



Technische Universität München

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie

**Molekularbiologische Lebend/tot-Unterscheidung bei Viren
und Bakterien nach Desinfektionsverfahren**

Johannes Ho

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Prof. Dr. Michael Groll

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Reinhard Niessner

2. Priv. - Doz. Dr. Michael Seidel

Die Dissertation wurde am 13.10.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 30.11.2017 angenommen.

Danksagung

Diese Dissertation entstand von 2013 bis 2017 am DVGW: Technologiezentrum Wasser (TZW) Karlsruhe in der Abteilung Mikrobiologie und Molekularbiologie im Rahmen des durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes EDIT „*Entwicklung und Implementierung eines Anreicherungs- und Detektionssystems für das Inline-Monitoring von wasserbürtigen Pathogenen in Trink- und Rohwasser*“.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner vom Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie für die Unterstützung und die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und zu begutachten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Andreas Tiehm für die Möglichkeit, diese Arbeit am Technologiezentrum Wasser Karlsruhe durchführen zu können, die Betreuung, den Freiraum zur selbstständigen Arbeit sowie den zahlreichen Gelegenheiten, internationale und nationale Konferenzen besuchen zu können.

Weiterer Dank geht an PD Dr. Michael Seidel für die zahlreichen Anregungen und die Unterstützung sowohl bei meiner Arbeit als auch im Rahmen einer Reihe durchgeführter Projekte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Andreas Kunze und Dennis Elsässer für die erfolgreiche und spannende Zusammenarbeit im Projekt EDIT bedanken.

Um nicht mit einer langen Namenliste fortzufahren, möchte ich mich hiermit herzlich bei allen Kollegen des TZW bedanken, die mir während meiner Arbeit zur Seite gestanden haben. Hierbei nochmal ein besonderes Dankeschön an Claudia Stange, Viola Simon, Carmen Kraffert, Monika Bösl und Charlotte Schäfer für die langjährige Unterstützung im Labor und bei Denkanstößen und Versuchsplanungen. Für die Möglichkeit zur Desinfektion mit Ozon, die Bereitstellung des ozonhaltigen Wassers und für die Zusammenarbeit möchte ich mich sehr bei der Abteilung Analytik und Wasserbeschaffenheit des TZW Karlsruhe und speziell bei Beat Schmutz bedanken. Die Bestrahlung mit Niederdruck-UV-Strahlung wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Technologie sowie Mikrobiologie des TZW durchgeführt – auch ein großer Dank für die interessante Zusammenarbeit.

Letzter und vielleicht auch wichtigster Dank geht an meine Familie, besonders an meine Frau Kayan, die mich im Laufe dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben. Auch meinem Onkel Georg möchte ich Normals für die Korrekturen danken.

Die Experimente dieser Arbeit wurden hauptsächlich im Rahmen des Projektes EDIT

durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich nochmals beim BMBF für die finanzielle Unterstützung in den oben genannten Projekten bedanken.

Bisherige Veröffentlichungen

Hinweis: Im Laufe der Arbeit erfolgte eine Namensänderung von J. Otto auf J. Ho.

Ho J., Seidel M., Niessner R., Eggers J., Tiehm A.:

Long amplicon (LA)-qPCR for the discrimination of infectious and noninfectious phiX174 bacteriophages after UV inactivation.

Water Research 103: 141-148 (2016)

Karthe, D.; Behrmann, O.; Blättel, V.; Elsässer, D.; Heese, C.; Ho, J.; Hügle, M.; Hufert, F.; Kunze, A.; Niessner, R.; 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

10.1007/s12665-016-6287-90.1016/j.watres.2016.07.032

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 MCR3.

Analytical and Bioanalytical Chemistry 406(14): 3323-3334 (2014)

Erklärung

Ich erkläre, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die vorgelegte Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht. Von den vorgesehenen Rechtsfolgen in § 25 Abs. 5 wurde Kenntnis genommen.

Ort, Tag, Monat Jahr

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	5
Bisherige Veröffentlichungen.....	6
Erklärung	7
Inhaltsverzeichnis.....	8
1 Einleitung und Zielsetzung	11
1.1 Einleitung.....	11
1.2 Zielsetzung.....	12
2 Theoretische Grundlagen.....	13
2.1 Wasserhygiene	13
2.2 Trinkwassergewinnung und Aufbereitung	14
2.3 Krankheitsausbrüche durch kontaminiertes Wasser	18
2.4 Hygienisch relevante Organismen.....	19
2.5 Qualitätskontrolle mit dem Indikatorprinzip	23
2.6 Nachweisverfahren	24
2.6.1 Kulturverfahren	24
2.6.2 Molekularbiologische Verfahren (PCR)	26
2.6.3 Durchflusszytometrie	42
2.6.4 Raman-Mikrospektroskopie	45
2.7 Hygiene-Online-Monitoring (EDIT Projekt)	45
3 Ergebnisse und Diskussion	48
3.1 Übersicht der Versuche	48
3.2 Methodenentwicklung: Lebend/tot-Differenzierung von Bakterien und Viren	49
3.2.1 Standardbedingungen zur Entwicklung der Lebend/tot-Differenzierung.....	50
3.2.2 Test der PMA-qPCR	51
3.2.3 Entwicklung der Long amplicon qPCR	53
3.2.4 Long amplicon PMA-qPCR	75
3.2.5 Etablierung der Durchflusszytometrie	106
3.2.6 Zusammenfassung und Fazit der Methodenentwicklung	114
3.3 Anwendung der Lebend/tot-Unterscheidung bei Desinfektionsverfahren	118
3.3.1 Thermische Desinfektion.....	119
3.3.2 Niederdruck-UV-Strahlung	132
3.3.3 Chlor	147

3.3.4	Ozon.....	156
3.3.5	Fazit Desinfektionsverfahren.....	163
3.4	Integration der Lebend/tot-Unterscheidung in ein Hygiene-online-Monitoring.....	166
3.4.1	Konzentrierung.....	167
3.4.2	Lab-on-Chip-Modul.....	171
3.4.3	Isothermale Amplifikation.....	176
3.4.4	Fazit	178
4	Zusammenfassung und Ausblick	179
5	Summary and outlook	183
6	Experimenteller Teil	187
6.1	Abkürzungsverzeichnis	187
6.2	Lister der Geräte und Materialien.....	189
6.2.1	Geräte.....	189
6.2.2	Kits und Reagenzien	189
6.2.3	Chemikalien	190
6.2.4	Sonstiges Verbrauchsmaterial.....	191
6.2.5	Medien	192
6.3	Basismethoden.....	194
6.3.1	Bakterielle Stammlösungen.....	194
6.3.2	Virale Stammlösungen.....	195
6.3.3	Hitzebehandelte Arbeitslösung („tot“)......	195
6.3.4	Nachweisverfahren: Kulturverfahren.....	196
6.3.5	Nachweisverfahren: Mikroskopische Gesamtzellzahl.....	198
6.3.6	Nachweisverfahren: Durchflusszytometrie.....	199
6.3.7	Nachweisverfahren: qPCR	202
6.3.8	PMA-Behandlung.....	207
6.3.9	Extraktion	207
6.4	Entwicklung der LA-qPCR	208
6.4.1	Primer-Entwicklung.....	208
6.4.2	In silico Spezifitätstest	208
6.4.3	Herstellen von Standards	209
6.4.4	Optimierung der qPCR.....	211
6.4.5	Zusätzliche Entwicklungsschritte zum Nachweis aller Bakterien (16S).....	213
6.4.6	Bestimmung des 16S-Genom-Äquivalent	213
6.5	Entwicklung der LA-PMA-qPCR	215

6.5.1	Testverfahren mit Organismen	215
6.5.2	phiX174- und MS2-Bakteriophagen	217
6.5.3	<i>E. coli</i>	218
6.5.4	<i>E. faecalis</i>	219
6.5.5	Modifikation der PMA-qPCR	219
6.5.6	Gesamtbakterienzahl (auf Basis von 16S-rDNA)	219
6.6	Etablierung der Durchflusszytometrie	220
6.7	Anwendung der Lebend/tot-Unterscheidung bei Desinfektionsverfahren	220
6.7.1	Thermische Desinfektion.....	220
6.7.2	Chlorung	221
6.7.3	Ozon.....	222
6.7.4	UV	223
6.7.5	Raman-Mikrospektroskopie	225
6.8	Integration ins Hygiene-online-Monitoring (EDIT Projekt)	226
6.8.1	Aufkonzentrierung.....	226
6.8.2	Lab-On-Chip-Modul	227
7	Anhang.....	228
7.1	Sequenzen der Standards.....	228
7.2	Erstellte Software	230
7.3	F- und t-Test	231
7.4	Literaturliste zur PMA-Behandlung	232
8	Literaturverzeichnis.....	236

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Trinkwasser muss so beschaffen sein, dass durch Wasser übertragene Krankheitserreger nicht in Konzentrationen vorliegen, „*die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen*“ (TrinkwV, 2001), § 5.1).

Die Sicherstellung dieses Qualitätsmerkmals setzt Methoden zum Nachweis hygienisch relevanter Mikroorganismen voraus. In der Trinkwassermikrobiologie werden in der Routine Kulturverfahren eingesetzt, die auf dem Wachstum der Organismen auf Nährmedien beruhen. Da sich einige hygienisch relevante Organismen nur langsam vermehren, kann es Tage bis Wochen dauern, bis ein Ergebnis vorliegt. Besonders Viren oder Bakterien im *viable but not culturable* Stadium (VBNC) lassen sich gar nicht oder nur mit großem Aufwand nachweisen. Eine zeitnahe Überwachung von Wasserressourcen oder Aufbereitungsverfahren ist somit mit Kulturverfahren nicht möglich.

Mit molekularbiologischen Methoden, wie der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), kann die DNA oder RNA von Organismen vervielfältigt und somit nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Kulturverfahren dauert der Nachweis nur wenige Stunden. Außerdem ist die Detektion der Bakterien und Viren möglich, die sich in Kulturverfahren nicht nachweisen lassen.

Die qPCR bietet den Vorteil eines sehr schnellen Nachweises, erlaubt aber derzeit – im Gegensatz zu Kulturverfahren – keine Beurteilung der Infektiosität. Tote Bakterien oder inaktive Viren können noch immer DNA oder RNA enthalten und werden somit in der qPCR nachgewiesen. Hygienisch sind nur die Organismen relevant, die eine Infektion auslösen können, also lebendig oder aktiv sind. Somit kann die qPCR nicht für Hygienebewertungen, Risikoabschätzungen oder den Nachweis einer Desinfektion eingesetzt werden, was den Anwendungsbereich stark einschränkt.

Der Einsatz der qPCR für hygienische Fragestellungen setzt eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen voraus. Eine solche Differenzierungsmöglichkeit sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht und geprüft werden. Seit einigen Jahren werden in der Molekularbiologie interkalierende Farbstoffe wie Propidiumiodid Monoazid (PMA) zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen eingesetzt. PMA dringt in beschädigte Organismen ein und lagert sich an die DNA oder RNA. Mit PMA markierte DNA oder RNA kann in der qPCR nicht mehr nachgewiesen werden – somit werden beschädigte Organismen von der qPCR ausgeschlossen.

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer PMA-basierten Lebend/tot-Unterscheidung für molekularbiologische (qPCR) Methoden zum Nachweis von hygienisch relevanten Organismen. Da nur wenige Studien die Wirkung von PMA bei Viren zeigen, sollte die Methode nicht nur für Bakterien, sondern auch für Viren entwickelt werden.

In der Literatur ist die qPCR mit PMA-Behandlung (PMA-qPCR) meist mit hitzebehandelten Bakterien beschrieben, was letztendlich nur eine geringe Relevanz für die Wasserpraxis hat. Die entwickelte Lebend/tot-Unterscheidung sollte in dieser Arbeit beim Einsatz gängiger Desinfektionsverfahren wie Chlorung, Ozonung und UV-Strahlung getestet werden. Im Fokus steht auch der Vergleich mit den standardisierten Kulturverfahren, dem aktuellen Gold-Standard in der Trinkwassermikrobiologie. Um einen hohen Bezug zur gängigen Praxis zu gewährleisten, sollten - im Gegensatz zu vielen bisherigen Studien - auch praxisrelevante Konzentrationen bei Desinfektionsverfahren untersucht werden. Konkret sollte überprüft werden, ob sich eine Desinfektion von Bakterien und Viren mit dem entwickelten molekularbiologischen Verfahren und der Lebend/tot-Unterscheidung erfassen lässt.

Die Durchflusszytometrie sollte als neue Methode am TZW Karlsruhe etabliert und als Referenzverfahren vergleichend in den Versuchen mit Bakterien eingesetzt werden. In der Durchflusszytometrie sollte ebenfalls eine Lebend/tot-Unterscheidung durchgeführt werden.

Im Rahmen des BMBF-Projektes EDIT wurde von mehreren Projektpartnern ein Anreicherungs- und Detektionssystem für das Monitoring von wasserbürtigen Pathogenen entwickelt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Integration der Lebend/tot-Unterscheidung in das *Hygiene-online Monitoring*.

Letztendlich lassen sich die Ziele dieser Arbeit mit *molekularbiologische Lebend/tot-Unterscheidung bei Viren und Bakterien bei Desinfektionsverfahren* zusammenfassen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Wasserhygiene

Trinkwasser wird aus natürlichen Ressourcen, beispielsweise aus Quell-, Oberflächen- oder Grundwasser gewonnen. Nach der Nutzung wird das Wasser in Kläranlagen gereinigt und gelangt wieder in die Umwelt, was den Wasserkreislauf schließt (Abbildung 1).

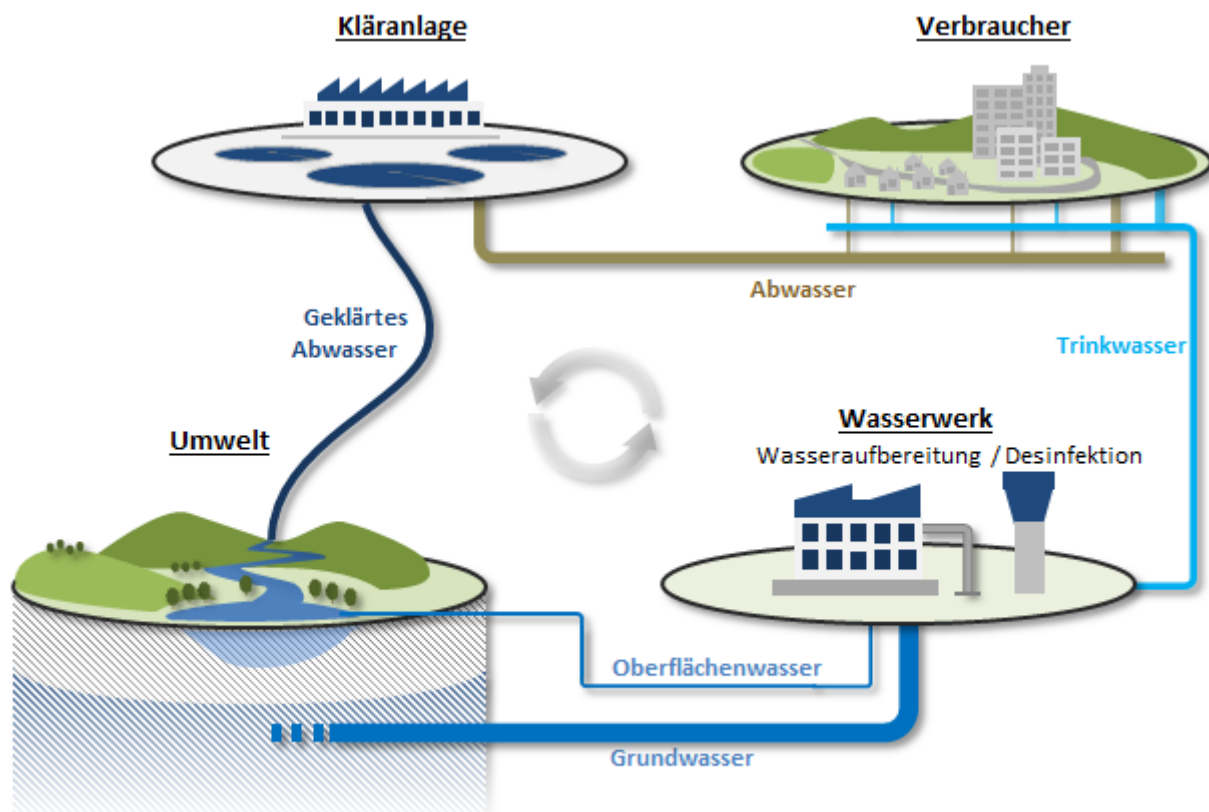


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Wasserkreislaufs.

Durch Krankheitsausbrüche gelangen menschliche Krankheitserreger – Viren, Bakterien und Parasiten – in hohen Konzentrationen in das häusliche Abwasser. So kann ein Liter Abwasser beispielsweise bis zu 10^8 Noroviren enthalten (Katayama et al., 2008; Rosa et al., 2010). In Kläranlagen wird die Menge der Viren bei der Abwasserbehandlung vor allem durch Adsorption (Seidel et al., 2016), sowie Flockung und Aufnahme durch Organismen (Kim and Unno, 1996) reduziert. Studien zeigen allerdings, dass lediglich 30 bis 99 % der Viren entfernt werden (Carducci et al., 2008; Fleischer et al., 2000; La Rosa et al., 2010; Nordgren et al., 2009; Ottoson et al., 2006a; Payment et al., 1986). Im Beispiel der 10^8 Noroviren verbleiben bei einer Reduktion von 99 % durch die Klärung 1.000.000 Viren pro Liter im geklärten Abwasser, welches in Flüsse geleitet wird. Dies erklärt, wieso sich in Oberflächenwassern in Deutschland (Hamza et al., 2009) und weltweit (Jones et al., 2017;

Lodder and de Roda Husman, 2005; Rutjes et al., 2009; Vecchia et al., 2012) ebenfalls humanpathogene Viren wie Entero-, Rota- und Noroviren nachweisen lassen.

Auch extreme Wetterereignisse können Auswirkungen auf die Konzentration humanpathogener Organismen in der Umwelt haben. An Substrat adsorbierte Viren können beispielsweise durch Überschwemmungen gelöst werden und so auch in Oberflächenwasser oder Grundwasser gelangen. Trockenrisse verringern die Adsorptionskapazität der Böden, was wiederum bei folgenden Niederschlagsereignissen für eine geringere natürliche Reduktion von Viren und Bakterien führt (Karthe, 2015). Gleichermaßen können Organismen von gedüngten Feldern gespült werden oder über geklärtes Abwasser im Überlauf in die Umwelt gelangen (Gotkowitz et al., 2016; Rajal et al., 2007; Seidel et al., 2016; Sidhu et al., 2012; Templar et al., 2016).

Eine Infektion kann durch gastrointestinale Aufnahme ausgelöst werden (WHO, 2011), wodurch kontaminiertes Oberflächenwasser ein Risiko für Badende darstellt (Schijven and de Roda Husman, 2006). Dabei genügt die Aufnahme einer sehr geringen Anzahl von Viren. Die genaue infektiöse Dosis wird in der Literatur diskutiert und liegt zwischen einem und 10.000 Virenpartikeln (Atmar et al., 2014; Kirby et al., 2015; Pond, 2005; Schmidt, 2015; Teunis et al., 2008). Andere bekannte Viren, beispielsweise Influenza, werden direkt zwischen Individuen übertragen; eine Verbreitung auf dem Wasserweg wurde noch nicht nachgewiesen (WHO, 2011).

Da Trinkwasser aus diesen potentiell kontaminierten Quellen gewonnen wird, werden Maßnahmen zur Gewährleistung der hygienischen Unbedenklichkeit getroffen. Im Rahmen der Wasseraufbereitung wird das Rohwasser in mehreren Stufen gereinigt, um zu gewährleisten, dass durch Wasser übertragene Krankheitserreger nicht in Konzentrationen vorliegen, „die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen“ (TrinkwV, 2001), § 5.1).

2.2 Trinkwassergewinnung und Aufbereitung

Um die Anforderungen an ein gesundheitlich unbedenkliches Trinkwasser zu erfüllen, werden verschiedene Verfahren eingesetzt, um potenziell belastete Wasserressourcen aufzubereiten. Dazu gehören die genaue Kenntnis der verwendeten Wasserressource und der Schutz des Einzugsgebietes. Grundwasser aus Tiefenbrunnen ist bereits durch die Passage des Wassers durch verschiedene Bodenschichten durch Filtration, Sedimentation, Sorption und Abbau gereinigt. Dieses Wasser bedarf teils lediglich einer Entfernung von Eisen (z.B. Karlsruher Trinkwasser). Durch Filtrationsbecken kann das Grundwasser beispielsweise durch Oberflächenwasser künstlich angereichert und die natürliche Reinigung genutzt werden (Balke and Zhu, 2008; Preuß and Schulte-Ebbert, 2001). Eine 2008

durchgeführte Umfrage von 954 DVGW-Mitgliedsunternehmen (Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches) ergab, dass Grundwasser in Deutschland von 83 % der Unternehmen als Quelle für Trinkwasser genutzt wird, 3 % davon aus angereichertem Grundwasser (Niehues, 2009). Doch nicht überall lassen die geologischen Gegebenheiten eine Nutzung von Grundwasser zu. Oberflächengewässer (10 % der Unternehmen), Uferfiltrat (7 %) und Stauseen werden ebenfalls als Ressource von Trinkwasser genutzt. Mit sinkender Intensität der natürlichen Reinigung steigen die mögliche Belastung und das mögliche Risiko (Abbildung 2).

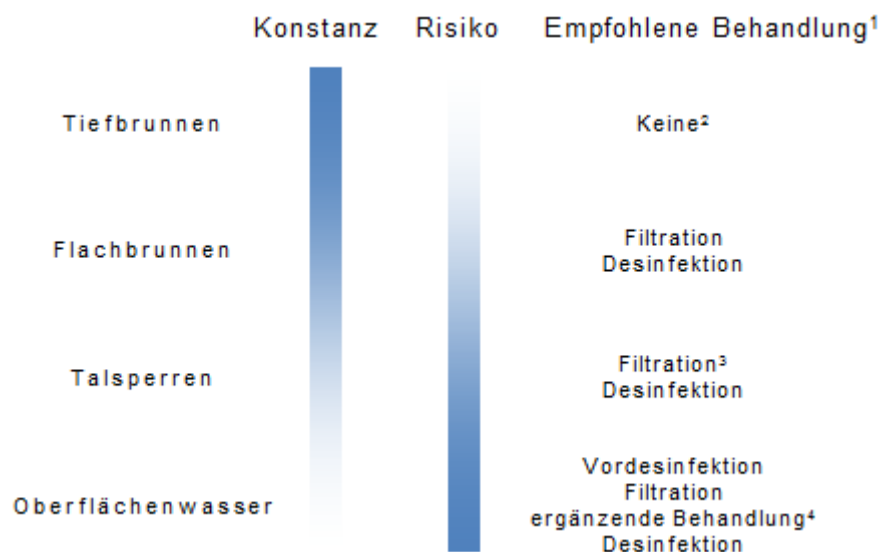


Abbildung 2: Variabilität und Risiko der für die Trinkwasser genutzten Wasserquellen. 1: (WHO, 2011), 2. Desinfektion bei Verunreinigungen, 3. Bei ungeschützten Talsperren, 4. Bei starker fäkaler Kontamination.

Um weiterhin die Unbedenklichkeit des Trinkwassers zu gewährleisten, werden zur Aufbereitung chemische Desinfektionsverfahren, Membranfiltration, granulare Filter oder UV-Strahlung sowie Flockung und Sedimentation eingesetzt. Etwa die Hälfte der Unternehmen setzten Desinfektionsverfahren ein, davon 42 % UV-Strahlung, 29 % Chlor oder Hypochlorit, 24 % Chlordioxid und 5 % Ozon (Niehues, 2009). Eine Desinfektion wird routinemäßig zur Reduktion einer möglichen Kontamination oder punktuell als Reaktion auf eine vorhandene Kontamination eingesetzt.

Ultraviolettstrahlung ist eine elektromagnetische Strahlung, die wirksam gegen Bakterien, Viren und Protozoen eingesetzt werden kann (Hijnen et al., 2006). Die Strahlung wird in der Wasserpraxis vor allem von Quecksilberdampflampen erzeugt. Die emittierte Wellenlänge des durch Elektronen angeregten Quecksilberdampfes ist vom Druck in der Lampe abhängig. Bei Niederdrucklampen (ca. 0,8 Pa) liegt 90 % der abgegebenen Strahlung bei 253,7 nm. Durch das nahe Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm kann somit das

genetische Material von Organismen geschädigt und diese so abgetötet werden. Mitteldruck-Strahler emittieren bei einer breiteren Wellenlänge mit mehreren Emissionspeaks zwischen 240 und 800 nm. Da nur ein enger Wellenlängenbereich von 240 bis 290 nm für die Desinfektion wirksam ist, geht ein Teil der eingesetzten Energie (u.a. in Form von sichtbarem Licht) verloren. Dennoch werden im Trinkwasserbereich Mitteldruckstrahler eingesetzt, da die Leistung der Strahler besser angepasst und der erhöhte Energieverbrauch kompensiert werden kann (Eggers, 2014).

Eine **thermische Desinfektion** kann im Trinkwasserbereich in Warmwasserleitungen gegen Legionellen eingesetzt werden (Mouchtouri et al., 2007). Hausinstallationen sollen bei einem Legionellenbefall auf mindestens 70 °C geheizt werden (DVGW-Arbeitsblatt W 551). Thermische Behandlungsarten sind sonst vor allem aus der Lebensmittelindustrie (Pasteurisieren) oder zur Sterilisation in der Labor- und Medizintechnik bekannt. Durch Hitze werden zelluläre Stoffwechselwege gestört, da Proteine zerstört werden. Außerdem beschädigt Hitze die bakterielle Zellmembran und Hülle, sowie bei höheren Temperaturen auch die Nukleinsäure (Russell, 2003).

Chlor wird als Desinfektionsmittel im Bade- und Trinkwasserbereich, so wie für die Flächendesinfektion eingesetzt. Eine Chlorung kann als Reaktion auf eine Belastung eines Trinkwassernetzes erfolgen (DVGW-Arbeitsblatt W 557) oder zum Schutz der mikrobiologischen Qualität bei langen Rohrleitungen als letzter Schritt einer Trinkwasserbehandlung dienen. Chlor, Chlordioxid und Hypochlorit werden bei etwa der Hälfte der Wasserversorger als Desinfektionsmittel eingesetzt (Niehues, 2009). Von den verschiedenen zur Desinfektion eingesetzten chlorhaltigen Substanzen hat reines Chlor (Cl_2) das höchste Oxidationspotential. Dies führt jedoch auch dazu, dass Chlor mit organischen Bestandteilen im Wasser - beispielsweise Huminsäuren - reagiert und somit verbraucht wird. Für eine Desinfektionswirkung muss diese sogenannte Chlorzehrung erst mit einer höheren Dosis kompensiert werden. Durch die Reaktionen mit organischen Stoffen entstehen Reaktionsnebenprodukte wie Trihalogenmethane (Chloroform, Bromdichlormethan, Dichlorbrommethan und Bromoform), deren Konzentration im Trinkwasser 0,05 mg/L nicht überschreiten darf (TrinkwV, 2001). Alternativ zu Chlor kann beispielsweise Chlordioxid oder Natriumhypochlorit für eine Desinfektion eingesetzt werden. Durch das geringere Redoxpotential ist die Chlorzehrung und die Bildung von Nebenprodukten geringer (Amy, Bull, et al., 2000). Chlor reagiert in Wasser bei neutralem pH zu Salzsäure und hypochloriger Säure (HOCl). Aus letzterer bilden sich Oxonium- und Hypochlorit-Ionen; wobei hypochlorige Säure die größte Desinfektionswirkung hat. Chlor beeinträchtigt die bakterielle Zellmembran und kann durch Diffusion in Zellen beispielsweise Transportproteine zerstören und somit Stoffwechselwege unterbrechen, was letztendlich zur Inaktivierung der Bakterien führt

(Venkobachar et al., 1977; Virto et al., 2005). Bakterien reagieren je nach Zellwandaufbau unterschiedlich auf Chlor (Huang et al., 1997).

Ozon wirkt wie Chlor als oxidatives Desinfektionsmittel und wird sowohl im Trinkwasser- als auch im Badewasserbereich eingesetzt. Zur Applikation wird gasförmiges Ozon aus Sauerstoff in einem Generator erzeugt und in Wasser gelöst (Ozonreaktor). Ozon ist sehr instabil, reagiert schnell und hat deswegen keine Langzeitwirkung wie Chlor. Die Desinfektionswirkung von Ozon basiert auf einer Beschädigung der Zellwand von Bakterien und einer folgenden Lyse (Diao et al., 2004).

Ozon reagiert mit der im Wasser gelösten Organik und bestimmten anorganischen Stoffen – deswegen wird eine Ozonzugabe im Rahmen einer Trinkwasseraufbereitung meist erst nach einer ersten Reinigungsstufe eingesetzt. Als bedeutendes Nebenprodukt ist hier die Bildung von Bromat aus bromhaltigem Wasser zu nennen (Amy, Bull, et al., 2000). Die karzinogene Wirkung von Bromat wurde im Tierversuch bei Ratten, Mäusen und Goldhamstern nachgewiesen (Roßkamp and Dieter, 1999).

In der Wasserversorgung kommen die genannten Desinfektionsverfahren auch in Kombination vor. Das im Überlinger See (Bodensee) gewonnene Wasser wird beispielsweise mittels Mikrofilter, Ozon und Schnellsandfilter aufbereitet. Abschließend erfolgt eine Chlorung, um die Qualität während des Transportes durch das Rohrnetz sicherzustellen (Zweckverband Bodensee-Wasserversorgung, 2017). Berliner und Hamburger Trinkwasser stammt aus Grundwasser, das über Flockung und Sandfiltration gereinigt wird (Berliner Wasserbetriebe, 2017; Hamburg Wasser, 2017).

Ein wichtiger Punkt der Sicherheit des Trinkwassers ist die Gewährleistung und Überwachung der Funktionen aller technischen Maßnahmen. Ebenfalls wichtig ist dies bei Hausinstallationen. Diese Konzepte (Sicherung und Kenntnis des Einzugsgebietes, Aufbereitung und Desinfektion, Sicherung des Leitungssystems und der Hausinstallation) werden zusammenfassend als Multibarrierenprinzip bezeichnet (WHO, 2011).

2.3 Krankheitsausbrüche durch kontaminiertes Wasser

Durch eine Kontamination von Trinkwasser wurde im Jahr 2003 in Torgau-Oschatz, Deutschland, in 88 Fällen eine Erkrankung mit Noroviren ausgelöst. Durch den zu geringen Druck einer Ersatzwasserleitung wurde kontaminiertes Wasser einer privat installierten Zisterne in das Wassernetz gedrückt (Merbecks et al., 2004).

Eine defekte Desinfektionsanlage und Kontamination des Oberflächenwassers durch die einsetzende Schneeschmelze verursachten 2009 in einem Skigebiet im Allgäu, Deutschland, 483 Fälle von Infektionen mit Noroviren (Robert Koch-Institut, 2012a). Diese und auch weitere in Tabelle 1 aufgeführte Krankheitsausbrüche waren ausnahmslos durch die fehlerhafte oder unzureichende Funktion der Aufbereitung oder der technischen Gegebenheiten bedingt. Dies zeigt, wie wichtig eine Überwachung der Trinkwasserqualität und die Einhaltung der Regelwerke (Multibarrierenprinzip) sind.

Tabelle 1: Liste von Trinkwasser-assoziierten Krankheitsausbrüchen durch Viren.

Quelle	Viren	Wasser	Studienort	Grund
(Borchardt et al., 2012)	Adenovirus Enterovirus Norovirus Rotavirus	Trinkwasser (Grundwasser)	Wisconsin (USA) 2006	keine Desinfektion
(Hazam et al., 2010)	Hepatitis E	Trinkwasser	Delhi 2000	Kontamination mit Abwasser
(Hewitt et al., 2007)	Norovirus	Trinkwasser (Quellwasser, UV + Filtration)	Neuseeland 07.2006	Kontamination mit Abwasser
(Hoebe et al., 2004)	Norovirus	Freizeitwasser Chlorung	Holland 2002	Wiederbenutzung des Wassers, Kontamination des Reservoirs, unzureichende Chlorung
(Nygård et al., 2004)	Norovirus (vermutet)	Trinkwasser (Brunnen)	Norwegen 2002	Kontamination durch Beschädigung und auffälliges System
(Riera-Montes et al., 2011)	Norovirus	Grundwasser, UV desinfiziert, Schnellsandfiltration + Wasserreservetank.	Schweden 2009	Kontamination des Reservetanks, Überlauf durch Schneeschmelze
(Steyer et al., 2011)	Norovirus Astrovirus Hepatitis A	Unbehandeltes Grundwasser und Leitungswasser	Slovenien 2008	Keine Desinfektion
(Zhou et al., 2016)	Novorius	Trinkwasser	China 2014	Zusammenlegung und Trink- und Abwasserleitung / Wassertanks
(Arankalle et al., 2006)	Hepatitis A	Brunnenwasser	Indien 2004	Kontamination mit Kläranlagenüberlauf
(Rab et al., 1997)	Hepatitis E	Trinkwasser	Pakistan 1993	Schnell- statt Langsandsandfiltration
(Merbecks et al., 2004)	Norovirus	Trinkwasser	Deutschland 2003	Rücklauf aus kontaminierter Zisterne durch zu geringen Druck einer Ersatzwasserleitung
(Robert Koch-Institut, 2012a)	Norovirus GI und GII	Trinkwasser aus Quelle in Geröllfeld (Oberflächennahes Wasser)	Deutschland 2009	Defekte UV-Desinfektion, Kontamination des Wassers

2.4 Hygienisch relevante Organismen

Nach § 5 der Trinkwasserverordnung dürfen im Trinkwasser „Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nummer 1 des Infektionsschutzgesetzes, die durch Wasser übertragen werden können, nicht in Konzentrationen enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen“ (TrinkwV, 2001). Dies schließt Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten mit ein (§ 2, IfSG, 2000).

Bakterien

Escherichia coli (*E. coli*) kommt im Darm von warmblütigen Tieren inklusive dem Menschen vor. *E. coli* wird als Indikator für fäkale Kontaminationen in Trink- und Rohwasser sowie bei Lebensmitteln eingesetzt. In 100 mL Trinkwasser darf *E. coli* nicht nachweisbar sein (Anlage 1, TrinkwV 2001). Neben den nicht gesundheitsschädlichen Arten gibt es auch pathogene Formen von *E. coli*, die durch die Bildung von Zellgiften (z.B. Shigatoxin-produzierende *E. coli*, STEC) Durchfallerkrankungen auslösen können. Diese enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) sind unter anderem durch den Ausbruch des Stammes O104:H4 in Norddeutschland 2011 durch kontaminiertes Gemüse bekannt (Robert Koch-Institut, 2011).

Enterokokken kommen wie *E. coli* im Darm vor und können somit als Indikator für fäkale Verunreinigungen eingesetzt werden. Im Vergleich mit *E. coli* ist die Konzentration von Enterokokken meist eine Log-Stufe niedriger, allerdings sind sie resistenter gegenüber Chlor und lassen sich über einen längeren Zeitraum nachweisen (Byappanahalli et al., 2012; WHO, 2011). So lässt sich durch einen Nachweis von Enterokokken auf fäkale Einträge schließen, die eine längere Zeitspanne zurück liegen. Enterokokken dürfen in 100 mL Trinkwasser nicht nachweisbar sein (Anlage 1, TrinkwV 2001). Enterokokken spielen ebenfalls eine Rolle bei Infektionen in Krankenhäusern – auch mit Mehrfach-Resistenzen gegen Antibiotika (Klare et al., 2012). Die wichtigsten Vertreter der Gattung Enterokokken sind die Bakterienarten *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) und *Enterococcus faecium*.

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) kommt vor allem in Biofilmen, feuchten Oberflächen sowie in gering gechlorten Schwimmbädern, Pools und Oberflächengewässern vor. Die direkte Konzentration im Trinkwasser ist dagegen sehr gering, allerdings kann sich das Bakterium in Rohrleitungen, Wasserzählern und Armaturen ansiedeln und ist dort nur schwer – z.B. nur durch langanhaltende Chlorung - zu entfernen (Wingender et al., 2009). In der Trinkwasserverordnung ist ein Grenzwert für *P. aeruginosa* lediglich für abgefülltes Trinkwasser aufgeführt (Keine in 250 mL). Die Fähigkeit, bei geringem Nährstoffangebot wachsen zu können und mögliche multiple Resistenz gegen Antibiotika macht *P. aeruginosa* zu einem der wichtigsten Krankenhauskeime. Die Bakterien können für Lungenentzündungen, Meningitis und Infektionen von Wunden sowie des Urinal- und

Gastrointestinaltraktes verantwortlich sein (Mena and Gerba, 2009).

Viren

Viren können sich im Gegensatz zu Bakterien nicht selbstständig vermehren. Neben direkter Übertragung von Mensch zu Mensch oder über kontaminierte Oberflächen können einige Viren auch über den Wasserpfad übertragen werden. Für viele virale Erkrankungen haben Impfstoffe nur begrenzte Wirksamkeit (z.B. 3 Jahre bei Rotaviren) oder sind gar nicht verfügbar (Robert Koch-Institut, 2012b).

Adenoviren können Fieber, Augen- und Lungenentzündungen hervorrufen. Sie sind für 3 bis 9 % der Magen-Darm-Entzündungen bei Kindern verantwortlich. Von Adenoviren sind über 40 Typen bekannt, die teilweise unterschiedliche Krankheiten hervorrufen. Die Viren werden fäkal-oral über Wasser, Lebensmittel oder kontaminierte Oberflächen verbreitet und kommen das ganze Jahr über vor. Es gibt keine spezifische Therapie; eine Immunisierung ist nicht möglich (Pond, 2005; Robert Koch-Institut, 2003).

Enteroviren sind eine diverse Gruppe von Viren, die für Kinderlähmung (Polioviren), Erkrankungen des Herzmuskels, sowie die Hand-, Fuß- und Mundkrankheit (Coxsackieviren) und Hirnhautentzündungen (Echoviren) verantwortlich sind. Erkältungen und Fieber sind mildere Symptome einer Infektion (Kiehl, 2009). Eine Übertragung erfolgt fäkal-oral, auch über kontaminiertes Wasser. Die Viren treten im Abwasser meist in geringerer Konzentration als Indikatorbakterien auf (Wyn-Jones and Sellwood, 2001).

Noroviren verursachen Brechdurchfall und kommen vermehrt in den Wintermonaten vor (Bernard et al., 2013; Höhne and Askar, 2014). Infektionen sind besonders für ältere oder immungeschwächte Menschen in Krankenhäusern und Altersheimen gefährlich. Sie sind für 50 % der nicht-bakteriell bedingten Gastroenteritiden verantwortlich. Die Viren werden fäkal-oral übertragen. 2012 kam es in Deutschland zu einem großen Ausbruch durch mit Fäkalien kontaminierte Tiefkühlerdbeeren mit 10950 Fällen (Robert Koch-Institut, 2012a).

Bakteriophagen phiX174 und MS2

Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien infizieren und somit für den Menschen ungefährlich sind. Die Bakteriophagen phiX174 und MS2 infizieren *E. coli* bzw. coliforme Bakterien und werden somit auch Coliphagen genannt. Phagen werden nach dem Infektionsweg über die bakterielle Zelle (Soma) oder Zellfortsätze (F-Pilus) in somatische und F-spezifische Phagen unterteilt.

Phagen können als Modelle für humanpathogene Viren eingesetzt werden, da sie sich vergleichbar bei Desinfektionsverfahren verhalten, leichter nachzuweisen sind und meist in

höheren Konzentrationen vorkommen. Bei der Bewertung von Gewässern lässt sich anhand der Anzahl der Bakteriophagen allerdings keine quantitative Aussage über die Zahl humanpathogener Viren treffen. Lassen sich keine Phagen detektieren, so ist dies aber ein Zeichen dafür, dass keine humanpathogenen Viren im Wasser vorhanden sind. Dies liegt vor allem daran, dass Phagen meist in einer höheren Konzentration im Wasser zu finden sind (Grabow, 2004).

Bakteriophagen können eine Kontamination eines Oberflächengewässers mit Abwasser über einen längeren Zeitraum anzeigen als Indikatorbakterien (Lucena et al., 2003).

Einige Studien zeigen, dass Phagen als Indikator für humanpathogene Viren in der Behandlung von Kläranlagenabwasser (Martin-Diaz et al., 2016) und Oberflächenwasser (Jones et al., 2017; Rezaeinejad et al., 2014) eingesetzt werden können. In einer Studie von Guzmán et al. (2007) werden somatische Coliphagen als Indikatoren für humanpathogene Viren im als Dünger eingesetzten Klärschlamm genutzt.

Ihr breites Wirtsspektrum macht den Einsatz als Indikator für humanpathogene Viren jedoch schwer. F-spezifische Bakteriophagen dagegen vermehren sich in der Umwelt nur geringfügig und sind somit besser geeignet. Allerdings zeigen sich F-spezifische Phagen empfindlicher gegenüber Desinfektionsmittel (Sidhu and Toze, 2009).

Da Phagen ungefährlich sind, bieten sie sich in Laborversuchen als Ersatz für humanpathogene Viren an. So wurde beispielsweise die Verteilung von Viren in Handtrocknern im Sanitärbereich mit Phagen untersucht (Kimmitt and Redway, 2016). In dieser Arbeit wurden ebenfalls Bakteriophagen als Surrogat eingesetzt.

Grundsätzlicher Aufbau von Bakterien und Viren

Bakterien und Viren haben einen komplexen Aufbau und können aus vielen Bestandteilen mit unterschiedlichen Funktionen bestehen. Für die Thematik dieser Arbeit sind primär die Hülle und die Nukleinsäure dieser Organismen relevant. Bakterien werden nach dem Zellwandaufbau in Gram-negativ und Gram-positiv eingeteilt (Abbildung 3).

Gram-negative Bakterien besitzen eine äußere Membran, die als Diffusionsbarriere fungiert. Geladene oder große Moleküle werden durch diese Membran zurückgehalten und können nicht in das Bakterium eindringen. Gram-positive Bakterien haben diese Membran nicht.

Unter der Membran befindet sich ein aus Zucker und Aminosäuren bestehendes Gerüst, das die Zellmembran des Bakteriums umgibt. Bei Gram-positiven Bakterien ist diese

Peptidoglycan-Schicht größer ausgelegt als bei Gram-negativen Bakterien (Berg et al., 2011; Silhavy et al., 2010). Viele Viren bestehen prinzipiell nur aus einer Proteinhülle, dem Kapsid, welches die Nukleinsäure umgibt. Das Kapsid besteht aus mehreren gleichen Untereinheiten, den Kapsomeren. Diese können in einer einfachen geometrischen Figur, beispielsweise einem Ikosaeder angeordnet sein.

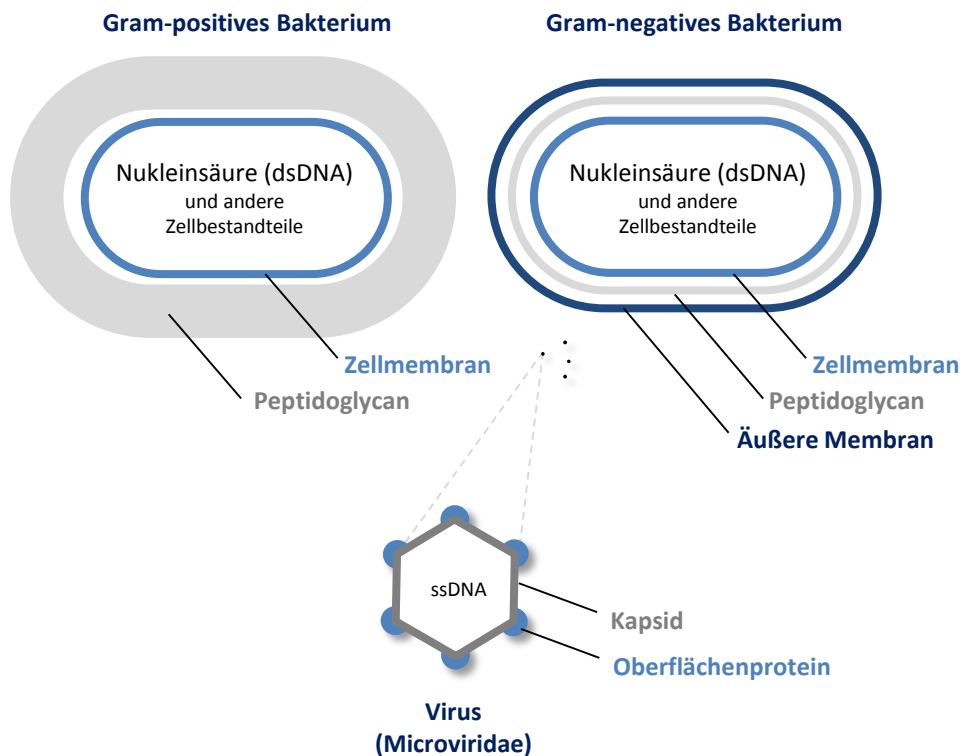


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Hülle und der Nukleinsäure von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie einer Virengruppe.

2.5 Qualitätskontrolle mit dem Indikatorprinzip

Die mikrobiologischen Anforderungen sehen vor, dass weder *E. coli* noch Enterokokken in 100 mL Trinkwasser nachweisbar sind (TrinkwV § 5.2 Anlage 1). Diese Bakterien werden sowohl vom Menschen als auch anderen Tieren ausgeschieden und gelangen somit in das Abwasser. Lassen sich *E. coli* Bakterien im Wasser oder Trinkwasser nachweisen, so ist dies ein Indiz für eine Kontamination mit Abwasser und einer möglichen Belastung mit Krankheitserregern. Somit lässt sich durch den Nachweis von Darmbakterien auch auf das mögliche Vorhandensein von Krankheitserregern schließen. Dieses Indikatorsystem wird bereits seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt.

Viele Untersuchungen zeigen allerdings, dass das Vorhandensein der genannten Indikatoren nicht immer mit der Präsenz von pathogenen Viren korreliert. In den genannten Studien zur Viruslast in Kläranlagen wurden stets unterschiedliche Reduktionen von Indikatorbakterien und pathogenen Viren gemessen (Carducci et al., 2008; La Rosa et al., 2010; Nordgren et al., 2009; Ottoson et al., 2006a; Payment et al., 1986). In Oberflächengewässern konnten ebenfalls pathogene Viren ohne Korrelation zu Indikatororganismen nachgewiesen werden (Hörman et al., 2004; Sidhu et al., 2012). Erst kürzlich kam es in Spanien zu einer Infektion mit Noroviren aus Flaschenwasser (Blanco et al., 2017). In der Wasseraufbereitung reagieren verschiedene Arten von Bakterien und Viren unterschiedlich stark auf Desinfektionsverfahren (WHO, 2011). Ob sich Bakteriophagen oder bestimmte Viren als Indikatoren eignen, ist nicht ausreichend belegt – unter anderem auch, weil es an entsprechenden Nachweisverfahren mangelt (Jones et al., 2017).

Die Möglichkeiten des nicht korrelierenden Auftretens von Indikatororganismen und Pathogenen legt den Wunsch nahe, ein erweitertes Spektrum an Organismen (und nicht nur die Indikatoren) mit möglichst kurzer zeitlicher Verzögerung nachzuweisen.

2.6 Nachweisverfahren

Trink- und Rohwasser wird stichprobenartig untersucht. In der Trinkwasserverordnung ist die Mindesthäufigkeit der Untersuchungen für Trinkwasser pro Jahr festgelegt (§14 und Anlage 4, TrinkwV 2001). Wasserbürtige Organismen können mit verschiedenen Verfahren nachgewiesen werden. In der gängigen Wasserpraxis sind dies, wie in der Trinkwasserverordnung vorgeschrieben, ausschließlich Kulturverfahren.

In dieser Arbeit wurden drei grundsätzliche Methoden eingesetzt:

Kulturverfahren	Nachweis von Organismen, die sich auf einem Nährmedium vermehren (Bakterien) oder Wirtszellen infizieren können (Viren). Nur aktive Organismen werden erfasst.
Molekularbiologische Verfahren (PCR, qPCR)	Bakterien und Viren werden über ihre DNA oder RNA nachgewiesen.
Durchflusszytometrie	Bakterien werden angefärbt und mit einem Laser erfasst und quantifiziert. Ein direkter Nachweis von Viren existiert bisher noch nicht.

2.6.1 Kulturverfahren

Bakterien werden auf oder in einem Nährmedium inkubiert und das Wachstum entweder direkt über sichtbare Kolonien oder über Stoffwechselprodukte nachgewiesen. Im klassischen Plattenverfahren wird eine Wasserprobe durch einen Filter mit einer nominellen Porengröße von 0,45 Mikrometern gesaugt und der Filter auf ein Nährmedium aufgetragen (Abbildung 4, links). Nach Inkubation des Nährmediums sind bei einem positiven Befund bakterielle Kolonien makroskopisch sichtbar und können gezählt werden. Dabei geht man davon aus, dass jede Kolonie aus einem Bakterium entstanden ist. Das Messergebnis wird deswegen in Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) angegeben. Durch den Einsatz spezieller Zusätze kann ein spezifischer Nachweis eines Bakteriums erfolgen. So lässt beispielsweise der Zusatz CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien unter UV-Licht fluoreszieren (Abbildung 4, mittig) und hemmt gleichzeitig das Wachstum anderer Bakterien (Lowbury and Collins, 1955). Neben spezifischen Zusätzen kann allgemeines Bakterienwachstum z.B. durch den blauen Farbstoff *Resazurin* dargestellt werden (Abbildung 4, rechts). Dieser wird von aktiven Zellen durch die Übertragung von Elektronen zum roten Resorufin reduziert (Xu et al., 2015).

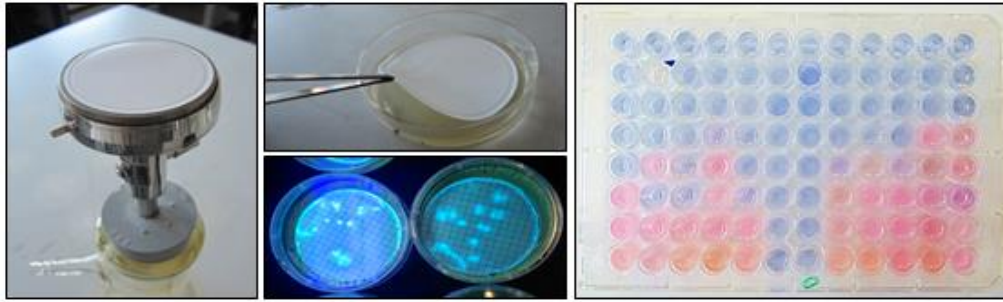


Abbildung 4: Plattenverfahren zum Nachweis von *P. aeruginosa* auf Selektivagar (links, mittig). MPN Verfahren mit Minimalmedium (R2A) und Zellaktivitätsfärbung *PrestoBlue*® (rechts).

Für den Nachweis von *E. coli*, sowie für viele andere, hygienisch relevante Bakterien, sind ISO / DIN-Normen verfügbar (vgl. Tabelle 2). Das Indikatorbakterium *E. coli* kann nach 18 Stunden im Kulturverfahren nachgewiesen werden. Nicht alle Bakterien vermehren sich so schnell wie *E. coli* – pathogene Legionellen benötigen beispielsweise mehrere Tage bis Wochen, um auf Kulturmedien zu wachsen.

Neben der teilweise langen Zeit bis ein Ergebnis vorliegt, haben Kulturverfahren den Nachteil, nur die Organismen erfassen zu können, die sich auf Nährmedien vermehren. In Laborversuchen konnte gezeigt werden, dass sich einige lebende Bakterien unter bestimmten Umständen nicht auf Kulturmedien vermehren. Dieser Zustand wird lebend, aber nicht kultivierbar bzw. *viable but not culturable* (VBNC) genannt (Oliver, 2010; Wingender and Flemming, 2011). Bakterien im VBNC-Stadium können mit den standardisierten Kulturverfahren nicht nachgewiesen werden, aber immer noch Toxine bilden (Liu et al., 2017) oder sich unter bestimmten Umständen vermehren (Ramamurthy et al., 2014).

Viren werden im Kulturverfahren nachgewiesen, indem sie Wirtszellen infizieren. Dazu wird eine Bakterienkultur (Phagen) oder eine Linie eukaryotischer Zellen (Humanpathogene Viren) mit einer Probe infiziert. Werden die Zellen durch die Viren zerstört, ist dies durch sichtbare Lücken, so genannten Plaques, in der Kultur der Wirtszellen sichtbar. Durch die Zucht der Wirtszellen ist der Nachweis von Viren mit Kulturverfahren aufwändig und zeitintensiv. So dauert der Nachweis von Entero- oder Adenoviren im Kulturverfahren bis zu zwei Wochen (vgl. Tabelle 2). Sind keine Wirtszellen verfügbar, können die Viren nicht nachgewiesen werden.

Im Falle von Kontaminationen oder bei Extremereignissen ist es wünschenswert, möglichst zeitnah Messwerte über hygienisch relevante Bakterien und Viren zu erhalten, um entsprechend mit Gegenmaßnahmen (Abkochgebote, Spülungen, Abschalten von Brunnen etc.) reagieren zu können. Dies ist mit den klassischen Kulturverfahren jedoch nicht möglich.

2.6.2 Molekularbiologische Verfahren (PCR)

Mit molekularbiologischen Verfahren kann die Nukleinsäure eines Organismus in wenigen Stunden nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 2). In der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wird die DNA vervielfältigt und kann durch die Einlagerung von fluoreszenten Farbstoffen erfasst werden. Die qPCR bietet somit im Vergleich zu den klassischen Kulturverfahren einen erheblichen Zeitvorteil.

Tabelle 2: Zeitaufwand für Kulturverfahren und qPCR einiger ausgewählter Organismen.

Organismus	Kulturverfahren		PCR
<i>E. coli</i>	18-22 Stunden	DIN EN ISO 9308	6-8 Stunden Kein normiertes Verfahren
Legionella	9-14 Tage	DIN EN ISO 11731	
<i>Campylobacter sp.</i>	4-5 Tage	DIN EN ISO 10272	
<i>P. aeruginosa</i>	2-9 Tage	DIN EN ISO 16266	
Adenovirus	14 Tage	WHO-Methode	
Norovirus	4 Tage	Kein Kulturverfahren Verfügbar. Kultur/PCR Kombiverfahren nach Jones et al. (2015)	8-10 Stunden Kein normiertes Verfahren
Enterovirus	3-14 Tage	Verfahren nach Terletskaia-Ladwig et al. (2008)	
Rotavirus	3-7 Tage	Verfahren nach Arnold et al. (2009)	

Nachweis von Nukleinsäuren

Alle bisher bekannten Lebewesen enthalten Nukleinsäure in Form von DNA (Desoxyribonukleinsäure) und können somit mit einer PCR nachgewiesen werden. DNA besteht aus zwei komplementären Doppelsträngen, in denen genetische Informationen durch verschiedene Nukleotide kodiert sind (organische Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin). Viren, die meist nicht zu lebenden Organismen gezählt werden, können statt DNA auch RNA (Ribonukleinsäure) enthalten. RNA kann durch enzymatische Prozesse in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, was einen Nachweis mit der PCR ermöglicht.

Ablauf einer qPCR

In der zyklisch ablaufenden qPCR wird durch die Schritte Denaturierung (1), Primer Annealing (2) und Elongation (3) ein bestimmter Teil eines DNA-Stranges verdoppelt (Abbildung 5).

1. Durch hohe Temperaturen (95 °C) lösen sich die Wasserstoffbrücken im DNA-Doppelstrang und es entstehen zwei Einzelstränge.

2. Zwei Primer (kurze DNA-Fragmente) lagern sich spezifisch an die Einzelstränge an und definieren den Start und Endpunkt des zu vervielfältigenden DNA-Stückes, das so genannte Amplifikat.
3. Bei 72 °C verlängert das Enzym DNA-Polymerase die Primer und es entsteht jeweils ein Doppelstrang. In diesen Doppelstrang können sich fluoreszente Farbstoffe einlagern – die Gesamtfluoreszenz der Probe steigt.

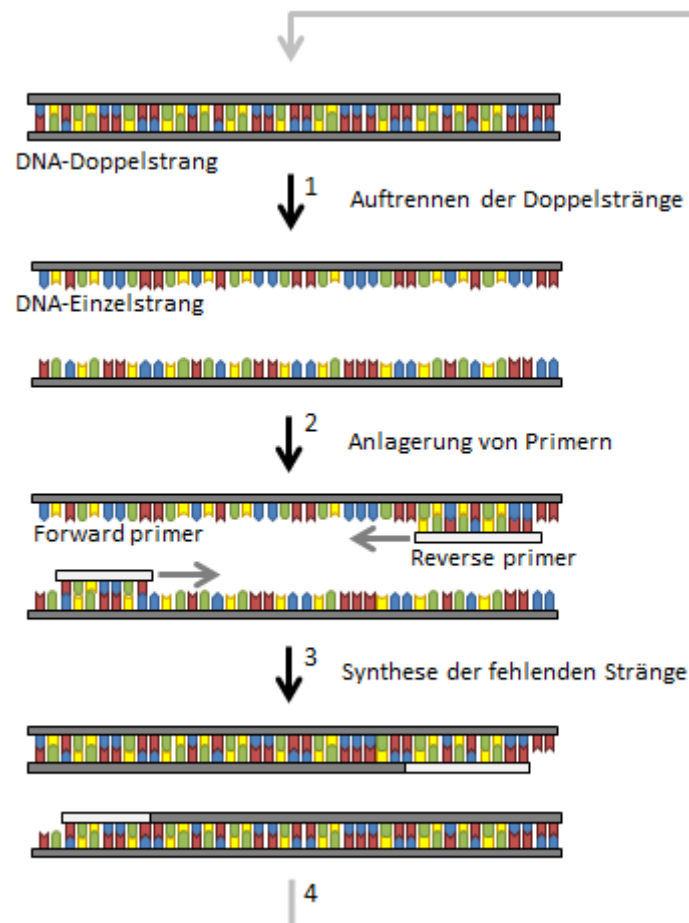


Abbildung 5: Prinzip und einzelne Phasen eines Zyklus der PCR. Komplementäre Basen der Nucleotide wurden farblich dargestellt.

Da in jedem Zyklus eine Verdopplung stattfindet, steigt die Menge der DNA-Moleküle exponentiell an. Gleichzeitig steigt die Menge an eingelagerten, fluoreszenten Farbstoffen (s. Abbildung 7, links). Wichtig für die Bestimmung der Proben in der qPCR ist der Quantifizierungs-Zyklus (Cq) – der Zyklus bei dem die Fluoreszenz der Probe die Hintergrundfluoreszenz übersteigt (Schwellenwert, *threshold*). Für jede eingesetzte Probe kann in der qPCR somit ein Cq-Wert angegeben werden, der sich mit sinkender Ausgangskonzentration erhöht.

Quantifizierung

Zur absoluten Quantifizierung werden in der qPCR Standards mit bekannter Konzentration eingesetzt. Als Basis eines Standards kann entweder ein positives PCR-Produkt (DNA-Standard) oder die Kultur des nachzuweisenden Organismus (Genomischer Standard) dienen. Zur Herstellung eines DNA-Standards (Abbildung 6, links) wird ein entsprechendes PCR-Produkt in einen bakteriellen Vektor kloniert. Dieser wird durch Transformation in ein Bakterium eingeschleust und anschließend über Kultivierung des Bakteriums vervielfältigt. Nach Extraktion und Aufreinigung der Vektoren wird deren Konzentration mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt und auf eine bestimmte DNA-Kopienzahl eingestellt. Ein genomischer Standard (Abbildung 6, rechts) wird durch Extraktion der genomischen Nukleinsäure aus einer Laborkultur hergestellt. Die Kultur wird zuvor mit einem Referenzverfahren (z.B. mikroskopische Gesamtzellzahl) quantifiziert. Für die Extraktion der Proben wird das gleiche Extraktionsverfahren eingesetzt. Dies hat den Vorteil, eventuelle Verluste an Nukleinsäure während der Probenbearbeitung mit in die Kalibrierung einzubeziehen. Für die Vermessung des Standards müssen jedoch Verfahren zur Quantifizierung der Organismen verfügbar sein.

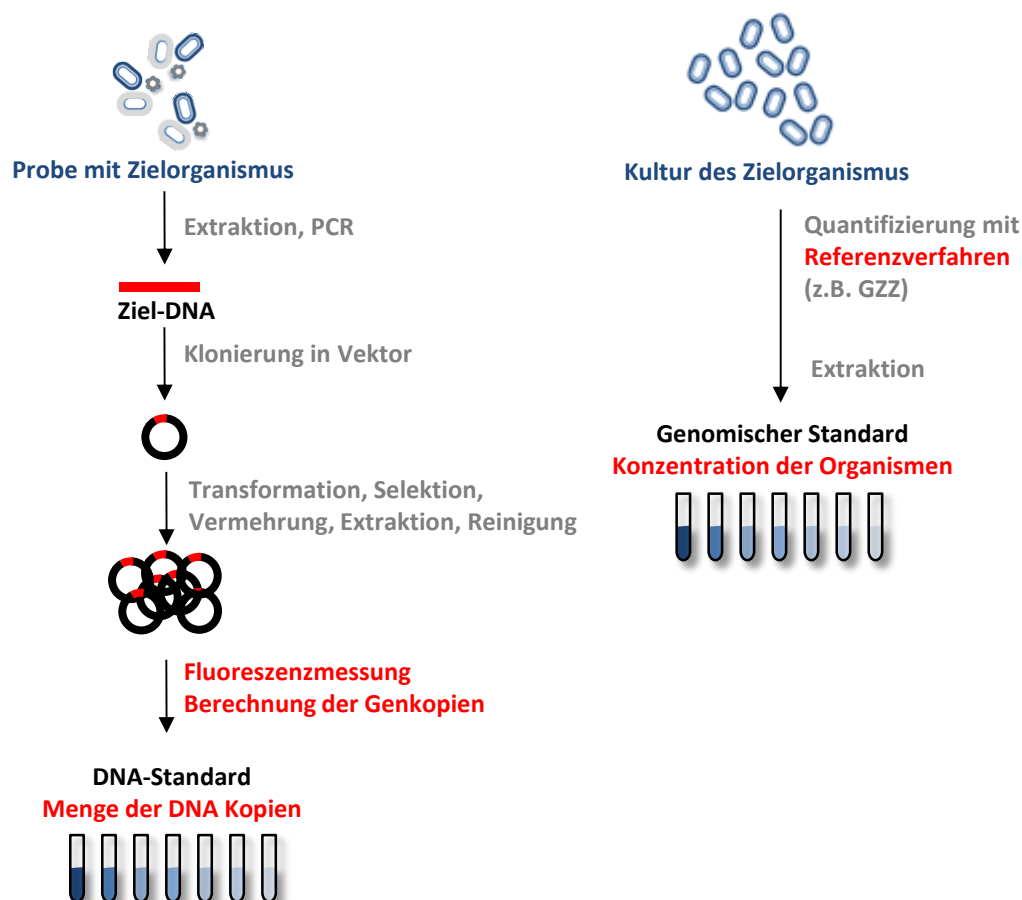


Abbildung 6: Grundlage von Vektor-basierten und genomischen Standards. Bezugsgrößen in rot.

Standards werden in der qPCR in einer dekadischen Verdünnungsreihe eingesetzt (Abbildung 7, links). Aus den Cq-Werten der Standards lässt sich eine Kalibrierkurve erstellen, indem die Messwerte gegen die eingesetzte Konzentration aufgetragen werden (Abbildung 7, rechts). Durch die Kalibriergerade lässt sich aus dem Cq-Wert unbekannter Proben die Konzentration der DNA-Menge errechnen (Bustin et al., 2009).

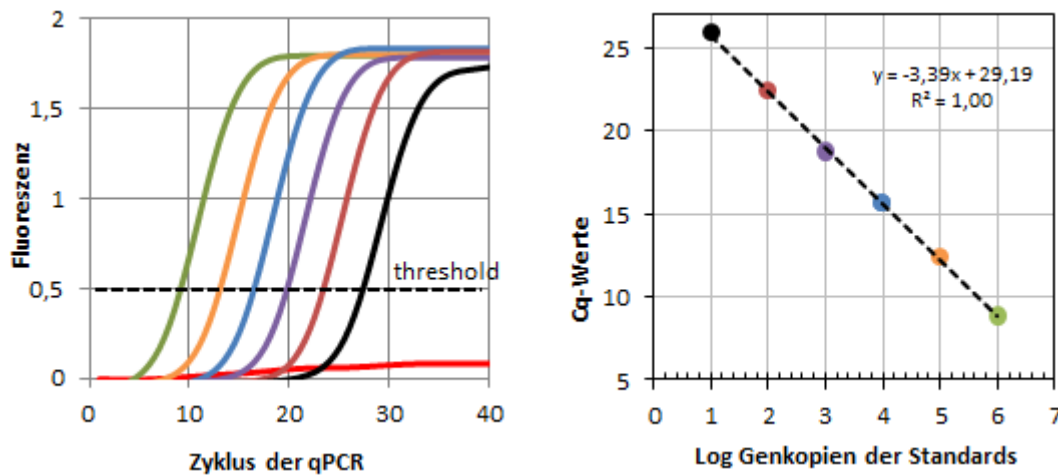


Abbildung 7: qPCR-Lauf von Standardlösungen mit DNA-Konzentrationen von 10^6 bis 10^1 Genkopien pro μL (links). Kalibrierkurve als Verhältnis zwischen Cq-Werten und DNA-Konzentrationen (rechts).

Die Steigung der Kalibriergerade zeigt die Effizienz der qPCR-Reaktion. Bei einer Effizienz von 1,0 (100 %) findet in jedem Zyklus der qPCR eine Verdopplung der DNA statt. In den MIQE Guidelines - *Minimale Informationen für Quantitative Experimente* (Bustin et al., 2009) wird für die Effizienz ein tolerierbarer Grenzbereich von 0,9 bis 1,05 angegeben. Störstoffe in der Probenmatrix wie beispielsweise Huminsäuren interagieren mit der Polymerase oder der Nukleinsäure und können zu einer geringeren Effizienz führen.

Quantifizierungsgrenzen

Für die Nachweisgrenze der qPCR lassen sich zwei Bereiche definieren: die Detektionsgrenze (LOD, *limit of detection*) und die Quantifizierungsgrenze (LOQ, *limit of quantification*). Messungen mit einem Cq-Wert über der Detektionsgrenze sind mit hoher Wahrscheinlichkeit (meist 95 %) positiv. Nach der MIQE Guideline liegt die Detektionsgrenze der qPCR bei 3 Genkopien pro Reaktionsansatz (z.B. $1 \mu\text{L}$) (Bustin et al., 2009). Bei Burns und Valdivia (2008) wird als Detektionsgrenze ein vergleichbarer Wert von 2,5 Genkopien ermittelt. Der LOQ wird meist aus der Summe des Mittelwertes und der dreifachen Standardabweichung von Negativkontrollen (Proben ohne Ziel-DNA) berechnet (Bustin et al., 2009; Shrivastava and Gupta, 2011). In der qPCR kommt es jedoch vor, dass die Fluoreszenz von Negativkontrollen den Schwellenwert (*threshold*) nicht überschreitet und

nicht bestimmt werden kann (Abbildung 7, links, Kontrolle). Deswegen wurden zur Bestimmung der Nachweisgrenze umfangreichere Verfahren vorgeschlagen (Burns and Valdivia, 2008; Nutz et al., 2011).

Bedeutender für diese Arbeit ist die Quantifizierungsgrenze – der Bereich, in dem mit der qPCR gemessene Proben quantitativ erfasst werden können. In den MIQE Guidelines liegt dieser Bereich zwischen den Standards mit der höchsten und der niedrigsten Konzentration, die in eine gültige Kalibrierung einbezogen wurden (Bustin et al., 2009). Nach Forootan et al. (2017) lässt sich der LOQ durch den Variationskoeffizienten der Standards bestimmen. Dieser sollte den Wert 0,35 nicht überschreiten. Die Berechnung erfolgt aus dem Quotienten des Mittelwertes der entsprechenden qPCR-Messungen eines Standards und der Standardabweichung dieser Messwerte.

Spezifität

Mit der qPCR lässt sich theoretisch jeder Organismus anhand seiner DNA oder RNA nachweisen. Außerdem lassen sich PCR-Reaktionen sowohl für ganze Organismengruppen als auch für einzelne Gene erstellen. So können beispielsweise bei enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) die Toxizitätsgene direkt nachgewiesen werden (Wang et al., 2014). Dies setzt voraus, dass die Sequenz der Nukleinsäure bekannt ist und die Primer, die in der Reaktion eingesetzt werden, spezifisch an die gewünschte Stelle binden. Unspezifische qPCR-Reaktionen führen zu falsch positiven Ergebnissen – beispielsweise wenn die DNA von *E. coli* beim Nachweis von Viren ebenfalls vervielfältigt wird. Eine qPCR muss somit sorgfältig entwickelt und mit Qualitätskontrollen überprüft werden. Dazu zählen Positiv- und Negativkontrollen innerhalb der qPCR, sowie die Überprüfung der Produkte aus der qPCR mittels Schmelzpunktanalyse und Größenanalyse im Gel. Wird ein falsches Produkt gebildet, so hat dies im Vergleich zur Positivkontrolle meist eine unterschiedliche Größe und Nukleotid-Zusammensetzung, was im Gel oder der Schmelzkurve erkennbar ist (Otto et al., 2015).

2.6.2.1 Einsatzbereiche von qPCR-Verfahren

Die qPCR wird als Methode zum Nachweis von hygienisch relevanten Organismen im Trinkwasserbereich (Kunze et al., 2015), im Abwasser (Ottoson et al., 2006b), bei infizierten Personen (Mesquita et al., 2011) und bei Nahrungsmitteln wie Meeresfrüchten (Costafreda et al., 2006) eingesetzt. Für einige der Nachweisverfahren existieren Normen im Lebensmittelbereich, beispielsweise für den Nachweis von Shiga-Toxin-bildenden *E. coli* (STEC) (ISO/TS 13136:2012, n.d.), Noroviren (ISO/TS 15216-1:2013, n.d.), Salmonellen (ISO 10135:2007, n.d.) und Bakterien der Gattung *Yersinia* (ISO/TS 18867:2015, n.d.).

Da nur wenige Virenpartikel für eine Infektion ausreichen, wird von der WHO ein Nachweis von einem Rotavirus in 90 m³ Trinkwasser gefordert. Der Einsatz der qPCR setzt durch das geringe Probevolumen von wenigen Mikrolitern eine aufwändige Konzentrierung voraus (Kunze et al., 2015; Seidel et al., 2016). Neben Trinkwasser ist auch die hygienische Beschaffenheit des Rohwassers von Bedeutung. So ermöglicht ein schnelles Nachweisverfahren eine Bewertung des Einzugsgebietes in Sinne des Multibarrierenprinzips. Dadurch kann z.B. auf eine erhöhte Virenlast bei Unwettern oder Überflutungen zeitnah reagiert werden. Gleiches gilt für die Inaktivierungsleistung einer Abwasserbehandlung. Somit ergeben sich im Wasser- und Trinkwassersektor umfassende Anwendungsmöglichkeiten für ein schnelles Detektionsverfahren wie die qPCR (Abbildung 8).



Abbildung 8: Mögliche Anwendungsbereiche einer hygienischen Überwachung mit PCR-Methoden.

2.6.2.2 Problematik: Die hygienische Relevanz eines molekularbiologischen Ergebnisses

In qPCR-Reaktionen werden Nukleinsäuren quantifiziert, um bestimmte Organismen wie Viren oder Bakterien nachzuweisen. Dies hat einen entscheidenden Nachteil: Wird ein Bakterium oder ein Virus zerstört, so ist dies keineswegs gleichbedeutend mit der Zerstörung seiner Nukleinsäure. Somit werden mit der qPCR ebenfalls Organismen nachgewiesen, die bereits – auch seit langer Zeit - tot sind (Young et al., 2007a). Für hygienische Bewertungen und Risikoeinschätzungen sind jedoch nur die Organismen von Belang, die eine Infektion auslösen können.



	Kulturverfahren	qPCR
 Lebende Zelle	Wachstum Positiv	DNA vorhanden Positiv
 Tote Zelle	Kein Wachstum Negativ	DNA vorhanden Falsch Positiv

Abbildung 9: Unterschiedliche Messergebnisse bei Kulturverfahren und qPCR bei lebenden und toten Bakterien.

Studien im medizinischen, Lebensmittel- oder Umweltbereich zeigen meist deutliche Unterschiede zwischen qPCR-Ergebnissen und der Zahl infektiöser Organismen (Panousis et al., 2005; Pina et al., 1998; Rogers et al., 2010; Young et al., 2007b). Beispielsweise wurde in einer Studie von Borchardt et al. (2003) Brunnenwasser auf Viren überprüft. Mittels qPCR konnten in vielen der Proben Rota- und Hepatitis-Viren gefunden werden. Allerdings zeigte keine der Probe eine Infektiosität im Kulturverfahren.

Für den Einsatz in Risiko- oder Hygienebewertungen muss die qPCR um eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Organismen erweitert werden.

2.6.2.3 Lebend/tot-Unterscheidung in der qPCR

In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien mit den Farbstoffen Propidium-Monoazid (PMA) und Ethidium-Monoazid (EMA) (Abbildung 10) zur Unterscheidung von lebenden und toten Organismen in der PCR durchgeführt (Nocker et al., 2006). Diese fluoreszenten Farbstoffe interkalieren in Einzel- oder Doppelstrang-DNA oder RNA (Prevost et al., 2016).

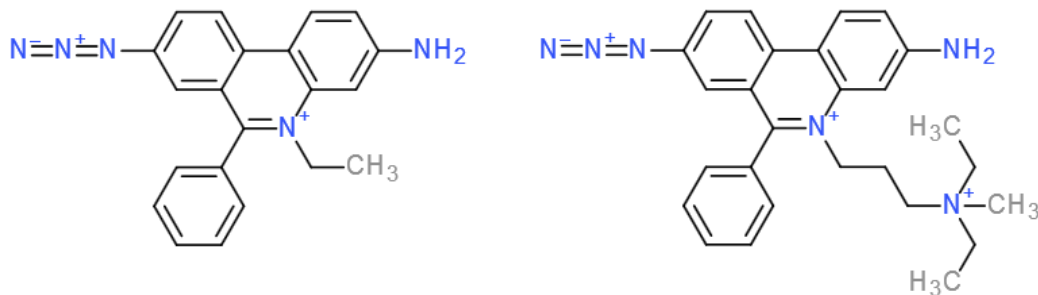


Abbildung 10: EMA (links) und PMA (rechts).

Das Prinzip der Lebend/tot-Unterscheidung basiert auf einem Ausschluss der toten Zellen von der qPCR (Abbildung 11). Durch die positive Ladung von PMA und EMA dringen diese Stoffe nur in Zellen mit beschädigter Hülle ein, nicht aber in intakte Zellen. Durch blaues Licht von 460 nm Wellenlänge (Photolyse) zerfällt die Azido-Gruppe des Moleküls zum reaktiven Nitren und Stickstoff (DeTraglia et al., 1978). Das Nitren reagiert mit der Phosphatdesoxyribose der Nukleinsäure, worauf eine kovalente Bindung entsteht (Coffman et al., 1982). Freies PMA oder EMA reagiert mit anderen Zellbestandteilen oder mit Wasser und wird somit inaktiviert (Kell et al., 1998). In der folgenden Extraktion werden die Zellen aufgeschlossen und die Zellbestandteile und das verbleibende PMA oder EMA entfernt. Die Suspension enthält nun die Nukleinsäure der lebenden Zellen und die mit PMA oder EMA gekoppelte Nukleinsäure der toten Zellen. In der qPCR können DNA-Polymerasen nicht an markierte Nukleinsäuren binden (Kell et al., 1998). Somit wird nur die Nukleinsäure der lebenden Zellen nachgewiesen (Nocker et al., 2006).

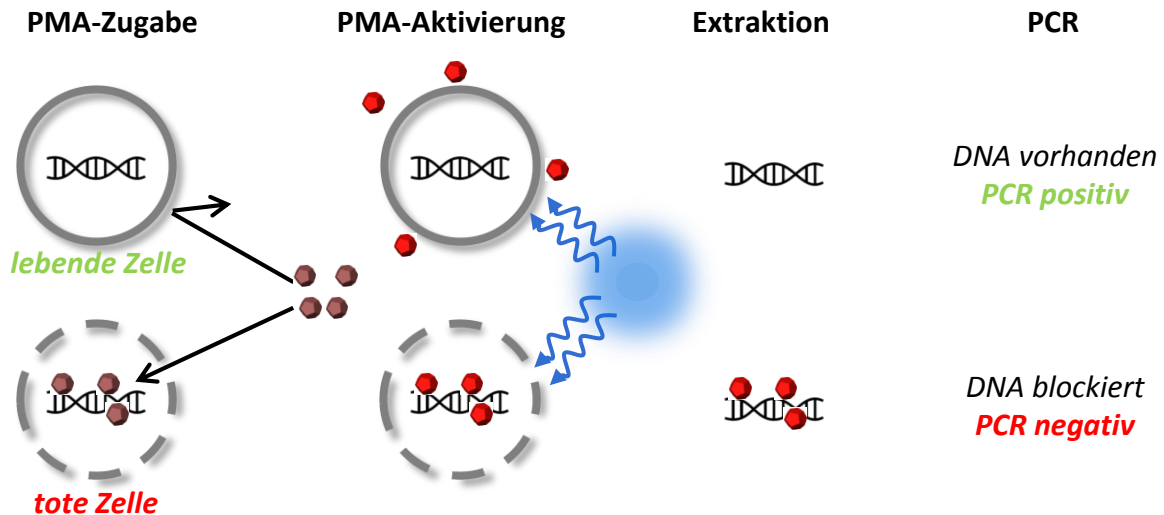


Abbildung 11: Wirkprinzip von PMA bei lebenden und toten Zellen.

Im Vergleich zwischen PMA und EMA zeigt letzteres eine höhere Effizienz bei der Blockierung der Nukleinsäure beschädigter Zellen. Um mit PMA den gleichen Effekt wie mit EMA zu erzeugen, wird meist eine höhere Konzentration des Farbstoffes benötigt. Dies liegt an der doppelt positiven Ladung des PMA-Moleküls, das eine Diffusion in die Zellen erschwert. Einige Studien mit EMA zeigen jedoch, dass auch unbehandelte Organismen durch den Farbstoff beeinflusst werden, was letztendlich zu einem falsch negativen Ergebnis führt. Der Effekt wurde sowohl bei Bakterien (Delgado-Viscogliosi et al., 2009; Nocker et al., 2006; Soejima et al., 2011a; Wang and Levin, 2006), als auch bei Viren (Bellehumeur et al., 2015; Graiver et al., 2010) beobachtet. Deswegen findet PMA in den neueren Studien vermehrt Verwendung.

2.6.2.4 Problematik der Definition „tot“

Je nach Zustand eines Mikroorganismus ist es schwer, zwischen lebend und tot zu unterscheiden. Bei **Bakterien** basiert das Kulturverfahren auf dem Wachstum und zeigt somit lebende Zellen, die sichtbare Kolonien bilden. Es konnte jedoch unter Laborbedingungen nachgewiesen werden, dass sich unter bestimmten Umständen lebende Bakterien nicht auf Nährmedien vermehren - also keine Kolonie bilden. Dieser **VBNC** (*viable but not culturable*) genannte Zustand konnte schon bei vielen Bakterien nachgewiesen werden (Oliver, 2010; Wingender and Flemming, 2011). Bei einigen dieser Bakterien lässt sich über molekularbiologische Methoden ein Stoffwechsel nachweisen, was darauf schließen lässt, dass sie noch leben. Unter anderen Umweltbedingungen könnte ein erneutes Wachstum möglich sein.

Beispielsweise zeigen einige Studien, dass Bakterien im VBNC-Stadium nicht auf Kulturmedien wachsen, da sie das Enzym Katalase nicht produzieren. Dieses spaltet das bei aeroben Abbau entstehende Wasserstoffperoxid, welches als reaktive Sauerstoffspezies für Zellen giftig ist (Oliver, 2010). Durch externe Zugabe von Katalase konnten einige Bakterienspezies im VBNC-Stadium wieder zum Wachstum gebracht werden: *Salmonella typhi* (Zeng et al., 2013), *Ralstonia solanacearum* (Kong et al., 2014), *Vibrio cholerae* (Senoh et al., 2015), und *Vibrio parahaemolyticus* (Mizunoe et al., 2000). Bei anderen Spezies wie *Enterococcus faecium* oder *Helicobacter pylori* war diese Methode nicht erfolgreich (Li et al., 2014). Pathogene Bakterien wie enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), *Virbio cholerae* oder *Salmonella enterica* in VBNC-Zustand konnten in einem Medium mit eukaryotischen Zellen wieder zum Wachstum angeregt werden. Ohne diese Zellen wurde kein Wachstum beobachtet (Senoh et al., 2012).

Diese Ergebnisse machen deutlich, wie schwer sich der Zustand „tot“ mit den derzeitigen Messmethoden erfassen lässt. Es ist wenig dazu bekannt, bis zu welcher Schädigung sich eine Zelle regenerieren kann oder unter welchen Umweltbedingungen dies möglich ist. Somit lässt sich auch nicht festlegen, welches in Abbildung 12 gezeigte Stadium mit dem unwiderruflichen Tod des Organismus gleichzusetzen ist (Davey, 2011).

Wichtig ist, dass die jeweiligen Nachweisverfahren unterschiedliche Eigenschaften der Organismen erfassen, welche im klassischen Sinne als lebend und tot bezeichnet werden. Im Kulturverfahren werden kultivierbare Organismen detektiert. In der PMA-qPCR werden dagegen die Organismen, die über eine Intakte Hülle (Membran oder Kapsid) verfügen, nachgewiesen. Ohne PMA erfolgt die Unterscheidung auf Ebene der Nukleinsäure – nur Organismen mit intakter DNA werden erfasst (Abbildung 12).

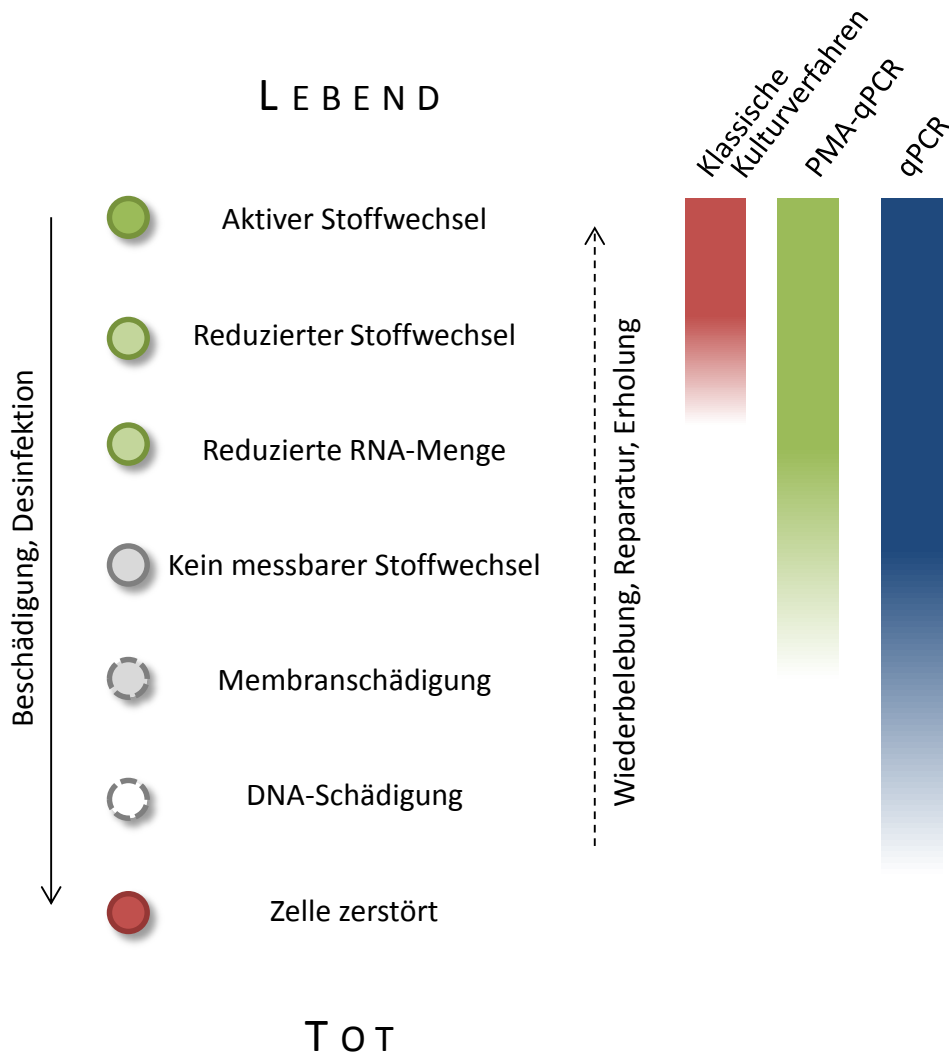


Abbildung 12: Unterschiedliche Zustände von Bakterien vom Zustand „lebend“ bis zu „tot“. Da nicht bekannt ist, von welchem Stadium aus sich Zellen regenerieren können, lässt sich der Zustand „tot“ nicht festlegen. Die klassischen Kulturverfahren, PMA-qPCR und qPCR erfassen unterschiedliche Abschnitte des dargestellten Spektrums. Abbildung modifiziert nach (Davey, 2011).

Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und können sich nicht ohne die Hilfe eines Wirts vermehren. Sie sind somit definitionsgemäß nicht lebendig. Hygienisch relevant sind solche Viren, die eine Infektion auslösen können. Somit muss bei Viren zwischen infektiös und nicht infektiös unterschieden werden.

2.6.2.5 Bisherige Studien zur Lebend/tot-Unterscheidung

In den letzten Jahren wurde die Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA in einigen Studien beschrieben (s. 7.4 auf Seite 232). Die Ergebnisse zeigen sowohl erfolgreiche (Coudray-Meunier et al., 2013; Pan and Breidt, 2007; Prevost et al., 2016) als auch nicht erfolgreiche (Graiver et al., 2010; Kim and Ko, 2012; Yáñez et al., 2011) Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien bzw. infektiösen und nicht infektiösen Viren. Dies eröffnet die Frage nach dem Grund der unterschiedlichen Ergebnisse.

Die Lebend/tot-Differenzierung mit PMA besteht aus mehreren Schritten (Abbildung 11), die jeweils unterschiedlich durchgeführt werden können. So wurden in vielen Studien Parameter zur Konzentration von PMA, der Inkubationstemperatur und der Inkubations- bzw. Belichtungszeit variiert (vgl. Tabelle 3). Grundsätzlich legen diese Parameter fest, wie stark PMA in tote und lebende Zellen eindringt.

Ist die **Konzentration** von PMA zu niedrig gewählt sind zu wenig PMA-Moleküle vorhanden, um alle toten Organismen zu markieren. Eine zu hohe PMA-Konzentration führt dazu, dass PMA auch in lebende Organismen eindringen kann (Fittipaldi et al., 2012). Nur in wenigen Studien werden mehrere Konzentrationen getestet (Chang et al., 2010; Kralik et al., 2010; Nocker et al., 2006; Salam et al., 2014; Wang et al., 2014) - die jeweilige optimale PMA-Konzentration fällt in den Studien unterschiedlich aus. In diesen Studien werden zwar unterschiedliche Bakterien untersucht, allerdings finden sich auch bei gleichen Bakterien unterschiedliche Parameter. Beispielsweise werden bei Gensberger et al. (2013) 10 µM PMA und bei Asfahl und Savin (2012) 240 µM PMA zur Behandlung von *E. coli* Bakterien eingesetzt.

Weniger divers ist die **Inkubationszeit** von PMA in der Literatur. In den meisten Studien wird eine fünfminütige Inkubationszeit genutzt (vgl. Tabelle 3). Das Eindringen von PMA durch Diffusion benötigt eine bestimmte Zeit. Bei zu kurzer Inkubation können nicht alle toten Zellen markiert werden. Bei zu langer Inkubation kann PMA auch in lebende Zellen eindringen. Wird die PMA-Konzentration entsprechend angepasst, können die Inkubationszeiten relativ flexibel gewählt werden (Fittipaldi et al., 2012).

Die Diffusion von PMA kann zusätzlich durch die **Temperatur** beeinflusst werden. Höhere Temperaturen steigern die Diffusion durch Membranen (Vossenberget al., 1995) und damit auch die Aufnahme von PMA. Die Temperatur wurde nur in wenigen Studien variiert (Elizaquível et al., 2014; Nkuipou-Kenfack et al., 2013) – meist wird Raumtemperatur oder eine Kühlung auf Eis genutzt. Die Diffusion durch Membranen kann außerdem durch zusätzliche Agentien beeinträchtigt werden. So wirkt sich beispielsweise Desoxycholsäure negativ auf die Membranintegrität aus (Lee and Levin, 2009; Wang et al., 2014; Yang et al.,

2011), Glycerin dagegen stabilisierend (Soro et al., 2010).

Eine ausreichende **Fotoaktivierung** des PMAs ist in zweierlei Hinsicht wichtig: erstens sollen alle PMA-Moleküle an die Nukleinsäure der toten Zellen gebunden werden. Zweitens sollen alle nicht gebundenen PMA-Moleküle inaktiviert werden, so dass diese nach der Extraktion nicht in die Nukleinsäure der lebenden Zellen interkalieren. In den meisten Studien werden Halogenlampen genutzt, bei deren Einsatz die Proben zusätzlich gekühlt werden müssen (vgl. Tabelle 3). Einige Studien setzten auf LED-Systeme, die auch kommerziell zum Zweck der PMA-Aktivierung vertrieben werden. Ein besonderer Vorteil dieser Systeme ist die definierte Wellenlänge des emittierten Lichts (meist 465 nm) und die standardisierte Behandlung mehrerer Proben (Fittipaldi et al., 2012).

Tabelle 3: Vergleich der für die PMA-qPCR eingesetzten Parameter in gängiger Literatur (68 Studien von 2006 bis 2016, s. Tabelle 49 im Anhang auf Seite 232).

PMA-Konzentration	Studien
Unter 10 µM	4
10 bis unter 50 µM	18
50 µM	16
100 µM	16
Über 100 bis 200 µM	1
Ab 200 µM	9
Mehrere	4

PMA Inkubation	Studien
Unter 5 Minuten	3
5 Minuten	48
10 Minuten	8
Über 10 Minuten	9

Belichtungsapp.	Studien
Halogenlampe	49
LED	14
Andere	5

Belichtungszeit	Studien
Unter 5 Minuten	16
5 Minuten	16
10 Minuten	17
15 Minuten	18
Über 10 Minuten	1

Amplifikatgröße

In der qPCR werden normalerweise kleine DNA-Fragmente (Amplifikate) nachgewiesen. Mit steigender Größe der Amplifikate steigt die benötigte Zeit zur Bildung eines Doppelstranges. Gleichmaßen sinkt die Effizienz der Reaktion. Somit sind beispielsweise bei SYBRGreen I Amplifikatgrößen unter 300 bp empfohlen (Arya et al., 2005). Auch bei der PMA-qPCR wurden meistens kleinere Amplifikate unter 500 bp für die qPCR eingesetzt (Tabelle 4).

Tabelle 4: In Studien zur PMA-qPCR und PMA-PCR eingesetzte Amplifikatgrößen (73 Studien von 2006 bis 2016).

Amplifikatgröße	Studien
unter 100 bp	9
100 bis unter 200 bp	32
200 bis unter 500 bp	23
500 bis unter 1000 bp	4
1000 bis unter 2000 bp	4
über 2000 bp	1

In der PMA-qPCR legt die Größe des Amplifikates den Bereich der Nukleinsäure fest, in der mindestens ein PMA-Molekül gebunden sein muss, um einen Nachweis toter Zellen zu verhindern. Dieser Bereich kann durch eine Erhöhung der PMA-Konzentration verkleinert werden (Fittipaldi et al., 2012). Allerdings ist die PMA-Markierung der DNA auch von der Permeabilität der Zellen abhängig und kann nicht beliebig erhöht werden, ohne auch lebende Zellen zu beeinflussen.

Mit einem größeren Amplifikat wird ein größerer Bereich der Nukleinsäure in der qPCR nachgewiesen. Folglich werden bei einem solchen Nachweis weniger PMA-Moleküle benötigt, um die DNA toter Zellen auszuschließen. Nicht alle Polymerasen eignen sich jedoch für den Nachweis langer Amplifikate. Ohne zusätzliche Proteine, die die Bindung zwischen DNA-Matrix und der Polymerase verstärken, können nur kleine Fragmente amplifiziert werden (niedrige Progressivität). Nur durch die Kopplung eines stabilisierenden Proteins (z.B. *sso7d*) können längere Amplifikate in der qPCR nachgewiesen werden (Wang, 2004). In einigen Studien zur Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA wurden längere Amplifikate eingesetzt – allerdings nur bei einer qualitativen PCR. Die Daten zeigen jedoch einen verbesserten Ausschluss toter Zellen (Contreras et al., 2011; Luo et al., 2010; Soejima et al., 2011b; Yang et al., 2013).

Organismen

Etwa dreiviertel der Studien zur Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA wurden mit Bakterien durchgeführt. Da in den meisten Studien nur eine Bakterienspezies untersucht wird, sind Vergleiche durch die unterschiedlichen Behandlungsparameter schwierig. In einigen Studien zeigt sich jedoch, dass verschiedene Organismen unterschiedlich stark auf PMA reagieren (Kralik et al., 2010; Nocker et al., 2006). Dies erklärt sich durch die unterschiedlichen Diffusionsbarrieren der jeweiligen Bakterien und deren Resistenz zur eingesetzten Inaktivierung. Studien zur PMA-qPCR zur Differenzierung von infektiösen und nicht infektiösen Viren sind erst in den letzten Jahren vermehrt durchgeführt worden. Eine

Unterscheidung konnte beispielsweise bei Hepatitis A (Moreno et al., 2015), Adenoviren (Fongaro et al., 2016) oder murinen Noroviren (Kim and Ko, 2012) unter bestimmten Bedingungen erfolgreich durchgeführt werden.

Anwendungsbereiche der PMA-qPCR

Die Lebend/tot-Differenzierung mit PMA basiert auf der Permeabilität der bakteriellen oder viralen Hüllen (vgl. Abbildung 12). Die meisten veröffentlichten Studien beschränken sich darauf, die generelle Funktion der Lebend/tot-Unterscheidung beispielhaft zu zeigen. Dies geschieht meist durch Zerstörung der bakteriellen oder viralen Hülle mit Hitze. Von 68 gesichteten Publikationen (2006 bis 2016, vgl. Tabelle 49) zu PMA wurden 34 hitzebehandelte Organismen untersucht. Studien zu Realproben bei Hitzebehandlung kommen vor allen im Bereich der Lebensmittelhygiene vor, wie beispielsweise dem Erhitzen und der Pasteurisierung von Milch (Wang et al., 2014; Yang et al., 2011), *E. coli* oder *Campylobacter* Bakterien auf Fleisch (Wang et al., 2009) oder Geflügel (Josefsen et al., 2010). In der Wasserpraxis kommt eine Behandlung mit Hitze bei einem Legionellenbefall in Hausinstallationen vor. Dabei soll im Leitungsnetz eine Temperatur 70 °C erreicht werden (DVGW-Arbeitsblatt W 551). In vielen Publikationen werden zum Test von PMA höhere Temperaturen zur Behandlung der Organismen eingesetzt, beispielsweise 100 °C (Cawthorn and Witthuhn, 2008; Desfossés-Foucault et al., 2012; Soejima et al., 2011b; Wang and Levin, 2006).

Die Anwendung einer thermischen Behandlung im Wasserfach ist somit vergleichsweise unbedeutend. Dagegen werden in der Wasseraufbereitung Desinfektionsverfahren wie Ozon, Chlor oder UV-Strahlung eingesetzt. Lediglich 21 der gesichteten Publikationen untersuchen die Wirkung der Chlor-, Ozon- oder UV-Behandlung. Auch in vielen dieser Studien werden die Desinfektionsverfahren so eingesetzt, dass keine direkte Praxisrelevanz besteht (vergl. Tabelle 5). Oft lassen weitere Einschränkungen der Studien die Bewertung eines sinnvollen Einsatzes von PMA in der Wasserpraxis nicht zu:

- Die Reduktion durch PMA ist nur gering (teils weniger als eine Log-Stufe)
- Extreme Bedingungen wurden untersucht (vergl. Tabelle 5)
- Zellen wurden nur auf eine Art / mit einer bestimmten Dosis behandelt
- Es erfolgte kein Vergleich mit Kulturverfahren
- Falsch negative Effekte von EMA oder PMA wurden nicht überprüft
- Reaktionsbedingungen wurden nicht überprüft

Tabelle 5: Übersicht von Studien zur Lebend/tot-Unterscheidung und den jeweils eingesetzten Konzentrationen von Chlor, Ozon und UV-Strahlung. *Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß § 11 Trinkwasserverordnung 2001, Umweltbundesamt, Stand 2012.

Desinfektion	zugelassene Konzentration nach TrinkwV*	Anwendung Literatur zu PMA	
Chlor oder Natriumhypochlorit	1,2 mg/L freies Chlor (Ausnahmefälle) 0,1 – 0,3 mg/L freies Chlor (Normalfall)	0,25 - 4 mg/L (7 Konzentrationen)	Diese Arbeit
		0,5 mg/L	(Parshionkar et al., 2010)
		1 mg/L	(Chang et al., 2009, 2010)
		2 mg/L	(Leifels et al., 2015)
		2; 40 mg/L	(E.-S. Lee et al., 2015)
		5; 40 mg/L	(Nocker et al., 2007)
		10 mg/L	(Prevost et al., 2016)
100 mg/L	(Sánchez et al., 2011)		
Ozon	Bis 10 mg/L	0,1 - 10 mg/L (8 Konzentrationen)	Diese Arbeit
		8 mg/L	(L. Asfahl and C. Savin, 2012)
UV	Mindestens 400 J/m ² (bezogen auf 254 nm)	25 - 1000 J/m² (12 Stärken)	Diese Arbeit
		330 - 1800 J/m²	(Karim et al., 2015)
		Sonnenstrahlung	(Bae and Wuertz, 2009, 2012; Dong et al., 2014)
		500 J/m ²	(Banihashemi et al., 2012)
		1 KJ/m ²	(E.-S. Lee et al., 2015)
		4 KJ/m ²	(Prevost et al., 2016)
		600-2300 J/m ²	(Leifels et al., 2015)
0,26 – 2,6 MJ/m ²	(Kralik et al., 2014)		

2.6.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine leistungsfähige Methode zur Erfassung von Bakterien. Die Zellen werden einzeln mit einem Laser über optische Sensoren detektiert (Abbildung 13). Die zu messende Probe strömt durch eine Düse, die von einem Mantelstrom einer Trägerflüssigkeit umflossen wird. Durch hydrodynamische Effekte entsteht eine Einzelzellsuspension, die an einen Laser geleitet wird. Trifft der Laser auf eine Zelle, wird das Licht im kleinem Winkel (*Forward Scatter*, FSC) oder in größeren Winkeln seitlich gestreut (*Side Scatter*, SSC). Durch mehrere Detektoren kann das gestreute Licht gemessen werden, wobei sich aus dem *Forward Scatter* die Größe der Zelle und mit dem *Side Scatter* charakteristische Eigenschaften (Membranbeschaffenheit, Granula, Form des Nukleus) ableiten lassen (Kötzsch et al., 2012). Die Durchflusszytometrie ist als Alternative zur mikroskopischen Gesamtzellzahl in der Schweiz seit 2013 als Methode zugelassen.

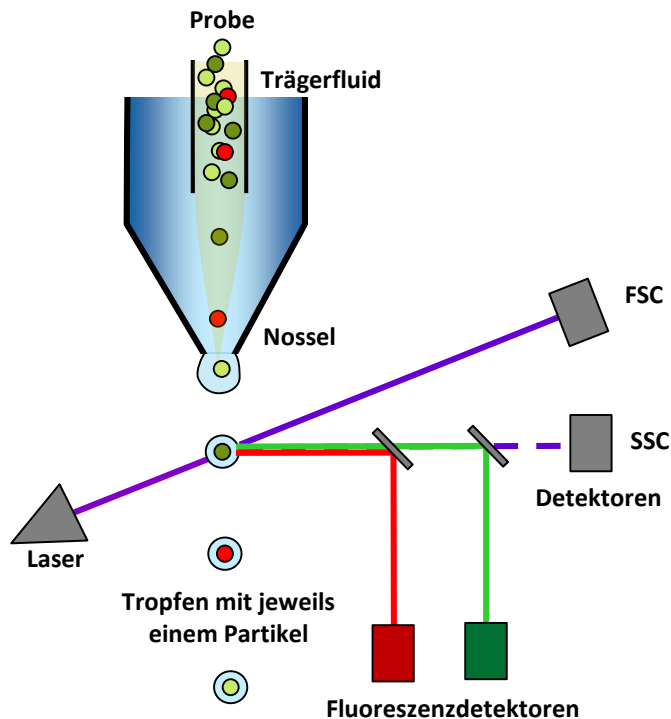


Abbildung 13: Prinzip der Durchflusszytometrie

Messergebnisse der Durchflusszytometrie werden meist in zweidimensionalen Plots dargestellt (Abbildung 14, A). Bei ausreichend hoher Bakterienkonzentration sind meist Signalcluster zu erkennen – also Bereiche innerhalb des Plots, in denen ein großer Teil der Messsignale liegen. Je nach Fragestellung kann dabei eine andere Darstellung gewählt werden. Die generellen Größen- und Formverhältnisse lassen sich ohne Farbstoffe in einem FSC/SSC Plot darstellen. Bakterien sind – zumindest was Trinkwasser angeht – meist

größer als Partikel und zeigen eine charakteristische Laserablenkung und Streuung. In Umweltproben sind jedoch meist anorganische Partikel enthalten, die die Messung stören und das Ergebnis verfälschen können.

Zur Messung der **Gesamtbakterienzahl** (Abbildung 14, B) werden interkalierende Farbstoffe wie SYBR Green I eingesetzt. Diese besitzen eine grüne Fluoreszenz, die durch die Bindung mit DNA oder RNA erheblich verstärkt wird. Von dem Laser angeregt, emittieren gefärbte Bakterienzellen somit grünes Licht, in Abhängigkeit von der Menge der Nukleinsäure. Eine Unterscheidung zwischen Matrix und Bakterien ist somit möglich. Außerdem kann durch die Leuchtkraft zwischen Bakterien mit viel Nukleinsäure (high nucleic acid - HNA) und wenig Nukleinsäure (low nucleic acid - LNA) unterschieden werden (Kötzsch et al., 2012). HNA- und LNA-Cluster repräsentieren nach Vila-Costa et al. (2012) unterschiedliche phylogenetische Gruppen von Bakterien. Das Signal ist somit charakteristisch für ein bestimmtes Wasser – Änderungen des Verhältnisses zwischen HNA und LNA können beispielsweise auf Kontaminationen hinweisen.

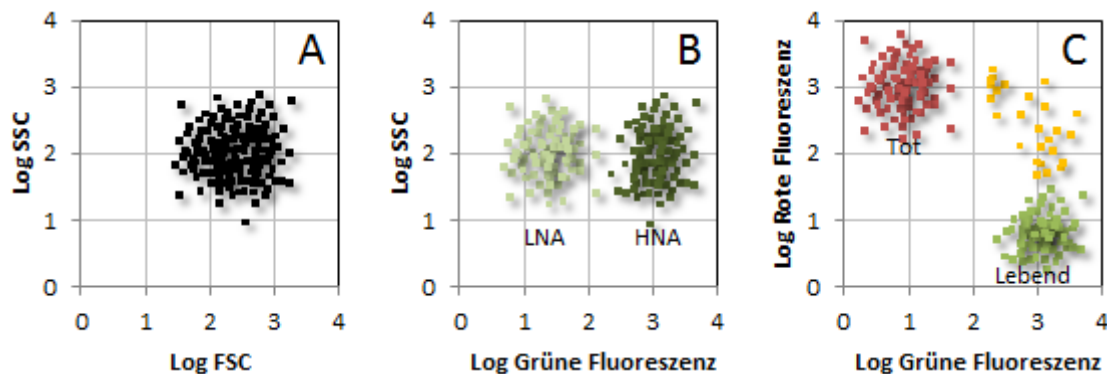


Abbildung 14: Mögliche Signalcluster in der Durchflusszytometrie bei unterschiedlichen Darstellungen der Messsignale. A: Bakteriengröße und Form ohne Fluoreszenz, B: Einteilung nach Menge der Nukleinsäure nach Färbung mit SYBR Green I, C: Einteilung in lebende und tote Zellen nach rot/grün-Fluoreszenz. SSC: seitwärts gestreutes Licht, FSC: vorwärts gestreutes Licht.

In der Durchflusszytometrie wird zur Unterscheidung von **lebenden und toten** Bakterien Propidiumiodid (PI) eingesetzt, welches nach dem gleichen Prinzip wie PMA funktioniert und nur in membrangeschädigte Zellen eindringt. Bakterien, in die PI eingedrungen ist, fluoreszieren bei Laserbestrahlung im roten Licht (Abbildung 14, C). Im Vergleich zu PMA oder EMA fehlt die reaktive Azido-Gruppe bei PI, die eine kovalente Bindung mit der Nukleinsäure ermöglicht (vgl. 2.6.2.3).

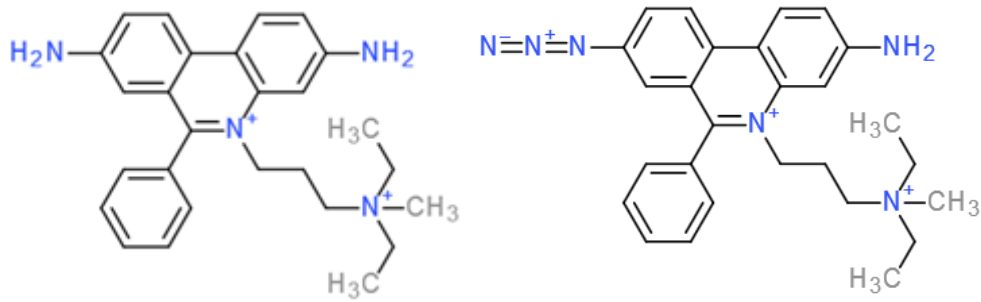


Abbildung 15: Strukturformeln von Propidiumiodid (PI, links) und Propidium-Monoazid (PMA, rechts).

Zur Gegenfärbung wird beispielsweise der Farbstoff SYBR Green I eingesetzt. Meist sind zwischen den Singalclustern der lebenden und toten Zellen weitere Bereiche zu erkennen, die beispielsweise beschädigte Zellen darstellen. Die rot/grün Färbung von PI und SYBR Green I lässt sich ebenfalls im Fluoreszenzmikroskop betrachten (Abbildung 16).

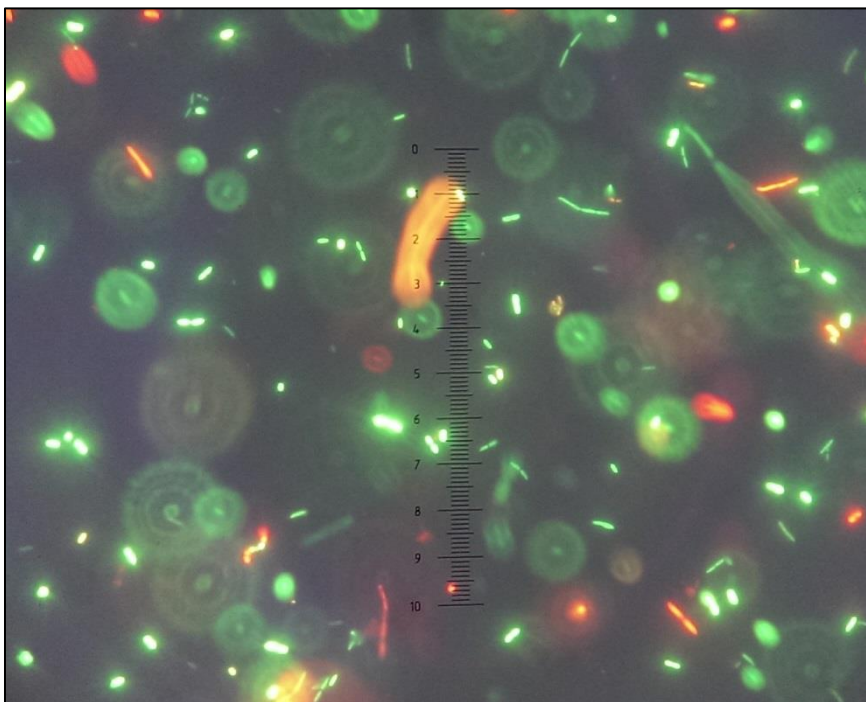


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit SYBR Green und Propidiumiodid angefärbte *E. coli*. Lebende Zellen färben sich grün, beschädigte Zellen rot (1000 Fach vergrößert, 1 Teilstrich = 1 μM).

Einstellen von Messbereichen (*Gates*)

Wie in Abbildung 14 exemplarisch dargestellt wird, bilden die Bakterien in einer Probe charakteristische Signalcluster. Zur Quantifizierung werden Bereiche in den Plots in so genannte *Gates* eingeteilt. So wurden in Abbildung 14 B zwei Bereiche um die Signalcluster LNA und HNA gelegt, um die jeweilige Anzahl der Signale bzw. Bakterien zu bestimmen.

Nicht immer lassen sich einzelne Bereiche derart leicht unterscheiden. Wichtig sind somit definierte Bakterienlösungen bzw. Kontrollen, um die *Gates* festzulegen.

In der Anleitung des Schweizerischen Vereines des Gas- und Wasserfaches (SVGW) zur Messung von Trinkwasserproben mittels Durchflusszytometrie wird die Kalibrierung der Sensorik mit EVIAN Mineralwasser empfohlen (Kötzsch et al., 2012). Die Bakterien in diesem Wasser lassen sich nach Einstellung der Fotodioden für grüne Fluoreszenz in Zellen mit viel Nukleinsäure (high nucleic acid - HNA) und wenig Nukleinsäure (low nucleic acid - LNA) einteilen (Kötzsch et al., 2012).

Gleichermaßen kann – auch in Anlehnung an die PMA-qPCR – bei der Lebend/tot-Unterscheidung in der Durchflusszytometrie mit unbehandelten (lebenden) und hitzebehandelten (toten) Bakterien eine Kalibrierung durchgeführt werden.

2.6.4 Raman-Mikrospektroskopie

In der Raman-Spektroskopie wird die inelastische Streuung vom monochromatischen Licht an Molekülen oder Festkörpern untersucht. Je nach Energieübertragung der bestrahlten Oberfläche verändert sich das Spektrum der emittierten elektromagnetischen Strahlung. In der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS) werden die zu bestrahlenden Objekte vorher mit Gold- oder Silberpartikeln beschichtet, was das Raman-Signal verstärkt. Bei der Analyse von Mikroorganismen ist es durch das Raman-Spektrum beispielsweise möglich, zwischen verschiedenen *E. coli* Stämmen zu unterscheiden (Yang et al., 2016) oder Bakterien in einem Biofilm zu charakterisieren (Ivleva et al., 2017). Versuche zeigen, dass sich lebende und tote Bakterien ebenfalls im Raman-Signal unterscheiden. So konnten über die SERS-Spektren unbehandelter *E. coli* von mit Polymyxin bzw. Ampicillin behandelten (Zhou et al., 2015) oder hitzebehandelten (Chu et al., 2008) *E. coli* unterschieden werden.

2.7 Hygiene-Online-Monitoring (EDIT Projekt)

Um Organismen aus Wasserproben mit molekularbiologischen Methoden nachweisen zu können, sind mehrere hintereinander ablaufende Prozesse nötig. Da in der qPCR nur ein geringes Volumen im Mikroliterbereich eingesetzt werden kann, muss ein großes Probevolumen von einem bis zu mehreren hundert Litern zunächst konzentriert werden. Dies ist beispielsweise über die Adsorption an geladene Filtermaterialien möglich (Hamza et al., 2011), oder einer Ultrafiltration (Sidhu et al., 2012). Im eingegrenzten Wasser müssen die Nukleinsäuren für die qPCR zugänglich gemacht werden, was über den chemischen oder

physikalischen Aufschluss der Bakterien und Viren geschieht. Danach kann aus der extrahierten Nukleinsäure eine qPCR durchgeführt werden. Diese Prozesse laufen im Allgemeinen in einem Labor ab und werden separat durchgeführt. Lediglich die Aufkonzentrierung von großen Probevolumina wird aus logistischen Gründen vor Ort durchgeführt, beispielsweise bei Glaswolle, oder geladenen Filtern (Wunderlich et al., 2016).

Trink- und Rohwasser wird stichprobenartig untersucht, wobei in der Trinkwasserverordnung die Mindesthäufigkeit der Untersuchungen für Trinkwasser pro Jahr festgelegt ist (§14 und Anlage 4, TrinkwV 2001). Ein kontinuierliches Monitoring, wie es beispielsweise für physikalische oder chemische Parameter erfolgt, ist für Bakterien und Viren bisher nicht realisiert worden. Anwendungsbereiche eines solchen Monitorings sind beispielsweise Leitungen des Trinkwassernetzes oder das zur Trinkwassergewinnung eingesetzte Rohwasser zur kontinuierlichen und schnellen Überprüfung der hygienischen Qualität.

Ziel des BMBF-Projektes **EDIT** ist die Entwicklung eines solchen molekularbiologischen Monitoring-Systems für Trink- und Rohwasser. Das System ist modular aufgebaut und vereint Aufkonzentrierung, Extraktion und den Nachweis von hygienisch relevanten Viren und Bakterien. Das Schema dieses so genannten *Hygiene online Monitorings* (HOLM) ist in Abbildung 17 dargestellt. Zur Detektion werden 1000 L Trink- oder Rohwasser mit verschiedenen nacheinander geschalteten Verfahren – kontinuierliche Ultrafiltration (CUF) und Monolithische Adsorptionsfiltration (MAF) – auf 1 mL aufkonzentriert (Kunze et al., 2015; Wunderlich et al., 2016). Die Organismen in der Probe werden auf einem Mikrofluidik-Chip weiter konzentriert, die Nukleinsäuren extrahiert und aufgereinigt (Hakenberg et al., 2015; Vulto et al., 2009). Danach erfolgt die Detektion der einzelnen Bakterien und Viren anhand der Nukleinsäure über eine isothermale Amplifikation auf einer automatisierten Analyseplattform (MCR3) (Kunze et al., 2016). Im Gegensatz zur thermischen Strangtrennung (Denaturierung) bei der qPCR erfolgt bei der isothermalen Amplifikation dieser Schritt durch die Polymerase selbst. Der Prozess wird *Rekombinase Polymerase Amplifikation* (RPA) genannt. Wie auch die qPCR läuft eine RPA in Zyklen ab, in denen die Ziel-Fragmente verdoppelt werden. Ein Zyklus besteht aus folgenden drei Schritten:

1. Das Enzym Rekombinase fügt einen komplementären Primer in die Zielsequenz ein. Der ursprüngliche Doppelstrang wird an dieser Stelle getrennt.
2. Einzelstrang-bindende Proteine (SBP) stabilisieren die Verbindung und verhindern die Entfernung des Primers (Rückreaktion).
3. Eine strangversetzende DNA-Polymerase synthetisiert vom Primer aus einen neuen, komplementären DNA-Strang. Gleichzeitig wird der ursprüngliche Doppelstrang aufgetrennt. Wie in der qPCR entstehen durch zwei gegengesetzte Primer aus einem Doppelstrang zwei Doppelstränge.

Da die Strangtrennung in der RPA enzymatisch erfolgt, benötigen die einzelnen Schritte jedes Zyklus keine spezifische Temperatur. Die Reaktion kann somit im Gegensatz zur qPCR bei einer Temperatur – also isothermal – erfolgen (Zaghloul, 2014).

Beide molekularbiologischen Nachweisverfahren haben jedoch das Problem, nicht zwischen lebenden und toten Organismen unterscheiden zu können (vgl. 2.6.2.2). Um hygienisch relevante Daten zu liefern, ist deswegen eine solche Differenzierung in Form eines Lebend/tot-Modules integriert (*Live/dead module*, Abbildung 17). Die Entwicklung und Integration dieser Lebend/tot-Unterscheidung war ein Ziel dieser Arbeit.

Die Auswertung der vom HOLM erfassten Daten erfolgt automatisch; bei einer Überschreitung vorher definierter Grenzwerte kann z.B. eine Benachrichtigung über eine Kurznachricht (SMS) erfolgen. Der Anwender kann somit rasch auf mögliche Kontaminationen reagieren, Gegenmaßnahmen ergreifen oder weitere Testverfahren durchführen, mit denen kein Monitoring möglich ist (z.B. Kulturverfahren).

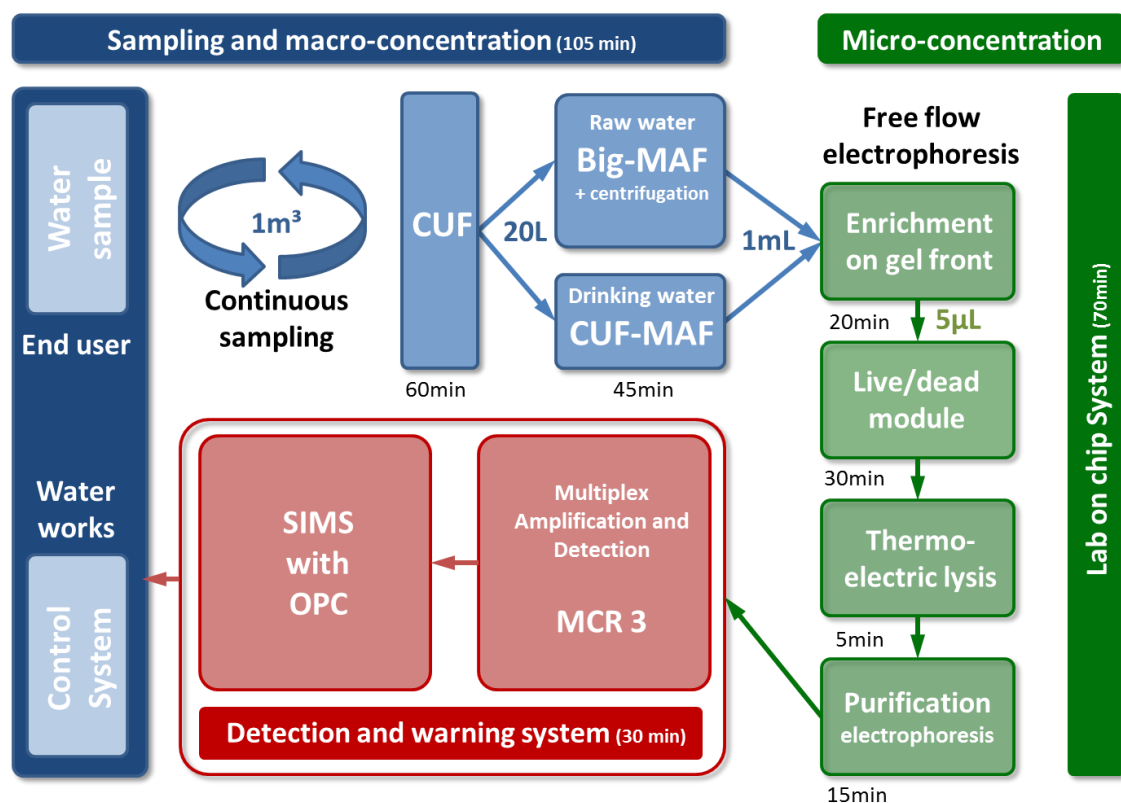


Abbildung 17: Schematische Darstellung des im Projekt EDIT entwickelten *Hygiene-Online-Monitorings* (HOLM). CUF: Kontinuierliche Ultrafiltration, MAF: Monolithische Adsorptionsfiltration, MCR3: *Munich Chip Reader 3. Generation*, SIMS: *systemtechnisch integrierbares System*, OPC: *Open Platform Communications*.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Übersicht der Versuche

In folgender Tabelle sind alle durchgeführten Versuche in Gruppen aufgelistet.

Tabelle 6: Übersicht der durchgeführten Versuchsphasen.

	Ziel des Versuchs	Bedingungen	Messverfahren	Kap.	S.
Phase I: Methodenentwicklung Lebend/tot-Differenzierung von Bakterien und Viren	Prinzipielle PMA-Behandlung	Hitzebehandelte (90 °C) Bakteriophagen	PMA-qPCR	3.2.1	50
	Entwicklung der LA-qPCR	Nukleinsäure phiX174 MS2 <i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i> 16S	LA-qPCR	3.2.3	53
	Entwicklung der LA-PMA-qPCR	Hitzebehandelte (90 °C) Bakteriophagen und Bakterien	LA-PMA-qPCR	3.2.4	75
	Etablierung der Durchflusszytometrie	Hitzebehandelte (90 °C) Bakterien	Durchflusszytometrie	3.2.5	106
Phase II: Anwendung Lebend/tot-Unterscheidung bei Desinfizierten Proben	Wirkung von PMA bei thermischer Behandlung	50 bis 105 °C bei phiX174 50 bis 90 °C bei <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , MS2	PMA-qPCR, LA-PMA-qPCR, Kulturverfahren	3.3.1	119
	Wirkung von PMA bei UV Desinfektion	Bis 1000 J/m ² bei phiX174 Bis 10 KJ/m ² bei <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , MS2		3.3.2	132
	Wirkung von PMA bei einer Desinfektion mit Chlor	Bis 12,4 mg/L bei phiX174 Bis 4 mg/L bei <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , MS2	Durchflusszytometrie bei Bakterien	3.3.3	147
	Wirkung von PMA bei einer Desinfektion mit Ozon	Bis 10 mg/L	Katalase-MPN bei <i>P. aeruginosa</i>	3.3.4	156
Phase III: Integration der Lebend/tot-Unterscheidung in das hygiene-online-Monitoring (HOLM)	PMA Behandlung nach Aufkonzentrierung mit MAF	Unbehandelte und hitzebehandeltes (90 °C) Trinkwasser	LA-PMA-qPCR	3.4.1	167
	PMA-Behandlung nach Aufkonzentrierung mit CUF-MAF-UF im Feldversuch	Unbehandelte phiX174 Bakteriophagen	LA-PMA-qPCR	3.4.1	168
	Gelpassage mit PMA behandeln Proben	Unbehandelte DNA	qPCR	3.4.2	171
	Aufreinigung von Proben im Mikrofluidik-Chip	Unbehandelte und hitzebehandelte (90 °C) phiX174-Bakteriophagen	LA-PMA-qPCR	3.4.2	174
	Isothermale Amplifikation	Unbehandelte und hitzebehandelte (90 °C) phiX174-Bakteriophagen	Isothermale Amplifikation, LA-PMA-qPCR, PMA-qPCR	3.4.3	176

3.2 Methodenentwicklung: Lebend/tot-Differenzierung von Bakterien und Viren

In der gängigen Wasserpraxis werden Trink- und Rohwasser mit Kulturverfahren auf Indikatororganismen überprüft. Nicht immer jedoch lässt sich eine Kontamination mit humanpathogenen Viren durch Indikatorbakterien nachweisen (Seidel et al., 2016). Für Hygienebewertungen ist es demnach wünschenswert, verschiedene hygienisch relevante Organismen direkt nachzuweisen. Kulturverfahren sind jedoch vor allem für humanpathogene Viren labor- und zeitintensiv. Eine zeitnahe Überprüfung von Gewässern ist somit mit den klassischen Kulturverfahren nicht möglich.

Mit molekularbiologischen Methoden wie der qPCR lassen sich hygienisch relevante Organismen wie Viren und Bakterien in wenigen Stunden nachweisen. In Vergleich zu den gängig eingesetzten Kulturverfahren bietet die qPCR somit einen bedeutenden Zeitvorteil. Außerdem lassen sich Organismen wie beispielsweise Noroviren oder Bakterien im VBNC-Stadium (viable but not culturable) nachweisen, für die kein Kulturverfahren zur Verfügung steht.

Die Detektion mittels qPCR basiert auf dem Erfassen der viralen oder bakteriellen Nukleinsäure. Dies hat einen entscheidenden Nachteil: Auch nach der Inaktivierung eines Bakteriums oder Virus (z.B. durch Desinfektion) kann dessen Nukleinsäure auch noch längere Zeit intakt sein. Somit werden mit der qPCR auch Organismen detektiert, die nicht infektiös und somit hygienisch nicht relevant sind.

Um das Risiko pathogener Organismen beispielsweise in Gewässern bewerten zu können, muss die qPCR um eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien bzw. infektiösen und nicht infektiösen Viren erweitert werden. Diese Unterscheidung kann beispielsweise durch den Einsatz des fluoreszenten Farbstoffes Propidiumiodid-Monoazid (PMA) ermöglicht werden (s. 2.6.2.3 auf Seite 33). PMA dringt in beschädigte Organismen ein und markiert die Nukleinsäure. Diese kann danach nicht mehr in der qPCR nachgewiesen werden. In intakte Organismen dringt PMA nicht ein.

Ziel der Methodenentwicklung ist die Etablierung einer PMA-basierten Lebend/tot-Unterscheidung für den molekularbiologischen Nachweis (PMA-qPCR) der Bakteriophagen phiX174 und MS2, sowie verschiedener Bakterien. Die Ergebnisse sollten dabei mit dem Kulturverfahren übereinstimmen. Um einen späteren Einsatz bei desinfizierten Proben zu ermöglichen, sollte der Nachweis einer Reduktion von mindestens 5 Log-Stufen lebender Bakterien bzw. infektiöser Viren mit der PMA-qPCR ermöglicht werden. In den meisten bisherigen Studien zur PMA-qPCR liegt die Differenz zwischen lebenden und toten Organismen nur bei 1-2 Log-Stufen. Bei Bakterien sollte als zweite Vergleichsmethode die Durchflusszytometrie etabliert und eingesetzt werden.

3.2.1 Standardbedingungen zur Entwicklung der Lebend/tot-Differenzierung

Zum Test der Funktionalität der PMA-qPCR wurden in Anlehnung an bisherige Studien (s. 2.6.2.5) hitzebehandelte Organismen eingesetzt. Hitze zerstört die Hülle der Organismen und erlaubt ein Eindringen von PMA in die Bakterien oder Viren. Für jeden Versuch wurden kultivierte Bakterien oder Viren in Leitungswasser suspendiert (Arbeitslösung, 6.3.1). Die Konzentration der Organismen wurde mit etwa 10^6 Zellen bzw. Viren pro μL hoch gewählt, um bei der qPCR auf eine Konzentrierung verzichten zu können. Die Arbeitslösung wurde zweigeteilt: Ein Teil wurde für zehn Minuten bei $90\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Thermoblock inkubiert (tote / nicht infektiöse Organismen), der andere Teil wurde nicht behandelt (lebende / infektiöse Organismen). Diese beiden Lösungen wurden immer nach dem gleichen Prinzip hergestellt (6.3.3). Da Viren nicht zu der lebenden Welt gezählt werden, wird im Folgenden von unbehandelten (lebenden Bakterien, infektiösen Viren) und hitzebehandelten (tote Bakterien, nicht infektiöse Viren) gesprochen. In der PMA-qPCR sollte das Messergebnis der unbehandelten Probe mit dem der PCR identisch sein (kein Einfluss von PMA auf unbehandelte Organismen). Die hitzebehandelte Probe sollte in der PMA-qPCR nicht nachgewiesen werden (Ausschluss der hitzebehandelten Organismen).

Die unbehandelten und hitzebehandelten Proben wurden jeweils nach dem gleichen Schema in folgenden Methoden quantifiziert:

- **Kulturverfahren**
Arbeitslösungen wurden direkt im Kulturverfahren eingesetzt (6.3.4)
- **qPCR**
Arbeitslösungen wurden extrahiert (6.3.9) und danach in der qPCR quantifiziert (6.3.7).
- **PMA-qPCR**
Arbeitslösungen wurden mit PMA behandelt und fotoaktiviert (6.3.8), extrahiert (6.3.9) und in der qPCR quantifiziert (6.3.7).

3.2.2 Test der PMA-qPCR

In einem initialen Versuch wurde die Lebend/tot-Unterscheidung mit den bereits im Labor etablierten qPCR-Nachweisverfahren getestet. Unbehandelte und hitzebehandelte phiX174 Bakteriophagen wurden mit dem Kulturverfahren (Plaque Assay), der qPCR (261-369 bp) und der PMA-qPCR (100 μ M PMA, 261-369 bp) quantifiziert.

Unbehandelte phiX174 ließen sich in der qPCR, PMA-qPCR und im Kulturverfahren mit vergleichbaren Messwerten von $8,2 \mid 8,4$ und $8,0 \times 10^5$ Genkopien oder PFU pro μ L nachweisen (Abbildung 18, grün). Die Unterschiede liegen im Bereich der Standardabweichung (Maximal $2,50 \times 10^5$ Genkopien pro μ L). PMA hat damit keinen Einfluss auf unbehandelte Bakteriophagen.

Nach der **Hitzebehandlung** (Abbildung 18, rot). wurden im Kulturverfahren keine infektiösen Phagen mehr detektiert. In der qPCR wurde mit $4,24 \times 10^5$ Genkopien pro μ L ein geringerer Messwert erreicht. In der PMA-qPCR werden nach Hitzebehandlung $1,39 \times 10^5$ Genkopien pro μ L detektiert, was 0,78 Log-Stufen Reduktion entspricht.

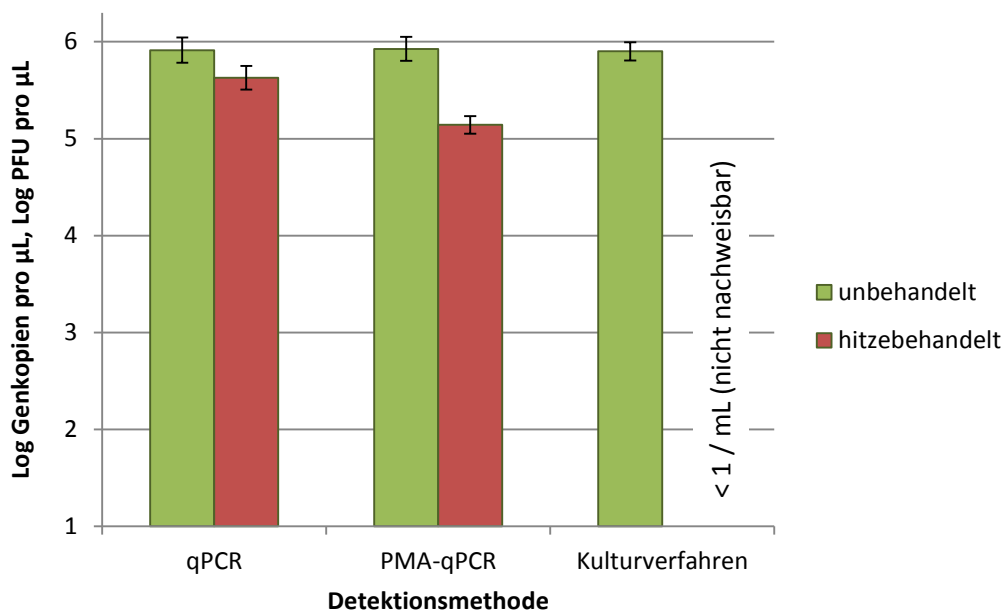


Abbildung 18: Detektion unbehandelter und hitzebehandelter phiX174 Bakteriophagen mittels qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren (n = 3).

Das Kulturverfahren zeigt, dass keine Phagen mehr infektiös sind – das Ergebnis der PMA-qPCR ist für diese Probe demnach zu hoch (falsch positiv). Die Reduktion in der qPCR (ohne PMA) lässt sich durch Beschädigung der Nukleinsäure durch die Hitzebehandlung erklären. Dadurch wird ebenfalls das Kapsid der Viren beschädigt und PMA kann die DNA markieren. Der geringe Einfluss von PMA auf hitzebehandelte Bakteriophagen liegt an der

eingesetzten qPCR. Mit den verwendeten Primern wird nur ein kleines, 108 Basenpaare langes Stück der Viren-DNA amplifiziert. PMA dringt nach Beschädigung des Kapsids in das Virus ein und markiert die Nukleinsäure (Abbildung 19). Da nur ein kleines Stück der viralen DNA amplifiziert wird, ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein PMA-Molekül die Amplifikation in der qPCR stört, sehr gering. Folglich ist die Reduktion in der PMA-qPCR ebenfalls gering. Bei *E. coli* wurden (mit ebenfalls kleinem Amplifikat) vergleichbare Ergebnisse erzielt.

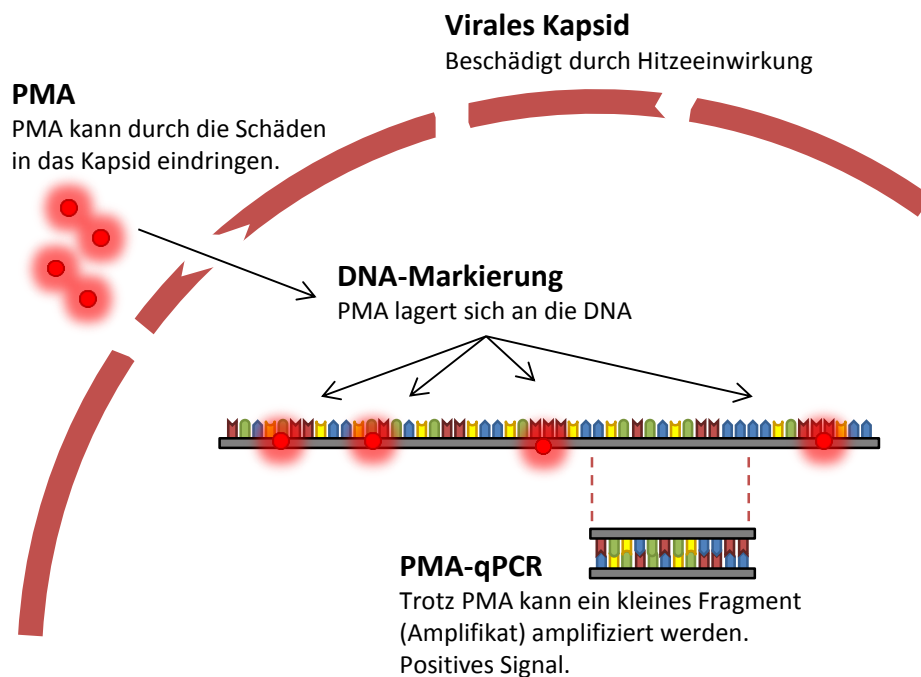


Abbildung 19: Einfluss der Amplifikatgröße auf das Ergebnis der PMA-qPCR.

Bisherig etablierte qPCR-Nachweismethoden wurden speziell für kleine Amplikate um 100 Basenpaare entwickelt. In diesen qPCR-Verfahren konnte die PMA-Behandlung somit nicht erfolgreich integriert werden. Um das Ziel einer Lebend/tot-Differenzierung zu erreichen, mussten neue qPCR-Primer für den Nachweis längerer Amplikate entwickelt werden (LA-qPCR).

3.2.3 Entwicklung der Long amplicon qPCR

In den vorausgehenden Versuchen wurde festgestellt, dass in der PMA-qPCR mit kleinen Amplifikaten nur eine geringe Signalreduktion von hitzebehandelten Organismen erreicht werden kann (s. Abbildung 18). Für keine der Zielorganismen (*phiX174*, MS2, *E. coli*, *E. faecalis*) waren qPCR-Nachweisverfahren und Primer vorhanden, die den Nachweis langer Amplifikate erlaubten. Deswegen mussten neue Primer und Standards für eine qPCR mit langen Amplifikaten entwickelt werden, die *long amplicon qPCR* (LA-qPCR).

Da genau überprüft werden sollte, wie sich die Amplifikatlänge auf die qPCR auswirkt, sollten für jeden Ziel-Organismus mehrere Primer zum Nachweis von Fragmenten von ca. 500 bp und 1000 bp entwickelt werden (Abbildung 20). Die qPCR konnte für Amplifikate bis 550 bp mit den bereits im Labor etablierten qPCR-Reagenzien (*SensiMix SYBR No-ROX Kit*, Bioline, Luckenwalde, Deutschland) durchgeführt werden. Für Amplifikate über 550 bp musste eine andere Polymerase eingesetzt werden: SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad, München, Deutschland) (vgl. Amplifikatgröße bei 2.6.2.5). Alle Primer sollten das gleiche Gen oder die gleiche Region im Genom nachweisen. Somit konnte ein qPCR-Standard für alle Primer-Kombinationen hergestellt werden.

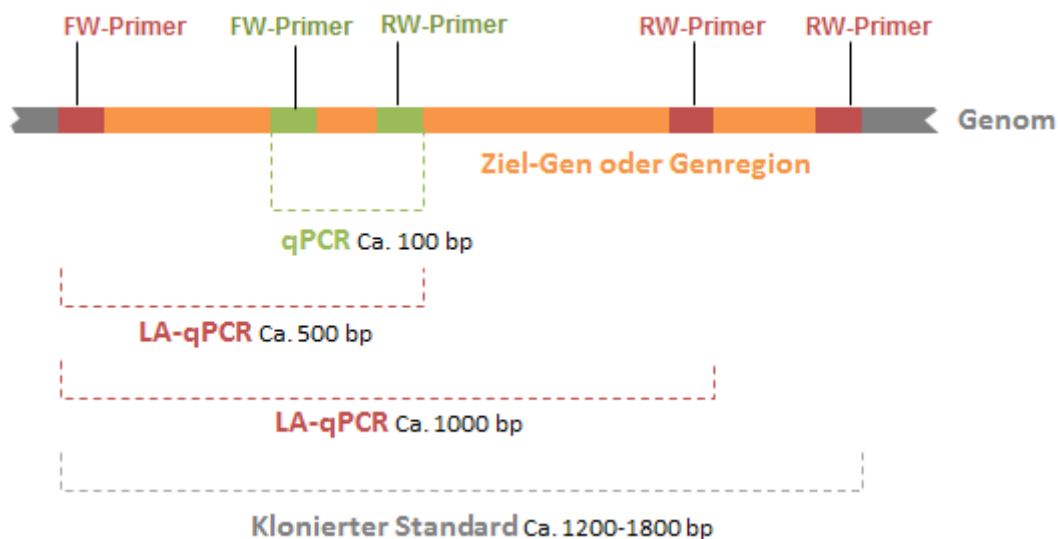


Abbildung 20: Prinzipielle Position der neu entwickelten Primer (rot) für die LA-qPCR.

Grundsätzliches Ziel dieser Entwicklungsphase waren Nachweisverfahren für *phiX174*- und MS2-Bakteriophagen sowie für die Bakterien *E. coli* und *E. faecalis*. Zusätzlich sollte ein allgemeiner Primer für alle Bakterien (16S rDNA) hergestellt werden, um auch ohne spezifische Primer die PMA-qPCR weiterer Bakterien durchführen zu können. Die

Entwicklung wurde in mehreren Schritten durchgeführt:

▪ **Primersuche in der Literatur / Entwicklung neuer Primer (s. 6.4.1)**

Sofern vorhanden wurden Primer aus Literaturquellen bezogen und neu kombiniert, um die entsprechenden Amplifikate nachweisen zu können. Neue Primer wurden mit der frei zugänglichen Software Primer-BLAST (Ye et al., 2012) entwickelt.

▪ **In silico Spezifitätstest (s. 6.4.2)**

In der qPCR soll nur der Ziel-Organismus nachgewiesen werden. Werden auch andere Organismen nachgewiesen, so ist der Primer unspezifisch und das Ergebnis der qPCR kann falsch positiv ausfallen. Deswegen wurde ein Spezifitätstest mit einem Datenbankabgleich (Primer-Blast) durchgeführt. Da in dieser Arbeit nur mit dotierten Proben gearbeitet wurde, ist die Spezifität von geringer Bedeutung. Jedoch macht eine spezifische Entwicklung einen späteren Einsatz bei Umweltproben möglich.

▪ **Erstellen von vektoriellen Standards (s. 6.4.3)**

Das mit dem entwickelten Primern größtmögliche DNA-Fragment wurde in einen bakteriellen Vektor kloniert. Vektorielle Standards werden genutzt, um vom Cq-Wert der qPCR auf die Anzahl der Genkopien zu schließen.

▪ **Optimierung der LA-qPCR (s. 6.4.4)**

Die optimale Annealingtemperatur in der qPCR wurde mittels Temperaturgradient in einem *Eppendorf-Reaplex-Cycler* ermittelt. Als Proben wurden Standards in Konzentration von 10^5 und 10^2 Genkopien pro μL , extrahierte Nukleinsäure und ultrareines Wasser (Negativkontrolle) eingesetzt. Zwölf Temperaturen von $55\text{ }^\circ\text{C}$ bis $70\text{ }^\circ\text{C}$ wurden überprüft.

▪ **Testlauf der qPCR mit Standards (s. 6.4)**

Eine Verdünnungsreihe des entwickelten Standards wurde in der qPCR eingesetzt. Informationen zur Auswertung der qPCR und der Quantifizierungsgrenze sind unter 6.3.7 zu finden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Entwicklung der LA-qPCR für die jeweiligen Organismen separat aufgeführt. In Tabelle 7 sind die Details zu jedem Entwicklungsschritt dargestellt. Eine Liste aller für die späteren Versuche relevanten Primer und die entsprechenden qPCR-Programme sind in Tabelle 33 dargestellt

Tabelle 7: Details zur Entwicklung von LA-qPCR-Primern für phiX174, MS2, *E. coli*, *E. faecalis* und Bakterien (16S).

Organismus	Primersuche in Literatur	Primer-Entwicklung	In silico Spezifitätstest	Erstellen von Standards	qPCR-Optimierung	Testlauf mit Standards
Bakteriophage phiX174 5386 bp ssDNA 11 Gene	Crews et al. (2007) Myers et al. (2009) Weaver und Maling (2003)	Basissequenz NC_001422 Sequenzen auf Seite 56	Primer BLAST mit Zielsequenz NC_001422.	Primer / Genomposition 11 – 1136 (1125 bp Länge) Genomischer Standard mit extrahierter phiX174 DNA.	60 °C als Temperatur für alle Primerkombinationen genutzt. (berechnete Temperatur, Daten aus Projekt Path2Ogenscan).	Test mit allen verfügbaren Primer-Kombinationen.
Bakteriophage MS2 ssRNA 4 Gene	Dreier et al. (2005) O'Connell et al. (2006) Pecson et al. (2009)	Keine Entwicklung notwendig, Literaturquellen ausreichend. Sequenzen auf Seite 59	Primer BLAST mit Zielsequenz GQ153927.1	Primer / Genomposition 2114 – 3304 (1191 bp Länge)	60 °C als Temperatur für alle Primerkombinationen genutzt (Daten aus Projekt Path2Ogenscan).	Test mit allen verfügbaren Primer-Kombinationen.
Bakterium E. coli beta-D- glucuronidase (uidA)	Bej et al. (1991) Heijnen und Medema (2006) Donhauser et al. (2009) Maheux et al. (2009)	Keine Entwicklung notwendig, Primer aus Literaturquellen wurden neu kombiniert. Sequenzen auf Seite 61	Einige Tests bereits durchgeführt durch Maheux et al. (2009) Primer BLAST mit Zielsequenz BA000007.2	Primer / Genomposition 2 – 1812 beta-D-glucuronidase (1810 bp Länge)	Gradienten qPCR 30 30 60 Sekunden 55-70 °C Annealing	Test mit den Kombinationen 2-629 und 570-1812.
Bakterium E. faecalis Superoxid Dismutase (SodA)	Nur eigene Entwicklung	Basissequenz CP008816.1 SodA auf Position 2.498.562 – 2.499.170 Sequenzen auf Seite 65	Primer BLAST mit Zielsequenz CP008816.1.	Primer / Genomposition 55 – 1193 Superoxid Dismutase (1138 bp Länge)	Gradienten qPCR 30 30 60 Sekunden 55-70 °C Annealing	Test mit den Kombinationen aus 56 Forward und 573, 856 und 1193 Reverse.
Bakterien 16S rDNA	Muyzer et al. (1993) Marchesi et al. (1998) Baker et al. (2003) Harris (2003) Smits et al. (2004) Klindworth et al. (2013) Gaza et al. (2015)	Keine Entwicklung notwendig, Literaturquellen ausreichend. Sequenzen auf Seite 69	Spezifitätstest mittels Silva Datenbank (Quast et al. 2013) (s.)	Primer / Genomposition 31 – 1404 (1396 bp Länge)	Gradienten qPCR 30 30 60 Sekunden 55-70 °C Annealing	Test mit den Kombinationen 341-926 und 341-1404.

3.2.3.1 phiX174 Bakteriophagen

Ergebnisse der Primer-Entwicklung/-Suche

Um den Einfluss der Amplifikatlänge detailliert bewerten zu können, wurden für den Nachweis der Bakteriophage phiX174 eine größere Zahl von Primern entwickelt. In der folgenden Tabelle 8 sind diese Primer dargestellt. Die möglichen Amplifikate decken neun der elf Gene von phiX174 ab (s. Abbildung 21).

Tabelle 8: Primer für den qPCR-Nachweis des Bakteriophagen phiX174. * Die Position wurde anhand des Datenbankeintrages NC_001422.1 ermittelt. ** Berechnung nach Nakano et al. (1999).

N.	Länge	Sequenz (5'-3')	Pos*	Richtung	T °C**	Quelle
1	20	GGCCGTCTTCATTTCCATGC	4758	FW	60	Diese Arbeit
2	20	GCAGGACGCTTTTTACGTT	4916	FW	58	Diese Arbeit
3	20	GCTTCCATGACGCAGAAGTT	11	FW	58	(Crews et al., 2007)
4	20	ACTGCTGGCGGAAAATGAGA	119	FW	58	Diese Arbeit
5	20	GGTTCGTCAAGGACTGGTTT	261	FW	58	(Crews et al., 2007)
6	20	TTGAACAGCATCGGACTCAG	369	RW	58	(Crews et al., 2007)
7	19	CGTACCATAAACGCAAGCC	575	RW	57	Diese Arbeit
8	21	CATCCCGTCAACATTCAAACG	647	FW	59	(Myers et al., 2009)
9	19	CTTCCATGATGAGACAGGC	687	RW	57	(Weaver and Malling, 2003)
10	20	ATCTGACCAGCAAGGAAGCC	1074	RW	60	Diese Arbeit
11	20	CGTCCATCTCGAAGGAGTCG	1136	RW	63	Diese Arbeit

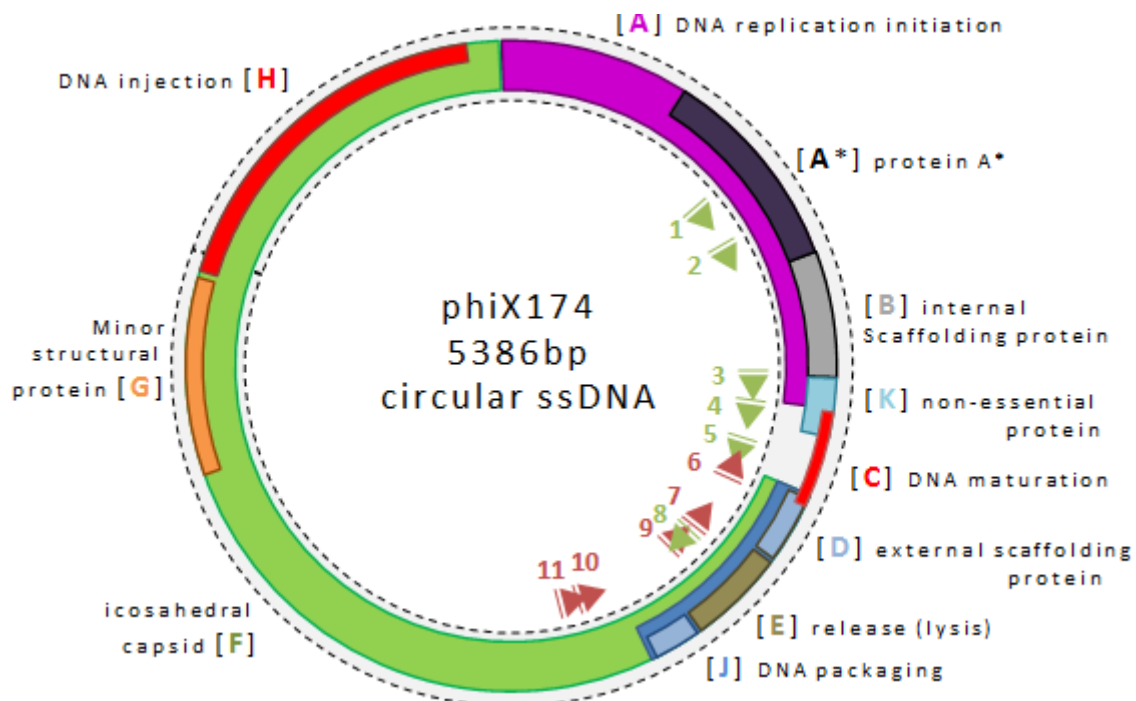


Abbildung 21: Struktur des Genoms von phiX174 Bakteriophagen und Position der verwendeten Primer. Position der Gene nach Sequenz NC_001422 (NCBI) von Air et al. (1985).

In silico Spezifitätstest

Keine anderen Organismen wurden nachgewiesen.

qPCR-Standard

Ein vektorieller Standard konnte bei phiX174 nicht hergestellt werden. In der Standardherstellung waren im Schritt der Blau-Weiß-Selektion nur blaue, aber keine weißen Kolonien zu finden. Eine blaue Kolonie entsteht aus einem Bakterium, welches einen Vektor ohne Insert in der Transformation aufgenommen hat. Die für die qPCR ausgewählte phiX174 DNA enthält mehrere Gene des Virus, unter anderem das Gen E. Dieses kodiert ein Protein, welches ähnlich wie Penicillin auf die Zellwandsynthese des Bakteriums wirkt. Durch die Expression dieses Gens werden Zellen mit Insert am Wachstum gehindert. Somit konnten keine weißen bzw. positiven Klone wachsen und kein vektorieller Standard erstellt werden. Alternativ wurde mit einem genomischen Standard aus extrahierter phiX174 DNA gearbeitet (vgl. 6.3.7).

Der eingesetzte genomische Standard hat den Vorteil, für alle möglichen Primerkombinationen zu funktionieren. Außerdem besitzt er - wie der Bakteriophage selbst - Einzelstrang-DNA. Bei einem Templat aus Einzelstrang-DNA folgt der erste qPCR-Zyklus nicht der normalen Strangverdopplung, da in diesem Schritt zunächst Doppelstrang-DNA aus dem Einzelstrang synthetisiert wird. Wie die Stammlösung hat der Standard eine Konzentration von $2,02 \times 10^{10}$ Phagen pro mL.

Optimierung der qPCR

Die optimale Annealingtemperatur der Primer in der qPCR wurde im Projekt *Path2Ogenscan* (BMBF Förderkennzeichen: 02WU1143) mit 60 °C bestimmt. Dies wurde durch einen Temperaturgradienten (analog zu den Experimenten dieser Arbeit) mit Standards, Positiv- und non-Target-DNA durchgeführt.

Testlauf der qPCR mit Standards

Der Einsatz des genomischen Standards mit zwei Primerkombinationen ist in Abbildung 22 exemplarisch gezeigt. Mit dem genomischen Standard konnten in allen verwendeten Primerkombinationen (Tabelle 9) Effizienzwerte zwischen 0,96 und 1,03 erreicht werden. Lediglich bei dem Nachweis des 445-bp-Amplifikates konnte nur eine Effizienz von 0,80 erreicht werden. Durch die zirkuläre Form des Genoms wurde durch eine spezielle Primerkombination, bei dem der forward Primer (Position 647) hinter dem reverse Primer (Position 369) liegt, die Amplifikation eines 5108 Basenpaaren langen Amplifikates ermöglicht.

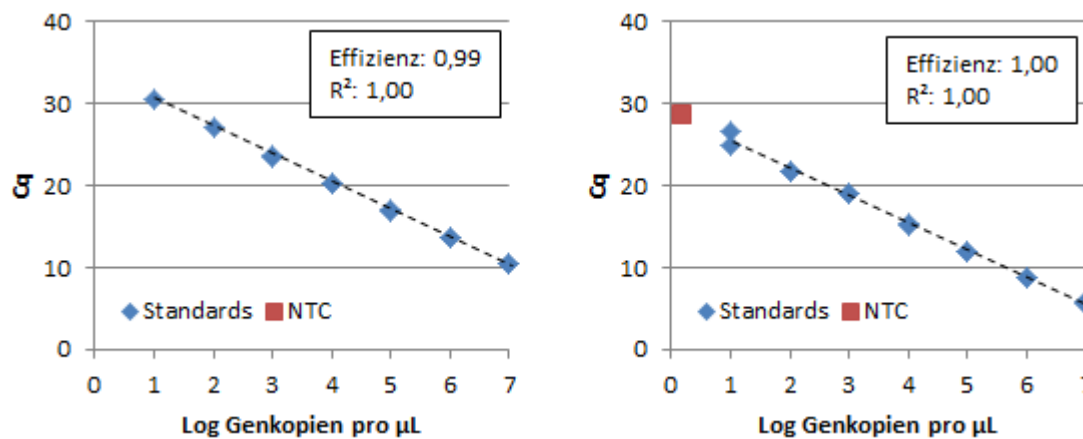


Abbildung 22: Nachweis von phiX174 Bakteriophagen mit zwei Primerkombinationen. Links: 108 bp, rechts: 1063 bp. Bei nicht dargestellte Daten der Negativkontrollen (NTC, *no template control*) lagen die Messpunkte liegen bei einer Kopienzahl $< 1 / \mu\text{L}$ oder $Cq > 40$ ($m = 7$, $n = 3$).

In den Tests zeigte sich, dass mit der Länge des Amplifikates auch die Möglichkeit von unspezifischen Bindungen steigt und nicht alle Verdünnungen des Standards in die Kalibrierung einbezogen werden konnten. Resultierend steigt die Quantifizierungsgrenze des 1525- und 1765-bp-Amplifikates auf 100 Genkopien pro μL . Bei 5108 Basenpaaren konnten trotz dieses Effektes alle eingesetzten Verdünnungen (10^7 bis 10^1 Phagen pro μL) in die Kalibrierung mit einbezogen werden. Die falsch positiven Signale lassen sich im Gel durch kürzere (falsche) Amplifikate nachweisen, eine (quantitative) Trennung der Signale in der qPCR ist jedoch nicht möglich. Die Entwicklung der LA-qPCR von phiX174 war somit erfolgreich.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primerkombinationen mit den Details zu den Protokollen und Daten der Kalibrierkurven. * Taq-Mix: E = EvaGreen, S = SYBR Green. ** Konzentration des niedrigsten Standards in der Kalibrierkurve in Genkopien pro μL .

Amplifikatgröße	108	250	445	564	568	936	1063	1125	1525	1765	5108
FW Primer	261	119	119	11	119	119	11	11	4916	4758	647
RW Primer	369	369	575	564	687	1074	1074	1136	1074	1136	369
Elongationszeit	20s	20s	40s	40s	40s	65s	65s	65s	110s	110s	225s
Taq-Mix *	S	S	S	S	S	E	E	E	E	E	E
Effizienz (STD)	1.00	1.00	0.80	0.96	0.99	1.03	1.02	1.00	0.97	1.00	1.00
R ² (STD)	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.93	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00
m	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	7
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
LOQ **	10	10	10	10	10	10	10	10	100	100	10
Schmelzpunkt	77.7	82.5	83.5	84.0	82.5	85.0	85.7	85.3	85.7	85.0	86.0
Cq des NTC	31.2	39.1	41.3	>45	38.6	21.4	25.4	>45	41.3	27.8	>35

3.2.3.2 MS2 Bakteriophagen

Primersuche in der Literatur / Entwicklung neuer Primer

Für den Nachweis von MS2 Bakteriophagen wurde eine Liste von Primern aus Literaturquellen ausgewählt (Tabelle 10). Daraus ergeben sich neun Primerkombinationen.

Tabelle 10: Eingesetzte Primersequenzen zum qPCR-Nachweis von MS2 Bakteriophagen. * Position in Bezug auf den Datenbankeintrag GQ153927.1. ** Theoretische Annealingtemperatur nach Nakano et al. (1999).

N.	Länge	Sequenz (5´-3´)	Pos*	Richtung	T °C**	Quelle
1	20	CTGGGCAATAGTCAAAGCGA	2717	FW	58	Diese Arbeit, basiert auf (Dreier et al., 2005)
2	20	CGTGGATCTGACATACCTCC	3031	RW	60	
3	21	GCTCTGAGAGCGGCTCTATTG	2232	FW	63	(O'Connell et al., 2006)
4	20	CTACCGATCGTCGTTGTTTG	2114	FW	58	(Pecson et al., 2009)
5	20	TGGTGATACCGAGACTGCC	3150	RW	60	
6	20	TTCATGCTGTCGGTGATTC	3304	RW	56	

In silico Spezifitätstest

Keine anderen Organismen wurden mit den Primerkombinationen nachgewiesen.

Erstellen von Standards

Der erstellte Standard hat eine Insert-Länge von 1191 Basenpaaren (2114-3304 Primer) und stimmt zu 98 % mit dem Datenbankeintrag GQ153927.1 (*Enterobacterio phage MS2 isolate*) überein. Der aufgereinigte und linearisierte Standard hatte eine Konzentration von 16,2 ng/µL, was bei einer Größe von 4191 Basenpaaren (3000 bp Vektor und 1191 bp Insert) $3,53 \times 10^9$ Genkopien pro µL entspricht (Formel 8, s. S. 210). Folgende Abbildung zeigt die Position des Standards im Genom von MS2 sowie die Position der Primer.

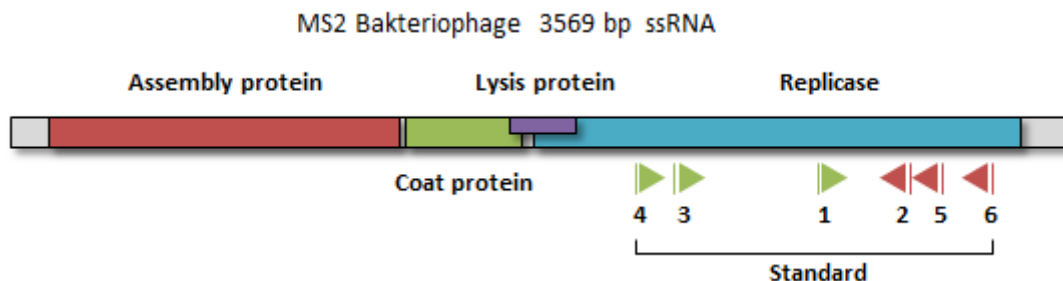


Abbildung 23: Genomaufbau von MS2 Bakteriophagen mit vier kodierenden Genen und Positionen der Primer entsprechend der Nummerierung in Tabelle 10.

Optimierung der qPCR

Die optimale Annealingtemperatur der Primer in der qPCR wurde im Projekt Path2Ogenscan (BMBF Förderkennzeichen: 02WU1143) mit 60 °C bestimmt. Diese Temperatur wurde für alle Primerkombinationen genutzt. Dies wurde durch einen Temperaturgradienten (analog zu den Experimenten dieser Arbeit) mit Standards, Positiv- und non-Target DNA durchgeführt.

Testlauf der qPCR mit Standards

Die verschiedenen Primerkombinationen wurden in einer qPCR mit Verdünnungsreihe des Standards vermessen. Die Ergebnisse sind beispielhaft für zwei Primerpaare in Abbildung 24 und zusammenfassend in Tabelle 11 dargestellt.

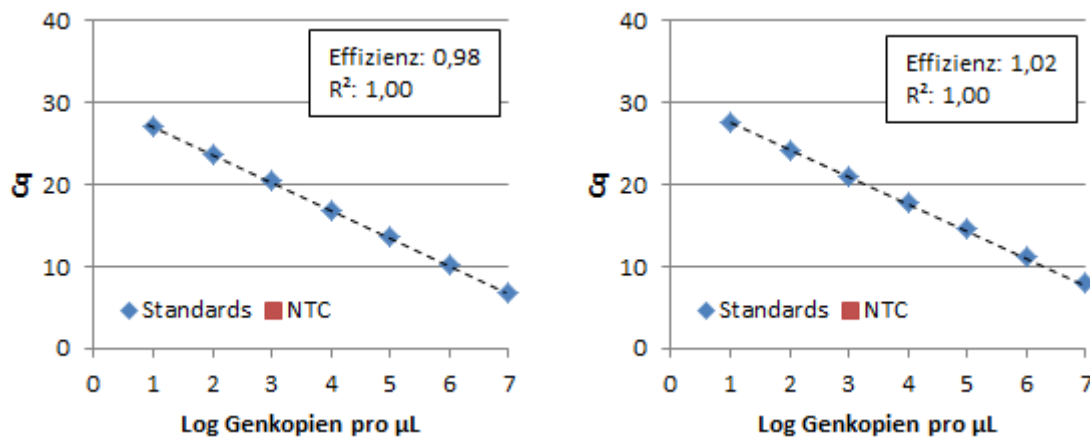


Abbildung 24: Nachweis von MS2 Bakteriophagen mit dem Primerpaar 2114-3031 (links) und 2717-3031 (rechts). Nicht dargestellte NTC (no template control) Messpunkte liegen bei Cq > 40 (m = 7, n = 3).

Alle Kombinationen mit den Reverse Primern an den Positionen 3031 und 3150 erlauben eine qPCR mit Effizienzwerten über 0,97. Die Effizienz mit dem 3304-Reverse Primer war grundsätzlich schlechter (0,85-0,87). Der Primer hat die niedrigste Annealingtemperatur (theoretisch 56 °C). In der durchgeführten qPCR wurden 60 °C eingesetzt – eine bessere Effizienz ist bei niedrigen Temperaturen wahrscheinlich, allerdings würde dies auch eine geringere Spezifität bedeuten. Die Negativkontrolle (NTC) lag bei allen Reaktionen unter dem Schwellenwert der qPCR (Cq > 45). Die Entwicklung der LA-qPCR für MS2 Bakteriophagen war somit erfolgreich.

Tabelle 11: Liste der überprüften Primerkombinationen mit den Details zu den Protokollen und Daten der Kalibrierkurven. * Taq-Mix: E = EvaGreen, S = SYBR Green. ** Konzentration des niedrigsten Standards in der Kalibrierkurve in Genkopien pro μL .

Amplifikatgröße	314	799	917	433	918	1036	587	1072	1190
FW Primer	2717	2232	2114	2717	2232	2114	2717	2232	2114
RW Primer	3031			3150			3304		
Elongationszeit	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Taq-Mix *	S	S	S	E	E	E	E	E	E
Effizienz (STD)	1,02	0,97	0,98	1,01	0,99	0,93	0,85	0,87	0,86
R ² (STD)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00
m	7	7	7	6	7	7	7	7	7
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
LOQ **	10,3	11,6	10,0	95,6	9,3	5,9	8,1	9,3	11,7
Schmelzpunkt (STD)	86	86	87	87	87	87	88	87	88
Cq des NTC	> 45	> 45	> 45	> 45	> 45	> 45	> 45	> 45	> 45

3.2.3.3 *E. coli*

Primersuche in Literatur / Entwicklung neuer Primer

Aus der Datenbanksuche wurden 12 Primer ermittelt. Diese wurden bereits von Maheux et al. (2009) positiv auf ihre Spezifität für *E. coli* getestet. Sechs Primer wurden für die LA-qPCR entsprechend der Amplifikatlänge ausgewählt (Tabelle 12). Die Primerbindestellen sind alle auf dem UidA Gen von *E. coli* lokalisiert und ermöglichen je nach Kombination Amplifikatlängen bis zu 1810 bp.

Tabelle 12: qPCR-Primer für den Nachweis von *E. coli*. * Position relativ zum Start des UidA Gens im Datenbankeintrag BA000007.2. ** Theoretische Annealingtemperatur nach Nakano et al. (1999).

N.	Länge	Sequenz (5'-3')	Pos*	Richtung	T °C**	Quelle
1	19	CGGTTCGTTGGCAATACTC	570	FW	57	(Donhauser et al., 2009)
2	20	CTGATAGCGCGTGACAAAAA	629	RW	56	
3	20	AAAACGGCAAGAAAAAGCAG	1359	RW	54	(Bej et al., 1991)
4	22	TGTTACGTCCTGTAGAAAGCCC	1812	RW	62	
5	21	ATGGAATTCGCCGATTTTGC	168	RW	57	(Heijnen and Medema, 2006)
6	20	ATTGTTGCCTCCCTGCTGC	2	FW	60	

In silico Spezifitätstest

Der Spezifitätstest mit Primer-BLAST ergab nur bei den Primerkombinationen mit dem Reverse Primer 1812 Übereinstimmung bei einer Nicht-Ziel-Spezies (*Staphylococcus carnosus*). Die Formation setzt allerdings eine Primer-Bindung mit 5 Missmatches (Fehlpaarungen) voraus, was bei einer optimierten Annealingtemperatur sehr unwahrscheinlich ist. Alle anderen Primerkombinationen waren im Abgleich spezifisch, da keine mögliche Reaktion mit Nicht-Ziel-Spezies gefunden wurden.

Erstellen von Standards

Die Sequenzierung des Standards ergab eine Größe von 1812 Basenpaaren (2 - 1812 Primer). Alle Primersequenzen sind im Standard enthalten. Die Datenbanksuche mit BLAST (NCBI) ergab 99 % Ähnlichkeit zum Eintrag *Escherichia coli* FAP1 beta-D-glucuronidase (CP009578.1, 2216892-2215084). Der aufgereinigte und linearisierte Standard hatte eine Konzentration von 138,7 ng/μL, was bei einer Größe von 4812 Basenpaaren (3000 bp Vektor und 1812 bp Insert) $2,63 \times 10^{10}$ Genkopien pro μL entspricht (Formel 8, s. S. 210). Folgende Abbildung zeigt die Position des Standards in der Region des UidA-Gens.

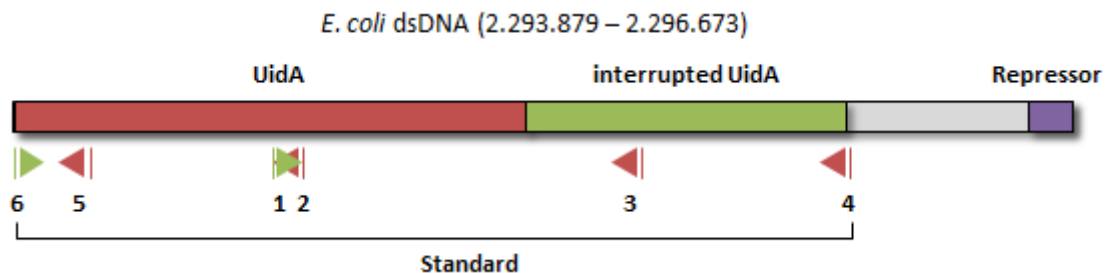


Abbildung 25: Schema des UidA-Standards und Position der Primer entsprechend der Nummerierung in Tabelle 12.

Optimierung der qPCR

In einer qPCR mit Temperaturgradient wurde die optimale Annealingtemperatur für die Primerpaare 2-629 und 570-1812 ermittelt. Bei dem Primerpaar 570-1812 verändern sich die C_q-Werte bei allen eingesetzten Proben mit einer maximalen Abweichung von 0,4 über den gesamten Temperaturgradienten nur geringfügig (Abbildung 26, rechts). Als Annealingtemperatur kann somit 70 °C genutzt werden. Die Standards zeigen bei dem Primerpaar 2-629 (Abbildung 26, links) vergleichbare C_q-Werte. Bei höheren Temperaturen steigen jedoch die C_q-Werte der extrahierten DNA.

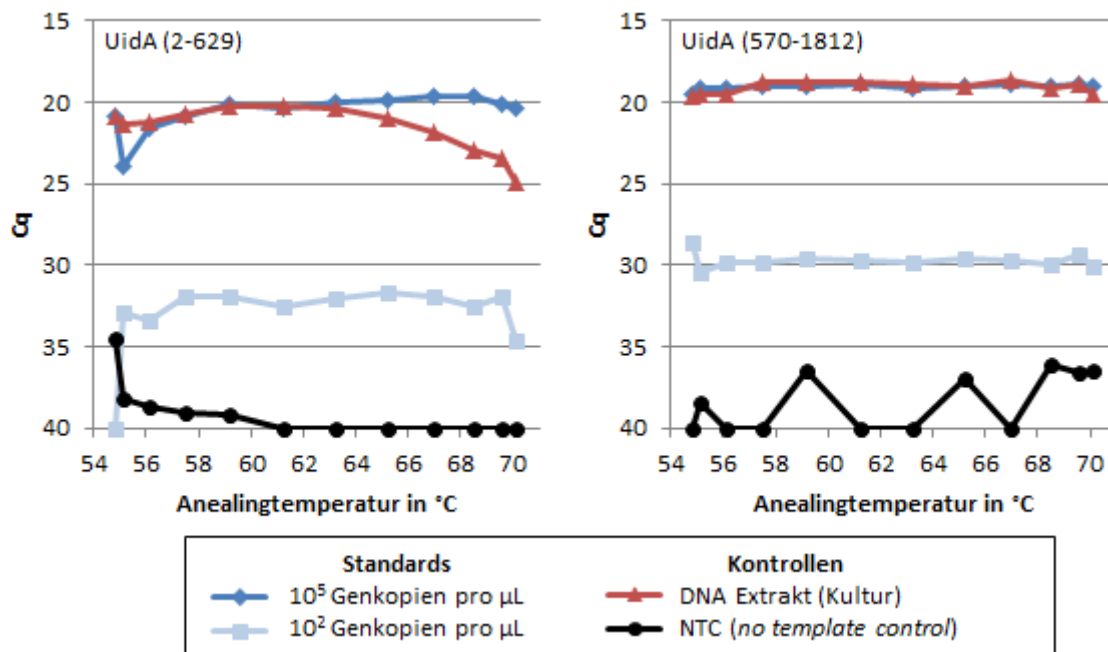


Abbildung 26: Cq-Werte des *E. coli* (UidA) Standards bei verschiedenen Annealingtemperaturen. Links: Primer an den Positionen 2; 629. Rechts: Primer an den Positionen 570-1812 (rechts).

Die Abweichung der Cq-Werte bei Standard und Extrakt kann durch geringe Sequenzunterschiede an den Primerbindestellen der jeweiligen Proben hervorgerufen werden. Stimmen die Sequenzen nicht vollständig überein, sinkt die Bindungsenthalpie und erschwert die Primer-Templat-Bindung. Gleichzeitig steigt der Cq-Wert. Beim Standard geschieht dies nicht – hier zeigt die Sequenzierung, dass Template und Primer an der Bindestelle komplett übereinstimmen.

Die Produktgrößenanalyse (QIAxcel) zeigt bei fast allen Proben ein Fragment in der entsprechenden Größe. Mit dem 570-1812-Primerpaar ist bei einer Annealingtemperatur von 55 °C bei der extrahierten *E. coli* DNA neben dem eigentlichen Produkt noch ein Fragment von 583 bp sichtbar (Abbildung 27, rechts, blau). Bei 65 °C ist nur das Zielprodukt vorhanden. Die Schmelzkurven (Abbildung 27, links) zeigen sowohl bei 55 °C als auch bei 65 °C einen einzelnen Schmelzpunkt bei etwa 87 °C. Die falsche Bindung ist demnach nicht in der Schmelzkurve zu erkennen.

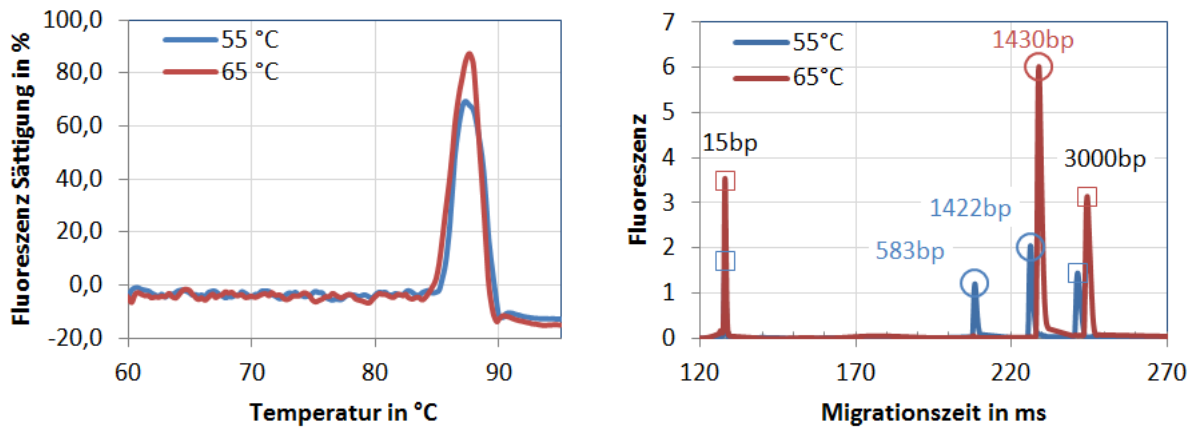


Abbildung 27: Qualitätskontrolle der *UidA* qPCR von *E. coli* DNA mit dem Primerpaar 570-1812 bei verschiedenen Annealingtemperaturen. Links: Schmelzkurven des qPCR-Gerätes. Rechts: Elektropherogramm der Produktgrößenanalyse mit QIAxcel. Die jeweilig ermittelten Produktgrößen sind entsprechend farblich mit Kreisen markiert. Kalibrierpunkte bei 15 und 3000 bp.

Das zusätzliche Produkt entsteht durch eine unspezifische Bindung eines Primers, die sich mit der Erhöhung der Temperatur verringert. Dies tritt nur bei der extrahierten *E. coli*-Probe auf, die genomische DNA enthält. Der Standard enthält neben der Zielsequenz lediglich noch das Plasmid – eine falsche Paarung der Primer ist somit weniger wahrscheinlich und tritt hier deswegen nicht auf.

Testlauf der qPCR mit Standards

Mit dem optimierten Temperaturprogramm waren für die Primer-Kombinationen 2-629 und 570-1812 Kalibrierkurven mit dem *UidA* Standard im Konzentrationsbereich von 10^1 bis 10^6 Kopien pro μL möglich (Abbildung 28). Die Effizienz lag bei 1,04 ($R^2 = 0,99$, $m = 6$, $n = 3$) sowie 0,94 ($R^2 = 1,00$, $m = 7$, $n = 3$). Details der Auswertung sind in Tabelle 13 dargestellt.

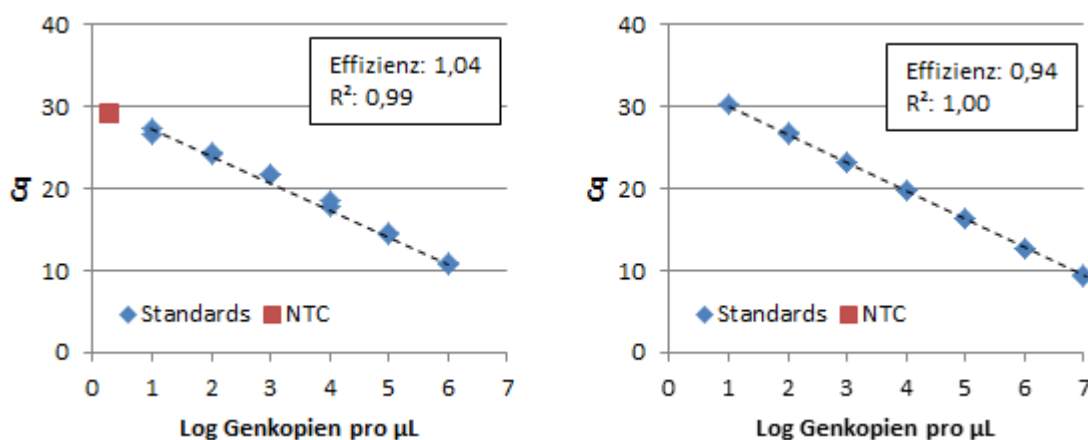


Abbildung 28: Nachweis von *E. coli* mit dem Primerpaar 2-629 (links, $m = 6$, $n = 3$) und 570-1812 (rechts, $m = 7$, $n = 3$). Nicht dargestellte NTC (no template control) Messpunkte liegen bei $C_q > 40$.

Tabelle 13: Liste der überprüften Primerkombinationen mit den Details zu den Protokollen und Daten der Kalibrierkurven. * Taq-Mix: E= EvaGreen, S=SYBR Green. ** Konzentration des niedrigsten Standards in der Kalibrierkurve in Genkopien pro μL .

Amplifikatgröße	627	1242
FW Primer	2	570
RW Primer	629	1812
Elongationszeit	30	30
Taq-Mix *	S	E
Effizienz (STD)	1,04	0,94
R ² (STD)	0,99	1,00
m	6	7
n	3	3
LOQ **	11,1	10,0
Schmelzpunkt (STD)	87,1	89,0
Cq des NTC	29,0	> 40

3.2.3.4 *E. faecalis*

Primersuche in der Literatur / Entwicklung neuer Primer

Aus der Datenbanksuche mit Primer-BLAST wurden fünf Kombinationen von Primern ausgewählt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Mit Primer-BLAST entwickelte Primer für den qPCR-Nachweis von *E. faecalis*. * Position relativ zum Start des Soda Gens im Datenbankeintrag CP008816.1. ** Theoretische Annealingtemperatur nach Nakano et al. (1999).

N.	Länge	Sequenz (5´-3´)	Pos*	Richtung	T °C**
1	20	TTGACGTGGAAACAATGCAC	56	FW	56
2	20	TGCTCAATTCCTCAGCGGT	857	RW	58
3	20	CCGCTGTAAAGCGAATGGTG	1193	RW	60
4	23	CCCAGTTAACAACGTTCCAGAAT	553	RW	61
5	25	GCTGCWGCAAAAAGTTCGTTTACTT	578	RW	62

In silico Spezifitätstest

Bei keiner der vier Primerkombinationen wurden andere Treffer in der Datenbank gefunden.

Erstellen von Standards

Der entwickelte Standard hat eine Insertlänge von 1198 Basenpaaren. Die Datenbankanalyse (BLAST) der Sequenz ergab 99 % Ähnlichkeit zum Eintrag *Enterococcus faecalis* V583 superoxide dismutase (AE016830.1, 431050-432244). Der aufgereinigte und linearisierte Standard hatte eine Konzentration von 21,3 ng/μL, was bei einer Größe von 4198 Basenpaaren (3000 bp Standard und 1198 bp Insert) $4,63 \times 10^9$ Genkopien pro μL entspricht (Formel 8, s. S. 210). Folgende Abbildung zeigt die Position des Standards in der Region des SodA-Gens.

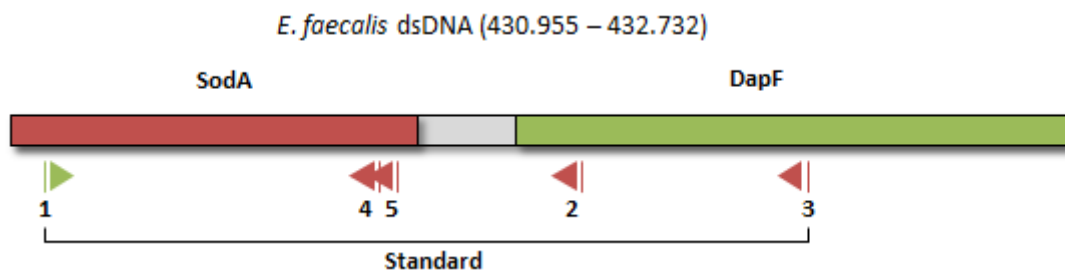


Abbildung 29: Schema des Standards für *E. faecalis* und Position der Primer aus Tabelle 14.

Optimierung der qPCR

In einer qPCR mit Temperaturgradient wurde die optimale Annealingtemperatur für die Primerpaare 56-573 und 56-1193 ermittelt. Beide Temperaturgradienten zeigen nur sehr geringe Abweichungen in den C_q-Werten für Standards und extrahierter DNA bei steigender Annealingtemperatur bis zu 65 °C für die qPCR mit den Primern 56-573 und 67 °C für die qPCR mit den Primern 56-1193 (Abbildung 30). 65 °C bzw. 67 °C können somit für den Annealingschritt in der qPCR verwendet werden. Sowohl Gel als auch Schmelzkurve zeigen keine Auffälligkeiten oder ein zusätzliches Produkt.

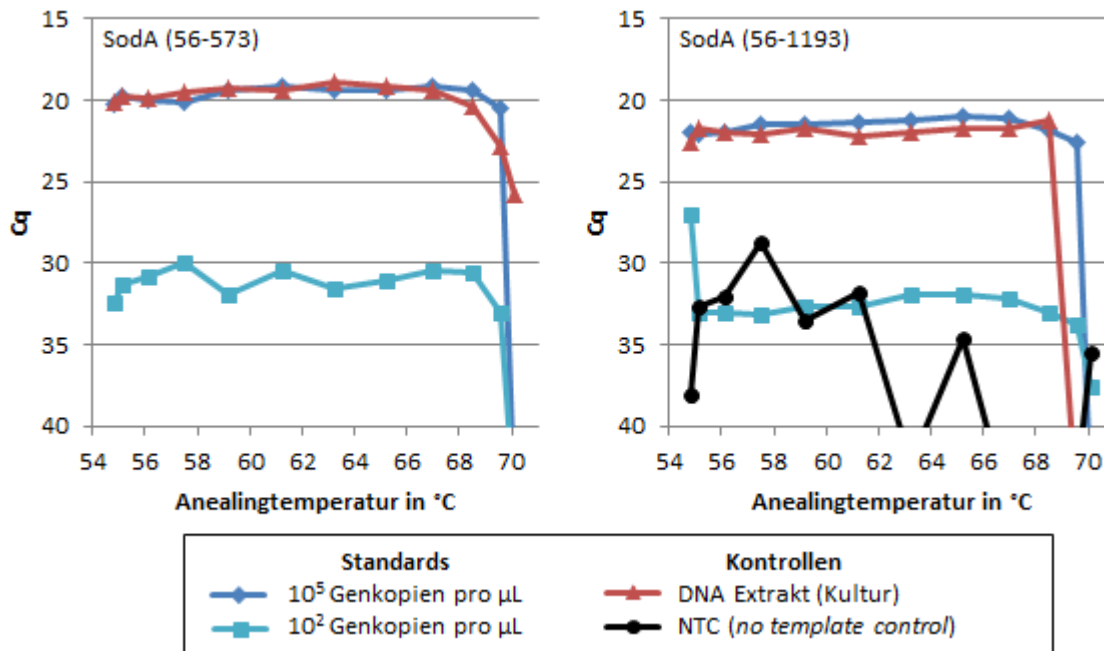


Abbildung 30: Cq-Werte einer qPCR von *E. faecalis* DNA und dem SodA Standard mit den Primerpaaren 56-573 und 56-1193 in Abhängigkeit der Annealingtemperatur.

Testlauf der qPCR mit Standards

Mit dem optimierten Temperaturprogramm waren für die Primer-Kombinationen 56-573 und 56-1193 Kalibrierkurven mit dem SodA Standard im Konzentrationsbereich von 10^1 bis 10^7 Kopien pro μL möglich (Abbildung 31). Die Effizienz lag jeweils bei 0,96 ($R^2 = 1,00$, $m = 7$, $n = 3$), Negativkontrollen waren nicht nachweisbar ($Cq > 40$).

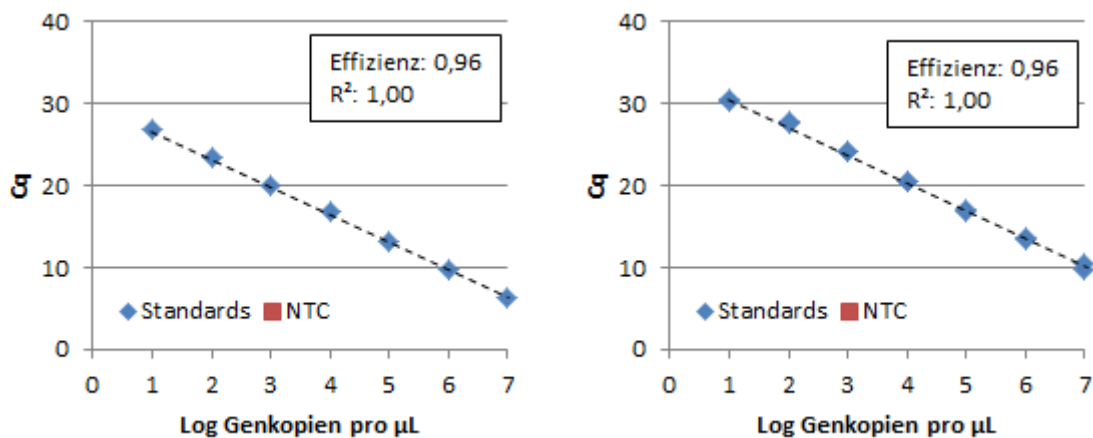


Abbildung 31: Nachweis von *E. faecalis* mit der qPCR. Links: Primer an den Positionen 56-573. Rechts: Primer an den Positionen 56-1193. Nicht dargestellte NTC (no template control) Messpunkte liegen bei $Cq > 40$ ($m = 7$, $n = 3$).

Tabelle 15: Liste der überprüften Primerkombinationen mit den Details zu den Protokollen und Daten der Kalibrierkurven. * Taq-Mix: E = EvaGreen, S = SYBR Green. ** Konzentration des niedrigsten Standards in der Kalibrierkurve in Genkopien pro μL .

Amplifikatgröße	517	1137
FW Primer	56	
RW Primer	573	1193
Elongationszeit	30	30
Taq-Mix *	S	E
Effizienz (STD)	1,00	1,00
R ² (STD)	0,96	0,96
m	7	7
n	3	3
LOQ **	10,0	14,0
Schmelzpunkt (STD)	87,0	88,8
Cq des NTC	> 40	> 40

3.2.3.5 Gesamtbakterienzahl (16S)

Primersuche in der Literatur / Entwicklung neuer Primer

Für den Nachweis von Bakterien wurden insgesamt 19 Primer aus Literaturquellen weiter untersucht (Tabelle 16).

In silico Spezifitätstest

Mit der 16S-qPCR sollen alle Bakterien nachgewiesen werden. Somit muss der Primer möglichst alle Bakterien erfassen und entsprechend unspezifisch sein. Im Entwicklungsprozess wurde mit einem Datenbankabgleich geprüft, ob alle Bakteriengruppen erfasst werden können (Methode s. 6.4.5).

Die Primer erfassen maximal 95 % bis minimal 12 % der bakteriellen Sequenzen in der Datenbank. Alle Primer sind in den konservierten Regionen des 16S-Gens lokalisiert (vergl. Abbildung 32), wobei jene mit niedriger Übereinstimmung teilweise in die variablen Regionen reichen. Dies ist gut bei den Primern Nr. 1, 5, 12 und 15 (Tabelle 16) ersichtlich: Die Position im Gen unterscheidet sich nur minimal, jedoch sinkt die Spezifität mit steigender Position. In einigen Primern werden variable Positionen im 16S-rRNA-Gen durch den Einsatz von Wobbeln (bzw. Mischungen verschiedener Primer) kompensiert.

Tabelle 16: Liste der getesteten qPCR-Primer für den unspezifischen Nachweis von Bakterien. Die Datenbanktreffer zeigen an, an welchen Anteil der in der 16S-Datenbank (Silva) enthaltenen Bakterien der Primer bindet.

Primer-Eigenschaften					Datenbanktreffer	
Nr.	Sequenz	Position	Richtung	Quelle	Bakt. (0 miss)	Bakt. (2 miss)
1	CCTACGGGNGGCWGCAG	341	FW	(Klindworth et al., 2013)	95 %	99 %
2	GACTACHVGGGTATCTAATCC	805	RW		91 %	97 %
3	AGAGTTTGATCMTGGC	8	FW		84 %	96 %
4	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT	926	RW	(Gaza et al., 2015)	90 %	98 %
5	CCTACGGGAGGCAGCAG	341	FW	(Muyzer et al., 1993)	91 %	98 %
6	ATTACCGGGCTGCTGGC	534	RW		87 %	98 %
7	AGAGTTGATCCTGGCTCAG	8	FW	(Smits et al., 2004)	66 %	94 %
8	GGTTACCTGTACGACTT	1510	RW		30 %	70 %
9	CAGGCTAACACATGCAAGTC	43	FW	(Marchesi et al., 1998)	12 %	82 %
10	GGGCGGWTGTACAAGGC	1404	RW		53 %	78 %
11	GCTCAGGAYGAACGCTGG	22	FW	(Harris, 2003)	35 %	68 %
12	TACTGCTGCCCGTA	358	RW		13 %	98 %
13	GAGTTTGATCCTGGCTC	9	FW	(Baker et al., 2003)	67 %	94 %
14	AGTTTGATCCTGGCT	10	FW		67 %	95 %
15	CAGACTCTACGGGAGGCA	335	FW		73 %	97 %
16	GATTAGATACCTGG	786	FW		82 %	98 %
17	CTTGTGCGGGCCCCGTAATTC	939	RW		62 %	95 %
18	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	1541	RW		40 %	46 %

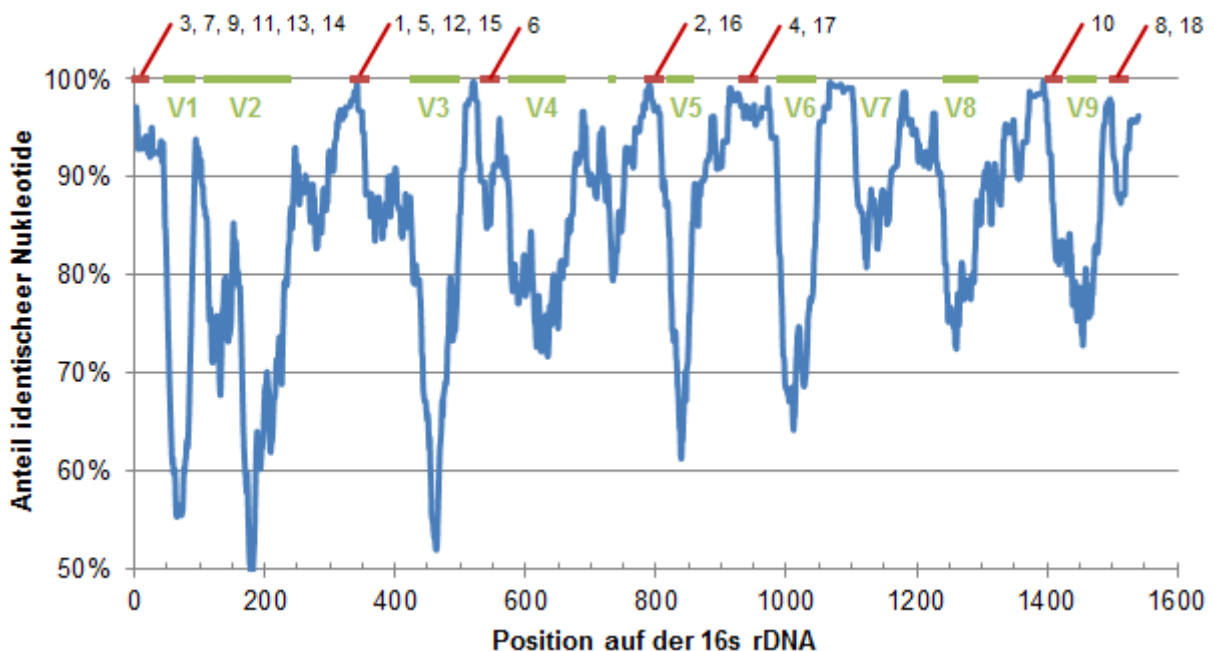


Abbildung 32: Konservierte und variable Regionen (V1 – V9) der 16S rDNA. Die Positionen der Primer sind in rot, variable Regionen (unter 80 % identische Nukleotide) in grün dargestellt. Schwarze Ziffern entsprechen den Primern aus Tabelle 13.

Die beste Kombination für ein Amplifikat um 500 Basenpaare bietet die Kombination der Primer 341 FW (Nr. 1) und 926 RW (Nr. 4). Ein Amplifikat über 1000 Basenpaare ist bei gleichem Forward Primer an Position 1404 (Nr. 10) am besten möglich. Eine bessere Abdeckung der Datenbank, allerdings mit einem kleineren Amplifikat von 918 bp, wird von der Primerkombination 8 FW (Nr. 3) und 926 RW (Nr. 4) ermöglicht.

Erstellen von Standards

Um mit allen Primerkombinationen arbeiten zu können, wurde der vektorielle Standard mit den Primern 8 FW und 1404 RW erstellt. Als Template wurde extrahierte *E. coli* DNA einer Arbeitslösung eingesetzt. Das Insert hat eine Länge von 1506 Basenpaaren. Die Sequenz entspricht dem Datenbankeintrag *Escherichia coli strain ST540 rRNA-16S ribosomal RNA* (CP007391.1, 1253904-1252402) zu 99 %. Der aufgereinigte und linearisierte Standard hatte eine Konzentration von 60,1 ng/μL, was bei einer Größe von 4506 Basenpaaren (3000 bp Vektor und 1506 bp Insert) $1,22 \times 10^{10}$ Genkopien pro μL entspricht (Formel 8, s. S. 210).

Optimierung der qPCR

In einer qPCR mit Temperaturgradient wurde die optimale Annealingtemperatur für die Primerpaare 341-926 und 341-1404 ermittelt (Abbildung 33). Bei den Primern 341-926 liefert eine Annealingtemperatur von 59 °C die niedrigsten C_q-Werte. Abweichende Temperaturen führten zu höheren Messwerten. Die Primerkombination 341-1404 zeigt nahezu konstante C_q-Werte für einen breiten Temperaturbereich. Bei Annealingtemperaturen über 65 °C kommt es zu einem Anstieg der C_q-Werte. Für die Primer 341-1404 sollte somit höchstens 65 °C als Annealingtemperatur genutzt werden.

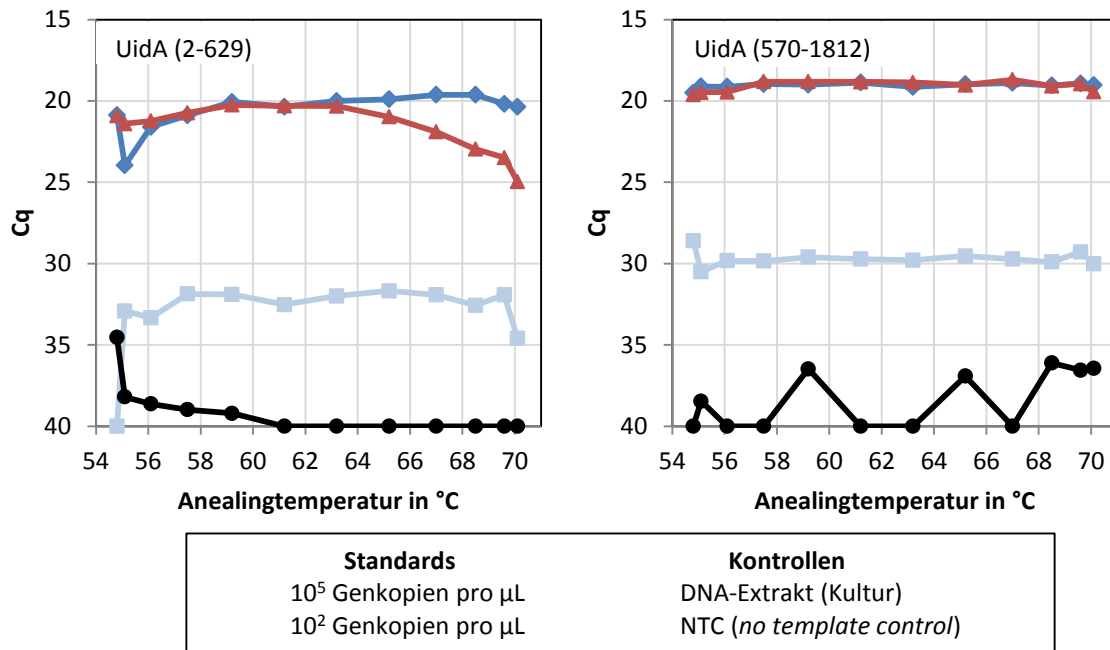


Abbildung 33: Cq-Werte einer qPCR von *E. coli* DNA und dem 16S Standard mit den Primerpaaren an den Positionen 341-926 (links) und 341-1404 (rechts) in Abhängigkeit der Annealingtemperatur.

Testlauf der qPCR mit Standards

Mit dem optimierten Temperaturprogramm waren für die Primer-Kombination 341-926 Kalibrierkurven mit dem 16S-Standard im Konzentrationsbereich von 10² bis 10⁷ Kopien pro µL möglich (Abbildung 34, links). Der Standard in der niedrigsten Konzentration konnte nicht in die Kalibriergerade einbezogen werden. Die Negativkontrolle lag mit einem Cq von 34,6 bei ca. 16 Genkopien pro µL. Beim 341-1404-Primerpaar konnten alle Standards in die Kalibriergerade einbezogen werden. Die Negativkontrolle lag mit durchschnittlich 3 Genkopien pro µL unter der niedrigsten Standardkonzentration.

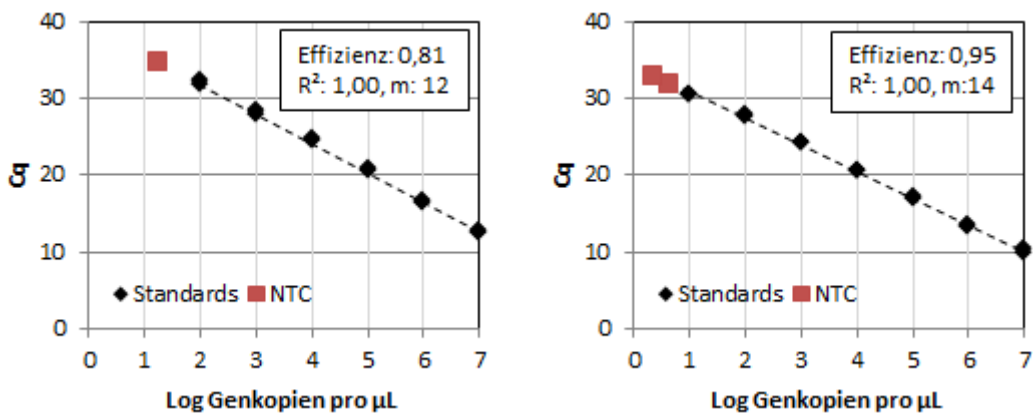


Abbildung 34: qPCR Läufe mit dem 16S Standard zum Nachweis aller Bakterien mit den Primerpaaren 341-926 (links, m = 12, n = 3) und 341-1404 (rechts, m = 14, n = 3).

Tabelle 17: Liste der überprüften Primerkombinationen mit den Details zu den Protokollen und Daten der Kalibrierkurven. * Taq-Mix: E = EvaGreen, S = SYBR Green. ** Konzentration des niedrigsten Standards in der Kalibrierkurve in Genkopien pro μL .

Amplifikatgröße	585	1063
FW Primer	341	
RW Primer	926	1404
Elongationszeit	30	30
Taq-Mix *	S	E
Effizienz (STD)	1,00	1,00
R ² (STD)	0,81	0,95
m	12	14
n	3	3
LOQ **	109	13,3
Schmelzpunkt (STD)	86,9	88,2
Cq des NTC	34,6	32,5

Kopienzahl der 16S rDNA pro Genom

In der qPCR wird bei der Kalibrierung mit einem vektoriellen Standard die Zahl der Genkopien ermittelt. Das Gen der 16S rDNA ist mehrmals im Genom von Bakterien enthalten – somit ist der Wert des Standards nicht äquivalent zur Anzahl der Organismen. Beispielsweise entsprechen 70 rDNA-Genkopien in einer *E. coli* Probe nicht 70 Bakterien, sondern nur zehn, da jedes *E. coli* Bakterium das Gen der rRNA in siebenfacher Ausführung trägt.

Um aus der Kopienzahl der 16S Gene in der qPCR die Zahl der Organismen zu berechnen, musste die Anzahl der Genkopien pro Genom bestimmt werden. Dies wurde mit einer Datenbankanalyse ermittelt (6.4.6). Insgesamt wurden 4021 Datenbankeinträge analysiert und nach Bakteriengruppen geordnet (Tabelle 18).

Tabelle 18: Anzahl der Kopien der 16S rDNA in dem Genom verschiedener Bakteriengruppen. Rote Einträge weichen um mehr als 20 % von Literaturangaben ab (n = Anzahl Genome).

Bakterien (Gruppe)	Nach Větrovský und Baldrian (2013)		Diese Arbeit	
	Anzahl Genome (n)	16S / Genom	Anzahl Genome (n)	16S / Genom
Bacteria	Nicht angegeben		4021	4,5±2,9
Actinobacteria	201	3,1±1,7	465	3,1±1,7
Aquificae	6	2,0±0,6	15	1,9±0,6
Bacteroidetes/Chlorobi group	59	3,5±1,5	156	3,4±1,7
Caldiserica	1	1	1	1
Chlamydiae/Verrucomicrobia group	72	1,4±0,5	116	1,7±0,5
Chloroflexi	10	2,2±1,2	26	1,5±1
Cyanobacteria	23	2,3±1,2	87	2,3±1
Deferribacteres	4	2,0±0,0	4	2±0
Deinococcus-Thermus	16	2,7±1,0	21	2,5±0,9
Dictyoglomi	2	2,0±0,0	2	2±0
Elusimicrobia	1	1	3	1±0
Fibrobacteres/Acidobacteria group	2	3	10	1,6±0,8
Firmicutes	395	5,8±2,8	939	6,9±3
Fusobacteria	5	5,0±0,7	16	4,8±0,7
Gemmatimonadetes	1	1	2	1,5±0,5
Nitrospirae	2	2,0±1,4	7	1,7±0,7
Planctomycetes	6	1,7±0,8	6	2,8±2,4
Proteobacteria	n.a.	n,a	2018	4,4±2,6
Alphaproteobacteria	179	2,2±1,3	345	2,1±1,3
Betaproteobacteria	101	3,3±1,6	280	2,8±1,5
Deltaproteobacteria	43	2,7±1,4	71	2,8±1,3
Epsilonproteobacteria	70	3,0±1,1	174	2,6±0,7
Gammaproteobacteria	379	5,8±2,8	1148	5,8±2,3
Spirochaetes	31	2,4±1,0	41	2,1±0,8
Synergistetes	4	2,5±1,0	4	2,8±0,4
Tenericutes	43	1,6±0,5	35	1,5±0,5
Thermodesulfobacteria	1	2	3	1,3±0,5
Thermotogae	13	1,8±1,0	28	1,5±0,8

Die Ergebnisse weichen bei einigen der Organismengruppen, beispielsweise den Planctomycetes, leicht von Literaturdaten ab (Větrovský and Baldrian, 2013). Bei Větrovský und Baldrian wurden die Daten in mehreren separaten Schritten analysiert, wohingegen die Analyse in dieser Arbeit automatisiert durchgeführt wurde.

Diese Daten dienen der Übertragung des Messwertes *16S-Genkopien* aus der qPCR beim Einsatz eines vektoriiellen Standards zur eigentlichen Anzahl der Bakterien. Dies stellt vor allem bei unbekanntem Mischpopulationen (durch die hohe Standardabweichung von 2,9 bei einem Wert von 4,5 Genkopien pro Bakterium) lediglich eine Annäherung an den realen Wert dar. Dennoch ist die Einbeziehung der Genkopien pro Bakterium ein wichtiger Schritt zur indirekten Quantifizierung. Neben der Gesamtbakterienzahl können die 16S Primer auch für

Reinkulturen eingesetzt werden. Die Zahl der Genkopien pro Bakterium ist für die in dieser Arbeit untersuchten Spezies in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Anzahl der 16S rDNA in den Genomen in dieser Arbeit eingesetzten Bakterien. * Unzureichende Daten. Die Werte der jeweilig höher gelegenen phylogenetischen Gruppe wurde als Referenz verwendet (n = Anzahl Genome).

Bakterium	Untersuchte Einträge (n)	16S / Genom
<i>Campylobacter jejuni</i>	23	3±0
<i>Campylobacter lari</i>	2	3±0
<i>Escherichia coli</i>	101	7,6±0,5
<i>Escherichia hermannii</i> * (Enterobacteriaceae)	353	6,9±1,3
<i>Legionella pneumophila</i>	12	5,2±1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	2,9±0,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> * (Enterobacteriaceae)	353	6,9±1,3
<i>Bacillus subtilis</i>	62	7±1,1
<i>Clostridium perfringens</i>	3	8,7±1,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	7±0,3
<i>Enterococcus faecium</i>	5	4±0
<i>Enterococcus gallinarum</i>	19	6±0
<i>Micrococcus luteus</i> * (Actinobacteria)	465	3,1±1,7

Mit den Zahl der 16S rDNA pro Bakterium lässt sich aus der Kopienzahl der 16S rDNA Gene in einer qPCR ein Äquivalent zur Anzahl der Genome (Genom Äq.) bzw. der Bakterienzahl ermitteln (Formel 1).

Formel 1

$$\text{Genom } \ddot{A}q_{\text{Bakterium}} = \frac{16S \text{ Genkopien in qPCR}}{16S \text{ Genkopien pro Genom}_{\text{Bakterium}}}$$

Die Formel wird zur Berechnung der Bakterienzahl eines 16S qPCR im folgenden Kapitel, beispielsweise im der Entwicklung der LA-PMA-qPCR, bei verschiedenen Bakterien eingesetzt (s. Abbildung 55).

3.2.3.6 Fazit der Entwicklung der LA-qPCR

Die Entwicklung aller LA-qPCR-Nachweisverfahren für phiX174 und MS2 Bakteriophagen, allen Bakterien (16S), sowie den Bakterien *E. coli* und *E. faecalis* konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Die Lebend/tot-Unterscheidung kann nun mit diesen qPCR-Methoden weiter entwickelt werden.

3.2.4 Long amplicon PMA-qPCR

Die ursprünglichen qPCR-Nachweisverfahren mit kurzen Amplifikaten konnten nicht für die PMA-qPCR genutzt werden. Deswegen wurden neue Primer für lange Amplifikate und entsprechende Standards für die *long amplicon* qPCR (LA-PMA-qPCR) entwickelt, mit denen die Etablierung der Lebend/tot-Unterscheidung fortgesetzt werden konnte.

Für die Versuche wurden unbehandelte und hitzebehandelte Organismen eingesetzt. Ziel dieses Entwicklungsschrittes ist die Optimierung der Applikation von PMA zur Unterscheidung dieser Organismen. Bei der Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA haben diverse Parameter Einfluss auf die Wirkung von PMA (vgl. 2.6.2.5), wobei in dieser Arbeit besonders die PMA-Konzentration untersucht wurde. Generell sollten Parameter wie PMA-Konzentration, Inkubationszeit, Reaktionstemperatur und Belichtung so optimiert werden, dass:

- Unbehandelte Organismen von PMA nicht beeinflusst werden (A)
- Hitzebehandelte Organismen nicht erfasst werden (B)

In bisherigen Versuchen wurde die PMA-Behandlung nur für eine Organismenkonzentration durchgeführt. Außerdem konnte in viele Studien zur PMA-qPCR durch die Lebend/tot-Unterscheidung nur eine geringe Signalreduktion dargestellt werden (vgl. 2.6.2.5). In zwei Testverfahren soll geprüft werden, ob die LA-PMA-qPCR auch bei geringen und hohen Organismenkonzentrationen eingesetzt werden kann. Zusätzlich sollen die Ziele A und B der Entwicklung geprüft werden. Das Prinzip beider Methoden ist in Abbildung 35 dargestellt und die Methode unter 6.5.1 beschrieben.

- A. Um zu prüfen, ob PMA keinen Einfluss auf **unbehandelte Organismen** in unterschiedlichen Konzentrationen hat (falsch negativ), wurde eine Verdünnungsreihe mit der LA-PMA-qPCR quantifiziert. Die Anzahl der Bakterien wurde mikroskopisch (Gesamtzellzahl), die der Viren über das Kulturverfahren bestimmt und diente als Basiswert für den Vergleich der Methoden. Mit steril filtriertem Leitungswasser (0,2 µM Filter) wurde – ausgehend von der Arbeitslösung – eine dekadische Verdünnungsreihe bis 10^{-7} erstellt. Die Proben wurden mit PMA behandelt, extrahiert und mit der LA-qPCR quantifiziert.
- B. Zum Test der Funktionalität der Lebend/tot-Unterscheidung wurde jede Verdünnung der **unbehandelten** Organismen mit einer konstanten Menge **hitzebehandelter** Organismen gemischt. Die Menge an lebenden Organismen ändert sich somit entsprechend der Verdünnungsreihe, die Konzentration toter Organismen bleibt konstant. Es ergeben sich die Mischverhältnisse von 1:1, 1:10, 1:100 usw. unbehandelter und hitzebehandelter Organismen.

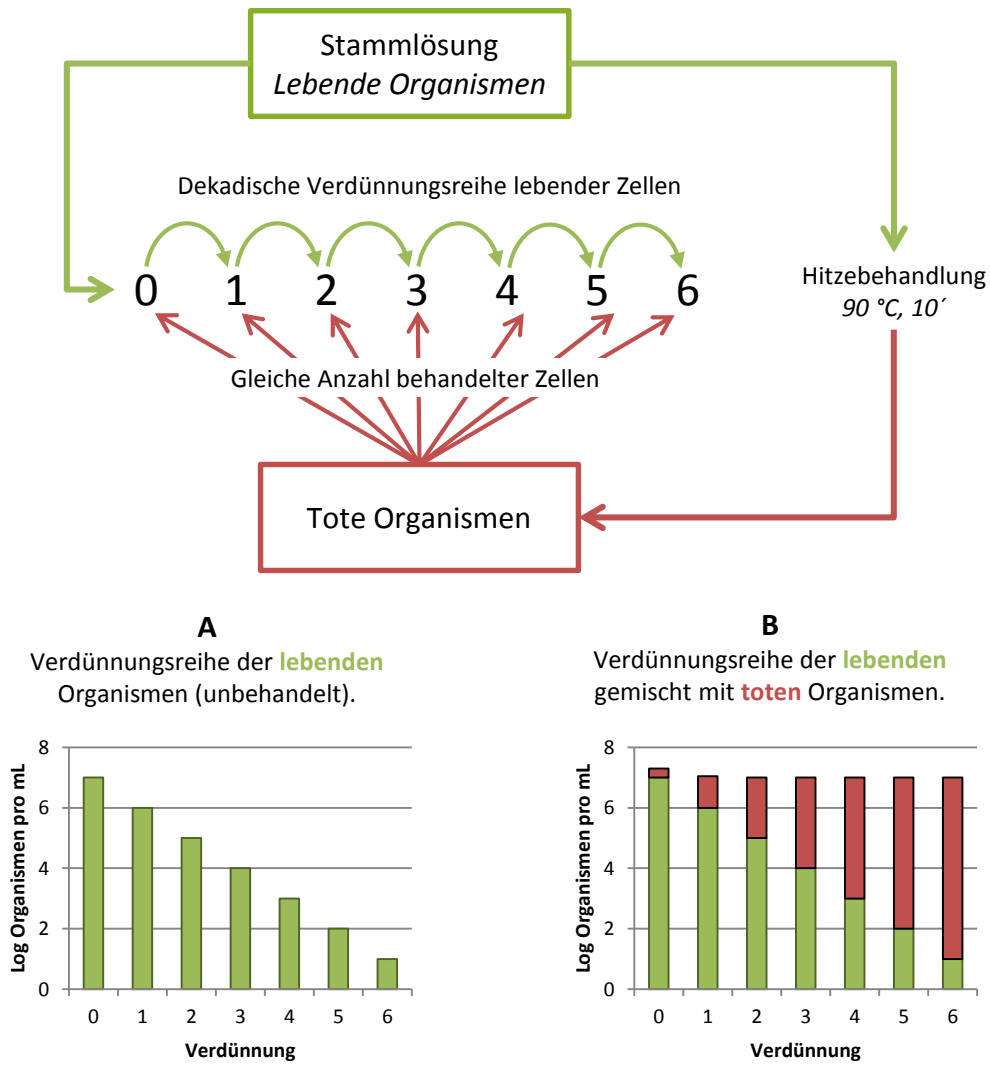


Abbildung 35: Ablaufschema des Methodenvergleiches für *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* und phiX174.

3.2.4.1 phiX174- und MS2-Bakteriophagen

Wirkung von PMA auf die Nukleotide von MS2 und phiX174

Die bisherigen Ergebnisse der PMA-qPCR zeigten nur eine geringe Reduktion im Messsignal bei hitzebehandelten Bakteriophagen. Das Genom von phiX174 besteht aus Einzelstrang-DNA (ssDNA), das von MS2 aus Einzelstrang-RNA (ssRNA). Das Genom von Bakterien besteht aus Doppelstrang-DNA (dsDNA). Die Art der Nucleinsäure könnte somit einen Einfluss auf das Interkalieren der PMA-Moleküle und somit auf die PMA-qPCR haben.

Einzelstrang- (ss) und Doppelstrang-DNA (ds) von phiX174 sowie Einzelstrang-RNA (ss) und cDNA von MS2 wurden mit 50 µM PMA behandelt und mit der qPCR quantifiziert. Für die qPCR kamen die Primerpaare 119-687 (phiX174) und 2717-3031 (MS2) zum Einsatz.

Sowohl bei Einzel- und Doppelstrang-DNA (bzw. cDNA) als auch bei Einzelstrang-RNA bewirkte PMA eine starke Reduktion des qPCR-Signales gegenüber den Kontrollproben ohne PMA (Abbildung 36). Die Ergebnisse zeigen, dass PMA bei Viren mit ssDNA (phiX174), als auch bei ssRNA (MS2) eingesetzt werden kann.

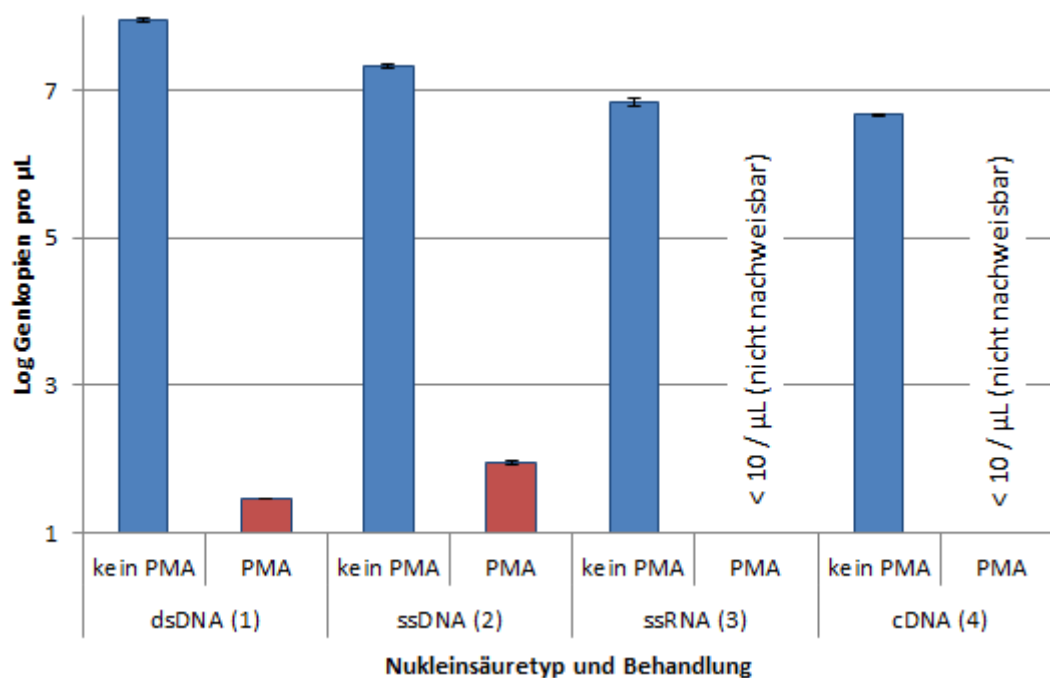


Abbildung 36: qPCR-Ergebnisse von mit PMA behandelter Einzel- und Doppelstrang-DNA sowie Einzelstrang RNA der Bakteriophagen phiX174 und MS2 (n = 2).

Graiver et al. (2010) kommen zu dem Schluss, dass zumindest EMA bei RNA nicht effektiv ist. In der Studie wurde kein Effekt durch PMA bei inaktiven Influenzaviren festgestellt. Dies steht zwar im Widerspruch zu den Ergebnissen in dieser Arbeit, allerdings wurden die Viren bei Graiver et al. bei 37 °C inaktiviert, worauf die viralen Kapside mit höchster

Wahrscheinlichkeit noch intakt waren und EMA nicht zur RNA gelangen konnte. Bei den vergleichbaren Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumiodid oder Ethidiumbromid gibt es keinen Unterschied in der Markierung von Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA (Cosa et al., 2007). Eine aktuelle Studie von Prevost et al. (2016) konnte mittlerweile die Wirksamkeit von PMA bei Einzel- und Doppelstrang-RNA und DNA bestätigen.

Einfluss der PMA-Konzentration auf unbehandelte Phagen

Unbehandelte MS2 und phiX174 Bakteriophagen wurden mit unterschiedlichen PMA-Konzentrationen behandelt und in der qPCR quantifiziert (Abbildung 37). Bei **phiX174** (Primer 119-687) zeigte sich kein Einfluss auf das qPCR-Signal und auch bei hohen Konzentrationen von 400 μM wurden nicht weniger Bakteriophagen detektiert. Bei **MS2** (Primer 2717-3031) zeigte sich bereits bei 1 μM PMA eine starke Reduktion des Signales. Mit höheren Konzentrationen lagen die Werte unter der Quantifizierungsgrenze (10 Genkopien pro μL).

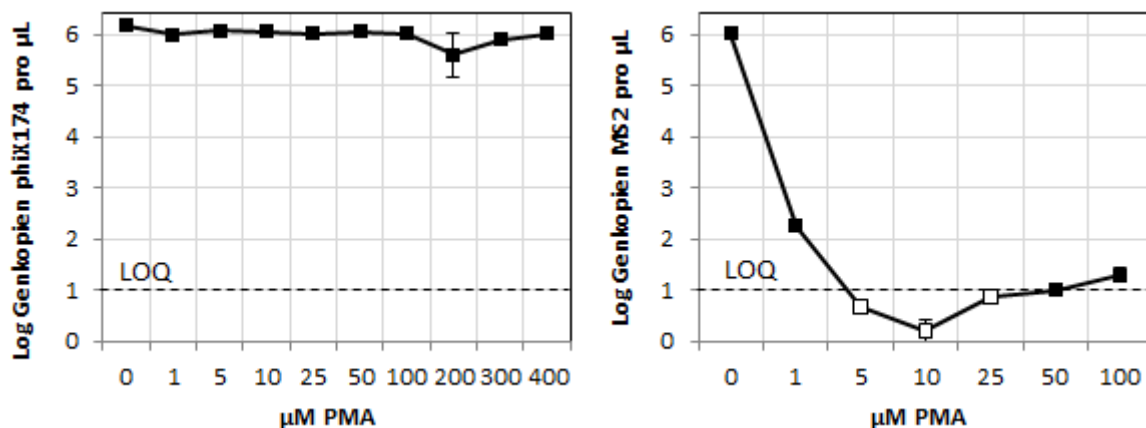


Abbildung 37: qPCR-Ergebnisse nach Applikation verschiedener PMA-Konzentrationen auf unbehandelte MS2 (rechts, n = 3) und phiX174 Bakteriophagen (links, n = 3). Nicht ausgefüllte Symbole liegen unterhalb der Quantifizierungsgrenze (LOQ).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PMA sehr leicht in das Kapsid von MS2 eindringen kann, nicht jedoch in phiX174. In der Studie von Kim und Ko (2012) wurde bei MS2 ebenfalls auf den Einfluss von PMA auf intakte Viren bei 125 μM PMA hingewiesen. Zusätzlich werden auch abweichende Messergebnisse von PMA-qPCR und Kulturverfahren beschrieben. Ein vergleichbares Verhalten ist bei der Desinfektion mit Chlor zu beobachten, welches MS2 (im Vergleich zu phiX174) bereits bei sehr geringen Konzentrationen inaktiviert (Hornstra et al., 2011). Ein möglicher Effekt von PMA auf die Extraktion oder das cDNA-Synthese-Kit in dieser Arbeit ist nicht auszuschließen. Es gibt zurzeit keine weitere Literatur zur PMA-Behandlung von MS2 Bakteriophagen. Einige Studien zeigen, dass PMA durchaus bei Einzelstrang-RNA Viren eingesetzt werden kann, z.B. bei murinen Noroviren (Karim et al., 2015), Mengoviren (Fongaro et al., 2016) oder Hepatitis A (Moreno et al., 2015). Viren unterscheiden sich beispielsweise durch den Aufbau und die Ladungseigenschaften der

Hülle bzw. dem isoelektrischen Punkt. So liegt der isoelektrische Punkt bei MS2 bei ca. 3,9, bei phiX174 bei ca. 7,0. Bei den in den genannten Studien behandelten Mengo- und Noroviren liegt der isoelektrische Punkt bei etwa 6 (Chlumecka et al., 1977; Michen and Graule, 2010). Dieser Unterscheid wird bei Versuchen mit unterschiedlichen pH-Werten im Folgenden aufgegriffen.

Auswirkung des pH-Wertes auf die PMA-qPCR bei Viren

Viren sind bei pH-Werten unter dem isoelektrischen Punkt positiv und bei pH-Werten darüber negativ geladen. Da PMA ebenfalls positiv geladen ist, ist eine Auswirkung des isoelektrischen Punktes der Viren und des pH-Wertes der Probe auf die PMA-qPCR denkbar. Dies wurde experimentell mit unbehandelten und hitzebehandelten MS2 und phiX174 Bakteriophagen überprüft. Der pH-Wert von in sterilem Leitungswasser suspendierten Phagen wurde auf 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 12 eingestellt. Die Proben wurden mit 100 µM PMA behandelt und mittels qPCR (phiX174 Primer: 119-687, MS2 Primer: 2717-3031) quantifiziert (Abbildung 38).

Von pH 7 an sinkt das Signal von unbehandelten phiX174 Bakteriophagen mit dem pH-Wert geringfügig. Nur bei pH 12 wurden über 2 Log-Stufen weniger Phagen detektiert. Generell wurden hitzebehandelte phiX174 erfolgreich durch PMA von der qPCR ausgeschlossen, lediglich bei pH 10 wurden mehr Phagen gemessen.

Wie bereits im vorherigen Versuch beobachtet wurde, führt PMA bei unbehandelten MS2 bei neutralem pH-Wert zu einer starken Signalreduktion. Auch bei höheren pH-Werten konnten keine Phagen detektiert werden. Im sauren Bereich war der Nachweis erfolgreich – der höchste Messwert konnte bei pH 4 ermittelt werden. Gleichermaßen wurden im sauren Milieu auch hitzebehandelte MS2 Bakteriophagen detektiert.

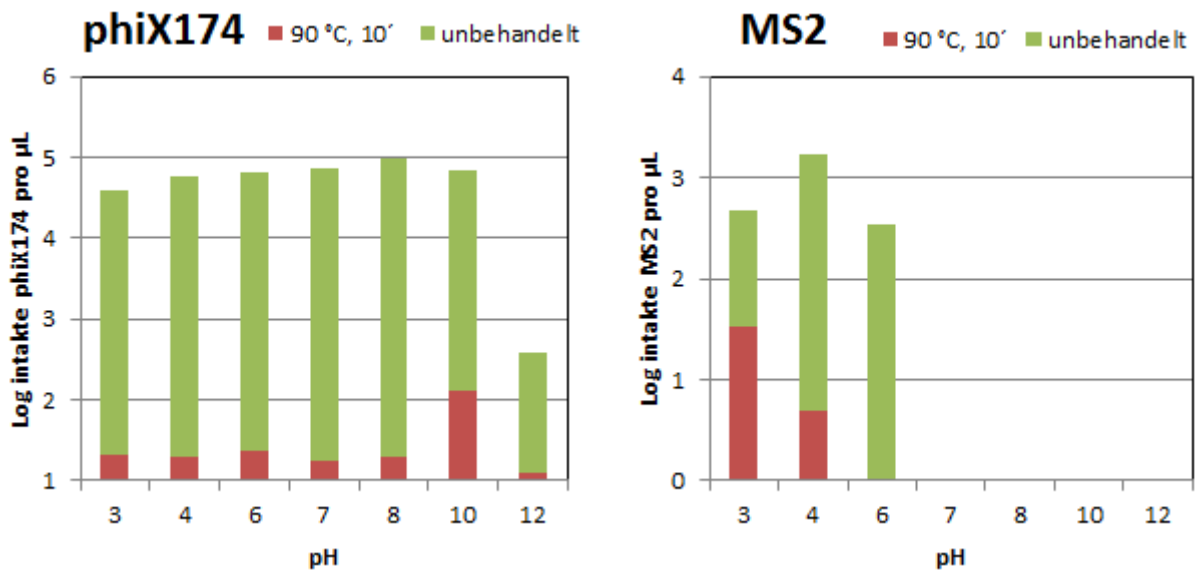


Abbildung 38: Ergebnisse der PMA-qPCR von unbehandelten und hitzebehandelte phiX174 und MS2 Bakteriophagen bei unterschiedlichen pH-Werten (n=2). IE = Isoelektrischer Punkt nach Michen und Graule (2010).

Die Ergebnisse des Vergleiches zeigen, wie groß der Einfluss des pH-Wertes bei Viren ist. Gleichzeitig zeigt sich, dass das beste Ergebnis (kein Einfluss von PMA auf intakte Viren und Ausschluss der hitzebehandelten Viren) bei pH-Werten im Bereich des isoelektrischen Punktes der Viren erreicht wurden. Speziell bei unbehandelten MS2 wurden bei pH 4 am meisten Phagen in der PMA-qPCR detektiert. Der Effekt lässt sich dadurch begründen, dass weniger PMA in die Viren eindringen kann - gleichermaßen steigt das Signal hitzebehandelter Phagen an.

Trotz der dargestellten Ergebnisse konnte die PMA-qPCR für MS2 Bakteriophagen bei pH 4 nicht erfolgreich durchgeführt werden. So zeigte sich bei den für die Desinfektionsversuche eingesetzten Proben auch bei pH 4 eine starke Reduktion der Kontrollproben. Generell gestaltet sich die Anpassung des pH-Wertes bei qPCR-Proben durch das sehr kleine Probevolumen (v.a. nach einer Aufkonzentrierung) problematisch.

LA-PMA-qPCR hitzebehandelter phiX174

Unbehandelte und hitzebehandelte phiX174 Bakteriophagen wurden mittels PMA-qPCR (100 µM PMA) mit unterschiedlichen Primern (261-369, 119-687, 11-1074) und dem Kulturverfahren quantifiziert.

Das Signal hitzebehandelter Viren verringerte sich mit steigender Amplifikatgröße der qPCR (Abbildung 39). Gleichzeitig stieg der Effekt von PMA und die damit verbundene Reduktion des qPCR-Signales. Bei der qPCR mit dem 1063 Basenpaaren großen Amplifikat (Primer 11-1074) und im Kulturverfahren konnten keine intakten Viren nachgewiesen werden.

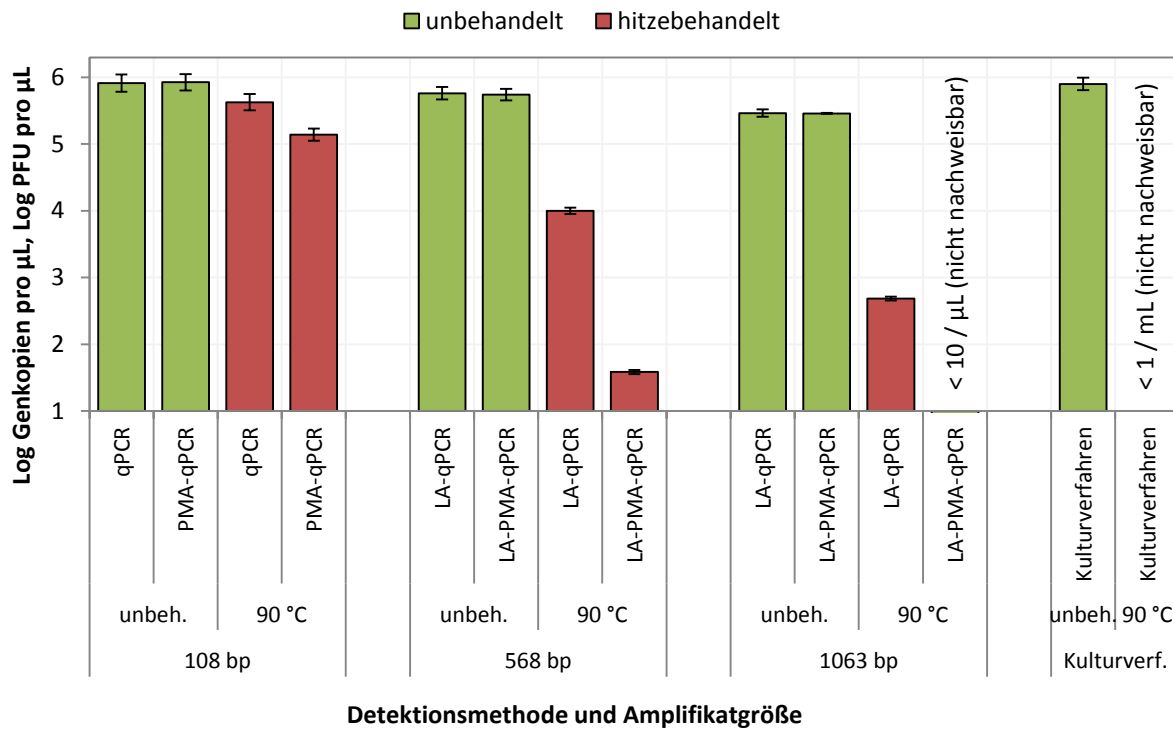


Abbildung 39: Ergebnisse aus qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren für unbehandelte (8 °C) und hitzebehandelte (90 °C, 10 min) phiX174 Bakteriophagen (n = 3).

Hitze verursacht Strangbrüche in der DNA sowie direkte Schäden am Kapsid des Virus. Außerdem spielen oxidative Prozesse eine Rolle, die ebenfalls Schäden hervorrufen können (Chernikov et al., 2007). Mit größeren Amplifikaten können die Schäden an der DNA des Virus besser erfasst werden (größere Signalreduktion). Durch Hitze wird die Hülle der Viren zerstört oder durchlässig, PMA kann eindringen und die DNA markieren. Wie die hitzeinduzierten DNA-Schäden verteilt sich die PMA-Markierung auf das komplette Genom des Virus. Je größer das DNA-Stück ist, das in der qPCR analysiert wird, desto wahrscheinlicher wird es, dass ein PMA-Molekül die Amplifikation in der qPCR stört. Somit ist die Reaktion in der LA-PMA-qPCR größer als in der PMA-qPCR.

PMA-qPCR hitzebehandelter MS2

Unbehandelte und hitzebehandelte MS2 Bakteriophagen wurden mit 5 µM PMA behandelt und mit der qPCR (Primer 2717-3031) quantifiziert (Abbildung 40). Bei **unbehandelten** MS2 lieferten qPCR und Kulturverfahren die gleichen Ergebnisse. Durch PMA wurde das Signal behandelter MS2 um mehrere Log-Stufen reduziert. Es konnten keine **hitzebehandelten** MS2 im Kulturverfahren nachgewiesen werden (> 8 Log-Stufen Reduktion). In der qPCR werden etwa eine, in der PMA-qPCR etwa vier Log-Stufen erreicht.

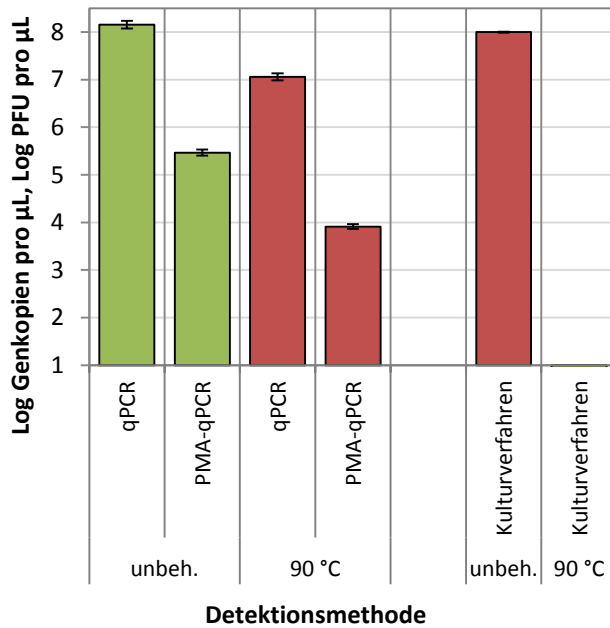


Abbildung 40: Ergebnisse aus qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren für unbehandelte (8 °C) und hitzebehandelte (90 °C, 10 min) MS2 Bakteriophagen (n = 3).

Mit PMA wurde in der qPCR nur eine Reduktion von 3 Log-Stufen erreicht. Mit einem größeren Amplifikat könnte in der LA-PMA-qPCR eine höhere Reduktion erreicht werden - allerdings würde der starke Effekt von PMA auf unbehandelte MS2 ebenfalls verstärkt werden.

Test der LA-PMA-qPCR: Unbehandelte phiX174 (A)

Bisher wurden die Versuche mit phiX174 nur mit einer hohen Organismenkonzentration durchgeführt. Im folgenden Verfahren soll nun überprüft werden, ob sich die PMA-qPCR auch bei unterschiedlichen Konzentrationen anwenden lässt. Um dies zu überprüfen, wurde eine Verdünnungsreihe der unbehandelten phiX174 Stammlösung mit 100 µM PMA behandelt und in der qPCR (261-369) und LA-qPCR (11-1074) gemessen (Abbildung 41). Mit beiden qPCR-Verfahren ließen sich fast identische Messwerte wie mit dem Kulturverfahren ermitteln, was sowohl durch die geringe Y-Achsenverschiebung der Trendgerade, als auch deren Steigung deutlich wird.

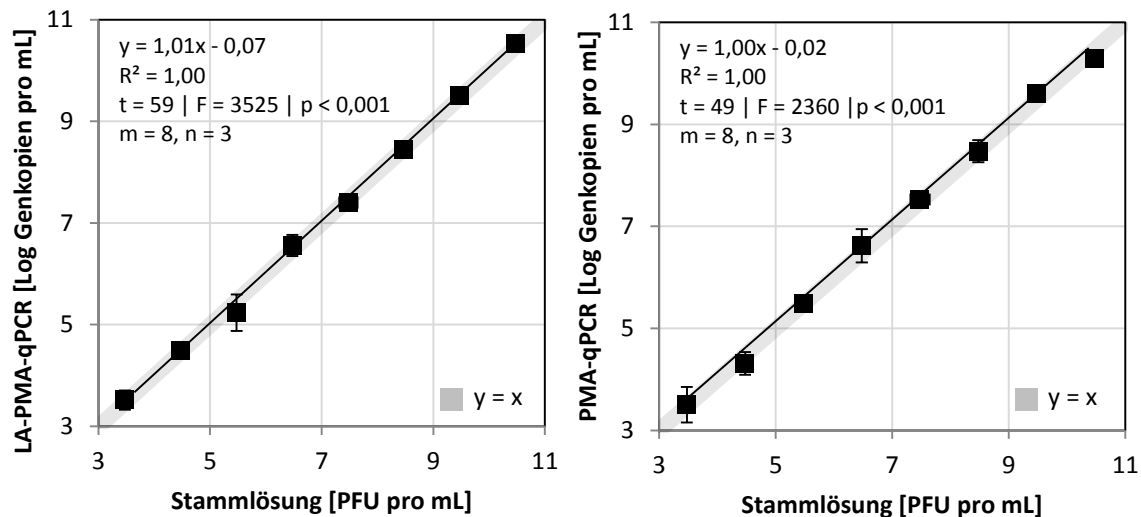


Abbildung 41: Vergleich der Messwerte einer Verdünnungsreihe unbehandelter phiX174 von LA-PMA-qPCR (links) und der PMA-qPCR (rechts) mit dem Kulturverfahren (n = 3, m = 8).

Die LA-PMA-qPCR lässt sich sowohl im niedrigen als auch im hohen Konzentrationsbereich einsetzen – PMA zeigt keine Wirkung auf unbehandelte phiX174. Der folgende Versuch soll zeigen, ob ein Ausschluss hitzebehandelter Phagen durch PMA bei unterschiedlichen Organismenkonzentrationen ebenfalls möglich ist.

Test der LA-PMA-qPCR: Unbehandelte und hitzebehandelte phiX174 (B)

Nachdem die PMA-qPCR für unbehandelte phiX174 erfolgreich getestet wurde, wurde darauf aufbauend untersucht, ob der Ausschluss hitzebehandelter Phagen auch bei unterschiedlichen Konzentrationen mit dem gleichen Protokoll funktioniert.

Wie im vorherigen Versuch wurde eine Verdünnungsreihe unbehandelter phiX174 als Probe eingesetzt. Zusätzlich wurden zu jeder Probe eine der Ausgangskonzentration entsprechende Menge an hitzebehandelten phiX174 zugegeben (Methode 6.5.1). Die Proben wurden mit der LA-PMA-qPCR (100 μ M PMA, Primer 11-1074) quantifiziert (Abbildung 42).

Durch das PMA werden in der LA-PMA-qPCR nur die unbehandelten Viren detektiert und die gemessene Konzentration sinkt mit jeder Verdünnungsstufe. Ohne PMA erfasst die LA-qPCR auch die hitzebehandelten phiX174. Die bei der ersten Verdünnung gemessene Reduktion in der LA-qPCR wird durch die geringere Zahl an unbehandelten phiX174 in der Probe erreicht.

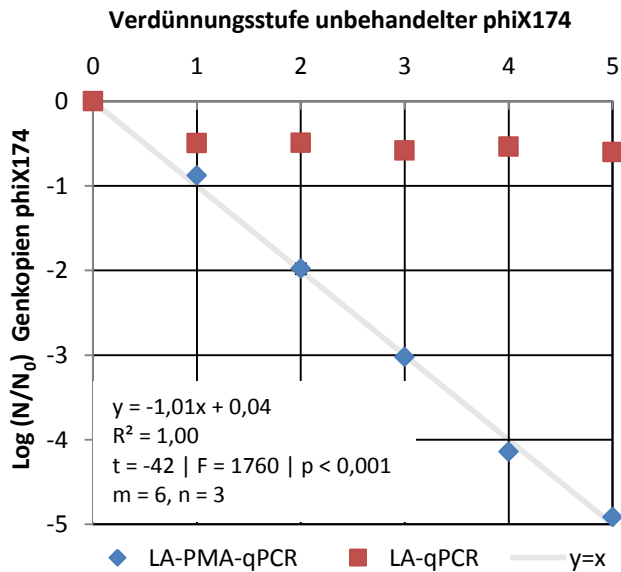


Abbildung 42: Ergebnisse von LA-qPCR und LA-PMA-qPCR von Mischungen unbehandelter und hitzebehandelter phiX174 (n = 3, m = 6)

Der Versuch zeigt, dass die LA-PMA-qPCR sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Virenkonzentrationen zwischen unbehandelten und hitzebehandelten phiX174 Bakteriophagen unterscheiden kann. Die Entwicklung der LA-PMA-qPCR war somit bei phiX174 erfolgreich.

3.2.4.2 E. coli

Die PMA-qPCR von *E. coli* Bakterien zeigte – wie auch bei phiX174 – nur eine geringe Signalreduktion hitzebehandelter Bakterien. Neben der Verlängerung der Amplifikate in der qPCR wurde der Einfluss unterschiedlicher Reaktionsbedingungen der PMA-Behandlung untersucht. Ziel der Entwicklung ist der Ausschluss hitzebehandelter Bakterien ohne einen negativen Einfluss auf unbehandelte Bakterien in der PMA-qPCR.

Reaktionsparameter: Inkubationstemperatur und Belichtungszeit

Die Diffusion von PMA durch (beschädigte) Membranen kann durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur positiv beeinflusst werden (vgl. 2.6.2.5). In vielen Studien wurde die Behandlung in der Lebend/tot-Differenzierung auf Eis durchgeführt. Da PMA in den ersten Versuchen eine zu geringe Reduktion hitzebehandelter Zellen zeigte, wurde eine höhere Temperatur für die PMA-Behandlung eingesetzt und die Proben ungekühlt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Fotoaktivierung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die PMA-qPCR: Bei nicht ausreichender Belichtung können nicht alle PMA-Moleküle an die Nukleinsäure binden. Ob dies gegeben ist, wurde durch Variation der Fotoaktivierungszeit auf 5, 10 und 15 Minuten überprüft. Beide Parameter wurden in einer PMA-qPCR (100 µM PMA, Primer 1213-1359)

mit unbehandelten und hitzebehandelten *E. coli* überprüft (Abbildung 43).

Unbehandelte *E. coli* liefern unabhängig von den Reaktionsparametern identische Ergebnisse. Bei **hitzebehandelten** Zellen bewirkte die Erhöhung der **Reaktionstemperatur** auf Raumtemperatur eine Verringerung des Signals um 1,7 Log-Stufen.

Eine **Verkürzung der Aktivierung** von PMA auf 5 Minuten resultiert in einer geringeren Reduktion der hitzebehandelten Zellen in der PMA-qPCR. Eine Verlängerung der Aktivierungsphase zeigt keinen erhöhten Effekt von PMA, es ist lediglich eine geringere Abweichung der Einzelmessungen zu erkennen.

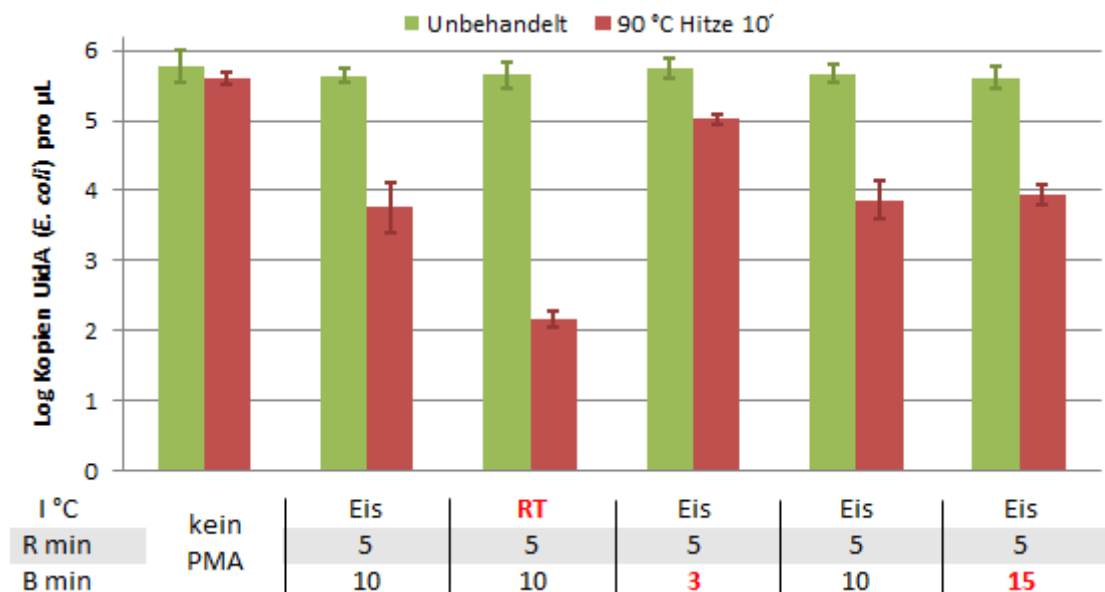


Abbildung 43: qPCR-Ergebnisse von mit 100 µM PMA behandelten lebenden und toten (Hitzebehandelt) *E. coli*. In der PMA-Applikation wurden Inkubationstemperatur (I), PMA-Reaktionszeit (R) sowie Belichtungszeit (B) variiert (Variationen rot markiert) (n = 3).

Durch die erhöhte Temperatur kann PMA besser in die beschädigten Zellen eindringen. Dies entspricht den Ergebnissen von Elizaquível et al. (2012a) und Nkuipou-Kenfack et al. (2013) für *Salmonella typhimurium* und *Listeria monocytogenes*. Die Arbeit mit interkalierenden Farbstoffen auf Eis wird meist wegen den eingesetzten Halogenlampen in der folgenden Fotoaktivierung durchgeführt. Außerdem ist die gekühlte Inkubation ein Relikt aus früheren Studien mit EMA (s. 2.6.2.3). EMA dringt leichter in intakte Zellen ein, weswegen die Reaktion durch niedrigere Temperaturen abgeschwächt wurde. Bei PMA ist dies nicht nötig bzw. auch im Sinne der Funktion der interkalierenden Farbstoffe sogar hinderlich.

Während die Inkubationszeit von PMA in den meisten Studien fünf Minuten beträgt, so wird die Belichtungszeit oft unterschiedlich gewählt. Bei Yang et al. (2013) sind es fünf, bei Bae und Wuertz (2012) zehn und bei Nkuipou-Kenfack et al. (2013) 15 Minuten. In vielen Studien wird außerdem mit Halogenleuchten (breites Emissionsspektrum) gearbeitet, nur wenige setzen LED-Systeme mit einer auf PMA abgestimmten Wellenlänge von 460 nm ein

(vgl. Tabelle 3, S. 38). Da die Reduktion nach 10 Minuten nicht weiter erhöht wurde, kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der PMA-Moleküle nach dieser Zeit aktiviert wurde. Eine **längere Belichtung** von 15 Minuten kompensiert dabei zusätzlich Unterschiede in den Proben und im Handling, was letztendlich zu einer geringeren Abweichung der Ergebnisse führt.

Die PMA-Behandlung mit 5-minütiger Inkubation sowie 15-minütiger Belichtung zeigte die höchste Signalreduktion bei hitzebehandelten *E. coli* und wurde somit für die weiteren Versuche nach diesem Protokoll eingesetzt.

Reaktionsparameter: PMA-Konzentration und Inkubationszeit

Durch die PMA-Konzentration wird festgelegt, wie viele Moleküle PMA zur Verfügung stehen, um geschädigte Zellen zu markieren. Ist die Konzentration zu gering, können nicht alle Zellen markiert werden und die Reduktion ist nicht ausreichend. Gleichzeitig kann PMA bei zu hoher Konzentration auch in intakte Organismen eindringen. Dies ist ebenfalls von der Inkubationszeit abhängig, da die Diffusion der PMA-Moleküle eine bestimmte Zeit benötigt.

In einem Versuch sollte überprüft werden, welche PMA-Konzentration bei welcher Inkubationszeit die beste Wirkung (Totzellausschluss und kein Effekt auf intakte Zellen) erzielt. Unbehandelte und hitzebehandelte *E. coli* wurden mit verschiedenen PMA-Konzentrationen unterschiedlich lange bei Raumtemperatur behandelt, extrahiert und mit der qPCR (Primer 2-629) quantifiziert (Abbildung 44).

Bei **unbehandelten Zellen** lässt sich nur eine minimale (maximal 0,2 Log-Stufen) bis keine Abnahme des qPCR-Signales bei zunehmender PMA-Konzentration feststellen.

Mit allen eingesetzten PMA-Konzentrationen über 1 μM konnten die **hitzebehandelten Zellen** erfolgreich von der qPCR ausgeschlossen werden (qPCR unter der Nachweisgrenze von 10 Kopien pro μL). Lediglich bei 1 μM PMA ist noch ein Signal zu erkennen.

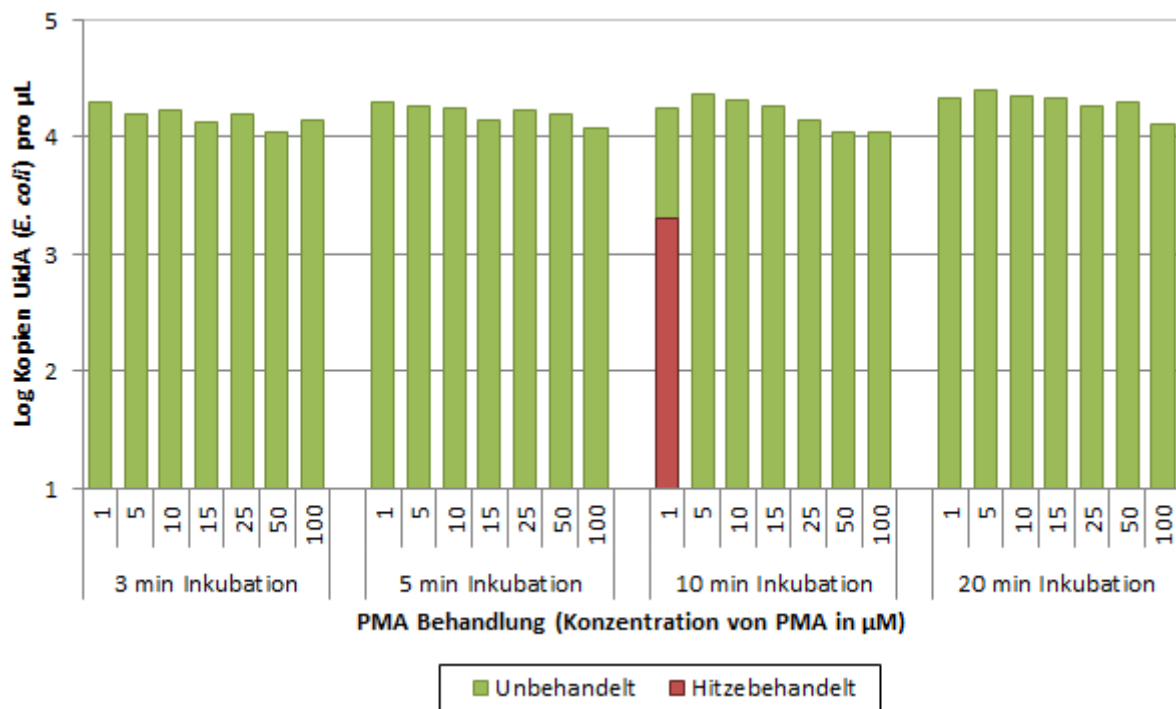


Abbildung 44: LA-PMA-qPCR (627 bp) Ergebnisse von unbehandelten (grün) und hitzebehandelten (rot) *E. coli* Bakterien. Es wurden verschiedene PMA-Konzentrationen und Inkubationszeiten eingesetzt. Nicht dargestellte, rote Balken stellen nicht nachweisbare Proben dar (n = 2).

Die Daten mit intakten Zellen zeigen, dass PMA – unabhängig von den Reaktionsparametern - nicht in unbehandelte *E. coli* eindringt. Ein Ausschluss hitzebehandelter Zellen ist ebenfalls gegeben. Lediglich bei einer der Proben mit 1 µM PMA wurden über 1000 Zellen detektiert. Dies liegt primär an der schwierigen Handhabung sehr geringer PMA-Konzentrationen. Hochkonzentrierte Stammlösungen sind unempfindlich gegen Licht (Nocker et al., 2006). Die für die Zugabe von 1 µM PMA eingesetzte, stark verdünnte Lösung (20 µM) wurde bereits durch das Umgebungslicht im Labor aktiviert. Somit gab es bei einigen Proben mit 1 µM PMA einen schwächeren Effekt unabhängig von der Inkubationszeit. Für die eingesetzte Menge *E. coli* könnten somit PMA-Konzentrationen von 5 bis 100 µM bei einer Inkubationszeit von 3 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur eingesetzt werden. In der Literatur finden sich vergleichbare Parameter für den Nachweis von *E. coli* in der PMA-qPCR (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Übersicht der Parameter zur PMA-qPCR von *E. coli* in Veröffentlichungen.

Literatur	Behandlung	PMA Konz. in μM	Inkubationszeit in min	Belichtungsapparatur	Belichtungszeit in min
Diese Arbeit	Hitze	5-100	5	LED	15
(Elizaquível et al., 2012a)	Isopropanol	50	5	LED	15
(Elizaquível et al., 2012b)	Ätherische Öle	100	5	LED	15
(Gensberger et al., 2013)	Hitze	10	5	Halogen	5
(Kim and Ko, 2012)	Isopropanol	125	5	Halogen	10
(Kim and Wuertz, 2015)	Sedimentproben	100	5	Halogen	10
(Nocker et al., 2006)	Isopropanol	Bis 240	2	Halogen	2
(Nocker et al., 2007)	Hitze, Chlor	Bis 200	5	Halogen	2
(Soejima et al., 2012)	Hitze	23,5	10	Halogen	5
(Wang et al., 2014)	Hitze	16	5	Halogen	5
(Xiao et al., 2013)	VBNC	20	5	Halogen	5
(Yang et al., 2011)	Hitze	100	5	Halogen	5
(Yang et al., 2013)	Hitze	20	5	Halogen	5
(Zhang et al., 2015)	UV	200	5	Halogen	15

Test der LA-PMA-qPCR: Unbehandelte *E. coli* (A)

Die PMA-qPCR von *E. coli* wurde in den vorherigen Versuchen mit einer konstanten Organismenkonzentration eingesetzt. Nun soll im Prüfverfahren dargestellt werden, ob das Verfahren mit dem gleichen Protokoll auch für unterschiedliche Konzentrationen von *E. coli* anwendbar ist. Dies wurde mit einer Verdünnungsreihe unbehandelter *E. coli* durchgeführt. Die Proben wurden mit 20 μM PMA behandelt und mit der LA-qPCR (2-629 und 570-1812) quantifiziert. Als Vergleichsmethode wurde das IDEEX-Kulturverfahren eingesetzt.

In beiden qPCR-Verfahren ließen sich fast identische Messwerte wie mit dem Kulturverfahren ermitteln, was sowohl durch die geringe Y-Achsenverschiebung der Trendgerade als auch deren Steigung deutlich wird (Abbildung 45).

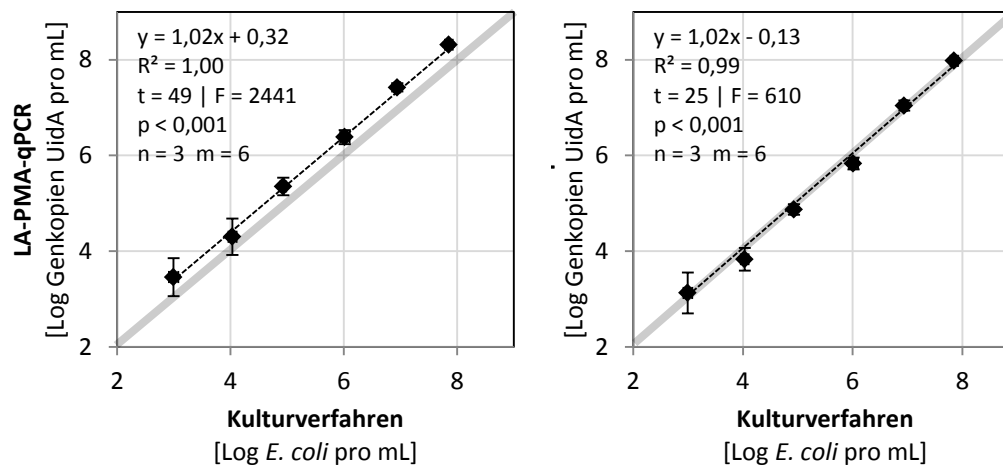


Abbildung 45: Vergleich der Messwerte einer Verdünnungsreihe unbehandelter *E. coli* von LA-PMA-qPCR (Primer 570-1812, links) und der PMA-qPCR (Primer 2-629, rechts) mit dem Kulturverfahren ($n = 3$, $m = 6$).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die LA-PMA-qPCR bei unbehandelten *E. coli* in einem breiten Konzentrationsbereich einsetzen lässt. Die Funktion des Ausschlusses toter Zellen in dieser Methode soll nun mit Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten *E. coli* überprüft werden.

Test der LA-PMA-qPCR: Unbehandelte und hitzebehandelte *E. coli* (B)

Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten *E. coli* wurden mit der LA-PMA-qPCR (570-1812) quantifiziert (Abbildung 46). In der LA-PMA-qPCR lassen sich die unbehandelten *E. coli* auch in einer Suspension mit extremen Lebend/tot-Verhältnissen nachweisen. In vielen Literaturquellen zur PMA-qPCR wird nur eine geringe Log-Reduktion beschrieben oder beobachtet, dass eine größere Menge von behandelten (toten) Bakterien nicht mehr durch PMA von der qPCR ausgeschlossen werden kann (Elizaquível et al., 2012b; Gensberger et al., 2013; Pan and Breidt, 2007; Slimani et al., 2012). Dies kann entweder durch höhere PMA-Konzentrationen oder – wie in dieser Arbeit – durch den Einsatz langer Amplifikate kompensiert werden.

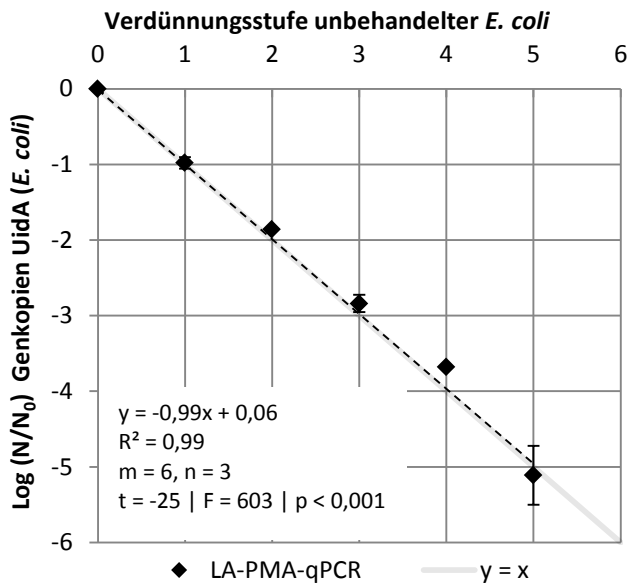


Abbildung 46: Ergebnisse der LA-PMA-qPCR mit Mischungen unbehandelter und hitzebehandelter *E. coli*.

Beide Testverfahren zeigen, dass unbehandelte *E. coli* in unterschiedlichen Konzentrationen und Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten Zellen in der LA-PMA-qPCR mit einem einheitlichen Protokoll nachgewiesen werden können. Die Ergebnisse sind dabei mit dem Kulturverfahren vergleichbar. Die Etablierung der Lebend/tot-Unterscheidung für *E. coli* war somit erfolgreich.

3.2.4.3 *E. faecalis*

Nachdem die LA-PMA-qPCR bei *E. coli* Bakterien erfolgreich etabliert wurde, sollte ein identisches Verfahren für *E. faecalis* etabliert werden. *E. faecalis* gehört zu den Gram-positiven Bakterien und hat somit andere Hülleigenschaften als das Gram-negative Bakterium *E. coli*. Da die Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA auf Hülleigenschaften und Membranpermeabilität beruht, sind bei *E. faecalis* Unterschiede in den Ergebnissen zu erwarten.

PMA-Konzentration

Analog zu *E. coli* wurden verschiedene PMA-Konzentrationen von 1 bis 100 μM und Inkubationszeiten von 3 bis 20 Minuten an unbehandelten und hitzebehandelten *E. faecalis* getestet (Abbildung 47). Das Primerpaar 56-573 wurde für die qPCR eingesetzt.

Im Gegensatz zu *E. coli* verringern selbst geringe Konzentrationen an PMA das Signal **unbehandelter** *E. faecalis*. Dieser Effekt verstärkt sich bei längeren Inkubationszeiten, bei denen mehr PMA durch die intakten Zellen diffundieren kann. Eine Inhibition der hitzebehandelten Bakterien ist wie bei *E. coli* bei jeder PMA-Konzentration gegeben. Lediglich bei 1 μM PMA und 10-minütiger Inkubation war die Behandlung ohne Wirkung. Wie

bei *E. coli* ist dies durch die schwierige Handhabung geringer PMA-Konzentrationen zu erklären (vorzeitige Aktivierung durch Umgebungslicht).

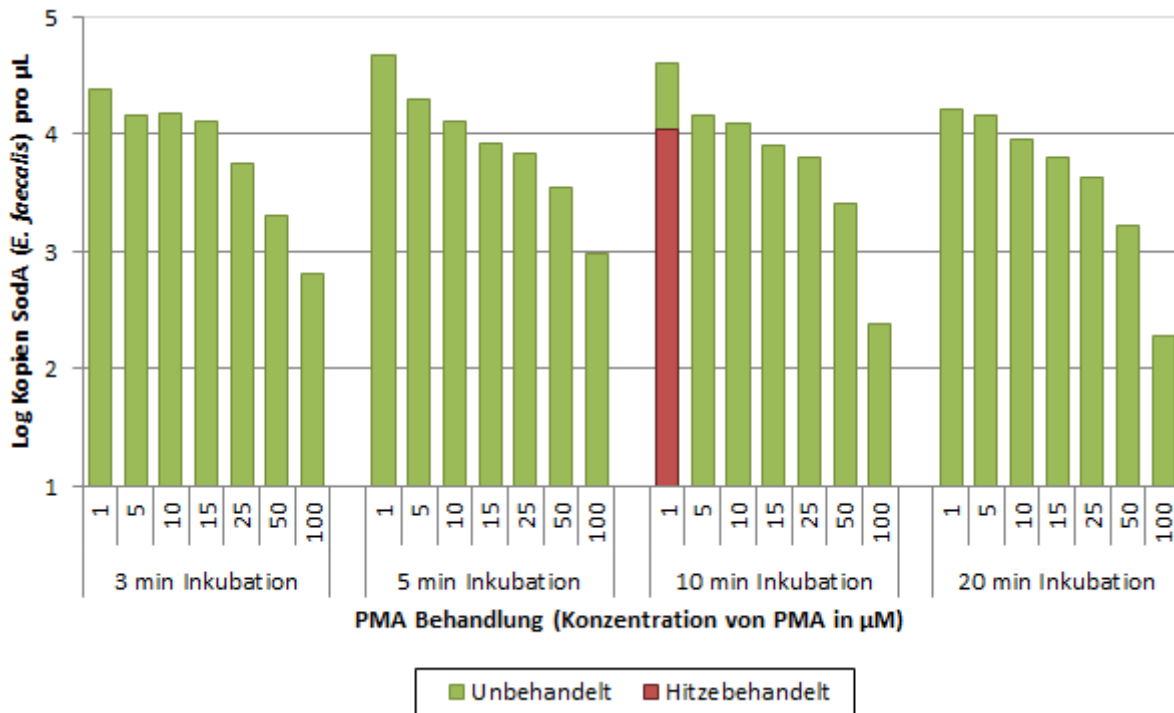


Abbildung 47: qPCR-Ergebnisse von mit PMA behandelten *E. faecalis*. Es wurden verschiedene PMA-Konzentrationen und Inkubationszeiten eingesetzt. Es wurden unbehandelte (grün) sowie hitzebehandelte (rot) Bakterien eingesetzt (n = 2).

Der generelle Unterschied unbehauelter *E. faecalis* zu *E. coli* lässt sich durch die unterschiedlichen Hülleigenschaften erklären. Um starke falsch negative Effekte durch PMA zu vermeiden, sollte *E. faecalis* demnach nur mit geringen PMA-Konzentrationen bis 10 µM behandelt werden. Die Ergebnisse in Abbildung 44 zeigen, dass diese Konzentration auch für *E. coli* wirksam ist. In der Literatur wird lediglich in Salam et al. (2014) eine vergleichbar niedrige PMA-Konzentration für *E. faecalis* in PBS Puffer vorgeschlagen. Diese hat keinen Einfluss auf unbehauelte *E. faecalis*. Dagegen zeigen die Studien von de Almeida et al. (2016), Sassoubre et al. (2012) und Pinheiro et al. (2016) bei 50 bzw. 100 µM PMA eine Signalreduktion unbehauelter Zellen um bis zu einer Log-Stufe. Bei Takahashi et al. (2011) werden 240 µM PMA eingesetzt; ein Test auf mögliche falsch negative Einflüsse erfolgt jedoch nicht. Die jeweiligen Parameter der Studien sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Übersicht der Parameter zur PMA-qPCR von *E. faecalis* in Veröffentlichungen.

Literatur	Behandlung	PMA Konz. in μM	Inkubationszeit in min	Belichtungsapparat	Belichtungszeit in min
Diese Arbeit	Hitze	10	5	LED	15
(de Almeida et al., 2016)	EDTA, PBS	50	5	Halogen	2
(Pinheiro et al., 2016)	Hitze	100	5	Halogen	10
(Salam et al., 2014)	Hitze	15 (PBS) 50 (Salzwasser)	10	Halogen	30
(Sassoubre et al., 2012)	UV (Solar)	100	5	Halogen	3
(Takahashi et al., 2011)	Realproben	240	5	Halogen	5

In dieser Arbeit betrug die Reduktion bis zu zwei Log-Stufen. Dies lässt sich durch den Einsatz der langen Amplifikate erklären. In der LA-PMA-qPCR ist die durch PMA hervorgerufene Signalreduktion stärker als bei kurzen Amplifikaten. In allen hier genannten Studien wurden Amplifikate um 100 bp in der PMA-qPCR eingesetzt, was auch in einer geringeren Reduktion sowohl bei lebenden als auch bei toten Zellen resultiert.

Die Autoren der genannten Studien begründen den Effekt von PMA auf unbehandelte *E. faecalis* durch abgestorbene Zellen in der Suspension. Viele der Daten dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass PMA in bestimmten Konzentrationen in intakte *E. faecalis* eindringen kann.

Test von Wachstumsbedingungen

E. faecalis wurde bisher in LB Medium kultiviert und zeigte in den Versuchen eine starke Sensitivität gegenüber PMA. In der Studie von Salam et al. (2014) finden sich Hinweise darauf, dass bei *E. faecalis* im Meerwasser mit einer höheren PMA-Konzentration von 50 μM ohne einen Effekt auf unbehandelte Zellen gearbeitet werden kann. Die Bakterien reagieren somit möglicherweise bei unterschiedlichen Kulturbedingungen ebenfalls unterschiedlich auf PMA. Um dies zu überprüfen, wurden mehrere verschiedene Medien (TSB, LB, LB in niedriger Konzentration, R2A) zur Kultivierung von *E. faecalis* eingesetzt. Bis auf die Auswahl des Mediums wurden die Bedingungen zur Herstellung von Arbeitslösungen (unbehandelt / hitzebehandelt) in dieser Arbeit eingehalten (s. 6.3.1). Die Zellen wurden in vier unterschiedlichen Reaktionspuffern mit Kochsalzkonzentration von 0,9 bis 6,0 % resuspendiert. Die Proben wurden mit 50 μM PMA behandelt, extrahiert und mit der qPCR quantifiziert (Primerpaar 56-573).

Die Ergebnisse in Abbildung 48 zeigen in der qPCR (ohne PMA) keinen Messunterschied zwischen unbehandelten und hitzebehandelten *E. faecalis*. Je nach Medium wurde das qPCR-Signal unbehandelter *E. faecalis* unterschiedlich stark reduziert. Die größte Reduktion

wurde bei LB Medium (1,1 Log-Stufen), die niedrigste Reduktion bei R2A Medium (0,5 Log-Stufen) gemessen. *E. faecalis* in LB-Medium mit geringerer Konzentration sind ebenfalls weniger empfindlich gegenüber PMA.

Mit der Salzkonzentration im Suspensionsmedium sinkt der Einfluss von PMA auf unbehandelte Zellen. Bei 6 % NaCl ist der Unterschied im Messsignal von qPCR und PMA-qPCR nur noch gering (0,2 Log-Stufen). Somit sind die falsch negativen Effekte durch PMA bei hohen Salzkonzentrationen geringer. Allerdings wurden bei steigender Salzkonzentration auch höhere Werte für hitzebehandelte Zellen in der PMA-qPCR gemessen – die erreichte Reduktion von PMA wurde also reduziert.

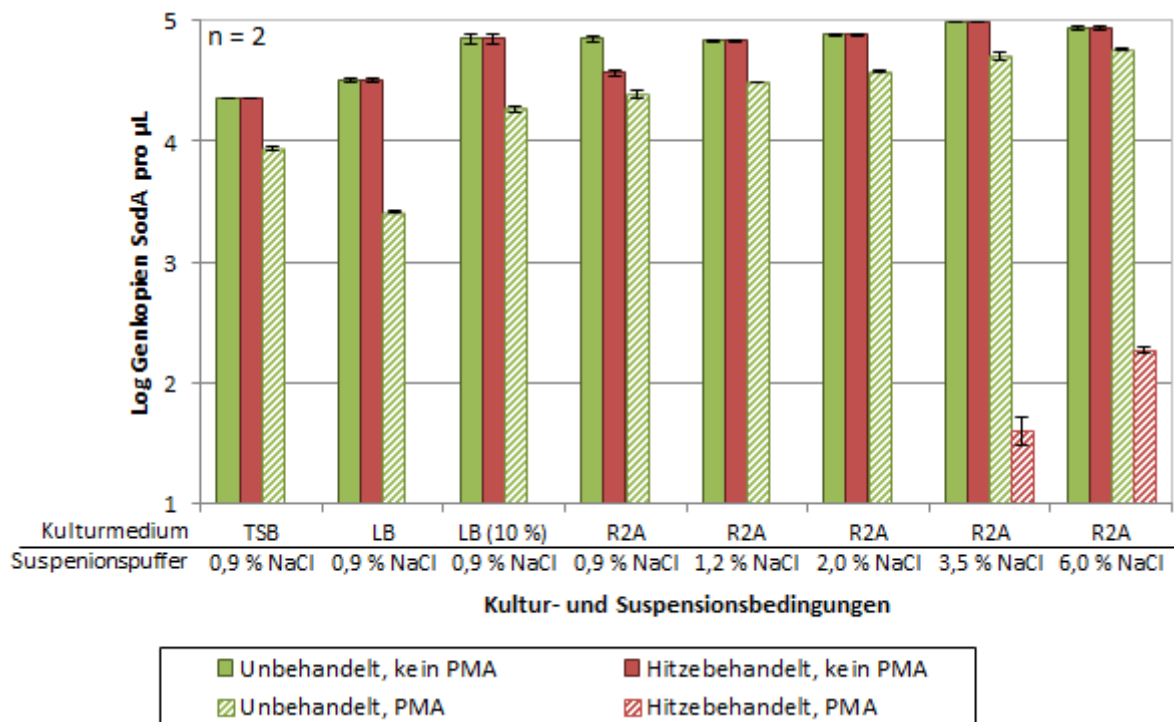


Abbildung 48: Ergebnisse von qPCR und PMA-qPCR von unbehandelten und hitzebehandelten *E. faecalis*, kultiviert in verschiedenen Nährmedien und suspendiert in Medien mit unterschiedlicher Salzkonzentration (n = 2).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl Kulturbedingungen als auch der Suspensionspuffer die Aufnahme von PMA in unbehandelte und hitzebehandelte Zellen beeinflusst. In R2A-Medium kultivierte, unbehandelte *E. faecalis* zeigten die geringste Sensitivität gegenüber PMA. Erhöhte Salzkonzentrationen im Suspensionspuffer stören die PMA-Behandlung, was zu einem geringen Effekt von PMA sowohl auf unbehandelte als auch auf hitzebehandelte Zellen führt. In der Studie von Nkuipou-Kenfack et al. (2013) wird ebenfalls von einem Einfluss des Kulturmediums auf die PMA-Behandlung berichtet, jedoch keine Messdaten gezeigt. Neben dem Einfluss auf die Bakterien können Matrixeffekte die Effizienz der Diffusion von PMA in die Zellen verringern oder die Aktivierung von PMA durch Absorption blockieren (Zhu et al., 2012).

Trotz Variation des Kulturmediums kann ein Einfluss von PMA auf unbehandelte *E. faecalis* nicht ausgeschlossen werden. Jedoch konnten durch den Wechsel des Kulturmediums von LB zur R2A die falsch negativen Effekte verringert werden.

Bei Versuchen mit unbehandelten Zellen mit der Lebend/tot-Differenzierung stellt sich die Frage, ob diese Zellen wirklich alle intakt bzw. lebend sind. Wie bereits angemerkt wird die Reduktion unbehauelter Zellen durch PMA in vielen Studien mit beschädigten Zellen in einer Bakterienkultur begründet (de Almeida et al., 2016; Pinheiro et al., 2016; Sassoubre et al., 2012). In dieser Arbeit konnte dies allerdings bei *E. coli* nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 44). Es ist somit davon auszugehen, dass die *E. faecalis* Bakterien tatsächlich intakt und trotzdem PMA-sensibel sind. Für die folgenden Testverfahren stellt sich nun die Frage, ob eine Kalibrierung für *E. faecalis* mit der PMA-qPCR und ein Vergleich mit dem Kulturverfahren überhaupt möglich sind.

Test der LA-PMA-qPCR: unbehandelte *E. faecalis* (A)

Eine Verdünnungsreihe unbehauelter *E. faecalis* wurde mit der qPCR (Primerpaar 56-573) und der LA-qPCR (Primerpaar 56-1193) mit und ohne den Einsatz von 15 µM PMA quantifiziert (Abbildung 49). Das Ergebnis der LA-PMA-qPCR wurde mit dem Kulturverfahren verglichen.

Sowohl mit der PMA-qPCR als auch mit der LA-PMA-qPCR wurden durch die zuvor beobachtete Wirkung von PMA auf unbehauelte Bakterien wie erwartet geringere Werte als im Kulturverfahren gemessen (Abbildung 49 A und B). Bei höheren Zellzahlen ist der Unterschied zum Kulturverfahren geringer (0,4 Log-Stufen bei 10^8 Bakterien pro mL) als bei niedrigeren Zellzahlen (1,6 Log-Stufen bei 10^5 Bakterien pro mL).

Ohne PMA lassen sich sowohl in der LA-qPCR als auch in der qPCR mit dem Kulturverfahren vergleichbare Messwerte erreichen (Abbildung 49 C und D).

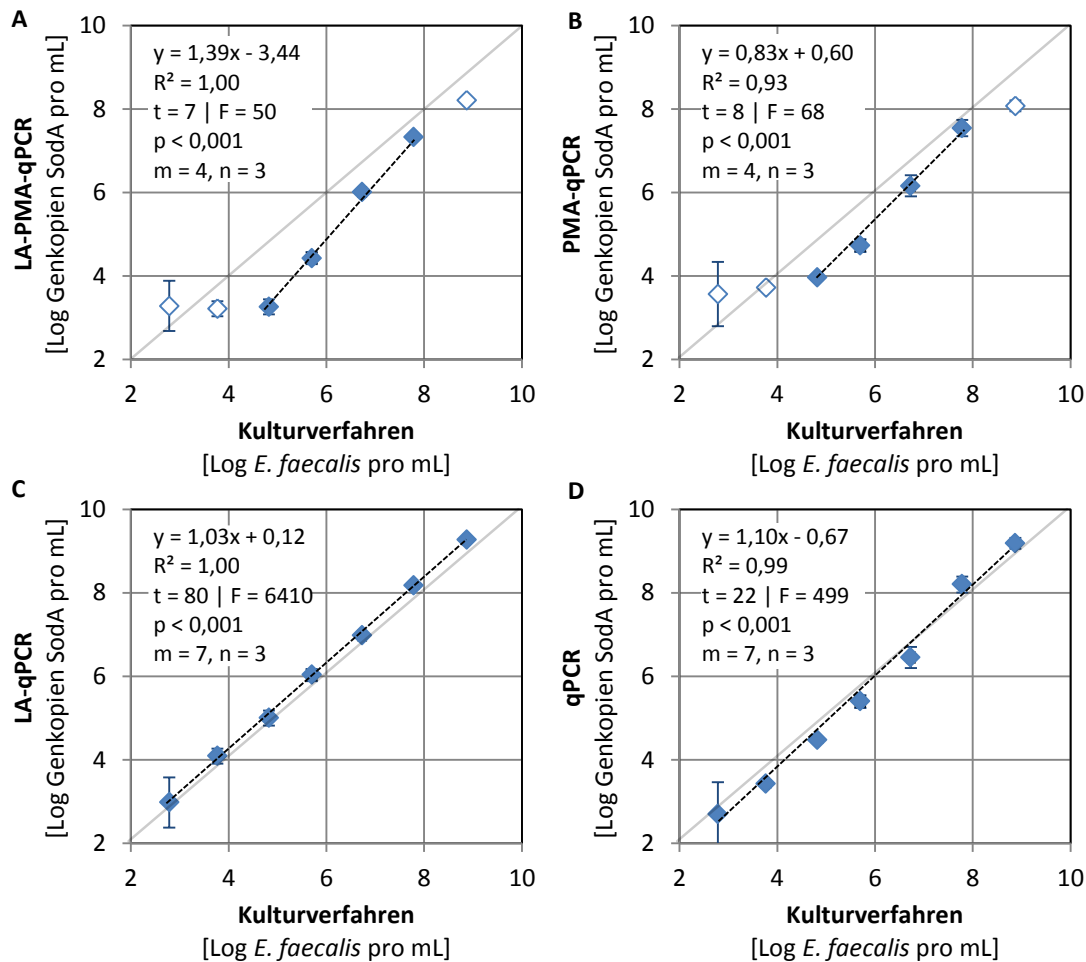


Abbildung 49: Vergleich der Messwerte einer Verdünnungsreihe unbehandelter *E. faecalis* der LA-PMA-qPCR (A), PMA-qPCR (B), LA-qPCR (C) und qPCR (D) mit dem Kulturverfahren. Leere Symbole wurden nicht für die Berechnung der Trendgeraden einbezogen.

Durch den Einsatz von R2A als Kulturmedium konnte ein geringerer Effekt von PMA auf intakte Zellen erreicht werden. Die resultierende Reduktion der in der PMA-qPCR gemessenen Bakterien ist jedoch nicht gleichmäßig und abhängig von der Ausgangskonzentration. Die Zahl der verfügbaren PMA-Moleküle pro Bakterium sinkt mit steigender Bakterienmenge. Gleichmaßen kann weniger PMA in die Bakterien eindringen und das Signal in der qPCR verringern. Dieser Effekt wurde in der Literatur bei toten Bakterien beobachtet: Bei hohen Konzentrationen toter Zellen reicht die PMA-Menge nicht aus, um alle Zellen ausreichend zu markieren (Elizaquível et al., 2012b; Gensberger et al., 2013; Slimani et al., 2012). Dies führt zu der Überlegung, dass bei Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten *E. faecalis* ein großer Teil der PMA-Moleküle durch die beschädigten Zellen „verbraucht“ wird und eine PMA-qPCR dieser Bakterien somit doch (auch ohne falsch negativen Effekt durch PMA) möglich ist.

Test der LA-PMA-qPCR: Unbehandelte und hitzebehandelte *E. faecalis* (B)

Bei ausschließlich unbehandelten Bakterien wurde in den zuvor beschriebenen Versuchen eine Signalreduktion (falsch negativ) durch die PMA-Behandlung beobachtet. In diesem Test der LA-PMA-qPCR wurden Mischungen (s. 6.5.1) aus unbehandelten und hitzebehandelten *E. faecalis* quantifiziert (Abbildung 50). Bei Mischungen aus unbehandelten und behandelten *E. faecalis* tritt kein falsch negativer Effekt auf.

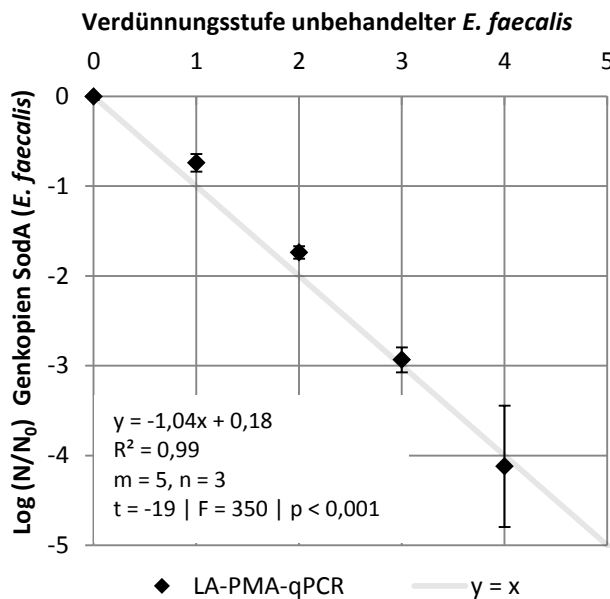


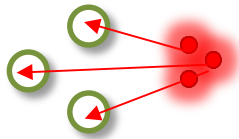
Abbildung 50: Ergebnisse der LA-PMA-qPCR von Mischungen unbehandelter und hitzebehandelter *E. faecalis* (m = 5, n = 3).

Zuvor wurde beschrieben, wie hohe Zellzahlen die Zahl der pro Bakterium verfügbaren PMA-Moleküle verringert (s. Tests zur LA-PMA-qPCR bei *E. coli*). Analog dazu werden bei Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten *E. faecalis* primär die leichter zugänglichen, beschädigten Zellen markiert. Für die Markierung der weniger PMA-sensitiven unbehandelten Bakterien steht weniger PMA zur Verfügung. Somit fällt die Markierung unbehandelter *E. faecalis* durch PMA und damit die falsch negativen Effekte geringer aus.

Die Testverfahren zeigen, dass unbehandelte *E. faecalis* in unterschiedlichen Konzentrationen und Mischungen mit hitzebehandelten Zellen in der LA-PMA-qPCR mit einem einheitlichen Protokoll nachgewiesen werden können. Identische Ergebnisse mit dem Kulturverfahren sind möglich, sind jedoch vom Verhältnis lebender und toter *E. faecalis* abhängig. So ist bei Suspensionen von ausschließlich lebenden *E. faecalis* ein verringerter Messwert der LA-PMA-qPCR zu erwarten (falsch negativ), vor allem wenn es sich um eine geringe Organismenkonzentration handelt (Abbildung 51, oben). Dies sollte allerdings nur Laborproben betreffen – in Umweltproben ist zu erwarten, dass zumindest einige Bakterien

(auch andere Bakterienspezies) beschädigt vorliegen und entsprechendes PMA (vergleichbar mit den hitzebehandelten Zellen im Versuch) verbrauchen (Abbildung 51, unten). Die Etablierung der Lebend/tot-Unterscheidung für Mischungen aus lebenden und toten *E. faecalis* war somit erfolgreich.

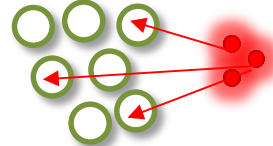
Nur intakte Zellen



Geringe Zellkonzentration

PMA dringt in intakte Zellen ein. Diese werden in der qPCR nicht mehr detektiert.

Falsch negativ

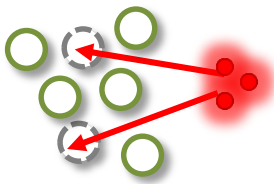


Hohe Zellkonzentration

Da nicht genügend PMA-Moleküle vorhanden sind, können einige der Zellen nicht markiert werden. Das Signal ist leicht verringert.

Schwach falsch negativ

Intakte und beschädigte Zellen

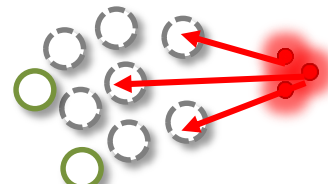


Arbeitsbereich

PMA dringt bevorzugt in beschädigte Zellen ein. Intakte Zellen sind nicht betroffen, da kein PMA zur Verfügung steht. Es werden nur intakte Zellen in der qPCR nachgewiesen.

Der Arbeitsbereich kann bis zu einem Verhältnis von 6 Log-Stufen beschädigter zu intakten Zellen liegen (99,9999 %).

Korrektes Signal



Hohe Zahl beschädigter Zellen

Da nicht genügend PMA-Moleküle vorhanden sind, können einige der beschädigten Zellen nicht markiert werden. Es werden intakte und beschädigte Zellen nachgewiesen.

Falsch positiv

Abbildung 51: Vereinfachte Darstellung der Wirkung einer einheitlichen Konzentration von PMA auf verschiedene Suspensionen PMA-sensitiver Zellen.

3.2.4.4 Modifikation der PMA-qPCR

Bisherige Versuche zeigen, dass die optimale PMA-Konzentration für Suspensionen mit unbehandelten *E. coli* und *E. faecalis* unterschiedlich ist. Eine gemeinsame PMA-Behandlung von Mischproben gestaltet sich somit schwierig. Desoxycholsäure wirkt sich negativ auf die Membranintegrität aus (Wang et al., 2014). Glycerin wirkt dagegen stabilisierend, was letztendlich die Permeabilität verringert (Soro et al., 2010). Dadurch kann die Wirkung von PMA positiv und negativ beeinflusst werden. In zwei Experimenten wurde überprüft, ob sich die Zugabe von Desoxycholsäure und Glycerin positiv auf die Lebend/tot-Differenzierung in der PMA-qPCR auswirkt.

Desoxycholsäure

Unbehandelte und hitzebehandelte *E. coli* und *E. faecalis* Bakterien wurden mit 0,1 % Desoxycholsäure (SD) für 20 Minuten bei 30 °C inkubiert. Danach wurde eine sehr geringe PMA-Konzentration von 1 µM eingesetzt, die Proben extrahiert und mit der qPCR quantifiziert (*E. coli* Primer: 2-629; *E. faecalis* Primer: 56-573).

Auf **unbehandelte** *E. coli* (Abbildung 52, grüne Balken) hat die Desoxycholsäure nur einen geringen Einfluss (0,3 Log-Stufen Signalreduktion). Bei *E. faecalis* sinkt das qPCR-Signal dagegen um 2 Log-Stufen.

Einen positiven Effekt der Desoxycholsäure auf **hitzebehandelte** Bakterien (rote Balken) lässt sich nur bei *E. coli* erkennen: Das Signal sinkt durch die Säure um zusätzliche 1,4 Log-Stufen. Eine zusätzliche Signalreduktion konnte bei *E. faecalis* nicht nachgewiesen werden.

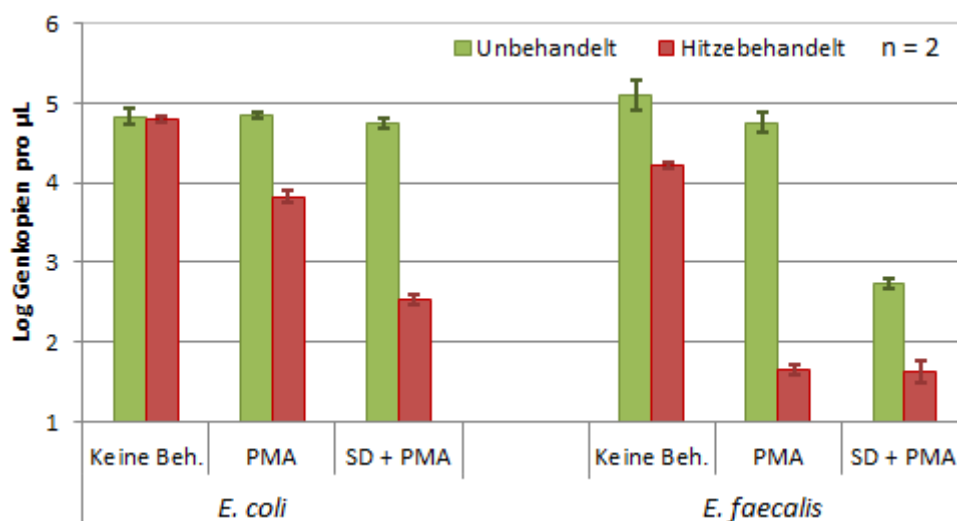


Abbildung 52: qPCR-Ergebnisse unbehandelter und hitzebehandelter Bakterien. Zur Verstärkung des PMA Effektes wurde 0,1 % Desoxycholsäure (SD) vor der PMA-Behandlung zugesetzt (n = 2).

Die Behandlung mit Desoxycholsäure hat somit nicht den gewünschten Effekt. Bei hitzebehandelten *E. coli* wird zwar eine erhöhte Reduktion in der qPCR erreicht, allerdings werden auch weniger unbehandelte *E. faecalis* durch die Zugabe der Desoxycholsäure detektiert.

Desoxycholsäure wurde in den Studien von Lee und Levin (2009), Yang et al. (2011) und Wang et al. (2014) für den Nachweis von *Vibrio vulnificus*, *E. coli* und *E. coli* O157:H7 eingesetzt. In allen Studien wurde durch PMA nur ein sehr geringer Ausschluss von toten Zellen in der qPCR erreicht, der durch Desoxycholsäure verbessert wurde. Dies ist sowohl der Behandlungsart selbst (Kälte, geringe Hitze), als auch den kleinen Amplifikaten (100 bis 200 bp) in den Studien geschuldet. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wäre ein Ausschluss toter Zellen durch den Einsatz langer Amplifikate ohne Desoxycholsäure möglich.

Gram-positive Bakterien wie *E. faecalis* wurden nur bei Nkuipou-Kenack et al. (2013) untersucht (*Listeria monocytogenes*). Die Desoxycholsäure hat in dieser Studie ebenfalls einen negativen Einfluss auf unbehandelte Bakterien, was den Beobachtungen in dieser Arbeit entspricht.

Glycerin

Unbehandelte und hitzebehandelte *E. faecalis* wurden mit Glycerin (5 und 10 %) vorbehandelt und mittels PMA-qPCR (56-573) quantifiziert. Es wurde eine hohe (100 μM) und eine niedrige (5 μM) PMA-Konzentration eingesetzt (Abbildung 53). Die Detektion von unbehandelten Zellen wird durch Glycerin nicht beeinflusst – der falsch negative Effekt von PMA wird also nicht verringert. Bei 100 μM PMA liegen alle Proben, auch die der unbehandelten Bakterien, an der Quantifizierungsgrenze (10 Genkopien pro μL). Glycerin eignet sich somit nicht, um den Effekt von PMA auf unbehandelte Zelle zu verringern.

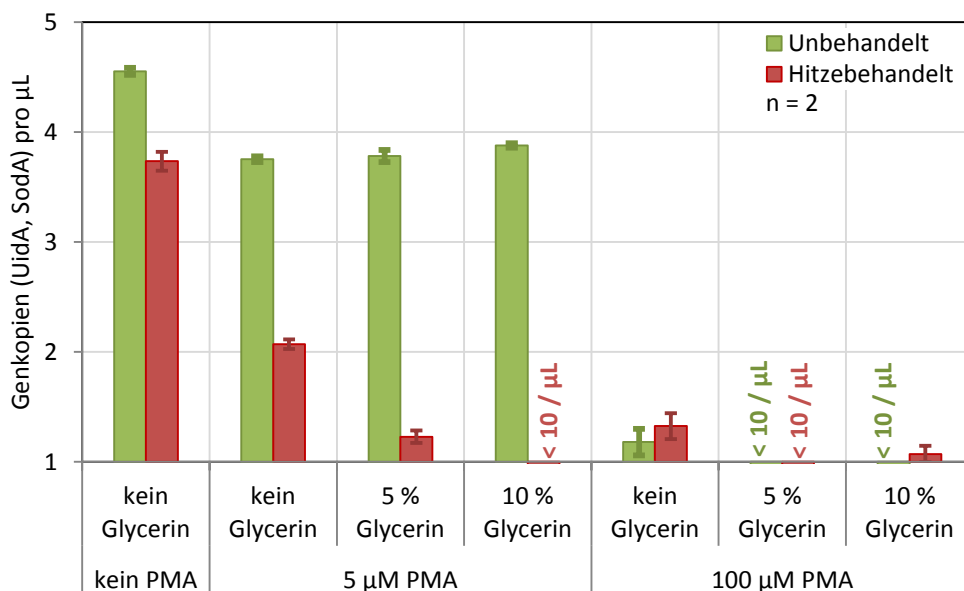


Abbildung 53: PMA-qPCR-Ergebnisse unbehandelter und hitzebehandelter *E. faecalis* (n = 2). Einige Proben wurden zusätzlich mit Glycerin behandelt (5 und 10 % Endkonzentration).

Zusammenfassung

Weder eine Behandlung mit Desoxycholsäure noch mit Glycerin erscheint nach den dargestellten Ergebnissen für Mischproben sinnvoll. Bei *E. coli* kann eine Vorbehandlung mit Desoxycholsäure jedoch zu einer erhöhten Reduktion in der PMA-qPCR führen, sofern eine geringe PMA-Konzentration eingesetzt wird. Dies kann – wie gängige Literatur zeigt (Lee and Levin, 2009; Wang et al., 2014; Yang et al., 2011) – auch den Einsatz von kurzen Amplifikaten bei der PMA-qPCR kompensieren.

3.2.4.5 Gesamtbakterienzahl (16S)**Einfluss der PMA-Konzentration**

Vorherige Versuche haben gezeigt, dass PMA in unbehandelte *E. faecalis* eindringen kann, was in den Versuchen zu einer Signalreduktion in der qPCR führte. Um zu untersuchen, wie sich die PMA-Behandlung bei anderen Bakterien auswirkt, wurden jeweils sechs Gram-positive und Gram-negative Bakterien kultiviert, mit verschiedenen PMA-Konzentrationen behandelt und mit der 16S-qPCR quantifiziert (Abbildung 54).

Generell zeigt sich bei **Gram-negativen** Bakterien eine geringe Reduktion der detektierten Bakterien durch PMA, die mit Erhöhung der PMA-Konzentration bis auf maximal 0,5 Log-Stufen bei 100 µM PMA steigt. Bei *Campylobacter jejuni* werden bei 1 µM PMA 0,75 Log-Stufen weniger Bakterien detektiert. Bei höheren PMA-Konzentration steigt Reduktion nur noch geringfügig wie bei den anderen Gram-negativen Bakterien. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur führte bei fast allen Gram-negativen Bakterien zu einem verstärkten Effekt von PMA. Bei **Gram-positiven** Bakterien sinkt das qPCR-Signal bei steigender PMA-Konzentration viel stärker als bei Gram-negativen Bakterien. Bei *Micrococcus luteus* verringert sich die gemessene Konzentration un behandelter Zellen um über drei Log-Stufen bei 100 µM PMA.

		Gram-negative Bakterien						Gram-positive Bakterien						
		<i>E. coli</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	Trinkwasser
PMA-Konzentration in µM	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,7	0,3	0,3	0,1	0,0	0,2	0,6	0,1
	5	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	1,0	0,4	0,4	0,6	0,2	0,6	0,8	0,2
	10	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	1,1	0,4	0,8	0,7	0,6	0,6	1,0	0,2
	25	0,2	0,2	0,5	0,3	0,3	1,0	0,7	0,7	0,9	0,5	1,2	1,6	0,3
	50	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	1,1	1,3	1,7	2,1	1,7	2,6	2,8	0,4
	100	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	1,4	2,7	2,8	2,0	2,3	3,1	3,0	0,5
	100 bei 30 °C	0,3	0,2	0,8	0,1	1,1	0,0	n.a.						
	100 bei 40 °C	0,7	0,8	0,9	0,9	1,8	0,0	n.a.						

Abbildung 54: Log qPCR-Signalreduktion (16S, 534bp) von unbehandelten Bakterien durch PMA-Behandlung in verschiedenen Konzentrationen bei Raumtemperatur sowie einer Inkubation bei 30 und 40 °C. Die Daten stellen Mittelwerte aus 2 Replikaten mit jeweils zwei qPCR-Messungen dar (4 Messwerte). Rote Färbung stellt starken (falsch negativen) Einfluss auf die qPCR durch PMA dar.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass PMA nicht nur in unbehandelte *E. faecalis*, sondern auch in andere Gram-positive Bakterien eindringen kann. Wie *E. coli* zeigen andere Gram-negative Bakterien diesen Effekt nicht oder nur sehr geringfügig. Die Unterschiede erklären sich durch die Hülleigenschaften von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (vgl. 2.4). Durch die äußere Membran wird eine Diffusion des zweifach positiv geladenen PMAs in die Gram-negativen Zellen verhindert bzw. stärker unterbunden als bei Gram-positiven Zellen.

Der Einfluss von PMA auf unbehandelte Gram-positive Zellen wurde im Fall einzelner Bakterienarten, wie zum Beispiel *Listeria monocytogenes* (Nkuipou-Kenfack et al., 2013), *Brochothrix thermosphacta* (Mamlouk et al., 2012), *Mycobacterium avium* (Kralik et al., 2010) und *E. faecalis* (de Almeida et al., 2016; Kim and Ko, 2012) beschrieben. Einige Studien zeigen dies auch bei Gram-negativen Bakterien wie *C. jejuni* oder *Salmonella* (Banihashemi et al., 2012). Generell werden somit in der PMA-qPCR weniger Bakterien gemessen als im Kulturverfahren (falls durchgeführt), oder in der qPCR ohne PMA. Im Kontrast zu diesen Daten zeigen einige andere Studien keinen Einfluss von PMA auf unbehandelte Zellen (Desfossés-Foucault et al., 2012; Løvdal et al., 2011; Nocker et al., 2006, 2007).

Die Ergebnisse dieses Experiments und die Daten aus Literaturangaben zeigen nochmals deutlich den Einfluss verschiedener Parameter der PMA-qPCR. So zeigen die bisherigen Daten auch, dass die Zusammensetzung der Bakteriensuspension eine große Rolle spielt (vgl. Abbildung 63). In allen genannten Studien wurden kleine Amplifikate (ca. 100 bp) für den molekularbiologischen Nachweis eingesetzt. Bei kleinen Amplifikaten wird mehr PMA in den Zellen benötigt, um eine Reduktion des Signales zu bewirken. So können auch höhere PMA-Konzentrationen eingesetzt werden, ohne dass unbehandelte Zellen beeinflusst werden.

Die PMA-Konzentration lag in den genannten Studien zwischen 20 und 100 μM , wobei selten verschiedene Konzentrationen wie in dieser Arbeit getestet wurden. Ein möglicher falsch negativer Effekt durch PMA wurde in einigen Studien entweder nicht diskutiert oder ein Vergleich mit Referenzen (Kulturverfahren oder PCR ohne PMA) nicht durchgeführt.

Im Experiment zeigte sich bei höheren Inkubationstemperaturen bei der PMA-Behandlung auch eine größere Reduktion unbehandelter Zellen durch PMA. Durch Erhöhung der Temperatur steigt die Membranpermeabilität und PMA kann vermehrt in die Zellen eindringen. In einigen Studien wird durch die höhere Temperatur eine bessere Reduktion in der PMA-qPCR erreicht und diese auch empfohlen (Elizaquível et al., 2014; Nkuipou-Kenfack et al., 2013). Dies ist durchaus mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar. In beiden Studien wurden kurze Amplifikate genutzt, bei denen mehr PMA benötigt wird, um

eine Reduktion in der qPCR zu erzielen. Durch die erhöhte Inkubationstemperatur gelangt mehr PMA in die Zellen - mit einem kleinen Amplifikat reichen die PMA-Moleküle jedoch nicht für eine Reduktion der unbehandelten Zellen aus. Bei größeren Amplifikaten ist diese Methode – wie die Ergebnisse zeigen - jedoch nicht zu empfehlen.

Bereits 1 μM PMA bewirkten bei *C. jejuni* eine starke Reduktion der gemessenen Bakterienkonzentration. Diese Reduktion ist bei dieser PMA-Konzentration viel stärker als bei den eingesetzten Gram-positiven Bakterien. Bei weiterer PMA-Zugabe sank die Bakterienkonzentration in der qPCR geringfügig weiter ab. Wird die Ausgangskonzentration auf den Messwert bei 1 μM PMA gesetzt, sind die Ergebnisse mit denen von *E. coli* vergleichbar. Dieser Effekt kommt möglicherweise durch bereits beschädigte Zellen in der Kultur zustande, die durch das PMA von der qPCR ausgeschlossen werden. *C. jejuni* vermehrt sich unter mikroaerophilen Bedingungen (geringe Sauerstoffkonzentration). Nach der Kultivierung wurden die Zellen unter normalen Laborbedingungen gelagert bzw. in Suspension gehalten. Bei diesen Sauerstoffkonzentrationen sind die *C. jejuni* Bakterien nicht überlebensfähig (Hilbert et al., 2010). Somit wurden durch die Zugabe von 1 μM PMA die toten Zellen von der qPCR ausgeschlossen (starker Signalabfall).

Test der 16S LA-PMA-qPCR: Unbehandelte Bakterien (A)

Die entwickelte 16S LA-PMA-qPCR sollte mit verschiedenen Konzentrationen unbehandelter Bakterien überprüft und mit dem Kulturverfahren verglichen werden. Eine Verdünnungsreihe von unbehandelten *E. faecalis*, *E. coli* und *P. aeruginosa* wurde mit dem Kulturverfahren (MPN, s. 6.3.4.1), der PMA-qPCR und der LA-PMA-qPCR quantifiziert (Abbildung 55). Es wurden 15 μM PMA und die 16S Primer 341-926 eingesetzt. Aus dem Ergebnis der qPCR (16S Genkopien) wurde mit Formel 1 das Genomäquivalent, also die Zahl der Bakterien, berechnet.

Entsprechend der Verdünnungsstufe wurden in der LA-PMA-qPCR bei *E. coli* und *P. aeruginosa* sinkende Messwerte erreicht (Abbildung 55). Wie zuvor gezeigt (s. Abbildung 49), kann die PMA-qPCR nicht bei einer Suspension aus ausschließlich unbehandelten *E. faecalis* eingesetzt werden, da PMA auch in die intakten bzw. kultivierbaren Zellen eindringen kann. Ohne PMA lässt sich die Verdünnungsreihe von *E. faecalis* jedoch darstellen (Abbildung 55, B). Die Anzahl der Genkopien liegt bei allen Messungen höher als der entsprechende Messwert im MPN-Verfahren. Nach Berechnung des Genom-Äquivalent der qPCR sind die Messwerte vergleichbar: Das qPCR-Ergebnis beträgt 99,1 %; 105,6 % und 101,7 % des Kulturverfahrens bei *E. coli*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa*.

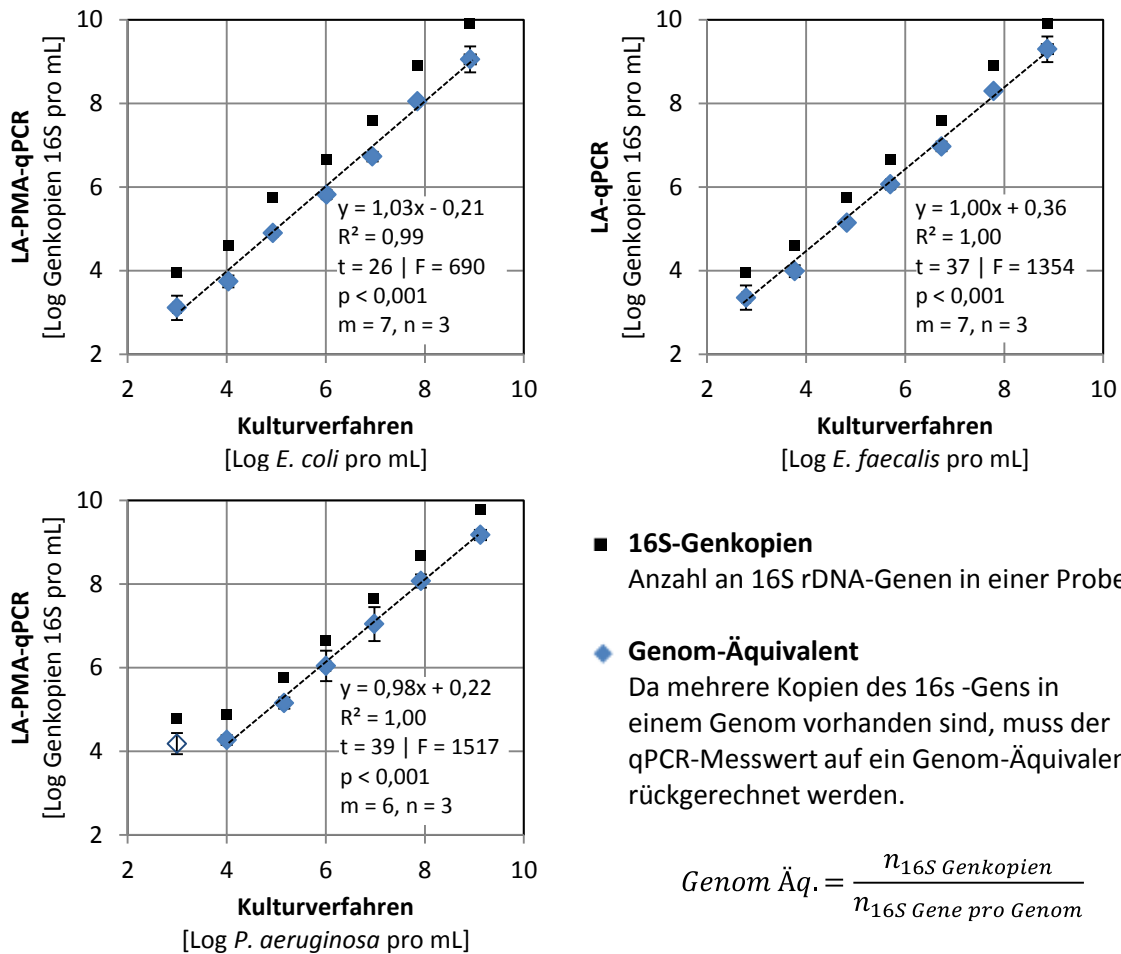


Abbildung 55: Vergleich der Messwerte von Kulturverfahren und LA-PMA-qPCR bzw. LA-qPCR einer Verdünnungsreihe unbehandelter Bakterien. Aus den mit vektoriellen Standards ermittelten Konzentration an Genkopien wurde das Genomäquivalent für jedes Bakterium berechnet.

Beobachtungen bei der Kultivierung von *P. aeruginosa*

Das Kulturverfahren (MPN) wurde zwei Tage nach Erstellen der Verdünnungsreihe angesetzt. Nur die unverdünnte, sowie die erste und zweite dekadische Verdünnung konnte kultiviert werden (Abbildung 56, rot). Höher verdünnte Proben zeigten kein Wachstum. Durch das Ansetzen einer frischen Verdünnungsreihe für das MPN-Verfahren konnten die erwarteten Zellzahlen ermittelt werden (Abbildung 56, schwarz).

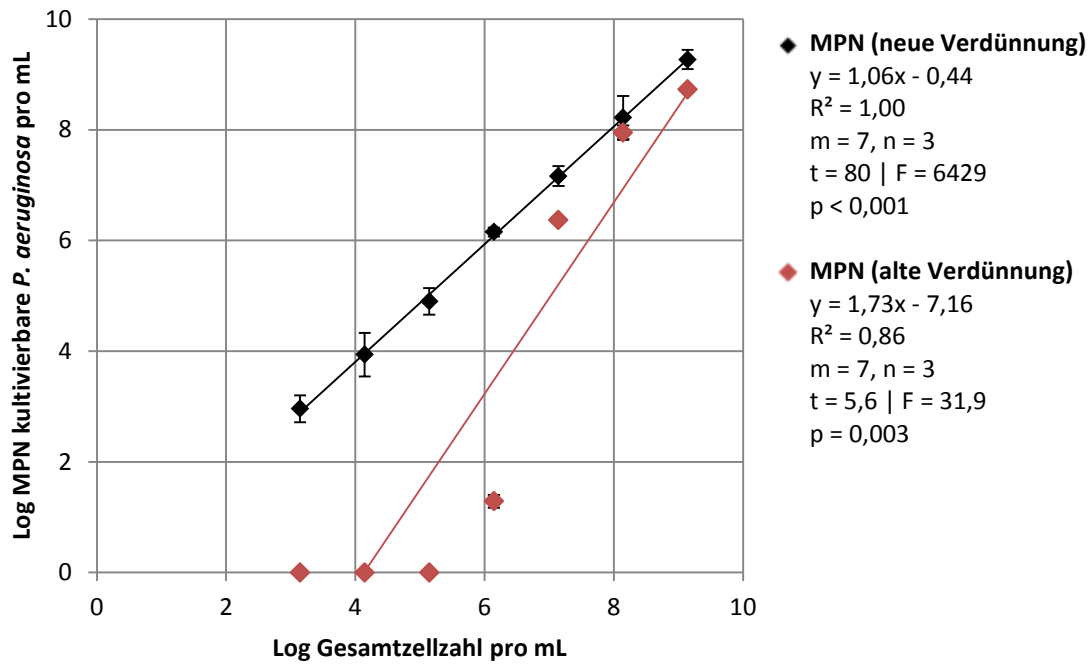


Abbildung 56: Ergebnisse des MPN-Kulturverfahrens für eine frische und eine ältere (2 Tage) Verdünnungsreihe von *P. aeruginosa* ($m = 7, n = 3$).

P. aeruginosa scheint in Leitungswasser bei Nährstoffmangel in ein Stadium zu wechseln, welches sich nicht mehr in R2A-Medium vermehrt. Das VBNC-Stadium wurde bei einigen Bakterien bereits durch einfache Lagerung ohne Nährstoffe induziert, allerdings erst nach einer längeren Zeitspanne und bei höheren Temperaturen (Lowder et al., 2000; Wu et al., 2015). Somit kann – ohne weitere Untersuchungen – dieses Verhalten nicht genau interpretiert werden. In vergleichenden Versuchen mit der Durchflusszytometrie zeigten sich zwischen älteren und neuen Verdünnungen bei *P. aeruginosa* ebenfalls Unterschiede im Messsignal (Abbildung 86).

Test der 16S LA-PMA-qPCR: Unbehandelte und hitzebehandelte Bakterien (B)

Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten Bakterien wurden in der 16S-LA-PMA-qPCR (341-926) quantifiziert (Tabelle 22). Für alle untersuchten Bakterien konnten Kalibriergeraden mit Steigungswerten (m) um 1,0 und einem Koeffizienten (R^2) über 0,99 erstellt werden. Je nach Bakterium konnten nicht alle Verdünnungen für die Kalibriergerade genutzt werden, was ausnahmslos die stark verdünnten Proben betrifft.

Tabelle 22: Ergebnisse der 16S LA-PMA-qPCR aus Mischungen von unbehandelten und hitzebehandelten Bakterien. *m: Arbeitsbereich, bzw. die in der Trendgerade einbezogenen Verdünnungen. ** Regressionsanalyse mit t- und F-Test mit P-Wert. *LOQ: Quantifizierungsgrenze und letzter Messwert der Trendgerade in Log Genkopien pro μL .**

Organismus	Gram	m*	Steigung Trend	R ²	P **	t **	F **	LOQ***
<i>C. jejuni</i>	-	4	1,05	0,99	0,091	-2,2	4,9	0,7
<i>C. lari</i>	-	5	0,98	1,00	< 0,001	-27	704	2,2
<i>E. coli</i>	-	5	1,02	1,00	< 0,001	-17	285	1,4
<i>E. hermannii</i>	-	4	1,38	0,99	< 0,001	-9,5	90	1,2
<i>K. pneumoniae</i>	-	5	1,03	1,00	0,013	-4,3	18	1,7
<i>L. pneumophila</i>	-	6	1,00	1,00	< 0,001	-127	1614	2,0
<i>P. aeruginosa</i>	-	5	1,00	1,00	< 0,001	-15	210	1,9
<i>B. subtilis</i>	+	5	1,01	0,99	< 0,001	-17	294	1,3
<i>C. perfringens</i>	+	5	0,96	1,00	< 0,001	-20	415	0,9
<i>E. gallinarum</i>	+	5	0,96	0,99	< 0,001	-16	258	1,1
<i>E. faecalis</i>	+	5	1,04	0,99	< 0,001	-11	124	1,4
<i>E. faecium</i>	+	4	0,98	0,99	< 0,001	-12	143	1,4
<i>M. luteus</i>	+	5	0,84	0,99	< 0,001	-9	87	0,8

Die LA-PMA-qPCR war sowohl für Gram-negative als auch für Gram-positive Bakterien erfolgreich. Maximal sechs Log-Stufen Reduktion wurden im Nachweisverfahren erreicht. Sowohl bei der Durchflusszytometrie, als auch bei der PMA-qPCR sind Mischungen aus vielen toten mit wenig intakten Organismen problematisch (Elizaquível et al., 2012b; Gensberger et al., 2013; Slimani et al., 2012). Yang et al. (2011) gibt für *E. coli* eine Grenze von 1 % lebenden Bakterien (2 Log-Stufen Reduktion) für 100 μM PMA an. In dieser Arbeit sind jedoch weitaus weniger lebende Bakterien noch innerhalb des Messbereichs. Zusätzlich wird in einigen Fällen die Nachweisgrenze der qPCR (10 / μL) erreicht, was die maximale Zahl der Messpunkte einschränkt.

In den vorherigen Versuchen (Abbildung 54) wurde gezeigt, dass PMA in unbehandelte Gram-positive Bakterien eindringen kann. Dieser Effekt ist geringer, wenn sich beschädigte Zellen in der Suspension befinden, in welche das PMA bevorzugt diffundieren kann. Dieser Effekt wurde bei *E. faecalis* im identischen Testverfahren bereits beschrieben (s. Abbildung 50).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien mit einem einheitlichen Protokoll (15 μM PMA) in Leitungswasser mit der LA-PMA-qPCR möglich ist. Die Entwicklung einer unspezifischen LA-PMA-qPCR für Bakterien war somit erfolgreich.

3.2.5 Etablierung der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie sollte im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert und in den Versuchen als Vergleichsverfahren eingesetzt werden. In der Durchflusszytometrie wird ebenfalls eine Farbstoff-basierte Lebend/tot-Differenzierung mit Propidiumiodid (PI) statt Propidium-Monoazid eingesetzt (s. 2.6.3). Stofflich unterscheidet sich PI von PMA nur durch die fehlende Azid-Gruppe, mit der die Bindungsreaktion an die Nukleinsäure ermöglicht wird (s. Abbildung 15 auf S. 44). PI dringt in beschädigte Zellen ein und markiert die Nukleinsäure, worauf diese Zellen bei entsprechender Laserbestrahlung (z.B. 422-nm-Wellenlänge) rotes Licht emittieren. So kann in der Durchflusszytometrie zwischen intakten (lebenden) und beschädigten (toten) Bakterien unterschieden werden.

Da der rote Farbstoff Propidiumiodid nach dem gleichen Prinzip wie PMA funktioniert, sind in der Durchflusszytometrie ähnliche Ergebnisse wie in der PMA-qPCR zu erwarten. Um eine ausreichende Unterscheidung lebender und toter Bakterien zu ermöglichen, wurde die Applikation der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe SYBR Green I und Propidiumiodid zunächst mit unbehandelten und hitzebehandelten Bakterien untersucht. Die Methodik zur Herstellung bakterieller Arbeitslösungen aus der Entwicklung der PMA-qPCR wurden dabei beibehalten (6.3.1).

Konzentration der Zellfarbstoffe: SYBRGreen

SYBR Green I färbt alle Zellen in Abhängigkeit der enthaltenen Nukleinsäure grün. Auch wenn der Farbstoff Propidiumiodid letztendlich für die Lebend/tot-Differenzierung verantwortlich ist, wurde die Applikation von SYBR Green I ebenfalls überprüft. Die eingesetzte Stammlösung des Farbstoffs liegt 10.000-fach konzentriert vor und wird auf eine einfache Konzentration in der Probelösung verdünnt.

Unbehandelte und hitzebehandelte *E. coli* wurden mit 30 μM Propidiumiodid und unterschiedlichen SYBR Green-Konzentrationen von 0,1 bis 10 μM angefärbt. Im Durchflusszytometer wurden 10^5 Ereignisse (z.B. Zellen) gemessen. Mit steigender Menge des grünen Farbstoffes steigt die Fluoreszenz und auch die Differenz zwischen unbehandelten und hitzebehandelten Zellen an (Abbildung 57, rechts). Dies ermöglicht eine bessere Unterscheidung der unbehandelten und der hitzebehandelten Probe (Abbildung 57, links). Bei einfach konzentrierter SYBR Green-Färbung ist eine deutliche Abgrenzung vom Geräterauschen möglich. Eine weitere Erhöhung der Farbstoffkonzentration verringert den Signalunterschied zwischen unbehandelten und hitzebehandelten Zellen (Gerät meldet hohe Hintergrundfluoreszenz der Probe). Einfach konzentriertes SYBR Green I eignet sich somit am besten zum Anfärben der Bakterien.

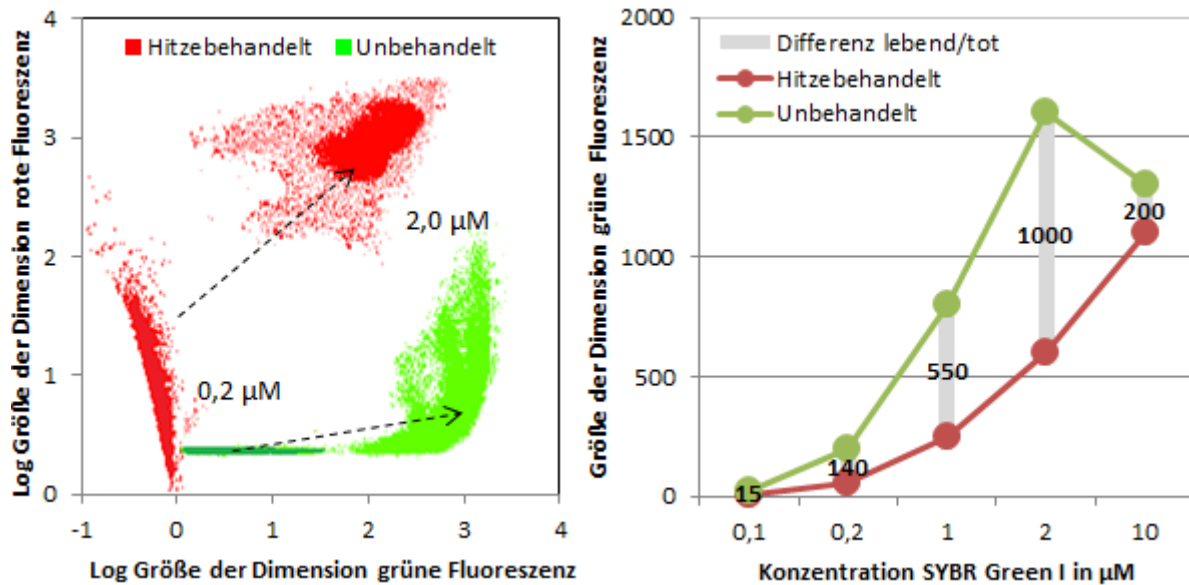


Abbildung 57: Grün/Rot-Plot von unbehandelten (grün) und hitzebehandelten (rot) *E. coli* Bakterien (Links). Grünfluoreszenz bei verschiedenen SYBR Green-Konzentrationen (rechts). Die Zellen wurden zusätzlich zu SYBR Green mit einer konstanten Konzentration (30 µM) Propidiumiodid gefärbt. Die Fluoreszenz stellt eine dimensionslose Größe dar.

Konzentration der Zellfarbstoffe: Propidiumiodid

Propidiumiodid dringt in der Lebend/tot-Differenzierung wie PMA in beschädigte Zellen ein. Propidiumiodid hat bis auf die Azid-Gruppe den gleichen Aufbau wie PMA (s. 2.6.2.3). Somit sollten sich die Konzentration des Farbstoffes und der Bakterientyp (Gram-positiv oder negativ) auf das Ergebnis auswirken, wie es bei PMA beobachtet wurde (s. Abbildung 54). Diese Hypothese wurde im Folgenden untersucht.

Unbehandelte und hitzebehandelte Arbeitslösungen von *E. faecalis*, *E. coli* und *P. aeruginosa* (jeweils ca. 10^7 Zellen pro mL) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Propidiumiodid angefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Zusätzlich wurde als Mischpopulation eine Probe Belebtschlamm untersucht (1:100, mit sterilfiltriertem Leitungswasser verdünnt). Um den Effekt der unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen auszuwerten, wurden jeweils die Größe der Dimension rote Fluoreszenz von unbehandelten und hitzebehandelten Bakterien verglichen (Abbildung 58). Für den Vergleich wurden im Durchflusszytometer 10^5 Ereignisse (z.B. Zellen) erfasst.

Bei der geringsten eingesetzten Konzentration von Propidiumiodid lag die Größe der Dimension rote Fluoreszenz bei allen unbehandelten Bakterien zwischen 5 und 20. Mit steigender Konzentration von Propidiumiodid steigt die Fluoreszenz sowohl unbehandelter, als auch hitzebehandelter Zellen. Bei Belebtschlamm, *E. coli* und *P. aeruginosa* steigt die Leuchtintensität beschädigter Zellen stärker als die der unbeschädigten Zellen an. Somit wird

die Differenz des Signales zwischen unbehandelten und hitzebehandelten Zellen größer, je mehr Farbstoff eingesetzt wird. Bei 30 μM PI liegt die Größe der Dimension rote Fluoreszenz bei 50, 11 und 40 für unbehandelte *P. aeruginosa*, *E. coli* und Belebtschlamm. Durch Hitzebehandlung stieg der Wert auf 400, 280 und 400 an, was einer Differenz von 350, 269 und 360 entspricht. Bei 150 μM PI steigt die Fluoreszenz unbehandelter *P. aeruginosa* und Belebtschlamm stark an, gleichzeitig sinkt die Fluoreszenz hitzebehandelter Zellen. Die Differenz der Dimension rote Fluoreszenz verringert sich auf 100 und 110 für *P. aeruginosa* und Belebtschlamm.

Bei *E. faecalis* wird die Differenz in der Leuchtintensität zwischen unbehandelten und hitzebehandelten Zellen mit steigender Propidiumiodid-Konzentration geringer. So steigt die Größe der roten Fluoreszenz bei unbehandelten Zellen von 20 (1,5 μM PI) auf 90 (30 μM), wohingegen die Werte der hitzebehandelten Zellen nur geringfügig entsprechend von 180 auf 220 ansteigen.

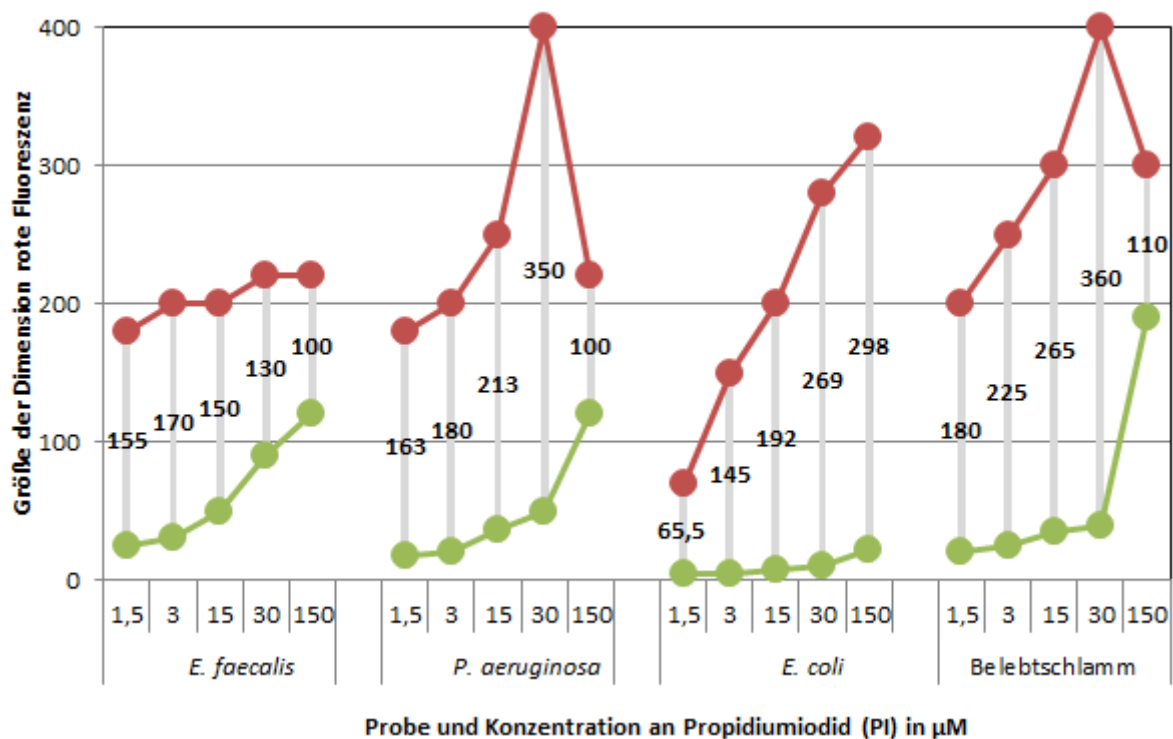


Abbildung 58: Rot-Fluoreszenz verschiedener unbehandelter (grün) und hitzebehandelter (rot) Bakterien bei unterschiedlichen Konzentrationen von Propidiumiodid. Die Linien zeigen die Differenz der Messwerte an.

Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen mit PMA: Generell wird bei höheren PI-Konzentrationen mehr Farbstoff in die Zellen aufgenommen, wobei dies bevorzugt bei den beschädigten, also leichter zugänglichen Zellen geschieht.

Es gibt wie bei PMA eine ungleichmäßig starke Aufnahme des Farbstoffes in Gram-positive und -negative Zellen, welche durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellen bedingt ist (in

3.2.4.5 diskutiert). So wurden durch 100 μM PMA 2 Log-Stufen weniger *E. faecalis* in der PMA-qPCR erfasst. Bei *E. coli* und *P. aeruginosa* lag die Reduktion nur bei 0,4 Log-Stufen (s. 3.2.4.5). Ein solcher quantitativer Vergleich kann bei der Durchflusszytometrie nicht über die Organismenkonzentration durchgeführt werden, da die Lage der Messbereiche (*Gates*) entsprechend der Signale für unbehandelte und hitzebehandelte Zellen gesetzt wird – die Konzentration unbehandelter oder hitzebehandelter Zellen ändert sich somit trotz einer Verschiebung der Rot-Fluoreszenz bei PI-Konzentrationen zwischen 1,5 und 30 μM nur geringfügig. Lediglich bei 150 μM PI waren bei *P. aeruginosa*, *E. faecalis* und der Belebtschlamm-Probe Unterschiede in der gemessenen Bakterienkonzentration zu beobachten, da sich die Bereiche (*Gates*) für lebende und tote Zellen überschneiden. Die genannten Proben zeigen bei 150 μM PI zwischen unbehandelten und hitzebehandelten die geringste Differenz in der Fluoreszenz.

Der unterschiedliche Effekt der interkalierenden Farbstoffe auf Gram-positive und -negative Bakterien lässt sich somit nur über die Fluoreszenzwerte beschreiben (Tabelle 23). Bei *E. faecalis* ist Größe der roten Fluoreszenz bei unbehandelten Zellen mit 30 μM am größten. *P. aeruginosa*, *E. coli* und Belebtschlamm liefern geringere Werte. Gleichermaßen verhält es sich mit der Differenz zwischen der Fluoreszenz bei 1,5 und 30 μM PI. Die größte Differenz im Fluoreszenzwert zwischen unbehandelten und hitzebehandelten Zellen wird bei *E. faecalis* mit 1,5 μM PI erreicht. *E. faecalis*, *E. coli* und Belebtschlamm zeigen hier ebenfalls andere, höhere Werte. Dies zeigt, dass sich die Farbstoffe PI und PMA wie erwartet vergleichbar verhalten und stärker in unbehandelte Gram-positive als in Gram-negative Zellen eindringen.

Tabelle 23: Vergleich des Einflusses von Propidiumiodid (PI) in der Durchflusszytometrie und PMA in der qPCR bei Gram-positiven und Gram-negativen Zellen. Belebtschlamm enthält vermehrt Gram-negative Bakterien (71,4-97,3 %, (Zhang et al., 2012). FL_{rot} = Größe der roten Fluoreszenz.

	Parameter	<i>E. faecalis</i> Gram +	<i>P. aeruginosa</i> Gram -	<i>E. coli</i> Gram -	Belebtschlamm Gram - > + *
Durchflusszytometrie	FL _{rot} unbehandelten Zellen, 30 µM PI	90	50	11	40
	Differenz FI _{rot} 1,5 µM PI und 30 µM PI	70	35	6	20
	Differenz FI _{rot} unbehandelt und hitzebehandelt 30 µM PI	130	350	269	360
	PI Konzentration der maximalen Differenz FI _{rot} unbehandelt und hitzebehandelt	1,5 µM	30 µM	150 µM	30 µM
PMA-qPCR	Log-Reduktion in der PMA-qPCR bei 100 µM PMA	2,0	0,4	0,4	Keine Daten
	PMA-Konzentration mit maximal 0,5 Log-Stufen Reduktion	1 µM	> 100 µM	> 100 µM	Keine Daten

Zusammenfassend liefert 30 µM PI bei Gram-negativen Bakterien einen maximalen Unterschied zwischen unbehandelten und hitzebehandelten Zellen. Bei Gram-positiven Zellen ist diese Konzentration nicht optimal, aber ebenfalls einsetzbar, da zwischen unbehandelt und behandelt unterschieden werden kann. Ein gemeinsames Protokoll macht die Messung von Mischproben möglich. Höhere Konzentrationen von Propidiumiodid (150 µM) führen zu einem verstärkten Eindringen des Farbstoffes in unbehandelte Zellen. Außerdem führt die starke Fluoreszenz der Lösung (Matrix) zu einer internen Reduzierung der Sensorstärke (geringere gemessene Fluoreszenz).

Test der Durchflusszytometrie: Unbehandelte Bakterien (A)

Eine dekadische Verdünnungsreihe unbehandelter Bakterien wurde mit der Durchflusszytometrie (1x SYBR Green I; 30 µM PI) und dem Kulturverfahren (MPN) quantifiziert (Abbildung 59). Bei *E. coli*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa* konnten alle Suspensionen von 10⁹ bis 10³ Bakterien pro Milliliter gemessen werden. Die jeweiligen Werte für den Ordinatenabschnitt von -0,24; 0,08 und -0,21 für *E. coli*, *P. aeruginosa* und *E. faecalis* zeigen, dass die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit dem Kulturverfahren vergleichbar sind.

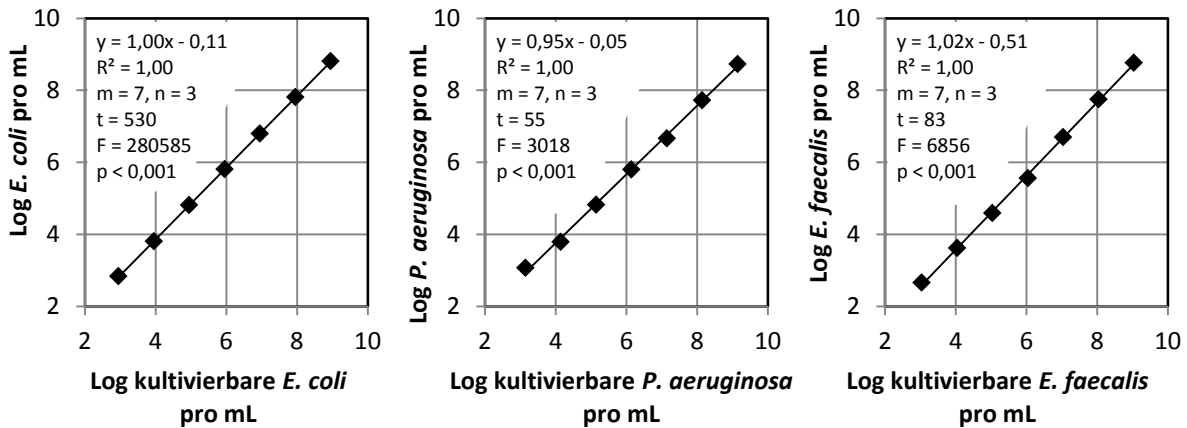


Abbildung 59: Vergleich der Messwerte von Durchflusszytometrie und Kulturverfahren bei unbehandelten Bakterien ($m = 7, n = 3$).

Bei der LA-PMA-qPCR war der identische Versuch bei unbehandelten *E. faecalis* nicht erfolgreich und führte zu einer Signalreduktion durch PMA (s. Abbildung 49). Bei PI wurde ebenfalls ein Effekt auf unbehandelte *E. faecalis* festgestellt (vgl. Abbildung 58). Doch obwohl diese auch PI aufnehmen, lassen sich die Zellen dennoch durch die Differenz im Fluoreszenzsignal unterscheiden, wenn die Bereiche für lebende und tote Bakterien im Rot/grün-Plot den Kontrollen (unbehandelt = lebend; hitzebehandelt = tot) entsprechend gelegt werden.

Dies macht Kontrollen erforderlich, da sich die Fluoreszenzsignale von angefärbten *E. coli*, *E. faecalis* und auch anderen Bakterien im Durchflusszytometer unterscheiden. Die einfachste Möglichkeit ist, eine unbehandelte und eine hitzebehandelte Probe im Durchflusszytometer zu messen. Aus der unterschiedlichen Position der Bakterien lassen sich dann die Bereiche (Gates) für „lebend“ und „tot“ legen (vgl. Abbildung 61).

Test der Durchflusszytometrie: Unbehandelte und hitzebehandelte Bakterien (B)

Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten Bakterien wurden mit der Durchflusszytometrie (2 μM SYBR Green, 30 μM PI) quantifiziert (Abbildung 60). Mit steigender Verdünnung der unbehandelten Zellen werden weniger Signale im Bereich für lebende Zellen detektiert. Die Zahl der Signale im Bereich toter Zellen bleibt konstant.

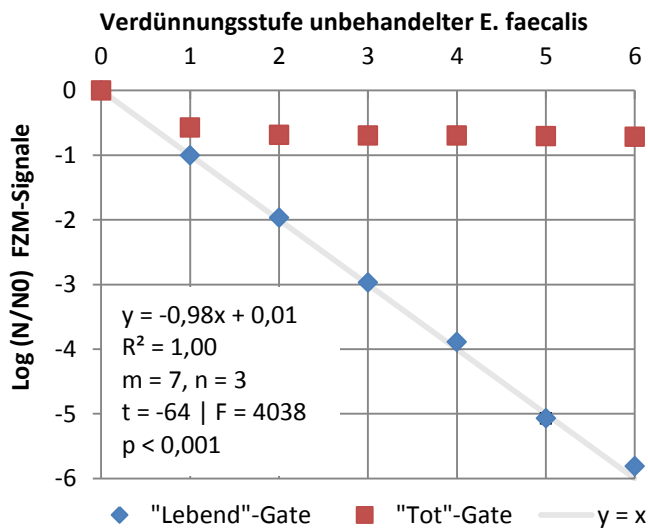


Abbildung 60: Messergebnisse von Mischungen unbehandelter und hitzebehandelter *E. faecalis* in der Durchflusszytometrie ($m = 6, n = 3$).

Die oben dargestellte Kalibrierkurve aus Mischungen von intakten und hitzebehandelten Bakterien konnten auch mit anderen Spezies erfolgreich durchgeführt werden (Tabelle 24).

Tabelle 24: Ergebnisse der Durchflusszytometrie aus Mischungen von unbehandelten und hitzebehandelten Bakterien. m : In der Trendgerade einbezogene Verdünnungen. LOQ: Quantifizierungsgrenze und letzter Messwert der Trendgerade in Log Genkopien pro mL. * Regressionsanalyse mit t- und F-Test mit P-Wert.

Organismus	Gram	m	Steigung Trend	R^2	p^*	t^*	F^*	LOQ
<i>C. lari</i>	-	6	0,93	1,00	< 0,001	-38	1447	1,7
<i>E. coli</i>	-	5	1,00	1,00	< 0,001	-114	13028	1,0
<i>E. hermanni</i>	-	6	0,95	1,00	< 0,001	-51	2598	1,5
<i>K. pneumoniae</i>	-	6	0,98	1,00	< 0,001	-205	42062	0,7
<i>L. pneumophila</i>	-	6	0,97	1,00	< 0,001	-54	2903	0,8
<i>P. aeruginosa</i>	-	5	0,99	1,00	< 0,001	-221	48835	1,8
<i>E. faecalis</i>	+	6	0,98	1,00	< 0,001	-64	4103	0,6
<i>M. luteus</i>	+	5	0,97	1,00	< 0,001	-27	753	1,8

Wie auch in der PMA-qPCR sind Messungen von Zellsuspensionen mit extremen Lebend/tot-Verhältnissen schwierig. So fällt bei einer Lösung aus hitzebehandelten Zellen ein kleiner Teil der Signale in den Bereich lebender Zellen. Auch wenn dies mit 0,001 % relativ wenige Signale betrifft, beschränkt es dennoch den Arbeitsbereich. Die Bereiche für „lebend“ und „tot“ überschneiden sich bei einigen Bakterien wie beispielsweise *L. pneumophila* oder *C. perfringens* – entsprechende Bereiche (Gates) lassen sich somit nicht ohne Kompromisse bzw. leichte Signalverluste legen (s. Abbildung 61). Dies ist der Physiologie der Bakterien geschuldet, die sowohl die Aufnahme der Farbstoffe (Zellwand und Membran) als auch die Leuchtintensität (DNA-Menge) beeinflusst. Die jeweiligen Gates für „lebend“ und „tot“ sind in der folgenden Abbildung 61 dargestellt.

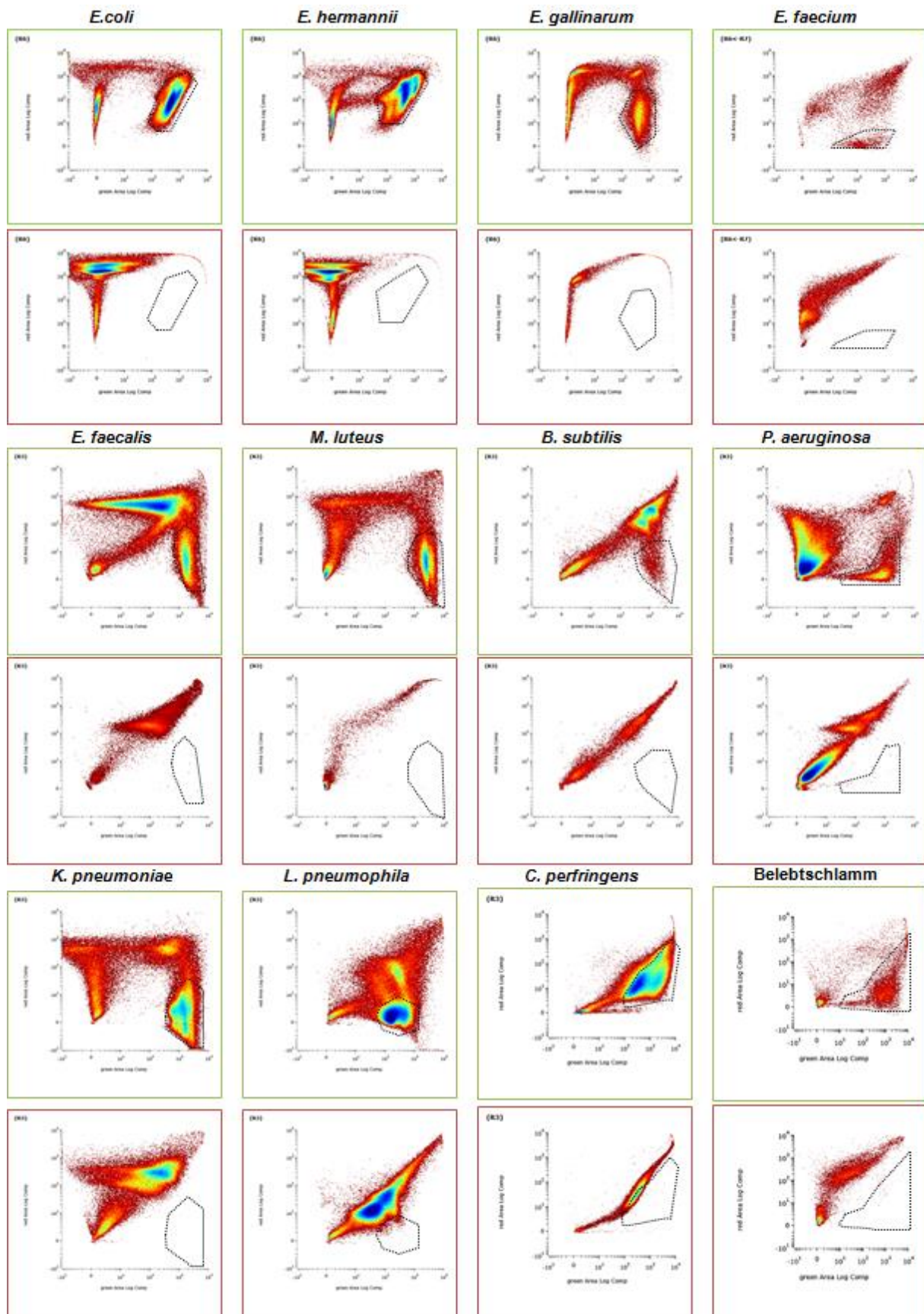


Abbildung 61: Markierung des lebend Gates bei der Messung von unbehandelten (grüner Rahmen) und hitzebehandelten (roter Rahmen) Bakterien im Durchflusszytometer. Die x-Achse zeigt die Intensität der grünen, die y-Achse die Intensität der roten Fluoreszenz (Größe ohne Einheit).

Fazit

Mit der Durchflusszytometrie konnte erfolgreich zwischen hitzebehandelten und unbehandelten Bakterien unterschieden werden. Dabei konnten auch Proben mit extremen Lebend/tot-Verhältnissen analysiert werden. Bei jedem Versuch (bzw. Bakterientyp) müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt werden. Die Etablierung der Lebend/tot-Unterscheidung mittels Durchflusszytometrie war somit erfolgreich und die Methode konnte als Vergleichsverfahren zur LA-PMA-qPCR in den folgenden Versuchen eingesetzt werden.

3.2.6 Zusammenfassung und Fazit der Methodenentwicklung

Ziel der Methodenentwicklung war eine qPCR-basierte Methode zur Differenzierung von lebenden und toten Bakterien sowie infektiösen und nicht infektiösen Viren. Die Methodenentwicklung zeigte, dass die Größe der Amplifikate in der qPCR einen erheblichen Einfluss auf den Nachweis beschädigter Viren und Bakterien hat. Mit den bereits etablierten qPCR-Reaktionen mit kurzen Amplifikaten war die Lebend/tot-Unterscheidung nicht erfolgreich, da nur ein geringer Teil beschädigter Organismen von der qPCR ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 39, links). Um diese Unterscheidung zu ermöglichen, mussten neue qPCR-Verfahren zum Nachweis langer Amplifikate entwickelt werden, die LA-PMA-qPCR. Grundsätzlich erhöht sich mit der Größe des Amplifikates die Wahrscheinlichkeit, dass eine DNA-Schädigung oder eine Markierung durch PMA (durch Beschädigung der Hülle) zu einer Blockierung der qPCR führt (Abbildung 62). Mit der neu entwickelten LA-PMA-qPCR ließen sich mit dem Kulturverfahren vergleichbare Messwerte für unbehandelte und hitzebehandelte Bakterien und Viren erzielen (Abbildung 39, rechts).

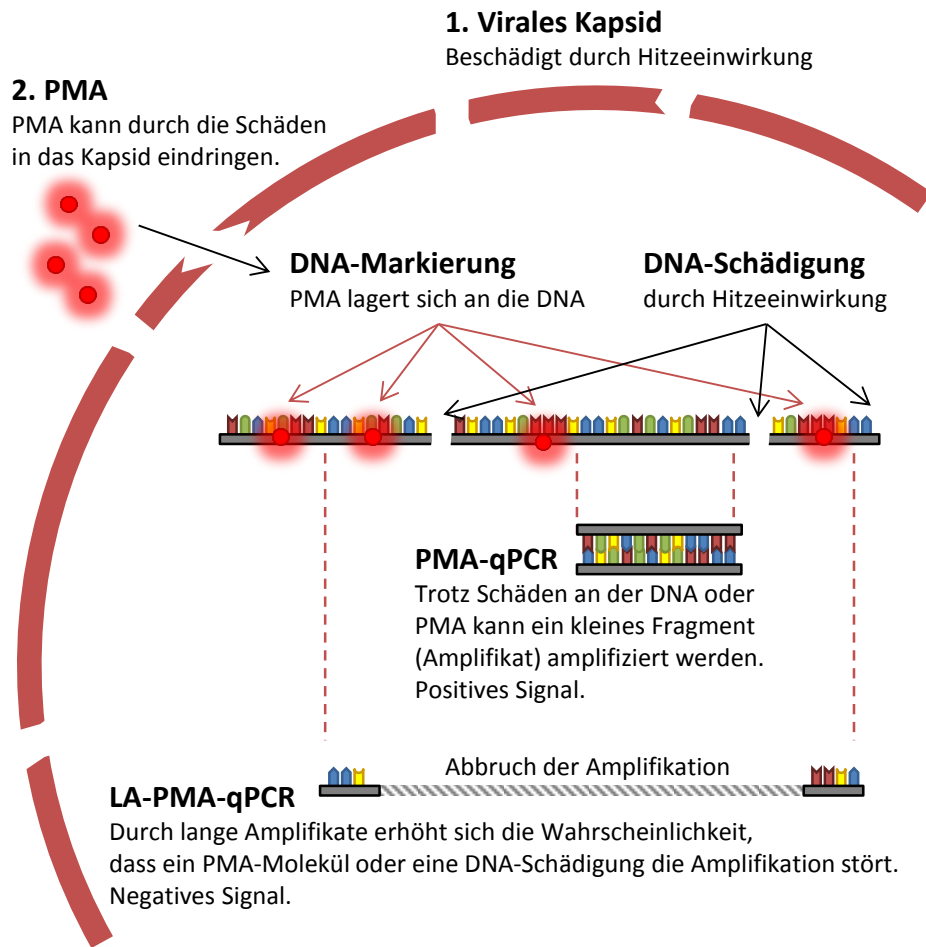


Abbildung 62: Prinzip der Lebend/tot-Unterscheidung am Beispiel von hitzebehandelten Viren mit der PMA-qPCR und der LA-PMA-qPCR.

Organismenspezifische Wirkung von interkalierenden Farbstoffen

Die Ergebnisse der PMA- und PI-Behandlung zeigen je nach Organismus einen unterschiedlich starken Effekt auf intakte Bakterien oder infektiöse Viren (Abbildung 63). **Gram-negative Bakterien** ließen sich mit hohen PMA-Konzentrationen behandeln, ohne das PCR-Signal der vitalen Zellen gravierend zu beeinflussen. Bei **Gram-positiven Bakterien** hingegen bewirkten schon geringe PMA-Konzentrationen einen Abfall des Messsignals und somit falsch negative Ergebnisse (Abbildung 54). In der Durchflusszytometrie zeigten sich vergleichbare Effekte (Abbildung 58), die aufgrund der fast identischen Farbstoffe PI und PMA zu erwarten waren. Die **Bakteriophagen MS2** und **phiX174** zeigen ebenfalls einen extremen Unterschied bei der Behandlung mit PMA. Dieser Unterschied wird durch die unterschiedlichen Hülleigenschaften hervorgerufen (s. 2.4 und 3.2.4.5). Der isoelektrische Punkt der Viren und entsprechend der pH-Wert der Probe kann ebenfalls eine Rolle bei der Wirkung von PMA spielen. So wurde die Signalreduktion bei unbehandelten MS2 bei pH 4 nicht beobachtet (Abbildung 38).

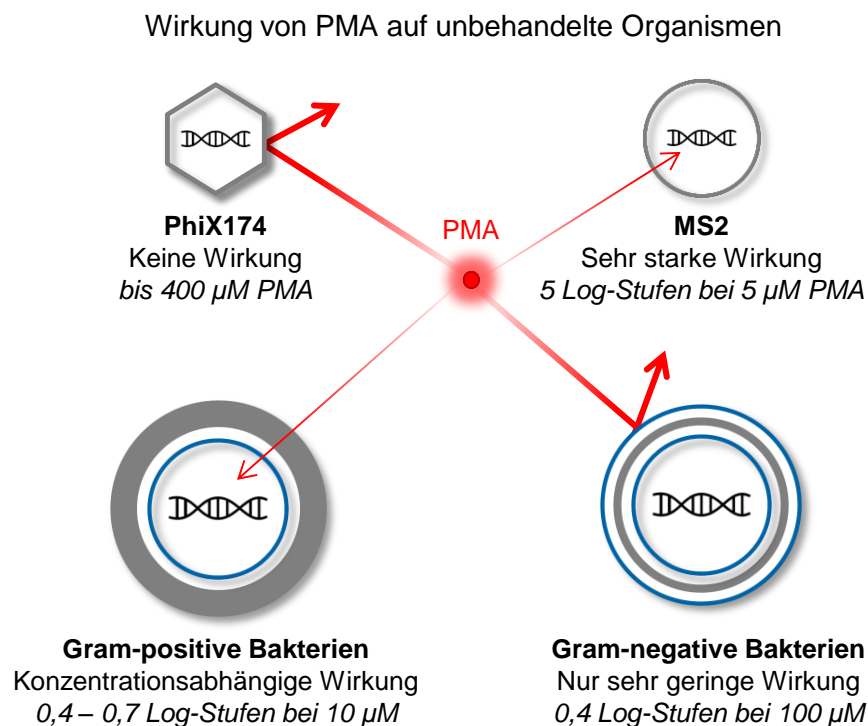


Abbildung 63: Schematische Darstellung der PMA-Aufnahme von vitalen Bakterien und Viren.

Trotz der unterschiedlichen Wirkung von PMA und PI auf intakte Organismen konnten Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten Bakterien und Viren erfolgreich mit der LA-PMA-qPCR oder der Durchflusszytometrie unterschieden und mit den Kulturverfahren vergleichbare Messergebnisse erreicht werden. Eine Unterscheidung war

auch dann noch möglich, wenn ein großer Teil der in einer Probe suspendierten Organismen beschädigt war – eine wichtige Funktion der LA-PMA-qPCR, welche in den meisten Studien zur Lebend/tot-Unterscheidung nicht erreicht wird. Dies ist vor allem für den Nachweis von Desinfektionen bedeutend, da diese mindestens eine Reduktion von 4 Log-Stufen erreichen müssen. Somit war die Entwicklung einer Lebend/tot-Differenzierung in der qPCR und die Etablierung der Durchflusszytometrie erfolgreich.

Bisher wurden die Bakterien und Viren im Rahmen der Methodenentwicklung mit Hitze bei 90 °C inaktiviert. Da in der Wasserpraxis vor allem jedoch chemische und physikalische Desinfektionsverfahren eingesetzt werden, stellt sich die Frage, ob die Lebend/tot-Differenzierung auch hier erfolgreich eingesetzt werden kann.

3.3 Anwendung der Lebend/tot-Unterscheidung bei Desinfektionsverfahren

In den meisten bisherigen Studien zu PMA wurden die Bakterien oder Viren mit Methoden bzw. Dosierungen inaktiviert, die nicht praxisrelevant sind (vergl. Tabelle 5 auf Seite 41). Deswegen sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob die LA-PMA-qPCR auch bei Viren und Bakterien eingesetzt werden kann, die mit praxisnahen Bedingungen mit UV, Chlor und Ozon behandelt wurden. Außerdem sollte die thermische Desinfektion bei geringeren Temperaturen überprüft werden. Die jeweiligen Konzentrationen und Behandlungsstärken der Desinfektionsverfahren sind in Tabelle 25 aufgeführt (Details unter 6.7 auf S. 220).

Tabelle 25: In den Versuchen eingesetzte Desinfektionsverfahren mit entsprechenden Parametern.

Organismus	Thermisch Temperatur °C	Niederdruck-UV Energie in J / m ²	Chlor Konzentration in mg / L	Ozon Konzentration in mg / L
phiX174	8 50 70 90 für jeweils 10 Minuten 105 für 10, 20, 30, 60 Minuten autoklaviert	0 25 50 75 100 125 150 175 200 300 400 500 600 700 800 1000	0,07 0,16 0,55 1,32 3,96 12,4	0 0,1 0,2 0,5 1 2 3 5 10
MS2 <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	8 50 60 70 80 90 für jeweils 10 Minuten	0 25 50 75 100 200 400 10.000	0 0,25 0,5 0,75 1 1,5 2 4	0 0,5 1 1,5 2 3 5 10

Neben der zu überprüfenden LA-PMA-qPCR wurden Kulturverfahren und bei Bakterien zusätzlich die Durchflusszytometrie als Messverfahren eingesetzt. Die Versuche mit phiX174 wurden zeitlich zuerst mit einer größeren Anzahl an Primern bzw. Amplifikatlängen durchgeführt. Anhand der Ergebnisse wurde die Dosierung für *E. coli*, *P. aeruginosa* und MS2 leicht angepasst. Eine Übersicht der Nachweisverfahren ist in Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 26: In Desinfektionsversuchen für die jeweiligen Organismen eingesetzte Nachweisverfahren.

Organismus	qPCR-Verfahren (6.3.7)	Kulturverfahren (6.3.4)	Flowzytometrie (6.3.6)
phiX174	108 – 5108 bp (Alle in Tabelle 9 auf Seite 58 aufgeführten Primer)	Plaque Assay (EN ISO 10705-1:2001)	Nicht etabliert
MS2	314 bp (2717-3031)	Plaque Assay (EN ISO 10705-2:2001)	Nicht etabliert
<i>E. coli</i>	1242 bp (UidA, 570 – 1812)	IDEEEX	Durchgeführt
<i>P. aeruginosa</i>	1063 bp (16S, 341 – 1404)	Plattenverfahren (spezifisches Medium) Katalase-MPN (6.3.4.1)	Durchgeführt

Ziel dieses Versuches ist es zu zeigen, welches molekularbiologische Nachweisverfahren am besten geeignet ist, um zwischen intakten und inaktivierten Organismen zu

unterscheiden. Die Ergebnisse werden als Signalreduktion (N/N_0) in Log-Stufen angegeben. Da die Nachweisgrenze der eingesetzten Verfahren sehr unterschiedlich ist, wurden bei den qPCR-Verfahren auch Messwerte außerhalb des Arbeitsbereichs in den Diagrammen als Symbole ohne Füllung dargestellt. Die Effizienz und Eliminationsleistung der einzelnen Desinfektionsverfahren ist für diesen Vergleich nicht relevant und soll auch nicht diskutiert werden.

3.3.1 Thermische Desinfektion

Eine thermische Desinfektion wird zur Desinfektion von Rohrleitungen in Hausinstallationen bei einem Befall mit Legionellen eingesetzt. Bei den vorherig beschriebenen Versuchen wurden die Organismen für 10 Minuten bei 90 °C inaktiviert. Für die Methodenentwicklung ist diese Behandlung optimal, da die Hüllen der Organismen dabei beschädigt werden und die Lebend/tot-Differenzierung mit interkalierenden Farbstoffen möglich ist. Organismen werden allerdings auch bei geringeren Temperaturen inaktiviert. Somit stellt sich die Frage, ob sich diese Inaktivierung ebenfalls durch das entwickelte Verfahren nachweisen lässt.

3.3.1.1 phiX174

PhiX174 Bakteriophagen wurden für 10 Minuten bei 50, 70, 90 und für 10, 20, 30 und 60 Minuten bei 105 °C inkubiert. Zusätzlich wurden Proben autoklaviert (121 °C, 20 Minuten).

Im **Kulturverfahren** (Plaque Assay) zeigten Temperaturen von 50 °C für zehn Minuten keinen Einfluss auf phiX174 Bakteriophagen (Abbildung 64, schwarz). Bei 70 °C sank die Anzahl der infektiösen Phagen um 1,9 Log-Stufen. Bei 90 °C konnten nur noch 15 Phagen pro mL detektiert werden, was einer Reduktion von ca. 8,5 Log-Stufen entspricht. Ab 105 °C konnten keine Bakteriophagen mehr nachgewiesen werden (> 9 Log-Stufen Reduktion).

Das Signal der **qPCR** (108 bp, Abbildung 64 A, blau) sinkt mit steigender Temperatur leicht und erreicht bei einer Behandlung von 105 °C für 60 Minuten eine Reduktion von 0,7 Log-Stufen. Selbst autoklavierte Phagen konnten mit der qPCR nachgewiesen werden – das Signal lag lediglich 1,9 Log-Stufen unter dem der unbehandelten Phagen. Bei qPCR-Reaktionen mit **größeren Amplifikaten** stieg die Reduktion des Signals an: Bei 105 °C für 60 Minuten wurden mit Amplifikatlängen von 564, 1063 und 1544 Basenpaaren entsprechend 3,4, 4,1 und 5,2 Log-Stufen Reduktion erreicht (Abbildung 64 B, C und D).

In der **PMA-qPCR** wurde bei 70 °C bei allen Amplifikatlängen etwa eine Log-Stufe Reduktion erreicht. Bei einem Amplifikat mit einer Länge von 108 bp sank das Signal bei stärkerer Behandlung nur leicht (Abbildung 64 A). Die zusätzliche Reduktion durch PMA betrug etwa

eine Log-Stufe. Bei allen größeren Amplifikaten stieg die Reduktion bei 70 °C auf bis zu 5,1 Log-Stufen an. Das Signal bei Temperaturen über 90 °C sank nur sehr leicht oder veränderte sich nicht mehr.

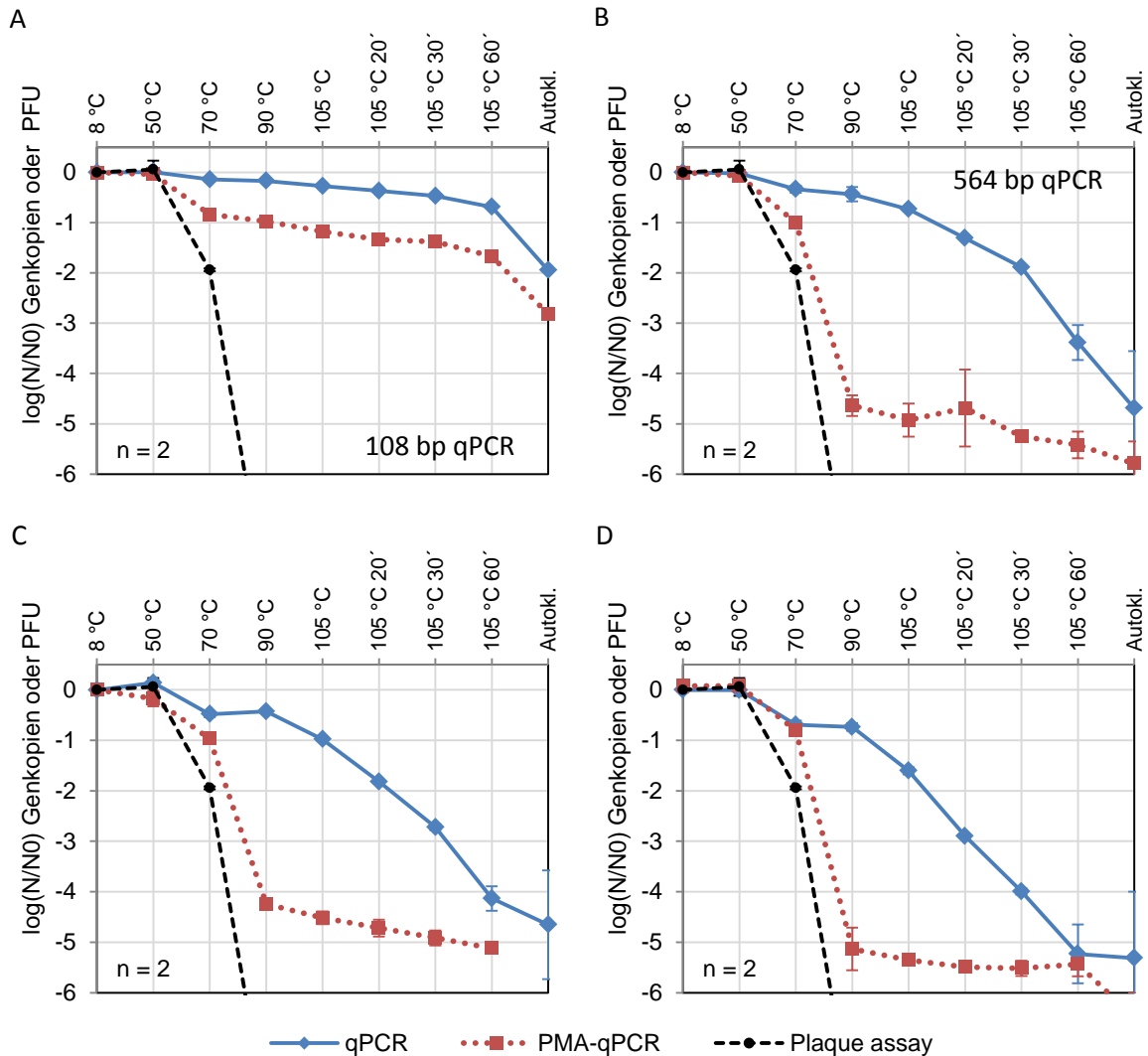


Abbildung 64: Ergebnisse von qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren (Plaque Assay) von hitzebehandelten phiX174-Bakteriophagen. Datenpunkte als Mittelwerte aus zwei unabhängigen Replikaten mit Doppelbestimmung (n = 2).

Hitze verursacht Schäden an Proteinen und verursacht Strangbrüche an genomischer DNA. Je größer das von den Primern flankierte Fragment in der qPCR ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Strangbruch in diesem Bereich befindet und die Amplifikation folglich nicht möglich ist. Somit wird mit größeren Amplifikaten eine größere Reduktion gemessen. Unterschiede zum Kulturverfahren zeigen jedoch, dass die Reduktion nicht allein auf der Zerstörung der Nukleinsäure beruht. Durch PMA wird eine höhere Reduktion erreicht, was auf Schäden am viralen Kapsid hindeutet. Wie bereits in der Methodenentwicklung festgestellt wurde, steigt die Reduktion durch PMA mit der Länge der

Amplifikate (vgl. Abbildung 39). So konnte die Hitzebehandlung von phiX174 erfolgreich mit der LA-PMA-qPCR nachgewiesen werden.

Die in der qPCR gemessene Reduktion durch die Hitzebehandlung lässt sich gegen die Behandlungsstärke (Temperatur und Zeit) auftragen (Abbildung 65 A). Die Datenpunkte mit gleicher Amplifikatlänge zeigen eine direkte Abhängigkeit erster Ordnung ($R^2 = 0,94$ | $0,98$ | $0,98$ | $0,98$ entsprechend für 108, 564, 1066 und 1544 bp). Gleichmaßen ist die Reduktion bei identischer Behandlung von der Größe des Amplifikates abhängig (Abbildung 65 B). Die Beziehung lässt sich ebenfalls durch einen Trend erster Ordnung beschreiben ($R^2 = 0,75$ | $0,96$ | $0,99$ | $0,99$ | $1,00$ entsprechend für $90\text{ °C } 10'$, $105\text{ °C } 10'$, $105\text{ °C } 20'$, $105\text{ °C } 30'$, $105\text{ °C } 60'$).

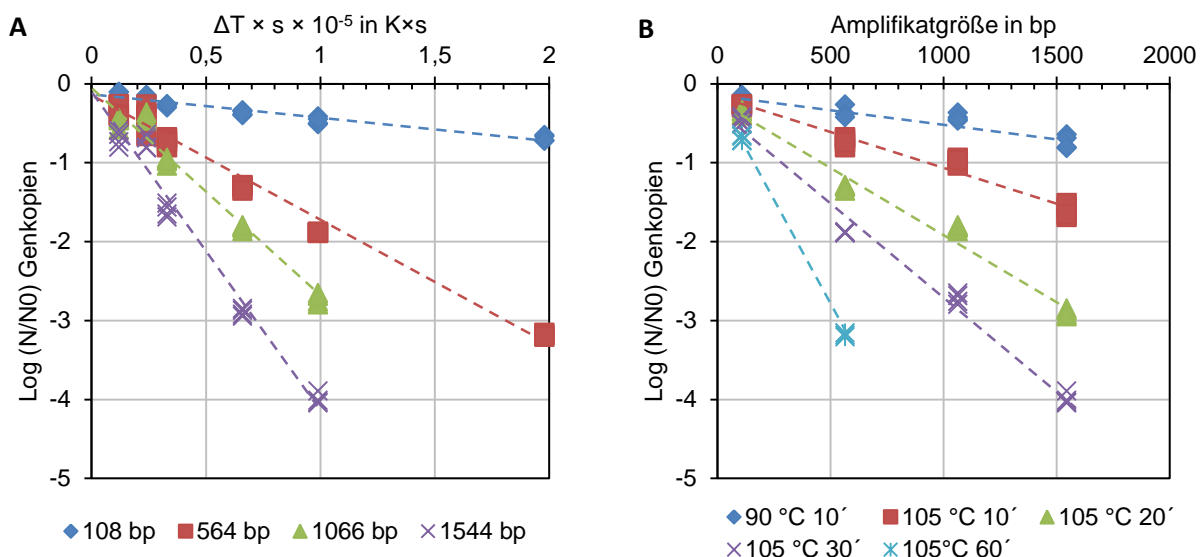


Abbildung 65: Einfluss der Behandlungsdosis (links, A) und Amplifikatgröße (rechts, B) auf die Reduktion in der qPCR. Datenpunkte als Einzelwerte (links: $m=24$ (108), 24 (564), 20 (1066), 20 (1544), rechts: $m=16$, 16 , 16 , 16 , 7 entsprechend steigender Dosis)

Die jeweiligen Zusammenhänge zwischen Reduktion, Amplifikatgröße und der Dosis der thermischen Inaktivierung sind in Formel 2 zusammengefasst. Dabei ist N die Anzahl der Bakteriophagen nach Behandlung, N_0 die Ausgangskonzentration, ΔT die Temperaturdifferenz der Hitzebehandlung zu $323,15\text{ K}$ (Temperatur ohne Reduktion), s die Behandlungsdauer in Sekunden und A die Amplifikatgröße in bp. k hat die Einheit $K^{-1} \times s^{-1} \times bp^{-1}$.

Formel 2

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = \Delta T \times s \times A \times k$$

Werden alle Ergebnisse der **qPCR** ab einer Behandlung von 70 °C einbezogen, so ergibt sich für die qPCR-Ergebnisse (88 Messwerte) ein konstantes k von $-0,275 \text{ K}^{-1} \times \text{s}^{-1} \times \text{bp}^{-1} \times 10^{-7}$ mit einem R^2 von 0,97 (Abbildung 66). Die autoklavierten Proben wurden nicht dargestellt, da die Details der Desinfektion (genaue Temperatur und Zeit) nicht bekannt sind. Der Trend zeigt, dass die Reduktion in der qPCR direkt von der Dosis und der betrachteten Amplifikatlänge abhängig ist.

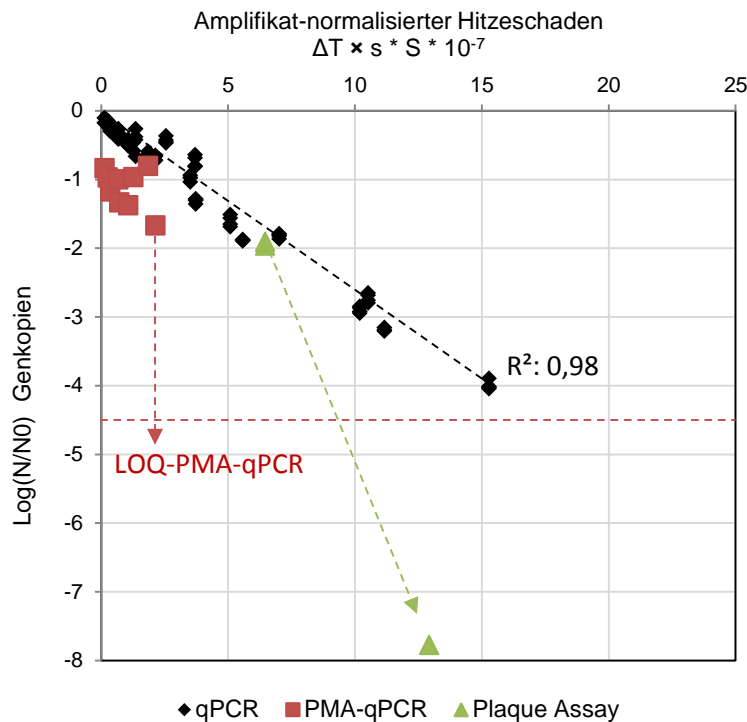


Abbildung 66: Messwerte von qPCR ($m = 88$), PMA-qPCR ($m = 24$) und Plaque Assay ($m = 4$). Die Trendgerade wurde anhand der Messwerte der qPCR gelegt. Gestrichelte Pfeile zeigen den Trend bei PMA-qPCR und Kulturverfahren. Der rote gestrichelte Pfeil zeigt zur ungefähren Position des ersten Datenpunktes unter der Quantifizierungsgrenze (10 Genkopien pro μL).

Die Ergebnisse der **PMA-qPCR** zeigen eine höhere Reduktion als die der qPCR und folgen somit nicht dem beschriebenen Trend. Die Reduktion beruht dabei zusätzlich zur thermischen DNA-Schädigung auf einer Verringerung des Signales durch das eingedrungene PMA.

Die Werte des **Kulturverfahrens** wurden unter Berücksichtigung des kompletten Genomes (5386 bp) geplottet. Dabei liegt der Wert bei 70 °C leicht unter der Trendgerade. Messwerte bei höheren Temperaturen liegen über 4 Log-Stufen unter diesem Trend. Ursache hierfür ist neben der Zerstörung des Genomes auch die Beschädigung viraler Proteine, die für die Infektion nötig sind. Das Kapsid ist nach einer Behandlung von 70 °C dennoch nicht permeabel für PMA – somit gibt es einen Messunterschied zwischen PMA-qPCR und dem Plaque Assay. Die dargestellten mathematischen Zusammenhänge beschreiben nur den

Schaden an der Nukleinsäure, also das Messergebnis der qPCR, nicht aber den Einfluss anderer Effekte, wie die Schäden am Kapsid (PMA-qPCR) oder der Oberfläche (Kulturverfahren).

3.3.1.2 MS2

Das Genom der Bakteriophage MS2 besteht aus RNA. RNA ist weniger stabil als DNA, weswegen bei MS2 im Vergleich zu phiX174 (DNA) eine höhere Reduktion in der qPCR zu erwarten war. Da bei phiX174 bei 105 °C keine weitere Reduktion mehr gemessen werden konnte, wurde in den Folgeversuchen mit Hitze auf Temperaturen über 90 °C verzichtet, dafür jedoch die Auflösung des Temperaturgradienten erhöht. MS2 Bakteriophagen wurden für 10 Minuten bei 50, 60, 70, 80 und für 90 °C für 10 Minuten inkubiert und mit der qPCR (314 bp), PMA-qPCR (314 bp) und dem Plaque-Assay quantifiziert (Abbildung 67).

Im **Kulturverfahren** wird bei einer Behandlung von 60 °C eine Reduktion von 2,6 Log-Stufen erreicht, bei 90 °C liegt die Reduktion bei 5 Log-Stufen (Abbildung 67, schwarz). In der **qPCR** sinkt die gemessene Konzentration der Viren ebenfalls bei 60 °C ab (Abbildung 67, blau). Die Reduktion ist geringer als im Kulturverfahren und liegt bei 0,8 Log-Stufen bei 60 °C und bei 3,3 Log-Stufen bei 90 °C. In der PMA-qPCR werden bei diesen Temperaturen 2,1 bzw. 5,9 Log-Stufen Reduktion erreicht. Die groben Trends der Reduktion im Kulturverfahren und in der PMA-qPCR verlaufen ähnlich, jedoch unterscheiden sich die Reduktionswerte bei einzelnen Temperaturen bis zu 1,4 Log-Stufen.

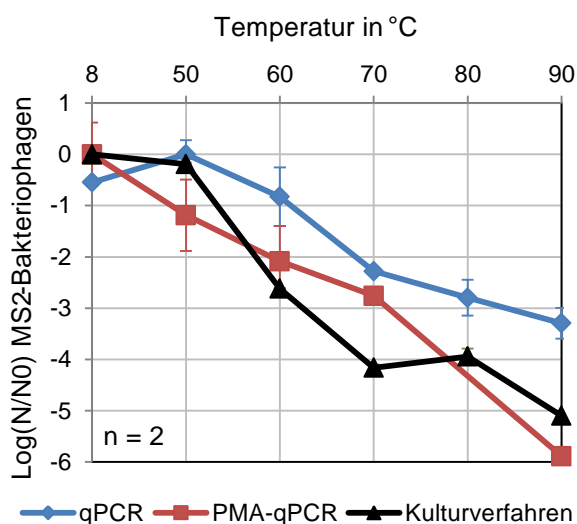


Abbildung 67: Signalreduktion von MS2 Bakteriophagen mit qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren nach thermischer Desinfektion. Datenpunkte als Mittelwerte aus zwei unabhängigen Replikaten mit Doppelbestimmung (n = 2).

Trotz der geringen Amplifikatgröße von 314 bp ist bei MS2 eine deutlich höhere Reduktion des qPCR-Signales (ohne PMA) durch Hitze – beispielsweise 3,3 Log-Stufen bei 90 °C - zu

beobachten. Bei phiX174 wurde bei einer Amplifikatgröße von 564 bp und gleicher Behandlung (90 °C) lediglich eine Reduktion von 0,4 Log-Stufen erreicht. Dieser Unterschied ist in der instabileren RNA von MS2 geschuldet, die bei Hitze im größeren Maße zerstört wird als die DNA von phiX174. Wie bei phiX174 lässt sich bei diesem Versuch ein Zusammenhang von Reduktion, Amplifikatgröße und Temperatur herstellen. Werden die Daten analog zu Abbildung 66 geplottet, hat die Konstante k einen Wert von $-4,77 \text{ K}^{-1} \times \text{s}^{-1} \times \text{bp}^{-1} \times 10^{-7}$ ($R^2 = 0,90$; $m = 4$; $n = 2$). Durch die stabilere DNA wurde bei phiX174 ein geringerer Wert ermittelt. Die Reduktion in der qPCR ist bei MS2 also wie erwartet höher. Auffällig ist bei MS2 der geringe Unterschied zwischen qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren. Es gibt wenig Literatur zur PMA-qPCR bei MS2, die sich vergleichen lässt. Bei Kim und Ko (2012) werden in einer Mischung von unbehandelten und hitzebehandelten (80 °C) MS2 mit der PMA-qPCR keine intakten MS2 detektiert; dagegen zeigt sich in der qPCR keine Reduktion. In der Studie werden maximal 2 Log-Stufen Reduktion gezeigt, während in dieser Arbeit bei 80 °C bereits vier Log-Stufen erreicht werden. Gemein mit dieser Arbeit ist der Einfluss von PMA auf intakte MS2. Ein Nachweis infektiöser Bakteriophagen ist somit am besten durch die qPCR zu realisieren. Längere Amplifikate konnten in dieser Arbeit bei MS2 nicht überprüft werden, da sich keine der etablierten LA-qPCR-Methoden für MS2 erfolgreich anwenden ließ. Es ist wahrscheinlich, dass die cDNA-Synthese von langen Amplifikaten mit dem in dieser Arbeit verwendeten Kit nicht möglich ist. Ein erfolgreicher Einsatz der LA-qPCR erscheint angesichts der Ergebnisse bei phiX174 bei MS2 aber wahrscheinlich.

3.3.1.3 Bakterien

Die Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden wie MS2 Bakteriophagen bei 50, 60, 70, 80 und 90 °C für 10 Minuten inkubiert und mit der LA-qPCR (*E. coli*: 1242 bp; *P. aeruginosa* 16S-1063 bp), LA-PMA-qPCR, der Durchflusszytometrie und dem Kulturverfahren (*E. coli*: IDEEX, *P. aeruginosa*: Plattenverfahren) quantifiziert. Bei *P. aeruginosa* wurde zusätzlich das MPN-Verfahren mit Katalase-Zugabe eingesetzt. In diesem Verfahren werden die Proben auf ein Medium mit wenig Nährstoffen (R2A) und zusätzlicher Katalase (1000 U/mL) kultiviert (s. 6.3.4.1). Es wird vermutet, dass einige Bakterien im VBNC-Stadium keine Katalase bilden können und somit durch reaktive Sauerstoffspezies, die bei Stoffwechselprozessen entstehen, zerstört werden (vgl. 2.6.2.4). Durch externe Zugabe von Katalase soll VBNC-Bakterien das Wachstum ermöglicht werden.

Bei *E. coli* wurde im **Kulturverfahren** bei 60 °C eine Reduktion von 1,2 Log-Stufen erreicht (Abbildung 68, links). Bei höheren Temperaturen konnte kein Wachstum mehr festgestellt werden (Reduktion > 8,2 Log-Stufen). In der **qPCR** beträgt die Reduktion bei 90 °C lediglich 2,5 Log-Stufen. Durch **PMA** wird das qPCR-Signal bei 70 °C um eine und bei 80 °C bis um

sechs Log-Stufen reduziert. Die Durchflusszytometrie zeigt mit der qPCR vergleichbare Messwerte.

Die Anzahl der kultivierbaren *P. aeruginosa* (Abbildung 68, rechts) sinkt wie bei *E. coli* ab einer Temperatur von 60 °C um 2,7 Log-Stufen. Bei 90 °C wurde eine Reduktion von 6 Log-Stufen erreicht. In der qPCR wurden bei 60 °C eine, bei 90 °C 1,8 Log-Stufen Reduktion gemessen. In der PMA-qPCR, Durchflusszytometrie und im Katalase-MPN Verfahren wurden vergleichbare Messwerte erzielt – die Reduktion bei 90 °C beträgt etwa vier Log-Stufen.

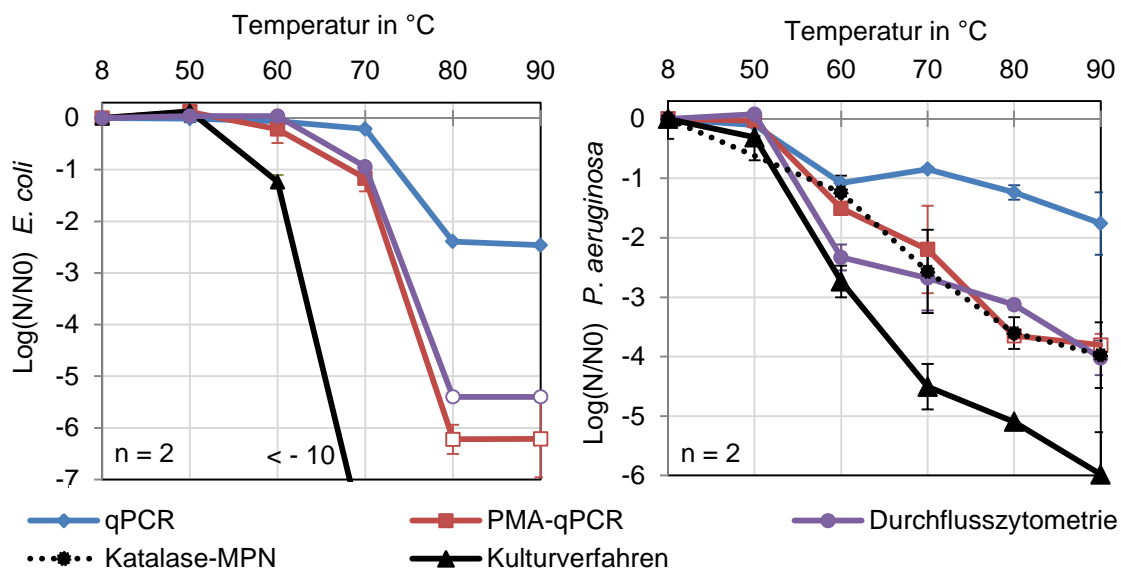


Abbildung 68: Reduktion von *E. coli* und *P. aeruginosa* durch thermische Desinfektion in LA-qPCR, LA-PMA-qPCR, Durchflusszytometrie und Kulturverfahren und Katalase-MPN-Verfahren (nur *P. aeruginosa*). Leere Symbole unter der Quantifizierungsgrenze (PMA-qPCR und Durchflusszytometrie 10 / μ L).

Der Einsatz von PMA und PI ist bei beiden Bakterien erfolgreich, jedoch zeigen sich Unterschiede zum Kulturverfahren. Temperaturen bis 60 °C beschädigen die Membran von *E. coli* nicht, wodurch PMA oder PI nicht eindringen und die DNA markieren können. Dies erklärt, wieso in der qPCR mit und ohne Lebend/tot-Unterscheidung vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. In der Studie von Wang et al. (2014) wurde bei *E. coli* O157:H7 in Milch bei 63 °C ebenfalls keine Signalreduktion erreicht. Mittels Natriumcholat (*sodium cholate*, SD) war PMA in einer Studie von Yang et al. (2011) 65 °C für *E. coli* wirksam, die Reduktion betrug allerdings lediglich 5 Cq-Werte in der qPCR (ca. 1,5 Log-Stufen). Außerdem wurden kleine Amplifikate eingesetzt.

Bei 80 °C wird die Membran der Zellen zerstört und sowohl PMA als auch PI können in die beschädigten Zellen eindringen. Auch ohne PMA konnte - wie bei hitzebehandelten MS2

oder phiX174 - eine Reduktion in der qPCR gemessen werden (bei *E. coli* 2,5 Log-Stufen). Dies lässt sich durch Hitzeschäden an der DNA erklären. Durch den Einsatz der interkalierenden Farbstoffe PMA und PI wurde in der PMA-qPCR und der Durchflusszytometrie weniger Bakterien detektiert – die Werte liegen unter der Nachweisgrenze, was einer Reduktion von mindestens 5-6 Log-Stufen entspricht.

Vergleichbare Reaktionen von PMA finden sich bei Yang et al. (2013) für mit 80 °C inaktivierte *E. coli* O157:H7. Die PMA-qPCR wurde für *E. coli* bei höheren Temperaturen von 130 °C (Soejima et al., 2012) ebenfalls als erfolgreich beschrieben.

Es gibt nur wenige Studien zur PMA-qPCR bei *P. aeruginosa*. Bei Gensberger et al. (2013) wird bei hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* (75 °C, 10 min) nur eine sehr geringe Reduktion in der qPCR gezeigt. Im Kulturverfahren wurden keine Bakterien mehr detektiert, die Reduktion betrug mindestens 3,5 Log-Stufen (Nachweisgrenze erreicht) - in dieser Arbeit waren es 5 Log-Stufen im Kulturverfahren und eine Log-Stufe in der qPCR. Gleichermaßen verhält es sich mit der Studie von Tavernier und Coenye (2015), in welcher bei 95 °C für 15 Minuten ebenfalls die Nachweisgrenze (4 Log-Stufen) erreicht wird. Mit dieser Arbeit vergleichbare Messwerte finden sich in einer alten Studie von Tsuji et al. (Tsuji et al., 1982), in der im Kulturverfahren bei 70 °C und zehnmütiger Inkubation ebenfalls 5 Log-Stufen Reduktion erreicht werden. Somit zeigt sich *P. aeruginosa* stabiler als *E. coli* bei einer Hitzebehandlung. PMA-qPCR, Durchflusszytometrie und Katalase-MPN-Verfahren lieferten vergleichbare Ergebnisse. Das bis zu 2 Log-Stufen niedrigere Signal des Plattenverfahrens zeigt, dass einige *P. aeruginosa* Bakterien dort nicht kultiviert werden konnten, jedoch (nach PMA-qPCR und Durchflusszytometrie) über intakte Membranen verfügten. In Bezug auf das Plattenverfahren handelt es sich somit um ein VBNC-Stadium. Die Lebend/tot-Unterscheidung ist somit erfolgreich und erfasst nur lebende, einschließlich nicht kultivierbare (VBNC) Bakterien.

Raman-Mikrospektroskopie

Durch Hitze induzierte Schäden an der Hülle bzw. der Membran von Bakterien ermöglichen ein Eindringen von PMA in die Zellen und den Ausschluss aus der qPCR. Mit Hilfe der Raman-Mikrospektroskopie lässt sich die Oberfläche von Bakterien charakterisieren und somit Beschädigungen erfassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unbehandelte und hitzebehandelte (90 °C, 10 Minuten) *E. coli* jeweils mit und ohne PMA-Behandlung (100 µM) mittels Raman-Mikrospektroskopie untersucht. Die spektroskopischen Versuche wurden mit Hilfe von Dr. Natalia Ivleva und Ruben Wilhelm Weiß an der TUM durchgeführt. Für die Raman-Spektren wurde ein Nd:YAG-Laser (532 nm, 27 nW an der Probe) verwendet, für die SERS-Analysen ein He-Ne-Laser (633 nm, 14 nW an der Probe). Die Versuche wurden nach der in Kubryk et al. (2015) beschriebenen Methode durchgeführt. Je Probentyp wurden jeweils zwei bis vier Bakterien untersucht.

Effekt von PMA auf die Raman-Mikrospektroskopie

Mit PMA zeigte sich bei hitzebehandelten Bakterien ein sehr starker Anstieg der Signalintensität (Abbildung 69). Die Laserleistung musste für die mit PMA behandelten Proben reduziert werden. Die Probe mit unbehandelten Zellen mit PMA zeigte ebenfalls einen – allerdings viel geringeren Anstieg der Signalintensität.

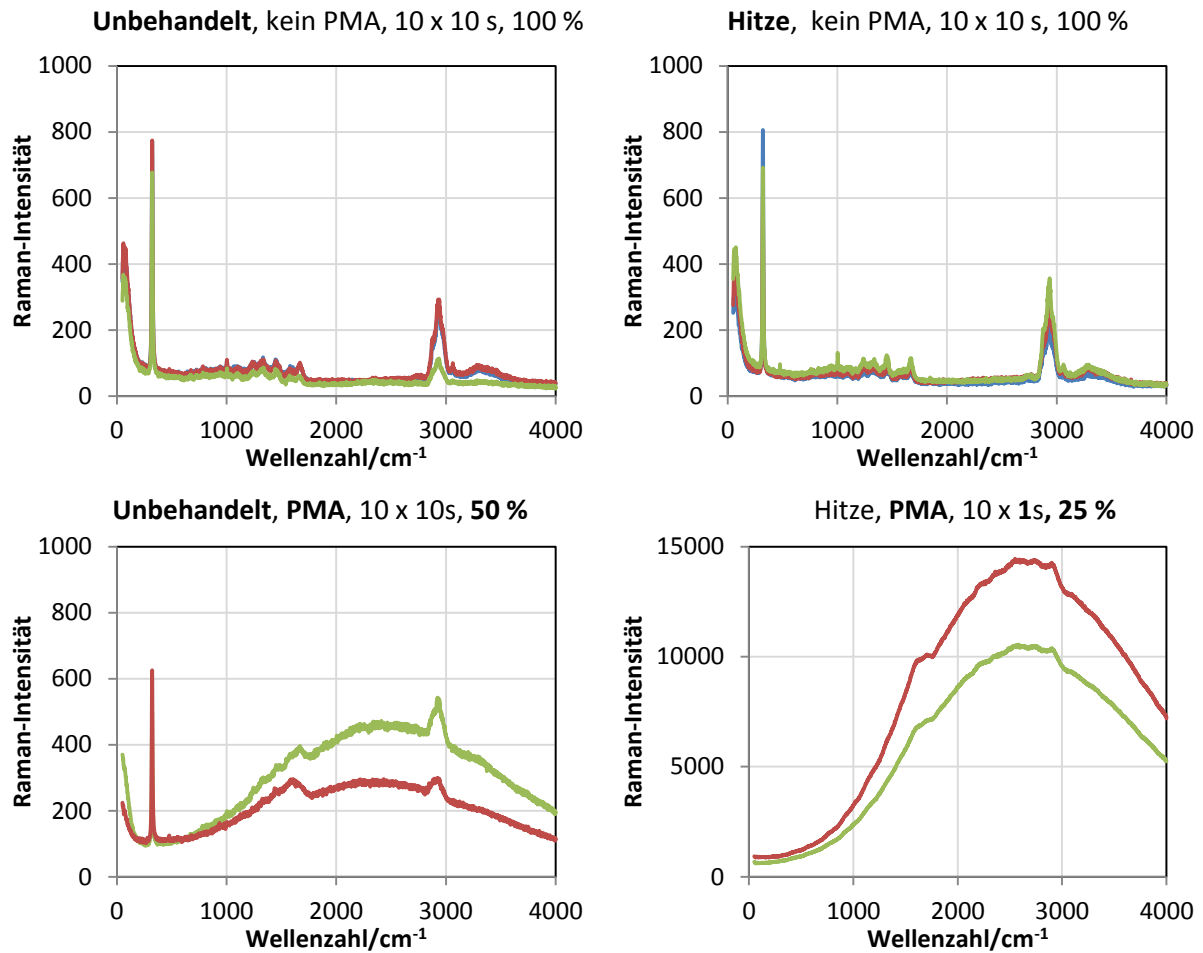


Abbildung 69: Raman-Spektren von unbehandelten und hitzebehandelten *E. coli* jeweils mit und ohne PMA-Färbung ($m=4135$, $n=3$ für unbehandelt, $n=2$ für hitzebehandelt). Bei mit PMA behandelten Proben wurde die Laserleistung auf 50 % bzw. 25 % verringert.

Fluoreszenz stellt grundsätzlich ein Problem der Raman-Mikrospektroskopie dar, da das Raman-Signal von Fluoreszenzsignalen überlagert werden kann (Cai et al., 2011). PMA kann zwar nicht in unbehandelte Bakterien eindringen, beeinflusste aber dennoch die Messung, da es sich auf der Oberfläche der Organismen befand. Bei hitzebehandelten Bakterien ist dieser Effekt sehr viel stärker, da PMA zusätzlich noch innerhalb der Zellen vorliegt. Ein direkter Vergleich der Signale ist durch die unterschiedlichen Messparameter nicht möglich. Somit muss der Vergleich un behandelter und hitzebehandelter Bakterien auf Proben ohne PMA-Behandlung beschränkt werden.

Raman-Analyse un behandelter und hitzebehandelter Zellen

In der Detailansicht sind geringe Änderungen zwischen un behandelten und hitzebehandelten *E. coli* in den Raman-Spektren sichtbar (Abbildung 70). So sind Peaks bei 669 und 719 cm^{-1} bei un behandelten, nicht aber bei hitzebehandelten Zellen vorhanden.

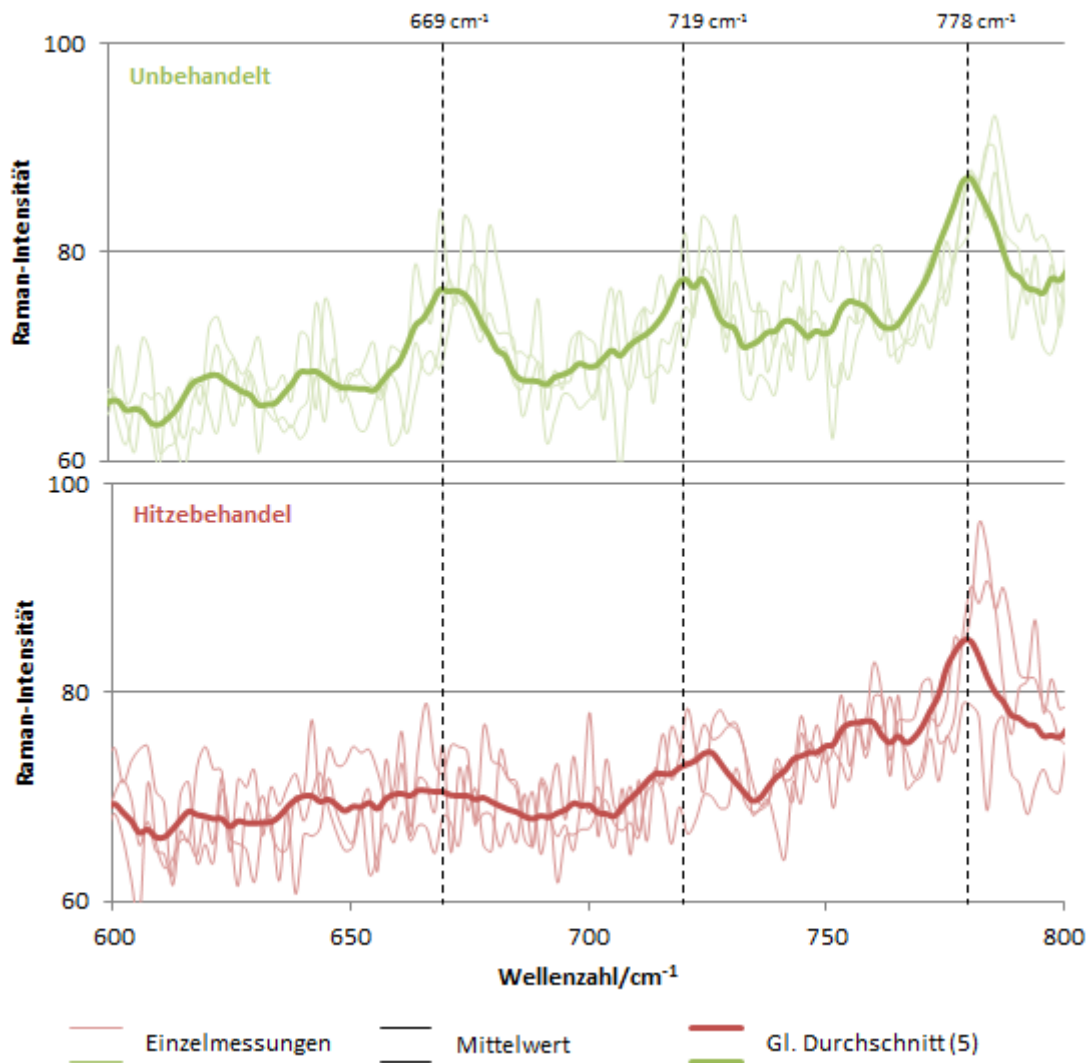


Abbildung 70: Raman-Spektren unbehandelter (grün) und hitzebehandelter (rot) *E. coli*. Dicker Graph jeweils als laufender Durchschnitt aus 5 Werten.

Im SERS-Spektrum (Abbildung 71) sind bei den unbehandelten *E. coli* Bakterien Peaks bei 735, 1050, 1330 und 1450 cm⁻¹ zu erkennen. Im SERS-Spektrum hitzebehandelter *E. coli* ist der Peak bei 735 cm⁻¹ nicht vorhanden und die Intensität der Peaks bei 1330 und 1450 cm⁻¹ fällt geringer aus.

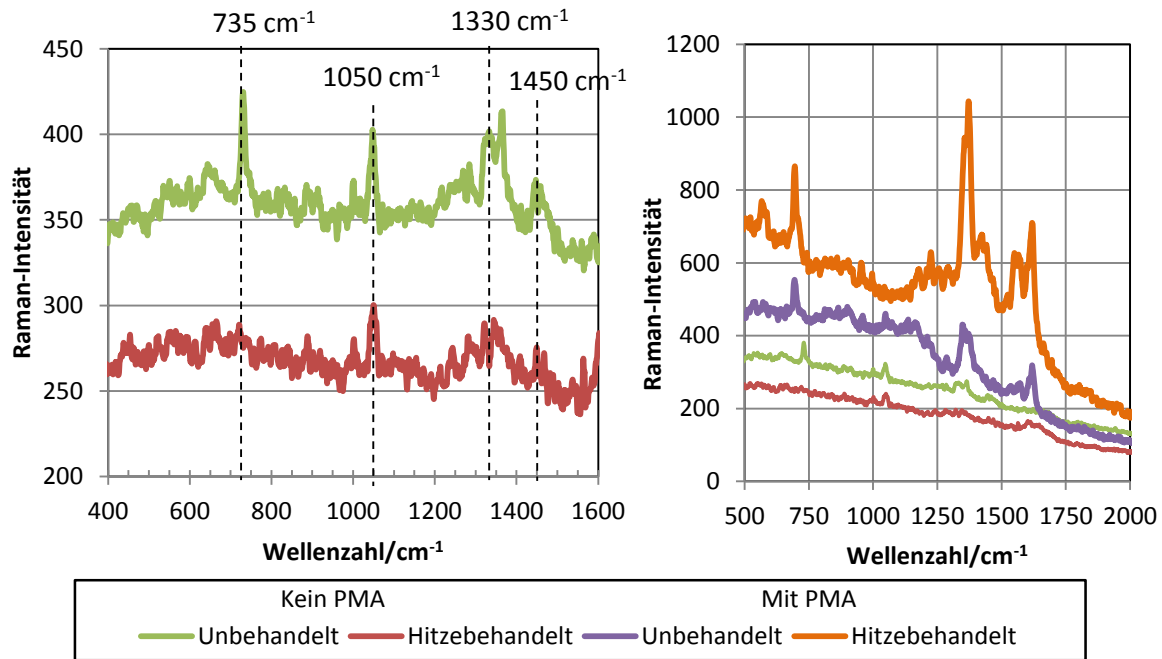


Abbildung 71: SERS Spektrum unbehandelter und hitzebehandelter *E. coli* Bakterien in Detailansicht (links), Vergleich der Spektren mit und ohne PMA (rechts).

In den Studien von Zhou et al. (2015) und Chu et al. (2008) sind identische Effekte durch Hitze und Antibiotika bei *E. coli* gezeigt. Die Unterschiede werden durch die Beschädigung der Zellwand (Peak an Position 730 cm^{-1}) und der Zellmembran (Peak an Position 1330 cm^{-1}) erklärt (Kahraman et al., 2011; Liu et al., 2009). Im Detail wird der Peak bei 730 cm^{-1} durch adeninhaltige Verbindungen (Kubryk et al., 2016) bzw. Metabolite der Purin-Degradation (Adenin, Hypoxanthin, Xanthin und Guanin sowie Harnsäure und AMP) erzeugt (Premasiri et al., 2016). Die Raman-Spektren der hitzebehandelten Zellen deuten somit auf Schäden an Zellwand und Zellmembran. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten der PMA-qPCR (Abbildung 68): Hitzeinduzierte Schäden führten durch ein Eindringen von PMA zu einer Reduktion der gemessenen Zellzahl in der PMA-qPCR. Die hülschädigende Wirkung von Hitze konnte somit durch die Raman-Streuung bestätigt werden.

3.3.1.4 Fazit

Mit der LA-PMA-qPCR lässt sich ab einer Amplifikatgröße von 564 bp ein mit dem Kulturverfahren vergleichbares Ergebnis für hitzeinaktivierte phiX174 Bakteriophagen erzielen. Hitze verursacht Schäden an der viralen und bakteriellen Hülle (Kapsid, Membran), woraufhin PMA eindringen kann. Höhere Temperaturen schädigen die Nukleinsäure direkt durch Strangbrüche. Diese Strangbrüche lassen sich umso besser erfassen, je länger die Amplifikate in einer qPCR sind (s. Abbildung 62 auf S. 115).

Bei Viren führen Behandlungen, die nur Oberflächenproteine beschädigen, nicht jedoch das Kapsid, zu unterschiedlichen Ergebnissen, da die Phagen zwar inaktiviert, jedoch nicht sensitiv für PMA sind (70 °C). Gleiches gilt für die Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa*. Auch hier wurden Unterschiede zwischen PMA-qPCR und dem Kulturverfahren festgestellt. Bakterien können sich möglicherweise von einem hitzeinduzierten, nicht kultivierbaren Zustand wieder erholen (VBNC). Diese Zellen werden von der LA-PMA-qPCR erfasst, nicht aber von den Kulturverfahren.

3.3.2 Niederdruck-UV-Strahlung

UV-Strahlung kann als Desinfektionsverfahren effektiv gegen Bakterien, Viren und Parasiten eingesetzt werden. In Deutschland wird eine UV-Desinfektion von 42 % der Wasserversorger eingesetzt (vgl. 2.2). Die Dosis muss dabei mindestens 400 J/m² betragen (§ 11 TrinkwV 2001). Niederdruck-UV-Strahler emittieren bei einer Wellenlänge von 254 nm, nahe bei dem Absorptionsmaximum von DNA (260 nm). In dieser Arbeit wurden die Bakteriophagen phiX174 und MS2 sowie die Bakterien *E. coli* und *E. faecalis* mit verschiedenen Niederdruck-UV Intensitäten bestrahlt und mittels qPCR, PMA-qPCR und dem Kulturverfahren quantifiziert. Da Niederdruck-UV-Strahlung hauptsächlich von der Nukleinsäure absorbiert wird, stellt sich die Frage, ob eine Lebend/tot-Differenzierung mit PMA überhaupt realisierbar ist. Gleichzeitig wäre bei einem DNA-schädigenden Verfahren natürlich zu erwarten, dass die Schädigung auch in einem DNA-Nachweisverfahren wie der qPCR erfasst werden kann.

3.3.2.1 phiX174

PhiX174 Bakteriophagen wurden in einem kollimierten Niederdruck-UV-Strahler (Collimated Beam, LP CB) bei einer Wellenlänge von 253,7 nm nach dem standardisierten Protokoll nach Bolton et al. (2015) bestrahlt. Dabei wurden in einem initialen Versuch mit Intensitäten von 100, 200, 300, 400, 500 und 1000 J/m² bestrahlt. Für die Quantifizierung der Proben mit der qPCR bzw. LA-qPCR kam ein großes Spektrum an Primern für Amplifikatgrößen von 108 bis 1764 bp (Primer s. Tabelle 9 auf S. 58) zum Einsatz.

In der qPCR sinkt die Zahl der detektierten phiX174 Bakteriophagen mit steigender Stärke der UV-Behandlung (Abbildung 72 A). Bei 1000 J/m² werden 0,8 Log-Stufen Reduktion erreicht. Die Log-Reduktion in der qPCR zeigt bei gleicher Amplifikatgröße eine Abhängigkeit erster Ordnung von der eingesetzten UV-Dosis.

Größere Amplifikate führen bei gleicher UV-Dosis zu einer höheren Reduktion (Abbildung 72, B-H). Bei 200 J/m² wurden 0,2 | 0,5 | 1,0 | 1,2 | 1,8 | 2,4 | 3,0 und 3,5 Log-Stufen Reduktion bei Amplifikaten mit 108 | 250 | 456 | 568 | 955 | 1063 | 1544 und 1764 bp gemessen. Auch hier ist eine Abhängigkeit erster Ordnung zu erkennen.

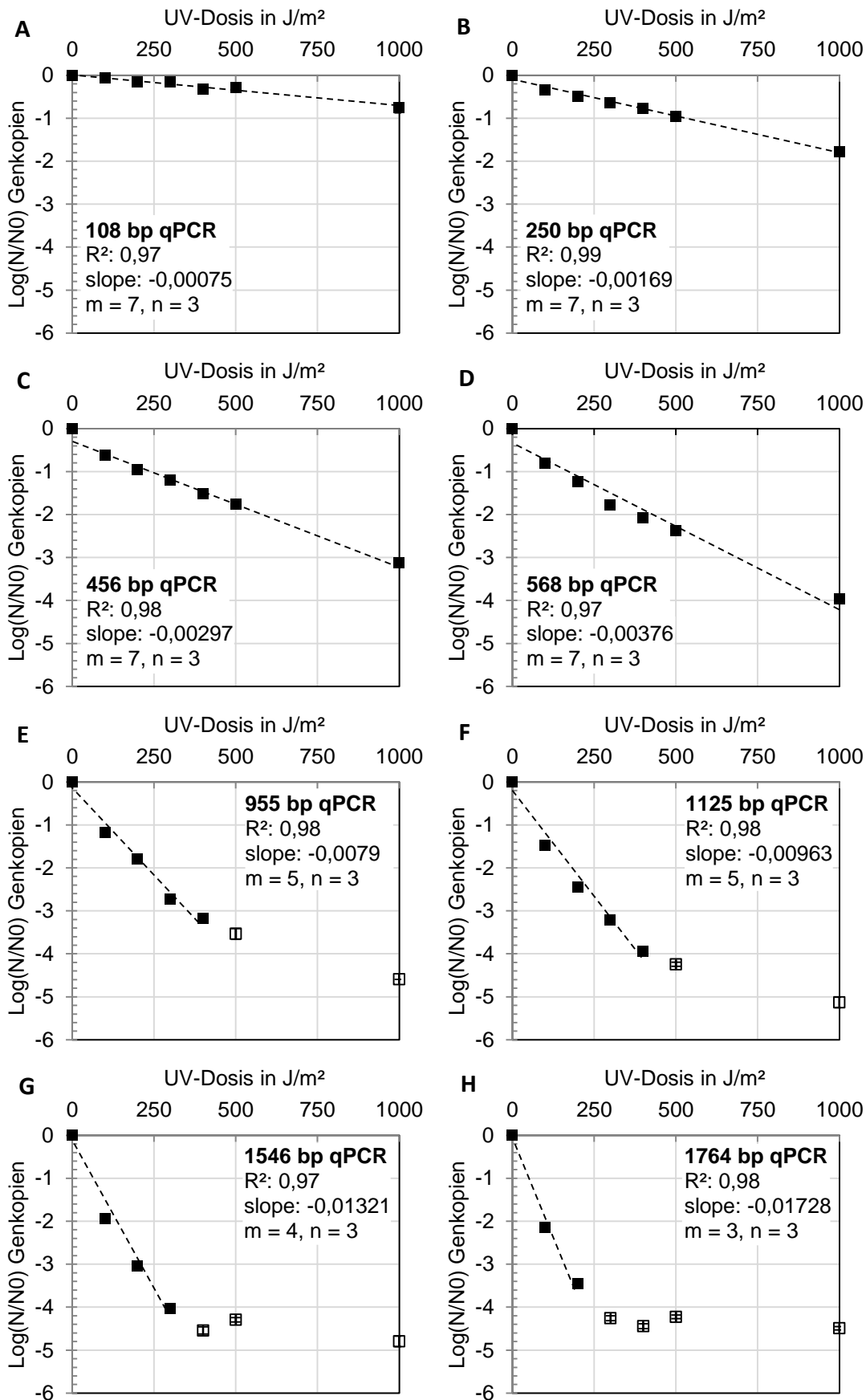


Abbildung 72: qPCR-Ergebnisse mit unterschiedlichen Amplifikatlängen (A-H) für mit UV-behandelte phiX174 Bakteriophagen. Jedes Quadrat steht für den Mittelwert aus drei Replikaten. Die dargestellte Standardabweichung ist meist kleiner als die Symbole. Die Daten der ausgefüllten Quadrate wurden für die Trendlinien genutzt.

Durch die Niederdruck-UV-Strahlung werden aus benachbarten Pyrimidinen in der Nukleinsäure Dimere gebildet. Liegt im Bereich des Amplifikates ein Dimer vor, so kann es in der qPCR nicht mehr nachgewiesen werden (Ravanat et al., 2001). Beim Einsatz der kleinen Amplifikate von 108 bp ist die Reduktion bei 1000 J/m² mit 0,8 Log-Stufen sehr gering. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Studien, in denen ebenfalls mit kleinen Amplifikaten und mit UV-behandelten Viren gearbeitet wurde (Leifels et al., 2015; Prevost et al., 2016). So wird auch in einigen Studien zur UV-Behandlung von Viren argumentiert, dass die Inaktivierung nicht durch eine DNA-Schädigung hervorgerufen wurde, da die PCR nicht beeinflusst wird (Lévêque, 1995). Zu diesem Schluss lässt sich durchaus kommen. Immerhin erfasst die qPCR die Nukleinsäure, zeigt jedoch eine geringere Reduktion als das Kulturverfahren.

Die Infektiosität der Viren ist jedoch nicht nur von einem kleinen Abschnitt der Nukleinsäure abhängig. Für eine Infektion muss – zumindest bei phiX174 – ein großer Teil des Genomes intakt sein (Calendar, 2006). Die Infektiosität lässt sich somit nicht mit einem kleinen Amplifikat in der qPCR ermitteln.

Bei längeren Amplifikaten (vgl. Abbildung 72 B - H) ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass ein Dimer die Amplifikation in der qPCR verhindert und die Nukleinsäure nicht nachgewiesen werden kann. Folglich wird durch längere Amplifikate eine höhere Reduktion gemessen (Beck et al., 2014).

Bei Amplifikaten ab 936 bp (Abbildung 72, E-H) folgt die gemessene Reduktion nicht mehr dem exponentiellen Trend. Bei stärkerer Bestrahlung konnte keine weitere Reduktion der Phagen mehr gemessen werden. Dieser Effekt resultiert durch die hohe Anzahl beschädigter oder zerstörter DNA, die bei qPCR-Reaktionen mit großen Amplifikaten zu einer Bildung unspezifischer Produkte führt. Auch bei der Hitzebehandlung wurden diese Effekte beobachtet (Abbildung 64).

Mit steigender UV-Dosis steigt die Reduktion in der qPCR bei gleicher Amplifikatlänge in einer direkten Abhängigkeit (Abbildung 72). Werden die Ergebnisse für unterschiedliche Amplifikatlängen bei gleicher UV-Dosis geplottet, zeigt sich eine Abhängigkeit erster Ordnung von der Amplifikatlänge (Abbildung 73). Dieser Zusammenhang lässt sich für Bestrahlungen bis 400 J/m² zeigen. Bei 500 und 1000 J/m² ist die Datengrundlage für eine Trendlinie zu gering. Die Reduktion in der qPCR ist also sowohl direkt von der amplifizierten UV-Dosis als auch direkt von der Amplifikatlänge abhängig. Diese Abhängigkeit wird in einem späteren Vergleich detailliert aufgegriffen.

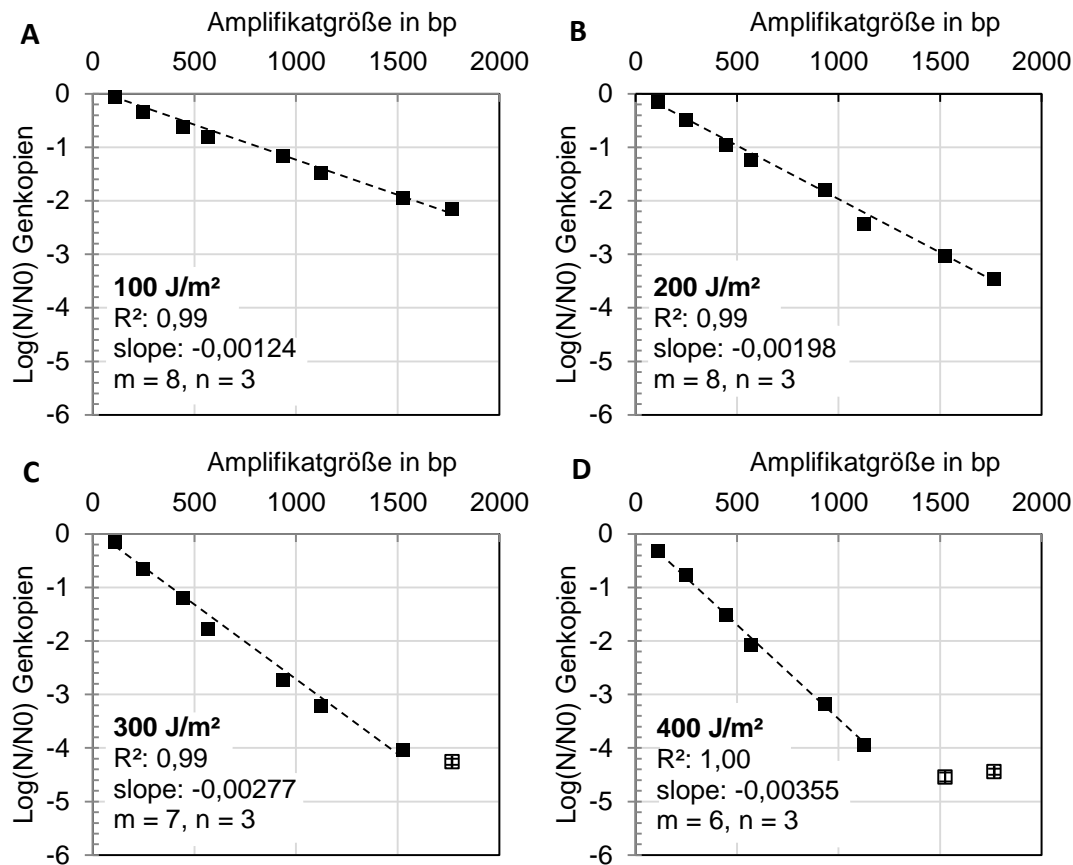


Abbildung 73: Abhängigkeit der in der qPCR gemessenen Reduktion bestrahlter phiX174 Bakteriophagen von der Amplifikatlänge. Datenpunkte als Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung (teils kleiner als Symbole). Ausgefüllte Datenpunkte wurden für die Trendgeraden genutzt.

PMA-Behandlung

Durch die starke Reduktion bei großen Amplifikaten und entsprechend wenig Messpunkten wurde eine neue Bestrahlung durchgeführt. PhiX174 wurde nach dem gleichen Verfahren mit 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 und 800 J/m² bestrahlt. Die Proben wurden mit 200 µM PMA behandelt, extrahiert und mit der qPCR mit Amplifikaten von 108, 568, 1063 und 5107 bp quantifiziert. Parallel wurden Proben auch ohne PMA in die qPCR eingesetzt.

Die PMA-Behandlung zeigte bei keinem der eingesetzten Amplifikate einen Effekt (Abbildung 74). Dies wird vor allem durch die identische Steigung der Trendgeraden deutlich. PMA hat also auch bei großen Amplifikaten kein Effekt.

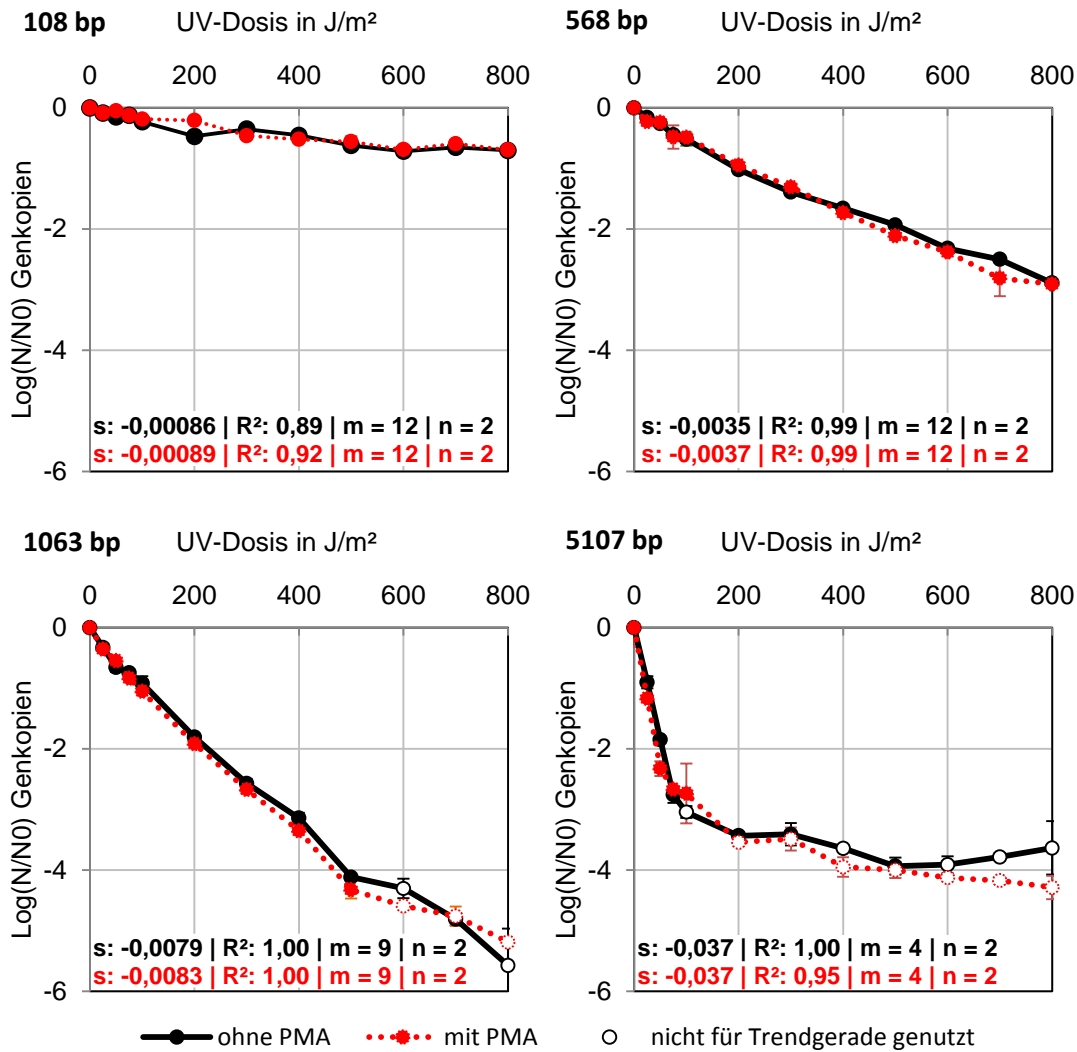


Abbildung 74: qPCR- und PMA-qPCR-Ergebnisse für UV-behandelte phiX174 Bakteriophagen. Datenpunkte als Mittelwerte aus zwei Replikaten mit Standardabweichung (teils kleiner als Symbole). Ausgefüllte Datenpunkte wurden für die Trendgeraden genutzt (nicht gezeigt). s: Steigung der Trendgeraden.

Niederdruck UV-Strahlung beschädigt ausschließlich die Nukleinsäure der Viren. Da das Kapsid intakt bleibt, kann PMA nicht in das Virus eindringen und die Nukleinsäure markieren. Dies bestätigen die kürzlich publizierten Studien von Leifels et al. (2015) und Karim et al. (2015) bei Adeno-, Entero- und Noroviren. Beim Einsatz von Mitteldruck-UV-Strahlung können dagegen auch Proteine beschädigt werden (Eischeid and Linden, 2011). Durch die Schäden am Kapsid ist auch PMA wirksam, wie in der Studie von Sangsanont et al. (2014) bei Adenoviren gezeigt wurde.

Kulturverfahren und 5107-bp-qPCR

Bisher wurde gezeigt, dass sich die Reduktion in der qPCR mit der Amplifikatlänge erhöht und PMA nicht wirksam ist. Es wird somit nur die DNA beschädigt. Bei phiX174 codiert das ganze Genom für die Infektion wichtige Proteine. Dies führt zu dem Schluss, dass eine qPCR des ganzen Genomes erfolgen muss, um zwischen infektiösen und nicht infektiösen phiX174 unterscheiden zu können.

Um diese These beweisen zu können, wurden in Abbildung 75 die Ergebnisse des Kulturverfahrens mit der LA-qPCR mit 5108 bp Amplifikatlänge verglichen.

Im Kulturverfahren wurden wie in der qPCR mit steigender UV-Dosis weniger infektiöse Bakteriophagen detektiert. Die Reduktion beschreibt ebenfalls eine Kinetik erster Ordnung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke. Vier Log-Stufen Reduktion werden mit 115 J/m² erreicht. Wie in vorherigen Versuchen gezeigt wurde, steigt die ermittelte Reduktion in der qPCR mit der Amplifikatgröße. Unter einer Dosis von 100 J/m² (Bereich der Trendlinie) liefern qPCR und das Kulturverfahren identische Reduktionswerte.

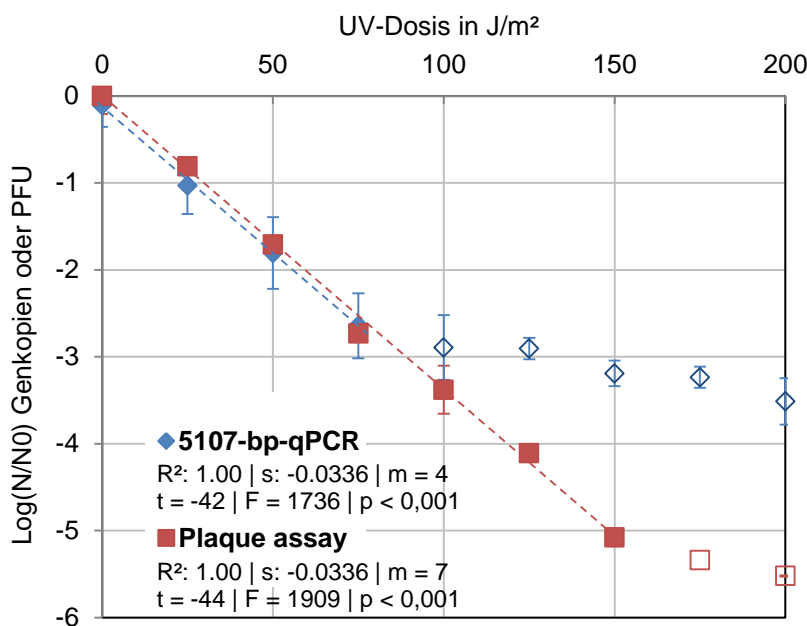


Abbildung 75: Ergebnisse von Kulturverfahren und qPCR mit 5107-bp-Amplifikat. Datenpunkte als Mittelwerte aller durchgeführten Experimente mit Standardabweichung. Ausgefüllte Datenpunkte wurden für die Trendgeraden genutzt. (n = 11 für 0, 100, 200 J/m², n = 8 für 25, 50, 75 J/m², n = 4 für 125, 150, 175 J/m²).

Wie zu beweisen war, zeigen Kulturverfahren und eine LA-qPCR des ganzen Genomes identische Ergebnisse. Dies ist deutlich in den identischen Steigungswerten der Trendgeraden sichtbar. Die Steigung der Trendlinie, oft als k bezeichnet, beträgt $-0,034 \text{ m}^2 \cdot \text{J}^{-1}$. Vergleichbare Werte für k ($-0,035$, $-0,037$ und $-0,031 \text{ m}^2 \cdot \text{J}^{-1}$) wurden von Slater und Maurer (1991), Sommer et al. (1998) und Zuo et al. (2015) publiziert. Wie in den vorherigen Reaktionen mit langen Amplifikaten gab es auch hier bei höheren UV-Dosen falsch positive

Signale durch unspezifische Produkte, was den messbaren Bereich der qPCR einschränkt. Dieser Effekt tritt nicht bei den PCR-Standards (intakte Viren-DNA) auf. Die unspezifischen Produkte entstehen somit durch teils zerstörte virale Nukleinsäure.

Im Kulturverfahren ist die Infektiosität des Virus von Bedeutung, was die Funktionalität der Hülle (Andocken an der Wirtszelle, Injektion der DNA) und die der Nukleinsäure (Replikation) einschließt. Niederdruck-UV-Strahlung beschädigt nur die DNA, die Hülle wird nicht beeinflusst. Somit liefert eine qPCR des phiX174-Genoms die gleichen Ergebnisse wie das Kulturverfahren.

Die Unterscheidung von infektiösen und nicht infektiösen phiX174 bei UV-Strahlung kann somit erfolgreich mit einer LA-qPCR ohne eine Vorbehandlung mit PMA durchgeführt werden. Allerdings schränkt das lange Amplifikat die qPCR in Bezug auf die Quantifizierungsgrenze sehr ein. Wie in der Entwicklung der LA-qPCR für phiX174 gezeigt wurde (s. 3.2.3.1), konnten bei Amplifikaten von 1525 und 1765 bp Länge nicht alle Standards in die Kalibriergerade einbezogen werden (vgl. Tabelle 9, S. 58). Dadurch erhöht sich die Quantifizierungsgrenze in beiden Fällen auf 100 Genkopien pro μL . Bei mit UV-Strahlung behandelten Proben besteht bei geringer Konzentration an intakten und hoher Konzentration an beschädigten DNA-Molekülen die Gefahr unspezifischer Produkte. Dies ist beispielsweise in Abbildung 72 bei größeren Amplifikaten zu erkennen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion der bestrahlten phiX174-Bakteriophagen sowohl mit der Amplifikatlänge (bei gleicher UV-Dosis) als auch mit der UV-Dosis (bei gleicher Amplifikatlänge) in einer Korrelation erster Ordnung steht (vgl. Abbildung 72 ff.). Beide Einflussgrößen wurden als Produkt zusammengefasst und gegen die Reduktion von qPCR und Kulturverfahren geplottet (Abbildung 76). Für das Kulturverfahren wurde als Amplifikat die Genomgröße von phiX174 (5386 bp) eingesetzt.

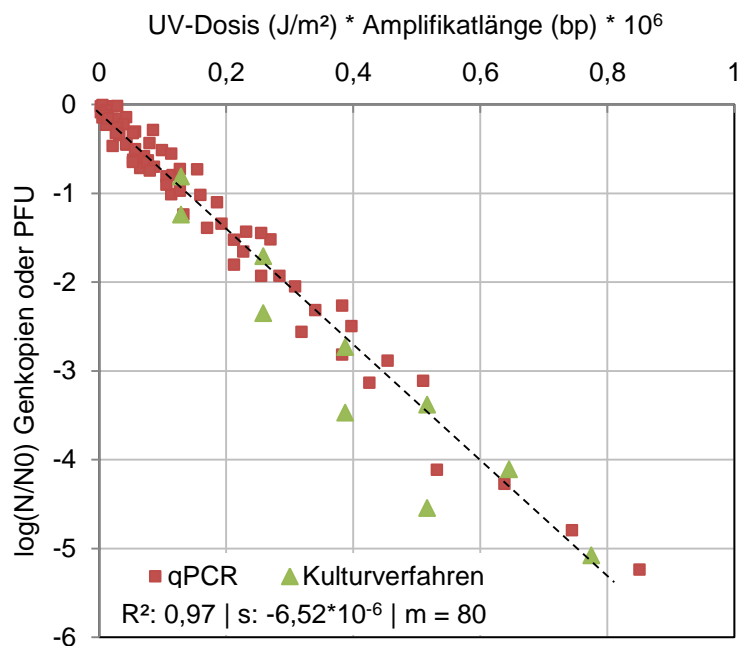


Abbildung 76: Ergebnisse der qPCR und des Kulturverfahrens in Abhängigkeit von UV-Dosis und der Amplifikatlänge in der qPCR. Für das Kulturverfahren wurde das komplette Genom als Amplifikatlänge angenommen ($n = 2$, $m = 69$ für qPCR, $m = 11$ Kulturverfahren).

Formel 3 beschreibt die Abhängigkeit der Reduktion von der Amplifikatlänge und der UV-Dosis. Dabei ist N_0 die Zahl der unbehandelten Phagen (Initiale Konzentration), N die Anzahl der Phagen nach der Behandlung, D die UV-Dosis in J/m² und S die Größe des Amplifikates in bp. Die normalisierte PCR-Effekt-Konstante k_{UV} beträgt $-6.52 \times 10^{-6} \times m^2 \times J^{-1} \times bp^{-1}$ und entspricht der Steigung der Trendgeraden in Abbildung 76. Die Formel und k_{UV} ist sowohl für die qPCR als auch für das Kulturverfahren gültig.

Formel 3

$$\text{Log}_{10} \left(\frac{N}{N_0} \right) = D \times S \times k_{UV}$$

Die Konstante k_{UV} erlaubt die Berechnung der Infektiosität der Phagen bzw. des Ergebnisses des Kulturverfahrens anhand von PCR-Daten nach folgender Formel:

Formel 4

$$N = N_0 \times 10^{D \times S \times k_{UV}}$$

Anhand der qPCR-Daten ließen sich die Ergebnisse des Kulturverfahrens berechnen. Die Werte sind in der folgenden Abbildung verglichen und zeigen, dass die Werte sehr gut übereinstimmen.

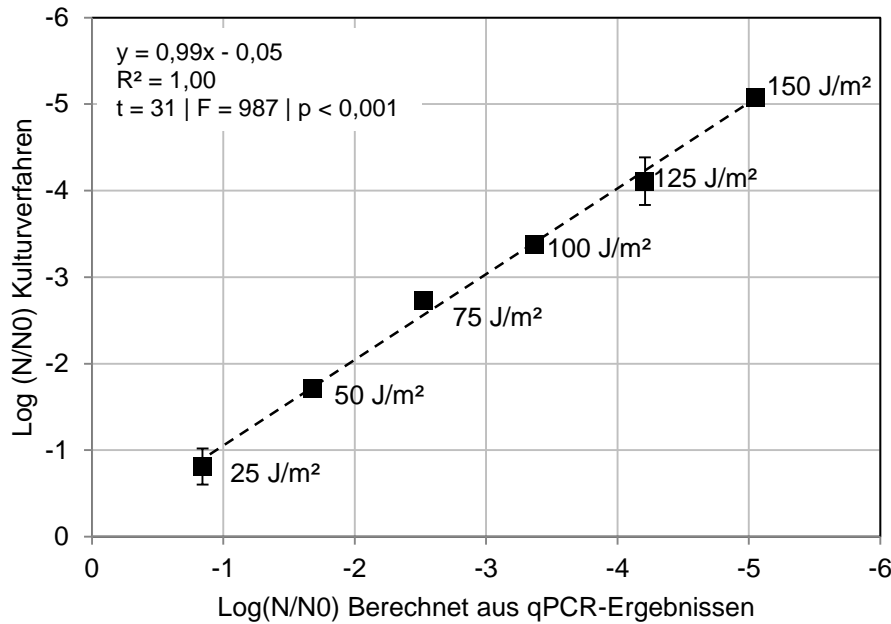


Abbildung 77: Berechnung von Messwerten aus qPCR-Ergebnissen gegen Ergebnisse des Kulturverfahrens.

Für phiX174-Bakterien konnte somit ein Verfahren entwickelt werden, das es ermöglicht, auch ohne den Nachweis des ganzen Genomes die Reduktion durch eine UV-Desinfektion erfassen zu können.

3.3.2.2 MS2

Für MS2-Bakteriophagen stand das Collimated Beam System, welches für phiX174 eingesetzt wurde, nicht zur Verfügung. Die Desinfektion wurde deswegen mit einem Niederdruck-UV Strahler durchgeführt. Dieser wurde zuvor mit einem Radiometer vermessen (s. 6.7.4). Für die Bestrahlung wurde eine Dosis von 25, 50, 75, 100, 200, 400 und 10.000 J/m² eingesetzt. MS2 wurden in der qPCR (314 bp), PMA-qPCR und dem Plaque-Assay quantifiziert.

Im **Kulturverfahren** sank die Konzentration der MS2-Bakteriophagen mit steigender Dosis (Abbildung 78). Bei 200 J/m² wurde eine und bei 400 J/m² zwei Log-Stufen Reduktion erreicht. Erst bei 10.000 J/m² konnten keine Phagen mehr im Plaque-Assay detektiert werden. Im Vergleich mit phiX174 sind MS2-Bakteriophagen somit sehr viel resistenter gegenüber UV-Strahlung. In der **qPCR** wurde nur bei der stärksten Dosis eine Reduktion festgestellt (2 Log-Stufen). Wie auch bei phiX74 hatte **PMA** bei UV-Behandlung keinen Effekt.

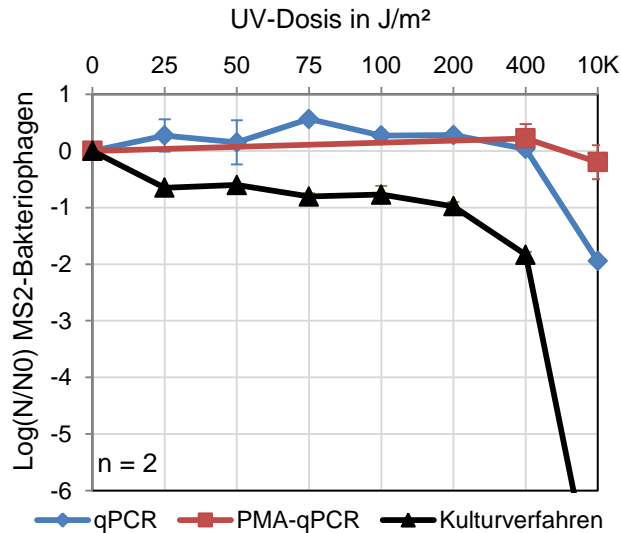


Abbildung 78: Signalreduktion von MS2-Bakteriophagen mit qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren nach UV-Behandlung.

Die Datengrundlage für eine ähnliche Trenddarstellung wie bei phiX174 ist bei MS2 zu gering. Werden die Daten des Kulturverfahrens dargestellt, so ergibt sich für die Konstante k_{UV} ein Wert von $-1,04 \text{ J/m}^2 \times \text{bp} \times 10^6$ ($R^2 = 0,87$, $m = 10$). Mit den Daten einiger Publikationen ließen sich ebenfalls vergleichbare Werte für k_{UV} von $-1,05$ (Pecson et al., 2009) und $-1.14 \times 10^{-6} \times \text{m}^2 \times \text{J}^{-1} \times \text{bp}^{-1}$ (Calgua et al., 2014) für qPCR-Daten und von $-1,09$ (Calgua et al., 2014) und $-1.02 \times 10^{-6} \times \text{m}^2 \times \text{J}^{-1} \times \text{bp}^{-1}$ (Thurston-Enriquez et al., 2003) für das Kulturverfahren berechnen. Die für phiX174 vorgeschlagene Methode der Berechnung von Ergebnissen funktioniert somit auch für RNA-Phagen.

Bei RNA-Viren muss für lange Amplifikate der vorausgehende Schritt der cDNA-Synthese entwickelt werden. Dies war mit dem in dieser Arbeit eingesetzten cDNA-Kit beispielsweise nicht möglich. Größere Amplifikate lieferten kein messbares Ergebnis. Erfolgreiche Studien der RNA-Viren für den Encephalitis Virus (Zhang et al., 2001) und Hepatitis Virus (Tellier et al., 1996) mit langen Amplifikaten zeigen aber, dass dies möglich ist. Somit ist eine Berechnung des Ergebnisses wie bei phiX174 möglich. Jedoch muss ein größeres Amplifikat eingesetzt werden, um solide Messwerte mit der qPCR zu erhalten. Somit kann mit der qPCR ebenfalls die Differenzierung zwischen infektiösen und nicht infektiösen MS2-Bakteriophagen erfolgreich durchgeführt werden.

3.3.2.3 Bakterien

E. coli und *P. aeruginosa* wurden wie MS2-Bakteriophagen mit einer Dosis von 25, 50, 75, 100, 200, 400 und 10.000 J/m^2 bestrahlt. Zur Quantifizierung der Proben wurde die LA-qPCR (*E. coli*: 1242 bp; *P. aeruginosa* 16S-1063 bp), LA-PMA-qPCR, Durchflusszytometrie und

das Kulturverfahren (*E. coli*: IDEEX, *P. aeruginosa*: Plattenverfahren) eingesetzt. *P. aeruginosa* wurde im Katalase-MPN-Verfahren gemessen (Abbildung 79). Da die Lebend/tot-Differenzierung mit PMA bei den bisherigen Versuchen mit Niederdruck-UV-Strahlung unwirksam war (vgl. Abbildung 74), wurden in der LA-PMA-qPCR und der Durchflusszytometrie nur die mit 400 und 10.000 J/m² bestrahlten Proben untersucht.

Wie erwartet, zeigten sich bei beiden Bakterien in der **Durchflusszytometrie** nur geringfügige Unterschiede im Messsignal. Lediglich bei *E. coli* wurde eine Reduktion von zwei Log-Stufen bei 10.000 J/m² gemessen.

In der **LA-qPCR** steigt die Reduktion mit der Dosis an. Bei *E. coli* werden bei 400 J/m² eine Log-Stufe, bei *P. aeruginosa* 3,3 Log-Stufen gemessen. Die **LA-PMA-qPCR** zeigt ein fast identisches Signal. Im **Kulturverfahren** wurde bei beiden Bakterien eine höhere Reduktion gemessen. Die Nachweisgrenze und über 8 Log-Stufen Reduktion wird bei *E. coli* bei 200 J/m² und bei *P. aeruginosa* bei 400 J/m² erreicht. Die Messwerte des **Katalase-MPN** Verfahrens (*P. aeruginosa*) liegen bei 50 bis 200 J/m² etwa eine Log-Stufe über dem Kulturverfahren, wobei ebenfalls bei 400 J/m² kein bakterielles Wachstum mehr zu beobachten war. Eine vergleichbar starke Reduktion tritt in der qPCR und PMA-qPCR nur bei 10.000 J/m² auf.

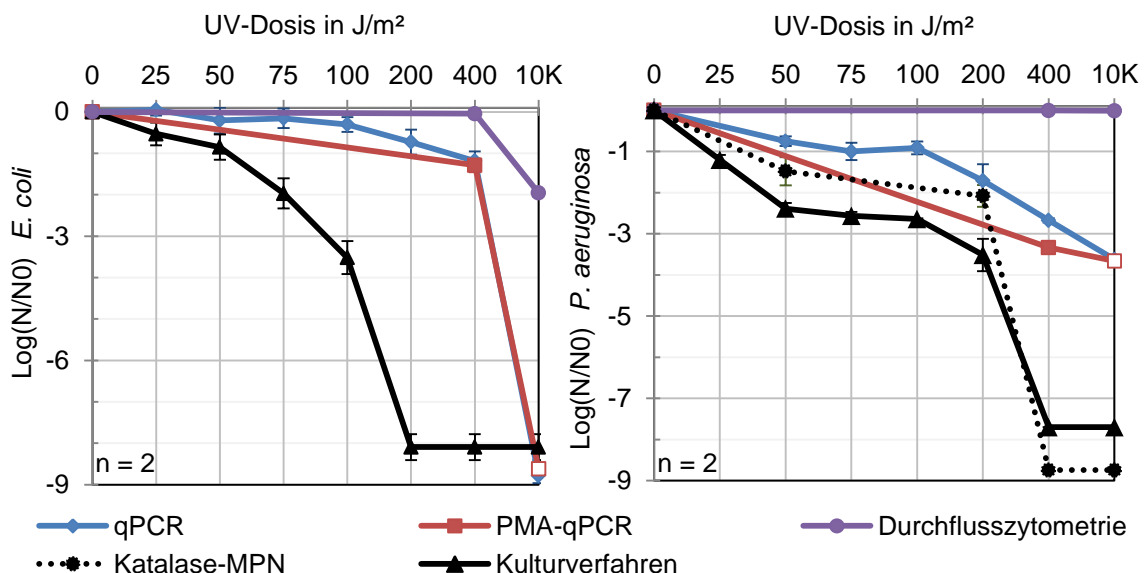


Abbildung 79: Signalreduktion von mit Niederdruck-UV-bestrahlten *E. coli* (links) und *P. aeruginosa* (rechts) mit qPCR, PMA-qPCR, Durchflusszytometrie und Kulturverfahren. *P. aeruginosa* wurde zusätzlich mit dem Katalase-MPN-Verfahren quantifiziert.

Niederdruck-UV-Strahlung bewirkt eine Schädigung der Nukleinsäuren, was wiederum zum Ausfall der Zellfunktionen und zum Absterben der Bakterien führt. Da die Hülle bei Niederdruck UV-Strahlung nicht beschädigt wird, können interkalierende Farbstoffe wie PMA oder Propidiumiodid nicht in die Bakterien eindringen. Die starke DNA-Schädigung bei 10 KJ/m² führt in Durchflusszytometrie zu einer geringeren Fluoreszenz, und die Zellsignale

können von den unbehandelten Zellen teilweise unterschieden werden (vgl. Abbildung 80). Diese hohe UV-Dosis ist jedoch nicht praxisrelevant.

In der Literatur finden sich einige Studien zum Einsatz der qPCR und PMA bei der UV-Desinfektion von Bakterien. In der Studie von Zhang et al. (Zhang et al., 2015) konnte in der qPCR trotz langer Amplifikate (ca. 1500 bp) keine Reduktion mit PMA festgestellt werden. Generell wurde nur eine sehr geringe Reduktion sowohl in der qPCR, als auch im Kulturverfahren gemessen (Linden et al., 2015). Bei Nocker et al. (2007) und Banihashemi et al. (2012) hat PMA ebenfalls keine Wirkung auf mit UV-Strahlung behandelte *E. coli* bzw. *C. jejuni* und Salmonella. Bei Banihashemi et al. (2012) werden mit langen Amplifikaten (1600 bp) für *C. jejuni* und Salmonella mit dem Kulturverfahren vergleichbare Messwerte erreicht. Dies konnte in dieser Arbeit trotz einer vergleichbaren Amplifikatgröße von 1242 bp nicht erreicht werden. In Anbetracht der unterschiedlichen Ergebnisse von *E. coli* und *P. aeruginosa* in dieser Arbeit, können die abweichenden Ergebnisse von der genannten Studie durch unterschiedliche Organismen erklärt werden.

Ebenfalls gibt es Studien, in denen die PMA-Behandlung als wirksam bei UV-Behandlung beschrieben wird. Bei Kralik et al. (2014) sind mit UV behandelte *Mycobacterium avium* PMA sensitiv. Die Art der UV Strahlung wird jedoch in der Studie nicht genau beschrieben, womit nicht klar ist, ob dieser Effekt auf Anteile von UVA-Strahlung zurückzuführen ist. Bei mit Sonnenlicht inaktivierten, fäkalen Bacteroidales (Bae and Wuertz, 2009) und bei *Bacteroides ovatus* (Dong et al., 2014) konnte mittels PMA eine Reduktion intakter Zellen gemessen werden. Ein Vergleich mit dem Kulturverfahren wurde in diesen Studien allerdings nicht durchgeführt. Sonnenlicht enthält neben sichtbarem Licht auch Strahlung im UVA- und UVB-Bereich und schädigt bakterielle Proteine. Dies erklärt auch die Wirksamkeit interkalierender Farbstoffe wie PMA.

Eine wie bei den Bakteriophagen durchgeführte Berechnung zur Ermittlung des UV-Schadens ist bei Bakterien nicht möglich. Viren haben ein kleines Genom von wenigen tausend Nukleotiden. Bei phiX174 und MS2 ist ein Großteil des Genoms für eine Infektion essentiell – eine Schädigung der Nukleinsäure ist somit mit einem Verlust der Infektiosität gleichzusetzen. Bakterien besitzen größere Genome – *E. coli* beispielsweise über 5 Millionen Nukleotide. Nicht alle Bereiche des Genoms sind für das Überleben des Bakteriums wichtig - Schäden wirken sich weniger drastisch aus, vor allem, wenn nicht essentielle Gene betroffen sind. Eine Reparatur der durch UV-Strahlung induzierten Schäden an der DNA ist bei Bakterien ebenfalls möglich. Somit ist eine Berechnung der Anzahl der lebenden Bakterien über die Daten der LA-qPCR nicht möglich.

Niederdruck-UV-Strahlung in der Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie wird die DNA mit Farbstoffen angefärbt und die Fluoreszenz der gesamten Bakterienzelle detektiert. Dagegen wird in der qPCR die DNA direkt nachgewiesen. Es ist zu erwarten, dass DNA-schädigende Strahlung mit beiden Methoden nachgewiesen werden kann. Da in den Versuchen bisher nur ein minimaler Effekt der UV-Strahlung in der Durchflusszytometrie festgestellt wurde, wurde in einem separaten Versuch eine *E. coli* Arbeitslösung mit höheren UV-Dosen von 0,1 bis 120 kJ/m² bestrahlt. Die Proben wurden in der Durchflusszytometrie und der LA-qPCR (1242 bp) quantifiziert. In der Messung der Proben mit dem Durchflusszytometer (Abbildung 80) zeigt sich eine Abnahme der Fluoreszenz im Grün-Kanal, kein Unterschied jedoch im Rot-Kanal. So lagen mit steigender UV-Dosis immer weniger Messsignale im Bereich lebender Zellen.

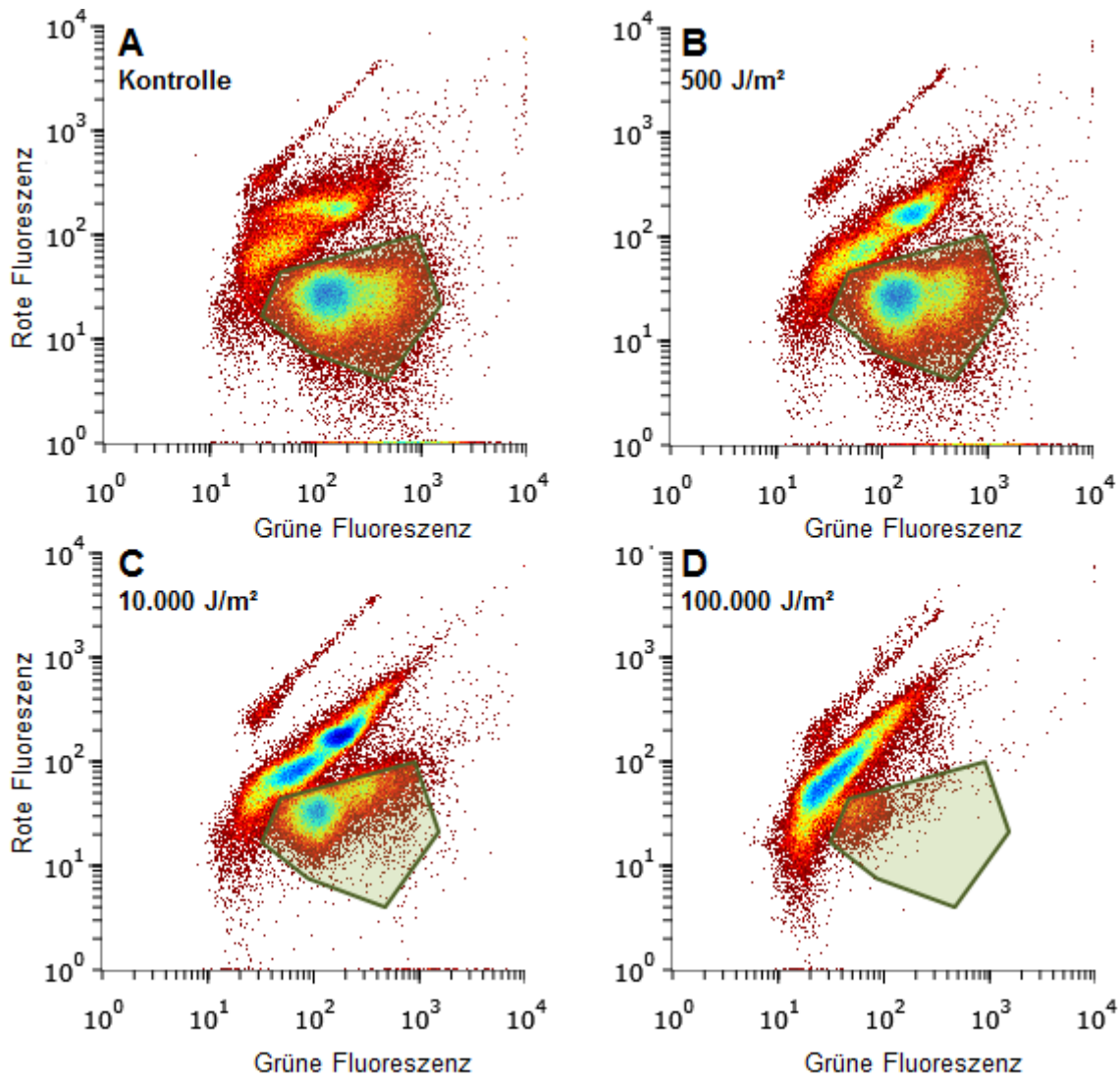


Abbildung 80: Grün- und Rot-fluoreszenz einer mit Niederdruck-UV-Strahlung behandelten *E. coli* Probe. Die Zellen wurden mit SYBRGreen und Propidiumiodid angefärbt. Der grüne Bereich zeigt die als intakt gewerteten Zellen an.

Wie in der qPCR folgen die in der Durchflusszytometrie bestimmten Messwerte einer direkten Abhängigkeit von der eingesetzten UV-Dosis (Abbildung 81). Die schädigenden Effekte der Strahlung haben allerdings nur einen geringen Einfluss auf die Leuchtintensität, so dass eine Log-Stufe Reduktion von *E. coli* Bakterien erst nach einer Behandlung von 30.000 J/m² festgestellt wurde. In der LA-qPCR wurde eine vergleichbare Reduktion bereits bei 75 J/m² erreicht (vgl. Abbildung 79).

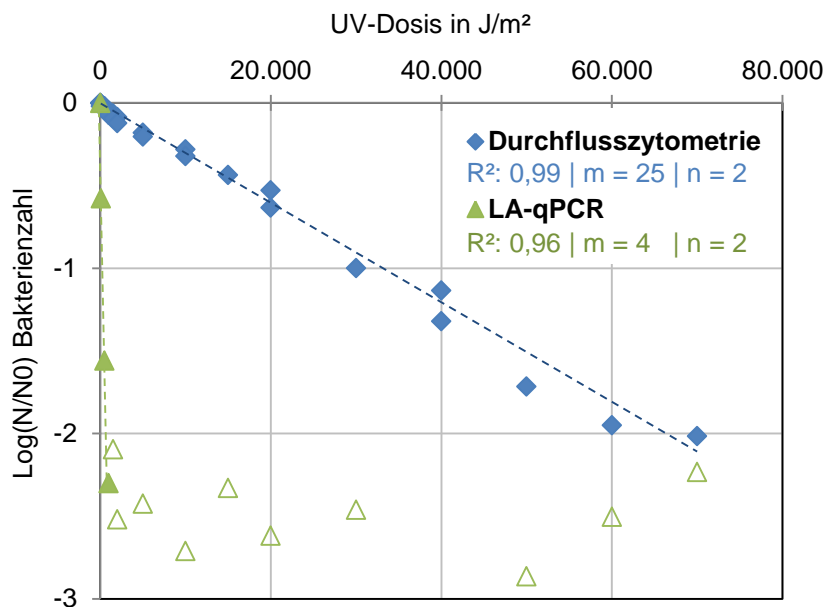


Abbildung 81: Reduktion des Signales von *E. coli* im Durchflusszytometer und LA-qPCR bei steigender Niederdruck-UV-Behandlung.

In der LA-qPCR wurde in den Versuchen zwar eine Reduktion des Signales durch UV-Strahlung gemessen, jedoch wurden im Kulturverfahren höhere Reduktionswerte erreicht. In der Durchflusszytometrie kann in den relevanten Strahlungsdosen (bis 1000 J/m²) keine Reduktion gemessen werden. Eine Desinfektion mit Niederdruck-UV Strahlung lässt sich somit nicht genau nachweisen. Es ist denkbar, dass bei einem längeren Amplifikat eine bessere Übereinstimmung möglich ist. Da Bakterien jedoch über ein großes Genom mit entsprechender Komplexität verfügen, ist zu erwarten, dass auch die Position des nachzuweisenden Abschnittes eine Rolle spielt.

3.3.2.4 Fazit

Niederdruck-UV-Strahlung verursacht Schäden an Nukleinsäuren, nicht aber an Hüllstrukturen von Bakterien und Viren. Interkalierende Farbstoffe wie PMA oder Propidiumiodid können somit nicht zur Differenzierung zwischen lebenden und inaktivierten Organismen eingesetzt werden.

In der qPCR wird ein bestimmter Abschnitt der Nukleinsäure nachgewiesen. Tritt eine Schädigung in diesem Abschnitt auf, so bricht die Amplifikation ab und das Bakterium oder Virus wird nicht nachgewiesen. Je größer dieser Abschnitt ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, die Schädigung nachzuweisen. Durch diesen Effekt konnten bei Bakteriophagen mit dem Kulturverfahren vergleichbare Messwerte erzielt werden, da diese ein kleines Genom (bis 10^4 bp) besitzen, welches komplett oder zum großen Teil von einer qPCR erfasst werden kann.

Die in der qPCR detektierte Reduktion korreliert dabei direkt mit der Größe des Amplifikates und der UV-Dosis. Somit ist es möglich, anhand einer qPCR die Infektiosität und damit das Ergebnis des Kulturverfahrens zu berechnen.

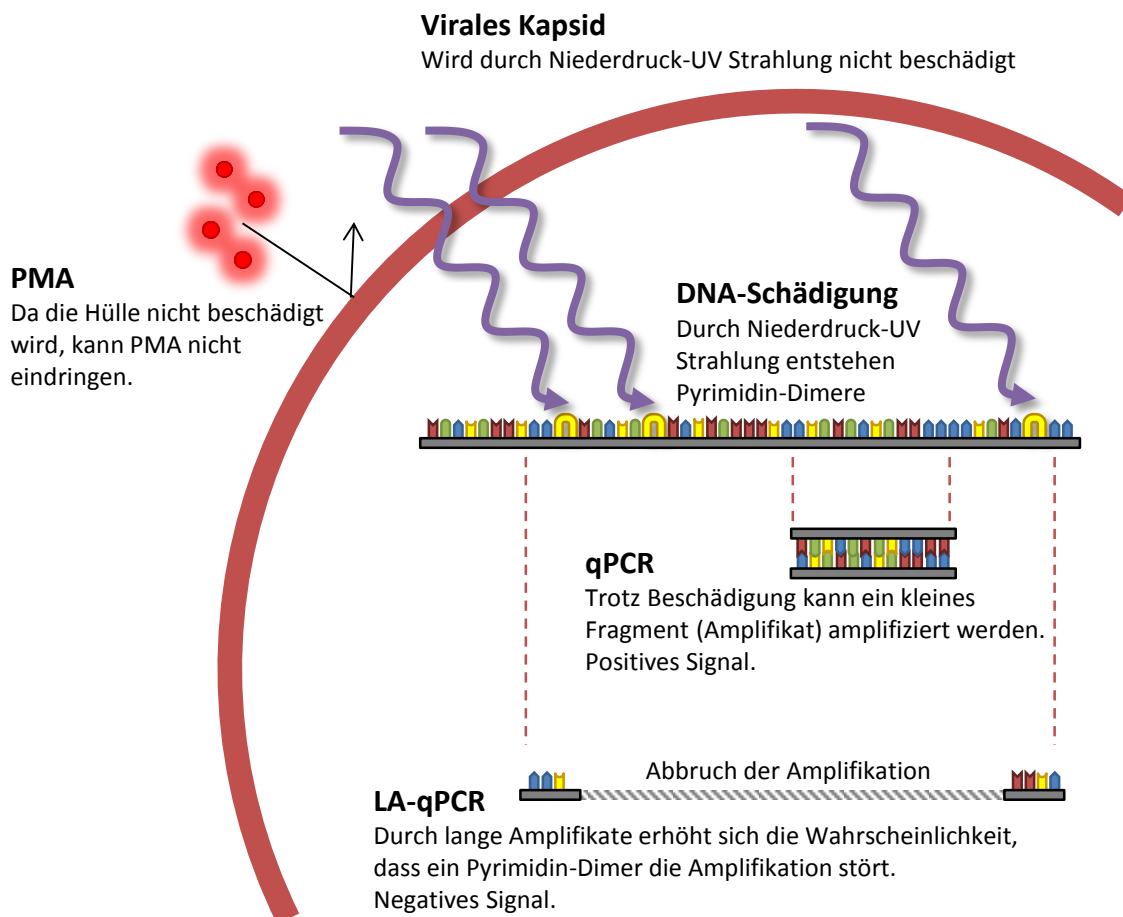


Abbildung 82: Wirkung von Niederdruck-UV-Strahlung auf Viren, die PMA-Behandlung und das Ergebnis der qPCR bzw. LA-qPCR.

3.3.3 Chlor

Chlor wird bei etwa der Hälfte der Wasserversorger als Desinfektionsmittel eingesetzt. Eine Chlorung kann auch als Reaktion auf eine Belastung eines Trinkwassernetzes erfolgen (DVGW-Arbeitsblatt W 557) oder zum Schutz der mikrobiologischen Qualität bei langen Rohrleitungen dienen. Chlor beeinträchtigt die bakterielle Zellmembran und kann durch Diffusion in Zellen beispielsweise Transportproteine zerstören und somit Stoffwechselwege unterbrechen. In Versuchen sollte geklärt werden, ob eine Inaktivierung von Bakterien und Viren mit Chlor, durch molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden kann. PhiX174, MS2, *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden mit verschiedenen Chlorkonzentrationen behandelt und mit der qPCR, PMA-qPCR und dem Kulturverfahren quantifiziert. Die Konzentration des freien Chlors wurde in den Versuchen nach Zugabe in die Proben gemessen. In allen Experimenten wurde versucht, das für die Kultivierung der Organismen eingesetzte Medium so gut wie möglich zu entfernen, um eine Chlorzehrung durch Organik zu verhindern.

3.3.3.1 phiX174

PhiX174-Bakteriophagen wurden in Leitungswasser gelöst. Eine Natriumhypochloritlösung wurde entsprechend dosiert, um Chlorkonzentrationen von 0,05 | 0,1 | 0,6 | 1,2 | 4 und 12 mg/L zu erreichen. Nach Chlorzugabe wurde die Chlorkonzentration bestimmt; die Menge des freien Chlors lag bei 0,07 | 0,16 | 0,55 | 1,32 | 3,96 und 12,4 mg/L. Ein Ansatz wurde nach 25 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mit Natriumthiosulfat gestoppt. Ein zweiter Ansatz wurde nach 55 Minuten gestoppt. Die Proben wurden mit der qPCR bzw. PMA-qPCR mit Primern für Amplifikatgrößen von 108, 564 und 1066 bp und mit dem Plaque Assay quantifiziert.

Die Ergebnisse zeigen nur minimale Unterschiede zwischen den zwei Inkubationszeiten (Abbildung 83). Im **Kulturverfahren** (Abbildung 83, schwarz) werden bei der niedrigsten eingesetzten Dosis von 0,07 mg/L fast 4 Log-Stufen Reduktion erreicht. Von 0,16 bis 1,32 mg/L Chlor bleibt die Reduktion bei etwa 6 Log-Stufen konstant und steigt bei 3,36 mg/L auf 8 Log-Stufen. Bei 12,4 mg/L konnten keine Phagen mehr detektiert werden.

In der **qPCR** (Abbildung 83, blau) zeigt sich bis 0,16 mg/L Chlor bei allen eingesetzten Amplifikaten keine Reduktion. 0,55 mg/L Chlor liefert eine Reduktion von 0,8 | 1,6 | 2,4 für die jeweiligen Amplifikate. Die Nachweisgrenze wird bei 1,32 mg/L (1063 bp) bzw. 3,36 bp (108 und 568 bp) mit 5 bis 6 Log-Stufen Reduktion erreicht.

Durch **PMA** (Abbildung 83, rot) wird die Reduktion der qPCR um bis zu zwei Log-Stufen verstärkt. Dies ist allerdings nur bei 0,55 mg/L Chlor zu beobachten. Bei höheren oder geringeren Chlor-Konzentrationen liefert die PMA-qPCR verglichen mit der qPCR nur ein

leicht verändertes Signal. Die Unterschiede in den Proben mit unterschiedlicher Inkubationszeit (25 und 60 Minuten) sind auch in der qPCR minimal.

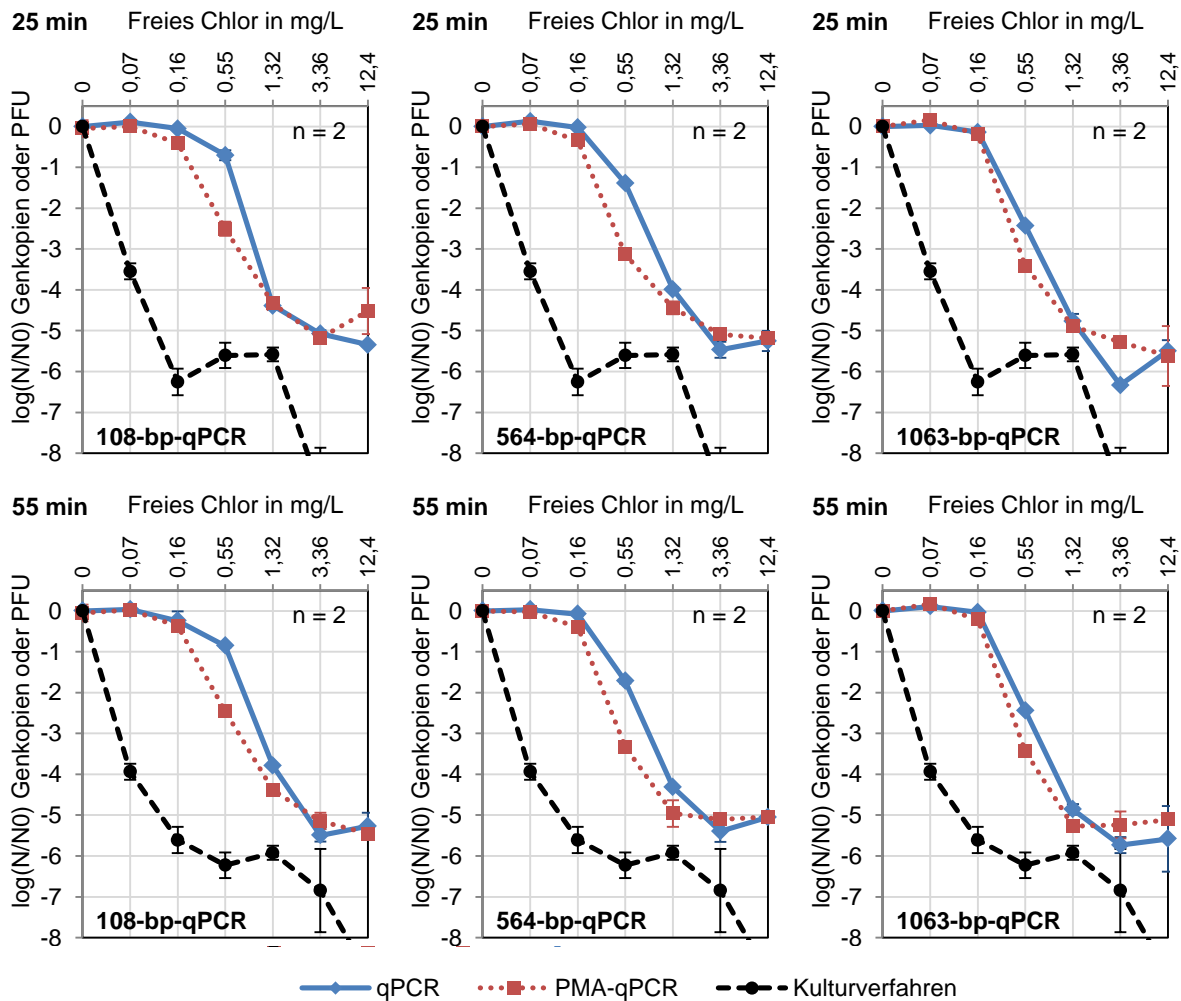


Abbildung 83: Ergebnisse aus qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren von mit Chlor behandelten phiX174-Bakteriophagen. Verschiedene Amplifikatgrößen wurden in der qPCR und PMA-qPCR eingesetzt. Die Proben wurden bei 25 (oben) und 55 Minuten (unten) abgestoppt (n=2, m=7).

In seiner oxidativen Wirkung beschädigt Chlor zunächst die virale Oberfläche. PhiX174 besitzt Hüllproteine, sogenannte Spikes (Protein H), die an die Polysaccharide der Wirtszellen binden, um eine Infektion auszulösen (Inagaki et al., 2005). Dieses Protein spielt außerdem bei der viralen Replikation eine Rolle (Cherwa et al., 2011). Werden diese Oberflächenproteine durch die geringe Chlordosis beschädigt, so bewirkt dies eine Reduktion der infektiösen Viren im Kulturverfahren. Da die Genomstruktur und das Kapsid der Viren intakt bleibt, können sie sowohl in der qPCR als auch in der PMA-qPCR detektiert werden. Die Amplifikatgröße ist dabei irrelevant. Dies unterstützt die Ergebnisse der Studien von Page et al. (2010) bzw. Nuanualsuwan und Cliver (2003), dass sich geringe Chlorkonzentrationen auf den Anheftungsmechanismus von Viren auswirken, nicht aber auf das Genom und folglich die PCR.

Höhere Chlorkonzentrationen beschädigen das virale Kapsid. Im Gegensatz zur thermischen Belastung führt das Eindringen des Chlors in die Viren auch zu einer Zerstörung der Nukleinsäure. Dies wird deutlich, da auch ohne PMA eine Reduktion zu beobachten ist. Der geringe Unterschied zwischen qPCR und PMA-qPCR spricht dafür, dass die meisten Viren sowohl Schäden am Kapsid als auch am Genom haben. Durch längere Amplifikate können die Schäden am Genom analog zur UV oder thermischen Behandlung besser erfasst werden. Studien zu Hepatitis A (Li et al., 2002) und MS2 (Wigginton et al., 2012) zeigen vergleichbare Effekte durch Oberflächen- und Genomschäden durch Chlor.

Sowohl qPCR als auch Kulturverfahren zeigen eine Stagnationsphase, in der die Reduktion durch höhere Chlorkonzentration bis zu einem bestimmten Punkt nicht erhöht wird. Sigstam et al. (2014) begründen diesen Effekt durch unterschiedliche Virenpopulationen, Aggregation oder eine resistente Subpopulation. Der Plateau-Effekt sei wahrscheinlich auf eine Schutzschicht auf den Viren aus Abbauprodukten zurückzuführen. Werden diese Theorien in Betracht gezogen, so ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit drei Phasen für steigende Chlorkonzentration:

1. Die Oberfläche der Viren wird beschädigt, nicht aber deren Kapsid oder Genom. Dies führt zu einer Reduktion in Kulturverfahren. In der PMA-qPCR oder qPCR ist kein Unterschied messbar.
2. Zerstörung der Hülle einiger Viren. Die freien Bestandteile lagern sich mit anderen Viren zusammen und schützen diese vor weiteren Beschädigungen. Dies führt zu einer Plateau-Phase im Kulturverfahren. Die nun zerstörten Viren führen zur Reduktion des qPCR- und PMA-qPCR-Signales.
3. Zerstörung der geschützten Viren durch erhöhte Chlorkonzentration. Das Signal des Kulturverfahrens sinkt. Theoretisch müsste auch das Signal der qPCR weiter sinken, jedoch wird im Versuch die Nachweisgrenze erreicht.

Mit den qPCR-Verfahren lässt sich mit langen Amplifikaten und PMA eine größere Reduktion als ohne diese Modifikationen nachweisen. Jedoch ist bei geringen Chlorkonzentrationen ein falsch positives Ergebnis im Vergleich zum Kulturverfahren zu erwarten.

3.3.3.2 MS2

Bei MS2-Bakteriophagen wurde auf die Dosierung einer sehr hohen Chlorkonzentration von über 10 mg/L wie bei PhiX174 verzichtet. Dafür wurde die Auflösung der eingesetzten Konzentrationen im niedrigeren Bereich erhöht. Wie phiX174 wurden MS2 in Leitungswasser mit 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,5 | 2 und 4 mg/L Chlor behandelt und die Reaktion nach

25 Minuten bei Raumtemperatur mit Natriumthiosulfat abgestoppt. MS2 wurden in der qPCR (314 bp), PMA-qPCR und dem Plaque-Assay quantifiziert.

Das Signal der MS2-Bakteriophagen sinkt mit steigender Chlordosis in qPCR, PMA-qPCR und Kulturverfahren ab 1,5 mg/L Chlor gleichermaßen (Abbildung 84). Bis 1,5 mg/L Chlor ist nur eine minimale Reduktion der Phagen in den drei eingesetzten Methoden festzustellen. Bei 2 mg/L sinkt das Signal aller Methoden um über 4 Log-Stufen. Bei 4 mg/L werden im Kulturverfahren 7 Log-Stufen Reduktion erreicht, ähnlich der qPCR. Die Standardabweichungen aller Proben ab 1,5 mg/L Chlor sind sehr hoch und reichen über mehrere Log-Stufen. Die Wirkung von PMA ist bei MS2-Bakteriophagen bei der eingesetzten Chlordosis gering und bewirkt maximal eine Log-Stufe zusätzliche Reduktion.

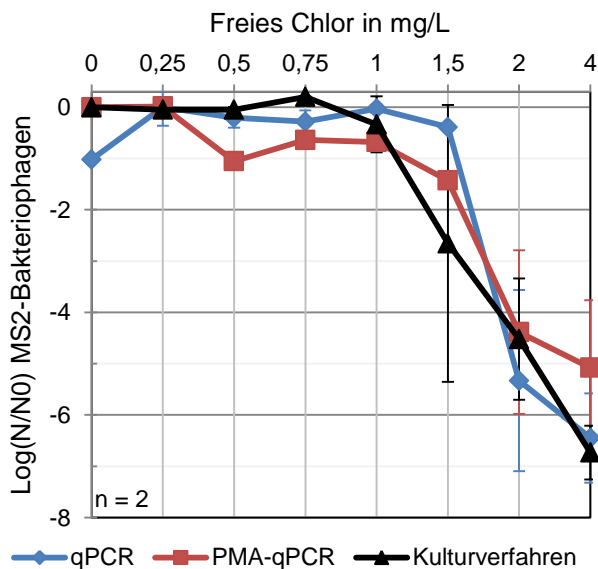


Abbildung 84: Signalreduktion von MS2-Bakteriophagen bei verschiedenen Chlorkonzentrationen bei einer Einwirkzeit von 25 Minuten (n = 2, m = 8).

Der große Unterschied innerhalb der Replikate ist der Probenmatrix und des darin gelösten Kohlenstoffes geschuldet. Dieser wurde mit einem DOC-Messgerät auf 48,8 mg/L bestimmt. MS2-Phagen werden bei der Kultivierung im Nährmedium suspendiert, welches sich trotz Waschen und Verdünnen in entsprechender Konzentration in den Versuchslösungen befindet. Dadurch reagiert ein Teil des Chlors mit der Matrix und in geringerem Ausmaß mit den Bakteriophagen. Diese Chlorzehrung bedingt auch, dass geringe Konzentrationen unter 1 mg/L keine Wirkung auf die Bakteriophagen zeigen.

Ein Vergleich der Daten mit anderen Studien gestaltet sich als schwierig, da die Versuchsbedingungen meist unterschiedlich gewählt wurden. Der Nachweis größerer Amplifikate war in dieser Arbeit bei MS2 nicht erfolgreich, eine aktuelle Studie von McLellan et al. (2016) zeigt jedoch, dass größere Amplifikate bei Chlorbehandlung zu einer größeren Reduktion des Signales in der qPCR bei MS2-Bakteriophagen führen. Die

Chlorkonzentrationen sind mit 10 bis 200 mg/L in der Studie allerdings viel höher gewählt, die Reaktion der Phagen auf das Chlor fällt dagegen sehr gering aus (2 Log-Stufen Reduktion bei 10 mg/L Chlor). Verglichen mit anderen RNA-Viren zeigt die Studie von Leifels et al. (2015), dass mit PMA oder EMA bei RNA-Viren (Rota-, Poli- und murine Noroviren) bei 2 mg/L Chlor ein mit dem Kulturverfahren vergleichbarer Wert erreicht werden kann. Die jeweils unterschiedlichen Effekte auf die qPCR ohne PMA in dieser Studie zeigen, dass große Unterschiede zwischen einzelnen Virenarten zu erwarten sind und ein Vergleich mit MS2 in dieser Arbeit nicht direkt möglich ist. Zusätzlich zeigen Xue et al. (2013), dass unterschiedliche Abschnitte des Genoms von Viren unterschiedlich stark von Chlor beeinflusst werden. Ein entsprechender Nachweis von infektiösen Viren nach der Desinfektion mit Chlor via qPCR setzt umfassende Kenntnisse des Inaktivierungsmechanismus auf molekularer Ebene voraus.

3.3.3.3 Bakterien

Die Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden wie MS2 mit entsprechenden Chlorkonzentrationen behandelt und die Reaktion nach 25 Minuten gestoppt. Zur Quantifizierung der Proben wurde die LA-qPCR (*E. coli*: 1242 bp; *P. aeruginosa* 16S-1063 bp), LA-PMA-qPCR, Durchflussszytometrie und das Kulturverfahren (*E. coli*: IDEEX, *P. aeruginosa*: Plattenverfahren) eingesetzt. *P. aeruginosa* wurde im Katalase-MPN-Verfahren gemessen.

E. coli (Abbildung 85, links) wird durch geringe Chlorkonzentration bis 0,75 mg/L nur im Nachweis des Kulturverfahrens beeinflusst und der Messwert um etwas über eine Log-Stufe reduziert. Mit steigender Konzentration sinkt die Menge der kultivierbaren *E. coli* bis an die Nachweisgrenze, welche bei 4 mg/L erreicht wird (7,5 Log-Stufen Reduktion). **qPCR** und **Durchflussszytometrie** zeigen keine Änderung des Signales bis 2 mg/L. Bei dieser Chlorkonzentration wird durch **PMA** in der qPCR eine Log-Stufe weniger *E. coli* gemessen. Bei 4 mg/L sinkt das Signal aller Methoden, wobei bei der PMA-qPCR und in der Durchflussszytometrie die Nachweisgrenze (bis zu 6 Log-Stufen Reduktion) erreicht wird.

Die Konzentration von ***P. aeruginosa*** (Abbildung 85, rechts) sinkt in allen Methoden von der geringsten (0,25 mg/L) bis zur höchsten (4 mg/L) Chlordosis. Wie bei *E. coli* zeigt das Kulturverfahren bei 0,75 mg/L etwa eine Log-Stufe Reduktion. Ebenfalls werden bei 4 mg/L keine Bakterien mehr detektiert (ca. 7 Log-Stufen Reduktion).

Die Messwerte von qPCR und Kulturverfahren sind bis zu 0,75 mg/L Chlor fast identisch. Bei Chlorkonzentrationen von 0,75 bis 1,5 mg/L zeigt die qPCR keine Signaländerung, bei 2 mg/L sinken die Messwerte nochmals auf eine maximale Reduktion von 2 Log-Stufen.

PMA-qPCR und Durchflusszytometrie liefern im Vergleich zum Kulturverfahren jeweils einen um eine halbe bzw. eine Log-Stufe niedrigeren Messwert. Bei höheren Chlorkonzentrationen ist die Reduktion im Kulturverfahren größer. Das Katalase-MPN-Verfahren und die PMA-qPCR liefern in etwa die gleichen Messwerte.

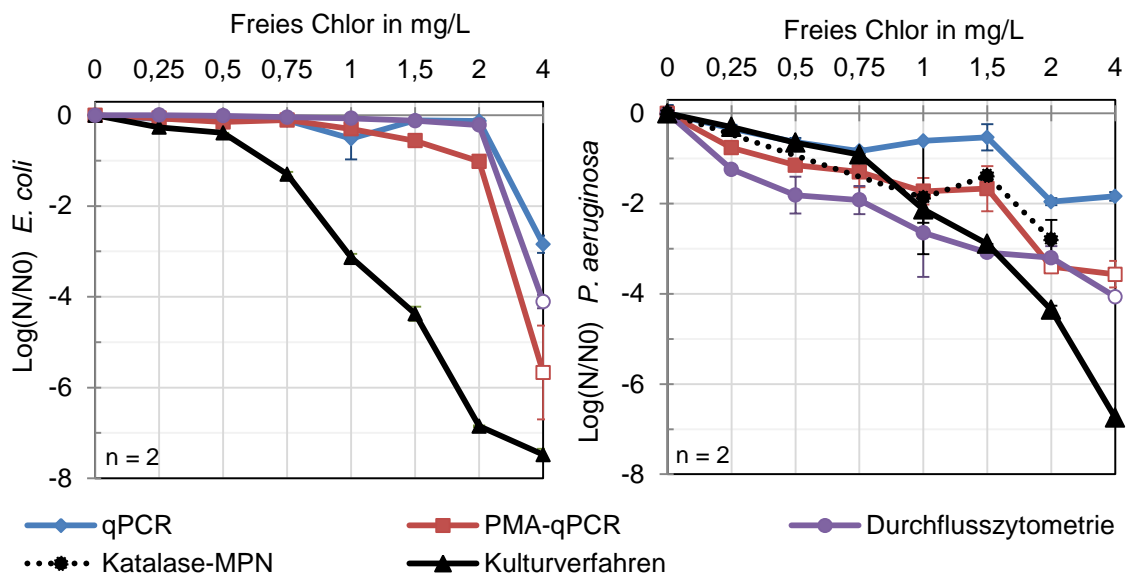


Abbildung 85: Log-Reduktion von *E. coli* (links) und *P. aeruginosa* (rechts) in qPCR, PMA-qPCR, Kulturverfahren und Durchflusszytometrie nach Behandlung mit Chlor (m=8, n=2).

Chlor wurde nur in wenigen Studien bei Bakterien mit PMA getestet. In der Studie von Nocker et al. (2007) wurden durch PMA bei mit 20 mg/L Hypochlorit behandelten *Salmonella typhimurium* in der qPCR 0,4 Log-Stufen weniger Bakterien gemessen als ohne PMA. Bei 40 mg/L beträgt dieser Unterschied vier Log-Stufen. Nach den Untersuchungen des Wirkungsmechanismus von Desinfektionsmitteln von Cho et al. (2010) werden durch Chlor primär intrazelluläre Bestandteile zerstört, wobei die Permeabilität der Bakterien zunächst nicht beeinträchtigt wird. Dies wird durch die Ergebnisse von Vitro et al. (2005) mit *Yersinia enterocolitica* und *E. coli* unterstützt: Mit Chlor behandelte Bakterien wurden zunächst zu 99,9 % inaktiviert (Kulturverfahren), bevor Nukleinsäure oder Proteine aus den Zellen dringen konnten und es zu Membranschäden kam. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn sich zusätzlich Organik in den Proben befindet (Chlorzehrung). Die Beobachtungen in zitierten Studien entsprechen auch den Beobachtungen in dieser Arbeit: Geringe Chlorkonzentrationen zeigen nur im Kulturverfahren eine Reduktion, da intrazelluläre Proteine zerstört werden, die Hülle der Bakterien jedoch intakt bleibt. PMA kann somit nicht in die Zellen eindringen. Bei höheren Konzentrationen werden zusätzlich auch die Membranen zerstört und die DNA beschädigt. Dies führt zu dem beobachteten Signalabfall in der Durchflusszytometrie, PMA-qPCR und qPCR.

Die starke Reduktion von qPCR und PMA-qPCR und Durchflusszytometrie bei 4 mg/L und die minimale Reduktion bei geringeren Chlorkonzentrationen sind der Chlorzehrung geschuldet. Durch Bestandteile des Mediums steht nach Zugabe nicht das gesamte Chlor für die Desinfektion zur Verfügung. Vergleichbare Ergebnisse sind in der Studie von Vitro et al. (2005) bei *Y. enterocolitica* und *E. coli* gezeigt.

Die niedrigen Werte der Durchflusszytometrie unter den Messwerten des Kulturverfahrens sind einer kurzen Lagerungsphase im Kühlschrank bei 8 °C geschuldet. Es konnte beobachtet werden, dass die Effizienz der Färbung mit Zellfarbstoffen bei *P. aeruginosa* bei längerer Lagerung abnimmt. Dabei verlagert sich das Signal einiger Zellen im Durchflusszytometer aus dem gesetzten „Lebend“-Gate (Abbildung 86). Das neue Stadium bzw. Gate wurde „hungernd“ genannt. Wird den „hungernden“ Zellen wieder Nährmedium zugeführt, verschiebt sich ihr Signal wieder in das „Lebend“-Gate. Die Stadien wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht: Hungernde *P. aeruginosa* sind kleiner und zeigen eine weniger intensive Färbung. Die „Tot“-Färbung und die damit verbundene Verschiebung in das „Tot“-Gate funktioniert in beiden Zuständen, allerdings mit unterschiedlicher Leuchtintensität.

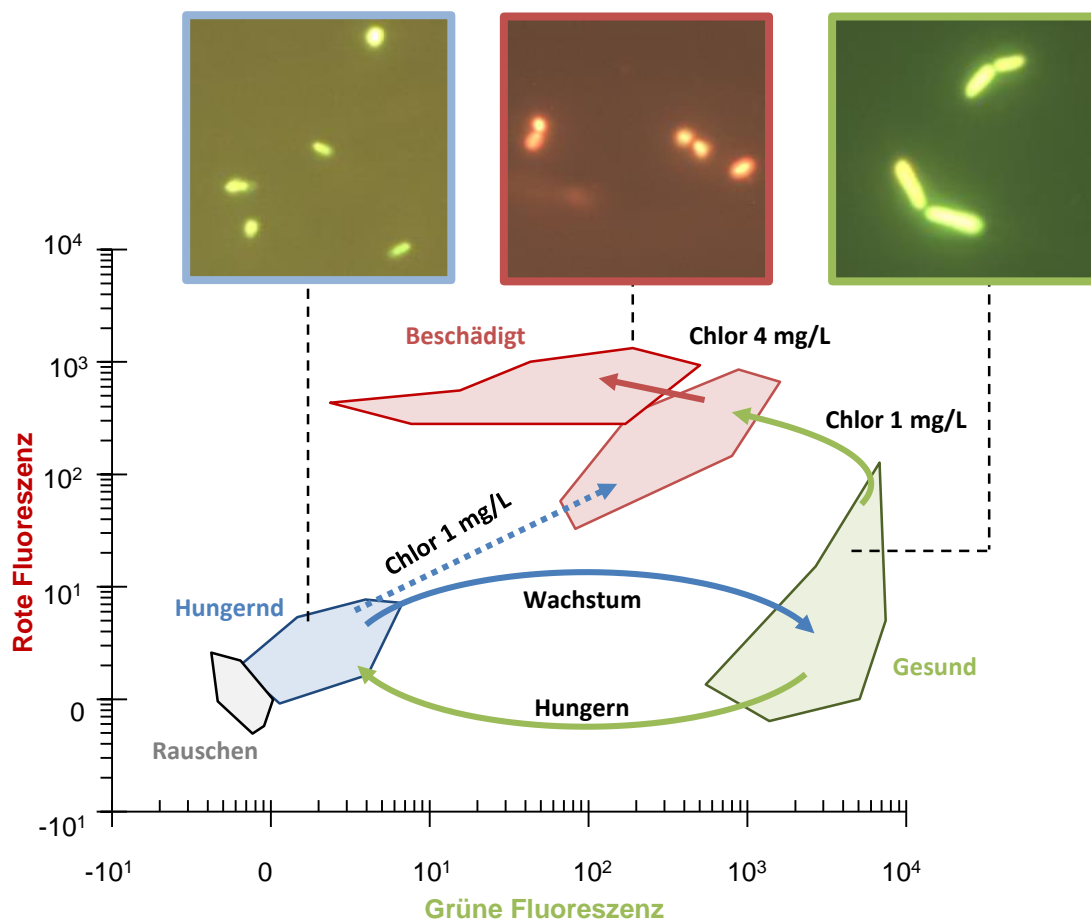


Abbildung 86: Einfluss der Lagerung einer *P. aeruginosa*-Kultur in Leitungswasser bei 8 °C. Die Proben wurden mit SYBR Green und Propidiumiodid angefärbt. Mikroskopische Bilder mit identischen Farbstoffen bei 1000-facher Vergrößerung.

Der beschriebene Zustand der kleineren Zellen ist durch einen durch die Lagerung ausgelösten Hungerzustand zu erklären. Bakterien können ihre Oberfläche verkleinern wenn keine Nährstoffe mehr verfügbar sind (Barcina et al., 2006). Dies wurde beispielsweise auch bei *P. aeruginosa* beobachtet (Sanin et al., 2003). Vergleichbare Zellstadien konnten im Kulturverfahren nicht nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 56).

3.3.3.4 Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass die PMA-qPCR nach einer Chlorbehandlung nur unter bestimmten Bedingungen identische Ergebnisse mit dem Kulturverfahren liefert. Die genannten Studien zeigen sowohl positive als auch negative Ergebnisse – wobei jeweils unterschiedliche Bedingungen und Organismen Fokus der jeweiligen Studien waren.

Geringe Chlorkonzentrationen schädigen die Oberfläche von Viren und die intrazellulären Proteine von Bakterien (Abbildung 87, 1). Da Membran oder Kapsid nicht beschädigt werden, kann PMA nicht eindringen und die Nukleinsäure markieren. Interkalierende Farbstoffe haben somit bei geringen Chlorkonzentrationen keine Wirkung, und die Lebend/tot-Unterscheidung funktioniert nicht. **Höhere Chlorkonzentrationen** schädigen die Hülle der Organismen und PMA kann eindringen (Abbildung 87, 2 + 3). Eine Signalreduktion ist in der PMA-qPCR messbar. Neben PMA kann auch Chlor in die Viren oder Bakterien gelangen, worauf das Genom beschädigt wird. Die Schäden können durch lange Amplifikate besser erfasst werden. In der Durchflusszytometrie lässt sich die Lebend/tot-Differenzierung ebenfalls durchführen, jedoch erschwert die unterschiedliche Aufnahme der Farbstoffe die Auswertung.

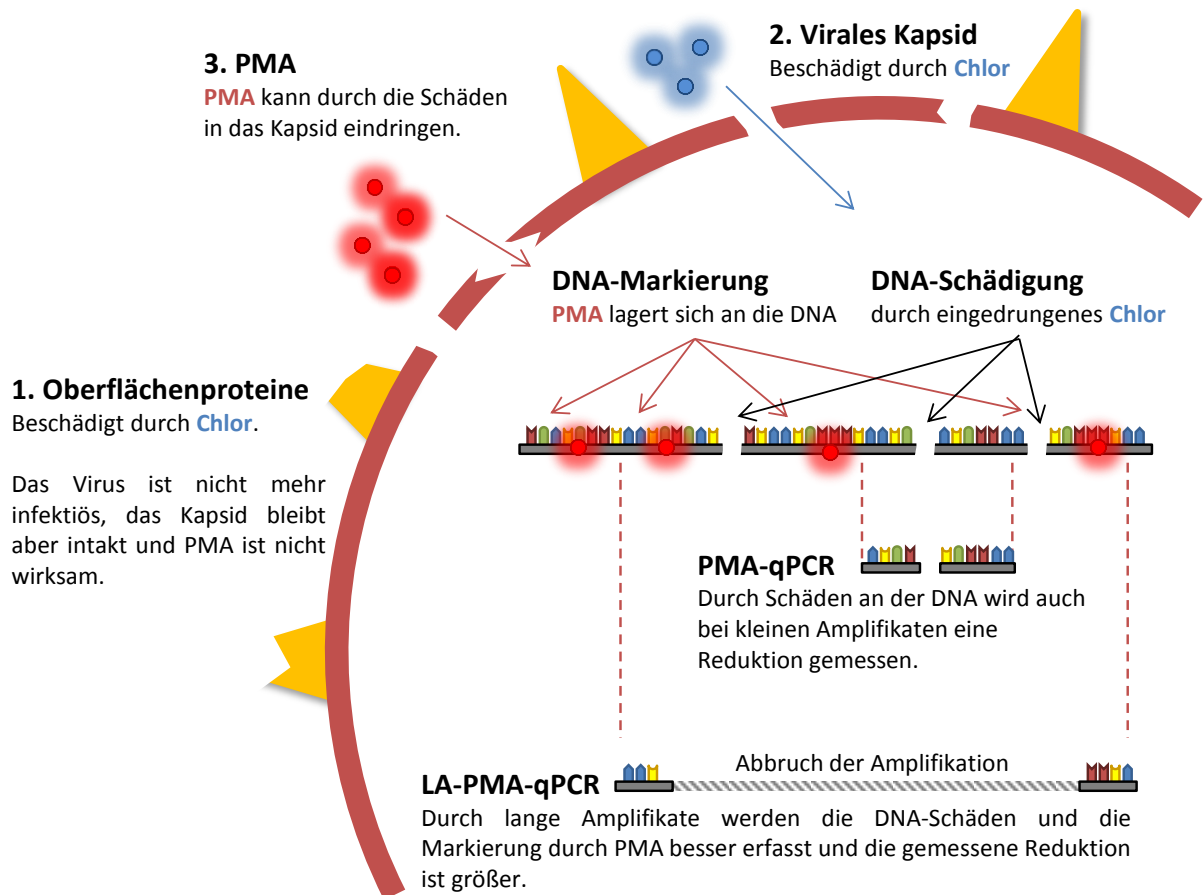


Abbildung 87: Wirkung von Chlor auf den Nachweis von Viren mit der LA-PMA-qPCR.

3.3.4 Ozon

Ozon wirkt wie Chlor als oxidatives Desinfektionsmittel und wird sowohl im Trinkwasser-, als auch im Badewasserbereich eingesetzt. Ozon ist sehr instabil und hat deswegen keine Langzeitwirkung wie Chlor. Die zugelassene Ozondosis liegt mit 10 mg/L höher als bei Chlor.

Die Ergebnisse der Chlordesinfektion zeigten bei niedrigen Konzentrationen Unterschiede zwischen Kulturverfahren und den molekularbiologischen Methoden mit Lebend/tot-Unterscheidung. Da Ozon ebenfalls oxidativ wirkt, ist fraglich, ob eine Desinfektion mit der LA-PMA-qPCR nachgewiesen werden kann. Wie in den Versuchen zur Chlorung wurden phiX174, MS2, *E. coli* und *P. aeruginosa* mit verschiedenen Ozonkonzentrationen behandelt und mit der qPCR, PMA-qPCR und dem Kulturverfahren quantifiziert. Die Ozonkonzentration wurde vor der Zugabe mittels Indigo-Methode (EN ISO 10705-1:2001, n.d.) bestimmt.

3.3.4.1 phiX174

Der initiale Versuch mit Ozon wurde mit dem Bakteriophagen phiX174 durchgeführt. Um zu prüfen, wie sich die Amplifikatlänge auf die Reduktion auswirkt, wurden erneut verschiedene Primer für den Nachweis in der qPCR eingesetzt. phiX174 wurde in Leitungswasser gelöst und mit Ozonkonzentrationen von 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 | 2 | 3 | 5 und 10 mg/L behandelt. Nach 25 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit Natriumthiosulfat gestoppt und die Proben mittels qPCR (108, 564, 1063 bp), PMA-qPCR und dem Plaque Assay quantifiziert.

Bis zu Konzentrationen von 0,2 mg/L Ozon wurde mit keiner der Methoden eine Reduktion gemessen (Abbildung 88). Höhere Konzentrationen zeigen in allen Methoden eine steigende Reduktion. Bei 5 mg/L werden über 4 Log-Stufen erreicht. Die Reduktion des Kulturverfahrens liegt etwas über dem der PMA-qPCR und qPCR: Bei 3 mg/L sind es 3,5 Log-Stufen, in der qPCR 3,0 | 3,2 | 3,1 und in der PMA-qPCR 3,2 | 3,4 | 3,4 Log-Stufen entsprechend für die Amplifikatlängen von 108 | 564 | 1063 bp. Der Trend der Reduktion bei steigender Ozonkonzentration ist demnach in allen Methoden gleich. Ebenso wird die Reduktion durch größere Amplifikate in der qPCR bzw. PMA-qPCR nicht erhöht.

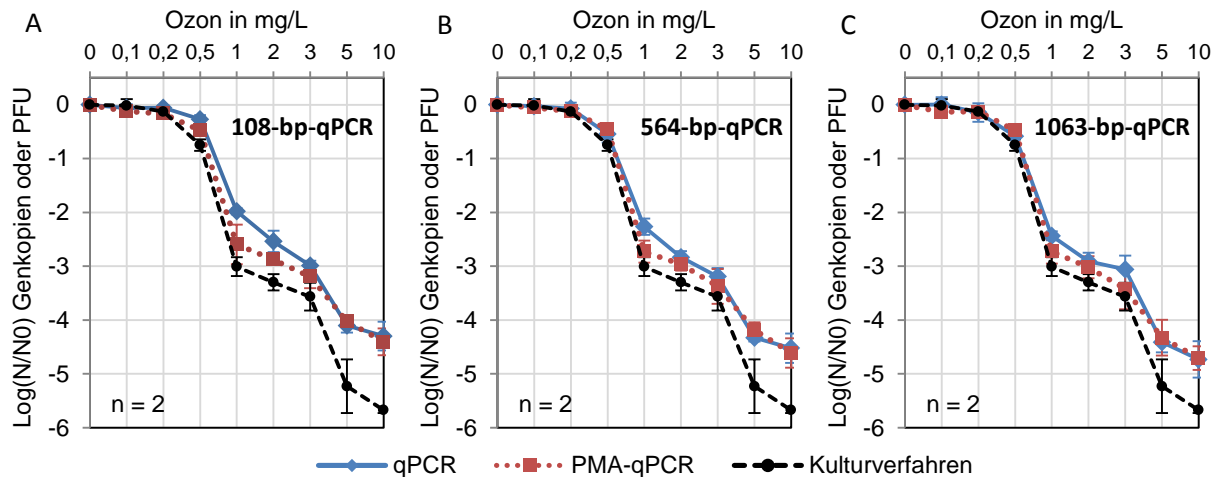


Abbildung 88: Ergebnisse von Kulturverfahren, qPCR und PMA-qPCR für mit Ozon behandelte phiX174 Bakteriophagen. In der qPCR und PMA-qPCR wurden verschiedene Amplifikate eingesetzt ($n = 2$, $m = 9$).

Ozon reagiert sofort und hat ein höheres Oxidationspotenzial (2,07 eV) als Chlor (1,36 eV) (Acher et al., 1997). Die geringen Unterschiede zwischen qPCR und PMA-qPCR zeigen, dass die Nukleinsäure der Viren direkt beschädigt wird. Wie bei Chlor dringt Ozon nach der Beschädigung des Kapsids in die Viren ein und zerstört die DNA. PMA kann zwar eindringen, zeigt aber keine zusätzliche Reduktion, da die DNA bereits zerstört wurde. Bei Chlor und vor allem bei der thermischen und UV-Behandlung konnte ein Unterschied zwischen den Amplifikatgrößen festgestellt werden. Bei Ozon wurde bei allen Amplifikatgrößen fast die gleiche Reduktion gemessen. In einer Studie von Shin und Sobsey (2003) wurden in der qualitativen PCR bei ozonbehandelten Noro- und Polioviren ebenfalls keine Unterschiede zwischen langen und kurzen Amplifikaten festgestellt. Roy et al. (1981) kommt bei behandelten Polioviren zu dem Schluss, dass die Wirkung von Ozon hauptsächlich auf einer Schädigung der Nukleinsäure beruht. Kim et al. (1980) zeigt, dass Ozon zunächst das Kapsid von Viren aufbricht und die Nukleinsäure zugänglich macht. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Studien, da die gemessenen genomischen Schäden (PCR) analog zum Verlust der Infektiosität sind (Kulturverfahren). Die sehr geringen Unterschiede zwischen den qPCR-Daten verschiedener Amplifikatlängen deuten auf eine komplette Zerstörung des Genoms. Somit ist eine Ozonbehandlung bei phiX174 durch alle eingesetzten qPCR-Reaktionen möglich – PMA und lange Amplifikate spielen nur eine untergeordnete Rolle.

3.3.4.2 MS2

In der Chlorbehandlung wurde bei MS2 in der qPCR, PMA-qPCR und im Kulturverfahren vergleichbare Werte gemessen. Die Ergebnisse von phiX174 zeigten bei Ozon eine stärkere Wirkung als bei Chlor. Somit ist zu erwarten, dass MS2 ebenfalls stärker auf Ozon reagiert.

MS2-Bakteriophagen wurden in Trinkwasser gelöst und mit 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 5 und 10 mg/L Ozon behandelt. Die Reaktion wurde nach 25 Minuten bei Raumtemperatur mit Natriumthiosulfat abgestoppt. MS2 wurden in der qPCR (314 bp), PMA-qPCR und dem Plaque-Assay quantifiziert (Abbildung 89).

Mit steigender Ozonkonzentration bis zu 3 mg/L sinkt die Menge an in der qPCR und im Kulturverfahren detektierten Bakteriophagen (ca. 1 Log-Stufe Reduktion). Bei 5 mg/L Ozon beträgt die Reduktion bis zu 5 Log-Stufen, sowohl im Kulturverfahren als auch in der qPCR. Tendenziell liefern Kulturverfahren, qPCR und PMA-qPCR die vergleichbare Ergebnisse. Bei 5 und 10 mg/L Ozon wird in der PMA-qPCR die Quantifizierungsgrenze (10 Genkopien pro μL) erreicht – somit kann keine weitere Reduktion gemessen werden.

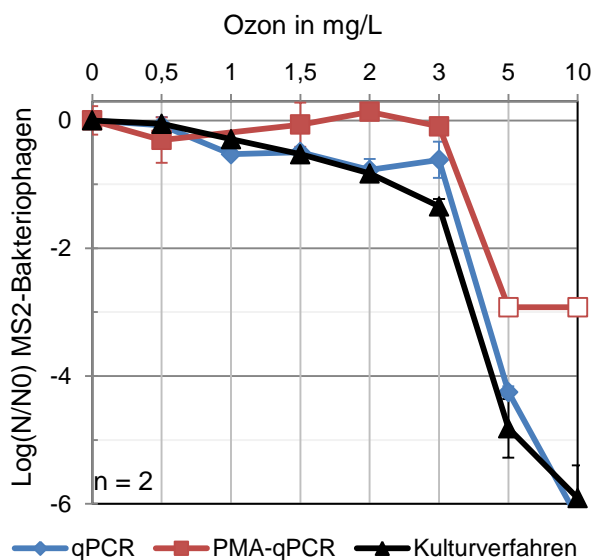


Abbildung 89: Ergebnisse von Kulturverfahren, qPCR und PMA-qPCR für mit Ozon behandelte MS2 Bakteriophagen ($n = 2$, $m = 8$). Leere Symbole zeigen Messpunkte unter der Nachweisgrenze (10 Genkopien pro μL in qPCR-Reaktionen).

Wie bei den Versuchen mit Chlor mit MS2-Bakteriophagen zeigen geringe Ozonkonzentrationen durch die Zehrung der Matrix keine oder nur eine sehr geringe Reduktion. Generell ist der Effekt durch Ozon bei MS2 aber mit dem bei phiX174 vergleichbar – eine komplette Zerstörung des Genoms wird von allen Methoden gleichermaßen detektiert. Somit unterstützt dieses Ergebnis ebenfalls die bei phiX174 genannten Studien zur Ozonbehandlung bei Viren (MS2-Bakteriophagen wurden dabei nur von Shin und Sobsey (2003) untersucht). Wie bei phiX174 lässt sich mit einer qPCR eine Desinfektion von MS2-Bakteriophagen mit Ozon nachweisen.

3.3.4.3 Bakterien

Sowohl bei MS2 als auch bei phiX174 wurde nach einer Ozonzugabe in allen Methoden eine vergleichbare Reduktion gemessen. Auch die Amplifikatlänge spielte bei der Reduktion nur eine untergeordnete Rolle. Bakterien sind unterschiedlich aufgebaut – sie besitzen vor allem ein sehr viel größeres Genom. So ist es fraglich, ob bei *E. coli* und *P. aeruginosa* ebenfalls vergleichbare Daten mit molekularbiologischen und kulturellen Methoden ermittelt werden können.

E. coli und *P. aeruginosa* wurden wie MS2 in Leitungswasser dispergiert und mit entsprechenden Ozonkonzentrationen behandelt. Die Reaktion wurde nach 25 Minuten gestoppt. Zur Quantifizierung der Proben wurde die LA-qPCR (*E. coli*: 1242 bp; *P. aeruginosa* 16S-1063 bp), LA-PMA-qPCR, Durchflusszytometrie und das Kulturverfahren (*E. coli*: IDEEX, *P. aeruginosa*: Plattenverfahren) eingesetzt. *P. aeruginosa* wurde im Katalase-MPN-Verfahren gemessen.

Die Messwerte von PMA-qPCR, Durchflusszytometrie und Kulturverfahren zeigen bei der Desinfektion mit Ozon sowohl bei *E. coli* als auch bei *P. aeruginosa* sehr ähnliche Messwerte (Abbildung 90). Die Nachweisgrenze und über 8 Log-Stufen Reduktion wird bei ***E. coli*** in allen Methoden bei 2 mg/L Ozon erreicht. Bei 1 und 1,5 mg/L Ozon zeigt das Kulturverfahren bis zu einer Log-Stufe stärkere Reduktion als die PMA-qPCR. Dagegen liegen die Messwerte der qPCR (ohne PMA) etwa 3 Log-Stufen über dem Kulturverfahren.

Bei ***P. aeruginosa*** zeigten PMA-qPCR, Durchflusszytometrie und Kulturverfahren bis 3 mg/L Ozon ebenfalls vergleichbare Messwerte. Bei höheren Ozonkonzentrationen konnte im Kulturverfahren eine stärkere Reduktion detektiert werden, wohingegen bei den anderen Methoden die Nachweisgrenze erreicht wird.

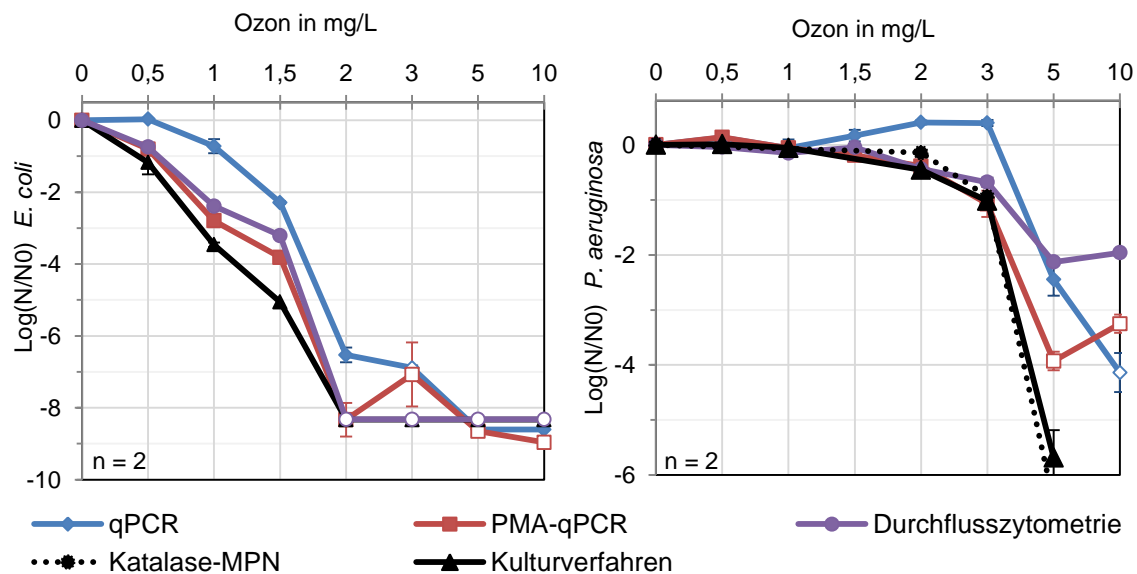


Abbildung 90: Ergebnisse von Kulturverfahren, Flowzytometrie, qPCR und PMA-qPCR für mit Ozon behandelte *E. coli* (links) und *P. aeruginosa* (rechts) (n = 2, m = 8). Leere Symbole zeigen Messpunkte unter der Nachweisgrenze (10 Genkopien pro µL in qPCR-Reaktionen).

Durch Ozon werden primär bakterielle Oberflächenstrukturen, Zellmembran und Zellwände angegriffen. Der Effekt ist auch in der Elektronenmikroskopie durch eine andere Struktur der Bakterien ersichtlich (Diao et al., 2004). Die Schäden verursachen eine starke Erhöhung der Permeabilität, die letztendlich auch zur Zerstörung des Zellinneren durch eindringendes Ozon führt (Cho et al., 2010; Komanapalli and Lau, 1996; L. Asfahl and C. Savin, 2012). Die Zerstörung der Nukleinsäure führt im Versuch dazu, dass die inaktivierten Bakterien von allen Methoden gleichermaßen nicht mehr detektiert werden. Initiale und leichte Schäden an Oberflächenstrukturen (v.a. bei 0,5 mg/L Ozon) führen zu einem Unterschied zwischen Kulturverfahren und PMA-qPCR bzw. Durchflusszytometrie. Abweichungen von PMA-qPCR und qPCR sind durch Bakterien bedingt, deren Permeabilität durch Ozon erhöht wurde, aber noch über ein intaktes Genom verfügen. Diese Phasen konnten ebenfalls bei den Versuchen mit phiX174 beobachtet werden. Räsänen et al. (2013) und Lee et al. (2015) zeigen vergleichbare Messwerte für *Mycobacterium fortuitum* im Kulturverfahren, qPCR und PMA-qPCR für mit Ozon behandeltes Oberflächenwasser und Laborproben. Auch in diesen Studien wurden in der qPCR geringfügig mehr Bakterien als in der PMA-qPCR detektiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in Übereinstimmung der Literatur, dass die Inaktivierung von Bakterien durch Ozon mit molekularbiologischen Methoden wie der qPCR gemessen werden kann. PMA wird dabei nicht benötigt.

3.3.4.4 Fazit

Ozon verursacht Schäden an den Hüllen von Bakterien und Viren sowie deren Genom (Abbildung 91). In diesem Prozess wird die Nukleinsäure zerstört. Im Gegensatz zu Chlor sind hier die Schäden am Genom stärker, so dass auch mit kleineren Amplifikaten in der qPCR eine Reduktion wie mit dem Kulturverfahren gemessen werden kann. Durch die Zerstörung des Genoms ist die Wirkung von interkalierenden Farbstoffen gering, da diese nicht benötigt werden.

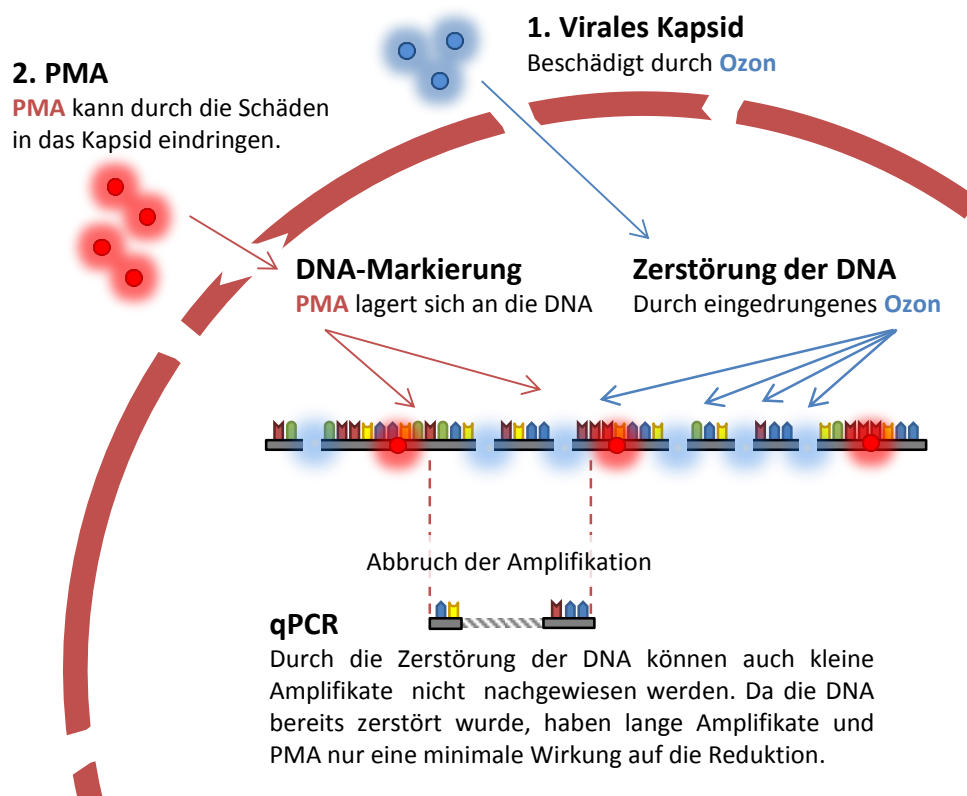


Abbildung 91: Wirkung von Ozon auf den Nachweis von Viren mit der qPCR und bei PMA-Behandlung.

In Abbildung 92 sind die Daten aller qPCR und PMA-qPCR-Experimente mit allen vier Organismen (*phiX174*, *MS2*, *E. coli* und *E. faecalis*) mit dem Kulturverfahren vergleichend dargestellt. Die Steigung der Trendgerade von $0,98 \text{ Log}(N/N_0) \text{ Kulturverfahren} / \text{Log}(N/N_0) \text{ PMA-qPCR}$ ($R^2 = 0,98$) zeigt nochmal deutlich, dass beide Methoden bei Ozon mit allen Organismen vergleichbare Messwerte liefern. Somit lässt sich eine Desinfektion mit Ozon sowohl mit qPCR als auch mit der PMA-qPCR nachweisen.

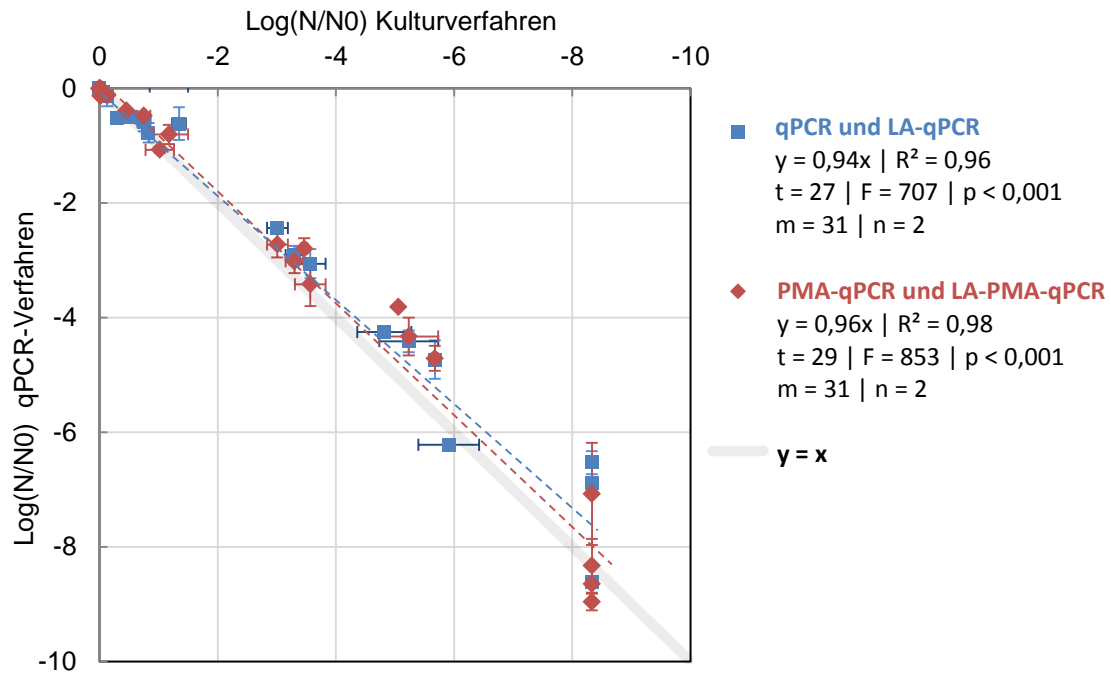


Abbildung 92: Vergleich der Ergebnisse von qPCR-Verfahren ohne (blau) und mit PMA (rot) mit dem Kulturverfahren von mit Ozon behandelten Proben (PhiX174, MS2, *E. coli*, *P. aeruginosa*). Datenpunkte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen dar, die je mittels Doppelbestimmung quantifiziert wurden.

3.3.5 Fazit Desinfektionsverfahren

Viren (phiX174, MS2) und Bakterien (*E. coli*, *P. aeruginosa*) wurden mit Chlor, Ozon, UV und Hitze inaktiviert und mit molekularbiologischen und kulturellen Verfahren quantifiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, bei desinfizierten Proben mit qPCR-Verfahren vergleichbare Messwerte wie im Kulturverfahren zu erhalten. Der Erfolg der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien sowie infektiösen und nicht infektiösen Viren ist stark von der Desinfektionsmethode und Dosis abhängig. So lässt sich eine **Ozonung** oder **thermische Desinfektion** sehr gut mittels qPCR bzw. LA-PMA-qPCR sowohl bei Viren als auch bei Bakterien nachweisen. Für den Nachweis von Bakterien ist auch die Durchflusszytometrie geeignet. Beim Einsatz von **Chlor** gibt es vor allem im niedrigen Konzentrationsbereich große Unterschiede zwischen molekularbiologischen und kulturellen Verfahren. Der Desinfektionserfolg bei **UV-Strahlung** lässt sich bei Viren mittels qPCR und Rückrechnung auf die Genomgröße ermitteln. Bei Bakterien ist dies aufgrund der Genomgröße nicht möglich. In der Durchflusszytometrie kann eine UV-Desinfektion von Bakterien ebenfalls nicht mit PI bestimmt werden.

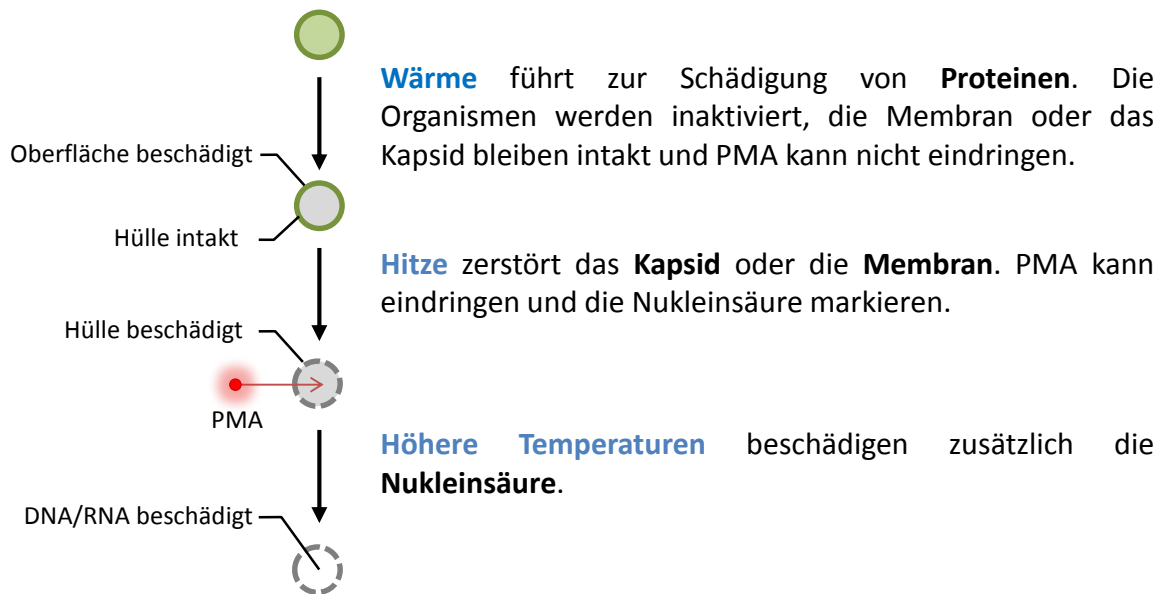
Generell führt der Einsatz der Farbstoffe PI und PMA zu einem vergleichbaren Ergebnis in den jeweiligen Methoden (Durchflusszytometrie bzw. PMA-qPCR). Durch die Charakteristika der Messmethode ergeben sich dabei Einschränkungen: Im jetzigen Entwicklungsstand kann die Durchflusszytometrie nicht für Viren eingesetzt werden. Außerdem lassen sich in dieser Methode bei UV-Desinfektion mit den getesteten Methoden keine Rückschlüsse über lebende Bakterien treffen. Dies ist in der qPCR durch ein Einsatz langer Amplifikate möglich. Die Erkenntnisse wurde in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Eignung von Durchflusszytometrie und LA-PMA-qPCR zum Nachweis der Reduktion von Bakterien und Viren in verschiedenen Desinfektionsverfahren.

Desinfektionsverfahren	qPCR lange Amplifikate + PMA	Durchflusszytometrie SYBR Green I + Propidiumiodid
Hitze	gut geeignet	geeignet
UV	Nur bei Viren geeignet	nicht geeignet
Chlor	Nicht für niedrige Konzentrationen geeignet	Nicht für niedrige Konzentrationen geeignet
Ozon	gut geeignet	geeignet

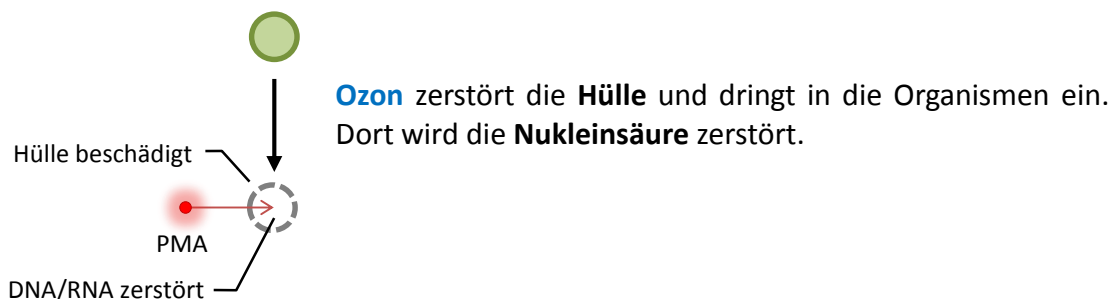
Somit konnte durch die Versuche erfolgreich dargestellt werden, welches molekularbiologische Verfahren am besten geeignet ist, um zwischen lebenden und toten Organismen nach einer Desinfektion mit Hitze, Ozon, Chlor und Niederdruck-UV-Strahlung

differenzieren zu können. Die Ergebnisse der jeweiligen Methoden lassen Rückschlüssen auf die Wirkungsmechanismen zu, die in folgenden Abbildungen nochmal zusammengefasst dargestellt sind. Statt PMA kann auch PI (Durchflusszytometrie) eingesetzt werden.



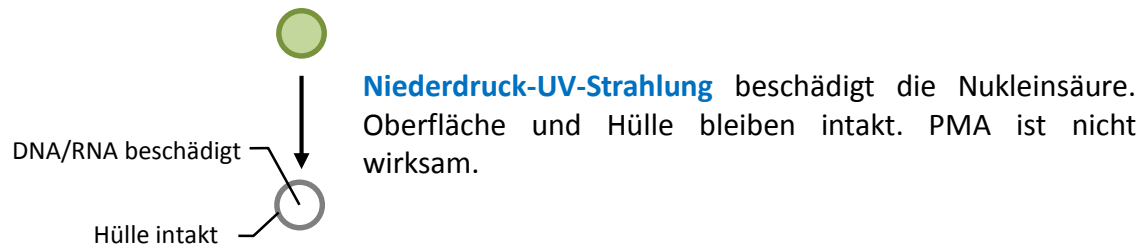
Nachweismethode: LA-PMA-qPCR

Hitze beschädigt die Hülle von Bakterien und Viren. Die Nukleinsäure kann so durch PMA markiert werden. Genomschäden durch Hitze können durch lange Amplifikate besser erfasst werden.



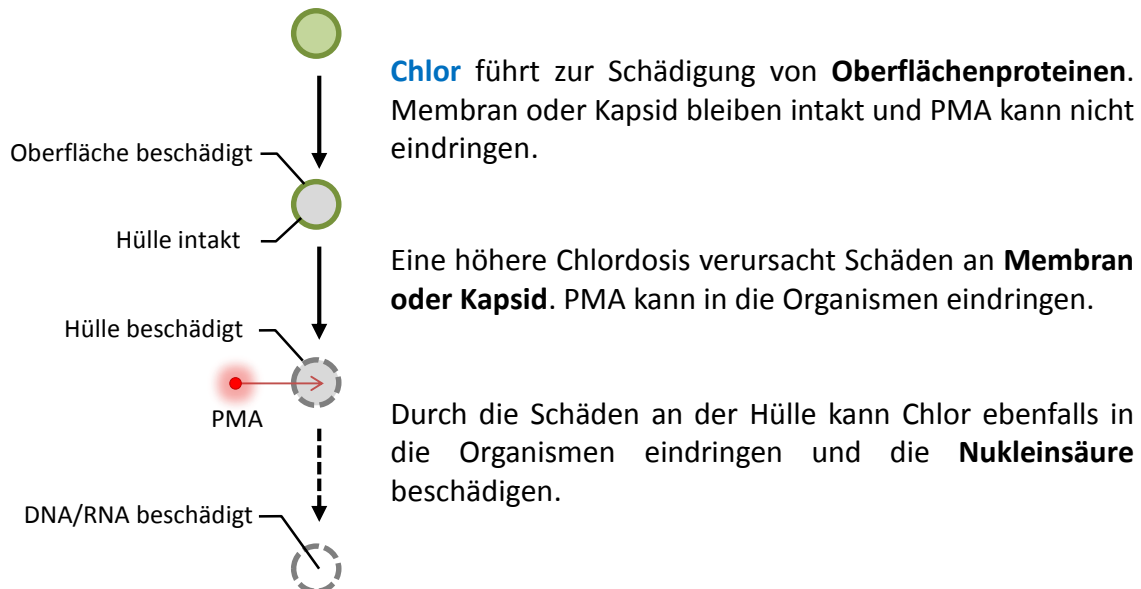
Nachweismethode: qPCR

Da die Nukleinsäure durch Ozon zerstört wird, kann eine Behandlung durch die qPCR nachgewiesen werden. PMA oder lange Amplifikate werden nicht benötigt.



Nachweismethode: LA-qPCR

Da die Hülle nicht beschädigt wird, kann PMA nicht in die bestrahlten Organismen eindringen. Durch die Schäden am Genom steigt die Reduktion mit der Amplifikatgröße. Bei Viren lässt die direkte Abhängigkeit der Reduktion von der Amplifikatgröße eine Berechnung der Infektiosität zu.



Nachweismethode: LA-PMA-qPCR

Durch PMA und lange Amplifikate kann in der qPCR eine höhere Reduktion erreicht werden. Schäden an Proteinen bei niedrigen Chlorkonzentrationen können nicht erfasst werden.

3.4 Integration der Lebend/tot-Unterscheidung in ein Hygiene-online-Monitoring

Im BMBF Projekt EDIT wurde ein Modellsystem zur schnellen Konzentration von Trink- und Rohwasser mit anschließender molekularbiologischer Detektion entwickelt (s. 2.7 S. 45). Durch den molekularbiologischen Nachweis wird die Detektion von Viren und Bakterien ermöglicht, deren Nachweis mit Kulturverfahren viel Zeit in Anspruch nehmen würde, oder für die kein Kulturverfahren zur Verfügung steht. Allerdings wird bei einem molekularbiologischen Nachweis nicht zwischen lebend und toten Organismen unterschieden (s. 2.6.2.4). Um hygienisch relevante Daten liefern zu können, muss im System eine solche Differenzierungsmöglichkeit integriert werden. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

Die Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA kann nicht bei einem großen Probevolumen eingesetzt werden, da eine bestimmte PMA-Konzentration eingestellt werden muss, um tote Organismen vom Nachweis ausschließen zu können (vgl. 2.6.2.5). Somit muss die Zugabe von PMA nach der Aufkonzentrierung erfolgen. Im Extraktionsschritt wird die Nukleinsäure der Organismen für den folgenden molekularbiologischen Nachweis zugänglich gemacht. Die PMA-Behandlung muss somit vor der Extraktion erfolgen, da dies der letzte Zeitpunkt ist, an dem die Organismen intakt vorliegen. Die sinnvollste Integrationsmöglichkeit ist das Lab-on-Chip-Modul, in dem eine Mikro-Aufkonzentrierung und die Extraktion erfolgt.

Im Projekt wurden alle Module separat von den jeweiligen Projektpartnern entwickelt. In Experimenten wurde geprüft, ob eine PMA-Behandlung und die Lebend/tot-Unterscheidung mit den einzelnen Modulen des EDIT Systems realisierbar sind. Folgende Schnittstellen wurden untersucht:

- **Aufkonzentrierung**

In der Aufkonzentrierung wird das Volumen der Probe eingeengt. Die Organismen dürfen dabei nicht beschädigt werden, da sie sonst als „tot“ von der Detektion ausgeschlossen werden.

- **Lab-on-Chip**

PMA muss innerhalb des Chip-Systems zugegeben werden. Somit muss die Reaktion und auch die Aktivierung von PMA innerhalb des Chips erfolgen. Danach muss überschüssiges PMA wieder von der Probe getrennt werden.

- **Isothermale Amplifikation**

In dieser Arbeit wurde zur Entwicklung der Lebend/tot-Differenzierung nur die qPCR eingesetzt. Ob PMA auch bei einer isothermalen Amplifikation wirksam ist, war nicht bekannt.

Ziel der Entwicklung ist die Integration der PMA-basierten Lebend/tot-Unterscheidung in die Module des Hygiene-online-Monitoring-Systems. Die durchgeführten Versuche sind in Abbildung 93 mit dem schematischen Aufbau des HOLMs dargestellt.

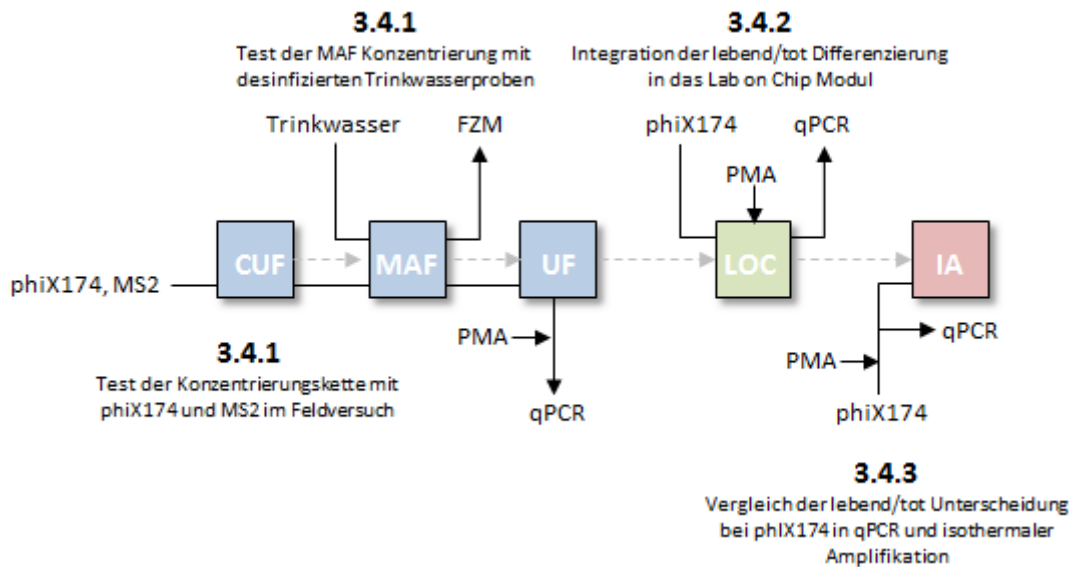


Abbildung 93: Schema der Module im *Hygiene online Monitoring* (HOLM) und der durchgeführten Versuche. CUF: Kontinuierliche Ultrafiltration, MAF: Monolithische Adsorptionsfiltration, UF: Ultrafiltration, LOC: Lab on Chip, IA: isothermale Amplifikation.

3.4.1 Konzentrierung

Die Aufkonzentrierung des HOLM-Systems besteht aus mehreren Stufen, in denen das Probevolumen jeweils eingegrenzt wird (s. 2.7). Für die anschließende Lebend/tot-Differenzierung ist essentiell, dass die Organismen bei der Konzentrierung nicht beschädigt oder so verändert werden, dass ein Nachweis nicht mehr möglich ist.

Monolithische Adsorptionsfiltration (MAF)

Im ersten Versuch wurde geprüft, ob eine Lebend/tot-Differenzierung mit Bakterien nach einer Aufkonzentrierung mittels monolithischer Adsorptionsfiltration (MAF) durchgeführt werden kann. Für diesen Versuch wurden mit Diethylaminoethan funktionalisierte MAF-Disks freundlicherweise von der TUM zur Verfügung gestellt.

Ein Liter Trinkwasser (Karlsruhe) wurde analog zu den Desinfektionsexperimenten (s. 6.7 ff.) mit Ozon (1 mg/L, 5 mg/L), Chlor (0,2 mg/L, 1,2 mg/L), UV (100 J/m², 400 J/m²) und Hitze (60 °C, 90 °C) behandelt. Jeweils zwei 100-mL-Aliquots wurden mittels MAF und 0,45-µm-Filtern auf ein Endvolumen von 20 mL aufkonzentriert. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Generell zeigt sich bei den MAF-Filter ein geringeres Signal als bei den 0,45- μm -Filtern (Abbildung 94). Bei beiden Chlor und Ozonkonzentrationen sowie bei 90 °C konnten keine lebenden Organismen mehr detektiert werden. Die mit 60 °C und Niederdruck-UV-Strahlung behandelten Proben zeigten keine oder geringfügige Reduktion.

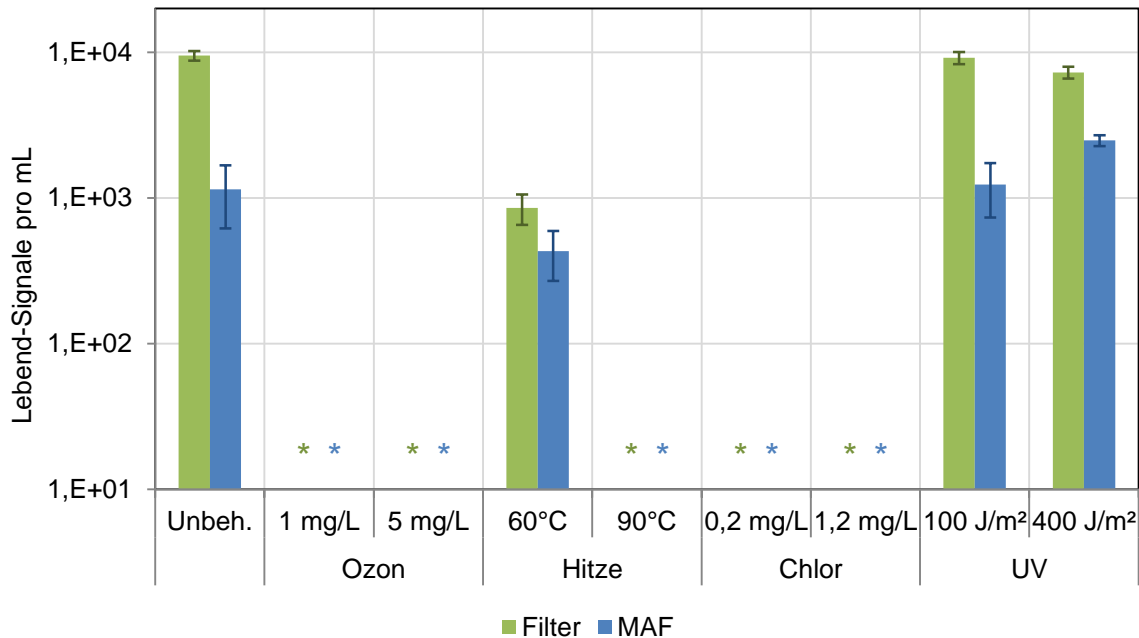


Abbildung 94: Durchflusszytometrische Ergebnisse von mit verschiedenen Methoden desinfiziertem Trinkwasserproben. Die Proben wurden mittels MAF und 0,45- μm -Filter aufkonzentriert ($n = 3$). * Werte unter LOQ (10 intakte Zellen pro mL).

Die Wirkung und Effizienz der Lebend/tot-Unterscheidung in den Versuchen entspricht den Beobachtungen der vorherig beschriebenen Desinfektionsversuche. Auch wenn mit der Konzentrierung mittels MAF generell weniger Bakterien detektiert wurden, so zeigen die Ergebnisse dennoch, dass eine Lebend/tot-Unterscheidung mit dieser Konzentrierungsmethode möglich ist.

Kombinierte Aufkonzentrierung

Im Rahmen von Feldversuchen wurden im EDIT-Projekt Spikingversuche an einer Teststrecke in Kooperation mit den Berliner Wasserbetrieben und der TUM durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 95 schematisch dargestellt. Für diesen Versuch wurde ein großes Volumen der Bakteriophagen MS2 und phiX174 kultiviert (jeweils 4 L nach 6.3.2). Trinkwasser in einem Kunststoffkanister wurde mit Bakteriophagen versetzt und mit einer Druckpumpe über eine Schlauchleitung in die Teststrecke gepumpt. In den Versuchen wurden 10^{12} , 10^{10} , 10^8 und 10^6 Phagen (PFU) eingesetzt (jeweils zwei Ansätze). Nach jeweils 100, 500 und 900 Litern Durchfluss wurde eine Probe direkt aus der Wasserleitung über einen Hahn in 15-mL-Zentrifugengefäße abgefüllt (Messpunkt M).

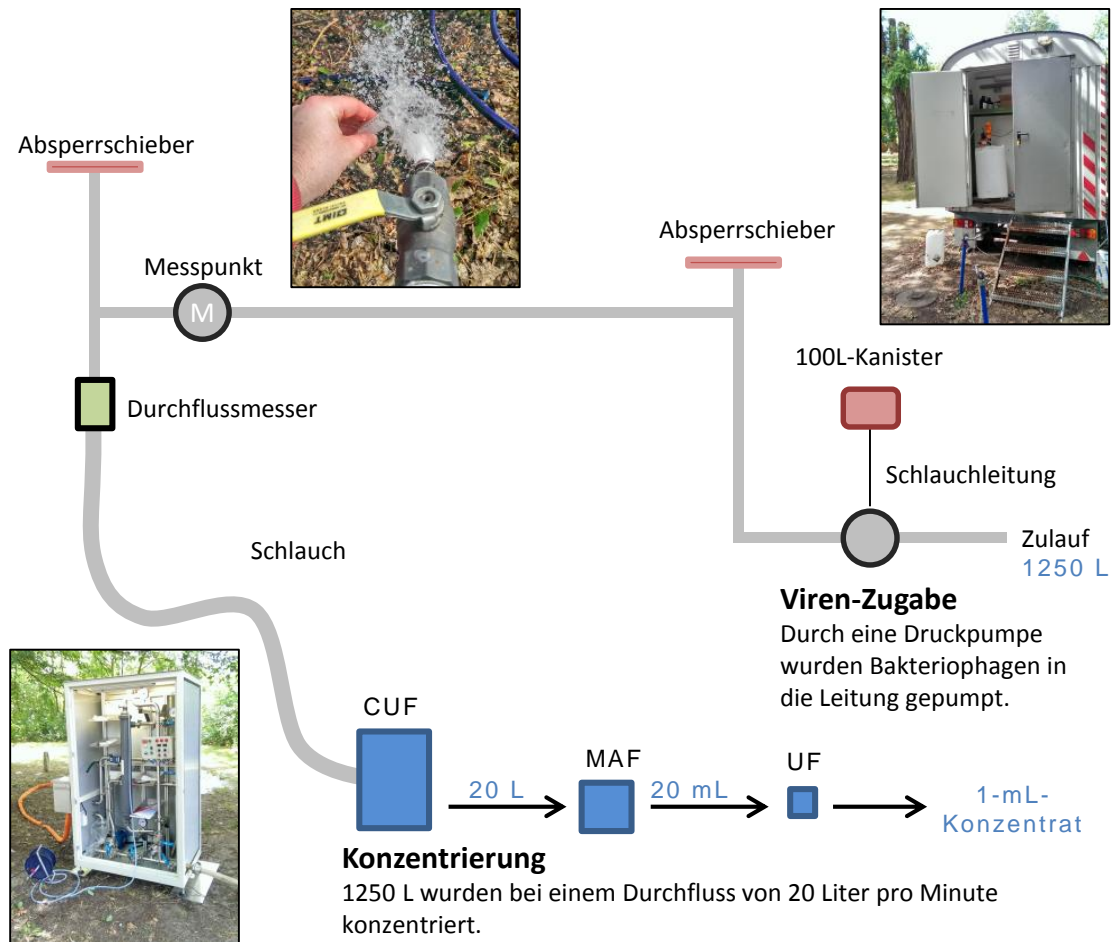


Abbildung 95: Aufkonzentrierung von mit Bakteriophagen gespicktes Trinkwasser mit dem EDIT-System. CUF: Kontinuierliche Ultrafiltration, MAF: Monolithische Adsorptionsfiltration, UF: e Ultrafiltration.

Jeweils 1250 Liter wurden bei einer Flussrate von etwa 20 Liter pro Minute mittels kontinuierlicher Ultrafiltration (CUF) auf 20 Liter konzentriert. Das Eluat wurde danach vor Ort mittels monolithischer Adsorptionsfiltration (MAF) weiter auf 20 mL und danach im Labor der TUM mittels zentrifugaler Ultrafiltration (UF) auf ein Volumen von 1 mL eingengt. qPCR- und PMA-qPCR-Analysen wurden in Karlsruhe durchgeführt. Die Proben wurden extrahiert und mit der LA-PMA-qPCR (1063 bp) und der LA-qPCR analysiert. Um eine Inhibition durch den Elutionspuffer auszuschließen, wurden die Eluate von MAF und zentrifugaler Ultrafiltration ebenfalls in zehnfachen und hundertfachen Verdünnung in die qPCR eingesetzt.

Generell steigt die Konzentration der Bakteriophagen nach den einzelnen Konzentrationsstufen an (Abbildung 96, A). In den Proben des Zulaufs ist der Unterschied zwischen der Gesamtzahl der Phagen (qPCR) und intakten Bakteriophagen (PMA-qPCR) gering. Nach der kontinuierlichen Ultrafiltration (CUF) wurden knapp zwei Log-Stufen weniger intakte Phagen detektiert. Die Proben nach der Aufkonzentrierung mittels MAF und UF zeigen wiederum nur eine geringe Zahl an beschädigten Phagen an.

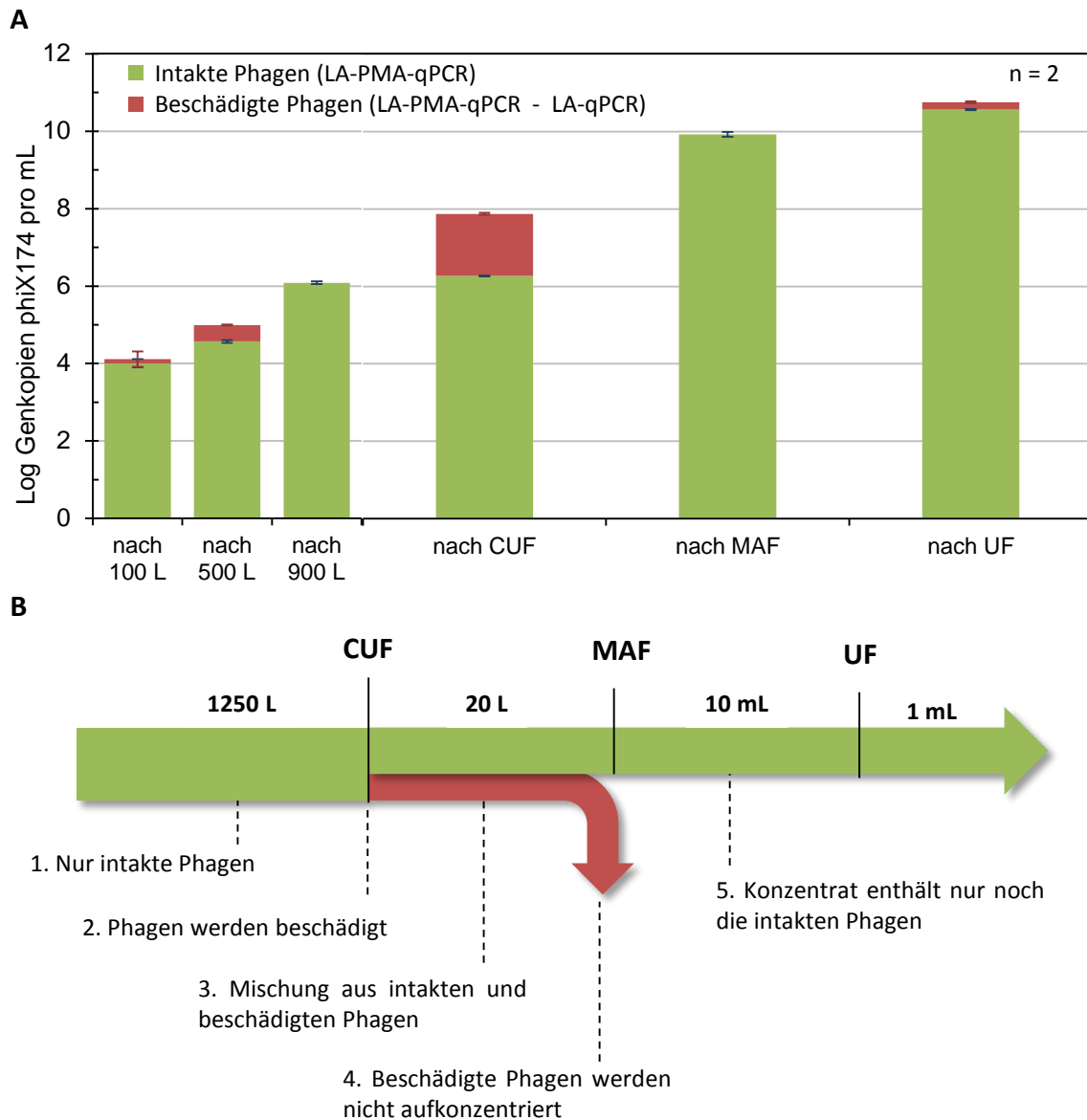


Abbildung 96: Intakte und beschädigte phiX174 im Zustrom der CUF (Kontinuierliche Ultrafiltration) nach 100, 500 und 900 Liter Durchfluss und nach den Aufkonzentrierungsstufen CUF, MAF (monolithische Adsorptionsfiltration) und UF (Zentrifugale Ultrafiltration).

Wird die Zahl der Phagen auf das Gesamtvolumen rückgerechnet, so werden nach der MAF etwa 2 Log-Stufen weniger phiX174 nachgewiesen. Dies ist in etwa der Teil der Phagen, der in der Probe nach der CUF als beschädigt detektiert wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass die Bakteriophagen beispielsweise durch mechanische Kräfte durch die hohe Fließgeschwindigkeit in der CUF beschädigt wurden. Die beschädigten Bakteriophagen oder entsprechende freie Phagen-DNA wurde durch andere Ladungseigenschaften nicht mehr in der MAF konzentriert (Abbildung 96, B). Für die Aufkonzentrierungskette und die Lebend/tot-Unterscheidung muss die CUF somit beispielsweise mit einer niedrigeren Fließgeschwindigkeit betrieben werden, um die Organismen nicht zu beschädigen.

Ansonsten ist ein falsch negatives Ergebnis entweder durch eine Lebend/tot-Unterscheidung oder den Verlust der beschädigten Phagen in der MAF zu erwarten. Gleichzeitig zeigt dieser Versuch allerdings auch, dass in der MAF nur intakte Phagen konzentriert werden. Dies ist ein enormer Vorteil, da bereits innerhalb der Aufkonzentrierung eine gewisse Lebend/tot-Differenzierung stattfindet und die beschädigten – hygienisch nicht relevanten - Phagen in der weiteren Prozesskette nicht beachtet werden müssen. Inwiefern sich dieser Effekt bei desinfizierten Organismen bzw. generell bei Bakterien auswirkt, ist nicht geklärt. So ist es denkbar, dass nur stark beschädigte Phagen oder freie Nukleinsäure nicht konzentriert werden. Für die restlichen, toten Organismen muss somit weiterhin eine Differenzierung auf qPCR-Ebene stattfinden.

Die Versuche zeigen, dass eine Differenzierung zwischen intakten und beschädigten Organismen auch nach einer Aufkonzentrierung mit der LA-PMA-qPCR möglich ist. Das Lebend/tot-Modul ist somit mit der Konzentrierung kompatibel.

3.4.2 Lab-on-Chip-Modul

Die Funktion des Lab-On-Chip-Moduls im Projekt EDIT ist die Extraktion und die Aufreinigung der Nukleinsäure. Der eingesetzte Mikrofluidik-Chip (Abbildung 97) besteht aus zwei Flüssigkeitskammern (Probe- und Elutionskammer), die von einem Polyacrylamidgel getrennt sind. In jeder Kammer befindet sich ein elektrischer Leiter, der unter Spannung gesetzt werden kann. In einem elektrischen Feld bewegt sich die negativ geladene Nukleinsäure zur Kathode. Dabei passiert sie das Polyacrylamidgel und wird durch die Passage durch das Gel aufgereinigt: Störstoffe bleiben dabei im Gel hängen oder haben ein anderes Laufverhalten als die Nukleinsäure. Die Chips und eine Spannungsquelle wurden vom IMTEK Freiburg zur Verfügung gestellt. Da kein Fluidik-System zur Verfügung stand, wurden die Chips manuell mit 10- μ L-Pipetten befüllt.

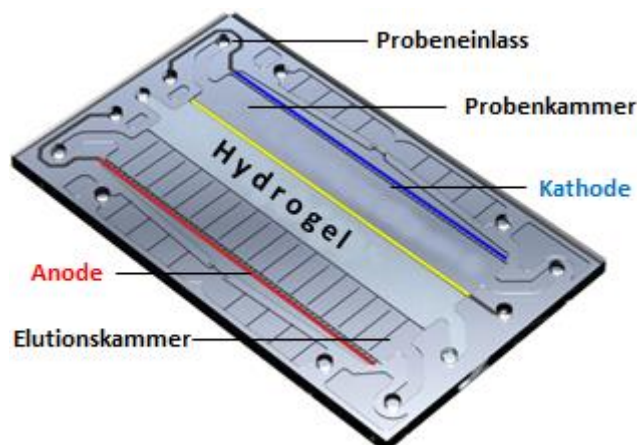


Abbildung 97: Im Lab-on-Chip-Modul eingesetzter Mikrofluidik-Chip.

In diesen Chip sollte die Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA-Behandlung durchgeführt werden. Wichtig für einen funktionierenden Nachweis mit der PMA-qPCR ist das Entfernen von überschüssigem PMA nach der Behandlung. Normalerweise geschieht dies innerhalb der Extraktion durch Waschschritte. PMA wirkt als starker PCR-Inhibitor – ohne Aufreinigung wird - selbst wenn nur intakte Organismen vorliegen - kein oder ein zu geringes Signal in der qPCR gemessen. Somit stellt sich die Frage, ob PCR von der Nukleinsäure durch ein elektrisches Feld in einem Gel aufgereinigt werden kann. PMA besitzt eine doppelt positive Ladung und sollte im elektrischen Feld in Richtung der Kathode wandern. Um das Laufverhalten von DNA und PMA im Gel zu untersuchen, wurden zunächst Versuche in einem Agarosegel durchgeführt.

Verhalten von PMA-Proben im elektrischen Feld

Nukleinsäure eines qPCR-Produktes des Bakteriophagen phiX174 (250 bp) wurde unterschiedlich behandelt, um bestimmte Mischungen von Organismen in Proben nachzustellen (Tabelle 28). Die Proben wurden in ein 0,5 prozentiges Agarosegel eingesetzt. Zusätzlich wurde unbehandeltes und aktiviertes PMA (100 μ M) als Probe auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 28: Proben und deren Zusammensetzung für den Test der Gelpassage.

Probe	Zusammensetzung	Simulation von
A	nicht aktiviertes PMA	überschüssiges PMA
B	aktiviertes PMA	überschüssiges PMA
C	DNA	intakte Organismen (Positivkontrolle ohne PMA)
D	aktiviertes PMA und DNA (nicht gekoppelt)	intakte Organismen
E	DNA gekoppelt mit PMA	beschädigte Organismen
F	Mischung von D und E	Mischung aus intakten und beschädigten Organismen

Am Gel wurde für 15 Minuten eine Spannung von 80 Volt angelegt und danach eine Färbung mit Ethidiumbromid durchgeführt. Das Gel wurde in einer UV-Kammer fotografiert (Abbildung 98). Wie vermutet läuft sowohl nicht aktiviertes (A) als auch aktiviertes PMA (B) durch die positive Ladung zur Kathode. Unbehandelte DNA (C), DNA mit aktiviertem PMA (D) und DNA mit aktiviertem PMA und mit PMA verbundene DNA (F) zeigen eine Bande in gleicher Höhe. Mit PMA verbundene DNA (E) ist im Gel nicht sichtbar.

Um die Nukleinsäure zu quantifizieren, die sich durch das Gel bewegt hatte, wurden die Bereiche in Höhe der positiven Banden ausgeschnitten (Abbildung 98, gestrichelt). Die Gelstücke wurden mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland)

aufgereinigt und die Proben mit der qPCR (250 bp) quantifiziert. In Abbildung 98 sind die qPCR-Ergebnisse als Anteil des Signales der Positivkontrolle (DNA ohne PMA) dargestellt. Unbehandelte DNA (C, intakte Zellen) zeigte in der qPCR nach der Gelpassage die höchste Konzentration (definiert als 100 %). Die Proben, die PMA enthalten hatte, lieferten schwächere Messwerte von 37 % (D) bzw. 58 % (F). Mit PMA gekoppelte DNA (E, beschädigte Zellen) zeigte nur ein sehr geringes Signal in der qPCR (0,6 %).

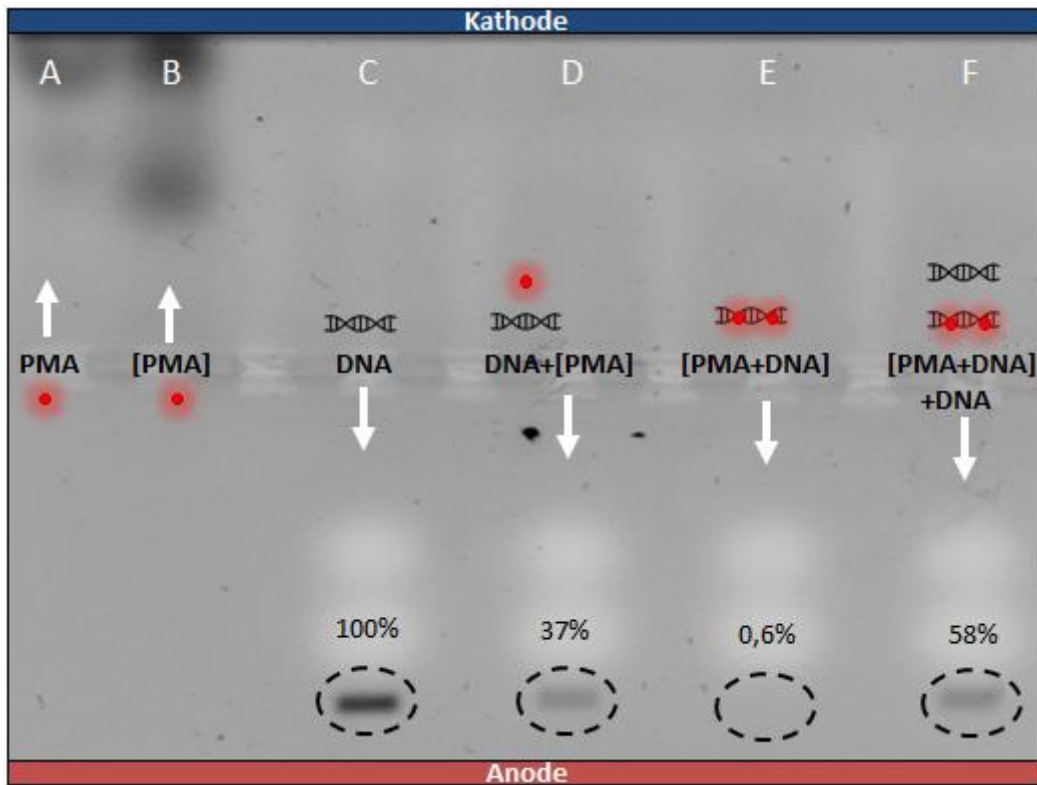


Abbildung 98: Gelextraktion von Mischungen aus phiX174 DNA und PMA (rot). Eingeklammerte Proben wurden mit Licht aktiviert. Schwarze gestrichelte Kreise stellen die extrahierten Positionen dar. Prozentuale Angaben entsprechen dem qPCR-Signal der extrahierten DNA an den jeweiligen Stellen in Relation zur Positivkontrolle ohne PMA an Position C.

Generell wäre zu erwarten gewesen, dass die mit PMA gekoppelte DNA kein Signal in der qPCR liefert. In diesem Experiment lässt sich eine Kontamination der Proben untereinander nicht ausschließen, da sich alle Proben letztendlich in derselben Gelapparatur befinden. Außerdem war das gewählte Amplifikat zu klein für eine entsprechend starke Inhibition. Mit PMA versetzte Proben zeigen ein verändertes Laufverhalten. Dieser Effekt entsteht durch Konformationsänderungen der Nukleinsäure (Sekundärstruktur) durch das PMA und nicht, wie sich vermuten lässt, durch die zusätzliche positive Ladung (Sigmon and Larcom, 1996). Mischungen aus PMA und DNA können somit auch nach einer Gelpassage in der qPCR detektiert und von freiem PMA getrennt werden.

Test der Aufreinigung im Chip mit PMA-qPCR-Proben

Für die bessere Visualisierung der Proben innerhalb des Chips wurde ein einfaches Halterungssystem auf Basis eines Objektträgers für die Mikroskopie konstruiert (Abbildung 98). Neben der direkten optischen Kontrolle der Kontakte erlaubt die Halterung auch das Einspannen in den Objektisch eines Mikroskops und die Belichtung des Chips selbst für die Aktivierung von PMA.

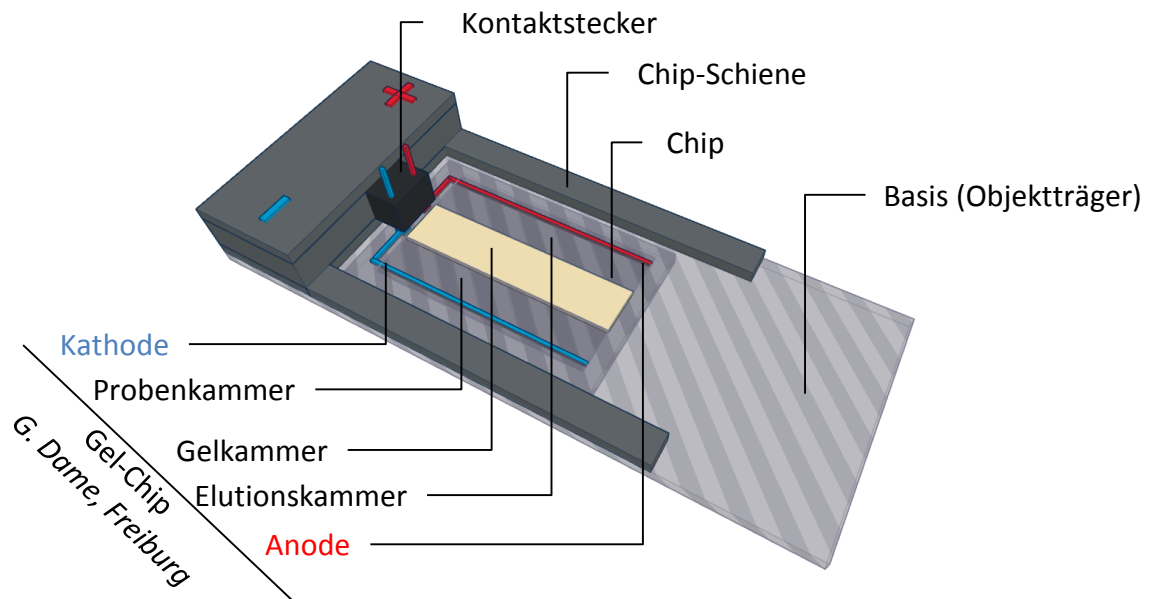


Abbildung 99: Modellzeichnung der Mikrochiphalterung mit Plug-In-Kontaktstecker und Leitung zur Spannungsversorgung.

Da die Nukleinsäure im Chip nicht durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden konnte, wurden in einem initialen Versuch mit dem Farbstoff Bromphenolblau gearbeitet. Der Farbstoff ist, wie Nukleinsäure, negativ geladen und bewegt sich somit im elektrischen Feld in die gleiche Richtung. PMA und Bromphenolblau wurden in entgegengesetzte Kammern des Mikrofluidik-Chips als Proben eingesetzt und eine Spannung angelegt. Nach einigen Minuten wurden die Farbstoffe entsprechend ihrer Ladung durch den Chip und das mittige Gel bewegt (Abbildung 100).

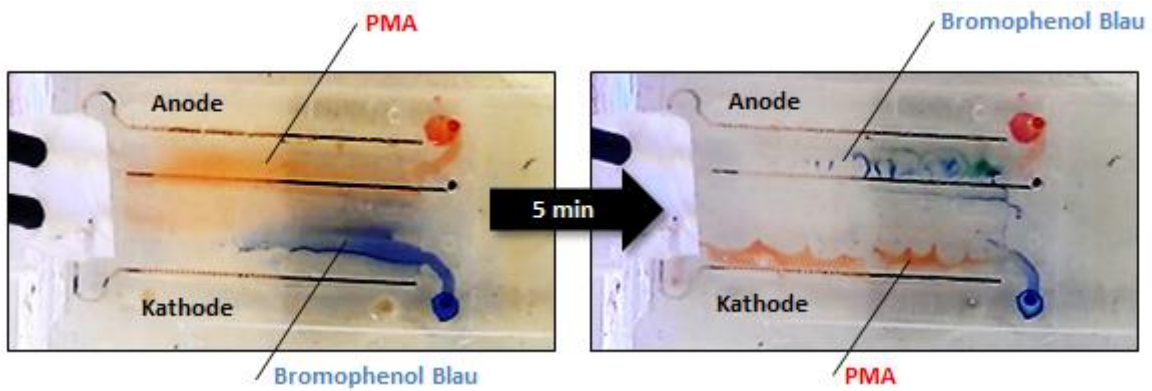


Abbildung 100: Mit Bromophenolblau und PMA beladener Chip vor und nach Anlegen eines elektrischen Feldes.

Nachdem das Verhalten von PMA und DNA im elektrischen Feld untersucht und die generelle Funktion des Mikrofluidik-Chips bestätigt wurde, konnten Tests mit Organismen durchgeführt werden. Proben mit unbehandelten und hitzebehandelten phiX174 ohne und mit PMA-Behandlung wurden in der qPCR (568 bp) gemessen. Ein Teil der Proben wurde vor der qPCR durch den Chip in der Gelpassage aufgereinigt (Abbildung 101). Ohne Gelpassage zeigt nur die Probe ohne PMA ein positives Signal. Unbehandelte, mit PMA versetzte Phagen ließen sich in der qPCR nicht nachweisen. Die gleiche Probe lieferte nach der Gelpassage ein Signal in der qPCR. Die qPCR der hitzebehandelten Phagen war mit und ohne Gelpassage generell negativ.

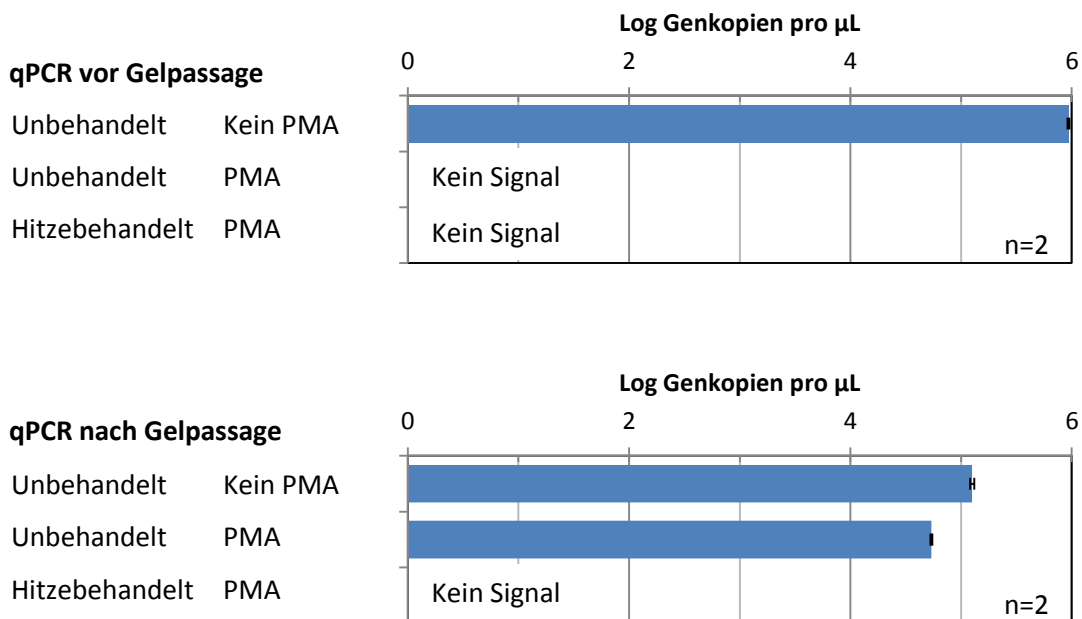


Abbildung 101: qPCR-Ergebnisse unbehandelter und hitzebehandelter Bakteriophagen mit und ohne PMA-Behandlung. Die Proben wurden direkt (oben) und nach einer Gelpassage im Chip (unten) gemessen.

Wie in vorherigen Versuchen gezeigt wurde, hat PMA kein Einfluss auf unbehandelte phiX174. Allerdings inhibiert das PMA in der Probe die Reaktion der qPCR. Ohne Aufreinigung werden somit auch unbehandelte phiX174 nicht detektiert. Durch das elektrische Feld im Mikrofluidik-Chip trennt sich das (nicht gebundene) PMA von der Nukleinsäure. Das Eluat aus dem Chip enthält somit nach der Gelpassage kein inhibierendes PMA mehr und die Nukleinsäure kann in der qPCR detektiert werden. Eine Aufreinigung der mit PMA versetzten Nukleinsäure ist somit durch die Gelpassage im Chip möglich.

3.4.3 Isothermale Amplifikation

Letzter Schritt der Prozesskette zur Detektion von Bakterien und Viren im HOLM-System ist die isothermale Amplifikation in Form einer RPA (Rekombinase Polymerase Amplifikation). Wie in der qPCR werden die Zielorganismen über die Nukleinsäure detektiert. Die Detektion findet dabei nicht in einem Reaktionsgefäß, sondern immobilisiert auf einem Mikrochip statt (s. 2.7). Es sollte geprüft werden, ob sich mit PMA in der isothermalen Amplifikation ebenfalls zwischen lebenden und toten Organismen unterscheiden lässt. Dieser Test wurde wie die Entwicklung der LA-PMA-qPCR mit Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten Organismen in einer Verdünnungsreihe durchgeführt (Prinzip s. Abbildung 35 auf S. 76). Die Extrakte der Proben wurden an die TUM geschickt und mit der isothermalen Amplifikation von Dr. Andreas Kunze und parallel dazu mit der qPCR (250 bp und 1063 bp) gemessen. Das in der isothermalen Amplifikation detektierte Fragment hatte eine Länge von 200 bp.

In den Ergebnissen der qPCR (Abbildung 102, links) zeigt sich bei beiden Amplifikatgrößen eine Reduktion entsprechend der Verdünnung der Proben. In der isothermalen Amplifikation (Abbildung 102, rechts) ist ebenfalls eine Reduktion des Messsignales zu erkennen. Dabei ist ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen der Konzentration intakter Organismen und der Signalstärke der isothermalen Amplifikation (bzw. des Chemilumineszenz-Signales) erkennbar.

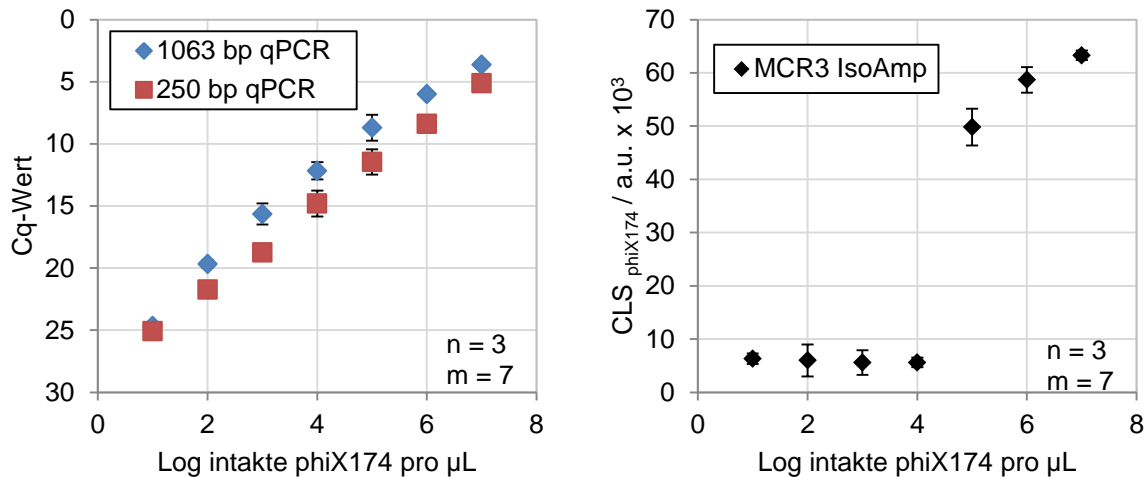


Abbildung 102: Ergebnisse aus isothermaler Amplifikation (Andreas Kunze, TUM) und qPCR einer Mischung aus unbehandelten und hitzebehandelten phiX174-Bakteriophagen. Die Konzentration hitzebehandelter Phagen ist in jeder Probe gleich, die Konzentration unbehandelter Phagen sinkt je Probe um den Faktor 10. CLS = Chemilumineszenz-Signal. (n = 3, m = 7).

Wie bereits in der Entwicklung gezeigt wurde, werden mit PMA in der qPCR nur die intakten Phagen detektiert – folglich sinkt das Messsignal entsprechend der Verdünnung intakter Phagen. Hätte PMA keine Funktionalität, so wäre der Messwert für alle Proben weitgehend identisch. In der RPA ist die Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA ebenfalls wirksam. Um die Proben entsprechend zu quantifizieren, ist eine entsprechende Kalibrierung der isothermalen Amplifikation nötig. Der Versuch zeigt jedoch deutlich, dass die Unterscheidung von intakten und hitzebehandelten Bakteriophagen mit PMA möglich ist.

Ein vergleichbares Experiment wurde von Chen et al. (2011) und in einer aktuellen Studie von Youn et al. (2017) mit Salmonella-Bakterien auf Lebensmitteln durchgeführt. In beiden Studien wurde eine LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) eingesetzt, um die Bakterien zu quantifizieren. Die Zellen wurden bei Chen et al. mit Hitze (100 °C) und bei Youn et al. mit Isopropanol behandelt. In den Studien konnten Kalibrierkurven (Abbildung 102) entsprechend mit vier bzw. sechs Messpunkten erstellt werden. Die Amplifikatlänge ist wie in dieser Arbeit eingesetzten RPA mit 127 bp und 228 bp ebenfalls kurz gewählt. Bisherige Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine größere Reduktion mit längeren Amplifikaten erreicht wird. In diesen Versuchen konnte eine Unterscheidung erfolgreich mit ungefähr 200 bp durchgeführt werden, wohingegen bei den Desinfektionsversuchen größere Amplifikate ein besseres Ergebnis lieferten. Wie bereits beschrieben wurde, kompensieren große Amplifikate eine geringe PMA-Verteilung auf der Nukleinsäure. Dies kann durch eine niedrige PMA-Konzentration oder geringer Permeabilität der beschädigten Zellen bedingt sein (z.B. durch die in dieser Arbeit eingesetzten Desinfektionsverfahren in geringer Dosis/Stärke). So sind kleinere Amplifikate bei entsprechender Beschädigung von Organismen und entsprechend hoher PMA-Konzentration (in den Studien 100 µM PMA mit zusätzlichem PMA-Enhancer) zumindest für die Erfassung von PMA nicht notwendig. Große

Amplifikate müssen aber dennoch zur Erfassung von Nukleinsäureschäden – beispielsweise bei UV Behandlungen – eingesetzt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Versuche, dass die Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA innerhalb der im HOLM eingesetzten isothermalen Amplifikation eingesetzt werden kann.

3.4.4 Fazit

Die Lebend/tot-Differenzierung konnte in allen drei Schnittstellen erfolgreich getestet werden:

- **Aufkonzentrierung**

Auch nach der Konzentrierung mittels Ultrafiltration und monolithischer Adsorptionsfiltration war eine Lebend/tot-Unterscheidung möglich.

- **Lab-on-Chip**

Überschüssiges PMA konnte durch die Gelpassage entfernt werden. Dieses würde sonst den folgenden Nachweis stören. Die Lebend/tot-Unterscheidung kann somit auch auf einem Mikrofluidik-Chip angewandt werden.

- **Detektion**

Durch die Behandlung mit PMA wurde in der isothermalen Amplifikation eine starke Signalreduktion erreicht. Eine Lebend/tot-Unterscheidung ist somit möglich.

Somit konnte die Integration der Lebend/tot-Unterscheidung in das im EDIT-Projekt entwickelte HOLM-System erfolgreich durchgeführt werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Trinkwasser muss so beschaffen sein, dass durch Wasser übertragene Krankheitserreger nicht in Konzentrationen vorliegen, „die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen“ (TrinkwV, 2001), § 5.1). Die Sicherstellung dieses Qualitätsmerkmals setzt Methoden zum Nachweis hygienisch relevanter Mikroorganismen voraus. In der Trinkwassermikrobiologie werden in der Routine Kulturverfahren eingesetzt, die auf dem Wachstum der Organismen auf Nährmedien beruhen. Da sich einige hygienisch relevante Organismen nur langsam vermehren, kann es Tage bis Wochen dauern, bis ein Ergebnis vorliegt. Mit molekularbiologischen Methoden wie der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) kann die DNA oder RNA von Organismen in wenigen Stunden vervielfältigt und somit nachgewiesen werden.

Die Nukleinsäure von Bakterien und Viren kann jedoch auch noch nach dem Tod oder der Inaktivierung intakt sein. Somit werden mit der qPCR ebenfalls Organismen nachgewiesen, die bereits – auch seit langer Zeit - tot sind. Für hygienische Bewertungen und Risikoeinschätzungen sind jedoch nur die Organismen von Belang, die eine Infektion auslösen können. Folglich setzt der Einsatz der qPCR für hygienische Fragestellungen eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen voraus.

Seit einigen Jahren werden in der Molekularbiologie interkalierende Farbstoffe wie Propidiumiodid-Monoazid (PMA) zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen eingesetzt. PMA dringt in beschädigte Organismen ein und lagert sich an die DNA oder RNA. Mit PMA markierte DNA oder RNA kann in der qPCR nicht mehr nachgewiesen werden – somit werden beschädigte Organismen von der qPCR ausgeschlossen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer molekularbiologischen Lebend/tot-Differenzierung für Viren und Bakterien. Diese konnte mit den bereits im Labor verfügbaren und in vorherigen Forschungsprojekten entwickelten qPCR-Nachweisverfahren nicht erfolgreich durchgeführt werden. In diesen Verfahren wurden ausschließlich kleine Fragmente (Amplifikate) in der qPCR nachgewiesen. Wird die DNA eines toten Bakteriums durch PMA markiert, so verteilen sich die PMA-Moleküle im Genom des Bakteriums. Wird nur ein kleiner Teil der DNA nachgewiesen, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein PMA-Molekül erfasst wird gering. Mit kleinen Amplifikaten von etwa 100 Basenpaaren konnten in dieser Arbeit sogar autoklavierte Viren nachgewiesen werden.

Um eine Lebend/tot-Differenzierung zu ermöglichen, wurden deswegen neue qPCR-Nachweisverfahren mit langen Amplifikaten über 1000 Basenpaaren entwickelt – die *long*

Amplicon qPCR (LA-qPCR). Der Fokus lag dabei auf den Bakterien *E. coli*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa* sowie den Bakteriophagen phiX174 und MS2. Die Behandlung von PMA wurde für diese Organismen optimiert.

In den Versuchen konnte zunächst gezeigt werden, dass intakte (lebende) Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterschiedlich auf PMA reagieren. Bei Gram-negativen Bakterien drang PMA auch in höheren Konzentrationen nicht oder nur sehr gering ein. Bei unbehandelten Gram-positiven Bakterien jedoch zeigte PMA auch in geringen Konzentrationen eine starke Reduktion in der qPCR. Ein so angelegter Vergleich zwischen Gram-positiven und -negativen Bakterien wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Trotz des negativen Effektes von PMA auf unbehandelte Zellen konnte für alle Organismen eine Kalibrierung mit Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten Bakterien und Viren durchgeführt werden. In den meisten Studien wird in der PMA-Behandlung nur eine geringe Signalreduktion von wenigen Log-Stufen dargestellt. Extreme Verhältnisse von toten und lebenden Zellen werden nur in wenigen Studien erfolgreich detektiert. In dieser Arbeit konnten bis zu sechs Log-Stufen (99,9999 %) toter Zellen durch PMA von der qPCR ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse zeigen außerdem vergleichbare Messwerte mit dem Kulturverfahren. Die Entwicklung der Lebend/tot-Unterscheidung für Viren und Bakterien konnte somit erfolgreich durchgeführt werden.

In vielen Studien zur Lebend/tot-Unterscheidung wurde die PMA-qPCR ausschließlich bei mit hohen Temperaturen behandelten Bakterien angewandt. Inaktivierung mit Hitze verursacht vor allem Schäden an der Hülle, weswegen sich die Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA hier sehr gut demonstrieren lässt. Relevant für den Wasserbereich sind jedoch vor allem Desinfektionsverfahren wie Chlor, Ozon und UV-Strahlung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, welche molekularbiologische Methode am besten zur Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien sowie infektiösen und nicht infektiösen Viren geeignet ist.

Ozonbehandelte Bakterien und Viren konnten mit der qPCR und der PMA-qPCR sowohl mit langen als auch mit kurzen Amplifikaten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stimmten dabei mit den Kulturverfahren überein. Somit reicht eine einfache qPCR für den Nachweis aus, Modifikationen wie lange Amplifikate oder PMA werden nicht benötigt. Bei einer Desinfektion mit Chlor zeigten sich Unterschiede zwischen PMA-qPCR, LA-PMA-qPCR und Kulturverfahren. So konnte eine Inaktivierung von Bakterien oder Viren bei geringen Chlorkonzentrationen nur mit Kulturverfahren nachgewiesen werden. Erst bei höheren Chlorkonzentrationen konnte in der LA-PMA-qPCR zwischen intakten und beschädigten Organismen unterschieden werden.

Bei der in vielen Studien eingesetzten Inaktivierung mit Hitze konnte mit der LA-PMA-qPCR und mit dem Kulturverfahren vergleichbare Messwerte erzielt werden. Der Einsatz von großen Amplifikaten zeigte zusätzlich auch ohne PMA eine Schädigung der Nukleinsäure, deren Ausmaß direkt mit der Behandlungsintensität korreliert.

Bei einer Desinfektion mit Niederdruck-UV-Strahlung hatte die Behandlung mit PMA keinen Einfluss auf die Detektion. Jedoch konnten die Schäden der UV-Strahlung durch den Einsatz unterschiedlicher Amplifikatlängen erfasst werden. Bei Viren konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass sich die Reduktion der Infektiosität anhand eines qPCR-Ergebnisses berechnen lässt. Grundlage hierfür sind mathematische Zusammenhänge zwischen der Reduktion, dem betrachteten Genomabschnitt und der UV-Dosis. Diese Methode ermöglicht somit einen sehr schnellen Nachweis einer UV-Desinfektion mit der qPCR.

Der Erfolg einer Lebend/tot-Differenzierung ist somit vor allem von der Art abhängig, wie ein Bakterium oder Virus inaktiviert wurde. In dieser Arbeit konnten praxisrelevante Desinfektionsverfahren erfolgreich mit den entwickelten Methoden verglichen werden. So wurde gezeigt, welches Verfahren sich am besten für eine Lebend/tot-Unterscheidung eignet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie erfolgreich als neue Methode am TZW Karlsruhe etabliert und konnte vergleichend in den Desinfektionsversuchen eingesetzt werden. Die Lebend/tot-Unterscheidung wurde in der Durchflusszytometrie durch den Farbstoff Propidiumiodid ermöglicht. Im Vergleich zur qPCR erlaubt die Durchflusszytometrie eine schnellere Messung von Bakterien in ungefähr 15 Minuten, die Methode ist allerdings ohne den Einsatz von Sonden unspezifisch. Generell lässt sich die Durchflusszytometrie für das schnelle Erfassen der Gesamtbakterienzahl oder für Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung einsetzen, wohingegen die sich die qPCR für einen spezifischen Nachweis von Bakterien, Viren und auch bestimmten Genen eignet. Die Lebend/tot-Unterscheidung mit interkalierenden Farbstoffen lässt sich in beiden Methoden durchführen, in der Durchflusszytometrie ist jedoch die Abgrenzung zwischen lebenden und toten Bakterien durch die unterschiedliche Aufnahme der Farbstoffe oftmals nicht eindeutig.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Integration der Lebend/tot-Unterscheidung in ein molekularbiologisches Hygiene-online-Monitoring-System (HOLM). Die Entwicklung wurde im Rahmen des Projektes EDIT von mehreren Projektpartnern durchgeführt. Das modulare System besteht aus einer mehrstufiger Aufkonzentrierung, Lab-on-Chip-Aufreinigungs- und Extraktionsmodul sowie einer Mikroarray-basierten isothermalen Detektion. Die PMA-Behandlung wurde für die entsprechenden Module geprüft.

Eine Lebend/tot-Unterscheidung mit PMA konnte auch nach der Aufkonzentrierung durchgeführt werden. Zusätzlich konnte in einem Feldversuch mit der LA-PMA-qPCR gezeigt

werden, ab welcher Stufe der Konzentrierung Bakteriophagen beschädigt und somit in einer sekundären Konzentrierung wahrscheinlich nicht weiter erfasst wurden. Die Kompatibilität des Lab-on-Chip-Systems mit der PMA-basierten Lebend/tot-Unterscheidung konnte in mehreren Versuchen erfolgreich dargestellt werden. So ließ sich die Nukleinsäure der Organismen durch ein angelegtes elektrisches Feld von dem zugegeben PMA reinigen und eine qPCR auch ohne Extraktion durchführen. Im letzten Baustein des HOLMs – der Mikroarray-basierten isothermalen Amplifikation – konnte durch die PMA-Behandlung erfolgreich zwischen lebenden und toten Organismen unterschieden werden.

Zusammenfassend konnte die molekularbiologische Lebend/tot-Unterscheidung erfolgreich entwickelt und in das HOLM-System integriert werden. Durch umfangreiche Versuche mit Desinfektionsverfahren konnten wichtige Informationen über den Nachweis einer Desinfektion – vor allem UV-Strahlung – gewonnen werden.

Besonders bei der Detektion von pathogenen Viren ist der Einsatz der qPCR vielversprechend. Die vorgestellten Modifikationen – PMA und lange Amplifikate – bieten die Möglichkeit, die Effizienz von Desinfektionsverfahren zu erfassen. Die LA-PMA-qPCR hat großes Potential, als schnelle Detektionsmethode für humanpathogene Viren parallel zur Erfassung der Indikatororganismen mit Kulturverfahren zur Kontrolle der hygienischen Bedingungen von Wasserressourcen zu dienen. Für den Einsatz in der Routine sind vor allem Standardisierungen und Validierungen nötig.

Die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit werden in mehreren Projekten weiter verfolgt. So wird die LA-qPCR zur Untersuchung der UV-Desinfektion mit modernen UV-LED Strahlern bei Bakterien und Viren eingesetzt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich anhand eines LA-qPCR-Ergebnisses die Reduktion durch UV-Strahlung im Kulturverfahren berechnen lässt. Die geringe Datengrundlage in der Literatur erlaubt nicht, den Erfolg dieses Konzeptes auch für andere Viren zu zeigen. Somit müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um die Anwendbarkeit der Methode für beispielsweise Adenoviren oder murine Noroviren zu untersuchen.

Mit der LA-PMA-qPCR soll außerdem die Reduktion von Viren, Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen bei einem Sandfiltrationssystem mit Ozon- und UV-Desinfektion zur Grundwasseranreicherung (*Management Aquifer Recharge*) eingesetzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass hygienisch relevante Daten mit molekularbiologischen Methoden möglich sind.

Die weiterführenden Anwendungen zeigen, ob die Erkenntnisse dieser Arbeit eingesetzt werden können. Somit lässt sich letztendlich an dieser Stelle nur auf neue, interessante Erkenntnisse aus den folgenden Projekten hoffen.

5 Summary and outlook

Drinking water must be free of pathogens in concentrations that may be harmful to human health (TrinkwV, 2001), § 5.1). Compliance with this criterion methods for the detection of hygienically relevant microorganisms are needed. Cultural methods based on the growth of microorganisms are routinely used to detect waterborne pathogens and fecal indicators. However, these methods are complex and time consuming - especially for viruses. Using molecular biology approaches, such as qPCR, waterborne organisms can be detected in hours by targeting their nucleic acids.

DNA or RNA from bacteria and viruses can still be intact after death or inactivation. Consequently, qPCR analysis will show positive results even if all bacteria or viruses in a sample are dead or inactivated. As only infectious organisms are important for hygienic aspects or risk assessments, qPCR requires a differentiation between living and dead organisms.

In the last years, several attempts were undertaken to improve qPCR analysis with regards to exclude inactive organisms from the detection and to give comparable results to infectivity assays. One approach is the use of the fluorescent dye propidium monoazide (PMA). This dye can enter damaged organisms and label nucleic acids. DNA or RNA bond to PMA cannot be amplified in PCR reactions. As the dye does not enter intact cells, only damaged organisms are excluded from detection by qPCR.

Goal of this dissertation was the development of a PMA based live/dead-differentiation for viruses and bacteria. For standard SYBR Green based qPCR reactions, a maximum amplicon size length of 300 base pairs is recommended. Since nucleic acids are labelled by PMA, the dye is evenly distributed on the whole genome. If only a small part of the genome is amplified in qPCR, the chance of a PMA molecule blocking the amplification is low. In this thesis, even autoclaved viruses could be detected in a qPCR with small amplicons around 100 base pairs.

To enable a live/dead-differentiation, new qPCR methods for the detection of long amplicons of around 1000 base pairs were developed. The method was named long amplicon qPCR (LA-qPCR). Specific qPCR detection and PMA treatment was optimized for the common health related bacteria *E. coli*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* as well as the bacteriophages MS2 and phiX174.

Experiments in this thesis showed that PMA uptake is different for intact Gram positive and Gram negative bacteria. Whereas intact Gram negative bacteria are not affected by high

PMA concentrations, Gram positive bacteria were highly sensitive for PMA, leading to lower gene copy numbers in qPCR. A broad overview of the effects of different bacteria types, dye concentration and incubation temperatures is shown in this thesis for the first time.

Despite the uptake of PMA in intact Gram positive bacteria, for both Gram positive and negative organisms the live/dead-differentiation could be successfully applied for mixtures of intact and heat treated samples. In most published studies only a very low log-reduction of dead cells is shown with PMA-qPCR. The method developed in this thesis was able to exclude up to six log-levels of dead bacteria from intact cells (99.9999 %). The results are even comparable to cultural assays.

Many studies in the field of molecular biological live/dead differentiation are limited to heat killed bacteria. This treatment mainly destroys viral or bacterial hull structures allowing an uptake of PMA and is therefore very suitable to show the principle of intercalating dyes. For drinking water however, disinfection methods like chlorine, ozone and UV are common for disinfection and organism inactivation. In this thesis, experiments were performed to evaluate which live/dead differentiation can be applied for the different disinfection methods.

Ozone treated bacteria and viruses could be detected with qPCR and PMA-qPCR using small as well as long amplicon sizes. The results match the data of the culture based assay. Consequently, in case of ozone, a standard qPCR can differentiate between live and dead organisms – PMA or long amplicons are not necessary. For samples disinfected with chlorine, different results for qPCR, PMA-qPCR and culture assay were determined. An inactivation of bacteria or viruses treated with low chlorine concentrations could only be detected with culture assays. For heat treated samples similar results for LA-PMA-qPCR and culture assay could be achieved. Using different amplicon sizes in qPCR revealed DNA damage, correlating with amplicon size and applied temperature. For low pressure UV radiation PMA could not be applied successfully. However, the use of different amplicon sizes in qPCR indicated a direct correlation between UV dose, amplicon size and log-reduction. Using this correlation, it was possible to calculate the infectivity of UV treated viruses using a simple qPCR assay. In this thesis, the best methods for the detection of living bacteria or infectious viruses could be shown for heat, chlorine, ozone and UV treatment.

Within the scope of this thesis flow cytometry was established and successfully used as comparative method in the disinfection experiments. Live/dead differentiation in flow cytometry was obtained by propidiumiodide (PI) which works similar to PMA in qPCR. Flow cytometry allows a quick quantification of bacteria within 15 minutes, but is however, without the use of probes, unspecific and mainly useable to detect total cell counts and bacterial community changes over time. Additionally, differences in the staining of microorganisms can

lead to high uncertainty in analysis. qPCR in contrast can be used for specific detection of bacteria, viruses and genes of interest, but is therefore not as prompt as flowcytometry.

An additional goal of this thesis was the integration of live/dead differentiation into a hygiene-online-monitoring system. The system was developed by several institutes within the framework of the project EDIT. The modular system combines a multi-level concentration, lab-on-chip purification and extraction and a microarray-based isothermal detection of multiple bacteria and viruses. PMA treatment in the live/dead module was tested with each module and the complete system.

Differentiation of live and dead organisms was successful after the concentration of high volumes of spiked drinking water in a field test. Live/dead differentiation could be successfully integrated in the lab-on-chip module, where nucleic acids are purified not only from matrix components but also from remaining PMA. Consequently it was possible to perform a PMA-qPCR without additional purification of the sample. In the final detection module of the hygiene-online-monitoring system – the isothermal amplification – live/dead differentiation was also tested successfully.

In summary, the LA-PMA-qPCR method developed in this thesis can give important information for the elimination of bacteria and viruses by disinfection – especially for low pressure UV irradiation. The molecular biological live/dead differentiation was successfully integrated in the hygiene-online-monitoring developed in the EDIT project.

Especially for human pathogenic viruses qPCR with live/dead differentiation is promising. Long amplicons and PMA provide the ability to quickly measure the efficiency of disinfection actions. LA-PMA-qPCR therefore has high potential for a fast screening method parallel to cultural detection of indicator organisms for hygienically screening of water resources as recommended by the World Health Organization. Particularly for routine tests, standardization protocols and validation experiments are needed. The results, developed methods and the topic of this thesis are perused in multiple research projects like UV disinfection using LED technology und specific flow cytometry. LA-PMA-qPCR is also used to quantify the reduction of viruses, bacteria and antibiotic resistance genes in a sand filtration system combined with UV and ozone treatment for management aquifer recharge.

In this thesis, it was shown that the infectivity of phages treated with low pressure UV can be calculated using a qPCR result. It was not possible to test this method for human pathogenic viruses, as data from literature is insufficient, especially in case of studies using both qPCR and cultural assays. Therefore, more experiments are needed for validation of this method - for example for adeno- or enteroviruses.

In summary, this thesis demonstrates the possibility of molecular biological techniques to give hygienically relevant data. Future applications in upcoming projects will show whether the developed method can be used valuably.

6 Experimenteller Teil

6.1 Abkürzungsverzeichnis

BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
Cq	<i>quantitation cycle</i>
CUF	Kontinuierliche Ultrafiltration
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>dsDNA / RNA</i>	<i>double stranded</i> (Doppelstrang-) DNA / RNA
DSMO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVGW	Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EMA	Ethidiumbromid Monoazid
FCM	Durchflusszytometrie (Flowzytometrie)
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärts gestreutes Licht)
FW-Primer	<i>forward</i> Primer
Genom Äq	Genom äquivalent
He-Ne-Laser	Helium-Neon-Laser
HNA	<i>high nucleic acid</i>
HOLM	Hygiene-Online-Monitoring
ie	Isoelektrischer Punkt
IfSG	Infektionsschutzgesetz
LA	long amplicon
LA-qPCR	qPCR mit langen Amplifikaten (<i>long amplicon</i>)
LNA	<i>low nucleic acid</i>
MAF	Monolithische Adsorptionsfiltration
MCR3	Munich Chip Reader (3. Generation)
MPN	<i>most probable number</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NTC	<i>no template control</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFU	<i>plaque forming Unit</i>

PI	Propidiumiodid
PMA	Propidiumiodid-Monoazid
PMA-qPCR	qPCR mit vorheriger PMA-Behandlung der Proben
qPCR	Quantitative PCR
rDNA / RNA	Ribosomale DNA / RNA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
rt-PCR	reverse transkriptase PCR
RW-Primer	<i>reverse</i> Primer
SERS	<i>surface enhanced raman scattering</i>
sodA	superoxide dismutase (Gen)
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärts gestreutes Licht)
ssDNA / RNA	<i>single stranded</i> (Einzelstrang-) DNA / RNA
sso7d	Sulfolobus solfataricus DNA-binding protein 7d
STEC	Shigatoxin produzierende <i>E. coli</i>
SVGW	Schweizerische Verein des Gas- und Wasserfaches
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
TUM	Technische Universität München
TZW	Technologiezentrum Wasser
<i>U</i>	Units
UF	Ultrafiltration
uidA	beta-D-glucuronidase (Gen)
UV	Ultraviolett
VBNC	<i>viable but not culturable</i> (Lebend aber nicht kultivierbar)
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

6.2 Lister der Geräte und Materialien

6.2.1 Geräte

Autoklav	3850EL, Tuttnauer
Brutschrank	50125882, HeraTherm INC 18, Langensfeld, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	DMRE 020-025.025, Leica, Deutschland
Gelkammer	MultiSUB Mini, Cleaver Scientific, Warwickshire, UK
Luchtdichter Zylinder, 2,5 L	AG0025A, AnaeroJar™, Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland
MilliQ	Simplicity 185, SV000, Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mixing Block MB-102	Biozym Scientific, Oldendorf, Detuschland
Nanocolor 500 D	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NanoPhotometer	Implen, Westlake, USA
PCR-Reinigungsbank	UVC/T-M-AR, Biosan, Riga, Lettland
PhAST Blue	GenIUL, Terrassa, Spanien
pH-Elektrode	PH315i, WTW, Weilheim, Deutschland
QIAxcel	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Quanti-Tray Sealer	IDEEX, Westbrook, USA
Qubit Fluorometer	invitrogen; Kalifornien, USA
Realplex	Eppendorf, Version 2.2
Rotor-Gene 6000	Corbett Life Science, Version 1.7, B87
S3 Cell Sorter	Biorad, Hercules, USA
Schüttler	KS15, Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Spannungsquelle	Consort E122, Turnhout, Belgien
Sterilbank	Biowizard GL-130, KOJAIR, Vilppula, Finnland
Temperierbare Haube für Schüttler	TH15, Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Thermoblock	MB-102 Thermocell mixing block, BioNova, Rom, Italien
Tpersonal cycler	Biometra, Version 1.1.2
Ultraviolett-Strahler Typ NU-8 KL	Konrad Benda-Herolab, Freiberg, Deutschland
UV-Sichtkammer	Spectroline, Westbury, USA
UV-Tisch	Gene Flash, Syngene, Cambridge, UK
Vortexer	VF2, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Zentrifuge (15 / 50 mL)	Heraeus™ Multifuge™ X1R, Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge (1,5 mL)	Heraeus™ Tresco 21, Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland

6.2.2 Kits und Reagenzien

Bacterial Xpress	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Colilert-18	IDEEX , Westbrook (Maine), USA
DyNAmo cDNA Synthese Kit	BIOZYM, Oldendorf, Deutschland
<i>E. coli</i> K12 JM109	Promega, Mannheim, Deutschland
Enterolert	IDEEX , Westbrook (Maine), USA
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Katalase	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Laufpuffer Flowzytometer	ProFlow Sort Grade 8x Sheath Fluid, Biorad, Hercules, USA
Nanocolor Test 0-17	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

pGEM-T Vector System II Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
Plasmid Purification Midi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PrestoBlue	Invitrogen, Frederick, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAxcel DNA Screening Cartridge	1050349, QIAGEN, Hilden, Deutschland
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland
SensiMix SYBR No-ROX Kit	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	BioRad, München, Deutschland
Viral Xpress	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
X-Gal	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

6.2.3 Chemikalien

0,1 M IPTG	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2316.3
Acrylamid	Merck, Darmstadt, Deutschland	1006381000
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland	6494.2
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2267.4
Ampicillin 100 mg/L	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A0166-5G
APS	Merck, Darmstadt, Deutschland	1012001000
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland	T116.2
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland	1-02382-0250
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland	1070242500
DSMO	Carl Roth, Deutschland	7029.1
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland	8043.1
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland	6755.1
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	8187601000
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2218.1
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland	1083370250
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland	1037530500
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	9781.1
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland	1049360500
MgCl 2M	Merck, Darmstadt, Deutschland	8147330500
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland	1064041000
Natriumhypochlorit (NaOCl)	Sigma Aldrich; Missouri, USA	1056142500
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland	1091471000
Pepton	Merck, Darmstadt, Deutschland	1070431000
PI (Propidiumiodid)	EMD Chemicals, San Diego, USA	537059-50
PMA (Propidiumiodid monoazid)	Biotium, Kalifornien, USA	BTIU40013
SYBR Green I	Life Technologies, Eugene, USA	S-7563

Temed	Merck, Darmstadt, Deutschland	1107320100
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland	4855.2
Trypton	Roth, Karlsruhe, Deutschland	8952.3
Ultrareines Wasser (UltraPure™)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	10977049
X-gal 160 mg/L	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2315.4

6.2.4 Sonstiges Verbrauchsmaterial

CampyGen™	OXOID, Hampshire, England
Filterspitzen 10 – 100 µL	702124, Brand, über VWR, Darmstadt, Deutschland
Filterspitzen 100 – 1000 µL	732-0534, VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 10 – 100 µL	712556, Brand, über VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 100 – 1000 µL	6125735, VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96 Well	167008, Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland
Petrischalen 45 mm	391-2075, Greiner bio-one, über VWR, Darmstadt, Deutschland
Petrischalen 90 mm	391-0491, Greiner bio-one, über VWR, Darmstadt, Deutschland
50-mL-Zentrifugengefäß	525-0156, VWR, Darmstadt, Deutschland
15-mL-Zentrifugengefäß	525-0150, VWR, Darmstadt, Deutschland
500-mL-sterile Probengefäße	FV500-09, Aqua Laborservice, Wertheim, Deutschland
Filterapparatur	Schott, Mainz, Deutschland
Vakuumpumpe	SM16612, Sartorius, Göttingen, Deutschland
MilliQ Kartusche	SimPAK002, Millipore, Darmstadt, Deutschland
5-mL-Probenröhrchen	211-0057, VWR, Deutschland
Vivaspin 15R 30.000	512-4124, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filterspitzen 0,5 – 10 µL	732-0543, VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5 – 10 µL	702526, Brand, über VWR, Darmstadt, Deutschland
0,1-mL-Reaktionsgefäße (für Rotorgene)	712500, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
0,2-µm-Sterilfilter	4906, Pall, Crailsheim, Deutschland
0,2-mL-Reaktionsgefäße, 8-fach Strip	712030, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
0,2-mL-Reaktionsgefäße, 8-fach Deckel	712100, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
0,2-µm-Membranfilter, GZZ	GSWP02500, Merck Millipore, Molsheim, Frankreich
0,45-µm-Filter Ez-Pak	Merck Millipore, Molsheim, Frankreich
1,5-mL-Reaktionsgefäße	211-2166, VWR, Darmstadt, Deutschland
31-µm-Nylonfilter	Sefar, Heiden, Schweiz

6.2.5 Medien

BCYE Agar	OXOID, Hampshire, England (CM0655)
BCYE Agar Ergänzung	OXOID, Hampshire, England (SR152E)
BCYE Agar Zusatz	OXOID, Hampshire, England (SR110C)
LB Medium	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland (110285)
MSB Medium	Sifin Diagnostics, Berlin, Deutschland (TN1071)
Pseudomonas Ergänzung	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland (107624)
Pseudomonas Selektivagar	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland (107620)
R2A Medium	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland (17209)
TBX-Agar	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland (116122)

LAXI-Platten (1 L)

Stoff	Menge
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
pH auf 7 einstellen, autoklavieren und nach abkühlen ab 50 °C folgende Stoffe zugeben:	
Ampicillin 100 mg/L	1 mL
0,1 M IPTG	5 mL
X-gal 160 mg/L	500 µL

SOC-Medium (1 L)

Stoff	Menge
NaCl	0,6 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	20 g
KCl	0,2 g
pH auf 7 einstellen, autoklavieren und nach abkühlen ab 50 °C folgende Stoffe zugeben:	
MgCl 2M	10 mL
Glukose 2M	10 mL

TYG Bouillon, Agar und Weichagar

Medium	TYGB	TYGA	ssTYGA
Volumen	100 mL	1 L	500 mL
Trypton	1 g	10 g	5 g
Hefe-Extrakt	0,1 g	1 g	0,5 g
NaCl	0,8 g	8 g	4 g
Agar	-	15 g	4 g
Ca-Glucose	1 ml	10 ml	5 ml

TAE Puffer (als 50x Stammlösung, 1 L)

Stoff	Menge
TRIS	242 g
Essigsäure	57,1 mL
EDTA	18,6 g

TSB-Medium (1 L)

Stoff	Menge
NaCl	5 g
Soyton	3 g
Trypton	17 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucose	2,5 g

Medien Vergleich

Stoff	TSB-Medium	R2A-Medium	LB-Medium
NaCl	5 g	-	10 g
Soyton	3 g	-	-
Trypton	17 g	-	10 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g	0,3 g	-
Glucose	2,5 g	-	-
Hefeextrakt	-	0,5 g	5 g
Pepton	-	0,5 g	-
Casein	-	0,5 g	-
Stärke	-	0,5 g	-
Natriumpyruvat	-	0,3 g	-
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	-	0,05 g	-
pH nach autoklavieren	7,3	7,2	7,2

6.3 Basismethoden

6.3.1 Bakterielle Stammlösungen

Die in der Arbeit verwendeten Bakterien (Tabelle 29) wurden in jedem Versuch separat kultiviert. Dazu wurde eine Übernachtskultur des entsprechenden Bakteriums in 40 mL R2A-Medium in ein 50-mL-Zentrifugengefäß gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde erneut 40 mL R2A mit 10 µL der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 1 (ca. 2-6 Stunden) bei 37 °C bebrütet. Folgende Organismen wurden abweichend kultiviert: *L. pneumophila* wurde auf BCYE-Agar und *Campylobacter spp.* in einem abgeschlossenen Zylinder (AnaeroJar™) in einer mikroaerophilen Umgebung, eingestellt mit sauerstoffzehrendem Material (CampyGen™), kultiviert. Nach Wachstum einiger sichtbarer Kolonien wurden die Zellen mit 0,9 % NaCl von der Platte in ein 50-mL-Zentrifugengefäß gespült.

Alle Kulturen wurden bei 8 °C für 1-2 Stunden gelagert und dann für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Das Medium im Überstand wurde durch Dekantieren entfernt und die Kultur direkt mit steril filtriertem (0,2-µm-Filter) Leitungswasser (Karlsruhe, mit Vorlauf) suspendiert.

Folgende Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit eingesetzt.

Tabelle 29: Liste der eingesetzten Bakterienstämme und deren Quelle.

Bakterium	DSMZ Nr.	Gram
<i>Campylobacter jejuni</i>	DSM 4688	-
<i>Campylobacter lari</i>	DSM 11375	-
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1058	-
<i>Escherichia hermannii</i>	DSM 4560	-
<i>Legionella pneumophila</i>	DSM 7513	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 30104	-
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 347	+
<i>Clostridium perfringens</i>	DSM 756	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 13591	+
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	+
<i>Enterococcus gallinarum</i>	DSM 20628	+
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030	+

6.3.2 Virale Stammlösungen

Herstellen der phiX174-Stammlösung nach EN ISO 10705-2:2001

Ein steriler Glaskolben mit 50 mL (500 mL) MSB Medium (Sifin Diagnostics, Berlin, Deutschland) wurde mit 0,5 mL der WG5 Kultur (*E. coli*, DSM 13127) angeimpft und für 24 Stunden bei 36 °C mit 100 rpm im Schüttler bebrütet. Danach wurde 5 mL (50 mL) der Übernachtskultur in 50 mL (500 mL) vorgewärmtes MSB Medium gegeben und für 90 Minuten bei gleichen Bedingungen inkubiert. Ein Milliliter der Phagen-Stammlösung (phiX174, DSM 4497) wurde hinzugegeben (mindestens 10^7 PFU/mL) und für weitere fünf Stunden inkubiert. Zum Ernten der Phagen wurde 5 mL (50 mL) Chloroform hinzugegeben, 15 Minuten bei 200 rpm geschüttelt und die Lösung über Nacht bei 4 °C gelagert. Die wässrige Phase wurde in ein 50 mL Zentrifugegefäß gegeben und bei 3500 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den Phagen wurde in sterile 500-mL-Probengefäße gefüllt bzw. dort gesammelt. Die Konzentration der Stammlösung wurde mit dem Kulturverfahren (6.3.4.2) bestimmt.

Herstellen der MS2-Stammlösung nach EN ISO 10705-1:2001

Die Kultivierung von MS2 Bakteriophagen wurde wie bei phiX174 mit folgenden Kulturen durchgeführt: *Salmonella typhimurium* (WG 49, NCTC 12484) und MS2 (NCTC 12487). Das TYGB-Medium wurde entsprechend der Norm hergestellt (Rezept im Anhang unter 6.2.5 aufgeführt).

6.3.3 Hitzebehandelte Arbeitslösung („tot“)

Virale oder bakterielle Stammlösung wurde in ein in 1,5-mL-Kunststoffgefäß gegeben für 10 Minuten in einem Thermoblock bei 90 °C inkubiert. Danach wurden die Proben durch kurzes Verwirbeln gemischt und bei 8 °C bis zur weiteren Bearbeitung gekühlt.

6.3.4 Nachweisverfahren: Kulturverfahren

6.3.4.1 Bakterien

MPN

Das MPN-Verfahren (*most probable number*) ist ein Titerverfahren, in dem eine Probe in einer Verdünnungsreihe auf mehrere Probengefäße aufgeteilt wird. Hierzu werden Platten mit 96 Probenkammern bzw. Wells eingesetzt. Positive Wells werden durch sichtbare Trübung bestimmt. In den Versuchen wurden je Position 30 µL Probe auf 120 µL R2A-Medium eingesetzt. Falls nicht abweichend angegeben, wurden die Platten für 7 Tage bei 20 °C inkubiert. War eine eindeutige Auswertung nicht möglich (z.B. bei sehr geringer Trübung), wurde in jedes Well 4 µL PrestoBlue® (Invitrogen, Frederick, USA) gegeben. Wells mit roter Färbung wurden als positiv gewertet.

Aus der Verteilung der positiven Verdünnungen lässt sich die Anzahl der Bakterien in der Ursprungprobe berechnen. Nach folgender Formel 5 wurde die Konzentration pro mL bestimmt. Dabei ist n_x die Anzahl der positiven Wells der Verdünnung x , n_{total} die Zahl der Wells einer Verdünnung, V_x das Volumen eines Wells und m der letztendliche Wert für die *most probable number* (MPN). Die MPN-Auswertung wurde durch ein eigens programmiertes, browserbasiertes Script durchgeführt (s. Anhang).

Formel 5

$$\sum_{x=1}^{Ver.} \frac{n_x * V_x}{1 - \exp(-V_x * m)} = \sum_{x=1}^{Verd.} n_{total} * V_x$$

Katalase-MPN-Verfahren

Das R2A-Medium für den MPN-Test wurde vorher mit Katalase (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland, 500.000 U/ml) auf eine Konzentration von 1.000 U/ml gemischt. Das MPN-Verfahren wurde ohne weitere Modifikationen durchgeführt.

Plattenverfahren

Mit dem Plattenverfahren können Bakterien durch deren Wachstum, also durch die Bildung von makroskopisch sichtbaren Kolonien, direkt gezählt werden. Für das Verfahren bestehen einige Normen, z.B. (ISO 9308-1:2014) für den Nachweis von *E. coli* oder (ISO 11731-2:2004) für den Nachweis von Legionellen in schwach belastetem Wasser.

Für den Nachweis wird die Probe mit den Bakterien mittels Unterdruck durch einen Filter mit 0,45-µm-Porengröße (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) gezogen und auf einer 45-mm-Petrischale mit entsprechendem Nährmedium platziert und leicht angedrückt. Die Petrischalen werden danach umgedreht und für eine definierte Zeit und Temperatur inkubiert. Da nur eine begrenzte Zahl von Bakterien auf einer Platte ausgezählt werden können, müssen Proben mit einer hohen Bakterienlast vorher mit 0,9 % NaCl entsprechend verdünnt werden. In den Versuchen wurde bei bekannten Konzentrationen auf 5 bis 50 Bakterien pro Platte verdünnt und bei unbekanntem Proben mit mehreren Verdünnungen gearbeitet. Es wurden je Verdünnung jeweils zwei Platten eingesetzt (Doppelbestimmung).

Tabelle 30: In den Kulturverfahren eingesetzten Medien.

Nachweis von	Medium und Produkt-Nr.	Inkubation	Hersteller
<i>E. coli</i>	TBX (116122)	37 °C, 24 h	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<i>P. aeruginosa</i>	Pseudomonas Selektivagar (107620) mit Ergänzung (107624)	37 °C, 48 h	
allen Bakterien	LB (110285)	35 °C	
allen Bakterien	R ₂ A (17209)	35 °C	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>L. pneumophila</i>	BCYE Agar (CM0655), Ergänzung (SR110C und SR152E)	35 °C	OXOID, Hampshire, England

IDEEX (Colilert und Enterolert)

Der Nachweis von *E. coli* und *E. faecalis* Bakterien mit dem IDEXX-Verfahren wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Verwendete Materialien sind im Anhang aufgeführt.

6.3.4.2 Phagen

Der Nachweis der Bakteriophagen phiX174 und MS2 wurde gemäß der Arbeitsvorschriften der EN ISO 10705-2:2001 bzw. EN ISO 10705-1:2001 durchgeführt. Die Hersteller der verwendeten Medien sind im Anhang aufgeführt.

6.3.5 Nachweisverfahren: Mikroskopische Gesamtzellzahl

Die mikroskopische Gesamtzellzahl wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Einspannen eines 0,2- μ m-Filters in die Filtrationsapparatur.
2. Die Probe wird in die Filtrationsapparatur gegeben. Bei Volumen unter 5 mL wird das Probenvolumen durch Zugabe von autoklavierter 0,9 %-NaCl-Lösung auf 5 mL erhöht.
3. Filtration der Probe durch den Filter mittels Unterdruck (-Pumpe).
4. Der Unterdruck wird durch öffnen des Ventils neutralisiert.
5. Überschichten des Filters mit steril filtrierter (0,2- μ m-Filter) 0,1 mg/mL Acridinorange-Färbelösung (ca. 5 mL).
6. Inkubation für 3 Minuten bei Raumtemperatur.
7. Filtration der Färbelösung.
8. Bei laufender Vakuumpumpe wird der Filter mit einer Pinzette von der Apparatur entfernt.
9. Trocknung des Filters für 5 Minuten auf einem Objektträger.
10. Der Filter wird mittels Sandwich-Prinzip auf einen Objektträger gebracht (Objektträger, Immersionsöl, Filter, Immersionsöl, Deckgläschen, Immersionsöl).
11. Das Präparat wird im Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Vergrößerung 660x, grüne Fluoreszenz).
12. In 10 zufälligen Gesichtsfeldern werden die Bakterien gezählt.

Das Ergebnis wird mit Hilfe von Formel 6 berechnet. Dabei ist x die mittlere Zellzahl der Gesichtsfelder, F ein gerätespezifischer Faktor von 69336 (einheitslos) und V das filtrierte Volumen in mL.

Formel 6

$$GZZ / mL = \frac{x \times F}{V}$$

Sofern die Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld den Arbeitsbereich (50 - 400) unter- oder übersteigt, wurde die Probe entsprechend verdünnt oder ein größeres Volumen filtriert.

6.3.6 Nachweisverfahren: Durchflusszytometrie

Alle Versuche wurden mit dem S3 Cell Sorter (Biorad, Hercules, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Gerät wird mit einem blauen Laser (488 nm) bei 100 % Laserleistung betrieben. Die eingesetzte Optik ist in Abbildung 103 dargestellt.

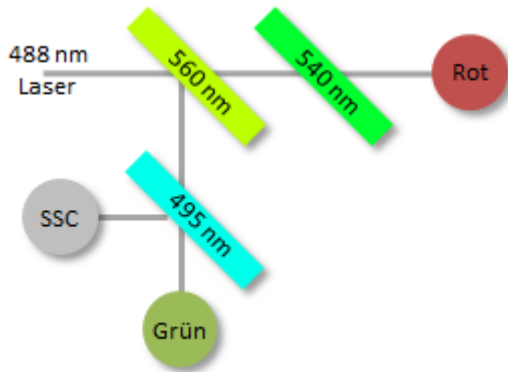


Abbildung 103: Strahlengang im eingesetzten Durchflusszytometer.

Die interne Sensorik (Dioden-Spannung) wurde auf 420 nm (FSC), 360 nm (SSC), 760 nm (grün) und 585 nm (rot) gestellt. Es wurde mit einer Fließgeschwindigkeit auf Stufe 3 (ca. 50 μL pro Minute) gearbeitet. Der interne Trigger wurde auf den grünen Fluoreszenzkanal gestellt (Schwellenwert bzw. *threshold* = 0,4). Zum Betrieb des Gerätes wurde ultrareines Wasser und Laufpuffer (Sheath Fluid) eingesetzt. Je nach Anwendung wurde SYBR Green I (Life Technologies, Eugene, USA, 10.000x in DMSO) und Propidiumiodid (EMD Chemicals, San Diego, USA, 50 mg, als 30 mM Stammlösung in DMSO) zum Färben der Zellen eingesetzt.

Messungen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 1 mL der Probe in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß geben. Die Probe ist mit steril Filtriertem (0,2- μm -Filter) *Evian* Mineralwasser zu verdünnen, sofern die (erwartete) Bakterienkonzentration über 10^6 Zellen pro mL liegt.
2. Zugabe von 10 μL 3 mM Propidiumiodid (Arbeitslösung).
3. Zugabe von 10 μL 100x SYBR Green I (Arbeitslösung).
4. Mischen der Probe.
5. Inkubation für 10 Minuten beim Raumtemperatur in einem mit Alufolie abgedeckten Reaktionsgefäßständer (im Dunklen).
6. 100 μL der Probe wird in ein 5 mL Probenröhrchen gegeben.
7. Das gesamte Volumen wird im Durchflusszytometer gemessen.
8. Der jeweilige Messwert der Gates wird als Fluoreszenzsignale pro 100 μL angegeben.

Auswertung der Messungen und Kontrollen

Für die Quantifizierung lebender und toter Bakterien in der Durchflusszytometrie wurden Gates für diese Bereiche mit Hilfe der unbehandelten und hitzebehandelten Arbeitslösungen (s. 6.3.3) oder der zu messenden Proben gelegt. Jeweils 100 μL wurden separat gemessen. Auf die Bereiche der stärksten Signalkonzentration wurde jeweils ein Gate gelegt. Dies ist beispielhaft für Kläranlagenablauf in Abbildung 104 dargestellt.

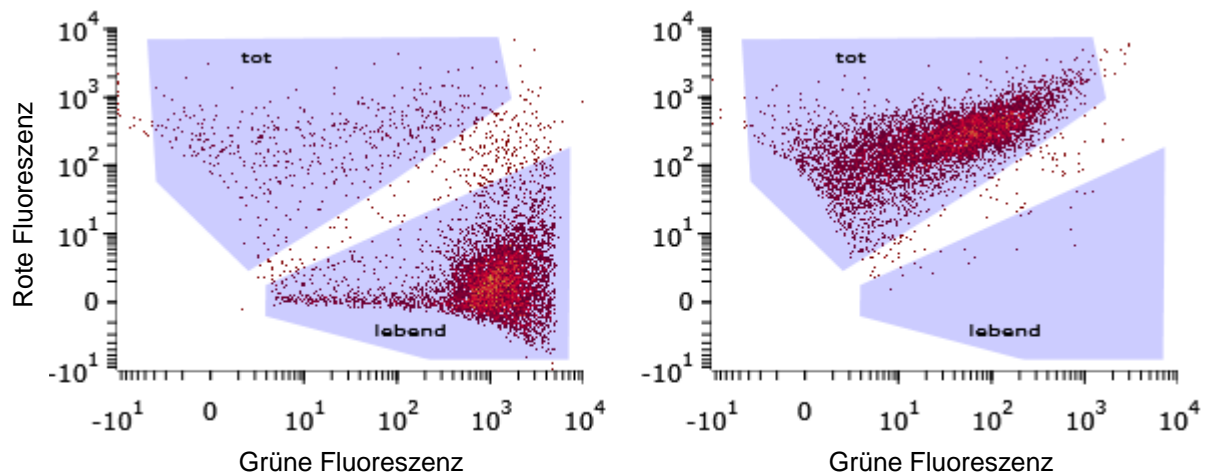


Abbildung 104: Einstellen der „lebend“- und „tot“-Gates bei unbehandeltem (links) und hitzebehandeltem (rechts) Kläranlagenablauf (1:100 Verdünnt). Screenshot aus der Software *ProSort* des Durchflusszytometers.

Signalkompensierung

Durch die Kompensation sinkt die gemessene Rot-Fluoreszenz unbehandelter und die Grün-Fluoreszenz hitzebehandelter Zellen. Dies führt zu einer besseren Auftrennung der Signale. Je nach Bakterium oder Probe ließen sich durch die Kontrollen (unbehandelt, hitzebehandelt) Bereiche (Gates) für lebende und tote Bakterien festlegen. Bei vielen Bakteriengattungen waren zusätzliche Signalcluster zwischen „lebend“ und „tot“ sichtbar, die als „beschädigt“ bezeichnet wurden. Außerdem wurde ein Gate auf das Hintergrundrauschen des Gerätes gelegt.

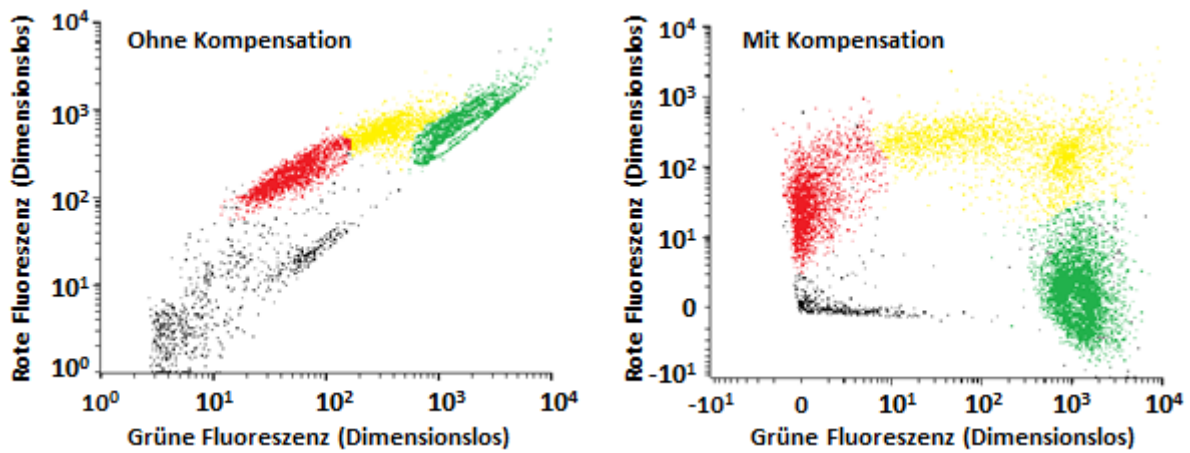


Abbildung 105: Grün/Rot-Graph von im Durchflusszytometer gemessenen *E. faecalis* Zellen (hitzebehandelt und unbehandelt). Ohne Kompensation (links) und mit Kompensation (rechts). Die Signale wurden nach den Kategorien „lebend“ (Grün) und „tot“ (Rot) sowie dem Zwischenstadium „beschädigt“ (Gelb) gefärbt. Schwarze Punkte stellen das Hintergrundrauschen des Gerätes dar.

Kalibrierung mit EVIAN-Mineralwasser

EVIAN-Mineralwasser wurde mit SYBR Green angefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Im Grün/SSC-Graph (Abbildung 104) ergibt sich ein charakteristisches Bild mit zwei Signalclustern mit hoher und niedriger grüner Fluoreszenz. Die Bereiche der Cluster wurden durch Gates in die Bereiche HNA (high nucleic acid) und LNA (low nucleic acid) eingeteilt.

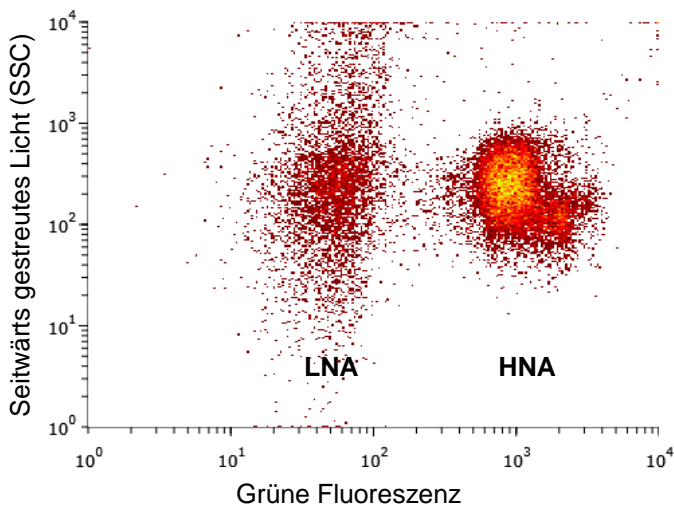


Abbildung 106: Kalibrierung des Durchflusszytometers mit EVIAN-Mineralwasser zum Messen der Gesamtzellzahl nach Protokoll des SVGW. Zu erkennen ist sowohl der HNA- als auch die LNA-Cluster.

Angabe der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz wird als einfacher Messwert im Durchflusszytometer nicht angegeben, sondern lediglich auf einer Skala ohne Einheit in den Graphen dargestellt. Da das genaue Messverfahren und die Berechnung nicht bekannt ist, kann für die Fluoreszenz keine Einheit angegeben werden.

6.3.7 Nachweisverfahren: qPCR

Reagenzien und Geräte

qPCR-Reaktionen wurden in einem *Rotor-Gene 6000* (Corbett Life Science, Version 1.7, B87) Cycler durchgeführt. Als Reaktionsgefäße wurde 0,1-mL-Röhrchen (BIOZYM, Oldendorf, Deutschland) genutzt. In Tabelle 31 ist die Zusammensetzung der Reaktionslösung dargestellt. Bei Amplifikaten bis zu 550 Basenpaaren (bp) Länge wurde das *SensiMix SYBR No-ROX Kit* (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) eingesetzt. Bei größeren Amplifikaten wurden der *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* (BioRad, München, Deutschland) genutzt. Es wurden sowohl Ansätze mit 20 µL als auch mit 10 µL Reaktionsvolumen hergestellt. Tests ergaben keine volumenbedingten Unterschiede in den C_q-Werten und der Effizienz der qPCR. Im Pipettierprozess wurde zunächst die Reaktionslösung hergestellt, auf die 0,1-mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt und danach Standards, Kontrolle und Proben zugegeben. Die jeweiligen Pipettierschritte wurden innerhalb einer PCR-Reinigungsbank durchgeführt. Die Oberfläche wurde vor jedem Versuch für 8 Minuten mit der eingebauten UV-Lampe bestrahlt.

Tabelle 31: Zusammensetzung eines PCR- oder qPCR-Ansatzes. * Template wurde erst nach dem Aliquotieren der Reaktionslösung in die Reaktionsgefäße zugegeben.

	20-µL-Ansatz	10-µL-Ansatz
Ultrareines Wasser	6,4 µL	3,2 µL
Polymerase/Mix	10 µL	5 µL
Primer A, 10 pmol/L	0,8 µL	0,4 µL
Primer B, 10 pmol/L	0,8 µL	0,4 µL
Template *	2 µL	1 µL

Tabelle 32: Rotorgene qPCR-Cycler-Temperaturprogramm.

		SensiMix SYBR No-ROX Kit	SsoFast™ EvaGreen
Schritt	Temperatur	Dauer	Dauer
1	95 °C	10 min	3 min
2	95 °C	30 sec	
3	s. Tabelle 33	30 sec	
4	72 °C	s. Tabelle 33	
5	70-99 °C	1 sec / 1 °C	

Schleife - 45 x

Folgende Primer und Programme wurden für den Nachweis in der qPCR eingesetzt.

Tabelle 33: Liste der Primer und entsprechenden qPCR-Programme.

Target	Amplifikat bp	FW Pos.	RW Pos.	Polymerase	Elongationszeit in sek	Annealing temperatur in °C	Sequenzen
phiX174	108	261	369	S	20	60	Tabelle 8, Seite 56
phiX174	250	119	369	S	20	60	
phiX174	445	119	575	S	40	60	
phiX174	564	11	564	S	40	60	
phiX174	568	119	687	S	40	60	
phiX174	936	119	1074	E	65	60	
phiX174	1063	11	1074	E	65	60	
phiX174	1125	11	1136	E	65	60	
phiX174	1525	4916	1074	E	110	60	
phiX174	1765	4758	1136	E	110	60	
phiX174	5108	647	369	E	225	60	
MS2	314	2717	3031	S	30	60	Tabelle 10, Seite 59
<i>E. coli</i>	627	2	629	S	30	62	Tabelle 12, Seite 61
<i>E. coli</i>	1242	570	1812	E	30	65	
<i>E. faecalis</i>	517	56	573	S	30	65	Tabelle 14, Seite 65
<i>E faecalis</i>	1137	56	1193	E	30	65	
16S	585	341	926	S	30	59	Tabelle 16, Seite 69
16S	1063	341	1404	E	30	60	

Proben, Standards und Kontrollen

In jeder qPCR-Reaktion wurden vektorielle oder genomische Standards sowie Negativkontrollen neben den eigentlichen Proben eingesetzt. Vektorielle Standards wurden photometrisch vermessen (Angabe in Genkopien pro μL). Der Messwert von genomischen Standards stammt bei Bakteriophagen aus dem Kulturverfahren und bei Bakterien aus der mikroskopischen Gesamtzellzahl (Angabe in Organismen pro μL).

Als Negativkontrolle diente ultrareines Wasser (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Die Arbeitslösungen der Standards mit einer Konzentration von 10^8 Genkopien pro μL wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Vor einer qPCR wurde aus der Arbeitslösung eine dekadische Verdünnungsreihe bis 10^1 Genkopien pro μL mit ultrareinem Wasser erstellt. Die Verdünnungen wurden mehrmals, bis maximal zwei Tage, eingesetzt, sofern mehrere qPCR-Reaktionen durchgeführt werden mussten. Für die Kalibrierung und für alle Proben wurden in der qPCR stets mindestens Doppelbestimmungen eingesetzt.

Tabelle 34: In jeder qPCR eingesetzte Proben.

Röhrchen	Probentyp	Genkopien
1 - 2	Negativkontrolle	0
3 - 4	Standard	$10^7 / \mu\text{L}$
5 - 6	Standard	$10^6 / \mu\text{L}$
7 - 8	Standard	$10^5 / \mu\text{L}$
9 - 10	Standard	$10^4 / \mu\text{L}$
11 - 12	Standard	$10^3 / \mu\text{L}$
13 - 14	Standard	$10^2 / \mu\text{L}$
15 - 16	Standard	$10^1 / \mu\text{L}$
17 - 72	Proben	Unbekannt

Auswertung der qPCR

In jeder qPCR-Reaktion wurden zur **absoluten Quantifizierung** Vektor-basierte oder genomische Standards zur Quantifizierung der Genkopien oder der Organismenkonzentration eingesetzt. Der Schwellenwert (*threshold*) wurde automatisch von der Software bestimmt. Die **Effizienz** der qPCR wurde mit folgender Formel aus der Steigung einer Trendgerade des Log-Wertes der Konzentration des Standards und der C_q-Werte ermittelt. Dabei ist *E* die Effizienz in Prozent und *m* die Steigung der Trendgerade.

Formel 7
$$E = (10^{\frac{-1}{-m}}) - 1 * 100$$

Die Standardkurve musste dabei folgende Kriterien erfüllen:

- Effizienz: 0,90 bis 1,05
- R^2 Mindestens 0,99 ($m \geq 5$, $n \geq 3$)

Da in den Versuchen die Reduktion berechnet werden sollte, wurden nur quantifizierbare Daten in die Ergebnisse aufgenommen. Die **Quantifizierungsgrenze** (LOQ, *limit of quantification*) wurde nach dem *MIQE Guidelines* an den Bereich der qPCR-Standards angelehnt. Der quantifizierbare Bereich reicht vom Standard mit der niedrigsten zum Standard mit der höchsten Konzentration (üblich 10^1 bis 10^7 Genkopien pro μL , s. Abbildung 107, links). Diese Definition kann zusätzlich mit dem Variationskoeffizienten der Standards (vgl. 2.6.2.1) überprüft werden (Abbildung 107, rechts). Der Variationskoeffizient liegt bei allen Standards unter dem definierten Schwellenwert von 0,35. Der Variationskoeffizient CV wurde wie folgt berechnet:

$$CV_{STD}\% = 100 \times \frac{\text{Varianz}_{STD}}{\text{Mittelwert}_{STD}}$$

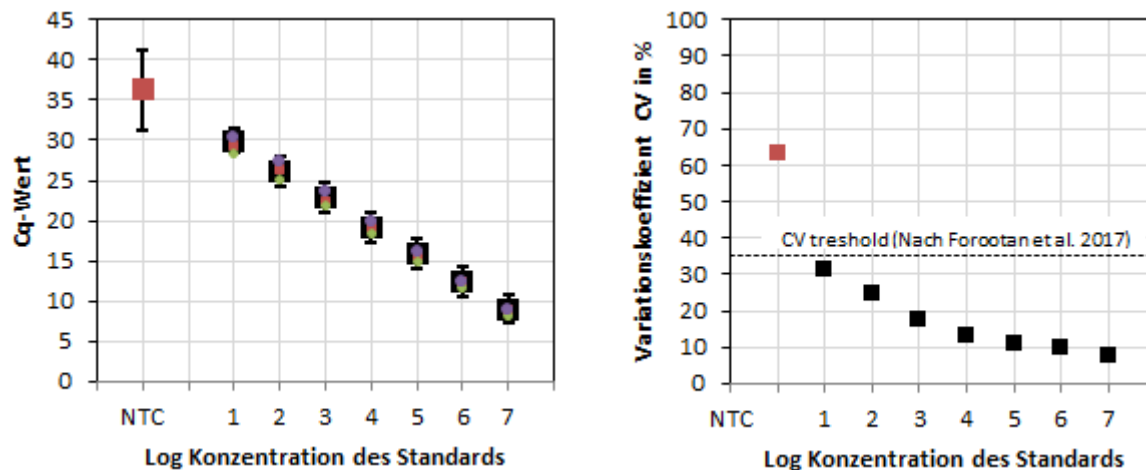


Abbildung 107: Links: Mittelwerte (Quadrate) und drei Einzelmessungen (Punkte) des phiX174-Standards und NTC. Effizienz der Kalibriergeraden bei 0,94 (R^2 : 1,00) mit $m = 7$, $n = 18$. Rechts: Variationskoeffizient der Standards.

qPCR-Produktanalyse

PCR-Produkte wurden als Qualitätskontrolle mit einer automatisierten Elektrophorese QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Deutschland) untersucht (Screen Gel Software, Version 1.1.0). qPCR-Ergebnisse wurde nur dann als positiv gewertet, wenn das entsprechende Amplifikat in der gleichen Größe wie eine Kontrolle oder eines Standards nachweisbar war.

rt-PCR / cDNA Synthese

Die rt-PCR wurde mit dem *DyNAmo cDNA Synthese Kit* (BIOZYM, Oldendorf, Deutschland) als separater Schritt in einem Tpersonal cycler (Biometra, Version 1.1.2) vor der qPCR durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung ist in Tabelle 35 und das entsprechende Temperaturprogramm des Cyclers in Tabelle 36 dargestellt. Je nachdem wie viel Template für die qPCR benötigt wurde, wurden 10- oder 20- μ L-Ansätze verwendet. Als Prozesskontrolle wurde MS2-RNA eingesetzt. Diese wurde bei $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Als Negativkontrolle diente ultrareines Wasser. Für die RT-PCR wurden 0,2-mL-Reaktionsgefäße eingesetzt (BIOZYM, Oldendorf, Deutschland).

Tabelle 35: Zusammensetzung einer Reaktion zur cDNA-Synthese.

	20- μ L-Ansatz	10- μ L-Ansatz
RT-Puffer	10 μ L	5 μ L
Random Hexamer	1 μ L	0,5 μ L
M-Mulv RNase	2 μ L	1 μ L
RNase freies H ₂ O	3 μ L	1,5 μ L
Template	4 μ L	2 μ L

Tabelle 36: PCR-Cycler Temperaturprogramm zur cDNA Synthese.

Temperatur	Dauer [min]
25 $^{\circ}\text{C}$	10
37 $^{\circ}\text{C}$	30
85 $^{\circ}\text{C}$	5
4 $^{\circ}\text{C}$	hold

6.3.8 PMA-Behandlung

Zum Herstellen einer Stammlösung wurde ein Milligramm PMA (Biotium, Kalifornien, USA) in 978 μL DMSO (Dimethylsulfoxid, Carl Roth, Deutschland) suspendiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (2000 μM). Die Inkubation der Proben fand im Dunkeln in einem mit Alufolie abgedeckten Thermoblock (Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland) bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt. Zur Belichtung wurde die Belichtungsapparatur *PhAST Blue* (GenIUL, Terrassa, Spanien) eingesetzt. Das Protokoll ist in Abbildung 108 schematisch dargestellt.

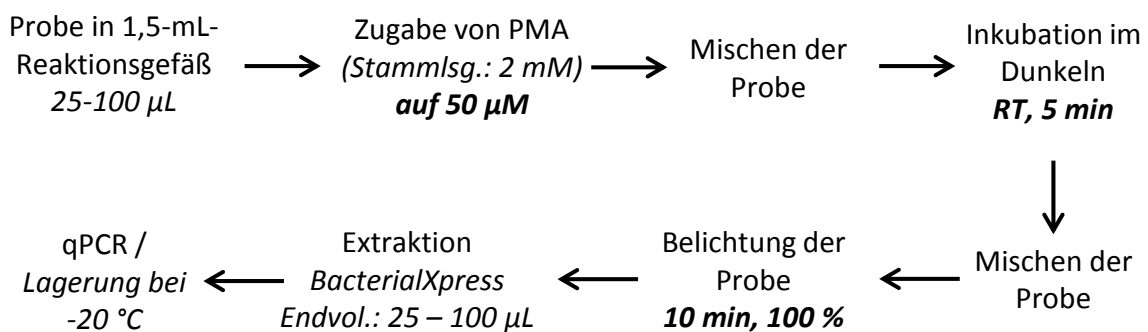


Abbildung 108: Behandlung von Proben mit PMA. Die Parameter der Standardbehandlung sind fett dargestellt. Das Endvolumen der Extraktion ist mit dem Probevolumen identisch, wodurch die Verdünnung durch PMA-Zugabe kompensiert wurde.

6.3.9 Extraktion

Die Extraktion wurde bei Bakterien mit dem BacterialXpress und bei Viren mit dem ViralXpress Kit durchgeführt (beide *Merck Millipore*, Darmstadt, Deutschland). Das Protokoll weicht leicht von den Herstellerangaben ab. Zu 50 μL Probe im 1,5-mL-Reaktionsgefäß wurden 200 μL BacterialXpress (oder ViralXpress) zugegeben und gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 250 μL Isopropanol zugegeben und 10 Sekunden gemischt. Die Proben wurden bei 21.000 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette abgenommen und 400 μL 70 % Ethanol in das Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde so lange gemischt, bis sich das Pellet vom Boden des Reaktionsgefäßes löste. Die Proben wurden wieder für 5 Minuten bei 21.000 g zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Pipette entfernt. Die Reaktionsgefäße wurden offen bei Raumtemperatur für mindestens 10 Minuten getrocknet und danach in 50 μL ultrareinem Wasser (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) suspendiert. Ein Resuspendieren der Pellets erfolgte entweder bei $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht oder durch direktes Mischen der Probe durch Auf- und Abpipettieren.

6.4 Entwicklung der LA-qPCR

6.4.1 Primer-Entwicklung

Sofern möglich wurden qPCR-Primer aus Literaturangaben übernommen. Die Entwicklung eigener Primer für die LA-qPCR wurde mit der Software *Primer-BLAST* (Ye et al., 2012) durchgeführt. Hierzu wird in einer Zielsequenz (Target) nach Primern gesucht. Ein Spezifitätstest wird gegen die restliche Datenbank (Non-Targets) ausgeführt. Die Programmparameter sind in Tabelle 37 dargestellt. Alle Primer wurden von Thermo Fisher (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Tabelle 37: Parameter in Primer-BLAST zur Entwicklung von neuen Primern.

Parametergruppe	Parameter	Wert
PCR Template	Template	Sequenz des Ziel-Organismus (phiX174) oder Genes (SodA) (s. Tabelle 7, Basissequenz)
Primer Parameters	PCR product size Min	500
	PCR product size Max	1100
	# of Primers to return	30
	Primer melding temperatures	57,0 60,0 63,0 3
Primer Pair Specificity Checking Parameters	Database	nr
	Organism	bacteria (taxid:2)
	Entrez query	NOT * [ORGANISM]

6.4.2 In silico Spezifitätstest

Der Spezifitätstest wurde mit *Primer-BLAST* durchgeführt (s. 6.4.1). Um eine möglichst einfache Übernahme der Methode für andere Benutzer zu ermöglichen, wurden die Namen der Parameter und Parametergruppen direkt aus dem Programm übernommen und nicht ins Deutsche übersetzt. Folgende Parameter wurden im Programm eingegeben:

Tabelle 38: Einstellungen zum Test der Spezifität mit Primer-BLAST.

Parametergruppe	Parameter	Wert
PCR Template	Template	Sequenz des Ziel-Organismus (z.B. phiX174) oder Ziel-Genes (z.B. SodA) (s. Tabelle 7, In silico Spezifitätstest)
Primer Parameters	Use my own forward primer	Sequenz des FW-Primers
	Use my own reverse primer	Sequenz des RW-Primers
Primer Pair Specificity Checking Parameters	Database	nr
	Organism	bacteria (taxid:2)
	Entrez query	NOT * [ORGANISM]

Ein Primer wurde als spezifisch gewertet, wenn keine anderen möglichen Zielsequenzen in der Datenbank gefunden wurden, oder, sofern unspezifische Produkte gefunden wurden, eine Amplifikation unwahrscheinlich ist (über 3 Mismatch-Positionen, Amplifikatlänge stark abweichend).

6.4.3 Herstellen von Standards

In dieser Arbeit wurden sowohl Vektor-basierte, als auch genomische Standards eingesetzt.

Tabelle 39: Aufbau von vektoriellen und genomischen Standards.

Typ	Basis	Herstellung	Quantifizierung	Äquivalent
Vektor-basiert	PCR-Produkt des Zielamplikates	PCR-Produkt wird in ein Vektor kloniert	DNA wird photometrisch quantifiziert	Genkopien
Genomisch	Kultur des Zielorganismus	Organismen werden extrahiert	GZZ (Bakterien) oder Kulturverfahren (Viren)	Organismen

Vektor-basierter Standard

Das Arbeitsschema der Herstellung eines Vektor-basierten Standards ist in Abbildung 109 dargestellt.

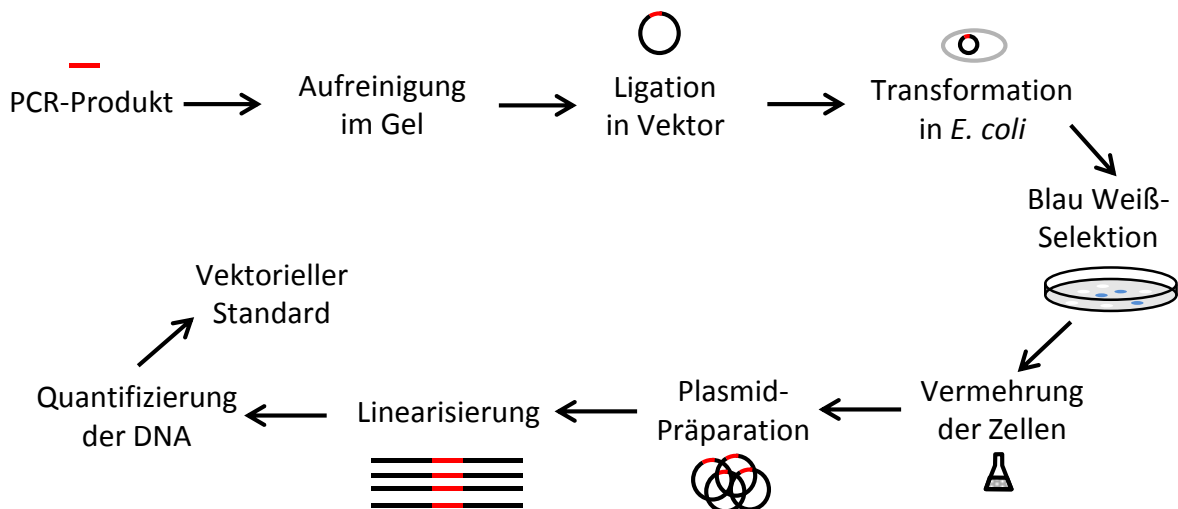


Abbildung 109: Workflow der Herstellung von vektoriellen Standards.

Ausgangsmaterial für die Herstellung ist das entsprechende PCR-Produkt. Dieses wurde entsprechend des PCR-Protokolls generiert (s. 6.3.7), die Größe des Amplifikates via *QIAxcel* ermittelt und mit der theoretischen Größe in Sequenzdatenbanken verglichen.

Das PCR-Produkt wurde in einem 1 % Agarosegel aufgereinigt (1-fach konzentriertes TAE als Laufpuffer, 90 V, 30 Minuten Laufzeit) und danach aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Die gereinigte DNA wurde mit dem *pGEM-T Vector System II Kit* (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben in ein Plasmid ligiert. Die Transformation wurde mit kompetenten *E. coli K12 JM109* (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Positive Kolonien wurden durch Blau Weiß-Selektion auf LAXI-Platten (s. 6.2.5) ermittelt.

Eine positive (weiße) Kolonie wurde in einem 100-mL-Ansatz mit LB-Medium als Übernachtskultur bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Kultur wurde für Glycerinstammlösungen verwendet (30 % Glycerin) und bei -75 °C gelagert. Die restliche Kultur wurde mit dem *Plasmid Purification Midi Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt. Die folgende Linearisierung des Vektors erfolgte mit dem Enzym *Apal* (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) mit entsprechendem Puffer des Herstellers. Der Reaktionsansatz besteht aus 5 µg Plasmid-DNA, 10 µL Puffer, 2,5 µL Enzym und wurde auf 20 µL mit ultrareinem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde für mindestens 6 Stunden bei 30 °C im Heizblock inkubiert und danach für 15 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Der geschnittene Vektor wurde via Agarosegel (1 %) überprüft und danach mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Des Weiteren wurden die tatsächliche Länge und die Sequenz des Inserts durch eine Sequenzierung überprüft. Der Standard wurde mit den vektoriellen Primern M13 FW und RW in einer PCR amplifiziert, wie oben beschrieben aufgereinigt und schließlich sequenziert (StarSEQ, Mainz, Deutschland). Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes Seaview (Gouy et al., 2009) überprüft und mittels BLAST (Altschul et al., 1997) mit der NCBI-Datenbank abgeglichen. Die Konzentration der DNA wurde mittels des *Qubit® dsDNA BR Assay Kits* (Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland) bestimmt. Aus der Konzentration wurde mit Formel 8 die Zahl der Genkopien berechnet. Dabei ist 660 pg/pmol das durchschnittliche Molekulargewicht von Doppelstrang-DNA (Mülhardt, 2007), $6,023 \times 10^{23}$ die Anzahl an Teilchen pro Mol und n_i bzw. n_v die Anzahl der Nukleotide des Inserts bzw. Vektors (3000 bp).

$$\text{Formel 8} \quad \text{Genkopien} = \mu\text{g DNA} \times \frac{\text{pmol}}{660\text{pg}} \times \frac{10^6\text{pg}}{1\mu\text{g}} \times \frac{1}{n_i + n_v} \times \frac{6,023 \cdot 10^{23}}{10^{12}\text{pmol}}$$

Alle Standards wurden auf eine Konzentration von 10^9 Kopien pro μL verdünnt und bei $-75\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert (Stammlösung). Zum direkten Einsatz wurden mehrere Aliquote mit 10^8 Kopien pro μL hergestellt (Arbeitslösung). In der qPCR wurde der Cq-Wert der Standards den entsprechenden Genkopien des Standards zugeordnet.

Genomischer Standard

Das Arbeitsschema der Herstellung eines genomischen Standards ist in Abbildung 110 dargestellt. Basis eines genomischen Standards ist eine virale oder bakterielle Stammlösung nach 6.3.1 bzw. 0 (s. S. 194). Bakterien wurden mittels mikroskopischer Gesamtzellzahl (s. 6.3.5), Viren mit dem Kulturverfahren (s. 6.3.4.2) quantifiziert. Proben der Stammlösung wurden extrahiert (s. 6.3.9) und der Extrakt als Stammlösung des Standards eingesetzt. Bei RNA-Viren wurde das Genom in cDNA umgeschrieben (s. 6.3.7, cDNA Synthese). In der qPCR wurde der Cq-Wert der Standards den entsprechenden Organismenkonzentrationen des Standards zugeordnet.

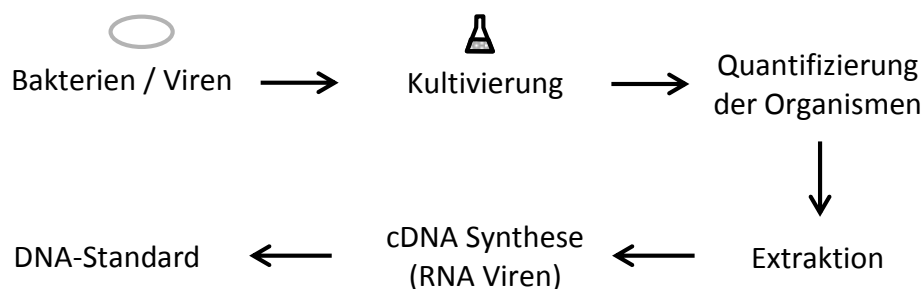


Abbildung 110: Workflow der Herstellung von genomischen Standards.

6.4.4 Optimierung der qPCR

Die optimale Annealingtemperatur wurde in einem Temperaturgradient in einem *Realplex* qPCR-Cycler (Eppendorf, Version 2.2) durchgeführt. Für jede zu testende qPCR (bzw. jedes Primerpaar) wurden vier parallele Reaktionslösungen (Tabelle 29) mit unterschiedlichen Templates erstellt:

- Standard DNA (10^5 Genkopien pro μL)
- Standard DNA (10^2 Genkopien pro μL)
- Positivkontrolle (Extrahierte DNA oder cDNA; ca. 10^5 Organismen pro μL)
- Negativkontrolle (ultrareines Wasser)

Tabelle 40: Zusammensetzung eines PCR- oder qPCR-Ansatzes.

	Ansatz für 12 Proben
ultrareines Wasser	76,8 µL
Polymerase/Mix	120 µL
Primer A, 10 pmol/L	9,6 µL
Primer B, 10 pmol/L	9,6 µL
Template	24 µL

Die Template wurden dabei direkt in die Reaktionslösung gegeben. Diese wurde in zwölf 0,2-mL-Reaktionsgefäße aliquotiert. Diese wurden im Cycler in Richtung des Temperaturgradienten platziert. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 41 dargestellt. Die Einzeltemperaturen des Gradienten sind: 54,8 | 55,1 | 56,1 | 57,5 | 59,2 | 61,2 | 63,2 | 65,2 | 67,0 | 68,5 | 69,6 | 70,1 °C. Die Auswertung erfolgte über den Vergleich der ermittelten Cq-Werte der eingesetzten Proben.

Tabelle 41: Replex qPCR-Cycler-Temperaturprogramm mit Gradient.

		SensiMix SYBR No-ROX Kit	SsoFast™ EvaGreen
Schritt	Temperatur	Dauer	Dauer
1	95 °C	10 min	3 min
2	95 °C	30 sec	
3	55 - 70 °C	30 sec	
4	72 °C	60 sec	
5	70-99 °C	1 sec / 1 °C	

Schleife - 45 x

6.4.5 Zusätzliche Entwicklungsschritte zum Nachweis aller Bakterien (16S)

Eine *Test Probe* Suche der 16S-Primersequenzen gegen die SILVA (16S) Datenbank (SSU Ref NR 119, Juli 2014, 534.968 Sequenzen) wurde mit Standardeinstellungen (Tabelle 42) und mit 2 Mismatches durchgeführt (Quast et al., 2013). Das Programm ist unter <https://www.arb-silva.de/> verfügbar (letzter Abruf April 2017). Um eine möglichst einfache Übernahme der Methode für andere Benutzer zu ermöglichen, wurden die Namen der Parameter und Parametergruppen direkt aus dem Programm übernommen und nicht ins Deutsche übersetzt.

Tabelle 42: Parameter für *Test Probe* zum Abgleich von 16S-Primern.

		Abgleich 1	Abgleich 2
Parametergruppe	Parameter	Wert	Wert
Sequence Data	Probe Sequence	Primer-Sequenz	
Database	SILVA Database	SSU 128	
	Sequence Collecton	REFNR	
Mismatches	Maximum Number of Mismatches	0	2
	Consider x occurances of N as match	0	

Eine Suche resultiert in drei Ergebnisparameter:

- *Match* Übereinstimmung mit Primersequenz
- *Missmatch* Keine Übereinstimmung mit Primersequenz
- *Nodata* Daten an der Suchposition fehlen (nicht gewertet)

Für das Ergebnis wurde das Verhältnis zwischen *Match* und Gesamtdaten (Summe aus *Match* und *Missmatch*) gezählt.

6.4.6 Bestimmung des 16S-Genom-Äquivalent

Eine 151 bp große Sequenz einer konservierten Region der 16S-rDNA (AE014075.1:235436-235586) wurde über *blastn* gesucht. Die Parameter sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: Parameter BLASTn zur Suche von 16S-Sequenzen.

Parametergruppe	Parameter	Wert
PCR Template	Template	Sequenz von AE014075.1:235436-235586
Choose Search Set	Database	Nucleotide collection (nr/nt)
	Organism	Kein Wert
	Entrez Query	„bacteria“ AND „complete genome“ AND 1000000:1000000000[SLEN]
Algorithm Parameters	Max target sequences	20000

Die Ergebnisse wurden in Form einer CSV-Tabelle (Alignment:Table:CSV) mit Excel ausgewertet. Dabei wurden die Treffer jedes Datenbankeintrags gezählt. Die Zahl der Treffer entsprechen dabei der Anzahl der Genkopien des 16S-Genes. Die Ergebnistabelle ist beispielhaft in Tabelle 44 dargestellt. Datenbanktreffer mit weniger als 140 von 151 Nukleotiden Übereinstimmung wurden nicht gezählt.

Tabelle 44: Ausschnitt der Ergebnistabelle zur Erfassung der 16S-Genkopien pro Genom. Beispielhaft werden hier *E. coli* und *K. pneumoniae* gezeigt. Jede Tabellenzeile stellt eine 16S-Kopie dar. Der Letzte Eintrag der Tabelle wurde nach den Bewertungskriterien ausgeschlossen, da die Sequenz nur an 28 Positionen übereinstimmt (Match < 140).

Accession	Ident. %	Match	Hit Pos. Start	Hit Pos. Ende	E-Value	n 16S	Ergebnis
AE014075.1	99	151	1245078	1245228	8,2E-71	1	CP017279.1 7 Genkopien <i>E. coli</i>
AE014075.1	99	151	4443942	4443792	8,2E-71	2	
AE014075.1	99	151	4799361	4799211	8,2E-71	3	
AE014075.1	99	151	5186060	5185910	8,2E-71	4	
AE014075.1	99	151	5230957	5230807	8,2E-71	5	
AE014075.1	99	151	5322840	5322690	8,2E-71	6	
AE014075.1	99	151	5427550	5427400	3,8E-69	7	
CP018735.1	99	151	469144	469294	8,2E-71	1	CP017279.1 8 Genkopien <i>Klebsiella pneumoniae</i>
CP018735.1	99	151	1245078	1245228	8,2E-71	2	
CP018735.1	99	151	4443942	4443792	8,2E-71	3	
CP018735.1	99	151	4799361	4799211	8,2E-71	4	
CP018735.1	99	151	5186060	5185910	8,2E-71	5	
CP018735.1	99	151	5230957	5230807	8,2E-71	6	
CP018735.1	99	151	5322840	5322690	8,2E-71	7	
CP018735.1	99	151	5427550	5427400	8,2E-71	8	
CP018735.1	89	28	1029129	1029102	4,0E-03	-	

6.5 Entwicklung der LA-PMA-qPCR

6.5.1 Testverfahren mit Organismen

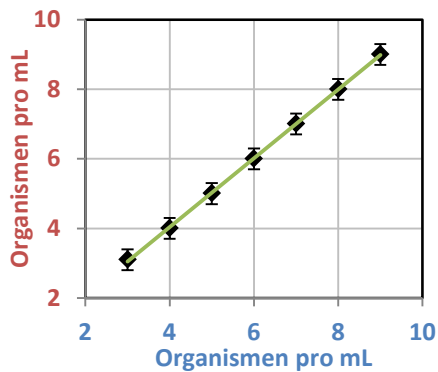
Ausgangsmaterial des Versuches ist eine bakterielle oder virale Arbeitslösung (6.3.1). Bakterien wurde mittels mikroskopischer Gesamtzellzahl (6.3.5), Viren mit dem Kulturverfahren (6.3.4.2) quantifiziert. Aus diesen Arbeitslösungen wurde mit steril filtriertem Leitungswasser (0,2-µm-Filter) eine Verdünnungsreihe bis 10^{-7} in sterilen 50 mL Zentrifugengefäßen hergestellt. 50-µL-Proben dieser Verdünnungen wurden mit PMA behandelt (6.3.8), extrahiert (6.3.9) und in der LA-qPCR quantifiziert (6.3.7). Die Parameter der Verfahren sind in Tabelle 45 dargestellt.

Für das zweite **Testverfahren B** wurde ein Aliquot der Stammlösung für 10 Minuten bei 95 °C in einem Thermoblock hitzebehandelt. Jeweils 1 mL der unbehandelten Verdünnungen wurde mit der gleichen Menge hitzebehandelter Stammlösung (unverdünnt) gemischt. Die so hergestellten Suspensionen wurden mit der LA-PMA-qPCR und dem Kulturverfahren quantifiziert (Parameter in Tabelle 45).

Tabelle 45: Parameter der Testverfahren für die LA-PMA-qPCR und das Kulturverfahren.

Organismus	LA-qPCR-Primer	PMA Konzentration	Kulturverfahren 6.3.4
phiX174	11 - 1074	100 µM	Plaque Assay 6.3.4.2
<i>E. coli</i>	570 - 1812	100 µM	IDEX (Colilert)
<i>E. faecalis</i>	56 - 1193	15 µM	IDEX (Enterolert)
Bakterien (16S)	341 - 1404	15 µM	MPN

Die Auswertung der Tests der LA-PMA-qPCR und des Methodenvergleiches erfolgen über eine zweidimensionale Gegenüberstellung der Messergebnisse des Kulturverfahrens und der Ergebnisse der entsprechenden qPCR (Abbildung 111).



Vergleichsverfahren (x)

Messergebnis des Vergleichsverfahrens in Organismen pro mL.

Referenzverfahren (y)

Messergebnis des Kulturverfahrens.

Arithmetisches Mittel

Mittelwerte aus (mindestens) drei Messungen mit jeweiliger Doppelbestimmung ($n = 3 \times 2$) mit **Standardabweichung**.

Trendgerade

Bestimmtheitsmaß R^2 (Optimal: 1)

Messungengenauigkeiten, Varianz der Methode

Interzept b (Optimal: 0)

Abweichungen durch Kalibrierung oder Methodik

Steigung m (Optimal: 1)

Effizienz der Methode, Verluste, Spezifität (falsch-positiv / falsch-negativ).

t- und F-Test des Regressionskoeffizienten

Signifikanz des Zusammenhanges der beiden Methoden (Optimal: $p = 0$).

Abbildung 111: Prinzip der Auswertung und Darstellung des Methodenvergleiches. Die Beispielwerte zeigen eine optimale Übereinstimmung von Referenz- und Vergleichsverfahren.

t- und F-Test

Beide statistischen Tests zeigen die Abweichungen der Messwerte von der linearen Regression (Trendgerade). Im **t-Test** des Regressionskoeffizienten wird die so genannte Nullhypothese (Regressionskoeffizient beträgt Null) geprüft. Je größer der Wert des t-Tests ist, desto unwahrscheinlicher ist die Nullhypothese und umso wahrscheinlicher ist ein Zusammenhang der betrachteten Variablen (hier die beiden Methoden). Im **F-Test** wird die Varianzhomogenität und die Gesamtsignifikanz des Modells geprüft. Wie auch im t-Test soll die Nullhypothese (kein Zusammenhang der Methoden) widerlegt werden. Je größer der Wert des F-Tests ist, desto weniger wahrscheinlich ist die Nullhypothese. Der **p-Wert** zeigt die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete Zusammenhang zufällig entstanden ist (Fahrmeir et al., 2011). Die Berechnung wurde im Programm Excel (Microsoft, Redmond, USA, Version 14.0.7180.5002) durchgeführt. Die Berechnung basiert auf den Formeln 9, 10 und 11 (im Anhang unter 7.3).

6.5.2 phiX174- und MS2-Bakteriophagen

6.5.2.1 Wirkung von PMA auf die Nukleotide von MS2 und phiX174

Um die Wirkung von PMA auf Einzelstrang-RNA und DNA zu untersuchen, wurden die Extrakte der Bakteriophagen MS2 und phiX174 untersucht. Die Probenvorbereitung ist in Abbildung 112 dargestellt. MS2- und phiX174-Bakteriophagen wurden mit dem ViralXpress Kit extrahiert. Die extrahierte phiX174-ssDNA wurde mit 50 µM PMA behandelt. Danach wurde die Probe mit dem ViralXpress-Kit zum Entfernen des überschüssigen PMAs erneut extrahiert („gewaschen“). Die gleiche Prozedur wurde mit dem Produkt einer phiX174-qPCR durchgeführt (dsDNA). Beide Proben wurden in der qPCR (phiX174, 119 - 687) quantifiziert.

Extrahierte MS2-RNA wurde mit 50 µM PMA behandelt, gewaschen und mit dem DyNAmo cDNA-Synthese-Kit (BIOZYM, Oldendorf, Deutschland) zu cDNA umgeschrieben. MS2-cDNA wurde gleichermaßen behandelt. Beide Proben wurden in der qPCR (MS2, 2717 - 3031) quantifiziert.

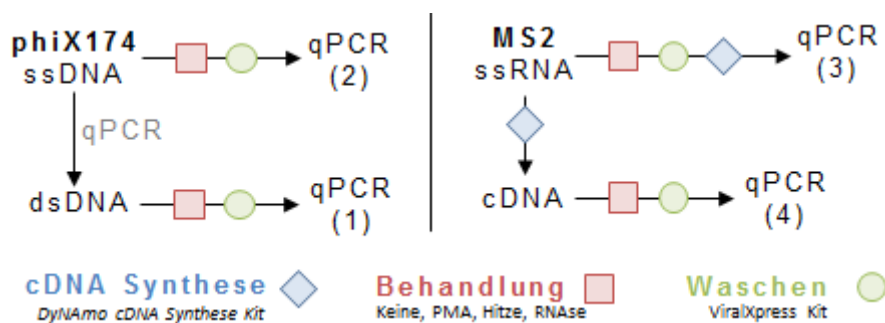


Abbildung 112: Arbeitsschema zur Behandlung von MS2-ssRNA und -cDNA sowie phiX174-ssDNA und -dsDNA mit PMA und zum Nachweis via qPCR.

6.5.2.2 Einfluss der PMA-Konzentration auf unbehandelte Phagen

MS2 Bakteriophagen wurden mit 0, 1, 5, 10, 25, 50 und 100 µM PMA versetzt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 Minuten belichtet. Nach der Extraktion wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und die Proben mittels qPCR (MS2, Primer 2717-3031) quantifiziert. Das Experiment wurde auch für phiX174 durchgeführt (phiX174, Primer 119 - 687), wobei hier zusätzlich noch 200, 300 und 400 µM PMA getestet wurde. Die Versuche wurden mit jeweils zwei Replikaten durchgeführt.

6.5.2.3 Auswirkung des pH-Wertes

Arbeitslösung unbehandelter und hitzebehandelter Viren (6.3.3) wurde in 50 mL Zentrifugengefäße aliquotiert. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 12 eingestellt. PMA wurde zu einer Endkonzentration von 100 µM zugegeben, inkubiert, belichtet, extrahiert (ViralXpress) und mit der qPCR quantifiziert (phiX174: 119 - 687, MS2: 2717 - 3031).

6.5.3 *E. coli*

Reaktionsparameter: Inkubationstemperatur und Belichtungszeit

Ein Teil der hergestellten *E. coli* Stammlösung wurde im Thermoblock für 10 Minuten bei 90 °C behandelt. Beide Proben wurden mit 100 µM PMA (2,64 µL bei 50 µL Probevolumen) versetzt, wobei jeweils ein Parameter des Protokolls geändert wurde. Die Proben wurden mit dem BacterialXpress-Kit extrahiert und in der qPCR (UidA, 1213 - 1359) quantifiziert.

Tabelle 46: Variation der Reaktionsparameter bei der PMA-Behandlung von *E. coli*.

Probe Nr.	PMA	Reaktionstemperatur (°C)	Reaktionszeit (min)	Belichtungszeit (min)
1	Kein PMA	Eis	5 min	10 min
2	100 µM	Eis		10 min
3		Raumtemperatur		10 min
4		Eis		3 min
5		Eis		10 min
6		Eis		15 min

Reaktionsparameter: PMA-Konzentration und Inkubationszeit

Unbehandelte und hitzebehandelte (90 °C, 10 Minuten) *E. coli* wurden mit verschiedenen PMA-Konzentrationen (1, 5, 10, 15, 25, 50, 100 µM) behandelt. Um die Applikation von geringen PMA Mengen zu ermöglichen, wurden weitere Stammlösungen mit 20 und 200 µM PMA in ultrareinem Wasser hergestellt. Von jeder PMA-Konzentration wurden vier Replikate erstellt, die 3, 5, 10 und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert wurden. Die Belichtungszeit war bei allen Proben identisch (10 Minuten). Die Proben wurden extrahiert und mit der qPCR quantifiziert (Primer 2 - 629).

6.5.4 *E. faecalis*

Test von Wachstumsbedingungen

E. faecalis wurden wie in 6.3.1 beschrieben in R2A, LB, 10 % LB (verdünnt mit 0,9 % NaCl) und TSB-Medium kultiviert. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden die Bakterien in 0,9 % | 1,2 % | 3,5 % | 6,0 % NaCl suspendiert. Die so hergestellten Proben wurden nach dem Standardprotokoll (s. 6.3.8 ff.) mit 50 µM PMA behandelt, extrahiert und mit der qPCR (56 - 573) quantifiziert. Das Salz wurde vor der PMA-Behandlung nicht entfernt.

6.5.5 Modifikation der PMA-qPCR

Desoxycholsäure

50 µL der Arbeitslösungen von *E. coli* und *E. faecalis* wurden mit 1 µL 5 % Desoxycholsäure gemischt und für 20 Minuten bei 30 °C auf dem Thermoblock inkubiert. Die Proben wurden danach mit 1 µM PMA behandelt (Standardverfahren, 6.3.8). Als Kontrolle diente eine Probe ohne Desoxycholsäure sowie eine Probe ohne PMA. Die Proben wurden extrahiert und mittels qPCR quantifiziert (*E. coli*: UidA 2 - 629, *E. faecalis*: SodA 56 - 573).

Glycerin

Analog zum Versuch mit Desoxycholsäure wurden Proben von *E. coli* und *E. faecalis* vor der PMA-Behandlung mit 2,5 bzw. 5 µL Glycerin vermengt und gemischt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie im vorherigen Versuch beschrieben.

6.5.6 Gesamtbakterienzahl (auf Basis von 16S-rDNA)

Test verschiedener PMA-Konzentrationen

Eine Arbeitslösung verschiedener Bakterien (*E. coli*, *E. hermannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. jejuni*, *C. perfringens*, *E. gallinarum*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *M. luteus* und *B. subtilis*) wurde im 6.3.1 beschriebenen Standardverfahren hergestellt. Jeweils zwei Replikate (je 50 µL) wurden mit 0, 1, 5, 10, 25, 50 und 100 µM PMA behandelt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 10 Minuten belichtet. Bei Gram-negativen Bakterien wurde bei jeweils zwei zusätzlichen Proben die Temperatur bei der PMA-Inkubation auf 30 °C und 40 °C erhöht. Die Proben wurden extrahiert und mittels qPCR (16S, 341 - 926) quantifiziert.

6.6 Etablierung der Durchflusszytometrie

Konzentration der Zellfarbstoffe: SYBRGreen

Unbehandelte und hitzebehandelte (90 °C, 10 Minuten) *E. coli* wurden mit 1 / 0,5 / 0,1 und 0,05-fach konzentriertem SYBRGreen angefärbt. Zur vereinfachten Darstellung wurden die Plots der separaten Messungen in ein Bild zusammengefügt.

Konzentration der Zellfarbstoffe: Propidiumiodid

Ein vergleichbares Experiment wurde mit Propidiumiodid durchgeführt. *E. faecalis*, *E. coli* und *P. aeruginosa* sowie Belebtschlamm (1:1000 in 0,9 % NaCl, Kläranlage Karlsruhe-Neureut) wurden jeweils mit 0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 und 5-fach konzentrierter Propidiumiodidlösung behandelt. Die Messwerte der Rot-Fluoreszenz der stärksten Konzentration an Signalen (die meisten Zellen) wurden in einem Diagramm dargestellt.

Test der Lebend/tot-Unterscheidung

In der Durchflusszytometrie wurden wie in der PMA-qPCR Verdünnungsreihen aus unbehandelten (intakten) Bakterien und Mischungen aus unbehandelten und hitzebehandelten (beschädigten) Bakterien vermessen. Dabei handelt es sich um die gleichen Proben, die bereits für den Test der LA-PMA-qPCR eingesetzt wurden. Das Verfahren ist unter 3.2.4 und in Abbildung 35 beschrieben.

6.7 Anwendung der Lebend/tot-Unterscheidung bei Desinfektionsverfahren

Details zur Behandlung der jeweiligen Desinfektionsmethoden sind im Folgenden aufgeführt. Grundsätzlich wurden Arbeitslösungen von Bakterien und Viren (6.3.1 und 0) in Leitungswasser gelöst. Zur Entfernung des Mediums wurden Phagen-Stammlösungen durch zentrifugale Ultrafiltration (Vivaspin 15R 30.000) konzentriert und wieder in frischem Leitungswasser gelöst. Dies wurde 3 mal wiederholt. Die jeweiligen Lösungen wurden dann auf die Probengefäße in gleichem Volumen aufgeteilt. Für jede Dosis wurden stets zwei Probegefäße angesetzt.

6.7.1 Thermische Desinfektion

Die Probelösungen wurden in 50-mL-Kunststoffröhrchen (*E. coli*) oder 1,5-mL-PCR-Reaktionsgefäße (*P. aeruginosa*, MS2, phiX174) gefüllt und im vorgeheiztem Thermoblock nach Erreichen der Temperatur im Referenzgefäß (Trinkwasser ohne Probe) inkubiert. Proben mit phiX174 wurden für 10 Minuten bei 50 °C, 70 °C und 90 °C und bei 105 °C für 10,

20, 30 und 60 Minuten inkubiert. *E. coli*, *P. aeruginosa* und MS2 wurden für 10 Minuten bei 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C und 90 °C temperiert. Zur schnelleren Kühlung wurden die 50-mL-Proben vor der Lagerung bei 8 °C für 5 Minuten auf Eis gestellt.

6.7.2 Chlorung

Natriumhypochlorit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde 1:1000 mit Leitungswasser auf etwa 130 mg/L freies Chlor verdünnt. Die Konzentration des freien und des Gesamtchlors wurde in einer 1:100-Verdünnung mit dem Nanochlor-Küvettest (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt.

10 mL Probenlösung wurde in 20-mL-Glasgefäße gegeben. Anhand der Chlorkonzentration der Stammlösung wurde in die Probengefäße eine entsprechende Menge Chlor gegeben, um Konzentrationen von 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,6 mg/L, 1,2 mg/L, 4 mg/L und 10 mg/L zu erreichen. Die Proben mit MS2, *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden mit anderen Chlorkonzentrationen von 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,75 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L und 4 mg/L Chlor versetzt. Die Chlorkonzentration jeder Probe wurde mit dem Küvettest bestimmt. Nach 25 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 10 µL 1M Natriumthiosulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) abgestoppt. Bei phiX174 wurde ein Replikat zusätzlich erst nach 55 Minuten gestoppt. Durch die Chlorzugabe hatten alle Probegefäße ein unterschiedliches Volumen. Um dies auszugleichen, wurden durch Zugabe von Leitungswasser alle Proben nach der Reaktion auf ein einheitliches Volumen gebracht (15 mL). Das für die Chlorung von phiX174-Bakteriophagen eingesetzte Pipettierschema ist in Tabelle 47 dargestellt. Die Proben wurden bei 8 °C gelagert und mit den entsprechenden Methoden (s. Tabelle 25) quantifiziert.

Tabelle 47: Pipettierschema zur Chlorung von phiX174-Bakteriophagen.

Ziel-Dosis mg/L	Probenvolumen mL	Zugabe Chlor mL	freies Chlor mg/L	Gesamtchlor mg/L	Wasserzugabe mL
0	10	0	n/a	n/a	5
0,05	10	0,3	0,07	0,66	4,7
0,1	10	0,4	0,16	0,66	4,6
0,5	10	0,6	0,55	1,32	4,4
1,2	10	1	1,32	2,2	4
4	10	2	3,96	4,76	3
10	10	5	12,4	12,64	0

6.7.3 Ozon

Bei der Ozonung wurden 100-mL-Glasflaschen mit 50-mL-Probe eingesetzt. Ozonhaltiges Wasser wurde freundlicherweise von der Abteilung Technologie des TZW Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Ozon aus einem Generator (Ozomat COM-AD-02, Anseros, Tübingen, Deutschland) wurde in einen gekühlten Glaszylinder geleitet. Die Ozonkonzentration der Stammlösung wurde mittels Farbumschlag der Indigo-Methode (EN ISO 10705-1:2001, n.d.) bestimmt (ca. 26 mg/L). Bei phiX174 wurden Ozonkonzentrationen von 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 3,0 mg/L, 5,0 mg/L und 10 mg/L, bei MS2, *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L, 3,0 mg/L, 5,0 mg/L und 10 mg/L eingestellt. Das ozonhaltige Wasser wurde entsprechend der Zielkonzentration in die Probengefäße gegeben. Nach 25 minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit 10 µL 1M Natriumthiosulfat abgestoppt und das Volumen mit Leitungswasser auf 100 mL gebracht. Das für die Ozonbehandlung von phiX174-Bakteriophagen eingesetzte Pipettierschema ist in Tabelle 48 dargestellt. Die Proben wurden bei 8 °C gelagert und mit den entsprechenden Methoden (s. Tabelle 25) quantifiziert.

Tabelle 48: Pipettierschema zur Ozondesinfektion von phiX174-Bakteriophagen.

Probenvolumen mL	Ozon mg/L	Ozon-Zugabe mL	Trinkwasser Zugabe mL
50	0	0	50
50	0,1	0,2	50
50	0,2	0,4	50
50	0,5	1,02	49
50	1	2,08	48
50	2	4,35	46
50	3	6,82	43
50	5	12,5	38
50	10	33,33	17

6.7.4 UV

phiX174: Zur Bestrahlung wurde ein Niederdruckstrahler (253,7 nm) nach dem Protokoll von (Bolton et al., 2015) eingesetzt. Dieser *Collimated Beam*-Strahler wurde freundlicherweise von der Abteilung Technologie des TZW zur Verfügung gestellt. 10 mL der Probelösung wurde in eine Petrischale (45 mm) auf einem Magnetprüher unter der UV-Lampe platziert und entsprechend der Zieldosis bestrahlt. Der Versuch wurde in drei Ansätzen mit unterschiedlichen Bestrahlungsbereichen zwischen 0 und 1000 J/m² durchgeführt. Die genauen Werte sind wie folgt:

- a. 0, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 J/m²
- b. 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 J/m²
- c. 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 J/m²

***E. coli*, *P. aeruginosa*, MS2:** Eine anderer UV-Strahler wurde für diese Versuche eingesetzt. Die Strahlung einer 254-nm-UV-Lampe (Nu-8-KL, Konrad Benda-Herolab, Freiberg, Deutschland) wurde mit einem Radiometer (EPIGAP, Ö-NORM M5873-1: 2001-03) in verschiedenen Winkeln und Entfernungen gemessen (Abbildung 113, A). Eine 10-mL-Probe wurde in einer Petrischale 10 cm unter der Lampe auf einem Magnetprüher platziert. Die in diesem Abstand verrichtete Leistung der Lampe beträgt ca. 8,3 W/m² (Abbildung 113, D). Diese Leistung wird nach dreiminütigem Vorbrennen der Lampe erreicht, und bleibt danach konstant. Diese wurde aus dem Mittelwert der Emissionsmesswerte im Bereich der Petrischale gebildet. Die Proben wurden für 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Sekunden, sowie für 20 Minuten bestrahlt, um Strahlungsdosen von 25, 50, 75, 100, 200, 400 und 10000 J/m² zu erreichen. Um eine Reparatur der durch UV induzierten Schäden zu vermeiden (z.B. durch Photoreaktivierung), wurden die Reaktionsgefäße durch Alufolie vor Licht geschützt, bei 8 °C gelagert und mit den entsprechenden Methoden (s. Tabelle 25) quantifiziert.

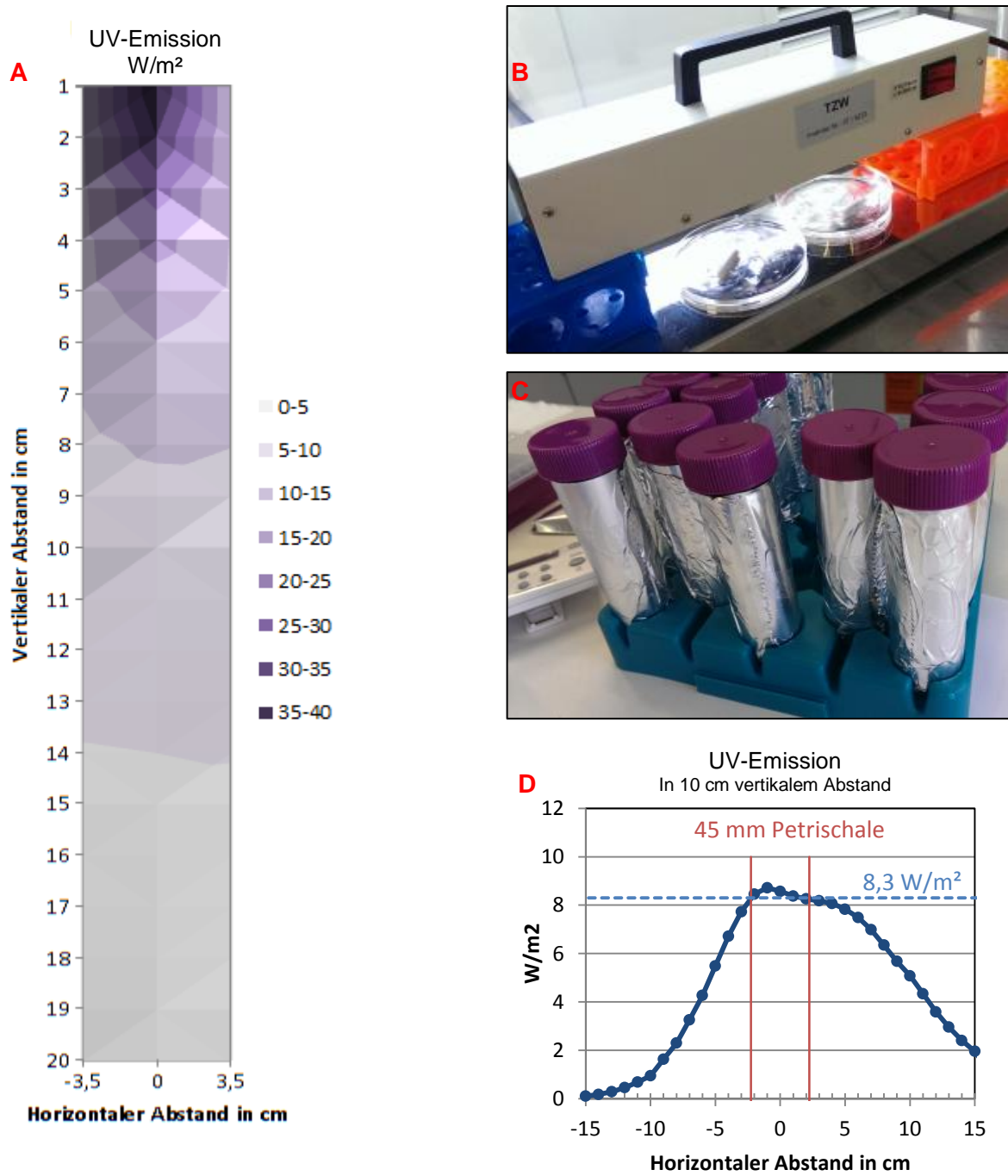


Abbildung 113: A: UV-Emission des eingesetzten Strahlers in verschiedenen Entfernungen zur Lampe. Versuchsaufbau zur UV-Behandlung von Proben (B) und lichtgeschützte Lagerung der Proben (C). Bestimmung der Emission bei 10 cm Entfernung zur Lampe bei 45-mm-Petrischalen (D).

6.7.5 Raman-Mikrospektroskopie

Eine unbehandelte und hitzebehandelte Arbeitslösung von *E. coli* wurde wie in 6.3.1 beschrieben hergestellt. Aus der Kultur wurden in jeweils zwei 1,5-mL-Reaktionsgefäße 100 μ L der Bakterienlösung gegeben. Eine der Proben wurde jeweils mit 100 μ M PMA behandelt, so dass vier Probentypen entstanden:

- Unbehandelte *E. coli* ohne PMA
- Unbehandelte *E. coli* mit PMA
- Hitzebehandelte *E. coli* ohne PMA
- Hitzebehandelte *E. coli* mit PMA

Die Proben wurden gekühlt an die TUM transportiert und dort mit dem in Kubryk et al. (2015) beschriebenen Verfahren vorbehandelt. Zur Durchführung der Raman-Mikrospektroskopie wurden je Probe zwei bis vier Zellen ausgewählt und die Raman-Spektren aufgenommen. Für die Versuche wurde ein Raman-Mikroskop (LabRAM HR, Horiba Scientific, Frankreich) mit einem Nd:YAG-Laser (532 nm, max. 27 nW an der Probe) sowie einem He-Ne-Laser (633 nm, max. 14 nW an der Probe) und 100x-Objektiv (NA = 0,9) eingesetzt.

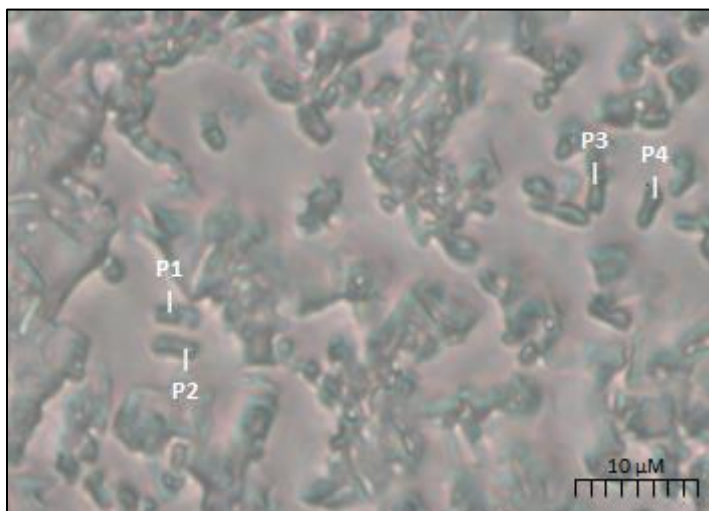


Abbildung 114: Mikroskopische Aufnahme von *E. coli* Bakterien (unbehandelt, kein PMA) mit markierten Zellen zur Raman-Mikrospektroskopie. Ein Teilstrich entspricht einem μ m.

Die Versuche erfolgten ebenfalls analog zur Durchführung in Kubryk et al. (2015). Die mit PMA behandelten Proben mussten mit einer geringeren Laserleistung aufgenommen werden: unbehandelte *E. coli* wurden bei 10 \times 10 s bei 50 % Laserleistung und bei hitzebehandelten *E. coli* bei 10 \times 1 s bei 25 % Laserleistung gemessen.

6.8 Integration ins Hygiene-online-Monitoring (EDIT Projekt)

6.8.1 Aufkonzentrierung

Monolithische Adsorptionsfiltration (MAF)

Jeweils 1 L Trinkwasser (Karlsruhe) wurde mit Ozon, Chlor, UV und Hitze behandelt. Drei Replikate mit jeweils 100 mL wurden mittels MAF-DEAE (Diethylaminoethan) und parallel dazu mit 0,45- μ m-Filtern aufkonzentriert. Die Ozon (1 mg/L und 5 mg/L), Chlor (0,2 mg/L und 1,2 mg/L), UV (100J/m² und 400 J/m²) und Hitzebehandlung (60 °C und 90 °C) erfolgt wie in den Desinfektionsversuchen (6.7). Die MAF-Säulen wurden freundlicherweise von der TUM zur Verfügung gestellt. Zur Aufkonzentrierung nach der Desinfektion wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Zusammensetzen der Filterapparatur (Netz + O-Ring + MAF Disc).
2. Füllen der Apparatur mit sterilem Wasser.
3. Verschließen der Apparatur, Anschluss an Schlauch und Schlauchpumpe.
4. Filtration der Probe (ca. 0.4 L/min).
5. Verschließen des Ablaufs.
6. Zugabe von 20 mL Puffer (1,5 M NaCl, 0,05 M HEPES, pH 7).
7. Elution von 1/3 Volumen, 2 Minuten Pause, wiederholen bis das ganze Volumen eluiert wurde.
8. Lagerung der Probe bei 8 °C im Kühlschrank.

Die Bakterien auf den 0,45- μ m-Filtern wurden in 15-mL-Zentrifugengefäße gegeben, mit 10 mL steril filtriertem Leitungswasser gefüllt und durch Verwirbeln vom Filter gelöst. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie (SYBR Green und Propidiumiodid Färbung) untersucht.

Konzentrierungskette (CUF – MAF – UF)

Die genauen Details zu den jeweiligen Konzentrierungsstufen und dem Ablauf der Prozesskette sind in der Dissertation von Dennis Elsässer (TUM) nachzulesen (<http://www.ch.tum.de/index.php?id=814>).

6.8.2 Lab-On-Chip-Modul

Herstellen der Mikrofluidik-Chips

Chips wurden vom IMTEK Freiburg zur Verfügung gestellt. Das in der Mitte des Chips positionierte Gel wurde jeweils vor einer Versuchsreihe hergestellt. Dazu wurde 1 mL Polyacrylamidlösung in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß nach folgendem Rezept hergestellt:

Stoff	Menge
1-fach TAE	867,5 μ L
40 %-iges Acrylamid/Bisacrylamid	125 μ L
Temed	2 μ L
10 %-iges APS	5,5 μ L

Die Lösung wurde mit einer 10- μ L-Pipette in die Gelkammer gespritzt. Der Chip wurde mindestens eine Stunde zum Trocknen in einem geschlossenen Gefäß mit etwas Wasser bei Raumtemperatur gelagert.

Durchführung von Experimenten mit Mikrofluidik-Chips

Experimente mit den Mikrofluidik-Chips wurden nach folgendem Ablauf durchgeführt:

1. Herstellen der entsprechenden Proben.
2. Probe im gleichen Volumen mit 1-fach konzentriertem TAE-Puffer mischen.
3. 10 μ L der Probenmischung wird mit einer 10- μ L-Pipette in die Probenkammer eingespritzt. Dabei muss langsam pipettiert werden, um die Flüssigkeit in der Probenkammer verteilen zu können.
4. In die Elutionskammer (gegenüber der Probenkammer) wird 10 μ L 1 x TAE-Puffer gegeben.
5. Der Chip wird in die Halterungsapparatur gesteckt und die Kontakte angeschlossen.
6. Die Spannungsquelle wird für 10 Minuten eingeschaltet.
7. Aus der Elutionskammer wird die Flüssigkeit mit einer 10- μ L-Pipette entfernt und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben.
8. Lagerung der Probe bei -20 °C oder direkte Weiterverarbeitung (qPCR).

7 Anhang

7.1 Sequenzen der Standards

In den folgenden Sequenzen wurden *forward* (grün) und *reverse* (rot) Primer farblich hervorgehoben.

MS2

CTACCGATCGTCGTTGTTTGGCAATGCACGTTCTCCAACGGTGCCTCTATGGGGCACAAGTTGCAGG
 ATGCAGCGCCTTACAAGAAGTTCGCTGAACAAGCAAGCGTTACCCCGCGCTCTGAGCGGCTCTATTG
 GTCCGAGACCAATGTGCGCCGTGGATCAGACACGCGGTCCGCTATAACGAGTCATATGAATTTAGGCT
 CGTTGTAGGGAACGGAGTGTTCACAGGTCCGAAGAATAATAAAAATAGATCGGGCTGCCTGTAAGGAGC
 CTGATATGAATATGTACCTCCAGAAAGGGTTCGGTGCCTTTATCAGACGCCGGCTCAAATCCGTTGGT
 ATAGATCTGAATGATCAATCGATCAACCAGCTTCTGGCTCAGCAGGGCAGCGTAGATGGTTCGCTTGC
 GACGATAGACTTATCGTCTGCATCCGACTCCATCTCCGATCGCCTGGTGTGGAGTTTTCTCCACCTG
 AGCTATATTCATATCTCGATCGTATCCGCTCACACTACGGAATCGTAGATGGCGAGACGATACGATGG
 GAACTATTTTCCACAATGGGAAATGGGTTACATTTGAGCTAGAGTCCATGATATTCTGGGCAATAGT
 CAAAGCGACCCAAATCCATTTTGGTAACGCCGAACCATAGGCATCTACGGGGACGATATTATAAGTC
 CCAGTGAGATTGCACCCCGTGTGCTAGAGGCACTTGCCACTACGGTTTTAAACCGAATCTTCGTCAA
 ACGTTTCGTGTCCGGGGCTCTTTTCGCGAGAGCTGCGGGCGCGCACTTTTACCGTGGTGTGATGTCAA
 CCGTTTTGCATCAAGAAACCTGTTGACAATCTCTTCGCCCTGATGCTGATATTAAATGGGCTACGGGG
 TTGGGGATTTGTCGGAGGTATGTCAGATCCAGCCTCTACAAGGTGTGGGGTACGGCTTTCCTCCAG
 GTGCCTTCGATGTTCTTCGGTGGGACCGACCTCGCTGCCGACTACTACGTAGTCAGCCCGCCTACGGC
 AGTCTCGGTATACACCAAGACTCCGTACGGGCGGCTGCTCGCGGATACCCGTACCTCGGGTTCCGTC
 TTGCTCGTATCGCTCGAGAACGCAAGTTCTTCAGCTAAAAGCACGACAGTGGTTCGTACATAGCGTGG
 TTCCATACTGGAGGTGAAATCACCGACAGCATGAA

E. faecalis (SodA)

TTGACGTGGAAACAATGCACCTTACACCATGATAAACACCACAACACTTATGTGACTAACTTAAACGCA
 GCGATTGAAAAACATCCAGAATTGGGCGAAAAATCTGTAGAAAACCTAATTTCAAGATATGAATGCTAT
 TCCTGAAGATATCCGCACAGCTGTTTCGTAACAATGGTGGCGGTCACGCAAACCATAACATTTCTTCTGGG
 AAATTATGGCACCAAATGCTGGTGGACAACCAACTGGCGCTATTAAGAAGCAATCGATGAAACATTT
 GGTAGCTTTGATGAAATGAAAGCTGCTTTCAAAAACAGCTGCAACTGGCCGCTTTGGTTCAGGTTGGGC
 TTGGTTAGTTGTGAATAACGGTAAATTAGAAATCACTTCAACACCAAACCAAGATTCACCATTAATGG
 ATGGCCAAACACCTGTTTTAGGTCTTGACGTTTGGGAACATGCGTATTACTTAAAATATAAAAACGTT
 CGTCCAGATTACATTGAAGCATTCTGGAACGTTGTTAACTGGGATAAAGTAAACGAACTTTTGCTGC
 AGCAAAATAAGTTTGCCAATTGTAAAAGGAAAGAGTCAAATGACGGCCGTCATTTGACTCTTCCCTT
 TTTACAAATCCAGGGTCGAAATAGTTGTTTCGTTTATGGCATACTAAAGTAAGTAGGGAAAAGATAACGG
 ATACATAAAGAAGGAGCTAAAAAATGAATGTTATGATGCAAAAAGTACACGGGTCAGAAAATGATTT
 CTTTTTATTGGATGAAACACAGTTTGGAGCGTTCTTTAACCGCTGAGGAAATTGAGCAATTGCGCATCC
 AGTTATGTTTCGCGGAAACAGGATTATTGGCGGGAGCAGATGGGTTACTTTTTGGTAGGAGAAGGGACT
 CACGGCACGCCCAATGCTAGAATGCGAGTGATTAACAGCGATGGTAGTGAAGCAAGCATGTGCGGGAA
 CGGCTTGCGTACGGTTGCCCGTTATTTAGCTGAAAAAACAAGAAAAATCATTTACAGTTGAAACAA
 TGTTTGCAGATTTGAAAGTACGTCAAGCCCCAATTTAGCTGAAGAAGTAGCGACTTACCAAGTGGAA
 ATTTCCGCCAGTAAGTTTTGAAGCAGTTACTATCCCAATGCATTTAGGGGTCCAAACATTAATTGATGA
 AATCGTACCAGCCTTATCTAAACCATTCGCTTTACAGCGG

Bakterien (16S)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCAAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAG
GAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGAAACTGCCTGATGGA
GGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCG
GGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGCGA
CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTTCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAA
GGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGAC
GTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGCT
CAACCTGGGACCTGCATTTGATACCGCCAAGCCTCAGTCTCGGAGGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGAC
GCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT
CGACTTGGGGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAATGT
GCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGC
CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCG
TAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGAATG
CCACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGA
AGTAGGTAGCTTAACCCTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC
AAGGTAACC

E. coli (UidA)

ATTGTTGCCTCCCTGCTGCGGTTTTTCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAGCGTTTTTGCAGCAGAAAA
GCCGCCGACTTCGGTTTTGCGGTGCGGAGTGAAGATCCCTTTCTTGTACCGCCAACGCGCAATATGCC
TTGCGAGGTCGCAAAGTCGGCGAAATCCATACCTGTTACCGACGACGGCGCTGACGCGATCAAAGA
CGCGGTGATACATATCCAGCCATGCACACTGATACTTCTACTCCACATGTGCGGTGTACATTGAGTGC
AGCCCGGCTAACGTATCCACGCCGTATTCCGGTATGATAATCGGCTGATGCAGTTTTCTCCTGCCAGGC
CAGAAGTTCTTTTTCCAGTACCTTCTCTGCCGTTTCCAAATCGCCGCTTTGGACATAACCATCCGTAAT
AACGGTTCAGGCACAGCACATCAAAGAGATCGCTGATGGTATCGGTGTGAGCGTCGCAGAACATTACA
TTGACGCAGGTGATCGGACGCGTCCGGTTCGAGTTTACGCGTTGCTTCCGCCAGTGGCGCGAAATATTC
CCGTGCACCTTGCGGACGGGTATCCGGTTCGTTGGCAATACTCACATCACCACGCTTGGGTGGTTTT
TGTCACGCGCTATCAGCTCTTTAATCGCCTGTAAGTGCCTTGTGAGTTTCCCCGTTGACTGCCTCT
TCGCTGTACAGTTCTTTCCGGCTTGTGCCCGCTTCGAAACCAATGCCTAAAGAGAGGTTAAAGCCGAC
AGCAGCAGTTTCATCAATCACCACGATGCCATGTTTCATCTGCCAGTCGAGCATCTCTTTCAGCGTAA
GGGTAATGCGAGGTACGGGTAGGAGTTGCCCAATCCAGTCCATTAATGCGTGGTTCGTGCACCATCAG
CACGTTATCGAATCCTTTGCCACGCAAGTCCGCATCTTCATGACGACCAAAGCCAGTAAAGTAGAACG
GTTTGTGGTTAATCAGGAAGTTCGCCCTTCACTGCCACTGACCGGATGCCGACGCGAAGCGGGTAG
ATATCACACTCTGTCTGGCTTTTGGCTGTGACGCACAGTTTCATAGAGATAACCTTACCCCGTTGCCA
GAGGTGCGGATTCCCCTGCAACAGTCCAGGTAGTGCTTCGTCCAGTTGCCACCCCCCTGTTTATCCG
CATCAAGATAGTTCAACGCTGACATCACAATTGGCCACCACCTGCCAGTCAACAGACGTGTGGTTACA
GTCTTGCGCGACATGCGTCAACCAGGTTATATCGTCCACCCAGGTGTTCCGGGTTGGTGTAGAGCATT
CGCTGCGACGGATCCCAGCATAGTTAAAGAAATCATGGAAGTAAGACTGCTTTTTCTTCCGTTTTTG
TCGGTAATCACCATTCCCAGCGGGATAGTCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTTACACAACGGTGATACG
TACACTTTTCCCAGCAATAACATACGGCGTGACATCGGCTTCAAATGGAGTATAGCCGCCCTGATGGT
CCATCACTTCTGATTATTGACCCACACTTTGCCGTAATGAGTGACCGCATCGAAACGCAGCAGGATA
CGCTGGCCTGCCAACCTTTCCGGTATAAAGACTTCGCGCTGATACCAGACGTTGCCCGCATAATTACG
AATATTTGCATCGGCGAAGTGCCTGTTAAACTGCCTGGCACAGCAATTGCCCGGCTTTCTTGTAAACG
CGCTTCCCACCAACGGTGCATCAATCCACAGTTTTTCGCGATCCAGACTGAATGCCACAGGCGCTCG
AGTTTTTTGATTTACGGGTTGGGCTTTCTACAGGACGTAACA

7.2 Erstellte Software

MPN Verfahren

Dieses Programm wurde zur vereinfachten und schnellen Auswertung vieler MPN-Ergebnisse geschrieben. Die Anzahl positiver Kavitäten muss dabei als laufende Zahlenfolge, beginnend mit der kleinsten Verdünnung, eingetragen werden (z.B. 541 bei fünf positiven Kavitäten in der unverdünnten, vier in der 1:10 verdünnten, eine in der 1:100 verdünnten Probe). Mehrere Proben können nacheinander durch Zeilenumbruch eingetragen werden. Die Berechnung der Organismenkonzentration (pro mL) erfolgt automatisch.

MPN THING

1. enter settings of your experiment
 2. enter MPN positive result values for each row without separator (e.g. 554211)
 (use a leading zero (e.g. 0204 for 2 and 4) when n > 3)
 3. use a new line for each sample
 4. results are displayed below

Manual settings

Number of dilutions: 8
 Number of replicates (n): 5
 sample volume (µL): 30

Presets

MPN
 Methanogenes
 BTEX degraders
 Manual settings

543
 21
 555541

no.	dil values	MPN/mL
1	5,4,3,0,0,0,0,0	900,23
2	2,1,0,0,0,0,0,0	22,77
3	5,5,5,5,4,1,0,0	561787,16

n:5 dils:8 vol:0.03 mL

Scientific values (rounded)

Voreinstellungen

Anzahl der Replikate, Verdünnungen, Volumina. Manuelle Einstellungen sind ebenfalls möglich.

MPN-Ergebnisse

Eingabe der Anzahl Positiven Wells je Verdünnung.

Organismenkonzentration

Automatisch berechnet für alle Eingeebenen Versuche.

7.3 F- und t-Test

Formel 9

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Formel 10

$$t = \frac{r \times \sqrt{n}}{\sqrt{(1 - r^2)}}$$

Formel 11

$$F = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{k - 1}}{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - f(x)_i)^2}{n - k}}$$

Dabei sind x und y die Messwerte der zu vergleichenden Methoden, n die Anzahl der Datenpunkte und k die Anzahl der Variablen inklusive des Interzept.

7.4 Literaturliste zur PMA-Behandlung

Tabelle 49: Literaturliste zum Einsatz von interkalierenden Farbstoffen in der PCR oder qPCR mit Angaben zu den eingesetzten Organismen (bei Bakterien: + = Gram-positiv, - = Gram-negativ), der Inaktivierung, der PMA-Konzentration in μM und der Amplifikatlänge in der PCR oder qPCR. Die Amplifikatlänge wurde in vielen Studien nicht angegeben. Eine Bestimmung war jedoch meist aus den angegebenen Primersequenzen durch eine BLAST-Suche gegen den Zielorganismus möglich.

Literatur	Organismus	Behandlung / Inaktivierung	PMA-Konzentration in μM	Amplifikatlänge
(Bae and Wuertz, 2009)	Fäkale Bacteroidales (-)	Sonne	100	100
(Bae and Wuertz, 2012)	Campylobacter (-), Salmonella (-), Enterococcus (+) (Mensch, Kuh, Hund)	Sonnenlicht	100	150
(Banihashemi et al., 2012)	C. jejuni (-), Salmonella (-)	UV 500 J/m ²	15	100, 1700
(Bellehumeur et al., 2015)	PRRS-Virus Klinische Proben	Keine	100	100
(Cawthorn and Witthuhn, 2008)	Enterobacter sakazakii (-)	Hitze, 100 °C, 10 min	50	928
(Chang et al., 2009)	L. pneumophila (-) im Poolwasser	95 °C, 2 min 1 mg/L Chlor	EMA	453
(Chang et al., 2009) (Chang et al., 2010)	L. pneumophila (-) im Poolwasser	95 °C, 2 min 1 mg/L Chlor	50-400	453
(Contreras et al., 2011)	<i>Vibrio anguillarum</i> (-), <i>F. psychrophilum</i> (-)	40-80 °C	10	140 - 720
(Coudray-Meunier et al., 2013)	Hepatitis A (sR) Rotavirus (dR)	80 °C	50	174 353 77 87 313 352
(de Almeida et al., 2016)	<i>E. faecalis</i> (+) im Biofilm	EDTA, PBS, Salzlösung	50	138
(Delgado-Viscogliosi et al., 2009)	L. Pneumophila (-)	Wasserproben	5-200	n/a
(Desfossés-Foucault et al., 2012)	Lactococcus (+) 100 °C 18 min		200	100
(Dong et al., 2014)	Bacteroides ovatus (-)	UVA (Sonnenlicht)	100	271
(Elizaquível et al., 2012a)	<i>E. coli</i> (-), <i>Listeria monocytogenes</i> (+), <i>Salmonella</i> (-) auf Gemüse	Isopropanol	50	100
(Elizaquível et al., 2012b)	<i>E. coli</i> (-) O157:H7 auf Salat und Soya	Ätherische Öle	100	142
(Escudero-Abarca et al., 2014)	Snow Mountain Virus (Norovirus)	85 °C 1-15 min	100	213
(Fittipaldi et al., 2010)	T4 Phagen		100	163
(Fongaro et al., 2016)	Mengovirus Adenovirs In Schweinekot	Hitze 95 °C und Lagerung bei 23 °C	50	Ca. 100
(Gensberger et al., 2013)	<i>E. coli</i> (-) <i>P. aeruginosa</i> (-)	Hitze, 75 °C 10´	10	760

Literatur	Organismus	Behandlung / Inaktivierung	PMA-Konzentration in μM	Amplifikatlänge
(Graiver et al., 2010)	Influenza	37 °C	200	100
(Josefsen et al., 2010)	Campylobacter (-) auf Hühnchen		20	287
(Karim et al., 2015)	Poliovirus	Hitze, 72 °C, 99 °C	348	100-400
	Murine Noroviren	Chlor, 0,5 mg/L		
	Norwalk Virus	UV 330 J/m ² , 1870 J/m ²		
(Kim and Ko, 2012)	MS2 Muriner Norovirus	Hitze 72 °C, 10 min (Noro) 80 °C, 20 min (MS2)	10	300
(Kim and Ko, 2012)	<i>E. coli</i> (-) <i>B. subtilis</i> (+)	Isopropanol	125	300
(Kim and Wuertz, 2015)	<i>E. coli</i> (-), Enterococcus (+) im Sediment	real	100	106
(Kobayashi et al., 2009b)	<i>E. coli</i> (-)	100 °C, 15 min	-	-
(Kobayashi et al., 2009a)	<i>S. aureus</i> (+) <i>S. epidermidis</i> (+)	Hitze	50	337
(Kralik et al., 2010)	<i>Mycobacterium avium</i> (+)	Hitze, 80 °C 15 min	5-100	145
(Kralik et al., 2014)	<i>Mycobacterium avium</i> (+)	UV (0,26-2,6 KJ/m ²)	25	337
(L. Asfahl and C. Savin, 2012)	<i>E. coli</i> im Abwasser	Ozon 2u8 mg/L, UV, Chlor (ohne Anagabe)	240	187
(Lee and Levin, 2009)	<i>V. vulnificus</i> (-)	Einfrieren	2	205
(E.-S. Lee et al., 2015)	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Chlor 2u40 mg/L, Ozon 1,5 mg/L, UV 1KJ/m ²	30	442
(M. Lee et al., 2015)	Murines Norovirus	Hitze bis 90 °C, 1 min	250	52
(Leifels et al., 2015)	Adenovirus	600-2300 J/m ² 2 mg/L Chlor	100	
	Poliovirus			
	phiX174			
(Løvdal et al., 2011)	<i>L. innocua</i> (+)	Hitze 80 °C, 15 min	50	101
(Luo et al., 2010)	<i>A. faecalis</i> (+) in Sediment	real	40	1400, 200 (Nested)
(Mamlouk et al., 2012)	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (+)		50	70
(Moreau et al., 2015)	Herpesvirus 1	Pestizide	500	197
(Moreno et al., 2015)	Hepatitis A (sR) Auf Salat und Spinat	99 °C 5 min	50	172
(Nkuipou-Kenfack et al., 2013)	<i>Salmonella Typhimurium</i> (-) <i>Listeria monocytogenes</i> (+)		10	288, 175
(Nocker et al., 2006)	<i>E. coli</i> 0157:H7 (-) <i>S. sobrinus</i> (+)	Isopropanol	3, 30, 240	103

Literatur	Organismus	Behandlung / Inaktivierung	PMA-Konzentration in µM	Amplifikatlänge
(Nocker et al., 2007)	L. monocytogenes (+) M. avium (+) E. coli (-)	Hitze 90 °C, Chlor bis 60 mg/L UV (ohne Angabe)	Bis 200	200
(Nocker et al., 2009)	Pseudomonas aeruginosa Listeria monocytogenes Salmonella enterica serovar Typhimurium Serratia marcescens Escherichia coli O157:H7	Isopropanol	100	100-300
(Pan and Breidt, 2007)	Listeria monocytogenes	-	50	78
(Parshionikar et al., 2010)	Norovirus, Poliovirus	0,5 mg/L Chlor Hitze 19, 37, 72 °C	100	360, 194
(Pinheiro et al., 2016)	E. faecalis	90 °C 30 min	100	143
(Prevost et al., 2016)	Adenovirus Coxsackievirus	UV (4KJ/m²) Chlor 10 mg/L	0,01	64
(Pribylova et al., 2012)	Mycobacterium avium (+)	Antibiotika	50	150
(Rawsthorne et al., 2009)	Bacillus subtilis Sporen	Hitze, 115 °C 0-10 min	10	271
(Rieder et al., 2008)	Klinisches Abwasser	Elektrisches Feld	50	490
(Salam et al., 2014)	E. faecalis (+)	Hitze, 85 °C 20 min	15 PBS 50 Salzwasser	144
(Sánchez et al., 2011)	Hepatitis A	100 mg/L Chlor Hochdruck 500MPa 15 min 45 °C	100	n/a
(Sassoubre et al., 2012)	E. faecalis	Seewasser	100	106
(Slimani et al., 2012)	L. pneumophila	Hitze, 59 °C, 30 min	6,25	n/a
(Soejima et al., 2011b)	E. coli (-) und andere Enterobacteriaceae	2 min 100 °C Hitze	100 (EMA)	110, 340, 670, 1490
(Soejima et al., 2012)	E. coli (-), S. enteritidis (-)	130 °C 2s, 66 °C 30 min	23,5	2583
(Takahashi et al., 2011)	E. faecalis (+) bei Patienten mit apikaler Parodontitis	real	240	107
(Takahashi et al., 2015)	Muriner Norovirus	Inaktiviertes Lysozym	50	128
(Tavernier and Coenye, 2015)	P. aeruginosa	95 °C 15 min	50	70
(Vesper et al., 2008)	Diverse Pilze	80 °C Hitze	30 (filter)	300
(Wang and Levin, 2006)	Vibrio vulnificus (-)	100 °C 5 min	6 EMA	204
(Wang et al., 2009)	E. coli O157:H7 (-) auf Fleisch	Fleisch	EMA	225
(Wang et al., 2014)	E. coli O157:H7 in Milch	63 °C, 2 Min	16 mit SD	201
(Wu et al., 2015)	Vibrio cholerae (-)	90 °C 15 min VBNC	20	97

Literatur	Organismus	Behandlung / Inaktivierung	PMA-Konzentration in μM	Amplifikatlänge
(Xiao et al., 2013)	<i>E. coli</i> als VBNC		20	118
(Yáñez et al., 2011)	<i>L. pneumophila</i> (-)	72 °C, 15 min	50	80
(Yang et al., 2011)	<i>E. coli</i> in Milch	Hitze bis 72 °C	100	131
(Yang et al., 2013)	<i>S. Typhimurium</i> (-), <i>E.coli</i> O157:H7 (-) <i>L. monocytogenes</i> (+) in Salat, Fleisch, Tomate	Hitze, 80 °C 10 min	20	300-700
(Zhang et al., 2015)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	254 nm	200	194, 1465
(Zhu et al., 2012)	<i>V. parahaemolyticus</i> (-) in Meeresfrüchten	90 °C 10 Minuten	20	233

8 Literaturverzeichnis

Acher, A., Fischer, E., Turnheim, R., Manor, Y., 1997. Ecologically friendly wastewater disinfection techniques. *Water Research* 31, 1398–1404. doi:10.1016/S0043-1354(96)00000-0

Air, G.M., Els, M.C., Brown, L.E., Laver, W.G., Webster, R.G., 1985. Location of antigenic sites on the three-dimensional structure of the influenza N2 virus neuraminidase. *Virology* 145, 237–248. doi:10.1016/0042-6822(85)90157-6

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

Amy, G., Bull, R., Craun, G., Pegram, A., Siddiqui, M., 2000. Disinfectants and disinfectant by-products, Environmental health criteria. World Health Organization, Geneva.

Arankalle, V.A., Sarada Devi, K.L., Lole, K.S., Shenoy, K.T., Verma, V., Haneephabi, M., 2006. Molecular characterization of hepatitis A virus from a large outbreak from Kerala, India. *Indian J. Med. Res.* 123, 760–769.

Arnold, M., Patton, J.T., McDonald, S.M., 2009. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses, in: Coico, R., McBride, A., Quarles, J.M., Stevenson, B., Taylor, R.K. (Eds.), *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. 15C.3.1-15C.3.24.

Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R., 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5, 209–219. doi:10.1586/14737159.5.2.209

Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., Graham, D.Y., 2014. Determination of the 50% human Infectious dose for Norwalk virus. *Journal of Infectious Diseases* 209, 1016–1022. doi:10.1093/infdis/jit620

Bae, S., Wuertz, S., 2012. Survival of host-associated bacteroidales cells and their relationship with *Enterococcus* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and adenovirus in freshwater microcosms as measured by propidium monoazide-quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 922–932. doi:10.1128/AEM.05157-11

Bae, S., Wuertz, S., 2009. Discrimination of viable and dead fecal Bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2940–2944. doi:10.1128/AEM.01333-08

Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555.

Balke, K.-D., Zhu, Y., 2008. Natural water purification and water management by artificial groundwater recharge. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 9, 221–226. doi:10.1631/jzus.B0710635

Banihashemi, A., Dyke, M.I., Huck, P.M., 2012. Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable *Campylobacter* and *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology* 113, 863–873. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05382.x

Barcina, I., Lebaron, P., Vives-Rego, J., 2006. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiology Ecology* 23, 1–9. doi:10.1111/j.1574-

6941.1997.tb00385.x

Beck, S.E., Rodriguez, R.A., Linden, K.G., Hargy, T.M., Larason, T.C., Wright, H.B., 2014. Wavelength dependent UV inactivation and DNA damage of adenovirus as measured by cell culture infectivity and long range quantitative PCR. *Environmental Science & Technology* 48, 591–598. doi:10.1021/es403850b

Bej, A.K., DiCesare, J.L., Haff, L., Atlas, R.M., 1991. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1013–1017.

Bellehumeur, C., Boyle, B., Charette, S.J., Harel, J., L'Homme, Y., Masson, L., Gagnon, C.A., 2015. Propidium monoazide (PMA) and ethidium bromide monoazide (EMA) improve DNA array and high-throughput sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus identification. *Journal of Virological Methods* 222, 182–191. doi:10.1016/j.jviromet.2015.06.014

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Häcker, B., 2011. *Biochemie*, Korr. Nachdr. der 6. Aufl. ed. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg.

Berliner Wasserbetriebe, 2017. Wasserkreislauf - Das Wasserwerk [WWW Document]. BWB. URL /content/language1/html/1806.php (accessed 8.24.17).

Bernard, H., Höhne, M., Niendorf, S., Altmann, D., Stark, K., 2013. Epidemiology of norovirus gastroenteritis in Germany 2001–2009: eight seasons of routine surveillance. *Epidemiology and Infection* 1–12. doi:10.1017/S0950268813000435

Blanco, A., Guix, S., Fuster, N., Fuentes, C., Bartolomé, R., Cornejo, T., Pintó, R.M., Bosch, A., 2017. Norovirus in bottled water associated with gastroenteritis outbreak, Spain, 2016. *Emerging Infectious Diseases* 23, 1531–1534. doi:10.3201/eid2309.161489

Bolton, J.R., Beck, S.E., Linden, K.G., 2015. Protocol for the determination of fluence (UV dose) using a low-pressure or low-pressure high-output UV lamp in bench-scale collimated beam ultraviolet experiments. *IUVA NEWS* 17.

Borchardt, M.A., Bertz, P.D., Spencer, S.K., Battigelli, D.A., 2003. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1172–1180. doi:10.1128/AEM.69.2.1172-1180.2003

Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Kieke, B.A., Lambertini, E., Loge, F.J., 2012. Viruses in nondisinfected drinking water from municipal wells and community incidence of acute gastrointestinal illness. *Environmental Health Perspectives* 120, 1272–1279. doi:10.1289/ehp.1104499

Burns, M., Valdivia, H., 2008. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *European Food Research and Technology* 226, 1513–1524. doi:10.1007/s00217-007-0683-z

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012. Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 685–706. doi:10.1128/MMBR.00023-12

Cai, Z., Zou, W., Wu, J., 2011. A dual-excitation difference technique for fluorescence rejection in Raman spectroscopy. *IEEE*, pp. 29–32. doi:10.1109/ISBB.2011.6107637

- Calendar, R., 2006. *The Bacteriophages*. Oxford University Press, Oxford; New York.
- Calgua, B., Carratalà, A., Guerrero-Latorre, L., de Abreu Corrêa, A., Kohn, T., Sommer, R., Girones, R., 2014. UVC inactivation of dsDNA and ssRNA viruses in water: UV fluences and a qPCR-based approach to evaluate decay on viral infectivity. *Food and Environmental Virology* 6, 260–268. doi:10.1007/s12560-014-9157-1
- Carducci, A., Morici, P., Pizzi, F., Battistini, R., Rovini, E., Verani, M., 2008. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Science & Technology* 58, 893. doi:10.2166/wst.2008.437
- Cawthorn, D.-M., Witthuhn, R.C., 2008. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1178–1185. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03851.x
- Chang, B., Sugiyama, K., Taguri, T., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Watanabe, H., 2009. Specific Detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 147–153. doi:10.1128/AEM.00604-08
- Chang, B., Taguri, T., Sugiyama, K., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Watanabe, H., 2010. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Japanese journal of infectious diseases* 63, 119–123.
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J.C., Stein, R.E., Ge, B., 2011. Rapid detection of viable *Salmonellae* in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4008–4016. doi:10.1128/AEM.00354-11
- Chernikov, A.V., Gudkov, S.V., Shtarkman, I.N., Bruskov, V.I., 2007. Oxygen effect in heat-induced DNA damage. *Biophysics* 52, 185–190. doi:10.1134/S0006350907020078
- Cherwa, J.E., Young, L.N., Fane, B.A., 2011. Uncoupling the functions of a multifunctional protein: The isolation of a DNA pilot protein mutant that affects particle morphogenesis. *Virology* 411, 9–14. doi:10.1016/j.virol.2010.12.026
- Chlumecka, V., D'Obrenan, P., Colter, J.S., 1977. Isoelectric focusing studies of mengo virus variants, their protein structure units and constituent polypeptides. *Journal of General Virology* 35, 425–437.
- Cho, M., Kim, J., Kim, J.Y., Yoon, J., Kim, J.-H., 2010. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research* 44, 3410–3418. doi:10.1016/j.watres.2010.03.017
- Chu, H., Huang, Y., Zhao, Y., 2008. Silver nanorod arrays as a surface-enhanced Raman scattering substrate for foodborne pathogenic bacteria detection. *Applied Spectroscopy* 62, 922–931. doi:10.1366/000370208785284330
- Coffman, G.L., Gaubatz, J.W., Yielding, K.L., Yielding, L.W., 1982. Demonstration of specific high affinity binding sites in plasmid DNA by photoaffinity labeling with an ethidium analog. *Journal of Biological Chemistry* 257, 13205–13207.
- Contreras, P.J., Urrutia, H., Sossa, K., Nocker, A., 2011. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *Journal of Microbiological Methods* 87, 89–95. doi:10.1016/j.mimet.2011.07.016
- Cosa, G., Focsaneanu, K.-S., McLean, J.R.N., McNamee, J.P., Scaiano, J.C., 2007. Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochemistry and Photobiology* 73, 585–599.

doi:10.1562/0031-8655(2001)0730585PPOFDD2.0.CO2

Costafreda, M.I., Bosch, A., Pinto, R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time taqman reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3846–3855. doi:10.1128/AEM.02660-05

Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2013. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. *BMC Microbiology* 13, 216–232. doi:10.1186/1471-2180-13-216

Crews, N., Wittwer, C., Gale, B., 2007. Continuous-flow thermal gradient PCR. *Biomedical Microdevices* 10, 187–195. doi:10.1007/s10544-007-9124-9

Davey, H.M., 2011. Life, death, and in-between: Meanings and methods in microbiology. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5571–5576. doi:10.1128/AEM.00744-11

de Almeida, J., Hoogenkamp, M., Felipe, W.T., Crielaard, W., van der Waal, S.V., 2016. Effectiveness of EDTA and modified salt solution to detach and kill cells from *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics* 42, 320–323. doi:10.1016/j.joen.2015.11.017

Delgado-Viscogliosi, P., Solignac, L., Delattre, J.-M., 2009. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 3502–3512. doi:10.1128/AEM.02878-08

Desfossés-Foucault, É., Dussault-Lepage, V., Le Boucher, C., Savard, P., LaPointe, G., Roy, D., 2012. Assessment of probiotic viability during Cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification. *Frontiers in Microbiology* 3, 350–361. doi:10.3389/fmicb.2012.00350

DeTraglia, M.C., Brand, J.S., Tometsko, A.M., 1978. Characterization of azidobenzamidines as photoaffinity labels for trypsin. *Journal of Biological Chemistry* 253, 1846–1852.

Diao, H., Li, X., Gu, J., Shi, H., Xie, Z., 2004. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process Biochemistry* 39, 1421–1426. doi:10.1016/S0032-9592(03)00274-7

Dong, S., Hong, P.-Y., Nguyen, T.H., 2014. Persistence of *Bacteroides ovatus* under simulated sunlight irradiation. *BMC Microbiology* 14, 178–188. doi:10.1186/1471-2180-14-178

Donhauser, S.C., Niessner, R., Seidel, M., 2009. Quantification of *E. coli* DNA on a flow-through chemiluminescence microarray readout system after PCR amplification. *Analytical Sciences* 25, 669–674. doi:10.2116/analsci.25.669

Dreier, J., Stormer, M., Kleesiek, K., 2005. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4551–4557. doi:10.1128/JCM.43.9.4551-4557.2005

Eggers, J., 2014. UV-Desinfektion - Rahmenbedingungen und Entwicklungen. *TZW-Schriftenreihe Band 65* 135–149.

Eischeid, A.C., Linden, K.G., 2011. Molecular Indications of protein damage in adenoviruses after UV disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1145–1147. doi:10.1128/AEM.00403-10

Elizaquível, P., Aznar, R., Sánchez, G., 2014. Recent developments in the use of viability

dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology* 116, 1–13. doi:10.1111/jam.12365

Elizaguível, P., Sánchez, G., Aznar, R., 2012a. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control* 25, 704–708. doi:10.1016/j.foodcont.2011.12.003

Elizaguível, P., Sánchez, G., Aznar, R., 2012b. Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables after inactivation by essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 159, 115–121. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.006

EN ISO 10705-1:2001, n.d. Nachweis und Zählung von Bakteriophagen - Teil 1: Zählung von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen.

Escudero-Abarca, B.I., Rawsthorne, H., Goulter, R.M., Suh, S.H., Jaykus, L.A., 2014. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? *Food Microbiology* 41, 91–95. doi:10.1016/j.fm.2014.01.009

Fahrmeir, L., Künstler, R., Pigeot, I., Tutz, G., 2011. *Statistik: der Weg zur Datenanalyse*, 7. Auflage, korrigierter Nachdruck. ed, Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin Heidelberg.

Fittipaldi, M., Nocker, A., Codony, F., 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods* 91, 276–289. doi:10.1016/j.mimet.2012.08.007

Fittipaldi, M., Rodriguez, N.J.P., Codony, F., Adrados, B., Peñuela, G.A., Morató, J., 2010. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 168, 228–232. doi:10.1016/j.jviromet.2010.06.011

Fleischer, J., Schlafmann, K., Otchwemah, R., Botzenhart, K., 2000. Elimination of enteroviruses, other enteric viruses, F-specific coliphages, somatic coliphages and *E. coli* in four sewage treatment plants of southern Germany. *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua* 49, 127–138.

Fongaro, G., Hernández, M., García-González, M.C., Barardi, C.R.M., Rodríguez-Lázaro, D., 2016. Propidium monoazide coupled with PCR Predicts infectivity of enteric viruses in swine manure and biofertilized soil. *Food and Environmental Virology* 8, 79–85. doi:10.1007/s12560-015-9225-1

Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M., 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification* 12, 1–6. doi:10.1016/j.bdq.2017.04.001

Gaza, S., Felgner, A., Otto, J., Kushmaro, A., Ben-Dov, E., Tiehm, A., 2015. Biodegradation of chloro- and bromobenzoic acids: Effect of milieu conditions and microbial community analysis. *Journal of Hazardous Materials* 287, 24–31. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.01.025

Gensberger, E.T., Sessitsch, A., Kostić, T., 2013. Propidium monoazide–quantitative polymerase chain reaction for viable *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* detection from abundant background microflora. *Analytical Biochemistry* 441, 69–72. doi:10.1016/j.ab.2013.05.033

Gotkowitz, M.B., Bradbury, K.R., Borchardt, M.A., Zhu, J., Spencer, S.K., 2016. Effects of climate and sewer condition on virus transport to groundwater. *Environmental Science & Technology* 50, 8497–8504. doi:10.1021/acs.est.6b01422

- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2009. SeaView Version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27, 221–224. doi:10.1093/molbev/msp259
- Grabow, W.O.K., 2004. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water Sa* 27, 251–268.
- Graiver, D.A., Saunders, S.E., Topliff, C.L., Kelling, C.L., Bartelt-Hunt, S.L., 2010. Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. *Journal of Virological Methods* 164, 51–54. doi:10.1016/j.jviromet.2009.11.024
- Guzmán, C., Jofre, J., Montemayor, M., Lucena, F., 2007. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids: Indicator and pathogens in sludges. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2420–2429. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x
- Hakenberg, S., Hügler, M., Meyer, P., Behrmann, O., Dame, G., Urban, G.A., 2015. Fenton fragmentation for faster electrophoretic on chip purification of amplifiable genomic DNA. *Biosensors and Bioelectronics* 67, 49–52. doi:10.1016/j.bios.2014.06.003
- Hamburg Wasser, 2017. Der Weg des Wassers - Trinkwasseraufbereitung [WWW Document]. URL <https://www.hamburgwasser.de/privatkunden/unser-wasser/der-weg-des-wassers/trinkwasseraufbereitung/> (accessed 8.24.17).
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Überla, K., Wilhelm, M., 2009. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research* 43, 2657–2668. doi:10.1016/j.watres.2009.03.020
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M., 2011. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 424–436. doi:10.1016/j.ijheh.2011.07.014
- Harris, K.A., 2003. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Medical Microbiology* 52, 685–691. doi:10.1099/jmm.0.05213-0
- Hazam, R.K., Singla, R., Kishore, J., Singh, S., Gupta, R.K., Kar, P., 2010. Surveillance of hepatitis E virus in sewage and drinking water in a resettlement colony of Delhi: what has been the experience? *Archives of Virology* 155, 1227–1233. doi:10.1007/s00705-010-0707-z
- Heijnen, L., Medema, G., 2006. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J Water Health* 4, 487–498.
- Hewitt, J., Bell, D., Simmons, G.C., Rivera-Aban, M., Wolf, S., Greening, G.E., 2007. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at a New Zealand ski resort. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7853–7857. doi:10.1128/AEM.00718-07
- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* 40, 3–22. doi:10.1016/j.watres.2005.10.030
- Hilbert, F., Scherwitzel, M., Paulsen, P., Szostak, M.P., 2010. Survival of *Campylobacter jejuni* under conditions of atmospheric oxygen tension with the support of *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5911–5917. doi:10.1128/AEM.01532-10
- Hoebe, C.J.P.A., Vennema, H., de Roda Husman, A.M., van Duynhoven, Y.T.H.P., 2004. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water

fountain. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 699–705. doi:10.1086/381534

Höhne, M., Askar, M., 2014. Aktuelles zu Norovirus-Infektionen. Epidemiologische und molekular-epidemiologische Aspekte in Deutschland ab der Saison 2009/2010 bis Ende 2013. *Epidemiologisches Bulletin*, Robert Koch-Institut 19, 165–168.

Hörman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C.-H., Torvela, N., Heikinheimo, A., Hanninen, M.-L., 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000–2001. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 87–95. doi:10.1128/AEM.70.1.87-95.2004

Hornstra, L.M., Smeets, P.W.M.H., Medema, G.J., 2011. Inactivation of bacteriophage MS2 upon exposure to very low concentrations of chlorine dioxide. *Water Research* 45, 1847–1855. doi:10.1016/j.watres.2010.11.041

Huang, J., Wang, L., Ren, N., Ma, F., Juli, 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research* 31, 607–613. doi:10.1016/S0043-1354(96)00275-8

IfSG, 2000. Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 20 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist.

Inagaki, M., Wakashima, H., Kato, M., Kaitani, K., Nishikawa, S., 2005. Crucial role of the lipid part of lipopolysaccharide for conformational change of minor spike H protein of bacteriophage phiX174. *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 305–311. doi:10.1016/j.femsle.2005.08.014

ISO 9308-1:2014, n.d. Water quality -- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.

ISO 10135:2007, n.d. Geometrical product specifications (GPS) -- Drawing indications for moulded parts in technical product documentation (TPD).

ISO 11731-2:2004, n.d. Water quality -- Detection and enumeration of *Legionella* -- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts.

ISO/TS 13136:2012, n.d. Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

ISO/TS 15216-1:2013, n.d. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification.

ISO/TS 18867:2015, n.d. Microbiology of the food chain -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*.

Ivleva, N.P., Kubryk, P., Niessner, R., 2017. Raman microspectroscopy, surface-enhanced Raman scattering microspectroscopy, and stable-isotope Raman microspectroscopy for biofilm characterization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409, 4353–4375. doi:10.1007/s00216-017-0303-0

Jones, M.K., Grau, K.R., Costantini, V., Kolawole, A.O., de Graaf, M., Freiden, P., Graves, C.L., Koopmans, M., Wallet, S.M., Tibbetts, S.A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C.E., Vinjé, J., Karst, S.M., 2015. Human norovirus culture in B cells. *Nature Protocols* 10, 1939–1947. doi:10.1038/nprot.2015.121

Jones, T.H., Brassard, J., Topp, E., Wilkes, G., Lapen, D.R., 2017. Waterborne viruses and f-

- specific coliphages in mixed-use watersheds: microbial associations, host specificities, and affinities with environmental/land use factors. *Applied and Environmental Microbiology* 83, e02763-16. doi:10.1128/AEM.02763-16
- Josefsen, M.H., Lofstrom, C., Hansen, T.B., Christensen, L.S., Olsen, J.E., Hoorfar, J., 2010. Rapid quantification of viable campylobacter bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5097–5104. doi:10.1128/AEM.00411-10
- Kahraman, M., Keseroğlu, K., Çulha, M., 2011. on sample preparation for surface-enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra. *Applied Spectroscopy* 65, 500–506. doi:10.1366/10-06184
- Karim, M.R., Fout, G.S., Johnson, C.H., White, K.M., Parshionikar, S.U., 2015. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *Journal of Virological Methods* 219, 51–61. doi:10.1016/j.jviromet.2015.02.020
- Karthe, D., 2015. Bedeutung hydrometeorologischer Extremereignisse im Kontext des Klimawandels für die Trinkwasserhygiene in Deutschland und Mitteleuropa. *Hydrologie und Wasserbewirtschaftung* 59, 264–270. doi:10.5675/HyWa_2015,5_7
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research* 42, 1441–1448. doi:10.1016/j.watres.2007.10.029
- Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R., Barer, M.R., 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 169–187.
- Kiehl, H.W. (Ed.), 2009. *Kompendium Infektiologie & Infektionsschutz*, 14., überarb. und erw. Aufl. ed. Hoffmann, Berlin.
- Kim, C.K., Gentile, D.M., Sproul, O.J., 1980. Mechanism of Ozone Inactivation of Bacteriophage f2. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 210–218.
- Kim, M., Wuertz, S., 2015. Survival and persistence of host-associated Bacteroidales cells and DNA in comparison with *Escherichia coli* and *Enterococcus* in freshwater sediments as quantified by PMA-qPCR and qPCR. *Water Research* 87, 182–192. doi:10.1016/j.watres.2015.09.014
- Kim, S.Y., Ko, G., 2012. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus: Using propidium monoazide to assess viability. *Letters in Applied Microbiology* 55, 182–188. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03276.x
- Kim, T., Unno, H., 1996. The roles of microbes in the removal and inactivation of viruses in a biological wastewater treatment system. *Water Science and Technology* 33, 243–250. doi:10.1016/0273-1223(96)00426-X
- Kimmit, P.T., Redway, K.F., 2016. Evaluation of the potential for virus dispersal during hand drying: a comparison of three methods. *Journal of Applied Microbiology* 120, 478–486. doi:10.1111/jam.13014
- Kirby, A.E., Teunis, P.F., Moe, C.L., 2015. Two human challenge studies confirm high infectivity of Norwalk Virus. *Journal of Infectious Diseases* 211, 166–167. doi:10.1093/infdis/jiu385
- Klare, I., Witte, W., Wendt, C., Werner, G., 2012. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. *Bundesgesundheitsblatt* -

Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 55, 1387–1400. doi:10.1007/s00103-012-1564-6

Klindworth, A., Priesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glockner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41, e1–e1. doi:10.1093/nar/gks808

Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M.J., Hall, G.S., Bauer, T.W., 2009a. Improving clinical significance of PCR: Use of propidium monoazide to distinguish viable from dead staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis. *Journal of Orthopaedic Research* 27, 1243–1247. doi:10.1002/jor.20872

Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M.J., Procop, G.W., Hall, G.S., Bauer, T.W., 2009b. Limiting false-positive polymerase chain reaction results: detection of DNA and mRNA to differentiate viable from dead bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64, 445–447. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.04.004

Komanapalli, R.I., Lau, S.B.H., 1996. Ozone-induced damage of *Escherichia coli* K-12. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46, 610–614. doi:10.1007/s002530050869

Kong, H.G., Bae, J.Y., Lee, H.J., Joo, H.J., Jung, E.J., Chung, E., Lee, S.-W., 2014. Induction of the viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by Low temperature in the soil microcosm and its resuscitation by catalase. *PLoS ONE* 9, e109792. doi:10.1371/journal.pone.0109792

Kötzsch, S., Alisch, S., Egli, T., Hammes, F., Weilenmann, H., Pfister, L., Karmann, S., 2012. Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben. Schweizerisches Bundesamt für Gesundheit (BAG). *Methodenhandbuch*, Ausgabe 1, 1 1, 1–47.

Kralik, P., Babak, V., Dziedzinska, R., 2014. Repeated cycles of chemical and physical disinfection and their influence on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability measured by propidium monoazide F57 quantitative real time PCR. *The Veterinary Journal* 201, 359–364. doi:10.1016/j.tvjl.2014.05.032

Kralik, P., Nocker, A., Pavlik, I., 2010. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *International Journal of Food Microbiology* 141, S80–S86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.018

Kubryk, P., Kölschbach, J.S., Marozava, S., Lueders, T., Meckenstock, R.U., Niessner, R., Ivleva, N.P., 2015. Exploring the potential of stable isotope (resonance) Raman microspectroscopy and surface-enhanced Raman scattering for the analysis of microorganisms at single cell level. *Analytical Chemistry* 87, 6622–6630. doi:10.1021/acs.analchem.5b00673

Kubryk, P., Niessner, R., Ivleva, N.P., 2016. The origin of the band at around 730 cm⁻¹ in the SERS spectra of bacteria: a stable isotope approach. *The Analyst* 141, 2874–2878. doi:10.1039/C6AN00306K

Kunze, A., Dilcher, M., Abd El Wahed, A., Hufert, F., Niessner, R., Seidel, M., 2016. On-Chip isothermal nucleic acid amplification on flow-based chemiluminescence microarray analysis platform for the detection of viruses and bacteria. *Analytical Chemistry* 88, 898–905. doi:10.1021/acs.analchem.5b03540

Kunze, A., Pei, L., Elsässer, D., Niessner, R., Seidel, M., 2015. High performance concentration method for viruses in drinking water. *Journal of Virological Methods* 222, 132–137. doi:10.1016/j.jviromet.2015.06.007

L. Asfahl, K., C. Savin, M., 2012. Destruction of *Escherichia coli* and Broad-Host-Range

Plasmid DNA in Treated Wastewater by Dissolved Ozone Disinfection under Laboratory and Field Conditions. *Advances in Microbiology* 02, 1–7. doi:10.4236/aim.2012.21001

La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Muscillo, M., 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 46, 266–273.

Lee, E.-S., Lee, M.-H., Kim, B.-S., 2015. Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection. *International Journal of Food Microbiology* 210, 143–148. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.019

Lee, J.-L., Levin, R.E., 2009. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 79, 184–188. doi:10.1016/j.mimet.2009.08.014

Lee, M., Seo, D.J., Seo, J., Oh, H., Jeon, S.B., Ha, S.-D., Myoung, J., Choi, I.-S., Choi, C., 2015. Detection of viable murine norovirus using the plaque assay and propidium-monoazide-combined real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 221, 57–61. doi:10.1016/j.jviromet.2015.04.018

Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., Hamza, I.A., 2015. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 218, 686–693. doi:10.1016/j.ijheh.2015.02.003

Lévêque, F., 1995. Virucidal effect of UV light on hepatitis a virus in sea water: evaluation with cell culture and RT-PCR. *Water Science and Technology* 31, 157–160. doi:10.1016/0273-1223(95)00257-N

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L., Chao, F.H., 2002. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4951–4955. doi:10.1128/AEM.68.10.4951-4955.2002

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P., 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00258

Linden, K.G., Hull, N.M., Rodriguez, R.A., 2015. Comment on “UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.” *Environmental Science & Technology* 49, 10750–10751. doi:10.1021/acs.est.5b02534

Liu, J., Zhou, R., Li, L., Peters, B.M., Li, B., Lin, C., Chuang, T.-L., Chen, D., Zhao, X., Xiong, Z., 2017. Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 under cryopreservation. *Research in microbiology* 168, 188–193.

Liu, T.-T., Lin, Y.-H., Hung, C.-S., Liu, T.-J., Chen, Y., Huang, Y.-C., Tsai, T.-H., Wang, H.-H., Wang, D.-W., Wang, J.-K., Wang, Y.-L., Lin, C.-H., 2009. A high speed detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for monitoring antibiotic-induced chemical changes in bacteria cell wall. *PLoS ONE* 4, 470–480. doi:10.1371/journal.pone.0005470

Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M., 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1453–1461. doi:10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005

Løvdal, T., Hovda, M.B., Björkblom, B., Møller, S.G., 2011. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *Journal of Microbiological Methods* 85, 164–169. doi:10.1016/j.mimet.2011.01.027

- Lowbury, E.J.L., Collins, A.G., 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas pyocyanea*. *Journal of clinical pathology* 8, 47.
- Lowder, M., Unge, A., Maraha, N., Jansson, J.K., Swiggett, J., Oliver, J.D., 2000. Effect of starvation and the viable-but-nonculturable state on green fluorescent protein (GFP) fluorescence in GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. *Applied and environmental microbiology* 66, 3160–3165.
- Lucena, F., Mendez, X., Moron, A., Calderon, E., Campos, C., Guerrero, A., Cardenas, M., Gantzer, C., Shwartzbrood, L., Skraber, S., Jofre, J., 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of Applied Microbiology* 94, 808–815. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x
- Luo, J.-F., Lin, W.-T., Guo, Y., 2010. Method to detect only viable cells in microbial ecology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 377–384. doi:10.1007/s00253-009-2373-1
- Maheux, A.F., Picard, F.J., Boissinot, M., Bissonnette, L., Paradis, S., Bergeron, M.G., 2009. Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli*/*Shigella* in water samples. *Water Res.* 43, 3019–3028. doi:10.1016/j.watres.2009.04.017
- Mamlouk, K., Macé, S., Guilbaud, M., Jaffrès, E., Ferchichi, M., Prévost, H., Pilet, M.-F., Dousset, X., 2012. Quantification of viable *Brochothrix thermosphacta* in cooked shrimp and salmon by real-time PCR. *Food Microbiology* 30, 173–179. doi:10.1016/j.fm.2011.09.012
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D., Wade, W.G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 795–799.
- Martin-Diaz, J., Casas-Mangas, R., Garcia-Aljaro, C., Blanch, A.R., Lucena, F., 2016. Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. *Water Science and Technology* 73, 2182–2188. doi:10.2166/wst.2016.066
- McLellan, N.L., Lee, H., Habash, M.B., 2016. Evaluation of propidium monoazide and long-amplicon qPCR as an infectivity assay for coliphage. *Journal of Virological Methods* 238, 48–55. doi:10.1016/j.jviromet.2016.10.004
- Mena, K.D., Gerba, C.P., 2009. Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 201*. Springer US, Boston, MA, pp. 71–115.
- Merbecks, S., Beier, D., Müller, L., Partisch, M., Gruschwitz, A., 2004. Zu einer Häufung von Norovirus-Erkrankungen als Folge verunreinigten Trinkwassers. *Epidemiologisches Bulletin* 36, 301–302.
- Mesquita, J.R., Vaz, L., Cerqueira, S., Castilho, F., Santos, R., Monteiro, S., Manso, C.F., Romalde, J.L., Nascimento, M.S.J., 2011. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiology* 28, 936–941. doi:10.1016/j.fm.2011.01.005
- Michen, B., Graule, T., 2010. Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology* 2, 388–397. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x
- Mizunoe, Y., Wai, S.N., Ishikawa, T., Takade, A., Yoshida, S., 2000. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS Microbiology Letters* 186, 115–120. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09091.x

- Moreau, P., Faury, N., Burgeot, T., Renault, T., 2015. Pesticides and ostreid herpesvirus 1 infection in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *PLOS ONE* 10, e0130628. doi:10.1371/journal.pone.0130628
- Moreno, L., Aznar, R., Sánchez, G., 2015. Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. *International Journal of Food Microbiology* 201, 1–6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.012
- Mouchtouri, V., Velonakis, E., Hadjichristodoulou, C., 2007. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. *American Journal of Infection Control* 35, 623–627. doi:10.1016/j.ajic.2007.01.002
- Mülhardt, C., 2007. *Molecular Biology and Genomics, The experimenter series*. Elsevier, AP, Amsterdam.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 59, 695–700.
- Myers, M.B., Mittelstaedt, R.A., Heflich, R.H., 2009. Using phiX174 DNA as an exogenous reference for measuring mitochondrial DNA copy number. *BioTechniques* 47, 867–869. doi:10.2144/000113222
- Nakano, S., Fujimoto, M., Hara, H., Sugimoto, N., 1999. Nucleic acid duplex stability: influence of base composition on cation effects. *Nucleic acids research* 27, 2957–2965.
- Niehues, B., 2009. DVGW-Umfrage Regelwerk Wasser – Ergebnisse der Umfrage aus 2008 *Energie Wasser Praxis*, 34–37.
- Nkuipou-Kenfack, E., Engel, H., Fakih, S., Nocker, A., 2013. Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. *Journal of Microbiological Methods* 93, 20–24. doi:10.1016/j.mimet.2013.01.018
- Nocker, A., Cheung, C.-Y., Camper, A.K., 2006. 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* 67, 310–320. doi:10.1016/j.mimet.2006.04.015
- Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A.K., Brousseau, R., 2009. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbiological Methods* 76, 253–261. doi:10.1016/j.mimet.2008.11.004
- Nocker, A., Sossa, K.E., Camper, A.K., 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 70, 252–260. doi:10.1016/j.mimet.2007.04.014
- Nordgren, J., Matussek, A., Mattsson, A., Svensson, L., Lindgren, P.-E., 2009. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research* 43, 1117–1125. doi:10.1016/j.watres.2008.11.053
- Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., 2003. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 350–357. doi:10.1128/AEM.69.1.350-357.2003
- Nutz, S., Döll, K., Karlovsky, P., 2011. Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium*

- verticillioides and *F. proliferatum*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 717–726. doi:10.1007/s00216-011-5089-x
- Nygård, K., Vold, L., Halvorsen, E., Bringeland, E., RøTtingen, J.A., Aavitsland, P., 2004. Waterborne outbreak of gastroenteritis in a religious summer camp in Norway, 2002. *Epidemiology and Infection* 132, 223–229. doi:10.1017/S0950268803001894
- O'Connell, K.P., Bucher, J.R., Anderson, P.E., Cao, C.J., Khan, A.S., Gostomski, M.V., Valdes, J.J., 2006. real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 478–483. doi:10.1128/AEM.72.1.478-483.2006
- Oliver, J.D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 415–425. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x
- Otto, J., Jurzik, L., Schneider, M., Stange, C., Hamza, I.A., Preuß, G., Tiehm, A., 2015. Entwicklung und Validierung von molekularbiologischen PCR-Methoden zum quantitativen Nachweis von hygiene relevanten Bakterien und Viren im Wasser. *energie|wasser-praxis (EWP)* 58–62.
- Ottoson, J., Hansen, A., Björleinius, B., Norder, H., Stenström, T.A., 2006a. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Research* 40, 1449–1457. doi:10.1016/j.watres.2006.01.039
- Ottoson, J., Hansen, A., Björleinius, B., Norder, H., Stenström, T.A., 2006b. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Research* 40, 1449–1457. doi:10.1016/j.watres.2006.01.039
- Page, M.A., Shisler, J.L., Marinas, B.J., 2010. Mechanistic aspects of adenovirus serotype 2 inactivation with free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2946–2954. doi:10.1128/AEM.02267-09
- Pan, Y., Breidt, F., 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 8028–8031. doi:10.1128/AEM.01198-07
- Panousis, K., Grigoris, P., Butcher, I., Rana, B., Reilly, J.H., Hamblen, D.L., 2005. Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta orthopaedica* 76, 341–346.
- Parshionikar, S., Laseke, I., Fout, G.S., 2010. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4318–4326. doi:10.1128/AEM.02800-09
- Payment, P., Fortin, S., Trudel, M., 1986. Elimination of human enteric viruses during conventional waste water treatment by activated sludge. *Canadian Journal of Microbiology* 32, 922–925. doi:10.1139/m86-170
- Pecson, B.M., Martin, L.V., Kohn, T., 2009. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: Advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5544–5554. doi:10.1128/AEM.00425-09
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3376–3382.

- Pinheiro, E.T., Neves, V.D., Reis, C.C., Longo, P.L., Mayer, M.P.A., 2016. Evaluation of the propidium monoazide–quantitative polymerase chain reaction method for the detection of viable *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 42, 1089–1092. doi:10.1016/j.joen.2016.04.003
- Pond, K., 2005. Water recreation and disease: plausibility of associated infections: acute effects, sequelae and mortality, Emerging issues in water and infectious disease series. IWA Publ, London.
- Premasiri, W.R., Lee, J.C., Sauer-Budge, A., Théberge, R., Costello, C.E., Ziegler, L.D., 2016. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 408, 4631–4647.
- Preuß, G., Schulte-Ebbert, U., 2001. Artificial Groundwater Recharge and Bank Filtration, in: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology Set*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 425–444.
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2016. Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Research* 91, 68–76. doi:10.1016/j.watres.2015.12.049
- Pribylova, R., Kubickova, L., Babak, V., Pavlik, I., Kralik, P., 2012. Effect of short- and long-term antibiotic exposure on the viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as measured by propidium monoazide F57 real time quantitative PCR and culture. *The Veterinary Journal* 194, 354–360. doi:10.1016/j.tvjl.2012.05.002
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219
- Rab, M.A., Bile, M.K., Mubarik, M.M., Asghar, H., Sami, Z., Siddiqi, S., Dil, A.S., Barzgar, M.A., Chaudhry, M.A., Burney, M.I., 1997. Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: a common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 151–157.
- Rajal, V., Mcswain, B., Thompson, D., Leutenegger, C., Kildare, B., Wuertz, S., 2007. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research* 41, 1411–1422. doi:10.1016/j.watres.2006.12.034
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P., Shinoda, S., 2014. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in public health* 2: 103, 1–9. doi:10.3389/fpubh.2014.00103
- Räsänen, N.H.J., Rintala, H., Miettinen, I.T., Torvinen, E., 2013. Comparison of culture and qPCR methods in detection of mycobacteria from drinking waters. *Canadian Journal of Microbiology* 59, 280–286. doi:10.1139/cjm-2012-0695
- Ravanat, J.-L., Douki, T., Cadet, J., 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63, 88–102. doi:10.1016/S1011-1344(01)00206-8
- Rawsthorne, H., Dock, C.N., Jaykus, L.A., 2009. PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2936–2939. doi:10.1128/AEM.02524-08
- Rezaeinejad, S., Vergara, G.G.R.V., Woo, C.H., Lim, T.T., Sobsey, M.D., Gin, K.Y.H., 2014. Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. *Water Research* 58, 122–131. doi:10.1016/j.watres.2014.03.051

- Rieder, A., Schwartz, T., Schön-Hölz, K., Marten, S.-M., Süß, J., Gusbeth, C., Kohnen, W., Swoboda, W., Obst, U., Frey, W., 2008. Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *Journal of Applied Microbiology* 105, 2035–2045. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03972.x
- Riera-Montes, M., Brus Sjölander, K., Allestam, G., Hallin, E., Hedlund, K.-O., Löfdahl, M., 2011. Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiology and Infection* 139, 1928–1935. doi:10.1017/S0950268810003146
- Robert Koch-Institut, 2012a. Bericht: Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im Ausbruch von Norovirus-Gastroenteritis in Einrichtungen mit Gemeinschaftsverpflegung, *Epidemiologisches Bulletin* 41. RKI-Hausdruckerei, Berlin, Deutschland.
- Robert Koch-Institut, 2012b. Epidemiologie der Rotavirus-Erkrankungen in Deutschland im Zeitraum von 2001 bis 2011, *Epidemiologisches Bulletin* 44. RKI-Hausdruckerei, Berlin, Deutschland.
- Robert Koch-Institut, 2011. Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch Deutschland 2011. RKI-Hausdruckerei, Berlin, Deutschland.
- Robert Koch-Institut, 2003. Keratokonjunktivitis epidemica und andere Konjunktivitiden durch Adenoviren, *Epidemiologisches Bulletin* 7. RKI-Hausdruckerei, Deutschland.
- Rogers, G.B., Marsh, P., Stressmann, A.F., Allen, C.E., Daniels, T.V.W., Carroll, M.P., Bruce, K.D., 2010. The exclusion of dead bacterial cells is essential for accurate molecular analysis of clinical samples. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 1656–1658. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03189.x
- Rosa, G.L., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Muscillo, M., 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. doi:10.4415/ANN_10_03_07
- Roßkamp, E., Dieter, H.H., 1999. Entstehung von Bromat bei der Aufbereitung von Schwimm- und Badebeckenwasser. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 42, 859–862. doi:10.1007/s001030050209
- Roy, D., Wong, P.K., Engelbrecht, R.S., Chian, E.S., 1981. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Applied and environmental microbiology* 41, 718–723.
- Russell, A.D., 2003. Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science progress* 86, 115–137.
- Rutjes, S.A., Lodder, W.J., van Leeuwen, A.D., de Roda Husman, A.M., 2009. Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production. *Journal of Applied Microbiology* 107, 97–105. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04184.x
- Salam, K.W., El-Fadel, M., Barbour, E.K., Saikaly, P.E., 2014. A propidium monoazide-quantitative PCR method for the detection and quantification of viable *Enterococcus faecalis* in large-volume samples of marine waters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8707–8718. doi:10.1007/s00253-014-6023-x
- Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R., 2011. Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology* 4, 21–25. doi:10.1007/s12560-011-9074-5
- Sangsanont, J., Katayama, H., Kurisu, F., Furumai, H., 2014. Capsid-damaging effects of UV irradiation as measured by quantitative pcr coupled with ethidium monoazide treatment.

Food and Environmental Virology 6, 269–275. doi:10.1007/s12560-014-9162-4

Sanin, S.L., Sanin, F.D., Bryers, J.D., 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry* 38, 909–914. doi:10.1016/S0032-9592(02)00173-5

Sassoubre, L.M., Nelson, K.L., Boehm, A.B., 2012. Mechanisms for photoinactivation of *Enterococcus faecalis* in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7776–7785. doi:10.1128/AEM.02375-12

Schijven, J., de Roda Husman, A.M., 2006. A Survey of diving behavior and accidental water ingestion among Dutch occupational and sport divers to assess the risk of infection with waterborne pathogenic microorganisms. *Environmental Health Perspectives* 114, 712–717. doi:10.1289/ehp.8523

Schmidt, P.J., 2015. Norovirus Dose-Response: Are currently available data informative enough to determine how susceptible humans are to infection from a single virus?: New Perspectives on Norovirus Dose-Response Modeling. *Risk Analysis* 35, 1364–1383. doi:10.1111/risa.12323

Seidel, M., Jurzik, L., Brettar, I., Höfle, M.G., Griebler, C., 2016. Microbial and viral pathogens in freshwater: current research aspects studied in Germany. *Environmental Earth Sciences* 75:1384, 1–20. doi:10.1007/s12665-016-6189-x

Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Colwell, R.R., Miyoshi, S., Nair, G.B., Takeda, Y., 2012. Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiology and immunology* 56, 342–345.

Senoh, M., Hamabata, T., Takeda, Y., 2015. A factor converting viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to a culturable state in eukaryotic cells is a human catalase. *MicrobiologyOpen* 4, 589–596. doi:10.1002/mbo3.264

Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2003. Reduction of Norwalk Virus, Poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by Ozone Disinfection of Water. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3975–3978. doi:10.1128/AEM.69.7.3975-3978.2003

Shrivastava, A., Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* 2, 21–21.

Sidhu, J., Toze, S., 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environment International* 35, 187–201. doi:10.1016/j.envint.2008.07.006

Sidhu, J.P.S., Hodggers, L., Ahmed, W., Chong, M.N., Toze, S., 2012. Prevalence of human pathogens and indicators in stormwater runoff in Brisbane, Australia. *Water Research* 46, 6652–6660. doi:10.1016/j.watres.2012.03.012

Sigmon, J., Larcom, L.L., 1996. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* 17, 1524–1527. doi:10.1002/elps.1150171003

Sigstam, T., Rohatschek, A., Zhong, Q., Brennecke, M., Kohn, T., 2014. On the cause of the tailing phenomenon during virus disinfection by chlorine dioxide. *Water Research* 48, 82–89. doi:10.1016/j.watres.2013.09.023

Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000414–a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414

Slater, S.C., Maurer, R., 1991. Requirements for bypass of UV-induced lesions in single-stranded DNA of bacteriophage phi X174 in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U.S.A. 88, 1251–1255.

Slimani, S., Robyns, A., Jarraud, S., Molmeret, M., Dusserre, E., Mazure, C., Facon, J.P., Lina, G., Etienne, J., Ginevra, C., 2012. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. *Journal of Microbiological Methods* 88, 319–321. doi:10.1016/j.mimet.2011.12.010

Smits, T.H., Devenoges, C., Szynalski, K., Maillard, J., Holliger, C., 2004. Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 57, 369–378. doi:10.1016/j.mimet.2004.02.003

Soejima, T., Minami, J., Iwatsuki, K., 2012. Rapid propidium monoazide PCR assay for the exclusive detection of viable *Enterobacteriaceae* cells in pasteurized milk. *Journal of Dairy Science* 95, 3634–3642. doi:10.3168/jds.2012-5360

Soejima, T., Schlitt-Dittrich, F., Yoshida, S., 2011a. Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of *Enterobacteriaceae*. *Analytical Biochemistry* 418, 37–43. doi:10.1016/j.ab.2011.06.027

Soejima, T., Schlitt-Dittrich, F., Yoshida, S., 2011b. Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of *Enterobacteriaceae*. *Analytical Biochemistry* 418, 37–43. doi:10.1016/j.ab.2011.06.027

Sommer, R., Haider, T., Cabaj, A., Pribil, W., Lhotsky, M., 1998. Time dose reciprocity in UV disinfection of water. *Water Science and Technology* 38, 145–150. doi:10.1016/S0273-1223(98)00816-6

Soro, A.A., Dje, K.M., Thonart, P., 2010. Changes in membrane permeability during rehydration of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11. *Research Journal of Applied Sciences* 5, 7–12. doi:10.3923/rjasci.2010.7.12

Steyer, A., Torkar, K.G., Gutiérrez-Aguirre, I., Poljšak-Prijatelj, M., 2011. High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 392–398. doi:10.1016/j.ijheh.2011.05.006

Takahashi, H., Nakazawa, M., Ohshima, C., Sato, M., Tsuchiya, T., Takeuchi, A., Kunou, M., Kuda, T., Kimura, B., 2015. Heat-denatured lysozyme inactivates murine norovirus as a surrogate human norovirus. *Scientific Reports* 5:11819, 1–9. doi:10.1038/srep11819

Takahashi, Y., Yoshida, A., Nagayoshi, M., Kitamura, C., Nishihara, T., Awano, S., Ansai, T., 2011. Enumeration of viable *Enterococcus faecalis*, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time polymerase chain reaction: Enumeration of live/dead *E. faecalis*. *Microbiology and Immunology* 55, 889–892. doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00390.x

Tavernier, S., Coenye, T., 2015. Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* in multispecies biofilms using PMA-qPCR. *PeerJ* 3:e787, 1–15. doi:10.7717/peerj.787

Tellier, R., Bukh, J., Emerson, S.U., Miller, R.H., Purcell, R.H., 1996. Long PCR and its application to hepatitis viruses: amplification of hepatitis A, hepatitis B, and hepatitis C virus genomes. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 3085–3091.

Templar, H.A., Dila, D.K., Bootsma, M.J., Corsi, S.R., McLellan, S.L., 2016. Quantification of human-associated fecal indicators reveal sewage from urban watersheds as a source of pollution to Lake Michigan. *Water Research* 100, 556–567. doi:10.1016/j.watres.2016.05.056

Terletskaia-Ladwig, E., Meier, S., Hahn, R., Leinmuller, M., Schneider, F., Enders, M., 2008.

- A convenient rapid culture assay for the detection of enteroviruses in clinical samples: comparison with conventional cell culture and RT-PCR. *Journal of Medical Microbiology* 57, 1000–1006. doi:10.1099/jmm.0.47799-0
- Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., E. Miller, S., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology* 80, 1468–1476. doi:10.1002/jmv.21237
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Riley, K., Gerba, C.P., 2003. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 577–582. doi:10.1128/AEM.69.1.577-582.2003
- TrinkwV, 2001. Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459).
- Tsuji, A., Kaneko, Y., Takahashi, K., Ogawa, M., Goto, S., 1982. The effects of temperature and ph on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of Gram-negative rods. *Microbiology and Immunology* 26, 15–24. doi:10.1111/j.1348-0421.1982.tb00149.x
- Vecchia, A., Fleck, J., Comerlato, J., Kluge, M., Bergamaschi, B., Da Silva, J., Da Luz, R., Teixeira, T., Garbinatto, G., Oliveira, D., Zanin, J., Van der Sand, S., Frazzon, A., Franco, A., Roehe, P., Spilki, F., 2012. First description of adenovirus, enterovirus, rotavirus and torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 72, 323–329. doi:10.1590/S1519-69842012000200013
- Venkobachar, C., Iyengar, L., Prabhakara Rao, A.V.S., 1977. Mechanism of disinfection: Effect of chlorine on cell membrane functions. *Water Research* 11, 727–729. doi:10.1016/0043-1354(77)90114-2
- Vesper, S., McKinstry, C., Hartmann, C., Neace, M., Yoder, S., Vesper, A., 2008. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *Journal of Microbiological Methods* 72, 180–184. doi:10.1016/j.mimet.2007.11.017
- Větrovský, T., Baldrian, P., 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE* 8:e57923, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0057923
- Vila-Costa, M., Gasol, J.M., Sharma, S., Moran, M.A., 2012. Community analysis of high- and low-nucleic acid-containing bacteria in NW mediterranean coastal waters using 16S rDNA pyrosequencing: Bacterial composition of different cytometric populations in Mediterranean waters. *Environmental Microbiology* 14, 1390–1402. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02720.x
- Virto, R., Manas, P., Alvarez, I., Condon, S., Raso, J., 2005. Membrane Damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5022–5028. doi:10.1128/AEM.71.9.5022-5028.2005
- Vossenbergh, J.L., Ubbink-Kok, T., Elferink, M.G., Driessen, A.J., Konings, W.N., 1995. Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. *Molecular microbiology* 18, 925–932.
- Vulto, P., Hermann, C., Zahn, P., Maier, U., Dame, G., Urban, G.A., 2009. A microchip for automated extraction of RNA from Gram-positive bacteria. *IEEE*, pp. 108–111. doi:10.1109/SENSOR.2009.5285553
- Wang, L., Li, P., Zhang, Z., Chen, Q., Aguilar, Z.P., Xu, H., Yang, L., Xu, F., Lai, W., Xiong,

- Y., Wei, H., 2014. Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process. *Food Control* 36, 119–125. doi:10.1016/j.foodcont.2013.08.011
- Wang, L., Li, Y., Mustapha, A., 2009. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1719–1728. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04358.x
- Wang, S., Levin, R.E., 2006. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 64, 1–8. doi:10.1016/j.mimet.2005.04.023
- Wang, Y., 2004. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Research* 32, 1197–1207. doi:10.1093/nar/gkh271
- Weaver, R.P., Malling, H.V., 2003. The in vivo but not the in vitro am3 revertant frequencies increase linearly with increased ethylnitrosourea doses in spleen of mice transgenic for phiX174 am3, cs70 using the single burst assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534, 1–13.
- WHO, 2011. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva.
- Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., 2012. Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental Science & Technology* 46, 12069–12078. doi:10.1021/es3029473
- Wingender, J., Flemming, H.-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 417–423. doi:10.1016/j.ijheh.2011.05.009
- Wingender, J., Hamsch, B., Schneider, S., 2009. Mikrobiologisch-hygienische Aspekte des Vorkommens von *Pseudomonas aeruginosa* im Trinkwasser. *Energie Wasser Praxis Energie Wasser Praxis*.
- Wu, B., Liang, W., Kan, B., 2015. Enumeration of viable non-culturable *Vibrio cholerae* using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 115, 147–152. doi:10.1016/j.mimet.2015.05.016
- Wunderlich, A., Torggler, C., Elsässer, D., Lück, C., Niessner, R., Seidel, M., 2016. Rapid quantification method for *Legionella pneumophila* in surface water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 2203–2213. doi:10.1007/s00216-016-9362-x
- Wyn-Jones, A.P., Sellwood, J., 2001. Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology* 91, 945–962. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01470.x
- Xiao, X., Tian, C., Yu, Y., Wu, H., 2013. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 using propidium monoazide treatments and qPCR. *Canadian Journal of Microbiology* 59, 157–163. doi:10.1139/cjm-2012-0577
- Xu, M., McCanna, D.J., Sivak, J.G., 2015. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 71, 1–7. doi:10.1016/j.vascn.2014.11.003
- Xue, B., Jin, M., Yang, D., Guo, X., Chen, Z., Shen, Z., Wang, X., Qiu, Z., Wang, J., Zhang, B., Li, J., 2013. Effects of chlorine and chlorine dioxide on human rotavirus infectivity and genome stability. *Water Research* 47, 3329–3338. doi:10.1016/j.watres.2013.03.025
- Yáñez, M.A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Múrtula, R., Martínez, L., Catalán, V., 2011.

Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 85, 124–130. doi:10.1016/j.mimet.2011.02.004

Yang, D., Zhou, H., Haisch, C., Niessner, R., Ying, Y., 2016. Reproducible *E. coli* detection based on label-free SERS and mapping. *Talanta* 146, 457–463. doi:10.1016/j.talanta.2015.09.006

Yang, X., Badoni, M., Gill, C.O., 2011. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. *Food Microbiology* 28, 1478–1482. doi:10.1016/j.fm.2011.08.013

Yang, Y., Xu, F., Xu, H., Aguilar, Z.P., Niu, R., Yuan, Y., Sun, J., You, X., Lai, W., Xiong, Y., Wan, C., Wei, H., 2013. Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Microbiology* 34, 418–424. doi:10.1016/j.fm.2013.01.004

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134

Youn, S.Y., Jeong, O.M., Choi, B.K., Jung, S.C., Kang, M.S., 2017. Application of loop-mediated isothermal amplification with propidium monoazide treatment to detect live *Salmonella* in chicken carcasses. *Poultry Science* 96, 458–464. doi:10.3382/ps/pew341

Young, G., Turner, S., Davies, J.K., Sundqvist, G., Figdor, D., 2007a. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod* 33, 1417–1420. doi:10.1016/j.joen.2007.09.002

Young, G., Turner, S., Davies, J.K., Sundqvist, G., Figdor, D., 2007b. Bacterial DNA Persists for Extended Periods after Cell Death. *Journal of Endodontics* 33, 1417–1420. doi:10.1016/j.joen.2007.09.002

Zaghloul, H., 2014. Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis. *World Journal of Hepatology* 6, 916. doi:10.4254/wjh.v6.i12.916

Zeng, B., Zhao, G., Cao, X., Yang, Z., Wang, C., Hou, L., 2013. Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*. *BioMed Research International* 2013, 1–7. doi:10.1155/2013/907170

Zhang, F., Huang, Q., Ma, W., Jiang, S., Fan, Y., Zhang, H., 2001. Amplification and cloning of the full-length genome of Japanese encephalitis virus by a novel long RT-PCR protocol in a cosmid vector. *Journal of Virological Methods* 96, 171–182. doi:10.1016/S0166-0934(01)00331-7

Zhang, S., Ye, C., Lin, H., Lv, L., Yu, X., 2015. UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science & Technology* 49, 1721–1728. doi:10.1021/es505211e

Zhang, T., Shao, M.-F., Ye, L., 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal* 6, 1137–1147. doi:10.1038/ismej.2011.188

Zhou, H., Yang, D., Ivleva, N.P., Mircescu, N.E., Schubert, S., Niessner, R., Wieser, A., Haisch, C., 2015. Label-free in situ discrimination of live and dead bacteria by surface-enhanced Raman scattering. *Analytical Chemistry* 87, 6553–6561. doi:10.1021/acs.analchem.5b01271

Zhou, N., Zhang, H., Lin, X., Hou, P., Wang, S., Tao, Z., Bi, Z., Xu, A., 2016. A waterborne norovirus gastroenteritis outbreak in a school, eastern China. *Epidemiology and Infection* 144, 1212–1219. doi:10.1017/S0950268815002526

Zhu, R.-G., Li, T.-P., Jia, Y.-F., Song, L.-F., 2012. Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 90, 262–266. doi:10.1016/j.mimet.2012.05.019

Zuo, X., Chu, X., Hu, J., 2015. Effects of water matrix on virus inactivation using common virucidal techniques for condensate urine disinfection. *Chemosphere* 136, 118–124. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.083

Zweckverband Bodensee-Wasserversorgung, 2017. Weg des Wassers [WWW Document]. URL <http://www.bodensee-wasserversorgung.de/index.php?id=124&L=0%3Flevel%3D1> (accessed 8.24.17).