

## **Neue Anwendungen in der Trinkwasserhygiene – die Durchflussszytometrie**

In den Leitsätzen für die zentrale Trinkwasserversorgung ist in Deutschland unter anderem ausgeführt:

„... die Güteanforderung an das abzugebende Trinkwasser haben ... sich im Allgemeinen an den Eigenschaften eines ... Grundwassers von einwandfreier Beschaffenheit ... zu orientieren, das dem natürlichen Wasserkreislauf entnommen und in keiner Weise beeinträchtigt wurde...

Trinkwasser muss frei sein von Krankheitserregern und darf keine gesundheitsschädlichen Eigenschaften haben.

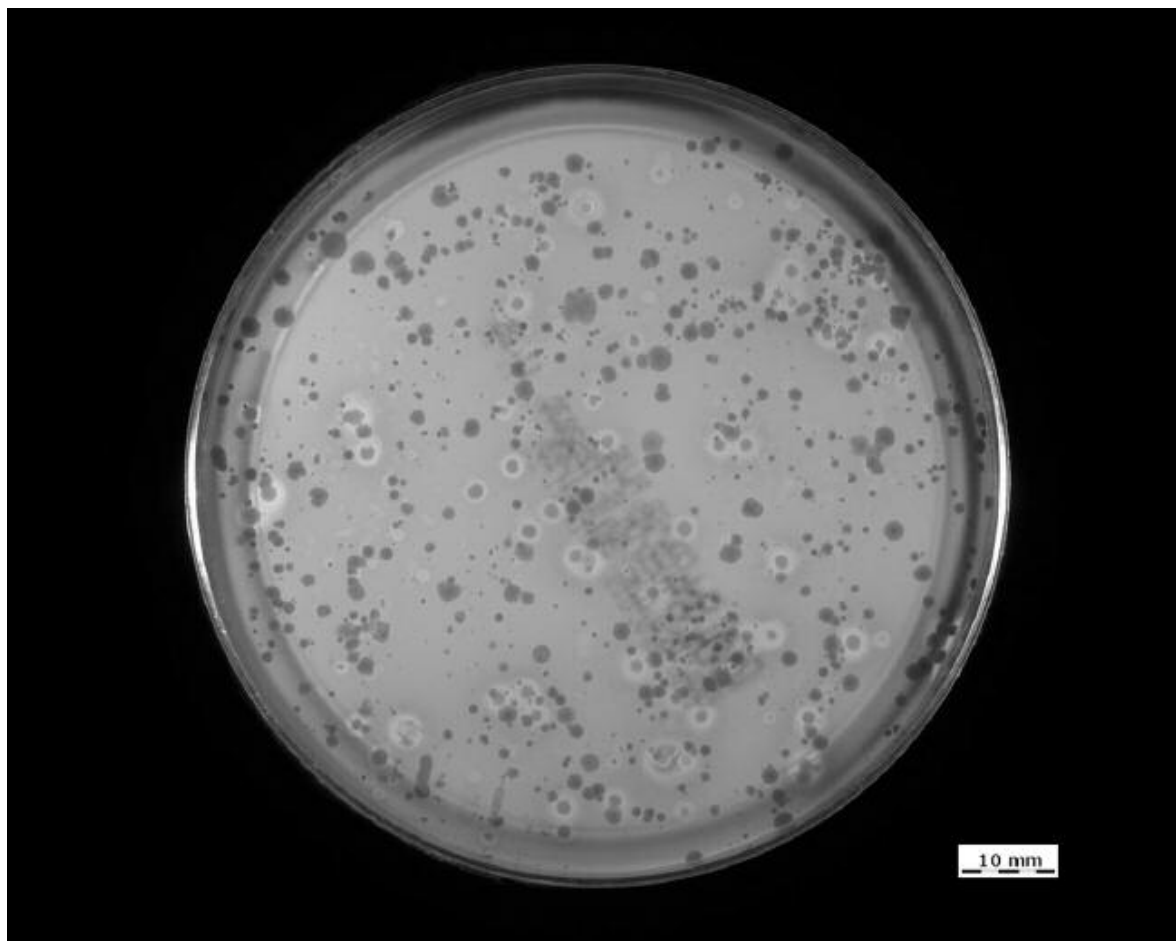
Trinkwasser soll appetitlich sein und zum Genuss anregen. Es soll farblos, klar, kühl, geruchlos und geschmacklich einwandfrei sein.“<sup>1</sup>

### *Hygienische Untersuchungen*

Der hygienische Zustand eines Wassers, also die An- oder Abwesenheit von Bakterien und insbesondere Krankheitserregern, wird dadurch überprüft, dass eine Wasserprobe einem festen oder flüssigen Wachstumsmedium zugegeben wird, auf oder in dem sich entsprechende Bakterien oder, allgemeiner, Mikroorganismen vermehren können und so sichtbar werden. Um den Untersuchungsaufwand zu verringern, werden zunächst nicht alle möglichen Krankheitserreger gesucht, sondern es wird die Anwesenheit von Mikroorganismen unter festgelegten Bedingungen geprüft. Diese Bedingungen lassen z.B. bestimmte Bakterienarten oder -gruppen sichtbar werden, wie die coliformen Bakterien (*Escherichia coli*) oder die Enterokokken, welche üblicherweise nicht in unbeeinträchtigten Grund- oder Quellwässern zu finden sind. Ihre Anwesenheit gibt Anlass zur Sorge, dass sie Zutritt zum Wasser erhielten oder eine Desinfektion nicht ausreichend war. Weiterhin werden bei der Trinkwasseruntersuchung Wachstumsmedien verwendet, auf denen viele verschiedenartige Bakterien wachsen können (so genannte Bestimmung der Gesamtkeimzahl bei 22 bzw. 36°C). Werden die hier geltenden Grenzwerte überschritten, besteht Anlass zur Sorge um den allgemeinen hygienischen Zustand des Wasserleiters mit der Aufgabe, die Ursache der hohen Bakterienzahl zu ermitteln und ihre Anwesenheit zu beenden.

---

1 Deutsche Norm: DIN 2000, mit den „Leitsätzen für die zentrale Trinkwasserversorgung“



**Abb. 10:** Punktförmige Kolonien verschiedenartiger Bakterien, gewachsen auf einem festen Wachstumsmedium; Bildquelle: wikimedia, HanseN

Dieses methodische Vorgehen ist hervorgegangen aus den Entdeckungen von Louis Pasteur bzw. Robert Koch zur Erkennung und Bekämpfung von Erkrankungen. Hier entstand bei verschiedenen Erkrankungen die Aufgabe, zur Diagnose die Krankheitserreger zu vermehren und sicher zu bestimmen. Robert Koch entwickelte hierzu die Methode, flüssige Wachstumsmedien durch Zugabe eines Mittels wie Pektin oder Agar zu verfestigen. Wird auf solch ein festes Medium eine Lösung mit Bakterien gegeben, vermehren sich diese und sind als kleinere oder größere Punkte sichtbar (Abb. 10). Diese auch als Plattierung bezeichnete Methode wird in der Bakteriologie oder Medizin seitdem standardmäßig verwendet und dient bei der Untersuchung eines Trinkwassers dazu, in diesem befindliche Bakterien nachzuweisen. Es wird seit etwa 100 Jahren eingesetzt, blieb in seinem Grundsatz unverändert, jedoch durch neue Erkenntnisse leicht modifiziert. Nachteile dieses Verfahrens sind, dass die Wachstumszeit mindestens 48 h beträgt und dass die Wahl des Wachstumsmediums bestimmt, welche Mikroorganismen sich jeweils vermeh-

ren können und damit nachgewiesen werden. Das Ergebnis einer Prüfung liegt somit erst nach frühestens zwei Tagen vor und viele der in einem Wasser befindlichen Mikroorganismen bleiben unentdeckt.

### *Durchflusszytometrie*

In der Medizin bestand zur Diagnose bestimmter Erkrankungen die Notwendigkeit, die Anzahl und Verteilung der verschiedenen Blutzellen im Blut sicher zu bestimmen. Erfolgte dies zunächst mithilfe des Mikroskops, so konnte diese Aufgabe durch neue technische Entwicklungen automatisiert werden. Hierbei wird zunächst das Blut verdünnt und in raschem Strom durch ein sehr dünnes Glasröhrchen (Kapillare) geleitet, wo sich die einzelnen Zellen quasi einzeln hintereinander anordnen. Ein Detektor erlaubt die Bestimmung der Größe und Zahl dieser Zellen und damit ihre Differenzierung. Diese Technik wird als Durchflusszytometrie bezeichnet (von griechisch Zytos = die Zelle, metrein = messen).

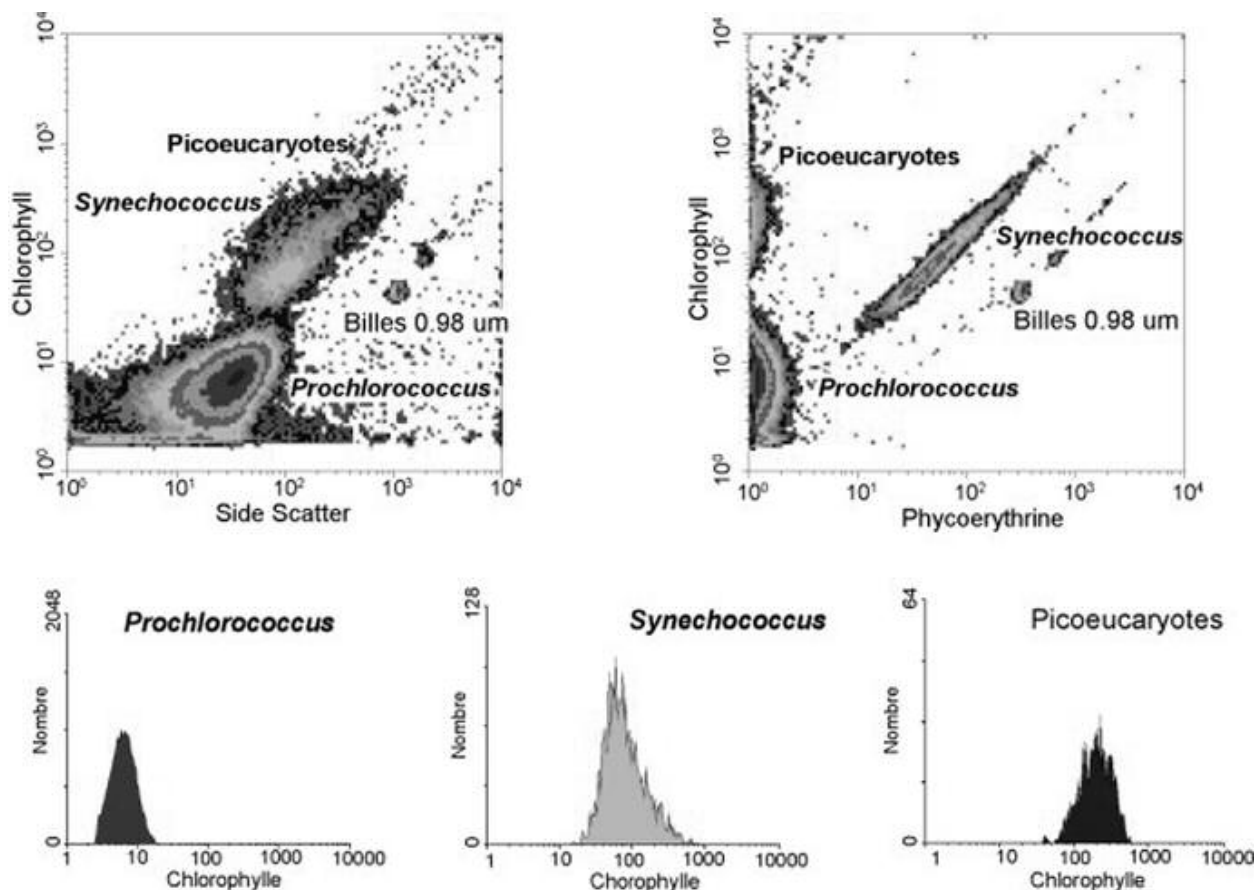
Weiterentwicklungen erlauben es nun, nicht nur die größeren Blutzellen (etwa 0,007 - 0,02 mm) zu vermessen, sondern auch die mit etwa 0,001 mm deutlich kleineren Bakterienzellen. Diese lassen sich z. B. mit Antikörpern markieren. Diese haften an bestimmten Bakterien, werden durch weitere Verfahren markiert und beim Fluss durch die Kapillare erkannt. Da Antikörper spezifisch sind, lassen sich so z. B. durch unterschiedliche Farbstoffe unterschiedliche Bakteriengruppen oder -arten mit einer Messung feststellen. Abb. 11 zeigt als Anwendungsbeispiel, ohne näher ins Detail zu gehen, drei Algenpopulationen, markiert mit verschieden farbigen Farbstoffen.

### *Anwendung in der Trinkwasserhygiene*

Wie erwähnt, benötigen die bisherigen Standardmethoden der Plattierung die Herstellung von verschiedenen Arten von Wachstumsmedien zur Anzucht der Bakterien bei einer Anzuchtdauer von mindestens 48 h. Im Anschluss ist die Zählung und Differenzierung bzw. noch eine weitere Absicherung der Ergebnisse nötig. Der Wunsch nach einer Abkürzung und Vereinfachung dieser Standardverfahren führte beim Forschungsinstitut der EAWAG<sup>2</sup> in Dübendorf, Schweiz, zur Entwicklung und Anpassung der Durchflusszytometrie an die Bedürfnisse der Trinkwasseruntersuchung.

---

<sup>2</sup> Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz



**Abb. 11:** Ergebnis einer Durchflusszytometrie einer Meerwasserprobe mit sehr kleinem Plankton (Picoplankton: *Prochlorococcus*, *Synechococcus* und *Picoeukaryotes*); Bild aus: *Vaulot, wikimedia*

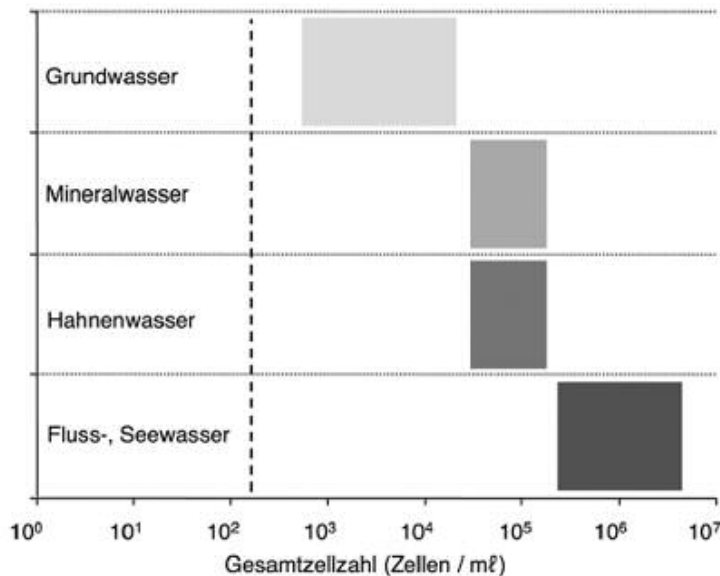
Als man diese Methode auf Trinkwasser anwandte, stellte sich heraus, dass ein Wasser, welches mit der oben beschriebenen, herkömmlichen Plattierungsmethode als frei von Mikroorganismen charakterisiert wurde, eine Unzahl lebender Mikroorganismen enthält. So lassen sich in einem hygienisch einwandfreien Wasser je ml bis zu 50 000 - 100 000 lebensfähige Zellen nachweisen. Diese Organismen wachsen sehr langsam und benötigen zur Anzucht so spezielle Bedingungen, dass diese nur bei einzelnen Arten bisher bekannt sind. Eine Anzucht auf den üblichen festen Nährmedien ist so nicht möglich. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von den nicht-kultivierbaren Mikroorganismen, was jedoch nur ausdrückt, dass die genauen Bedingungen zurzeit nicht bekannt sind. Heute vermutet man anhand von Untersuchungen der in einer Probe gefundenen DNA, dass etwa 99 % der vorkommenden Bakterien zu dieser Gruppe zu zählen sind.

Diese Mikroorganismen sind zunächst nicht als Krankheitserreger bekannt, so dass ihre Anwesenheit im Trinkwasser keinen Grund zur Beunruhigung darstellt. Die Anwesenheit dieser Mikroorganismen z. B. auf unserer Haut oder in

so genannten Biofilmen in Wasserleitungen wird sogar als günstig angesehen, da sie regulierend und der Ansiedlung von Krankheitserregern entgegen wirken.

Die Methode der Durchflusszytometrie zur Zählung der Totalzellzahl in einem Wasser fand inzwischen Aufnahme in das Schweizerische Lebensmittelbuch. Anwendungen erfolgen z. B. zurzeit bei den Züricher und Basler Trinkwasserbetrieben. Zunächst erfolgt die Erprobung dieser neuen Methode zusätzlich zu den gesetzlich vorgeschriebenen Standardverfahren.

Eine Übersicht der bei der EAWAG mit dieser Methode in verschiedenen Wässern gefundenen Zellzahlen zeigt Abb. 12.



**Abb. 12:** Gesamtzellzahlen in verschiedenen Wässern, verändert nach: Egli (2010): Neue Methoden für die Wasseranalytik, GWA 4/2010

### Was leistet die Durchflusszytometrie?

Mit dieser Methode lassen sich nach Anfärbung innerhalb von etwa 15 min Anzahl und, je nach Nachweis, auch Art der in einem Wasser befindlichen Mikroorganismen bestimmen. Die Methode liefert also sehr viel schneller Ergebnisse als die Standardverfahren. Ebenso lässt sich nachweisen, ob die Zellen intakt sind (ein Hinweis auf die Vermehrungsfähigkeit) oder ob es sich um abgestorbene Zellen handelt. Deutliche Unterschiede treten, wie ausgeführt, bei der Totalzellzahl auf im Vergleich zur Standardmethode der Plattierung, während die Untersuchung der Anwesenheit von wachstumsfähigen

coliformen Bakterien, E. coli bzw. Enterokokken mit beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse liefert.

### *Welche Nachteile finden sich?*

Ein Nachteil ist der hohe Preis der Geräte, die für die Durchflusszytometrie benötigt werden. Zudem ist die eindeutige Differenzierung und Bewertung der jeweiligen Mikroorganismen bei z. T. sehr hohen Zahlen zurzeit noch in der Erprobungsphase. Prozessorientierte Schritte, wie die Keimreduktion durch Ozonung und Chlorung, lassen sich sicher mit der Durchflusszytometrie verfolgen. Die Wirkung einer sachgerechten UV-Desinfektion lässt sich jedoch nicht prüfen, da die betroffenen Zellen zwar geschädigt sind und sich nicht mehr vermehren, jedoch durchaus noch für einige Zeit intakt und lebendig bleiben, so dass sich der gemessene Wert zunächst nicht ändert. Hier muss eine weitere Massnahme erfolgen, wie die Messung eines zusätzlichen Zellparameters. Ähnliches kann auch bei Desinfektion mit Chlordioxid auftreten, wie eine Untersuchung bei den Basler Trinkwasserbetrieben ergab.

Zusammenfassend lässt sich zurzeit sagen, dass die neue Methode der Durchflusszytometrie in der Lage ist, rasch hygienische Veränderungen im Bereich einer Trinkwasseraufbereitungsanlage aufzuzeigen (Prozesskontrolle), und dass sie in Verbindung mit einer zusätzlichen Messung die mikrobielle Aktivität eines Wassers gut abbildet.

Eine Absicherung mittels des herkömmlichen Plattierungsverfahrens scheint aber noch so lange angeraten, bis die erwähnten Unsicherheiten ganz ausgeräumt sind.

*Manfred Schleyer*