

Molekulare Methoden in der mikrobiellen Trinkwasseranalytik

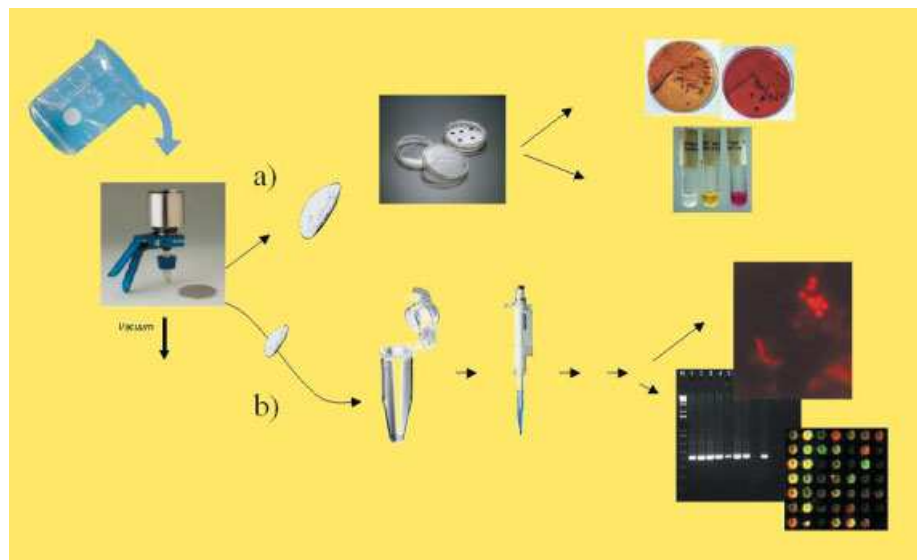
Wolfgang Köster* und Thomas Egli

Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology (EAWAG), Dübendorf, Schweiz

► In jedem natürlichen Wasser sind Mikroorganismen vorhanden. Eine für die menschliche Gesundheit potenziell bedenkliche Situation entsteht erst dann, wenn (human)pathogene Spezies (Viren, Bakterien oder Protozoen) eine kritische Zahl überschreiten. Um ein derartiges Gefährdungspotenzial rechtzeitig erkennen zu können, ist es unerlässlich, die mikrobiologische Wasserqualität zu kontrollieren. Dabei genießt Trinkwasser die höchste Priorität. Aber auch Wasser, das für Agrarproduktion oder Aquakultur eingesetzt wird, sowie in der Freizeit genutzte Schwimmbäder und Oberflächen-gewässer sollten Kontrollen unterliegen.

Über einen Zeitraum von vielen Jahren wurden Wasserproben auf das Vorhandensein von Organismen untersucht, die eine fäkale Kontamination anzeigen sollen. Diese Indikatoren sind hauptsächlich Bakterien (z. B. *Escherichia coli*, thermotolerante coliforme Bakterien, Enterokokken), die als harmlose Kommensalen einen Anteil der normalen Darmflora von Mensch und Warmblütern ausmachen. Für viele der „klassischen“ Erreger, die im Zusammenhang mit Wasser zu nennen sind (z. B. *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*), war das herkömmliche Indikator-konzept hinreichend.

Dass es den idealen Indikatororganismus zum Anzeigen von fäkalen Verunreinigungen (und damit Gesundheitsrisiken) aber gar nicht gibt, wurde spätestens deutlich, nachdem verschiedene Pathogene (insbesondere parasitische Protozoen wie *Cryptosporidium* und *Giardia*) als Auslöser wasserbedingter Epidemien erkannt wurden. Diese Krankheitserreger zeigten Charakteristika im Kontext von Wasser-Aufbereitung und Desinfektionsmaßnahmen, die sich deutlich von den Eigenschaften der bislang verwendeten Indikatoren unterschieden^[2; 4]. Zudem wurden verschiedene Bakterien (z. B. *Legionella pneumophila*, Toxin-produzierende Stämme von *Escherichia coli*) identifiziert, die früher nicht im Zusammenhang mit wasserbedingten Erkrankungen genannt wurden, und es wurde vermutet, dass viele bislang schwer nachzuweisende Viren Verursacher derartiger Erkrankungen sein könnten. Das Erscheinen dieser vermehrt auftretenden Pathogene hat die Entwicklung von neuen Nachweismethoden entscheidend beschleunigt.



Nachweismethoden in der Trinkwassermikrobiologie: Nach einem Konzentrierungs- oder Anreicherungsschritt (z. B. Filtration) gibt es zahlreiche Alternativen bei der Anwendung von (a) traditionellen oder (b) neueren molekularen Methoden. Details siehe Text.

Analytische Methoden der mikrobiologischen Qualitätskontrolle

Bei der Bewertung der mikrobiologischen Qualität von (Trink-)Wasser rückt ein spezielles Problem in den Vordergrund: Manche Mikroorganismen sollten selbst dann noch nachweisbar sein, wenn sie in extrem geringer Anzahl in einer Probe vorkommen (weniger als ein Organismus bzw. Partikel pro 100 ml). Bevor die eigentlichen Nachweismethoden zur Anwendung kommen, kann man diesem Problem auf verschiedene Art begegnen: durch Konzentrierung der Probe (Filtration, Zentrifugation, Fällung, Immun-Präzipitation) oder durch Anreicherung des Zielorganismus beziehungsweise durch Amplifikation von Spezies-spezifischen Signalen oder Strukturen.

Im Folgenden werden lediglich die Grundprinzipien und charakteristischen Aspekte der hauptsächlich relevanten Nachweismethoden erwähnt (siehe auch *Tabelle 1*). Für eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Techniken inklusive ihrer Stärken und Schwächen sei auf den Methodenteil des WHO/OECD-Dokuments über sicheres Trinkwasser verwiesen^[10].

„Klassische“ Methoden

Die traditionellen Methoden basieren vorwiegend auf Anreicherung und/oder Wachstum von Mikroorganismen auf speziellen Nährmedien. Entsprechende Tests, oft kostengünstig und einfach in der Durchführung, konzentrieren sich meist auf Enterobakterien als Indikatoren für fäkale Verunreinigungen. Jedoch lediglich ein kleiner Anteil der in einer Probe vorhandenen vitalen Bakterien wird dabei detektiert; sind doch viele selektive Medien durch stringente Bedingungen charakterisiert, die das Wachstum von Zellen unterbinden, welche ungünstigen Umweltbedingungen oder oxidativem Stress ausgesetzt waren^[14; 11].

Signifikante Verbesserungen bezüglich Ausbeute und Identifizierung verschiedener Ziel-Bakterien wurde durch die Verwendung chromogener Substanzen erreicht. Der Nachweis beruht dabei nicht auf strengen Selektionsbedingungen, sondern setzt auf Medien mit Substraten für bestimmte Enzyme. Beispielsweise bewirkt das von coliformen Bakterien produzierte Enzym β -Galaktosidase eine Farbveränderung von ONPG (O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid). In

Methoden	Charakteristika/Vorteile	Einschränkungen/Nachteile	Anwendung: Status Quo und Zukunftsperspektive
Immunologischer Nachweis von spezifischen antigenen Strukturen	<ul style="list-style-type: none"> • Qualitative und quantitative Ergebnisse möglich (innerhalb best. Grenzen) • Relativ spezifisch für Zielorganismen 	<ul style="list-style-type: none"> • Oft zeitaufwendige Vor-Kultivierung nötig • Mangel an Sensitivität • Selektivität evtl. problematisch wegen mögl. Kreuzreaktion • Erlaubt ohne Vor-Kultivierung keine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen • Meist keine Information über Infektiosität von Pathogenen 	<ul style="list-style-type: none"> • Standardisierung und Automatisierung möglich
Immunomagnetische Separierung (IMS)	<ul style="list-style-type: none"> • Schneller und spezifischer als andere Konzentrierungsmethoden • Gute Basis für andere Nachweis- (PCR, RT-PCR, FACS, FISH) und Kulturmethoden 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensitivität, Verlässlichkeit evtl. beeinflusst durch Umweltbedingungen • Selektivität evtl. problematisch wegen mögl. Kreuzreaktion • Meist keine Information über Infektiosität von Pathogenen 	
„Polymerase Chain Reaction“ (PCR)	<ul style="list-style-type: none"> • Im Prinzip höchst sensitiv (aber: siehe Limitierungen) • Selektiv • Spezifisch • Kann „nicht-kultivierbare“ Mikroben nachweisen • Schneller als Kultivierungsmethoden (3–4 Std.) • Gute Basis für weitere Analysen von Nukleinsäuren (Sequenzierung, RFLP, RAPD) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eingeschränkte Verlässlichkeit (momentan kann der Nachweis eines einzigen Mikroorganismus nicht garantiert werden) • Negativ beeinflussbar durch Umweltbedingungen • Grund-Technik erlaubt keine Quantifizierung amplifizierbarer DNA/RNA-Fragmente • Momentan keine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen • keine Information über Infektiosität von Pathogenen 	<ul style="list-style-type: none"> • Gegenwärtig keine Standardisierung • Potential für Automation • Potential für Quantifizierung (TaqMan)
RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Wie PCR • Guter Hinweis auf lebende Organismen mit mRNA als Zielmolekül • Hinweis auf pathogenes Potential, wenn mRNA eines Virulenz-Gens 	<ul style="list-style-type: none"> • Wie PCR (Ausnahme: Unterscheidung zwischen tot und vital mit mRNA als Zielmolekül) • Extraktion nachweisbarer Mengen intakter RNA-Moleküle ist problematisch wegen Instabilität 	<ul style="list-style-type: none"> • Gegenwärtig keine Standardisierung • Potential für Automation • Potential für Quantifizierung (TaqMan)
„Flow Cytometry“, „Fluorescence-Activated Cell Sorting“ (FACS)	<ul style="list-style-type: none"> • Schneller als Kultivierungsmethoden • Nachweis von „nicht-kultivierbaren“ Organismen möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • keine Information über Infektiosität von Pathogenen • Limitierte Verlässlichkeit für Organismen in geringer Konzentration 	
Fluorescence in-situ hybridisation (FISH)	<ul style="list-style-type: none"> • Schneller als Kultivierungsmethoden • Vor-Kultivierung nicht erforderlich • Nachweis von „nicht-kultivierbaren“ Organismen möglich • Kann individuelle Zellen sichtbar machen (z.B mit ribosomaler RNA als Zielmolekül) • Verschiedene („multicolour“) Fluoreszenzmarkierungen gestatten Nachweis verschiedener Mikroben • Verwendbar in Kombination mit Geräten, die automatisiertes Scanning gestatten 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Sensitivität mit chromosomalen Genen oder mRNA als Zielmolekül • Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen oft schwierig • Nicht anwendbar, um einen Organismus pro 100 ml nachzuweisen ohne aufwendige Konzentrierungsschritte 	<ul style="list-style-type: none"> • Potential für Automation
„Molecular Fingerprinting“ („Ribotyping“, RFLP, RAPD, AP-PCR)	<ul style="list-style-type: none"> • Schneller als Kultivierungsmethoden • Exzellent für Unterscheidung von Stämmen oder Isolaten innerhalb einer Spezies 	<ul style="list-style-type: none"> • Momentan keine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen • RAPD funktioniert nur mit Reinkulturen 	
„DNA chip Array“	<ul style="list-style-type: none"> • Technik im Mikromaßstab gestattet Test von bis zu mehreren hundert Sequenzen in einem Versuch auf einem einzigen „Chip“ • Sensitiv, selektiv und spezifisch nach Wunsch um entweder Organismengruppen oder (Sub-)spezies nachzuweisen 	<ul style="list-style-type: none"> • Schnell (2 – 4 Std.) • Zur Zeit sehr kostenintensiv • Benötigt geschultes Personal • Absolute Quantifizierung kann schwierig sein 	<ul style="list-style-type: none"> • Technik noch nicht weit verbreitet
Biosensoren	<ul style="list-style-type: none"> • Immunoaffinitäts-Schritt, um Mikroorganismen an Oberflächen zu binden; Nachweis durch Laser Anregung von gebundenen fluoreszierenden Antikörpern, akustogravimetrische Wellentransduktion, oder Oberflächen- Plasmon-Resonanz 	<ul style="list-style-type: none"> • Zur Zeit keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen • Schnell, aber abhängig von kultivierbaren Organismen 	<ul style="list-style-type: none"> • Technik erst am Anfang der Entwicklung
„Solid State Biochip“	<ul style="list-style-type: none"> • Ziel der Methode: schneller Nachweis (Minuten) zahlreicher Toxine und Mikroben • Ansatz unabhängig von Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitierungen können noch nicht abgeschätzt werden 	<ul style="list-style-type: none"> • Technik noch nicht verfügbar, visionärer Ansatz, zur Zeit in Entwicklung

Tab. 1: „Moderne“ Methoden in der mikrobiellen Trinkwasseranalytik

ähnlicher Weise wird der Umsatz von MUG (5-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid) durch die von *E. coli* exprimierte β -Glucuronidase-Aktivität mittels Fluoreszenz unter UV-Licht angezeigt^[5; 7]. Ein Nachteil derartiger Test ist darin zu sehen, dass die Expression eines bestimmten Enzyms nicht strikt an eine bestimmte Spezies gebunden ist: So wurde etwa einerseits β -Galaktosidase-Aktivität in einer Zahl von Bakterien, Hefen, Pilzen und Protozoen gefunden, darunter eine Reihe von apathogenen Spezies, die nicht mit fäkalen Verunreinigungen assoziiert sind; andererseits wurden einige enteropathogene *E. coli* phänotypisch als β -Glucuronidase-negativ getestet.

Anerkannte Standard-Methoden (z. B. publiziert von „International Organization for Standardization“ (ISO), „European Committee for Standardisation“ (CEN) und American Public Health Association (APHA)) existieren für Kultivierung, Nachweis und Quantifizierung von:

- verschiedenen Bakterien (z. B. *E. coli*, fäkale Enterokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spec.*, *Legionella spec.*, *Vibrio cholerae* ...)
- einigen Bacteriophagen (z. B. somatische Coliphagen, F-RNA-Phagen, Vibrio-Phagen)
- wenigen Viren (z. B. Enteroviren).

Trotz erheblicher Fortschritte in den letzten Jahren besteht ein Bedarf an Verbesserung und Innovation auf dem Gebiet des Nachweises mittels Kultivierung. Viele der klassischen Techniken sind zeitaufwendig und lassen Selektivität und Spezifität vermissen (z. B. keine Unterscheidung zwischen „normalen“ *E. coli* und enterovirulenten Stämmen wie *E. coli* O157:H7). Zudem überdauern manche Bakterien in einem lebensfähigen aber „nicht-kultivierbaren“ Zustand^[3]. Ähnliches gilt für viele Viren und Protozoen, deren Kultivierung extrem aufwendig oder gar unmöglich ist.

Molekulare Methoden

Die meisten molekularen Techniken funktionieren auf der Basis von Biochemie, Genetik und Immunologie und wurden anfangs für die medizinische Diagnostik entwickelt. Im Folgenden werden die wesentlichen Prinzipien kurz erläutert:

Nachweis auf PCR-Basis

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) generiert multiple Kopien spezifischer DNA-Fragmente *in vitro*. Techniken auf PCR-Basis sind auf alle im Wasser vorkommende Organismen anwendbar, sofern deren Genome (RNA oder DNA) für die enzymatische Re-

aktion zugänglich gemacht werden können. Ausgehend von wenigen Kopien oder nur einem Genom (oder Fragmenten davon), lassen sich DNA-Fragmente in Quantitäten herstellen, die dann mit etablierten Methoden einfach sichtbar gemacht werden können. Abhängig von der „Ziel-Sequenz“, im Chromosom oder auf Plasmiden lokalisiert, erlaubt diese Technik nach Belieben den Nachweis größerer Organismengruppen oder alternativ die Identifizierung spezifischer (Sub-)Spezies. Das geschieht entweder durch die Amplifizierung von Regionen, die innerhalb verschiedener Spezies konserviert vorliegen (z. B. Bereiche der 16S-ribosomalen DNA) oder durch Vervielfältigung von Sequenzen, die mit speziellen Funktionen wie Virulenz-Determinanten (z. B. pyrogene Exotoxine von Streptokokken) assoziiert sind. So ist es möglich, gezielt auf die Anwesenheit einer Zahl von Pathogenen zu testen. Da die Schritte des PCR-Protokolls in drei bis vier Stunden durchgeführt werden können, lassen die Erreger von wasserbedingten Krankheiten in akzeptabler Zeit ermitteln. Zahlreiche Versionen des Grund-Protokolls sind publiziert^[1; 9]. In Kombination mit der Reversen Transkriptase (RT), einem Enzym, das DNA-Kopien von RNA-Templates synthetisiert, ist es möglich, DNA-Fragmente zu amplifizieren, die genomischen Regionen von RNA-Viren entsprechen. Zur Zeit ist die RT-PCR die praktikabelste Methode für den Nachweis nicht-kultivierbarer Viren, beispielsweise Caliciviren, die als Auslöser verschiedener gastrointestinaler Krankheiten gelten, welche durch Wasser übertragen werden können.

Die PCR-Methodik hat gegenwärtig noch einige Schwächen: 1) Die Basismethode kann nicht zwischen vitalen und toten Organismen oder gar frei vorkommender DNA in einer Probe unterscheiden; 2) das einfache Grund-Protokoll gestattet keine Quantifizierung amplifizierbarer Nucleinsäuren; 3) die enzymatische Reaktion kann durch nachhaltige Effekte von Umweltbedingungen negativ beeinflusst werden; 4) der absolut sichere Nachweis eines einzigen in einer Probe vorkommenden Organismus kann aufgrund von Inkonsistenzen und fehlender Standardisierung nicht garantiert werden. Daher wird derzeit in einigen Labors versucht, die Methodik hinsichtlich Reproduzierbarkeit, Verlässlichkeit, Quantifizierung und Automatisierung zu optimieren.

Nachweis mittels markierter Sonden

Fluoreszenz-markierte Sonden kann man einsetzen, um Moleküle nachzuweisen, die für bestimmte Mikroorganismen charakteri-

stisch sind. So können Oberflächenstrukturen wie Epitope von exponierten Proteinen als Zielort für markierte Antikörper dienen. In ähnlicher Weise können innerhalb der Zelle Nucleotidsequenzen (geeignete Abschnitte von Messenger-RNA oder ribosomaler RNA) mit Oligonucleotid-Sonden interagieren. Markierte Zellen lassen sich dann mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie oder Laser-Scanning-Elektronenmikroskopie darstellen. Alternativ können fluoreszierende Partikel (z. B. Bakterien oder Oozysten von Cryptosporidien) mit der Flowcytometrie erfasst werden. Alle diese Fälle erfordern aber eine hohe Anzahl (einige hundert Kopien) markierter Zielmoleküle, um ein detektierbares Signal zu generieren.

Durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) können Mikroorganismen in ihrem natürlichen Habitat identifiziert werden, ohne dass ein Kultivierungsschritt notwendig ist. Ein typisches FISH-Experiment umfasst die Filtration einer Wasserprobe durch eine Membran und die Fixierung der Organismen auf der Membran. Die anschließende Permeabilisierung der Zelloberfläche ermöglicht den Eintritt in die Zelle und damit die Bindung an spezifische Ziel-Moleküle. Mehrfachmarkierte, längere Sonden^[18] oder gekoppelte Peptid-Nucleinsäuren (PNA)^[15] geben stärkere Fluoreszenzsignale. Die Methodik ist hauptsächlich für Bakterien und Protozoen geeignet.

„Molecular Fingerprinting“

Im Hinblick auf einen verlässlichen Nachweis von verschiedenen Mikroorganismen in Wasser oder Umweltproben wurde die molekulare Typisierung entwickelt. „Molecular Fingerprinting“ profitiert von der Tatsache, dass distinkte Regionen des Genoms hoch spezifisch und damit repräsentativ für bestimmte (Sub-)Spezies oder Stämme sind. Vielfach bilden Nucleotidsequenzen als Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen oder als Zielsequenzen für „Primer“ im Rahmen von Amplifizierungstechniken die Grundlage für weitere Strategien. Verschiedene Ansätze existieren: „Pulsed-field“-Gelelektrophorese (PFGE)^[17], „Ribotyping“^[8], „Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) und PCR in Kombination mit RFLP^[16]. „Random Amplified Polymorphic DNA“ (RAPD), auch bekannt als „Arbitrarily Primed PCR“ (AP-PCR)^[19], repräsentiert eine Technik, die im Anschluss an eine elektrophoretische Auftrennung hoch-spezifische DNA-Profile („Fingerprints“) liefert.

Die kompletten Prozeduren sind deutlich schneller als die traditionellen Ansätze und lassen sich in zwei bis drei Stunden durch-

führen. Gegenwärtig jedoch sind einige Limitierungen augenfällig: 1) Eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen ist nicht möglich; 2) die RAPD-Methode benötigt Reinkulturen.

Laser-Scanning-Analyse

Diese Technologie funktioniert auf der Basis von chromogenen oder fluorogenen Substraten, die an Antikörper oder Oligonukleotide gekoppelt werden. Mikroorganismen aus Wasserproben werden auf speziellen Polyester-Filtern gesammelt. Die herkömmliche Methode – das Anschauen des markierten Organismus unter dem Mikroskop – wurde durch eine motorisierte Laser-Scanning-Einrichtung ersetzt, welche mit einem Epifluoreszenzmikroskop verbunden ist. Automatisch registrierte Fluoreszenzereignisse bedürfen der mikroskopischen Bestätigung durch den Experimentator, um falsch positive Partikel (z. B. durch Autofluoreszenz) auszuschließen. Die Methode, die sich ideal mit immuno-magnetischen Trenntechniken (IMS) kombinieren und komplett in weniger als vier Stunden durchführen lässt^[20], ist für den Nachweis von Bakterien und Protozoen geeignet.

DNA-Chip Array

Im Prinzip wurden zwei Typen von DNA-Microarray-Technologie entwickelt:

- 1) In einer automatisierten Auftragsprozedur werden cDNA-Sonden (einige hundert Nukleotide lang) auf einer festen Oberfläche (z. B. Glas) fixiert. Anschließend folgt die Exposition und spezifische Hybridisierung in Gegenwart einer Auswahl von sogenannten „Zielsequenzen“, die entweder separat oder in einer Mischung angeboten werden^[6].
- 2) Ein „Array“ von kurzen Oligonukleotiden (ca. 18 bis 25 Basenpaare) oder RNA-Sonden (s. o.) wird markierten DNA-Fragmenten ausgesetzt. Nach erfolgter Hybridisierung wird auf das Vorhandensein von komplementären Sequenzen getestet und deren Identität bestimmt. Das dieser Methode zugrunde liegende Prinzip wurde zuerst von Affymetrix Inc. entwickelt und als sogenannter „GeneChip® Array“ oder „DNA Chip“ beschrieben^[12; 13].

Biosensoren

Verschiedene Typen von Biosensoren befinden sich zur Zeit im Stadium der Entwicklung. Alle von ihnen funktionieren mit drei primären Komponenten: Immunoaffinitäts-Techniken, Tests auf der Basis von Oberflächenchemie und integrierter Optik. In einem ersten Schritt werden die in einer Probe vorhandenen Zielorganismen von Antikörpern, die an den Biosensor gekoppelt sind, erkannt und gebunden. Dann bindet ein Satz von „Reporter-Antikörpern“ an den selben Zielorganismus und katalysiert eine chemische Reaktion. Ein chemischer Sensor detektiert das Produkt dieser chemischen Reaktion. Das wiederum ändert die optischen Eigenschaften des Sensors, und es werden Signale mit Hilfe von Laser weitergegeben. Letztendlich erhält man sowohl qualitative als auch quantitative Informationen bezüglich eines spezifischen Mikroorganismus in einer Wasser- oder Umweltprobe. Obwohl einige Prototypen von Biosensoren bereits beschrieben wurden, stellt die Sensitivität derzeit noch ein entscheidendes Problem dar.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass sich die molekularen Methoden oftmals als sensitiver und selektiver erweisen, in kürzerer Zeit Ergebnisse liefern als die konventionellen Ansätze und darüber hinaus die gezielte Detektion bestimmter Pathogene beziehungsweise Pathogen-spezifischer (Virulenz-)Faktoren erlauben. Die direkten Tests funktionieren unabhängig von Kultivierungstechniken, was auch die Identifi-

zierung von „nicht-kultivierbaren“ Spezies (Viren, Bakterien, Protozoen) ermöglicht. Leider sind einige Ansätze, die auf den Prinzipien von Biochemie, Molekularbiologie, Genetik oder Nanotechnologie basieren, auf teure apparative Ausstattung und/oder besonders geschultes Personal angewiesen. Für alle Nachweismethoden ist es notwendig, deutliche Anstrengungen hinsichtlich Kosten-Effizienz, Verlässlichkeit, Standardisierung und Automatisierung zu unternehmen. Auf jeden Fall aber stellen die molekularen Techniken vielversprechende Werkzeuge für zukünftige Herausforderungen auf dem Gebiet der mikrobiellen Analytik dar.

Anwendungen

Routinemäßige Überwachung

Die Methoden für die routinemäßige Überwachung der mikrobiologischen Wasserqualität sollten einfach durchzuführen und robust, also reproduzierbar sein. Auch ist es nicht praktikabel, in der Standardüberprüfung auf das Vorhandensein einer großen Zahl von (potenziell) pathogenen Organismen zu testen. Es ist daher ratsam, sich auf eine limitierte Anzahl von geeigneten Indikatororganismen zu beschränken oder sich auf solche Organismen einzustellen, die erfahrungsgemäß häufiger Probleme verursachen. Im Hinblick auf bestimmte Spezies und ihr zahlenmäßiges Auftreten sind allerdings Unterschiede in verschiedenen Ländern zu erwarten, wobei auch regionale und saisonale Parameter eine Rolle spielen. Außer-

dem erscheint es sinnvoll, die Effizienz der Wasserbehandlung zu überwachen und dabei das optimale Funktionieren des Desinfektionsprozesses sicherzustellen.

Untersuchung wasserbedingter Epidemien

Viele kleinere „Unfälle“ im Zusammenhang mit mangelhafter Wasserqualität bleiben unentdeckt, und wie Ereignisse in den letzten Jahren gezeigt haben, ist das Risiko einer Epidemie prinzipiell gegeben. Bei der Verbreitung von Krankheiten ist es unerlässlich, schnellstmöglich das auslösende Agens zu identifizieren. Daher ist es essentiell, schnelle und zuverlässige Nachweismethoden zu optimieren und zu etablieren, die sich durch hohe Sensitivität und Spezifität für ein bestimmtes Pathogen beziehungsweise toxisches Agens auszeichnen. Hier sind hauptsächlich die molekularen Methoden gefragt. Im Sinne eines optimalen Schutzes der öffentlichen Gesundheit ist es zwingend notwendig, mit den neuesten Entwicklungen Schritt zu halten.

Fazit

Im Idealfall sollten Methoden, die der zahlenmäßigen Erfassung und Identifizierung von Mikroorganismen dienen (sei es in der Routine-Analyse oder bei der Erforschung der Etiologie von Epidemien im Zusammenhang mit dem Konsum von Wasser), in ein ganzheitliches Konzept eingebettet sein. Es bezieht alle Stationen von der Wasserressource bis zum Wasserhahn beim Konsumenten mit ein, und es sollten Informationen aus verschiedenen Bereichen (Klima, Wetter, Hydrologie, Geochemie, Epidemiologische Studien, Wasseraufbereitung und Verteilung, Risikoabschätzung etc.) miteinander verknüpft werden.

Oft ist es sinnvoll, eine Kombination verschiedener Nachweismethoden zu wählen, da sowohl die traditionellen als auch die molekularen Techniken Vor- bzw. Nachteile aufweisen. Verantwortliche Personen mit Richtlinienkompetenz in entsprechenden staatlichen Behörden und Ämtern sollten aufgeschlossen sein für neue Methoden, sobald sich diese als praktikabel erwiesen haben, auch wenn noch nicht sämtliche Prozesse der Standardisierung durchlaufen wurden.

Literaturverzeichnis

- [1] **Bej, A.K., McCarty, S.C. und Atlas, R.M.** (1991). Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. and Environ. Microbiol.* 57: 2429–2432.
- [2] **Casemore D.P.** (1991). The epidemiology of human cryptosporidiosis and the water route of infection. *Water Science and Technology* 24, 157–164.
- [3] **Colwell, R.R. und Grimes, D.J.** (Eds.) (2000) Viable but nonculturable micro-organisms in the environment. *ASM Press, Washington, DC.*
- [4] **Craun G.F.** (1991). Causes of waterborne outbreaks in the United States. *Water Science and Technology* 24, 17–20.
- [5] **Edberg, S.C., Allen, M.J. und Smith, D.B.** (1991) Defined substrate technology method for rapid and specific simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74, 526–529.
- [6] **Ekins, R. und Chu F.W.** (1999) Microarrays: their origins and applications. *Tibtech* 17, 217–218.
- [7] **Fricker, E.J., Illingworth, K.S. und Fricker, C.R.** (1997) Use of two formulations of colilert and quantitrayTM for assessment of the bacteriological quality of water. *Water Research* 31, 2495–2499.
- [8] **Grimont, F. und Grimont, P.A.D.** (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiology* 137B, 165–175.
- [9] **Juck, D., J. Ingram, J. Prevost, M. Coallier, J. und Greer, C.** (1996). Nested PCR protocol for the rapid detection of *Escherichia coli* in potable water. *Can. J. Microbiol.* 42: 862–866.
- [10] **Köster W., T. Egli, N. Ashbolt, K. Botzenhart, N. Burlion, T. Endo, P. Grimont, E. Guillot, C. Mabilat, L. Newport, M. Niemi, P. Payment, A. Prescott, P. Renaud, A. Rust** (2002) Analytical methods for microbiological water quality testing; in *OECD/WHO Guidance document „Safer Drinking Water – Improving the Assessment of Microbial Safety“, in Arbeit.*
- [11] **LeChevallier, M.W., Cameron, S.C. und McFeters, G.A.** (1982) New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 484–492.
- [12] **Lemieux, B., Aharoni, A. und Schena, M.** (1998) Overview of DNA chip technology. *Mol. Breeding* 4, 277–289.
- [13] **Lipshutz, R.J., Fodor, S.P.A., Gingeras, T.R. und Lockhart, D.J.** (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays Review. *Nature Genetics* 21(Suppl 5), 20–24.
- [14] **McFeters, G.A., Kippin, J.S. und LeChevallier, M.W.** (1986) Injured coliforms in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1–5.
- [15] **Prescott, A.M. und Fricker, C.R.** (1999) Use of PNA oligonucleotides for the in situ detection of *Escherichia coli* in water. *Molecular and Cellular Probes* 13, 261–268.
- [16] **Studer, E., Domke, M., Wegmüller, B., Lüthy, J., Schmid, S., und Candrian, U.** (1998). RFLP and sequence analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* PCR products amplified directly from environmental samples. *Lebensm. Wiss. Technol.* 31:537–545.
- [17] **Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering R.V., Mickelsen, P. A. Murray, B. E., Persing, D. H. und Swaminathan, B.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
- [18] **Trebesius, K., Amann, R., Ludwig, W., Mühlegger, K. und Schleifer K.-H.** (1994) Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive 23 S rRNA-targeted polynucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3228–3235.
- [19] **Williams, J. G. K., Kubelick, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. und Tingey, S. V.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531–6535.
- [20] **Van Poucke, S.O., Nelis, H.J.** (2000) Rapid detection of fluorescent and chemiluminescent total coliforms and *Escherichia coli* on membrane filters. *J Microbiol Methods.* 42:233–44.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Wolfgang Köster
Environmental Microbiology and Molecular Ecotoxicology (MIX)
 Swiss Federal Inst. for Environmental Science and Technology (EAWAG)
 Überlandstrasse 133
 CH-8600 Dübendorf
 Schweiz
 Tel.: +41-1-823 55 67
 Fax: +41-1-823 55 47
 E-Mail: wolfgang.koester@eawag.ch