

Anforderungen

an die mikrobiologisch-hygienische Trinkwasseruntersuchung: neue Verfahren

Direktausstrich von Legionellen

Quelle: Fischeder

Der Beitrag gibt einen Überblick über **Neuerungen und Änderungen bei mikrobiologischen Verfahren** im Trinkwasserbereich. Änderungen in den bestehenden Normen werden ebenso wie Probleme der Legionellenanalytik dargestellt. Weitere Punkte sind die **Anforderungen an die Qualitätssicherung** im akkreditierten Labor, insbesondere die neue Norm DIN EN ISO 11133 zur Überprüfung der Nährmedien, sowie ein kurzer Überblick über molekularbiologische und chemische Identifizierungsmethoden und ihre Einsatzbereiche.

von: Dr. Regine Fischeder et al.

Seit Inkrafttreten der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) am 1. Januar 2003 sind ausschließlich quantitative Analyseverfahren für die Bestimmung der mikrobiologischen Parameter vorgeschrieben. Es handelt sich bei den in Anlage 5 aufgelisteten Verfahren um international genormte Methoden, bisher mit Ausnahme der Methode zum Nachweis von *Clostridium perfringens*. Andere als die aufgeführten Untersuchungsverfahren können verwendet werden, „wenn das Umweltbundesamt auf Antrag allgemein festgestellt hat, dass die mit ihnen erzielten Ergebnisse im Sinne der allgemein an-

erkannten Regeln der Technik gleichwertig und mindestens genauso zuverlässig sind wie die mit den vorgegebenen Verfahren ermittelten Ergebnisse, und nachdem sie vom Umweltbundesamt in einer Liste alternativer Verfahren im Internet veröffentlicht worden sind“.

Mittlerweile gab es eine Aktualisierung der DIN EN ISO 9308-1 zum Nachweis von *E. coli* sowie coliformen Bakterien und die neue Norm ISO 14189 für *Clostridium perfringens*. Letztere wird bei der 4. Änderung der Trinkwasserverordnung in Anlage 5 aufgenommen werden.

Dies wurde vom DVGW-Projektkreis Mikrobiologie zum Anlass genommen, eine Informationsveranstaltung zu organisieren, die einen Überblick über die Neuerungen und Veränderungen bei mikrobiologischen Verfahren im Trinkwasserbereich gab. Es wurden Änderungen in den bestehenden Normen ebenso dargestellt wie Probleme bei der Legionellenanalytik. Weitere Punkte waren Aspekte der Qualitätssicherung im mikrobiologischen Labor wie z. B. die neue DIN EN ISO 11133 zur Überprüfung der Nährmedien sowie aktuelle Anforderungen der Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS). Außerdem wurde über den Nachweis von Phagen

als Indikator für das Vorkommen von Viren berichtet und ein Überblick über molekularbiologische und chemische Identifizierungsmethoden und ihre Einsatzbereiche gegeben.

Im Folgenden werden die Vorträge kurz zusammengefasst und die wichtigsten Diskussionspunkte aus den insgesamt vier Veranstaltungen (Bonn, Hannover, Leipzig, Karlsruhe) erörtert.

E. coli/coliforme Bakterien: Die Neufassung der DIN EN ISO 9308-1

Bei dem in der Trinkwasseranalytik verwendeten Begriff „coliforme Bakterien“ handelt es sich nicht um eine taxonomisch eindeutig definierte Gruppe, sondern um eine Zusammenfassung von Bakterien aus der Familie der Enterobakterien mit bestimmten biochemischen Eigenschaften. Coliforme Bakterien gelten nicht als reine Fäkalindikatoren, da sie je nach Art auch oder sogar ausschließlich in der Umwelt vorkommen.

In Abhängigkeit von den Nachweisverfahren werden unterschiedliche Arten als coliforme Bakterien erfasst. Nach dem Verfahren der Trinkwasserverordnung 1990 wurden coliforme Bakterien über das Merkmal „Säure- und Gasbildung aus Laktose“ definiert. Hierbei wurden laut DIN 38411, Teil 6, überwiegend Bakterien der Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Klebsiella* als coliforme Bakterien erfasst.

Bei Anwendung des Verfahrens nach der DIN EN ISO 9308-1 aus dem Jahre 2001, das gemäß TrinkwV 2001 in Deutschland seit dem Jahr 2003 als Referenzverfahren diente, wurde nur noch die „Säurebildung aus Laktose“ zum Nachweis der coliformen Bakterien verwendet. Die nicht gasbildenden Biotypen wurden hierbei im Gegensatz zum früheren Verfahren ebenfalls den coliformen Bakterien zugeordnet.

Gleichzeitig mit diesem Referenzverfahren wurde das Colilert®-Verfahren als gleichwertiges Verfahren für die Trinkwasseruntersuchungen auf *E. coli*

und coliforme Bakterien zugelassen. Die Bestimmung der coliformen Bakterien erfolgt bei dem Colilert®-Verfahren durch den Nachweis des Enzyms β -D-Galactosidase, das für die Laktose-Vergärung verantwortlich ist. Durch die Anwendung dieses Verfahrens wird das Spektrum der erfassten coliformen Bakterien auf etwa fünfzehn Gattungen erweitert.

Mit Inkrafttreten der TrinkwV 2001 führten die unterschiedlichen Coliformen-Nachweise, die man durch die mögliche Anwendung dieser beiden Verfahren erhält, zu kontroversen Diskussionen. Daher war es hilfreich, dass von der ISO-Arbeitsgruppe „Coliforme“ im Jahre 2006 die Definition für coliforme Bakterien und *E. coli* folgendermaßen festgelegt wurde:

- Coliforme Bakterien: Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae*, die das Enzym β -D-Galactosidase exprimieren
- *E. coli*: Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae*, die die beiden Enzyme β -D-Galactosidase und β -D-Glucuronidase exprimieren

Diese Definition wurde bei der Überarbeitung der DIN EN ISO 9308-1 berücksichtigt. Die Neufassung dieser Norm ist im Dezember 2014 in Kraft getreten und beschreibt nun ein Membranfiltrationsverfahren mit einem chromogenen Medium, auf dem diese beiden Enzymaktivitäten abgelesen werden können. Somit sind die Nachweisreaktionen für coliforme Bakterien und *E. coli* in den beiden für das Trinkwasser zugelassenen Verfahren identisch.

Durch die Verlagerung der Definition der coliformen Bakterien von der Laktose-Vergärung auf die Enzymaktivität werden mit den jetzt gültigen Verfahren auch solche Bakterienarten erfasst, die vorwiegend in der Umwelt (Boden und Wasser) vorkommen und nicht aus Fäkalien stammen. Dies schränkt die ohnehin nicht eindeutige Indikatorfunktion des Parameters coliforme Bakterien weiter ein. Diesem Umstand wurde bereits bei der Änderung der

TrinkwV im Jahr 2012 durch die Verschiebung der coliformen Bakterien von den mikrobiologischen Parametern (Anlage 1) zu den Indikatorparametern (Anlage 3) Rechnung getragen und der damit verbundenen Möglichkeit für die Gesundheitsämter, Ausnahme genehmigungen zuzulassen.

Grundsätzlich muss der Befund „coliforme Bakterien“ weiterhin für jeden Einzelfall bewertet und die hygienische Relevanz hinterfragt werden. Unabhängig davon gilt nach wie vor, dass das Vorkommen von coliformen Bakterien ein Indikator für Mängel bei der Aufbereitung, Desinfektion und Verteilung von Trinkwasser ist.

Bei dem in der aktuellen Fassung der DIN EN ISO 9308-1 beschriebenen Verfahren handelt es sich um ein Membranfiltrationsverfahren auf einem chromogenen Nährmedium (Chromogener Coliformen Agar, CCA).

Ein Vorteil dieses Verfahrens liegt in der kürzeren Analysendauer. Das Ergebnis des Nachweises für *E. coli* (blauviolett gefärbte Kolonie) liegt bereits nach 24 Stunden vor (Abb. 1). Auch die Ergebnisse für die anderen coliformen Bakterien liegen im Normalfall bereits nach einem Tag vor. Nur falls die Begleitflora die Durchführung des zur Bestätigung notwendigen Oxidase-Tests behindert oder die verdächtigen Kolonien sehr klein sind, verlängert sich die Untersuchungszeit wegen der erforderlichen Subkultivierung auf zwei Tage.

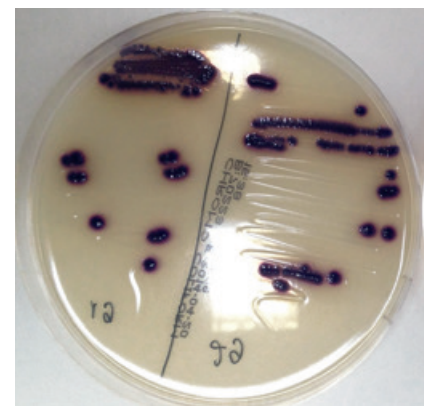


Abb. 1: Ausstriche von Reinkulturen von *E. coli* auf dem chromogenen Agar CCA

Quelle: Fischeder

Erfahrungen mit dem Chromogenen Coliformen Agar (CCA) haben gezeigt, dass die „Rosafärbung“ der als für coliforme Bakterien „verdächtig“ angesehenen Kolonien in Abhängigkeit von verschiedenen Nährbodenqualitäten stark variieren kann. Außerdem kann es, gerade bei desinfizierten Wässern, zu einer verzögerten Galactosidase-Reaktion kommen. Daher wird empfohlen, eine Bebrütungszeit von mindestens 21 Stunden einzuhalten. Derzeit wird die Norm dahingehend überarbeitet, dass die Bebrütungszeit zukünftig von „21 ± 3 Stunden“ auf „21 bis 24 Stunden“ geändert werden soll.

Die Auswertung des Oxidase-Tests der bereits rosa gefärbten Kolonien, die direkt vom CCA abgenommen werden, erfordert von den Labormitarbeitern Erfahrung, um eine eventuelle Veränderung von Rosa nach Blau/Violett eindeutig zu erkennen. In vielen Fällen vereinfacht eine Subkultivierung der roten und rosafarbenen Kolonien z. B. auf DEV-Agar das Ablesen des Oxidase-Tests.

Aeromonaden wachsen ebenfalls als deutlich rosa gefärbte Kolonie auf dem CCA, können aber durch die positive Oxidase-Reaktion eindeutig von coliformen Bakterien unterschieden werden.

Wie schon bei der Vorgängermethode mit Laktose-TTC-Agar können auch auf dem CCA grampositive Kokken falsch positive Befunde verursachen. Diese erschienen auf dem Laktose-TTC-Agar als sehr kleine, gelb gefärbte Kolonien. Auf dem CCA wachsen sie als sehr kleine, schwach rosa gefärbte Kolonien. Zusammen mit einer negativen Oxidase-Reaktion könnten sie als falsch positive coliforme Bakterien gewertet werden. In der Regel zeigen diese Bakterien bei einer Subkultivierung auf CCA allerdings kein Wachstum mehr, außerdem kann der Verdacht auf grampositive Kokken auch mithilfe der Mikroskopie (Gramfärbung) bestätigt werden.

Wie bei allen anderen Membranfiltrationsverfahren ist es auch beim Nachweis von *E. coli* und coliformen

Bakterien wichtig, eine geeignete Kombination aus Membranfilter und Nährboden zu finden, die chargenweise überprüft werden sollte, da deutliche Unterschiede bei den Nährboden- und Membranfilterqualitäten existieren.

***Clostridium perfringens* (einschließlich Sporen)**

Für den Nachweis von *Clostridium perfringens* gab es bisher, im Gegensatz zu den übrigen (mikrobiologischen) Parametern, kein CEN/ISO-Verfahren. Das in Anlage 5 der TrinkwV 2001 aufgeführte Analyseverfahren ist „[...] bis zur etwaigen künftigen Annahme weiterer internationaler CEN/ISO-Verfahren für diese Parameter [...]“ vorgeschrieben.

Die Normungsarbeit für das TSC-Verfahren speziell für *Clostridium perfringens* wurde bereits mehrmals gestartet, zuletzt unter dem Vorsitz von Österreich. Am 1. November 2013 wurde dann die ISO 14189 (Nachweis von *Clostridium perfringens* aus Wasserproben) beim Beuth-Verlag veröffentlicht. Eine deutsche Übersetzung und Übernahme der Norm als EN und DIN ist vorgesehen. Aber ab wann soll bzw. muss die neue Norm angewendet werden?

Da es keine eindeutige Übergangsregelung gibt, wurde seitens des Umweltbundesamtes vorgeschlagen, „bis zu einer neuen Entscheidung des Ordnungsgebers sowohl das m-CP-Verfahren als auch das Verfahren nach ISO 14189 als zulässige mikrobiologische Analyseverfahren für *Clostridium perfringens* (einschließlich Sporen) zu behandeln.“ Dennoch wird empfohlen, sich rechtzeitig mit der neuen Methode vertraut zu machen und an den vom Niedersächsischen Landesgesundheitsamt (NLGA) angebotenen Ringversuchen teilzunehmen.

Das Verfahren an sich ist nicht neu, Tryptose-Sulfit-Cycloserin (TSC)-Agar war bereits Bestandteil der ISO 6461-2 (1986) zum Nachweis anaerober sulfitreduzierender Sporenbildner (*Clostridien*). Für den Nachweis von *Clos-*

tridium perfringens wurden zu Beginn der Normung neben der Sulfitreduktion vier Differenzierungstests vorgeschlagen, im Lauf der Normung blieb der Nachweis der Sulfitreduktion (Schwarzfärbung der Kolonien) und der sauren Phosphatase übrig.

Auch wenn die Produktivität im Vergleich zum m-cp-Agar höher ist¹, gibt es verschiedene (erhebliche) Nachteile des Verfahrens:

- Die Stärke der Sulfitreduktion und somit die Schwarzfärbung der Kolonie ist abhängig von Alter und Lagerung der TSC-Platten.
- Bei nicht-vorreduzierten TSC-Platten besteht die Möglichkeit, dass kein Nachweis der Sulfitreduktion möglich ist. Grundsätzlich müssen alle Kolonien von beige über grau nach schwarz als verdächtig angesehen werden.
- Es gibt deutliche Qualitätsunterschiede bei TSC-Fertigplatten. Es sollten verschiedene Herstellerchargen getestet werden, immer in Verbindung mit dem Membranfilter, um die optimale Kombination herauszufinden. Selbst hergestellte Medien, die anaerob gelagert werden, ergaben bisher die besten Ergebnisse.
- Das Phosphatase-Reagenz enthält die giftige (und teure) Komponente Fast Blue B Salt (toxisch und mutagen) und ist nur zwei Wochen haltbar.
- Die erforderliche Subkultivierung für den Bestätigungstest bedeutet eine Verlängerung der Analysendauer auf mindestens zwei Tage bei positivem Befund.

Bereits während der Normung haben verschiedene Laboratorien (Mitglieder des Projektkreises Mikrobiologie) Versuche zur Vereinfachung des Phosphatasetests gemacht, z. B. die Umgehung der Subkultivierung durch Einlegen des bewachsenen Membranfilters in eine „Pflanze“ des Phosphatase-Reagenz. Dies funktioniert allerdings nur bei

¹ persönliche Mitteilung von Dr. Luden vom Niedersächsischen Landesgesundheitsamt

schwach gefärbten Kolonien und das Reagenz muss weiterhin hergestellt werden. Um Letzteres zu umgehen, wurde vorgeschlagen, den m-cp-Agar für die Bestätigungsreaktion einzusetzen – dies fand dann auch Eingang in ein nationales Vorwort zur Norm (Empfehlung des NA 119-01-03-03 UA „Mikrobiologie“): „Das Reagenz für saure Phosphatase beinhaltet eine giftige und Krebs erzeugende Komponente (Echtblausalz B), ist aufwändig in der Herstellung und verfügt über eine geringe Haltbarkeit. Daher wird [...] auf eine alternative Nachweisreaktion der sauren Phosphatase hingewiesen. Diese beinhaltet anaerobes Subkultivieren der zu überprüfenden Kolonien über Nacht auf m-CP-Agar bei $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$ und anschließendes Bedampfen mit Ammoniumhydroxid über eine Dauer von 20 bis 30 Sekunden. Eine Rosa- bis Rotfärbung zunächst dunkelgelber Kolonien gilt als bestätigter Nachweis der sauren Phosphatase.“

Trotz all der beschriebenen negativen Begleitumstände – die TSC-Methode ist nur für saubere Wässer (Trinkwässer) geeignet und bei Trinkwässern ist in der Regel nicht mit einem positiven Befund zu rechnen, sodass die Anzahl der verdächtigen Kolonien (und die Anzahl der anzulegenden Subkulturen) für die Bestätigung vermutlich gering ist. Aus diesem Grund werden keine größeren Probleme bei der Umstellung der Methoden erwartet.

Für belastete Rohwässer (z. B. Oberflächenwasser, Uferfiltrat) ist das m-CP-Verfahren weiterhin anwendbar, da das m-CP-Medium weiterhin benötigt wird und somit verfügbar ist.

Trinkwasser und Qualitätssicherung

Mit der DIN EN ISO 11133 zum Thema Qualitätssicherung von Nährmedien wurde der erste gemeinsame Standard in der Lebensmittel- und Wassermikrobiologie erstellt – entsprechend umfangreich und ausführlich ist der Text der Norm, zuzüglich der Anhänge A bis J.

Grundsätzlich ist die Forderung zur Qualitätssicherung von Nährmedien nicht neu: Mindestens qualitative Positiv- und Negativkontrollen sowie Sterilkontrollen waren schon lange Bestandteil der guten Laborpraxis (oder sollten es gewesen sein!).

Die wichtigsten Aspekte der neuen Norm sind:

- Welche Testungen müssen die Hersteller von Nährmedien und welche muss der Anwender bzw. das Prüflabor durchführen?
- Alle Bakterienstämme aus veröffentlichten ISO-Normen, die als Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt werden sollen, sind mit WDCM-Nummern aufgelistet. In Anhang F sind die Mikroorganismen für die Wassermikrobiologie erfasst.
- Nährmedien, die für quantitative Methoden vorgesehen sind, müssen auch quantitativ überprüft werden. Bei Verwendung von Membranfiltrationsverfahren muss die Kombination Filter/Medium getestet werden – sowohl bei Chargenänderung der Membranfilter als auch der Medien.
- Es gibt genaue Angaben zur Herstellung von Gebrauchskulturen der Referenzstämmen und zur Durchführung von Prüfungen.

Wenn ein Hersteller von Nährmedien selbst die Prüfungen gemäß DIN EN ISO 11133 in (s)einem akkreditierten Labor durchführt bzw. durchführen lässt und dies dem Käufer mit einem entsprechenden Zertifikat bestätigt, kann der Käufer seine Qualitätssicherung auf qualitative Positiv- und Negativkontrollen und eine Sterilkontrolle beschränken.

Nach Beschluss des Sektorkomitees „Gesundheitlicher Verbraucherschutz“ der DAkkS und des zugehörigen Fachbeirats haben die Labore noch bis Ende 2016 Zeit, die entsprechenden Vorgaben der Norm umzusetzen.

Die DAkkS-Regel 71 SD 4 011 „Anforderungen bei der Akkreditierung von Untersuchungsstellen für Trinkwasser“ ▶

Elektroakustische Wasserlecksuche

AQUAPHON® A 200

professionell – flexibel – intelligent



- schnelle und zuverlässige Benutzerführung durch Anwendungsfälle
- kabelloses, komfortables Arbeiten durch Funkkomponenten
- schnelle und präzise Leckortung durch intelligente Filter
- integrierter Audioplayer zum direkten Vor-Ort-Vergleich von Leckgeräuschen
- Wasserdicht (IP67)



wurde innerhalb der DAkKS-Gremien unter Mitarbeit von Behörden und Institutionen erstellt und wird ständig überarbeitet. Aktuelle Papiere für Laboren (und Begutachter) sind auf der Webseite der DAkKS zu finden.

In dem Papier 71 SD 4 011 finden sich u. a. Hinweise zu externen Probenehmern (Einbindung, Schulung, Begutachtung usw.), Definitionen von Unterauftrags- und Fremdvergabe, Mindestzahl zu bestehender Ringversuche und eine Erläuterung zu den Anforderungen an Prüfberichte. Ein weiterer wichtiger Punkt im Rahmen der Akkreditierung ist die Flexibilisierung (DAkKS-Dokument 71 SD 0 002), d. h., neue Verfahren im flexiblen Geltungsbereich können ohne Benachrichtigung der DAkKS (und vor allem ohne erneute Begutachtung) eingesetzt werden. Für die Verfahren der TrinkwV 2001 (es gilt die jeweils aktuelle Liste der Verfahren des Umweltbundesamtes) ist lediglich eine Flexibilisierung der Stufe III möglich, d. h., es können – ohne Benachrichtigung der DAkKS – neue Ausgabestände einer Norm eingesetzt werden. Dies ist z. B. wichtig für die Umstellung auf die überarbeitete Norm 9308-1 (coliforme Bakterien und *E. coli*), während es sich beim Nachweisverfahren für *C. perfringens* um eine neue Norm handelt, die vom Labor bei der DAkKS gemeldet werden muss.

Bei Begutachtungen der DAkKS in Trinkwasserlaboratorien gibt es bestimmte Abweichungen, die immer wieder auftreten, in der Regel aber nicht kritisch sind. Die folgende Liste gibt einige wenige Beispiele, erhebt aber keinen Anspruch auf Vollständigkeit:

- Prüfungen oder Kontrollen werden durchgeführt, aber nicht dokumentiert.
- Dokumente sind nicht aktuell (z. B. Arbeitsanweisungen).
- Interne Audits, Schulungen u. ä. fehlen oder sind nicht (ausreichend) dokumentiert.
- Proben, Stämme und Reagenzien werden nicht getrennt gelagert.
- Es wird mit Tipp-Ex übermalt oder

mit einem Stift unleserlich durchgestrichen.

- Es werden „alte“ Methoden im Akkreditierungsumfang belassen, ohne dass QS-Maßnahmen oder Ringversuche durchgeführt werden.
- Es fehlt eine Regelung zur Raumluftüberwachung.

Zu den deutlich seltener vorkommenden kritischen Abweichungen gehören z. B. fehlende Positiv- und Negativkontrollen oder fehlende Prüfmittelüberwachung.

Bei der sehr lebhaften Diskussion zum Thema Abweichungen zeigte sich (wieder), wie unterschiedlich Begutachter bestimmte Vorgehensweisen im Labor beurteilen.

Bei der Begutachtung geht es in erster Linie um die Kompetenz eines Labors, die sich nicht ausschließlich durch das Abhaken eines Fragekatalogs und Ausfüllen von Formblättern beurteilen lässt. Grundsätzlich gilt: Wenn ein Labor nicht mit der vom Begutachter gefundenen Abweichung einverstanden ist, sollte es mit einer guten Begründung dagegen Einspruch erheben. Der Fall kann dann im Sektorkomitee besprochen und gegebenenfalls entschieden werden.

Probleme bei der Legionellenanalytik

Legionellen sind weit verbreitete Bakterien, die in allen Wässern vorkommen können. Die Kultivierung von Legionellen ist nur auf speziellen Nährböden unter bestimmten Bedingungen möglich, da sie für die Vermehrung Cystein und Eisensalze benötigen.

Verschiedene Normen beschreiben das Verfahren für den Nachweis von Legionellen. Während die ISO 11731 bei allen Arten von Umweltproben, eingeschlossen Trinkwasser, Prozesswasser und natürliche Wässer sowie verwandte Materialien, wie Sedimente, Ablagerungen und Biofilme, Anwendung findet, beschreibt die DIN EN ISO 11731-2 das Membranfiltrati-

onsverfahren, welches für Wässer mit niedriger Bakterienzahl geeignet ist.

Für den Nachweis von Legionellen im Trinkwasser regelt die Trinkwasserverordnung in den §§ 14 und 15, wann und wo Legionellen in Trinkwasser zu untersuchen sind. In Anlage 5, Teil 1, Buchstabe f der TrinkwV 2001 ist festgelegt, dass die Untersuchung auf Legionellen entsprechend den oben genannten Normen, der ISO 11731 sowie der DIN EN ISO 11731 Teil 2, unter Berücksichtigung gegebenenfalls vorliegender Empfehlungen des Umweltbundesamtes, durchzuführen ist.

Derzeit liegt zur Untersuchung von Trink- und Schwimmbadwasser auf Legionellen eine Empfehlung des Umweltbundesamtes aus dem August 2012 vor, welche ein Untersuchungsverfahren, basierend auf den beiden genannten Normen, beschreibt.

Probleme bei der Legionellenanalytik ergeben sich in der Regel bei Wässern mit hoher Begleitflora (z. B. Kühlwasser, Oberflächenwasser, Abwasser). So kann beispielsweise das Wachstum von Pilzen, schwärmenden Bakterien sowie von *Pseudomonas aeruginosa* die Auswertung der Ansätze erschweren bzw. unmöglich machen. Von den einzelnen Laboratorien werden deshalb verschiedene Maßnahmen zur Unterdrückung der Begleitflora durchgeführt (z. B. Hitzebehandlung, Säurebehandlung, Verdünnung der Probe). Diese unterschiedlichen Vorgehensweisen können in Einzelfällen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, sodass empfohlen wird, die Verfahrensweise auf dem Prüfbericht zu dokumentieren.

Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass die Legionellenanalytik, gerade bei Wasserproben mit hoher Begleitflora, nur von erfahrenen und geschulten Mitarbeitern durchgeführt werden sollte. Um ein einheitliches Vorgehen der Mitarbeiter im Labor zu gewährleisten, werden interne Qualitätssicherungsmaßnahmen empfohlen (z. B. Parallelzählungen).

Zurzeit wird die ISO 11731 überarbeitet und liegt als 4th Draft ISO/DIS 11731 vor. Als Anlass der Überarbeitung können folgende Gründe genannt werden:

- Der GVPC-Agar, der in Deutschland verwendet wird, ist für den Nachweis von *Legionella pneumophila* gut geeignet, das Koloniewachstum anderer Legionellenarten wird allerdings gehemmt.
- Es ist bekannt, dass die Behandlungsmethoden zur Unterdrückung der Begleitflora (Hitze- und/oder Säurebehandlung) sowie das Untersuchungsverfahren (Direktansatz, Membranfiltration mit/ohne Resuspendierung der Bakterien) sich auf die Wiederfindung verschiedener Legionellenarten auswirken können.
- In anderen Ländern, z. B. in den Niederlanden, erfolgt der Nachweis von Legionellen auf anderen Nährmedien. Die Länder haben insofern das Interesse, die bei ihnen etablierten Nährmedien weiterhin zu verwenden.

Zukünftig wird die Art und Beschaffenheit der Wasserprobe die Probenbehandlung zur Unterdrückung der Begleitflora (z. B. Säurebehandlung, Hitzebehandlung, Verdünnung der Probe), die Wahl des Nährmediums (z. B. BCYE, BCYE + AB, MWY, GVPC) sowie das Untersuchungsverfahren (Direktansatz, Membranfiltration) bestimmen.

Phagen

Zur Gewährleistung der Abgabe von hygienisch einwandfreiem Trinkwasser an den Konsumenten ist eine Risikobewertung für die Gewinnung, Aufbereitung und Verteilung der zu diesem Zweck genutzten Wasser unabhängig. Explizit empfohlen wird dies von der WHO im Rahmen eines Water Safety Plan. Für diese Risikobewertung ist nicht nur die Kenntnis der Qualität des Rohwassers notwendig, sondern auch der Leistungsfähigkeit der einzelnen Aufbereitungsstufen.

Innerhalb des für die Untersuchung und Bewertung der mikrobiologischen Qualität von Trinkwasser angewendeten Indikatorprinzips gibt es für bakterielle Krankheitserreger und auch für Parasiten festgelegte Indikatoren (z. B. *E. coli*, *Clostridium perfringens*). Auf diese wird, anstatt der eigentlichen Krankheitserreger, untersucht. Bei Viren als dritter Gruppe potenzieller Krankheitserreger gibt es hierfür keine konkreten Vorgaben in der TrinkwV 2001. Die Analytik der verschiedenen, potenziell durch Wasser übertragbaren enteropathogenen Viren ist methodisch schwierig, teilweise unmöglich, aufwendig und daher für Wasserversorgungslabore innerhalb der Routineuntersuchung nicht machbar. Phagen sind Viren, die Bakterien infizieren. Deren Analyse ist im Vergleich einfach, robust und kostengünstig. Phagen ähneln in Größe, Aufbau, Struktur sowie Widerstandsfähigkeit den relevanten in Rohwässern vorkommenden Viren und sind daher ein geeigneter Indikator zur Prüfung der Wasseraufbereitung, einschließlich der Desinfektion.

Der Nachweis ist in DIN EN ISO 10705 genormt und beschreibt in Teil 1 die Analyse von F-spezifischen Bakteriophagen und in Teil 2 den Nachweis von somatischen Coliphagen. Der Nachweis der somatischen Coliphagen ist einfacher und robuster und die beiden Wasserversorger Bodensee-Wasserversorgung und Stadtwerke Düsseldorf AG untersuchen z. B. regelmäßig ihr Rohwasser und die Aufbereitungsstufen (teilweise nachgestellt in Versuchsanlagen) auf diesen Parameter. Darüber hinaus wurden in beiden Laboren, in Anlehnung an die Norm, weitergehende Methoden entwickelt, um das zu untersuchende Volumen zu vergrößern und damit eine größere Aussagekraft zu erreichen.

Identifizierung von Bakterien – Welche Verfahren gibt es und wann sind sie sinnvoll?

Die Überwachungsparameter nach TrinkwV 2001 in mikrobiologischer Hinsicht bestehen ausschließlich aus

Indikatorparametern. Dabei sollen nicht bestimmte einzelne Bakterienarten als Krankheitserreger detektiert werden, sondern solche Gattungen und Arten, die in fäkalen Verunreinigungen vorhanden sind und damit die potenzielle Anwesenheit von fäkalen Krankheitserregern anzeigen. Solche Nachweise führen zu entsprechenden Maßnahmen wie z. B. Inbetriebnahme von Desinfektionsmaßnahmen oder Abkochverfügungen.

Allerdings ist die Indikatorfunktion von coliformen Bakterien eingeschränkt, da diese sowohl fäkale Verunreinigungen als auch Verunreinigungen nichtfäkaler Herkunft anzeigen können (Empfehlung des Umweltbundesamtes von 2009). Insofern ist gerade bei Nachweisen von coliformen Bakterien unter Umständen eine Identifizierung sinnvoll, um zu prüfen, ob es sich um eine Spezies handelt, die ausschließlich in der Umwelt vorkommt, oder um eine, die fäkalen Ursprungs sein kann. Auch bei dem Nachweis von Enterokokken gibt es einzelne Spezies, die mit dem Referenzverfahren erfasst werden, aber nicht fäkalen Ursprungs sind [2].

Wenn daher systemische Kontaminationen von coliformen Bakterien oder Enterokokken in Trinkwasserversor-



NEU
DALMINEX
Standrohr

iro
IRO Oldenburg 2016
Rohrleitungen im Wärme- und
Energie-transport
11.02. - 12.02.2016
Stand-Nr.: 2. OG-H-7

DALMINEX GmbH • Halleforthstraße 87 • 33758 Schloß Holte-Stukenbrock
Tel.: 0049 (0)5207 9137 0 • E-Mail: kluge@dalmindex.de • Internet: www.dalmindex.de

gungssystemen nachgewiesen werden, kann die Identifizierung der vorkommenden Spezies sinnvoll sein. Auch für die Ursachenforschung kann die Identifizierung hilfreich sein, da bestimmte Arten unter Umständen nur in bestimmten Habitaten vorkommen. Eine Identifizierung der autochthonen Bakterien, die z. B. bei der Koloniezahlbestimmung erfasst werden, ist dagegen nicht sinnvoll.

Als mögliche Identifizierungsverfahren sind zu nennen:

1. Identifizierung aufgrund der biochemischen Eigenschaften (z. B. API®)
2. Identifizierung mithilfe der Flugzeit-Massenspektrometrie MALDI-TOF-MS
3. PCR über die Analyse des 16S-rRNA-Gens oder funktioneller Gene mit Sequenzierung und Sequenzanalyse
4. Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (Gensonden) verfügbar für Familien, Gattungen, Arten und einzelne Stämme

Für die ersten drei Verfahren ist der Ausgangspunkt jeweils eine Kolonie als Reinkultur.

Der FISH-Nachweis (4.) ist theoretisch auch für Einzelzellen anwendbar (mikroskopischer Nachweis). Dieses Verfahren kann dementsprechend auch für nicht kulturell verfügbare Bakteriengruppen angewendet werden. Die käuflichen Kits, die für manche Bakteriengruppen verfügbar sind, sind teurer als Materialien für Kulturverfahren. Für die Auswertung muss in dem anwendenden Labor immer ein Epifluoreszenz-Mikroskop vorhanden sein und die Anwendung erfordert erfahrenes Personal.

Die Methoden 1 und 2 wurden vor allem für medizinische Anwendungen entwickelt und stoßen daher bei Umweltisolaten häufig an ihre Grenzen. Die Identifizierungen sind hier nur für solche Isolate möglich, die auch in der jeweiligen Datenbank bereits enthalten sind, was bei Umweltisolaten bisher in der Regel nicht der Fall ist. Die

biochemischen Nachweisreaktionen z. B. über API® sind relativ einfach und kostengünstig durchzuführen.

Der Nachweis über MALDI-TOF-MS geht sehr schnell, erfordert jedoch teure Instrumente, die in der Regel aber bei medizinischen Laboratorien vorhanden sind. Die Differenzierung von Isolaten kann dort beauftragt werden.

Die Methode 3 stellt den Gold-Standard dar, da mit diesem Verfahren in der Regel auch Umweltisolate eindeutig identifiziert werden können. Ausgehend von einer Bakterienkolonie wird ein charakteristischer Genabschnitt (das 16S-rRNA-Gen oder ein funktionelles Gen) über eine PCR vervielfältigt und anschließend dessen DNA-Sequenz bestimmt. Durch den Vergleich dieser Sequenz mit den verfügbaren umfangreichen Datenbanken ist die Identifizierung bis auf Gattungs- oder Speziesebene möglich. Diese Methodik ist nicht auf bestimmte Bakteriengruppen beschränkt und erlaubt auch die Einordnung bisher noch unbekannter Isolate. Auch diese Methodik ist auf Speziallaboratorien beschränkt.

Die verschiedenen Verfahren sollten der jeweiligen Problemstellung angepasst sein. Eine Identifizierung ist nur dann sinnvoll, wenn sie für die Ursachenforschung Erkenntnisse bringt. Eine generelle Identifizierung bei allen Positivnachweisen sollte nicht gefordert werden.

Fazit

Es hat sich gezeigt, dass die Themenauswahl der eingangs erwähnten Informationsveranstaltung des DVGW auf großes Interesse gestoßen ist, was auch durch die Nachfrage nach weiteren Veranstaltungen im Jahr 2016 belegt wird.

Es gab viele Fragen und interessante Diskussionen zu den Vorträgen und leider reichte die Zeit nicht aus, alle Aspekte zu beleuchten. Vor dem Hintergrund ständiger Veränderungen der gesetzli-

chen und normativen Regelungen zeigt sich daher, wie wichtig ein regelmäßiger fachlicher Austausch, z. B. in Form einer solchen Veranstaltung, im Bereich der Wassermikrobiologie ist. ■

Literatur

- [1] Korth, Petzoldt, Nitsche, Hamsch, Hügler: Enterokokkenbelastungen im Trinkwasser – Ursachenanalyse. In: DVGW energie | wasser-praxis 9/2013, S. 54–60.

Die Autoren

Dr. Uta Böckelmann, Berliner Wasserbetriebe Laboratorien, Berlin

Dr. Regine Fischeder, Zweckverband Landeswasserversorgung, Langenau

Barbara Gerten, Merck KGaA, Darmstadt

Dipl.-Biol. Kerstin Gröbe, Aqua Service Schwerin Labor Rostock, Rostock

Dr. Beate Hamsch, DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW), Karlsruhe

Dr. Beate Kilb, IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser, Beratungsgesellschaft mbH, Mülheim a. d. Ruhr

Dipl.-Biol. Bernd Lange, IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser, Beratungsgesellschaft mbH, Mülheim a. d. Ruhr

Dr. Jürgen Meyer, Zweckverband Bodensee-Wasserversorgung BWV, Sipplingen

Dr. Anne Soltwisch, Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH, Gelsenkirchen

Dr. Steffen Schneider, Hessenwasser GmbH & Co. KG, Darmstadt

Dipl.-Biol. Vera Schumacher, Stadtwerke Düsseldorf AG, Düsseldorf

Kontakt:

Dr. Regine Fischeder
Zweckverband Landeswasserversorgung
Am Spitzigen Berg 1
89129 Langenau
Tel.: 07345 9638-2263
E-Mail: fischeder.r@lw-online.de
Internet: www.lw-online.de