

Durchflusszytometrie als schnelle Detektionsmethode

für Bakterien in Roh- und Trinkwasser

Die Durchflusszytometrie ist eine **schnelle und leistungsfähige Methode**, um Bakterien im Trink- und Rohwasser zu erfassen. Eine Arbeitsgruppe, bestehend aus dem TZW: Technologiezentrum Wasser Karlsruhe, dem Rheinisch-Westfälischen Institut für Wasserforschung (IWW), der DVGW-Forschungsstelle an der Technischen Universität Hamburg (TUHH) und dem Engler-Bunte-Institut in Karlsruhe (EBI), erarbeitet im Rahmen **des DVGW-geförderten Projektes „FlowDetect“** (Weiterentwicklung und Validierung der Durchflusszytometrie als schnelle Detektionsmethode für Bakterien in Roh- und Trinkwasser) (DVGW-Förder-Nr.: W 201703) systematisch **Potenziale und Grenzen** dieser zukunftsweisenden Technologie. Unterstützung erhält die Arbeitsgruppe hierbei von mehreren deutschen Wasserversorgern. Der Beitrag stellt Details zur Technologie, den Anwendungsmöglichkeiten und Vergleichsstudien vor.

von: Dr. Johannes Ho, Prof. Dr. Andreas Tiehm (beide: TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser), Dr. Andreas Nocker, Dr. Bernd Bendinger (beide: IWW Zentrum Wasser), Stephanie West (Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Institut für Technologie) & Anne Trimbach (DVGW-Forschungsstelle TUHH)

Die **routinemäßige** mikrobiologische Überwachung von Trinkwasser erfolgt nach dem Indikatorprinzip durch den kulturellen Nachweis der mikrobiologischen Parameter *Escherichia coli* (*E. coli*) und Enterokokken sowie der mikrobiologischen Indikatorparameter *Clostridium perfringens*, coliforme Bakterien und anhand der Koloniezahlen (KZ) bei 22 °C und 36 °C. Ein ent-

sprechender Nachweis dauert mehr als 18 Stunden; für den Nachweis weiterer fakultativ pathogener Mikroorganismen im Kulturverfahren liegen die Ergebnisse erst nach mehreren Tagen vor. Um jedoch auf mögliche Risikoereignisse wie Starkregen oder Kontaminationen umgehend und spezifisch reagieren zu können, ist eine schnelle Überwachung der entsprechenden

Wasserressourcen wünschenswert. Vor diesem Hintergrund gewinnen schnelle und molekularbiologische Methoden zunehmend an Bedeutung [1–6].

Bei der Durchflusszytometrie (DFZ) handelt es sich um eine leistungsfähige Methode, um die Gesamtzellzahl, d. h. alle in einer Wasserprobe enthaltenen Bakterien, zu quantifizieren. Insbesondere in der Schweiz wird die Entwicklung dieser Methode vorangetrieben [7, 8] und das Verfahren zunehmend in der Praxis genutzt. Der Nachweis mittels DFZ ist innerhalb von nur 15 Minuten möglich und bietet somit einen Vorteil, wenn der mikrobiologische Zustand einer Wasserprobe schnell erfasst werden soll.

Durchflusszytometrie in der Roh- und Trinkwasseranalytik

Neben Grund- und Oberflächenwässern enthalten auch Trink- und Mineralwasser eine Vielzahl an Bakterien. Diese natürlichen Trinkwasserbakterien tragen zur biologischen Stabilität



Abb. 1: Im Projekt FlowDetect beteiligte Forschungsinstitute (rot) und Wasserversorger (blau)

Quelle: TZW

eines Wassers bei, und der Verbrauch von Nährstoffen und die Besiedlung der Oberflächen wirken einer Vermehrung potenzieller Krankheitserreger entgegen. Während sich nur ein Bruchteil dieser Bakterien in Kulturverfahren erfassen und quantifizieren lässt, ist die Durchflusszytometrie in der Lage, alle diese Bakterien schnell zu erfassen. Durch den Einsatz eines DNA-Farbstoffes können außerdem Zellen mit geringem DNA-Gehalt und wenig Fluoreszenz (LNA, low nucleic acid) sowie Zellen mit viel DNA und starker Fluoreszenz (HNA, high nucleic acid) unterschieden werden. Für jede Wassermatrix lässt sich auf diese Weise eine charakteristische Fluoreszenzsignatur erkennen. Durch die Messung der Bakterienzahl und des HNA/LNA-Verhältnisses kann sehr schnell der allgemeine mikrobiologische Zustand des untersuchten Wassers abgebildet und Abweichungen davon – beispielsweise durch Kontaminationen, Wiederverkeimung, Stagnation und Desinfektion – erkannt werden. Eine anschließende mikrobiologische Analyse kann dann die Messdaten ergänzen und zur genaueren Bewertung beitragen.

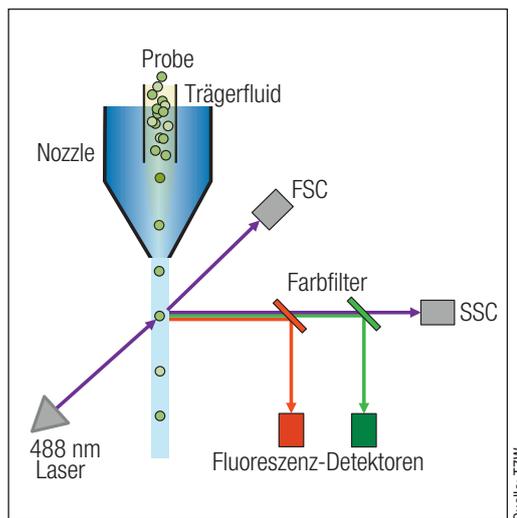


Abb. 2: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie

Damit Wasserversorger in Deutschland die Durchflusszytometrie gezielt nutzen können, sind einheitliche Protokolle und eine entsprechende Validierung nötig. Im Rahmen des DVGW-geförderten Projektes FlowDetect haben TZW, IWW, EBI und TUHH in diesem Zusammenhang vergleichende Untersuchungen durchgeführt.

Forum Fernwasserversorgung

Versorgungssicherheit in Zeiten des Klimawandels

3.–4. Februar 2020, Hildesheim

Jetzt anmelden!

THEMEN

- ➔ Fernwasserversorgung – Rollen-Aufwertung durch den Klimawandel
- ➔ Assetmanagement und Zustandsbewertung
- ➔ Freileitungsmonitoring – Neues Gefährdungspotential durch Überspannung?
- ➔ Hygieneanforderungen im Rohrleitungsbau, Leckortung und Wasserverlustmonitoring

ZIELGRUPPEN

Fach- und Führungskräfte von Fernwasserversorgern, Ortsversorgern als bestehende oder potentielle Kunden von Fernwasserversorgern, Ingenieurbüros und anderen Dienstleistern, Behörden und Ministerien



Abb. 3: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung von mit SG angefärbtem Mineralwasser (links) und Trinkwasser (rechts) im Grün/Rot-Plot. Jeder blaue Punkt stellt ein Bakterium oder ein Partikel dar; die Überlagerung mehrerer Punkte wird in helleren Farben dargestellt. Bei der Mineralwasserprobe lassen sich zwei Cluster an Zellen erkennen: HNA und LNA.

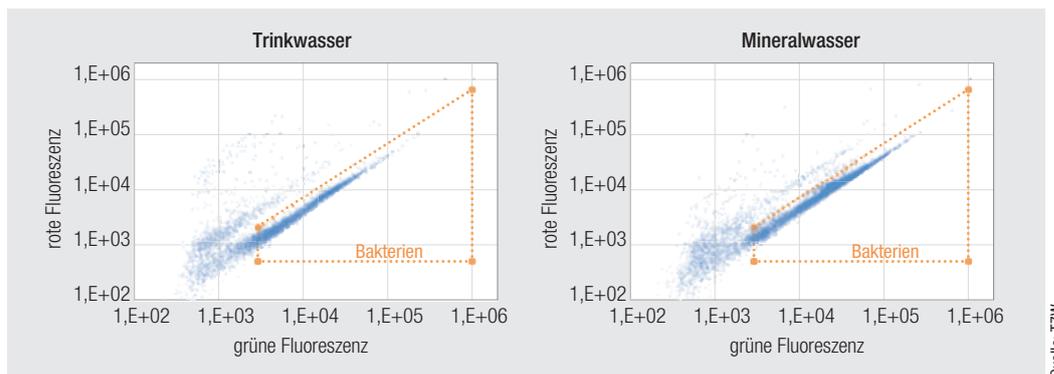
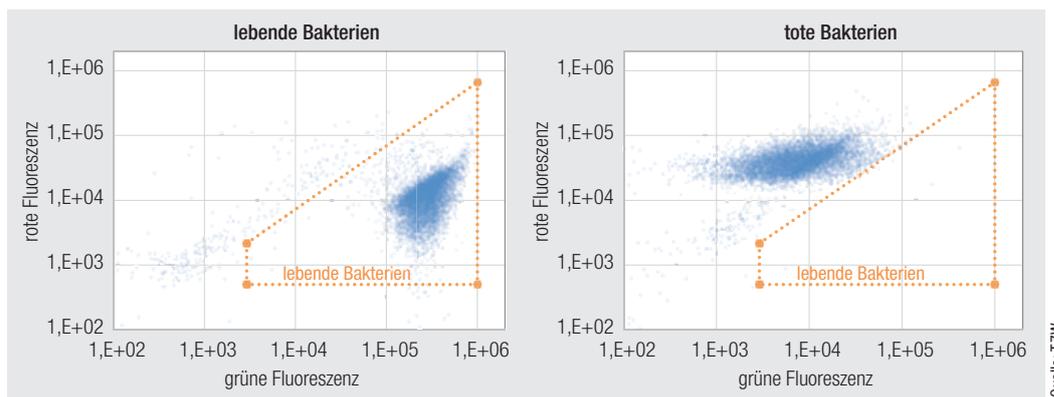


Abb. 4: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung von mit SG und PI angefärbten lebenden (links) und toten (rechts) E. coli-Bakterien im Grün/Rot-Plot



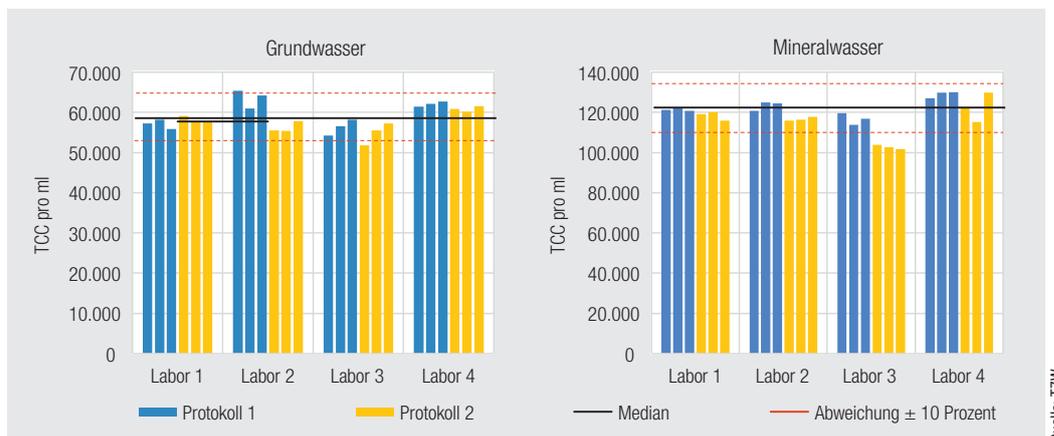
Prinzip der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer sind prinzipiell automatisierte Fluoreszenzmikroskope zur Untersuchung von Partikeln (Abb. 2). Die zu messende Probe wird durch hochpräzise Pumpen im Mikrofluidik-System des Durchflusszytometers zu einer Düse, der sogenannten Nozzle, gefördert. Durch den Mantelstrom einer Trägerflüssigkeit entsteht durch hydrodynamische Effekte eine laminare Strömung mit einzelnen Partikeln. Der Flüssigkeitsstrom und die darin enthaltenen Partikel passieren einen oder mehrere Laser – trifft der Laser auf einen Partikel, wird das Licht in kleinem oder großem Winkel seitlich gestreut. Durch mehrere Detektoren kann das gestreute Licht dann gemessen werden, wobei sich aus dem vorwärts gestreuten Licht (For-

ward Scatter, FCS) die Größe und mit dem seitwärts gestreuten Licht (Side Scatter, SSC) charakteristische Eigenschaften wie Granularität ableiten lassen. Das Ergebnis einer Messung kann in Form eines zweidimensionalen Dot-Plots oder Dichtediagrammes sowie eindimensional als Histogramm dargestellt werden.

Durch fluoreszierende Farbstoffe lassen sich zusätzlich einzelne Bestandteile von Zellen färben und mit entsprechenden Filtern und Detektoren erfassen. Durch den grün fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green (SG) lassen sich z. B. Nukleinsäuren wie DNA oder RNA von Bakterien markieren. Die Bakterienzellen erhalten dadurch eine starke grüne Fluoreszenz und lassen sich so von organischen oder anorganischen Partikeln unterscheiden. Im

Abb. 5: Bestimmung der Totalzellzahl in Grund- und Mineralwasser durch die Labore von TZW, IWW, TUHH und EBI mit zwei verschiedenen Protokollen. Die durchschnittliche mittlere Abweichung vom Median beträgt bei Grundwasser 4,4 Prozent und bei Mineralwasser 4,7 Prozent.



2D-Plot lassen sich die Signale der Bakterien durch Abgrenzung des Messbereiches durch sogenannte Gates (gestrichelte Linie) quantifizieren und andere Signale vom Ergebnis ausschließen (Abb. 3).

SG färbt alle Bakterien unabhängig von ihrer Integrität. Der rot fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) kann dagegen nur in Zellen mit einer geschädigten Membran eindringen. Bei Kombination von SG und PI haben tote Zellen eine stark erhöhte rote Fluoreszenz im Vergleich zu lebenden Zellen, in die PI nicht eindringen konnte (Abb. 4). Die simultane Verwendung beider Farbstoffe erlaubt so zusätzlich die Bewertung des Integritätszustandes von Bakterien in einer Wasserprobe [9].

Laborübergreifende Vergleichsuntersuchungen

Zur Validierung der Durchflusszytometrie wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens Proben von Trink-, Mineral-, Grund- und Oberflächenwässern in den Laboren der Projektpartner gemessen. Dabei wurden sowohl die Ergebnisse der Totalzellzahl und intakten (= lebenden) Bakterien als auch das Verhältnis von HNA zu LNA verglichen. Zusätzlich setzten die Projektpartner mehrere Protokolle ein, die sich im Lösungsmittel und der Konzentration der Farbstoffe unterscheiden. In einem ersten Vergleich wurde eine durchschnittliche Abweichung der Messergebnisse zwischen 3 und 11 Prozent erreicht. Aufbauend auf den Erfahrungen der Untersuchungen wurden einheitliche Protokolle erarbeitet, anhand derer einfache und einheitliche Untersuchungen auch bei Wasserversorgern ermöglicht werden sollen. Innerhalb der Gruppe der wissenschaftlichen Partner zeigten sich nach Abgleich der Messprotokolle nur geringe Messunterschiede (Abb. 5). Die Messungen belegen somit eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Durchflusszytometrie mit unterschiedlichen Geräten und in verschiedenen Laboren. Im weiteren Verlauf des Projektes sollen Wasserversor-

gungsunternehmen in die Untersuchungen eingebunden und der Versuchsumfang vergrößert werden.

Fazit und Ausblick

Die im Rahmen des Projektes durchgeführten ersten Vergleichsuntersuchungen belegen, dass die Durchflusszytometrie in den Laboren der vier beteiligten Partner reproduzierbar ist. Im weiteren Verlauf sollen die Positionierung der Gates vereinfacht und die Auswirkung von Matrixeffekten auf die durchflusszytometrischen Bestimmungen untersucht werden. Im Rahmen der weitergehenden Validierung der Durchflusszytometrie werden unterschiedliche Roh- und Trinkwässer der im Projekt beteiligten Wasserversorger in die Untersuchungen einbezogen. Des Weiteren laufen an den beteiligten Forschungsinstituten Versuche zur Weiterentwicklung der Durchflusszytometrie, wobei der Fokus auf der Bewertung der Wasserqualität nach Desinfektionsverfahren (lebens-/tot-Differenzierung) und der spezifischen Detektion von Bakterien liegen wird. ■

Literatur

- [1] Ho, Johannes; Seidel, Michael; Niessner, Reinhard; Eggers, Jutta; Tiehm, Andreas (2016): Long amplicon (LA)-qPCR for the discrimination of infectious and noninfectious phix174 bacteriophages after UV inactivation. In: *Water research* 103, S. 141–148. DOI: 10.1016/j.watres.2016.07.032.
- [2] Hügler, Michael; Reiter, Carolin; Hamsch, Beate (2019): Falschpositive E. coli-Nachweise in Trinkwasserproben. In: *DVGW energie/wasser-praxis* (70), S. 44–46.
- [3] Hügler, Michael; Stange, Claudia; Ho, Johannes; Tiehm, Andreas (2018): Molekularbiologische Methoden – Trends und Entwicklungen. Entwicklungstrends für die Wasserversorgung. In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser Karlsruhe* (50), S. 45–63.
- [4] Otto, Johannes; Jurzik, Lars; Schneider, Melanie; Stange, Claudia; Hamza, Ibrahim; Preuß, Gudrun; Tiehm, Andreas (2015): Entwicklung und Validierung von molekularbiologischen PCR-Methoden zum quantitativen Nachweis von hygiene relevanten Bakterien und Viren im Wasser. In: *DVGW energie/wasser-praxis* (10), S. 58–62.
- [5] West, Stephanie; Wagner, Michael; Groll, Daniel; Teichmann, Lars; Horn, Harald (2015): Biofilme in Anlagen zur Wasserversorgung. Methoden zur Bestimmung und Früherkennung. In: *DVGW energie/wasser-praxis* (5), S. 46–50.
- [6] Ho, Johannes (2017): Molekularbiologische lebens-/tot-Unterscheidung. In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser Karlsruhe* (81).
- [7] Hammes, Frederik; Egli, Thomas (2010): Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 397 (3), S. 1083–1095. DOI: 10.1007/s00216-010-3646-3.

- [8] Kötzsch, Stefan; Alisch, Sven; Egli, Thomas; Hammes, F.; Weilenmann, H.; Pfister, L.; Karmann, S. (2012): Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben. In: *Schweizerisches Bundesamt für Gesundheit (BAG). Methodenhandbuch*, Ausgabe 1 (10), S. 2012.
- [9] Nocker, Andreas; Cheswick, Ryan; Duthel de la Rochere, Pierre-Marie; Denis, Matthieu; Léziart, Tanguy; Jarvis, Peter (2017): When are bacteria dead? A step towards interpreting flow cytometry profiles after chlorine disinfection and membrane integrity staining. In: *Environmental technology* 38 (7), S. 891–900. DOI: 10.1080/09593330.2016.1262463.

Die Autoren

Dr. Johannes Ho ist wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Mikrobiologie und Molekularbiologie am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe.

Dr. Andreas Nocker ist stellvertretender Leiter des Bereiches Angewandte Mikrobiologie des IWW Zentrum Wasser in Mülheim an der Ruhr.

Stephanie West ist wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Wasserchemie und Wassertechnologie am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT).

Anne Trimbach ist Doktorandin an der DVGW-Forschungsstelle TUHH in Hamburg.

Dr. Bernd Bendinger ist Leiter des Bereiches Angewandte Mikrobiologie des IWW Zentrum Wasser in Mülheim an der Ruhr.

Prof. Dr. Andreas Tiehm ist Leiter der Abteilung Mikrobiologie und Molekularbiologie am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe.

Kontakt:

Dr. Johannes Ho
TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser
Karlsruher Straße 84
76139 Karlsruhe
Tel.: 0721 9678-136
E-Mail: johannes.ho@tzw.de
Internet: www.TZW.de