„Reverse Isotope Labeling“: Eine neue Methode zur Bestimmung des biologisch verfügbaren gelösten organischen Kohlenstoffs (BDOC)

Hintergrund

Bei der Beurteilung der mikrobiologischen Stabilität von Wasser wird oft zwischen dem Anteil des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC), der zur Assimilation genutzt wird (AOC) und so eine Aufkeimung von Bakterien zur Folge hat, und dem Anteil des mikrobiologisch abbaubaren organischen Kohlenstoffs (BDOC) unterschieden, der in Teilen assimiliert und in Teilen metabolisch zu CO_2 umgesetzt wird und so zur Mineralisation des organischen Kohlenstoffs führt.

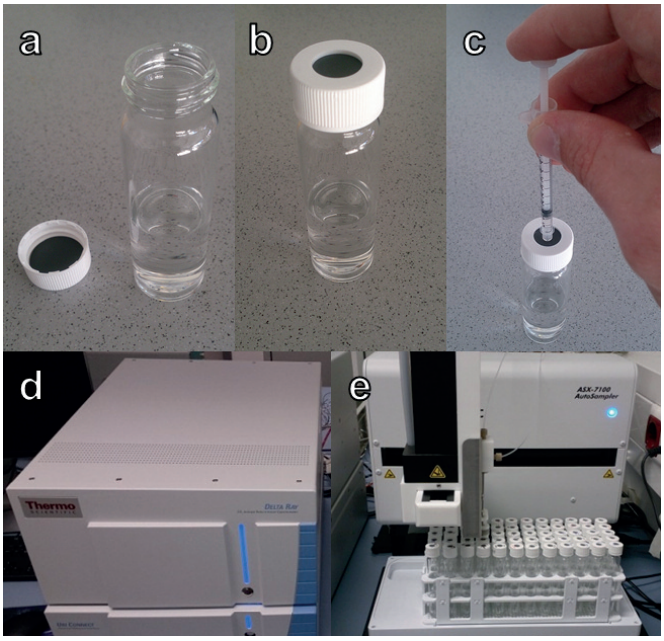

Abbildung 1: Beispielhafte Probenvorbereitung (a, b: Probenzugabe; c: Zugabe des ^{13}C-markierten Bikarbonats) und Darstellung des verwendeten Messgeräts (d: Isotopenverhältnis-Infrarot-Spektrometer, Thermo Fisher) mit Autosampler für bis zu 60 Proben (e: ASX-7100, Teledyne)

Methoden zur AOC-Bestimmung basieren oft auf kulturellen Nachweismethoden der Zellmenge und haben neben der mangelnden Kultivierbarkeit oft den Nachteil der schlechten Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboratorien.

Das „Reverse Isotope Labeling“ (RIL) stellt eine neue Methode für die Bestimmung des BDOC dar, die u. a. bereits zur Untersuchung des DOC-Abbaus in Aktivkohlefiltern zur Trinkwasseraufbereitung genutzt wurde (Dong et al. 2017). Mit RIL misst man in einer Probe die freigesetzte Menge an CO_2, die direkt durch den Abbau von DOC oder Nährstoffen gebildet wird. Damit wird der BDOC in einer international vergleichbaren Einheit bestimmt (mg CO_2 L^{-1}), die einfach in mg BDOC L^{-1} umgerechnet werden kann.

Der Unterschied zu den klassischen BDOC-Methoden liegt darin, dass beim RIL CO_2 nicht direkt quantitativ bestimmt wird, sondern dessen Isotopenverhältnis gemessen wird. Basierend auf der Isotopenverdünnungsmethode lässt sich dann die freigesetzte Menge an CO_2 (Mineralisation bzw. BDOC) sehr genau über eine Massenbilanz berechnen.

Der Vorteil ist, dass das Isotopenverhältnis von CO_2 sehr genau und mit einfacher Absorptionsphotometrie bestimmt werden kann und deshalb sehr geringe Mengen des mineralisierten organischen Kohlenstoffs detektiert werden können.

Technologie

Die Mineralisation von Substraten zu CO_2 wird oft durch Verwendung eines ^{13}C-markierten Substrats untersucht, wodurch das entstandene Produkt ($^{13}CO_2$) gemessen werden kann. Isotopisch markierte natürliche Substanzen wie DOC oder AOC sind aber wegen der hohen Anzahl unterschiedlichster Verbindungen nicht verfügbar, außerdem würden diese nicht die Zusammensetzung des DOC für ein originäres Wasser repräsentieren. Für die Bestimmung der Mineralisation wird der Probe deshalb beim RIL das ^{13}C-markierte Produkt, hier in Form von Natriumbikarbonat ($NaH^{13}CO_3$), zugesetzt und der Ansatz umgekehrt („reverse"). Als Folge der Mineralisation zu hauptsächlich $^{12}CO_2$ verändert sich das Isotopenverhältnis des Bikarbonats in der Wasserprobe. Diese Veränderung kann gemessen werden und erlaubt unter Verwendung einer Massenbilanz die Berechnung des in der Probe produzierten CO_2.

Neben unseren eigenen Vorarbeiten, konnten ähnliche Ansätze zur Untersuchung des gelösten anorganischen Kohlenstoffs (Freije-Carrelo et al. 2018) sowie der photochemischen Mineralisation von DOC (Powers et al. 2017) die erfolgreiche Anwendung von Isotopenverdünnungsmethoden zeigen. Durch den Einsatz eines neuen Infrarot-Spektrometers (Delta Ray von Thermo Fisher) kann das $^{13}C/^{12}C$ Isotopenverhältnis von CO_2 sehr präzise über einen großen Bereich des ^{13}C-Anteils gemessen werden. Dies erlaubt wiederum eine sehr empfindliche Bestimmung der CO_2-Produktion. Beim RIL wird der DIC als Summenparameter für das entstandene CO_2 gemessen.

Methode

Wasserproben werden in nährstofffreie Schraubdeckelgefäße mit Septum überführt und mit ^{13}C-markiertem Bikarbonat ($H^{13}CO_3^-$) versetzt (siehe Abbildung 1 a-c). Zur Messung des gelösten anorganischen Kohlenstoffs (DIC) werden Flüssigproben entnommen und in Messröhrchen gegeben, die mit 85%iger Phosphorsäure versetzt wurden. Das so ausgetriebene CO_2 wird über einen Gasstrom in das Infrarot-Spektrometer überführt (Abbildung 1 d und e) und vermessen. Die Konzentration des in der Probe enthaltenen CO_2 kann anhand des Isotopenverhältnisses über eine Massenbilanz berechnet werden. Aus der Differenz zwischen „Tag 0" (= originärem Zustand) und „Tag 7" (nach 7-tägigem Substratumsatz) lässt sich die Mineralisation zu CO_2 bei der für die jeweilige Probe relevanten Temperatur und Inkubationszeit (im Fall der MULTI-ReUse-Proben ca. 22 °C und 7 Tage) berechnen. Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

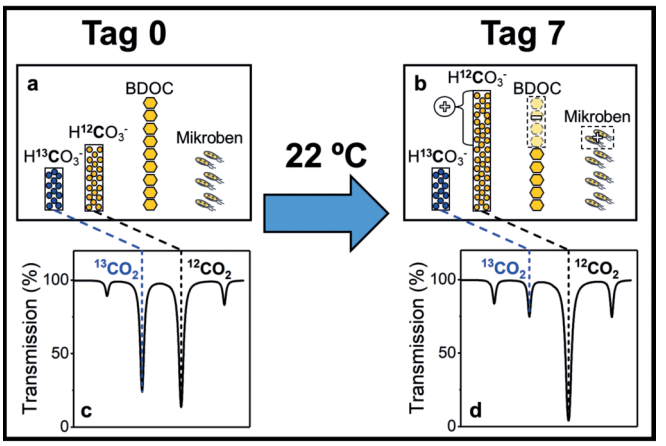

Abbildung 2: Schema zur Bestimmung der mikrobiellen Mineralisation. Zu Beginn wird ^{13}C-markiertes Bikarbonat einer bestimmten Zusammensetzung zur Wasserprobe gegeben (a) und vermessen (c). Die mikrobiell bedingte Mineralisation (BDOC) zu Bikarbonat (b) führt zu einer Zunahme des natürlichen DIC (hier vereinfacht als ^{12}C-Bikarbonat) und zu einer Verschiebung des gemessenen Isotopenverhältnisses (d). Aus der Differenz (Tag 0 und Tag 7) lässt sich die Mineralisation für den gewählten Zeitraum bei definierter Temperatur bestimmen.

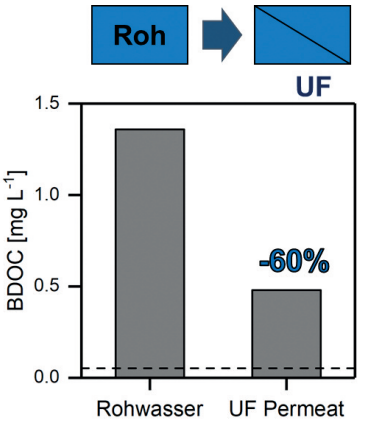

Abbildung 3: Durchschnitt der ermittelten Mineralisation bzw. des biologisch abbaubaren gelösten organischen Kohlenstoffs (BDOC) im Kläranlagenablauf (Rohwasser) und nach Passage der Verfahrenskombination Flockung und Ultrafiltration (UF). Durch die Flockung und Abscheidung ausgebildeter Flocken sowie Ultrafiltration wird der BDOC um etwa 60 % reduziert. Die Messpräzision für den gelösten anorganischen Kohlenstoff (DIC) in den untersuchten Wässern liegt bei etwa 50 µg L^{-1} (gestrichelte Linie).

RIL zur Untersuchung der mikrobiellen Aktivität

Die Veränderungen der mikrobiellen Aktivität des Kläranlagenablaufes infolge der Verfahrenskombination Flockung und Ultrafiltration konnte mittels des RIL-Verfahrens untersucht werden. Abbildung 3 zeigt den ermittelten BDOC nach einem Zeitraum von 7 Tagen im Kläranlagenablauf und nach Aufbereitung mittels Flockung + Ultrafiltration (UF). Die gute Wirkung der Flockung und Ultrafiltration auf Teile des DOC zeigt sich durch die Reduktion des BDOC um ca. 60 %.

Über 7 Tage hinausgehende Langzeitmessungen mit RIL haben gezeigt, dass die mikrobielle Mineralisation des DOC über sehr lange Zeiträume anhält. In Abbildung 4 ist der zeitliche Verlauf des BDOC für das Rohwasser und nach Passage der Verfahrensschritte Flockung und Ultrafiltration dargestellt.

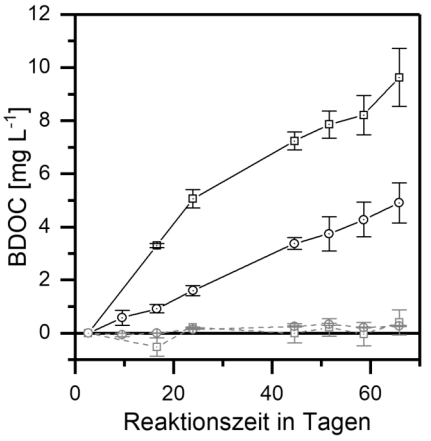

Abbildung 4: Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der mikrobiellen Mineralisation (BDOC) im Kläranlagenablauf (schwarze Quadrate) und nach Passage von Flockung und Ultrafiltration (schwarze Kreise). Die Kontrollen (über 0.2 µm Labormembran steril filtriert) sind als entsprechende graue Symbole dargestellt. Es zeigt sich, dass die im Wasser enthaltenen Mikroorganismen über einen langen Zeitraum aktiv sind.

Potential der Methode

Das RIL-Verfahren liefert einen international vergleichbaren Summenparameter für die mikrobielle Aktivität, wodurch sich zukünftig Wässer besser für entsprechende Anwendungen klassifizieren lassen. So ist es beispielsweise möglich, Betriebswässer verschiedenster Qualität zu untersuchen, unabhängig von hygienischem Zustand, Partikel- und Nährstoffgehalt. Dies ist besonders bei der weitergehenden Aufbereitung von kommunalen Abwässern interessant, da sie sich sehr stark in ihren physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften unterscheiden können. Das RIL-Verfahren ist dabei kultur- und nährstoffunabhängig und erlaubt die Erfassung des Mineralisationsgrads über die Bestimmung des produzierten CO_2 (das Endprodukt des biologischen Nährstoffabbaus). Weiterhin funktioniert das RIL-Verfahren auch für sauerstofffreie Wässer in Anwesenheit anderer Elektronenakzeptoren (Oxidationsmittel) wie Nitrat oder Sulfat. Prinzipiell lassen sich so auch anaerobe Wässer (gereinigtes kommunales Abwasser, anaerobes Betriebswasser, Grundwasser) näher charakterisieren. Durch seine hohe Empfindlichkeit bietet das RIL-Verfahren eine Alternative zu anderen Normen wie zum Beispiel ISO 7827 und ISO 14593. Im Fall der untersuchten Wässer liegt die Messpräzision für den gelösten anorganischen Kohlenstoff (DIC) bei etwa 30 µg L-1. Die Empfindlichkeit des RIL-Verfahrens wird derzeit weiter verbessert mit dem Ziel, den BDOC im Trinkwasser oder Grundwasser bestimmen zu können.

Fazit

Die neue RIL-Methode stellt eine einfach zu handhabende und gleichzeitig empfindliche Methode zur Bestimmung der mikrobiologischen Mineralisation von DOC dar und liefert laborübergreifend vergleichbare Werte mit präzisen Konzentrationsangaben. Das RIL-Verfahren misst den Abbau von im Wasser enthaltenen Nährstoffen bzw. DOC und gibt damit direkt den BDOC an. Dadurch kann man feststellen, wenn die mikrobielle Aktivität im zur Wiederverwendung aufbereiteten Wasser ein Maß erreicht, dass Maßnahmen zur Risikominderung getroffen werden müssen.

Literatur

Dong, X., Jochmann, M. A., Elsner, M., Meyer, A. H., Backer, L. E., Rahmatullah, M., Schunk, D., Lens, G., Meckenstock, R. U. (2017). Environ. Sci. Technol. 51, 11876–11883.

Freije-Carrelo, L., Alonso Sobrado, L., Moldovan, M., Encinar, J. R., Garcia Alonso, J. I. (2018). Anal. Chem. 90, 4677–4685.

Powers, L. C., Brandes, J. A., Stubbins, A., Miller, W. L. (2017). Mar. Chem. 194, 1–9.

ISO 7827:2010, Deutsche Fassung EN ISO 7827:2012, Wasserwesen, N. (Ed.) (2013). Beuth Verlag GmbH: Berlin

ISO 14593:1999, Deutsche Fassung EN ISO 14593: 2005, Wasserwesen, N. (Ed.) (2005). Beuth Verlag GmbH: Berlin

Autoren

Dr. Marcel Schulte, Biofilm-Centre, Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen, Essen

Kontakt: marcel.schulte@uni-due.de

Prof. Dr. Rainer Meckenstock, Biofilm-Centre, Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen, Essen

Kontakt: rainer.meckenstock@uni-due.de

Abkürzungen

AOC	assimilierbarer organischer Kohlenstoff
BDOC	biologisch abbaubarer gelöster organischer Kohlenstoff
DIC	gelöster anorganischer Kohlenstoff
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
UF	Ultrafiltration
RIL	Reverse Isotope Labeling

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

CC BY SA

GEFÖRDERT VOM Bundesministerium für Bildung und Forschung