

Eine sichere Ressource für uns alle!



Deutscher Verein des
Gas- und Wasserfaches e.V.



🔗 www.dvgw.de/zukunft-wasser

Erweiterte Verfahren für die Überwachung mikrobiologischer Parameter beim Trinkwassermonitoring (MoVe)

Kurzfassung

**Dr. Claudia Stange, Dr. Michael Hügler, Dr. Johannes Ho,
Dr. Lara Stelmaszyk und Prof. Dr. Andreas Tiehm**
TZW: DVGW-Technologiezentrum, Karlsruhe
Dr. Andreas Nocker und Dr. Bernd Bendinger
IWW Zentrum Wasser, Mühlheim an der Ruhr



Erweiterte Verfahren für die Überwachung mikrobiologischer Parameter beim Trinkwassermonitoring (MoVe

Kurzfassung

März 2024

DVGW-Förderkennzeichen W 202214

Zusammenfassung

Die routinemäßige und akkreditierte Überwachung der mikrobiologisch-hygienischen Wasserqualität von Trinkwässern, Brauchwässern und Badegewässern erfolgt mit kultivierungsbasierenden Standardmethoden. Sie stellen den Goldstandard der mikrobiologischen Wasserqualitätsanalytik dar. Dennoch können viele weitergehende Fragestellungen im Wasserbereich durch die alleinige Anwendung dieser Standardmethoden nur unzureichend beantwortet werden. In den letzten Jahrzehnten sind Möglichkeiten in der kultivierungsunabhängigen und molekularen Diagnostik entstanden, die viele Fragestellungen in der mikrobiologischen Wasseranalytik zugänglich gemacht haben, die noch vor wenigen Jahren unlösbar waren.

Im Projekt MoVe wurden diese molekular diagnostischen Werkzeuge für das mikrobiologische Monitoring evaluiert. Insgesamt wird ein umfassender Überblick über diese neuartigen Methoden gegeben, der sowohl Nukleinsäure-basierte Amplifikationsmethoden, Durchflusszytometrie, Sequenzierungsansätze, spektroskopische Verfahren als auch Online-Sensorik umfasst. Basierend auf der verfügbaren Literatur und eigenen Erfahrungen konnten Anwendungsfelder identifiziert werden, für die der Einsatz bestimmter Verfahren bereits heute einen deutlichen Mehrwert bietet:

- PCR-basierter quantitativer Nachweis von Krankheitserregern wie Legionellen oder enteralen Viren sowie von Antibiotikaresistenzgenen.
- Next Generation Sequencing zur Aufklärung von Krankheitserregern, der Struktur und Funktionsweise mikrobieller Gemeinschaften und der Gesamtheit von Antibiotikaresistenzgenen (Resistom).
- Durchflusszytometrie zur schnellen Bestimmung von Bakterienkonzentrationen und bestimmten Eigenschaften dieser Bakterien (lebend/tot und hoher/niedriger Nukleinsäuregehalt).
- Online-Systeme zur Bestimmung der Biomasse durch Messung der Enzymaktivität, des ATP-Gehalts oder durchflusszytometrische Bakterienzählung.
- Identifizierung von fäkalen Eintragsquellen durch PCR-basierte Methoden zum Nachweis von wirtsspezifischen mikrobiellen Quellenverfolgungsmarkern.
- Identifizierung von Bakterienisolaten mittels MALDI-TOF-MS.
- PCR-basierter Nachweis von Stoffwechselleistungen wie z. B. Abbau organischer Schadstoffe (Rohwasserschutz), Nitrifikation (Ammoniumoxidation) und Denitrifikation (Nitratreduktion) oder Bildung von Algentoxinen.

Die Anwendung neuer, sich ergänzender mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Untersuchungsmethoden im Wasserbereich steht erst am Anfang. Um diese neuen Möglichkeiten adäquat nutzen zu können, ist eine enge Zusammenarbeit zwischen Wasserwirtschaft, DVGW-Instituten und universitärer Forschung notwendig. Dabei wird eines deutlich: Jede Methode hat ihre Stärken und Schwächen. Es gibt keine allgemein gültigen Untersuchungsmethoden, sondern nur geeignete „Werkzeuge“ für klar definierte Fragestellungen. Aber auch die Nutzung der Daten aus den neuen Verfahren stellt eine Herausforderung dar. Die neuen Methoden liefern Konzentrationen und Einheiten, die ein neues Denken erfordern. Aufgrund der fehlenden Standardisierung müssen die Ergebnisse von methodisch versierten Fachleuten mit Augenmaß interpretiert werden. Dennoch können diese neuen Verfahren zusätzliche Informationen liefern, die wesentlich zur Klärung wichtiger Fragen der mikrobiologischen Wasserqualität beitragen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Ergebnisse der Studie	2
3	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	5

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat im Bereich der Analytik von mikrobiologischen Indikatorparametern und Krankheitserregern eine rasante Entwicklung stattgefunden. Gleichzeitig basiert die amtliche Überwachung derzeit in der Routine noch immer nahezu exklusiv auf den klassischen Kulturverfahren. Daher stellt sich die Frage, wie die Zukunft der Trinkwasserüberwachung auf mikrobiologische Parameter aussieht. Vor diesem Hintergrund wurden die aktuell verfügbaren Analysetechniken und -verfahren für mikrobiologische Parameter unter Einbeziehung der Erfahrungen aus anderen Bereichen (z. B. Medizin, Lebensmittelüberwachung) zusammengestellt. Die Verfahren wurden hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten für die Trinkwasserversorger (Einsatzbereiche, Vor- und Nachteile, Aufwand, Feldtauglichkeit, Kosten, Standardisierbarkeit) beurteilt. Ziel des Projektes war es Aussagen zur zukünftigen Entwicklung der Analytik mikrobiologischer Parameter zu machen, Handlungsempfehlungen für Wasserversorger zu geben und diese bei der Kommunikation mit den Gesundheitsämtern/-behörden und der Vermittlung von methodischem Fachwissen zu unterstützen.

2 Ergebnisse der Studie

Die routinemäßige und akkreditierte Überwachung der mikrobiologisch-hygienischen Wasserqualität von Trink-, Brauch- und Badewasser erfolgt mit Hilfe von kultivierungsbasierten Standardmethoden. Diese Methoden sind ein wesentlicher Bestandteil des bewährten Wasserqualitätsmanagements zum Schutz der menschlichen Gesundheit und stellen den Goldstandard in der mikrobiologischen Wasserqualitätsanalytik dar. Sie haben jedoch ihre Grenzen, wenn es um weitergehende Fragestellungen geht, z. B. bei der Ursachensuche von Verschmutzungen. Die sichere Identifizierung von Mikroorganismen und Eintragsquellen ist ein essentielles Werkzeug für die Ursachenforschung und Kontaminationsvermeidung und damit für das Risikomanagement und eine sichere Wasserversorgung. Die rasante Entwicklung der Life Sciences, der Bio- und Informationstechnologie sowie der Automatisierungstechnik in den letzten Jahrzehnten führte zu neuen molekularbiologischen Verfahren in der Wasseranalytik. Dadurch sind viele Fragestellungen, die noch vor wenigen Jahren in der mikrobiologischen Wasseranalytik unlösbar erschienen, durch moderne Analyseverfahren zugänglich geworden.

Die sich weiterentwickelnden molekularen Technologien bieten eine wachsende Anzahl von technischen Optionen für die qualitative und quantitative Erfassung von mikrobiologischen Schlüsselparametern, wie z. B. wasserbürtiger Krankheitserreger, Antibiotikaresistenzgene und der Dynamik mikrobieller Gemeinschaften. Das Projekt MoVe hat diese molekularen Diagnoseinstrumente für die Erfassung von mikrobiologischen Parametern im Wasser in Hinblick auf Durchführbarkeit und Aussagekraft der Verfahren betrachtet. Insgesamt wird mit dieser Studie ein Überblick über diese neuartigen Methoden gegeben, der sowohl Nukleinsäure-basierte Amplifikationsmethoden, Sequenzierungsansätze, spektroskopische Verfahren als auch online-Sensorik umfasst.

In der Praxis können verschiedene Methoden je nach Fragestellung synergetisch eingesetzt werden. Bislang werden diese neuen Methoden noch nicht umfangreich genutzt. Gründe hierfür sind u. a. die Kosten für die Anschaffung der Geräte und die Weiterbildung des Personals, die teilweise höheren Kosten der spezifischen Analysen sowie die noch fehlenden Erfahrungen der Wasserversorgungsunternehmen, der Gesundheitsbehörden und der Analyselaboratorien. Durch die rasche Entwicklung auf diesem Gebiet fehlt oftmals das Wissen, welche Verfahren zur Verfügung stehen und für welche Fragestellungen diese Verfahren sinnvoll eingesetzt werden können. Zudem erschwert das Fehlen von Grenzwerten die standardisierte Bewertung der Ergebnisse. Um aus den Daten richtige und aussagekräftige Schlüsse ziehen zu können, ist daher die Interpretation der Ergebnisse durch Personen mit guten methodischen Kenntnissen erforderlich.

Die molekularen Methoden werden ständig weiterentwickelt, um den verschiedenen Anwendungen und Anforderungen gerecht zu werden. Zum jetzigen Zeitpunkt weisen die betrachteten Verfahren sehr unterschiedliche Reifegrade auf. Während beispielsweise die Durchflussszytometrie bereits von Wasserversorgungsunternehmen zur Erfassung der Gesamtzellzahl eingesetzt wird, sind Biosensoren noch der akademischen Forschung zuzuordnen.

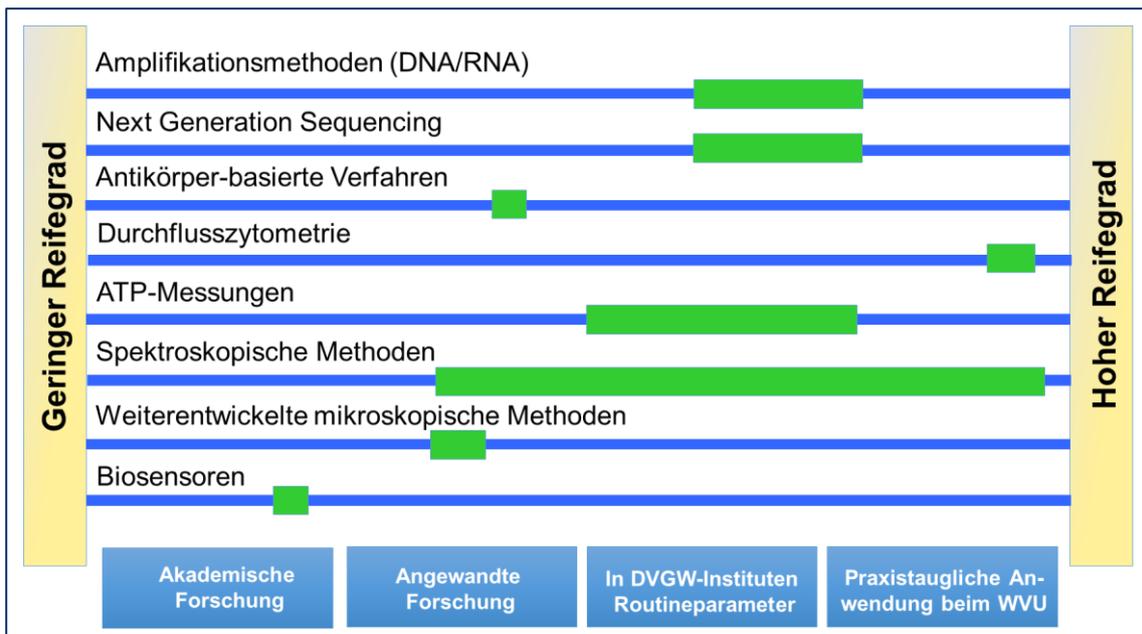


Abbildung 1: Reifegrad der Analyseverfahren

Auf Basis der verfügbaren Literatur und eigener Erfahrungen konnten Anwendungsfelder identifiziert werden, für die der Einsatz bestimmter Verfahren bereits heute einen deutlichen Mehrwert bietet:

- Die **quantitative real-time PCR (qPCR)** ermöglicht den quantitativen Nachweis von **Mikroorganismen**, wie z. B. Wasserpathogenen. Dies betrifft u. a. pathogene Viren, deren kultureller Nachweis sehr aufwändig ist oder für die kein kultureller Nachweis zur Verfügung steht. Sind Bakterien nicht kultivierbar oder haben stressbedingt ihre Kultivierbarkeit zeitweilig verloren (viable but not culturable, VBNC), stellen molekularbiologische Verfahren zurzeit die einzige Möglichkeit dar, diese Bakterien zu erfassen. Die Kombination einer Vorbehandlung mit Propidiummonoazid (PMA) oder Ethidiummonoazid (EMA) mit der qPCR kann eine Unterscheidung zwischen intakten und nicht intakten Bakterien oder Viren ermöglichen. Aktive Bakterien können über ihre messenger RNA mit Hilfe der Reverse Transkriptase-qPCR nachgewiesen werden. Beim Einsatz der qPCR in der Wasseranalytik ist zu beachten, dass die Bakterien oder Viren in einem ersten Schritt immer konzentriert bzw. angereichert und die Nukleinsäuren extrahiert und aufgereinigt werden müssen. Diese Vorbehandlung hat einen großen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit.
- Als Alternative zur qPCR kann die **digitale PCR (dPCR)** zum Nachweis von **Krankheitserregern** eingesetzt werden. Sie hat gegenüber der qPCR noch einige Vorteile. So ermöglicht sie eine genaue Quantifizierung ohne Kalibrierung des Systems und eine höhere Sensitivität, Präzision und Reproduzierbarkeit. Außerdem ist die Quantifizierung mittels dPCR in der Regel unempfindlicher gegenüber Inhibitionseffekten.
- Die **qPCR und dPCR** werden seit einigen Jahren auch zur Bestimmung der Prävalenz ausgewählter **Antibiotikaresistenzgene (ARG)** in verschiedenen Umweltreservoirs eingesetzt. Es handelt sich um Verfahren, die das Screening spezifischer Gene ermöglichen. Hierfür werden spezifische Oligonukleotide als Primer verwendet. Die qPCR bzw. dPCR ist ein geeigneter Ansatz für spezifische Überwachungsprogramme. Für die Betreiber vor Ort kann die Quantifizierung mittels PCR von Vorteil sein, da sie

schnell durchführbar ist. Um zuverlässige Daten für eine Risikobewertung zu erhalten, kann der Nachweis vollständiger ARG mittels Long Amplicon-PCR anstelle kurzer ARG-Fragmente wichtige zusätzliche Informationen liefern.

- Neben der qPCR ist die **Metagenomik über Next Generation Sequencing (NGS)** der am weitesten verbreitete kulturunabhängige Ansatz zum Nachweis von **Bakterien und Antibiotikaresistenzen**. Die Metagenomik ist eine nicht zielgerichtete Methode, die einen breiten Überblick über genetische Determinanten ermöglicht. Dies wird durch die Verknüpfung von DNA-Sequenzanalysen mit Datenbanken, die alle bekannten Gene enthalten, erreicht. Es ist hervorzuheben, dass die qPCR-Methode empfindlicher und für die absolute Quantifizierung von Zielgenen geeignet ist, während die Metagenomik das Potential hat, einen Überblick über die Gene und ihre jeweilige relative Häufigkeit z. B. von Antibiotikaresistenzgenen zu liefern.
- Die **Durchflusszytometrie** hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen diagnostischen Werkzeug entwickelt. In Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Methode eine schnelle Erfassung von **Bakterienzahlen und charakteristischen Populationsmustern** im Wasser. Obwohl der unspezifische Charakter der Fluoreszenzfarbstoffe keine Aussagen über hygienisch relevante Bakterien zulässt, können Veränderungen der Bakterienkonzentrationen, mikrobiologische Fingerabdrücke und Aufkeimungspotentiale wichtige Hinweise auf Veränderungen und technische Einflussfaktoren liefern. Der Nutzen liegt in der Möglichkeit einer schnellen Prozesskontrolle.
- Generell besteht ein großer Bedarf an mikrobiologischen **Online-Analyseverfahren**. Für Online-Verfahren kommen verschiedene Messprinzipien in Frage. Dies sind die Durchflusszytometrie, die eine Quantifizierung der Gesamtzellzahl im Wasser erlaubt, sowie Methoden, die die mikrobielle Aktivität über die Messung der Enzymaktivität oder die Messung von ATP, dem universellen Energieträger aller biologischen Zellen, erfassen. Erfahrungen mit entsprechenden Messsystemen werden derzeit im Rahmen des DVGW-Forschungsprojektes TRINKcontrol gesammelt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese mikrobiellen Parameter eine sinnvolle und schnell messbare Ergänzung zu den bisher vorgeschriebenen Indikatorparametern darstellen können.
- Die derzeit in der Qualitätskontrolle eingesetzten mikrobiologischen Methoden sind geeignet, eine Beeinträchtigung durch fäkale Einträge nachzuweisen, geben aber keine Auskunft über die Herkunft der Kontamination. Diese Information ist jedoch für gezielte Schutzmaßnahmen unerlässlich. Mit Hilfe sogenannter **Microbial Source Tracking (MST)**-Methoden ist es möglich, die Herkunft solcher Verunreinigungen zu ermitteln. Dabei werden in Wasserproben aus Einzugsgebieten definierte DNA-Abschnitte, die spezifisch für menschliche oder tierische Exkremente sind, mittels **PCR-basierter Verfahren** quantitativ erfasst.
- Mit der **MALDI-TOF-MS** wurde in den letzten Jahren eine neue Methode zur schnellen **Identifizierung von Mikroorganismen** entwickelt. Die Methode hat sich im klinischen Bereich etabliert und besitzt auch für den Trinkwasserbereich ein erhebliches Potential. Der große Vorteil liegt in der Schnelligkeit der Methode. Liegen Bakterienisolate vor, ist die Identifizierung vieler Isolate in kurzer Zeit (Stunden) möglich. Bei Nachweis von Indikatorbakterien kann die schnelle Speziesbestimmung noch am Tag des Befundes wichtige Hinweise auf die Eintragsquelle und die Bewertung liefern. So können Abkochgebote und damit eine negative Außenwirkung vermieden und das Vertrauen der

Verbraucher in die Trinkwasserqualität gestärkt werden. Die Bewertung der Ergebnisse muss jedoch immer im fachlichen Kontext erfolgen, da Isolate aus Trinkwasserproben in der Regel anders zu bewerten sind als z. B. Isolate aus medizinischen Proben.

- Durch den Einsatz von **NGS**-basierten Hochdurchsatzverfahren kann die **mikrobielle Gemeinschaft** von Wasserproben entschlüsselt werden. Dies erleichtert die Bewertung der mikrobiellen Wasserqualität und die Identifizierung der wichtigsten anthropogenen oder umweltbedingten Faktoren, die für Schwankungen im Ökosystem verantwortlich sind.
- Im Rahmen der Wasseraufbereitung oder auch bei Sanierungsmaßnahmen in Grundwasserleitern ist die Kenntnis über das Vorkommen und die Aktivität bestimmter Bakteriengruppen essentiell, um die gewünschte biologische Aufbereitung zu erreichen. Für diese Gruppen stehen oft keine geeigneten oder schnell anwendbaren kulturellen Nachweisverfahren zur Verfügung. Hier kann ein qualitativer oder quantitativer **PCR-Nachweis** von funktionellen Genen für **spezifische Stoffwechselleistungen** wichtige Informationen liefern. Beispiele für solche Stoffwechselleistungen sind: Abbau organischer Schadstoffe (Rohwasserschutz), Nitrifikation (Ammoniumoxidation) und Denitrifikation (Nitratreduktion) oder die Bildung von Algentoxinen. Durch den Nachweis spezifischer messenger RNA ist auch ein direkter Aktivitätsnachweis möglich.

3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Das Projekt MoVe hat die Durchführbarkeit und Vielseitigkeit molekularer Diagnoseinstrumente für die Überwachung von Mikroorganismen im Wasser, die eine Gefahr für die menschliche Gesundheit und die Umwelt darstellen können, aufgezeigt. Die sich ständig weiterentwickelnden molekularen Technologien bieten eine wachsende Anzahl von technischen Optionen für die qualitative und quantitative Erfassung von mikrobiologischen Schlüsselparametern, wie z. B. wasserbürtige Krankheitserreger, Antibiotikaresistenzgene und die Dynamik mikrobieller Gemeinschaften.

Jede Methode hat ihre Stärken und Grenzen, was zu Kombinationen bei der Methodenwahl führt, die von den zu lösenden Forschungsfragen abhängen. In der Praxis können verschiedene Methoden synergetisch eingesetzt werden. In der Praxis können verschiedene Methoden je nach Fragestellung synergetisch eingesetzt werden. Die zunehmende Erfahrung von Wasserversorgungsunternehmen, Gesundheitsbehörden und AnalySELaboratorien mit den Analyseverfahren werden eine häufigere und breitere Anwendung dieser Werkzeuge fördern. Um die diese neuen Möglichkeiten möglichst schnell adäquat zu nutzen, ist eine enge Zusammenarbeit zwischen wasserwirtschaftlicher Praxis, praxisorientierten Instituten und universitärer Forschung notwendig. Die neuen Verfahren ergänzen die klassischen Verfahren und liefern wichtige Zusatzinformationen.

Impressum

DVGW Deutscher Verein des
Gas- und Wasserfaches e. V.
Technisch-wissenschaftlicher Verein
Josef-Wirmer-Straße 1–3
53123 Bonn

Tel.: +49 228 9188-5
Fax: +49 228 9188-990
E-Mail: info@dvgw.de
Internet: www.dvgw.de

Download als PDF unter: www.dvgw.de

Nachdruck und Vervielfältigung nur im
Originaltext, nicht auszugsweise, gestattet.