

Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben





„Don't panic!“
Douglas Adams



Vorwort

Neue Methoden stellen meist eine Herausforderung für den Anwender dar. Dies gilt für die technische Durchführung, als auch für die Interpretation der Resultate. Dieser Leitfaden wurde erstellt, um Erstanwendern den Einstieg in die durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben zu erleichtern. Doch auch erfahrene Anwender können hiermit ihr Wissen vertiefen. Basierend auf dem aktuellen Kenntnisstand werden die wichtigsten Punkte und jene, die besonderer Beachtung bedürfen anhand praxisnaher Beispiele verständlich erläutert. Dieses Dokument dient ausserdem der Erweiterung und Erläuterung der *Methodenschrift 333, „Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süsswasser mittels Durchflusszytometrie“* des Schweizerischen Lebensmittelbuchs (SLMB).

Autoren

Stefan Köttsch
Sven Alisch
Thomas Egli

Wissenschaftlicher Beitrag

Frederik Hammes
Hans Ulrich Weilenmann
Lara Pfister
Stephanie Karmann

Finanzierung

Schweizerischer Verein des Gas- und Wasserfaches (SVGW) Zürich
Forschungsfond für Wasser (FOWA) des SVGW

Veröffentlichung

Schweizerisches Bundesamt für Gesundheit (BAG)

Ausgabe 1, 31.10.2012



Inhalt

1.	Einleitung.....	4
2.	Das Prinzip beider durchflusszytometrischer Methoden.....	5
3.	Die Durchflusszytometrie als Standardmethode in der Trinkwasseranalytik.....	7
	3.1. Ermittlung der Totalzellzahl und des LNA/HNA-Verhältnisses	10
	3.2. Ermittlung der Anzahl intakter und permeabilisierter Zellen	12
4.	Grundsätzliches für Neueinsteiger	15
	4.1. Anwenderfehler	17
	4.2. Problematische Proben.....	20
5.	Probennahme und Probenstabilität.....	24
	5.1. Fixierung von Wasserproben.....	26
6.	Beispiele aus der Realität.....	28
	6.1. Schweizweite Analyse von Grund- und Quellwasser.....	29
	6.2. Trinkwasseraufbereitung.....	32
	6.3. Analyse von Trinkwasserverteilsystemen in Gebäuden	35
7.	Ausblick.....	38
8.	Würdigung der Teilnehmer des Methodenworkshops	40
9.	Literatur	42
10.	Symbole und Abkürzungen	45
11.	Glossar	45



1. Einleitung

Um zeiteffizient präzise Aussagen über den mikrobiologischen Zustand von Wasser treffen zu können, bedarf es schneller und einfacher Methoden. Während der letzten 100 Jahre nahm der Umfang des hygienisch relevanten Wissens im Bereich der Wasserverwertung als Lebensmittel stetig zu. Die zahlreichen Seuchenausbrüche der Vergangenheit, auch aufgrund schlechter hygienischer Bedingungen, sensibilisierten die Forscher und die Menschen allgemein für dieses wichtige Thema. Dennoch existieren auf dem Gebiet der Trinkwassermikrobiologie weltweit bis heute nur zwei gesetzlich anerkannte und routinemässig angewandte Analysemethoden.

Diese Methoden sind (a) die Verwendung des Darmbakteriums *Escherichia coli* (i. d. Schweiz u. d. EU auch *Enterokokken*) als Hygiene-Anzeiger für eine mögliche Verunreinigung des Wassers mit Fäkalien (Indikator-Konzept) und (b) die Bestimmung der aerob-mesophilen Keimzahl (AMK) als generellem Parameter für die mikrobielle Belastung eines Wassers. Die Methodik beider Fälle basiert auf der Kultivierung im Wasser vorhandener vermehrungsfähiger Mikroben (v. a. Bakterien) auf festen Nährstoffmedien (Agarplatten) und der anschliessenden Auszählung der gebildeten Kolonien nach Bebrütung.

Seit der Einführung der Methoden wurden sie durch kleine Modifikationen verbessert und stellen nun seit mehr als hundert Jahren weltweit den Standard zur Beurteilung der Wasserqualität dar. Aktuell wird die AMK-Methode jedoch vermehrt als nicht mehr hygienerelevant eingestuft; es wird empfohlen, diesen Parameter nur für die Beurteilung der Prozesseffizienz in der Trinkwasseraufbereitungskette heranzuziehen.

Der Relevanzverlust der AMK-Methode entstammt der Erkenntnis, dass die üblichen AMK-Plattierungsmethoden nur einen Bruchteil der tatsächlichen im Probenmedium lebenden Keime erfassen können, d.h. nur jene, welche unter diesen Wachstumsbedingungen zur Koloniebildung fähig sind. Das bedeutet, dass mit Hilfe des AMK-Verfahrens gewonnene Werte weit unterhalb der Realität liegen, da nur ein geringer Teil (üblicherweise 0.01 – 1 %) der in Wasserproben vorhandenen Mikroorganismen auf den verwendeten Nährstoffplatten zu einer Kolonie (koloniebildende Einheiten, KBE) aufwachsen können. Somit beruht die in den Leitlinien für Trinkwasser festgelegte Grenzwertzahl von weniger als 300 KBE/ml auf einer starken Unterschätzung der tatsächlichen Zahl vorhandener Mikroorganismen. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, ist die AMK-Methode nicht nur relativ langsam (Bestimmungsdauer: 3 – 10 Tage), sie liefert auch keine realitätsnahen Werte. Die AMK-Methode wurde daher vor mehr als zehn Jahren von der WHO, der EU und den USA von der Liste der hygienisch-relevanten Trinkwasserparameter gestrichen.



Damit besteht derzeit ein akuter Mangel an robusten Methoden, denn wesentliche Neuerungen in Hinblick auf Alternativen zur AMK-Methode, die über eine Anwendung zu Forschungszwecken hinausgehen oder gar zeitnah in der Praxis anwendbar wären, waren bisher nicht in Sicht.

Sehr gute Fortschritte sind allerdings im Bereich weiterentwickelter durchflusszytometrischer Methoden zu verzeichnen. Die Durchflusszytometrie entstammt den medizinischen Disziplinen, wo sie sich im Laufe der 1980er Jahre etablierte. Sie kommt beispielsweise bei der Analyse von (verhältnismässig grossen) Blut- oder Keimzellen zum Einsatz. Zunächst hauptsächlich im Bereich der Forschung eingesetzt, ergab sich aus der zunehmenden Weiterentwicklung der Durchflusszytometrie (DZ) und der gestiegenen Messempfindlichkeit der Geräte nach und nach die Nutzbarkeit der DZ auch im Bereich der aquatischen Mikrobiologie. [1 - 9]

2. Das Prinzip beider durchflusszytometrischer Methoden

Das Prinzip aller hier erwähneter durchflusszytometrischer Methoden ist im Grunde gleich. Die Basis bildet in beiden Fällen die Anfärbung der Zellen einer Probe mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs oder eines Fluoreszenzfarbstoffgemischs (*Abb. 1*).

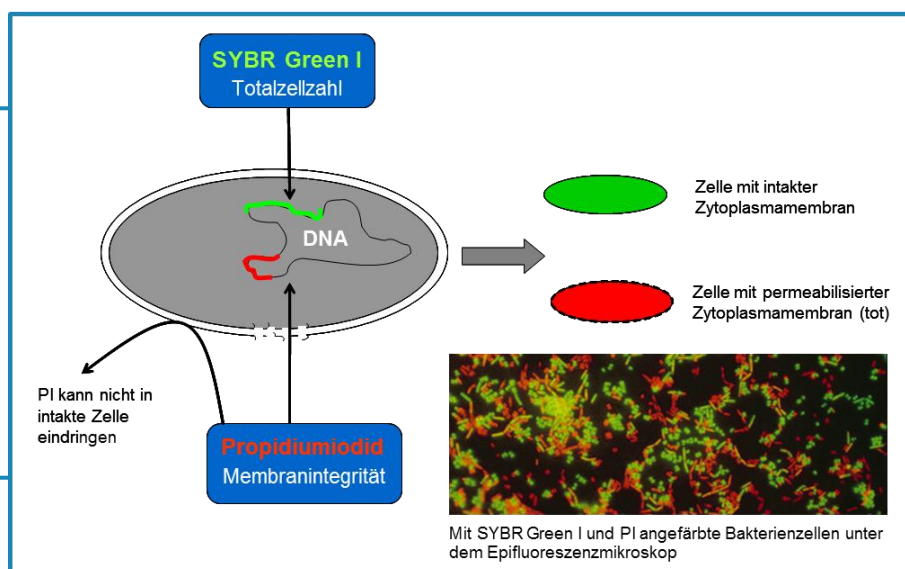


Abb. 1: Das Prinzip der Zellfärbung. Die Zellen werden durch die Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen, die an die DNA in der Zelle binden, markiert. Für die Analyse der Totalzellzahl wird SYBR Green I verwendet. Für die „Live/Dead“ Analyse wird eine Mischung aus SYBR Green I und Propidiumiodid genutzt.



Zur Ermittlung der TZZ inklusive der LNA/HNA-Zahlen kommt der unter Anregung durch Laserlicht (488 nm) grün fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I zum Einsatz. Für die Ermittlung der Anzahl der Zellen mit intakter Zellmembran wird ein Farbstoffgemisch aus dem unter Anregung grün fluoreszierenden SYBR Green I und dem stark rot fluoreszierenden Propidiumiodid (PI) verwendet. Nach einer kurzen Inkubationszeit wird die Probe dem Durchflusszytometer zugeführt. Dort werden die Zellen während der Messung mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt durch eine von einem Laser durchstrahlte Glaskapillare geschleust. Jede den Laserstrahl passierende Zelle führt zu einer Lichtstreuung und zu einer Fluoreszenzlichtemission abhängig vom eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff. Das entstehende Streulicht- bzw. Fluoreszenzlichtsignal wird über Filter zu Detektoren geleitet und dort erfasst. Durch die an das DZ gekoppelte Analysesoftware kann so jedem einzelnen Partikel, respektive jeder einzelnen Zelle, ein spezifisches Streulicht- und Fluoreszenzsignal zugeordnet werden (*Abb. 2 und 3*). [10; 13; 14; 15; 21; 25; 26]

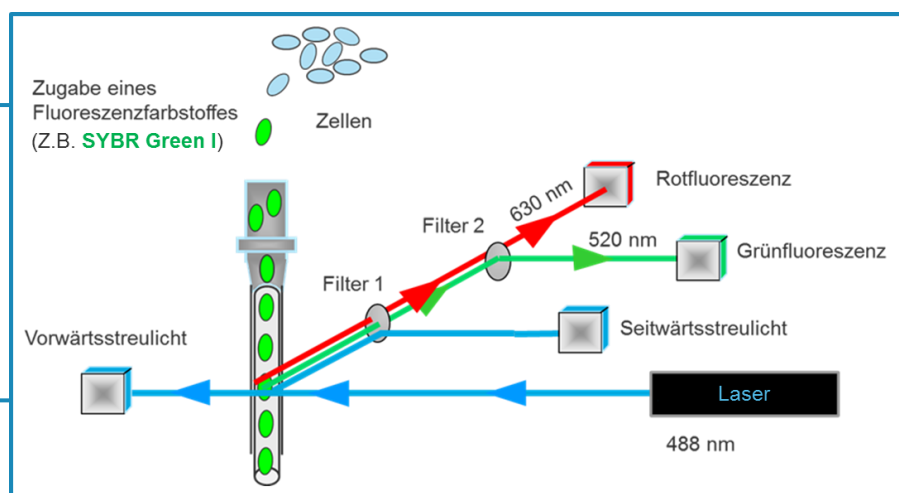


Abb. 2: Das Prinzip der Durchflusszytometrie in vereinfachter Darstellung.

In *Abbildung 3* werden die für die Anwendung der *Methode 333* typischen Signalkombinationen Grün- zu Rotfluoreszenz (G-FL/R-FL), das Grünfluoreszenz-Histogramm und die Grünfluoreszenz zu Seitwärtsstreulicht (G-FL/SSC) dargestellt. Die obere Zeile stammt aus der Software CyFlow der Firma BD Accuri, die untere Bildzeile zeigt die Density Plots und das Histogramm der FlowMax-Software der Firma Partec. Die Hintergrundsignale sind jeweils grau gekennzeichnet und die Zellsignale sind durch Pfeile markiert. Die Abbildung verdeutlicht, wo und wie die jeweiligen Signale in den einzelnen Darstellungen typischerweise auftreten. So wird beispielsweise deutlich, dass der Bereich des Hintergrunds im G-FL Histogramm und im Density Plot G-FL/SSC anders dargestellt wird, als im Grünfluoreszenz/Rotfluoreszenz Density Plot, was bei Analysen von Proben mit starken Hintergrundsignalen hilfreich sein kann, wie im weiteren Verlauf des Handbuchs unter *Punkt 4.2* noch gezeigt werden wird.

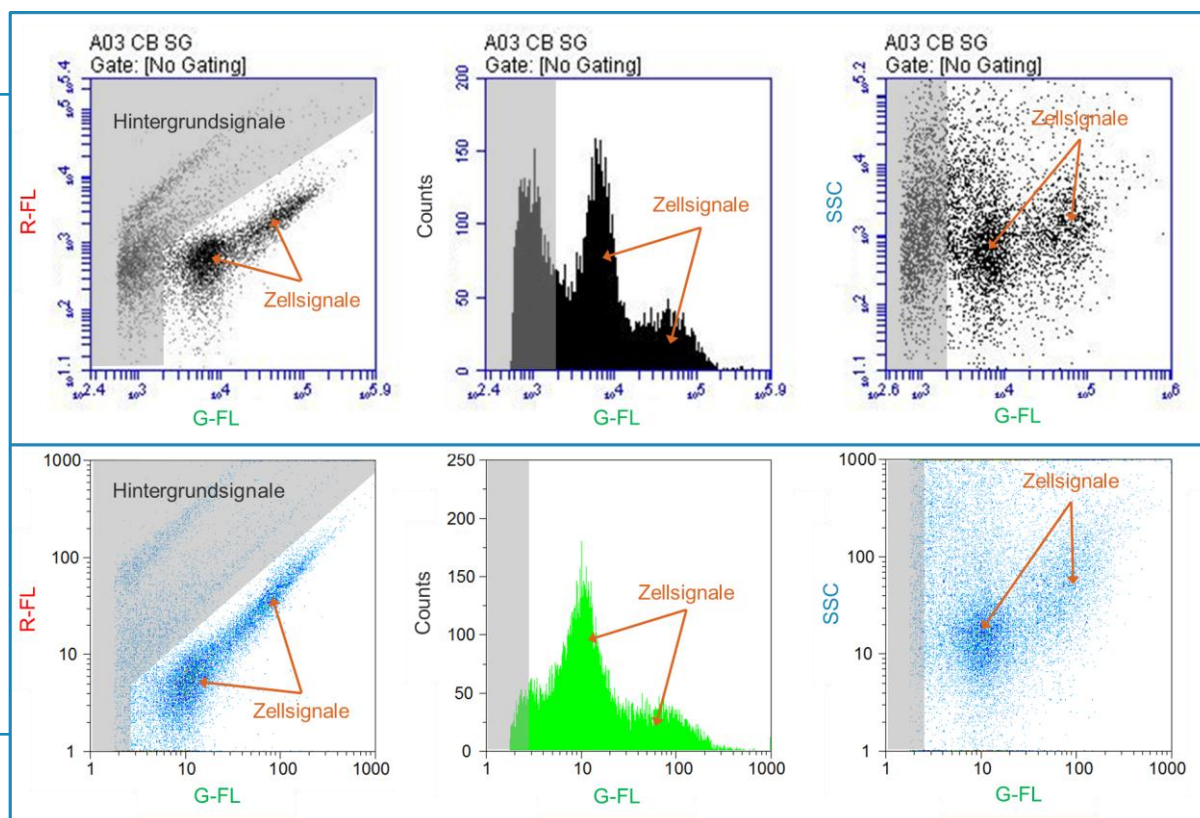


Abb. 3: Typische Signale und deren Kombinationen, dargestellt anhand zwei verschiedener DZ-Analyseprogramme. Farblich gekennzeichnet bzw. durch Pfeile markiert: die Hintergrund- und Zellsignale.

3. Die Durchflusszytometrie als Standardmethode in der Trinkwasseranalytik

Durchflusszytometrische Verfahren helfen dabei, die Lücke zu schliessen, die sich zwangsläufig aus der Einsicht in die Tatsache ergibt, dass die althergebrachte AMK-Methode, die alleinig auf Aufwuchs (Plattierungsverfahren) basiert, in ihrer Aussagekraft mangelhaft ist. Die Durchflusszytometrie, so wie sie hier beschrieben wird, ist eine quantitative Analysemethode. Sie dient dem Erhalt mikrobiologischer Summenparameter. Genauer gesagt, erlaubt die hier vorgestellte Methode die präzise Detektion der Totalzellzahl in einer Wasserprobe, einschliesslich einer Unterscheidung der Zellen in schlecht anfärbbare, da wenig Nukleinsäuren enthaltende (low nucleic acid, LNA) und gut anfärbbare, da viele Nukleinsäuren (high nucleic acid, HNA) enthaltende Bakterienzellen. Diese Zellen kommen im Bereich der natürlichen Wasser als auch im Bereich der Trinkwässer vor.



Viele Zellen in einer Wasserprobe sind nicht automatisch mit schlechter Wasserqualität gleichbedeutend. Es mag einen Laien irritieren, dass in unchloriertem Trink- oder auch in handelsüblichem Mineralwasser mehrere zehn- bis hunderttausend Zellen/ml leben (*Abb. 4*).

Für die biologische Stabilität des Wassers sind sie jedoch essentiell, besetzen sie doch eine Art „Nische“ in ihrem System und hindern durch den Verbrauch der im Wasser verfügbaren Nährstoffe andere Zellen (z.B. potentielle Krankheitserreger) daran, sich ebenfalls in diesem System anzusiedeln bzw. zu vermehren.

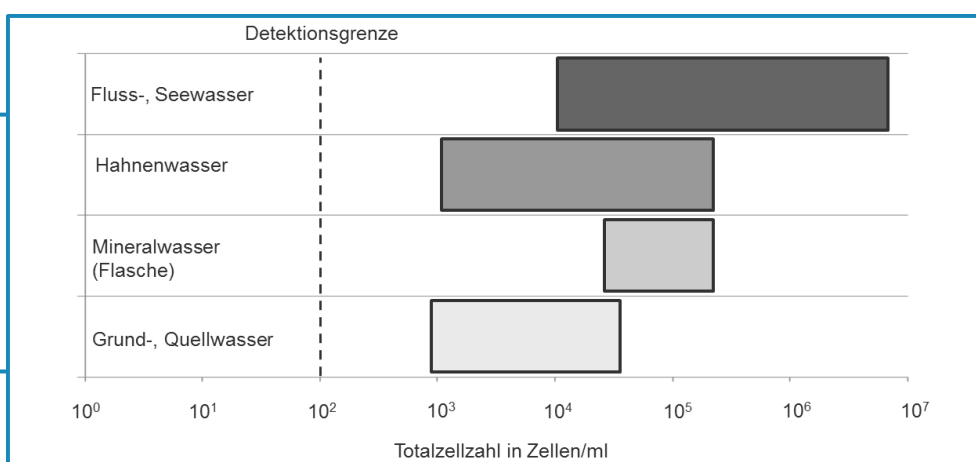


Abb. 4: In hygienisch einwandfreien Systemen des Süßwasserbereichs üblicherweise vorkommende Zellzahlen. Ermittelt mit durchflusszytometrischer Analyse oder mikroskopischer Zählung.

Vergleicht man reale Resultate der AMK-Methode mit denen der DZ, wird deutlich, wie stark die Unterschiede zwischen den beiden Methoden tatsächlich sind. So wurden in einem Vergleichstest vier Wasserproben unterschiedlicher Herkunft durch drei unabhängige Labore mit dem Plattierungsverfahren AMK- und der DZ-Methode analysiert. Die AMK-Methode detektierte durchschnittlich nur 0.01 % der Totalzellzahlen der Wasserproben. Zusätzlich unterlagen die Resultate der Plattierung hohen Schwankungen (*Abb. 5*).

Die Totalzellzahl und das quantitative Verhältnis von LNA- und HNA-Zellen zueinander liefern wertvolle detaillierte Informationen über den allgemeinen mikrobiologischen Zustand des untersuchten Wassers und zu eventuell vorliegenden Störungen. Diese Störungen können im Anschluss an die durchflusszytometrische Analyse durch weiterführende Untersuchungen genauer verifiziert werden. Durch eine weitere interessante durchflusszytometrische Analyse-methode – die „Live/Dead“-Methode – können Zellen mit intakter oder permeabilisierter Membran differenziert werden. Geht man davon aus, dass Zellen mit einer permeabilisierten („löchrigen“) Membran irreversibel geschädigt, ergo „tot“ sind, ergeben sich für diese Methode interessante Anwendungsgebiete.



Detaillierte Informationen über die natürliche Membranintegrität der Zellen innerhalb einer Wasserprobe sind beispielsweise für die Prozessüberwachung im Bereich der Trinkwasseraufbereitung bedeutsam. Mit ihr kann die Effektivität von Desinfektionsprozessen, wie Chlorung, Ozonung, Temperaturbehandlung oder die Behandlung mittels Sonnenlicht überprüft werden.

Die Methode eignet sich allerdings nicht dafür, das Absterben von Bakterienzellen durch die Desinfektion mit UV-C-Licht zu quantifizieren, da bei diesem Verfahren zwar die DNA der Zellen geschädigt wird, die enzymatischen Aktivitäten und die Zellmembran jedoch nicht oder nur wenig beeinträchtigt werden.

Ein weiterer möglicher Einsatzbereich liegt in der Kontrolle der Hauptverteilsysteme und reicht bis hin zu Untersuchungen der Verteilsysteme in Gebäuden. Allerdings bedarf es bis zur Empfehlungsreife dieser Methode durch das BAG Validierungsdaten, wofür aktuell weitere Analysen und Werterhebungen stattfinden müssen [10 - 26].

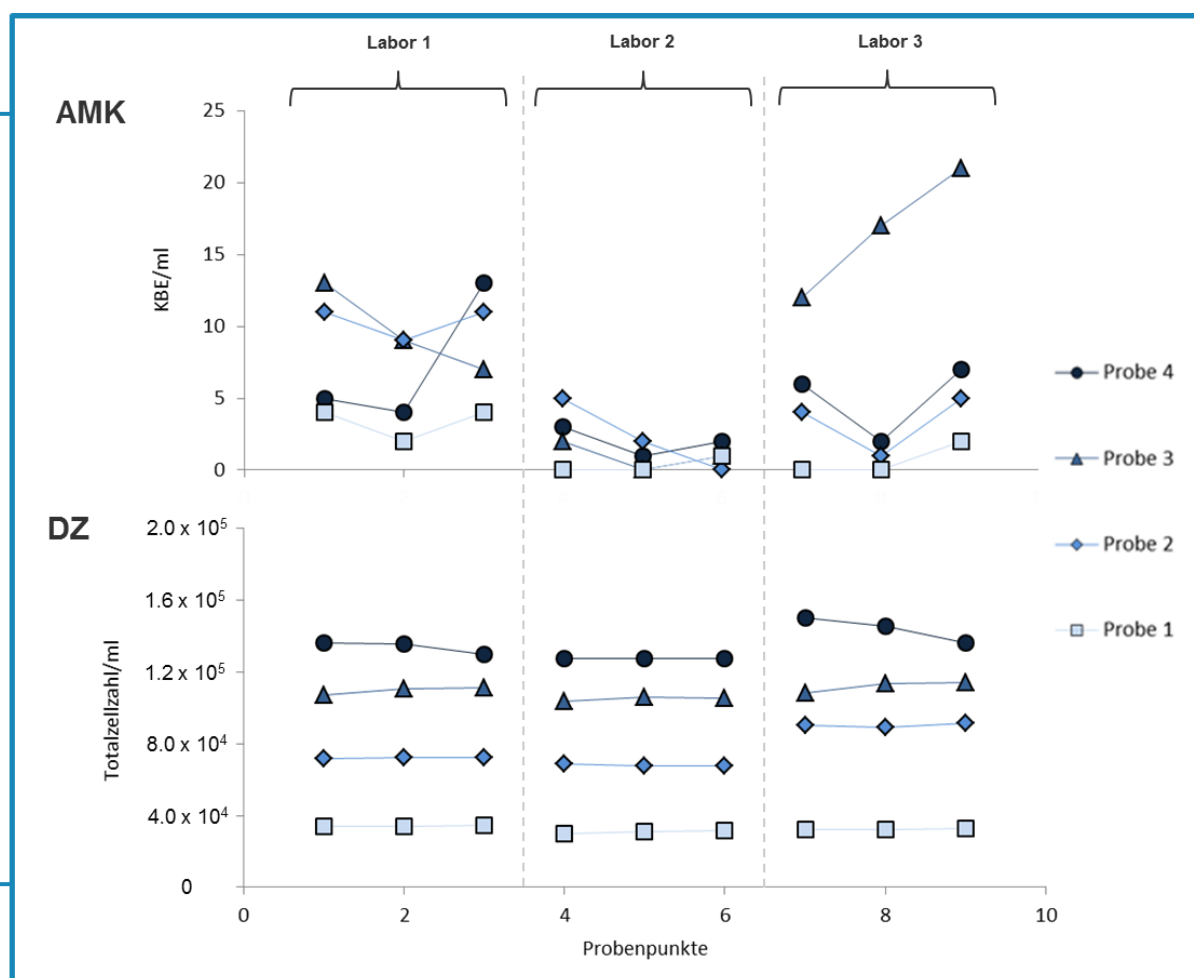


Abb. 5: Auszug eines Vergleichstests dreier unabhängiger Labore. Ersichtlich werden die deutlichen Unterschiede bezüglich der Resultate des Plattierungsverfahrens AMK und der Bestimmung der Totalzellzahl mittels DZ.



3.1. Ermittlung der Totalzellzahl und des LNA/HNA-Verhältnisses

Der Folgeabschnitt bildet die Ergänzung zum *Methodenleitfaden SLMB Nr.: 333*. Auf eine detaillierte Ausführung bezüglich der Einzelschritte wird an dieser Stelle bewusst verzichtet.

Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Analyse wird zunächst der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Stocklösung 10.000x) im Verhältnis 1:100 in 0,2 µm filtriertem DMSO verdünnt. Der Probe wird dieses Farbstoffaliquot im Verhältnis 1:100 zugegeben (z.B.: 10 µl SYBR Green I 100x in DMSO auf 1000 µl Probe).

Die auf diese Weise angefärbte Probe wird gemischt und danach für mindestens 13 Minuten bei 37°C (± 2°C) in Dunkelheit inkubiert.

Eine Verdünnung von Proben sollte immer vor Anfärbung und Inkubation erfolgen. Der Farbstoff bindet nicht irreversibel an der Zell-DNA und kann bei Verdünnung nach Anfärbung wieder aus der Zelle diffundieren, was eine Verschlechterung des Signals zur Folge hat.

Die DZ-Analyse einer Wasserprobe ermöglicht neben der Bestimmung der TZZ auch die Erfassung der LNA- und HNA-Zellzahlen innerhalb eines Analyseschrittes. Die LNA- und HNA-Zellzahlen geben Aufschluss über die Zellgrößenverhältnisse der bakteriologischen Gemeinschaft einer Wasserprobe und sind von Wasser zu Wasser unterschiedlich, die LNA/HNA-Zahlen sind daher als eine Art „Fingerabdruck“ einer Probe zu verstehen.

Für die Auswertung der Analysedaten empfiehlt es sich, die grafischen Darstellungen möglichst einfach zu halten. Im Grunde werden nur die folgenden drei Signalkombinationen benötigt: die Grün-/Rotfluoreszenz (G-FL/R-FL Density Plot), Grünfluoreszenz/Seitwärtsstreulicht (G-FL/SSC Density Plot) und das Histogramm der Grünfluoreszenz (G-FL Histogramm). Die Bestimmung der TZZ (nachfolgend als Gate 1 {G1} bezeichnet) erfolgt unter Nutzung der Gating-Option im G-FL/R-FL Density Plot. Der abgebildete Cluster wird dabei vom Anwender manuell mithilfe der Gating-Option der Analysesoftware mit einem Rahmen (Gate) versehen. Die Software zeigt die jeweiligen Konzentrationsverhältnisse für dieses Gate (hier {G1}) in counts/Volumeneinheit (counts/ml oder counts/µl) an (*Abb. 6*).

Zur Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses einer Wasserprobe stehen zwei Optionen zur Verfügung. Wurde das Gate zur Erfassung der Totalzellzahl im Density Plot Grün- zu Rotfluoreszenz gesetzt, erfolgt der zur Bestimmung der LNA/HNA-Zahlen nötige Transfer des TZZ-Gates auf den Density Plot der Grünfluoreszenz zu Seitwärtsstreulicht (Option 1) oder auf das Histogramm der Grünfluoreszenz (Option 2).

Nur in seltenen Fällen muss eine Korrektur der Gates bzw. Region Ranges erfolgen, da die Zellcluster bei optimal gewählten Einstellungen ihre Position nicht verändern, sondern lediglich in Form und Grösse variieren.

Option 1:

Die Bestimmung der LNA (hier {G2}) und HNA (hier {G3}) erfolgt unter Nutzung der Gating-Option im G-FL/SSC Density Plot. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Es wird ein Gate-Transfer der TZZ {G1} vom G-FL/R-FL Density Plot auf den G-FL/SSC Density Plot durchgeführt. Im G-FL/SSC- Density Plot werden die Gates 2 {G2} und 3 {G3} durch den Probanden definiert. Durch die Software erfolgt die jeweilige Konzentrationsauswertung von {G2} und {G3} in counts/Volumeneinheit (counts/ml oder counts/ μ l). Die Gates {G2} und {G3} werden anschliessend prozentual berechnet (Abb. 6).

Option 2:

Die Bestimmung der LNA {G2} und HNA {G3} erfolgt unter Nutzung der Gating-Option im G-FL Histogramm. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Es wird ein Gate-Transfer der TZZ {G1} auf das G-FL Histogramm durchgeführt. Im G-FL Histogramm werden die Region Ranges bzw. die Gates 2 {G2} und 3 {G3} manuell durch den Probanden definiert. Durch die Software erfolgt die jeweilige Konzentrationsauswertung von {G2} und {G3} in counts/Volumeneinheit (counts/ml oder counts/ μ l). Die Gates {G2} und {G3} werden anschliessend prozentual berechnet (Abb. 6).

Beispiel für Option 1:

LNA {G2} = 5.05×10^4 Zellen/ml

HNA {G3} = 3.65×10^4 Zellen/ml

Prozentuale Berechnung:

$$\frac{\text{LNA}\{G2\}}{(\text{LNA}\{G2\} + \text{HNA}\{G3\})} \times 100 = \text{LNA in \%}, \text{ hier } 58 \% \text{ LNA}$$

$$\frac{\text{HNA}\{G3\}}{(\text{HNA}\{G3\} + \text{LNA}\{G2\})} \times 100 = \text{HNA in \%}, \text{ hier } 42 \% \text{ HNA}$$

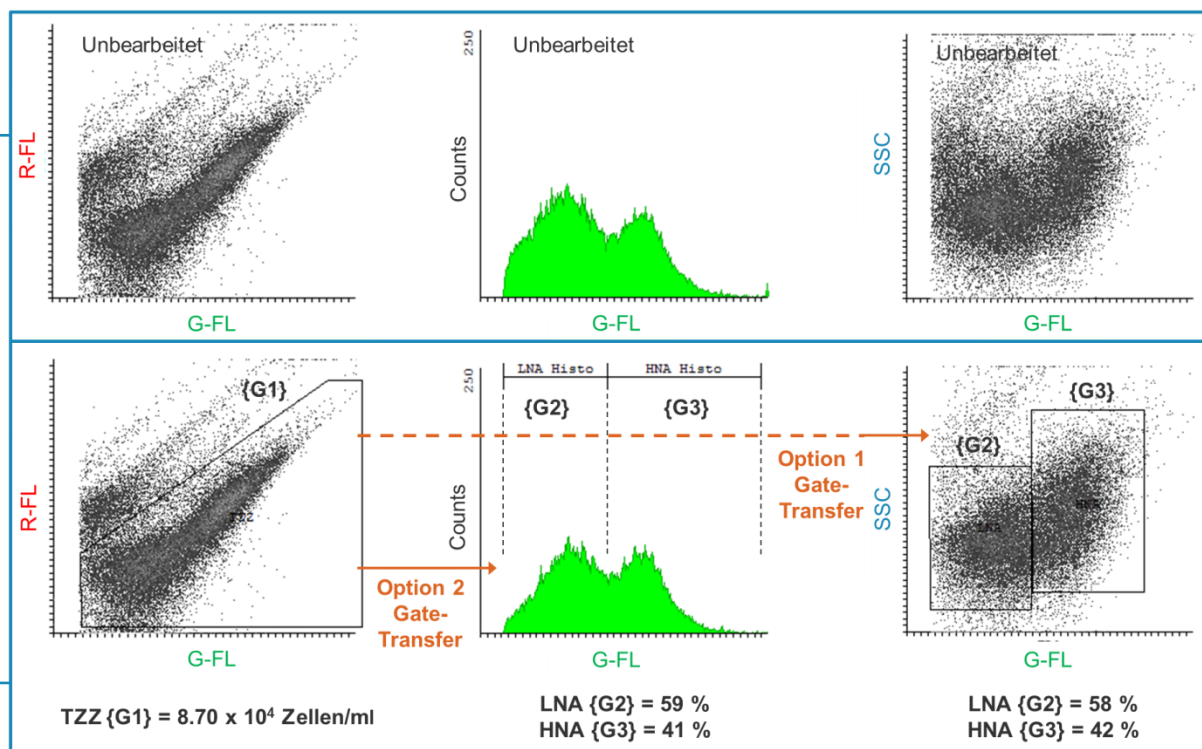


Abb. 6: Übersicht zu allen relevanten Signalen und deren Kombinationen zur Bestimmung der TZZ und des LNA/HNA-Verhältnisses einer Wasserprobe. In der oberen Zeile sind die unbearbeiteten Graphen der Signalkombinationen Grün- zu Rotfluoreszenz (G-FL/R-FL), das Histogramm Grünfluoreszenz (G-FL) und die Signalkombination Grünfluoreszenz zu Seitwärtsstreulicht (G-FL/SSC) aufgetragen. In der unteren Zeile sind die bearbeiteten Graphen der Signalkombinationen Grün- zu Rotfluoreszenz (G-FL/R-FL), das Histogramm Grünfluoreszenz (G-FL) und die Signalkombination Grünfluoreszenz zu Seitwärtsstreulicht (G-FL/SSC) aufgetragen. Nach der Bestimmung (Gating) der TZZ {G1} im Density Plot Grün- zu Rotfluoreszenz erfolgt der Transfer des TZZ-Gates auf den Density Plot der Grünfluoreszenz zu Seitwärtsstreulicht (Option 1) oder auf das Histogramm der Grünfluoreszenz (Option 2). Anschließend werden die Gates {G2}, {G3} (Option 1) oder die Region Ranges {G2}, {G3} (Option 2) für die Bestimmung der LNA- und HNA-Zahlen gesetzt und prozentual zur Summe der LNA- und HNA-Zahlen (LNA+HNA) berechnet. Option 1 und Option 2 ergeben LNA/HNA-Werte mit minimaler Varianz (~1 %).

3.2. Ermittlung der Anzahl intakter und permeabilisierter Zellen

Die nachfolgende, weiterführende durchflusszytometrische Methode ist als Ergänzung zur *Methode 333* zu verstehen. Mit ihr werden Zellen mit intakter Membran („lebend“) von Zellen mit irreversibler Schädigung (permeabilisierte Membran, „tot“) unterschieden und die Zahl intakter Zellen (Zellzahl *intakt*, ZZi) ermittelt. Daten zur Validierung stehen aktuell (10/2012) noch aus, allerdings findet die sogenannte „Live/Dead“-Methode in der Forschung bereits breite Anwendung. Da die Methode grosses Potenzial birgt, was ihre zukünftige Anwendung in z.B. der Prozessüberwachung der Trinkwasseraufbereitung betrifft, wird an dieser Stelle näher auf sie eingegangen.



Zur Anfärbung der Wasserproben wird ein DNA-bindendes Fluoreszenzfarbstoffgemisch aus SYBR Green I und dem rot-fluoreszierenden Propidiumiodid (PI) verwendet. Aktuell wird die Methode wie folgt durchgeführt. Einem, wie unter Punkt 3.1 beschrieben, vorbereiteten SYBR Green I Aliquot (100x in DMSO) werden 10 µl Propidiumiodid (30 mM in DMSO) zugegeben. Diese Aliquote können bei – 20 °C gelagert werden. Der Probe wird dieses Farbstoffaliquot im Verhältnis 1:100 zugegeben (z.B.: 10 µl SYBR Green I / PI Mix auf 1000 µl Probe). Die auf diese Weise angefärbte Probe wird gemischt und danach für mindestens 13 Minuten bei 37°C (± 2°C) in Dunkelheit inkubiert.

Propidiumiodid dringt durch permeabilisierte Zellmembranen wesentlich schneller in die Zellen ein und bindet dort an deren DNA/RNA. Dennoch ist die Methode sehr zeitabhängig, die Messung sollte unmittelbar nach der Anfärbung erfolgen. Das dient der Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse im Bereich der Zahl permeabilisierter Zellen, da PI über längere Zeiträume in alle Zellen der Probe – auch in die Zellen mit intakter Membran – diffundiert und dort ebenfalls an deren DNA/RNA bindet. Es empfiehlt sich, maximal drei Proben gleichzeitig vorzubereiten und nach erfolgter Inkubation für die Dauer der Analyse in Dunkelheit aufzubewahren. Die Anwendung von automatischen Probegebern ist – anders als für die Ermittlung der TZZ-/LNA-/HNA-Zahlen – innerhalb der Durchführung dieser Methode nicht möglich.

Das Signalverhalten der low nucleic acid (LNA-) und der high nucleic acid (HNA-) Zellen fällt mit fortschreitender Permeabilisierung unterschiedlich aus (Abb. 7). Der Cluster der HNA-Zellen (1) weist zuerst Zeichen der Permeabilisierung auf. Der Zellcluster beschreibt eine Bogenbewegung. Der Cluster der LNA-Zellen (2) folgt verzögert. Die Signalverschiebung des LNA-Clusters beschreibt dabei eine gerade Aufwärtsbewegung. Ab einem gewissen Punkt, der abhängig von der Probenbehandlung ist, lysieren die Zellen und die entsprechenden Signale wandern (3) in den Bereich des Gerätehintergrundes. [25; 26]

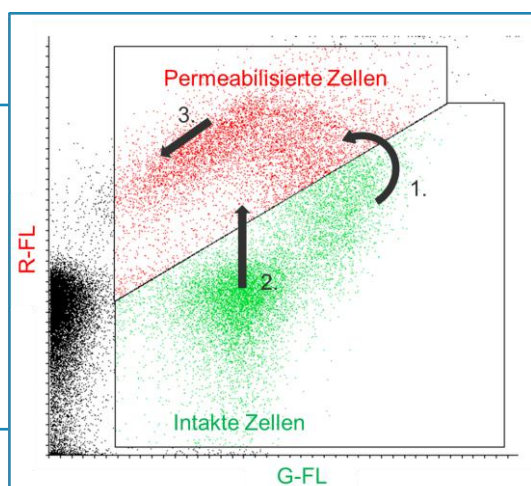


Abb. 7: Typisches Verhalten der LNA- und HNA-Cluster während einer „Live/Dead“-Analyse. Je nach Intensität der Probenbehandlung (z.B. durch Temperatur oder Chlorung) fallen d. Signale u. Bewegungen der Cluster unterschiedlich aus. 1) Bogenbewegung des HNA-Clusters, 2) Aufwärtsbewegung des LNA-Clusters, 3) Bewegung der Signale lysierender Zellen in Richtung des Bereichs der Hintergrundsignale.



Ermittlung des Anteils intakter Zellen (ZZi)

Für die Ermittlung der Zahl intakter und permeabilisierter Zellen wird die Signalkombination Grün-/Rotfluoreszenz (G-FL/R-FL Density Plot) benötigt. Hierzu werden zwei Messungen durchgeführt. Zuerst wird die Totalzellzahl (TZZ) ermittelt. Die Bestimmung TZZ {G1} erfolgt – wie unter Punkt 3.1 beschrieben – unter Nutzung der Gating-Option im G-FL/R-FL Density Plot. Der abgebildete Cluster wird dabei vom Anwender manuell mithilfe der Gating-Option der Analysesoftware mit einem Rahmen (Gate) versehen. Die Software zeigt die jeweiligen Konzentrationsverhältnisse für dieses Gate (hier „{G1}“ genannt) in counts/Volumeneinheit (counts/ml oder counts/μl) an.

Als zweiter Schritt folgt die Ermittlung der Anzahl intakter Zellen (ZZi). Die Bestimmung ZZi {G2} erfolgt unter Nutzung der Gating-Option mithilfe eines Rahmens (hier {G2} genannt), den der Anwender manuell um den abgebildeten Zellcluster setzt. Durch die Software erfolgt die jeweilige Konzentrationsdarstellung von TZZ {G1} und ZZi {G2} in counts/ml. Der Anteil der intakten Zellen wird anschliessend prozentual berechnet (Abb. 8).

Beispiel:

Messung 1: TZZ {G1} = 6.76×10^4 Zellen/ml

Messung 2: ZZi {G2} = 3.25×10^4 Zellen/ml

Prozentuale Berechnung:

$$\frac{\text{ZZi \{G2\}}}{\text{TZZ \{G1\}}} \times 100 = \text{ZZi in \%}, \text{ hier } 48 \% \text{ ZZi}$$

Damit sind 48 % der Zellen intakt. Bei 52 % der Zellen ist die Membran permeabilisiert.

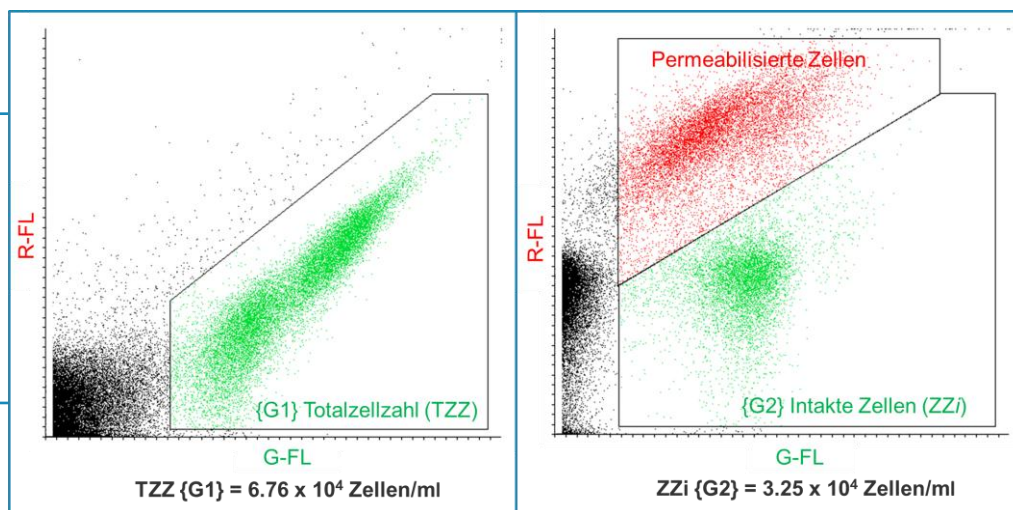


Abb. 8: Beispiel zur Gating-Strategie „Vergleich“, zur Ermittlung der Anteile intakter und permeabilisierter Zellen. Die Wasserprobe wurde mit Chlordioxid behandelt.



4. Grundsätzliches für Neueinsteiger

Generell ist davon abzuraten, mittels hochkomplexer Wasserproben den Einstieg in das Thema „durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben“ zu suchen. Neulingen auf diesem Gebiet wird daher empfohlen, sich zunächst mit der Methode vertraut zu machen. Das Analysieren vieler verschiedener Wasserproben schärft hierbei nicht bloss das Selbstvertrauen des Anwenders. Es generiert ausserdem wichtige Erfahrungswerte, die unabdingbar sind, will man ein Gefühl für die Durchflusszytometrie bekommen. So sollte zuallererst mit der Analyse einfach strukturierter Wasserproben begonnen werden. Diese Herangehensweise ist auch für den Routinebetrieb zu empfehlen; etwa wenn der Anwender ein ihm nicht vertrautes Gerät nutzt und die optimalen Einstellungen für dieses DZ-Gerät erst festlegen muss.

Abbildung 9 zeigt die ideale Lage der Clustersignale. Im G-FL/R-FL Density Plot sollten die LNA- und HNA- Cluster idealerweise immer auf einer (gedachten) diagonalen Linie liegen. Die Abbildung zeigt eine einfache Wasserprobe: Evian Mineralwasser. Evian Mineralwasser bildet hauptsächlich einen grossen HNA-Zellcluster und aufgrund seiner stets vergleichbar guten Qualität eignet es sich hervorragend für Analysen zum Zwecke der Signalfindung oder zur Kontrolle der gewählten Settings.

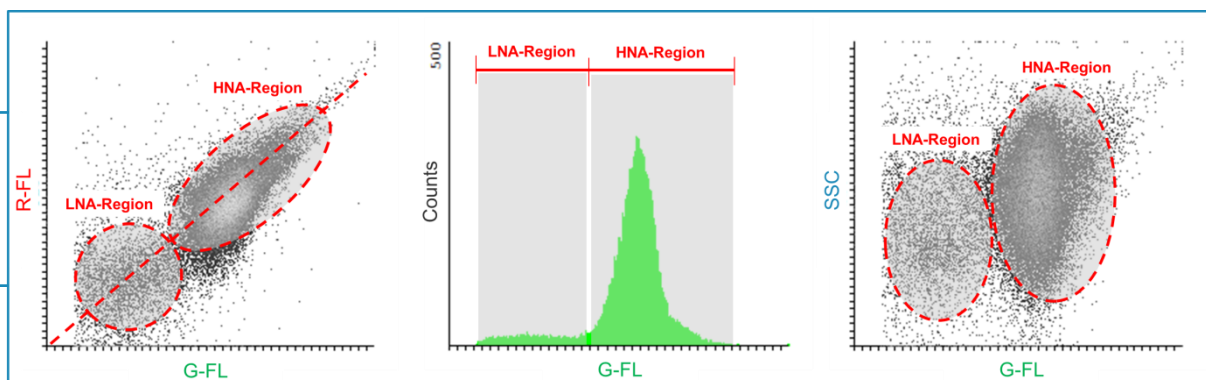


Abb. 9: Evian Mineralwasser analysiert zum Zweck der Signalfindung. Die Position der Zellsignale ist hier ideal. Im G-FL/R-FL Density Plot liegen die LNA- u. HNA-Cluster in der Bildmitte auf einer gedachten diagonalen Linie. Auch im G-FL Histogramm und im Density Plot G-FL/SSC sind die Zellsignale optimal positioniert.

Zudem hat sich während der Etablierung der Methode dieses Mineralwasser (filtriert) neben Ultra-Reinstwasser als Verdünnungsmedium für Wasserproben als sehr gut geeignet erwiesen. Für mikrobiologische Arbeiten typische künstliche Verdünnungsmedien, wie z.B. phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), sollten nicht verwendet werden, da Mikroausfällungen das Hintergrundsignal erheblich verschlechtern und damit die Messung erschweren können. Eine weitere Möglichkeit der Signalfindung stellen die Kalibrationsbeads dar. Diese Kalibrationsbeads sind auch für die tägliche Kontrolle der Geräte erforderlich.



Beads sind nahezu perfekte Kügelchen. Sie werden vom Hersteller der jeweiligen DZ und von anderen Lieferanten angeboten. Es empfiehlt sich, die jeweiligen vom Hersteller des Gerätes empfohlenen Kalibrationsbeads zu nutzen. Beads sind in den unterschiedlichsten Varianten erhältlich. So zum Beispiel: Counting-Beads, Fluoreszenz-Beads oder auch Grössen-Beads.

Abbildung 10 zeigt die Signale von 0.5 μm Beads mit Grünfluoreszenz in drei unterschiedlichen Wasserproben: die Beads in Reinstwasser, ohne Zellsignale (erste Zeile), Beads in Evian unter Anwesenheit eines HNA-Clusters (zweite Zeile) und Beads in Trinkwasser unter Anwesenheit eines LNA- und eines HNA-Clusters (dritte Zeile).

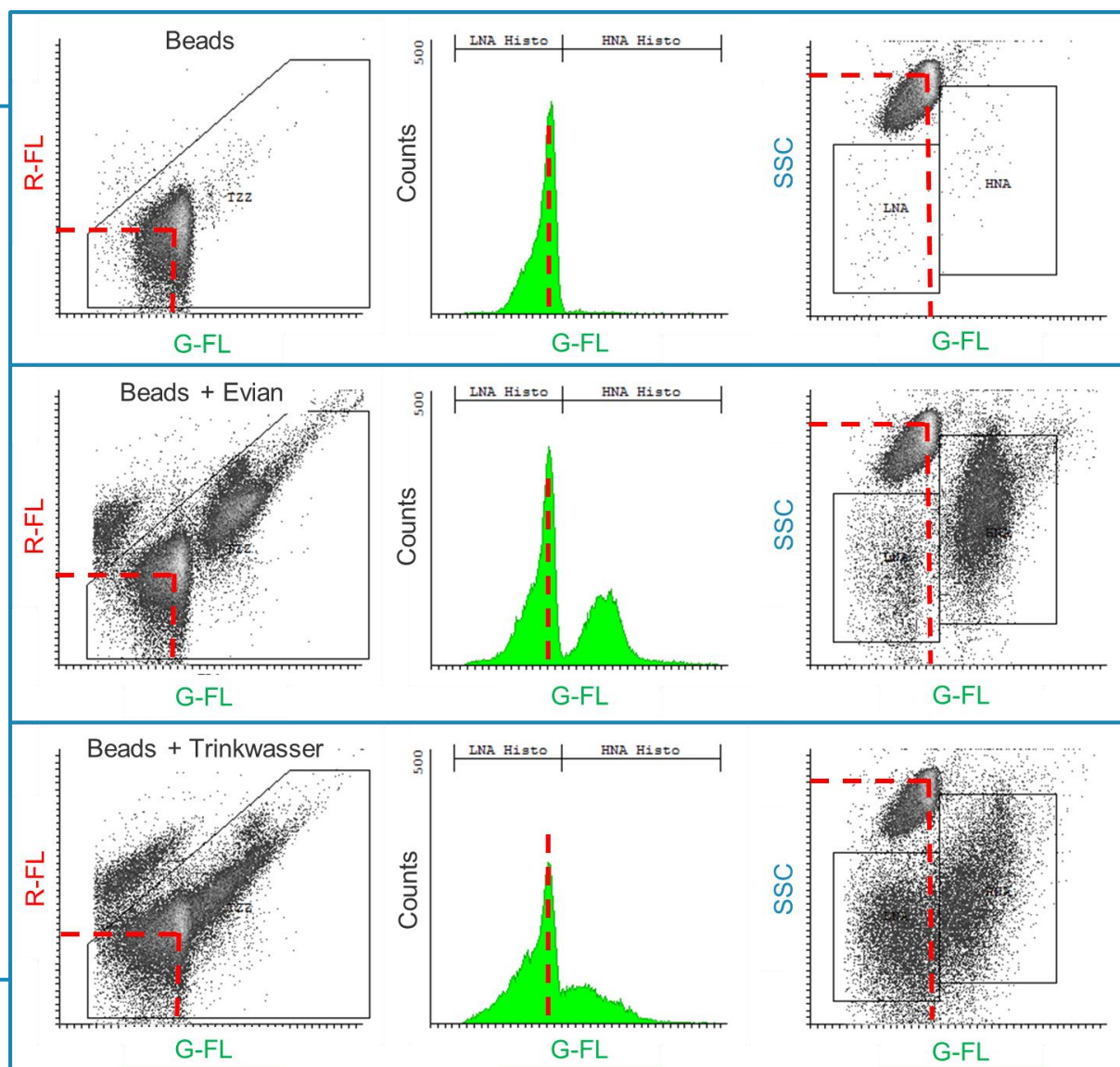


Abb. 10: Beads 0.5 μm mit Grünfluoreszenz in Reinstwasser (keine Zellsignale), in Evian Mineralwasser und in Trinkwasser. Die Lage der Beads im oberen Bildbereich des G-FL/SSC Plots (Grössensignale) ergibt sich aus Form und Grösse der 0.5 μm Beads.



4.1. Anwenderfehler

Innerhalb des Workshops zur Etablierung der Methode traten anfänglich Probleme bei der Analyse der Messungen auf. Die meisten dieser Probleme beruhten allerdings auf Anwenderfehlern. So analysierten Probanden ihre Proben beispielsweise mit nicht optimal gewählten Settings. Häufige Fehler waren dabei falsch gewählte Gain-Einstellung im Bereich der Grün (G-FL)- und Rot (R-FL)- Fluoreszenz. Für Anwender an Geräten mit frei wählbaren Gain-Einstellungen ist es wichtig, die optimalen Werte für das von ihnen benutzte Gerät individuell zu bestimmen, da sich diese nicht beliebig auf jedes andere Durchflusszytometer übertragen lassen. Sind die Einstellungen einmal gefunden, dürfen diese während der Messung nicht mehr verändert werden. Das ist auch nicht notwendig, wie noch gezeigt werden wird.

Die Software der jeweiligen Durchflusszytometer bietet ausserdem die Möglichkeit, die gewählten Settings, die Gates und die Optionen des Gatetransfers zu speichern. Informationen dazu sind den Anleitungen der jeweils verwendeten Programme zu entnehmen. Generell gilt: die Hintergrundsignale des Gerätes sollten bei der Analyse immer im Ansatz sichtbar bleiben. Das hilft dem Anwender, sich ein besseres Bild über die Verteilung der Zellcluster und deren Abgrenzung vom Hintergrund zu machen. Kommt es während der Messung zu störenden bzw. wechselnden Hintergrundsignalen, kann der Anwender sich einer Funktion bedienen, die „Lower Limit“ oder „Threshold“ genannt wird. Diese wird auf das ausgewählte („Trigger“-) Signal angewendet und schliesst nicht benötigte Signalinformationen aus (*Abb. 11*).

Eine Veränderung der Gain-Werte, wenn sie einmal optimal ermittelt wurden, ist ebenso wenig erforderlich, wie ein immer neues Setzen der Gates bzw. der Region Ranges. Die Signale der Zellcluster variieren zwar von Probe zu Probe in Form und Grösse, die Position der Signale in den Density Plots und in den Histogrammen bleibt jedoch stets gleich.

Abbildung 12 zeigt die Density Plots und Histogramme vier unterschiedlicher Wasserproben. Die einmal gesetzten Gates bzw. Region-Ranges ($\{G1\}$, $\{G2\}$, $\{G3\}$) bleiben unverändert. Die Signale der Zellcluster aller vier Proben liegen immer innerhalb der definierten Bereiche. *Probe 1* ist eine Grundwasserprobe aus dem Grund- und Quellwasserwerk Hardhof der Wasserversorgung Zürich mit einer TZZ von 3.43×10^4 Zellen/ml. *Probe 2* ist eine Quellwasserprobe vom selben Ort mit einer TZZ von 6.60×10^4 Zellen/ml. *Probe 3* ist eine Trinkwasserprobe nach der Aufbereitung in der Anlage Lengg/Zürich mit einer TZZ von 1.13×10^5 Zellen/ml. *Probe 4* ist eine Trinkwasserprobe aus der Untersuchung einer Hausinstallation in Oetwil am See nach Spülung des Systems. Die TZZ dieser Probe beträgt 1.35×10^5 Zellen/ml.

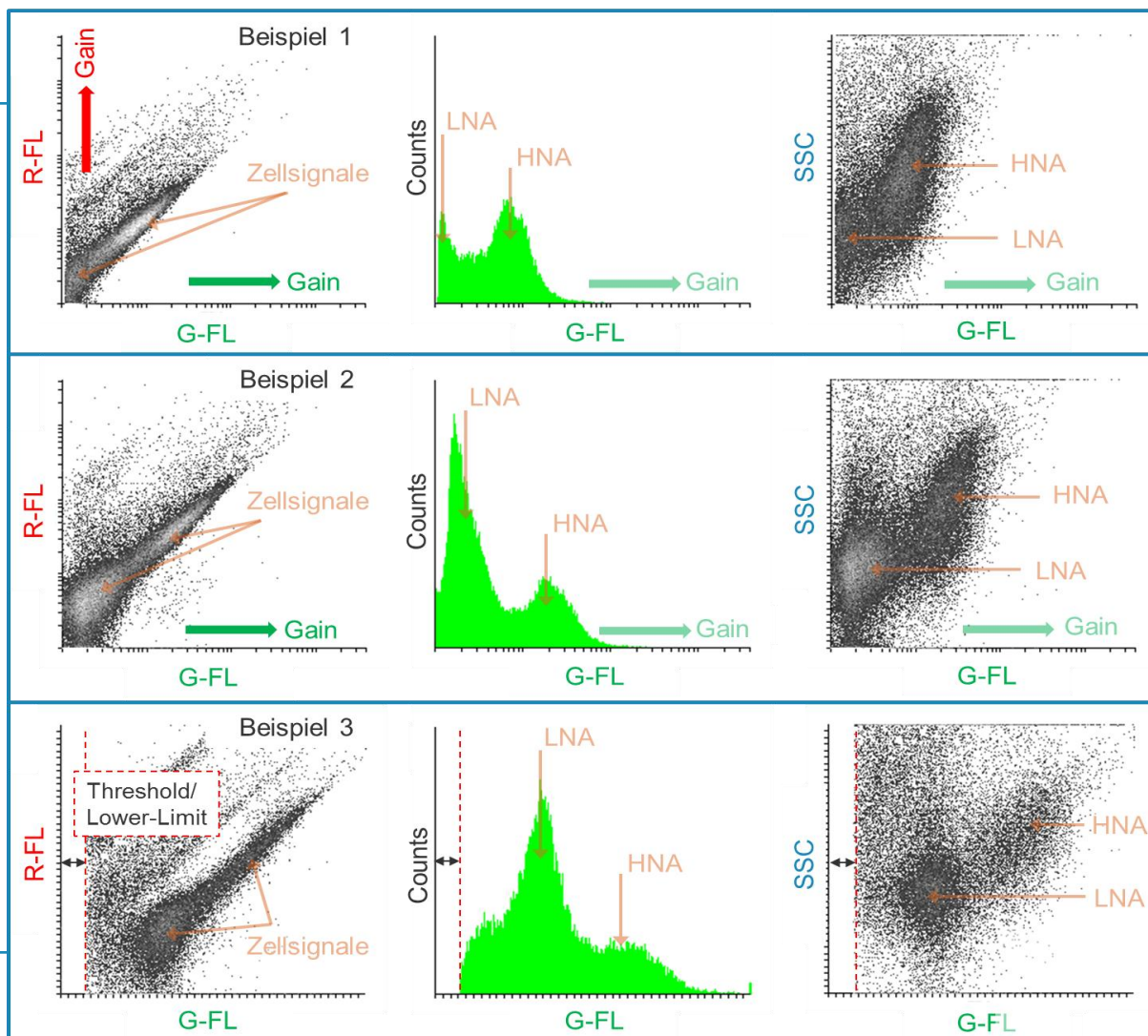


Abb. 11: Eine Probe, von drei unterschiedlichen Probanden (hier: *Beispiel 1, 2, 3*) analysiert. Die Gain-Settings der ersten beiden Beispiele sind nicht optimal gewählt. Sie bedürfen einer Anpassung. *Beispiel 1, v.l.n.r.:* Im Density Plot G-FL/R-FL lassen sich die Signale der Zellcluster mit den gewählten Gain-Settings nicht deutlich darstellen und damit nicht korrekt erfassen. Der Cluster der LNA-Zellen ist kaum sichtbar. Es bedarf einer Erhöhung der Gain-Werte im Bereich d. R-FL (roter Pfeil) und der G-FL (grüner Pfeil). Die farblich entsprechend gekennzeichneten Pfeile weisen jeweils in die Richtung, in die sich die Zellcluster unter Anpassung der Werte verlagern. *Rechts daneben:* die Abbildung des entsprechenden G-FL-Histogramms. Der Peak der LNA-Zellsignale ist nicht optimal dargestellt. Der Pfeil der Gain-Anpassung der G-FL weist in die Richtung, in die sich die Zellsignale durch die Anpassung verlagern werden. Gleiches gilt für die Darstellung der Grünfluoreszenz zu Seitwärtsstreulicht (SSC) (*ganz rechts*). *Beispiel 2, v.l.n.r.:* Beide Cluster sind besser sichtbar, jedoch noch nicht optimal dargestellt. Eine Erhöhung der Gain-Werte im Bereich der G-FL (grüner Pfeil weist die Richtung, i. d. sich die Signale bewegen werden) bewirkt eine bessere Darstellung, macht den Gerätehintergrund im Ansatz sichtbar und erleichtert dadurch die Unterscheidung der Zellcluster vom Hintergrundsignal. *Beispiel 3, v.l.n.r.:* Proben mit störenden, zu intensiven Hintergrundsignalen können eine Messung erschweren und unerwünschte Probenverdünnungen notwendig machen, da andernfalls die Werte der Zählereignisse (counts/Sekunde; siehe *Methode 333 d. SLMB, Punkt 6.3, „Messbereiche“*) das für die Methode wichtige Limit von 1.000 counts/s. überschreiten würden. In diesem Fall findet die Funktion „Threshold“ bzw. „Lower-Limit“ Anwendung. Durch sie werden störende Signale des Hintergrundes ausgeblendet, was zu einer deutlichen Reduzierung der counts/Sekunde führt, ohne die Probe weiter verdünnen zu müssen. Das Hintergrundsignal sollte dennoch stets im Ansatz sichtbar bleiben, da das eine Zuordnung der Cluster erleichtert. Die Option „Threshold/„Lower-Limit“ (rot gestrichelte Linie) wird im Beispiel auf das Signal der Grünfluoreszenz angewendet. Im G-FL-Histogramm sind die Peaks der LNA/HNA-Zellcluster mittig platziert, der Bereich links davon beschreibt den Übergang in den Bereich des Gerätehintergrunds. Im Density Plot G-FL/SSC sind die Signal der LNA- und HNA-Cluster deutlich auszumachen, der Bereich des Hintergrundes (links) ist „ausgeblendet“.

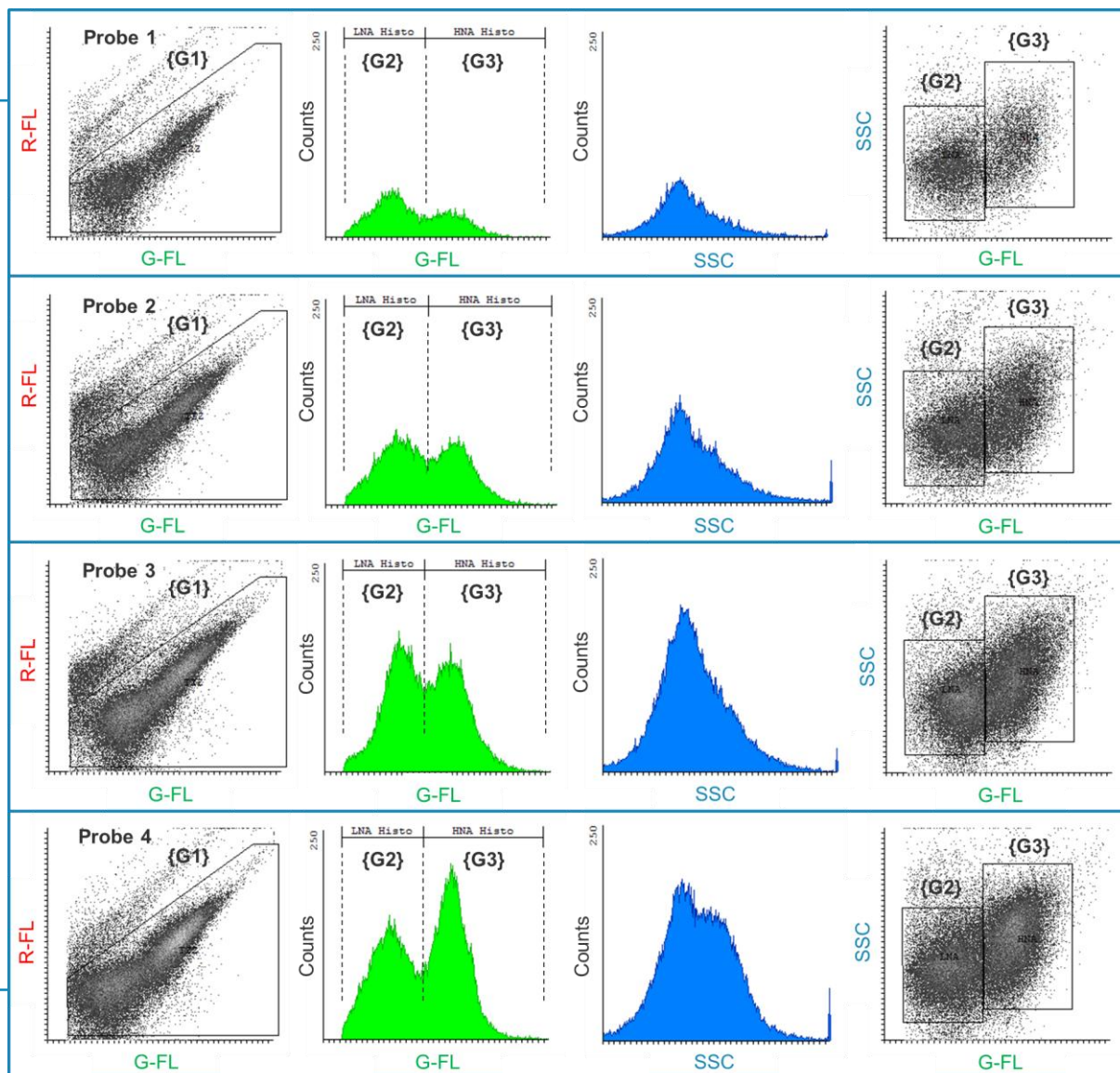


Abb. 12: Vier Wasserproben völlig unterschiedlicher Art und Herkunft mit teils erheblich voneinander abweichenden TZZ. Die einmal gesetzten Gates/Region-Ranges wurden unverändert beibehalten. Dennoch liegen die Signale der Zellcluster aller Proben stets innerhalb der ursprünglich gesetzten Gates/Region-Ranges. Das SSC Histogramm wird an dieser Stelle zum Zweck der Verdeutlichung zusätzlich zu den drei typischerweise benötigten Signalkombinationen aufgeführt.





Die nächste Probe (Abb. 14) stellt sich auf den ersten Blick als ein einziger Zellcluster dar, der ideal auf der diagonalen Bildebene des G-FL/R-FL Density Plots liegt. Doch das scheinbar durchgängige, graue Band enthält sogar drei Cluster. Einen grossen Cluster im Bereich der LNA-Zellsignale, dazu einen kleineren HNA- und einen grösseren HNA-Cluster. Abhängig vom verwendeten DZ und dessen Hard- und Software ist es durchaus möglich, dass mehrere Cluster abgebildet werden können. Je höher die Laserleistung und je besser die Auflösung des Geräts, desto detaillierter fällt die Darstellung der Cluster-Signale aus. Insgesamt betrachtet, sind Proben mit mehr als zwei Clustern also nicht ungewöhnlich und insgesamt durchaus häufig. Im G-FL/R-FL Density Plot lassen sich die drei Cluster nicht eindeutig unterscheiden, das Histogramm der G-FL und das Diagramm der Grünfluoreszenz/Seitwärtsstreulicht (G-FL/SSC) helfen jedoch bei der korrekten Bestimmung. Bereits im unbearbeiteten G-FL Histogramm sind drei einzelne Peaks auszumachen, die nach Ausblendung der Hintergrundsignale noch deutlicher ersichtlich sind. Im G-FL/SSC Density Plot, der die Grössensignale der Zellen abbildet, sind die drei einzelnen Cluster ebenfalls deutlich zu erkennen.

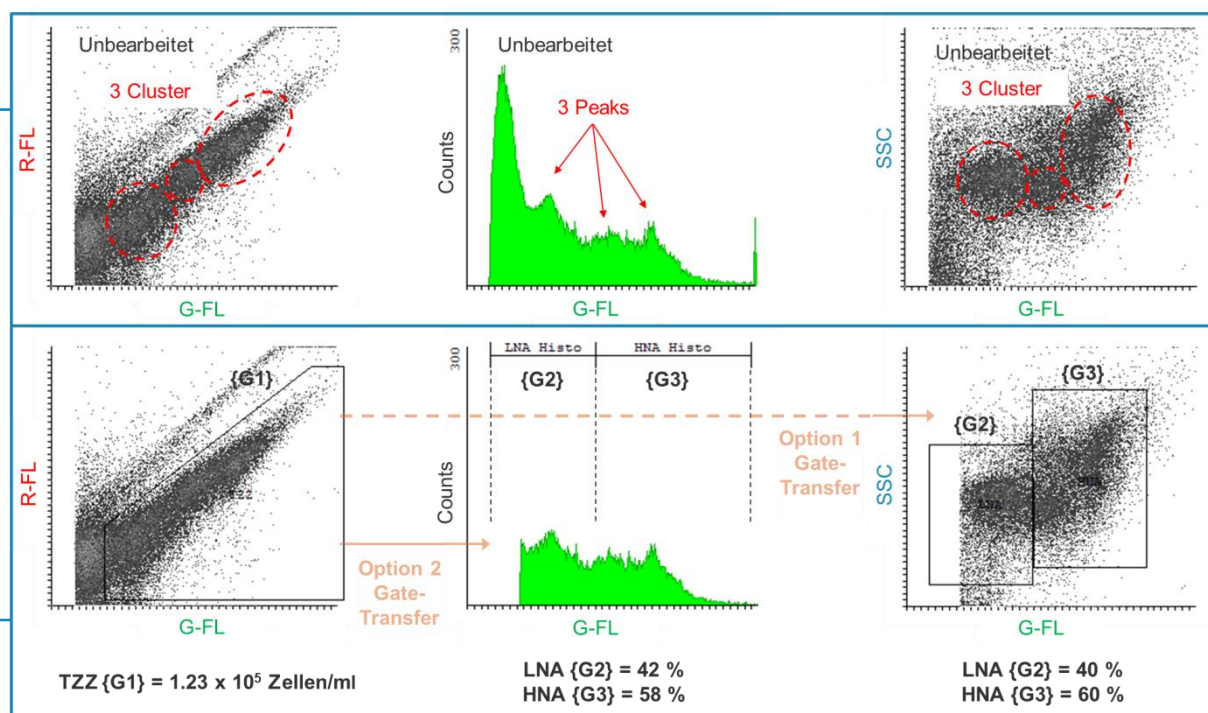


Abb. 14: Probe mit drei Zellclustern; einer im Bereich der LNA- und zwei im Bereich der HNA-Zellen. Im Grünfluoreszenz-Histogramm sind drei deutliche Peaks auszumachen, die sich nach Ausblendung der Hintergrundsignale klar abzeichnen. Die hier dargestellte Probe wurde ohne vorherige Verdünnung analysiert.

„Wohlgenährte“, sehr grosse HNA-Zellen, wie in Abbildung 15 dargestellt, sind während durchflusszytometrischer Analysen nicht so häufig anzutreffen. Die Probe entstammt der Untersuchung einer Kunststoffleitung. Die aus der Leitung migrierenden Kohlenstoffverbindungen bildeten die Grundlage für den vorliegenden üppigen Aufwuchs



grosser HNA-Zellen. Die Grössensignale der Cluster (G-FL/SSC) sind trotz optimal gewählter Settings kaum noch darstellbar und liegen deutlich im oberen Bildbereich. Auch steht bei einer TZZ von 1.51×10^6 Zellen/ml ein geringer LNA-Anteil von 9 % einem HNA-Anteil von 91 % gegenüber. Für die Ermittlung des LNA/HNA-Anteils ist hier das G-FL Histogramm entscheidend (Option 2), da sich im Density Plot G-FL/SSC nur ein Bruchteil der Signale erfassen liesse.

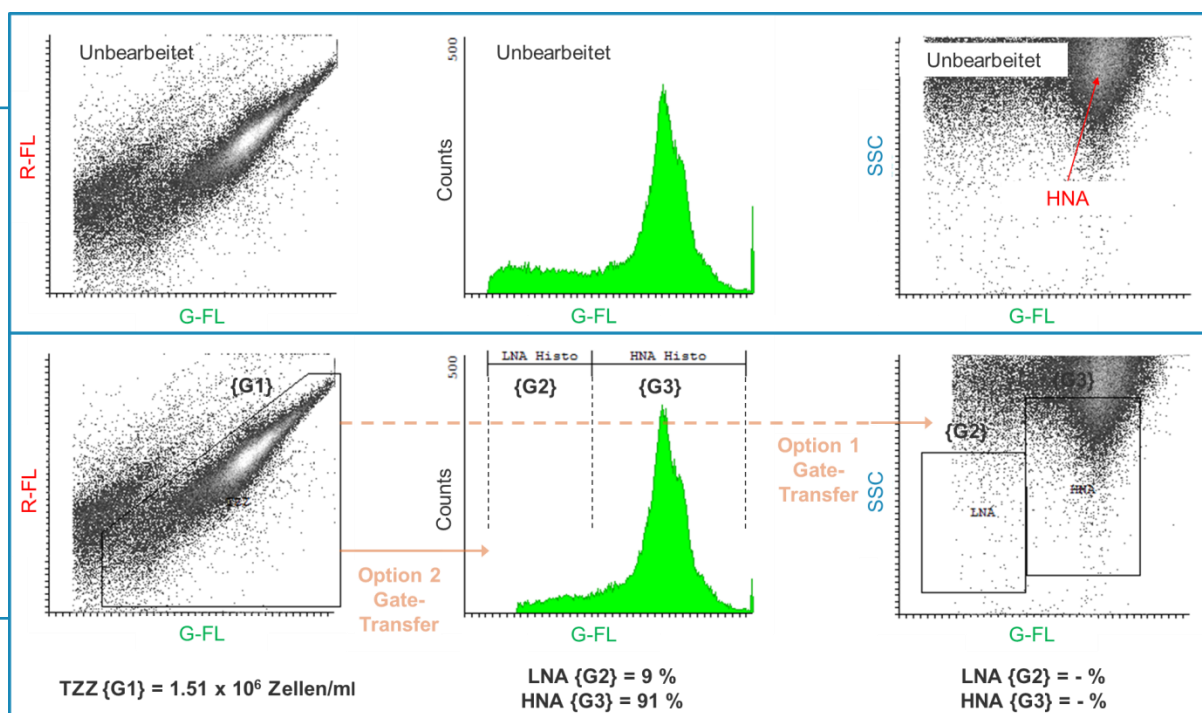


Abb. 15: Fast ausschliesslich (91 %) HNA-Zellen in beachtlicher Grösse, wie aus der Lage der Clustersignale im Density Plot G-FL/SSC ersichtlich. Hier erfolgt die Bestimmung der LNA/HNA über das Histogramm der Grünfluoreszenz, also mittels Anwendung von Option 2 des Gate-Transfers. Option 1 liesse sich nur durchführen, wenn die Settings abgeändert würden. Das ist allerdings, wie bereits beschrieben, zu vermeiden. Die dargestellte Probe wurde vor der Messung im Verhältnis 1:100 verdünnt.

Eine hohe Zellzahl und nicht minder beeindruckende Hintergrundsignale sind die Besonderheit der in *Abbildung 16* gezeigten Beispielprobe. Die Probe entstammt einem Oberflächenwasser nach einem Regenereignis und ist in dieser Ausprägung relativ häufig anzutreffen. Natürlich wäre es auch hier möglich, die Probe weiter zu verdünnen (Probe wurde vor der Messung bereits im Verhältnis 1:100 verdünnt). Jede weitere Probenverdünnung würde aber sowohl die Signale des Hintergrunds, als auch die Zellsignale betreffen, was ab einem gewissen Verdünnungsgrad nachteilig für das Ergebnis der Messung sein kann. Eine weitere Verdünnung der Probe würde zur Unterschreitung der Detektionsgrenze (siehe *Methode 333* des SLMB) von 10^3 Zellen/ml führen.

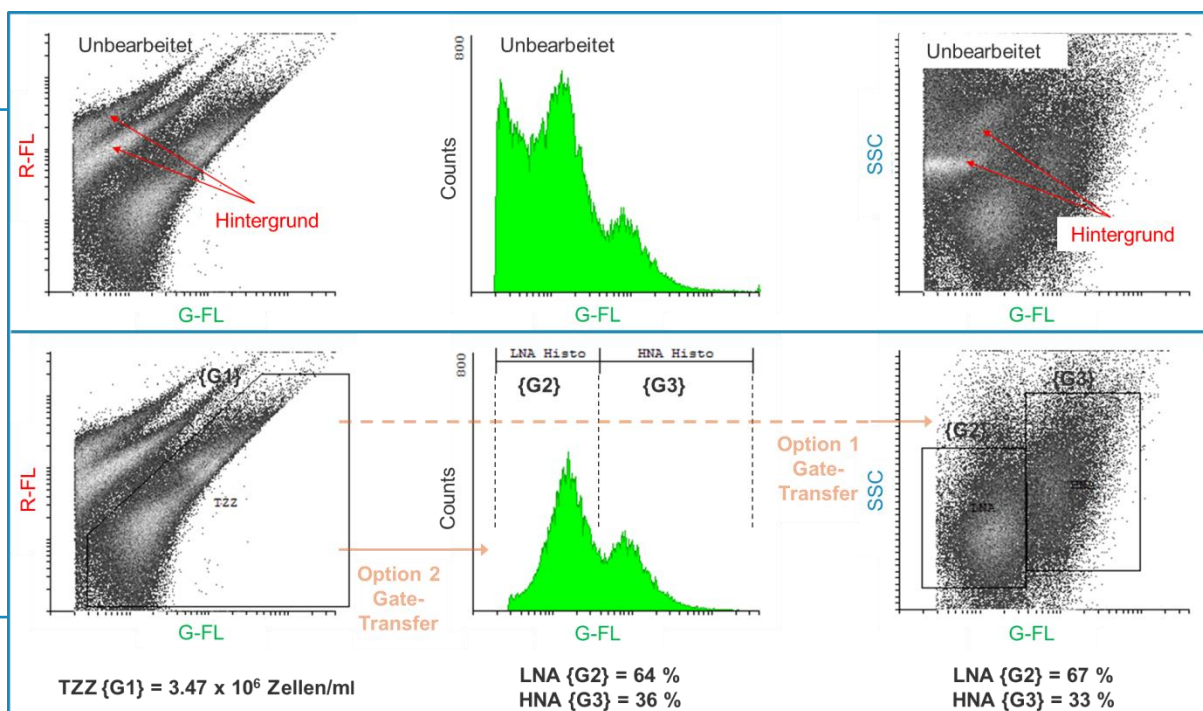


Abb. 16: Probe mit hoher Zellzahl und starken Hintergrundsignalen. Die Probe wurde vor der Analyse im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die zur Ermittlung der LNA/HNA-Zahlen nötigen Gate-Transferoptionen 1 und 2 sind durch die entsprechenden Pfeile farbig gekennzeichnet.

Die folgende Probe, *Abbildung 17*, stellt einen weiteren besonderen Fall dar. Die Signale des Hintergrunds und die Zellsignale gehen scheinbar ineinander über und lassen kaum eine Abgrenzung voneinander erkennen. Proben dieser Art sind eher die Ausnahme. Im Falle einer solchen Probe sind zwei Dinge von Bedeutung: Grundsätzlich ist eine ungefähre Zellzahl besser als keine Zellzahl. Auch wenn die Unterscheidung zwischen Zellcluster und Hintergrund in diesem Fall schwerfällt, so lassen sich sowohl die TZZ, als auch das Verhältnis der LNA/HNA-Zellen mithilfe des unter Punkt 3.1 beschriebenen Vorgehens (Gating im G-FL/R-FL Density Plot; Transfer der Gates entsprechend *Option 1* oder *Option 2*, prozentuale Berechnung der LNA/HNA-Anteile) bestimmen.

Ausserdem ist es in diesem Fall sehr hilfreich, die Darstellungen der Signale genau zu betrachten und in ihnen nach Ansatzpunkten zu suchen. So liegen zum Beispiel die Signale des Hintergrunds im G-FL/SSC Density Plot meist anders, da es sich hierbei um grössen- und nicht um fluoreszenzabhängige Signale handelt.

Abbildung 17 zeigt beispielhaft zwei vergrößerte Ausschnitte der beiden Density Plots. Die vergrößerte Ansicht des G-FL/SSC Plots lässt erkennen, wo die Trennung zwischen Hintergrund- und Zellsignalen verläuft.

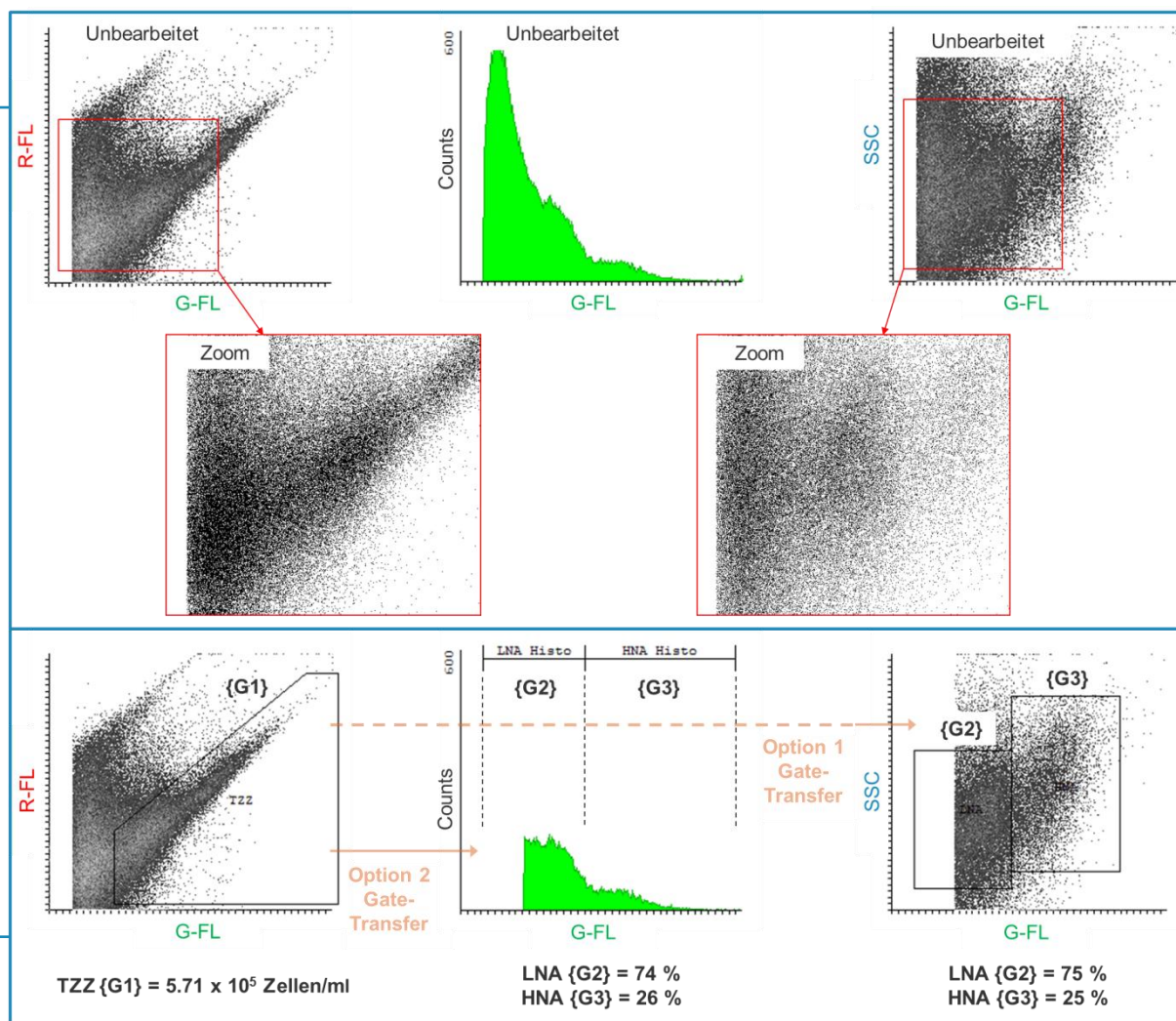


Abb. 17 Eine Wasserprobe ohne ersichtliche Abgrenzung zwischen den Zellsignalen und dem Hintergrund (vergrößerter G-FL/R-FL Ausschnitt). In der Vergrößerung des Density Plots G-FL/SSC, der die Grössensignale abbildet, wird die Abgrenzung ersichtlich. Das Gate {G1} erfasst hier nicht alle Zellen, doch eine Probe mit einer ungefähren Zellzahl ist einer vorschnell zur „nicht analysierbar“ erklärten Probe vorzuziehen.

5. Probennahme und Probenstabilität

Natürlich gilt auch für Proben, die durchflusszytometrisch analysiert werden sollen: Die beste Probe ist eine frische Probe. Die Analyse sollte also möglichst unmittelbar nach Probennahme stattfinden. Hierbei sind jedoch einige Punkte zu beachten. Als Gefässe für die Aufbewahrung und den Transport der Wasserproben ist Glasware ideal, die zuvor bei 500°C für drei Stunden ausgebrannt wurde. Das Ausbrennen der Gefässe verhindert die Kontamination der Proben durch organische Kohlenstoffverbindungen, die andernfalls die Nährstoffgrundlage für ein ungewolltes Zellwachstum bilden würden. Zum Verschliessen der Probengefässe sollten



entweder Glasschliffkappen oder Kunststoffverschlüsse mit Teflondichtungen verwendet werden. Die Teflondichtungen sind, wie die Glasware auch, inert. Sie verhindern die mögliche Migration organischer Kohlenstoffverbindungen aus dem Kunststoff des Verschlusses in die Wasserprobe hinein. Deshalb sind Probengefäße aus Glas, Glasverschlüsse oder Kunststoffverschlüsse mit Teflondichtungen auch für Wasserproben zu verwenden, die einer TOC/DOC-Analyse unterzogen werden sollen. Eine Probennahme unter sterilen Bedingungen ist für die Durchführung der *DZ-Methode 333* nicht erforderlich, da es sich nicht um ein spezifisches Nachweisverfahren für Hygiene-Indikatorkeime handelt.

Wasserproben sind stets gekühlt zu transportieren. Auch die Lagerung einer unbehandelten Probe über 48 Stunden stellt für die anschließende Ermittlung der TZZ und des LNA/HNA-Verhältnisses kein Problem dar, solange die Proben in den oben beschriebenen, geeigneten Gefäßen und bei Temperaturen von 4°C – 8°C aufbewahrt werden. Sind die Gefäße nicht optimal gereinigt und wird gar die Kühlkette für längere Zeit unterbrochen, ergeben sich gravierende Änderungen im Probenbild. In *Abbildung 18* ist eine Wasserprobe in zwei verschiedenen Stadien (*Probe A* u. *Probe B*) dargestellt. *Probe A* zeigt den Zustand der Probe direkt nach Probennahme, also „frisch“. *Probe B* bildet hingegen den Zustand der Probe nach einer Lagerzeit von 72 Stunden ab.

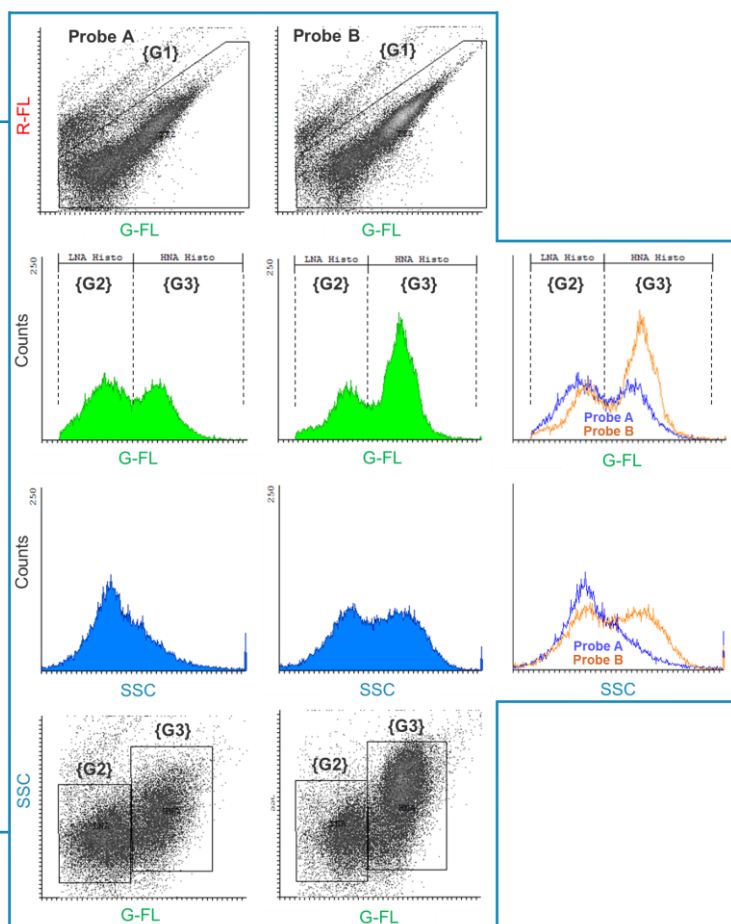


Abb. 18: Eine Wasserprobe in zwei verschiedenen Stadien. *Probe A* zeigt den Zustand der Probe direkt nach der Entnahme. *Probe B* bildet die Veränderungen der TZZ und des LNA/HNA-Verhältnisses nach einer 72-stündigen Lagerung und einer Unterbrechung der Kühlung ab. Die Totalzellzahl in *Probe B* nahm um 27 % zu, das LNA/HNA-Verhältnis verschob sich deutlich zugunsten des HNA-Anteils.



Während dieser Zeit kam es zu einer längeren Unterbrechung der Kühlung. Das Resultat ist eindeutig: die Totalzellzahl in *Probe B* stieg von 6.60×10^4 auf 9.02×10^4 Zellen/ml. Das bedeutet einen Anstieg der TZZ um 27 % im Vergleich zur frischen *Probe A*. Die Unterbrechung der Kühlung wirkte sich auch auf das LNA/HNA-Verhältnis aus. Lag es in der frischen *Probe A* noch bei 53 % LNA und 47 % HNA, wies *Probe B* ein LNA/HNA-Verhältnis von 35 % LNA zu 65 % HNA auf. [18; 20; 21; 22; 23]

5.1. Fixierung von Wasserproben

Im Zuge der Validierung wurden wiederholt Proben an die Teilnehmer des zur Methodenetablierung durchgeführten Workshops versendet. Diese Proben wurden teils mit Glutaraldehyd (siehe *Methode 333* des SLMB, *Punkt 8*, „Validierung“) fixiert. Allerdings stellt diese Art der Probenbehandlung eher eine Notlösung dar. Glutaraldehyd hat zwei aktive Bindungsenden, an denen es mit sich selbst sowie mit den reaktiven Endgruppen von Proteinen reagiert. Es kommt zu Polymerisationen und Kreuzvernetzungen, infolge dessen wird das gesamte Protein-Gel der Zellen fixiert.

Zwar bleibt die Zellzahl in einer mit Glutaraldehyd fixierten Probe stabil, doch kommt es bei zunehmendem Probenalter zu einem verstärkten Hintergrundsignal und einer Änderung des Fingerabdrucks der Probe.

Um die Stabilität der Proben während des Versands an die externen Probanden auch ohne Kühlung zu gewährleisten, erwies sich die Fixierung mit Glutaraldehyd (GA) jedoch als tauglich. Ein Versand unter Kühlung ist der Fixierung allerdings in jedem Fall vorzuziehen und die Fixierung mit GA sollte bei Routineanalysen gänzlich vermieden werden. Denn bei der Verwendung von Glutaraldehyd zur Probenfixierung ist zu beachten, dass sich die derart behandelten Proben nicht unter dem Gesichtspunkt „lebend/tot“, also in Hinblick auf intakte und permeabilisierte Zellmembranen, untersuchen lassen. Auch ist eine Plattierung einer derart fixierten Probe nicht mehr möglich.

Um sicher zu stellen, dass die mit GA fixierten Proben stabil sind und sich durch die Zugabe des GA während des Versands und der Lagerung keine störenden Hintergrundsignale bilden, wurden im Eawag-Labor zur Kontrolle vier Proben in Triplikaten durch zwei Probanden abwechselnd über einen Zeitraum von acht Tagen analysiert. Am *Tag 0* wurden die Proben frisch, ohne Zugabe von GA, analysiert. Danach wurde Glutaraldehyd zur Fixierung zugegeben und die Proben wurden acht Tage lang bei Zimmertemperatur gelagert. Die Analysen fanden an den *Tagen 1, 2, 3, 5, und 8* statt (*Abb. 19*). [27]

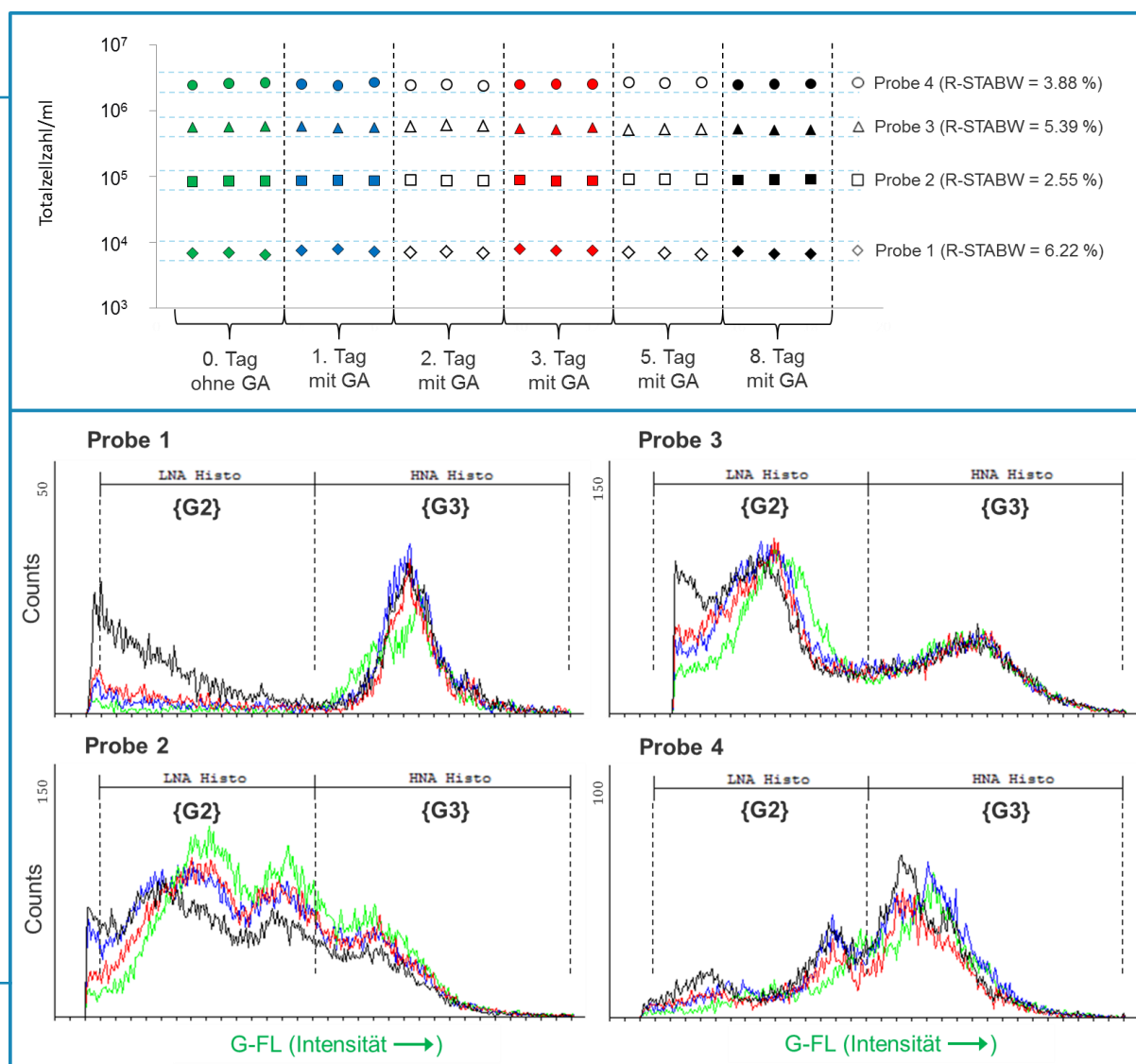


Abb. 19: Vier Proben, gemessen in Triplikaten. *Tag 0* zeigt die Proben im frischen Zustand, die *Tage 1, 2, 3, 5 und 8* die mit GA fixierten, bei Zimmertemperatur gelagerten Proben. Dazu die farblich angepassten G-FL Histogramme des jeweiligen Probenalters (0.Tag=grün, 1.Tag=blau, 3.Tag=rot und 8.Tag=schwarz). Deutlich erkennbar: der Fingerabdruck (LNA/HNA) und der Hintergrund haben sich nach acht Tagen deutlich verändert (schwarze Kurven). Ohne GA ist die Signalintensität G-FL am höchsten (grüne Kurven). R-STABW = relative Standardabweichung



6. Beispiele aus der Realität

Die DZ-Methode ist in Hinblick auf ihren Einsatz im Wasserbereich eine relativ junge Methode. Nur durch routinierte Anwendung der Methode wird es möglich sein, mehr Erkenntnisse bezüglich des Verhaltens der Mikrobiologie im Bereich Wasser zu generieren und damit die Aussagekraft der Ergebnisse zu steigern. Die DZ-Analyse der TZZ, der LNA- und HNA-Zahlen und der Zahlen intakter und permeabilisierter Zellen, ist grundsätzlich als Screening-Methode zu verstehen. In der Realität trifft man auf eine Vielzahl unterschiedlicher Wassertypen und ebenso gross sind die Unterschiede der DZ-Resultate. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, Grenzwerte für den Parameter TZZ zu etablieren. Vielmehr bietet sich bei der Anwendung der DZ die Referenzwertmethode an. Jedes wasserführendes System kann zeitlich oder örtlich definiert werden. Auf diese Weise können die Resultate von Systemen mit einem bekannten, konstanten Ausgangspunkt, wie z.B. einer Grundwasserpumpstation, über längere Zeiträume verglichen werden, um Informationen zur Stabilität der Zellzahl des jeweiligen Wassers zu erhalten. Für technische Systeme, wie z.B. die Probenpunkte einer Hausinstallation, können die Werte an der Wasseruhr (Schnittstelle zur Versorgungsleitung) mit den Werten im und am Ende des Systems verglichen werden, um eventuell vorliegende Störungen innerhalb des Systems zu erkennen. Um das Verhalten der Mikrobiologie in einem wasserführenden System optimal beschreiben zu können, sollten zudem neben der Untersuchung zusätzliche Informationen (z.B. Wassertyp, Netzschutz, Leitungsmaterial, etc.) gesammelt werden. Solche Informationen können bei der Resultatinterpretation sehr hilfreich, eventuell sogar ausschlaggebend sein.

Im Folgenden sollen reale Fallstudien exemplarisch erläutert werden, die eine mögliche Herangehensweise bei der DZ-Analyse von Wassersystemen verdeutlichen. Die ausgewählten Fälle stammen aus drei unterschiedlichen Projekten, spiegeln aber in Kombination den normalen Verlauf von der Trinkwassergewinnung, über die Aufbereitung bis hin zur Verteilung wider (Abb. 20).

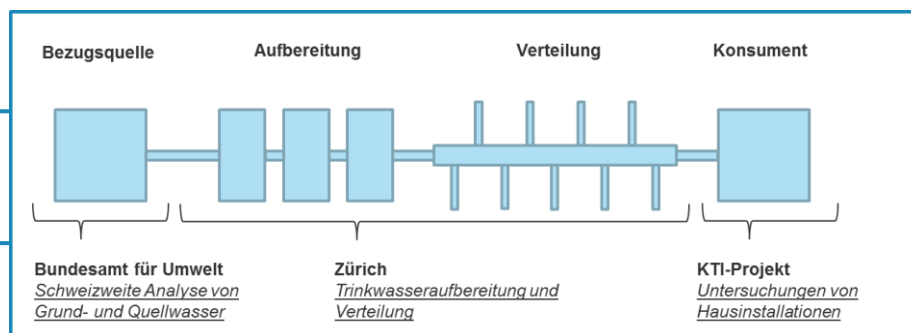


Abb. 20: Schematische Darstellung der ausgewählten Projekte zum Aufzeigen möglicher Herangehensweisen bezüglich der DZ-Analyse von (Trink-)Wasserverteilsystemen.



6.1. Schweizweite Analyse von Grund- und Quellwasser

In der Schweiz wird ein Grossteil des Trinkwassers aus Grund- und Quellwasservorkommen generiert. Um neue Erkenntnisse bezüglich des Zustands des Schweizer Grundwassers zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Umwelt (BAFU) in den Jahren 2009 und 2010 umfangreiche chemische und biologische Studien durchgeführt. Unter anderem kam auch die DZ zur Anwendung, um neue Erkenntnisse basierend auf mikrobiologischen Summenparametern zu erlangen und um zu zeigen, dass die DZ auch im Bereich Grundwasser angewendet werden kann.

Der erste Teil des Projektes umfasste die zweimalige Analyse von 50 Messstellen des Modules „TREND“ des nationalen Grundwasser-Beobachtungs-Netzwerkes (NAQUA). Im zweiten Teil des Projektes wurden zusätzliche Probenstellen des NAQUA Modules „SPEZ“ hinzugefügt und zusammen mit ausgewählten Proben der „TREND“ Messstellen während des Jahres 2010 mehrfach analysiert. Neben der TZZ wurden auch das LNA/HNA-Verhältnis und das Verhältnis intakter/permeabilisierter Zellen in den unterschiedlichen Wasserproben bestimmt. Als Beispiel sind hier nur die Resultate einer Messserie aufgeführt (*Abb. 21 und 22*). Die zweite Probenserie umfasste etwa die gleiche Anzahl an Proben und ergab ähnliche Resultate.

Die Hauptaussage der Studie bezüglich der durchflusszytometrischen Daten ist, dass die TZZ von unbehandelten Grund- und Quellwasser in der Regel im Bereich von 10^3 bis 10^4 Zellen/ml liegt. Das ermittelte LNA/HNA-Verhältnis, gemittelt über alle Proben der Studie, beträgt 65/35 % und der Anteil der intakten Zellen lag im Mittel bei 93 %. Obwohl die Probennahmen zeitlich weit auseinander lagen und zu unterschiedlichen Jahreszeiten stattfanden (Herbst 2009 und Frühling 2010), wiesen die meisten Grund- und Quellwässer zum Grossteil eine beachtenswerte mikrobiologische Stabilität auf. Auch wurden im Rahmen der Studie zu allen durchflusszytometrisch analysierten Proben AMK-Werte produziert. Im Direktvergleich Totalzellzahlen zu keimbildenden Einheiten (KBE) konnten aus 172 unterschiedlichen Grund- und Quellwasserproben 0.12 % der Zellen mit dem AMK-Verfahren kultiviert und damit gezählt werden. Der Korrelationskoeffizient fällt im direkten Methodenvergleich mit $R^2 = 0.22$ sehr gering aus.

In der *Abbildung 21* sticht die Probe „NTG07“ mit starken Schwankungen bezüglich der Zellzahlen, als auch mit starken Schwankungen im Bereich des LNA/HNA-Verhältnisses heraus. Dieser Effekt könnte z.B. durch ein Regenereignis hervorgerufen worden sein oder durch den Einfluss der Jahreszeiten. Andere Proben hingegen, wie z.B. „NTG12“ und „NTG34“, weisen zu beiden Analysezeitpunkten zwar deutlich höhere Zellzahlen als die restlichen Proben auf, jedoch zeigen sich keine Auffälligkeiten mit Blick auf das LNA/HNA-Verhältnis dieser Proben.

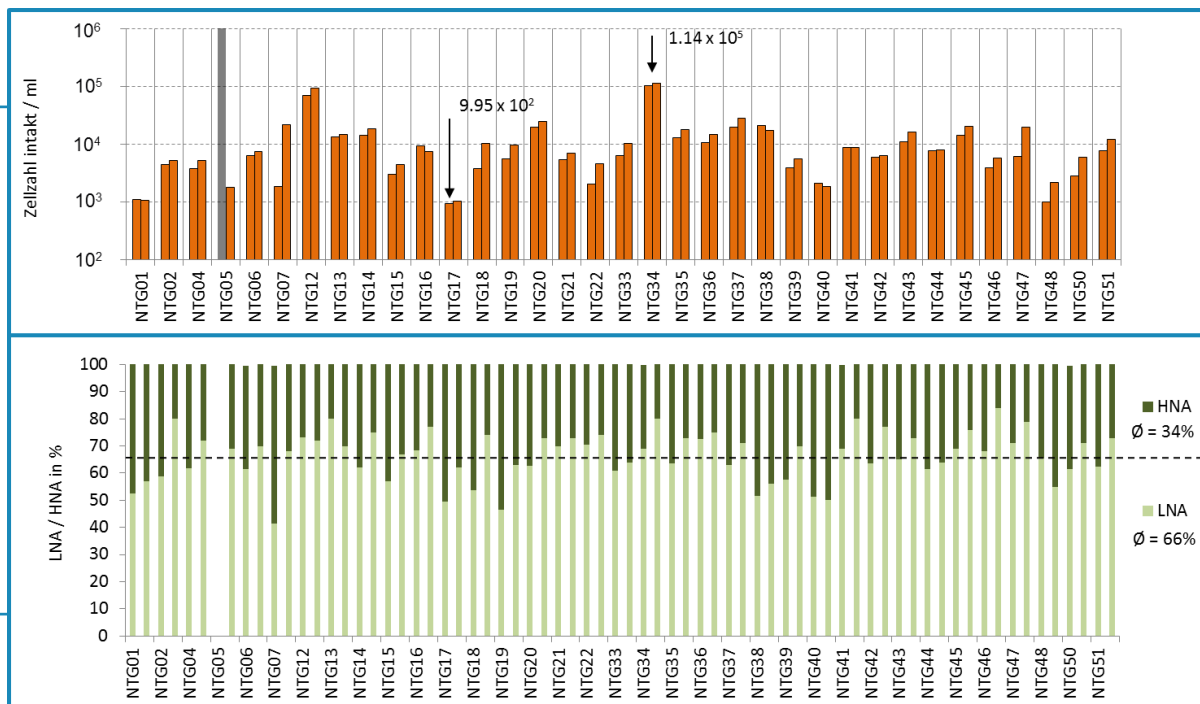


Abb. 21: Gesamtübersicht über die mit DZ gemessenen Zellzahlen (intakt) und die dazugehörigen LNA/HNA-Verhältnisse von unterschiedlichen Grundwasserleitern, gemessen 2009 und 2010. Der graue Balken im oberen Graphen dient als Platzhalter für die Probe NTG05, die in der ersten Probenrunde nicht analysiert wurde. Jeweils die niedrigsten und die höchsten Werte einer Probenstelle sind numerisch aufgeführt.

Um eine klare Aussage über die mikrobiologische Stabilität eines Grund- oder Quellwassers treffen zu können, muss der jeweilige Wasserleiter in Zeitintervallen über das ganze Jahr beprobt werden. In *Abbildung 22* sind sieben ausgewählte Grundwasserleiter aufgeführt, die bis zu fünfmal innerhalb eines Jahres analysiert wurden. Während der Grossteil der beprobten Grundwasserleiter über das ganze Jahr hin weitestgehend mikrobiologisch stabil blieb, weist die Probe „TGG15“ starke Fluktuationen bezüglich der Zellzahlen und des LNA/HNA-Verhältnisses auf. Es kam aber auch vor, dass das LNA/HNA-Verhältnis einer Probe fluktuierte, ohne dass eine Zu- oder Abnahme der Zellzahlen erkennbar war (Beispiel „BSG04“).

Der Anteil der intakten Zellen betrug in allen Quell- und Grundwasserproben der Studie $\geq 90\%$ (*Abb. 23*). Dieser hohe Anteil von Zellen mit intakter Zellmembran ist nicht nur typisch für natürliche Wässer. Auch im Bereich Trinkwasser, das ohne Desinfektionsmassnahmen oder Netzschutzmittel aufbereitet wird, ist dieser 90 % Anteil typisch.

Grundsätzlich bietet es sich immer an, eine Wasserprobe auch durch weitere Methoden zu untersuchen. Die Zellzahl allein ist ein isolierter Parameter, der nicht auf jede Frage eine Antwort gibt. Wie im Beispiel der *Abbildung 24* bietet es sich an, auch die Resultate anderer Methoden zu kombinieren, um zusätzliche Informationen über das wasserführende System zu erhalten. [28]

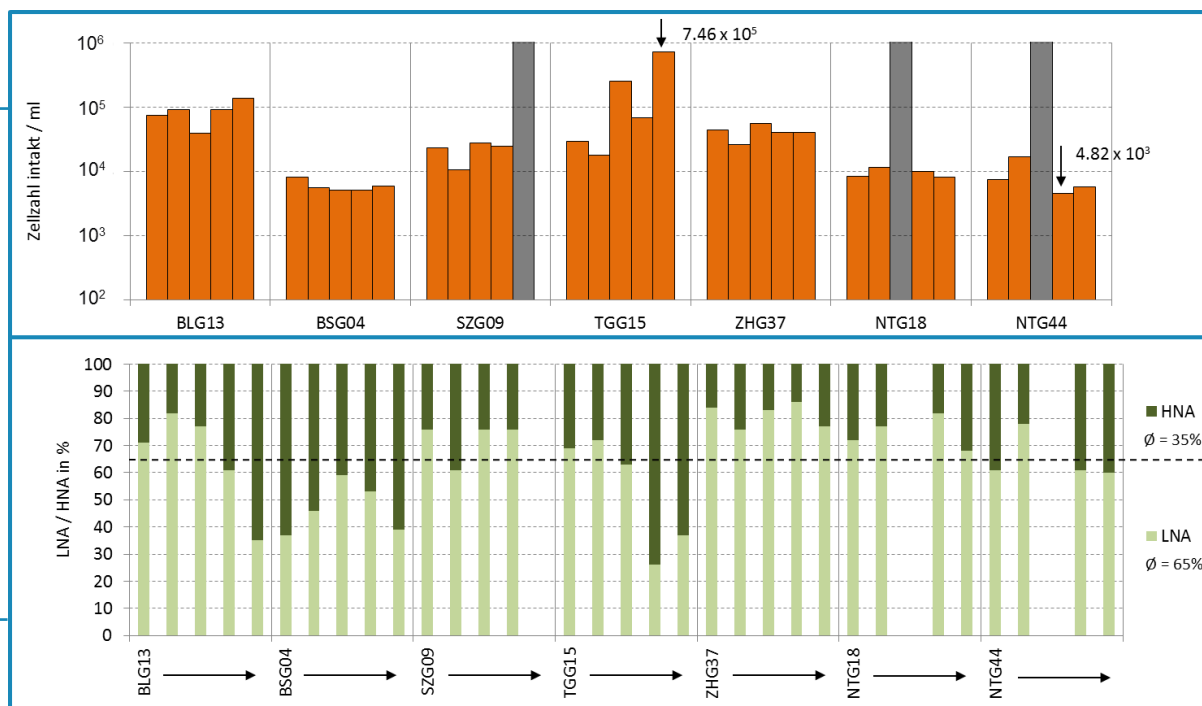


Abb. 22: Gesamtübersicht über die mit DZ gemessenen Zellzahlen (intakt) und die dazugehörigen LNA/HNA-Verhältnisse unterschiedlicher Grundwasserleiter innerhalb eines Jahres. Die grauen Balken im oberen Graphen dienen als Platzhalter für Proben, die nicht analysiert wurden. Jeweils die niedrigsten und die höchsten Werte einer Probenstelle sind numerisch aufgeführt.

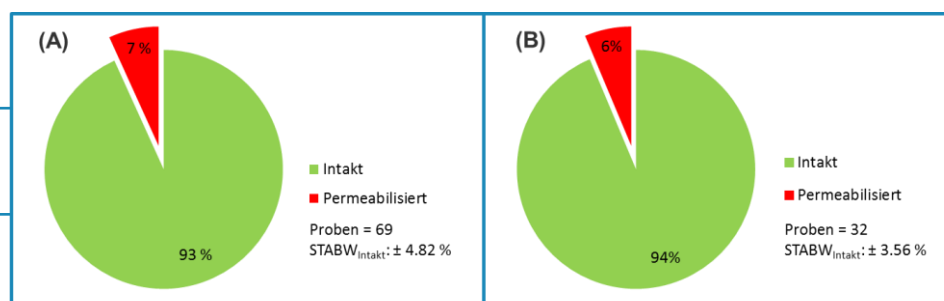


Abb. 23: Die gemittelten Anteile intakter und permeabilisierter Zellen der Resultatsreihen aus den Abbildungen 21 (A) und 22 (B). Der Anteil der intakten Zellen in den analysierten natürlichen Wasserproben betrug meist $\geq 90\%$. STABW = Standardabweichung

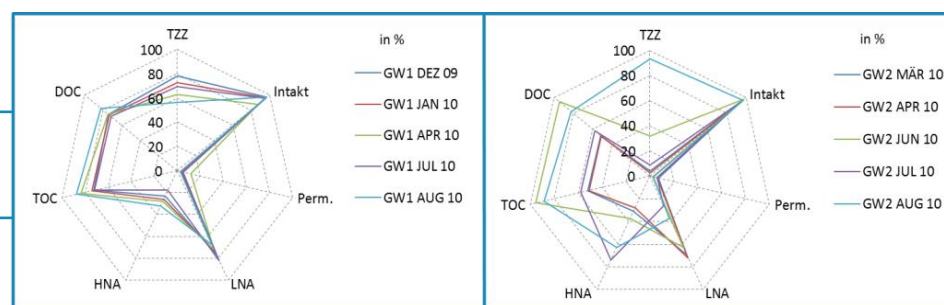


Abb. 24: Zwei unterschiedlich stabile Grundwasserleiter (GW1 und GW2), die über einen längeren Zeitraum regelmässig beprobt und mittels verschiedener Methoden analysiert wurden. Die prozentual aufgetragenen Parameter sind die TZZ, die Anteile intakter und permeabilisierter Zellen (Intakt/Perm.), das LNA/HNA-Verhältnis, der TOC und der DOC.



6.2. Trinkwasseraufbereitung

Am Beispiel der Trinkwasseraufbereitungsanlage Lengg/Zürich soll gezeigt werden, wie ein System zur Trinkwasseraufbereitung und -verteilung mittels der durchflussszytometrischen Analyse beschrieben werden kann (Abb. 25). In der Anlage Lengg wird Seewasser zu Trinkwasser aufbereitet. Das Seewasser, mit einer durchschnittlichen TZZ von 1.2×10^6 Zellen/ml und einer DOC-Konzentration von 1.3 mg/l durchläuft nacheinander die folgenden Aufbereitungsstufen: 1. Vor-Ozonung, 2. Schnellsandfilter (SSF), 3. Zwischen-Ozonung, 4. Aktivkohlefilter (AKF) und 5. Langsandsandfilter (LSF).

Nach der Vor-Ozonung ist die Zellzahl stark reduziert (TZZ: ca. 1.0×10^3 Zellen/ml), da die Zellen durch die Ozonung abgetötet werden und lysieren (zerfallen). Lysierte Zellen werden durch die DZ nur noch in Form eines erhöhten Hintergrundsignals erfasst, da die Zellen ihre Partikelstruktur verlieren und deshalb keine eindeutigen Signale mehr liefern. Der DOC-Gehalt von 1.3 mg/l ändert sich während der bzw. durch die Ozonung nicht. Durch die Oxidationsprozesse der Ozonung erhöht sich jedoch der Anteil der biologisch verfügbaren organischen Kohlenstoffverbindungen (AOC).

Nach dem das ozonierte Wasser die Stufe des SSF durchlaufen hat, erhöht sich die Zellzahl deutlich (TZZ: ca. 2.5×10^5 Zellen/ml). Der DOC-Gehalt hingegen nimmt um 0.2 mg/l ab. Grund dafür ist die Ansiedlung von Mikroorganismen (Biofilmbildung) auf der Oberfläche der Sandkörner des SSF. Diese Mikroorganismen setzen einen Grossteil des DOC des vorbeifliessenden Wassers in Biomasse um und durch Ablöseprozesse des Biofilms gelangen neue Zellen in das zuvor desinfizierte Wasser.

Im Anschluss erfolgt eine erneute Ozonung des Wassers, wodurch die Zellzahlen wiederum signifikant abnehmen (TZZ: ca. 1.0×10^3 Zellen/ml) und die DOC-Konzentration stabil bleibt.

Nach der Stufe des AKF nimmt der DOC-Gehalt weiter ab und sinkt auf 0.9 mg/l. Die Zellzahl erhöht sich wieder, liegt aber mit ca. 9.0×10^4 Zellen/ml 100-fach unter der TZZ des Rohwassers. Im AKF findet ein ähnlicher Prozess wie im SSF statt. Mit dem Unterschied, dass auch chemische Verbindungen, die nicht biologisch abbaubar sind, von der Aktivkohle absorbiert werden.

Im letzten Schritt, dem LSF, erfolgt die endgültige biologische Stabilisierung des Wassers. Im Vergleich zu SSF und AKF besitzt der LSF eine weit grössere Oberfläche, bedingt durch die Korngrösse des eingesetzten Sandes und das Volumen des Filters. Der LSF sorgt dafür, dass im Wasser ein natürliches mikrobiologisches Konsortium mit einer TZZ von ca. 1.0×10^5 Zellen/ml aufwächst, das während der Verteilung im Netzwerk, gemeinsam mit einer DOC-Konzentration von 0.8 mg/l, die biologische Stabilität gewährleistet. Dadurch bleiben Zellzahl und mikrobiologischer Fingerabdruck selbst nach 48 Stunden Verweilzeit im Verteilnetz stabil. [21]

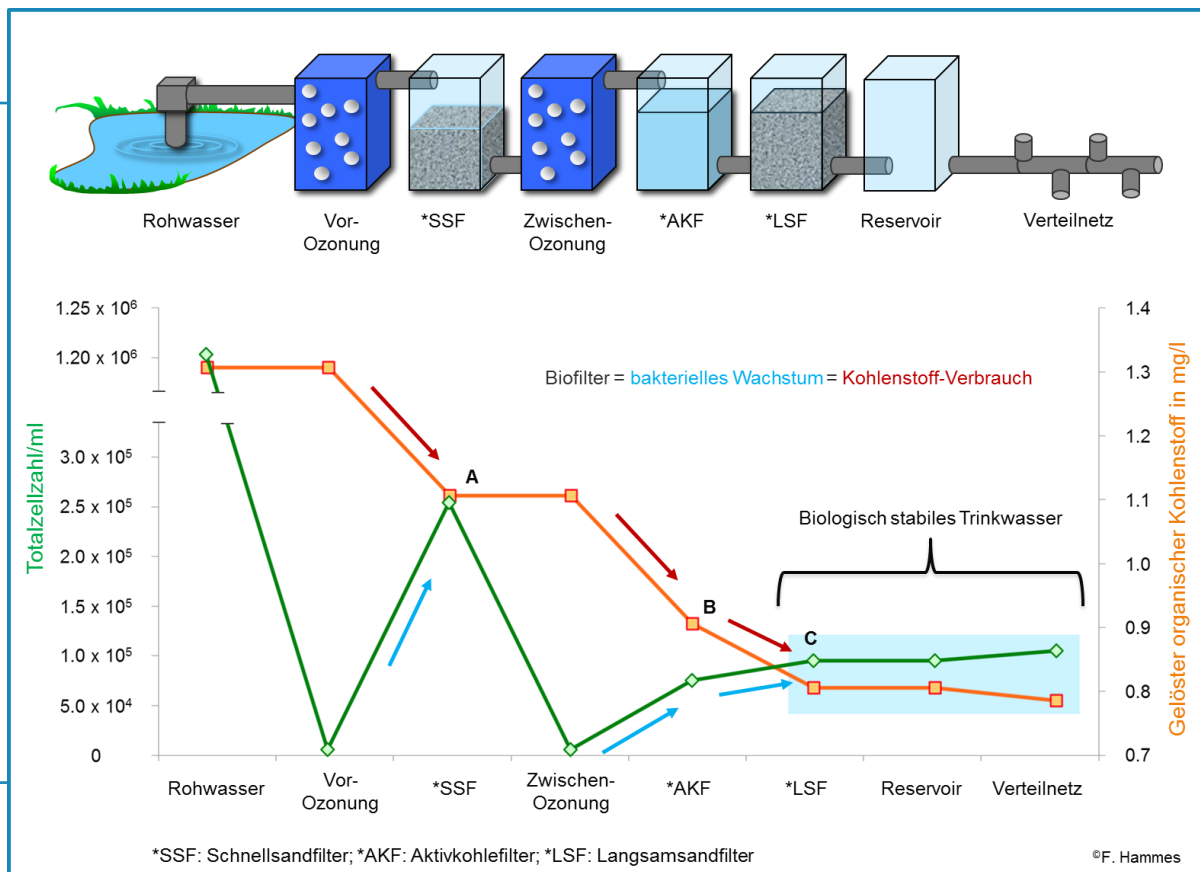


Abb. 25: Schematische Darstellung des Aufbaus der Wasseraufbereitung Lengg, Zürich und des Verhaltens der Parameter TZZ und DOC nach den jeweiligen Aufbereitungsstufen und im Verteilnetz. Die biologische Stabilisierung des Wassers erfolgt durch die drei Biofilter (A: SSF, B: AKF und C: LSF) des Aufbereitungssystems. Folgt man dem Verlauf des DOC-Gehalts und dem Verlauf der Zellzahlen durch die einzelnen Stufen der Aufbereitung, wird deutlich, dass der DOC-Gehalt bei der Passage der unterschiedlichen Biofilter reduziert wird und sich gleichzeitig die Zellzahlen bis zum letzten Aufbereitungsschritt stabilisieren. Im Reservoir und im Netzwerk bleiben dann die Zellzahlen und der DOC-Gehalt weitestgehend stabil.

Aktuell existiert in der Trinkwasseraufbereitung eine Vielzahl an Aufbereitungsschritten in unterschiedlicher Kombination. Die letzte Stufe einer Trinkwasseraufbereitung können auch Desinfektionsverfahren, wie z.B. Filtration, Chlorung oder Bestrahlung durch ultraviolettes Licht (UV-C) bilden. In *Abbildung 26* ist das aus unterschiedlichen Verfahren resultierende Verhalten der Zahl intakter Zellen bei steigender Verweilzeit im Verteilnetz schematisch aufgeführt. Dabei wird deutlich, dass Wasser im Verteilnetz nicht steril ist und die Thematik der biologischen Stabilität bei jeder Trinkwasseraufbereitung und -verteilung eine wichtige Rolle spielt.

Geringe Zellzahl-Fluktuationen in Verteilnetzen sind normal, jedoch ist es schwierig, direkte Faktoren oder gar Grenzwerte festzulegen. Die durchflusszytometrische Analyse der TZZ oder der Zahl intakter Zellen ist indirekt hygienisch relevant, denn im Zug einer starken Zunahme der Zellzahlen erhöht sich gleichzeitig auch das Risiko, dass sich mithin auch pathogene Mikroorganismen im System etablieren könnten.

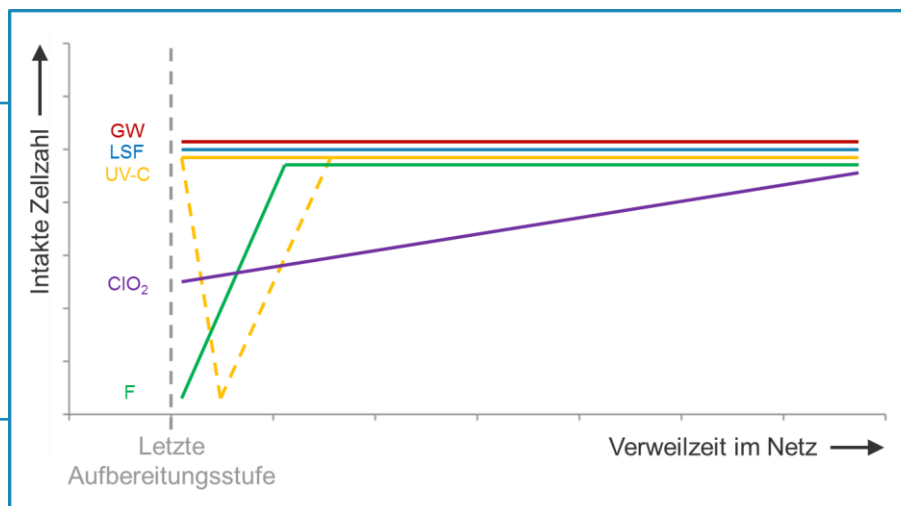


Abb. 26: Idealisierte Darstellung zum Verhalten der Zahl intakter Zellen bei unterschiedlichen finalen Aufbereitungsstufen und Verweilzeiten in einem intakten und gut gepflegten Verteilnetz. Wird das Trinkwasser direkt aus einem stabilen Grundwasserleiter (Rot: GW) gewonnen und verteilt, bleiben die Zellzahlen konstant. Der gleiche Effekt tritt ein, wenn die letzte Aufbereitungsstufe der Trinkwasseraufbereitung beispielsweise ein Langsandsandfilter (Blau: LSF) ist. Wird das Wasser im letzten Aufbereitungsschritt mittels ultraviolettem Licht (Gelb: UV-C) behandelt, wird ein Grossteil der Zellen irreversibel geschädigt/abgetötet. Die spezielle Zellschädigung durch die UV-C Behandlung kann allerdings mit den derzeit verfügbaren durchflusszytometrischen Verfahren nicht direkt erfasst werden, weshalb sich die Zellzahlen scheinbar nicht verändern und stabil bleiben. Der theoretische Zellzahlverlauf (gelb gestrichelt) hingegen zeigt, dass die UV-C-Behandlung die Zellen zunächst irreversibel schädigt/abtötet. Diese sind u.U. noch biochemisch aktiv, jedoch nicht mehr zur Teilung fähig. Mit steigender Verweilzeit werden aber die abgetöteten Zellen von den im Verteilsystem lebenden Zellen ersetzt. Wird dem Trinkwasser ein Netzschutz zugegeben (z.B. Violett: Chlordioxid, ClO_2), so verringert sich in Abhängigkeit zur ClO_2 -Konzentration (in der Schweiz: $0,05 \text{ mg}_{\text{Chlor aktiv}}/\text{kg}_{\text{Wasser}}$) zunächst die Zahl der intakten Zellen um etwa 50 % – 60 %, nimmt dann aber mit steigender Verweilzeit wieder zu, da der Netzschutz an Wirkung verliert. Wird in der letzten Stufe ein Filtrationsschritt angewendet (Grün: F), so wird das gesamte bakterielle Konsortium entfernt. Im Anschluss findet ein Wiederaufwuchs eines neuen bakteriellen Konsortiums statt, das sich nach einer gewissen Verweilzeit wieder stabilisiert.

Allerding steht nach wie vor die Frage nach Grenzwerten im Raum; beziehungsweise danach, wie eine „starke Zunahme“ der Zellzahlen, verursacht durch etwaige Störungen, definiert wird. Ein „Faktor X“ allein reicht dafür nicht aus.

Zur Verdeutlichung: die Verdopplung der Zellzahlen auf 2.0×10^5 Zellen/ml in einem Verteilsystem mit ursprünglich 1.0×10^5 Zellen/ml ist in jedem Fall kritischer zu betrachten, als die Verdopplung der Zellzahlen in einem Verteilsystem, in dem die Zellzahlen von 3.0×10^3 Zellen/ml auf 6.0×10^3 Zellen/ml anwachsen. Eine Verdopplung von 1.0×10^5 Zellen/ml auf 2.0×10^5 Zellen/ml setzt, aufgrund der bereits ursprünglich höheren Anzahl an Mikroorganismen, eine massivere Störung voraus, die, z.B. durch zusätzlichen Nährstoffeintrag ins System, zu diesem Aufwuchs führt.



Für weiterführende Erkenntnisse bezüglich des Verhaltens der Zellzahlen in Verteilnetzen und den damit verbundenen, wachsenden Interpretationsmöglichkeiten müssen sowohl die Forschung, als auch die Routineanwendungen vertieft, erweitert und verfeinert werden. Selbst die Analyse des gesamten organischen Kohlenstoffes (TOC) – ein normierter Summenparameter, der seit Jahren fester Bestandteil in der Wasseranalytik ist – muss bisher ohne Grenz- oder Richtwerte auskommen. Vielmehr beruht die Resultatauswertung hier auf Erfahrungen. [14; 19; 21; 26; 28; 29; 30; 31]

6.3. Analyse von Trinkwasserverteilsystemen in Gebäuden

Während Trinkwasser durch gut gepflegte kommunale Hauptverteilsysteme meist ohne Qualitätsverluste über weite Strecken hinweg transportiert werden kann, kommt es im Bereich der Hausinstallationen deutlich häufiger zu mikrobiologischen und chemischen Qualitätsminderungen. Die Ursache dafür liegt in der typischen Kombination aus langen Stagnationszeiten, erhöhten Temperaturen und unterschiedlichen Leitungsmaterialien. Aktuell ist über den Grad der Trinkwasserqualität in gebäude-internen Trinkwasserverteilsystemen aber nur sehr wenig bekannt. Anhand des hier dargestellten Beispiels einer untersuchten Hausinstallation soll verdeutlicht werden, wie sich ein Screening mittels DZ in Kombination mit TOC realisieren und interpretieren lässt.

Das untersuchte Gebäude war ein Neubau mit 13 Wohneinheiten und insgesamt 63 Probenstellen (hier: Wasserhähne). Für die Steigleitungen im Gebäude wurde Chromstahl und für alle Abzweigungen zu den Wohneinheiten zertifizierte Kunststoffleitungen aus Polyethylen strahlenvernetzt (PE-Xc) verwendet.

Das in das Gebäude eingespeiste Wasser ist Grundwasser ohne Netzschutz, also ein mikrobiologisch stabiles Wasser. Der TOC-Gehalt betrug 0.5 mg/l, die TZZ lag bei 8.0×10^3 Zellen/ml und das LNA/HNA-Verhältnis wurde mit 70/30 % bestimmt. Diese Werte sind für ein natürliches und stabiles Grundwasser typisch.

Für Verteilnetze jeder Art bietet sich die Referenzwertstrategie an. Hierbei wird die Qualität des Wassers am Eingang des jeweiligen Systems mit Werten innerhalb des Systems verglichen.

Da das Gebäude zum Zeitpunkt der Analyse noch unbewohnt war, konnte eine ideale Beprobungsstrategie angewendet werden, die es ermöglichte, definierte Stagnations- und Spülzeiten einzuhalten. Zuerst wurden alle Probenpunkte für zehn Minuten gespült, danach ruhte das System. Das Wasser in der Hausinstallation stagnierte über Nacht für ca. 15 Stunden.



Am Morgen des darauffolgenden Tages wurde die erste Probenrunde durchgeführt, gefolgt von einer erneuten zehnminütigen Spülung des gesamten Systems und einer erneuten Beprobung.

Im Vergleich der Werte innerhalb der Hausinstallation mit denen des Netzwassers zeigten sich teils gravierende mikrobiologische Veränderungen. So kam es bezüglich der TZZ in den Stagnationswässern zu einem zehn- bis 100-fachen Aufwuchs (*Abb. 27*).

Ein Dreifach-Wasserverteiler (Abzweig der Steigleitungsstränge mit Entnahmehähnen) direkt nach der Wasseruhr bildete die jeweils ersten drei Probenpunkte der Probenserien „nach Stagnation“ und „nach Spülung“, wobei die Werte „nach Spülung“ auch als Referenzwerte dienten. In den Diagrammen der *Abbildung 27* sind diese Werte mit „Wasseruhr“ bzw. „Wasseruhr (Ref.)“ gekennzeichnet. Nach der Stagnationsphase über Nacht wies bereits dieser direkt nach der Wasseruhr liegende Leitungsbereich eine starke mikrobiologische Verkeimung auf, für die jedoch keine eindeutigen Gründe gefunden werden konnten. Denn das für die Zuleitungen verwendete Material war Chromstahl (migrationsarm) und auch die Temperaturen im Keller des Gebäudes waren mit 10 °C nicht übermässig hoch. Es ist zu vermuten, dass die grosse Oberfläche des neuen Partikelfilters am Hausanschluss einen Aufwuchs begünstigte. Nach erfolgter Spülung erreichten die Zellzahlen wieder Werte auf Netzniveau.

Interessant sind besonders die Probenpunkte, deren Zellzahlen auch nach erfolgter Spülung nicht auf den Wert des Netzwassers zurückfielen. So lagen die Werte einiger Probenpunkte selbst nach erfolgter Spülung bis zu zehnfach über dem Referenzwert des Netzwassers (in *Abb. 27* durch Pfeile markiert). Interessant sind diese Punkte deshalb, weil hier ersichtlich wird, ob eventuell ein erhöhtes Biofilmwachstum in den betreffenden Leitungsabschnitten vorliegt. Die Zeitspanne zwischen den Schritten Spülung und Beprobung scheint zu kurz, als dass Zellen neu aufwachsen könnten. Die erhöhten Zellzahlen nach Systemspülung könnten daher aus einem Ablöseprozess, bedingt durch übermässigen Biofilmbewuchs, resultieren. Unterstützt wird diese Annahme auch durch die Betrachtung des Gesamtbildes der LNA/HNA-Zahlen über alle Probenpunkte hinweg. Während im Wertebereich „nach Stagnation“ alle Probenpunkte einen stark veränderten mikrobiologischen Fingerabdruck aufwiesen (LNA/HNA: ca. 20/80 %), erreichte der Grossteil der Probenpunkte nach erfolgter Systemspülung wieder annähernd die Werte des Netzwassers (LNA/HNA: 70/30 %). Nur an Probenpunkten, an denen sich nach erfolgter Spülung die TZZ nicht reduzierte, blieb auch das LNA/HNA-Verhältnis unverändert (LNA/HNA: ca. 20/80 %). Erste interne Labortests zeigten, dass in Biofilmen von Wasserverteilleitungen praktisch keine LNA-, sondern beinahe ausschliesslich HNA-Zellen vorkommen. Somit würde die Zellzahl in der planktonischen Phase als eine Art „Indikator“ des Biofilmbewuchses in den Leitungen fungieren und bei der Auffindung von Problemstellen hilfreich sein.

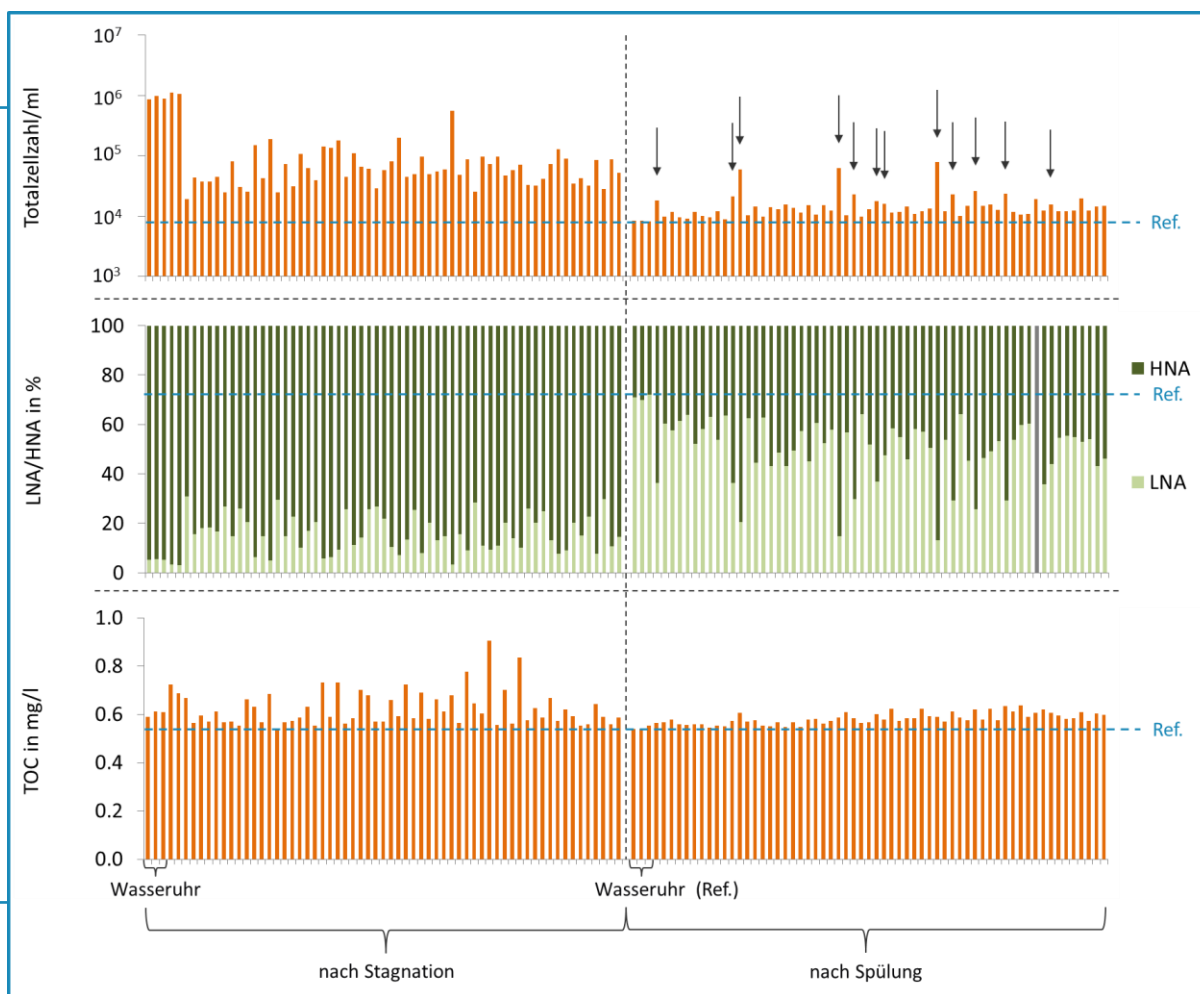


Abb. 27: Jeder Balken repräsentiert einen Probenpunkt der Hausinstallation, jeweils 63 Probenpunkte „nach Stagnation“ und „nach Spülung“. *Diagramm oben:* Übersicht zu den TZZ; links die 63 Werte der TZZ nach 15-stündiger Stagnation, rechts die Werte nach Spülung. Die blaue, gestrichelte Linie zeigt die TZZ des Netzwassers (Referenzwert). Die schwarzen Pfeile markieren die Probenpunkte, deren TZZ trotz Spülung deutlich über dem Referenzwert lagen. *Diagramm Mitte:* Übersicht über die LNA/HNA-Verhältnisse der untersuchten Probenpunkte; links „nach Stagnation“, rechts „nach Spülung“. Die hellgrünen Balken zeigen den Anteil der LNA-Zellen, die dunkelgrünen Balken zeigen den Anteil der HNA-Zellen. Der graue Balken dient als Platzhalter, da dieser Einzelwert nicht ermittelt werden konnte. Die blaue, gestrichelte Linie zeigt das LNA/HNA-Verhältnis im Netzwasser (Referenzwert). *Diagramm unten:* Übersicht der TOC-Werte der 63 Probenpunkte. Die blaue, gestrichelte Linie zeigt die TOC-Konzentration im Netzwasser (Referenzwert).

Bei einer vorliegenden Störung (z.B. Nährstoffeintrag durch Kunststoffleitungen) verändert sich der mikrobiologische Fingerabdruck basierend auf einer starken Zunahme der HNA-Fraktion. Auch während der Untersuchungen anderer Hausinstallationen wurde dieser Effekt beobachtet. In Hinblick auf den TOC-Gehalt des Wassers im System fielen manche Werte nach Stagnation nur geringfügig erhöht aus. Nach Spülung konnten keine erhöhten TOC-Werte mehr beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass die durch Migrationsprozesse aus den Kunststoffen herausgelösten, verwertbaren Substanzen in Biomasse umgesetzt, also bereits abgebaut wurden.



Vorangegangene Labortests bezüglich des Verkeimungspotentials des in der Hausinstallation verwendeten Materialtyps PE-Xc unterstützen diese Aussage.

Probenpunkte, deren TZZ-Werte sich auch nach Spülung nicht reduzieren und ausserdem weiterhin das zugunsten der HNA-Fraktion verschobene, typische LNA/HNA-Verhältnis aufweisen, sollten weitergehend untersucht werden. Hierfür kämen nicht nur die Indikatororganismen *E. coli* und *Enterokokken*, sondern beispielsweise auch Plattierungsverfahren zur Detektion von *Pseudomonas aeruginosa* oder Legionellen in Betracht. Ergeben weiterführende Untersuchungen keinen Hinweis auf das Vorhandensein humanpathogener Mikroorganismen, sollten die betreffenden Probenpunkte mit zeitlichem Abstand zur Kontrolle erneut und wiederholt durchflusszytometrisch untersucht werden. Dadurch liessen sich eventuell auftretende Trends in der Entwicklung der Werte feststellen und aussagekräftig beurteilen. [22; 23; 32; 33]

7. Ausblick

Die Durchflusszytometrie ist seit Jahrzehnten fester Bestandteil der medizinischen Blut- und Keimzellanalytik und kann mittlerweile dank stetig sensitiver werdender Geräte auch im Bereich der mikrobiologischen Wasseranalytik eingesetzt werden. In den vergangenen zehn Jahren hat die Durchflusszytometrie wesentlich zu einem besseren Detailverständnis im Bereich der Wassermikrobiologie beigetragen.

Sie birgt zudem zahlreiche Möglichkeiten für einen weiteren Methodenausbau. Mit der gelungenen Etablierung des Parameters Totalzellzahl eröffnet sich nun auch ein potentieller neuer Markt. So könnten die Hersteller spezielle Geräte und Farbstoffkits entwickeln, die direkt für den Einsatz im Bereich der Wasseranalytik konzipiert sind und die Handhabung der Methode weiter vereinfachen würden. Gerade im Bereich der Routineanalytik würde dies einen wesentlichen Fortschritt darstellen, um die Erkenntnisse aus der Forschung im Bereich der aquatischen Mikrobiologie auch im Alltag nutzbar zu machen.

Ein nächster Schritt, der sich zeitnah realisieren liesse, wäre die Ausweitung des Anwendungsfelds hin zur Standardisierung der Methodik der „Bestimmung der Zahlen intakter und permeabilisierter Zellen mittels Durchflusszytometrie“.

Die DZ allein ist jedoch nicht die universelle Methode, die das Verhalten der Mikrobiologie in einem Wasser allumfassend interpretieren könnte. Die Kombination unterschiedlicher Verfahren und Wege ist nach wie vor der Schlüssel zu einem besseren Verständnis aller Facetten dieser komplexen Thematik.



So könnte zeitnah etwa die vielversprechende Adenosintriphosphat (ATP)-Methode automatisiert und standardisiert werden, wobei an ihrer Automatisierung bereits intensiv gearbeitet wird. Die Bestimmung des freien und totalen ATP und des daraus resultierenden zellulären ATP bietet sich gerade im Bereich der Trinkwasserdesinfektion als ideale Partnermethode für die DZ-Analyse an.

Auch wird bereits an der Entwicklung automatisierter DZ-Geräte gearbeitet, die es ermöglichen, die DZ-Methode für regelmässige Online-Messungen innerhalb der Prozessüberwachung der Trinkwasseraufbereitung einzusetzen. Im Bereich der Forschung wird zudem bereits eine Form der Echtzeit-Durchflusszytometrie eingesetzt, durch die mikrobiologische Prozesse ohne zeitliche Unterbrechungen beobachtet werden können.

Ein weiteres Feld der DZ-Methodik ist die spezifische Detektion pathogener Mikroorganismen. Durch den Einsatz spezieller Aufkonzentrierungs- und Antikörpertechniken können bereits heute beispielsweise Legionellen, Giardien oder Kryptosporidien in natürlichen Wasserproben mittels DZ-Analyse weitgehend problemlos und schnell detektiert werden.

Schon anhand dieser wenigen Beispiele wird deutlich, dass die Durchflusszytometrie eine Methode mit Potential und Zukunft ist, die sich bei konsequent vorangetriebener Etablierung als verlässliche Methode im Rahmen von Routineanalysen erweisen wird. Alternativmethoden, die ähnliche Informationen liefern können, sind derzeit nicht in Sicht. *Abbildung 28* zeigt, ergänzend zu den bereits erwähnten DZ-Methoden, weitere durchflusszytometrische Verfahren, die bereits im Bereich der Forschung Anwendung finden. [10; 14; 25; 26; 30; 34; 35; 36; 37; 38; 39]

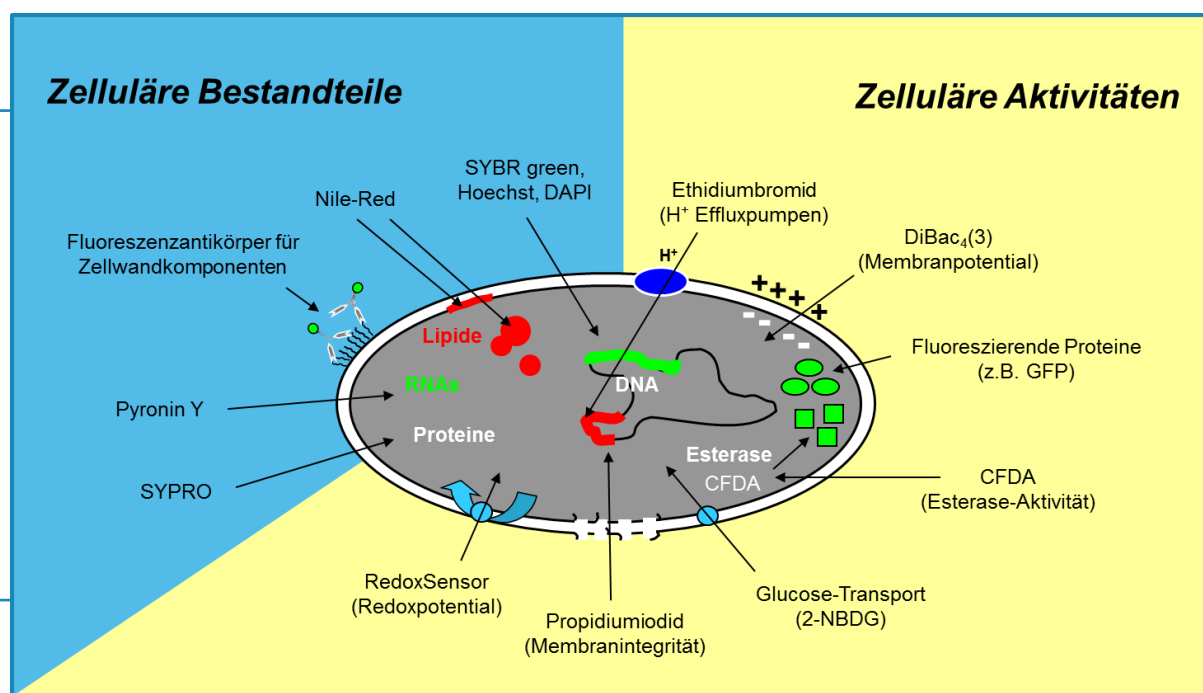


Abb. 28: Übersicht zu unterschiedlichen DZ-Verfahren, die aktuell im Bereich der Forschung angewendet werden.



8. Würdigung der Teilnehmer des Methodenworkshops

Wie in der Einleitung dieses Handbuchs dargestellt, ist es heute an der Zeit, neue Wege im Bereich der Trinkwasseranalytik zu beschreiten und moderne Methoden anzubieten. Analysemethoden, die schnell und präzise arbeiten und die traditionellen, jedoch nicht mehr zeitgemässen Wege in naher Zukunft ergänzen oder – im Rahmen neuer Methodenpakete – ersetzen können.

Zum Zwecke der Etablierung und der Validierung der Methode 333 „*Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süsswasser mittels Durchflusszytometrie*“ und ihrer Aufnahme als empfohlene Methode in das Schweizerische Lebensmittelbuch (SLMB) rief die Eawag einen Methodenworkshop ins Leben, der national wie international grosses Interesse und regen Zuspruch fand.

So nahmen 14 Institutionen aktiv an diesem Workshop teil, führten eigene durchflusszytometrische Untersuchungen durch und stellten die erhaltenen Ergebnisse zum Zwecke der Methodvalidierung zur Verfügung. Weitere 10 Institutionen nahmen an den regelmässigen Zusammenkünften teil und verhalfen der Methode mit ihrem Fachwissen und zahlreichen, fruchtbaren Beiträgen im Rahmen der wissenschaftlichen Diskussion zur Empfehlungsreife und schliesslich zum Eintrag ins Schweizerische Lebensmittelbuch (SLMB).

Wir erlauben uns daher an dieser Stelle, alle 24 teilnehmenden Laboratorien und Institutionen, die dem Methodenworkshop zu seinem Erfolg verholfen haben, in *Tabelle 1* namentlich aufzuführen. Verbunden damit sprechen wir allen Teilnehmern unseren herzlichen Dank für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die von ihnen umfangreich investierte Zeit aus. Ausserdem bedanken wir uns ausdrücklich für das ausserordentliche persönliche Engagement aller Partner und ihren Mut, mit diesem Projekt neue Wege in der Trinkwasseranalytik zu beschreiten.



Tab. 1: Auflistung aller Institutionen und Probanden, die am DZ-Workshop teilgenommen haben.

Teilnehmende Institutionen (aktiv)	Land	Probanden
Eawag	Schweiz	H. U. Weilenmann, F. Hammes, W. Gang, L. Pfister, S. Karmann, I. Wilhartitz, H. A. Keserue, R. Schneebei, A. Elmer, P. Neale, T. Egli, S. Köttsch
Bundesamt für Gesundheit	Schweiz	I. Niederhauser, M. Wicki
Wasserversorgung Zürich	Schweiz	C. Berger, F. Dornbierer
Industrielle Werke Basel	Schweiz	L. Klingler, S. Obrist
Kantonales Labor Basel-Landschaft	Schweiz	S. Langenegger, J. Engelmann
Kantonales Labor Zürich	Schweiz	S. Förster, N. Steffen
Technische Universität Hamburg-Harburg / DVGW Forschungsstelle	Deutschland	T. Meier, J. Moritz
MPI für chemische Ökologie Jena	Deutschland	H. Merker, S. Scholz
European Aeronautic Defense and Space Company - Innovation Works	Deutschland	C. Heller
Technische Universität Dresden	Deutschland	G. Orzechowski
Bachema AG	Schweiz	H. P. Fuchsli, E. Belloni
Labor Spiez	Schweiz	M. Wittwer
ABC Labor Spiez	Schweiz	P. Joss
Technische Universität Delft	Niederlande	E. Prest
Teilnehmende Institutionen (begleitend)		
SVGW Zürich	Schweiz	
Kantonales Labor Luzern	Schweiz	
Kantonales Labor St. Gallen	Schweiz	
Knecht Rohrsanierungen AG	Schweiz	
SIGE Trinkwasseraufbereitung	Schweiz	
Université de Neuchâtel	Schweiz	
Universität Basel	Schweiz	
Universität Cranfield	Grossbritannien	
Laboratory of Microbial Ecology and Technology	Belgien	
HET Waterlaboratorium	Niederlande	



9. Literatur

- [1] Winkle, S. (1997): Geisseln der Menschheit. Kulturgeschichte der Seuchen, p. 153–250. Artemis & Winkler, Düsseldorf/Zürich.
- [2] Prüss-Üstün, A., Corvalán, C., WHO (2006): Preventing disease through healthy environments: towards an estimate of the environmental burden of disease. WHO, Geneva, Switzerland.
- [3] Schardinger, F. (1892): Über das Vorkommen Gärung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurteilung desselben. Wiener Klin Wochenschr. 5, p. 403–405.
- [4] Koch, R. (1883): Über die neuen Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Mikrokosmen in Boden, Luft und Wasser. In: Gesammelte Werke von Robert Koch (G. Gaffky, E. Pfuhl, J. Schwalbe, Herausg.). Erster Band, p. 274–284. Verlag Georg Thieme, Leipzig, 1912.
- [5] OECD; WHO (2003): Assessing microbial safety of drinking water, improving approaches and methods. OECD, Paris, and WHO, Geneva.
- [6] WHO (2008): Guidelines for drinking water quality (3rd edition) incorporating the 1st and 2nd addenda, Volume 1, Recommendations (electronic resource). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [7] Allen, M.J. et al. (2004): Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? Intern J Food Microbiol. 92, p. 265–274.
- [8] Staley, J.T.; Konopka, A. (1985): Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu Rev Microbiol. 39, p. 321–346.
- [9] WHO (2003): Heterotrophic plate counts and drinking-water safety. The significance of HPCs for water quality and human health. Bartram J. et al., eds. IWA Publishing, London.
- [10] Egli, T., Hammes, F., 2010. Neue Methoden für die Wasseranalytik. gwa 4, p. 315–324.
- [11] Bouvier, T., del Giorgio, P.A., Gasol, J.M., 2007. A comparative study of the cytometric characteristics of high and low nucleic-acid bacterio-plankton cells from different aquatic ecosystems. Appl Environ Microbiol. 9, p. 2050–2066.
- [12] Vila-Costa, M., Gasol, J.M., Shalabh, S., Moran, M.A., 2012. Community analysis of high- and low-nucleic acid-containing bacteria in NW Mediterranean coastal waters using 16S rDNA pyrosequencing. Environ Microbiol. 14, p. 1390–1402.
- [13] Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., Boon, N. (2010): Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. Trends Biotechnol. 28, p. 416–424.
- [14] Hammes, F., Egli, T., (2010): Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. Anal Bioanal Chem. 397, p. 1083–1095.



- [15] Wang, Y., Hammes, F., Boon, N., Chami, M., Egli, T. (2009): Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. ISME. 3, p. 889–902.
- [16] Wang, Y. (2009) “The unseen majority”: heterotrophic bacteria in freshwater, more than just small and non-cultivable. ETH Zürich, Switzerland, Diss. ETH-No. 17894.
- [17] Hammes, F., Goldschmidt, F., Vital, M., Wang, Y., Egli, T. (2010): Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. Water Res. 44, p. 3915–3923.
- [18] Hammes, F., Egli, T., 2005. New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. Environ Sci Technol. 39, p. 3289–3294.
- [19] Wang, Y., Hammes, F., Egli, T., 2008. The impact of industrial-scale cartridge filtration on the native microbial communities from groundwater. Water Res. 42, p. 4319–4326.
- [20] Hammes, F., Boon, N., Vital, M., Ross, P., Magic-Knezev, A., Dignum, M., 2010. Bacterial colonization of pellet softening reactors used during drinking water treatment. Appl Environ. Microbiol. 77, p. 1041–1048.
- [21] Hammes, F., Berger, C., Köster, O., Egli, T., 2010. Assessing biological stability of drinking water without disinfectant residuals in a full-scale water supply system. Res Technol. 59, p. 31–40.
- [22] Lautenschlager, K., Boon, N., Wang, Y., Egli, T., Hammes, F., 2010. Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. Water Res. 44, p. 4868–4877.
- [23] Lautenschlager, K., 2011. Origin, function and stability of microbial communities in non-chlorinated public drinking water. ETH Zürich, Switzerland, Diss. ETH-No. 19950.
- [24] Vital, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L., Hammes, F., 2012. Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: Alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. Water Res., in Press.
- [25] Berney, M., Vital, M., Huelshoff, I., Weilenmann, H.U., Egli, T., Hammes, F., 2008. Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. Water Res. 42, p. 4010–4018.
- [26] Ramseier, M., von Gunten, U., Freihofer, P., Hammes, F., 2011. Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate. Water Res. 45, p. 1490–1500.
- [27] ZMB/Uni Zürich, (2007). Einführung in die Elektronenmikroskopie: Präparation. www.zmb.uzh.ch/resources/download/EMpreparation.pdf



- [28] Köttsch, S., Egli, T., (2011). Untersuchungen zu Protozoen und mikrobiologischen Summenparametern in Grundwasserleitern der Schweiz. Eawag/Dübendorf, Umweltmikrobiologie.
- [29] Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., Egli, T., (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. Water Res. 42, p. 269–277.
- [30] Hammes, F., Vital, M., Lautenschlager, K., (2009). A comparison between AOC, FCM TCC and conventional drinking water parameters. Eng. Sci - techneau.org.
- [31] Hammes, F., Berney, M., Vital, M., (2008). Cultivation independent assessment of viability with flow cytometry. Eng. Sci - techneau.org.
- [32] Köttsch, S., Egli, T., 2012. Entwicklung, Anwendung und Etablierung durchflussszytometrischer Methoden zur schnellen Bestimmung der Mikrobiologie von Trinkwasser-verteilnetzen und Hausinstallationssystemen und Evaluierung des Migrations- und Biofilmbildungspotentials bei der Epoxidharz-Sanierung von Trinkwasserleitungen. KTI-Projekt 12121.1 PFIW-IW.
- [33] Köttsch, S., Egli, T., 2012. Methodenpaket BioMig: Ermittlung des Verkeimungspotentials von Kunststoffen in Kontakt mit Trinkwasser. Aqua und Gas Nr. 5, p. 54-62.
- [34] Hammes, F., Goldschmidt, F., Vital, M., Wang, Y., Egli, T., 2010. Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. Water Res. 44, p. 3915-3923.
- [35] Hammes, F., Broger, T., Weilenmann, HU., Vital, M., Helbing, J., Bosshart, U., Huber, P., Odermatt, P., Sonnleitner, B., 2012. Development and laboratory-scale testing of a fully automated online flow cytometer for drinking water. Cytometry Part A, 81A, p. 508-516.
- [36] Füsclin, HP., Köttsch, S., Keserue, HA., Egli, T., 2010. Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry. Cytometry Part A, 77A, p. 264-274.
- [37] Keserue, HA., Baumgartner, A., Felleisen, R., Egli, T., 2012. Rapid detection of total and viable *Legionella pneumophila* in tap water by immunomagnetic separation, double fluorescent staining and flow cytometry. Microbial Biotechnology 5, p. 753–763.
- [38] Keserue, HA., Füsclin, HP., Egli, T., 2011. Rapid detection and enumeration of *Giardia lamblia* cysts in water samples by immunomagnetic separation and flow cytometric analysis. Appl Environ Microbiol. 77, p. 5420–5427.
- [39] Keserue, HA., Füsclin, HP., Wittwer, M., Nguyen-Viet, H., Nguyen, T.T., Surinkul, N., et al., 2012 Comparison of rapid methods for detection of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. (oo)cysts using transportable instrumentation in a field deployment. Env Sci Technol. 46, p. 8952–8959.



10. Symbole und Abkürzungen

AOC	<i>engl., assimilable organic carbon</i> , assimilierbarer organischer Kohlenstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	<i>engl., diluted organic carbon</i> , gelöster organischer Kohlenstoff
DZ	Durchflusszytometrie, Durchflusszytometer
{G1}	Gate 1
{G2}	Gate 2
{G3}	Gate 3
G-FL	Grünfluoreszenz
HNA	High Nucleic Acid
LNA	Low Nucleic Acid
R-FL	Rotfluoreszenz
SSC	Sidescatter (Seitwärtsstreulicht)
TOC	<i>engl., total organic carbon</i> , gesamt vorhandener organischer Kohlenstoff
TZZ	Totalzellzahl
ZZi	Zellzahl intakt = Anzahl der intakten Zellen

11. Glossar

<i>Beads</i>	–	Kalibrationskügelchen für Durchflusszytometer
<i>Counts</i>	–	Anzahl der Zählereignisse (hier: Zellen bzw. Partikel)
<i>Density Plot</i>	–	Konzentrations-Diagramm zur Auswertung der DZ-Analysedaten
<i>Gain</i>	–	Hochspannungseinstellung der Photomultiplikatoren
<i>Gate</i>	–	definierter Bereich im Density Plot
<i>Planktonische Phase</i>	–	Zellen, die frei suspendiert in der Wasserphase vorliegen
<i>Region Range</i>	–	definierter Bereich im Histogramm
<i>Threshold/Lower-Limit</i>		Funktion zum Ausblenden unerwünschter Signale
<i>Trigger</i>	–	ausgewählter Hauptparameter

