

33. Wasserhygienetage Bad Elster

Salzwasser- und Solebäder: Klärung der Eignung derzeit angewandter hygienischer Überwachungsparameter und der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln – SOLUTION

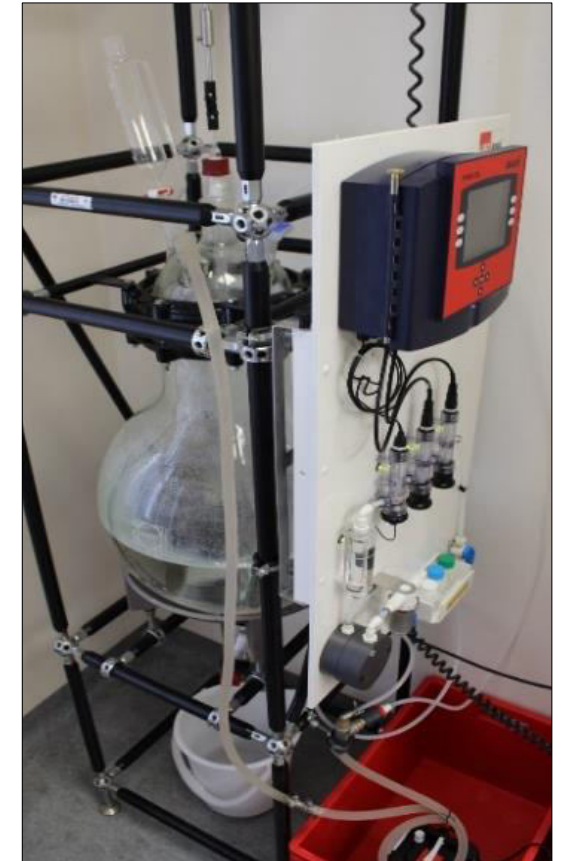
Projektziele

- Untersuchungen zur Bildung, Identifikation und zu Folgen von Desinfektionsnebenprodukten in betont salzhaltigen Badewässern – **FG II 3.2**
- Evaluierung der derzeit angewandten hygienischen Überwachungsparameter und –methoden für Salz- und Solebäder sowie ggf. Entwicklung geeigneterer Alternativen – **FG II 3.5**
- Entwicklung eines Prüfverfahrens zur Beurteilung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und Desinfektionsverfahren für die Badebeckenwasserdesinfektion von natürlich gewonnenen und künstlichen hergestellten salzhaltigen Wässern – **FG II 3.3**



Artifizielles Meerwasser – Matrix für die Untersuchungen

- Realitätsnahe Ausgangsmatrix für die Untersuchungen von salzhaltigen Wässern im Labormaßstab
Standardverfahren der ASTM International: *Standard Practice for Preparation of Substitute Ocean Water*
– Designation: D1141 – 98 (Reapproved 2021)
- Hauptbestandteile: **NaCl, Na₂SO₄**, (MgCl₂, CaCl₂, SrCl₂, KCl, NaHCO₃, KBr, H₃BO₃, NaF)
- Herstellung erfolgte zunächst in einem großvolumigen Reaktor (Fassungsvermögen: 50 l) mit Umwälzbetrieb und online-Messtechnik zur Überwachung der Hygienehilfsparameter
- Gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zwischen den Versuchsreihen



FG II 3.2 – Chemische Analytik

- Untersuchungen zum Eintrag von Präkursoren ins Badebeckenwasser/Meerwasser
- Bestimmung von Trihalogenmethanen (THMs) in salzhaltigem Schwimm- und Badebeckenwasser
– aktueller oberer Wert nach DIN 19643: 20 µg/l
- Sensitiver Nachweis von Bromat (gentoxisch), welches in desinfizierten, bromidhaltigen Wässern vorkommen kann – aktueller oberer Wert nach DIN 19643: 2 mg/l

▪ Chemische Untersuchungsparameter – Realproben

THMs	→ GC
Bromat	→ IC-ICP-MS, IC + Kartuschen
Metalle (Arsen)	→ ICP-MS
Anionen (Chlorit + Chlorat)	→ IC
TOC (II 3.4)	

Sensitive Bestimmung von Bromat in salzhaltigem Wasser

■ Kopplung IC mit ICP-MS

- zur Steigerung der Messempfindlichkeit und Reduzierung der Matrixinterferenz wurde ein Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry* – ICP-MS) mit einer Ionenchromatografie (IC) gekoppelt



Bromat (BrO_3^-) =

Desinfektionsnebenprodukt in
Badebeckenwasser, insbesondere in
Meerwasserschwimmbädern

Bromat entsteht durch die Ozonierung bzw.
Chlorierung von Bromid (Br^-)-haltigem
Wasser



Leit- und Grenzwerte für Bromat in Europa
unterscheiden sich stark (0,009 – 2 mg/l)

Einstufung als Karzinogen der Kategorie 1B

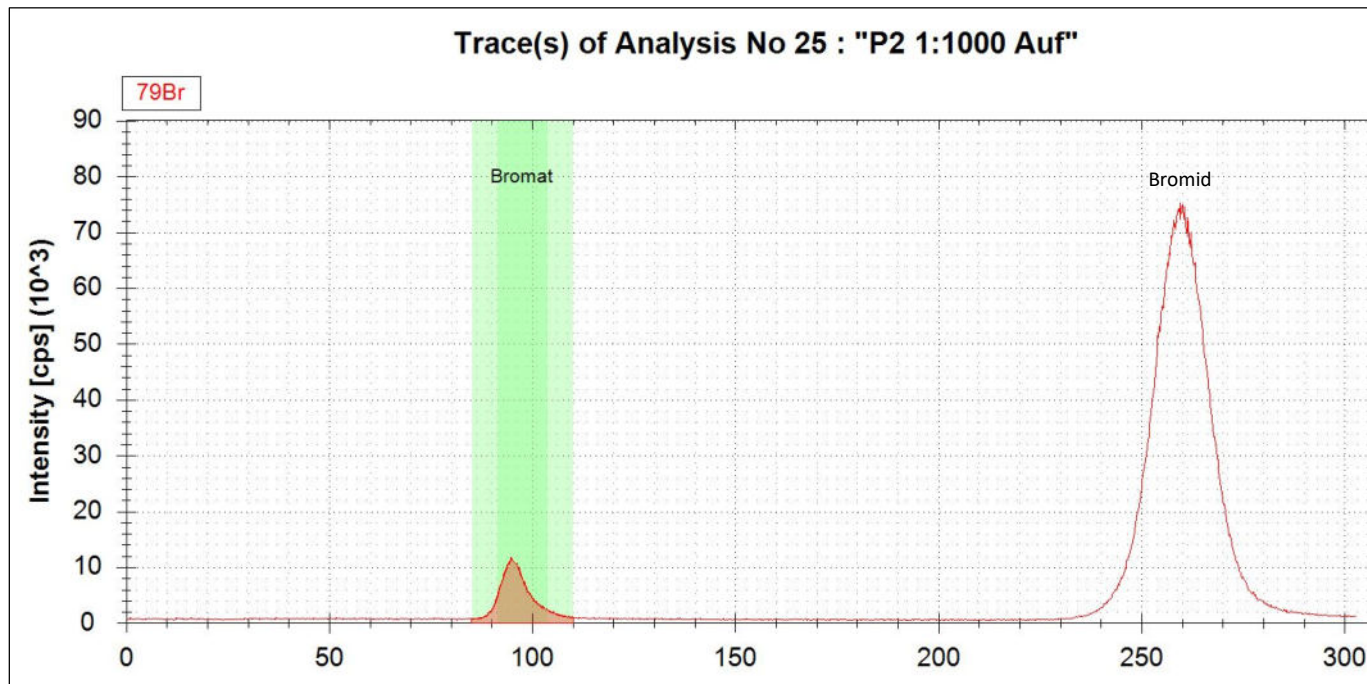
Mögliche Absenkung des oberen Werts für
Bromat auf 0,1 mg/l

→ **Notwendigkeit empfindlicher
Messmethoden**

Sensitive Bestimmung von Bromat in salzhaltigem Wasser

■ Kopplung IC mit ICP-MS

- Salzfracht erfordert eine Verdünnung der Proben von mindestens 1 : 1000
- Proben mit 5 ppb Bromat aufgestockt und anschließend vermessen



Bromat (BrO_3^-) =

Desinfektionsnebenprodukt in
Badebeckenwasser, insbesondere in
Meerwasserschwimmbädern

Bromat entsteht durch die Ozonierung bzw.
Chlorierung von Bromid (Br^-)-haltigem
Wasser



Leit- und Grenzwerte für Bromat in Europa
unterscheiden sich stark (0,009 – 2 mg/l)

Einstufung als Karzinogen der Kategorie 1B

Mögliche Absenkung des oberen Werts für
Bromat auf 0,1 mg/l

→ **Notwendigkeit empfindlicher
Messmethoden**

Sensitive Bestimmung von Bromat in salzhaltigem Wasser

- Silberkartusche (Ag-Kartusche – *Chromafix PS-Ag+*) ermöglicht die Entfernung der Chlorid-Matrix
- Bariumkartuschen (Ba-Kartusche – *Chromafix PS-Ba 2+*) eliminieren Sulfat-Matrix
- Probenmatrix – artifizielles Meerwasser
Aufstockung mit 0.05 mg/l, 0.5 und 2 mg/l Bromat
→ Bestimmung der Wiederfindungsrate



Bromat (BrO_3^-) =

Desinfektionsnebenprodukt in
Badebeckenwasser, insbesondere in
Meerwasserschwimmbädern

Bromat entsteht durch die Ozonierung bzw.
Chlorierung von Bromid (Br^-)-haltigem
Wasser



Leit- und Grenzwerte für Bromat in Europa
unterscheiden sich stark (0,009 – 2 mg/l)

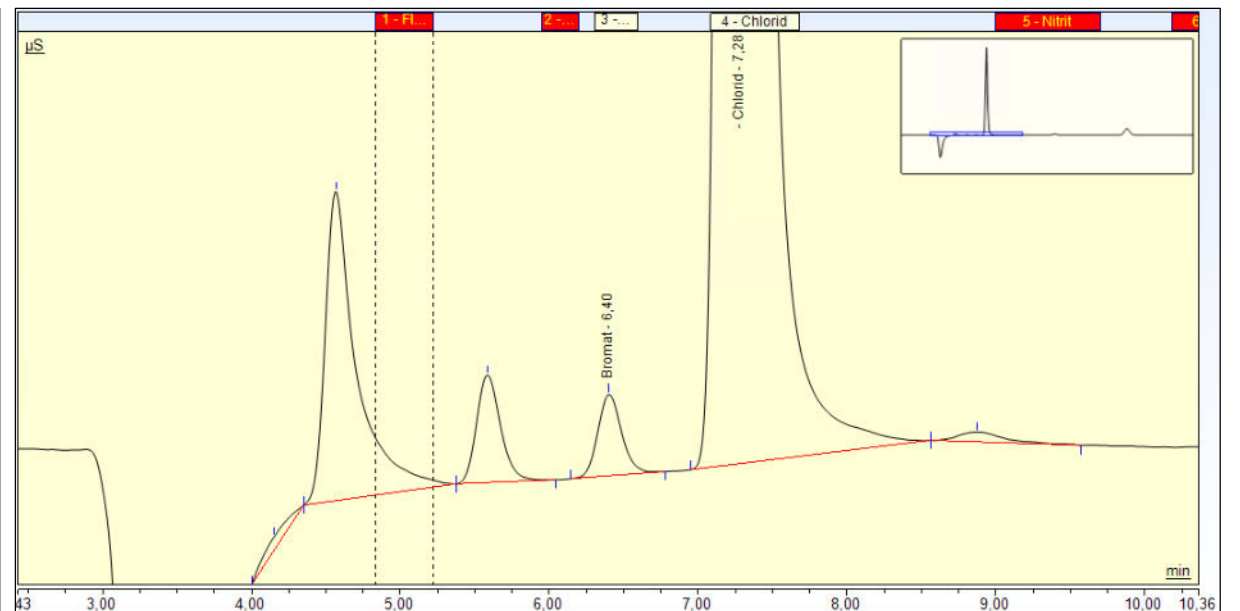
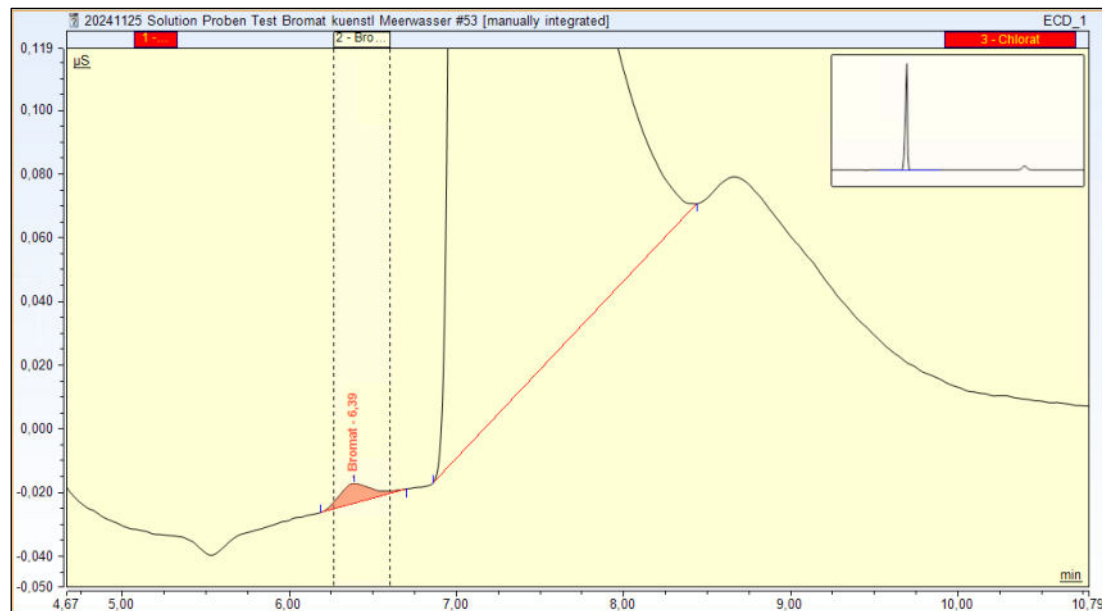
Einstufung als Karzinogen der Kategorie 1B

Mögliche Absenkung des oberen Werts für
Bromat auf 0,1 mg/l

→ **Notwendigkeit empfindlicher
Messmethoden**

Sensitive Bestimmung von Bromat in salzhaltigem Wasser

- Silberkartusche (Ag-Kartusche – *Chromafix PS-Ag+*) ermöglicht die Entfernung der Chlorid-Matrix
- Bariumkartuschen (Ba-Kartusche – *Chromafix PS-Ba 2+*) eliminieren Sulfat-Matrix
- Probenmatrix – artifizielles Meerwasser
 - Aufstockung mit 0.05 mg/l, 0.5 und 2 mg/l Bromat → Bestimmung der Wiederfindungsrate



Sensitive Bestimmung von Bromat in salzhaltigem Wasser

- Probenmatrix – artifizielles Meerwasser
Aufstockung mit 0.05 mg/l, 0.5 und 2 mg/l Bromat → Bestimmung der Wiederfindungsrate
- Messung der Proben ohne Kartusche von Vorteil um eine geeignete Vorverdünnung der Proben entsprechend ihres Chloridgehalts vorzunehmen

ohne Kartuschen	Aufstockung	Wiederfindung Bromat [mg/l]
Reinstwasser ohne Kartusche	+ 0,05 mg/l BrO ₃	0,053
Reinstwasser ohne Kartusche	+ 2,00 mg/l BrO ₃	2,17
artifiz. Meerwasser ohne Kartusche	/	< 0,25
artifiz. Meerwasser ohne Kartusche	0,05	< 0,25
artifiz. Meerwasser ohne Kartusche	0,5	0,48
artifiz. Meerwasser ohne Kartusche	2	1,78

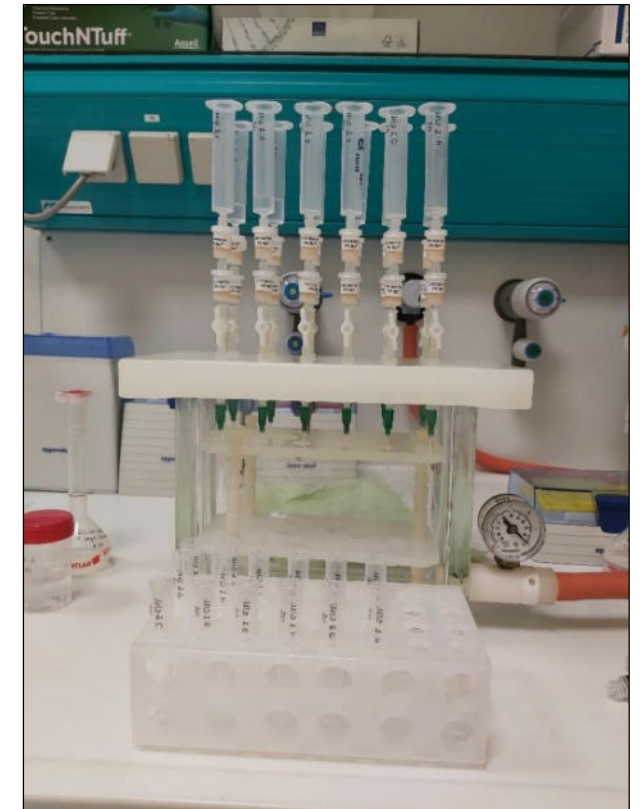
mit Kartuschen	Aufstockung	Wiederfindung
Reinstwasser mit Kartusche	+ 0,05 mg/l BrO ₃	0,050
Reinstwasser mit Kartusche	+ 2,00 mg/l BrO ₃	2,10
artifiz. Meerwasser mit Kartusche	/	/
artifiz. Meerwasser mit Kartusche	0,05	0,035
artifiz. Meerwasser mit Kartusche	0,5	0,36
artifiz. Meerwasser mit Kartusche	2	1,41

Sensitive Bestimmung von Bromat in salzhaltigem Wasser

- Messung von Realproben aus Bädern mit einer sehr hohen Salzfracht

Realproben		Bromat [mg/l]	
		ohne Kartusche	mit Kartusche
Therme a	BW	< 0,05	0,06
	Filtrat	< 0,05	0,06
Therme b	Becken I = salzhaltiges BW (6%)	0,30	0,38
	Becken II = salzhaltiges BW (10%)	< 0,5	0,12
	Becken III		
	= salzhaltiges BW (15%)	< 0,5	0,36

→ nach aktuellem Versuchsstand ermöglicht der Einsatz dieser Kartuschen eine sehr genaue Bestimmung von Bromat, auch bei Proben mit salzhaltiger Matrix



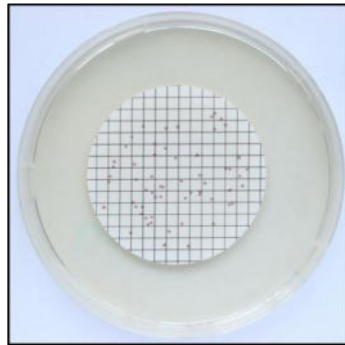
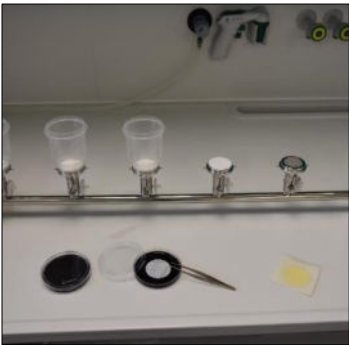
FG II 3.5 – Mikrobiologie

Untersuchungen zur Persistenz verschiedener Indikator- und Krankheitserreger in salzhaltigem Wasser

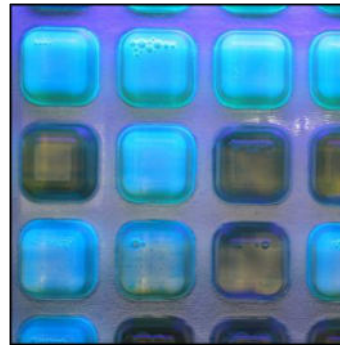
- Bestimmung der Wiederfindungsrate nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit einem breiten Methodenspektrum
- Projektziel: Daten und Kenntnisse zur Eignung von Nachweismethoden für Mikroorganismen in Salzwasser

E. coli,
P. aeruginosa,
Enterokokken,
Legionella spec.,
S. aureus,...

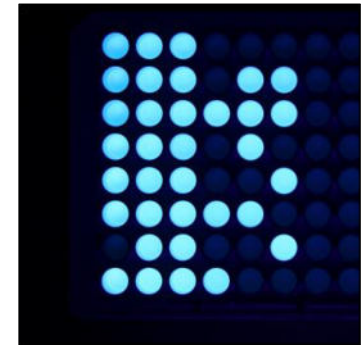
▪ Membranfiltration + Selektivmedium



▪ Flüssiganreicherung (MPN-Verfahren)



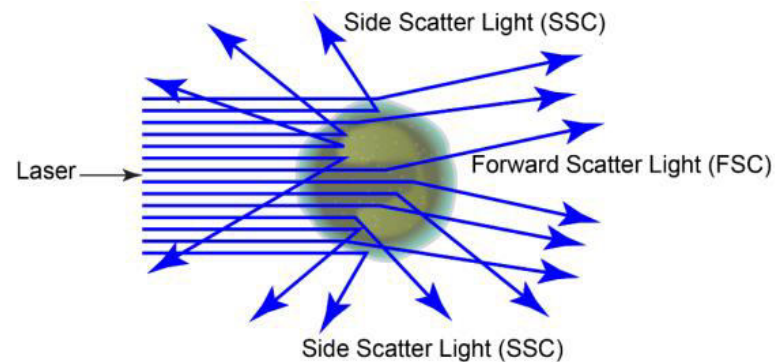
▪ Mikrotiterplatten (MPN-Verfahren)



FG II 3.5 – Mikrobiologie

Untersuchungen zur Persistenz verschiedener Indikator- und Krankheitserreger in salzhaltigem Wasser

- **Durchflusszytometrie** als kulturunabhängiges Verfahren für die Untersuchung der mikrobiellen Gesamtflora im salzhaltigen Badewasser
- Prozessüberwachung – ermöglicht Rückschlüsse über mögliche Prozesse und Veränderungen im Badebeckenwasser, hochfrequent
- ggf. inhibitorische Effekte durch das Salz auf den Nachweis von Bakterien



Mantelstrom wird erzeugt

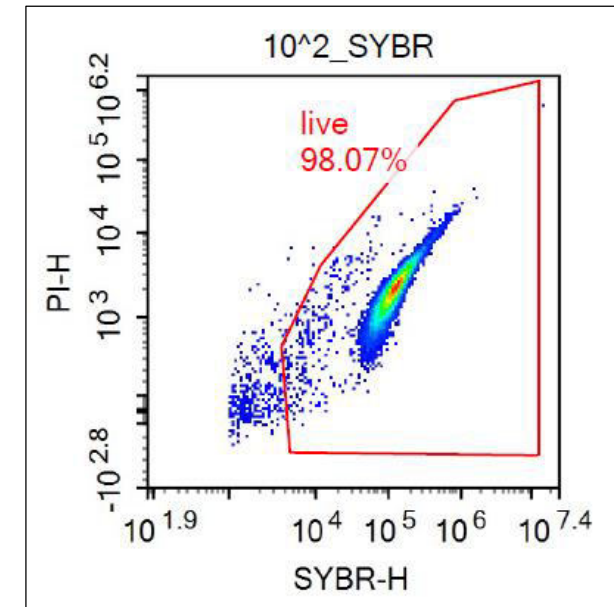
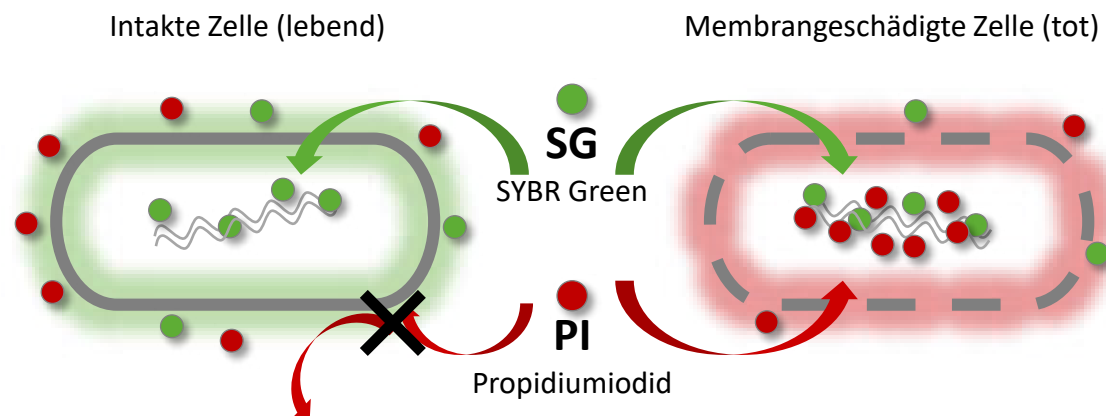
→ Partikel wird in der Flow-Zelle fokussiert

→ Laser blau (488 nm), Laser rot (637 nm)
erzeugen verschiedene Signale:

- Seitwärtsstreulicht SSC (Side Scatter)
- Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter)
- Farbe des Partikels, die exprimiert wird

Kurze Einführung – Durchflusszytometrie (DFZ)

- Etablierung eines Templates für die Wasseranalyse in Zusammenarbeit mit OMNI Life Science
- **Lebend/tot-Differenzierung**
- Grüner Farbstoff färbt alle Bakterien unabhängig von ihrer Membranintegrität
- Roter Farbstoff kann nur in membran-geschädigte Zellen eindringen
- Verschiebung des Signal-Clusters

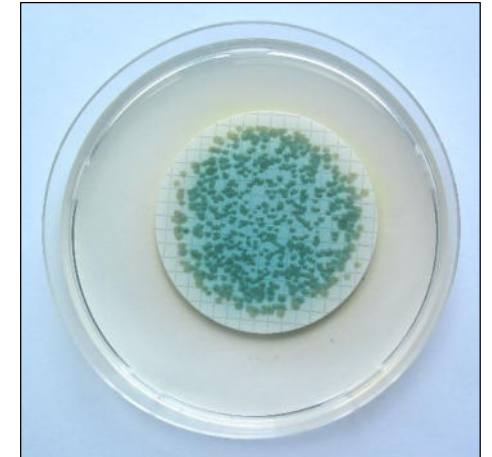


FG II 3.5 – Mikrobiologie – Untersuchungen zur Persistenz

- 1) Untersuchung der **Vergleichbarkeit verschiedener Methoden** innerhalb einer Spezies, insbesondere der Einfluss von Salz auf den zuverlässigen Nachweis
- 2) Untersuchung **unterschiedlicher Chlor-Konzentrationen**, Vergleiche zwischen Chlor-gezehrten und ungechlorten Wässern
- 3) Untersuchung von Naturisolaten, sowie aus nativem Meerwasser isolierten Stämmen, Aussage zu **stammspezifischen Unterschieden**
- 4) Vergleich der Persistenz im ungechlorten **salzhaltigen Wasser vs. Leitungswasser**
- 5) Einfluss unterschiedlicher **Wachstumsphasen** (exp. vs. stat.)
- 6) Untersuchung von **Realproben**

Skizze Versuchsablauf – Beispiel *P. aeruginosa*

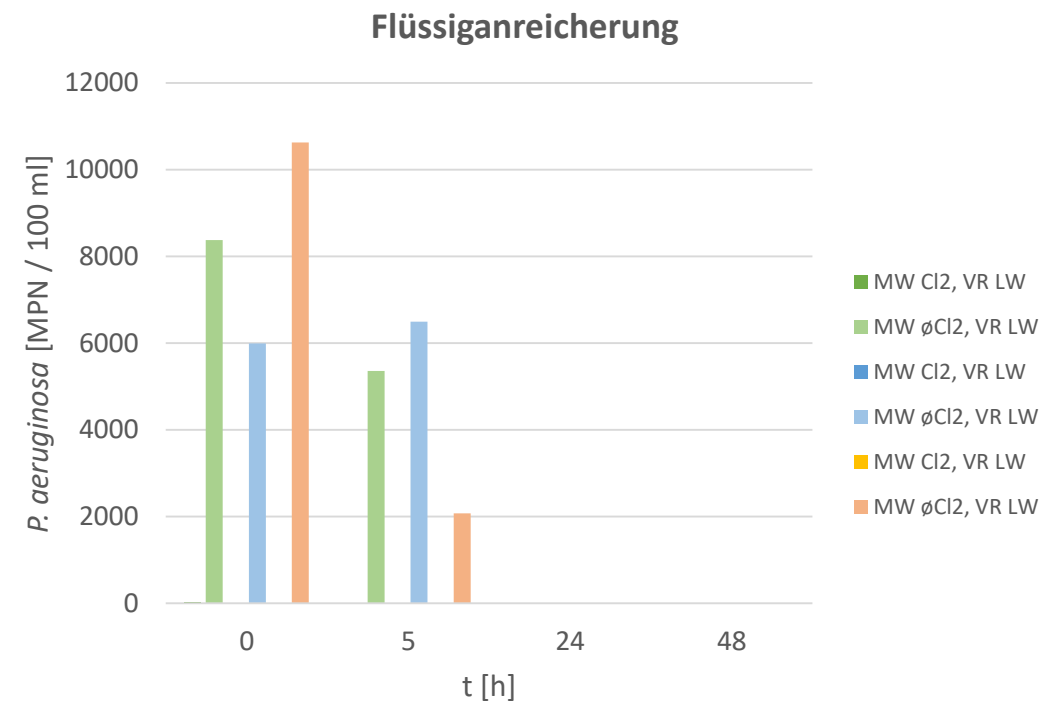
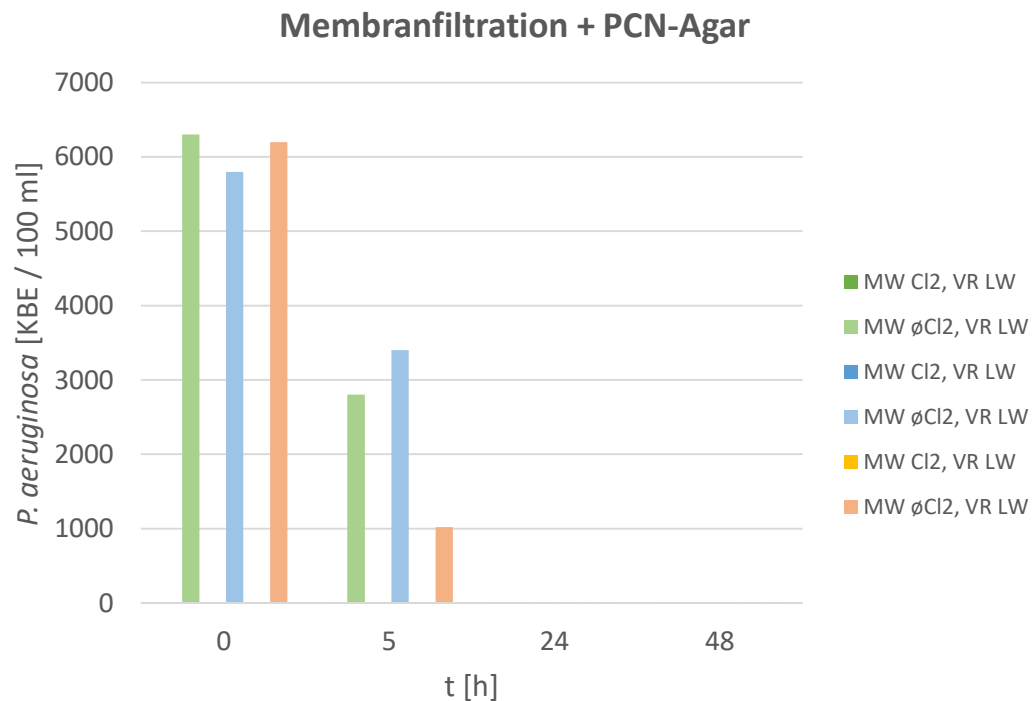
- **Spezies:** *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) – Stamm **ATCC 15442**
Naturisolat und Referenzstamm – stammspezifische Unterschiede?!
- **Ziel des Versuchs:** Vergleichsuntersuchung zum **Einfluss der Wachstumsphase** (exponentiell oder stationär) auf die Persistenz der MO im artifiziellen Meerwasser, angesetzt im Kolben (**Chlor-gezehrt und ungechlort**);
Durchführung von drei unabhängigen Versuchen parallel
- **Kolben beimpft – Bakterienkonzentration $\approx 10^2$ CFU/ml**
- **c [Cl⁻] bei $\approx 0,42$ mg/l**
- Homogenisierung für wenige Sekunden \rightarrow Zeitpunkt t_0 \rightarrow Inkubation bei RT, schüttelnd
- Untersuchung der Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten $t_0 \rightarrow t_1$ (5h) $\rightarrow t_2$ (24h) $\rightarrow t_3$ (48h)
- Für die Probenahme wurden Weithalsflaschen mit 5 mg Natriumthiosulfat (250 ml, PP) verwendet, um die Wirkung von Chlor zu hemmen
- Untersuchungsmethoden:
 - **Flüssiganreicherung (DIN EN ISO 16266-2)**
 - **Membranfiltration + Selektivmedium (Cetrimid-Agar) – VGL Methodik für salzhaltige Matrix!**



1) Untersuchung/Vergleich unterschiedlicher Nachweisverfahren

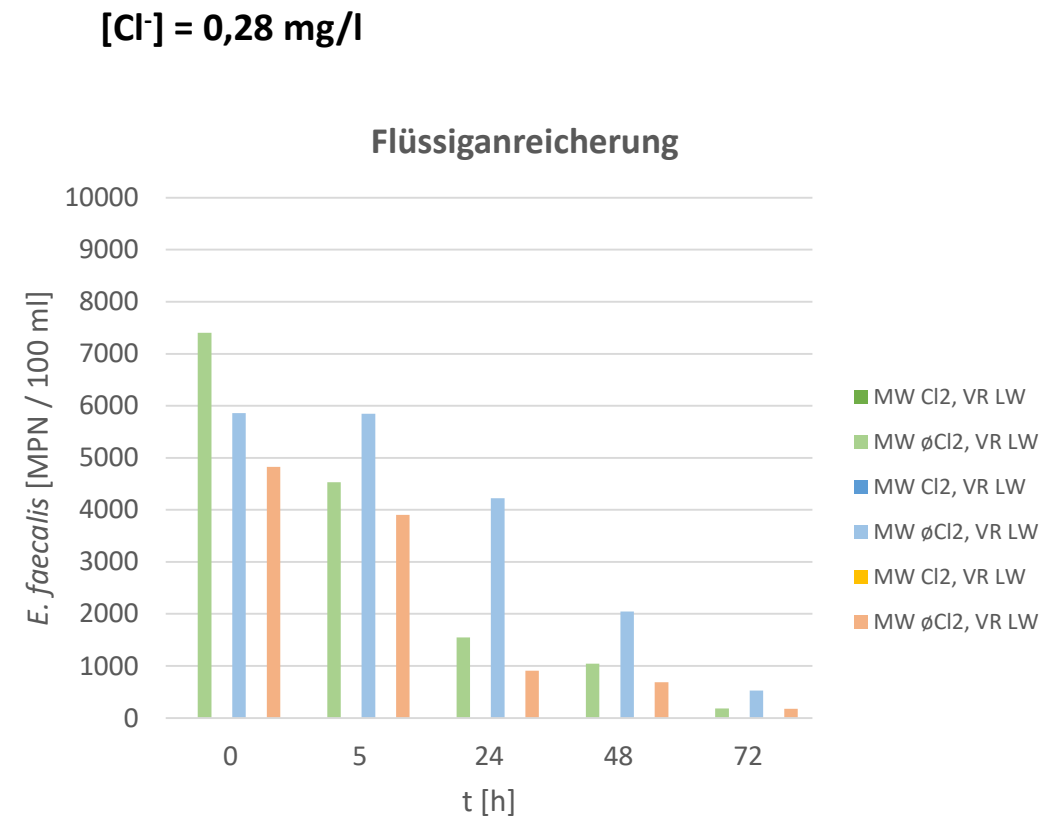
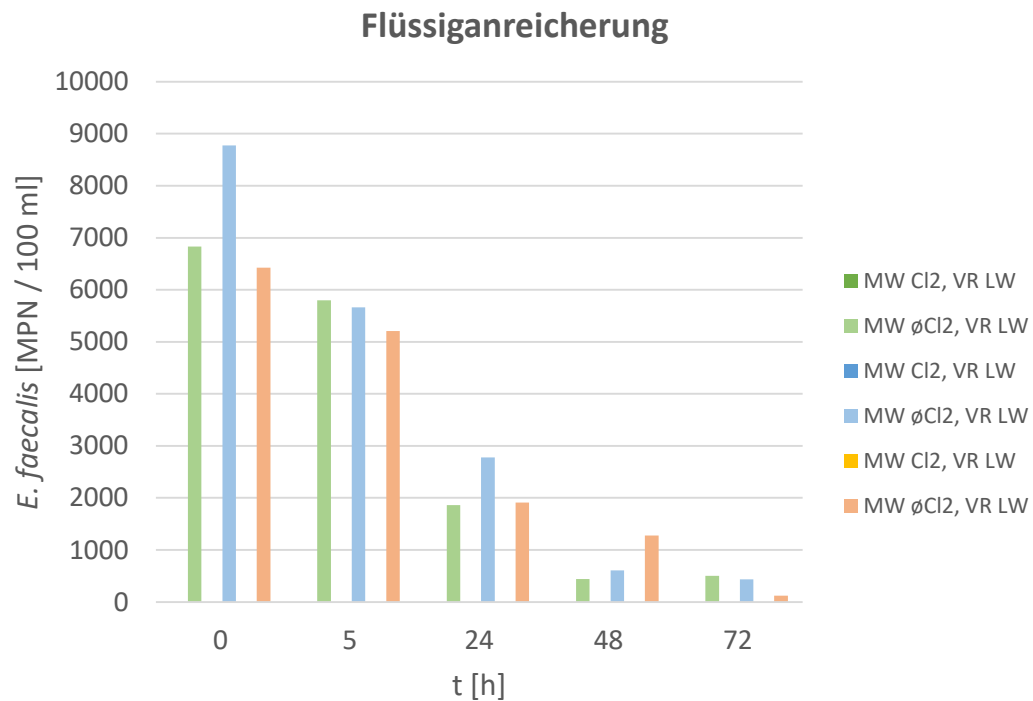
- Untersuchungen zur Persistenz von *P. aeruginosa* im gechlorten (Chlor-gezehrt) und ungechlorten salzhaltigen Wasser, $[Cl^-] \approx 0,3 \text{ mg/l}$
- **Membranfiltration vs. Flüssiganreicherung**

Verdünnung der Wasserproben (1 : 10) erforderlich!



2) Persistenz bei unterschiedlichem Chlorgehalt

- Untersuchungen zur Persistenz von *E. faecalis* im gechlorten (Chlor-gezehrt) und ungechlorten salzhaltigen Wasser
- Unterschiedliche Gehalte $[Cl^-] = 0,8 \text{ mg/l}$

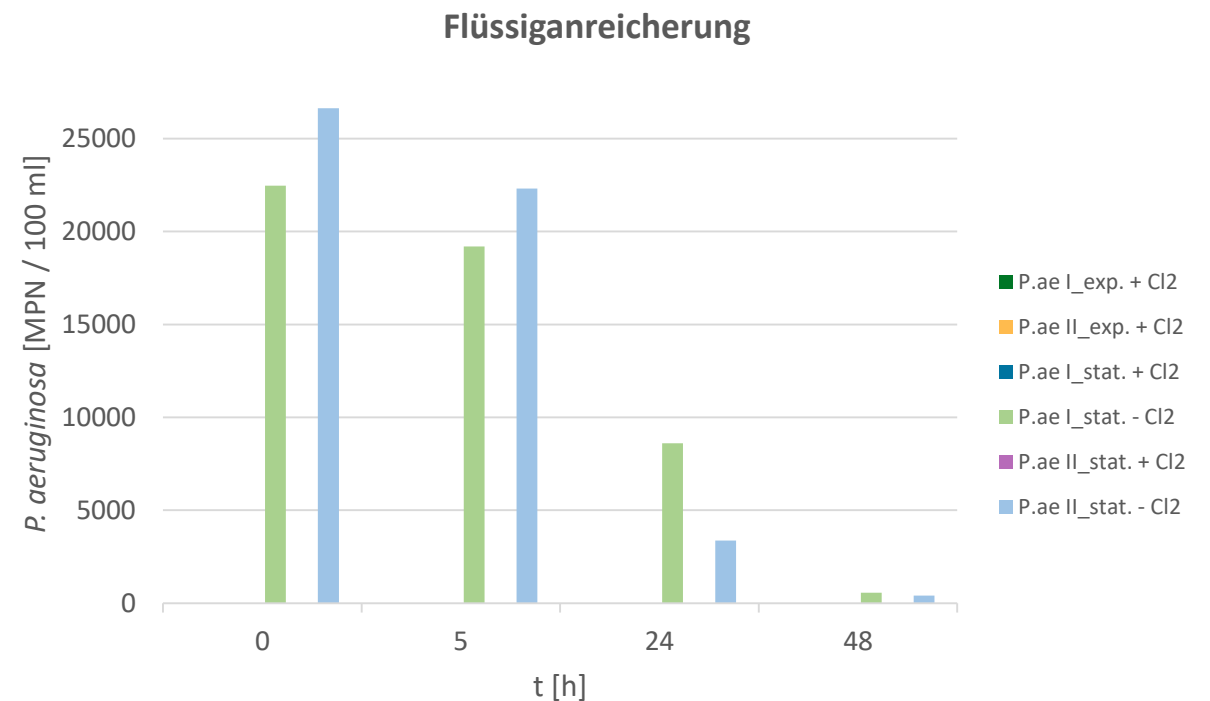
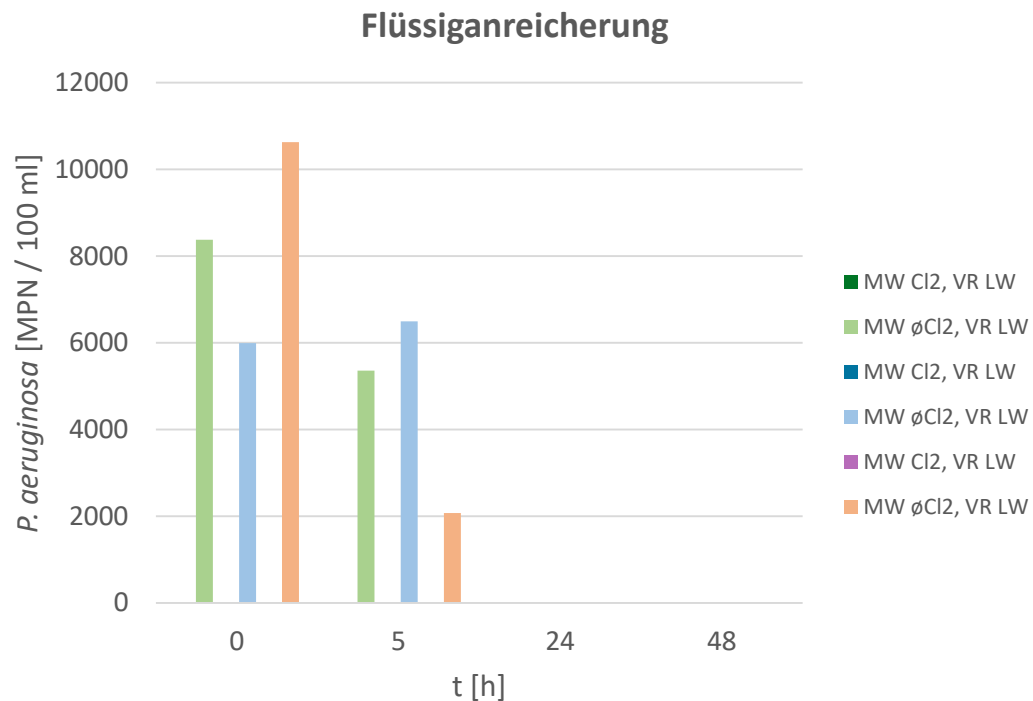


3) Untersuchung von Naturisolaten – stammspezifische Unterschiede

- Untersuchungen zur Persistenz von *P. aeruginosa* im gechlorten (Chlor-gezehrt) und ungechlorten salzhaltigen Wasser, $[Cl^-] \approx 0,3 \text{ mg/l}$
- *P. aeruginosa* WDCM 00026

Höhere Tenazität!

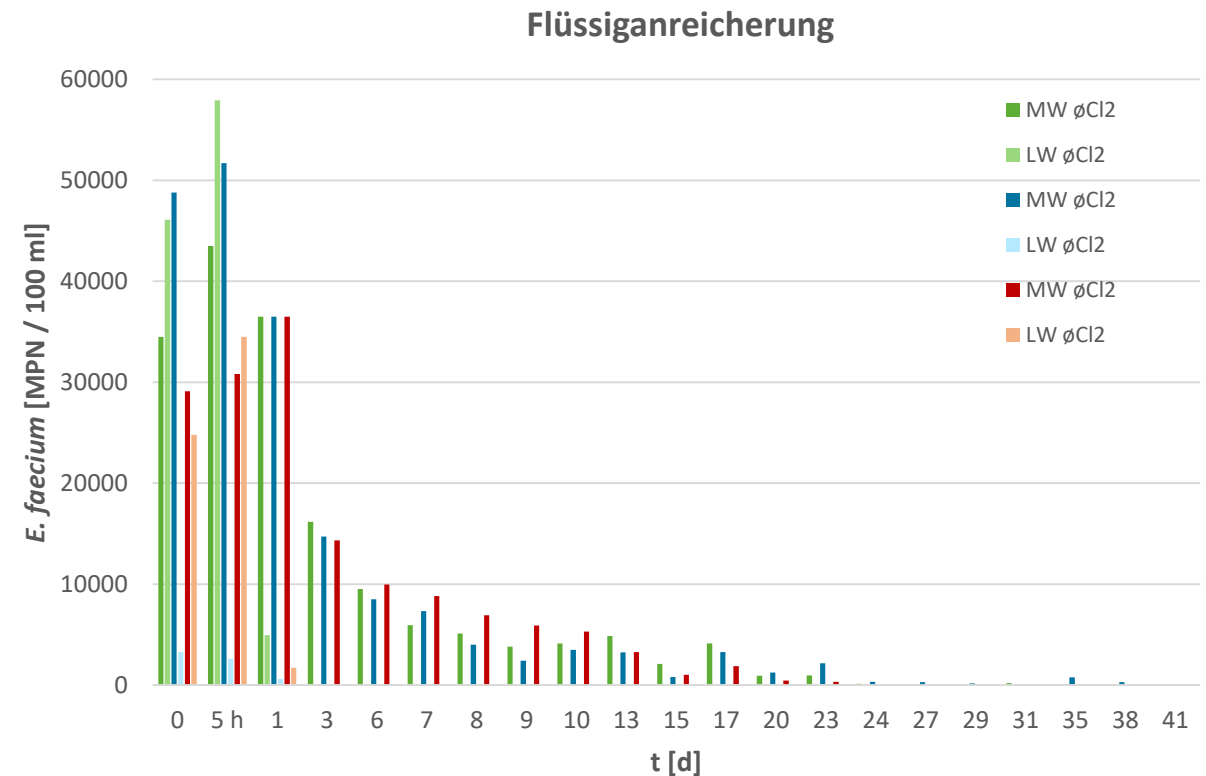
vs. *P. aeruginosa* ATCC 15442



4) Vergleich der Persistenz im salzhaltigen Wasser vs. Leitungswasser

- Vergleichsuntersuchung zur Persistenz von *E. faecium* (DSM 110643) im artifiziellen Meerwasser (angesetzt im Kolben, **ungechlort**) und im Leitungswasser (unsteril)
- Startkonzentration: **10³ CFU/ml**
- Flüssiganreicherung (41 ± 0,5 °C, Auswertung nach 24- 28 h)

- alle vier untersuchten Naturisolate, auch *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* zeigen eine erhöhte Persistenz im ungechlorten, artifiziellen Meerwasser verglichen mit Leitungswasser
- Höhere Tenazität
- Salz besitzt keine Biozid-Wirkung



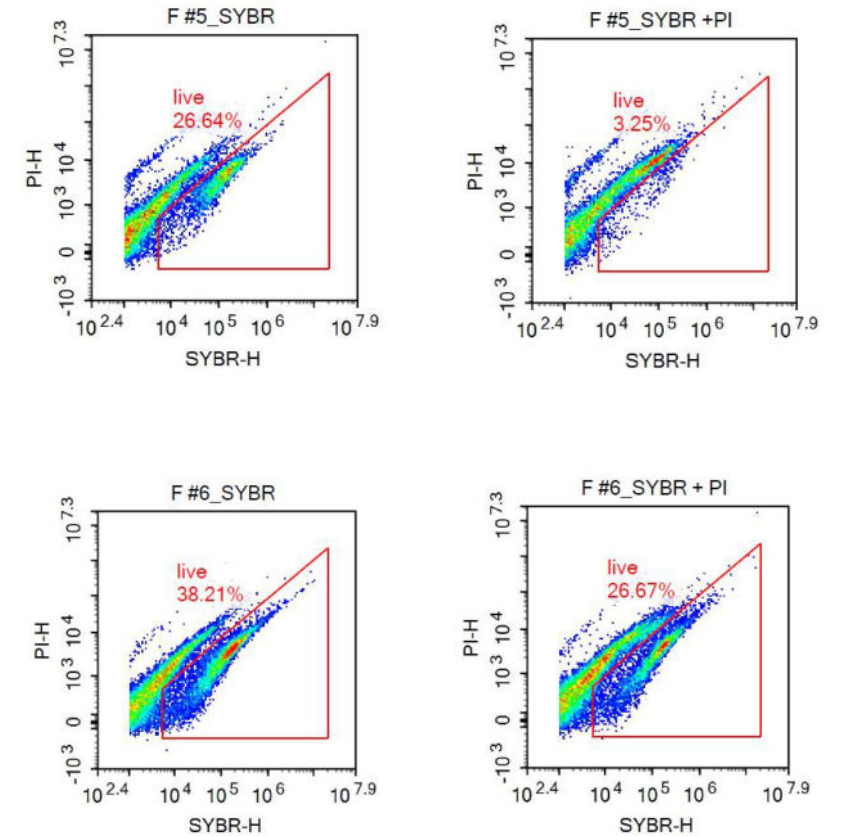
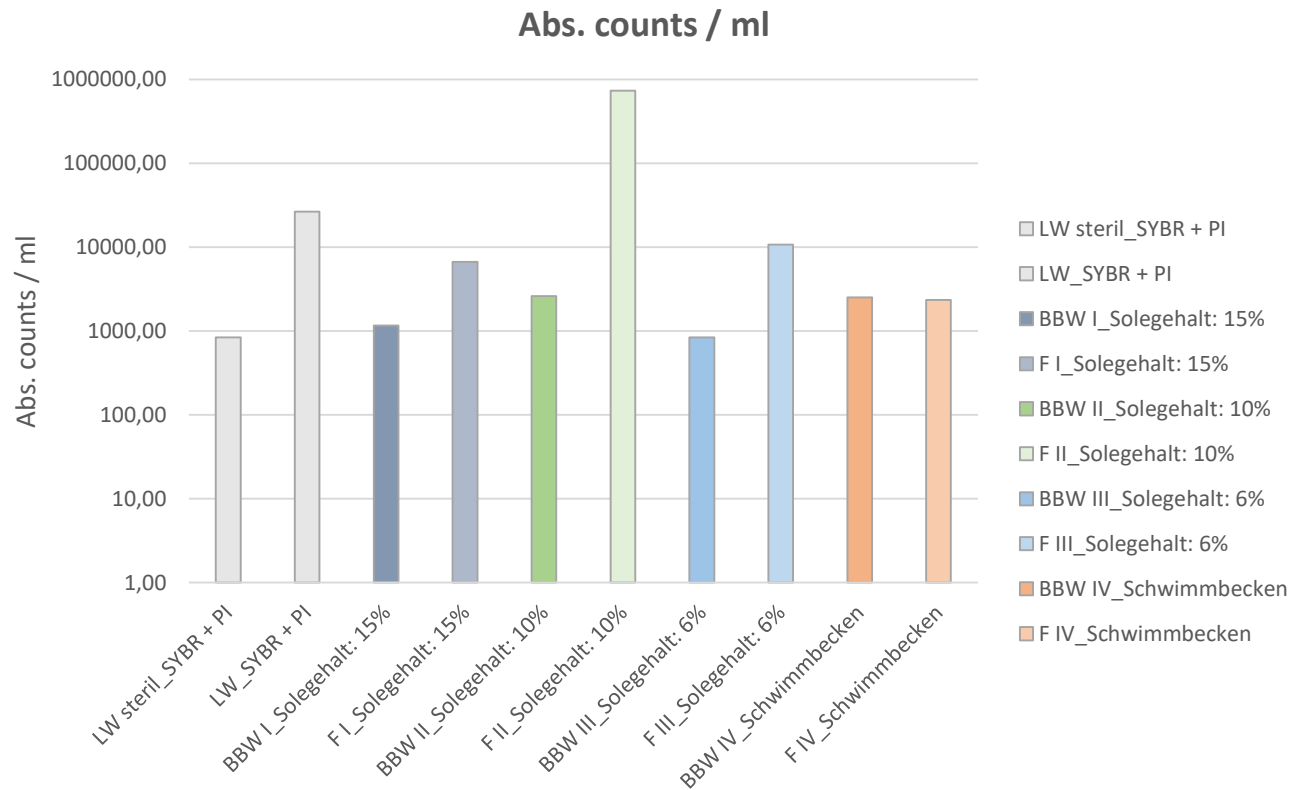
Realproben

- Gewinnung von Realproben → akquiriert von Solebädern aus dem näheren Umkreis (max. 150 km) und von Meerwasserbädern an Nord- und Ostsee

- Mikrobiologische Analyse der Realproben (Badebeckenwasser, Filtrat)
 - Einsatz Durchflusszytometrie → Aussage zur Gesamtzellzahl an Bakterien in einer Probe (unspezifische Färbung zur Lebend/tot-Differenzierung mit SYBR Green und Propidiumiodid)
 - Methode einsetzbar zur Prozessüberwachung in Bädern?!
 - Nach aktuellem Untersuchungsstand werden die klassischen Überwachungsparameter (*E. coli*, Enterokokken, *P. aeruginosa*), sowie *S. aureus* in salzhaltigen Wässern (Thermalwasser oder Meerwasser) bereits nach wenigen Sekunden eliminiert; im Filtrat gelegentlich Legionellen (< 10 KBE/100 ml)

- Probenahme aus Zulauf der Bäder bzw. natives Ostsee- und Nordseewasser
 - Isolation, Identifizierung und Kultivierung halophiler Bakterien auf salzhaltigem Agar

Durchflusszytometrie – Realproben Therme xy



- Filtrat Probe II: Koloniezahl bei 36°C > Parameterhöchstwert (100 KBE/ml)

Flüssiganreicherung > 2419,6 MPN/100 ml

Zusammenfassung

- ✓ Untersuchungen zur Persistenz verschiedener Indikator- und Krankheitserreger in salzhaltigem Wasser; breites Methodenspektrum
→ Flüssiganreicherung erfordert Verdünnung (Salzfracht stört Substratumsatz); Membranfiltration + Selektivmedium robuster
- ✓ Desinfektion mit Chlor effizient für die klassischen Überwachungsparameter (*E. coli*, Enterokokken, *P. aeruginosa*), sowie *S. aureus* in salzhaltigen Wässern (Thermalwasser oder Meerwasser)
- ✓ Durchflusszytometrie ermöglicht Rückschlüsse über mögliche Prozesse und Veränderungen im Badebeckenwasser (hochfrequent)
- ✓ Identifikation und Kenntnisse zum Bildungspotential verschiedener Desinfektionsnebenprodukte

Die mikrobiologischen und chemisch-physikalischen Überwachungsparameter laut der UBA-Empfehlung (Hygieneanforderungen an Bäder und deren Überwachung) und der DIN 19643 sind für salzhaltige sowie nicht salzhaltige Wässer gleichermaßen sinnvoll gewählt und erlauben eine effektive Überwachung.

Salz ist kein Biozid. Eine Desinfektion salzhaltiger Badewässer zur Aufrechterhaltung eines hygienisch einwandfreien Zustandes ist unbedingt erforderlich.

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Danksagung

FG II 3.2

Dr. Alexander Kämpfe, Manuela Wude, Pia Laetitia Müller

FG II 3.5

Dr. Christina Förster, Sebastian Gläsel, Kristin Adler, Yvonne Schreiner, Niklas Godawa, Madlen Koch, Katrin Oehm, Ina Fuchs, Jacqueline Bochmann

FG II 3.4

Sven Unger