

Analysemethoden

Durchflusszytometrie in der Trinkwasseranalytik

FREDERIK HAMMES¹, MATTHIAS STEINBERG²

¹EIDGENÖSSISCHE ANSTALT FÜR WASSERVERSORGUNG, ABWASSERREINIGUNG UND GEWÄSSERSCHUTZ (EAWAG), DÜBENDORF, SCHWEIZ

²PARTEC GMBH, MÜNSTER

A century ago, Robert Koch described routine cultivation techniques to determine the microbiological status of drinking water by counting microbial colonies on agar plates. Since then these methods are used worldwide in drinking water quality control. Plating methods require time and effort and today we know that the total bacterial cell count often is significantly underestimated. Flow cytometry offers a fast, easy and accurate alternative with improved informative value on total cell counts and cell viability.

DOI: 10.1007/s12268-012-0182-z

© Springer-Verlag 2012

Bakterien im Trinkwasser

■ Bakterien sind natürliche Bewohner der meisten aquatischen Ökosysteme. Als ein solches mikrobielles Ökosystem kann auch unser Trinkwasser angesehen werden. Die Anzahl der im Wasser vorhandenen Bakterienzellen ist eine interessante und wichtige Messgröße in der Trinkwasseraufbereitung. Sie kann Aufschluss über die korrekte Funktionsweise einzelner Aufbereitungsstufen innerhalb eines Wasserwerks geben und potenzielle Gefahren für den Konsumenten frühzeitig erkennen lassen. Die heutige Routineanalytik in der Trinkwassermikrobiologie basiert weltweit unter anderem auf der Zahl der aeroben mesophilen Keime (AMK). Diese Methode wurde schon vor 120 Jahren von dem bekann-

ten Bakteriologen Robert Koch und seinen Kollegen begründet und beruht auf der Plattierung der Wasserprobe auf einem Nährboden und der anschließenden makroskopischen Zählung der sich entwickelnden Bakterienkolonien. Sie wird auch heute noch als genereller Parameter für die mikrobielle Belastung eines Wassers angesehen. Mittlerweile weiß man allerdings, dass der AMK-Wert alles andere als ein idealer Messparameter für die Bewertung des mikrobiellen Zustands eines Wassers ist. Das größte Problem liegt in der Tatsache, dass typischerweise nur weniger als ein Prozent der Bakterien im Wasser durch die AMK-Methode erfasst werden können. Weitere große Nachteile liegen in der Arbeitsintensität der Metho-

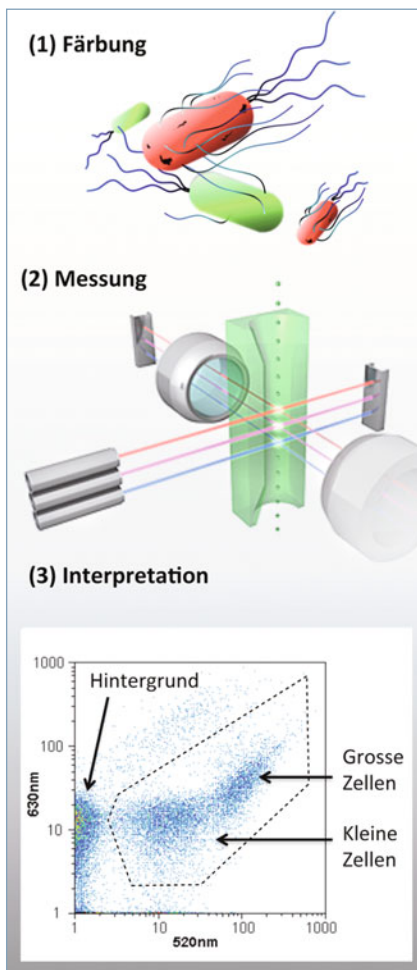
de und dem langen Zeitraum, der benötigt wird, bis das Ergebnis vorliegt. Jede Probe muss zunächst einzeln plattiert werden. Die Bakterienzellen benötigen drei bis zehn Tage, um zu sichtbaren Kolonien heranzuwachsen. Erst dann kann die Anzahl der Kolonien bestimmt werden, sodass das Ergebnis der Untersuchung deutlich vom Zeitpunkt der Probenentnahme entkoppelt ist. In der Trinkwasseranalytik fehlen immer noch Techniken, die eine schnelle, quantitative und exakte Bestimmung der bakteriellen Gesamtzellzahl ermöglichen.

Was kann die Durchflusszytometrie leisten?

Durchflusszytometrie ist eine Technik, in der einzelne, in wässriger Lösung suspendierte Partikel oder Zellen in einer Flusskammer an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Die Wechselwirkungen zwischen dem Laserstrahl und dem Partikel erzeugen gestreutes Licht und können Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Partikel beladen sind, anregen. Diese Signale werden über verschiedene Photodetektoren für die einzelnen Zellen aufgenommen. Als Ergebnis liefert eine durchflusszytometrische Messung quantitative Informationen über Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellen, die über diese Charakterisierung natürlich auch gezählt werden können (**Abb. 1**). Durchflusszytometrie wird in großem Umfang in der klinischen Diagnostik, z. B. bei der Charakterisierung der Zellen des Immunsystems, eingesetzt. In den vergangenen 20 Jahren hat sich die Methode jedoch auch zu einem wichtigen Werkzeug in der aquatischen Mikrobiologie entwickelt. Diese Tendenz ist insbesondere der technischen Entwicklung geschuldet, die die vormals großen und komplexen Geräte hin zu kompakten und einfach zu bedienenden Laborgeräten weiter entwickelt hat. Hierdurch wird es auch möglich, Durchflusszytometrie für Analysen im Bereich der aquatischen Mikrobiologie einzusetzen, die einen hohen Probendurchsatz erfordern.

Tab. 1: Fluoreszenzfarbstoffe und deren Einsatz in der Durchflusszytometrie.

Analyseziel	Messparameter	Fluoreszenzfarbstoffe
Detektion	Gesamtzellzahl	SYBR Green I, SYBR Green II, DAPI
Identifizierung	spezifische Merkmale der Bakterien	Antikörper markiert mit z. B. FITC
Zellvitalität	Membranintegrität	Propidiumjodid, SYTOX Green
	Membranpotenzial	DiBAC ₄ (3), Rhodamine 123
	Membranfunktion (Pumpe)	Ethidiumbromid
	Enzymaktivität	cFDA, FDA, Calcein-AM
	Respiration	CTC



▲ **Abb. 1:** Funktionsprinzip des Durchflusszytometers: (1) Markierung der Mikroorganismen mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (siehe auch Tab. 1); (2) Messung der Fluoreszenzsignale nach Anregung durch Laserlicht; (3) Darstellung des Messergebnisses anhand der Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Wellenlängen des Lichtes (jeder Punkt entspricht einem gemessenen Bakterium).

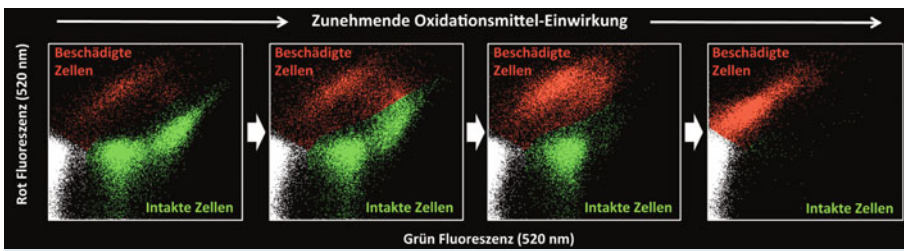
Fluoreszenzfärbungen bei Bakterien

Bei der Trinkwasseranalyse werden spezifische Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, um zwischen den kleinen Bakterienzellen (zumeist kleiner als ein Mikrometer) und einer Vielzahl nicht-bakterieller organischer wie auch anorganischer Partikel zu unterscheiden. Fluoreszenzmarkierungen können jedoch nicht nur die Bakterien vom Hintergrund abgrenzen. Wenn sie richtig eingesetzt werden, können Fluoreszenzmarkierungen eine Reihe weiterer wichtiger Informationen über die Wasserprobe geben (**Tab. 1**). Die Wahl des zu verwendenden Fluoreszenzfarbstoffes hängt in erster Linie vom Zweck der Untersuchung,

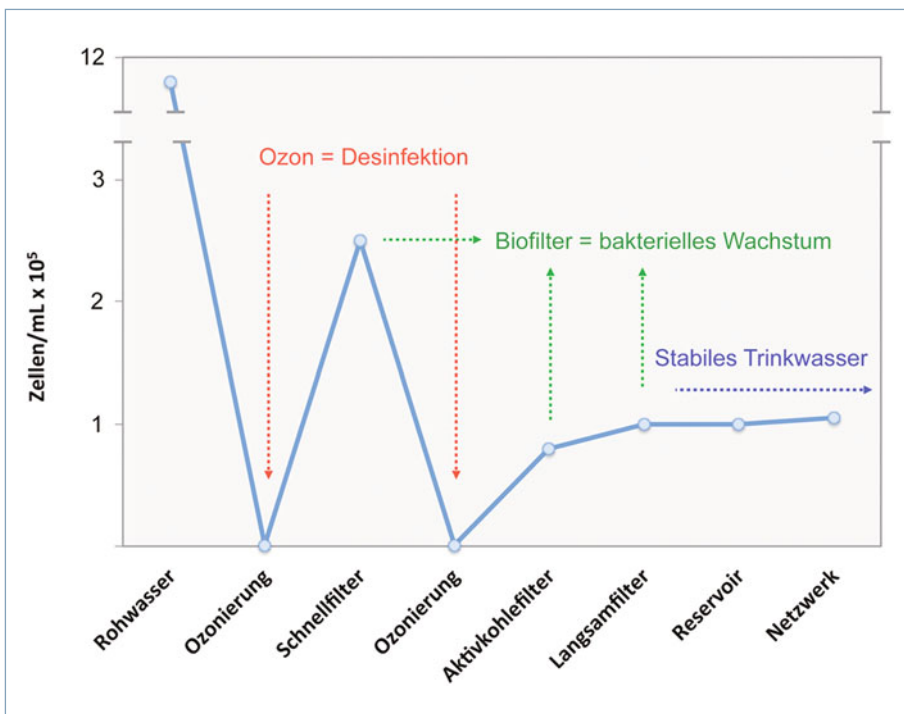
aber auch von den technischen Gegebenheiten des Analysegeräts ab (z. B. die Ausstattung mit optischen Filtern oder die Bestückung der Laser). In der Trinkwasseranalytik kann Fluoreszenzmarkierung in drei Kategorien unterteilt werden: (1) die Detektion der Mikroorganismen, (2) ihre Identifizierung und (3) die Bestimmung der Zellvitalität. Die direkte Detektion wird normalerweise durch eine Fluoreszenzmarkierung mit DNA-bindenden Farbstoffen wie DAPI, Hoechst, SYBR Green und SYTO9 durchgeführt. Als Messergebnis wird die Gesamtzellzahl unabhängig von der Art und der Vitalität der Bakterien dargestellt (**Abb. 1**, Punkt 3). Eine geeignete Fluoreszenzfärbung kann jedoch auch eingesetzt werden, um bestimmte bakterielle Gruppen oder Stämme zu identifizieren. Phylogenetische Gruppen können durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) aufgetrennt werden, und eine Unterscheidung verschiedener Bakterienarten wird über die Markierung der Bakterien mit fluoreszierenden Antikörpern erreicht. Neben der Erfassung der Gesamtzellzahl und der spezifischen Bestimmung ist die Messung der Vitalität der Mikroorganismen ein wichtiger Parameter bei der Trinkwasseraufbereitung (**Abb. 2**). Weltweit werden in Wasserwerken verschiedene Desinfektionsmethoden (z. B. Ozonbehandlung, Chlorierung oder UV-Bestrahlung) zur Behandlung des Trinkwassers während dessen Aufbereitung eingesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung zur Erfassung der bakteriellen Vitalität basiert auf der Messung verschiedener zellulärer Eigenschaften wie der Membranintegrität, der Stoffwechselaktivität, des Membranpotenzials oder der Membranfunktion. Aus einer Kombination verschiedener Farbstoffe ist es möglich, Informationen über den Grad und den Ort einer Zellschädigung zu erhalten.

Der Einsatz der Durchflusszytometrie in der Trinkwasseranalytik

Der Durchflusszytometrie bieten sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten innerhalb der Trinkwasserindustrie. Zunächst eignet sich die Methode hervorragend zur Überwachung des Prozesses der Wasseraufbereitung im Wasserwerk und an verschiedenen Punkten innerhalb des Verteilernetzwerks (**Abb. 3**). Ein gutes Beispiel ist die Überwachung eines Desinfektions-



▲ **Abb. 2:** Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Bakterien. Die grünen Zellpopulationen entsprechen lebenden, intakten Zellen, die roten Zellpunkte stehen für geschädigte oder abgestorbene Zellen. Mit zunehmender Wirkungszeit des Desinfektionsmittels sterben die Mikroorganismen ab.



▲ **Abb. 3:** Die Entwicklung der Gesamtzahl von Mikroorganismen im Verlauf der Trinkwasseraufbereitung (vom Rohwasser bis ins Verteilernetzwerk). Am Ende soll ein mikrobiologisch stabiles Trinkwasser stehen.

chrittes (z. B. Chlorierung), bei dem ein Problem sofort als Anstieg der Zellzahl vitaler Mikroorganismen im Wasser registriert würde (**Abb. 2**). In der Schweiz haben große Was-

serversorgungsunternehmen, wie die Wasserversorgung Zürich, schon proaktiv Maßnahmen eingeleitet, um durchflusszytometrische Messungen in die Routineüberwa-

chung ihrer Anlagen zu integrieren. Des Weiteren kann die Durchflusszytometrie im Rahmen der angewandten Forschung und Prozessoptimierung eingesetzt werden, um z. B. die optimale Dosierung von Desinfektionsmitteln zu bestimmen oder den Einfluss der Durchflussrate bei der biologischen Filtration zu untersuchen. Letztendlich stellt die Durchflusszytometrie natürlich auch innerhalb der Grundlagenforschung eine wertvolle Methode dar. So kann sie eingesetzt werden, um mehr über die Wirkungsmechanismen von Desinfektionsprozessen (Bestimmung des Ortes, der Art und des Grades einer zellulären Schädigung) zu erfahren oder um bakterielles Wachstum unter nährstoffarmen Bedingungen zu untersuchen. ■

Korrespondenzadressen:



Dr. Frederik Hammes
Eidgenössische Anstalt für
Wasserversorgung, Abwasser-
reinigung und Gewässerschutz
(Eawag)
Umweltmikrobiologie
Überlandstraße 133
CH-8600 Dübendorf
Tel.: +41-(0)58-765-5372
Fax: +41-(0)58-765-5547
frederik.hammes@eawag.ch



Matthias Steinberg
PARTEC GmbH
Otto-Hahn-Straße 32
D-48161 Münster
Tel.: 02534-8008-0
Fax: 02534-8008-90
m.steinberg@partec.com
www.partec.com