

# Vergleich von Kulturverfahren und molekularbiologischen Verfahren für die Trinkwasserüberwachung

27. Wasserhygienetage Bad Elster, 07.02.2019

Dr. Beate Hambsch, Dr. Michael Hügler

**TZW**



# ÜBERSICHT

---

- 1** **Trinkwasserüberwachung**  
**Anforderungen und gesetzliche Regelungen**
- 2** **Mikrobiologische Verfahren**  
**Kultur und Molekularbiologie**
- 3** **Forschungsergebnisse**  
**Einsatz molekularbiologischer Verfahren in WVU**
- 4** **Identifizierung**  
**Einsatzmöglichkeiten molekularbiologischer Verfahren**
- 5** **Zusammenfassung**

# TRINKWASSERÜBERWACHUNG

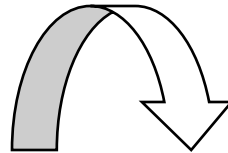
---

## Zielsetzung bei der Trinkwasserversorgung

Versorgung aller Abnehmer  
mit seuchenhygienisch  
einwandfreiem Wasser

=

Vermeidung  
trinkwasserbedingter  
Erkrankungen



Prävention:  
breite Anzeigenbasis  
für potentielle Anwesenheit  
von Krankheitserregern

### Fäkalindikatorprinzip

sensitive Anzeige fäkaler Verunreinigungen, als potentielle Anwesenheit fäkaler Krankheitserreger, mittlerweile gesetzlich festgelegtes hygienisch-mikrobiologisches Kontrollsystem, weltweit.

# TRINKWASSERÜBERWACHUNG

---

## TrinkwV § 4 Allgemeine Anforderungen

- (1) Trinkwasser muss so beschaffen sein, dass
- Schädigung der menschlichen Gesundheit nicht zu besorgen
  - genusstauglich
  - rein

Anforderung gilt als erfüllt, wenn Einhaltung

- bei Wassergewinnung, -aufbereitung und –verteilung mindestens allgemein anerkannte Regeln der Technik
- Anforderungen §§ 5, 6, 7 und 7a dieser Verordnung

# TRINKWASSERÜBERWACHUNG

---

## TrinkwV § 5 Mikrobiologische Anforderungen

- (1) Krankheitserreger nicht in Konzentrationen, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen
- (2) Grenzwerte in Anlage 1 Teil I (mikrobiologische Parameter) dürfen nicht überschritten werden  
(*E. coli*, Enterokokken 0 /100mL)
- (4) Konzentrationen von Mikroorganismen, die das Trinkwasser verunreinigen ..., sind zu minimieren.
- (5) - Mikrobielle Belastungen des Rohwassers, die zu einer übertragbaren Krankheit führen können ⇒ Aufbereitung evtl. einschl. Desinfektion, nach allgemein anerkannten Regeln der Technik  
- In Leitungsnetzen, sofern 1 und 2 nur durch Desinfektion einzuhalten, Vorhaltung einer hinreichenden Desinfektionskapazität

# MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN

---

## Klassische Kulturverfahren

- empfindlich  
(1 Bakt. / 100 mL, 0,5 ÷ 4 pg ( $10^{-12}$ g) C/L)
- robust
- standardisiert
- quantifizierbar
- nur lebende Zellen werden erfasst

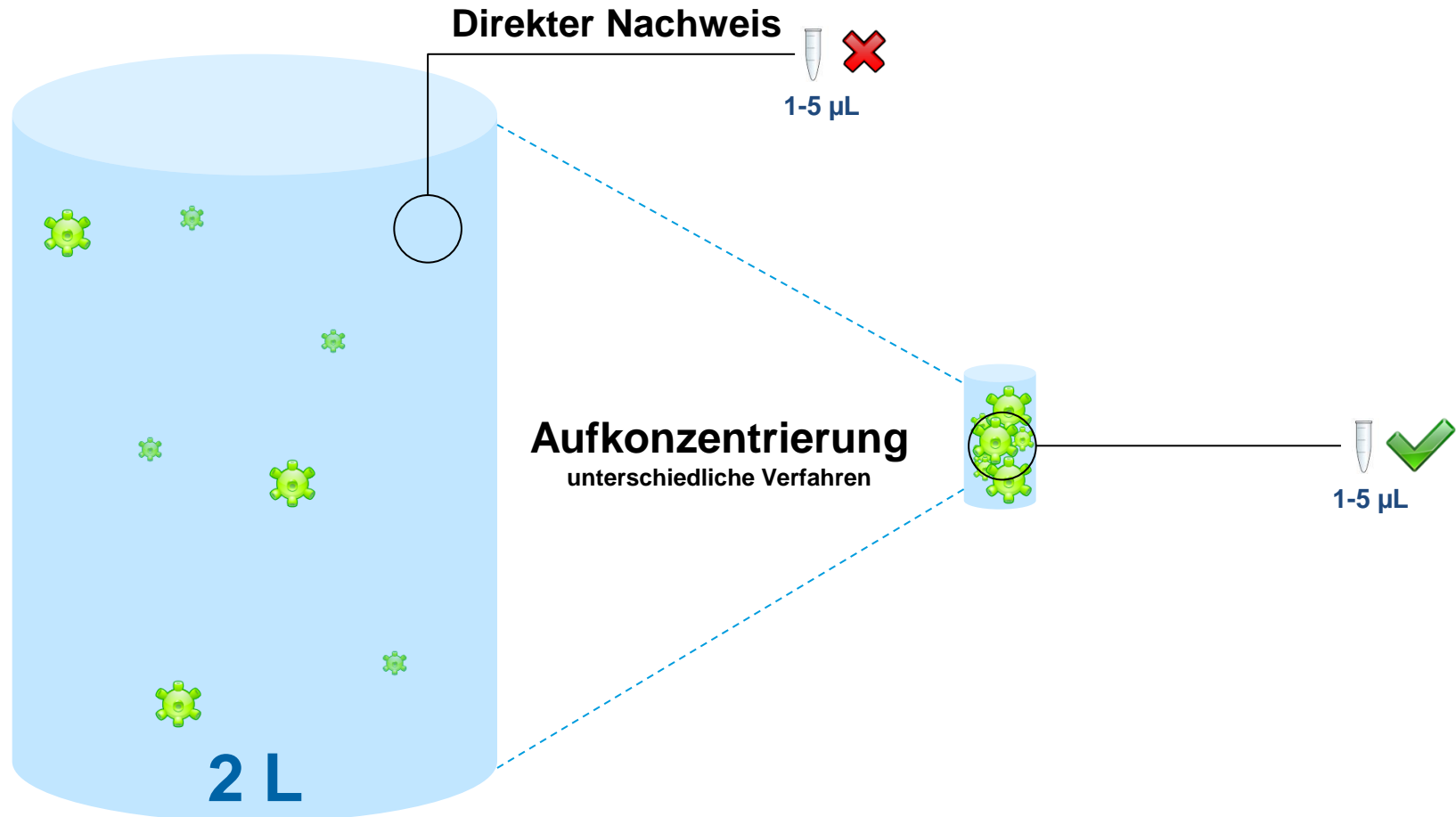
## aber

- Zeitbedarf der Inkubation
  - E. coli* / coliforme Bakterien 1d
  - Clostridium perfringens* 1d
  - Enterokokken 2d
  - Pseudomonas aeruginosa* 2-5d
  - Legionella spp. 10d

## Molekularbiologische Verfahren

- Keine Kultivierung erforderlich
  - PCR (qualitativ und quantitativ)
  - FISH (qualitativ und quantitativ)
  - MALDI-TOF MS (qualitativ)
- + geringer Zeitbedarf
  - + hohe Spezifität
  - + Erfassung nicht kultivierbarer Mikroorganismen (PCR, FISH)
- Voranreicherung erforderlich
  - Unterscheidung tot/lebend durch zusätzliche Schritte (PCR)

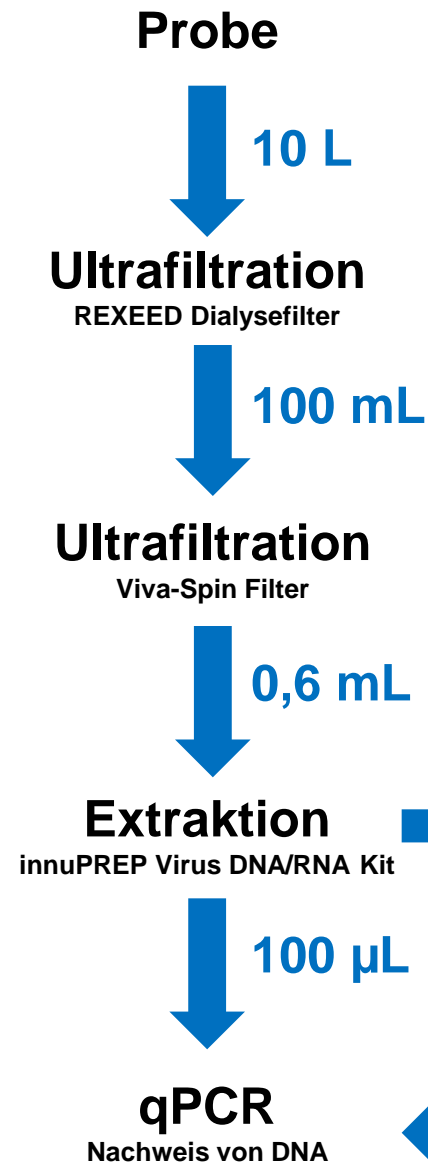
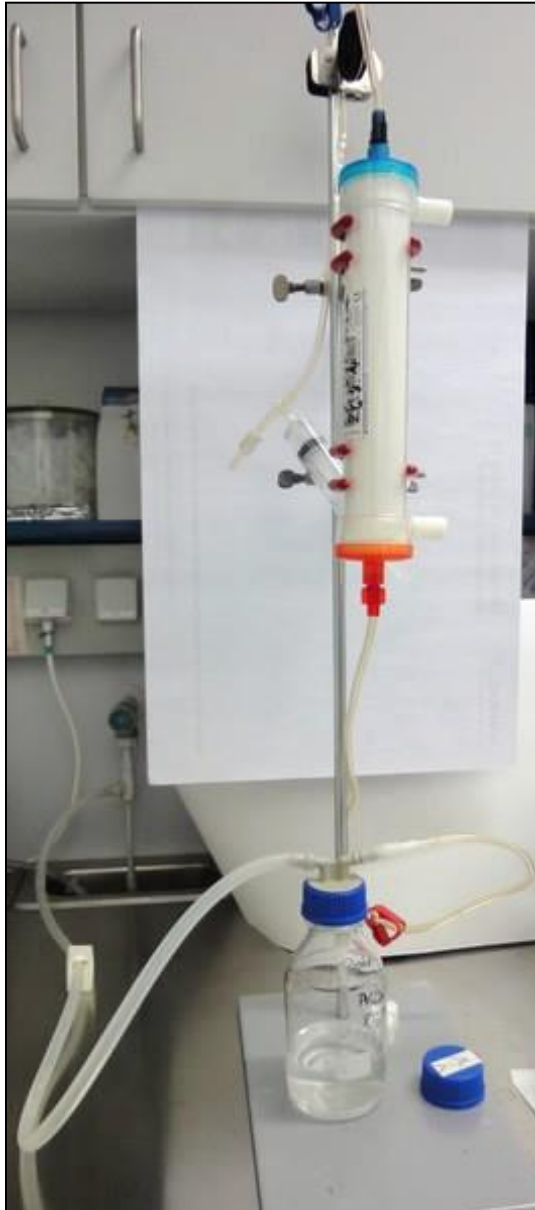
# MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN



**qPCR: Problem der Nachweisgrenze (Sensitivität)**



# MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN



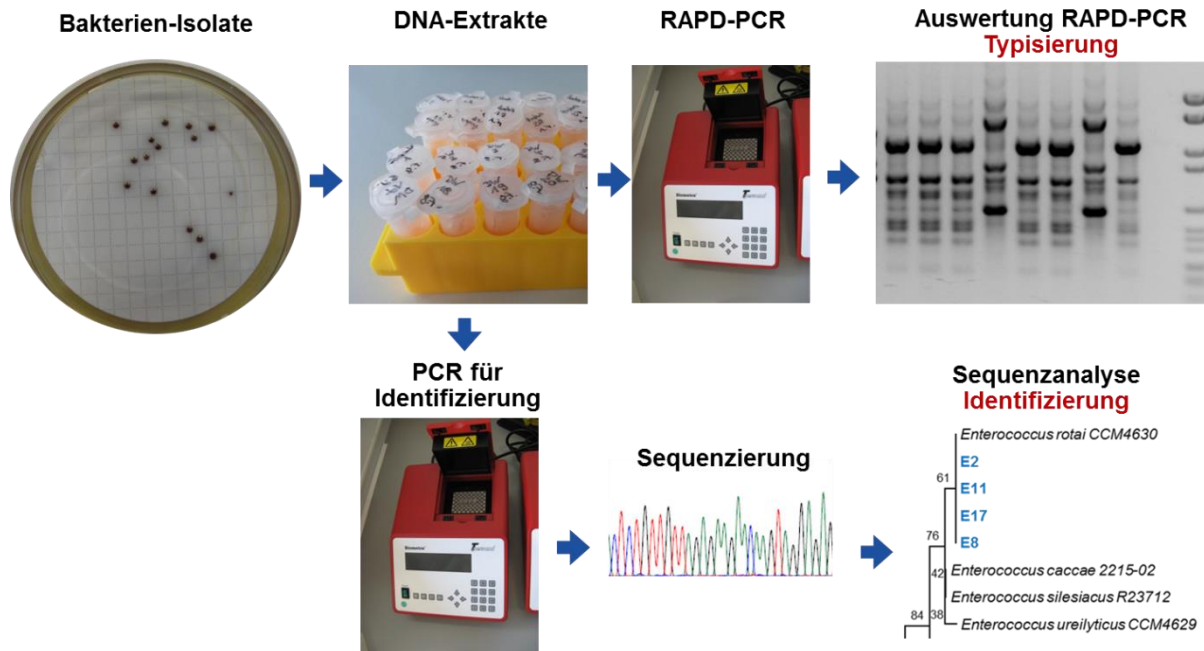
**qPCR: Problem der Nachweisgrenze**

**Reverse Transkription**  
Bei RNA-Viren: RNA → DNA

# MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN

## Molekularbiologische Methoden

- PCR-basierte Methoden
  - Quantifizierung (qPCR)
  - Identifizierung und Typisierung von Bakterien
  - (Bakterielle Gemeinschaftsanalyse)

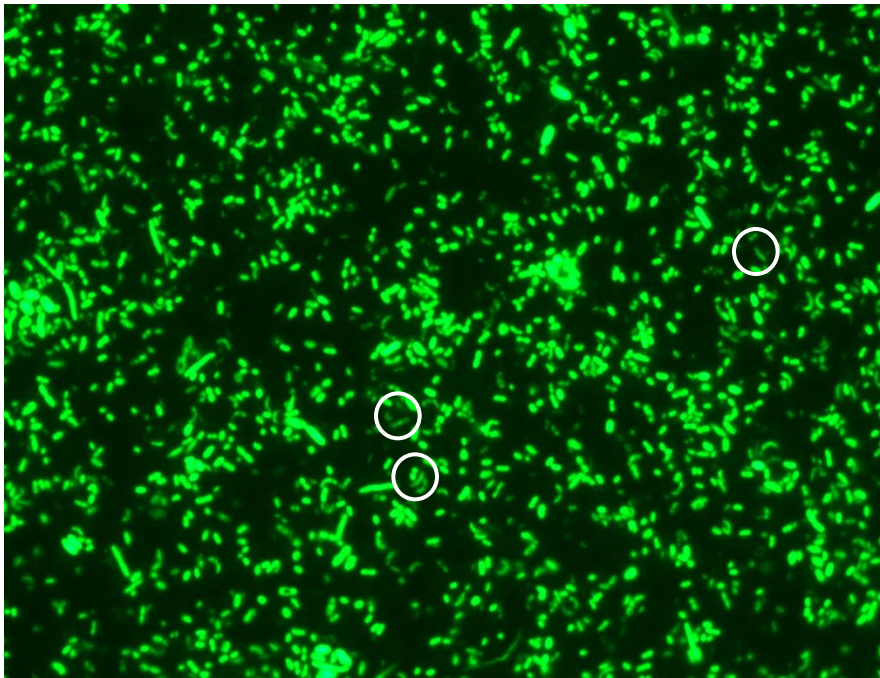


# MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN

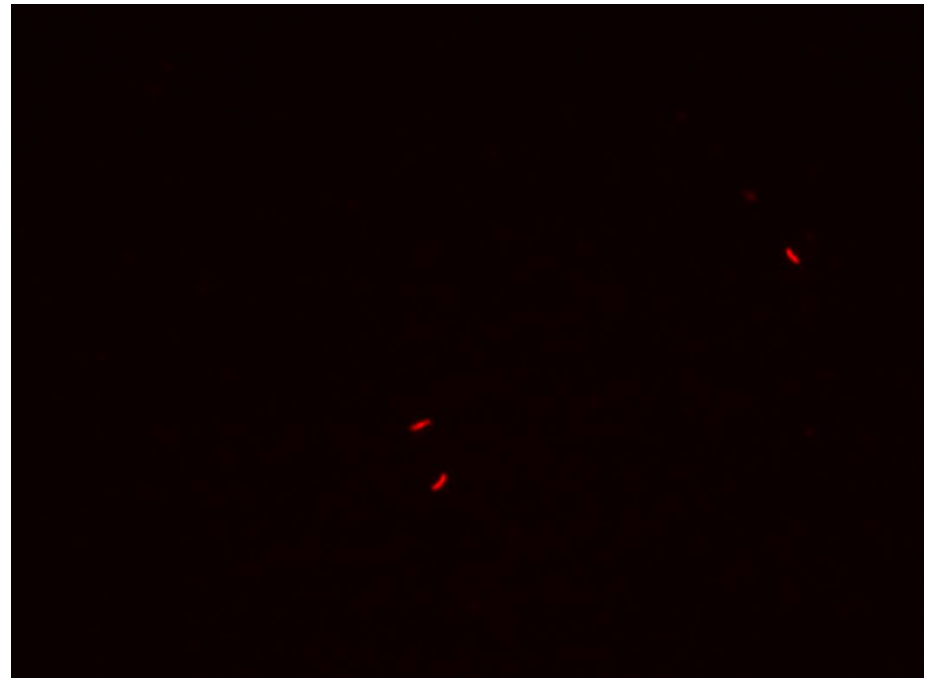
---

## Molekularbiologische Methoden

- FISH: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
  - Nachweis und Quantifizierung



Sonde EUB (*Eubacteria*)

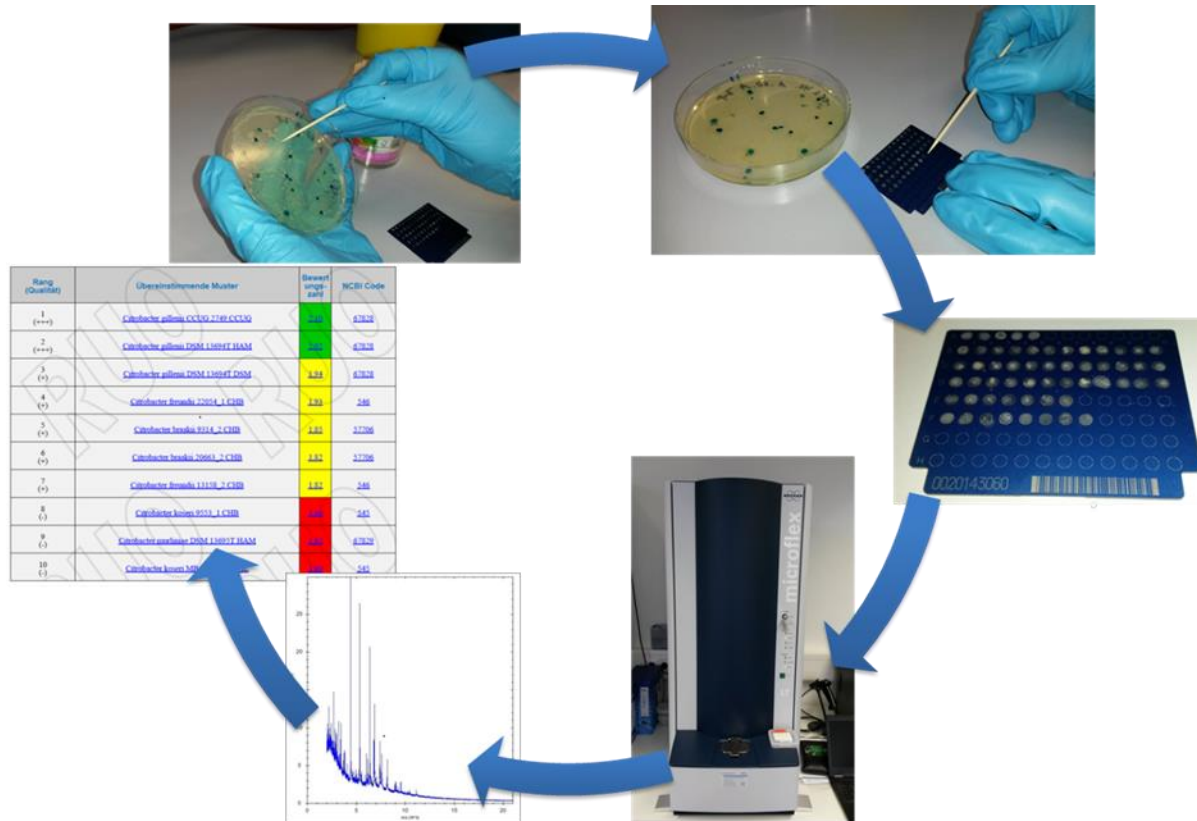


*Campylobacter*-spezifische Sonde

# MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN

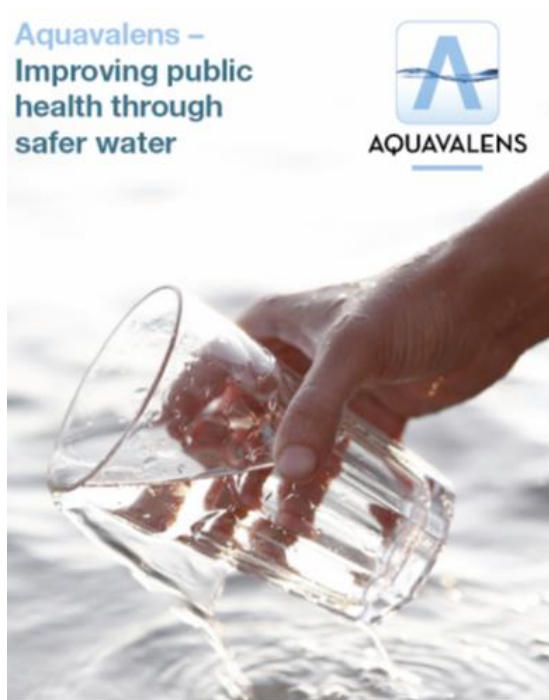
## Molekularbiologische Methoden

- Identifizierung über MALDI-TOF-MS



## AQUA VALENS

Protecting the health of Europeans by improving methods for the detection of pathogens in drinking water and water used in food preparation



- FP 7
- 8,9 Mio €
- 2013 – 2018
- 40 Partner
- 13 Länder

[www.aquavalens.org](http://www.aquavalens.org)

# FORSCHUNGSERGEBNISSE

---

## AQUA VALENS

- Verbesserung der Sicherheit des Europäischen Trinkwassers durch die Entwicklung **schneller Nachweismethoden** für Viren, Bakterien und Parasiten in Wasser
- Entwicklung von geeigneten Plattformen, die die aktuellsten Erkenntnisse in Bezug auf **molekulare Techniken** nutzen
- Das Projekt soll einen Beitrag zur **schnelleren und routinemäßig einsetzbaren Detektion von wasserbürtigen Pathogenen** leisten und die Bereitstellung hygienisch unbedenklichen Wassers für den menschlichen Gebrauch und zur Herstellung von Lebensmitteln verbessern.

# FORSCHUNGSERGEBNISSE

---

## AQUAVALENS Ziel des WP10

Implementierung und Erprobung der zuvor entwickelten Plattformen und Analysentechnologien für die  
**Untersuchung realer Wasserproben in 4 großen WVU (je 1 x Spanien, Großbritannien, Deutschland, Dänemark)**

Messprogramm 13 Monate, mind. monatlich,  
Rohwasser, Prozesswasser, aufbereitetes Wasser, Netzwasser

Molekulare Methoden: PCR, FISH

Kulturmethode: zur Verifikation, wo möglich





# FORSCHUNGSERGEBNISSE

## WP10 Messkampagnen (Primäranreicherung)





# FORSCHUNGSERGEBNISSE

## WP10 Molekulare Technologien und Verifikation



WP10 work: Aquavalens techniques  
Detection techniques and verification  
analyses



### PCR

- **Viruses**
  - Ceeram kits: **Norovirus GI, GII** and Hepatitis A virus
- **Bacteria**
  - GPS kits: ***E. coli*, *Campylobacter* spp, *C. jejuni*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp, *L. pneumophila***
- **Protozoa**
  - Ceeram kits: ***Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp**
  - GPS kits: ***G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp, *T. gondii***

### FISH and microscopy techniques

- **Total cell count (DAPI staining)**
- **Viable cell count (FISH)**
- ***E. coli* (FISH)**
- **thermophilic *Campylobacter* (FISH)**

### Verification analyses

- ***E. coli***
- **Coliform bacteria**
- ***Campylobacter* spp**
- ***C. perfringens***
- ***Somatic coliphages***
- ***Enterococci***
- ***P.aeruginosa***
- ***L.pneumophila***
- ***Giardia* spp**
- ***Cryptosporidium* spp**

■ Minimum parameters

WP10-Large Systems  
January 2018

CETAQUA  
WATER TECHNOLOGY CENTER

wrc

TZW  
Technologiekennetrum  
Wasser

Aigües de Barcelona

Nordvand

The James  
Hutton  
Institute

vermicon  
solutions for microbiology

microLAN  
On-line Biomonitoring Systems

GPS  
Genomic Profiling System

U  
B  
Universitat  
de Barcelona

Technical  
University of  
Denmark

DTU

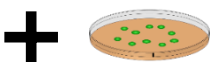
# FORSCHUNGSERGEBNISSE

## WP10 Primäranreicherung



VS

Direkte  
Probe



### Rexeed (Dead-End Ultrafiltration)

Wiederfindung von *E. coli*, coliformen Bakterien und *Campylobacter* (Ergebnisse deutsches WWU)

Sampling point	Parameter	July 2016			July 2017		
		Direct sample	Rexeed™ sample	Recovery	Direct sample	Rexeed™ sample	Recovery
		MPN/L	MPN/L	%	MPN/L	MPN/L	%
RW	<i>E. coli</i>	700	585	<b>83,5</b>	240	127	<b>52,9</b>
RW	coliform bact.	11200	7658	<b>68,4</b>	4110	2717	<b>66,1</b>
RW	<i>Campylobacter</i>	7	4	<b>57,1</b>	6	5,2	<b>86,6</b>
FS1	<i>E. coli</i>	50	14	<b>28,0</b>	74	90	<b>122</b>
FS1	coliform bact.	660	375	<b>56,8</b>	930	867	<b>93,2</b>
FS1	<i>Campylobacter</i>	<1	1,1	n.a.	2	2,9	<b>145</b>
AKF1	<i>E. coli</i>	<10	<b>&lt;0,03</b>	n.a.	<10	<b>0,03</b>	n.a.
AKF1	coliform bact.	<10	<b>0,4</b>	n.a.	<10	<b>1,4</b>	n.a.
AKF1	<i>Campylobacter</i>	<1	<b>&lt;0,04</b>	n.a.	n.t.	<b>&lt;0,06</b>	n.a.

# FORSCHUNGSERGEBNISSE

## WP10 Primäranreicherung: Rexeed Filtration

- gutes Werkzeug (Wiederfindung und Anreicherung) für Viren und Bakterien in Prozess- und aufbereitetem Wasser, nicht jedoch für stark belastete Rohwässer
- erst die Primäranreicherung ermöglicht die molekularen Methoden qPCR und FISH
- im Eluat der Primäranreicherung können auch die Kulturverfahren angewendet werden (Herabsetzung der Nachweisgrenze).
- keine Probleme mit Verstopfung bei Filtration von bis zu 1000 L Trinkwasser



# FORSCHUNGSERGEBNISSE

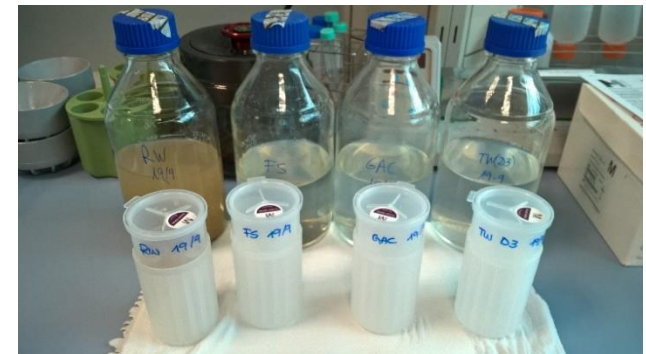
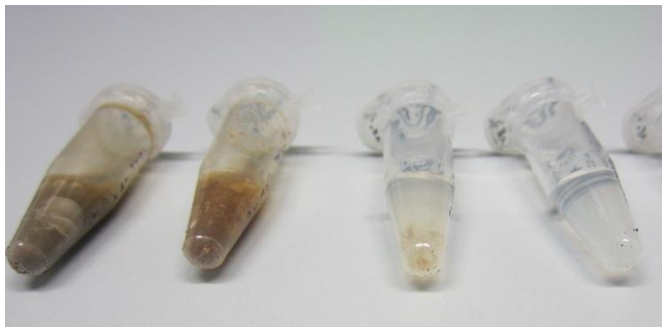
## WP10 Sekundäranreicherung und DNA-Extraktion

### Zweiter Konzentrierungsschritt

- Notwendig für PCR-Methoden
- Centricon®Plus- 70, VivaSpin 15R filters, PEG-precipitation

### Extraktion der DNA bzw. RNA

- Wiederfindung der bakteriellen DNA and viralen RNA bei der Extraktion (z. B. mit NucliSENS®) zufriedenstellend
- DNA-Konzentration im DNA-Extrakt stark schwankend



# FORSCHUNGSERGEBNISSE

## WP10 Vergleich PCR-Nachweis und Kultur

- Bakteriennachweis *E. coli*
- In 3 der 4 WVU nachweisbar
- Übereinstimmung mit Verifikation (Kultur) zufriedenstellend
- Falschpositive 8%, Falschnegative 6%

		Aquavalens method	
Number of comparisons	213	Positive	Negative
Verification method	Positive	33%	6%
	Negative	8%	52%

# FORSCHUNGSERGEBNISSE

---

## WP10 PCR-Detektion, Ergebnisse

### Viren

- Virus-Nachweise in den ersten Aufbereitungsschritten (spanisches und deutsches WVU → hochbelastetes Flusswasser als Rohwasser). Kein Nachweis in dänischem WVU (Grundwasser) und Großbritannien.
- Punktuelle Nachweise in niedrigen Konzentrationen im Leitungsnetz

### Bakterien

- *E.coli* and *Campylobacter spp.*: Nachweis in Rohwässern und Reduktion durch den Aufbereitungsprozess.
- Einige wenige niedrige Positivnachweise im Leitungsnetz, negativ mit Verifikationsmethoden (möglicherweise tote / inaktivierte Zellen)

### Protozoen

- In der Regel **keine Positivnachweise mit PCR**, da das Untersuchungsvolumen zu klein ist (Einsatz von 1-5 µL)

# FORSCHUNGSERGEBNISSE

---

## Zusammenfassung

- Anwendung der neu entwickelten molekularen Methoden über 13 Monate (Juli 2016-August 2017) in 4 großen Wasserversorgungen
- Rexeed-Filtration (bis 1000 L) sehr gute Primäranreicherung mit guter Wiederfindung für alle Mikroorganismen, auch bei Kulturmethode
- PCR-Methoden: zusätzlich Sekundäranreicherung und DNA-Extraktion erforderlich
- PCR-Nachweise von *E. coli*, Campylobacter und Noroviren und Abnahme durch die Aufbereitung messbar (nicht Parasiten)
- FISH-Nachweis und Abnahme in der Aufbereitung bei den Parametern Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl und thermophile Campylobacter
- Molekulare Methoden erfordern Voranreicherungsschritte und sind deshalb zumindest für “einfache” Parameter wie *E. coli* nicht schneller.

# IDENTIFIZIERUNG

---

## Warum Identifizierung in Trinkwasserproben?

### Grenzwertüberschreitung im Trinkwasser:

- Nachweis von *E. coli*, coliformen Bakterien, Enterokokken
- Maßnahmen: Abkochgebot, Desinfektion etc...
- Ursachenforschung

 **Identifizierung kann bei Ursachenforschung hilfreich sein!**

### Identifizierung sinnvoll (z. T. von GA gefordert):

bei coliformen Bakterien (Unterscheidung fäkal / nicht fäkal),  
bei Enterokokken (z. T. auch Nachweis von nicht fäkalen Spezies)



**API®**

- 



# IDENTIFIZIERUNG

---

**API®**

## **Vorteile**

- einfache Handhabung
- kostengünstig, keine hohen Anschaffungskosten

## **Nachteile**

- Identifizierung von Bakterienarten nur möglich, wenn die Stämme in der Datenbank enthalten sind
- v. a. medizinische Anwendungen

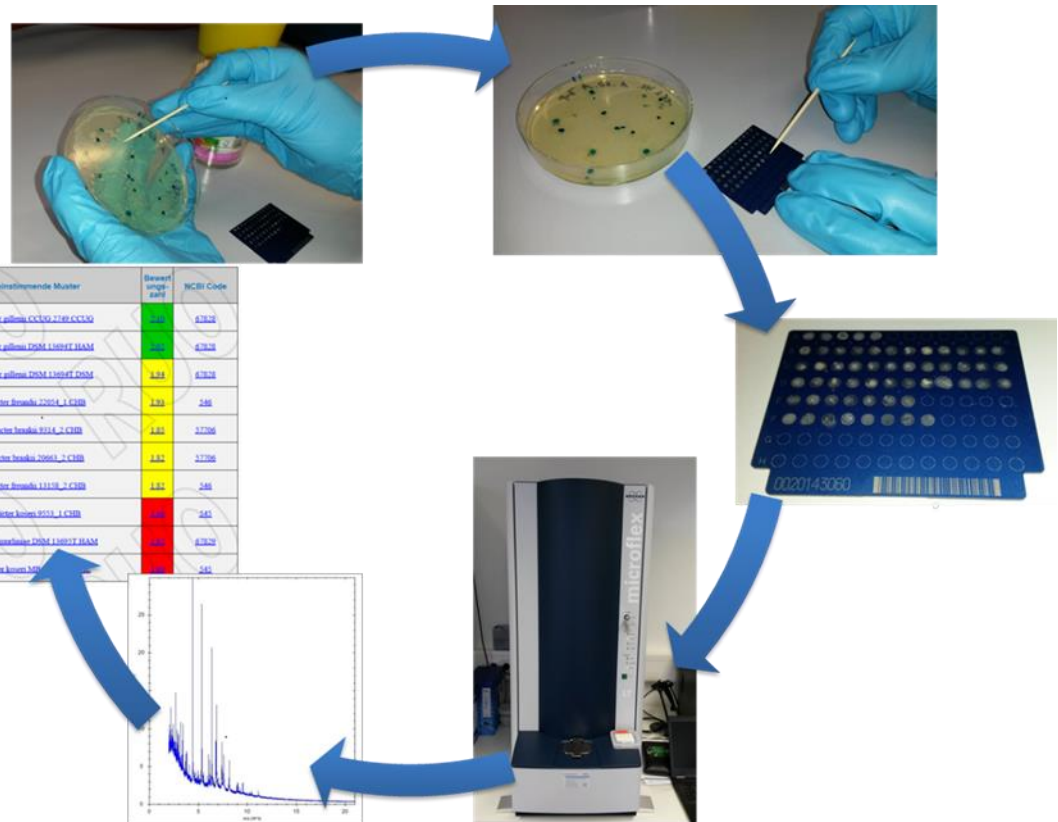
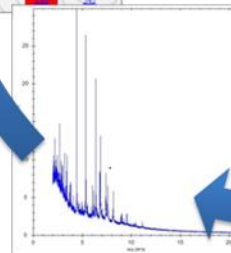
# IDENTIFIZIERUNG

## MALDI-TOF-MS

### „Molekularer Fingerabdruck“ von Bakterien

- Auswahl einer Kolonie
- Mischen mit Matrixsubstanz auf dem Probesteller
- Aufnahme eines Massenspektrums (Proteinmuster)
- Abgleich des „Fingerabdrucks“ mit einer Datenbank

Rang (Qualität)	Überstimmende Muster	Bewertungszahl	NCBI Code
1 (+++)	<i>Citrobacter jejuni</i> CCUG 2181 CCUG	1.00	6.38.2
2 (+++)	<i>Citrobacter jejuni</i> DSM 11019T HAM	0.99	6.38.2
3 (++)	<i>Citrobacter jejuni</i> DSM 11019T DSM	0.98	6.38.2
4 (+)	<i>Citrobacter jejuni</i> C2014_1 C200	0.93	2.66
5 (+)	<i>Citrobacter jejuni</i> 2114_2 C200	0.81	2.739
6 (+)	<i>Citrobacter jejuni</i> 20963_2 C200	0.82	2.739
7 (+)	<i>Citrobacter jejuni</i> 11138_2 C200	0.82	2.66
8 (-)	<i>Caplisteria jejuni</i> 0113_1 C200	0.68	2.61
9 (-)	<i>Citrobacter jejuni</i> DSM 11019T HAM	0.65	6.38.2
10 (-)	<i>Citrobacter jejuni</i> DSM 11019T HAM	0.65	2.61



# IDENTIFIZIERUNG

---

## MALDI-TOF-MS

### Vorteile

- schnell
- unkompliziert
- geringe Verbrauchskosten

### Nachteile

- bisher keine Klassifizierung von Subspezies
- nur so gut wie die Datenbank
- hohe Anschaffungskosten
- für Umweltproben noch keine umfangreiche Datenbank

**April 2019 Beginn eines  
DVGW-Forschungsvorhabens am TZW**

# IDENTIFIZIERUNG

## Sequenzanalyse

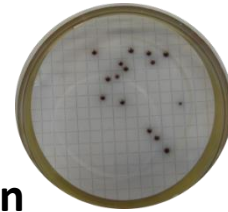
### Vorgehensweise

- Reinkultur als Kolonie
- Kolonie-PCR
- Sequenzierung
- Sequenzanalyse

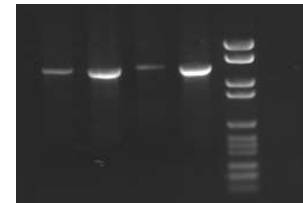
### Varianten

- funktionelle Gene, wenn 16S rRNA nicht ausreichend zur Differenzierung
- Sequenz Gesamtgenom (langwierig, teuer), z. B. bei EHEC-Ausbruch

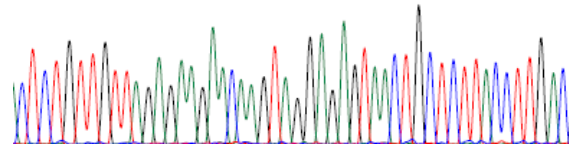
#### 1. Isolierung



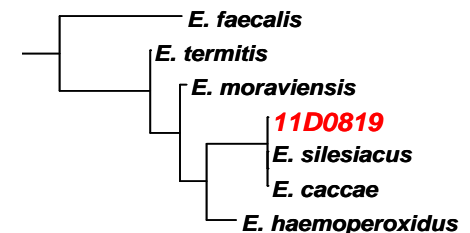
#### 2. PCR 16S rRNA Gen



#### 3. Sequenzierung



#### 4. Sequenzanalyse



# IDENTIFIZIERUNG

---

## Sequenzanalyse

### Vorteile

- immer eindeutige Sequenz
- Einordnung von neuen / unbekannten Isolaten möglich
- „Gold Standard“ der Identifizierung

### Nachteile

- hoher Arbeitsaufwand
- Sequenzanalyse erfordert Erfahrung
- Zeitdauer im Stundenbereich  
(Kultur, Kolonie-PCR, Sequenzierung, Sequenzanalyse)

# IDENTIFIZIERUNG

---

## Schlussfolgerungen

- Wahl der Methodik muss der Problemstellung angepasst sein
- im Trinkwasser z. B. zur Ursachenforschung sinnvoll
- wenn Faktor Zeit entscheidend: MALDI-TOF-MS
- wenn hohe Genauigkeit gefordert: Sequenzierung
- medizinische Fragestellungen: häufig MALDI-TOF-MS, da hierfür bereits umfassende Datenbankeinträge vorliegen
- Fachexpertise zur Befundbewertung erforderlich

# ZUSAMMENFASSUNG

---

## Molekularbiologische Methoden (quantitativ)

- zur allgemeinen Trinkwasserüberwachung (Indikatoren, quantitativ) derzeit noch nicht geeignet: zu unempfindlich, zu störänfällig, nicht standardisiert
- in Sondersituationen einsetzbar bzw. zum direkten Nachweis von Krankheitserregern (qPCR oder FISH)
- wenn kultureller Nachweis nicht möglich ist (z. B. bei einigen Viren)
- wenn kultureller Nachweis erschwert ist (z. B. durch störende Begleitflora bei *Pseudomonas aeruginosa*)
- wenn kultureller Nachweis sehr lange dauert (z. B. bei Legionellen oder bei *Campylobacter*)



# ZUSAMMENFASSUNG

---

## Molekularbiologische Methoden (qualitativ)

- Identifizierung, wenn bereits Kolonien vorliegen
- wenn Identifizierung zur Ursachenforschung gefordert
- mögliches Identifizierungsverfahren aus Kolonie:  
Sequenzanalyse nach PCR (sehr genau)
- mögliches Identifizierungsverfahren aus Kolonie:  
MALDI-TOF-MS (sehr schnell)

# VIELEN DANK

---

Für die Förderung im Rahmen des  
EU-Projektes Aquavalens und mehrerer DVGW-Projekte

Für Ihre Aufmerksamkeit!



**Dr. Beate Hambsch**

TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser

Karlsruher Straße 84

76139 Karlsruhe

T 0721 9678-220 / F 0721 9678-101

[beate.hambsch@tzw.de](mailto:beate.hambsch@tzw.de)