

# Durchflusszytometrie zur schnellen Bestimmung von Veränderungen der mikrobiologischen Wasserqualität

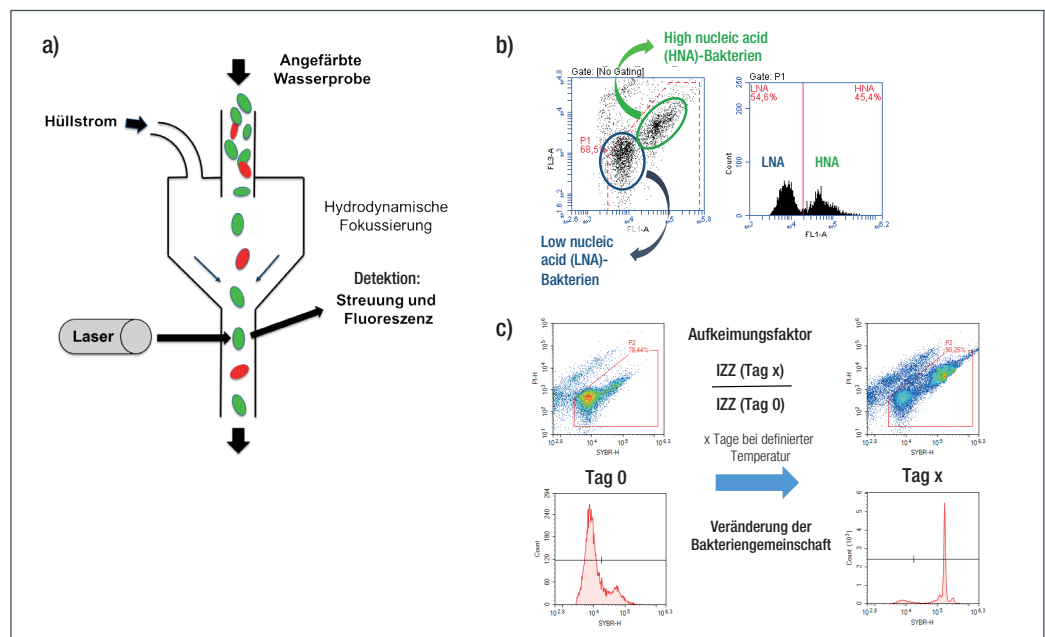
Die Durchflusszytometrie hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen diagnostischen Werkzeug in der Wasserforschung entwickelt, dessen Mehrwert auch in der Praxis zunehmend erkannt wird. In Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht es die Methode, die Bakterienkonzentrationen und charakteristischen Populationen im Wasser schnell zu erfassen. Obwohl der unspezifische Charakter der Fluoreszenzfarbstoffe keine Aussagen über hygienisch relevante Bakterien erlaubt, können Veränderungen der Bakterienkonzentrationen, der mikrobiologischen Fingerabdrücke und der Aufkeimungspotenziale wichtige Informationen über veränderte Umweltbedingungen und technische Einflussfaktoren liefern. Der Nutzen besteht in einem tieferen Verständnis der Ursachen für mikrobiologische Veränderungen im Wasser und in der Möglichkeit einer schnellen Prozesskontrolle. Die in diesem Fachbeitrag exemplarisch gezeigten Beispiele umfassen Veränderungen der Bakterienzahlen über das Tiefenprofil einer Talsperre, im Verlauf einer Aufbereitung sowie in Verteilungsnetzen.

von: Dr. Andreas Nocker & Dr. Bernd Bendinger (beide: IWW Zentrum Wasser)

Die Durchflusszytometrie hat sich in der jüngeren Vergangenheit zu einer gleichermaßen leistungsfähigen wie auch benutzerfreundlichen Methode entwickelt, die zunehmend auch außerhalb der Forschung von Wasserversorgern als diagnostisches Werkzeug für Fragestellungen in der Praxis eingesetzt wird [1]. Deutschland folgt damit Ländern wie der Schweiz oder Großbritannien. Die Methode ist bestens geeignet, um sowohl die Gesamtzellzahl (GZZ, Summe aus lebenden und toten Bakterien) als auch die Intaktzellzahl (IZZ, nur lebende Bakterien) nach Anfärben der Proben mit Fluoreszenzfarb-

stoffen schnell zu bestimmen. Im Durchflusszytometer werden die angefärbten Bakterien durch einen Hüllstrom vereinzelt (d. h. hydrodynamisch fokussiert), durch eine Kapillare geführt und nach Anregung der Farbstoffe durch einen Laser detektiert (Abb. 1a). Die Bakterien erscheinen im resultierenden Fluoreszenz-Dichtediagramm als einzelne Punkte in einem definierten Feld (engl.: gate, Abb. 1b). Bei geeigneter Wahl von Fluoreszenzfarbstoffen kann zwischen intakten (potenziell lebenden) und membran-geschädigten (toten) Zellen unterschieden werden. Neben der Quantifizie-

**Abb. 1:** Prinzip der Durchflusszytometrie und resultierende Daten: a) schematische Darstellung der Quantifizierung angefärbter Mikroorganismen in einer Wasserprobe nach Vereinzelung durch einen Hüllstrom, b) resultierendes Dichtediagramm der Rot- und Grünfluoreszenz und Unterscheidung zwischen LNA- und HNA-Bakterien, c) Bestimmung des Aufkeimungsfaktors durch Inkubation der Wasserprobe für eine bestimmte Zeit bei einer definierten Temperatur



Quelle: IWW

Die Messung von Bakterien ermöglicht die Methode die Bestimmung der relativen Anteile von charakteristischen Bakterienpopulationen, die sich in ihrem Nukleinsäuregehalt unterscheiden. Letztere beziehen ihre Namen aus dem Englischen: low nucleic acid (LNA)- und high nucleic acid (HNA)-Bakterien. Deren relative Anteile sind besonders gut bei der Darstellung der Daten als Histogramm sichtbar, dieses stellt quasi den bakteriologischen „Fingerabdruck“ der Wasserprobe dar (Abb. 1b). Während LNA-Bakterien typischerweise unter oligotrophen (nährstoffarmen) Bedingungen dominieren, gewinnen HNA-Bakterien bei vermehrtem Nährstoffangebot sowie bei Stagnation die Oberhand. Diese Parameter können sowohl offline mit Proben, die gekühlt an ein Labor verschickt werden, als auch online vor Ort gemessen werden. Der Zeitbedarf für eine Messung beträgt ca. 15 Minuten, wobei der Hauptteil der Zeit auf die Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoffen entfällt.

Ein weiterer Parameter, der sich mittels der Durchflusszytometrie im Offline-Verfahren bestimmen lässt, ist das Aufkeimungspotenzial. Hierfür wird die Wasserprobe in Glasgefäßen, die frei von assimilierbarem organischem Kohlenstoff (assimilable organic carbon, kurz: AOC) sind, nach der Messung des Tag-0-Wertes (der dem mikrobiologischen Zustand zum Zeitpunkt der Probenahme entspricht) bei einer für die Wasserprobe relevanten Temperatur für eine bestimmte Zeit inkubiert und nochmals gemessen (Abb. 1c). Typischerweise wurden die Proben in den hier gezeigten Beispielen für sieben Tage inkubiert, da in diesem Zeitraum in der Regel eine maximale Aufkeimung erreicht wird. Diese Aufkeimung erfolgt dann, wenn sich im Wasser Nährstoffe befinden, die von den Bakterien verwertet werden können. Je höher dabei die Nährstoffkonzentration, desto höher ist folglich auch das Aufkeimungspotenzial. Der Tag-7-Wert stellt damit die maximale Bakterienkonzentration dar, die im schlimmsten Fall (worst case) bei langer Stagnation im realen System erreicht werden kann. Das Aufkeimungs-

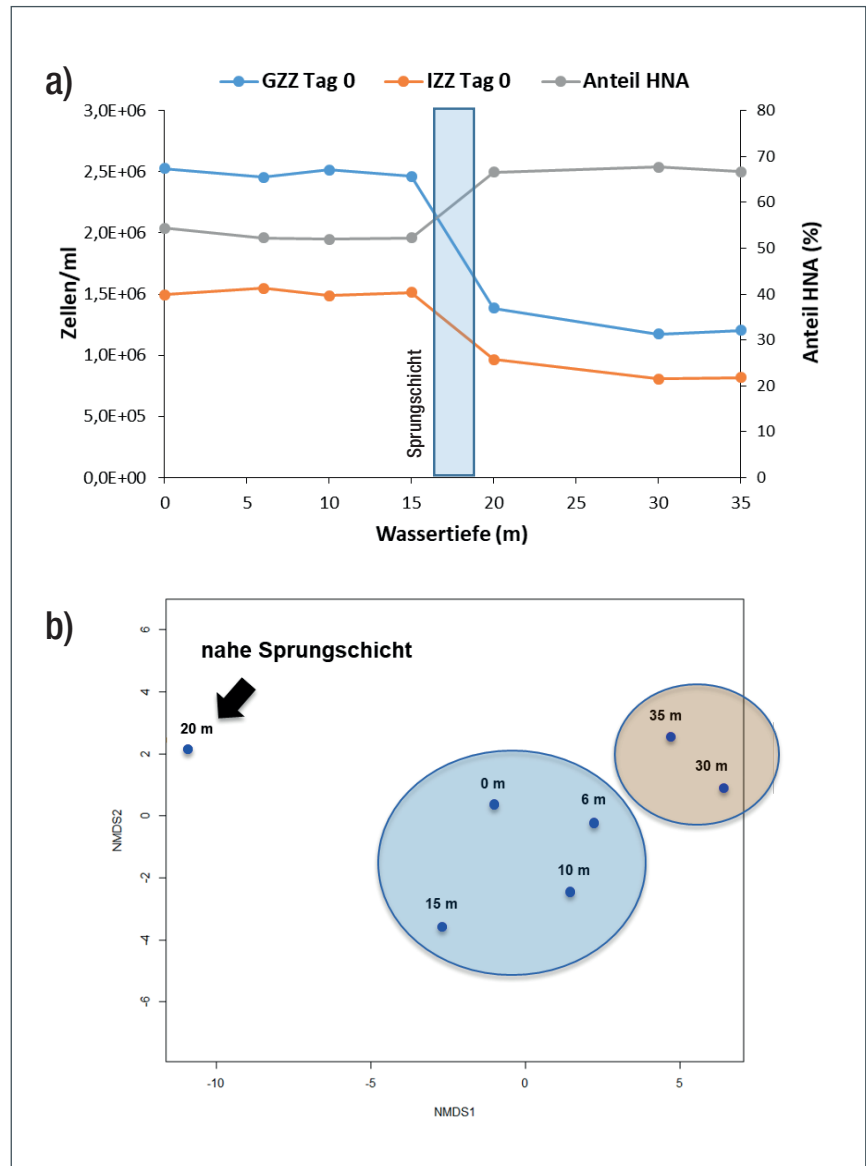


Abb. 2: Tiefenprofil einer Talsperre zur Zeit der thermischen Schichtung: a) Verlauf der Gesamtzellzahl (GZZ), Intaktzellzahl (IZZ) und des relativen Anteils von HNA-Bakterien mit zunehmender Wassertiefe, b) NMDS-Analyse der IZZ-Histogramme mittels flowCHIC. Cluster in Oberflächennähe und in der Tiefe sind farblich gekennzeichnet.

potenzial kann auch als Faktor berechnet werden, der die Veränderung der Zellzahlen innerhalb von sieben Tagen ausdrückt.

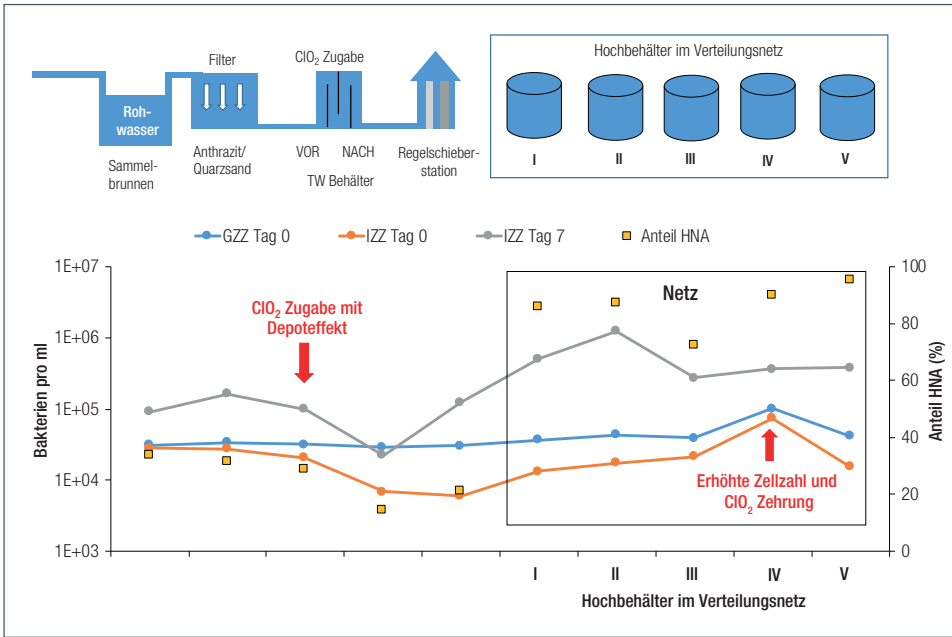
Die folgenden Beispiele zeigen Anwendungen der Durchflusszytometrie in der Praxis, angefangen vom Rohwasser bis zur Trinkwasseraufbereitung und dessen Verteilung.

### Anwendungsbeispiele

#### Tiefenprofil einer Talsperre

Das Rohwasser einer untersuchten Talsperre (Probenahme am 11. November 2020) zeigte stabile Konzentrationen

der GZZ und der IZZ bis zu einer Wassertiefe von 15 m (Abb. 2a). Die Zellzahlen unterlagen einer abrupten Abnahme um einen Faktor von ca. 1,5 bis 2 bei einer Wassertiefe von 20 m, während der Anteil von HNA-Bakterien hier sprunghaft von 52 auf 67 Prozent anstieg. In dieser Wassertiefe befand sich die Sprungschicht der zu diesem Zeitpunkt noch thermisch geschichteten Talsperre. Sowohl die Bakterienzahlen als auch der HNA-Anteil blieben in größeren Wassertiefen auf diesen Niveaus. Der Anteil Membran-intakter Bakterien stieg zu diesem Zeitpunkt tendenziell mit zunehmender Tiefe von 59 Prozent (0 m) auf 68 Prozent (35 m) an.



Quelle: WWV

Abb. 3: Veränderungen der Zellzahlen, des Aufkeimungspotenzials (IZZ Tag-7-Werte) und des relativen Anteils von HNA-Bakterien im Verlauf der Aufbereitung von Brunnenwasser und während der Verteilung

Die zwei mikrobiologisch unterscheidbaren Wasserzonen wurden weiter differenziert durch eine NMDS-Analyse (nonmetric multidimensional scaling) der Histogramme der membran-intakten Bakterien unter Verwendung der flowCHIC-Software [2]. Der Fingerabdruck der 20-m-Probe unterschied sich hierbei deutlich von den Fingerabdrücken der oberflächennahen und der

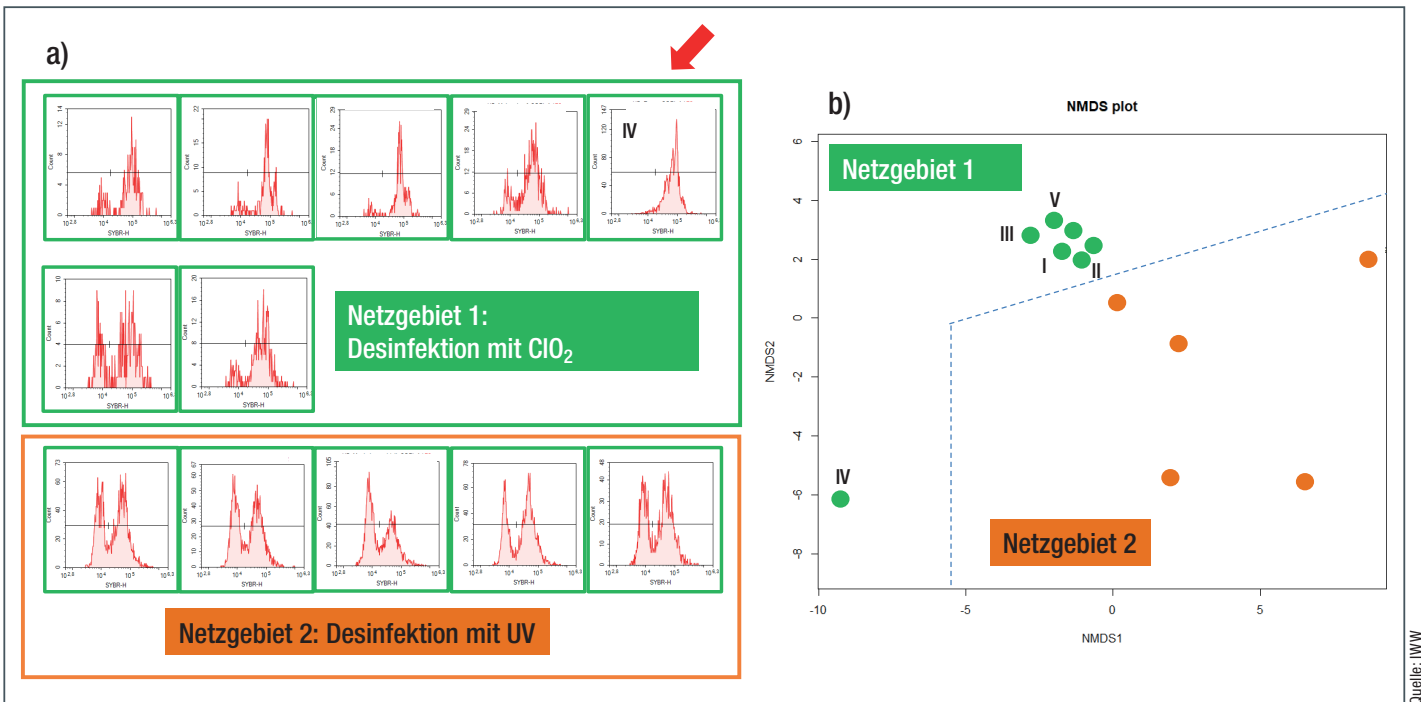
tiefsten Wasserproben (Abb. 2b), was auf eine unterschiedliche Populationszusammensetzung der membran-intakten Bakterien direkt unterhalb der Sprungschicht hinweist.

**Veränderung der Zellzahlen in der Aufbereitung und Verteilung**

Die Durchflusszytometrie bietet sich auch zum Erfassen von Veränderungen

der Zellzahlen während der Wasseraufbereitung und der nachfolgenden Verteilung an. **Abbildung 3** zeigt in diesem Zusammenhang exemplarisch die Aufbereitung in einem Wasserwerk, das Oberflächenwasser-beeinflusstes Grundwasser aus Sammelbrunnen bezieht. Das Rohwasser durchläuft dabei Filter mit Anthrazit und Quarzsand und wird anschließend mit Chlordioxid versetzt. Vom Trinkwasserbehälter am Ende der Aufbereitung fließt das fertig aufbereitete Trinkwasser dann in das Verteilungsnetz.

Während die GZZ im Verlauf der gesamten Aufbereitung stabil war, unterlag die IZZ nach der Zugabe von Chlordioxid einer deutlichen Reduktion. Mit zunehmender Einwirkzeit sank die IZZ weiter und der Depoteffekt war in der Verteilung deutlich sichtbar. Im Verteilungsnetz wurden fünf verschiedene Hochbehälter untersucht. Das Wasser in der Verteilung wies im Vergleich mit der Aufbereitung deutlich höhere HNA-Anteile auf, was mit einer Veränderung der Zusammensetzung der Bakterienpopulationen gleichzusetzen ist. Auch das Aufkeimungspotential (IZZ Tag-7-Werte) nahm im Verteilungsnetz tendenziell zu. Gleichbleibend war auf



Quelle: WWV

Abb. 4: Wasserprofile der IZZ von Hochbehälterproben aus zwei Netzgebieten (1 und 2), die Wasser nach Desinfektion mit Chlordioxid bzw. mit UV verteilen: a) IZZ-Histogramme, b) NMDS-Analyse der IZZ-Histogramme

der anderen Seite die GZZ mit der Ausnahme des Hochbehälters IV. Dort war neben den erhöhten Zellzahlen auch der Anteil intakter Bakterien (72 Prozent) im Vergleich mit den anderen Hochbehältern am höchsten, was auf die stärkste Zehrung an Chlordioxid hinwies.

Die Auffälligkeit des Hochbehälters IV war der Grund für einen Vergleich weiterer Hochbehälter in diesem und einem benachbarten Verteilungsnetz zu einem späteren Zeitpunkt. Insgesamt sieben Hochbehälter, die vorwiegend mit Wasser des untersuchten Grundwasserwerks (Netzgebiet A) versorgt wurden sowie fünf Hochbehälter, die ihr Wasser vorwiegend aus einem Talsperrenwasserwerk (Netzgebiet B) erhielten, wurden in dem Vergleich berücksichtigt.

Die Fingerabdrücke der beiden Netzgebiete unterschieden sich deutlich (Abb. 4). Dabei war die Clusterbildung der Hochbehälter im Netzgebiet A stark ausgeprägt – mit der Ausnahme von Hochbehälter IV, der sich auch zu diesem Probenahmezeitpunkt stark von den anderen Hochbehältern unterschied. Auffällig war hierbei die besonders hohe Dominanz der HNA-Bakterien (ca. 90 Prozent), was auf eine Aufkeimung hindeutete. In der Tat betrug die theoretische Aufenthaltszeit des Wassers in diesem Hochbehälter ca. vier Tage, was mit einer Zehrung des Desinfektionsmittels einherging und die besagte Aufkeimung ermöglichte.

Wasserproben der Hochbehälter des Netzgebietes B bildeten im Vergleich weniger kompakte Cluster, die Histogramme wiesen untereinander jedoch deutliche Ähnlichkeiten auf.

#### Mikrobiologische Kartierung eines Verteilungsnetzes

Ein weiteres Beispiel der Anwendung der Durchflusszytometrie ist die mikrobiologische Kartierung von Wasserverteilungsnetzen. Der in **Abbildung 5** gezeigte Netzbereich wird von zwei Wasserwerken (WW) gespeist, wobei der rote Bereich vorwiegend von WW 1, der blaue Bereich hingegen von WW 2 versorgt wird. Der grüne Bereich wiederum erhält Mischwasser der beiden Wasserwerke. In den Wasserproben wurden die Bakterienkonzentrationen im Ist-Zustand (IZZ Tag 0) und das Aufkeimungspotenzial (nach sieben Tagen Inkubation der Proben im Labor bei einer Temperatur von 22 °C) gemessen. Die IZZ-Werte im Ist-Zustand des Verteilungsnetzes erwiesen sich im Vergleich zum jeweiligen Wasserwerk im gesamt-

ten beprobten Netzgebiet als stabil (Faktoren von ca. 1,0), zum Teil fielen die Zellzahlen sogar geringfügig (Faktoren < 1,0) (Abb. 5a). Betrachtet man die Veränderungen der Aufkeimungspotenziale jeder Probenahmestelle, ergaben sich hingegen Unterschiede: Tendenziell wiesen die endständigen Probenahmestellen mit den größten Entfernungen zum jeweiligen Wasserwerk höhere Aufkeimungspotenziale auf (Abb. 5b). Im Vergleich mit Abbildung 5a kann geschlussfolgert werden, dass in der Praxis das Wasser schnell genug verbraucht wurde, bevor die maximal mögliche Bakterienkonzentration erreicht war. Das Aufkeimungspotenzial ist also bei der Identifizierung von kritischen Netzbereichen nützlich. Das Ausmaß der Aufkeimung wird in der Praxis jedoch nicht nur durch die Dauer der Stagnation, sondern auch durch die Temperatur wesentlich beeinflusst.

#### Online-Monitoring

Das Online-Monitoring von Bakterienzahlen ermöglicht die automatisierte Erfassung von Veränderungen in der allgemeinen mikrobi-



## Water Hammer Protection

für Wasser- und Abwassersysteme

«Die **Sicherheit**, die wir im Notfall brauchen.»  
Pascal Kilchherr, SITSE

**OLAER**

**ORELL Tec AG**  
Bonnstrasse 3,  
CH – 3186 Düringen

[www.orelltec.com](http://www.orelltec.com)

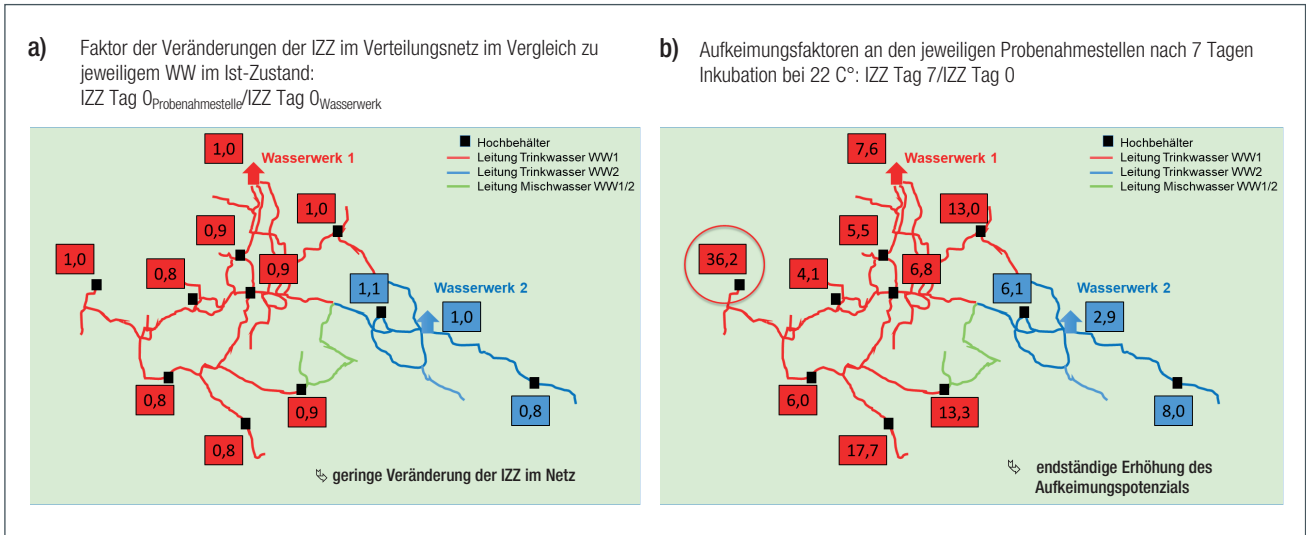


Abb. 5: Veränderungen der Intaktzellzahlen (IZZ) und der Aufkeimungspotenziale in einem Trinkwasserverteilungsnetz, das von zwei Wasserwerken (WW1 und WW2) gespeist wird.

logischen Wasserqualität in hoher Auflösung mit Datenpunkten in Intervallen von  $\geq 30$  Minuten. Diese hochauflösende Diagnostik kommt typischerweise zum Einsatz, wenn kritische Kontrollpunkte durch Offline-Diagnostik definiert wurden. Gerade bei Prozessen mit stark variierenden Zellzahlen minimiert die hohe Datenauflösung die Schwankung der Ergebnisse durch sporadische Entnahme von Einzelproben.

Abbildung 6 zeigt die Veränderung der GZZ und IZZ in zwei unterschiedlichen Wasserwerken, welche Oberflächenwasser aufbereiten. Sowohl das vollständig aufbereitete Trinkwasser am Ausgang des Wasserwerks A (Abb.

6a) als auch der Ablauf eines Aktivkohlefilters von Werk B (Abb. 6b) unterlagen einem Tag-Nacht-Rhythmus, der sich durch das Verbrauchsverhalten erklärt. Die Zunahme der Zellzahl im vollständig aufbereiteten Trinkwasser von der Nacht bis in die frühen Morgenstunden ging mit dem geringeren Wasserverbrauch und somit längerer Aufenthaltsdauer des Wassers im Reinwasserbehälter einher. Die Aufkeimung wird wahrscheinlich durch assimilierbaren organischen Kohlenstoff (AOC) begünstigt, der durch oxidative Prozesse in der vorgeschalteten Wasseraufbereitung (im dargestellten Fall durch Ozonung) gebildet wird. Die Nährstoffe werden noch im Wasserwerk von den Bakterien verwertet,

was zu einer biologischen Stabilisierung des Trinkwassers führt. Interessanterweise reagierten die Bakterienzahlen auch auf Verbrauchsspitzen (wie z. B. in einer Silvesternacht mit kurzzeitig erhöhtem Wasserverbrauch in den frühen Morgenstunden; Tag 6 in Abb. 5a) mit einer kurzzeitigen Abnahme. Ein weiteres nicht bekanntes Ereignis führte zu einer kurzzeitigen Erhöhung der Zellzahlen an Tag 12 und der Fortsetzung des Tag-Nacht-Zyklus auf einem höheren Niveau am Folgetag.

Auch der Ablauf eines Aktivkohlefilters kann solch ein tagesabhängiges mikrobiologisches Verhalten zeigen (Abb. 6b). In diesem Wasserwerk konnte eben-

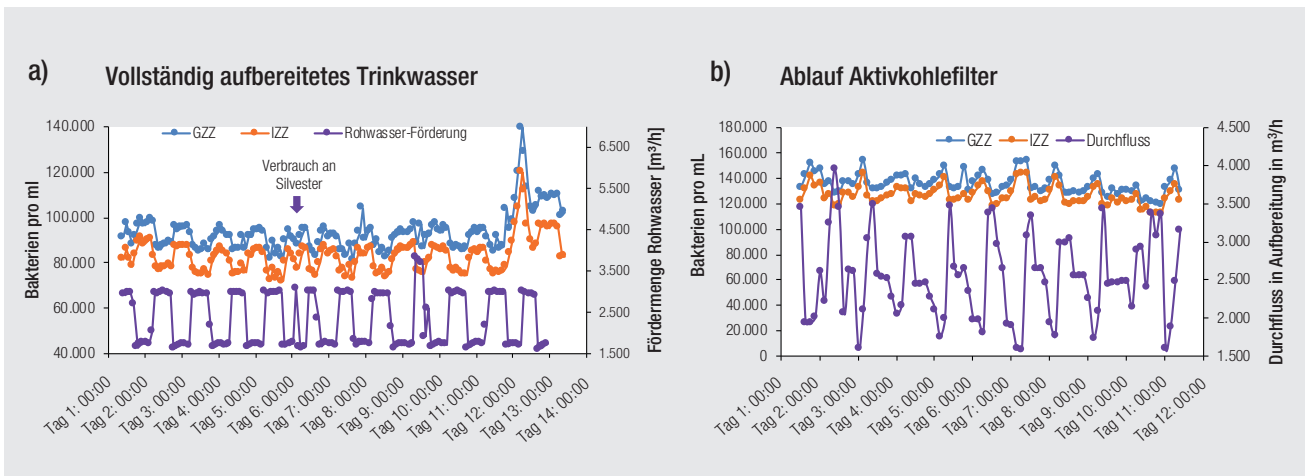


Abb. 6: Online Monitoring: Veränderung der GZZ und IZZ in a) vollständig aufbereitetem Trinkwasser am Werksausgang und b) in Ablauf eines Aktivkohlefilters in Abhängigkeit von der Rohwasserförderung bzw. vom Wasserdurchfluss. Die beiden Beispiele stammen von unterschiedlichen Wasserwerken, die Oberflächenwasser aufbereiten. Die Uhrzeiten beziehen sich jeweils auf den Anfang jedes neuen Tages (00:00 Uhr).

falls ein Teil des AOC aus einer vorge-schalteten Ozonbehandlung stam-men. Aus dem tagsüber hohen Was-serververbrauch resultiert ein hoher Durchfluss und eine Abnahme der Bakterienkonzentrationen, während geringe Durchflüsse in der Nacht und den frühen Morgenstunden zu einer Zunahme der Bakterienzahlen führen. Das Ausmaß der biologischen Stabili-sierung des Wassers (d. h. die Umwand-lung von Nährstoffen in Biomasse) in dem Filter hängt also von der Aufent-haltsdauer des Wassers im Filter ab. Ab-hängig von der „biologischen Aktivi-tät“ des Filters kann davon ausgegan-gen werden, dass die Geschwindigkeit der biologischen Stabilisierung filter-spezifisch ist und sich mit zunehmen-dem Alter der Aktivkohle verändert. Eine Ableitung charakteristischer Kenngrößen für den Filterbetrieb wäre denkbar.

### Zusammenfassung und Ausblick

Die in diesem Fachbeitrag aufgezähl-ten Beispiele aus der Praxis zeigen die breiten Anwendungsmöglichkeiten der Durchflussszytometrie. Obwohl sie nicht Teil der mikrobiologischen Routinemethoden ist, hat sie sich als diagnostisches Werkzeug inzwischen fest in modernen Wasserlaboren eta-bliert und wird in der wissenschaft-lichen Literatur zunehmend als Al-ternative für die Koloniezahl disku-tiert [3]. Die Ergebnisse der angewen-deten unspezifischen Methodik

erlauben zwar keine direkten Aussa-gen zur Anwesenheit hygienisch re-levanter Bakterien, jedoch können sie einen wichtigen Beitrag zur Prozess-kontrolle liefern. Denn hierfür ist die Erfassung der gesamten Bakterienpo-pulation und nicht nur der wenigen kultivierbaren Bakterien notwendig. Da sich deren relativer Anteil an der Gesamtbakterienpopulation in der Wasseraufbereitung und -verteilung infolge der Dynamik der Mikrobiolo-gie stark ändern kann, können Kolo-niezahlen unterschiedlicher Probe-nahmestellen nicht direkt miteinan-der verglichen werden [4].

### Danksagung

Die vorgestellten Ergebnisse sind aus verschiedenen Studien zusammenge-tragen, die u. a. von der innogy SE (jetzt E.ON), dem DVGW, der Trinkwasser-versorgung Magdeburg GmbH, der Ar-beitsgemeinschaft Trinkwassertalsper-ren (ATT) und hier nicht erwähnten Wasserversorgungsunternehmen fi-nanziert wurden. Weiterhin danken die Autoren den Wasserwerken West-falen GmbH, dem Wahnbachtalsper-renverband und anderen nichtgenann-te Wasserversorgungsunternehmen für ihre tatkräftige Unterstützung. Ein spezieller Dank gilt den IWW-Mitar-beiterinnen und -Mitarbeitern Denise Windrich, Dietmar Pütz, Lorenz Schul-te-illingheim und Kathrin Wiede für die praktische Durchführung durch-flussszytometrischer Messungen. ■

### Literatur

- [1] Safford H. R., Bischel H. N.: Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review, in: *Water Research* 2019 (51), 110–133.
- [2] Schumann, J. et al.: flowCHIC: Analyze flow cytometric data using histogram information. R package version 1.0.0., 2014, [www.ufz.de/index.php?en=38422](http://www.ufz.de/index.php?en=38422).
- [3] van Nevel, S. et al.: Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring, in: *Water Research* 2017 (113), 191–206.
- [4] Nocker, A. et al.: Microbiological changes along a modular wastewater reuse treatment process with a special focus on bacterial regrowth, in: *Journal of Water Reuse and Desalination* 2020 (10(4)), 380–393.

### Die Autoren

**Dr. Andreas Nocker** ist stellvertretender Bereichsleiter Angewandte Mikrobiologie im IWW Zentrum Wasser in Mülheim an der Ruhr.

**Dr. Bernd Bendinger** leitet den Bereich Angewandte Mikrobiologie im IWW Zentrum Wasser in Mülheim an der Ruhr.

#### Kontakt:

Dr. Andreas Nocker  
IWW Zentrum Wasser  
Moritzstr. 26  
45476 Mülheim an der Ruhr  
Tel.: 0208 40303-383  
E-Mail: [a.nocker@iww-online.de](mailto:a.nocker@iww-online.de)  
Internet: [www.iww-online.de](http://www.iww-online.de)

## Gelsenwasser 1/4