



Universität für Bodenkultur Wien
University of Natural Resources
and Life Sciences, Vienna

Masterarbeit

Beurteilung der Desinfektionswirkung von UV und ClO₂ bei Trinkwasserproben mittels Durchflusszytometrie, ATP-Bestimmung und Kultivierung

verfasst von

Luzia HAIDER, BSc

im Rahmen des Masterstudiums

Lebensmittelwissenschaften und -technologie

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

Wien, Mai 2022

Betreut von:

Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Fürhacker Maria

Institut für Siedlungswasserbau, Industrierewasserwirtschaft und Gewässerschutz

Department für Wasser-Atmosphäre-Umwelt

Diese Arbeit wurde am
**Institut für Siedlungswasserbau, Industrierwasserwirtschaft und
Gewässerschutz**
des
Department für Wasser-Atmosphäre-Umwelt
der
Universität für Bodenkultur Wien

unter der Betreuung von

Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Fürhacker Maria
Institut für Siedlungswasserbau, Industrierwasserwirtschaft und Gewässerschutz
Department für Wasser-Atmosphäre-Umwelt

Und der Mitbetreuung von

Dipl. Ing. Dr. Zunabovic Marija und Dipl. Ing. Christoph Schönher
Institut für Siedlungswasserbau, Industrierwasserwirtschaft und Gewässerschutz
Department für Wasser-Atmosphäre-Umwelt

erstellt.

Matrikelnummer 01040220

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich diese Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Gedanken, die im Wortlaut oder in grundlegenden Inhalten aus unveröffentlichten Texten oder aus veröffentlichter Literatur übernommen wurden, sind ordnungsgemäß gekennzeichnet, zitiert und mit genauer Quellenangabe versehen.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder ganz noch teilweise in gleicher oder ähnlicher Form an einer Bildungseinrichtung als Voraussetzung für den Erwerb eines akademischen Grades eingereicht. Sie entspricht vollumfänglich den Leitlinien der Wissenschaftlichen Integrität und den Richtlinien der Guten Wissenschaftlichen Praxis.

Wien, 25.05.2022



Luzia HAIDER

Danksagung

Diese Masterarbeit wurde an der BOKU Wien am Department Siedlungswasserbau, Industrierwasserwirtschaft und Gewässerschutz (SIG) unter der Leitung von Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Thomas Ertl durchgeführt. Ein großes Dankeschön gebührt meinen Betreuerinnen Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Maria Fürhacker, und Dipl.-Ing. Dr. Marija Zunabovic-Pichler, die mir diese Arbeit ermöglicht haben und mich mit Ideen und Ratschlägen durch die Arbeit geführt haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dipl. Ing. Christoph Schönher, der mir bei der gesamten praktischen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist, immer neue Ideen für die Versuchsreihen eingebracht hat und mich bei den Auswertungen und der Korrektur für die schriftliche Arbeit unterstützt hat. Bei der praktischen Arbeit wurde ich zusätzlich von den Mitarbeiter*Innen des mikrobiologischen und chemischen Labors am SIG unterstützt, da möchte ich mich im Besonderen bei Yassi Najafi, Eva-Maria Mattausch, Dipl. Ing. Fiedler Christina, Dipl. Ing. Philipp Proksch, Dipl.Ing. Lukas Peherdorfer und Wolfgang Stach für die Hilfe bedanken.

Um ein Masterarbeitsprojekt durchziehen zu können ist das Verständnis und die Unterstützung durch das familiäre Umfeld und vom Bekanntenkreis von großer Bedeutung. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mir durch Aufmunterung oder Unterstützung bei der Kinderbetreuung geholfen habt. Danke an meinen Lebensgefährten Lukas Haider und an meine Kinder Emil und Felix, für euer Verständnis, dass sehr viel Zeit in diese Arbeit geflossen ist. Danke an meine Schwiegermama Rosina Haider und an meine Schwägerin Martha Haider fürs Übernehmen der Kinder, dadurch war das Abschließen der praktischen und schriftlichen Arbeit erst möglich.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Kurzfassung	VI
Abstract	VII
1. Einleitung	1
2. Zielsetzung und Aufgabenstellung	3
3. Allgemeine Grundlagen (inklusive Literaturstudie)	4
3.1 Wasseraufbereitung in Trinkwasserversorgungsanlagen	4
3.1.1 Desinfektion von Trinkwasser	5
3.1.1.1 Chemische Desinfektion durch Oxidationsmittel	5
3.1.1.2 Physikalische Desinfektion mittels UV-Strahlung	8
3.1.1.3 Kombination von UV- und Chlordesinfektion	10
3.2 Biologische Stabilität	11
3.2.1 Herausforderungen	11
3.2.2 Möglichkeiten die biologische Stabilität des Trinkwassers zu erreichen	13
3.2.3 Fazit	14
3.3 Methoden zur Bestimmung der Lebensfähigkeit (Viability) von Organismen	14
3.3.1 Konventionelle Methoden	14
3.3.1.1 Plattengussmethode (HPC)	14
3.3.2 Neuere Methoden zur Erfassung des mikrobiologischen Zustandes	16
3.3.2.1 Durchflusszytometrie (DFZ)	16
3.3.2.2 ATP Methode	25
3.3.2.3 Wachstumspotential	30
3.3.2.4 Ausblick: Online-Messungen mittels Durchflusszytometrie und ATP Methode	32
3.3.2.5 Ausblick: Beurteilung der Desinfektionswirkung nach UV-Desinfektion	33
4. Material und Methoden	35
4.1 Durchflusszytometrie (DFZ)	35
4.1.1 Material	35
4.1.1.1 Probenahme	35
4.1.1.2 Vorbereitung und Messen der Proben	35
4.1.1.3 Herstellen der Farbstoffe	35
4.1.2 Methode	36
4.1.2.1 Muffeln der Flaschen	36
4.1.2.2 Probenahme	36
4.1.2.3 Vorbereitung und Messen der Proben	36
4.1.2.4 Herstellen der Farbstofflösungen	37
4.2 Kultivierungsverfahren (Koloniebildende Einheiten = KBE)	38
4.2.1 Material	38
4.2.2 Methode	39
4.2.2.1 Probenahme	39
4.2.2.2 Vorbereitung Peptonwasser	39
4.2.2.3 Vorbereitung Agar R2A	39
4.2.2.4 Vorbereitung Hefeextraktagar (HEA)	39
4.2.2.5 Plattengussverfahren	39
4.3 Untersuchung des Wachstumspotentials (WP)	40
4.3.1 Durchflusszytometrie	40
4.3.1.1 Material	40
4.3.1.2 Methode	40
4.3.2 Kultivierungsverfahren (KBE)	41

4.3.2.1	Material	41
4.3.2.2	Methode	41
4.4	ATP Methode	42
4.4.1	Material	42
4.4.2	Methode	42
4.4.2.1	Herstellen des ATP Reagenz	42
4.4.2.2	ATP Standardkurve	43
4.4.2.3	Messung	43
4.5	Untersuchungen von Proben in einer Trinkwasserversorgungsanlage (TWVA)	44
4.6	Laboruntersuchungen	45
4.6.1	Einflussfaktoren auf die SG1PI-Färbung	45
4.6.1.1	Material	45
4.6.1.2	Methode	46
4.6.2	Bestimmung der Desinfektionswirkung von ClO ₂	46
4.6.2.1	Material	46
4.6.2.2	Methode	48
4.7	Datenauswertung	51
4.7.1	Untersuchungen von Proben in einer TWVA	51
4.7.1.1	Durchflusszytometrie	51
4.7.1.2	Kultivierungsverfahren	51
4.7.2	Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung	52
4.7.3	Bestimmung der Desinfektionswirkung von ClO ₂	52
4.7.3.1	Auswertung der DFZ	52
4.7.3.2	Auswertung ATP	52
4.7.3.3	Auswertung KBE	52
4.7.3.4	Auswertung Wachstumspotential	52
5.	Ergebnisse und Diskussion	54
5.1	Untersuchungen von Proben in einer Trinkwasserversorgungsanlage (TWVA)	54
5.1.1	Durchflusszytometrische Ergebnisse	54
5.1.1.1	Gesamtzellzahl (TCC) und HNA Anteil	54
5.1.1.2	Zahl der intakten Zellen (ICC) und HNA Anteil (iHNA)	56
5.1.1.3	Verhältnis Zahl der intakten Zellen/Gesamtzellzahl (ICC/TCC): ICC Anteil	58
5.1.2	Kultivierungsverfahren	60
5.1.2.1	Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE)	60
5.1.3	Wachstumspotential (WP)	61
5.1.3.1	Wachstumspotential DFZ	61
5.1.3.2	Kultivierungsabhängiges Wachstumspotential	64
5.2	Laboruntersuchungen	67
5.2.1	Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung	67
5.2.2	Bestimmung der Desinfektionswirkung von ClO ₂	72
5.2.2.1	Ergebnisse der DFZ	72
5.2.2.2	Ergebnisse ATP Methode	78
5.2.2.3	Ergebnisse der kulturellen Methoden	81
5.2.2.4	Vergleich der Ergebnisse	82
5.2.2.5	Ergebnisse des ClO ₂ -Experiments Wachstumspotential	83
6.	Schlussfolgerungen	90
6.1	Untersuchungen in einer TWVA	90
6.2	Laborexperimente	90
6.2.1	Einflussfaktoren auf die SG1PI-Färbung	90
6.2.2	Einfluss der Desinfektionswirkung von ClO ₂	91
6.2.2.1	SG1PI Färbung nach ClO ₂ Desinfektion	92
6.2.2.2	CFDA	92
6.2.2.3	ATP Methode	92
6.2.2.4	Wachstumspotential	93
6.3	Weitere Fragestellungen und Fazit	93

7. Zusammenfassung	95
8. Abkürzungsverzeichnis	97
9. Abbildungsverzeichnis	99
10. Tabellenverzeichnis	102
11. Literatur	103
12. Anhang	110
13. Lebenslauf	117

Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung und Bewertung der Desinfektionswirkung in einer Trinkwasserversorgungsanlage (TWVA) und bei Laborexperimenten mit *E. faecium*. Bei der TWVA wurden mit Hilfe der kulturellen Methode und der Durchflusszytometrie (TCC und ICC) die UV-Desinfektion und die Desinfektion durch Zugabe von ClO_2 bestimmt und die Stabilität des Wassers anhand des Wachstumspotentials (WP) untersucht. Bei den Laborexperimenten wurde durch Desinfektion von *E. faecium* mit unterschiedlichen Konzentrationen ClO_2 unter Anwendung verschiedener Methoden (kulturell, DFZ (SG1PI in DMSO, SG1PI in Tris, CFDA), und ATP Methode) die Desinfektionswirkung veranschaulicht und die Methoden wurden miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Desinfektionswirkung grundsätzlich mit allen Methoden dargestellt werden konnte mit dem Nachteil, dass bei der kulturellen Methode nach der Desinfektion die meisten Zellen nicht mehr wachsen konnten. Im WP Versuch konnte gezeigt werden, dass nach alleiniger UV-Desinfektion das Trinkwasser bei einer Temperatur von 15°C nach 10 Tagen Lagerung instabil ist. Des Weiteren wurde beobachtet, dass mit dem Farbstoff CFDA bei unbehandelten *E. faecium* die in RW verdünnt wurden nur 30 Prozent der Esterase Aktivität ermittelt werden konnte. Der Vergleich aller Methoden beim Laborexperiment zeigt, dass die Ergebnisse der ICC bei Verwendung von DMSO im Vergleich zu Tris Puffer als Lösungsmittel für SG1PI besser mit den Resultaten der ATP Methode und der Esterase Aktivität zusammenpassen. Die kulturelle Methode weicht von den Ergebnissen der anderen Methoden völlig ab, am besten passen die Ergebnisse der ATP Methode und der CFDA Färbung zusammen. Die Ergebnisse zeigen, dass für die adäquate Beurteilung der Desinfektionswirkung Wissen über den Mechanismus der Abtötung der Zellen nach erfolgter Desinfektion notwendig ist. Dann kann die passende Detektionsmethode ausgewählt werden, wobei eine Kombination von mehreren Methoden von Vorteil ist.

Abstract

The aim of this work was to determine and evaluate the disinfection effect in a drinking water supply system and in laboratory experiments with *E. faecium*. The UV disinfection and the disinfection by adding ClO₂ were determined at the drinking water supply system with the aid of the culture method and flow cytometry (TCC and ICC). The stability of the water was examined on basis of the growth potential. In the laboratory experiments the disinfection effect was illustrated by disinfecting *E. faecium* with different concentrations of ClO₂ using different methods (cultural, flow cytometry (SG1PI in DMSO, SG1PI in Tris, CFDA), and ATP method) and the methods were compared with one another. The results show that the disinfection effect could basically be shown with all methods. The disadvantage of the cultural method is that after the disinfection most of the cells could no longer grow. In the growth potential test, it could be shown that after UV disinfection alone, the drinking water is unstable after 10 days of storage at a temperature of 15 °C. It was also observed that with the dye CFDA in untreated *E. faecium* that were diluted in raw water, only 30 percent of the esterase activity could be determined. The comparison of all methods in the laboratory experiment shows that the results of the ICC when using DMSO compared to Tris buffer as a solvent for SG1PI fit better with the results of the ATP method and the esterase activity. The cultural method differs completely from the results of the other methods; the results of the ATP method and the CFDA staining match best. The results show that knowledge of the mechanism by which the cells are killed after disinfection is necessary for an adequate assessment of the disinfection effect. The appropriate detection method can then be selected, a combination of several methods being advantageous.

1. Einleitung

Schnelligkeit, Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit des Nachweises lebender Bakterien im Trinkwasser sind Schlüsselthemen für die Sicherheit des Menschen (Guilini et al., 2015). Ziel der öffentlichen Trinkwasserversorgung ist es, Wasser von akzeptabler ästhetischer und hygienischer Qualität zu produzieren und diese Qualität während der gesamten Verteilung bis zum Verbrauch zu erhalten. Aus mikrobiologischer Sicht kann sich die Qualität des aufbereiteten Wassers durch übermäßiges Bakterienwachstum verschlechtern, was zu Problemen wie einer sensorischen Verschlechterung der Wasserqualität (z. B. Geschmack, Geruch, Trübung, Verfärbung) sowie zur Verbreitung von Krankheitserregern führen kann (Nescerecka et al., 2014). In Trinkwasserversorgungsanlagen (TWVA) werden verschiedene Desinfektionsmethoden angewendet, z.B. Chlorung, UV-Desinfektion, um ein gesundheitlich einwandfreies Wasser zum Konsumenten zu verteilen.

Für die Beurteilung der Desinfektionswirkung in Trinkwasser ist das Einhalten der mikrobiologischen Parameterwerte nach der Trinkwasserverordnung erforderlich. Diese sind im österreichischen Lebensmittelbuch Codexkapitel B 1 Trinkwasser deklariert. Nach der Desinfektion dürfen in 250 ml Wasser keine *E. coli*, *Enterokokken* und wenn das Wasser in Flaschen oder anderen Behältnissen in Verkehr gebracht wird auch keine *P. aeruginosa* nachweisbar sein (Bundesministerium Arbeit, Soziales und Gesundheit, 2019). Neben dem Zeit- und Materialaufwand der dafür vorgesehenen Bestimmungsmethoden besteht die Tatsache, dass die meisten (bis zu 99%) der wasserbürtigen Bakterien nicht kultivierbar sind. Nach einer Desinfektion werden die Mikroorganismen entweder vollständig inaktiviert oder teilweise nur gestresst, aber sind noch intakt (VBNC = viable but not culturable). In diesem VBNC Zustand ist eine Kultivierung standardmäßig nicht mehr möglich und kann zu einer Unterschätzung der Überlebensrate führen.

Chlor und ClO_2 sind Oxidationsmittel die zur Desinfektion von Trinkwasser sehr häufig eingesetzt werden und zur Begrenzung des Nachwachsens von Bakterien in Wasserverteilungssystemen dienen. Sie reagieren mit verschiedenen zellulären Verbindungen und beeinflussen metabolische und physiologische Prozesse. Die Bakterienmembranen können geschädigt werden, indem die Permeabilität verändert wird, die ATP-Produktion gehemmt wird, Fragmentproteine und Nukleinsäureschäden verursacht werden. Außerdem hemmen sie das Bakterienwachstum auf Agarmedien, selbst nachdem niedrige Oxidationsmitteldosen verwendet wurden. Diese Bakterien sind zwar lebensfähig aber durch den oxidativen Stress ist es ihnen nicht möglich auf Nährmedien zu wachsen und verschwinden dadurch in den VBNC Zustand. Es ist wichtig, die Kultivierung durch weniger zeitaufwendige und effektivere Methoden zur raschen Überwachung der Desinfektionseffizienz zu ergänzen (Phe et al., 2005).

Für die allgemeine Beurteilung der Wasserqualität haben neben den kulturellen Standardmethoden zwei mikrobiologische Parameter zunehmend Beachtung gefunden, nämlich die durchflusszytometrische Bestimmung der intakten Zellzahl (intact cell count „ICC“) und die Adenosin-Triphosphat-Analyse (ATP). Diese Verfahren kommen für die Überwachung des mikrobiologischen Gesamtzustands und auch nach Desinfektion immer häufiger zum Einsatz. Für die Akzeptanz neuer oder alternativer Methoden oder Parameter durch Wasserversorger und Behörden sind jedoch umfangreiche Feldtests sowie Vergleiche mit herkömmlichen Methoden erforderlich. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist der Nachweis von intakten Zellen mit Hilfe von Farbstoffkombinationen (SYBR Green und Propidiumiodid) möglich. Die ATP-Methode nutzt das Nukleotid ATP (Adenosintriphosphat), dieses ist ein universeller Energieträger und reguliert energieliefernde Prozesse in Zellen. Die Konzentration dieses Moleküls kann daher als Indikator für intakte Zellen quantitativ herangezogen werden (Firlinger et al., 2017).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesen Methoden und vergleicht diese mit den „langsameren“ kulturellen Methoden, um beispielhaft die Desinfektionswirkung „schnell“ messen zu können. Es wird einerseits die Desinfektionswirkung in einer Trinkwasserversorgungsanlage (TWVA) und andererseits von *E. faecium*, die im Labor gezüchtet und mit Chlordioxid (ClO₂) desinfiziert wurden, beurteilt. Wobei die vorhin genannten Methoden zur Beurteilung herangezogen und die Ergebnisse verglichen und diskutiert werden.

2. Zielsetzung und Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Ermittlung und Bewertung der Desinfektionswirkung bei Trinkwasserproben, die mit ultravioletter (UV)-Strahlung und Chlordioxid (ClO_2) behandelt wurden und bei im Labor gezüchteten Bakterien (*E. faecium*), die mit unterschiedlichen ClO_2 Konzentrationen behandelt wurden. Dafür ist es notwendig die intakten (lebensfähigen) Zellen der Proben zu bestimmen, wobei für deren Bestimmung verschiedene Methoden angewandt werden. Es wurden koloniebildende Einheiten (KBE) mittels Plattengussmethode, die Zellzahl mittels Durchflusszytometrie und ATP photometrisch bestimmt.

In einem ersten Schritt wurden im Rahmen eines Projektes regelmäßig die Gesamtzellzahl und die Anzahl der intakten Zellen in verschiedenen Proben (Rohwasser, nach UV-Desinfektion, nach UV-Desinfektion und ClO_2 Zugabe, im Netz und Hochbehälter) eines Trinkwasserversorgers durchflusszytometrisch gemessen und die koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Dadurch kann im beprobten Zeitraum beobachtet werden ob und wie sich die ICC/TCC des Wassers der einzelnen Probenahmestellen verändert und ob eine etwaige Veränderung mit anderen Maßnahmen oder Ereignissen zusammenfällt. Des Weiteren kann die Desinfektionswirkung nach Zugabe von ClO_2 und die weitere Entwicklung der TCC/ICC im Netz und im Hochbehälter beurteilt werden.

Im zweiten Schritt erfolgte die experimentelle Untersuchung spezifischer Aspekte der Bestimmung der Zahl der intakten Zellen mittels Durchflusszytometrie. In Anlehnung an Untersuchungen von Nescerecka et al. (2016a) wurden der Einfluss des Lösungsmittels, die Anwendung verschiedener Konzentrationen Propidiumiodid (PI) und der Messdauer ermittelt. Verschiedene Konzentrationen PI in Tris Puffer wurden mit der üblichen Konzentration PI in Dimethylsulfoxid (DMSO) verglichen. Als Probe wurde Rohwasser verwendet, das in weiteren Experimenten vor der Messung thermisch und mit ClO_2 behandelt wurde. Dieser Versuch soll zeigen ob DMSO Bakterien zerstört und diese dadurch fälschlicherweise als „tote“ Zellen detektiert werden. Auch der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen PI und die Messdauer wurden herangezogen, um darzustellen ob „tote“ Bakterien ausreichend angefärbt (z.B. durch geringe PI Konzentration) wurden oder fälschlicherweise zu wenige intakte Zellen detektiert wurden (z.B. durch zu hohe PI Konzentration).

Den letzten Arbeitsschwerpunkt bildete das Testen weiterer Möglichkeiten, um intakte Zellen zu detektieren. Ziel ist es neben der Membranpermeabilität andere Komponenten, die durch die Desinfektion zum Zelltod führen, in die Bewertung der Desinfektionswirkung einbeziehen zu können. In einem Laborexperiment wurde *E. faecium*, durch Zugabe unterschiedlicher ClO_2 Konzentrationen, behandelt. In Vorexperimenten wurden verschiedene Farbstoffe für die Durchflusszytometrie getestet: Bis-(1,3-dibutylbabiturat) trimethinoxonol (DiBAC4(3)), Carboxy Fluorescein Diacetat (CFDA), Gel Red, PI in DMSO und PI in Tris Puffer, um zu testen welche Kombinationen für den eigentlichen Versuch sinnvoll sind. Für die weiteren Experimente wurden, aufgrund guter Ergebnisse, PI in DMSO und in Tris Puffer verdünnt und CFDA zur durchflusszytometrischen Bestimmung der intakten Zellen verwendet. Zusätzlich wurde die Adenosintriphosphat-Methode (ATP) auf Basis eines verbesserten ATP Protokolls nach Hammes et al. (2010) zur Bestimmung des intrazellulären ATPs, das in Zusammenhang mit den intakten Zellen steht, eingeführt. Außerdem wurden mithilfe des Plattengussverfahrens die KBE bestimmt. Durch diesen Versuchsaufbau können verschiedene Parameter (Membranpermeabilität bei SG1PI, Enzymaktivität bei CFDA und IC – ATP bei der ATP Methode), die eine Bestimmung der Zahl der intakten Zellen zulassen, miteinander verglichen werden.

Bei den Untersuchungen der Trinkwasserproben und beim Laborexperiment mit *E. faecium* wurden zusätzlich Wachstumspotential-Versuche durchgeführt, um zu zeigen ob eine Wiederaufkeimung der Bakterien nach erfolgter Desinfektion und nach einer bestimmten Lagerzeit und Temperatur möglich ist.

3. Allgemeine Grundlagen (inklusive Literaturstudie)

In der Literaturstudie werden Grundlagen, die in der Wasseraufbereitung von Trinkwasserversorgungsanlagen (TWVA) von Bedeutung sind, dargestellt. Das Thema Desinfektion ist hier von großer Bedeutung, wobei aufgrund des vorhandenen Schwerpunkts in der Arbeit, auf die Chlordioxid- und UV- Desinfektion näher eingegangen wird.

Danach wird die Detektion von intakten Zellen thematisiert. Es werden die Durchflusszytometrie, wo das Hauptaugenmerk auf die verschiedenen Detektionsmöglichkeiten von intakten Zellen durch Verwendung verschiedener Farbstoffe gerichtet wird und die ATP Methode, wo näher auf die Herausforderungen dieser Methode eingegangen wird, genauer erklärt.

Zum Schluss wird auf das Thema Biostabilität eingegangen, wobei die Herausforderungen in diesem Bereich bedeutend sind.

3.1 Wasseraufbereitung in Trinkwasserversorgungsanlagen

Trinkwasser bietet eine einzigartige nährstoffarme Umgebung, in der sich verschiedene einheimische mikrobielle Gemeinschaften vermehren (Vital et al., 2012).

Ziel der öffentlichen Trinkwasserversorgung ist es, Wasser von akzeptabler ästhetischer und hygienischer Qualität zu produzieren und diese Qualität während der gesamten Verteilung bis zum Verbrauch zu erhalten. Aus mikrobiologischer Sicht kann sich die Qualität des aufbereiteten Wassers durch übermäßiges Bakterienwachstum verschlechtern, was zu Problemen wie einer sensorischen Verschlechterung der Wasserqualität (z. B. Geschmack, Geruch, Trübung, Verfärbung) sowie zur Verbreitung von Krankheitserregern führen kann (Nescerecka et al., 2014).

Die Verfahren zur Trinkwasseraufbereitung werden in drei Gruppen eingeteilt:

- physikalische Verfahren
- chemische Verfahren
- biologische Verfahren

Um das Aufbereitungsziel zu erreichen, müssen häufig Verfahrenskombinationen eingesetzt werden (Karger & Hoffmann, 2013a). In Tabelle 1 sind die Hauptverfahren der Trinkwasseraufbereitung aufgelistet.

Tabelle 1: Hauptverfahren der Trinkwasseraufbereitung (Karger & Hoffmann, 2013b)

Physikalisch	Chemisch	Biologisch
<i>Sedimentation</i> (z. B. Absetzbecken)	<i>Oxidation/Reduktion</i> (z. B. KMnO_4 -Zugabe zur Entmanganung)	<i>Entmanganung</i> (z. B. Einsatz von einlagernden und oxidierenden speziellen Manganbakterien)
<i>Siebung/Rechen</i> (z. B. Siebtrommel)	<i>Flockung</i> (z. B. Entfernung feindisperser Partikel mit Me-Salzen)	<i>Denitrifikation</i> (z. B. Nitratentfernung mit auto-oder heterotrophen Bakterien)
<i>Filtration</i> (z. B. Mehrschichtfilter)	<i>Fällung</i> (z. B. zur Schwermetall-elimination)	
<i>Membranverfahren</i> (z. B. Umkehrosmose zur Nitratentfernung)	<i>Enteisenung/Entmanganung</i> (z. B. durch O_2 -Zugabe)	
<i>Gasaustausch</i> (z. B. Verdüsung zur CO_2 -Reduktion)	<i>Entsäuerung</i> (z. B. Marmorfiltration)	
	<i>Ionenaustauscher</i> (z. B. zur Enthärtung)	

3.1.1 Desinfektion von Trinkwasser

Desinfektion ist die Abtötung von Mikroorganismen. Nach einer einwandfreien Desinfektion sind in definierten Volumina Krankheitserreger mit spezifizierten Verfahren nicht mehr nachweisbar und die Zahl unspezifischer Mikroorganismen liegt unter einem geforderten Wert (Karger & Hoffmann, 2013b).

Die Desinfektion von Trinkwasser stellt aber keine Sterilisation dar, es werden also nicht alle im Wasser befindlichen Mikroorganismen inaktiviert. Das ist bei der Trinkwasserdesinfektion auch gar nicht erforderlich. Das Ziel der Desinfektion ist es, die Konzentration an pathogenen Mikroorganismen so zu verringern, dass für den Menschen keine Gefährdung mehr gegeben ist (Sommer et al., 2007).

Es können unterschiedliche Methoden angewendet werden, um das Trinkwasser frei von gesundheitsschädigenden Keimen und Bakterien zu bekommen. Die Krankheitserreger können entfernt oder physikalisch / chemisch abgetötet werden.

Für die Trinkwasserdesinfektion sind folgende Verfahren zulässig:

- Chlorung mit Natrium-, Kalium-, Calcium- oder Magnesiumhypochlorit
- Chlorung mit Chlorgas
- Behandlung mit Chlordioxid
- Ozonung
- UV-Bestrahlung (Trinkwasser, 2020)

Heutzutage umfassen die am häufigsten verwendeten Desinfektionsmethoden für Trinkwasser die physikalische Desinfektion (Filtration / UV / Wärme) und die chemische Desinfektion (Chlor / Ozon) (Wang et al., 2010).

3.1.1.1 Chemische Desinfektion durch Oxidationsmittel

Chlor ist eines der häufigsten Oxidationsmittel zur Desinfektion von Trinkwasser und zur Begrenzung des Nachwachsens von Bakterien in TWVAs. Es reagiert mit verschiedenen zellulären Verbindungen und beeinflusst metabolische und physiologische Prozesse. Es kann Bakterienmembranen schädigen, indem es ihre Permeabilität verändert, die ATP-Produktion hemmt und Fragmentproteine und Nukleinsäureschäden verursacht (Phe et al., 2005).

Die Chlorgas-Desinfektion ist einfach und preisgünstig, daher wird sie häufig angewendet. Chlor ist aber sehr giftig (MAK-Wert 1,5 mg/m³), daher gelten für den Umgang strenge Vorschriften (Karger & Hoffmann, 2013a). Bei der Desinfektion mit Hypochloritlösungen oder Chlorgas (Verfahren der Chlorung) darf nach einer Reaktionszeit von mindestens 30 Minuten eine Restkonzentration an freiem Chlor (angegeben als Cl₂) von 0,3 mg/l Cl₂ nicht unterschritten und von 0,5 mg/l Cl₂ nicht überschritten werden. Bei Abgabe an den Abnehmer bzw. Verbraucher beträgt die zulässige Höchstkonzentration an freiem Chlor in der Regel 0,3 mg/l Cl₂ (Bundesministerium Arbeit, Soziales und Gesundheit, 2019). Im Teilstrom wird das Chlorgas mit Wasser gemischt und es läuft folgende chemische Reaktion ab:



Die gebildete Salzsäure wird sofort durch die Karbonate im Wasser neutralisiert. Außerdem entsteht unterchlorige Säure, die Dissoziation dieser ist stark pH-Wertabhängig. Mit steigendem pH-Wert muss die Menge an Chlor gesteigert werden. Chlor wirkt auch als Oxidationsmittel (die Keimabtötungswirkung wird durch den abgespaltenen aktiven Sauerstoff erreicht), daher erfolgt durch oxidierbare Substanzen eine Chlorzehrung. Ein Nachteil bei der Anwendung von Chlor ist, dass organische Inhaltsstoffe des Wassers chloriert werden. Dabei entstehen unterschiedliche Trihalogenmethane (THM) oder Haloforme. Für die Summe der vier Haloforme gilt in Österreich ein Grenzwert von 30 mg/l. Der Chloreinsatz führt außerdem zur Bildung von Chlorphenolen, die

dem Wasser einen unangenehmen muffigen Geschmack geben. Eine Konzentration ab 0,02 mg/l wirkt bereits störend (Karger & Hoffmann, 2013b).

Der Einsatz von Chlor und Hypochloriten ermöglicht es frei suspendierte Mikroorganismen sowie virale und bakterielle Krankheitserreger abzutöten bzw. zu inaktivieren. Voraussetzung dafür ist ein weitgehend trübstoffreies Wasser. Falls das zu desinfizierende Wasser Partikel enthält, müssen diese in geeigneter Weise vor der Desinfektion entfernt werden, da in ihnen eingeschlossene Krankheitserreger vor der Wirkung des Desinfektionsmittels geschützt sind. Die Entfernung von Parasiten kann nur durch eine leistungsfähige Filtration, wie z.B.: Flockungs-, Membran-, oder Uferfiltration, gewährleistet werden (Karger & Hoffmann, 2013a).

Chlordioxid (ClO₂) besitzt ein höheres Oxidationsvermögen als Chlorgas. Dies hat den Vorteil, dass die Wirkung bei stark reduzierter Geschmacks- und Geruchsgrenze erreicht wird (Karger & Hoffmann, 2013b). Der Einsatz von Chlordioxid ermöglicht frei suspendierte Mikroorganismen sowie virale und bakterielle Krankheitserreger abzutöten bzw. zu inaktivieren. Das Wasser muss aber trübstoffarm sein, sind Partikel vorhanden müssen diese vor der Desinfektion in geeigneter Weise entfernt werden, da eingeschlossene Krankheitserreger vor der Wirkung des Desinfektionsmittels geschützt sind. Im Zuge der Aufbereitung muss außerdem eine Eliminierung von parasitären Krankheitserregern gewährleistet sein, da diese auch bei Einsatz von maximal zulässiger Dosis nicht in ausreichender Weise abgetötet werden (DVGW W 224, 2010).

Bei der Desinfektion mit Chlordioxid (angegeben als ClO₂) beträgt die Zugabe mindestens 0,2 mg/l ClO₂ und höchstens 0,4 mg/l ClO₂. Eine Mindestreaktionszeit von 15 Minuten ist einzuhalten, wobei auf ausreichende Durchmischung zu achten ist. Nach der Reaktionszeit muss jedenfalls eine Restkonzentration von mindestens 0,05 mg/l ClO₂ nachweisbar sein. Bei Abgabe an den Abnehmer bzw. Verbraucher beträgt die zulässige Höchstkonzentration des bei diesem Verfahren entstehenden, unerwünschten Nebenproduktes Chlorit 0,2 mg/l (Bundesministerium Arbeit, Soziales und Gesundheit, 2019).

Aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften wird Chlordioxid am Anwendungsort hergestellt.

Für die Herstellung kommen zwei Verfahren in Frage:

- Das Chlorit-/Chlor-Verfahren
- Das Chlorit-/Salzsäure-Verfahren (Roeske, 2016)

Folgende Reaktionen laufen dabei ab:



Je konzentrierter eine Chlordioxidlösung ist, desto schneller zerfällt diese. Darum werden konzentrierte Lösungen entweder direkt nach der Herstellung auf eine 2 bis 3 g/l Lösung verdünnt oder direkt in das zu desinfizierende Wasser dosiert. Negativen Einfluss auf die Stabilität von Chlordioxidlösungen haben der pH- Wert, Spuren von Verunreinigungen, Erwärmung und Lichteinfall.

Chlordioxidgas ist sehr giftig, ist ab einer Konzentration von 0,3 mg/l (0,1 ppm) in der Luft geruchlich wahrnehmbar und hat einen chlorähnlichen Geruch. Um nicht zulässige Betriebszustände zu verhindern, sind bei der Trinkwasserdesinfektion nur Verfahren zulässig bei denen eine sichere Herstellung und eine kontinuierliche Prozessüberwachung möglich sind (DVGW W 224, 2010). Die Herstellung von Chlordioxid-Lösungen mit einer Konzentration zwischen 6 und 20 mg/l sind mit heutiger Technologie im Reaktor möglich.

Für beide Verfahren gilt neben der technischen Sicherheit der Anlagen, dass das eingesetzte Natriumchlorit möglichst vollständig zu ClO₂ umgesetzt wird. Die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten, wie z.B. Chlorat, bei der chemischen Umsetzung soll unterbunden werden.

Eine stabile ClO₂-Lösung soll auch über längere Zeiträume vorliegen. Gasförmiges Chlordioxid zersetzt sich ab einer Konzentration von 300 g/m³ (= 10 Vol.-%) explosionsartig zu Chlor und Sauerstoff. Im überstehenden Gasraum kann bei Chlordioxidkonzentrationen von 8 g/l Chlordioxid bei Atmosphärendruck und 20 °C diese kritische Konzentration durch Ausgasung entstehen. Daher darf aus Sicherheitsgründen die Konzentration der hergestellten ClO₂-Lösung nicht über 4 g/l ClO₂ liegen (Roeske, 2016).

Die Desinfektionswirkung kann mit Chlordioxid, abhängig von der Chlordioxidosis und dem Zehrungspotential des Wassers, über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Als Chlordioxidzehrung wird die Differenz zwischen der zugegebenen Chlordioxidosis und der im Wasser vorhandenen Chlordioxidkonzentration in mg/l nach einer bestimmten Reaktionszeit bezeichnet. Die Zehrung wird durch die Stabilität des Desinfektionsmittels, Licht- und Temperatureinflüsse und gelöste organische und anorganische Stoffe beeinflusst. Zur Charakterisierung der organischen Belastung von Trinkwasser kann der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) herangezogen werden.

Im Vergleich zu Chlor und Hypochloriten ist vorteilhaft, dass durch Verwendung von Chlordioxid eine gleichbleibende Desinfektionswirkung bei pH-Werten größer als 8 möglich ist. Des Weiteren reagiert Chlordioxid nicht mit Bromid, Ammonium und Aminen. Eingeschränkt wird der Einsatz von Chlordioxid von hohen DOC-Konzentrationen (>2,5 mg/l), da bei solch hohen Konzentrationen, durch die höhere Chlordioxid-Zehrung, die zulässige maximale Dosiermenge von 0,4 mg/l Chlordioxid möglicherweise nicht ausreicht.

Da der Grenzwert des Chlordioxidreaktionsprodukts Chlorit, laut österreichischem Lebensmittelbuch (2017), bei 0,2 mg/l liegt, kann es sein, dass die Chlordioxidzugabe auf Werte unter 0,4 mg/l zu begrenzen ist. Wird mehr als 0,2 mg/l Chlordioxid dosiert, sollte die Chloritkonzentration regelmäßig kontrolliert werden (DVGW W 224, 2010).

Wirksamkeit / Effizienz von Oxidationsmitteln

Die unterschiedliche Selektivität und Reaktivität der Oxidationsmittel gegenüber bestimmten Verbindungen können deren Reaktivität gegenüber Mikroorganismen direkt beeinflussen. Zusätzlich zur Reaktivität des Oxidationsmittels können die Zusammensetzung und der physiologische Zustand der Bakteriengemeinschaft die Effizienz der bakteriellen Desinfektion beeinflussen. Einheimische Bakteriengemeinschaften in natürlichen Gewässern und in Trinkwässern umfassen eine Reihe sehr unterschiedlicher Bakterien mit stark variablen physikalischen (z. B. Zellgröße und -form), chemischen (z. B. Membranzusammensetzung) und biologischen (z. B. physiologischen) Eigenschaften. Diese Heterogenität wird wahrscheinlich die Wirksamkeit von Desinfektionsprozessen beeinflussen. Die Effizienz von Oxidationsmitteln, die Membranschäden verursachen, nahm in der Reihenfolge Ozon > Chlor > Chlordioxid > Ferrat > Permanganat > Chloramin ab (Ramseier et al., 2011).

ct-Wert

Ein Maß für die Desinfektionswirkung ist der ct-Wert. Wenn Versuchsreihen mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen durchgeführt werden, können diese im ct-Wert als Maß für die Wirksamkeit zusammengefasst werden. Des Weiteren können anhand des ct-Wertes verschiedene Desinfektionsmittel besser verglichen werden.

Der ct₉₉ Wert ist das Produkt aus der Konzentration des Desinfektionsmittels und der für eine die Reduktion der Testkeime um 2 Log Stufen benötigten Zeit:

$$ct_{99} = \bar{c} * t_{99\%}$$

Die Effektivität eines bestimmten Desinfektionsmittels gegenüber eines bestimmten Testorganismus wird durch den ct-Wert beschrieben.

Ein hoher ct_{99} -Wert sagt aus, dass relativ hohe Desinfektionsmittelkonzentrationen und lange Einwirkzeiten notwendig sind, um eine Reduktion von 99% (2 Log Stufen) zu erreichen. Organismen mit hohem ct -Wert sind also relativ resistent gegenüber dem Desinfektionsmittel (Schmidt, 2012).

Die Breitbanddesinfektionseigenschaften von Chlordioxid liefern unter normalen Umständen niedrigere ct -Werte als die herkömmliche Chlorbehandlung (International Dioxide, 2019).

Tabelle 2: ct_{99} -Werte (Verringerung um 2 Log Stufen) verschiedener Mikroorganismen nach ClO_2 Desinfektion (Schmidt, 2012)

Mikroorganismen	ct_{99} -Werte ClO_2 Desinfektion [min*mg/l]
<i>E. coli</i>	0,118
<i>E. faecium</i>	0,339
Bakteriophagen MS2	0,101
Bakteriophagen PRD1	0,047

3.1.1.2 Physikalische Desinfektion mittels UV-Strahlung

Bereits Ende des vorletzten Jahrhunderts ist bekannt, dass UV-Strahlen keimtötende Wirkung haben, aber erst in unserer Zeit haben Anlagen zur Erzeugung von UV-Strahlen einen Leistungsstand erreicht, der ihren Einsatz zur Desinfektion von Trinkwasser ermöglicht. Mittlerweile ist eine Keimreduzierung im Trinkwasser möglich wie sie bei chemischen Desinfektionsverfahren erreicht werden (Roeske, 2016).

Die Desinfektion mit UV-Licht gewinnt als Alternative zur Chlordesinfektion zunehmend an Bedeutung, da eine Vielzahl von Krankheitserregern inaktiviert werden kann, keine gefährlichen Desinfektionsnebenprodukte anfallen und die Desinfektion sicher und einfach durchgeführt werden kann (Guo et al., 2012).

UV-Licht, das von Quecksilberbogenlampen (Nieder- oder Mitteldruck) emittiert wird, ist gegen eine Vielzahl von pathogenen Mikroorganismen wirksam, einschließlich Viren, Bakterien und Protozoen-Zysten (Hallmich & Gehr, 2010).

Das Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz (2021), die Trinkwasserverordnung (2017), das Österreichische Lebensmittelbuch (Codex), Kapitel B1 „Trinkwasser“ (2019), und der Wassersicherheitsplan (WHO, 2017) bieten nationale und internationale Qualitätskonzepte, um in der Trinkwasserversorgung nach erfolgter UV-Desinfektion ausreichende Zuverlässigkeit und Sicherheit zu gewährleisten. Die Anwendung dieser Konzepte bietet die Möglichkeit die aktuellen Anforderungen an den Betrieb und die Überwachung von TWVAs zu erfüllen (Sommer et al., 2007).

Prinzip der Desinfektion durch UV-Bestrahlung

Für die Bestrahlung werden üblicherweise zwei UV-Lampentypen verwendet: Niederdruck (LP), der nahezu monochromatisches Licht bei 254 nm (UV-C-Strahlung) aussendet, und Mitteldruck (MP), der polychromatisches Licht über einen weiten Wellenlängenbereich aussendet, einschließlich solcher, die mit keimtötenden Wirkungen zwischen 200 nm und 300 nm verbunden sind (Lyon et al., 2012).

Wenn Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Parasiten) einer UV-Strahlung ausgesetzt werden, absorbieren diese die UV-Photonen, wodurch eine photochemische Reaktion ausgelöst wird (Sommer et al., 2007). UV-Bestrahlung bei Wellenlängen von 200 bis 400 nm inaktiviert

Krankheitserreger, indem sie Veränderungen in der Genom-DNA oder anderen intrazellulären Molekülen wie Proteinen und Enzymen mit ungesättigten Bindungen verursacht (Liu et al., 2011). Die UV-Strahlung greift hauptsächlich die Nukleinsäuren der Mikroorganismen an. Bei Anwendung von geeignetem Wellenlängenbereich und ausreichend hoher UV-Fluenz (= Dosis), führen die Schädigungen in den Mikroorganismen zu deren Inaktivierung, das heißt zum Verlust ihrer Vermehrungsfähigkeit (reproduktiver Zelltod). Inaktivierte Mikroorganismen stellen keine Infektionsgefahr für den Menschen dar (Sommer et al., 2007). Abbildung 1 zeigt die Wirkung von UV-Strahlen auf ein Bakterium.

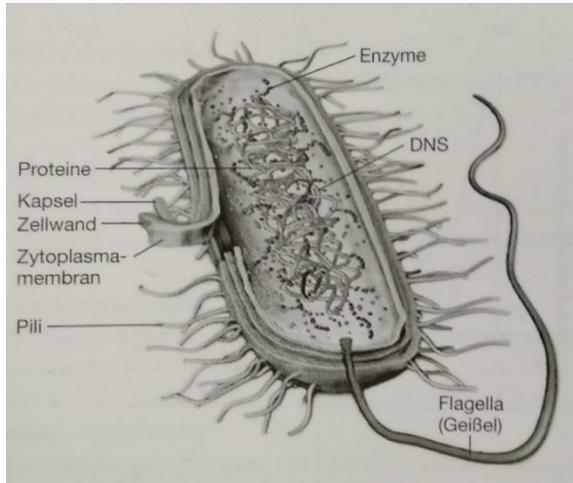


Abbildung 1: Wirkung der UV-Bestrahlung auf ein Bakterium: Mitteldruckstrahler (poly- chromatische Strahler) emittieren ein breites Wellenspektrum, das nicht nur die DNA von Bakterien zerstört, sondern auch die Zellmembran, Proteine, Lipide und Enzyme. Dadurch können die Mikroorganismen ihre Reparaturmechanismen (Foto- und Dunkelreaktivierung) nicht mehr aktivieren (Roeske, 2016)

Die notwendige Inaktivierungs-Bestrahlungsdosis hängt von verschiedenen Faktoren ab. Einzelne Bakterien sind leichter abzutöten als zusammengelagerte oder an Feststoffpartikeln absorbierte Mikroorganismen. Weitgehend gleich empfindlich gegenüber UV-Strahlen sind vegetative Bakterien, Viren und Pilze. Bakteriensporen und Parasiten besitzen eine deutlich höhere Widerstandsfähigkeit (Roeske, 2016).

Ein Vorteil der UV-Desinfektion von Wasser liegt darin, dass kein Zusatz von Chemikalien erforderlich ist. Des Weiteren ist die Reaktionszeit (Bruchteile von Sekunden) sehr kurz, daher wird kein Reaktionsbehälter benötigt. Außerdem erfolgt keine Veränderung der Wasserinhaltsstoffe bei korrekter Anwendung und im Gegensatz zu den chemischen Desinfektionsverfahren ist die Desinfektionswirkung weder vom pH-Wert noch von der Temperatur abhängig. Im Gegensatz zu chemischen Desinfektionsverfahren ist UV-Strahlung sehr gut gegenüber Dauerformen von Parasiten (z. B. Oocysten von Cryptosporidien, Zysten von *Giardia lamblia*) wirksam und sie besitzt eine spezifische mikrobizide Wirkung (Sommer et al., 2007).

Nachteilig ist, dass während des praktischen Einsatzes im Gegensatz zu chemischen Desinfektionsverfahren (Chlor, Ozon) keine direkte Messung eines „Desinfektionsmittels“ möglich ist. Des Weiteren erfolgt die mikrobizide Wirkung nur am Ort der Strahlung, es gibt keine nachhaltige Wirkung (z. B. im Leitungssystem) (Sommer et al., 2007). Außerdem haben viele Mikroben DNA-Reparatursysteme, Prozesse, die als Photoreaktivierung und Dunkelreparatur bezeichnet werden. UV-induzierte DNA-Schäden können durch diese Reparaturmechanismen repariert werden. Die Fähigkeit zur Zellreparatur hängt von Merkmalen wie Bestrahlungsquelle, angewandter Dosis, Inkubationsbedingungen und Art des Organismus ab (Olsen et al., 2015). Die Anzahl lebensfähiger Organismen kann sich aufgrund der Photoreaktivierung um mehrere log-Werte erhöhen, was ein Hindernis für das Erreichen sicherer Desinfektionsniveaus und einen möglichen Nachteil für die Anwendung der UV-Desinfektion darstellt (Hallmich & Gehr, 2010). Zusätzlich verursacht die UV-Desinfektion Verschiebungen von großen zu kleinen NOM (natürliche organische Materie) -Molekülen. Diese kleineren organischen Verbindungen bereichern die Verfügbarkeit von mikrobiellen Substraten und steigern dann das

Bakterienwachstum. Es ist zu beachten, dass diese Phänomene bei UV-Bestrahlungsdosen von mehr als 200 mJ / cm² beobachtet wurden (Liu et al., 2011).

3.1.1.3 Kombination von UV- und Chlordesinfektion

Die UV-Bestrahlung kann zusammen mit Chlor verwendet werden, um eine Desinfektion mit mehreren Barrieren zu erreichen und einen Restschutz zu bieten. Zhao et al. (2011) weisen auf die Möglichkeit hin die UV- und Chlorexposition sowohl für die Desinfektion als auch für die fortgeschrittene Oxidation zu nutzen, um die gleichzeitige Bekämpfung von Krankheitserregern und Mikroverunreinigungen zu erreichen (Zhao et al., 2011).

In der Praxis ist eine UV-Bestrahlung vor oder nach der Chlorierung bei Wasseraufbereitungsprozessen technisch machbar. Im letzteren Fall wird das Wasser während der ersten Desinfektionsstufe gleichzeitig UV-Bestrahlung und Chlorierung ausgesetzt (Liu et al., 2011).

Bei der Kombination von UV- und Chlordesinfektion stellt sich die Frage welche Nebenprodukte durch diese Desinfektionsmethode gebildet werden und ob ein synergistischer Effekt resultiert. Diese zwei Fragestellungen werden im Folgenden behandelt.

Bildung von Nebenprodukten

Wenn Chlor vor oder während der UV-Desinfektion (z. B. zur Voroxidation) zugesetzt wird, sind Wechselwirkungen zwischen Chlor und UV-Licht unvermeidlich, wodurch ein neues Spektrum im Wechsel von natürlichem organischem Material (NOM) und der Bildung von Desinfektionsnebenprodukten (DBPs) erzeugt wird (Zhao et al., 2011). Die Auswirkungen von Co-Expositionsprozessen auf NOM können sich von denen der UV-Bestrahlung allein unterscheiden. Durch sequentielle Desinfektionsschemata unter Verwendung von UV-Bestrahlung und Chlorierung werden voraussichtlich auch die Bildung von DBP in Wasser minimiert, da in solchen Prozessen niedrigere Chlordosierungen für einen langfristigen Restschutz in Verteilungssystemen verwendet werden können (Liu et al., 2011).

UV allein bei üblichen Desinfektionsdosen bildet keine halogenhaltigen DBPs, da zu ihrer Bildung ein Halogenierungsmittel wie Chlor oder Chloramin erforderlich ist. Es liegen jedoch nur wenige umfassende Studien zur Bewertung der Auswirkung der UV-Behandlung auf die DBP-Bildung in Kombination mit einem sekundären Desinfektionsmittel vor.

Die UV-Behandlung könnte die DBP-Bildung durch die Änderung der DOM (dissolved organic matter = gelöste organische Substanz) - Struktur und die anschließende Reaktivität gegenüber Chlor / Chloraminen beeinflussen. Magnuson et al., 2002 fanden heraus, dass mit zunehmender LP- und MP-UV-Dosis eine Verschiebung zu kleineren DOM-Molekülen auftrat (Lyon et al., 2012).

Lyon et al., 2012 fanden heraus, dass typische UV-Desinfektionsdosen keinen Einfluss auf die Bildung regulierter THMs und HAAs (heterozyklische aromatische Amine) mit anschließender Chlorierung oder Chloraminierung hatten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei Anwendung von LP- und MP-UV-Strahlung auf Oberflächengewässer mit typischen Desinfektionsdosen die Auswirkungen auf eine Reihe regulierter und nicht regulierter DBPs mit anschließender Chlorierung oder Chloraminierung minimal sind. In Wässern mit einem erhöhten Nitratgehalt kann die Verwendung von LP gegenüber MP UV die Wirkung auf die Bildung von Halogennitromethan verringern (Lyon et al., 2012).

Synergistischer Effekt

Frühere Studien untersuchten die sequentielle Desinfektion mit UV und Chlor im Abwasser und berichteten über einen synergistischen Effekt auf die Inaktivierung heterotropher Bakterien, totaler Coliforme und die Entfernung von Antibiotikaresistenzgenen (Wang et al., 2012) (Zhang et al., 2015).

Li et al., 2018 zeigten in ihrer Studie die vorteilhaften Auswirkungen kombinierter UV-LED- und Chlorbehandlungsverfahren auf die Inaktivierung von *B. subtilis*-Sporen. Die Inaktivierungsratenkonstante der UV₂₆₅/Cl₂- und UV₂₈₀/Cl₂-Behandlungsprozesse bei einer UV-Fluenz von 125 mJ/cm² war doppelt so hoch wie diejenigen, die allein während der UV₂₆₅- und UV₂₈₀-Behandlung erhalten wurden.

Insgesamt war die Verbesserung der Sporeninaktivierung vielversprechend, sodass durch Kombination von UV-LEDs und Chlor ein wirksamer Prozess zur Inaktivierung von Krankheitserregern mit zusätzlichen Vorteilen erzielt werden konnte (Li et al., 2018).

Zur Kombination von UV-Strahlung und Chlordioxid brachten Rand et al., 2007 eine Studie heraus. Sie verglichen die Wirksamkeit von Chlordioxid (ClO₂) mit freiem Chlor (Cl₂) mit und ohne Vorbehandlung mit Niederdruck-Ultraviolettlicht (UV) für Biofilmkontrolle. Die Daten dieser Studie zeigen, dass die UV / ClO₂-Kombination am wirksamsten war, ClO₂ war wirksamer als Cl₂ und UV-Licht allein war bei der Bekämpfung von suspendierten oder Biofilmbakterien im Vergleich zur Behandlung mit ClO₂ oder Cl₂ am wenigsten wirksam (Rand et al., 2007).

Murphy et al., 2007 untersuchten Vorteile einer sequenziellen Desinfektion, unter anderem durch Kombination von UV und Chlordioxid, um die Persistenz von *Escherichia coli* unter Bedingungen zu kontrollieren, die für Trinkwasserverteilungssysteme relevant sind. Im Allgemeinen erzielten UV-behandelte Systeme (Abwasser und Biofilme) in Kombination mit Chlordioxid größere logarithmische Reduzierungen als Systeme, die nur mit Desinfektionsmitteln auf Chlorbasis behandelt wurden. Während der UV-Desinfektion mit niedrigem Chlorgehalt wurde jedoch festgestellt, dass *E. coli* in geringen Mengen bestehen bleibt. Um eine ausreichende Desinfektion bereitzustellen ist ein besseres Verständnis der Fähigkeit des Desinfektionsmittels auf Chlorbasis in Kombination mit UV-Strahlung notwendig. Dies führt letztendlich zu einer verbesserten Bewirtschaftung und Sicherheit des Trinkwassers (Murphy et al., 2007).

3.2 Biologische Stabilität

Die biologische Stabilität von Trinkwasser bezieht sich auf das Konzept, den Verbrauchern Trinkwasser mit der gleichen mikrobiellen Qualität am Wasserhahn wie in der TWVA zur Verfügung zu stellen. Ein unkontrolliertes Wachstum von Bakterien kann jedoch während der Verteilung in Wasserleitungssystemen auftreten und zu hygienischen (z. B. Entwicklung opportunistischer Krankheitserreger), ästhetischen (z. B. Verschlechterung von Geschmack, Geruch, Farbe) oder betrieblichen (z. B. Verschmutzung oder Biokorrosion von Rohren) Problemen führen.

Das Ziel des Konzepts der biologischen Stabilität besteht darin, dass keine Änderung der Wasserqualität während der Trinkwasserverteilung auftritt oder zumindest nicht in einem Maße, das die Sicherheit des Verbrauchers oder eine ästhetische Wahrnehmung beeinträchtigt oder ein technisches Versagen verursacht wird (Prest et al., 2016).

Wasser kann als biologisch „instabil“ angesehen werden, wenn es das Wachstum von Bakterien ermöglicht (Vital et al., 2012).

3.2.1 Herausforderungen

Um das Bakterienwachstum während des Transports zu begrenzen, wird Trinkwasser in zahlreichen Ländern unter Verwendung verschiedener Substanzen (z. B. freies Chlor, Chlordioxid, Monochloramin) in unterschiedlichen Konzentrationen verteilt. Um eine Desinfektion im Verteilungssystem gewährleisten zu können wird das Desinfektionsmittel in Konzentrationen zugeführt, die eine Desinfektionswirkung während der Wasserverteilung ermöglicht. Das heißt, dass Restkonzentrationen der Desinfektionssubstanzen im Trinkwasserverteilungssystem vorhanden sind (Prest et al., 2016).

Desinfektionsmittel zielen aber nicht nur auf Bakterien ab, sondern reagieren auch mit natürlichen organischen Stoffen, Rohroberflächen und Partikeln im Netzwerk, wodurch möglicherweise assimilierbarer organischer Kohlenstoff (AOC) gebildet bzw. freigesetzt wird. AOC kann leicht von Bakterien konsumiert werden und wird daher als Hauptverursacher der biologischen Instabilität angesehen. Darüber hinaus wirkt sich der Zerfall von Chlor im Netzwerk negativ auf die Fähigkeit aus, das Wachstum von Mikroben am äußersten Ende des Netzwerks zu hemmen. Unter Berücksichtigung aller Faktoren würden das Vorhandensein von Nährstoffen, eine Verringerung der Anzahl konkurrierender Bakterien und das Fehlen von Desinfektionsmittelresten möglicherweise zu einer biologischen Instabilität im Verteilungsnetz führen. Dies hätte ein anschließendes Bakterienwachstum zur Folge (Abbildung 2). Neben der Bedeutung von Nährstoffen wird das Ausmaß des Bakterienwachstums durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst. Beispielsweise kann eine erhöhte Wassertemperatur den Chlorabbau beschleunigen und das Bakterienwachstum begünstigen, während Änderungen der hydraulischen Bedingungen die Nährstoffversorgung für Mikroorganismen in Biofilmen und / oder die Ablösung von Bakterien von den Rohroberflächen beeinflussen können. Schließlich können sowohl die Qualität von Materialien, die mit Trinkwasser in Kontakt kommen, als auch das Vorhandensein von Sedimenten und losen Ablagerungen die allgemeine mikrobielle Qualität des Wassers beeinflussen (Nescerecka et al., 2014).

Eine weitere Problematik stellen vorhandene Biofilme in Rohrsystemen dar. Biofilme sind Aggregate von mikrobiellen Zellen, die normalerweise an einer Fest-Flüssig-Grenzfläche akkumulieren und in einer Matrix aus hochhydratisiertem EPS (extrazelluläre polymere Substanzen) eingeschlossen sind. Die EPS-Struktur bietet eine Schutzumgebung gegen Desinfektionsmittelrückstände und gegen Weideorganismen und bindet organische und anorganische Verbindungen. Aufgrund extrazellulärer Enzyme im EPS können Biofilmbakterien komplexe organische Substrate wie Huminsäuren verwenden, die nicht leicht biologisch abbaubar sind und normalerweise nicht von Wasserbakterien verwendet werden. Die Verfügbarkeit zusätzlicher Nährstoffe schafft neue ökologische Nischen und ermöglicht somit das Wachstum anderer Mikroorganismen als im Rohwasser.

Eine weitere Herausforderung beim Erhalt der Biostabilität sind die unterschiedlichen Verweilzeiten des Wassers im Netzwerk. Im Allgemeinen wurden höhere Bakterienhäufigkeiten bei höheren Wasserverweilzeiten im Netzwerk beobachtet. Der Einfluss der Verweilzeit auf die mikrobielle Dynamik ist aber nicht eindeutig und hängt häufig von anderen Faktoren ab, wie dem Zerfall des restlichen Desinfektionsmittels und / oder der Verfügbarkeit des Substrats (Prest et al., 2016).

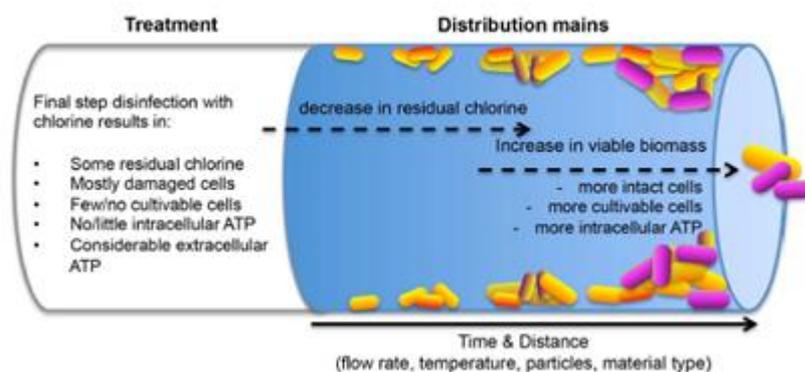


Abbildung 2: Ein Worst-Case-Szenario in einem instabilen, gechlorten Vertriebsnetz. Zeigt mögliche Veränderungen des mikrobiologischen Zustands, der eventuell zu einer hygienischen und sensorischen Verschlechterung der Wasserqualität führen kann. Diese mikrobiologischen Veränderungen resultieren aus dem Abbau des Restchlors (Nescerecka et al., 2014).

3.2.2 Möglichkeiten die biologische Stabilität des Trinkwassers zu erreichen

Um biologische Stabilität zu erreichen und den Verbrauchern Wasser in guter Trinkqualität zur Verfügung zu stellen, muss nicht nur sauberes und sicheres Wasser produziert werden, sondern müssen auch Veränderungen in der Bakteriengemeinschaft während der Trinkwasserverteilung begrenzt werden, die zu einem unkontrollierten Wachstum bis zu hohen Bakterienzellzahlen und zum Auftreten unerwünschter Mikroorganismen führen würden.

Eine Zunahme der Bakterienhäufigkeit ist ein klares Zeichen für eine biologische Instabilität und kann als Änderung spezifischer Bakterien gemessen werden. Der spezifische Nachweis erfolgt traditionell durch Kultivierung auf selektiven Medien und in jüngerer Zeit mit molekularen Techniken wie qPCR (quantitative Poly-Kettenreaktion) oder unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die Quantifizierung aller Bakterienzellen in einer Wasserprobe wird durch Zellmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen (z. B. SYBR Green 1 oder DAPI) und anschließende Detektion entweder durch Epifluoreszenzmikroskopie oder DFZ erreicht. Neben den genannten Einzelzellmethoden bietet die ATP Methode eine nützliche Messung der biologischen Aktivität von Wasser, da ATP nur in lebenden Zellen vorhanden ist.

Eine Änderung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft weist auf Instabilität hin. Um die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Trinkwasser beurteilen zu können werden molekulare Methoden die überwiegend auf DNA-Extraktion und PCR (poly chain reaction) – Amplifikation basieren eingesetzt. Zusätzlich bieten Fingerabdruckmethoden wie DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) und T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) Einblick in die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft, ohne dass bestimmte Bakteriengruppen oder -arten identifiziert werden müssen. Fingerabdruckmethoden sind für einen schnellen Vergleich zwischen Bakteriengemeinschaften in verschiedenen Wasserproben nützlich (Prest et al., 2016).

Prest et al., 2016 schlagen einen umfassenden, integrierten Ansatz für die Untersuchung der Bakteriendynamik in Trinkwasserverteilungssystemen vor. Bei diesem Ansatz sind sowohl Vorhersagemethoden in kontrollierten Labortests zur Bewertung der wachstumsfördernden Eigenschaften im Wasser als auch Analysemethoden für die direkte Vor-Ort-Anwendung erforderlich.

Die Analyse der Wasserqualität sollte mit einer Kombination von Methoden zur Analyse von mikrobiellen und Umweltparametern durchgeführt werden. Folgende Methoden-Kombination wird von Prest et al., 2016 empfohlen:

- Bewertung der Bakterienhäufigkeit mittels Durchflusszytometrie
- Bewertung der bakteriellen Aktivität / Lebensfähigkeit mittels Durchflusszytometrie in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen mit denen „lebende“ von „toten“ Zellen unterschieden werden können. Diese Methode wird durch ATP-Messungen ergänzt.
- Nachweis grundlegender Verschiebungen in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft durch Analyse von Proben mit durchflusszytometrischen Fingerabdrücken
- Eingehende Analyse der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft mit 16S-rRNA-Gensequenzierungsmethoden
- Analyse von Umweltparametern, einschließlich Temperatur, pH-Wert, Leitfähigkeit, Konzentrationen biologisch abbaubarer organischer (z. B. AOC und BDOC) und anorganischer Nährstoffe (z. B. Verbindungen auf Phosphat-, Schwefel- und Stickstoffbasis wie Ammonium und Sulfat, Methan und metallische Verbindungen wie Eisen und Mangan).

Vorhersagemethoden sind nützlich um unterstützende Informationen für die Entscheidungsfindung zur Verbesserung der Wasseraufbereitung und / oder der Verteilungsbedingungen bereitzustellen. Dazu wird das Wachstumspotential (siehe Kapitel 3.3.2.3) verwendet (Prest et al., 2016).

3.2.3 Fazit

Die Erzeugung und Verteilung von biologisch stabilem Trinkwasser sollte für Wasserversorger ein nicht verhandelbares Ziel sein, um den Verbrauchern die gleiche Wasserqualität zu bieten, die in der Aufbereitungsanlage erzeugt wird. Dies kann nur durch eine angemessene Überwachung und Kontrolle der mikrobiellen Prozesse während der Wasseraufbereitung und -verteilung erreicht werden.

Neue analytische und molekulare Methoden wie Durchflusszytometrie und Sequenzierungsmethoden mit hohem Durchsatz eröffnen neue Möglichkeiten für ein besseres Verständnis der Ökologie von Trinkwasserverteilungssystemen. Diese sollten kombiniert und in einheitlichen Ansätzen zur Untersuchung der mikrobiellen Dynamik in Trinkwasserverteilungssystemen in vollem Umfang umgesetzt werden. Darüber hinaus bieten neuartige Analysemethoden wie die vollautomatische und durchflusszytometrische Online-Analyse neue Perspektiven für die Überwachung der Trinkwasserqualität (Prest et al., 2016).

3.3 Methoden zur Bestimmung der Lebensfähigkeit (Viability) von Organismen

Beurteilung der Lebensfähigkeit und ihre Herausforderungen

Die Beurteilung der Lebensfähigkeit setzt ein grundlegendes Verständnis der verschiedenen Parameter die Leben oder Tod eines Bakteriums ausmachen und definieren, sowohl in Bezug auf den einzelnen Organismus als auch auf die Umgebung in der es untersucht wird, voraus.

Zusätzlich wird die Beurteilung der Lebensfähigkeit dadurch erschwert, dass Bakterien eine breite und komplexe Gruppe von Organismen darstellen. Unterschiedliche Wachstumsbedingungen beeinflussen wahrscheinlich die Art und Weise, in der Bakterien hinsichtlich ihrer Lebensfähigkeit und Aktivität wahrgenommen werden.

Darüber hinaus ist die bakterielle Heterogenität nicht auf breite Gruppen beschränkt, sondern tritt bekanntermaßen auch innerhalb einer einzelnen Spezies auf die in derselben Umgebung wächst (Hammes et al., 2011).

Um die Lebensfähigkeit von Bakterien in Trinkwässern zu beurteilen gibt es verschiedene Möglichkeiten diese zu bewerten. In den nächsten Kapiteln wird auf konventionelle Methoden, hier im speziellen auf Kultivierungsmethoden, wie z.B. die heterotrophe Plattenkoloniezahl (HPC) und auf neuere Methoden (Durchflusszytometrie und ATP Methode) eingegangen.

3.3.1 Konventionelle Methoden

Wenn das geeignete Wachstumsmedium und die Kultivierungsbedingungen für den Organismus bekannt sind bleibt die Kultivierung, einschließlich heterotrophe Plattenkoloniezahl (HPC), most probable number (MPN) und direct viable count (dvc), ein zuverlässiger Einzelnachweis für die Lebensfähigkeit (Hammes et al., 2011).

3.3.1.1 Plattengussmethode (HPC)

Als Koloniezahl wird die Zahl der sichtbaren Kolonien bezeichnet, die sich aus den in 1 ml (Plattengussmethode) oder 100 ml/250 ml (Membranfiltration) des zu untersuchenden Wassers befindlichen Mikroorganismen in Plattenkulturen mit nährstoffreichen Nährböden bei festgelegten

Bebrütungstemperaturen und innerhalb einer bestimmten Bebrütungszeit entwickeln (Feuerpfeil, 2008).

Da in einer Wasserprobe die Mikroorganismen einzeln, aber auch in Verbänden oder adsorbiert an Partikel vorkommen, muss die Zahl der Kolonien nicht mit der Zahl der entwicklungsfähigen und kultivierbaren Mikroorganismen übereinstimmen. Deshalb wurde die frühere Bezeichnung „Gesamtkeimzahl“ durch den Begriff „Koloniezahl“, angegeben in Kolonien bildende Einheiten (KBE), ersetzt.

Eine Vielzahl von Mikroorganismen unterschiedlicher Herkunft können in Wasserproben vorhanden sein. Wertvolle Informationen zur Beurteilung und Überwachung der Wasserqualität in hygienischer Hinsicht ergeben sich durch die Bestimmung der Zahl der Mikroorganismen bezogen auf ein festgelegtes Wasservolumen und ein bestimmtes Nährmedium sowie bestimmte Kultivierungsbedingungen (Feuerpfeil, 2008).

Welche Mikroorganismen sich unter den Kultivierungsbedingungen nachweisen lassen wird durch die Wahl des Nährmediums bestimmt. Wenn ein größeres Spektrum von heterotroph wachsenden Bakterien aus Trinkwasser erfasst werden soll, kann z.B. der R2A-Agar (niedriger Nährstoffgehalt in Kombination mit langen Bebrütungszeiten und niedrigen Bebrütungstemperaturen) verwendet werden.

In der Trinkwasseruntersuchung und bei der hygienischen Beurteilung hat die Koloniezahl mit Grenz- bzw. Richtwerten Tradition. Zur Beurteilung der Wasserqualität wurde die Bestimmung der Koloniezahl in internationale und nationale Richtlinien und Verordnungen integriert (Feuerpfeil, 2008).

Das Inverkehrbringen von Trinkwasser wird in Österreich im Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz (LMSVG) sowie in der Trinkwasserverordnung (TWV) geregelt. In dieser werden strengste Anforderungen an die Qualität und die Überwachung von Trinkwasser gestellt (Infoportal Trinkwasser, 2020).

Ein Hauptvorteil von HPC-Daten ist, dass ein positives Ergebnis ein unbestreitbarer Indikator für die Lebensfähigkeit der Zellen ist, die Kolonien gebildet haben. Forscher können mit Hilfe von Kultivierungsmethoden verschiedene Arten von Organismen als Reinkulturen isolieren, was im Laufe der Jahre die detaillierte Charakterisierung zahlreicher Trinkwasserbakterien erleichtert hat. Darüber hinaus sind HPC-Methoden relativ kostengünstig, einfach und die Bediener können HPC-Daten mit mehr als einem Jahrhundert historischer Daten weltweit vergleichen um die Interpretation und Entscheidungsfindung zu erleichtern (Nevel et al., 2017).

3.3.1.1 Herausforderungen bei der Kultivierung von Trinkwasserproben

Wasserbakterien

In Trinkwässern befinden sich viele unterschiedliche Gruppen an Bakterien, die in diesem speziellen Milieu des geringen Nährstoffgehalts leben können. Unter Verwendung kultivierungsunabhängiger Methoden haben viele Studien unwiderlegbar gezeigt, dass die Gesamtkonzentration der Bakterienzellen in Wasser im Vergleich zu den Ergebnissen der HPC um mehrere Größenordnungen höher ist. Da die Zählung von HPC-Bakterien nur den Nachweis eines kleinen, spezifischen Anteils der Gesamtbakterien ermöglicht, ist eine zuverlässige Bewertung der Auswirkungen mikrobieller Prozesse in Wasseraufbereitungs- und Verteilungssystemen auf die endgültige Wasserqualität mit diesem Parameter nahezu unmöglich (Vital et al., 2012).

Des Weiteren können Mikroorganismen in einer Wasserprobe einzeln, aber auch in Verbänden oder adsorbiert an Partikel vorkommen. Die Zahl der Kolonien muss daher nicht mit der Zahl der entwicklungsfähigen und kultivierbaren Mikroorganismen übereinstimmen. Deshalb wurde die frühere Bezeichnung „Gesamtkeimzahl“ durch den Begriff „Koloniezahl“, angegeben in Kolonien bildende Einheiten (KBE), ersetzt (Feuerpfeil, 2008).

Zeit

Die Kontrolle der bakteriologischen Qualität von Trinkwasser basiert auf konventionellen Kulturmethode, bei denen nur Bakterien bewertet werden, die in der Lage sind, die Zellteilung mit ausreichender Geschwindigkeit einzuleiten und auf Nährmedien sichtbare Kolonien zu bilden. Diese Reaktion erfordert normalerweise 24 Stunden bis mehr als 2 Wochen (Phe et al., 2005). Wenn zum Beispiel ein mikrobiologisches Problem in einem Trinkwasserdesinfektionsschritt aufgrund der Inkubationsdauer erst 3 Tage nach dem tatsächlichen Ereignis festgestellt wird, werden Korrekturmaßnahmen erst dann durchgeführt, wenn das Wasser den Verbraucher bereits erreicht hat (Hammes et al., 2011).

Trinkwasserdesinfektion

In Trinkwasserverteilungssystemen sind Mikroorganismen verschiedenen Belastungen ausgesetzt (Hunger, suboptimale Temperatur und oxidativer Stress usw.), die zu einer Vielzahl physiologischer Zustände führen, von kultivierbaren bis zu toten Zellen bis hin zu weniger gut definierten Zustände wie "lebensfähige oder aktive, aber nicht kultivierbare" Zellen (VBNC oder ABNC). Chlor und Chlordioxid sind häufig eingesetzte Oxidationsmittel zur Desinfektion von Trinkwasser und zur Begrenzung des Nachwachsens von Bakterien in Wasserverteilungssystemen. Sie reagieren mit verschiedenen zellulären Verbindungen und beeinflussen metabolische und physiologische Prozesse. Bakterienmembranen werden durch die Oxidationsmittel geschädigt, indem sie ihre Permeabilität verändern, sie hemmen die ATP-Produktion, zerstören Fragmentproteine und verursachen Nukleinsäureschäden. Das Wachstum der Bakterien auf Agarmedien wird durch Chlor und Chlordioxid gehemmt, selbst nachdem sie niedrigen Oxidationsmitteldosen ausgesetzt wurden (Phe et al., 2005).

3.3.2 Neuere Methoden zur Erfassung des mikrobiologischen Zustandes

Herkömmliche kultivierungsbasierte Nachweismethoden reichen nicht aus um alle wichtigen bakteriologischen Ereignisse zu beschreiben (Vital et al., 2012). In jüngerer Zeit wurden quantitative Methoden vorgeschlagen, insbesondere solche, die auf DFZ unter Verwendung geeigneter Fluorochrome beruhen. Im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie ist DFZ schnell, einfach und äußerst empfindlich. Es kann hilfreich sein, verschiedene Cluster in Bakterienpopulationen zu unterscheiden, beispielsweise solche mit hohem Nukleinsäuregehalt (HNA-Zellen) und solche mit niedrigem Nukleinsäuregehalt (LNA-Zellen) (Phe et al., 2005).

Die Tatsache, dass die kultivierungsunabhängige Lebensfähigkeitsanalyse auf eine Vielzahl von einzelnen zellulären Prozessen abzielt, macht diesen Ansatz sinnvoll und geeignet, um komplexe Fragen zu beantworten (Hammes et al., 2011).

In den letzten 20 bis 30 Jahren wurden mikrobiologische Instrumente zur Charakterisierung komplexer Bakteriengemeinschaften und -prozesse in natürlichen Umgebungen wie Flüssen und Ozeanen sowie in technischen Systemen, insbesondere der Abwasserbehandlung, entwickelt. Für die allgemeine Beurteilung der Wasserqualität haben zwei mikrobiologische Parameter zunehmend Beachtung gefunden, nämlich 1. die DFZ - Zellzahl und 2. die ATP - Analyse. Für die Akzeptanz neuer oder alternativer Methoden oder Parameter durch Wasserversorger und Behörden sind jedoch umfangreiche Feldtests sowie Vergleiche mit herkömmlichen Methoden erforderlich (Vital et al., 2012).

3.3.2.1 Durchflusszytometrie (DFZ)

Die Durchflusszytometrie (DFZ) wurde auf dem Gebiet der aquatischen Mikrobiologie als kultivierungsunabhängiges Instrument zur Aufzählung und Bewertung suspendierter Bakteriengemeinschaften eingeführt. DFZ in Kombination mit fluoreszierenden Färbungen enthüllt wichtige Informationen wie die Gesamtzellkonzentration, die Lebensfähigkeit der Bakterien, die Bakterieneigenschaften oder die Bakterienidentität in Wasserproben. Eine breite Palette von fluoreszierenden Färbungen und fluoreszierend markierten Verbindungen ist

verfügbar und zielt auf eine bestimmte Eigenschaft oder Komponente der Zelle ab, wie Membranen, Nukleinsäuren oder Proteine (Prest et al., 2013).

3.3.2.1.1 Funktionsweise der DFZ

Die Partikel werden in einem Durchflusszytometer in der Trägerflüssigkeit durch einen Laserstrahl transportiert. Für die Analyse ist jedes suspendierte Partikel oder jede Zelle von 0,2 – 150 Mikrometer Größe geeignet. Die Partikel werden im Flüssigkeitssystem in einem laminaren Probenstrom, hydrodynamisch fokussiert, zur Analyse durch den Laserstrahl transportiert. Wenn Partikel das Laserlicht durchqueren streuen sie das auftreffende Licht und alle Fluoreszenzmoleküle auf den Partikeln fluoreszieren. Die entsprechend positionierten Linsen sammeln das streuende und fluoreszierende Licht, dieses wird dann durch eine Kombination aus Strahlteilern (Splitter) und Filtern zu den entsprechenden Detektoren geleitet. Die Detektoren erzeugen elektronische Signale, deren Intensität proportional zu den auftreffenden optischen Signalen ist. Von jedem Partikel werden alle verfügbaren Messdaten erfasst, diese Eigenschaften oder Parameter basieren auf seiner Lichtstreuung und den Fluoreszenzmerkmalen. Im Computer werden die Daten gesammelt und zusammen mit einer vorab festgelegten Anzahl zu messender Partikel in einer sogenannten „List Mode“ Datei gespeichert. Abbildung 3 zeigt die drei Hauptbestandteile eines Durchflusszytometers (Biosciences, 2014).

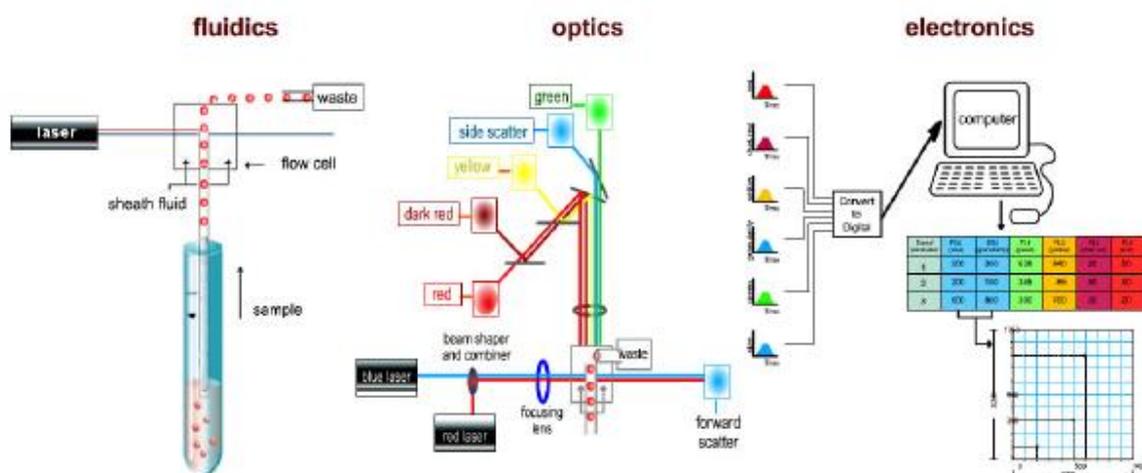


Abbildung 3: Die drei Hauptbestandteile eines Durchflusszytometers (Biosciences, 2014)

Lichtstreuung

Lichtstreuung tritt in der DFZ dann auf, wenn ein Partikel einer kolloidalen Lösung das einfallende Laserlicht ablenkt (TYNDALL-Effekt). Das Maß dieser Streuung hängt von den physikalischen Eigenschaften, wie Größe und interne Komplexität, des Partikels ab. Die Lichtstreuung wird von verschiedenen Faktoren, z.B. Zellmembran, Kern und allen granulären Zellkomponenten beeinflusst (Biosciences, 2014).

Fluoreszenzen

In der DFZ werden fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt, um Zellen in einer Flüssigkeit detektieren zu können. Ein Molekül das fluoreszierende Eigenschaften besitzt absorbiert Lichtenergie in einem Bereich, der charakteristisch für diese Verbindung ist. Ein Elektron des Moleküls wird durch die Energie des absorbierten Lichts in einen höheren Energielevel gehoben, fällt schnell in den Grundzustand zurück und emittiert die überschüssige Energie als Lichtquant in Form eines Photons. Dieser Energieübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu den gebundenen Fluorochromen, je mehr gebundene Fluorochrome, umso mehr Fluoreszenz wird emittiert und umso höher ist die Fluoreszenzintensität.

In der DFZ wird normalerweise der Argon-Ionen Laser verwendet, weil das 488 nm Licht mehr als ein Fluorochrom anregt. Wenn die Emissionspeaks von verschiedenen Fluorochromen, die sich jeweils bei 488 nm anregen lassen, sich nicht überlappen, können diese gleichzeitig verwendet werden (Biosciences, 2014). Es sind viele Fluoreszenzfarbstoffe erhältlich, im nächsten Kapitel werden ein paar davon vorgestellt.

3.3.2.1.2 Möglichkeiten zur Beurteilung des Lebenszustandes von Organismen mittels DFZ

Um die Lebensfähigkeit von Organismen beurteilen zu können, werden verschiedene zelluläre Prozesse von Organismen herangezogen. In Abbildung 4 sind verschiedene Prozesse anhand einer Zelle dargestellt, die eine Beurteilung des Lebenszustandes ermöglichen. In den anschließenden Absätzen wird auf die für diese Arbeit relevanten (in Abb. 4 umrandet) Methoden eingegangen.

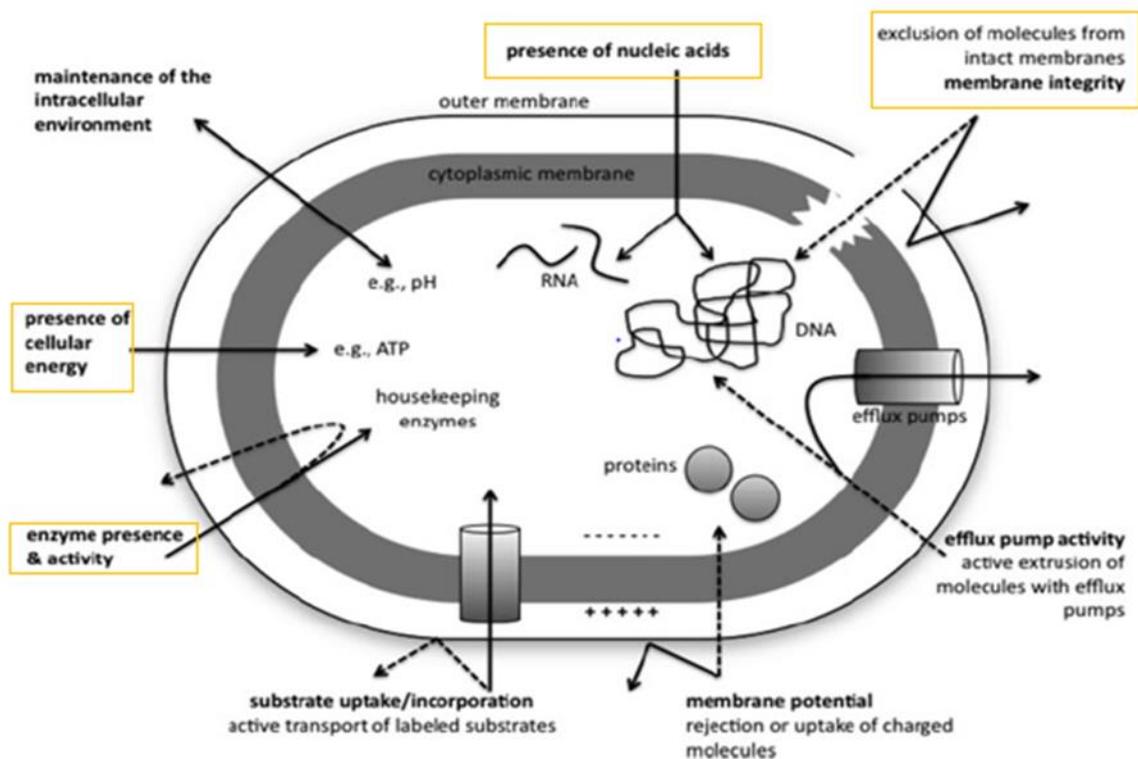


Abbildung 4: Das Konzept der Bewertung verschiedener zellulärer Prozesse zur Beurteilung des Lebenszustands des Organismus (Hammes et al., 2011)

Vorhandensein von Nukleinsäuren

Bekannte Gesamtzellzahl-Färbungen wie SYTO 9, SYBR Green I und II, Picogrün und Acridin Orange können zur Färbung der Nukleinsäuren von Bakterien verwendet werden. Sind diese vorhanden erhalte ich ein Signal, dieses entspricht der Gesamtzellzahl (TCC).

Das Fehlen von Nukleinsäuren ist zwar ein gewisser Indikator für den „Tod“, das bloße Vorhandensein von Nukleinsäuren ist jedoch kein Maß für die Lebensfähigkeit. Zum Beispiel ist keine der oben genannten Färbemethoden empfindlich genug, um die durch UV-C-Desinfektion verursachten spezifischen Nukleinsäureschäden nachzuweisen, die üblicherweise bei der Trinkwasseraufbereitung verwendet werden.

Die Färbung der Nukleinsäuren ist auf die Erkennung von Membranschäden der Zellen beschränkt, beschreibt jedoch nicht das Ausmaß der Verletzung (tödlich oder nicht) oder die Fähigkeit der Zelle, die beschädigten Nukleinsäuren zu reparieren (Hammes et al., 2011).

Schumann et al. (2003) weisen darauf hin, dass teilweise zerfallene tote Zellen ohne ein Chromosom bei jeglichen Nukleinsäure-Targeting-Färbungen unentdeckt blieben (Schumann et al., 2003). Argumentativ sollten Zellen, die so geschädigt sind, dass Nukleinsäuren nicht mehr nachweisbar sind, vielleicht gar nicht als Zellen, sondern als organische Partikel erkannt werden (Hammes et al., 2011).

Membranintegrität

Die Membranintegrität zeigt den Schutz der Zellbestandteile und das Potenzial Gradienten zu erzeugen, die die Lebensfähigkeit erhöhen, aber keine Zellreplikation garantieren. Zellen mit einer beschädigten Membran können keinen elektrochemischen Gradienten aushalten und werden normalerweise als tote Zellen klassifiziert (Vives-Rego et al., 2000).

Die Analyse von Membranschäden eignet sich am besten zur Beurteilung der Lebensfähigkeit in Situationen, in denen eine aggressive physikalisch-chemische Schädigung der Zellen zu erwarten ist (Hammes et al., 2011).

Die Membranintegritätsanalyse ist ähnlich wie die Nukleinsäureschädigung ein konservativer Indikator für die Lebensfähigkeit. Es ist anzunehmen, dass eine Zelle mit einer stark beschädigten zytoplasmatischen Membran aufgrund der Unfähigkeit eine einzigartige intrazelluläre Umgebung aufrechtzuerhalten als "tot" angesehen werden kann.

Das umgekehrte Argument (dass Zellen mit intakten Membranen „lebendig“ sind) ist jedoch nicht unbedingt richtig. Ein einfaches Beispiel ist die UV-C-Desinfektion, die zur Inaktivierung von Bakterien führen würde, ohne dass die zytoplasmatische Membran sofort nachweisbar geschädigt würde (Hammes et al., 2011).

SYBR Green 1 (SG 1) und Propidiumiodid (PI)

SYBR Green 1 ist membrandurchgängig und kann sowohl gesunde als auch membrangeschädigte Zellen färben. Im Gegensatz dazu ist Propidiumiodid (PI) ein Nukleinsäurefarbstoff der nur in Zellen mit beschädigten Membranen eindringt. Bakterien mit permeabilisierten Membranen werden von verschiedenen Autoren als nicht lebensfähig angesehen und so werden sie mittels kommerzieller Färbekits unter Nutzung von zweifacher Färbung (SG1 und PI) detektiert (Phe et al., 2005).

PI ist ein großer (668 Da), doppelt geladener, rot fluoreszierender Farbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. PI wird üblicherweise in Kombination mit einer Gesamtnukleinsäurefärbung wie SG 1 oder SYTO 9 verwendet. Die spezifischen durchflusszytometrischen Muster, die auf diese Weise nachgewiesen werden können, deuten auf verschiedene Grade der Zellschädigung hin (Hammes et al., 2011).

Mit Hilfe der DFZ ist es möglich den Übergang von „intakten“ zu „beschädigten“ Zellen wiederzugeben. Die Form des Übergangs ist charakteristisch und ähnelt je nach Instrumentierung, Signalkompensation und anderen Einstellungen häufig einem „Halbmond“. Die Verschiebung der Signale spiegelt die Menge an PI wider die in die Zellen eindringt. Dadurch können unterschiedliche Integritätszustände unterschieden und zwischen zwei Extremen, nämlich vollständig intakte / lebende und stark beschädigte / tote Zellen differenziert werden. Abbildung 5 zeigt die Verschiebung der Zellsignale durch Zugabe von ClO₂. Es tritt auf

weil es eine Verschiebung in Zellen mit einer starken grünen und einer schwachen roten Signalintensität zu einer erhöhten roten und einer schwächeren grünen Intensität gibt. Die Frage, die sich aus dieser Verschiebung ergibt, ist an welchem Punkt des Übergangs die Signale noch lebenden Zellen zugeordnet werden können und wo Zellen als tot angesehen werden sollten (Nocker et al., 2017).

Die Farbstoffkombination (SG1PI) hat sich etwa bei der Untersuchung der Wirkung von Chlorungsmethoden bei der Desinfektion in der Wasseraufbereitung als sehr aussagekräftig erwiesen (Ramseier et al., 2010). Die Schädigung der Zelle kann unmittelbar nach der Behandlung sichtbar gemacht werden. Bei Anwendung von UV-Strahlen liegt ein anderer Wirkmechanismus vor und daher kann zumindest unmittelbar nach der Behandlung noch keine Aussage über die Zellviabilität getroffen werden (Zunabovic-Pichler et al., 2018).

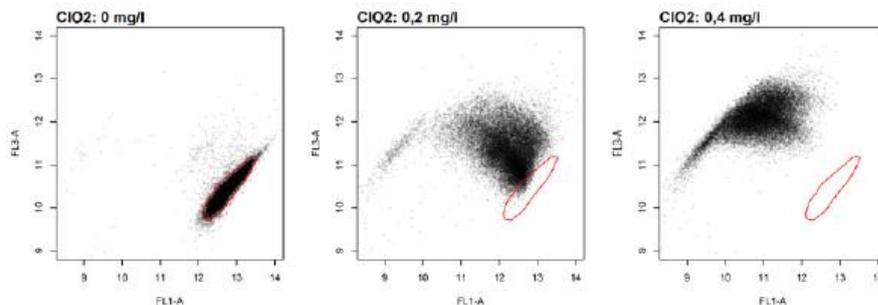


Abbildung 5: Streudiagramme der Grün- und Rot-Fluoreszenz dreier DFZ-Messungen der gleichen Probe (*E. faecium*) bei unterschiedlicher Zugabe von Chlordioxid und Färbung mit SG1 und PI. Rot markiert ist der Signalbereich der unbehandelten Probe. Die Beschädigung der Zellmembranen durch Chlordioxid zeigt sich durch eine Verschiebung des Signals in den Bereich höherer Rot-Fluoreszenz und geringere Grün-Fluoreszenz (Zunabovic-Pichler et al., 2018)

Enzymatische Aktivität

Bakterien enthalten eine Reihe von Enzymen, z. B. Esterasen, Dehydrogenasen, Peptidasen. Das Fehlen dieser Enzyme in einer Zelle deutet auf die Unfähigkeit der Zelle hin, neue Proteine zu synthetisieren und aufrechtzuerhalten, was auf Inaktivität und möglichen Tod hinweist. Die Enzymaktivität wird üblicherweise durch den Nachweis spezifischer Spaltprodukte in Zellen gemessen.

Alle Bakterien enthalten relativ unspezifische Esterasen und ihre Anwesenheit kann durch Zugabe eines ungeladenen, nicht fluoreszierenden und lipophilen Substrats nachgewiesen werden. Das bei Spaltung entstehende fluoreszierende polare Produkt bleibt in den Zellen in unterschiedlichem Maße erhalten (Hammes et al., 2011).

Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA) ist ein verestertes fluorogenes Substrat, das häufig zur Beurteilung der Esterase Aktivität in Bakterien verwendet wird (Hoefel et al., 2003). Es ist ein Molekül, das in die Bakterienzelle eindringen kann und durch unspezifische Esteraseenzyme hydrolysiert und grüne Fluoreszenz erzeugt (Wang et al., 2010). CFDA ist zellpermeagierend und hydrolysiert die Diacetat (DA) -Gruppen durch intrazelluläre unspezifische Esterasen zu fluoreszierendem Carboxyfluorescein (CF). Im Gegensatz zu herkömmlichem Fluorescein enthält CF zusätzliche negative Ladungen, was zu einer verbesserten Retention in der Zelle führt. Eine Doppelfärbung mit CFDA und PI wird auch häufig verwendet, um leichter zwischen aktiven und inaktiven Bakterien zu unterscheiden (Hoefel et al., 2003).

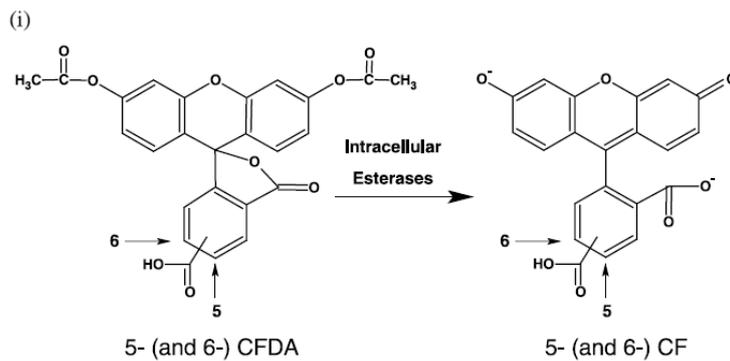


Abbildung 6: Mechanismus zur zellulären Markierung durch fluorogen veresterte Substrate (CFDA) (Hoefel et al., 2003)

Die Verwendung von CFDA für die Bestimmung intakter Zellen birgt aber auch einige Herausforderungen: Die meisten Substrate, die für Enzymaktivitätsmessungen verwendet werden, gelangen durch passive Diffusion in Bakterienzellen. Darüber hinaus ist die eigentliche Spaltung (Substrat-Enzym-Reaktion) unabhängig von der Zellenergie. Daher legt der Nachweis der Enzymaktivität nicht notwendigerweise die Lebensfähigkeit der Zellen nahe und es ist mehr als wahrscheinlich, dass kürzlich abgetötete Zellen immer noch enzymatische Aktivität zeigen (Hammes et al., 2011). Breeuwer und Abee, 2000 berichteten über mehrere Fälle, in denen tote Zellen eine erhöhte Esterase Aktivität zeigten, wahrscheinlich aufgrund eines besseren Transports der Farbstoffe in tote Zellen, während die Enzyme aktiv bleiben (Breeuwer & Abee, 2000). Daher ist wiederum die zeitabhängige Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität in Zellen ein Schlüsselaspekt und nicht das bloße Vorhandensein dieser Aktivität bei einer Schnappschussanalyse einer Probe. Andererseits ist das Fehlen von enzymatischer Aktivität keineswegs ein Indikator für tote Zellen, sondern kann auch mit einem Zustand geringer Aktivität in Bakterien in Verbindung gebracht werden (Hammes et al., 2011).

Des Weiteren gelangen Esterase-Aktivitätssonden nicht leicht in Gram-negative Bakterien, daher ist diese Anwendung in Wasserproben ungewiss, sofern keine geeigneten Permeationsmethoden entwickelt werden. Die Farbstoffextrusion kann entweder durch die Verwendung von Farbstoffen, die innerhalb der Zelle vernetzen, oder durch die Verwendung geeigneter metabolischer Inhibitoren überwunden werden (Vives-Rego et al., 2000).

Guilini et al., 2015 bieten einen Lösungsvorschlag und berichten, dass Carboxyfluorescein abgeleitete Sonden eine freie Carbonsäuregruppe besitzen die ungeschützt bleibt. Das negativ geladene Carboxylat ist bei physiologischem pH-Wert weitgehend ionisiert, wodurch die Diffusion durch Bakterienmembranen begrenzt wird. Sie testeten Pro-Fluorophore bei denen die Carboxylatfunktion maskiert ist und identifizierten Triembarin das die Kriterien erfüllt und eine 6 bis 10-fache Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit ermöglicht. Zusätzlich verbessern Kontrastmittel das Signal-Rausch-Verhältnis wobei Brilliant Blue R empfohlen wird, das geeignete spektrale Eigenschaften aufweist und seine Nützlichkeit als Kontrastmittel demonstrieren konnte, da es nicht in lebende Bakterien eindringt und die Fluoresceinemission löscht (Guilini et al., 2015).

Im Allgemeinen sollte die enzymatische Aktivität mit Sorgfalt betrachtet und die untersuchten Versuchsbedingungen oder Umgebungsbedingungen genau berichtet werden (Hammes et al., 2011).

3.3.2.1.3 HNA/LNA Zellen

Bakterienzellen, die in natürlichen Gewässern vorkommen weisen unterschiedliche Mengen an Nukleinsäuren (sowohl DNA als auch RNA) auf, die durch die in nahezu allen Wasserproben vorkommenden HNA- und LNA-Bakterien charakterisiert sind (Hammes et al., 2011).

Bei der DFZ-Analyse aquatischer Bakteriengemeinschaften können häufig zwei grundlegende Zellcluster beobachtet werden, die sich in ihrer Fluoreszenzintensität und Zellgröße unterscheiden. Diese Cluster werden üblicherweise als Bakterien mit hohem Nukleinsäuregehalt (HNA) und mit geringem Nukleinsäuregehalt (LNA) bezeichnet (Ramseier et al., 2011).

Der HNA Anteil kann sowohl bei der SG1 Färbung (HNA = HNA Anteil der TCC) als auch bei der SG1PI Färbung (iHNA = HNA Anteil der ICC) bestimmt werden.

Verhalten der HNA/LNA Zellen nach Oxidation

Während der HNA-Cluster die am häufigsten bekannten Bakterien beschreiben kann, ist wenig über die genaue Natur von LNA-Zellen bekannt. Insbesondere ist unklar, ob LNA- und HNA-Bakterien unterschiedliche Spezies sind, ob LNA-Bakterien Krankheitserreger enthalten können und inwieweit LNA-Bakterien lebensfähige und aktive Organismen sind. Vorläufige Messungen an TWVAs im Originalmaßstab haben gezeigt, dass sich LNA-Zellen nach der Chlorung anders verhalten als HNA-Zellen. Sie erscheinen häufig intakt, wenn sie mit Propidiumiodid (PI) angefärbt werden. Dies hat ein besonderes Interesse daran geweckt, die Reaktion einheimischer Trinkwasserbakterien mit Oxidationsmitteln zu verfolgen.

Interessanterweise wurden die Zellmembranen von HNA Bakterien während der Behandlung mit Chlordioxid und Permanganat viel schneller geschädigt als von LNA Bakterien. Während der Behandlung mit Chlor und Chloramin wurden jedoch nur geringe Unterschiede beobachtet und bei der Ferratbehandlung wurden keine Unterschiede beobachtet. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität dieser Oxidationsmittel wurde vermutet, dass HNA- und LNA-Bakterienzellmembranen eine unterschiedliche chemische Konstitution aufweisen. Im Allgemeinen wurden HNA-Zellmembranen durch die Oxidationsmittel schneller geschädigt als LNA-Zellmembranen (Ramseier et al., 2011).

Unterscheidung HNA/LNA Zellen mit Hilfe des Streudiagramms

Abbildung 7 zeigt ein typisches Messresultat einer Rohwasserprobe als Streudiagramm der Signalkombination von Grün- und Rot-Fluoreszenz mit sogenannten Gates. Die Zellen werden mit SYBR Green 1 (SG 1) unter Verwendung eines Messprotokolls nach dem schweizerischen Lebensmittelbuch (SLMB, 2012) gefärbt. Die Abgrenzung bestimmter Signalbereiche im Zuge der Datenauswertung erfolgt durch Gates. Diese ermöglichen z.B. die Abtrennung von Zellsignalen vom Signalhintergrund (Zunabovic-Pichler et al., 2018).

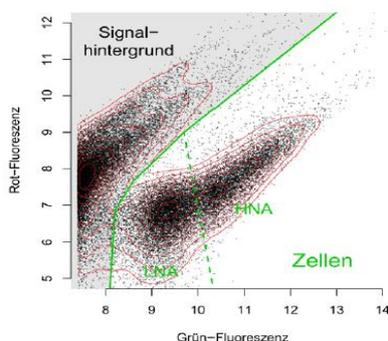


Abbildung 7: Streudiagramm der Grün- und Rot-Fluoreszenz einer DFZ-Messung mit überlagerter Dichteschätzung (rote Linien). Die Gates (grüne Linien) dienen der Abtrennung der Zellsignale vom Signalhintergrund und der Unterscheidung von LNA- und HNA-Zellen (Zunabovic-Pichler et al., 2018).

Durch Verbindung der quantitativen (Zell-Konzentration) mit der qualitativen (Unterscheidung LNA- und HNA-Zellen) wird die Möglichkeit zur Charakterisierung der einzelnen Probe bzw. der Wasserressource verstärkt. Durch weiterführende Techniken der Datenauswertung (Cluster-Analysen und sogenannte Fingerprinting-Methoden) kann die Ableitung von quantitativer Information verbessert werden (Zunabovic-Pichler et al., 2018).

3.3.2.1.4 Anwendungen der DFZ im Trinkwasserbereich

In den letzten zehn Jahren hat sich DFZ als Instrument zur schnellen Beurteilung der Trinkwasserqualität herauskristallisiert. Eine der einfachsten Anwendungen, nämlich die Bestimmung der Gesamtzellzahl (TCC) unter Verwendung von DFZ in Kombination mit Nukleinsäure-Targeting-Färbungen, erwies sich wiederholt als nützlich für die Überwachung von Behandlungsprozessen oder den Nachweis von Änderungen der Trinkwasserqualität (Prest et al., 2013).

Zu den Anwendungen von DFZ gehören die Quantifizierung der Bakterienkonzentrationen im Rohwasser, die Überwachung von Änderungen entlang der Wasserbehandlungsprozesse und die Bewertung der Desinfektionseffizienz. Von besonderer Bedeutung für die Desinfektion ist das Verständnis und die Bewertung der Lebensfähigkeit von Bakterien, damit zwischen Bakterienpopulationen mit unterschiedlichem Lebensfähigkeitsstatus unterschieden werden können. Eine der wichtigsten Hürden für die Entwicklung der DFZ von einem Forschungsinstrument zu einer Diagnosemethode, die in der Wasserindustrie realistisch angewendet werden kann, ist die Verwendung fester Betriebs- und „Gate“- Einstellungen. Im durchflusszytometrischen Vokabular sind Gates Bereiche auf dem Streudiagramm, die vom Benutzer definiert werden und die als relevant erachteten Signale bestimmen. Gates, die mit den meisten Wasserproben gut funktionieren, wurden für proprietäre Durchflusszytometer entwickelt. In Kombination mit der Zellintegritätsfärbung wird festgestellt, dass Bakterien, die sich in einem solchen Gate befinden, intakte Zellmembranen aufweisen (Nocker et al., 2017).

DFZ wird durch die kontinuierliche Entwicklung verbesserter taxonomischer Sonden, die auf der Hybridisierung von rRNA - oder sogar mRNA-Genen und funktionellen Sonden basieren und den physiologischen und metabolischen Status von Zellen erfassen können, weiter verbessert (Wang et al., 2010).

DFZ liefert keine Informationen über die Art der gemessenen Spezies (z. B. *E. coli*, *Legionella*, *Vibrio*, nicht pathogene unbekannte Bakterien), sofern keine Immunmarkierung angewendet wird (Ramseier et al., 2011).

Durch die Entwicklung des Online-Durchflusszytometers (siehe S. 34), der eine einfache Interpretation ermöglicht, sind eine schnelle und effiziente Überwachung und Verwaltung von Mikroben Gemeinschaften in aquatischen Systemen, wie von Trinkwasseraufbereitungsprozessen und Analysen zur Biosicherheit vor Ort möglich (Wang et al., 2010).

3.3.2.1.5 Herausforderungen in der DFZ

Notwendige Kompetenzen und Geräte

Für die DFZ werden qualifizierte und gut ausgebildete Bediener und angemessene Kühlsysteme für Hochleistungslaser und Zellsortierer benötigt. Die Anschaffung der Geräte ist teuer. Die Auswahl und Gewinnung der optimalen Fluorochrome, Kontrollmikroorganismen und Validierungen für eine bestimmte Anwendung können manchmal schwierig sein.

Anspruchsvolle Geräte benötigen auch ausreichend Platz, angemessene Luftqualität, eine saubere Atmosphäre und angemessene Kühlsysteme, wenn Hochleistungslaser verwendet werden. Sobald die Ausrüstung und geschulte Techniker verfügbar sind, müssen eine Auswahl der am besten geeigneten Fluorochrome unter den Hunderten zur Verfügung stehenden getroffen werden und Fluorochrome, die für die Studie von innovativem Nutzen sein könnten, ermittelt werden. Die bestmöglichen Kontrollen und Validierungen zu erhalten, ist der entscheidende Schritt (Vives-Rego et al., 2000).

Methodenstandardisierung, Datenanalyse und -interpretation, Fehlen von Daten

Zu den wichtigsten Herausforderungen bei der Implementierung von DFZ für die Industrie gehören: Methodenstandardisierung, Datenanalyse und -interpretation, Schwierigkeiten beim Vergleich mit historischen Daten, kultureller Wandel innerhalb der Institutionen der Wasserunternehmen und Zuverlässigkeit der Instrumente.

Darüber hinaus hat das Fehlen geeigneter vorgeschriebener Konzentrationen oder Werte, formaler Standardmethoden oder Akkreditierungen die Technologie bisher eingeschränkt. Da DFZ zunehmend für betriebliche Entscheidungen mit potenziellen finanziellen und gesundheitlichen Auswirkungen eingesetzt wird, ist es wichtig Vertrauen in die Ergebnisse zu haben. Daher sollte die Akkreditierung ein wünschenswertes Ziel sein (Hassard & Whitton, 2019).

Als relativ junge Methodik fehlt es der Durchflusszytometrie mitunter noch an Vergleichsdaten (Kötzsch & Sinreich, 2014).

Bestimmung der Stabilität von Trinkwasser

Änderungen in der Art der Bakterien innerhalb der Gemeinschaft werden durch Beobachtung von Schwankungen in der Verteilung der DNA innerhalb der Zellen bewertet. Zum Beispiel durch Vergleichen der Verteilung von Zellen über Populationen, die vom Benutzer durch Gates definiert wurden, wie z. B. Bakterien mit hoher Nukleinsäure (HNA) und Bakterien mit niedriger Nukleinsäure (LNA). Für jedes Trinkwasserverteilungssystem müssen spezifische Basislinien und der Schwankungsbereich um diese Basislinien festgelegt werden, der mit sauberem Wasser vereinbar ist.

Dies erfordert große Datenmengen, die von den interessierenden Trinkwasseraufbereitungs- und -verteilungssystemen gesammelt werden. Diese müssen Routinewerte definieren, die die ordnungsgemäße Funktionsweise des gesamten Systems beschreiben und ermitteln, wie und in welchem Ausmaß Schwankungen dieser Werte Anomalien widerspiegeln und den Erfolg von Korrekturmaßnahmen beschreiben können. Basislinien, die durch permanente Überwachung des Routinebetriebs erstellt werden, können auch für die Planung und Überwachung von Änderungen bei der Aufbereitung oder Verteilung von Wasser von Nutzen sein (Schleich et al., 2019).

Verwendung von Farbstoffen und Lösungsmitteln

Eine Herausforderung bei der mikrobiellen Durchflusszytometrie besteht darin, dass die verwendeten fluoreszierenden Farbstoffe bei Anwendung auf Säugetierzellen relativ gut verstanden werden, ihre Wechselwirkung mit Algen, Bakterien oder Viren jedoch wenig bekannt ist. Dies wird komplizierter, wenn man die Zunahme kommerziell erhältlicher Fluorochrome berücksichtigt, die auf ihre möglichen Anwendungen überprüft werden müssen (Vives-Rego et al., 2000).

Variationen der Färbemethode können das Ergebnis stark beeinflussen. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, den Wirkmechanismus der Farbstoffe zu verstehen und zu wissen auf welche zellulären Prozesse zur Beurteilung des Lebenszustands die Farbstoffe abzielen. Z.B. ist die Verwendung von SG1PI nach UV-Desinfektion nicht sinnvoll, da die Zellmembran von UV beschädigten Zellen intakt ist und PI nur in permeabilisierte Zellen diffundieren kann.

Durch falsche Färbebedingungen können Bakterien geschädigt und Artefakt Ergebnisse erzeugt werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass hohe Temperaturen Zellmembranen permeabilisieren und dass PI bei zu hohen Konzentrationen fälschlicherweise in „lebende“ Zellen eindringen kann. Des Weiteren können, durch Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für die Farbstoffkombination SG1PI, zusätzliche Zellen geschädigt werden. Als Alternative bietet sich Tris Puffer an (Nescerecka, Hammes, et al., 2016). Diese Problemstellung wird in dieser Arbeit im Experiment „Ermittlung des Einflusses der PI-Konzentration, des Farbstofflösungsmittels und der Messdauer“ behandelt.

Mikrobielle Morphologie

Ein weiteres Problem ist die mikrobielle Morphologie, die normalerweise weit von der idealen homogenen Kugelform für die Zytometrie entfernt ist. Nicht kugelförmige Zellen, stäbchenförmige Bakterien, langgestreckte oder filamentöse Mikroorganismen und im Allgemeinen nicht axiale Symmetrie können Orientierungsartefakte verursachen, bei denen die Fluoreszenz- und Lichtstreusignale von der Orientierung der Zelle relativ zur Richtung des Anregungslichts abhängen (Vives-Rego et al., 2000).

3.3.2.2 ATP Methode

Die Beurteilung der Lebensfähigkeit natürlicher mikrobieller Gemeinschaften ist ein komplexes, ungelöstes Thema, das derzeit unterschiedliche Methoden erfordert, die sich gegenseitig ergänzen können. Der ATP-Nachweis ist eine Methode, die besonders wertvoll ist, da sie spezifisch die lebensfähigen Zellen in einer Probe misst.

Adenosintriphosphat (ATP) wird oft als Energiewährung von biologischen Zellen bezeichnet und ist aktivierter Energieträger in allen lebenden Zellen. Deswegen kann ATP als Indikator für die Viabilität herangezogen werden.

Ein typisches Verfahren zum ATP-Nachweis umfasst die chemische und / oder enzymatische Extraktion von ATP aus Bakterienzellen, gefolgt von der Messung der Lichtemission, die erhalten wird, wenn das gelöste ATP mit dem Luciferin – Luciferase - Komplex reagiert. Die Methode ist schnell, robust, einfach durchzuführen, kostengünstig und erkennt sowohl kultivierbare als auch nicht kultivierbare Organismen (Hammes et al., 2010).

3.3.2.2.1 ATP und zelluläre Nukleotide

Das wichtigste energiereichste Nukleotid in Zellen ist die Phosphatverbindung Adenosintriphosphat (ATP). Abbildung 8 zeigt die chemische Struktur von ATP. Die Energie wird durch die Oxidation von organischen Stoffen konserviert und wird in den Zellen hauptsächlich in Form von ATP gespeichert (Vang, 2013).

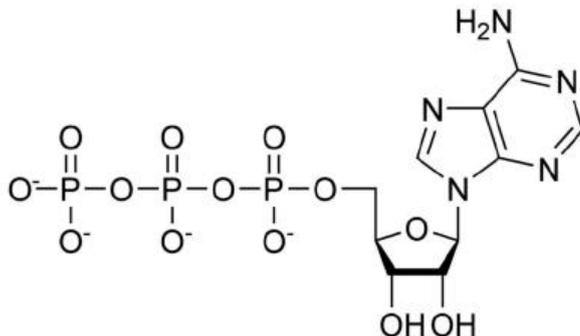


Abbildung 8: chemische Struktur von ATP (Vang, 2013)

Keine anderen Triphosphatnukleotide in den Zellen sind als Substrat aktiv, deswegen kann ATP in biologischen Proben ohne Störung durch andere natürlich vorkommende Verbindungen gemessen werden. ATP spielt eine essenzielle Rolle im Zellmetabolismus, ist verglichen mit anderen Metaboliten in hohen Konzentrationen vorhanden und ist im Protoplasma von Mikroorganismen gleichmäßig verteilt, von wo aus es möglich ist es leicht zu extrahieren. Aufgrund seiner hohen Umsatzrate kann ATP ein guter Indikator für die Lebensfähigkeit von Zellen sein (Ochromowicz & Hoekstra, 2005).

3.3.2.2 Methoden zur Bestimmung von ATP

ATP und andere Nukleotide können mit verschiedenen Methoden, welche in vier verschiedene Gruppen von Techniken gegliedert werden können, gemessen werden:

- Chromatographische Methoden
- Fluoreszenz Methoden
- Sensoren mit immobilisierter Luciferase
- Biolumineszenz Methoden (Vang, 2013)

Biolumineszenz Methode mithilfe des Luc Assay

Da in dieser Arbeit die Biolumineszenz Methode (Luc Assay) angewendet wird, wird auf diese näher eingegangen.

Biolumineszenz ist die Emission von Licht in einem biologischen System, welche mit Hilfe einer Enzym - katalysierten biochemischen Reaktion stimuliert wird. Die meist verwendete Methode zur Detektion von ATP ist die Biolumineszenz Methode, welche das Luciferase Enzym von einem Glühwürmchen nutzt, auch bekannt als Luc Assay. Diese Methode hat den Vorteil hohe Sensitivität und Selektivität zu besitzen und ist relativ einfach in der Durchführung (Vang, 2013).

Prinzip Luc Assay für die Bestimmung von zellulärem ATP:

1. Extraktion vom ATP
2. Reaktion mit Luciferin/Luciferase
3. Messung der Lichtemission mit Hilfe eines Photomultiplier/Luminometer

In Abbildung 9 sind die Schritte des Luc Assay abgebildet.

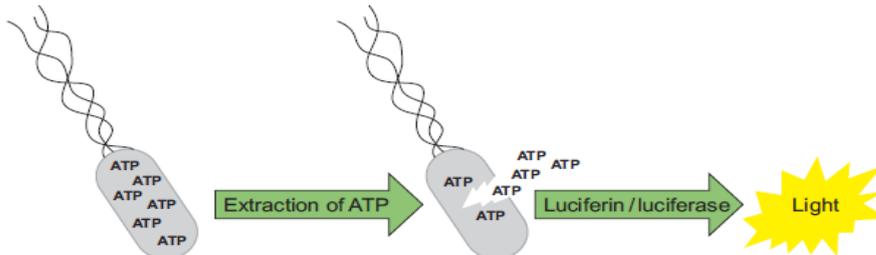


Abbildung 9: Prinzip des Luc Assay zur Bestimmung von ATP (Vang, 2013)

Das Biolumineszenzsystem ist von vier Komponenten abhängig: Sauerstoff (O₂), die Luc Enzyme, das Substrat Luciferin (LH₂) und der ATP-Mg²⁺ Komplex.

Der Luc Assay ist eine 2 Stufen Reaktion. Die erste Reaktion inkludiert das Substrat Luciferin (D-LH₂) und ATP-Mg²⁺, wobei ATP zu AMP hydrolysiert wird, wodurch das enzymgebundene Zwischenprodukt D-Luciferyladenylat (DLH₂-AMP) und anorganisches Pyrophosphat (PPi, d.h. P₂O₇⁴⁻) erzeugt werden das an Mg²⁺ gebunden ist:



Die zweite Reaktion ist die Oxidation und Decarboxylierung des gebildeten Zwischenprodukts D-LH₂-AMP unter Bildung von AMP, CO₂ und Oxyluciferin das der Lichtemitter (hv) mit Photonen von gelbgrünem Licht (550-570 nm) ist:



Diese Reaktion läuft in mehreren Schritten ab.

Die Aktivierungsreaktion ist für ATP sehr spezifisch und tritt bei anderen Nucleosidtriphosphaten nicht auf. Das Vorhandensein des zweiwertigen Kations Mg^{2+} ist für die Biolumineszenzreaktion von wesentlicher Bedeutung, da die Bildung von $ATP-Mg^{2+}$ Komplexen die negativen Ladungen teilweise abschirmt und die Konformation der Phosphatgruppen beeinflusst und somit die Notwendigkeit dieses zweiwertigen Kations bei der Reaktion erklärt. Das von der Biolumineszenzreaktion emittierte Licht besteht aus Photonen und wird mit einem Luminometer registriert. Die Lichtleistung wird gemessen, indem die Fläche unter der Lichtemissionskurve für einen festgelegten Zeitraum integriert wird. Ein Luminometer besteht üblicherweise aus einer Probenkammer für eine Küvette, einem Detektor (Photomultiplier - PMT), einer Signalverarbeitung und einer Signalausgangsanzeige (Vang, 2013). Ein handelsüblicher Luminometer ist in Abbildung 10 dargestellt.



Abbildung 10: Beispiel eines handelsüblichen Luminometers (Vang, 2013)

Eine PMT registriert Lichtphotonen entweder durch Zählen einzelner Photonen oder es registriert den elektrischen Strom, wenn Photonen auf die PMT treffen, wobei die Ausgabe Photonen pro Sekunde (cps) oder relative Lichteinheiten (RLU) ist.

Das PMT detektiert Licht, das proportional zur Konzentration des Analyten emittiert wird, z.B. ATP. Es wird auch ein Hintergrund erkannt, der durch Phosphoreszenz von Kunststoffen, Verunreinigungen in Reagenzien usw. verursacht wird (Vang, 2013).

Bestimmung von mikrobiellem = intrazellulärem (IC-ATP) und extrazellulärem ATP (EC-ATP)

EC-ATP ist in Gewässern häufig und sollte bei der Analyse von mikrobiellem ATP berücksichtigt werden. Wenn EC-ATP ignoriert wird kann dies die Empfindlichkeit des Assays und die Interpretation der ATP-Daten erheblich beeinträchtigen. Daher kann mikrobielles ATP nur zuverlässig gemessen werden, wenn auch extrazelluläres ATP berücksichtigt wird.

Zur Bestimmung des EC-ATPs wird ein Teil der Wasserprobe filtriert und danach genauso wie die Probe behandelt und gemessen. Das Ergebnis der Probe stellt das Gesamt-ATP und das Ergebnis der filtrierten Probe das EC-ATP dar. Das mikrobielle = intrazelluläre ATP wird danach folgendermaßen berechnet: $IC-ATP = \text{Gesamt-ATP} - EC-ATP$ (Hammes et al., 2010).

Vorteile (im Vergleich zu kulturbasierten Methoden):

- Messung für alle aktiven Zellen (auch VBNC-Zellen)
- quantitativ
- Ergebnisse verfügbar innerhalb von Minuten (Echtzeitanalyse)
- einfaches Messverfahren
- kleine Probenmengen
- Potenzial für Sensorplattform
- Genaueres Maß bei verklumpten, oder partikelassoziierten Zellen

Nachteile:

- unspezifisch
- nicht so empfindlich wie kulturbasierte Methoden für spezifische Indikatoren, z.B. *E. coli* / Coliforme
- Ergebnisse können nicht zu einer Zellenzahl konvertiert werden
- Hohe Kapitalkosten
- Höheres technisches Wissen notwendig

(Vang, 2013)

3.3.2.2.3 Optimiertes Promega Protokoll von Hammes et al., 2010

In der vorliegenden Arbeit wurde das optimierte Protokoll von Hammes et al., 2010 als Basis herangezogen:

Es wurde ein kommerzieller ATP-Test / ein kommerzielles ATP-Protokoll optimiert, um die Empfindlichkeit für den Nachweis von ATP in oligotrophen Umgebungen zu verbessern und spezifisch zwischen intrazellulärem und extrazellulärem ATP zu unterscheiden.

Es wurden zwei einfache Optimierungsschritte getestet und in das Protokoll eingeführt. Erstens bedeutet ein größeres Probenvolumen während der ATP-Analyse, dass mehr ATP-Moleküle für die Reaktion mit dem Luciferase-Enzymkomplex verfügbar sind, was zu einem stärkeren Lumineszenzsignal bei gleicher ATP-Konzentration führt. Es wurden Volumina von 50-500 µl getestet, wobei 500 µl Probenvolumen anhand der Ergebnisse der Experimente festgelegt wurde (Hammes et al., 2010).

In dieser Masterarbeit wurden die Experimente in Well-Platten durchgeführt, somit war das Probenvolumen mit 250 µl limitiert.

Zweitens wurden die optimale Temperatur und Inkubationszeit für das in der vorliegenden Studie verwendete spezifische Produkt eingestellt. Die Hauptbedeutung dieser Experimente besteht darin, dass eine undefinierte „Raumtemperatur“, wie im Protokoll für diesen bestimmten Assay beschrieben, zu signifikanten Abweichungen bei den gemessenen Daten führen kann und dass der Anwender für alle Assays lieber eine spezifisch definierte Temperatur verwenden sollte. Das Optimum wurde aufgrund der Experimente mit 38°C für 20 Sekunden festgelegt. In Abbildung 11 sind die unterschiedlichen Ergebnisse durch Veränderung der Temperatur und der Volumina ersichtlich. Mit dieser Methode wurde eine Nachweisgrenze von 0,0001 nM ATP erreicht (Hammes et al., 2010).

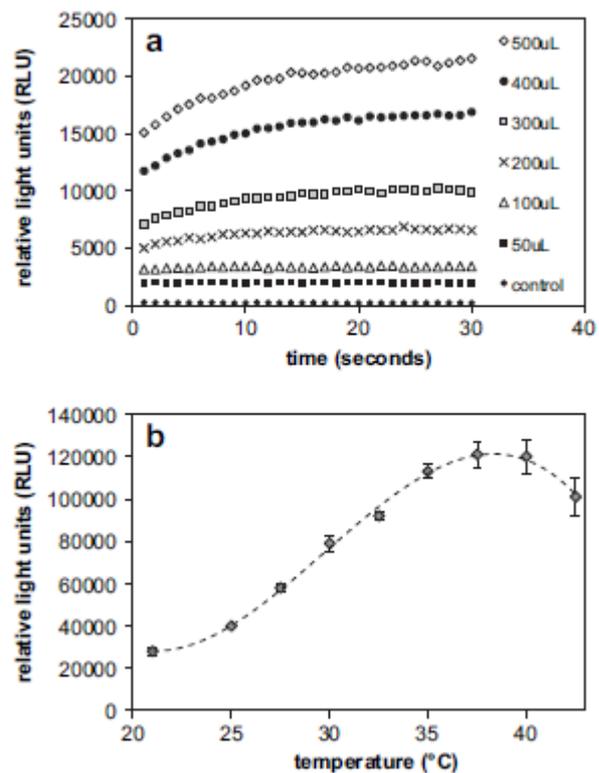


Abbildung 11: Optimierung ATP Protokoll: a) höhere Volumina und Inkubationszeiten b) Temperatur (Hammes et al., 2010)

Diese empfohlenen Inkubationsbedingungen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Da durch Verwendung von Well-Platten das Probenvolumen mit 250 µl limitiert ist liegt die Nachweisgrenze (NG) bei 0,005 nM ATP und die Bestimmungsgrenze (BG) bei 0,01 nM ATP.

3.3.2.2.4 Herausforderungen bei der ATP-Methode

Fehlendes einheitliches Protokoll

Eine Vielzahl von Faktoren kann die Lichtemission beeinflussen:

- Potenzielle Inhibitoren
- Temperatur
- pH
- Stabilität der katalytischen Aktivität über die Zeit.

Zum Beispiel nahm die Lichtproduktion des ATP-Assays mit zunehmenden Salzkonzentrationen im Trinkwasser ab, wobei Calcium eine Haupthemmverbindung war.

Unterschiedliche Methoden, verschiedene Enzymreagenzien und ATP-Freisetzungsmittel zur Messung und Quantifizierung von ATP in Trinkwasserproben führen zu Unterschieden in den ATP-Konzentrationen zwischen den Studien. Um vergleichbare und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten ist es daher notwendig ein einheitliches Protokoll zu verwenden (Vang, 2013).

ATP-Fraktionen

ATP tritt sowohl als intrazelluläres (mikrobielles) ATP (IC-ATP), als auch als extrazelluläre (freie) ATP-Fraktion (EC-ATP) auf. IC-ATP lässt auf lebensfähige Zellen rückschließen und bei EC-ATP wird angenommen, dass es aus Zellen in der Absterbephase stammt. In dieser Arbeit wird das intrazelluläre ATP mit IC-ATP und das extrazelluläre ATP mit EC-ATP abgekürzt. In Meeres- und Süßwasserproben ist die Konzentration an EC-ATP beispielsweise signifikant und übersteigt häufig die IC-ATP-Konzentration. Daher ist es in solchen Proben wichtig, sowohl IC als auch EC-ATP zu quantifizieren.

Speziell für Trinkwasser ist der Anteil an EC-ATP im Allgemeinen gering, variiert jedoch zwischen 7 und 100%. Es wurde festgestellt, dass IC-ATP ein genauerer und transparenterer Parameter für die mikrobielle Aktivität ist als Gesamt-ATP, was es möglicherweise einfacher macht, kleine Unterschiede in der mikrobiellen Trinkwasserqualität festzustellen (Vang, 2013).

ATP Gehalt in Zellen und Korrelation mit anderen Methoden

Es ist allgemein bekannt, dass die ATP-Konzentration einer Zelle sowohl mit ihrer Größe als auch mit ihrer physiologischen Aktivität korreliert (Vital et al., 2012). ATP ist das wichtigste energietragende Molekül in allen lebenden Zellen, und der ATP-Gehalt hängt von der Größe und dem physiologischen Zustand der Zelle ab. Folglich hängt der ATP-Gehalt einer Wasserprobe nicht nur von der Mikrobendichte, sondern auch von der Mikrobengemeinschaft und der Nährstoffverfügbarkeit ab. Daher können ATP-Konzentrationen nicht direkt in eine Zellzahl umgewandelt werden. Trotzdem kann ATP sowohl als Maß für die Zellaktivität als auch für die Anwesenheit von Bakterien interpretiert werden (Vang, 2013).

Extraktion von ATP

Eine Herausforderung bei der Durchführung quantitativer ATP-Analysen in Trinkwasserproben, die relativ wenig ATP enthalten, ist eine möglichst vollständige Zellyse, um eine hohe Leistung und eine möglichst genaue Messung zu erzielen (Vang, 2013).

Stabilität der Enzyme

Es ist wichtig, dass die zu verwendenden Enzymreagenzien über die Zeit relativ stabil bleiben, da der Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms auch zu einem Verlust der Empfindlichkeit führt, der sich direkt auf die Nachweisgrenze der Assay-Messung auswirkt. Daher ist die richtige

Lagerung der Reagenzien (Einhaltung von bis Temperatur und von bis Dauer) von großer Bedeutung (Vang, 2013).

Standardkurve

Um das Lichtsignal (RLUs = relative light units oder cps = counts per seconds) in eine ATP-Konzentration umzuwandeln, muss die Probe auf einen ATP-Standard bezogen werden, entweder mit einer Standardkurve oder durch Standardaddition. Bei Verwendung einer Kalibrierungskurve zur Umwandlung von RLU- oder cps- Signalen in eine ATP-Konzentration ist es wichtig, die ATP-Standardkontrollen mehrmals über mehrere Tage zu messen.

Für die Quantifizierung von ATP in Trinkwasser ist es notwendig, entweder ATP-Standards zu verwenden, die in derselben Matrix wie das Trinkwasser hergestellt wurden, oder eine Standardaddition zu verwenden. Die Steigung der Kalibrationskurve unterscheidet sich, wenn ATP-Standardverdünnungen in z.B. Puffer, MQ-Wasser oder steriltfiltriertem autoklaviertem Trinkwasser hergestellt werden (Vang, 2013).

ATP und Chlordesinfektion

In Trinkwasseraufbereitungsanlagen wird die Desinfektion häufig als letzter Schritt zur Inaktivierung mikrobieller Verunreinigungen eingesetzt. Um die Stabilität von EC-ATP in Gegenwart von Chlor zu testen, zeigte nanopures Wasser, das mit ATP ergänzt und anschließend gechlort wurde, dass die EC-ATP-Konzentrationen stabil blieben, bis eine extrem hohe Menge an Chlor (> 11,2 mg-Cl₂/l) zugesetzt wurde. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass EC-ATP bei typischen Trinkwasserkonzentrationen von Chlor mindestens fünf Minuten lang stabil bleibt, hohe Chlorkonzentrationen jedoch ATP-Moleküle oxidieren können (Nescerecka et al., 2016b).

Faktoren die den ATP Assay beeinflussen

Es gibt verschiedene Faktoren, die die Lichtemission der Probe beeinflussen, z.B. Probenvolumen, Reaktionsgeschwindigkeiten, Konzentration der Reaktanten, Reagenzieninjektion und -mischung, Küvettenmaterial und -größe und Temperatur.

Infolgedessen können die Verwendung unterschiedlicher Methoden, verschiedener Enzymreagenzien und ATP-Freisetzungsmittel zur Messung und Quantifizierung von ATP in Trinkwasserproben zu Unterschieden in den ATP-Konzentrationen zwischen den Studien führen. Deswegen ist die Verwendung von einem einheitlichen Protokoll wichtig (Vang, 2013).

ATP-Konzentration im Trinkwasser

Die ATP-Konzentrationen im Trinkwasser sind im Vergleich zu anderen Wassertypen, z.B. Meeres-, Oberflächen- oder Abwasser, gering (Vang, 2013). Um diese geringen ATP Konzentrationen im Trinkwasser detektieren zu können haben Hammes et al., 2010 ein optimiertes Protokoll entwickelt. Dieses ermöglicht die Verbesserung der Nachweisgrenze (durch Verwendung von größerem Probenvolumina und bestimmen einer geeigneten Inkubationstemperatur von 38°C) und somit solide und vergleichbare Daten (Hammes et al., 2010).

3.3.2.3 Wachstumspotential

Das Bakterienwachstumspotential ist die Quantifizierung des Ausmaßes des Bakterienwachstums, das in einer Probe unter definierten Bedingungen auftreten kann. Die Nährstoffverfügbarkeit, hauptsächlich organischer Kohlenstoff und andere wachstumsfördernde / begrenzende Verbindungen (z. B. Stickstoff, Phosphor und Eisen), bestimmen das Wachstumspotential der Bakterien. Durch die Bestimmung des Bakterienwachstumspotentials ist die Beurteilung der biologischen Stabilität des Wassers möglich. Ist nach einer bestimmten Inkubation und Temperatur kein/kaum Wachstum der einheimischen Bakteriengemeinschaft möglich, kann das Wasser als stabil angesehen werden.

Das Bakterienwachstumspotenzial ist wichtig, um die Bedenken hinsichtlich der Wasserqualität im Zusammenhang mit dem Nachwachsen von Bakterien zu verstehen und zu bewältigen. Das Wachstumspotential von Bakterien hängt von wachstumsfördernden / limitierenden Verbindungen ab. Daher ist die Nährstoffverfügbarkeit der Schlüsselfaktor für das Wachstumspotential von Bakterien (Farhat et al., 2018). Durch Desinfektion kann die Bakteriengemeinschaft soweit minimiert werden, dass ein Aufkeimen dieser auch bei Vorhandensein von ausreichenden Nährstoffen nicht möglich ist. Bei Verwendung von z.B. Chlorverbindungen können aber organische Kohlenstoffverbindungen in kleinere Komponenten, die von Bakterien leichter aufgenommen werden können, abgebaut werden. Diese können von Mikroorganismen, die sich z.B. in Biofilmen im Netz aufhalten, genutzt werden. Einige wissenschaftliche Arbeiten beschäftigen sich mit diesem Thema: Lehtola et al., 2002; Liu et al., 2011; Zhao et al., 2011; Lyon et al., 2012.

Die Auswahl geeigneter Werkzeuge für die Messung des Bakterienwachstums ist für die routinemäßige Durchführung der Messung des Wachstumspotenzials von entscheidender Bedeutung.

In den letzten drei Jahrzehnten wurden zahlreiche Methoden zur Bestimmung des Bakterienwachstumspotentials und der wachstumsfördernden Eigenschaften von Wasser entwickelt. Die ersten entwickelten Methoden zur Bestimmung des Bakterienwachstumspotenzials konzentrierten sich auf den biologisch abbaubaren organischen Kohlenstoff. Diese Methode wird ursprünglich von Van der Kooij et al., 1982 verwendet, um den Anteil gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) zu beschreiben, der von Mikroorganismen schnell zum Wachsen verwendet wird. In anderen Studien wird assimilierbarer organischer Kohlenstoff (AOC) als wichtiger Parameter zur Beurteilung der biologischen Stabilität von Wasser und des mikrobiellen Wachstumspotenzials während der Behandlung und Verteilung angesehen.

Der AOC-Bioassay basiert auf der linearen Beziehung zwischen der AOC-Konzentration und dem maximalen Bakterienwachstum (d.h. der maximalen Ernte). Die AOC-Konzentration wird unter Verwendung des maximalen Bakterienwachstums der Testbakterien berechnet.

AOC zielt explizit auf ein breites Spektrum von biologisch verfügbaren organischen Kohlenstoffverbindungen mit niedrigem Molekulargewicht ab, die im Allgemeinen in geringen Konzentrationen im Wasser vorhanden sind. Die Bestimmung des Bakterienwachstumspotentials durch den konventionellen AOC-Bioassay wie den Assay von Van der Kooij et al., 1982 gehen in der Regel von einer organischen Kohlenstoffbegrenzung aus, die aber nicht für alle Wasserproben gilt.

Zahlreiche Studien trugen zur ständigen Optimierung des Bioassays bei, wobei drei Aspekte im Vordergrund standen: die Auswahl des Inokulums, die Optimierung der Inokulation und Inkubation sowie die Entwicklung von Messungen des Bakterienwachstums. Es wird empfohlen von der Verwendung eines einzelnen Bakterienstamms zu einer Mischung aus zwei oder mehr Bakterienstämmen oder der einheimischen Bakteriengemeinschaft überzugehen. Die Verlagerung von kultivierungsabhängigen Quantifizierungsmethoden zu kultivierungsunabhängigen Methoden war eine weitere Hauptvariante der anfänglichen Wachstumspotentialmethoden.

Ein universeller Assay, der für verschiedene Probentypen geeignet ist, erleichtert die Durchführung der Messung des Bakterienwachstumspotenzials, ermöglicht ein besseres Verständnis der Dynamik des Bakterienwachstums in verschiedenen Probentypen und erleichtert den Vergleich der Ergebnisse zwischen verschiedenen Studien.

Farhat et al., 2018 beschäftigten sich mit diesem Thema und entwickelten den „Uniform Growth Potential Assay“. Dieser soll ein einheitliches Verfahren liefern, das für verschiedene Probentypen implementiert werden kann.

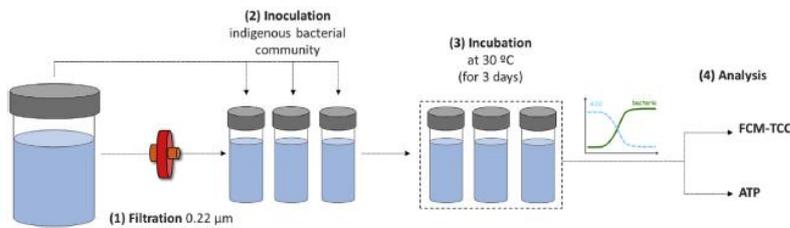


Abbildung 12: Schema vom Prozess der Wachstumspotentialmessungen (Farhat et al., 2018).

Das zu prüfende Wasser wird mit einem 0,22 µm Filter filtriert, dann mit einheimischen Bakterien inokuliert, für 3 Tage bei 30 °C inkubiert und durchflusszytometrisch und mit Hilfe der ATP Methode analysiert. Abbildung 12 zeigt ein Schema vom Prozess der WP-Messungen.

Der Assay kann das Wachstumspotential verschiedener Proben unabhängig von der Art der wachstumslimitierenden Verbindungen messen. Die Verwendung der einheimischen Bakteriengemeinschaft als Inokulum ist ein Schwerpunkt des Assays. Die Verwendung der im getesteten Wasser vorhandenen einheimischen Bakteriengemeinschaft als Inokulum zeigte die Fähigkeit, eine breitere und vielfältigere Palette assimilierbarer Substrate im Vergleich zu Bakterien bestimmter Stämme zu verwenden. Dies bietet eine realistischere Interpretation des tatsächlichen Wachstumspotenzials, wenn natürlich verfügbare Substrate untersucht werden, da die einheimischen Bakterien besser an die in bestimmten Proben vorhandenen anorganischen Kohlenstoffverbindungen angepasst sind (Farhat et al., 2018).

3.3.2.4 Ausblick: Online-Messungen mittels Durchflusszytometrie und ATP Methode

Eine geringe Auswahl an Stichproben erschwert die genaue Charakterisierung und das anschließende Verständnis der mikrobiellen Dynamik in aquatischen Ökosystemen. Ein logischer technologischer Fortschritt ist ein hoher Durchsatz und eine vollständige Automatisierung der Schritte zur Probenahme, Färbung, Messung und Datenanalyse (Besmer et al., 2014). Online Geräte wurden sowohl in der DFZ als auch in jüngerer Zeit für die ATP Methode entwickelt.

Online DFZ

Besmer et al., 2014 entwickelten einen Online – DFZ - Prototypen, dieses weiter entwickelte Online-Durchflusszytometrie-System wird bereits eingesetzt. Die Experimente zeigten mehrere Vorteile von Online-DFZ bei der Überwachung:

- Langzeitmessungen ermöglichen die Erkennung stabiler Phasen, zyklischer Muster und unerwarteter Ereignisse, die durch gelegentliche Stichprobenentnahme entweder übersehen oder falsch charakterisiert würden.
- Häufige Messungen ermöglichen eine detaillierte Analyse von Ereignissen und Schwankungen.
- Automatisierte Messungen ermöglichen die Aufzeichnung erwarteter oder unerwarteter Ereignisse (z. B. Schneeschmelze, Niederschlag) unabhängig von der Verfügbarkeit von Personal vor Ort.
- Online-Messungen ermöglichen die Echtzeit-In-situ-Überwachung einer Vielzahl aquatischer Ökosysteme, die zeitliche Variabilität in verschiedenen Zeitskalen, Konzentrationsbereichen und Zusammensetzungen der mikrobiellen Gemeinschaft aufweisen.
- Multiparameter-Messungen, d.h. Online-DFZ in Kombination mit anderen Online-Sensoren (z. B. Temperatur, Leitfähigkeit), ermöglichen eine robuste Unterscheidung zwischen aquatischen Ökosystemen und / oder ihren jeweiligen Bedingungen sowie die Identifizierung von Stabilität und Abweichungen davon (Besmer et al., 2014).

Online ATP

Hansen et al., 2019 entwickelten ein auf Mikrofluidik basierendes System für eine automatisierte Online-Methode zum schnellen Nachweis und zur Überwachung der Trinkwasserkontamination, bei der mikrobielles Adenosin-5'-triphosphat (ATP) als bakterieller Indikator verwendet wird. Das System besteht aus einer mikrofluidischen Patrone auf Polymethylmethacrylat-Basis, die in ein Gehäuse eingesetzt ist und die Funktionen der Lagerung und Abgabe von Flüssigkeiten, der Lyse-Schritte und der Echtzeit-Detektion umfasst. Insgesamt zeigte das entwickelte Prototypensystem einen hochempfindlichen, schnellen Nachweis von Bakterienkontaminationen in Trinkwasserproben. Vor der Online-Implementierung ist eine Weiterentwicklung erforderlich (Hansen et al., 2019).

Vera und Wert, 2019 haben eine Online-ATP-Methode zur kontinuierlichen IC-ATP-Bestimmung demonstriert. Die Ergebnisse der Online-ATP-Analysen (6-stündiges Intervall) stimmten gut mit den Ergebnissen diskreter ATP-Messungen überein. Die Methode war in der Lage, den schnellen Anstieg von ATP zu erfassen, wenn ein einfacher Kohlenstoff wie Acetat zugesetzt wurde, was die Empfindlichkeit der Methode für plötzliche Änderungen der Biomasseproduktion zeigt. Die direkte IC-ATP-Messung vor Ort und die Online-ATP-Methode können nützlich sein, um die Lebensfähigkeit der Biomasse und den Einfluss jedes einzelnen Prozesses auf die Bakterienhäufigkeit schnell zu bewerten. Mit einer umfassenderen Datenerfassung kann IC-ATP in hydrologische Modelle integriert werden, um die mikrobielle Dynamik im Wassernetzwerk besser zu verstehen. Es kann ferner als ein guter Frühwarnparameter dienen, um eine erhöhte biologische Aktivität anzuzeigen, die sofortige Korrekturmaßnahmen und weitere Untersuchungen von Kontaminationsquellen, Hotspots für Bioaktivität und Biofouling im Verteilungssystem erforderlich macht (Vera & Wert, 2019).

3.3.2.5 Ausblick: Beurteilung der Desinfektionswirkung nach UV-Desinfektion

Die Bewertung der Desinfektionswirkung nach der UV-Desinfektion mittels neuer Methoden stellt für die Trinkwasserversorgung eine Herausforderung dar. Wie schon im Kapitel 3.3.2.1 erwähnt ist nach UV-Desinfektion und Verwendung von SG1PI die Unterscheidung von „lebenden“ und „toten“ Bakterien nicht sinnvoll. Im Folgenden werden Arbeiten vorgestellt, die sich mit diesem Thema beschäftigen und Möglichkeiten aufzeigen diese Aufgabe anzugehen.

Xu et al., 2018 inaktivierten *E. coli* mit Chlor- und UV-Desinfektion und überprüften die Desinfektionswirkung mit verschiedenen Methoden. Unter anderem auch mit der ATP Methode, wobei kein zunehmender Trend beobachtet wurde und der Abbau von Gesamt-ATP und IC-ATP vernachlässigbar war. *E. coli*-Zellen wurden bei 100 mJ/cm² vollständig getötet, aber das IC-ATP verringerte sich nur um 8,56%. Des Weiteren untersuchten sie den DNA- und mRNA Zerfall, dies ergab, dass der Abbau von mRNA von den Zielgenen abhängt. Während der UV-Desinfektion lag die Schädigung der mRNA von *E. coli*-mRNA in der folgenden Schweregradreihenfolge: RecA > ssb ≥ dnaA > gadA. Während der UV-Desinfektion wurde eine offensichtliche Schädigung der mRNA beobachtet, was zu einem allmählichen Verlust der Funktionen und zu einer DNA-Schädigung führte. Die Studie zeigt, dass mRNA möglicherweise auf die Lebensfähigkeit von Bakterien hinweist (Xu et al., 2018).

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle, empfindliche und spezifische Alternative zu Kultivierungsmethoden. Die herkömmliche PCR kann jedoch lebensfähige Zellen nicht von nicht lebensfähigen Zellen oder von freien Nukleinsäuren in den Proben unterscheiden. Viability PCR (vPCR) ist eine PCR-basierte Strategie, die selektiv lebensfähige mikrobielle Zellen nachweist. Die Leistung hängt jedoch von den Proben- und Desinfektionsbedingungen ab. Da bei der vPCR die Lebensfähigkeit mit der Integrität der Zellmembran korreliert, können inaktivierte Zellen, die intakte Zellmembranen behalten, zu falsch positiven Ergebnissen führen. Assays für bakterielle ribosomale RNA-Vorläufer (Prä-rRNA) sind in einigen Anwendungen nützliche Alternativen zur vPCR. In wachsenden oder ernährungsphysiologisch stimulierten Bakterien können Prä-rRNAs 25% der gesamten zellulären rRNA ausmachen, wodurch sie erheblich

leichter nachzuweisen sind als mRNAs. Prä-rRNA-Pools werden abgebaut, wenn sich das Wachstum verlangsamt, und schnell wieder aufgefüllt, wenn lebensfähigen Zellen frische Nährstoffe verabreicht werden. Die Prä-rRNA-Synthese als Reaktion auf eine Ernährungsstimulation wird in einer Methode genutzt, die als Molecular Viability Test (MVT) bezeichnet wird. Bei der MVT wird eine Probe in zwei Aliquote aufgeteilt, von denen eines durch Zugabe von bakteriologischem Kulturmedium ernährungsphysiologisch stimuliert wird. Wenn lebensfähige Zellen einer Zielspezies in der Probe vorhanden sind, steigt die prä-rRNA (gemessen durch reverse Transkription [RT] -qPCR) im stimulierten Aliquot im Vergleich zum Kontrollaliquot (nicht stimuliert) an. Da nicht lebensfähige Zellen diese Veränderung nicht katalysieren können, erkennt MVT selektiv lebensfähige Bakterien. In der Studie von Weigel et al., 2017 wurde gefragt, ob MVT eine bakterielle Inaktivierung durch UV-Bestrahlung nachweisen kann. Für das Experiment wurde kurzwelliges UV-Licht (254 nm) verwendet das eine Intensität von 539.3 mJ/cm² erreichte. Sie kamen zu dem Schluss, dass MVT die UV-Desinfektion von Bakterien beurteilen kann, mit der Einschränkung, dass eine kurze Wartezeit (≤ 1 h für *E. coli*) nach der Bestrahlung bis zur Analyse erforderlich sein kann, damit die inaktivierten Zellen zuverlässig MVT-negativ werden (Weigel et al., 2017).

Diese Studien zeigen, dass es herausfordernd ist, eine adäquate Methode zur Bestimmung der Desinfektionswirkung nach erfolgter UV-Desinfektion zu entwickeln. Die Verwendung der HPC ist zwar möglich und nützlich, aber mit den bekannten Nachteilen der langen Inkubationsdauer und der Detektion von einem Bruchteil der Bakteriengemeinschaft suboptimal. Die DFZ mit der Farbstoffkombination SG1 und PI vermag nur permeabilisierte Zellen als „tote“ Zellen zu detektieren und die ATP Methode liefert nach UV-Desinfektion keine zuverlässigen Daten, da anscheinend nur wenig ATP direkt nach UV-Bestrahlung abgebaut wird. Einen weiteren Ansatz liefern Xu et al., 2018 und Weigel, et al., 2017. Xu et al., 2018 zeigten, dass während der UV-Desinfektion eine offensichtliche Schädigung der mRNA erfolgte und detektierten diese, wenn in der Probe noch vorhanden, mit Hilfe qPCR (Xu et. al., 2018). Weigel et al., 2017 argumentieren, dass es schwierig ist die geringen mRNA Konzentrationen zu detektieren und setzen auf den Molecular Viability Test (MVT), bei dem die Messung von Prä-rRNAs nach erfolgter UV Desinfektion, nach Zugabe eines frischen Nährstoffs zur Aktivierung der Prä-rRNAs, zur Ermittlung der intakten Zellen genutzt wird (Weigel et al., 2017). Möglicherweise ist es auch in der DFZ notwendig Farbstoffe die die Detektion der mRNA oder der Prä-rRNA ermöglichen zu verwenden, um die Desinfektionswirkung nach UV-Desinfektion beurteilen zu können.

4. Material und Methoden

4.1 Durchflusszytometrie (DFZ)

4.1.1 Material

4.1.1.1 Probenahme

- Sterile Tubes (50 ml)
- Gemuffelte Glasbinde (5 l, 1 l, 250 ml, 100 ml)
- Gasbrenner

4.1.1.2 Vorbereitung und Messen der Proben

- BD ACCURI C6 mit Autoloader
- Farbstoffe: SYBR Green 1 (SG1); SYBR Green 1 - Propidiumiodid in DMSO (SG1PI_DMSO); SYBR Green 1 - Propidiumiodid in Tris Puffer (SG1PI_Trис); 5(6) – Carboxyfluorescein Diacetat (CFDA)
- Lamina
- Steril filtriertes Wasser (0,2 µm Filter)
- Durchsichtige 96 Well Platten
- Pipetten (1000 µl, 10 µl)
- Thermoshaker mit 96 Well Platten Aufsatz
- Einweghandschuhe (Nitrilhandschuhe beim Arbeiten mit den Farbstoffen im DFZ Raum)

4.1.1.3 Herstellen der Farbstoffe

Mit den Farbstoffen darf nur im DFZ Raum mit entsprechender Arbeitskleidung und Nitril Einweghandschuhen gearbeitet werden.

SYBR Green 1 (SG1)

- SG1 Stock Solution (Herstellerangabe zur Konzentration: 10.000x)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 0,2 µm Spritzenfilter
- Spritze (10 ml)
- Sterile Eppis

SYBR Green 1 - Propidiumiodid in DMSO (SG1PI_DMSO)

- SG1 Stock Solution (Herstellerangabe zur Konzentration: 10.000x)
- Propidiumiodid (PI) in DMSO Stock Solution (20 mM)
- Propidiumiodid (PI) Pulver
- Kleines Becherglas oder kleiner Messzylinder
- Analysenwaage
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 0,2 µm Spritzenfilter

- Spritze (10 ml)
- Sterile Eppis

SYBR Green 1 - Propidiumiodid in Tris Puffer (SG1PI Tris)

- Siehe SG1/PI in DMSO
- Aber statt PI in DMSO (20 mM): Propidiumiodid (PI) in Reinstwasser Stock Solution (5 mM)
- Und zusätzlich Tris Puffer (10 mM, pH 8,1)

5(6) – Carboxyfluorescein Diacetat (CFDA)

- 5(6) – Carboxyfluorescein Diacetat (pulverförmig): 4 C° Kühlschrank
- DMSO 0,2 µm filtriert
- Eppis

4.1.2 Methode

4.1.2.1 Muffeln der Flaschen

Alle Flaschen werden zuerst im Geschirrspüler gereinigt. Dann werden die großen Flaschen (1 l und 5 l) 2 Mal mit Alufolie abgedeckt. Die kleinen Flaschen (100 ml und 250 ml) werden mit dem Stopfen und Alufolie versehen (Stopfen nicht ganz andrücken). Danach werden sowohl die großen Flaschen als auch die kleinen Flaschen im Muffelofen (550 °C, 240 min) erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die Stopfen der kleinen Flaschen gut angedrückt.

4.1.2.2 Probenahme

Alle nicht abflammbaren Teile des Probenahmeahns werden vor der Probenahme entfernt. Das Abflämmen des Probenahmeahns wird so lange durchgeführt, bis nach dem Öffnen des Hahns ein Zischen zu hören ist. Anschließend wird so lange gespült, bis die Wassertemperatur konstant bleibt. Bei Probenahmestellen, bei denen nach wenigen Sekunden die Temperaturkonstanz erreicht wurde da sie direkt an der Hauptleitung lagen, wurde trotzdem immer mehrere Minuten gespült, bevor die Probe entnommen wurde (Pebersdorfer et al., 2018). Falls wie in dieser Arbeit die ICC überprüft werden soll, muss die Probenahme unter sterilen Bedingungen ablaufen: Sterile Verhältnisse werden durch Spülen und Abflämmen des Hahns, sowie die Verhinderung von Aerosolbildung (Spritzwasser) hergestellt. Das Wasser wird in sterile 50 ml Tubes gefüllt, sofort wieder verschlossen und gekühlt (4-8 °C) ins Labor gebracht. Am Anfang des Projekts wurden bei der Probenahme vor Ort große, gemuffelte Glasflaschen (1 L und 5 L) befüllt, gekühlt (4-8°C) ins Labor gebracht und dann erst in kleinere sterile Gebinde aus Glas abgefüllt. Ab der Probenahme vom 07.03. wurden die kleineren Glasflaschen (100 ml für DFZ und 250 ml für KBE) vor Ort steril befüllt, da eine Kontamination beim Umfüllen in die kleineren Gebinde im Labor ausgeschlossen werden soll.

4.1.2.3 Vorbereitung und Messen der Proben

Jeweils 297 µl Probe werden in Dreifachbestimmung in die 96 Well Platte pipettiert. Als Blindwert dient eine Dreifachbestimmung von Reinstwasser. Wenn auf einer Platte 2 verschiedene Farbstoffe verwendet werden müssen zwischen diesen Waschschritten (nur Reinstwasser, ohne Farbstoff) erfolgen.

Im DFZ Raum in der Lamina werden danach 3 µl Farbstoff hinzugefügt, wobei die Farbstoffe für die Untersuchungen der Wasserproben von der Trinkwasserversorgungsanlage mit DMSO gelöst wurden (bis auf die Proben vom 18.06., diese wurden in Tris Puffer gelöst). In den Experimenten

danach, wurden DMSO und Tris Puffer als Lösungsmittel miteinander verglichen. Die Inkubation erfolgt auf einem Thermoshaker bei 37 °C für 13 min (Anleitung aus SLMB, 2012) im Dunkeln. Die Inkubationsbedingungen für CFDA unterscheiden sich von den anderen Farbstoffen: 30 °C für 30 min wieder im Dunkeln.

Die Messung erfolgt im Accuri unter folgenden Parametern:

- Messvolumen: im Regelfall 50 µl
- Treshhold-Setzung: FL1-H (relative Signalstärke: 700 bzw. 800) für SG1
- Flussrate „slow“ (14 µl pro Minute) (Zunabovic-Pichler et al., 2018)

Die Accuri BD Software und Excel wurden zur Auswertung der Daten verwendet. Die Auswertung wird im Kapitel 4.7 detailliert beschrieben.

4.1.2.4 Herstellen der Farbstofflösungen

SYBR Green 1 (SG1)

Die SG 1 Stock Solution wird im DFZ Raum vor Verwendung aufgetaut und die benötigte Menge an DMSO wird mit Hilfe der Spritze und Filteraufsatz (0,2 µm) filtriert.

Die sterilen Eppis werden mit je 990 µl filtriertem DMSO befüllt und in der Lamina im DFZ Raum werden 10 µl SG 1 Stock Solution dazu pipettiert. Das Eppi wird verschlossen, gevortext und beschriftet.

Die fertigen SG 1 Arbeitslösungen werden im -18 °C Gefrierschrank aufbewahrt.

SYBR Green 1 - Propidiumiodid in DMSO (SG1PI DMSO)

PI in DMSO Stock Solution (20 mM):

13,4 mg Propidiumiodid werden mit Hilfe der Analysenwaage in ein kleines Becherglas oder in einen kleinen Messzylinder eingewogen. WICHTIG: Gefäß muss unbedingt aus Glas sein, weil sonst Gefahr der Zerstreung des Pulvers aufgrund elektrostatischer Aufladung besteht. Das Tragen von Schutzbrille, Mundschutz und Nitrilhandschuhe ist essenziell! Es wird mit einem potenziell mutagenen Stoff gearbeitet! Das Pulver wird mit 1 ml 0,2 µm filtriertem DMSO gelöst. Das gelöste PI wird in sterile Eppis überführt, beschriftet und im -18 °C Gefrierschrank aufbewahrt.

SG1PI in DMSO Arbeitslösung (400 µM)

Die SG 1 Stock Solution und PI Stock Solution werden zum Auftauen im DFZ Raum in die Lade gelegt. Die benötigte Menge an DMSO wird mit Hilfe der Spritze und Filteraufsatz (0,2 µm) filtriert.

Sterile Eppis werden je mit 970 µl filtriertem DMSO befüllt und in der Lamina im DFZ Raum werden 10 µl SG Stock Solution und 20 µl PI Stock Solution dazu pipettiert. Das Eppi wird verschlossen, gevortext und beschriftet.

Die fertigen Arbeitslösungen werden im -18 °C Gefrierschrank aufbewahrt (max. 6 Monate).

SYBR Green 1 - Propidiumiodid in Tris Puffer (SG1/PI Tris)

PI in Tris Stock Solution (5 mM):

Siehe PI in DMSO (20 mM), nur dass für das Lösen vom PI Pulver 4 ml 0,2 µm filtriertes Reinstwasser verwendet wird, wenn es sich nicht vollständig löst kann die Lösung für ca. 3 min ins Ultraschallbad gestellt werden.

Tris Puffer:

Herstellen von 250 ml: 302,8 mg Tris Pulver werden in einen 250 ml Messkolben eingewogen, 240 ml Reinstwasser dazu gegeben und gemischt. Dann wird eine 1:10 Verdünnung

konzentrierter Salzsäure hergestellt. Der 250 ml Messkolben wird mit einem Magnetstäbchen versehen und am Magnetrührer gestellt. Mit der Pasteurpipette werden tropfenweise verdünnte Salzsäure in den 250 ml Kolben hinzugefügt und der pH-Wert wird mit Hilfe des pH-Meters ständig kontrolliert, die Zugabe erfolgt bis zu einem pH-Wert von 8,1. Danach wird das Magnetstäbchen mit einem Magnetstab rausgegeben. Der 250 ml Messkolben wird bis zur Marke mit Reinstwasser aufgefüllt, gemischt, in eine 250 ml Schottflasche überführt und autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgt im 4 °C Kühlschrank.

SG1PI in Tris Arbeitslösung (600 µM):

Siehe SG1PI in DMSO Arbeitslösung (400 µM) mit dem Unterschied, dass zum Lösen von PI 120 µl PI Stock Solution (5 mM), 10 µl SG 1 Stock Solution und 870 µl filtrierter Tris Puffer verwendet werden.

5(6) – Carboxyfluorescein Diacetat (CFDA)

Stock Solution (10 mM):

Berechnung Einwaage:

$$M_{\text{CFDA}} = 460 \text{ g/mol}$$

$$\beta = c \times M = 10 \text{ mmol/l} \times 0,46 \text{ g/mmol}$$

$$\beta = 4,6 \text{ g/l}$$

in 1 ml: 4,6 mg (zu wenig Gewicht für genaue Wägung in der Analysenwaage), deswegen werden 11,04 mg 5(6) – Carboxyfluorescein Diacetat (pulverförmig) in ein kleines Becherglas eingewogen und mit 2,4 ml 0,2 µm filtriertem DMSO vermengt und gut homogenisiert. Die Stock Solution wird in 2 Eppis aufgeteilt und im Gefrierschrank bei -18 °C gelagert.

Arbeitslösung (1mM)

900 µl 0,2 µm filtriertes DMSO wird in einem Eppi vorgelegt und 100 µl Stock Solution (10 mM) werden dazu pipettiert und homogenisiert. Das Eppi wird beschriftet und im Gefrierschrank bei -18 °C gelagert.

4.2 Kultivierungsverfahren (Koloniebildende Einheiten = KBE)

Zur Bestimmung der KBE wurde in dieser Arbeit das Plattengussverfahren angewendet.

4.2.1 Material

- Gemuffelte 250 ml Glasflaschen mit Stopfen (2 Stück für jede Probenahmestelle)
- Geschirrspüler
- Alufolie
- Muffelofen
- Reinstwasser
- Peptonwasser (für die Herstellung der Verdünnungsstufen)
- Eprouvetten und passendes Rack
- Agar: R2A und Hefeextraktagar (HEA)
- Autoklav
- Sterile Pipetten (1 ml und 10 ml)
- Sterile Petrischalen (Durchmesser: 100 mm)

- Inkubator (22 °C, 27 °C und 37 °C)

4.2.2 Methode

4.2.2.1 Probenahme

Wie bei der DFZ Probenahme erklärt, nur dass 2 Stück 250 ml Glasflaschen für jede Probenahmestelle aufgefüllt werden.

4.2.2.2 Vorbereitung Peptonwasser

16,1 g des Peptonwasser - Mediums werden in 1 Liter Reinstwasser suspendiert, gut gemischt und um eine vollständige Lösung zu erreichen erhitzt. 9 ml Peptonwasser werden jeweils in die Eppendorf Tubes mithilfe einer 10 ml - Pipette gefüllt und in das Rack gestellt. Die Tubes werden mit einer Alufolie, die mit einem sterilen Band versehen wird, umhüllt und dann bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen kann das Peptonwasser im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden (Roth, 2020a).

4.2.2.3 Vorbereitung Agar R2A

18,1 g des R2A - Mediums werden in 1 l destilliertem Wasser suspendiert. Zum Lösen wird das Medium unter Rühren erhitzt und eine Minute lang gekocht, das Medium muss vollständig gelöst sein. Für 15 Minuten wird es im Autoklav bei 121 °C sterilisiert und vor Verwendung auf ca. 50 °C abgekühlt. Falls das Medium nicht sofort verwendet wird kann es nach Abkühlen im 4 °C Kühlschrank gelagert werden und vor Gebrauch geschmolzen und wieder auf die 50°C Arbeitstemperatur abgekühlt werden (Roth, 2020b).

4.2.2.4 Vorbereitung Hefeextraktagar (HEA)

24 g des HEA - Mediums werden in 1 l destilliertem Wasser suspendiert. Unter Rühren wird das Medium erhitzt, es muss vollständig gelöst sein. Das Medium wird für 15 Minuten im Autoklav bei 121 °C sterilisiert und vor Verwendung auf ca. 45 °C abgekühlt. Wenn das Medium bei 4 °C gelagert wird, muss es vor Gebrauch geschmolzen, abgekühlt werden und kann in einem Wasserbad bei ca. 45 °C für maximal 4 Stunden aufbewahrt werden (Roth, 2020c).

4.2.2.5 Plattengussverfahren

Die Proben werden mit Peptonwasser verdünnt. Die Verdünnungsstufen für die verschiedenen Probenahmestellen bei HEA wurden aus Erfahrungswerten folgendermaßen festgelegt: RW: 10^0 (unverdünnte Probe), 10^{-1} ; Netzstellen: 10^0 , 10^{-1} ; nach UV: 10^0 ; Hochbehälter Zulauf und Ablauf: 10^0 , 10^{-1} . Bei Verwendung von R2A Agar werden dieselben Verdünnungsstufen verwendet, nur beim Hochbehälter Ablauf wird eine Verdünnung mehr vorbereitet und kultiviert (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}), da beim Hochbehälter Ablauf manchmal ein stärkeres Bakterienwachstum auftrat. Es werden jeweils 1 ml Probe in Doppelbestimmung in die Petrischalen steril pipettiert. Die Probe wird mit Agar bedeckt und durch vorsichtiges Bewegen der Petrischalen in Achterschleifen miteinander vermischt. Nach Abkühlen des Agars (fester Agar) werden die Platten mit dem Deckel nach unten im Inkubator bei den unterschiedlichen Temperaturen (22 °C, 37 °C für Hefeextraktagar- und 27 °C für R2A-Platten) inkubiert. Die Platten werden bei 22 °C für 3 Tage, bei 37 °C für 2 Tage und bei 27 °C für eine Woche inkubiert, danach erfolgt die Auszählung der gewachsenen Kolonien. Das Ergebnis sind dann koloniebildende Einheiten pro Milliliter Probe (KBE/ml).

4.3 Untersuchung des Wachstumspotentials (WP)

4.3.1 Durchflusszytometrie

Beim Wachstumspotential wird überprüft, ob das beprobte Wasser nach einem Standversuch bei definierter Temperatur zur Nachverkeimung neigt. Hierfür wurden Proben in 100 ml gemuffelte Flaschen gefüllt, mit dem dazugehörigen gemuffelten Schließstopfen verschlossen und bei 10 °C, teilweise auch bei 15 und 22 °C, im Brutschrank gelagert. An Tag 0, 3, 7, und 10 wurde die Gesamtzellzahl (TCC) und teilweise die Zahl der intakten Zellen (ICC) der Proben durchflusszytometrisch ermittelt (Mayer et al., 2017).

4.3.1.1 Material

- 100 ml Glasflaschen mit Schließstopfen gemuffelt (2 Flaschen für jede Probenahmestelle und jeden Tag)
- Kühlschränke (10, 15 und 22 °C)
- Natriumthiosulfat (NaThS) (18 mg/l) (vor Verwendung steril filtrieren, 0,1 µm): zur Reduktion des restlichen ClO₂, damit beim WP Versuch keine weitere Desinfektion durch das restliche Chlordioxid stattfindet. Wurde bei manchen Probenahmen und Probenahmestellen zugegeben. Wenn es zugegeben wurde ist das in den Diagrammen bei den Ergebnissen vermerkt.
- Durchflusszytometrische Messung: siehe 4.1: Für die SG1PI Färbung wurde DMSO als Lösungsmittel verwendet. Nur beim WP vom 18.7. wurde SG1PI_Trīs_6µM verwendet.

4.3.1.2 Methode

Abbildung 13 zeigt die Arbeitsschritte zur Ermittlung des Wachstumspotentials, mit Hilfe der Durchflusszytometrie zur Bewertung der Zellzahl pro ml Probe.

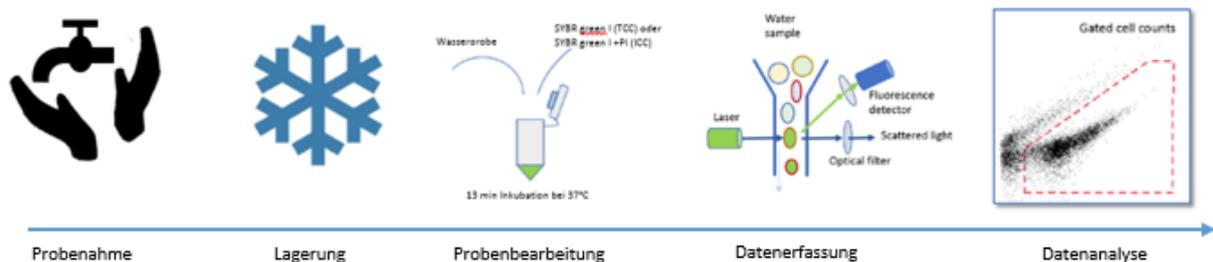


Abbildung 13: Schritte Ermittlung des Wachstumspotentials durchflusszytometrisch

Die gemuffelten Flaschen werden wie bei der Probenahme bei der DFZ erklärt mit Trinkwasser befüllt und gekühlt ins Labor gebracht. Dort werden die Flaschen (für jede Probenahmestelle, Temperatur und jeden Tag 2 Flaschen) in den Kühlschränken gelagert. Wenn die Chlordioxid Zehrung bei Proben mit NaThS gestoppt werden soll, so erfolgte die Zugabe in den leeren gemuffelten Flaschen im Labor in der Lamina. Die Flaschen werden gekennzeichnet und vor Ort befüllt. Danach werden sie in den Kühlschrank gestellt, für jede Probenahmestelle, Temperatur (10, 15 und 22°C) und jeden Tag 2 Flaschen.

Die Gesamtzellzahl (TCC; SYBR Green 1) und die Zahl der intakten Zellen (ICC; SYBR Green 1 und Propidiumiodid) werden am Tag der Probenahme (Tag 0) und an weiteren Tagen (in dieser Arbeit meist an Tag 3, 7, und 10) gemessen. Material und Methoden der DFZ sind unter 4.1 beschrieben, wobei als Verdünnungsmittel für die Farbstoffe DMSO verwendet wurde.

In Tabelle 3 ist der Probenplan und die Lagerung der Proben bei den verschiedenen Temperaturen dargestellt.

Tabelle 3: Probenplan WP Durchflusszytometrie, Lagerung der 100 ml Glasflaschen mit Probe (jeweils 2 Flaschen pro Temperatur) in Kühlschränke (10, 15 und 22°C), Messung mit Hilfe der Durchflusszytometrie und SG1 an Tag 0,3 und 7

WP Probenplan DZ												
Probenahme- stelle	RW			nUV			nUV+ ClO2	Netz 1	Netz 2	Hb Zulauf	Hb Ablauf	
Datum/°C Lagerung	10°C	15°C	22°C	10°C	15°C	22°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	15°C
31.1.	x			x								
7.2.	x			x			x			x		
14.2.	x			x			x	x		x		
21.2.	x			x			x	x		x		
7.3.	x	x	x	x	x	x	x				x	
14.3.	x			x	x		x		x		x	x
21.3.	x			x	x					x	x	x
25.4.	x	x	x		x	x	x		x		x	
18.7.	x	x			x						x	x

4.3.2 Kultivierungsverfahren (KBE)

Bei der Bestimmung des Wachstumspotentials (WP) wird die Koloniezahl nach sieben Tagen Standzeit ermittelt. Die Beurteilung erfolgt anhand eines Vergleichs der Ausgangskoloniezahl mit der Koloniezahl nach 7 Tagen Standzeit (Mayer et al., 2017).

4.3.2.1 Material

- 250 ml Flaschen mit Schliffstopfen gemuffelt (2 Flaschen für jede Probenahmestelle und jeden Tag)
- Kühlschrank (10 °C)
- Natriumthiosulfat (NaThS) (18 mg/l) (vor Verwendung steril filtrieren, 0,1 µm)
- Kultivierung: siehe 4.2.1

4.3.2.2 Methode

Die gemuffelten Flaschen werden wie bei der Probenahme der DFZ erklärt mit Trinkwasser befüllt und gekühlt ins Labor gebracht. Dort werden die Flaschen (für jede Probenahmestelle, Temperatur und jeden Tag 2 Flaschen) in den Kühlschränken bei 10°C gelagert. Bei Verwendung von NaThS wird dies wie unter 4.3.1 beschrieben durchgeführt.

Die HPC wird wie unter 4.2.2 beschrieben an Tag 0 und 7 ermittelt, mit dem Unterschied, dass am 7. Tag für die Probe von jeder Probenahmestelle eine Verdünnungsstufe mehr hergestellt wird und dann kultiviert wird. Falls Wachstum auftritt, kann dieses durch den einen Verdünnungsschritt mehr abgedeckt werden.

Tabelle 4 zeigt den Probenplan für das kultivierungsabhängige Wachstumspotential. Die Kultivierung erfolgt an Tag 0 und 7 auf HEA und R2A, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

Tabelle 4: Probenplan WP KBE; Lagerung der 250 ml Glasflaschen (je Probenahmestelle 2 Flaschen) im 10°C Kühlschrank und Kultivierung an Tag 0 und 7 auf HEA und R2A

WP Probenplan KBE					
Probenahmestelle	RW	nUV	nUV+ClO2	Netz 2	Hb Ablauf
Datum/°C Lagerung	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C
10.1.	x				
24.1.	x				
7.2.	x	x	x		
21.2.	x	x	x		
7.3.		x			x
21.3.	x	x		x	x
18.7.	x	x		x	x

4.4 ATP Methode

4.4.1 Material

- BacTiter-Glo™ Puffer
- BacTiter-Glo™ Substrat
- Eppis
- Reine ATP Standard Lösung (10 mM)
- Verdünnungsmedium für die ATP Standardkurve: In den Experimenten dieser Arbeit ist das Verdünnungsmedium das Wasser, das zum Verdünnen der Bakterien verwendet wird (Rohwasser und physiologische Kochsalzlösung), dieses wird mit einem Spritzenfilter mit Porenweite 0,1 µm filtriert. Es wurde also eine Standardkurve für Rohwasser und physiologische Kochsalzlösung erstellt.
- Spritzenfilter mit Porenweite 0,1 µm
- Spritze 10 ml
- Weiße 96 Well Platte
- BacTiter-Glo™ Reagenz (Mischung aus Puffer und Substrat)
- Thermoshaker
- Luminometer
- Handschuhe

4.4.2 Methode

4.4.2.1 Herstellen des ATP Reagenz

ATP Puffer und Substrat werden für 2-24 Stunden im Dunkeln temperiert. Danach wird der Puffer zum Substrat überführt und vorsichtig vermischt. Das homogenisierte Reagenz wird in Eppis, jeweils 1 ml, aufgeteilt und mit Alufolie lichtgeschützt verpackt. Das Reagenz kann für 2 Wochen im Gefrierschrank bei -18 °C oder für 1 Monat bei -80 °C aufbewahrt werden. Vor Verwendung des ATP Reagenzes werden die benötigten Eppis im Dunkeln aufgetaut und für 2 Stunden temperiert („Burn off“-Periode), um maximale Empfindlichkeit bei niedrigen Hintergrundsignalen zu erreichen (Pomega Corporation, 2015). Das Reagenz beinhaltet Substanzen zur Zellyse.

4.4.2.2 ATP Standardkurve

Ausgehend von der reinen ATP Standard Lösung (10 mM) werden Verdünnungen mit dem 0,1 µm filtriertem Verdünnungsmedium in sterile Eppis hergestellt:

10 µl (10 mM) + 990 µl Verdünnungsmedium → 0,1 mM

10 µl (0,1 mM) + 990 µl Verdünnungsmedium → 1 µM

100 µl (1 µM) + 900 µl Verdünnungsmedium → 0,1 µM

100 µl (0,1 µM) + 900 µl Verdünnungsmedium → 10 nM

100 µl (10 nM) + 900 µl Verdünnungsmedium → 1 nM

100 µl (1 nM) + 900 µl Verdünnungsmedium → 0,1 nM

100 µl (0,1 nM) + 900 µl Verdünnungsmedium → 0,01 nM

500 µl (0,01 nM) + 500 µl Verdünnungsmedium → 0,005 nM

Die Nachweisgrenze im optimierten Protokoll von Hammes et al., 2010 ist 0,0001 nM ATP bei Verwendung eines Probenvolumens von 500 µl. Da in der aktuellen Arbeit das Probenvolumen durch Verwendung von Well Platten mit 250 µl limitiert war liegt die Nachweisgrenze (NG) bei 0,005 nM ATP und die Bestimmungsgrenze (BG) bei 0,01 nM ATP.

Hammes et al., 2010 haben in Versuchen festgestellt, dass ein höheres Probenvolumen die Sensitivität des Protokolls erhöht (Hammes et al., 2010).

4.4.2.3 Messung

ATP Messung Standardkurve

Die Messung erfolgt in 3 Schritten: 1. Temperieren, 2. Inkubieren, 3. Messung im Luminometer.

Temperieren: In eine weiße 96 Well Platte werden im 3-fach Ansatz im oberen Teil 50 µl Reagenz und im unteren Teil 280 µl ATP Verdünnungen, ab der Verdünnungsstufe 1 nM, pipettiert. Als Blindwert dient das filtrierte Verdünnungsmedium (RW oder physiologische Kochsalzlösung), das auch im 3-fach Ansatz mitbestimmt wird. Die Platte wird für 1 Minute bei 38 °C am Thermoshaker temperiert.

Inkubieren: Danach werden 250 µl der ATP Verdünnungen zum Reagenz überführt. Die Platte wird für 20 Sekunden bei 38 °C am Thermoshaker inkubiert.

Messung im Luminometer: Direkt nach der Inkubation erfolgt im Luminometer (Messung der Lumineszenz im Integral) die Messung.

Auswertung: Von den erhaltenen Mittelwerten der jeweiligen ATP Verdünnungen ([cps] = counts per seconds) wird jeweils der gemittelte Blindwert abgezogen. Z.B. gemessener Mittelwert [cps] (1 µM ATP) – Mittelwert Blindwert = [cps] (1 µM ATP). Die erhaltenen Werte [cps] für die jeweiligen ATP Verdünnungen werden in einem Diagramm gegen die Konzentrationen dieser Verdünnungen [µM] aufgetragen, wobei eine Standardkurve entsteht, die für die Berechnung der ATP Konzentration der Proben verwendet wird. Die Standardkurve muss für jedes Wasser, oder Verdünnungsmedium extra erstellt werden. In den Experimenten dieser Arbeit ist das Verdünnungsmedium das Wasser, das zum Verdünnen der Bakterien verwendet wird (0,1 µm filtriertes Rohwasser und physiologische Kochsalzlösung). Es wurde also eine Standardkurve für Rohwasser und physiologische Kochsalzlösung erstellt. Die Bestimmung der jeweiligen Standardkurven erfolgte an 5 verschiedenen Tagen (pro Tag alle ATP Konzentrationen als 3fach Bestimmung jeweils für RW und physiologische Kochsalzlösung). Für jeden Tag wurden die drei cps - Werte jeder ATP Konzentration als Mittelwert berechnet und dieser wurde dann von allen Tagen als Mittelwert jeder ATP Konzentration in die Standardkurve hineingenommen (siehe Anhang).

ATP Messung Probe

Von der zu untersuchenden Probe werden jeweils ca. 5 ml mit Hilfe des 0,1 µm Filters und der Spritze filtriert. Das Ergebnis der Messung der filtrierten Probe ist das extrazelluläre ATP (EC-ATP). Es werden Reinstwasser (Blindwert), die Probe und die filtrierte Probe in Dreifachbestimmung gemessen.

Die Arbeitsschritte sind dieselben wie bei der ATP Standardkurve (Temperieren, Inkubieren, Messung im Luminometer), wobei als Blindwert Reinstwasser verwendet wird. Die Zellyse zur Freisetzung des ATP aus der Zelle wird mit Hilfe des Reagenzes gewährleistet.

4.5 Untersuchungen von Proben in einer Trinkwasserversorgungsanlage (TWVA)

Im Zuge der Neuerrichtung einer Trinkwasserversorgungsanlage (TWVA) soll eine mikrobiologische Beurteilung des Wassers vorgenommen werden. Dazu wurden in regelmäßigen Abständen (ca. jede Woche) von meinem Kollegen Dipl. Ing. Lukas Pehersdorfer vor Ort, vom 06.12.2016 bis 18.07.2017, Wasserproben von verschiedenen Probenahmestellen entnommen. Die Proben wurden im Labor von mir und meinen Kolleg*Innen der Mikrobiologie durchflusszytometrisch (TCC und ICC) und teilweise mittels Plattengussverfahren (KBE) überprüft. Zusätzlich wurde von einigen Wasserproben das Wachstumspotential bestimmt. Auf Basis dieser Daten erfolgte die mikrobiologische Beurteilung des Rohwassers, die Bewertung der Desinfektionswirkung direkt nach UV und ClO₂ Behandlung und die Charakterisierung des Trinkwassers im Hochbehälter und beim Endkunden (Netzstellen). Zusätzlich wurden folgende Messungen von Dipl. Ing. Lukas Pehersdorfer vor Ort durchgeführt: pH-Wert, Redoxpotential, elektrische Leitfähigkeit, Wassertemperatur, gelöster Sauerstoff und Chlordioxidkonzentration (Daten siehe Anhang).

Bei dieser TWVA handelt es sich um einen Horizontalfilterbrunnen, der das Wasser aus acht Strängen bezieht. Bis zur Einspeisung ins Netz (ab 2.2.2017) wurde das Wasser von allen Strängen in einer Probephase von der Mittelkammer (Stränge 1,6,7,8) und der großen Kammer (Stränge 2,3,4,5) in nahegelegene Gewässer abgeleitet. Das in dieser Arbeit untersuchte Rohwasser stammt bis 2.2.2017 aus der großen Kammer Stränge (2,3,4,5), danach von allen Strängen, aus der großen Kammer (alle Stränge wurden in der großen Kammer zusammengeführt).

Um ein besseres Bild von den Probenbezeichnungen zu erhalten, zeigt Abbildung 14 den schematischen Aufbau der TWVA. Das Rohwasser (RW) wird über drei zeit- und differenzdruckgesteuerte 50 µm Filter filtriert, dann via UV-Desinfektion und zusätzlicher ClO₂-Zugabe desinfiziert und gelangt zur Verteilung ins Netz wo es zu den Verbrauchern transportiert wird. Wasser das momentan nicht verbraucht wird kann im Hochbehälter gesammelt werden und bei Bedarf durch den Ablauf wieder ins Netz eingespeist werden.

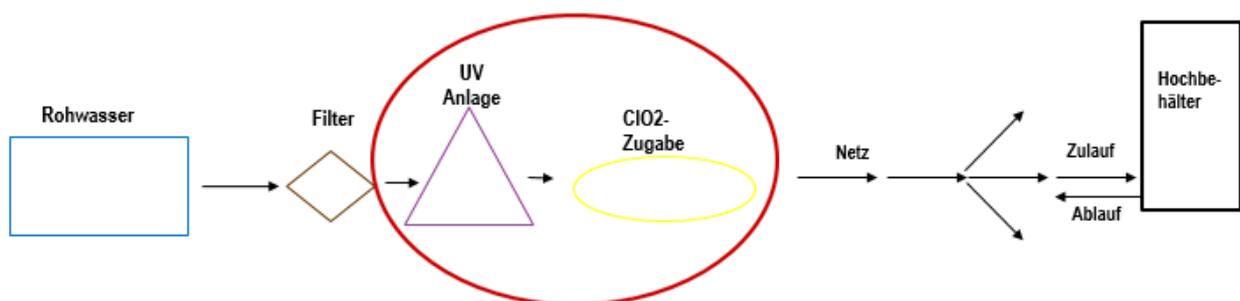


Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Trinkwasserversorgungsanlage

In dieser Arbeit erfolgten wiederkehrende Probenahmen vom Rohwasser (RW) = unbehandeltes Wasser, nach der UV-Desinfektion (nUV), nach UV und zusätzlicher ClO₂ Zugabe (nUV+ ClO₂), von 2 verschiedenen Netzstellen (Netz 1 und Netz 2) und vom Hochbehälter Zulauf (Hb Zulauf) und Ablauf (Hb Ablauf). Die 1. Netzstelle ist ca. 800 m und die 2. Netzstelle ca. 1800 m von der Aufbereitungsanlage entfernt.

Die neue TWVA ist mit einer zweistufigen Desinfektion ausgestattet. Die erste Desinfektionsstufe umfasst drei mit jeweils 8 Strahlern ausgestatteten UV-Anlagen. Der maximale Durchfluss je Anlage beträgt laut Typprüfung 360 m³/h und die minimale UV-Transmission des zu desinfizierenden Wassers 52%. Im Anschluss daran befindet sich eine Injektionsstelle für Chlordioxid. Das Chlordioxid wird mit dem Chlorit-Salzsäure-Verfahren hergestellt und die Chlordioxidanlage wird in kontinuierlicher Betriebsweise betrieben. Dabei wird das vor Ort hergestellte Chlordioxid ohne Vorratsbehälter direkt in die Transportleitung hinzugefügt. Bis 17.2.2017 wurde eine Chlordioxidkonzentration von 0,08 mg/l zugegeben, dann auf 0,06 mg/l gesenkt und ab 7.8.2017 wurde die Chlordioxidkonzentration wieder erhöht (Pebersdorfer et al., 2018). Laut Trinkwasserverordnung beträgt die Mindestkonzentration 0,2 mg/l und die Höchstkonzentration 0,4 mg/l (Bundesministerium Arbeit, Soziales und Gesundheit, 2019). Dies verdeutlicht, dass die zusätzliche Desinfektion durch ClO₂ mit einer geringen Konzentration durchgeführt wird. Der DOC (dissolved organic carbon) liegt im Untersuchungszeitraum zwischen 0,4 und 0,6 mg/l. Aus der Literatur ist bekannt, dass Wässer mit einem geringen DOC-Gehalt (< 1 mg/l) eine geringe Desinfektionsmittelzehrung zeigen (Pebersdorfer et al., 2018).

Der Untersuchungszeitraum ist vom 6.12.2017 bis 18.7.2018, wobei 13 Probenahmen stattgefunden haben. Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Durchflusszytometrie (Gesamtzellzahl/ml (TCC); intakte Zellzahl/ml (ICC)), die koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) und das Wachstumspotential (Veränderung der Gesamtzellzahl/ml von Tag 0 bis Tag 10, nach Lagerung der Proben bei 10, 15 und 20°C) zur Überprüfung der biologischen Stabilität des Wassers verwendet.

4.6 Laboruntersuchungen

4.6.1 Einflussfaktoren auf die SG1PI-Färbung

Nescerecka et al., 2016a schreiben, dass die Anwendung von Farbstoffen in der DFZ kritisch zu sehen ist, insbesondere jedoch der Ansatz der Bestimmung der Lebensfähigkeit mit Hilfe von Doppelfärbungen (z. B. SG1PI). Erstens können Temperatur, Zeit und Farbstoffkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeiten und die Wirksamkeit der Färbung beeinflussen. Des Weiteren fanden sie in ihrer Arbeit heraus, dass DMSO während der Färbung zunehmend unerwünschte Zellschäden verursachte, und dies wurde nicht beobachtet, als der Farbstoff in Tris-Puffer hergestellt wurde (Nescerecka et al., 2016a).

Um diese Beobachtungen zu überprüfen wurden in diesem Versuch verschiedene Konzentrationen PI_Trīs (2 µM, 4 µM, 6 µM, 8 µM, 12 µM) und PI_DMSO (4 µM), 4DµM abgekürzt, miteinander verglichen. Als Probe wurde Rohwasser von einer anderen TWVA vom 10.04. verwendet, von dieser wurde durchflusszytometrisch die ICC mit den unterschiedlichen Farbstoffen erfasst. Ein Teil der unbehandelten Probe wurde jeweils unterschiedlich erhitzt (60 °C, 5 min und 80 °C, 10 min) und ein weiterer Teil wurde mit ClO₂ (0,1 mg/l) behandelt und dann ebenso durchflusszytometrisch gemessen. Der Einfluss der PI-Konzentration, des Farbstofflösungsmittels und der Messdauer wurden ermittelt.

4.6.1.1 Material

- Propidiumiodid (PI)
- Reinstwasser
- Tris Puffer (10 mM, pH 8)

- DMSO
- SYBR Green 1
- Wasserbad 60 und 80°C
- ClO₂ (0,1 mg/l)

4.6.1.2 Methode

Herstellung der PI Stock Lösung (5 mM) für PI_Trис: wie auf Seite 39 beschrieben.

Herstellen der PI Arbeitslösung in Tris

200 µM: 950 µl Tris + 40 µl PI (20 mM) + 10 µl SG1 → 2 µM in Well Platte

400 µM: 910 µl Tris + 80 µl PI (20 mM) + 10 µl SG1 → 4 µM in Well Platte

600 µM: 870 µl Tris + 120 µl PI (20 mM) + 10 µl SG1 → 6 µM in Well Platte

800 µM: 830 µl Tris + 160 µl PI (20 mM) + 10 µl SG1 → 8 µM in Well Platte

1200 µM: 750 µl Tris + 240 µl PI (20 mM) + 10 µl SG1 → 12 µM in Well Platte

Herstellen der PI Stock Lösung (20 mM) und Arbeitslösung (400 µM) in DMSO wie auf Seite 39 beschrieben.

Die unbehandelte Probe wurde zuerst, wie im Kapitel 4.1.2 beschrieben mit dem BD ACCURI C6 gemessen. Danach wurde ein Teil der Probe bei 60 °C für 5 min, ein weiterer bei 80 °C für 10 min erhitzt und der letzte Teil mit 0,1 mg/l ClO₂ versetzt. Diese behandelten Proben wurden gleichermaßen gemessen.

Es wurde folgendes Auftragschema auf der Wellplatte verwendet:

2µMx2	4µMx2	4DµMx2	6µMx2	8µMx2	12µMx2
-------	-------	--------	-------	-------	--------

Jede Reihe enthält alle Konzentrationen in Doppelbestimmung und es wurden 6 dieser Reihen aufgetragen, d.h. nach 12 µM in Doppelbestimmung wird wieder 2 µM, 4 µM, usw. aufgetragen und im Durchflusszytometer gemessen. Dadurch kann die zeitliche Komponente bei der Auswertung miteinbezogen werden (inwieweit verändert sich die intakte Zellzahl direkt nach der Inkubation bis 2:50 h nach Inkubation).

4.6.2 Bestimmung der Desinfektionswirkung von ClO₂

4.6.2.1 Material

Verwendeter Stamm: *E. faecium*: Reconta_AB_13_Wasser Selcherei Ablaufrohr WB in Cryostock

Anlegen einer Schrägagarkultur

- Lamina Werkbank
- sterile Impfösen
- MRS Bouillon
- Anaerobiertopf optional (*E. faecium* ist fakultativ anaerob)
- Inkubator bei 37 °C
- sterile 15 ml Tubes

Probenvorbereitung von *E. faecium* ausgehend von der Kultur am Schrägagar

Material wie bei Anlegen Schrägagarkultur plus:

- *E. faecium* auf Schrägagar
- Zentrifuge
- Eppendorfer Tubes
- Sterile 50 ml Tubes
- Physiologische NaCl Lösung (8,5 g/l) autoklaviert
- Rohwasser (0,1 µm filtriert)

CIO₂-Behandlung der vorbereiteten Stämme

- Gerät: Hoch Spektralphotometer
- Amaranthlösung
- Vollpipette (1 ml) und Pasteurpipette
- 25 ml Kolben
- ClO₂ Stock Lösung
- Küvette
- Reinstwasser (destilliertes Wasser)
- Kühlschrank (10°C)
- Natriumthiosulfat (NaThS) (18 mg/l) (vor Verwendung steril filtrieren, 0,1 µm)

Durchflusszytometrie

- Material wie unter 4.1.1 beschrieben
- SG1PI_Triss_6µM

Bestimmung des ct-Werts

- Gerät: Hoch Spektralphotometer
- Amaranthlösung
- Vollpipette (1 ml) und Pasteurpipette
- 25 ml Kolben
- ClO₂ Stock Lösung
- Küvette
- Reinstwasser (destilliertes Wasser)

ATP Methode

- Material wie unter 4.4.1 beschrieben

Plattengussverfahren (KBE)

- Peptonwasser
- Sterile Pipetten
- Pipettierhilfe
- Sterile Eprovetten
- Sterile Petrischalen (Durchmesser: 100 mm)
- TSA Agar: autoklaviert

- Inkubator (37 °C)

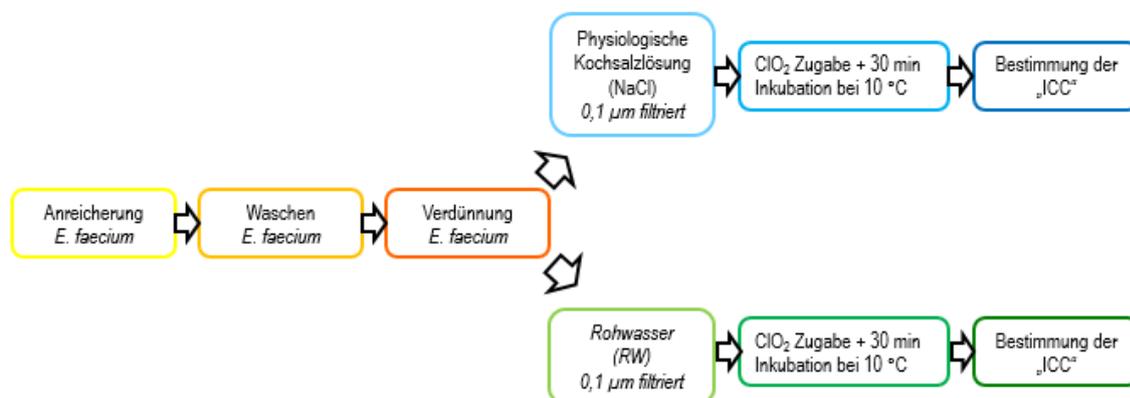
Wachstumspotential

- Glasflaschen 100 ml, pro Probe 2 Flaschen
- Kühlschrank (10°C)
- Durchflusszytometrische Messung: Material wie unter 4.1.1 beschrieben, es werden SG1PI_DMSO_4µM, SG1PI_Trис_6µM und CFDA für die Färbung verwendet.
- ATP Messung: Material wie unter 4.4.1 beschrieben

4.6.2.2 Methode

Abbildung 15 zeigt das Schema der Arbeitsschritte für das Experiment: „Bestimmung der Desinfektionswirkung von ClO₂“.

Abbildung 15: Arbeitsschritte ClO₂ – Experiment *E. faecium*



Anlegen einer Schrägagarkultur:

Das Überführen der Kultur erfolgt unter sterilen Bedingungen: steriles Material in einer sterilen Werkbank (Lamina). Mit einer kleinen Impföse wird eine Reinkultur von *E. faecium* aus dem Cryostock in MRS Bouillon überführt. Die Inkubation erfolgt für 24 h bei 37°C anaerob, durch Verwendung eines Anaerobiertopf. Mit einer großen Impföse wird *E. faecium* aus der 24 h Kultur in eine frische MRS Bouillon überführt und für 18 h bei 37°C anaerob inkubiert.

In mehreren 15 ml Tubes wird mit MRS Agar ein schräger Nährboden hergestellt, darauf eine Öse von der 18 h Übernachtkultur überführt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Aufbewahrung der Kultur auf Schrägagar erfolgt im Kühlschrank bei 4 °C. Diese kann für ca. 4 Monate verwendet werden. Der Sinn dahinter ist, dass die Experimente immer mit derselben Ausgangskultur durchgeführt werden.

Probenvorbereitung von E. faecium ausgehend von der Kultur am Schrägagar:

Das Überführen der Kultur erfolgt unter sterilen Bedingungen: steriles Material in einer sterilen Werkbank (Lamina).

Anreicherung: 1 Öse der Kultur vom Schrägagar wird in frische MRS Bouillon überführt und die Inkubation erfolgt für 24 h bei 37°C anaerob. Davon wird 1 Öse in eine frische MRS Bouillon überführt und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Diese 18 h Kultur wird homogenisiert, 1 ml davon in ein Eppi überführt und zentrifugiert: 5000 rpm / 6 min.

Das Waschen der Kultur erfolgt in der Lamina: Der Überstand vom Eppi wird vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette entfernt. 1 ml NaCl Lösung (0,85 %) wird zum Pellet gegeben und langsam mit der Pipette homogenisiert und gevortext. Dieser Vorgang wird 3 Mal wiederholt. Die Kultur verbleibt homogenisiert in 1 ml NaCl Lösung, bzw. in 1 ml steril filtriertem Rohwasser.

Dann werden Verdünnungen bis 10^{-3} in sterilen Tubes sowohl in NaCl als auch in 0,1 µm filtriertem Rohwasser hergestellt. In einem Vorversuch wurde durchflusszytometrisch diese Verdünnungsstufe, sowohl in NaCl als auch in RW verdünnt, durch Bestimmung der Gesamtzellzahl (~650.000 Zellen/ml) als optimal eingestuft.

ClO₂-Behandlung der vorbereiteten Stämme

Bestimmung der ClO₂ Konzentration mit Hilfe der Amaranthmethode:

Diese Methode wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der ClO₂-Konzentration der Stocklösung verwendet (ClO₂ ist nicht stabil), um dann *E. faecium* mit verschiedenen Konzentrationen an ClO₂ behandeln zu können.

Blindwert: Mit der Vollpipette wird 1 ml Amaranth in einen 25 ml Kolben pipettiert, mit Reinstwasser (destilliertes Wasser) wird der Kolben bis kurz unter die Markierung befüllt und mit einer Pasteurpipette wird bis zur Markierung Reinstwasser aufgefüllt. Dann werden die Tasten „Timer“ und „Start“ gedrückt, danach muss nach einer Minute gemessen werden. In dieser Minute muss der Kolben 1 Mal geschwenkt, die Küvette mit Probe ausgespült und die Küvette bis über die Markierung befüllt, gesäubert und in das Gerät gestellt werden. Danach wird die „Zero“ Taste gedrückt.

Probe: Die Arbeitsschritte vom Blindwert werden wiederholt, aber statt Reinstwasser wird Probe verwendet und zum Schluss wird die Taste „Read“ gedrückt.

ClO₂-Behandlung der Stämme:

Es werden folgende Konzentrationen verwendet: unbehandelt; 0,1 mg/l; 0,2 mg/l; 0,4 mg/l; Diese wurden in einem Vorversuch bestimmt, bei dem die Konzentrationen 0,5 mg/l, 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,3 mg/l und 0,4 mg/l getestet wurden. Ziel war es Konzentrationen zu wählen die den Verlauf der Desinfektionswirkung gut darstellen. Ausgehend vom unbehandelten Rohwasser sollen eine geringe, eine mittelmäßige (wo ca. die Hälfte der Zellen abgetötet werden), und eine sehr starke (fast alle Zellen zerstört) Desinfektionswirkung erkennbar sein. Da nach einer Desinfektion mit 0,5 mg/l ClO₂ so gut wie keine Zellen abgetötet wurden, wurde diese weggelassen. Bei der Desinfektion mit 0,1 mg/l ClO₂ war eine geringe Wirkung erkennbar, bei 0,2 mg/l ClO₂ konnte ungefähr die Hälfte der Zellen abgetötet werden und nach einer Zugabe von 0,4 mg/l ClO₂ waren nur mehr wenige lebende Zellen übrig.

Im Vorversuch wurden außerdem noch höhere Konzentrationen verwendet (0,6 mg/l und 1,2 mg/l), da aber durchflusszytometrisch bei 0,4 mg/l fast keine intakten Zellen detektierbar waren, wurde 0,4 mg/l als höchste Konzentration festgelegt.

Nach Zugabe von ClO₂ kommen die behandelten und auch die unbehandelten Proben für 30 min (Einwirkzeit) in den Kühlschrank bei 10°C und werden alle 5 min vorsichtig durchmischt. Unmittelbar nach dieser Einwirkzeit erfolgt die Zugabe von jeweils 18 mg/l Natriumthiosulfat in 50 ml Probe und Durchmischen der Probe, um die ClO₂ Wirkung zu stoppen. (Auch die unbehandelte und Hitze behandelte Probe wird mit ThS behandelt, um gleiche Bedingungen zu schaffen).

Hitzebehandlung

Jeweils 1 Eppi mit *E. faecium* in 0,85%iger NaCl und in RW werden im Heizblock bei 90°C für 5 Minuten erhitzt. Diese werden ebenso bis zur Verdünnungsstufe 10^{-3} mit NaCl bzw. RW verdünnt und mit den anderen ClO₂ behandelten Proben und der unbehandelten Probe im Kühlschrank bei 10°C für 30 min inkubiert.

Durchflusszytometrie

Methode wie unter 4.1 beschrieben, es werden SG1PI_DMSO_4 μ M, SG1PI_Trис_6 μ M und CFDA für die Färbung verwendet.

Bestimmung des ct-Werts

Nach erfolgter Zugabe von ClO₂ und 30-minütiger Inkubation bei 10°C wird die Restchlordioxid Konzentration mit Hilfe der Amaranthmethode im Spektralphotometer (wie auf Seite 49 beschrieben) bestimmt. Durch Bildung des Produkts von Restchlordioxid Konzentration [mg/l] und Zeit [min] ergibt sich der ct-Wert [mg/l*min].

ATP Methode

Methode wie unter 4.4.2 beschrieben

Plattengussverfahren (KBE)

Herstellung TSA Agar

40 g des Mediums werden in 1 l destilliertem Wasser suspendiert und zum Lösen unter Rühren erhitzt. Das Medium wird in 200 ml Aliquote abgefüllt, für 15 Minuten im Autoklav bei 121°C sterilisiert und vor Verwendung auf ca. 50 °C abgekühlt. Falls das Medium nicht sofort verwendet wird kann es nach Abkühlen im 4 °C Kühlschrank gelagert werden und vor Gebrauch geschmolzen und wieder auf die 50°C Arbeitstemperatur abgekühlt werden (Roth, 2020d).

Plattengussverfahren

Die Proben werden mit Peptonwasser verdünnt (10⁻³ und 10⁻⁴ für die unbehandelte Probe, 10⁰ und 10⁻¹ für die behandelten Proben) und jeweils 1 ml in Doppelbestimmung werden in die Petrischalen steril pipettiert. Die Probe wird mit TSA Agar bedeckt und in Achterschleifen homogenisiert. Nach Abkühlen des Agars (fester Agar) werden die Platten mit dem Deckel nach unten im Inkubator bei 37 °C für 24 h inkubiert. Danach erfolgt die Auszählung der gewachsenen Kolonien.

Wachstumspotential

Für das Wachstumspotential wurde *E. faecium* ausgehend von der Schrägagarkultur, wie auf Seite 48 beschrieben, aufgereinigt und in sterilen 1 Liter Gebinden 10⁻³ verdünnt. Die Verdünnung wurde in 100 ml Glasflaschen in der Lamina aufgeteilt und mit den üblichen Konzentrationen an ClO₂ (0,1; 0,2; 0,4 mg/l) in Doppelbestimmung für jeden Tag (jeweils 2 Flaschen pro Tag) behandelt, 2 Flaschen pro Tag bleiben unbehandelt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 10°C wurde die Chlordioxidwirkung mit 18 mg/l NaThS aufgehoben. Die Flaschen wurden im 10°C Kühlschrank bis zur Messung gelagert. Tag 0 wurde wie gehabt in den sterilen 50 ml Tubes durchgeführt und am selben Tag gemessen.

Versuch 1:

Es wurden Flaschen für Tag 3, 10 und 13 gelagert und die intakten Zellen wurden an den jeweiligen Tagen durchflusszytometrisch und mit Hilfe der ATP Methode gemessen. Durchflusszytometrisch wurde die SG1PI_Trис_6 μ M Färbung verwendet und die Methode wurde wie in Kapitel 4.1 beschrieben durchgeführt. Die ATP Messung erfolgte wie unter 4.4.2 erklärt.

Versuch 2:

Es wurden Flaschen für Tag 3, 10, 7 und 14 gelagert und die intakten Zellen wurden an den jeweiligen Tagen durchflusszytometrisch und mit Hilfe der ATP Methode gemessen. Durchflusszytometrisch wurde die SG1PI_Trис_6 μ M und die CFDA Färbung verwendet und die Methode wurde wie in Kapitel 4.1 beschrieben durchgeführt. Die ATP Messung erfolgte wie unter 4.4.2 erklärt. Bei der CFDA Färbung wurde ein zweites RW einer anderen Quelle unbehandelt mitgeführt.

4.7 Datenauswertung

4.7.1 Untersuchungen von Proben in einer TWVA

4.7.1.1 Durchflusszytometrie

Die vom BD Accuri erhaltenen Daten können mit Hilfe der BD Sampler Software abgerufen werden, wobei für die Trinkwasserproben ein Gate (Bereich der „lebenden“ Zellen) vom Department zur Verfügung gestellt wurde. Beim Laborexperiment wurde der Zellcluster der unbehandelten Probe als Gate verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel.

In dieser Arbeit wird die Gesamtzellzahlfärbung mit SG1 als TCC (Total cell count = Gesamtzellzahl) und die intakte Zellzahlfärbung mit SG1 und PI als ICC (intact cell count = Zahl der intakten Zellen) bezeichnet. Die Gesamtzellzahl beinhaltet alle Zellen, die in der Probe vorhanden sind, sowohl intakte, geschädigte und „tote“ Zellen. Intakte Zellen sind Zellen mit intakter Zellmembran, sie werden als lebensfähig angesehen und sind normalerweise auch vermehrungsfähig.

Die Nachweisgrenze wird mit 100 Zellen pro Milliliter, die Bestimmungsgrenze mit 1 000 Zellen pro Milliliter angegeben (Zunabovic-Pichler et al., 2018).

Auswertung der TCC und ICC am Tag der Probenahme (Tag 0)

Die Proben von Tag 0 jeder Probenahmestelle wurden in sterile 50 ml Tubes abgefüllt und am selben Tag durchflusszytometrisch in Dreifachbestimmung gemessen. Die Daten (TCC und ICC) wurden von der BD Software ins Excel kopiert und die Mittelwerte und Standardabweichungen von den Dreifachbestimmungen wurden von jeder Probenahmestelle berechnet. Diese Daten wurden als Punkt Diagramm mit verbundener Linie durch Auftragung des Probenahmetages (Datum) gegen TCC/ml bzw. ICC/ml dargestellt. Des Weiteren wurde der ICC Anteil (ICC/TCC) als Punkt-Linien-Diagramm und als Boxplot dargestellt.

Auswertung Wachstumspotential

Von jeder Probe gibt es 2 Flaschen die bei den unterschiedlichen Temperaturen (10, 15 und 20°C) gelagert wurden. Daher wurden an Tag 3, 7 und 10 von jeder Probenahmestelle zwei Dreifachbestimmungen gemessen. Diese wurden im Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung wurde berechnet. Um die Abweichung der TCC/ml von Tag 0 ausgehend zu erfassen wurden die Mittelwerte von Tag 0 als 100%=1 im Diagramm eingezeichnet und die Mittelwerte der weiteren Tage je nachdem ob ein Wachstum mit >1 (% Zunahme) oder eine Abnahme mit <1 (%Abnahme) im Diagramm erfasst. Um bei einer Zunahme der TCC herauszufinden ob es sich um ein signifikantes Wachstum handelt wurde der T-Test angewendet bei dem im Signifikanzniveau von 5% der kritische Wert mit dem T-Wert verglichen wurde um entscheiden zu können ob die Nullhypothese (es kommt zu keinem signifikanten Wachstum) abgelehnt (T-Wert<kritischer Wert) werden kann.

4.7.1.2 Kultivierungsverfahren

Auswertung der KBE/ml am Tag der Probenahme (Tag 0)

Die KBE/ml der Probenahmestellen Rohwasser und nach UV-Desinfektion (jeweils 2 Platten pro Nährmedium und Probenahmetag) wurden im Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung wurde berechnet. Die Darstellung erfolgte als Punkt-Linien-Diagramm Tag der Probenahme (Datum) gegen KBE/ml.

Auswertung Wachstumspotential

Die Mittelwerte der 2 Platten beider Flaschen wurden im Mittelwert zusammengefasst und als Punkt-Linien-Diagramm Tag (0 und 7) gegen log KBE/ml dargestellt.

4.7.2 Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung

Von den Doppelbestimmungen jeder Konzentration und jeder Reihe wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Diese Daten wurden in einem Punkt-Linien-Diagramm Zeit gegen intakte Zellen/ml dargestellt.

4.7.3 Bestimmung der Desinfektionswirkung von ClO₂

4.7.3.1 Auswertung der DFZ

SG1 und PI

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der TCC und der ICC (Doppelbestimmung) von der unbehandelten Probe und den behandelten Proben (0,1; 0,2; 0,4 mg/l ClO₂ und Hitze-90°C/10 min) aller Versuche wurden berechnet. Im Punkt-Diagramm wurde für jede Probe die Abnahme der ICC in %, ausgehend von der Gesamtzellzahl eingezeichnet und so der Verlauf der Desinfektionswirkung mit zunehmend stärkerer Behandlung veranschaulicht. Es erfolgte der Vergleich von Tris Puffer und DMSO als Lösungsmittel und der Vergleich von Rohwasser und physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel für *E. faecium*.

CFDA

Die doppelt bestimmten Esteraseaktivitäts-Werte der unbehandelten Probe und den behandelten Proben (0,1; 0,2; 0,4 mg/l ClO₂ und Hitze-90°C/10 min) aller Versuche wurden im Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung wurde berechnet. Diese Werte wurden im Punktdiagramm Probe gegen Esteraseaktivität dargestellt und Rohwasser und physiologische Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel für *E. faecium* wurden verglichen.

4.7.3.2 Auswertung ATP

Die Konzentration der unfiltrierten Probe stellt das Gesamt - ATP, und jene der filtrierten Probe das extrazelluläre (EC) ATP dar. Nach Berechnung der Mittelwerte und Abzug des Blindwerts kann mit Hilfe der Formel der Standardkurve die ATP Konzentration der unfiltrierten Probe und der filtrierten Probe berechnet werden. Danach erfolgt die Berechnung des intrazellulären (IC) ATPs: Gesamt-ATP – extrazelluläres (EC) ATP. Die Standardabweichung von IC-ATP und EC-ATP wurde berechnet. Die ATP Konzentrationen wurden mit der Standardabweichung in einem Balkendiagramm Probe gegen ATP dargestellt.

4.7.3.3 Auswertung KBE

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der KBE (Doppelbestimmung) von der unbehandelten Probe und den behandelten Proben (0,1; 0,2; 0,4 mg/l ClO₂ und Hitze-90°C/10 min) aller Versuche wurden berechnet. Im Balkendiagramm wurden diese Werte dargestellt und zusätzlich in einer Tabelle in Zahlen angegeben.

4.7.3.4 Auswertung Wachstumspotential

SG1PI

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der TCC und der ICC (Doppelbestimmung) von der unbehandelten Probe und den behandelten Proben (0,1; 0,2; 0,4 mg/l ClO₂ und Hitze-90°C/10 min) wurden für Tag 0, 3 und 13 bzw. 0,3,7 und 14 im 2.Versuch berechnet. Im Punkt-Linien-Diagramm wird für jede Probe die ICC und für die unbehandelte Probe zusätzlich die TCC dargestellt.

CFDA

Die doppelt bestimmten Esteraseaktivitäts-Werte der unbehandelten Probe und den behandelten Proben (0,1; 0,2; 0,4 mg/l ClO₂ und Hitze-90°C/10 min) für Tag 0,3,7 und 14 (die Esteraseaktivität

wurde nur im 2. Versuch gemessen) wurden im Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung wurde berechnet. Die Werte der Proben wurden im Punkt-Linien-Diagramm Tag gegen Esteraseaktivität dargestellt.

ATP

Die Doppelbestimmungen (IC-ATP und EC-ATP) der unbehandelten Probe und den behandelten Proben (0,1; 0,2; 0,4 mg/l ClO₂ und Hitze-90°C/10 min) für Tag 0, 3 und 13 bzw. 0,3,7 und 14 im 2.Versuch wurden im Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung wurde berechnet. Diese Werte wurden in einem Balkendiagramm Tag gegen ATP, für jede Probe in einem eigenen Diagramm, dargestellt.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Untersuchungen von Proben in einer Trinkwasserversorgungsanlage (TWVA)

5.1.1 Durchflusszytometrische Ergebnisse

5.1.1.1 Gesamtzellzahl (TCC) und HNA Anteil

Die Gesamtzellzahl (TCC) wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des Farbstoffes SYBR Green 1 bestimmt. Durch die Auswertung der TCC der einzelnen Probenahmestellen kann zwar normalerweise keine Aussage über die Desinfektionswirkung gemacht werden, aber es ermöglicht mikrobiologische Veränderungen über die Zeit der Beprobung zu erkennen. Falls es zu einer Verringerung der TCC nach einem Desinfektionsschritt kommt, dann aufgrund der weitgehenden Zerstörung der Reaktanten (im Falle von SYBR Green die Nukleinsäuren der Zelle). Der HNA Anteil kann nach der Desinfektion auch leicht erhöht sein, wahrscheinlich aufgrund einer besseren Anfärbbarkeit nach UV-Desinfektion. Eine Erhöhung der TCC geht meist mit einer Erhöhung der intakten Zellzahl (ICC) einher, das kann auf eine Wiederverkeimung im Verteilnetz, z.B. durch zusätzlichen Nährstoffeintrag, oder grundsätzlich höheren Nährstoffgehalt usw., hinweisen. Außerdem kann nach Ermittlung der ICC mit Hilfe der TCC, der Anteil der ICC bezogen auf die TCC Werte berechnet werden.

In Abbildung 16 sind die TCC aller Probenahmestellen dargestellt. Die TCC des Rohwassers (RW) verhält sich während des gesamten Untersuchungszeitraums relativ stabil und liegt zwischen 80.000 und 90.000 Zellen/ml. Eine Ausnahme ist zu erkennen, nämlich am 7.2. beginnt die Steigung der Kurve, die am 14.2. mit fast 105.000 Zellen/ml den Peak erreicht. Eine Woche später liegen die Werte wieder im Normalbereich.

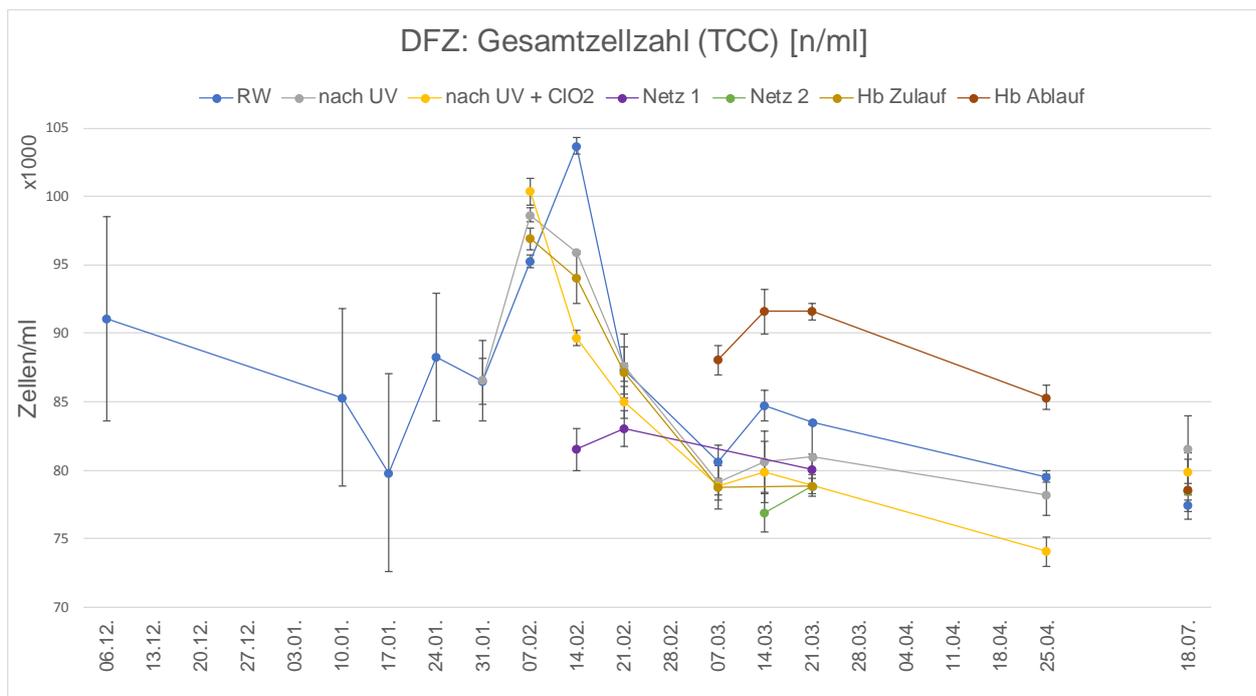


Abbildung 16: Gesamtzellzahl (TCC) am Tag der Probenahme von den verschiedenen Probenahmestellen im zeitlichen Verlauf, Messung durchflusszytometrisch mit SG1, jede Konzentrationsangabe ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung der Probe

Bei dieser TWVA handelt es sich um einen Horizontalfilterbrunnen, der das Wasser aus acht Strängen bezieht. Bis 31.1. wurde das Rohwasser nur von 4 Strängen bezogen, ab 2.2. kam das Wasser aus allen 8 Strängen, was auch mit dem Beginn der Einspeisung ins Netz zusammenfiel. Dies erkennt man auch in einem Anstieg der TCC ab der Probenahme vom 7.2., bis sich das System ab der Probenahme vom 21.2. wieder stabilisiert hat.

Die TCCs direkt nach der Desinfektion sind wie erwartet denen des Rohwassers sehr ähnlich, es werden ja alle Zellen detektiert und die TCC ändert sich nach der Desinfektion nicht, außer bei starker Desinfektion und daraus resultierenden Zerstörung der Zellen. Bei den Proben vom Hochbehälter Ablauf werden im Durchschnitt etwas höhere TCC Werte gemessen. Ein Grund dafür könnte Biofilm im Rohr oder Wachstum von Bakterien sein, da im Hochbehälter keine Restchlorkonzentration mehr nachweisbar ist. Ein Vergleich der Vor-Ort-Parameter (siehe Anhang) zeigt, dass im Hochbehälter im Mittel um 2,5 mg/l höhere Werte für den gelösten Sauerstoff gemessen wurden. Daher kann durch Bestimmung des gelösten Sauerstoffes bei den Netz-Probenahmestellen darauf geschlossen werden ob die Trinkwasserprobe direkt von der TWVA oder vom Hochbehälter stammt. Bei den in diesem Projekt entnommenen Trinkwasserproben vom Netz handelt es sich demnach um Wasser, das nur eine kurze Verweildauer im Netz aufwies, was auch die niedrigeren TCC Werte erklärt.

Wie im theoretischen Teil erläutert, können bei der durchflusszytometrischen Messung von Wasserproben zwei verschiedene Cluster unterschieden werden. Diese setzen sich aus Bakterien mit einem niedrigen Nukleinsäuregehalt (LNA) und einem weiteren mit hohem Nukleinsäuregehalt (HNA) zusammen. In dieser Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der HNA Anteile aller Probenahmestellen sowohl der TCC als auch von der ICC ausgewertet. Siehe dazu Abbildung 17 und 20.

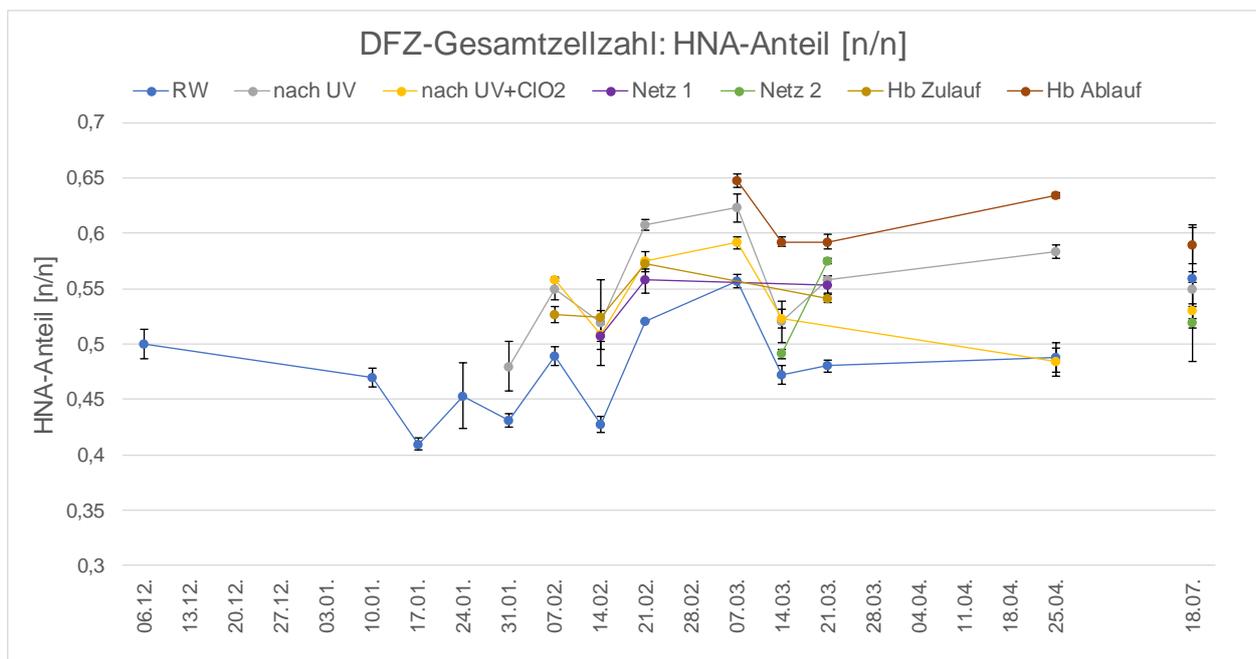


Abbildung 17: HNA-Anteil von der TCC am Tag der Probenahme von den verschiedenen Probenahmestellen im zeitlichen Verlauf, Messung durchflusszytometrisch mit SG1, jede Konzentrationsangabe ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung der Probe

Beim RW liegen die HNA Werte meistens unter 50 Prozent und nur zwei Mal knapp darüber. Nach der UV-Desinfektion erhöht sich dieser um ca. 5 Prozent und ist im Hochbehälter Ablauf am höchsten (im Vergleich mit den HNA Werten des Rohwassers). Durch die UV-Desinfektion nimmt der HNA-Anteil der TCC zu, wahrscheinlich aufgrund einer besseren Anfärbbarkeit nach

UV-Desinfektion. Die höheren HNA-Werte im Hochbehälter lassen den Schluss zu, dass dort Zellen mit höherem Nukleinsäure-Gehalt vorkommen.

Der HNA-Anteil liegt durchschnittlich bei ca. 50%, damit in einem für österreichische Rohwässer festgestellten Wertebereich und zeigt zusätzlich keine deutlichen Änderungen während der Untersuchungszeiträume (Mayer et al., 2017).

5.1.1.2 Zahl der intakten Zellen (ICC) und HNA Anteil (iHNA)

Abbildung 18 zeigt die ICC aller Probenahmestellen am Tag der Probenahme.

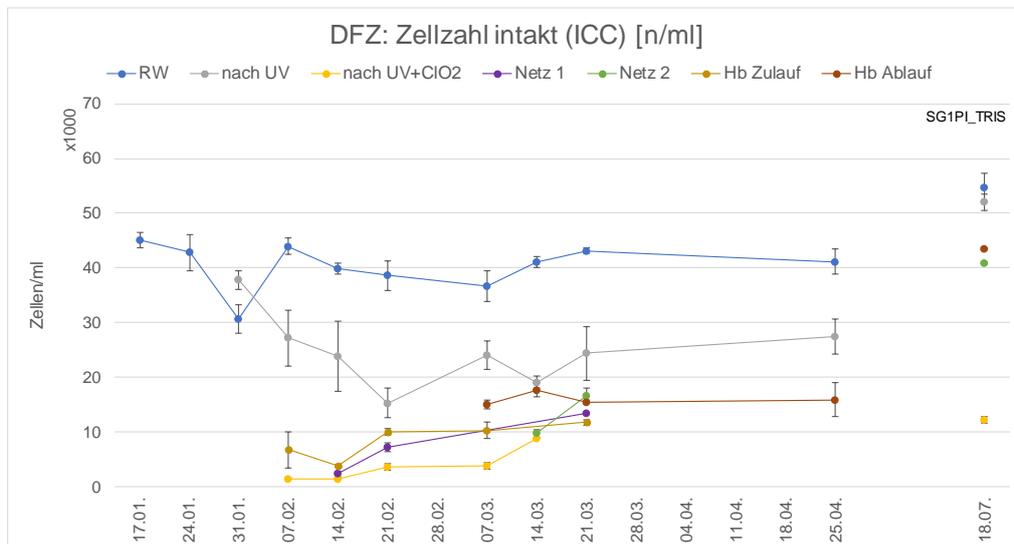


Abbildung 18: ICC am Tag der Probenahme von den verschiedenen Probenahmestellen im zeitlichen Verlauf, Messung durchflusszytometrisch mit SG1PI, jeder Punkt beruht auf einer Dreifachbestimmung der Probe

Mit der Farbstoffkombination SG1PI können intakte Zellen von den geschädigten / „toten“ Zellen unterschieden werden, indem SYBR Green 1 in alle Zellen eindringt und an Nukleinsäuren bindet. PI gelangt nur in permeabilisierte Zellen (z.B. Schädigung der Zellmembran nach ClO₂ Zugabe), verdrängt dort SG 1 und bindet ebenso an Nukleinsäuren. Dadurch verschiebt sich das Signal und die intakte Zellzahl (ICC) kann bestimmt werden (alle Zellen, die im Gate verbleiben).

Für die Untersuchungen von der TWVA wurde SG1PI in DMSO gelöst verwendet. Wobei nach dem Laborexperiment „Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung“ (siehe 5.2.1), beschlossen wurde, das DMSO durch Tris Puffer zu ersetzen. Es wird vermutet, dass DMSO Zellen zerstört und dadurch zu wenige intakte Zellen gemessen werden. Die letzte Messung bei diesem Projekt am 18.7. wurde mit SG1PI in Tris Puffer durchgeführt und bestätigte die Vermutung. Die ICC ist bei allen Probenahmestellen höher als bei den Probenahmen davor. Leider fand an diesem Tag keine zusätzliche Färbung mit SG1PI in DMSO gelöst statt, deswegen kann kein direkter Vergleich der Probenahmestellen an diesem Tag von SG1PI in DMSO gelöst mit SG1PI in Tris Puffer gelöst gemacht werden.

Die ICC des Rohwassers verbleibt im gesamten Untersuchungszeitraum relativ stabil bei Werten zwischen 30.000 und 45.000 Zellen/ml. Vom 17.1. bis inklusive der Probenahme am 31.1. verringert sich die ICC um ca. 15.000 Zellen/ml, dann kommt es am 7.2. zu einem Anstieg (13.000 Zellen/ml), danach bleiben die Werte der ICC auf einem sehr ähnlichen Niveau. Bei der TCC des Rohwassers ist ein Peak am 14.2. erkennbar, dieser bleibt bei der ICC aus. Es wurde also eine höhere Gesamtzellzahl gemessen, aber die intakte Zellzahl bleibt unverändert, bzw. ist sogar etwas geringer als am 7.2.

Nach der UV-Desinfektion wurden mit der Farbstoffkombination SG1PI in DMSO gelöst im Durchschnitt rund 20.000 intakte Zellen/ml weniger gemessen als beim Rohwasser. Nach UV-Strahlung sollte die Zellmembran nicht zerstört werden, warum eine Reduzierung der ICC nach UV-Desinfektion hier ersichtlich ist wird im Kapitel 5.1.1.3 diskutiert (Ramseier et al., 2010).

Am 17. Februar wurde die ClO_2 Konzentration von 0,08 mg/l auf 0,06 mg/l reduziert, dies ist durch eine leichte Erhöhung der ICC Werte bei den Probenahmestellen nach ClO_2 , Netz 1 und Hochbehälter Zulauf ab der darauf folgenden Probenahme am 21.2. ersichtlich.

In Abbildung 19 sind die gemessenen ClO_2 Konzentrationen direkt nach der Desinfektionsstelle dargestellt.

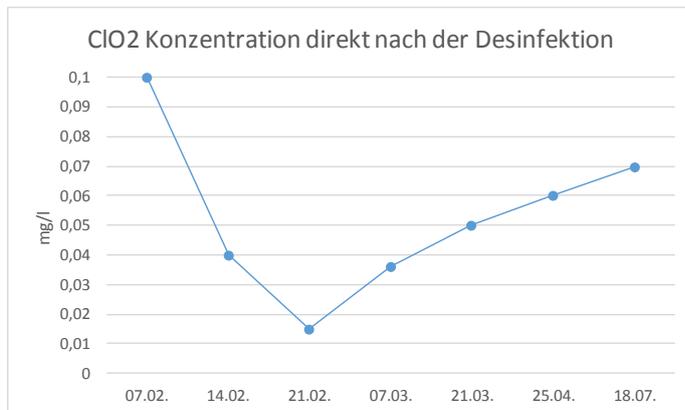


Abbildung 19: ClO_2 Konzentration gemessen direkt nach der Desinfektionsstelle

Die Reduktion der ClO_2 Konzentration ist ab 21.2. gut erkennbar, danach werden wieder etwas höhere Werte gemessen. Die höheren ClO_2 Werte können aus einem niedrigeren Volumenstrom resultieren.

Die ICCs vom Hochbehälter Ablauf sind etwa 12.000 Zellen/ml höher als nach erfolgter Desinfektion. Dies kann durch Biofilmaktivität im Netz oder aber auch durch z.B. Schadensfälle im Netz oder im Hochbehälter ausgelöst werden. Des Weiteren konnte im Hochbehälter keine ClO_2 Restkonzentration gemessen werden (diese wurde von Dipl. Ing. Lukas Pehersdorfer bei der Probenahme gemessen, Daten siehe Anhang), was den vorhandenen Mikroorganismen je nach Nahrungsangebot Wachstum ermöglichen kann.

In Abbildung 20 ist der HNA-Anteil der Zahl der intakten Zellen (iHNA) abgebildet.

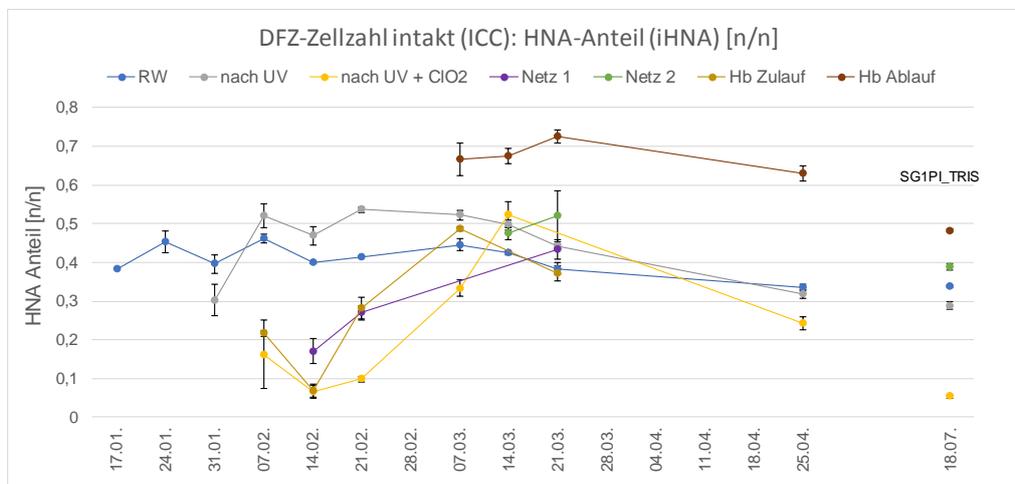


Abbildung 20: HNA-Anteil der Zahl der intakten Zellen (iHNA) am Tag der Probenahme von den verschiedenen Probenahmestellen im zeitlichen Verlauf, Messung durchflusszytometrisch mit SG1PI, jeder Punkt beruht auf eine Dreifachbestimmung der Probe

Bei Betrachtung des HNA-Anteils der ICC fällt auf, dass das RW zwischen 17.01. und 14.02. einen ähnlichen Verlauf zeigt wie jener der TCC Messung, nur im Durchschnitt um 7,5% geringer. Der HNA Anteil nach der UV-Desinfektion ist meist wieder etwas höher als beim RW. Im Hochbehälter Ablauf werden wieder die höchsten Werte für HNA Bakterien gemessen. Ein großer Unterschied zum HNA Anteil der TCC ist nach der ClO₂ Zugabe erkennbar. Ramseier et al., 2011 beschreiben, dass die Zellmembranen von Bakterien mit hohem Nukleinsäuregehalt (HNA) während der Behandlung mit Chlordioxid und Permanganat bei geringeren Konzentrationen an Desinfektionsmittel leichter geschädigt wurden als die von Bakterien mit niedrigem Nukleinsäuregehalt (LNA). HNA-Zellen von Wasserproben wurden ab einer Konzentration von 9 mg*min/l ClO₂ teilweise zerstört und bei der Zugabe von 40 mg*min/l ClO₂ wurden alle HNA-Zellen zerstört, aber die LNA-Zellen waren noch intakt. Nach Zugabe von 1.400 mg*min/l ClO₂ konnten keine intakten Zellen nachgewiesen werden (Ramseier et al., 2010). Die Ergebnisse hier zeigen ebenso, dass durch die Desinfektion mit ClO₂ vor allem HNA Zellen zerstört werden.

5.1.1.3 Verhältnis Zahl der intakten Zellen/Gesamtzellzahl (ICC/TCC): ICC Anteil

Abbildung 21 zeigt den Verlauf des ICC Anteils aller untersuchten Proben der verschiedenen Probenahmestellen.

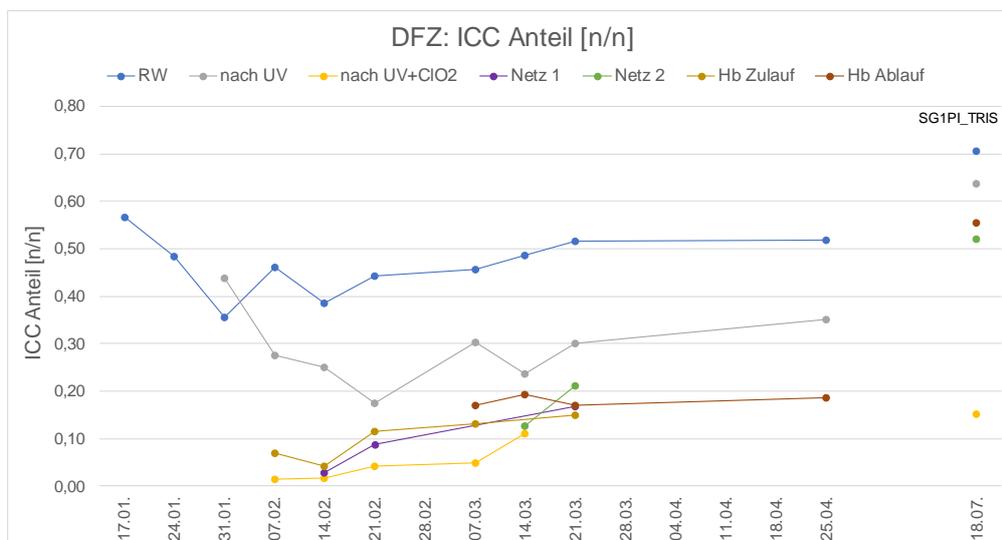


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Messung des ICC Anteils der Probe mit SG1PI am Tag der Probenahme: Verhältnis TCC/ICC; jede Messung erfolgte als Dreifachbestimmung

Das RW dieser TWVA besitzt ungefähr 50% intakte Zellen. Bei der UV-Desinfektion (ohne ClO₂-Zugabe) muss berücksichtigt werden, dass eine ICC Färbung nach UV kaum Aussagekraft zur Membranpermeabilisierung besitzt, da UV-Strahlung die DNA denaturiert und die Membran intakt bleibt. PI kann aber nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringen, um SG1 zu verdrängen und dadurch bei der Detektion eine Trennung zwischen intakten und geschädigten Zellen zu ermöglichen. Eine Verringerung der ICC von fast 50% gegenüber dem RW ist aber feststellbar. Dies deutet darauf hin, dass DMSO Zellen, die durch die UV-Bestrahlung ohnehin schon gestresst waren, permeabilisieren konnte und diese dadurch als „tote“ Zellen gemessen wurden. Deswegen kann die Vermutung aufgestellt werden, dass durch die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für SG1PI die Desinfektionswirkung nach UV-Bestrahlung ermittelt werden konnte. Offen ist, ob alle Zellen deren DNA mit Hilfe von UV-Bestrahlung zerstört wurde, ebenso durch DMSO permeabilisiert wurden. Eine weitere Vermutung ist, dass die Dauer von Probenahme bis Messung (ca. 4 Stunden) ausreichte, dass die Membran der UV geschädigten Zellen aufgrund von Zelltod permeabilisiert wurde.

Die letzte Messung am 18.7. erfolgte mit SG1PI in Tris Puffer gelöst. Wie erwartet wurden durchwegs höhere ICC Anteile ermittelt, obwohl die TCC aller Probenahmestellen an diesem Tag

der Beprobung gering waren. Der ICC Anteil der UV-behandelten Proben ist zwar geringer als die des Rohwassers, aber nur um 4%. Um die Vermutung der Detektion von UV-geschädigten Zellen durch DFZ mit SG1PI in DMSO gelöst zu bestätigen, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

In Abbildung 22 ist der ICC Anteil bezogen auf die TCC als Boxplot veranschaulicht. Die Linie in der Box zeigt die Anzahl der intakten Zellen im Mittel als Median aller Probenahmen jeder einzelnen Probenahmestelle. Die Zahl steht für die Anzahl der Probenahmen, z.B. bei RW: n=9 (es wurden 9 Werte, also 9 ICC Ergebnisse von verschiedenen Probenahmen, in den Boxplot hineingenommen).

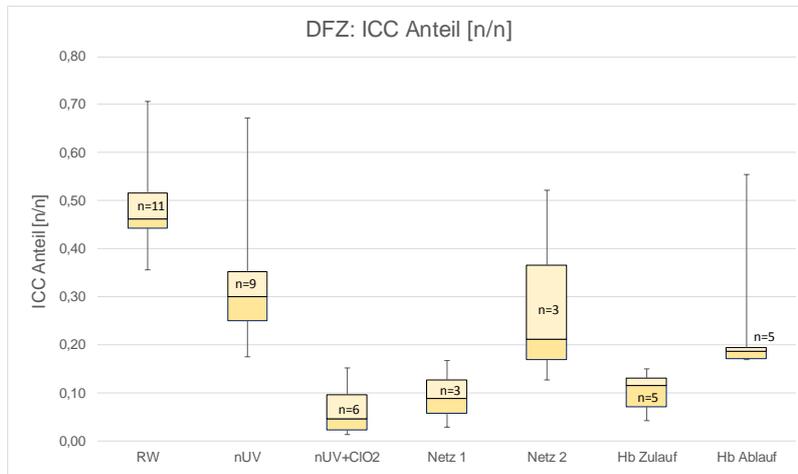


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Messung des ICC Anteils der Probe mit SG1PI: Verhältnis TCC/ICC; Darstellung aller SG1PI Messungen des Trinkwasseranlageprojekts am Tag der Probenahme als Boxplot; jede Messung erfolgte als Dreifachbestimmung

Die Abnahme der ICC nach Desinfektion und auch die Zunahme dieser im Netz bzw. Hochbehälter sind gut erkennbar. Die ICC Anteile der 1. Netzstelle sind der ICC Anteile nach ClO₂ Zugabe sehr ähnlich, da diese Netzstelle örtlich sehr nahe am Ort der Desinfektionsmaßnahme liegt. Die Ausreißer nach oben bei RW, nUV, Netz 2 und Hb Ablauf stellen die Messungen am 18.7., bei denen SG1PI in Tris Puffer gelöst verwendet wurde, dar.

Abbildung 23 zeigt die Box Plot Darstellung von Abbildung 22 ohne der Probenahme vom 18.07., um den Ausreißer durch Verwendung von SG1PI in Tris Puffer gelöst aus der Grafik zu nehmen.

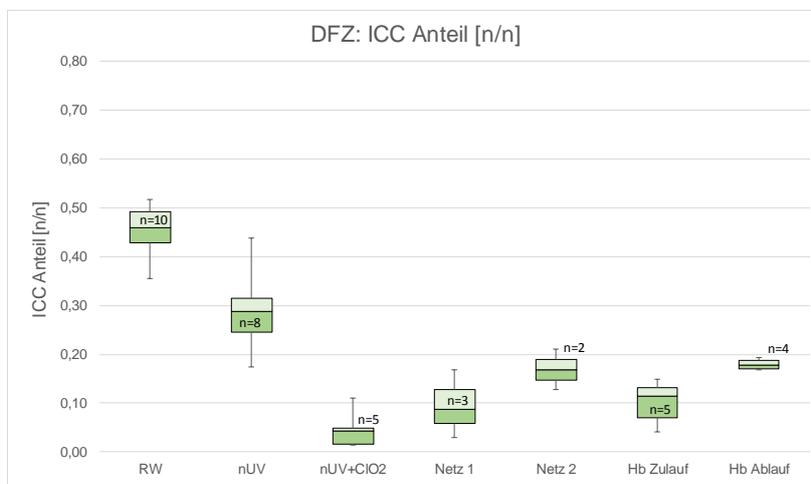


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Messung des ICC Anteils der Probe mit SG1PI ohne Probenahme am 18.07.: Verhältnis TCC/ICC; Darstellung aller SG1PI Messungen des Trinkwasseranlageprojekts am Tag der Probenahme als Boxplot; jede Messung erfolgte als Dreifachbestimmung

Beim Vergleich von Abbildung 21 und 22 ist bei den Probenahmestellen die am 18.07. beprobt wurden (RW, nUV, nUV+ClO₂, Netz 2 und Hb Ablauf) ein großer Unterschied bei den Maximalwerten erkennbar. Die Werte passen in Abbildung 23 viel besser zusammen, dies verdeutlicht den Unterschied zwischen den zwei Lösungsmitteln DMSO und Tris Puffer. Bei Anwendung der Farbstoffkombination SG1PI wurden also mit Tris Puffer als Lösungsmittel, wie oben erwähnt, mehr intakte Zellen detektiert als mit DMSO als Lösungsmittel.

5.1.2 Kultivierungsverfahren

5.1.2.1 Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Um die durchflusszytometrischen Ergebnisse der ICC mit den KBE vergleichen zu können, wurden die Proben teilweise auf Hefeextraktagar (22 und 37°C) und R2A Agar (27°C) kultiviert und nach der Inkubationsdauer als KBE/ml ausgewertet.

In Abbildung 24 sind die KBE/ml Probe über den gesamten Versuchszeitraum von Rohwasser und nach UV-Desinfektion abgebildet.



Abbildung 24: Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe angesetzt am Tag der Probenahme vom Rohwasser und nach UV Bestrahlung; Verwendung von Hefeextraktagar (Inkubation bei 22 und 37 °C) und R2A Agar (Inkubation bei 27°C); 1 Datenpunkt entspricht dem gewichteten Mittelwert von 2 ausgezählten Platten; Auszählung der Kolonien nach der Inkubationsdauer

Auf Hefeextraktagar (HEA) konnten sowohl im RW als auch nach UV-Desinfektion nur ein paar wenige KBE/ml ausgezählt werden. Auf R2A Agar sind beim RW meistens zwischen 15 und 35 Kolonien gewachsen, wobei durchflusszytometrisch zirka 40.000 intakte Zellen/ml detektiert wurden. Der Peak am 7.2. passt nicht mit der ICC, gemessen mit der DFZ, zusammen. Durch die geringen Werte bei der kulturellen Methode aufgrund des geringen kultivierbaren Anteils ist ein Zusammenhang zwischen den beiden Methoden meist nicht gegeben. Nach der UV-Desinfektion konnten auf R2A Agar nur mehr <10 KBE/ml kultiviert werden. Nach zusätzlicher ClO₂ Zugabe sind auf keinem Nährmedium Kolonien gewachsen.

Wie dieses Beispiel zeigt, kann die Desinfektionswirkung kulturell mit zunehmend intensiveren Desinfektionsmaßnahmen bestimmt werden, da nach UV-Desinfektion noch ein paar Kolonien nachgewiesen werden konnten, aber durch die zusätzliche Anwendung von ClO₂ keine Kolonien auf den verwendeten Nährmedien wachsen konnten. Nachteilig beim Kultivierungsverfahren im Vergleich zur Durchflusszytometrie ist aber, dass die Kolonien auf R2A Agar erst nach einer Woche ausgezählt werden können und nicht alle wasserbezogenen Bakterien Kolonien bilden können (VBNC).

Laut Trinkwasserverordnung, 2017 muss Wasser, welches in Verkehr gebracht wird am Punkt der Abfüllung, nach einer Bebrütungstemperatur von 22°C ≤ 100 KBE/ml und nach einer Bebrütungstemperatur von 37°C ≤ 20 KBE/ml aufweisen (RIS, 2017). Diese Voraussetzungen sind sowohl beim Rohwasser als auch direkt nach der Desinfektion gegeben. Auch bei den Netzstellen und bei den Hochbehälter Proben konnten diese Grenzwerte eingehalten werden (keine Abbildung).

5.1.3 Wachstumspotential (WP)

5.1.3.1 Wachstumspotential DFZ

Die folgenden Abbildungen (25 und 26) zeigen die relativen Gesamtzellzahlen in den Proben der verschiedenen Probenahmestellen ausgehend vom Probenahmetag = Tag 0 (d 0) bis Tag 10 (d 10). Tag 0 stellt die Ausgangszellzahl in 100% =1 dar, im weiteren Verlauf des Lagerungsversuchs zeigt >1 ein Wachstum und <1 eine Reduktion der TCC ausgehend von Tag 0 an. Beim Lagerversuch wurden zwar teilweise die intakten Zellen mit SG1PI gemessen, aber zur Bewertung der Stabilität des Wassers wurden die TCC Werte herangezogen. Es wird angenommen, dass eine Erhöhung der TCC einen Anstieg der ICC impliziert. Abbildung 24 zeigt die WP Versuche von RW und nach UV bei 10, 15 und 22 °C.

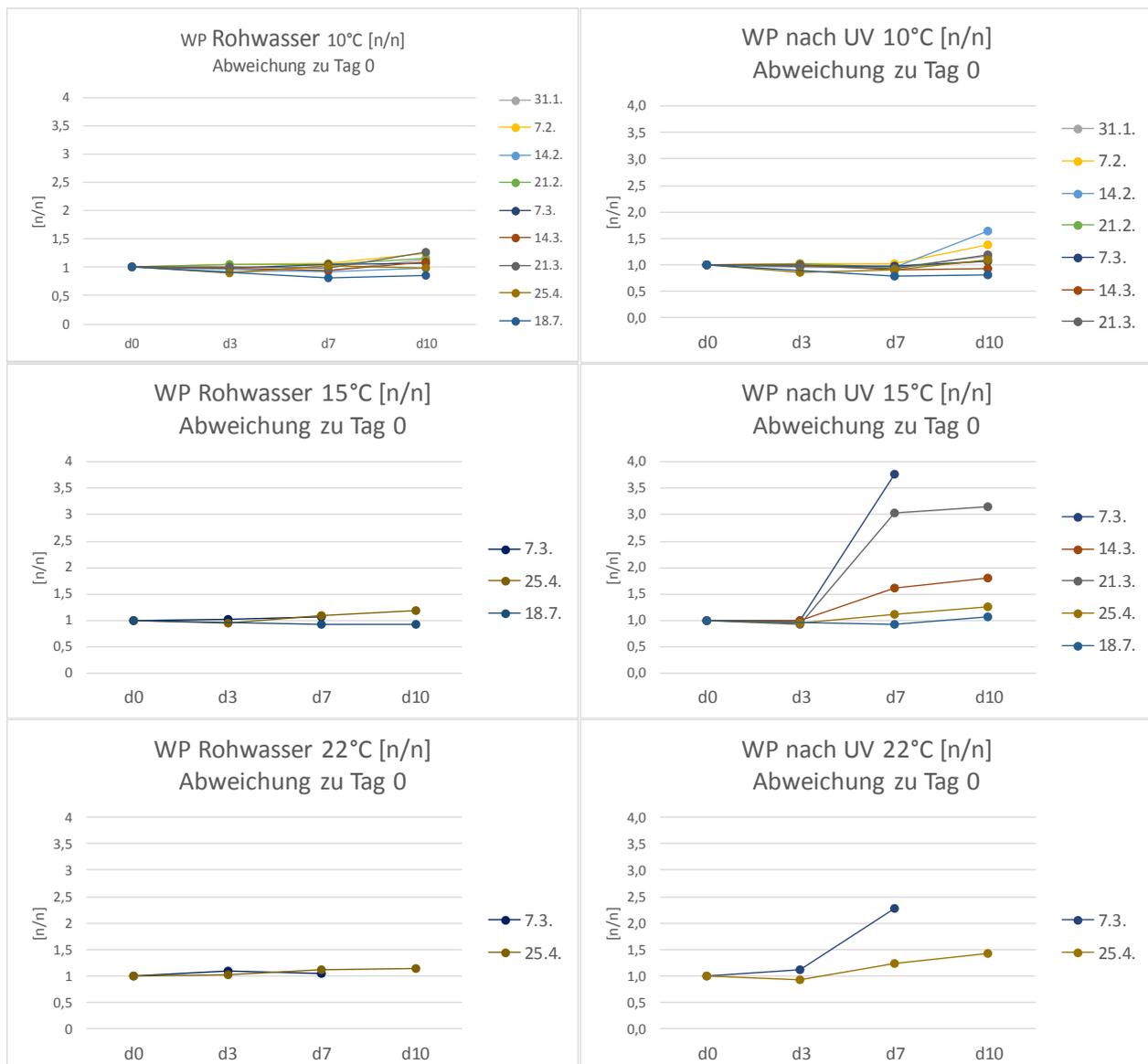


Abbildung 25: Ergebnisse der Wachstumspotentialmessungen Rohwasser und nach UV-Bestrahlung nach Inkubation über 10 Tage bei unterschiedlichen Temperaturen: 10, 15 und 22°C; Durchflusszytometrisch mit SG1PI gemessen; 1 stellt die Ausgangskonzentration dar = 100%, >1 = Wachstum, <1 = Rückgang der TCC

Der Standversuch des Rohwassers zeigt, dass dieses grundsätzlich stabil ist, ein geringes Wachstum der Zellen ist nach dem 7. Tag erkennbar. Dasselbe gilt für UV behandeltes RW bei 10°C Lagerung, wobei die Erhöhung der TCC zwischen Tag 7 und 10 stärker ausfällt. Eine Erhöhung der Lagerungstemperaturen geht mit einer größeren Zunahme der gesamten Zellenzahl einher. Was ermöglicht den Bakterien nach der UV-Desinfektion ein stärkeres Wachstum im Vergleich zu den Bakterien im RW? Hier ist zu überlegen welche Unterschiede die 2 Proben aufweisen. Das RW enthält eine bestimmte Bakteriengemeinschaft und Nährstoffe. Nach der UV-Desinfektion wird ein Teil der Bakterien inaktiviert und es kann teilweise zur Spaltung von organischen Kohlenstoffmolekülen kommen. Es entstehen kleinere organische Moleküle, die von den Bakterien besser verwertet werden können. Manche Bakterien besitzen die Fähigkeit sich nach erfolgter UV-Behandlung durch unterschiedliche Reparaturmechanismen zu regenerieren. Dieses Zusammenspiel (Regeneration der Bakterien nach mehreren Tagen Lagerung und bessere Verfügbarkeit von Nährstoffen) könnte die Ursache des stärkeren Wachstums von Bakterien in der UV behandelten Probe nach 7 Tagen Lagerung bei 10 °C bzw. bereits nach 3 Tagen bei 15 und 22 °C sein.

Wie im Methodenteil bereits erwähnt wurde, wurde ab 3.7. die Probenahme verändert. Die Probenflaschen für das WP (100 ml Glasflaschen) wurden ab diesem Tag direkt bei der Probenahmestelle steril befüllt und dann gekühlt in das Labor gebracht, wo sie sofort in die Kühlschränke gestellt wurden. Davor wurden große Glasgebinde befüllt und erst im Labor in die 100 ml Glasflaschen umgefüllt. Mit der neuen Probenahme wurde das Risiko im Labor beim Umfüllen Keime einzubringen eliminiert. Um zu kontrollieren ob diese Umstellung einen Unterschied ausmachte wurden die Standardabweichungen von RW und nUV von Tag 3 vor und ab dem 3.7. verglichen, wobei eine niedrigere Standardabweichung nach der Umstellung die Änderungen bei der Probenahme positiv bestätigte. Die Standardabweichungen bei RW waren ab dem 3.7. um 33 Prozent und bei nUV um 14 Prozent niedriger als davor.

In Abbildung 26 sind die WP Versuche von Proben nach UV + nach ClO₂ Zugabe, den Netzstellen und von Hochbehälter Zulauf und Ablauf dargestellt.

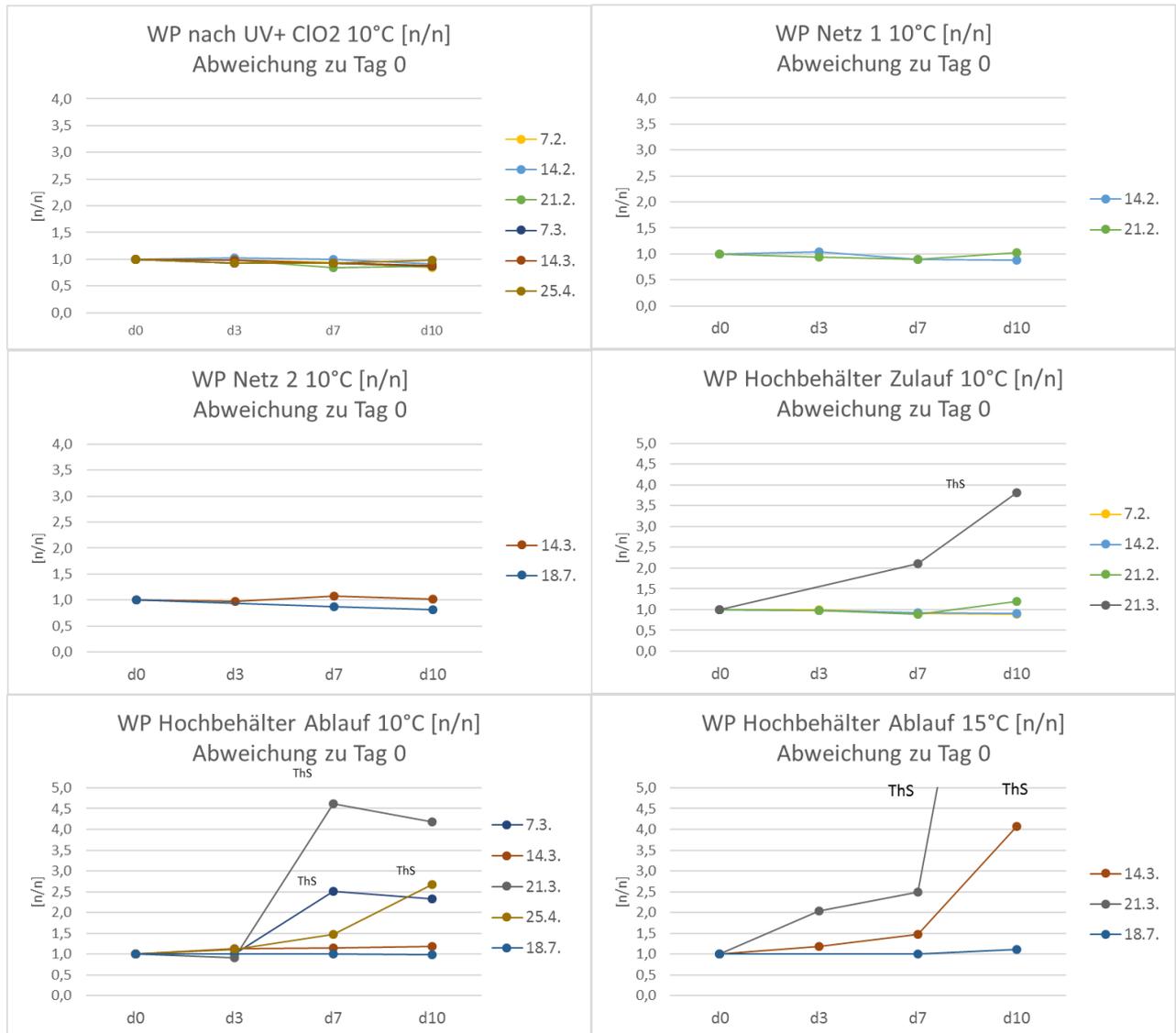


Abbildung 26: Ergebnisse der Wachstumspotentialmessungen in Proben gezogen nach UV und zusätzlicher ClO₂ Behandlung, 2 verschiedene Netzstellen, Hochbehälter Zulauf und Ablauf über 10 Tage bei 10°C bzw. 15 °C; Durchflusszytometrisch mit SG1 gemessen; 1 stellt die Ausgangskonzentration dar = 100%, >1 = Wachstum, <1 = Rückgang der TCC

Im Wasser, das durch UV-Bestrahlung und zusätzliche ClO₂ Desinfektion behandelt wurde, kann im Standversuch von 10 Tagen kein Wachstum festgestellt werden, im Gegenteil, es findet ein leichter Rückgang der TCC, bei ohnehin schon geringer Ausgangszellzahl, statt. Der Grund für diesen Rückgang könnte die verbleibende Restchlordioxidkonzentration in den Proben sein.

Die Ergebnisse des Standversuchs der Netzstellen zeigten ein ähnliches Bild, wie bereits erwähnt, die 1. Netzstelle befindet sich direkt nach der ClO₂ Zugabe.

Beim WP Versuch der Proben vom Zulauf und Ablauf des Hochbehälters wurde eine interessante Beobachtung gemacht. Vereinzelt wurde bei den Proben Thiosulfat zugegeben, um eventuelle Restchlordioxidkonzentrationen zu binden damit diese das Wachstum nicht beeinflussen können. Aber durch Zugabe von Thiosulfat kam es spätestens nach dem 3. Tag der Lagerung zu einem großen Anstieg der TCC. Wahrscheinlich sind in den Wasserproben Bakterien vorhanden, die Thiosulfat als Nahrungsquelle nutzen und sich somit rapide vermehren können. Ohne Zugabe von Thiosulfat kam es zu keinem Wachstum, das Wasser kann daher als stabil eingestuft werden.

T-Test

Durch die Anwendung des T-Tests kann bestimmt werden ob das Wachstum signifikant ist. Der T-Test zeigt in einem bestimmten Signifikanzniveau (5%) durch Einbeziehen des Mittelwerts, der Standardabweichung und Stichprobengröße ob eine aufgestellte Nullhypothese (H0) abgelehnt werden kann (In dieser Arbeit: H0 = Es kommt zu keinem signifikanten Wachstum). Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse, wobei die TCC jeder Probenahmestelle nach 7 und 10 Tagen jeweils mit Tag 0 verglichen wurde.

Tabelle 5 gibt einen guten Überblick der gesamten DFZ WP Versuche.

Tabelle 5: T-Test zur Bestimmung von signifikantem Wachstum: Vergleich der TCC von Tag 7 und Tag 10 mit Tag 0; x=signifikantes Wachstum; o=Wachstum, aber nicht signifikant; ↓=Rückgang der TCC; (ThS)=Zugabe von 16g/l Natriumthiosulfat

		Wachstumspotential: T-Test: Signifikantes Wachstum?											
Tage Lagerung		10.1.	24.1.	31.1.	7.2.	14.2.	21.2.	7.3.	14.3.	21.3.	25.4.	18.7.	
d7	RW 10°C	o	x	↓	x	↓	x	↓	↓	↓	o	↓	
d10	RW 10°C	x	x	x	x	↓	x	x	x	x	↓	↓	
d7	RW 15°C										x	↓	
d10	RW 15°C										x	↓	
d7	nUV 10°C			↓	o	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
d10	nUV 10°C			x	x	x	x	x	↓	x	x	↓	
d7	nUV 15°C								x	x	x	o	
d10	nUV 15°C								x	x	x	↓	
d7	nUV+ClO2 10°C				↓	↓	↓	↓	↓		↓		
d10	nUV+ClO2 10°C				↓	↓	↓	↓	↓		↓		
d7	Netz 1 10°C					↓	↓						
d10	Netz 1 10°C					↓	o						
d7	Netz 2 10°C								x			↓	
d10	Netz 2 10°C								x			↓	
d7	Hb Zulauf 10°C				↓	↓	↓			x (ThS)			
d10	Hb Zulauf 10°C				↓	↓	x			x (ThS)			
d7	Hb Ablauf 10°C							x (ThS)	x	x (ThS)	x (ThS)	o	
d10	Hb Ablauf 10°C							x (ThS)	x	o (ThS)	x (ThS)	↓	
d7	Hb Ablauf 15°C								x (ThS)	x (ThS)		x	
d10	Hb Ablauf 15°C								x (ThS)	x (ThS)		x	

Bei RW und nUV ist ersichtlich, dass nach 7 Tagen Lagerung bei 10°C meist eine Verringerung der TCC, oder kein signifikantes Wachstum messbar ist. Aber nach 10 Tagen kommt es meist zu einem signifikanten Wachstum. Die nUV Proben nach Lagerung bei 15°C verdeutlichen den Einfluss höherer Temperaturen für das Wachstum von Bakterien, signifikantes Wachstum ist bereits nach 7 Tagen Lagerung messbar. Durch Zugabe von ClO₂ ist wie bereits erwähnt ein Rückgang der TCC sowohl nach 7 Tagen als auch nach 10 Tagen detektierbar. Auch bei der Netzstelle 1 ist entweder ein Rückgang der TCC oder kein signifikantes Wachstum feststellbar, wie schon angeführt ist diese Stelle in der Nähe der Desinfektionsstelle. Durch Zugabe von ThS ist immer Wachstum feststellbar, wobei die Lagerung der Hochbehälter Ablauf Proben auch ohne Zugabe von ThS, bis auf die 10°C Probe am 18.7., signifikantes Wachstum zeigt. Des Weiteren fällt auf, dass die Proben vom 18.7. stabil sind, nur bei den Hb Ablauf Proben wurde bei 15°C Lagerung signifikantes Wachstum festgestellt.

5.1.3.2 Kultivierungsabhängiges Wachstumspotential

Die Kultivierung erfolgte auf Hefeextraktagar bei 22 und 37 °C und auf R2A Agar bei 27 °C bei unterschiedlicher Inkubationsdauer. Im Folgenden sind die Wachstumspotentiale der Proben auf R2A Agar abgebildet und beschrieben, da bei vorhandenem Wachstum dies am besten auf R2A Agar ersichtlich war.

Sowohl beim RW als auch nach der UV-Desinfektion (siehe Abbildung 27) konnte in fast allen Standversuchen ein Wachstum nach 7 Tagen Lagerung der Proben bei 10 °C festgestellt werden.

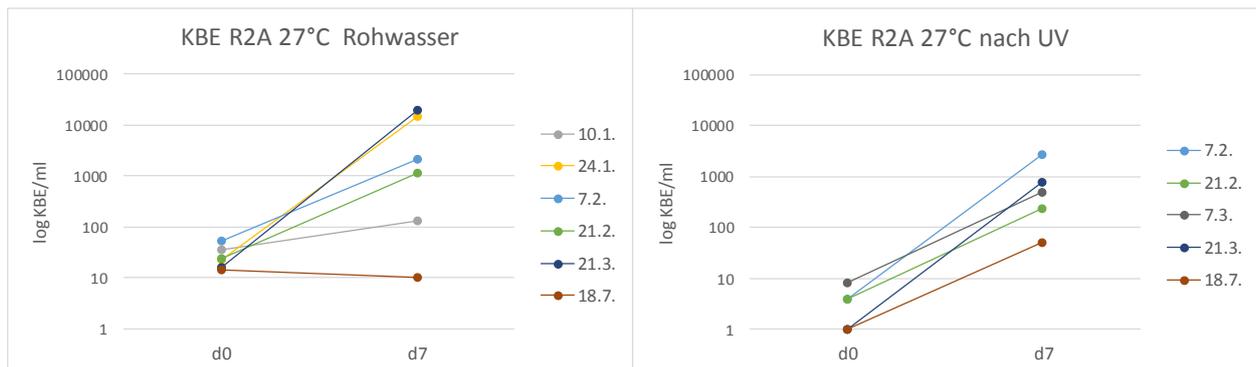


Abbildung 27: Ergebnisse der Wachstumspotentialmessungen in Proben von Rohwasser und nach UV-Desinfektion auf R2A Agar bei 27°C für 7 Tage inkubiert; das Gießen der Platten fand am Probenahmetag und nach 7 Tage Standzeit des Wassers bei 10°C statt; das Ergebnis wird in KBE/ml Probe angegeben, hier logarithmisch dargestellt

Bei der Messung des Wachstumspotentials mittels DFZ waren die TCC Werte bis Tag 7 von RW und nUV aber durchwegs konstant (siehe Abbildung 25). Jetzt stellt sich die Frage warum bei der Kultivierung ein deutlicher Anstieg der KBE/ml nach 7 Tagen Standzeit stattfindet. Eine Möglichkeit wäre eine Verschiebung der Zusammensetzung der Population durch die Lagerung, was durchflusszytometrisch in einer Änderung des HNA Anteils ersichtlich wäre. Der jeweilige Vergleich der HNA Anteile von RW und nUV von Tag 0 und Tag 7 zeigt aber keinen großen Unterschied (keine Abbildung). Das heißt die Zusammensetzung der Bakterienpopulation von Tag 0 zu Tag 7 hat sich in Hinblick auf HNA bzw. LNA Anteil nicht geändert.

Des Weiteren ist zu beachten, dass die Probe für die Bestimmung der KBE/ml aus eigenen Glasflaschen genommen wurde, nämlich aus 250 ml Flaschen die wie die 100 ml Flaschen bei 10°C gelagert wurden. Beim Vergleich der TCC (RW und nUV Proben) von den 100 ml und 250 ml Gebinden ist aber kein durchgehend erhöhter TCC bei den 250 ml Gebinden an Tag 7 erkennbar.

Der Grund für die bessere Kultivierbarkeit der Bakterien nach 7 Tagen Lagerung, obwohl die Anzahl der Bakterien laut TCC konstant bleibt, könnte auch im Phänomen VBNC zu finden sein. Wie in der Theorie schon erläutert wurde, ist meist nur ein geringer Teil der Wasserbakterien in der Lage Kolonien zu bilden. Am Tag der Probenahme war es also für einen geringen Anteil der Bakterien möglich Kolonien zu bilden. Augenscheinlich befanden sich aber nach der Standzeit von 7 Tagen bei 10 °C weniger Bakterien in diesem VBNC Zustand als am Tag der Probenahme (möglicherweise durch Anpassung an die Bedingungen, Nährstoffaufnahme aus dem Wasser, usw.) und hatten die Möglichkeit auf R2A zu wachsen.

Nach UV-Bestrahlung des Wassers und zusätzlicher ClO₂ Zugabe konnten keine Kolonien, weder auf HEA noch auf R2A, wachsen (Tag 0 und Tag 7), es gibt keine Abbildung dazu. Es wurden jeweils 1ml der Verdünnung 0 kultiviert.

Die Standversuche der Netzproben und der Ablaufproben des Hochbehälters (siehe Abbildung 28) zeigen im Allgemeinen keine größeren Veränderungen der KBE/ml nach 7 Tagen Lagerung bei 10 °C.

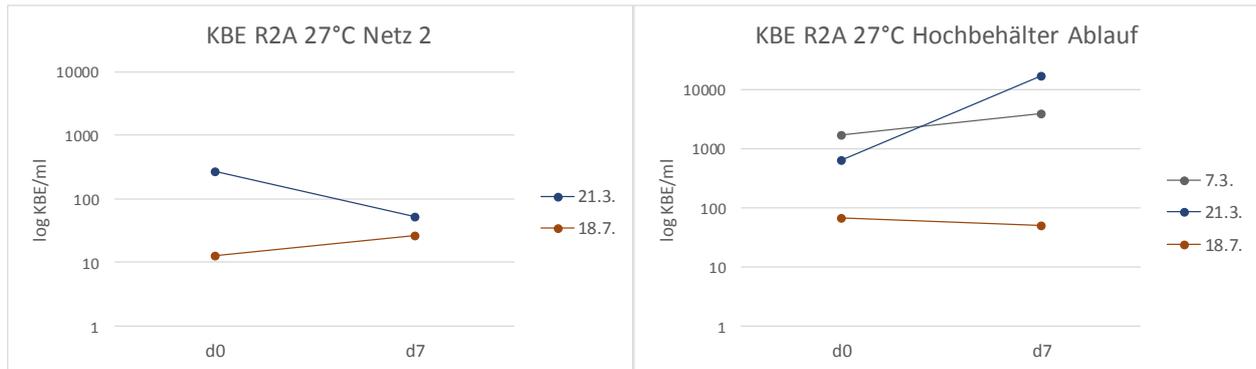


Abbildung 28: Ergebnisse der Wachstumspotentialmessungen in Proben von Netzstelle 2 und Hochbehälter Ablauf auf R2A Agar bei 27°C für 7 Tage inkubiert; das plattieren fand am Probenahmetag und nach 7 Tage Standzeit des Wassers bei 10°C statt; das Ergebnis wird in KBE/ml Probe angegeben, hier logarithmisch dargestellt

Nur bei der Probe vom Hochbehälter Ablauf konnte am 21.3. stärkeres Wachstum festgestellt werden. Diese Zunahme konnte auch durchflusszytometrisch gemessen werden, wobei bei den Proben der DFZ ThS zugegeben wurde und das wahrscheinlich der Grund für das starke Wachstum ist. Bei den Proben für die HPC wurde aber kein Thiosulfat zugegeben. Da die Erhöhung der TCC vom 21.3. im Vergleich zu den anderen Probenahmen sehr hoch ausfällt (46% mehr Bakterien am 7. Tag im Vergleich zu Tag 0), ist es wahrscheinlich und mit den Ergebnissen der HPC stimmig, dass es ohne Zugabe von ThS trotzdem zu einer Zunahme der TCC gekommen wäre, vermutlich aber etwas abgeschwächt.

T-Test

Tabelle 6 gibt einen Überblick der kulturellen WP Versuche.

Tabelle 6: T-Test zur Bestimmung von signifikantem Wachstum: Vergleich der gewachsenen Kolonien (KBE/ml) auf R2A Agar von Tag 7 mit Tag 0; x = signifikantes Wachstum; o = Wachstum, aber nicht signifikant; ↓ = Rückgang der TCC; - = kein Wachstum

Wachstumspotential kulturell: T-Test: Signifikantes Wachstum?							
	10.1.	24.1.	7.2.	21.2.	7.3.	21.3.	18.7.
RW 10°C	o	x	o	x		o	↓
nUV 10°C			x	x	x	x	o
nClO2 10°C			-	-			
Netz 2 10°C					↓		o
Hb Ablauf 10°C					x	x	↓

Die RW und nUV Proben weisen bis auf die letzte Probenahme beim kulturellen Wachstumspotential immer Wachstum auf. Mit Hilfe des T-Tests konnte dieses Wachstum bei 3 RW Proben als nicht signifikantes Wachstum eingeteilt werden, wobei bei den Wasserproben vom 7.2. und 21.3. nur 2 Platten auswertbar waren und dadurch der kritische Wert, der zum Vergleich mit dem T-Wert herangezogen wird, sehr hoch ist. Nach ClO₂ Zugabe kann nach 7 Tagen Lagerung bei 10°C kein Wachstum festgestellt werden und bei der Netz 2 Probe ist ein Rückgang der Zellen bzw. nicht signifikantes Wachstum beobachtbar. Die Hb Ablauf Probe weist, bis auf die Proben vom 18.7., signifikantes Wachstum auf. So wie beim durchflusszytometrischen WP ist nach Lagerung der Proben bei 10°C für 7 Tage bei den Proben vom 18.7. kein signifikantes Wachstum feststellbar. Dies bestätigt die Annahme, dass die Wasserproben an diesem Tag auffallend stabil waren.

Vergleich Wachstumspotential RW und nUV Proben DFZ und kulturell

Tabelle 7 zeigt die Proben in Prozent (RW und nUV) bei denen es nach 7 bzw. 10 Tagen nach Lagerung bei 10°C zu Wachstum kommt und wie viel davon signifikantes Wachstum ist.

Tabelle 7: Prozentueller Anteil von RW und nUV Proben beim Wachstumspotential Versuch, bei dem Wachstum auftrat und prozentueller Anteil davon signifikantes Wachstum

DFZ	Wachstum [%]	davon signifikantes Wachstum [%]	Kulturell	Wachstum [%]	davon signifikantes Wachstum [%]
RW			RW		
d7	46	40	d7	83	20
d10	73	100			
nUV			nUV		
d7	11	0	d7	100	80
d10	78	100			

Dies verdeutlicht wie schon in Kapitel 5.1.3.1 erwähnt, dass beim Wachstumspotential DFZ bei den nUV Proben bis Tag 7 zwar ein kleiner Anteil der Proben Wachstum zeigt (aber kein signifikantes Wachstum), aber erst zwischen Tag sieben und zehn in 78 Prozent der nUV Proben die Bakterien die Fähigkeit besitzen sich zu erholen und sich zu vermehren. Alle Proben mit Wachstum weisen signifikantes Wachstum auf. Dies unterstreicht die Annahme, dass manche Bakterien Reparaturmechanismen besitzen, die es ihnen nach ein paar Tagen nach der UV-Desinfektion ermöglicht sich zu regenerieren und sich wieder zu vermehren. Deswegen ist die zusätzliche ClO₂ Desinfektion in geringer Konzentration von Vorteil.

Der Vergleich von DFZ und kulturellem WP bestätigt wie in Kapitel 5.1.3.2 erwähnt, dass bei der kulturellen Methode bereits nach 7 Tagen ein hoher Prozentsatz der Proben zu Wachstum neigt. Der Unterschied bei den nUV Proben ist am deutlichsten: bei der Messung mit Hilfe des Durchflusszytometers nach 7 Tagen ist kein signifikantes Wachstum messbar, bei der kulturellen Methode kommt es aber bei 80% der Versuche zu einem signifikanten Wachstum. Hier wird, wie schon erwähnt, der VBNC Zustand der Bakterien als Grund vermutet. Am Tag der Probenahme sind viele Zellen durch die UV-Desinfektion geschwächt und können kulturell nicht nachgewiesen werden. Aber nach 7 Tagen Lagerung erholen sich einige davon (vielleicht auch teilweise aufgrund der Reparaturmechanismen) und können auf TSA wachsen.

5.2 Laboruntersuchungen

5.2.1 Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung

Wie in Kapitel 5.1.1.3 beschrieben, wird durch UV-Bestrahlung die Zellmembran nicht zerstört, trotzdem zeigen die durchflusszytometrischen Ergebnisse bei der Färbung mit SG1PI in DMSO gelöst eine Reduktion der ICC um zirka 50% des UV behandeltem Wasser gegenüber dem Rohwasser. Der Grund könnte die Zerstörung der Zellmembran durch DMSO sein. Außerdem zeigt eine Studie von Nescerecka et al., 2016a, dass, wie in Abbildung 29 dargestellt ist, DMSO als Verdünnungsmittel für PI ab einer Inkubationsdauer von 6 Minuten bei 37 °C zunehmend unerwünschte Zellschäden verursacht (Nescerecka et al., 2016a).

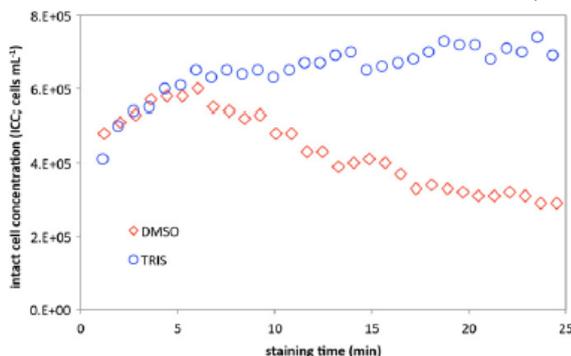


Abbildung 29: Der Einfluss von TRIS-Puffer (pH = 8,1) und DMSO als Lösungsmittel zur Herstellung von Farbstoff-Arbeitslösung auf die SGPI-Färbung. Flusswasserproben wurden 25 min bei 37 °C mit 3 µM PI in 10.000 x verdünnter SG (n = 30) angefärbt (Nescerecka et al., 2016a).

Nescerecka et al., 2016a vermuten, dass mit zunehmender Inkubationsdauer bei 37°C intakte Zellen durch DMSO zerstört werden und fälschlicherweise als „tote“ Zellen detektiert werden. In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob mit dem DFZ Protokoll (13 min Inkubation bei 37 °C und dann Messen) ein Unterschied zwischen DMSO und Tris Puffer als Lösungsmittel über die gesamte Messdauer von 2 h 50 min bei der Detektion von intakten Zellen erkennbar ist und ob die Verwendung von unterschiedlichen PI Konzentrationen in Tris Puffer gelöst Auswirkungen auf die Detektion von intakten Zellen hat. Nach 13 Minuten Inkubation beobachten Nescerecka et al., 2016a eine Verringerung der intakten Zellen von $6 \cdot 10^5$ auf $4 \cdot 10^5$, also um 33 Prozent. D. h. in dieser Arbeit sollten nach der Inkubationsdauer bei DMSO als Lösungsmittel weniger intakte Zellen detektiert werden als mit Tris Puffer. Es soll überprüft werden ob das so ist, wie sich die unterschiedlichen Lösungsmittel bei verschiedenen behandelten Wasserproben (unterschiedlich erhitzt und ClO₂ Behandlung) in der Messung der Zahl der intakten Zellen auswirken und wie sich diese im Verlauf der Messdauer entwickeln.

Dazu wurde der in DMSO gelöste Farbstoff mit der üblichen PI Konzentration von 4 µM (SG1PI_DMSO_4µM) hergestellt. Der Vergleich erfolgte mit SG1PI Farbstoffe bei denen PI in Tris Puffer gelöst wurde und unterschiedliche Konzentrationen PI (2, 4, 6, 8 und 12 µM) zur Herstellung verwendet wurden (SG1PI_Tris_2,4,6,8 + 12 µM). Nescerecka et al., 2016a empfehlen eine Konzentration zwischen 3 und 12 µM, dieser Konzentrationsbereich wurde im Experiment abgedeckt. Die Farbstoffe wurden durchflusszytometrisch zur Detektion der ICC im unbehandeltem Rohwasser, nach zwei verschiedenen Hitzebehandlungen (60 °C 5 min lang und 80 °C 10 min lang) und nach Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ verwendet.

Ziel war es die Einflussfaktoren PI Konzentration, verwendetes Lösungsmittel (DMSO oder Tris Puffer) und Messdauer (Messung bei Raumtemperatur) unter Beibehaltung des Protokolls (Inkubation bei 37°C für 13 min) vom SLMB, 2012 für den Farbstoff SG1PI von unbehandeltem und unterschiedlich behandeltem Rohwasser zu testen. Im Unterschied zum Versuch von Nescerecka et al.,2016a wurde die Inkubationszeit am Thermoshaker bei 37°C auf 13 Minuten festgelegt (im Mittel konstante Werte von SG1PI in Tris Puffer in Abbildung 29 erkennbar). Die Darstellung der ICCs erfolgt direkt nach der Inkubation über eine Messdauer von knapp 3 Stunden. Dies zeigt ob eine Detektion von konstanten ICC Werten über die Messdauer bei den unterschiedlichen PI Konzentrationen und verwendeten Lösungsmitteln möglich ist. Die Auswertung ist in Abbildung 30 bis Abbildung 33 zu sehen.

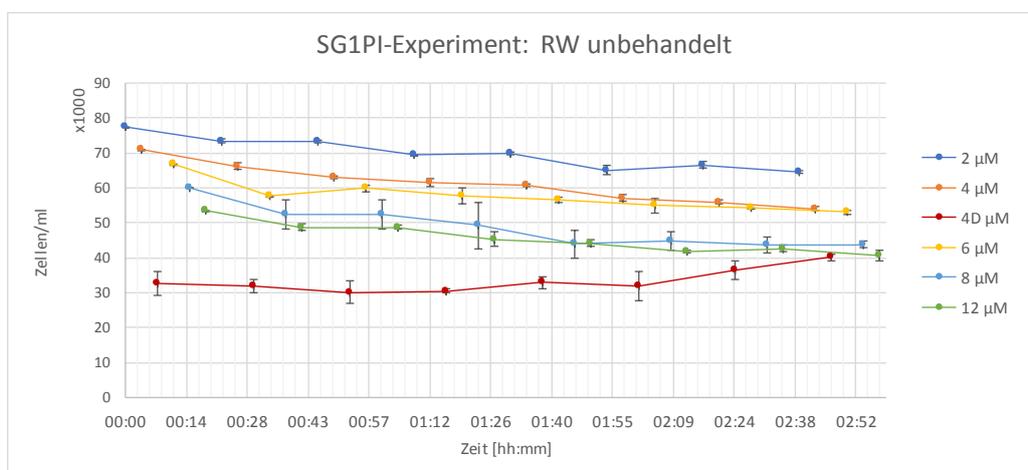


Abbildung 30: Ermittlung der Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung: unbehandeltes Rohwasser mit SG1PI_DMSO_4µM (4D µM) und SG1PI_Tris_2,4,6,8 + 12 µM gefärbt, 13 min bei 37°C am Thermoshaker temperiert und durchflusszytometrisch (n=2) zur Bestimmung der ICC gemessen

Bei der SG1PI_Tris Färbung wurden mit aufsteigender PI Konzentration bei der unbehandelten Probe weniger intakte Zellen detektiert, wobei bei allen Konzentrationen die ICCs über die Zeit jeweils im Mittel 22,4 % abnehmen. Die ICC-Werte der SG1PI_Tris_4 + 6 µM und die der

SG1PI_Tis_8 + 12 μM Färbung sind jeweils sehr ähnlich. Bei Verwendung von SG1PI_DMSO_4 μM wurden deutlich geringere ICCs gemessen (im Durchschnitt 24.000 Zellen/ml weniger als bei Verwendung von SG1PI_Tris_6 μM). Erst nach fast 3 Stunden Messung stieg die ICC der SG1PI_DMSO_4 μM Färbung an und erreichte eine ähnliche ICC wie die SG1PI_Tis_12 μM Färbung, wobei die Zunahme der ICC von Anfang bis Ende 22,8% beträgt. Der Unterschied zwischen den Färbungen mit SG1PI_DMSO_4 μM und SG1PI_Tris_4 μM nach 13 Minuten Inkubationszeit bei 37°C fällt höher aus als bei Nescerecka et al., 2016a. Die ICC der SG1PI_DMSO_4 μM Färbung ist bei der ersten Messung nach der Inkubation um 51% weniger als bei der SG1PI_Tris_4 μM Färbung. Im Bereich in dem konstante ICC Werte für SG1PI_Tris_4 μM erhalten werden (ca. nach 1,5 Stunden) beträgt der Unterschied zu SG1PI_DMSO_4 μM 36% was dem Ergebnis von Nescerecka et al., 2016a (33%) Nahe kommt.

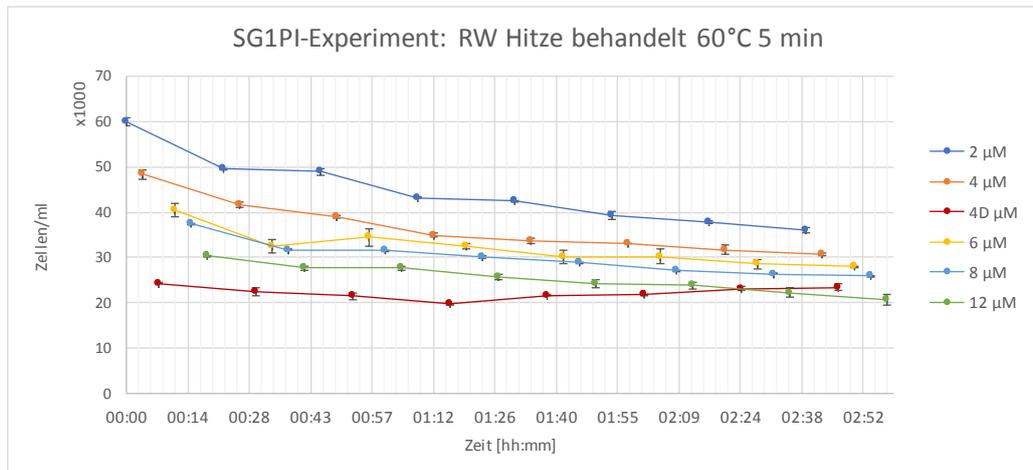


Abbildung 31: Ermittlung der Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung: 5 min bei 60 °C behandeltes Rohwasser mit SG1PI_DMSO_4 μM und SG1PI_Tris_2,4,6,8 + 12 μM gefärbt, 13 min bei 37°C am Thermoshaker temperiert und durchflusszytometrisch (n=2) zur Bestimmung der ICC gemessen

Nach einer thermischen Behandlung des Rohwassers für 5 Minuten bei 60 °C wurde bei allen verwendeten Farbstoffen ein Abfall der ICC in den Proben beobachtet. Durch die SG1PI_DMSO_4 μM Färbung konnten wieder mit Abstand die wenigsten intakten Zellen/ml Probe detektiert werden. Der Unterschied zur SG1PI_Tris_6 μM Färbung beträgt im Durchschnitt 10.000 Zellen/ml. Wieder fällt auf, dass sich zum Schluss die ICC der SG1PI_DMSO_4 μM Färbung der SG1PI_Tis_12 μM Färbung angleicht. Die ICC der SG1PI_DMSO_4 μM Färbung ist bei der ersten Messung nach der Inkubation um 46% weniger als bei der SG1PI_Tris_4 μM Färbung. Im Bereich in dem konstante ICC Werte für SG1PI_Tris_4 μM erhalten werden (ca. nach 1,5 Stunden) beträgt der Unterschied zu SG1PI_DMSO_4 μM 31%.

Nach einer zehn minütigen Behandlung bei 80 °C verbleiben im RW nur mehr wenige intakte Zellen. In Abbildung 32 ist erkennbar, dass die SG1PI_Tris_2 μM Färbung eine zu geringe PI Konzentration enthält, da erst nach 1,5 Stunden Messung relativ stabile Werte und auch ICCs, die den Werten von den anderen Farbstoffen näher kommen, nachgewiesen werden. Nescerecka et al., 2016a berichten, dass bei Verwendung von PI in niedrigen Konzentrationen die Verschiebung von den "intakten" zu den "geschädigten" Regionen eindeutig unvollständig ist (Nescerecka et al., 2016a). Es ist also zu wenig PI vorhanden, um alle membrangeschädigten Bakterien anzufärben.

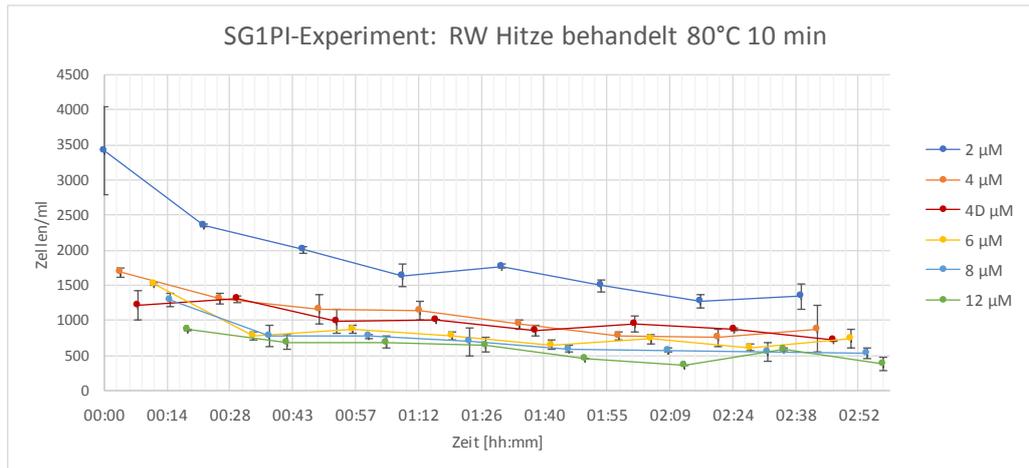


Abbildung 32: Ermittlung der Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung: 10 min bei 80 °C behandeltes Rohwasser mit SG1PI_DMSO_4µM und SG1PI_Trис_2,4,6,8 + 12 µM gefärbt, 13 min bei 37°C am Thermoshaker temperiert und durchflusszytometrisch (n=2) zur Bestimmung der ICC gemessen

Mit den SG1PI_Trис_6 +8 + 12 µM Färbungen wurden die geringsten ICC Werte gemessen. Außerdem ist in Abbildung 32 erkennbar, dass die ICC der SG1PI_Trис_4 µM Färbung und die der SG1PI_DMSO_4 µM Färbung am ähnlichsten sind. Sind die Zellen zum Beispiel durch starke Hitzebehandlung des Rohwassers stark geschädigt ist bei Verwendung derselben Konzentration PI wenig, bis kein Unterschied messbar. Die ICC der SG1PI_DMSO_4µM Färbung ist bei der ersten Messung nach der Inkubation um 32% weniger als bei der SG1PI_Trис_4 µM Färbung. Im Bereich in dem konstante ICC Werte für SG1PI_Trис_4 µM erhalten werden (ca. nach 1,5 Stunden) kann bei der SG1PI_DMSO_4µM Färbung um 10% mehr intakte Zellen detektiert werden. Was wiederum die Annahme unterstreicht, dass bei fast vollständiger Zerstörung der Zellen das verwendete Lösungsmittel keinen Einfluss mehr nimmt.

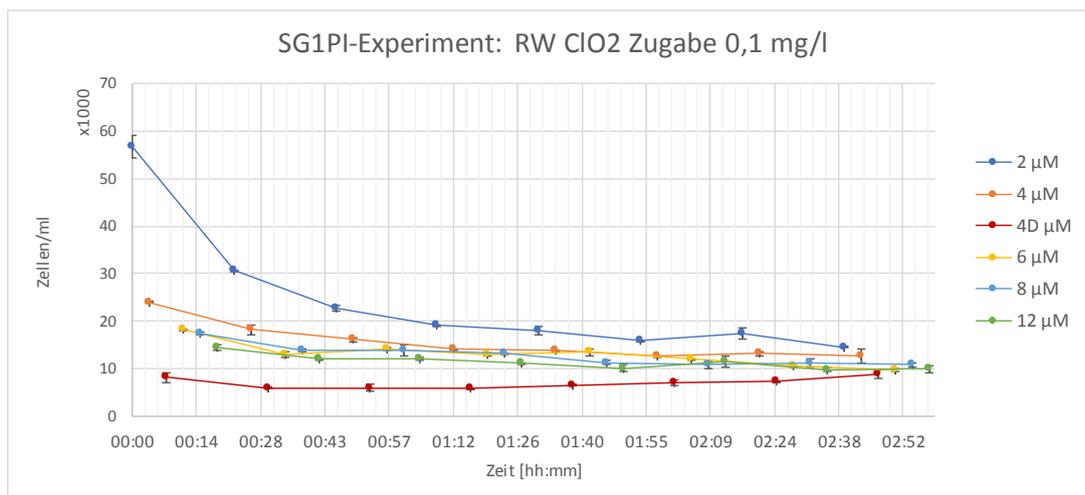


Abbildung 33: Ermittlung der Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung: 0,1 mg/l ClO₂ behandeltes Rohwasser mit SG1PI_DMSO_4µM und SG1PI_Trис_2,4,6,8 + 12 µM gefärbt, 13 min bei 37°C am Thermoshaker temperiert und durchflusszytometrisch (n=2) zur Bestimmung der ICC gemessen

Abbildung 33 zeigt den zeitlichen Verlauf und Vergleich von Rohwasser das mit 0,1 mg/l ClO₂ behandelt, dann mit den verschiedenen Färbelösungen inkubiert und durchflusszytometrisch gemessen wurde. Die Detektion von geringeren ICC Werten bei DMSO als Lösungsmittel und die Notwendigkeit einer PI Konzentration von mindestens 4 µM ist wieder gut erkennbar. Durch Tris Puffer als Lösungsmittel (Vergleich von SG1PI_DMSO_4µM und SG1PI_Trис_6µM) können im

Mittel 5.500 ICCs mehr detektiert werden. Die ICC der SG1PI_DMSO_4µM Färbung ist bei der ersten Messung nach der Inkubation um 60% weniger als bei der SG1PI_Trис_4 µM Färbung. Im Bereich in dem konstante ICC Werte für SG1PI_Trис_4 µM erhalten werden (ca. nach 1,5 Stunden) beträgt der Unterschied zu SG1PI_DMSO_4µM 68%. Nach Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ ist also der Unterschied von den 2 Lösungsmitteln im gesamten Messverlauf sehr hoch.

Die ICCs der SG1PI_Trис_6 +8 + 12 µM Färbungen sind im gesamten zeitlichen Verlauf der Messung am ähnlichsten. Bei der SG1PI_Trис_4 µM Färbung werden erst nach über einer Stunde Messung konstante und ähnliche ICCs wie bei den SG1PI_Trис_6 +8 + 12 µM Färbungen detektiert. Daher müsste eine längere Inkubation erfolgen, um ab Beginn der Messung adäquate und konstante ICCs nachweisen zu können.

Dieses Experiment stützt die Annahme von Nescerecka et al., 2016a, dass durch Verwendung von DMSO als Lösungsmittel nach einer Inkubation von 13 Minuten bei 37°C deutlich weniger intakte Zellen detektiert werden als mit Trис Puffer. Dies verdeutlicht den kritischen Einfluss, den ein Farbstofflösungsmittel auf das Ergebnis eines Lebensfähigkeitstests haben kann.

Die optimale PI-Konzentration muss eine vollständige Färbung geschädigter Zellen gewährleisten, ohne falsche PI-positive Ergebnisse zu verursachen (Färbung intakter Zellen) (Nescerecka et al., 2016a). Ab einer Konzentration von 12 µM PI erhöht sich, wie in Abbildung 32 ersichtlich ist, das Risiko für falsch positive Ergebnisse.

Die Membranen der Zellen in der stark thermisch behandelten Probe (10 min, 80°C) waren definitiv beschädigt, aber mit 2 µM PI konnten die „toten“ Zellen unzureichend angefärbt werden. Dazu schreiben Nescerecka et al., 2016a, dass ausreichend PI in Lösung vorhanden sein muss, um eine maximale Interkalation mit der gesamten Ziel-DNA geschädigter Zellen zusammen mit SG 1 zu erreichen. Letzteres gewährleistet einen vollständigen Energietransfer von SG 1 zu PI (bekannt als Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) oder "Quenching"), der für eine kritische Verschiebung der PI-Signalintensität und damit für die Fähigkeit zur Differenzierung zwischen SG 1 - positiven und PI-markierten Zellen verantwortlich ist (Nescerecka et al., 2016a).

Aufgrund der Ergebnisse wird eine Konzentration von 4 bis 6 µM PI in Trис Puffer gelöst vorgeschlagen, beide Konzentrationen erzielen bei allen 4 Proben über die getestete Zeit stabile und plausible Werte. Da in der Arbeit von Nescerecka et al., 2016a 6 µM PI in Trис Puffer gelöst als optimale Konzentration vorgeschlagen wird und das mit den Ergebnissen dieser Arbeit gut übereinstimmt, wird im ClO₂ Experiment mit der SG1PI_Trис_6 µM Färbung weitergearbeitet.

Eine weitere Beobachtung bei allen Proben und allen PI Konzentrationen in Trис Puffer gelöst ist, dass in den ersten 30 Minuten der durchflusszytometrischen Messung die ICC höher ist als im weiteren zeitlichen Verlauf. Erst danach werden konstante ICC Werte gemessen. Das zeigt, dass die Inkubationsdauer von 13 Minuten nicht ausreicht, um alle permeabilisierten Zellen mit PI anzufärben. Dies stellt bei den weiteren Experimenten kein Problem dar, da die SG1PI Färbung immer nach der SG1 Färbung auf der Well Platte angereicht wird.

Folgendes Protokoll für die SG1PI Färbung wurde nach diesem Versuch für die weiteren Experimente weitergeführt:

- 6 µM PI in Trис in 10.000 x SG1 gelöst zur Anfärbung der intakten und geschädigten Zellen
- Inkubation im Dunkeln: 13 Minuten bei 37°C am Thermoshaker
- Reihenfolge auf der Well Platte: zuerst die Gesamtzellzahl (TCC) (SG1) – Färbung und dann die intakte Zellzahl (ICC) (SG1PI) – Färbung

5.2.2 Bestimmung der Desinfektionswirkung von ClO₂

Um die Desinfektionswirkung mittels *E. faecium* zu demonstrieren, wurde dieser in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) und Rohwasser (0,1 µm filtriert) verdünnt und mit unterschiedlichen Konzentrationen ClO₂ behandelt (0=unbehandelte Probe; 0,1; 0,2; und 0,4 mg/ml). Zusätzlich wurde jeweils eine Probe erhitzt. Alle Proben wurden bei 10°C für 30 min inkubiert, danach wurde die ClO₂ Wirkung mit ThS (18 mg/l) aufgehoben. Die Detektion der intakten Zellen (ICC) erfolgte mit einem kombinierten Farbstoff SG1PI in Tris Puffer sowie in DMSO gelöst, um einen weiteren Vergleich von Tris Puffer und DMSO als Lösungsmittel für SG1PI zu erhalten. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (TCC) erfolgte mit Hilfe von SG1. Außerdem wurden die lebenden Zellen mit CFDA und der ATP Methode nachgewiesen.

5.2.2.1 Ergebnisse der DFZ

Kombination SG1 und PI

Wie schon an anderen Stellen dieser Arbeit beschrieben, ist es möglich mit der Farbstoffkombination SYBR Green 1 und Propidiumiodid lebende Zellen durchflusszytometrisch zu detektieren.

Die intakten Zellen wurden bei der Auswertung als Prozent von der Gesamtzellzahl (TCC) dargestellt, d. h. die jeweiligen Datenpunkte stellen den Anteil der ICC in % ausgehend von der TCC (=100%) dar. Die TCC Werte verändern sich mit zunehmender ClO₂ Konzentration und nach Hitzebehandlung nicht und können daher als Ausgangswert herangezogen werden.

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung von *E. faecium* in NaCl verdünnt (10⁻³ Verdünnung) mit SG1PI gefärbt dargestellt.

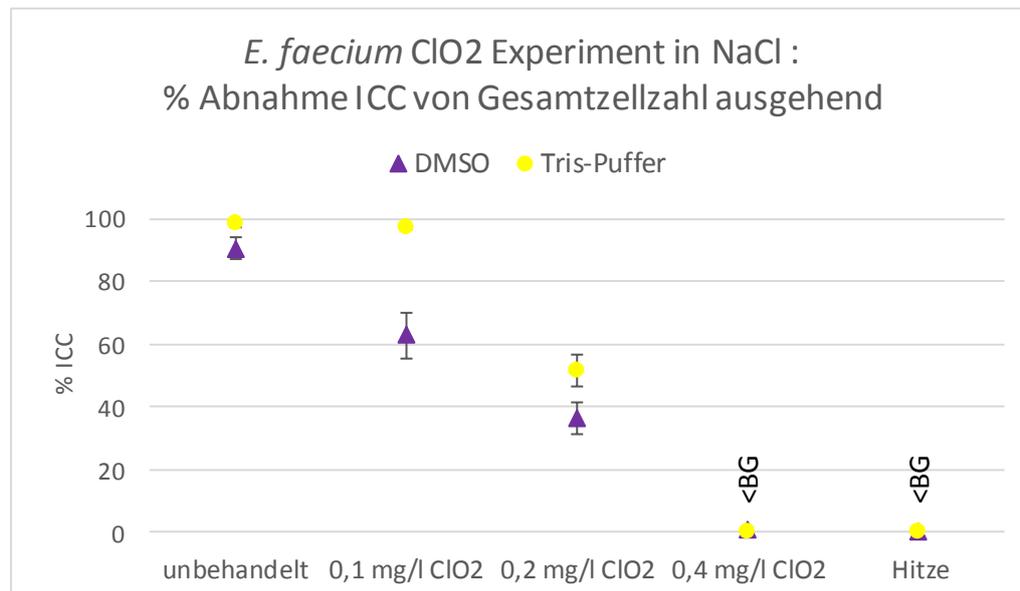


Abbildung 34: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* verdünnt in NaCl, die jeweiligen Datenpunkte stellen die ICCs (SG1PI Färbung) in Prozent ausgehend von der TCC (SG1 Färbung) dar

In Abbildung 34 ist ein deutlicher Unterschied zwischen der SG1PI_DMSO und der SG1PI_Triss Färbung erkennbar. Wie schon im vorangegangenen Experiment („Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung“) und in der Arbeit von Nescerecka et al., 2016a beschrieben, wird mit DMSO meist weniger ICC detektiert als mit Tris Puffer als Lösungsmittel für SG1PI. Bei der unbehandelten Probe werden mit der SG1PI_Triss Färbung 9% mehr intakte Zellen gemessen als mit der SG1PI_DMSO Färbung. Bei einer ClO₂ Konzentration von 0,1 mg/l ist der Unterschied am größten. Die SG1/PI_Triss gefärbten Proben beinhalten 97% und die SG1PI_DMSO gefärbten Proben 63% intakte Zellen, das ist also ein Unterschied von 34%. Bei einer Konzentration von

0,2 mg/l ClO₂ wird der Unterschied wieder kleiner (16%) und bei einer Konzentration von 0,4 mg/l ClO₂ und bei den thermisch behandelten Proben gibt es nur einen geringen Unterschied, da nur mehr wenige intakte Zellen (0,4 mg/l ClO₂ und Hitzebehandlung < BG) vorhanden sind. Dies bestätigt grundsätzlich die Ergebnisse vom vorhergehenden Experiment, bei dem ebenso mit zunehmender Schädigung der Unterschied zwischen Tris Puffer und DMSO als Lösungsmittel für SG1PI geringer wird.

Die Tris Kurve zeigt, dass bei der unbehandelten Probe fast alle Zellen (99%) intakt sind, eine Behandlung mit 0,1 mg/l ClO₂ permeabilisiert im Mittel 2% der Zellen und bei einer ClO₂ Konzentration von 0,2 mg/l sind ca. noch die Hälfte der Zellen intakt (52%). Bei einer Zugabe von 0,4 mg/l ClO₂ sowie bei der thermisch behandelten Probe sind fast alle Membranen permeabilisiert.

Die DMSO Werte zeigen mit zunehmender ClO₂ Konzentration einen linearen Abfall der intakten Zellen, was eine schöne Desinfektionsgerade ergibt, dies würde für DMSO als Lösungsmittel für die Färbung sprechen. Bei den Tris Puffer Werten ist der lineare Abfall erst ab einer Konzentration von 0,2 mg/l ClO₂ ersichtlich. *E. faecium* ist im Vergleich zu anderen Bakterien (z.B. *E. coli*) resistenter gegenüber ClO₂ (der ct-Wert von *E. faecium* ist fast 3 Mal so hoch wie von *E. coli*). Dies könnte der Grund sein warum eine signifikante Reduktion der Bakterien erst ab einer Zugabe von 0,2 mg/l ClO₂ möglich ist.

Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der SG1PI Färbung von *E. faecium* in Rohwasser verdünnt (10⁻³ Verdünnung).

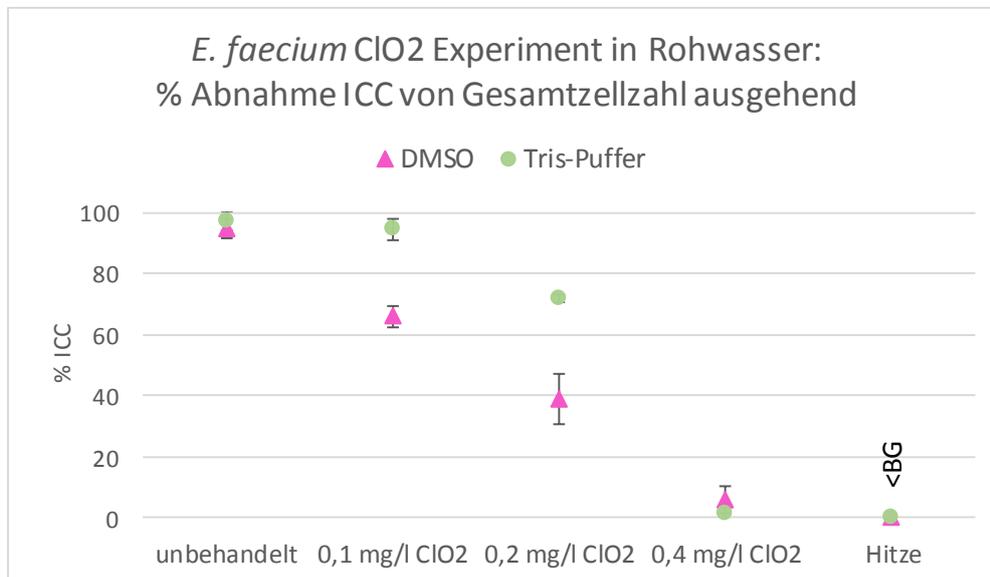


Abbildung 35: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* verdünnt in Rohwasser, die jeweiligen Datenpunkte stellen die ICCs (SG1PI Färbung) in Prozent ausgehend von der TCC (SG1 Färbung) dar

Bei diesen Versuchen ist wieder ein großer Unterschied zwischen den beiden Lösungsmitteln erkennbar. Bei den unbehandelten Proben ist der Unterschied minimal (3%) und bei den Proben die mit 0,1 und 0,2 mg/l ClO₂ behandelt wurden sind die Unterschiede am größten (28% und 32%). Bei den thermisch behandelten Proben wurden mit beiden Färbeprotokollen keine intakten Zellen detektiert. Die 0,4 mg/l ClO₂ behandelten Proben zeigen einen kleinen Unterschied, hier wurden mit dem DMSO Färbeprotokoll im Mittel geringfügig mehr intakte Zellen detektiert. Wobei bei dieser ClO₂ Konzentration nur mehr wenige intakte Zellen übrig sind. Im Experiment „Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung“ wurde bereits erwähnt, dass bei sehr stark geschädigten Zellen die Art des Lösungsmittels keine Rolle spielt.

Bei Verwendung der SG1PI_Trис Färbung wurden bei den unbehandelten Proben 97% intakte Zellen detektiert. Die Behandlung mit 0,1 mg/l ClO₂ zeigte eine kleine Verringerung der intakten

Zellen auf 94%, 0,2 mg/l ClO₂ bewirken einen Rückgang der intakten Zellen auf 72% und erst die Behandlung mit 0,4 mg/l ClO₂ erzeugt einen starken Rückgang der intakten Zellen auf 1%. In den thermisch behandelten Proben konnten keine intakten Zellen gemessen werden.

Wieder zeigt die SG1PI_DMSO Färbung eine lineare Reduktion der intakten Zellen mit steigender ClO₂ Konzentration, was im ersten Blick plausibel erscheint. Durch Zugabe von 0,1 und 0,2 mg/l ClO₂ bei RW als Verdünnungsmittel kann mit der SG1PI_Trīs Färbung nur eine geringe Reduktion der ICC festgestellt werden. Dies könnte aber wie bei Abbildung 34 (NaCl verdünnte *E. faecium* bereits beschrieben) mit dem hohen ct-Wert von *E. faecium* (hoher ct-Wert = höhere Resistenz gegenüber dem Desinfektionsmittel) zusammenhängen.

Abbildung 36 zeigt den Vergleich der Desinfektionswirkung von behandelten *E. faecium* in NaCl und in RW, also Abbildung 34 und Abbildung 35 in einem Diagramm. Hier soll eine Gegenüberstellung der Desinfektionswirkung von *E. faecium* in Rohwasser und in NaCl verdünnt erfolgen.

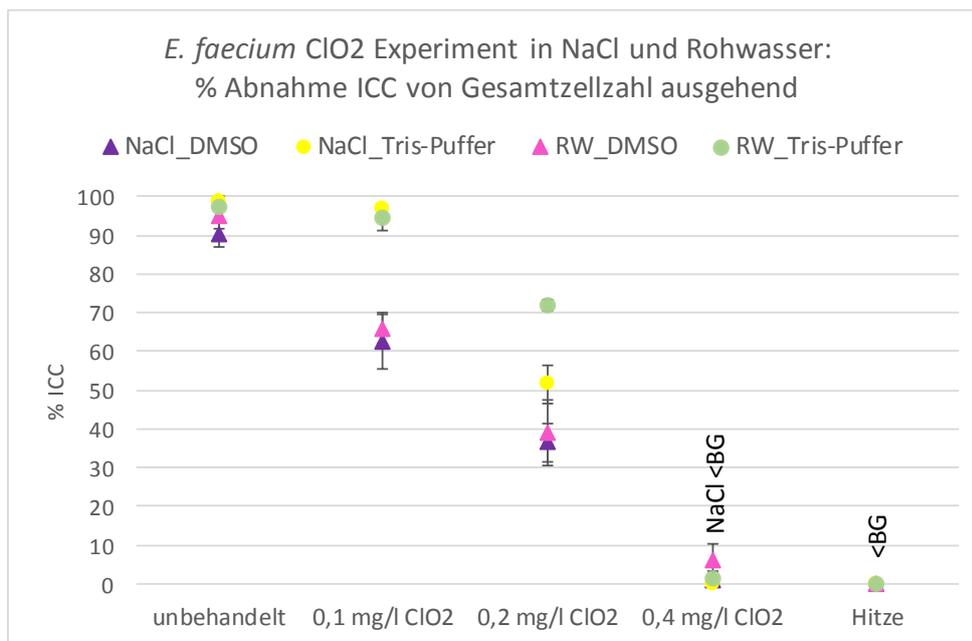


Abbildung 36: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* verdünnt in NaCl und in Rohwasser, die jeweiligen Datenpunkte stellen die ICCs (SG1PI Färbung) in Prozent ausgehend von der TCC (SG1 Färbung) dar

Zuerst werden die Proben, die mit SG1PI_DMSO gefärbt wurden (rosa = RW, lila = NaCl als Verdünnungsmittel), miteinander verglichen, wobei sich diese sehr ähnlich sind. Die in RW verdünnten *E. faecium* weisen bei jeder ClO₂ Behandlung einen geringfügig höheren Anteil an intakten Zellen auf, ein möglicher Grund dafür wird im nächsten Absatz erklärt. Bei den thermisch behandelten Proben konnten in RW und in NaCl nur wenige intakte Zellen (<BG) detektiert werden.

Beim Vergleich der Desinfektionskurven der Proben, die mit SG1PI_Trīs gefärbt wurden (grün = RW, gelb = NaCl als Verdünnungsmittel) fällt auf, dass nach Behandlung mit 0,2 mg/l ClO₂ *E. faecium* in RW verdünnt deutlich mehr intakte Zellen aufweist. Die Bakterien, die im RW verdünnt wurden, scheinen gegenüber der Desinfektion resistenter zu sein, als diejenigen die in NaCl verdünnt wurden. Der Unterschied liegt bei 20%. Dies ist bereits beim Vergleich der SG1PI_DMSO gefärbten Proben aufgefallen, wobei der Unterschied bei allen ClO₂ Behandlungen auftrat und dieser gering ausfiel (im Durchschnitt 4%). Nocker et. al., 2017 berichten über die erhöhte Resistenz von autochthonen Bakteriengemeinschaften in Trinkwasser gegenüber der Desinfektion im Vergleich zu einzelnen Stämmen. Hier wird die

Vielfalt der in echten Gewässern enthaltenen Bakterienflora als Grund für die höhere Chlorresistenz genannt (Nocker et al., 2017). Dies konkret kann hier nicht der Grund sein, weil ein einzelner Stamm behandelt und gemessen wurde. *E. faecium* wurde aber vor der Behandlung in 0,1 µm filtriertem RW (die ursprüngliche Bakterienflora wurde entfernt) verdünnt, vielleicht lassen die im RW vorhandenen Nährstoffe usw. (also diese spezielle Matrix) *E. faecium* hartnäckiger gegenüber ClO₂ werden.

ct-Wert

Nach Zugabe von 0,4 mg/l ClO₂ und 30-minütiger Einwirkzeit bei 10 °C kommt es zur Reduktion von *E. faecium* in RW verdünnt um 99% und in NaCl verdünnt um 99,9%. Die Werte der SG1PI_Trīs_6 µM Färbung wurden herangezogen. Mit Hilfe der Restchlordioxid Konzentration (Bestimmung durch Amaranthmethode, Seite 50) kann der ct-Wert berechnet werden: $ct_{99} = \bar{c} * t_{99\%}$, bzw. $ct_{99,9} = \bar{c} * t_{99,9\%}$.

Der $ct_{99(RW)}$ beträgt 4,82 mg/l*min und der $ct_{99,9(NaCl)}$ beträgt 2,45 mg/l*min. Diese Ergebnisse zeigen, dass *E. faecium* in RW verdünnt resistenter gegenüber ClO₂ ist, als in NaCl verdünnt. Denn ein höherer ct-Wert weist auf eine bessere Resistenz gegenüber dem Desinfektionsmittel hin (Schmidt et. al, 2012). Zusätzlich wurde durch Verdünnung der Bakterien im RW und Desinfektion mit 0,4 mg/l ClO₂ nur eine Reduktion von 2 Log Stufen und in NaCl verdünnt von 3 Log Stufen erreicht. Dies bestätigt die Annahme, dass *E. faecium* in RW verdünnt gegenüber der ClO₂ Konzentration (Ergebnisse DFZ (SG1PI), Seite 74-77) stabiler ist.

Der Vergleich mit dem ct-Wert von Schmidt et al., 2012 ($ct_{99, E. faecium} = 0,339$) zeigt, dass die verwendete Methode zur Bestimmung der intakten Zellzahl einen großen Unterschied ausmacht. In der Arbeit von Schmidt et al., 2012 wurden zur Berechnung des ct-Wertes die Werte der kulturellen Methode nach erfolgter Desinfektion herangezogen und in dieser Arbeit die DFZ Werte nach Färbung mit SG1PI_Trīs_6 µM. Dies bestätigt, dass bei der kulturellen Methode nach erfolgter Desinfektion mit ClO₂ viel weniger intakte Zellen detektiert werden als mit der DFZ, wahrscheinlich aufgrund des VBNC Zustandes der Bakterien.

CFDA

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung von *E. faecium*, sowohl in NaCl als auch in Rohwasser verdünnt, die mit dem fluorogenem Farbstoff CFDA gefärbt wurden, zu sehen. CFDA kann in alle Zellen eindringen, wird aber nur in intakten Zellen durch das Vorhandensein des Enzyms Esterase in fluoreszierende Produkte gespalten. Das heißt je mehr Esterase Aktivität detektiert werden kann, desto mehr intakte Zellen sind in der Probe vorhanden.

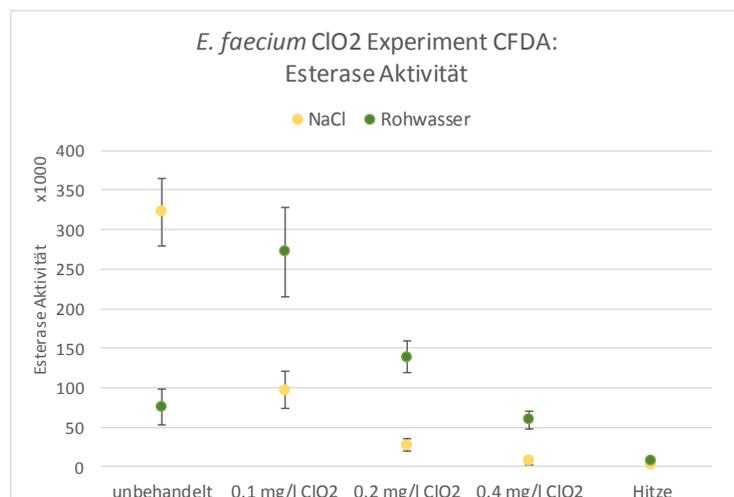


Abbildung 37: Bestimmung der Desinfektionswirkung: CFDA Färbung und durchflusszytometrische Detektion der Esterase Aktivität von *E. faecium* in NaCl und Rohwasser verdünnt

Die Desinfektionswirkung von *E. faecium* in NaCl verdünnt konnte mit Hilfe der CFDA Färbung und anschließender durchflusszytometrischen Messung der Esterase Aktivität gut abgebildet werden. Eine anfänglich sehr hohe Esterase Aktivität der unbehandelten Probe fällt durch die Zugabe zunehmender ClO₂ - Konzentration stetig ab. Bei den thermisch behandelten *E. faecium* Proben kann keine Esterase Aktivität mehr gemessen werden.

Bei den Proben, die in Rohwasser verdünnt wurden, tritt ein interessantes Phänomen auf. Die gemessene Esterase Aktivität der unbehandelten Proben erreicht einen ähnlichen Wert wie die Proben die mit 0,4 mg/l ClO₂ behandelt wurden, obwohl sie bei den unbehandelten Proben am höchsten sein sollte. Es stellt sich hier die Frage warum die Esterase Aktivität bei den in RW verdünnten unbehandelten Proben nicht adäquat detektiert werden konnte. Um zu testen ob dies eine Besonderheit von dem hier verwendetem RW ist, wurde *E. faecium* in 4 verschiedenen Rohwässern (jeweils aus einer anderen Quelle) verdünnt. Diese wurden dann unbehandelt und nach Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ mit CFDA gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen.

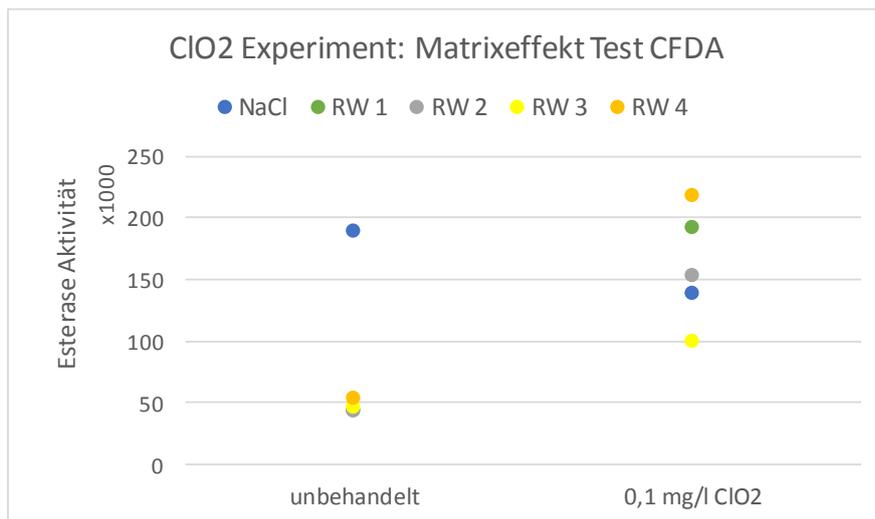


Abbildung 38: CFDA Färbung von *E. faecium* in 4 verschiedenen Rohwässern und NaCl verdünnt mit nachfolgender durchflusszytometrischen Messung der Esterase Aktivität; unbehandelte und mit 0,1 mg/l ClO₂ desinfizierte Proben

Wie in Abbildung 38 zu sehen ist tritt dieser Effekt in allen hier getesteten Rohwässern auf und lässt darauf schließen, dass die unzureichende Detektion der Esteraseaktivität von *E. faecium* in allen Rohwässern, wenn keine Behandlung stattgefunden hat, gegeben ist. In den unbehandelten Proben wurde nur eine geringe Esterase Aktivität gemessen. Erst durch die Zugabe von ClO₂ wurde eine höhere Aktivität detektiert. Vermutlich kann CFDA, wenn RW als Verdünnungsmatrix dient, nicht gut in die Zellen eindringen oder wird durch Komponenten des Wassers zerstört. Erst nach Zugabe von ClO₂, oder wenn NaCl als Verdünnungsmedium verwendet wird, kann die Esterase Aktivität adäquat gemessen werden. Dies zeigt, dass die Anwendung der CFDA Färbung für vor allem unbehandeltes RW eine Herausforderung darstellt. Es ist wichtig dieses Färbeprotokoll mit autochthonen Bakteriengemeinschaften in verschiedenen Rohwässern und mit Rohwässern die unterschiedlich desinfiziert wurden zu testen.

In Abbildung 37 ist ab einer Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ zu den in Rohwasser verdünnten *E. faecium* (grüne Kurve) die Desinfektionswirkung gut erkennbar. Die Esterase Aktivität nimmt stetig ab und bei den thermisch behandelten Proben ist keine Aktivität mehr detektierbar. Wie schon bei der SG1PI Färbung aufgefallen ist, ist auch bei der CFDA Färbung die Esterase Aktivität bei den in RW verdünnten *E. faecium* bei allen ClO₂ behandelten Proben etwas höher als bei den in NaCl verdünnten. Der Grund könnte, wie oben schon beschrieben, eine erhöhte Resistenz der Bakterien in der Matrix des Rohwassers gegenüber der Desinfektion sein.

Diese Arbeit und zahlreiche Studien haben alle gemein, dass Kulturen (im Labor gezüchtete Bakterien) behandelt wurden und dann mit unterschiedlichen CFDA - Färbeprotokollen durchflusszytometrisch die Esterase Aktivität bestimmt wurde. Interessant wäre es diese Protokolle mit autochthonen Trinkwasserbakterien zu testen.

Zu diesem Thema berichten Zunabovic et al., 2018, dass CFDA bei natürlichen Wasserproben erfahrungsgemäß wesentlich geringere Fluoreszenzsignale erzeugt, daher ist die Anwendung besonders durch eine schwierige Abtrennbarkeit der Zell-Signale vom Signalhintergrund eingeschränkt, wenngleich etwa die Auswirkungen einer Desinfektion deutlich sichtbar gemacht werden können (Zunabovic-Pichler et al., 2018). In Abbildung 39 wird ein unbehandeltes Wasser und ein Wasser nach Chlorung nach der Färbung mit CFDA gegenübergestellt.

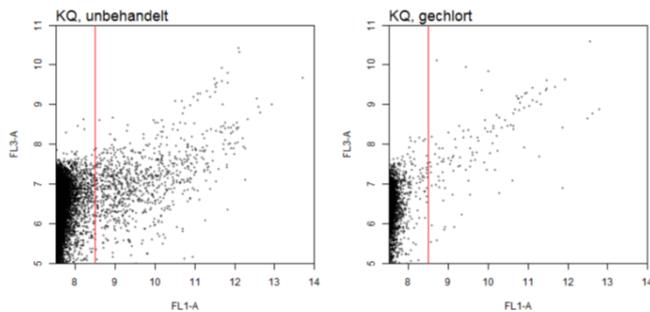


Abbildung 39: Gegenüberstellung von Streudiagrammen der Grün- und Rot-Fluoreszenz (Färbung mit CFDA) für Proben vor und nach einer Chlorung (Karstquellwasser). Die Anzahl an Detektion rechts der roten Linie beträgt 20.000 pro ml für die unbehandelte Probe (TCC mit SG1: 100.000) bzw. 3.000 pro ml für die gechlorte Probe (TCC mit SG1: 50.000) (Zunabovic-Pichler et al., 2018)

Interessant wäre der Versuch durch Zugabe von Kontrastmitteln (z.B. Brilliant Blue R), wie Giuliani et al., 2015 zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis empfehlen, die Abtrennbarkeit der Zell-Signale vom Signalhintergrund zu erleichtern.

5.2.2.2 Ergebnisse ATP Methode

Eine weitere Möglichkeit die Desinfektionswirkung zu beschreiben bietet die ATP Methode. ATP ist ein universeller Energieträger und daher ubiquitär in lebenden Zellen vorhanden, umso weniger intrazelluläres ATP detektiert werden kann, desto weniger intakte Zellen sind in der Probe vorhanden. Zur Berechnung des IC ATPs muss die Probe selbst (= Gesamt-ATP) und die filtrierte Probe (= EC ATP) gemessen werden. Das IC ATP wird dann folgendermaßen berechnet: IC ATP = Gesamt-ATP – EC ATP.

In

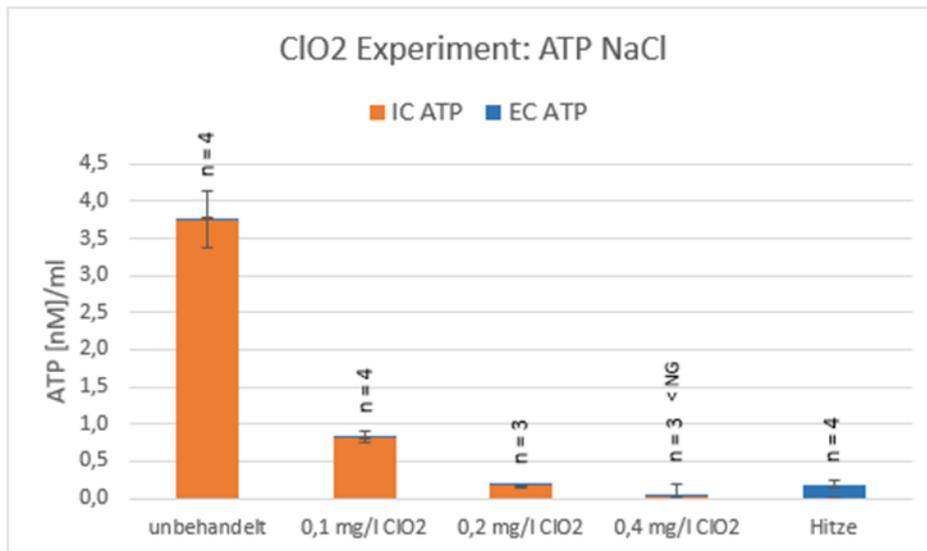


Abbildung 40 sind die Ergebnisse der ATP Messung von *E. faecium* in steril filtriertem NaCl verdünnt nach erfolgter Desinfektion und Messung mit Hilfe des ATP Assays abgebildet. Die ATP Methode wurde wie in Kapitel 4.4 beschrieben eingesetzt und das intra- (IC) und extrazelluläre (EC) ATP wurden berechnet. Der Blindwert von NaCl beträgt im Mittel 166 cps und liegt unter der Bestimmungsgrenze.

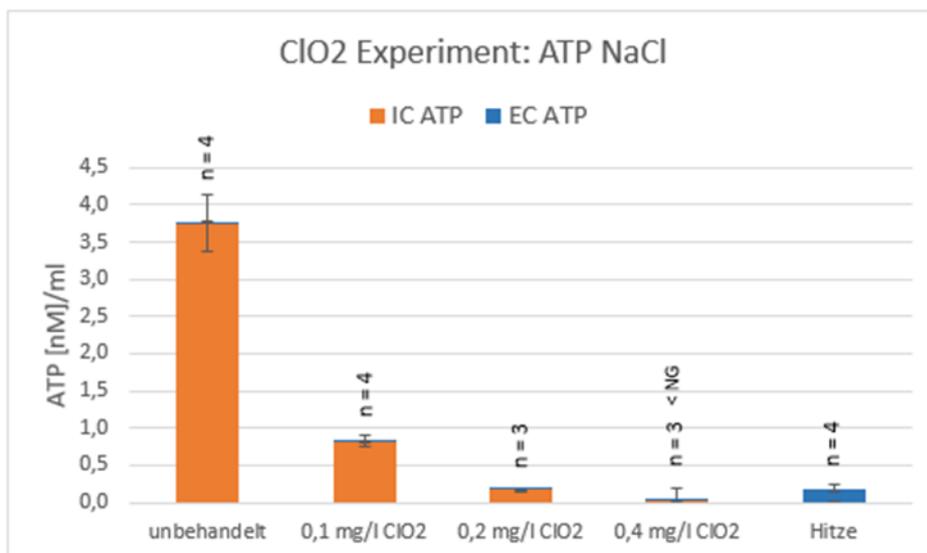


Abbildung 40: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* in steril filtriertem NaCl verdünnt – ATP Ergebnisse

Bei den in NaCl verdünnten Proben ist die Desinfektionswirkung durch Anwendung der ATP Methode gut ersichtlich. Es kommt zu einem stetigen Abfall des IC-ATPs bis bei 0,4 mg/l ClO₂

und den thermisch behandelten Proben kein IC-ATP (jeweils < NG) nachgewiesen wird. EC-ATP wurde nur in den thermisch behandelten Proben gemessen und hier nur in geringer Konzentration.

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der ATP Messung von *E. faecium* in steril filtriertem Rohwasser verdünnt dargestellt. Der Blindwert von RW beträgt im Mittel 149 cps und liegt unter der Bestimmungsgrenze.

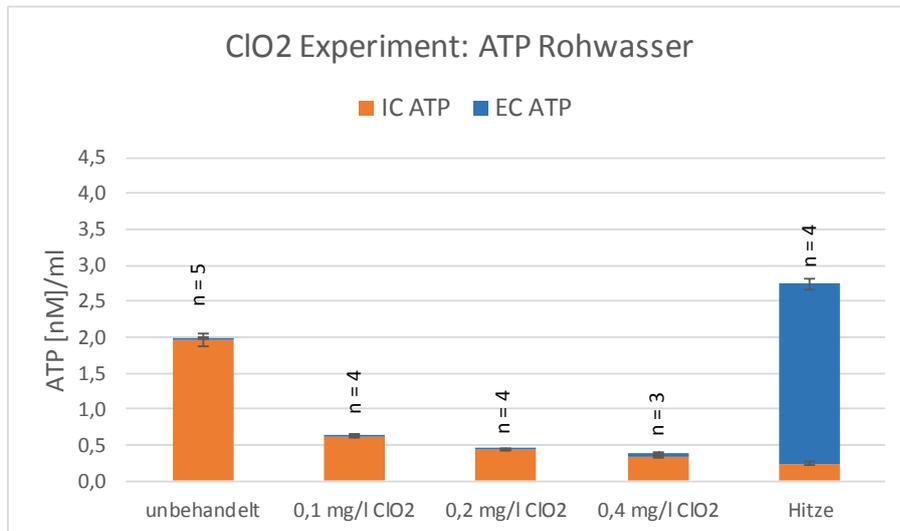


Abbildung 41: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* in steril filtriertem Rohwasser verdünnt – ATP Ergebnisse

Wieder ist die Desinfektionswirkung durch den stetigen Abfall des IC-ATPs mit erhöhter ClO₂ Konzentration gut erkennbar. EC-ATP ist nur bei den thermisch behandelten Proben messbar und hier in einer höheren Konzentration als das IC-ATP der unbehandelten Proben. Dieses Phänomen wird auch in anderen Studien beobachtet, wobei es meist in Kombination mit einer hohen Dosis an Oxidationsmitteln beschrieben wird. Nescerecka et al., 2016b erhielten nach Desinfektion mit 5,6 mg Cl₂ L⁻¹ ein mehr als zweifach höheres Gesamt-ATP im Vergleich zu der anfänglichen Gesamt-ATP-Konzentration der unbehandelten Probe. Dies deutet darauf hin, dass zusätzliches ATP entweder synthetisiert wurde oder dass der ATP-Nachweis nach aggressiver Desinfektion verbessert wurde. Außerdem kann die Chlorung zur Hemmung von ATP-assoziierten Enzymen führen. Somit wird in stark gechlorten Proben die ATP-Hydrolyse sofort gehemmt, und dies könnte zum Nachweis der gesamten ATP führen, von denen ein Teil unter normalen und / oder weniger stressigen Bedingungen durch die ATP-Hydrolyse schnell in Energie für den bakteriellen Stoffwechsel umgewandelt wird. Zusätzlich wurde dies mit Hitzeschock-Experimenten untersucht, die zeigten, dass nach starker thermischer Behandlung der Proben das gemessene Gesamt-ATP auch wesentlich höher war als die Werte, die in unbehandelten Kontrollproben gemessen wurden. Dies legt nahe, dass die beobachteten erhöhten Gesamt- und EC-ATP-Konzentrationen nicht nur für oxidativen Stress spezifisch sind, sondern auch in engem Zusammenhang mit einer schweren Schädigung der Bakterienmembran stehen (Nescerecka, 2016b).

In Abbildung 41 fällt außerdem auf, dass bei den thermisch behandelten Proben IC-ATP vorhanden ist. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der SG1PI und CFDA Färbung zeigt, dass bei den thermisch behandelten Proben eigentlich alle Zellen permeabilisiert wurden und daher kein IC-ATP vorhanden sein sollte. Die Berechnung des IC-ATP erfolgt durch: IC-ATP = Gesamt-ATP – EC-ATP. Da für die Messung des EC-ATPs ein zusätzlicher Filtrationsschritt notwendig ist, könnte durch diesen ATP verloren gegangen sein, dadurch bleibt bei der Berechnung des IC-ATPs eine Differenz übrig.

Ein Vergleich der zwei Verdünnungsmedien (NaCl und RW) zeigt, dass Unterschiede bei den Ergebnissen der ATP Konzentrationen erkennbar sind. Nach Zugabe höherer ClO_2 Konzentrationen (ab einer Konzentration von 0,2 mg/l ClO_2) wurde bei der Bakteriensuspension von *E. faecium* die in Rohwasser verdünnt wurde höheres (im Mittel 0,071 nM Unterschied) IC-ATP detektiert. Dies weist auf einen höheren Anteil an intakten Zellen in den RW verdünnten *E. faecium* im Vergleich zu den NaCl verdünnten Bakterien hin. Bei den unbehandelten Proben und nach einer Behandlung mit 0,1 mg/l ClO_2 wurde aber bei den mit NaCl verdünnten Proben höhere IC-ATP Konzentrationen gemessen. In dieser Hinsicht wäre es sinnvoll den ATP Assay in verschiedenen Verdünnungsmedien zu testen, um herauszufinden ob unterschiedliche Matrices diesen beeinflussen können.

EC-ATP konnte nach der ClO_2 Desinfektion weder in den NaCl noch in den RW verdünnten *E. faecium* Proben detektiert werden. Dies beobachteten auch Nescerecka et al., 2016b in ihrer Studie mit *E. coli*: Bei niedrigen Chlorkonzentrationen konnte eine Verringerung des IC-ATPs und Gesamt-ATPs gemessen werden, das EC-ATP erhöhte sich aber nicht. Aufgrund des beobachteten Verlusts von IC-ATP schlagen sie vor, dass die niedrigen Chlorkonzentrationen eindeutig subzellulären Schaden verursachten, der die membrangebundenen Funktionen beeinflusste. Die gleichzeitige Abnahme von IC-ATP und Gesamt-ATP, während EC-ATP nicht beeinflusst wurde, zeigt an, dass ATP intrazellulär hydrolysiert wurde und die ATP-Hydrolyserate höher war als die ATP-Synthese. Nescerecka et al., 2016b beobachteten eine Abnahme des IC-ATPs mit steigenden Chlorkonzentrationen, aber EC-ATP stieg nur wenn die Chlordosis 0,35 mg/l überschritt. Ein weiterer Grund für das Nicht Vorhandensein von EC-ATP könnte ATP-Abbau aufgrund von extrazellulären Enzymen sein (Nescerecka et al., 2016b).

In der vorliegenden Arbeit konnte aber auch bei der höchsten ClO_2 Konzentration (0,4 mg/l) kaum EC-ATP ermittelt werden. Die einzigen höheren EC-Werte wurden in der thermisch behandelten in RW verdünnten Probe (wie bereits weiter oben beschrieben wurde) gemessen. Warum also konnten in den 0,4 mg/l ClO_2 behandelten Proben und in den in NaCl verdünnten und thermisch behandelten Proben kein EC-ATP nachgewiesen werden, obwohl, wie in den durchflusszytometrischen Ergebnissen ersichtlich ist, alle Zellen permeabilisiert wurden und daher das ATP aus den Zellen heraustrat?

Eine mögliche Erklärung wäre, dass ClO_2 ab einer gewissen Konzentration das frei gesetzte ATP zerstört. Zu diesem Thema haben Triff und Spiegel, 1976 eine Arbeit zum Thema Anwendung der ATP Methode nach erfolgter Desinfektion herausgebracht. Damit ATP als Maß für die Desinfektion dienen kann, dürfen die Desinfektionsmittel, im Fall ihrer Arbeit ClO_2 und Cl_2 , die Biolumineszenzreaktion nicht stören. Sie fanden heraus, dass bei den ClO_2 Konzentrationen, die für die normale Desinfektion von Trinkwasser verwendet werden, bei einer Expositionszeit von 60 Sekunden nur eine geringfügige Störung erzeugt wird (Tiff & Spiegel, 1976). Auch Nescerecka et al., 2016b beschäftigten sich mit dem Thema und kamen zu dem Schluss, dass EC-ATP bei typischen Trinkwasserkonzentrationen an Chlor mindestens fünf Minuten lang stabil bleibt, dass aber hohe Chlorkonzentrationen ATP-Moleküle oxidieren können.

Da in dieser Arbeit nach erfolgter Desinfektion eine 30-minütige Einwirkzeit (in den vorher beschriebenen Studien waren es nur 1 bzw. 5 Minuten) verwendet wurde ist es möglich, dass das EC-ATP wegen der langen Exposition durch ClO_2 zerstört wurde. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten weitere Experimente zur Stabilität von EC-ATP nach Desinfektion mit unterschiedlichen ClO_2 -Konzentrationen und verschiedenen Einwirkzeiten durchgeführt werden.

Jetzt bleibt noch die Frage offen warum in den thermisch behandelten NaCl verdünnten Proben kaum EC-ATP nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise wird das EC-ATP durch NaCl zerstört. Dazu müssten weitere Versuche zur Überprüfung der Stabilität von EC-ATP in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt werden.

5.2.2.3 Ergebnisse der kulturellen Methoden

In dieser Arbeit wurde die Desinfektionswirkung zusätzlich mit Hilfe der traditionellen heterotrophen Koloniezahl (HPC) auf TS Agar getestet. In Abbildung 42 sind die Ergebnisse in einem Balkendiagramm dargestellt. Da die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) bei einer Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ so gering sind, dass sie im Balkendiagramm fast nicht mehr erkennbar sind, wurde die Anzahl der KBE/ml Probe in Tabelle 8 zusätzlich in Zahlen veranschaulicht.

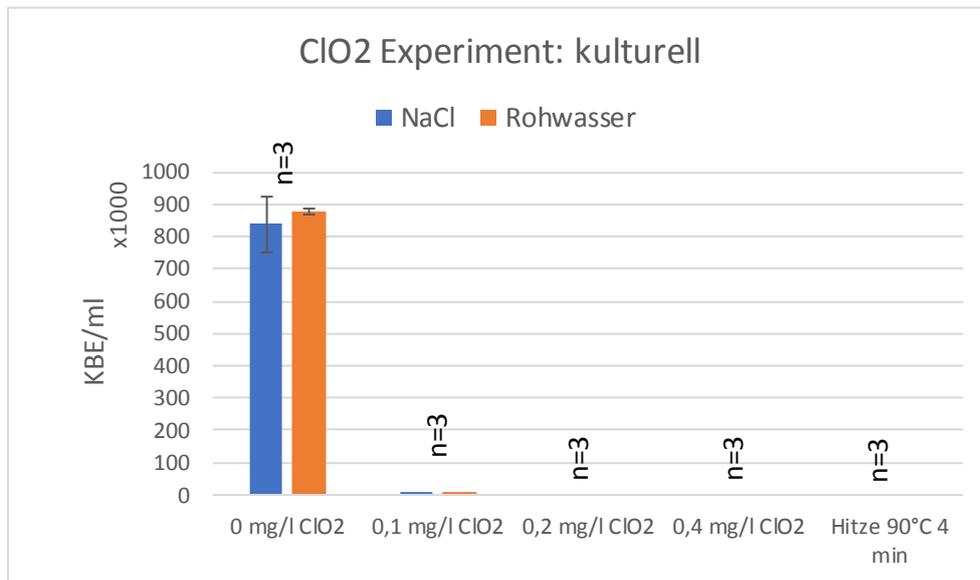


Abbildung 42: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Ergebnisse der heterotrophen Plattenkoloniezahl (HPC) auf TS Agar: *E. faecium* in Rohwasser und NaCl verdünnt; KBE = koloniebildende Einheit

Tabelle 8: Bestimmung der Desinfektionswirkung: KBE/ml in Zahlen

NaCl		
Behandlung	KBE	Stabw
0 mg/l ClO ₂	840000	86023
0,1 mg/l ClO ₂	54	102
0,2 mg/l ClO ₂	0	0
0,4 mg/l ClO ₂	0	0
Hitze 90°C 4 min	0	0

RW		
Behandlung	KBE	Stabw
0 mg/l ClO ₂	878333	10274
0,1 mg/l ClO ₂	15	8
0,2 mg/l ClO ₂	0	0
0,4 mg/l ClO ₂	0	0
Hitze 90°C 4 min	0	0

Die KBE pro ml der unbehandelten Proben (840.000±86.023 KBE/ml für NaCl und 878.333±10.274 KBE/ml für RW als Verdünnungsmittel) sind höher als die ICC Werte der Durchflusszytometrie (638.221± 60.531 ICC/ml für NaCl und 638.587± 55.863 ICC/ml für RW als Verdünnungsmittel). Das heißt es konnten mit dem TS Agar alle intakten Zellen der unbehandelten Probe kultiviert werden, die höheren KBE Werte im Vergleich zur ICC können aufgrund von Pipettierfehler zustande kommen.

Nach ClO₂ Zugabe fallen die KBE/ml bei der Kultivierungsmethode stark ab, nämlich bei einer Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ auf 54 bzw. 15 KBE/ml. Ab einer Zugabe von 0,2 mg/l ClO₂ und bei den thermisch behandelten Proben wurden keine KBE nachgewiesen. Bei den durchflusszytometrischen Messungen wurden sowohl bei der SG1PI (Tris Puffer und DMSO als Lösungsmittel) als auch bei der CFDA Färbung nach Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ deutlich mehr intakte Zellen gemessen als bei der kulturellen Methode. Auch bei den Proben nach 0,2 mg/l ClO₂

Zugabe wurden durchflusszytometrisch intakte Zellen detektiert. Dies deutet darauf hin, dass nach ClO₂ Behandlung der korrekte Wert der intakten Zellen von *E. faecium*, zumindest mit dem TS Agar, nicht mehr abzubilden ist. Viele Zellen gelangen wahrscheinlich in den VBNC (viable but not culturable) - Zustand und können daher auf dem Nährboden nicht mehr wachsen. Phe et al., 2005 schreiben, dass kulturelle Methoden die tatsächliche Anzahl lebensfähiger Zellen in einer Trinkwasserprobe erheblich unterschätzen, insbesondere wenn Stressbehandlungen wie oxidative Prozesse angewendet werden (Phe et al., 2005).

Hammes et al., 2011 schreiben aber auch, dass die Kultivierung der zuverlässigste Einzelnachweis für die Lebensfähigkeit bleibt, wenn das geeignete Wachstumsmedium und die Kultivierungsbedingungen für den Organismus bekannt sind (Hammes et al., 2011).

Deswegen ist es wichtig die Ergebnisse folgendermaßen zu interpretieren: Die Desinfektionswirkung in Proben von *E. faecium* konnte, unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen (TS Agar, Temperatur, usw.), mit Hilfe der HPC Methode nicht korrekt dargestellt werden.

5.2.2.4 Vergleich der Ergebnisse

Hier erfolgt der Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen angewendeten Methoden zur Detektion von intakten Zellen *E. faecium* in NaCl verdünnt, dieser ist in

Tabelle 9 dargestellt. Es wird bei jeder Methode vom Wert der intakten Zellen der unbehandelten Probe ausgegangen =100%.

Tabelle 9: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Vergleich der verschiedenen Methoden zur Detektion der intakten Zellen; Laborexperiment, *E. faecium* in NaCl

Behandlung	ICC % Tris-Puffer	ICC% DMSO	IC ATP %	CFDA %	KBE%
unbehandelt	100	100	100	100	100
0,1 mg/l ClO ₂	90,47	71,69	22,03	30,2	0,006
0,2 mg/l ClO ₂	52,91	27,01	4,55	8,5	0
0,4 mg/l ClO ₂	1,12	0,57	0,44	2,1	0
Hitze	0,02	0,02	0,11	0,8	0

Bei den Ergebnissen der ATP Methode und der Durchflusszytometrie (SG1PI und CFDA) ist eine kontinuierliche Abnahme des Signals für die intakten Zellen mit Erhöhung der ClO₂ Konzentration erkennbar. Nach Zugabe von 0,4 mg/l ClO₂ bzw. bei den thermisch behandelten Proben kann bei diesen Methoden nur mehr ein geringes Signal detektiert werden. Die kulturelle Methode weicht von den Ergebnissen der anderen Methoden völlig ab und es können bereits nach Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ weniger als 0,01 % der KBE/ml, ausgehend von der unbehandelten Probe, wachsen.

Am besten passen die Ergebnisse der ATP Methode und der CFDA Färbung zusammen. Hammes et al., 2011 beschreiben in einer Studie die Esterase Aktivität zusammen mit mehreren anderen Lebensfähigkeitsparametern in verschiedenen Trinkwasserproben. In dieser Studie wurde hervorgehoben, dass eine relativ gute Korrelation zwischen der Konzentration der Esterase-positiven Zellen und der ATP-Konzentration in den Wasserproben gefunden wurde (Hammes et al., 2011).

Nach einer Zugabe von 0,4 mg/l ClO₂ und bei den thermisch behandelten Proben konnten im Vergleich zu den anderen Methoden relativ hohe Esterase Aktivitäten gemessen werden. Das könnte daran liegen, dass nach erfolgter Desinfektion die Esterasen nicht sofort ihre Aktivität verlieren müssen. Dazu schreiben Hammes et al., 2011 weiters, dass die eigentliche Spaltung (Substrat-Enzym-Reaktion) unabhängig von der Zellenergie ist. Daher legt der Nachweis der Enzymaktivität nicht notwendigerweise die Lebensfähigkeit der Zellen nahe und es ist sehr

wahrscheinlich, dass kürzlich abgetötete Zellen immer noch enzymatische Aktivität aufweisen (Hammes et al., 2011).

Der Abfall der ICC bei der SG1PI Färbung nach 0,1 mg/l und 0,2 mg/l ClO₂ Zugabe ist im Vergleich zu den anderen Methoden gering, ab einer ClO₂ Konzentration von 0,4 mg/l fällt die ICC fast auf null Prozent. Bei moderateren ClO₂ Dosen (0,1 und 0,2 mg/l) ist die Reihenfolge der intakten Zellen permeabilisierte Membran > Esterase Aktivität > ATP > KBE. Ab einer Konzentration von 0,4 mg/l ClO₂ und bei den thermisch behandelten Proben ändert sich die Reihenfolge auf Esterase Aktivität > ATP > Membranpermeabilisierung > KBE.

Der Vergleich von DFZ mit SG1PI Färbung und den anderen Methoden zeigt, dass die Werte der SG1PI Färbung in DMSO gelöst besser mit den anderen Methoden zusammenpasst. Wenn Tris-Puffer als Lösungsmittel für SG1PI verwendet wird werden nach Zugabe von 0,1 und 0,2 mg/l ClO₂ deutlich mehr intakte Zellen detektiert als bei allen anderen Methoden. Welche nun die „richtige“ Methode ist, lässt sich aus den in dieser Arbeit durchgeführten Ergebnissen nicht eindeutig sagen. Einerseits spricht viel dafür, dass DMSO zusätzlich intakte geschwächte Zellen zerstört (siehe Kapitel 5.2.1: Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung), aber im Methodenvergleich würde SG1PI in DMSO gelöst besser zu den Werten der anderen Methoden passen. Deswegen ist es notwendig weitere Versuche zur Beeinflussung von Bakterien durch DMSO durchzuführen.

Hammes et al., 2010 veranschaulichen den Vorteil der Kombination von Durchflusszytometrie- und zellgebundenen ATP-Messungen zur Charakterisierung mikrobiologischer Veränderungen während der Wasserbehandlung. Während sich die beiden unabhängigen Methoden weitgehend bestätigten und ein ähnliches grundlegendes Gesamtmuster zeigten, ermöglichten sie auch einen detaillierteren Einblick in das spezifische mikrobielle Verhalten während jedes Behandlungsschritts. Es besteht allgemein Einigkeit darüber, dass eine Kombination von Methoden, die sich auf verschiedene Lebensfähigkeitsindikatoren konzentriert, jeder einzelnen Methode überlegen ist, vor allem wenn natürliche mikrobielle Gemeinschaften bewertet werden (Hammes et al., 2010). Diskrepanzen zwischen IC-ATP und ICC können sich auch aus der Zellmorphologie, der Bakterienart und dem physiologischen Zustand ergeben (Nescerecka et al., 2014).

5.2.2.5 Ergebnisse des ClO₂-Experiments Wachstumspotential

Um zu ermitteln ob *E. faecium* in steril filtriertem Rohwasser verdünnt nach erfolgter Desinfektion die Fähigkeit zur Wiederaufkeimung besitzt, wurden die Proben bei 15 Grad gelagert. An den Tagen 0, 3, 7, 10 und 13 bzw. 14 wurden die TCC, die ICC und die Enzymaktivität durchflusszytometrisch gemessen. Zusätzlich wurde das WP durch die ATP Methode bestimmt (beim ersten Versuch nicht an allen Tagen). Zur Bestimmung der ICC wird die SG1PI_Trīs_6µM Färbung verwendet und wird im Folgenden SG1PI Färbung genannt.

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse der SG1PI Färbung des 1. Versuchs dargestellt. Im Diagramm sind die SG1 Färbung, also die Gesamtzellzahl (TCC) der unbehandelten Probe und die SG1PI Färbung, also die intakte Zellzahl (ICC) der unbehandelten und der ClO₂ behandelten Proben abgebildet.

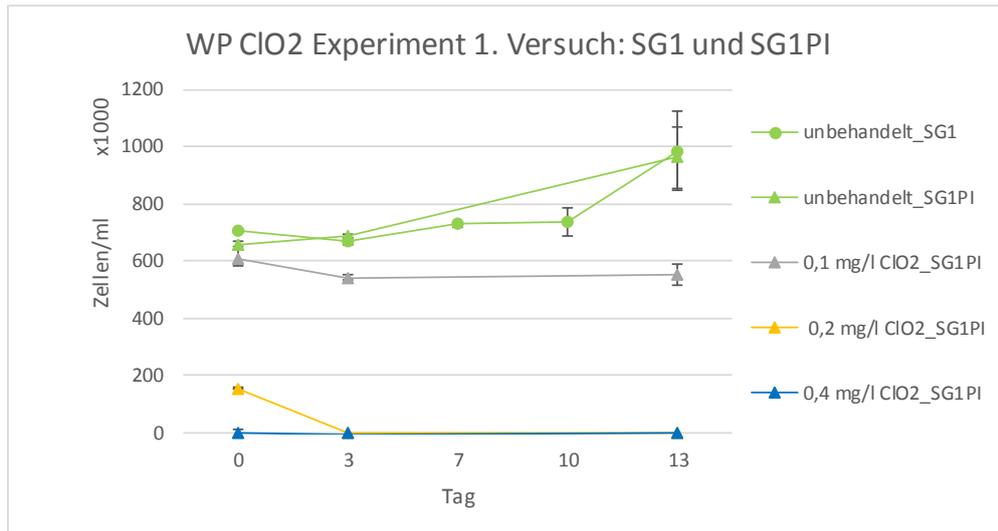


Abbildung 43: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Ergebnisse Wachstumspotential 1. Versuch: SG1 Färbung der unbehandelten Probe und SG1PI Färbung der unbehandelten und mit ClO₂ behandelten Proben

Bei der unbehandelten Probe ist ein geringes Wachstum ab dem 7. Tag der Lagerung zu erkennen, von Tag 10 bis Tag 13 kommt es zu einer Erhöhung der ICC um rund 250.000 Zellen/ml. Bei der 0,1 mg/l ClO₂ behandelten Probe verringert sich die ICC von Tag 0 zu Tag 3 und bleibt bis Tag 13 stabil, wobei am 7. und 10. Tag keine SG1PI Färbung durchgeführt wurde. Die TCC Werte von den Tagen 7 und 10 (im Diagramm nicht eingezeichnet) zeigen aber konstante Werte. Die Probe, die mit 0,2 mg/l ClO₂ desinfiziert wurde wies am Tag der Durchführung (Tag 0) noch eine geringe ICC von 154.000 Zellen/ml auf, diese verringerte sich bis Tag 3 und auch in den darauf folgenden Tagen auf eine verschwindend geringe Zahl (in diesem Diagramm nicht mehr erkennbar). Die wenigen Zellen, die die Desinfektion überlebten, konnten sich anscheinend nicht erholen. Die Zugabe von 0,4 mg/l lies ab Tag 0 so gut wie keine intakten Zellen übrig und es kam in den 13 Tagen Lagerung auch zu keiner Wiederaufkeimung.

In Abbildung 44 sind die Ergebnisse des 2. Versuchs vom ClO₂ Wachstumspotential Experiment dargestellt.

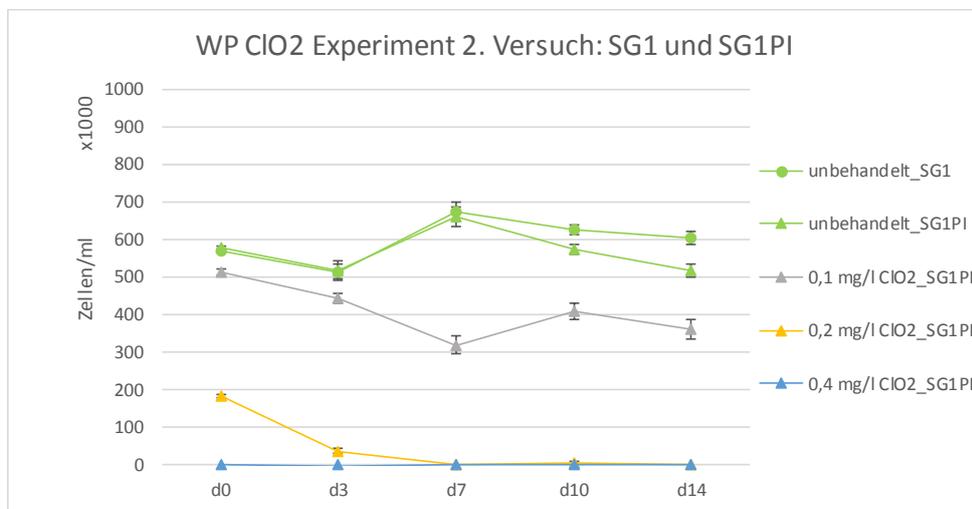


Abbildung 44: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Ergebnisse Wachstumspotential 2. Versuch: SG1 Färbung der unbehandelten Probe und SG1PI Färbung der unbehandelten und mit ClO₂ behandelten Proben

Der 2. Versuch liefert größtenteils ähnliche Ergebnisse, wie der erste. Die Wachstumspotentialkurven der 0,2 mg/l bzw. der 0,4 mg/l ClO_2 Zugabe sind denen des 1. Versuchs sehr ähnlich mit der Ausnahme, dass am 3. Tag nach 0,2 mg/l ClO_2 Zugabe geringfügig mehr ICC detektiert wurden. Die ICC der 0,1 mg/l ClO_2 Desinfektion sinkt bis Tag 7 um ca. 200.000 Zellen, steigt bis Tag 7 wieder um ca. 100.000 Zellen an und sinkt bis zum 14. Tag wieder etwas. Bei der unbehandelten Probe kommt es zu einer Erhöhung der ICC von Tag 3 bis Tag 7 um ca. 200.000 Zellen/ml Probe, dann sinkt diese wieder bis Tag 14 um ca. 100.000 Zellen. Möglicherweise muss sich *E. faecium* in den ersten Tagen noch an die Wassermatrix und Temperatur von 15 °C gewöhnen, von Tag 3 bis Tag 7 haben sie alle Nährstoffe aufgebraucht und befinden sich ab dann in der Absterbephase. Ein möglicher Grund für die Abweichungen zwischen den zwei Versuchen könnte eine unterschiedliche Beschaffenheit der beiden 0,1 µm filtrierten Rohwässer sein, z.B. eine andere Verfügbarkeit der Nährstoffe. Das RW stammt zwar von derselben TWVA und dem gleichen Probenahmetag, aber der 2. Versuch wurde 2 Monate später durchgeführt, daher wurde das filtrierte RW bis dahin bei 4 °C gelagert.

Im Allgemeinen werden ab einer Konzentration von 0,2 mg/l ClO_2 die meisten *E. faecium* abgetötet, diese können sich bei einer weiteren Lagerung von 13 bzw. 14 Tagen bei 15°C nicht regenerieren, sondern sterben bis zum 3. bzw. spätestens 7. Tag ab.

Beim 2. Versuch wurde das WP des ClO_2 Experiments durchflusszytometrisch durch die CFDA Färbung ergänzt. Da die Esterase Aktivität der unbehandelten Rohwasser Proben (wahrscheinlich aufgrund von Zerstörung der Esterasen durch unbekannte Stoffe im Rohwasser) bei den voran gegangenen Versuchen nur unzureichend detektiert werden konnte, war interessant ob sich durch die Lagerung die Bedingungen, in Bezug auf die Detektion der Esterase Aktivität, verändern. Es wurde zusätzlich ein zweites unbehandeltes RW einer anderen TWVA in das Experiment hineingenommen, das auch schon bei dem kleinen Versuch „Matrixeffekt“ mit dabei war. Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse dazu.

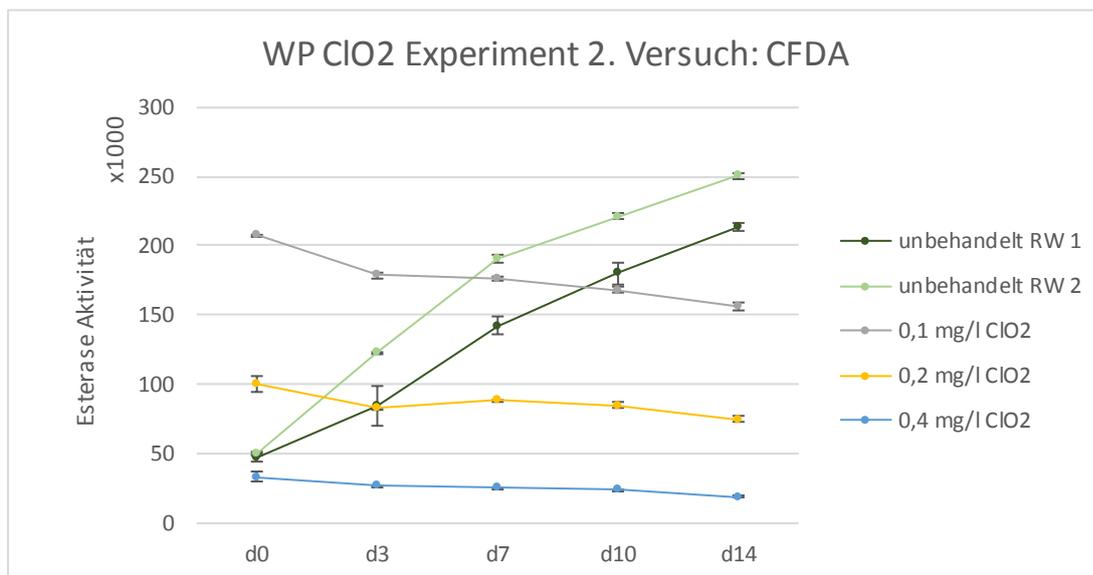


Abbildung 45: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential *E. faecium* in Rohwasser verdünnt: CFDA Färbung und durchflusszytometrische Messung

Die Anfangswerte der Esterase Aktivität der ClO_2 behandelten Proben sind mit den voran gegangenen Experimenten vergleichbar. Bei der Lagerung verringert sich diese bei jeder Behandlungsstufe nach ein paar Tagen geringfügig, aber stetig. Eine Verringerung der Esterase aktiven Zellen gegen Null, so wie es bei der ICC durch Messung mit SG1PI_Tris ab einer Zugabe von 0,2 mg/l ClO_2 der Fall ist, ist nicht ersichtlich.

Wang et al., 2010a berichten diesbezüglich auch, dass vollständig permeabilisierte Zellen immer noch Esterase Aktivität zeigten (Wang et al., 2010a). Eine erhöhte Enzymaktivität, die durch das Abwehrsystem von Zellen unter Stress ausgelöst wird, kann zum erhöhten Prozentsatz an Esteraseaktiven Zellen beitragen. Es wurde berichtet, dass *E. coli*-Zellen, die thermisch abgetötet wurden (60 ° C für 30 Minuten), auch noch restliche Esterase Aktivitäten aufweisen (Villarino et al. 2000). Daher ist die Esterase Aktivität nicht der genaueste Parameter zur Beurteilung der Desinfektionseffizienz durch freies Chlor oder Hitze an *E. coli*-Zellen (Wang et al., 2010a).

Auffällig sind die Ergebnisse der zwei unbehandelten Rohwasserproben, welche am Tag des Experiments ebenfalls mit den Werten der Esterase Aktivität der vorangegangenen Versuche (Abbildung 37) übereinstimmen. Die Esterase Aktivität nimmt aber während der 14 Tage Lagerung ständig zu und scheint am 14. Tag noch immer nicht ihren Höhepunkt erreicht zu haben. Dies bestätigt die Annahme, dass im unbehandelten RW Substanzen vorhanden sind, die entweder das Eindringen von CFDA in die intakten Zellen verhindern, oder CFDA zerstören bevor es die Zellen passieren kann. Erst durch die Lagerung scheinen diese Komponenten schön langsam, durch vermutlichen Zerfall, ihre Wirkung zu verlieren und CFDA kann wieder in die Zellen eindringen, in den intakten Zellen von den vorhandenen Esterasen gespalten und dadurch durchflusszytometrisch gemessen werden. Zu klären wäre noch, welche Substanzen das sind und wie man diese durch eine Vorbehandlung spezifisch beseitigen könnte, um dann mit der CFDA Färbung bei autochthonen unbehandelten Wässern möglicherweise brauchbare Ergebnisse zu erhalten. Aus den Experimenten dieser Arbeit kann geschlossen werden, dass NaCl als Verdünnungsmatrix diese Stoffe nicht beinhaltet und ClO₂ diese störenden Komponenten offenbar zerstört.

Die Versuche des Wachstumspotentials vom ClO₂ Experiment wurden ebenfalls mit der ATP Methode gemessen. In Abbildung 46 bis Abbildung 49 sind jeweils die Ergebnisse der unbehandelten und der ClO₂ behandelten Proben von den zwei Versuchen dargestellt.

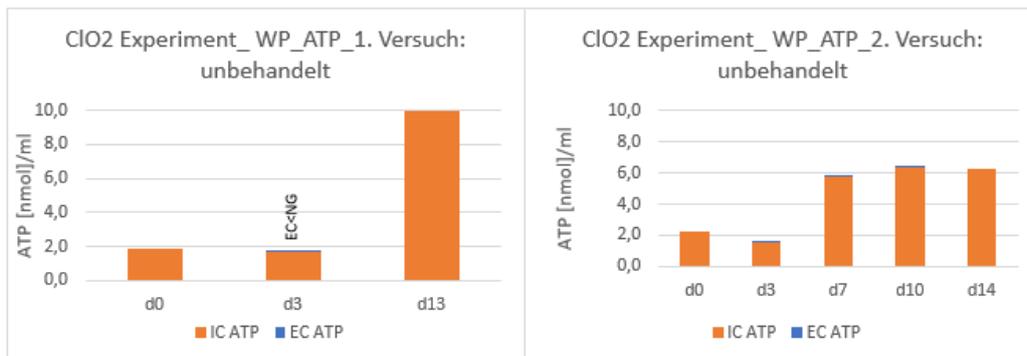


Abbildung 46: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential ATP Methode: *E. faecium* in Rohwasser verdünnt und bei 15 °C gelagert; unbehandelte Probe

Bei den unbehandelten Proben verringert sich das IC-ATP bis Tag 3 geringfügig und steigt dann bis Tag 13 bzw. 14 an. Wobei, so wie bei der SG1PI Färbung schon aufgefallen ist, fällt das Wachstum beim 1. Versuch höher aus. Beim 2. Versuch müsste das IC-ATP, wenn man es mit den Ergebnissen der SG1PI Färbung vergleicht, eigentlich von Tag 7 auf Tag 14 wieder sinken, aber die ATP Werte zeigen den Höhepunkt des Wachstums am 10. Tag und erst dann wieder eine geringe Abnahme des IC-ATPs.

Um dies erklären zu können werden zunächst die ATP Werte/Zelle beider Versuche gegenübergestellt. Bei der Berechnung der ATP Werte pro Zelle werden die ICC Werte der unbehandelten Proben an den jeweiligen WP Tagen herangezogen. Tabelle 10 zeigt die ATP Werte pro Zelle in nM für beide Versuche an verschiedenen WP Tagen.

Tabelle 10: WP beide Versuche: Vergleich ATP Werte/Zelle an unterschiedlichen Tagen

Tag	1. Versuch	2. Versuch
	nM ATP/Zelle	nM ATP/Zelle
d0	1,5E-05	3,9E-06
d7		8,7E-06
d13/d14	1,0E-05	1,2E-05

Es ist ersichtlich, dass die ATP/Zelle Werte beim zweiten Versuch etwas niedriger ausfallen, wobei sie sich zum Schluss des Wachstumspotential Versuchs (d13/14) fast angleichen. Außerdem fällt auf, dass beim 2. Versuch die ATP/Zelle Werte am 7. Tag höher und am 14. Tag noch höher ausfallen als zu Beginn des Experiments.

Eine mögliche Erklärung liefern Nescerecka et al., 2016b, wo beschrieben wird, dass das Zellvolumen die ATP-Werte pro Zelle beeinflusst, die normalerweise während der exponentiellen Wachstumsphase höher sind. Dies erklärt weitgehend eine eher schwache Korrelation zwischen IC-ATP und ICC. Im Gegensatz dazu korrelierten ATP per Zellwerte stark mit der relativen Zellgröße und IC-ATP korrelierte daher gut mit dem relativen Biovolumen. Diese Daten zeigen den Einfluss der Zellgröße, in diesem Fall bezogen auf den physiologischen Zustand der Zellen (Wachstum), auf die Interpretation der ATP-Daten sowie den Vorteil der gemeinsamen Verwendung von DFZ und ATP (Nescerecka et al., 2016b).

Beim 2. Versuch ist die Erhöhung der ICC geringer als die Zunahme der ATP-Konzentration. Die Zellzahl erhöht sich während der Lagerung nur geringfügig, aber die Zellen werden größer, also das Biovolumen wird mehr und damit auch das IC-ATP.

Farhat et al., 2018 schreiben ebenfalls, dass bei der Prüfung des Wachstumsausmaßes von verschiedenen einheimischen Mikroben Gemeinschaften in demselben Wassertyp, die Zunahme von ATP durch Zugabe von einfachen Kohlenhydraten nicht den gleichen Trend wie die Zunahme der Zellzahl zeigte. Die Autoren führen die Diskrepanz zwischen den ATP-Ergebnissen und den DFZ-Ergebnissen auf die Art der ATP-Messung und die Möglichkeit zurück, den Peak-ATP-Wert zu verfehlen. Kürzlich durchgeführte Studien unter Verwendung von Online-ATP-Messungen zeigten einen raschen Anstieg, aber auch ein schnelles Absinken der ATP Werte, insbesondere wenn einfache Kohlenstofftypen wie Acetat hinzugefügt werden. Dementsprechend können Offline-ATP-Messungen (da nur punktuelle Messungen an verschiedenen Tagen erfolgen) möglicherweise die Spitze des ATP-Werts verfehlen, was eine ungenaue Endpunktinterpretation des Wachstums ergibt (Farhat et. al, 2018). Wie in der Studie von Nescerecka et al., 2016b zu sehen ist, bleibt die ATP-Lumineszenz ein zellassoziierter Parameter, der je nach Wachstumsstadium in jeder Zelle variieren kann (Nescerecka et al., 2016b). Die DFZ untersucht im Vergleich zur ATP-Analyse spezifisch das numerische Wachstum einer Kultur, das das Grundprinzip des Konzepts des bakteriellen Wachstumspotenzials darstellt. Welche Methode für die Bewertung des Wachstumspotentials gewählt wird hängt von der Definition des Wachstums ab. Soll die Zellvermehrung untersucht werden ist die DFZ gut geeignet, soll aber die Bildung von Biomasse als Wachstumsparameter dienen eignet sich die ATP Methode gut. Beide Methoden sind genau und zuverlässig und zusammen geben Informationen wie ATP/Zelle mehr Aufschluss über das Wachstumspotenzial (Farhat et al., 2018).

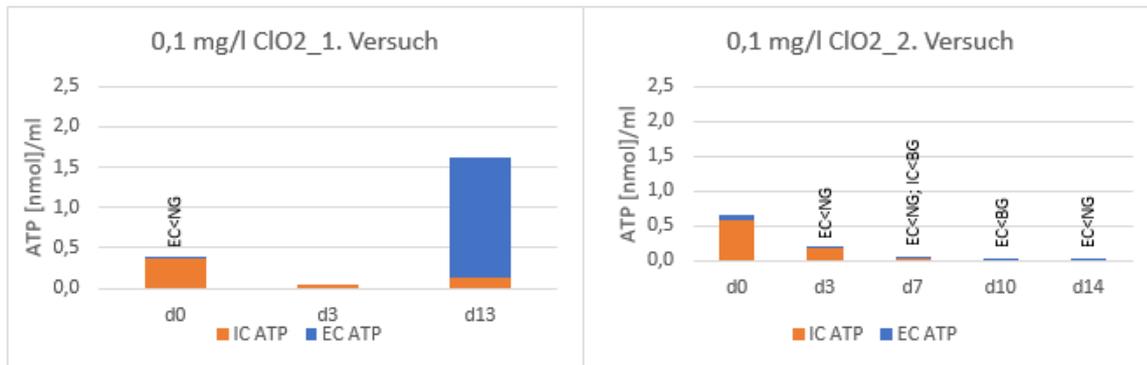


Abbildung 47: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential ATP Methode *E. faecium* in Rohwasser verdünnt und bei 15 °C gelagert; Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂

Nach Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ kann nur mehr ein geringer Teil des IC-ATPs (im Vergleich zu den unbehandelten Proben) ermittelt werden. Durch die Lagerung ist beim ersten Versuch eine Abnahme des IC-ATPs von Tag 0 bis Tag 3 zu erkennen. Nach einer Standzeit von 13 Tagen wurde eine geringe IC-ATP Konzentration und ein hoher EC-ATP Wert detektiert. Beim 2. Versuch nimmt das IC-ATP von Tag 0 bis Tag 7 ab und ab Tag 10 konnte kein IC-ATP (< NG) mehr gemessen werden.

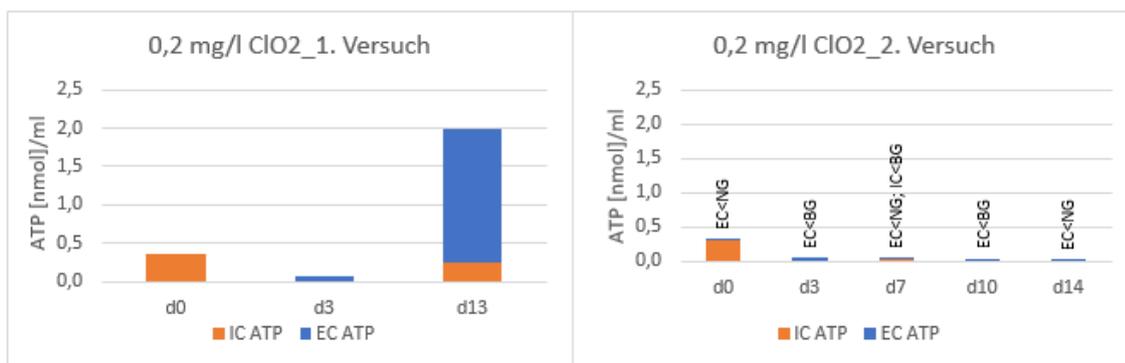


Abbildung 48: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential ATP Methode *E. faecium* in Rohwasser verdünnt und bei 15 °C gelagert; Zugabe von 0,2 mg/l ClO₂

Die Ergebnisse nach Zugabe von 0,2 mg/l ClO₂ sind denen der 0,1 mg/l Zugabe sehr ähnlich: Beim 1. Versuch sinkt das IC-ATP von Tag 0 bis Tag 3 und eine geringe Konzentration EC-ATP ist vorhanden. Die Messung von Tag 13 ergibt wieder eine relativ hohe EC-ATP Konzentration. Beim 2. Versuch ist am Tag des Experiments noch eine geringe Konzentration an IC-ATP messbar, ab dem 3. Tag der Lagerung nur mehr geringe Konzentrationen EC-ATP.

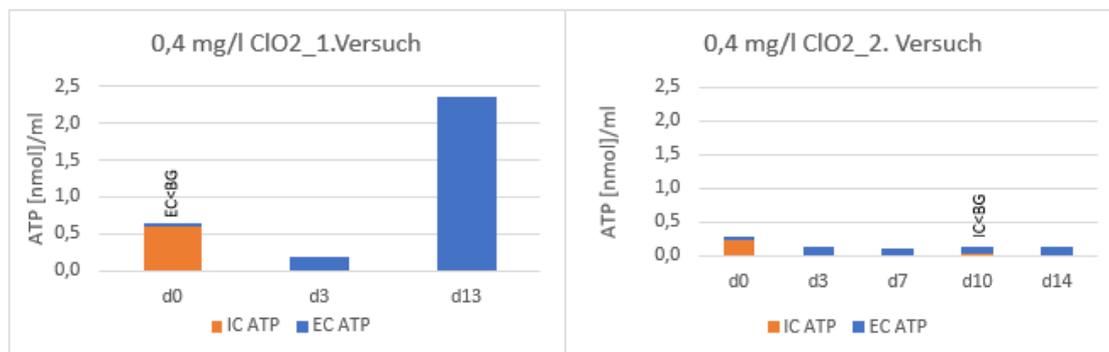


Abbildung 49: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential ATP Methode *E. faecium* in Rohwasser verdünnt und bei 15 °C gelagert; Zugabe von 0,4 mg/l ClO₂

Nach Zugabe von 0,4 mg/l ClO₂ wurde mit Hilfe der ATP Methode am Tag des Experiments erneut eine geringe Konzentration IC-ATP gemessen. Die ATP Messungen der Proben nach der Lagerung ergeben nur geringe Konzentrationen EC-ATP, wobei wieder beim 1. Versuch am 14. Tag relativ hohe EC-ATP Werte bestimmt werden konnten, die etwas höher als die IC-ATP Werte der unbehandelten Probe am Versuchstag sind.

Dieses Experiment zeigt, dass durch die Bestimmung von ATP das Wachstumspotential der unbehandelten Proben gut verfolgt werden kann. Nach ClO₂ Behandlung ist bei diesen zwei Versuchen, wenn man die IC-ATP Werte mit den Ergebnissen der SG1PI_Trīs Färbung vergleicht, der Rückgang des IC-ATPs von der unbehandelten Probe zur 0,1 mg/l ClO₂ Behandlung zu groß und ein weiterer Abfall bei den 0,2 mg/l und 0,4 mg/l ClO₂ Behandlungen zumindest beim ersten Versuch nicht erkennbar. Auffällig ist, dass beim ersten Versuch nach 13 Tage Lagerung eine hohe Konzentration EC-ATP detektierbar ist.

Der Vergleich des WPs der SG1PI_Trīs Färbung mit der ATP Methode zeigt, dass durch Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂ bereits wenig IC-ATP messbar ist und dieses auch im Laufe der Lagerung immer weniger wird. Die ICC ist im Gegensatz dazu bei Zugabe derselben ClO₂ Konzentration relativ hoch und bleibt während des WP Versuchs relativ konstant, ein Wiederaufkeimen ist aber auch nicht messbar. Das heißt bereits ab einer Konzentration von 0,1 mg/l ClO₂ ist ein Wiederaufkeimen von *E. faecium* während der 13 bzw. 14 Tage Lagerung bei 10 °C nicht messbar.

Offen bleibt warum im 1. Versuch nach 13 Tage Lagerung hohe EC-ATP Werte messbar sind und im 2. Versuch nicht. Dass es zwischen den 2 Versuchen Unterschiede gibt war auch schon bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten ersichtlich. Es könnte daran liegen, dass der 2. Versuch ca. 4 Wochen später durchgeführt wurde und durch die Lagerung des steril filtrierte Rohwasser bei 4°C Komponenten (wie z.B. Enzyme), die durch den 0,1 µm Filter durchgehen, nach der Lagerung nicht mehr vorhanden waren bzw. sich die Zusammensetzung dieser Substanzen geändert hat. Eine Theorie ist, dass Enzyme die Vorhandenen Bestandteile der bereits durch ClO₂ zerstörten ATP wiederhergestellt haben, diese aber nach der Lagerung des steril filtrierte Rohwasser nicht mehr vorhanden waren.

6. Schlussfolgerungen

6.1 Untersuchungen in einer TWVA

Bei den Untersuchungen in der TWVA wurde gezeigt, dass die Durchflusszytometrie eine gute Methode ist, um sowohl Veränderungen der Gesamtzellzahl (TCC) durch Verwendung von SG1 als auch Änderungen der Zahl der intakten Zellen (ICC) mit Hilfe der Farbstoffkombination SG1PI_DMSO darzustellen. Die Desinfektionswirkung nach ClO₂ Zugabe konnte mit der angewendeten Methode (durchflusszytometrisch mit SG1PI_DMSO) gut veranschaulicht werden. Die Interpretation der Ergebnisse nach UV-Desinfektion gestaltet sich schwieriger, da durch UV-Strahlung die Zellmembran nicht permeabilisiert wird. Methoden zur Beurteilung der Desinfektionswirkung nach UV-Desinfektion werden in Kapitel 3.3.2.5 dargestellt. Wobei schlussfolgernd die adäquate Beurteilung als herausfordernd beschrieben wird.

Bei den WP Versuchen kann durch die Überprüfung der TCC über mehrere Tage festgestellt werden, ob das Wasser bei der ausgewählten Lagerungstemperatur stabil ist. Aus den eigenen Versuchen konnte die Erkenntnis abgeleitet werden, dass eine Erhöhung der TCC eine Zellvermehrung anzeigt und damit auf einen Anstieg der ICC schließen lässt. Daher kann durch regelmäßiges messen der TCC, auch nach der UV-Desinfektion, Veränderungen der Gesamtzellzahl, also entweder ein Wachstum oder ein Rückgang der Zellen, über einen bestimmten Zeitraum detektiert werden. Wobei online-Methoden, die unter Punkt 3.3.2.4 vorgestellt werden, sinnvoll sind. Zusätzlich konnte der weitere Verlauf der TCC und ICC im Netz und im Hochbehälter durchflusszytometrisch gut beschrieben werden.

Mit der kulturellen Methode konnte die Desinfektionswirkung bei allen Probenahmestellen nachgewiesen werden. Die Nachteile liegen in der langen Inkubationszeit (Ergebnisse erhält man erst nach einer Woche) und dass nur ein kleiner Teil der autochthonen Bakterien auf Nähragar Kolonien bilden können obwohl viel mehr Zellen intakt sind (VBNC).

Sowohl die Ergebnisse der DFZ als auch der kulturellen Methode deuten auf ein durchwegs stabiles Wasser hin. Da aber nach der UV-Behandlung und mehreren Tagen Standzeit eine deutliche Erhöhung der Gesamtzellzahlen messbar ist, scheint die zusätzliche Zugabe von ClO₂ in geringer Konzentration sinnvoll zu sein. Im Ablauf des Hochbehälters sind die ICC und auch die KBE schon am Probenahmetag immer etwas höher, nach einer Standzeit von 14 Tagen bei 10 °C konnte aber nur durch Zugabe von Thiosulfat und die damit verbundene Nährstoffverfügbarkeit Wachstum festgestellt werden. Die KBE/ml Probe befinden sich für alle Probenahmestellen im zulässigen Bereich, der von der Trinkwasserverordnung, 2017 vorgegeben wird.

Die Beschreibung des Trinkwassers und die Überprüfung der Desinfektionswirkung der TWVA in dieser Arbeit konnte sowohl mit der DFZ als auch mit der kulturellen Methode gut veranschaulicht werden. Die Detektion der ICC mit Hilfe von DMSO nach der UV- Behandlung ist noch klärungsbedürftig und die Nachteile der HPC wurden aufgezeigt.

6.2 Laborexperimente

6.2.1 Einflussfaktoren auf die SG1PI-Färbung

Bei diesem Experiment wurden die Einflussfaktoren PI-Konzentration, Farbstofflösungsmittel und Messdauer bei der Anwendung der SG1PI Färbung getestet und es konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

Mit DMSO als Lösungsmittel für SG1PI werden nach erfolgter Inkubation bei 37°C für 13 Minuten mit Hilfe der Durchflusszytometrie deutlich weniger intakte Zellen detektiert als mit Tris Puffer als Lösungsmittel. Nescerecka et al., 2016a führen das auf eine Zerstörung der Zellmembran bei der

Inkubation durch DMSO zurück. Die vermutliche Permeabilisierung der Zellen durch DMSO war bei den unbehandelten und leicht thermisch behandelten Proben (60°C, 5 min) am höchsten. Bei der starken thermischen Behandlung (80°C, 10 min) war der Unterschied zwischen DMSO und Tris Puffer als Lösungsmittel gering, da nur mehr wenige intakte Zellen in der Probe vorhanden waren.

Es kann nun die Frage gestellt werden welche Ergebnisse (SG1PI in DMSO oder Tris Puffer gelöst) die „richtigen“ sind. Die Experimente dieser Arbeit lassen keine eindeutige Antwort zu. Dazu müssten weitere Versuche durchgeführt werden, bei denen die Membranpermeabilität von Wasserbakterien nach Anfärben mit SG1PI in DMSO und Tris Puffer mit geeigneten Verfahren miteinander verglichen werden.

Die PI-Konzentration hat einen deutlichen Einfluss auf das Ergebnis. Die optimale PI-Konzentration muss eine vollständige Färbung geschädigter Zellen gewährleisten, ohne falsche PI-positive Ergebnisse zu verursachen (Färbung intakter Zellen) (Nescerecka et al., 2016a). Bei den thermisch behandelten RW-Proben wurden mit der SG1PI_Trīs_8 + 12 µM Färbung, weniger intakte Zellen detektiert als mit DMSO (4 µM) als Lösungsmittel. Die Verwendung von zu niedrigen PI Konzentrationen (<4 µM) kann ebenso zu falschen Ergebnissen führen, da für die Anfärbung der permeabilisierten Zellen zu wenig Farbstoff vorhanden ist. Deswegen wird eine Konzentration von 4 bis 6 µM PI in Tris gelöst vorgeschlagen, beide Konzentrationen erzielen bei allen 4 Proben über die getestete Zeit stabile und plausible Werte. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde mit der SG1PI_Trīs_6 µM Färbung weitergearbeitet.

Wenn PI in Tris Puffer gelöst wird sind am Anfang der Messung noch nicht alle zerstörten Zellen angefärbt, die ICC ist also noch etwas höher als nach 30-minütiger Messung. Die Inkubation von 13 Minuten ist daher zu kurz, um alle permeabilisierten Zellen anfärben zu können. Entweder die Inkubationsdauer wird erhöht oder die SG1PI Färbung wird auf der Well-Platte erst nach den SG1 Färbungen aufgetragen, zweiteres wurde in dieser Arbeit bei den weiteren Versuchen durchgeführt.

Die Einhaltung eines einmal festgelegten Protokolls ist besonders wichtig, weil die Ergebnisse sonst nicht reproduzierbar sind. Im Unterschied zur ICC ist bei der TCC die Wahl des Lösungsmittels nicht so kritisch, da alle Zellen angefärbt werden.

6.2.2 Einfluss der Desinfektionswirkung von ClO₂

Da bei der Trinkwasserdesinfektion häufig Chlor oder ClO₂ verwendet werden, sind Informationen über die Auswirkungen von Chlorverbindungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen für die Kontrolle der öffentlichen Gesundheit von großer Bedeutung. Es ist bekannt, dass Chlorverbindungen mit verschiedenen zellulären Verbindungen reagieren und Schäden auf verschiedenen zellulären Ebenen verursachen, einschließlich Membranschäden, Proteinfragmentierung, Hemmung der ATP-Produktion und Nukleinsäure Schäden. Angesichts der Ungenauigkeit der herkömmlichen Plattenzählmethode bei der Beurteilung der Lebensfähigkeit der Zellen wurden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt und angewendet, die auf verschiedene Zellkompartimente abzielen (Wang et al., 2010a).

In dieser Studie wurden zwei fluoreszierende Färbesätze erfolgreich angewendet, um die Auswirkungen der chemischen Desinfektion durch ClO₂ auf die Lebensfähigkeit der Zellen von *E. faecium* zu bewerten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zellmembranintegrität (aufgedeckt durch SG1PI-Färbung) ein guter „universeller“ Indikator für die Desinfektionseffizienz ist, wobei durch Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmitteln (DMSO und Tris Puffer) Abweichungen in den Ergebnissen entstehen. Durch Verwendung von DMSO werden durchwegs (außer nach intensiver Abtötung der Zellen durch Verwendung von hohen ClO₂ Konzentrationen (ab 0,4 mg/l) und hohen Temperaturen (ab 80°C, 10 min)) niedrigere ICC Werte gemessen.

Die IC-ATP Konzentration und die Esterase Aktivität sind, mit den im Ergebnisteil angeführten Einschränkungen bei Verdünnung von *E. faecium* in Rohwasser (CFDA kann unzureichende in

die intakten Zellen eindringen, vermutlich weil es von bestimmten Substanzen/Enzymen die im RW vorhanden sind teilweise zerstört wird), gute Indikatoren für die tatsächliche Bakterienaktivität von *E. faecium*. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Konzentration an ClO₂ die *E. faecium* Zellen zuerst ihre Kultivierbarkeit auf festem Medium verloren (ab 0,2 mg/l keine KBE), ihre Zellmembran aber erst ab einer Dosis von 0,4 mg/l ClO₂ fast vollständig zerstört war und die Esterase Aktivität bei *E. faecium* in Rohwasser verdünnt auch bei 0,4 mg/l ClO₂ noch messbar war. Beim Vergleich der Ergebnisse der ATP Methode mit den durchflusszytometrischen Daten fällt auf, dass das IC-ATP nach Behandlung mit 0,1 und 0,2 mg/l ClO₂ mit der Esterase Aktivität besser zusammen passt und die Ergebnisse der 0,4 mg/l ClO₂ und thermisch behandelten Proben denen der ICC ähnlicher sind.

6.2.2.1 SG1PI Färbung nach ClO₂ Desinfektion

Wie schon erwähnt kann PI nur in Zellen eindringen, wenn die Membran permeabilisiert ist, daher ist die Anwendung des SG1PI Färbeprotokolls nach membranschädigenden Desinfektionsmethoden sinnvoll. Das Experiment „Einfluss der Desinfektionswirkung von ClO₂“ zeigt, dass die Kombination von SG1 und PI die Desinfektionswirkung durch ClO₂ von *E. faecium* gut darstellen kann. Des Weiteren wurde die Notwendigkeit eines einheitlichen Protokolls verdeutlicht, da durch Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel (Tris Puffer und DMSO) die Ergebnisse für die ICC variieren. Mit Tris Puffer wurden nach Zugabe von 0,1 und 0,2 mg/l ClO₂ höhere ICC detektiert als mit DMSO als Lösungsmittel. Entweder es wurden geschwächte intakte Zellen durch DMSO zerstört, oder mit Tris Puffer als Lösungsmittel konnten nicht alle permeabilisierten Zellen detektiert werden.

6.2.2.2 CFDA

Die Desinfektionswirkung von *E. faecium* in NaCl verdünnt nach Zugabe unterschiedlicher ClO₂ Konzentrationen konnte durch Verwendung vom CFDA Protokoll gut dargestellt werden. Die unbehandelte Probe von *E. faecium* in RW verdünnt ergab nach Anwendung der CFDA Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung ein zu schwaches Signal. Es konnte nur ein geringer Teil der intakten Zellen detektiert werden, wobei das Vorhandensein von Störfaktoren im RW (z.B. Substanzen die CFDA zerstören können) ein möglicher Grund sein könnte. Das zusätzliche Experiment „Matrixeffekt“ zeigt, dass dieses Phänomen nicht nur im RW das in dieser Arbeit als Verdünnungsmittel verwendet wurde, sondern zumindest in vier getesteten Rohwässern aus unterschiedlichen Quellen auftritt. Zusätzlich interessant ist, dass nach Zugabe von ClO₂ die Detektion der intakten Zellen wieder möglich ist und der weitere Desinfektionsverlauf durch das CFDA Protokoll abbildbar ist. Vermutlich werden die Störfaktoren im Rohwasser, die CFDA zerstören, durch ClO₂ eliminiert.

6.2.2.3 ATP Methode

Mit Hilfe der ATP Methode konnte die Abnahme der intakten Zellen nach der Behandlung mit ClO₂ gut beschrieben werden. Trotzdem werfen die Ergebnisse ein paar Fragen auf: Obwohl durch die ClO₂ Desinfektion Membranschäden entstanden und folglich EC-ATP austreten muss, ersichtlich durch die Abnahme des IC-ATPs, konnte weder in den NaCl noch in den RW verdünnten *E. faecium* Proben EC-ATP detektiert werden (<BG). Nur bei den thermisch behandelten Proben konnte EC-ATP gemessen werden, wobei in den NaCl verdünnten Proben nur ein geringer Teil nachweisbar war. Vermutlich wird in der 30-minütigen ClO₂ Einwirkzeit das durch die Desinfektion herausgetretene EC-ATP durch ClO₂ zerstört.

Wie oben kurz angeschnitten konnte in den thermisch behandelten NaCl verdünnten Proben nur ein geringer Teil des EC-ATPs nachgewiesen werden. Möglicherweise wird das EC-ATP durch NaCl zerstört. Dazu müssten weitere Versuche zur Überprüfung der Stabilität von EC-ATP in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt werden.

Auch die Beobachtung, dass bei den unbehandelten Proben die IC-ATP Konzentration in NaCl verdünnten *E. faecium*, trotz sehr ähnlicher ICC höher ist als in den RW gelösten Bakterien wirft die Frage auf wie sich der ATP Assay in verschiedenen Matrices verhält. Zumal sich diese Beobachtung ab der Zugabe von 0,2 mg/l ClO₂ umkehrt und dann in den RW verdünnten Proben höhere IC-ATP Werte erzielt werden.

Unterschiede in den Ergebnissen zwischen DFZ und ATP Methode zeigen, dass es hilfreich ist sich zu vergegenwärtigen welche Aussage durch die jeweilige Methode getroffen werden kann. Des Weiteren kann die Anwendung mehrerer Methoden und/oder Färbeprotokolle von Vorteil sein.

6.2.2.4 Wachstumspotential

In dieser Arbeit wurden sowohl die DFZ mit dem SG1PI_Trīs und CFDA Färbeprotokoll als auch die ATP Methode erfolgreich zur Veranschaulichung des Wachstumspotentials der unbehandelten und ClO₂ behandelten Proben angewendet.

CFDA hat den Nachteil, dass trotz vollständiger Zerstörung der Membranen und nicht Vorhandensein von ATP bei 0,2 und 0,4 mg/l ClO₂ Behandlung ab Tag 3 spätestens Tag 7 diese Zerstörung der Zellen nicht abbildbar ist, es konnte noch immer Restenzymaktivität gemessen werden.

Bei den Messungen des WPs mit Hilfe von CFDA konnte zusätzlich eine interessante Beobachtung bei den unbehandelten Proben gemacht werden. Am Tag der Probenahme konnte, wie schon im Kapitel 6.2.2.2 beschrieben, die Enzymaktivität bei der unbehandelten Probe erst nach Zugabe von ClO₂ adäquat gemessen werden. Wobei als möglicher Grund die Anwesenheit von Substanzen die CFDA zerstören können vermutet wird. Beim WP Versuch wurde die Enzymaktivität der unbehandelten Probe nach 3, 7, 10 und 14 Tagen Lagerung gemessen und eine lineare Erhöhung der Esterase Aktivität mit länger andauernder Lagerung bei 10 °C ist zu erkennen. Nach 14 Tagen Lagerung werden Esterase Aktivitäten gemessen, die für unbehandelte Proben plausibel erscheinen und den Wert der 0,1 mg/l ClO₂ Zugabe deutlich übertreffen. Möglicherweise zerfallen die Substanzen die CFDA eliminieren können sukzessive während der Lagerung oder werden durch andere Komponenten zerstört.

Beim Vergleich der DFZ und ATP Ergebnisse fallen Unterschiede auf, die beim 2. Versuch auch durch unterschiedliche ATP/Zelle – Werte dargestellt werden konnten. Der Grund liegt in der Detektion verschiedener Lebensparameter dieser zwei Methoden. Die ATP-Analyse ermöglicht eine genaue Quantifizierung von Änderungen der Konzentration der aktiven Biomasse und die DFZ (SG1 und SG1PI Färbung) misst die Änderungen der ICC oder TCC (Farhat et al., 2018).

6.3 Weitere Fragestellungen und Fazit

In dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten präsentiert wie die Desinfektionswirkung nach unterschiedlichen Desinfektionsmaßnahmen überprüft werden kann. Im Allgemeinen wurden die Ziele dieser Arbeit erreicht, wobei weitere Fragestellungen aufkamen:

- Ist es möglich die ICC nach der UV-Desinfektion mit SG1PI in DMSO gelöst wahrheitsgetreu abzubilden? Welche Möglichkeiten gibt es die UV-Desinfektion und die einhergehende Abnahme der intakten Zellen wirklichkeitsnah mit den neueren Methoden zu detektieren?
- Wie stabil ist EC-ATP in physiologischer NaCl-Lösung und ClO₂-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten?
- Gibt es ein Protokoll für die CFDA Färbung um Bakterien, die in Rohwasser verdünnt wurden, adäquat zu detektieren? Z.B. durch Entfernen der Bakterien vom Rohwasser und

Überführen dieser in physiologische Kochsalzlösung, oder durch Entfernen der störenden Substanzen im Rohwasser.

- Ist die Detektion von natürlichen Bakterien im Trinkwasser durch CFDA mit Hilfe von Kontrastmitteln (wie z.B. Brilliant Blue R) möglich?

Diese Arbeit zeigt, wie wichtig es ist bei der Beurteilung der Desinfektionswirkung den Mechanismus der Zerstörung durch die Desinfektionsmaßnahme zu verstehen. Erst dann kann die Methode zur Bestimmung der intakten Zellen bestimmt werden (z.B. PI nicht geeignet nach UV-Desinfektion). Des Weiteren wird veranschaulicht, dass die Verwendung unterschiedlicher Färbeprotokolle in der DFZ (z.B. Lösungsmittel DMSO/Tris Puffer) die Ergebnisse beeinflussen kann.

Die Definition von lebenden oder toten Zellen hängt weitgehend von der Methode ab, mit der die Lebensfähigkeit der Zellen bewertet wird (Wang et al., 2010a). Es ist zwingend erforderlich, dass die Farbstoffe, die in der DFZ Anwendung finden, als Indikatoren für bestimmte zelluläre Funktionen verstanden werden, die mit der Lebensfähigkeit in Zusammenhang stehen können, dass sie jedoch nicht die Lebensfähigkeit der Zellen an sich messen (Ramseier et al., 2010).

Der beste Ansatz ist die Verwendung einer Kombination von kultivierungsunabhängigen Methoden, die auf verschiedene zelluläre Prozesse abzielen, die mit der Lebensfähigkeit verknüpft sind, um spezifische und aussagekräftige Informationen über verschiedene Zellzustände, Arten von Zellschäden und den Grad der Zellschädigung zu erhalten. Es ist zu betonen, dass die Methoden vor der Anwendung sorgfältig ausgewählt und optimiert werden sollten, wobei die jeweilige Umgebung und die zu analysierenden Organismen zu berücksichtigen sind. In dieser Hinsicht sind folgende kritische Punkte zu berücksichtigen: (1) der mit der Methode gemessene zelluläre Prozess, (2) die Spezifität der Methode gegenüber dem Zielorganismus, (3) der inhärente Zusammenhang zwischen verschiedenen Methoden / Prozessen, (4) die sequenz- und zeitabhängige Art und Weise, in der zelluläre Prozesse auf einen bestimmten Stress reagieren und die Fähigkeit von Zellen, sich von einer bestimmten Verletzung zu erholen. Die Anwendung von kultivierungsunabhängigen Lebensfähigkeitstests auf Umweltproben ist ein notwendiges und lohnendes Unterfangen, um das Verhalten von Bakterien in komplexen natürlichen Umgebungen zu verstehen (Hammes et al., 2011).

Die Beurteilung der Desinfektionswirkung durch die Bestimmung der ICC oder anderer Lebensfähigkeitsparameter ist ein weites und relativ neues Gebiet, welches weitere Experimente und Forschungen notwendig macht. Außerdem ist es wichtig einheitliche Protokolle und Standardisierungen der neuen Methoden für die spezifischen Probenarten und den verschiedenen Desinfektionsmaßnahmen einzuführen, um die Ergebnisse der TWVAs reproduzierbar und gut vergleichbar machen zu können.

7. Zusammenfassung

Die Bestimmung der Desinfektionswirkung in TWVAs ist ein wesentlicher Bestandteil, um sicheres Wasser für den Verbraucher zu gewährleisten. Meist wird dies noch mit den zeitaufwendigeren kulturellen Methoden bestimmt, mit dem Nachteil, dass nicht alle Wasserbakterien detektiert werden (VBNC). Die neueren Methoden (DFZ, ATP Methode) sparen Zeit und liefern schnell gute Ergebnisse. Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung und Bewertung der Desinfektionswirkung in einer TWVA und bei Laborexperimenten mit *E. faecium*. Die UV-Desinfektion und die Desinfektion durch Zugabe von ClO_2 wurden mit Hilfe der kulturellen Methode und der Durchflusszytometrie (TCC und ICC) bestimmt und die Stabilität des Wassers anhand des Wachstumspotentials untersucht. Bei den Laborexperimenten wurden einerseits die Lösungsmittel DMSO und Tris Puffer für die SG1PI Färbung miteinander verglichen. Andererseits wurde durch Desinfektion von *E. faecium* mit unterschiedlichen Konzentrationen ClO_2 unter Anwendung verschiedener Methoden (kulturell, DFZ (SG1PI_4 μM _DMSO, SG1PI_6 μM Tris, CFDA), und ATP Methode) die Desinfektionswirkung veranschaulicht. Im WP Versuch wurde das Potential der Wiederaufkeimung von *E. faecium* bestimmt und zum Schluss wurden die Methoden miteinander verglichen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte anhand Detektion der TCC und der ICC die Veränderung der Gesamtzellzahl und der intakten Zellzahl der verschiedenen Probenahmestellen (RW, nach UV, nach UV+ ClO_2 , Netz 1 und 2, Hochbehälter Zulauf und Ablauf) über den Untersuchungszeitraum gut dargestellt werden. Die biologische Stabilität und damit einhergehend ob die Desinfektionsmaßnahme ausreichend ist wurde mittels WP Versuche geprüft. Aufgrund der erhaltenen Werte kann das Wasser dieser TWVA vom Rohwasser bis zum Verbraucher als stabil eingestuft werden. Nur die Ergebnisse des Hochbehälter Ablaufs weisen etwas höhere TCC und ICC Werte auf. Des Weiteren konnte ab ClO_2 Zugabe die Desinfektion durch Detektion der intakten Zellen sichtbar gemacht werden und die Desinfektionswirkung im Netz aufgrund durchwegs niedriger ICC Werte dargestellt werden. Ob die ICC der UV behandelten Proben (ca. 50% Reduktion der ICC) mit der Farbstoffkombination SG1PI_DMSO hinreichend abgebildet werden konnte ist fraglich, da UV-Strahlen die DNA und andere Kompartimente der Zelle schädigen und eigentlich nicht die Membran permeabilisieren. PI kann aber nur in permeabilisierte Zellen eindringen. In dieser Arbeit werden zwei Vermutungen für diese Werte aufgestellt. Entweder werden die Membranen der bereits durch UV geschwächten Zellen mit Hilfe von DMSO permeabilisiert oder die Zeit zwischen Probenahme und Messung (ca. 4 Stunden) reicht aus, dass der Zelltod der UV geschädigten Zellen herbeigeführt wird.

Im Wachstumspotential Versuch konnte bei den UV behandelten Proben gezeigt werden, dass das Wasser bei 10°C bis zum 7. Tag stabil ist. Bei Erhöhung der Temperatur auf 15 bzw. 20 °C kommt es bereits nach dem 3. Tag Standzeit zu einem Bakterienwachstum, nach 10 Tagen Lagerung kommt es bei 78% der WP Versuche zu einem Wachstum und alle davon wurden durch den T-Test als signifikantes Wachstum bestätigt. Bei den anderen Probenahmestellen zeigten sich die WP Kurven unauffällig, bis auf einzelne Proben vom Hochbehälter, wobei ein Bakterienwachstum nur nach Zugabe von Thiosulfat erfolgte.

Die Desinfektionswirkung konnte bei der TWVA zusätzlich mit der kulturellen Methode bestimmt werden, mit dem Nachteil, dass nur ein geringer Teil der Zellen kultivierbar war und die Ergebnisse erst nach einer Woche auswertbar waren.

Das Experiment „Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung“ zeigt, dass nach der Inkubationszeit von 13 Minuten bei 37°C bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel deutlich weniger ICC detektiert werden als mit Tris Puffer. Um eine Aussage darüber machen zu können was die „richtigen“ Ergebnisse sind, sind weitere Versuche notwendig.

Mit der Farbstoffkombination SG1PI und der ATP Methode konnte beim Laborexperiment „Bestimmung der Desinfektionswirkung von ClO_2 “ die Abnahme der intakten Zellen mit höherer

ClO_2 Konzentration gut dargestellt werden. Die Zahl der intakten Zellen der unbehandelten Probe konnte mit der kulturellen Methode mit dem gewählten Medium und unter den Inkubationsbedingungen nachgebildet werden. Durch die Zugabe von ClO_2 verabschiedeten sich aber fast alle Zellen in den VBNC Zustand und die Desinfektionswirkung konnte nicht realistisch beurteilt werden. Die Illustration der Desinfektionswirkung von *E. faecium* in NaCl verdünnt war mit der CFDA Färbung möglich, aber bei Verwendung von Rohwasser als Verdünnungsmedium konnte die Abnahme der intakten Zellen erst ab der Zugabe von ClO_2 veranschaulicht werden. Bei *E. faecium* verdünnt in steril filtriertem unbehandeltem RW konnte nur 26% der Esterase Aktivität im Vergleich zur selben Verdünnung in steril filtriertem NaCl detektiert werden. Es wird vermutet, dass unbestimmte Komponenten im Rohwasser entweder CFDA zerstörten oder das Eindringen von CFDA in die Zelle verhinderten. Im Allgemeinen zeigen alle Methoden, dass *E. faecium* in steril filtriertem RW robuster gegenüber der ClO_2 Desinfektion ist als in steril filtriertem NaCl. Es wird vermutet, dass die RW Matrix (Komponenten, die nach der Filtration durch einen 0,1 μm Filter im Wasser verbleiben, wie z.B. Enzyme, Nährstoffe usw.) ein besseres Milieu bietet. Der ct_{99} Wert von *E. faecium* in RW beträgt 4,82 $\text{mg/l} \cdot \text{min}$ und der $\text{ct}_{99,9}$ Wert in NaCl beträgt 2,45 $\text{mg/l} \cdot \text{min}$. Diese wurden mit Hilfe der ICC Werte nach Desinfektion mit 0,4 mg/l ClO_2 und den Restchlordioxid Konzentrationen berechnet. Sie bestätigen die höhere Resistenz von *E. faecium* in steril filtriertem RW gegenüber steril filtriertem NaCl und verdeutlichen im Allgemeinen eine hohe Resistenz von *E. faecium* gegenüber der ClO_2 Desinfektion.

Beim Vergleich der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der intakten Zellen (DFZ: SG1PI_DMSO, SG1PI_Triss, CFDA; ATP und kulturell) werden die Unterschiede der einzelnen Techniken nochmals deutlich. Diese Darstellung zeigt, dass die prozentuelle Abnahme der intakten Zellen anhand SG1PI_DMSO besser mit den Werten von CFDA und ATP zusammenpassen als SG1PI_Triss. Da aber mit den verschiedenen Methoden unterschiedliche Parameter für die Aktivität der intakten Zellen herangezogen werden (SG1PI Färbung: Anzahl der intakten Zellen; CFDA: Esterase Aktivität; ATP: IC ATP korreliert mit dem Biovolumen) ist es schwierig deswegen SG1PI_DMSO anhand dieses Vergleiches als die „richtige“ Methode zu deklarieren. Es wird aber klar, dass weitere Versuche notwendig sind, um eine eindeutige Entscheidung für Tris Puffer oder DMSO als Lösungsmittel treffen zu können.

Diese Arbeit zeigt, dass für die adäquate Beurteilung der Desinfektionswirkung grundsätzliches Wissen über den Mechanismus der Abtötung der Zellen nach erfolgter Desinfektion notwendig ist (wie wird die Zelle durch die jeweilige Desinfektionsmethode zerstört). Danach kann die dafür passende Detektionsmethode zur Beurteilung der Lebensfähigkeit ausgewählt werden. Von Vorteil ist die Kombination von mehreren Methoden, z.B. DFZ und ATP. Des Weiteren unterstreicht diese Arbeit, wie wichtig es ist, in Experimenten die verwendeten Materialien, die mit den zu untersuchenden Bakterien in Berührung kommen vorab zu testen, um beurteilen zu können wie die zu untersuchende Probe dadurch beeinflusst wird. Außerdem ist eine Standardisierung der Methoden von großer Bedeutung, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

8. Abkürzungsverzeichnis

AOC	assimilable organic carbons = assimilierbarer organischer Kohlenstoff
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Bestimmungsgrenze
BPP	Biomasseproduktionspotential
BWTS	Ballastwasseraufbereitungssysteme
CFDA	Carboxy Fluorescein Diacetat
ClO ₂	Chlordioxid
cps	counts per seconds = Zählungen pro Sekunde
DBP	Desinfektionsnebenprodukte
DFZ	Durchflussszytometrie
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DiBAC ₄ (3)	Bis – (1,3-dibutylbabiturat) trimethinoxonol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid = Desoxyribonukleinsäure
DOC	dissolved organic carbonates = gelöste organische Kohlenstoffe
DOM	dissolved organic matter = gelöste organische Substanz
EC-ATP	extrazelluläres ATP
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
HAA	heterocyclic aromatic amins = heterozyklische aromatische Amine
Hb	Hochbehälter
HEA	Hefeextraktagar
HNA	high nucleic acid = hoher Nukleinsäuregehalt
HPC	heterotrophic plate count = heterotrophe Plattenkoloniezahl
IC-ATP	intrazelluläres ATP
ICC [n/ml]	Intact cell count = Zahl der intakten Zellen [Zellen pro Milliliter]
iHNA	intrazelluläres HNA
KBE	koloniebildende Einheit
LMSVG	Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz
LNA	low nucleic acid = niedriger Nukleinsäuregehalt
LP	low pressure = niedriger Druck
LP-UV	low pressure-Ultraviolett Strahlung
mg/l	Milligramm pro Liter
mJ	Megajoule

ml	Milliliter
MP	middle pressure = mittlerer Druck
MP-UV	middle pressure-Ultraviolett Strahlung
mRNA	messenger Ribonucleicacid = Botenribonukleinsäure
NG	Nachweisgrenze
nM	Nanomol
NaThS=ThS	Natriumthiosulfat, in der Arbeit als ThS (Thiosulfat) abgekürzt
nClO ₂	nach Chlordioxid
NOM	natural organic matter = natürliche organische Substanz
nUV	nach Ultraviolett Strahlung
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
RLU	relative light units = relative Lichteinheiten
RNA	Ribonucleicacid = Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RW	Rohwasser
SG 1	SYBR Green 1
T ATP	Gesamt ATP
TCC [n/ml]	Total cell count = Gesamtzellzahl [Zellen pro Milliliter]
THM	Trihalogenmethane
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism
TWV	Trinkwasserverordnung
TWVA	Trinkwasserversorgungsanlage
UV	ultraviolett
UV-LED	Ultraviolette Strahlung – light emitting diodes
VBNC	viable but not culturable = lebensfähig aber nicht kultivierbar
WP	Wachstumspotential
µM	Mikromolar

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkung der UV-Bestrahlung auf ein Bakterium: Mitteldruckstrahler (polychromatische Strahler) emittieren ein breites Wellenspektrum, das nicht nur die DNA von Bakterien zerstört, sondern auch die Zellmembran, Proteine, Lipide und Enzyme. Dadurch können die Mikroorganismen ihre Reparaturmechanismen (Foto- und Dunkelreaktivierung) nicht mehr aktivieren (ROESKE, 2016, S. S. 182).....	9
Abbildung 2: Ein Worst-Case-Szenario in einem instabilen, gechlorten Vertriebsnetz. Zeigt mögliche Veränderungen des mikrobiologischen Zustands, der eventuell zu einer hygienischen und sensorischen Verschlechterung der Wasserqualität führen kann. Diese mikrobiologischen Veränderungen resultieren aus dem Abbau des Restchlors (NESČEREČKA u. a., 2014).....	12
Abbildung 3: Die drei Hauptbestandteile eines Durchflusszytometers (BIOSCIENCES, 2014).....	17
Abbildung 4: Das Konzept der Bewertung verschiedener zellulärer Prozesse zur Beurteilung des Lebenszustands des Organismus (HAMMES u. a., 2011)	18
Abbildung 5: Streudiagramme der Grün- und Rot-Fluoreszenz dreier DFZ-Messungen der gleichen Probe (<i>E. faecium</i>) bei unterschiedlicher Zugabe von Chlordioxid und Färbung mit SG1 und PI. Rot markiert ist der Signalfeldbereich der unbehandelten Probe. Die Beschädigung der Zellmembranen durch Chlordioxid zeigt sich durch eine Verschiebung des Signals in den Bereich höherer Rot-Fluoreszenz und geringere Grün-Fluoreszenz (ZUNABOVIĆ-PICHLER u. a., 2018) ..	20
Abbildung 6: Mechanismus zur zellulären Markierung durch fluorogen veresterte Substrate (CFDA) (HOEFEL u. a., 2003)	21
Abbildung 7: Streudiagramm der Grün- und Rot-Fluoreszenz einer DFZ-Messung mit überlagerter Dichteschätzung (rote Linien). Die Gates (grüne Linien) dienen der Abtrennung der Zellsignale vom Signalfeldhintergrund und der Unterscheidung von LNA- und HNA-Zellen (ZUNABOVIĆ-PICHLER u. a., 2018).	22
Abbildung 8: chemische Struktur von ATP (VANG, 2013)	25
Abbildung 9: Prinzip des Luc Assay zur Bestimmung von ATP (VANG, 2013)	26
Abbildung 10: Beispiel eines handelsüblichen Luminometers (VANG, 2013)	27
Abbildung 11: Optimierung ATP Protokoll: a) höhere Volumina und Inkubationszeiten b) Temperatur (HAMMES u. a., 2010).....	28
Abbildung 12: Schema vom Prozess der Wachstumspotentialmessungen (FARHAT u. a., 2018).	32
Abbildung 13: Schritte Ermittlung des Wachstumspotentials durchflusszytometrisch	40
Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Trinkwasserversorgungsanlage	44
Abbildung 15: Arbeitsschritte ClO ₂ – Experiment <i>E. faecium</i>	48
Abbildung 16: Gesamtzellzahl (TCC) am Tag der Probenahme von den verschiedenen Probenahmestellen im zeitlichen Verlauf, Messung durchflusszytometrisch mit SG1, jede Konzentrationsangabe ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung der Probe.....	54
Abbildung 17: HNA-Anteil von der TCC am Tag der Probenahme von den verschiedenen Probenahmestellen im zeitlichen Verlauf, Messung durchflusszytometrisch mit SG1, jede Konzentrationsangabe ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung der Probe.....	55
Abbildung 18: ICC am Tag der Probenahme von den verschiedenen Probenahmestellen im zeitlichen Verlauf, Messung durchflusszytometrisch mit SG1PI, jeder Punkt beruht auf einer Dreifachbestimmung der Probe	56

Abbildung 19: ClO₂ Konzentration gemessen direkt nach der Desinfektionsstelle57

Abbildung 20: HNA-Anteil von der Zellzahl intakt (iHNA) am Tag der Probenahme von den verschiedenen Probenahmestellen im zeitlichen Verlauf, Messung durchflusszytometrisch mit SG1PI, jeder Punkt beruht auf eine Dreifachbestimmung der Probe57

Abbildung 21: Durchflusszytometrische Messung des ICC Anteils der Probe mit SG1PI am Tag der Probenahme: Verhältnis TCC/ICC; jede Messung erfolgte als Dreifachbestimmung.....58

Abbildung 22: Durchflusszytometrische Messung des ICC Anteils der Probe mit SG1PI: Verhältnis TCC/ICC; Darstellung aller SG1PI Messungen des Trinkwasseranlageprojekts am Tag der Probenahme als Boxplot; jede Messung erfolgte als Dreifachbestimmung.....59

Abbildung 23: Durchflusszytometrische Messung des ICC Anteils der Probe mit SG1PI ohne Probenahme am 18.07.: Verhältnis TCC/ICC; Darstellung aller SG1PI Messungen des Trinkwasseranlageprojekts am Tag der Probenahme als Boxplot; jede Messung erfolgte als Dreifachbestimmung59

Abbildung 24: Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe angesetzt am Tag der Probenahme vom Rohwasser und nach UV Bestrahlung; Verwendung von Hefeextraktagar (Inkubation bei 22 und 37 °C) und R2A Agar (Inkubation bei 27°C); 1 Datenpunkt entspricht dem gewichteten Mittelwert von 2 ausgezählten Platten; Auszählung der Kolonien nach der Inkubationsdauer..... 60

Abbildung 25: Ergebnisse der Wachstumspotentialmessungen Rohwasser und nach UV-Bestrahlung nach Inkubation über 10 Tage bei unterschiedlichen Temperaturen: 10, 15 und 22°C; Durchflusszytometrisch mit SG1 gemessen; 1 stellt die Ausgangskonzentration dar = 100%, >1 = Wachstum, <1 = Rückgang der TCC.....61

Abbildung 26: Ergebnisse der Wachstumspotentialmessungen in Proben gezogen nach UV und zusätzlicher ClO₂ Behandlung, 2 verschiedene Netzstellen, Hochbehälter Zulauf und Ablauf über 10 Tage bei 10°C bzw. 15 °C; Durchflusszytometrisch mit SG1 gemessen; 1 stellt die Ausgangskonzentration dar = 100%, >1 = Wachstum, <1 = Rückgang der TCC63

Abbildung 27: Ergebnisse der Wachstumspotentialmessungen in Proben von Rohwasser und nach UV Desinfektion auf R2A Agar bei 27°C für 7 Tage inkubiert; das Gießen der Platten fand am Probenahmetag und nach 7 Tage Standzeit des Wassers bei 10°C statt; das Ergebnis wird in KBE/ml Probe angegeben, hier logarithmisch dargestellt65

Abbildung 28: Ergebnisse der Wachstumspotentialmessungen in Proben von Netzstelle 2 und Hochbehälter Ablauf auf R2A Agar bei 27°C für 7 Tage inkubiert; das plattieren fand am Probenahmetag und nach 7 Tage Standzeit des Wassers bei 10°C statt; das Ergebnis wird in KBE/ml Probe angegeben, hier logarithmisch dargestellt.....66

Abbildung 29: Der Einfluss von TRIS-Puffer (pH = 8,1) und DMSO als Lösungsmittel zur Herstellung von Farbstoff-Arbeitslösung auf die SGPI-Färbung. Flusswasserproben wurden 25 min bei 37 ° C mit 3 µM PI in 10.000 × verdünnter SG (n = 30) angefärbt. (NESČERĚČKA u. a., 2016a).....67

Abbildung 30: Ermittlung der Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung: unbehandeltes Rohwasser mit SG1PI_DMSO_4µM (4D µM) und SG1PI_Tris_2,4,6,8 + 12 µM gefärbt, 13 min bei 37°C am Thermoshaker temperiert und durchflusszytometrisch (n=2) zur Bestimmung der ICC gemessen68

Abbildung 31: Ermittlung der Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung: 5 min bei 60 °C behandeltes Rohwasser mit SG1PI_DMSO_4µM und SG1PI_Tris_2,4,6,8 + 12 µM gefärbt, 13 min bei 37°C am Thermoshaker temperiert und durchflusszytometrisch (n=2) zur Bestimmung der ICC gemessen69

Abbildung 32: Ermittlung der Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung: 10 min bei 80 °C behandeltes Rohwasser mit SG1PI_DMSO_4µM und SG1PI_Trīs_2,4,6,8 + 12 µM gefärbt, 13 min bei 37°C am Thermoshaker temperiert und durchflusszytometrisch (n=2) zur Bestimmung der ICC gemessen 70

Abbildung 33: Ermittlung der Einflussfaktoren auf die SG1PI Färbung: 0,1 mg/l ClO₂ behandeltes Rohwasser mit SG1PI_DMSO_4µM und SG1PI_Trīs_2,4,6,8 + 12 µM gefärbt, 13 min bei 37°C am Thermoshaker temperiert und durchflusszytometrisch (n=2) zur Bestimmung der ICC gemessen 70

Abbildung 34: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* verdünnt in NaCl, die jeweiligen Datenpunkte stellen die ICCs (SG1PI Färbung) in Prozent ausgehend von der TCC (SG1 Färbung) dar..... 72

Abbildung 35: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* verdünnt in Rohwasser, die jeweiligen Datenpunkte stellen die ICCs (SG1PI Färbung) in Prozent ausgehend von der TCC (SG1 Färbung) dar 73

Abbildung 36: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* verdünnt in NaCl und in Rohwasser, die jeweiligen Datenpunkte stellen die ICCs (SG1PI Färbung) in Prozent ausgehend von der TCC (SG1 Färbung) dar 74

Abbildung 37: Bestimmung der Desinfektionswirkung: CFDA Färbung und durchflusszytometrische Detektion der Esterase Aktivität von *E. faecium* in NaCl und Rohwasser verdünnt..... 75

Abbildung 38: CFDA Färbung von *E. faecium* in 4 verschiedenen Rohwässern und NaCl verdünnt mit nachfolgender durchflusszytometrischen Messung der Esterase Aktivität; unbehandelte und mit 0,1 mg/l ClO₂ desinfizierte Proben 76

Abbildung 39: Gegenüberstellung von Streudiagrammen der Grün- und Rot-Fluoreszenz (Färbung mit CFDA) für Proben vor und nach einer Chlorung (Karstquellwasser). Die Anzahl an Detektion rechts der roten Linie beträgt 20 000 pro ml für die unbehandelte Probe (TCC mit SG1: 100 000) bzw. 3 000 pro ml für die gechlorte Probe (TCC mit SG1: 50 000) (ZUNABOVIC-PICHLER u. a., 2018) 77

Abbildung 40: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* in steril filtriertem NaCl verdünnt – ATP Ergebnisse 78

Abbildung 41: Bestimmung der Desinfektionswirkung: *E. faecium* in steril filtriertem Rohwasser verdünnt – ATP Ergebnisse 79

Abbildung 42: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Ergebnisse der heterotrophen Plattenkoloniezahl (HPC) auf TS Agar: *E. faecium* in Rohwasser und NaCl verdünnt; KBE = koloniebildende Einheit 81

Abbildung 43: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Ergebnisse Wachstumspotential 1. Versuch: SG1 Färbung der unbehandelten Probe und SG1PI Färbung der unbehandelten und mit ClO₂ behandelten Proben 84

Abbildung 44: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Ergebnisse Wachstumspotential 2. Versuch: SG1 Färbung der unbehandelten Probe und SG1PI Färbung der unbehandelten und mit ClO₂ behandelten Proben 84

Abbildung 45: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential *E. faecium* in Rohwasser verdünnt: CFDA Färbung und durchflusszytometrische Messung 85

Abbildung 46: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential ATP Methode: *E. faecium* in Rohwasser verdünnt und bei 15 °C gelagert; unbehandelte Probe 86

Abbildung 47: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential ATP Methode *E. faecium* in Rohwasser verdünnt und bei 15 °C gelagert; Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂..... 88

Abbildung 48: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential ATP Methode *E. faecium* in Rohwasser verdünnt und bei 15 °C gelagert; Zugabe von 0,2 mg/l ClO₂..... 88

Abbildung 49: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Wachstumspotential ATP Methode *E. faecium* in Rohwasser verdünnt und bei 15 °C gelagert; Zugabe von 0,4 mg/l ClO₂..... 88

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hauptverfahren der Trinkwasseraufbereitung (KARGER & HOFFMANN, 2013, S. 114)..4

Tabelle 2: ct₉₉-Werte (Verringerung um 2 Log Stufen) verschiedener Mikroorganismen nach ClO₂ Desinfektion (W. SCHMIDT, 2012)..... 8

Tabelle 3: Probenplan WP Durchflusszytometrie, Lagerung der 100 ml Glasflaschen mit Probe (jeweils 2 Flaschen pro Temperatur) in Kühlschränke (10, 15 und 22°C), Messung mit Hilfe der Durchflusszytometrie und SG1 an Tag 0,3 und 7 41

Tabelle 4: Probenplan WP KBE; Lagerung der 250 ml Glasflaschen (je Probenahmestelle 2 Flaschen) im 10°C Kühlschrank und Kultivierung an Tag 0 und 7 auf HEA und R2A..... 42

Tabelle 5: T-Test zur Bestimmung von signifikantem Wachstum: Vergleich der TCC von Tag 7 und Tag 10 mit Tag 0; x=signifikantes Wachstum; o=Wachstum, aber nicht signifikant; ↓=Rückgang der TCC; (ThS)=Zugabe von 16g/l Natriumthiosulfat 64

Tabelle 6: T-Test zur Bestimmung von signifikantem Wachstum: Vergleich der gewachsenen Kolonien (KBE/ml) auf R2A Agar von Tag 7 mit Tag 0; x = signifikantes Wachstum; o = Wachstum, aber nicht signifikant; ↓ = Rückgang der TCC; - = kein Wachstum 66

Tabelle 7: Prozentueller Anteil von RW und nUV Proben beim Wachstumspotential Versuch, bei dem Wachstum auftrat und prozentueller Anteil davon signifikantes Wachstum 67

Tabelle 8: Bestimmung der Desinfektionswirkung: KBE/ml in Zahlen 81

Tabelle 9: Bestimmung der Desinfektionswirkung: Vergleich der verschiedenen Methoden zur Detektion der intakten Zellen; Laborexperiment, *E. faecium* in NaCl 82

Tabelle 10: WP beide Versuche: Vergleich ATP Werte/Zelle an unterschiedlichen Tagen 87

11. Literatur

- Besmer, M. D., Weissbrodt, D. G., Kratochvil, B. E., Sigrist, J. A., Weyland, M. S., & Frederik Hammes. (2014). *The feasibility of automated online flow cytometry for in-situ monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems*.
- Biosciences, B. (2014). *Einführung in die Durchflusszytometrie*.
- Breeuwer, P., & Abee, T. (2000). *Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques*.
- Bundesministerium Arbeit, Soziales und Gesundheit (Ed.). (2019). *Österreichisches Lebensmittelbuch Codexkapitel B1 Trinkwasser*.
https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/lebensmittel/buch/codex/B1_Trinkwasser.pdf?7a1iyg
- Corporation, P. (Ed.). (2015). *BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay*.
- DVGW W 224 (Ed.). (2010). *Verfahren zur Desinfektion von Trinkwasser mit Chlordioxid*.
- Farhat, N., Frederik Hammes, Emmanuelle Prest, & Johannes Vrouwenvelder. (2018). *A uniform bacterial growth potential assay for different water types*.
- Feuerpfeil, I. (2008). *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. WILEY-VCH.
- Firlinger, L., Schönher, C., Zunabovic-Pichler, M., Mayr, E., & Perfler, R. (2017). *Durchflusszytometrische Bestimmung der intakten Zellen („ICC“) bei unterschiedlichen Desinfektionsmethoden*.
- Guilini, C., Corinne Baehr, Etienne Schaeffer, Patrick Gizzi, Frédéric Ru´f, Jacques Haiech, Etienne Weiss, Dominique Bonnet, & Jean-Luc Galzi. (2015). *New fluorescein precursors for live bacteria detection*.
- Guo, M., Huang, J., Huc, H., Liu, W., & Yang, J. (2012, May 3). *UV inactivation and characteristics after photoreactivation of Escherichia coli with plasmid: Health safety concern about UV disinfection*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.005>

- Hallmich, C., & Gehr, R. (2010, February 1). *Effect of pre- and post-UV disinfection conditions on photoreactivation of fecal coliforms in wastewater effluents*.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.003>
- Hammes, F., Berney, M., & Egli, T. (2011). Cultivation-independent Assessment of Bacterial Viability. In S. Müller & T. Bley (Eds.), *High Resolution Microbial Single Cell Analytics* (pp. 123–150). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2010_95
- Hammes, F., Goldschmidt, F., Vital, M., Wang, Y., & Egli, T. (2010). Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Research*, 44(13), 3915–3923. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.015>
- Hansen, C. B., A. Kerrouche, K. Tatari, A. Rasmussen, T. Ryan, P. Summersgill, M.P.Y. Desmulliez, H. Bridle, & H.J. Albrechtsen. (2019). *Monitoring of drinking water quality using automated ATP quantification*.
- Hassard, F., & Whitton, R. (2019). *Understanding the Use of Flow Cytometry for Monitoring of Drinking Water*.
- H.M. Murphy, S.J. Payne, & G.A. Gagnon. (2007). *Sequential UV- and chlorine-based disinfection to mitigate Escherichia coli in drinking water biofilms*.
- Hoefel, D., Grooby, W. L., Monis, P. T., Andrews, S., & Saint, C. P. (2003). A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 379–388.
- International Dioxide (Ed.). (2019). *CT disinfection credits*.
- J.L. Rand, R. Hofmann, M.Z.B. Alam, C. Chauret, R. Cantwell, R.C. Andrews, & G.A. Gagnon. (2007). *A field study evaluation for mitigating biofouling with chlorine dioxide or chlorine integrated with UV disinfection*.
- Karger, R., & Hoffmann, F. (2013a). *Wasserversorgung*. Springer Fachmedien Wiesbaden.
<https://doi.org/10.1007/978-3-8348-2096-9>
- Karger, R., & Hoffmann, F. (2013b). *Wasserversorgung: Gewinnung - Aufbereitung - Speicherung - Verteilung* (14., vollst. aktualisierte Aufl). Springer Vieweg.

- Kötzsch, S., & Sinreich, M. (2014). *Zellzahlen zum Grundwasser: Bestimmung mittels Durchflusszytometrie*.
- Li, G.-Q., Huo, Z.-Y., Wu, Q.-Y., Lu, Y., & Hu, H.-Y. (2018). Synergistic effect of combined UV-LED and chlorine treatment on *Bacillus subtilis* spore inactivation. *Science of The Total Environment*, 639, 1233–1240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.240>
- Liu, W., Zhang, Z., Yang, X., Xu, Y., & Liang, Y. (2011, November 13). *Effects of UV irradiation and UV/chlorine co-exposure on natural organic matter in water*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.031>
- Lyon, B. A., Dotson, A. D., Linden, K. G., & Weinberg, H. S. (2012, June 8). *The effect of inorganic precursors on disinfection byproduct formation during UV-chlorine/chloramine drinking water treatment*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.011>
- Mayer, E., Marija Zunabovic-Pichler, Lukas Pehersdorfer, Philipp Proksch, & Luzia Firlinger. (2017). *Wassergewinnung Plesching: Begleitung der Inbetriebnahme in Zusammenhang mit den Desinfektionsmaßnahmen Chlordioxid und UV und Lokalisierung von Ursachen für die Bildung von unerwünschten Geruchs- und Geschmackstoffen*. 69.
- Nescerecka, A., Hammes, F., & Talis Juhna. (2016). *A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining*.
- Nescerecka, A., Juhna, T., & Hammes, F. (2016). Behavior and stability of adenosine triphosphate (ATP) during chlorine disinfection. *Water Research*, 101, 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.087>
- Nescerecka, A., Rubulis, J., Vital, M., Juhna, T., & Hammes, F. (2014). Biological Instability in a Chlorinated Drinking Water Distribution Network. *PLOS ONE*, 9(5), e96354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096354>
- Nevel, S. V., Koetzsch, S., Proctor, C. R., Besmer, M. D., & Vrouwenvelder, J. S. (2017). *Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring*.

- Nocker, A., Cheswick, R., Dutheil de la Rochere, P.-M., Denis, M., Léziart, T., & Jarvis, P. (2017). When are bacteria dead? A step towards interpreting flow cytometry profiles after chlorine disinfection and membrane integrity staining. *Environmental Technology*, 38(7), 891–900. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1262463>
- Ochromowicz, K., & Hoekstra, E. J. (2005). ATP as an indicator of microbiological activity in tap water. *European Commission Directorate-General Joint Research Centre*.
- Olsen, R. O., Hess-Erga, O.-K., Larsen, A., Thuestad, G., Tobiesen, A., & Hoell, I. A. (2015). Flow cytometric applicability to evaluate UV inactivation of phytoplankton in marine water samples. *Marine Pollution Bulletin*, 96(1–2), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.012>
- Pebersdorfer, L., Perfler, R., Mayr, E., & Zunabovic-Pichler, M. (2018). *Prozessbegleitung der Inbetriebnahme eines Horizontalfilterbrunnens an einem Uferfiltratstandort*.
- Phe, M.-H., Dossot, M., Guilloteau, H., & Block, J.-C. (2005). Nucleic acid fluorochromes and flow cytometry prove useful in assessing the effect of chlorination on drinking water bacteria. *Water Research*, 39(15), 3618–3628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.002>
- Prest, E. I., Hammes, F., Kötzsch, S., van Loosdrecht, M. C. M., & Vrouwenvelder, J. S. (2013). Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Research*, 47(19), 7131–7142. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.051>
- Prest, E. I., Hammes, F., Loosdrecht, M. C. M. van, & Vrouwenvelder, J. S. (2016). *Biological Stability of Drinking Water: Controlling Factors, Methods, and Challenges*.
- Ramseier, M. K., Gunten, U. von, Freihofer, P., & Hammes, F. (2010, November 10). *Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate | Elsevier Enhanced Reader*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.016>
- Ramseier, M. K., von Gunten, U., Freihofer, P., & Hammes, F. (2011). Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by

- ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate. *Water Research*, 45(3), 1490–1500. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.016>
- RIS. (2017). *Trinkwasserverordnung (TWV)*.
- Roeske, W. (2016). *Trinkwasserdesinfektion: Grundlagen - Verfahren - Anlagen - Geräte - Mikrobiologie - Chlorung - Ozonung - UV-Bestrahlung - Membranfiltration - Qualitätssicherung* (3., aktualisierte und erweiterte Auflage). DIV Deutscher Industrieverlag.
- Roth, C. (Ed.). (2020a). *Produkt-Datenblatt Peptonwasser gepuffert*.
- Roth, C. (Ed.). (2020b). *Produkt-Datenblatt R2A Agar*.
- Roth, C. (Ed.). (2020c). *Produkt-Datenblatt Hefeextraktagar*.
- Roth, C. (Ed.). (2020d). *Produkt-Datenblatt Trypton Soya Agar*.
- Schleich, C., Chan, S., Pullerits, K., Besmer, M. D., Paul, C. J., Rådström, P., & Keucken, A. (2019). *Mapping Dynamics of Bacterial Communities in a Full-Scale Drinking Water Distribution System Using Flow Cytometry*.
- Schumann, R., Schiewer, U., Karsten, U., & Rieling, T. (2003). *Viability of bacteria from different aquatic habitats. II. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity*.
- Sommer, R., Cabaj, A., & Hirschmann, G. (2007). Desinfektion von Trinkwasser: Sicherheit von UV-Anlagen. *Österreichische Wasser-Und Abfallwirtschaft*, 59(1–2), 9–14.
- Tift, E. C., & Spiegel, S. J. (1976). Use of adenosine triphosphate assay in disinfection control. *Environmental Science & Technology*, 10(13), 1268–1272.
- Trinkwasser, I. (Ed.). (n.d.). *Lebensmittel Trinkwasser*.
<https://www.trinkwasserinfo.at/qualitaet/lebensmittel-trinkwasser/>
- Vang, Ó. K. (2013). ATP measurements for monitoring microbial drinking water quality. *DTU Environment*.
- Vera, G. A. de, & Wert, E. C. (2019). *Using discrete and online ATP measurements to evaluate regrowth potential following ozonation and (non)biological drinking water treatment*.

- Vital, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L., & Hammes, F. (2012). Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: Alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Research*, 46(15), 4665–4676. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.010>
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., & Caron, G. N. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 429–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00549.x>
- W. Schmidt. (2012). *Untersuchungen zur Desinfektionswirkung und Sicherheit der In-line-Elektrolyse von Chlor als umweltschonendes Verfahren für die Desinfektion von Trinkwasser.*
- Wang, X., Hu, X., Wang, H., & Hu, C. (2012). Synergistic effect of the sequential use of UV irradiation and chlorine to disinfect reclaimed water. *Water Research*, 46(4), 1225–1232. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.027>
- Wang, Y., Claeys, L., van der Ha, D., Verstraete, W., & Boon, N. (2010). Effects of chemically and electrochemically dosed chlorine on *Escherichia coli* and *Legionella beliardensis* assessed by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 331–341. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2526-2>
- Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., & Boon, N. (2010). Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*, 28(8), 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.04.006>
- Weigel, K. M., Nguyen, F. K., Kearney, M. R., Meschke, J. S., & Cangelosi, G. A. (2017). Molecular Viability Testing of UV-Inactivated Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(10). <https://doi.org/10.1128/AEM.00331-17>
- Xu, L., Zhang, C., Xu, P., & Wang, X. C. (2018). Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of *Escherichia coli*: Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage. *Journal of Environmental Sciences*, 65, 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.07.006>

- Zhang, X., Li, W., Blatchley, E. R., Wang, X., & Ren, P. (2015). UV/chlorine process for ammonia removal and disinfection by-product reduction: Comparison with chlorination. *Water Research*, 68, 804–811. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.044>
- Zhao, Q., Shang, C., Zhang, X., Ding, G., & Yang, X. (2011, September 27). *Formation of halogenated organic byproducts during medium-pressure UV and chlorine coexposure of model compounds, NOM and bromide*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.053>
- Zunabovic-Pichler, M., Mayr, E., Schönher, C., Fiedler, C., & Kerschbaumer, D. (2018). *Durchflusszytometrie in der Wasserversorgung Mikrobiologische Charakterisierung von Einflussfaktoren und Zustandsveränderungen bei der Wasserversorgung*.

12. Anhang

Beilage 1: Vor-Ort-Parameter: Rohwasser	110
Beilage 2: Vor-Ort-Parameter: nach UV	111
Beilage 3: Vor-Ort-Parameter: nach UV + ClO ₂	111
Beilage 4: Vor-Ort-Parameter: Netzstelle 1	112
Beilage 5: Vor-Ort-Parameter: Netzstelle 2	112
Beilage 6: Vor-Ort-Parameter: Hochbehälter Zulauf	112
Beilage 7: Hochbehälter Ablauf	113
Beilage 8: SG1PI – Experiment: RW unbehandelt, 2. Versuch	113
Beilage 9: SG1PI – Experiment: RW thermisch behandelt 60°C 5 min, 2. Versuch	114
Beilage 10: RW thermisch behandelt 80°C 10 min, 2. Versuch.....	114
Beilage 11: SG1PI – Experiment: RW nach Zugabe von 0,1 mg/l ClO ₂ , 2. Versuch	115
Beilage 12: ATP Standardkurve in NaCl: Werte der 5 Messungen	115
Beilage 13: ATP Standardkurve in NaCl.....	115
Beilage 14: Standardkurve in RW: Werte der 5 Messungen.....	116
Beilage 15: ATP Standardkurve in RW.....	116

Beilage 1: Vor-Ort-Parameter: Rohwasser

Rohwasser						
Datum	pH-Wert	Redoxpotential (mV)	Leitfähigkeit (µS/cm)	Temperatur (°C)	gelöster Sauerstoff (mg/l)	Wasserherkunft
30.11.2016	7,5	186	552	11,9	0,65	Stränge 2,3,4,5
13.12.2016	7,4	251	549	12,0	1,46	Stränge 2,3,4,5
10.01.2017	7,3	232	636	12,1	3,77	Stränge 2,3,4,5
17.01.2017	7,4	239	639	12,1	4,06	Stränge 2,3,4,5
24.01.2017	7,5	191	636	11,9	4,43	Stränge 2,3,4,5
31.01.2017	7,4	190	604	11,6	4,87	Stränge 2,3,4,5
07.02.2017	7,4	167	658	12,3	5,32	alle Stränge
14.02.2017	7,3	192	646	12,0	5,5	alle Stränge
21.02.2017	-	168	641	11,9	5,59	alle Stränge
07.03.2017	-	172	594	11,8	5,64	Stränge 2,3,4,5
14.03.2017	7,3	182	652	11,7	5,8	alle Stränge
21.03.2017	7,3	166	643	11,7	6,04	alle Stränge
25.04.2017	7,3	186	646	11,5	6,28	alle Stränge
18.07.2017	7,2	205	641	12,4	6,91	alle Stränge

Beilage 2: Vor-Ort-Parameter: nach UV

nach UV						
Datum	pH-Wert	Redoxpotential (mV)	Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	gelöster Sauerstoff (mg/l)	Wasserherkunft
31.01.2017	7,5	198	603	11,8	4,95	Stränge 2,3,4,5
07.02.2017	7,4	182	649	12,0	5,52	alle Stränge
14.02.2017	7,3	210	652	12,0	5,43	alle Stränge
21.02.2017	-	177	646	11,9	5,7	alle Stränge
07.03.2017	-	394	594	11,7	5,6	Stränge 2,3,4,5
14.03.2017	7,3	192	651	11,7	5,82	alle Stränge
21.03.2017	7,3	133	647	11,7	6,00	alle Stränge
25.04.2017	7,3	187	646	11,4	6,42	alle Stränge
18.07.2017	7,2	82,5	638	-	6,8	alle Stränge

Beilage 3: Vor-Ort-Parameter: nach UV + ClO₂

nach UV+ClO ₂							
Datum	pH-Wert	Redoxpotential (mV)	Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	gelöster Sauerstoff (mg/l)	ClO ₂ (mg/L)	Wasserherkunft
07.02.2017	7,4	380	647	11,9	5,45	0,1	alle Stränge
14.02.2017	7,3	603	646	11,9	5,39	0,04	alle Stränge
21.02.2017		532	645	11,9	5,76	<0,02	alle Stränge
07.03.2017		505	594	11,7	5,72	0,036	Stränge 2,3,4,5
14.03.2017	7,3	546	653	11,7	5,79	-	alle Stränge
21.03.2017	7,3	543	648	11,7	6,03	0,05	alle Stränge
25.04.2017	7,3	509	644	-	6,29	0,06	alle Stränge
18.07.2017	7,2	407,5	634	12,0	6,87	0,07	alle Stränge

Beilage 4: Vor-Ort-Parameter: Netzstelle 1

Netzstelle 1							
Datum	pH-Wert	Redoxpotential (mV)	Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	gelöster Sauerstoff (mg/l)	ClO_2 (mg/L)	Wasserherkunft
14.02.2017	7,3	233	645	11,9	5,88	<0,02	alle Stränge
21.02.2017		188	648	11,3	5,88	<0,02	alle Stränge
21.03.2017	7,3	200	645	11,9	6,21		alle Stränge

Beilage 5: Vor-Ort-Parameter: Netzstelle 2

Netzstelle 2							
Datum	pH-Wert	Redoxpotential (mV)	Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	gelöster Sauerstoff (mg/l)	ClO_2 (mg/L)	Wasserherkunft
14.03.2017	7,3	200	639	10,5	5,9	-	alle Stränge
21.03.2017	7,3	211	639	11,5	6,07	-	alle Stränge
18.07.2017	7,2	133	628	16,9	6,81	<0,05	alle Stränge

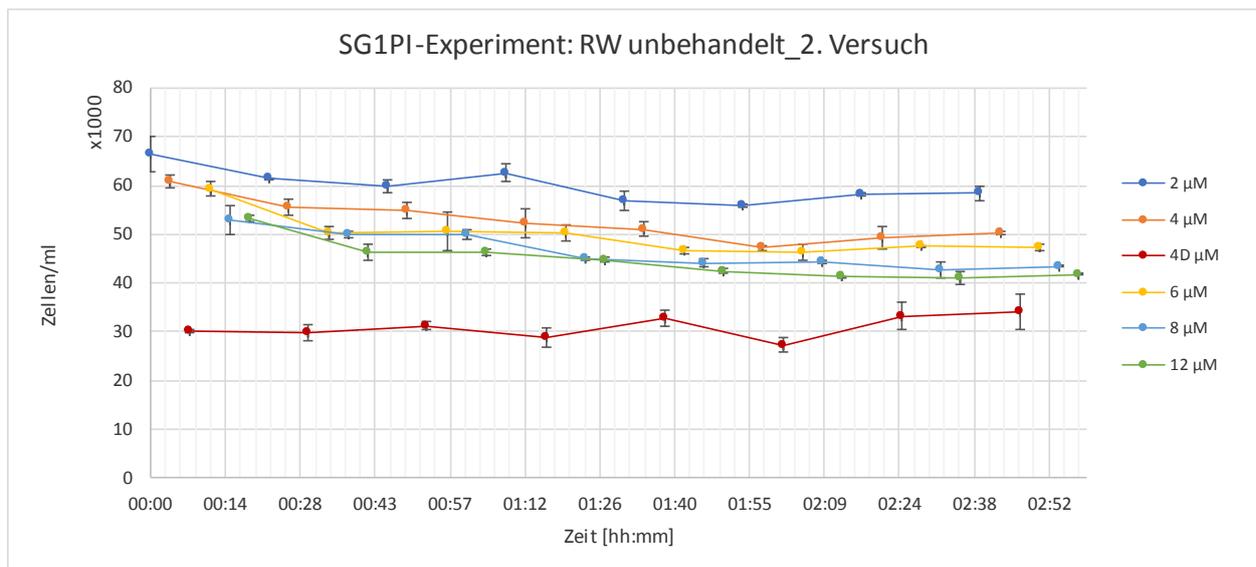
Beilage 6: Vor-Ort-Parameter: Hochbehälter Zulauf

Hochbehälter Zulauf							
Datum	pH-Wert	Redoxpotential (mV)	Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	gelöster Sauerstoff (mg/l)	ClO_2 (mg/L)	Wasserherkunft
14.02.2017	7,3	489	646	11,5	5,5	<0,02	alle Stränge
21.02.2017		237	644	11,4	5,6	<0,02	alle Stränge
21.03.2017		238	596	11,4	5,87	<0,02	alle Stränge

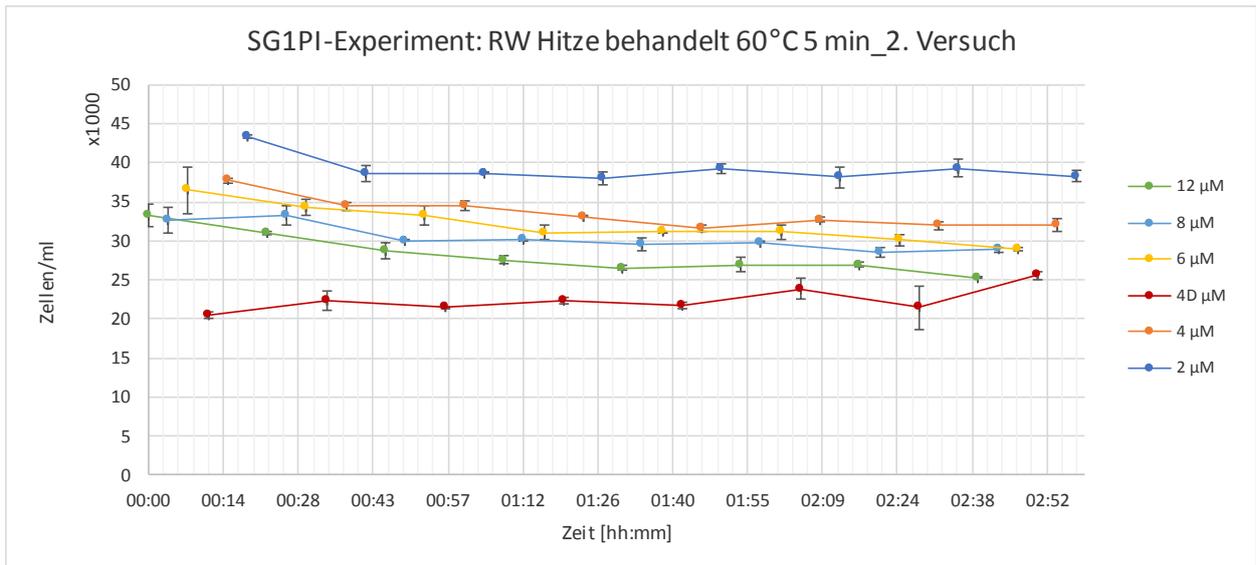
Beilage 7: Vor-Ort-Parameter Hochbehälter Ablauf

Hochbehälter Ablauf							
Datum	pH-Wert	Redoxpotential (mV)	Leitfähigkeit (µS/cm)	Temperatur (°C)	gelöster Sauerstoff (mg/l)	ClO ₂ (mg/L)	Wasserherkunft
07.03.2017		238	618	11,3	7,27	<0,02	Stränge 2,3,4,5
14.03.2017	7,4	167	647	11,1	8,9		alle Stränge
21.03.2017	7,4	173	649	11,5	8,44		alle Stränge
25.04.2017	7,5	190	643	11,3	9,27		alle Stränge
18.07.2017	7,4	101,9	628	12,5	9,55	<0,05 *	alle Stränge

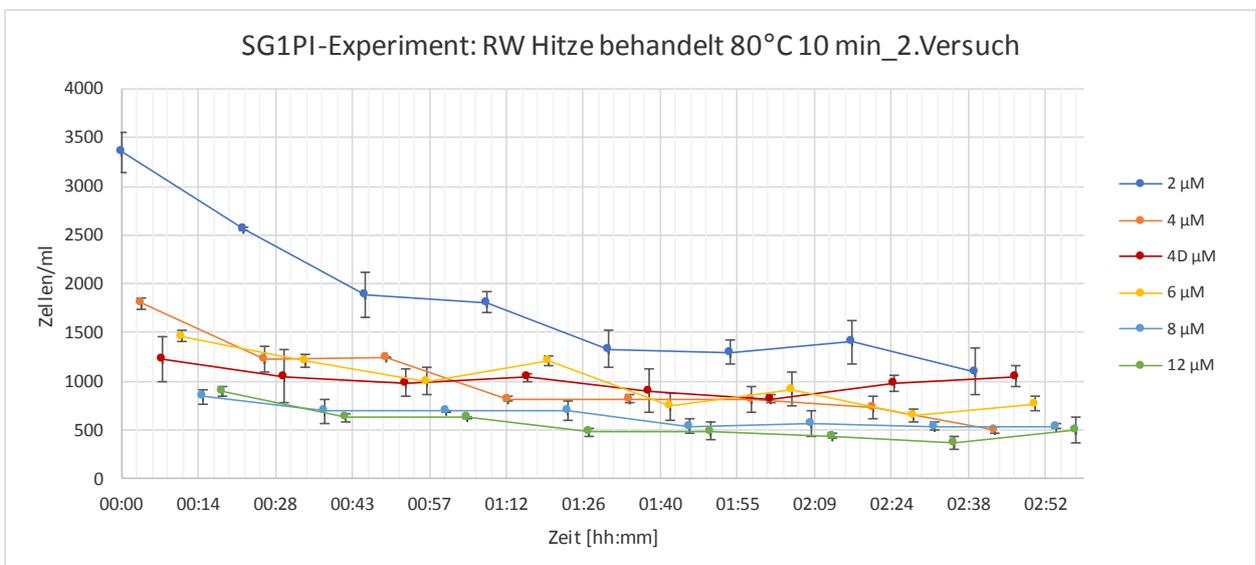
Beilage 8: Einflussfaktoren auf SG1PI Färbung: RW unbehandelt, 2. Versuch



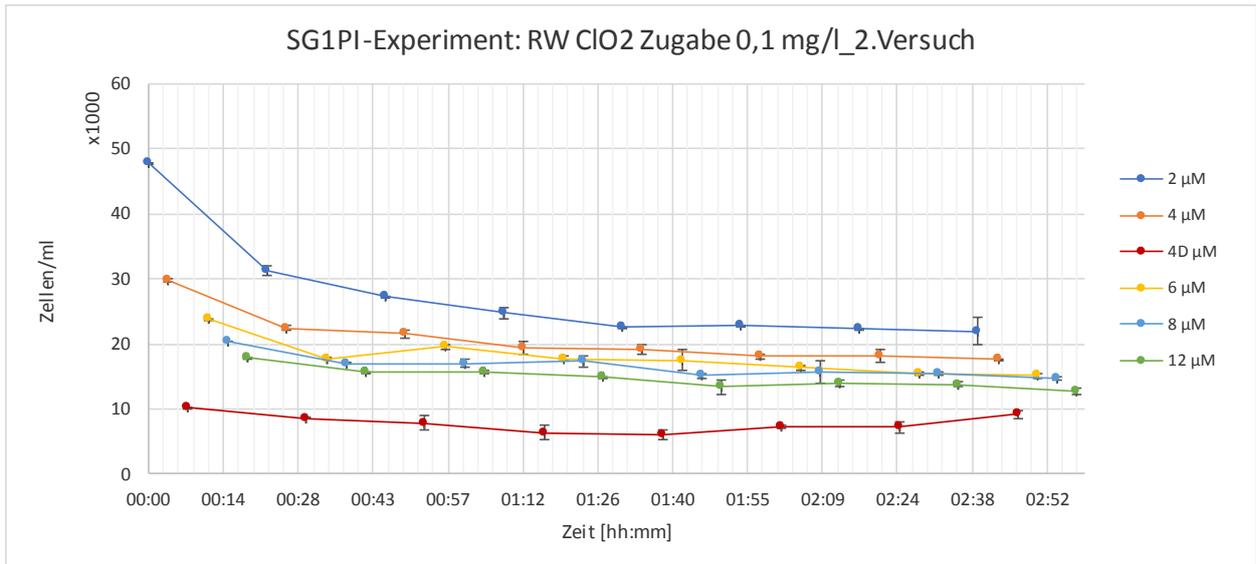
Beilage 9: Einflussfaktoren auf SG1PI Färbung: RW thermisch behandelt 60°C 5 min, 2. Versuch



Beilage 10: Einflussfaktoren auf SG1PI Färbung: RW thermisch behandelt 80°C 10 min, 2. Versuch



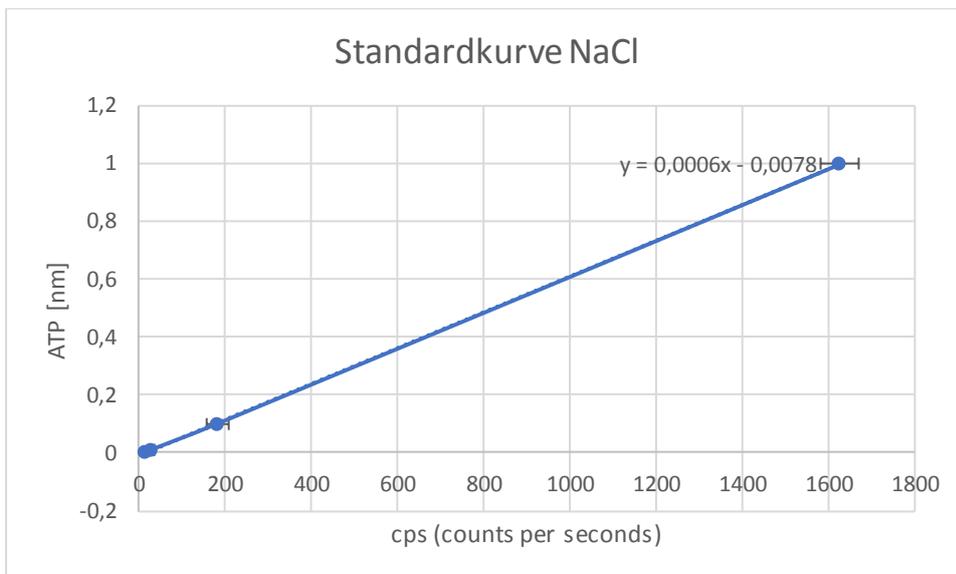
Beilage 11: Einflussfaktoren auf SG1PI Färbung: RW nach Zugabe von 0,1 mg/l ClO₂, 2. Versuch



Beilage 12: ATP Standardkurve in NaCl: Werte der 5 Messungen

ATP [nM]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	4. Messung	5. Messung	MW	Stabw
0,005	12	17	13	16	13	14	2,06
0,01	20	35	26	32	28	28	5,76
0,1	218	178	150	185	179	182	24,02
1	1677	1555	1645	1624	1632	1627	44,59

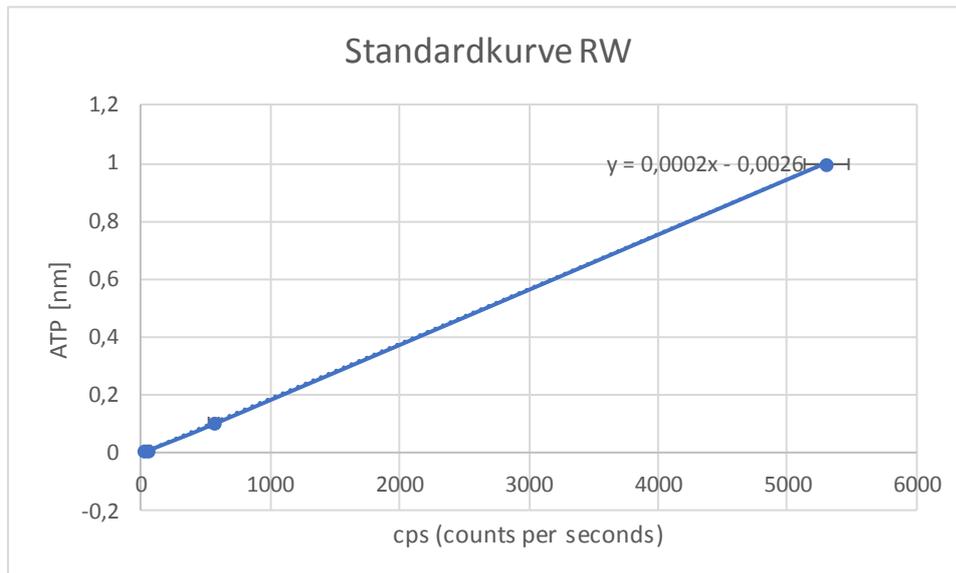
Beilage 13: ATP Standardkurve in NaCl



Beilage 14: Standardkurve in RW: Werte der 5 Messungen

ATP [nM]	1. Messung	2. Messung	3. Messung	4. Messung	5. Messung	MW	Stabw
0,005	24	34	32	28	31	30	3,49
0,01	51	59	65	57	63	59	4,90
0,1	562	488	615	568	584	563	41,94
1	5053	5154	5496	5354	5465	5304	173,66

Beilage 15: ATP Standardkurve in RW



13. Lebenslauf



BSc Luzia Haider

05.09.1984

Bruno-Marek-Allee 23/27

1020 Wien

Tel.: 0676/9260095

E-Mail: luzia.firlinger@gmail.com

Eckdaten

- Ausgebildete Sozialpädagogin
- Bachelorabschluss Lebensmittel- und Biotechnologie
- Seit SS 2015: Masterstudium Lebensmittelwissenschaft und –technologie
- Mutter von 2 Kindern: 1 und 6 Jahre alt
- seit Februar 2021: Labortechnikerin in der Mikrobiologie bei Octapharma

Berufserfahrung

seit 02/2021

Labortechnikerin in der Mikrobiologie bei Octapharma

Qualitätskontrolle der Zwischenprodukte, Produkte, der eingesetzten Materialien und Räumlichkeiten: Probenzüge, mikrobielle Testungen

seit 06/2016

Persönliche Assistentin:

Susanne Müller Privat

Betreuung und Unterstützung von Susanne Müller, die als körperlich behinderte Erwachsene für alltägliche Aufgaben Hilfe benötigt

08/2007 - 04/2016

Persönliche Assistentin:

Bernhard Rotter Privat

Betreuung und Unterstützung von Bernhard Rotter, der als körperlich behinderter Erwachsener für alltägliche Aufgaben Hilfe benötigte

06/2008 - 03/2010

Sozialpädagogin

Psychosomatik AKH

Betreuung von verhaltens kreativen Kindern im Pflichtschulalter: Hausaufgaben, Freizeitgestaltung, Gespräche, interdisziplinärer Austausch im Team

09/2004 - 06/2008 **Behindertenbetreuerin**
Rainman´s Home
Betreuung von autistischen und anders behinderten Menschen:
Mitwirken beim Aufbau einer neuen Tagesstätte, Leitung der
Haushaltsgruppe, Freizeitgestaltung, Gespräche,
Teambesprechungen

Ausbildung und Praktika

seit 03/2015: **Masterstudium Lebensmittelwissenschaft und –
technologie**
BOKU Wien

02/2020 **Pflichtpraktikum Master**
Braumanufaktur Schalken

02-11/2017 **Praktische Masterarbeit**
BOKU Wien: Department Institut für Siedlungswasserbau,
Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz
„Beurteilung der Desinfektionswirkung durch Bestimmung der
intakten Zellen mit unterschiedlichen Methoden (DFZ, ATP
Bestimmung, kulturell)“

10/2010 - 03/2015 **Bachelorstudium Lebensmittel- und Biotechnologie**
BOKU Wien

07/2012 **Praktikantin**
Rösselmühle Ludwig Polsterer GmbH
Getreideannahme und erste Analysen, Labortätigkeiten

07-08/2013 **Praktische Bachelorarbeit**
BOKU Wien: Department für Biochemie
„Präparation einer Glykan-Affinitätschromatographiesäule“

09/1999 - 06/2004 **Ausbildung Sozialpädagogin**
Bundesbildungsanstalt für Sozialpädagogik
Matura erfolgreich abgeschlossen

09/1995 - 06/1999 Hauptschule Arbesbach

09/1991 - 06/1995 Volksschule Arbesbach

Kenntnisse und Fähigkeiten

Sprachen	Deutsch (Muttersprache) Englisch (fließend)
Interessen	Lesen, Sport, Kochen, Fortbildung