

BERICHT

Projekt : RIKO-1

RISIKOANALYSE DES EINTRAGS MIKROBIELLER KONTAMINATION IN TRINKWASSERBRUNNEN UND ABLEITUNG VON VERMEIDUNGSSTRATEGIEN – PHASE 1 Mikrobiologische Methoden: Stand der Technik

von
Oliver Thronicker

Blue Biolabs GmbH

Die Erstellung dieses Berichtes wurde finanziell gefördert durch



Berlin, Germany
2013

Important Legal Notice

Disclaimer: The information in this publication was considered technically sound by the consensus of persons engaged in the development and approval of the document at the time it was developed. Blue Biolabs disclaims liability to the full extent for any personal injury, property, or other damages of any nature whatsoever, whether special, indirect, consequential, or compensatory, directly or indirectly resulting from the publication, use of application, or reliance on this document. Blue Biolabs disclaims and makes no guaranty or warranty, expressed or implied, as to the accuracy or completeness of any information published herein. It is expressly pointed out that the information and results given in this publication may be out of date due to subsequent modifications. In addition, Blue Biolabs disclaims and makes no warranty that the information in this document will fulfil any of your particular purposes or needs. The disclaimer on hand neither seeks to restrict nor to exclude Blue Biolabs's liability against all relevant national statutory provisions.

Wichtiger rechtlicher Hinweis

Haftungsausschluss: Die in dieser Publikation bereitgestellte Information wurde zum Zeitpunkt der Erstellung im Konsens mit den bei Entwicklung und Anfertigung des Dokumentes beteiligten Personen als technisch einwandfrei befunden. Blue Biolabs schließt vollumfänglich die Haftung für jegliche Personen-, Sach- oder sonstige Schäden aus, ungeachtet ob diese speziell, indirekt, nachfolgend oder kompensatorisch, mittelbar oder unmittelbar sind oder direkt oder indirekt von dieser Publikation, einer Anwendung oder dem Vertrauen in dieses Dokument herrühren. Blue Biolabs übernimmt keine Garantie und macht keine Zusicherungen ausdrücklicher oder stillschweigender Art bezüglich der Richtigkeit oder Vollständigkeit jeglicher Information hierin. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die in der Publikation gegebenen Informationen und Ergebnisse aufgrund nachfolgender Änderungen nicht mehr aktuell sein können. Weiterhin lehnt Blue Biolabs die Haftung ab und übernimmt keine Garantie, dass die in diesem Dokument enthaltenen Informationen der Erfüllung Ihrer besonderen Zwecke oder Ansprüche dienlich sind. Mit der vorliegenden Haftungsausschlussklausel wird weder bezweckt, die Haftung der Blue Biolabs entgegen den einschlägigen nationalen Rechtsvorschriften einzuschränken noch sie in Fällen auszuschließen, in denen ein Ausschluss nach diesen Rechtsvorschriften nicht möglich ist.

Impressum

Titel

Risikoanalyse des Eintrags mikrobieller Kontamination In Trinkwasserbrunnen und Ableitung von Vermeidungsstrategien – Phase 1

Autoren

Oliver Thronicker, Blue Biolabs GmbH

Qualitätskontrolle

Uta Böckelmann, BWB
Dietmar Petersohn, BWB

Veröffentlichung genehmigt durch das Technische Komitee

Regina Gnirss, BWB F+E
Elke Wittstock, BWB WV
Dietmar Petersohn, BWB WV
Andreas Wicklein, BWB WV
Uta Böckelmann, BWB Labor
Gesche Grützmacher, KWB
Andreas Hartmann, KWB

Leistung

RIKO-1 Mikrobiologische Methoden: Stand der Technik

Endversion

19.04.2013

Inhalt

KAPITEL 1 DAS INDIKATORPRINZIP	1
1.1 ESCHERICHIA COLI UND ENTEROKOKKEN	1
1.2 COLIFORME BAKTERIEN	1
1.3 GRENZEN DES INDIKATORSYSTEMS.....	2
KAPITEL 2 STAND DER TECHNIK FÜR DEN NACHWEIS DER INDIKATORKEIME IN WASSERPROBEN.....	3
2.1 NACHWEIS ÜBER FILTRATION UND KULTIVIERUNG AUF SELEKTIVMEDIEN	3
2.2 NACHWEIS ÜBER SELEKTIVE FLUOROGENE SUBSTRATE.....	4
2.3 NACHWEIS VON INDIKATORORGANISMEN MIT MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN	5
KAPITEL 3 MÖGLICHKEITEN DER FRÜHERKENNUNG UND ONLINE-DETEKTION.....	7
KAPITEL 4 ZUSAMMENFASSENDER BETRACHTUNG DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.....	8
4.1 NACHWEIS VON COLIFORMEN BAKTERIEN IN BODENPROBEN.....	8
4.2 EINSATZ DER QUANTITATIVEN ECHTZEIT-POLYMERASE-KETTENREAKTION (qPCR)	8
4.3 VERKNÜPFUNG MIKRO- UND MOLEKULARBIOLOGISCHER METHODEN	9
KAPITEL 5 SCHLUSSFOLGERUNGEN	10
RERENZEN	12

Kapitel 1

Das Indikatorprinzip

Trinkwasser muss so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit insbesondere durch Krankheitserreger nicht zu besorgen ist (TrinkwV 2001, Abschnitt II, §4). Diese Festlegung geht auf die Erfahrungen früherer Generationen zurück, die immer wieder mit durch kontaminiertes Wasser verursachte Epidemien und Seuchen zu kämpfen hatten. So kam es selbst in Deutschland noch bis Mitte des 20. Jahrhunderts mehrfach zu Ausbrüchen von Cholera und Typhus mit tausenden von Todesfällen (Schindler 2004). Neben den für diese Krankheiten verantwortlichen Mikroorganismen existieren zahlreiche andere durch Wasser übertragbare Krankheitserreger. Nicht nur Bakterien können hierbei von kritischer Bedeutung sein. Es gibt auch zahlreiche Viren, Protozoen und Parasiten, die ebenso durch verunreinigtes Wasser übertragen werden können.

Bisher ist es nicht möglich, alle diese Krankheitserreger mit wirtschaftlich vertretbarem Aufwand sicher im Wasser nachzuweisen. Da jedoch die weitaus überwiegende Zahl über fäkale Verunreinigungen ins Wasser gelangen, sollte Wasser, das nicht mit menschlichen oder tierischen Exkrementen in Kontakt gekommen ist, auch keine fäkal übertragbaren Pathogene enthalten. Bei der mikrobiologischen Trinkwasseruntersuchung hat sich daher das sogenannte „Indikatorprinzip“ durchgesetzt, bei dem man gezielt spezifische Indikatorkeime nachweist, die stellvertretend für andere Mikroorganismen eine fäkale Verunreinigung des Wassers anzeigen können.

Die Anforderungen an Indikatorkeime sind zahlreich (Feuerpfeil und Botzenhart 2008). So sollten sie ein Teil der normalen Darmflora sein und idealerweise auch nur im menschlichen Darm vorkommen und dabei selbst nicht pathogen sein.

Außerhalb des Verdauungstraktes sollten sie nicht vermehrungsfähig, aber in der Natur und gegenüber Desinfektionsmaßnahmen widerstandsfähiger als pathogene Mikroorganismen sein. Auch sollten sie stets in größerer Anzahl zu finden sein als die pathogenen Keime, die sie anzeigen, mit diesen in Relation stehen und dabei einfach zu identifizieren und zu quantifizieren sein.

Bisher konnten keine Indikatoren gefunden werden, die all diese Bedingungen optimal erfüllen. Einige Organismen können diese Kriterien jedoch zumindest ausreichend erfüllen und wurden in der Trinkwasserverordnung als Indikatoren aufgenommen. Dieses Prinzip hat sich jahrzehntelang bewährt und wird auch zukünftig eine wichtige Rolle spielen, solange keine effektiveren Nachweismethoden existieren.

1.1 *Escherichia coli* und Enterokokken

Als sehr verlässliche Indikatoren für fäkale Verunreinigungen haben sich insbesondere *Escherichia coli* (*E.coli*) und Enterokokken bewährt. Ihr in der TrinkwV 2001 Anlage 1 Teil I festgelegter Grenzwert (jeweils 0 in 100 ml) darf keinesfalls überschritten werden.

E.coli kommt im Darm von Warmblütern mit einem Anteil von 1 – 2 % vor und ist gegenüber Umwelteinflüssen widerstandsfähiger als viele Darmpathogene (z.B. *Salmonella* sp.) (Winfield und Groisman 2004). Die in der TrinkwV 2001 erfasste Gruppe der Enterokokken beinhaltet im Wesentlichen die Arten *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.durans* und *E.hirae*.

1.2 Coliforme Bakterien

Das bereits eingangs erwähnte intestinale (im Darm lebende) Bakterium *E.coli* ist ein spezieller Vertreter einer größeren Gruppe von Indikatorbakterien, den sogenannten coliformen Bakterien. Sie stellen keine taxonomische Gruppe dar, sondern sind durch ihre Stoffwechseleigenschaften charakterisiert.

Coliforme Bakterien sind stäbchenförmige Bakterien, die vor allem im Darm von Warmblütern vorkommen. Sie können allerdings auch einige Zeit außerhalb ihrer natürlichen Umgebung überleben und sind damit gut zur Untersuchung von Wasserproben auf fäkale Verunreinigungen geeignet. Einige coliforme Bakterien kommen jedoch natürlicherweise auch im Boden und in Oberflächenwässern vor, so dass ihr Nachweis im Trinkwasser auch einen Hinweis auf Fehler bei der Wasseraufbereitung darstellen kann.

Beim Auftreten coliformer Bakterien bei der Trinkwasseruntersuchung ist zwischen Einzelbefunden (einmaliger Nachweis an einer Trinkwasserentnahmestelle) und sogenannten systemischen Kontaminationen (Nachweis in engem zeitlichem Kontext an mehreren Probenahmestellen im Verteilungsnetz) zu unterscheiden. Eine systemische Kontamination ist ein Hinweis, dass ausgehend von einer spezifischen Stelle (z.B. einem Brunnen, einem Biofilm oder einer Leckage im Verteilungsnetz) weite Teile des Netzes kontaminiert worden sind (Umweltbundesamt 2009).

1.3 Grenzen des Indikatorsystems

Da sowohl mit den klassischen Kulturverfahren (DIN EN ISO 9308-1, den Referenzverfahren nach TrinkwV 2001) als auch mit alternativen Nachweisverfahren (ISO 9308-2, 2012) auch so genannte „Umweltcoliforme“ nachgewiesen werden, ist der Nachweis von coliformen Bakterien im Wasser nicht immer als ein Hinweis auf eine direkte fäkale Verunreinigung zu werten. Jedoch ist den Empfehlungen des Umweltbundesamtes zu entnehmen, dass das Vorkommen coliformer Bakterien „unabhängig vom Nachweisverfahren entsprechend der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) immer eine unerwünschte Belastung des Trinkwassers darstellt“ und „im Trinkwasser deutlich kritischer einzuschätzen ist als zum Beispiel der alleinige Nachweis erhöhter Koloniezahlen ohne Hinweis auf andere mikrobiologische Grenzwertüberschreitungen nach TrinkwV 2001“ (Umweltbundesamt 2009). Daher ist immer eine differenziertere Betrachtung coliformer Befunde empfehlenswert.

Durch Spezifizierung der Nachweisverfahren wurde versucht, das erfasste Artenspektrum aller Indikatorbakterien auf solche Arten einzuengen, die spezifisch auf eine fäkale Verunreinigung hindeuten. In der Vergangenheit haben sich hier z.B. als Dichtmaterial eingesetzte (nicht sterilisierte) Hanfstricke als Kontaminationsquelle erwiesen (Feuerpfeil und Botzenhart 2008). Aber auch jüngere Ergebnisse deuten z.B. auf Enterokokkenbefunde aus nicht fäkalen Quellen hin. So wurden in der Vergangenheit sowohl coliforme Bakterien, als auch Enterokokken in Insekten nachgewiesen (Korth 2012).

Kapitel 2

Stand der Technik für den Nachweis der Indikatorkeime in Wasserproben

Der Nachweis von Indikatorbakterien im Trinkwasser erfolgte in der Vergangenheit vornehmlich mit Hilfe mikrobiologischer Verfahren. Die Reaktionszeit dieser Verfahren ist jedoch vergleichsweise langsam, da kultivierungsbasierte Ansätze generell vor allem durch das Wachstumsverhalten der Bakterien beschränkt sind.

Mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren können Trinkwasserkontaminationen wesentlich schneller detektiert werden. Jedoch sind viele dieser modernen Techniken noch nicht nach TrinkwV zugelassen und können die klassischen Verfahren noch nicht ersetzen. Einige Verfahren werden jedoch bereits erfolgreich eingesetzt und bieten sogar vielversprechende Perspektiven für eine online Überwachung.

2.1 Nachweis über Filtration und Kultivierung auf Selektivmedien

Das in der ISO 9308-1 beschriebene Referenzverfahren für den Nachweis und die Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien in Wasser für den menschlichen Gebrauch basiert auf Membranfiltration, einer anschließenden Subkultur auf einem Selektivagar (Laktose-TTC-Agar mit Tergitol) und der Berechnung der Anzahl der gesuchten Organismen in der Probe (DIN EN ISO 9308-1 2001).

Coliforme Bakterien werden hier durch „Säurebildung mittels Laktosefermentation, sowie durch negative Oxidasereaktion“ definiert. Der Bakterienstamm *E. coli* ist zusätzlich in der Lage, Indol aus Tryptophan (innerhalb von 21 h bei 44 °C) zu produzieren. Um eine weitere Differenzierung zu erreichen, muss daher bei diesem Nachweisverfahren immer eine zusätzliche (zeitaufwändige) Subkultivierung erfolgen, bei der auf diese Reaktion getestet wird.

In der TrinkwV 2001 fiel das in der TrinkwV 1990 für coliforme Bakterien zusätzlich definierende Merkmal „Laktosefermentation unter Gasbildung“ weg. In diesem Zusammenhang wurde nach der Umstellung von verschiedenen Laboren ein Anstieg positiver Nachweise bemerkt (Feuerpfeil et al. 2002). Ähnliche Beobachtungen wurden auch nach Umstellung auf das weiter unten besprochene „Colilert-18/Quanti-Tray“ System gemacht (Niemella et al. 2003). Dies wird auf die Vergrößerung des erfassten Artenspektrums zurückgeführt (vgl. Tabelle1).

Tab.1 Erfasste Bakteriengattungen in Abhängigkeit des Nachweisverfahrens

Fett: coliforme Bakterien, die in der Umwelt und in menschlichen Faeces vorkommen können;

Fett und kursiv: coliforme Bakterien, die als primäre Umweltmikroorganismen angesehen werden.

(Quelle: Umweltbundesamt 2009)

Methode nach TrinkwV 1990 Laktose zu Säure und Gas	Methode nach DIN EN ISO 9308-1, TrinkwV 2001 Laktose zu Säure	Alternativverfahren nach TrinkwV 2001, „Colilert®-18/Quanti-Tray®“ β-O-Galaktosidase
Escherichia Klebsiella Enterobacter Citrobacter	Escherichia Klebsiella Enterobacter Citrobacter Yersinia Serratia Hafnia Pantoea Kluyvera	Escherichia Klebsiella Enterobacter Citrobacter Yersinia Serratia Hafnia Pantoea Kluyvera Cedecea Ewingella Moellerella Leclercia Rahnella Yokenella

Das im Laktose-TTC-Agar enthaltene Natriumheptadecylsulfat (Tergitol 7) wurde bereits 1947 von Chapman erfolgreich eingesetzt, um gram-positive Bakterien und *Proteus sp.* zu inhibieren (Chapman 1947). Durch Dehydrogenasen der Atmungskette in lebenden Zellen wird das zugegebene Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zu Formazan reduziert, was alle Bakterienkolonien während der Bebrütung zunächst rot einfärbt.

Laktose-fermentierende Bakterien bilden durch die Fermentation Säure, die eine pH Verringerung des Mediums bewirkt und vom pH-Indikator Bromthymolblau durch eine gelbe Farbe des umgebenden Mediums angezeigt wird. Coliforme Bakterienkolonien (z. B. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*) sind daher gelb oder orange gefärbt, während nicht-Laktose-fermentierende (β -Galactosidase-negative) Bakterien (z.B. *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*) dunkelrot auf blauem Medium bleiben (Carl Roth 2012, Abb. 1).

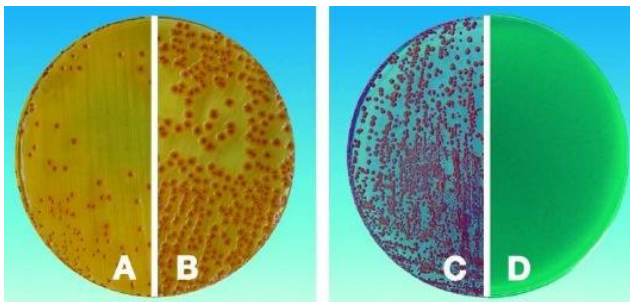


Abb. 1

- A) *E. coli*
 - B) *Klebsiella spp.*
 - C) nicht-Lactosefermentierende Spezies
 - D) nicht-inoculierter Lactose-TTC-Agar
- (Quelle: Carl Roth 2012)

Bei starker Begleitflora kann es jedoch vorkommen, dass die gebildete Säure wieder abgebaut wird und es zu einer Realkalisierung und somit zu einem erneuten Farbumschlag kommt (Fricker et al. 2010). So können falschnegative Ergebnisse entstehen. Daher ist das TTC-Verfahren eher für besonders reine Wässer und nur bedingt für Rohwässer mit hoher Hintergrundflora geeignet.

2.2 Nachweis über selektive fluorogene Substrate

Das inzwischen auch nach ISO zertifizierte und nach TrinkwV als alternatives Verfahren zur Bestimmung von *E.coli* und Coliformen zugelassene IDEXX Colilert-18-System funktioniert nach einem enzymbasierten Nachweisprinzip. Da zunächst ein spezifisches Substratgemisch direkt in der Wasserprobe gelöst wird, welches während der Bebrütung mögliche Begleitflora unterdrückt, ist es robuster gegenüber Begleitbakterien. Die im Substratgemisch enthaltenen fluorogenen Substrate ermöglichen eine schnelle Detektion der in der Probe enthaltenen coliformen Bakterien über eine Farbreaktion nach 18-stündiger Inkubation bei 36 °C.

Eine einfache Möglichkeit der Quantifizierung der in 100 ml enthaltenen coliformen Bakterien bietet das von IDEXX entwickelten Quanti-Tray-System. Es basiert auf einem Kunststoffträger, in dem sich Vertiefungen befinden, die das Colilert-18-Medium aufnehmen können. Nach Verschweißen des Trays und anschließender Bebrütung können die Einzelkompartimente gezählt werden, in denen ein Farbumschlag stattgefunden hat und die Anzahl der Coliformen Bakterien mittels „most probable number“ (MPN) bestimmt werden. Je nach Anzahl der Vertiefungen im Tray können Zählungen bis 200 je 100 ml und bis 2.419 je 100 ml ohne Verdünnung ausgewertet werden.

Coliforme Bakterien bilden das Enzym β -Galaktosidase, welches das im "Substrat" enthaltene ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid) in das stark gelbe o-Nitrophenol und einen β -D-Galaktopyranosidrest spalten. Das zusätzlich im Medium enthaltene MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glukuronid) kann nur von in der Probe enthaltenen *E.coli* mittels β -Glukuronidase in β -D-Glukuronid und das unter UV-Licht stark blau fluoreszierende 4-methyl-umbelliferon gespalten werden (Abb. 2). Der Colilert-18/Quanti-Tray ermöglicht somit die gleichzeitige Quantifizierung von *E.coli* und coliformen Bakterien.

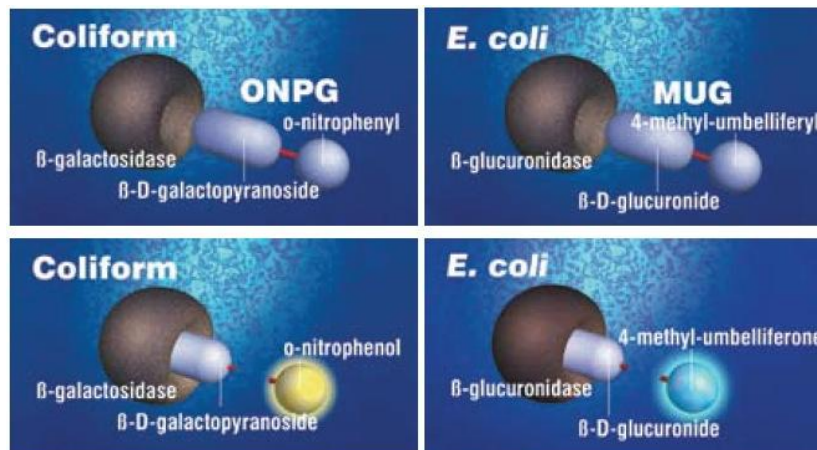


Abb. 2 Funktionsprinzip von Colilert-18 (Quelle: IDEXX 2011)

2.3 Nachweis von Indikatororganismen mit molekularbiologischen Methoden

Neben den oben beschriebenen so genannten "mikrobiologischen Nachweismethoden" werden seit einiger Zeit auch molekularbiologische Nachweisverfahren zur Wasseranalyse eingesetzt. Diese sind bisher nicht nach TrinkwV zugelassen. Im Gegensatz zu mikrobiologischen Methoden sind molekularbiologische Verfahren jedoch hoch sensitiv und sehr spezifisch. Es ist möglich, pathogene Keime deren Kultivierung hochproblematisch und teuer wäre, innerhalb weniger Stunden direkt nachzuweisen. So können neben Bakterien auch Viren oder Protozoen detektiert und quantifiziert werden.

Das Funktionsprinzip der molekularbiologischen Analyse beruht auf dem direkten Nachweis eines Zielorganismus über sein genetisches Material (DNA, RNA). Neben der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bei der die in den Zellen vorliegende ribosomale RNA direkt angefärbt wird, ist die am häufigsten verwendete Methode die PCR (Polymerase Kettenreaktion). Hierbei wird zunächst ein organismenspezifischer Bereich der Gesamt-DNA vervielfältigt, bis genug Kopien des Moleküls vorliegen, um es (z.B. mit fluoreszierenden DNA-Farbstoffen) zu detektieren. Weiterentwicklungen der klassischen PCR-Methode wie die digitale PCR oder qPCR ermöglichen heute bereits die exakte Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen Ziel-DNA. Inzwischen ist es mit molekularbiologischen Methoden sogar möglich, mehrere Organismen in einem einzigen Ansatz zu detektieren (Straub et al. 2005).

Dass die Zielorganismen hierzu nicht mehr vermehrungsfähig sein müssen, kann je nach Fragestellung von Vorteil aber auch von Nachteil sein. Denn auch z.B. nach Desinfektion abgetötete und somit völlig harmlose pathogene Keime können mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden, solange ihre DNA noch intakt ist. Andererseits können physiologisch vorgeschädigte oder unter Laborbedingungen nicht kultivierbare Bakterien („viable but not culturable“), die ihre Pathogenität nicht verloren haben, sicherer als mit den klassischen Kultivierungsmethoden erfasst werden. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen wirklich pathogen auf Wirtsorganismen wirkenden und harmlosen (vorgeschädigten) Bakterien kann jedoch mit bisher etablierten Methoden nicht erreicht werden. Um mit molekularbiologischen Methoden beispielsweise eine Lebend-Tot-Differenzierung zu ermöglichen, werden zwar momentan verschiedene neue Methoden erprobt (Nocker et al. 2007) allerdings sind auch die neuen Methoden noch nicht ausreichend abgesichert.

Der klassische Verfahrensablauf einer molekularbiologischen Analyse beinhaltet in vielen Fällen eine Aufkonzentrierung und eine anschließende DNA-Extraktion. Bei der Aufkonzentrierung kann es jedoch auch zur Anreicherung von Störstoffen kommen, die sich inhibierend auf die nachfolgende DNA-Vervielfältigung auswirken. Um dies zu überprüfen, sollten neben der üblichen Positiv- und Negativkontrolle auch Inhibitionskontrollen mit bekannten DNA-Mengen mitgeführt werden, die eine mögliche Störung der Reaktion anzeigen (Girones et al. 2010).

Das größte Potential der molekularbiologischen Nachweisverfahren liegt sicherlich in der direkten phylogenetischen Zuordnung der Organismen. Durch Analyse (Sequenzierung) der DNA ist es möglich, die genetische Ähnlichkeit der Organismen mit bekannten Quellen zu bestimmen und so Aussagen über die Herkunft und physiologischen Eigenschaften der Bakterien abzuleiten (Lee 2011).

Kapitel 3

Möglichkeiten der Früherkennung und Online-Detektion

Die Detektion und Quantifizierung von Mikroorganismen ist seit einigen Jahren großen Veränderungen unterworfen. Die klassischen mikrobiologischen Methoden der Kultivierung werden immer häufiger durch Methoden, die auf biochemischen oder molekularbiologischen Reaktionen beruhen, ergänzt. So ist beispielsweise das IDEXX Colilert-18-System seit 2003 in die Liste alternativer Verfahren gemäß § 15 Abs. 1 TrinkwV 2001 des Umweltbundesamtes aufgenommen und wird somit als gleichwertig gegenüber dem klassischen Verfahren nach DIN EN ISO 9308-1 angesehen. Weitere alternative Systeme sind bereits auf dem Markt oder befinden sich in der Entwicklung.

Hinsichtlich einer Früherkennung (< 18 Stunden) sind bereits verschiedene Ansätze in der Entwicklung.

- Das TECTA-System (Veolia Water) kombiniert die Vorteile des enzymbasierten Nachweises (siehe MUG/ONPG in Kapitel 2) mit einer hochsensitiven Detektionsoptik und ermöglicht so eine Reduktion der Nachweiszeit auf bis zu zwei Stunden (bei hohen Befunden).
- Das Coliguard-System von mbOnline verfolgt einen ähnlichen Ansatz zur semi-kontinuierlichen, automatisierten Analyse von Trinkwasser. Hierbei werden alle 3 – 4 Stunden 1000 ml Wasser fluoreszenzoptisch auf ihren biochemischen Stoffumsatz hin überprüft.
- Am Korea Research Institute of Chemical Technology konnten *E.coli* bereits erfolgreich mit einem auf Nanoröhren basierenden System nachgewiesen werden (So et al. 2006). Hierbei wurden spezifisch auf die Oberflächenstruktur von *E.coli* abgestimmte Oligonukleotide (sogenannte Aptamere) eingesetzt, die das Bakterium in der Nanoröhre zurückhalten und so eine sehr sensitive Detektion ermöglichen.
- Ein besonders kreativer Ansatz von Namura basiert auf fluoreszenzmarkierten Phagen (bakterienspezifische Viren). Diese Phagen wurden genetisch so verändert, dass sie Fluoreszenzmarker in *E.coli* einschleusen, so dass diese optisch detektiert werden können (Namura et al. 2008).

Viele der neuen Systeme müssen sich allerdings erst noch in der Praxis bewähren und es liegen noch nicht genügend Daten zur Verlässlichkeit und Vergleichbarkeit mit klassischen Methoden vor. Da die Kosten für molekularbiologische Untersuchungen in den kommenden Jahren jedoch weiter stetig abnehmen werden, können viele der Vorteile dieser Methoden zukünftig auch Eingang in die Routineanalytik finden.

Besonders die genetische Klassifizierung von Befunddaten birgt ein großes Potential. Während die klassische in der Routineanalytik eingesetzte Mikrobiologie meist lediglich eine grobe Einteilung der Gattungen gestattet, ermöglichen molekularbiologische Methoden viel genauere Aussagen weit über die Klassifizierung der Art hinaus. Der direkte und gesicherte Nachweis von Antibiotikaresistenzen oder Pathogenitätsfaktoren sowie Hinweise zur Herkunft (Tier, Mensch oder Umwelt) der detektierten Indikatororganismen konnte bereits experimentell gezeigt werden (Jung et al. 2012) und könnte zukünftig die Routineanalytik erweitern.

Kapitel 4

Zusammenfassende Betrachtung der Untersuchungsergebnisse

Im Rahmen des Projektes RIKO-1 wurden umfangreiche mikro- und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden an den Standorten Tiefwerder und Spandau mehr als 150 Wasser- und Bodenproben aus verschiedenen Tiefen entnommen. Von mehr als 100 dieser Proben wurden DNA-Extrakte gewonnen. Zusätzlich wurden mit unterschiedlichen Material- (z.B. Brunnenmanschetten) und Umweltproben (z.B. von Insekten und Mollusken) Wachstumsversuche und mikroskopische Analysen durchgeführt.

Neben klassischen mikrobiologischen Nachweisverfahren, wurde eine Vielzahl der Proben auch molekularbiologisch untersucht. Da es sich bei diesen Untersuchungen zum überwiegenden Teil nicht um Routineanalysen handelte, mussten die eingesetzten Methoden auf den jeweiligen Einzelfall angepasst werden.

Um auch für zukünftige Problemstellungen einfache Handlungsempfehlungen ableiten zu können, sollen die eingesetzten Methoden im Folgenden hinsichtlich ihrer praktischen Umsetzung als auch ihrer Aussagekraft bewertet werden.

4.1 Nachweis von coliformen Bakterien in Bodenproben.

Der Nachweis von Bakterien in Bodenproben wird durch verschiedene Randbedingungen erschwert. So haftet der überwiegende Teil der im Boden vorkommenden Bakterien an Bodenpartikeln (Hattori 1973) und ihre horizontale Verteilung ist sehr inhomogen. Gerade bei fäkalcoliformen Bakterien ist die Verteilung stark von der Verteilung der Eintragsquellen (z.B. Kot oder Pflanzenmaterial) abhängig.

Zusätzlich ist bei einer vertikalen Probenahme immer das Problem einer möglichen Verschleppung von Bakterien in tiefere Schichten zu berücksichtigen. Eine mögliche Lösung wäre es, zunächst einen vertikalen Schacht anzulegen und diesen dann an verschiedenen Stellen horizontal zu beproben. Gerade bei größeren Tiefen ist dies jedoch mit hohem Aufwand und Kosten verbunden. Im Rahmen von RIKO-1 wurde daher der wesentlich einfachere Ansatz der Beprobung mittel Bohrstock gewählt. Um vertikale Verschleppungen zu minimieren, wurde der Bohrstock vor jeder Bohrung mit Ethanol gereinigt und dann flammensterilisiert (Hartel und Hagedorn 1983). Durch Abtrag der oberen bakterienreichen Bodenschicht sollte die Verschleppungsgefahr zusätzlich minimiert werden. Die Untersuchungen sind in den Teilberichten Spandau und Tiefwerder ausführlich dokumentiert.

Auch wenn es nur relativ wenige Vergleichsuntersuchungen zur Tiefenverteilung coliformer Bakterien in unbelasteten Böden gibt (Entry et al. 2000, Carabin et al. 1998), erscheinen die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen plausibel und die gewählte Methodik als geeignet für eine schnelle und unkomplizierte Standortbeurteilung.

4.2 Einsatz der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird schon seit geraumer Zeit zum schnellen Nachweis hygienisch relevanter Bakterien eingesetzt (Wilson et al. 2003, Tissier et al. 2012). Die Methode ist sehr sensitiv und findet auch in der medizinischen Diagnostik breite Anwendung (Joseph et al. 2012, Reddington 2013). In dieser Studie wurde die Methode der qPCR unter anderem dazu verwendet, eine große Anzahl von Proben schnell auf das Vorhandensein eines spezifischen coliformen Bakteriums hin zu überprüfen. Voraussetzung war die Identifizierung der coliformen Keime in Positivbefunden durch Sequenzierung (vgl. Abschnitt 4.3) zur Erstellung eines entsprechenden "Primers" (spezifische, an die Ziel-DNA bindende Oligonukleotide).

Bei der Anwendung der qPCR im Umweltbereich stellen sich jedoch eine Reihe von Herausforderungen. So enthalten Grundwasserproben meist gelöste Stoffe (z.B. Huminstoffe und Ionen), die bei unzureichender Probenaufbereitung die PCR-Reaktion stören können.

Zusätzlich müssen die für die Detektion und Quantifizierung gewählten Oligonukleotide selektiv genug auf die zu detektierenden Zielorganismen abgestimmt werden, da in Umweltproben meist eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterienarten gleichzeitig vorliegen.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen ist nicht auszuschließen, dass auch andere im Grundwasser oder Boden vorkommende Bakterien ein positives Signal erzeugt haben können. Neben der Überprüfung der Spezifität der verwendeten Oligonukleotide anhand öffentlich zugänglicher Datenbanken wurden die Ergebnisse daher auch mit geeigneten Negativ- (Grundwässer nachweislich unbelasteter Brunnen) und Positivkontrollen (Reinst-DNA des Zielorganismus) abgesichert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei Anwendung der PCR-Methodik besteht darin, dass keine Unterscheidung zwischen vermehrungsfähigen, methabolisch aktiven oder toten und nicht mehr aktiven Bakterien möglich ist. Hier existieren zwar bereits Ansätze diesen Nachteil auszugleichen (Nocker et al. 2007), jedoch sind diese den kulturbasierten Ansätzen bisher noch unterlegen. Andererseits ist es mit der PCR-Methodik möglich, bei ganz speziellen Fragestellungen auch nicht mehr vermehrungsfähige Reste von Mikroorganismen gezielt nachzuweisen, gerade dann, wenn klassische Kultivierungsmethoden bei der Spurensuche versagen (z.B. nach Desinfektionsmaßnahmen).

Die im Projekt erarbeiteten Ergebnisse der qPCR-Untersuchungen stellten daher unter den gegebenen Voraussetzungen eine sinnvolle Ergänzung der mikrobiologischen Untersuchungen dar und es wurde die Grundlage geschaffen, die qPCR auch bei zukünftigen Problemstellungen einzusetzen.

4.3 Verknüpfung mikro- und molekularbiologischer Methoden

Um die Vorteile der kultivierungsbasierten (Nachweis lebender Zellen) und die der molekularbiologischen Methoden (genaue Identifikation) zu kombinieren, wurde in RIKO-1 der bei den Berliner Wasserbetrieben bereits etablierte Ansatz der Sequenzierung positiver Befunde angewendet. Dieser Ansatz hat sich als äußerst effektiv bei der Befundanalyse erwiesen, da er die Differenzierung der auftretenden hygienisch relevanten Mikroorganismen ermöglichte. Durch den Abgleich mit älteren Befunden und bereits vorhandenen Datenbanken konnten genauere Hinweise auf die Art der Quelle gewonnen werden. Eine Identifizierung der befundauslösenden Bakterien kann somit auch bei zukünftigen Ereignissen helfen, Kausalketten zu plausibilisieren und bei der Wahl der nötigen Maßnahmen zu unterstützen.

Die kontinuierliche Sequenzierung ausgewählter Positivbefunde erscheint in diesem Zusammenhang auch zukünftig sehr sinnvoll, um eine größere Datenbasis für die Ursachenanalyse zu erhalten und übergeordnete Zusammenhänge zu erkennen. Für die zweite Projektphase wird daher vorgeschlagen,

- (i) weiterhin alle Positivbefunde zu sequenzieren,
- (ii) zusätzliche Umfeldproben zu entnehmen und zu bestimmen, und
- (iii) die Ergebnisse in einer georeferenzierten Datenbank zu sammeln und für die räumlich-zeitliche Auswertung mit den Bewegungsdaten der Brunnen zu verknüpfen.

Kapitel 5 Schlussfolgerungen

Die derzeit nach TrinkwV 2001 zugelassenen Verfahren zur mikrobiologischen Kontrolle von Trinkwasser sind sensitiv genug, um klassische Indikatorkeime verlässlich zu erfassen. Jedoch existieren auch weiterhin Unsicherheiten bezüglich der direkten Identifizierung von Krankheitserregern, die bisher nicht mit vertretbarem Aufwand ausgeräumt werden können. Daher wurde das Indikatorprinzip auch in der Vergangenheit dem Stand der Technik entsprechend ständig angepasst und überarbeitet.

Für Wasserversorger stellt vor allem die Erweiterung des erfassten Artenspektrums durch die in der TrinkwV 2001 zugelassenen alternativen Verfahren eine wichtige Neuerung dar. So werden nun potentiell auch Arten erfasst, die zuvor unbemerkt ins Trinkwasser gelangt wären. Viele dieser zusätzlich detektierten Arten sind jedoch nicht auf fäkale Verunreinigung zurückzuführen, sondern zählen zu den Umweltkeimen, was eine differenzierte Betrachtung der Befundereignisse empfehlenswert macht. Da auch eine Kontamination mit Keimen aus anderen Quellen (Boden, Insekten oder Oberflächenwasser) im Einzelfall ein nicht zu unterschätzendes hygienisches Risiko darstellen kann, ist ihre Erfassung für eine sichere Trinkwasserversorgung jedoch keinesfalls als Nachteil zu betrachten.

Die molekularbiologische Analyse kann hier beispielsweise bei der Bestimmung der coliformen Bakterien ergänzend eingesetzt werden und Defizite in der Befunddifferenzierung optimal ausgleichen. Durch eine nachgelagerte Isolation und Sequenzierung der mit den klassischen Methoden erfassten Einzelbefunde kann klar bestimmt werden, ob es sich um Bakterien fäkalen Ursprungs oder um sogenannte „Umweltcoliforme“ handelt.

Waren die Kosten für eine Sequenzanalyse vor wenigen Jahren noch zu hoch, um sie in der Routineuntersuchung von Trinkwasser einzusetzen, so sind derartige Analysen heute bereits preislich mit den klassischen Verfahren vergleichbar. Auch wenn sie bisher nur als sinnvolle Ergänzung dienen und klassische Verfahren nicht ersetzen können, kann eine Verknüpfung und Visualisierung der so gewonnenen neuen Daten Einblicke in bisher nicht sichtbare Zusammenhänge ermöglichen. So können Befundereignisse über die Identifizierung der beteiligten Bakterienstämme räumlich und zeitlich korreliert werden und direkt mit Befunden aus Umweltproben verglichen werden, um mögliche Quellen zu identifizieren. Um den Kontext auftretender Befunde besser zu verstehen, ist es daher sinnvoll, jegliche Eingriffe in das System zwischen Brunnen und Trinkwassernetz genau zu dokumentieren und an zentraler Stelle in aufbereiteter Form zu aggregieren.

Der Fokus weiterer Forschung sollte auch auf der Früherkennung spezifischer Indikatoren liegen. Hierfür bietet sich die Technik der multiplex quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) an. Durch die Entwicklung geeigneter Protokolle könnten mit diesem Verfahren mehrere Indikatorbakterien gleichzeitig über ihre DNA-Signatur quantifiziert werden. Eine Wasserprobe könnte somit nach der Probenahme innerhalb weniger Stunden gleichzeitig auf eine Vielzahl möglicher Indikatorkeime hin getestet werden. Die Überprüfung ist hierbei nicht auf kultivierbare Indikatorkeime beschränkt, sondern kann sogar direkt auf durch Kultivierung nur schwer nachweisbare pathogene Keime zielen. Zum Nachweis genügt die Anwesenheit gezielt vermehrbare DNA in der Probe.

Da bei der PCR jedoch nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden wird, besteht auch hier noch Bedarf an Forschungs- und Entwicklungsarbeit. Ein derzeit verbreiteter Ansatz des Ausschlusses toter Zellen bei der DNA-Vermehrung beruht auf der Verwendung von Propidiumiodidmonoazid (Nocker et al. 2007), welches durch die Membran geschädigter Bakterien dringen und mit ihrer DNA eine irreversible Bindung eingehen kann. Bei der folgenden DNA-Amplifikation wird dann nur die DNA nichtgeschädigter Zellen erfasst.

Ein weiteres Problem der PCR-Technik besteht in der möglichen Inhibition durch Wasserinhaltsstoffe. Gerade die im Rohwasser weit verbreiteten Huminstoffe können hier bei ungenügender DNA-Aufreinigung die Reaktion stören. Diesem Problem kann in der Praxis durch Inhibitionskontrollen, eine verbesserte Aufreinigung oder Verdünnung der Probe begegnet werden.

Auch die Weiterentwicklung bestehender Systeme zur Onlineüberwachung ist denkbar. Systeme wie Coliguard und Tecta (siehe Kapitel 3), die auf einem Nachweis spezifischer Enzymaktivität basieren, können durch semikontinuierliche, automatisch beprobende Systeme auf Basis molekularbiologischer Nachweisverfahren ergänzt werden. Ein solches System könnte direkt in Wasserwerken installiert werden und beim Auftreten von Kontaminationen über eine Mobilfunkschnittstelle eine Benachrichtigung an die verantwortliche Stelle versenden. Solche kontinuierlichen automatisierten Beprobungen von Rohwässern gestalten sich vermutlich jedoch vor allem wegen der Bildung von Ablagerungen (z.B. Eisenhydroxide oder Biofilme) schwierig, könnten jedoch mit geeigneten Reinigungsmechanismen realisiert werden.

Basierend auf den in diesem Bericht und den Teilberichten Spandau und Tiefwerder dokumentierten Ergebnissen der Literaturrecherche und Feldversuche kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass eine Kombination aus

- (i) Früherkennung (Onlinesysteme),
- (ii) genauer Befundanalyse (Sequenzierung),
- (iii) Datenerfassung (GMS/ LIMS) und
- (iv) Datenanalyse (Kartierung, Korrelation, verknüpfte Darstellung)

einen wesentlichen Beitrag für das zukünftige Verständnis und die Vermeidung von Kontaminationsereignissen leisten kann.

Weitere Untersuchungen sollten auf den Bezug zwischen Kontaminationsereignissen und Umfeldproben, die Überlebensfähigkeit der identifizierten Keime unter sich ändernden Randbedingungen (z.B. Zunahme Extremwetterperioden) und den Bezug zwischen der Erfassung der vermehrungsfähigen Keime mit dem Colilert-18 und qPCR-Befunden abzielen.

Renzen

Carabin H., Gyorkos T. W., Kokoskin E., Payment P., Joseph L., Soto J. 1998

Comparison of methods of sampling for Toxocara species and fecal coliforms in an outdoor day care environment.

The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses 9 (3) p. 149-56

Carl Roth GmbH + Co. KG 2012

LACTOSE-TTC-AGAR MIT NATRIUM-HEPTADECYLSULFAT

Produkt-Datenblatt CP65 Stand 11/2012

Chapman, G.H. 1947

A superior culture medium for the enumeration and differentiation of coliforms.

J. Bact. 53(4), 504.

Entry James A., Hubbard Robert K., Thies Janice E., Fuhrmann Jeffrey J. (2000)

The Influence of Vegetation in Riparian Filterstrips on Coliform Bacteria: II. Survival in Soils

Journal of Environment Quality 29 (4) p. 1215

Feuerpfeil, I. und Botzenhart K. 2008

Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ISBN 978-3-527-31569-7

Feuerpfeil I., Szewzyk R., Hummel A. 2002

Die mikrobiologischen Nachweisverfahren der neuen Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001)

Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 45:1006-1009

Fricker, C. R., Warden, P. S., DeSarno, M. and Eldred, B. 2010,

Significance of Methods and Sample Volumes for E.coli and Total Coliform Measurements, Water Research Foundation.

Hartel P. G., Hagedorn C. 1983

Microtechnique for isolating fecal coliforms from soil.

Applied and environmental microbiology 46 (2) p. 518-20

Hattori T. 1973

Microbial Life in Soil. Marcel Dekker, New York .

Hye-Mi So; Dong-Won Park; Yo-Han Kim; Sun Young Choi; Young Mi Kim; Sung Chun Kim; Beom Soo Kim; Jeong-O Lee 2006;

"Single-walled carbon nanotube biosensor for detection of E. coli,"

Nanotechnology Materials and Devices Conference, 2006.

NMDC 2006. IEEE , vol.1, no., pp.358-359, 22-25

IDEXX Laboratories, Inc. 2011

Colilert-18 an easy 18-hour test for coliforms and E. coli

Colilert-18 Broschüre

Jung Eun Lee, Heetae Lee, You-Hee Cho, Hor-Gil Hur, GwangPyo Ko 2011

F+ RNA coliphage-based microbial source tracking in water resources of South Korea,

Science of The Total Environment, Volumes 412-413, Pages 127-131

Jung Eun Lee, Sunghye Lee, Jooheon Sung, GwangPyo Ko 2011
Analysis of human and animal fecal microbiota for microbial source tracking
ISME J.; 5(2): 362–365.

Korth 2012

Enterokokkenbelastungen im Trinkwasser
TZW aktuell, Nachrichten aus dem Technologiezentrum Wasser, Ausgabe 33, 10/2012

Namura M., T. Hijikata, K. Miyanaga, and Y. Tanji. 2008

Detection of Escherichia coli with fluorescent labeled phages that have a broad host range to E. coli in sewage water. Biotechnology progress 24:481–6.

Niemela S.I., Lee J.V., Fricker C.R. 2003,

A comparison of the International Standards Organisation reference method for the detection of coliforms and Escherichia coli in water with a defined substrate procedure.
Journal of Applied Microbiology, 95, 1285–1292

Nocker A., P. Sossa-Fernandez, M. D. Burr, and A. K. Camper. 2007.

Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. Applied and environmental microbiology 73:5111–7.

Reddington, K.; Tuite, N.; Barry, T.; O'Grady, J.; Zumla, A. 2013

Advances in multiparametric molecular diagnostics technologies for respiratory tract infections. Current opinion in pulmonary medicine vol. 19 (3) p. 298-304

Joseph, Cornelia Reena; Lalitha, Prajna; Sivaraman, Kavitha R; Ramasamy, Kim; Behera, Umesh Chandra 2012

Real-time polymerase chain reaction in the diagnosis of acute postoperative endophthalmitis. American journal of ophthalmology vol. 153 (6) p. 1031-7.e2

Rompré A., Servais P., Baudart J., de-Roubin M. R., Laurent P. 2002

Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. Journal of microbiological methods 49 (1) p. 31-54

Rosina Girones, Maria Antonia Ferrús, José Luis Alonso, Jesus Rodriguez-Manzano, Byron Calgua, Adriana de Abreu Corrêa, Ayalkibet Hundesa, Anna Carratala, Sílvia Bofill-Mas 2011

Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques
Water Research, Volume 44, Issue 15, August 2010, Pages 4325-4339

Schindler, P. 2004

Fäkale Verunreinigungen im Trinkwasser
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in der Helmholtz-Gemeinschaft

Straub, T.M., Dockendorff, B.P., Quinonez-Diaz, M.D., Valdez, C.O., Shutthanandan, J.I., Tarasevich, B.J., Grate, J.W., BrucknerLea, C.J., 2005.

Automated methods for multiplexed pathogen detection.
J. Microbiol. Methods 62 (3), 303-316.

Tissier, Adeline; Denis, Martine; Hartemann, Philippe; Gassilloud, Benoît (2012)

Development of a rapid and sensitive method combining a cellulose ester microfilter and a real-time quantitative PCR assay to detect Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in 20 liters of drinking water or low-turbidity waters.
Applied and environmental microbiology vol. 78 (3) p. 839-45

TrinkwV 2001

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch
BGBl. I S.2370

Umweltbundesamt 2009

Coliforme Bakterien im Trinkwasser
Bundesgesundheitsblatt, 52; 474-482

Wilson D.A., Yen-Lieberman B., Reischl U., Gordon S.M., Procop G.W. 2003

Detection of Legionella pneumophila by real-time PCR for the mip gene.
Journal of clinical microbiology 41 (7) p. 3327-30

Winfield M. D., and E. A. Groisman. 2004.

Phenotypic differences between Salmonella and Escherichia coli resulting from the disparate regulation of homologous genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:17162–7.