

Warum zellzählende Messmethoden in der Mikrobiologie uns helfen, die Grenzen der traditionellen Kultivierungsmethoden zu erkennen und dennoch nicht geeignet sind, ein Risiko von Wasser spontan zu beurteilen. Erfahrungen aus der Praxis der Prozessmesstechnik.

Im März 1882 präsentierte Robert Koch die Möglichkeit, Bakterien auf selektiven Nährböden zu vermehren und durch Koloniebildung nachzuweisen. Seither gelten die aus Mikroorganismen gebildeten Kolonien als Massstab für die hygienische Beurteilung z.B. von Trinkwasser. Die Grenzwerte variieren je nach Land, Anwendung und Art der Verunreinigung. Typischerweise liegt die zulässige Keimzahl für E.Coli z.B. bei 0 KBE/ml.



Die Gesamtkeimzahl variiert je nach Region und Branche. Für Trinkwasser sind z.B. in Deutschland auf DEV Agar 100KBE/1ml zulässig. In der Schweiz 300KBE/1ml dort jedoch - Aerobe mesophile Keime. In der Pharmaindustrie gilt ein Grenzwert von 10KBE/100ml auf R2A AGAR und die Halbleiterindustrie arbeitet mit dem Grenzwert von 0KBE/1000ml.

Doch was bedeuten diese KBE bzw. CfU tatsächlich ?

Der Mikrobiologe lernt - eine lebende Einzelzelle wächst zu einer Kolonie. Wird keine Kolonie gefunden so wird das Wasser als keimfrei - bzw. zumindest frei von vermehrungsfähigen Bakterien - anerkannt.



In der Praxis stellen sich für „Nicht Mikrobiologen“ einige pragmatische Fragen.

1.) Werden alle vermehrungsfähigen Bakterien mit der Kulturmethode erfasst?

Antwort: Mit der kulturbasierenden Methode werden diejenigen Mikroorganismen erkannt welche folgende Bedingungen erfüllen:

- das Nährmedium passt zu den vorhandenen Mikroorganismen
- die Bebrütungstemperatur passt zu den gesuchten Mikroorganismen
- die Mikroorganismen können sich im Beobachtungszeitraum vermehren

Daraus folgt: Mikroorganismen die andere Bedingungen oder einfach mehr Zeit benötigen werden mit der klassischen Kulturmethode nicht erkannt.

So mancher Mikrobiologe hat schon erlebt, dass auf einem in der Brutkammer vergessenen Agar nach einigen Tagen dann doch Kolonien vorhanden waren.

2.) Wenn die Bedingungen passen - können dann mit der kulturbasierenden Methode alle entsprechenden Mikroorganismen erfasst werden ?

Antwort: Ein grosser Teil der lebenden Mikroorganismen befinden sich in einem VBNC Zustand. ViableButNotCulturable. In diesem Zustand sind sie überlebensfähig jedoch mit kulturellen Methoden nicht nachweisbar.

Daraus folgt: Mit der kulturellen Methode kann nur ein Teil der Mikroorganismen detektiert werden.



2.1.) Sind diese VBNC Bakterien schädlich?

Antwort: Es wird **vermutet**, dass diese nicht vermehrungsfähigen Bakterien auch nicht infektiös sind.

Die Bakterien sind jedoch in der Lage den VBNC Zustand wieder zu verlassen und eine erneute Kontamination zu erzeugen, welche dann ggf. auch mit der kulturellen Methode nachgewiesen werden kann

Daraus folgt: VBNC Bakterien stellen eine nicht zu unterschätzende Gefährdung dar

Um was geht es:

KBE | CFU Grenzwerte geben an, ob eine Verkeimung vorliegt oder nicht. Moderne Zell-zählende Messverfahren zeigen, nur ein Bruchteil der vorhandenen Mikrobiologie bilden überhaupt Kolonien. Sind nun Zell-zählende Messverfahren die Methode der Wahl und Koloniebildende Methoden obsolet?

Was erläutern wir:

Koloniebildende Messmethoden erfassen nur einen minimalen Anteil des mikrobiologischen Geschehens im Trinkwasser. Moderne Messmethoden zeigen ein ganz anderes Bild der Mikrobiologie. Z.B. 50.000 lebende Zellen in 1 ml Trinkwasser ohne dass dabei auch nur 1 Kolonie gebildet wird. Wir zeigen welche modernen Messverfahren es gibt und welche Informationen diese liefern.

Betrachtete Messverfahren:

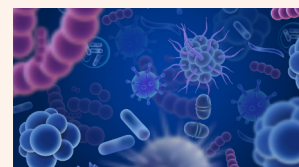
- ATP - Adenosintriphosphat
- Cell Count Methoden am Beispiel des Durchflussflowzytometers
- Messung der Enzymaktivität

Anwendungsbereiche:

- Trinkwasser
- Reinstwasser
- Water Reuse
- Oberflächengewässer
- Mineralbrunnenbetriebe
- Lebensmittel
- Pharmaindustrie

Art des Whitepapers:

Technische Information aus der Praxis



Wie sonst können wir die mikrobiologische Belastung in Wasser bestimmen?

Im Laborbereich hat es zahlreiche Methoden mit denen Mikrobiologen die mikrobiologische Belastung in Wasser bestimmen können. Um 2010 hat die Eawag damit begonnen, Trinkwassersysteme direkt im Feld mit durchflusszytometrischen Online-Messgeräten zu untersuchen. Fast gleichzeitig kamen weitere Messmethoden auf den Markt, die den Anlagenbetreibern helfen, die mikrobiologische Belastung detaillierter und schneller zu erfassen.

Im wesentlichen unterscheiden wir 3 Messmethoden:

- 1.) zellzählende System wie Durchflusszytometer, Laser Scutter oder Bildanalysierende Verfahren
- 2.) Messgeräte der enzymatischen Aktivität
- 3.) Die aktive Energie der Bakterien messende Verfahren, wie z.B. ATP

Da Durchflusszytometer bereits seit den 1970er Jahren in der Biologie und Medizin eingesetzt werden, wollen wir zunächst die Ergebnisse der zellzählenden Messmethoden näher betrachten.

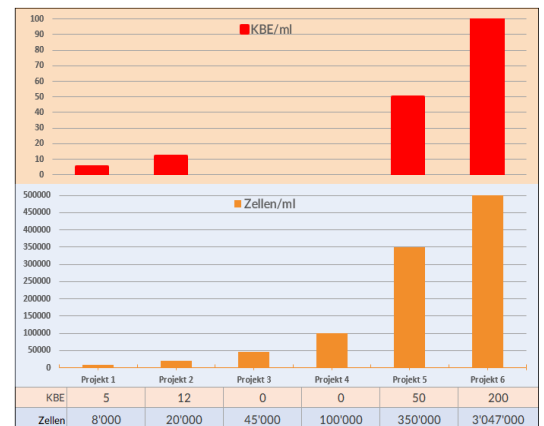
Mikrobiologische Beurteilung anhand der vorhandenen lebenden Zellen.

Als die Eawag 2010 begann, Trinkwasser auf die Zellkonzentration zu untersuchen, zeigte sich schnell, dass im Zürcher Trinkwasser 80'000 bis 140'000 Zellen/ml Trinkwasser vorkommen können. Im Flusswasser können es bis zu 3 Millionen Zellen sein. Erste Vergleiche mit Kultivierungsmethoden zeigten, dass selbst bei einer Zellkonzentration von 100'000 Zellen/ml die Kultivierungsmethoden 0 Kolonien als Ergebnis anzeigen können.

Weitergehende Untersuchungen mit Totalzellzahlen - zwischenzeitlich auch mit Unterscheidung von lebenden und toten Zellen zeigten, dass zwischen Anzahl lebenden Zellen und Kolonien keine Zusammenhänge möglich sind.

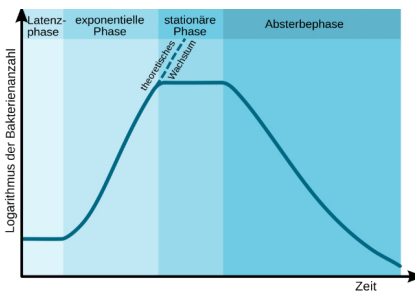
So kann ein WFI der Pharmaindustrie mit einem Grenzwert von 10KBE/100ml - gerne auch 6000 lebende Zellen/100ml aufweisen.

Ein sauberes Trinkwasser kann auch 100.000 lebende Zellen/ml enthalten ohne dass sich auch nur eine Kolonie bildet. In anderen Fällen wiederum können wenige Zellen Kolonien bilden.



Zusammenstellung von Zellzahlen und Kolonien aus verschiedenen Trinkwasseruntersuchungen. Besonders auffällig ist Es hat Projekte im Trinkwasser mit 8000 Zellen und deutlicher Kolonienzahl. Bei anderen Projekten mit 45.000 oder gar 100.000 Zellen werden hingegen keine Kolonien gefunden.

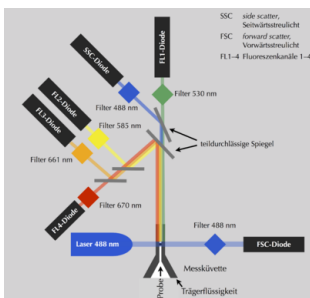
Woran liegt es das tausende lebende Zellen keine Kolonie bilden?



Aus pragmatischer - nicht wissenschaftlicher - Sicht bietet sich folgende Erklärung an. Mikroorganismen haben unterschiedliche Lebensphasen. Ausschliesslich in der **exponentiellen Phase** vermehren sich die Mikroorganismen und sind nur in dieser Phase in der Lage, Kolonien zu bilden. Aus Sicht der Zählung lebender Zellen ist eine Zelle jedoch den ganzen Zyklus - bis hin zum vollständigen Absterben - eine lebende Zelle. Betrachtet man den Lebenszyklus von Zellen, so wird deutlich, in welcher relativ kurzen Zeitspanne des gesamten Lebenszyklus Mikroorganismen nur vermehrungsfähig sind. Hinzu kommt der oben beschriebene VBNC-Zustand.

Daraus folgt: Zellzählende Messmethoden zeigen uns deutlich, wie hoch der Gehalt an Mikroorganismen in unserem Wasser ist und wie gering der Anteil ist, den wir mit kulturbasierten Methoden überhaupt nachweisen können.

Zellzählung mittels Durchflusszytometrie



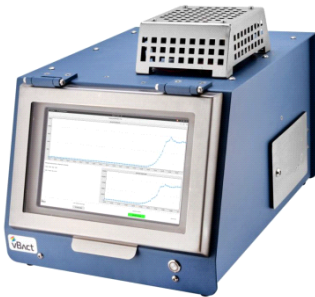
Bei der Durchflusszytometrie wird die Probe langsam durch eine dünne Kapillare geführt. Es werden Farbstoffe eingesetzt, welche durch eine intakte Zellwand durchdringen können sowie Farbstoffe, die erst dann in die Zelle eindringen können, wenn die Zellwand zerstört ist. So können lebende und tote Zellen ermittelt werden. Diese präzise Zählmethode kann oftmals zusätzlich auch noch die Grösse von Bakterien ermitteln. Nachteilig wirkt sich aus, dass oftmals nur sehr kleine Probenvolumina, z.B. < 0.1ml innerhalb 20 Minuten analysiert werden können. Eine weitere Herausforderung stellt die inhomogene Verteilung der Mikrobiologie - besonders in sehr sauberem Wasser - dar. Es empfiehlt sich daher über einen gewissen Zeitraum eine Baseline der typischen Schwankungsbreite zu ermitteln um dann aussergewöhnliche Abweichungen detektieren zu können.

Grösster Vorteil dieser Methode ist die breite Anwendung in der Wissenschaft und Medizin

Grösster Nachteil dieser Methode in der Wasseranalytik ist das geringe Probenvolumen und die lange Messdauer.

Zellzählung mittels Bildanalyse

Die Bildanalyse ist eine sehr moderne Methode um Mikroorganismen in Wasser zu detektieren. Die Technologie ermöglicht es mehrere Parameter gleichzeitig zu erfassen. Lebende Zellen, Bakterien Population, μ Partikel Anzahl und μ Partikel Grössenverteilung.

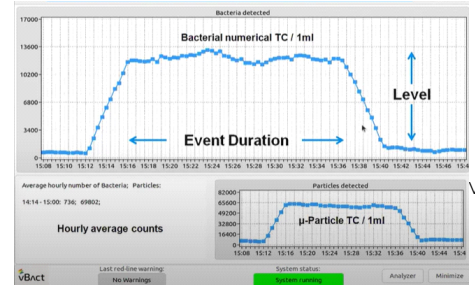


Beispiel eines Bildanalyse Messgerätes

Die Auswertung der Bakterien Population ermöglicht es bestimmte Betriebszustände - wie Ablösungen von Biofilm und Verunreinigungen sekundenschnell zu detektieren.

Dies ermöglicht auch Angriffe auf die Wasserversorgung direkt zu detektieren.

μ Partikel Anzahl und Auswertung der Grössenverteilung ermöglichen die Detektion μ Plastik genauso wie die Detektion von z.B. metallische Ablösungen und anderen Feststoffen.



Auswertebeispiel für Zellzahl und μ Partikel

Grösste Vorteile dieser Methode kontinuierlich bis zu 100ml/min zu analysieren und Angriffe auf die Wasserversorgung zu erkennen. Keine Verbrauchsmaterialien, Messwertupdates z.B. jede 10 Sekunden.

Grösster Nachteil dieser Methode in der Wasseranalytik, ist die bislang geringe Verbreitung.

Der optimale Anwendungsfall für zellzählende Messmethoden:

Für eine direkte Gefährdungsbeurteilung ist es erforderlich zu erkennen, ob und wie stark sich die Mikroorganismen vermehren können. Die Zellzahl eignet sich gut, Veränderungen der mikrobiologischen Kontamination zu detektieren, auch wenn die Zellzahl selbst keine direkte Gefährdungsbeurteilung ermöglicht.

Typische Anwendungsfälle sind daher die Detektion von Verkeimungsherden, Überwachung von Desinfektions- und Filterleistungen, Nachweis von VBNC Bakterien.

Insbesondere RealTime Systeme - wie bildanalysierende Verfahren - stechen hier durch Ihre Einzigartigkeit hervor, innert weniger Sekunden Abweichungen zu detektieren. Auch können gleichzeitig Partikel und Bakterienpopulationen detektiert werden.

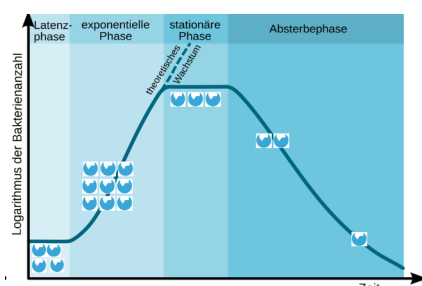
Online Durchflusssytometer wiederum haben ihren Vorteil in der Vergleichbarkeit zu Geräten im Laboreinsatz sowie weitergehenden Auswertemöglichkeiten.

Messgeräte zur Messung der Enzymaktivität

Enzyme werden von Mikroorganismen wie Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen produziert. Enzyme steuern biochemische Reaktionen innerhalb und außerhalb lebender Zellen. Welche Enzyme ein Mikroorganismus produzieren kann, ist genetisch festgelegt und bestimmt die Art des Stoffwechsels, den der Mikroorganismus zur Energiegewinnung und zum Wachstum nutzen kann.



Wird den Enzymen ein geeignetes Substrat angeboten, so verändern die Enzyme dieses Substrat in einer katalytischen Reaktion. Diese Veränderung bzw. das entstehende Produkt kann z.B. durch Fluoreszenz gemessen werden.



Betrachten wir wieder die Lebensphasen der Mikroorganismen so wird deutlich, in Abhängigkeit der Lebensphase werden unterschiedliche Mengen an Enzymen produziert.

Schon in der Phase der Anpassung des Stoffwechsels an das Nahrungsangebot werden viele Enzyme produziert. **Die höchste Enzymexpression** findet während der **exponentiellen Wachstumsphase** statt. In der Absterbephase wird die Enzymproduktion immer weiter reduziert bis sie vollständig zum Erliegen kommt.

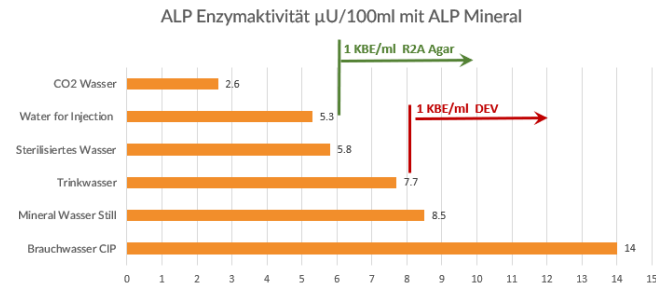
Grundsätzliche Vorteile der Enzymaktivitäts Messung

Werden spezifische Substrate verwendet, können auch spezifische Mikroorganismen gemessen werden. Z.B. E.coli oder Enterokokken. Eine direkte Gefährdungsabschätzung ist möglich, da Mikroorganismen in der Vermehrungsphase ein deutlich höheres Messergebnis liefern.

Der optimale Anwendungsfall für Messgeräte zur Messung der Enzymaktivität:

Enzymaktivitätsmessgeräte können sowohl online als auch im Labor für eine Vielzahl von Anwendungen und Aufgaben eingesetzt werden. Ihre Hauptvorteile gegenüber den bereits genannten Anwendungsfällen sind:

- 1.) die Sensitivität - Nachweis kleinster Verunreinigungen in Reinstwasser ab einem Grenzwert von 0KBE/1000ml.
- 2.) die direkte Gefährdungsbeurteilung.
- 3.) die Möglichkeit spezifische Mikroorganismen zu messen.



Die Ergebnisse des Enzymaktivitäts Messgerätes lassen eine direkte Beurteilung der Wasserqualität zu. Ab ca. 6 μU können auf R2A Agar erste Kolonien



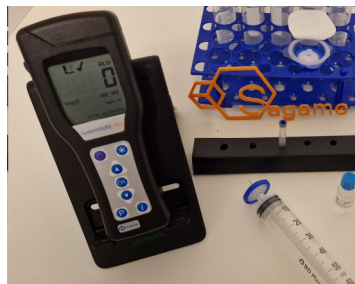
Beispiel eines Enzymaktivitäts Messgerätes für kontinuierliche und manuelle Messungen im Wasserwerk

Grösste Vorteile dieser Methode sind die Sensitivität sowie Spezifität und die direkte Gefährdungsbeurteilung einer Wasserprobe.

Grösster Nachteil dieser Methode in der Wasseranalytik, ist die bislang geringe Verbreitung.

ATP Messgeräte

Zur Messung der mikrobiologischen Aktivität haben sich auch ATP-Messgeräte bewährt. Adenosintriphosphat (ATP) ist ein Energiemolekül, das in allen lebenden Zellen vorkommt. Die Menge ist proportional der Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen,



Beispiel einer manuellen ATP Messung mit Filtration

Schimmelpilzen und Hefen.

Für die Messung werden die Zellen der Mikroorganismen lysiert und das intrazelluläre ATP reagiert mit dem zugefügten Enzym Luciferase und dem Substrat D-Luciferin. Bei dieser Reaktion wird Licht erzeugt. Die Lichtmenge ist proportional zur vorhandenen ATP-Menge. Auch hier folgt die Menge der ATP Produktion der Lebensphase der Mikroorganismen.

Die wesentlichen Unterschiede zur Messung der Enzymaktivität sind folgende:

Werden Mikroorganismen aktiv, so werden zuerst die Enzyme exprimiert um die angebotene Nahrung für Stoffwechsel verwenden zu können. Erst danach startet der ADP / ATP Stoffwechsel. Die Enzymaktivitätsmessung ist daher die sensitivere Messung, speziell bei sehr sauberem Wasser.

Im Wasser gelöstes extrazelluläres ATP kann zu falsch positiven Messwerten führen.

Bei Handmessgeräten kann die Probe durch 0.45 μm Filter vollständig von extrazellulärem ATP und reaktionshemmenden Stoffen wie Metallionen, Taninen, Polyphenole usw. befreit werden. Die Messung kann sich so auf das intrazelluläre ATP fokussieren. Zusammen mit der sehr schnellen Reaktion eignet sich ATP hervorragend für rein manuelle Messungen - auch von sehr sauberem Wasser.

Grösste Vorteile dieser Methode sind die schnelle mobile Anwendung - Ergebnis bereits nach 2 min, das grosse Probenvolumen und die direkte Gefährdungsbeurteilung einer Wasserprobe.

Grösster Nachteil dieser Methode in der Wasseranalytik, ist die Schwierigkeit, bei Online Messungen die Probe zu filtrieren.

- Fortsetzung folgt -

Die Sagamo AG ist eine spezialisierte Service- und Vertriebsorganisation, die sich auf die automatische Messung mikrobiologischer und chemischer Qualität von Wasser sowie anderen Produkten konzentriert. Unsere Kunden stammen aus den Bereichen Wasser, Food & Beverage, Pharma, Life Science und allgemeine Prozessindustrie. Wir konzentrieren uns ganz auf die Bedürfnisse des Kunden und die Einzigartigkeit der Anwendung - für dieses Ziel arbeiten wir mit verschiedenen - führenden - Herstellern zusammen.