

Mikrobiologische Befunde –

Bewertung und Quellenidentifizierung

Trinkwasserfortbildung Hygieneinspektoren BW,

09.07.2024

Dr. Michael Hügler



Agenda

- Mikrobiologische Parameter nach Trinkwasserverordnung
- Identifizierung von Bakterien
- Bewertung von mikrobiologischen Befunden
- Methoden zur weitergehenden Ursachenanalyse

Trinkwasserverordnung

§ 6 Mikrobiologische Anforderungen

- (1) Im Trinkwasser dürfen Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nummer 1 des Infektionsschutzgesetzes, die durch Trinkwasser übertragen werden können, nicht in Konzentrationen enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen.
- (2) In Trinkwasser dürfen die in Anlage 1 Teil I festgelegten Grenzwerte für mikrobiologische Parameter nicht überschritten werden.
- (3) Im Trinkwasser, das zur Abgabe in verschlossenen Behältnissen bestimmt ist, dürfen die in Anlage 1 Teil II festgelegten Grenzwerte für mikrobiologische Parameter nicht überschritten werden.
- (4) Wird dem Gesundheitsamt bekannt, dass im Trinkwasser eines Wasserversorgungsgebiets Mikroorganismen vorkommen, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen und für die in dieser Verordnung kein Grenzwert festgelegt ist, so legt das Gesundheitsamt für das betroffene Wasserversorgungsgebiet unter Beachtung von Absatz 1 einen Höchstwert fest, der nicht überschritten werden darf.
- (5) Mikroorganismen, die das Trinkwasser verunreinigen oder seine Beschaffenheit nachteilig beeinflussen können, dürfen in Trinkwasser nur in Konzentrationen enthalten sein, die so niedrig sind, wie dies mit im Einzelfall angemessenem Aufwand unter Einhaltung mindestens der allgemein anerkannten Regeln der Technik möglich ist.

Im Sinne dieses Gesetzes ist

1. Krankheitserreger:

ein vermehrungsfähiges Agens (Virus, Bakterium, Pilz, Parasit) oder ein sonstiges biologisches transmissibles Agens, das bei Menschen eine Infektion oder übertragbare Krankheit verursachen kann,

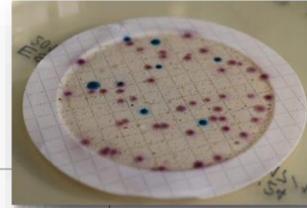
Analytik nach Trinkwasserverordnung

Mikrobiologische Parameter:

- *E. coli*
- Intestinale Enterokokken

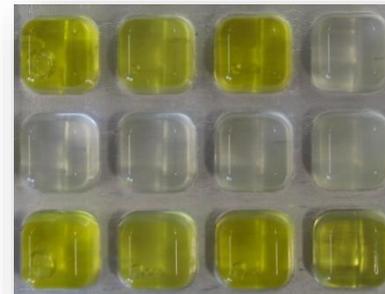
Parameter	Grenzwert*
Escherichia coli (E. coli)	0/100 ml
Intestinale Enterokokken	0/100 ml

* Die festgelegten Werte berücksichtigen die Messunsicherheiten der Untersuchungs- und Probennahmeverfahren.



Indikatorparameter:

- coliforme Bakterien
- Koloniezahlen (22°C, 36°C)
- *Clostridium perfringens*
(Bestimmung wenn Rohwasser aus Oberflächenwasser stammt oder von Oberflächenwasser beeinflusst wird)



Nachweisverfahren

Liste mikrobiologischer Untersuchungsverfahren nach § 43 Absätze 1 bis 3 TrinkwV

4. Änderungsmitteilung

Stand: 24.06.2023

Parameter	Referenzverfahren nach TrinkwV	Alternatives Verfahren nach § 43 Absatz 2
<i>Escherichia coli</i> und coliforme Bakterien	§ 43 Absatz 1 Nummer 1: DIN EN ISO 9308-1: 2017-09 DIN EN ISO 9308-2: 2014-06	Colilert®-18/Quanti-Tray® ^a (verglichen mit DIN EN ISO 9308-1:2001-07) [entspricht DIN EN ISO 9308-2: 2014-06]
Intestinale Enterokokken	§ 43 Absatz 1 Nummer 2: DIN EN ISO 7899-2: 2000-11	Chromocult®-Enterokokken-Agar (verglichen mit DIN EN ISO 7899-2: 2000-11) Enterolert®-DW/Quanti-Tray® (verglichen mit DIN EN ISO 7899-2: 2000-11)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	§ 43 Absatz 1 Nummer 3: DIN EN ISO 16266: 2008-05	Pseudalert®/Quanti-Tray® ^a (verglichen mit DIN EN ISO 16266: 2008-05) [entspricht DIN EN ISO 16266-2: 2023-01]
Koloniezahl bei 22°C und 36°C	§ 43 Absatz 1 Nummer 4: DIN EN ISO 6222: 1999-07 § 43 Absatz 3 ^b	
<i>Clostridium perfringens</i> , einschließlich Sporen	§ 43 Absatz 1 Nummer 5: DIN EN ISO 14189: 2016-11	
<i>Legionella spec.</i>	§ 43 Absatz 1 Nummer 6: DIN EN ISO 11731: 2019-03 in Verbindung mit § 43 Absatz 5 ^c	
Somatische Coliphagen	§ 43 Absatz 1 Satz 2: DIN EN ISO 10705-2: 2002-01; ISO 10705-3: 2003-10	

Analytik nach Trinkwasserverordnung

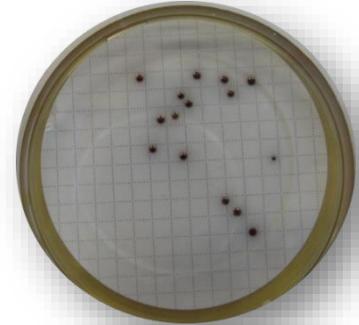
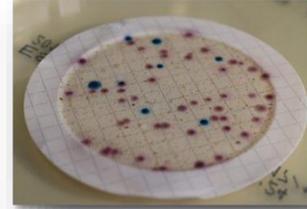
Mikrobiologische Parameter:

E. coli

- Indikator für fäkale Kontamination

Intestinale Enterokokken

- Fäkal oder Umwelt (z.B. Insekten)



Indikatorparameter:

coliforme Bakterien

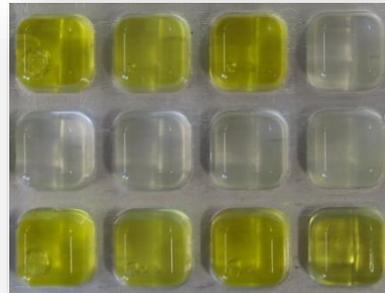
- Fäkal oder Umweltbakterien
- Indikator für allgemeine Wasserqualität

Koloniezahlen (22°C, 36°C)

- Indikator für Wasserbeschaffenheit (Stagnation, Nährstoffe, Materialien, ...)

Clostridium perfringens

- Indikator für fäkale Kontamination



Ursachen oft unklar, Bewertung der Befunde oft schwierig

Identifizierung von Bakterien

Ausgangssituation

- MALDI-TOF MS hat sich im Trinkwasserbereich etabliert
- Identifizierung von Bakterien bei mikrobiologischen Befunden im Trinkwasser findet immer häufiger statt
- Bewertung Identifizierungsergebnisse kann schwierig sein

Was kann die Identifizierung leisten?

Identifizierung mittels MALDI-TOF MS

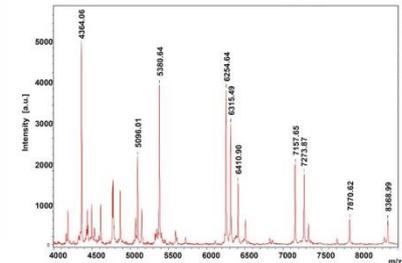
Workflow MALDI-TOF MS: Kolonie → Proteinspektrum



MALDI-TOF MS

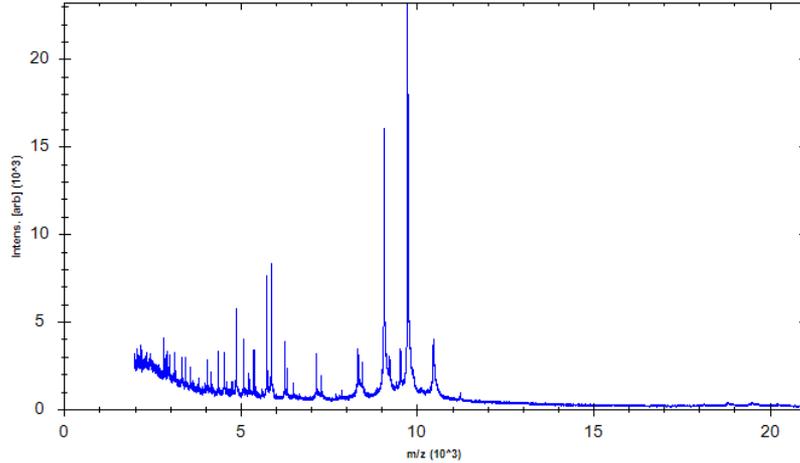
1 Stunde

Proteinspektrum
MALDI-TOF-MS

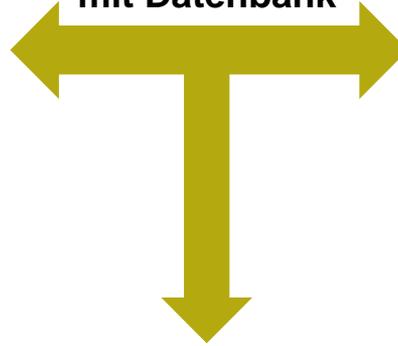


MALDI-TOF-MS Methodik

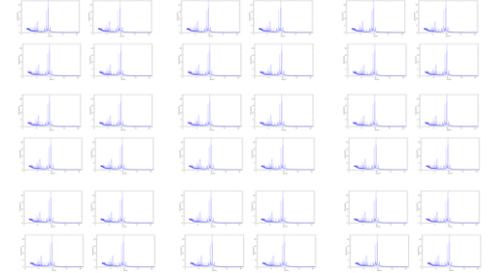
MALDI-TOF-MS Spektrum



Automatischer Abgleich
mit Datenbank



Identifizierung



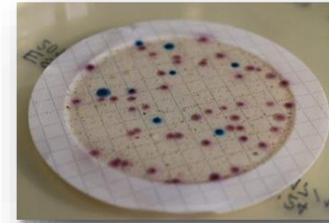
Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Rang (Qualität)	Übereinstimmende Muster	Bewertungszahl	NCBI Code
1 (+++)	Enterococcus faecium 20218_1 CHB	2.00	1352
2 (+++)	Enterococcus faecium DSM 20477T DSM	2.00	1352
3 (+++)	Enterococcus faecium 11037 CHB	2.00	1352
4 (+++)	Enterococcus faecium PX_21086109_III MLD	2.00	1352
5 (+++)	Enterococcus faecium DSM 17050 DSM	2.00	1352
6 (+++)	Enterococcus faecium DSM 2146 DSM	2.00	1352
7 (+++)	Enterococcus faecium DSM 2918 DSM	2.00	1352
8 (+++)	Enterococcus faecium DSM 13589 DSM	2.00	1352

Indikatorbakterien: *E. coli*

Nachweis von *E. coli*

- DIN EN ISO 9308-1 → Membranfiltration auf CCA
- DIN EN ISO 9308-2 → Colilert-18-Quantitray-Verfahren



Identifizierung von *E. coli*

- sichere Identifizierung mit MALDI möglich
(direkt von CCA, direkt aus Colilert, nach Überimpfung)

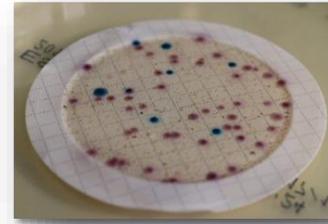
Im Normalfall keine Bestätigung erforderlich!

Bestätigung kann bei unsicherer/unplausibler Befundlage hilfreich sein

Indikatorbakterien: *E. coli*

Praxisfälle:

- falschpositive *E. coli*-Befunde
- In Hochbehälter
- In Brunnen, Aufbereitung

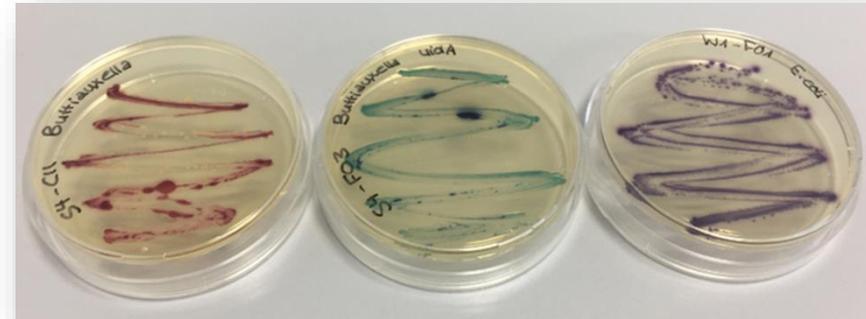


Ergebnis Identifizierung:

Buttiauxella spp.



Quelle: NLGA

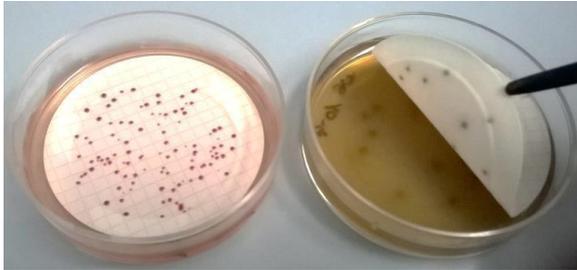


Hügler et al. 2019 ewp
Leister et al. 2023 Water Research

Indikatorbakterien: Enterokokken

Nachweis von Enterokokken

- DIN EN ISO 7899-2 → Membranfiltration auf Slanetz & Bartley-Agar



Identifizierung von Enterokokken

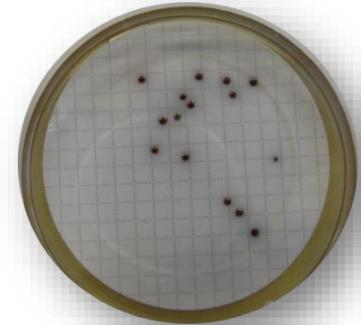
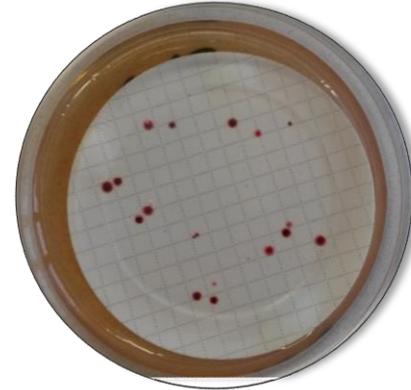
- **Intestinale Enterokokken:**
E. faecium, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*
- auf Selektivagar (S&B) wachsen nicht nur intestinale Enterokokken

Art	Anzahl
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	384
<i>Enterococcus faecium</i>	249
<i>Enterococcus faecalis</i>	205
<i>Enterococcus hirae</i>	149
<i>Enterococcus mundtii</i>	146
<i>Enterococcus moraviensis</i>	82
<i>Enterococcus termitis</i>	46
<i>Enterococcus gallinarum</i>	44
<i>Enterococcus durans</i>	31
<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	20
<i>Enterococcus rotai</i>	19
<i>Enterococcus haemoperoxidans</i>	17
<i>Enterococcus thailandicus</i>	4
<i>Enterococcus silesiacus</i>	2
<i>Enterococcus gilvus</i>	2
<i>Enterococcus avium</i>	2
<i>Enterococcus sulfureus</i>	1
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	1
Gesamt	1404

Indikatorbakterien: Enterokokken

Identifizierung von Enterokokken

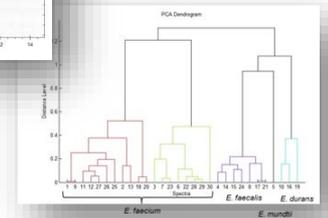
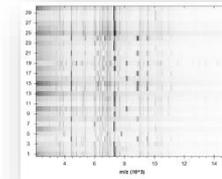
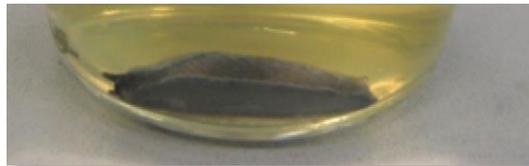
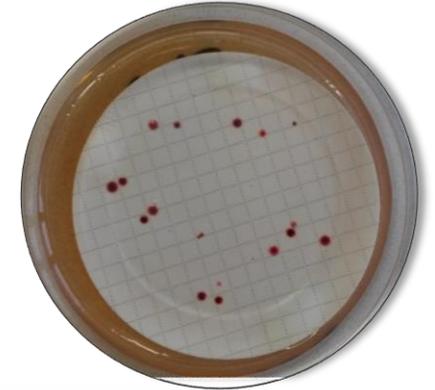
- zuverlässige **Identifizierung auf Artniveau**
(MALDI: direkt von S&B, nach Überimpfung)
 - Datenbank gut, nur **einzelne Arten fehlen**
 - klare Unterscheidung von **intestinalen Enterokokken**
(*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*)
und anderen Enterokokken-Arten möglich
(*E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. rotai*, ...)
- **Mehrwert bei Ursachenforschung**
→ **Grundlage für Maßnahmen**



Empfehlungen für die Praxis

Enterokokken

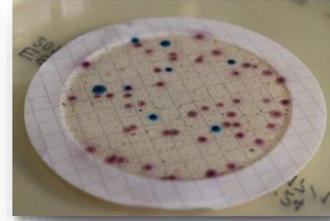
- Identifizierung bei Positivbefund immer zu empfehlen
- schnelle Verifizierung von intestinalen Enterokokken und damit einer möglicher fäkaler Belastung
- Clusteranalyse ermöglicht Erfassung der Stammdiversität
- häufig Insekten und andere Invertebraten Ursache für Enterokokken-Belastung



Indikatorbakterien: coliforme Bakterien

Nachweis von coliformen Bakterien

- DIN EN ISO 9308-1 → Membranfiltration auf CCA
- DIN EN ISO 9308-2 → Colilert-18-Quantitray-Verfahren



Identifizierung von coliformen Bakterien

- direkte Identifizierung von Selektivagar (CCA) oder aus Colilert-Tray möglich
- bessere Identifizierung nach Überimpfung auf Nähragar
- Identifizierung mit MALDI i.d.R. sehr gut möglich
- zuverlässige **Identifizierung auf Gattungsniveau**, einzelne Arten auf Artniveau

Indikatorbakterien: coliforme Bakterien

Wann ist eine Identifizierung eindeutig?

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Serratia fonticola KGB03 18D0976-1	2.48	135008810
2 (+++)	Serratia fonticola KGB02 18D0844-4	2.47	135008810
3 (+++)	Serratia fonticola DSM 4576T DSM	2.46	47917
4 (+++)	Serratia fonticola 15D1155-9b	2.44	135008810
5 (+++)	Serratia fonticola 15D0717-1	2.43	135008810
6 (+++)	Serratia fonticola KGB04 18D1052-1	2.43	135008810
7 (+++)	Serratia fonticola DSM 9663 DSM_2	2.43	47917
8 (+++)	Serratia fonticola DSM 4576T DSM_2	2.42	47917
9 (+++)	Serratia fonticola 19D0475-1	2.41	135008810

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Buttiauxella agrestis DSM 4586T HAM	2.12	82977
2 (+)	Buttiauxella ferragutiae DSM 9390T HAM	1.96	82989
3 (+)	Buttiauxella warmboldiae DSM 9404T HAM	1.94	82993
4 (+)	Buttiauxella gaviniae DSM 9393T HAM	1.92	82990
5 (+)	Buttiauxella izardii DSM 9397T HAM	1.90	82991
6 (+)	Buttiauxella sp. S04-F03 (DSM 113932)	1.80	155334956
7 (+)	Buttiauxella noackiae DSM 9401T HAM	1.70	82992
8 (-)	Cedecea davisae CCUG 21141 CCUG	1.57	158484
9 (-)	Siccibacter colletis DSM 107916T DSM	1.54	543

Indikatorbakterien: coliforme Bakterien

Wann ist eine Identifizierung eindeutig?

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Raoultella planticola VA04253_09 ERL	2.42	575
2 (+++)	Raoultella planticola VA3440_3_09 ERL	2.42	575
3 (+++)	Raoultella planticola MHNC_28_1 ERL	2.43	575
4 (+++)	Raoultella planticola MHNC_SB2787 ERL	2.43	575
5 (+++)	Raoultella ornithinolytica MB_18887 CHB	2.42	54291
6 (+++)	Raoultella planticola DSM_2688 DSM	2.40	575
7 (+++)	Raoultella ornithinolytica CCUG_52805 CCUG	2.39	54291
8 (+++)	Raoultella planticola DSM_4617 DSM	2.37	575
9 (+++)	Klebsiella oxytoca and species ornithinolytica / planticola / terrigena of the genus Raoultella have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.		

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Raoultella ornithinolytica DSM_7464T DSM	2.37	54291
2 (+++)	Raoultella ornithinolytica MB_18887 CHB	2.38	54291
3 (+++)	Raoultella ornithinolytica CCUG_52805 CCUG	2.23	54291
4 (+++)	Raoultella ornithinolytica VA00837_09 ERL	2.11	54291
5 (+++)	Klebsiella oxytoca ATCC_700324 THL	2.11	571
6 (+++)	Raoultella terrigena VA12423_10 ERL	2.10	577
7 (+++)	Raoultella planticola VA3440_3_09 ERL	2.07	575
8 (+++)	Raoultella planticola VA04253_09 ERL	2.07	575
9 (+++)	Klebsiella oxytoca and species ornithinolytica / planticola / terrigena of the genus Raoultella have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.		

Klebsiella oxytoca and species ornithinolytica / planticola / terrigena of the genus Raoultella have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.

Indikatorbakterien: coliforme Bakterien

Raoultella planticola

- RG 1 (nach TRBA)
- Ubiquitär verbreitet (Pflanzen, Gewässer, Boden, Tiere, Mensch) → Umweltbakterium
- selten Infektionen bei immunsupprimierten Patienten

Raoultella ornithinolytica

- RG 2 (nach TRBA)
- Ubiquitär verbreitet (Pflanzen, Gewässer, Boden, Tiere, **Fische**) → Umweltbakterium
- Kann Fisch verderben → Durchfall bei Verzehr von verdorbenem Fisch
- selten Infektionen bei Menschen

Klebsiella oxytoca and species *ornithinolytica* / *planticola* / *terrigena* of the genus *Raoultella* have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.

Empfehlungen für die Praxis

Coliforme Bakterien

- **Einzelbefund**
 - Identifizierung nicht unbedingt notwendig
 - Nachprobe
- **regelmäßige Positivbefunde und höheren Belastungen**
 - Identifizierung für Ursachenforschung sinnvoll
 - weitere Maßnahmen zur Ursachenforschung (z.B. Anreicherung)



Unterscheidung

- **netzinterne Ursachen (z. B. Sedimente, Biofilme)**
 - eine oder wenige Arten
- **externe Ursachen (z. B. Undichtigkeit, Rohrbrüche)**
 - mehrere verschiedene Arten

Identifizierungsergebnis erlaubt keine Aussage zu möglicher Pathogenität !

Anreicherungsuntersuchungen

Warum kann eine Anreicherungsuntersuchung sinnvoll sein?

- Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit (bei niedrigen Befundsituationen)
- Untersuchung von Eintragsquellen
- Verifizierung von oberflächlichen Einträgen / fäkalen Belastungen

MikroSens-System:

Anreicherung von großen Probenvolumina



Anreicherung mit dem MikroSens-System

Anreicherung

- Anreicherung großer Volumina (z.B. 100 L) für mikro- und molekularbiologische Untersuchungen



**Anreicherung
(vor Ort)**



**Elution
(Labor)**



**Analyse
(Labor)**

Anreicherung in der Praxis

Brunnen: Einfluss durch nahes Fließgewässer vorhanden?

- Ausgangslage: gelegentliche Nachweise von coliformen Bakterien im Rohwasser der Brunnen (i.d.R. niedriger Bereich)
- Kommt es bei Hochwasser zu Einträgen in die Brunnen?
- Untersuchungsprogramm:
Anreicherung Normalbetrieb
Anreicherung während Hochwasser

Microbial Source Tracking

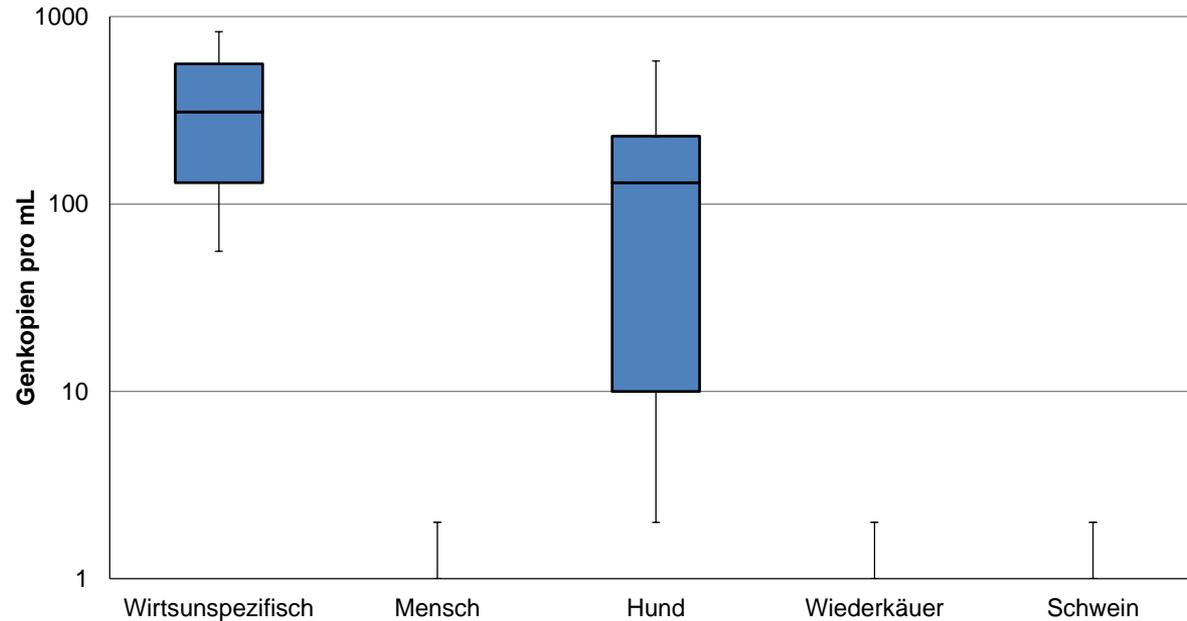


Fäkalindikatoren zeigen Kontamination an, aber nicht die Herkunft.

- Herkunftsbestimmung kann für die Einleitung von Gegenmaßnahmen hilfreich sein
- Microbial Source Tracking (MST)-Verfahren

Microbial Source Tracking: Praxisbeispiel

Untersuchungen in einem städtisch geprägten Einzugsgebiet



→ Kontamination durch Hundefäkalien

Microbial Source Tracking: Praxisbeispiel

Quellwassernutzung für Hof

- Gelegentlich fäkale Belastungen (*E. coli*-Nachweis)
- Pferdekoppeln und Rinderweiden im Einzugsgebiet

- Nachweis von Pferde- und Rindermarkern

Zusammenfassung

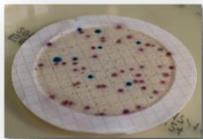
Vorteile einer Bakterien-Identifizierung mit MALDI-TOF-MS

- Identifizierung von Indikatorbakterien noch am Befundtag
(coliforme Bakterien, Enterokokken...)
→ schnelle Verifizierung, Ursachenanalyse,
Identifizierung der Eintragsquelle, Bewertung

Weitergehende Methoden zur Ursachenforschung

- Anreicherungsuntersuchungen
- Microbial Source Tracking

Analyse



Identifizierung



Abt.	Spezies/Genus/Bakterie	Identifizierung	MS/MS-Daten
1	Escherichia coli O157:H7	+	+
2	Salmonella enterica serovar Enteritidis	+	+
3	Staphylococcus aureus	+	+
4	Enterobacteriaceae	+	+
5	Enterobacteriaceae	+	+
6	Enterobacteriaceae	+	+
7	Enterobacteriaceae	+	+
8	Enterobacteriaceae	+	+
9	Enterobacteriaceae	+	+
10	Enterobacteriaceae	+	+
11	Enterobacteriaceae	+	+
12	Enterobacteriaceae	+	+
13	Enterobacteriaceae	+	+
14	Enterobacteriaceae	+	+
15	Enterobacteriaceae	+	+
16	Enterobacteriaceae	+	+
17	Enterobacteriaceae	+	+
18	Enterobacteriaceae	+	+
19	Enterobacteriaceae	+	+
20	Enterobacteriaceae	+	+

Anreicherung



Maßnahmen



Danksagung

- TZW-Kolleginnen & Kollegen:
*Carolin Leister, Monika Bösl, Lydia Grabner,
Claudia Stange*

Heike Petzoldt, Andreas Korth

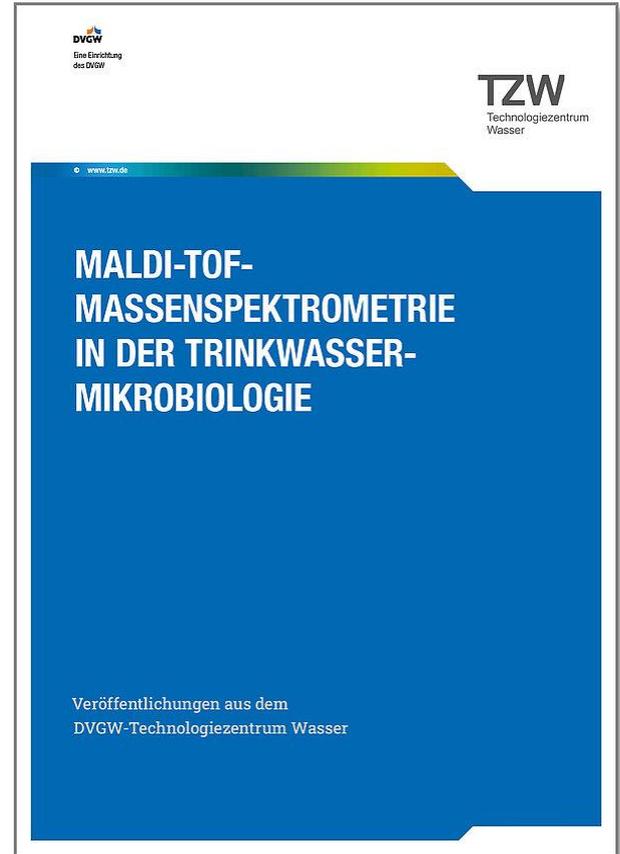
Beate Hambsch, Andreas Tiehm

Förderung:



GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Abonnieren Sie
unseren Newsletter
TZW NEWS.
Anmeldung auf
www.tzw.de



Dr. Michael Hügler

Wassermikrobiologie

TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser

Karlsruher Straße 84

76139 Karlsruhe

michael.huegler@tzw.de