

Eine sichere Ressource für uns alle!



Jetzt
kaufen auf
shop.wvgw.de
Als Print oder
PDF-Download

Deutscher Verein des
Gas- und Wasserfaches e.V.



www.dvgw.de/zukunft-wasser

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

Abschlussbericht

**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

Abschlussbericht

März 2024

DVGW-Förderkennzeichen W 202214

Danksagung

Das TZW und das IWW bedanken sich beim Deutschen Verein des Gas- und Wasserfaches e.V. (DVGW) für die finanzielle Förderung des Projektes (DVGW-Förderkennzeichen W 202214).

Einzelne hier dargestellte Untersuchungsergebnisse wurden im Rahmen Beratungsprojekten und Forschungsvorhaben gewonnen:

EVA	DVGW	W 201830
AGRO	BMBF	02WRS1277C
MicSource	DVGW	W7/02/14
Antibiotikaresistenzen	DVGW	W4/04/09
Biomarker CoV2	BMBF	02WRS1557B
BioChlor	BMBF	WT1801
MALDI-ID	DVGW	W201823
Massenvermehrung	DVGW	W202127
EDIT	BMBF	033W010B
FlowDetect	DVGW	W201703
GroundCare	BMBF	033W037A
TRINKcontrol	DVGW	W202203
EE-HYG	BMBF	03ET1234

Besonders erwähnen möchten wir Gleb Gawrilshuk, der seine Bachelor Thesis im Rahmen von TRINKcontrol angefertigt hat. Erste exemplarische Ergebnisse aus seiner Bachelor Thesis sind direkt in diesen Bericht eingeflossen.

Für die Diskussion und Begleitung im Projekt MoVe möchten wir uns bei der Projektbegleitgruppe bedanken:

Dr. Regine Fischeder	Zweckverband Landeswasserversorgung
Dr. Karin Gerhardy	DVGW e.V., Bonn
Dr. Thomas Meier	Hamburger Wasserwerke GmbH
Dr. Julia Rinck	DVGW e.V., Bonn
Dr. Vera Schumacher	Berliner Wasserbetriebe

Vielen Dank für die Anregungen sowie die kritische Diskussion der Ergebnisse. Dieser Dank gilt auch den Projektsteuerungsgruppen W-TK-1-4 Wasseraufbereitungsverfahren und W-GTK-1-3 Wassergüte und allen Teilnehmern am Projekt-Workshop.

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 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	Analyseverfahren.....	2
2.1	Nukleinsäure-basierte Methoden	2
2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	2
2.1.2	Nested PCR.....	4
2.1.3	Real-time PCR.....	4
2.1.4	Digitale PCR	5
2.1.5	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	5
2.1.6	Multiplex PCR (mPCR)	6
2.1.7	Integrierte Zellkultur-PCR (ICC-PCR).....	6
2.1.8	Long Amplicon PCR (LA-PCR)	6
2.1.9	PCR nach Propidium- bzw. Ethidiummonoazid-Behandlung (PMA/EMA PCR) ..	7
2.1.10	Isothermale Amplifikation	9
2.1.11	DNA-Microarray	10
2.1.12	Nukleinsäurehybridisierung.....	10
2.1.13	Molekulare Typisierungsmethoden.....	12
2.2	Sequenzierung.....	14
2.2.1	Klassische Verfahren der Sequenzierung	14
2.2.2	Next Generation Sequencing (NGS)	15
2.3	Antikörperbasierte Methoden	18
2.3.1	Immunoassays.....	19
2.3.2	Immunologischer Biochip	23
2.4	Durchflusszytometrie	24
2.5	ATP-Biolumineszenz.....	25
2.6	Spektroskopische Methoden.....	26
2.6.1	Massenspektroskopie	26
2.6.2	Fluoreszenzspektroskopie	27
2.6.3	Infrarot-Spektroskopie (IR-Spektroskopie)	27
2.6.4	Raman-Spektroskopie.....	28
2.6.5	Laser-induzierte Breakdown Spektroskopie (LIBS)	29
2.6.6	Terahertz-Spektroskopie (THz-Spektroskopie)	29
2.7	Mikroskopische Methoden	30
2.7.1	Untersuchungen mit Licht- und Elektronenmikroskop	30
2.7.2	Direkte-Epifluoreszenz-Filtertechnik (DEFT)	30
2.7.3	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	30
2.7.4	Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	30
2.8	Biosensoren.....	31
2.8.1	Klassifizierung von Biosensoren	31
2.8.2	Sensoren auf der Grundlage von elektronischen Nasen / Zungen	33
2.8.3	Immobilisierungsverfahren	33
3	Anwendungsfelder und Potentiale der relevanten Analyseverfahren.....	35
3.1	Nachweis hygienisch-relevanter Parameter	35
3.1.1	Indikatorbakterien und pathogene Bakterien	35
3.1.2	Viren	44
3.1.3	Antibiotikaresistenzen	52

3.2	Durchflusszytometrie	61
3.2.1	Hintergründe zur Methodik.....	61
3.2.1	Anwendungsbeispiele	62
3.2.2	Was ist bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen.....	70
3.3	Mikrobiologische Online-Sensorik.....	73
3.4	Aufklärung von Eintragsquellen (Microbial Source Tracking)	79
3.5	Charakterisierung von Bakteriengemeinschaft mittels Next Generation Sequencing.....	88
3.5.1	Praxisbeispiele.....	88
3.6	Identifizierung hygienisch-relevanter Bakterien mittels Sequenzierung und MALDI-TOF-MS.....	92
3.7	Erfassung von mikrobiologischen Prozessen über PCR-basierte Verfahren	101
3.7.1	Bildung von Cyanotoxinen	101
3.7.2	Abbau organischer Schadstoffe	102
3.7.3	Nitrifizierende (Ammoniumoxidation) und denitrifizierende (Nitratreduktion) Bakterien	108
4	Schlussfolgerungen und Ausblick	113
5	Literatur	117
6	Abkürzungsverzeichnis	163
7	Abbildungsverzeichnis	165
8	Tabellenverzeichnis	169