

Molekularbiologische Verfahren in der Trinkwasseranalytik – wo stehen wir und wo geht die Reise hin?

Birgit Kuhlmann und Gudrun Preuß

Institut für Wasserforschung GmbH, Dortmund



Molekularbiologische Verfahren

➔ Sonden

➔ PCR-basierte Verfahren

- Identifizierung von Spezies
- Quantifizierung
- Besiedlungsmuster
- Erfassung funktioneller Gene

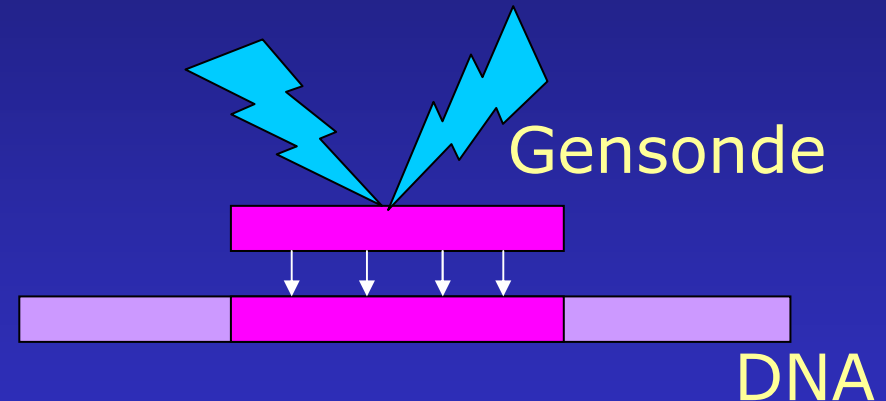
Einsatz von spezifischen Gensonden

Grundlage:

- Fluoreszenzmarkierung spezifischer Gensequenzen in den Zellen (Fluoreszenz-In-situ Hybridisierung (FISH)),
- mikroskopische Detektion

Reaktion:

- Anlagerung von komplementären Sequenzen



z. T. kommerziell erhältliche Kits:

- Erfassung vitaler Zellen (rRNA-Sonden)
- Spezifische Unterscheidung E. coli / coliforme Bakterien (VIT[®]-Gensonden), Legionellen ...

Untersuchungsprogramm

Zielorganismen:

- E. coli
- Enterobacter aerogenes

Matrix:

- dotiertes Trinkwasser
- Zellkulturen

unbehandelt, formalinfixiert, autoklaviert

Test-Kit für E.coli und Coliforme (2 RNA-Sonden):

- Anreicherung
- Fixierung
- Hybridisierung



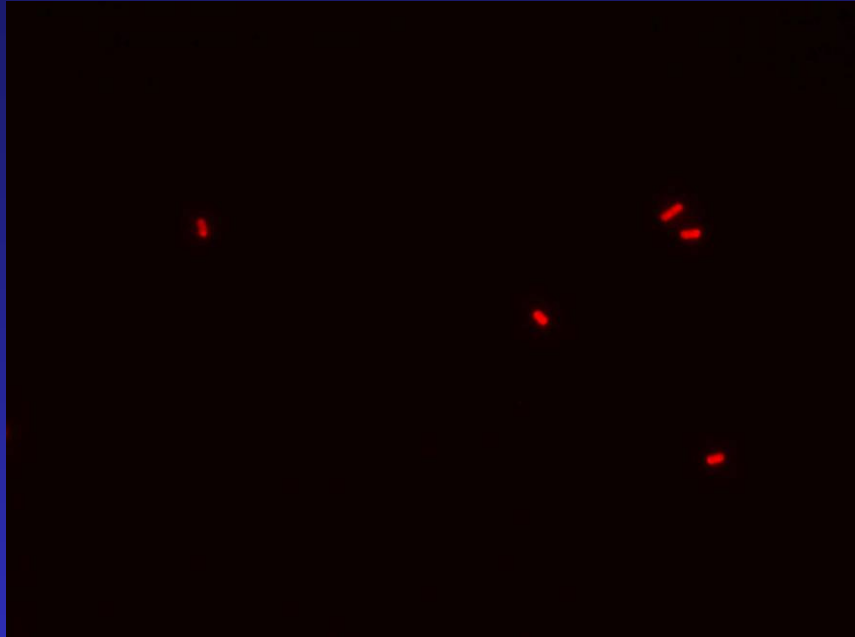
Mikroskopie:

Rot = coliform

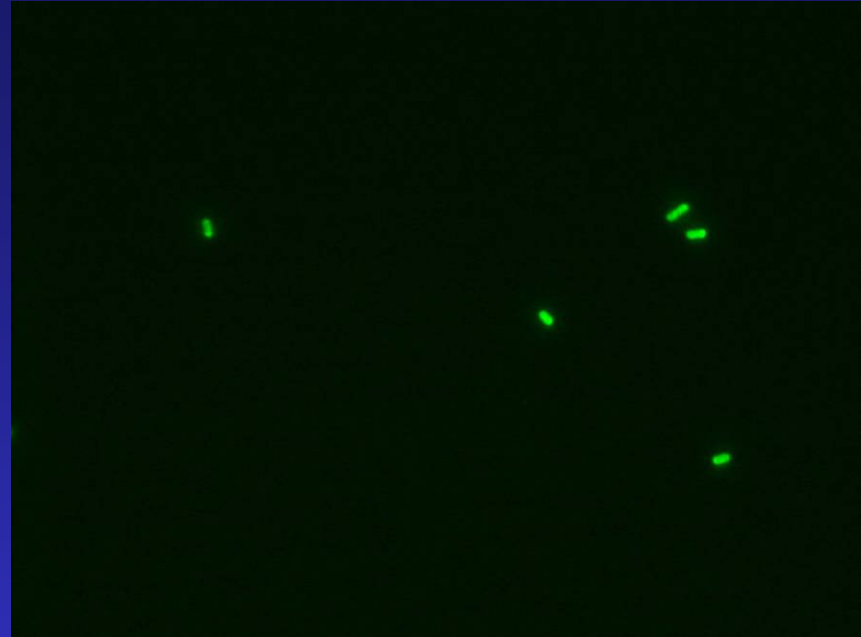
Rot + Grün = E. coli



Anreicherungskulturen (*E. coli*) ca. 10^6 Zellen / ml



Coliforme = rot



E. coli = rot + grün

Aber:

- leichte Grünfluoreszenz auch bei Coliformen möglich
- deutliche Fluoreszenz in formalinfixierten Proben (nicht in autoklavierten)
- keine Detektion in Wasserproben (< Nachweisgrenze)

Bisherige Erfahrungen

Positiv	Einschränkungen
Einfache Handhabung, kein steriles Arbeiten	Unterscheidung <i>E.Coli</i> / Coliforme u. U. problematisch
Ergebnis innerhalb weniger Stunden (ca. 4-5, zuvor jedoch Anreicherung)	keine Quantifizierung möglich (Anreicherungsschritt)
Deutliche Fluoreszenz, langsames Verblassen	keine Unterscheidung vital / tot bei formalinfixierten Proben

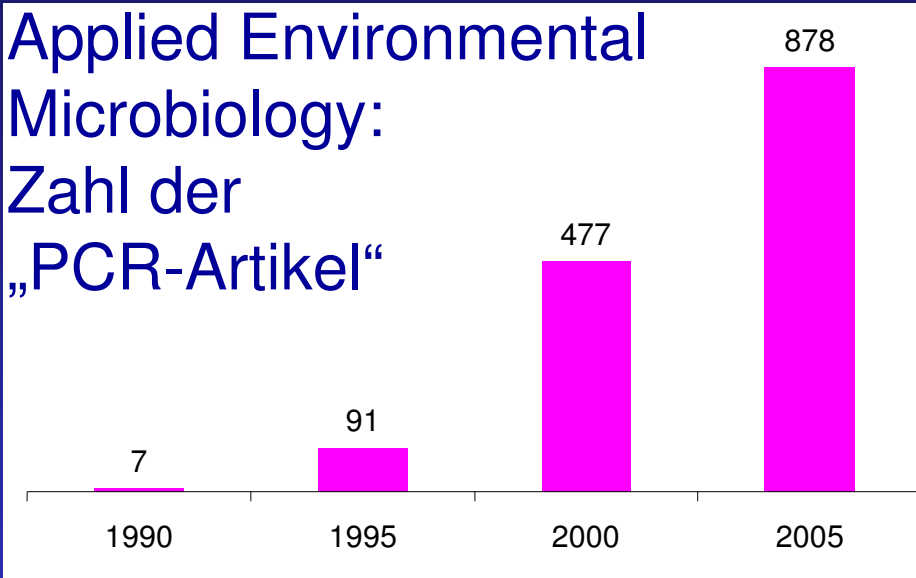
Mangelnde Sensitivität: ein *E. coli* in 100 ml ?

Bisher hohe Zellzahlen und „Aktivierung“ der Zellen erforderlich



PCR – die Wunderwaffe der Mikrobiologie (?)

Applied Environmental Microbiology:
Zahl der „PCR-Artikel“



PCR ist

- sensitiv
 - spezifisch
 - schnell
- und erfasst auch*
- nicht kultivierbare Organismen.



PCR ist

- teuer
 - nicht qualitätsgesichert
 - benötigt hochqualifiziertes Personal
- und*
- unterscheidet nicht zwischen „lebender“ und „toter“ DNA.



Prinzip der PCR

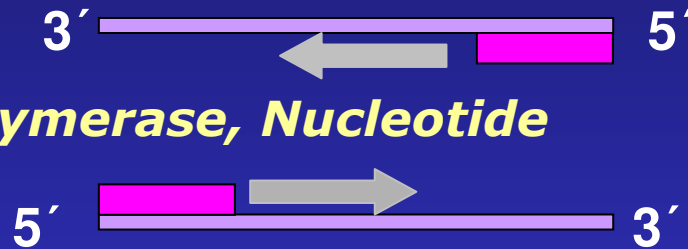
DNA-Doppelstrang



DNA-Einzelstrang



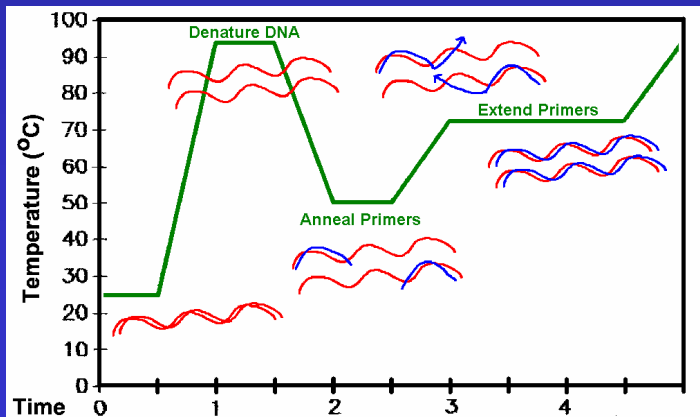
Taq-DNA-Polymerase, Nucleotide



Anlagerung der
Primer und DNA-
Synthese



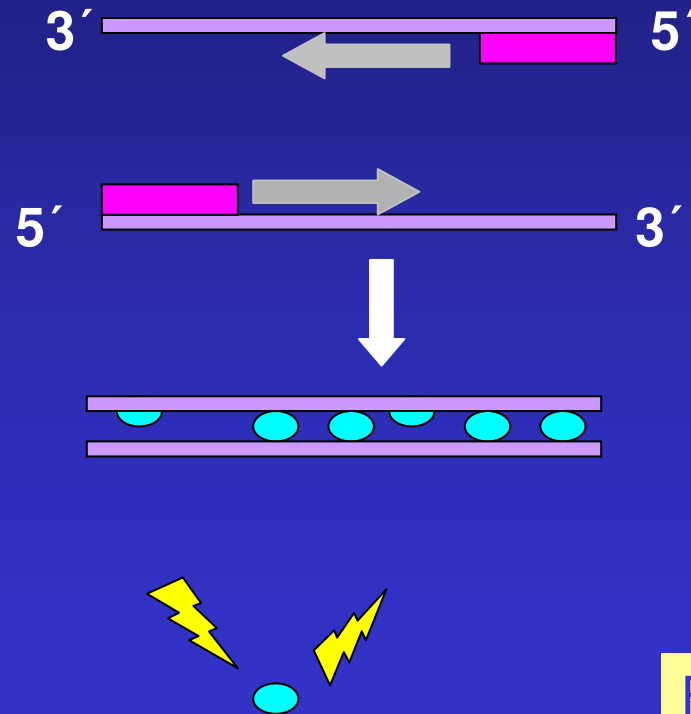
Amplifizierte DNA



Quantitative PCR

Real-Time PCR

Anfärbung der DNA mit interkalierenden Fluorophoren (z.B. SYBR-Green)



Anlagerung der
Primer und DNA-
Synthese

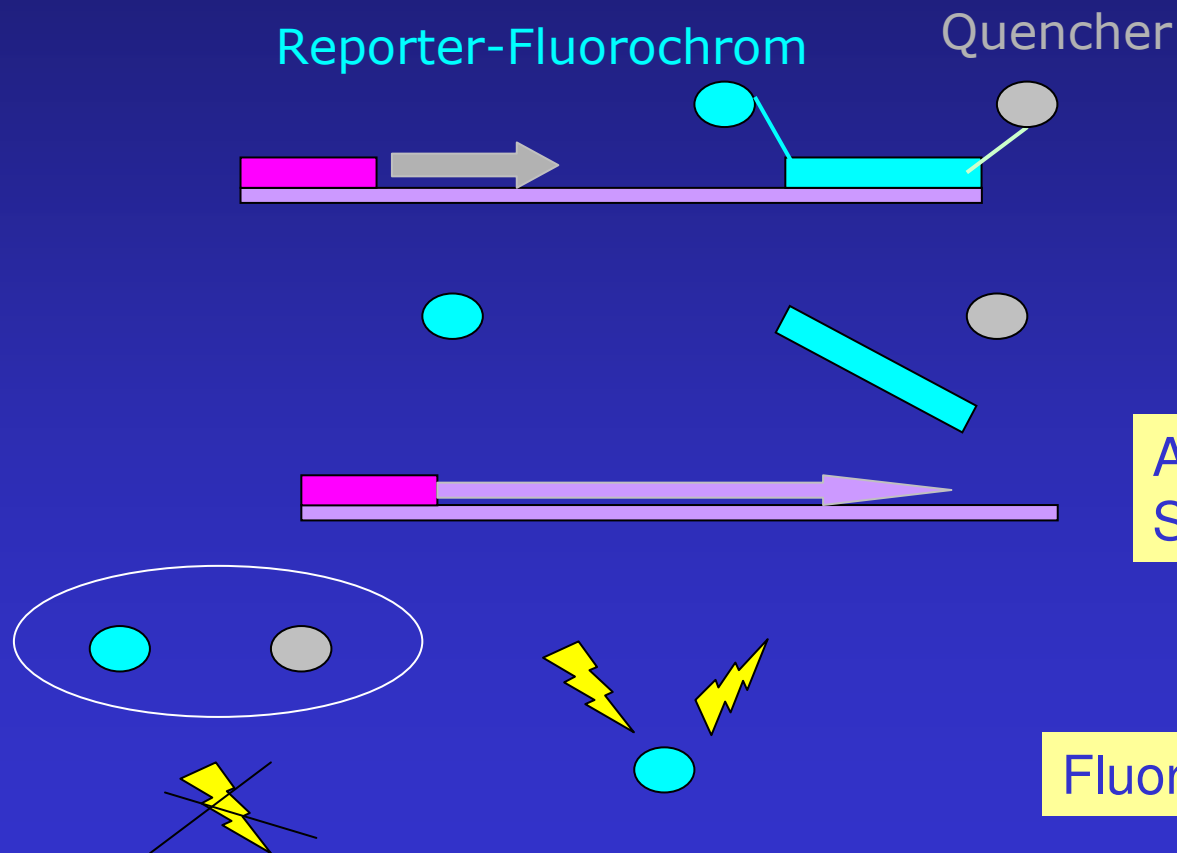
Einbau des
Farbstoffs in die
doppelsträngige
DNA

Fluoreszenzmessung

Quantitative PCR

Real-Time PCR

TaqMan-Sonden



Anlagerung der
Primer und DNA-
Synthese+ TaqMan-
Sonde

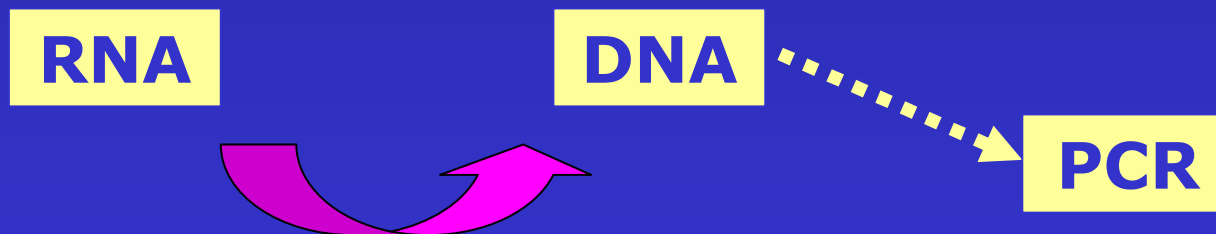
Abspaltung der
Sonde

Fluoreszenzmessung

Erfassung von RNA

- Unterscheidung von lebenden und toten Zellen
- Maß für die Aktivität

RNA wird in „normaler“ PCR nicht amplifiziert, daher



Reverse Transkriptase

PCR: Identifizierung und Quantifizierung von Spezies

- Erfassung von speziesspezifischen DNA-Abschnitten
- Voraussetzung: Genom sequenziert, veröffentlicht und in Datenbanken gespeichert

Vorgehen:

- ➔ Suche nach geeigneten Primern (Literatur, Datenbanken)
- ➔ Optimierung der Reaktionsbedingungen
- ➔ Überprüfung und Absicherung der Methode



In Wasser untersuchte Organismen (Beispiele)

Bakterien

Ammoniumoxidierer

Bacteroides

Bifidobakterien

Campylobacter

Coliforme

Dehalogenierer

Denitrifikanten

E. coli

Enterokokken

Eubakterien

Geobacter

Helicobacter

Legionellen

Mycobacterium avium

Proteobakterien

Pseudomonas

Salmonellen

Shigella

Yersinia enterocolitica

Viren

Adenoviren

Astroviren

Enteroviren

Noroviren

Rotaviren

Hepatitis-A-Virus

Polyomavirus

Poliovirus

Parasiten

Cryptosporidien

Giardien



Untersuchungsprogramm

DVGW-Forschungsvorhaben W7/02/05

Referenzorganismen:
E. coli und Coliforme

Erfassung

- der DNA (lebender + toter Organismen)
- der RNA (lebender Organismen)
- Quantifizierung (Real-Time PCR)

Vergleichsuntersuchungen
mit Wässern verschiedener
Herkunft

Abgleich mit
Kulturverfahren (TTC,
Chromocult®, Colilert®)

Bewertung

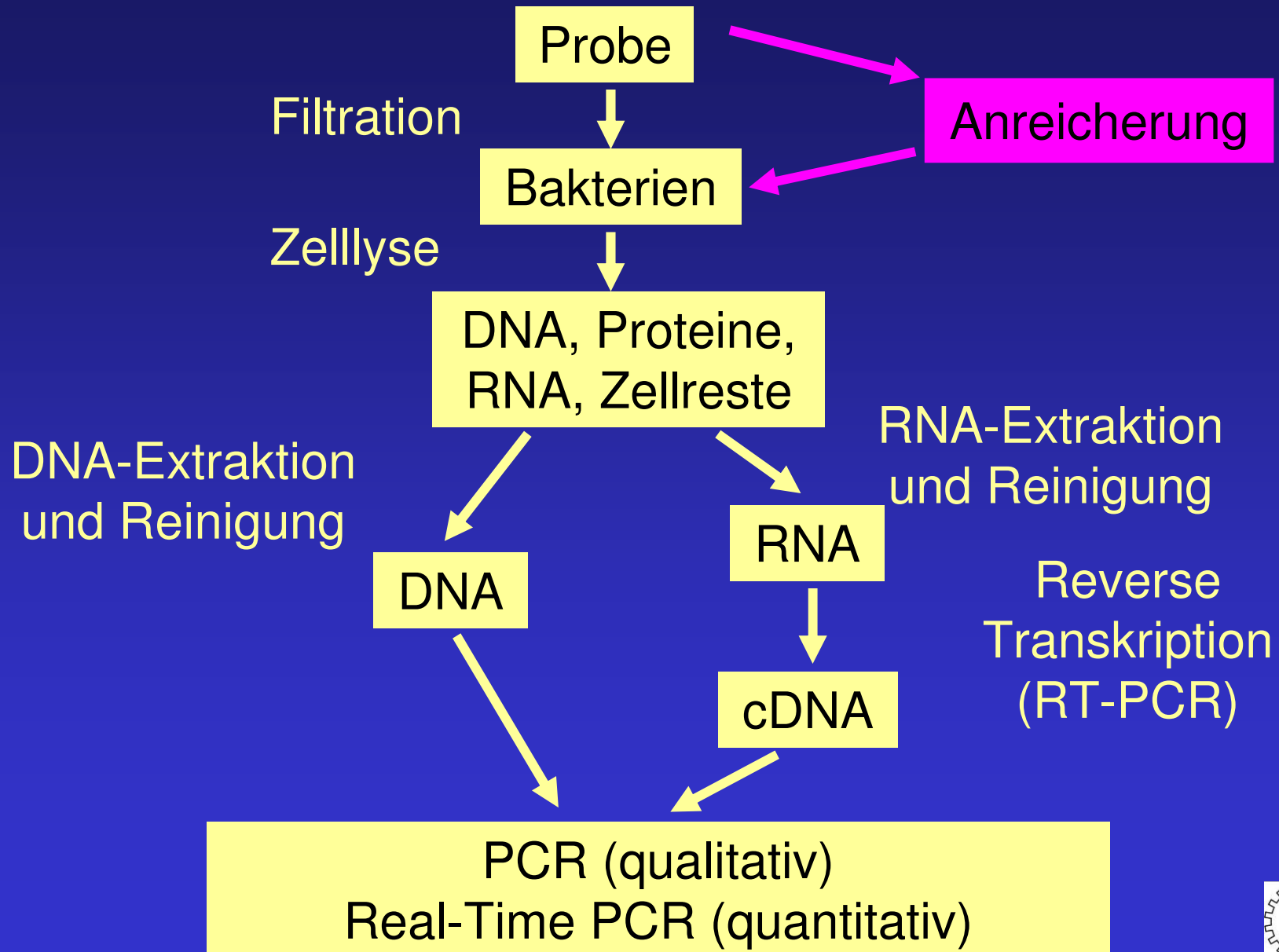


Definition E. coli/Coliforme

....eine Frage der verwendeten Nachweismethode

	Selektiv- medium	Oxidase- test	Indol- bildung	Galacto- sidase	Gluco- ronidase	lacZ – Gen	uidA – Gen
TTC	+/+	-/-	+/-				
Chromo- cult®	+/+			+/+	+/-		
Coli- lert®	+/+			+/+	+/-		
PCR						+/+	+/-

Analysengang



Qualitätssicherung

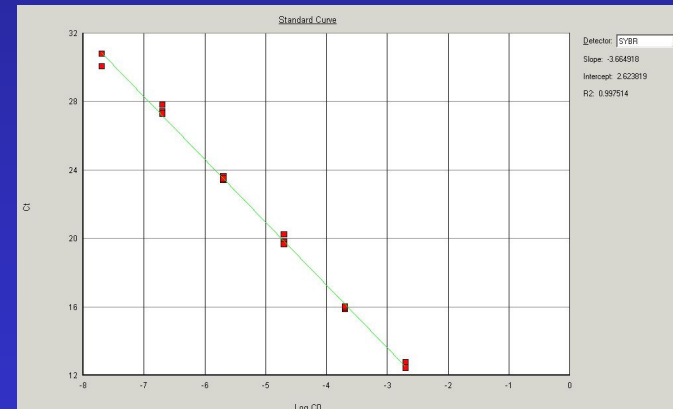
Qualitative PCR

- Positiv- und Negativkontrolle
- Molekülgröße

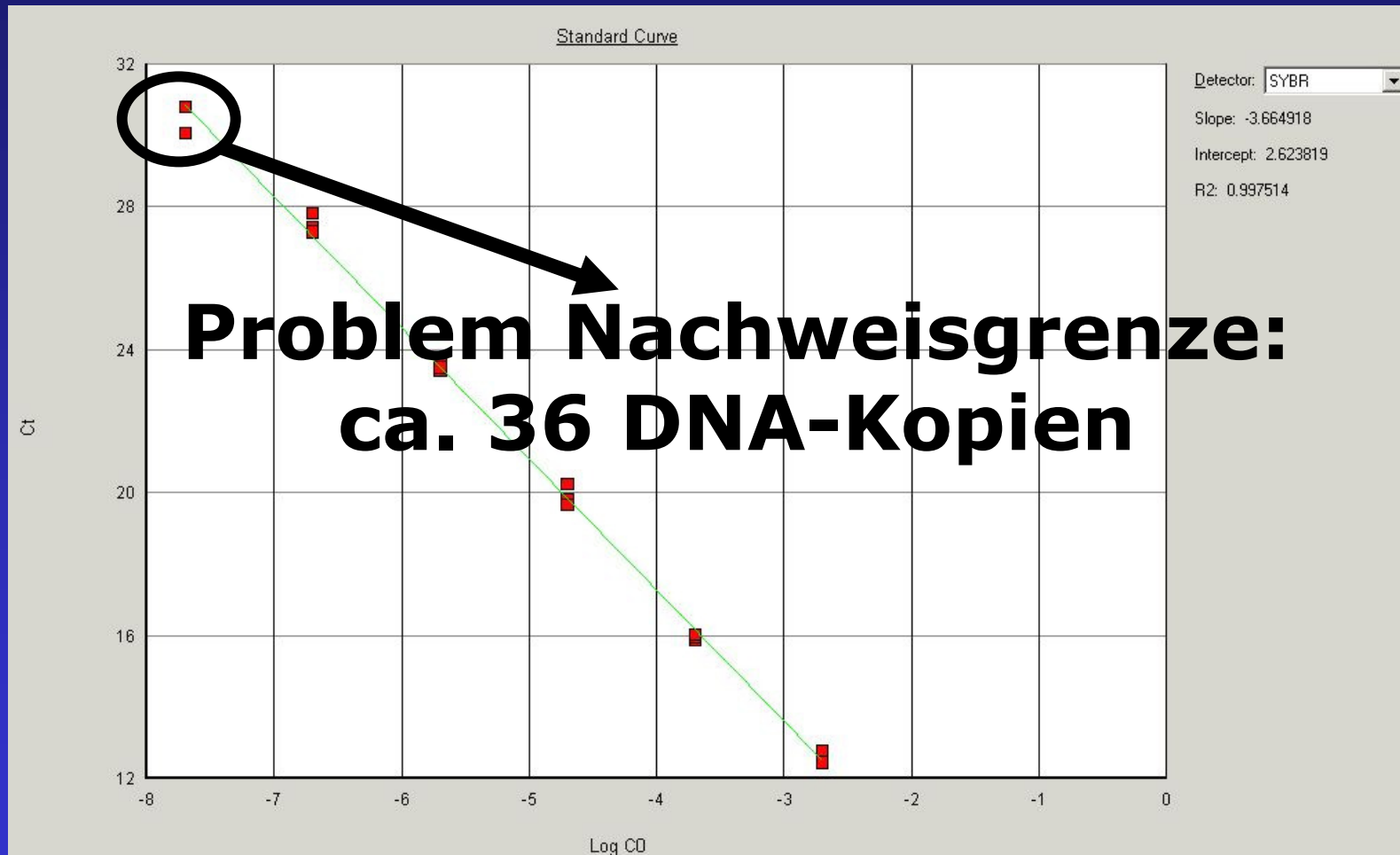


Real-Time PCR

- Kalibration
- Verfahrenskennndaten
- Positiv- und Negativkontrolle
- Mehrfachbestimmung

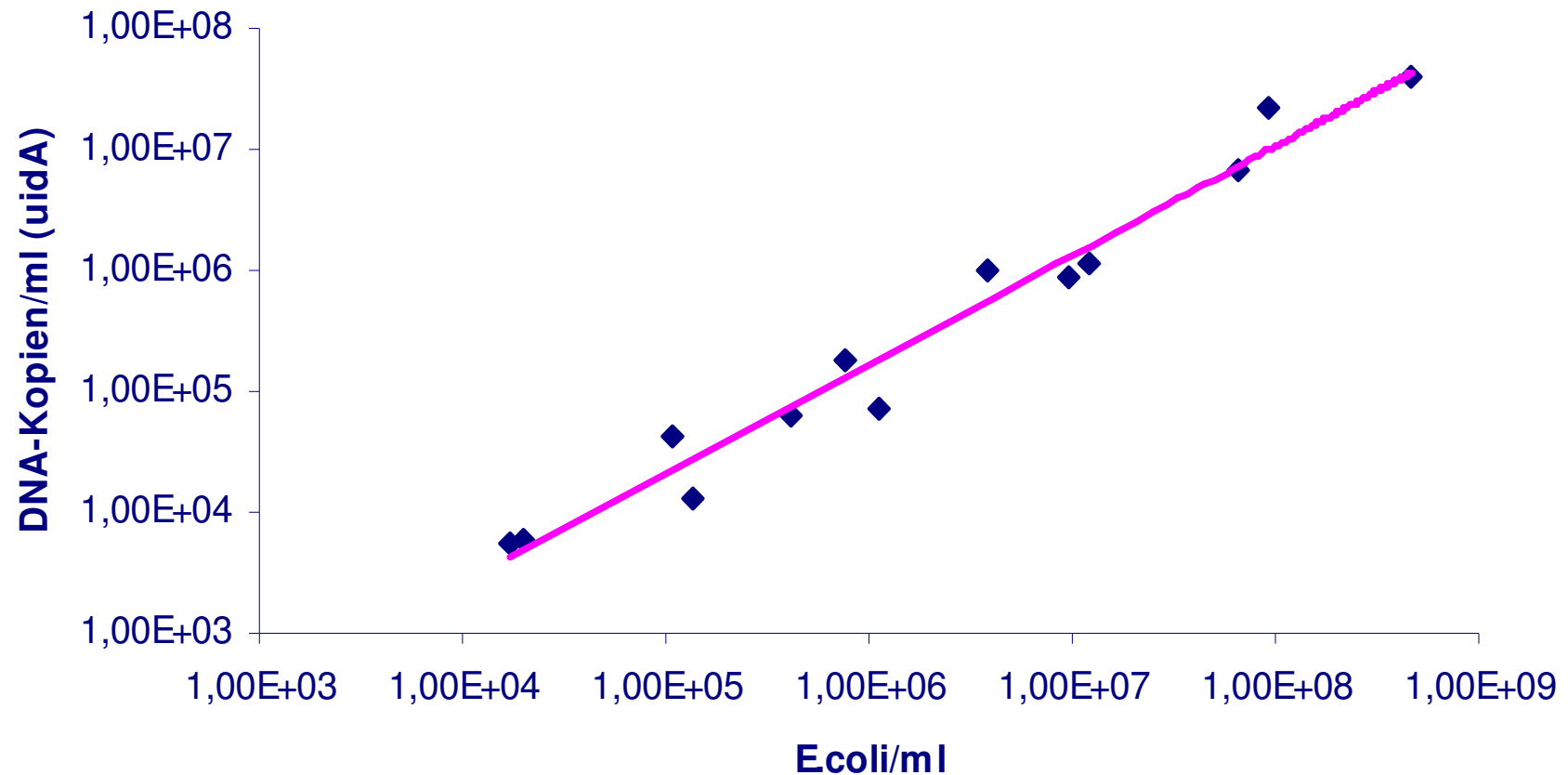


Real Time-PCR: Quantifizierung



Verhältnis *E. coli*/DNA-Kopien

Korrelationskoeffizient: 0,9515



Untersuchte Proben

Oberflächenwasser

2 Flüsse

3 Talsperren

Wasser aus der Aufbereitung

Angereichertes Grundwasser

Uferfiltrat

nach Filtration

nach Ozonung

nach Flockung

nach Ozonung+Aktivkohlefiltration

Trinkwasser

mit Thiosulfat

ohne Thiosulfat

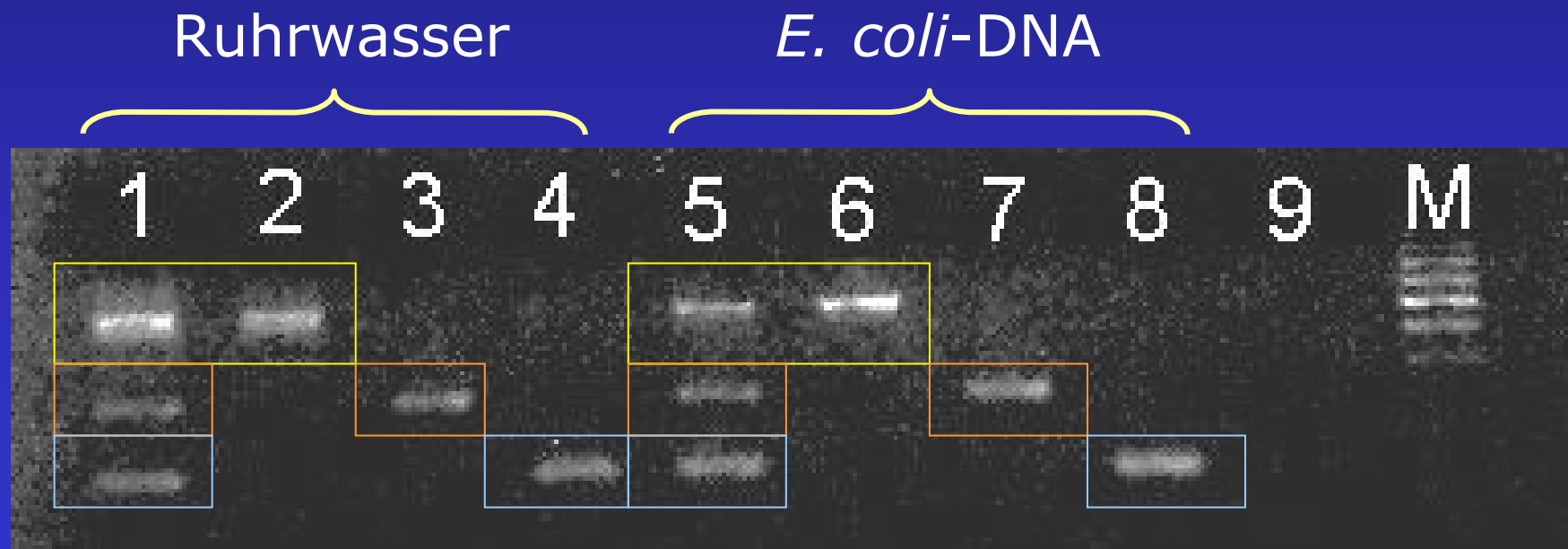
mit Thiosulfat dotiert

ohne Thiosulfat dotiert

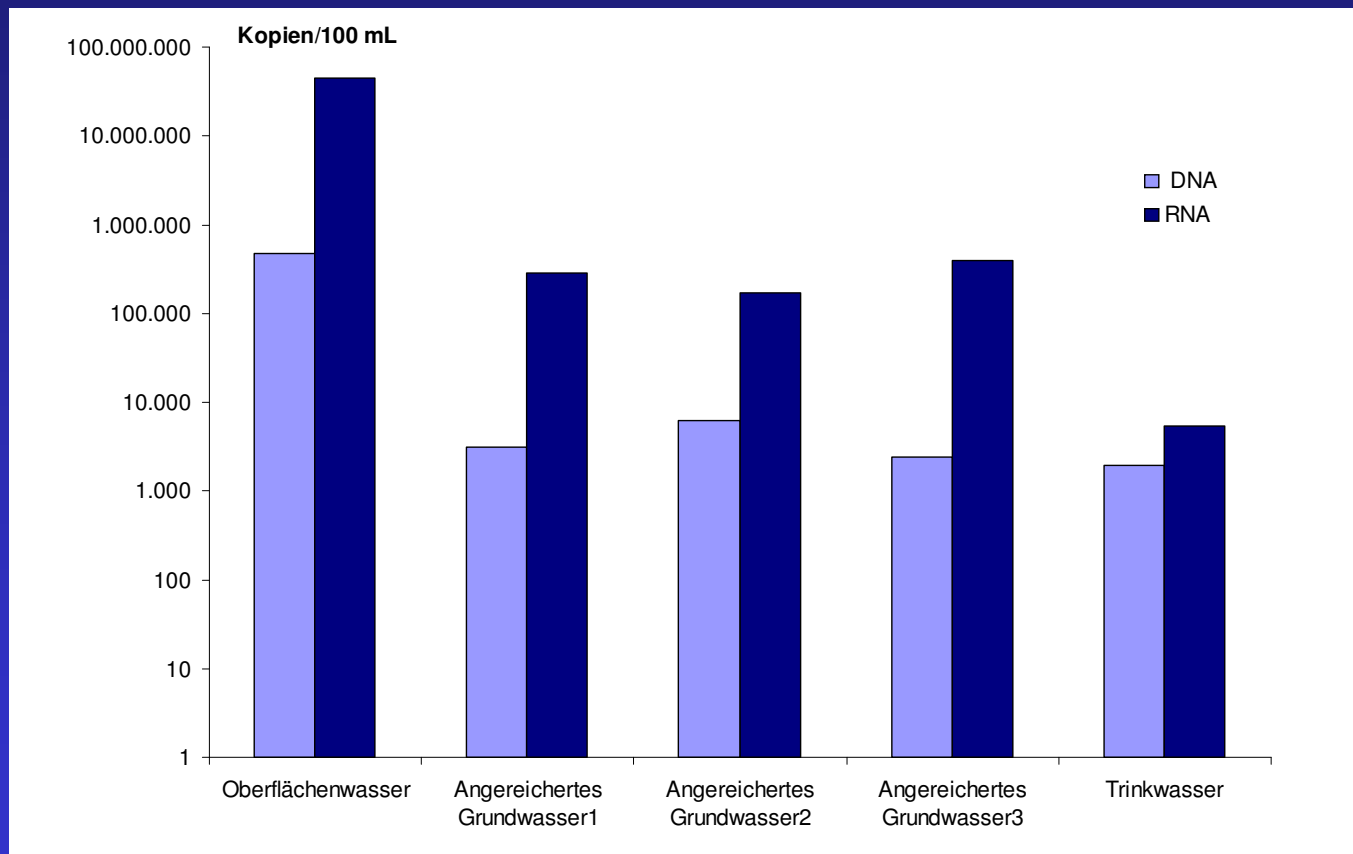


Multiplex-PCR

- eubakt. Primer als „inline Kontrolle“
- lacZ-Primer: Galactosidase
- uidA-Primer: Glucuronidase



Bakterielle DNA und RNA in Proben eines Wasserwerks



Vergleich mit Kulturverfahren

Proben	Anzahl	TTC		PCR (uidA)			
		+	-	+	-	falsch positiv	falsch negativ
Gesamt	55	16	39	12	43	1	5
OW	13	12	1	9	4	0	3
TW	13	0	13	0	13	0	0
ZW	29	4	25	3	26	1	2

OW: Oberflächenwasser

TW: Trinkwasser

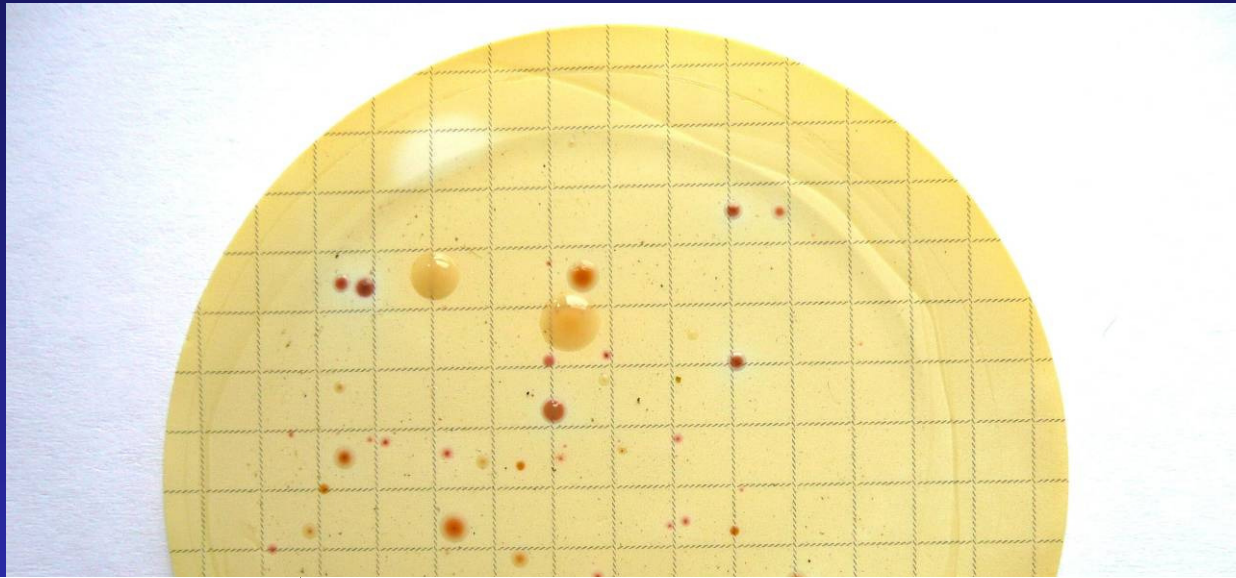
ZW: Zwischenstufen aus der Trinkwasseraufbereitung



Ergebnisse des Forschungsvorhabens

- PCR: Bestimmung nur nach Vorkultivierung
→ ?Quantifizierung?
- Recht gute Übereinstimmung PCR/Kulturverfahren bei E.coli
- Der für Coliforme verwendete Primer erfasst anscheinend ein anderes Spektrum als die Kulturverfahren
- PCR-Verfahren bringen eher falsch-negative als falsch-positive Ergebnisse
- Gegenüber Kulturverfahren keine Zeit- und Kostenersparnis

Identifizierung von Kolonien



Kolonie	Bunte Reihe	uidA	lacZ
orange, gelber Hof	E.coli	+	+
gelb, gelber Hof	E.coli	+	+
rot, gelber Hof	Coliformer	-	+
gelb	kein Colif.	-	-
rot	kein Colif.	-	-
blau	kein Colif.	-	-
violett	kein Colif.	-	-

Untersuchung der mikrobiellen Diversität mittels PCR-basierter Verfahren

Prinzip:

gruppenspezifische Primer (z.B. Sulfatreduzierer, Ammoniumoxidierer, Eubakterien)

Auftrennung der DNA (DGGE¹/TGGE²/SSCP³)

Identifizierung (Gensonden, Klonierung)
oder
Mustervergleich

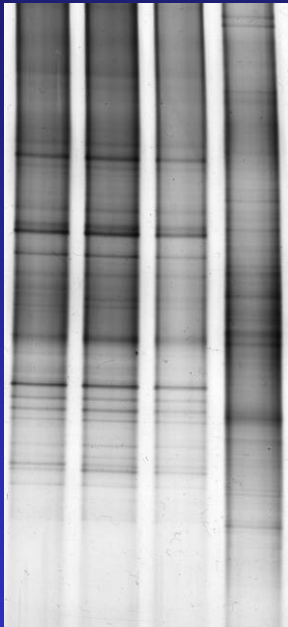
¹ Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese

² Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese

³ Single Strand Coformation Polymorphism



DGGE Muster zur



1 2 3 4

Charakterisierung
und Vergleich von
Standorten

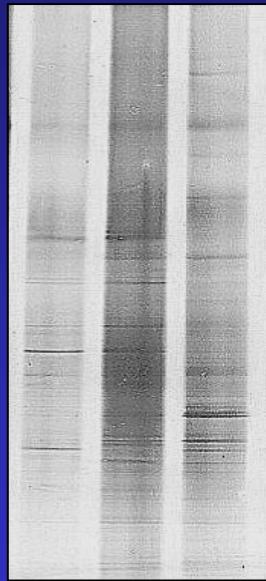


1 2 3 4 5 6

Reinwasser (1-3) und Trinkwasser (4-6)

Proben aus dem Verlauf der künstlichen
Grundwasseranreicherung (1 Rohwasser, 2 Vorfiltereinlauf,
3 Hauptfiltereinlauf, 4 angereichertes Grundwasser)

DGGE-Muster zur



1 2 3

Erfassung des Einflusses von
Stoffeinträgen (Arzneimittel, Antibiotika,
PSM etc.)

Zeitliche Veränderung der eubakteriellen
Besiedlung eines mit Phenanthren
belasteten Testfilters

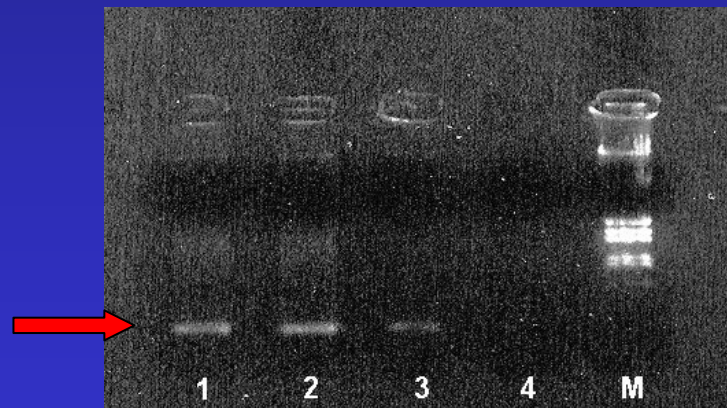
(1 Beginn, 2 Mitte, 3 Ende der Dosierung)

Erfassung funktioneller Gene

Erfassung und Quantifizierung von spezifischen Organismen bzw. –gruppen wie

- Sulfatreduzierer
- tetracyclinresistente Bakterien
-

Agarosegel mit
1, 2, 3: Gülleproben mit dem
Resistenzgen TetM
4: Negativkontrolle, M:
Größenmarker



Fazit

In der Trinkwasserhygiene bieten PCR-Verfahren zur Zeit keine Alternative zu den herkömmlichen Methoden.

PCR basierte Bestimmungen bieten sich immer dann an, wenn eine Kultivierung schwierig bzw. langwierig ist (z.B. Legionellen, Helicobacter, Viren).

Mit der PCR/DGGE bieten sich völlig neue Einblicke in die mikrobielle Besiedlung von Standorten.

Beispiele für weitere Einsatzmöglichkeiten der PCR:

- die Identifizierung von Kolonien
- die Erfassung funktioneller Gene.



Wir bedanken uns
für die finanzielle Förderung der
verschiedenen Forschungsprojekte
und bei
Ihnen
für den langen Atem!

