HOCHSCHULE MITTWEIDA
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Bachelorarbeit

Herr
Philipp von der Heydt

Vergleichende Bestimmung von Somatischen Coliphagen mit zwei *E. coli* Stämmen nach DIN EN ISO 10705-2, Etablierung von Kultivierungsstrategien für die Bakteriophage ϕX174 sowie Validierung einer Konzentrationsmethode nach DIN EN ISO 10705-3.

Mittweida, 25.08.2024

Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften

Bachelorarbeit

Vergleichende Bestimmung von Somatischen Coliphagen mit zwei *E. coli* Stämmen nach DIN EN ISO 10705-2, Etablierung von Kultivierungsstrategien für die Bakteriophage ϕX174 sowie Validierung einer Konzentrationsmethode nach DIN EN ISO 10705-3.

Autor:
Herr

Philipp von der Heydt

Studiengang:
Biotechnologie

Seminargruppe:
BT21wM-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Iris Herrmann-Geppert

Zweitprüfer:
Dipl. Ing. (FH) Angelica Weilbach

weitere Betreuer:
M.Sc. Dipl. Ing. (FH) René Kretschmer

Einreichung:
Mittweida, 25.08.2024

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2024

Bibliographische Beschreibung:

Von der Heydt, Philipp: „Vergleichende Bestimmung von Somatischen Coliphagen mit zwei *E. coli* Stämmen nach DIN EN ISO 10705-2, Etablierung von Kultivierungsstrategien für die Bakteriophage ϕX174 sowie Validierung einer Konzentrationsmethode nach DIN EN ISO 10705-3“. - 2024. - 9, 69, 7 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2024

Englischer Titel

Comparative determination of somatic coliphages using two *E. coli* strains according to DIN EN ISO 10705-2, establishment of cultivation strategies for bacteriophage ϕX174, and validation of a concentration method according to DIN EN ISO 10705-3.

Kurzbeschreibung:

In dieser Arbeit wird das Verfahren zum quantitativen Nachweis von somatischen Coliphagen gemäß der DIN EN ISO 10705-2 im Labor des ZWA-Hainichen angewandt. Dabei werden die beiden *Escherichia coli*-Wirtsstämme, *E. coli* C (ATCC 13706) und *E. coli* CN (ATCC 700078), auf ihre Eignung für dieses Verfahren verglichen. Zudem soll die Kultivierung des Bakteriophagen ϕ X174 für Qualitätskontrollen etabliert werden. Darüber hinaus sollte das Verfahren der Membranfiltration zur Aufkonzentrierung von Bakteriophagen in Wasserproben gemäß DIN EN ISO 10705-3 validiert werden.

Danksagung

Liebe Leserinnen und Leser,

ich möchte meine tiefe Dankbarkeit für die Fertigstellung meiner Bachelorarbeit zum Thema " Vergleichende Bestimmung von Somatischen Coliphagen mit zwei *E. coli* Stämmen nach DIN EN ISO 10705-2, Etablierung von Kultivierungsstrategien für die Bakteriophage ϕX174 sowie Validierung einer Konzentrationsmethode nach DIN EN ISO 10705-3" zum Ausdruck bringen. Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung und Hilfe vieler Personen nicht möglich gewesen.

Meinen Hochschulbetreuern, Frau Herrmann-Geppert und Herr Kretschmer, danke ich zutiefst für die fachliche Anleitung und die wertvollen Ratschläge während des gesamten Schreibprozesses.
Mein besonderer Dank gilt auch meiner Praxisbetreuerin Frau Weilbach für die Bereitstellung der notwendigen Ressourcen und die Möglichkeit, die Forschung durchzuführen.
Ebenso möchte ich meiner Familie und all meinen Freunden meinen Dank aussprechen für die Motivation, die sie mir gegeben haben.
Ihr aller Beitrag hat maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen, und ich bin zutiefst dankbar für jede Form der Unterstützung, die ich erhalten habe.

Herzlichen Dank!

Mit freundlichen Grüßen,
Philipp von der Heydt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **V**

Formelverzeichnis ..... **VII**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VIII**

1 Einleitung **1**

2 Grundlagen **2**

2.1 Enterische Viren 2

2.2 Bakteriophagen 3

2.3 Somatische Coliphagen 5

2.4 Quantitativer Nachweis von somatischen Coliphagen 7

2.5 Aufkonzentrierung von Bakteriophagen 9

2 Zielstellung **10**

3 Material **11**

3.1 Lösungen und Chemikalien 11

3.2 Geräte 11

3.3 Medien 12

3.4 Mikroorganismen 13

4 Methoden **14**

4.1 Vorbereitente Tätigkeiten 14

4.1.1 Probennahme und Probenvorbereitung 14

4.1.2 Herstellung der Stammkulturen 14

4.1.3 Herstellung der Arbeitskulturen 14

4.1.4 Kalibrierung 15

4.2 Durchführung 16

4.2.1 Herstellung der Impfkulturen 16

4.2.2 Standardverfahren 16

4.3 Kultivierung des Bakteriophagen Φ X174 für Qualitätskontrollen und Erstellung von Mittelwertzielkarten 18

4.3.1 Kultivierung der Bakteriophagen Φ X174 und Qualitätskontrolle 18

4.3.2 Erstellung der Mittelwertzielkarten 18
4.4 Aufkonzentrierung von Bakteriophagen aus Wasserproben 19
4.4.1 Vorbereitung von Abwasserproben zur Herstellung des Spikematerials 19
4.4.2 Vorbereitung der gespikten Proben 20
4.4.3 Membranfiltration 20
5 Ergebnisse und Diskussion 21
5.1 Kalibrierung 21
5.2 Vergleich der *Escherichia Coli* Stämme 13706 und 700078 32
5.2.1 Vergleich der *Escherichia Coli* Stämme 13706 und 700078 mit deskriptiven Statistiken 32
5.2.2 Test auf Normalverteilung mithilfe des Q-Q-Plots 37
5.2.3 Statistischer Vergleich beider *E. coli* Referenzstämme mit dem Mann-Whitney-U-Test 39
5.3 Kultivierung der Bakteriophage Φ X174 (DSM 4497) für Qualitätskontrollen ... 41
5.3.1 Kultivierung der Bakteriophage Φ X174 41
5.3.2 Erstellung der Mittelwertzielkarten für die Bakteriophage Φ X174 44
5.3.3 Qualitätskontrollen der kultivierten Bakteriophage Φ X174 53
5.4 Aufkonzentrierung von Bakteriophagen aus Wasserproben 54
5.4.1 Herstellung des Spikematerials 54
5.4.2 Aufkonzentrierung der Wasserproben 56
5.5 Fehlerquellen 65
6 Ausblick 66
7 Zusammenfassung 67
Literaturverzeichnis 70
Anhang 78
Selbstständigkeitserklärung 85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rezeptorstellen für die Infektion einer Wirtszelle durch somatische- und F-spezifische Coliphagen [Lamy, et al. 2020] 4

Abbildung 2: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Familien von somatischen Coliphagen [Jofre, et al. 2016] 6

Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Plaque Assays zur Zählung somatischer Coliphagen [Lamy, et al. 2020] 8

Abbildung 4: Versuchsaufbau der Membranfiltration 21

Abbildung 5: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von den KBE/ml für die Impfkultur 13706 22

Abbildung 6: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von den KBE/ml für die Impfkultur 700078 22

Abbildung 7: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Impfkultur 13706 24

Abbildung 8: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Impfkultur 700078 24

Abbildung 9: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von den KBE/ml für die Impfkultur 13706 (zweite Kalibrierung) 28

Abbildung 10: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von den KBE/ml für die Impfkultur 700078 (zweite Kalibrierung) 28

Abbildung 11: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Impfkultur 13706 (zweite Kalibrierung) 29

Abbildung 12: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Impfkultur 13706 (zweite Kalibrierung) 30

Abbildung 13: Boxplot für den Vergleich der beiden Referenzstämme 13706 und 700078 35

Abbildung 14: Q-Q-Plot des Referenzstammes 13706 38

Abbildung 15: Q-Q-Plot des Referenzstammes 700078 39

Abbildung 16**:** Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-4} der Untersuchung des 25.04.2024 42

Abbildung 17**:** Streuung der PFP/ml für die kultivierte Bakteriophage mit dem Referenzstamm 13706 45

Abbildung 18**:** Streuung der PFP/ml für die kultivierte Bakteriophage mit dem Referenzstamm 700078 46

Abbildung 19**:** Unterschied der Plaque-Morphologie bei der Verwendung des *E. coli* Stammes 13706 und 700078 49

Abbildung 20**:** Mittelwertzielkarte für den Referenzstamm 13706 51

Abbildung 21**:** Mittelwertzielkarte für den Referenzstamm 700078 52

Abbildung 22**:** Einfluss des untersuchten Volumens bei der Aufkonzentrierung auf die Wiederfindungsrate (η) 63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kalibrierungswerte der ersten Kalibrierung für den Stamm 13706 80

Tabelle 2: Kalibrierungswerte der ersten Kalibrierung für den Stamm 700078 80

Tabelle 3: Kalibrierungsergebnisse der ersten Kalibrierung für den Stamm 13706 25

Tabelle 4: Kalibrierungsergebnisse der ersten Kalibrierung für den Stamm 700078 25

Tabelle 5: Kalibrierungswerte der zweiten Kalibrierung für den Stamm 13706 80

Tabelle 6: Kalibrierungswerte der zweiten Kalibrierung für den Stamm 700078 80

Tabelle 7: Kalibrierungsergebnisse der zweiten Kalibrierung für den Stamm 13706 30

Tabelle 8: Kalibrierungsergebnisse der ersten Kalibrierung für den Stamm 700078 31

Tabelle 9: Ergebnisse der Plaque-Assays für den Vergleich der beiden Referenzstämme 13706 und 700078 33

Tabelle 10: Statistische Größen für den Vergleich der beiden Referenzstämme 13706 und 700078 81

Tabelle 11: Bestimmung der relativen Zählvarianz (σ_r^2) 81

Tabelle 12: Stichprobenquantil, Perzentil und theoretisches Quantil des Stammes 13706 82

Tabelle 13: Stichprobenquantil, Perzentil und theoretisches Quantil des Stammes 700078 82

Tabelle 14: Verdünnungsergebnisse des Doppelansatzes der Bakteriophage Φ X174 vom 25.04.2024 41

Tabelle 15: Verdünnungsergebnisse des Doppelansatzes der Bakteriophage Φ X174 vom 02.05.2024 43

Tabelle 16: Vergleich der PFP/ml für die kultivierte Bakteriophage Φ X174 44

Tabelle 17: Anzahl der PFP/Platte für die Abwasserproben mit beiden Referenzstämmen 48

Tabelle 18: Bestimmung der Relativen operationalen Varianz (σ_O^2) für den Stamm 13706 83

Tabelle 19: Bestimmung der Relativen operationalen Varianz (σ_O^2) für den Stamm 700078 84

Tabelle 20: Qualitätskontrollen der Ansätze des Vergleiches der *E. coli* Referenzstämme..... 53

Tabelle 21:Ergebnisse der Spikematerial Untersuchung mit dem Stamm 13706 55

Tabelle 22: Ergebnisse der Spikematerial Untersuchung mit dem Stamm 700078 55

Tabelle 23: Ergebnisse der Aufkonzentrierung von Bakteriophagen in Wasserproben mit der Membranfiltration 59

Tabelle 24: Zusammenfassung der Wiederfindungsraten (η) für jedes untersuchte Volumen..... 62

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der relativen Zählvarianz (σ_r^2) 17

Formel 2: Berechnung des Stichprobenquantils (z-Wert)..... 17

Formel 3: Berechnung der Perzentile (P) für die Ermittlung der theoretischen Quantile 17

Formel 4: Berechnung der U-Statistik (U) für den Mann-Whitney-U-Test 17

Formel 5: Berechnung der z-Statistik für den Mann-Whitney-U-Test 17

Formel 6: Berechnung der relativen operationalen Varianz (σ_O^2)..... 19

Formel 7: Berechnung der Cochran's Streuungstest Statistik (T_1)..... 19

Formel 8: Berechnung der Cochran's Streuungsprüf Statistik (T_2)..... 20

Formel 9: Berechnung der Wiederfindungsrate η in % 20

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Deionisiertes Reinstwasser
ATCC	*American Type Culture Collection* (Amerikanische Typenkultursammlung)
CCA	*Chromogenic coliform Agar* (Chromogener Coliformer Agar)
CV	Variationskoeffizient
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
dsDNA	*double-stranded DNA* (doppelsträngige DNA)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EU	Europäische Union
Exp. Nr.	Experimentnummer
IQR	Interquartilsabstand
McF	McFarland
MSA	Modifizierter Scholtens‘ Agar
MSB	Modifizierter Scholtens‘ Bouillon
MSN	Messstellennummer
n. a.	nicht auswertbar
NTU	Nephelometrischen Trübungseinheiten
OA	Originalansatz
P	Perzentil
PFP	*Plaque-forming Particle* (Plaque-bildendes Partikel)
PFU	*Plaque-forming* Unit (Plaque-bildende Einheit)
Q1	unteres Quartil
Q3	oberes Quartil

qPCR	*quantitative polymerase chain reaction* (quantitative Polymerase-Ketten-reaktion)
R	Rang
$R_{1/2}$	Rangsumme 1 bzw. 2
SM	*Sodium-Magnesium* (Natrium-Magnesium)
ssDNA	*single-stranded DNA* (einzelsträngige DNA)
ssMSA	Modifizierter Scholtens‘ Weichagar
TTC	*2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride* (2,3,5-Triphenyltetrazolium chlorid)
T_1	Cochran’s Streuungstest Statistik
T_2	Cochran’s Streuungsprüf Statistik
U	U-Statistik
WG5	*Escherichia coli* CN (ATCC 700078)
ZWA	Zweckverbandes „Kommunale Wasserver- /Abwasserentsorgung Mittle res Erzgebirgsvorland“
σ_r^2	relative Zählvarianz
σ_O^2	relative operationale Varianz

1 Einleitung

Jeder Mensch hat das Recht auf Zugang zu sauberem Trinkwasser. In dieser Hinsicht liegt es in der Verantwortung der Staaten, die Wasserqualität für ihre Bürger sicherzustellen, angefangen bei Trinkwasser bis hin zu Gewässern für Freizeitaktivitäten [URL-1]. In Europa wird die Sicherheit des Wassers durch die Europäische Union (EU)-Trinkwasserrichtlinie ("Richtlinie (EU) 2020/2184 des Europäischen Parlaments und des Rates) vom 16. Dezember 2020 gewährleistet [URL-5]. Durch die Umsetzung dieser Richtlinie in nationales Recht sollen die Mitgliedsstaaten sicherstellen, dass das Trinkwasser den festgelegten Qualitätsstandards entspricht und für die Verbraucher sicher ist [URL 6]. Die EU-Trinkwasserrichtlinie wurde in Deutschland am 21. Juni 2023 vollständig umgesetzt. Die Umsetzung erfolgte durch eine umfassende Novellierung der deutschen Trinkwasserverordnung, die am 24. Juni 2023 in Kraft trat und wesentliche Inhalte der EU-Trinkwasserrichtlinie von 2020 in nationales Recht überführte und sichert somit die hohe Qualität des Trinkwassers in Deutschland. Die neuste Erweiterung der EU-Trinkwasserrichtlinie vom 16. Dezember 2020 führte einen bedeutenden mikrobiellen Parameter ein - die "somatischen Coliphagen". Dieser Schritt ereignete sich im Rahmen eines risikobasierten Ansatzes und dient der Verifizierung der Entfernungswirksamkeit von Viren oder Partikeln im Größenbereich von Viren während der Wasserbehandlung und als Indikator für mögliche fäkale Verunreinigungen. Die Implementierung dieses Parameters soll der Sicherung der Wasserqualität dienen, indem er Messungen und Kontrollen ermöglicht, um potenzielle Verunreinigungen in unterschiedlichen Aufbereitungsphasen von Wasser in Wasseraufbereitungsanlagen zu identifizieren und geeignete Maßnahmen zur Behebung von Qualitätsproblemen einzuleiten [Hambsch, Ho 2023]. Die Empfehlung zur Verwendung dieses neuen Parameters beruht auf seiner Fähigkeit, die Effektivität der Wasserbehandlung in Bezug auf Viren und ähnlich kleine Partikel zu überprüfen. Mit einem festgelegten Referenzwert von 50 PFU pro 100 ml für Rohwässer bietet dieser Parameter einen klaren Maßstab für die Einschätzung der Wasserqualität [URL-5]. Diese quantitative Vorgabe erleichtert nicht nur die Überwachung, sondern trägt auch dazu bei, frühzeitig auf potenzielle Gesundheitsrisiken durch Verunreinigungen zu reagieren. Der festgelegte Referenzwert für somatische Coliphagen gibt an, dass bei einer Überschreitung

im Rohwasser auch das aufbereitete Wasser auf somatische Coliphagen untersucht werden muss. Somit müssen bei einer Referenzwertüberschreitung alle Schritte der Wasseraufbereitung auf virale Kontaminationen oder Verunreinigungen überprüft werden damit die Anlage als sicher gilt [Hambsch, Ho 2023]. Der Parameter somatische Coliphagen, wird durch das Verfahren der DIN EN ISO-10705-2:2001 bestimmt, um die Präsenz solcher viralen, fäkalen Verunreinigungen zu erkennen und weiter Schritte gegen potenzielle Kontaminationen in den Aufbereitungsschritten einzuleiten [Lamy et al. 2020].

2 Grundlagen

2.1 Enterische Viren

Viren gelten als obligate intrazelluläre Parasiten, da sie außerhalb einer Wirtszelle nicht eigenständig vermehrungsfähig sind. Diese Unfähigkeit resultiert aus einem eingeschränkten Genpool, der nur eine begrenzte Anzahl von Biomolekülen für die Selbstreplikation kodiert. Die Produktion von viralen Partikeln, auch als Virionen bezeichnet, erfolgt durch die Übernahme der reproduktiven Mechanismen und die Nutzung des Stoffwechsels einer infizierten Wirtszelle im Infektionsprozess. Die parasitäre Natur von Viren zeigt sich darin, dass sie vollständig auf die Wirtszelle angewiesen sind, um sich zu vermehren und ihre genetische Information zu replizieren. Dieser Prozess beinhaltet die Manipulation der zellulären Mechanismen durch die Viren, um ihre eigenen genetischen Materialien zu reproduzieren und neue infektiöse Virionen zu produzieren. Diese Abhängigkeit von der Wirtszelle macht Viren zu hoch spezialisierten Erregern, die ihre Vermehrung innerhalb lebender Zellen realisieren [Eisenreich, et al. 2019]. Enterische Viren können hauptsächlich den Magen-Darm-Trakt von Menschen und warmblütigen Tieren infizieren und sich darin replizieren. Ihr genetisches Material kann entweder ein- oder doppelsträngige DNA oder RNA sein, welche in einer Proteinstruktur, dem Kapsid, gespeichert ist. Dieses Kapsid besteht aus verschiedenen morphologischen Untereinheiten, die jedem Virus besondere Eigenschaften verleihen. Es sind über 200 anerkannte Enterische Viren bekannt, von denen 140 Serotypen nach der fäkal-oralen Übertragungsroute beim Menschen Infektionen verursachen können. Obwohl diese Viren sich in der Umwelt nicht vermehren können, werden sie in extrem hoher Anzahl in den Fäkalien infizierter Personen ausgeschieden. Diese könnten durch Oberflächenwasser, Grundwasser und Abwasser in die Umwelt gelangen. Die Umweltpersistenz dieser Viren wird in den meisten

Fällen durch das Fehlen einer Virenhülle weiter verstärkt, was sie gegenüber ungünstigen Bedingungen und Wasserbehandlungsprozessen resistent macht. Daher wurden Strategien entwickelt, die auf der Detektion von Indikatororganismen basieren, um die Anzahl viraler Pathogene auf die relevantesten Infektionserreger zu begrenzen. In den letzten Jahrzehnten wurden alternative Indikatoren als Surrogate für Enterische Viren in Betracht gezogen. Einige Mikroorganismen der fäkalen Mikrobiota dienen als Bezug für die fäkal-orale Übertragungsroute, über die Enterische Viren und fäkale Bakterien übertragen werden können. Die Verwendung von bakteriellen Modellstämmen gewährleistet jedoch nicht die Abwesenheit von Enterischen Viren im Wasser. Bakteriophagen wurden als eng mit Enterischen Viren verwandte Indikatoren vorgeschlagen. Diese Viren richten sich gegen bakterielle Zellen und können auf Verschmutzung durch fäkale Bakterien hinweisen. Coliphagen, insbesondere solche, die *Escherichia coli* (*E. coli*) infizieren, wurden aufgrund ihrer Häufigkeit und Rolle als beste Kandidaten für die Detektion fäkaler Kontamination ausgewählt [Lamy, et al. 2020].

2.2 Bakteriophagen

Bakteriophagen sind winzige Viren im Nanometer Bereich von ca. 30 bis 300 nm, die ausschließlich Bakterienzellen infizieren und sich in ihrem Inneren vermehren [URL-2]. Sie sind überall in der Umwelt präsent und werden als die am häufigsten vorkommenden biologischen Agenten auf der Erde betrachtet. Die Vielfalt der Bakteriophagen zeigt sich in ihrer Größe, Morphologie und genomischen Organisation. Ungeachtet dieser Vielfalt teilen sie alle ein gemeinsames Merkmal: ein Nukleinsäuregenom, umhüllt von phagenkodierten Kapsidproteinen. Diese Proteine schützen das genetische Material und ermöglichen seine Übertragung in die nächste Bakterienzelle. Interessanterweise sind Bakteriophagen trotz ihres äußeren Erscheinungsbilds nicht aktiv beweglich, ihre Fortbewegung erfolgt durch die Brownsche Bewegung. Bakteriophagen zeigen eine bemerkenswerte Spezifität gegenüber ihren Wirten, indem sie normalerweise nur eine spezifische bakterielle Art oder sogar bestimmte Stämme innerhalb einer Art infizieren [Kasman, Porter 2022]. Der Tropismus von Bakteriophagen wird durch eine spezifische Anbindung über als Schlüsselrezeptoren betrachtete Proteine auf der Oberfläche des bakteriellen Wirts bedingt. Diese Phase, als Anbindung oder Adsorption des Virions bezeichnet, wird von Penetration, viraler Synthese, Reifung/Assemblierung und schließlich der Freisetzung neuer Virionen gefolgt. Die Rezeptoren befinden sich an zwei verschiedenen Stellen

[Lamy, et al. 2020]. Einige Phagenrezeptorstellen, die sich an bakteriellen Geschlechtsfimbrien (wie F-Pili's) für Reproduktionszwecke befinden, werden von F-spezifischen Phagen genutzt, auch als sexuelle oder männlich-spezifische Coliphagen bekannt, die durch das F-Plasmid (was erstmals in *E. coli K12* detektiert wurde) kodierte Sex-Pili, Bakterien infizieren [Jofre, et al. 2016]. Sie werden von Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase unter optimalen Bedingungen produziert. Einige Phagenrezeptorstellen befinden sich an der bakteriellen Zellwand und sind ständig präsent. Diese Rezeptorstellen werden von somatischen Coliphagen erkannt, die sich auch an abgestorbene Bakterien anheften können (siehe Abbildung 1) [Lamy, et al. 2020].

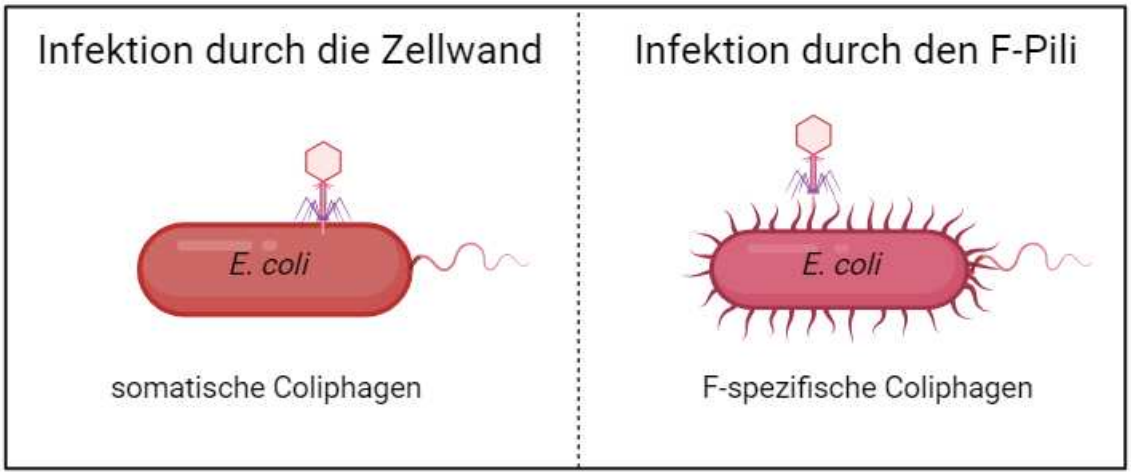

Abbildung 1, Rezeptorstellen für die Infektion einer Wirtszelle durch somatische- und F-spezifische Coliphagen Infektion einer Wirtszelle durch somatische Coliphagen (links), durch F-spezifische Coliphagen (rechts) | erstellt mit BioRender und modifiziert von [Lamy, et al. 2020]

Weiterführende Schritte werden durch zwei Replikationsstrategien realisiert: den lytischen und den lysogenen Zyklus. Im lytischen Zyklus dringt die Phage in eine Wirtszelle ein und nutzt deren Ressourcen, um Proteine für die Vermehrung der Phage herzustellen. Dies führt zur Produktion neuer Phagenpartikel und schließlich zum Tod der Wirtszelle durch Lyse, wodurch die neu entstandenen Phagen freigesetzt werden, um weitere Zellen zu infizieren. Im lysogenen Zyklus integriert die Phage sein Genom entweder in das bakterielle Chromosom oder erhält es als episomales Element. In beiden Fällen erfolgt die Replikation und Weitergabe an die Tochterbakterien, ohne diese zu töten. Diese eingebetteten Phagen-Genome werden als Prophagen bezeichnet, und die Bakterien, die sie beherbergen, werden als Lysogene bezeichnet. Unter spezifischen Umweltbedingungen

können Prophagen wieder in den lytischen Zyklus übergehen und ihren Wirt töten [Kasman, Porter 2022].

2.3 Somatische Coliphagen

Coliphagen sind Bakteriophagen, die präferiert *E. coli* infizieren. Im Bereich der Wasserqualität werden sie in somatische und F-spezifische Coliphagen unterteilt. Während somatische Coliphagen eine vielfältige Gruppe darstellen und *E. coli* durch die Zellwand infizieren, nutzen F-spezifische Bakteriophagen die durch das F-Plasmid kodierten Sex-Pili, um Bakterien zu infizieren [Jofre, et al. 2016]. Die somatischen Coliphagen stellen eine Gruppe von Bakteriophagen dar, die Einzel- oder Doppelstrang DNA aufweisen und verschiedenen Familien angehören, darunter *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* und *Microviridae*. Die Bezeichnung "somatisch" bezieht sich auf den allgemeinen Körper (Soma) der Bakterienzelle. Diese Viren haben eine spezifische Affinität für Bakterien, insbesondere *E. coli*, woher auch der Begriff Coliphage stammt. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass ihre Wirtsspezifität nicht auf *E. coli* beschränkt ist; sie infizieren auch andere Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* wie *Klebsiella* und *Enterobacter*. Diese Bakterien sind nicht nur im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren vorkommend, sondern auch in der Vegetation und in Biofilmen präsent. In Bezug auf die Wasserqualität spielen somatische Coliphagen eine entscheidende Rolle als Indikatoren für mögliche fäkale Verunreinigungen [Schröter-Bobsin 2005]. Ebenso dienen somatische Coliphagen der Verifizierung der Entfernungswirksamkeit der Aufbereitung für Viren bzw. Partikel im Größenbereich von Viren [Hambsch, Ho 2023]. Ihre natürliche Präsenz ist in menschlichen Fäkalien sowie in den Fäkalien von Nutztieren wie Rindern, Schweinen, Geflügel und anderen Tieren zu finden. Wenn somatische Coliphagen im Wasser gefunden werden, deutet dies darauf hin, dass möglicherweise auch fäkale Materialien, die Enterische Viren enthalten könnten, ins Wasser gelangt sind. Die verschiedenen Familien somatischer Coliphagen weisen charakteristische Merkmale in ihrer Struktur auf. Die *Myoviridae* zeichnen sich durch ein kubisches Kapsid, entweder icosahedral oder gestreckt sowie eine lineare doppelsträngige DNA (dsDNA) und einen langen kontraktilen Schwanz aus. Im Gegensatz dazu besitzen die *Siphoviridae* ebenfalls ein kubisches Kapsid (icosahedral), lineare dsDNA, jedoch einen langen nicht-kontraktilen Schwanz. Die *Podoviridae* zeigen ein kubisches Kapsid (icosahedral) und lineare dsDNA, aber einen kurzen nicht-kontraktilen Schwanz. Die *Microviridae* hingegen haben ein kubisches

Kapsid (icosahedral) und zirkuläre einzelsträngige DNA (ssDNA), jedoch keinen Schwanz (siehe Abbildung 2). Diese strukturellen Unterschiede ermöglichen es den somatischen Coliphagen, vielfältige Wege der Bakterieninfektion zu nutzen und verschiedene Strategien zur Überwindung der Wirtszellbarriere einzusetzen [Schröter-Bobsin 2005].

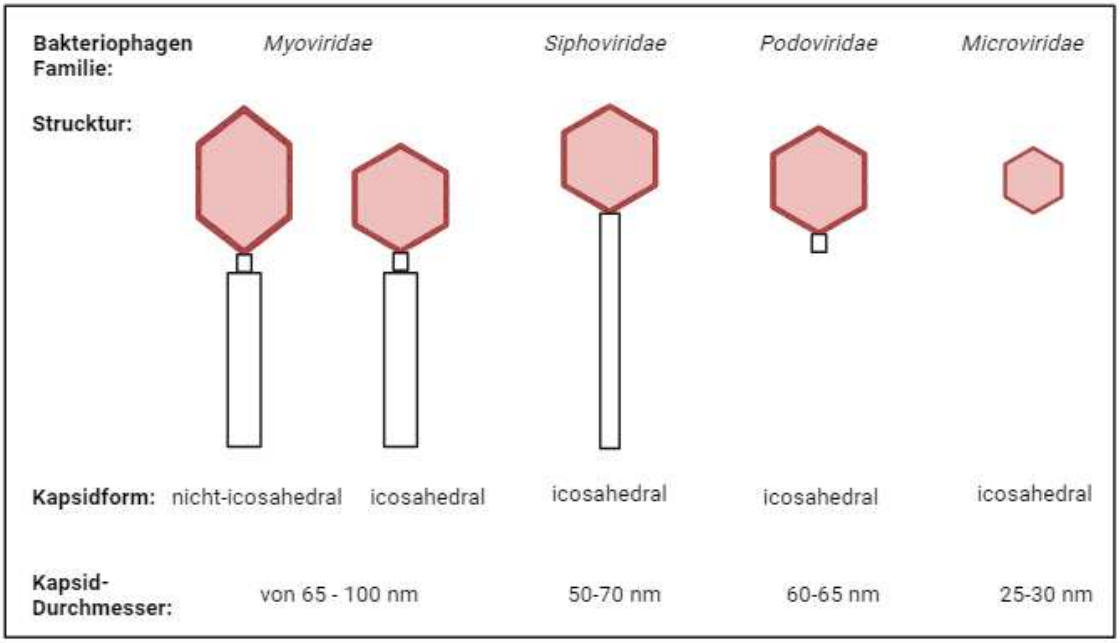

Abbildung 2, Morphologische Unterschiede der verschiedenen Familien von somatischen Coliphagen Darstellung der verschiedenen Familien der somatischen Coliphagen und ihrer Unterschiede von links nach rechts (*Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Microviridae)* | erstellt mit Biorender und modifiziert von [Jofre, et al. 2016]

Somatische Coliphagen sind virulente Phagen, die sich durch ihre Anheftung an Lipopolysaccharid- oder Proteinrezeptoren in der Bakterienzellwand auszeichnen. Diese spezielle Bindungsfähigkeit ermöglicht es den Phagen, sich effektiv an die Wirtszelle zu heften und ihre lytischen Prozesse zu initiieren. Unter optimalen Bedingungen zeigen somatische Coliphagen eine bemerkenswerte Fähigkeit zur Zellzerstörung. Innerhalb eines kurzen Zeitraums von 20 bis 30 Minuten sind sie in der Lage, die Wirtszelle zu lysieren [Schröter-Bobsin 2005].

2.4 Quantitativer Nachweis von somatischen Coliphagen

In der DIN EN ISO-10705-2:2001 wird ein Verfahren zum Nachweis und der Zählung von somatischen Coliphagen durch Bebrütung einer Probe mit einem geeigneten Wirtsstamm festgelegt [DIN EN ISO 10705-2:2001]. Bei solchen kulturbasierten Verfahren liegt der Schwerpunkt der Coliphagen Detektion hauptsächlich auf der direkten Beobachtung von runden Klärzonen (Plaques), die der lysierten Wirtszelle entsprechen [Lamy et al. 2020]. Die Ergebnisse manifestieren sich als Plaque-forming Unit (PFU) oder Plaque-forming particle (PFP) in einer gegebenen Probe. Eine PFU/PFP repräsentiert in der Regel ein einzelnes Virion, kann jedoch auch eine Anhäufung von Virionen sein, dass zu einer einzelnen lysierenden Plaque in einer Monolayer-Kultur der Wirtszelle führt. PFUs finden Anwendung in den Methoden der US EPA, während PFPs den ISO-Standards folgen [Jofre, et al. 2016]. Diese Verfahren gelten als unkompliziert, verlässlich und kosteneffizient, erfordern jedoch bis zu 2 Tage für Resultate [Lamy et al. 2020]. Dieses Verfahren kann dabei für alle Arten von Wasser, Sedimenten, Schlamm als auch Schalentierextrakte angewandt werden [DIN EN ISO 10705-2:2001]. Das Verfahren basiert dabei auf einem quantitativen Plaque Assay (siehe Abbildung 3). Dabei wird ein bestimmtes Volumen an Bakterienkultur ab einer Zelldichte von ca. $1 \cdot 10^8$ KBE/ml mit modifizierten Scholtens‘ Weichagar (ssMSA) und der zu prüfenden Probe (die somatische Coliphagen enthalten kann) vermengt und anschließend auf einer festen modifizierten Scholtens‘ Agar (MSA) Platte ausgegossen (Doppel-Agarschicht Verfahren). Nachfolgend werden die Agarplatten in einem Brutschrank bebrütet. Während dieser Zeit beginnen die Coliphagen die Wirtsstämme (*E.coli*) zu lysieren, wodurch Plaques entstehen können. Die sichtbaren lytischen Plaques werden dann sorgfältig ausgezählt (siehe Abbildung 3) [Lamy et al. 2020].

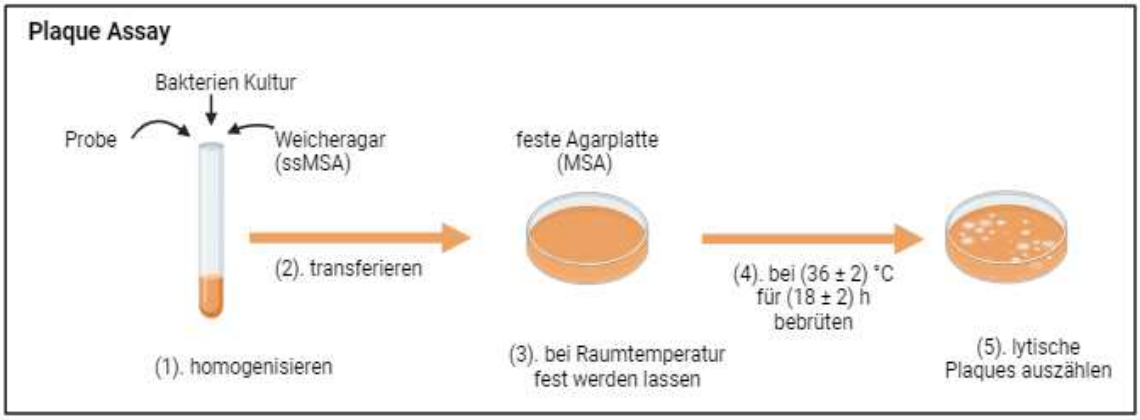

Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Plaque Assays zur Zählung somatischer Coliphagen modifiziert von [Lamy et al. 2020]

Für die Untersuchung einer Probe werden zwei verschiedene *E. coli* Stämme verwendet. Bei Proben mit erwartet niedriger Phagenzahl wie Trinkwasser kommt der *E. coli*-Stamm C (Amerikanische Typenkultursammlung (ATCC) 13706) zum Einsatz. In Situationen, in denen Rohwasser oder Abwasser stark verschmutzt ist und eine hohe Hintergrundflora aufweisen, wird die Nutzung des *E. coli*-Stamms CN (ATCC 700078) auch als WG5 bekannt empfohlen. Um mögliche Störeinflüsse durch die vorhandene Hintergrundflora zu minimieren, wird dem Nährmedium MSA Nalidixinsäure als Antibiotika für den Stamm 700078 zugesetzt. Die Nalidixinsäure hemmt dabei die Proliferation gram-negativer Bakterien und Kokken durch Inhibition der Topoisomerase II (Gyrase). Dieses Enzym ist essenziell für die bakterielle DNA-Replikation, und die Hemmung seiner Funktion führt dazu, dass die DNA nicht ordnungsgemäß repliziert werden kann [Sugino et al. 1977]. Somit wird das Wachstum anderer Bakterienarten minimiert [DIN EN ISO 10705-2:2001]. Ebenso wird auch empfohlen, eine große Anzahl von Petrischalen parallel zu verwenden, um eine zuverlässige Detektion von einem PFP in 100 ml Wasser sicherzustellen [Lamy et al. 2020]. Die verwendeten Wirtsstämme sind nicht pathogen für Mensch und Tier. Der Umgang erfolgt nach nationalen und internationalen Sicherheitsvorschriften für bakteriologische Laboratorien. Somatische Coliphagen sind hingegen sehr resistent gegenüber Austrocknung, was das Risiko einer Kreuzkontamination erhöht. Daher sind hohe Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Dies wird sichergestellt, indem man beim Umgang mit den Phagen immer unter der Sterilbank arbeitet oder einen separaten Laborbereich nutzt. Die benötigte Zelldichte von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml für beide *E. coli* Stämme wird mithilfe einer Kalibrierung ermittelt, bei der die Inkubationszeit und der McFarland

(McF)-Wert beider Stämme (13706 und 700078) bestimmt wird, die einer Zelldichte von etwa $1 \cdot 10^8$ KBE/ml entsprechen. Es wird dabei empfohlen, solch eine Kalibrierung mindestens dreimal pro Stamm durchzuführen [DIN EN ISO 10705-2:2001]. Der McF-Wert entspricht einem Trübungsstandard für eine Bakterienkultur und wird mit dem Densitometer gemessen. Densitometer ermöglichen die Messung der Lösungstrübung in einem breiten Bereich von bis zu 15,0 McF-Einheiten [URL-3]. Das Funktionsprinzip beruht auf der Messung der optischen Dichte in McF-Einheiten. Das Densitometer misst die Lichtabsorption, die von der Dichte der Bakteriensuspension abhängt. Höhere Dichte führt zu höherer Absorption. Die Absorption wird durch das Verhältnis von einfallendem zu durchgelassenem Licht bestimmt. Ein Blindwert des verwendeten modifizierten Scholtens‘ Bouillon (MSB) wird ermittelt und von den gemessenen McF-Werten abgezogen [URL-4]. Zur Überprüfung, ob die Vorbereitungen des Versuchs erfolgreich waren, dient die Coliphage Φ X174 (ATCC 13706-B1) als Kontrollbakteriophage [Lamy et al. 2020]. Diese gehören zur Familie *Microviridae* und dient als Indikator für virale Abwasserverunreinigungen. Sie ist nicht pathogen für Menschen und Tiere und eignen sich gut zum Arbeiten im mikrobiologischen Labor (Arbeiten mit Krankheitserregern Risikogruppe 1). Die Phage präsentiert morphologisch ein ikosaedrales Kapsid, das mit 12 Spikes besetzt ist. Im Gegensatz zu einigen anderen Phagen hat sie keinen Schwanz und weist eine Kapsidgröße von 25 nm auf [URL-7]. Diese somatische Coliphage Φ X174 gilt dabei unter allen Matrizen als sehr stark persistent gegenüber Temperaturen von 0 °C – 100 °C beeinflusst durch seine spezifischen morphologischen Eigenschaften [Nappier 2015].

2.5 Aufkonzentrierung von Bakteriophagen

Die ISO-Norm 10705-3 definiert die allgemeinen Prinzipien zur Beurteilung der Effektivität von Methoden zur Anreicherung von Bakteriophagen in Wasser. Eine Anreicherung wird für Wasserproben empfohlen, die voraussichtlich weniger als 3 PFP pro Milliliter enthalten. Anreicherungsmethoden können auf alle Arten von Wasser angewendet werden, vorausgesetzt, dass die Menge und Art der suspendierten Feststoffe und/oder gelösten Stoffe das Anreicherungsverfahren nicht beeinträchtigen. Die Probe wird mit einer Methode behandelt, die Bakteriophagen aus einem relativ großen Probenvolumen (100 ml bis zu mehreren Litern) in ein kleineres Volumen (5 ml) konzentriert [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Diese Methode basiert auf einer Membranfiltertechnik zur Konzentration

und Zählung von männlichen RNA-Coliphagen und wurde modifiziert, um die Wiederfindungsrate nach der Filtration von Volumina über 100 ml zu verbessern. Sie wird für Wasserproben mit einem Volumen von 100 ml bis 1 l und einer Trübung von weniger als 2,0 NTU (Nephelometrische Trübungseinheiten) empfohlen. Die Membranfiltration ist eine Methode zur Abtrennung und Konzentration von Mikroorganismen aus Flüssigkeiten. Dabei wird die Flüssigkeit durch eine poröse Membran gepresst, die nur Partikel bis zu einer bestimmten Größe durchlässt. Mikroorganismen, die größer als die Poren der Membran sind, werden auf der Oberfläche zurückgehalten. Anschließend können die gefilterten Mikroorganismen gezählt oder weiter analysiert werden [Kraume 2020]. Bei der Aufkonzentrierung von Bakteriophagen (nach ISO-10705-3) wird Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) zum Wasser hinzugefügt. $MgCl_2$ wird dabei verwendet, um die Osmolarität der Lösung zu erhöhen, indem es die Anzahl an osmotisch aktiven Teilchen erhöht [Daloee, Behbahani 2020]. Durch die erhöhte Osmolarität wird der Druckunterschied zwischen den Seiten der Membran verringert, was die Filtration effizienter macht [Feigenspan 2017]. Das Validierungsverfahren der Methode besteht darin, die Wiederfindungsrate der Bakteriophagen aus verschiedenen Proben zu ermitteln, die mit natürlich kontaminiertem Wasser (roh oder behandelt) beimpft werden. Die Wiederfindungsrate wird über verschiedene Volumina hinweg untersucht, wobei besonderes Augenmerk auf die Reproduzierbarkeit gelegt wird [DIN EN ISO 10705-3:2003].

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, im Labor des ZWA-Hainichen das Verfahren zum quantitativen Nachweis von somatischen Coliphagen gemäß der Norm DIN EN ISO 10705-2 anzuwenden. Dabei sollen die beiden vorgeschlagenen *Escherichia coli*-Wirtsstämme, *E. coli* C (ATCC 13706) und *E. coli* CN (ATCC 700078, auch als WG5 bekannt) hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für dieses Verfahren durch statistische Tests verglichen werden. Des Weiteren soll die Kultivierung des Bakteriophagen ϕ X174 für Qualitätskontrollen im Labor etabliert werden, um künftige Ansätze nach dem Standardverfahren auf ihre Gültigkeit und Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Zusätzlich soll das Verfahren der Membranfiltration zur Aufkonzentrierung von Bakteriophagen in Wasserproben ge-

mäß DIN EN ISO 10705-3 validiert werden, um sowohl größere Volumina von Wasserproben untersuchen zu können als auch um das Standardverfahren der DIN EN ISO 10705-2 bezüglich des Kosten, Zeit und Energieaufwandes zu verbessern.

3 Material

3.1 Lösungen und Chemikalien

- Ethanol von Th. Geyer (99,8 % bezogen auf Trockenmasse, Artikel Nr. 9589)
- Glycerin (steril) von Sifin (99,8%, steril, Lot: 2X010762, verwendbar bis 2027-04 und 99,9%, steril, Lot: 9M011869, verwendbar bis 2024-03)
- Calciumchlorid ($CaCl_2$) ≥ 98%, getrocknet, Pulver von Carl Roth GmbH + Co KG (CAS Nr.: 10043-52-4)
- Nalidixinsäure von Sigma-Aldrich (≥ 98,0%, CAS Nr.: 389-08-2)
- Natriumhydroxid (NaOH) von Carl Roth GmbH + Co KG (CAS Nr.: 1310-73-2)
- 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) von Sigma-Aldrich (≥ 98,0%, CAS Nr.: 298-96-4)
- Natriumchlorid (NaCl) von Carl Roth GmbH + Co KG (≥ 99,5 %, CAS Nr.: 7647-14-5)
- Maximal- Wiederbelebungs-Lösung von Thermo Fisher Scientific, Lot: 3768995 (Pepton 1g/l, NaCl 8,5 g/l, 1 l Aqua dest.)
- Tris-HCL von Thermo Fisher Scientific (Lot: 2858138)
- Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) ≥99 % von Carl Roth GmbH + Co KG (CAS Nr.: 7786-30-3)
- Tween® 80 von Carl Roth GmbH + Co KG (CAS Nr.: 9005-65-6)
- Chloroform ($CHCL_3$) von Th. Geyer GmbH & Co. KG (CAS Nr.: 67-66-3)
- Fleischextrakt von Carl Roth GmbH + Co KG (CAS Nr.: 68990-09-0)
- Natriumthiosulfat ≥99 % von Carl Roth GmbH + Co KG (CAS Nr.: 7772-98-7)

3.2 Geräte

- AQUA-Lab B30/Integrity (Serien Nr.: 5750, AQUA-Lab GmbH Co. KG)
- McFarland Densitometer DEN-1, DEN-1B V.3GW (Grant Instruments (Cambridge) Ltd)

- Sicherheitswerkbank-Hera Safe (Serien Nr.: 40163805, Kendro Laboratory Products GmbH)
- Waage Typ BCE42021-1S (Serien Nr.: 42402658, Sartorius Stedim Biotech GmbH)
- Spülautomat PG 8583 (Serien Nr.: 184647476, Miele & Cie. KG)
- Brutschrank BD 53 für 44 °C (BINDER GmbH)
- 211 DS Digital Shaking Incubator (Serien Nr.: 11020522, Labnet)
- Wasserbad Typ 1002 (Serien Nr.: 105512910, Gesellschaft für Labortechnik GmbH - Burgwedel)
- Tischabzug Typ TA 1500 (Laborbau/Systeme Hemling GmbH)
- Varioklav-Dampfsterilisator Greenline 80s (Serien Nr.: 21100321, H+P Labortechnik GmbH)
- Varioklav-Dampfsterilisator Greenline 80s (Serien Nr.: 23111123, H+P Labortechnik GmbH)
- Kühlschrank Liebherr (Serien Nr.: 844666912, Liebherr)
- Kühlschrank Liebherr profiline (Serien Nr.: 761345525, Liebherr)
- Gefrierbox (Severin Elektrogeräte GmbH)
- Ultratiefkühlschrank ULUF 15 für -70 °C (Serien Nr.: 25.22 1117522, ARCTIKO A/S)
- Membranfilter-Dispenser Porenweite 0,45 µm (Lot: 0222 11406 2107623, Sartorius Stedim Biotech GmbH)
- Membranfiltrationsanlage + Pumpe (Serien Nr.: 14352859, Sartorius Stedim Biotech GmbH)
- Membranfilter 0,22 µm (Lot: 112054107A, Sartorius Stedim Biotech GmbH)

3.3 Medien

- Modifizierter Scholtens‘ Bouillon (MSB) von Sifin, Lot: 4850623, verwendbar bis 2026-06 (Pepton 10 g/l, Hefeextrakt 3 g/l, Fleischextrakt 12 g/l, NaCl 3 g/l, Na_2CO_3-Lösung (150 g/l) 5 ml, $MgCl_2$-Lösung (100 g $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ in 50 ml Wasser) 0,3 ml, pH 7,2 ± 0,2)
- Agar für die Mikrobiologie von Sifin (Lot: A01497, verwendbar bis 2025-01)
- Grundmedium Modifizierter Scholtens‘ Agar (MSA) (Pepton 10 g/l, Hefeextrakt 3 g/l, Fleischextrakt 12 g/l, NaCl 3 g/l, Na_2CO_3-Lösung (150 g/l) 5 ml, Agar für

die Mikrobiologie 14 g/l, $MgCl_2$-Lösung (100 g $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ in 50 ml Wasser) 0,3 ml, pH 7,2 ± 0,2)

- Vollmedium Modifizierter Scholtens‘ Agar (MSA) (200 ml Grundmedium geschmolzen mit 1,2 ml Calciumchlorid-Lösung)
- Modifizierter Scholtens‘ Weichagar (ssMSA) (Pepton 10 g/l, Hefeextrakt 3 g/l, Fleischextrakt 12 g/l, NaCl 3 g/l, Na_2CO_3-Lösung (150 g/l) 5 ml, Agar für die Mikrobiologie 8 g/l, $MgCl_2$-Lösung (100 g $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ in 50 ml Wasser) 0,3 ml, pH 7,2 ± 0,2)
- Chromogener Coliformen Agar (CCA) von Thermo Fisher Scientific Lot: 3804821 (Hefeextrakt 2g/l, NaCl 5 g/l, Enzymatischer Verdau von Casein 1 g/l, NaH_2PO_4 2,2 g/l, Na_2HPO_4 2,7 g/l, Natriumpyruvat 1 g/l, Sorbitol 1 g/l, Tryptophan 1 g/l, Tergitol® 15-S-7 0,15 g/l, 6-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid 0,2 g/l, 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-Glucuronsäure 0,1 g/l, IPTG 0,1 g/l, Agar 13,55 g/l)
- MacConkey-Agar von Thermo Fisher Scientific, Lot: 4378994 (Pepton 20 g/l, Lactose 10 g/l, Gallensalze 5g/l, Neutralrot 75 mg/l, Agar 12-20 g/l)
- Deutsches Einheitsverfahren (DEV) Nähragar von Thermo Fisher Scientific Lot: 4443868 (Pepton 10 g/l, Fleischextrakt 10 g/l, NaCl 5 g/l, Agar 10 g/l)

3.4 Mikroorganismen

- *Escherichia coli* ATCC 13706 PK/5 von Thermo Fisher Scientific (Lot: 560641)
- *Escherichia coli* ATCC 700078 auch WG5 (DSM: 18455-0321-001)
- Φ X174 ATCC 13706-B1 von Niedersächsisches Landesgesundheitsamt- Aurich von 1-2024 (Ringversuch)
- *Escherichia coli* phage *Escherichia* phage Φ X174 von dem Leibnitz-Institut DSMZ GmbH (DSM-No. 4497)

4 Methoden

4.1 Vorbereitente Tätigkeiten

4.1.1 Probennahme und Probenvorbereitung

Die Probennahme und der Transport der Proben erfolgte durch qualifizierte Probennehmer nach der ISO 8199, ISO 5667-1, ISO 5667-2 und ISO 5667-3. Die Lagerung betrug maximal 48 h bis zum Ansatz bei (5 ± 3) °C (höchstmöglich erlaubte Lagerzeit beträgt 72 h).

4.1.2 Herstellung der Stammkulturen

Für die Herstellung der Stammkulturen wurden die Referenzkulturen 13706 und 700078 wie in Punkt 3.4 aufgelistet kultiviert. Für den Stamm 13706 wurden lyophilisierte Kolonien aus Culti Loops in etwa 3 ml MSB gelöst und in einem vorgewärmten 300 ml Erlenmeyerkolben mit (50 ± 5) ml MSB übertragen. Für den Stamm 700078 wurde der Inhalt einer Ampulle, gefriergetrocknet nach Vorgabe des Herstellers Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in 0,5 ml sterilem Wasser gelöst und anschließend in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit (50 ± 5) ml MSB überführt. Diese Suspensionen brüteten unter leichtem Schütteln (100 ± 10) min^{-1} für (20 ± 4) h bei (36 ± 1) °C im Brutschrank. Die Zugabe von 10 ml sterilem Glycerin, was einer Endkonzentration von 15-20 % Volumenanteil entspricht, ermöglicht das Gefrieren der Kulturen. Dieses erfolgte in 0,5 ml Teilvolumina in 2 ml Kulturröhrchen bei (-70 ± 10) °C im Ultratiefkühlschrank. Die Kulturen dienten dann als Referenz für das Labor.

4.1.3 Herstellung der Arbeitskulturen

Für die Herstellung der Arbeitskulturen wurde je ein Reaktionsgefäß mit der Stammkultur der verschiedenen Wirtsstämme aus dem Ultratiefkühlschrank genommen und auf Raumtemperatur (15 °C bis 30 °C) aufgewärmt. Als nächstes wurden die Kulturen auf je 2 Platten Lactose haltiges Medium wie McConkey-Agar oder chromogenem Coliformen-Agar (CCA) angeimpft, um Einzelkolonien wachsen zu lassen. Diese Platten brüteten anschließend bei (36 ± 2) °C für (20 ± 4) Stunden. Nach der Bebrütung wurden (50 ± 5) ml MSB in einen 300-ml-Erlenmeyerkolben gegeben und auf (36 ± 1) °C vorgewärmt.

Pro Wirtsstamm wurden je zwei bis drei Lactose-positive Kolonien als Kulturmaterial von den Agarplatten mithilfe einer Impföse abgenommen und in den Erlenmeyerkolben mit dem MSB eingeimpft. Die Kulturen brüteten für (5 ± 1) h bei (36 ± 1) °C unter leichtem Schütteln im Brutschrank. Danach wurde 10 ml steriles Glycerin zu jeder Kultur hinzugefügt und gut gemischt. Die fertigen Arbeitskulturen wurden anschließend in je 1,2 ml sterile Kulturröhrchen verteilt und im Ultratiefkühlschrank bei (-70 ± 10) °C gelagert.

4.1.4 Kalibrierung

Um die notwendige Zelldichte von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml der Impfkulturen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem McF-Wert zu ermitteln, wurde eine Kalibrierung für beide Referenzstämme je dreimal durchgeführt. Dazu wurde je ein Kulturgefäß der Arbeitskulturen aus der Ultratiefkühlung entnommen und auf Raumtemperatur kurz aufgewärmt. Währenddessen wurde für jede Arbeitskultur ein 300 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml MSB gefüllt und vortemperiert. Nach der Messung des Blindwertes des MSB erfolgte die Zugabe der Arbeitskultur. Dafür wurden die Arbeitskulturen gevortext und 0,5 ml der jeweiligen Kultur in den zugehörigen MSB eingeimpft. Folgend wurden die Suspensionen inkubiert, wobei sich die Inkubation über 3,5 h bei (36 ± 1) °C unter leichtem Schütteln im Brutschrank erstreckte. Hierfür wurde jede 30 Minuten 3,2 ml der Suspensionen entnommen und der McF-Wert in 19 mm Ø Röhrchen mithilfe des Densitometers ermittelt. Nach jeder Messung wurde sofort eine dezimale Verdünnungsreihe bis 10^{-7} (in Pepton-Lösung) durchgeführt. Aus den Röhrchen der letzten drei Verdünnungsstufen wurde je 1 ml auf Deutsches Einheitsverfahren (DEV)-Agar Platten im Doppelansatz ausplattiert. Nach der Bebrütung bei (36 ± 1) °C für (20 ± 4) h im Brutschrank erfolgte die Auszählung der KBE. Wobei nur die Anzahl an KBE von 30 bis 300 in die Berechnung einbezogen wurden.

4.2 Durchführung

4.2.1 Herstellung der Impfkulturen

Die Herstellung der Impfkultur aus der jeweiligen Arbeitskultur erfolgte analog wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben. Mit dem Unterschied, dass beim Erreichen der Orientierungswerte für die Inkubationszeit und McF-Wert die Impfkulturen auf Eis gelegt wurden. Die besagten Werte wurden hierfür aus der Kalibrierung entnommen.

4.2.2 Standardverfahren

4.2.2.1 Standardverfahren für Proben mit niedriger Belastung

Für die Analyse einer Wasserprobe (100 ml) des ZWA-Hainichen mit niedriger Phagenzahl (Rohwasser) wurde das Standardverfahren mit den Stämmen 13706 und WG5* angewandt. Dazu wurde zu einer 200 ml Flasche mit autoklavierten und geschmolzenen ssMSA unter aseptischen Bedingungen 1,2 ml Calciumchlorid ($CaCl_2$)-Lösung und 2 ml 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung hinzugegeben. Der fertige ssMSA wurde dann mit 10 ml Teilvolumina auf jeweils 20 Kulturröhrchen aufgeteilt und in einem Wasserbad bei (45 ± 1) °C aufbewahrt. Zu jedem Kulturröhrchen wurde 5 ml der vortemperierten Originalprobe hinzugefügt. Dabei wurde jedes Teilvolumen als Doppelansatz untersucht. Anschließend wurde 1 ml an Impfkultur zu den Kulturröhrchen hinzu pipettiert und alle Röhrchen mit einer Einwegimpföse umgerührt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die fertigen Kulturröhrchen ab diesem Zeitpunkt nicht länger als 10 min im Wasserbad bei (45 ± 1) °C stehen. Der Inhalt jedes Röhrchens wurde jeweils auf eine Petrischale (14 cm) mit MSA-Vollmedium gegossen und zum Erstarren unter der Sicherheitswerkbank stehen gelassen. Die Bebrütung erfolgte bei (36 ± 2) °C für (18 ± 2) h im Brutschrank. Nach der Bebrütung wurden die Plaques auf den Platten gezählt. Für den Vergleich der beiden Referenzstämme wurde die relative Zählvarianz, der z-Wert für das Stichprobenquantil, die Perzentile für die theoretischen Quantile, die U-Statistik oder auch der z-Wert für den Mann-Whitney-U-Test mit den folgenden Formeln berechnet:

* bei dem Stamm WG5 für das Standardverfahren muss Nalidixinsäure in einer Endkonzentration von 250 µg/ml zu dem ssMSA zugesetzt werden.

Formel 1: Berechnung der relativen Zählvarianz (σ_r^2)

$$\sigma_r^2 = 2 \cdot \left(\frac{x1 - x2}{x1 + x2}\right)^2 \tag{1}$$

x1/2 … Ergebnis 1 bzw. 2

Formel 2: Berechnung des Stichprobenquantils (z-Wert)

$$z = \frac{Originalwert - s}{\bar{x}} \tag{2}$$

s … Standardabweichung

$\bar{x}$ … arithmetisches Mittel

Formel 3: Berechnung der Perzentile (P) für die Ermittlung der theoretischen Quantile

$$\mathrm{P} = \frac{(R - 0{,}5)}{n} \cdot 100 \tag{3}$$

n … Gesamtzahl der Werte in der Stichprobe

R … Rang des Wertes in der sortierten Liste

Formel 4: Berechnung der U-Statistik (U) für den Mann-Whitney-U-Test

$$U = R_{1/2} - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} \tag{4}$$

$R_{1/2}$ … Rangsumme 1 bzw. 2

n … Gesamtzahl der Werte in der Stichprobe

Formel 5: Berechnung der z-Statistik für den Mann-Whitney-U-Test

$$z = \frac{U - E(U)}{\sqrt{Var(U)}} \tag{5}$$

U … U-Statistik

4.2.2.2 Standardverfahren für Proben mit hoher Belastung

Für die Untersuchung von Proben mit hoher Phagenzahl (Abwasser) wurde wie in Abschnitt 4.2.2.1 vorgegangen nur mit folgenden Änderungen. Es wurde eine Flasche

ssMSA mit 50 ml benötigt, ergänzt durch 300 µl $CaCl_2$-Lösung und 0,5 ml TTC-Lösung. Dieser ssMSA wurde dann auf Teilvolumina von 2,5 ml ssMSA in Glasröhrchen aufgeteilt, wobei nur 1 ml der Probe und 1 ml Impfkultur hinzugefügt wurde. Zusätzlich kamen kleine Petrischalen (9 cm) mit MSA-Vollmedium zum Einsatz.

4.3 Kultivierung des Bakteriophagen Φ X174 für Qualitätskontrollen und Erstellung von Mittelwertzielkarten

4.3.1 Kultivierung der Bakteriophagen Φ X174 und Qualitätskontrolle

Zur Kultivierung der Bakteriophage ϕ X174 wurde 25 ml MSB in einen 300 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben und mit 0,25 ml Wirtskultur beimpft. Die Suspension inkubierte 90 Minuten lang bei (36 ±2) °C und wurde dabei bei (100 ± 10) min^{-1} geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von ϕ X174 aus einer Stammlösung, um eine Endkonzentration von 10^{-7} PFP zu erreichen. Daraufhin erfolgte eine 4- bis 5-stündige Inkubation der Lösung unter gleichen Bedingungen. Nach der Bebrütung folgte die Zugabe von 2,5 ml Chloroform ($CHCl_3$), die Lösung wurde gemischt und über Nacht bei (5 ± 3) °C gelagert. Die wässrige Phase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und in Zentrifugenröhrchen bei mindestens 3000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bei (5 ± 3) °C aufbewahrt. Folgend wurde der Überstand in Pepton-Lösung bis 10^{-12} verdünnt, um den gesuchten Titer von ca. 50 PFP durch Ausgießen auf MSA und Bestimmung der KBE im Doppelansatz nach dem Standardverfahren (siehe 4.2.2.2) zu ermitteln. Die geeignete Verdünnung wurde in 200 ml Sodium-Magnesium (SM)-Puffer gegeben und 5 % Volumenanteil Glycerin hinzugefügt. Zuletzt wurde die Phagensuspension in 2,4-ml-Teilvolumina Kunststoffreaktiongefäße verteilt und bei (- 70 ± 10) °C aufbewahrt. Für eine Überprüfung wurde ein Reaktionsgefäß aufgetaut und entsprechend dem Standardverfahren (siehe 4.2.2.2) untersucht.

4.3.2 Erstellung der Mittelwertzielkarten

Für die Erstellung der Mittelwertzielkarte wurde zuerst die kultivierte Bakteriophage je auf 10 Platten mit jedem Referenzstamm nach der Methode von 4.2.2.2 untersucht. Anschließend wurde zur Ermittlung der Ausschlussgrenzen für die Mittelwertzielkarten Abwasserproben nach dem Standardverfahren (siehe 4.2.2.2) analysiert. Des Weiteren war es nötig, hierfür die relative operationale Varianz mit folgender Formel zu berechnen:

Formel 6: Berechnung der relativen operationalen Varianz (σ_O^2)

$$\sigma_O^2 = \frac{(s^2 - \bar{x})}{\bar{x}^2} \tag{6}$$

s^2 … Varianz

$\bar{x}$ … arithmetisches Mittel

4.4 Aufkonzentrierung von Bakteriophagen aus Wasserproben

4.4.1 Vorbereitung von Abwasserproben zur Herstellung des Spikematerials

Zunächst wurde eine Abwasserprobe gemäß der Methode von 4.1.1 entnommen und anschließend bei 1.000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach auf Eis gelagert. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes mit dem Standardverfahren (siehe 4.2.2.2) untersucht. Danach wurde Glycerin in einer Endkonzentration von 5 % Volumenanteil zum Überstand hinzugefügt. Es wurden 10 ml Aliquots in Glasröhrchen verteilt und bei (−20 ± 5) °C eingefroren. Für die Untersuchung wurden jeweils zwei Röhrchen aufgetaut und aus jedem Röhrchen zweimal 0,5 ml Aliquots nach dem Standardverfahren (siehe 4.2.2.2) analysiert. Dabei sollte eine Konzentration von 60 PFP bis 200 PFP pro Milliliter erreicht werden, sonst müsste die Probe verdünnt oder ausgetauscht werden. Diese Zählung wurde mit der folgenden Formeln auf die Homogenität in den Röhrchen selbst und zwischen den Röhrchen untersucht:

Formel 7: **Berechnung der Cochran's Streuungstest Statistik (T_1)**

$$T_1 = \sum_{i=1}^{I}\sum_{j=1}^{J}\left[\left(z_{ij} - \frac{z_{i+}}{J}\right)^2 \Big/ \left(\frac{z_{i+}}{J}\right)\right] \tag{7}$$

Z_{i+} … Gesamtzahl der Plaques der Duplikate einer Ampulle

I … Anzahl der Ampullen

J … Anzahl der Duplikate

Formel 8: Berechnung der Cochran's Streuungsprüf Statistik (T_2)

$$T_2 = \sum_{j=1}^{J} \left[\left(z_{i+} - \frac{z_{++}}{I} \right)^2 \Big/ \left(\frac{z_{++}}{I} \right) \right] \tag{8}$$

Z_{++} … Gesamtzahl der Plaques für alle Ampullen und Duplikate

4.4.2 Vorbereitung der gespikten Proben

Für die Herstellung der gespikten Proben wurde insgesamt 3 l Rohwasserprobe wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben entnommen und in je 0,125; 0,250; 0,5 und zweimal 1 l Teilvolumina aufgeteilt. Anschließend wurde 1 ml des vorbereiteten Spikematerials in jedes Gefäß gegeben, mit Ausnahme des 1-Liter-Gefäßes (Originalansatz).

4.4.3 Membranfiltration

Bei der Membranfiltration wurde Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) zu jeder Probe hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 0,05 mol/l zu erreichen. Anschließend wurden die Proben durch einen Membranfilter aus gemischten Celluloseestern gefiltert, wobei eine Filterrate von 1 Liter in 30 Minuten eingehalten wurde. Der Membranfilter wurde dann in 8 Fragmente geschnitten und in ein Plastikröhrchen überführt, zu dem 5 ml Elutionslösung hinzugefügt wurden. Dieses Röhrchen wurde für 4 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Schließlich wurde die gesamte Elutionslösung in 1 ml Aliquots wie eine Abwasserprobe gemäß dem Abschnitt 4.2.2.2 analysiert. Der Filter wurde zusätzlich nach demselben Verfahren untersucht, wobei keine flüssige Probe verwendet wurde, sondern der Filter mit der Oberseite auf die Wirtsmonolayer-Schicht im ssMSA gelegt wurde. Zur Ermittlung der Wiederfindungsraten wurde folgende Formel verwendet:

Formel 9: Berechnung der Wiederfindungsrate η in %

$$\eta = \frac{N_c}{N_s} \cdot 100\ \% \tag{9}$$

N_c … die Gesamtanzahl der Plaques, die aus einem Konzentrat gewonnen wurden

N_s … die Anzahl der Plaques aus 1 ml des Spike Materials

Abbildung 4: Versuchsaufbau der Membranfiltration

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Kalibrierung

Durch die Kalibrierung konnten die optimalen Parameter (Inkubationszeit und der McF-Wert) für die Quantifizierung der somatischen Coliphagen mit der jeweiligen Impfkultur ermittelt werden. Dabei war es das Ziel, die Zelldichte an *E. coli* Bakterien von etwa $1 \cdot 10^8$ KBE/ml zu erreichen, damit ausreichend Wirtszellen für die Lyse durch die Coliphagen vorhanden waren. Wichtig ist jedoch, dass die Ergebnisse für die ersten Kalibrierungen (alle vor dem 13.03.2024) vorbereitet und dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Die restlichen wurden selbst durchgeführt. Dabei erfolgte die Kalibrierung nach DIN EN ISO-10705-2:2001 dreimal für jeden Stamm, um eine Beziehung zwischen der Koloniezahl und der Absorption herzustellen [DIN EN ISO 10705-2:2001]. Die ermittelten Inkubationszeiten, McF-Werte und KBE/ml wurden als Mittelwerte der Verdünnungsstufen von 10^{-5} bis 10^{-7} für die erste vollständige Kalibrierung beider Stämme in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst (siehe Anhang). Diese Ergebnisse wurden zunächst jeweils in ein Diagramm übertragen, bei dem der McF-Wert der Anzahl an KBE/ml gegenübergestellt wurde (siehe Abbildung 5 und 6). Dabei ist bei der Kalibrierung des Stammes 700078 vom 14.02.2024 zu beachten, dass diese nicht in die Ermittlung der Parameter für diesen Stamm einbezogen wurde. Der Stamm wurde häufig aus dem Brutschrank entnommen. Dadurch konnten sich die *E. coli* nicht in ähnlicher Weise teilen

und die Zelldichte von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml wurde deutlich später erreicht im Vergleich zu den anderen Versuchen (siehe Abbildung 6).

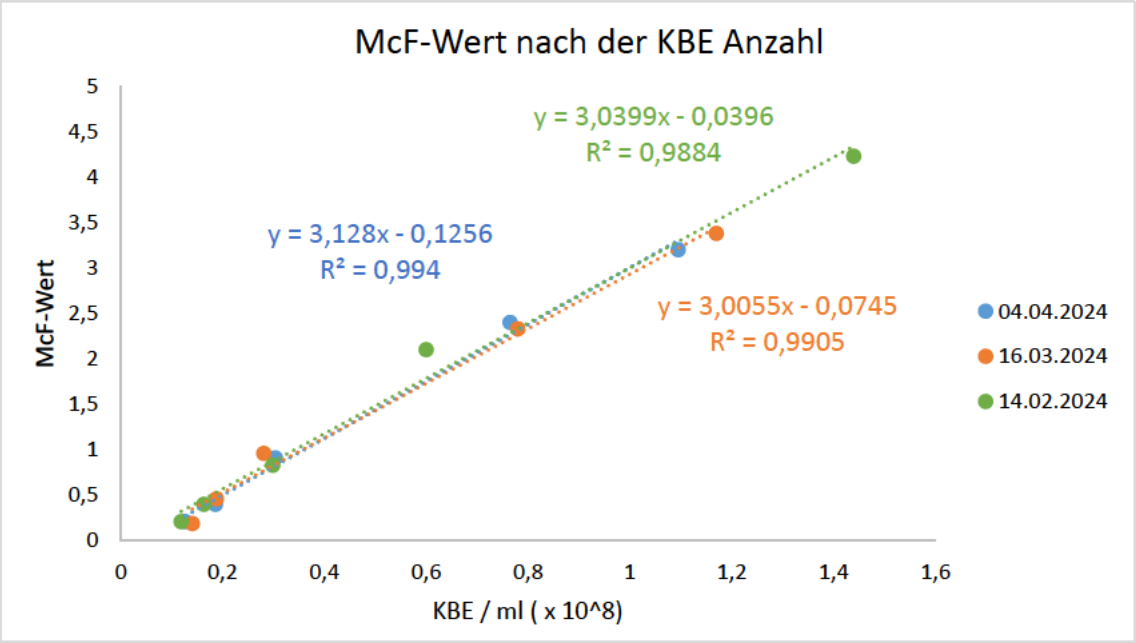

Abbildung 5: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von den KBE/ml für die Impfkultur 13706

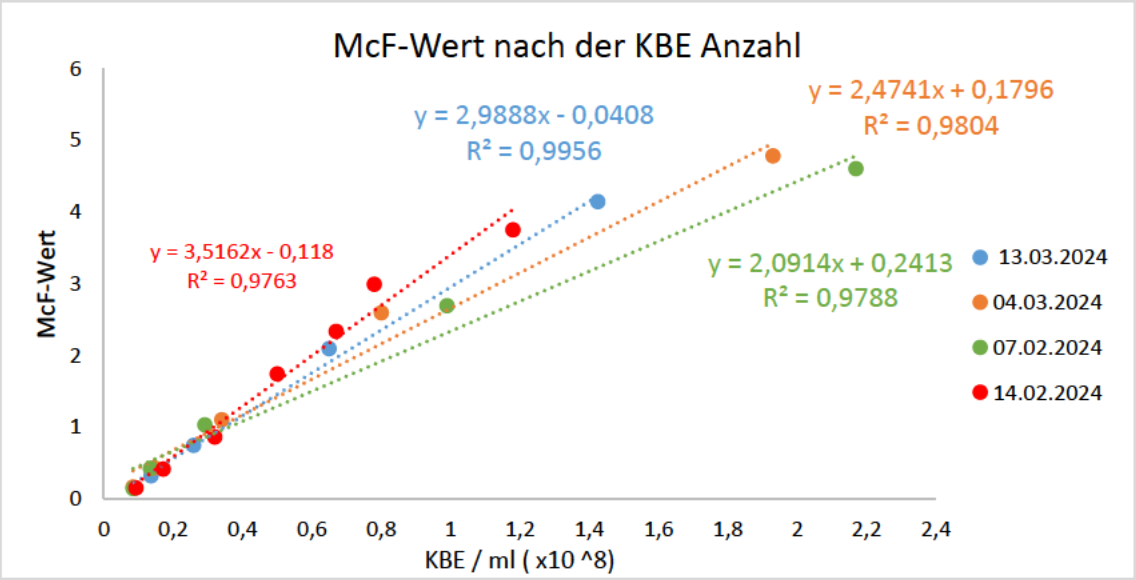

Abbildung 6: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von den KBE/ml für die Impfkultur 700078

Durch eine Ermittlung der Trendlinien der einzelnen Kalibrierungsdurchgängen konnten die McF-Werte berechnet werden, die einer spezifischen Zelldichte von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml entsprechen (siehe Abbildung 5 und 6). Hierfür wurde der Wert „x“ in den zugrunde liegenden Gleichungen durch „1“ substituiert, um die McF-Werte zu ermitteln. Bei den Kalibrierungen der Impfkultur 13706 wurden folgende McF-Werte ermittelt: Am 04.04.2023 wurde ein Wert von 3,002 festgestellt, am 16.03.2024 betrug der Wert 2,931 und am 14.02.2024 wurde ein Wert von 3,000 bestimmt. Zur Festlegung des Orientierungswertes für das Standardverfahren wurde das arithmetische Mittel dieser ermittelten Werte berechnet, welches sich auf 2,978 beläuft (siehe Tabelle 3). Bei der Kalibrierung unter Verwendung des Stammes 700078 wurden die McF-Werte wie folgt festgestellt: 2,948 am 13.03.2024, 2,654 am 04.03.2024 und 2,333 am 07.02.2024. Durch die Berechnung des arithmetischen Mittels dieser Werte wurde der Orientierungswert für das Standardverfahren mit diesem Stamm ermittelt, der sich auf 2,645 beläuft (siehe Tabelle 4). Für die Ermittlung des Parameters Inkubationszeit wurden die ermittelten McF-Werte (siehe Tabelle 1 und 2 im Anhang) in den Diagrammen mit den Inkubationszeiten gegenübergestellt, um festzustellen, wann die verschiedenen Stämme an den verschiedenen Tagen der Kalibrierung die angestrebte Ziel-Zelldichte von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml erreichen. Anschließend wurden exponentielle Trendlinien ermittelt (siehe Abbildung 7 und 8), wobei bei diesen Trendlinien der y-Wert durch die einzelnen eben ermittelten McF-Werte ersetzt und die fehlenden Zeiten berechnet wurden [Buselmaier 2009].

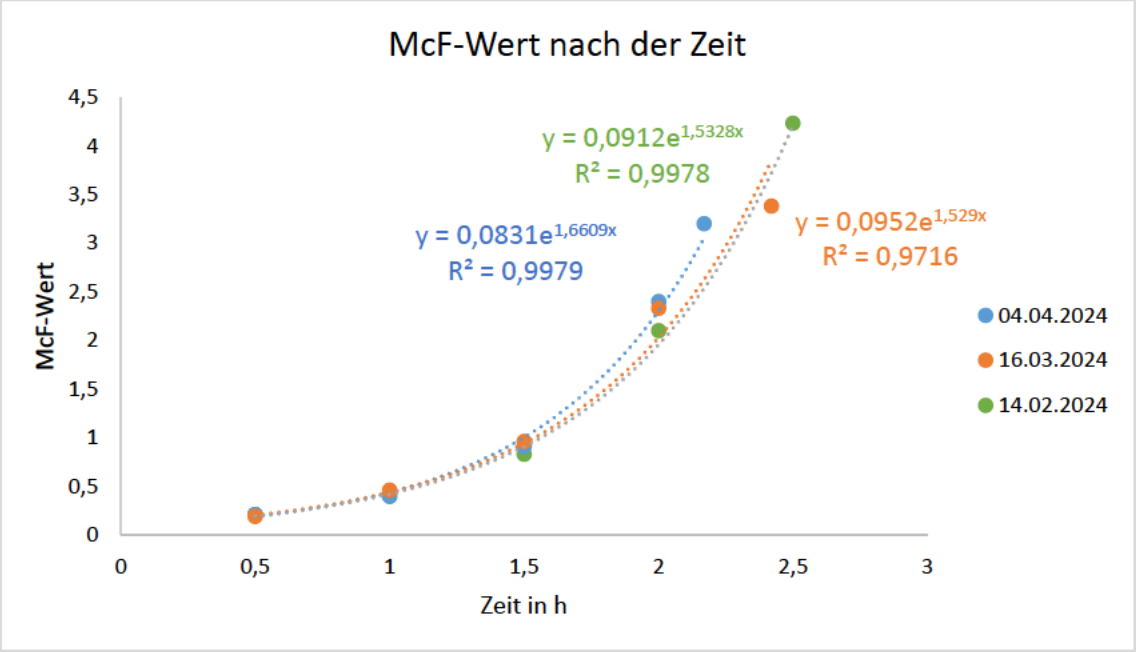

Abbildung 7: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Impfkultur 13706

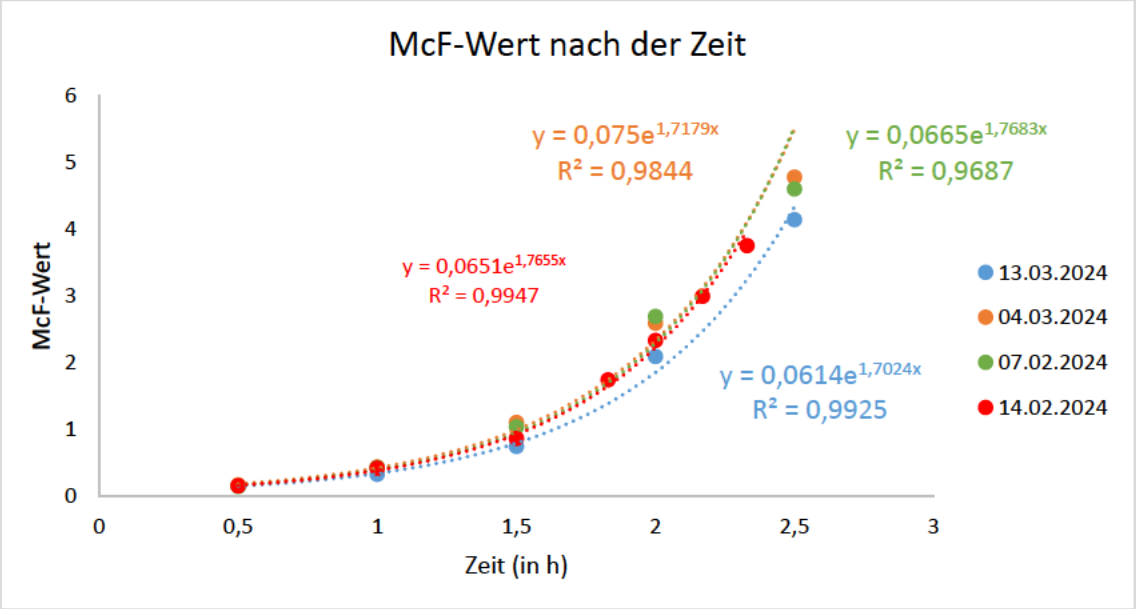

Abbildung 8: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Impfkultur 700078

Für die Bakterienkultur 13706 wurden die folgenden Inkubationszeiten ermittelt: Am 04.04.2024 wurde die Ziel-Zelldichte nach 2,16 h erreicht, am 16.03.2024 nach 2,24 h und am 14.02.2024 dauerte es ebenfalls 2,28 h, bis die Zelldichte erreicht wurde. Um den

Parameter der Inkubationszeit einheitlich für das Standardverfahren zu bestimmen, wurde das arithmetische Mittel aus den gemessenen Zeiten gebildet, was sich auf 2,23 h (~ 2 h und 14 min) beläuft (siehe Tabelle 3). Für die Bakterienkultur 700078 wurden die Inkubationszeiten 2,27 h, 2,08 h und 2,01 h ermittelt und das arithmetische Mittel von 2,12 h (~ 2 h und 7 min) als Parameter Inkubationszeit für das Standardverfahren mit diesem Stamm bestimmt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 3: Kalibrierungsergebnisse der ersten Kalibrierung für den Stamm 13706

Datum	McF-Wert bei 1 x 10^8	Ø	Zeit in h	Ø	
04.04.24	3,002	2,978	2,16	2,23	2h 14 min
16.03.24	2,931		2,24		
14.02.24	3,000		2,28		

Tabelle 4: Kalibrierungsergebnisse der ersten Kalibrierung für den Stamm 700078

Datum	McF-Wert bei 1 x 10^8	Ø	Zeit in h	Ø	
13.03.24	2,948	2,645	2,27	2,12	2h 7min
04.03.24	2,654		2,08		
07.02.24	2,333		2,01		

Die Auswertung der Diagramme zeigt deutlich, dass sowohl innerhalb eines Stammes als auch im direkten Vergleich zwischen den beiden Stämmen geringfügige Unterschiede erkennbar sind. Diese Unterschiede spiegeln sich in den gemessenen Werten wieder und verdeutlichen die Variabilität der Reaktionen der Bakterienkulturen auf die gegebenen Bedingungen und Umstände. Unterschiede könnten durch die verwendeten Materialien für die Messung entstehen. Beispielsweise erforderte jede Messung des McF-Wertes im Densitometer einen Austausch oder besser ein unbenutztes Glasröhrchen. Diese Röhrchen könnten aufgrund wiederholten Sterilisierens und Auswaschens kleine Kratzer oder andere Defekte aufweisen, die die Messung der Absorption stören könnten [Eberle et al. 2017]. Ebenso wichtig war es, das Densitometer 15 min vor der Bedienung einzuschalten, um das Gerät in seinem Arbeitsmodus zu stabilisieren [URL-8]. Bakterien benötigen spezifische Bedingungen, um optimal zu wachsen, einschließlich geeigneter Temperaturen,

pH-Werte und Nährstoffkonzentrationen. Diese Bedingungen sind entscheidend für die Länge der einzelnen Wachstumsphasen einer mikrobiologischen Wachstumskurve von Bakterien. Die erste Phase ist hierbei die Lag-Phase, bei der sich die *E. coli* noch an ihre Umgebung und die vorherrschenden Bedingungen anpassen [URL-9]. Allgemein lässt sich sagen, dass sich der *E. coli* Stamm 700078 in der Lag-Phase länger an die Bedingungen anpassen muss als der Stamm 13706. Nach einer halben Stunde erreichen die Kalibrierungswerte von 700078 nur 0,084 bis 0,088 $\cdot$ 10^8 KBE, während 13706 Werte von 0,119 bis 0,141 $\cdot$ 10^8 KBE aufweist (siehe Tabelle 1 und 2 im Anhang). Im Gegensatz dazu weisen die *E. coli* des Stammes 700078 nach zwei Stunden am 04.03.2024 und insbesondere am 07.02.2024 deutlich höhere KBE Werte auf als die des Stammes 13706, obwohl diese in der Lag-Phase noch geringere Werte hatten. Mit der Ausnahme, dass der Stamm 700078 am 13.03.2024 niedrigere KBE Werte aufweist als die Kalibrierungen am 16.03.2024 und 04.04.2024 des Stammes 13706. Die Kalibrierung des Stammes 13706 am 14.02.2024 erreichte nach zwei Stunden mit 0,6 $\cdot$ 10^8 KBE zu diesem Zeitpunkt die niedrigste Anzahl von allen Kalibrierungen. Laut dieser Ergebnisse vermehrt sich der Stamm 700078 in der exponentielle-Phase (Log-Phase) schneller, obwohl seine Lag-Phase länger andauert. Wohingegen der Stamm 13706 sich in der Log-Phase langsamer teilt (siehe Tabelle 1 und 2 im Anhang). Ein wichtiger Faktor, der die Wachstumsphasen von Bakterien beeinflusst, ist das Auftauen der Bakteriensuspension. Beim Auftauen der Arbeitskulturen in den Kryoröhrchen ist darauf zu achten, dass dieser Vorgang kurz gehalten wird. Der Grund dafür ist, dass die Lag-Phase des Bakterienwachstums bereits beginnt, da sich die Bakterien schon in einem verwertbarem Medium befinden. Werden die Zellen gleichmäßig aufgetaut, herrschen synchrone Bedingungen, die zu ähnlichen Ergebnissen innerhalb eines Stammes führen. Dies erklärt, dass nach 0,5 Stunden in der Regel ähnliche Werte innerhalb der einzelnen Stämme entstehen, da diese alle etwa gleich lang aufgetaut wurden (siehe Tabelle 1 und 2 im Anhang) [Sleight et al. 2006]. Auffällig ist jedoch, dass bei der ersten Kalibrierung des Stammes 13706 vom 16.03.2024 der KBE Wert nach einer halben Stunde mit 0,141 $\cdot$ 10^8 KBE erhöht ist (siehe Tabelle 1 im Anhang). Dies liegt daran, dass die Arbeitskultur fast 30 Minuten aufgetaut wurde und die *E. coli* bereits mit der Replikation begonnen hatten, sodass vor Beginn der Datenerfassung bereits mehr *E. coli* in der Impfkultur vorhanden waren. Der Einfrier- und Auftauprozess kann Zellen stressen oder schädigen, was zu einer Verlängerung der Lag-Phase

führen kann, während sich die Zellen von diesen Schäden erholen und ihre metabolischen Funktionen anpassen müssen. Es ist daher möglich, dass sich die *E. coli* des Stammes 700078 schneller an ihre neuen metabolischen Eigenschaften anpassen können [Bertrand 2019]. In der Log-Phase teilen sich die Bakterien sehr schnell, was bedeutet, dass viele lebende und aktive Zellen vorhanden sind [URL-10]. Die Bakteriensuspensionen mussten aller 30 min aus dem Brutschrank entnommen werden, um den McF-Wert zu messen. Für diesen Zeitraum befanden sich die *E. coli* nicht in der optimalen Umgebung mit der Temperatur für das Wachstum bei (36 ± 2) °C, was das Wachstum in der Log-Phase beeinträchtigt haben kann. Eine andere Quelle für unterschiedliches Wachstum könnte eine mangelnde Homogenisierung der Arbeitskulturen während der Vorbereitung sein, wodurch sich die *E. coli* zusammen aggregierten und diese dabei entstehenden Anhäufungen an Bakterien die Messung der Absorption verfälschen, da sie die Lichtstreuung erhöhen [Brandis-Heep 2020]. Aufgrund eines hohen Verbrauches an Impfkultur für die anderen Versuche war es notwendig, eine zweite Kalibrierung der Stämme durchzuführen. Hierfür wurde wie bei der ersten Kalibrierung vorgegangen. Zuerst wurden die Ergebnisse (McF-Werte, Inkubationszeit und KBE/ml) in den Tabellen 5 und 6 (siehe Anhang) zusammengetragen und anschließend wurden dieselben Diagramme erstellt wie auch zuvor. Zuerst wurde also der McF-Wert der KBE/ml Anzahl gegenübergestellt (siehe Abbildung 9 und 10).

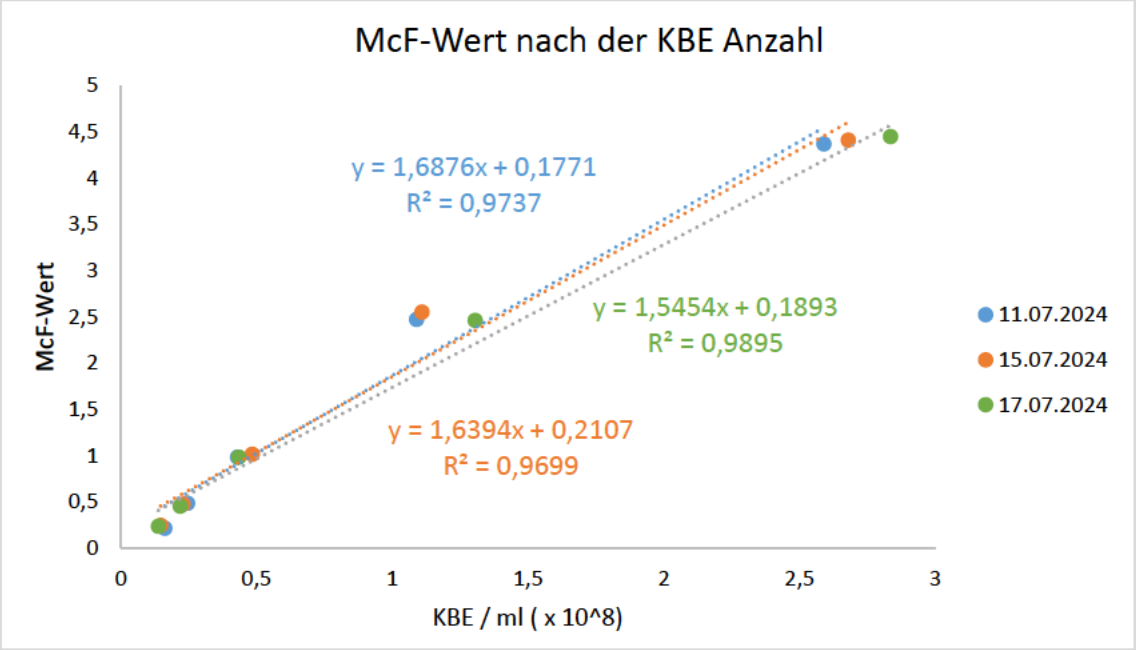

Abbildung 9: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von den KBE/ml für die Impfkultur 13706 (zweite Kalibrierung)

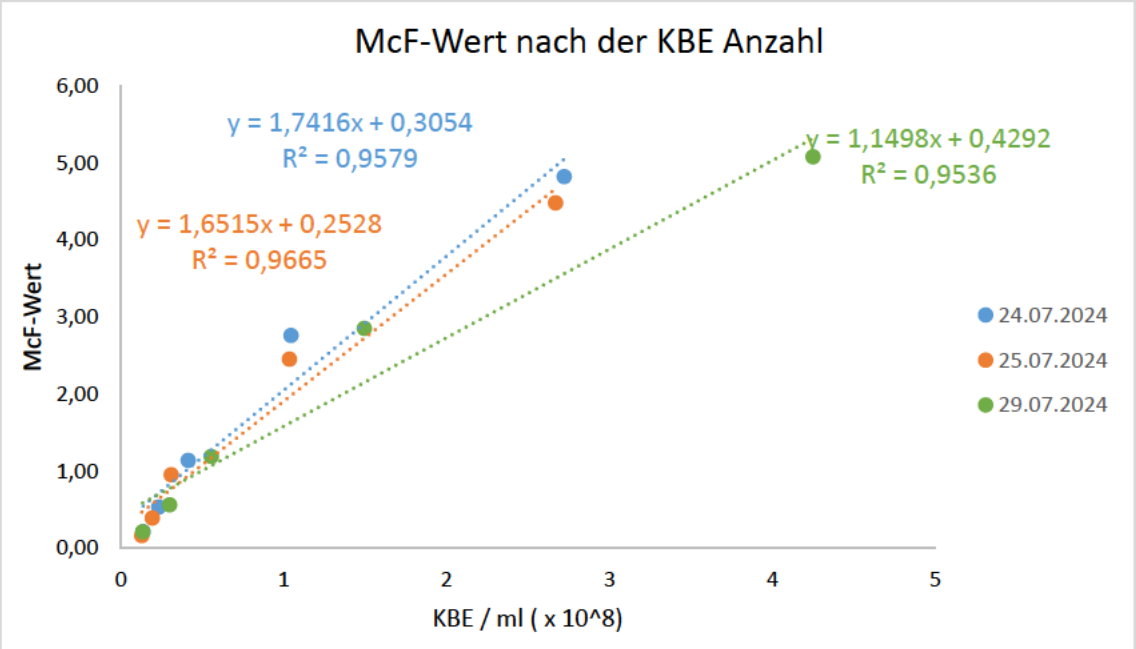

Abbildung 10: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von den KBE/ml für die Impfkultur 700078 (zweite Kalibrierung)

Hierbei wurden mithilfe der Trendlinien aus der Abbildung 9 und 10 folgende McF-Werte wie auch bei der ersten vollständigen Kalibrierung berechnet: 1,865 für den 11.07.2024,

1,850 für den 15.07.2024 und zuletzt 1,735 für die Kalibrierung am 17.07.2024. Als Parameter für den McF-Wert dieses Stammes wurde der Wert 1,817 berechnet (siehe Tabelle 7). Für den Stamm 700078 wurden folgende Werte berechnet: 2,047 für die Kalibrierung vom 24.07.2024, 1,904 für den Durchgang am 25.07.2024 und 1,579 für die Kalibrierung am 29.07.2024. Als Parameter für den McF-Wert dieses Stammes wurde der Wert 1,843 berechnet (siehe Tabelle 8). Des Weiteren wurde auch wie bei der ersten vollständigen Kalibrierung die Werte der McF-Werte und Inkubationszeiten aus Tabelle 5 und 6 (siehe Anhang) in Diagrammen gegenübergestellt (siehe Abbildung 11 und 12).

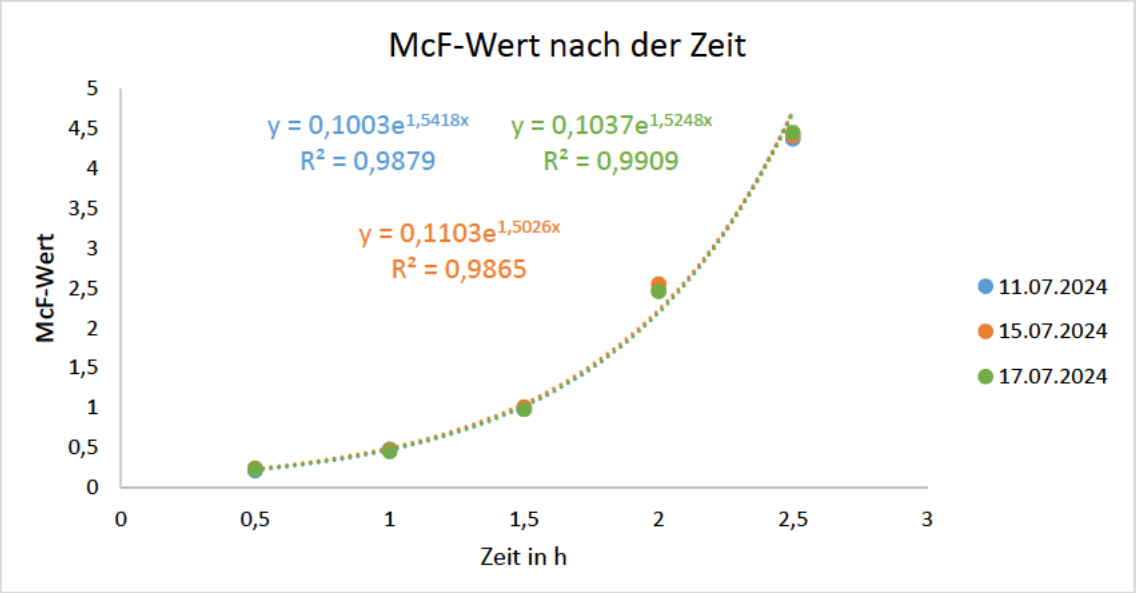

Abbildung 11: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Impfkultur 13706 (zweite Kalibrierung)

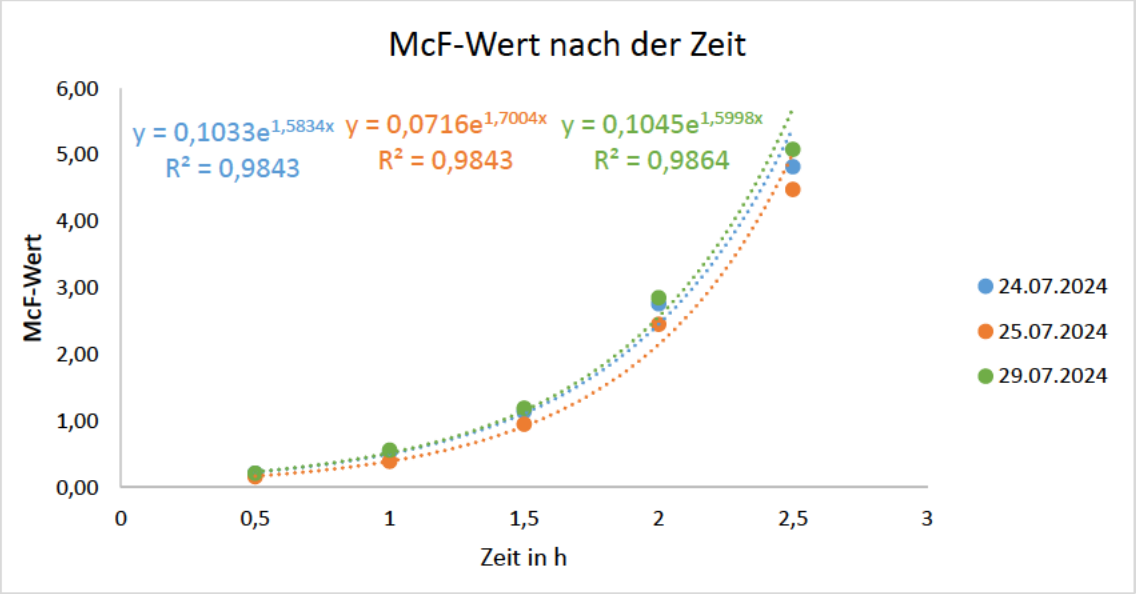

Abbildung 12: Diagramm der McF-Werte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Impfkultur 13706 (zweite Kalibrierung)

Für die zweite vollständige Kalibrierung der Stämme wurde für den Stamm 13706 mithilfe der Trendlinien aus Abbildung 11 die folgenden Inkubationszeiten berechnet. Zuerst wurde der Wert 1,90 h für die Kalibrierung am 11.07.2024 berechnet. Für die Kalibrierung am 15.07.2024 wurde die Inkubationszeit von 1,88 h ermittelt und für die letzte Kalibrierung des 17.07 wurde der Wert 1,85 ermittelt. Als Parameter (arithmetisches Mittel der einzelnen Werte) wurde der Wert 1,87 (~ 1 h und 52 min) berechnet (siehe Tabelle 7). Für den Stamm 700078 wurden folgende Werte mithilfe der Trendlinien aus Abbildung 12 berechnet: 1,89 h bei der Kalibrierung des 24.07.2024; 1,93 h für den 25.07.2024 und 1,70 h für den 29.07.2024. Der Parameter für die Inkubationszeit des Stammes 700078 bei der zweiten vollständigen Kalibrierung wurde mit 1,84 h (~ 1 h und 50 min) berechnet (siehe Tabelle 8).

Tabelle 7: Kalibrierungsergebnisse der zweiten Kalibrierung für den Stamm 13706

Datum	McF-Wert bei 1 x 10^8	Ø	Zeit in h	Ø	
11.07.24	1,865	1,817	1,90	1,87	1h 52min
15.07.24	1,850		1,88		
17.07.24	1,735		1,85		

Tabelle 8: Kalibrierungsergebnisse der zweiten Kalibrierung für den Stamm 700078

Datum	McF-Wert bei 1 x 10^8	Ø	Zeit in h	Ø	
24.07.24	2,047	1,843	1,89	1,84	1h 50min
25.07.24	1,904		1,93		
29.07.24	1,579		1,70		

Bei der Gegenüberstellung der Kalibrierungswerte der beiden *E. coli*-Stämme fällt zunächst auf, dass sowohl der McF-Wert als auch die Inkubationszeit bei der zweiten Kalibrierung signifikant niedriger ist als bei der ersten Kalibrierung. Um diese Unterschiede quantitativ zu erfassen, wurden die prozentualen Abweichungen zwischen den beiden Kalibrierungen berechnet. Für den Stamm 13706 betrug der McF-Wert in der ersten Kalibrierung 2,978, während er in der zweiten Kalibrierung auf 1,817 sank. Dies entspricht einer prozentualen Abweichung von 48,44 %, was eine erhebliche Änderung darstellt. Bei dem Stamm 700078 lag der McF-Wert bei der ersten Kalibrierung bei 2,645 und reduzierte sich bei der zweiten Kalibrierung auf 1,843. Dies entspricht einer prozentualen Abweichung von 35,74 %. Diese Werte verdeutlichen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kalibrierungen der untersuchten Stämme alleine in diesem Parameter. Auch der Parameter der Inkubationszeit zeigt deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kalibrierungen. Dabei beträgt die Inkubationszeit, die nötig ist, um die Zielzelldichte von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml zu erreichen bei dem Stamm 13706 der ersten Kalibrierung 2,23 h und bei der zweiten Kalibrierung 1,87 h. Diese beiden Parameter weißen damit eine prozentuale Abweichung von 17,56 % auf. Bei dem Stamm 700078 beträgt der Parameter der Inkubationszeit bei der ersten Kalibrierung 2,12 h und bei der zweiten Kalibrierung 1,84 h. Dies entspricht einer prozentualen Abweichung von 14,14 %.

Ursache für die bedeutsamen Unterschiede könnte bei den methodischen Aspekten für die Herstellung der Arbeitskulturen zu finden sein. So ist es notwendig, für deren Herstellungen Lactose-positive Kolonien einer Lactose-haltigen Agarplatte zu entnehmen und diese in einem Kolben mit MSB zu bebrüten. Dabei ist nie sicher, wie viele *E. coli* Zellen sich innerhalb solcher Kolonien befinden. Es ist wahrscheinlich, dass die entnommenen Kolonien eine höhere Zelldichte aufwiesen. Mehr Bakterienzellen führen dazu,

dass bei der Messung der Absorption diese größer ausfällt, was den großen Unterschied der McF-Werte erklärt [URL-4]. Des Weiteren wurden mit vier Kolonien insgesamt mehr Zellen entnommen als bei der ersten Kalibrierung mit drei entnommenen Kolonien. Dadurch ist die Anzahl der *E. coli* die am Start vorhanden waren bei der zweiten Kalibrierung höher als bei der ersten. Wenn also mehr *E. coli* zum Startzeitpunkt der zweiten Kalibrierung vorhanden waren und diese dadurch auf einem höheren Niveau starteten als die der ersten Kalibrierung, konnten deshalb schneller höhere Zellzahlen erreicht werden, da seit dem Start des Wachstums mehr Zellen vorhanden waren, die sich teilen konnten [Cooper 1991].

5.2 Vergleich der *Escherichia Coli* Stämme 13706 und 700078

5.2.1 Vergleich der *Escherichia Coli* Stämme 13706 und 700078 mit deskriptiven Statistiken

Um zu überprüfen, ob die beiden *E. coli* Referenzstämme 13706 und 700078 sich in ihrer Anwendbarkeit bezüglich des Standardverfahrens unterscheiden, wurden diese miteinander verglichen. Hierzu wurde nach der Methodik des Standardverfahren (siehe 4.2.2) eine Rohwasserprobe mehrfach mit den beiden Referenzstämmen untersucht, wobei zu der Rohwasserprobe immer ein bestimmtes Volumen an verschiedenen Abwässern (höhere Belastung) hinzudotiert wurde. Das verwendete Rohwasser aus dem Wasserwerk Freiberg dient als Testmaterial, da es einen stabilen pH-Wert von 6,9 sowie eine konstante Leitfähigkeit von 170 µS/cm aufwies, um für konstante Bedingungen zu sorgen. Für den Vergleich sollten die Endergebnisse (PFP/100 ml der gespikten Rohwasserproben) statistisch ausgewertet werden. Hierfür wurden die Ergebnisse in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Ergebnisse der Plaque-Assays für den Vergleich der beiden Referenzstämme 13706 und 700078

Datum	MSN des Spike Materi-als	PFP/ml für den OA jedes Abwas-sers		Angesetz-tes Volu-men (ml) in 250 ml Rohwas-ser	theoretische PFP/100 ml		PFP/100 ml gespiktes Rohwasser	
		13706	700078		13706	700078	13706	700078
17.07.2024	60052	1	7	4	1,6	11,2	14	10
18.07.2024	EP 2.6	136	127	3	163	152	193	179
18.07.2024	Au 1.6	93	76	3	112	91	119	126
18.07.2024	OE 2.6	39	36	6	94	86	99	97
23.07.2024	EP 2.6	203	225	1,5	122	135	164	178
23.07.2024	Au 1.6	61	71	4	98	114	137	148
23.07.2024	OE 2.6	36	41	10	144	164	185	217
30.07.2024	Au 1.6	220	229	5	440	458	495	521
30.07.2024	OE 2.6	24	27	10	96	108	109	121
31.07.2024	Mi 1.6	58	66	10	232	264	273	297
31.07.2024	HA 2.6	62	76	10	248	304	308	322
31.07.2024	Φ X174	50	53	4	80	85	86	92
06.07.2024	HA 2.6	25	36	11	110	158	126	173
06.07.2024	HA 2.6	25	36	9	90	130	110	119
06.07.2024	Mi 1.6	59	57	9	212	205	225	216

Bei einer genaueren Betrachtung der Ergebnisse ist auffällig, dass die erste Durchführung des Vergleichs mit der Probe 60052 deutlich geringere Werte an PFP/100 ml aufweist (siehe Tabelle 9). Dies liegt daran, dass es sich bei der Probe nicht um ein Abwasser gehandelt hatte und die Versuchsreihe für den Vergleich der beiden Stämme nicht mit einbezogen wurde. Des Weiteren ist wichtig zu erwähnen, dass es sich bei den zu dotierten Proben um Abwässer handelt, deren Zusammensetzung nicht eindeutig definierbar ist und auch stark von äußeren Bedingungen (bspw. pH-Wert oder Temperatur) abhängt [URL-11]. So ist es möglich, dass die Probe eines Abwassers an verschiedenen Tagen unterschiedliche Werte an PFP/ml aufweisen. Das beste Beispiel ist hier die Probe Au 1.6, welche bei den ersten Untersuchungen 93 bzw. 61 PFP/100 ml aufwies. Jedoch wies dieses Abwasser aus der gleichen Aufbereitungsanlage eine Woche später mehr als die doppelte Anzahl an PFP/100 ml auf. Dasselbe Verhalten der Originalansatz (OA) Proben zeigte sich ebenfalls sehr deutlich bei den Proben EP 2.6 oder HA 2.6 (siehe Tabelle 9). Anhand der erwarteten hohen Phagenanzahl in diesen Proben wurden jeweils 0,5 ml OA auf zwei Platten pipettiert, um die Plaques besser auszählen zu können. Da sonst bei einer

Phagenanzahl von bis zu über 300 PFP/ml eine genaue Auszählung nicht möglich gewesen wäre [Sanders 2012]. Bei diesen Untersuchungen der Abwässer stehen die Buchstaben der Messstellnummern (MSN) als Kürzel für den Ort und die Zahl für die Nummer des Ablaufes. Um verschiede Größenbereiche an PFP zu untersuchen, konnte ebenso das zu dotierte Volumen an Abwasser variiert werden, bspw. bei der Probe HA 2.6 vom 06.07.2024 bei der einmal 11 und 9 ml an Abwasser zu dem Rohwasser dazu dotiert wurde. Anhand der Ergebnisse für die untersuchten 100 ml Probe ist zu sehen, dass dies gut funktionierte, da bei der Zugabe von 11 ml 126 bzw. 173 PFP/100 ml Probe entstanden, wohingegen bei der Zugabe von 9 ml nur 110 bzw. 119 PFP/100 ml entstanden sind (siehe Tabelle 9). Für die Versuchsreihe mit Φ X174 wurde kein Abwasser verwendet, sondern die kultivierte Bakteriophage Φ X174 (siehe 5.3), um eine höhere Stichprobenanzahl zu erreichen. Nützlich ist diese als Testmaterial auch, da sie bei der Verwendung der zwei verschiedenen Stämme unterschiedliche PFP Werte hervorbringt (siehe Tabelle 9). Die in Tabelle 9 berechneten theoretischen Werte dienen dazu, einen Größenbereich an PFP zu ermitteln, den die verwendete Probe bei 100 ml in etwa erreichen sollten. So zeigen die Endresultate zwar alle Abweichungen zu den berechneten Werten, welche aber als normal einzustufen sind, da es sich immer noch wie eben erwähnt um Abwasserproben handelt und sich die Anzahl der PFP mit jeden zu dotierten ml deutlich ändern kann trotz Homogenisierung [URL-11]. Besonders ist hierbei die Probe Au 1.6 vom 18.07.2024, bei der theoretisch mehr PFP bei der Untersuchung mit 13706 entstehen sollten jedoch das Gegenteil eintritt und bei dem Stamm 700078 mit 126 PFP/100 ml Probe mehr PFP entstanden als bei dem Stamm 13706 mit 119 PFP/100 ml Probe. Dies lässt sich ebenso mit demselben Grund wie zuvor begründen. Zusätzlich kommt hinzu, dass der OA auf kleinen Platten ausplattiert wurde. Dadurch haben Proben mit einer hohen Belastung an somatischen Coliphagen weniger Platz. Dies führt dazu, dass die entstehenden Plaques miteinander verschmelzen und unscharfe Grenzen bilden, was das Zählen erschwert (siehe 5.3.2). Jenes beeinflusst dann auch die theoretisch berechneten Werte und kann zu dem Unterschied zwischen diesen und den realen Werten bei der Probe Au 1.6 führen [Sanders 2012].

Um die beiden Stämme nun bezüglich ihrer Anwendbarkeit zu vergleichen, war es notwendig, bestimmte statistische Größen wie den Mittelwert, Standardabweichung, Median oder den Interquartilsabstand zu berechnen (siehe Tabelle 10 im Anhang). Um mit diesen

Werten besserer Aussagen tätigen zu können und diese grafisch darzustellen, wurde ein Boxplot mit den Endergebnissen der beiden Stämme und den dazugehörigen statistischen Werten (siehe Tabelle 10 im Anhang) erstellt (siehe Abbildung 13).

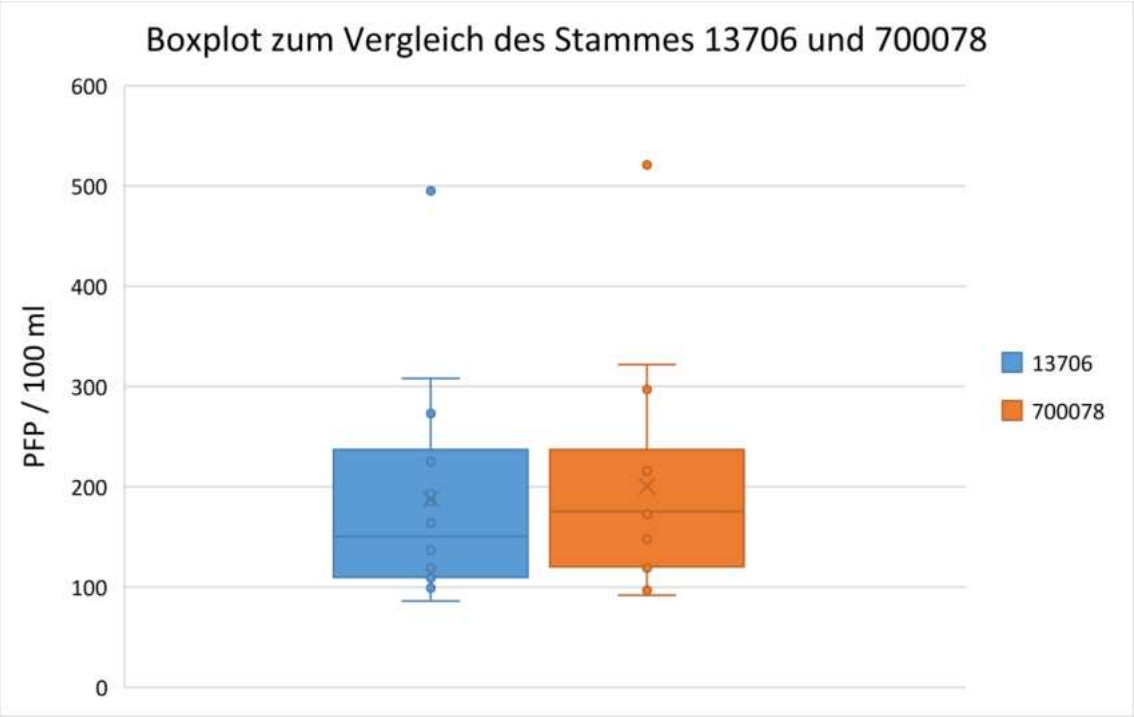

Abbildung 13: Boxplot für den Vergleich der beiden Referenzstämme 13706 und 700078

Die berechneten Werte als auch die grafische Darstellung zeigen deutlich, dass der Stamm 700078 im Durchschnitt eine höhere Konzentration an PFP somatischer Coliphagen aufweist als der Stamm 13706. Der Mittelwert (im Boxplot durch das „X“ markiert) des Stammes 700078 liegt mit 200,43 PFP/100 ml signifikant über dem des Stammes 13706, der einen Mittelwert von 187,79 PFP/100 ml aufweist. Diese Tendenz zeigt sich auch im Median (Querstriche innerhalb der Box), der für den Stamm 700078 mit 175,5 PFP/100 ml deutlich höher liegt als für den Stamm 13706, dessen Median bei 150,5 PFP/100 ml liegt (siehe Abbildung 13). Die berechneten Mittelwerte haben hierbei eine prozentuale Abweichung von 6,31 % was bedeutet, dass mit dem Stamm 700078 mehr somatische Coliphagen nachgewiesen werden als mit dem Stamm 13706. Begründet werden kann dieser Unterschiede mit der Antibiotikawirkung der Nalidixinsäure, die bei der Untersuchung des Nalidixinsäuren-resistenten Stammes 700078 verwendet wird, wodurch andere gramnegative Bakterien (als bakterielle Hintergrundflora) am Wachstum

gehemmt werden, indem die Nalidixinsäure die Aktivität des Enzyms Gyrase beeinträchtigt, welches für die Entwirrung und das Auseinanderziehen der doppelsträngigen DNA während der Replikation verantwortlich ist. Dieses Enzym ist essenziell für die bakterielle DNA-Replikation, und die Hemmung seiner Funktion führt dazu, dass die DNA nicht ordnungsgemäß repliziert werden kann. Folglich werden andere Bakterien, die auch durch die Coliphagen lysiert werden können, schon während der Vorbereitung abgetötet und stören die *E. coli* der Nalidixinsäure-resistenten Mutante nicht am Wachstum auf dem Agar, weshalb diese als Wirtszelle besser durch die Phagen lysiert werden können [Sugino et al. 1977]. Jedoch wirkt Nalidixinsäure nicht effektiv gegen grampositive Bakterien aus mehreren Gründen: Erstens unterscheiden sich die Zielenzyme DNA-Gyrase und Topoisomerase IV bei grampositiven Bakterien strukturell, was die Hemmung erschwert. Zweitens erschwert die dicke Peptidoglykan-Zellwand von grampositiven Bakterien die Aufnahme des Antibiotikums. Drittens besitzen einige grampositive Bakterien Efflux-Pumpen, die Nalidixinsäure aus der Zelle pumpen, bevor es wirksam werden kann [Bush et al. 2020]. Zur Beurteilung der Streuung der Werte wurden die Interquartilsabstände ermittelt, die in Abbildung 13 durch die Boxen dargestellt sind. Das untere Quartil (Q1) beträgt 110 PFP/100 ml für den Stamm 13706 und 121 PFP/100 ml für den Stamm 700078. Das obere Quartil (Q3) wurde mit 225 PFP/100 ml für den Stamm 13706 und 217 PFP/100 ml für den Stamm 700078 bestimmt. Daraus ergeben sich Interquartilsabstände (IQR) von 115 PFP/100 ml für den Stamm 13706 und 96 PFP/100 ml für den Stamm 700078. Der niedrigere IQR des Stammes 700078 im Vergleich zu dem des Stammes 13706 bedeutet, dass die Streuung der mittleren 50 % der Daten bei Stamm 700078 geringer ist. Konkret bedeutet dies, dass die Werte des Stammes 700078 enger um den Median gruppiert sind, was auf eine homogenere Verteilung der Messwerte hinweist [Daniel, Cross 2008]. Begründet werden kann dies auch anhand der Nalidixinsäure, da diese wie schon erwähnt störende andere Bakterien hemmt und infolgedessen die Präzision der Phagen-Infektion der Versuchsreihe erhöht. Diese Reduktion der Konkurrenz führt zu einer geringeren Schwankung der PFP-Werte, da diese nicht durch unerwünschte bakterielle Aktivitäten beeinflusst werden [Sugino et al. 1977].

Zur weiteren Untersuchung wurde die Individuelle Zählunsicherheit ermittelt, um einen prozentualen Wert zu erhalten, an dem man erkennen kann, wie repräsentativ die Ergebnisse dieser Arbeit sind und wie groß die Fehlerwahrscheinlichkeit ist das die Ergebnisse

falsch ausgezählt wurden. Dazu wurde eine Abwasserprobe nach dem Standardverfahren (siehe 4.2.2.2) auf 30 Platten untersucht und alle zweimal nacheinander gezählt. Die Ergebnisse der Zählungen wurden in der Tabelle 11 (siehe Anhang) zusammengefasst. Ebenso wurden sowohl die Differenzen der Werte nach den beiden Zählungen als auch deren Summe ermittelt (siehe Tabelle 11 im Anhang). Mithilfe dieser Werte konnte nun für jede gezählte Platte die relative Zählvarianz (σ_r^2) durch die Formel 1 ermittelt werden (siehe Tabelle 11 im Anhang). Um die relative Standardunsicherheit der wiederholten Zählungen zu ermitteln, wurde des Weiteren der Mittelwert der relativen Zählvarianzen mit 0,002 ermittelt. Der Idealwert sollte < 0,02 sein, aber Werte < 0,1 sind akzeptabel. Sollte der Wert > 0,1 sein, sollten die einzelnen relativen Zählvarianzen Werte nochmals untersucht werden. Der ermittelte Wert für die mittlere relative Zählvarianz liegt mit 0,002 innerhalb der Grenze [DIN EN ISO 16140-3:2021-06]. Anschließend wurde von diesem Wert die Quadratwurzel gezogen, um die relative Standardunsicherheit der wiederholten Zählungen von 4,5 % zu ermitteln. Insgesamt lässt sich anhand dieses Wertes erkennt, dass die individuelle Zählunsicherheit recht gering ist, wodurch die Werte der Zählungen insgesamt sehr genau sind und nur geringfügig variieren.

5.2.2 Test auf Normalverteilung mithilfe des Q-Q-Plots

Allein anhand der statistischen Werte lässt sich sagen, dass mithilfe des Stammes 700078 bei unterschiedlicher Phagenanzahl mehr somatische Coliphagen in 100 ml nachgewiesen werden konnten, als wenn der Stamm 13706 verwendet wurde. Um jedoch genauere Aussagen darüber treffen zu können, das beide *E. coli* Stämme sich in ihrer Anwendbarkeit für das Verfahren ähneln und ob auch beide für das Verfahren der DIN-Norm 10705-2 verwendbar sind, sollte ein statistischer Test der Ergebnisse beider Stämme durchgeführt werden. Hierfür ist es notwendig, die Daten hinsichtlich der Verteilung zu untersuchen, ob es sich bei den Ergebnissen der beiden Stämme um normalverteilte Ergebnisse handelt. Es wurden für die Endergebnisse der Untersuchung für jeden Stamm ein Q-Q-Plot erstellt (siehe Abbildung 14 und 15). Dabei stellt die X-Achse die theoretischen Quantile dar und repräsentiert dabei die erwarteten Werte, wenn die Daten normalverteilt wären. Die Y-Achse stellt die Stichprobenquantile dar und zeigt die tatsächlichen Quantile der Stichproben je Stamm [Eckstein et al. 1994]. Aus diesem Grund wurden die für das Q-Q-Plot benötigten z-Werte des Stichprobenquantils mithilfe der Formel 2 berechnet und in

den Tabellen 12 und 13 zusammengefasst (siehe Anhang). Für die z-Werte des theoretische Quantils wurden die dazu passenden Perzentile mit der Formel 3 berechnet und in den z-Wert des theoretischen Quantils mithilfe von z-Wert Tabellen umgerechnet (siehe Tabelle 12 und 13 im Anhang). Wären die Daten exakt normalverteilt, würden alle Punkte auf der 45°-Linie liegen. Je weiter die Punkte von dieser Linie abweichen, desto stärker weicht die Verteilung von der Normalverteilung ab. Das 95%-Konfidenzintervall, dargestellt durch die roten Bögen, zeigt an, dass die Daten wahrscheinlich normalverteilt sind, wenn sie innerhalb dieses Intervalls liegen. Bilden die Daten jedoch einen Bogen und weichen in bestimmten Bereichen deutlich von der Linie ab, deutet dies auf eine Abweichung von der Normalverteilung hin [URL-15].

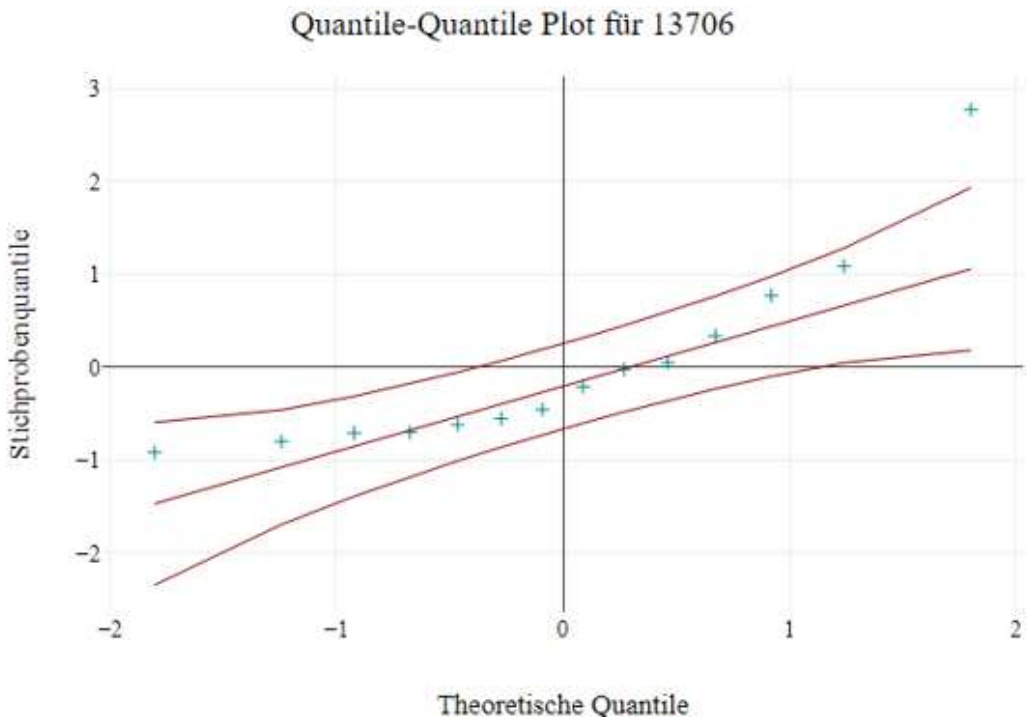

Abbildung 14: Q-Q-Plot des Referenzstammes 13706 | erstellt mit DATAtab

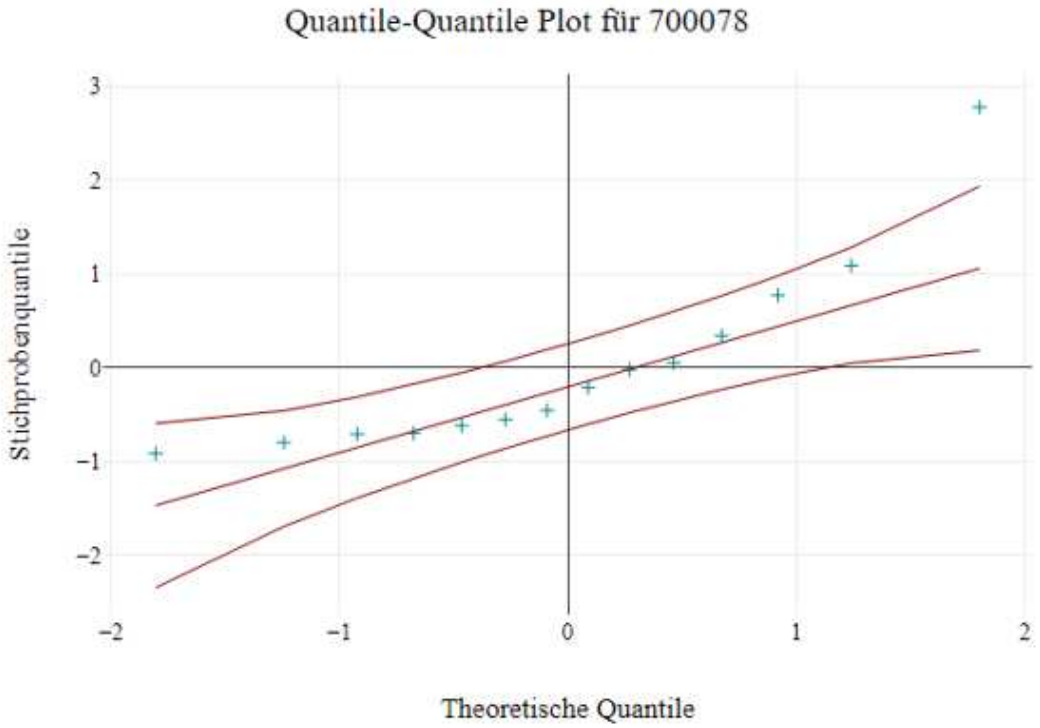

Abbildung 15: Q-Q-Plot des Referenzstammes 700078 | erstellt mit DATAtab

Anhand der beiden Q-Q-Plots beider Referenzstämme ist zu erkennen, dass beide von der mittleren Geraden abweichen und sich Bögen der Daten bilden. Für den Stamm 13706 sind die Originalwerte 495, 308, 273 und 86 PFP/100 ml am ehesten für die Bildung des Bogens maßgebend. Für den Stamm 700078 sind es die Originalwerte 521, 322, 297 und 92 PFP/100 ml, die den Bogen bilden. Des Weiteren sind die extremeren Werte mit 495 PFP/100 ml (13706) und 521 (700078) nicht mehr innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls, was ebenso dazu beiträgt, das die zu vergleichenden Daten nicht als normalverteilt angenommen werden [URL-15].

5.2.3 Statistischer Vergleich beider *E. coli* Referenzstämme mit dem Mann-Whitney-U-Test

Für eine weitergehende statistische Analyse der beiden *E. coli*-Referenzstämme war es notwendig, einen geeigneten statistischen Test auszuwählen. Mit diesem Test sollte überprüft werden, ob sich die Verteilung und die Werte der Stämme 13706 und 700078 signifikant unterscheiden. Dadurch sollten Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob beide Referenzstämme auch bei unterschiedlicher Phagenanzahl gleichermaßen für das Verfahren der DIN-Norm 10705-2 geeignet sind. Hierfür wurde der Mann-Whitney-U-Test

durchgeführt. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein nicht-parametrischer Test, der verwendet wird, um Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Gruppen zu vergleichen. Er prüft, ob die Verteilungen der beiden Gruppen unterschiedlich sind, ohne Annahmen über die Form der Verteilung zu machen. Hierbei geht es insbesondere um die Mediane der beiden Gruppen. Er vergleicht die Ränge der Datenpunkte und prüft, ob eine Gruppe tendenziell höhere oder niedrigere Werte hat als die andere. Dies entspricht einem Vergleich der Mediane. Aufgrund dessen wurden die zwei Hypothesen aufgesetzt, die für den Test notwendig sind. Einmal die Nullhypothese, die besagt, dass es keinen Unterschied in den Medianen der beiden unabhängigen Gruppen gibt. Und des Weiteren die Alternativhypothese, nach der ein solcher Unterschied doch existiert [MacFarland, Yates 2016]. Zuerst wurden die Originaldaten der Ergebnisse aus den Untersuchungen (siehe Tabelle 9) nach Größe (von niedrig nach hoch) sortiert und ihnen ein Rang hinzugefügt. So war beispielsweise der Wert 86 PFP/100ml gleich dem Rang „1“ und bei gleichen Werten wurde der Durchschnittsrang verwendet wie bei dem Wert 110 PFP/100 ml, der doppelt auftrat, beide den Rang „6,5“ erhielten. Folgend wurden die Werte der Ränge für jeden Stamm summiert. Für den Stamm 13706 wurde die Rangsumme 1 (R_1) von 194 berechnet und für den Stamm 700078 beträgt die Rangsumme 2 (R_2) 212. Folgend wurde die U-Statistik (U) für beide Referenzstämme mit der Formel 4 berechnet. Für den Stamm 13706 wurde U mit 89 berechnet und für den Stamm 700078 wurde der Wert mit 107 berechnet. Die U-Statistik, auch bekannt als Mann-Whitney-U-Statistik, wird anschließend benötigt, um den p-Wert zu ermitteln. Anschließend wurde durch eine Berechnung der Erwartungswertes der U-Statistik mit 98 ermittelt und die Varianz des U-Wertes mit 473,67 (Anzahl der Stichproben (n) beträgt 14 für jeden Stamm) [MacFarland, Yates 2016]. Mithilfe dieser Werte kann die z-Statistik mit -0,41 durch die Formel 5 berechnet werden [Herrmann 1984]. Durch diese z-Statistik kann mithilfe der kumulativen Verteilungsfunktion der Normalverteilung der p-Wert berechnet werden, der sich für diese Untersuchung der beiden Stämme auf 0,3409 beläuft jedoch ist der Mann-Whitney-U-Test zweiseitig, wodurch der finale p-Wert verdoppelt werden muss und damit 0,6818 bei einem Signifikanzniveau von 0.05 beträgt. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die beobachteten Daten unter der Annahme, dass die Nullhypothese wahr ist, auftreten. Er misst also, wie gut die Daten mit der Nullhypothese übereinstimmen. Das Signifikanzniveau ist ein Schwellenwert, der in statistischen Tests verwendet wird, um zu entscheiden, ob die Nullhypothese

abgelehnt werden soll. Da der p-Wert größer als das Signifikanzniveau von 0.05 ist, wird die Nullhypothese nicht abgelehnt. Das bedeutet, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Referenzstämmen 13706 und 700078 gibt. Somit sind beide Stämme für die Anwendung des Verfahren nach DIN-Norm 10705-2 geeignet und sollten für alle Wasserproben vergleichbare Ergebnisse erzielen [MacFarland, Yates 2016].

5.3 Kultivierung der Bakteriophage Φ X174 (DSM 4497) für Qualitätskontrollen

5.3.1 Kultivierung der Bakteriophage Φ X174

Die Kultivierung der Bakteriophage Φ X174 dient im Verfahren der DIN EN ISO 10705-2 als Qualitätskontrollmaßnahme, um zu überprüfen, ob bei der Ansetzung einer Probe Fehler oder Probleme aufgetreten sind, welche die Gültigkeit des Ansatzes beeinflussen könnten. Hierfür ist es zuerst wichtig, die passende Verdünnungsstufen herzustellen, bei denen die Bakteriophage auszählbare Ergebnisse erreicht, um mit dieser die Suspension an Phage herzustellen, die etwa einen Titer von 50 bis 60 PFP pro ml aufweist. Die ersten Ergebnisse der Verdünnungen wurden dazu in der Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Verdünnungsergebnisse des Doppelansatzes der Bakteriophage Φ X174 vom 25.04.2024

Verdünnung	PFP/ml Platte 1	PFP/ml Platte 2
10^{-1}	n. a.	n. a.
10^{-2}	n. a.	n. a.
10^{-3}	n. a.	n. a.
10^{-4}	n. a.	n. a.
10^{-5}	161	153
10^{-6}	17	16
10^{-7}	2	1
10^{-8}	0	1
10^{-9}	0	0
10^{-10}	0	0
10^{-11}	0	0
10^{-12}	0	1

Bei dieser Verdünnung wurden in den Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-4} so viele Plaques festgestellt, dass diese auf den Platten nicht auszählbar waren. Daher kann anhand dieser Ergebnisse keine Suspension mit dem gesuchten Titer von etwa 50 bis 60 PFP pro ml hergestellt werden, da keine genaue Titeranzahl bestimmbar ist. Die Verdünnungsstufen von 10^{-7} bis 10^{-12} zeigen hingegen das Gegenteil. Hier traten so wenige Plaques oder überhaupt keine Plaques auf, dass auch mit diesen Verdünnungsstufen keine geeignete Suspension hergestellt werden kann. Ein einzelner Plaque, wie er in der Verdünnungsstufe 10^{-12} beobachtet wurde, kann durch Kontamination als auch Zufall in einer höheren Verdünnungsstufe verursacht werden und wird deswegen für die Quantifizierung nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-4} konnten in der Abbildung 16 dargestellt werden.

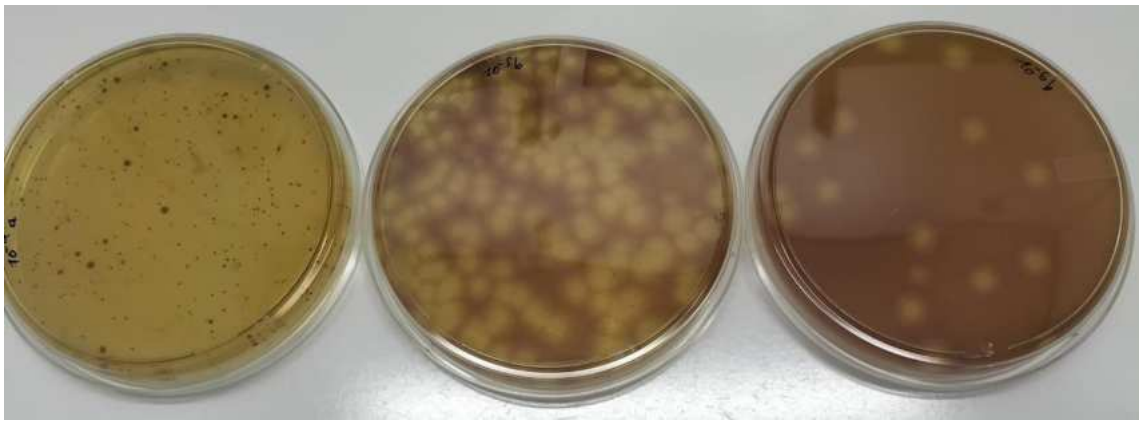

Abbildung 16: Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-4} der Untersuchung des 25.04.2024

Nur die Ergebnisse der Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} waren auf einer MSA-Platte auszählbar und ermöglichen eine genauere Bestimmung der Phagenanzahl in den Verdünnungsstufen (siehe Abbildung 16). In der Verdünnungsstufe 10^{-5} wurden im Doppelansatz 161 und 153 Plaques gezählt, was einem Durchschnitt von etwa 157 PFP/ml entspricht. In der Verdünnungsstufe 10^{-6} wurden 17 und 16 Plaques gezählt, was einem Durchschnitt von 16,5 (17) PFP/ml entspricht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verdünnung erfolgreich war, da die Phagenanzahl in der Verdünnungsstufe 10^{-5} etwa das Zehnfache derjenigen in der Verdünnungsstufe 10^{-6} beträgt. Mithilfe dieser Ergebnisse wäre es an sich möglich, nun die gesuchte Suspension an Phage herzustellen. Jedoch wird in der ISO-Norm 10705-2 angemerkt, dass man einen Phagen-Titer von etwa 10^{-9} haben sollte, um in den Verdünnungsstufen ausreichend hohe Titer zu erreichen, was bei der

Verdünnung vom 25.04.2024 nicht der Fall war mit einem Titer von maximal 10^{-7} (siehe Tabelle 14) [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Dabei ist jedoch zu beachten, dass gemäß der DSMZ die Bakteriophagen im ungünstigsten Fall Titer von bis zu 10^{-6} aufweisen können und es nicht immer gewährleistet ist, den optimalen Titer von 10^{-9} zu erreichen [URL-16]. Daher wurde die Phagenverdünnung wiederholt, um einen höheren Titer zu erzielen. Die Ergebnisse dieser Verdünnung sind in Tabelle 15 zusammengefasst [DIN EN ISO 10705-3:2003].

Tabelle 15: Verdünnungsergebnisse des Doppelansatzes der Bakteriophage Φ X174 vom 02.05.2024

Verdünnung	PFP/ml Ansatz 1	PFP/ml Ansatz 2
10^{-4}	n. a.	n. a.
10^{-5}	n. a.	n. a.
10^{-6}	>300	>300
10^{-7}	34	29
10^{-8}	6	4
10^{-9}	2	1
10^{-10}	0	0
10^{-11}	0	0
10^{-12}	0	0

Die Phagenanzahl bei diesem Versuch war höher als bei der Verdünnung vom 25.04.2024. So ist bei diesem Versuch bei der Verdünnungsstufe 10^{-6} der Titer schon so hoch, dass er mehr als 300 PFP/ml aufwies und in den noch niedrigeren Verdünnungsstufen, welche jetzt bei der Verdünnungsstufe 10^{-5} starteten, die Platten nicht mehr auswertbar waren. Zur Bestimmung des Volumens, was von einer Verdünnungsstufe benötigt wurde, um die Ziel Suspension mit einer Phagenanzahl von ca. 50 bis 60 PFP/ml herzustellen, waren die Verdünnungsstufen 10^{-8} und höher nicht geeignet, da auch wie schon zuvor erläutert, bei diesen zu wenige oder gar keine Plaques entstanden. Die Ergebnisse auf den Platten wurden nicht wie in der Abbildung 16 aufgenommen, waren aber ähnlich zu dieser Aufnahme nur das die Anzahl der Plaques nicht gleich war. Jedoch war die Verdünnungsstufe 10^{-7} die entscheidende Stufe, bei der 34 und 29 Plaques pro Platte entstanden sind, was einem Durchschnitt von 31,5 (32) PFP/ml entspricht. Daraus konnte berechnet werden, welches Volumen einer niedrigeren Verdünnung benötigt wird, um die gewünschte Lösung herzustellen. Aufgrund des begrenzten Volumens, welches von jeder

Verdünnungen vorhanden war, wurde 4 ml der 10^{-5} Verdünnungsstufe verwendet, die einen Titer (durch Hochrechnung) von etwa 3200 PFP/ml aufweisen sollte, welche dann in 200 ml SM-Puffer verdünnt wurde. Dadurch wurde eine Phagenanzahl von theoretisch 64 PFP/ml für die angestrebte Lösung erreicht (größer als die gewollten 50 bis 60 PFP/ml). Obwohl diese Konzentration theoretisch zu hoch ist, wurde sie weiterverwendet, da die genaue Phagenanzahl in der 10^{-5} Verdünnung nicht sicher bestimmt werden konnte und ein zu niedrigerer Phagen-Titer vermieden werden sollte [URL-16].

5.3.2 Erstellung der Mittelwertzielkarten für die Bakteriophage Φ X174

Um zu überprüfen, ob die Bakteriophage in einer konstanten Anzahl an PFP/ml kultiviert wurde, erfolgte eine Zehner Bestimmung der Bakteriophage mit jedem der beiden Referenzstämme nach dem Standardverfahren (siehe Abschnitt 4.2.2.2). Die dabei erlangten Ergebnisse wurden dafür in der Tabelle 16 zusammengetragen.

Tabelle 16: Vergleich der PFP/ml für die kultivierte Bakteriophage Φ X174 (DSM-No. 4497)

Referenz-stamm	PFP/ml										Ø
13706	45	44	43	47	45	44	46	49	50	42	45,5
700078	50	55	51	53	50	45	49	44	47	48	49,2

Anhand der Ergebnisse ist sichtbar, dass die kultivierte Phage konstant in ihrer Anzahl von PFP pro ml ist. Bei der Untersuchung mit dem Stamm 13706 wurde ein Variationskoeffizient (CV)-Wert von 5,79 % berechnet, der die relative Standardabweichung der Wiederholpräzision darstellt. Dieser Wert gibt Aufschluss über die Streuung der Messwerte im Vergleich zu ihrem Mittelwert und ermöglicht eine präzise Beurteilung der Messgenauigkeit [URL-14]. Für den Stamm 700078 wurde ein CV-Wert von 6,85 % ermittelt. Der CV-Wert gilt in der Biologie als niedrig, wenn er unter 10 % liegt. Dies ist mit 5,79 % und 6,85 % der Fall. Dadurch lässt sich schlussfolgern, dass die Untersuchungen der kultivierten Phage eine geringe relative Streuung der Messwerte aufweisen, was für eine präzise und konstante Durchführung des Verfahrens steht und die Phage für künftige Untersuchungen konstante Ergebnisse erzielen sollte [URL-13]. Diese Korrelation

der Werte um den jeweilig ermittelten Mittelwert wird in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt, um mögliche Muster zu erkennen. Bei der Kultivierung mit dem Stamm 13706 fällt auf, dass die Werte der ersten Platten noch sehr nah am Mittelwert liegen. Im Gegensatz dazu zeigen die letzten drei Platten größere Abweichungen mit Abständen von bis zu 5 Plaques vom Mittelwert und das sowohl im Bereich unterhalb und oberhalb des Mittelwertes (siehe Abbildung 17). Bei der Kultivierung mit dem Stamm 700078 ist auffällig, dass exakt die ersten fünf Platten Werte oberhalb und die letzten fünf Platten Werte unterhalb des Mittelwertes zeigen (siehe Abbildung 18). Die beobachte Variabilität in den Ergebnissen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die kultivierten Bakteriophagen nach nur einmaligem Vortexen direkt nacheinander in den ssMSA (der verschiedenen Reagenzgefäße) gegeben wurden. Dies führte möglicherweise zu einer unzureichenden Homogenisierung der späteren Phagenproben. Dabei muss nach DIN-Norm 10705-2 darauf geachtet werden, dass die Phage nicht länger als 10 min in den Röhrchen im Wasserbad mit dem ssMSA verweilt [DIN EN ISO 10705-2:2001]. Eine ungleichmäßige Verteilung der Phagen kann zu Abweichungen in der Streuung der Daten führen. Für eine präzisere Analyse ist es wichtig, die Phagenproben durch intensiveres Vortexen oder zusätzliche Homogenisierungsschritte gleichmäßig zu verteilen. Dies reduziert die Wahrscheinlichkeit von Variationen in der Plaque-Zahl und sorgt für konsistente Ergebnisse [Brandis-Heep 2020].

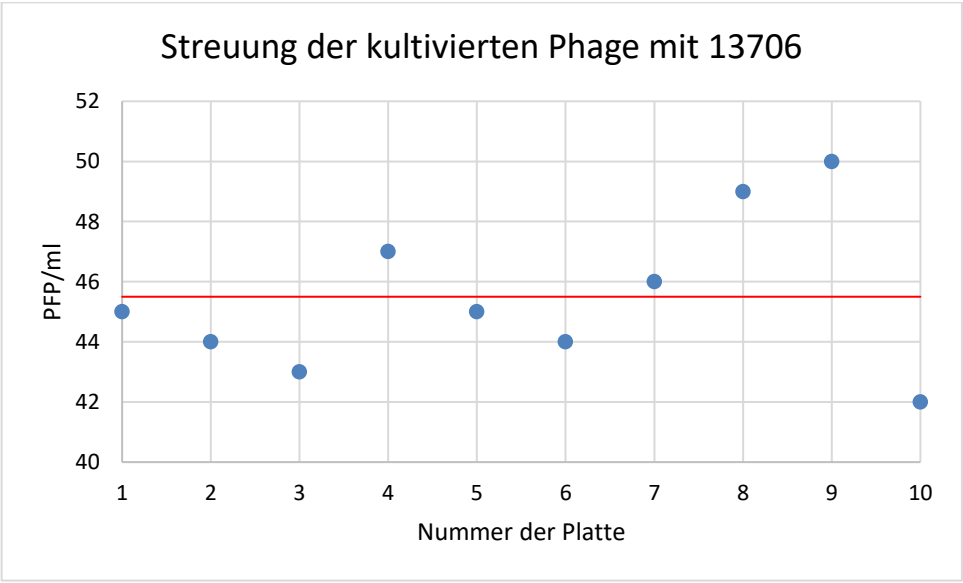

Abbildung 17: Streuung der PFP/ml für die kultivierte Bakteriophage mit dem Referenzstamm 13706

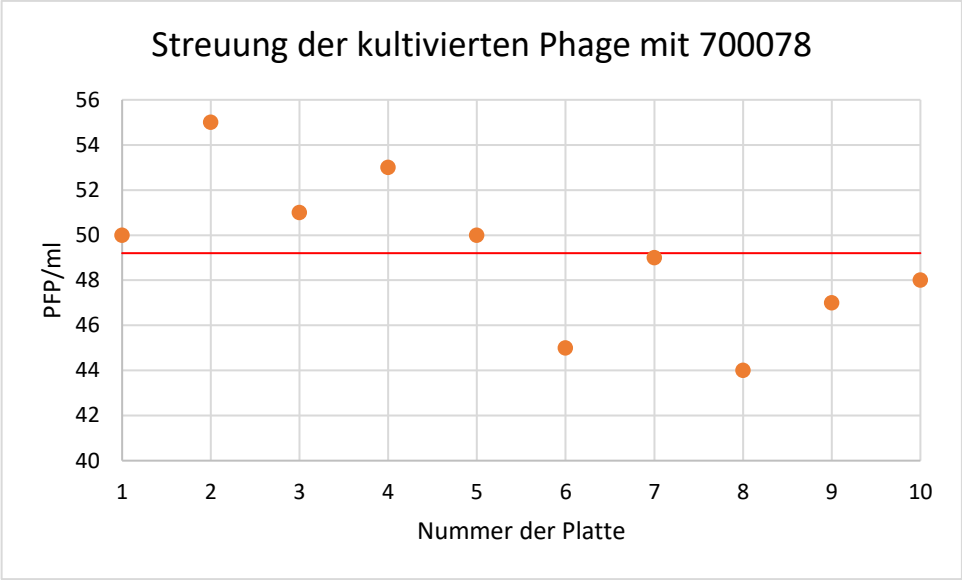

Abbildung 18: Streuung der PFP/ml für die kultivierte Bakteriophage mit dem Referenzstamm 700078

Des Weiteren wurde ein Unterschied bei der Kultivierung mit den beiden Referenzstämmen *E. coli* 13706 und 700078 nachgewiesen. So konnten nach der Bebrütung der kultivierten somatischen Coliphage mit dem Stamm 13706 im Durchschnitt 45,5 (46) Plaques gezählt werden. Nach der der Bebrütung mit dem Stamm 700078 konnten im Durchschnitt 49,2 (49) Plaques gezählt werden (siehe Tabelle 16). Die prozentuale Abweichung dieser beiden Mittelwerte liegt bei 8,13 % bzw. (6,52 %) bei den aufgerundeten Werten. Diese Abweichung lässt sich, wie bereits in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, auf die antibiotische Wirkung von Nalidixinsäure zurückführen, die das Wachstum anderer gramnegativer Bakterien als Teil der bakteriellen Hintergrundflora hemmt. Durch diese Hemmung werden konkurrierende Bakterien, die ebenfalls von den Phagen lysiert werden könnten, bereits während der Probenvorbereitung abgetötet. Dadurch wird das Wachstum der Nalidixinsäure-resistenten *E. coli*-Mutante auf dem Agar nicht beeinträchtigt, was wiederum dazu führt, dass diese als Wirtszellen effektiver von den Phagen lysiert werden können [Sugino et al. 1977].

Wie bereits diskutiert, ist es das Ziel, mittels der Quantifizierung der kultivierten Bakteriophagen bei der Qualitätskontrolle in zukünftigen Untersuchungen reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. So ist es essenziell für jeden Referenzstamm ein präzises Untersuchungsintervall festzulegen, um potenzielle Abweichungen während der Qualitätskontrolle mit solch einem Intervall der kultivierten Bakteriophage eingrenzen zu können.

Eine Überschreitung oder Unterschreitung der Ausschlussgrenzen eines solchen Untersuchungsintervalls würde bedeuten, dass ein paralleler Ansatz des Standardverfahrens potenzielle Mangel aufweist oder fehlerhaft durchgeführt wurde. Sollte die Qualitätskontrolle auch nach einer Wiederholung immer noch nicht innerhalb der Grenzen des Intervalls sein, so müssen die Ergebnisse verworfen werden [DIN EN ISO 10705-2:2001]. Für die Bestimmung dieses Intervalls wurden natürliche Abwasserproben gemäß des Standardverfahrens (siehe 4.2.2.2) analysiert, um die Variationen in der Anzahl der Phagen zu erfassen (siehe Tabelle 17) [DIN EN ISO 13843:2018-03]. Anschließend wurde für bestimmte ausgewählte Abwasserproben von jedem Stamm ein Variationskoeffizient berechnet, auf dessen Grundlage das gesuchte Intervall ermittelt wurde. Hierfür wurden Ergebnisse mit unterschiedlichen Dimensionen an der Phagenanzahl benötigt. So wurden insgesamt 13 Abwasserproben mit je zehn Ansätzen pro Referenzstamm nach somatischen Coliphagen untersucht (siehe Tabelle 17). Wenn ein Abwasser eine zu hohe PFP/ml Anzahl während einer Voruntersuchung aufweist, ist das Verfahren für diese Abwasserprobe durch eine geeignete Verdünnung anwendbar [DIN EN ISO 10705-2:2001]. Die Zusammensetzung von Abwässern unterschiedlicher Herkunft ist nicht eindeutig definierbar und auch stark von äußeren Bedingungen abhängig, was eine gleichbleibende Untersuchung schwierig macht [URL-11]. Abwasser enthält eine Vielzahl von Stoffen und Organismen, die aus verschiedenen Quellen wie industriellem oder kommunalem Abwasser stammen. Diese große Vielfalt an Bakterien und Viren macht es jedoch zu einem guten Ausgangsmaterial für Testuntersuchungen [URL-12].

Tabelle 17: Anzahl der PFP/Platte für die Abwasserproben mit beiden Referenzstämmen

Datum	MSN	PFP/Platte mit dem Referenzstamm 13706										PFP/ml	PFP/Platte mit dem Referenzstamm 700078										PFP/ml
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
14.03.24	HA 2.6	27	31	22	16	22	22	26	28	51	31	28	28	29	25	23	18	19	32	32	27	22	26
19.03.24	OE 2.6	28	26	22	24	25	23	23	24	22	24	24	31	35	41	41	37	36	30	30	35	34	35
04.04.24	OE 2.6 (2)	41	42	46	45	48	45	49	46	41	44	45	52	51	48	44	53	48	53	48	45	45	49
02.04.24	LS 1.6	>> 100 pfp pro Platte (nicht auswertbar)																					
04.04.24	DR 1.6	6	4	4	3	4	5	3	1	7	9	5	7	8	7	6	5	5	5	9	0	6	6
04.04.24	EP 1.6	8	8	5	5	9	6	4	4	5	5	18	1	1	6	5	13	10	10	12	7	5	21
08.04.24	OE 2.6 (3)	41	45	33	31	39	39	54	47	29	28	39	37	37	53	45	38	36	51	47	29	32	41
09.04.24	Mi 1.6	20	21	34	23	29	26	27	21	21	20	24	19	17	23	28	32	34	25	26	22	21	25
15.04.24	HA 2.6 (2)	47	43	57	49	67	53	38	53	56	45	51	43	39	42	44	45	46	52	44	46	36	44
15.04.24	Mi 1.6 (2)	14	14	15	15	11	12	10	9	20	17	14	14	12	18	17	11	10	5	8	16	15	13
17.04.24	Au 1.6	112	124	131	134	114	108	122	121	115	105	119	92	102	106	106	88	87	95	111	92	89	97
26.04.2024	Ha 2.6 (3)	4	3	14	16	8	8	9	8	8	6	8	17	13	22	22	22	16	12	15	21	16	18
26.04.2024	Mi 1.6 (3)	20	21	23	23	18	21	16	14	9	13	18	24	23	25	25	29	21	14	15	8	7	19

Von den 13 Abwasserproben war eine Probe (LS 1.6) nicht auswertbar (siehe Tabelle 17). Bei der LS 1.6 Abwasserprobe entstanden bei 1 ml Probe auf einer kleinen MSA-Platte deutlich mehr als 100 Plaques, sodass diese Probe nicht auszählbar war. Die Phagen haben hier so viele Bakterien lysiert und Plaques gebildet, dass fast der ganze ursprüngliche

mikrobiologische Bakterienrasen kaum noch vorhanden war, da dieser durch das Lysieren der Bakterien und das Entstehen der Plaques zu einer klaren Fläche wurde. Die Probe Au 1.6 ähnelte der Probe LS 1.6, jedoch waren die Plaques auf der Platte noch zählbar, da nach Grenzen zwischen den einzelnen Plaques sichtbar waren. Im Durchschnitt zeigte die Probe Au 1.6 119 PFP/ml mit dem *E. coli*-Stamm 13706 und 97 PFP/ml mit dem Stamm 700078. Dies entspricht einer prozentualen Abweichung von 22,68 %. Ursache für diese große Abweichung könnte der deutliche Unterschied in der Plaque-Morphologie sein (siehe Abbildung 19).

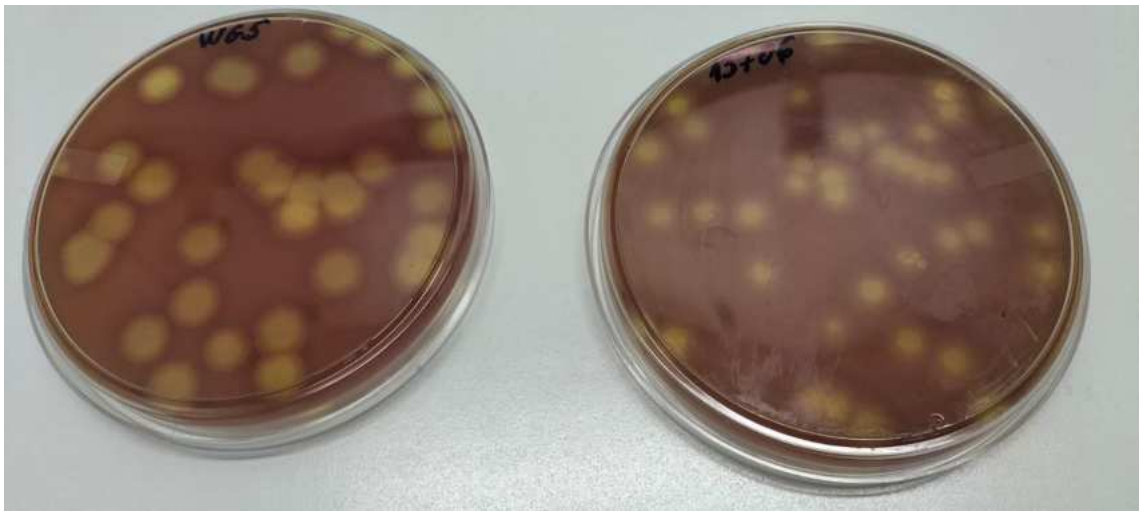

Abbildung 19: Unterschied der Plaque-Morphologie bei der Verwendung des *E. coli* Stammes 13706 und 700078

Die Plaques auf den Platten mit dem Referenzstamm 700078 waren sehr groß und verschmolzen teilweise miteinander. Dieses Verschmelzen der Plaques, insbesondere bei Proben mit einer hohen Phagenanzahl, führt zu unscharfen Grenzen zwischen den Plaques, was deren Unterscheidung erschwert und zu Zählfehlern führen kann [Sanders 2012]. Dies ist auch der Grund, dass im angewandten Verfahren nach der DIN-Norm 10705-2 das Kontrastmittel TTC vorgeschlagen wird, da es als Redox-Indikator die Plaques besser voneinander unterscheidbar macht [Altman 1976].

Bei der Probe DR 1.6 fällt auf, dass die Anzahl der PFP/ml im Vergleich zu den anderen Abwasserproben mit 5 PFP/ml für den Stamm 13706 und mit 6 PFP/ml für den Stamm 700078 deutlich geringer ist. Ebenso sind die Werte der Probe EP 1.6 pro Platte sehr gering. Jedoch handelte es sich hier um eine Verdünnung (1:3) der Orginalprobe,

wodurch trotz der geringen Anzahl an Plaques pro Platte die Anzahl an PFP/ml in der unverdünnten Probe höher ist. Insgesamt zeigten von den zwölf auswertbaren Abwasserproben acht eine erhöhte PFP/ml Anzahl, wenn mit dem Ansatz des Stammes 700078 gearbeitet wurde, wodurch dieser eine bessere Eignung für Proben mit einer hohen Belastung an Phagen aufweist (siehe Tabelle 17). Diese Schlussfolgerung basiert auf der Verwendung von Nalidixinsäure (wie es auch bei dem zehner Ansatz der kultivierten Phage der Fall ist), welche die bakterielle Hintergrundflora in den Abwasserproben reduziert. Dies führt zu einer verbesserten Phagenlyse, da störende Bakterien eliminiert werden. [Sugino et al. 1977]. Ein weiterer Grund wäre, dass der Stamm 13706 in anderen Laboren Mutationen entwickelte, welche die Resistenz der *E. coli* gegenüber den somatischen Coliphagen erhöhte. Diese Veränderungen könnten zu einer verringerten Anzahl von PFP/ml geführt haben [Münsch 2005]. In den Versuchen dieser Arbeit konnten solche Resistenzen weder bestätigt, geprüft oder ausgeschlossen werden.

Um aus den Ergebnissen der natürlichen Abwasserproben nun das gesuchte Untersuchungsintervall zu ermitteln, wurden jeweils vier Messreihen der untersuchten Abwasserproben mit unterschiedlicher Phagenanzahl gewählt. Dies ist wichtig, um die Robustheit des CV-Wertes zu testen und sicherzustellen, dass er unabhängig von den Messbedingungen zuverlässige Ergebnisse liefert [URL-14]. Für die Ermittlung dieses CV-Wertes mit dem Stamm 13706 wurden die vier Messreihen: DR 1.6; OE 2.6 (3); Mi 1.6 und HA 2.6 (2) (siehe Tabelle 17) ausgewählt. Von jeder Messreihe wurde zuerst das arithmetische Mittel und die Varianz gebildet, um die relative operationale Varianz ($\boldsymbol{\sigma_0^2}$) mithilfe der Formel 6 zu berechnen (siehe Tabelle 18 im Anhang). Die Ergebnisse belaufen sich dabei in der eben aufgeführten Reihenfolge auf: 0,026; 0,022; -0,004 und 0,007. Dabei stehen diese Werte dafür, wie stark die Varianz im Verhältnis zum Mittelwert steht. Der negative Wert der Probe Mi 1.6 (mit -0,004) stammt hierbei von der hohen Varianz der Werte dieser Messreihe. Von allen Werten wurde anschließend der Mittelwert berechnet, um die durchschnittliche relative operationale Varianz zu erhalten, die sich auf 0,013 beläuft. Um den Variationskoeffizienten (CV) für alle vier Messreihen zu bestimmen, wurde zunächst die Quadratwurzel des zuvor berechneten Wertes gezogen. Anschließend wurde dieser Wert in einen Prozentwert umgerechnet, was zu einem Ergebnis von 11,4 % führte. Dieselben Schritte wurden auch für den Stamm 700078 durchgeführt, wobei die folgenden Messreihen ausgewählt wurden: OE 2.6; OE 2.6 (2); DR 1.6 und HA

2.6 (3) (siehe Tabelle 17). Dabei wurden folgende gerundeten relative operationale Varianzen in der eben aufgeführten Reihenfolge berechnet: -0,016; -0,016; 0,005 und -0,009 (siehe Tabelle 19 im Anhang). Anschließend wurden die durchschnittliche relative operationale Varianz mit 0,009 bestimmt und der CV-Wert beträgt 9,5 %. Anhand der ermittelten Variationskoeffizienten von 11,4 % für den Stamm 13706 und 9,5 % für den Stamm 700078 wurden die erforderlichen Toleranzintervalle für die kultivierte Phage bestimmt. Diese Intervallgrenzen sind entscheidend, um die Reproduzierbarkeit und Validität paralleler Ansätze gemäß dem Standardverfahren sicherzustellen. Zur Berechnung dieser Intervalle wurden die Mittelwert aus den Zehner Bestimmungen der kultivierten Bakteriophagen herangezogen. Die berechneten CV-Werte wurden auf die Mittelwerte angewandt, um die Toleranzgrenzen festzulegen. Für den Stamm 13706 wurde ein Toleranzintervall von ± 5 PFP bestimmt, was zu Ausschlussgrenzen von 51 PFP (oberer Grenzwert) und 41 PFP (unterer Grenzwert) führt (siehe Abbildung 20). Analog wurde für den Stamm 700078 ein Toleranzintervall von ± 5 PFP festgelegt, resultierend in Ausschlussgrenzen von 54 PFP und 44 PFP (siehe Abbildung 21) [DIN EN ISO 13843:2018-03].

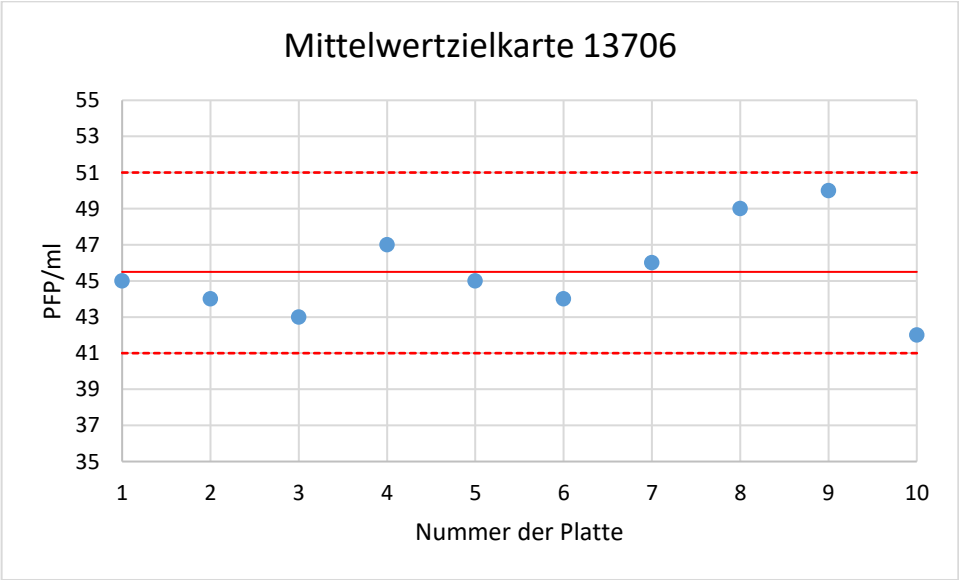

Abbildung 20: Mittelwertzielkarte für den Referenzstamm 13706

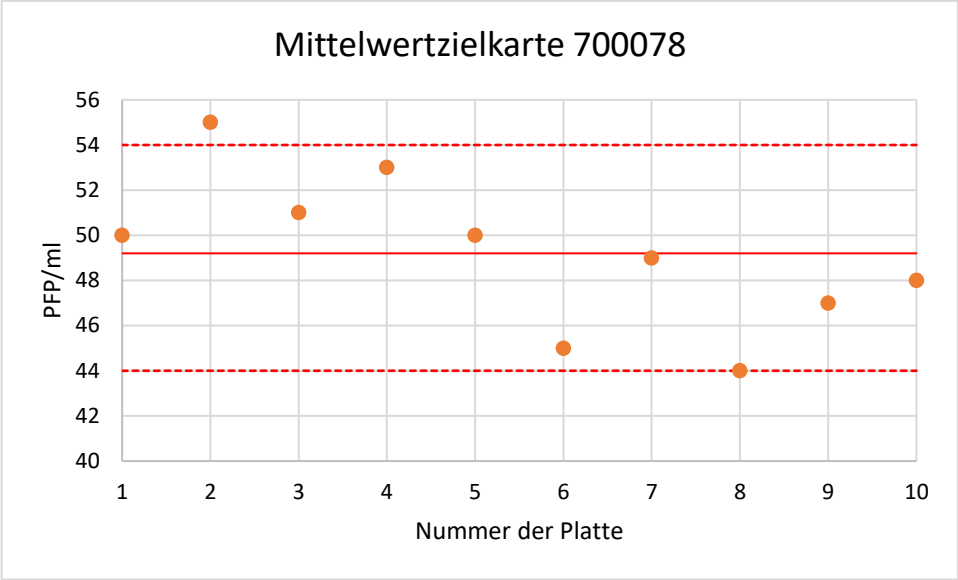

Abbildung 21: Mittelwertzielkarte für den Referenzstamm 700078

Diese Werte sind entscheidend für die Bewertung der durchzuführenden Ansätze nach dem Standardverfahren und müssen eingehalten werden. Die festgelegten Grenzwerte sind in diesem Kontext nicht als hoch einzustufen, da ein Variationskoeffizient von bis zu 10 % in der biologischen Forschung als akzeptabel und niedrig betrachtet wird. In den untersuchten Proben lag der Variationskoeffizient bei 9,5 % und 11,4 % [URL-13]. Dies impliziert, dass die durchzuführenden Qualitätskontrollen keine signifikanten Schwankungen aufweisen sollten. Signifikante Abweichungen könnten zu wichtigen, jedoch nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen, die daher unter Umständen verworfen werden müssen. Ein Beispiel hierfür ist der Wert der zweiten Platte für den Stamm 700078, der mit 55 PFP/ml nach der Ermittlung der Ausschlussgrenzen über der zulässigen Obergrenze von 54 PFP/ml für diesen Stamm liegt. Tritt ein solcher Wert im Rahmen des Standardverfahrens auf, ist die gesamte Versuchsreihe mindestens einmal zu wiederholen. Sollte der Wert auch nach der Wiederholung außerhalb der vorgegebenen Grenzen liegen, müsste das Referenzmaterial der kultivierten Phage verworfen werden. Um solche potenziellen Schwankungen zu minimieren, ist es unerlässlich, dass das Verfahren konsequent nach einheitlichen und standardisierten Richtlinien durchgeführt wird [DIN EN ISO 10705-2:2001].

5.3.3 Qualitätskontrollen der kultivierten Bakteriophage Φ X174

Auf der Basis der ermittelten Ausschlussgrenzen für die kultivierte Bakteriophage Φ X174 wurde diese als Qualitätskontrolle bei jedem Ansatz für den obig durchgeführten Vergleich der *E. coli* Referenzstämme mit untersucht. Diese Vorgehensweise gewährleistet, dass die Bakteriophage Φ X174 als Referenzpunkt zur Validierung der experimentellen Ergebnisse dient, indem sie Abweichungen und Variabilität der unterschiedlichen Ansätze aufzeigt. Dabei wurden die gewonnenen Werte in der Tabelle 20 zusammengetragen.

Tabelle 20: Qualitätskontrollen der Ansätze des Vergleiches der *E. coli* Referenzstämme

Datum	PFP/ml mit 13706	PFP/ml mit 700078
17.07.2024	50	52
18.07.2024	49	53
23.07.2024	46	49
30.07.2024	49	50
31.07.2024	50	53
06.08.2024	47	52
Ø	49	52

Die Ergebnisse der Qualitätskontrollen zeigen, dass die gemessenen Werte für den *E. coli* Stamm 13706 im Bereich von 46 bis 50 PFP/ml liegen, während für den Stamm 700078 Werte zwischen 53 und 49 PFP/ml ermittelt wurden. Diese Ergebnisse liegen sowohl innerhalb der festgelegten Ausschlussgrenzen für den Stamm 13706 (41 bis 51 PFP/ml) als auch für den Stamm 700078 (44 bis 54 PFP/ml). Folglich wurden die festgelegten Qualitätskriterien erfüllt, und alle Ansätze zum Vergleich der Referenzstämme sind als gültig anzusehen. Auch der Vergleich der Referenzstämme ist anhand dieser Ergebnisse sichtbar. So weißen die Kontrollen mit dem Stamm 700078 konstant höhere Werte auf. Der ermittelte Mittelwert der Ergebnisse mit dem Stamm 700078 beträgt aufgerundet 52 PFP/ml und für den Stamm 13706 49 PFP/ml. Diese Mittelwerte beider Stämme zeigen hierbei eine prozentuale Abweichung von 5,95 %. Dies war zu erwarten, da der Stamm 700078, wie auch schon vorher erwähnt mit Nalidixinsäure untersucht wird, welche mit ihrer Antibiotikawirkung die bakterielle Hintergrundflora stört und somit höhere Werte impliziert [Sugino et al. 1977]. Der Unterschied zwischen den beiden *E. coli* Stämmen ist

geringer als beim direkten Vergleich der Stämme (siehe 5.2), bei dem eine prozentuale Abweichung von 6,31 % festgestellt wurde. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass es sich bei diesen Phagen um kultivierte Bakteriophagen handelt, die nicht direkt aus natürlichen Proben stammen. Kultivierte Bakteriophagen zeichnen sich dadurch aus, dass sie spezifisch an die in der Kontrollprobe verwendeten Referenzstämme angepasst sind [URL-16]. Dies könnte die geringere prozentuale Abweichung erklären. Im Gegensatz dazu können Phagen aus natürlichen Proben eine größere Variabilität aufweisen, da sie unterschiedliche Arten oder Familien umfassen können, die auch die Wirtsstämme infizieren. Diese natürliche Diversität kann zu einer größeren Variabilität in der Wirksamkeit führen [Jofre, et al. 2016].

5.4 Aufkonzentrierung von Bakteriophagen aus Wasserproben

5.4.1 Herstellung des Spikematerials

Die Untersuchung von Rohwässern mithilfe des Standardverfahrens (siehe 4.2.2) benötigt sehr viele Materialien und ist sehr Kosten, Zeit und Energie aufwendig. Jedoch wurden dafür in der DIN EN ISO 10705-3 Methoden beschrieben, mit denen sich der hohe Aufwand des Standardverfahrens verringern lässt. Die im Labor des ZWA-Hainichen durchführbare Methode ist dabei die Vorgehensweise mit der Membranfiltration, welche mithilfe eines bestimmten Validierungsverfahren validiert werden sollte, um auch größere Volumina an Wasserproben auf somatische Coliphagen mit diesem Verfahren untersuchen zu können. Es ist anzumerken, dass für eine erfolgreiche Validierung mindestens fünf Untersuchungen mit natürlichen Rohwässern durchgeführt werden sollten, um die Aufkonzentrierung bei verschiedenen Volumina zu evaluieren. Aufgrund zeitlicher Beschränkungen war es jedoch lediglich möglich, die Aufkonzentrierung mit vier verschiedenen Rohwässern zu untersuchen. Der erste Schritt für die Aufkonzentrierung war es, eine natürliche Abwasserprobe zu finden, die genug PFP/ml (60 – 200 PFP/ml) aufweist, um diese Probe als Spikematerial für die später untersuchten Rohwässer zu verwenden [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Dafür wurde das Abwasser Au 1.6 (1:2 verdünnt) mit den beiden *E .coli* Referenzstämmen 13706 und 700078 untersucht damit entschieden werden konnte, mit welchen Referenzstamm die Variabilität an PFP/ml innerhalb eines Reagenzgefäßes als auch zwischen zwei Reagenzgefäßen am geringsten ist. Die Ergebnisse der

im Doppelansatz durchgeführten Spike-Proben für den Referenzstamm 13706 sind in Tabelle 21 zusammengefasst, während die Ergebnisse für den Referenzstamm 700078 in Tabelle 22 dargestellt sind.

Tabelle 21: Ergebnisse der Spikematerial Untersuchung mit dem Stamm 13706

Tube Nr.	PFP/ml 1. Zählung	PFP/ml 2. Zählung	PFP/ml Mittelwert	PFP/ml Summe
1	68	66	67	134
2	44	62	53	106
1+2	-	-	-	240

Tabelle 22: Ergebnisse der Spikematerial Untersuchung mit dem Stamm 700078

Tube Nr.	PFP/ml 1. Zählung	PFP/ml 2. Zählung	PFP/ml Mittelwert	PFP/ml Summe
1	70	62	66	132
2	54	58	56	112
1+2	-	-	-	244

Für den Stamm 13706 wurde für das erste Tube eine Summe von 134 PFP/ml und für das zweite Tube eine Summe von 106 PFP/ml ermittelt. Für den Stamm 700078 wurde für das erste Tube hingegen eine Summe von 132 PFP/ml und für das zweite Tube eine Summe von 112 PFP/ml ermittelt. Erkennbar ist, dass die Werte eines Tubes, das mit beiden Referenzstamm untersucht wurde, nur geringe Abweichungen in ihren Summen zeigen (z. B.: 134 zu 132 PFP/ml). Der Unterschied zwischen den zwei Tubes, die mit einem Referenzstamm untersucht wurden, ist in der Summe jedoch recht hoch (z.B.: 134 zu 106 PFP/ml), obwohl beide Tubes aus demselben Abwasser hergestellt wurden. Der geringe Unterschied innerhalb eines Tubes zwischen den beiden Referenzstämmen kann auf die Anwendung von Nalidixinsäure und deren schon mal erläuterte antibiotisch hemmende Wirkung zurückgeführt werden. Diese könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass mit dem Stamm 700078 eine geringfügig höhere Anzahl an Bakteriophagen nachgewiesen wurde [Sugino et al. 1977]. Der größere Unterschied zwischen den Tubes lässt sich damit erklären, dass es sich hier um ein Abwasser handelt, dessen Zusammensetzung auch innerhalb einer Probe variieren kann. Somit kann es möglich sein, dass in der abgefüllten Probe auch durch zum Beispiel unzureichendes homogenisieren der Probe mehr

Bakteriophagen enthalten sind als im zweiten Tube [URL-12]. Um jedoch die Variabilität der Tubes berechnen zu können, wurde mit der Hilfe der Formeln 7 und 8 die Cochran's Streuungstest Statistik (T_1) und die Cochran's Streuungsprüf Statistik (T_2) berechnet. Durch die Bestimmung des T_1-Wertes kann die Variabilität des Spikematerials in der PFP/ml Anzahl innerhalb eines Tubes bestimmt werden. Desto geringer die Werte von T_1 sind, desto geringer ist die Variabilität des Spikematerials innerhalb eines Tubes [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Der T_2-Wert hingegen beurteilt die Variation des Spikematerials zwischen mehreren Tubes. Für den Referenzstamm 13706 wurde ein T_1-Wert von 0,03 für das erste Tube und ein T_1-Wert von 3,06 für das zweite Tube ermittelt, was zu einem kumulierten T1-Wert von 3,09 führt. Hierbei liegt der gesamt T_1-Wert innerhalb der in der DIN EN ISO 10705-3 vorgegebenen Grenze von ($0{,}01 < T_1 < 5{,}99$), wodurch die Homogenität der Probe für den T_1-Wert bestanden wurde. Anschließend musste auch T_2 berechnet werden, um zu prüfen, ob der Unterschied zwischen den beiden Tubes ebenfalls gültig ist. Dabei wurde mit Formel 8 ein T_2-Wert von 0,027 ermittelt. Dieser Wert befindet sich innerhalb der durch die DIN-Norm definierten Grenze, die besagt, dass der T_2-Wert kleiner als 3,84 sein muss [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Anhand dieser Ergebnisse ist nun die Aussage zu tätigen, dass sich das Spikematerial mit dem Referenzstamm 13706 zur Untersuchung für die Aufkonzentrierung eignet. Für den Stamm 700078 wurde dieselbe Methodik angewandt und zuerst der T_1-Wert für das erste Tube mit 0,48 ermittelt und der T_1-Wert für das zweite Tube mit 0,14 ermittelt, was ein gesamten T_1-Wert von 0,62 ergibt, der innerhalb der Grenzen liegt. Der T_2-Wert wurde mit 1,64 berechnet, welcher ebenfalls innerhalb der Grenze liegt und somit das Abwasser auch mit dem Stamm 7000078 eine zureichende Homogenität aufweist [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Es wurde sich insgesamt jedoch für die Aufkonzentrierung auf den Stamm 13706 fokussiert, da dessen T_2-Wert deutlich niedriger ausfällt als der des Stammes 700078, um eine möglichst geringe Variabilität zwischen den Tubes des Spikematerials anzustreben. Und des Weiteren ist es materialsparend, den Stamm 13706 zu verwenden, da keine extra Nalidixinsäure benötigt wird.

5.4.2 Aufkonzentrierung der Wasserproben

Nachdem das Spikematerial hergestellt und getestet wurde, konnte mit der eigentlichen Aufkonzentrierung begonnen werden. Dazu wurden die Ergebnisse aller Versuche in der

Tabelle 23 zusammengetragen. Die für die Auswertung gültigen Experimente wurden mit natürlichen Rohwässern durchgeführt. Dies wurde auch bei der Durchführung des ersten Versuches mit der Exp Nr. 1 eingehalten jedoch wie in Tabelle 23 zu sehen ist, waren die Ergebnisse der ersten Aufkonzentrierung niedrig ausgefallen. Um die Effizienz der Aufkonzentrierung der Bakteriophagen zu optimieren, wurden initial Experimente mit sterilem Wasser als Basis durchgeführt. Diese Vorversuche dienten dazu, die Einflussfaktoren auf die Phagen Ausbeute systematisch zu untersuchen und zu verstehen. Durch den Einsatz von sterilem Trinkwasser konnte ein standardisiertes und kontrolliertes Umfeld geschaffen werden, das es ermöglichte, die methodischen Parameter zu variieren und deren Einfluss auf die Nachweisbarkeit der Bakteriophagen nach der Aufkonzentrierung zu analysieren. Die Erkenntnisse aus diesen Versuchen waren entscheidend, um die Bedingungen für die nachfolgenden Aufkonzentrierungen zu optimieren und die Effizienz der Phagen Rückgewinnung zu verbessern. Diese Experimente entsprechen in der Tabelle 23 den Experimentnummer (Exp. Nr.) 2 bis 7 und des Weiteren wurde für alle ein Volumen von 500 ml sterilem Trinkwasser gewählt. Dafür wurde bei Exp. Nr. 2 sterilisiertes Wasser verwendet, jedoch ohne den Zusatz von Natriumthiosulfat in den Flaschen. Bei diesem Versuch sind jedoch nach der Aufkonzentrierung der Probe nur vier Bakteriophagen nachgewiesen worden. Eine mögliche Ursache ist, dass das Natriumthiosulfat fehlte. Natriumthiosulfat neutralisiert hierbei in Wasserproben Chlor und Chloramine [Lai et al. 2021]. Dadurch kann eine Nachdesinfektion in der Probennahmen Flasche ausgeschlossen werden. Aufgrund dessen wurden die anschließenden Experimente nur noch mit sterilen Wasser durchgeführt, zudem Natriumthiosulfat hinzugegeben wurde, damit das Chlor die nachzuweisenden Bakteriophagen nicht inaktiviert [Brié et al. 2018]. Es ist ergänzend anzumerken, dass bei Exp. Nr. 2 die Filter nach der Filtration gemäß der Methodik mit einem Skalpell in acht Teile geschnitten wurden. Diese Vorgehensweise erwies sich jedoch als unpraktisch, da die Filter eher rissen, was möglicherweise zu einer reduzierten Anzahl an PFP nach der Aufkonzentrierung führte. Dies liegt daran, dass die Filter auf einer sterilen Petrischale geschnitten wurden, sodass Reste der Flüssigkeit und somit auch Bakteriophagen auf der Oberfläche der Petrischale verblieben und nicht in das vorgesehene Reaktionsgefäß übertragen werden konnten, in dem auch die Elutionslösung hinzugefügt wurde. Aufgrund dessen wurden anschließend für jeden Versuch der Filter im Ganzen in die Reaktionsgefäße überführt. Auch ist das Schneiden des Filters an sich

eine potenzielle Fehlerquelle, da sowohl die dabei erbrachten Scherkräfte in Verbindung mit thermischen Kräften die Zellwände der Mikroorganismen schwächen und zerstören können [Bulut et al. 1999]. Folgend wurden nun die Experimente drei bis sieben durchgeführt. Bei Experiment drei wurde extra zur normalen Methodik die Probe 30 min lang gerührt. Bei Experiment fünf wurde die Probe auch 30 min gerührt, jedoch das Volumen der Elutionslösung auf 8 ml verdoppelt als auch die Zeit im Ultraschallbad auf 8 min verdoppelt. Für Experiment sechs wurde wie mit Experiment fünf vorgegangen nur mit dem Unterschied, dass die Probe nicht 30 min gerührt wurde. Für das Experiment sieben wurde ein anderer Filter mit einer Porengröße von 45 µm verwendet und die Volumen 125 ml und 250 ml extra zu dem sonstigen Volumen von 500 ml untersucht. In den Experimenten drei bis sechs war nur ein geringfügiger Anstieg des Anteils an wiedergewonnenen Phagen im Vergleich zu Experiment zwei erkennbar. Die gefundenen Werte lagen zwischen 12 und 14 PFP pro 5 ml des untersuchten Konzentrats (Elutionslösung mit den Bakteriophagen), was, wie bereits zuvor erläutert, auf den Einsatz von Natriumthiosulfat zurückzuführen ist [Brié et al. 2018]. Ein aufschlussreicheres Ergebnis brachte Experiment sieben, so konnte mit dem neuen Filter deutlich mehr Bakteriophagen nach der Aufkonzentrierung nachgewiesen werden. Dabei wurden etwas mehr als viermal so viele Bakteriophagen nachgewiesen, die nach der Aufkonzentrierung wiedergefunden wurden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in den folgenden Experimenten acht bis zehn, die mit Rohwasser untersucht wurden, der Filter mit einer Porengröße von 45 µm verwendet. Bevor jedoch die Auswertung der Aufkonzentrierungen mit den natürlichen Rohwasserproben möglich war, musste erst einmal auch bei diesen durchgeführten Proben der T_1 und T_2-Wert überprüft werden, um zu prüfen, ob die Ergebnisse auch verwendet werden dürfen. Dafür wurde für jedes Tube welches als Spikematerial bei einer Aufkonzentrierung mit Rohwasser verwendet wurde, der T_1-Wert bestimmt und auch jedes Tube der vier Versuche mit Rohwasser mit jedem anderen Tube auf den T_2-Wert untersucht. So beträgt der T_1-Wert 0,036 für Exp. Nr. 1, während er bei Exp. Nr. 8 bei 0,243 liegt. Exp. Nr. 9 weist einen T_1-Wert von 0,042 auf, und für Exp. Nr. 10 wurde ein T_1-Wert von 0,011 berechnet. Die T_1-Werte liegen somit alle innerhalb der schon vorher erwähnten Grenze von ($0{,}01 < T_1 < 5{,}99$) und können somit nach dem T_1-Wert akzeptiert werden [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Für die Bestimmung der T_2-Werte wurde jede der vier Tubes des Spikematerials für die Rohwasserproben mit den anderen verglichen. Es wurden

dabei folgende Werte für T_2 berechnet: 0,230 für Exp. Nr. 1 und 8; 0,951 für Exp. Nr. 1 und 9; 1,098 für Exp. Nr. 1 und 10; 0,246 für Exp. Nr. 8 und 9; 0,323 für Exp. Nr. 8 und 10 und zuletzt 0,005 für Exp. Nr. 9 und 10. Die T_2-Werte wie 0,005 (von Exp. Nr. 9 und 10) sind dabei plausibel, wenn man die Summen des Spikematerials betrachtet (siehe Tabelle 23), so erkennt man das diese beiden Proben sich in ihrer Anzahl von PFP/ml Spikematerial nur um eine PFP unterscheiden, wodurch auch ein geringer T_2-Wert vorhersagbar ist. Ebenso ist der T_2-Wert von Exp. Nr. 1 und 10 mit 1,098 plausibel, da die Ergebnisse des Spikematerials den größten Unterschied mit einer Differenz von 15 PFP/ml aufweisen. Alle T_2-Werte befinden sich jedoch unterhalb der festgelegten Grenze von ($T_2 < 3{,}84$), wodurch ihre Homogenität nach der DIN-Norm 10705-3 akzeptiert wurde [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Ziel der Aufkonzentrierung war es, die Wiederfindungsrate η in % für jedes untersuchte Volumen an Rohwasserprobe zu bestimmen, um ein potenzielles Volumen zu ermitteln, bei dem die Aufkonzentrierung der Proben am besten funktioniert. Hierzu wurden die Ergebnisse der einzelnen Aufkonzentrierungen als auch die Ergebnisse einiger vorher diskutierten Werte in der Tabelle 23 zusammengetragen.

Tabelle 23: Ergebnisse der Aufkonzentrierung von Bakteriophagen in Wasserproben mit der Membranfiltration

Exp. Nr.	Hinzugegebene Phagen			PFP/5 ml Konzentrat bei der Aufkonzentrierung mit Spikematerial				PFP/5 ml Konzentrat ohne Spikematerial	Maximale Wiederfindungsrate für die Aufkonzentrierung in %	Originalansatz PFP/100 ml
	2 x 0,5 ml		1 ml	125 ml	250 ml	500 ml	1000 ml	1000 ml *		
1	54	56	110	22	18	20	26	0	23,64	23
2	34	26	60	-	-	4	-	0	6,67	-
3	47	51	98	-	-	13	-	0	13,27	-
4	47	51	98	-	-	13	-	0	13,27	-
5	47	51	98	-	-	14	-	0	14,29	-
6	47	51	98	-	-	12	-	0	12,24	-
7	57	49	106	58	64	51	n.a.	0	60,38	-
8	49	54	103	41	48	51	50	0	49,51	7
9	49	47	96	24	21	43	18	0	44,79	52
10	47	48	95	71	64	61	52	0	74,74	26

Wie schon vorher erwähnt sind die Ergebnisse der ersten Aufkonzentrierung (Exp. Nr. 1) recht gering mit Werten von 18 bis 26 PFP aus den gewonnenen 5 ml Konzentrat, weshalb auch die Experimente 2 bis 7 durchgeführt wurden. Diese Werte für Exp. Nr. 1 sind zu gering, da in jedem Volumen 110 PFP hinzugefügt wurde, diese aber nicht ansatzweise wiedergefunden wurden. Für diese Probe wäre es unmöglich, dieses Verfahren der Aufkonzentrierung mittels der Membranfiltration im Labor des ZWA-Hainichen zu etablieren, da einfach zu wenig Bakteriophagen wiedergefunden werden. Dies würde dazu führen, dass die Ergebnisse zu stark verfälscht sind, was zur Gefährdung der Wasserqualität führen könnte, da potenzielle Kontaminationen mit Fäkalien, die auch andere gefährliche Mikroorganismen wie bestimmte enterischen Viren enthalten können, nicht entdeckt werden würden [Schröter-Bobsin 2005]. Die zweite Aufkonzentrierung, die mit Rohwasser als Probe durchgeführt wurde (Exp. Nr. 8), zeigte schon verbesserte Ergebnisse, da bei dieser der andere Filter mit der Porengröße 45 µm verwendet wurde. So wurde über die vier Probenvolumen Werte zwischen 41 bis 51 PFP pro 5 ml Konzentrat gefunden, womit hier schon für das Volumen 500 ml mit 51 PFP/5 ml Konzentrat bei 103 PFP an zugegebenen Spikematerial eine Wiederfindungsrate von fast 50 % erreicht wurde. Der Grund dafür kann sein, dass ein 0,45 µm Filter mit größeren Poren weniger wahrscheinlich schnell verstopft, während ein 0,22 µm Filter schneller gesättigt werden kann, was seine Effektivität verringert [Larsen et al. 2023]. Jedoch auch mit dem neuen Filter wurden Ergebnisse geliefert, die geringere Werte bei der Aufkonzentrierung aufweisen wie bei Exp. Nr. 9, bei der bei den Volumen 125 ml, 250 ml und 1 l nur 18 bis 24 PFP/5 ml Konzentrat entdeckt wurden. Mit der Ausnahme, dass bei dem Volumen 500 ml etwa die doppelte Anzahl an Bakteriophagen mit 43 PFP/5 ml Konzentrat nachgewiesen wurde. Ursache dafür ist wahrscheinlich die Beschaffenheit der verwendeten Rohwasserprobe, welche einen hohen Eisengehalt mit 3,48 mg/l hat [World Health Organization 2022]. Die NTU wurden ebenfalls gemessen, allerdings erst einen Tag nach der ursprünglichen Untersuchung der Probe. Der gemessene Wert betrug 3,2, was für die geplante Aufkonzentrierung zu hoch ist, da ein maximal zulässiger NTU-Wert von unter 2,0 erforderlich ist. Das bedeutet, dass die Ergebnisse mit diesen Rohwasser eigentlich nicht verwendet werden dürfen, jedoch die Werte für diese Arbeit weiter verwendet wurden, da aus Zeitgründen die Stichprobenzahl sonst noch niedriger wäre [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Nach der Konzentration fiel auf, dass der Filter eine auffällige braun- bis rötliche Färbung

aufwies. Dies kann darauf zurückzuführen sein, das Eisen im Wasser mit Sauerstoff reagiert und Eisenoxide bildet. Diese Eisenoxide neigen dazu, sich auf der Membranoberfläche abzulagern. Diese Ablagerungen sind sowohl für die Veränderung der Filterfarbe verantwortlich als auch dafür, dass sie die Membranporen blockieren, was die Durchflussrate der Filtration reduziert und somit geringe Ergebnisse wie bei 125, 250 und 1000 ml verursachen kann [Fidalgo de Cortalezzi et al. 2014]. Ebenso können Bakteriophagen durch Eisen in einer Wasserprobe inaktiviert werden. Dieser Prozess ist typischerweise auf die Oxidation von Eisen zurückzuführen. Eisen, insbesondere in seiner zweiwertigen Form (Fe^{2+}), kann mit Sauerstoff und anderen Oxidationsmitteln reagieren, was zu einer Erhöhung der oxidativen Bedingungen führt. Diese Bedingungen können die Viruspartikel in der Wasserprobe schädigen und ihre Fähigkeit zur Infektion verringern [Heffron et al. 2019]. Wiederum anders verlief die letzte Aufkonzentrierung (Exp. Nr. 10) deutlich besser als die anderen und so wurden Werte zwischen 52 bis 71 PFP im Konzentrat wiedergefunden. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass die Filtergeschwindigkeit bei den Aufkonzentrierungen vorher noch schneller waren als 1 l in 30 min. So kann eine zu hohe Filtergeschwindigkeit dazu führen, dass die Membranen schneller verstopfen, da Partikel und Mikroorganismen in großer Menge auf die Membran treffen und die Poren blockieren können [Lee et al. 2020]. Ebenso gibt es in Experiment Nr. 10 vermutlich mehr einzelne Bakteriophagen, die kleiner als die Poren der Membran sind und daher ungehindert hindurchtreten können. Dies liegt daran, dass in dieser Probe insgesamt weniger Partikel vorhanden sind, die die Bildung von größeren Komplexen verhindern könnten. Im Gegensatz dazu hat Experiment Nr. 9 eine höhere Partikelkonzentration, was zur Bildung von Konglomeraten führt. Diese Konglomerate bestehen aus Phagen und Eisenpartikeln, wodurch sie eine größere Ausdehnung erreichen. Aufgrund ihrer Größe können diese Konglomerate die Poren der Membran nicht mehr passieren und werden zurückgehalten. Dies erklärt den deutlichen Unterschied der Phagenanzahl zwischen Exp. Nr. 9 und 10 [Heffron et al. 2019]. Auffällig bei den Ergebnissen der Rohwasser Untersuchungen ist, dass bei allen Proben im Originalansatz mit 100 ml mehrere Bakteriophagen nachgewiesen werden konnten, diese jedoch im Ansatz 1 l* Probe ohne Spikematerial nach der Aufkonzentrierung (unabhängig vom verwendetet Filter) nicht nachgewiesen werden konnten. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die natürlichen Bakteriophagen aus den Rohwasserproben zu klein sind und die Filter passieren. Es könnte sich möglicher Weise

um Vertreter der Familie der *Microviridae* handeln, die auch *E. coli* lysieren und Plaques verursachen. Sie besitzen keinen Schwanz und sind im Durchschnitt nur 25 bis 30 nm groß, wodurch die Poren der Filter mit der Porengröße von 0,22 µm oder 0,45 µm zu groß sind und die Phagen nicht aufgehalten werden könnten [Jofre, et al. 2016]. Unabhängig von der Lage der Phagen (vertikal oder horizontal) wird die Oberfläche der Phagen sich nicht groß ändern, da kein „Schwanz" vorhanden ist und die Phagen passieren den Filter trotzdem [Lee M.J. et al. 2020]. Im Gegensatz dazu könnte es sein, dass die Phagen im Spikematerial Vertreter einer Bakteriophagenfamilie sind, deren Größe dazu führt, dass sie eher in den Filtern zurückgehalten werden. Dies würde erklären, warum Phagen nachgewiesen werden können, wenn Spikematerial verwendet wird, während dies nicht der Fall ist, wenn das Spikematerial nicht vorhanden ist. [Schröter-Bobsin 2005]. Jedoch muss beachtet werden, dass die Filtrationseinheit in der DIN-Norm 10705-3 als auch in der Originalquelle nicht exakt beschrieben ist, wodurch es auch deswegen zu Unterschieden kommen kann da der genaue Aufbau nicht überprüft werden konnte [Sobsey et al. 1990].

Mit den Ergebnissen für die Anzahl der Bakteriophagen, die nach der Aufkonzentrierung nachgewiesen werden konnten, wurde nun für jedes Volumen und jedes Experiment mit den Rohwässern die Wiederfindungsrate mithilfe der Formel 9 berechnet. Die Ergebnisse wurden dazu in der Tabelle 24 zusammengetragen.

Tabelle 24: Zusammenfassung der Wiederfindungsraten (η) für jedes untersuchte Volumen

Exp. Nr.	η in % nach der Aufkonzentrierung in:			
	125 ml	250 ml	500 ml	1000 ml
1	20	16,36	18,18	23,64
8	39,81	46,6	49,51	48,54
9	25	21,88	44,79	18,75
10	74,74	67,37	64,21	54,74
$\bar{x}$	39,89	38,05	44,17	36,42
s	21,38	23,52	19,26	17,89
95 % Konfidenz Intervall	[5.94,73.84]	[0.59,75.51]	[13.55,74.80]	[7.94,64.90]

Für das analysierte Volumen von 125 ml wurde die höchste Wiederfindungsrate von Bakteriophagen in Exp. Nr. 10 mit 74,74 % festgestellt, während die niedrigste Rate in Exp.

Nr. 1 mit 20 % beobachtet wurde. Aus den Wiederfindungsraten wurde ein arithmetisches Mittel von 39,89 % für das Volumen von 125 ml berechnet. Basierend auf der berechneten Standardabweichung von 21,38 % für dasselbe Volumen konnte das 95 %-Konfidenzintervall bestimmt werden (5.94, 73.84) , das die Bandbreite beschreibt, innerhalb derer ein weiterer ermittelter Parameter mit 95 % Wahrscheinlichkeit liegen würde. Für die Volumina von 250 ml und 500 ml wurden die höchsten Wiederfindungsraten ebenso bei Exp. Nr. 10 festgestellt, mit 67,37 % für 250 ml und 64,21 % für 500 ml. Im Gegensatz dazu wurden auch die niedrigsten Wiederfindungsraten bei Exp. Nr. 1 ermittelt, mit 16,36 % für 250 ml und 18,18 % für 500 ml. Nur bei dem untersuchten Volumen von 1 l wurde die niedrigste Wiederfindungsrate bei Exp. Nr. 9 (mit 18,75 %) ermittelt. Die höchste Rate für dieses Volumen war auch wie bei den anderen Volumen bei Exp. Nr. 10 und betrug 54,74 %. Von den Ergebnissen der Aufkonzentrierung wurden wie auch schon für das Volumen 125 ml erklärt für alle anderen Volumen das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und das 95 % Konfidenzintervall der Wiederfindungsraten berechnet (siehe Tabelle 24). Anschließend konnte mit diesen Werten für jedes untersuchte Volumen dessen Einfluss auf die Wiederfindungsrate in dem Diagramm (siehe Abbildung 22) dargestellt werden.

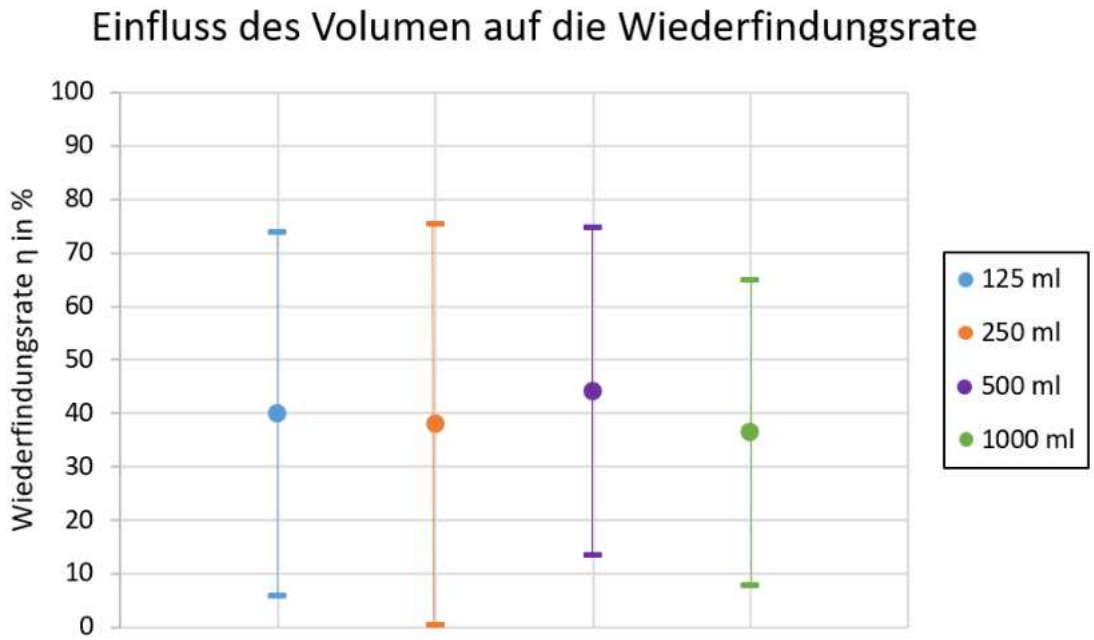

Abbildung 22: Einfluss des untersuchten Volumens bei der Aufkonzentrierung auf die Wiederfindungsrate (η)

Wenn man die vier untersuchten Volumina nur danach bewertet, bei welchem Volumen insgesamt über alle Experimente hinweg die meisten Bakteriophagen wiedergefunden wurden, zeigt sich, dass bei 500 ml mit einem Mittelwert von 44,17 % die höchste Wiederfindungsrate an Bakteriophagen festgestellt wurde. Im Vergleich dazu wurden bei 1 l nur 36,42 % der Bakteriophagen wiedergefunden, was die geringste Menge darstellt (siehe Abbildung 22). Die geringeren Werte bei den 1 l Experimenten ist damit zu erklären, dass größere Volumina auch mehr Partikel und Verunreinigungen enthalten, die die Membranporen verstopfen können. Dies führt zu einer erhöhten Belastung der Membran und kann deren Effizienz verringern, was zu geringeren Wiederfindungsraten führen kann [Lee et al. 2020]. Die geringeren Werte in den kleinen Volumina (125 ml und 250 ml) können wiederum daher stammen, dass die Phagenanzahl zum Volumen so groß ist, das viele Phagen gleichzeitig durch die Membran beim Filtern aufgehalten werden und daher sich Schichten an Bakteriophagen auf der Membran bilden, die sogenannten „cake layers“. Die Cake Layer blockiert die Poren der Membran oder verengt sie, was zu einer verringerten Durchflussrate und einer erhöhten Belastung der Membran führt. Dies reduziert die Effizienz der Filtration, jedoch sind die Wiederfindungsraten dennoch höher als bei 1 l, da die „cake layer“ bei größeren Volumen noch viel größere sind, da mehr Partikel gelöst sind [Zhao et al. 2022]. Jedoch lassen sich die Ergebnisse auch an den berechneten Konfidenzintervallen bewerten. So ist in Abbildung 22 sichtbar, dass die kleineren Volumen deutlich größere Konfidenzintervalle aufweisen als wenn höhere Volumen (ab 500 ml) für die Aufkonzentrierung verwendete wurden. Auch anhand der Ergebnisse lässt sich dieser Unterschied sehen so gilt für das Volumen von 125 ml das 95 % Konfidenzintervall von (39.89 ± 33.95 %) und für 250 ml das Intervall (38.05 ± 37.46 %). Im Gegensatz dazu sind für die höheren Volumina wie bei 500 ml das 95 % Konfidenzintervall bei (44.17 ± 30.63 %) und bei 1 l liegt es bei (36.42 ± 28.48 %). Ursache dafür ist das die Werte der einzelnen Wiederfindungsraten bei den unterschiedlichen Experimenten nicht so stark von dem arithmetischen Mittel streuen, was auch anhand der niedrigeren Standardabweichungen zu sehen ist (siehe Tabelle 24). Begründet werden kann dies damit das größere Volumina eine bessere Mischung und Homogenität der Bakteriophagen in der Lösung ermöglichen, da mehr „Raum“ zu Verfügung steht [Sobsey et al. 1990]. Dies reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass bestimmte Bereiche der Lösung höhere oder

niedrigere Konzentrationen von Phagen aufweisen, was zu einer gleichmäßigeren Wiederfindungsrate führt und die Werte nicht so stark streuen. Ebenso folgt eine Reduzierung des Konzentrationseffekts in einer Flüssigkeit, da bei höheren Volumina die Konzentration von Bakteriophagen und Partikel allgemein weniger anfällig für lokale Anreicherungen sind, was die Variabilität der Wiederfindungsraten verringert [URL-18]. Falls die Aufkonzentrierung von Bakteriophagen im Labor des ZWA-Hainichen eingeführt werden würde, wäre es am sinnvollsten, Rohwasserproben mit einem Volumen von 500 ml zu untersuchen, da bei diesen Volumen insgesamt die höchsten Wiederfindungsraten gefunden wurden und auch die Streuung der Werte gering ist. Jedoch sind die Werte der Aufkonzentrierung für eine Validierung nicht geeignet, da erstens zu wenig Stichproben von Rohwässern untersucht wurden (mindestens fünf) und des Weiteren war das Experiment Nummer neun aufgrund eines zu hohen NTU-Wertes nicht für die Aufkonzentrierung geeignet und müsste auch wiederholt werden, wenn die Probe einen geringeren NTU-Wert aufweist [DIN EN ISO 10705-3:2003].

5.5 Fehlerquellen

Während den Untersuchungen der Wasserproben auf somatische Coliphagen wurden einige potenzielle Fehlerquellen entdeckt, welche einen möglichen Einfluss auf die Auswertung der Ergebnisse hatten. Als erstes spielt hier der ssMSA eine Rolle. Dieser Agar erstarrte bei manchen Proben wie den Abwasserproben DR 1.6 oder EP 1.6 (nur von 5.3.2) nicht. Dies liegt daran, dass für die Herstellung des Agars verschieden Chargen verwendet wurden, deren Zusammensetzung sich unterscheiden kann. Aufgrund dessen wurde bei der Herstellung des ssMSA für jede Charge die verwendete Masse des dafür nötigen Agars der Mikrobiologie verändert. Statt 8 g wurden 10 g des Agars für alle Durchführungen abseits der Abwasser Untersuchungen von Abschnitt 5.3.2 dieser Arbeit verwendet. Wenn der flüssige Agar nicht fest wurde, konnten die Platten mit dem Agar nicht umgedreht und mit dem Deckel nach unten bebrütet werden. Deshalb wurden diese Platten mit dem Deckel nach oben bebrütet, um dennoch Ergebnisse zu erzielen. Diese wiesen eine höhere Messunsicherheit auf, da sich beim Bebrüten Kondenswasser gebildet hat, das auf die Platten getropft ist und somit die ansonsten immobilen Bakterien auf den Platten ortsspezifisch mobil machte. Dadurch konnten die Bakterien in die Plaques einwandern. Dieses Einwandern verfälscht die Ergebnisse des Verfahrens, da die Verteilung der Bakterien auf der Platte nicht mehr den ursprünglichen Bedingungen entspricht [Finer

J.E., Finer J.J. 2007]. Ein weiteres Problem bestand darin, dass nach dem Gießen des ssMSA und der Probe die Agarplatten teilweise zu stark geschwenkt wurde, wodurch Agar an den Deckel gelangte. In diesem Bereich des Weichagars, wo kein fester MSA vorhanden ist, können potenzielle Phagen keine Plaques bilden [Kutter 2009]. Zudem kann es während des Gießvorgangs zu der Bildung von Luftblasen im Weichagar kommen. Diese Luftblasen stellen eine physische Barriere dar, die das Eindringen von Bakterien oder anderen Mikroorganismen verhindert, was in diesen Bereichen die Entstehung von Plaques ausschließt [URL-17]. Als Konsequenz wurde der Weichagar bei der Herstellung nicht mehr mit einem Rührstab gerührt, sondern die Flaschen wurden leicht geschwenkt, was die Schaumbildung und damit auch die Entstehung der Luftblasen verringerte. Auch wurde der ssMSA immer zügig auf die MSA Platten gegossen, um zu verhindern, dass sich Luftblasen im Agar einschließen.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die beiden *E. coli* Stämme 13706 und 700078 bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf das Verfahren der DIN EN ISO-10705-2 verglichen werden. Für eine präzisere Vergleichsanalyse wäre es von Vorteil, eine noch größere Anzahl an Proben zu untersuchen, da dies die statistische Signifikanz der Ergebnisse erhöhen würde. Die Bakteriophage Φ X174 konnte erfolgreich für das Labor des ZWA-Hainichen kultiviert werden, um anschließend für Qualitätskontrollen des Standardverfahren (siehe 4.2.2) verwendet zu werden. Die Membranfiltration zur Aufkonzentrierung von Bakteriophagen aus Wasserproben konnte durchgeführt werden. Jedoch konnte diese nicht erfolgreich validiert werden, da die notwendige Anzahl der untersuchten Rohwässer aufgrund von Zeitmangel nicht erreicht wurde und die Wiederfindungsrate für den ZWA-Hainichen zu gering war. Weitere Untersuchungen müssen mithilfe dieser Methode durchgeführt werden, um eine höhere Anzahl an Daten für die Validierung der Aufkonzentrierung zu erhalten. Ebenso müsste auch das Validierungsverfahren für den Referenzstamm 700078 durchgeführt werden. Des Weiteren wäre es eine Möglichkeit, weitere Methoden der Aufkonzentrierung nach DIN EN ISO 10705-3 zu prüfen, um zu vergleichen, ob diese bessere Ergebnisse liefern. Die erste Methode hierfür wäre die Adsorptions- und Elutionsmethode von Bakteriophagen mit der Verwendung eines elektropositiven Filters, der für verschiedene Probentypen und Volumina geeignet ist, einschließlich

Batch- und Inline-Filtration. Sie wird insbesondere für Wassermengen von 10 l bis 100 l empfohlen [Logan et al. 1980]. Die zweite Methode ist eine Flockung mit Magnesiumhydroxid ($Mg(OH)_2$). Sie wird empfohlen, um Coliphagen aus Trinkwasser zu konzentrieren, insbesondere solche, die empfindlich auf einen hohen pH-Wert reagieren. Diese Methode eignet sich für Wasserproben von 100 ml bis 1 l mit einer Trübung von > 2,0 NTU [DIN EN ISO 10705-3:2003]. Methoden wie die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bieten vielversprechende Ansätze für die Detektion von Bakteriophagen in Wasserproben. Diese Technik hat sich bereits in der Identifizierung und Quantifizierung von Phagen bewährt [Bisen et al. 2024]. Trotz dieser Fortschritte müssen Techniken wie die qPCR weiterentwickelt werden, um zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Partikeln unterscheiden zu können, da für die Sicherstellung der Trinkwasserhygiene ausschließlich infektiöse Phagen relevant sind [Lamy et al. 2020].

7 Zusammenfassung

Die EU-Trinkwasserrichtlinie unterstreicht das fundamentale Menschenrecht auf sauberes Trinkwasser und die obligatorische Verpflichtung der Staaten, dieses zu gewährleisten. Ihre Implementierung in nationales Recht ist erforderlich, um die Qualität des Trinkwassers zu garantieren. Die kürzliche Erweiterung der Richtlinie integrierte somatische Coliphagen als bedeutenden Parameter zur Überwachung der Wasserqualität und zur frühzeitigen Identifizierung von Gesundheitsrisiken. Somatische Coliphagen sind Viren, die *E. coli* infizieren und als Indikatoren für fäkale Verunreinigungen und der Verifizierung der Entfernungswirksamkeit der Wasseraufbereitung gegen Viren und Partikel im Größenbereich von Viren dienen. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, das Verfahren zum quantitativen Nachweis von somatischen Coliphagen gemäß DIN EN ISO 10705-2 im Labor des ZWA-Hainichen anzuwenden und die Anwendbarkeit der *E. coli*-Wirtsstämme *E. coli* C und *E. coli* CN durch statistische Tests zu vergleichen. Zusätzlich soll die Kultivierung des Bakteriophagen ϕ X174 für Qualitätskontrollen etabliert und das Verfahren der Membranfiltration zur Aufkonzentrierung von Bakteriophagen gemäß DIN EN ISO 10705-3 validiert werden. Vorerst wurde für das Verfahren die Impfkulturen der zwei Referenzstämme kalibriert. Anschließend wurde für den Vergleich ein Plaque-Assay durchgeführt, bei dem eine Arbeitskultur mit der Probe in Weichagar homogenisiert und auf festem Agar gegossen wurde. Nachfolgend wurden die Plaques, die durch die Lyse

der somatischen Coliphagen entstanden, gezählt und die Ergebnisse ausgewertet. Zur Kultivierung der Bakteriophage ϕ X174 wurde diese mit dem Wirtsstamm 13706 inkubiert. Für die Mittelwertzielkarten wurde eine Zehnerreihe der kultivierten Bakteriophagen mit jedem Stamm durchgeführt und verschiedene Abwässer analysiert, um die Ausschlussgrenzen festzulegen. Zur Aufkonzentrierung von Bakteriophagen in Wasserproben wurde zunächst eine Abwasserprobe als Spikingmaterial vorbereitet und in die zu untersuchenden Wasserproben zu dotiert. Diese Proben wurden anschließend mithilfe einer Membranfiltrationseinheit filtriert, und das daraus gewonnene Konzentrat wurde gemäß dem Standardverfahren analysiert, um die Validierung durchzuführen. Die Kalibrierung der Wirtsstämme wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Bei der Gegenüberstellung der Kalibrierungswerte der beiden *E. coli*-Stämme zeigt die erste Kalibrierung eine prozentuale Abweichung des McF-Wert von 48,44 % für 13706 und 35,74 % für 700078. Für den Parameter der Inkubationszeit liegen diese Werte bei 17,56 % für 13706 und 14,14 % für 700078. Die Unterschiede sind damit zu begründen, dass für die erste Kalibrierung weniger Lactose-positive Kolonien entnommen wurden. Für den Vergleich der beiden Wirtsstämme wurde der Stamm 700078 nach den deskriptiven Statistiken als der Stamm ermittelt, mit dem mehr PFP/ml entstehen, was mit der Antibiotikawirkung der Nalidixinsäure zu erklären ist. Die für den Vergleich verwendeten Ergebnisse wurden als nicht normalverteilt durch Q-Q-Plots bestimmt und der Mann-Whitney-U-Test wurde durchgeführt. Mithilfe dieses Tests wurden die Erkenntnis erlangt, dass sich die verwendeten Werte nicht in ihrer Verteilung unterscheiden und somit beide *E. coli*-Wirtsstämme für das Verfahren der DIN-Norm 10705-2 für alle Wasserproben geeignet sind. Für die kultivierte Bakteriophage Φ X174 wurden die wichtigsten Werte für die Mittelwertzielkarte ermittelt. Dabei beträgt der Mittelwert für die Bakteriophage mit dem Stamm 13706 45,5 PFP/ml und die Ausschlussgrenzen betragen 51 bzw. 41 PFP/ml. Für den Stamm 700078 wurden die Werte 49,2 PFP/ml als Mittelwert und 54 bzw. 44 PFP/ml als Ausschlussgrenzen ermittelt. Die durchgeführten Qualitätskontrollen unter bzw. überschritten diese Grenzen nicht. Für die Validierung der Aufkonzentrierung von Bakteriophagen aus Wasserproben mit der Membranfiltration wurde das Abwasser Au 1.6 (1:2 verdünnt) als Spikematerial verwendet. Es wurde sich für die Validierung zuerst auf den Stamm 13706 fokussiert, da dessen T_2-Wert niedriger war. Anschließend wurden die Experi-

mente für die Aufkonzentrierung durchgeführt, bei denen durch die Experimente mit sterilem Wasser herausgekommen ist, das der nach DIN-Norm vorgeschriebene Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm deutlich geringere Wiederfindungsraten aufweist, als wenn ein Filter mit der Porengröße von 0,45 µm verwendet wird. Aufgrund dessen wurde für alle Aufkonzentrierungen mit Rohwasser nach den Experimenten der Filter mit der größeren Porengröße verwendet. Dabei wurde ermittelt, dass bei einem Volumen von 500 ml die Aufkonzentrierung die größte Wiederfindungsrate mit 44,17 % zeigt. Zudem sind die Validierungswerte nicht nur in ihrer Anzahl unzureichend, sondern auch qualitativ mangelhaft, da eine Probe (Exp. Nr. 9) den NTU-Grenzwert (< 2,0) mit einem Wert von 3,2 überschritt. Allgemein ist für eine Interpretation solcher Ergebnisse eine größere Stichprobengröße zum Vorteil, wodurch mehr Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Für weitere Ergebnisse wäre es nützlich, andere mögliche Methoden der Aufkonzentrierung wie eine Flockung mit ($Mg(OH)_2$) oder die Adsorptions- und Elutionsmethode mit elektropositiven Filter zu überprüfen. Auch andere Methoden, wie die qPCR, die neue vielversprechende Ansätze für die Detektion von Phagen in Wasserproben bieten, sollten in Betracht gezogen werden.

Literaturverzeichnis

Altman, F. P., (1976): *Tetrazolium Salts and Formazans*. Progress in Histochemistry and Cytochemistry. 9 (3), 1-51.

Bertrand, R. L., (2019): *Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division*. Journal of bacteriology. 201(7).

Bisen, M., Kharga, K., Mehta, S., (2024): *Bacteriophages in nature: recent advances in research tools and diverse environmental and biotechnological applications.* Environ Sci Pollut Res. 31, 22199–22242.

Brandis-Heep, A., (2020): *Isolierung und Kultivierung von Bakterien*. Störiko, A. (eds) Methoden der Mikrobiologie. Springer Spektrum. 1-62.

Brié, A., Gantzer, C., Boudaud, N., Bertrand, I., (2018): *The impact of chlorine and heat on the infectivity and physicochemical properties of bacteriophage MS2*. FEMS Microbiology Ecology. 94(8).

Bulut, S., Waites, W. M., Mitchell, J. R., (1999): *Effects of combined shear and thermal forces on destruction of Microbacterium* lacticum. Applied and environmental microbiology. 65(10), 4464-4469.

Buselmaier, W., (2009): *Wachstum einer Bakterienkultur*. Biologie für Mediziner. Springer-Lehrbuch. Springer. 260-264.

Bush, N.G., Diez-Santos, I., Abbott, L.R., Maxwell, A., (2020): *Quinolones Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance*. Molecules. 25, 5662.

Cooper, S. (1991): *Bacterial Growth and Division*. Academic Press. 7-17.

Daloee, T.S., Behbahani, F.K., (2020): *$MgCl_2$ and its applications in organic chemistry and biochemistry: a review*. Mol Divers. 24, 463–476.

Daniel, W.W., Cross, C.L., (2008): *Biostatistics : a foundation for analysis in the health sciences*. Wiley. 10, 48.

DIN EN ISO 10705-2:2001: Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Bakteriophagen – Teil 2: Zählung von somatischen Coliphagen. Deutsche Fassung (ISO-10705-2:2001)

DIN EN ISO 10705-3:2003: Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriophages from water. English version (First edition 2003-10-01)

DIN EN ISO 16140-3:2021-06 Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahrensvalidierung - Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor. Deutsche Fassung (EN ISO 16140-3:2021)

DIN EN ISO 13843:2018-03 Wasserbeschaffenheit - Anforderungen zur Bestimmung von Leistungsmerkmalen von quantitativen mikrobiologischen Verfahren ; Deutsche Fassung (EN ISO 13843:2017)

Eberle, L., Svensson, A., Graser, A., (2017): *Innovative approach for identifying root causes of glass defects in sterile drug product manufacturing*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 104, 162-170.

Eckstein, P., Götze, W., Hartl, F., Rönz, B., Strohe, H.G., (1994): *Lexikon Statistik*. Gabler Verlag Wiesbaden. 1, 294- 299.

Eisenreich, W., Rudel T., Heesemann ., Goebel W., (2019): *How Viral and Tracellular Bacterial Pathogens Reprogram the Metabolism of Host Cells to Allow Their Intracellular Replication*. Frontiers in cellular and infection microbiology. 9, 2235-2988.

Feigenspan, A., (2017): *Osmoregulation*. Prinzipien der Physiologie. Springer Spektrum. 285-319.

Fidalgo de Cortalezzi, M.M., Gallardo, M.V., Yrazu, F., Gentile, G.J., Opezzo, O., Pizarro, R., Poma, H.R., Rajal, V.B., (2014): *Virus removal by iron oxide ceramic membranes.* Journal of Environmental Chemical Engineering. 2(3), 1831-1840.

Finer, J.E., Finer, J.J., (2007): *A simple method for reducing moisture condensation on Petri dish lids*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 91, 299-304.

Hambsch, B., Ho, J., (2023): *Bedeutung der neuen mikrobiologischen Parameter der EU-Trinkwasserrichtlinie für die deutsche Wasserversorgung*. Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V. W 202012.

Heffron, J., McDermid, B., Mayer, B.K., (2019): *Bacteriophage inactivation as a function of ferrous iron oxidation.* Civil and Environmental Engineering Faculty Research and Publications. 7(1).

Herrmann, D., (1984): *Mann-Whitney-Test*. Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik — 30 BASIC-Programme. Anwendung von Mikrocomputern. Vieweg+Teubner. 2, 48-50.

Jofre J., Lucena F., Blanch A.R., Muniesa M., (2016): *Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources*. Water. 8(5), 199.

Kasman, L.M.; Porter LD. (2022): *Bacteriophages*. In StatPearls.StatPearls Puplishing LLC.

Kraume, M., (2020): *Filtration und druckgetriebene Membranverfahren*. Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik 3. Springer Vieweg, 373-425.

Kutter, E., (2009): *Phage Host Range and Efficiency of Plating*. Clokie, M.R., Kropinski, A.M. (eds) Bacteriophages. Methods in Molecular Biology™. 501, 141-149.

Lai, S., Nielsen, B., Andrews, N., Thompson, K.C., (2021): *The impact of two commonly used neutralizing agents in water sampling bottles on legionella and pseudomonas bacteria recovery.* Journal of Hospital Infection. 117, 44-51

Lamy, M.C., Sanseverino, I., Niegowska, M., Lettieri, T., (2020): *Microbiological Parameters under the Drinking Water Directive. Current state of art on somatic coliphages and Clostridium perfringens and spores. EUR 29932 EN*, Publications Office of the European Union, Luxembourg, JRC118219.

Larsen, F., Offersen, S. M., Li, V. R., Deng, L., Nielsen, D. S., Rasmussen, T. S., (2023): *Choice of Ultrafilter Affects Recovery Rate of Bacteriophages.* Viruses. *15*(10), 2051.

Lee, H., Segets, D., Süß, S., Peukert, W., Chen, S., Pui, D.Y.H., (2020): *Effects of filter structure, flow velocity, particle concentration and fouling on the retention efficiency of ultrafiltration for sub-20 nm gold nanoparticles.* Separation and Purification Technology. 241, 116689.

Lee, M.J., Liu, B., Yen, J., Chang, C., (2020): *New microbial origin compound capable of destruct T4 bacterial phage structure.* IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 594.

Logan, K. B., Rees, G. E., Seeley, N. D., Primrose, S. B., (1980): *Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater: Evaluation of positively charged, microporous filters*. Journal of Virological Methods. 1(2), 87-97.

MacFarland, T.W., Yates, J.M., (2016): *Mann–Whitney U Test*. Introduction to Nonparametric Statistics for the Biological Sciences Using R. Springer, Cham. 103-132.

Münsch, B., (2005): *Die Bedeutung der Efflux-assoziierten Mutationen für die Fluorochinolonresistenz bei Escherichia coli*. 85, Ulm, Universität Ulm, Fakultät Medizin, Dissertation.

Nappier, S., (2015): *Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for Ambient Water Quality*. United States Environmental Protection Agency's Office of Water, Office of Science and Technology Health and Ecological Criteria Division.

Sanders, E. R. (2012). *Aseptic laboratory techniques*: *plating methods*. Journal of visualized experiments : JoVE. (63), e3064.

Schröter-Bobsin, U., (2005): *Untersuchungen zur Einsatzmöglichkeit der Dreikantmuschel Dreissena polymorpha als biologischer Filter und Wasserhygienemonitor*. 126, Dresden, Technische Universität Dresden, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Dissertation.

Sleight, S. C., Wigginton, N. S., Lenski, R. E., (2006): *Increased susceptibility to repeated freeze-thaw cycles in Escherichia coli following long-term evolution in a benign environment*. BMC evolutionary biology. *6*, 104.

Sobsey, M. D., Schwab, K.J., Handzel, T. R, (1990): *A Simple Membrane Filter Method to Concentrate and Enumerate Male-Specific RNA Coliphages*. AWWA Research Foundation. 82(9), 52-59.

Sugino, A., Peebles, C. L., Kreuzer, K. N., Cozzarelli, N. R., (1977): *Mechanism of action of nalidixic acid: purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74(11), 4767–4771.

World Health Organization, (2022): *Guidelines for drinking-water quality.* fourth edition incorporating the first and second addenda. 240-247.

Zhao, F., Han, X., Shao, Z., Li, Z., Li, Z., Chen, D., (2022): *Effects of different pore sizes on membrane fouling and their performance in algae harvesting*. Journal of Membrane Science. 641, 119916.

URL-1 (22.08.2024, 12:37 Uhr) Factsheet der Europäischen Kommission: Sauberes Trinkwasser für alle Europäer. URL: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/de/MEMO_18_430

URL-2 (23.08.2024, 13:03 Uhr) Onmeda-Redaktion: Bakteriophagen. URL: https://www.onmeda.de/krankheiten/krankheitserreger/bakteriophagen-id200430/

URL-3 (24.08.2024 20:13 Uhr): Labortechnik: Densitometer DEN-1B. URL: https://www.labortechnik.com/de/densitometer/den-1b/zell-suspensionstruebung

URL-4 (20.08.2024, 23.44 Uhr): Microbe Online: McFarland Densitometer: Parts, Priciple, and Operation. URL: https://microbeonline.com/mcfarland-densitometer-parts-principle-and-operation/

URL-5 (27.07.2024, 12:34 Uhr) Amtsblatt der Europäischen Union: Richtlinie (EU) 2020/2184 des Europäischen Parlaments und des Rates. URL: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX%3A32020L2184

URL-6 (21.07.2024, 12:53 Uhr) IHK Karlsruhe: Die neue EU-Trinkwasserrichtlinie: Umsetzung in nationales Recht bis 12.1.2023. URL: https://www.ihk.de/karlsruhe/fachthemen/umwelt/wasser/wasser-aktuell/die-neue-eu-trinkwasserrichtlinie-umsetzung-in-5297336

URL-7 (21.08.2024, 14:32 Uhr) Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: *Escherichia* phage phiX174 (Sinsheimervirus phiX174). URL: https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-4497

URL-8 (29.07.2024, 22:41 Uhr) Biosan SIA: DEN-1 Densitometer Suspensionstrübungsmelder. URL: https://biosan.lv/media/products/files/den-1-bedienerhandbuch.pdf

URL-9 (29.07.2024, 22:45 Uhr) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: mikrobielles Wachstum. URL: https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/mikrobielles-wachstum/7597

URL-10 (25.07.2024, 13:56 Uhr) Greenlane: Phasen der Bakterienwachstumskurve. URL: https://www.greelane.com/de/wissenschaft-technologie-mathematik/wissenschaft/bacterial-growth-curve-phases-4172692

URL-11 (29.07.2024, 22:51 Uhr) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: Abwasser. URL: https://www.spektrum.de/lexikon/chemie/abwasser/37

URL-12 (29.07.2024, 16:44 Uhr) Bayerisches Landesamt für Umwelt: Spurenstoffe im Wasser. URL: https://www.lfu.bayern.de/buerger/doc/uw_125_spurenstoffe.pdf

URL-13 (28.07.2024, 10:07 Uhr) Faster Capital: Variabilität Messung Variationskoeffizient verstehen. URL: https://fastercapital.com/de/inhalt/Variabilitaet-Messung--Variationskoeffizient-verstehen.html

URL-14 (26.07.2024, 23:01 Uhr): Janedu UG: Variationskoeffizient. URL: https://welt-der-bwl.de/Variationskoeffizient

URL-15 (22.08.2024, 01:38 Uhr): DATAtab e. U.: Test auf Normalverteilung. URL: https://datatab.de/tutorial/test-auf-normalverteilung

URL-16 (22.08.2024, 18:06 Uhr): DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: Supply, storage, propagation and purification of phages. URL: https://www.dsmz.de/fileadmin/user_upload/Collection_allg/DSMZ_Cultivation_of_Phages.pdf

URL-17 (22.08.2024, 23:13 Uhr): Phys.org: Bursting bubbles launch bacteria from water to air. URL: https://phys.org/news/2018-11-bacteria-air.html

URL-18 (24.08.2024, 00:54 Uhr): LEIFIchemie: Dichte im Teilchenmodell. URL: https://www.leifichemie.de/einfuehrung-die-chemie/teilchenmodell/grundwissen/dichte-im-teilchenmodell

Anhang

1. Herstellung von Natriumhydroxid-Lösung

Natriumhydroxid (NaOH, 1 mol/l) wurde hergestellt, indem 3,9997 g NaOH mit einer Feinwaage abgewogen und in einen sterilen 100 ml Maßkolben überführt wurden. Anschließend wurde der Kolben bis zur oberen Markierung mit Aqua dest. aufgefüllt. Diese NaOH-Lösung ist bei (5 ± 3) °C für bis zu einem Monat lagerfähig.

2. Herstellung der Nalidixinsäure-Lösung

Für die Nalidixinsäure-Lösung (25 mg/ml) wurden 250 mg Nalidixinsäure in 2 ml NaOH gelöst und anschließend wurden 8 ml Aqua dest. hinzugefügt. Anschließend durch einen Membranfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm filtrieren oder im Autoklav bei (121 ± 3) °C für 15 min sterilisieren. Bei (5 ± 3) °C nicht länger als 8 h oder bei (-20 ± 3) °C höchstens für 6 Monate lagern.

3. Herstellung von 2,3,5- Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung

Das Kontrastmittel 2,3,5- Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC, 100 mg/l) wurde hergestellt, indem 0,025 g TTC auf einer Feinwaage abgewogen und in 2,5 ml 96 % Ethanol gelöst wurden. Von dieser Lösung wurden 1 ml zu je 100 ml ssMSA-Weichagar vor dem Ansatz der Impfkultur hinzugefügt.

4. Herstellung der Calciumchlorid-Lösung

Für die Calciumchlorid-Lösung ($CaCl_2$, c= 1 mol/l) wurden 14,6 g CaCl2 auf einer Feinwaage abgewogen und in 100 ml Aqua dest. unter vorsichtigem Erhitzen gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und durch einen Membranfilter mit 0,2 µm Porenweite in ein steriles Gefäß steril filtriert. Diese Lösung ist bei (5 ± 3) °C für 6 Monate lagerfähig.

5. Herstellung von Glycerin (steril)

100 ml Glycerin (870 g/l) auf 20 ml Flaschen verteilen und im Autoklav bei (121 ± 3) °C für 15 min sterilisieren. Anschließen im Dunkeln nicht länger als 1 Jahr lagern

6. Herstellung der Pepton-Salzlösung

Benötigte Substanzen (in Form der der Maximal- Wiederbelebungs-Lösung) (siehe Material 3.1) in 1 l heißem Aqua dest. lösen den pH-Wert auf (7,2 ± 0,2) bei (45 ± 3) °C einstellen so dass er nach der Sterilisation (7,2 ± 0,5) beträgt. Anschließend in Teilvolumina von 200 ml in Flaschen aufteilen und im Autoklav bei (121 ± 3) °C für 15 min sterilisieren. Im Dunkeln nicht länger als 6 Monate aufbewahren.

7. Herstellung von MSB

Benötigte Substanzen (s. Material 3.3) in 1 l heißen Aqua dest. lösen. Den pH-Wert auf (7,2 ± 0,2) bei (45 ± 3) °C einstellen, so dass er nach der Sterilisation (7,2 ± 0,5) beträgt. Je 200 ml des Mediums auf Flaschen verteilen und im Autoklaven bei (121 ± 3) °C für 15 min sterilisieren. Im Dunkeln bei (5 ± 3) °C nicht länger als 6 Monate aufbewahren.

8. Herstellung MSA Grundmedium

Benötigte Substanzen (s. Material 3.3) in 1 l kochendem Wasser lösen. Den pH-Wert auf (7,2 ± 0,2) bei (55 ± 3) °C einstellen, so dass er nach der Sterilisation (7,2 ± 0,5) beträgt. Je 200 ml des Mediums auf Flaschen verteilen und im Autoklaven bei (121 ± 3) °C für 15 min sterilisieren. Im Dunkeln bei (5 ± 3) °C nicht länger als 6 Monate aufbewahren.

9. Herstellung von MSA Vollmedium

MSA Grundmedium schmelzen und auf 45 °C bis 50 °C abkühlen. Die Calciumchlorid-Lösung unter aseptischen Bedingungen hinzufügen, gut mischen und in Petrischalen gießen (20 ml in 9-cm Petrischalen, 50 ml in 14-cm- bis 15-cm-Petrischalen). Petrischalen dann im Dunkeln bei (5 ± 3) °C nicht länger als 1 Monat aufbewahren.

10. Herstellung von ssMSA

MSA Grundmedium herstellen nur mit 8 g Agar der Mikrobiologie.

11. Herstellung von SM-Puffer

Für 200 ml Suspension 1,17 g NaCl und 0,39 g $MgCl_2$ einwiegen und diese Reagenzien in 10 ml Tris (1M) auflösen. Anschließend den Kolben bis zur Markierung mit Aqua dest. auffüllen und folgend die Suspension durch einen Membranfilter mit 0,2 µm Porenweite in ein steriles Glasgefäß sterilfiltrieren.

12. Herstellung der Elutionslösung

Für 500 ml Suspension wurden 5 g Fleischextrakt, 14,61 g NaCl in 500 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wurde mithilfe einer kleinen Spritze 15 g Tween 80 zu der Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension bei (5 ± 3) °C gelagert.

Tabelle 1: Kalibrierungswerte der ersten Kalibrierung für den Stamm 13706

Zeit in h	04.04.2024		Zeit in h	16.03.2024		Zeit in h	14.02.2024	
	McF-Wert	KBE x 10^8		McF-Wert	KBE x 10^8		McF-Wert	KBE x 10^8
0,5	0,21	0,127	0,50	0,19	0,141	0,5	0,21	0,119
1	0,4	0,186	1.00	0,46	0,188	1,0	0,40	0,164
1,5	0,91	0,304	1,50	0,96	0,281	1,5	0,83	0,299
2	2,40	0,765	2,00	2,33	0,780	2,0	2,10	0,600
2,17	3,20	1,095	2,42	3,38	1,170	2,5	4,23	1,440

Tabelle 2: Kalibrierungswerte der ersten Kalibrierung für den Stamm 700078

Zeit in h	13.03.2024		04.03.2024		07.02.2024		14.02.2024		
	McF-Wert	KBE x 10^8	McF-Wert	KBE x 10^8	McF-Wert	KBE x 10^8	Zeit in h	McF-Wert	KBE x 10^8
0,5	0,15	0,088	0,16	0,084	0,14	0,084	0,50	0,15	0,092
1	0,32	0,136	0,43	0,145	0,42	0,134	1,00	0,41	0,171
1,5	0,74	0,259	1,10	0,340	1,03	0,291	1,50	0,86	0,320
2	2,09	0,650	2,59	0,800	2,69	0,990	1,83	1,74	0,500
2,5	4,14	1,425	4,78	1,930	4,60	2,170	2,00	2,33	0,670
							2,17	2,99	0,780
							2,33	3,75	1,180

Tabelle 5: Kalibrierungswerte der zweiten Kalibrierung für den Stamm 13706

Zeit in h	11.07.2024		Zeit in h	15.07.2024		Zeit in h	17.07.2024	
	McF-Wert	KBE x 10^8		McF-Wert	KBE x 10^8		McF-Wert	KBE x 10^8
0,5	0,21	0,162	0,5	0,24	0,147	0,5	0,23	0,139
1	0,48	0,246	1	0,47	0,230	1	0,45	0,219
1,5	0,98	0,430	1,5	1,01	0,485	1,5	0,98	0,435
2	2,47	1,090	2	2,55	1,110	2	2,46	1,305
2,5	4,37	2,590	2,5	4,41	2,680	2,5	4,45	2,835

Tabelle 6: Kalibrierungswerte der zweiten Kalibrierung für den Stamm 700078

Zeit in h	24.07.2024		Zeit in h	25.07.2024		Zeit in h	29.07.2024	
	McF-Wert	KBE x 10^8		McF-Wert	KBE x 10^8		McF-Wert	KBE x 10^8
0,5	0,21	0,138	0,5	0,16	0,130	0,5	0,21	0,135
1	0,53	0,234	1	0,39	0,194	1	0,56	0,300
1,5	1,14	0,415	1,5	0,95	0,310	1,5	1,19	0,555
2	2,76	1,045	2	2,45	1,035	2	2,85	1,495
2,5	4,82	2,723	2,5	4,48	2,670	2,5	5,08	4,250

Tabelle 10: Statistische Größen für den Vergleich der beiden Referenzstämme 13706 und 700078

	13706	700078
Mittelwert ($\bar{x}$)	187,79	200,43
Standardabweichung (s)	106,80	111,09
Median	150,5	175,5
Q1 (unteres Quartil)	110	121
Q3 (oberes Quartil)	225	217
IQR	115	96

Tabelle 11: Bestimmung der relativen Zählvarianz (σ_r^2)

Probe	Ergebnis 1 x1	Ergebnis 2 x2	x1 - x2	x1 + x2	rel. Zählvarianz σ_r^2
1	41	43	-2	84	0,001133787
2	46	46	0	92	0
3	34	34	0	68	0
4	47	46	1	93	0,000231241
5	46	47	-1	93	0,000231241
6	36	37	-1	73	0,000375305
7	40	41	-1	81	0,000304832
8	41	40	1	81	0,000304832
9	44	44	0	88	0
10	34	34	0	68	0
11	34	34	0	68	0
12	25	26	-1	51	0,000768935
13	34	33	1	67	0,000445534
14	37	37	0	74	0
15	31	32	-1	63	0,000503905
16	36	36	0	72	0
17	46	42	4	88	0,004132231
18	52	53	-1	105	0,000181406
19	37	36	1	73	0,000375305
20	28	29	-1	57	0,000615574
21	32	32	0	64	0
22	30	30	0	60	0
23	30	39	-9	69	0,034026465
24	37	36	1	73	0,000375305
25	28	29	-1	57	0,000615574
26	33	33	0	66	0
27	43	42	1	85	0,000276817
28	39	42	-3	81	0,002743484
29	36	36	0	72	0
30	29	29	0	58	0
Summe	1106	1118			0,048

Tabelle 12: Stichprobenquantil, Perzentil und theoretisches Quantil des Stammes 13706

Originalwert	Stichprobenquantil (z-Wert)	Perzentil (%)	theoretisches Quantil (z-Wert)
86	-0,95	3,57	-1,80
99	-0,83	10,71	-1,24
109	-0,74	17.86	-0,92
110	-0,73	25.00	-0,67
119	-0,64	32.14	-0,46
126	-0,58	39.29	-0,27
137	-0,48	46.43	-0,09
164	-0,22	53.57	0,09
185	-0,03	60.71	0,27
193	0,05	67.86	0,46
225	0,35	75.00	0,67
273	0,80	82.14	0,92
308	1,13	89.29	1,24
495	2,88	96.43	1,80

Tabelle 13: Stichprobenquantil, Perzentil und theoretisches Quantil des Stammes 700078

Originalwert	Stichprobenquantil (z-Wert)	Perzentil (%)	theoretisches Quantil (z-Wert)
92	-0.98	3,57	-1.80
97	-0.93	10,71	-1.24
119	-0.73	17.86	-0.92
121	-0.71	25.00	-0.67
126	-0.67	32.14	-0.46
148	-0.47	39.29	-0.27
173	-0.25	46.43	-0.09
178	-0.20	53.57	0.09
179	-0.19	60.71	0.27
216	0.14	67.86	0.46
217	0.15	75.00	0.67
297	0.87	82.14	0.92
322	1,09	89.29	1,24
521	2,89	96.43	1,80

Tabelle 18: Bestimmung der Relativen operationalen Varianz (σ_O^2) für den Stamm 13706

Probe	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Replikat 4	Replikat 5	Replikat 6	Replikat 7	Replikat 8	Replikat 9	Replikat 10	Anzahl Replikate	Arithmetisches Mittel $\bar{x}$	Varianz S^2	Relative operationale Varianz $u^2 0$
1	47	43	57	49	67	53	38	53	56	45	10	50,8	68,178	0,007
2	41	45	33	31	39	39	54	47	29	28	10	38,6	72,044	0,022
3	6	4	4	3	4	5	3	1	7	9	10	4,6	5,156	0,026
4	20	21	34	23	29	26	27	21	21	20	10	24,2	21,956	-0,004

Tabelle 19: Bestimmung der Relativen operationalen Varianz (σ_O^2) für den Stamm 700078

Probe	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Replikat 4	Replikat 5	Replikat 6	Replikat 7	Replikat 8	Replikat 9	Replikat 10	Anzahl Replikate	Arithmetisches Mittel $\bar{x}$	Varianz S^2	Relative operationale Varianz $u^2 0$
1	52	51	48	44	53	48	53	48	45	45	10	48,7	11,567	-0,016
2	31	35	41	41	37	36	30	30	35	34	10	35	16	-0,016
3	17	13	22	22	22	16	12	15	21	16	10	17,6	14,933	-0,009
4	7	8	7	6	5	5	5	9	0	6	10	5,8	5,956	0,005

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt haben. Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

25.08.2024, 09648 Mittweida

[redacted]

Philipp von der Heydt