

Entwicklung von schnellen und selektiven Anreicherungsverfahren zur Probenvorbereitung von Mikroorganismen in Trinkwasser

Caroline Peskoller, Reinhard Nießner, Michael Seidel

Lehrstuhl für Analytische Chemie, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, TU München

Einleitung

Laut Trinkwasserverordnung dürfen im Wasser für den menschlichen Gebrauch keine Erreger sein, die die menschliche Gesundheit gefährden. Derzeit werden für Routineuntersuchungen hauptsächlich mikrobiologische Methoden angewandt, welche einzelne Mikroorganismen durch selektive Kultivierungsschritte nachweisen. Diese Methoden sind jedoch sehr zeitaufwändig und können mehrere Tage dauern, bis eine Kontamination des Wassers nachgewiesen werden kann. Moderne und schnelle Nachweismethoden für Mikroorganismen, wie real-time PCR, Antikörper-Assays oder analytische Mikroarrays [1,2] ermöglichen eine schnelle Detektion von mikrobieller Kontamination in Wasser. Da allerdings die deutsche Trinkwasserverordnung den Nachweis von einem Keim in 100 mL fordert, sind extrem schnelle und effektive Anreicherungs-schritte (Faktor 10⁴-10⁵) notwendig, um die Nachweisgrenzen für diese Detektionsverfahren zu senken.

In dieser Arbeit wurde ein quasikontinuierliches Verbundverfahren entwickelt, das innerhalb kurzer Zeit selektiv Mikroorganismen von einem großen Volumen (mindestens 10 L) auf ein kleines Volumen (200 µL) einengt. Dazu wurde eine Querstrom-Filtrationsanlage mit einer Affinitätschromatographie gekoppelt. Dabei findet mit Hilfe der Querstrom-Filtration eine schnelle Voranreicherung der Bakterien statt, welche in der anschließenden Affinitätschromatographie separiert und weiter aufkonzentriert werden können.

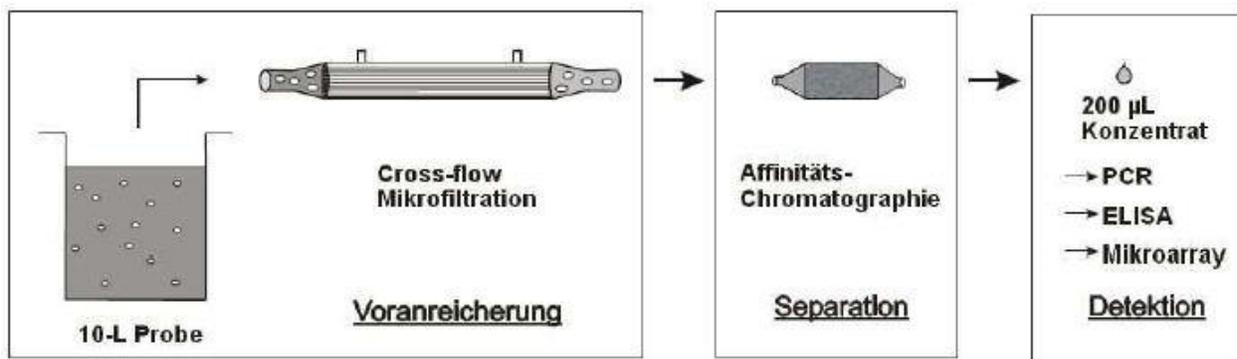


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des quasikontinuierlichen Verbundverfahrens.

Querstrom-Filtrationsanlage

Eine schnelle gröÙenselektive Voranreicherung der Mikroorganismen erfolgt durch die Querstrom-Mikrofiltration (engl.: cross flow). Dabei handelt es sich um eine Filtrationstechnik, bei welcher der Suspensionsstrom nicht senkrecht zur Filteroberfläche wie im Falle der konventionellen Dead-End-Filtration ist, sondern die Filtermembran tangential und turbulent anströmt. Es bildet sich auf der Membran eine Deckschicht

durch Partikelablagerungen, welche allerdings reversibel ist. Die Partikel können wieder durch die von der Überströmung erzeugten Scher- und Auftriebskräfte in die Kernströmung zurückgeführt werden. Der Suspensionsstrom wird in Filtrat (gereinigtes Wasser) und Retentat (unfiltriertes Produkt) getrennt.

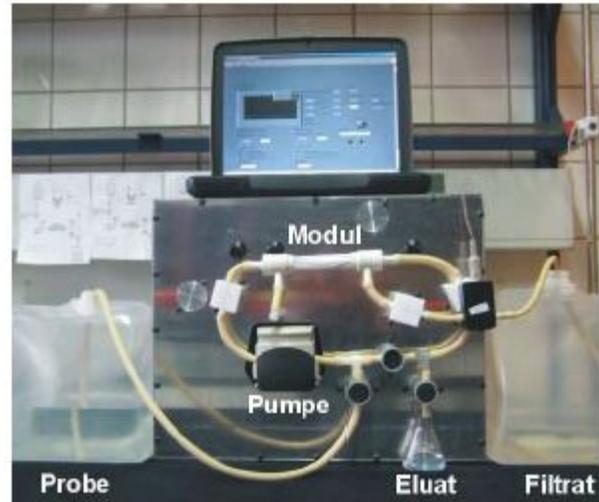


Abbildung 2: Aufbau der Querstrom-Filtrationsanlage

In dieser Arbeit wurde eine Filtrationseinheit aufgebaut, bei dem die Testparameter Transmembrandruck, Durchfluss und Querstromgeschwindigkeit eingestellt und kontrolliert werden können [3]. In Abbildung 2 ist der fluidische Aufbau der Querstrom-Filtrationsanlage dargestellt. Als Modul wurde das MiniKros® Sampler Plus-Hohlfasermodule von Spectrum Laboratories (Material: PES, Porengröße: 0,5 µm, Membranfläche: 290 365 cm²) verwendet. Im Gegensatz zur konventionellen Filtrationsführung wird das Retentat rezirkuliert, und es findet eine Aufkonzentrierung der Zellen im Zirkulationsstrom statt. Die Mikroorganismen bleiben während der Anreicherung in Lösung und können anschließend effektiv eluiert werden. Die Vorteile dieser Filtrationsführung sind die hohen Wiederfindungsraten der angereicherten Partikel, sowie eine geringe Belastung der Bakterien während der Filtration.

Mit der aufgebauten Filtrationsanlage ist es möglich, automatisiert 10 L Wasser auf 50 mL (200-fach) innerhalb 15 Minuten anzureichern. Dabei können 91±5% der Zellen in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 100 cfu/mL zerstörungsfrei angereichert werden.

Affinitätschromatographie

Eine Separation der Zellen in Kombination mit einer weiteren Aufkonzentrierung erfolgt anschließend mit Hilfe einer Hochleistungs-Affinitätschromatographie (AC) an einer monolithischen Säule [4]. Dazu wurde ein neuartiges makroporöses, monolithisches Material auf der Grundlage von Epoxidmonomeren entwickelt, welches bei Raumtemperatur durch eine Polyaddition hergestellt werden kann [5]. Das monolithische Material weist eine hohe Porosität (79%) und eine mittlere Porengröße von 22 μm auf, welche mittels Hg-Porosimetrie bestimmt wurde. Dadurch kann ein ungehinderter Durchfluss der Bakterien (Größe: 1-3 μm) durch die Säule gewährleistet werden. Als Affinitätsligand wird das Antibiotikaderivat Polymyxin B verwendet, welches selektiv Gram-negative Bakterien bindet [6].

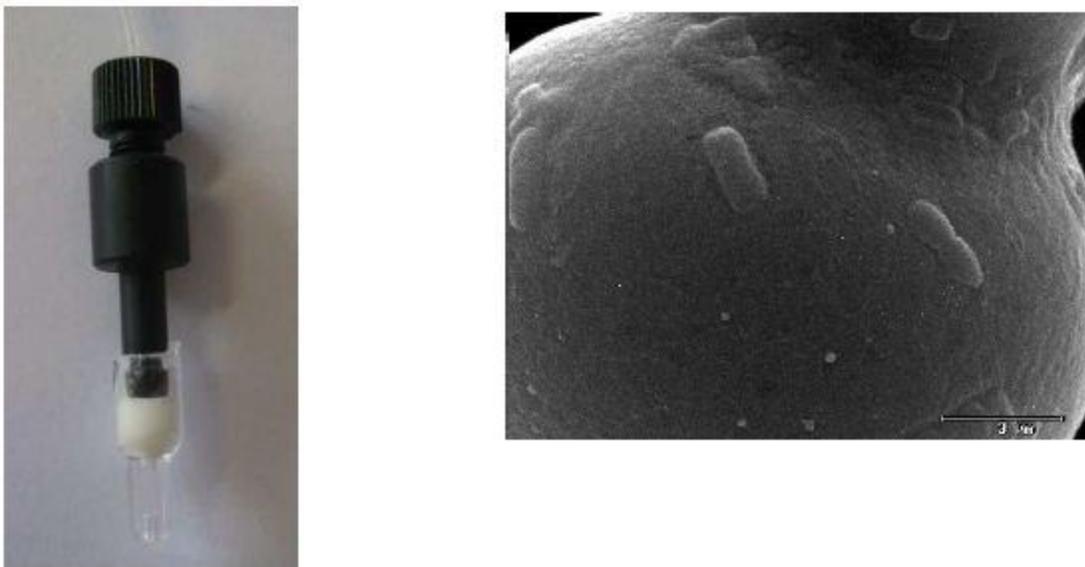


Abbildung 3: (A) Monolithische Affinitätssäule zur Separation von Bakterien (Säule: 6 mm x 4,5 mm I.D.)
(B) REM-Aufnahme der Affinitätsmatrix mit gebundenen E. coli Zellen

Die Gram-negativen Bakterien binden an der monolithischen Polymyxin B Säule bei pH 4 und können durch eine pH-Änderung wieder freigesetzt werden. Die Wiederfindung liegt dabei in einem Elutionsvolumen von 200 μL bei $97 \pm 3\%$. Die monolithischen Affinitätssäulen besitzen eine sehr hohe dynamische Bindungskapazität (4×10^9 Zellen/Säule), welche nahezu geschwindigkeitsunabhängig ist. Dadurch ist eine Separation der Zellen bei hohem Durchfluss (>10 mL/min) und geringem Rückdruck (<1 bar) möglich. Somit können die im ersten Schritt angereicherten Bakterien (50 mL) innerhalb von 5 Minuten durch die Hochleistungs-Affinitätschromatographie (AC) auf weitere 200 μL (250 fach) angereichert und separiert

werden. Es konnte bereits eine Kopplung dieses Verbundverfahrens mit der realtime PCR als Detektionsmethode gezeigt werden.

Literatur:

- [1] A. Wolter, R. Niessner, M. Seidel, *Anal. Chem.* 2008, 80, 5854.
- [2] M. Seidel, R. Niessner, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 1521-1544.
- [3] C. Peskoller, R. Niessner, M. Seidel, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 399.
- [4] C. Peskoller, R. Niessner, M. Seidel, *J. Chromatogr. A*, 2009, doi:10.1016/j.chroma.2009.02.041.
- [5] M. Weller, C. Peskoller, R. Niessner, *PCT Int. Appl. WO 2008135246* (2008).
- [6] B.A. Newton, *Bacteriol. Rev.* 1956, 20, 14.