



## TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie  
Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie

### **Verbundverfahren zur schnellen Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren für das Inline-Monitoring von Trink- und Rohwasser**

**Dennis Elsäßer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

### **Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen  
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Nießner  
2. Prof. Dr.-Ing. Jörg Drewes

Die Dissertation wurde am 15.05.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17.07.2017 angenommen.



## Danksagung

*Diese Arbeit entstand in der Zeit von August 2013 bis Juli 2016 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner. Die Arbeit wurde durch das Projekt „EDIT – Entwicklung und Implementierung eines Anreicherungs- und Detektionssystems für das Inline-Monitoring von wasserbürtigen Pathogenen in Trink- und Rohwasser“ des BMBFs gefördert.*

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Nießner für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in diesem sehr interessanten Thema durchführen zu können. Weiterhin möchte ich ihm für die guten Rahmenbedingungen, die Laborausstattung und die Möglichkeiten für Tagungsbesuche danken. Dies alles und die von ihm geförderte Vielseitigkeit des Instituts haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei PD Dr. Michael Seidel für seine Betreuung und sein Vertrauen bedanken. Die zahlreichen wertvollen Diskussionen und Anregungen, die angenehme Arbeitsatmosphäre in seiner Gruppe und der Freiraum zur selbstständigen Arbeit ermöglichten mir, mich auch über das fachliche hinaus weiterzuentwickeln, und haben mir bei meiner Arbeit sehr geholfen.

Meinem Labornachbarn Dr. Andreas Kunze gehört mein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts EDIT und auch darüber hinaus für die gegenseitige Unterstützung während des gesamten Verlaufs meiner Arbeit und die gute Zeit im Labor.

Sehr bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen Anika Wunderlich und Catharina Kober für die schöne Zeit und die immer gute Zusammenarbeit. Auch bei meinen Kollegen Carmen Torggler, Aleksandra Stanojlovic-Collin, Veronika Stiegler, Dr. Elisangela Linares, Alda Gega, Susanna Mahler, Angelika Nistler, Verena Meyer, Jessica Beyerl und Jonas Bemetz möchte ich mich für die gute Atmosphäre und die schöne Zeit am IWC bedanken.

Bei Carolin Hartmann, Klemens Thaler und Stefan Heberle möchte ich mich für die gute, wenn auch nur kurze, Labornachbarschaft bedanken. Roland Hoppe und Sebastian Wiesemann danke ich für ihre Unterstützung und die Umsetzung vieler Ideen und für ihre Hilfe bei allen technischen Fragen. Auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts danke ich für das freundliche Arbeitsklima während meiner Zeit am Institut.

Meinen Kollegen aus dem Projekt EDIT möchte ich für die konstruktive Zusammenarbeit und das Vertrauen danken. Mein besonderer Dank gilt dabei Johannes Ho für die gute Zusammenarbeit bei der Planung und Durchführung der Messkampagne in Berlin.

Zu Letzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Ulrike und Rolf Elsässer und meinen Schwestern Dixie und Kelly, die mich immer unterstützt haben und stets an mich geglaubt haben. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Lengger, S.; Otto, J.; **Elsässer, D.**; Schneider, O.; Tiehm, A.; Fleischer, J.; Niessner, R.; Seidel, M. *Oligonucleotide microarray chip for the quantification of MS2, PhiX174, and adenoviruses on the multiplex analysis platform MCR 3*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. 406(14): p. 3323-34.

Kunze, A.; Pei, L.; **Elsässer, D.**; Niessner, R.; Seidel, M. *High performance concentration method for viruses in drinking water*. Journal of Virological Methods, 2015. 222: p. 132-137.

Wunderlich, A.; Torggler, C.; **Elsässer, D.**; Lück, C.; Niessner, R.; Seidel, M. *Rapid quantification method for Legionella pneumophila in surface water*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016. 408(9): p. 2203-2213.

Karthe D.; Behrmann O.; Blättel V.; **Elsässer D.**; Heese C.; Hügler M.; Hufert F.; Kunze A.; Niessner R.; Otto J.; Scharaw B.; Spoo M.; Tiehm A.; Urban G.; Vosseler S.; Westerhoff T.; Dame G.; Seidel M. *Modular development of an inline monitoring system for waterborne pathogens in raw and drinking water*. Environmental Earth Sciences, 2016. 75(23): p. 1481

Hjelmsø M.H.; Hellmér M.; Fernandez-Cassi X.; Timoneda N.; Lukjancenko O.; Seidel M.; **Elsässer D.**; Aarestup F.; Löfström C.; Bofill-Mas S.; Abril J.F.; Girones R.; Schultz A.C. *Evaluation of methods for the concentration and extraction of viruses from wastewater in the context of metagenomic sequencing*, PLoS ONE, 2017. 12(1): e0170199



# Inhalt

I	Einleitung und Problemstellung .....	1
II	Theoretische Grundlagen .....	5
	1. Pathogene im Wasser.....	6
	1.1 Wasserhygiene-Monitoring .....	7
	1.2 Indikatorkeime .....	8
	1.3 Gesetzliche Bestimmungen.....	10
	1.4 Technische Aspekte .....	11
	2. Aufkonzentrierungstechniken für Mikroorganismen und Viren in Wasser.....	13
	2.1 Physikochemische Eigenschaften von Bakterien und Viren. ....	14
	2.1.1 Bakterien.....	14
	2.1.2 Viren.....	15
	2.2 Ultrafiltration .....	16
	2.3 Adsorptions-/ Elutionsmethoden.....	21
	2.3.1 Elektronegative Filter.....	26
	2.3.2 Elektropositive Filter.....	27
	2.3.3 Glaswolle.....	29
	2.3.4 Flockung .....	29
	2.3.5 Affinitätsbasierte Separationsverfahren.....	30
	2.4 Monolithen .....	33
	2.4.1 Massentransport in Monolithen .....	34
	2.4.2 Silica-Monolithen.....	36
	2.4.3 Polymer-Monolithen.....	36
	2.4.4 Anwendung von Monolithen zur Separation von Viren und Bakterien.....	38
	2.5 Monolithische Adsorptionsfiltration .....	40
	3. Detektion von Pathogenen .....	42
	3.1 Kulturbasierte Methoden .....	42
	3.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	43

3.3 Chemilumineszenz-Mikroarrays.....	45
3.3.1 Antikörper-Mikroarrays .....	46
3.3.2 DNA-Mikroarrays am MCR 3 .....	47
3.3.3 On-Chip-DNA-Amplifikation .....	48
III Ergebnisse und Diskussion.....	49
1. Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren aus großen Wasservolumina zur Hygieneüberwachung .....	50
2. Ultrafiltration .....	51
2.1 Aufbau der Ultrafiltrationsanlage Konti-CUF .....	51
2.2 Charakterisierung der Anlage .....	54
2.2.1 Mechanische Charakterisierung.....	54
2.2.2 Biologische Charakterisierung.....	55
2.3 Filtration unter optimierten Bedingungen .....	59
2.4 Zusammenfassung Ultrafiltration.....	62
3. Monolithische Adsorptionsfiltration .....	62
3.1 Optimierung Elutionspuffer für MAF-OH.....	63
3.2 Entwicklung neuer Funktionalisierungen .....	64
3.2.1 Optimierung der Elution für MAF-DEAE .....	68
3.2.2 Quantitative Charakterisierung der Monolithen mit Bakteriophage MS2 .....	69
3.2.3 Parallele Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren mittels MAF-DEAE.....	71
3.2.4 Optimierung von MAF-DEAE für Bakterien.....	78
3.2.5 Aufkonzentrierung unter optimierten Bedingungen.....	79
3.2.6 Aufkonzentrierung mittels mehrerer Monolithen .....	81
3.2.7 Zusammenfassung Entwicklung neuer Funktionalisierungen für MAF .....	84
3.2 Anwendung von MAF in verschiedenen Wassermatrices .....	84
3.2.1 Oberflächenwasser .....	84
3.2.2 Einfluss der Trübung und Partikelfracht auf die MAF.....	87
3.2.3 Zusammenfassung Filtration von Realproben.....	88



3.3 Prozessautomatisierung der MAF .....	89
3.3.1 Aufbau des automatisierten Systems für MAF: AutoMAF .....	91
3.3.2 Charakterisierung und Optimierung der AutoMAF .....	93
3.3.3 Zusammenfassung Automatisierung .....	96
4. Kombination der Aufkonzentrierungs- und Detektionsschritte zum Wasserhygiene-Monitoring	97
4.1 Test des Gesamtsystems.....	97
4.2 Test des Gesamtsystems unter realen Bedingungen .....	101
4.2.1 Testaufbau 1: Gesamtstrommessung .....	103
4.2.2 Testaufbau 2: Teilstrommessung .....	108
IV Zusammenfassung und Ausblick .....	116
V Summary and Outlook .....	123
VI Experimenteller Teil .....	129
1. Geräte und Materialien .....	130
1.1 Geräte .....	130
1.2 Software.....	131
1.3 Verbrauchsmaterialien .....	131
1.4 Chemikalien .....	132
1.5 Kits .....	134
1.6 Mikroorganismen und Viren .....	134
1.7 Puffer .....	135
2. Standardprozeduren .....	138
2.1 Aufkonzentrierung einer Wasserprobe mittels Ultrafiltration .....	138
2.2 Monolithische Adsorptionsfiltration .....	140
2.2.1 Herstellung der Monolithen.....	140
2.2.2 Funktionalisierung der Monolithen .....	141
2.2.3 Aufkonzentrierung mit MAF.....	142
2.2.4 Aufkonzentrierung mit AutoMAF .....	143
2.3 Zentrifugale Ultrafiltration (CeUF) .....	144

2.4 Mikrobiologische und molekularbiologische Verfahren.....	144
2.4.1 Kultivierung der Zellen.....	144
2.4.2 Nukleinsäureextraktion mit Viral Xpress Extraction Kit.....	144
2.4.3 Nukleinsäureextraktion mit QIAamp DNA-Mini Kit.....	145
2.4.4 cDNA-Synthese.....	145
2.4.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	145
2.4.6 Colilert-18.....	146
2.5 Munich Chip Reader 3 .....	146
2.5.1 Mikroarray-Herstellung.....	147
2.5.2 On-Chip-RPA auf dem MCR 3 .....	149
2.5.3 Auswertung der Messdaten .....	151
2.6 Auswertung von Aufkonzentrierungsexperimenten .....	151
VII Abkürzungen.....	152
VIII Literatur .....	156

---

## I Einleitung und Problemstellung

In hochentwickelten Industrieländern wie Deutschland oder den USA werden wasserbürtige Pathogene heutzutage nicht als bedeutendes Gesundheitsrisiko für die Bevölkerung betrachtet. Doch selbst in diesen Ländern kommt es regelmäßig zu Krankheitsausbrüchen, die durch Bakterien oder Viren im Trinkwasser ausgelöst werden [1-3]. Beispiele aus jüngerer Vergangenheit sind der Ausbruch von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) in Deutschland 2011 [4], der Ausbruch von Cryptosporidien und *E. coli* O157:H7 in Kanada 2000 [1], weitverbreitete Ausbrüche von Gastroenteritis 2004 in den USA, die auf *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Arcobacter* spp. und Adenoviren im Grund- und Trinkwasser zurückgeführt wurden [5, 6] oder die häufig auftretenden Ausbrüche von Noroviren [7-9].

Eine Kontamination des Trinkwassers mit Pathogenen kann über viele unterschiedliche Wege stattfinden [10]. Beispielsweise können extreme Wetterverhältnisse eine temporäre Verschlechterung der mikrobiologischen Qualität des Rohwassers verursachen. Dies kann auch zu einer Kontamination des Trinkwassers führen [11, 12]. Selbst in Ländern mit modernen Infrastrukturen konnte ein Zusammenhang zwischen starken Regenfällen oder langer Trockenheit und wasserassoziierten Krankheitsausbrüchen festgestellt werden [13]. Auch der Klimawandel und die möglicherweise damit verbundene Zunahme von extremen Wetterbedingungen wird als potentielle Gefahr für die mikrobiologische Trinkwasserqualität betrachtet [14, 15]. Die Kontamination von Oberflächen- und Grundwasser, welches zur Produktion von Trinkwasser verwendet wird, beispielsweise durch die Landwirtschaft oder Brunnen, kann ebenfalls einen Weg von Pathogenen ins Trinkwasser darstellen [16-21]. Auch der demographische Wandel und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Wasserinfrastruktur können einen Einfluss auf die Trinkwasserhygiene haben, da Leitungssysteme in Gebieten mit rückläufiger Bevölkerungsdichte weniger stark ausgelastet werden und somit die Bildung von Biofilmen in den Leitungen begünstigt wird [22].

Um die Hygiene des Trinkwassers auch in Zukunft gewährleisten zu können, sind moderne Systeme notwendig, die in der Lage sind dieser Herausforderung zu begegnen und die Überwachung der Wasserqualität hinsichtlich biologischer Parameter auszubauen [23]. Die direkte Analyse von Wasserproben ist dabei jedoch oft nicht ausreichend, da Pathogene selbst in Konzentrationen, die viel geringer sind als die Nachweisgrenze üblicher Analysemethoden, ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen können [23]. Die Nachweisgrenzen dieser Methoden liegen je nach Zielorganismus und eingesetzte Probenmenge üblicherweise im Bereich von 1 bis 1000 Keime/ $\mu\text{l}$ . Daher müssen diese Analyseverfahren mit Aufkonzentrierungsprozessen kombiniert werden, um Proben zunächst aus einem Maßstab von hunderten bis tausenden Litern in den Milli- oder Mikroliterbereich einzuengen. Die so gewonnene Konzentrationserhöhung der Proben um einen Faktor  $10^5$  oder sogar  $10^6$  ermöglicht die Detektion von einem Keim in  $90 \text{ m}^3$ , was beispielsweise dem von der

WHO vorgeschlagenen Grenzwert für Rotaviren für sicheres Trinkwasser entspricht [23]. Durch den Einsatz schneller und effizienter Aufkonzentrierungsverfahren kann die Sensitivität der anschließenden Detektion maßgeblich erhöht werden, wodurch eine Überwachung der biologischen Trink- und Rohwasserqualität ermöglicht wird. Ein solches Hygiene-Monitoring soll angewandt werden, um nicht nur das Trinkwasser selbst, sondern insbesondere das Rohwasser zur Gewinnung von Trinkwasser zu untersuchen und damit helfen nachhaltig eine hohe Trinkwasserqualität zu gewährleisten. Dieses Monitoring-Konzept kann auch bei Trinkwasseraufbereitungsanlagen zum Einsatz gebracht werden, um beispielsweise deren Reduktionsleistung zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Verbundverfahren entwickelt werden, welches zur Anreicherung von viralen und bakteriellen Pathogenen im Trinkwasser eingesetzt werden kann. In vorangegangenen Arbeiten am Lehrstuhl für Analytische Chemie & Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München (IWC) wurden bereits einzelne Komponenten für ein Trinkwasser-Monitoringsystem entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein mehrstufiger, automatisierter Prozess, basierend auf diesen Arbeiten, etabliert werden. Dabei stand besonders die Kombination zu einem mehrstufigen Verbundverfahren und die dazu notwendigen Weiterentwicklungen im Fokus. Zu diesem Zweck wurden auf Basis der bereits bestehenden Komponenten neue Prozessanlagen konstruiert und Verfahren so weiterentwickelt und aufeinander abgestimmt, dass eine Verknüpfung der Teilkomponenten zu einem Gesamtprozess ermöglicht wurde. Dieser sollte einen möglichst hohen Automatisierungsgrad aufweisen, sodass eine Durchführung unter realen Bedingungen mit minimalen Personalaufwand und möglichst ohne manuelle Schritte realisierbar ist.

Als ersten Aufkonzentrierungsschritt sollte ein Ultrafiltrationsverfahren entwickelt werden, um Proben mit einem Volumen von 1000 L oder mehr auf ein Volumen von 20 L aufzukonzentrieren. Zu diesem Zweck sollte eine neue Filtrationsanlage konstruiert werden, welche in der Lage ist, Pathogene aus Wasserproben in kurzer Zeit aufzukonzentrieren. Die Anlage sollte mit verschiedenen Pathogenen getestet und mit weiteren Aufkonzentrierungsverfahren kombiniert werden. Als zweiter Schritt wurde die monolithische Adsorptionsfiltration (MAF) weiterentwickelt. Dazu sollten verschiedene Oberflächenfunktionalisierungen untersucht werden, um eine Anreicherung ohne vorherige Probenvorbereitung auf ein Volumen von 20 mL zu ermöglichen.

Es sollten Verfahren zur Funktionalisierung von monolithischen Disks mit neuen funktionellen Gruppen etabliert werden. Dabei konnten drei neue Arten MAF-Disks mit Anionen- und Kationenaustauschergruppen etabliert werden. Die neuen Disks sollten mit einer Auswahl von Indikatororganismen getestet werden, um herauszufinden, inwiefern sie sich dazu eignen Viren und Bakterien ohne vorherige Einstellung des pH-Werts aus Wasser aufzukonzentrieren. Auch die

Möglichkeit der Kombination unterschiedlich funktionalisierter MAF-Disks in einer MAF-Säule sollte untersucht werden. Mit den neu entwickelten Disks und der Kombination unterschiedlicher Monolithen in einer Säule sollte eine parallele Aufkonzentrierung verschiedener Bakterien und Viren ohne Probenvorbereitung (z.B. durch Ansäuern der Probe) ermöglicht werden. Dies war die Voraussetzung zur Integration von MAF in das Verbundverfahren. Darüber hinaus sollte eine Anlage gebaut werden, die den MAF-Prozess automatisch durchführen kann. Die Verfahren sollten so ausgelegt werden, dass eine möglichst schnelle und vollständige Aufkonzentrierung wasserbürtiger Pathogene erreicht wird. Abschließend sollten die einzelnen Komponenten mit zentrifugaler Ultrafiltration als drittem Prozessschritt zu einem Gesamtprozess kombiniert und mit einer Mikroarray-Detektion auf dem MCR 3 verknüpft werden, um die Anwendbarkeit des Systems für ein Wasserhygiene-Monitoring unter realen Bedingungen zu zeigen.

---

## II Theoretische Grundlagen

## 1. Pathogene im Wasser

Mikroorganismen kommen natürlich in Wasser vor. Wenn es sich dabei um humanpathogene Keime handelt, kann dies zu einer Gefahr für die menschliche Gesundheit werden. Infektionskrankheiten, die durch wasserbürtige Pathogene verursacht werden, sind das meist verbreitete Gesundheitsrisiko im Zusammenhang mit Trinkwasser [23]. Die Pathogene können Bakterien, Viren, Protozoen oder Helminthen sein. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Pathogene, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Zusammenhang mit Trinkwasserhygiene als relevant eingestuft werden. Viele dieser Organismen sind fäkalen Ursprungs, wie z.B. die Bakterien *E. coli*, Klebsiellen, *Campylobacter*, Salmonellen, Shigellen oder *Vibrio cholerae* [24-27]. Auch Viren und Protozoen wie Enteroviren, Rotaviren, Noroviren, *Cryptosporidium* oder *Giardia intestinalis* [28-32] können über eine Kontamination durch Abwasser ins Trinkwasser gelangen. Diese Organismen können über einen längeren Zeitraum im Wasser überleben und sich im Falle der Bakterien unter Umständen sogar vermehren.

**Tabelle 1: Pathogene, die als relevant für die Trinkwasserhygiene eingestuft werden [23, 33].**

Bakterien	Viren	Protozoen	Helminthen
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Adenoviren	<i>Acanthamoeba spp.</i>	<i>Dracunculus medinensis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Astroviren	<i>Cryptosporidium hominis/ parvum</i>	<i>Schistosoma spp.</i>
<i>Escherichia coli</i> – Pathogen	Enteroviren	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
<i>Francisella tularensis</i>	Hepatitis A Viren	<i>Entamoeba histolytica</i>	
<i>Legionella spp.</i>	Hepatitis E Viren	<i>Giardia intestinalis</i>	
<i>Leptospira</i>	Noroviren	<i>Naegleria fowleri</i>	
<i>Mycobacteriaceae</i>	Rotaviren		
<i>Salmonella enterica ssp.</i>	Sapoviren		
Andere Salmonellae			
<i>Shigella spp.</i>			
<i>Vibrio cholerae</i>			

Neben den Pathogenen fäkalen Ursprungs gibt es noch weitere Pathogene, die auf anderem Weg ins Trinkwasser gelangen. Dazu zählen vor allem Legionellen, Pseudomonaden und Aeromonaden. Diese kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Sie können daher in vielen Arten von Wasser wie Trink-, Oberflächen- oder Grundwasser wachsen. Sie werden aber auch in anderen wasserführenden Systemen wie Verdunstungskühlanlagen, Rohrleitungen, Ventilen, Duschköpfen oder Sandfiltern



gefunden, wo sie Biofilme bilden können [34, 35]. In Biofilmen können sich Viren und Bakterien anhäufen und über längere Zeiträume (bis hin zu Wochen) wachsen [36, 37]. Durch ein Abreißen von Biofilmen können Pathogene im Wasser freigesetzt werden und damit ein Gesundheitsrisiko darstellen [38]. Da Biofilme Reinigungs- oder Desinfektionsmaßnahmen überstehen und anschließend weiterwachsen können, ist eine Erfassung durch etablierte Kultur-basierte Methoden oft schwierig [36, 39].

### 1.1 Wasserhygiene-Monitoring

Die Überprüfung der mikrobiologischen Wasserqualität soll Verbraucher vor Krankheiten schützen, die durch den Konsum von mikrobiologisch belastetem Wasser ausgelöst werden können. In den letzten hundert Jahren wurde diese Überwachung am fertig aufbereiteten Trinkwasser durchgeführt. Dabei wird das Vorhandensein fäkaler Indikatorkeime überprüft, wodurch die potentielle Belastung mit pathogenen Keimen im Wasser beurteilt wird. Jedoch kommt es dabei immer wieder zu Fällen, in denen Indikatorkeime gefunden werden, nachdem das Wasser an den Verbraucher weitergegeben wurde. Weiterhin gab es Fälle von trinkwasserbedingten Krankheitsausbrüchen mit Wasser, in dem keine Indikatorkeime gefunden wurden [11]. Zwischen 1971 und 2006 berichtete das United States Center for Disease Control von 780 Fällen von Krankheitsausbrüchen, die im Zusammenhang mit dem Konsum von Trinkwasser standen. Dabei waren 557.094 Personen betroffen [40]. Im Zeitraum von 1999 bis 2006 wurden in Spanien 413 Ausbrüche mit 23.642 Krankheitsfällen registriert [11]. Da diese Ausbrüche trotz gesetzlicher Vorgaben, die solche Ausbrüche verhindern sollen, und den damit verbundenen mikrobiologischen Untersuchungen, welche auf der Detektion von Indikatororganismen beruhen, stattfinden konnten, werden von der WHO seitdem verstärkt Maßnahmen zur Prävention solcher Ausbrüche vorgeschlagen. Insbesondere die Überwachung nicht nur des Trinkwassers selbst, sondern auch die Überwachung aller Faktoren, die die Qualität des Trinkwasser beeinflussen können, von der Wasserquelle bis zum Verbraucher, sind wichtiger Bestandteil dieser Maßnahmen [23, 41]. Im Rahmen der Maßnahmen sollen Barrieren für mikrobiologische Kontamination errichtet werden, welche den Schutz der Wasserquellen, die Wasserbehandlung und -desinfektion sowie die Wartung und Überwachung der Wasserleitungen beinhalten [11, 42]. Dazu wurden in den letzten Jahren von der WHO und der International Water Association (IWA) diverse Leitfäden veröffentlicht. Neben dem WHO Leitfaden für Trinkwasserqualität [23] zählen dazu das Water Safety Manual [41], der WHO-Leitfaden über aufkommende Probleme durch infektiöse Krankheiten im Wasser [43], sowie ein Leitfaden zur mikrobiellen Sicherheit von Wasser, der in Zusammenarbeit mit der OECD veröffentlicht wurde [44]. In Deutschland wird ein solches multiples Barrierensystem bereits angewandt. Dieses besteht grundsätzlich aus fünf Stufen [45]. Diese sind:

1. Maßnahmen im Einzugsgebiet gegen hygienisch-mikrobiologische und chemische Verunreinigungen aus unterschiedlichen Quellen wie z.B. Landwirtschaft, Industrie, Siedlungen, Verkehrswege usw.
2. Voraufbereitung von Oberflächenwasser
3. Langsandsandfiltration, Bodenpassage, Uferfiltration
4. Aufbereitung und ggf. Desinfektion
5. Rohrnetzpflege und Desinfektion

Die Umsetzung dieser Barrieren ist über Rechtsnormen und technische Regelwerke wie das Wasserhaushaltsgesetz, die Landeswassergesetze der Bundesländer oder DVGW-Arbeitsblätter verankert [45]. Allerdings sind diese Maßnahmen den örtlichen Gegebenheiten untergeordnet, sodass die Schutzmöglichkeiten nicht überall optimal umgesetzt werden können.

### 1.2 Indikatorkeime

Um die Wasserqualität optimal überwachen zu können, wäre es notwendig, alle pathogenen oder potentiell pathogenen Mikroorganismen und Viren im Wasser zu detektieren und zu quantifizieren. Jedoch gibt es für viele wasserbürtige Pathogene zur Detektion oder Quantifizierung im Wasser keine geeigneten Methoden [46]. Für einige Organismen stehen zwar Methoden bereit oder werden erforscht, diese sind jedoch noch nicht in der Routineanalytik für Wasserqualität etabliert [47]. Deshalb werden zur Beurteilung der Wasserhygiene Indikatororganismen betrachtet [48]. Die WHO definiert Indikatororganismen als nichtpathogene Organismen, die die folgenden Kriterien erfüllen [23]:

- In menschlichen und tierischen Fäkalen universell in großer Anzahl vorhanden
- Keine Vervielfältigung im Wasser möglich
- Im Wasser ähnlich persistent wie fäkale Pathogene
- In höherer Menge vorhanden als fäkale Pathogene
- Reagieren auf Behandlung in gleicher Weise wie fäkale Pathogene
- Leicht durch einfache, kostengünstige Kulturmethoden nachzuweisen

Diese Kriterien setzen voraus, dass ein Organismus als Indikator für sowohl fäkale Kontamination als auch Behandlungs-/Prozesseffizienz eingesetzt werden soll. Dies ist in der Praxis aber kaum umzusetzen. Daher werden Indikatoren in drei Gruppen eingeteilt: Mikrobiologische Prozessindikatoren, Fäkalindikatoren und Indexorganismen. Prozessindikatoren werden genutzt, um die Wirksamkeit eines Prozesses zu demonstrieren. Fäkalindikatoren werden als Hinweis auf Fäkalkontamination genutzt. Indexorganismen geben einen Hinweis auf das Vorhandensein und das Verhalten von Pathogenen [49]. Die Beurteilung der mikrobiologischen Qualität von Wasser beruht auf

dem Nachweis von Index- und Indikatororganismen. Dazu zählen vor allem coliforme Keime, fäkale oder thermotolerante Coliforme, *Escherichia coli*, Enterokokken, und Bakteriophagen [11].

Coliforme Keime sind fakultativ anaerobe, gramnegative, stäbchenförmige Bakterien, die Laktose spalten können und Säuren und Gase bei 35 °C innerhalb von 48 h produzieren. Sie gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie beinhalten die Gattungen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Leclercia* und einige Mitglieder der Gattung *Serratia*. Sie werden als Indikatoren verwendet, da sie im Darm von Warmblütern vorkommen und daher als Indikator für fäkale Verunreinigung dienen. Einige coliforme Keime können jedoch auch in der Umwelt wachsen. Weiterhin gibt es keine Möglichkeit von der Anzahl coliformer Keime auf die Anzahl pathogener Keime im Wasser zu schließen. Aufgrund dessen und Berichten über Stämme mit untypischem Verhalten ist die Verwendung der Gesamtheit aller coliformen Keime als Fäkalindikatoren umstritten [50, 51]. Der Begriff fäkale Coliforme oder thermotolerante Coliforme umfasst coliforme Bakterien, die bei Temperaturen bis zu 44,5 °C wachsen und Lactose spalten. Ihr Verhalten ähnelt dem von pathogenen Bakterien. In den meisten Trinkwasserregulierungen findet diese Untergruppe jedoch keine Beachtung und wurde durch *E. coli* ersetzt. *E. coli* gehört zu den fäkalen Coliformen und deutet spezifischer auf fäkale Kontamination hin. Aus diesem Grund ist es in vielen Ländern als Indikatorkeim in den Wasserverordnungen vorgeschrieben [11] und wird auch von der WHO als solcher empfohlen [23].

Enterokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe, kugelförmige Bakterien. Zu ihnen zählen fäkale Streptokokken und Enterokokken sowie intestinale Enterokokken. Die Verwendung von Enterokokken als Indikatorkeim hat in den letzten Jahren zunehmend an Akzeptanz gewonnen. Dies hat mehrere Gründe: Enterokokken zeigen eine starke Verbindung zu Gesundheitsrisiken im Zusammenhang mit Wasser, besonders bei Symptomen von Magen-Darm-Erkrankungen. Sie sind in den Fäkalien von Warmblütern immer vorhanden und nicht in der Lage sich in mit Abwasser kontaminierten Gewässern zu vermehren. Weiterhin sind sie in Wasser länger überlebensfähig als coliforme Keime und somit näher an wasserbürtigen pathogenen Bakterien [52-54]. Den größten Anteil der in Fäkalien enthaltenen Enterokokken stellen *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus hirae* dar [53].

Die Anwendung von Indikatororganismen dient der Einschätzung der mikrobiologischen Wasserqualität. Dazu werden bislang hauptsächlich Bakterien als Indikatoren verwendet. Es wird jedoch zunehmend angezweifelt, dass diese sich eignen, um alle wasserbürtigen Pathogene zu repräsentieren [55, 56]. Viren und Protozoen besitzen vollkommen andere Eigenschaften als Bakterien. Sie unterscheiden sich nicht nur in Größe und Form, sondern sind oft robuster gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsschritten [57]. Auch hinsichtlich ihrer Pathogenität unterscheiden sich insbesondere Viren stark von Bakterien. Viren bergen ein 10 – 10.000-fach höheres

Infektionsrisiko als Bakterien, weil schon geringste Mengen ausreichen, um Krankheiten auszulösen [58-60]. Daher sind virale Indikatoren notwendig, um eine vollständige Hygieneüberwachung zu ermöglichen. Als virale Indikatoren wird eine Reihe von Bakteriophagen verwendet. Sie dienen ebenfalls häufig dazu, die Effizienz von Trinkwasserchlorierungsschritten zu überprüfen [61, 62]. Dazu werden vor allem somatische Coliphagen, F-spezifische RNA Bakteriophagen (FRNA-Phagen) und Phagen aus *Bacteroides fragilis* verwendet [63-65]. Somatische Coliphagen sind Viren, die spezifisch *E. coli* angreifen. Sie werden häufig als Indikator für Verschmutzung mit Fäkalien oder Abwasser verwendet. Zudem können sie als Biotracer eingesetzt werden, um Verschmutzungsquellen von Oberflächengewässern und Aquiferen zu finden [66, 67]. Da sie sich jedoch stark von enteralen Viren unterscheiden, ist es nur eingeschränkt möglich sie als Indikator für diese zu verwenden [63]. FRNA-Phagen besitzen eine ähnliche Größe und Form wie humane Enteroviren. Ihre Anwesenheit deutet auf Kontamination durch Abwasser hin. Weiterhin können sie sich in Wassersystemen nicht replizieren. Daher ist ihr Einsatz als Indikator vielversprechend. Da sie jedoch nur in geringen Mengen in humanen Fäkalien vorkommen und sich in Abwasser vermehren können, dienen sie hauptsächlich als Indikator für eine Kontamination mit Abwasser [68]. *Bacteroides fragilis* ist ein anaerobes Bakterium und Teil der natürlichen Flora im Darm von Mensch und Tier. Der *B. fragilis* Phage HSP 40 eignet sich aus verschiedenen Gründen besonders als Indikator für Verunreinigungen aus humanen Fäkalien [65]. Diese Phagenart ist humanspezifisch und wird nur in menschlichen Fäkalien gefunden. Sie konnten bislang nur in Abwasser, fäkal kontaminiertem Wasser und Sedimenten daraus gefunden werden, jedoch nicht in sauberem Wasser. Die Anzahl der gefundenen Phagen korrelierte mit dem Grad der Verschmutzung des Wassers und die Phagen waren immer in höherer Anzahl als enterale Viren zu finden. Zudem sind HSP 40-Phagen nicht in der Lage sich in der Umwelt zu replizieren [69].

### 1.3 Gesetzliche Bestimmungen

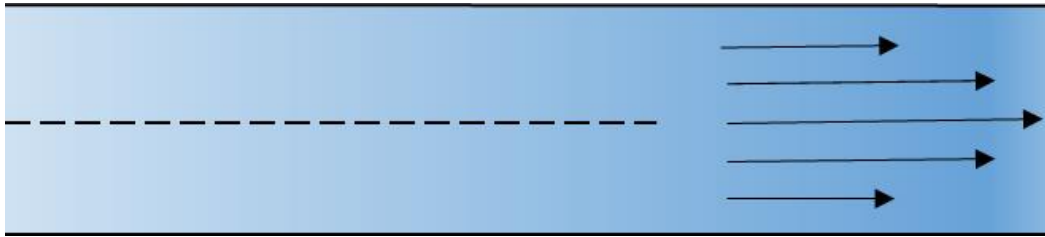
Im Infektionsschutzgesetz § 37 sind die Anforderungen an die Beschaffenheit von Trinkwasser geregelt. Darin heißt es: „Wasser für den menschlichen Gebrauch muss so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit, insbesondere durch Krankheitserreger, nicht zu besorgen ist.“ Darauf bezieht sich auch die Trinkwasserverordnung. Darin heißt es in § 5 Absatz 1: „Im Trinkwasser dürfen Krankheitserreger im Sinne des §2 Nr. 1 des Infektionsschutzgesetzes, die durch Wasser übertragen werden können, nicht in Konzentrationen enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen.“ Die hier beschriebenen Konzentrationen sind als Grenzwerte für Indikatororganismen in der Trinkwasserverordnung festgelegt. Diese betragen 0 in 100 mL für *E. coli*, coliforme Keime und Enterokokken sowie 100 in 100 mL für Legionellen und 0 in 250 mL für *Pseudomonas aeruginosa* [70].

Grenzwerte für weitere Mikroorganismen oder Viren gibt die Trinkwasserverordnung nicht vor. Die Überprüfung der mikrobiologischen Trinkwasserqualität basiert daher nur auf den oben genannten Indikatorkeimen.

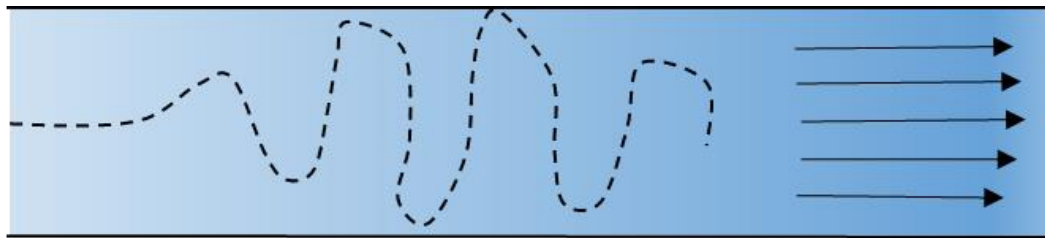
#### 1.4 Technische Aspekte

Um eine zuverlässige Überwachung der Trinkwasserhygiene zu ermöglichen, ist nicht nur das Wasser selbst, sondern auch die Versorgungssysteme, die zur Verteilung des Wassers genutzt werden, von entscheidender Bedeutung. Diese Versorgungssysteme bestehen in der Regel aus Rohrleitungssystemen, durch die das Wasser gepumpt wird. Somit startet die Kontrolle der Wasserhygiene mit der Entnahme des Wassers aus einem Wasserleiter. Daher ist die Verteilung einer möglichen Kontamination des Wassers innerhalb dieser Rohrleitungen ein wichtiger Einflussfaktor für alle weiteren Messungen. Es muss sichergestellt werden, dass eine Probe aus einem Wasserleiter auch repräsentativ für das gesamte im Leiter befindliche Wasser ist. Eine Abschätzung darüber, lässt sich durch das Strömungsverhalten des Wassers innerhalb des Leiters treffen. Grundsätzlich können zwei Strömungsverhalten vorliegen: Laminare und turbulente Strömung [71]. Bei laminarer Strömung treten keine Verwirbelungen innerhalb der Strömung auf. Das bedeutet, dass das Wasser in Schichten übereinander fließt, die sich nicht vermischen (siehe Abbildung 1 A). Ein in der Mitte der Leitung befindlicher Partikel wird somit immer in der Mitte bleiben und sich nicht zum Rand bewegen. Die Verteilung der Geschwindigkeit über dem Rohrquerschnitt hat dabei die Form eines Rotationsparaboloids. Eine repräsentative Entnahme einer Teilmenge des Wassers, ist unter diesen Bedingungen kaum möglich. Im Gegensatz dazu vermischen sich Partikel in einer turbulenten Strömung innerhalb von kurzer Zeit über den gesamten Rohrquerschnitt (siehe Abbildung 1 B). Die Geschwindigkeitsverteilung des Wassers ist ausgeglichener als bei laminarer Strömung. Dieses Verhalten wurde bereits 1883 von Oswald Reynolds durch einen Färbeversuch von Wasser in einem Rohrleiter demonstriert [72]. Dies hat zur Folge, dass sich Pathogene im Wasser, je nachdem, ob in einer Rohrleitung turbulente oder laminare Strömung vorliegt, anders im Rohrleiter verteilen werden.

(A)



(B)



**Abbildung 1: Laminare (A) und turbulente Strömung in einer Rohrleitung. Eine beispielhafte Verteilung eines in das System eingebrachten Partikels ist als gestrichelte Linie schematisch dargestellt. Das Strömungsprofil wird durch die Pfeile symbolisiert.**

Um zu bestimmen, ob in einer Rohrleitung turbulentes oder laminares Strömungsverhalten vorliegt, kann die Reynolds-Zahl berechnet werden. Diese ist eine dimensionslose Kennzahl, die das Verhältnis von Trägheits- und Zähigkeitskräften beschreibt. Sie ist definiert als

$$Re = \frac{\rho v_{St} D}{\eta} = \frac{v_{St} D}{\nu} \quad \text{Gleichung (1)}$$

Dabei ist  $\rho$  die Dichte,  $v_{St}$  die Strömungsgeschwindigkeit,  $\eta$  die dynamische Viskosität und  $\nu$  die kinematische Viskosität.  $D$  beschreibt die charakteristische Länge des Körpers. Im Falle einer Rohrleitung entspricht  $D$  dem Durchmesser. Überschreitet die Reynolds-Zahl einen kritischen Wert  $Re_{krit}$ , wird eine laminare Strömung anfällig gegen geringste Störungen, was zu einem Umschlag in turbulente Strömung führt. Für eine Rohrströmung gilt eine kritische Reynolds-Zahl von  $Re_{krit} = 2040$  [73]. In der Literatur werden jedoch auch häufig Werte von  $Re_{krit} = 2300$  zitiert. Da Wasser bei 20 °C eine kinematische Viskosität von ca.  $10^{-6} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  besitzt, liegen die Reynolds-Zahlen in technischen Anwendungen häufig bei  $Re > 10^4$  und somit im turbulenten Bereich. Das hat zur Folge, dass sich eine Kontamination durch Pathogene in einem Wasserleiter in den meisten Fällen innerhalb kurzer Zeit über den gesamten Rohrquerschnitt verteilt. Daher kann mit Hilfe der Reynolds-Zahl eine Abschätzung darüber getroffen werden, ob eine Probe, die an einem Rohrleiter beispielsweise über ein T-Stück gezogen wurde, repräsentativ ist.

## 2. Aufkonzentrierungstechniken für Mikroorganismen und Viren in Wasser

Wasserbürtige Pathogene können bereits in sehr geringen Dosen zu Krankheitsausbrüchen führen. Einige sind so infektiös, dass bereits eine Dosis von 1 bis 100 Partikeln oder Mikroorganismen zu Krankheit führen kann [23]. Die direkte Messung von kleinsten Konzentrationen an Bakterien oder Viren im Wasser ist nicht möglich, da eine Untersuchung von sehr großen Probenvolumina dazu nötig wäre und die Sensitivität der Detektionsmethoden nicht ausreicht. Daher ist es notwendig, Aufkonzentrierungsmethoden zu entwickeln und anzuwenden, um kleine Mengen Pathogene in großen Wasservolumina zu finden. Dabei werden die physikochemischen Eigenschaften der Pathogene genutzt, um sie von der Wassermatrix und anderen Matrixbestandteilen abzutrennen. Um zu gewährleisten, dass möglichst alle in einer Probe enthaltenen Keime detektiert werden können, müssen Aufkonzentrierungsmethoden bestimmte Anforderungen erfüllen. Dazu müssen zunächst alle enthaltenen Pathogene von der Methode erfasst und aufkonzentriert werden können. Weiterhin sollte ein möglichst großer Aufkonzentrierungsfaktor erreicht werden. Das bedeutet, ein möglichst großes Volumen sollte verarbeitet werden, und auf ein möglichst geringes Volumen eingengt werden können. Durch die Aufkonzentrierung dürfen keine negativen Effekte auf die Detektion zustande kommen. Um eine Risikobewertung zu erlauben, muss die Aufkonzentrierung zudem schnell erfolgen. Zur Automatisierung der Prozesse, ist es weiterhin vorteilhaft, wenn Proben nicht vorkonditioniert werden müssen, beispielsweise durch Einstellung des pH-Wertes.

Da einzelne Prozessschritte in ihrer Effizienz limitiert sind und nur selten Aufkonzentrierungsfaktoren über  $10^4$  erreichen, ist es oft notwendig, mehrere Methoden miteinander zu kombinieren. Dabei werden häufig orthogonale Methoden verwendet, die unterschiedliche Eigenschaften der Pathogene nutzen, um nicht nur die Konzentration zu erhöhen, sondern auch andere Matrixbestandteile abzureichern. Als erster Schritt werden meist Methoden, die sehr große Volumina verarbeiten können, angewendet, wie z.B. Ultrafiltration oder geladene Filtermembranen [74]. Als zweiter Schritt werden oft Methoden verwendet, die die Oberflächenladung von Pathogenen nutzen, wie z.B. Flockung oder Adsorptions-Elutions-Methoden. Je nach Ausgangsvolumen und Pathogenkonzentration sind unterschiedlich viele Schritte notwendig, um ein Volumen im Milliliterbereich zu erreichen. Allerdings sinkt mit der Anzahl der Verfahrensschritte auch die Ausbeute, da nur sehr selten eine Wiederfindung von 100 % pro Teilschritt erreicht werden kann. Eine Übersicht über verschiedene mehrstufige Verfahren, die zur Aufkonzentrierung großer Wasservolumina angewandt wurden, ist in Tabelle 4 am Ende dieses Kapitels gegeben. Im Folgenden sind die der Aufkonzentrierung zu Grunde liegenden Eigenschaften von Bakterien und Viren sowie Aufkonzentrierungsmethoden, die für das Wasserhygiene-Monitoring relevant sind, beschrieben.

## 2.1 Physikochemische Eigenschaften von Bakterien und Viren.

Die Funktion der Aufkonzentrierungsmethoden basiert auf den physikochemischen Eigenschaften von Viren und Mikroorganismen. Dazu zählen vor allem ihre Form und Größe sowie die Beschaffenheit und Eigenschaften der Oberfläche. Diese sind nachfolgend beschrieben.

### 2.1.1 Bakterien

Bakterien sind prokaryotische Lebewesen, die in der Umwelt ubiquitär vorkommen. Sie können in vielen verschiedenen Formen auftreten: Kugelförmige Kokken, zylinder- oder stäbchenförmig, wendelförmig, mit Stielen oder Anhängen sowie fadenförmig. Die meisten Bakterien besitzen eine Länge von 1 bis 5  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser von 0,6 bis 1  $\mu\text{m}$ .

Bakterien sind nach Außen durch eine Zellmembran begrenzt. Man unterscheidet dabei zwischen grampositiven und gramnegativen Membranen. Diese unterscheiden sich in Ihrem Verhalten bei der Gramfärbung mit dem Farbstoff Kristallviolett. Dieser Unterschied resultiert aus ihrem grundlegend verschiedenen Aufbau. Grampositive Bakterien können aufgrund ihres Aufbaus diesen Farbstoff aufnehmen und erscheinen dadurch nach Färbung violett. Gramnegative Bakterien hingegen können diesen Farbstoff nicht aufnehmen. Sie erscheinen nach Gramfärbung rötlich. Zu den gramnegativen Zellen zählen z.B. alle Enterobakterien wie *E. coli*, *Salmonelle*, *Shigella*, *Klebsiella*, und *Enterobacter* sowie *Legionella* und *Pseudomonas*. Zu den grampositiven Bakterien zählen z.B. *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* und *Bacillus*.

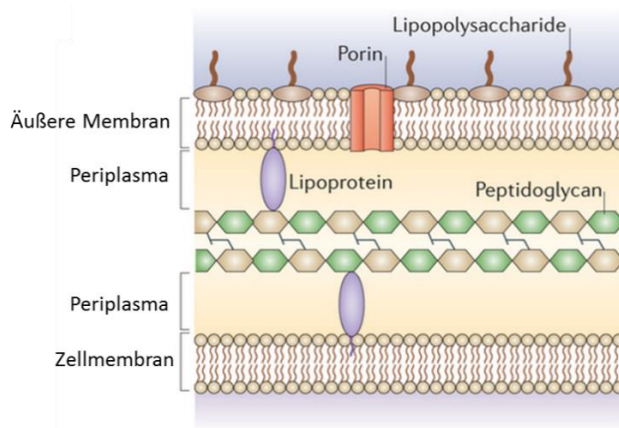
Die Zellhülle grampositiver Bakterien besteht aus einer Cytoplasmamembran und einer dicken Mureinhülle. Diese besteht aus Peptidoglycanen und ist 20 – 80 nm dick. Die Peptidoglycanketten formen eine starke Zellwand durch Quervernetzung, welche durch das Enzym DD-Transpeptidase katalysiert wird. An der Außenseite befinden sich Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren. Diese dienen als Chelatbildner und können ebenfalls zur Anhaftung von Bakterien an Oberflächen oder andere Zellen beitragen. Teichonsäuren sind Ribitol-Phosphat-Polymere oder Glycerol-Phosphat-Polymere, die kovalent in der Peptidoglycanschicht verankert sind. Lipoteichonsäuren sind kovalent an Glycolipide der Zellmembran gebunden. Teichonsäuren tragen zur Festigkeit der Zellwand bei, indem sie Kationen wie Magnesium oder Natrium anziehen [75, 76].

Die Zellhülle gramnegativer Bakterien besteht aus einer Cytoplasmamembran, einer dünnen Mureinschicht und einer weiteren, äußeren Membranhülle. Die Peptidoglycanschicht ist nur ca. 2-3 nm dick. Die äußere Membran beinhaltet Lipopolysaccharide (LPS) und Proteine, wie z.B. Porine, die Poren zum Stoffaustausch in der Membran formen. Die LPS-Schicht kommt nur im äußeren Blatt der Membran vor und besteht aus drei Teilen. Lipid A verankert die LPS-Struktur in der äußeren Membran und bildet den inneren Bereich des LPS. Lipid A wirkt als Endotoxin. Die Kernregion schließt daran an.

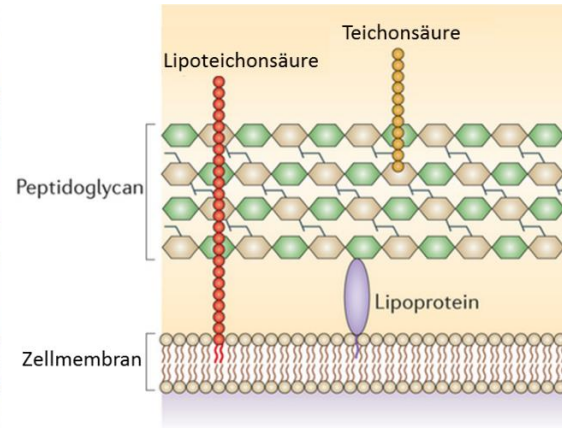


Diese besteht hauptsächlich aus Heptosen und 2-Keto-3-desoxy-D-manno-octansäuren [77]. Weiterhin enthält sie Glucose, Galactose und N-Acetylglucosamin. Den dritten Teil bilden Polysaccharide. Der Polysaccharid-Teil der LPS-Struktur wird auch als O-Antigen bezeichnet. Dieser Bereich ist je nach Bakterienart und -stamm unterschiedlich.

(A) Gramnegative Bakterien



(B) Grampositive Bakterien

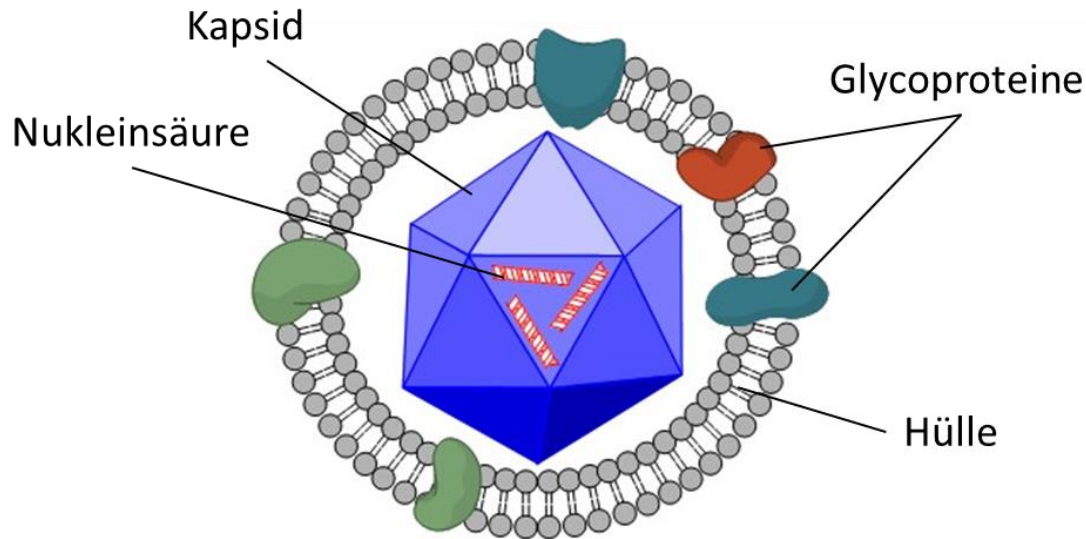


**Abbildung 2: Bakterienzellwand von gramnegativen (A) und grampositiven (B) Bakterien nach Brown et al. [78]**

Aufgrund ihrer komplexen Zellmembran spielen bei der Adsorption von Bakterien aneinander oder an eine stationäre Phase eine Vielzahl von Interaktionen eine Rolle. Diese können durch extrazelluläre Proteine, Polysaccharide, Teichonsäuren oder Lipopolysaccharide zustande kommen. Bakterien können  $\beta$ -D-Glucuronidase nutzen, um Bakterien an einer stationären Phase zu immobilisieren [79-81].

### 2.1.2 Viren

Viren sind Partikel, die aus den Nukleinsäuren DNA oder RNA und einer Proteinhülle bestehen. Die Proteinhülle wird Kapsid genannt und ist bei einigen Arten von Viren mit einer zusätzlichen, von viralen Membranproteinen durchsetzten, Lipiddoppelschicht umgeben. Diese wird als Virushülle bezeichnet. Viren, die über eine Virushülle verfügen, werden als behüllt bezeichnet, Viren ohne Virushülle werden als unbehüllt bezeichnet. Viren sind zwischen 15 und 440 nm groß. Das Kapsid kann unterschiedliche Formen haben, z.B. isometrisch, ikosaederförmig, helikal oder geschlossenförmig.



**Abbildung 3: Behüllter Viruspartikel mit Membranhülle und Kapsid.**

Viren besitzen aufgrund der Proteine nach Außen sowohl positiv als auch negativ geladene Gruppen an der Oberfläche. Diese resultieren aus den funktionellen Gruppen der Aminosäuren der Proteine in der Virushülle behüllter Viren bzw. des Kapsids unbehüllter Viren. Je nach Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur der Proteine ergeben sich andere Verteilungen der geladenen Gruppen. Abhängig von der Anzahl und Verteilung dieser Gruppen und dem pH-Wert der Umgebung, besitzen Viren eine positive oder negative Nettoladung sowie einen isoelektrischen Punkt [82]. Diese Nettoladung kann genutzt werden, um Viren an geladene Materialien zu adsorbieren. So werden in der Wasseraufbereitung z.B. geladene Filter verwendet, um Viren zu entfernen [83, 84]. Auch die VIRADEL Methode basiert auf der Nettoladung der Oberflächen von Viren [85]. Die Flokkulation von Viren in der Trinkwasseraufbereitung basiert ebenfalls auf der Oberflächenladung der Viren [86]. Bei der Chromatofokussierung werden Viren auf Basis ihres IEP aufgereinigt und charakterisiert [87].

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, die die zuvor beschriebenen Eigenschaften der Pathogene nutzen, um diese aufzukonzentrieren.

## 2.2 Ultrafiltration

Unter Filtration versteht man ein Trennverfahren, mit dem Feststoffe aus Flüssigkeiten oder Gasen abgetrennt werden. Dabei wird ein Fluid mit dem abzutrennenden Feststoff durch eine poröse Membran geleitet, wobei je nach Porengröße, Feststoffe zurückgehalten werden. Eine Probe wird somit in Filtrat und Retentat getrennt. Die treibende Kraft ist dabei der Druck. Druckgetriebene Filtrationsverfahren werden abhängig von der Größe der abgetrennten Partikel in (Partikel)Filtration, Mikrofiltration (MF), Ultrafiltration (UF), Nanofiltration (NF) und Umkehrosmose (UO) eingeteilt. Die

Übergänge sind dabei fließend. In Tabelle 2 sind typische Porengrößen und Anwendungen der Filtrationsverfahren aufgelistet. Die Trenngrenzen sind als Molecular Weight Cut Off (MWCO) angegeben. Zur Abtrennung von Viren und Bakterien werden Ultrafiltrationsmembranen mit Porengrößen von ca. 20 nm eingesetzt.

**Tabelle 2: Porengrößen und Anwendungen verschiedener Filtrationsverfahren**

Verfahren	Porengröße	Molekülmasse (MWCO)	Filtrationsdruck	Abtrennung von
Partikelfiltration	> 10 µm			Pollen, Sand
Mikrofiltration	0,1 – 10 µm	> 5000 kDa	< 2 bar	Bakterien, Hefen, Partikel
Ultrafiltration	2 – 100 nm	5 – 5000 kDa	1 – 10 bar	Makromoleküle, Proteine, Viren
Nanofiltration	1-2 nm	0,1 – 5 kDa	3 – 20 bar	Peptide, Zucker
Umkehrosmose	< 1 nm	< 100 Da	10 – 80 bar	Salze, Ionen, kleine organische Moleküle

Zur Auswahl einer geeigneten Filtermembran für eine Stofftrennung müssen mehrere Parameter beachtet werden. Die Membran muss ausreichend Filterfläche bieten, um die angestrebten Probenmengen zu verarbeiten. Weiterhin muss sie widerstandsfähig gegen Fouling und mechanische Belastungen sein. Eine Filtration bei konstantem Druckverlust kann durch die Darcy-Gleichung beschrieben werden.

$$\frac{dV_p}{dt} = Q = \frac{\Delta p}{\eta_F} A \left( \frac{1}{R_m + R_p} \right) \quad \text{Gleichung (2)}$$

Darin ist  $V_p$  das permeierte Volumen,  $t$  die Zeit,  $Q$  der Volumenstrom,  $\Delta p$  die Druckdifferenz zwischen Feed und Filtratseite an der Membran (Transmembrandruck),  $\eta_F$  die dynamische Viskosität des permeierenden Fluids,  $A$  die durchströmte Filterfläche,  $R_m$  der Membranwiderstand und  $R_p$  der Gelpolarisationswiderstand. Während der Filtration sammeln sich Partikel an der Membranoberfläche zu einem Filterkuchen an.  $R_p$  steigt mit zunehmender Schichtdicke des Filterkuchens. Der Trennfaktor einer Membran ist definiert als:

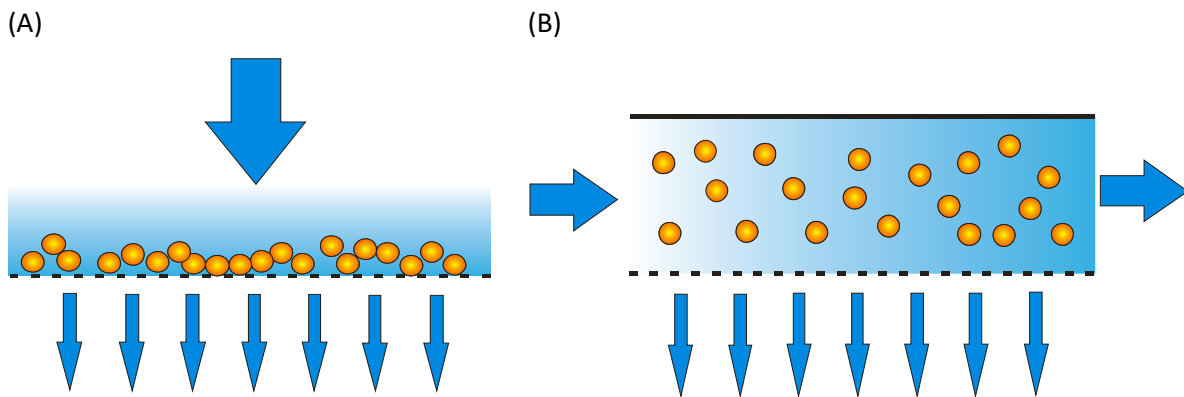
$$T = \frac{C_p}{C_f} \quad \text{Gleichung (3)}$$

Dabei sind  $C_f$  und  $C_p$  die Konzentrationen von Feed und Permeat. Mithilfe des Trennfaktors und der hydraulischen Durchlässigkeit kann die Membranleistung eines Filters eingeschätzt werden. Die hydraulische Durchlässigkeit  $L_p$  ist definiert als:

$$L_p = \frac{J}{\Delta p} \quad \text{Gleichung (4)}$$

$J$  ist der Permeatvolumenstrom pro Membranfläche. Die Darcy-Gleichung zeigt, dass der erreichbare Volumenstrom stark abhängt von der Membranfläche und der Druckdifferenz zwischen Feed und Filtratseite. Daher werden die Arbeitsbereiche von Filtermembranen zur besseren Vergleichbarkeit häufig auch mit dem auf die Membranfläche bezogenen Volumenstrom in  $L/(m^2h)$  oder dem auf Membranflächen und Druckdifferenz bezogenen Volumenstrom in  $L/(m^2 h \text{ bar})$  angegeben. Wie aus Gleichung (1) ebenfalls ersichtlich ist, nimmt bei Filtration durch eine Membran der Volumenstrom mit der Zeit ab, da sich ein Filterkuchen bildet und somit  $R_p$  kontinuierlich steigt. Wie schnell sich ein Filterkuchen bildet hängt stark von der Partikelfracht der Matrix ab. Bei Proben mit geringem Partikelanteil, wie z.B. Trinkwasser, wird nur wenig Filterkuchen gebildet, wohingegen die hohe Partikelfracht von Oberflächen- oder Rohwasser sehr schnell zur Bildung eines Filterkuchens, bis hin zur Verblockung der Membran, führen kann. Wie Gleichung (2) zeigt, kann einer Verblockung durch Erhöhung der Membranfläche oder des Drucks entgegengewirkt werden. Da eine Druckerhöhung jedoch zur Kompression des Filterkuchens führen kann, ist diese Maßnahme nur für Proben mit geringer Partikelfracht sinnvoll. Eine Erhöhung der Membranfläche ist je nach verwendetem Filtermaterial kostenintensiv und kann einen erhöhten apparativen Aufwand bedeuten, da mit der Membranfläche auch die Größe des Filtermoduls wächst und ggf. leistungsstärkere Pumpen notwendig werden, um die Druckdifferenz aufrecht zu erhalten.

Diese Art der Filtration wird auch Dead-End (DE) -Filtration genannt. Um eine Verblockung der Membran zu verhindern, kann eine Filtration alternativ auch im sogenannten Cross-Flow (CF) oder Tangential-Flow (TF) betrieben werden. Dabei wird die Membran tangential angeströmt, sodass Feststoffe im Feed konstant von der Membran fort transportiert werden. Dadurch kann sich keine oder nur eine geringe Deckschicht aufbauen und eine Verblockung der Membran wird verhindert. Der Filtratfluss bleibt konstant (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Prinzip der Dead-End- (A) und Cross-Flow-Filtration (B)**

Ultrafiltrationsmembranen können in unterschiedlichen Geometrien verwendet werden. Für die Dead-End-Filtration werden häufig Flachmembranen verwendet. Diese sind zumeist Scheiben aus porösem Metall oder Keramik oder Folien aus Polymer. Flachmembranen können in Kassettenmodulen kombiniert werden, um die Filterfläche zu erhöhen. Daneben gibt es noch Hohlfasermembranen. Diese eignen sich besonders zur Cross-Flow-Filtration. Sie werden jedoch auch im Dead-End-Betrieb genutzt. Hohlfasermembranen bestehen meist aus im Nassspinnverfahren hergestellten Polymermembranen, aber auch Keramik oder Sintermetall sind möglich. Wickelmodule werden zumeist nur in der Umkehrosmose oder der Nanofiltration verwendet. Polymerfiltermembranen werden meist aus Polyethersulfon (PES), Polysulfon (PS), Polyacrylnitril (PAN), Celluloseacetat (CA), Polyamid, Polyvinylidendifluorid (PVDF), Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Polyethylen (PE) hergestellt. Je nach verwendetem Polymer, können unterschiedliche Membraneigenschaften wie Porengröße oder Hydrophobizität erreicht werden.

Weiterhin kann zwischen symmetrischen und asymmetrischen Membranen unterschieden werden. Symmetrische Membranen verfügen über eine homogene Porenstruktur über die gesamte Membrandicke. Asymmetrische Membranen besitzen hingegen zwei Schichten. Eine dünne und feinporige trennaktive Deckschicht und eine dickere, mechanisch stabile und grobporige Stützschrift. Bei Integral-asymmetrischen Membranen bestehen beide Schichten aus dem gleichen Material, bei Composit-Membranen bestehen die Schichten aus unterschiedlichen Materialien. Bei Ultra- und Nanofiltrationsmembranen handelt es sich häufig um asymmetrische Membranen, die vermehrt zur Cross-Flow-Filtration eingesetzt werden. Bei Umkehrosmosemembranen handelt es sich immer um asymmetrische Membranen. Beim Rückspülen einer Filtermembran wird ein Volumenstrom bzw. Druck an der Rückseite der Membran angelegt, um die Vorderseite von der Deckschicht zu befreien. Bei asymmetrischen Membranen besteht die Rückseite aus der stabilen, grobporigen Stützschrift, weshalb beim Rückspülen deutlich höhere Drücke und Flussraten als bei der Filtration angelegt werden können, ohne eine Beschädigung der Membran zu verursachen.

Ultrafiltrationsmembranen können in verschiedenen Größen hergestellt werden und sind daher sehr vielseitig einsetzbar. Filterflächen von Membranen reichen dabei von mehreren Quadratmetern bei großen Filtermodulen bis zu wenigen Quadratzentimetern in z.B. Zentrifugenfiltern (*centrifugal ultrafiltration*, CeUF). UF-Membranen sind zur Aufkonzentrierung von Mikroorganismen und Viren besonders geeignet, da sie unselektiv alle Organismen abtrennen und keine Probenvorbereitung notwendig ist. Holowecky et al. zeigten 2009 die Anwendung von Ultrafiltration zur simultanen Anreicherung der Bakteriophagen MS2 und ΦX174 sowie *Cryptosporidium parvum*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* und *Francisella tularensis* aus 100-L-Wasserproben [88]. Dabei konnten Wiederfindungen von bis zu 79 % erreicht werden und eine volumetrische Aufkonzentrierung um den Faktor  $6 \times 10^2$ . Gibson und Schwab zeigten 2009 ein zweistufiges Verfahren aus Ultrafiltration und zentrifugaler Ultrafiltration, um Bakterien und Viren aus Trink- und Oberflächenwasser aufzukonzentrieren [89]. Dabei wurde ein volumetrischer Aufkonzentrierungsfaktor von  $2 \times 10^4$  erreicht. In Trinkwasser konnten Wiederfindungen zwischen 31 und 74 % und in Oberflächenwasser zwischen 41 und 64 % erzielt werden. Rutjes et al. konnten 2005 durch ein Verfahren aus zwei Ultrafiltrationsschritten Enteroviren aus 600 L Flusswasser aufkonzentrieren [90]. Dabei wurde eine volumetrische Aufkonzentrierung um den Faktor  $1,5 \times 10^4$  erreicht.

Der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor, der mit einer Filtration erreicht werden kann, errechnet sich aus dem Verhältnis von filtriertem Volumen zum eluierten Volumen. Der Einfluss der Filtrationsparameter auf den volumetrischen Aufkonzentrierungsfaktor lässt sich aus Gleichung (2) ableiten. Je höher der Volumenstrom ist, desto mehr Probe kann pro Zeiteinheit durch den Filter strömen und somit aufkonzentriert werden. Der Volumenstrom ist proportional zur angelegten Druckdifferenz zwischen Feed und Filtratseite sowie der Filterfläche. Jedoch verhält sich der Widerstand, der durch die Deckschicht auf dem Filter aufgebaut wird, umgekehrt proportional zum Volumenstrom. Proben mit höherer Partikelfracht bilden schneller eine Deckschicht auf der Membranoberfläche und senken somit auch den Volumenstrom schneller als Proben mit geringerer Partikelbelastung. Durch die Verwendung größerer Filterflächen lässt sich die Bildung einer Deckschicht verlangsamen und der Volumenstrom erhöhen. Jedoch führen größere Membranflächen und somit auch größere Module zu einer Erhöhung des notwendigen Elutionsvolumens, da die an der größeren Membranoberfläche angereicherten Bakterien und Viren wieder aus dem System gespült werden müssen. Daher ist der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor durch die Beschaffenheit der filtrierten Probe und der damit verbundenen Deckschichtbildung und durch das Totvolumen der verwendeten Filteranlagen limitiert. Es ist deshalb häufig effektiver mehrstufige Verfahren anzuwenden, um die volumetrische Aufkonzentrierung zu erhöhen, als einen einzigen Filtrationsschritt zu vergrößern. Es muss in Betracht gezogen werden, wieviel Probe in einem Zeitintervall filtriert werden kann und in welchem Volumen anschließend eluiert werden kann, um mit

Ultrafiltrationsverfahren einen effektiven Aufkonzentrierungsprozess zu erreichen. Die alleinige Betrachtung des volumetrischen Aufkonzentrierungsfaktors zum Vergleich verschiedener Aufkonzentrierungsverfahren kann irreführend sein, da dieser nicht die verwendete Wassermatrix und die zur Aufkonzentrierung notwendige Zeit berücksichtigt.

Bei der Aufkonzentrierung großer Volumina durch Ultrafiltration werden hauptsächlich Hohlfasermodule eingesetzt [91]. Diese können durch Rückspülungen, Regenerations- und Desinfektionsschritte für mehrere (über 30) Filtrationszyklen verwendet werden [92]. Weiterhin sind sie bereits in der Industrie sowie der Trinkwasseraufbereitung zur Abscheidung von Partikeln etabliert, weshalb Ultrafiltrationsmodule mit großen Filterflächen ( $\geq 50 \text{ m}^2$ ) für sehr hohe Durchsätze von über  $100.000 \text{ m}^3/\text{d}$  kommerziell erhältlich sind [93]. In Form kleinerer Module oder als Zentrifugenfilter werden UF-Membranen auch als sekundäre oder tertiäre Aufkonzentrierungsstufen für kleinere Volumina verwendet.

### 2.3 Adsorptions-/ Elutionsmethoden

Neben der Abtrennung durch Größenausschluss wie bei der Ultrafiltration können auch andere Eigenschaften der Partikeloberfläche genutzt werden, um eine Abtrennung von Partikeln zu erzielen. Bereits 1967 wurde die auf diesem Prinzip basierende Virus-Adsorptions-Elutions-Methode (VIRADEL) vorgestellt [94, 95]. Diese Methode hat mittlerweile eine Vielzahl von Anwendungen mit verschiedenen Viren und Filtermaterialien erfahren. Auch Bakterien konnten bereits durch Adsorptions-/Elutionsmethoden aufkonzentriert werden [96, 97]. Nachfolgend sind zunächst die verschiedenen physikalisch-chemischen Einflussgrößen der Adsorptions-/Elutionsmethoden aufgelistet. In den darauffolgenden Kapiteln sind die einzelnen Methoden im Detail beschrieben.

#### **Van-der-Waals-Kräfte:**

Van-der-Waals-Kräfte sind nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen Atomen und Molekülen. Sie können anziehend oder abstoßend wirken. Sie sind im Vergleich zu kovalenten Bindungen relativ schwach. Die Van-der-Waals-Interaktionsenergie ist abhängig vom Radius eines Partikels ( $R$ ), vom Abstand des Partikels zur Fläche ( $D$ ) oder einem anderen Partikel und der Hamaker-Konstante ( $A$ ).

$$F_{vdw} = -\frac{AR}{6D} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Bei der Abtrennung von Partikeln wie Viren oder Bakterien mittels Adsorptions-/Elutionsmethoden sind die Van-der-Waals-Kräfte zwar vorhanden, spielen im Vergleich zu anderen Kräften aber nur eine untergeordnete Rolle.

### **Ionische Wechselwirkungen**

Ionische Wechselwirkungen kommen durch den Elektronentransfer eines elektropositiven auf ein elektronegatives Element zustande. Durch Elektronenaufnahme bzw. -abgabe entstehen Ladungen, die eine Coulomb-Kraft aufeinander auswirken.

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad \text{Gleichung (6)}$$

Die Kraft  $F$  ist abhängig von den Ladungsmengen  $q$ , dem Abstand der Ladungsmengen  $r$  sowie der elektrischen Feldkonstante  $\epsilon_0$ . Ionische Wechselwirkungen sind relativ stark und über größere Entfernungen wirksam. Diese Wechselwirkungen können zu Separation von Molekülen oder Partikeln genutzt werden. Moleküle oder Partikel, die ionisierbare Gruppen an der Oberfläche tragen, besitzen eine Nettoladung. Dadurch können die geladenen Gruppen innerhalb einer mobilen Phase mit gegensätzlich geladenen stationären Phasen interagieren. Dieses Prinzip zur Separation ist weit verbreitet, z.B. in der Ionenaustauschchromatographie oder der Abtrennung von Partikeln durch geladene Filtermembranen.

Die Ladung eines Partikels hängt von den ionisierbaren Gruppen an der Oberfläche sowie deren Dichte und Verteilung ab. Dadurch ergibt sich für die Partikel eine Nettoladung, welche stark vom pH-Wert abhängig ist. Dieser beeinflusst die Dissoziation der Oberflächengruppen, wodurch diese protoniert oder deprotoniert werden können. Durch die so entstandene Oberflächenladung werden Gegenionen aus der Umgebung angezogen. Je nach pH-Wert der umgebenden Matrix tragen Partikel eine positive, negative oder keine Nettoladung. Der pH-Wert, bei dem keine Nettoladung vorhanden ist, wird als isoelektrischer Punkt (IEP) bezeichnet. Dieser wird häufig herangezogen, um das Adsorptions- und Elutionsverhalten von Partikeln und Molekülen vorherzusagen. So sollte ein adsorbierter Partikel eluiert werden, wenn der pH-Wert der Umgebung den isoelektrischen Punkt des Partikels überquert, z.B. durch Einsatz eines Elutionspuffers. In der Praxis ist dies jedoch nicht immer der Fall, da das Verhalten auch von der Verteilung der Ladungen und deren Dichte auf der Partikeloberfläche abhängt [98].

Zur gezielten Nutzung ionischer Wechselwirkungen werden stationäre Phasen mit geladenen funktionellen Gruppen verwendet. Dabei unterscheidet man zwischen starken und schwachen Ionenaustauscherguppen. Die Bezeichnung stark oder schwach bezieht sich darauf, wie sehr sich die



Ionisierung der Gruppe mit dem pH-Wert ändert und gibt keine Auskunft darüber, wie stark Analyten gebunden werden. Starke Ionenaustauschergruppen behalten ihre Ladung über einen breiten pH-Bereich. Es werden keine Protonen aufgenommen oder abgegeben, sie bleiben also konstant gleich geladen. Bei schwachen Ionenaustauschern ist das nicht der Fall. Je nach eingesetzter funktioneller Gruppe können sich Adsorptions- und Elutionsverhalten von Analyten ändern [99].

Zu den am häufigsten verwendeten Ionenaustauschergruppen gehören Diethylaminoethyl-, Diethylaminopropyl- und quaternäre Ammoniumgruppen als Anionenaustauscher sowie Sulfopropyl-, Methylsulfonat- und Carboxymethylgruppen als Kationenaustauscher. Starke Ionenaustauscher besitzen den Vorteil, dass eine Adsorption auch bei hohen oder niedrigen pH-Werten stattfinden kann, da sich ihre Ladungseigenschaften nicht mit dem pH-Wert ändern. Daher sind sie vielseitig einsetzbar. Weiterhin sind sie auch gut geeignet, für Analyten mit besonders hohem oder niedrigem isoelektrischen Punkt. Die Anwendung von Ionenaustauschern ist besonders in der Chromatographie zur Aufreinigung von Proteinen weit verbreitet. Da die meisten Proteine isoelektrische Punkte im neutralen pH-Bereich besitzen, werden dabei sowohl starke als auch schwache Ionenaustauschergruppen eingesetzt. Da Viren von einer Proteinhülle umgeben sind, lässt sich dieses Grundprinzip auch auf sie anwenden. Dabei finden ionische Wechselwirkungen zwischen den Hüllproteinen der Viren und den Ionenaustauschergruppen statt. Allerdings sind viele Viren bereits zu groß für kommerzielle partikuläre Chromatographiesäulen. Auch Bakterien besitzen geladene Gruppen und Proteine an ihrer Oberfläche. Daher können auch sie ionische Wechselwirkungen eingehen. Mit 1-5  $\mu\text{m}$  Länge sind auch Bakterien deutlich zu groß für partikuläre Säulen. Deshalb ist für Bakterien und Viren die Anwendung von geladenen Filtermembranen weit verbreitet. Diese erhalten ihre Ladung, indem ein Filtermaterial mit einem Polymer wie beispielsweise Polyethylenimin überzogen wird. Es werden Polymere eingesetzt, die selbst über geladene Gruppen verfügen. Alternativ werden Polymere verwendet, die über Epoxygruppen verfügen, die dann in einem zweiten Schritt, z.B. mit aliphatischen Polyaminen, funktionalisiert werden. Auch auf geladenen Filtermembranen werden die oben genannten Ionenaustauschergruppen eingesetzt. Die Anwendung von solchen Filtern zur Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien aus Wasser wird in den Kapiteln 2.3.1 und 2.3.2 ausführlich beschrieben.

Neben partikulären Säulen können auch monolithische Säulen zur Ionenaustauschchromatographie verwendet werden. Diese können mit deutlich größere Poren hergestellt werden, sodass sie auch zur Aufreinigung oder Aufkonzentrierung von Viren oder sogar Bakterien eingesetzt werden können. Die Anwendung von ionischen Wechselwirkungen zur Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien mit monolithischen Säulen wird im Kapitel 2.4.4 näher beschrieben.

### **Wasserstoffbrücken**

Wasserstoffbrücken sind Wechselwirkungen zwischen kovalent an elektronegative Atome gebundenen Wasserstoffatomen und freien Elektronenpaaren. Sie sind verantwortlich für spezielle Eigenschaften vieler Biomoleküle, wie z.B. die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen, die Basenpaarung in DNA-Doppelsträngen oder die Bindungsaffinität von Enzym-Substrat-Komplexen. Proteine, wie sie an der Oberfläche von Viren oder Bakterien vorkommen, verfügen häufig über freie Elektronenpaare und können daher Wasserstoffbrücken mit Wasserstoffatomen bilden. Die in Adsorptions-/Elutionsmethoden verwendeten stationären Phasen bestehen häufig aus Polymeren, die über OH-Gruppen an der Oberfläche verfügen. Daher kann es zur Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Filtermedium und Viren und Bakterien kommen, die das Adsorptionsverhalten beeinflussen.

### **Hydrophobe Wechselwirkungen**

Im Gegensatz zu ionischen Wechselwirkungen basieren hydrophobe Wechselwirkungen nicht auf der direkten Interaktion zweier hydrophober Moleküle, sondern auf dem Verhalten der Wassermoleküle in der Umgebung. In wässriger Umgebung formen die Wassermoleküle eine geordnete Struktur um hydrophobe Flächen, da sie keine Wasserstoffbrücken in deren Richtung bilden können. Um dennoch ein Maximum an Wasserstoffbrücken zu bilden, richten sie sich gleichmäßig aus. Die Minimierung dieser geordneten Wasserhülle führt zu einer geringeren Anzahl geordneter Wassermoleküle, wodurch die Entropie steigt. Daher lagern sich hydrophobe Flächen in wässriger Umgebung zusammen, um einen thermodynamisch günstigeren Zustand zu erreichen, in dem die Grenzflächen mit geordneten Wassermolekülen minimiert werden. Dieser Effekt wird z.B. in der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) oder der Umkehrphasenchromatographie genutzt. In ersten Studien wurden bereits Verfahren zur Anwendung von HIC zur Aufkonzentrierung oder Aufreinigung von Viren untersucht. Wolff et al. konnten 2010 das Modified-Vaccinia-Ankara-Virus mittels einer Kombination aus HIC und einer Zellulosemembran aufzureinigen [100]. Dabei wurden Wiederfindungen von 55 bis 76 % erreicht. Li et al. kombinierten 2015 Ultrafiltration mit HIC, um das Maul- und Klauenseuche-Virus mit einer Wiederfindung von 75 % anzureichern und aufzureinigen [101]. Dabei kamen jeweils kommerzielle Sepharose-Säulen mit Partikelgrößen zwischen 30 und 90 µm zum Einsatz, welche Buthyl- oder Phenyl-Liganden zur Adsorption von Viren nutzten.

## Affinitätsliganden

Bei der Separation mittels Affinitätsliganden wird anstelle von unspezifischen Interaktionen eine spezifische Kopplung eines Analyten mit einem speziellen Liganden, der an der stationären Phase immobilisiert wurde, genutzt. Als Liganden werden dabei meist Antikörper, Antigene oder Lektine verwendet. Aber auch Nukleinsäuren, enzymatische Kofaktoren, Streptavidin oder Metallionenchelate können als Affinitätsliganden genutzt werden (siehe Tabelle 3). Letztere werden in der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) zur gezielten Aufreinigung von Proteinen mit Bindungsaffinität für Metallionen eingesetzt. Diese Eigenschaft wird häufig gezielt in rekombinanten Proteinen genutzt, um deren Aufreinigung zu erleichtern [102]. Die Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Antikörpern mit Protein A, Protein G oder Protein L als Liganden ist eine andere weit verbreitete Anwendung von Affinitätsliganden. Bei der Anwendung von Antikörpern als Ligand spricht man von Immunoaffinitätschromatographie.

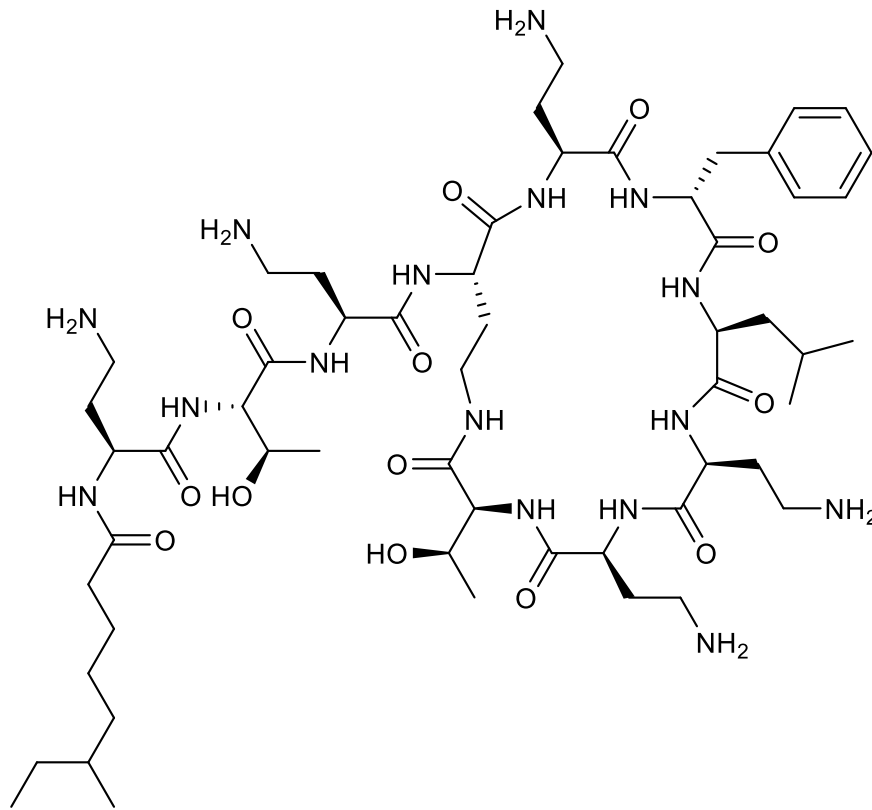
**Tabelle 3: Häufig genutzte Affinitätsinteraktionen [79] (modifiziert).**

Ligand	Zielmolekül
Enzyme	Substrat-Analoga, Inhibitoren, Kofaktoren
Antikörper	Antigen, Viren, Zellen, Protein A, Protein G, Protein L
Nukleinsäuren	Komplementäre Basensequenz, Histone, nukleinsäurebindende Proteine
Hormone, Vitamine	Rezeptoren, Trägerproteine
Lectin	Polysaccharide, Glycoproteine, Zellen, Zell-Oberflächenrezeptoren
Glutathione	Glutathion-S-Transferasen
Streptavidin, Avidin	Biotin, Proteine mit Streptavidin-peptid
Metallionen	Proteine mit Polyhistidin-Tag, Proteine mit Histidin, Cystein oder Tryptophan an der Oberfläche

Die Interaktion von Ligand und Analyt kann aus elektrostatischen oder hydrophoben Wechselwirkungen sowie Van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrücken resultieren. Die Elution eines adsorbierten Analyten kann spezifisch durch einen kompetitiven Liganden oder unspezifisch durch eine Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke oder der Polarität verursacht werden. In Tabelle 3 sind häufig genutzte Affinitätsinteraktionen aufgelistet.

Ein weiterer Affinitätsligand ist das Antibiotikum Polymyxin B (PmB), welches aus dem Bakterium *Bacillus polymyxa* isoliert werden kann [103, 104]. PmB kann zur Entfernung von Endotoxinen aus Proben genutzt werden. Dazu sind kommerzielle Gele unter den Handelsnamen Detoxi-Gel von Thermo Scientific oder Separopore von bioWorld erhältlich. PmB interagiert dabei elektrostatisch mit

der Lipid A Komponente der LPS-Struktur [105]. Aufgrund seiner Struktur aus einem positiv geladenen zyklischen Ring und einem linearen Teil (siehe Abbildung 5) kann PmB auch als unspezifische funktionelle Gruppe zur Anionenaustauschchromatographie verwendet werden [106]. Am IWC wurde PmB bereits als Affinitätsligand zur Aufkonzentrierung von *E. coli* eingesetzt [107].



**Abbildung 5: Strukturformel des Antibiotikums Polymyxin B [108].**

### 2.3.1 Elektronegative Filter

Die ersten negativ geladenen Membranfilter wurden schon 1967 zur Aufkonzentrierung von Viren aus Zellextrakten und Abwasser verwendet. [85, 109, 110] Da die meisten Bakterien und Viren bei neutralem pH-Wert negativ geladen sind, müssen die Proben zur Aufkonzentrierung mit negativ geladenen Filtern zunächst angesäuert werden, um den IEP der Viren und Bakterien zu überschreiten. Die dann positiv geladenen Viren oder Bakterien adsorbieren an die Filtermembran und können durch anschließende Erhöhung des pH-Wertes, zumeist in Kombination mit einem proteinhaltigen Puffer, wieder eluiert werden. Diese Technik wurde bald für die Aufkonzentrierung von Viren aus Wasserproben verwendet [111, 112]. Dabei wurden 1900 L Wasser auf pH 3,5 eingestellt und anschließend Polioviren zugefügt. Es konnten über 90 % der zugesetzten Viren adsorbiert werden. Die Wiederfindungen im Eluat lagen zwischen 40 und 67 %.

Als negativ geladene Membranen werden meist Cellulosenitrat-HA-Filter von Millipore verwendet. Cellulosenitrat wird durch Behandlung von Cellulose mit Salpetersäure oder einer Mischung von Salpetersäure und Schwefelsäure hergestellt. Dabei werden die Glucosemoleküle der Cellulose mit jeweils drei Nitratgruppen verestert, was zur negativen Ladung bei neutralem pH-Wert führt. Die Cellulosenitrat-HA-Filter von Millipore besitzen eine Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$ . Sie erlauben die Filtration sehr großer Probevolumina. So konnten auch beispielsweise Noroviren aus Proben von 100 – 532 L Trinkwasser mit HA-Filtern aufkonzentriert werden [113]. Durch eine Beschichtung der Filter mit Aluminium- oder Magnesiumionen konnte die Adsorption sogar noch verbessert werden, da die zusätzlichen Ionen die Interaktion zwischen Filter und Viren verstärken [114].

Die Vorteile von elektronegativen Filtern liegen in den hohen Wiederfindungen. Sie wurden bereits mit einem breiten Spektrum an Viren getestet und konnten gute Ergebnisse erzielen. Sie sind kostengünstig und können relativ große Volumina verarbeiten, bevor Verblockung auftritt. Der Hauptnachteil dieser Filter ist, dass aufgrund der negativen Ladung eine Vorkonditionierung der Probe vor der Filtration notwendig ist, um eine Adsorption von Viren und Bakterien zu erlauben [74]. Dadurch wird insbesondere die Filtration sehr großer Volumina aufwändig.

### 2.3.2 Elektropositive Filter

Im Gegensatz zu negativ geladenen Filtern, müssen Proben vor der Filtration mit elektropositiven Filtern nicht vorbehandelt werden. Da die meisten Viren und Bakterien in pH-neutraler Umgebung eine negative Nettoladung tragen, adsorbieren sie ohne eine Änderung des pH-Wertes an eine positiv geladene Membran. Solche Membranen sind auf dem Markt weit verbreitet. Dazu zählen die 1MDS-Filter von Cuno, NanoCeram Filter von Argonide, oder Virocap von Scientific Methods Inc.

1MDS-Filter werden schon lange für die Aufkonzentration bzw. Abtrennung von Viren aus Trinkwasser und Umweltproben eingesetzt. Dabei konnten ähnliche Wiederfindungen wie bei elektronegativen Filtern erreicht werden [115]. Sie bestehen aus einer oberflächenmodifizierten Glasfaser-Cellulose Membran mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$ . In den Richtlinien der US Environmental Protection Agency (USEPA) wird diese Membran zur Abreicherung von Enteroviren aus Trinkwasser empfohlen [116]. Polaczyk et al. zeigten die Verwendung von 1MDS-Filtern zur simultanen Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren [117]. Dabei konnten die Bakteriophagen MS2 und  $\Phi\text{X174}$  mit  $32 \pm 13 \%$  und  $37 \pm 26 \%$  wiedergefunden werden. *Salmonella enterica*, *Bacillus globigii* Endosporen sowie *Cryptosporidium parvum* Oozysten wurden mit jeweils  $18 \pm 9,9$ ,  $21 \pm 1,9$  und  $8,7 \%$  Wiederfindung aus 20 L aufkonzentriert. Um die hohen Kosten dieser Membran zu reduzieren, wurde gezeigt, dass sie gewaschen und wiederverwendet werden können [118]. Als kostengünstigere Alternative können

NanoCeram- oder Virocap-Filter verwendet werden. Diese Filter bestehen aus einer Mischung aus Mikroglassfasern und Cellulose mit Nanoaluminiumfasern. Sie sind mit Porengrößen von 1 bis 30  $\mu\text{m}$  erhältlich.

Sowohl mit 1MDS- als auch mit NanoCeram-Filtern, konnte bereits gezeigt werden, dass die Aufkonzentrierung von Viren auch aus sehr großen Volumina möglich ist. Parshikonar et al. konnten mit 1MDS-Filtern Noroviren aus 2010 L Brunnenwasser aufkonzentrieren und mittels PCR nachweisen [119]. Durch eine Kombination mit Celite-Filtern als zweiter Stufe und zentrifugaler Ultrafiltration als dritter Stufe konnte eine Aufkonzentrierung um den Faktor  $6 \times 10^4$  erreicht werden. Mittels einer anschließenden qPCR wurden die Noroviren als Teil einer fäkalen Verunreinigung eines Trinkwasserbrunnens identifiziert. Der Einsatz dieses Verbundverfahrens ermöglichte, dass der Eintrag von Abwasser in den Trinkwasserbrunnen als Ursache für den Ausbruch von Gastroenteritis bei 84 Personen identifiziert werden konnte.

Borchardt et al. nutzten 1MDS-Filter, um 1500-L-Proben aus Trinkwasserbrunnen und Oberflächenwasser aufzukonzentrieren [120]. Durch eine Kombination mit saurer und organischer Flockung wurde ein Aufkonzentrierungsfaktor von  $10^5$  erreicht. Die Detektion erfolgte mittels qPCR. Es wurden Enteroviren, Rotaviren, Hepatitis A-Viren und Noroviren, sowohl in Teilen der untersuchten Trinkwasserbrunnen, als auch im Flusswasser gefunden. Dadurch konnte eine Kontamination des Trinkwassers durch den Eintrag von Oberflächenwasser nachgewiesen werden.

NanoCeram-Filter wurden von der US Environmental Protection Agency genutzt, um murine Noroviren und Polioviren aus 1500 – 1900 L verschiedenen Wassermatrizes aufzukonzentrieren [121]. Die mittels qPCR bestimmten Wiederfindungen für Polioviren und murine Noroviren lagen bei 20 % und 30 % für Grundwasser und bei 6 % und 10 % für Oberflächenwasser. Durch eine Kombination mit saurer Flockung als zweiter Aufkonzentrierungsstufe konnte damit ein volumetrischer Aufkonzentrierungsfaktor von  $5 \times 10^4$  erreicht werden.

Ein Nachteil bei der Anwendung von elektropositiven Filtern sind die hohen Kosten [74]. Diese liegen für 1MDS-Filter bei 200 – 300 US-Dollar pro Filter. Diese Kosten limitieren die Einsatzmöglichkeiten in Routine-Anwendungen wie dem kontinuierlichen Hygiene-Monitoring. NanoCeram-Filter sind mit ca. 40 US-Dollar pro Filter deutlich günstiger. Allerdings sind diese Filter erst kürzer auf dem Markt erhältlich, weshalb es bislang nur wenige Daten über deren tatsächliche Effektivität zur Aufkonzentrierung von Pathogenen gibt.

### 2.3.3 Glaswolle

Glaswolle-Filtration ist eine kostengünstige Alternative zu geladenen Filtermembranen. Die Aufkonzentrierung von Viren aus großen Wasservolumina mittels Glaswolle erfuhr wachsende Beliebtheit in den 1990er Jahren. Dabei wird Glaswolle in eine Säule gepackt und anschließend mit einer Wasserquelle verbunden. Die Elution erfolgt meist mit 3 % Rinderextraktbuffer. Damit konnten z.B. Wiederfindungen von 72 – 75 % für Polioviren aus Trink- und Meerwasser erzielt werden [122]. Lambertini et al. erreichten eine Wiederfindung von 98 % für Polioviren, 28 % für Adenovirus 41 und 30 % für Norovirus GII aus Trinkwasser. Dabei wurden sehr große Volumina von 1500 L untersucht und ein volumetrischer Aufkonzentrierungsfaktor von  $10^5$  erreicht [123]. Der Hauptvorteil der Glaswolle gegenüber anderen Verfahren sind die Einfachheit der Methode und die sehr geringen Kosten. Weiterhin ist keine Probenvorbereitung notwendig, da Glaswolle über eine elektropositive Ladung verfügt [74]. Da es jedoch keine kommerziellen Glaswollemodule gibt und die Säulen daher händisch gepackt werden müssen, kann es zu hohen Varianzen zwischen verschiedenen Laboren kommen.

### 2.3.4 Flockung

Als Flockung bezeichnet man ein Verfahren, bei dem suspendierte oder kolloidale Fremdbestandteile im Wasser koaguliert werden, um anschließend durch Filtration oder Sedimentation abgetrennt zu werden. Dieses Verfahren kann dazu genutzt werden, um Mikroorganismen und Viren über eine Adsorption an Flocken aus z.B. Aluminiumhydroxid [110], Eisenoxid [124], Magermilchpulver [125, 126], Casein [127], Ammoniumsulfat oder Rinderextrakt [128] zu binden. Dabei wird zunächst über Absenkung des pH-Wertes, Zugabe von organischen Lösemitteln oder Aussalzen eine Flockung erzeugt. Mikroorganismen und Viren adsorbieren dabei an die gebildeten Flocken. Diese können durch Zentrifugation in einem Pellet abgetrennt werden. Das Pellet kann in einem kleinen Volumen resuspendiert werden. Häufig wird die Flockung als zweiter Aufkonzentrierungsschritt nach einer Filtration eingesetzt [120, 121, 123, 129], da z.B. Proben, die durch geladene Filter aufkonzentriert wurden, mit proteinhaltigem Puffer eluiert werden. Diese Proteine können zur Flockung genutzt werden [130, 131]. Flockung wurde aber auch schon als primärer Anreicherungsschritt angewandt. Hurwitz et al. nutzten 2013 eine Flockung mit Eisenchlorid, um Viren und Bakterien aus 20 L Meerwasser aufzukonzentrieren [132]. Im Vergleich zu UF-Methoden konnten dabei höhere Wiederfindungen erzielt werden, jedoch war die Flockung mit 25 h deutlich langsamer als eine Filtration, die innerhalb von 6 h durchgeführt wurde. Calgua et al. konnten durch eine Flockung mit Magermilchpulver Adenoviren, Noroviren, Rotaviren und Polyomaviren aus 10-L-Flusswasserproben aufkonzentrieren und anschließend mittels qPCR detektieren [126]. Die Wiederfindungen lagen dabei

in einem Bereich zwischen 20 und 95 %. Flockungsverfahren stellen eine kostengünstige Alternative zu Filtrationsverfahren dar, allerdings sind sie deutlich langsamer.

### 2.3.5 Affinitätsbasierte Separationsverfahren

Neben den unspezifischen Adsorptionsverfahren zur Aufkonzentrierung oder Separation können auch spezifische Wechselwirkungen genutzt werden. Dabei werden Antikörper als Affinitätsliganden verwendet. Die beiden häufigsten Anwendungen von Antikörpern dazu sind die Immunofiltration und die immunomagnetische Separation (IMS).

Bei der Immunofiltration werden Antikörper in den Poren einer Filtermembran immobilisiert [133]. Bei der immunomagnetischen Separation werden Antikörper an magnetische Nano- oder Mikropartikel gebunden [134]. Im Anschluss werden die Partikel durch das Anlegen eines magnetischen Feldes von der Matrix abgetrennt. Durch den Einsatz paramagnetischer oder superparamagnetischer Partikel, die ihre magnetischen Eigenschaften nur in Anwesenheit des magnetischen Feldes besitzen, kann eine Elution erfolgen, indem das magnetische Feld wieder entfernt wird [135].

Durch den Einsatz von Antikörpern als Affinitätsliganden können Bakterien oder Viren selektiv adsorbiert werden. Dadurch werden Störstoffe und Inhibitoren, die in der Matrix vorhanden sind und anschließende Detektionsmethoden wie qPCR beeinflussen können, entfernt [136]. Um eine effektive Aufkonzentrierung durch IMS zu gewährleisten, sind allerdings relativ hohe Konzentrationen der Analyten notwendig. Daher ist IMS hauptsächlich als zweite oder dritte Aufkonzentrierungsstufe geeignet. Weiterhin ist durch anschließende Waschschriffe und den Einfluss von Matrixkomponenten auf die Funktion der Antikörper und Antigene ein Ausbeuteverlust möglich [135]. Die Anwendung immunologischer Aufkonzentrierungsmethoden ist weiterhin, aufgrund der sehr hohen Kosten von Antikörpern, auf sehr kleine Probenvolumina im Milliliterbereich beschränkt [137, 138]. Die damit erreichten volumetrischen Aufkonzentrierungsfaktoren liegen im Bereich von ca. 30. Um die Anwendung im größeren Maßstab zu ermöglichen, sind Antikörper, die in größeren Mengen deutlich kostengünstiger hergestellt werden, notwendig. Die Produktion von monoklonalen Antikörpern in Pflanzenzellen (sog. Plantibodies) könnte eine Anwendung immunologischer Aufkonzentrierungsmethoden in der Zukunft auch für große Probenvolumina erlauben [139].

Am IWC wurden bereits monolithische Säulen mit Antikörpern als Affinitätsliganden funktionalisiert. Damit konnte *Staphylococcus aureus* erfolgreich aus 1-L-Proben auf 1 mL aufkonzentriert werden. Die Nachweisgrenze für eine anschließende Messung mittels Durchflusszytometrie konnte damit auf 42 *S. aureus* / mL gesenkt werden [81].



**Tabelle 4: Übersicht über mehrstufige Verfahren zur Aufkonzentrierung großer Wasservolumina**

1. Stufe	2. Stufe	Wassermatrix	Volumen	Elutionsvolumen	Vol. Faktor	Organismen	Analyse	Wiederfindung	Literatur
1MDS-Filter	Celite	Brunnen	2010 L	80 mL	$\sim 10^4$	Norovirus	PCR	k.A.	[119]
Cellulosemembran	Membranfilter	Trinkwasser	1900 L	5 mL	$\sim 10^5$	Poliovirus	Kultur	92%	[140]
NanoCeram-Filter	Flockung	Grundwasser	1500 - 1900 L	30 mL	$\sim 10^4$	Poliovirus Norovirus	PCR Kultur	20% (PCR) 30% (PCR)	[121]
Glaswolle	Flockung	Brunnen	1500 L	2 mL	$\sim 10^5$	Poliovirus Adenovirus	PCR	56% 28%	[141]
1MDS-Filter	Flockung (pH oder PEG)	Trinkwasser Oberflächenwasser Grundwasser	1500 L	30 mL (pH) 3 – 6 mL (PEG)	$\sim 10^5$	Enterovirus Hepatitis A Virus Rotavirus Norovirus	PCR	k.A.	[120]
Membranfilter	Flockung	Trinkwasser	1000 L	20 – 80 mL	$\sim 10^4$	Poliovirus	Kultur	70%	[142]
UF (negativ geladen)	UF	Oberflächenwasser	600 L	40 mL	$\sim 10^3 - 10^4$	Enterovirus	PCR	k.A.	[90]
HA Filter	2. HA Filter 3. CeUF	Trinkwasser	100 – 532 L	5 mL (HA) 0,9 mL (CeUF)	$\sim 10^4 - 10^5$	Norovirus	PCR	k.A.	[113]
Fiberglas	Flockung	Trinkwasser Meerwasser	19 – 1000 L	1,6 L	$\sim 10^2$	Poliovirus	Kultur	50%	[129]
UF	UF	Oberflächenwasser	100 L	50 – 100 mL	$\sim 10^3$	Humanes Enterovirus Humanes Adenovirus	PCR	k.A.	[143]
NanoCeram	Celite	Reinstwasser	100 L	40 mL	$\sim 10^3$	Poliovirus	Kultur	84%	[144]
1MDS-Filter	Celite	Trinkwasser	100 L	40 mL	$\sim 10^3$	Poliovirus	Kultur	36%	[144]
UF	-	Oberflächenwasser						67%	
UF	-	Trinkwasser	100 L	150 mL	$\sim 10^2$	Bakteriophage MS2 Bakteriophage PhiX174 <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Francisella tularensis</i>	Kultur	64% 68% 47% 72% 79% 40%	[88]

## Theoretische Grundlagen

---

1. Stufe	2. Stufe	Wassermatrix	Volumen	Elutions- volumen	Vol. Faktor	Organismen	Analyse	Wiederfindung	Literatur
UF	CeUF	Trinkwasser (TW) Oberflächenwasser (OFW)	100 L	5 ml	$\sim 10^4$	Norovirus Adenovirus Polyomavirus Enterovirus Hepatitis G Virus  <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Clostridium perfringens</i> Bakteriophage MS2 Bakteriophage PRD1 Murines Norovirus Poliovirus	PCR          Kultur	TW/OFW 68,3%/51,2% 56,4%/52,9% 31,1%/64,1% 48,2%/58,2% 42,6%/57,4% 74,0%/41,5% 40,2%/-	[89]
Flockung	Filtration	Meerwasser	20 L	20 mL	$\sim 10^3$	T4-Phage T7-Phage <i>Candidatus Pelagibacter</i> <i>Synechococcus</i> Prasinovirus <i>Roseobacter</i> <i>Daphnia</i> Chlorovirus <i>Bradyrhizobium</i> <i>Ruegeria</i>	PCR	k.A.	[132]

---

## 2.4 Monolithen

Die Anwendung von Monolithen als stationäre Phase in der Bioseparation wird bereits seit den späten 1960ern erforscht [145]. In den späten 1980ern wurden sie als Trennphasen in der Chromatographie eingeführt. Seitdem wurden sie zur Alternative für partikuläre Säulen weiterentwickelt [146]. Im Gegensatz zu herkömmlichen gepackten Chromatographiesäulen bestehen sie aus einem blockförmigen makroporösen Material. Sie zeichnen sich durch eine hohe Porosität und ein zusammenhängendes Porennetzwerk aus [147]. Da je nach Material die Porengröße und das in sich verbundene poröse Netzwerk genau angepasst und kontrolliert werden können, sind damit hochgradig optimierte Prozesse möglich. Die stationären Phasen bieten nur sehr geringen Gegendruck zur mobilen Phase und ermöglichen dadurch sehr hohe Flussraten. Die großen Porendurchmesser erlauben auch großen Zielmolekülen einen einfachen Zugang zu den Bindestellen an der Porenoberfläche [148]. Daher besitzen Monolithen für Makromoleküle eine höhere Kapazität als gepackte Säulen, obwohl sie über eine kleinere innere Oberfläche verfügen [149].

Partikuläre Säulen bestehen aus mikroporösen gepackten Partikeln. Die Bindestellen befinden sich im Inneren der Poren. Um zu diesen zu gelangen, muss der Analyt zunächst durch die Grenzschicht in die Poren diffundieren. Der Massentransfer ist somit diffusionsbestimmt. Dadurch wird der Massentransport mit zunehmendem Molekulargewicht langsamer. Dies führt zu Peakverbreiterung. In Monolithen befinden sich die Bindestellen an den Porenoberflächen des zusammenhängenden kontinuierlichen Porennetzwerks. Selbst große Analyten wie Proteine, Viren oder bei sehr großen Porendurchmessern sogar Bakterien können ungehindert durch die Poren fließen. Da keine Porendiffusion stattfindet, sondern ausschließlich Filmdiffusion, ist der Massentransport nahezu ausschließlich konvektionsgetrieben [149, 150].

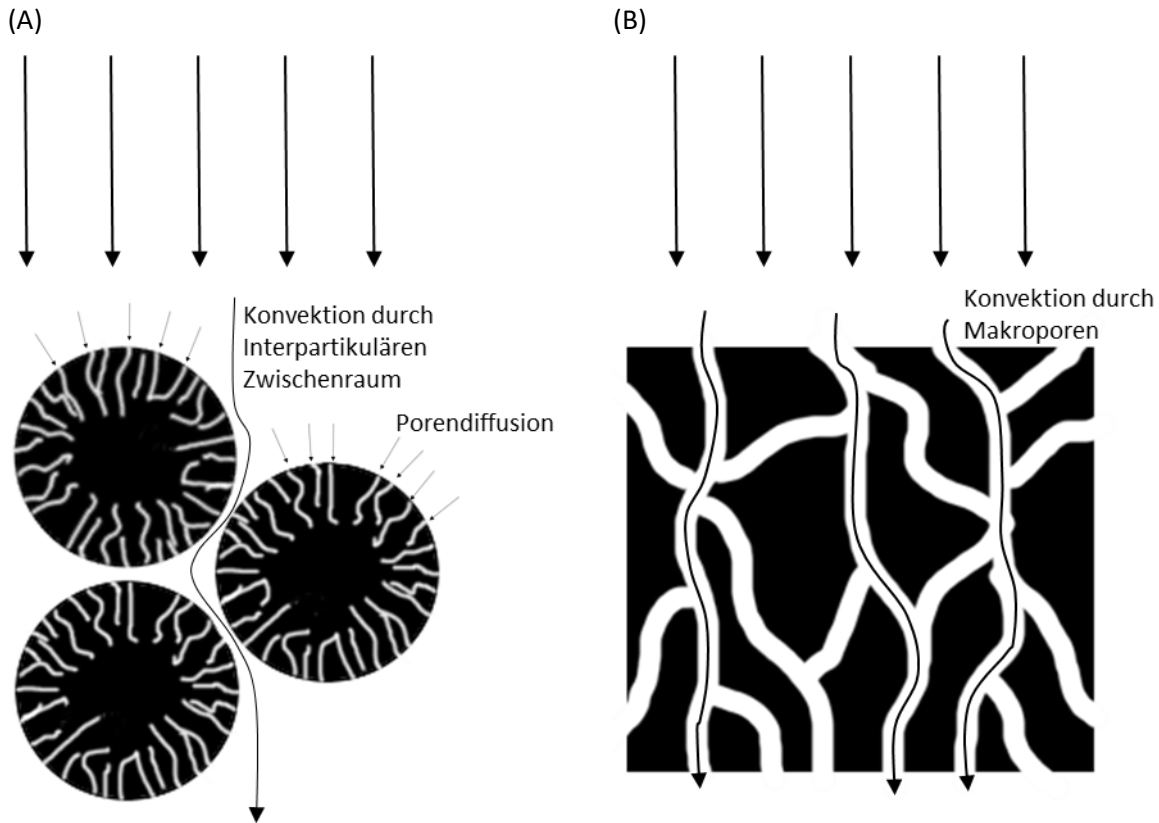


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Massentransports in partikulären Säulen (A) und in Monolithen (B).

### 2.4.1 Massentransport in Monolithen

Die Trennleistung einer Chromatographiesäule wird danach beurteilt, wie gut sie Stoffe voneinander trennen kann. Bei guter Trennleistung werden zwei Stoffe in zwei separate Peaks getrennt. Die Trennleistung kann über die van-Deemter-Gleichung beschrieben werden [151]. Dabei wird die Höhe eines theoretischen Bodens (HETP, height equivalent to a theoretical plate) wie folgt berechnet:

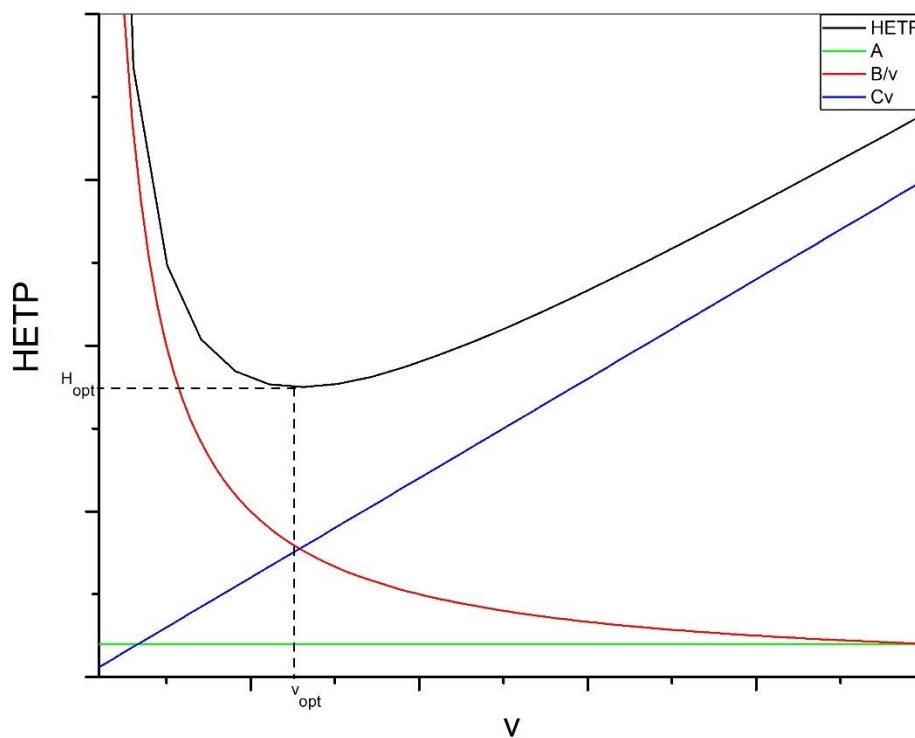
$$H = A + \frac{B}{v} + Cv \quad \text{Gleichung (7)}$$

Dabei ist H die Bodenhöhe, v die Flussgeschwindigkeit und die Parameter A, B und C die strömungsmechanischen Einflussgrößen. Je kleiner H ist, desto größer ist die Trennleistung.

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Gleichung (8)}$$

L ist die Säulenlänge und N die Anzahl der Trennstufen. A beschreibt die Eddy-Diffusion oder Wirbeldiffusion. Sie kommt durch unterschiedliche Flusswege und unregelmäßige Packung der Säule zustande und ist unabhängig von der Flussrate. Weiterhin ist der A-Term vom Teilchendurchmesser der stationären Phase abhängig. Der B-Term beschreibt die longitudinale Diffusion entlang der Säulenachse. Er ist abhängig von der Viskosität und Temperatur der mobilen Phase sowie von deren

Diffusionskoeffizienten. Je höher die Flussgeschwindigkeit ist, desto geringer ist die Verweilzeit in der Säule, somit nimmt der B-Term mit der Flussgeschwindigkeit ab. Der C-Term beschreibt den Massenübergang zwischen der stationären und der mobilen Phase. Er ist abhängig von der Art der beiden Phasen und proportional zur Strömungsgeschwindigkeit. Weiterhin ist er abhängig vom Partikeldurchmesser und der Porosität sowie der Säulengeometrie und dem Diffusionskoeffizienten der stationären Phase. Es ergibt sich eine Hyperbelfunktion für H, aus der folgt, dass es eine optimale Flussgeschwindigkeit gibt, bei der H minimal ist und die Trennleistung somit maximal. Abbildung 7 zeigt die Auswirkungen der verschiedenen Einflussgrößen auf die Bodenhöhe H.



**Abbildung 7: Typischer van-Deemter-Graph einer partikulären Säule. Die Eddy-Diffusion (grün), longitudinale Diffusion (rot) und der Massenübergang (blau) beeinflussen die Bodenhöhe H (schwarz). Bei Monolithen steigt der C-Term nicht mit der Flussgeschwindigkeit  $v$ , sodass H auch bei hohen Flussraten gering bleibt**

Da Monolithen anstelle gepackter Partikel über sehr große Poren verfügen, wird der A-Term für sie sehr klein [152]. Die Bindestellen in Monolithen liegen direkt an der Porenoberfläche und es findet keine Diffusion in mikroporöse Partikel statt. Daher ist der C-Term ebenfalls sehr klein. Er hängt nur noch von der Filmdiffusion und der Adsorptions-/Desorptions-Kinetik ab. Er ist somit nahezu unabhängig von der Flussrate [153]. Dadurch steigt H bei Monolithen mit zunehmender Flussrate nicht oder nur minimal. Die Trennleistung von Monolithen ist somit unabhängig von der

Flussgeschwindigkeit. Dadurch können Monolithen im Gegensatz zu partikulären Säulen auch bei hohen Flussraten sehr gute Trennleistungen erzielen. Somit sind sie für größere Probenvolumina interessant, da der Durchsatz durch hohe Flussraten gesteigert werden kann.

Monolithen können auf unterschiedliche Arten hergestellt werden. Dies kann auf organischer oder anorganischer Basis geschehen. Im Folgenden werden die wichtigsten Arten von Monolithen beschrieben.

### 2.4.2 Silica-Monolithen

Monolithen können auf organischer oder anorganischer Basis hergestellt werden. Der am häufigsten angewandte anorganische Monolith ist der Silica-Monolith. Silica-Monolithen werden zumeist direkt in einer Kapillare über einen Sol-Gel-Prozess hergestellt. Dabei werden für gewöhnlich Tetramethoxysilan (TMOS) als Siliziumquelle und Polyethylenoxid (PEO) als Polymer in einer wässrigen sauren Lösung gemischt [154]. Durch das Polymer wird eine Trennung in zwei Phasen ausgelöst. Nach der Trocknung bildet die Silicaphase die Matrix des Monolithen. Die Lösemittelphase bildet die Poren. Über die Anteile an TMOS und PEO werden die Porengröße und die Netzwerkzusammensetzung bestimmt. Silica-Monolithen verfügen oft über eine bimodale Porenstruktur aus Mesoporen von 2 – 25 nm und Makroporen von 1 - 2  $\mu\text{m}$ . Dadurch kann ein geringer Rückdruck bei gleichzeitig hoher Oberfläche erzielt werden [155]. Die Makroporen erlauben einen hohen Fluss der mobilen Phase. Die Mesoporen bieten eine hohe Oberfläche an der die Adsorption stattfindet. Silica-Monolithen sind aufgrund ihrer komplizierten Herstellung teuer. Ihre Hydrophobizität führt zu unspezifischer Bindung von Biomolekülen, weshalb sie hauptsächlich zur Trennung von organischen Molekülen eingesetzt werden [156]. Unter dem Handelsnamen Chromolith werden Silica-Monolithen von Merck kommerziell vertrieben [157]. Als Alternative zu reinen Silica-Monolithen wurden organisch/-anorganische Hybrid-Monolithen entwickelt [147]. Diese können durch eine Cokondensation des funktionellen Monomers in einem einzelnen Schritt hergestellt werden [158]. Sie bieten eine hydrolytisch stabilere stationäre Phase als herkömmliche Silica-Monolithen, wurden bislang aber nur vereinzelt eingesetzt.

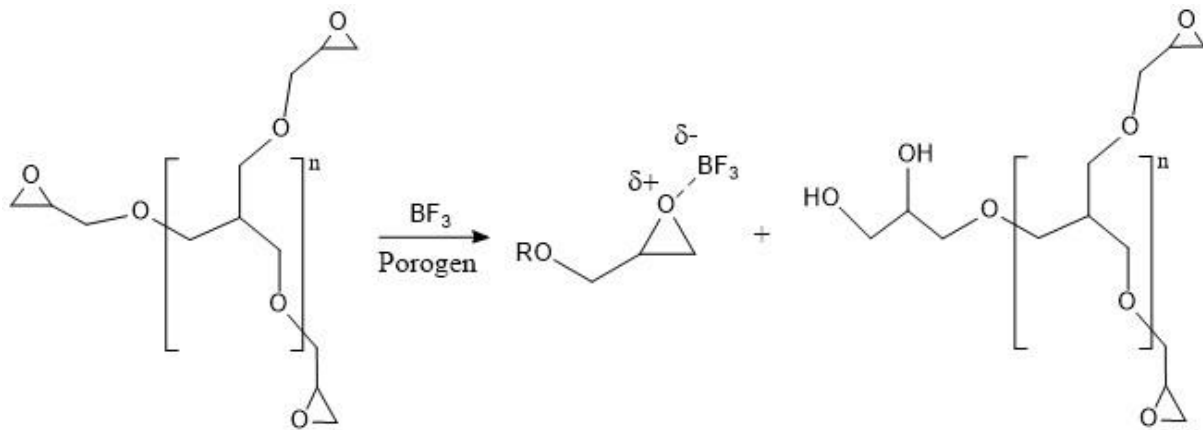
### 2.4.3 Polymer-Monolithen

Im Allgemeinen werden organische Monolithe durch radikalische Polymerisation hergestellt [159]. Eine Polymerisationsmischung besteht aus einem Initiator, einem Monomer, einem Quervernetzer, und einem Lösungsmittel oder einer Lösungsmittelmischung als Porogen [147]. Die Reaktionsmischung wird in eine geeignete Säulenform gefüllt und die Reaktion wird über eine Behandlung mit UV-Licht

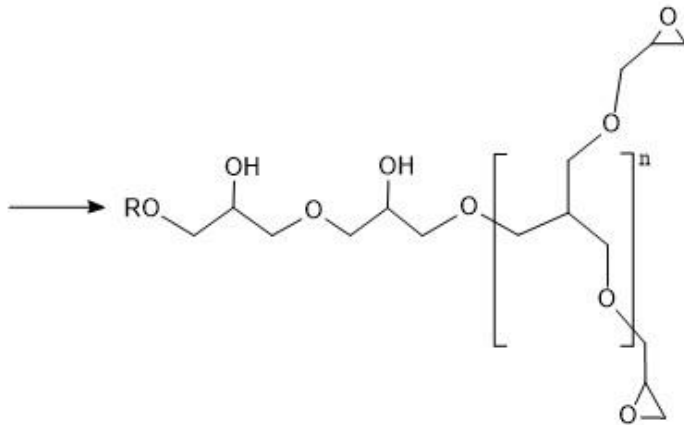
gestartet. Das nichtpolymerisierende Porogen bildet dabei ein Porennetzwerk im Monolithen. Durch den Anteil an Porogen bzw. Monomer kann die Porosität des entstehenden Monolithen beeinflusst werden. Polymer-Monolithen können aus diversen unterschiedlichen Monomeren hergestellt werden, wodurch es möglich ist Monolithen in verschiedenen Formaten herzustellen [160]. Zu den am weitesten verbreiteten Monolithen gehören die Methacrylat-Monolithen [161]. Diese werden am häufigsten aus Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA) [162-165] oder Glycidymethacrylat (GMA) [166, 167] hergestellt. Die daraus resultierenden Monolithen sind besonders gut geeignet, um anschließend funktionalisiert zu werden [168]. Die Epoxygruppen von GMA erlauben eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionalisierungsreaktionen [169-171]. Unter dem Handelsnamen Convective Interaction Media (CIM) werden organische Poly(GMA-EDMA)-Monolithen von BIA Separations (Slowenien) vertrieben. Dabei handelt es sich um monolithische Disks, die mit verschiedenen funktionellen Gruppen funktionalisiert wurden [172]. Sie verfügen über Porengrößen zwischen 100 und 1500 nm.

Eine weitere Gruppe der Polymer-Monolithen sind die Acrylamidgele und Cryogegele [80, 173, 174]. Sie zeichnen sich durch ihre besonders großen Poren aus. Es können Porengrößen von bis zu 100  $\mu\text{m}$  erreicht werden. Weiterhin sind diese Monolithen besonders hydrophil, weshalb sie für Chromatographie von Proteinen, DNA oder sogar Zellen eingesetzt werden [175]. Weiterhin werden Monolithen mit einer Vielzahl anderer Monomere hergestellt, wie z.B. Styrol [176], Agarose [177] oder 2-Vinyl-4,4-Dimethylazlacton (VDA) [178]. Durch die Anwendung spezieller Monomere können bestimmte Eigenschaften der Monolithen erzeugt werden, wie z.B. besondere pH-Stabilität.

Eine gezielte Weiterentwicklung herkömmlicher Polymer-Monolithen, um eine Prozessierung großer Volumina zu ermöglichen, wurde durch die monolithische Adsorptionsfiltration erreicht. Die MAF wurde am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie von Peskoller et al. entwickelt [107]. Der makroporöse Epoxy-Monolith wird durch eine Polymerisation des Monomers Polyglycerol-3-glycidylether hergestellt. Als Porogen dient eine Mischung aus Toluol und Methyl-*tert*-Buthylether (MTBE). Die Selbstpolymerisation wird durch die Lewis-Säure Bortrifluoriddiethyletherat ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) initiiert. Durch das Porogen kann die Porengröße eingestellt werden. Durch eine Mischung von Toluol und MTBE im Verhältnis 60:40 und eine Zusammensetzung des Reaktionsgemisches im Verhältnis 80:20 Porogen/Monomer werden Porengrößen von 20  $\mu\text{m}$  erreicht. Diese Makroporen erlauben den ungehinderten Durchgang von sehr großen Analyten wie z.B. Bakterien. Die Epoxygruppen an der Porenoberfläche erlauben die Immobilisierung von Liganden an den Monolithen. Mit diesen Monolithen können Proben mit höheren Volumenströmen als bei herkömmliche Monolithen und bei niedrigem Gegendruck verarbeitet werden.



Polyglycerol-3-glycidyl ether (CL9)



**Abbildung 8:** Ausschnittsweise Darstellung der Umsetzung des Monomers Polyglycerol-3-glycidylether (CL9) zum Polymer-Monolithen.

#### 2.4.4 Anwendung von Monolithen zur Separation von Viren und Bakterien

Durch die Einführung von Monolithen ist die Chromatographie von großen Analyten wie Makromolekülen, Viren oder sogar Zellen möglich geworden. Dies ist zum einen durch die Porengröße der Monolithen bedingt, da diese die Passage großer Analyten erlaubt. Zum anderen ermöglicht der geringe Rückdruck eine Separation, ohne Viren und Zellen zu beschädigen [174, 179]. Bakterien besitzen einen Durchmesser von ca. 1 – 10  $\mu\text{m}$ , weshalb sie Monolithen mit besonders großen Poren benötigen. Daher wurden für Bakterien bislang vorrangig Cryogele verwendet. Diese ermöglichen mit Makroporen von 10 – 100  $\mu\text{m}$  Durchmesser ungehinderten Durchgang der Bakterien. So konnten mit Cryogelen bereits verschiedene *E. coli* und *B. halodurans* Bakterienstämme mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) [180] aufkonzentriert werden. Weiterhin wurde eine Methode zur Anionenaustauschchromatographie von *E. coli* entwickelt [181]. Auch die Hefe



*S. cerevisiae* konnte bereits erfolgreich durch monolithische Affinitätschromatographie separiert werden [182].

Die Anreicherung oder Separation von Viren durch monolithische Säulen wurde in den letzten Jahren mit vielen verschiedenen Systemen untersucht. Dabei wurden insbesondere die CIM-Methacrylat-Monolithen verwendet. Smrekar et al. nutzen 2007 CIM-Monolithen mit quaternären Ammoniumgruppen (CIM-QA), um T4 Phagen mittels Anionenaustauschchromatographie anzureichern [183]. Dabei konnte eine Wiederfindung von ca. 70 % erreicht werden. Kramberger et al. nutzten 2009 CIM-Anionenaustausch-Monolithen mit Diethylaminoethan- (DEAE) und QA-Gruppen, um den *Staphylococcus aureus* Bakteriophagen VDX-10 aus Zelllysaten aufzureinigen und aufzukonzentrieren, um ihn für antibakterielle Agenzien oder *Phage Display Assays* anwenden zu können. Es konnten 60 % der Phagen wiedergefunden werden [184]. Zur Elution der Phagen wurden Hochsalzpuffer auf HEPES- und Phosphatbasis verwendet. 2010 nutzten Smrekar et al. CIM-QA Methacrylat-Monolithen, um die Bakteriophagen T7, Lambda und M13 aufzureinigen [185]. Zur Elution wurde Tris-HCl-Puffer mit 1 M NaCl verwendet. Noppe et al. zeigten 2006 die Anwendung von Bakteriophagen als Affinitätsliganden in Cryogel-Monolithen [186, 187]. Die Phagen wurden dabei als Fängermoleküle genutzt, um Lactoferrin aus Milch aufzukonzentrieren. Die Aufkonzentrierung von Viren aus Wassermatrizes zeigten Gutiérrez-Aguirre et al. 2008 [188]. Sie nutzen Methacrylat-Monolithen mit Ionenaustauschgruppen, um Rotaviren aus 1-L-Trink- und -Oberflächenwasserproben anzureichern. Sie konnten somit die Sensitivität der anschließenden qPCR-Detektion deutlich erhöhen. Sie nutzten CIM-Säulen mit Sulfitgruppen (CIM-SO<sub>3</sub>) sowie CIM-QA-Säulen. Die Viren wurden mit 50 mM HEPES, 2 M NaCl bei pH 7 eluiert. Die Wiederfindungen lagen zwischen 54 und 102 %. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Monolithen eingesetzt werden können, um Viren aus Wasser zu entfernen. Dazu wurden CIM-QA-Anionenaustausch-Monolithen auf Methacrylatbasis verwendet. Um die Separation zu verbessern, wurde eine CIM-Säule mit Hydroxygruppen (CIM-OH) vorgeschaltet, sodass störende Moleküle aus der Matrix entfernt und der Rückdruck gemindert wurde. Es wurden Rotaviren, Noroviren, Astroviren und Sapoviren gleichzeitig aus 5 - 10 L Kläranlagen-Ablaufwasser abgereichert [189].

Auch mittels MAF, konnten verschiedene Liganden zur Aufkonzentrierung von Viren oder Bakterien genutzt werden. So wurde das Antibiotikum Polymyxin B als Affinitätsligand an den Monolithen gekoppelt um *E. coli* anzureichern. Mit dieser Methode konnten 97 % der eingesetzten Bakterien durch Carbonatpuffer eluiert und anschließend wiedergefunden werden [107]. Durch die Immobilisierung eines Antikörpers auf dem Monolithen konnte *Staphylococcus aureus* erfolgreich aufkonzentriert werden [81]. Dadurch konnte die Sensitivität der nachfolgenden Durchflusszytometrie auf 42 Zellen/mL erniedrigt werden. Da die ersten Anwendungen mit Affinitätsliganden erfolgten, wurde

die Methode zunächst als monolithische Affinitätsfiltration bezeichnet. Durch die Hydrolyse der Epoxygruppen des Monolithen konnten Hydroxygruppen an der Porenoberfläche erzeugt werden. Mit diesen war es möglich, Bakteriophage MS2 über ionische Wechselwirkungen aufzukonzentrieren. Durch das Ansäuern der Wassermatrix wurde der isoelektrische Punkt der Phagen überschritten. Dadurch wurde eine positive Nettoladung der Phagenoberfläche erreicht und eine Adsorption an die OH-Gruppen des Monolithen war möglich. Anschließend wurde der pH-Wert bei der Elution mit Rinderextraktpuffer bei pH 9,5 wieder erhöht. Mit dieser Methode konnte eine Wiederfindung von  $111,8 \pm 16,3$  % für MS2 erzielt werden [190]. Da die Aufkonzentrierung somit auch über andere Interaktionen möglich war, wird die Methode im Folgenden als monolithische Adsorptionsfiltration bezeichnet.

Im Gegensatz zu den weit verbreiteten CIM-Monolithen, sind die Monolithen der MAF-Methode nicht dazu ausgelegt, als HPLC-Säule verwendet zu werden. Stattdessen werden sie direkt an eine Schlauchpumpe angeschlossen. Durch die großen Poren der Monolithen und die hohen Pumpleistungen von Schlauchpumpen, sind bei MAF sehr viel größere Volumenströme im Bereich von bis zu 1 L/min möglich. CIM-HPLC-Säulen werden hingegen üblicherweise im Bereich von 0,5 - 5 mL/min betrieben. Somit ist eine Aufkonzentrierung großer Probenvolumina hier nur sehr viel langsamer möglich als mittels MAF. Weiterhin sind MAF-Säulen als Einwegartikel konzipiert. Daher entfällt die Notwendigkeit von Vorfiltrationen oder Reinigungsschritten nach der Filtration. Dadurch ist eine Anwendung auch im Feld möglich.

### 2.5 Monolithische Adsorptionsfiltration

Im Gegensatz zu anderen Monolithen, wurde die MAF speziell zur Aufkonzentrierung von Mikroorganismen und Viren entwickelt. Der Aufbau einer MAF-Säule ähnelt zwar dem einer monolithischen Chromatographiesäule (siehe Abbildung 9), der Fokus der Methode liegt aber auf einer Anreicherung der Gesamtheit aller Organismen in einer Probe und einer Abtrennung von der Wassermatrix. Die Adsorption findet über Mechanismen, die auch in der Chromatographie oder der Tiefenfiltration mit geladenen Filtermembranen angewandt werden, statt. Eine Auflösung zwischen den unterschiedlichen Analyten, wie sie in der Chromatographie beabsichtigt ist, soll dabei jedoch nicht erzielt werden. Daher handelt es sich bei der MAF um eine Filtration, nicht um eine Chromatographie. Aspekte wie Trennschärfe, Peakverbreiterung oder Auflösung werden hier nicht berücksichtigt.

Die Monolithen können in verschiedenen Größen hergestellt werden. Die ersten MAF-Säulen wurden in Glassäulen synthetisiert [107]. Diese wurden zuvor oberflächenbehandelt, um eine kovalente

Bindung des Polymers an die Glasoberfläche zu ermöglichen. Im Rahmen der Dissertation von Lu Pei wurden die Monolithen vergrößert [191]. Sie werden als monolithische Disks in PTFE-Formen synthetisiert. Die Disks haben einen Durchmesser von 3,84 cm und eine Höhe von 1 cm, sodass herkömmliche 50-mL-Einwegspritzen als Gehäuse für die Säulen verwendet werden können. Dadurch wurde eine Erhöhung der Bindekapazität erreicht. Zudem ist es mit diesen MAF-Disks möglich, große Wasservolumina von mehreren Litern zu verarbeiten. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist der Wegfall der Glassäulen. Die MAF-Disks werden in Einwegspritzengehäusen mit PTFE-Siebböden und O-Ringen zur Abdichtung zu einer MAF-Säule zusammengebaut. Dadurch wurden die Kosten für eine Säule im Vergleich zu einer Glassäule drastisch gesenkt, sodass eine MAF-Säule nur noch zwischen 2 und 3 € kostet. Die Notwendigkeit einer Regeneration der Säule entfällt dadurch. Es können selbst Proben mit hohem Verschmutzungsgrad und hoher Partikelfracht wie Oberflächen-, Roh- oder sogar Abwasser ohne Vorfiltration filtriert werden. Abbildung 9 a-c zeigen eine MAF-Glassäule, MAF-Disks und eine MAF-Säule im Vergleich.



**Abbildung 9: MAF Glassäule (A), MAF-Disks (B) und MAF-Säule (C)**

### 3. Detektion von Pathogenen

#### 3.1 Kulturbasierte Methoden

Die Standardmethoden zur Detektion der meisten Bakterien und einiger Viren basieren auf Kulturverfahren. Dabei werden die Organismen auf selektiven Kultivierungsmedien angereichert. Je nach Art des Organismus kann die Kultivierung zwischen 48 h bis zu mehreren Tagen oder sogar Wochen dauern [192, 193]. Kulturverfahren bieten den Vorteil, dass ganze Organismen detektiert werden. Dadurch werden im Fall von Bakterien nur lebende, wachstumsfähige und im Fall von Viren nur infektiöse Exemplare detektiert. Zur Detektion von Bakterien reicht deren eigene Kultivierung auf dem Medium. Um Viren zu detektieren, müssen sie zusammen mit Bakterienkulturen inkubiert werden, die dann von den Viren infiziert werden [194]. Für viele enterale Viren, wie z.B. Rotaviren oder Noroviren, gibt es jedoch keine etablierten Kulturverfahren [113].

Die Quantifizierung erfolgt für Bakterien durch Auszählung der gewachsenen Kolonien. Dabei wird davon ausgegangen, dass jeder lebende Mikroorganismus eine Kolonie ausbildet. Durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungen wird sichergestellt, dass Kolonien vereinzelt und in einem zählbaren Bereich von ca. 10 – 300 Kolonien pro Platte liegen. Die resultierenden Konzentrationen werden in kolonienbildenden Einheiten (KBE)/mL angegeben. Anstelle des üblichen Ausplattierens werden Wasserproben auch häufig zunächst über einen Mikrofilter angereichert. Anschließend wird der Filter auf dem selektiven Nährmedium inkubiert [195]. Da diese Methode auf dem Wachstum der Bakterien beruht, können manche Bakterien in bestimmten Fällen damit nicht detektiert werden. So können die Bakterien z.B. in einem nichtkultivierbaren Zustand, dem VBNC-Status (*viable but not culturable*), vorliegen. Bakterien in diesem Zustand leben zwar, wachsen aber nicht unter normalen Bedingungen. Sie sind somit durch Kulturverfahren nicht detektierbar. Sind in einer Probe viele verschiedene Bakterien mit unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten, ist eine exakte Bestimmung oft schwierig. Beispielsweise kommt es bei der Kultivierung von Legionellen aus Umweltproben häufig dazu, dass diese von anderen, schneller wachsenden Bakterien überwachsen werden [196].

Eine andere kulturbasierte Methode zum Nachweis von Bakterien misst nicht direkt deren Wachstum, sondern deren enzymatische Aktivität während der Kultivierung. Dabei können spezielle enzymatische Reaktionen verfolgt werden, die spezifisch für eine Spezies, Gruppe oder Klasse sind. Diese Art des Nachweises wird z.B. im Colilert®-Verfahren (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) angewandt. Dabei wird einer Probe das Substrat o-Nitrophenol- $\beta$ -D-Galaktopyranoiod zugegeben. Coliforme Bakterien können dieses mit Hilfe des in der Membran enthaltenen Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase zu o-Nitrophenol umwandeln. Dieses erscheint gelb, wodurch nach Inkubation von 18 h ein Farbumschlag in der Probe zu erkennen ist, wenn Coliforme vorhanden sind [197]. Das Bakterium *E. coli* verfügt in der Membran zudem über das Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase. Dieses spezifische Enzym kann das Substrat

4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid zu einem fluoreszierenden Stoff umwandeln. Durch diese spezifische Reaktion kann *E. coli* von anderen coliformen Bakterien in der Probe unterschieden werden. Das Colilert®-Verfahren ist in der deutschen Trinkwasserverordnung akzeptiert und besitzt eine Sensitivität von 1 KBE pro 100 mL [198]. Die Quantifizierung erfolgt über die statistische Methode *most probable number* [195]. Auf derselben Methode basiert auch das Enterolert®-Verfahren zur Detektion von Enterokokken.

Eine Vielzahl an Viren und Bakteriophagen werden durch den sogenannten Plaque-Assay detektiert. Dabei werden die Viren zunächst mit einem Wirtsbakterium in geschmolzenem Agar inkubiert und anschließend auf einen Agarboden in einer Petrischale ausplattiert. Auf dem Agarboden wächst ein Bakterienrasen. In diesem befinden sich Löcher, die sogenannten Plaques, wenn Bakterien von Bakteriophagen infiziert wurden und dadurch eine Zelllyse initiiert wurde. Diese Plaques werden ausgezählt und mit dem angewandten Verdünnungsfaktor verrechnet, um eine Phagenkonzentration in der Einheit Plaque bildende Einheiten (*plaque forming units*, PFU)/mL zu erhalten [199].

### 3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der DNA durch eine enzymatische Reaktion vervielfältigt werden kann. DNA-Endstücke, die sogenannten Primer, werden an einen komplementären DNA-Einzelstrang angelagert. Die Primer sind dabei die Startpunkte der Amplifikation. Das Enzym DNA-Polymerase katalysiert die Synthese eines komplementären DNA-Stranges. Zumeist wird dafür das thermostabile Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, die sogenannte Taq-Polymerase verwendet. Alternativ dazu können aber auch thermostabile Enzyme aus Archea, wie z.B. die Pfu-Polymerase [200] oder die Pwo-Polymerase [201], verwendet werden.

Der Ablauf der PCR wird über Temperaturstufen gesteuert. Zunächst werden mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgespaltet. Danach folgt ein Hybridisierungsschritt, bei dem sich die Primer bei Temperaturen zwischen ca. 55 und 65 °C an die DNA-Einzelstränge anlagern. Die optimale Temperatur hängt dabei von der Länge und Sequenz der Primer ab. Wenn die Hybridisierungstemperatur nicht optimal gewählt ist, können sich Primer an nicht exakt komplementäre Sequenzen anlagern, wodurch es zu unspezifischen Amplifikationsprodukten kommt. Im Elongationsschritt wird der angelagerte Primer von der DNA-Polymerase verlängert. Sie beginnt am 3'-Ende der angelagerten Primer und verlängert diese komplementär zum Originalstrang mit freien Nukleotiden. Je nach verwendeter Polymerase liegt die Temperatur bei ca. 68 – 72 °C. Diese

drei Schritte werden in bis zu 50 Zyklen wiederholt, um eine exponentielle Vermehrung der DNA zu erzielen.

Bei der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) wird ein fluoreszierender Farbstoff eingesetzt, um die Amplifikation verfolgen zu können. Dies kann entweder spezifisch über DNA-Sonden mit Fluoreszenzmarkern oder unspezifisch durch DNA-interkalierende Farbstoffe erfolgen [202]. DNA-interkalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid oder SYBR Green I sind einfach anzuwenden und können DNA unspezifisch durch Einlagerung in DNA-Doppelstränge nachweisen. Dies führt dazu, dass auch unspezifische PCR-Produkte detektiert werden [203].

Um unspezifische Signale zu identifizieren, kann im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Dabei werden DNA-Doppelstränge durch einen Temperaturgradienten geschmolzen. Der Schmelzpunkt unterschiedlicher DNA-Stücke unterscheidet sich dabei je nach Nukleinsäuresequenz und Länge. Durch die daraus resultierende Änderung des Fluoreszenzsignals kann zwischen spezifischem und unspezifischem Signal unterschieden werden. Zum spezifischen Nachweis von DNA werden Sonden, die in das Amplifikat eingebaut werden, genutzt. FRET-Sonden (*fluorescence resonance energy transfer*) beinhalten zwei Fluoreszenzfarbstoffe. Einer dient als FRET-Donor, der andere als FRET-Akzeptor. Diese werden in räumlicher Nähe in das PCR-Produkt eingebaut, sodass ein strahlungsloser Energietransfer vom Donor-Molekül zum Akzeptor-Molekül stattfindet. Die Fluoreszenz des Donor-Moleküls verringert sich. Dafür steigt die Fluoreszenz des Akzeptor-Moleküls an [204]. *Molecular Beacons* nutzen den FRET-Effekt, indem eine Sonde einen Reporterfarbstoff und einen Quencher enthält. Die Sonde bildet eine Sekundärstruktur aus, die Quencher und Farbstoff so nahe zusammenführt, dass keine Fluoreszenz entsteht. Beim Einbau der Sonde in das PCR-Produkt durch die Polymerase, wird der Quencher räumlich durch Auflösung der Sekundärstruktur vom Farbstoff getrennt. Dadurch wird nach dem Einbau der Sonde ein Fluoreszenzsignal emittiert [204, 205].

Die Fluoreszenz nimmt im Lauf der PCR mit ansteigender DNA-Menge zu. Die Fluoreszenzsignale werden zur Quantifizierung genutzt. Dazu wird entweder der Ct-Wert (*cycle threshold*) oder der Cp-Wert (*crossing point*) betrachtet. Der Ct-Wert ist der Zeitpunkt in der Reaktion, zu dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Grenzwert überschreitet und dadurch als positives Signal betrachtet wird. Der Cp-Wert ist der Zeitpunkt, zu dem die zweite Ableitung des Fluoreszenzverlaufs ein Maximum aufweist, die Zunahme des Fluoreszenzsignals also maximal ist. Über Standards mit bekannter Konzentration können so Kalibrierkurven zur Quantifizierung erstellt werden.

Die PCR ist verglichen mit Kulturmethode sehr schnell. Sie liefert Ergebnisse innerhalb von wenigen Stunden. Sie ist sehr sensitiv, selektiv und eignet sich auch für Organismen, die durch Kulturverfahren

nur schwer oder nicht nachzuweisen sind. Im Gegensatz zur Kultur werden hier jedoch keine vollständigen Bakterien oder Viren nachgewiesen, sondern nur DNA-Fragmente. Daher ist aus der PCR keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen bzw. infektiösen und nichtinfektiösen Viren möglich. Um eine Lebend-/Tot-Unterscheidung mittels PCR zu ermöglichen, wurden in den letzten Jahren spezielle PCR-Verfahren entwickelt. Dazu werden Mikroorganismen und Viren zunächst mit Propidium-Monoazid (PMA) oder Ethidium-Monoazid (EMA) behandelt [206-209]. Diese DNA-interagierenden Fluoreszenzfarbstoffe können die Zellmembran bzw. Proteinhülle intakter Bakterien oder Viren nicht durchdringen. Bei zerstörten Exemplaren können sie nach Photoreaktion irreversibel an die DNA binden. Durch Einsatz von blauem Licht wird eine Photolyse initiiert, bei der Stickstoff freigesetzt wird. Weiterhin entstehen dabei hochreaktive Nitrene. Diese binden kovalent an die CH-Bindungen der DNA und modifizieren diese somit dauerhaft durch Stickstoff-Kohlenstoff-Bindungen [210]. Sie behindern dadurch die Amplifikation. Die DNA der intakten Viren oder Bakterien bleibt hingegen nachweisbar. Auch andere Effekte können die PCR negativ beeinflussen. So können einige Inhaltsstoffe, wie z.B. bestimmte Proteine, Huminstoffe oder Salze, die PCR inhibieren, indem z.B. Magnesiumionen, die als Cofaktoren für die Polymerase dienen, chemisch gebunden werden oder Proteasen die Polymerase abbauen. Daher können die Detektionslimits von PCR-Assays je nach Probenmatrix und deren Inhaltsstoffen schwanken.

Die Selektivität der PCR hängt stark vom amplifizierten Gen ab. Je nachdem, welches Gen zur Amplifikation gewählt wird, kann eine PCR eine ganze Bakteriengattung, einzelne Arten oder nur spezielle Subtypen identifizieren. So kann z.B. durch Amplifikation des 16S rRNA-Gens von Legionellen die gesamte Gattung *Legionella* detektiert werden. Durch Amplifikation des mip-Gens wird nur die Art *Legionella pneumophila* detektiert [211, 212].

### 3.3 Chemilumineszenz-Mikroarrays

Mikroarrays bestehen aus einer Anordnung reaktiver Spots auf einem Trägermaterial wie Glas oder Kunststoff. Die chemisch oder biochemisch reaktiven Rezeptoren werden durch physikalische oder chemische Interaktionen immobilisiert [213]. Durch diese Miniaturisierung können bei deutlich verringertem Reagenzienverbrauch hunderte Reaktionen auf kleinsten Flächen durchgeführt werden [214]. Die dazu eingesetzten Rezeptoren können unter anderem Antikörper, DNA, Zellen, Aptamere, Lectine oder Membranrezeptoren sein [213, 215]. Durch deren exakte Positionierung auf dem Mikroarray können bestimmte Reaktionen genau nachverfolgt werden. Dadurch werden Multiplex-Messungen auf einem Chip ermöglicht. Die Nachverfolgung der Reaktionen kann über Fluoreszenz [216], elektrochemisch [217], über markierungsfreie Auslesesysteme [218, 219] oder über Chemilumineszenz (CL) [220, 221] erfolgen.

Am IWC sind ausschließlich Chemilumineszenz-basierte Mikroarrays im Einsatz. Sie werden am MCR 3 (Munich Chip Reader der 3. Generation) durchgeführt. Dieser ist ein automatisiertes, Fluss-basiertes Mikroarray-System mit eingebauter CCD-Kamera zur Auslesung von Chemilumineszenz-Signalen. Um diese Signale zu erzeugen, wird das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) eingesetzt. Es eignet sich gut für Mikroarrays, da es kostengünstig ist, eine schnelle Kinetik aufweist und sehr klein ist und somit keine sterische Hinderung an anderen Molekülen verursacht. HRP dient zur Katalyse der Chemilumineszenzreaktion von Wasserstoffperoxid und Luminol. Dabei entsteht ein Aminophthalation, welches sich im angeregten Zustand befindet. Bei seiner Rückkehr in den Grundzustand emittiert es Licht bei einer Wellenlänge von 425 nm. Dieses wird von der CCD-Kamera des MCR 3 aufgenommen.

Der MCR 3 konnte bereits für zahlreiche Themen angewandt werden. Zunächst wurde er zur Detektion von Antibiotika in Milch entwickelt [222, 223]. Diese Anwendung wurde auch zur Detektion von Antibiotika in Honig weiterentwickelt [224]. Weitere Anwendungen sind die Detektion von Mykotoxinen in Lebensmitteln [225] und von Zoonose-Antikörpern in Schweineseren [226]. Durch die Erweiterung der Flusszelle durch eine Temperatursteuerung, wurden auch DNA-Mikroarray-Assays auf dem MCR 3 ermöglicht. Diese konnten zur Detektion von Bakterien [227, 228] und Viren [229] angewandt werden. Aktuell wird am IWC an weiteren Anwendungen für den MCR 3 geforscht. Dazu zählen die Serotypisierung von Legionellen [230] sowie die isotherme DNA-Amplifikation und Detektion mittels eines Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Assays [231].

Die auf dem MCR 3 angewendeten Mikroarray-Prinzipien sind nachfolgend erklärt.

### 3.3.1 Antikörper-Mikroarrays

Antikörper-Mikroarrays, auch Mikroarray-Immunoassays (MIA) genannt, basieren auf dem Prinzip der ELISA-Methode (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Bei diesem Immunoassay wird durch eine enzymatische Farbreaktion ein Antigen nachgewiesen. Mit dieser Methode können Proteine wie z.B. Antikörper, aber auch Viren, Zellen, Hormone, Toxine oder Pestizide nachgewiesen werden. Wie beim ELISA können auch die Antikörper-Mikroarrays in verschiedenen Formaten durchgeführt werden. Dabei unterscheidet man zwischen direkten, indirekten und Sandwich-Assays. Diese können im kompetitiven oder nichtkompetitiven Format durchgeführt werden. Bei kompetitiven Formaten wird der Probe ein synthetisches Kompetitor-Antigen zugegeben, welches mit dem Analyten um die Bindestellen der Antikörper konkurriert.

Bei direkt kompetitiven Assays werden die Antikörper auf der Chipoberfläche immobilisiert. Der Probe wird eine bekannte Menge Kompetitor-Antigene zugemischt, die mit dem Analyten in der Probe um



die Bindestellen der immobilisierten Antikörper konkurrieren. Die Konzentration des Analyten kann somit indirekt über die Anzahl der gebundenen, markierten Kompetitoren bestimmt werden. Beim indirekt kompetitiven Assay werden die Kompetitor-Antigene immobilisiert. Diese konkurrieren mit den Analyten in der Probe um die Bindestellen der markierten Antikörper. Dieses Format wird auf dem MCR 3 zum Nachweis von Antibiotika in Milch verwendet [223]. Antibiotikaderivate werden als Kompetitor auf dem Chip immobilisiert und konkurrieren mit den Antibiotika in der Probe um die freien Primärantikörper. In diesem Assay werden unmarkierte Primärantikörper und HRP-markierte Sekundärantikörper zur Erzeugung eines CL-Signals verwendet.

Bei nichtkompetitiven Formaten wird der Analyt-Antikörper-Komplex direkt an der Oberfläche nachgewiesen. Bei Sandwich-Formaten werden zunächst Fängerantikörper immobilisiert. Der Analyt bindet an diese im Überschuss vorhandenen Fänger. Anschließend wird ein markierter Detektionsantikörper eingesetzt, der an die gebundenen Analyten bindet. Der so entstandene Komplex aus zwei Antikörpern und einem Analyten wird Sandwich-Komplex genannt. Dieses Format eignet sich besonders für große Analyten wie z.B. Bakterien, da ausreichend Bindestellen für mindestens zwei Antikörper an der Oberfläche vorhanden sein müssen. Auf dem MCR 3 wurde dieses Format angewandt, um die Bakterien *E. coli* und *L. pneumophila* nachzuweisen [232, 233]. Die Fängerantikörper binden an das O-Antigen der LPS-Strukturen an der Bakterienoberfläche. Die Detektionsantikörper sind mit HRP markiert und binden an weitere Antigenstrukturen. Anschließend wird die Chemilumineszenzreaktion von Wasserstoffperoxid und Luminol durch das HRP katalysiert.

### 3.3.2 DNA-Mikroarrays am MCR 3

Bei DNA-Mikroarrays werden DNA-Sonden als Fängermoleküle auf die Mikroarrays gespottet. Diese dienen dazu, komplementäre DNA-Einzelstränge durch Hybridisierung zu binden. Die nachzuweisenden DNA-Stränge des Analyten werden zuvor in einer PCR amplifiziert. Dabei werden markierte Primer verwendet. Die reverse-Primer werden mit Biotin markiert, die forward-Primer mit Digoxigenin. Dadurch entstehen in der PCR markierte DNA-Stränge. Die Einzelstränge sind jeweils unterschiedlich markiert. Die Amplifikation findet mit der sogenannten Stopped-PCR-Strategie statt. Dabei wird die Amplifikation in der logarithmischen Phase abgebrochen. Dadurch ist die Anzahl der amplifizierten DNA-Stränge proportional zur eingesetzten Konzentration [227]. Anschließend erfolgt eine Einzelstrangseparation. Hierzu werden Streptavidin-konjugierte magnetische Nanopartikel verwendet. Diese binden an die Biotin-markierten DNA-Stränge. Die Nanopartikel werden durch ein magnetisches Feld in einer Separationssäule zurückgehalten. Durch heißen Puffer werden die DNA-Doppelstränge getrennt und die Digoxigenin-markierten Einzelstränge werden mit dem Puffer aus der Säule gespült. Diese werden anschließend in den Mikroarray injiziert. Die markierten Einzelstränge

werden dann im DNA-Mikroarray an die komplementären immobilisierten Sonden gebunden. Durch HRP-markierte Antikörper gegen Digoxigenin werden die DNA-Einzelstränge detektiert. HRP katalysiert die Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid, welche mit der CCD-Kamera aufgenommen wird.

Am MCR3 wurde diese Methode bereits eingesetzt, um die Bakterien *E. coli* O157:H7, *S. enterica*, *C. jejuni* [228], sowie Adenoviren und die Bakteriophagen  $\Phi$ X174 und MS2 [234] zu detektieren.

### 3.3.3 On-Chip-DNA-Amplifikation

Im Gegensatz zu herkömmlichen DNA-Mikroarrays ist bei On-Chip-DNA-Amplifikationen keine PCR im Vorfeld notwendig. Die Amplifikation und anschließende Detektion finden direkt auf dem Mikroarray statt. Dazu werden DNA-Sonden, die bei der Amplifikation als reverse-Primer dienen, auf den Chip gespottet. Zur Amplifikation wird ein Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Assay (RPA-Assay) genutzt. Anders als bei der PCR, findet die Amplifikation dabei isotherm statt. Dadurch entfällt die Notwendigkeit von Aufheiz- und Abkühlphasen, wodurch die Amplifikation schneller durchgeführt werden kann. Temperaturgesteuerte Schritte der PCR werden dabei durch enzymatische Reaktionen ersetzt.

Zur Detektion auf dem Mikroarray wird die Probe zuvor mit freien reverse-Primern, Biotin-markierten forward-Primern sowie einem Reaktionsmix für die Amplifikation gemischt, welcher die Enzyme Polymerase und Rekombinase sowie Einzelstrang-DNA-bindende Proteine enthält. Die Rekombinase formt einen Komplex mit jeweils einem der Primer. Dieser lagert sich an die komplementäre Stelle der Ziel-DNA an. Der Doppelstrang wird dabei gespalten. Die Einzelstrang-DNA-bindenden Proteine binden an den durch den Primer ersetzten Teil der DNA, um eine Wiederanlagerung zu verhindern. Durch die Polymerase wird der Primer verlängert. Dabei wird Biotin, das an die forward-Primer gebunden ist, entweder durch Hybridisierung von markierten Strängen, die in Lösung synthetisiert wurden, oder durch On-Chip-Synthese immobilisiert. Zur Detektion wird Streptavidin-HRP eingesetzt. Streptavidin bindet an die Biotin-Marker der forward-Primer. HRP katalysiert die Chemilumineszenzreaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid. Die Signale werden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet.

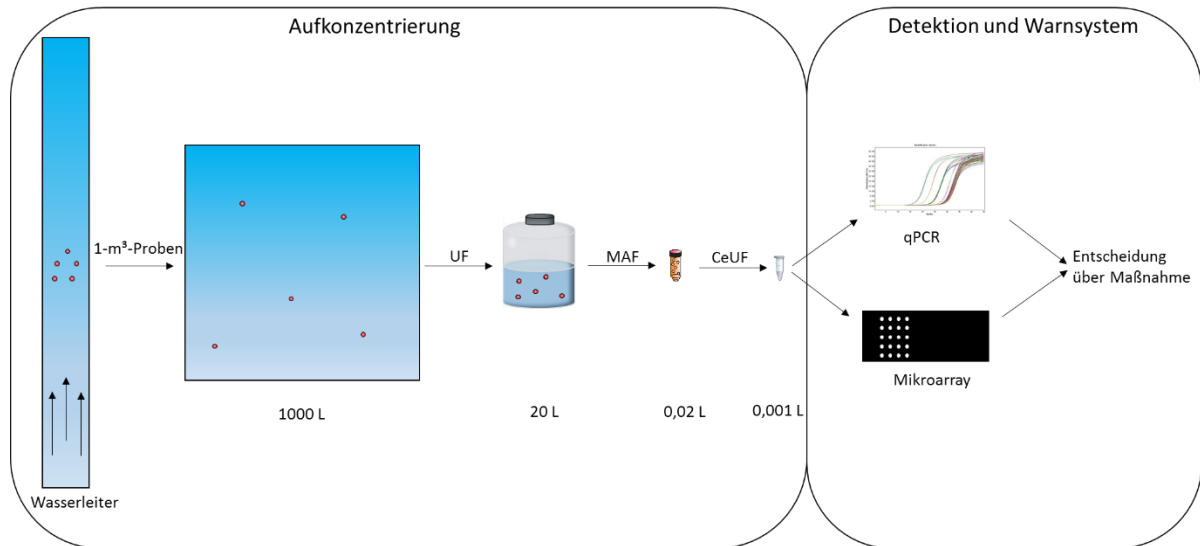
Mit dem RPA-Mikroarray-Assay konnte auf dem MCR 3 bereits DNA des humanen Adenovirus 41, des Bakteriophagen  $\Phi$ X174 sowie des Bakteriums *E. faecalis* nachgewiesen werden [231]. Durch die Amplifikation auf dem Chip entfallen die bei herkömmlichen DNA-Mikroarrays notwendigen PCR- und Einzelstrangseparationsschritte. Diese Neuerung macht die Detektion viel schneller möglich und reduziert den Arbeitsaufwand deutlich.

---

### III Ergebnisse und Diskussion

## 1. Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren aus großen Wasservolumina zur Hygieneüberwachung

Die hier beschriebene Methode zur kontinuierlichen Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien aus Wasserproben von 1 m<sup>3</sup> Volumen ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Aufkonzentrierung und Detektion von Pathogenen aus 1-m<sup>3</sup>-Wasserproben.**

Zunächst wird das Aufkonzentrierungssystem an einen Wasserleiter angeschlossen, um kontinuierlich Wasser aus diesem zu entnehmen. In einem ersten Anreicherungs-schritt werden 1000 L Wasser über Ultrafiltration auf ein Volumen von 20 L aufkonzentriert. Im zweiten Schritt wird dieses Konzentrat mittels monolithischer Adsorptionsfiltration weiter angereichert auf ein Volumen von 20 mL. Zur finalen Einengung auf ein Volumen von 1 mL wird zentrifugale Ultrafiltration genutzt. Bei der Prozessierung durch MAF werden Matrixbestandteile von der Probe abgetrennt, sodass diese im Anschluss an die Aufkonzentrierung direkt mit bioanalytischen Verfahren wie qPCR oder analytischem Mikroarray untersucht werden kann. Mit diesen Messungen können biologische Kontaminationen, die sich im Wasserleiter befinden, detektiert werden. Die Aufkonzentrierung ermöglicht die Detektion von sehr geringen Konzentrationen in großen Volumina. Im Falle einer Kontamination können aufgrund der Daten entsprechende Desinfektionsmaßnahmen vom Wasserbetreiber durchgeführt werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der modularen Entwicklung und Automatisierung der einzelnen Aufkonzentrierungsschritte sowie deren Kombination zu einem Gesamtprozess. Die Entwicklung der Mikroarray-basierten Detektionsmethoden sind Teil der Dissertationen von Andreas Kunze und Anika Wunderlich.

Im folgenden Ergebnisteil werden zunächst die Entwicklung und die Charakterisierung der einzelnen Prozessstufen (kontinuierliche UF, MAF und automatisierte MAF) zur Aufkonzentrierung beschrieben.

Im Anschluss wurden alle Schritte zu einem Prozess kombiniert und getestet. Der Aufkonzentrierungsprozess wurde weiterhin mit dem, in der Dissertation von Andreas Kunze entwickelten, Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Mikroarray kombiniert. Dieser kombinierte Gesamtprozess wurde abschließend unter Realbedingungen bei den Berliner Wasserbetrieben (BWB) getestet.

## 2. Ultrafiltration

### 2.1 Aufbau der Ultrafiltrationsanlage Konti-CUF

Der Aufbau der Ultrafiltrationsanlage (kontinuierliche cross-flow Ultrafiltration, Konti-CUF) ist eine Weiterentwicklung der, in einer vorangegangenen Arbeit von Martin Rieger konstruierten, Filtrationsanlage [235]. Mit dieser Anlage wurde bereits eine Konzeptstudie durchgeführt, bei der sehr große Wasserproben von 30 bzw. 90 m<sup>3</sup> untersucht wurden [236]. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden die mittels UF aufkonzentrierten Proben auch bereits mit MAF als zweiter Stufe und CeUF als dritter Stufe aufkonzentriert. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Beprobung vieler kleinerer Volumina von ca. 1 m<sup>3</sup> eine genauere Beurteilung der Wasserqualität erlaubt als wenige sehr große Probenvolumina. Aus den Erfahrungen mit der ersten Ultrafiltrationsanlage wurde ein Anforderungsprofil für eine zweite Filtrationsanlage erstellt. Diese wurde in Zusammenarbeit mit Andreas Kunze und GWK Präzisionstechnik konzipiert und anschließend von GWK konstruiert. Die wichtigsten Anforderungen an die neue Anlage waren eine verbesserte Desinfektion, sowie die Möglichkeit andere Filtermodule einsetzen zu können. Weiterhin wurde die Instrumentierung der Anlage weiterentwickelt. Zudem sollte die Anlage kompakter als der Vorgänger werden, um einfacher transportierbar zu sein.

Die neue Anlage ist in Abbildung 11 dargestellt. Sie ist auf ein Stahlgerüst montiert und hat die Abmessungen 200 cm × 120 cm × 80 cm (h × b × t) und ein Leergewicht von ca. 300 kg. Die gesamte Anlage ist mit einem Hubwagen transportierbar und kompakter als die Vorgängeranlage, sodass ein Transport mit einem Lastwagen oder Transporter mit Hebebühne möglich ist. Höhenverstellbare Stellfüße sowie eingebaute Wasserwaagen erlauben den sicheren Aufbau der Anlage auch in unebenem Gelände. Die seitlich angebrachten Wassertanks sind zum besseren Transport abnehmbar. Die Rohrleitungen haben einen Durchmesser von 1 ½ Zoll. Dabei handelt es sich um eine Standard-Rohrdimension, wodurch spätere Änderungen oder Anpassungen einfacher möglich sind, weil keine Spezialanfertigungen benötigt werden. Der Stromanschluss erfolgt über eine herkömmliche 230 V Steckdose.



**Abbildung 11: Foto der Ultrafiltrationsanlage Konti-CUF mit Vorrattank (rechts) und Filtrattank (links).**

Der innere Aufbau der Anlage ist in Abbildung 12 dargestellt. Der Kern der Anlage besteht aus einer Polyethersulfon (PES)-Hohlfasermembran der Firma Inge AG mit einer Membranfläche von  $6 \text{ m}^2$  und einer nominalen Porengröße von ca.  $0,02 \text{ }\mu\text{m}$ . Das Filtermodul wurde in einer Größe gewählt, mit der ein Durchsatz von mindestens  $1 \text{ m}^3/\text{h}$  erreicht werden kann. Der vom Hersteller empfohlene Arbeitsbereich dieses Moduls liegt bei Transmembrandrücken zwischen  $0,1$  und  $1,5 \text{ bar}$  und einem Flux zwischen  $60$  und  $180 \text{ L}/(\text{m}^2 \times \text{h})$ . Am IWC wurde bereits zuvor mit diesem Modul gearbeitet, wobei mit Trinkwasser selbst bei einem Flux von über  $200 \text{ L}/(\text{m}^2 \times \text{h})$  keine negativen Beeinträchtigungen festgestellt werden konnten. Für die Rückspülung werden ein Flux zwischen  $230$  und  $300 \text{ L}/(\text{m}^2 \times \text{h})$  und Transmembrandruck von  $0,3 - 3,0 \text{ bar}$  empfohlen. Die Rohrleitungen und Kreiselpumpen sind ebenfalls so gewählt, dass ein Volumenstrom von mindestens  $1 \text{ m}^3/\text{h}$  erreicht werden kann. Dafür wurde ein Rohrdurchmesser von  $1,5 \text{ Zoll}$  gewählt. Die Pumpen wurden speziell so gewählt, dass ein Anlaufen mit trockener Pumpe möglich ist.

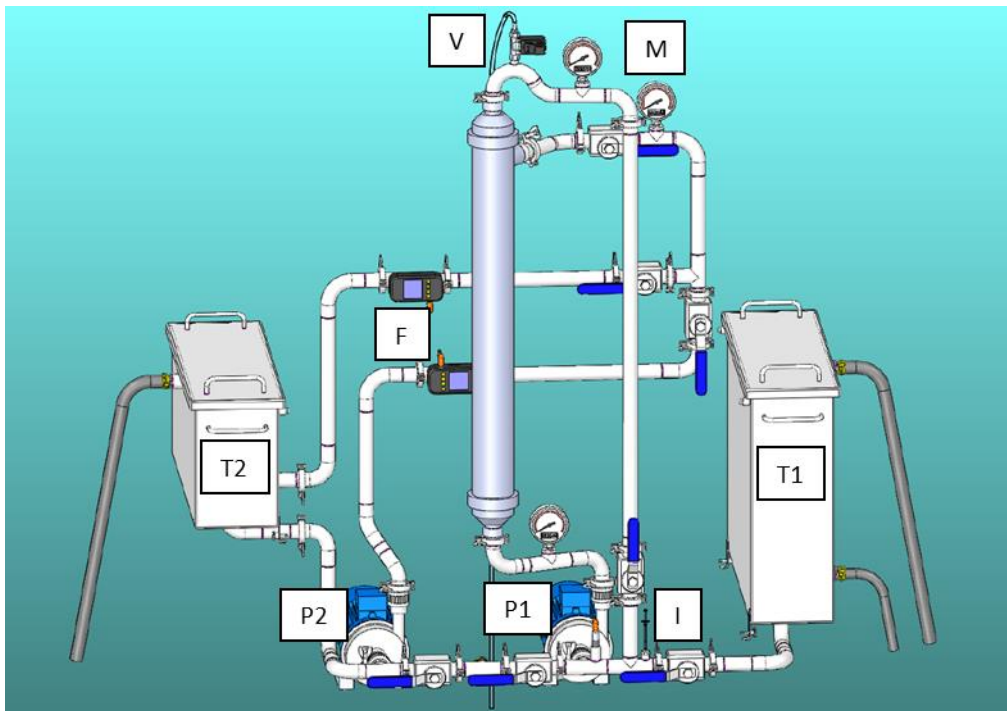
Die Anschlüsse der Rohrleitungen sind so konzipiert, dass auch andere Filtermodule eingesetzt werden können. Die Anlage wird über einen  $\frac{3}{4}$  Zoll-Bajonettverschluss an einen Wasserleiter angeschlossen. Wasserproben werden zunächst in einen  $100\text{-L}$ -Vorrattank (T1) geleitet, aus dem das Wasser mit einer Kreiselpumpe (P1) auf die Filtermembran gepumpt wird. Durch diesen Aufbau kann auch an Wasserleitungen mit schwankendem Druck gearbeitet werden, da der Vorrattank als Pufferzone dient und die Kreiselpumpe gleichmäßig Probe befördern kann. Um eine Befüllung der Anlage zu erleichtern, wurde am höchsten Punkt des Rohrleitungssystems ein Entlüftungsventil

angebracht. Durch dieses Ventil können beim Befüllen der Anlage Luftblasen entfernt werden. Vor der Kreiselpumpe ist ein Anschluss für eine externe Schlauchpumpe angebracht (I), um Proben mit Viren oder Bakterien zusetzen zu können.

Die Probe wird im Kreislauf durch das System gepumpt. Das Filtrat tritt dabei senkrecht zum Probenstrom aus der Filtermembran aus und wird zum Teil in einem 60-L-Filtrattank (T2) gespeichert. Die Anlage wird mittels manuell zu bedienender Kugelventile gesteuert, mit denen zwischen Entlüftung, Filtration und Elution umgeschaltet werden kann. Über die Ventile kann auch zwischen Dead-End- und Cross-Flow-Modus umgeschaltet werden. Die zu analysierenden Viren und Bakterien werden im Kreislaufsystem aufkonzentriert und anschließend eluiert. Der Elutionsprozess wurde im Vergleich zur Vorgängeranlage vollständig überarbeitet. Bei dieser wurde ein Druckbehälter an der Rückseite des Filters eingesetzt, um eine Rückspülung mit filtriertem Wasser durchzuführen. Da dieser Behälter komplett verschlossen war, konnte die Desinfektion nur schwer überprüft werden. Weiterhin war damit keine direkte Steuerung des Elutionsvolumens möglich. Eine Elution mit einem Volumen, welches das Volumen des Behälters (24 L) übersteigt, war nicht möglich. Zur Verbesserung der Elution wurde diese daher für die neue Anlage anders realisiert. Zur Elution dient das, im zweiten Tank gespeicherte, filtrierte Wasser. Dieses wird über eine zweite Kreiselpumpe (P2) im Anschluss an die Filtration zur Elution des Systems genutzt. Das Eluat wird separat aufgefangen. Die Elution erfolgt über eine Rückspülung der Membran mit dem Wasser aus dem Filtrattank. Dieses wird über die Rückseite durch die Membran gespült. Dabei werden höhere Drücke und Flussraten als bei der Filtration verwendet, um die aufkonzentrierten Analyten von der Filtermembran zu lösen. Durch einen Druckstoß von der Rückseite der Membran kann die Elutionsleistung weiter verbessert werden. Mit der Kreiselpumpe kann ein konstanter Druck über die gesamte Elution hinweg gewährleistet werden. Dies war zuvor mit dem Druckbehälter nicht möglich. Zudem kann mit unterschiedlichen Flussraten, Drücken und Volumina eluiert werden, wodurch eine Anpassung des Prozesses, z.B. an unterschiedliche Wassermatrizes, möglich ist. Des Weiteren besitzt die Anlage zwei digitale Flussmesser (F), welche die Flussrate während der Filtration und der Elution anzeigen. Darüber hinaus verfügen die Flussmesser über eine Dosierfunktion, die an die beiden Kreiselpumpen gekoppelt ist. Dadurch ist es möglich, dass die Pumpen nach einer bestimmten Probenmenge, z.B. 1000 L Probe oder 20 L Eluat, automatisch abgeschaltet werden. Während der Filtration kann der Druck über die Manometer (M) an der Anlage abgelesen werden.

Die Rohrleitungen, die Tanks und die Instrumentierung der Anlage sind so ausgelegt, dass es keine nichtdurchströmten Leitungsabschnitte gibt. Dadurch kann die Anlage besser desinfiziert werden und eine Kreuzkontamination zwischen unterschiedlichen Proben wird vermieden. Zur besseren Entlüftung der Anlage wurde über dem Filtermodul ein Entlüftungsventil (V) angebracht. Mit diesem können

Luftblasen, die sich am obersten Punkt der Anlage sammeln, entfernt werden. Weiterhin wurde das Volumen der verbauten Rohrleitungen soweit wie möglich minimiert, um das notwendige Elutionsvolumen so gering wie möglich zu halten. Dies ist notwendig, da bei der Elution das gesamte Wasservolumen in der Anlage ausgespült werden muss.



**Abbildung 12: Innerer Aufbau der Filtrationsanlage mit Vorrattank (T1), Filtrattank (T2), Filtrationspumpe (P1), Elutionspumpe (P2), Injektionsventil (I), Entlüftungsventil (V), Manometern (M) und Flussmessern (F), Bild GWK Präzisionstechnik GmbH.**

## 2.2 Charakterisierung der Anlage

### 2.2.1 Mechanische Charakterisierung

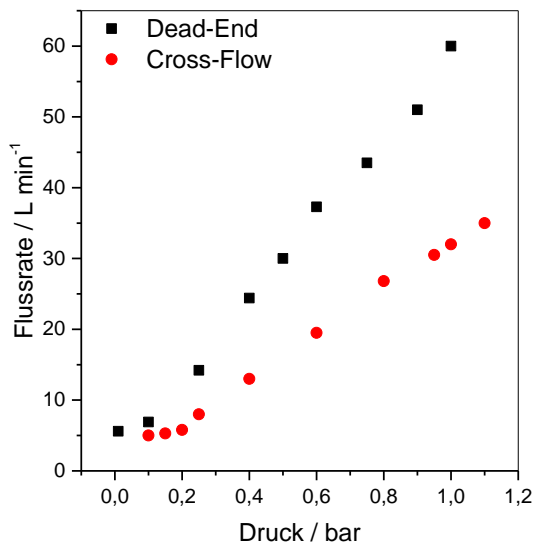
Die Charakterisierung der Anlage erfolgte zunächst mit reinem Leitungswasser, um einen Arbeitsbereich der Anlage zu definieren. Dazu wurden Flussraten und Drücke ermittelt, mit denen die Anlage betrieben werden kann ohne die Filtermembran zu beschädigen. Alle Parameter wurden für Cross-Flow- und Dead-End-Betrieb sowie Elution separat ermittelt. Dazu wurde die Flussrate variiert und der jeweilige Druck am Filtereingang im Filtrationsbetrieb bzw. am Filterausgang im Elutionsbetrieb abgelesen. Als minimale Flussraten wurden diejenigen Einstellungen definiert, bei denen der Druck im System ausreichend ist, um den Gegendruck der Filtermembran zu überwinden. Dies waren 5,3 L/min im Cross-Flow- und 5,6 L/min in Dead-End-Betrieb. Für die Elution lag die minimale Flussrate bei 6 L/min. Da Druckschwankungen im System die Filtermembran beschädigen können, wurden diejenigen Einstellungen als maximale Flussraten definiert, bei denen der Druckmesser am Filterausgang noch keine Schwankungen anzeigt. Dies ist im Cross-Flow-Betrieb bei



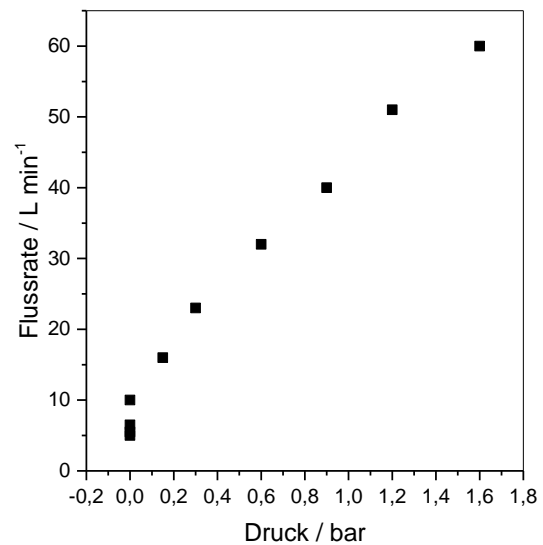
35 L/min und im Dead-End-Betrieb bei 60 L/min der Fall. Die maximale Flussrate für die Elution beträgt 60 L/min.

In Abbildung 13 sind die Flussraten für die verschiedenen Betriebsmodi in Abhängigkeit vom angelegten Druck dargestellt. Im Cross-Flow-Modus wird nicht der gesamte Volumenstrom durch die Membran geleitet, sondern nur ein Teil davon. Daher muss ein höherer Druck am System angelegt werden, um die gleiche Filtrat-Flussrate wie im Dead-End-Modus zu erreichen, bei dem der gesamte Volumenstrom durch die Membran fließt. In beiden Modi steigt der Druck linear mit der Flussgeschwindigkeit. Dieser lineare Bereich entspricht dem definierten Arbeitsbereich der Anlage. Unterhalb dieses Bereichs kann nicht gearbeitet werden, da die Pumpe ausreichend schnell pumpen muss, um den Gegendruck der Membran zu überwinden. Dieser liegt bei ca. 0,2 bar. Unterhalb dieses Gegendrucks kommt kein Fluss im System zustande. Für sehr niedrige Flussraten sind die abgelesenen Drücke zudem nicht mehr im linearen Bereich, da das Manometer nicht sensitiv genug ist, um Drücke  $< 0,1$  bar zu messen.

(A)



(B)



**Abbildung 13: Flussrate im Dead-End- und Cross-Flow-Modus in Abhängigkeit vom Filtereingangsdruck (A), Flussrate während der Elution in Abhängigkeit vom Druck an der Filtrerrückseite in Abhängigkeit (B).**

### 2.2.2 Biologische Charakterisierung

Zur biologischen Charakterisierung der Anlage wurden Filtrationsexperimente mit 1-m<sup>3</sup>-Leitungswasserproben durchgeführt. Ziel war es zunächst, geeignete Betriebsparameter für die Aufkonzentrierung zu finden. Die Anforderung an die Anlage war ein Durchsatz von mindestens 1 m<sup>3</sup>/h. Um diesen zu erfüllen, wurden alle Experimente mit einer Flussrate von 20 L/min gefahren, was einem

Durchsatz von 1,2 m<sup>3</sup>/h entspricht, durchgeführt. Die Elution wurde jeweils in einem Volumen von 20 L durchgeführt, um sicherzustellen, dass das gesamte in der Anlage vorhandene Wasser ausgespült wird. Dabei wurde das Wasser zunächst kontinuierlich mit einer Suspension versetzt, die Bakteriophage MS2 enthielt. Dieser diente als Indikatorkeim, da er nicht pathogen ist und sich daher gut für den Testbetrieb eignet. Die Konzentration der zudosierten Suspension lag bei  $7 \times 10^9$  genomische Einheiten (GU)/mL. Die Suspension wurde mit einer Flussrate von ca. 5 mL/min kontinuierlich zugeführt. Die Flussrate in der Filteranlage lag bei 20 L/min. Im Anschluss an die Filtration wurden die aufkonzentrierten Bakteriophagen mit 20 L des im Filtrattank aufgefangenen Wassers aus der Anlage gespült. Es wurden Proben vom Eluat sowie der zudosierten Phagensuspension genommen. Die Proben wurden zunächst einer Nukleinsäureextraktion mit dem ViralXpress Kit unterzogen. Anschließend wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt. Danach wurden die Proben mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) untersucht, um die Wiederfindungen zu bestimmen. Dazu wurden die insgesamt zudosierten und im Eluat wiedergefundenen Bakteriophagen berechnet. Die Ergebnisse der Wiederfindungsexperimente sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Wiederfindung wurde als Verhältnis von Organismen im Eluat zu den eingesetzten Organismen in der Probe berechnet. Der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor aller Experimente lag bei einem Wert von 50. Der Netto-Aufkonzentrierungsfaktor wurde aus dem Produkt von Wiederfindung und volumetrischen Aufkonzentrierungsfaktor berechnet.

**Tabelle 5: Übersicht der Experimente zur biologischen Charakterisierung der Ultrafiltrationsanlage für verschiedene Organismen in Dead-End- und Cross-Flow-Modus (m = 1, n = 3).**

Modus	Organismus	Proben- kontamination in 1 m <sup>3</sup>	Eluat- kontamination in 20 L	Wiederfindung	Aufkonz.faktor (netto)
Dead-End	MS2	$1,7 \times 10^{12}$ GU	$1,2 \times 10^{12}$ GU	70,5 % ± 3,5 %	35,3
Cross-Flow	MS2	$3,1 \times 10^{11}$ GU	$1,3 \times 10^{11}$ GU	41,9 % ± 2,0 %	21,0
Dead-End (niedriger Elutionsdruck)	MS2	$2,9 \times 10^{11}$ GU	$2,6 \times 10^9$ GU	0,9 % ± 0,2 %	0,5
Dead-End	<i>E. coli</i>	$2,2 \times 10^{11}$ GU	$3,4 \times 10^{11}$ GU	154,9 % ± 20,6 %	77,5
Cross-Flow	<i>E. coli</i>	$1,2 \times 10^{11}$ GU	$2,2 \times 10^{11}$ GU	178,8 % ± 44,2 %	89,4
Dead-End	ΦX174	$6,6 \times 10^{11}$ GU	$3,2 \times 10^{11}$ GU	49,2 % ± 4,8 %	24,6
Dead-End	ΦX174	$7,7 \times 10^{10}$ GU	$5,4 \times 10^{10}$ GU	70,9 % ± 5,4 %	35,5

Die Aufkonzentrierung im Dead-End-Modus erzielte eine höhere Wiederfindung als im Cross-Flow-Modus. Dies kann durch die höheren Scherkräfte, die bei der Cross-Flow-Filtration auf die Viren einwirken, begründet sein. Da die Elution bei einer hohen Flussrate und hohem Druck (1,6 bar) stattfand, könnte es jedoch auch dabei zur Beschädigung der Phagen kommen. Daher wurde eine weitere Dead-End Filtration durchgeführt, bei der der Druck bei der Elution auf 0,6 bar verringert wurde. Dabei wurde die Wiederfindung drastisch gesenkt, auf nur noch 0,93 %. Dies ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass der Filterkuchen, der sich während der Filtration auf der Membran gebildet hat, beim Rückspülen erst wieder von der Membran gelöst werden muss. Hierzu ist ein Druckstoß notwendig. Bei Elution mit geringem Druck wird der Filterkuchen nicht oder nur teilweise von der Membran gelöst und die aufkonzentrierten Viren werden nicht aus der Anlage gespült.

Des Weiteren wurde die Anlage auch mit dem Bakterium *E. coli* (DSM 5695) getestet. Dabei wurde derselbe Aufbau wie zuvor verwendet, es wurde jedoch eine *E. coli*-Suspension zudosiert. Bei der Zudosierung von Bakterien besteht wie bei Viren die Problematik, dass eine ausreichende

Konzentration verwendet werden muss, um auch in großen Volumina noch ein Messsignal zu erhalten. Diese Menge muss zuvor in einer Bakterienübernachtskultur hergestellt werden. Insgesamt wurde eine Menge von ca.  $2,2 \times 10^{11}$  Bakterien in  $1 \text{ m}^3$  Leitungswasser dosiert. Es wurde eine Suspension mit einer Konzentration von ca.  $1,1 \times 10^9$  GU/mL hergestellt und kontinuierlich mit einer Flussrate von ca. 5 mL/min in den Zustrom der Filteranlage gepumpt. Während der Filtration wurden so ca. 200 mL der Suspension in die Wasserprobe injiziert. Die Elution wurde bei einem Druck von 1,6 bar in 20 L durchgeführt. Anschließend erfolgten eine Extraktion mit Viral Xpress sowie die Quantifizierung mittels qPCR. Die Wiederfindungen lagen bei  $178 \pm 44$  % im Cross-Flow-Modus und bei  $154 \pm 21$  % im Dead-End-Modus. Derart hohe Wiederfindungen im Bereich deutlich über 100 % verdeutlichen die Problematik der Detektion von Bakterien in großen Volumina. Es kann kaum sichergestellt werden, dass eine Probe aus den 20 L Eluat repräsentativ für das gesamte Volumen ist. Es wurden jeweils 2 - 3 mL des Eluats als Probe genommen. Davon wurde je 200  $\mu\text{l}$  zur Nukleinsäureextraktion und anschließenden qPCR eingesetzt. Eine optimale Durchmischung des Eluats kann dabei nicht sichergestellt werden. Die Bakterien werden an der Membranoberfläche aufkonzentriert und können dabei möglicherweise in der Deckschicht der Membran miteinander interagieren und Agglomerate bilden. Diese können bei der anschließenden Elution nicht vollständig aufgelöst werden. Daher liegen in der Eluatprobe nicht einzelne Bakterien im Wasser vor, sondern Zellverbände, die zu einer inhomogenen Konzentrationsverteilung führen. Diese Agglomerate können bei der anschließenden Analytik zu einer Über- oder Unterbestimmung der Eluatkonzentration führen, da nur ein Teil des Wassers analysiert werden kann und nicht die gesamte Probe. Eine Optimierung des Probenahmeprozesses ist allerdings nur schwer möglich, da nicht kontrolliert werden kann, ob eine stärkere Durchmischung der Probe oder längeres Schütteln eine tatsächliche Auswirkung haben. Daher können die Wiederfindungen, die aus 20-L-Eluatproben stammen, stark schwanken. Die bestimmten Werte für Konzentrationen sind daher möglicherweise nicht repräsentativ für die tatsächliche Leistung der Aufkonzentrierung. Um diese einschätzen zu können, ist daher die Größenordnung der Eluatkonzentration ausreichend, da diese im selben Bereich wie die eingesetzten Mengen liegen sollte. Da die gemessenen Konzentrationen innerhalb der angestrebten Größenordnung liegen, scheint der Filtrationsprozess ausreichend gut für Bakterien zu funktionieren.

Darüber hinaus wurde die Anlage zudem noch mit dem Bakteriophagen  $\Phi\text{X174}$  getestet. Der Aufbau war identisch mit dem zuvor verwendeten. Die Konzentration der zudosierten Phagensuspension lag bei  $8 \times 10^7$  bzw.  $8 \times 10^8$  GU/ml. Die damit erzielten Wiederfindungen lagen mit 49,2 % und 70,9 % im selben Bereich wie für MS2. Somit wurde gezeigt, dass die Anlage dazu geeignet ist, verschiedene Viren und Bakterien aufzukonzentrieren.

Basierend auf den Ergebnissen der Experimente wurden die Filtrationsparameter für die Anlage festgelegt. Da Trinkwasser nur eine sehr geringe Trübung aufweist ( $< 0,01$  NTU), ist eine Filtration im Cross-Flow-Modus nicht notwendig, um ein Verblocken der Membran zu verhindern. Die Wiederfindung im Dead-End-Modus war generell höher, weshalb dieser zur Aufkonzentrierung von Pathogenen verwendet wird. Die Elution findet in 20 L Wasser statt und wird mit einem Druck von 1,6 bar durchgeführt.

Um zu gewährleisten, dass es zu keiner Kreuzkontamination kommen kann, wurde ein Desinfektionsprotokoll für die Anlage entwickelt. Dabei werden alle Tanks und Rohre der Anlage mit 200 ppm Natriumhypochlorit gespült. Zunächst wird der Filtrationszyklus, und anschließend der Elutionskreislauf der Anlage gespült. Nachfolgend wird die Anlage mit ca. 300 L Wasser gespült. Um zu überprüfen, ob dieses Protokoll ausreichend ist, wurde eine Filtration von  $1 \text{ m}^3$  mit Bakteriophage MS2-versetztem Trinkwasser mit anschließender Desinfektion durchgeführt. Es wurden Proben der Ausgangs-Phagensuspension und dem Eluat genommen. Die Phagensuspension wurde vor und nach dem Zudosieren gewogen, um die genaue eingesetzte Menge zu bestimmen. Nach der Desinfektion der Anlage wurden Proben aus dem Filtrattank und dem Elutionsschlauch genommen. Von allen Proben wurde eine Nukleinsäureextraktion mittels Viral Xpress Kit, eine anschließende cDNA-Synthese und eine Quantifizierung mittels qPCR durchgeführt. Die mittels qPCR bestimmten Konzentrationen wurden mit dem eingesetzten Volumen der Phagensuspension bzw. dem Elutionsvolumen multipliziert, um die exakte Menge der Phagen in den Proben zu bestimmen. Dabei wurden in der Ausgangsprobe  $1,69 \times 10^{12}$  GU MS2 Phagen und im Eluat  $1,19 \times 10^{12}$  GU MS2-Phagen gefunden. In den Proben aus dem Filtrattank und dem Elutionsschlauch nach der Desinfektion konnten keine Bakteriophagen nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass das Desinfektionsprotokoll ausreichend ist und alle Kontaminationen damit entfernt werden können. Daher wird es nach jeder filtrierten Probe angewandt, um eine Kreuzkontamination auszuschließen. Während die Anlage nicht in Betrieb ist, wird sie ebenfalls unter 200 ppm Natriumhypochlorit gelagert, um die Bildung von Biofilmen in den Rohren und dem Filtermodul zu verhindern.

### 2.3 Filtration unter optimierten Bedingungen

Die optimierten Bedingungen wurden für Filtrationsexperimente mit  $1\text{-m}^3$ -Wasserproben angewandt. Dabei wurden die Proben kontinuierlich mit einer Suspension von Bakteriophage  $\Phi\text{X174}$  versetzt. Es wurden verschiedene Ausgangskonzentrationen der Suspension im Bereich zwischen  $10^{11}$  und  $10^8$  GU/L hergestellt. Diese wurden eingesetzt, um Probenkonzentrationen von  $10^5$  bis  $10^2$  GU/mL in den  $1\text{-m}^3$ -Wasserproben zu erzielen. Die Filtrationen wurden im Dead-End-Modus bei einer Flussrate von 20 L/min durchgeführt. Die Elution fand bei einem Druck von 1,6 bar in 20 L statt. Es wurden jeweils

Proben von der Phagensuspension und dem Eluat genommen und nach der Filtration analysiert. Dazu wurde eine DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Mini Kit und eine anschließende qPCR durchgeführt. Pro Konzentration wurde jeweils eine Filtration durchgeführt ( $m = 1$ ). Die Quantifizierung mittels qPCR wurde in Triplikaten durchgeführt ( $n = 3$ ). Die Konzentrationen der Proben und Eluate sind in Abbildung 14 dargestellt. Dabei ist der lineare Zusammenhang der Konzentrationen zu erkennen. Tabelle 6 zeigt die Wiederfindungen. Diese liegen für die beiden hohen Ausgangskonzentrationen bei  $43,69 \pm 1,56 \%$  und  $49,10 \pm 5,28 \%$ . Dies entspricht einem Aufkonzentrierungsfaktor von 21,5 bzw. 24,5. Für die beiden niedrigeren Konzentrationen wurden Wiederfindungen von  $101,58 \pm 61,95 \%$  und  $210,0 \pm 98,89 \%$  bestimmt. Die große Streuung ist dabei wahrscheinlich durch die schon zuvor im Kapitel 2.2.2 beschriebene Problematik der Probennahme in 20-L-Eluatproben zu erklären. Hinzu kommt die mangelnde Sensitivität der qPCR für extrem kleine Konzentrationen. Der lineare Bereich der qPCR endete bei einer Konzentration von  $3,7 \times 10^3$  GU/mL. Insgesamt scheint die Aufkonzentrierungsleistung der Anlage aber zufriedenstellend. Im Vergleich mit der Vorgängeranlage konnten die Wiederfindungen sogar leicht verbessert werden, welche für eine Menge von  $10^{10}$  GU MS2, eingesetzt in 1000 L, bei  $19,3 \pm 13,6 \%$  im Dead-End-Modus und  $45,4 \pm 23,3 \%$  im Cross-Flow-Modus lagen [235].

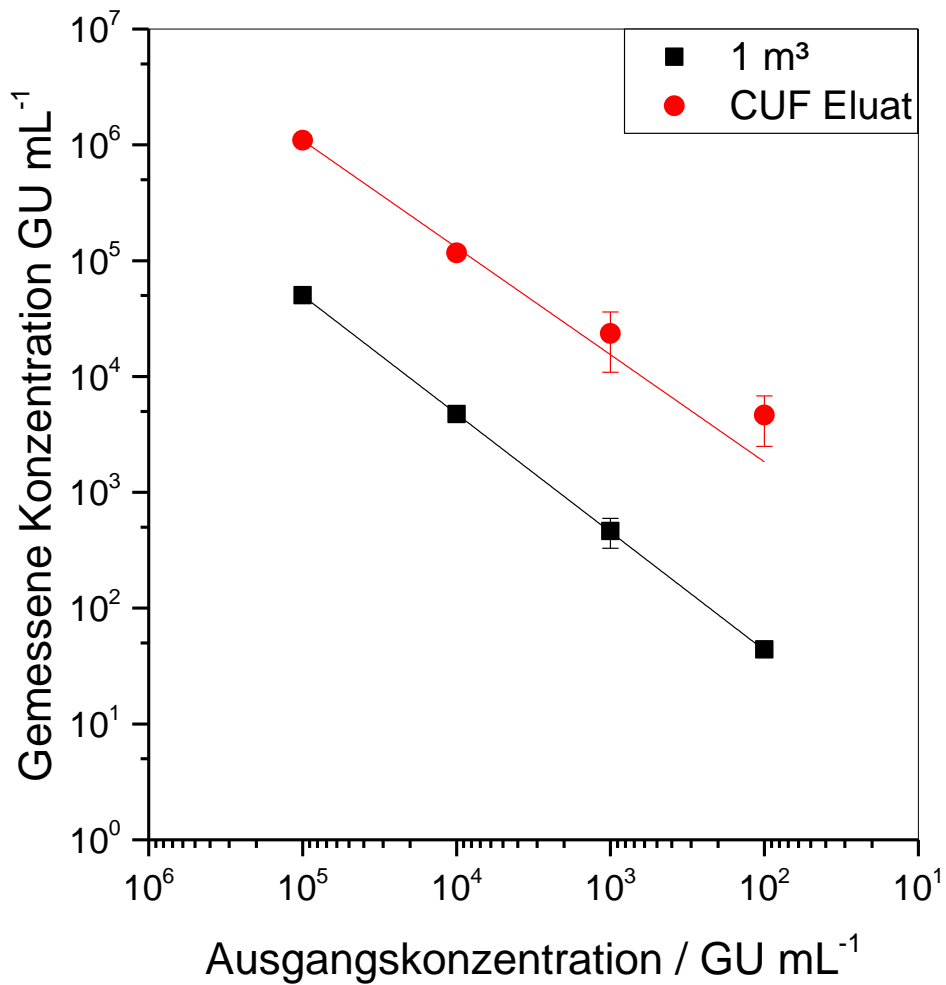


Abbildung 14: Aufkonzentrierung unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen von Bakteriophage  $\Phi$ X174 aus 1 m<sup>3</sup> Wasser auf 20 L mit der Konti-CUF ( $m = 1$ ,  $n = 3$ ).  $R^2 = 0,99$  für 1 m<sup>3</sup> und  $R = 0,99$  für CUF Eluat.

Tabelle 6: Wiederfindungen der Eluate für verschiedene Ausgangskonzentrationen ( $m = 1$ ,  $n = 3$ ). Werte über 100 % resultieren aus der mangelnden Sensitivität der qPCR und den großen Probenvolumina von 20 L.

Ausgangskonzentration	Wiederfindung
10 <sup>5</sup> GU/mL	43,7 ± 1,6 %
10 <sup>4</sup> GU/mL	49,1 ± 5,3 %
10 <sup>3</sup> GU/mL	101,6 ± 62,0 %
10 <sup>2</sup> GU/mL	210,0 ± 98,9 %

### 2.4 Zusammenfassung Ultrafiltration

Es wurde eine mobile UF-Anlage gebaut um Wasserproben von 1 m<sup>3</sup> auf 20 L einzuengen. Dabei wurde das ursprüngliche Design der ersten Anlage weiterentwickelt. Durch den Einsatz einer zweiten Pumpe und eines Filtratbehälters anstelle eines Druckbehälters konnte eine leichter zu steuernde Elution etabliert werden. Weiterhin sind die Teile der Anlage leichter zu desinfizieren. Durch die verringerten Abmessungen ist ein Transport der Anlage leichter möglich. Die Anlage wurde mechanisch und biologisch charakterisiert und es wurden die Betriebsparameter für die Filtrations-, Elutions- und Desinfektionsschritte festgelegt. Die Wiederfindungsraten für die Bakteriophagen MS2 und ΦX174 lagen mit über 40 % in einem akzeptablen Rahmen. Es ist möglich, dass die Wiederfindungen weiter gesteigert werden können, indem die Betriebsparameter weiter optimiert werden. So könnten durch geringere Flussraten und Drücke bei Filtration und Elution weniger Beschädigungen durch Scherkräfte auftreten. Allerdings würde dies den Durchsatz der Anlage deutlich verringern. Da die Anlage im Hygiene-Monitoring verwendet werden soll, ist Zeit ein wichtiger Faktor, weshalb die Filtration ein Kompromiss aus Effektivität und Durchsatz ist. Zudem müssten diese Optimierungen mit einem sehr breiten Spektrum an Mikroorganismen und Viren durchgeführt werden, um den Einfluss dieser Parameter auf deren Integrität genauer beurteilen zu können. Da die relevanten Organismen jedoch humanpathogen sind, kann mit ihnen nur in einem entsprechenden Labor gearbeitet werden. Da die UF-Anlage zu groß ist, um in einem solchen Labor am Institut für Wasserchemie betrieben zu werden, konnte bislang nur mit Indikatorkeimen wie Bakteriophage MS2 gearbeitet werden. Die durchgeführten Charakterisierungsexperimente zeigen jedoch bereits, dass die Anlage zum Einsatz im kontinuierlichen Wasserhygiene-Monitoring geeignet ist. Weitere Optimierungen sind daher erst unter realen Bedingungen und im kombinierten Gesamtprozess sinnvoll.

### 3. Monolithische Adsorptionsfiltration

Zur Aufkonzentrierung von Mikroorganismen und Viren aus Wasserproben mittlerer Volumina (ca. 10 - 100 L) wurde die monolithische Adsorptionsfiltration entwickelt. Die Entwicklung dieser Methode war Teil der Dissertationen von Caroline Peskoller [237] und Lu Pei [191]. Dabei handelt es sich um ein makroporöses Polyepoxid, das durch die Polymerisation von Polyglycerol-3-glycidylether hergestellt wird. Durch die Verwendung einer Mischung von Toluol und Methyl-*tert*-butylether wird eine Porengröße von ca. 20 µm erreicht. An der Porenoberfläche befinden sich Epoxygruppen, die durch Hydrolyse zu Hydroxygruppen funktionalisiert werden können. Diese können genutzt werden, um Mikroorganismen und Viren aus Wasser über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen aufzukonzentrieren. Ziel dieser Arbeit war es, die MAF-Methode so weiterzuentwickeln, dass sie für das Inline-Hygiene-Monitoring eingesetzt werden kann. Dazu wurden Monolithen benötigt, die es



ermöglichen, Pathogene ohne weitere Probenvorbereitung, wie z.B. pH-Veränderungen, direkt aus Wasserproben aufzukonzentrieren. Daher wurde zunächst die Oberflächenchemie der Monolithen weiterentwickelt. Da Bakterien und Viren an ihrem isoelektrischen Punkt zu Agglomeration neigen, sollte eine Möglichkeit gefunden werden, eine Aufkonzentrierung möglichst ohne Überschreitung des IEP zu erzielen. Dazu sollten alternative Puffersysteme untersucht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Aufkonzentrierung mittels MAF auch in Realproben, die eine deutlich höhere Belastung durch Schwebstoffe und Partikel beinhalten, möglich ist. Dies ist notwendig, um, wie von der WHO gefordert, nicht nur das Trinkwasser selbst, sondern auch Rohwasser überwachen zu können. Zuletzt sollte eine Automatisierung des MAF-Prozesses stattfinden, die in das kombinierte Gesamtsystem integriert werden kann.

### 3.1 Optimierung Elutionspuffer für MAF-OH

Bei der Aufkonzentrierung mittels MAF-OH wurde bislang häufig BEG-Puffer verwendet. Dieser ist ein Standardpuffer, der auch bei anderen Aufkonzentrierungsmethoden, wie z.B. der Glaswollefiltration, häufig eingesetzt wird. Allerdings hat der hohe Proteingehalt dieses Puffers oft negativen Einfluss auf nachfolgende Analysemethoden, wie beispielsweise PCR Reaktionen, die durch den Rinderextrakt inhibiert werden. Weiterhin ist langfristig der Einsatz eines automatisierten Lab-on-Chip-Systems zur Nukleinsäureextraktion anstelle manueller Kits im Wasserhygiene-Monitoringsystem geplant. Dieses System wurde während des BMBF-Projekts EDIT am Institut für Mikrosystemtechnik der Universität Freiburg (IMTEK) entwickelt. Das System basiert auf elektrophoretischer Aufreinigung der DNA und kann durch proteinhaltige Puffer gestört werden. Im dreistufigen Aufkonzentrierungsverfahren für das Wasser-Hygiene-Monitoringsystem wird der MAF eine zentrifugale Ultrafiltration nachgeschaltet, bei der der Puffer ausgetauscht werden kann. Somit ist der Einsatz des Lab-on-Chip-Systems nach MAF auch mit Elution durch BEG-Puffer möglich. Allerdings kann MAF auch außerhalb des Verbundverfahrens eingesetzt werden. Daher wurde untersucht, ob der BEG-Puffer durch alternative Puffersysteme ersetzt werden kann. Hierzu wurden 10-L-Wasserproben mit Bakteriophage MS2 versetzt und mittels MAF-OH mit einer Flussrate von 1 L/min filtriert. Dabei wurden sehr hohe Ausgangskonzentrationen von ca.  $10^8$  GU/mL eingestellt, um die Monolithen vollständig mit Bakteriophagen zu beladen. Dadurch sollte eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Elutionspuffern erreicht werden. Die Elution der adsorbierten Phagen von den gesättigten Monolithen erfolgte anschließend mit unterschiedlichen Elutionspuffern in einem Volumen von 20 mL. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 150 mL/min. Die Nukleinsäureextraktion fand mit dem Viral Xpress Kit statt. Danach erfolgte die cDNA-Synthese und anschließend die Quantifizierung durch qPCR.

Alle Filtrationsexperimente wurden jeweils dreimal durchgeführt ( $m = 3$ ). Die Quantifizierung mittels qPCR wurde in Triplikaten durchgeführt ( $n = 3$ ). Zunächst wurde der Einsatz von Glycinpuffer untersucht. Dieser wird wie BEG-Puffer hergestellt, jedoch ohne den Zusatz von Rinderextrakt. Die Ergebnisse zeigen, dass die adsorbierten Phagen mit Glycinpuffer auch ohne Rinderextrakt eluiert werden können. Mit dem Referenzpuffer BEG wurden  $1,1 \times 10^{11} \pm 3,3 \times 10^{10}$  GU eluiert. Mit Glycin wurden  $5,8 \times 10^{10} \pm 7,7 \times 10^9$  GU eluiert. Der Zusatz von Detergenzien wie Tween 20, Tween 80 oder Pluronic F-127 konnte die Elution nicht weiter verbessern. Es wurden jeweils  $1,1 \times 10^{10} \pm 1,1 \times 10^{10}$  GU,  $7,3 \times 10^{10} \pm 2,76 \times 10^9$  GU und  $2,6 \times 10^{11} \pm 5,8 \times 10^{10}$  GU eluiert. Als alternatives Puffersystem wurde Carbonatpuffer untersucht. Dieser zeigte mit  $1,2 \times 10^{11} \pm 6,3 \times 10^{10}$  GU eine ähnliche Elutionsleistung wie die Glycin-basierten Puffer. Auch hier konnte der Einsatz von Detergenzien die Ausbeute nicht weiter steigern. Mit Zusatz von Tween 80 wurden  $6,6 \times 10^{10} \pm 6,4 \times 10^{10}$  GU und mit Tween 20  $8,6 \times 10^{10} \pm 6,2 \times 10^{10}$  GU eluiert. Durch den Einsatz einer 1:10 Verdünnung von Carbonatpuffer mit Reinstwasser konnte die Elutionsleistung mit  $1,0 \times 10^{11} \pm 2,4 \times 10^{10}$  eluierten GU ebenfalls nicht verändert werden. Zum Vergleich wurden auch Elutionen mit Reinstwasser bei neutralem pH-Wert und bei pH 3 durchgeführt. Damit wurden je  $5,7 \times 10^9 \pm 4,6 \times 10^9$  und  $4,2 \times 10^8 \pm 1,8 \times 10^8$  GU eluiert. Die Konzentrationen der Eluate mit Reinstwasser bei pH 7 und pH 3 lagen somit bei  $2,9 \times 10^8$  und  $2,1 \times 10^7$  GU/mL. Die Konzentrationen der Reinstwassereluate unterschieden sich damit kaum von der Ausgangskonzentration. Diese lagen für Reinstwasser bei  $1,3 \times 10^8$  GU/mL und bei  $2,5 \times 10^7$  GU/mL für Reinstwasser bei pH 3. Die Ergebnisse zeigen, dass BEG-Puffer zur Elution von MS2 durch einfachere Puffersysteme ersetzt werden kann. Dadurch wäre ein Einsatz in z.B. automatisierten Lab-on-Chip Systemen zur Nukleinsäureextraktion oder in PCR-Reaktionen einfacher möglich.

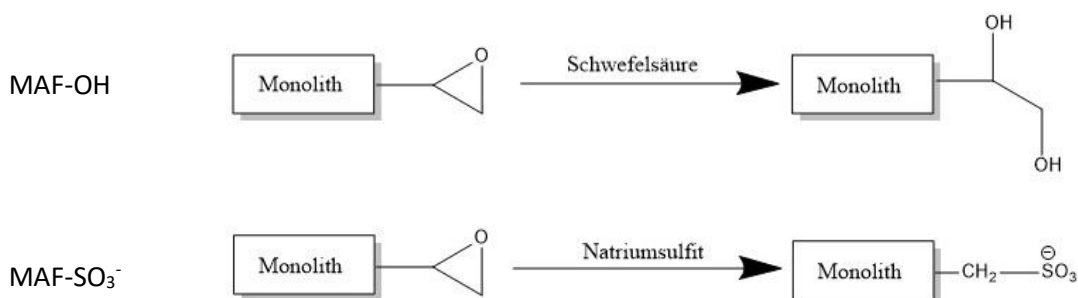
### 3.2 Entwicklung neuer Funktionalisierungen

Die Aufkonzentrierung von Mikroorganismen und Viren mittels MAF basiert auf den ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Analytenoberfläche und den funktionellen Gruppen an der Porenoberfläche der Monolithen. In vorangegangenen Arbeiten wurden Hydroxygruppen verwendet, um Viren oder Bakterien aus zuvor angesäuerten Proben anzureichern. Bei dieser Verfahrensweise wird der isoelektrische Punkt (IEP) von beispielsweise Bakteriophage MS2 zweimal überschritten. Zunächst bei der Einstellung auf pH 3 durch Ansäuern und anschließend bei der Elution bei pH 9,5. Am isoelektrischen Punkt kann es leicht zur Agglomeration der Viren kommen. Dies kann zu Fehlern in der nachfolgenden Quantifizierung führen, da eine repräsentative Probenahme erschwert wird. Das Ziel dieser Arbeit war es, Monolithen zu entwickeln, mit denen eine Aufkonzentrierung ohne vorheriges Ansäuern möglich ist und damit die Überschreitungen des isoelektrischen Punkts der Analyten zu minimieren. Weiterhin sollte dadurch auch eine

Automatisierung des MAF-Prozesses erleichtert werden, da der Ansäuerungsschritt nur sehr aufwändig automatisiert werden kann.

Die bislang verwendeten Hydroxygruppen werden in der Ionenaustauschchromatographie als schwache Kationenaustauscher verwendet. Daher wurde der Einsatz von anderen Ionenaustauscherguppen auf den Monolithen untersucht. Durch Funktionalisierung mit Diethylamin (10 % Diethylamin in 50 % Ethanol, 60 °C, 3 h) wurden schwache Anionenaustauscherguppen (Diethylaminoethan, DEAE) an die Porenoberfläche synthetisiert. Durch Einsatz von Triethylamin (10 % Triethylamin in 50 % Ethanol, 60 °C, 3 h) wurden quaternäre Ammoniumgruppen (Q) als starke Anionenaustauscherguppen an der Oberfläche synthetisiert. Diese Gruppen kommen auch in der Ionenaustauschchromatographie zum Einsatz und konnten bereits zur Anreicherung von Viren auf Chromatographiesäulen bei pH 7 eingesetzt werden [183, 184, 189]. Sie tragen positive Ladungen und sind daher geeignet, um in pH-neutralen Medien zumeist negative geladenen Viren und Mikroorganismen ohne weitere Probenvorbereitung aufzukonzentrieren. Des Weiteren wurde die Funktionalisierung mit Natriumsulfit (1 M Natriumsulfit, pH 11, 75 °C, 8h) untersucht. Die dadurch synthetisierten Sulfitgruppen ( $-\text{SO}_3^-$ ) sind negativ geladen und dienen als starke Kationenaustauscher.

#### Kationenaustauschersäulen



#### Anionenaustauschersäulen

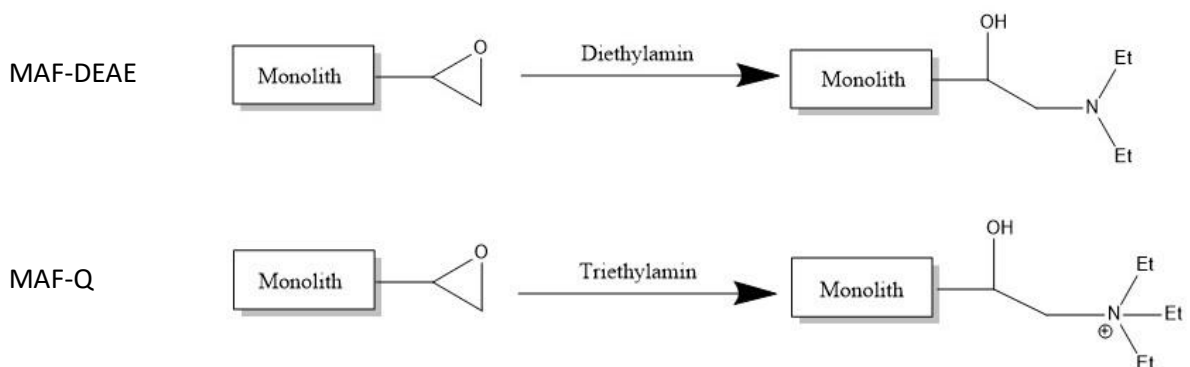


Abbildung 15: Funktionalisierung der MAF-Disks mit Ionenaustauschgruppen.

Zur Überprüfung der neuen funktionellen Gruppen und deren Verwendung zur Aufkonzentrierung von Viren wurden Filtrationsexperimente mit Bakteriophage MS2 durchgeführt. Dazu wurden 10-L-Leitungswasserproben mit Bakteriophage MS2 versetzt und auf eine Konzentration von  $3,7 \times 10^7 \pm 4,8 \times 10^6$  GU/mL eingestellt. Zur Überprüfung der funktionellen Gruppen -OH und  $-\text{SO}_3^-$  wurden die Proben mit 37 %iger Salzsäure auf pH 3 eingestellt. Die Proben zur Überprüfung der DEAE- und Q-Anionenaustauschergruppen sowie unfunktionalisierter Monolithen wurden nicht weiter behandelt, mit einer Flussrate von 1 L/min filtriert und anschließend in einem Volumen von 20 mL eluiert. Als Elutionspuffer diente Rinderextrakt-Glycin-Puffer (*beef extract glycine*, BEG-Puffer). Der pH-Wert des Elutionspuffers wurde für die OH- und  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen-Proben mit 32 %iger Natronlauge auf 9,5 eingestellt. Für die MAF-DEAE, MAF-Q und unfunktionalisierten Monolithen wurde der Puffer mit 37 %iger Salzsäure auf pH 3,0 eingestellt. Es wurden jeweils drei Filtrationsexperimente durchgeführt ( $m = 3$ ). Anschließend erfolgte eine Nukleinsäureextraktion mit dem Viral Xpress Kit und eine cDNA-Synthese. Danach erfolgte die Quantifizierung mittels qPCR in Triplikaten ( $n = 3$ ).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Konzentration der Proben für alle funktionellen Gruppen durch die Aufkonzentrierung mittels MAF um mindestens einen Faktor 10 erhöht werden konnte. Im Vergleich dazu wurde die Konzentration mit unfunktionalisierten Monolithen nur um den Faktor 1,5 erhöht. Da diese Monolithen hochreaktive Epoxygruppen an der Porenoberfläche tragen, ist es möglich, dass es hier zu Ringöffnungen und somit zu Interaktionen zwischen Monolith und MS2-Phagen kommen kann. Dadurch ist eine geringe Aufkonzentration möglich. Insbesondere die DEAE- und Q-Anionenaustauschergruppen zeigen eine starke Erhöhung der Eluatkonzentration. Die negativ geladenen OH- und  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen erhöhten die Konzentration nicht im gleichen Maße. Da die eingesetzte Konzentration der MS2-Phagen jedoch sehr hoch lag, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindungskapazität der monolithischen Säule überschritten wurde. Es wurden keine Wiederfindungen berechnet, da diese nicht repräsentativ für die Aufkonzentrierungsleistung unter realen Bedingungen mit sehr viel niedrigeren Ausgangskonzentrationen wären. Die Konzentrationen wurden bewusst so hoch gewählt, da es sich bei diesem Experiment zunächst nur um einen reinen Funktionstest handelte. Es sollte überprüft werden ob die neuen funktionellen Gruppen eingesetzt werden können, um mittels MAF Viren aus Wasser aufkonzentrieren zu können und ob sie ähnlich gut wie die bereits etablierten MAF-OH-Säulen funktionieren. Durch hohe Probenkonzentrationen sollte gewährleistet werden, dass sowohl die 10-L-Ausgangsproben als auch die 20-mL-Eluatproben mittels qPCR quantifiziert werden können.

Es wäre ebenfalls möglich, dass die Synthese dieser beiden Gruppen nicht so effizient funktioniert wie die der positiv geladenen Gruppen. Dadurch wäre eine geringere Bindungskapazität möglich. Es muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass bei der Aufkonzentrierung der Proben bei pH 3 und der

anschließenden Elution bei pH 9,5 der isoelektrische Punkt (IEP) von Bakteriophage MS2 zweimal überschritten wird. Dies ist bei Filtration im neutralen pH-Bereich nur einmal der Fall. Am isoelektrischen Punkt kann es leicht zur Agglomeration der Viren kommen. Dies kann zu Fehlern in der nachfolgenden Quantifizierung führen. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass die Synthese und Anwendung der neuen funktionellen Gruppen auf MAF-Disks funktioniert. Mit allen vier funktionellen Gruppen konnte eine Aufkonzentrierung erzielt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufkonzentrierung von MS2-Phagen mittels positiv geladener funktioneller Gruppen an der MAF-Oberfläche auch in unbehandeltem Wasser möglich ist. Es ergeben sich durch die insgesamt vier MAF-Sorten grundsätzlich jedoch auch viele Möglichkeiten im Hinblick auf andere zukünftige Anwendungen. So wäre beispielsweise die Anwendung der negativ geladenen Monolithen MAF-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> und MAF-OH denkbar für Viren, die einen besonders hohen IEP besitzen und dadurch bei pH 7 eine positive Ladung tragen, wie z.B. bestimmte Polio- oder Influenzaviren. So könnte durch Kombination positiv und negativ geladener Monolithen ein breiteres Spektrum von Pathogenen aufkonzentriert werden. Für die hier angestrebte Aufkonzentrierung bei pH 7 wurden mit MAF-DEAE die besten Ergebnisse erzielt. Daher wurde im Folgenden hauptsächlich mit diesen Monolithen gearbeitet. Weiterhin konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine Vielzahl funktioneller Gruppen an die Monolithen synthetisiert und zur Aufkonzentrierung genutzt werden kann.

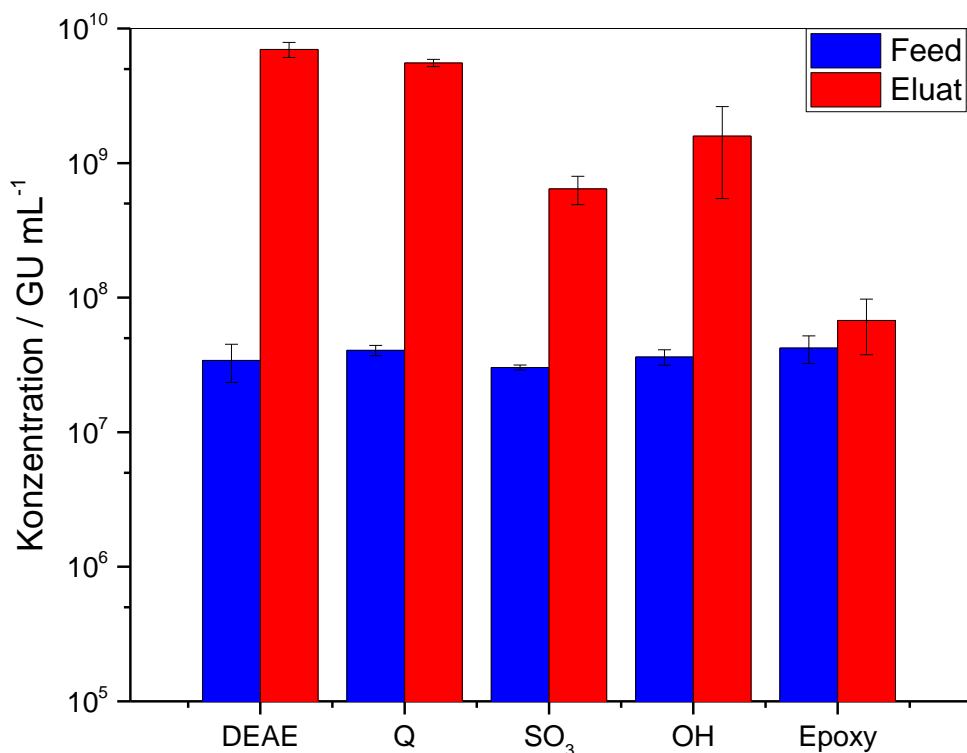


Abbildung 16: Überprüfung der funktionellen Gruppen auf MAF-Disks. (m = 3, n = 3)

### 3.2.1 Optimierung der Elution für MAF-DEAE

Zur Optimierung der Aufkonzentrierung mittels der positiv geladenen Monolithen wurden ebenfalls alternative Elutionspuffer untersucht. Neben dem bisher angewandten BEG-Puffer bei pH 9,5 wurden Glycinpuffer bei pH 9,5 sowie Hochsalzpuffer aus 0,05 M HEPES und 1,5 M NaCl bei pH 3 und ohne gezielte pH-Einstellung (entspricht pH 6) getestet. Da die hier angewandten DEAE- und Q-Funktionalisierungen auf den Monolithen auch in der Ionenaustauschchromatographie eingesetzt werden, wurde der Hochsalzpuffer ebenfalls aus der Chromatographie übernommen. Zur Überprüfung der Elutionsleistung der Puffer wurden jeweils 10 L Leitungswasser mit Bakteriophage MS2 versetzt und mit einer Flussrate von 1 L/min filtriert. Anschließend wurden die adsorbierten Phagen in 20 mL des jeweiligen Puffers eluiert. Es wurden jeweils drei Filtrationen pro Puffer durchgeführt ( $m = 3$ ). Die Ergebnisse nach anschließender Extraktion (Viral Xpress), cDNA-Synthese und qPCR (gemessen in Triplikaten,  $n = 3$ ) sind in Abbildung 17 dargestellt. Durch den bislang verwendeten Elutionspuffer BEG bei pH 9,5 wurde die Konzentration um den Faktor  $13 \pm 4$  erhöht. Im Eluat mit Glycinpuffer wurde die Konzentration um den Faktor  $32 \pm 7$  erhöht. Der Einsatz des Hochsalzpuffers konnte die Konzentrationserhöhung auf einen Faktor von  $42 \pm 27$  erhöhen. Bei pH 6 konnte mit Hochsalzpuffer sogar eine Erhöhung um den Faktor  $66 \pm 11$  erzielt werden. Bei der Elution mit Hochsalzpuffer wird die Ionenstärke des Puffers verwendet, um adsorbierte Phagen von der Monolithenoberfläche zu lösen. Daher funktioniert er auch im neutralen pH-Bereich. Somit kann dieser Puffer zusammen mit den positiv geladenen Monolithen genutzt werden, um eine Aufkonzentrierung der Bakteriophagen ohne Veränderung des pH-Werts zu erzielen. Aus diesem Grund wurde in allen folgenden Experimenten Hochsalzpuffer mit neutralem pH-Wert zur Elution verwendet.

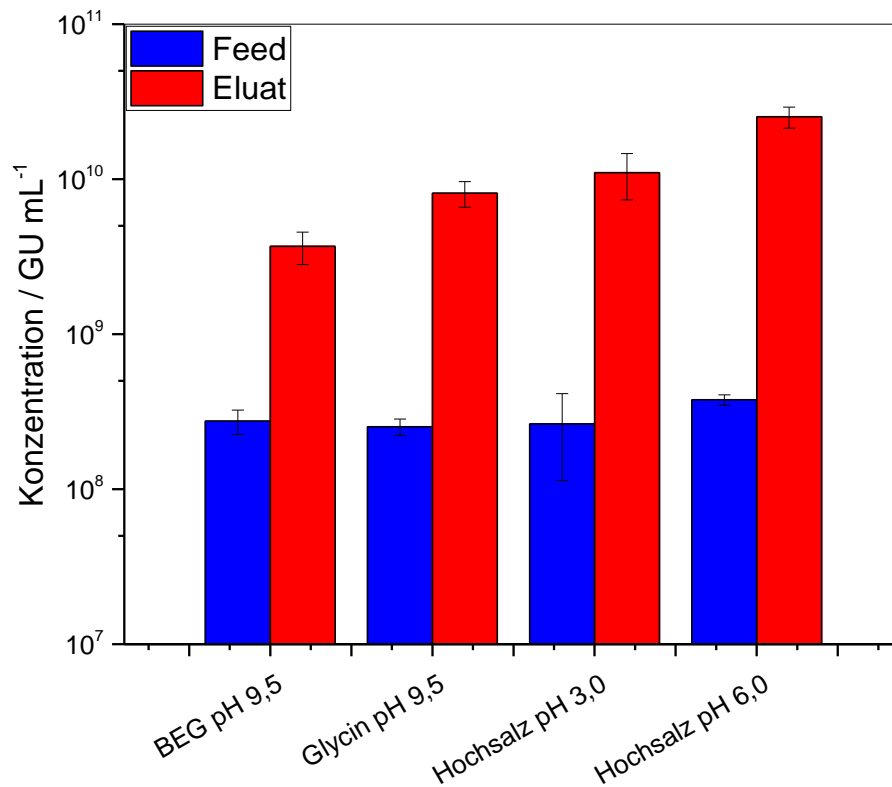


Abbildung 17: Elutionsleistung verschiedener Puffer zu Elution von Bakteriophage MS2 für MAF-DEAE (m = 3, n = 3).

### 3.2.2 Quantitative Charakterisierung der Monolithen mit Bakteriophage MS2

Um einen Monolithen zu finden, mit dem eine direkte Aufkonzentrierung in Wasserproben möglich ist, wurden die vier verschiedenen MAF-Sorten bei pH 7 getestet. Dazu wurden 10-L-Leitungswasserproben zunächst mit verschiedenen Konzentrationen an Bakteriophage MS2 versetzt. Die Filtration fand bei einer Flussrate von 1 L/min statt. Die anschließende Elution der adsorbierten Phagen erfolgte in 20 mL Hochsalzpuffer. Dieser wurde auf pH 7,0 eingestellt um bei gleichbleibendem, neutralen pH-Wert zu arbeiten. Die Analyse der Proben wurde mittels qPCR durchgeführt. Zur Charakterisierung der unterschiedlichen MAF-Säulen wurden jeweils Kalibrierkurven für die qPCR vor- und nach MAF aufgenommen. Dazu wurden jeweils die Fluoreszenzsignale der qPCR zu demjenigen Zeitpunkt verwendet, an dem die Negativkontrolle noch kein Signal abgab, d.h. an dem noch kein unspezifisches Signal erzeugt wurde. So blieb das Fluoreszenzsignal für die Proben von MAF-DEAE in den Amplifikationszyklen 1 bis 36 konstant und stieg ab Zyklus 37 an. Daher wurden die Fluoreszenzsignale bei Zyklus 36 ausgewertet. Durch diese Vorgehensweise wurde sichergestellt, dass es sich bei allen Fluoreszenzsignalen nur um spezifische Amplifikate handelte.

Die Fluoreszenzsignale der qPCR sind für alle Proben jeweils vor und nach der MAF-Aufkonzentrierung in Abbildung 18 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Detektionslimits jeweils vor und nach MAF berechnet.

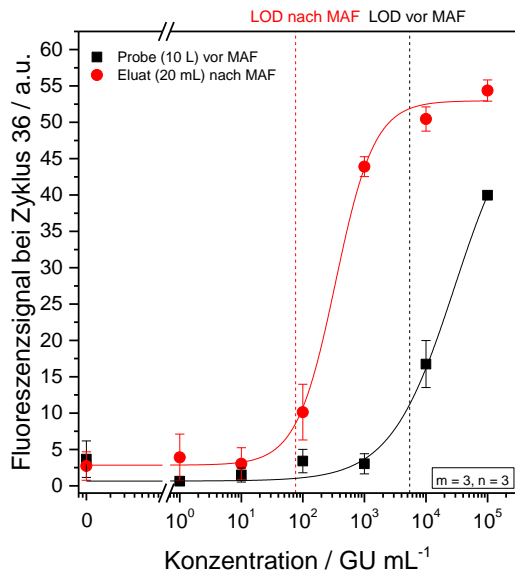
Für die Kationenaustauschersäulen MAF-OH und MAF-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> sind keine Unterschiede in den Fluoreszenzsignalen vor und nach der Aufkonzentrierung zu erkennen. Da der isoelektrische Punkt von MS2-Phagen bei ca. 3,9 liegt [82], ist die Nettoladung der Phagen in neutralen Medium negativ. Daher konnte keine Adsorption stattfinden.

Für beide Anionenaustauschsäulen MAF-DEAE und MAF-Q ist eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzsignale zu erkennen. Die Adsorption hat eindeutig stattgefunden. Die Detektionslimits der qPCR konnten durch den Einsatz von MAF von  $5,4 \times 10^3$  GU/mL auf  $7,6 \times 10^1$  GU/mL für MAF-DEAE und von  $8,4 \times 10^2$  GU/mL auf  $2,1 \times 10^2$  GU/mL für MAF-Q verbessert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Adsorption der Bakteriophagen wie erwartet auf ionischen Wechselwirkungen basiert, da sie ausschließlich an den positiv geladenen Monolithen stattgefunden hat. Weiterhin zeigen sie, dass die Aufkonzentrierung von Bakteriophagen MS2 aus unbehandelten Wasserproben mit unverändertem pH-Wert mittels MAF-DEAE und MAF-Q unabhängig von der eingesetzten Konzentration funktioniert. Da MAF-DEAE die höchste Aufkonzentrierungsleistung aufwies, wurden alle weiteren Experimente mit dieser Säulenart vorgenommen.

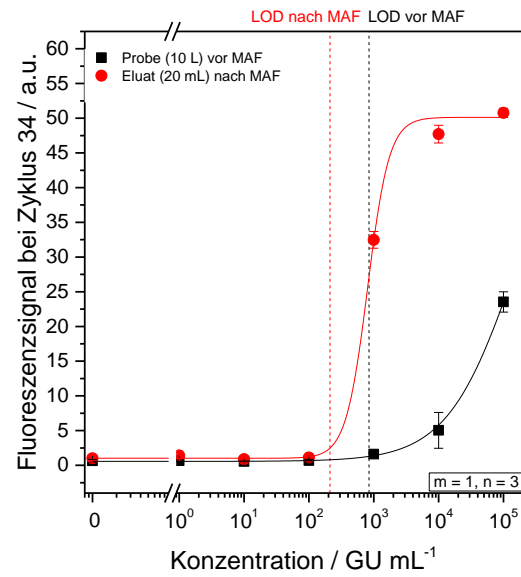
Da nachgewiesen wurde, dass die Adsorption über ionische Wechselwirkungen bei pH 7 für MS2 grundsätzlich funktioniert, konnte im nächsten Schritt die Untersuchung der Anwendung zur parallelen Aufkonzentrierung von mehreren Bakterien und Viren gleichzeitig erfolgen.



(A) MAF-DEAE



(B) MAF-Q



(C) MAF-OH

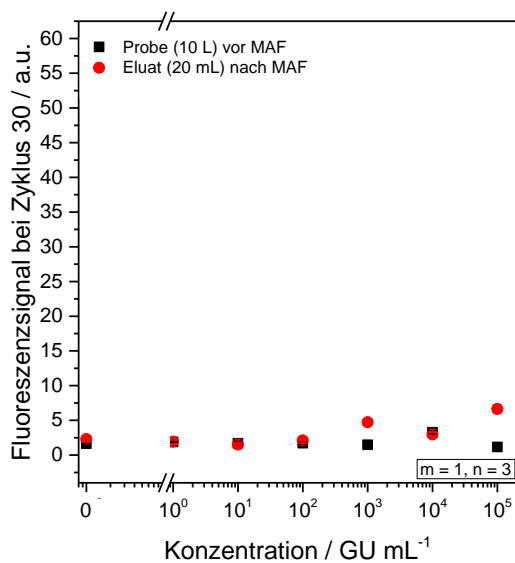
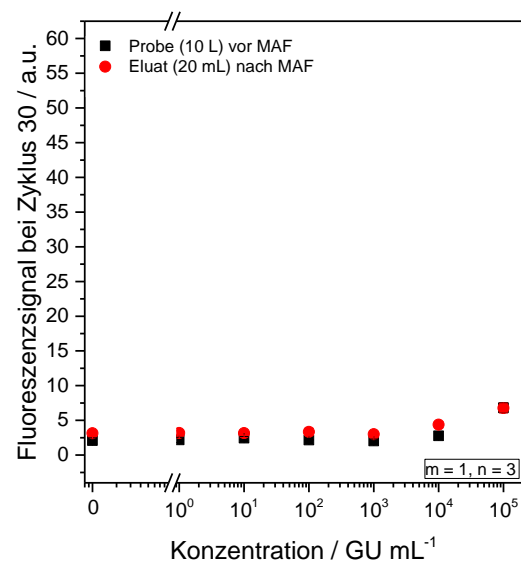
(D) MAF-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Abbildung 18: Fluoreszenzsignale der qPCR für 10-L-Wasserproben vor und nach Aufkonzentrierung mittels MAF bei pH 7 für vier verschiedene Funktionalisierungen

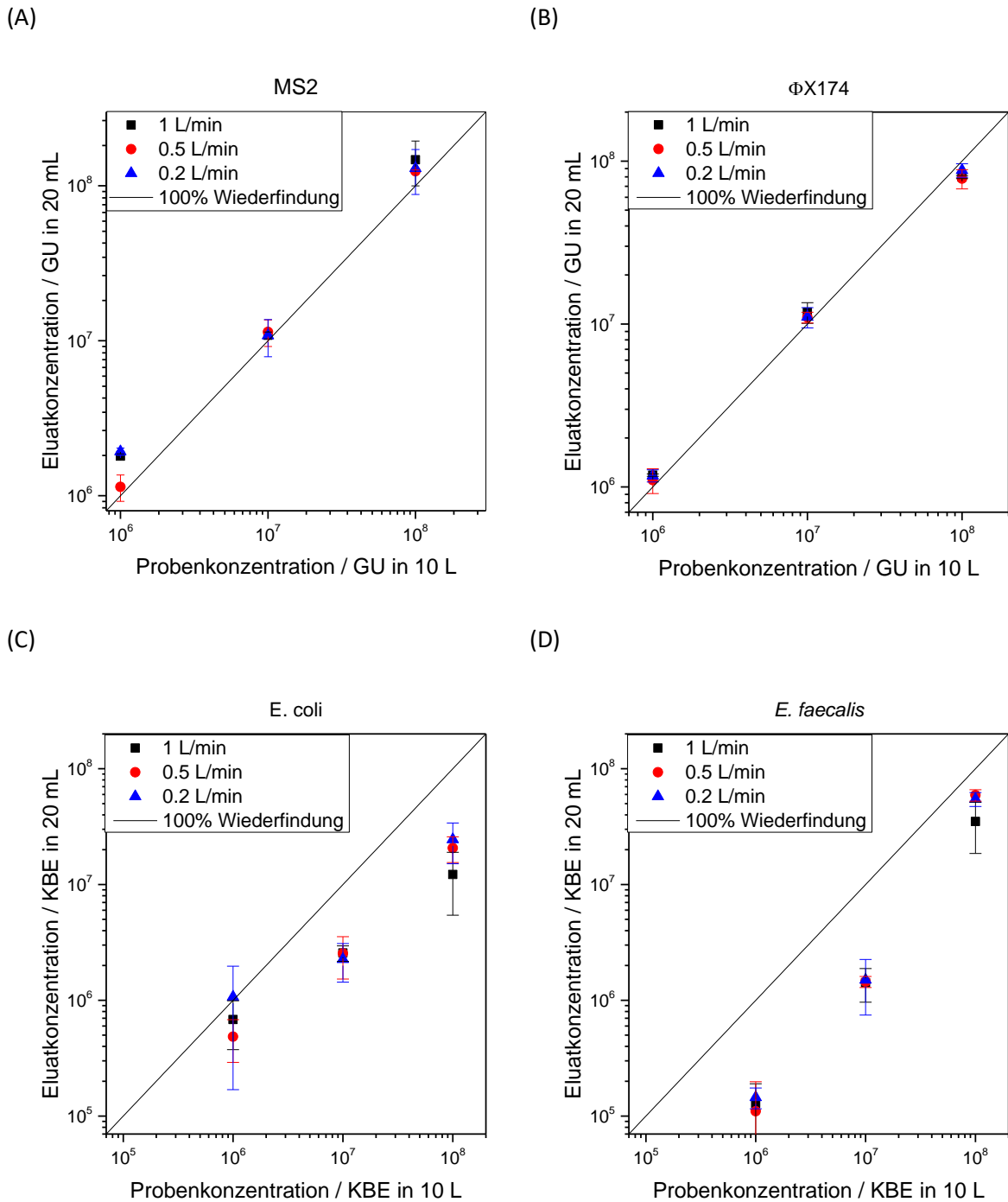
### 3.2.3 Parallele Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren mittels MAF-DEAE

Um die Prozessbedingungen für MAF zur Anwendung im Wasserhygiene-Monitoring weiter zu optimieren, wurde die Anzahl der verwendeten Indikatororganismen erhöht. Da mittels MAF ein möglichst breites Spektrum an wasserbürtigen Pathogenen aufkonzentriert werden soll, wurden 10-L-Wasserproben mit den Bakteriophagen MS2 und ΦX174 sowie den Bakterien *E. coli* und *E. faecalis*

versetzt. Weiterhin sollte dieser Versuchsaufbau näher an realen Wasserproben sein, da in diesen ebenfalls eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen und Viren enthalten ist. MS2 diene dabei als ein Beispiel für Viren mit niedrigem isoelektrischen Punkt (IEP 3,9 [82]),  $\Phi$ X174 als Virus mit hohem IEP (IEP 6,6 – 7,0 [82]). *E. coli* wurde als gramnegatives Bakterium verwendet, *E. faecalis* als Beispiel für grampositive Bakterien. Die Auswahl der Bakterienstämme erfolgte dabei so, dass keine Interaktion zwischen den Bakteriophagen und den Bakterien stattfinden konnte. Vor der Zugabe der Organismen, wurden dekadische Verdünnungsreihen in Saline-Magnesium-Puffer hergestellt. Diese wurden anschließend genutzt, um die Wasserproben mit  $10^6$ ,  $10^7$  oder  $10^8$  Kopien aller Organismen pro 10 L zu versetzen.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Flussrate auf die Aufkonzentrierung untersucht. Da der Massentransport in monolithischen Filtern konvektionsgetrieben ist, sollte die Flussrate keinen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten der Mikroorganismen und Viren haben. Da die Filtration jedoch bei relativ hohen Flussraten von bis zu 1 L/min erfolgt, ist es möglich, dass dabei hohe Scherkräfte entstehen. Diese könnten Bakterien oder Viren beschädigen und dadurch zu deutlich verringerten Wiederfindungen führen. Um dies auszuschließen, wurden die Filtrationsexperimente bei drei unterschiedlichen Flussraten durchgeführt. Diese lagen bei 1 L/min, da dies aufgrund des Rückdrucks die maximal erreichbare Flussrate war, 0,2 L/min, da dies die minimale Flussrate der Pumpe war und 0,5 L/min als mittlere Flussrate. Nach der Filtration wurden die adsorbierten Organismen in 20 mL Hochsalzpuffer (0,05 M HEPES, 1,5 M NaCl) bei pH 7,0 eluiert und anschließend mittels Nukleinsäureextraktion (Viral Xpress), cDNA-Synthese (für MS2) und qPCR quantifiziert. Die Ergebnisse der Aufkonzentrierungsexperimente für die verschiedenen Organismen und Flussraten sind in Abbildung 19 dargestellt.

Alle Organismen zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter und wiedergefundener Konzentration. Des Weiteren waren die eluierten Konzentrationen bei allen Organismen konstant für alle Flussraten. Dies zeigt, dass die Adsorption tatsächlich unabhängig von der Flussrate stattgefunden hat und keine Beschädigung der Bakterien oder Viren auftrat. Für alle Flussraten wurden Regressionsgeraden berechnet. Die Linearität der Messpunkte wurde mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten verglichen. Die berechneten Koeffizienten sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Konzentrationsverläufe weisen für alle Organismen hohe Linearitäten auf (Pearson  $R > 0,99$ ).



**Abbildung 19:** Konzentrationen von MS2 (A),  $\Phi$ X174 (B), *E. coli* (C) und *E. faecalis* (D) nach Aufkonzentrierung mittels MAF-DEAE aus 10-L-Wasserproben bei unterschiedlichen Flussraten. Standardabweichungen ( $m = 3$ ,  $n = 3$ ) sind als Fehlerbalken dargestellt. Eine theoretische Wiederfindung von 100 % ist als schwarze Linie dargestellt.

**Tabelle 7: Wiederfindungen von MS2,  $\Phi$ X174, *E. coli* und *E. faecalis* nach Aufkonzentrierung aus 10-L-Wasserproben mittels MAF-DEAE bei verschiedenen Flussraten. Die Linearität einer linearen Regression durch die Punkte bei einer Flussrate ist als Pearson R aufgelistet ( $m = 3$ ,  $n = 3$ ).**

Test-Organismus	Fluss	Wiederfindung			Linearität (Pearson R)
		$10^6 / 10 \text{ L}$	$10^7 / 10 \text{ L}$	$10^8 / 10 \text{ L}$	
<b>MS2</b>	1 L/min	180,0 ± 6,2%	108,4 ± 5,5%	147,1 ± 47,2%	0,997
	0,5 L/min	114,1 ± 22,0%	114,1 ± 22,2%	124,0 ± 2,5%	0,999
	0,2 L/min	192,8 ± 10,4%	108,0 ± 29,1%	129,7 ± 41,8%	0,996
<b><math>\Phi</math>X174</b>	1 L/min	118,3 ± 2,0%	118,1 ± 17,1%	79,8 ± 1,7%	0,999
	0,5 L/min	110,2 ± 19,1%	109,9 ± 8,3%	78,1 ± 10,5%	0,997
	0,2 L/min	117,3 ± 10,1%	110,4 ± 15,7%	87,9 ± 8,4%	0,999
<b><i>E. coli</i></b>	1 L/min	68,2 ± 30,8%	25,6 ± 3,9%	12,2 ± 6,8%	0,997
	0,5 L/min	48,6 ± 19,5%	25,4 ± 10,1%	20,7 ± 5,2%	0,998
	0,2 L/min	107,0 ± 90,1%	22,6 ± 8,3%	24,6 ± 9,4%	0,978
<b><i>E. faecalis</i></b>	1 L/min	12,9 ± 6,2%	14,2 ± 4,6%	35,0 ± 16,5%	0,993
	0,5 L/min	11,0 ± 8,8%	14,5 ± 1,6%	59,2 ± 6,7%	0,999
	0,2 L/min	14,5 ± 3,0%	15,0 ± 7,6%	54,8 ± 7,6%	0,999

Die Wiederfindungen für die einzelnen Organismen bei den verschiedenen Flussraten sind ebenfalls in Tabelle 7 aufgelistet. Diese lagen für die Bakteriophagen MS2 und  $\Phi$ X174 zwischen 108 und 192 % sowie zwischen 78 und 120 %. Bei der Betrachtung von Wiederfindungen von über 100 % muss jedoch die Kalibrierung der qPCR berücksichtigt werden. Diese wurde mit Suspensionen der Zielorganismen im Elutionspuffer in unterschiedlichen Verdünnungsstufen durchgeführt. Die Kalibriersuspensionen wurden anschließend exakt wie die Proben behandelt. Es wurden von allen Kalibratoren und Proben Triplikate in der qPCR gemessen. Anschließend wurde eine Regressionsgerade durch die Mittelwerte der Kalibratoren gelegt. Dieses Vorgehen wurde für jede einzelne qPCR-Messung wiederholt. Da auf eine qPCR-Mikrotiterplatte nur 96 Proben passen, liegen den Graphen aus Abbildung 19 jeweils 3 Kalibriergeraden zu Grunde. Jede einzelne dieser Kalibriergerade ist fehlerbehaftet. Darüber hinaus schwanken auch die gemessenen Cp-Werte. Bei den angewandten Kalibrierungen entspricht eine Änderung des Cp-Wertes um 0,5 bereits einer Änderung der ermittelten Konzentration um 0,1 Log-Stufen. Zur Bestimmung der Wiederfindung werden die Konzentrationen mit den Probenvolumina multipliziert, um die Mengen der Organismen in den Proben zu bestimmen. Diese werden dann miteinander ins Verhältnis gesetzt, um die Wiederfindung zu berechnen. Dadurch multiplizieren sich die Ungenauigkeiten der PCR weiter. Aus diesen messungsbedingten Ungenauigkeiten resultieren die teilweise sehr hohen Wiederfindungen von über 100 %. Bei alternativen Quantifizierungsmethoden, wie beispielsweise dem Plaque-Assay, existiert diese Ungenauigkeit nicht, da hier eine Kalibrierung deutlich einfacher funktioniert, indem z.B. Plaques ausgezählt und mit der Verdünnungsstufe verrechnet werden. Da in dieser Arbeit jedoch hohe Probenmengen nötig waren und der Durchsatz

von kulturbasierten Methoden wie Plaque-Assay sehr begrenzt ist, musste mit qPCR gearbeitet werden.

Die Problematik exakter Wiederfindungen ist in Abbildung 19 (A) deutlich zu erkennen. Die ermittelten Konzentrationen der Eluate liegen eindeutig im angestrebten Bereich, der durch die Linie „100 % Wiederfindung“ dargestellt ist. Die berechneten Wiederfindungen liegen jedoch deutlich über 100 %. Daher scheint die Betrachtung der Wiederfindung allein kein sinnvolles Maß, um die Leistungsfähigkeit der Monolithen endgültig zu beurteilen. Deshalb wurden die Linearitäten der ermittelten Konzentrationen untereinander bestimmt. Eine hohe Linearität zeigt den systematischen Zusammenhang der Messwerte. Bei geringer Linearität liegen entweder Messfehler vor, oder es hat keine systematische Adsorption an die Monolithen stattgefunden.

Für *E. coli* und *E. faecalis* lagen die Wiederfindungen zwischen 10 und 60 %. Die Standardabweichungen waren dabei höher als bei den Bakteriophagen. Somit lagen die durch MAF erzielten Konzentrationen für Bakterien insgesamt höher als die Ausgangskonzentration. Die Messwerte für Bakterien zeigten eine ähnliche Linearität wie die der Viren. Dies deutet darauf hin, dass die Adsorption tatsächlich stattgefunden hat. Die Aufkonzentrierung war allerdings nicht so effizient wie die der Bakteriophagen.

Jedoch sollte die Aufkonzentrierungsleistung für Bakterien noch weiter verbessert und Ausbeuteverluste minimiert werden, um quantitative Aussagen zu erlauben. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Anreicherung bei hohen Flussraten ohne negativen Einfluss auf die Detektion möglich ist. Dadurch kann der Probendurchsatz erhöht werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass eine Aufkonzentrierung von Viren bei pH 7 mit MAF-DEAE mit zufriedenstellend hohen Wiederfindungen durchgeführt werden kann. Für Bakterien konnte nur eine geringe Wiederfindung mit stärkeren Schwankungen erzielt werden. Ein Grund dafür könnte eine starke Bindung der Bakterien an die MAF-DEAE-Säule sein, sodass nicht alle Bakterien eluiert werden können. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Adsorption an die schwache Anionenaustauschergruppe DEAE nicht ausreicht, um die Bakterien ausreichend stark und dauerhaft zu adsorbieren. Daher wurden als Alternative auch MAF-Q-Säulen mit einer Mischung aus Bakterien und Viren getestet.

### **Parallele Aufkonzentrierung mittels MAF-Q**

Als Alternative zu MAF-DEAE, um ein möglichst breites Spektrum an wasserbürtigen Pathogenen aufzukonzentrieren, wurden auch die MAF-Q-Monolithen mit einer Mischung aus Bakterien und Viren getestet. Da MAF-Q mit quaternären Ammoniumgruppen funktionalisiert sind, kann sich das Adsorptionsverhalten von Viren und Bakterien im Vergleich zu MAF-DEAE unterscheiden. Daher

wurden auch MAF-Q-Säulen auf ihre Fähigkeit verschiedene Viren und Bakterien aus Wasser bei pH 7 aufzukonzentrieren hin untersucht. Es wurden 10-L-Leitungswasserproben mit den Bakteriophagen MS2 und  $\Phi$ X174 sowie den Bakterien *E. coli* und *E. faecalis* versetzt und bei einer Flussrate von 1 L/min filtriert. Die hergestellten Probenkonzentrationen lagen bei  $10^6$ ,  $10^7$  oder  $10^8$  Kopien je Organismus in 10 L. Die Elution fand in jeweils 20 mL Hochsalzpuffer (0,05 M HEPES, 1,5 M NaCl) bei pH 7 statt. Im Anschluss an die Filtration wurde eine Nukleinsäureextraktion mit dem Viral Xpress Kit sowie eine cDNA-Synthese durchgeführt. Danach wurden die Proben mittels qPCR quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

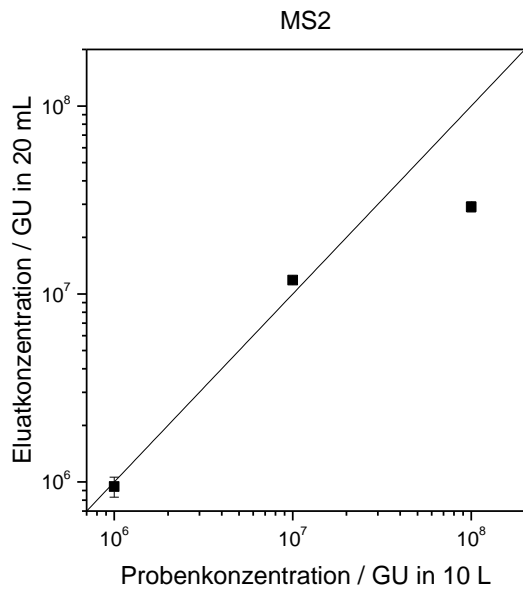
Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zur Aufkonzentrierung mit MAF-DEAE eine deutliche Verschlechterung der Aufkonzentrierungsleistung. Die mit MAF-Q erzielten Wiederfindungen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Wiederfindungen für Bakteriophagen schwanken dabei besonders stark (29 - 118 % für MS2, 30 - 87 % für  $\Phi$ X174). Für Bakterien waren die Wiederfindungen deutlich geringer als bei MAF-DEAE. Für *E. coli* lagen sie zwischen 7 und 21 %, für *E. faecalis* lagen sie zwischen 3 und 15 %. Die Daten bestätigen die Ergebnisse der Kalibrierung mit MS2-Phagen. Da es sich bei MAF-Q um eine Funktionalisierung mit einer starken Anionenaustauschergruppe handelt, ist es wahrscheinlich, dass die Elution der Grund für die Verschlechterung der Ausbeute ist. Da die Ladung der funktionellen Gruppe von MAF-Q über einen breiteren pH-Bereich stabil bleibt, ist es möglich, dass auch bei einer Elution mit Hochsalzpuffer die Interaktion zwischen Monolith und Analyt stabiler ist als bei der schwachen Anionenaustauschergruppe auf der MAF-DEAE-Säule. Daher ist die Elution im Vergleich mit einer MAF-DEAE Säule möglicherweise weniger effektiv. Eine Erhöhung des Elutionsvolumens könnte die Wiederfindungen möglicherweise verbessern, würde aber den Aufkonzentrierungsfaktor senken.

Da eine Funktionalisierung für MAF gesucht wurde, mit der eine Aufkonzentrierung möglichst aller wasserbürtigen Pathogene auf ein minimales Volumen möglich ist, zeigen die Ergebnisse, dass MAF-DEAE für diesen Zweck besser geeignet ist als MAF-Q. Daher wurde die weitere Optimierung des MAF-Prozesses ausschließlich mit MAF-DEAE durchgeführt.

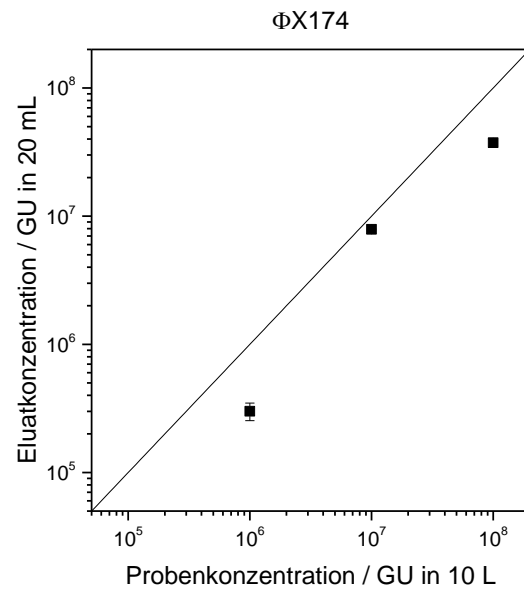
**Tabelle 8: Wiederfindungen von MS2,  $\Phi$ X174, *E. coli* und *E. faecalis* nach Aufkonzentrierung aus 10-L-Wasserproben mittels MAF-Q (m = 1, n = 3).**

Probenkonzentration	MS2	$\Phi$ X174	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
$10^8$ / 10 L	29 %	37 %	7 %	15 %
$10^7$ / 10 L	118 %	79 %	8 %	10 %
$10^6$ / 10 L	94 %	30 %	21 %	3 %

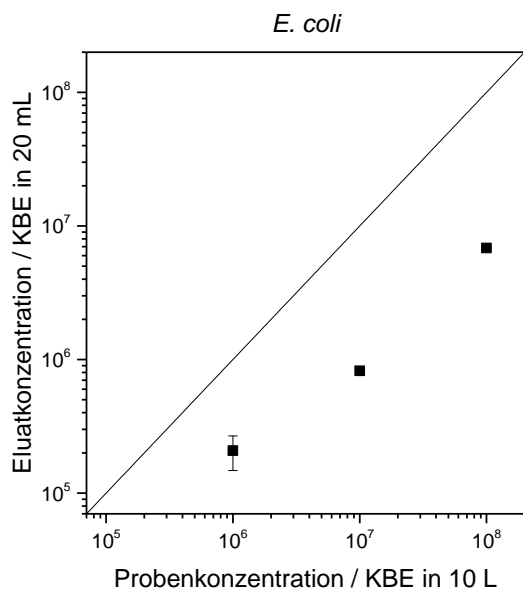
(A)



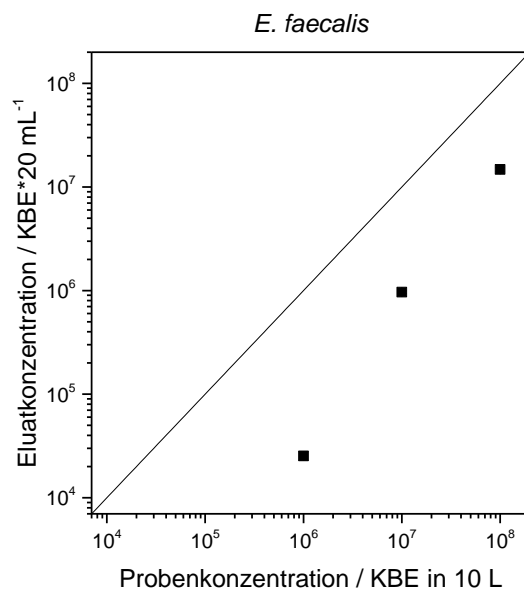
(B)



(C)



(D)



**Abbildung 20:** Konzentrationen von MS2 (A),  $\Phi$ X174 (B), *E. coli* (C) und *E. faecalis* (D) nach Aufkonzentrierung mittels MAF-Q aus 10-L-Wasserproben. Standardabweichungen ( $m=1$ ,  $n=3$ ) sind als Fehlerbalken dargestellt. Eine theoretische Wiederfindung von 100 % ist als schwarze Linie dargestellt.

### 3.2.4 Optimierung von MAF-DEAE für Bakterien

In den Experimenten mit Proben, die sowohl Viren als auch Bakterien enthielten, zeigte sich, dass mit Hochsalzpuffer eine effiziente Elution der Viren von den MAF-DEAE möglich ist. Die Aufkonzentrierung von Bakterien war jedoch nicht effizient. Daher wurde im nächsten Schritt gezielt die Aufkonzentrierung von Bakterien untersucht. Es sollte dabei zunächst herausgefunden werden, ob Bakterien überhaupt an MAF-DEAE binden. Weiterhin wurde ein Puffer gesucht, mit dem die Bakterien anschließend wieder eluiert werden können. Mit Hilfe dieses Puffers sollte dann das MAF-Verfahren für Proben mit Viren und Bakterien so angepasst werden, dass die Elution zweistufig erfolgt. Zunächst sollten Bakterien in einem speziellen Bakterienpuffer eluiert werden. Anschließend sollten Viren separat mit dem bereits etablierten Hochsalzpuffer eluiert werden.

Um den MAF-Prozess für die Aufkonzentrierung von Bakterien zu verbessern, wurden Filtrationsexperimente in 100-mL-Wasserproben durchgeführt. Dadurch war es möglich die Bakterienkonzentration in der Ausgangsprobe, im Eluat und im Filtrat exakt zu messen. Dies ist in 10-L-Proben nur schwer durchführbar, da die Konzentrationen im Filtrat zumeist deutlich unter dem Detektionslimit der qPCR lagen. Das Ziel der Optimierung für Bakterien war es, zunächst zu überprüfen, ob Bakterien überhaupt an die Monolithen binden. Des Weiteren wurde ein Elutionspuffer für Bakterien gesucht, der dazu genutzt werden sollte einen zweiten Elutionsschritt zu etablieren, der speziell Bakterien eluieren sollte. Da die Elution von Viren mit Hochsalzpuffer bereits zufriedenstellend funktionierte, wurde die Elutionsleistung für Viren in diesem Experiment nicht betrachtet.

Die 100-mL-Wasserproben wurden mit *E. coli*, *E. faecalis*, MS2 und ΦX174 versetzt und jeweils auf eine Konzentration von je  $10^6$  Kopien/mL pro Organismus eingestellt. Die Flussrate während der Filtration lag bei 20 mL/min. Das Elutionsvolumen betrug 20 mL. Die Elution fand bei einer Flussrate von 160 mL/min statt. Anschließend wurden Proben von Ausgangsprobe, Filtrat und Eluat genommen, eine Nukleinsäureextraktion mittels Viral Xpress Kit durchgeführt und anschließend mittels qPCR quantifiziert. Im Filtrat konnte keiner der zugesetzten Organismen wiedergefunden werden. Daher muss eine Adsorption stattgefunden haben. Um die Wiederfindung zu verbessern, wurden verschiedene Elutionspuffer getestet. Die erzielten Wiederfindungen für *E. coli* und *E. faecalis* mit den getesteten Puffern sind in Tabelle 9 aufgeführt.



**Tabelle 9: Untersuchung verschiedener Elutionspuffer zur Verbesserung der Aufkonzentrierung von *E. coli* und *E. faecalis* mit MAF-DEAE. (m = 2, 3, n = 3)**

Elutionspuffer	Wiederfindung	
	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
0,5 M Glycin, 3 % Rinderextrakt, pH 9,5	66 ± 16 %	113 ± 8 %
0,5 M Glycin, 3 % Rinderextrakt, pH 3,0	28 ± 15 %	22 ± 2 %
0,5 M Glycin, pH 9,5	23 ± 5 %	80 ± 15 %
0,5 M Glycin, 0,1 % Tween 20, pH 9,5	46 ± 15 %	108 ± 22 %
Boratpuffer, pH 8,2	14 ± 3 %	-
0,05 M Tris, 0,05 % Triton X-100	2 ± 0,7 %	-

Die höchste Wiederfindung konnte mit BEG-Puffer bei pH 9,5 erzielt werden. Eine Änderung des pH-Wertes des Puffers oder der Einsatz ohne Rinderextrakt konnte keine Verbesserung erzielen. Auch der Zusatz des Detergenz Tween 20 verbesserte die Wiederfindung nicht. Weitergehend wurden alternative Puffersysteme untersucht. Jedoch konnte weder mit Boratpuffer noch mit Tris-Puffer eine Verbesserung erzielt werden. Daher wurde für weitere Experimente BEG-Puffer bei pH 9,5 als Elutionspuffer für Bakterien verwendet.

### 3.2.5 Aufkonzentrierung unter optimierten Bedingungen

Die optimierten Bedingungen zur parallelen Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien ohne Probenvorbereitung wurden durch Filtrationsexperimente mit 10-L-Wasserproben überprüft. Dazu wurden die Proben mit MS2, ΦX174, *E. coli* und *E. faecalis* versetzt. Die Filtration fand bei einer Flussrate von 1 L/min statt. Die Elution erfolgte zweistufig. Zunächst sollten Bakterien mit 20 mL BEG-Puffer bei pH 9,5 und bei einer Flussrate von 160 mL/min eluiert werden. Anschließend erfolgte eine Virenelution mit 20 mL Hochsalzpuffer bei pH 7, und bei einer Flussrate von 160 mL/min. Es wurde eine Nukleinsäureextraktion mit dem Viral Xpress Kit und zur späteren Detektion von MS2 eine cDNA-Synthese durchgeführt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels qPCR. Die Konzentrationen der Eluate in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration sind in Abbildung 21 dargestellt. In den Eluaten der Virenstufe mit Hochsalzpuffer wurden nur sehr geringe Mengen von Viren oder Bakterien gefunden (< 1% der eingesetzten Menge). Die eingesetzten Viren konnten bereits in der ersten Stufe eluiert werden. Daher ist eine zweistufige Elution nicht notwendig.

Für die Eluate von MS2, ΦX174 und *E. coli* sind lineare Korrelationen zwischen Proben- und Eluatkonzentrationen zu erkennen. Die Wiederfindungen für die eingesetzten Viren und Bakterien bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die Wiederfindungen lagen zwischen 97 und 111 % für *E. coli*, zwischen 75 und 91 % für ΦX174 und zwischen 112 und 114 % für

MS2. Es konnte somit eine deutliche Verbesserung für *E. coli* erzielt werden. Die Wiederfindungen für die Bakteriophagen MS2 und  $\Phi$ X174 sanken leicht. Für *E. faecalis* schwankten die Wiederfindungen stark. Im Vergleich mit den Experimenten zur Optimierung der Aufkonzentrierung von Bakterien hat sich die Wiederfindung von *E. faecalis* deutlich verschlechtert. Die Ergebnisse legen nahe, dass die ionischen Wechselwirkungen zwischen Monolith und Bakterienoberfläche nicht stark genug sind, um *E. faecalis* zu adsorbieren und es nur zu einer Retention kommt. Dadurch sind hohe Wiederfindungen in kleinen Volumina möglich, wohingegen bei großen Volumina ein Teil der Bakterien während der Filtration durch den Monolithen hindurchfließen kann. Daher scheint MAF-DEAE zur Aufkonzentrierung von *E. faecalis* aus 10-L-Wasserproben nicht geeignet zu sein.

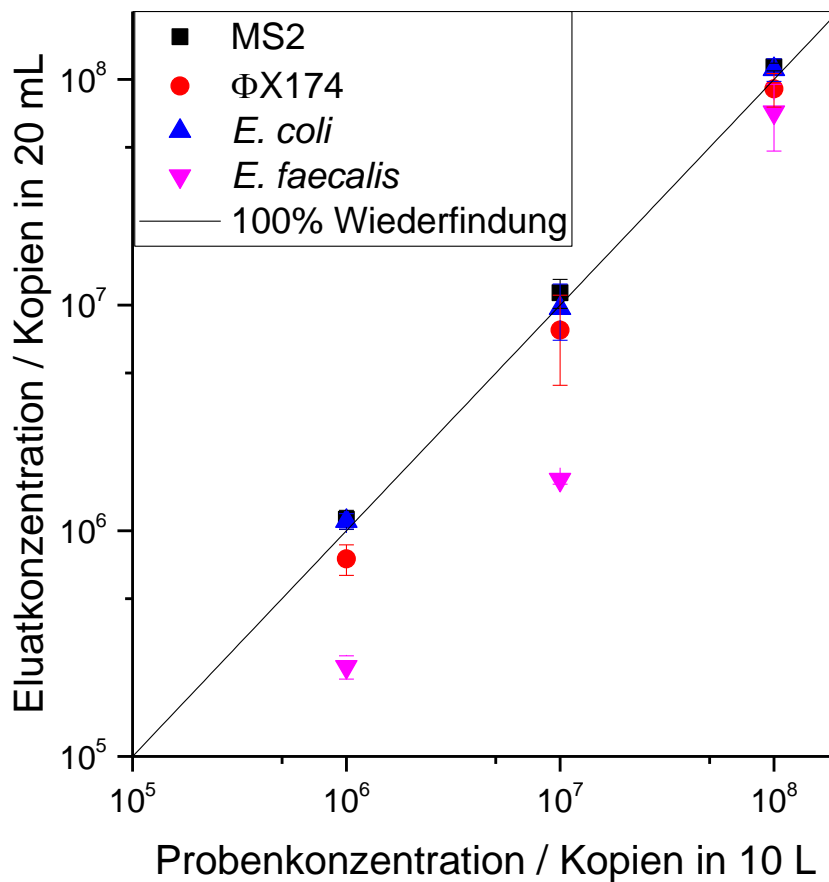


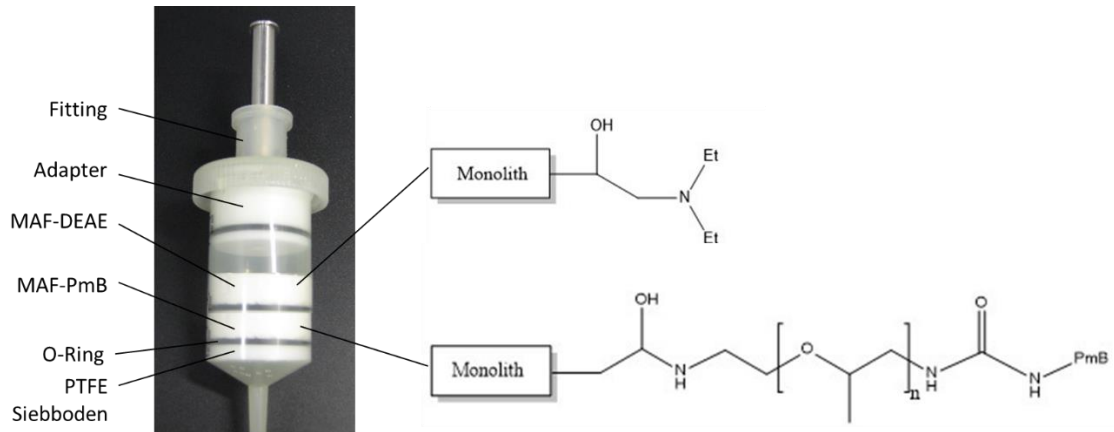
Abbildung 21: Konzentrationen von MS2,  $\Phi$ X174, *E. coli* und *E. faecalis* nach Aufkonzentrierung mittels MAF-DEAE aus 10-L-Wasserproben mit optimierter Bakterienelution. Standardabweichungen ( $m=3, n=3$ ) sind als Fehlerbalken dargestellt. Eine theoretische Wiederfindung von 100% ist als schwarze Linie dargestellt.

**Tabelle 10: Wiederfindungen von MS2, ΦX174, *E. coli* und *E. faecalis* nach Aufkonzentrierung aus 10-L-Wasserproben mittels MAF-DEAE mit optimierten Bakterienelutionsbedingungen (m = 3, n = 3).**

Eingesetzte Anzahl	Wiederfindung			
	MS2	ΦX174	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
10 <sup>8</sup>	113,6 ± 4,4 %	90,8 ± 15,5 %	110,9 ± 12,7 %	71,7 ± 23,5 %
10 <sup>7</sup>	113,3 ± 16,6 %	77,5 ± 33,3 %	97,0 ± 27,1 %	16,9 ± 0,8 %
10 <sup>6</sup>	112,3 ± 10,9 %	75,1 ± 11,5 %	110,4 ± 8,7 %	25,0 ± 2,9 %

### 3.2.6 Aufkonzentrierung mittels mehrerer Monolithen

Die parallele Anreicherung von Bakterien und Viren mittels MAF-DEAE konnte für eine Auswahl an Organismen erfolgreich gezeigt werden. Jedoch war die Aufkonzentrierung des Bakteriums *E. faecalis* dabei nur mit stark schwankenden Wiederfindungen möglich. Daher wurde die Möglichkeit untersucht, zwei Monolithen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen in einer MAF-Säule zu verwenden, um die Wiederfindung von *E. faecalis* zu erhöhen. Hierzu wurde zusätzlich zur MAF-DEAE eine mit Polymyxin B funktionalisierte MAF-Disk, in die Säule eingebaut. Die Polymyxin-B-Monolithen (MAF-PmB) wurden im Rahmen der Dissertation von Caroline Peskoller entwickelt und in der Masterarbeit von Veronika Stiegler weiterentwickelt und auf MAF-Disks übertragen. Polymyxin B diente dabei zunächst als Affinitätsligand für *E. coli*. Das Antibiotikum Polymyxin B dient mit seinen geladenen Gruppen jedoch auch als starker Anionenaustauscher. Dadurch konnte auch *E. faecalis* mit hohen Wiederfindungen aufkonzentriert werden. Zwischen dem Monolithen und PmB dient das Polyetheramin Jeffamine ED 2003 als Spacer, um eine bessere Adsorption der Bakterien an die funktionellen Gruppen zu ermöglichen. Die MAF-PmB-Disk wurde in der Säule unter die MAF-DEAE Disk platziert, um die darin nicht gebundenen *E. faecalis* zu adsorbieren. Um zu gewährleisten, dass die gesamte Wasserprobe durch beide Monolithen fließt, wurde ein O-Ring zwischen den beiden MAF-Disks platziert (siehe Abbildung 22). Da es sich bei PmB um ein Antibiotikum handelt, welches die Zelllyse von *E. coli* auslösen kann, wurden die zwei Monolithen nach der Filtration in separate Säulen eingebaut und einzeln eluiert. Dadurch sollte verhindert werden, dass PmB mit *E. coli* interagieren kann.



**Abbildung 22: Aufbau der Mixed Mode MAF-Säule mit MAF-DEAE Disk (oben) und MAF-PmB Disk (unten)**

10-L-Wasserproben wurden mit *E. coli*, *E. faecalis*, MS2 und  $\Phi$ X174 versetzt und mit einer Flussrate von 1 L/min filtriert. Zur Elution wurde die MAF-Säule zerlegt und die beiden Monolithen jeweils in eine neue, separate Säule eingebaut. Pro Disk wurden 20 mL BEG-Puffer bei pH 9,5 zur Elution verwendet. Die Eluate wurden anschließend separat behandelt. Die Nukleinsäureextraktion erfolgte mit dem Viral Xpress Kit. Anschließend wurden eine cDNA-Synthese für MS2 und die Quantifizierung der vier Analyten mittels qPCR durchgeführt. Die Gesamtkonzentrationen der eingesetzten Organismen in 40 mL Gesamteluat sind in Abbildung 23 in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration dargestellt.

Für alle Organismen konnten hohe Wiederfindungen erzielt werden. Diese lagen zwischen 74 % und 133 % für MS2, 101 % und 108 % für  $\Phi$ X174 sowie 64 % und 100 % für *E. coli*. Die Wiederfindungen für *E. faecalis* konnten deutlich erhöht werden und lagen zwischen 88 % und 116 %. Die Konzentrationen der Eluate korrelieren linear mit den Ausgangskonzentrationen. Im Vergleich mit vorherigen Experimenten sind die Wiederfindungen von *E. coli* und MS2 leicht gesunken. Dies ist vermutlich eine Folge der separaten Elution der beiden Disks. Da die MAF-Säule dazu zerlegt und wieder zusammgebaut werden muss, können die Monolithen beschädigt werden. Weiterhin ist es möglich, dass Restmengen an Flüssigkeit, die noch Analyten enthalten kann, durch Zusammendrücken der Disk verloren gehen. Dies ist insbesondere für die obere Disk, hier MAF-DEAE, der Fall, da sie händisch in ein neues Gehäuse übertragen wird. Die Wiederfindung von Bakteriophage  $\Phi$ X174 konnte leicht erhöht werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass dieser teilweise auch an der zweiten Disk (MAF-PmB) adsorbiert. Für *E. faecalis* zeigen die Ergebnisse, dass diese Bakterien durch die erste Säule durchgespült werden und erst in der zweiten Disk adsorbieren.

Insgesamt wird durch die Ergebnisse ersichtlich, dass eine Kombination verschiedener MAF-Disks in einer Säule die parallele Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren verbessert. Dabei können die Wiederfindungen einzelner Viren oder Bakterien jedoch leicht sinken. Zur gezielten Aufkonzentrierung

einzelner Mikroorganismen oder Viren ist daher die Verwendung von nur einer MAF-Disk besser geeignet. Die Aufkonzentrierung mit zwei oder mehr Monolithen ist jedoch ein geeignetes Mittel, um eine breite Masse an Organismen zu erfassen.

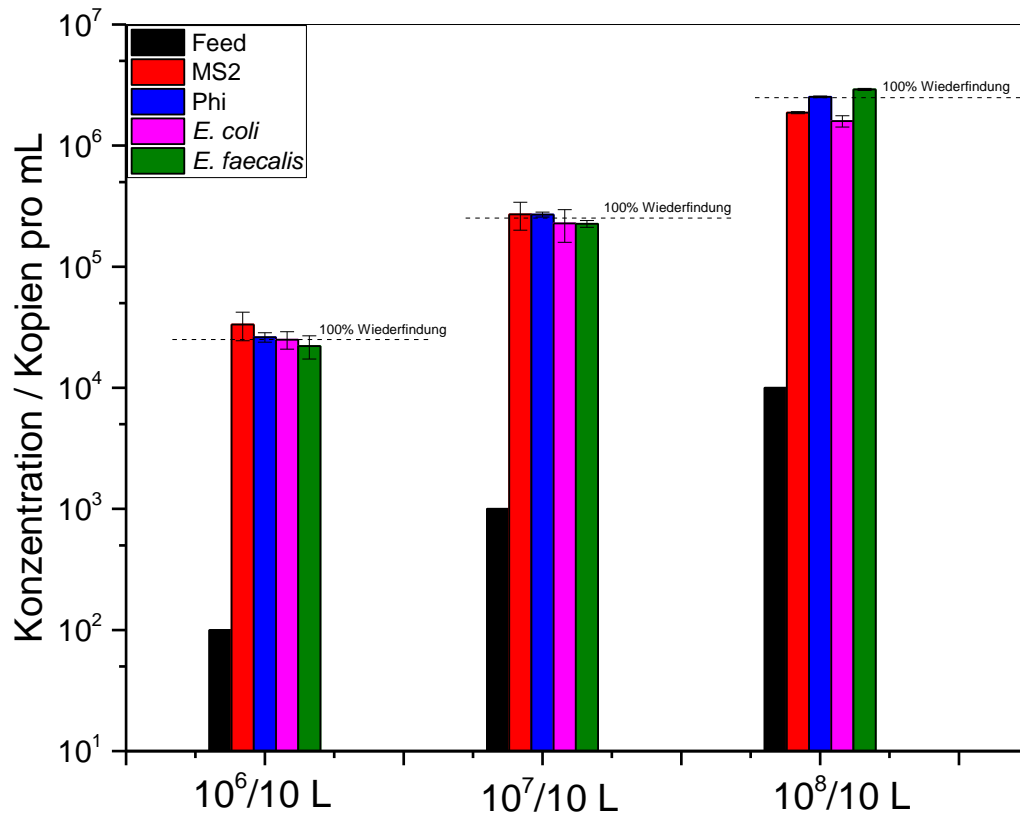


Abbildung 23: Konzentrationen von MS2,  $\Phi$ X174, *E. coli* und *E. faecalis* nach Aufkonzentrierung mittels mixed mode MAF aus 10-L-Wasserproben. Standardabweichungen ( $m = 2$ ,  $n = 3$ ) sind als Fehlerbalken dargestellt. Eine theoretische Wiederfindung von 100 % ist als gestrichelte Linie dargestellt.

### 3.2.7 Zusammenfassung Entwicklung neuer Funktionalisierungen für MAF

Das Ziel der Weiterentwicklung der MAF war es, eine parallele Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien ohne vorherige Probenvorbereitung, wie z.B. Änderung des pH-Wertes, zu ermöglichen. Dazu wurden verschiedene funktionelle Gruppen an die Porenoberfläche der Monolithen synthetisiert. Die verschiedenen Funktionalisierungen wurden daraufhin untersucht, ob eine Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien mit einer zufriedenstellend hohen Wiederfindung erreicht werden kann. Dabei zeigte sich in ersten Versuchen, dass Monolithen mit der funktionellen Anionenaustauschergruppe DEAE und der Kationenaustauschgruppe OH besonders gut funktionieren. Es konnte anhand von Indikatororganismen gezeigt werden, dass Mikroorganismen und Viren mit positiv geladenen Gruppen, wie DEAE, bei neutralen pH-Bedingungen aufkonzentriert werden können. Da es jedoch auch seltene Fälle von Viren gibt, deren IEP über 7 liegt, kann es in diesen speziellen Fällen möglich sein, dass zur Aufkonzentrierung  $\text{SO}_3^-$ - oder OH- Kationenaustauschergruppen notwendig sind. Im Falle des Bakteriums *E. faecalis* wurde gezeigt, dass eine Adsorption aus 10-L-Wasserproben nur mit einer starken Anionenaustauschergruppe effektiv ist. Darüber hinaus konnte das Prinzip einer MAF-Säule mit unterschiedlich funktionalisierten Monolithen demonstriert werden. Durch die Kombination verschiedener funktioneller Gruppen in einer Säule konnte eine Aufkonzentrierung von vier verschiedenen Analyten erzielt werden. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um das Potential dieser Methode genauer zu untersuchen. So könnte die Kombination von positiv und negativ geladenen Monolithen oder unterschiedlicher Affinitätsliganden das Spektrum der aufkonzentrierten Organismen noch weiter erhöhen. Auch eine gezielte Anpassung an spezielle Matrices und Analyten wäre mit einem solchen modularen System möglich. So könnte eine erste MAF-Disk als Vorfilter dienen, um Störstoffe aus der Matrix zu entfernen, während die zweite Disk zur Aufkonzentrierung der Analyten genutzt wird. Die hier gezeigte Anwendung verdeutlicht das große Potential dieser Methode.

## 3.2 Anwendung von MAF in verschiedenen Wassermatrices

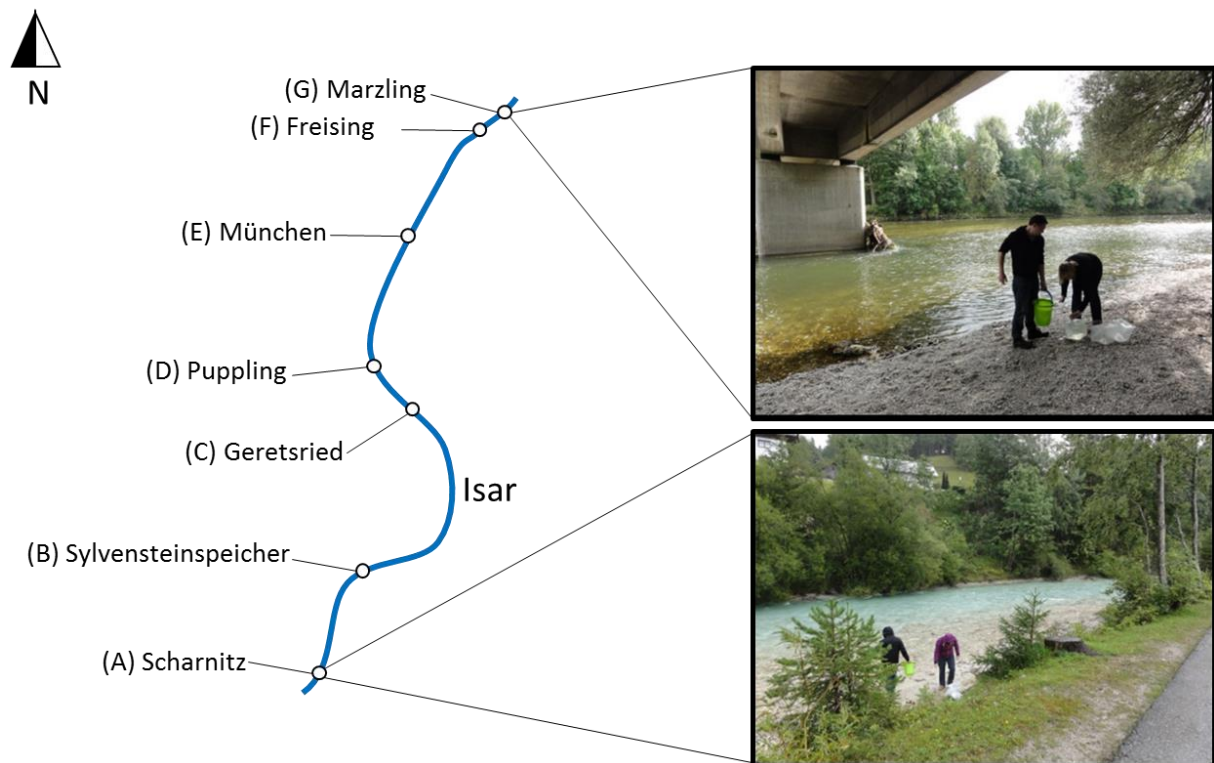
### 3.2.1 Oberflächenwasser

Die Aufkonzentrierung mittels MAF wurde an verschiedenen Realproben getestet, um die Funktionalität in technischen- und Umweltwasserproben zu untersuchen. In einer Prinzipstudie fand eine Beprobung entlang der Isar an sieben Probenahmestellen statt. Pro Stelle wurden jeweils 3 mal 10 L Oberflächenwasser gesammelt. Die Proben wurden in 10-L-Einwegbehältern ins Labor transportiert, dort auf pH 3 eingestellt und mittels MAF-OH bei einer Flussrate von 1 L/min aufkonzentriert. Die Elution erfolgte in 20 mL BEG-Puffer bei pH 9,5. Anschließend wurden die Proben mittels zentrifugaler Ultrafiltration auf ein finales Volumen von 1 mL eingeeengt. Weiterhin fand eine

Untersuchung der Proben auf Legionellen mittels Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (CL-SMIA) auf dem MCR 3 statt. Die Detektion mittels CL-SMIA wurde von Anika Wunderlich (IWC) entwickelt und durchgeführt. Ziel war es, die Anwendbarkeit von MAF im Verbund mit modernen Analysemethoden an Realproben zu demonstrieren. Die GPS-Koordinaten der Probenahmestellen sowie die Trübungen der Proben und die gemessenen Legionellenkonzentrationen sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Trübungen der Proben lagen zwischen 0,4 und 1,0 NTU. Dies deutet bereits darauf hin, dass die Proben in erheblichem Maße Schwebstoffe und andere Matrixbestandteile enthielten, die eine Herausforderung für die Aufkonzentrierungsmethoden darstellen. Da im Verbund mit anderen vorhergehenden Methoden wie UF solche Schwebstoffe sogar weiter angereichert werden, ist es unabdingbar die Leistungsfähigkeit der MAF in Bezug auf Matrixbestandteile zu untersuchen.

Bei der Filtration der Isarproben lagerten sich Schwebstoffe, die größer als der Porendurchmesser waren, an der Oberfläche der Monolithen an. Die Mikroorganismen adsorbierten an die Bindestellen der Porenoberfläche, während andere Matrixbestandteile durch die Poren hindurch liefen. Die Leistungsfähigkeit der MAF kann bei der Anwendung für Umweltwasserproben auch von den im Wasser gelösten Stoffen beeinflusst werden. So können neben Bakterien auch andere geladene Partikel an die MAF-Disks binden. Weiterhin wird auch die Konzentration von Salzen im Wasser die Adsorption durch ionische Wechselwirkungen beeinflussen. In Flusswasser ist die Salzkonzentration im Allgemeinen nicht hoch genug, um adsorbierte Bakterien von der MAF zu verdrängen. In Salzwasser wäre ein solches Verhalten jedoch möglich. Daher ist es notwendig für unterschiedliche Wassermatrizes zunächst Vorversuche durchzuführen, um die Leistungsfähigkeit der MAF beurteilen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nur Flusswasser untersucht werden, da dieses häufig in technischen Systemen z.B. für Kühltürme verwendet wird. Daher wurde hier hauptsächlich der Einfluss der Partikelfracht des Wassers auf MAF betrachtet. Die Ergebnisse zeigen sehr geringe Legionellenkonzentrationen am Wegpunkt A nahe der Quelle. Die Legionellenbelastung steigt entlang des Flussverlaufs weiter an, auf bis zu 782 KBE in 10 L am Wegpunkt D. Anschließend sinkt sie wieder an den Wegpunkten E, F und G. Die Änderung der Legionellenkontamination entlang der Isar kann hier sehr gut beobachtet werden. Die Konzentrationen lagen alle in einem sehr niedrigen Bereich, der ohne eine vorherige Aufkonzentrierung nicht nachweisbar ist. Je nach Schwebstoffanteil der Proben war eine zunehmende Verblockung der Monolithen im Lauf der Filtration zu beobachten. Dies führte dazu, dass die Flussrate bei Proben mit hoher Trübung (Proben B, D, F, G) reduziert werden musste, um den Gegendruck der Monolithen, bzw. deren Komprimierung durch den Druck im System, zu verringern. Da die Flussrate jedoch keinen Einfluss auf die Adsorption hat, wurde dadurch nur der Durchsatz verringert. Jedoch war es somit möglich, auch von Proben mit hoher Trübung jeweils 10 L durch einen Monolithen zu filtrieren.

Die Ergebnisse stellen zwar nur eine Momentaufnahme des Tags der Probenahme dar, allerdings zeigen sie sehr gut, dass die Aufkonzentrierung mittels MAF auch in Realproben mit hohem Schwebstoffanteil gut funktioniert und mit einem Mikroarray-Detektionssystem gekoppelt werden kann. Jedoch verdeutlichen sie auch den Einfluss der Wassermatrix. Die Trübung entlang der Isar schwankte so deutlich, dass ein Unterschied während der Filtration, insbesondere im Hinblick auf den Rückdruck, bemerkbar war. Bei hoher Belastung des Wassers mit Schwebstoffen war eine Verblockung der Monolithen und damit ein deutlicher Anstieg des Drucks zu beobachten. Auch der Durchsatz wurde dadurch merklich verringert. Die Menge des filtrierbaren Wassers hängt somit stark von der Matrix ab.



**Abbildung 24: Probenahmestellen für Oberflächenwasser entlang der Isar.**



**Tabelle 11: GPS-Koordinaten der Probenahmestellen, Trübungswerte der Oberflächenwasserproben und gemessenen CL-Signale am MCR 3 für *L. pneumophila* entlang der Isar.**

Wegpunkt	Nördliche Breite / °N	Östliche Länge / °E	Höhe über Null / m	Uhrzeit / Uhr	Ortschaft in der Nähe	Trübung / NTU	CL-Signal MCR 3 / a.u.
A	47.38603	11.27063	973.9	10.30	Scharnitz (Österreich)	0,42 ± 0,04	466 ± 309
B	47.56937	11.52658	753.1	11.45	Sylvensteinspeicher	0,69 ± 0,09	5403 ± 1339
C	47.85697	11.51137	609.1	13.45	Geretsried	0,46 ± 0,04	8266 ± 2276
D	47.91677	11.44570	575.0	14.20	Puppling	1,04 ± 0,11	18960 ± 8615
E	48.12640	11.57533	511.9	17.50	München-Innenstadt	0,45 ± 0,09	5378 ± 2372
F	48.39815	11.75227	441.0	15.45	Freising	0,96 ± 0,11	7051 ± 2956
G	48.40293	11.79153	438.5	16.30	Marzling	0,72 ± 0,09	6226 ± 1986

### 3.2.2 Einfluss der Trübung und Partikelfracht auf die MAF

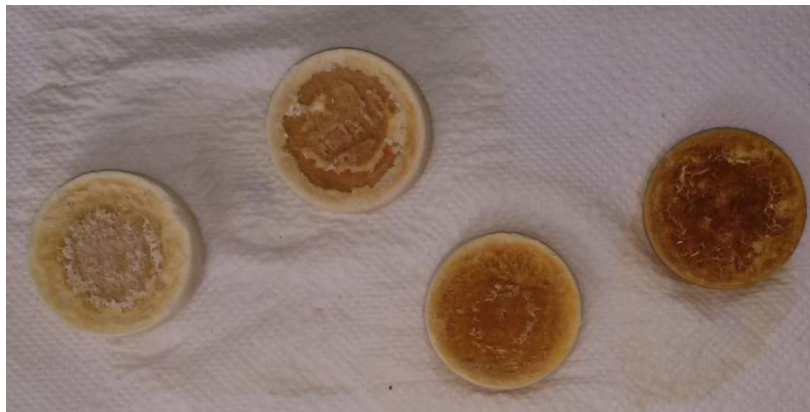
Um den Einfluss der Schwebstoffe innerhalb einer Wassermatrix auf die MAF genauer zu untersuchen, wurden Wasserproben mit Partikeln künstlich auf bestimmte Trübungswerte eingestellt. Als Schwebstoffe dienten dabei Abwasserproben aus unterschiedlichen Stufen einer Kläranlage. Es wurden drei verschiedene Sorten Schwebstoffe mit unterschiedlichen Partikelgrößen verwendet, um Proben mit sehr großen Partikeln > 1 mm, mit mittleren Partikeln von ca. 0,5 mm und mit sehr kleinen Partikeln < 0,1 mm zu versetzen. Mit diesen Partikeln wurden Wasserproben auf Trübungen von 10, 1 und 0,5 NTU eingestellt und anschließend mittels MAF filtriert. Die Trübungen wurden so gewählt, dass sie in einem ähnlichen Bereich wie Realproben lagen. Zur Überwachung des Drucks während der Filtration wurde ein digitaler Druckmesser an die Pumpe angeschlossen. Es wurde solange mit Partikeln versetztes Wasser durch unfunktionalisierte Monolithen filtriert, bis ein Gegendruck von 3,5 bar gemessen wurde. Oberhalb dieses Grenzwertes werden MAF-Säulen undicht und es kann zum Brechen der Gehäuse kommen.

Tabelle 12 zeigt die filtrierbaren Volumina für die verschiedenen Trübungen und Partikelgrößen. Es ist zu erkennen, dass nur relativ kleine Probenvolumina filtrierbar sind, sofern große Partikel enthalten sind. Für sehr kleine Partikel sind die Volumina deutlich höher. Für alle Partikelgrößen sinkt die Probenmenge mit ansteigender Trübung. Die Partikel setzen sich auf der Oberfläche der Monolithen ab, sodass es mit zunehmender Probenmenge zu einer Verblockung der Poren kommt. Dabei findet die Verblockung mit großen Partikeln schneller statt als mit kleinen. Die Daten zeigen jedoch, dass eine Trübungsmessung ohne Kenntnis der Größe der enthaltenen Schwebstoffe keine Aussage über das Verhalten bei der Filtration erlaubt. Da es jedoch im Einsatz mit realen Proben schwer ist, eine exakte Matrixcharakterisierung vor der Probenverarbeitung durchzuführen, kann die Trübung ein Indikator für die Leistungsfähigkeit der MAF sein. Dies kann insbesondere bei Proben mit hoher Partikelfracht,

wie z.B. Abwasserproben, eine erste Abschätzung der zu erwartenden Aufkonzentrierung erlauben. Um jedoch genaue Aussagen treffen zu können, sind Experimente mit der jeweiligen Probenmatrix notwendig. Da die Partikelgrößenverteilung der wichtigste Faktor ist und sich diese je nach Wasserart und Probenahmestelle unterscheidet, sind generelle Aussagen allerdings nur schwer zu treffen.

**Tabelle 12: Auswirkung der Trübung und Partikelgröße auf das filtrierbare Volumen der MAF. (n = 3)**

Trübung / NTU	Partikel < 1 mm	Partikel 0,5 mm	Partikel > 1 mm
	Volumen / L	Volumen / L	Volumen / L
0,5	30	20	20
1	20	10 - 20	10 -12
10	4	1,5	0,9



**Abbildung 25: Foto der Oberseite verschiedener MAF-Disks nach Filtration von Wasserproben mit unterschiedlicher Partikelfracht.**

### 3.2.3 Zusammenfassung Filtration von Realproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Monolithen mit verschiedenen Wassermatrizes getestet. Darüber hinaus wurden auch Monolithen an diverse Projektpartner verschickt, um Versuche mit unterschiedlichen Wassermatrizes durchzuführen. Die Volumina, die verarbeitet werden konnten, hingen dabei sehr stark von der Art der Wassermatrix und deren Partikelfracht ab. In Tabelle 13 sind die dabei gesammelten empirischen Daten über die filtrierten Volumina für verschiedene Wassermatrizes und Trübungen zusammengefasst. Da hierbei Realproben filtriert wurden, wurde

jeweils nur die Trübung gemessen. Über die Partikelgrößenverteilung konnte keine Aussage getroffen werden. Daher können diese Werte nur als Hinweis dienen, im speziellen Fall aber abweichen. Somit ist es für jede spezielle Probe notwendig, das filtrierbare Volumen experimentell zu bestimmen. Da bei zunehmender Verblockung des Monolithen der Druck in der MAF-Säule steigt, kommt es zudem zu einer Komprimierung des Monolithen. Diese führt zu einer zusätzlichen Verringerung des Durchsatzes. Dem kann jedoch durch eine Verringerung der Pumpgeschwindigkeit teilweise entgegengewirkt werden. Da die MAF-Säulen jedoch im Durchfluss betrieben werden, kann eine Verblockung bei hoher Partikelfracht nicht verhindert werden. Um dies zu erreichen, wären MAF-Module, die in einem Cross-Flow-Modus betrieben werden können, notwendig. Eine Weiterentwicklung der MAF-Säulen für einen solchen Betrieb wird derzeit im Rahmen des Projekts Metawater durchgeführt. Da bei der Aufkonzentrierung von Realproben nicht immer dieselbe Trübung vorliegt, ist es für das Wasserhygiene-Monitoringsystem bzw. die Automatisierung der MAF notwendig den Druck während der Filtration zu überwachen, um ggf. eingreifen zu können und die Flussrate zu senken. Anderenfalls könnte es im Extremfall zum Platzen der MAF-Säule kommen.

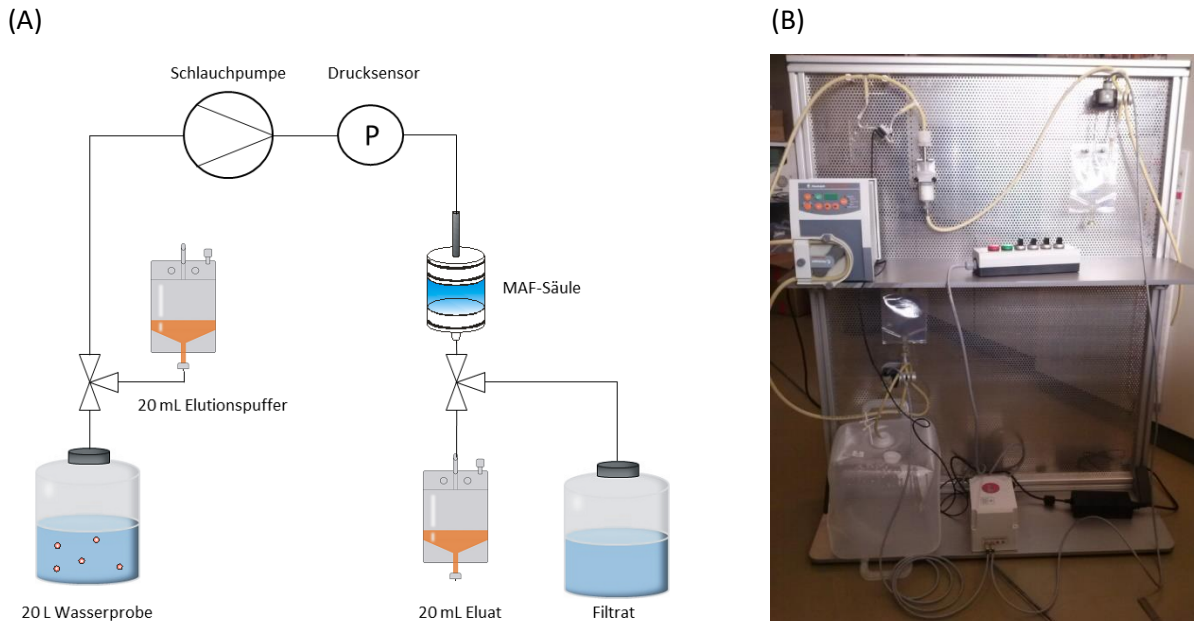
**Tabelle 13: Durch MAF filtrierbares Probenvolumen für verschiedene Wassermatrices und Trübungen. Da die Partikelgröße und Größenverteilung starken Einfluss auf das filtrierbare Volumen hat, sind ungefähre Bereiche angegeben. Werte sind nur bezogen auf Volumen. Bindekapazität der Monolithen wurde nicht berücksichtigt.**

Matrix	Trübung / NTU	Filtriertes Volumen
Leitungswasser	< 0,2	> 100 L
Oberflächenwasser	< 1	10 – 50 L
Oberflächenwasser	1-5	5 - 20 L
Oberflächenwasser	> 5	0,5 – 5 L
Grundwasser	3-10	5 – 20 L
Abwasser	> 50	≤ 1 L

### 3.3 Prozessautomatisierung der MAF

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines automatisierten Aufkonzentrierungsprozesses für Bakterien und Viren von 1000 L auf 1 mL. Den ersten Schritt dieses automatisierten Prozesses stellt die Konti-CUF dar. Die Proben aus dem ersten Schritt sollen im finalen Verbundprozess mittels MAF als zweitem Schritt weiter aufkonzentriert werden. Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit GWK Präzisionstechnik ein Gerät entwickelt, welches die MAF-Aufkonzentrierung automatisch durchführt. Das Gerät sollte möglichst kostengünstig und kompakt konstruiert sein. Um die exakten Spezifikationen des Gerätes zu bestimmen, wurde zunächst ein Entwicklungsaufbau verwendet, in

dem unterschiedliche Prozessvarianten getestet werden konnten. Weiterhin wurden damit die notwendigen Prozesszustände (Filtration, Elution, Spülen) und die zugehörigen Ventilstellungen definiert. Abbildung 26 zeigt den Entwicklungsaufbau.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Konfiguration der MAF-Automatisierung (A), Foto der Versuchsanlage im Betrieb (B).**

Der Entwicklungsaufbau bestand aus einer Lochplatte, einer Schlauchpumpe, zwei Schlauchklemmventilen, die je zwei Schläuche gleichzeitig fassen, einem Drucksensor sowie Sterilbeuteln und Probenbehältern. Der Aufbau der Systemkomponenten konnte variiert werden, um einen optimalen Prozessablauf zu finden. Der Kern des Systems bestand aus der monolithischen Säule, die an die Schlauchpumpe angeschlossen wurde. Diese war über ein Ventil mit einem Behälter für die Probe und mit einem Reservoir mit Elutionspuffer verbunden. Bei der Filtration wurde zunächst die Probe mit der Pumpe über die MAF-Säule geleitet. Zur Überwachung des Systemdrucks war ein Drucksensor an das Schlauchsystem angeschlossen. Das Filtrat, das aus der MAF-Säule austrat, wurde über ein zweites Ventil in einen Auffangbehälter geleitet. Nachdem die gesamte Probe über die Säule geleitet worden war, wurden die Ventile umgeschaltet, sodass nun Elutionspuffer durch das System gepumpt werden konnte. Dieser wurde ebenfalls durch das Modul geleitet und anschließend über das zweite Ventil in einen Auffangbehälter gepumpt. Dabei wurden die während der Filtration an die MAF-Säule gebundenen Mikroorganismen und Viren in einem Volumen von 20 mL von der Säule gelöst.

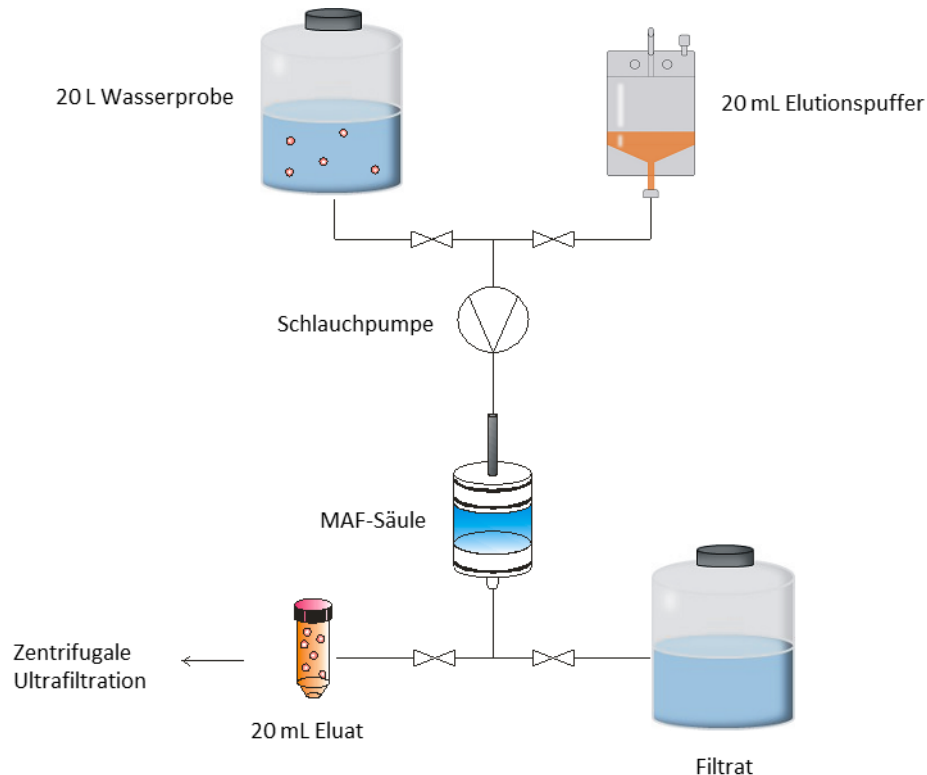
Das Ziel des Versuchsaufbaus war es, die Aufkonzentrierung mittels MAF in ein Gerät zu übertragen und um eine Drucküberwachung zu erweitern. Zur Überwachung des Drucks wurde aufgrund des 90

einfachen Aufbaus ein *Pro Occlusion* Detektor von Introtek verwendet. Dieser Detektor bietet den Vorteil, dass der probeführende Schlauch einfach in den Detektor eingeklemmt werden kann. Dadurch kommt es zu keiner Berührung zwischen Detektor und Probe, was eine Kontamination ausschließt und die Desinfektion zwischen verschiedenen Proben erleichtert. Der Drucksensor kann auf einen bestimmten Grenzwert eingestellt werden, sodass ein Warnsignal ausgegeben wird, sobald dieser Wert überschritten wird. Dadurch kann eine Beschädigung von Schläuchen oder MAF-Säule verhindert werden, falls es bei der Filtration von Proben mit hoher Partikelfracht zur Verblockung des Monolithen kommt. Durch eine Verengung des probeführenden Schlauchs konnte der Drucksensor direkt vor der MAF-Säule in das System eingebaut werden. Somit ist eine Drucküberwachung während der Filtration möglich. Um den Prozess zu testen, wurden Filtrationsexperimente mit 10-L-Wasserproben durchgeführt. Die Proben wurden auf pH 3 eingestellt und mit Bakteriophage MS2 versetzt. Die Filtration über eine MAF-OH Säule erfolgte automatisch mit dem System. Anschließend wurden die Ventile umgeschaltet, sodass 20 mL BEG-Puffer pH 9,5 aus dem Pufferreservoir über die Säule gepumpt und danach im Eluatreservoir aufgefangen wurden. Die Quantifizierung der Proben erfolgte nachfolgend mittels qPCR. Zum Vergleich wurde das selbe Experiment manuell wiederholt. Mit beiden Varianten wurde der Aufkonzentrierungsprozess jeweils dreimal wiederholt ( $m = 3$ ). Bei manueller Aufkonzentrierung wurden im Eluat  $1,14 \times 10^{11} \pm 3,4 \times 10^{10}$  GU gefunden. Bei automatisierter Filtration wurden  $9,34 \times 10^{10} \pm 3,08 \times 10^{10}$  GU gefunden. Die Unterschiede der beiden Methoden sind demnach vernachlässigbar klein. Die Standardabweichungen liegen in sehr ähnlichen Bereichen. Aus den Daten ist zu schließen, dass der automatisierte MAF-Prozess keine Unterschiede zur manuellen Aufkonzentrierung aufweist und somit für das finale Gerät übernommen werden kann. Im Verlauf der Experimente zeigte sich jedoch, dass die verwendeten Schlauchquetschventile zur Steuerung von zwei Schläuchen gleichzeitig zu schwach waren und nach einiger Zeit anfangen undicht zu werden. Um einen Verlust von Probe zu vermeiden, wurden diese Doppelventile durch jeweils zwei Einfachventile ersetzt. Die definierten Prozesszustände sind im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

### 3.3.1 Aufbau des automatisierten Systems für MAF: AutoMAF

Die durch den Entwicklungsaufbau gewonnenen Einsichten wurden genutzt, um ein Prozessschema mit den notwendigen Ventilen, Pumpen und Abläufen zu erstellen. Dieses wurde an GWK Präzisionstechnik weitergeleitet, sodass die finale Konstruktion der automatisierten MAF-Anlage (AutoMAF) gefertigt werden konnte. Abbildung 27 zeigt den schematischen Aufbau der automatisierten MAF-Anlage. Um zu gewährleisten, dass das System so auch in einem Wasserbetrieb einsetzbar ist, wurde die Anlage so einfach wie möglich konzipiert. Sie besteht im Wesentlichen aus

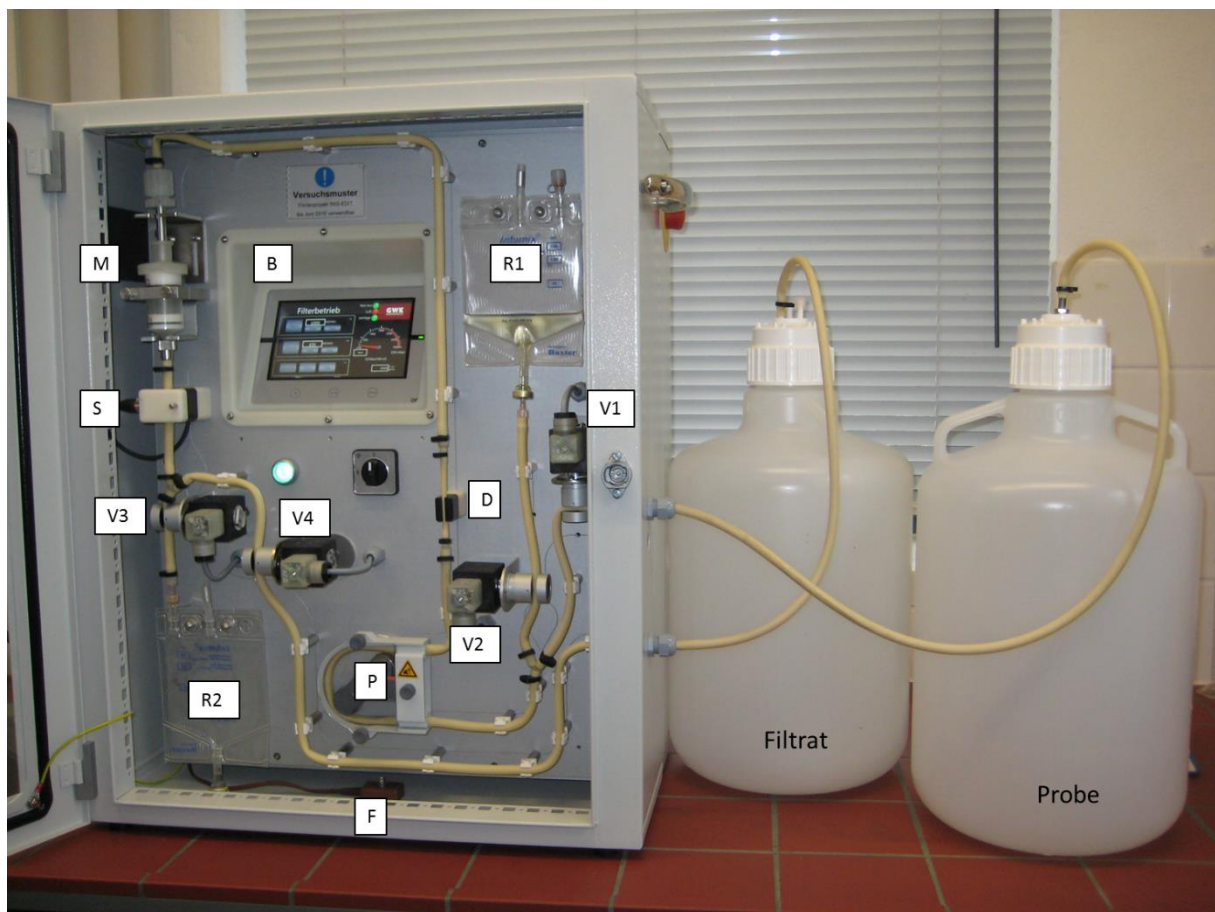
Behältern für Probe und Filtrat sowie Reservoirs für den Elutionspuffer und dem Eluat. Diese sind jeweils über ein Ventil und Schläuche an die Pumpe und die MAF-Säule angeschlossen.



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der finalen Automatisierung des MAF-Prozesses.**

Die finale Anlage ist in Abbildung 28 dargestellt. Bei der automatisierten MAF wird die Probe aus einem 20-L-Behälter mit einer Schlauchpumpe (P) zunächst am Drucksensor (D) vorbei auf die MAF-Säule (M) gepumpt. Dazu wird das System über das Bedienpanel (B) zuvor in den Filtrationsmodus geschaltet, bei dem die Ventile V1 und V4 geöffnet sind während V2 und V3 geschlossen bleiben. Die Probe fließt durch die MAF-Säule und das Filtrat wird in einem zweiten 20-L-Behälter aufgefangen. Sobald die gesamte Probe das System passiert hat und der Flussensor (S) keinen Probenstrom mehr registriert, erhöht das Gerät zunächst die Pumpgeschwindigkeit auf den Maximalwert (ca. 1,5 L/min), um alle Reste der Probe aus dem System zu spülen. Anschließend wird die Pumpe automatisch abgeschaltet. Um die an der MAF Säule adsorbierten Pathogene zu eluieren, wird das System am Bedienpanel auf den Elutionsmodus geschaltet. Dabei werden die Ventile V1 und V4 geschlossen sowie die Ventile V2 und V3 geöffnet. In diesem Modus wird der Elutionspuffer, der zuvor in das Pufferreservoir (R1) gefüllt wurde, über die Säule geleitet und anschließend im Eluatreservoir (R2) aufgefangen. Im Anschluss schaltet die Pumpe wieder automatisch auf Maximalgeschwindigkeit, um alle Reste der Probe aus dem System zu spülen. Die Flussraten für Filtration und Elution können am Bedienpanel separat eingestellt werden. Zudem lässt sich ein Maximaldruck festlegen. Sollte der Druck im System diesen Wert überschreiten, wird die Pumpe automatisch abgeschaltet. Der aktuelle Systemdruck wird ebenfalls

angezeigt. Der Flüssigkeitssensor (F) am Boden des Geräts detektiert Wasser im Gehäuse und schaltet das Gerät im Falle von Undichtigkeit ab. Im Automatikmodus werden Filtration und Elution vollautomatisch nacheinander durchgeführt. Darüber hinaus verfügt die Anlage über einen Spülmodus, in welchem der Filtrations- und Elutionskreislauf nacheinander mit einer zuvor angeschlossenen Natriumhypochloritlösung gereinigt und dekontaminiert werden. Die Reservoirs sind Einweg-Sterilbeutel, die über sterile Kanülen an das Schlauchsystem angeschlossen sind. Somit ist ein einfacher Wechsel zwischen verschiedenen Proben möglich.

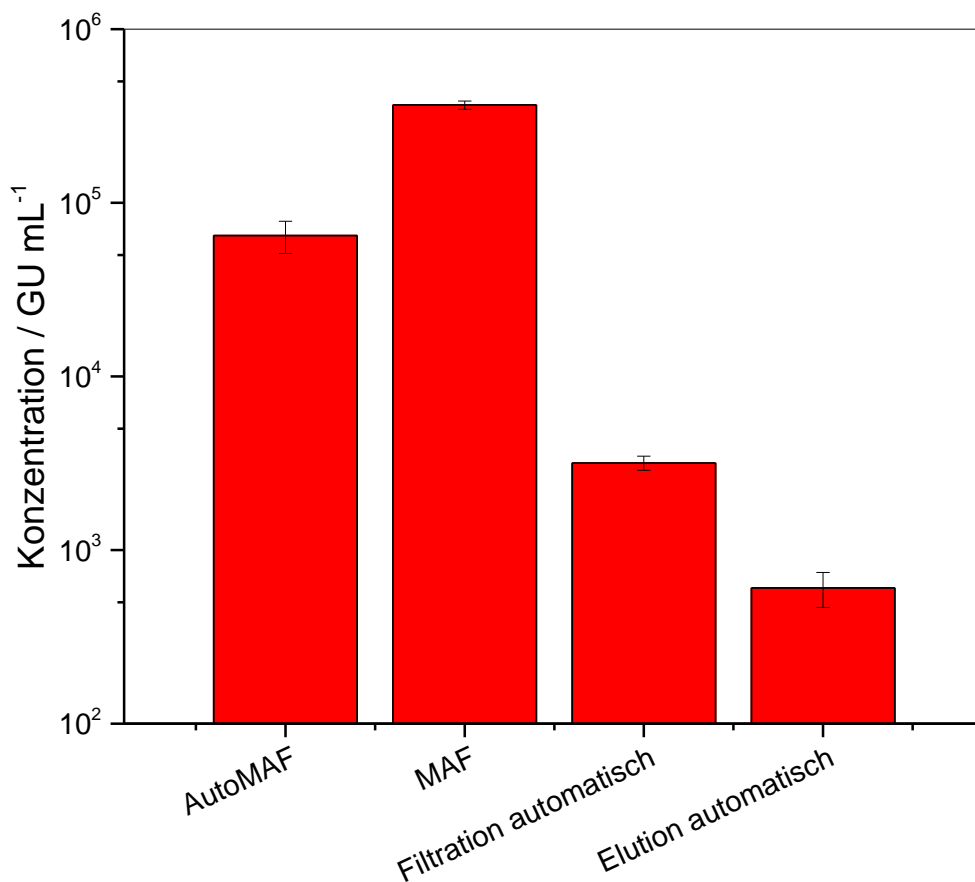


**Abbildung 28:** Foto des finalen Aufbaus der AutoMAF mit Ventilen (V1-4), Pumpe (P), MAF-Säule (M), Bedienpanel (B), Pufferreservoir (R1), Eluatreservoir (R2), Druckmesser (D), Flüssigkeitssensor (F) und Flussmesser (F).

### 3.3.2 Charakterisierung und Optimierung der AutoMAF

Zur Charakterisierung der AutoMAF wurde ein Funktionstest und Vergleich zur manuellen Filtration durchgeführt. Dazu wurden 10-L-Wasserproben mit Bakteriophage  $\Phi$ X174 versetzt und die Konzentration der Proben auf  $10^3$  GU/mL eingestellt. Der experimentelle Ablauf bestand aus Filtration mittels AutoMAF oder manueller MAF sowie anschließender Nukleinsäureextraktion (Viral Xpress) und

Quantifizierung durch qPCR. Um mögliche Fehlerquellen aufzudecken, wurden zudem Experimente durchgeführt, bei denen nur die Filtration bzw. nur die Elution mittels AutoMAF durchgeführt wurden. Der Rest der jeweiligen Filtration wurde manuell vorgenommen. Dadurch sollte es ermöglicht werden, Fehler in der AutoMAF besser zu identifizieren. Die Flussrate betrug jeweils 1 L/min. Die Elution wurde jeweils in 20 mL Hochsalzpuffer bei einer Flussrate von 160 mL/min vorgenommen. Die durch qPCR bestimmten Konzentrationen der Eluate für die verschiedenen Experimente sind in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29:**  $\Phi$ X174-Konzentration der Eluate nach manueller, automatisierter und teilautomatisierter MAF-Aufkonzentrierung ( $m = 1$ ,  $n = 3$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Filtration mittels AutoMAF nicht die gleiche Effektivität aufweist wie die manuelle Filtration. Die Ergebnisse wurden bei partiell automatischem Betrieb deutlich verschlechtert. Die Wiederfindung im automatischen Betrieb lag bei 12 %, im manuellen Betrieb bei 78 %. Beim partiell automatischen Betrieb lagen die Wiederfindungen bei unter 1 %. Da es keine eindeutige Ursache für die erhebliche Verringerung der Filtrationseffizienz gab, war eine umfangreiche Fehlersuche am Gerät notwendig. Dazu wurden systematisch Teile der Anlage umgangen bzw. durch Teile der manuellen Filtration ersetzt, um sich dieser anzunähern und den Fehler einzugrenzen. Dabei



wurden die Pufferreservoirs, der Anschluss der MAF-Säule, die Probenbehälter und die Flussraten verändert. Jedoch konnten mit keiner der Maßnahmen die Wiederfindungen der automatisierten Filtration signifikant verbessert werden. Als letzter Schritt blieb nur ein Wechsel der Verschlauchung der Anlage. Dabei wurde festgestellt, dass durch die deutlich kompaktere Bauweise der AutoMAF im Vergleich zum vorherigen Testaufbau die Schläuche der Anlage im Bereich der Ventile erhebliche Knicke und Winkel aufwiesen. Diese führten zu hohen Scherkräften innerhalb der Anlage, wodurch es vermutlich zur Beschädigung der Bakteriophagen während der Filtration kam. Dadurch konnten diese nicht mehr an die monolithische Säule binden. Nach der Erneuerung der Schläuche, wurden erneut Filtrationsexperimente mit Bakteriophage  $\Phi$ X174 durchgeführt. Um zu überprüfen, ob möglicherweise auftretende Scherkräfte, in Verbindung mit der osmotischen Belastung durch den Elutionspuffer eine Auswirkung auf die MAF haben, wurde die Elution sowohl mit BEG-Puffer als auch mit Hochsalzpuffer getestet. Die Konzentrationen der Ausgangsproben sowie der Eluate für manuelle und automatische Filtration sind in Abbildung 30 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Unterschiede zwischen manueller MAF und AutoMAF durch den Austausch der Verschlauchung behoben werden konnten. Die Unterschiede in den Eluatkonzentrationen zwischen MAF und AutoMAF sind vernachlässigbar klein. Jedoch zeigen die Daten den Einfluss von Scherkräften bei der Filtration. Da die mechanische Stabilität von Viren auch von deren Umgebung und vorhergehenden Belastungen abhängt, ist es wahrscheinlich, dass sich Organismen aus Realproben oder die unter anderen Bedingungen angezüchtet wurden, unterschiedlich verhalten.

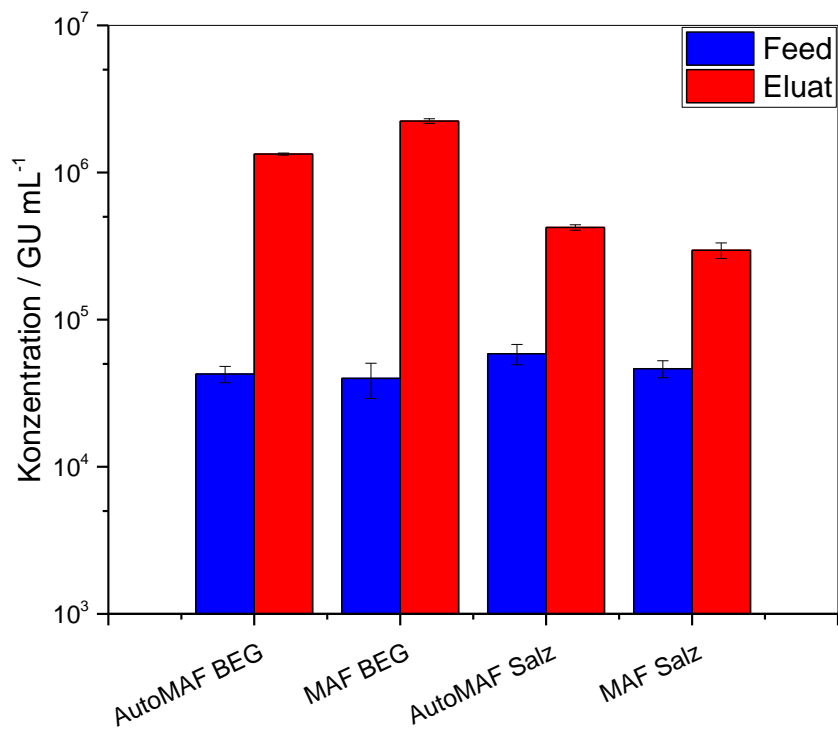


Abbildung 30:  $\Phi$ X174-Konzentration nach Aufkonzentrierung durch AutoMAF und manuelle MAF nach Optimierung der AutoMAF Anlage ( $m = 1, n = 3$ ).

### 3.3.3 Zusammenfassung Automatisierung

Zur Automatisierung des MAF-Prozesses wurden zunächst mit Hilfe eines Entwicklungsaufbaus alle notwendigen Bauteile und Abläufe bestimmt. Basierend auf diesen Daten, konnte anschließend ein automatisiertes Gerät zur Aufkonzentrierung von 20-L-Wasserproben mittels MAF gebaut werden. Dieses konnte den MAF-Prozess erfolgreich um eine Drucküberwachung erweitern. Es wurden Prozesse zur Filtration und Elution sowie Protokolle zur Dekontamination der Anlage entwickelt. Das Gerät kann als Teilkomponente eines automatisierten Kompletzprozesses in Verbindung mit der Konti-CUF-Anlage verwendet werden. Die nachgewiesenen Aufkonzentrierungsfaktoren lagen im selben Bereich wie bei manueller Filtration. Dabei wurde festgestellt, dass die sorgfältige Verlegung der Schläuche innerhalb der Anlage einen maßgeblichen Einfluss auf die Filtration haben. Daher muss vor jeder Anwendung der Anlage die Verschlauchung auf Knicke oder Winkel überprüft werden, um mögliche Einflüsse von auftretenden Scherkräften in der Anlage zu vermeiden.

Eine Implementierung der Anlage in den Kompletzprozess und die Kombination mit der Konti-CUF-Anlage zur Anreicherung von 1000-L-Wasserproben wurde in weiterführenden Experimenten durchgeführt und ist im folgenden Kapitel beschrieben.

## 4. Kombination der Aufkonzentrierungs- und Detektionsschritte zum Wasserhygiene-Monitoring

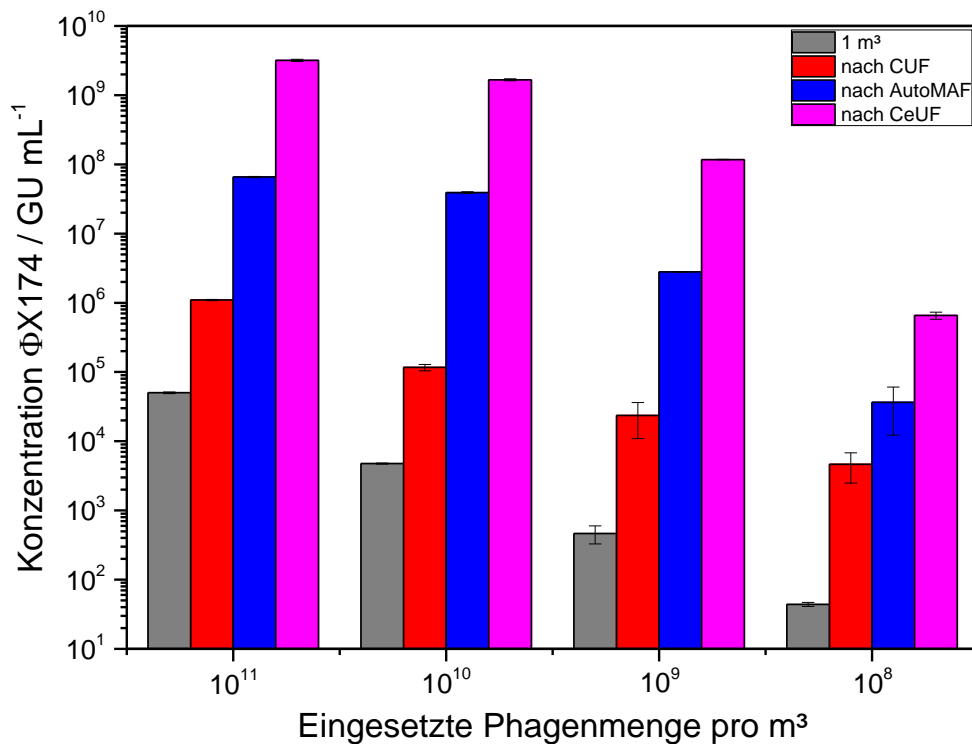
### 4.1 Test des Gesamtsystems

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Automatisierung von Aufkonzentrierungsmethoden für das Inline-Monitoring von Wasserproben. Zur Aufkonzentrierung von Wasserproben  $\geq 1000$  L wurde eine Ultrafiltrationsanlage konzipiert, gebaut und getestet. Mit ihr können große Wasserproben auf ein Volumen von 20 L eingengt werden. Weiterhin wurde die monolithische Adsorptionsfiltration dahingehend weiterentwickelt, dass es mit Hilfe von Anionenaustauschergruppen an der Porenoberfläche nun möglich ist, Bakterien und Viren direkt aus Wasserproben aufzukonzentrieren, ohne weitere Probenvorbereitung, wie z.B. Veränderung des pH-Wertes. Zudem wurde ein Gerät entwickelt, welches die MAF automatisch durchführt. Die einzelnen Komponenten wurden zu einem Gesamtprozess für das Hygiene-Monitoring zusammengeführt. Dieser Prozess besteht aus insgesamt drei Stufen. In der ersten Stufe werden  $1\text{-m}^3$ -Trinkwasserproben mittels Ultrafiltration auf 20 L eingengt. Die Filtration wird im Dead-End-Modus bei einer Flussrate von 20 L/min durchgeführt. Dieser Teilschritt dauert 40 min. Als zweite Stufe dient die AutoMAF. Diese wird mit einer MAF-DEAE-Säule bestückt und bei einer Flussrate von 1 L/min betrieben. Die Elution findet in 20 mL BEG-Puffer bei pH 9,5 statt. Die zweite Aufkonzentrierungsstufe dauert insgesamt 25 min. Die dritte Prozessstufe stellt die zentrifugale Ultrafiltration dar. Das MAF-Eluat wird in eine Amicon Ultra 15-Filtereinheit gefüllt und 20 min zentrifugiert. Das finale Volumen der Probe beträgt 1 mL. Für das Inline-Monitoring werden die aufkonzentrierten Proben mittels isothermer On-Chip-Amplifikation und -Detektion auf dem MCR 3 analysiert. Die Entwicklung dieses MCR 3-Assays ist Teil der Dissertation von Andreas Kunze. Vor der Detektion muss eine Nukleinsäureextraktion stattfinden. Diese kann mittels kommerzieller Extraktionskits oder durch ein Lab-on-Chip-System erfolgen. Ein solches Lab-on-Chip-System wird derzeit am Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK) der Universität Freiburg entwickelt und soll im Hygiene-Monitoring System eingesetzt werden. Da dieses System aber zum Zeitpunkt der Experimente noch nicht fertig gestellt war, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Nukleinsäureextraktionen manuell mit kommerziellen Kits durchgeführt.



**Abbildung 31: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs zum Test des Verbundverfahrens aus Ultrafiltration, monolithischer Adsorptionsfiltration, zentrifugaler Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung, Nukleinsäureextraktion und On-Chip-RPA zur Detektion von Pathogenen in Wasser.**

Der entwickelte Aufkonzentrierungsprozess und die Implementierung in ein Monitoringsystem wurden mit 1-m<sup>3</sup>-Wasserproben getestet, welche in der Konti-CUF kontinuierlich mit Bakteriophage ΦX174 versetzt wurden. Hierfür wurde jeweils 1 L einer Phagensuspension hergestellt und mittels einer Schlauchpumpe in die Wasserprobe injiziert. Die eingesetzten Phagensuspensionen wurden aus einer Stammlösung oder Verdünnungsstufen davon hergestellt, um je 10<sup>11</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>9</sup> und 10<sup>8</sup> Phagen in 1 m<sup>3</sup> zuzudosieren. Die angesetzten Stammlösungen wurden vor und nach der kontinuierlichen Zugabe während der Filtration gewogen, um die exakten zugegebenen Mengen bestimmen zu können. Die Proben wurden mit dem dreistufigen Prozess aufkonzentriert. Vor und nach jeder Stufe wurden Proben genommen und anschließend mittels qPCR quantifiziert. Die Nukleinsäureextraktion wurde zuvor mit dem QIAamp DNA-Mini Kit durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

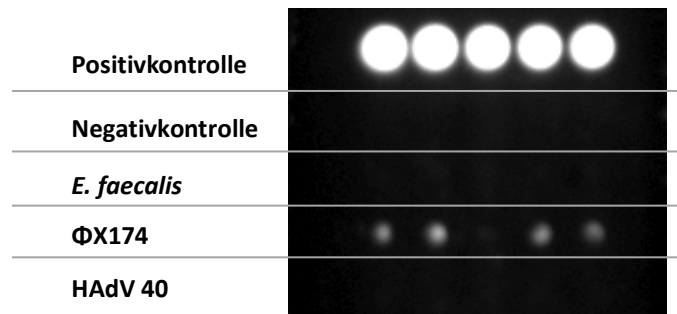


**Abbildung 32:** Kombination der einzelnen Prozessschritte Konti-CUF, AutoMAF und CeUF zur Aufkonzentrierung von Bakteriophage  $\Phi X174$  aus 1 m<sup>3</sup> Wasser auf 1 mL. (m = 1, n = 3)

Das Schaubild zeigt die Konzentrationen der Wasserprobe vor und nach den einzelnen Aufkonzentrierungsstufen. Die Konzentrationen beziehen sich jeweils auf das Gesamtvolumen. Um die Konzentrationen der 1-m<sup>3</sup>-Proben zu bestimmen, wurden die 1-L-Phagensuspensionen analysiert und auf 1-m<sup>3</sup>-Wasserprobe verrechnet. Daher sind hier auch sehr niedrige Messwerte möglich. Es ist zu erkennen, wie die Konzentration mit jedem Prozessschritt weiter ansteigt. Besonders bei der niedrigsten Ausgangskonzentration ist zu beobachten, dass die Konzentration aus einem Bereich deutlich unterhalb des Detektionslimits in den messbaren Bereich verschoben wurde. Damit ist ersichtlich, dass die Sensitivität der nachfolgenden Analyseschritte durch die Aufkonzentrierung der Probe deutlich erhöht wird. Die Wiederfindungen des dreistufigen Prozesses lagen bei insgesamt  $6,3 \pm 0,3 \%$ ,  $35,1 \pm 1,4 \%$ ,  $25,3 \pm 7,3 \%$  und  $1,5 \pm 0,2 \%$  für die Stammlösung und die drei Verdünnungsstufen. Diese Werte liegen für einen Prozess über drei Stufen und eine volumetrische Aufkonzentrierung um den Faktor  $10^6$  in einem akzeptablen Bereich. Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der kombinierte Aufkonzentrierungsprozess funktioniert.

Da die Kombination der Aufkonzentrierungsschritte funktioniert, wurde weiterhin die Implementierung der Anreicherung in das Hygiene-Monitoringsystem untersucht. Dazu wurde eine 1-m<sup>3</sup>-Wasserprobe kontinuierlich mit einer Suspension aus Bakteriophage  $\Phi X174$  versetzt. Mittels qPCR

wurde die Konzentration der Suspension bestimmt. Diese wurde vor und nach Zugabe gewogen, um die exakte zugegebene Menge bestimmen zu können. Dadurch konnte ermittelt werden, dass die zugegebene Phagenmenge einer Ausgangskonzentration der 1-m<sup>3</sup>-Wasserprobe von  $8,0 \times 10^0$  GU/mL entsprach. Die Probe wurde durch den dreistufigen Prozess auf 1 mL aufkonzentriert. Die Nukleinsäureextraktion erfolgte mit dem QIAamp DNA-Mini Kit. Die Proben wurden anschließend mit dem Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Assay (RPA-Assay) auf dem MCR 3 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Detektion der aufkonzentrierten Bakteriophagen mit dem RPA-Assay auf dem MCR 3.**

Abbildung 33 zeigt die Chemilumineszenzsignale auf der Chipoberfläche. Auf den Mikroarray wurden Primer für *E. faecalis*, ΦX174 und humanes Adenovirus 40 gespottet. Weiterhin wurden EZ-Link<sup>®</sup> Amino-PEG<sub>2</sub>-Biotin als Positivkontrolle und nukleasefreies Wasser als Negativkontrolle gespottet. Der Chip für die isothermale On-Chip-Amplifikation wurde nach Kunze et al. gespottet und verwendet [231]. Es wurden alle zur Verfügung stehenden, auf dem Chip etablierten RPA-Primer gespottet. Die Abbildung zeigt, dass nur bei der Positivkontrolle und bei ΦX174 Signale zu erkennen sind. Es ist somit gezeigt, dass die Kombination der Aufkonzentrierung mit dem RPA-Assay auf dem MCR 3 wie vorgesehen funktioniert. Weiterhin gibt es mit den angereicherten Proben keine Kreuzreaktivität mit den Primern für andere Organismen. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Kompletprozess für das Wasserhygiene-Monitoring aus Aufkonzentrierung, Nukleinsäureextraktion und isothermaler On-Chip-Amplifikation und -Detektion funktioniert. Ein Nachweis von kleinsten Erregerkonzentrationen kann damit innerhalb von 3,5 h erfolgen. Die Dauer der einzelnen Teilschritte ist in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Dauer der einzelnen Prozessschritte im Inline-Hygiene-Monitoringsystem.

Teilschritt	Benötigte Zeit
CUF	40 min
AutoMAF	25 min
CeUF	20 min
DNA-Extraktion	60 min
MCR 3	60 min
<b>Total</b>	<b>205 min</b>

#### 4.2 Test des Gesamtsystems unter realen Bedingungen

In Zusammenarbeit mit den Berliner Wasserbetrieben (BWB) und dem DVGW Technologiezentrum Wasser Karlsruhe (TZW) wurde das Verbundverfahren unter realen Bedingungen getestet. Dazu wurden die UF-Anlage und die AutoMAF an einer Teststrecke im Wasserwerk Berlin-Friedrichshagen aufgebaut. Diese besteht aus einem unabhängigen Wasserleitungsnetzwerk, in welches Kontaminationsfahnen eingebracht werden können. Dort wurde der Einsatz des Gesamtsystems zur Hygieneüberwachung mit dem Indikatororganismus Bakteriophage  $\Phi$ X174 getestet. Der Einsatz von Bakterien in der Teststrecke wurde von Seiten der BWB nicht gestattet. Proben wurden mittels UF und AutoMAF in Berlin aufkonzentriert und anschließend bei 4 °C gelagert. Im Anschluss an die Filtrationsversuche wurden die Proben zurück ans Institut transportiert, wo die weitere Bearbeitung durch CeUF, Nukleinsäureextraktion mittels QIAamp DNA-Mini Kit und die Analyse auf dem MCR 3 mittels des On-Chip-RPA-Amplifikationsassays stattfand. Weiterhin wurden die Proben mittels qPCR am TZW untersucht. Der Aufbau der Teststrecke ist in Abbildung 34 schematisch dargestellt.

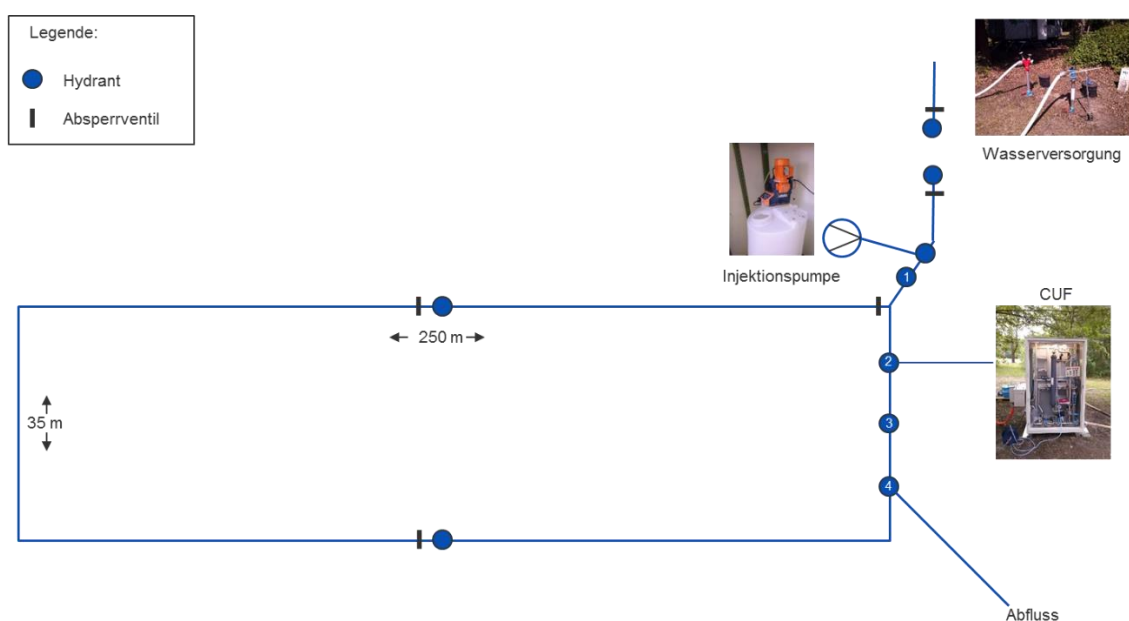


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Teststrecke im Berliner Wasserwerk Friedrichshagen

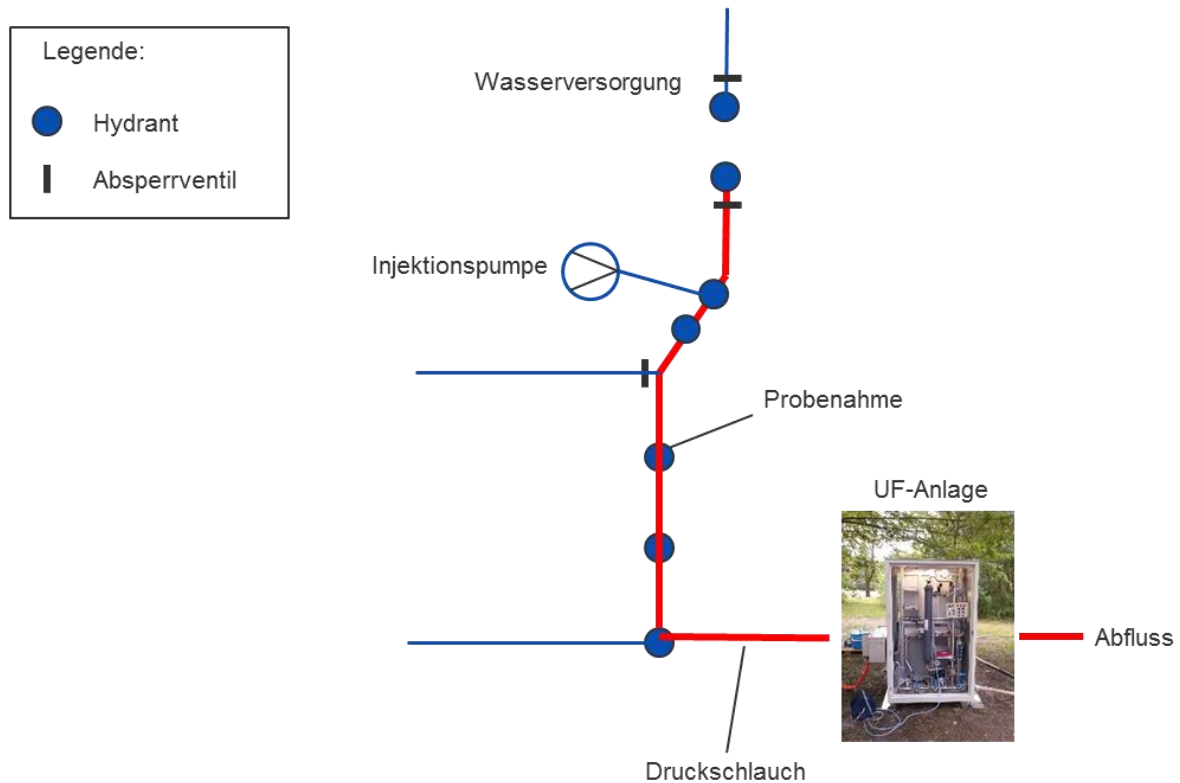
Die Teststrecke bestand aus unterirdischen Wasserrohren mit einem Durchmesser von 15 cm. Die Flussrate des Wassers konnte zwischen 1 und 20 m<sup>3</sup>/h variiert werden. Die Wasserversorgung der Strecke fand über zwei Hydranten statt, die über einen Druckschlauch miteinander verbunden waren. Wasser, welches darüber in die Strecke gelangte, floss zunächst an zwei weiteren Hydranten vorbei. An diesen konnten Proben gezogen werden oder gezielt Kontaminationen über eine Injektionspumpe in die Strecke eingeführt werden. Durch Öffnen oder Schließen verschiedener Absperrventile entlang der Strecke konnte der Verlauf des Wassers beeinflusst werden. Somit konnten kürzere oder längere Streckenabschnitte verwendet werden. Über einen Hydranten am Ende der Strecke wurde das Wasser in einen Abfluss geführt. Die UF-Anlage wurde über einen Hydranten an die Strecke angeschlossen. Der Anschluss wurde über einen Druckschlauch der Größe C (Durchmesser 52 mm) bewerkstelligt. Der Druckschlauch wurde mit einem speziellen Adapter an der Filteranlage angeschlossen (siehe Abbildung 35). Der Proben tank der Anlage wurde entfernt, da von Seiten der BWB Bedenken gegenüber der Verwendung dieses Tanks bestand. Weiterhin war der Tank nicht notwendig, da an einer Überdruckleitung gearbeitet wurde. Die Flussrate in der Anlage konnte über das Absperrventil der Filteranlage geregelt bzw. abgestellt werden. Eine Verwendung der Filtrationspumpe war aufgrund des Drucks in der Leitung nicht notwendig. Vor den Experimenten wurde die gesamte Teststrecke zunächst mit maximaler Flussrate gespült, um mögliche Ablagerungen mechanisch aus dem System zu waschen. Anschließend wurde die Strecke chloriert, um mögliche biologische Verunreinigungen zu entfernen und eine Beeinflussung der Experimente zu verhindern. Danach wurde die Strecke erneut mit Wasser bei maximaler Flussrate gespült bis kein Chlor mehr nachweisbar war. Der Nachweis von Chlor in der Teststrecke erfolgte mit dem Lovibond Chloride Minikit und dem Lovibond Comparator 2000+ (Tintometer Ltd, London, UK), welche standardmäßig bei BWB eingesetzt werden. Dabei wird durch eine Farbreaktion der Chlorgehalt des Wassers in einer Küvette überprüft und mit einer Referenzküvette verglichen (siehe Abbildung 35). Über die Intensität der Farbreaktion kann auf die Chlorkonzentration im Wasser zurückgeschlossen werden. Damit kann einfach und schnell gemessen werden, ob ausreichend Chlor zur Desinfektion eingesetzt wurde und ob dieses im Anschluss wieder aus dem System gespült wurde.





**Abbildung 35:** Adapter zum Anschluss des Druckschlauches an die Rohrleitung (links). Anschluss der UF-Anlage an die Teststrecke im Wasserwerk Berlin-Friedrichshagen ohne Probenbank (Mitte). Nachweis von Chlor in der Teststrecke mittels Farbreaktion und Vergleichsküvette (rechts).

#### 4.2.1 Testaufbau 1: Gesamtstrommessung



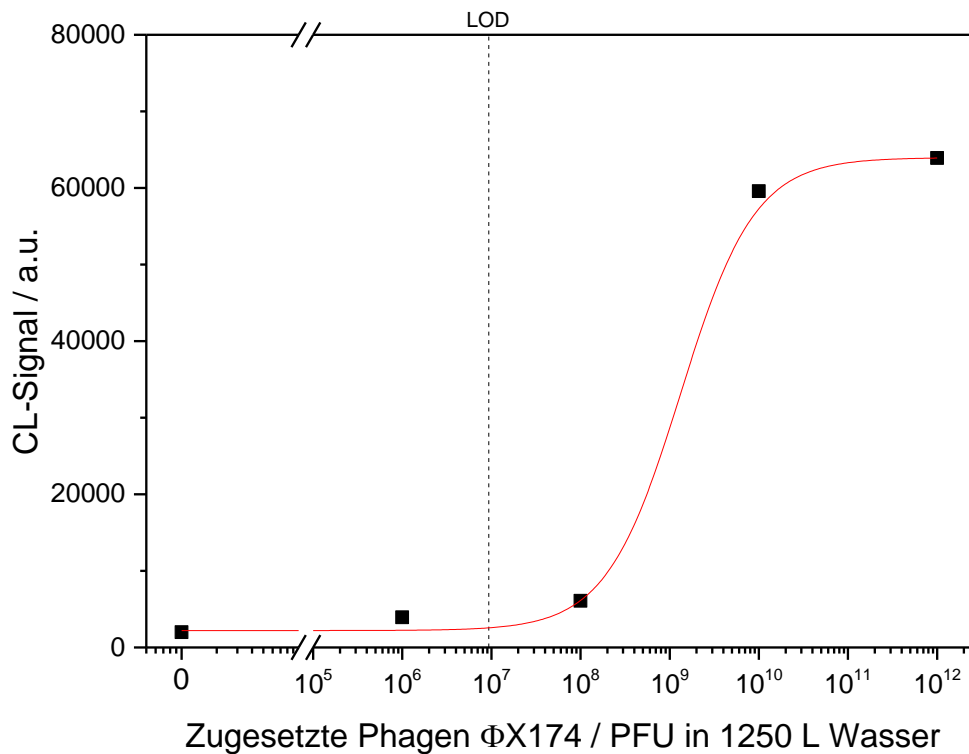
**Abbildung 36:** Schematische Darstellung des ersten Testaufbaus der Konti-CUF zur Gesamtstrommessung an der Teststrecke im Wasserwerk Berlin-Friedrichshagen. Der genutzte Streckenabschnitt ist hervorgehoben dargestellt.

Zunächst sollte die grundsätzliche Funktionalität des Hygiene-Monitoringsystems getestet werden, um festzustellen, ob eine Detektion der injizierten Kontaminationsfahne überhaupt möglich ist. Die UF-Anlage wurde hierzu so an die Teststrecke angeschlossen, dass der gesamte Wasserstrom durch die

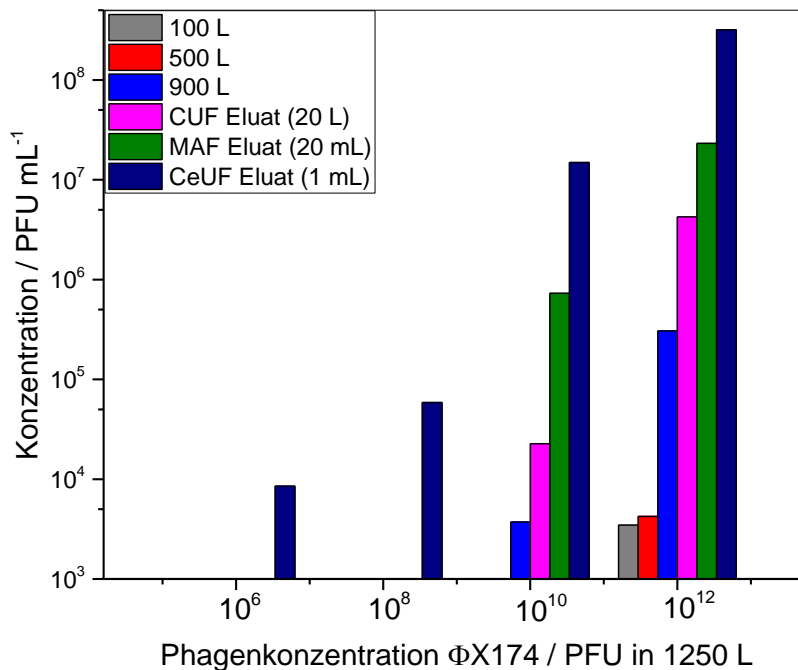
Anlage fließt. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 36 dargestellt. Es wurde eine Teilstrecke von ca. 40 m Länge verwendet. Die Flussrate im System lag bei 20 L/min. Als Kontaminationsfahnen wurden 10-L-Leitungswasserproben mit verschiedenen Konzentrationen des Bakteriophagen  $\Phi$ X174 versetzt. Es wurden jeweils ca.  $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^{10}$  und  $10^{12}$  PFU in 10 L eingesetzt. Dabei stellen diese Werte nur Größenordnungen dar, da vor Ort nicht die Möglichkeit bestand korrekte Verdünnungsreihen zu pipettieren. Daher wurden die Phagemengen mithilfe von Zentrifugenröhrchen auf ungefähre Größenordnungen verdünnt, um eine Machbarkeitsstudie mit dem Verbundverfahren durchzuführen. Die 10-L-Wasserproben wurden in einen 100-L-Tank gefüllt, der an die Injektionspumpe angeschlossen war. Durch die Injektionspumpe wurden die Kontaminationen kontinuierlich in die Teststrecke injiziert. Insgesamt wurden pro Experiment jeweils 1250 L Wasser durch die Teststrecke gepumpt und durch die UF-Anlage filtriert. Dabei lief das gesamte Wasser aus der Strecke auch durch die Filteranlage. Bei einer Streckenlänge von 40 m sollte die Kontaminationsfahne die UF-Anlage nach ca. 700 L Probe erreichen. Da die Kontaminationsfahne jedoch in einem Volumen von 10 L zugegeben wurde und somit über eine längere Strecke in der Rohrleitung verteilt war, wurde das Probenvolumen mit 1250 L angesetzt, um möglichst die gesamte zugesetzte Kontaminationsfahne durch die UF-Anlage zu spülen. Pro Konzentration wurde der Versuch zweimal durchgeführt ( $n = 2$ ). Am Hydranten Nr. 2 wurden jeweils nach 100, 500 und 900 L Proben genommen, um den Verlauf der Kontaminationsfahne später nachvollziehen zu können. Nach der Filtration wurden die angereicherten Phagen in 20 L Wasser von der Filtermembran eluiert. Das Eluat wurde an die AutoMAF angeschlossen und bei einer Flussrate von 20 L/min über eine MAF-DEAE-Säule weiter angereichert. Anschließend wurde die Elution mit BEG-Puffer bei pH 9,5 und einer Flussrate von 200 mL/min durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Detektion der Viren im Labor wurden die 20-mL-MAF-Eluate zunächst mittels CeUF auf 1 mL weiter aufkonzentriert. Die 1-mL-Probe wurde daraufhin in zwei Teile aufgetrennt. Ein Teil wurde zur Quantifizierung mittels qPCR an das TZW Karlsruhe geschickt, der andere Teil wurde am IWC mittels On-Chip-RPA untersucht. Dazu wurde zunächst eine Nukleinsäureextraktion mittels QIAamp DNA-Mini Kit durchgeführt. Die extrahierten Proben wurden auf dem MCR 3 mittels RPA-Assay untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Chemilumineszenzsignale sind für die vier verschiedenen Konzentrationsfahnen sowie einen Blindwert aufgetragen. Zunächst wurde eine Nachweisgrenze als CL-Signal des Blindwertes plus dreifacher Standardabweichung des Blindwertes berechnet. Sie liegt bei einer Konzentration von  $9,36 \times 10^6$  PFU in 1250 L. Dies entspricht einem Wert von 7,5 PFU/mL.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwendung des Gesamtsystems auch unter realen Bedingungen funktioniert. Die in die Teststrecke injizierten Kontaminationsfahnen konnten mit dem System detektiert werden. Sowohl die Aufkonzentrierung, als auch die Detektion und deren Kombination scheinen somit grundsätzlich für den Praxiseinsatz geeignet zu sein. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Kalibrierung des Gesamtsystems unter realen Bedingungen grundsätzlich möglich ist. Das System kann somit innerhalb von wenigen Stunden eine Aussage über die enthaltenen Mikroorganismen liefern. Eine Bestätigung der Messung ist im Anschluss mittels qPCR möglich. Diese wurde für die vorliegenden Proben am TZW Karlsruhe durchgeführt. Dazu wurde zuvor für alle Proben eine Nukleinsäureextraktion mit dem Viral Xpress Kit durchgeführt. Die qPCR wurde mit denselben Primern durchgeführt, die auch in allen anderen Experimenten am IWC verwendet wurden (siehe Tabelle 19).



**Abbildung 37: Chemilumineszenzsignale der RPA-Messung des Gesamtwasserstroms für die verschiedenen eingesetzten Phagenmengen ( $m = 1$ ,  $n = 5$ ).**



**Abbildung 38: Konzentrationen der Proben nach den einzelnen Aufkonzentrierungsstufen, gemessen mittels qPCR ( $m = 2, n = 2$ ). Die Messungen wurden von Johannes Ho am TZW Karlsruhe durchgeführt. Die PCR-Daten wurden vom TZW zur Verfügung gestellt.**

Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse der qPCR Messungen, die am TZW Karlsruhe durchgeführt wurden. Dabei wurden die Proben direkt aus der Teststrecke nach jeweils 100 L, 500 L und 900 L Filtratvolumen, sowie nach den einzelnen Aufkonzentrierungsschritten untersucht. Es sind die jeweils gemessenen Konzentrationen aufgetragen. Aufgrund der sehr ungenauen Bestimmung der Ausgangskonzentration war nur die jeweilige Größenordnung bekannt. Daher konnten keine Wiederfindungen für das Gesamtsystem berechnet werden. Wie in den Messungen am MCR 3 konnten auch mit qPCR alle Ausgangskonzentrationen nach der Aufkonzentrierung durch CUF, MAF und CeUF gemessen werden. Laut der Kalibrierung durch die Messungen am MCR 3 liegt der ermittelte Messwert für  $10^6$  eingesetzte Phagen unter dem LOD. Die Ergebnisse der qPCR legen jedoch nahe, dass dieser Wert noch im Arbeitsbereich der Methode liegt. Diese Diskrepanz ergibt sich wahrscheinlich daraus, dass die Kalibrierung nur mit Einfachbestimmung erstellt wurde, um zu zeigen, dass das System grundsätzlich kalibrierbar ist. Um den ermittelten LOD des Gesamtsystems zu verifizieren, sind weitere Messungen notwendig, die unter optimierten Bedingungen stattfinden. Dabei müssen die exakten eingesetzten Phagemengen zuvor in einem Labor eingestellt werden und die Proben direkt im Anschluss an die Aufkonzentrierung weiterverarbeitet werden. Die vorliegende Feldmessung zeigt jedoch das hohe Potential dieses Ansatzes. So ist für die unteren beiden Kontaminationsfahnen von  $10^6$  und  $10^8$  eingesetzten Phagen zu erkennen, dass eine Messung erst möglich war, nachdem die Probe alle drei

Aufkonzentrierungsschritte durchlaufen hatte. Diese Fahren entsprechen einer Ausgangskonzentration von  $8 \times 10^{-1}$  bzw.  $8 \times 10^1$  PFU/mL im Wasserleiter. Bei den höheren Konzentrationen war eine Messung bereits nach den ersten Stufen möglich bzw. sogar schon direkt aus dem Leiter. Daraus ist ersichtlich, wie die Sensitivität der Messung durch die vorherige Aufkonzentrierung auch unter realen Bedingungen deutlich erhöht wurde.

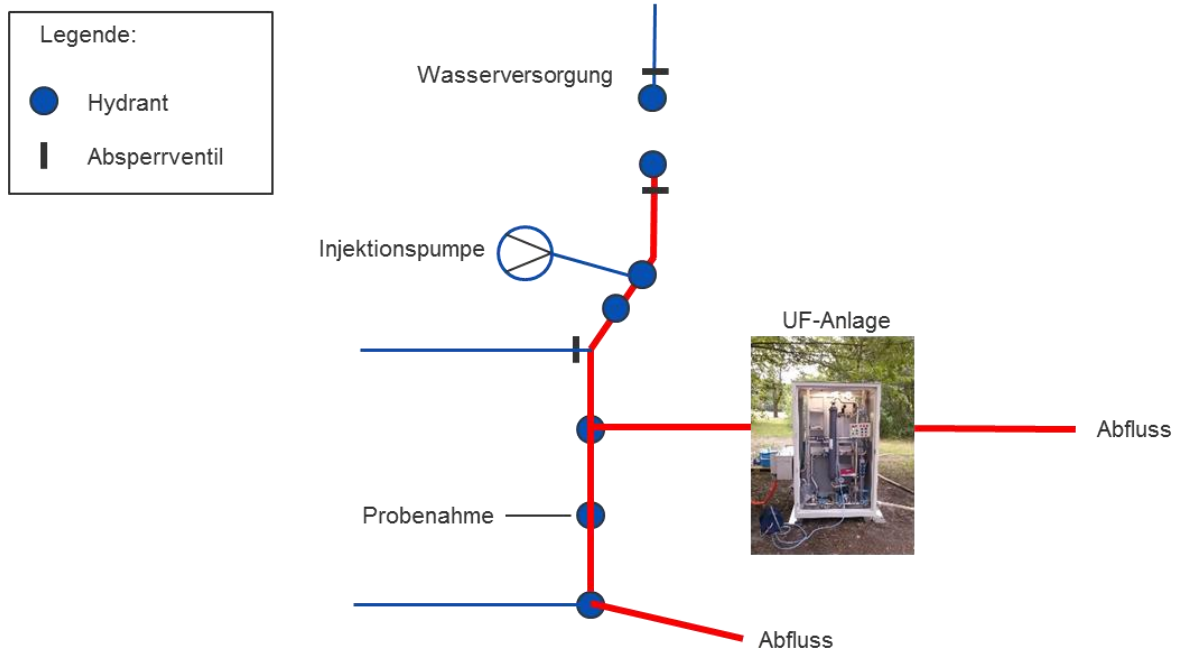
Bei Betrachtung der Konzentrationen nach den einzelnen Teilstufen fällt auf, dass die Aufkonzentrierung mittels MAF nicht effizient war. Insbesondere bei der eingesetzten Phagenmenge von  $10^{12}$  PFU. Die angestrebte Erhöhung der Probenkonzentration mittels MAF um den Faktor 1000 wurde nicht erreicht. Für eine eingesetzte Phagenmenge von  $10^{12}$  PFU lag die durch PCR ermittelte Konzentration nach CUF bei  $4,3 \times 10^6$  PFU/mL. Nach MAF lag die ermittelte Konzentration bei  $2,3 \times 10^7$  PFU/mL. Somit wurde die Konzentration nur um einen Faktor von 5,4 erhöht. Bei einer eingesetzten Phagenmenge von  $10^{10}$  PFU wurde die Konzentration von  $2,3 \times 10^4$  PFU/mL nach CUF durch MAF auf  $7,3 \times 10^5$  PFU/mL erhöht. Der erreichte Aufkonzentrierungsfaktor lag somit bei 32,1.

Dieser Verlust kann mehrere Ursachen haben. Zunächst wurden die Proben deutlich länger als zuvor und mit Unterbrechungen der Kühlkette gelagert. Auch die Wassermatrix kann einen Einfluss haben. Da die Rohrleitungen der Teststrecke nicht die gleiche Auslastung erfahren, wie Rohrleitungen in der tatsächlichen Wasserversorgung, mit denen die Module am IWC getestet wurden, können Ablagerungen oder Rost aus der Leitung in die Probe gelangt sein. Es ist möglich, dass solche Ablagerungen die Kapazität der MAF-Disks beeinflussen, indem Bindestellen besetzt werden. Daher könnte der Einsatz mehrerer MAF-Disks pro Säule notwendig sein, um die Kapazität und Retention zu erhöhen. Den größten Einfluss auf die MAF haben jedoch wahrscheinlich mechanische Belastungen der Bakteriophagen innerhalb der Teststrecke. Diese verursachen eine Beschädigung der Phagen, sodass deren DNA freigesetzt wird. Die freie DNA wird bei der Aufkonzentrierung nicht von der MAF-Säule zurückgehalten, weshalb sie später nicht in der qPCR nachgewiesen werden kann. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die mit dem Gesamtsystem detektierten Phagen höchstwahrscheinlich aktiv waren. Da für eine Risikobetrachtung im Rahmen eines Hygiene-Monitorings nur die aktiven Pathogene von Bedeutung sind, würde ein Verlust der beschädigten Keime im MAF-Schritt keinen Einfluss auf das Ergebnis der Risikobewertung haben. Weiterhin könnten darüber möglicherweise sogar Abschätzungen getroffen werden, wie viele Keime bereits im Wasserleiter durch mechanische Belastung inaktiviert werden. Die Daten der qPCR bestätigen somit die Messungen am MCR 3 und deuten darauf hin, dass mit dem Gesamtsystem hauptsächlich intakte Keime gemessen werden. Dies könnte bestätigt werden durch den Einsatz eines Lebend-/Tot-Moduls. Die Lebend-/Tot-Unterscheidung mittels On-Chip-RPA wird derzeit am IWC entwickelt, sodass zukünftig mit dem MCR 3 entsprechende Messungen möglich sind. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das Zusammenspiel

der Teilkomponenten unter realen Bedingungen grundsätzlich gut funktioniert und dass damit Kontaminationen, die zuvor außerhalb des Messbereichs lagen, nachgewiesen werden können. Durch Kalibrierung des Gesamtsystems sind quantitative Messungen möglich.

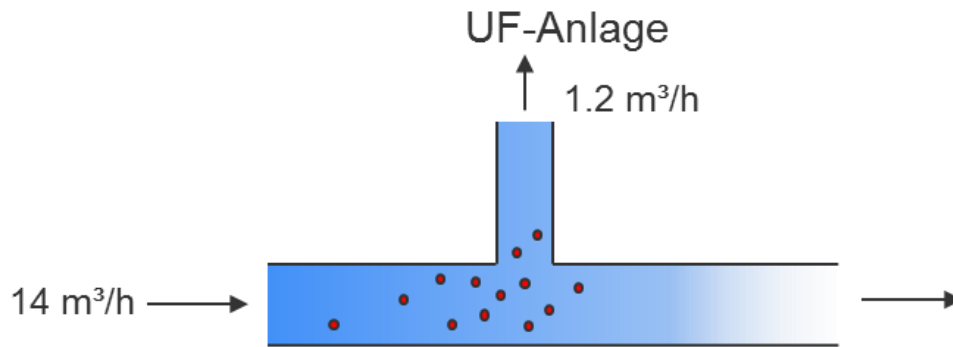
### 4.2.2 Testaufbau 2: Teilstrommessung

Neben der grundsätzlichen Funktionalität des Gesamtsystems sollte auch der Einsatz unter Bedingungen getestet werden, die den realen Gegebenheiten in einem kontinuierlichen Betrieb so nahe wie möglich kommen. Daher wurden Experimente mit einem zweiten Versuchsaufbau durchgeführt. Hierzu wurde die UF-Anlage so angeschlossen, dass nur ein Teilstrom des Wassers aus der Teststrecke in die Anlage gelangt (siehe Abbildung 39). Der Anschluss der Anlage erfolgte dazu an einem Hydranten entlang der Strecke, anstatt sie wie zuvor am Ende der Strecke. Dieser Aufbau entspricht dem Betrieb, wie er tatsächlich in einem Wasserwerk zum Hygiene-Monitoring implementiert werden würde. Da die Flussmengen in einem Wasserleiter (bis zu 20 m<sup>3</sup>/h) die Leistungsfähigkeit der UF-Anlage (ausgelegt auf 1 m<sup>3</sup>/h) deutlich überschreiten, wird nur eine Teilmenge in die Anlage geleitet. Ein weiterer Aspekt im realen Betrieb ist die Tatsache, dass die Wasserbetriebe nur für die Qualität des Wassers in ihren Leitungen verantwortlich sind. Sobald das Wasser diese Leitungen, z.B. durch einen Hydranten, verlässt, um in die UF-Anlage gespeist zu werden, wird es von den Wasserbetreibern nicht mehr als sauberes Trinkwasser angesehen. Daher darf einmal entnommenes Wasser nicht mehr zum Frischwasser zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde sämtliches Wasser, welches die UF-Anlage passierte, in einen Abfluss geführt. Eine Rückführung über einen Bypass oder eine Weiterleitung zum Verbraucher war nicht möglich.



**Abbildung 39: Schematische Darstellung des zweiten Testaufbaus der Konti-CUF zur Teilstrommessung an der Teststrecke im Wasserwerk Berlin-Friedrichshagen. Der genutzte Streckenabschnitt ist hervorgehoben dargestellt.**

Zur Simulation des realen Betriebs wurde die Teststrecke bei drei verschiedenen Flussraten betrieben. Eine Flussrate von  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  simulierte die Wasserleitung unter hoher Last,  $7 \text{ m}^3/\text{h}$  simulierte einen mittleren Verbrauch und  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$  einen geringen Verbrauch, wie er z.B. in der Nacht vorliegt. Ein wichtiger Aspekt dieses Aufbaus war die Verteilung der Kontaminationsfahne in der Wasserleitung. Da die Filteranlage über einen Hydranten zur Probenahme an die Wasserleitung angeschlossen ist, gelangt nur ein Teil der Probe zum Filter und wurde anschließend analysiert. Die Problematik der Verteilung der Probe im Wasserleiter ist schematisch in Abbildung 40 dargestellt. Mit diesem Aufbau sollte untersucht werden, ob eine solche Art der Probenahme repräsentativ war, und ob eine Kontamination in der Wasserleitung damit erfasst werden konnte. Die UF-Anlage wurde wie zuvor mit einer Flussrate von  $20 \text{ L}/\text{min}$  betrieben. Das entspricht  $1,2 \text{ m}^3/\text{h}$ . Eine Kontamination von  $10^{12} \text{ } \Phi\text{X174}$ -Phagen wurde punktuell in einem Volumen von ca.  $1 \text{ L}$  über die Injektionspumpe in die Strecke injiziert. Über den Hydranten Nr. 3 wurden im 30-Sekunden-Takt Proben genommen, um den Verlauf der Fahne später messen zu können. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung ( $n = 2$ ) durchgeführt.



**Abbildung 40: Schematische Darstellung der Problematik der Verteilung einer Kontaminationsfahne in der Wasserleitung. Partikel können im Hauptleiter oder in den Hydranten fließen. Eine Vorhersage über das exakte Verteilungsverhalten im Wasserleiter ist nicht möglich.**

Die Filteranlage wurde über einen 50 m langen  $\frac{3}{4}$ -Zoll-Schlauch ohne Proben tank an die Teststrecke angeschlossen. Der Schlauch verfügte über ein Volumen von ca. 14,25 L. In diesem Schlauch wurde das Wasser aus der Teststrecke mit einer Flussrate von 20 L/min in die Filteranlage geleitet. Die Länge der Teststrecke bis zu diesem Hydranten betrug ca. 40 m. Bei einem Rohrdurchmesser von 15 cm entspricht dies einem Volumen von 706,5 L. Vor jedem Experiment wurde zunächst berechnet, wie lange die Kontaminationsfahne bei der angelegten Rohrgeschwindigkeit braucht, um die 40-m-Strecke bis zum Hydranten (siehe Tabelle 15). Die Menge des zu filtrierenden Wassers wurde entsprechend so gewählt, dass die Fahne am Filter ankommen kann. Dabei wurden, um eine mögliche Verteilung der Kontaminationsfahne in der Rohrleitung zu berücksichtigen, sehr hohe Sicherheiten hinzuaddiert. Eine Kontaminationsfahne passiert den Hydranten bei einer Flussgeschwindigkeit von  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  nach ca. 3 min. Nach weiteren 43 s hat die Fahne den Schlauch zur Filteranlage passiert und ist an der Filtermembran angekommen. Daher wäre eine Filtrationsdauer von 5 min und somit einem filtrierte Volumen von ca. 100 L theoretisch ausreichend. Zur Sicherheit wurden aber 270 L filtrierte, um die Kontamination sicher auf dem Filter zu fangen. Die genauen Daten für die jeweiligen Experimente sind in Tabelle 15 aufgelistet. Zusätzlich wurde für alle angelegten Strömungen die Reynolds-Zahl nach Gleichung (1) berechnet. Damit kann eine Abschätzung über das Strömungsverhalten im Rohrleiter getroffen werden. Dabei wurde für Wasser eine kinematische Viskosität von ca.  $10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  angenommen. Als charakteristische Länge des Rohres wurde der Durchmesser von 15 cm verwendet. Die berechneten Reynolds-Zahlen lagen alle deutlich über der kritischen Reynolds-Zahl von 2040. Somit lag bei allen angelegten Flussgeschwindigkeiten turbulente Strömung vor. Es kann davon ausgegangen werden, dass die eingebrachten Kontaminationsfahnen sich durch die Verwirbelung im Rohr über den Rohrquerschnitt verteilt haben. Da die Teststrecke in Berlin nur für begrenzte Zeit (eine Woche) zur Verfügung stand, wurden anstelle von  $1\text{-m}^3$ -Proben nur die angegebenen Volumina filtrierte, um den Probendurchsatz zu erhöhen. Im Anschluss an die jeweilige Filtration, wurde die Wasserzufuhr der Filteranlage gestoppt und eine Elution in einem Volumen von 20 L durchgeführt.



Direkt im Anschluss wurden die Eluate mittels MAF-DEAE auf der Auto-MAF bei einer Flussrate von 1 L/min weiter aufkonzentriert. Die Elution erfolgte dabei in 20 mL BEG-Puffer bei pH 9,5. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 15: Übersicht der Prozessparameter für die untersuchten Flussgeschwindigkeiten bei der Teilstrommessung.**

Volumenstrom	Rohrgeschwindigkeit	Zeit, um Strecke zu durchlaufen	Tatsächlich filtriertes Volumen	Reynolds-Zahl
14 m <sup>3</sup> /h	13,2 m/min	3,03 min	270 L	33000
7 m <sup>3</sup> /h	6,6 m/min	6,06 min	500 L	16500
3,5 m <sup>3</sup> /h	3,3 m/min	12,12 min	700 L	8250

Zur Detektion wurden die Proben im Labor zunächst mittels CeUF auf ein finales Volumen von 1 mL weiter aufkonzentriert. 500 µl dieser Probe wurden an das TZW Karlsruhe zur Detektion durch qPCR geschickt. Die restliche Probe wurde einer Nukleinsäureextraktion unter Verwendung des QIAamp DNA-Mini Kits unterzogen. Anschließend wurden die Proben mittels RPA-Assay auf dem MCR 3 vermessen. Die Konzentrationen der Proben wurden über die Kalibrierung aus den Teilstrommessungen (siehe Abbildung 37) berechnet und sind in Tabelle 16 dargestellt. Es sind jeweils die bestimmten Konzentrationen für Messung 1 und 2 dargestellt.

**Tabelle 16: Gegenüberstellung der mittels Mikroarray und qPCR bestimmten Konzentrationen nach dreistufiger Aufkonzentrierung bei Teilstrommessung. Die PCR-Daten wurden vom TZW Karlsruhe zur Verfügung gestellt.**

Flussrate	MCR 3 Konzentration Messung 1 / PFU mL <sup>-1</sup>	MCR 3 Konzentration Messung 2 / PFU mL <sup>-1</sup>	qPCR Konzentration Messung 1 / PFU mL <sup>-1</sup>	qPCR Konzentration Messung 2 / PFU mL <sup>-1</sup>
14 m <sup>3</sup> /h	7,0 × 10 <sup>10</sup>	1,7 × 10 <sup>8</sup>	2,4 × 10 <sup>8</sup>	7,6 × 10 <sup>7</sup>
7 m <sup>3</sup> /h	1,8 × 10 <sup>8</sup>	1,3 × 10 <sup>8</sup>	4,0 × 10 <sup>7</sup>	2,8 × 10 <sup>6</sup>
3,5 m <sup>3</sup> /h	6,9 × 10 <sup>7</sup>	4,4 × 10 <sup>7</sup>	9,3 × 10 <sup>7</sup>	9,1 × 10 <sup>7</sup>

Alle vermessenen Proben lagen über der Nachweisgrenze. Daher werden alle Proben mit dem Hygiene-Monitoringsystem als positiv gewertet. Daraus kann abgeleitet werden, dass das System aus Aufkonzentrierung und Detektion auch im realen Umfeld grundsätzlich funktioniert. Verglichen mit den Messwerten des Aufbaus 1 waren die gemessenen CL-Signale hier sehr niedrig. Dies ist damit zu erklären, dass nur ein Teilstrom in die Anlage geleitet wurde und somit auch nur ein Teil der Kontamination detektiert wurde. Jedoch unterscheiden sich die Signale aus Aufbau 2 auch untereinander, obwohl jeweils die gleiche Menge an Phagen (10<sup>12</sup> PFU) in die Teststrecke injiziert

wurde. Die beiden Messungen mit  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  unterscheiden sich sehr stark. Es wurden CL-Signale von 63.922 a.u. im ersten Experiment und 8.722 a.u. im zweiten Experiment gemessen. Diese große Abweichung könnte im sigmoidalen Verlauf der CL-Signale begründet sein. Die Intensität der CL-Signale steigt ab einer gewissen Konzentration sehr schnell an und erreicht das maximale Signal der CCD-Kamera von ca. 63.000 a.u. (siehe Abbildung 37). Da die exakt eingesetzten Phagenmengen nicht bekannt waren, ist es möglich, dass der tatsächliche sigmoidale Verlauf weniger breit ist als hier dargestellt. Es ist möglich, dass die Konzentration der Proben genau im Bereich dieses Grenzwertes lag und es somit durch kleine Schwankungen in der Probenkonzentration zu starken Unterschieden im CL-Signal kam. Da es sich jedoch nur um eine Zweifachbestimmung handelt, sind weitere Wiederholungen notwendig, um dies zu bestätigen. Die Signale bei niedrigeren Flussraten lagen leicht unter denen der hohen Flussrate. Bei  $7 \text{ m}^3/\text{h}$  wurden Signale von 8.954 und 7.442 a.u. gemessen, bei  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$  wurden 4.931 und 3.925 a.u. gemessen. Diese Verringerung der Messsignale mit der Flussrate in der Teststrecke könnten mit der Verteilung der Kontaminationsfahne im Wasserleiter zusammenhängen. Je nach Flussrate im Wasserleiter ändert sich die Verteilung der Fahne im Wasserrohr. Dadurch gelangen abhängig von der Flussrate unterschiedliche Mengen der zugesetzten Bakteriophagen über den Hydranten in die Filteranlage. Dies ist auch anhand der Proben, die am Hydranten Nr. 3 vor der Filteranlage genommen wurden, ersichtlich. Mit Hilfe der qPCR (Messung durchgeführt von Johannes Ho am TZW Karlsruhe) konnte gemessen werden, dass die Fahne bei einer Flussrate von  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  nach 3,5 min am Hydranten ankommt und diesen nach weiteren 3 min passiert hat. Bei einer Flussrate von  $7 \text{ m}^3/\text{h}$  wurde die Fahne nach 6,5 min am Hydranten detektiert und war nach insgesamt 10 min daran vorbeigezogen. Somit benötigte die Fahne 3,5 min, um den Hydranten komplett zu passieren. Bei einer Flussrate von  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$  wurde die Fahne nach 8,5 min am Hydranten detektiert. Sie benötigte 11,5 min, um daran vorbei zu ziehen. Sie war somit deutlich breiter im Wasserleiter verteilt, als bei den höheren Flussraten.

Über die Konzentrationen, die mit dem Teilstrom ermittelt wurden, kann auf die Konzentration im Rohrleiter zurückgeschlossen werden. Die Filtration bei  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  wurde 13,5 min lang durchgeführt. In dieser Zeit passierten 3150 L Wasser die Leitung von denen 270 L auf die Filtermembran geleitet wurden. Das Verhältnis von Gesamt- zu Teilstrom lag somit bei 11,67. Die ermittelte Konzentration nach CeUF in 1 mL repräsentiert die Gesamtzahl der Phagen in 270 L. Multipliziert man diesen Wert mit dem Verhältnis von Gesamt- zu Teilstrom, erhält man die Menge der Phagen im Gesamtvolumen. Für  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  liegen diese Werte bei  $8,2 \times 10^{11}$  bzw.  $2,0 \times 10^9$  PFU in 3150 L. Für eine Flussrate von  $7 \text{ m}^3/\text{h}$  lag die Filtrationszeit bei 25 min und das Gesamtvolumen bei 2916 L. Das Verhältnis von 500 L Teilstrom zum Gesamtstrom lag bei 5,83. Die somit bestimmte Konzentration der Phagen im Leiter lag bei  $1,1 \times 10^9$  bzw.  $7,6 \times 10^8$  PFU in 2916 L. Bei einer Flussrate von  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$  wurde ein Teilstrom von 700 L in jeweils 35 min filtriert. Das Gesamtvolumen lag bei 2042 L. Das Verhältnis der Ströme betrug

2,92. Die Phagenkonzentration im Leiter lag bei  $2,0 \times 10^8$  bzw.  $1,3 \times 10^8$  PFU in 2042 L. Bei den Gesamtstromexperimenten wurden bei gleicher Zugabemenge von  $10^{12}$  Phagen im Leiter mittels qPCR  $3,2 \times 10^8$  Phagen gefunden. Die Messungen mit dem Teilstrom liefern also annähernd gleiche Ergebnisse wie die Gesamtstrommessungen.

Weiterhin wurden auch die aufkonzentrierten Proben am TZW Karlsruhe mittels qPCR untersucht. Dazu wurde zunächst eine Nukleinsäureextraktion mit dem Viral Xpress Kit durchgeführt. Die qPCR wurde mit denselben Primern durchgeführt, welche auch am IWC verwendet wurden (siehe Tabelle 19). Die Konzentrationen nach den einzelnen Aufkonzentrierungsschritten sind in Tabelle 17 dargestellt. Für alle Flussraten konnten bereits nach der ersten Stufe Konzentrationen gemessen werden. Auch hier ist die nur geringe Aufkonzentrierung in der zweiten Stufe mittels MAF zu sehen. So lagen die tatsächlichen Aufkonzentrierungsfaktoren von MAF für eine Flussrate von  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  bei 21,2 und 12,5. Für  $7 \text{ m}^3/\text{h}$  lagen die tatsächlichen Aufkonzentrierungsfaktoren bei 5,5 und 1,6 und für  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$  bei 1,4 und 4,7. Allerdings muss beachtet werden, dass die Konzentrationen nach CeUF im Vergleich zur MAF deutlich zu hoch liegen. So wurden hier tatsächliche Aufkonzentrierungsfaktoren von 14,2 und 60,4 für  $14 \text{ m}^3/\text{h}$ , 38,7 und 28,3 für  $7 \text{ m}^3/\text{h}$  und 106,2 und 65,3 für  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$  gemessen. Der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor für CeUF liegt hingegen nur bei 20. Somit lag entweder eine deutliche Unterbestimmung nach MAF oder eine Überbestimmung nach CeUF vor. Da bei CeUF nahezu das gesamte Probevolumen verarbeitet wird, und bei MAF nur ein Teil, ist es wahrscheinlicher, dass die Fehlbestimmung nach MAF aufgetreten ist. Eine Erklärung dafür könnte im BEG Puffer liegen. Dieser kann PCR inhibieren und somit zu Unterbestimmung führen. Da die Proben nach MAF über eine Woche lang gelagert werden mussten, könnten die Proteine im Puffer ausgeflockt sein. Das könnte eine ausreichende Abreicherung bei der Nukleinsäureextraktion behindert haben. Bei der CeUF wird ein Puffertausch durchgeführt, wodurch die Inhibitoren entfernt werden.

Es sind starke Schwankungen zwischen den jeweils zwei Proben pro Flussrate zu bemerken. Insgesamt korrelieren die Daten mit den mittels Mikroarray bestimmten Daten. Die Konzentration nach der dritten Stufe ist für eine Flussrate von  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  am höchsten. In Tabelle 16 ist eine Gegenüberstellung der mit qPCR und dem Mikroarray gemessenen Konzentrationen dargestellt. Mit beiden Methoden wurden bei der Flussrate von  $14 \text{ m}^3/\text{h}$  die höchsten Konzentrationen gemessen. Für die niedrigeren Flussraten von  $7 \text{ m}^3/\text{h}$  und  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$  wurden mittels Mikroarray allerdings höhere Werte bei  $7 \text{ m}^3/\text{h}$  gemessen als bei  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$ , in der PCR-Messung wurde die Konzentration bei  $3,5 \text{ m}^3/\text{h}$  höher bestimmt. Da es sich hier jedoch nur um erste Funktionstests handelt und den Daten nur jeweils zwei Messungen zu Grunde liegen, sind weitere Experimente notwendig, um statistische Aussagen treffen zu können.

**Tabelle 17: Mit qPCR gemessene Konzentrationen in Messung 1 und 2 nach CUF in 20 L, nach MAF in 20 mL und nach CeUF in 1 mL sowie die daraus resultierenden Wiederfindungen jeweils bezogen auf die zuvor gemessene Konzentration. Die Messungen wurden von Johannes Ho am TZW Karlsruhe durchgeführt. Die qPCR-Daten wurden vom TZW Karlsruhe zur Verfügung gestellt.**

Flussgeschwindigkeit	Konz. CUF / PFU mL <sup>-1</sup>	Konz. MAF / PFU mL <sup>-1</sup>	Konz. CeUF / PFU mL <sup>-1</sup>	Wiederfindung MAF	Wiederfindung CeUF
14 m <sup>3</sup> /h	7,88 × 10 <sup>5</sup>	1,67 × 10 <sup>7</sup>	2,38 × 10 <sup>8</sup>	2,12 %	71,11 %
	1,00 × 10 <sup>5</sup>	1,25 × 10 <sup>6</sup>	7,55 × 10 <sup>7</sup>	1,25 %	302,19 %
7 m <sup>3</sup> /h	1,86 × 10 <sup>5</sup>	1,02 × 10 <sup>6</sup>	3,96 × 10 <sup>7</sup>	0,55 %	193,57 %
	6,07 × 10 <sup>4</sup>	9,83 × 10 <sup>4</sup>	2,79 × 10 <sup>6</sup>	0,16 %	141,68 %
3,5 m <sup>3</sup> /h	6,36 × 10 <sup>5</sup>	8,78 × 10 <sup>5</sup>	9,33 × 10 <sup>7</sup>	0,14 %	531,06 %
	3,01 × 10 <sup>5</sup>	1,40 × 10 <sup>6</sup>	9,14 × 10 <sup>7</sup>	0,47 %	326,55 %

Die Daten zeigen insgesamt, dass die Flussrate im Wasserleiter bei der Beprobung ein wichtiger Parameter ist, um die Daten anschließend richtig interpretieren zu können. Bei der Anwendung dieses Systems in realen Wasserleitern wäre es demnach sinnvoll, Grenzwerte für eine Positiv-/Negativ-Messung in Abhängigkeit von der Flussrate zu definieren und so die verschiedenen Auslastungen der Rohre einzubeziehen. Um die Verteilung der Kontamination im Wasserleiter berücksichtigen zu können, ist eine Betrachtung der Reynolds-Zahl sinnvoll. Diese beinhaltet sowohl die Strömungsgeschwindigkeit als auch den Rohrlängendurchmesser. Sie gibt eine Aussage über das Strömungsverhalten. Somit könnten Grenzwerte für das Hygiene-Monitoringsystem mit der Reynolds-Zahl verknüpft werden, um Strömungsmechanische Einflüsse zu berücksichtigen und eine repräsentative Probenahme zu gewährleisten. Dabei sollte vor allem sichergestellt werden, dass eine turbulente Strömung vorliegt ( $Re > 2040$ ), damit eine Verteilung aller Kontaminanten über den gesamten Rohrquerschnitt erfolgt. Unter diesen Bedingungen ist es am wahrscheinlichsten, dass eine Kontamination über eine Probenahme an einem T-Stück erfasst werden kann.

Da bei der Detektion von Pathogenen im Trinkwasser die Zeit bis zur Detektion ein entscheidender Faktor ist, sollte auch dieser Berücksichtigung finden. So wäre es beispielsweise möglich, verschiedene Aufkonzentrierungsverfahren, die in diesem Zusammenhang angewandt werden, über einen Konzentrationsleistungsfaktor zu beurteilen, der aus dem Quotienten von Aufkonzentrierungsfaktor und dafür benötigter Zeit berechnet wird. Im Falle des hier genutzten Verbundverfahrens wird ein volumetrischer Aufkonzentrierungsfaktor von  $10^6$  innerhalb von 85 min erreicht. Somit läge der Faktor bei  $11765 \text{ min}^{-1}$ . Alternativ könnte auch ein Faktor berechnet werden, der die Zeit bis zum Messergebnis betrachtet. Im vorliegenden Fall liegt diese Zeit bei 205 min und der Faktor somit bei  $4878 \text{ min}^{-1}$ . Eine Betrachtung eines Faktors, der nicht den volumetrischen, sondern die tatsächliche Aufkonzentrierung einbezieht, ist in der Realität kaum umzusetzen. Wie insbesondere die Daten der

MAF-Stufe zeigen, spielen dabei die Gegebenheiten und Belastungen innerhalb eines Leitungsnetzwerks eine große Rolle. Diese müssen von Fall zu Fall betrachtet werden und lassen sich über generelle Aussagen kaum bewerten. Der volumetrische Konzentrationsleistungsfaktor könnte jedoch ein Mittel sein, um verschiedene Verfahren hinsichtlich ihrer Aufkonzentrierungsleistung pro Zeit zu vergleichen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Gesamtsystem unter realen Bedingungen grundsätzlich funktioniert. Die Daten zeigen, dass das System auch bei unterschiedlichen Lastzuständen im Rohrleitungsnetzwerk, z.B. bei hohen Volumenströmen tagsüber oder sehr geringer Last nachts, funktioniert. Im Fall von positiven Signalen könnte der Wasserbetreiber innerhalb von wenigen Stunden reagieren. Die MAF-Stufe erzielte niedrigere Wiederfindungen und Aufkonzentrierungsfaktoren als unter Laborbedingungen. Dies hängt wahrscheinlich mit der hohen mechanischen Belastung der Phagen in der Teststrecke zusammen, wodurch die DNA der Phagen frei wird und nicht mehr von der MAF zurückgehalten werden kann. Daher liegt dieser Ausbeuteverlust unter realen Bedingungen wahrscheinlich immer vor und ist nicht durch das System selbst begründet. Um dies genauer zu untersuchen, sind jedoch weitere Experimente unter Realbedingungen notwendig. Dabei sollten zunächst die Bedingungen der Messkampagne so optimiert werden, dass ein Labor in unmittelbarer Nähe zur Verfügung steht. Dadurch könnten Zugabemengen besser eingestellt werden und Lagerungszeiten verkürzt werden. So wäre eine exakte Kalibrierung des Gesamtsystems möglich. Durch eine Lebend-/Tot-Differenzierung der Proben vor dem MAF-Schritt könnte genauer untersucht werden, ob der Ausbeuteverlust tatsächlich daran liegt, dass die Keime in der Rohrleitung beschädigt werden und ihre DNA freisetzen. Da eine solche Beschädigung der Keime entlang des Rohrleiters auch bei tatsächlichen Realmessungen vorliegen müsste, könnte so untersucht werden wie stark diese Beschädigung mit der Länge der beprobten Rohrstrecke zunimmt. Es könnte so besser von der gemessenen Konzentration auf die tatsächliche Konzentration einer Kontamination im Rohrleiter rückgeschlossen werden. Dadurch könnten eventuell notwendige Desinfektionsschritte von Seiten der Wasserbetreiber besser gesteuert werden.

Die ersten Tests in Berlin konnten bereits das hohe Potential der Methode zeigen. Durch den sehr hohen volumetrischen Aufkonzentrierungsfaktor von  $10^6$ , konnte auch bei niedriger Wiederfindung insgesamt eine deutliche Erhöhung der Sensitivität der anschließenden Messung erzielt werden. Durch die kurze Prozessdauer von nur 3,5 h ist dadurch eine sehr schnelle Reaktion im Fall einer Kontamination möglich. Eine Quantifizierung kann anschließend mittels qPCR stattfinden. Die Erweiterung der On-Chip-RPA durch eine Lebend-/Tot-Differenzierung würde zudem eine genaue Risikoanalyse ermöglichen. Die Entwicklung einer Lebend-/Tot-RPA findet derzeit im Rahmen des Projekts Legiotyper am IWC statt.

---

## IV Zusammenfassung und Ausblick

Der Schutz des Trinkwassers vor viralen und bakteriellen Kontaminationen stellt eine große Herausforderung dar. Der Nachweis kleinster Konzentrationen hochinfektöser humanpathogener Erreger ist notwendig, um auch in Zukunft die Qualität des Trinkwassers sicherzustellen. Die Trinkwasserhygieneüberwachung basiert aktuell auf kulturbasierten Verfahren, deren lange Messzeiten von bis zu mehreren Tagen und deren eingeschränkte Anwendbarkeit (v.a. für Viren) sie unzureichend für die vollständige Überwachung der Wasserqualität machen. Moderne bioanalytische Nachweisverfahren wie qPCR, analytische Mikroarrays oder Antikörperverfahren ermöglichen eine schnelle Detektion eines sehr breiten Spektrums von Viren und Bakterien. Die Anwendung dieser Methoden zur Wasseranalytik ist jedoch aufgrund der großen notwendigen Probenvolumina ( $\geq 1 \text{ m}^3$ ) und der teilweise hohen Nachweisgrenzen von 100 bis 1000 Keime bzw. Viruspartikel/mL nur eingeschränkt möglich. Um diese Limitierung der Sensitivität zu überwinden, sind vorgeschaltete Aufkonzentrierungsverfahren notwendig, die eine Detektion ermöglichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung verschiedener Aufkonzentrierungsschritte zur parallelen Anreicherung von Bakterien und Viren. Die einzelnen Methoden sollten zu einem Verbundverfahren kombiniert werden, um eine schnelle, automatisierte Aufkonzentrierung von wasserbürtigen Pathogenen zu ermöglichen. Durch Kombination mit dem RPA-basierten On-Chip-Amplifikations- und Detektionssystem sollte ein Wasserhygiene-Monitoringsystem etabliert werden, das eine schnelle Detektion kleinster Konzentrationen wasserbürtiger Pathogene erlaubt. Dazu wurden Ultrafiltration und monolithische Adsorptionsfiltration zu einem Verbundverfahren kombiniert, um Proben von  $1 \text{ m}^3$  auf 20 mL einzuengen. Durch zentrifugale Ultrafiltration wurde eine weitere Aufkonzentrierung auf ein finales Volumen von 1 mL erreicht.

Zunächst wurde die als erste Stufe eingesetzte Ultrafiltration untersucht. Auf Basis vorangegangener Arbeiten wurde eine neue Filteranlage entwickelt. Sie ist kompakter als die Vorgängeranlage und verfügt über einen größeren Rohrdurchmesser, um höheren Probendurchsatz zu ermöglichen. Der Elutionsmechanismus wurde komplett überarbeitet, sodass nun eine zweite Pumpe zur Rückspülung genutzt wird, anstelle des zuvor verwendeten Druckbehälters. Über elektronische Flussmesser, die an die Pumpen gekoppelt sind, können die Probenmenge und die Eluatmenge genau gesteuert werden. Die Aufkonzentrierung mit der weiterentwickelten Anlage wurde mit den Indikatororganismen MS2,  $\Phi$ X174 und *E. coli* getestet. Dabei wurde eine Flussrate von 20 L/min angelegt, wodurch die Aufkonzentrierung von  $1 \text{ m}^3$  Wasser innerhalb einer Stunde durchgeführt werden konnte. Für Trinkwasserproben, aufgestockt mit MS2, konnten Wiederfindungen von 70,5 % im Dead-End-Modus und 41,9 % im Cross-Flow-Modus erreicht werden. Für *E. coli* wurden Wiederfindungen von 154,9 % im Dead-End- und 178,8 % im Cross-Flow-Modus gemessen. Weiterhin wurden verschiedene Konzentrationen von  $\Phi$ X174 eingesetzt und im Dead-End-Modus filtrierte.

Für Ausgangskonzentrationen zwischen  $10^2$  und  $10^5$  GU/mL wurden Wiederfindungen zwischen 43 und 210 % erzielt. Die Wiederfindungen von über 100 % sind wahrscheinlich damit zu begründen, dass die Viren und Bakterien über die gesamte Dauer der Filtration an der Oberfläche der Membran zusammengedrückt und in der Deckschicht komprimiert wurden. Durch die anschließende Elution konnten sie nicht wieder gleichmäßig in Suspension gehen, sondern lagen als Agglomerate vor. Dies führte dazu, dass die Proben, die aus den 20-L-Eluaten genommen wurden, nicht in der selben Form vorlagen wie die Ausgangsproben. Daher konnten die exakten Konzentrationen der Eluate nicht sicher bestimmt werden. Jedoch konnte von den ermittelten Größenordnungen auf die Aufkonzentrierungseffizienz geschlossen werden. Insgesamt lagen alle Probenkonzentrationen in der zu erwartenden Größenordnung. Somit war die Aufkonzentrierungsleistung der Filteranlage zufriedenstellend und ausreichend gut, um im Hygiene-Monitoringsystem eingesetzt zu werden.

Als zweite Aufkonzentrierungsstufe wurde die monolithische Adsorptionsfiltration untersucht. Dazu wurden zunächst neue funktionelle Gruppen an den Monolithen immobilisiert, um eine Aufkonzentrierung bei pH 7 zu ermöglichen. Dabei wurden die Anionenaustauschergruppen DEAE und Q, sowie die Kationenaustauschergruppe  $\text{SO}_3^-$  verwendet. Die funktionellen Gruppen wurden mit dem Indikatororganismus MS2 getestet, um sie mit der bereits etablierten MAF-OH zu vergleichen. Dabei wurden alle Monolithen mit dem Indikatororganismus gesättigt. Es konnten aus einer 10-L-Trinkwasserprobe mit einer Ausgangskonzentration von  $3,7 \times 10^7 \pm 4,8 \times 10^6$  GU/mL  $3,2 \times 10^{10}$  GU ( $n = 3$ ) an den Referenzmonolithen MAF-OH adsorbiert und anschließend wieder eluiert werden. Im Vergleich dazu konnten an die positiv geladenen Monolithen MAF-DEAE und MAF-Q mehr Bakteriophagen gebunden werden. Es wurden  $1,4 \times 10^{11}$  GU an MAF-DEAE und  $1,1 \times 10^{11}$  GU an MAF-Q gebunden. An MAF- $\text{SO}_3^-$  wurden hingegen nur  $1,3 \times 10^{10}$  GU gebunden. Somit konnte die Effektivität der Gruppen auf den Monolithen bestätigt werden. Um die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Monolithen hinsichtlich einer Aufkonzentrierung bei pH 7 ohne Probenvorkonditionierung zu beurteilen, wurden Filtrationsexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bakteriophage MS2 als Indikatororganismus durchgeführt. Dabei konnten die Detektionslimits der anschließenden qPCR durch MAF-DEAE von  $5,4 \times 10^3$  GU/mL auf  $7,6 \times 10^1$  GU/mL und durch MAF-Q von  $8,4 \times 10^2$  GU/mL auf  $2,1 \times 10^2$  GU/mL gesenkt werden. Auf den negativ geladenen Monolithen fand keine Adsorption statt. Somit konnte die Aufkonzentrierung von Viren erfolgreich auf einen positiv geladenen Monolithen übertragen werden. Dadurch entfällt die Notwendigkeit einer Anpassung des pH-Werts der Probe.

Zur Anwendung der positiv geladenen Monolithen im Wasserhygiene-Monitoring, wurde untersucht, ob damit eine parallele Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren bei hohen Flussraten möglich ist. Als Indikatororganismen wurden die Bakteriophagen MS2 und  $\Phi\text{X174}$  sowie die Bakterien *E. coli* und



*E. faecalis* eingesetzt, um ein möglichst breites Spektrum verschiedener Oberflächeneigenschaften von Zielorganismen zu repräsentieren. Durch Aufkonzentrierung bei 0,2 L/min, 0,5 L/min und 1 L/min mit MAF-DEAE konnte gezeigt werden, dass die Flussrate keinen Einfluss auf den Anreicherungsprozess der Organismen hat. Die Konzentrationen der Eluate lagen für alle Organismen und eingesetzten Konzentrationen unabhängig von der Flussrate im gleichen Bereich. Somit wurde gezeigt, dass der MAF-Prozess bei einer maximalen Flussrate von 1 L/min betrieben werden kann, um einen möglichst hohen Durchsatz der Aufkonzentrierung zu gewährleisten. Für alle eingesetzten Organismen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter und wiedergefundener Konzentration festgestellt. Insgesamt war die Aufkonzentrierung mittels MAF-DEAE effektiver als mit MAF-Q. Durch Anpassung des Elutionspuffers und des Elutionsprotokolls, konnten für MAF-DEAE hohe Wiederfindungen für die Bakteriophagen MS2 und  $\Phi$ X174 sowie für *E. coli* erzielt werden. Diese lagen zwischen 112 und 113 % für MS2, zwischen 91 und 75 % für  $\Phi$ X174 und zwischen 111 und 97 % für *E. coli* für Ausgangskonzentrationen zwischen  $10^8$  und  $10^6$  eingesetzte Organismen pro 10 L. Für *E. faecalis* konnten keine zufriedenstellend hohen Wiederfindungen durch Aufkonzentrierung mittels MAF-DEAE erzielt werden. Der Vergleich von Experimenten mit 10-L- und mit 100-mL-Proben zeigte, dass keine ausreichende Adsorption von *E. faecalis* an den Monolithen stattfindet, sondern dass nur eine Retention erzielt wurde.

Zur Verbesserung der mangelnden Adsorption von *E. faecalis* und somit möglicherweise auch anderer grampositiver Bakterien, wurde das Prinzip der Mixed-Mode-MAF untersucht. Dabei wurden zwei Monolithen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen in eine MAF-Säule eingebaut. Zur parallelen Aufkonzentrierung von MS2,  $\Phi$ X174, *E. coli* und *E. faecalis* wurden dazu Monolithen mit Polymyxin B und DEAE als funktionellen Gruppen kombiniert. Durch diese Kombination konnte die Wiederfindung von *E. faecalis* erheblich verbessert werden. Für  $10^6$ ,  $10^7$  und  $10^8$  eingesetzte Organismen lagen die Wiederfindungen zwischen 133 und 75 % für MS2, 107 und 101 % für  $\Phi$ X174, zwischen 100 und 64 % für *E. coli* und zwischen 116 und 88 % für *E. faecalis*. Somit konnte das Prinzip einer Mischsäule erfolgreich gezeigt werden. Durch diese Art der MAF-Säule wurde eine parallele Aufkonzentrierung der vier Indikatororganismen von 10 L auf 40 mL innerhalb von 20 min ermöglicht. Die entwickelte MAF-Methode ist somit etablierten Filtrations-, Fällungs- oder Chromatographieverfahren zur Aufkonzentrierung von Viren oder Bakterien, ebenbürtig bei deutlich reduziertem technischen Aufwand und hohem Durchsatz. Durch das modulare Prinzip sind viele Kombinationen denkbar, die auch an spezielle Anforderungen einzelner Anwendungen angepasst werden können.

Im Hinblick auf mögliche Anwendungen im Wasserhygiene-Monitoring wurde der Einfluss der Wassermatrix auf die Aufkonzentrierung mit MAF untersucht. Dazu wurden entlang der Isar Wasserproben genommen, um mittels MAF-OH Legionellen aus dem Oberflächenwasser

aufzukonzentrieren. Die Trübung der Wasserproben lag dabei zwischen  $0,42 \pm 0,04$  NTU ( $n = 3$ ) nahe der Quelle und  $1,04 \pm 0,11$  NTU an der Stelle mit der höchsten Trübung. Aus allen Proben konnten Legionellen aufkonzentriert und anschließend mittels Antikörper-Mikroarray detektiert werden. Trotz der teilweise hohen Trübung konnten alle 10-L-Proben von allen Probenahmestellen verarbeitet werden. Daraus ist ersichtlich, dass MAF sich grundsätzlich auch für Realproben eignet. Um die Leistungsfähigkeit der MAF für Realproben genauer zu untersuchen, wurden Trinkwasserproben mit Partikeln aus Abwasserproben unterschiedlicher Größe versetzt, auf verschiedene Trübungen eingestellt und mittels MAF filtriert. Die filtrierbaren Probenvolumina hingen dabei sehr stark von der Partikelgröße ab. So konnten bei Proben mit Partikeln  $> 1$  mm und einer Trübung von 10 NTU nur noch ca. 0,9 L verarbeitet werden, bevor die MAF-Säule verblockt war und kein Probenfluss mehr möglich war. Bei denselben Partikeln und einer Trübung von 0,5 NTU konnten die, für das Verbundverfahren aus CUF und MAF notwendigen, 20 L filtriert werden. Bei Proben mit kleineren Partikeln von ca. 0,5 mm Durchmesser konnten bei einer Trübung von 1 NTU bereits die notwendigen 20 L filtriert werden. Bei einer sehr hohen Trübung von 10 NTU konnte selbst mit kleinen Partikeln  $< 1$  mm nur 4 L filtriert werden. Die Daten legen nahe, dass eine Verblockung der MAF bei der Prozessierung von Trink- oder Rohwasser nicht stattfindet, da die Trübungen dieser Wasserarten normalerweise deutlich unter 1 NTU liegen. Bei der Filtration von Oberflächenwasser kann die Leistungsfähigkeit je nach Probenahmestelle stark schwanken.

Zur Integration des MAF-Prozesses in ein automatisiertes Wasserhygiene-Monitoringsystem, wurde in Zusammenarbeit mit GWK Präzisionstechnik GmbH ein Gerät entwickelt, welches die Filtration automatisch ausführt (AutoMAF). Dieses bestand aus einer Schlauchpumpe, vier Schlauchquetschventilen, einem Drucksensor, einem Flussmesser sowie einem Bedienpanel, an dem zwischen den Betriebsmodi Filtration, Elution und Spülen umgeschaltet werden konnte. Zur Aufkonzentrierung wurden Puffer und Eluatreservoirs an das Gerät angeschlossen und eine MAF-Säule eingesetzt. Nachdem eine Probe angeschlossen worden war, konnte diese durch das Gerät automatisch filtriert werden. Im Anschluss wurden die, an die MAF-Säule adsorbierten, Mikroorganismen und Viren automatisch eluiert. Beim Vergleich zwischen der Aufkonzentrierung mit dem automatisierten System und einer manuellen Aufkonzentrierung lagen die Unterschiede in der Wiederfindung zwischen 0,2 und 5,0 % und waren somit vernachlässigbar klein.

Nachdem die einzelnen Aufkonzentrierungsschritte modular entwickelt und getestet worden waren, wurden CUF und AutoMAF mit Zentrifugaler Ultrafiltration als drittem Aufkonzentrierungsschritt zu einem Verbundverfahren zur Anreicherung von 1000-L-Wasserproben auf ein finales Volumen von 1 mL kombiniert. Im Hinblick auf den Test des Gesamtsystems unter realen Bedingungen im Berliner Wasserwerk Friedrichshagen und mit dem RPA-Mikroarray-Assay, wurde das Gesamtsystem nur mit

Bakteriophagen  $\Phi$ X174 getestet, da dieser auch dort eingesetzt werden konnte. Zunächst wurde das kombinierte Aufkonzentrierungsverfahren auf seine Funktionalität getestet. Damit konnte der eingesetzte Bakteriophage in vier verschiedenen Ausgangskonzentrationen erfolgreich aufkonzentriert werden. Mittels qPCR wurden für eingesetzte Mengen von  $5 \times 10^{10}$  GU,  $5 \times 10^9$  GU,  $5 \times 10^8$  GU und  $5 \times 10^7$  GU in 1000 L, Wiederfindungen von insgesamt  $6,3 \pm 0,3$  %,  $35,1 \pm 1,4$  %,  $25,3 \pm 7,3$  % und  $1,5 \pm 0,2$  % ( $m = 1$ ,  $n = 3$ ) bestimmt. Da durch die Aufkonzentrierung eine Erhöhung der Probenkonzentration um den Faktor  $10^6$  erzielt werden sollte, lagen die Wiederfindungen in einem sehr guten Bereich. Das kombinierte Aufkonzentrierungsverfahren wurde mit der Detektion durch On-Chip-RPA auf dem MCR 3 kombiniert, um ein Gesamtsystem zum Wasserhygiene-Monitoring zu erhalten. Dieses wurde erneut mit dem Bakteriophagen  $\Phi$ X174 getestet. Mit dem so erzeugten Gesamtsystem war die Detektion einer Ausgangskonzentration von 8 GU/mL in einer 1000-L-Probe möglich. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Kombination der Aufkonzentrierungsschritte mit der On-Chip-RPA ohne negativen Einfluss auf das Messergebnis möglich ist. Die Analyse einer Probe von 1000 L war mit dem Gesamtsystem innerhalb von 205 min möglich.

Das entwickelte automatisierte Verbundverfahren wurde im Wasserwerk Berlin-Friedrichshagen unter realen Bedingungen an einer Rohrleitungsteststrecke eingesetzt. Dabei fand die Aufkonzentrierung mittels CUF und AutoMAF vor Ort statt. Die anschließende Aufkonzentrierung mittels CeUF, die Nukleinsäureextraktion und die Mikroarray-Detektion wurden am IWC durchgeführt. Das System wurde dabei auf zwei unterschiedliche Arten getestet, um seine Leistungsfähigkeit beurteilen zu können. Im ersten Testaufbau wurde das System an eine 40 m lange Leitungstrecke angeschlossen und das gesamte Wasser aus der Strecke wurde durch den Filter aufkonzentriert. Durch den Zusatz unterschiedlich hoher Kontaminationen mit Bakteriophage  $\Phi$ X174 in die Teststrecke konnte eine Nachweisgrenze von 7,5 PFU/mL für das Gesamtsystem mit Mikroarraymessung bestimmt werden.. Weiterhin wurde damit nachgewiesen, dass das Gesamtsystem unter realen Bedingungen funktioniert. Die mit dem Mikroarray gemessenen CL-Signale wurden durch die Ergebnisse der qPCR bestätigt. Im zweiten Testaufbau wurde der Betrieb unter realen Bedingungen getestet. Dazu wurde nur ein Teilstrom einer 40 m langen Rohrstrecke in die Filteranlage geleitet. Dabei wurden die Flussraten im Rohrleiter variiert, um verschiedene Auslastungsszenarien zu simulieren. Es wurde eine Kontamination von  $10^{12}$  PFU des Bakteriophagen  $\Phi$ X174 in die Teststrecke injiziert und mittels des Verbundverfahrens detektiert. Bei einer Flussrate von 14 m<sup>3</sup>/h wurden Konzentrationen von  $7,0 \times 10^{10}$  und  $1,7 \times 10^8$  PFU/ml. Bei 7 m<sup>3</sup>/h wurden  $1,8 \times 10^8$  und  $1,3 \times 10^8$  PFU/ml gemessen, bei 3,5 m<sup>3</sup>/h wurden  $6,9 \times 10^7$  und  $4,4 \times 10^7$  PFU/ml gemessen. Somit lagen die Messwerte für alle untersuchten Flussraten über der zuvor bestimmten Nachweisgrenze und wurden durch das Monitoringsystem als positiv detektiert. Die Proben konnten auch mittels qPCR quantifiziert werden. Die Mikroarray-Detektion konnte dadurch bestätigt werden. Die ersten Untersuchungen zeigen, dass das Verbundverfahren den

zeitnahen Nachweis kleinster Konzentrationen von wasserbürtigen Pathogenen in Wasserwerken ermöglichen kann. Mit dem Verbundverfahren ist es möglich, die Pathogene aus 1000-L-Wasserproben auf 1 mL anzureichern und anschließend mittels On-Chip-RPA zu detektieren.

Der erste erfolgreiche Einsatz des Verbundverfahrens an einem realen Wasserleiter zeigt das große Potential dieses Systems. Es kann darüber hinaus mit den bereits etablierten, kulturbasierten Detektionsverfahren kombiniert werden. Auch eine Anwendung in anderen wasserverarbeitenden Bereichen wie z.B. Verdunstungskühlanlagen oder Bewässerungsanlagen in der Landwirtschaft wäre denkbar. Die Möglichkeit der parallelen Aufkonzentrierung und anschließenden Detektion eines breiten Spektrums verschiedener Keime eröffnet neue Perspektiven für eine Vielzahl von Anwendungen. Allerdings wären für einen weiterreichenden Einsatz weitergehende Untersuchungen zum Einfluss der verschiedenen Parameter in den Rohrleitungen wie Flussgeschwindigkeit, Rohrlängendurchmesser oder Auslastung der Leitung notwendig. Darüber hinaus ist für eine Etablierung des Systems im Trinkwasserbetrieb eine vollständige Validierung mit allen möglichen Pathogenen zur Optimierung der Ausbeute sowie die Weiterentwicklung der On-Chip-RPA für weitere Organismen notwendig. Neben den bereits genannten Optimierungen kann das hier angewandte System noch anderweitig weiterentwickelt werden. Durch die Einführung eines Lab-On-Chip-Systems zur Nukleinsäureextraktion könnte der Automatisierungsgrad des Verfahrens deutlich erhöht werden. Ein solches System wird derzeit am Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK) der Universität Freiburg entwickelt. Weiterhin könnte durch die Erweiterung der RPA durch eine Lebend-/Tot-Differenzierung eine genaue Risikoanalyse der Proben durchgeführt werden. Die Entwicklung einer solchen Differenzierung findet derzeit am IWC statt. Durch die Kombination des hier entwickelten Verfahrens mit diesen Technologien wäre eine schnelle Detektion und Risikoanalyse zur Überwachung der Trinkwasserhygiene möglich. Dieses System könnte den Wasserversorgern helfen, auch in Zukunft sicheres Trinkwasser zu gewährleisten.

---

## V Summary and Outlook

The protection of drinking water against viral and bacterial contamination presents a great challenge. The detection of smallest concentrations of highly infectious pathogens is necessary to ensure the quality of drinking water in the future. Currently, the monitoring of drinking water hygiene is based on culture methods whose long measurement times of up to several days and limited applicability (especially for viruses) make them insufficient for the complete surveillance of drinking water quality. Modern, bioanalytical methods like qPCR, analytical microarrays or antibody-techniques enable a fast detection of a broad spectrum of viruses and bacteria. However, the application of these methods for water analysis is limited due to the high sample volumes needed ( $\geq 1 \text{ m}^3$ ) and the high detection limits of 100 to 1000 germs or viruses/mL. To overcome these limitations in sensitivity, concentration methods are needed to enable detection.

The aim of this work was the development of different concentration steps for the parallel enrichment of bacteria and viruses. The individual methods should be assembled to a combined process to enable a rapid automated concentration of waterborne pathogens. By combination with the RPA-based on-chip amplification and detection system a water hygiene monitoring system should be established to allow the fast detection of smallest concentrations of waterborne pathogens. Therefore, ultrafiltration and monolithic adsorption filtration were combined to a process to narrow down samples of  $1 \text{ m}^3$  to a volume of 20 mL. By centrifugal ultrafiltration a further concentration to a final volume of 1 mL was achieved.

As a first step ultrafiltration was investigated. Based on previous works a new filtration device was built. It is more compact than its precursor and possesses a larger pipe diameter to increase the sample throughput. The elution mechanism was completely revised so that now a second pump is used for the backflush instead of a pressure vessel. By electronic flow meters attached to the pumps the sample and eluate volumes can be controlled exactly. The concentration with the revised device was tested with the indicator organisms MS2,  $\Phi$ X174 and *E. coli*. A flow rate of 20 mL/min was used, whereby a concentration of  $1 \text{ m}^3$  of water could be performed within one hour. For drinking water spiked with bacteriophage MS2 recoveries of 70,5% in dead-end mode and 41,9% in cross-flow mode were achieved. For *E. coli* recoveries of 154,9% in dead-end- and 178,8% in cross-flow mode were measured. Furthermore, several concentrations of bacteriophage  $\Phi$ X174 were spiked and filtrated in dead-end and cross-flow mode.

For initial concentrations between  $10^5$  and  $10^2$  GU/mL recoveries between 43% and 210% were achieved. Recoveries above 100% are likely caused by viruses and bacteria being pressed to the surface of the filter membrane over the whole duration of the filtration and being compressed in the top layer. By subsequent elution bacteria and viruses couldn't return to an evenly suspended condition but rather to agglomerates. This led to samples taken from the 20-L-eluate not being in the same form as

the initial samples. However, it was possible to estimate the concentration efficiency by the orders of magnitude measured in the samples. Overall, sample concentrations ranged in the expected orders of magnitude. The Enrichment performance of the filtration device was good enough to be applied in the hygiene monitoring system.

As second concentration step, monolithic adsorption filtration was investigated. Therefore, new functional groups were immobilized onto the monoliths to enable a concentration at pH 7. Anion-exchange groups DEAE and Q as well as the cation-exchange group  $\text{SO}_3^-$  were used. The functional groups were tested with the indicator organisms MS2 to compare them to the already established MAF-OH. Therefore, all monoliths were saturated with the indicator organism. From a 10-L water sample with an initial concentration of  $3,7 \times 10^7 \pm 4,8 \times 10^6$  GU/mL ( $n = 3$ ) the reference monolith MAF-OH could adsorb and afterwards elute an amount of  $3,2 \times 10^{10}$  GU. In comparison, the positively charged monoliths MAF-DEAE and MAF-Q could bind more bacteriophages.  $1,4 \times 10^{11}$  GU were adsorbed to MAF-DEAE and  $1,1 \times 10^{11}$  GU were adsorbed to MAF-Q. To MAF- $\text{SO}_3^-$  however, only  $1,3 \times 10^{10}$  GU could be adsorbed. Hence, the effectivity of the groups could be confirmed. To evaluate the performance of the different monoliths regarding the concentration at pH 7 without preconditioning of the sample, filtration experiments with different concentrations of bacteriophage MS2 as indicator organism were performed. The detection limits for the subsequent qPCR could be improved by MAF-DEAE from  $5,4 \times 10^3$  GU/mL to  $7,6 \times 10^1$  GU/mL and by MAF-Q from  $8,4 \times 10^2$  GU/mL to  $2,1 \times 10^2$  GU/mL. On negatively charged monoliths no adsorption took place. Thereby, the concentration of viruses could be successfully transferred to a positively charged monolith. Hence, the need to adjust the pH value is omitted.

To apply the positively charged monoliths in water hygiene monitoring it was investigated, if a parallel concentration of bacteria and viruses at high flow rates is possible with them. The bacteriophages MS2 and  $\Phi$ X174 as well as the bacteria *E. coli* and *E. faecalis* were used as indicator organisms to represent a broad spectrum of surface properties of target organisms. By concentration at 0,2 L/min, 0,5 L/min and 1 L/min with MAF-DEAE it could be shown that the flow rate does not have an influence on the concentration process of the organisms. The eluate concentrations were in the same range for all organisms and spiked concentrations, independent from the flow rates. It was shown that the MAF process can be operated at the maximum flow rate of 1 L/min to guarantee the highest possible throughput. A linear correlation between spiked and recovered concentration was observed for all organisms. Overall the concentration by MAF-DEAE was more effective than by MAF-Q. By adjusting the elution buffer and the elution protocol, high recoveries could be achieved for bacteriophages MS2 and  $\Phi$ X174 as well as for *E. coli* with MAF-DEAE. They ranged between 112 and 113% for MS2, between 91 and 75% for  $\Phi$ X174 and between 97 and 111% for *E. coli* for initial concentrations between  $10^8$  and

$10^6$  organisms per 10 L. For *E. faecalis* it was not possible to achieve satisfyingly high recoveries by MAF-DEAE. By comparing experiments with 10-L and 100-mL samples it could be shown that no sufficient adsorption takes place on the monolith for *E. faecalis* but rather a retention.

To improve the lack of adsorption of *E. faecalis* and possibly other gram positive bacteria, the principle of mixed mode MAF was investigated. Therefore, two monoliths with different functional groups were put into one MAF column. For the parallel concentration of MS2,  $\Phi$ X174, *E. coli* and *E. faecalis* monoliths with polymyxin B and DEAE as functional groups were combined. This combination could improve the recovery of *E. faecalis* considerably. For  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  spiked organisms the recoveries ranged between 133 and 75% for MS2, 197 and 101% for  $\Phi$ X174, 100 and 64% for *E. coli* and 116 and 88% for *E. faecalis*. The principle of mixed columns could therefore be shown. This kind of MAF-column enabled the parallel concentration of four indicator organisms from 10 L to 40 mL within 20 min. The performance of the developed MAF-method is therefore equal to established filtration-, precipitation- or chromatography processes for the concentration of viruses or bacteria while at the same time reducing technical effort and achieving high throughput. By the modular principle, many combinations are possible and special requirements can be met.

The influence of the water matrix to the concentration by MAF was investigated regarding possible applications in water hygiene monitoring. Water samples were taken along the river Isar to concentrate legionella from surface water with MAF-OH. The turbidity of the samples ranged between  $0,42 \pm 0,04$  NTU ( $n = 3$ ) near the source and  $1,04 \pm 0,11$  NTU at the point with the highest turbidity. Legionella could be concentrated and afterwards be detected by antibody microarray from all samples. Despite the partially high turbidities all 10-L samples from all sampling sites could be processed. It can therefore be seen, that MAF is generally suited to process real samples. To investigate the performance of MAF for real samples, drinking water samples were spiked with particles from waste water in different sizes, adjusted to different turbidities und filtrated by MAF. The sample volumes that could be processed by MAF were highly depending on the particle size. From samples containing particles  $> 1$  mm and turbidity of 10 NTU only ca. 0,9 L could be processed before a blockage of the MAF-column occurred. Using the same particles adjusted to a turbidity of 0,5 NTU it was possible to filtrate 20 L which is the volume necessary for the combined process of CUF and MAF. For samples containing particles with a diameter of 0,5 mm it was possible to filtrate 20 L at a turbidity of 1 NTU already. At very high turbidities of 10 NTU it was even with small particles  $< 1$ mm only possible to filtrate a volume of 4 L. The data suggests that a blockage of the MAF won't occur when processing drinking or raw water, since the turbidities of these water matrices usually range far below 1 NTU. For the filtration of surface water, the performance can fluctuate depending on the sampling site.



For the integration of the MAF-process into an automated water hygiene monitoring system, a new device was developed in association with GWK Präzisionstechnik GmbH, which performs the filtration automatically (AutoMAF). This device consisted of a peristaltic pump, four squeeze valves, a pressure sensor, a flow meter and an operating panel to switch between the different operation modes filtration, elution and rinsing. For the concentration, reservoirs for buffer and eluate and a MAF-column were connected to the system. After the sample was connected, the device could perform the filtration automatically. Afterwards the microorganisms and viruses adsorbed to the MAF-column were automatically eluted. Comparing the automated system with a manual concentration the differences in recovery ranged between 0,2 and 5,0% and were therefore neglectable.

After the separate concentration steps were developed and tested modularly, CUF and AutoMAF were combined with centrifugal ultrafiltration as third step to a combined process for the concentration of 1000-L water samples to a final volume of 1 mL. Regarding the test of the complete system under real conditions in the water works Berlin-Friedrichshagen and combining it with the RPA-microarray assay, it was tested only with bacteriophage  $\Phi$ X174 since this phage could therefore be used in the water works. First the combined concentration process was tested for functionality. The used bacteriophage could successfully be concentrated from four different initial concentrations. By qPCR, recoveries for spiked amounts of  $5 \times 10^{10}$  GU,  $5 \times 10^9$  GU,  $5 \times 10^8$  GU and  $5 \times 10^7$  GU in 1000 L were determined as  $6,3 \pm 0,3\%$ ,  $35,1 \pm 1,4\%$ ,  $25,3 \pm 7,3\%$  and  $1,5 \pm 0,2\%$  ( $m = 1$ ,  $n = 3$ ).

Since it was desired to achieve a volumetric concentration factor of  $10^6$ , the recoveries were in a very good range. The combined concentration process was joint with on-chip-RPA on the MCR 3 to obtain a complete system for water hygiene monitoring. This was tested again with bacteriophage  $\Phi$ X174. The detection of an initial concentration of 8 GU/mL in a 1000-L sample was possible. It was thereby shown that the combination of the concentration steps with the on-chip-RPA was possible without negative influence on the measurement. The analysis of a sample of 1000 L was possible within 205 minutes.

The developed automated combined process was tested under real conditions at a test track in the water works Berlin-Friedrichshagen. The concentration by CUF and AutoMAF was performed on site. The subsequent concentration by CeUF, nucleic acid extraction and microarray detection was performed at IWC. The system was tested in two different setups to evaluate its performance. In the first test setup, the system was connected to a 40-m long pipe and all the water from the test track was concentrated by the filter. By addition of differently high contaminations of bacteriophage  $\Phi$ X174 to the test track a limit of detection of 7,5 PFU/mL for the combined system could be determined. Furthermore, it could be shown, that the combined system works under real conditions. The CL-signals measured by microarray could be verified by qPCR. In a second test setup, the process was tested

under real operating conditions. Therefore, only a part of the water in the 40-m long pipe track was led to the filter device. The flow rates in the pipe were varied to simulate different operating scenarios. A contamination of  $10^{12}$  PFU of bacteriophage  $\Phi$ X174 were injected and subsequently detected by the combined process. At a flow rate of 14 m<sup>3</sup>/h concentrations of  $7,0 \times 10^{10}$  and  $1,7 \times 10^8$  PFU/ml were detected. At 7 m<sup>3</sup>/h  $1,8 \times 10^8$  and  $1,3 \times 10^8$  PFU/ml were measured, at 3,5 m<sup>3</sup>/h  $6,9 \times 10^7$  and  $4,4 \times 10^7$  PFU/ml were detected. Hence all the investigated flow rates resulted in concentrations above the limit of detection determined beforehand and were considered as positive by the monitoring system. The samples could also be quantified by qPCR. Thereby, microarray measurements could be confirmed. The first investigations show that the combined system enables the rapid detection of smallest concentrations of waterborne pathogens in water works. With the combined system, it is possible to concentrate pathogens from 1000-L water samples to 1 mL and afterwards detect them by on-chip RPA.

The first successful operation of the combined process at a real water pipeline shows the great potential of the system. Furthermore, it can be combined with the already established culture based detection methods. Also, an application in other water associated areas like e.g. cooling towers or irrigation in agriculture would be possible. The ability of parallel concentration and subsequent detection of a broad range of different germs opens new perspectives for many applications. However, for further usage more investigations concerning the influence of different parameters in pipelines like flow velocities, pipe diameter or operating scenarios is needed. Moreover, for an establishment of the system in drinking water surveillance, a complete validation with all possible pathogens to optimize the yield and further develop the on-chip RPA is necessary. In addition, the here developed system could be further developed to gain more applications. By introduction of a lab-on-chip system for the nucleic acid extraction the degree of automatization could be enhanced considerably. Such a system is currently under development at the department of microsystems engineering (IMTEK) of the university of Freiburg. Furthermore, the extension of the RPA by a live-/dead differentiation could allow an exact risk analysis of the samples. Such a differentiation is currently being developed at IWC. By combination of the herein developed process and these technologies a fast detection and risk analysis for the surveillance of drinking water hygiene would be possible. This system could help water suppliers to ensure drinking water safety in the future.

---

## VI Experimenteller Teil

## 1. Geräte und Materialien

### 1.1 Geräte

Autoklav, Laboklav 55MV-FA (SHP Steriltechnik, Magdeburg)

Automatisierte MAF Anlage, AutoMAF (GWK Präzisionstechnik, München)

Brutschrank C24KC (Edison, New York, USA)

Färbeschale und Einsätze für 20 Objektträger (2290.1 und 2291.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Graviergerät mit Diamantstift (Proxxon, Niersbach)

Heizofen (Heraeus, Hanau)

Kontinuierliche Cross-Flow Ultrafiltrationsanlage, Konti-CUF (GWK Präzisionstechnik, München)

LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim)

Magnetrührer mit Heizung, RCT basic (IKA Labortechnik, Staufen)

MCR 3 (GWK Präzisionstechnik, München)

PDC 80 Piezo Dispense Capillary (Scinion, Berlin)

pH-Meter Multi 340i (WTW GmbH, Weilheim)

Pumpdrive 5206 Peristaltikpumpe (Heidolph, Schwabach)

QuantiTray Sealer Model 2x (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA)

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, MA, USA)

SciFLEXARRAYER S1 (Scienion, Berlin)

Thermomixer C (Eppendorf, Hamburg)

Trockenschrank, max. 120 °C (Memmert, Büchenbach)

Turbidimeter Turb 430 IR (WTW GmbH, Weilheim)

Ultraschallbad Sonorex RK510S (Bandelin, Berlin)

UV-VIS Spektrometer DU 650 (Beckman Industries, Fullerton, USA)

Vario Pumpsystem (Ismatec, Wertheim)

Vortexer Top Mix FB15024 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Waage Mettler PM 4600 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Zentrifuge 5804 R (Eppendorff, Hamburg)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

## 1.2 Software

ChemBio Office 2014 (Cambridge Soft, Waltham, MA, USA)

Corel Draw 12 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada)

EndNote X7 (Thomson Reuters, New York City, NY, USA)

Image J 1.49 (Rasband, NIH, Bethesda, USA)

MCRImageAnalyzer (GWK Präzisionstechnik, München)

Microsoft Office 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA)

Origin 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA)

## 1.3 Verbrauchsmaterialien

Autoklavierbeutel (0381.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Amicon Ultra-15 Zentrifugenfilter (UFC905024, Merck Millipore, Darmstadt)

Einmalspritze Injekt-F, PP/PE, 1 mL (T987.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze Injekt-F, PP/PE, 25 mL (T987.3, Carl Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze Inkjet, PP/PE, 20 mL (0059.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Einweg Pasteurpipetten, LDPE (EA61.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Kanister 10 L (N369.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Kanister 20 L (N370.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Klebefolie ARcare 90106, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, Irland)

Kunststoffträger, PMMA (TUM, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, München)

LightCycler Multiwell plate 96 (0472969001, Roche Diagnostics, Mannheim)

Marprene Schlauch, ID 6,4 mm (9020064016, Watson Marlow, Cornwall, UK)

Objektträger, 76x26x1 mm (0656.1 Carl Roth, Karlsruhe)

Precision Dispenser Tips, 50 mL (EH38.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Schraubdeckeldose steril, 120 mL (CEP3.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Silikonschlauch Tygon R3607 (Ismatec, Wertheim)

Spritzenfilter, 0,22 µm (P668.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Sterilindikatorband (8221.1 Carl Roth, Karlsruhe)

Ultrafiltrationsmodul Dizzer S 0,9 MB 6,0 (VK-0060, INGE AG, Greifenberg)

Zentrifugenröhrchen, PP, 15 mL (AN77.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenröhrchen, PP, 50 mL (AN79.1, Carl Roth, Karlsruhe)

#### 1.4 Chemikalien

1,1'-Carbonyldiimidazol, ≥97 % (21860, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

1,4-Dioxan, ≥99,5 % (42510, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES (H3375, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

2-Propanol (34959, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan, ≥97 % (50040, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

4-(Dimethylamino)-pyridin, DMAP, ≥99 % (522805, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Acetonitril, ≥99,9 % (34967, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Anti-Digoxigenin-Antikörper, Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert (ab6212, Abcam, Cambridge, UK)

Bortrifluoriddiethyletherat (175501, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Casein aus Kuhmilch (C5890, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Diethylamin (KK00.2, Carl-Roth, Karlsruhe)

Di-Kaliumhydrogenphosphat ≥99,999 % (60347, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Ethanol absolut, ≥99,8 % (32205, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

EZ-Link Amino-PEG2-Biotin (21346, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Glycin, 99,7-101 % (33226, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Hellmanex II (Hellma, Müllheim)

Kaliumhydrogenphosphat  $\geq 99,0$  % (60230, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

LB (Luria low salt) (L3397, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Magnesiumsulfat-Heptahydrat (10106, Merck, Darmstadt)

Methanol,  $\geq 99,8$  % (65548, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methyl-*tert*-butylether,  $\geq 99,5$  % (20249, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

N, N'-Dimethylformamid wasserfrei (40248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

N, N'-Disuccinimidylcarbonat  $\geq 95,0$  % (A43720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumchlorid  $\geq 99,5$  % (71381, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumhydroxid,  $\geq 32$  % (T196.2, Carl Roth, Karlsruhe)

Natriumhypochlorit (9062.3, Carl Roth, Karlsruhe)

Natriumsulfit,  $\geq 99,7$  % (P033.1, Carl Roth, Karlsruhe)

NZCYM-Medium (X974.1, Carl Roth Karlsruhe)

Pluronic F-127, Pflanzenzellkulturgetestet (P2443, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Polyglycerol-3-glycidylether (CL9, IpoX Chemicals, Laupheim)

Poly (Propylenglykol) Diamin 2000 Da (JEFFAMINE® ED-2003) (XTJ-502, Huntsman, Salt Lake City, UT, USA)

Polymyxin B Lösung, 20 mg/mL in Wasser (92283, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Rinderextraktpulver (B4888, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Salzsäure,  $\geq 37$  % (84415, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Schwefelsäure, 95-97 % (84720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Streptavidin, Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert (SA-5004, Vector Laboratories, Burlingham, NY, USA)

Toluol,  $\geq 99,7$  % (89677, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Triethylamin,  $\geq 99,5$  % (471283, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Sigma 7-9® (T1378, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Tween® 20 (Riedel-de Haën, Seelze)

Tween® 80, zur Synthese (Merck-Schuchardt, Darmstadt)

WESTSTAR SUPERNOVA ELISA Luminol solution (XLSE2L, 0250, Cyanagen, Bologna, Italien)

WESTSTAR SUPERNOVA ELISA Peroxide solution (XLSE2P, 0250, Cyanagen, Bologna, Italien)

Wasser, nukleasefrei (03315932001, Roche Diagnostics, Mannheim)

### 1.5 Kits

Colilert-18 Snap Packs (WP2001-18, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA)

DyNAmo cDNA Synthesis kit (F470L, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)

LightCycler 480 SYBR Green I Maser (04707516001, Roche Diagnostics, Mannheim)

NucliSens Lysis buffer (200292, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich)

NucliSens Magnetic Extraction reagent (200293, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich)

QIAamp DNA MiniKit (51304, Qiagen, Hilden)

TwistAmp Basic (TABAS03KIT, TwistDX, Cambridge, United Kingdom)

Viral Xpress Nukleinsäure Extraktionskit (3095, Merck Millipore, Darmstadt)

### 1.6 Mikroorganismen und Viren

Bakteriophage MS2, DSM 13767 (DSMZ, Braunschweig)

Bakteriophage ΦX174, DSM 4497 (DSMZ, Braunschweig)

*Enterococcus faecalis*, OG1RF, ATCC 47077 (Institut für Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg)

*Enterococcus faecalis*, Symbioflor, DSM 16440 (DSMZ, Braunschweig)

*Escherichia coli*, DSM 423 (DSMZ, Braunschweig)

*Escherichia coli*, DSM 5695 (DSMZ, Braunschweig)



*Legionella pneumophila* Serogruppe 1, Stamm Bellingham, ATCC 43111 (Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleissheim)

### 1.7 Puffer

Alle Puffer wurden mit Reinstwasser aus der Milli-Q plus 185 Anlage hergestellt

#### **Blocklösung**

1 M Tris

150 mM NaCl

Der pH-Wert wurde mit 37 % HCl auf 8,5 eingestellt

#### **Boratpuffer**

0,15 M NaCl

0,01 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

Der pH-Wert wurde mit NaOH (32 %) auf 9,5 eingestellt.

#### **Carbonatpuffer (pH 9,6)**

0,015 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

0,035 M NaHCO<sub>3</sub>

Der pH-Wert wurde mit NaOH (32 %) auf 9,6 eingestellt.

#### **Carbonatpuffer mit Tween 20**

0,1 % (v/v) Tween 20

Carbonatpuffer

#### **Carbonatpuffer mit Tween 80**

0,1 % (v/v) Tween 80

Carbonatpuffer

### **Hochsalzpuffer**

1,5 M NaCl

0,05 M HEPES

Der pH-Wert wurde mit 37 % HCl auf 7,0 eingestellt

### **Laufpuffer**

0,5 % (w/v) Casein

PBS

### **Phosphatpuffer (PBS) (pH 7,6)**

145 mM NaCl

70 mM  $K_2HPO_4$

10 mM  $KH_2PO_4$

### **Rinderextrakt-Glycin-Puffer (BEG) (pH 9,5)**

0,5 M Glycin

3 % (w/v) Rinderextraktpulver

Der pH-Wert wurde mit 32 % NaOH auf 9,5 eingestellt

### **Rinderextraktpuffer (BEG) (pH 3,0)**

0,5 M Glycin

3 % (w/v) Rinderextraktpulver

Der pH-Wert wurde mit 37 % HCl auf 3,0 eingestellt

### **Glycinpuffer**

0,5 M Glycin

Der pH-Wert wurde mit NaOH (32 %) auf 9,5 eingestellt.

### **Glycinpuffer mit Tween 20**

0,5 M Glycin

0,1 % (v/v) Tween 20

Der pH-Wert wurde mit NaOH (32 %) auf 9,5 eingestellt.

### **Glycinpuffer mit Tween 80**

0,5 M Glycin

0,1 % (v/v) Tween 80

Der pH-Wert wurde mit NaOH (32 %) auf 9,5 eingestellt.

### **Glycinpuffer mit Pluronic F-127**

0,5 M Glycin

0,1 % (v/v) Pluronic F-127

Der pH-Wert wurde mit NaOH (32 %) auf 9,5 eingestellt.

### **Saline Magnesium Puffer (SM-Puffer)**

100 mM NaCl

8 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

0,002 % (w/v) Gelatine

## **Tris-Puffer**

0,05 M Tris

0,05 % Tritin X-100

Der pH-Wert wurde mit NaOH (32 %) auf 9,5 eingestellt.

## **2. Standardprozeduren**

### **2.1 Aufkonzentrierung einer Wasserprobe mittels Ultrafiltration**

Der Aufkonzentrierungsprozess mittels Ultrafiltration basiert auf dem Konzentrationsverfahren aus der Dissertation von Martin Rieger [235] und von Kunze et al. [236]. Dieses wurde auf die neu entwickelte Filtrationsanlage übertragen. Die zur Aufkonzentrierung notwendigen Prozessschritte und zugehörigen Ventilstellungen sind in Tabelle 18 und Abbildung 41 dargestellt.

Nachdem die Anlage aufgestellt und an die Wasserzufuhr angeschlossen wurde, musste das System zunächst entlüftet werden, um die optimalen Betriebsbedingungen zu erreichen. Dazu wurden die Ventile der Anlage zunächst auf Cross-Flow-Filtration geschaltet und der Proben tank mit Wasser befüllt. Pumpe M1 wurde mit 20 – 30 % Leistung eingeschaltet, um das System langsam mit Wasser zu befüllen. Dabei wurde das Entlüftungsventil V8 geöffnet, um die Luftblasen, die sich am höchsten Punkt des Systems sammeln, heraus zu spülen. Das Ventil 2 wurde regelmäßig geöffnet und geschlossen, um zwischen Dead-End- und Cross-Flow-Betrieb hin- und her zu schalten, bis keine Luft mehr aus dem System entwich, und aus dem Entlüftungsschlauch keine Luftblasen mehr austraten. Anschließend wurde die Pumpe M1 abgeschaltet und die Ventile auf Elution gestellt, um den Elutionskreislauf zu entlüften. Dabei wurde das Ventil 3 geschlossen, um die Filtermembran vor Druckstößen zu schützen. Die Pumpe M2 wurde mit 20 % Leistung eingeschaltet, bis keine Luftblasen mehr aus dem System entwichen. Nachdem das System aufgebaut und entlüftet war, wurde es bis zum nächsten Transport nicht mehr geleert, um die Membran zu schützen. Zwischen Experimenten wurde das System nach Empfehlung des Membranherstellers in 200 ppm Natriumhypochlorit gelagert, um die Ausbildung von Biofilmen zu vermeiden.

Zur Aufkonzentrierung von Mikroorganismen und Viren wurden die Ventile auf auf Dead-End- oder Cross-Flow-Filtration geschaltet. Durch Öffnen oder Schließen von Ventil 2 konnte zwischen den zwei Modi umgeschaltet werden. Um Wasserproben mit Viren und Mikroorganismen zu versetzen, wurde über einen Einfüllstutzen vor Pumpe M1 eine zusätzliche Schlauchpumpe über einen Teflonadapter an die Anlage angeschlossen. Daran wurde eine Flasche mit Bakterien- oder Virensuspension angeschlossen und während der Filtration kontinuierlich zur Probe hinzugegeben, um eine

kontaminierte Wasserprobe zu simulieren. Die Dosierung der Probenmenge und des Elutionsvolumens wurde vor dem Start der Filtration an den beiden Flussmessern der Anlage eingestellt. Zum Start der Filtration wurde Pumpe M1 angeschaltet. Dabei lag die Pumpgeschwindigkeit bei 45 % für Cross-Flow- und 36 % für Dead-End-Filtrationen. Die Flussrate lag jeweils bei ca. 20 L/min. Die Filtration wurde über den zuvor eingestellten Flussmesser 1 gesteuert. Nach einem Probenvolumen von 1000 L wurde die Filtration automatisch gestoppt. Anschließend wurden die Ventile auf Elution eingestellt. Ein ¾ Zoll Gartenschlauch wurden an den Elutionsstutzen (zwischen Ventil 6 und 7) angeschlossen. Um das Eluat aufzufangen, wurde ein 20-L-Einwegbehälter an den Elutionsschlauch angeschlossen und Pumpe 2 wurde mit 80 % Pumpleistung angeschaltet. Dabei war Ventil 3 zunächst geschlossen, um einen Vordruck aufzubauen. Nachdem sich der Druck aufgebaut hatte, wurde Ventil 3 geöffnet, um mit einem Druckstoß alle auf der Membran konzentrierten Mikroorganismen und Viren aus dem System zu spülen. Die Elution wurde über Flussmesser 2 gesteuert, welcher die Pumpe automatisch nach 20 L abschaltete.

Anschließend wurde die Anlage mit 200 ppm Natriumhypochlorit gereinigt. Dabei wurden beide Wasserbehälter der Anlage mit Natriumhypochlorit versetzt, Filtrations- und Elutionskreislauf wurden jeweils einzeln gespült. Im Anschluss wurde die Anlage mit ca. 100 L Wasser (ggf. mit 200 ppm Natriumthiosulfat) chlorfrei gespült.

**Tabelle 18: Ventilstellungen für die verschiedenen Betriebseinstellungen der Konti-CUF**

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
<b>Dead-End-Filtration</b>	offen	geschlossen	offen	offen	geschlossen	geschlossen	geschlossen
<b>Cross-Flow-Filtration</b>	offen	offen	offen	offen	geschlossen	geschlossen	geschlossen
<b>Elution</b>	geschlossen	offen	offen	geschlossen	offen	geschlossen	offen
<b>Entleerung</b>	offen	offen	offen	offen	offen	offen	offen

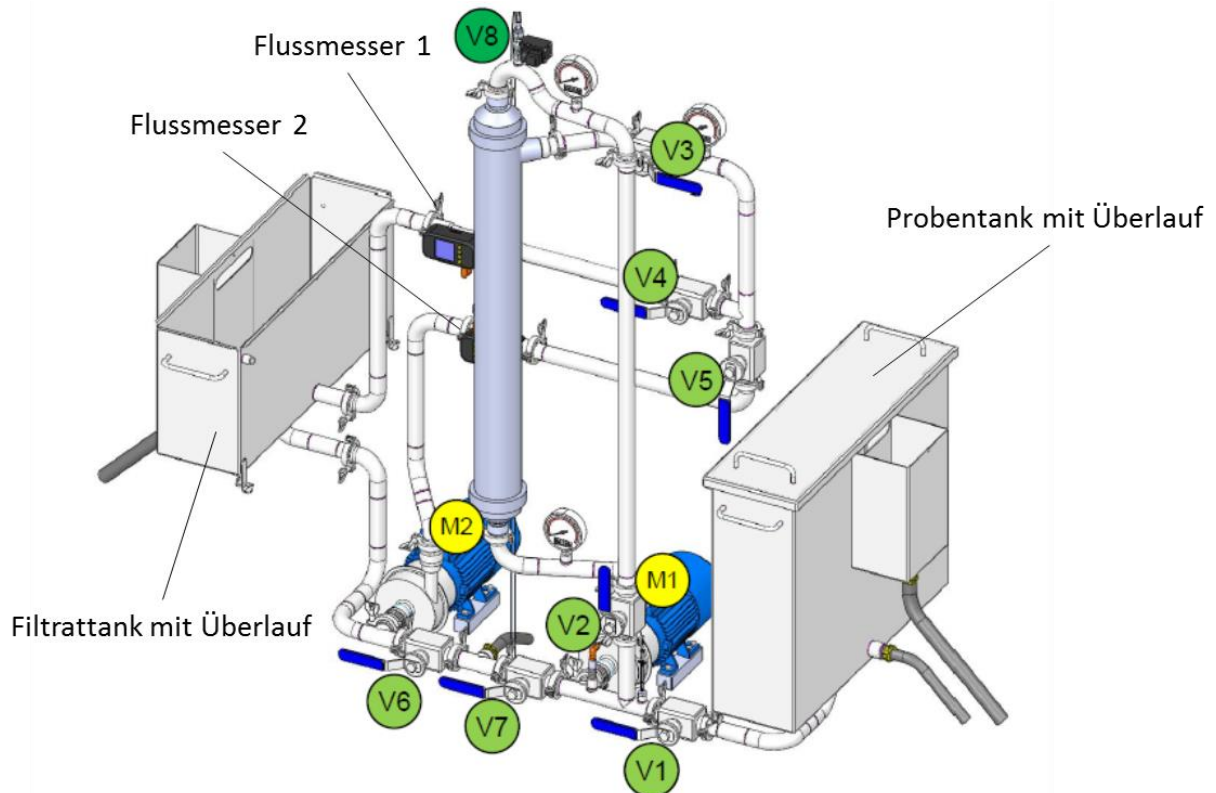


Abbildung 41: Positionen der Ventile in der Filteranlage, Bild GWK Präzisionstechnik GmbH.

## 2.2 Monolithische Adsorptionsfiltration

### 2.2.1 Herstellung der Monolithen

Zur Synthese von monolithischen Disks, wurde zunächst ein Porogen hergestellt, das aus einer Mischung 60:40 (v/v) von 5,65 mL Toluol und 3,77 mL Methyl-*tert*-butylether bestand. Pro Disk wurde je ein Ansatz in einem 15-mL-Zentrifugenröhrchen hergestellt. Vor der Synthese der Monolithen wurde der Heizofen (Heraeus, Hanau) auf 28 °C eingestellt und die PTFE-Formen, das Monomer Polyglycerol-3-glycidylether (CL9) sowie die Porogenmischung für 1 h vortemperiert. Als Katalysator wurde eine 1:10 (v/v)-Verdünnung von Bortrifluoriddiethyletherat in 1,4-Dioxan hergestellt. Pro Ansatz wurden 0,15 mL der Katalysatormischung in das Porogen eingesetzt und für 20 s mit Hilfe eines Vortex-Rührers gemischt. Anschließend wurden 2,4 mL des Monomers CL9 (Verhältnis 20:80 Monomer/Porogen) zügig hinzu pipettiert und anschließend für 1 min intensiv mit dem Vortex-Rührer vermischt. Die Reaktionsmischung wurde in eine vortemperierte PTFE-Form überführt und anschließend mit einem PTFE-Deckel verschlossen. Der entstehende weiße Monolith wurde nach 45 min Reaktionszeit mit Hilfe eines Spatels aus der Form gelöst und mit Methanol gewaschen, um das Porogen zu entfernen. Anschließend wurde der Monolith für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.2.2 Funktionalisierung der Monolithen

Nach der Synthese wurden die Epoxygruppen an der Porenoberfläche der Monolithen weiter funktionalisiert. Dazu wurden in einem Einweg-Dispenser-Gehäuse drei Monolithen auf einem PTFE-Siebboden und einem O-Ring zu einer monolithischen Säule zusammengebaut. Die Säulen wurden mit einem PTFE-Adapter verschlossen und an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Die Säulen wurden zunächst mit 300 mL Reinstwasser gespült und im Anschluss weiter funktionalisiert. Dazu wurde die Säule über einer Kristallisierschale mit der Reaktionsmischung platziert. Die Temperatur wurde durch einen Heizrührer konstant gehalten. Die Reaktionsmischung wurde mit der Peristaltikpumpe durch die Säule zirkuliert. Die Reaktionsbedingungen für verschiedene MAF-Funktionalisierungen sind nachfolgend aufgeführt.

MAF-DEAE:                10 % Diethylamin in 50 % Ethanol, 60 °C, 3 h

MAF-Q:                    10 % Triethylamin in 50 % Ethanol, 60 °C, 3h

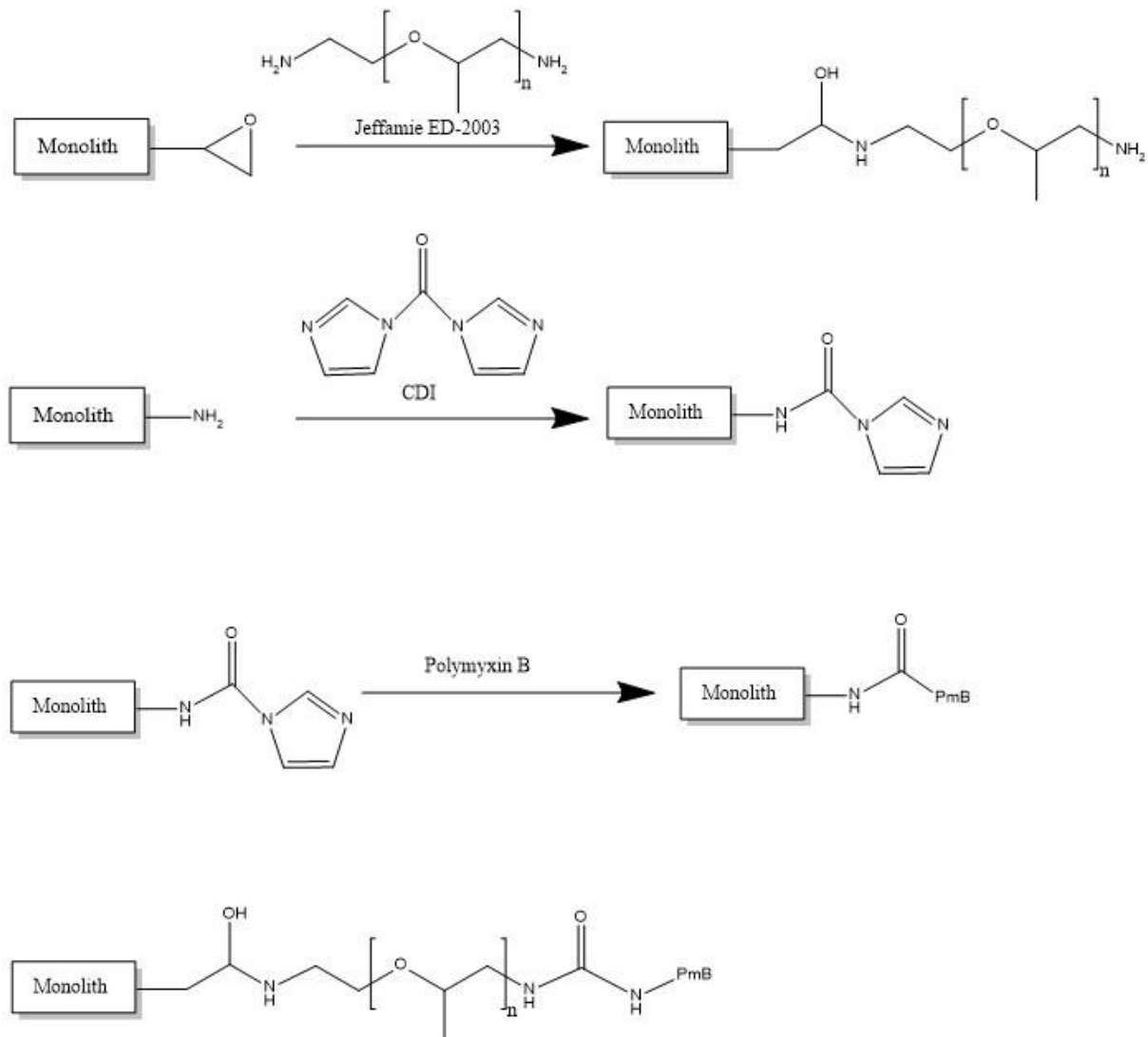
MAF-OH:                 0,5 M Schwefelsäure, 60 °C, 3 h

MAF-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>                1 M Natriumsulfit, pH 11, 75 °C, 8 h

Nach der Funktionalisierungsreaktion wurden die Säulen erneut mit 300 mL Reinstwasser gespült und anschließend auseinandergenommen. Die Monolithen wurden bis zur weiteren Verwendung in sterilen Bechern bei 4 °C in Reinstwasser gelagert.

#### **Funktionalisierung mit Polymyxin B**

Die Funktionalisierung von monolithischen Disks mit dem Antibiotikum Polymyxin B (PmB) wurde von Veronika Stiegler (IWC) entwickelt und durchgeführt. Dazu wurde zunächst Jeffamine® ED-2003 als Spacer an die MAF-OH-Disks synthetisiert. Dazu wurde das Jeffamine im Verhältnis 1:1 mit Carbonatpuffer gemischt. Die Mischung wurde anschließend zunächst mittels eines Adapters durch die Disks gepresst und anschließend für 24 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Lösung aus 2 mg/mL Carbonyldiimidazol (CDI) in Acetonitril hergestellt. Die Lösung wurde für weitere 24 h bei RT durch die Säule zirkuliert. CDI dient dabei als Linker zwischen PmB und Jeffamine. Zum Schluss wurde eine Lösung aus 50 µl PmB in 50 mL PBS-Puffer für weitere 24 h bei RT durch die Säule gepumpt. Die fertigen MAF-PmB-Disks wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.



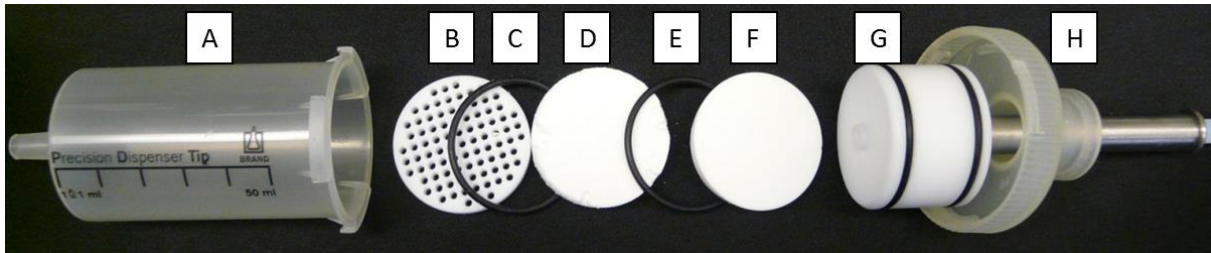
**Abbildung 42:** Darstellung der Funktionalisierung von Monolithen mit Polymyxin B mit allen Teilschritten. Im ersten Schritt wird Jeffamine ED-2003 als Spacer immobilisiert. Anschließend wird CDI als Linker eingesetzt, um Polymyxin B an das Jeffamine zu koppeln.

### 2.2.3 Aufkonzentrierung mit MAF

Für die monolithische Adsorptionsfiltration wurde zunächst eine MAF-Säule zusammengesetzt. Dazu wurde in ein Einweg-Dispenser-Gehäuse ein PTFE-Siebbofen, ein O-Ring und ein oder mehrere MAF-Disks eingesetzt. Bei der Filtration mit mehreren MAF-Disks wurde jeweils ein O-Ring zwischen zwei MAF-Disks platziert. Die Säule wurde mit einem PTFE-Adapter verschlossen und an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Anschließend wurde die Säule mit 1 L Reinstwasser äquilibriert bevor die Probe an die Pumpe angeschlossen wurde. Die Probe wurde mit einer Flussrate von 1 L/min filtriert. Anschließend wurde Luft durch die Säule gepumpt, um alle Reste der Probe aus der Säule zu entfernen. Anschließend wurde der Schlauch vom PTFE-Fitting entfernt und 20 mL Elutionspuffer mittels einer Spritze in die Säule injiziert. Die Säule wurde wieder an die Pumpe angeschlossen und die Elution



wurde mit einer Flussrate von 160 mL/min durchgeführt. Nachdem jeweils 1/3 des Elutionspuffers die Säule passiert hatte, wurde der restliche Puffer für 2 min in der Säule inkubiert, bevor die Elution fortgeführt wurde.



**Abbildung 43:** Foto der einzelnen Teile einer MAF-Säule mit zwei Disks. Gehäuse aus Dispenser-Tip (A), PTFE-Siebboden (B), O-Ring zur Abdichtung (C und E), MAF-Disks (D und F), PTFE-Adapter um die Säule an eine Pumpe anzuschließen (G) und Fitting zum Verschließen der Säule (H).

#### 2.2.4 Aufkonzentrierung mit AutoMAF

Zur automatisierten Aufkonzentrierung mittels MAF wurde die von GWK gebaute AutoMAF Anlage verwendet. Zunächst wurde eine MAF-Säule aus einem Einweg-Dispenser Gehäuse, einem PTFE-Siebboden, einem O-Ring und einer oder mehrerer MAF-Disks zusammengebaut. Diese wurde mit einem PTFE-Adapter verschlossen und an die AutoMAF-Anlage angeschlossen. Um Druckschwankungen zu minimieren, wurde das System zunächst mit Reinstwasser entlüftet. Dazu wurde 1 L Reinstwasser an die Anlage angeschlossen und der Modus Filtration bei einer Flussrate von 500 mL/min gewählt. Die Entlüftung diente gleichzeitig auch dazu das System auf eventuelle Leckagen und die Verschlauchung auf Knicke zu überprüfen. Nachdem das System entlüftet war, wurde die aufzukonzentrierende Probe angeschlossen. Das Pufferreservoir wurde mit 20 mL Elutionspuffer befüllt und die Ventile auf Filtration eingestellt. Anschließend wurde ein neuer Sterilbeutel oder ein 50-mL-Zentrifugenröhrchen als Eluatreservoir und ein leerer 20-L-Kanister als Filtratreservoir angeschlossen. Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 1 L/min eingestellt und die Pumpe wurde angeschaltet. Nachdem die gesamte Probe das System passiert hatte, wurde automatisch für 30 s Luft durch die Säule gepumpt, um mögliche Probenreste aus dem System zu spülen. Danach wurde die Pumpe automatisch abgeschaltet. Anschließend wurde das System auf Elution umgeschaltet und die Pumpe bei einer Flussrate von 200 mL/min eingeschaltet, um den Puffer aus dem Reservoir über die Säule in das Eluatreservoir zu leiten. Nachdem der Puffer die Säule passiert hatte, wurde erneut für 30 s Luft durch die Säule gepumpt, um alle Pufferreste aus dem System zu spülen. Nachdem die Elution abgeschlossen war, wurde das Eluat bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Im Anschluss an die Aufkonzentrierung wurde die MAF-Säule aus dem System entfernt und ein leeres Gehäuse angeschlossen. Die Schläuche die zum Proben-, Filtrat-, Puffer- und Eluatreservoir führen

wurden an eine 2-L-Schottflasche mit 200 ppm NaOCl angeschlossen. Das System wurde auf Spülmodus gestellt und der Filtrations- und Elutionskreislauf wurden für jeweils 15 min gespült. Anschließend wurde NaOCl-Lösung durch Reinstwasser ersetzt und der Spülvorgang wurde wiederholt.

### 2.3 Zentrifugale Ultrafiltration (CeUF)

Die Zentrifugale Ultrafiltration wurde mit Amicon Ultra-15-Filtern von Millipore mit einer Ausschlussgrenze von 50 kDa durchgeführt. Die Filterröhrchen wurden mit MAF-Eluat befüllt und bei 4500 U/min für ca. 20 min zentrifugiert. Die konzentrierten Proben wurden durch intensives Schütteln für 2 min von den Filtern gelöst und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## 2.4 Mikrobiologische und molekularbiologische Verfahren

### 2.4.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in NZCYM-Medium. *E. faecalis* wurde in LB-Luria-Medium kultiviert. Es wurden jeweils 100 mL Medium bei 37 °C für 14 h inkubiert und kontinuierlich mit 100 U/min geschüttelt. Die Zellen wurden im Anschluss bei 4000 U/min zentrifugiert und in SM-Puffer resuspendiert. Die Konzentration wurde über Messung der optischen Dichte bei 670 nm Wellenlänge bestimmt. Dabei entspricht eine  $OD_{670}$  von 0,1 einer Konzentration von  $10^8$  Zellen/mL.

### 2.4.2 Nukleinsäureextraktion mit Viral Xpress Extraction Kit

Die Nukleinsäureextraktion wurde mit dem Viral Xpress Nucleic Acid Extraction Kit wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 150 µL der Probe mit 200 µL des Lysepuffers für 5 min inkubiert. Anschließend wurde eine Fällung der freigesetzten Nukleinsäuren durch Zugabe von 350 µL 2-Propanol durchgeführt. Die Proben wurden für 10 min bei 20 °C und 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µL 70 % Ethanol resuspendiert. Die Proben wurden erneut für 10 min bei 20 °C und 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet für 10 min getrocknet. Anschließend wurde es in 20 µL nukleasefreiem Wasser resuspendiert und für 30 min bei 4 °C im Thermoshaker geschüttelt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3 Nukleinsäureextraktion mit QIAamp DNA-Mini Kit

Die Nukleinsäureextraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers anhand des Protokolls für DNA aus Blut und Körperflüssigkeiten. Zunächst wurden 20 µl QIAGEN Protease mit 200 µl Probe gemischt. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer hinzugefügt und für 15 s gemischt. Die Probe wurde für 10 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol (absolut, 96 – 100 %) hinzugefügt und erneut für 15 s geschüttelt. Die Probe wurde dann in die im Kit enthaltenen Zentrifugenfilter überführt und für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und 500 µl Waschpuffer 1 hinzugefügt. Es wurde erneut für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert und das Filtrat wurde wieder verworfen. Anschließend wurden 500 µl Waschpuffer 2 hinzugefügt und für 3 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Zentrifugenfilter auf ein 1,5 mL Reaktionsgefäß aufgesetzt und es wurden 100 µl Elutionspuffer hinzugefügt. Der Filter wurde für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe durch Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 min aus dem Filter eluiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.4.4 cDNA-Synthese

Für Bakteriophage MS2 wurde nach der Nukleinsäureextraktion noch eine cDNA-Synthese benötigt. Dazu wurde das DyNAmo Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 4 µL extrahierter RNA eingesetzt, um ein finales Volumen von 20 µL cDNA zu erhalten. Weiterhin enthielt der Reaktionsmix 10 µl Puffer, 1 µl Random-Hexamer-Primer, 2 µl Reverse Transkriptase und 3 µl nukleasefreies Wasser. Der Reaktionsmix wurde 10 s geschüttelt und anschließend für 10 min bei 25 °C und 200 U/min im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 37 °C erhöht und die Probe wurde für weitere 30 min inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurde die Probe für 5 min in einem Wasserbad bei 85 °C inkubiert und anschließend im Eisbad abgekühlt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.4.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifizierung und Quantifizierung von Viren und Mikroorganismen wurde der SYBR Green qPCR Assay verwendet. Die PCR wurde nach bereits veröffentlichten Protokollen durchgeführt. Die verwendeten Temperaturprogramme und Primer sind in Tabelle 19 aufgeführt. Für jede Probe wurden unter sterilen Bedingungen 18,4 µL Mastermix hergestellt. Dieser bestand aus 10 µL SYBR Green Master I Lösung, jeweils 0,4 µL FW und RW (je 10 µM) Primer sowie 7,6 µl nukleasefreiem Wasser. Pro Probe wurden 18,4 µL des Mastermix in eine Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 1,6 µL DNA-Probe versetzt. Dabei wurden alle Proben in Dreifachbestimmung untersucht. Als

Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser verwendet. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie verschlossen und für 1 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Die Amplifikationsprogramme im LightCycler480 bestanden aus einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 15 min, gefolgt von dreistufigen Amplifikationszyklen. Es wurden jeweils 45 Zyklen zur Amplifikation verwendet.

**Tabelle 19: Primersequenzen und Temperaturprogramme zur Quantifizierung von DNA mittels qPCR.**

Organismus	Primer	Programm	Literatur
MS2	FW: 5'-CTG GGC AAT AGT CAA A-3'	94 °C / 15 s	[238]
	RW: 5'-CGT GGA TCT GAC ATA C-3'	60 °C / 30 s	
		72 °C / 30 s	
ΦX174	FW: 5'-GGT TCG TCA AGG ACT GGT TT-3'	94 °C / 20 s	[239]
	RW: 5'-TTG AAC AGC ATC GGA CTC AG-3'	60 °C / 20 s	
		72 °C / 20 s	
<i>E. coli</i>	FW: 5'-CAA TTT TCG TGT CCC CTT CG-3'	94 °C / 30s	[240]
	RW: 5'-GTT AAT GAT AGT GTG TCG AAA C-3'	58 °C / 30 s	
		72 °C / 30 s	
<i>E. faecalis</i>	FW: 5'-CTG TAG AAG ACC TAA TTT CA-3'	95 °C / 15 s	[241]
	RW: 5'-CAG CTG TTT TGA AAG CAG-3'	55 °C / 15 s	
		72 °C / 15 s	

#### 2.4.6 Colilert-18

100 mL Probe wurden in einem sterilen Gefäß mit dem Inhalt einer Einzelpackung Colilert-18 versetzt. Anschließend wurde die Probe in ein Quantitray-2000 gefüllt und mit dem Sealer verschlossen. Das Tray wurde für 18 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die positiven Kavitäten (gelb gefärbt und/oder fluoreszierend) ausgezählt und die wahrscheinlichste Anzahl an Bakterien pro 100 mL Probe (most probable number, MPN) aus der MPN-Tabelle abgelesen. Bei Konzentrationen >25 Zellen/mL mussten die Proben zuvor in autoklaviertem Wasser verdünnt werden.

#### 2.5 Munich Chip Reader 3

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Mikroarray-Chips wurden von Catharina Kober (IWC) hergestellt und gespottet. Die Herstellung der Chips basiert auf den Arbeiten von Wolter et al. [242] und Donhauser et al. [227]. Eine genaue Beschreibung der Oberflächenchemie ist dort zu finden. Das verwendete Messprotokoll, sowie die Primer für die On-Chip RPA, wurden von Kunze et al. [231] entwickelt.

### 2.5.1 Mikroarray-Herstellung

#### **Vorbehandlung**

Mikroarray-Chips wurden in Chargen von jeweils 20 Stück hergestellt. Als Basis dienten Glasobjektträger, die zur Unterscheidung graviert wurden. Die Glasträger wurden zunächst in einer Färbeschale mit 200 mL 2 %iger Hellmanexlösung für 1 h im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde die Färbeschale für 18 h bei RT auf den Schüttler gestellt. Anschließend erfolgte eine erneute Reinigung im Ultraschallbad für 1 h. Nach der Reinigung wurden die Chips mit 5 × 200 mL Reinstwasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und visuell auf Schäden oder Verunreinigungen geprüft.

#### **Anätzung der Glasoberfläche**

Die gereinigten Chips wurden für 1 h in 200 mL einer 1:1-Mischung aus Methanol (absolut) und Salzsäure (37 %, rauchend) auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie mit 5 × 200 mL Reinstwasser gewaschen. Als nächstes wurden die Chips mit 200 mL konzentrierter Schwefelsäure für 1 h bei RT auf dem Schüttler geätzt. Danach erfolgte eine erneute Reinigung mit 5 × 200 mL Reinstwasser und einer Trocknung im Stickstoffstrom. Zur vollständigen Trocknung wurden die Chips im Anschluss für 15 min bei 70 °C in den Trockenschrank gestellt.

#### **Silanisierung mit GOPTS**

Zur Silanisierung der Chips wurde zunächst aus jeweils zwei Chips und 600 µl (3-Glycidylpropyl)-trimethoxysilan (GOPTS) ein Sandwich geformt. Dieses wurde für 3 h bei RT im Inkubator gelagert. Anschließend wurden die Sandwiches in einer Färbeschale mit Ethanol (absolut) getrennt und in einer zweiten Färbeschale mit 200 mL Ethanol (absolut) für 15 min bei RT im Ultraschallbad gereinigt. Dieser Reinigungsschritt wurde nachfolgend mit 200 mL Methanol (absolut) und erneut 200 mL Ethanol wiederholt. Die silanisierten Glaschips wurden im Stickstoffstrom und im Trockenschrank bei 70 °C für 15 min getrocknet.

#### **Beschichtung mit Jeffamine ED-2003**

Die Glaschips wurden mit 500 µl geschmolzenem Jeffamine ED-2003 über Nacht im Sandwich-Format bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert. Die Sandwiches wurden anschließend in einer Färbeschale mit Reinstwasser getrennt und in einer zweiten Färbeschale mit 200 mL Reinstwasser für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Die Chips wurden im Stickstoffstrom und im Trockenschrank getrocknet und bis zur weiteren Verwendung im Exsikkator gelagert.

### **Aktivierung mit DSC**

Zur Aktivierung von 10 Chips wurde eine Lösung aus 160 mg N,N'-Disuccinimidylcarbonat (DSC) und 8 mg 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) in 3,2 mL Dimethylformamid (absolut) und 250 µl Triethylamin (absolut) hergestellt. Es wurden aus je zwei Jeffamine-Oberflächen und 600 µl der Lösung Sandwiches geformt und für 4 h bei RT im Inkubator aktiviert. Anschließend wurden die Sandwiches in einer Färbeschale mit Methanol (absolut) getrennt und in 200 µl Methanol für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Die Trocknung erfolgte im Stickstoffstrom und im Trockenschrank. Die getrockneten Chips wurden noch am selben Tag gespottet.

### **Spotting von DNA-Oligomeren**

Zur Immobilisierung von DNA-Oligomeren auf den aktivierten Glaschips wurden Amino-C<sub>12</sub>-Linker am 5'-Ende der DNA verwendet. Das Spotting wurde mit einem SciFLEXARRAYER S1 durchgeführt. Der Spotter wurde zunächst mit einer unbeschichteten Borosilikat-Kapillare (PDC 80 Piezo Dispense Capillary, Scienion, Deutschland) mit einer 50 – 100 µm großen Öffnung bestückt. Das System wurde zunächst mit steril filtriertem, im Ultraschallbad entgastem Reinstwasser gespült. Es wurde eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 % und eine Temperatur von 20 °C eingestellt. Die zu spottenden reverse Primer wurden mit nukleasefreiem Wasser auf einer Konzentration von 150 µM eingestellt. Es wurden jeweils 30 µl der zu spottenden Lösungen in die Kavitäten einer 384-Well-Mikrotiterplatte (sciSOURCEPLATE-384-PP) überführt. Als Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser gespottet, als Positivkontrolle diente EZ-Link® Amino-PEG<sub>2</sub>-Biotin in einer Konzentration von 0,005 mg/mL in nukleasefreiem Wasser. Es wurden jeweils 84 Tropfen der Spottinglösungen pro Spot auf den Chip aufgetragen. Dabei entsprach ein Tropfen einem Volumen von  $439 \pm 26$  pL (n = 31). Die so auf dem Chip immobilisierte Primermenge entsprach der für die RPA-Reaktion empfohlenen Konzentration von 420 nM. Pro Chip wurden jeweils zwei identische Felder gespottet. Für jede Spottinglösung wurde eine Reihe mit je fünf Replikaten gespottet. Die Lösungen wurden immer in folgender Anordnung auf die Chips gespottet: An der Auslasseite wurde zunächst eine Negativkontrolle gespottet, gefolgt von den reverse-Primern für die Proben. Diese wurden in der Reihenfolge HAdV40, ΦX174, *E. faecalis* gespottet. Danach wurde erneut eine Negativkontrolle gespottet, gefolgt von der Positivkontrolle an der Einlasseite. Der Abstand zwischen den Reihen betrug jeweils 1300 µm, der Abstand zwischen den Spots einer Reihe betrug 1100 µm.

Im Anschluss an das Spotting wurden die Chips über Nacht bei 55 % relativer Luftfeuchtigkeit und 60 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Chips mit 1 M Tris/HCl bei pH 8,5 für 15 min auf dem Schüttler geblockt. Die geblockten Chips wurden mit Reinstwasser und anschließend

mit Methanol (absolut) für jeweils 2 min auf dem Schüttler gewaschen. Die Chips wurden im Stickstoffstrom getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### Herstellung eines Mikroarrays

Vor der Messung auf dem MCR 3 wurden die gespotteten Glaschips mit einer doppelseitigen Klebefolie und einem PMMA-Kunststoffträger zu einem Mikroarray zusammengefügt. Die Fertigung dieser Mikroarrays basiert auf der Arbeit von Kloth et al. [222] und ist in Abbildung 44 dargestellt. Die Mikroarrays wurden jeweils am Tag der Messung hergestellt. Durch die Klebefolie entstanden jeweils zwei Flusszellen mit einem Volumen von 48 µL. Somit konnte ein Mikroarray für zwei Messungen genutzt werden. Der PMMA-Träger wurde von der institutseigenen Werkstatt hergestellt und verfügte über die fluidischen Anschlüsse für den MCR 3. Die fertigen Mikroarrays wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

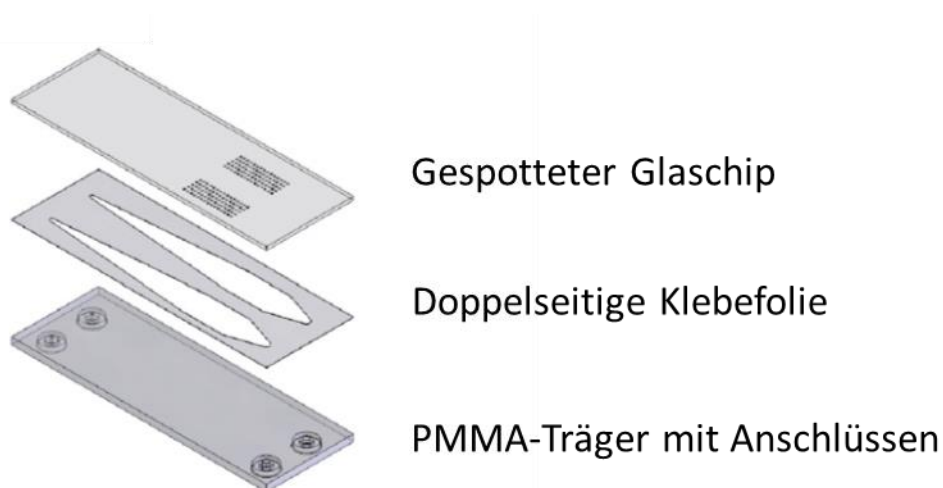


Abbildung 44: Schematische Darstellung eines Mikroarray nach Kloth et al. (modifiziert) [222]

#### 2.5.2 On-Chip-RPA auf dem MCR 3

Die Messung mittels On-Chip-RPA auf dem MCR 3 erfolgte nach Kunze et al. [231]. Vor der Messung wurde der MCR 3 zunächst mit dem Waschprogramm **Waschprogramm Anfang/ -Ende** mit dem Laufpuffer befüllt. Dieser bestand aus 0,5 % Casein in PBS-Puffer. Anschließend wurden die Chemilumineszenzreagenzien Luminol und Wasserstoffperoxid angeschlossen. Eine Lösung aus Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin in Laufpuffer in einer Konzentration von  $4 \times 10^{-4}$  mg/mL wurde in die Spritzeneinheit P0 eingesetzt. Das **Ladeprogramm für Reagenzien** wurde ausgeführt, um alle notwendigen Schläuche mit den Reagenzien zu befüllen. Um zu gewährleisten, dass das fluidische System vollständig mit den Reagenzien befüllt wurde, wurde vor der eigentlichen

Messung von Proben eine zweimalige On-Chip-RPA-Messung ohne Probe durchgeführt. Das dabei verwendete Messprogramm ist mit dem Probenmessprogramm identisch, wobei die Inkubationszeit jedoch auf 10 s verkürzt wurde.

Zur On-Chip-RPA-Messung wurde zunächst das Hintergrundsignal der Kamera mit einem unbenutzten, leeren Mikroarray aufgezeichnet. Dafür wurde dieser in die Flusszelleinheit eingelegt und das Programm **Blankaufnahme mit leerem Chip** (dark frame image) gestartet. Anschließend wurde das **On-Chip-RPA-Messprogramm** gestartet. Während der Temperierung der MCR 3-Flusszelle auf die eingestellte Temperatur wurde der RPA-Reaktionsmix hergestellt.

Die On-Chip-RPA-Reaktion wurde mit Hilfe des TwistAmp Basic Kit von TwistDx (Cambridge, UK) durchgeführt. Die Zusammensetzung des RPA-Reaktionsmix, sowie die Primer wurden von Kunze et al. [231] übernommen. Die Zusammensetzung des RPA-Mastermix ist in Tabelle 20 dargestellt, die Primersequenzen sind in Tabelle 21 aufgelistet. Die biotinylierten forward- und unmodifizierten reverse-Primer wurden in einer finalen Konzentration von 930 nM bzw. 93 nM eingesetzt.

**Tabelle 20: Zusammensetzung der Reaktionsmischung für die On-Chip-RPA**

Reagenz	Volumen pro Ansatz / $\mu$ l
Rehydratationspuffer	29,5
Nukleasefreies Wasser	10,5
Primer-Mix	5
MgAc <sub>2</sub> (280 mM)	4
DNA Probe	5
<b>Gesamt</b>	<b>54</b>

**Tabelle 21: Primersequenzen für die On-Chip-RPA.**

Organismus	Primersequenz
Humanes Adenovirus 40	FW: 5'-GCCCCAGTGGTCATACATGCACATCGCCGGGCAGG-3'
	RW: 5'-CGTGGGTCGGAGCCACAGTGGGGTTTCTGAACTT-3'
ΦX174	FW: 5'-CAAAGTTTGGATTGCTACTGACCGCTCTCGTGCTC-3'
	RW: 5'-CGCCTTCATGATGAGACAGGCCGTTTGAATG-3'
<i>Enterococcus faecalis</i>	FW: 5'-CAAACCATACATTCTTCTGGGAAATTATGGCACC-3'
	RW: 5'-CCAAAGCGGCCAGTTGCAGCTGTTTTGAAAG-3'



Für eine On-Chip-RPA-Messung wurde zunächst ein Mastermix aus Rehydratationspuffer, nukleasefreiem Wasser und Primer-Mix in einem Reaktionsgefäß hergestellt. Es wurden jeweils 45 µL dieser Lösung in ein Reaktionsgefäß aus dem TwistAmp Basic-Kit mit den lyophilisierten Enzymen überführt. Anschließend wurden 4 µL MgAc<sub>2</sub> in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert und die DNA-Probe wurde in das Reaktionsgefäß hinzugefügt. Dieses wurde verschlossen und durch Zentrifugation wurde MgAc<sub>2</sub> in den Mastermix hinzugefügt, um die Reaktion zu starten. Anschließend wurden 52 µL des Reaktionsmixes mit einem speziellen PTFE-Adapter in die Flusszelle des Mikroarrays überführt und dieser nach Aufforderung des Messprogramms in die Flusszelle des MCR 3 eingelegt.

### 2.5.3 Auswertung der Messdaten

Die Auswertung der Daten erfolgte über das 2D-Chemilumineszenzbild, welches von der CCD-Kamera des MCR 3 aufgenommen wurde. Dieses wurde mit der Software MCRVisualization 1.0.6 (GWK Präzisionstechnik GmbH, München, Deutschland) ausgewertet. Darin wurde die Intensität des CL-Signals als Graustufenintensität zwischen 0 und 65536 a.u. dargestellt. Zur Auswertung wurde zunächst das zuvor aufgenommene Hintergrundsignal des Chips automatisch abgezogen. Anschließend wurde ein Raster über die Spots gelegt und die Intensität des CL-Signals anhand der 10 hellsten Pixel pro Spot bestimmt. Die Signale der fünf Replikate pro Reihe wurden gemittelt. Signale mit einer Abweichung größer als 15 % wurden automatisch als Ausreißer markiert und nicht berücksichtigt.

## 2.6 Auswertung von Aufkonzentrierungsexperimenten

Zur Auswertung der Aufkonzentrierungsexperimente wurde jeweils die Wiederfindung berechnet. Dazu wurde die Konzentration der aufkonzentrierten Probe ( $C_2$ ) mit dem Volumen der aufkonzentrierten Probe ( $V_2$ ) multipliziert, mit dem Produkt der Ausgangskonzentration ( $C_1$ ) und des Ausgangsvolumens ( $V_1$ ) ins Verhältnis gesetzt und mit 100 multipliziert, um eine Angabe in Prozent zu erhalten.

$$WF = \frac{C_2 V_2}{C_1 V_1} \times 100 \quad \text{Gleichung (9)}$$

Der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor wurde als Verhältnis zwischen dem Ausgangsvolumen und dem Endvolumen berechnet.

$$AF = \frac{V_1}{V_2} \quad \text{Gleichung (10)}$$

---

## VII Abkürzungen

---

AF	Aufkonzentrierungsfaktor
AutoMAF	Automatisierte monolithische Adsorptionsfiltration
a.u.	<i>Arbitrary units</i>
BEG	<i>Beef Extract Glycine</i> (Rinderextrakt-Glycin-Puffer)
BWB	Berliner Wasserbetriebe
CA	Celluloseacetat
CCD	<i>Charge coupled device</i>
CDI	Carbonyldiimidazol
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CeUF	<i>Centrifugal ultrafiltration</i> (Zentrifugale Ultrafiltration)
CIM	<i>chromatographic interaction media</i>
CL	Chemilumineszenz
CL-SMIA	Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassay
C <sub>p</sub>	<i>Crossing Point</i>
C <sub>T</sub>	<i>Cycle Threshold</i>
CUF	Cross-Flow Ultrafiltration
DEAE	Diethylaminoethan
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	Ethidiummonoazid
GU	<i>Genomic Units</i> (genomische Einheiten)
HETP	<i>Height equivalent to a theoretical plate</i>
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IEP	Isoelektrischer Punkt
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

IMTEK	Institut für Mikrosystemtechnik, Universität Freiburg
IMS	Immunomagnetische Separation
IWA	<i>International water association</i>
IWC	Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, TU München
KBE	Kolonienbildende Einheiten
Konti-CUF	Kontinuierliche Cross-Flow-Ultrafiltrationsanlage
LPS	Lipopolysaccharid
MAF	Monolithische Adsorptionsfiltration
MCR 3	Munich Chip Reader 3
MF	Mikrofiltration
MPN	<i>Most probable number</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
NF	Nanofiltration
NTU	<i>Nephelometric turbidity unit</i> (Nephelometrischer Trübungswert)
OFW	Oberflächenwasser
PAN	Polyacrylnitril
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-Kochsalz-Puffer)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Polyethylen
PES	Polyethersulfon
PFU	<i>plaque forming units</i>
PMA	Propidiummonoazid
PmB	Polymyxin B
PS	Polysulfon
PVDF	Polyvinylidendifluorid

PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Quaternäre Ammoniumgruppe
qPCR	<i>quantitative Polymerase chain reaction</i> (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
RPA	<i>Rekombinase polymerase amplification</i>
TW	Trinkwasser
TZW	Technologiezentrum Wasser Karlsruhe
UF	Ultrafiltration
UO	Umkehrosmose
VBNC	<i>viable but not culturable</i>
VIRADEL	<i>virus adsorption and elution</i>
WF	Wiederfindung
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)

---

## VIII Literatur

1. Reynolds, K.A.; Mena, K.D., and Gerba, C.P., *Risk of waterborne illness via drinking water in the United States*, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008, Springer. p. 117-158.
2. Hamza, I.A.; Jurzik, L.; Überla, K., and Wilhelm, M., *Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2011. 214(6): p. 424-436.
3. Ford, T.E., *Microbiological safety of drinking water: United States and global perspectives*. *Environmental Health Perspectives*, 1999. 107(Suppl 1): p. 191.
4. Chattaway, M.A.; Dallman, T.; Okeke, I.N., and Wain, J., *Enteroaggregative E. coli O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again?* *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2011. 5(06): p. 425-436.
5. Fong, T.-T.; Mansfield, L.S.; Wilson, D.L.; Schwab, D.J.; Molloy, S.L., and Rose, J.B., *Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio*. *Environmental Health Perspectives*, 2007: p. 856-864.
6. O'Reilly, C.E.; Bowen, A.B.; Perez, N.E.; Sarisky, J.P.; Shepherd, C.A.; Miller, M.D.; Hubbard, B.C.; Herring, M.; Buchanan, S.D., and Fitzgerald, C.C., *A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004*. *Clinical Infectious Diseases*, 2007. 44(4): p. 506-512.
7. Scarcella, C.; Carasi, S.; Cadoria, F.; Macchi, L.; Pavan, A.; Salamana, M.; Alborali, G.; Losio, M.; Boni, P., and Lavazza, A., *An outbreak of viral gastroenteritis linked to municipal water supply, Lombardy, Italy, June 2009*. *Euro Surveillance: Bulletin European sur les Maladies Transmissibles= European Communicable Disease Bulletin*, 2009. 14(29): p. 506-513.
8. Häfliger, D.; Hübner, P., and Lüthy, J., *Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water*. *International Journal of Food Microbiology*, 2000. 54(1): p. 123-126.
9. Maunula, L.; Miettinen, I.T., and Von Bonsdorff, C.-H., *Norovirus outbreaks from drinking water*. *Emerging Infectious Diseases*, 2005. 11(11): p. 1716-1721.
10. Samendra, P.; Masaaki, K.; Charles, P., and Ian, L., *Rapid detection technologies for monitoring microorganisms in water*. *Biosensors Journal*, 2014. 2014.
11. Figueras, M. and Borrego, J.J., *New perspectives in monitoring drinking water microbial quality*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010. 7(12): p. 4179-4202.
12. Cann, K.F.; Thomas, D.R.; Salmon, R.L.; Wyn-Jones, A.P., and Kay, D., *Extreme water-related weather events and waterborne disease*. *Epidemiology and Infection*, 2013. 141(4): p. 671-686.
13. Nichols, G.; Lane, C.; Asgari, N.; Verlander, N.Q., and Charlett, A., *Rainfall and outbreaks of drinking water related disease and in England and Wales*. *Journal of Water and Health*, 2009. 7(1): p. 1-8.
14. Ahdoot, S. and Pacheco, S.E., *Global Climate Change and Children's Health*. *Pediatrics*, 2015. 136(5): p. e1468-e1484.
15. Delpla, I.; Jung, A.V.; Baures, E.; Clement, M., and Thomas, O., *Impacts of climate change on surface water quality in relation to drinking water production*. *Environ Int*, 2009. 35(8): p. 1225-1233.
16. Gallay, A.; De Valk, H.; Cournot, M.; Ladeuil, B.; Hemery, C.; Castor, C.; Bon, F.; Megraud, F.; Le Cann, P., and Desenclos, J., *A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2006. 12(6): p. 561-570.
17. Braeye, T.; De Schrijver, K.; Wollants, E.; Van Ranst, M., and Verhaegen, J., *A large community outbreak of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010*. *Epidemiology and Infection*, 2015. 143(04): p. 711-719.
18. Sezen, F.; Aval, E.; Ağkurt, T.; Yilmaz, Ş.; Temel, F.; Güleşen, R.; Korukluoğlu, G.; Sucakli, M.; Torunoğlu, M., and Zhu, B.-P., *A large multi-pathogen gastroenteritis outbreak caused by drinking contaminated water from antique neighbourhood fountains, Erzurum city, Turkey, December 2012*. *Epidemiology and Infection*, 2015. 143(04): p. 704-710.

19. Amvrosieva, T.; Titov, L.; Mulders, M.; Hovi, T.; Dyakonova, O.; Votyakov, V.; Kvacheva, Z.; Eremin, V.; Sharko, R., and Orlova, S., *Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus*. Central European Journal of Public Health, 2001. 9(3): p. 154-157.
20. Schmidt, P.; Pintar, K.; Fazil, A.; Flemming, C.; Lanthier, M.; Laprade, N.; Sunohara, M.; Simhon, A.; Thomas, J., and Topp, E., *Using Campylobacter spp. and Escherichia coli data and Bayesian microbial risk assessment to examine public health risks in agricultural watersheds under tile drainage management*. Water Research, 2013. 47(10): p. 3255-3272.
21. Corsi, S.R.; Borchardt, M.A.; Carvin, R.B.; Burch, T.R.; Spencer, S.K.; Lutz, M.A.; McDermott, C.M.; Busse, K.M.; Kleinheinz, G.T., and Feng, X., *Human and Bovine Viruses and Bacteria at Three Great Lakes Beaches: Environmental Variable Associations and Health Risk*. Environmental Science & Technology, 2015. 50(2): p. 987-995.
22. Londong, J.; Hillenbrand, T., and Niederste-Hollenberg, J., *Demografischer Wandel: Anlass und Chance für Innovationen in der Wasserwirtschaft*. KA Abwasser Abfall, 2011. 58(2): p. 152.
23. World Health Organization., *Guidelines for drinking-water quality*. 4th ed. 2011, Geneva: World Health Organization. xxiii, 541 p.
24. Samonis, G.; Elting, L.; Skoulika, E.; Maraki, S., and Tselentis, Y., *An outbreak of diarrhoeal disease attributed to Shigella sonnei*. Epidemiology and Infection, 1994. 112(2): p. 235-245.
25. Alegado, R.A. and Tan, M.W., *Resistance to antimicrobial peptides contributes to persistence of Salmonella typhimurium in the C. elegans intestine*. Cellular Microbiology, 2008. 10(6): p. 1259-1273.
26. Stelzer, W.; Mochmann, H.; Richter, U., and Dobberkau, H.J., *Characterization of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from waste water*. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A, 1988. 269(2): p. 188-196.
27. Stampi, S.; Varoli, O.; de Luca, G., and Zanetti, F., *Occurrence, removal and seasonal variation of "thermophilic" campylobacters in a sewage treatment plant in Italy*. Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin, 1992. 193(3): p. 199-210.
28. Rutjes, S.A.; Lodder, W.J.; van Leeuwen, A.D., and de Roda Husman, A.M., *Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production*. Journal of Applied Microbiology, 2009. 107(1): p. 97-105.
29. Rutjes, S.A.; Lodder, W.J.; Lodder-Verschoor, F.; van den Berg, H.H.; Vennema, H.; Duizer, E.; Koopmans, M., and de Roda Husman, A.M., *Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands*. Emerging Infectious Diseases, 2009. 15(3): p. 381-387.
30. Masini, L.; De Grandis, G.; Principi, F.; Mengarelli, C., and Ottaviani, D., *Research and characterization of pathogenic vibrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy)*. Water Research, 2007. 41(18): p. 4031-4040.
31. Lodder, W.J.; van den Berg, H.H.; Rutjes, S.A., and de Roda Husman, A.M., *Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. 76(17): p. 5965-5971.
32. Lodder, W.J. and de Roda Husman, A.M., *Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. 71(3): p. 1453-1461.
33. Seidel, M.; Jurzik, L.; Brettar, I.; Höfle, M.G., and Griebler, C., *Microbial and viral pathogens in freshwater: current research aspects studied in Germany*. Environmental Earth Sciences, 2016. 75(20): p. 1384.
34. Abdel-Nour, M.; Duncan, C.; Low, D.E., and Guyard, C., *Biofilms: the stronghold of Legionella pneumophila*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. 14(11): p. 21660-21675.
35. van Heijnsbergen, E.; Schalk, J.A.; Euser, S.M.; Brandsema, P.S.; den Boer, J.W., and de Roda Husman, A.M., *Confirmed and Potential Sources of Legionella Reviewed*. Environmental Science and Technology, 2015. 49(8): p. 4797-4815.



36. Wingender, J. and Flemming, H.-C., *Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2011. 214(6): p. 417-423.
37. O'Toole, G.; Kaplan, H.B., and Kolter, R., *Biofilm formation as microbial development*. Annual Reviews in Microbiology, 2000. 54(1): p. 49-79.
38. Skraber, S.; Schijven, J.; Gantzer, C., and de Roda Husman, A., *Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk?* Biofilms, 2005. 2(02): p. 105-117.
39. Kilb, B.; Lange, B.; Schaule, G.; Flemming, H.-C., and Wingender, J., *Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2003. 206(6): p. 563-573.
40. Craun, G.F.; Brunkard, J.M.; Yoder, J.S.; Roberts, V.A.; Carpenter, J.; Wade, T.; Calderon, R.L.; Roberts, J.M.; Beach, M.J., and Roy, S.L., *Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006*. Clinical Microbiology Reviews, 2010. 23(3): p. 507-528.
41. Bartram, J., *Water safety plan manual: step-by-step risk management for drinking-water suppliers*. 2009: World Health Organization.
42. Morris, J., *Filtered or waived, you need source protection*. Journal of New England Water Works Association, 1996. 110(3): p. 182-191.
43. Pedley, S. and Pond, K., *Emerging issues in water and infectious disease*. 2003: World Health Organization.
44. Dufour, A.; Snozzi, M.; Koster, W.; Bartram, J.; Ronchi, E., and Fewtrell, L., *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*. Water Intelligence Online, 2013. 12: p. 9781780405872.
45. Höll, K. and Niessner, R., *Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung*. 2011: De Gruyter.
46. Köster, W.; Egli, T.; Ashbolt, N.; Botzenhart, K.; Burlion, N.; Endo, T.; Grimont, P.; Guillot, E.; Mabilat, C., and Newport, L., *Analytical methods for microbiological water quality testing*. Assessing Microbial Safety of Drinking Water, 2003: p. 237.
47. Cangelosi, G.A., *Prospects for applying virulence factor-activity relationships (VFAR) to emerging waterborne pathogens*. Journal of Water and Health, 2009. 7(S1): p. S64-S74.
48. Borrego, J. and Figueras, M., *Microbiological quality of natural waters*. Microbiologia (Madrid, Spain), 1997. 13(4): p. 413-426.
49. Ashbolt, N.J.; Grabow, W.O., and Snozzi, M., *Indicators of microbial water quality*. IWA Publishing, 2001: p. 289-316.
50. Moriñigo, M.A.; Cornax, R.; Castro, D.; Martinez-Manzanares, E., and Borrego, J.J., *Viability of Salmonella spp and indicator microorganisms in seawater using membrane diffusion chambers*. Antonie van Leeuwenhoek, 1990. 57(2): p. 109-117.
51. Figueras, M.; Polo, F.; Inza, I., and Guarro, J., *Past, present and future perspectives of the EU bathing water directive*. Marine Pollution Bulletin, 1997. 34(3): p. 148-156.
52. Figueras, M.; Inza, I.; Polo, F.; Feliu, M., and Guarro, J., *A fast method for the confirmation of faecal streptococci from M-enterococcus medium*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(6): p. 2177-2178.
53. Kühn, I.; Iversen, A.; Burman, L.G.; Olsson-Liljequist, B.; Franklin, A.; Finn, M.; Aarestrup, F.; Seyfarth, A.M.; Blanch, A.R., and Vilanova, X., *Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment-a European study*. International Journal of Food Microbiology, 2003. 88(2): p. 133-145.
54. Figueras, M.; Inza, I.; Polo, F., and Guarro, J., *Evaluation of the oxolinic acid-esculin-azide medium for the isolation and enumeration of faecal streptococci in a routine monitoring programme for bathing waters*. Canadian Journal of Microbiology, 1998. 44(10): p. 998-1002.
55. Vivier, J.; Ehlers, M., and Grabow, W., *Detection of enteroviruses in treated drinking water*. Water Research, 2004. 38(11): p. 2699-2705.
56. Bosch, A., *Human enteric viruses in the water environment: a minireview*. International Microbiology, 2010. 1(3): p. 191-196.

57. Melnick, J.L.; Gerba, C.P., and Berg, G., *The ecology of enteroviruses in natural waters*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 1980. 10(1): p. 65-93.
58. Haas, C.N.; Rose, J.B.; Gerba, C., and Regli, S., *Risk assessment of virus in drinking water*. Risk Analysis, 1993. 13(5): p. 545-552.
59. Ward, R.L.; Bernstein, D.I.; Young, E.C.; Sherwood, J.R.; Knowlton, D.R., and Schiff, G.M., *Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection*. Journal of Infectious Diseases, 1986. 154(5): p. 871-880.
60. Schiff, G.; Stefanovic, G.; Young, B., and Pennekamp, J., *Minimum human infectious dose of enteric virus (Echovirus-12) in drinking water*, in *Enteric viruses in water*. 1984, Karger Publishers. p. 222-228.
61. Moriñigo, M.A.; Wheeler, D.; Berry, C.; Jones, C.; Muñoz, M.A.; Cornax, R., and Borrego, J.J., *Evaluation of different bacteriophage groups as faecal indicators in contaminated natural waters in Southern England*. Water Research, 1992. 26(3): p. 267-271.
62. Leclerc, H.; Edberg, S.; Pierzo, V., and Delattre, J., *Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters*. Journal of Applied Microbiology, 2000. 88(1): p. 5-21.
63. Havelaar, A. and Pot-Hogbeem, W., *F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene: ecological aspects*. Water Science and Technology, 1988. 20(11-12): p. 399-407.
64. Jofre, J.; Bosch, A.; Lucena, F.; Girones, R., and Tartera, C., *Evaluation of Bacteroides fragilis bacteriophages as indicators of the virological quality of water*. Water Science and Technology, 1986. 18(10): p. 167-173.
65. Duran, A.; Muniesa, M.; Mocé-Llivina, L.; Campos, C.; Jofre, J., and Lucena, F., *Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination*. Journal of Applied Microbiology, 2003. 95(1): p. 29-37.
66. Borrego, J.J.; Moriñigo, M.A.; de Vicente, A.; Córnox, R., and Romero, P., *Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms*. Water Research, 1987. 21(12): p. 1473-1480.
67. Paul, J.H.; Rose, J.B.; Brown, J.; Shinn, E.A.; Miller, S., and Farrah, S.R., *Viral tracer studies indicate contamination of marine waters by sewage disposal practices in key largo, Florida*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. 61(6): p. 2230-2234.
68. Debartolomeis, J. and Cabelli, V.J., *Evaluation of an Escherichia coli host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. 57(5): p. 1301-1305.
69. Lucena, F.; Lasobras, J.; McIntosh, D.; Forcadell, M., and Jofre, J., *Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of Bacteroides fragilis phages and coliphages in mussels*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. 60(7): p. 2272-2277.
70. TRINKWASSERVERORDNUNG, D., *Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung-TrinkwV) Fassung vom 21. Mai 2001*. BGBl. I, 2001(24): p. 959.
71. Bollrich, G., *Technische Hydromechanik 1: Grundlagen*. Vol. 1. 2013: Beuth Verlag.
72. Reynolds, O., *An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels*. Proceedings of the Royal Society of London, 1883. 35(224-226): p. 84-99.
73. Avila, K.; Moxey, D.; de Lozar, A.; Avila, M.; Barkley, D., and Hof, B., *The onset of turbulence in pipe flow*. Science, 2011. 333(6039): p. 192-196.
74. Cashdollar, J.L. and Wymer, L., *Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies*. Journal of Applied Microbiology, 2013. 115(1): p. 1-11.
75. Knox, K. and Wicken, A., *Immunological properties of teichoic acids*. Bacteriological Reviews, 1973. 37(2): p. 215.

76. Garimella, R.; Halye, J.L.; Harrison, W.; Klebba, P.E., and Rice, C.V., *Conformation of the phosphate D-alanine zwitterion in bacterial teichoic acid from nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *Biochemistry*, 2009. 48(39): p. 9242-9249.
77. Hershberger, C. and Binkley, S., *Chemistry and Metabolism of 3-Deoxy-d-mannooctulosonic Acid I. STEREOCHEMICAL DETERMINATION*. *Journal of Biological Chemistry*, 1968. 243(7): p. 1578-1584.
78. Brown, L.; Wolf, J.M.; Prados-Rosales, R., and Casadevall, A., *Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi*. *Nature Reviews Microbiology*, 2015. 13(10): p. 620-630.
79. Tetala, K.K. and van Beek, T.A., *Bioaffinity chromatography on monolithic supports*. *Journal of Separation Science*, 2010. 33(3): p. 422-438.
80. Dainiak, M.B.; Galaev, I.Y., and Mattiasson, B., *Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells*. *Journal of Chromatography A*, 2006. 1123(2): p. 145-150.
81. Ott, S.; Niessner, R., and Seidel, M., *Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of Staphylococcus aureus*. *Journal of Separation Science*, 2011. 34(16-17): p. 2181-2192.
82. Michen, B. and Graule, T., *Isoelectric points of viruses*. *Journal of Applied Microbiology*, 2010. 109(2): p. 388-397.
83. Wegmann, M.; Michen, B., and Graule, T., *Nanostructured surface modification of microporous ceramics for efficient virus filtration*. *Journal of the European Ceramic Society*, 2008. 28(8): p. 1603-1612.
84. Wegmann, M.; Michen, B.; Luxbacher, T.; Fritsch, J., and Graule, T., *Modification of ceramic microfilters with colloidal zirconia to promote the adsorption of viruses from water*. *Water Research*, 2008. 42(6): p. 1726-1734.
85. Wallis, C. and Melnick, J.L., *Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes*. *Bulletin of the World Health Organization*, 1967. 36(2): p. 219-225.
86. Matsushita, T.; Matsui, Y., and Shirasaki, N., *Analysing mass balance of viruses in a coagulation–ceramic microfiltration hybrid system by a combination of the polymerase chain reaction (PCR) method and the plaque forming units (PFU) method*. *Water Science and Technology*, 2006. 53(7): p. 199-207.
87. Brorson, K.; Shen, H.; Lute, S.; Pérez, J.S., and Frey, D.D., *Characterization and purification of bacteriophages using chromatofocusing*. *Journal of Chromatography A*, 2008. 1207(1): p. 110-121.
88. Holowecky, P.M.; James, R.R.; Lorch, D.P.; Straka, S.E., and Lindquist, H.D.A., *Evaluation of ultrafiltration cartridges for a water sampling apparatus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2009. 106(3): p. 738-747.
89. Gibson, K.E. and Schwab, K.J., *Tangential-Flow Ultrafiltration with Integrated Inhibition Detection for Recovery of Surrogates and Human Pathogens from Large-Volume Source Water and Finished Drinking Water*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. 77(1): p. 385-391.
90. Rutjes, S.A.; Italiaander, R.; van den Berg, H.H.J.L.; Lodder, W.J., and Husman, A.M.D., *Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. 71(7): p. 3734-3740.
91. Smith, C.M. and Hill, V.R., *Dead-end hollow-fiber ultrafiltration for recovery of diverse microbes from water*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009. 75(16): p. 5284-5289.
92. Winona, L.; Ommani, A.; Olszewski, J.; Nuzzo, J., and Oshima, K., *Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001. 47(11): p. 1033-1041.
93. Lañé, J.-M.; Vial, D., and Moulart, P., *Status after 10 years of operation—overview of UF technology today*. *Desalination*, 2000. 131(1): p. 17-25.

94. Wallis, C. and Melnick, J.L., *Concentration of viruses from sewage by adsorption on millipore membranes*. Bull World Health Organ, 1967. 36(2): p. 219-225.
95. Wallis, C. and Melnick, J.L., *Concentration of enteroviruses on membrane filters*. J Virol, 1967. 1(3): p. 472-477.
96. Payment, P.; Berube, A.; Perreault, D.; Armon, R., and Trudel, M., *Concentration of Giardia-Lambliia Cysts, Legionella-Pneumophila, Clostridium-Perfringens, Human Enteric Viruses, and Coliphages from Large Volumes of Drinking-Water, Using a Single Filtration*. Canadian Journal of Microbiology, 1989. 35(10): p. 932-935.
97. Block, J.C. and Rolland, D., *Method for Salmonella Concentration from Water at Ph-3.5, Using Micro-Fiber Glass Filters*. Applied and Environmental Microbiology, 1979. 38(1): p. 1-6.
98. Kroner, F. and Hubbuch, J., *Systematic generation of buffer systems for pH gradient ion exchange chromatography and their application*. Journal of Chromatography A, 2013. 1285: p. 78-87.
99. Staby, A.; Sand, M.-B.; Hansen, R.G.; Jacobsen, J.H.; Andersen, L.A.; Gerstenberg, M.; Bruus, U.K., and Jensen, I.H., *Comparison of chromatographic ion-exchange resins: IV. Strong and weak cation-exchange resins and heparin resins*. Journal of Chromatography A, 2005. 1069(1): p. 65-77.
100. Wolff, M.W.; Siewert, C.; Hansen, S.P.; Faber, R., and Reichl, U., *Purification of cell culture-derived modified vaccinia ankara virus by pseudo-affinity membrane adsorbers and hydrophobic interaction chromatography*. Biotechnology and Bioengineering, 2010. 107(2): p. 312-320.
101. Li, H.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Zhao, Q.; Zhu, Y.; Zou, X.; Yu, M.; Ma, G., and Su, Z., *A hydrophobic interaction chromatography strategy for purification of inactivated foot-and-mouth disease virus*. Protein Expression and Purification, 2015. 113: p. 23-29.
102. Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Dobeli, H.; Gentz, R., and Stuber, D., *Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent*. Nature Biotechnology, 1988. 6(11): p. 1321-1325.
103. Hanora, A.; Plieva, F.M.; Hedström, M.; Galaev, I.Y., and Mattiasson, B., *Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B*. Journal of Biotechnology, 2005. 118(4): p. 421-433.
104. Stansly, P. and Schlosser, M., *Studies on polymyxin: isolation and identification of Bacillus polymyxa and differentiation of polymyxin from certain known antibiotics*. Journal of bacteriology, 1947. 54(5): p. 549.
105. Newton, B., *The properties and mode of action of the polymyxins*. Bacteriological Reviews, 1956. 20(1): p. 14.
106. Hirayama, C. and Sakata, M., *Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles*. Journal of Chromatography B, 2002. 781(1): p. 419-432.
107. Peskoller, C.; Niessner, R., and Seidel, M., *Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of Escherichia coli bacteria*. Journal of Chromatography A, 2009. 1216(18): p. 3794-3801.
108. Ejim, L.; Farha, M.A.; Falconer, S.B.; Wildenhain, J.; Coombes, B.K.; Tyers, M.; Brown, E.D., and Wright, G.D., *Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy*. Nature Chemical Biology, 2011. 7(6): p. 348-350.
109. Wallis, C. and Melnick, J.L., *Concentration of enteroviruses on membrane filters*. Journal of Virology, 1967. 1(3): p. 472-477.
110. Wallis, C. and Melnick, J.L., *Concentration of viruses on aluminum and calcium salts*. American Journal of Epidemiology, 1967. 85(3): p. 459-468.
111. Farrah, S.R.; Gerba, C.P.; Wallis, C., and Melnick, J.L., *Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters*. Applied and Environmental Microbiology, 1976. 31(2): p. 221-226.
112. Wallis, C.; Henderson, M., and Melnick, J.L., *Enterovirus concentration on cellulose membranes*. Applied Microbiology, 1972. 23(3): p. 476-480.

113. Haramoto, E.; Katayama, H., and Ohgaki, S., *Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70(4): p. 2154-2160.
114. Haramoto, E.; Katayama, H.; Utagawa, E., and Ohgaki, S., *Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods*. Journal of Virological Methods, 2009. 160(1-2): p. 206-209.
115. Sobsey, M.D. and Glass, J.S., *Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters*. Applied and Environmental Microbiology, 1980. 40(2): p. 201-210.
116. Agency, U.S.E.P., *Membrane filtration guidance manual*. 2005.
117. Polaczyk, A.L.; Roberts, J.M., and Hill, V.R., *Evaluation of 1MDS electropositive microfilters for simultaneous recovery of multiple microbe classes from tap water*. Journal of Microbiological Methods, 2007. 68(2): p. 260-266.
118. Cashdollar, J.L. and Dahling, D.R., *Evaluation of a method to re-use electropositive cartridge filters for concentrating viruses from tap and river water*. Journal of Virological Methods, 2006. 132(1-2): p. 13-17.
119. Parshionikar, S.U.; Willian-True, S.; Fout, G.S.; Robbins, D.E.; Seys, S.A.; Cassady, J.D., and Harris, R., *Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. 69(9): p. 5263-5268.
120. Borchardt, M.A.; Haas, N.L., and Hunt, R.J., *Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70(10): p. 5937-5946.
121. Cashdollar, J.L.; Brinkman, N.E.; Griffin, S.M.; McMinn, B.R.; Rhodes, E.R.; Varughese, E.A.; Grimm, A.C.; Parshionikar, S.U.; Wymer, L., and Fout, G.S., *Development and Evaluation of EPA Method 1615 for Detection of Enterovirus and Norovirus in Water*. Applied and Environmental Microbiology, 2013. 79(1): p. 215-223.
122. Vilaginès, P.; Sarrette, B.; Champsaur, H.; Hugues, B.; Dubrou, S.; Joret, J.-C.; Laveran, H.; Lesne, J.; Paquin, J., and Delattre, J., *Round robin investigation of glass wool method for poliovirus recovery from drinking water and sea water*. Water Science and Technology, 1997. 35(11-12): p. 445-449.
123. Lambertini, E.; Spencer, S.K.; Bertz, P.D.; Loge, F.J.; Kieke, B.A., and Borchardt, M.A., *Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74(10): p. 2990-2996.
124. Zhu, B.; Clifford, D.A., and Chellam, S., *Virus removal by iron coagulation-microfiltration*. Water Research, 2005. 39(20): p. 5153-5161.
125. Cantalupo, P.G.; Calgua, B.; Zhao, G.; Hundesa, A.; Wier, A.D.; Katz, J.P.; Grabe, M.; Hendrix, R.W.; Girones, R.; Wang, D., and Pipas, J.M., *Raw sewage harbors diverse viral populations*. MBio, 2011. 2(5).
126. Calgua, B.; Fumian, T.; Rusinol, M.; Rodriguez-Manzano, J.; Mbayed, V.A.; Bofill-Mas, S.; Miagostovich, M., and Girones, R., *Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas*. Water Research, 2013. 47(8): p. 2797-2810.
127. Bitton, G.; Chang, L.T.; Farrah, S.R., and Clifford, K., *Recovery of coliphages from wastewater effluents and polluted lake water by the magnetite-organic flocculation method*. Applied and Environmental Microbiology, 1981. 41(1): p. 93-96.
128. Shields, P.A. and Farrah, S.R., *Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate*. Applied and Environmental Microbiology, 1986. 51(1): p. 211-213.
129. Gerba, C.P.; Farrah, S.R.; Goyal, S.M.; Wallis, C., and Melnick, J.L., *Concentration of Enteroviruses from Large Volumes of Tap Water, Treated Sewage, and Seawater*. Applied and Environmental Microbiology, 1978. 35(3): p. 540-548.
130. Sobsey, M.D.; Wallis, C., and Melnick, J.L., *Development of a simple method for concentrating enteroviruses from oysters*. Applied Microbiology, 1975. 29(1): p. 21-26.

131. Sobsey, M.D.; Carrick, R.J., and Jensen, H.R., *Improved methods for detecting enteric viruses in oysters*. Applied and Environmental Microbiology, 1978. 36(1): p. 121-128.
132. Hurwitz, B.L.; Deng, L.; Poulos, B.T., and Sullivan, M.B., *Evaluation of methods to concentrate and purify ocean virus communities through comparative, replicated metagenomics*. Environmental Microbiology, 2013. 15(5): p. 1428-1440.
133. Ijsselmuiden, O.; Herbrink, P.; Meddens, M.; Tank, B.; Stolz, E., and Van Eijk, R., *Optimizing the solid-phase immunofiltration assay: a rapid alternative to immunoassays*. Journal of Immunological Methods, 1989. 119(1): p. 35-43.
134. Šafařík, I. and Šafaříková, M., *Use of magnetic techniques for the isolation of cells*. Journal of Chromatography B, 1999. 722(1): p. 33-53.
135. Stevens, K.A. and Jaykus, L.-A., *Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review*. Critical Reviews in Microbiology, 2004. 30(1): p. 7-24.
136. Pappert, G.; Rieger, M.; Niessner, R., and Seidel, M., *Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of E. coli*. Microchimica Acta, 2010. 168(1-2): p. 1-8.
137. Yao, L.; Wu, Q.; Wang, D.; Kou, X., and Zhang, J., *Development of monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads for separation and detection of norovirus (genogroup II) in faecal extract samples*. Letters in Applied Microbiology, 2009. 49(2): p. 173-178.
138. Schwab, K.J.; De Leon, R., and Sobsey, M.D., *Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(6): p. 2086-2094.
139. Jain, P.; Pandey, P.; Jain, D., and Dwivedi, P., *Plantibody: An overview*. Asian Journal of Pharmacy and Life Science, 2011. 1(1): p. 87-94.
140. Wallis, C.; Henderso, M., and Melnick, J.L., *Enterovirus Concentration on Cellulose Membranes*. Applied Microbiology, 1972. 23(3): p. 476-&.
141. Lambertini, E.; Spencer, S.K.; Bertz, P.D.; Loge, F.J.; Kieke, B.A., and Borchardt, M.A., *Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74(10): p. 2990-2996.
142. Farrah, S.R.; Goyal, S.M.; Gerba, C.P.; Wallis, C., and Melnick, J.L., *Concentration of Poliovirus from Tap Water onto Membrane Filters with Aluminum-Chloride at Ambient Ph Levels*. Applied and Environmental Microbiology, 1978. 35(3): p. 624-626.
143. Rajal, V.B.; McSwain, B.S.; Thompson, D.E.; Leutenegger, C.M., and Wuertz, S., *Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater*. Water Research, 2007. 41(19): p. 4287-4298.
144. Karim, M.R.; Rhodes, E.R.; Brinkman, N.; Wymer, L., and Fout, G.S., *New Electropositive Filter for Concentrating Enteroviruses and Noroviruses from Large Volumes of Water*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. 75(8): p. 2393-2399.
145. Jungbauer, A. and Hahn, R., *Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology*. Journal of Separation Science, 2004. 27(10-11): p. 767-778.
146. Xie, S.; Allington, R.W.; Frechet, J.M., and Svec, F., *Porous polymer monoliths: an alternative to classical beads*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2002. 76: p. 87-125.
147. Yuan, H.Z., L., *Monoliths, Fundamentals for Sample Preparation*. Comprehensive Sampling and Sample Preparation, 2012. 2.
148. Trilisky, E.I.; Koku, H.; Czymmek, K.J., and Lenhoff, A.M., *Relation of structure to performance characteristics of monolithic and perfusive stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2009. 1216(36): p. 6365-6376.
149. Jungbauer, A. and Hahn, R., *Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies*. Journal of Chromatography A, 2008. 1184(1-2): p. 62-79.
150. Gritti, F.; Piatkowski, W., and Guiochon, G., *Study of the mass transfer kinetics in a monolithic column*. Journal of Chromatography A, 2003. 983(1-2): p. 51-71.

151. Van Deemter, J.J.; Zuiderweg, F., and Klinkenberg, A.v., *Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography*. Chemical Engineering Science, 1956. 5(6): p. 271-289.
152. Josic, D.; Buchacher, A., and Jungbauer, A., *Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion*. Journal of Chromatography B, 2001. 752(2): p. 191-205.
153. Siouffi, A.M., *About the C term in the van Deemter's equation of plate height in monoliths*. Journal of Chromatography A, 2006. 1126(1-2): p. 86-94.
154. Ali, I.; Gaitonde, V.D., and Aboul-Enein, H.Y., *Monolithic silica stationary phases in liquid chromatography*. Journal of Chromatographic Science, 2009. 47(6): p. 432-442.
155. Gao, W.; YANG, G.; Yang, J., and Liu, H., *Formation of the monolithic silica gel column with bimodal pore structure*. Turkish Journal of Chemistry, 2004. 28(3): p. 379-386.
156. Tanak, N.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hosoya, K., and Ikegami, T., *Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations*. Journal of Chromatography A, 2002. 965(1-2): p. 35-49.
157. Cabrera, K., *Applications of silica-based monolithic HPLC columns*. Journal of Separation Science, 2004. 27(10-11): p. 843-852.
158. Wu, M.; Chen, Y.; Wu, R.a.; Li, R.; Zou, H.; Chen, B., and Yao, S., *The synthesis of chloropropyl-functionalized silica hybrid monolithic column with modification of N, N-dimethyl-N-dodecylamine for capillary electrochromatography separation*. Journal of Chromatography A, 2010. 1217(26): p. 4389-4394.
159. Svec, F.; Tennikova, T.B., and Deyl, Z., *Monolithic materials: preparation, properties and applications*. Journal of Chromatography Library, 2003. 67.
160. Yang, W.; Yu, M.; Sun, X., and Woolley, A.T., *Microdevices integrating affinity columns and capillary electrophoresis for multibiomarker analysis in human serum*. Lab on a Chip, 2010. 10(19): p. 2527-2533.
161. Svec, F. and Frechet, J.M., *Molded rigid monolithic porous polymers: an inexpensive, efficient, and versatile alternative to beads for the design of materials for numerous applications*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1999. 38(1): p. 34-48.
162. Wei, F.; Fan, J.; Zheng, M.M., and Feng, Y.Q., *Combining poly (methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith microextraction and octadecyl phosphonic acid-modified zirconia-coated CEC with field-enhanced sample injection for analysis of antidepressants in human plasma and urine*. Electrophoresis, 2010. 31(4): p. 714-723.
163. Zheng, M.M.; Zhang, M.Y., and Feng, Y.Q., *Polymer monolith microextraction online coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry for analysis of  $\beta$ 2-agonist in human urine*. Journal of Separation Science, 2009. 32(11): p. 1965-1974.
164. Li, T.; Shi, Z.-G.; Zheng, M.-M., and Feng, Y.-Q., *Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking*. Journal of Chromatography A, 2008. 1205(1): p. 163-170.
165. Zheng, M.-M.; Zhang, M.-Y.; Peng, G.-Y., and Feng, Y.-Q., *Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2008. 625(2): p. 160-172.
166. Xu, Y.; Cao, Q.; Svec, F., and Frechet, J.M., *Porous polymer monolithic column with surface-bound gold nanoparticles for the capture and separation of cysteine-containing peptides*. Analytical Chemistry, 2010. 82(8): p. 3352-3358.
167. Lv, Y.-Q.; Fu, D.-Y.; Tan, T.-W., and Wang, M.-Y., *One-step purification of YLLIP2 isoforms from Candida sp. 99-125 by polyethyleneimine modified poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010. 62(2): p. 149-154.
168. Spross, J. and Sinz, A., *Monolithic media for applications in affinity chromatography*. Journal of Separation Science, 2011. 34(16-17): p. 1958-1973.

169. Tu, J.; Du, Z.; Li, H., and Zhang, C., *Development and characterization of porous epoxy monoliths via pore-initiated polymerization*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2011. 375(1): p. 68-75.
170. Petro, M.; Svec, F., and Fréchet, J.M., *Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography*. Biotechnology and Bioengineering, 1996. 49(4): p. 355-363.
171. Buchmeiser, M.R., *Polymeric monolithic materials: Syntheses, properties, functionalization and applications*. Polymer, 2007. 48(8): p. 2187-2198.
172. Tennikova, T.B. and Freitag, R., *An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography*. Hrc-Journal of High Resolution Chromatography, 2000. 23(1): p. 27-38.
173. Teilum, M.; Hansson, M.J.; Dainiak, M.B.; Mansson, R.; Surve, S.; Elmer, E.; Onnerfjord, P., and Mattiasson, G., *Binding mitochondria to cryogel monoliths allows detection of proteins specifically released following permeability transition*. Analytical Biochemistry, 2006. 348(2): p. 209-221.
174. Lozinsky, V.I.; Galaev, I.Y.; Plieva, F.M.; Savina, I.N.; Jungvid, H., and Mattiasson, B., *Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest*. Trends in Biotechnology, 2003. 21(10): p. 445-451.
175. Plieva, F.M.; Galaev, I.Y., and Mattiasson, B., *Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications*. Journal of Separation Science, 2007. 30(11): p. 1657-1671.
176. Petro, M.; Svec, F., and Frechet, J.M., *Molded continuous poly(styrene-co-divinylbenzene) rod as a separation medium for the very fast separation of polymers. Comparison of the chromatographic properties of the monolithic rod with columns packed with porous and non-porous beads in high-performance liquid chromatography of polystyrenes*. Journal of Chromatography A, 1996. 752(1-2): p. 59-66.
177. Gustavsson, P.E. and Larsson, P.O., *Continuous superporous agarose beds in radial flow columns*. Journal of Chromatography A, 2001. 925(1-2): p. 69-78.
178. Rohr, T.; Hilder, E.F.; Donovan, J.J.; Svec, F., and Frechet, J.M., *Photografting and the control of surface chemistry in three-dimensional porous polymer monoliths*. Macromolecules, 2003. 36(5): p. 1677-1684.
179. Pappas, D. and Wang, K., *Cellular separations: a review of new challenges in analytical chemistry*. Analytica Chimica Acta, 2007. 601(1): p. 26-35.
180. Dainiak, M.B.; Plieva, F.M.; Galaev, I.Y.; Hatti-Kaul, R., and Mattiasson, B., *Cell chromatography: Separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns*. Biotechnology Progress, 2005. 21(2): p. 644-649.
181. Arvidsson, P.; Plieva, F.M.; Savina, I.N.; Lozinsky, V.I.; Fexby, S.; Bülow, L.; Galaev, I.Y., and Mattiasson, B., *Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns*. Journal of Chromatography A, 2002. 977(1): p. 27-38.
182. Dainiak, M.B.; Kumar, A.; Galaev, I.Y., and Mattiasson, B., *Detachment of affinity-captured bioparticles by elastic deformation of a macroporous hydrogel*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. 103(4): p. 849-854.
183. Smrekar, F.; Ciringer, M.; Peterka, M.; Podgornik, A., and Strancar, A., *Purification and concentration of bacteriophage T4 using monolithic chromatographic supports*. Journal of Chromatography B, 2008. 861(2): p. 177-180.
184. Kramberger, P.; Honour, R.C.; Herman, R.E.; Smrekar, F., and Peterka, M., *Purification of the Staphylococcus aureus bacteriophages VDX-10 on methacrylate monoliths*. Journal of Virological Methods, 2010. 166(1-2): p. 60-64.
185. Smrekar, F.; Ciringer, M.; Strancar, A., and Podgornik, A., *Characterisation of methacrylate monoliths for bacteriophage purification*. Journal of Chromatography A, 2011. 1218(17): p. 2438-2444.



186. Noppe, W.; Plieva, F.M.; Galaev, I.Y.; Vanhoorelbeke, K.; Mattiasson, B., and Deckmyn, H., *Immobilised peptide displaying phages as affinity ligands: Purification of lactoferrin from defatted milk*. Journal of Chromatography A, 2006. 1101(1): p. 79-85.
187. Noppe, W.; Plieva, F.M.; Vanhoorelbeke, K.; Deckmyn, H.; Tuncel, M.; Tuncel, A.; Galaev, I.Y., and Mattiasson, B., *Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds*. Journal of Biotechnology, 2007. 131(3): p. 293-299.
188. Gutiérrez-Aguirre, I.; Banjac, M.; Steyer, A.; Poljšak-Prijatelj, M.; Peterka, M.; Štrancar, A., and Ravnikar, M., *Concentrating rotaviruses from water samples using monolithic chromatographic supports*. Journal of Chromatography A, 2009. 1216(13): p. 2700-2704.
189. Rački, N.; Kramberger, P.; Steyer, A.; Gašperšič, J.; Štrancar, A.; Ravnikar, M., and Gutierrez-Aguirre, I., *Methacrylate monolith chromatography as a tool for waterborne virus removal*. Journal of Chromatography A, 2015. 1381: p. 118-124.
190. Pei, L.; Rieger, M.; Lengger, S.; Ott, S.; Zawadsky, C.; Hartmann, N.M.; Selinka, H.C.; Tiehm, A.; Niessner, R., and Seidel, M., *Combination of Crossflow Ultrafiltration, Monolithic Affinity Filtration, and Quantitative Reverse Transcriptase PCR for Rapid Concentration and Quantification of Model Viruses in Water*. Environmental Science & Technology, 2012. 46(18): p. 10073-10080.
191. Pei, L., *Monolithic adsorption filtration (MAF)-Based Methods for Concentrating Viruses from Water*. 2015, Technische Universität München, Dissertation.
192. Leoni, E.; De Luca, G.; Legnani, P.; Sacchetti, R.; Stampi, S., and Zanetti, F., *Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems*. Journal of Applied Microbiology, 2005. 98(2): p. 373-379.
193. Rossen, L.; Nørskov, P.; Holmstrøm, K., and Rasmussen, O.F., *Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions*. International Journal of Food Microbiology, 1992. 17(1): p. 37-45.
194. Wyn-Jones, A. and Sellwood, J., *Enteric viruses in the aquatic environment*. Journal of Applied Microbiology, 2001. 91(6): p. 945-962.
195. Rompré, A.; Servais, P.; Baudart, J.; de-Roubin, M.-R., and Laurent, P., *Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches*. Journal of Microbiological Methods, 2002. 49(1): p. 31-54.
196. Ta, A.C.; Stout, J.E.; Yu, V.L., and Wagener, M.M., *Comparison of culture methods for monitoring Legionella species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods*. Journal of Clinical Microbiology, 1995. 33(8): p. 2118-2123.
197. Warren, L.; Benoit, R., and Jessee, J., *Rapid enumeration of Fecal Coliforms in water by a colorimetric beta-galactosidase assay*. Applied and Environmental Microbiology, 1978. 35(1): p. 136-141.
198. Umweltbundesamt, *Hinweise zu mikrobiologischen Parametern/Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001*. 2004.
199. Grabow, W., *Bacteriophages: update on application as models for viruses in water*. Water SA, 2001. 27(2): p. 251-268.
200. Costa, G.L. and Weiner, M.P., *Polishing with T4 or Pfu polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments*. Nucleic Acids Research, 1994. 22(12): p. 2423.
201. Ghasemi, A.; Salmanian, A.H.; Sadeghifard, N.; Salarian, A.A., and Gholi, M.K., *Cloning, expression and purification of Pwo polymerase from Pyrococcus woesei*. Iranian Journal of Microbiology, 2011. 3(3): p. 118.
202. Wilhelm, J. and Pingoud, A., *Real-time polymerase chain reaction*. Chembiochem, 2003. 4(11): p. 1120-1128.
203. Rasmussen, R.; Morrison, T.; Herrmann, M., and Wittwer, C., *Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye*. Biochemica, 1998. 2(8): p. 11.

204. Didenko, V.V., *DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications*. Biotechniques, 2001. 31(5): p. 1106.
205. Tyagi, S. and Kramer, F.R., *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. Nature Biotechnology, 1996. 14(3): p. 303-308.
206. Nocker, A.; Sossa-Fernandez, P.; Burr, M.D., and Camper, A.K., *Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. 73(16): p. 5111-5117.
207. Flekna, G.; Štefanič, P.; Wagner, M.; Smulders, F.J.; Možina, S.S., and Hein, I., *Insufficient differentiation of live and dead Campylobacter jejuni and Listeria monocytogenes cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR*. Research in Microbiology, 2007. 158(5): p. 405-412.
208. Nocker, A.; Cheung, C.-Y., and Camper, A.K., *Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells*. Journal of Microbiological Methods, 2006. 67(2): p. 310-320.
209. Fittipaldi, M.; Rodriguez, N.J.P.; Codony, F.; Adrados, B.; Peñuela, G.A., and Morató, J., *Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR*. Journal of Virological Methods, 2010. 168(1): p. 228-232.
210. Gritsan, N. and Platz, M., *Photochemistry of azides: the azide/nitrene interface*. 2010: John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA.
211. Hayden, R.; Uhl, J.; Qian, X.; Hopkins, M.; Aubry, M.C.; Limper, A.H.; Lloyd, R., and Cockerill, F., *Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture*. Journal of Clinical Microbiology, 2001. 39(7): p. 2618-2626.
212. Wellinghausen, N.; Frost, C., and Marre, R., *Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. 67(9): p. 3985-3993.
213. Seidel, M. and Niessner, R., *Chemiluminescence microarrays in analytical chemistry: a critical review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. 406(23): p. 5589-5612.
214. Schena, M.; Heller, R.A.; Theriault, T.P.; Konrad, K.; Lachenmeier, E., and Davis, R.W., *Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics*. Trends in Biotechnology, 1998. 16(7): p. 301-306.
215. Seidel, M. and Niessner, R., *Automated analytical microarrays: a critical review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. 391(5): p. 1521-1544.
216. Schäferling, M. and Nagl, S., *Optical technologies for the read out and quality control of DNA and protein microarrays*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. 385(3): p. 500-517.
217. Elsholz, B.; Wörl, R.; Blohm, L.; Albers, J.; Feucht, H.; Grunwald, T.; Jürgen, B.; Schweder, T., and Hintsche, R., *Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays*. Analytical Chemistry, 2006. 78(14): p. 4794-4802.
218. Gauglitz, G., *Direct optical detection in bioanalysis: an update*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. 398(6): p. 2363-2372.
219. Knauer, M.; Ivleva, N.P.; Liu, X.; Niessner, R., and Haisch, C., *Surface-enhanced Raman scattering-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms*. Analytical Chemistry, 2010. 82(7): p. 2766-2772.
220. Mirasoli, M.; Guardigli, M.; Michelini, E., and Roda, A., *Recent advancements in chemical luminescence-based lab-on-chip and microfluidic platforms for bioanalysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. 87: p. 36-52.
221. Marquette, C.A. and Blum, L.J., *Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. 385(3): p. 546-554.
222. Kloth, K.; Niessner, R., and Seidel, M., *Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. 24(7): p. 2106-2112.

223. Kloth, K.; Rye-Johnsen, M.; Didier, A.; Dietrich, R.; Martlbauer, E.; Niessner, R., and Seidel, M., *A regenerable immuno chip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk*. *Analyst*, 2009. 134(7): p. 1433-1439.
224. Wutz, K.; Niessner, R., and Seidel, M., *Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays*. *Microchimica Acta*, 2011. 173(1-2): p. 1-9.
225. Szkola, A.; Linares, E.; Worbs, S.; Dorner, B.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Niessner, R., and Seidel, M., *Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay*. *Analyst*, 2014. 139(22): p. 5885-5892.
226. Meyer, V.K.; Kober, C.; Niessner, R., and Seidel, M., *Regeneration of recombinant antigen microarrays for the automated monitoring of antibodies against zoonotic pathogens in Swine Sera*. *Sensors*, 2015. 15(2): p. 2614-2628.
227. Donhauser, S.C.; Niessner, R., and Seidel, M., *Quantification of E. coli DNA on a Flow-through Chemiluminescence Microarray Readout System after PCR Amplification*. *Analytical Sciences*, 2009. 25(5): p. 669-674.
228. Donhauser, S.C.; Niessner, R., and Seidel, M., *Sensitive Quantification of Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica, and Campylobacter jejuni by Combining Stopped Polymerase Chain Reaction with Chemiluminescence Flow-Through DNA Microarray Analysis*. *Analytical Chemistry*, 2011. 83(8): p. 3153-3160.
229. Lengger, S.; Otto, J.; Elsasser, D.; Schneider, O.; Tiehm, A.; Fleischer, J.; Niessner, R., and Seidel, M., *Oligonucleotide microarray chip for the quantification of MS2, Phi X174, and adenoviruses on the multiplex analysis platform MCR 3*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. 406(14): p. 3323-3334.
230. Wunderlich, A.; Torggler, C.; Elsässer, D.; Lück, C.; Niessner, R., and Seidel, M., *Rapid quantification method for Legionella pneumophila in surface water*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. 408(9): p. 2203-2213.
231. Kunze, A.; Dilcher, M.; Abd El Wahed, A.; Hufert, F.; Niessner, R., and Seidel, M., *On-chip isothermal nucleic acid amplification on flow-based chemiluminescence microarray analysis platform for the detection of viruses and bacteria*. *Analytical Chemistry*, 2015. 88(1): p. 898-905.
232. Langer, V.; Hartmann, G.; Niessner, R., and Seidel, M., *Rapid quantification of bioaerosols containing L. pneumophila by Coriolis®  $\mu$  air sampler and chemiluminescence antibody microarrays*. *Journal of Aerosol Science*, 2012. 48: p. 46-55.
233. Langer, V.; Niessner, R., and Seidel, M., *Stopped-flow microarray immunoassay for detection of viable E. coli by use of chemiluminescence flow-through microarrays*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011. 399(3): p. 1041-1050.
234. Lengger, S.; Otto, J.; Elsasser, D.; Schneider, O.; Tiehm, A.; Fleischer, J.; Niessner, R., and Seidel, M., *Oligonucleotide microarray chip for the quantification of MS2, PhiX174, and adenoviruses on the multiplex analysis platform MCR 3*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. 406(14): p. 3323-3334.
235. Rieger, M., *Entwicklung von Anreicherungs-und Detektionsmethoden umweltrelevanter Analyten (Viren in Trinkwasser; adsorbiertes Benzo [a] pyren)*. 2012, Technische Universität München, Dissertation.
236. Kunze, A.; Pei, L.; Elsasser, D.; Niessner, R., and Seidel, M., *High performance concentration method for viruses in drinking water*. *Journal of Virological Methods*, 2015. 222: p. 132-137.
237. Peskoller, C., *Entwicklung eines schnellen und selektiven Anreicherungs-systems für Bakterien mittels Querstromfiltration und Affinitätschromatographie*. 2010, Technische Universität München, Dissertation.
238. Dreier, J.; Stormer, M., and Kleesiek, K., *Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. 43(9): p. 4551-4557.

239. Crews, N.; Wittwer, C., and Gale, B., *Continuous-flow thermal gradient PCR*. Biomedical Microdevices, 2008. 10(2): p. 187-195.
240. Khan, I.U.; Gannon, V.; Kent, R.; Koning, W.; Lapen, D.R.; Miller, J.; Neumann, N.; Phillips, R.; Robertson, W., and Topp, E., *Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable Escherichia coli from agriculture watersheds*. Journal of Microbiological Methods, 2007. 69(3): p. 480-488.
241. Bensalah, F.; Flores, M.-J., and Mouats, A., *A rapid PCR based method to distinguish between Enterococcus species by using degenerate and species-specific sodA gene primers*. African Journal of Biotechnology, 2006. 5(9).
242. Wolter, A.; Niessner, R., and Seidel, M., *Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays*. Analytical Chemistry, 2007. 79(12): p. 4529-4537.