

# Die Flowzytometrie als Alternative zum klassischen HPC-Testverfahren

Die Quantifizierung der bakteriellen Verunreinigung der verschiedensten Wasserproben ist ein notwendiger Prozess, um die mikrobiologische Kontamination zu beurteilen und im Verlauf zu kontrollieren. Neben der immer noch als Standard geltenden Methode der Bestimmung der heterotrophen Keimzahl setzen sich heute mehr und mehr moderne Methoden durch. Speziell die Flowzytometrie als besonders schnelle, sehr gut standardisierbare und automatisierbare Methode erweist sich als wichtige Alternative zum klassischen HPC-Test.

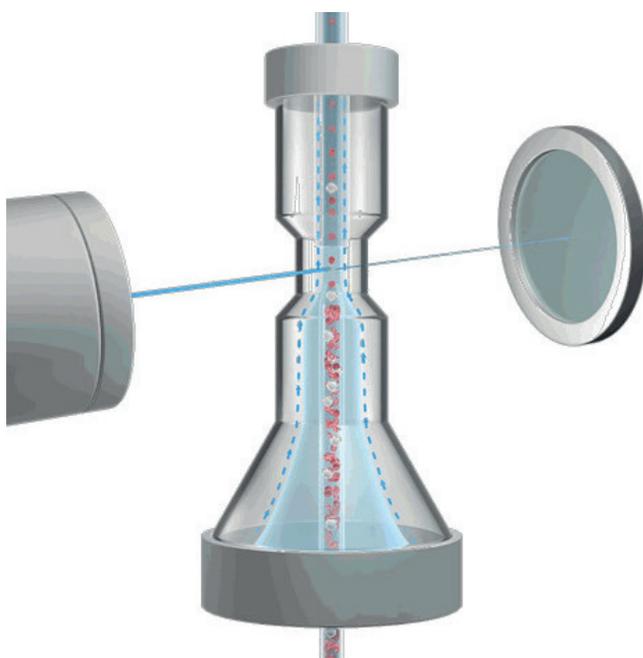
Die Analyse der mikrobiologischen Kontamination von Wasserproben ist branchenübergreifend von größter Bedeutung. Unabhängig davon, ob es sich hier um Trinkwasser oder Brauch-, Kühl-, Prozess- oder Schmutzwasser handelt, ist eine schnelle und zuverlässige Beurteilung der bakteriellen Belastung von hohem, nicht zuletzt wirtschaftlichem Interesse.

## Der alte Standard - das HPC-Testverfahren

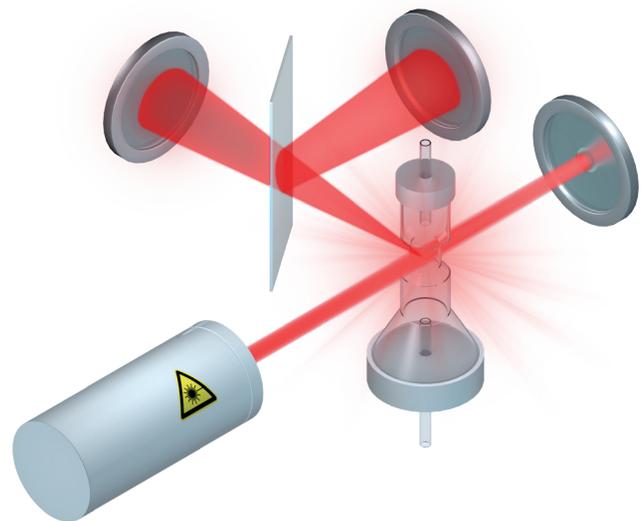
Weltweit erfolgt die bakterielle Qualitätskontrolle auch heute noch mehrheitlich über die Analyse der sogenannten 'heterotrophic plate count' (HPC) – der. Diese Methode geht zurück auf Robert Koch, der vor mehr als einem Jahrhundert den mikrobiologischen Status von Trinkwasser über die Zählung von Bakterienkolonien auf Agarplatten etablierte.

Heutzutage kennt man die vielen Limitationen dieser Methode:

- Längst nicht alle im Wasser enthaltenen Mikroorganismen wachsen und bilden Kolonien auf festen Kulturmedien. Diese Bakterien werden als „lebendig, aber nicht kultivierbar“ bezeichnet (viable but non-culturable - VBNC).
- Der Anteil der Bakterien, die in diesem Verfahren aufgrund ihrer Koloniebildung ausgezählt werden können, entspricht



**Bild 1:** Hydrodynamische Fokussierung



**Bild 2:** Streulicht und Fluoreszenzlicht werden detektiert und zur Charakterisierung genutzt

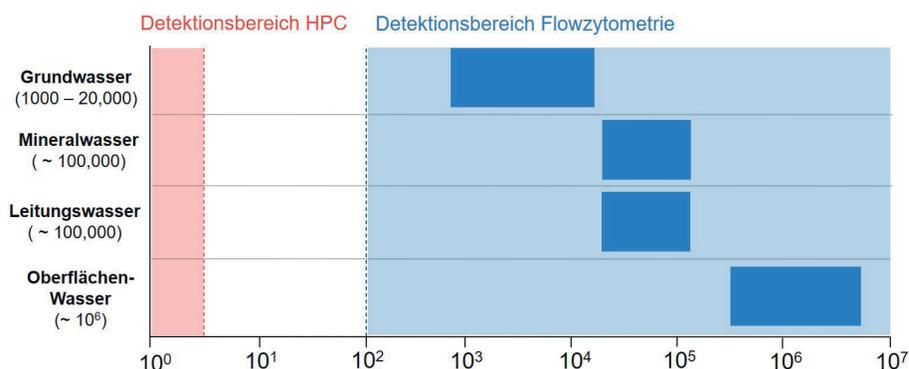
- nur ca. 0,1% der in einer Wasserprobe enthaltenen Bakterien.
- Die Auswertung der Kulturplatten erfordert einen erheblichen personellen Aufwand.
- Die verschiedenen HPC-Tests unterscheiden sich z.T. erheblich in Bezug auf ihre benutzerdefinierten Testbedingungen. Dies zieht eine große Bandbreite an quantitativen und qualitativen Ergebnissen nach sich und erschwert damit die Standardisierung und Vergleichbarkeit der Analysen.
- Die aber wohl größte Limitation besteht in der aufgrund der Kultivierungszeiten stark verzögerten Ergebnisausgabe. Diese kann abhängig von den gewählten Kulturbedingungen 1-14 Tage umfassen.

## State-of-the-art: die Flowzytometrie

Aufgrund all dieser Limitationen wurde bereits im Jahr 2012 von den Schweizer Behörden die Flowzytometrie als geeignete Methodik zur Bestimmung der Gesamtzellzahl in Frischwasser empfohlen. [1]

### Messprinzip

Die Flowzytometrie erlaubt die Analyse von in Suspension befindlichen Partikeln und basiert auf der Analyse von Streulicht und/oder emittiertem Fluoreszenzlicht während die Partikel -



**Bild 3:** Vergleich des „heterotrophic plate count“ (HPC) mit den Ergebnissen der Flowzytometrie für verschiedene Wasserproben

durch einen Hüllstrom vereinzelt - einen Laser passieren. Die Analyse von Bakterien in den verschiedenen Wasserproben ist nur eine von zahlreichen Anwendungen. Weitere Beispiele für Anwendungsfelder sind die Messung von Algen und Mikroplastik in Wasser, von Hefen und mikrobiellen Geschmacksverderbern in der Getränkeherstellung oder von Zellen und Zellfragmenten in der Diagnostik und der medizinischen Forschung. Während der Messung ermöglicht die hydrodynamische Fokussierung durch den Hüllstrom die Vereinzelnung der Zellen/Partikel, so dass sich diese perlschnurartig hintereinander aufreihen und den Laserstrahl passieren (**Bild 1**). Der Laserstrahl trifft auf die Zelle/Partikel und das entstehende Streulicht (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) sowie das angeregte und emittierte Fluoreszenzlicht werden erfasst und dienen der Charakterisierung der Zellen/Partikel (**Bild 2**).

Eine Markierung der Gesamtpopulation der Bakterien mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff sorgt dafür, dass sie vollständig erfasst und von nicht-biologischen Partikeln abgegrenzt wer-

den kann. Ergänzend kann eine Markierung toter Bakterien die Färbung präzisieren. Die quantitative Färbung der DNA führt zusätzlich zu der Möglichkeit Bakterien mit einem hohen Nukleinsäuregehalt (high content of nucleic acid – HNA) von jenen mit einem niedrigen (low content of nucleic acid – LNA) zu unterscheiden. Das Verhältnis von HNA- und LNA-Bakterien stellt einen weiteren sensitiven Parameter für die Überwachung eines beprobten Systems dar.

Im Unterschied zu den HPC-Testverfahren werden mittels Flowzytometrie nicht nur die Bakterien erfasst, die unter den verschiedenen Kulturbedingungen auf den Agarplatten wachsen können, sondern eine sehr viel größere Anzahl Bakterien. Dies erklärt, warum die HPC-Ergebnisse und die TTC („total cell count“ – Gesamtkeimzahl)- oder VCC („viable cell count“ – Gesamtzahl lebendiger Keime)- Ergebnisse der flowzytometrischen Analyse um den Faktor 100 bis 10.000 auseinanderliegen (**Bild 3**).

In den letzten Jahren haben sich mehr und mehr wissenschaftliche Publikationen mit der flowzytometrischen Analyse des TCC in Trink- und Industrierwasser beschäftigt. Die Stärken der Flowzytometrie sind vielseitig und umfassen (1) die hohe Sensitivität der Methodik aufgrund der Tatsache, dass alle Bakterien erfasst werden, (2) die kurze Zeit bis zum Endergebnis (< 20 min), (3) die hohe Reproduzierbarkeit (< 5 % SD), (4) der hohe Durchsatz und die leichte Durchführbarkeit, und (5) die Möglichkeit zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden zu können. Ein großer Vorteil der Methodik liegt ferner in der Möglichkeit der Automation [2 - 8].

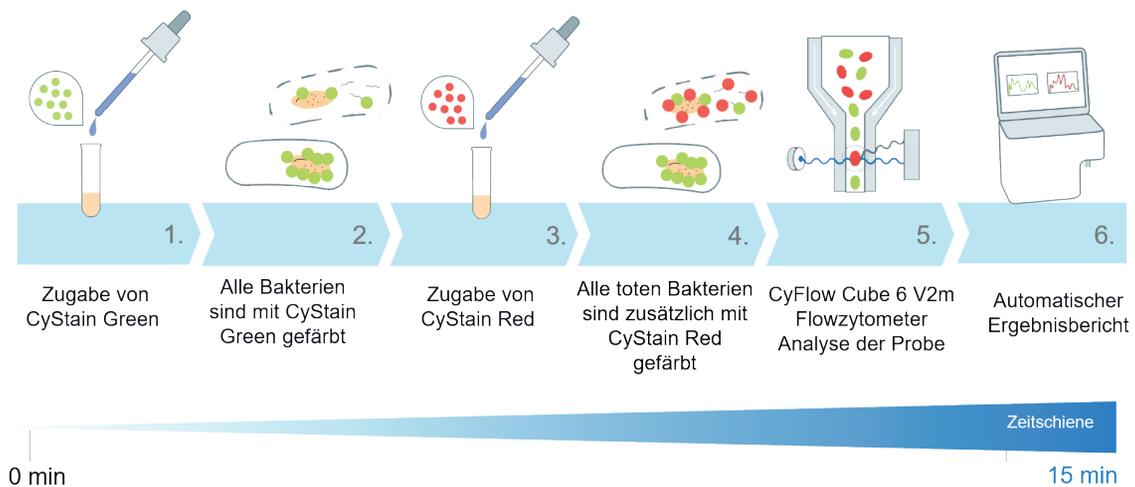
Um dies zu gewährleisten wurde von Sysmex Partec ein aufeinander abgestimmtes System aus Gerät und Test entwickelt: das CyFlow™ Cube 6 V2m Flowzytometer zusammen mit dem CyStain™ BacCount Total Kit und dem CyStain™ BacCount Viable Kit (**Bild 4**). Für die schnelle und automatische Abarbeitung kann ein Auto-loader (CyFlow™ V2m Robby) eingesetzt werden, der unter anderem auch 96er-Multititerplatten vollautomatisch abarbeiten kann. Das System wird komplettiert durch eine entsprechende, standardisierte Software und integriertem Qualitätskontroll-Material.

**Messprinzip des CyStain™ BacCount Viable Kits**

Die Lebendzellzahl-Messung mit dem CyStain™ BacCount Kit basiert auf der Farbmarkierung der Bakterien-DNA mit zwei ver-



**Bild 4:** CyFlow™ Cube 6 V2m Flowzytometer mit Autoloader und dem CyStain™ BacCount Viable Kit



**Bild 5:** Präparation des CyStain™ BacCount Viable Kits: Das membran-gängige CyStain™ Green markiert alle lebenden und toten Bakterien und emittiert ein charakteristisches grünes Fluoreszenzlicht. CyStain™ Red kann nur Bakterien anfärben, die eine geschädigte Membran aufweisen. Tote oder sterbende Bakterien weisen daher bei der Anfärbung mittels CyStain™ BacCount Viable sowohl rotes als auch grünes Fluoreszenzlicht auf.

schiedenen Farbstoffen (**Bild 5**):

- CyStain™ Green ist ein membran-gängiger, grüner Fluoreszenz-Farbstoff, der unspezifisch alle Bakterien in der Wasserprobe anfärbt. Dies umfasst sowohl tote als auch lebende Bakterien.
- CyStain™ Red ist ein nicht membran-gängiger, roter Fluoreszenz-Farbstoff. Er färbt daher nur Bakterien mit einer geschädigten und damit durchlässigen Membran an. Somit werden mit diesem Farbstoff tote und sterbende Bakterien erfasst.

Messung und Analyse auf dem CyFlow™ Cube 6 V2m sind automatisiert. Die generierten Berichte enthalten die Zellzahl (TCC oder VCC, je nach gewähltem Kit), die Zusammensetzung aus HNA- und LNA-Bakterien und können im pdf-Format gespeichert werden. Über die Anwendung in unbehandeltem Frischwasser hinaus ist der CyStain™ BacCount Test auch für die Bakterienmessung in mit Chlor oder Ozon behandeltem Trinkwasser sowie in Salzwasser geeignet.

### Ein Blick in die Zukunft

Heutzutage werden Wasserproben in regelmäßigen Abständen manuell gewonnen und zum Labor transferiert. In Zukunft wird es möglich sein, Wasserproben rund um die Uhr (24/7) automatisiert zu gewinnen und direkt flowzytometrisch zu analysieren. So wird eine engmaschige Echtzeitüberwachung des Systems ermöglicht. Die onCyt Microbiology AG, eine Ausgliederung der Eawag (Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz), hat hierzu eine Add-on Automationslösung für die Flowzytometrie entwickelt. Diese Add-on Komponente ermöglicht es im Abstand von wenigen Minuten Wasserproben zu entnehmen (>280 Proben pro Tag) und weiter zu bearbeiten. Das System ist flexibel einstellbar, so dass die individuellen Anwendersprüche an Frequenz, Inkubationstemperatur, Messprotokoll etc. umgesetzt werden können.

Für die unterschiedlichsten Industriezweige eröffnen sich durch das vollautomatische Online-Monitoring von Wasserproben mittels Flowzytometrie neue Möglichkeiten. Die Vorteile der Flowzytometrie gegenüber der HPC-Bestimmung – wie Analysegeschwindigkeit und Personalaufwand - werden durch diese neuen Möglichkeiten der Vollautomation noch einmal gesteigert. So hat die Flowzytometrie das Potential die bakteriellen Wasseranalysen aus dem vorigen Jahrhundert herauszuholen und weist dabei den Weg in die Zukunft – aussagekräftiger und effizienter.

### Literatur

1. Swiss Office for Health. Determining the total cell count and ratios of high and low nucleic acid content cells in freshwater using flow cytometry. Standard Operating Procedure no. 333, Dec. 2012.
2. Van Nevel S., et al., 2017. Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Res.* 113: p. 191-206.
3. Wang, Y., et al., 2010. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends Biotechnol.* 28, 416-424.
4. Van Nevel S., et al., 2013. Routine bacterial analysis with automated flow cytometry. *J Microbiol Methods.* 94, 73-76.
5. Hammes, F., et al., 2008. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research.* 42, 269-277.
6. Safford HR., et al., 2018. Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review. *Water Research.* 151, 110-133.
7. Prest et al., 2013. Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method, *Water Res.* 47: 7131-42.
8. Tatari et al., 2016. Sensors for microbial drinking water quality, DTU Environment

### Autorin

Dr. Maike Rieks  
 Sysmex Deutschland GmbH  
 E-Mail: [rieks.maike@sysmex.de](mailto:rieks.maike@sysmex.de)