

2 Methode

2.1 Standorte

Die fünf untersuchten Standorte, deren Lage in den Donau-Auen in Abbildung 2.1 veranschaulicht ist, untergliedern sich in vier Au-Stationen und eine Referenzstation am Hauptstrom der Donau. Die vier Au-Stationen teilen sich wiederum auf zwei verschiedene Gebiete in den Donau-Auen, die Lobau und die Regelsbrunner Au, auf. In der Lobau befinden sich drei der Stationen, welche sich in der Art der Anbindung unterscheiden. Zum einen wird die Lobau durch einen Altarm am südöstlichen Ende in Fließrichtung der Donau durchströmt. In diesem Abschnitt, unmittelbar nach dem Zufluss in das Augebiet, ist die Probenahmestelle Mannsdorfer Hagel (MH) gelegen. Dieser Standort wird durch seine sowohl geographische als auch hydrologische Nähe zum Hauptstrom gekennzeichnet. Zum anderen werden die zwei weiteren, flussaufwärts von MH gelegenen Stationen durch einen schmalen Augewässerabschnitt, genannt Schönauer Schlitz, unterhalb der Station MH mit dem durchströmten Altarm verbunden. Der Schönauer Schlitz stellt gleichzeitig den Zu- als auch Abfluss dar. Die zwei Probenahmestellen befinden sich einerseits am Kühwörther Wasser (KW) oberhalb der Gänshaufentraverse im mittleren Abschnitt der Lobau und andererseits am Eberschüttwasser (EW), welche sich im nordwestlichen Teil dieses Augebiets befindet. Die vierte Au-Station liegt in der Regelsbrunner Au. Die Probenahmestelle bei Regelsbrunn (RB) befindet sich oberhalb der Mündung dieses Augebiets in die Donau. Ähnlich wie die Station MH wird RB in Fließrichtung durchströmt und zeichnet sich durch eine hohe räumliche Nähe zur Donau aus.

Im Vergleich der vier Au-Stationen lässt sich für RB und MH eine häufige oberflächliche Anbindung mit der Donau beobachten. Dahingegen weisen KW und EW lediglich selten eine Verbindung zum Hauptstrom auf. Aufgrund des zumeist stehenden Charakters von KW und EW zeichnen sich diese Stationen durch einen Bewuchs von submersen Hydrophyten und Schwimmblattpflanzen aus, wobei letztere verstärkt an der Station EW auftreten (siehe Fotos zu den Stationen im Anhang).

Die zu Beginn erwähnte Referenzstation am Hauptstrom der Donau (DA) befindet sich stromabwärts der vier Au-Stationen bei Wildungsmauer.

2.2 Viren- und Bakterien-Abundanz

Die Abundanz der Viren (VA) und Bakterien (BA) wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie für unfiltrierte Proben bestimmt. Bei diesem direkten Zählverfahren werden Bakterien und Virenpartikel mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes, der sich an Nukleinsäuren anlagert, gefärbt und unter einem Lichtmikroskop sichtbar gemacht. Dies ist beispielhaft in Abbildung 2.2 für eine Probe aus dem Kühwörther Wasser dargestellt. Dabei werden unter dem Lichtmikroskop nicht die Virenpartikel selbst sondern ihre Fluoreszenzsignale betrachtet (Fuhrman und Hewson 2010). Weiters ist zu beachten, dass die in dieser Arbeit kurz als Viren-Abundanz bezeichnete Größe die Abundanz von virenähnlichen Partikeln (VLP) darstellt. Der Grund für die Verwendung dieses Begriffes liegt darin, dass mit der Epifluoreszenzmikroskopie ein geringer Anteil der gezählten Viren auch nicht-virulente Partikel darstellen können (Bettarel et al. 2000). Außerdem bezeichnet der in dieser Arbeit verwendete Begriff der heterotrophen Bakterien hier heterotrophe prokaryotische Zellen. Damit umfasst die hier verwendete Größe der Bakterien-Abundanz heterotrophe Bakterien und Archäen. An der Gewässeroberfläche stellen die Archäen allerdings nur einen geringen Anteil am Bakterioplankton dar. Dieser Anteil kann für das Süßwasser bis zu 15%

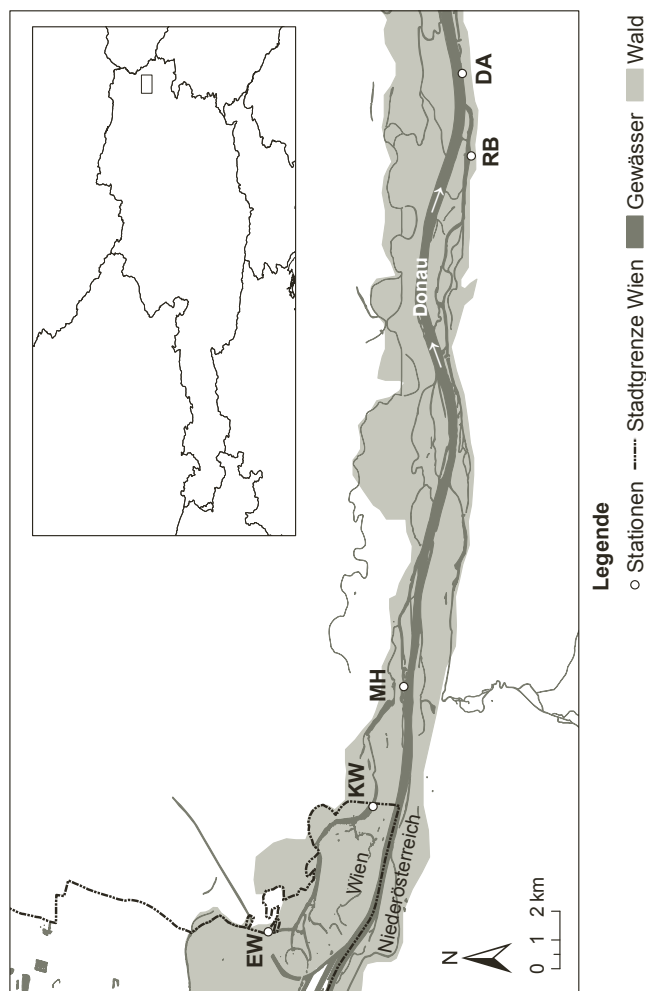


Abbildung 2.1: Karte der fünf untersuchten Standorte in den Donau-Auen. Eingefügte Karte zeigt die Lage des Untersuchungsgebiets in Österreich. Abkürzungen für die Stationen siehe Text im Kapitel Standorte. Quelle: Staatsgrenzen von ArcGIS Online, Stadtgrenze und Gewässer in Wien von „Offene Daten Österreichs“¹, Gewässer in Niederösterreich sowie Waldflächen digitalisiert mit Hilfe von ArcGIS Basemap Imagery.

¹<http://www.data.gv.at/> (07.10.2013)

betragen (Galand et al. 2006, Garneau et al. 2006, Pradeep Ram und Sime-Ngando 2008).

Für die Epifluoreszenzmikroskopie wurde der Farbstoff SYBR Gold (Invitrogen Molecular Probes) verwendet, welcher sich zur Visualisierung von einzel- und doppelsträngiger DNA und RNA eignet². Die Verwendung von SYBR Gold zum Färben der Proben wurde beispielsweise in Chen et al. (2001) beschrieben. Für die Filtration der Proben, welche zuvor mit Formaldehyd fixierten wurden, fanden Anodisc Filter (Whatman, 0.02 µm Porengröße) Verwendung. Um eine gleichmäßige Verteilung der Partikel auf der Filterfläche zu erhalten, wird zum einen ein Nitrocellulose Filter (Millipore, 0.45 µm Porengröße) als Trägerfilter verwendet. Zum anderen werden Filtrationsvolumen, die weniger als 1 ml betragen, mit 0.02 µm vorfiltriertem MilliQ auf 1 ml aufgefüllt. Der Farbstoff SYBR Gold wurde zwischen 15 und 30 Minuten lang im Dunkeln einwirken gelassen. Um das anschließende Ausbleichen des Farbstoffes zu verzögern wurde als Einbettungsmedium Citifluor verwendet. Bei der nachfolgenden Ermittlung der Viren- bzw. der Bakterien-Abundanz unter dem Mikroskop wurden 20 Zählfelder ausgewertet.

Die Abundanz (N) ergibt sich mit folgender Formel:

$$N = \frac{S \cdot n}{s \cdot V}$$

wobei S die Filterfläche, n die mittlere Anzahl pro Zählfeld, V das filtrierte Volumen und s die Fläche des Zählfeldes darstellen.

2.3 Umweltparameter

Neben der Viren- und Bakterien-Abundanz wurden Parameter zur Beschreibung der Standorte erhoben. Größen wie Leitfähigkeit (Cond), Sauerstoffgehalt (Oxy), Wassertemperatur (Temp) und pH-Wert (pH)

²<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp11494.pdf>
(03.11.2013)

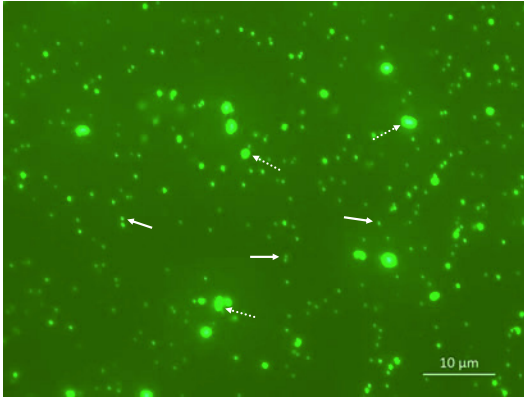


Abbildung 2.2: Foto einer mit SYBR Gold gefärbten Probe von der Station Kühwörther Wasser (KW) vom 23.05.2013. Die durchgezogenen Pfeile markieren beispielhaft die Fluoreszenzsignale von Viren, gepunktete Pfeile repräsentieren heterotrophe Bakterien.

wurden während der Probenahme mit tragbaren Messgeräten von WTW gemessen. Dabei wird der Sauerstoffgehalt mittels einer membranbedeckten galvanischen Sonde bestimmt. Im Labor erfolgte die Ermittlung des organischen (Org) und anorganischen Schwebstoffgehalts (Inorg) sowie des Chlorophyll *a*-Gehalts (Chl *a*).

Zur Bestimmung der beiden Schwebstoffanteile werden gemuffelte Glasfaserfilter (Whatman, 0.7 μm Porenweite) verwendet. Nach dem Trocknen der Filter bei 55°C und anschließendem Muffeln bei 450°C lassen sich Trockengewicht (TG) und Aschegewicht (AG) bestimmen. Gemeinsam mit dem Leergewicht (LG) der Filter und dem Filtrationsvolumen (V) werden die zwei Schwebstoffanteile wie folgt ermittelt:

$$\text{Org} = \frac{\text{TG} - \text{AG}}{V} \qquad \text{Inorg} = \frac{\text{AG} - \text{LG}}{V}$$

Die Filtration zur Ermittlung des Chlorophyll *a*-Gehalts, welcher als Maß für die Algenbiomasse dient, erfolgt ebenfalls über Glasfaserfilter

(Whatman, 0.7 μm Porenweite). Die anschließend eingefrorenen Filter werden in einem weiteren Schritt mit 90%igem Aceton extrahiert, homogenisiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Nach anschließender Zentrifugation lassen sich für den Überstand die Absorptionen bei 663 nm und bei 750 nm mit einem Spektrophotometer ermitteln. Der Chlorophyll *a*-Gehalt wird mit der Formel nach Talling bestimmt:

$$\text{Chl } a = \frac{11.40 \cdot (E_{663} - E_{750}) \cdot v}{V \cdot d}$$

mit E_{663} und E_{750} der Extinktionen bei 663 nm bzw. 750 nm, v dem Volumen des Extrakts, V dem filtrierten Volumen und d dem Durchmesser der Messküvette des Spektrophotometers.

2.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden zunächst mittels des nicht-parametrischen Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Die Parameter organischer und anorganischer Schwebstoffanteil, Leitfähigkeit, Viren- und Bakterien-Abundanz sowie das Verhältnis von Viren zu Bakterien wurden daraufhin log-transformiert, um sie in eine Normalverteilung zu überführen. Bis auf den organischen Schwebstoffgehalt sind die Größen für die Datenreihen der einzelnen Stationen normalverteilt. Für die gesamten Datensätze ergibt sich außer für die Leitfähigkeit und die Viren-Abundanz ebenfalls eine Normalverteilung. Aufgrund der nicht für alle Größen vorliegenden Normalverteilung werden mit Ausnahme der linearen Regression für die statistische Auswertung lediglich nicht-parametrische Verfahren angewandt.

Zur Erkennung von Ausreißern wurde die Methode der Bewertung der medianen absoluten Abweichung (MAD) verwendet (siehe Sachs 1992). Dabei werden jene Daten als Ausreißer betrachtet, die sich außerhalb des Bereiches $\text{Median} \pm 4.44 \times \text{MAD}$ befinden. Dies würde bei einer Normalverteilung dem Bereich Mittelwert $\pm 3 \times \text{Standardabweichung}$ entsprechen. Nicht plausibel erscheinende Werte, die als Ausreißer

identifiziert wurden, wurden durch lineare Interpolation ersetzt. Ebenso wurden fehlende Werte aufgefüllt. Davon ausgenommen sind jene Fehlwerte, die sich bei den Stationen MH und KW aufgrund der fehlenden Erreichbarkeit während des 100-jährlichen Hochwassers ergeben haben. Da es sich hierbei um ein Extremereignis handelt, ist es nicht zweckmäßig, diese Werte durch Interpolation zu ersetzen. Weiters beginnt die Zeitreihe an der Station DA einen Termin später als die übrigen Stationen. Die Daten am ersten Probenahmetermin wurden hier ebenfalls nicht aufgefüllt.

Um Unterschiede im Median zwischen den Zeitreihen der einzelnen Stationen zu ermitteln, wurden Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Anschließend wurden bei signifikantem Ergebnis paarweise Mann-Whitney-U-Tests berechnet und die p-Werte mittels Bonferroni-Korrektur durch Division durch die Anzahl der zu testenden Gruppen angepasst.

Weiters wurde die Korrelation zwischen den Zeitreihen der Stationen und der Referenz-Station DA berechnet, welche als räumliche Kohärenz bezeichnet wird (Livingstone et al. 2009).

Die Berechnung der statistischen Tests erfolgte in R. Zur multivariaten Beschreibung der Standortcharakteristiken wurde eine nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMS) verwendet. Diese wurde in PC-ORD 6 mittels Autopilot-Funktion durchgeführt. Zuvor wurde die Datenmatrix mit folgender Vorschrift normalisiert:

$$x_{norm} = \frac{x - x_{min}}{x_{max} - x_{min}}$$

Viren in den Donau-Flussauen
Saisonalität und Interaktion mit Bakterien und
abiotischen Faktoren
Teubner, I.
2015, XIV, 74 S. 29 Abb., Softcover
ISBN: 978-3-658-08064-8