

Die faszinierenden neuen Möglichkeiten der mikrobiologischen Methodik und molekularen Diagnostik im Wasserfach

Wer hätte vor dem Auftreten von COVID-19 (oder SARS-CoV2) gedacht, dass sich eine Pandemie als breiter öffentlichkeitswirksamer Werbeträger für die Anwendung molekularbiologischer und biochemischer Methoden entpuppt? Fachausdrücke wie PCR- und Antigentestung, ja sogar Nukleinsäure-Sequenzierung gehören mittlerweile zum Standard-Repertoire des „ganz normalen“ Erdenbürgers. Und es ist inzwischen fast jedem klar geworden, dass ohne Einsatz dieser leistungsfähigen Methoden das Krisenmanagement einem Blindflug gleichen würde. Die breite Anwendung dieser Methoden ist bis auf weiteres nicht wegzudenken.

Ein ähnlicher „Akzeptanzgewinn“ hinsichtlich einer analytisch-diagnostischen Methodik muss sich vor etwa 150 Jahre abgespielt haben, wenngleich, ohne Hilfe von Social Media und Fernsehen, auf die engere Fachwelt beschränkt bleibend. Durch Nobelpreisträger Robert Koch & Co konnten erstmals Krankheitserreger, anstatt der postulierten üblen Gerüche (Miasmen), als Ursache für Seuchenausbrüche identifiziert und darüber hinausgehend Verschmutzungs- und Infektionsquellen in der Umwelt nachverfolgbar gemacht werden. In diesem sogenannten „goldenen Zeitalter“ der Mikrobiologie wurde der Grundstein für die kultivierungsbasierten Standardmethoden zum Nachweis von mikrobiologischen Qualitätsindikatoren und Krankheitserregern gelegt: ein methodischer Quantensprung. Der Nachweis – beispielsweise des Fäkalindikatorbakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) – wird seit damals in qualitätsgesicherten Labors auf Basis der Koloniebildung durch Zellteilung auf Nährböden zur mikrobiologisch-hygienischen Untersuchung von Wasser eingesetzt.

Der Bedarf an komplementären Ergänzungsmethoden Kultivierungsbasierte Standardmethoden sind in der regelmäßigen akkreditierten Überwachung der mikrobiologisch-hygienischen Wasserqualität essentiell (z.B. Trinken und menschlicher Gebrauch, Freizeit/Schwimmen, Bewässerung). Sie stellen ein grundlegendes Element im modernen Qualitätsmanagement von Wasserressourcen im Sinne der öffentlichen Gesundheit dar. Ohne sie wäre das tägliche Leben in dieser Form nicht vorstellbar. Nichtsdestotrotz können viele weiterführende Frage- und Problemstellungen im Wasserfach mit Hilfe kultivierungsbasierter Standardmethoden nicht oder nur unzureichend bearbeitet oder gelöst werden. Dieser Bedarf an methodischen Ergänzungen wird durch die zunehmenden Anforderungen an die Qualitätsvorgaben verstärkt, wie beispielsweise durch risiko-basierte Analysenziele oder die Notwendigkeit der Aufklärung von Ursache oder Herkunft mikrobiologischer Kontaminationen. Die Möglichkeit zur Öffnung der mikrobiologischen „Black-Box“ wird daher in vielen Fällen im Zuge eines pro-aktiven und nachhaltigen Ressourcen- und Qualitätsmanagements zunehmend eingefordert.

Die neuen Möglichkeiten der Biotechnologie & Life Sciences Die rasanten Entwicklungen im Bereich der Lebenswissenschaften, Bio- und Informationstechnologien wie auch der Automatisierungstechnik haben beeindruckende Möglichkeiten für die mikro- und molekularbiologische Diagnostik in den letzten Jahrzehnten geschaffen. Mit Hilfe moderner molekularbiologischer und biochemischer Methoden lassen sich beispielsweise Mikroorganismen und Viren in ihre „Bausteine“ zerlegen (z.B. Basen der Nukleinsäuren oder Aminosäuren von Proteinen) um daraus Information zu deren Identität, Herkunft, häufig auch zur Relevanz bzw. Aktivität abzuleiten. Die generierten Datenmengen können anschließend mit Hilfe bioinformatischer Analysentools archiviert, mit Referenzdatenbanken verglichen und letztendlich ausgewertet werden (z.B. Identifikation unbekannter viraler oder bakteriologischer Isolate). Viele der vor einigen Jahren in der mikrobiologischen Untersuchung von Wasser noch gänzlich unlösbaren Fragestellungen sind mit diesen modernen Verfahren einer Analyse zugänglich gemacht geworden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig festzuhalten, dass diese neuen



(Foto: KL/Andrea Reischer)

Univ.-Prof. PD Dr. Andreas Farnleitner



Dr. Franziska Zibuschka

Methoden die gesetzlich vorgeschriebenen Untersuchungsstandards keinesfalls ersetzen, sondern bei Bedarf komplementieren können.

Der ÖWAV-Arbeitsausschuss „Mikrobiologie und Wasser“ Dieser Arbeitsausschuss der Fachgruppe Qualität und Hygiene hat sich zum Ziel gesetzt, die neuen Möglichkeiten der mikrobiologischen Methodik und molekularbiologischen Diagnostik zur Lösung aktueller Problemstellungen im Wasserfach laufend zu diskutieren und die essentiellen Entwicklungen und Informationen auf der Expertenebene – möglichst gut verständlich – zugänglich zu machen. Der methodisch-thematische Bogen ist dabei ganz im Sinne des ÖWAV breit angelegt und umfasst mikrobiologisch-hygienische Fragestellungen der menschlichen Nutzung von Wasserressourcen (wie bereits weiter oben ausgeführt), biotechnologisch-analytische Aspekte im Wasserfach (z. B. Mikrobiom-Analysen in der biologischen Abwasserreinigung, Biostabilitätsuntersuchungen in der Wasserversorgung), sowie, nicht zu vergessen, mikrobiell-ökologische Aspekte unserer Gewässer und Wasserressourcen. Zu schlagartig neuer Bedeutung und medialer Präsenz gelangt ist aus methodischer Sicht das Gebiet der abwasserbasierten Epidemiologie von Krankheitserregern, wie es das aktuelle Thema SARS-CoV-2 Überwachung zeigt. Die Aktivitäten des ÖWAV Arbeitsausschusses sind dabei nicht auf einige wenige Wasserarten bzw. Kompartimente beschränkt, sondern werden möglichst umfassend diskutiert (z. B. Oberflächenwasser, Grundwasser, Trinkwasser, Abwasser).

Zu den Tätigkeiten des Ausschusses wurden in den vergangenen Jahren bereits mehrere Seminare abgehalten. Beim Seminar 2017 wurde zudem der ÖWAV-Arbeitsbehelf 52 „Mikrobiologie und Wasser, Teil 1 – Übersicht zu den methodischen Möglichkeiten der Analyse“ vorgestellt (ÖWAV 2017). Dieser Arbeitsbehelf versucht einen kurzen und verständlichen Überblick für den/die Praktiker/in im Wasserfach über die derzeit vorhandenen Untersuchungsverfahren zu geben. Dabei wird neben den kultivierungsbasierten Standardverfahren vor allem die Vielfalt der ergänzenden Verfahren dargestellt und erklärt („von der DNA/RNA Diagnostik bis zur on-line Messtechnik“). Im Jahr 2022 soll nun erneut ein weiteres Seminar dieses Ausschusses stattfinden, bei dem der ergänzende ÖWAV-Arbeitsbehelf „Mikrobiologie und Wasser, Teil 2 – Fallstudien zur Illustration der neuen diagnostisch-analytischen Möglichkeiten“ (ÖWAV 2022) präsentiert werden wird. Der Schwerpunkt in diesem Arbeitsbehelf wird dabei auf die Demonstration der Lösungsmöglichkeiten mikrobiologischer Problemstellungen im Wasserfach mit Hilfe der neuen ergänzenden mikrobiologischen Methodik und molekularen Diagnostik gerichtet.

Ziel und Inhalt des vorliegenden Themenhefts 11-12/21 Der Themenschwerpunkt „Die neuen Möglichkeiten der mikrobiologischen Diagnostik zur Analyse der Wasserqualität“ der Österreichischen Wasser- und Abfallwirtschaft kann gewissermaßen als offizieller und sichtbarer Startschuss für die geplanten Aktivitäten 2022 des ÖWAV-Arbeitsausschusses „Mikrobiologie und Wasser“ gesehen werden. Es konnten eine Reihe von Originalarbeiten editiert werden, die in Summe einen ersten eindrucksvollen und prägnanten Einblick in die neuen Möglichkeiten der mikrobiologischen Methodik und molekularen Diagnostik geben um aktuelle oder ungelöste mikrobiologische Problemstellungen des Wasserfaches anzusprechen. Herzlichen Dank an alle Autoren für ihre Bemühungen, die zur erfolgreichen Realisierung dieses Themenschwerpunktes geführt haben. Im Gegensatz zum für 2022 geplanten Arbeitsbehelf „Mikrobiologie und Wasser, Teil 2 – Fallstudien zur Illustration der neuen diagnostisch-analytischen Möglichkeiten“ (ÖWAV 2022), sind die Originalarbeiten in dieser Ausgabe in englischer Sprache gehalten. Damit soll auch die nicht-deutschsprachige (internationale) ÖWAV Leserschaft erreicht werden.

Die Überwachung und auch Bewertung des ökologischen Qualitätszustandes des Grundwassers ist ein aktuelles Thema (Griebler et al. 2014). Unterschiedliche Bewertungsinstrumente wurden entwickelt, die auf ihre Anwendung und Validierung warten. Eines davon ist der sogenannte D-A-C-Index. Dieser bewertet die mikrobiologisch-ökologische Qualität des Grundwassers anhand der Gesamtzellzahl von Bakterien (prokaryontische Zellen), der Messung der mikrobiellen Aktivität, sowie der qualitativen Charakterisierung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC). Im Beitrag von *Retter et al.* werden die verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten des D-A-(C)-Index anhand eines kürzlich

erhobenen Datensatzes aus dem Murtal, Österreich, vorgestellt. Zunächst wird die Erweiterung des D-A-(C)-Index demonstriert, indem Messungen der DOC-Qualität, die mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelt wurden, als zusätzliche Variable zur Ergänzung der Analyse einbezogen werden. Darüber hinaus wird gezeigt, wie die Definition eines Referenzzustandes für einen „guten“ mikrobiologisch-ökologischen Zustand die Analyse verbessern und ein empfindlicheres Erkennen von Veränderungen bzw. Beeinflussungen von Grundwasserökosystemen ermöglichen kann.

Neben der Erfassung des ökologischen Qualitätszustandes von Oberflächen- und Grundwässern ist seit Beginn des Fachgebietes der Mikrobiologie, aufgrund der großen gesundheitlichen Bedeutung, die Frage nach Ausmaß und Herkunft mikrobiologischer fäkaler Kontaminationen von Wasser und Wasserressourcen von zentraler Wichtigkeit. Der standardisierte kultivierungsbasierte Nachweis von Fäkalindikatoren, wie beispielsweise *E. coli* oder intestinale Enterokokken, liefert verlässliche Informationen zur Quantität der Kontamination, jedoch keine Informationen zur Herkunft, da sowohl in tierischen als auch menschlichen Quellen vorkommend. Im Beitrag von *Steinbacher et al.* wird die Anwendbarkeit sogenannter verursacher-assoziiertes genetischer Fäkalmarker (PCR-basierte DNA Quantifizierung) zur Herkunftsbestimmung fäkaler Kontaminationen – auch als mikrobielles Source-Tracking bezeichnet – für niederösterreichische Wasserressourcen und ihre möglichen Eintragsquellen (d.h. kommunale Abwasserentsorgung, Nutztiere, Wild) erstmals umfassend getestet. Darüber hinaus wird der kombinierte Einsatz mit kultivierungs-basierten Fäkalindikatoren demonstriert.

Im Zusammenhang mit dem PCR-basierten Nachweis von genetischen Targets im Wasser wurde auch ein Beitrag zur Detektion von SARS-CoV-2 RNA im kommunalen Rohabwasser im Zuge der österreichischen Aktivitäten zur abwasserbasierten COVID-19 Surveillance geplant. Dieser Beitrag konnte leider nicht zeitgerecht realisiert werden. Es bleibt zu hoffen, dass Beiträge zu diesem Thema in kommenden ÖWAW Ausgaben sowie bei der im nächsten Jahr geplanten Vortragsveranstaltung realisiert werden können.

Die Kombination der Fachgebiete Mikrobiologie und Hydrologie ist für das Bereitstellen von Problemlösungen für die Wasserwirtschaft von besonderer Bedeutung. Besonders die Verknüpfung von mikrobiologischen Messdaten (Konzentrationen an Indikatoren und Krankheitserregern) mit der mathematisch-hydraulischen Transport- und Ausbreitungsmodellierung in Wasserressourcen kann grundlegende Informationen zur technischen Umsetzung und Dimensionierung von Managementkonzepten (z. B. Auslegung von Schutzzonen bei der Trinkwassergewinnung) oder Aufbereitungsmaßnahmen ableiten (Demeter et al. 2021). Im Beitrag von *Dex et al.* wird für einen österreichischen Abschnitt der Donau inklusive Altarm der Transport von Fäkalindikatoren (*E. coli* und Sporen von *Clostridium perfringens*) ins Grundwasser modelliert. Dazu wird ein 3-D ungesättigt-gesättigtes Grundwassermodell, gekoppelt mit einem 2-D hydrodynamischem Strömungsmodell verwendet. Der vorgestellte methodische Ansatz zeigt wie hydraulische Transportmodellierung und mikrobiologische Analysen kombiniert werden können, um die Entscheidungsfindung bei Planungsaktivitäten zu unterstützen.

Neben der Gefährdung durch fäkale Verunreinigungen kann die mikrobiologische Qualität von Grundwasser auch durch die Vermehrung bzw. Wachstum natürlicher wassereigener Bakterien, beispielsweise aufgrund von Nährstoffeinträgen, beeinträchtigt werden. Das kann zu hohen Konzentrationen an opportunistischen Krankheitserregern, zur Beeinträchtigung von Geruch und Geschmack, oder zur Biokorrosion in der Wasserversorgung oder bei der industriellen Verwendung führen. Das Auftreten solcher Phänomene deutet auf eine „biologische Instabilität“ hin, welche bei der Nutzung der Wasserressource (z. B. Verteilung, Lagerung) zu Qualitätsproblemen führen kann. Es soll ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass wassereigene Mikroorganismen zum ureigensten Bestandteil von Grundwasser gehören. Grund- und Trinkwässer sind nicht steril und das wassereigene Mikrobiom aus nährstoffarmen Grundwässern hat keinerlei negative gesundheitliche oder technische Relevanz in der Wasserversorgung. Im Beitrag von *Kirschner et al.* wird ein neues integratives, zweistufiges Konzept aus *in-situ* und prädiktiven Methoden angewandt, um die biologische Stabilität des Grundwassers im Zuge eines Uferfiltrationssystem der Donau umfassend bewerten zu können. Es werden traditionelle kultivierungsbasierte als auch ausgewählte kultivierungs-unabhängige Methoden (Gesamtzellzahl mit-

tels Mikroskopie und Durchflusszytometrie, Leucin-Isotopen-Inkorporation, 16S-rRNA-Genamplikon-Sequenzierung) entlang des Infiltrationspfades vom Fluss hin zum Grundwasserbrunnen vergleichend eingesetzt, um unterschiedliche Aspekte bei der Untersuchung der Biostabilität sichtbar zu machen.

Der Beitrag von *Schönher et al.* gibt als abschließende Arbeit einen fokussierten Einblick in die Methodik und Anwendbarkeit der Durchflusszytometrie (DZ) zur Analyse der mikrobiologischen Charakteristik von Grundwasser als Trinkwasserressource und im Zuge der Wasserverteilung. Die DZ kann hochauflösende Informationen auf Einzelzellebene, einschließlich der Gesamtzellzahl, der Größemessung, des Nukleinsäuregehalts, sowie der Lebensfähigkeit der erfassten Bakterienpopulationen (prokaryontische Zellen) liefern. Mehrere Fallstudien werden präsentiert, die das breite Spektrum an unterschiedlicher Zielsetzungen und Möglichkeiten demonstrieren, inklusive der Ergebnisse zur durchflusszytometrischen Charakterisierung ausgewählter österreichischer Trinkwasserressourcen und der fortgeschrittenen Datenanalyse bei der DZ.

Das im Anschluss an die wissenschaftlichen Artikel gebrachte Interview mit DI Wolfgang Vogl informiert kurz über die nationalen und internationalen Aktivitäten einer österreichischen Firma (VWMS GmbH, Zwerndorf) im Bereich des mikrobiologisch-biochemischen on-line Monitorings. Die Automatisierung und on-line Messtechnik zur „nahe Echtzeitanalyse“ mikrobiologischer Qualitätscharakteristiken ist von zunehmender internationaler Bedeutung. Schön, dass eine Österreichische Firma hier Pionierarbeit in der Entwicklung von Messtechnologien und Geräten und dessen Anwendung leistet. Ein kurzer Überblick zur Entstehungsgeschichte des Unternehmens sowie des eingesetzten Messprinzips und technischer Hintergrundinformationen wird gegeben.

Abschlussbemerkung Der Einsatz neuer komplementärer mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Analysemethoden im Wasserfach hat gerade erst begonnen. Ein neuerlicher methodischer Quantensprung, wie etwa zu Zeiten Robert Kochs, scheint im Gange. Um einen adäquaten Einsatz dieser neuen Möglichkeiten zu gewährleisten, ist vor allem die enge Kooperation zwischen der wasserwirtschaftlichen Praxis und der universitären Forschung unumgänglich. Dabei erscheint eines wesentlich: Jede Methodik hat ihre Möglichkeiten und Limitierungen. Es gibt keine universell anwendbaren Untersuchungsmethoden, lediglich geeignete „Werkzeuge“ für gut definierte Fragestellungen. Experten sind dabei gefordert die entsprechenden Informationen bereit zu stellen.

Literatur

Demeter, K., Drex, J., Komma, J., Parajka, J., Schijven, J., Sommer, R., Cervero-Arago, S., Lindner, G., Zoufal-Hruza, C.M., Linke, R., Savio, D., Ixenmaier, S., Kirschner, A.K.T., Kromp, H., Blaschke, A.P. & Farnleitner A.H. (2021) Modelling the interplay of future changes and wastewater management measures on the microbiological river water quality considering safe drinking water production, *Science of the Total Environment* **768**:144278.

Griebler, C., Malard, F. & Lefebvre, T. (2014) Current developments in groundwater ecology – from biodiversity to ecosystem function and services. *Current Opinion in Biotechnology* **27**:159–167.

ÖWAV (2017): Mikrobiologie und Wasser. Teil 1: Übersicht zu den methodischen Möglichkeiten der Analyse. ÖWAV-Arbeitsbehelf 52, Wien 2017

ÖWAV (2022): Mikrobiologie und Wasser. Teil 2: Fallstudien zur Illustration der neuen diagnostisch-analytischen Möglichkeiten. ÖWAV-Arbeitsbehelf, Wien 2022 (in Vorb.)

Univ.-Prof. PD Dr. A. Farnleitner, MSc.Tox.

Interuniversitäres Kooperationszentrum
Wasserqualität & Gesundheit (ICC Water
& Health) – www.waterandhealth.at,
Wien – Krems, Österreich

Fachbereich Wasserqualität und
Gesundheit, Karl Landsteiner Privatuni-
versität für Gesundheitswissenschaften,
Dr.-Karl-Dorrek-Straße 30,
3500 Krems an der Donau, Österreich

Institut für Verfahrenstechnik,
Umwelttechnik und Technische
Biowissenschaften 166/5/3,
Technische Universität Wien,
Gumpendorferstraße 1A,
1060 Wien, Österreich
andreas.farnleitner@tuwien.ac.at

Dr. F. Zibuschka (✉)
Innocentiagasse 9,
1130 Wien, Österreich
franziska.z@netm.at