

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM)

Masterarbeit

**Ermittlung von in vitro Wachstumsraten potentiell
pathogener *Vibrio spp.* mittels Durchflusszytometrie**

durchgeführt an
der Biologischen Anstalt Helgoland (BAH) in der Stiftung Alfred-Wegener-Institut
Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung

vorgelegt von

Torben Schierhorn

Betreuender Gutachter: Dr. Gunnar Gerdts

Zweiter Gutachter: Dr. habil. Thorsten Brinkhoff

Oldenburg, Oktober 2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	8
Abstract	9
1. Einleitung	11
1.1 <i>Vibrio spp.</i> als Risikofaktor	11
1.2 Durchflusszytometrie	12
1.3 Ziel der Masterarbeit.....	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Technische Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterial	15
2.1.3 Nährmedien und Lösungen	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Probenentnahme	17
2.2.2 Kultivierung der Bakterien.....	19
2.2.2.1 Anzucht der Bakterien.....	19
2.2.2.2 Identifikation über Chromagar	19
2.2.2.3 Vorbereitende Behandlung.....	19
2.2.3 Photometrie	20

2.2.4	Durchflusszytometrie	21
2.2.4.1	Schematischer Aufbau der Durchflusszytometrie	21
2.2.4.2	Detektion der Bakterien mittels Fluoreszenz.....	22
2.2.4.3	Messung im Durchflusszytometer	23
2.2.5	Sterilfiltration der Wasserproben	25
2.2.6	Versuchsdurchführung	26
2.2.7	Funktionsvorschrift und Kurvenanpassung.....	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Verdünnungsreihen	28
3.2	Vergleich der Wachstumskurven.....	29
3.2.1	Wachstumsverhalten von <i>Vibrio alginolyticus</i>	31
3.2.2	Wachstumsverhalten von <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
3.2.3	Wachstumsverhalten von <i>Vibrio vulnificus</i>	33
3.2.4	Wachstumsverhalten von <i>Vibrio cholerae</i>	34
3.3	Korrelationen	35
3.3.1	Korrelationen von <i>Vibrio alginolyticus</i>	38
3.3.2	Korrelationen von <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	40
3.3.3	Korrelationen von <i>Vibrio vulnificus</i>	42
3.3.4	Korrelationen von <i>Vibrio cholerae</i>	43
3.4	Vergleich der einzelnen Stationen	45
3.4.1	Stationsvergleich <i>Vibrio alginolyticus</i>	45
3.4.2	Stationsvergleich <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	47
3.4.3	Stationsvergleich <i>Vibrio vulnificus</i>	49
3.4.4	Stationsvergleich <i>Vibrio cholerae</i>	51

4. Diskussion	54
4.1 Laborversuche	54
4.1.1 In situ Inkubationstemperatur	54
4.1.2 Herkunft der verwendeten Keime	54
4.1.3 Nukleinsäuregehalt.....	55
4.2 Berechnung der Wachstumskurven	56
4.3 Einfluss der Umweltparameter auf die Keime.....	56
4.3.1 <i>Vibrio alginolyticus</i>	56
4.3.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	58
4.3.3 <i>Vibrio vulnificus</i>	61
4.3.4 <i>Vibrio cholerae</i>	62
5. Fazit	63
6. Ausblick.....	64
Literaturverzeichnis.....	65
Anhang 1: Optische Dichte in MB-Medium	70
Anhang 2: Verdünnungsreihen.....	70
Anhang 3: Berechnete Parameter der Wachstumskurven	76
Anhang 4: Wachstumskurven aller Keime und Standorte.....	80
Anhang 5: Regressionsgeraden aller potentieller Zusammenhänge	85
Anhang 6: Auswertung der Regressionsgeraden	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stationen der Heincke Fahrt 384	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie	21
Abbildung 3: Absorptions- und Emissionsspektrum von Sybr Green I	22
Abbildung 4: Dotplot von SSC gegen FSC	23
Abbildung 5: Dotplot von FL1 gegen SSC	24
Abbildung 6: Dotplot von FL1 gegen FL3	24
Abbildung 7: Histogramme für die Zeit der Messung, FL1 und FSC gegen die gemessene Zellzahl	25
Abbildung 8: Rotator in Inkubationsschrank mit 45 Falcon Tubes	26
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der prozentualen Abweichung in Bezug auf die Zellzahl	30
Abbildung 10: Wachstumskurven von <i>Vibrio alginolyticus</i>	31
Abbildung 11: Wachstumskurven von <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
Abbildung 12: Wachstumskurven von <i>Vibrio vulnificus</i>	33
Abbildung 13: Wachstumskurven von <i>Vibrio cholerae</i>	34
Abbildung 14: Autokorrelation von Salinität und DOC	36
Abbildung 15: Lag-Phase von <i>Vibrio alginolyticus</i> in Abhängigkeit der Salinität	39
Abbildung 16: Lag-Phase von <i>Vibrio alginolyticus</i> in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes	39
Abbildung 17: Verdopplungszeit von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in Abhängigkeit der Salinität	41
Abbildung 18: Verdopplungszeit von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes	42
Abbildung 19: Maximale Zellzahl von <i>Vibrio vulnificus</i> in Abhängigkeit der Salinität	43
Abbildung 20: Lag-Phase von <i>Vibrio cholerae</i> in Abhängigkeit der Salinität	44
Abbildung 21: Lag-Phase von <i>Vibrio cholerae</i> in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes	45
Abbildung 22: SGR von <i>Vibrio alginolyticus</i> im Wasser der dargestellten Stationen	46
Abbildung 23: Lag-Phase von <i>Vibrio alginolyticus</i> im Wasser der dargestellten Stationen	47

Abbildung 24: SGR von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> im Wasser der dargestellten Stationen	48
Abbildung 25: Lag-Phase von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> im Wasser der dargestellten Stationen	49
Abbildung 26: SGR von <i>Vibrio vulnificus</i> im Wasser der dargestellten Stationen	50
Abbildung 27: Lag-Phase von <i>Vibrio vulnificus</i> im Wasser der dargestellten Stationen	51
Abbildung 28: SGR von <i>Vibrio cholerae</i> im Wasser der dargestellten Stationen	52
Abbildung 29: Lag-Phase von <i>Vibrio cholerae</i> im Wasser der dargestellten Stationen	53
Abbildung 30: Wachstumskurven an Station 6	56
Abbildung 31: Wachstumskurven an Station 7	56
Abbildung 32: SGR in Abhängigkeit der Salinität	57
Abbildung 33: SGR in Abhängigkeit der Salinität und des DOC-Gehaltes	59
Abbildung 34: Maximale Zellzahl in Abhängigkeit der Salinität	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Daten der Stationen 1-28	18
Tabelle 2: Exemplarische Darstellung einer Verdünnungsreihe	28
Tabelle 3: Einteilung der Stationen in Gruppen und die jeweilige Inkubationstemperatur	29
Tabelle 4: Positive und inverse Korrelationen	37

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
BD	Becton Dickinson
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	dissolved organic carbon
<i>et al.</i>	und andere
FSC	Forward Scatter
g	Erdbeschleunigung
GF/C	glass fiber cartridges
GTTP	Filtertypbezeichnung (Polycarbonat Filter)
h	Stunde
HNA	high nucleic acid
L	Liter
Lat	latitude (Breitengrad)
LNA	low nucleic acid
Lon	longitude (Längengrad)
m	Meter
MB	Marine broth
Min	Minute
ml	Milliliter

nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC	polychromatic
Psu	practical salinity units
rpm	rotations per minute
SGR	maximum specific growth rate
SSC	Side Scatter
Tab.	Tabelle
UMB	Ultramicrobacteria
v.	<i>vibrio</i>
VZ	Verdopplungszeit
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Krankheiten und Infektionen, die von *Vibrio spp.* ausgelöst werden, stellen vor allem in tropischen Regionen ein erhebliches Risiko dar. Insbesondere der Verzehr roher Meeresfrüchte gilt als Infektionsquelle, aber auch Badegäste können sich unter bestimmten Umständen infizieren. In warmen Sommermonaten der letzten Jahre wurden auch Fälle in den gemäßigten Breiten bekannt. Vor allem die salzärmere Ostsee war davon betroffen. Bisher ist wenig über die Populationsdynamik von Vibrionen bekannt. In der angefertigten Arbeit konnten, mit Hilfe der Durchflusszytometrie, Wachstumsraten der Stämme *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* unter semi-natürlichen Bedingungen bestimmt werden. Hierfür lagen Wasserproben der Nord- und Ostsee sowie aus dem Kattegat und Skagerrak vor. Die in situ Inkubationstemperatur lag zwischen 14,6 und 17,5 °C.

Für jeden Keim und jede Wasserprobe wurden individuelle Wachstumskurven erstellt. Daraus ermittelte Wachstumsparameter sollten in Hinblick auf den Einfluss der Umweltparameter Salinität und DOC geprüft werden. Erwartungsgemäß korrelierte das Wachstum von *Vibrio alginolyticus* positiv mit der Salinität. Die größten Wachstumsraten konnten im Wasser der Nordsee gemessen werden. *Vibrio parahaemolyticus* erreichte zwar die höchsten Zellzahlen im Wasser mit hoher Salinität, nicht aber die größten spezifischen Wachstumsraten. Diese zeichneten sich eher bei moderater Salinität ab, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erlangen. *Vibrio vulnificus* zeigte in allen Wasserproben ähnliche Wachstumsraten und erreichte, entgegen den Erwartungen, die höchsten Zellzahlen im Wasser mit hoher Salinität. Wie die drei anderen Keime, tolerierte auch *Vibrio cholerae* die Bedingungen aller Wasserproben. Signifikante Unterschiede im Wachstum konnten nur in Bezug auf die Lag-Phase festgestellt werden. Diese dauerte länger, je höher der Salzgehalt des Wassers lag.

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Keime in allen Wasserproben deutliches Wachstum zeigten. Die Variabilität des Wachstums ließ sich jedoch nur bedingt mit den Umweltparametern Salinität und DOC erklären, zumal eine Autokorrelation dieser beiden Parameter vorlag. Es ist davon auszugehen, dass ein Zusammenspiel von mehreren Umweltparametern das Wachstum beeinflusst. Da der

Versuch mit Reinkulturen in sterilen Wasserproben durchgeführt wurde, schließt er biotische Umweltfaktoren aus. Daraus ließe sich eine Erklärung für das ungewöhnlich starke Wachstum von *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* bei hoher Salinität ableiten. Die Isolierung dieser Keime in der Umwelt gelingt meist nur bei niedriger Salinität.

Abstract

Infections and diseases caused by *Vibrio spp.* are a severe health risk in tropical regions. The consumption of raw seafood is the main source of infections, but also the contact with contaminated water can be an issue. In hot summer months this problem is also known in Northern Europe where it is used to be colder during the year. Some cases have been reported in low salinity waters like the Baltic Sea. So far, very little is known about the growth potential of *Vibrio spp.* in these regions. Flow cytometry can become a powerful method for studies in this field because it is less time consuming compared to other methods. In this work it supported the ability to determine growth rates of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholera* under semi-natural conditions. Therefore, water samples of the Kattegat, Skagerrak, North Sea and Baltic Sea were incubated at in situ temperature between 14.6 and 17.5°C.

It was calculated a growth curve for every strain and water sample. Furthermore the influence of salinity and DOC on bacterial growth was investigated. Therefore, a correlation between the environmental factors and the growth parameter was tested. As expected, the growth of *Vibrio alginolyticus* had a strong correlation with salinity. The highest growth rates were measured in water samples of the North Sea. Maximum cell numbers of *Vibrio parahaemolyticus* peaked in water samples with high salinity in contrast to the growth rates. The maximum SGR was measured in water samples with moderate salinity but there was no correlation with statistical significance. *Vibrio vulnificus* had similar growth rates in all water samples. Maximum cell numbers peaked in water samples with high salinity. Like the other three strains *Vibrio cholerae* tolerated the conditions of all water samples. Significant differences could only be detected in reference to the lag-phase. It took longer in high salinity waters.

All strains showed distinct growth in every water sample. Partly the variability of the growth can be explained by salinity and DOC, but there was an autocorrelation between these two environmental factors. Probably there are a lot more environmental factors influencing the growth potential of *Vibrio spp.* which were not taken into account. This study was carried out with pure cultures in sterile water samples. This is why biotic factors were excluded. This could be an explanation for the unusually strong growth of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in water samples with high salinity. In the environment these strains are known to be more frequent in regions with lower salinity.

1. Einleitung

1.1 *Vibrio* spp. als Risikofaktor

Arten der Gattung *Vibrio* werden auch als Vibrionen bezeichnet. Dabei handelt es sich um gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien, deren Erscheinungsform als gekrümmtes Stäbchen beschrieben werden kann (Austin, 2010). Sie sind heterotroph und gehören zur Klasse der Gammaproteobacteria.

Krankheiten und Infektionen, die durch pathogene Vibrionen ausgelöst werden, sind in tropischen Regionen bereits ein großes Risiko für die lokale Bevölkerung. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus* können ernsthafte Infektionen auslösen. Die Übertragung erfolgt meist über kontaminiertes Wasser oder den Verzehr infizierter Nahrungsmittel (Thompson et al., 2004). Steigende Wassertemperaturen in höheren Breiten ließen in den letzten Jahren auch ein stärkeres Bewusstsein in Nordeuropa entstehen, denn es besteht Grund zur Annahme, dass sich die entsprechenden Bakterienstämme bei wärmeren Bedingungen deutlich besser und schneller entwickeln (Baker-Austin et al., 2012). Kontaminiertes Wasser in den Küstenregionen oder der Konsum von rohen Meeresfrüchten können entsprechende Vibriosen beim Menschen auslösen. Insbesondere Muschelbestände, die große Mengen an Wasser filtrieren, gelten als Träger der potentiell pathogenen Vibrionen (Drake et al., 2007). Lebensmittelvergiftungen und Wundinfektionen, hervorgerufen durch *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* oder *Vibrio cholerae*, stellen vor allem für ältere und geschwächte Menschen eine große Gefahr für die Gesundheit dar (Collin & Rehnstam-Holm, 2011, Neifer & Frank, 2012).

Bakterien der Gattung *Vibrio* treten meist in Ästuaren, marinen Küstengebieten und Sedimenten auf (Oberbeckmann, 2011). In Folge der aktuellen Klimaveränderungen ist eine veränderte Populationsdynamik von *Vibrio* spp. in der Nordsee zu erwarten. In der salzärmeren Ostsee wurden in den letzten Jahren bereits die ersten Krankheitsfälle registriert (Collin & Rehnstam-Holm, 2011). Um das Gefahrenpotenzial abschätzen zu können, sollen Wachstumsraten ausgewählter Bakterienstämme unter semi-natürlichen Bedingungen mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden. Mit den ermittelten Daten werden anschließend die Parameter Lag-Phase, maximale spezifische Wachstumsrate,

maximale Zellzahl und Verdopplungszeit für unterschiedliche Wasserproben berechnet. Diese Parameter wiederum können in weiteren Arbeiten als Grundlage für Modelle zum Wachstum pathogener Vibrionen dienen.

1.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet eine Methode, möglichst viele Zellen innerhalb kurzer Zeit zu messen. Es ist daher in der diagnostischen Medizin ein seit vielen Jahren etabliertes System, welches mittlerweile auch vermehrt in der aquatischen Mikrobiologie Anwendung findet (Wang et al., 2010, Burzlaff, 2005). Das Prinzip der durchflusszytometrischen Messung beruht darauf, dass Zellen in Suspension einzeln an einem Objektiv vorbeigeführt und von einem fokussierten Lichtstrahl getroffen werden (Gierse, 2007). Die Brechung des Lichts bildet dabei eine individuelle Messung für jede Zelle ab. Da aber auch andere, mikroskopisch kleine Partikel eine Brechung des Lichts verursachen, wird die Erkennung von Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz genutzt. Photomultiplier und -dioden messen die emittierte Lichtmenge (Wang et al., 2010). Mit diesen Detektoren lässt sich die Fluoreszenzintensität markierter Zellen erfassen, während mit Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht morphologische Größen wie die Zellgröße und -granularität gemessen werden (Burzlaff, 2005, Gierse, 2007).

Die durchflusszytometrische Analyse basiert daher auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz der Zellen, die einen Laser-Strahl im rechten Winkel passieren. Zellen mit einer Größe zwischen 0,2 und 20 µm werden, mit einer Geschwindigkeit von 200 bis 2000 Ereignissen pro Sekunde, am Fokus des Laser-Strahls vorbeigeführt (Rothe, 2007). Diese Funktionsweise wird in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Anzahl von Zellen ausgewählter Bakterienstämme in steril filtrierten Wasserproben zu bestimmen. Regelmäßige Messungen über die Zeit bieten anschließend die Möglichkeit, Wachstumsraten der Reinkulturen aus den ermittelten Ergebnissen zu berechnen.

1.3 Ziel der Masterarbeit

Forschungsziel ist der Vergleich von Wachstumsraten der vier Keime *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* im Wasser unterschiedlicher Herkunft. Es ist bekannt, dass eine höhere Temperatur das Wachstum von Vibrionen begünstigt (Kim et al., 2012, Oberbeckmann et al., 2011,

Randa et al., 2004). Caburlotto et al. sprachen in ihren Untersuchungen, in Küstengewässern der Adria, gleichermaßen Temperatur und Salinität den größten Einfluss auf die Variabilität von *Vibrio* Populationen zu. Auf Grund einer Inkubation der Wasserproben bei in situ Temperatur kann untersucht werden, welchen Einfluss Umweltparameter wie Salinität und DOC-Gehalt haben.

In der Nordsee treten vor allem *Vibrio parahaemolyticus* und der verwandte *Vibrio alginolyticus* in den Sommermonaten mit hohen Abundanzen auf (Oberbeckmann et al., 2011). *Vibrio alginolyticus* zeigt besonders in Gebieten mit hoher und mittlerer Salinität ein vermehrtes Vorkommen (Böer et al., 2013). *Vibrio parahaemolyticus* wird am häufigsten bei moderater Salinität gefunden, tritt aber auch bei hoher und niedriger Salinität auf (Böer et al., 2013, Martinez-Urtaza et al., 2011).

Das Vorkommen von *Vibrio vulnificus* ist in erster Linie positiv mit der Temperatur korreliert. Das optimale Wachstum wird jedoch auch mit niedriger Salinität in Verbindung gebracht (Randa et al., 2004). Es wurden in den letzten Jahren beispielsweise vermehrt Wundinfektionen mit *Vibrio vulnificus* in der Ostsee festgestellt (Frank et al., 2006, Ruppert et al., 2004). Auch Infektionen mit *Vibrio cholerae* konnten auf den Kontakt mit Wasser aus der Ostsee zurückgeführt werden (Lukinmaa et al., 2006).

Folgende Hypothesen gilt es demnach zu untersuchen: Wachstumsraten von *Vibrio alginolyticus* sind positiv mit der Salinität korreliert. *Vibrio parahaemolyticus* verzeichnet ein optimales Wachstum bei mittlerem Salzgehalt. Wachstumsraten von *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* sind invers mit der Salinität korreliert. Niedrige DOC-Werte limitieren das Wachstum der genannten Keime.

2. Material und Methoden:

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Gerät/Material	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	VX 75	Systemec
Autoklav	VX 150	Systemec
Bechergläser	verschiedene Größen	Duran
Bottletop Filteraufsatz	500 ml, 250 ml	Nalgene
Durchflusszytometer	Accuri™ C6	Becton, Dickinson & Co
Elektronische Waage	BP 2100 S	Sartorius AG
Feinwaage	LE 225 D	Sartorius AG
Gefrierschrank	Öko_Arctis	AEG
Inkubationsrotator	SP 3 rotator	Stuart
Inkubationsschrank	Incubator	Sanyo
Kühlschrank	Öko_Santo Super	AEG
Laborspülmaschine	professional G7883	Miele
Magnetrührer	Electronicrührer Multipoint HP 15	Variomag
Messkolben	1000 ml	Brand GmbH & Co KG
Messzylinder	verschiedene Größen	Brand GmbH & Co KG
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Pipetten	20 µl - 10 ml	Gilson
Reinstwasseranlage	Milli-Q	Millipore
Schott-Flaschen	100 ml, 250 ml, 1L	Duran
Sterilbank	Mars Safety Class 2	Scanlaf

Stickstofftank	MVP 815P – 190AF-GB-BB	German cryo GmbH
Vortex	Genius 3	IKA
Wasserbad		Köttermann
Zentrifuge	Sorvall® RC 26 Plus	DuPont
Zentrifugenröhrchen		Nalgene
Zentrifugenrotor	Sorvall® SS 34	DuPont

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Bezeichnung	Hersteller
Autoklavierband	3m Comply™ Indicator tape	Steam
Einmalhandschuhe	Nitril	Roth
Einmalhandschuhe	Latex	Roth
Falcon Tubes	15 ml	Sarstedt AG
Falcon Tubes	5 ml polysterene	Becton, Dickinson & Co
Filter	Isopore Membran Filter 0,2 µm	Merck Millipore
Filter Glasfaser	G/FC 1,7 µm	Whatman
Impfösen	sterile	Greiner Bio-One International AG
Küvetten	Einmalküvette 1,5 ml	Brand GmbH & Co KG
Pasteurpipetten aus Glas		Brand GmbH & Co KG
PCR-tubes	0,5 ml farblos	Biozym
Plastikpipettenspitzen	200 µl, 1 ml, 10 ml	Sarstedt AG
Reagiergefäße	1,5 ml	Sarstedt AG

2.1.3 Nährmedien und Lösungen

Nährmedium/Lösung	Hersteller/Inhaltsstoffe
Chrom-Agar	CHROMagar™
Cleaning Solution	Accuri Cytometers Inc.
Decontamination Fluid	Accuri Cytometers Inc.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Flow Cell Clean	Accuri Cytometers Inc.
Formaldehyd-Lösung (37,5%)	Sigma
MB-Medium 2216E	Pepton 5g/L Hefe-Extrakt 1g/L FePO ₄ x H ₂ O 10mg/L Gealtertes Seewasser 500 ml/L Aqua dest. 500 ml/L ph-Wert 7,6 autoklaviert
50%Seewasser	
PC-Beads	Polysciences Inc.
Phosphat gepufferte	Natriumhydrogenphosphat 11,36g/L
Salzlösung (PBS)(10x)	Kaliumdihydrogenphosphat 2,72g/L Natriumchlorid (NaCl) 87 g/L ph-Wert 7,6
Sybr®Green I nucleic acid gel stain	Invitrogen

2.2 Methoden

2.2.1 Probenentnahme

Zur Bestimmung der Wachstumsraten potentiell pathogener Vibrionen bei unterschiedlichen Umweltbedingungen lagen Wasserproben der Ausfahrt 384 des Forschungsschiffes „Heincke“ (06.07 – 19.07.2012) von 28 verschiedenen Stationen vor. Die Stationen der Probenentnahme erstrecken sich von den ost- und nordfriesischen Inseln über Skagerrak und Kattegat bis in die Ostsee und Kieler Bucht (Abb. 1).

Aus zeitlichen Gründen war es für die vorliegende Arbeit nicht möglich, alle Stationen zu bearbeiten. Es wurde eine Auswahl von 18 Stationen getroffen, die in Abbildung 1 rot eingefärbt zu sehen sind.

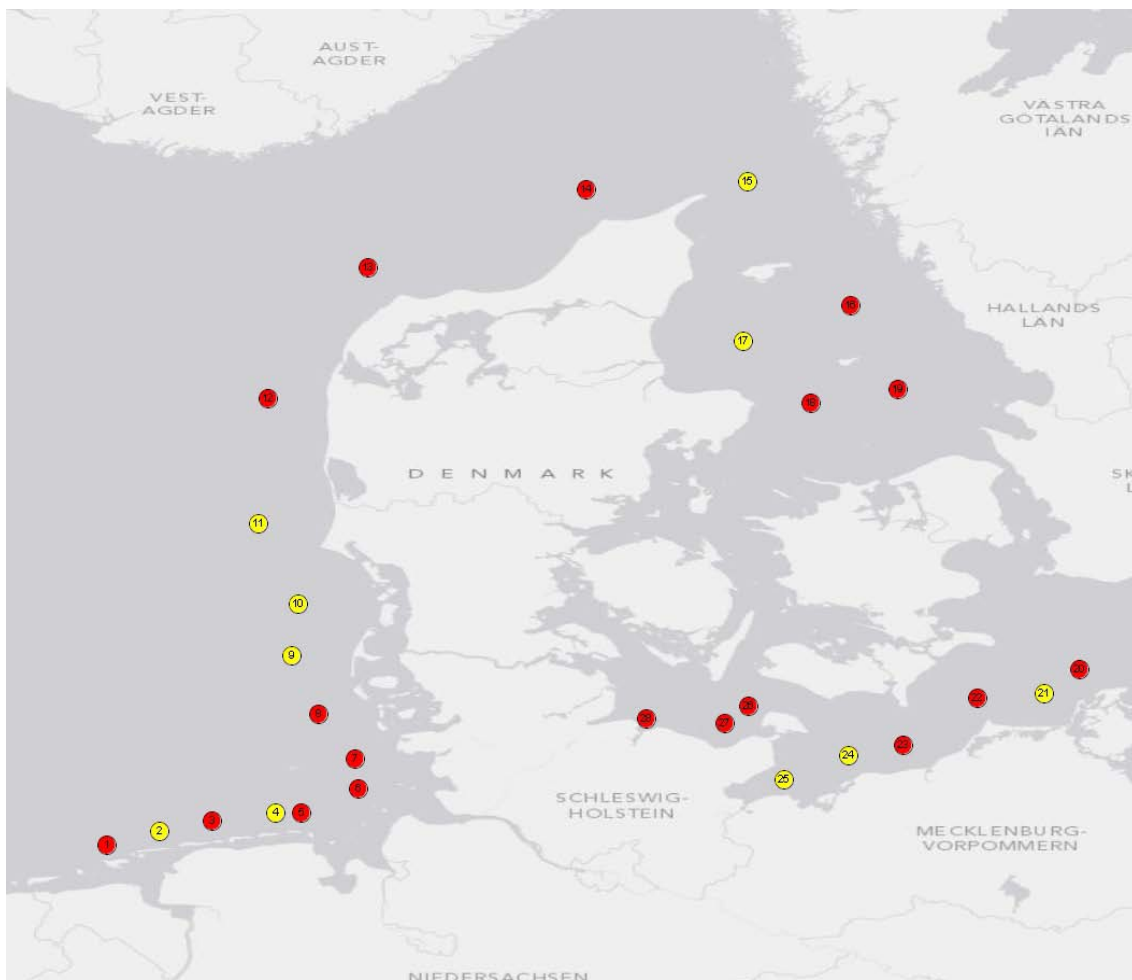


Abbildung 1: Darstellung der Stationen der Heincke Fahrt 384; bearbeitete Wasserproben in rot eingefärbt (Karte erstellt in GIS)

Für alle Stationen wurden mit Hilfe einer CTD die entsprechenden Daten zu Temperatur und Salinität des Wassers aufgenommen. Die verwendeten DOC-Werte (dissolved organic carbon) wurden mit freundlicher Unterstützung von Matthias Friebe (Universität Oldenburg) zur Verfügung gestellt (Tab. 1).

Tabelle 1: Daten der Stationen 1-28 (grau hinterlegte Stationen nicht bearbeitet)

Station	Datum	Zeit	PositionLat	PositionLon	Tiefe [m]	Temp. [°C]	Salinität [psu]	DOC [µmol/L]
HE384/001	06.07.12	06:40	53° 42,63' N	6° 39,52' E	10,6	17,530	31,945	170,48
HE384/002	06.07.12	13:35	53° 47,80' N	7° 0,25' E	16,2	16,828	32,052	144,96
HE384/003	07.07.12	06:33	53° 51,38' N	7° 21,41' E	18,6	16,124	32,042	144,06
HE384/004	07.07.12	13:37	53° 54,28' N	7° 46,50' E	21,2	15,246	31,057	119,74
HE384/005	08.07.12	06:30	53° 54,61' N	7° 56,91' E	16,4	15,677	32,38	121,04
HE384/006	08.07.12	13:38	54° 3,48' N	8° 19,88' E	13,3	17,828	29,901	158,37
HE384/007	09.07.12	06:32	54° 14,56' N	8° 18,59' E	11,4	17,687	29,748	175,38
HE384/008	10.07.12	06:30	54° 31,32' N	8° 3,75' E	14,3	16,989	30,296	168,78
HE384/009	10.07.12	13:28	54° 53,12' N	7° 52,98' E	15,3	15,984	31,339	139,15
HE384/010	11.07.12	06:33	55° 12,63' N	7° 55,86' E	17,9	15,956	31,465	130,75
HE384/011	11.07.12	13:33	55° 42,43' N	7° 39,96' E	12,5	16,228	32,645	123,94
HE384/012	12.07.12	07:20	56° 29,18' N	7° 43,78' E	26,4	15,137	33,224	119,34
HE384/013	12.07.12	14:10	57° 18,02' N	8° 23,34' E	31,4	14,175	34,046	98,12
HE384/014	13.07.12	06:34	57° 46,95' N	9° 50,44' E	35,4	14,494	33,703	92,61
HE384/015	13.07.12	13:34	57° 50,18' N	10° 54,66' E	65,6	16,126	32,558	150,56
HE384/016	14.07.12	06:32	57° 3,91' N	11° 36,01' E	17,6	16,323	21,266	212,22
HE384/017	14.07.12	13:29	56° 50,69' N	10° 53,18' E	9,1	12,246	25,715	178,19
HE384/018	15.07.12	06:33	56° 27,23' N	11° 19,88' E	14,8	16,875	16,577	242,64
HE384/019	15.07.12	13:32	56° 32,45' N	11° 54,74' E	28,3	16,713	16,855	239,64
HE384/020	16.07.12	06:32	54° 47,94' N	13° 6,94' E	32,3	15,528	7,874	324,61
HE384/021	16.07.12	10:07	54° 38,99' N	12° 52,82' E	10,8	14,695	7,987	320,31
HE384/022	16.07.12	13:53	54° 37,23' N	12° 26,26' E	12,6	16,028	9,778	311,50
HE384/023	17.07.12	06:32	54° 19,90' N	11° 57,03' E	14,8	15,806	9,16	312,30
HE384/024	17.07.12	13:37	54° 16,02' N	11° 34,96' E	21,2	16,482	10,342	303,09
HE384/025	18.07.12	06:37	54° 6,86' N	11° 9,14' E	19,3	16,497	11,595	297,49
HE384/026	18.07.12	13:33	54° 34,39' N	10° 55,20' E	11,2	16,219	15,18	274,20
HE384/027	19.07.12	06:37	54° 27,99' N	10° 45,83' E	11,2	16,553	14,414	278,40
HE384/028	19.07.12	10:45	54° 29,60' N	10° 14,29' E	9,5	15,975	15,231	268,60

2.2.2 Kultivierung der Bakterien

2.2.2.1 Anzucht der Bakterien

Die Wasserproben sollten, zur Ermittlung der Wachstumsraten, mit geringen Zellzahlen (10^2 Zellen pro ml) der Vibrionen inokuliert werden. Hierfür wuchsen die Bakterien im Marine Broth (MB) Medium (2216E 50% Seewasser) bis zur stationären Phase. Mit einer 1:10 Verdünnungsreihe und anschließender Messung im Durchflusszytometer konnte das Volumen des späteren Inoculats bestimmt werden, um auf die entsprechende Zellzahl von 10^2 pro ml zu gelangen.

Die Keime *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* wurden in MB-Medium in sterilen 15 ml Falcon Tubes bei 37°C herangezogen. Die Stämme wurden jeweils aus Zooplankton des Kattegats isoliert, mit der Ausnahme von *Vibrio vulnificus*, welcher aus Phytoplankton des Kattegats stammte. Alle Stämme wurden mittels *rpoB* Sequenzanalyse bestimmt. Zur Lagerung der Bakterien wurde eine Microbank™ angelegt. Bei dieser Methode lagern sich Bakterien in Suspension an chemisch behandelten Beads an. Die anschließende Aufbewahrung erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -190 °C.

Für die Kultivierung der Vibrionen wurde jeweils ein Zellpellet in Nährmedium überführt. In regelmäßigen Abständen (ca. 1 Woche) wurden 20 µl der angesetzten Kultur erneut in frischem MB-Medium inokuliert.

2.2.2.2 Identifikation über Chromagar

Um gewährleisten zu können, dass es sich bei den vorliegenden Vibrionen um die richtigen Stämme handelt, wurde ergänzend eine optische Prüfung durch Ausstreichen auf CHROMagar™ durchgeführt. Es erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Die typische, farbliche Erscheinungsform unterscheidet dabei zwischen *Vibrio parahaemolyticus* (lila), *Vibrio vulnificus/Vibrio cholerae* (grünblau bis türkis) und *Vibrio alginolyticus* (farblos).

2.2.2.3 Vorbereitende Behandlung

Für die spätere Versuchsdurchführung (siehe 2.2.6) wurden jeweils 50 µl der Bakteriensuspension aus den 15 ml Falcon Tubes in autoklavierte 100 ml Schott-

Flaschen mit 80 ml MB-Medium pipettiert. Es folgte eine Inkubation mit Magnetrührer bei ca. 200 rpm für 24 Stunden bei 37°C. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte in einem Eppendorf® BioPhotometer® gemessen bis das Wachstum die stationäre Phase erreichte (siehe 2.2.3 Photometrie).

Das anschließende Abzentrifugieren erfolgte bei ca. 10000 g (9300 rpm) für fünf Minuten im Sorvall® RC 26 Plus. Als Rotor wurde der Sorvall SS-34 verwendet. Um die Verschleppung von Nährstoffen zu vermeiden, sollte das entstandene Pellet anschließend in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen werden. Die überstehende Flüssigkeit wurde daher verworfen und das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen, mit Hilfe des IKA® Vortex Genius 3 in Suspension gebracht und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wiederholte sich dreimal, ehe das Pellet abschließend wieder in 10 ml PBS aufgenommen wurde.

In sterilen 15 ml Falcon Tubes erfolgte daraufhin eine 1:10 Verdünnungsreihe (10^0 bis 10^{-5}) mit PBS. Hierbei wurden jeweils zu 9 ml PBS, 1 ml der größeren Verdünnungsstufe gegeben und mit dem IKA® Vortex Genius 3 homogenisiert. Aus jeder Verdünnungsstufe wurde jeweils ein Aliquot für die Messung im BD Accuri™ C6 Flow Cytometer entnommen.

2.2.3 Photometrie

Zur Bestimmung der Wachstumskurven in Nährmedium wurden photometrische Messungen durchgeführt. Diese erfolgten im Eppendorf® BioPhotometer® bei einer Wellenlänge von 600 nm. Zur Bestimmung des Nullwertes wurde zunächst 1ml MB-Medium gemessen, bevor ein Aliquot von 1 ml der Stämme *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* aus den Versuchsansätzen der 100 ml Schott-Flaschen gemessen wurde. Die Messung wurde einmalig alle 2 Stunden durchgeführt, um feststellen zu können, wann die stationäre Phase erreicht ist. In den weiteren Versuchsansätzen wurde dann nur noch nach 24 Stunden mit der optischen Dichte überprüft, ob die stationäre Phase erreicht worden ist.

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Schematischer Aufbau der Durchflusszytometrie

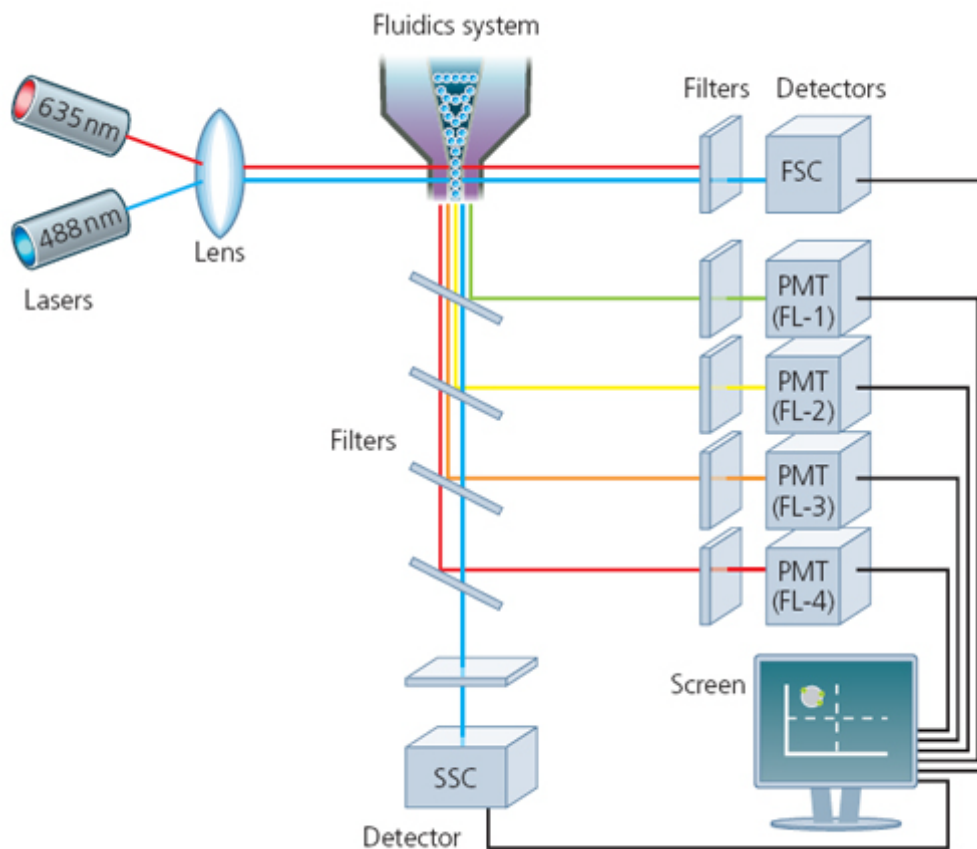


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie (Quelle: <http://www.abdserotec.com/resources/flow-cytometry-ebook/principles-of-the-flow-cytometer/signal-processing.html>)

Das BD Accuri™ C6 Flow Cytometer besitzt einen blauen (488 nm) und einen roten (640 nm) Laser mit den beiden Scatter Detektoren FSC (Forward Scatter) und SSC (Side Scatter) sowie vier Fluoreszenz Detektoren. Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung eines Durchflusszytometers, welches die Funktionsweise des BD Accuri™ C6 sehr gut abbilden kann. Lediglich der rote Laser (635 nm) unterscheidet sich in der schematischen Darstellung leicht.

Durch einen Hüllstrom fokussiert, werden Zellen einer Suspension einzeln an der Lichtquelle vorbeigeführt. Der Forward Scatter (FSC) misst die Beugung des Lichts im flachen Winkel und bildet das Volumen der Zelle ab, während der Side Scatter (SSC)

die Brechung des Lichts im rechten Winkel misst, welche von der Zellstruktur abhängt. Gleichzeitig werden mit dem gestreuten Licht die Fluoreszenzfarben gemessen. Die Detektoren FL1 (530 nm), FL2 (585 nm) und FL3 (>675 nm) erkennen Fluoreszenz, die durch den blauen Laser angeregt wurde, während FL4 (675 nm) Emissionen erkennt, die vom roten Laser angeregt wurden (Abb. 2).

2.2.4.2 Detektion der Bakterien mittels Fluoreszenz

Um die Fluoreszenzdetektion zu unterstützen, wurde der DNA-Farbstoff Sybr Green I genutzt. Sybr Green I ist ein Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wird im blauen Lichtspektrum bei einer Wellenlänge von 497 nm maximal angeregt und hat zwei weitere, aber deutlich schwächere Peaks im UV-Bereich bei ca. 290 nm und 380 nm (Abb. 3). Das Maximum der Emission liegt bei 520 nm und damit im grünen Lichtspektrum (Molecular Probes, Inc. , 2006).

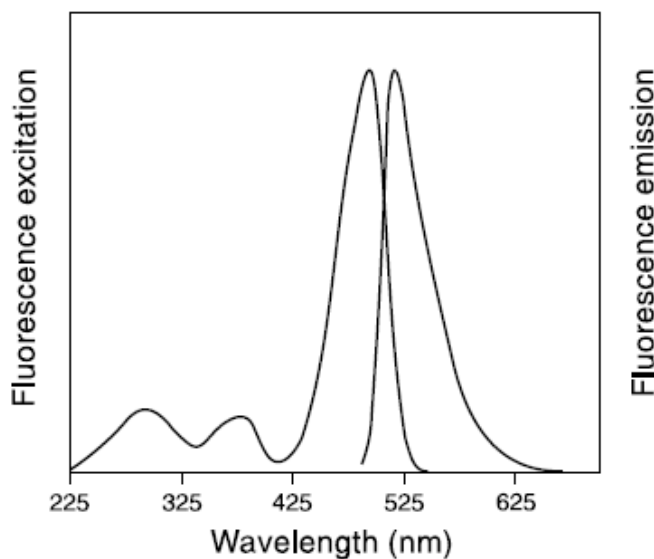


Abbildung 3:
Absorptions- und
Emissionspektrum
von Sybr Green I in
Anwesenheit von
DNA. (Quelle:
Molecular Probes,
Inc.)

Die Stocklösung (1 ml) wurde in Aliquots von 10 µl eingefroren. Für die Arbeitslösung wurden zu diesen 10 µl der Stocklösung 240 µl steril filtriertes DMSO gegeben (Verdünnung 1:25). DMSO ist ein organisches Lösungsmittel, welches leicht in Zellmembran eindringt und daher gut als Träger für Sybr Green I geeignet ist. Ungebunden gibt der Farbstoff fast keine Fluoreszenz ab, bindet der Farbstoff allerdings an DNA, wird die Fluoreszenz um ein vielfaches verstärkt.

2.2.4.3 Messung im Durchflusszytometer

Für eine Messung im Durchflusszytometer wurden jeweils Aliquots aus den 15 ml Falcon Tubes entnommen. Das Aliquot betrug 480 µl und wurde in 5 ml polystyrene BD Falcon Tubes unter Zugabe von 20 µl 0.2 µm filtriertem Formaldehyd (37,5 %) für eine Stunde fixiert, sodass die Endkonzentration des Formaldehyds bei 1,5 % lag. Anschließend wurden 10 µl PC-Beads sowie 10 µl Sybr Green I hinzugegeben. Beads besitzen einen definierten Durchmesser sowie eine definierte Anzahl pro Mikroliter und werden zur Quantifizierung der Zellen genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden PC-Beads mit einem Durchmesser von 1 µm und einer Anzahl von ca. 50 pro µl verwendet. Die Probe ruhte zum Anfärben zehn Minuten, bevor die Messung erfolgte.

Die Probe wurde für 90 Sekunden auf der Einstellung „slow“ gemessen, was einer Durchflussrate von 14 µl/min entspricht. Die Öffnung der Messküvette war hierbei auf 10 µm eingestellt. Insgesamt wurden dadurch immer 20 µl einer Probe gemessen. Der „Threshold“ wurde auf den Detektor FL1 bei 550 angesetzt, da sich dieser Wert in mehreren Versuchen als beste Lösung herausstellte. Als Threshold wird der niedrigste Signalwert bezeichnet, den das Zytometer aufnimmt. Mit Hilfe der Software CFlow®Plus konnten gemessene Ereignisse als Punktwolken (auch Dotplots genannt) und Histogramme dargestellt werden.

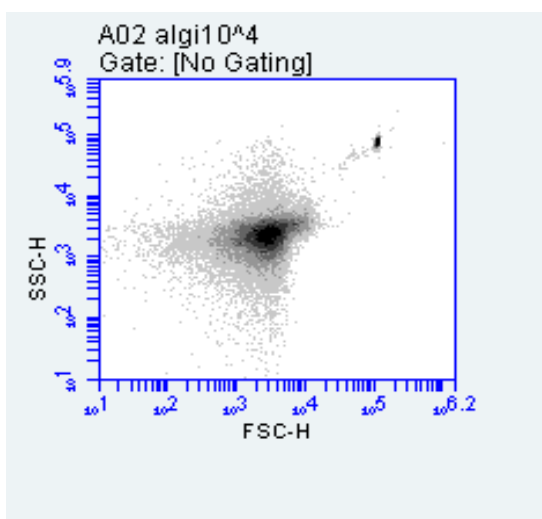


Abbildung 4: Dotplot von SSC gegen FSC

Der erste Dotplot (Abb. 4) bildet alle gemessenen Ereignisse von Forward Scatter und Side Scatter gegeneinander ab. Die Häufigkeit der Ereignisse wird optisch in verschiedenen Graustufen bis hin zu schwarz dargestellt. So ist in diesem Beispiel ein dunkler Bereich in der Mitte zu sehen, um den es eine Streuung von abnehmenden Ereignissen gibt. Oben rechts konzentrieren sich Ereignisse in einem sehr engen Bereich, welche die hinzugegebenen PC-Beads widerspiegeln.

Der zweite Dotplot (Abb. 5) bildet die gemessenen Ereignisse des Detektors FL1 und des Side Scatters gegeneinander ab. FL1 detektiert bei einer Wellenlänge von 530 nm Zellen, die mit Sybr Green I angefärbt wurden. Der Side Scatter liefert bei kleinen Partikeln (<1µm) bessere Ergebnisse als der Forward Scatter (BD Biosciences, 2012). In diesem Dotplot wurde das „Gate“ P1 gesetzt, welches sich innerhalb der gestrichelten roten Linie befindet. Gates beschreiben Regionen, die zur

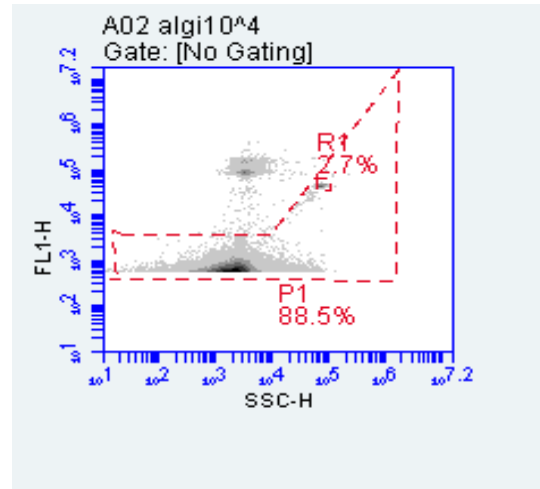


Abbildung 5: Dotplot von FL1 gegen SSC

Auswahl von Zellen in einer weiteren Darstellung dienen (Rothe, 2007). P1 zeigt Ereignisse, die beim Zählen der Zellen nicht berücksichtigt werden sollen. Darin enthalten sind auch die PC-Beads, welche in R1 dargestellt sind. Da in den Einstellungen der „Threshold“ für den Detektor FL1 auf 550 gesetzt wurde, erscheinen im unteren Bereich keine Ereignisse. Dies zeigt sich in einer imaginären Linie, die etwas oberhalb von der gestrichelten, roten Linie liegt. Die gesuchte Population ist als kleine graue Wolke im oberen, zentralen Bereich dieses Plots zu sehen.

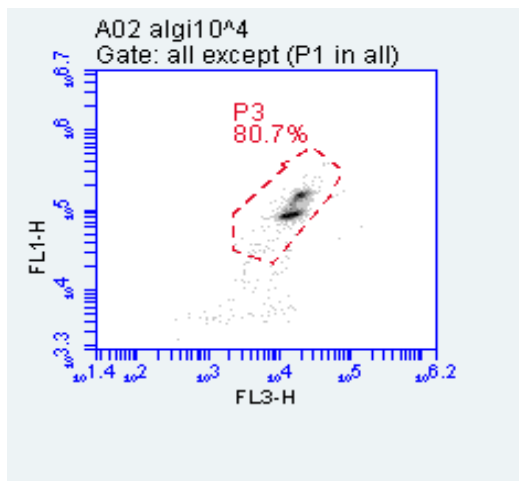


Abbildung 6: Dotplot von FL1 gegen FL3

Noch deutlicher zu erkennen ist sie im dritten Dotplot (Abb. 6). Hier werden die gemessenen Ereignisse mit den Detektoren FL3 und FL1 gegeneinander aufgetragen, um weitere Partikel, die nicht zur Population gehören, auszuschließen. Aus dem vorherigen Dotplot werden alle Ereignisse dargestellt, außer denen in P1. Mit dem Gate P3 wird die Population genauer eingegrenzt.

Alle Zellen die in P3 gezählt wurden, gelten daher als Zellzahl des entsprechenden Keimes in 20 µl der Probe. Die beiden dunkleren Bereiche, die sich innerhalb der Population etwas voneinander abgrenzen, sind auf Bakterien mit niedrigem (LNA) und hohem (HNA) Gehalt an Nukleinsäuren zurückzuführen (siehe 4.1.3).

Diese Tatsache spiegelt sich auch in einem der drei Histogramme wider (Abb. 7). Im mittleren Histogramm für den Detektor FL1 sind zwei Peaks für die Messung zu erkennen.

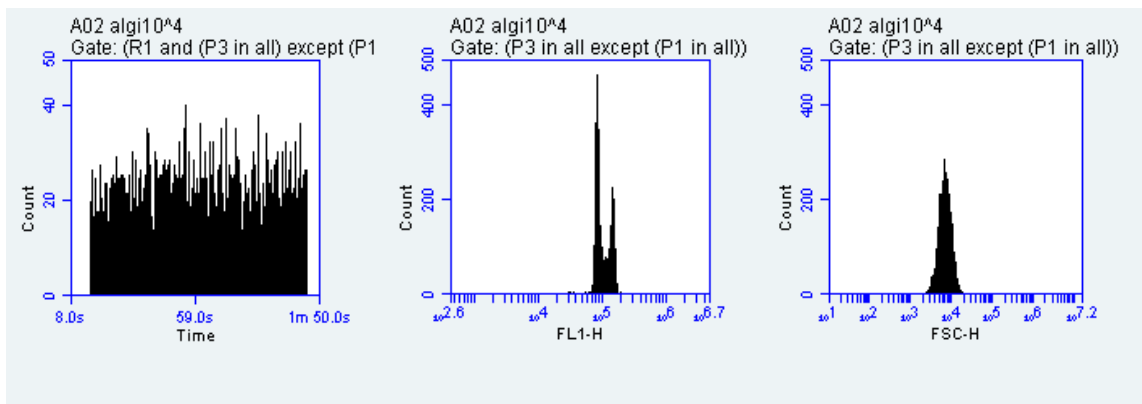


Abbildung 7: Histogramme für die Zeit der Messung, FL1 und FSC gegen die gemessene Zellzahl

Der größere Peak, der sich etwas weiter links auf der X-Achse befindet stellt LNA-Bakterien dar, während der zweite Peak HNA-Bakterien abbildet. Die homogene Verteilung im Histogramm des Forward Scatter spiegelt das Vorhandensein einer Reinkultur wider.

Für die Messung ist außerdem von Bedeutung, dass der Zählung im Durchflusszytometer eine gewisse Regelmäßigkeit zu Grunde liegt. Unregelmäßigkeiten (z.B. durch Verstopfung der Nadel) könnten die Messergebnisse beeinträchtigen. Aus diesem Grund sind im ersten Histogramm die „Counts“ gegen die Zeit aufgetragen. Dadurch konnte für den Fall von Unregelmäßigkeiten schon während oder direkt nach einer Messung entschieden werden, ob diese wiederholt werden muss.

2.2.5 Sterilfiltration der Wasserproben

Die 18 genutzten Wasserproben von der Heincke-Fahrt 384 wurden bereits direkt nach der Probenentnahme über 0,2 µm GTTP-Filter vorfiltriert und nach Beendigung der Fahrt bei -80°C gelagert. Für die vorliegende Arbeit erfolgte nach dem Auftauen der Wasserproben eine erneute Filtration über 0,2 µm GTTP-Filter in autoklavierte 1L Schott-Flaschen. Um eine Kontamination von außen zu vermeiden, wurden alle Materialien (Bottle Top mit Filter sowie die Flasche), die mit dem Wasser in Berührung

kamen, autoklaviert. Das Auf- und Absetzen der Bottle Tops erfolgte unter der sterilen Arbeitsbank.

Zur Gewährleistung der Sterilität der Proben wurde eine Methode von Vital et al. angewendet, bei der zunächst pasteurisiert (60 Grad Celsius für 30 Minuten) und anschließend über 0,2 µm filtriert wird (Vital et al., 2010). Das Pasteurisieren erfolgte mit Hilfe eines Wasserbades, das auf 60°C erhitzt wurde. Ein Ansatz mit einem Liter destilliertem Wasser in einer 1L Schott-Flasche zeigte, dass es ca. 25 Minuten dauert, bis die Temperatur von 60 °C im Inneren der Flasche erreicht ist. Eine Wasserprobe wurde daher nach der Filtration über 0,2 µm für 55 Minuten ins Wasserbad gestellt und anschließend erneut über 0,2 µm filtriert.

2.2.6 Versuchsdurchführung



Abbildung 8: Rotator in Inkubationsschrank mit 45 Falcon Tubes

In jeweils 15 sterile Falcon Tubes mit 15 ml Fassungsvermögen wurden 10 ml pasteurisiertes Wasser einer Station pipettiert. Die Inoculate waren *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae*, jeweils mit drei Replikaten. Außerdem lief für jede Wasserprobe ein Blindwert mit, ebenfalls als Triplikat. Die Wasserproben sollten mit 10^2 Zellen pro ml inokuliert werden, was gleichbedeutend mit 10^3 Zellen pro 10 ml Wasserprobe ist. Die Berechnung hierfür erfolgte mit den Ergebnissen der Messung der Verdünnungsreihen im Durchflusszytometer. Die berechnete Menge

wurde aus der 10^{-5} Verdünnung entnommen und in die Wasserproben pipettiert. Pro Versuchsdurchlauf konnten jeweils drei Wasserproben gleichzeitig beimpft werden, sodass inklusive Blindwerte ein Probevolumen von 45 Falcon Tubes erreicht wurde. Für die gesamten 18 Wasserproben waren daher sechs Versuchsdurchläufe nötig. Die jeweils 45 Proben wurden bei in situ Temperatur im Sanyo Incubator mit Hilfe des

Stuart rotator SB 3 inkubiert, um eine stetige Durchmischung und gleichbleibende Temperatur zu gewährleisten (Abb. 8). In regelmäßigen Abständen (ein- bis zweimal pro Tag) wurden Proben für die Messung im Durchflusszytometer genommen, um die Wachstumsraten dokumentieren zu können.

2.2.7 Funktionsvorschrift und Kurvenanpassung

Die gemessenen Zellzahlen pro 20 µl wurden mit dem Faktor 50 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Diese wiederum wurden zur Basis 10 logarithmiert, um die logarithmische Wachstumsphase übersichtlich darstellen zu können und die statistische Auswertung zu erleichtern. Zur Berechnung und Auswertung der Wachstumskurven wurde das Programm GraphPad Prism 6 genutzt. Dieses Programm bietet die Möglichkeit eine Kurvenanpassung mit Hilfe einer benutzerdefinierten Gleichung durchzuführen. Eine Gleichung zum fitten von bakteriellem Wachstum haben Kim et al. (2012) auf Grundlage der Gompertz Funktion entwickelt, um den Effekt von Temperatur auf das Wachstum von *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus* in Meeresfrüchten zu untersuchen. Die Funktion lautet:

$$Y = N_0 + C * \exp(-\exp((2.718 * SGR/C) * (\text{Lag} - t) + 1)) \quad (1)$$

Da es mit dieser Gleichung nicht auf Anhieb gelang, die Kurvenanpassung herzustellen, wurde diese mit freundlicher Unterstützung von Harvey Motulsky (CEO and Founder GraphPad Software Inc.) leicht verändert und wie folgt genutzt:

$$Y = Y_0 + C * \exp(-\exp((2.718 * SGR/C) * (\text{Lag} - X) + 1)) \quad (2)$$

In der Gleichung 2 ist Y die gemessene Zellzahl (log). Y_0 ist die logarithmierte, anfängliche Zellzahl, C ist die Differenz der Zellzahl zu Beginn und zum Schluss der Messungen. SGR (maximum specific growth rate) steht für die maximale spezifische Wachstumsrate in logarithmierter Zellzahl pro Stunde. Lag gibt die Verzögerungsphase an, bevor das Wachstum einsetzt und X steht für die Zeit.

3. Ergebnisse

3.1 Verdünnungsreihen

Die in der stationären Phase befindlichen Keime wurden auf 10^{-2} bis 10^{-5} verdünnt. Zum Erhalt einer Anfangskonzentration von 10^2 Zellen pro ml wurde die Zellzahl der jeweiligen Verdünnungsreihe über die Durchflusszytometrie ermittelt.

Tabelle 2: Exemplarische Darstellung einer Verdünnungsreihe

Verdünnung	Messung (in 20 μ l)	umgerechnet auf 10^{-4}	Mittelwert	Zellen pro ml	Inokulat [ml]	Inokulat [μ l]
<i>V. alginolyticus</i>						
10^{-2}	225.575	2255,75				
10^{-3}	24.676	2467,6				
10^{-4}	2.772	2772	2498	124922,5	0,0080	8
10^{-5}	667				0,0801	80
<i>V. para-haemolyticus</i>						
10^{-2}	201.756	2017,56				
10^{-3}	21.067	2106,7				
10^{-4}	2.482	2.482	2.202	110104	0,0091	9,1
10^{-5}	610				0,0908	91
<i>V. vulnificus</i>						
10^{-2}	153.904	1539,04				
10^{-3}	16.433	1643,3				
10^{-4}	1873	1873	1685	84256	0,0119	11,9
10^{-5}	580				0,1187	119
<i>V. cholerae</i>						
10^{-2}	176.106	1761,06				
10^{-3}	19.399	1939,9				
10^{-4}	2241	2241	1981	99033	0,0101	10,1
10^{-5}	573				0,1010	101

Die zuverlässigsten Ergebnisse lieferte das Durchflusszytometer im Bereich der 10^{-2} – 10^{-4} Verdünnungen. Die Ergebnisse der 10^{-2} und 10^{-3} Verdünnung wurden auf die 10^{-4} Verdünnung umgerechnet, um einen Mittelwert bilden zu können. Zum Erhalt der Zellzahl pro Milliliter wurde der Mittelwert mit dem Faktor 50 multipliziert. Es sollten 10^2 Zellen pro ml inokuliert werden, was insgesamt einer Soll-Zellzahl von 10^3 Zellen

für eine Wasserprobe mit 10 ml entspricht. Die Menge des Inokulats berechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Menge des Inokulats} = \frac{\text{Sollzellzahl pro ml}}{\text{Gemessene Zellzahl pro ml}} \quad (3)$$

3.2. Vergleich der Wachstumskurven

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich das Wachstumsverhalten der Vibrionen im Wasser unterschiedlicher Herkunft bei in situ Temperatur voneinander unterscheidet. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden die Stationen in 6 Gruppen zusammengefasst (Tab. 4).

Tabelle 3: Einteilung der Stationen in Gruppen und die jeweilige Inkubationstemperatur

Gruppe	Stationen	Inkubationstemperatur [°C]
Nordsee I	1,3,5	16,3
Nordsee II	6,7,8	17,5
Skagerrak	12,13,14	14,6
Kattegat	16,18,19	16,3
Ostsee	20,22,23	16,3
Kieler Bucht	26,27,28	16,3

Die verwendeten Wasserproben der Region Nordsee I wurden vor den ostfriesischen Inseln Borkum, Norderney und Wangerooge genommen. Die Stationen des Gebietes Nordsee II befanden sich vor der nordfriesischen Küste auf der Höhe zwischen Büsum und Amrum. Die Gruppe der Stationen des Skagerraks erstreckte sich vor der dänischen Küste von Thyborøn bis Hirtshals. Stationen des Kattegats lagen verteilt zwischen dänischer Ost- und schwedischer Westküste. Vor Rügen, dem Darß und Rostock befanden sich die bearbeiteten Stationen der Ostsee. Die Wasserproben aus der Kieler Bucht erstreckten sich von Fehmarn bis zur Kieler Förde. Diese Stationen befanden sich daher ebenfalls in der Ostsee. Da entnommenes Wasser der Kieler Bucht jedoch einen höheren Salzgehalt aufwies, als die übrigen Wasserproben der Ostsee, wird im Folgenden zwischen Kieler Bucht und den weiteren Stationen der Ostsee unterschieden.

Um eine realistische Kurvenanpassung, gerade in Bezug auf die Lag-Phase, zu erhalten, wurden die Y_0 -Werte nicht manuell bei 10^2 Zellen pro ml angesetzt, sondern automatisch von GraphPad Prism bezogen. Sie liegen in einem log-Bereich von 2,5 –

3,5 pro ml. Dies ist auch der Bereich in dem sich Blindwerte und frühe Messwerte befinden. Zurückzuführen ist dies darauf, dass im Durchflusszytometer immer einige Zellen angezeigt werden, die auch als Rauschen bezeichnet werden. Dieses wird zwar so gut wie möglich minimiert, kann jedoch nie ganz ausgeschaltet werden. Bei geringen Zellzahlen ist daher die prozentuale Abweichung von den real in der Probe befindlichen Zellen sehr stark und nimmt immer weiter ab, je mehr Zellen vorhanden sind (Abb. 9).

Prozentuale Abweichung

Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der prozentualen Abweichung in Bezug auf die Zellzahl

Als prozentuale Abweichung wird der Anteil des Blindwertes an der gemessenen Zellzahl definiert. Da sich die Blindwerte durchschnittlich in einem log-Bereich von 2,5 – 3 befinden, ist die prozentuale Abweichung besonders hoch, wenn sich auch die reale Zellzahl in diesem Bereich oder darunter befindet. Sie nimmt jedoch mit steigender log-Zellzahl exponentiell ab. In Abbildung 9 ist dies exemplarisch für *Vibrio parahaemolyticus* der Station 6 dargestellt. Für die Auswertung kann der Blindwert nicht einfach von der gemessenen Zellzahl abgezogen werden, weil sonst in einigen

Fällen die frühen Messungen sehr unrealistische Werte um Null oder sogar darunter annehmen würden.

3.2.1 Wachstumsverhalten von *Vibrio alginolyticus*

Für den graphischen Vergleich der Wachstumskurven wurde aus jeder Gruppe eine Station ausgewählt, um eine übersichtliche Darstellung gewährleisten zu können. Abbildung 10 stellt vergleichend die Wachstumskurven von *Vibrio alginolyticus* an den Stationen 1, 6, 13, 16, 20 und 26 dar. In den Wasserproben der Nordsee-Stationen 1 und 6 wurden die höchsten Zellzahlen und die größte spezifische Wachstumsrate erreicht. Beim Vergleich der Lag-Phase wurde im Wasser der Station 6 (Nordsee II) die kürzeste Dauer ermittelt, während die Lag-Phase im Wasser der Ostsee-Station 20 am längsten dauerte. Mit GraphPad Prism konnte außerdem berechnet werden, dass sich die spezifische Wachstumsrate an den einzelnen Stationen signifikant voneinander unterscheidet (p-value <0.0001).

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Abbildung 10: Wachstumskurven von *Vibrio alginolyticus* im Wasser unterschiedlicher Regionen

3.2.2 Wachstumsverhalten von *Vibrio parahaemolyticus*

Abbildung 11 zeigt die Wachstumskurven von *Vibrio parahaemolyticus* an den Stationen 1, 8, 13, 19, 22 und 28. Der Keim zeigte im Wasser der Ostsee-Station 20 eine vergleichsweise lange Verzögerungsphase, während für die weiteren dargestellten Stationen diesbezüglich nur geringe Unterschiede erkennbar waren. Die maximalen Zellzahlen fielen an Station 20 (Ostsee) und 28 (Kieler Bucht) etwas geringer aus als in den übrigen Stationen. Die größten maximalen Zellzahlen in diesem Vergleich wurden in der Wasserprobe der Nordsee-Station 8 festgestellt. Die SGR lag in den Wasserproben von fast allen dargestellten Stationen sehr hoch. Eine Ausnahme bildeten nur die Wachstumsraten im Wasser der Skagerrak-Station 13, welche deutlich niedriger ausfielen.

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Abbildung 11: Wachstumskurven von *Vibrio parahaemolyticus* im Wasser unterschiedlicher Regionen

3.2.3 Wachstumsverhalten von *Vibrio vulnificus*

Abbildung 12 zeigt die Wachstumskurven von *Vibrio vulnificus* an den Stationen 1, 8, 13, 18, 23 und 26. Die höchsten Zellzahlen konnten im Wasser der Nordsee-Station 1 erreicht werden. Die Wasserprobe der Kieler Bucht (Station 26) wies hingegen die niedrigste maximale Zellzahl auf, obwohl der Keim hier im Vergleich eine sehr kurze Lag-Phase aufwies. Die Wachstumskurven im Wasser der Stationen 13 (Skagerrak), 18 (Kattegat) und 23 (Ostsee) zeigten ähnliche Verläufe in Bezug auf Lag-Phase, SGR und maximale Zellzahl. Die Kurvenanpassung der Station 8 (Nordsee II) hebt sich deutlich von den übrigen Wachstumskurven ab, weil keine eindeutige Lag-Phase berechnet werden konnte. Das Problem einer ungenauen Bestimmung der Lag-Phase von *Vibrio vulnificus* trat darüber hinaus noch im Wasser der Stationen 7 (Nordsee II) und 16 (Kattegat) auf.

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Abbildung 12: Wachstumskurven von *Vibrio vulnificus* im Wasser unterschiedlicher Regionen

3.2.4 Wachstumsverhalten von *Vibrio cholerae*

Abbildung 13 zeigt die Wachstumskurven von *Vibrio cholerae* in den Wasserproben der Stationen 5, 7, 14, 19, 20 und 26. In Bezug auf maximale Zellzahl und maximale spezifische Wachstumsrate waren nur leichte Unterschiede zu erkennen. Im Wasser der Skagerrak-Station 14 zeichnete sich im Vergleich eine etwas größere SGR ab, obwohl die Lag-Phase des Keimes in dieser Wasserprobe am längsten dauerte. Die Lag-Phasen im Wasser der dargestellten Stationen zeigten insgesamt deutliche Unterschiede. In den Wasserproben der Stationen 7 (Nordsee II), 19 (Kattegat) und 20 (Ostsee) war die Lag-Phase beispielsweise deutlich kürzer.

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Abbildung 13: Wachstumskurven von *Vibrio cholerae* im Wasser unterschiedlicher Regionen

3.3 Korrelationen

Für die statistische Auswertung der Wachstumskurven wurde untersucht, ob und inwiefern diese von Umweltparametern wie Salzgehalt, Temperatur und DOC-Gehalt abhängen. Zu diesem Zweck wurden die unabhängigen Parameter maximale Zellzahl (Y_{max}), maximale spezifische Wachstumsrate (SGR), Lag-Phase und Verdopplungszeit ausgewählt und gegen die jeweiligen Umweltparameter aufgetragen. Da die Wasserproben in der vorliegenden Arbeit bei in-situ Temperatur inkubiert wurden, konnte für die Regressionen von Salinität und DOC-Gehalt ein Temperatureffekt, der die Einflüsse der anderen Parameter überlagert, nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden Regressionen für Salinität und DOC-Gehalt doppelt durchgeführt: Einmal unter Berücksichtigung aller Wasserproben sowie ein weiteres Mal für Proben, die bei 16,3°C inkubiert wurden. Dies waren 12 der insgesamt 18 Wasserproben. Der Koeffizient R^2 steht als Bestimmtheitsmaß dafür, wie hoch der Anteil der unabhängigen Parameter ist, der von der Variabilität der abhängigen Umweltparameter beschrieben werden kann. Die Steigung der Regressionsgeraden wird als signifikant ungleich 0 angenommen, wenn der p-value unter 0,05 liegt. Damit eine Regression durchgeführt werden darf, muss allerdings Linearität vorliegen. Jede Regressionsgerade wurde daher auf Linearität geprüft. Die Annahme der Nicht-Linearität galt dabei als signifikant, wenn der p-value hierfür unter 0,05 lag. Nicht-lineare Zusammenhänge wurden in einzelnen Fällen in graphischer Form dargestellt, sofern eine entsprechende Korrelation festgestellt werden konnte.

In Bezug auf die Zusammenhänge muss berücksichtigt werden, dass eine Autokorrelation zwischen Salinität und DOC-Werten vorlag. Wasserproben mit hoher Salinität wiesen einen niedrigen DOC-Gehalt auf, während bei niedriger Salinität besonders hohe DOC-Gehalte gemessen wurden. Abbildung 14 zeigt diese deutliche Korrelation, bei der die Variabilität des einen Parameters zu mehr als 95 Prozent mit der Variabilität des anderen Parameters beschrieben werden kann.

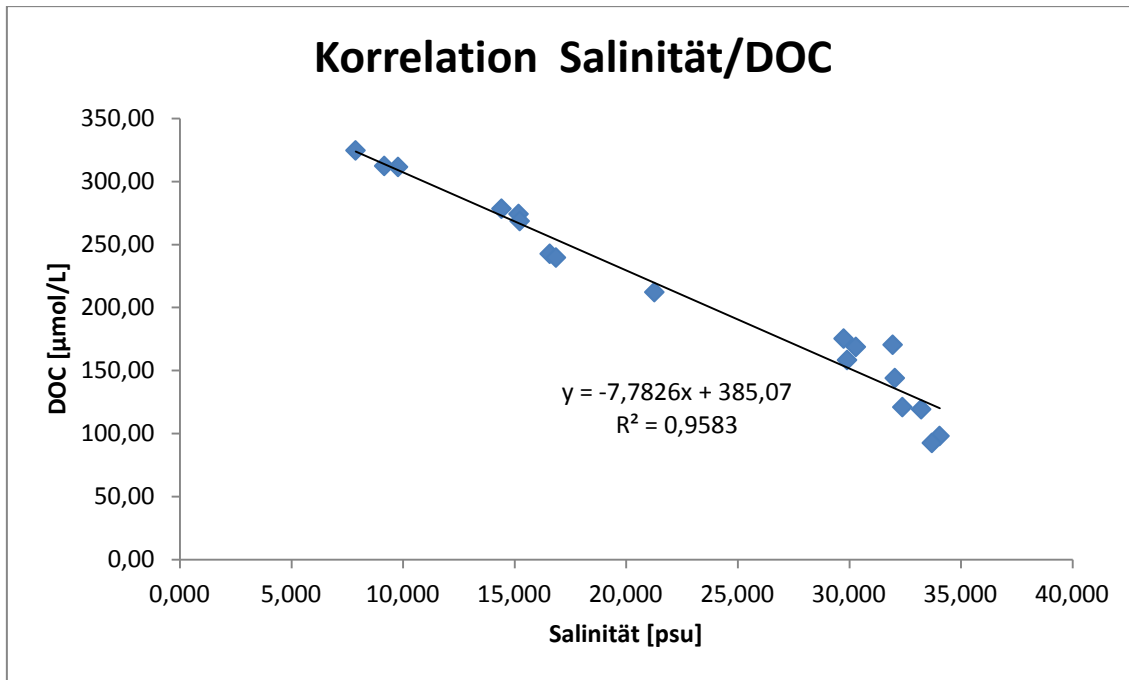


Abbildung 14: Autokorrelation von Salinität und DOC

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Korrelationen mit dazugehörigem Bestimmtheitsmaß R^2 und dem p-value. Ein signifikanter Zusammenhang wurde ermittelt, wenn der p-value unter 0,05 lag. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Tabelle 4 die Werte für den p-value, der Nicht-Linearität anzeigte, nicht mit aufgeführt, können aber aus Anhang 6 entnommen werden. Zur Unterscheidung, ob eine positive oder inverse (negative) Korrelation vorlag, wurden die entsprechenden Werte farblich gekennzeichnet. Positive Korrelationen sind in rot, negative in blau dargestellt.

Tabelle 4: Positive Korrelationen in rot und inverse Korrelationen in blau dargestellt

	Proben		Lag-Phase		SGR		VZ		Ymax	
			R ²	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value	R ²	p-value
<i>V. alginolyticus</i>	alle Proben	S	0,07	0,32	0,49	0,002	0,52	0,001	0,26	0,04
		DOC	0,04	0,44	0,32	0,02	0,35	0,01	0,13	0,16
	16,3 °C	S	0,13	0,25	0,77	0,0002	0,69	0,001	0,19	0,15
		DOC	0,15	0,21	0,62	0,002	0,57	0,005	0,08	0,36
<i>V. parahaemolyticus</i>	alle Proben	S	0,27	0,03	0,36	0,01	0,55	0,001	0,5	0,001
		DOC	0,21	0,07	0,33	0,02	0,61	0,0002	0,42	0,005
	16,3 °C	S	0,3	0,06	0,18	0,17	0,46	0,02	0,63	0,002
		DOC	0,28	0,08	0,12	0,27	0,39	0,03	0,65	0,002
<i>V. vulnificus</i>	alle Proben	S	0,05	0,37	0,1	0,22	0,01	0,71	0,56	0,001
		DOC	0,1	0,21	0,08	0,26	0,01	0,69	0,47	0,002
	16,3 °C	S	0,05	0,49	0,21	0,13	0,08	0,38	0,48	0,01
		DOC	0,04	0,52	0,11	0,3	0,02	0,66	0,39	0,03
<i>V. cholerae</i>	alle Proben	S	0,58	0,0004	0,19	0,08	0,06	0,33	0,06	0,36
		DOC	0,72	0,0001	0,24	0,04	0,09	0,23	0,14	0,13
	16,3 °C	S	0,71	0,001	0,08	0,4	0,04	0,56	0,07	0,42
		DOC	0,77	0,0004	0,02	0,65	0,01	0,82	0,15	0,24

3.3.1 Korrelationen von *Vibrio alginolyticus*

Für die maximale spezifische Wachstumsrate konnte eine positive Korrelation zum Salzgehalt festgestellt werden (p-value = 0,002). Die SGR stieg mit zunehmendem Salzgehalt. R^2 (0,49) zeigte allerdings, dass nur knapp die Hälfte der Variabilität der SGR mit dem steigenden Salzgehalt erklärt werden konnte. Eine stärkere Korrelation ergab sich, wenn nur die bei 16,3°C inkubierten Wasserproben betrachtet wurden. Hierdurch stieg R^2 auf 0,77 mit einem p-value von 0,0002. Invers korrelierte die SGR mit den DOC-Werten. Für die bei 16,3°C inkubierten Proben ergab sich hierfür ein R^2 von 0,62 bei einem p-value von 0,002.

Die Resultate der SGR fanden in den Ergebnissen für die Verdopplungszeit Bestätigung. Diese verringerte sich bei höheren Salzgehalten (p-value = 0,001). Fast 70 % der Variabilität der Verdopplungszeit konnten mit der Variabilität des Salzgehaltes erklärt werden ($R^2 = 0,69$). Für den DOC-Gehalt zeigte sich eine positive Korrelation. Bei steigendem DOC-Gehalt verlängerten sich die Verdopplungszeiten ($R^2 = 0,57$; p-value = 0,005).

Eine mögliche Korrelation von maximaler Zellzahl und Salinität ergab einen p-value von 0,04 und wäre somit ebenfalls signifikant gewesen. Allerdings lag keine Linearität vor, da der p-value hierfür 0,02 betrug. Bei Betrachtung der 16,3°C Proben bestätigte sich, dass eine Korrelation von Salinität und maximaler Zellzahl mit den ermittelten Daten ausgeschlossen werden konnte.

Die Lag-Phase konnte in keinen linearen Zusammenhang mit den Umweltparametern gebracht werden. Allerdings lieferten quadratische Funktionen als Kurvenanpassung eine Annäherung in Bezug auf Salinität und DOC-Gehalt. Für die Lag-Phase in Abhängigkeit der Salinität ergab sich ein R^2 von 0,82 (Abb. 15) und in Abhängigkeit vom DOC-Gehalt ein R^2 von 0,73 (Abb. 16). Abbildung 15 zeigt in einem Bereich von ca. 15-30 psu für die Lag-Phase Werte um die 20 Stunden. Bei einer Salinität von unter 10 bzw. über 30 psu dauerte die Lag-Phase dagegen länger an.

Abbildung 16 zeigt bei zunehmendem DOC-Gehalt zwischen ca. 90 und 300 $\mu\text{mol/L}$ für die Lag-Phase eine abnehmende Tendenz, bis diese für die drei Wasserproben mit dem höchsten DOC-Gehalt auch die längste Verzögerungsphase anzeigte.

Verzögerungsphase [h]

Abbildung 15: Lag-Phase von *Vibrio alginolyticus* in Abhängigkeit der Salinität

Verzögerungsphase [h]

Abbildung 16: Lag-Phase von *Vibrio alginolyticus* in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes

3.3.2 Korrelationen von *Vibrio parahaemolyticus*

Die maximale Zellzahl korrelierte positiv mit der Salinität, bei einem p-value von 0,002 (16,3 °C) bzw. 0,001 (alle Proben). Über die gesamten Wasserproben lag der Koeffizient R^2 bei 0,5. Durch Eingrenzung auf die bei 16,3°C inkubierten Wasserproben, erhöhte sich der Wert auf 0,63.

Für den DOC-Gehalt war ein linearer Zusammenhang in Bezug auf die maximalen Zellzahlen nur für die bei 16,3°C inkubierten Proben gültig. Mit steigendem DOC-Gehalt nahmen die maximalen Zellzahlen ab ($R^2 = 0,65$, p-value = 0,002). Im Gegensatz dazu wurde die maximale spezifische Wachstumsrate größer, wenn der DOC-Gehalt stieg (p-value = 0,02). Allerdings lag R^2 hierfür nur bei 0,33. Dies war in der Tatsache eines großen Streuungsbereiches der SGR um die Regressionsgerade begründet, der bei hohen DOC-Werten auftrat (siehe 4.3.2).

Bedingt durch die Autokorrelation von DOC und Salinität war dieses Problem auch im Bereich von niedriger Salinität festzustellen. Ein linearer Zusammenhang von SGR und Salinität war daher nicht gegeben (p-value = 0,0245). Für die Lag-Phase konnten ebenfalls keine linearen Zusammenhänge festgestellt werden. Der p-value von 0,03 für den Zusammenhang von Salinität und Lag-Phase hatte keine Bedeutung, weil nachgewiesen werden konnte, dass keine Linearität vorlag (p-value = 0,02).

Die Verdopplungszeit hingegen zeigte deutliche Zusammenhänge mit Salinität (Abb. 17) und DOC-Gehalt (Abb. 18). Diese verliefen allerdings, unter Berücksichtigung aller Proben, nicht linear. Für beide Umweltparameter lag der p-value für Nicht-Linearität bei 0,02. Mit der Eingrenzung auf Wasserproben, die bei 16,3°C inkubiert wurden, konnte zwar eine lineare Regression durchgeführt werden, der Koeffizient R^2 wurde dann aber sehr klein (0,46 bzw. 0,39). Weniger als 50 % der Ergebnisse konnten also in diesem Fall mit der Variabilität von Salinität oder DOC erklärt werden.

In den Abbildungen 17 und 18 wurde daher eine Kurvenanpassung herangezogen, um sich der Verteilung, unter Berücksichtigung aller Proben, zu nähern. Für die Salinität wurde eine quadratische Funktion genutzt, wodurch ein R^2 von ca. 0,72 erreicht wurde. Für mittleren Salzgehalt wurden die kürzesten Verdopplungszeiten ermittelt, die sich bei höherer Salinität deutlich verlängerten. Die Verdopplungszeit in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes folgte einer exponentiellen Entwicklung ($R^2 = 0,83$). Hierbei nahm die Verdopplungszeit zunächst mit

steigendem DOC-Gehalt, bis ca. 200 $\mu\text{mol/L}$, exponentiell ab und blieb bei noch höheren DOC-Werten auf einem konstant niedrigen Niveau.

Verdopplungszeit [h]

Abbildung 17: Verdopplungszeit von Vibrio parahaemolyticus in Abhängigkeit der Salinität

Verdopplungszeit [h]

Abbildung 18: Verdopplungszeit von *Vibrio parahaemolyticus* in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes

3.3.3 Korrelationen von *Vibrio vulnificus*

Eine Korrelation von DOC oder Salinität konnte ausschließlich in Bezug auf die maximale Zellzahl hergestellt werden. Mit steigender Salinität nahmen die maximalen Zellzahlen zu und bei höherem DOC-Gehalt nahmen sie ab. R^2 war jedoch mit 0,56 für Salinität und 0,47 für DOC-Gehalt nicht besonders hoch und verringerte sich noch, wenn nur die bei 16,3°C inkubierten Wasserproben betrachtet wurden. Eine Näherung der gemessenen, maximalen Zellzahlen in Abhängigkeit von der Salinität, mittels einer quadratischen Funktion, erhöhte den Koeffizienten R^2 für die bei 16,3°C inkubierten Wasserproben auf ca. 0,82 (Abb. 19). Diese Optimierung konnte durchgeführt werden, weil in den Wasserproben mit mittlerer Salinität die niedrigsten maximalen Zellzahlen gemessen wurden. Hohe und niedrige Salinität zeigten im Vergleich höhere maximale Zellzahlen.

Abbildung 19: Maximale Zellzahl von *Vibrio vulnificus* in Abhängigkeit der Salinität

3.3.4 Korrelationen von *Vibrio cholerae*

Für *Vibrio cholerae* konnten lineare Zusammenhänge nur in Bezug auf die Lag-Phase hergestellt werden. Für die SGR in Abhängigkeit von DOC wurde zwar ein p-value von 0,04 berechnet, jedoch konnten mit der Variabilität des DOC-Gehaltes nur knapp 25 % der Ergebnisse der maximalen spezifischen Wachstumsrate erklärt werden ($R^2 = 0,24$).

Für die Lag-Phase in Abhängigkeit von Salinität oder DOC-Gehalt wurden in den bei 16,3 °C inkubierten Wasserproben lineare Zusammenhänge festgestellt. Für die Korrelation von Lag-Phase und Salinität lag R^2 bei 0,71 mit einem p-value von 0,001. Invers korrelierte die Lag-Phase mit DOC. 77 % der Ergebnisse konnten mit der Variabilität des DOC-Gehaltes beschrieben werden (p-value = 0,0004).

Wenn alle Wasserproben berücksichtigt wurden, lag kein linearer Zusammenhang mit Salinität oder DOC-Gehalt vor (p-value jeweils 0,02). In diesen Fällen mussten für die Lag-Phasen in Abhängigkeit von Salinität und DOC Kurvenanpassungen zur Annäherung genutzt

werden. In Abhängigkeit der Salinität blieb die Lag-Phase bis ca. 30 psu konstant, ehe sie bei höherem Salzgehalt stark anstieg (Abb. 20). Hierfür wurde daher die Kurvenanpassung „plateau followed by one phase association“ genutzt, welche ein R^2 von 0,9 generierte.

Verzögerungszeit [h]

Abbildung 20: Lag-Phase von Vibrio cholerae in Abhängigkeit der Salinität

Für die Lag-Phase in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes zeigten sich bei niedrigen DOC-Werten von ca. 100 $\mu\text{mol/L}$ sehr lange Retentionszeiten. Diese nahmen jedoch schon bei ca. 150 – 200 $\mu\text{mol/L}$ sehr schnell ab und blieben bei steigenden Werten über 200 $\mu\text{mol/L}$, mit einer Ausnahme, alle in einem Bereich von ca. 25 Stunden. Für diesen Graphen wurde daher eine exponentiell abnehmende Funktion als Kurvenanpassung gewählt, wodurch ein R^2 von 0,86 erreicht werden konnte (Abb. 21).

Verzögerungszeit [h]

Abbildung 21: Lag-Phase von *Vibrio cholerae* in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes

3.4 Vergleich der einzelnen Stationen

Für den Vergleich von Wachstumsraten und Lag-Phase im Wasser der unterschiedlichen Stationen wurde die graphische Darstellung in einer Karte des Untersuchungsgebietes genutzt. Die maximale spezifische Wachstumsrate diente als Indikator für die Wachstumsgeschwindigkeit. Mit der Lag-Phase wurde aufgezeigt, wie viel Zeit verging, bevor die Wachstumsphase einsetzte. Auf eine graphische Darstellung der maximalen Zellzahlen wurde verzichtet, weil die logarithmierte Anzahl der Zellen keine erkennbaren Unterschiede für die verschiedenen Stationen geliefert hätte.

3.4.1 Stationsvergleich *Vibrio alginolyticus*

In Abbildung 22 ist die SGR der verschiedenen Stationen in einer Karte des Untersuchungsgebietes dargestellt. Je größer der Kreis, desto größer ist auch die maximale spezifische Wachstumsrate an der entsprechenden Station. Hierfür wurde die SGR mit dem

Faktor 5 multipliziert, um den Durchmesser des Kreises zu erhalten und somit einen relativen Vergleich der Stationen darzustellen.

Die größte SGR wurde in den Wasserproben aus der Nordsee gemessen, unabhängig davon, ob sie aus der Region Nordsee I oder Nordsee II stammten (0,079 - 0,1 log Zellzahl / h). Für die beiden Stationen des Skagerraks konnten mittlere Werte von etwa 0,5 und 0,58 log Zellzahl / h berechnet werden. Ähnliches gilt für die Kieler Bucht, wo die Werte zwischen 0,049 und 0,062 log Zellzahl / h variierten. Etwas niedriger fiel die SGR für *Vibrio alginolyticus* im Wasser der Ostsee aus (0,045 - 0,047 log Zellzahl / h). Für die Wasserproben des Kattegats ergab die Berechnung der SGR eine große Variabilität innerhalb der Region. Station 18 mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von 0,037 log Zellzahl / h hatte für *Vibrio alginolyticus* den niedrigsten Wert aller gemessenen Wasserproben, während die SGR von Station 16 mit 0,062 log Zellzahl / h zum oberen Durchschnitt gehörte.

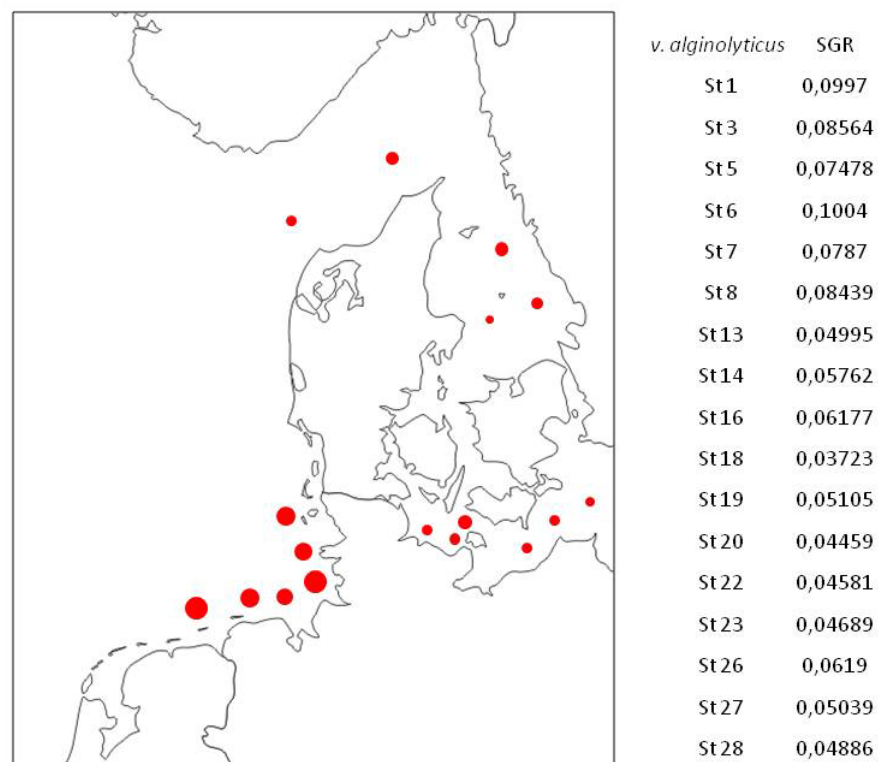


Abbildung 22: SGR von *Vibrio alginolyticus* im Wasser der dargestellten Stationen

Abbildung 23 zeigt die regionalen Unterschiede in der Dauer der Lag-Phase der Bakterien. Als graphische Darstellung wurde das Tortendiagramm gewählt. Ein nicht ausgefüllter Kreis

entspricht dem kompletten Ausbleiben der Lag-Phase, während ein farblich voll ausgefüllter Kreis eine Lag-Phase von 58,65 Stunden widerspiegelt. Diese Referenzgröße wurde gewählt, weil sie die längste Lag-Phase aller gemessenen Proben darstellte (*Vibrio parahaemolyticus* Station 23, siehe Abb. 25).

Die Lag-Phase von *Vibrio alginolyticus* unterschied sich erheblich beim Vergleich verschiedener Regionen (Abb. 23). In den Wasserproben der Ostsee, insbesondere an Station 20 (54,49 Stunden) und 23 (52,48 Stunden), waren sehr lange Verzögerungsphasen zu beobachten. Etwas schneller wurde diese Phase im Wasser des Skagerraks (35,38 – 41,55 Stunden) und Nordsee I überbrückt (27,39 – 29,15 Stunden). In den Wasserproben der Stationen des Kattegats (17,42 – 24,9 Stunden), der Kieler Bucht (14,66 -24,85 Stunden) und Nordsee II (14,47 – 21,97 Stunden) war eine sehr kurze Lag-Phase zu beobachten.

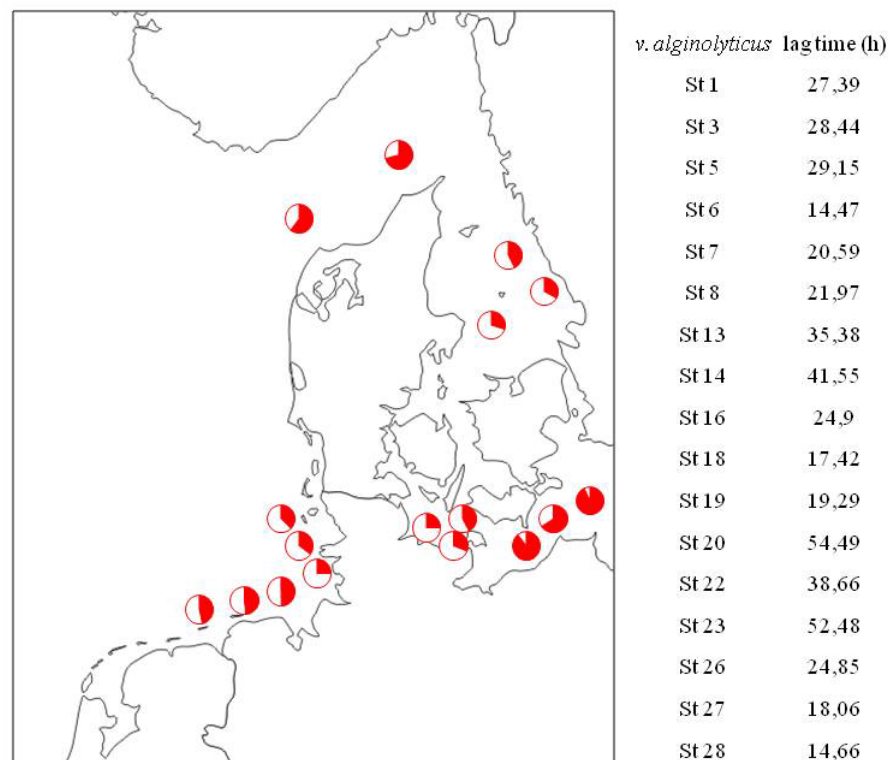


Abbildung 23: Lag-Phase von *Vibrio alginolyticus* im Wasser der dargestellten Stationen

3.4.2 Stationsvergleich *Vibrio parahaemolyticus*

In den Wasserproben aus dem Kattegat (0,166 – 0,27 log Zellzahl / h) und von der Ostsee-Station 23 (0,27 log Zellzahl / h) konnte eine sehr große SGR für *Vibrio parahaemolyticus*

festgestellt werden (Abb. 24). Etwas kleiner war die errechnete SGR für die beiden weiteren Ostseestationen 20 (0,114 log Zellzahl / h) und 22 (0,129 log Zellzahl / h) sowie für Kieler Bucht (ca. 0,824 – 0,106 log Zellzahl / h) und Nordsee II (ca. 0,096 – 0,102 log Zellzahl / h). Mittlere Wachstumsraten wurden in den Wasserproben der Region Nordsee I festgestellt. Hier lagen die Werte zwischen 0,059 und 0,078 log Zellzahl / h. Vergleichsweise niedrig war die SGR von *Vibrio parahaemolyticus* im Wasser des Skagerraks (ca. 0,04 – 0,046 log Zellzahl/h).

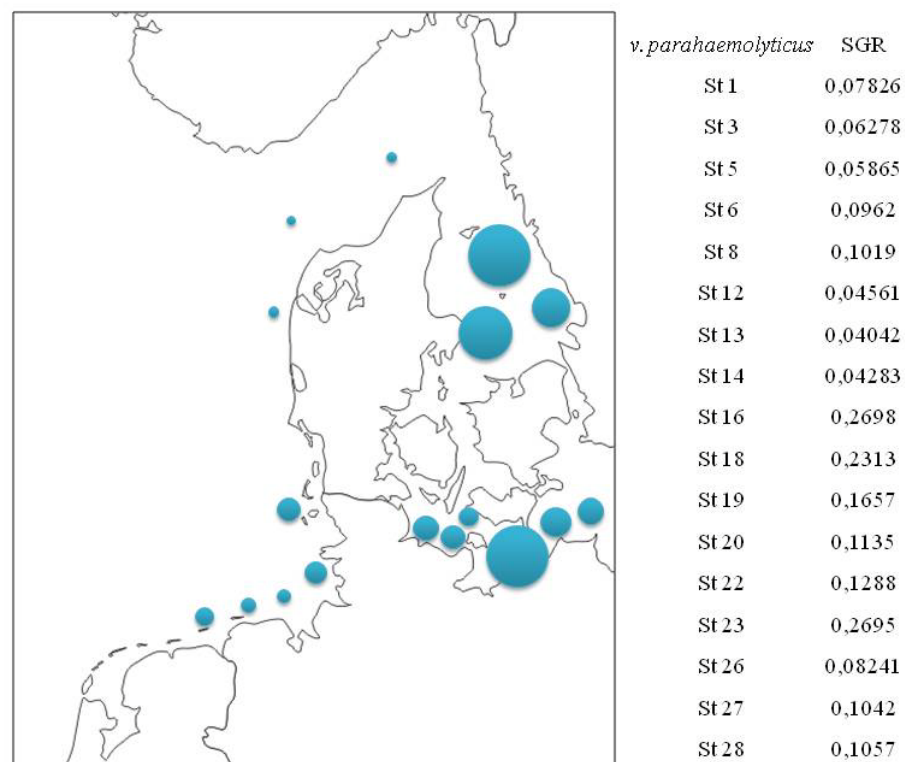


Abbildung 24: SGR von *Vibrio parahaemolyticus* im Wasser der dargestellten Stationen

Die Lag-Phase von *Vibrio parahaemolyticus* (Abb. 25) dauerte in den Wasserproben aus der Ostsee am längsten (40,26 – 58,65 Stunden). Während die kürzeste Zeit bis zum Eintritt in die Wachstumsphase im Wasser der Station 6 (Nordsee II) festgestellt werden konnte. Diese betrug hier nur ca. 14 Stunden. In den Proben der weiteren Stationen waren nur leichte

Variationen in Bezug auf die Verzögerungsphase von *Vibrio parahaemolyticus* zu erkennen. Für das Wasser aus der Kieler Bucht wurden 20,5 – 24,61 Stunden errechnet. Die Nordsee-Stationen lagen mit Ausnahme von Station 6 bei 25,05 – 28,64 Stunden. Etwas länger dauerte die Lag-Phase im Wasser des Skagerraks (29,83 – 34,09 Stunden) und Kattegats (29,63 – 34,66 Stunden).

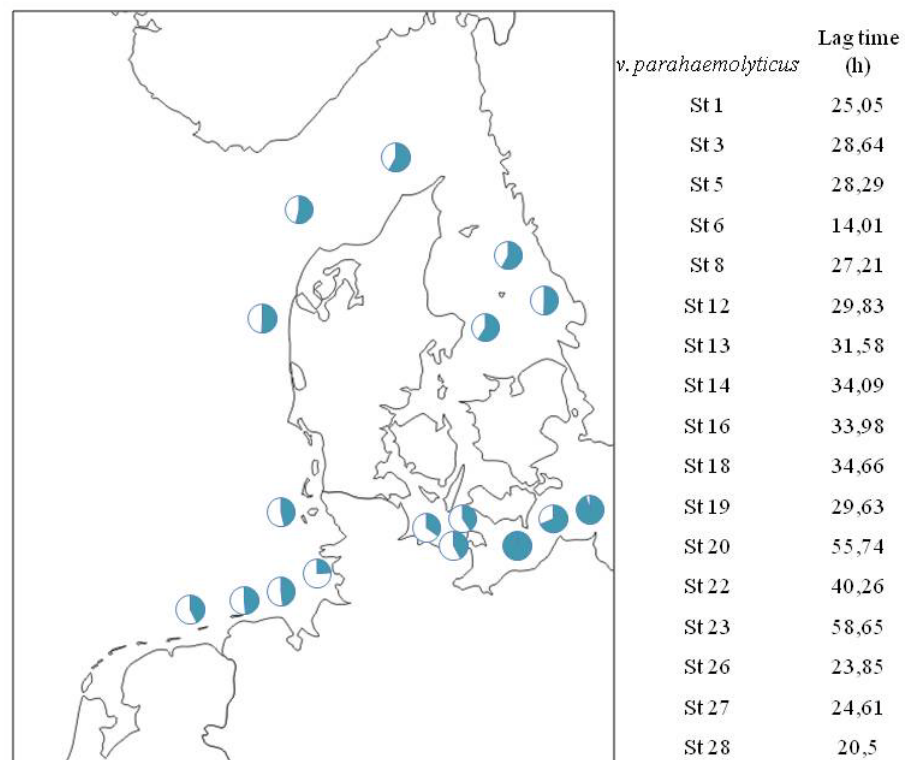


Abbildung 25: Lag-Phase von *Vibrio parahaemolyticus* im Wasser der dargestellten Stationen

3.4.3 Stationsvergleich *Vibrio vulnificus*

Die Wachstumsraten von *Vibrio vulnificus* waren in den Wasserproben der Ostsee (0,053 – 0,061 log Zellzahl / h) und der Kieler Bucht (0,048 – 0,066 log Zellzahl/h) in einem mittleren Bereich. Im Wasser der Stationen des Kattegats lagen sie geringfügig niedriger bei 0,045 – 0,055 log Zellzahl / h. Große Variationen in Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *Vibrio vulnificus* konnten innerhalb der Regionen des Skagerraks und der Nordsee festgestellt

werden. In den Wasserproben des Skagerraks variierten diese von 0,049 – 0,106 log Zellzahl / h, im Wasser der Nordsee von 0,032 – 0,095 log Zellzahl / h.

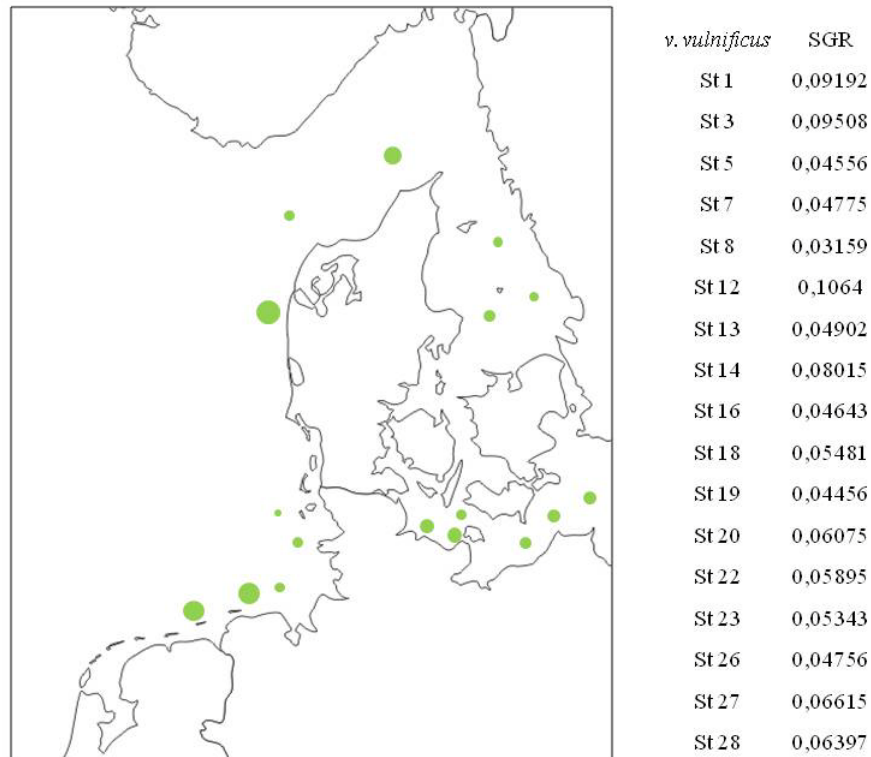


Abbildung 26: SGR von *Vibrio vulnificus* im Wasser der dargestellten Stationen

Die Lag-Phase von *Vibrio vulnificus* dauerte in den Wasserproben aus der Region Nordsee II nur 10,36 bzw. 12,58 Stunden. Auch im Wasser der Kattegat-Station 16 (15,09 Stunden) und der Kieler Bucht (19,07 – 21,32 Stunden) war sie von kurzer Dauer. Für die Stationen von Nordsee I und Ostsee ergaben sich deutlich längere Lag-Phasen von ca. 41,11 -44,55 bzw. 39,56 – 42,39 Stunden. In den Wasserproben des Skagerraks dauerte es am längsten, bis das Wachstum von *Vibrio vulnificus* einsetzte. Für die Stationen 12 und 14 ergaben sich Werte von 58,58 bzw. 56,65 Stunden für die Lag-Phase. Im Wasser der Skagerrak-Station 13 lag diese mit 43,17 Stunden in einem Bereich, der den Lag-Phasen aus der Region Nordsee I ähnelte. In den Wasserproben des Kattegats variierte die Lag-Phase sehr stark. Während für

Station 16 lediglich 15,09 Stunden errechnet wurden, dauerte es an Station 18 (41,19 Stunden) und Station 19 (34,01 Stunden) deutlich länger, bis die Wachstumsphase einsetzte.

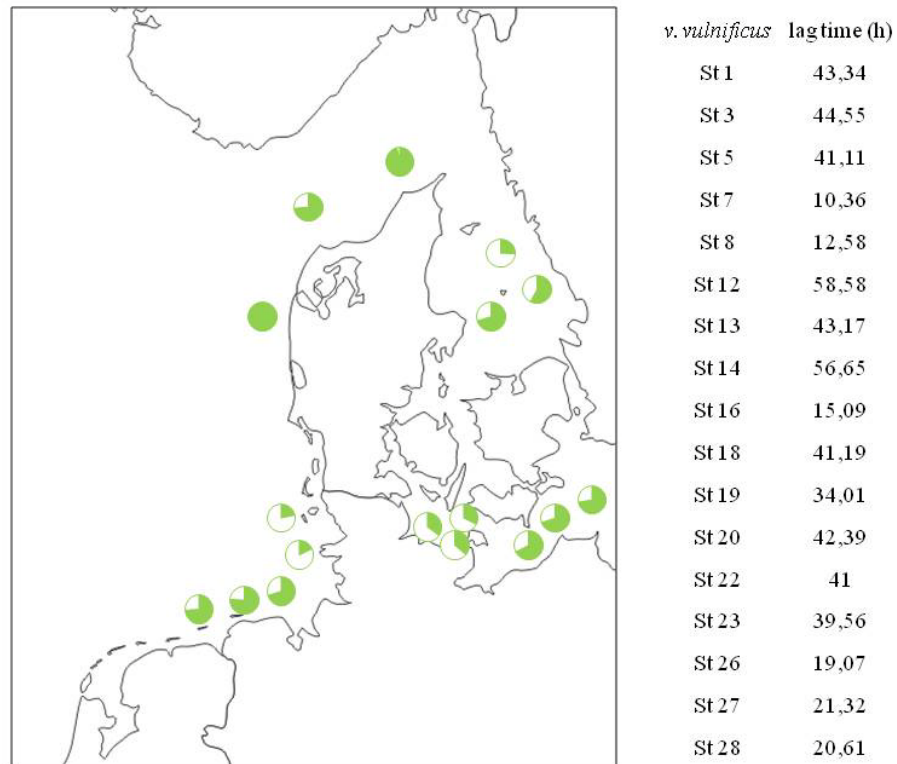


Abbildung 27: Lag-Phase von *Vibrio vulnificus* im Wasser der dargestellten Stationen

3.4.4 Stationsvergleich *Vibrio cholerae*

Die SGR von *Vibrio cholerae* war in den Wasserproben der Stationen des Skagerraks mit 0,082 – 0,094 log Zellzahl / h am höchsten. Im Wasser der Ostsee (0,049 – 0,058 log Zellzahl / h) und der Kieler Bucht (0,049 – 0,062 log Zellzahl / h) waren mittlere Wachstumsraten zu beobachten. Für die Stationen aus der Nordsee und dem Kattegat ergaben sich sehr unterschiedliche Werte für die SGR innerhalb der Regionen. Für die beiden Stationen des Kattegats lagen diese bei 0,036 bzw. 0,057 log Zellzahl / h. In den Wasserproben der Region Nordsee I variierten die Wachstumsraten von 0,046 – 0,7 log Zellzahl / h und im Wasser der Region Nordsee II von 0,31 – 0,61 log Zellzahl / h.

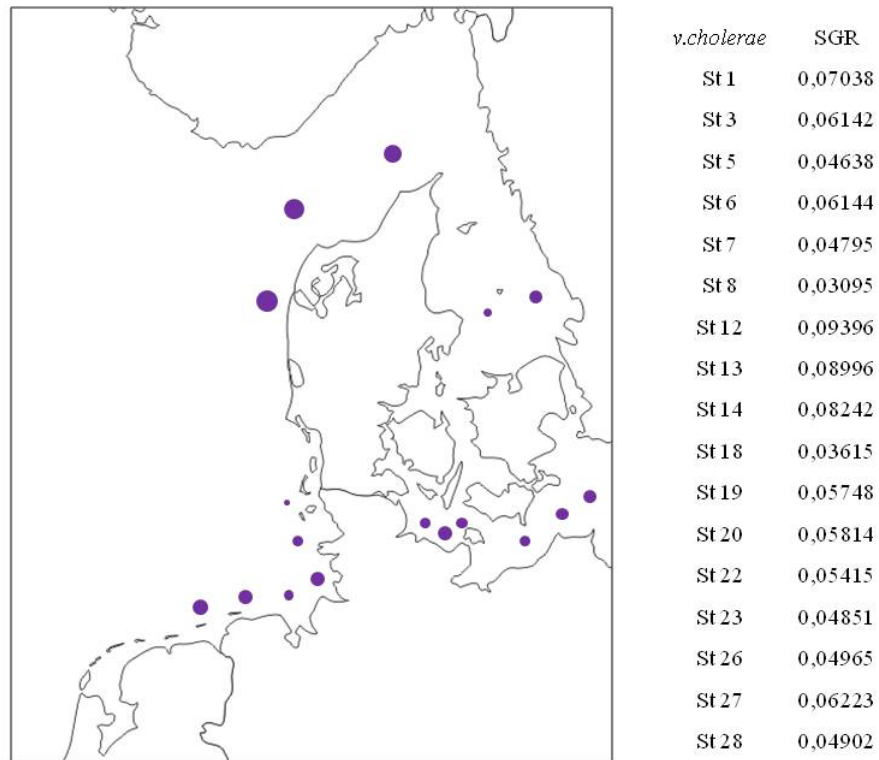


Abbildung 28: SGR von *Vibrio cholerae* im Wasser der dargestellten Stationen

Die Lag-Phase von *Vibrio cholerae* dauerte in den Wasserproben des Skagerraks am längsten (56,68 – 57,79 Stunden). Etwas kürzer war die berechnete Zeit bis zum Eintritt der Wachstumsphase in den Wasserproben der Nordsee. Für die Region Nordsee I wurden Werte von 39,5 – 48,96 Stunden errechnet. Im Wasser der Region Nordsee II war diese Phase mit 28,57 – 34,62 Stunden noch etwas kürzer. Leichte Variationen in der Lag-Phase zeigten sich in den beiden Wasserproben des Kattegats (25,1 und 38,65 Stunden). Die kürzeste Zeit bis zum Eintritt in die Wachstumsphase konnte im Wasser der Ostsee (24,11 – 28,28 Stunden) und der Kieler Bucht (23,69 – 26,9 Stunden) festgestellt werden.

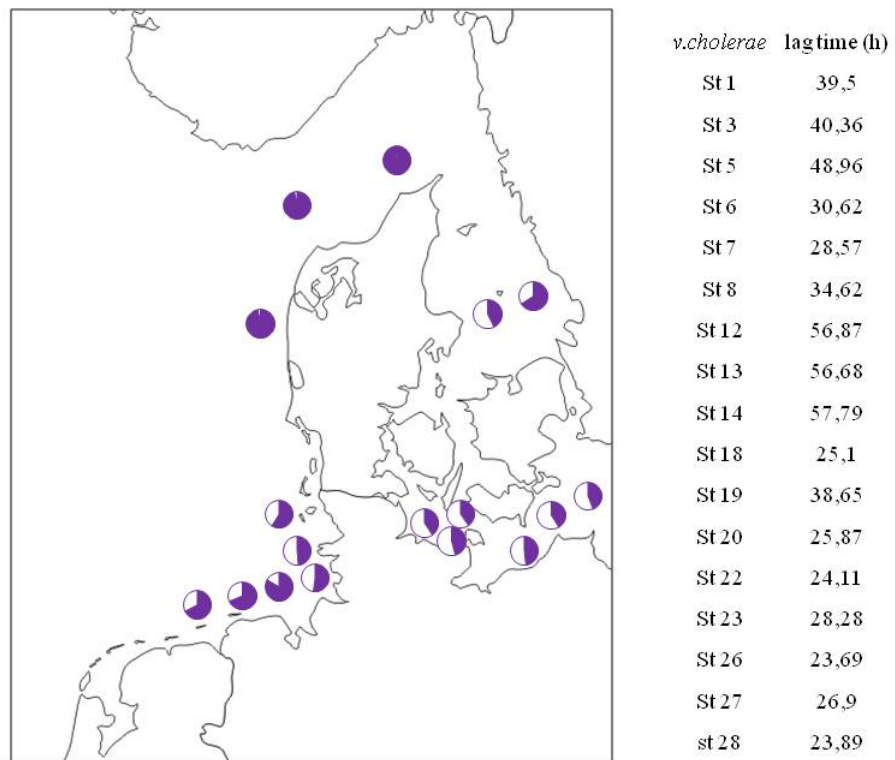


Abbildung 29: Lag-Phase von *Vibrio cholerae* im Wasser der dargestellten Stationen

4. Diskussion

4.1 Laborversuche

4.1.1 In situ Inkubationstemperatur

Für den Wachstumsvergleich der Bakterien in den unterschiedlichen Wasserproben war die Inkubation bei in situ Temperatur vorgesehen. Für einen optimierten, zeitlichen Ablauf der Laborarbeit mussten mindestens drei Wasserproben gleichzeitig bearbeitet werden. Aus diesem Grund erfolgte eine Einteilung der Stationen in Gruppen mit der Zuordnung zu einer jeweiligen Region (siehe Tabelle 4). Aus Tabelle 1 geht hervor, dass die Temperaturen an den Stationen der Probenentnahme oft sehr ähnlich waren. Nur das Wasser der Stationen des Skagerraks und der Region Nordsee II zeigten leichte Abweichungen. Für das Skagerrak wurde ein Mittelwert von 14,6 °C, für Nordsee II von 17,5 °C ermittelt. Die gemessene Temperatur an den weiteren Stationen ergab ein Mittel von 16,3 °C. Die Keime wurden daher im Wasser der einzelnen Stationen bei der jeweiligen Temperatur des Mittelwertes inkubiert.

4.1.2 Herkunft der verwendeten Keime

Unter der Annahme, dass Bakterien sich den Gegebenheiten ihres Lebensraumes anpassen, muss auch die Herkunft der verwendeten Keime in Bezug auf die ermittelten Ergebnisse berücksichtigt werden. Um einen möglichst realitätsnahen Versuchsaufbau zu erlangen, sollten die Wasserproben mit Keimen beimpft werden, die auf der Heincke Ausfahrt 363 im August 2011 aus dem Untersuchungsgebiet isoliert wurden.

Es wird angenommen, dass Wachstumsraten von *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* von der Salinität abhängen. Um zu gewährleisten, dass der entsprechende Keim nicht an besonders hohe oder niedrige Salzgehalte angepasst ist, wurden Stämme aus dem Kattegat genutzt, wo die Salinität sich in einem mittleren Bereich zwischen der von Nord- und Ostsee bewegt. Dass alle vier Keime bei ähnlichen Umweltbedingungen isoliert wurden, stellt einen weiteren Vorteil im Hinblick auf die Vergleichbarkeit dar.

4.1.3 Nukleinsäuregehalt

Die Messungen der Reinkulturen im Durchflusszytometer zeigten eine Clusterbildung, die auf Bakterien mit unterschiedlichem Nukleinsäuregehalt zurückgeführt werden kann. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zum Nukleinsäuregehalt (Marie et al. 1996) und mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann zwischen zwei Clustern unterschieden werden: Bakterien mit hohem Nukleinsäuregehalt (HNA) und Bakterien mit niedrigem Nukleinsäuregehalt (LNA) (Lebaron et al. 2001). HNA-Bakterien wurde lange Zeit eine größere Aktivität zugeschrieben als LNA-Bakterien. Ihre Anzahl sei sowohl in der geographischen Verteilung, als auch vertikal in der Wassersäule variabler (Corzo et al. 2005, Calvo-Díaz & Morán 2006). Laborversuche mit organischem Substrat und Nährstoffen zeigten, dass HNA Bakterien auf Veränderungen reagierten, während LNA Zellen dies nicht taten (Gasol et al. 1999, Lebaron et al. 2001, Vaqué et al. 2001). In den letzten Jahren hat sich allerdings eine kontroverse Diskussion entwickelt, ob die Schlussfolgerungen aus den bisher erzielten Ergebnissen richtig waren. Zubkov et al. (2001) und Longnecker et al. (2005) konnten demonstrieren, dass HNA und LNA Bakterien eine vergleichbare Leucinaufnahme aufweisen, welche als Indikator für Aktivität gilt. Darüber hinaus zeigten weitere Studien, dass sich die Beziehung von Aktivität der Bakterien und Nukleinsäuregehalt entlang eines Gradienten von der Küste zum offenen Meer (Sherr et al. 2006) und mit der Tiefe (Scharek & Latasa 2007) verändert. Daher wird vermutet, dass hier eine Beziehung zum trophischen Zustand des Systems besteht (Moran et al. 2007). Es ist jedoch immer noch sehr wenig bekannt, welche Faktoren für eine Zu- oder Abnahme von HNA Bakterien sorgen. Vergleiche der Studien werden außerdem erschwert, weil Versuchsaufbau und Durchführung in Bezug auf Messgeräte, Probenfixierung und Lagerung sowie Anfärbung der Zellen stets unterschiedlich sind. Annahmen aus frühen durchflusszytometrischen Messungen (Servais et al. 1999; Lebaron et al. 2001), dass HNA Bakterien größer und aktiver sind, konnten zuletzt von van Wambeke et al. (2011) bei Untersuchungen im Mittelmeer widerlegt werden. Der prozentuale Anteil von HNA Bakterien an der Gesamtpopulation war invers mit der Produktivität korreliert. Es lässt sich daher nicht abschließend klären, welche Bedeutung dem Auftreten von HNA- und LNA-Bakterien beigemessen werden kann. Es bleibt aber festzuhalten, dass bei der Messung von größeren Populationen im Durchflusszytometer eine solche Clusterbildung omnipräsent war.

4.2 Berechnung der Wachstumskurven

Die Berechnung der Wachstumskurven mit Hilfe der modifizierten Gompertz Funktion konnte für die Daten der folgenden Wasserproben nicht erfolgreich umgesetzt werden: *Vibrio alginolyticus* Station 12, *Vibrio parahaemolyticus* Station 7, *Vibrio vulnificus* Station 6 sowie *Vibrio cholerae* Station 16. Die Parameter dieser Wachstumskurven wurden daher für alle weiteren Berechnungen ausgeschlossen. In Abbildung 30 ist zu sehen, dass die Kurvenanpassung für *Vibrio vulnificus* an Station 6 verhindert wurde, weil die Berechnung der Anfangskonzentration nicht gelang. Auch die manuelle Eingabe einer Anfangskonzentration führte nicht zu einer adäquaten Kurvenanpassung.

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Abbildung 30: Wachstumskurven an Station 6

Abbildung 31: Wachstumskurven an Station 7

Die fehlerhafte Kurvenanpassung für *Vibrio parahaemolyticus* an Station 7 ist in Abbildung 31 erkennbar. Hier gelang es mit der Funktionsvorschrift nicht, die SGR zu ermitteln. Gleiches galt für *Vibrio alginolyticus* an Station 12 und *Vibrio cholerae* an Station 16.

Darüber hinaus wird aus Abbildung 31 ersichtlich, dass die Lag-Phase von *Vibrio vulnificus* an dieser Station nicht präzise ermittelt wurde und dadurch sehr kurz ausfällt. Gleiches galt für die Lag-Phase von *Vibrio vulnificus* an Station 8 und 16. Da die Ergebnisse in die Statistik mit eingeflossen sind, könnte dies in Bezug auf die Lag-Phase ein Grund für das Ausbleiben einer Korrelation zum Salzgehalt darstellen.

4.3 Einfluss der Umweltparameter auf die Keime

4.3.1 *Vibrio alginolyticus*

Vibrio alginolyticus zeigte die größten spezifischen Wachstumsraten in den Wasserproben aus der Nordsee. Diese Region weist zusammen mit dem Skagerrak die höchsten Salzgehalte der

untersuchten Proben aus. Die Regressionsgerade der SGR in Abhängigkeit des Salzgehaltes zeigte bereits über alle gemessenen Wasserproben eine positive Steigung. R^2 stieg aber erst von 0,4914 auf 0,7742, wenn nur die bei 16,3°C inkubierten Wasserproben berücksichtigt werden. Die Proben des Skagerraks und von Nordsee II fallen dabei heraus (Abb. 32).

SGR [log/h]

SGR [log/h]

Abbildung 32: SGR in Abhängigkeit der Salinität

Der erste Graph in Abbildung 32 macht deutlich, dass die SGR der Proben des Skagerraks sich unterhalb der Regressionsgeraden befindet, in etwa auf der Höhe der SGR von Wasserproben mit mittlerem Salzgehalt. Die SGR für Proben der Region Nordsee II befindet sich leicht oberhalb der Regressionsgeraden. Zwei Erklärungen sind für diese Abweichungen möglich: Entweder überlagert bei Proben aus dem Skagerrak (14,6°C) und Nordsee II (17,5°C) ein Temperatureffekt den Einfluss der Salinität oder die optimalen Bedingungen für *Vibrio alginolyticus* befinden sich, in Bezug auf die Salinität, in einem Bereich von 29 – 32 psu. Dieser Bereich wird von Nordsee I und Nordsee II abgedeckt. Möglich wäre, dass im Wasser mit höherem Salzgehalt, wie im Skagerrak, die maximalen Wachstumsraten wieder niedriger werden. Darüber hinaus könnte der DOC-Gehalt limitierend wirken, wenn ein gewisser Wert unterschritten wird. Wasserproben aus dem Skagerrak wiesen die niedrigsten DOC-Werte auf (92,61 – 119,34 $\mu\text{mol/L}$). Ein ähnlich niedriger Wert wurde nur noch im Wasser der Nordsee-Station 5 gemessen (121,04 $\mu\text{mol/L}$). In dieser Wasserprobe lag die SGR im Vergleich aller 6 Nordsee-Stationen allerdings auch am niedrigsten.

Werden die Wasserproben aus Kattegat, Ostsee und Kieler Bucht mit einbezogen, korreliert der DOC-Gehalt invers mit der SGR. Hierbei muss jedoch die Autokorrelation von DOC und Salinität berücksichtigt werden.

Je höher die Wachstumsraten, desto geringer ist die Verdopplungszeit. Dies wird auch bei den Wachstumsraten von *Vibrio alginolyticus* deutlich. Die Verdopplungszeit für die bei 16,3°C inkubierten Wasserproben korreliert invers mit der Salinität. Je „practical salinity unit“ verringert sich diese um 0,32 Stunden für den Bereich zwischen 7,874 und 32,38 psu.

Die ursprünglich formulierte Hypothese, dass *Vibrio alginolyticus* bei höherer Salinität auch größere Wachstumsraten aufweist, konnte damit bestätigt werden. Auf die maximal gemessenen Zellzahlen in der stationären Phase hatte dies jedoch keinen großen Einfluss. Es zeigt sich zwar eine Tendenz zu höheren Zellzahlen bei höherer Salinität, diese ist jedoch nicht statistisch signifikant (Tab. 4). Ein positiver Effekt von Salinität auf das Vorkommen von *Vibrio alginolyticus* stellten auch Böer et al. (2013) fest. Die Studie konnte allerdings nur für Proben aus dem Sediment eine statistisch signifikante Korrelation nachweisen.

Die Verzögerungszeit von *Vibrio alginolyticus* lag in den Wasserproben von 15-30 psu konstant niedrig bei 20 Stunden. Bei niedrigerer oder höherer Salinität dauerte die Verzögerungszeit länger. Die Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass die Lag-Phase besonders schnell überwunden werden kann, wenn *Vibrio alginolyticus* sich im genannten Salinitätsbereich befindet. Einen vergleichbaren Hinweis auf einen optimalen Salinitätsbereich in Bezug auf die Wachstumsbedingungen von Vibrionen erhielten auch Caburlotto et al. (2012). Vibrionen im Freiwasser bevorzugten einen Salinitätsbereich von 20-28 psu, während im Plankton und im Sediment die höchsten Abundanzen bei 30-35 psu gefunden wurden.

Bei steigenden DOC-Werten verringerte sich die Verzögerungszeit. Die drei Wasserproben mit den höchsten DOC-Werten weisen jedoch die längsten Verzögerungszeiten auf (Abb. 23). Dies dürfte darin begründet sein, dass es sich bei den genannten Proben, um Wasser aus der Ostsee mit der niedrigsten Salinität handelt. Demnach dürfte der Salzgehalt einen größeren Einfluss auf das Wachstum von *Vibrio alginolyticus* haben als der DOC-Gehalt.

4.3.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Für *vibrio parahaemolyticus* lag kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der maximalen spezifischen Wachstumsrate und dem Gradienten eines Umweltparameters vor. Der Grund hierfür lag in einer zu großen Streuung der Messergebnisse um die Regressionsgerade (Abb. 33).

SGR [log/h]

SGR [log/h]

Abbildung 33: SGR in Abhängigkeit der Salinität und des DOC-Gehaltes

Abbildung 33 zeigt jedoch tendenziell eine höhere SGR bei niedriger bis mittlerer Salinität bzw. mittleren bis hohen DOC-Werten. Bestätigung fand dies in den Ergebnissen für die Verdopplungszeit. Die Verdopplungszeit befindet sich bei einer Salinität von bis zu 30 psu immer deutlich unter 10 Stunden, teilweise sogar unter 5. Bei höherem Salzgehalt steigt die Verdopplungszeit auf über 15 Stunden (Abb. 17). Für den DOC-Gehalt bedeutete dies lange Verdopplungszeiten in Wasserproben mit niedrigen Werten. Ab 150 $\mu\text{mol/L}$ bleibt diese dann konstant unter 10 Stunden (Abb.18). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein niedriger DOC Wert und hohe Salinität das Wachstum des Keimes hemmen können.

Die Ausgangshypothese eines besseren Wachstums von *Vibrio parahaemolyticus* bei moderater Salinität und die Limitierung des Wachstums durch niedrige DOC-Werte findet darin Bestätigung. Abbildung 18 zeigt einen exponentiell abnehmenden Graphen in Bezug auf DOC ($R^2 = 0,83$). Niedrige Werte könnten demnach limitierend auf das Wachstum wirken. In Abbildung 17 wird deutlich, dass die quadratische Funktion mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,72 die beste Annäherung an die Verdopplungszeit in Abhängigkeit der Salinität liefert. In den Wasserproben mit niedriger bis moderater Salinität verliefen die Verdopplungszeiten deutlich schneller, als in den Wasserproben mit hoher Salinität. Um abschließend feststellen zu können, ob es sich dabei um einen optimalen Bereich für ein schnelles Wachstum dieses Keimes handelt, wären Vergleichswerte mit noch niedrigerem Salzgehalt nötig. Der Ausgangshypothese und dem Graphen in Abbildung 17 folgend müssten die Verdopplungszeiten sich, bei sehr geringer Salinität, demnach erhöhen.

Der Salzgehalt galt auch in einer Untersuchung vor Spaniens Küste als wichtigster Faktor für die Verteilung von *Vibrio parahaemolyticus* (Martinez-Urtaza, 2007). Bei niedriger Salinität

wurde der Keim häufiger gefunden, wobei berücksichtigt werden muss, dass der Salzgehalt nur in einem engen Bereich von 30,9 ppt – 36,2 ppt variierte. Bezogen auf die maximalen Zellzahlen würden unsere Ergebnisse in diesem kleinen Bereich die gleichen Schlussfolgerungen zulassen (Abb. 34)

Maximale Zellzahl (log) pro ml

Abbildung 34: Maximale Zellzahl in Abhängigkeit der Salinität

Abbildung 34 verdeutlicht aber auch, dass die maximalen Zellzahlen unter 30 psu wieder niedriger werden.

Böer et al. (2013) fanden in der Nordsee allerdings ebenfalls eine inverse Korrelation von Salinität und dem Auftreten von *Vibrio parahaemolyticus* in einem Bereich von 4 – 27 psu. Ein größerer Einfluss wurde hier jedoch der Temperatur zugesprochen. Unsere Ergebnisse (Abb. 34) zeigten dagegen eine positive Korrelation von maximalen Zellzahlen und Salinität. Die größte Abundanz konnte im Wasser der Region Nordsee II bei ca. 30 psu und einer Inkubationstemperatur von 17,5 °C gemessen werden. Da es sich hierbei um die höchste Inkubationstemperatur unserer Wasserproben handelt, könnte es den großen Einfluss der Temperatur widerspiegeln, der bereits von anderen Studien als entscheidender Einflussfaktor für das Auftreten von *Vibrio parahaemolyticus* aufgezeigt wurde (Vezzuli et al., 2009, Böer et al., 2013).

Die berechnete Lag-Phase von *Vibrio parahaemolyticus* war in fast allen Wasserproben mit ca. 14 - 34 Stunden verhältnismäßig kurz. Eine Ausnahme bildete das Wasser der salzärmeren Ostseestationen, wo es zwischen 40 und knapp 60 Stunden dauerte, bis das Wachstum einsetzte.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine große maximale spezifische Wachstumsrate nicht gleichzeitig bedeutet, dass auch die größten maximalen Zellzahlen und die kürzesten Lag-Phasen im Wasser der entsprechenden Stationen auftreten müssen. Es ist davon auszugehen, dass nur die Kombination mehrerer Umweltparameter die Variabilität des Wachstums erklären kann. Insgesamt bleibt aber festzuhalten, dass *Vibrio parahaemolyticus* sehr unterschiedliche Bedingungen in Bezug auf Salinität und Temperatur toleriert. Das ubiquitäre Auftreten des Keimes in Küstenregionen konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Böer et al., 2013, Caburlotto et al., 2011, Hervio-Heath et al., 2002, Vezzuli et al., 2009):

4.3.3 *Vibrio vulnificus*

Für *Vibrio vulnificus* konnte kein statistisch signifikanter Einfluss von Salinität oder DOC-Gehalt auf die maximalen spezifischen Wachstumsraten festgestellt werden. Entlang der Gradienten war die SGR fast konstant.

Die größte Abundanz in der stationären Phase trat entgegen den Erwartungen in Wasserproben mit hoher Salinität auf. Bisher wurde *Vibrio vulnificus* meist im Wasser mit niedriger bis mittlerer Salinität gefunden (Böer et al., 2013, Hervio-Heath et al., 2002). Bezogen auf ihr gesamtes Datenset, fanden auch Randa et al. (2004) eine inverse Korrelation von Abundanz und Salinität. Eine spezielle Betrachtung der Sommermonate offenbarte jedoch für diesen Zeitraum eine positive Korrelation. Höhere Temperaturen führten demnach dazu, dass *Vibrio vulnificus* höhere Salzgehalte tolerierte. Da in dieser Arbeit Wasserproben eine Temperatur auf dem Niveau von Sommermonaten hatten, dürfte darin die hohe Abundanz von *Vibrio vulnificus* im Wasser mit hoher Salinität begründet sein.

Die Isolierung des Keimes aus der Umwelt gelang meist erst bei einer Temperatur von über 14 °C (Böer et al., 2013, Oliver 2005). Materna et al. (2012) zeigten auf, dass die ökologische Nische von Vibrionen einen deutlich größeren Bereich umfasse, als ihr tatsächliches Vorkommen, insbesondere in Bezug auf die Salinität. Sie leiteten aus ihren Ergebnissen ab, dass der Grund für das seltene Auftreten von *Vibrio vulnificus* in salzigeren und kühleren

Gebieten eher auf biotische, als auf abiotische Umweltfaktoren zurückzuführen sei. Bei Vorversuchen zu dieser Arbeit konnte jedoch festgestellt werden, dass in Wasser mit hohem Salzgehalt und niedriger Inkubationstemperatur (13 °C) ein Wachstum der Reinkultur von *Vibrio vulnificus*, trotz langer Inkubationszeit von über 10 Tagen, komplett ausblieb, während bei gleicher Temperatur aber niedrigem Salzgehalt ein Wachstum des Keimes möglich war (Ergebnisse hier nicht aufgeführt). Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich der Einfluss des Salzgehaltes auf das Wachstum von *Vibrio vulnificus* erst bei niedrigen Temperaturen von unter 14 °C bemerkbar macht.

Die Ausgangshypothesen, dass die Wachstumsraten von *Vibrio vulnificus* invers mit der Salinität korrelieren und durch einen niedrigen DOC-Gehalt limitiert werden, konnten für die untersuchte Inkubationstemperatur jedoch nicht bestätigt werden.

4.3.4 *Vibrio cholerae*

Dies gilt ebenso für *Vibrio cholerae*. Die Wachstumsraten konnten in keinen linearen Zusammenhang mit den Umweltparametern gebracht werden, wenn von der Temperatur abgesehen wird.

Lineare Zusammenhänge bei der Auswertung der Wachstumskurven waren nur in Bezug auf die Lag-Phase erkennbar. Die Dauer der Lag-Phase korrelierte positiv mit der Salinität und invers mit DOC. Je höher der Salzgehalt bzw. je niedriger der DOC-Gehalt, desto länger dauerte es, bis das Wachstum von *Vibrio cholerae* einsetzte. Die Hypothesen, dass die Wachstumsraten von *Vibrio cholerae* invers mit der Salinität korrelieren und durch einen niedrigen DOC-Gehalt limitiert werden, konnten nicht bestätigt werden. Vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf *Vibrio cholerae* wurden von Materna et al. (2012) erzielt. Dort zeigte der Keim eine große Toleranz gegenüber Veränderungen von Temperatur und Salzgehalt, obwohl die Stämme aus warmen Ästuaren und Frischwassergebieten stammten.

Die positive Korrelation von Lag-Phase und Salinität macht andererseits deutlich, dass *Vibrio cholerae* in den Wasserproben mit niedriger Salinität und dementsprechend hohem DOC-Gehalt zumindest schneller beginnt zu wachsen und dadurch auch früher seine maximalen Zellzahlen erreicht. Dieser Parameter konnte in den Untersuchungen von Materna et al. (2012) nicht berücksichtigt werden.

5. Fazit

Der gewählte Versuchsaufbau bot die Möglichkeit, Wachstumsraten von Reinkulturen zu messen. Zu diesem Zweck musste das Wasser steril filtriert und pasteurisiert werden, damit die Ermittlung verlässlicher Ergebnisse im Durchflusszytometer gewährleistet werden konnte. Die sterilen Wasserproben stellen dadurch eine stark vereinfachte Form eines potentiellen Lebensraumes dar, da nur abiotische Faktoren das Wachstum der Keime beeinflussen. Unter realen Bedingungen werden Vibrionen darüber hinaus nicht nur in der Wassersäule, sondern auch im Sediment und Plankton gefunden. Im Plankton liegt nach Caburlotto et al. (2012) sogar eine deutlich höhere Abundanz vor, als im Freiwasser.

Die Keime *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* konnten in den untersuchten Wasserproben (7,9 – 34 psu; 14,6 – 17,5 °C) als Reinkultur von 10^2 Zellen pro ml auf 4×10^4 – 7×10^5 Zellen pro ml wachsen. Je nach Keim und Wasserprobe konnten die dargestellten Variationen im Wachstumsverhalten festgestellt werden. Eine wichtige Erkenntnis ergibt sich aus der Tatsache, dass neben *Vibrio alginolyticus* und *Vibrio parahaemolyticus* auch *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* im Wasser mit hoher Salinität bei der gegebenen Temperatur starkes Wachstum verzeichnen können. Zumindest als Reinkultur zeigten die Keime in den durchgeführten Versuchen innerhalb kurzer Zeit deutliche Wachstumsraten. Unter Berücksichtigung, dass der Temperatur eine tragende Rolle für das Wachstum von Vibrionen zugeschrieben wird, muss die in situ Inkubationstemperatur der Wasserproben als entscheidender Faktor aufgeführt werden. Da die Wasserproben im Hochsommer genommen wurden, lag auch die in situ Temperatur entsprechend hoch. Wie die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, kann sich *Vibrio vulnificus* bereits bei diesen Temperaturen auch im Wasser der Nordsee stark vermehren. Dies sollte gerade in besonders heißen Sommern und im Zuge der erwarteten Klimaerwärmung nicht unterschätzt werden, weil steigende Temperaturen das Wachstum noch begünstigen dürften. Möglicherweise treffen in Bezug auf das seltene Auftreten von *Vibrio vulnificus* in salzigeren Gebieten die Rückschlüsse von Materna et al. zu, biotische Faktoren seien dafür verantwortlich. Es wird beispielsweise diskutiert, dass es innerhalb der Gattung *Vibrio* konkurrenzfähigere Arten in Bezug auf die Nutzung von Nährstoffen geben könnte, wodurch die Ausbreitung unterlegener Arten begrenzt werde (Eiler et al., 2006). Das ubiquitäre Auftreten von *Vibrio parahaemolyticus* spricht für besonders gute Konkurrenzfähigkeit. Nach Whitaker et al. (2010) wird das Auftreten pathogener Stämme von

Vibrio parahaemolyticus durch niedrige Salinität begünstigt. Im Wissen der bereits aufgetretenen Fälle spricht daher weiterhin einiges dafür, dass die Ostsee ein größeres Gefahrenpotential für pathogene Keime bietet, als die Nordsee.

6. Ausblick

Die Durchflusszytometrie bietet eine geeignete Methode zur Messung von Bakterienpopulationen und deren Wachstum. Die Arbeit hat gezeigt, dass potentiell pathogene Vibrionen in den Sommermonaten im Untersuchungsgebiet eine große Abundanz im Freiwasser erreichen können. Für die höchsten maximalen Wachstumsraten könnte ein komplexes Zusammenspiel von biotischen und abiotischen Faktoren verantwortlich sein. Ein übergeordneter Einfluss dürfte jedoch von der Temperatur ausgehen. Zukünftige Versuche und Modellberechnungen sollten daher gezielt steigende Temperaturen einbeziehen, um das Gefahrenpotential in Nord- und Ostsee, im Zuge der Klimaerwärmung, besser abschätzen zu können. Sicherlich wäre auch eine bessere Aufklärung für Risikogruppen förderlich. Ältere Menschen mit Vorerkrankungen sind sich beispielsweise der Gefahr einer Infektion durch den Verzehr von rohen Meeresfrüchten oft nicht bewusst. Gerade in einer globalisierten Welt ist dieses Risiko nicht nur auf tropische Regionen begrenzt und sollte daher nicht unterschätzt werden. Eine Erkrankung von Touristen in Folge eines Badeurlaubs stellt in diesen Breiten noch die Ausnahme dar. Die aufgetretenen Fälle in besonders heißen Sommern könnten sich jedoch wiederholen. Steigende Wassertemperaturen in Folge der Klimaerwärmung bieten Anlass zur Annahme, dass Infektionen in den gemäßigten Breiten häufiger werden könnten. Die Arbeit hat gezeigt, dass *Vibrio vulnificus* und *Vibrio cholerae* auch im salzigeren Nordseewasser hohe Wachstumsraten erreichen können. Da diese Keime in der Umwelt nur selten aus Wasserproben mit hoher Salinität isoliert wurden, könnte die Konkurrenzfähigkeit in Bezug auf den Standort eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang bedarf es aber noch weiterer Studien, um das Gefahrenpotential besser abschätzen zu können.

Literaturverzeichnis

Austin, B. (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140 : 310-317.

Baker-Austin, C., Trinanés, J. A., Taylor, N. G., Hartnell, R., Siitonen, A., & Martínez-Urtaza, J. (2012). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Environmental microbiology reports* 2 , S. 7-18.

Böer, S., Heinemeyer, E.-A., Luden, K., Erler, R., Gerds, G., Janssen, F., Brennholt, N. (2013). Temporal and Spatial Distribution Patterns of Potentially Pathogenic *Vibrio spp.* at Recreational Beaches of the German North Sea. *Environmental Microbiology*.

Burzlauff, P. (2005). Neue Anwendungsmethoden der Durchflusszytometrie in der Biotechnologie. Hannover, Deutschland.

Caburlotto, G., Bianchi, F., Gennari, M., Ghidini, V., Socal, G., Bernardi Aubry, F., Bastianini, M., Taifi, M., Lleo, M. (2012). Integrated Evaluation of Environmental Parameters Influencing *Vibrio* Occurrence in the Coastal Northern Adriatic Sea (Italy) Facing the Venetian Lagoon. *Microbial Ecology* 63: 20-31.

Calvo-Díaz, A., Morán, X. (2006). Seasonal dynamics of picoplankton in shelf waters of the southern Bay of Biscay. *Aquatic Microbial Ecology*, 42: 159-174.

Collin, B., & Rehnstam-Holm, A.-S. (2011). Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden. Göteborg; Kristiansand, Sweden.

Corzo, A., Rodríguez-Galvez, S., Lubian, L., Sobrino, C., Sangrá, P., Martínez, A. (2005). Antarctic marine bacterioplankton subpopulations discriminated by their apparent content of nucleic acids differ in their response to ecological factors. *Polar Biology*, 29: 27-39.

Drake, S. L., DePaola, A., & Jaykus, L.-A. (2007). An Overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

Eiler, A., Johansson, M., Bertilsson, S. (2006). Environmental Influences on *Vibrio* Populations in Northern Temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (9): 6004-6011.

- Frank, C., Littman, M., Alpers, K., Hallauer, J. (2006). *Vibrio vulnificus* wound infections after contact with the Baltic Sea, Germany. *Euro Surveill.* 2006;11(33):pii=3024. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3024>
- Gasol, J., Zweifel, U., Peters, F., Fuhrmann, J., Hagström, A. (1999). Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 4475-4483.
- Gierse, A. (2007). Anwendung moderner optischer Analysesysteme in der Biotechnologie. Hannover, Deutschland.
- Hervio-Heath, D., Colwell, R.R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M., Pommepuy, M. (2002). Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 1123-1135.
- Kim, Y.W., Lee, S.H., Hwang, I.G., Yoon, K.S. (2012). Effect of Temperature on Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Flounder, Salmon Sashimi and Oyster Meat. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9: 4662-4675.
- Lebaron, P., Servais, P., Agogue, H., Courties, C., Joux, F. (2001). Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Applied Environmental Microbiology*, 67: 1775-1782.
- Longnecker, K., Sherr, B., Sherr, E. (2005). Activity and phylogenetic diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content and electron transport system activity in an upwelling ecosystem. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 7737-7749.
- Lukinmaa, S., Mattila, K., Lehtinen, V., Hakkinen, M., Koskela, M., Siitonen, A. (2006). Territorial waters of the Baltic Sea as a source of infections caused by *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139: report of 3 hospitalized cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 54: 1-6.
- Marie, D., Vaulot, D., Partensky, F. (1996). Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1 and Pico-Green for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 1649-1655.
- Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanés, J., Pazos, Y., Garcia-Martin, O. (2007). Environmental Determinants of the Occurrence and Distribution of *Vibrio*

parahaemolyticus in the Rias of Galicia, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (1): 265-274.

Martinez-Urtaza, J., Blanco-Abad, V., Rodriguez-Castro, A., Ansedo-Bermejo, J., Miranda, A., Rodriguez-Alvarez, X. (2011). Ecological determinants of the occurrence and dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in offshore areas. *The ISME Journal*, 1-13.

Materna, A., Friedman, J., Bauer, C., David, C., Chen, S., Huang, I., Gillens, A., Clarke, S., Polz, M., Alm, E. (2012). Shape and evolution of the fundamental niche in marine *Vibrio*. *The ISME Journal*, 1-10.

Moran, X., Bode, A., Suárez, L., Nogueira, E. (2007). Assessing the relevance of nucleic acid content as an indicator of marine bacterial activity. *Aquatic Microbial Ecology*, 46: 141-152.

Neifer, J. & Frank, C. (Mai 2012). Informationsbroschüre zu Nicht-Cholera-Vibrionen in Deutschland. Berlin, Deutschland.

Oberbeckmann, S. (2011). *Vibrio* spp. in the German Bight. Helgoland, Deutschland.

Oberbeckmann, S., Wichels, A., Wiltshire, K. H., & Gerdts, G. (2011). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. Helgoland, Deutschland.

Oliver, J. (2005). *Vibrio vulnificus*. In: Belkin, S., Colwell, R. Oceans and health: pathogens in the marine environment. Springer, New York, S. 253-276.

Randa, M., Polz, M., & Lim, E. (2004). Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* Population Dynamics as Assessed by Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (9): 5469-5476.

Rothe, G. (2007). Technische und Methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In A. T. Ulrich Sack, *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* (S. 27-70). Basel: Karger.

Ruppert, J., Panzig, B., Guertler, L., Hinz, P., Schwesinger, G., Felix, S. B., Friesecke, S. (2004). Two cases of severe sepsis due to *Vibrio vulnificus* wound infection acquired in the Baltic Sea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 912-915.

Scharek, R., Latasa, M. (2007). Growth, grazing and carbon flux of high and low nucleic acid bacteria differ in surface and deep chlorophyll maximum layers in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 46: 153-161.

Servais, P., Courties, C., Lebaron, P., Troussellier, M. (1999). Coupling bacterial activity measurements with cell sorting by flow cytometry. *Microbial Ecology*, 38: 180-189.

Sherr, E., Sherr, B., Longnecker, K. (2006). Distribution of bacterial abundance and cell-specific nucleic acid content in the Northeast Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part I*, 53: 713-725.

Thompson, F., Iida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 403-431.

Van Wambeke, F., Catala, P., Pujo-Pay, M., Lebaron, P. (2011). Vertical and longitudinal gradients in HNA-LNA cell abundances and cytometric characteristics in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, 8: 1853-1863.

Vaque, D., Casamayor, E., Gasol, J. (2001). Dynamics of whole community bacterial production and grazing losses in seawater incubations as related to the changes in the proportions of bacteria with different DNA content. *Aquatic Microbial Ecology*, 25: 163-177.

Vezulli, L., Pezzati, E., Moreno, M.; Fabiano, M., Pane, L., Pruzzo, C. (2009). Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). *Microbial Ecology*, 58: 808-818.

Vital, M., Stucki, D., Egli, T., & Hammes, F. (2010). Evaluating the Growth Potential of Pathogenic Bacteria in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (19): 6477-6484.

Wang, Y. H. (2010). Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in biotechnology Vol.28 No.8* .

Zubkov, M., Fuchs, B., Burkill, P., Amann, R. (2001). Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 5210-5218.

Weitere Quellen

BD Biosciences. (2012). Technical Bulletin. Threshold and Analysis of Small Particles on the BD Accuri™ C6 Cytometer .

Bio-Rad Laboratories, Inc. . *AbD serotec*. Abgerufen am 6. Mai 2013 von <http://www.abdserotec.com/resources/flow-cytometry-ebook/principles-of-the-flow-cytometer/signal-processing.html>

Molecular Probes, Inc. (2006). SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain.

Anhang 1 Optische Dichte in MB-Medium

Datum	Inkubationszeit [h]	OD <i>v. alginolyticus</i>	OD <i>v. parahaemolyticus</i>	OD <i>v. vulnificus</i>	OD <i>v. cholerae</i>	Stationen
15.01.2013	23	1,199	1,074	0,756	0,757	16,18,19
28.01.2013	24,5	0,912	1,293	0,722	0,855	20,22,23
05.03.2013	24,5	0,938	1,219	0,877	0,759	26,27,28
18.03.2013	24,5	1,101	1,106	0,857	0,788	12,13,14
25.03.2013	24	1,009	1,315	0,77	0,755	6,7,8
03.04.2013	25	0,564	1,34	0,487	0,667	1,3,5

Anhang 2 Verdünnungsreihen

Station 16,18,19 15.01.2013

Verdünnung	Messung (in 20 µl)	umgerechnet auf 10 ⁻⁴	Mittelwert	Zellen pro ml	Inokulat [ml]	Inokulat [µl]
<i>v. alginolyticus</i>						
10 ⁻²	291.812	2.918				
10 ⁻³	31.490	3.149				
10 ⁻⁴	3.049	3.049	3.039	151950	0,0066	6,6
10 ⁻⁵	322				0,0658	66
<i>v. parahaemolyticus</i>						
10 ⁻²	219.839	2.198				
10 ⁻³	23.024	2.302				
10 ⁻⁴	2.196	2.196	2.232	111600	0,0090	9
10 ⁻⁵	257				0,0896	90
<i>v. vulnificus</i>						
10 ⁻²	123.141	1.231				
10 ⁻³	13.250	1.325				
10 ⁻⁴	1.319	1.319	1.292	64600	0,0155	15,5
10 ⁻⁵	152				0,1548	155
<i>v. cholerae</i>						
10 ⁻²	126.110	1.261				
10 ⁻³	12.893	1.289				
10 ⁻⁴	1.326	1.326	1.292	64600	0,0155	15,5
10 ⁻⁵	135				0,1548	155

Station 20,22,23 28.01.2013

Verdünnung	Messung (in 20 µl)	umgerechnet auf 10 ⁻⁴	Mittelwert	Zellen pro ml	Inokulat [ml]	Inokulat [µl]
<i>v. alginolyticus</i>						
10 ⁻²	198.205	1982				
10 ⁻³	21.393	2139				
10 ⁻⁴	2.174	2174	2098	104900	0,0095	9,5
10 ⁻⁵	324				0,0953	95
<i>v. parahaemolyticus</i>						
10 ⁻²	257.654	2.577				
10 ⁻³	27.320	2.732				
10 ⁻⁴	2.858	2.858	2.722	136109	0,0073	7,3
10 ⁻⁵	363				0,0735	73
<i>v. vulnificus</i>						
10 ⁻²	180.577	1.806				
10 ⁻³	19.493	1.949				
10 ⁻⁴	1.949	1.949	1.901	95050	0,0105	10,5
10 ⁻⁵	221				0,1052	105
<i>v. cholerae</i>						
10 ⁻²	203.622	2.036				
10 ⁻³	21.965	2.197				
10 ⁻⁴	2.386	2.386	2.206	110312	0,0091	9,1
10 ⁻⁵	435				0,0907	91

Station 26,27,28 05.03.2013

Verdünnung	Messung (in 20 µl)	umgerechnet auf 10 ⁻⁴	Mittelwert	Zellen pro ml	Inokulat [ml]	Inokulat [µl]
<i>v. alginolyticus</i>						
10 ⁻²	201.764	2017,64				
10 ⁻³	21.737	2173,7				
10 ⁻⁴	2.562	2562	2251	112550	0,0089	8,9
10 ⁻⁵	788				0,0888	89
<i>v. parahaemolyticus</i>						
10 ⁻²	218.604	2186,04				
10 ⁻³	21.067	2106,7				
10 ⁻⁴	2.744	2.744	2.399	119954	0,0083	8,3
10 ⁻⁵	758				0,0834	83
<i>v. vulnificus</i>						
10 ⁻²	265.748	2657,48				
10 ⁻³	29.023	2902,3				
10 ⁻⁴	3.311	3311	2957	147850	0,0068	6,8
10 ⁻⁵	723				0,0676	68
<i>v. cholerae</i>						
10 ⁻²	171.143	1711,43				
10 ⁻³	19.325	1932,5				
10 ⁻⁴	2341	2341	1995	99750	0,0100	10
10 ⁻⁵	655				0,0010	100

Station 12,13,14 18.03.2013

Verdünnung	Messung (in 20 µl)	umgerechnet auf 10 ⁻⁴	Mittelwert	Zellen pro ml	Inokulat [ml]	Inokulat [µl]
<i>v. alginolyticus</i>						
10 ⁻²	225.575	2255,75				
10 ⁻³	24.676	2467,6				
10 ⁻⁴	2.772	2772	2498	124900	0,0080	
10 ⁻⁵	667				0,0801	80
<i>v. parahaemolyticus</i>						
10 ⁻²	201.756	2017,56				
10 ⁻³	21.067	2106,7				
10 ⁻⁴	2.482	2.482	2.202	110100	0,0091	
10 ⁻⁵	610				0,0908	91
<i>v. vulnificus</i>						
10 ⁻²	153.904	1539,04				
10 ⁻³	16.433	1643,3				
10 ⁻⁴	1873	1873	1685	84250	0,0119	
10 ⁻⁵	580				0,1187	119
<i>v. cholerae</i>						
10 ⁻²	176.106	1761,06				
10 ⁻³	19.399	1939,9				
10 ⁻⁴	2241	2241	1981	99050	0,0101	
10 ⁻⁵	573				0,1010	101

Station 6,7,8 26.03.2013

Verdünnung	Messung (in 20 µl)	umgerechnet auf 10 ⁻⁴	Mittelwert	Zellen pro ml	Inokulat [ml]	Inokulat [µl]
<i>v. alginolyticus</i>						
10 ⁻²	215.832	2158				
10 ⁻³	22.713	2271				
10 ⁻⁴	2.644	2644	2358	117900	0,0085	8,5
10 ⁻⁵	659				0,0848	85
<i>v. parahaemolyticus</i>						
10 ⁻²	250.993	2510				
10 ⁻³	26.811	2681				
10 ⁻⁴	3.126	3.126	2.772	138600	0,0072	7,2
10 ⁻⁵	604				0,0722	72
<i>v. vulnificus</i>						
10 ⁻²	168.752	1688				
10 ⁻³	18.321	1832				
10 ⁻⁴	2.220	2220	1913	95650	0,0105	10,5
10 ⁻⁵	516				0,1045	105
<i>v. cholerae</i>						
10 ⁻²	185.176	1852				
10 ⁻³	19.444	1944				
10 ⁻⁴	2380	2380	2059	102950	0,0097	9,7
10 ⁻⁵	497				0,0971	97

Station 1,3,5 03.04.2013

Verdünnung	Messung (in 20 µl)	umgerechnet auf 10 ⁻⁴	Mittelwert	Zellen pro ml	Inokulat [ml]	Inokulat [µl]
<i>v. alginolyticus</i>						
10 ⁻²	76.483	765				
10 ⁻³	8.052	805				
10 ⁻⁴	1.068	1068	879	43950	0,0228	22,8
10 ⁻⁵	437				0,2275	228
<i>v. parahaemolyticus</i>						
10 ⁻²	250.951	2510				
10 ⁻³	25.632	2563				
10 ⁻⁴	2.877	2.877	2.650	132500	0,0075	7,6
10 ⁻⁵	571				0,0755	76
<i>v. vulnificus</i>						
10 ⁻²	106.965	1070				
10 ⁻³	11.349	1135				
10 ⁻⁴	1.373	1.373	1.193	59650	0,0168	16,8
10 ⁻⁵	422				0,1676	168
<i>v. cholerae</i>						
10 ⁻²	156.551	1566				
10 ⁻³	15.952	1595				
10 ⁻⁴	1.868	1.868	1.676	83800	0,0119	11,9
10 ⁻⁵	422				0,1193	119

Anhang 3 Berechnete Parameter der Wachstumskurven

<i>v. alginolyticus</i>	Y0	Y0 lower	Y0 upper	C	C lower	C upper	SGR	SGR lower	SGR upper
St 01	2,942	2,835	3,05	2,639	2,51	2,768	0,0997	0,07838	0,121
St 03	3,032	2,955	3,109	2,014	1,921	2,108	0,08564	0,06331	0,108
St 05	3,052	2,982	3,122	1,918	1,832	2,004	0,07478	0,05715	0,09241
St 06	2,974	2,767	3,181	2,59	2,376	2,804	0,1004	0,09481	0,1059
St 07	3,035	2,915	3,154	2,293	2,162	2,423	0,0787	0,07211	0,0853
St 08	2,917	2,732	3,103	2,711	2,506	2,916	0,08439	0,07232	0,09646
St 13	2,917	2,865	2,97	2,101	2,026	2,176	0,04995	0,04586	0,05404
St 14	2,955	2,887	3,023	2,12	2,021	2,218	0,05762	0,05144	0,0638
St 16	2,673	2,584	2,763	2,274	2,166	2,382	0,06177	0,05222	0,07133
St 18	2,639	2,397	2,88	2,082	1,804	2,36	0,03723	0,03086	0,0436
St 19	2,65	2,436	2,864	2,146	1,902	2,39	0,05105	0,04046	0,06164
St 20	2,853	2,786	2,92	1,972	1,878	2,067	0,04459	0,03889	0,05029
St 22	2,701	2,605	2,797	2,273	2,151	2,394	0,04581	0,04058	0,05103
St 23	2,877	2,803	2,952	1,906	1,803	2,008	0,04689	0,03915	0,05463
St 26	3,296	3,231	3,36	2,09	2,006	2,175	0,0619	0,05556	0,06825
St 27	3,045	2,826	3,264	2,036	1,801	2,272	0,05039	0,04581	0,05496
St 28	2,899	2,518	3,281	2,196	1,783	2,609	0,04886	0,04479	0,05292

<i>v. alginolyticus</i>	Lag	Lag lower	Lag upper	Doubling Time	DT lower	DT upper	Ymax	Ymax lower	Ymax upper
St 01	27,39	23,33	31,45	6,953	5,728	8,844	5,581	5,522	5,64
St 03	28,44	24,16	32,72	8,093	6,419	10,95	5,046	5	5,092
St 05	29,15	25,34	32,97	9,269	7,501	12,13	4,971	4,926	5,015
St 06	14,47	12,13	16,81	6,906	6,544	7,311	5,564	5,539	5,59
St 07	20,59	17,64	23,54	8,807	8,126	9,613	5,327	5,289	5,365
St 08	21,97	17,15	26,8	8,214	7,186	9,584	5,628	5,568	5,689
St 13	35,38	33,3	37,45	13,88	12,83	15,12	5,019	4,969	5,069
St 14	41,55	38,94	44,15	12,03	10,86	13,47	5,074	5,007	5,141
St 16	24,9	21,26	28,55	11,22	9,718	13,27	4,947	4,897	4,998
St 18	17,42	6,907	27,92	18,62	15,9	22,46	4,72	4,644	4,796
St 19	19,29	10,46	28,12	13,58	11,24	17,13	4,796	4,728	4,865
St 20	54,49	51,31	57,67	15,54	13,78	17,82	4,825	4,762	4,889
St 22	38,66	34,25	43,07	15,13	13,58	17,08	4,974	4,911	5,037
St 23	52,48	48,69	56,26	14,78	12,69	17,71	4,783	4,716	4,85
St 26	24,85	21,95	27,75	11,2	10,16	12,48	5,386	5,348	5,425
St 27	18,06	11,51	24,6	13,76	12,61	15,13	5,081	5,039	5,124
St 28	14,66	4,844	24,48	14,19	13,1	15,47	5,095	5,031	5,16

<i>v. parahaemolyticus</i>	Y0	Y0 lower	Y0 upper	C	C lower	C upper	SGR	SGR lower	SGR upper
St 01	3,021	2,906	3,137	2,512	2,38	2,645	0,07826	0,06646	0,09007
St 03	2,975	2,859	3,091	2,621	2,48	2,761	0,06278	0,05214	0,07343
St 05	3,061	2,961	3,161	2,374	2,253	2,495	0,05865	0,04901	0,06829
St 06	2,461	2,112	2,809	3,362	3,005	3,719	0,0962	0,09104	0,1014
St 08	2,859	2,748	2,97	2,991	2,859	3,122	0,1019	0,08218	0,1217
St 12	2,974	2,862	3,086	2,442	2,31	2,573	0,04561	0,04049	0,05074
St 13	2,94	2,835	3,045	2,565	2,439	2,691	0,04042	0,03647	0,04437
St 14	3,044	2,923	3,164	2,322	2,177	2,467	0,04283	0,03664	0,04901
St 16	2,869	2,773	2,964	2,556	2,446	2,667	0,2698	0,1936	0,346
St 18	2,864	2,766	2,962	2,489	2,375	2,603	0,2313	0,1807	0,2818
St 19	2,595	2,496	2,694	2,865	2,748	2,981	0,1657	0,1213	0,2101
St 20	2,842	2,762	2,922	2,373	2,263	2,484	0,1135	0,08106	0,1459
St 22	2,824	2,745	2,903	2,378	2,286	2,469	0,1288	0,1097	0,1479
St 23	2,934	2,872	2,996	2,272	2,191	2,352	0,2695	0,1601	0,379
St 26	3,204	3,134	3,275	1,864	1,781	1,946	0,08241	0,0733	0,09151
St 27	3,211	3,074	3,347	1,902	1,747	2,058	0,1042	0,07579	0,1327
St 28	3,089	2,875	3,304	2,076	1,838	2,313	0,1057	0,08374	0,1276

<i>v. parahaemolyticus</i>	Lag	Lag lower	Lag upper	Doubling Time	DT lower	DT upper	Ymax	Ymax lower	Ymax upper
St 01	25,05	21,2	28,91	8,857	7,696	10,43	5,534	5,482	5,586
St 03	28,64	24,38	32,9	11,04	9,44	13,29	5,595	5,528	5,663
St 05	28,29	24,28	32,31	11,82	10,15	14,14	5,435	5,376	5,493
St 06	14,01	9,753	18,27	7,205	6,839	7,613	5,822	5,789	5,856
St 08	27,21	23,33	31,1	6,8	5,696	8,435	5,85	5,792	5,907
St 12	29,83	25,32	34,33	15,2	13,66	17,12	5,416	5,36	5,471
St 13	31,58	26,9	36,26	17,15	15,62	19,01	5,505	5,449	5,56
St 14	34,09	28,74	39,44	16,18	14,14	18,92	5,366	5,296	5,436
St 16	33,98	32,1	35,86	2,569	2,003	3,58	5,425	5,37	5,481
St 18	34,66	33,22	36,09	2,997	2,46	3,836	5,353	5,296	5,411
St 19	29,63	26,45	32,82	4,183	3,299	5,716	5,459	5,398	5,521
St 20	55,74	52,41	59,06	6,109	4,751	8,551	5,216	5,141	5,291
St 22	40,26	38,79	41,73	5,38	4,685	6,316	5,202	5,156	5,247
St 23	58,65	55,94	61,37	2,572	1,829	4,33	5,205	5,154	5,256
St 26	23,85	21,15	26,55	8,411	7,575	9,456	5,068	5,032	5,104
St 27	24,61	19,02	30,2	6,651	5,225	9,146	5,113	5,047	5,179
St 28	20,5	16,85	24,15	6,558	5,431	8,278	5,165	5,085	5,245

<i>v. vulnificus</i>	Y0	Y0 lower	Y0 upper	C	C lower	C upper	SGR	SGR lower	SGR upper
St 01	3,042	2,935	3,149	2,351	2,229	2,473	0,09192	0,07927	0,1046
St 03	3,185	3,062	3,307	1,919	1,777	2,062	0,09508	0,07351	0,1167
St 05	2,9	2,707	3,092	2,286	2,048	2,524	0,04556	0,03203	0,05908
St 07	2,452	1,67	3,234	2,669	1,852	3,487	0,04775	0,04146	0,05404
St 08	2,423	1,84	3,005	2,607	1,946	3,268	0,03159	0,02557	0,0376
St 12	3,045	2,944	3,147	2,031	1,886	2,176	0,1064	0,01197	0,2008
St 13	2,935	2,823	3,047	2,147	1,994	2,3	0,04902	0,04055	0,05749
St 14	2,913	2,825	3,002	2,227	2,096	2,358	0,08015	0,05406	0,1062
St 16	2,114	-0,45	4,677	2,672	0,032	5,31	0,04643	0,03552	0,05734
St 18	2,61	2,456	2,764	2,222	2,041	2,403	0,05481	0,02397	0,08565
St 19	2,501	2,299	2,704	2,263	2,01	2,516	0,04456	0,01619	0,07293
St 20	2,86	2,731	2,989	2,092	1,926	2,258	0,06075	0,0511	0,07039
St 22	2,834	2,706	2,962	1,949	1,789	2,109	0,05895	0,04937	0,06854
St 23	2,769	2,632	2,906	2,163	1,985	2,342	0,05343	0,04537	0,06149
St 26	3,317	2,939	3,694	1,277	0,883	1,67	0,04756	0,0375	0,05762
St 27	3,536	3,41	3,661	1,317	1,184	1,451	0,06615	0,05662	0,07568
St 28	3,493	3,368	3,618	1,214	1,082	1,347	0,06397	0,05419	0,07375

<i>v. vulnificus</i>	Lag	Lag lower	Lag upper	Doubling Time	DT lower	DT upper	Ymax	Ymax lower	Ymax upper
St 01	43,34	41,09	45,6	7,541	6,629	8,744	5,393	5,336	5,45
St 03	44,55	41,83	47,27	7,29	5,942	9,429	5,104	5,035	5,173
St 05	41,11	33,13	49,08	15,21	11,73	21,64	5,186	5,07	5,302
St 07	10,36	-9,39	30,11	14,52	12,83	16,72	5,121	5,041	5,202
St 08	12,58	-10,7	35,89	21,94	18,43	27,11	5,029	4,887	5,172
St 12	58,58	50,01	67,16	6,514	3,451	57,92	5,076	4,973	5,18
St 13	43,17	37,7	48,64	14,14	12,06	17,1	5,082	4,992	5,173
St 14	56,65	52,25	61,04	8,648	6,525	12,82	5,14	5,045	5,236
St 16	15,09	-65,6	95,86	14,93	12,09	19,52	4,785	4,653	4,917
St 18	41,19	26,16	56,21	12,65	8,093	28,92	4,832	4,737	4,927
St 19	34,01	10,27	57,74	15,56	9,504	42,81	4,764	4,639	4,89
St 20	42,39	38,14	46,63	11,41	9,847	13,56	4,952	4,862	5,041
St 22	41	36,96	45,03	11,76	10,11	14,04	4,783	4,699	4,866
St 23	39,56	35,04	44,09	12,97	11,27	15,28	4,932	4,833	5,031
St 26	19,07	8,335	29,81	14,57	12,03	18,48	4,593	4,533	4,653
St 27	21,32	18,16	24,48	10,48	9,159	12,24	4,853	4,818	4,888
St 28	20,61	17,66	23,56	10,84	9,399	12,79	4,707	4,676	4,738

<i>v. cholerae</i>	Y0	Y0 lower	Y0 upper	C	C lower	C upper	SGR	SGR lower	SGR upper
St 01	3,035	2,925	3,145	2,467	2,342	2,592	0,07038	0,06085	0,07992
St 03	2,984	2,787	3,182	2,234	2,008	2,461	0,06142	0,04479	0,07805
St 05	3,08	3,014	3,147	2,191	2,098	2,284	0,04638	0,03876	0,05399
St 06	3,138	3,05	3,226	2,494	2,392	2,595	0,06144	0,05434	0,06854
St 07	2,918	2,835	3,002	2,59	2,491	2,689	0,04795	0,04392	0,05198
St 08	2,864	2,563	3,166	2,78	2,318	3,242	0,03095	0,02302	0,03887
St 12	2,991	2,893	3,089	2,08	1,94	2,221	0,09396	0,03255	0,1554
St 13	2,925	2,804	3,046	2,079	1,905	2,253	0,08996	0,02428	0,1556
St 14	3,006	2,962	3,05	2,123	2,058	2,187	0,08242	0,06778	0,09705
St 18	2,607	2,365	2,849	2,448	2,156	2,739	0,03615	0,02779	0,0445
St 19	2,982	2,92	3,044	2,335	2,261	2,408	0,05748	0,04293	0,07203
St 20	2,778	2,693	2,863	2,669	2,568	2,769	0,05814	0,05359	0,0627
St 22	2,776	2,707	2,845	2,712	2,631	2,794	0,05415	0,05124	0,05706
St 23	2,979	2,917	3,04	2,481	2,408	2,554	0,04851	0,04582	0,0512
St 26	3,417	3,336	3,497	2,09	1,993	2,186	0,04965	0,04629	0,05302
St 27	3,482	3,379	3,585	1,852	1,712	1,992	0,06223	0,04815	0,07631
St 28	3,411	3,27	3,553	1,854	1,674	2,034	0,04902	0,0417	0,05635

<i>v. cholerae</i>	Lag	Lag lower	Lag upper	Doubling Time	DT lower	DT upper	Ymax	Ymax lower	Ymax upper
St 01	39,5	36,82	42,19	9,848	8,673	11,39	5,502	5,445	5,559
St 03	40,36	34,64	46,08	11,29	8,881	15,48	5,219	5,115	5,322
St 05	48,96	45,24	52,69	14,95	12,84	17,88	5,271	5,221	5,322
St 06	30,62	28,07	33,17	11,28	10,11	12,76	5,631	5,584	5,679
St 07	28,57	25,67	31,46	14,46	13,33	15,78	5,508	5,464	5,552
St 08	34,62	18,3	50,94	22,4	17,83	30,11	5,645	5,385	5,904
St 12	56,87	49,26	64,48	7,377	4,461	21,29	5,071	4,97	5,172
St 13	56,68	47,92	65,43	7,705	4,453	28,54	5,004	4,878	5,129
St 14	57,79	55,67	59,92	8,41	7,142	10,23	5,129	5,082	5,175
St 18	25,1	8,01	42,19	19,18	15,57	24,94	5,055	4,976	5,134
St 19	38,65	31,34	45,96	12,06	9,624	16,14	5,317	5,278	5,355
St 20	25,87	23,35	28,39	11,92	11,06	12,93	5,447	5,404	5,49
St 22	24,11	21,99	26,24	12,8	12,15	13,53	5,488	5,456	5,52
St 23	28,28	26,29	30,27	14,29	13,54	15,13	5,46	5,426	5,494
St 26	23,69	20,69	26,7	13,96	13,07	14,97	5,506	5,475	5,538
St 27	26,9	21,6	32,2	11,14	9,083	14,4	5,334	5,269	5,399
St 28	23,89	18,04	29,74	14,14	12,3	16,62	5,265	5,201	5,33

Anhang 4 Wachstumskurven aller Keime und Standorte

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Gemessene Zellzahl (log) pro ml

Anhang 5 Regressionsgeraden aller potentieller Zusammenhänge

Maximale Zellzahl (log) pro ml

Maximale Zellzahl (log) pro ml

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR [log/h]

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR [log/h]

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR [log/h]

SGR [log/h]

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

SGR [log/h]

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Maximale Zellzahl (log) pro ml

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR [log/h]

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR [log/h]

SGR [log/h]

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR [log/h]

Verzögerungszeit [h]

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR [log/h]

Verzögerungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Maximale Zelldichte (log) pro ml

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Gemessene Zelldichte (log) pro ml

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Maximale Zelldichte (log) pro ml

Verdopplungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Maximale Zelldichte (log) pro ml

Maximale Zellzahl (log pro ml)

SGR (log/h)

Verzögerungszeit [h]

SGR (log/h)

SGR (log/h)

Verzögerungszeit [h]

SGR (log/h)

Verzögerungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

SGR (log/h)

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Maximale Zellzahl (log) pro ml

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR (log/h)

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR (log/h)

SGR (log/h)

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR (log/h)

Verzögerungszeit (h)

Maximale Zellzahl (log) pro ml

SGR (log/h)

Verzögerungszeit (h)

Verdopplungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verzögerungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Verdopplungszeit [h]

Anhang 6 Auswertung der Regressionsgeraden

Vibrio alginolyticus

X-Achse	Y-Achse	Best Fit Steigung	95% Konfidenzintervall der Steigung	R ²	P-value für Steigung ≠ 0	P-value für Nicht-Linearität
Temperatur	Ymax	0,1627 ± 0,08405	-0,01636 to 0,3418	0,2	0,0719	0,0245
Salinity (16,3°C)	Ymax	0,01235 ± 0,008007	-0,005488 to 0,03019	0,1922	0,1539	0,197
Salinity	Ymax	0,01524 ± 0,006634	0,001107 to 0,02938	0,2604	0,0364	0,0203
DOC (16,3°C)	Ymax	-0,001086 ± 0,001136	-0,003617 to 0,001445	0,0838	0,3614	0,197
DOC	Ymax	-0,001358 ± 0,0009100	-0,003297 to 0,0005811	0,1293	0,1563	0,0203
Temperatur	SGR	0,01195 ± 0,005698	-0,0001973 to 0,02409	0,2266	0,0534	0,0007
Salinity (16,3°C)	SGR	0,001840 ± 0,0003143	0,001140 to 0,002541	0,7742	0,0002	0,3918
Salinity	SGR	0,001444 ± 0,0003793	0,0006357 to 0,002252	0,4914	0,0017	0,0687
DOC (16,3°C)	SGR	-0,0002195 ± 5,425e-005	-0,0003404 to -9,867e-005	0,6209	0,0023	0,3918
DOC	SGR	-0,0001465 ± 5,560e-005	-0,0002650 to -2,798e-005	0,3163	0,0188	0,0357
Temperatur	Lag	-6,738 ± 3,589	-14,39 to 0,9104	0,1903	0,0801	0,3546
Salinity (16,3°C)	Lag	-0,5301 ± 0,4298	-1,488 to 0,4275	0,132	0,2456	0,013
Salinity	Lag	-0,3248 ± 0,3165	-0,9992 to 0,3497	0,06559	0,3211	0,0007
DOC (16,3°C)	Lag	0,07625 ± 0,05653	-0,04971 to 0,2022	0,1539	0,2072	0,013
DOC	Lag	0,03219 ± 0,04055	-0,05422 to 0,1186	0,04032	0,4397	0,0203
Temperatur	Doubling Time	-1,754 ± 1,016	-3,920 to 0,4117	0,1657	0,1049	0,0245
Salinity (16,3°C)	Doubling Time	-0,3153 ± 0,06711	-0,4649 to -0,1658	0,6883	0,0008	0,1091
Salinity	Doubling Time	-0,2540 ± 0,06358	-0,3895 to -0,1185	0,5155	0,0012	0,1084
DOC (16,3°C)	Doubling Time	0,03813 ± 0,01053	0,01466 to 0,06160	0,5671	0,0047	0,1091
DOC	Doubling Time	0,02651 ± 0,009302	0,006682 to 0,04633	0,3512	0,0122	0,0203

Vibrio parahaemolyticus

X-Achse	Y-Achse	Best Fit Steigung	95% Konfidenzintervall der Steigung	R²	P-value für Steigung ≠ 0	P-value für Nicht-Linearität
Temperatur	Ymax	0,07978 ± 0,06680	-0,06257 to 0,2221	0,08683	0,2509	0,0245
Salinity (16,3°C)	Ymax	0,01536 ± 0,003760	0,006978 to 0,02373	0,6251	0,0022	0,1091
Salinity	Ymax	0,01620 ± 0,004160	0,007340 to 0,02507	0,5029	0,0014	0,0687
DOC (16,3°C)	Ymax	-0,002089 ± 0,0004825	-0,003165 to -0,001014	0,6522	0,0015	0,1091
DOC	Ymax	-0,001852 ± 0,0005576	-0,003040 to -0,0006636	0,4238	0,0047	0,0053
Temperatur	SGR	0,03021 ± 0,02169	-0,01602 to 0,07643	0,1145	0,1841	0,0632
Salinity (16,3°C)	SGR	-0,003664 ± 0,002463	-0,009151 to 0,001824	0,1812	0,1678	0,2788
Salinity	SGR	-0,004514 ± 0,001558	-0,007834 to -0,001195	0,3589	0,011	0,0245
DOC (16,3°C)	SGR	0,0004011 ± 0,0003397	-0,0003557 to 0,001158	0,1224	0,265	0,2788
DOC	SGR	0,0005352 ± 0,0001989	0,0001113 to 0,0009591	0,3255	0,0168	0,2418
Temperatur	Lag	-2,430 ± 3,441	-9,762 to 4,902	0,0322	0,4908	0,0632
Salinity (16,3°C)	Lag	-0,7518 ± 0,3607	-1,555 to 0,05178	0,3029	0,0637	0,0152
Salinity	Lag	-0,5886 ± 0,2531	-1,128 to -0,04935	0,2651	0,0344	0,0203
DOC (16,3°C)	Lag	0,09624 ± 0,04884	-0,01259 to 0,2051	0,2797	0,0771	0,6082
DOC	Lag	0,06501 ± 0,03269	-0,004657 to 0,1347	0,2086	0,0653	0,1818
Temperatur	Doubling Time	-3,912 ± 1,013	-6,071 to -1,754	0,4986	0,0015	0,0203
Salinity (16,3°C)	Doubling Time	0,2374 ± 0,08102	0,05689 to 0,4179	0,462	0,015	0,197
Salinity	Doubling Time	0,3481 ± 0,08062	0,1763 to 0,5199	0,5542	0,0006	0,0203
DOC (16,3°C)	Doubling Time	-0,02915 ± 0,01147	-0,05470 to -0,003599	0,3925	0,0293	0,2788
DOC	Doubling Time	-0,04557 ± 0,009355	-0,06550 to -0,02563	0,6127	0,0002	0,0203

Vibrio vulnificus

X-Achse	Y-Achse	Best Fit Steigung	95% Konfidenzintervall der Steigung	R²	P-value für Steigung ≠ 0	P-value für Nicht-Linearität
Temperatur	Ymax	-0,03891 ± 0,06298	-0,1731 to 0,09530	0,02481	0,546	0,0007
Salinity (16,3°C)	Ymax	0,01740 ± 0,005677	0,004747 to 0,03004	0,4843	0,012	0,1753
Salinity	Ymax	0,01558 ± 0,003583	0,007942 to 0,02321	0,5575	0,0006	0,7016
DOC (16,3°C)	Ymax	-0,002093 ± 0,0008192	-0,003918 to -0,0002676	0,3949	0,0286	0,1753
DOC	Ymax	-0,001795 ± 0,0004906	-0,002840 to -0,0007494	0,4715	0,0023	0,0687
Temperatur	SGR	-0,01254 ± 0,005483	-0,02422 to -0,0008537	0,2585	0,0372	0,3546
Salinity (16,3°C)	SGR	0,0008661 ± 0,0005302	-0,0003153 to 0,002047	0,2106	0,1335	0,4242
Salinity	SGR	0,0006513 ± 0,0005108	-0,0004373 to 0,001740	0,09776	0,2217	0,3186
DOC (16,3°C)	SGR	-8,168e-005 ± 7,519e-005	-0,0002492 to 8,584e-005	0,1056	0,3028	0,8247
DOC	SGR	-7,563e-005 ± 6,449e-005	-0,0002131 to 6,179e-005	0,08399	0,2592	0,9797
Temperatur	Lag	-13,39 ± 3,091	-19,98 to -6,802	0,5557	0,0006	0,08
Salinity (16,3°C)	Lag	0,2759 ± 0,3835	-0,5786 to 1,130	0,0492	0,4884	0,2788
Salinity	Lag	0,3512 ± 0,3811	-0,4609 to 1,163	0,05358	0,3714	0,0357
DOC (16,3°C)	Lag	-0,03454 ± 0,05124	-0,1487 to 0,07963	0,04345	0,5156	0,2788
DOC	Lag	-0,06122 ± 0,04646	-0,1602 to 0,03779	0,1037	0,2074	0,2418
Temperatur	Doubling Time	2,468 ± 0,9979	0,3413 to 4,595	0,2896	0,0258	0,7016
Salinity (16,3°C)	Doubling Time	-0,08750 ± 0,09431	-0,2976 to 0,1226	0,07926	0,3754	0,8247
Salinity	Doubling Time	-0,03764 ± 0,09953	-0,2497 to 0,1745	0,009442	0,7106	0,7016
DOC (16,3°C)	Doubling Time	0,005942 ± 0,01296	-0,02293 to 0,03481	0,02059	0,6564	0,8247
DOC	Doubling Time	0,004993 ± 0,01246	-0,02157 to 0,03155	0,01059	0,6944	0,9797

Vibrio cholerae

X-Achse	Y-Achse	Best Fit Steigung	95% Konfidenzintervall der Steigung	R²	P-value für Steigung ≠ 0	P-value für Nicht-Linearität
Temperatur	Ymax	0,1797 ± 0,03443	0,1063 to 0,2531	0,6449	0,0001	0,5
Salinity (16,3°C)	Ymax	-0,004147 ± 0,004929	-0,01530 to 0,007003	0,07292	0,4219	0,5216
Salinity	Ymax	-0,004718 ± 0,005023	-0,01542 to 0,005986	0,05554	0,3625	0,0687
DOC (16,3°C)	Ymax	0,0007944 ± 0,0006322	-0,0006356 to 0,002224	0,1493	0,2405	0,7381
DOC	Ymax	0,0009516 ± 0,0006014	-0,0003299 to 0,002233	0,1431	0,1344	0,5
Temperatur	SGR	-0,01525 ± 0,003058	-0,02177 to -0,008737	0,6239	0,0002	0,7016
Salinity (16,3°C)	SGR	0,0002810 ± 0,0003186	-0,0004397 to 0,001002	0,07953	0,4008	0,5216
Salinity	SGR	0,0007436 ± 0,0004026	-0,0001144 to 0,001602	0,1853	0,0846	0,1573
DOC (16,3°C)	SGR	-2,046e-005 ± 4,393e-005	-0,0001198 to 7,892e-005	0,02353	0,6525	0,5216
DOC	SGR	-0,0001071 ± 4,877e-005	-0,0002110 to -3,115e-006	0,2431	0,0443	0,1573
Temperatur	Lag	-9,710 ± 2,517	-15,07 to -4,347	0,4981	0,0015	0,0245
Salinity (16,3°C)	Lag	0,7911 ± 0,1695	0,4077 to 1,175	0,7076	0,0012	0,3333
Salinity	Lag	0,9397 ± 0,2052	0,5023 to 1,377	0,5829	0,0004	0,0203
DOC (16,3°C)	Lag	-0,1102 ± 0,02028	-0,1561 to -0,06438	0,7666	0,0004	0,2619
DOC	Lag	-0,1309 ± 0,02128	-0,1763 to -0,08558	0,7163	< 0,0001	0,0203
Temperatur	Doubling Time	2,877 ± 0,8247	1,120 to 4,635	0,448	0,0033	0,7433
Salinity (16,3°C)	Doubling Time	-0,05296 ± 0,08805	-0,2521 to 0,1462	0,03864	0,5624	0,5216
Salinity	Doubling Time	-0,09759 ± 0,09605	-0,3023 to 0,1071	0,0644	0,3257	0,8794
DOC (16,3°C)	Doubling Time	0,002826 ± 0,01199	-0,02429 to 0,02994	0,006139	0,8189	0,5216
DOC	Doubling Time	0,01478 ± 0,01188	-0,01054 to 0,04010	0,09348	0,2327	0,6538