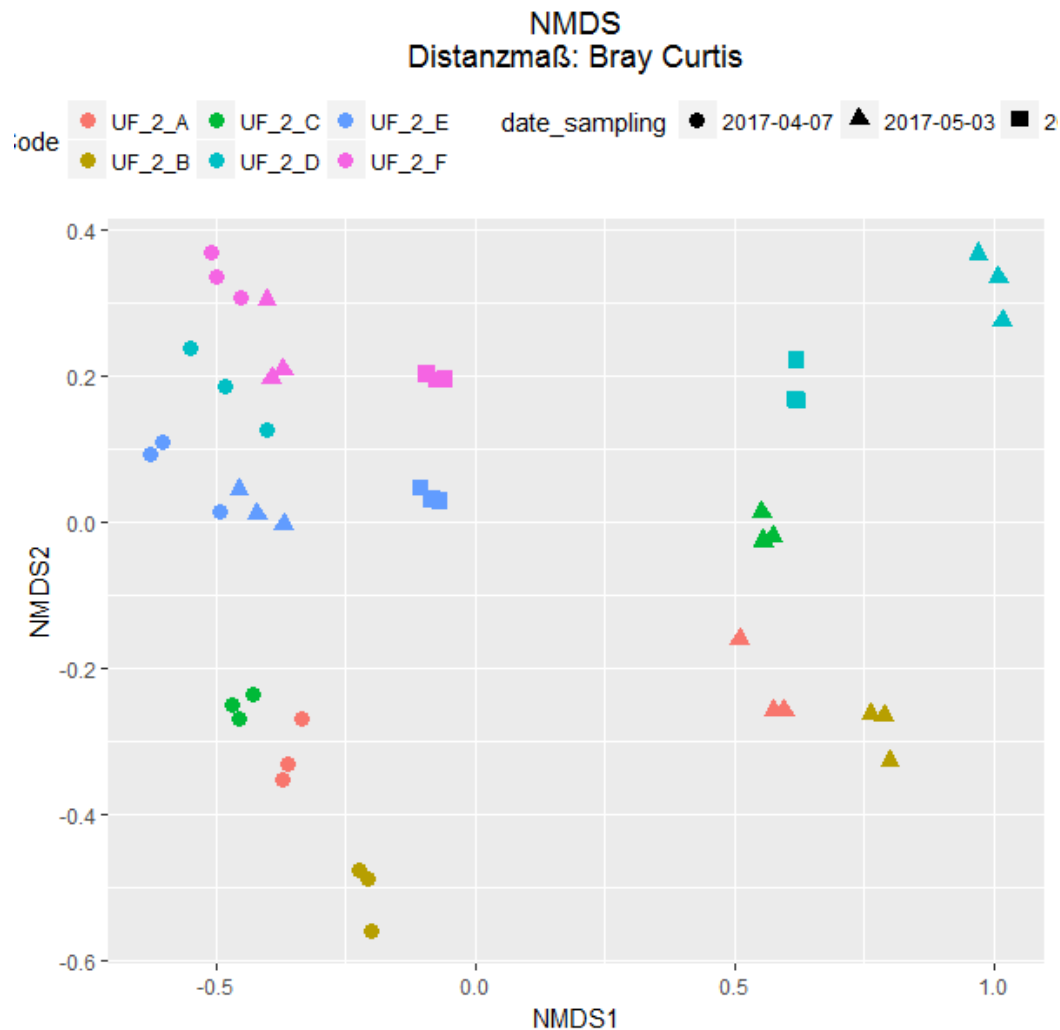


Abbildung 95: NMDS-Plot zur Darstellung der Ähnlichkeit der Triplikate.

MESSKAMPAGNE BEI WASSERRESSOURCEN

5.8 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

5.8.1 ERGEBNISSE NACH RESSOURCENTYPEN

Für die Ermittlung der Variabilität der Totalzellzahl und der HNA-Anteile bei unterschiedlichen Ressourcentypen wurde eine Messkampagne über ein hydrologisches Jahr bei unterschiedlichen Rohwässern durchgeführt. In Abbildung 96 ist das Gesamtergebnis dieser Untersuchung als Box-Plot-Darstellung zusammengestellt. Die schwarze Linie stellt den Median der einzelnen Messreihen dar, die Box stellt 50 % der Werte zwischen dem 25% und 75 % Quantil dar. Die Messstellen wurden nach Median-Werten der Größe nach gereiht aufgetragen. Mit wenigen Ausnahmen stellen die Messstellen in Porengrundwässern, Schichtquellen und Tiefengrundwässern jene Messstellen dar, die geringere und oftmals auch sehr konstante Zellzahlen bis ca. 150 000 TCC über das Jahr aufweisen. Karstquellen und Uferfiltrate stellen Messstellen mit etwas höheren Zellzahlen bis ca. 250 000 TCC und oftmals größerer Schwankungsbreite dar. Die Oberflächenwassermessstelle und eine oberflächenwasserbeeinflusste Uferfiltrat-Messstelle stellen Messstellen mit doch deutlich höheren Zellzahlen und Schwankungsbreite dar. Die geringsten HNA-Anteile konnten in der Gruppe der Quellen nachgewiesen werden, da diese sehr oft ausgeprägte LNA-Anteile aufweisen (siehe Mikrobiom-Ergebnisse in Kap. 5.10). Die Gruppe der Uferfiltrate zeigen über fast alle

RESULTATE

Messstellen einen konstanten HNA-Anteil bei knapp an 50 %. Einzelne Porengrundwässer und vor allem die Tiefengrundwässer stellen Messstellen mit den höchsten HNA-Anteilen dar.

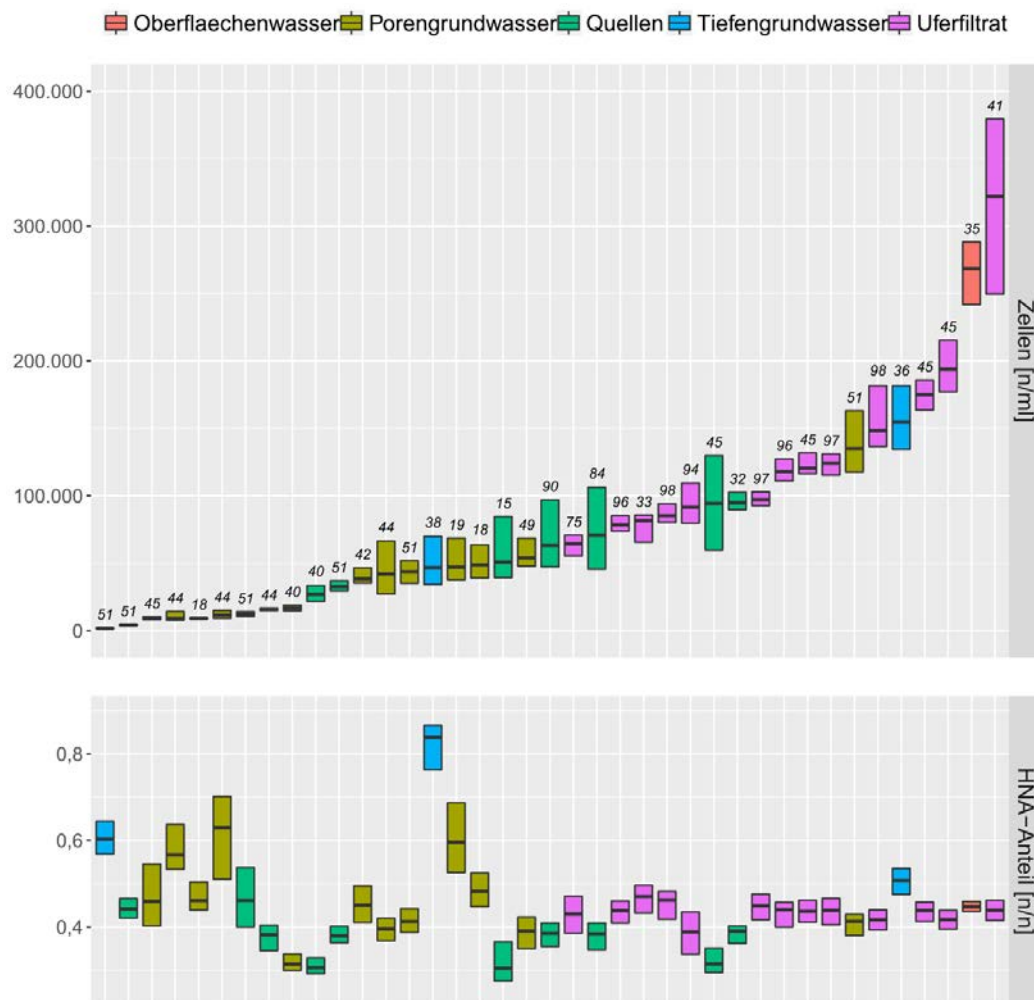


Abbildung 96: Gesamtdarstellung der DFZ-Ergebnisse der durchgeführten Beprobung ausgewählter Wasserressourcen (Rohwässer). Im oberen Teil der Abbildung sind die Totalzellzahlen, im unteren Teil der Abbildung die HNA-Anteile der einzelnen Messstellen dargestellt. Für die einzelnen Messstellen sind die jeweilige Anzahl der hinterlegten Messungen dazu geschrieben.

Stellt man die TCC der einzelnen Rohwässer den jeweiligen HNA-Anteilen gegenüber (Abbildung 97) gruppieren sich die einzelnen Messstellen der jeweiligen Ressourcengruppen immer in einem Naheverhältnis zueinander. Eine klare Abtrennung der einzelnen Gruppen kann jedoch nur auf Basis der TCC und des HNA-Anteils nicht durchgeführt werden. Diese grobe Einteilung hilft jedoch bei der Plausibilitätskontrolle der Ergebnisse einzelner Messstellen (z.B. Überprüfung der DFZ Ergebnisse im Laborinformationssystem für einzelne beschriebene Messstellen).

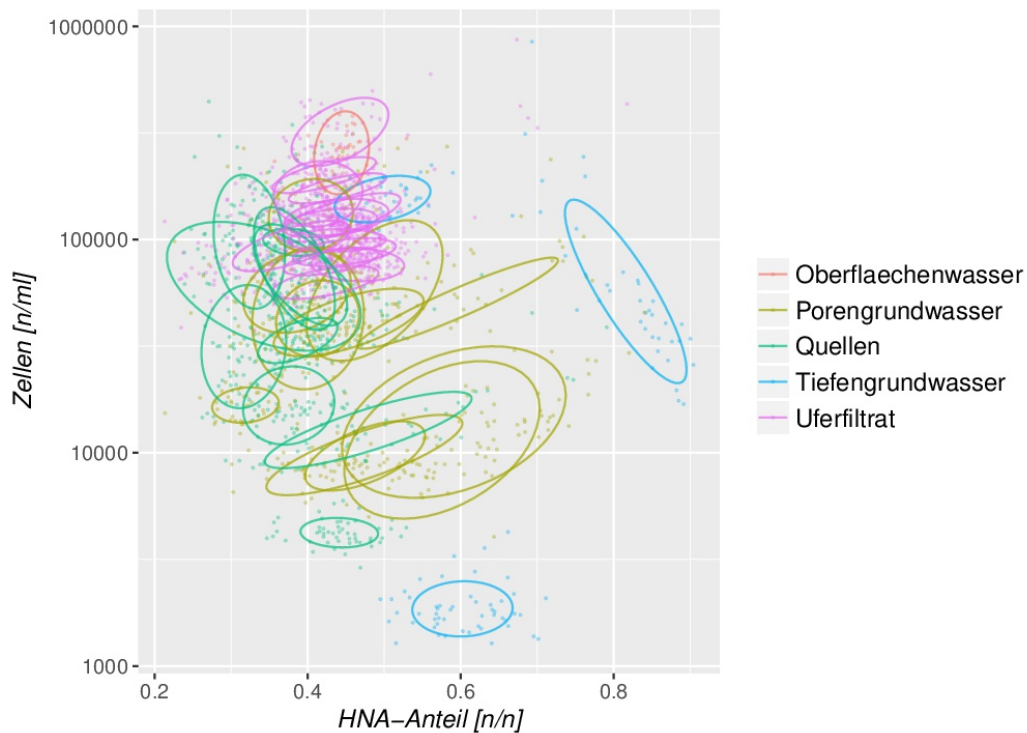


Abbildung 97: Gegenüberstellung des HNA-Anteils und der logarithmierten Gesamtzellzahl mit Unterteilung nach Ressourcentypen. Die eingezeichneten Ellipsen basieren auf einer Anpassung einer Normalverteilung und umfassen 50 % der Datenpunkte.

Will man eine weiterführende Charakterisierung der einzelnen Ressourcengruppen erreichen, können der TCC einzelne physikalisch-chemische Parameter gegenübergestellt werden. In Abbildung 98 (links) ist die TCC dem SAK254 gegenübergestellt, auf der rechten Seite den ermittelten NO₃-N Werten. Tiefen- und Porengrundwässer erreichen im Normalfall deutlich geringere SAK254 Werte als Uferfiltrate und Oberflächenwässer. Bei den Quellen können vor allem Karst- und Kluftquellen über hohe Schwankungen bei den SAK254 Werten erreichen. Im Gegensatz dazu erreichen vor allem die Porengrundwässer höhere Nitrat-Werte (hier als NO₃-N dargestellt).

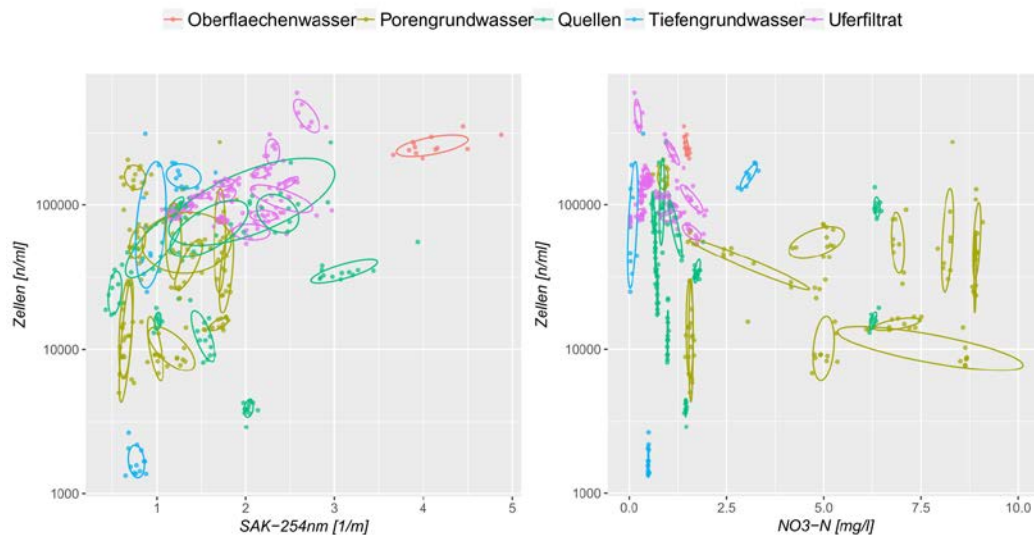


Abbildung 98: Gegenüberstellung von an den gleichen Proben ermittelten Ergebnissen einer UV-VIS-Spektrometrie mit der Gesamtzellzahl (Unterteilung nach Ressourcentypen). Die eingezeichneten Ellipsen basieren auf einer Anpassung einer Normalverteilung und umfassen 50 % der Datenpunkte.

5.8.1.1 CYTOMETRIC FINGERPRINTING

Mit Hilfe der Anwendung des Cytometric Fingerprinting kann eine vertiefende Charakterisierung durchgeführt werden. Wie in Kap. 2.5.2 dargestellt, werden die einzelnen Bins in einem fixen Auszählraster gezählt. In Abbildung 99 wurde dies für 2 043 Messungen unterschiedlicher Messstellen (Uferfiltrat und Karstquellwasser) durchgeführt und farblich in einem MDS-Plot markiert (Uferfiltrat blau, Karstquellwasser rot). Für 80 % der Werte kann dabei eine gute Trennung der beiden Gruppen erreicht werden. Gerade bei unterschiedlichen Events wie z.B. Hochwasser (Uferfiltrat) und Starkregen (Karstquellen) können eine breite Streuung auch in den Fingerprints der einzelnen Gruppen festgestellt werden. Das Cytometric Fingerprinting hilft daher nicht nur bei der Unterscheidung einzelner Rohwässer sondern kann im praktischen Betrieb der DFZ Anwendung auch für die Ermittlung von Ausreißern (bzw. Abweichungen von einem definierten Normalzustand) verwendet werden (siehe Kap. 5.8.2)

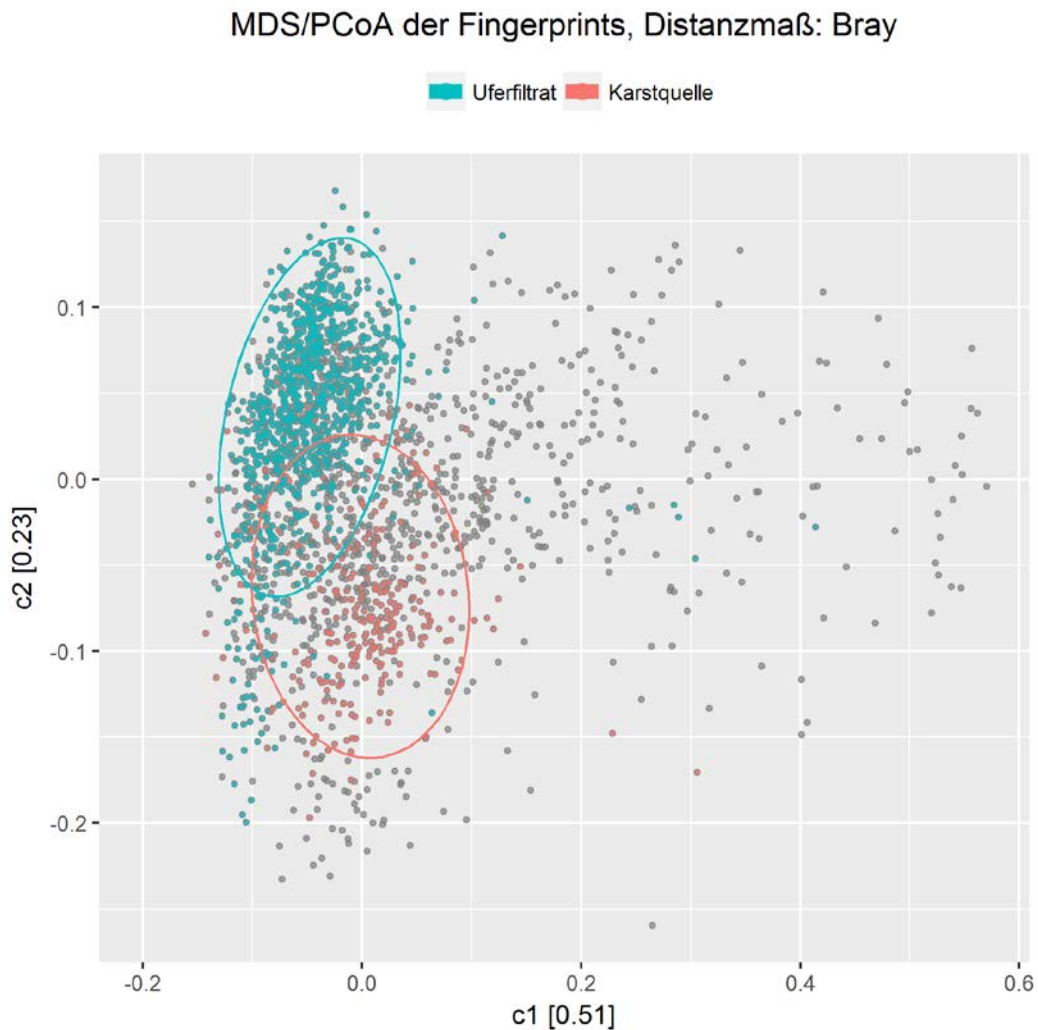


Abbildung 99: Anwendung des Cytometric Fingerprintings für DFZ-Daten (Verwendung der Grün- und Rotfluoreszenz) einer großen Anzahl unterschiedlicher Proben ($n=2043$) und Darstellung der Fingerprint-Abstände (Distanzmaß Bray-Curtis) mithilfe einer Multidimensionalen Skalierung. Farblich markiert sind zwei große Gruppen innerhalb der definierten Ressourcentypen. Die eingezeichneten Ellipsen basieren auf einer Anpassung einer Normalverteilung und umfassen 80 % der Datenpunkte.

5.8.2 ERGEBNISSE FÜR EINSATZ ALS PROZESSPARAMETER

Bei den Untersuchungen einzelner Messstellen wurden vielfach Beobachtungen gemacht, die die Durchflusszytometrie als schnelle Methode zur Feststellung von mikrobiologischen Veränderungen bestätigt. Durch den Einsatz der Durchflusszytometrie als Prozessparameter können Zusammenhänge einfach und sensitiv erfasst werden und stellen somit eine gute Grundlage für vertiefende Untersuchungen mit aufwendigen Methoden dar. In den folgenden Unterkapiteln sind einzelne Fallbeispiele für den Einsatz als Prozessparameter zusammengestellt.

5.8.2.1 FALLBEISPIEL EINFLUSS VON OBERFLÄCHENGEWÄSSERN

Im Rahmen der Messkampagne wurde mehrere Uferfiltrat-Standorte an der Donau beprobt. In Abbildung 100 sind die Zeitreihen der Totalzellzahlen für die einzelnen Uferfiltrat-Standorte aufgetragen. Dem Gegenüber wurde in der unteren Hälfte der Abbildung der Wasserstand der Donau am Pegel Korneuburg aufgetragen. Aufgrund der unterschiedlichen Entfernungen der einzelnen Messstellen zum Pegel Korneuburg sind einzelne Peaks deutlich verschoben, konnten aber demselben Auslöseereignis zugeordnet werden. Besonders deutlich ist dies Ende Jänner zu beobachten. Bei zwei Uferfiltrat-Standorten konnte ein

deutlicher Anstieg der TCC im Rahmen eines Hochwasserereignisses ermittelt werden. Bei einem Uferfiltrat-Standort konnte zusätzlich auch ein Anstieg der TCC bei höheren Donauwasserständen im Sommer (inkl. Betrieb während eines Hochwasserereignisses) festgestellt werden. Die dritte Messstelle (grün) zeigt hingegen nur einen geringen Einfluss durch die Wasserstände an der Donau.

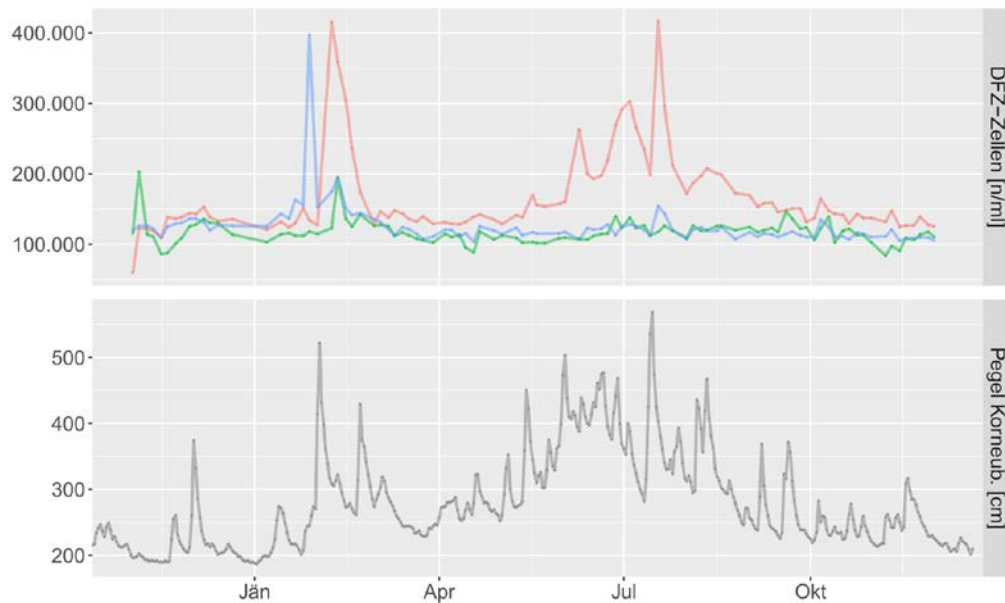


Abbildung 100: Gegenüberstellung der Ganglinien der Gesamtzellzahl von Uferfiltrat-Standorten mit der des Wasserstandes des zugeordneten Oberflächengewässers.

5.8.2.2 FALLBEISPIEL BIOLOGISCHE STABILITÄT

In Abbildung 101 und Abbildung 102 sind die DFZ Ergebnisse eines Wachstumsversuchs bei zwei unterschiedlichen Netzstellen (Einspeisepunkt nach Desinfektion bzw. Netzstelle nach Gegenbehälter bei gleicher Wasserressource) einmal als TCC (Abbildung 101) und einmal als ICC (Abbildung 102) für den Tag der Probenahme (Tag 0, links), den dritten Tag der Lagerung (Tag 3, Mitte) und den sechsten Tag der Lagerung (Tag 6, rechts) dargestellt. Der jeweils obere Bereich der Abbildungen stellt die Netzstelle unmittelbar nach Desinfektion, der untere Bereich die Netzstelle nach Behälter dar. Sowohl für die TCC als auch für die ICC konnten unmittelbar nach der Desinfektionsmaßnahme kein Wachstum (Vermehrung) festgestellt werden, während bei der Messstelle nach Behälter ein deutliches Wachstum festgestellt werden konnte, welche auf Mängel beim Behälter zurückzuführen waren.

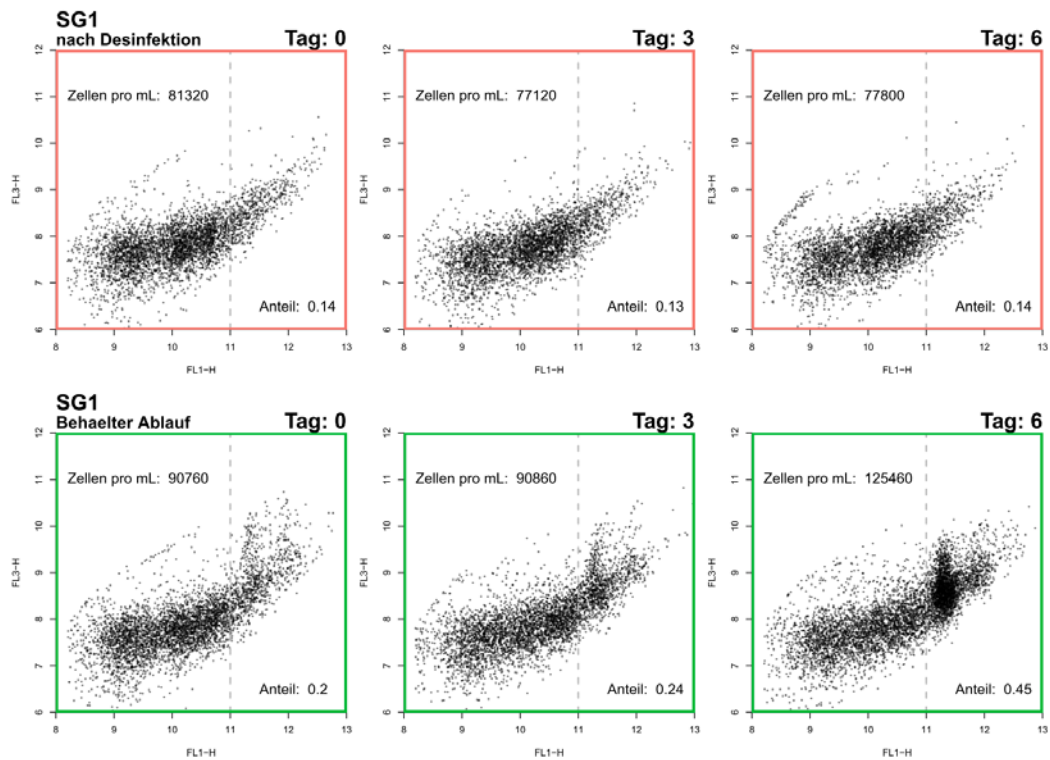


Abbildung 101: Streudiagramme der Grün- und Rotfluoreszenz von DFZ-Messungen im Rahmen eines Wachstumspotentialversuchs von 2 Proben aus einem Versorgungsnetz (Färbung mit SG1).

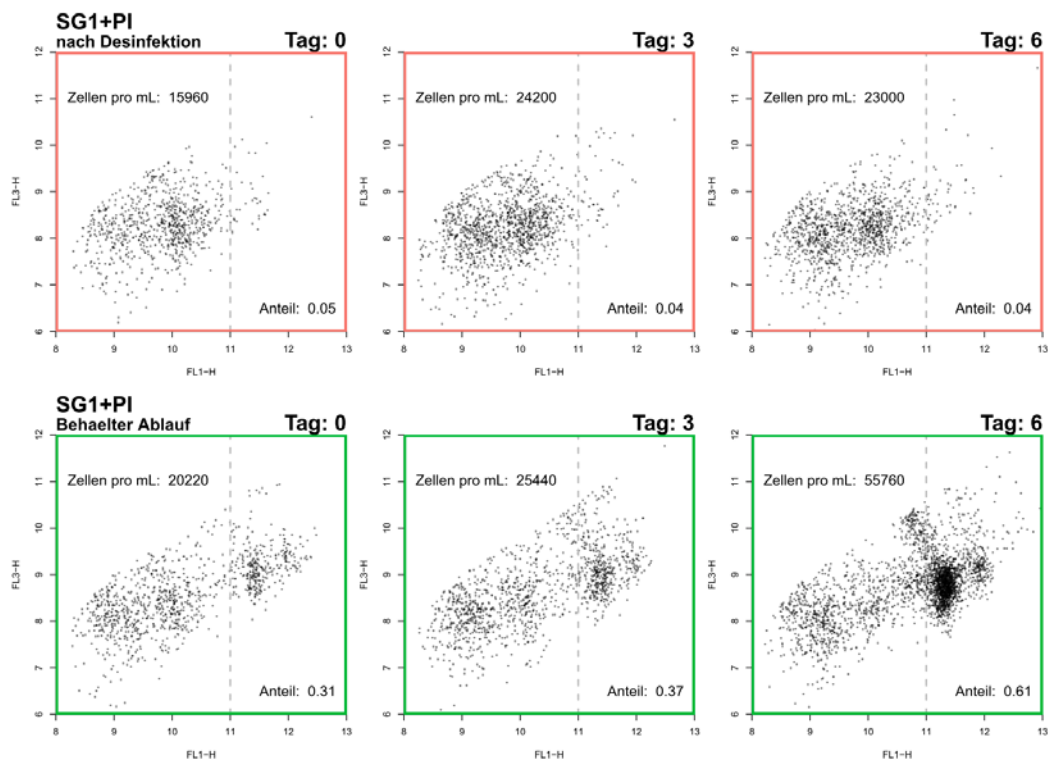


Abbildung 102: Streudiagramme der Grün- und Rotfluoreszenz von DFZ-Messungen im Rahmen eines Wachstumspotentialversuchs von 2 Proben aus einem Versorgungsnetz (Färbung mit SG1 und PI).

5.9 MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING

5.9.1 BAKTERIELLE DIVERSITÄT IN RESSOURCENTYPEN

Um die bakterielle Alpha-Diversität (Diversität innerhalb einer Probe) in den verschiedenen Ressourcen- bzw. Wassertypen zu bestimmen, wurden für alle Proben, mit mehr als 50 000 Reads (d.h. detektierte bakterielle 16S Sequenzen), vier klassische ökologische Parameter bestimmt. Dabei wurden die Anzahl an OTUs (Operational Taxonomic Units) herangezogen, um die Anzahl detektierter bakterieller Arten (observed richness) anzugeben. Da nie alle vorkommenden Arten detektiert werden können, wird die Gesamtanzahl an vorkommenden Arten mit dem Chao1-Schätzer (chao1 richness) geschätzt. Außerdem wurden zwei weitere Diversitätsparameter bestimmt (Shannon Diversität und Inverser Simpson Index), welche neben der Anzahl an Arten auch die Gleichmäßigkeit der Verteilung dieser Arten berücksichtigt. In Abbildung 103 sind diese vier Parameter als Boxplot für Uferfiltrat-, Grundwasser-, Quellen-, Karstquellen- und Netzstellenproben dargestellt.

Dabei zeigt sich, dass die größte Anzahl an verschiedenen bakteriellen Arten in den Karstquellproben gefunden wurde. Die Proben von Uferfiltrats- bzw. Quellstandorten zeigen im Mittel niedrigere Werte, streuen dabei aber deutlich mehr. Die geringste Artenanzahl weisen Grundwasserproben, aber insbesondere Netzstellenproben auf. Die Werte für die geschätzte Gesamtanzahl an Arten zeigt für alle Typen das gleiche Muster, ist aber um etwa 500 bis 2 000 Arten erhöht.

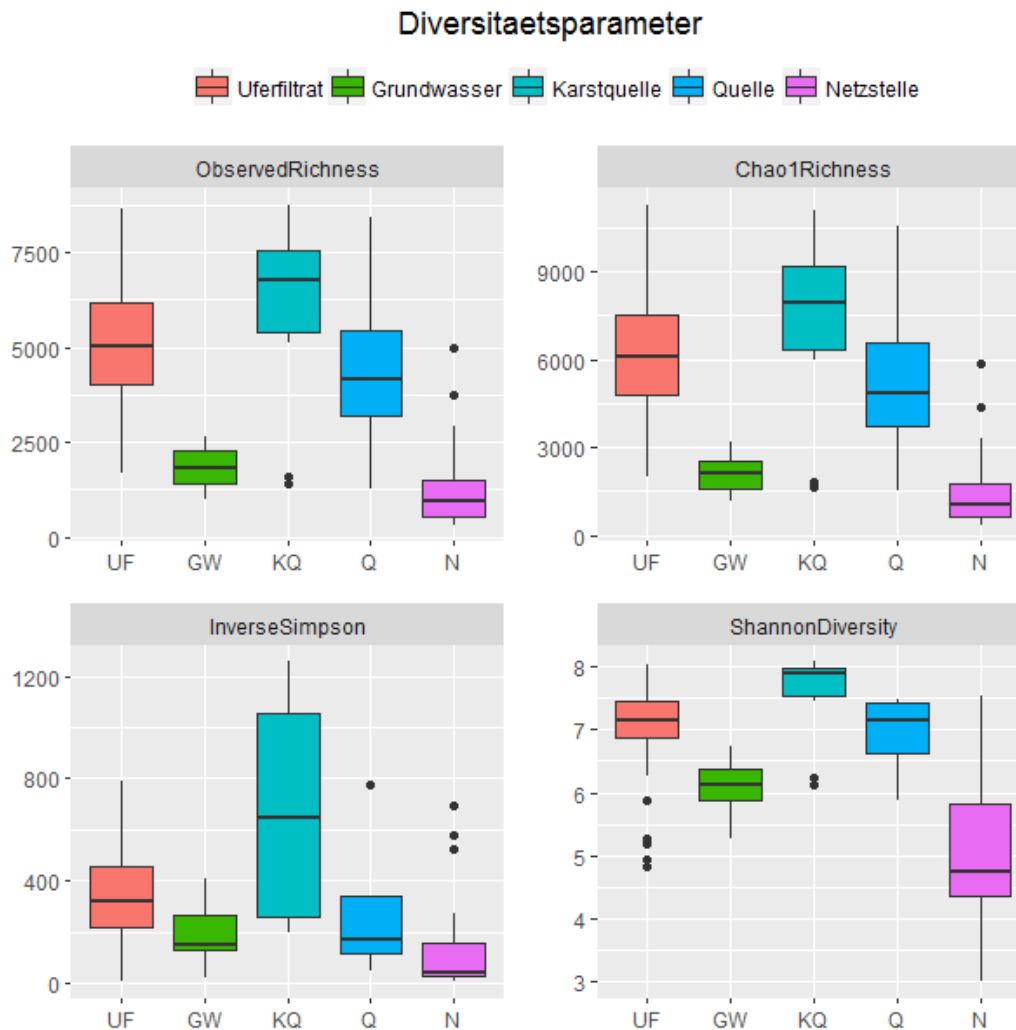


Abbildung 103: Boxplot der Diversitätsparameter nach Ressourcentyp.

Der Inverse Simpson Index stellt ein starkes Maß für die Gleich- bzw. Ungleichmäßigkeit der Verteilung der Arten dar. Dabei weisen insbesondere die Karstwasserquellen hohe Werte auf, was auf eine gleichmäßigere Verteilung der bakteriellen Arten hinweist. Zusammen genommen zeigt die Shannon Diversität ein ähnliches Bild wie die bloße Anzahl an detektierten Arten für Karstquellen, Uferfiltrate, Quellen und Grundwässer. Auffallend sind allerdings die niedrigen Werte für Netzstellen, die auf eine starke Verarmung der Artenanzahl, und zusätzlich eine große Ungleichmäßigkeit in ihrer Zusammensetzung hindeuten. Dieser Umstand ist vermutlich einem starken Selektionsdruck durch Desinfektionsmaßnahmen geschuldet.

5.9.2 BAKTERIELLE GEMEINSCHAFTEN IN RESSOURCENTYPEN

Um die Beta-Diversität (Ähnlichkeit zweier Proben zueinander) findet in der mikrobiellen Ökologie die Bray-Curtis-Ähnlichkeit häufig Anwendung. Dieses Distanzmaß kann verwendet werden, um in einem PCoA-Plot (Principal Coordinates Analysis – Haupt-Koordinaten-Analyse) diese Unterschiede in einer Ebene darzustellen. Je ähnlicher sich zwei Proben in ihrer bakteriellen Zusammensetzung sind, desto näher gruppieren sie sich in diesem in Abbildung 104 dargestelltem Plot.

Dabei ist zu erkennen, dass sich die bakteriellen Gemeinschaften klar nach Ressourcentyp aufteilen. Insbesondere die Gruppe der Uferfiltrate bildet einen von allen anderen Typen abgegrenzten Cluster. Die drei Netzstellenproben die in den Uferfiltrat-Cluster eindringen, sind von einer Netzstelle die unmittelbar einem Uferfiltratbrunnen folgen. Die mikrobiellen Gemeinschaften in Karstquellen bilden, mit zwei Proben

als Ausnahme, einen weiteren, sehr kompakten Cluster. Die beiden Karstwasser-Proben die sich in Nähe der Grundwasser-Proben anordnen stammen aus einem eigenen Quellgebiet mit sehr speziellen hydrogeologischen Eigenschaften. Leitfähigkeit und pH-Wert dieser Quelle entsprechen der üblichen Größenordnung für Porengrundwässer.

Die Proben aus Porengrundwässern ordnen sich ebenfalls nahe zueinander an, bilden aber keine scharfe Grenze zu den Proben der Netzstellen aus. Quellwässer bilden einen losen Cluster, der aber aufgrund der unterschiedlichen Quellarten nicht zuverlässig erscheint.

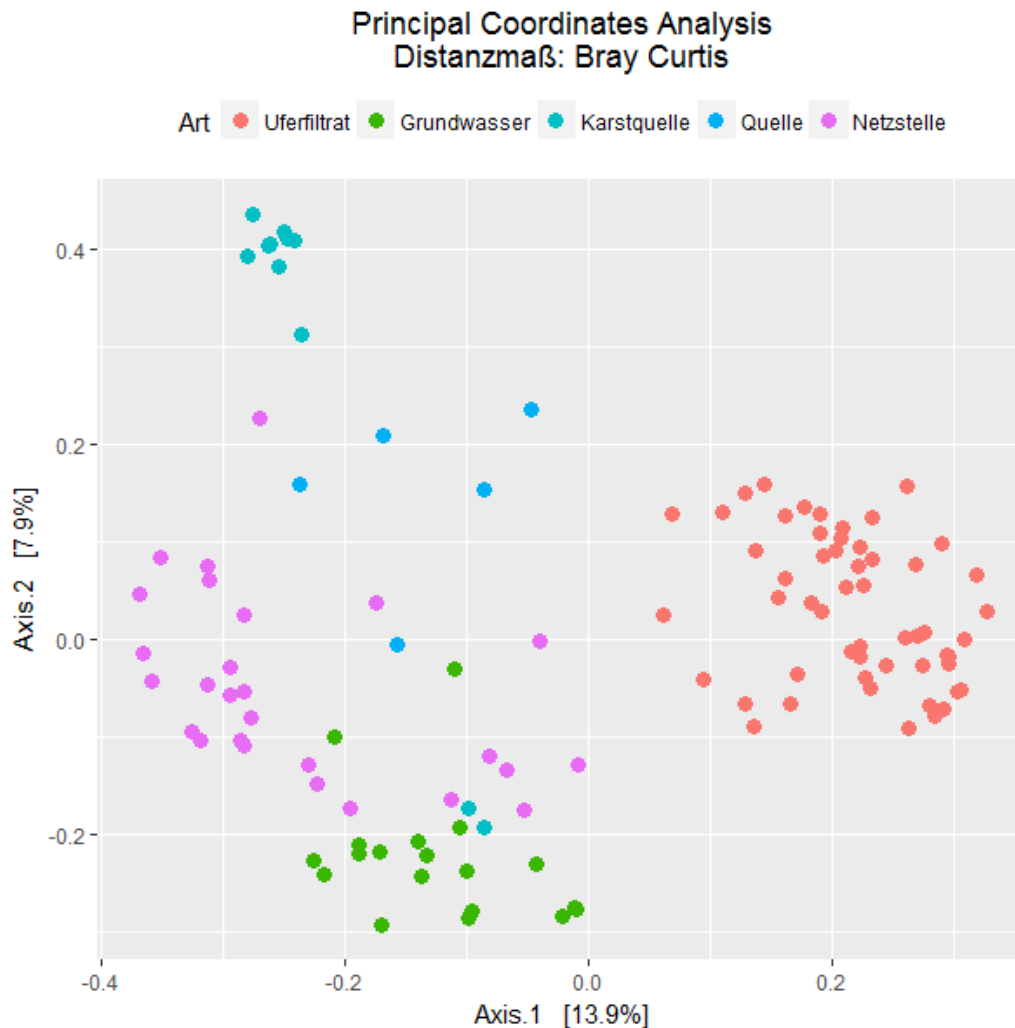


Abbildung 104: PCoA-Darstellung der bakteriellen Gemeinschaften nach Ressourcentyp.

5.9.3 BAKTERIELLE GEMEINSCHAFTEN IN EINZELNEN PROBEN

5.9.3.1 RELATIVE UND HOCHGERECHNETE ABSOLUTE ABUNDANZEN

Innerhalb einer Probenahmestelle oder auch entlang eines Aufbereitungs- oder Versorgungsweges kann die Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften eine starke zeitliche, bzw. räumliche Veränderung aufweisen. Exemplarisch dafür, wurde in Abbildung 105 das Mikrobiom auf Phylum-Ebene für ein Karstquellwasser zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. In der linken Hälfte der Abbildung sieht man die relative Zusammensetzung, und kann erkennen dass der größte Teil der Phyla in ihrem relativen Anteil wenig ändern, bzw. die Rangfolge sehr ähnlich ist. Die Ausnahme davon bilden allerdings die beiden dominanten Phyla, Parcubacteria und Planctomycetes. Während im Juni 2016 noch Parcubacteria die

Mehrheit darstellen, ändert sich diese Dominanz im Jahresverlauf kontinuierlich zugunsten der Planctomycetes.

Betrachtet man diese Veränderung jedoch im Kontext der durchflusszytometrisch bestimmten Zellzahlen, ergibt sich ein anderes Bild. In der rechten Hälfte von Abbildung 105 sind die hochgerechneten absoluten Abundanzen dargestellt. Dadurch ist zu erkennen, dass im Verlauf des Jahres zwar die Planctomycetes etwas zunehmen, aber wie die anderen Phyla auch eine relativ geringe Änderung in den totalen Zellzahlen aufweisen, und dass die starken relativen Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft auf eine starke Verminderung der Parcubacteria zurückzuführen sind.

Dadurch wird ersichtlich, dass die mittels NGS-Methoden erhaltenen, relativen Verhältnisse bakterieller Gemeinschaft immer auch im Kontext der Totalzellzahl betrachtet werden müssen. Starke Verschiebungen in der relativen Zusammensetzung müssen nicht zwangsläufig auf eine vollständige Änderung des Mikrobioms bedeuten, sondern können auch durch das Aufwachsen bzw. Verschwinden eines einzelnen Taxons hervorgerufen werden. Dieser Effekt wurde auch in einer Publikation näher erläutert (Props u. a. 2017).

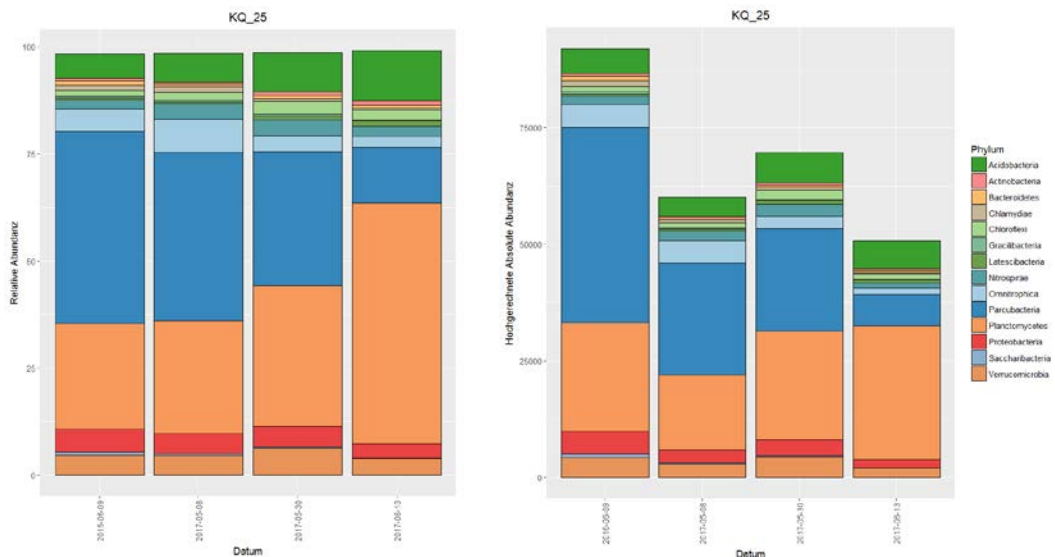


Abbildung 105: Zeitliche Veränderung eines Karstquellwassers (links relative, und rechts hochgerechnete absolute Abundanz in Balkendiagramm).

5.9.3.2 ZEITLICHE VARIANZ

Die zeitliche Varianz innerhalb einer Probe wurde bereits im vorherigen Abschnitt anhand von Abbildung 105 klar verdeutlicht. Dabei wurde die Verschiebung der zwei prominentesten Phyla beobachtet. Allerdings kann es auch zum Aufkommen vorher völlig unauffälliger Taxa kommen. In Abbildung 106 sind die hochgerechneten absoluten Abundanzen aller Phyla einer Grundwasserprobe zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. Dabei ist in der Probe vom Mai das Phylum Actinobacteria stark in den Vordergrund getreten (zweit häufigstes Phylum), welches zuvor an Stelle 15 der häufigsten Phyla rangiert hat.

Eine starke zeitliche Veränderung innerhalb einer Probenahmestelle, insbesondere das fast vollständige Aufkommen bzw. Wegfallens eines Taxas können als Indikatoren für veränderte Lebensbedingungen der Mikroorganismen gedeutet werden. Diese Veränderungen können z.B. die Verfügbarkeit eines zusätzlichen Nährstoffes, das Wegfallen eines Inhibitors, oder physikalische Ursachen wie z.B. Temperaturänderungen sein.

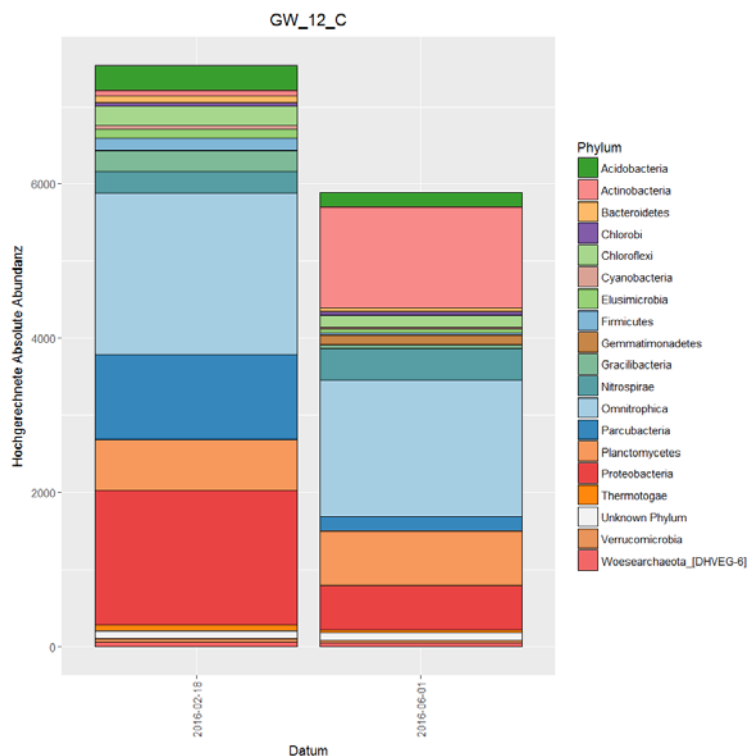


Abbildung 106: Zeitliche Veränderung eines Grundwassers (hochgerechnete absolute Abundanz in Balkendiagramm).

5.9.3.3 RÄUMLICHE VARIANZ

Neben der zeitlichen Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft, ist auch die räumliche Veränderung mittels Sequenzierungsverfahren verfolgbar. So sind für einen Uferfiltratsstandort die mikrobiellen Gemeinschaften unmittelbar aus dem Brunnen, direkt nach Aufbereitung dieses Wassers, und in einer darauf folgenden Netzstelle in Abbildung 107 in hochgerechneten absoluten Abundanzen dargestellt.

Dabei ist zu erkennen, dass die jahreszeitliche Dynamik der bakteriellen Gemeinschaften zum Teil geringer ist, als die räumliche Änderung entlang der Aufbereitung bzw. Verteilung des Wassers. Es zeigen sich zwar zeitliche Veränderungen, welche sich auch teilweise entlang des Versorgungsweges durchschlagen. So nimmt beispielsweise das Phylum Planctomycetes im Jahresverlauf an jeder Probennahmestelle stark zu.

Es zeigen sich aber insbesondere Änderungen, die unabhängig von der Jahreszeit zwischen den Probennahmestellen stattfinden. So nimmt zu allen drei Jahreszeiten nach Aufbereitung (Probe UF_5_B) die Anzahl an Actinobacteria ab, und jene der Omnithrophica zu. Der stärkste Umschwung in der mikrobiellen Gemeinschaft ist allerdings zwischen der sauerstoffangereicherten Probe und jener aus der Netzstelle (N_5_C) zu beobachten. So dominiert das Phylum Proteobacteria zu jeder Jahreszeit (im Sommer sogar mehr als die Hälfte aller detektierten Sequenzen), obwohl es in den vorangestellten Stellen zu den weniger auffälligen Phyla zählt.

RESULTATE

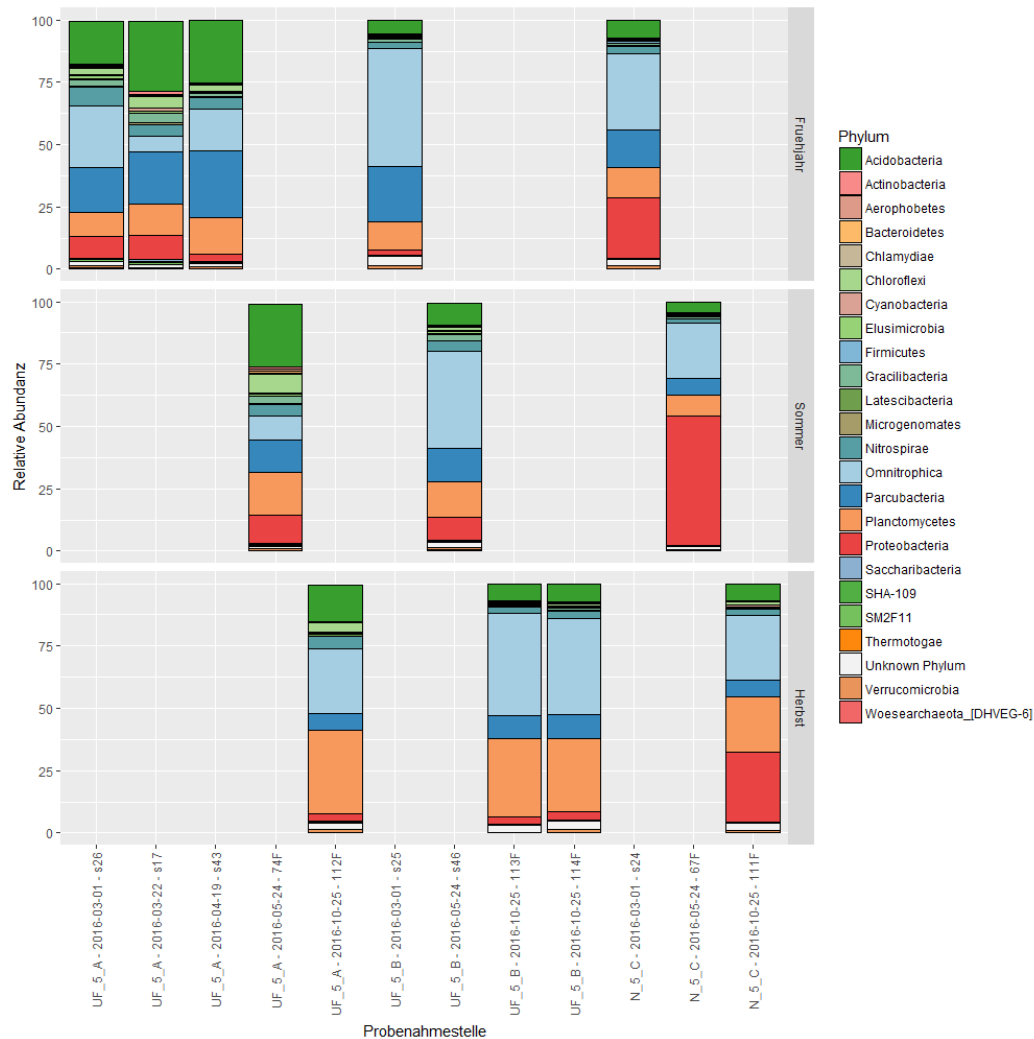


Abbildung 107: Räumliche Veränderung eines Uferfiltrates entlang der Verteilung (hochgerechnete absolute Abundanz in Balkendiagramm).

5.9.4 VERTEILUNG AUSGEWÄHLTER TAXA

Die Verteilung der bakteriellen Gemeinschaften aller untersuchten Proben auf Phylum-Ebene sind in Abbildung 108 dargestellt. Alle Phyla die mehr als 0,1% in 10% der Proben ausmachen sind mit in relativen Abundanzen dargestellt, um die Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu gewähren. Dabei ist zu erkennen, dass verschiedene Phyla unterschiedlich stark in verschiedenen Ressourcentypen vertreten sind. So sind Parcubacteria beispielsweise in den Proben der Karstquellen am stärksten vertreten, Acidobacteria in jenen von Uferfiltraten. Das Phylum Proteobacteria ist ebenfalls in allen Proben, dominant werden sie aber nahezu ausschließlich in Netzstellen, hier aber nicht in jeder.

RESULTATE

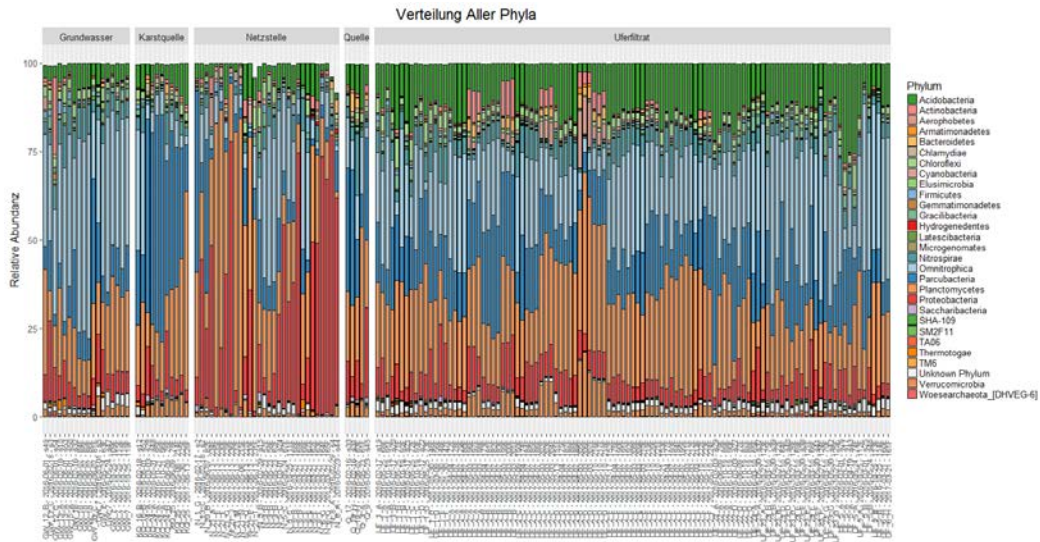


Abbildung 108: Verteilung aller Phyla mit mehr als 0,1% in 10% der Proben (relative Abundanz in Balkendiagramm).

Nimmt man einzelne taxonomische Einheiten aus der Gesamtheit der mikrobiellen Gemeinschaften heraus, zeigt sich, dass diese eine sehr unterschiedliche Verteilung innerhalb der untersuchten Proben aufweisen. Abbildung 109 ist die relative Verteilung für das Phylum Parcubacteria für alle untersuchten Proben dargestellt. Dabei ist sofort zu erkennen, dass dieses Phylum sehr unterschiedlich dominant in verschiedenen Wassertypen auftritt. So ist dieses Phylum in der Mehrheit der Karstquellen-Proben mit 50% oder mehr vertreten, während es in den übrigen Wasserarten mit wenigen Ausnahmen unter 30 Prozent liegt.

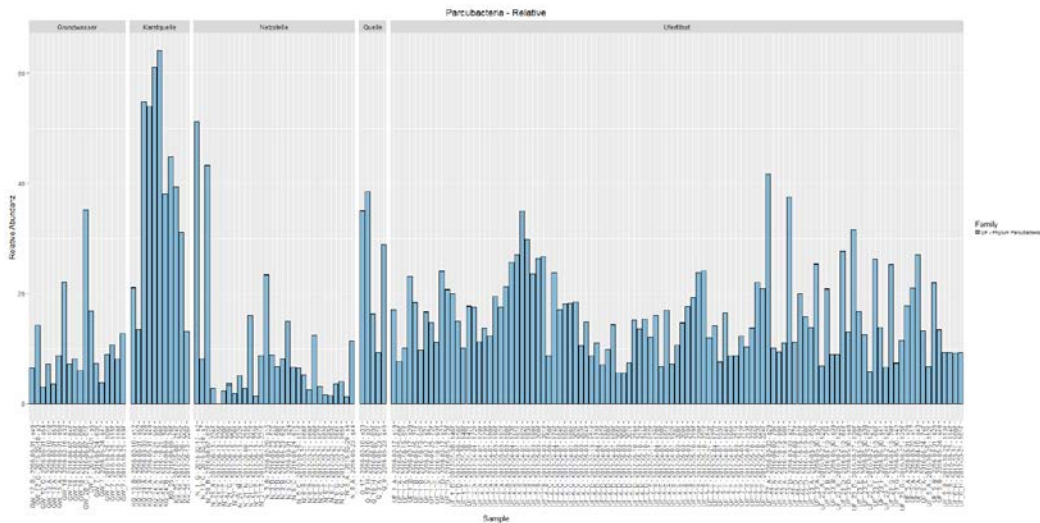


Abbildung 109: Relativer Anteil an Parcubacteria innerhalb aller Proben als Balkendiagramm.

Allerdings kann sich auch hier ein komplett anderes Bild, wenn man die relativen Anteile innerhalb einer Probe in Zusammenhang mit den totalen Zellzahlen setzt. Die dadurch gewonnene hochgerechnete Abundanz für das Phylum Parcubacteria ist in Abbildung 110 dargestellt. Dabei zeigen sich zwar immer noch sehr hohe Werte für Parcubacteria in den Karstquellen-Proben, allerdings weisen speziell eine Uferfiltrats-Probe aufgrund der hohen Totalzellzahl eine sehr hohe absolute Anzahl an Parcubacteria auf, während z.B. in Grundwasserproben oder auch fast allen Netzstellen nur eine sehr geringe absolute Anzahl an Parcubacteria aufkommt.

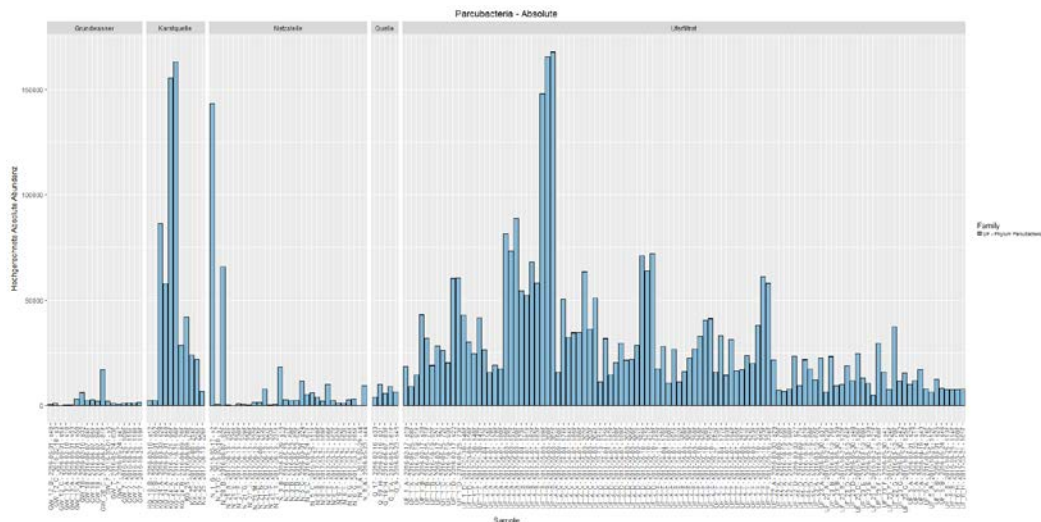


Abbildung 110: Hochgerechnete Absolute Abundanz an Parcubacteria innerhalb aller Proben als Balkendiagramm.

5.10 NGS UND DFZ – METHODENKOMBINATION

In einer Publikation aus 2017 wurden LNA und HNA-Zellen durch Filtration voneinander getrennt, und anschließend die jeweiligen Fraktionen mittels NGS-Verfahren sequenziert (Proctor u. a. 2018). Dabei konnte gezeigt werden, dass es Taxa gibt, die in einzelnen Proben ausschließlich in der HNA bzw. der LNA-Fraktion vorkommen. Unter den Phyla die ausschließlich in der LNA-Fraktion gefunden wurden, befinden sich viele sogenannte Candidate Phyla, ohne bisher kultivierte Repräsentanten.

Diejenigen Phyla, die in der zuletzt genannten Publikation als Bakterien der LNA-Fraktion dargestellt werden (Parcubacteria, Gracilibacteria, Saccharibacteria und SR1) wurden für die nachfolgende Darstellung als „Kleine Phyla“ zusammengefasst (Abbildung 108). Ein verhältnismäßig schwacher Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,42 zeigt, dass in den für diesen Bericht untersuchten Proben kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Summe dieser Phyla und dem Anteil an LNA-Zellen besteht.

Allerdings zeigt sich, dass es keine Proben gibt in denen die genannten Phyla einen hohen Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft ausmachen, und der LNA-Anteil niedrig ist. Es kann dadurch zwar nicht von einem hohen LNA-Anteil auf diese Gruppe an Phyla rückgeschlossen werden, der umgekehrte Schluss, dass ein hoher Anteil an den oben genannten „Kleinen Phyla“ einen hohen LNA-Anteil (und damit niedrigen HNA-Anteil) bedingt, ist sehr wohl möglich.

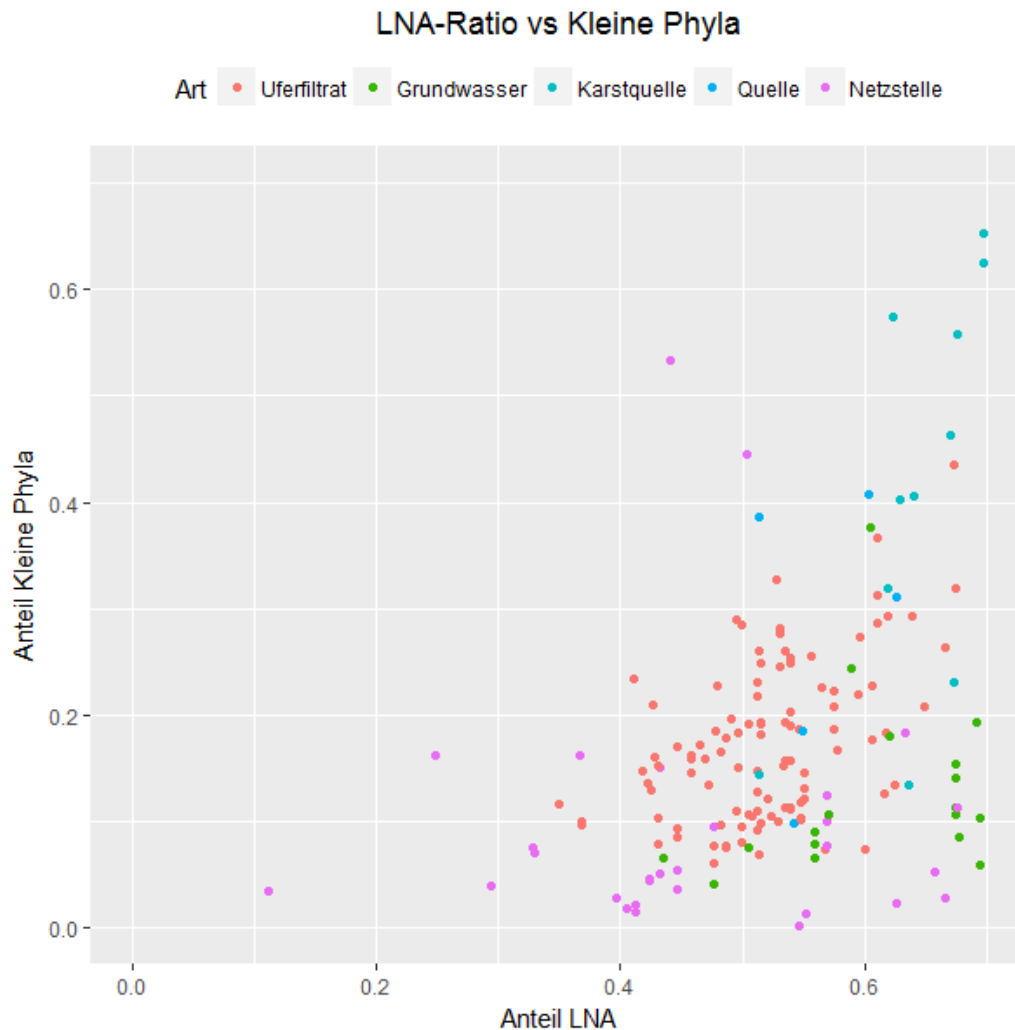


Abbildung 111: LNA-Anteil und Anteil bekannter LNA Phyla (Proctor u. a. 2018) als Scatterplot dargestellt.

Um den Zusammenhang einzelner Phyla, und dem LNA-Anteil weiter zu untersuchen, wurden für alle Phyla die Pearson-Korrelationen zwischen ihrer relativen Abundanz und dem LNA-Anteil bestimmt. In Tabelle 6 sind alle oben genannten „Kleinen Phyla“, und alle jene Phyla die eine erhöhte Signifikanz aufweisen, zusammengestellt. Dabei wurden nur jene Phyla berücksichtigt die zumindest 0,1% in der Hälfte der Proben ausgemacht haben, was dazu führte, dass das Phylum SR1 ausgeschlossen wurde. –

TABELLE 6 KORRELATION AUSGEWÄHLTER PHYLA UND LNA-ANTEIL

Phylum	Pearson Korrelation	p-Wert
Parcubacteria	0,40	$4,7 \cdot 10^{-8}$
Chlamydiae	0,36	$1,1 \cdot 10^{-6}$
Gracilibacteria	0,32	$1,6 \cdot 10^{-5}$
Saccharibacteria	0,26	$4,6 \cdot 10^{-4}$
Proteobacteria	– 0,47	$7,1 \cdot 10^{-11}$

Von den beschriebenen „Kleinen Phyla“ ist dieser Korrelationskoeffizient für das Phylum Parcubacteria am höchsten. Auch für Gracilibacteria und Saccharibacteria kann dieser Zusammenhang bestätigt werden. Als zusätzliches, vorher nicht beschriebenes Phylum, kann eine Verbindung zwischen LNA-Anteil und dem

Phylum Chlamydiae gezeigt werden. Besonders auffällig ist zudem der negative Korrelationskoeffizient zwischen LNA-Anteil und dem Phylum Proteobacteria. Dieser lässt darauf schließen, dass Proben mit erhöhtem Anteil an Proteobacteria auch einen reduzierten LNA-Anteil, und damit einen erhöhten HNA-Anteil aufweisen.

5.10.1 GEMEINSAME AUSWERTUNG DFZ UND NGS (WACHSTUMSPOTENTIAL)

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Ableitung qualitativer Information über die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft und die genaue Bestimmung der bakteriellen Zellzahlen zeitnah und in sehr hoher Messdichte. Somit kann eine Messstelle stets im Auge behalten und etwa der Zeitpunkt einer NGS-Probenahme bestmöglich geplant werden. Die dadurch ermöglichte ereignisbasierte Beprobung einerseits, und die Ausweitung der relativen NGS-Ergebnisse zu Absolutwerten andererseits, liefern einen wertvollen Beitrag zu einer umfassenden Optimierung bzw. Risikobetrachtung der Prozesse in Wasserversorgungsanlagen.

Zwar erlaubt die Durchflusszytometrie allein keine genaue Aussage über die jeweilige Zusammensetzung der in einer Wasserprobe vorhandenen Taxa, jedoch können mit ihrer Hilfe starke Indizien für eine Änderung der mikrobiellen Gemeinschaft gewonnen werden. Mit Hilfe von Abbildung 112, die die Veränderung einer mit UV behandelten Wasserprobe zwischen Anfang und Ende eines Lagerungsversuchs, zur Bestimmung der biologischen Stabilität zeigt, kann diese Möglichkeit besonders deutlich gemacht werden. Dargestellt sind neben zwei Streudiagrammen einer durchflusszytometrischen Messung - jeder Punkt entspricht dabei einer detektierten Zelle - Ergebnisse einer DNA-Sequenzierung. Die Änderung der taxonomischen Zusammensetzung spiegelt sich in den Ergebnissen der Durchflusszytometrie wieder. Der am Tag 14 der Lagerung ersichtliche, scharf abtrennbare Cluster besteht insbesondere aus Proteobacteria.

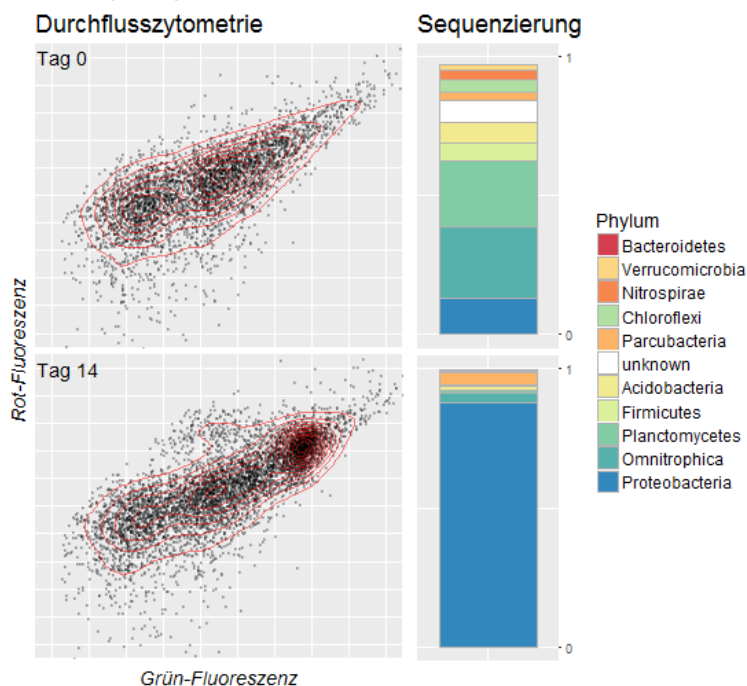


Abbildung 112: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie und DNA-Sequenzierung.

6 DAS ÖSTERREICHISCHE PROTOKOLL

IM FOLGENDEN SIND die einzelnen Erkenntnisse der methodischen Entwicklungen auf Basis der umfassenden Analyse österreichischer Grund- und Trinkwässer als Methodensammlung dargestellt. Die für die erfolgreiche Anwendung der Durchflussszytometrie in der Wasserversorgung notwendigen Prozesse und Schritte sind in standardisierte Arbeitsanweisungen (SOP) in Abschnitt 6.2 dargestellt. In Abbildung 113 (Abschnitt 6.1) ist ein Überblick über die einzelnen Prozesse und Schritte der durchflussszytometrischen Anwendung als Fließdiagramm dargestellt. Abschnitt 6.4 enthält eine standardisierte Arbeitsanweisung (SOP) zum im FloWRes-Projekt optimierten Verfahren zur Bestimmung des Mikrobioms in Wasserproben auf Basis des „Next-Generation-Sequencing“ (NGS).

DURCHFLUSSZYTOMETRIE

6.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG VON GRUND- UND TRINKWASSER

Wie aus Kapitel 5.1 ersichtlich können unterschiedliche Faktoren (Prozesse und Schritte) einen Einfluss auf das Ergebnis der durchflussszytometrischen Messung bei Wasserproben aufweisen. In Abbildung 113 ist ein Fließdiagramm mit den wichtigsten Faktoren zusammengestellt. Wie bei vielen anderen Analysen spielt auch in der Durchflussszytometrie die Probenahme, Transport und Lagerung der Wasserprobe bis zur tatsächlichen Messung im Labor eine zentrale Rolle. Fehler in der Probenvorbereitung können meist mit Hilfe der Datenanalyse (z.B. fehlender Farbstoff in der Probe) einfach erkannt bzw. mit Mehrfachmessungen ausgeschlossen werden. Die Messungenauigkeit der Messung an sich (Gerät) ist im Vergleich zu Fehler bei der Probenahme, Transport und Lagerung verschwindend gering. Da das Wasser bei der Messung mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff in Verbindung gebracht wird, ist für eine entsprechende Handhabung im Labor (Labor mit Sicherheitslevel 1), den persönlichen Schutz (Schutzbrille, Labormantel, Laborhandschuhe, etc.) und für die entsprechende Entsorgung der Rückstände (z.B. Autoklavierung) zu sorgen.

Bei der durchflussszytometrischen Messung können drei Prozessbereiche mit unterschiedlichen Arbeitsschritten und Faktoren identifiziert werden:

- Vorbereitung: Diese umfasst die Überprüfung des Geräts und die Probenvorbereitung bis zur Messung.
- Messung: Die Messung an sich umfasst die Messeinstellungen und die Überprüfung des Messvorgangs, die jedoch auch entsprechend in der Datenanalyse automatisiert durchgeführt werden kann.
- Datenanalyse: Die mit Hilfe der Durchflussszytometrie ermittelten Signale (Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften) stellen die Basis für die Ermittlung des Ergebnisses dar (z.B. Totalzellzahl). Diese können zusätzlich noch weiterführend einzeln (z.B. Clusteranalyse) oder im Vergleich (z.B. Cytometric Fingerprinting) beschrieben werden.

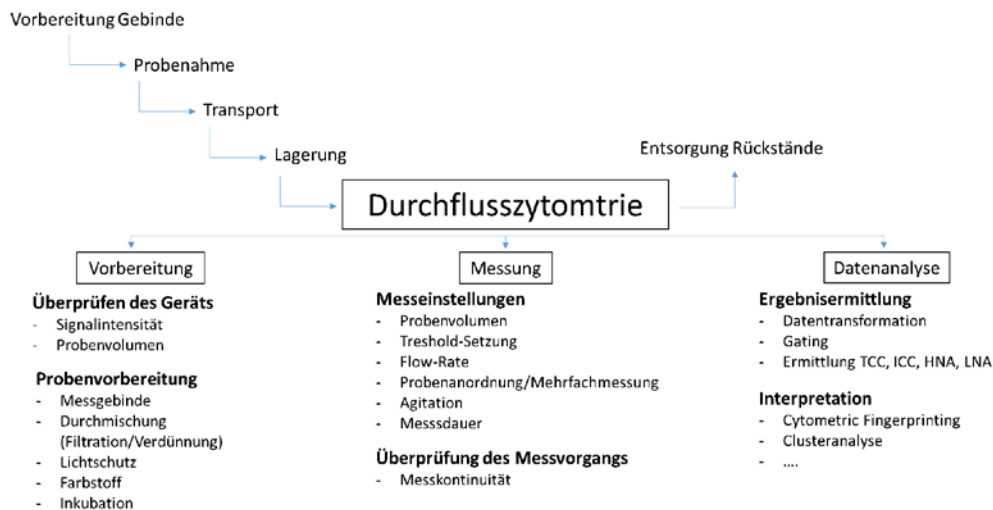


Abbildung 113: Überblick über die einzelnen Prozesse und Schritte der Anwendung der Durchflusszytometrie als Fließdiagramm dargestellt.

6.1.1 KRITISCHE PUNKTE UND EMPFEHLUNGEN ZUM EINSATZ DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass die Bestimmung der Totalzellzahl auf Basis einer Färbung mit SYBR® Green 1 eine äußerst robuste und zuverlässige Methode darstellt und daher auch von Laboren angewandt werden kann, die noch wenig Erfahrung im Umgang mit Durchflusszytometrie besitzen. Die Möglichkeit der Verwendung eines Auto-Loaders zur automatischen Abarbeitung einer Vielzahl an Proben erbringt erhebliche Arbeitserleichterungen und ermöglicht die Verdichtung von Probenahmestellen und -intervallen. Der Einsatz der Online-Durchflusszytometrie gestattet das mikrobiologische Monitoring von sensiblen Wasserressourcen in höchster Auflösung, erfordert dabei aber mehr Erfahrung durch den Anwender. Aus Sicht der Autoren können folgende Punkte als allgemeine Empfehlungen und insbesondere als Empfehlungen zur Bestimmung der Totalzellzahl ausgesprochen werden:

- Für die Probenahme sind sterile Einweg-Zentrifugenröhrchen sehr praktikabel und geeignet, sofern die Proben zeitnah gemessen werden. Eine Lagerungsdauer von bis zu 48 Stunden stellt kein Problem dar. Aber auch bei einer Überschreitung ist – sofern eine gute Kühlung der Proben sichergestellt ist – noch mit verwertbaren, allenfalls etwas erhöhten TCC-Ergebnissen zu rechnen. Gemuffelte Glasgebinde lassen eine etwas längere Lagerungsdauer zu.
- Eine Verdünnung oder Filtration der Proben ist nur in Ausnahmefällen (Oberflächenwasser) notwendig. Eine Anpassung des pH-Werts einer Probe muss nicht erfolgen. Bei hohen Chlor-Konzentrationen kann eine Beeinträchtigung der Anfärbung (SG1) eintreten und eine Zugabe von Natriumthiosulfat zur Chlor-Neutralisation ist angebracht. Natriumthiosulfat selbst hat keine Auswirkung auf die Anfärbung (SG1).
- Bei der Verwendung von DMSO als Farbstofflösungsmittel ist mit starkem Signalhintergrund zu rechnen. Eine Alternative stellt die Verwendung von TRIS-HCl-Puffer dar. Die Entscheidung, welche Variante gewählt wird, sollte am Beginn einer Messkampagne getroffen werden, um ein Höchstmaß an Vergleichbarkeit zu gewährleisten.
- Das verwendete Messgebinde hat Einfluss auf das Ergebnis, daher sollte dieses aus Gründen der Vergleichbarkeit einheitlich gehalten werden. Bei einem Wechsel sollte der Einfluss mittels Vergleichsuntersuchungen quantifiziert werden.

- Die Verwendung eines Auto-Loaders in Verbindung mit Mikrotiterplatten im 96er-Format bringt wesentliche Arbeitserleichterungen.
- Eine Inkubationszeit von 13 Minuten sollte jedenfalls eingehalten werden. Bei natürlichen Wasserproben ist nur in seltenen Fällen mit einer geringen Zunahme der Signalintensität bei noch längerer Einwirkzeit zu rechnen.
- Auf das Setzen von Waschschritten zwischen einzelnen Messungen kann u.U. zur (deutlichen) Beschleunigung des Messvorgangs verzichtet werden. Der TCC-Übertrag (Carry-Over) vom Vorgänger beträgt dabei etwa 1 %.
- Die Durchführung der Messung mit einer hohen Flow-Rate bedingt nur geringe Einbußen hinsichtlich Genauigkeit, erbringt aber eine deutliche Zeitersparnis.
- Das gemessene Probenvolumen sollte bei Proben mit sehr geringer TCC angepasst werden, da eine verbesserte Aussage hinsichtlich der Signalverteilung der Zelldetektionen zu erzielen ist.
- Die Messungen sollten präventiv abgedunkelt stattfinden, wenngleich keine besondere Beeinflussung durch Labor-Beleuchtung festgestellt wurde.
- Bei einem Wechsel des verwendeten Durchflusszytometers oder dem Arbeiten an verschiedenen Geräten sind Vergleichsmessungen durchzuführen. Auch nach Reparaturen am Gerät ist neben der Signalstabilität auch die Volumenbestimmung zu überprüfen.
- Wenngleich die TCC-Bestimmung mittels SG1 nicht besonders anfällig bezüglich der Gesamtmessdauer einer Messsequenz ist, sollte diese möglichst kurz gehalten werden.
- Die Festlegung eines einheitlichen Gates für alle Wasserproben stellt einen einfachen und robusten Weg dar, im Rahmen der Datenauswertung die TCC zu bestimmen. Die Festlegung der Grenzen dieses Gates sollte auf Basis einer großen Anzahl unterschiedlicher Proben getroffen werden. In Einzelfällen – etwa bei desinfizierten Wasserproben – kann es nichtsdestoweniger notwendig sein die Ergebnisse kritisch zu hinterfragen und Anpassung vorzunehmen. Die Hinzuziehung von Messungen steril-filtrierten Proben zur Gate-Festlegung zeigt jene Detektionen, die jedenfalls keine Zell-Signale sind.
- Die Einbeziehung von Streulichtparametern kann bei der Interpretation von auffälligen Detektionen helfen – so können etwa Luftblasen identifiziert werden. Beim Auflösungsvermögen der Streulichtsignale bestehen große Unterschiede zwischen verschiedenen Gerätemodellen.

Im Falle der Bestimmung des LNA- bzw. HNA-Anteils auf Basis einer Färbung mit SYBR® Green 1 gelten etwas abweichende Empfehlungen:

- Die Anfälligkeit dieses Parameters hinsichtlich der Lagerungsdauer ist erhöht. Ein Anstieg des HNA-Anteils geht der Zunahme der TCC typischerweise voraus.
- Gleichfalls wird dieser Parameter durch die Gesamtmessdauer einer Messsequenz stärker beeinflusst. Geringfügige Änderung der Signalintensität betreffen die TCC nicht, bewirken aber gerade bei Proben mit einer schlechten Unterscheidbarkeit der beiden Zell-Cluster eine deutliche Verschiebung des HNA-Anteils.

- Die Festlegung der Grenze zwischen beiden Gruppen erfolgt am einfachsten anhand von Dichteschätzungen der Grün-Fluoreszenz der Zell-Detektionen. Die Hinzunahme eines Streulichtsignals bietet meist nur wenig Unterscheidungsmöglichkeit, wenngleich diese Informationsquelle jedenfalls hinzugezogen werden sollte.

Die Bestimmung der Intaktzellzahl auf Basis der Farbstoffkombination aus SYBR® Green 1 und Propidiumiodid unterliegt einer wesentlich erhöhten Färbedynamik. Daraus leiten sich spezifische Anforderungen an das Vorgehen bei der Messung ab:

- Die Lagerungsdauer bis zur Messung kann das Ergebnis bei desinfizierten Wasserproben erheblich beeinflussen.
- Die Verwendung von TRIS-HCl-Puffer als Farbstofflösungsmittel verringert den Signalhintergrund und ergibt im Vergleich zu DMSO zum Teil deutlich höhere ICC-Werte. Die längerfristige Färbedynamik wird durch die Wahl des Farbstofflösungsmittels wesentlich beeinflusst.
- Für eine genaue Quantifizierbarkeit der ICC-Werte müssen hinsichtlich der Einwirkzeit des Farbstoffs genaue Vorgaben gemacht werden. Es ist mit einer wesentlich verringerten ICC bei Zunahme der Einwirkzeit zu rechnen. Damit sind Messsequenzen unter Verwendung eines Auto-Loaders Grenzen gesetzt.
- Auch die Fluoreszenz-Signale intakter Zellen sind im Vergleich zur reinen SG1-Färbung etwas ins Rot verschoben. Im Hinblick auf die Anpassung eines ICC-Gates sollte dies Berücksichtigung finden. Davon ist in erster Linie die Abtrennung der LNA-Zellen vom Signalhintergrund betroffen.

6.1.2 ONLINE-DURCHFLUSSZYTOMETRIE (ONLINE-BACTERIA-ANALYZER, METANOR)

Für den Einsatz der Online-Durchflusszytometrie sind keine allgemein gültigen Aussagen möglich, da das Vorgehen stark von den jeweiligen Gerätemodellen, die sich in der Bauart stark unterscheiden können, und von standortspezifischen Besonderheiten geprägt ist. Ein wesentlicher Vorteil der Online-Durchflusszytometrie besteht im Entfall der manuellen Probenvorbereitung sowie der Probenahme, des Proben transports und der Lagerung. Die Messeinstellungen gewährleisten darüber hinaus ein hohes Maß an Konstanz der Messbedingungen (Farbstoffeinwirkzeit). Aus Basis der Erfahrungen der Autoren mit Online-Bacteria-Analyzer (Metanor) gilt zu beachten:

- Ein Intervall der Waschzyklen von 24 Stunden ist ausreichend. Innerhalb dieser Zeitspanne ist nicht mit einer Veränderung der TCC-Ergebnisse zu rechnen.
- Die Inkubationsdauer kann für den jeweiligen Einsatzzweck optimiert werden. Für mikrobiologisch variable Probenahmestellen kann ein minimaler Wert und damit eine erhöhte Messfrequenz angestrebt werden.
- Die Gate-Festlegung muss je nach gewählten Einstellungen angepasst werden. Eine verkürzte Inkubationszeit führt tendenziell zu einer geringeren Signalintensität.
- Datenspeicherung und Datenübertragung müssen durchdacht werden, da größere Datenmengen anfallen.

- Eine regelmäßige Betreuung (Nachfüllen der Betriebsmittel) des Gerätes etwa alle 1-2 Wochen ist je nach Intensität des Betriebs erforderlich.

6.2 SOP DURCHFLUSSZYTOMETRIE

6.2.1 PROBENAHME

Die Probenahme erfolgt unter Verwendung von sterilen Einweg-Zentrifugenröhrchen oder mittels gereinigten, sterilen Glasbinden mit Schraubverschluss, wobei das Probenvolumen mindestens 50 ml beträgt. Ein Spülen des Probenahmehahns durch mehrmaliges volles Öffnen und Schließen des Ventils und anschließender längerer Spülung bei mäßiger Ventilöffnung ist notwendig, um den Einfluss stagnierenden Wassers in Hahn und Leitung auszuschließen (bei einem ständig durchflossenen Probenahmehahn ist dieses Vorgehen dementsprechend nicht notwendig). Die Dauer des Spülvorgangs richtet sich nach den örtlichen Gegebenheiten und der Absicht der Probenahme, sollte aber zumindest einige Minuten betragen. Ein Abflämmen oder eine chemische Desinfektion des Probenahmehahns ist für die Bestimmung der TCC und anderer Summenparameter mittels DFZ normalerweise nicht notwendig. Für eine sehr genaue Bestimmung der ICC kann das Einschleppen einzelner lebender Zellen aus dem Hahn allerdings störend sein. Auch bei Versuchen, die eine Probenlagerung (Biostabilität) beinhalten, sollten sterile Verhältnisse sichergestellt werden. Schöpfproben sind in einer Tiefe von ca. 25 cm unter der Wasseroberfläche zu nehmen.

6.2.2 TRANSPORT UND LAGERUNG

Der Probentransport und die anschließende Lagerung erfolgen lichtgeschützt bei 4 °C. Eine Erwärmung der Proben ist jedenfalls auszuschließen. Die Lagerungsdauer sollte prinzipiell so kurz wie möglich sein. Je nach gewünschtem DFZ-Parameter sind unterschiedliche maximale Lagerungsdauern zu beachten. Die Bestimmung der TCC und des HNA-Anteils ist bei oligotrophen Wasserressourcen bis zu 48 Stunden möglich. Ist eine darüber hinausgehenden Lagerungsdauer nicht zu vermeiden, kann der Einfluss mittels eines Lagerungsversuchs (Vorversuch) ermittelt werden. Die Bestimmung der ICC und anderer Viabilitätsparameter sollte unmittelbar nach Probennahme erfolgen.

6.2.3 MESSVORBEREITUNGEN

6.2.3.1 PROBENVORBEREITUNG

Eine Verdünnung von Proben ist normalerweise – gerade bei Proben aus einem oligotrophen Milieu – nicht notwendig. Sollte die maximal erlaubte Detektionsrate des Geräts wider Erwarten überschritten werden, ist eine erneute Messung der nun verdünnten Probe mit vertretbarem Aufwand durchzuführen.

Eine Filtration der Proben zur Entfernung großer Partikel, die zu gerätetechnischen Problemen führen könnten, ist nur in Ausnahmefällen (Oberflächenwasser) notwendig und mittels 30-µm-Schüttfiltern möglich.

Eine Anpassung des pH-Werts einer Probe muss bei Verwendung von SYBR® Green 1 für natürliche Wasserproben in der Regel nicht erfolgen.

Bei Proben mit einer hohen Chlor-Konzentration ist die Zugabe von Natriumthiosulfat zur Chlorneutralisation sinnvoll. Dabei wird eine Natriumthiosulfat-pentahydrat-Lösung (18 mg/ml) im Verhältnis 1:1 000 zugegeben.

6.2.3.2 FARBSTOFFVORBEREITUNG

Das Arbeiten mit hochkonzentrierten Farbstofflösungen stellt ein mögliches Sicherheitsrisiko dar, daher müssen die in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern angeführten Vorgaben strikt eingehalten werden.

6.2.3.2.1 SYBR® GREEN 1 - ARBEITSLÖSUNG

Für die Herstellung einer Arbeitslösung aus der vom Hersteller ausgelieferten, hochkonzentrierten Stammlösung – SG1 ist in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst – wird letztere im Verhältnis 1:100 mit steril-filtriertem (Beständigkeit des Filtermaterials muss überprüft werden) DMSO verdünnt. Als Gebinde kommen Mikroreaktionsgefäße („Eppi“) aus Polypropylen in Frage. Die Lagerung der Stamm- und Arbeitslösung erfolgt lichtgeschützt bei -18 °C.

6.2.3.2.2 FARBSTOFFKOMBINATION SYBR® GREEN 1 UND PROPIDIUMIODID – ARBEITSLÖSUNG

Die Herstellung einer Arbeitslösung aus der Stammlösung von SG1 (siehe auch Abschnitt 6.2.3.2.1) und PI, das sowohl in Pulverform als auch gelöst in Reinstwasser erhältlich ist, erfolgt durch die gemeinsame Verdünnung beider Farbstoffe in einer steril-filtrierten TRIS-HCl-Pufferlösung (10 mM, pH 8,1). Dabei wird SG1 im Verhältnis 1:100 verdünnt und PI in einer Konzentration von 600 µM beigegeben. Bezüglich Gebinde und Lagerung gelten die Ausführungen aus Abschnitt 6.2.3.2.1.

6.2.3.3 FARBSTOFFZUGABE ZUR PROBE UND INKUBATION

Die Zugabe von Farbstoff (Arbeitslösungen aus Abschnitt 6.2.3.2) zur Probe, die Raumtemperatur aufweisen sollte, erfolgt im Verhältnis 1:100. Damit beträgt die Konzentration des Farbstoffs in der Probe im Fall von SG1 1:10 000 (bezogen auf die Konzentration der Stammlösung) und im Fall von PI 6 µM.

Das benötigte Probenvolumen ist vom Gerätemodell, dem Messgebinde sowie den gewählten Messeinstellung abhängig und beträgt typischerweise einige Hundert Mikroliter. Hier sind die Herstellerangaben einzusehen. Das gewählte Messgebinde sollte idealerweise geringe Bindungskräfte auf Farbstoff und Zellen ausüben („low bind“).

Eine Inkubationszeit von 13 Minuten bei 37 °C sollte eingehalten werden. Dabei ist zu beachten, dass je nach verwendetem Inkubator und Probenvolumen die Zeit bis zum Erreichen der Zieltemperatur leicht variieren kann.

6.2.3.4 MEHRFACHMESSUNGEN EINER PROBE

Um einzelne abweichende Messungen auszuschneiden bzw. die Genauigkeit des Resultats zu erhöhen, ist die Mehrfachmessung einer Probe (Dreifachansatz) sinnvoll. Die Analyse von Mehrfachmessungen ermöglicht die (teilweise) Abschätzung der Variabilität der Messergebnisse.

6.2.4 MESSEINSTELLUNGEN UND -DURCHFÜHRUNG

Die Empfehlungen zu den Messeinstellungen sind zumindest teilweise vom jeweils verwendeten Gerätemodell abhängig. Die Empfehlungen des Geräteherstellers zur Erzielung möglichst präziser Messresultate (Streuung der Signalintensitäten, Bestimmung des gemessenen Volumens) sind zu berücksichtigen. Bei allen Messungen, bei denen ein gegenseitiger Vergleich beabsichtigt ist, sollten die gewählten Einstellungen so wenig als möglich variiert werden.

6.2.4.1 FLUORESZENZ-KOMPENSATION

Weder für die Messung mit SG1 noch für die Messung mit der Farbstoffkombination aus SG1 und PI ist eine Fluoreszenz-Kompensation notwendig.

6.2.4.2 GEMESSENES PROBENVOLUMEN

Das gemessene Probenvolumen (sollte dies wählbar sein) sollte groß genug sein, ein repräsentatives Abbild der bakteriellen Gemeinschaft einer Wasserprobe unter Berücksichtigung von Störsignalen (Grundkontamination, Carry-Over) zu erhalten. Eine Mindestanzahl an Detektionen lässt sich bei manchen Geräten auch durch andere Kriterien als das Volumen (bzw. eine Kombination von Kriterien) erreichen, d.h. etwa, dass der Messvorgang entweder nach dem Erreichen eines bestimmten Volumens oder nach dem Erreichen einer definierbaren Anzahl an Detektionen in einem ebenfalls definierbaren Signalbereich (Gate) beendet wird (je nachdem welches Kriterium früher erreicht wird).

6.2.4.3 DURCHFLUSSRATE

Der Einfluss der Durchflussrate („flow rate“) – etwa in Hinblick auf die Streuung der Messwerte – kann in einem Vorversuch durch mehrmaligem Messen der gleichen Probe (native Proben, Reinkulturen oder Beads) mit verschiedenen Einstellungen ermittelt werden.

6.2.4.4 THRESHOLD

Für die Messung von Proben unter Verwendung von SG1 sowie Fall der Farbstoffkombination aus SG1 und PI wird der Threshold bei natürlichen Wasserproben im Grün-Fluoreszenz-Kanal definiert. Werte geringerer Fluoreszenzintensitäten als jener des Thresholds werden nicht erfasst. Die genaue Größe des Thresholds muss in einem Vorversuch (natürliche Wasserproben) getestet werden. Hierbei wird der Threshold-Wert ausgehend von sehr geringen Werten solange gesteigert, bis nur noch ein kleiner Anteil jenes Bereichs mit extrem hoher Detektionsdichte erfasst wird, der im Bereich geringer Fluoreszenzintensität typischerweise zu sehen ist (Hintergrundrauschen). Die Zelldetektionen weisen davon typischerweise eine sichtbare Trennung durch erhöhte Fluoreszenzintensitäten auf. Eine „Abschneiden“ von Zellsignalen durch eine zu hohe Festlegung des Thresholds kann nicht mehr rückgängig gemacht werden.

6.2.4.5 MESSDAUER

Die Messdauer, d.h. die Dauer zwischen Beendigung der Inkubation und Beendigung der tatsächlichen Messung einer Probe, sollte grundsätzlich gering und insbesondere einheitlich sein. Dies gilt insbesondere für die Verwendung der Farbstoffkombination aus SG1 und PI zur Bestimmung einer Membranschädigung (ICC).

Bei Verwendung eines Auto-Loaders zur automatischen Abarbeitung einer großen Anzahl an Proben kann diese Forderung nicht erfüllt werden. Für die Bestimmung der TCC ist eine Messdauer bis zu 80 Minuten aber nicht als kritisch einzustufen.

6.2.4.6 PROBENABFOLGE UND ZWISCHENREINIGUNG

Hinsichtlich der Messreihenfolge von Proben und einer allfälligen Zwischenreinigung ist der Übertrag von Partikeln und Farbstoff zu berücksichtigen. Proben mit geringer Zellzahl sollten nicht, bzw. nur nach einer Zwischenreinigung, nach Proben mit wesentlich höherer Zellzahl positioniert werden. Gleichfalls ist nach einem Wechsel des verwendeten Farbstoffs ein Reinigungsschritt zu setzen.

6.2.4.7 LICHTSCHUTZ

Die Lichtexposition der gefärbten Proben sollte gering gehalten werden. Eine Abschattung des Messbereichs des DFZ bei Verwendung eines Auto-Loaders (Messserien) ist sinnvoll.

6.2.5 MESSUNGEN ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

6.2.5.1 BEADS

Eine regelmäßige, zumindest wöchentliche Kontrollmessung mit Beads („quality control beads“) muss durchgeführt werden. Die Beurteilung der Messergebnisse sollte unmittelbar erfolgen. Der Einsatz von Counting-Beads zur Überprüfung der Volumenmessung des Geräts bzw. zur Sicherstellung der Stabilität der Volumenmessung über längere Zeiträume ist sinnvoll.

6.2.5.2 VERGLEICHSPROBEN

Die Messung von ungefärbten oder gefärbten Reinstwasserproben (oder steril-filtrierter Wasserproben) nach der Messung einer normalen Probe (gleicher Farbstoff) gibt Aufschluss über den zu erwartenden Übertrag von Partikeln. Die Messung gefärbter (SG1) Reinstwasserproben (oder steril-filtrierter Wasserproben) kann Aufschluss über eine mögliche Verschmutzung des Geräts liefern und Anlass zu einer erweiterten Gerätereinigung sein. Die Messung von gefärbten, steril-filtrierte Wasserproben kann Informationen über Ausmaß und Signalbereich von unspezifischen Hintergrundsignalen liefern, und eine genauere Identifikation von Zell-Signalen in der zugeordneten gefärbten, nicht-filtrierte Wasserprobe ermöglichen.

6.2.5.3 VERDÜNNUNGSREIHEN

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen, d.h. mit definierten Verdünnungsstufen einer Probe (Verdünnungsmedium ist die steril-filtrierte Probe) oder Beads, kann die Messgenauigkeit in niedrigen oder hohen Konzentrationsbereichen bewertet werden.

6.2.6 DATENAUSWERTUNG

6.2.6.1 QUALITÄTSSICHERUNG

6.2.6.1.1 BEADS

Im Rahmen der Datenauswertung sollten Beads-Messungen zeitnah bearbeitet werden. Hier geht es insbesondere um die Entdeckung von Sprungstellen und längerfristigen Trends in der Signalintensität. Für die einzelnen Beads-Populationen ist neben dem Median der Signalintensität auch die Streuung („median absolute deviation“) zu beachten.

6.2.6.1.2 MESSVERLAUF

Die regelmäßige Kontrolle von ausgewählten, möglichst vergleichbaren Messverläufen (z.B. der Beads-Messungen) hinsichtlich der Anzahl der Detektionen und des Median der Fluoreszenz-Signale gibt Aufschluss über mögliche gerätetechnische Probleme.

6.2.6.2 GATING

Die Festlegung eines einheitlichen Gates für verschiedene Wasserproben basiert idealerweise auf einer größeren Anzahl von Messungen verschiedener Proben. Die wesentlichste Zielsetzung ist die Separation von

Zell-Signalen von Hintergrundsignalen. Dazu sind Beispiele aus der Fachliteratur heranzuziehen. Falls keine klare Trennung definiert werden kann, besteht eine Möglichkeit in der Messung steril-filtrierter Proben (Porengröße von 0,1 µm), deren Detektionen jedenfalls keine Zell-Signale sind. Eine wesentliche Hilfestellung in der Festlegung eines Gates bieten dichte-basierte Darstellungen. Eine Sensitivitätsanalyse, die in der Anwendung mehrerer Gate-Varianten besteht, gibt Aufschluss über die Änderung der ermittelten Größen (TCC, ICC, HNA-Anteil) in Abhängigkeit vom jeweiligen Gate.

MIKROBIOM – NEXT GENERATION SEQUENCING

6.3 OPTIMIERTES VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES MIKROBIOMS IN WASSERPROBEN AUF BASIS DES „NEXT-GENERATION-SEQUENCING“-VERFAHRENS (NGS)

Trinkwasserproben zeichnen sich aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Beschaffenheit durch eine geringe Zellzahl und in weiterer Folge einen geringen DNA Gehalt aus, weshalb die Anwendung von etablierten Extraktions- und Aufbereitungsverfahren oft nicht zielführend ist. Aus diesem Grund wurde das Verfahren zur Vorbereitung von Wasserproben bis zur Sequenzierung auf verschiedenen Ebenen optimiert:

- Steigerung des Gehalts an extrahierter DNA (Ausgangs-DNA)
- Verbesserte Amplifikation der DNA während der PCR
- Reduktion unerwünschter PCR Nebenprodukte

Zur Steigerung des DNA-Gehalts wurden zwei Methoden parallel angewendet, einerseits die Erhöhung des Volumens, welches filtriert wurde, andererseits die Optimierung der Extraktion selbst. Folgende Punkte können empfohlen werden:

- Die Verwendung von 5 L Probevolumen ist ausreichend zur DNA Extraktion und aus logistischer Sicht gut handhabbar, eine Steigerung auf bis zu 200L konnte keine Erhöhung der extrahierten DNA bewirken.
- Eine Steigerung der „beads“ Einwirkungsdauer auf die Filter auf 10 Min., sowie die Inkubationszeit der IRS Lösung des Kits erhöhen den Ertrag der extrahierten DNA.

In weiterer Folge wurde die Vervielfältigung der DNA optimiert, da aufgrund der Ausgangs- DNA Konzentrationen keine Amplifikation nach Herstellervorgabe möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass

- Eine Erhöhung der Ausgangs-DNA im PCR Ansatz durch mehr Volumen hilfreich ist
- eine Konzentration der Primer von 2 µM die Ergebnisse verbessert
- eine Erhöhung der Zyklenzahl auf bis zu 40 Zyklen möglich ist
- ein säulenbasiertes Clean-up Kit (nach Optimierung) eine bessere Aufreinigung ermöglicht, als eine Aufreinigung mittels magnetic beads

Durch Optimierung der Methode konnte die mikrobielle Zusammensetzung fast aller untersuchten Proben erfolgreich durchgeführt werden.

6.4 SOP SEQUENZIERUNG ZUR BESTIMMUNG DES WASSERMIKROBIOMS

6.4.1 PROBENAHME

5 L Probe werden in gereinigte, gemuffelte (550°C, 5 h) mit Aluminiumfolie verschlossene Glasflaschen steril abgefüllt, Transport erfolgt gekühlt (4°C).

6.4.2 FILTRATION

Die Probe wird innerhalb von 24 h über einen Membranfilter (PALL Supor® 200 PES Membranfilter, 0,2 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser) steril filtriert. Dabei wird die Probe regelmäßig geschwenkt, um auch abgesetzte Partikel zu filtrieren. Das Leerlaufen des Trichters muss vermieden werden. Anschließend wird der Trichter steril in ein Extraktionsröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

6.4.3 DNA-EXTRAKTION

Die DNA Extraktion wird mit dem DNA Isolations Kit (DNeasy® PowerWaterKit, Qiagen, USA) nach Herstellerangaben, mit folgenden Adaptionen durchgeführt:

- 10 Min. Ausschlagedauer der Filter und anschließende Zentrifugation für 4 Min.
- 10 Min. Inkubation bei 4°C nach Zugabe der IRS Lösung
- Verwendung von 50 µl EL-Lösung zur Eluierung

Anschließend erfolgt eine fluorometrische Messung der extrahierten DNA mittel Qubit® 2.0 Fluorometer und dem Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Oregon, USA). Die DNA Extrakte können bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

6.4.4 AMPLIFIKATION DES 16S-RRNA-GENS

Für den PCR Ansatz der Amplikon PCR werden folgende Reagenzien verwendet:

- 3,5 µl DNA Extrakt
- jeweils 5 µl forward und reverse Primer (c=2 µM) 341F (5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3') und 802R (5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3')
- 12,5 µl Mastermix "KAPA HiFi HotStart Ready Mix"

Bei jeder PCR wird zur Qualitätskontrolle eine Blindprobe mit Ultra-Reinstwasser statt des DNA Extrakts mitgeführt. Die PCR besteht aus folgenden Zyklen:

- 95°C 4 min. anfängliche Denaturierung
- 32-40 Wiederholungen der Abfolge: 98°C 20 sek., 65°C 20 sek. und 72°C 15 sek.
- 72°C 5 min. finale Extension
- 4°C bis Abschalten

Anschließend werden die PCR Produkte mit dem peqGOLD Cycle-pure Kit (Safety line, peqlab, Deutschland) folgendermaßen aufgereinigt:

- Volumen der PCR Reaktion mit gleichem Volumen CP-Puffer versetzen und gründlich vortexen
- Ansatz auf einen Spin Filter laden und 1 min. bei 10.000 g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 2 mal mit 750 µl Waschpuffer waschen, 1 min. bei 10.000 g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 5 min. bei 10.000g zum Trocknen zentrifugieren
- Spin Filter in ein neues Tube überführen, mit 40 µl Elutionspuffer versetzen und 5 min. inkubieren
- 2 min. bei 5.000 g zentrifugieren, Spin Filter entsorgen.

Die erhaltenen PCR Produkte werden anschließend mit einer Gelelektrophorese inklusive Blindprobe und Basenpaarleiter überprüft und die DNA Konzentration mittels Qubit® 2.0 Fluorometer gemessen. Konzentrationen sollten bei 1 – 8 ng/µl liegen, ansonsten wird die PCR mit angepasster Zyklenzahl wiederholt. Es darf nur eine einzelne Bande bei ca. 550 bp auftreten. Die PCR Produkte können bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

6.4.5 INDEX-PCR UND LIBRARY-ERSTELLUNG

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Index PCR lautet wie folgt:

- 1 – 15 µl DNA aus aufgereinigter Amplicon PCR
- 5 µl Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)
- 5 µl Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)
- 25 µl KAPA HiFi Hot Start ReadyMix
- 0 – 14 µl Wasser, PCR-Grad

Für jede einzelne Probe wird eine andere Primerkombination verwendet.

Die PCR wird folgendermaßen durchgeführt:

- 95°C 4 min. anfängliche Denaturierung
- 7 Wiederholungen der Abfolge: 98°C 20 sek., 65°C 20 sek. und 72°C 15 sek.
- 72°C 5 min. finale Extension
- 4°C bis Abschalten

Abhängig von der DNA Konzentration wird der verwendete DNA Gehalt erhöht und der Wassergehalt des Ansatzes so verringert, dass 30 ng DNA im Ansatz enthalten sind.

Die Index-PCR Produkte werden erneut, wie oben beschrieben aufgereinigt und die DNA Konzentration gemessen (Zielwert 10-30 ng/µl). Bei einer DNA Konzentration <10 ng/µl wird die PCR mit mehr DNA (und entsprechend weniger Wasser) wiederholt. Die PCR Produkte können bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Anschließend werden Aliquote jeder Probe mit TRIS/HCl Puffer (10 mM) auf eine Konzentration von 12 ng/µl verdünnt. Bei einer DNA Konzentration von 10 – 12 ng/µl wird die Probe unverdünnt verwendet. Zuletzt wird ein finaler Pool erstellt, welcher 5 µl jeder normalisierten Probe enthält. Die Sequenzierung erfolgt auf einem Illumina MiSeq (Reaktionskit V3, 2x300 bp).

7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

DIE MIKROBIOLOGISCHE BEURTEILUNG von Grund- und Trinkwasser ist auf wenige aufwändig zu bestimmende meist kultivierungsabhängige Standardparameter beschränkt. Die technologischen Entwicklungen in den letzten Jahren und Jahrzehnten und die daraus gewonnenen Erkenntnisse zeigen deutlich, dass die tatsächliche Dynamik der Mikrobiologie aquatischer Systeme mit den konventionellen Parametern nicht oder nur unvollständig abgebildet werden kann. Die Durchflusszytometrie (DFZ) ist eine Methode, die genau dies leistet, da sie die Anzahl der in einer Wasserprobe enthaltenen Zellen in kürzester Zeit und ohne aufwändige Kultivierung präzise quantifizieren kann. Die Möglichkeit, darüber hinaus qualitative Informationen über die mikrobielle Gemeinschaft zu ermitteln, erweitert das Einsatzspektrum der Methode beträchtlich.

Ziel dieses Projekts war es, das vielfältige Potential der DFZ zur mikrobiologischen Charakterisierung von Einflussfaktoren und Zustandsveränderungen in der Wasserversorgung zu erheben und eine Wissensplattform zur breiten Anwendung in der österreichischen Wasserversorgung zu etablieren. Ein besonderer Fokus lag dabei auf:

- der Untersuchung von kritischen Aspekten der methodischen Qualitätssicherung
- der Datenauswertung zur vollen Ausschöpfung des Informationsgehaltes von DFZ-Messungen
- der Untersuchung und Optimierung von DFZ-Vibilitäts-Assays zur Erfassung physiologischen Zustandes einer Zelle
- der Kombination der DFZ mit weiteren mikrobiologischen bzw. molekularbiologischen Methoden zur Gewinnung eines umfassenden Abbilds des mikrobiologischen Zustandes einer Wasserprobe
- der umfassenden Erhebung von Vergleichsdaten im Rahmen einer Messkampagne in Kooperation mit verschiedenen Wasserversorgern

Über die Gesamtprojektlaufzeit wurden insgesamt über 40 000 Einzelmessungen - darunter 10 000 Mehrfachbestimmungen - durchgeführt und 4 700 Proben gezogen. Insgesamt konnten Wasserproben aus sieben Bundesländern erhalten und untersucht werden. Daneben wurde im Rahmen von Laborversuchen auch eine Vielzahl künstlich hergestellten Probenmatrices analysiert.

Aufbauend auf vorhandenen Studien aus der internationalen Fachliteratur stand die Verwendung des Nukleinsäurefarbstoffes SYBR® Green 1 (SG1) im Mittelpunkt der Bearbeitungen. Seine hauptsächliche Anwendung besteht in der Ermittlung der Totalzellzahl (TCC) und des Verhältnisses von High-Nucleic-Acid-Zellen (HNA) zu Low-Nucleic-Acid-Zellen (LNA). Hier wurde jene Aspekte im Ablauf Probenahme-Messung-Datenauswertung beleuchtet, die als kritisch hinsichtlich einer methodischen Qualitätssicherung

eingeschätzt wurden. Dazu zählen neben den Einflüssen Probenahme, Transport und Lagerung insbesondere die Probenvorbereitung, die Durchführung der Messung und die Gerätekontrolle. Die Beurteilung einer tolerierbaren Abweichung bzw. erhöhten Streuung ist schwierig und ist nicht zuletzt mit dem jeweiligen Untersuchungsziel eng verbunden. Grundsätzlich sind neben einem möglichst genauen und reproduzierbaren Ergebnis auch eine gewisse zeitliche Flexibilität, eine minimale Probenvorbereitung und ein hoher Probendurchsatz wünschenswert. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Methode zur Ermittlung der Totallzellzahl als äußerst robust eingestuft werden kann und bei den meisten Anwendungen im Routinebetrieb auch bei geringfügigen Abweichungen (Lagerungs- und Messdauer) einer strikt einheitlichen Probenbehandlung zu aussagekräftigen Ergebnissen führt. Die Bestimmung des Anteils der LNA- bzw. der HNA-Zellen ist in dieser Hinsicht dagegen als anfälliger zu sehen, da die Signalintensität der Grün-Fluoreszenz einer größeren Dynamik unterliegt. Gerade auch gerätetechnische Einflüsse sind bei langfristigen Messreihen zu erwarten. Änderungen im Messergebnis für eine bestimmte Ressource müssen daher genau analysiert und nicht-erwünschte Ursachen ausgeschlossen werden.

Andere Färbemethoden der DFZ – etwa die Färbung mit der Kombination aus SG1 und Propidiumiodid (PI) zur Detektion von Schäden der Zellmembran (Intaktzellzahl ICC) – weisen hinsichtlich Qualitätssicherung eigene, grundsätzlich schärfere Anforderungen auf. So ist der Einfluss der Lagerungsdauer einer Probe (bis zur eigentlichen Messung) bei gechlorten Proben von großer Bedeutung. Darüber hinaus ist der Einfluss der Messdauer, d.h. die Zeitspanne von der Anfärbung bis zur tatsächlichen Messung durch das Gerät, wesentlich zu berücksichtigen und stellt damit eine Einschränkung hinsichtlich eines hohen Probendurchsatzes durch die Verwendung eines Auto-Loaders dar.

Als Technologie die einzelne Zellen vermisst („single cell analysis“), stellt die DFZ für jeden Partikel bzw. jede Zelle Messwerte der einzelnen Messkanäle (Fluoreszenz- und Streulicht) zur Verfügung. Im Idealfall nimmt jede Zelle nach ihren jeweiligen Eigenschaften (Bakterienart, physiologischer Zustand) eine reproduzierbare Position im Parameterraum ein. Diese Aussage sollte auch für Gruppen von Bakterien gelten, die ähnliche Eigenschaften aufweisen, und u.U. – wie im Fall der LNA- und HNA-Zellen – gut unterscheidbare Gruppen bzw. Cluster bilden. Die Untersuchungen zu weiterführenden Techniken der Datenauswertung, die im Rahmen dieses Projekts durchgeführt wurden, hatten zum Ziel, diesen Informationsgehalt zu erfassen. Clustering-Verfahren sind dafür ausgelegt Gruppenstrukturen zu finden. Sie sind dabei auch relativ robust gegenüber Signalverschiebungen aufgrund von Messungenauigkeiten, da sie in erster Linie auf der relativen Position einzelner Detektionen zueinander beruhen. Einen etwas anderen Ansatz verfolgt das Cytometric Fingerprinting, bei dem ein angepasstes Auszählraster eine einheitliche Grundlage zur Zusammenfassung multidimensionaler Messergebnisse zu einem Fingerprint-Vektor liefert. Über Ähnlichkeitsbetrachtungen dieser Fingerprints zueinander erhält man ein sehr sensitives Werkzeug zur Detektion von Signalverschiebungen bzw. Auffälligkeiten (auch in einzelnen Signalbereichen) von DFZ-Datensätzen. Für beide Methoden wurden im vorliegenden Projekt sinnvolle Verwendungsmöglichkeiten definiert.

Für den Nachweis unterschiedlicher spezifischer Bakteriencluster in der DFZ wurde eine Reihe von Bakterienstämmen getestet, für die allerdings mit dem Färbeprotokoll unter Verwendung von SG1 derzeit nicht davon ausgegangen werden, dass natürliche, sehr vielfältige Mischpopulationen aus oligotrophen Grundwässern auf dem Wege der Datenanalyse in ihre Bestandteile aufgelöst werden können.

Darüber hinaus sind verschiedene Techniken der Datenauswertung unverzichtbare Werkzeuge zur Qualitätssicherung (Analyse von Beads-Messungen), auf deren Einsatz gerade bei langfristigen Messprogrammen nicht verzichtet werden sollte. Die relativ einfache Probenvorbereitung und die kurze Messdauer der DFZ erlauben umfangreiche Messprogramme mit entsprechendem Datenaufkommen. Die Anwendung von flexiblen, erweiterbaren Methoden, die auch eine Neuanalyse von Datensätzen (Archiv) erlauben, sollte angestrebt werden. Die Verwendung der Programmiersprache R, deren vielfältige

Funktionalitäten kostenfrei zur Verfügung stehen, hat sich als sehr geeignet – bei vertretbarem Lernaufwand – herausgestellt.

Der Vergleich der DFZ mit weiteren mikrobiologischen bzw. molekularbiologischen Methoden (Kultivierungsmethoden, ATP-Messung, DNA-Sequenzierung) hatte neben der Ermittlung von Korrelationen und der Einordnung der DFZ-Ergebnissen selbst, gerade auch die Bewertung und Empfehlung einer kombinierten Anwendung vor Augen. So besticht die DFZ durch hohen Probendurchsatz und präzise Quantifizierung, deren Ergebnisse jedoch (zumindest in der hier angewandten Form) als Summenparameter anzusehen sind, die keinen direkten Aufschluss über die in einer Probe vorhandenen Bakterienarten erlauben. Diesen vertiefenden Einblick in die bakterielle Zusammensetzung bietet die Erfassung des Mikrobioms mittels Next-Generation-Sequencing-Verfahren (NGS), deren methodische Arbeitsschritte im Rahmen des vorliegenden Projektes für Proben mit teilweise sehr niedrigen DNA Gehalte in den einzelnen Wassermatrizes optimiert wurden. Der Abgleich von DFZ-Daten (Signalverschiebungen, Änderungen des LNA- bzw. HNA-Anteils, TCC-Veränderungen) mit NGS-Ergebnissen zeigt, dass Änderungen in der Wasserressource mit beiden Methoden in charakteristischer Weise nachvollzogen werden können. Darauf aufbauend lassen sich für bestimmte Wasserressourcen und Betriebsbedingungen Fälle definieren, in denen die DFZ als Ersatz für eine aufwändige Bestimmung des Mikrobioms im Sinne eines Monitorings dienen kann. In Erweiterung davon kann die DFZ jene Grundlage bieten, nach der eine NGS-Probenahme geplant werden kann, da nicht davon auszugehen ist, dass eine maßgebliche Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung ohne Auffälligkeit in den DFZ-Resultaten vonstattengeht. Die Methodenkombination DFZ (Quantifizierung, Zellviabilität) und NGS (Zusammensetzung der Arten) ist in der Lage eine umfassende mikrobielle Charakterisierung zu liefern.

Im Zuge einer Messkampagne zur Erhebung von DFZ-Grundlagendaten wurden von verschiedenen Wasserversorgern Roh- und Reinwasserproben aus 58 Probenahmestellen unterschiedlicher Wasserressourcen über zumindest ein Jahr zur Verfügung gestellt. Dies stellt die erste umfassende Untersuchung zum Zustand österreichischer Wasserressourcen mittels DFZ dar. Hinsichtlich der Größenordnung der TCC für bestimmte Ressourcentypen hat sich eine plausible Übereinstimmung mit internationalen Studien gezeigt, wenngleich nur sehr wenige Daten verfügbar sind. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass die Methode der DFZ in der beschriebenen Form sehr zuverlässige und reproduzierbare Resultate liefert. Die Spannweite der in der vorliegenden Messkampagne ermittelten TCC reicht von wenigen Tausend bis einigen Hunderttausend Zellen pro ml. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass eine Abhängigkeit vom Ressourcentyp (Uferfiltrat, Quellen, Porengrundwasser) hinsichtlich TCC und Anteil an HNA-Zellen gegeben ist. Dabei sind einzelne Messstellen als äußerst stabil zu bezeichnen (Variationskoeffizient der jährlichen TCC-Reihe von annähernd 0,1), andere zeichnen sich durch typische, oft mit Niederschlagsereignissen assoziierte Schwankungen aus (beispielsweise Karstquellen). Für bestimmte Uferfiltrate ist der Einfluss von Wasserspiegelschwankungen des Oberflächengewässers nachweisbar. Die Kombination aus TCC und HNA-Anteil ist für viele Messstellen charakteristisch und erlaubt eine sehr sensitive Erfassung von ungewöhnlichen Abweichungen.



Abbildung 114: Gesamtdarstellung der DFZ-Ergebnisse (TCC und HNA-Anteile) der durchgeführten Messkampagne von ausgewählten Wasserressourcen (Rohwässern), zusammengefasst nach Ressourcentyp (basierend auf den Median-Werten der einzelnen Probenahmestellen)

Das Konzept der biologischen Stabilität gewinnt im Rahmen der Trinkwasserversorgung zunehmend an Bedeutung und beinhaltet die Forderung, dass es während der Verteilung zu keinen negativen Veränderungen der mikrobiologischen Beschaffenheit des Wassers kommt. Im vorliegenden Projekt wurden neben Rohwasserproben auch einige Reinwasserproben untersucht. Dabei zeigten einzelne Proben aus dem Verteilnetz charakteristische Muster in den Signaldetektionen, die eine Verfolgung einer Nachverkeimung mittels DFZ als äußerst vielversprechend erscheinen lassen. Darüber hinaus wurde im vorliegenden Projekt ein Vorgehen zur Ermittlung der biologischen Stabilität im Labor-Lagerungsversuch definiert.

Als Hauptergebnis des Projekts konnte Folgendes erarbeitet werden:

- Die Darstellung der Situation bei unterschiedlichen österreichischen Grund- und Quellwässern und deren Variabilität über zumindest ein hydrologisches Jahr, die sehr charakteristische Resultate in Abhängigkeit vom Ressourcentyp (Uferfiltrat, Porengrundwasser, Quellen) ergeben hat.
- Die Festlegung von Einflussfaktoren auf die DFZ-Analyse durch Probenahme, Transport und Lagerung der Probe sowie durch die Vorbereitung und Durchführung der Messung und bei der Datenanalyse.
- Die Ausarbeitung eines „österreichischen Protokolls“ zur Anwendung der DFZ in der Wasserversorgung anhand unterschiedlicher Standardarbeitsanweisungen (SOP) für die Bestimmung der TCC, ICC, sowie der HNA- und LNA-Anteile. Zusätzlich konnten Hinweise für die Mikrobiom-Bestimmung mittels NGS sowie für die Anwendung der Online-DFZ ermittelt werden.

Zusammenfassend stellen die erreichten Ergebnisse eine gute Basis für die breite Anwendung der Methode in der österreichischen Wasserversorgung dar, um anwenderunabhängig, vergleichbare Ergebnisse zur Beurteilung der mikrobiologischen Charakteristik und von Zustandsveränderungen erfassen und interpretieren zu können.

Die DFZ zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus, die schnell verfügbaren Resultate – im Fall der online-Durchflusszytometrie nur wenige Minuten – erlauben eine bisher nicht

erreichte Reaktionszeit und eine hohe zeitliche Auflösung des mikrobiologischen Zustands. Diese Eigenschaften begründen die besondere Eignung der DFZ als Steuerungsparameter im Rahmen des Wasserwerksbetriebs.

Auf internationaler Ebene spielen neue Methoden zur Erfassung und zur Beurteilung des gesamten mikrobiologischen Spektrums eine immer wichtigere Rolle. Die Anwendung der DFZ und anderer Schnellmethoden gewinnt an Bedeutung und wird dabei kultivierungsabhängige Methoden sinnvoll ergänzen sowie in verschiedenen Bereichen zu einer wesentlich detaillierter mikrobiologischen Entscheidungsgrundlage führen.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TABELLE 7: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
ATP	Adenosintriphosphat
AOC	Assimilierbarer organischer Kohlenstoff
CF	Cytometric Fingerprinting
CFDA	Carboxyfluoresceindiacetat
ClO ₂	Chlordioxid
DFZ	Durchflusszytometrie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff
EC ATP	Extrazelluläres ATP
FL1	Fluoreszenz-Detektor – grün
FL2	Fluoreszenz-Detektor – orange
FL3	Fluoreszenz-Detektor – rot
FP	Fingerprinting
FSC	Vorwärtsstreuung
HNA	Zellen mit hohem Gehalt an Nukleinsäuren
IC ATP	Intrazelluläres ATP
ICC	Intaktzellzahl
KQ	Karstquelle
LNA	Zellen mit niedrigem Gehalt an Nukleinsäuren
NaCl	Natriumchlorid
NADS	Nucleic Acid Double-Staining
NGS	Next Generation Sequencing
OBA	Online Bacteria Analyser
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
SAK254	Spektraler Absorptionskoeffizient bei 254nm
SG1	SYBR® Green 1
SIP	Sample Injection Port
SSC	Seitwärtsstreuung
SOP	Standardarbeitsanweisung
TCC	Totalzellzahl
WP	Wachstumspotential
UF	Uferfiltrat

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Vergleich unterschiedlicher Methodenplattformen in der Mikrobiologie.....	10
Tabelle 2: Probenahmen (PN) für Mikrobiombestimmung mittels NGS.....	29
Tabelle 3: Vorgeschlagene und optimierte Durchführung der DNA Extraktion.....	35
Tabelle 4 Zusammensetzung der PCR Ansätze nach Hersteller und optimiert.....	36
Tabelle 5 Zusammensetzung Wasser und DNA für den PCR Ansatz der Index PCR	40
Tabelle 6 Korrelation ausgewählter phyla und LNA-Anteil	129
Tabelle 7: Abkürzungsverzeichnis	147

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übliche Werte der Totalzellzahl verschiedener Wasserressourcen.....	11
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Durchflussszytometers	15
Abbildung 3: Anregungs- und Emissionsspektrum von SYBR® Green 1.....	16
Abbildung 4: Exemplarisches Streudiagramm zur Festlegung von TCC, LNA- und HNA-Anteil	17
Abbildung 5: Streudiagramme von DFZ-Messungen (SG1 und PI) von E. faecium bei Zugabe von ClO ₂ ...	18
Abbildung 6: Cytometric Fingerprinting: Streudiagramm mit Auszählraster	21
Abbildung 7: Ablaufschema Sequencing by Synthesis.....	24
Abbildung 8: Reaktion von Luciferin und ATP zu Oxyluciferin und Licht.....	25
Abbildung 9: Summenlinien der Einzelmessungen, Mehrfachbestimmungen und Probenahmen (2015-16).	27
Abbildung 10: Summenlinien der Einzelmessungen, Mehrfachbestimmungen und Probenahmen (2015-17)	28
Abbildung 11: Prozessschema für die Durchführung einer NGS von Wasserproben	33
Abbildung 12: Darstellung einer Filtrationseinheit für die Vor-Ort-DNA-Aufkonzentration	34
Abbildung 13: Qubit® 2.0 Fluorometer	36
Abbildung 14: Zellzahl, Eventzahl gegenübergestellt mit DNA Konzentration	37
Abbildung 15: Amplicon PCR vor der Optimierung der Zusammensetzung der PCR	38
Abbildung 16: Unaufgereinigte, PCR optimierte und aufgereinigte Amplicon PCR Produkte vor der Clean-up Optimierung	38
Abbildung 17: Aufgereinigte Amplicon PCR Produkte nach Clean-up Optimierung	39
Abbildung 18: Vergleich Einfluss verschiedener Gebinde auf die TCC sowie den HNA-Anteil bei Lagerung(1)	44
Abbildung 19: Vergleich Einfluss verschiedener Gebinde auf die TCC sowie den HNA-Anteil bei Lagerung(2)	44
Abbildung 20: Vergleich First-Flush-Proben und Proben nach Vorspülung des Probenahmeahns	45
Abbildung 21: Vergleich First-Flush-Proben und Proben nach Vorspülung (definierte Wassermenge)	46
Abbildung 22: Versuche zur Ermittlung der Probenerwärmung beim Transport.....	47
Abbildung 23: Versuch zur Lagerfähigkeit verschiedener Proben in Zentrifugenröhrchen bei 4 °C.....	48
Abbildung 24: Veränderung von TCC und HNA-Anteil im Zuge der Lagerung (UF Rohwässer).....	49
Abbildung 25: DFZ-Messung von ungefärbten Wasserproben verschiedenster Herkunft.....	53
Abbildung 26: Streudiagramme von DFZ-Messungen verschiedener im Labor angezüchteter Organismen	53
Abbildung 27: Vergleich verschiedener DFZ Flow-Rates	55
Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf von TCC und HNA-Anteil bei Messung (SG1) mit einer 96er-Platte	57
Abbildung 29: Streudiagramme von zu unterschiedlichen Zeiten gemessenen Proben (96er-Platte, SG1)....	57
Abbildung 30: Zeitlicher Verlaufs der ICC und des HNA-Anteils anhand einer verschieden behandelten natürlichen Wasserprobe (96er-Mikrotiterplatte; SG1 und PI)	58
Abbildung 31: Dichteverteilung des FL1-H-Signals der Messung von 8-Peak Validation Beads.....	59
Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der einzelnen Beads-Peaks (8-Peak Validation Beads).	59
Abbildung 33: Vergleich des Verlaufs der Median-Signalintensität der LNA- und HNA-Zellen einer täglich beprobten Wasserressource mit jenem der isolierten Beads-Peaks.	60
Abbildung 34: Zeitlicher Messverlauf einer großen Anzahl an Messungen	62
Abbildung 35: Zeitlicher Messverlauf der Anzahl der Detektionen für Messungen mit unterschiedlicher Durchflussrate	63
Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf des Anteils auffälliger Detektionen für Messkampagne	64
Abbildung 37: Gegenüberstellung der Gesamtanzahl an Detektionen und Anteil auffälliger Detektionen....	65
Abbildung 38: Zeitlicher Messverlauf jener Messung mit dem höchsten ausgewiesenen Anteil an auffälligen Detektionen (Kriterium „flow rate“)	65
Abbildung 39: Zeitlicher Messverlauf der Messung mit dem höchsten ausgewiesenen Anteil an auffälligen Detektionen (Kriterium „signal acquisition“).	66
Abbildung 40: Dichte (FL1-A) für vier Zeitabschnitte der Messung mit dem höchsten ausgewiesenen Anteil an auffälligen Detektionen unterteilt nach Detektionen des Signalthintergrunds bzw. Zell-Detektionen (Kriterium „signal acquisition“)	66
Abbildung 41: Variationskoeff. von Triplikaten mit/ohne aut. Zwischenwaschschritt.....	68
Abbildung 42: TCC und Variationskoeff. der ersten Messung eines Triplikats (gefärbte Wasserproben)	68
Abbildung 43: Effektivität von aut. Waschzyklen hinsichtlich der Verminderung von Carry-Over	69
Abbildung 44: Einfluss des Messgebindes auf Messung den Carry-Over	70
Abbildung 45: Absolute TCC (gefärbte Wasserproben) und Carry-Over auf nachfolgende Messung von Reinstwasser.....	71

Abbildung 46: Messungen von Reinstwasser nach gefärbten Proben, mit/ohne aut. Zwischenwaschschritt..	71
Abbildung 47: Erste Messungen von Triplikaten gruppiert nach dem TCC-Verhältnis zur vorangehenden Messung mit/ohne aut. Zwischenwaschschritt	72
Abbildung 48: Bestimmung von Farbstoffübertrag bei Messung im automatischen Modus (1)	73
Abbildung 49: Bestimmung von Farbstoffübertrag bei Messung im automatischen Modus (2)	73
Abbildung 50: Streudiagramme von unmittelbar aufeinander folgenden DFZ-Messungen einer hitzebehandelten Wasserprobe mit unterschiedlichen Färbemethoden	74
Abbildung 51: Verhältnis der Detektionen im Zell-Gate zur Gesamtanzahl an Detektionen	75
Abbildung 52: Variationskoeff. von Triplikaten für die Anzahl der Detektionen im Signalhintergrund mit/ohne aut. Zwischenwaschschritt	75
Abbildung 53: Gegenüberstellung des Signalhintergrunds gefärbter Wasserproben zu jenem in anschließenden Messungen von Reinstwasser zu Reinigungszwecken	76
Abbildung 54: Vergleich der Gesamtanzahl an Detektionen bei Verwendung verschiedener Farbstofflösungsmittel und gleicher Threshold-Setzung.....	77
Abbildung 55: Pulse-Area und Pulse-Height bei sogenannten Singlets und Doublets.....	77
Abbildung 56: Streudiagramm mit Bereich möglicher Zellaggregate. Dichteverteilungen beider Gruppen. .	78
Abbildung 57: Vergleich einer TCC-Zeitreihe (Online-DFZ und Labor-Messungen)	79
Abbildung 58: Überlagerung einer zweimonatigen TCC-Zeitreihe (Online-DFZ) mit SAK254.....	80
Abbildung 59: Streudiagramme für Proben vor und nach einer Chlorung.....	82
Abbildung 60: Streudiagramme für Proben vor und nach einer Chlorung (Natriumthiosulfat).....	82
Abbildung 61: Wirkung von ClO_2 auf SG1 bei variabler Chlorzugabe bzw. Einwirkzeit (1)	84
Abbildung 62: Wirkung von ClO_2 auf SG1 bei variabler Chlorzugabe bzw. Einwirkzeit (2)	84
Abbildung 63: Streudiagramme (Färbung mit CFDA) für Proben vor und nach einer Chlorung	85
Abbildung 64: Gegenüberstellung von TCC und KBE 22 für eine Messreihe mit täglicher Probenahme.	88
Abbildung 65: ATP-Bestimmung für eine mit ClO_2 behandelte E.-faecium-Kultur (in NaCl-Lösung).	89
Abbildung 66: ATP-Bestimmung für eine mit ClO_2 behandelte E.-faecium-Kultur (in steril-filtriertes Rohwasser).	89
Abbildung 67: ICC für eine mit ClO_2 behandelte E.-faecium-Kultur (in NaCl-Lösung sowie steril-filtriertes Rohwasser eingebracht).	90
Abbildung 68: ATP-Bestimmung für eine Rohwasserprobe nach 0, 7 und 14 Tagen Standzeit.....	90
Abbildung 69: TCC und ICC für eine Rohwasserprobe nach 0, 7, 14 Tagen Standzeit.	91
Abbildung 70: Vergleich untransformierter und <i>Area sinus hyperbolicus</i> transformierter Daten	92
Abbildung 71: Streudiagramme (SG1 und SG1+PI) mit Kerndichteschätzung und angepasste Gates.....	93
Abbildung 72: Histogramm der Minimal-Abstände der Detektionen zweier Messungen zum Zell-Gate.	93
Abbildung 73: Änderung der TCC bei der Verschiebung der Gate-Grenzen anhand zweier Messungen	94
Abbildung 74: Streudiagramm eines Uferfiltrat-Rohwassers (ungefiltert, 0,1 μm und 0,2 μm Filtration)	95
Abbildung 75: Distanzanalyse beim Vorliegen einer Dreifachbestimmung.	97
Abbildung 76: Normalisierte Fingerprints aller Datensätze einer Messreihe.....	98
Abbildung 77: Streudiagramm der Grün- und Rot-Fluoreszenz jenes Datensatzes einer Messreihe, der die größte Bin-Abweichung enthält.	99
Abbildung 78: Ergebnis des hierarchischen agglomerativen Clusterings der Fingerprints (Dendrogramm)	100
Abbildung 79: Abtrennen der sich außerhalb des Gates befindlichen Datenpunkte	101
Abbildung 80: Einteilung der Datenpunkte in zwei Gruppen (Clustering).	102
Abbildung 81: Ermittlung der abgrenzenden Geraden mittels linearer Diskriminanzanalyse (1).....	103
Abbildung 82: Ermittlung der abgrenzenden Geraden mittels linearer Diskriminanzanalyse (2).	103
Abbildung 83: Beispiel eines Ergebnisses der automatischen LNA-HNA-Abtrennung	104
Abbildung 84: Ergebnis der LNA-HNA-Abtrennung für vier DFZ-Messungen	105
Abbildung 85: Dichteverteilungen (FL1-A) einer Quellen-Messstelle mit LNA-HNA-Abtrennung	106
Abbildung 86: Dichteverteilungen (FL1-A) einer Uferfiltrat-Messstelle mit LNA-HNA-Abtrennung.....	106
Abbildung 87: Detailbetrachtung: TCC und HNA-Anteil einer Messreihe für genauere Analyse	107
Abbildung 88: Beispiel zu Clusterergebnis, multidimensionaler Skalierung, sowie dazugehöriger TCC und HNA-Anteil	108
Abbildung 89: Skalierte Counts-Werte in Abhängigkeit der CF-Bins	109
Abbildung 90: Verteilung und Nummerierung der CF-Bins	109
Abbildung 91: Dichteverteilungen (FL1-A) der bei der Clusteranalyse festgelegten Gruppen.	110
Abbildung 92: Streudiagramme der einzelnen Gruppen bzw. Veränderungen zwischen den Gruppen.....	111
Abbildung 93: Streudiagramme (SG1) eines E.coli-Stammes (unbehandelt bzw. erhitzt)	112

Abbildung 94: Darstellung zweier Triplikate auf Phylum-Ebene (selbe Messstelle, unterschiedlicher Zeitpunkt).....	113
Abbildung 95: NMDS-Plot zur Darstellung der Ähnlichkeit der Triplikate.	114
Abbildung 96: Gesamtdarstellung der DFZ-Ergebnisse ausgewählter Wasserressourcen.....	115
Abbildung 97: Gegenüberstellung von HNA-Anteil und der TCC nach Ressourcentypen	116
Abbildung 98: Gegenüberstellung von UV-VIS-Spektrometrie Ergebnissen und der TCC	117
Abbildung 99: Anwendung des Cytometric Fingerprintings für DFZ-Daten einer großen Anzahl unterschiedlicher Proben und Darstellung der Fingerprint-Abstände mithilfe einer Multidimensionalen Skalierung.....	118
Abbildung 100: Gegenüberstellung der Ganglinien der TCC (Uferfiltrate) mit Wasserstandsdaten	119
Abbildung 101: Streudiagramme zu Wachstumspotentialversuch (Versorgungsnetzproben; SG1).....	120
Abbildung 102: Streudiagramme zu Wachstumspotentialversuch (Versorgungsnetzproben; SG1 und PI)..	120
Abbildung 103: Boxplot der Diversitätsparameter nach Ressourcentyp.....	122
Abbildung 104: PCoA-Darstellung der bakteriellen Gemeinschaften nach Ressourcentyp.	123
Abbildung 105: Zeitliche Veränderung eines Karstquellwassers (relative und hochgerechnete absolute Abundanz)	124
Abbildung 106: Zeitliche Veränderung eines Grundwassers (hochgerechnete absolute Abundanz)	125
Abbildung 107: Räumliche Veränderung eines Uferfiltrates entlang der Verteilung (hochgerechnete absolute Abundanz in Balkendiagramm).....	126
Abbildung 108: Verteilung der Phyla (relative Abundanz).....	127
Abbildung 109: Relativer Anteil an Parcubacteria innerhalb aller Proben	127
Abbildung 110: Hochgerechnete Absolute Abundanz an Parcubacteria innerhalb aller Proben	128
Abbildung 111: Streudiagramm zu LNA-Anteil und Anteil bekannter LNA Phyla	129
Abbildung 112: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie und DNA-Sequenzierung. ..	130
Abbildung 113: Fließdiagramm der einzelnen Prozesse und Schritte der DFZ-Anwendung.....	132
Abbildung 114: DFZ-Ergebnisse (TCC und HNA-Anteile) der Messkampagne (Rohwässer) nach Ressourcentyp	145

11 LITERATURVERZEICHNIS

Aghaeepour, Nima, Greg Finak, The FlowCAP Consortium, The DREAM Consortium, Holger Hoos, Tim R. Mosmann, Ryan Brinkman, Raphael Gottardo, und Richard H. Scheuermann. 2013. „Critical Assessment of Automated Flow Cytometry Data Analysis Techniques“. *Nature Methods* 10 (3): 228–38.

Backhaus, Klaus, Bernd Erichson, Wulff Plinke, und Rolf Weiber. 2015. *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung*. 14. Aufl. Springer Berlin Heidelberg.

Baldock, Daniel, Gerhard Nebe-von-Caron, Roy Bongaerts, und Andreas Nocker. 2013. „Effect of Acidic PH on Flow Cytometric Detection of Bacteria Stained with SYBR Green I and Their Distinction from Background“. *Methods and Applications in Fluorescence* 1 (4): 045001.

Basalaj, Wojciech. 2001. „Proximity Visualisation of Abstract Data“. University of Cambridge.

BD Biosciences. 2011. „A Guide to Absolute Counting Using the BD Accuri® C6 Flow Cytometer“.

BD Biosciences. 2012. „BD CSampler Software User Guide“.

BD Biosciences. 2018. „BD Biosciences Accuri® C6 personal flow cytometer - Features - Kits and Templates“.

Berney, Michael, Frederik Hammes, Franziska Bosshard, Hans-Ulrich Weilenmann, und Thomas Egli. 2007. „Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry“. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (10): 3283–90.

Besmer, Michael D., Frederik Hammes, Jürg A. Sigrist, und Christoph Ort. 2017. „Evaluating Monitoring Strategies to Detect Precipitation-Induced Microbial Contamination Events in Karstic Springs Used for Drinking Water“. *Frontiers in Microbiology* 8.

Besmer, Michael D., Jürg A. Sigrist, Ruben Props, Benjamin Buysschaert, Guannan Mao, Nico Boon, und Frederik Hammes. 2017. „Laboratory-Scale Simulation and Real-Time Tracking of a Microbial Contamination Event and Subsequent Shock-Chlorination in Drinking Water“. *Frontiers in Microbiology* 8.

Carlson, Marc, Valerie Obenchain, Herve Pages, Paul Shannon, Daniel Tenenbaum, und Martin Morgan. 2012. „High-Throughput Sequence Analysis with R and Bioconductor“, 83.

Duda, V. I., N. E. Suzina, V. N. Polivtseva, und A. M. Boronin. 2012. „Ultramicrobacteria: Formation of the Concept and Contribution of Ultramicrobacteria to Biology“. *Microbiology* 81 (4): 379–90.

Elhadidy, Ahmed M., Michele I. Van Dyke, Sigrid Peldszus, und Peter M. Huck. 2016. „Application of flow cytometry to monitor assimilable organic carbon (AOC) and microbial community changes in water“. *Journal of Microbiological Methods* 130 (November): 154–63.

Epstein, SS. 2013. „The phenomenon of microbial uncultivability“. *Current Opinion in Microbiology, Antimicrobials • Genomics*, 16 (5): 636–42.

Falcioni, Tania, Stefano Papa, und Josep M. Gasol. 2008. „Evaluating the Flow-Cytometric Nucleic Acid Double-Staining Protocol in Realistic Situations of Planktonic Bacterial Death“. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (6): 1767–79.

- Feuerpfeil, Irmgard, und Konrad Botzenhart. 2008. *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. Wiley.
- Finak, Greg, Juan-Manuel Perez, Andrew Weng, und Raphael Gottardo. 2010. „Optimizing Transformations for Automated, High Throughput Analysis of Flow Cytometry Data“. *BMC Bioinformatics* 11 (1): 546.
- Fisher, R. A. 1936. „The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems“. *Annals of Eugenics* 7 (2): 179–88.
- Fletez-Brant, Kipper, Josef Špidlen, Ryan R. Brinkman, Mario Roederer, und Pratip K. Chattopadhyay. 2016. „FlowClean: Automated Identification and Removal of Fluorescence Anomalies in Flow Cytometry Data“. *Cytometry Part A* 89 (5): 461–71.
- Fox, John. 2009. „Aspects of the Social Organization and Trajectory of the R Project“. *The R Journal* 1 (2): 5–13.
- Fraley, Chris, und Adrian E Raftery. 2002. „Model-Based Clustering, Discriminant Analysis, and Density Estimation“. *Journal of the American Statistical Association* 97 (458): 611–31.
- Gentleman, Robert C, Vincent J Carey, Douglas M Bates, Ben Bolstad, Marcel Dettling, Sandrine Dudoit, Byron Ellis, u. a. 2004. „Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics“. *Genome Biology* 5 (10): R80.
- Grégori, Gérald, Michel Denis, Sergio Seorbati, und Sandra Citterio. 2001. „Resolution of Viable and Membrane-Compromised Free Bacteria in Aquatic Environments by Flow Cytometry“. In *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Gruden, Cyndee, Steven Skerlos, und Peter Adriaens. 2004. „Flow cytometry for microbial sensing in environmental sustainability applications: current status and future prospects“. In *FEMS Microbiology Ecology* 49 (1): 37-49.
- Hambsch, Beate, und Peter Werner. 2008. „Bakterienvermehrungspotential“. In *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. Wiley.
- Hammes, Frederik. 2008. „A comparison of AOC methods used by the different TECHNEAU partners“. D 3.3.10. TECHNEAU.
- Hammes, Frederik, Cordula Berger, Oliver Köster, und Thomas Egli. 2010. „Assessing Biological Stability of Drinking Water without Disinfectant Residuals in a Full-Scale Water Supply System“. *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua* 59 (1): 31–40.
- Hammes, Frederik, und Thomas Egli. 2007. „A flow cytometric method for AOC determination“. D 3.3.1. TECHNEAU.
- Hammes, Frederik, und Thomas Egli. 2010. „Cytometric Methods for Measuring Bacteria in Water: Advantages, Pitfalls and Applications“. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (3): 1083–95.
- Hammes, Frederik, Felix Goldschmidt, Marius Vital, Yingying Wang, und Thomas Egli. 2010. „Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments“. *Water Research* 44 (13): 3915–23.

- Hammes, Frederik, Marius Vital, und Thomas Egli. 2010. „Critical Evaluation of the Volumetric “Bottle Effect” on Microbial Batch Growth“. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (4): 1278–81.
- Hill, Steven C., Michael W. Mayo, und Richard K. Chang. 2009. „Fluorescence of Bacteria, Pollens, and Naturally Occurring Airborne Particles: Excitation/Emission Spectra“. ARL-TR-4722.
- Ho, Cheuk Hei, Jeff Piotrowski, Scott J. Dixon, Anastasia Baryshnikova, Michael Costanzo, und Charles Boone. 2011. „Combining Functional Genomics and Chemical Biology to Identify Targets of Bioactive Compounds“. *Current Opinion in Chemical Biology* 15 (1): 66–78.
- Hoefel, Daniel, Warwick L Grooby, Paul T Monis, Stuart Andrews, und Christopher P Saint. 2003. „A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity“. *Journal of Microbiological Methods* 52 (3): 379–88.
- Holyst, H., und Wade Rogers. 2018. „Package ‚FlowFP‘“.
- Ihaka, Ross, und Robert Gentleman. 1996. „R: A Language for Data Analysis and Graphics“. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5 (3): 299–314.
- Illumina. 2012. „An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology“.
- Kooij, D. Van Der. 2000. „Biological Stability: A Multidimensional Quality Aspect of Treated Water“. *Water, Air, and Soil Pollution* 123 (1–4): 25–34.
- Kötzsch, Stefan, Sven Alisch, und Thomas Egli. 2012. „Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben“. Schweizer Bundesamt für Gesundheit, Bern.
- Kötzsch, Stefan, und Michael Sinreich. 2014. „Zellzahlen zum Grundwasser – Bestimmung mittels Durchflusszytometrie“. *Aqua & Gas*.
- Lautenschlager, Karin, Chiachi Hwang, Wen-Tso Liu, Nico Boon, Oliver Köster, Hans Vrouwenvelder, Thomas Egli, und Frederik Hammes. 2013. „A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks“. *Water Research* 47 (9): 3015–25.
- Leuko, Stefan, Andrea Legat, Sergiu Fendrihan, und Helga Stan-Lotter. 2004. „Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight Kit for Detection of Extremophilic Archaea and Visualization of Microorganisms in Environmental Hypersaline Samples“. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11): 6884–86.
- Lo, Kenneth, Florian Hahne, Ryan R. Brinkman, und Raphael Gottardo. 2009. „flowClust: a Bioconductor package for automated gating of flow cytometry data“. *BMC Bioinformatics* 10: 145.
- Mair, Florian, Felix J. Hartmann, Dunja Mrdjen, Vinko Tosevski, Carsten Krieg, und Burkhard Becher. 2016. „The End of Gating? An Introduction to Automated Analysis of High Dimensional Cytometry Data“. *European Journal of Immunology* 46 (1): 34–43.
- Molecular Probes. 2006. „SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain“.
- Monaco, Gianni, Hao Chen, Michael Poidinger, Jinmiao Chen, De Magalhães, João Pedro, und Anis Larbi. 2016. „flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data“. *Bioinformatics* 32 (16): 2473–80.

- Nescerecka, Alina, Frederik Hammes, und Talis Juhna. 2016. „A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining“. *Journal of Microbiological Methods* 131 (December): 172–80.
- Phe, Meng-Huot, Manuel Dossot, Hélène Guilloteau, und Jean-Claude Block. 2005. „Nucleic acid fluorochromes and flow cytometry prove useful in assessing the effect of chlorination on drinking water bacteria“. *Water Research* 39 (15): 3618–28.
- Picot, Julien, Coralie L. Guerin, Caroline Le Van Kim, und Chantal M. Boulanger. 2012. „Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation“. *Cytotechnology* 64 (2): 109–30.
- Prest, E. I., F. Hammes, S. Köttsch, M. C. M. van Loosdrecht, und J. S. Vrouwenvelder. 2013. „Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method“. *Water Research, Microbial ecology of drinking water and wastewater treatment*, 47 (19): 7131–42.
- Prest, Emmanuelle I., Frederik Hammes, Mark C. M. van Loosdrecht, und Johannes S. Vrouwenvelder. 2016. „Biological Stability of Drinking Water: Controlling Factors, Methods, and Challenges“. *Frontiers in Microbiology* 7 (Februar).
- Proctor, Caitlin R., Michael D. Besmer, Timon Langenegger, Karin Beck, Jean-Claude Walser, Martin Ackermann, Helmut Bürgmann, und Frederik Hammes. 2018. „Phylogenetic Clustering of Small Low Nucleic Acid-Content Bacteria across Diverse Freshwater Ecosystems“. *The ISME Journal*, Februar, 1.
- Props, Ruben, Frederiek-Maarten Kerckhof, Peter Rubbens, Jo De Vrieze, Emma Hernandez Sanabria, Willem Waegeman, Pieter Monsieurs, Frederik Hammes, und Nico Boon. 2017. „Absolute quantification of microbial taxon abundances“. *The ISME Journal* 11 (2): 584–87.
- Ramseier, Maaïke K., Urs von Gunten, Pietro Freihofer, und Frederik Hammes. 2011. „Kinetics of Membrane Damage to High (HNA) and Low (LNA) Nucleic Acid Bacterial Clusters in Drinking Water by Ozone, Chlorine, Chlorine Dioxide, Monochloramine, Ferrate(VI), and Permanganate“. *Water Research* 45 (3): 1490–1500.
- Rich, Collin, und Grant Howes. 2010. „The Accuri® C6 Flow Cytometer — A Small Revolution“. In *The Microflow Cytometer*. Pan Stanford Publishing.
- Rittmann, Bruce E., und Vernon L. Snoeyink. 1984. „Achieving Biologically Stable Drinking Water“. *Journal - American Water Works Association* 76 (10): 106–14.
- Roederer, Mario. 2001. „Spectral Compensation for Flow Cytometry: Visualization Artifacts, Limitations, and Caveats“. *Cytometry* 45 (3): 194–205.
- Roederer, Mario, und Richard R. Hardy. 2001. „Frequency Difference Gating: A Multivariate Method for Identifying Subsets That Differ between Samples“. *Cytometry* 45 (1): 56–64.
- Rogers, Wade T., Herbert A. Holyst, Wade T. Rogers, und Herbert A. Holyst. 2009. „FlowFP: A Bioconductor Package for Fingerprinting Flow Cytometric Data, FlowFP: A Bioconductor Package for Fingerprinting Flow Cytometric Data“. *Advances in Bioinformatics, Advances in Bioinformatics* 2009, 2009 (September): e193947.

- Rogers, Wade T., Allan R. Moser, Herbert A. Holyst, Andrew Bantly, Emile R. Mohler, George Scangas, und Jonni S. Moore. 2008. „Cytometric Fingerprinting: Quantitative Characterization of Multivariate Distributions“. *Cytometry Part A* 73A (5): 430–41.
- Rüger, Marc, Gerald Bensch, Ralf Tüngler, und Udo Reichl. 2012. „A Flow Cytometric Method for Viability Assessment of *Staphylococcus Aureus* and *Burkholderia Cepacia* in Mixed Culture“. *Cytometry Part A* 81A (12): 1055–66.
- Schenk, Marcela, Silvia Raffellini, Sandra Guerrero, Guillermo A. Blanco, und Stella Maris Alzamora. 2011. „Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: Study of cell injury by flow cytometry“. *LWT - Food Science and Technology* 44 (1): 191–98.
- Shapiro, Howard M. 2003. *Practical Flow Cytometry*. 4. Aufl. John Wiley & Sons.
- SLMB. 2012. „Methodenschrift 333.1: Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süßwasser mittels Durchflusszytomtrie“. In *Schweizerisches Lebensmittelbuch*. Schweizer Bundesamt für Gesundheit, Bern.
- Stocks, S. M. 2004. „Mechanism and Use of the Commercially Available Viability Stain, BacLight“. *Cytometry Part A* 61A (2): 189–95.
- Sträuber, Heike, und Susann Müller. 2010. „Viability States of Bacteria—Specific Mechanisms of Selected Probes“. *Cytometry Part A* 77A (7): 623–34.
- Van Nevel, S., S. Koetzsch, C. R. Proctor, M. D. Besmer, E. I. Prest, J. S. Vrouwenvelder, A. Knezev, N. Boon, und F. Hammes. 2017. „Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring“. *Water Research* 113 (April): 191–206.
- Van Nevel, Sam, Stefan Koetzsch, Hans-Ulrich Weilenmann, Nico Boon, und Frederik Hammes. 2013. „Routine bacterial analysis with automated flow cytometry“. *Journal of Microbiological Methods* 94 (2): 73–76.
- Venables, W.N., D.M. Smith, und R Core Team. 2018. „An Introduction to R. Notes on R: Programming Environment for Data Analysis and Graphics Version 3.4.4 (2018-03-15)“.
- Villarino, Andrea, Odile M. M Bouvet, Beatrice Regnault, Sylvie Martin-Delautre, und Patrick A. D Gri-mont. 2000. „Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells“. *Research in Microbiology* 151 (9): 755–68.
- Vital, Marius, David Stucki, Thomas Egli, und Frederik Hammes. 2010. „Evaluating the Growth Potential of Pathogenic Bacteria in Water“. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (19): 6477–84.
- Wagner, Silke, und Dorothea Wagner. 2007. „Comparing Clusterings - An Overview *“, Januar, 19.
- Watson, James V. 1991. *Introduction to Flow Cytometry*. Cambridge University Press.
- Yang, Lingling, Yingxing Zhou, Shaobin Zhu, Tianxun Huang, Lina Wu, und Xiaomei Yan. 2012. „Detection and Quantification of Bacterial Autofluorescence at the Single-Cell Level by a Laboratory-Built High-Sensitivity Flow Cytometer“. *Analytical Chemistry* 84 (3): 1526–32.

Zipper, Hubert, Herwig Brunner, Jürgen Bernhagen, und Frank Vitzthum. 2004. „Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications“. *Nucleic Acids Research* 32 (12): e103.

Zucker, Robert M. 2008. „Flow Cytometry Quality Assurance“. In *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*, 343–70. Springer Series on Fluorescence. Springer, Berlin, Heidelberg.

