

Durchflusszytometrie zur schnellen Bestimmung der im Wasser befindlichen Mikrobiologie und des Aufkeimungspotentials

Technologie

Der Großteil der im Wasser befindlichen Bakterien ist nicht kultivierbar und bildet keine Kolonien auf den verfügbaren mikrobiologischen Nährböden. Sie können daher mit kulturellen Nachweismethoden nicht erfasst werden. Unter den kultivationsunabhängigen Methoden nimmt die Durchflusszytometrie aufgrund der schnellen Durchführbarkeit und der guten Validierungsergebnisse mit verschiedenen Wassertypen eine besondere Stellung ein (Hammes et al. 2008; Van Nevel et al. 2017). Dieses diagnostische Verfahren, das in der Medizin für Blutuntersuchungen schon eine lange Tradition aufweist, hat sich in den letzten Jahren auch für mikrobiologische Wasseruntersuchungen zu einer leistungsstarken und praxistauglichen analytischen Methode entwickelt. Die Bestimmung der Bakterienkonzentration ist innerhalb von 15 Minuten möglich und neuerdings sogar im Online-Betrieb. Neben der reinen Quantifizierung erlaubt die Methode die Unterscheidung von intakten und membrangeschädigten Bakterien. Die Membranintegrität dient hierbei als Viabilitätsparameter: lebende Bakterien müssen eine intakte Zellmembran haben, während tote Bakterien oft geschädigt sind. Neben der Quantifizierung der Gesamt- und der Intaktbakterienzahlen im Wasser können auch charakteristische Bakteriengruppen unterschieden werden.

Kleine Volumina von Wasserproben (200 μL bis 1 mL) werden dafür mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen, die an das genetische Material der Bakterien binden. Die Unterscheidung intakter und geschädigter Bakterien

beruht darauf, dass einige Farbstoffe (z. B. Propidium Iodid, rot) nur in Bakterien mit geschädigter Zellmembran eindringen, während andere (z. B. SYBR Green, grün) sowohl geschädigte als auch intakte Bakterien sichtbar machen. Der kombinierte Einsatz dieser Farbstoffe ist besonders nützlich zur Bestimmung der Effizienz von bioziden Behandlungen, die Membranschädigend wirken (Beispiel in Abbildung 1).

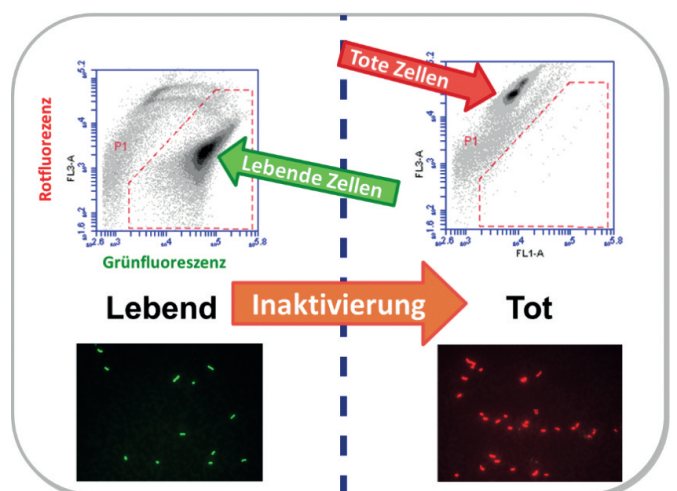


Abbildung 1: Beispielhafte durchflusszytometrische Dichte-Diagramme einer Bakteriensuspension mit lebenden/membranintakten Zellen (im rot-gestrichelten Fenster) bzw. mit abgetöteten membran-geschädigten Zellen (außerhalb des gestrichelten Bereiches) nach Färbung mit den zwei Farbstoffen SYBR Green und Propidium Iodid. Jeder Punkt stellt ein Bakterium dar. Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen mit der gewählten Färbestrategie lebende/intakte Bakterien grün und tote/membran-geschädigte Bakterien rot.

Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Aufkeimungspotentials

Neben der Bestimmung der Gesamt- und Intaktzellzahl, die den mikrobiologischen Ist-Zustand einer Wasserprobe zeigen, erlaubt die Durchflusszytometrie die Bestimmung des Aufkeimungspotentials (Whitton et al. 2018). Dazu werden die Wasserproben in Nährstoff-freien Probenahmegefäßen gesammelt und die Bakterienkonzentrationen gemessen am Tag 0 (= Ist-Zustand) und nach 7 Tagen Inkubation bei der für die jeweilige Probe relevanten Temperatur (im Fall der MultiReUse Proben ca. $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Das Vorgehen und ein beispielhaftes Resultat sind in Abbildung 2 dargestellt.

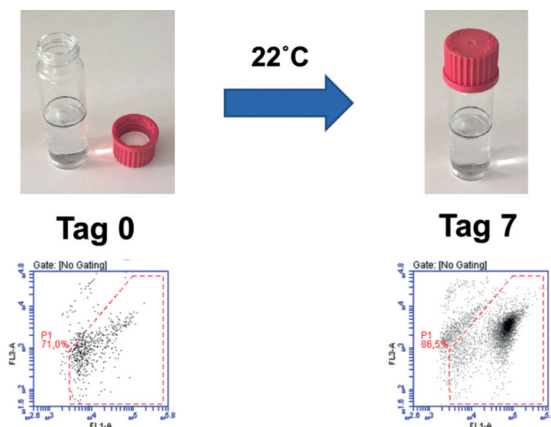


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der Bestimmung des Aufkeimungspotentials. Aufkeimung wird gemessen als Differenz der Bakterienzahlen am Tag 0 und Tag 7. Der Faktor der Zunahme stellt das Aufkeimungspotential dar, das sich in dieser Zeit bei definierter Temperatur im stagnierenden Wasser im ungünstigsten Fall ergeben kann.

Liegen Nährstoffe in der Wasserprobe vor, so vermehren sich die Bakterien unter den gegebenen Bedingungen innerhalb dieser 7 Tage. Die Differenz in den Bakterienkonzentrationen zwischen den beiden Zeitpunkten wird als Vermehrungsfaktor bzw. Aufkeimungspotential ausgedrückt. Je mehr Nährstoffe vorliegen, die am Tag 0 für das Bakterienwachstum genutzt werden können, desto höher ist das Aufkeimungspotential.

Veränderungen der Bakterienkonzentrationen entlang der Aufbereitung

Die Veränderungen der Bakterienkonzentrationen entlang einer Aufbereitung des Kläranlagenablaufes kann mittels Durchflusszytometrie abgebildet werden. Abbildung 3 zeigt die Konzentration von intakten Bakterien

im Kläranlagenablauf sowie nach Ultrafiltration (UF) bzw. Umkehrosmose (UO).

Während die Konzentration von intakten Bakterien im Kläranlagenablauf bei fast 10^7 intakten Zellen pro mL liegt, bewirkt die UF eine Log-Reduktion von mindestens 3 Log-Einheiten. Da das filtrierte Wasser auch Permeatseitig aufgekeimte Bakterien erfasst, kann man annehmen, dass die Filtrationsleistung der UF noch substanzial höher ist. Die Bakterienzahlen nach der UO liegen unter der Detektionsgrenze der Methode.

Während die durchflusszytometrische Messung des mikrobiologischen Ist-Zustand des behandelten Wassers damit klar eine Reduktion der im Wasser enthaltenen Bakterien zeigt, deuten die Messungen nach 7 Tagen Inkubation darauf hin, dass das mikrobiologische Aufkeimungspotential des Wassers weit weniger vermindert wurde (rote Balken in Abbildung 3). Dies wird bedingt durch im System enthaltene Nährstoffe. Aufkeimung im Rahmen der Wasserwiederverwendung kann auf der anderen Seite diverse technische Komplikationen verursachen, z. B. das Verstopfen von Düsen in landwirtschaftlichen Bewässerungssystemen oder exzessive Belagsbildung an Wandungen von industriellen wasserführenden Systemen.

Mikrobiologische Aufkeimung wird daher typischerweise unterdrückt durch Zugabe eines Biozides. Auch bei der Entscheidung, welche Biozidkonzentrationen nötig sind, um Aufkeimung nachhaltig zu unterbinden, kann die Durchflusszytometrie wertvolle Dienste leisten.

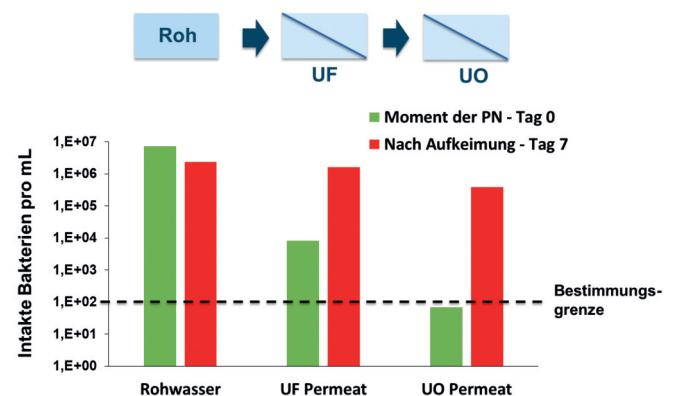


Abbildung 3: Konzentrationen intakter Bakterien im Kläranlagenablauf (Rohwasser) bzw. nach Passage durch die Ultrafiltration (UF) und die Umkehrosmose (UO) im Moment der Probenahme (Tag 0, grüne Balken) bzw. nach Aufkeimung (Tag 7, rote Balken). Die Bestimmungsgrenze der Durchflusszytometrie liegt bei ca. 100 Bakterien pro mL.

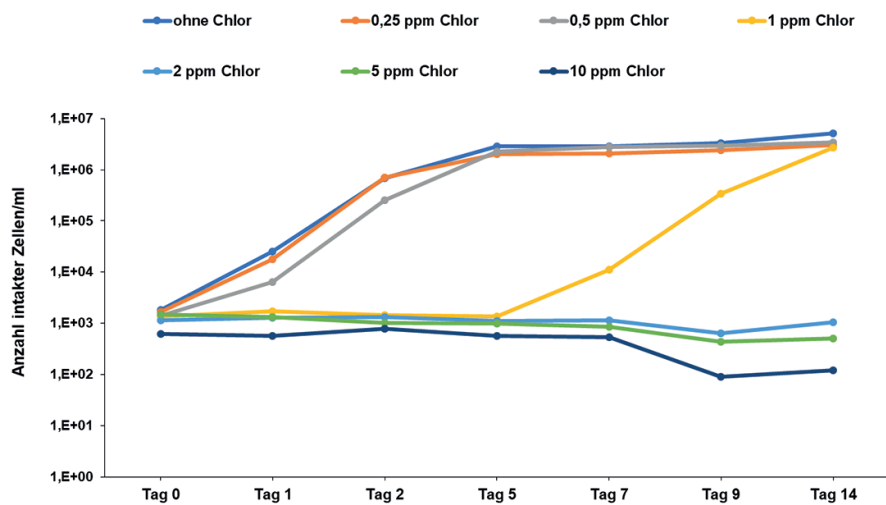


Abbildung 4: Bestimmung der Nachhaltigkeit verschiedener Chlorkonzentrationen (in Form von Hypochlorit) auf die Aufkeimung von Bakterien im UF-Permeat mittels Durchflusszytometrie.

Abbildung 4 zeigt den Effekt verschiedener Chlorkonzentrationen auf die Aufkeimung von UF-Permeat. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass eine Hypochloritkonzentration von ≥ 2 mg/L mikrobielle Aufkeimung über einen Zeitraum von zwei Wochen effizient unterdrücken kann.

Fazit

Wie für Trinkwasser erweist die Durchflusszytometrie hervorragende Dienste für das Monitoren von Wasser-aufbereitungsprozessen im Gebiet der Wasserwiederverwendung. Die mikrobiologischen Daten sind schnell verfügbar. Aufgrund der Tatsache, dass die Detektion nicht auf der Kultivierbarkeit der Bakterien beruht, wird die Gesamtpopulation der im Wasser befindlichen Bakterien erfasst. Während die Messung der klassischen Indikatorparameter wie Coliforme, Intestinale Enterokokken oder Clostridium perfringens nach Membranfiltration meist einen Nullwert aufweisen und die Gesamtkoloniezahl erst nach frühestens zwei Tagen vorliegt, liefert die Durchflusszytometrie schnell eine solide Datenbasis zur Einschätzung der mikrobiologischen Effizienz der Aufbereitung. Neben der Information des mikrobiologischen Ist-Zustandes einer Wasserprobe bzgl. der Gesamt- und Intaktzellkonzentrationen ermöglicht die Messung zu einem weiteren Zeitpunkt die Bestimmung der in diesem Zeitintervall möglichen Aufkeimung und damit Aussagen über den Gehalt an biologisch verfügbaren Nährstoffen. Die Methode ist damit sehr kompatibel mit dem HACCP-Konzept („Hazard analysis and critical control points“); sie ermöglicht die rasche Erkennung von mikrobiologi-

schen Schwankungen in der Wasserqualität und gibt damit Hinweise auf Handlungsbedarf bei der Qualitätssicherung.

Literatur

- Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster O., Egli, Th. (2008): Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research* 42, 269–277
- Van Nevel, S., Koetzsch, S., Proctor, C. R., Besmer, M. D., Prest, E. I., Vrouwenvelder, J. S., Knezev, A., Boon, N., Hammes, F. (2017): Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research* 15, 113–206
- Whitton, R., Fane, S., Jarvis, P., Tupper, M., Raffin, M., Coulon, F., Nocker, A. (2018): Flow cytometry-based evaluation of the bacterial removal efficiency of a black-water reuse treatment plant and the microbiological changes in the associated non-potable distribution network. *Science of the Total Environment* 645, 1620–1629

Autor/innen

Dr. Andreas Nocker, Angewandte Mikrobiologie,
IWW Zentrum Wasser, Mülheim an der Ruhr

Kontakt: a.nocker@iww-online.de

Barbara Zimmermann, Wassertechnologie,
IWW Zentrum Wasser, Mülheim an der Ruhr

Kontakt: b.zimmermann@iww-online.de

Kurzbeschreibung Projekt MULTI-ReUse

Gereinigtes Abwasser ist ein wichtiger Teil des Wasserkreislaufs. Eine Einleitung in Flüsse ist aus Umweltsicht akzeptabel, aber für eine wirtschaftliche Nutzung ist das Wasser meistens ungeeignet. MULTI-ReUse schließt diese Lücke und eröffnet durch die Entwicklung und Anwendung neuer Verfahren weitere Anwendungsmöglichkeiten für Betriebswasser. Ziel des Projektes ist die Entwicklung, Demonstration und Bewertung eines modularen Aufbereitungssystems. Damit soll das Betriebswasser in unterschiedlichen Qualitäten und wechselnden Mengen zu konkurrenzfähigen Preisen angeboten werden.

Impressum

Die Erstellung und Veröffentlichung dieses Factsheets erfolgt im Rahmen des MULTI-ReUse Verbundvorhabens, gefördert mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) unter dem Förderkennzeichen 02WAV1403 innerhalb der Fördermaßnahme WavE.

IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für
Wasserforschung gemeinnützige GmbH
Moritzstr. 26
45476 Mülheim an der Ruhr

Internet: <https://water-multi-reuse.org/>

E-Mail: info@iww-online.de

Presserechtlich verantwortlich:

Dr.-Ing. Wolf Merkel (Techn. Geschäftsführer)

November 2018

