

Neue Wege bei der Analyse der Trinkwasserqualität

Die langwierige Suche nach der schnellen Alternativmethode

Trinkwasser wird routinemässig auf das Vorkommen von Bakterien mit der Kultivierungsmethode untersucht. Problematisch bei dieser Methode ist der grosse Zeitbedarf. Die Ergebnisse liegen frühestens nach einem Tag vor. An der EAWAG wird deshalb momentan eine schnellere Methode entwickelt. Der Einsatz neuer, molekularer Techniken scheint dabei viel versprechend, die Ausarbeitung der Methode ist jedoch eine knifflige Angelegenheit.

Bereits seit vielen Jahrzehnten werden routinemässig bakterielle Parameter bestimmt, um die hygienische Qualität von Trinkwasser zu überprüfen. Dabei werden so genannte Indikatororganismen nachgewiesen, z.B. die Darmbakterien *Escherichia coli* [1]. Man geht davon aus, dass diese harmlosen Bakterien gemeinsam mit eventuellen Krankheitserregern ausgeschieden werden und ins Trinkwasser gelangen können. Für den Nachweis von *E. coli* bewährt sich seit Jahrzehnten die einfache und kostengünstige Kultivierungsmethode. Allerdings ist diese Methode sehr zeitaufwändig: Im allergünstigsten Fall dauert es 24 Stunden, bis ein Resultat vorliegt. Es gibt aber Situationen, in denen der Wasserversorger schneller wissen müsste, ob das abgegebene Trinkwasser tatsächlich hygienisch einwandfrei ist. Beispielsweise könnte es bei tagelangem heftigem Regen vorkom-

men, dass eine oder mehrere Quellen einer Wasserversorgung schlecht filtriertes und fäkal kontaminiertes Wasser liefern, das unter ungünstigen Umständen ins Trinkwasser gelangen könnte. In diesem Fall müsste der Wasserversorger sofort die nötigen Massnahmen für die Dekontamination des Trinkwassersystems (Desinfektion, Spülung) einleiten und darüber hinaus die Bevölkerung alarmieren, das Wasser abzukochen. Kommt das Analyseergebnis jedoch erst nach 24 Stunden, kann es bereits zu spät sein. Aus diesem Grund wird derzeit an der EAWAG eine schnellere Nachweismethode entwickelt, die auf neueren molekularbiologischen Techniken basiert.

Die *E.-coli*-Referenzmethode

Trinkwasser wird zu den Lebensmitteln gerechnet und unterliegt daher der Schweizerischen Hygieneverordnung [2]. Darin ist

festgehalten, dass zum Qualitätsnachweis die Referenzmethoden aus dem Schweizerischen Lebensmittelbuch heranzuziehen sind [3]. Andere Untersuchungsmethoden sind dann zulässig, «wenn sie nachweislich zu gleichen Beurteilungen führen wie die Referenzmethoden» [2]. Als Referenzmethode zum Nachweis von *E. coli* in Trinkwasser gilt die Kultivierungsmethode (Abb. 1 oben). Die Hygieneverordnung gibt für *E. coli* den Toleranzwert «nicht nachweisbar in 100 ml Wasserprobe» vor. Deshalb werden bei der Kultivierungsmethode 100 ml Wasserprobe durch einen Filter filtriert, auf dem *E. coli* und andere Bakterien zurückgehalten werden. Der Filter wird anschliessend auf eine Agarplatte gelegt, wobei die einzelnen Bakterienzellen zu zählbaren Kolonien heranwachsen können. Ob eine Kolonie tatsächlich aus *E.-coli*-Bakterien besteht, wird über eine Enzymreaktion bestätigt, bei der die *E.-coli*-Kolonien blau angefärbt werden (siehe Titelseite).

Die neu entwickelte Alternativmethode

Bei der Suche nach einer schnelleren Alternativmethode bieten sich Techniken aus der Molekularbiologie an. Besonders viel versprechend erschien uns der Einsatz der

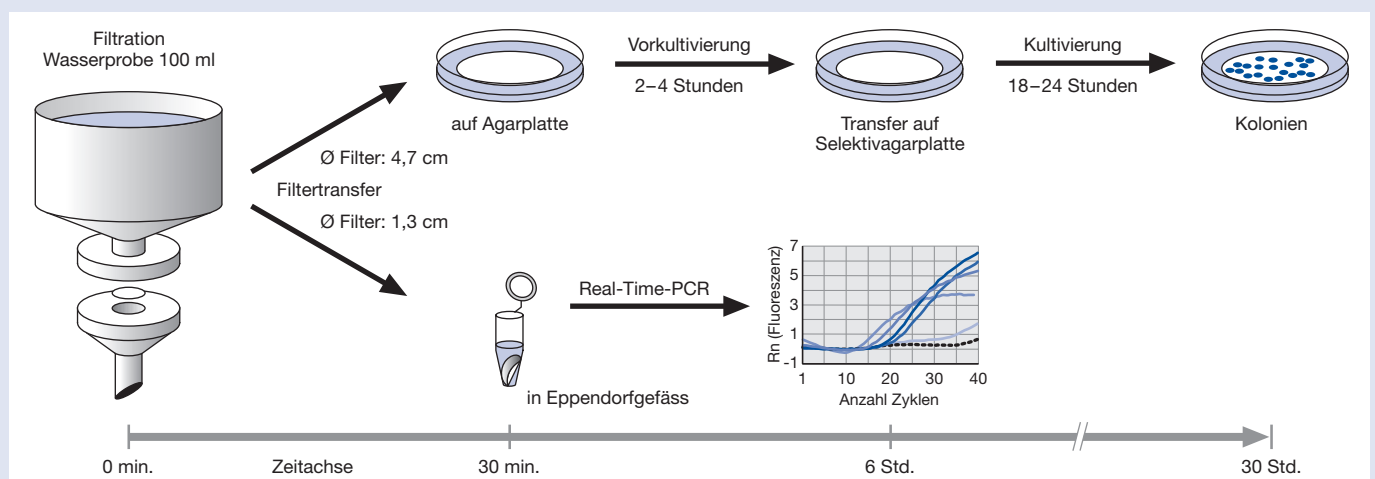


Abb. 1: Arbeitsschritte und Zeitbedarf der Kultivierungsmethode (oben) und der neu entwickelten Alternativmethode, basierend auf der PCR-Technologie (unten).

«Polymerase Chain Reaction» (PCR, Polymerase-Ketten-Reaktion, Abb. 1 unten). Dabei werden kurze, für *E. coli* definierte Abschnitte der Erbsubstanz (DNA) in sich wiederholenden Temperaturzyklen vervielfältigt. Mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs, der sich in die doppelsträngige DNA einlagert, können die synthetisierten DNA-Fragmente anschliessend sichtbar gemacht werden. Bei der von uns eingesetzten «Real-Time-PCR-Methode» wird die Fluoreszenz direkt gemessen und auf den Computer übertragen. Das Resultat ist die Anzahl der Temperaturzyklen, die durchlaufen werden müssen, damit das Nachweinsniveau für die Fluoreszenz erreicht wird. Bezogen auf eine zu analysierende Wasserprobe bedeutet dies: je mehr *E.-coli*-Zellen (d.h. je mehr DNA) in der Probe vorhanden sind, desto weniger Temperaturzyklen sind notwendig, um die synthetisierten DNA-Frag-

mente nachzuweisen. Ein wichtiger Punkt in unserem PCR-Protokoll ist die Vorbehandlung der Probe mit dem Enzym DNase, das eventuell vorhandene freie DNA von toten Bakterien abbaut. Damit sollten falsche Positivresultate ausgeschlossen werden.

Der Unterschied wird deutlich

Um nun die Übereinstimmung der neu entwickelten PCR-Methode mit der Kultivierungsmethode zu testen, wurde Trinkwasser im Labor mit *E.-coli*-Zellen kontaminiert und bei 4 °C gelagert. Während eines Monats wurden davon immer wieder Proben entnommen und mit beiden Methoden analysiert. Am Anfang des Experiments (Zeitpunkt 0) konnten mit beiden Methoden Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 2A+B). Dann aber nahm die Zahl der Bakterien, die mit der Kultivierungsmethode erfasst wurden, rapide ab. Wir erwarteten deshalb für die PCR-Methode, dass die Fluoreszenz erst nach einer grösseren Anzahl Temperaturzyklen nachweisbar ist. Dies war jedoch nicht der Fall. Selbst nach einem Monat wurden mit der PCR-Methode immer noch *E.-coli*-Zellen nachgewiesen. Diese Zellen waren offenbar nicht mehr fähig, auf dem Kulturmedium zu wachsen.

Solche Bakterienzellen, die nicht mehr kultiviert werden können, aber mit anderen Methoden noch identifizierbar sind, werden oft als «viable but not culturable» (VBNC, lebensfähig aber nicht kultivierbar) bezeichnet. Unter den Mikrobiologen sind kontroverse Diskussionen im Gange, ob im Falle von Indikatoren wie *E. coli* oder von krankmachenden Bakterien die Detektion von VBNC-Stadien relevant ist oder nicht. Es gibt Hinweise, dass solche Bakterien wieder «zum Leben erweckt» bzw. infektiös werden können [4], andere Untersuchungen beweisen das Gegenteil [5, 6]. Wahrscheinlicher scheint uns in unserem Experiment ein kontinuierliches Absterben, das je nach «Vorgeschichte» der *E.-coli*-Zelle unterschiedlich lange dauern kann.

Was sich bewährt hat, ist schwer zu ersetzen

Aus diesem einfachen Experiment geht hervor, dass die beiden Methoden nicht zu gleichen Beurteilungen führen und daher die PCR-Methode keine Alternative zur Kultivierungsmethode ist. Die Prinzipien, auf denen die beiden Methoden basieren, nämlich Vermehrungsfähigkeit im Fall der Kultivierungsmethode und Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte bei der PCR-Methode, sind vermutlich zu unterschiedlich, als dass eine genügende Übereinstimmung der Resultate erzielt werden könnte. Dies

macht bewusst, wie sehr die Festlegung von bakteriologischen Toleranzwerten von der Analyse-methode abhängt.

In der Literatur gibt es Vorschläge, bei der PCR-Methode eine kurze Vorkultivierung der Bakterien von einigen Stunden einzuführen. Mit dieser Massnahme stimmen die Ergebnisse besser mit jenen der Referenzmethode überein [7]. Generell sind Diskussionen im Gange und Normierungsvorschläge publiziert oder in Bearbeitung, die es erlauben, die Validierung von Alternativmethoden zukünftig zu vereinheitlichen [8]. Isoliert betrachtet, könnte die hier vorgestellte PCR-Methode als «neue» Methode etabliert werden. Dazu müsste aber genau herausgefunden werden, in welchen physiologischen Zuständen eine *E.-coli*-Zelle erfasst wird. Die Anwendungspalette für unsere neu entwickelte PCR-Methode scheint daher momentan eher im Forschungsbereich als bei der routinemässigen Trinkwasserüberwachung zu liegen.

Dank

Dem Institut Bachema in Schlieren sei herzlich gedankt für Initiierung und Finanzierung dieses Forschungsprojektes!



Annette Rust entwickelte die vorgestellte Methode im Rahmen ihrer Doktorarbeit in der Abteilung «Umweltmikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie».

Koautor: Wolfgang Köster

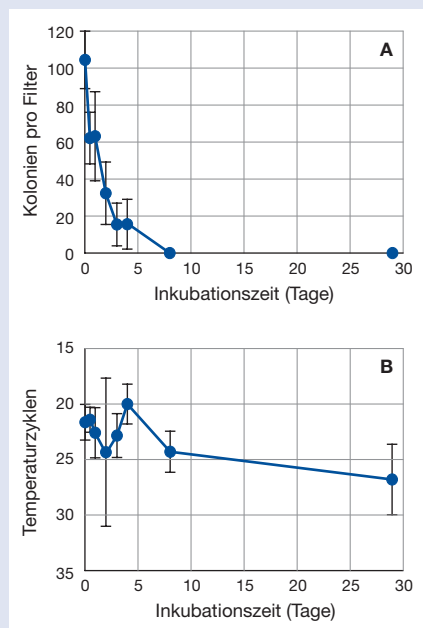


Abb. 2: Resultate der *E.-coli*-Bestimmung von künstlich kontaminiertem Trinkwasser mit der Kultivierungsmethode (A) und der PCR-Methode (B). Es wurden stets Kontrollen mit nicht kontaminiertem Wasser durchgeführt; Kultivierungsmethode: = 0 Kolonien, PCR-Methode: innerhalb von 40 Temperaturzyklen wurde das Nachweinsniveau nicht erreicht.

- [1] Köster W., Egli T., Rust A. (2002) Krankheitserreger im (Trink-)wasser? EAWAG news 53, 26–28.
- [2] Verordnung des EDI vom 26. Juni 1995 über die hygienischen und mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände, Räume, Einrichtungen und Personal (Hygieneverordnung, HyV), in 817.051, S. 1–16.
- [3] Ettl W. (Ed.) (2000): Kapitel 56, Mikrobiologie. In: Schweizerisches Lebensmittelbuch, Bundesamt für Gesundheit, Bern.
- [4] Colwell R.R. (2000): Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6, 121–125.
- [5] Smith R.J., Newton A.T., Harwood C.R., Barer M.R. (2002): Active but nonculturable cells of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* do not infect or colonize mice. *Microbiology* 148, 2727–2726.
- [6] Bogosian G., Bourneuf E.V. (2001): A matter of bacterial life and death. *EMBO reports* 21, 770–774.
- [7] Frahm E., Obst U. (2003): Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 52, 123–131.
- [8] Hübner P., Gautsch S., Jemmi T. (2002): In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 93, 118–139.