

Aus dem Institut für Wasserwirtschaft, Univ. f. Bodenkultur, Wien

ÜBER DEN EINFLUSS VON ULTRASCHALL UND ALTER DER PROBE AUF DIE ERGEBNISSE EINER BAKTERIOLOGISCHEN ABWASSERUNTERSUCHUNG

F ZIBUSCHKA, M. THEIL

Einleitung und Problemstellung

Angesichts der großen Vielfalt von ökologischen Nischen und Mikroökosystemen stellt sich bei der Durchführung mikrobiologischer Untersuchungen die Frage nach der jeweils anzuwendenden Methode. Von ihr hängt die Verlässlichkeit der Analysen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ab. Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang aber auch allen jenen vorbereitenden Arbeitsschritten, die vor dem eigentlichen Ansatz des Probenmaterials zu erfolgen haben, zu. Besonderes Augenmerk ist dabei der Untersuchung von Abwasserproben zuzuwenden, deren Homogenisierung, vor allem bei stärkerer Durchsetzung mit Schwebstoffen, problematisch sein kann. Einfluß auf das Ergebnis übt auch die unterschiedlich lange Lagerung der Proben aus, da in der Zwischenzeit unkontrollierbare Anreicherungs- und Eliminierungsprozesse abzulaufen beginnen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die beiden Einflußgrößen "Ultraschallbehandlung" und "Alter der Probe" untersucht.

Material und Methodik

Die Beprobungen erfolgten im Zeitraum von 1985 1987 innerhalb der Versuchspflanzenanlage Mannersdorf an der Leitha. Dabei handelt es sich um eine, im Auftrag der

NÖ-Landesregierung (Abteilung B/3-Siedlungswasserwirtschaft) vom Institut für Wasserwirtschaft (Abteilung Siedlungswasserbau und Gewässerschutz) der Univ.für Bodenkultur interdisziplinär bearbeiteten Pilotstudie*) zur Abwasserreinigung mit höheren Pflanzen. Untersucht wurde im gegenständlichen Fall die Koloniezahl der psychrophilen, heterotrophen, saprophytischen Keime, im folgenden als "Saprophyten" bezeichnet, (BBL-Trypticase Soy Agar; +22°C, 48h), sowie die Koloniezahl der Kolikeyme (Endoagar; +44,5°C, 24h)

Zur Ultraschallbehandlung wurden etwa 100 ml Probe in einem Glasbehälter in einer Ultraschallwanne der Marke SONOREX RK 100 (HF-Leistung 80/160 W bei 35 KHz) verwendet. Für zusätzliche Versuche wurde auch ein Handmixstab (Ultraturax) eingesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Homogenisierung von Abwasserproben erweist sich immer wieder als schwierig, vor allem dann, wenn diese verstärkt mit Detritus durchsetzt sind, an dem, auf Grund von Oberflächenspannungen, zahlreiche Mikroorganismen anhaften. REICHARDT (1978) erwähnt in diesem Zusammenhang den Einsatz mechanischer Dispergatoren und weist auf die damit verbundene Problematik hin. Das Untersuchungsergebnis wird in entscheidendem Maß von der Fähigkeit abhängen, vorhandene Zusammenballungen von Keimen aufzulösen, ohne dabei die Zellen zu zerstören.

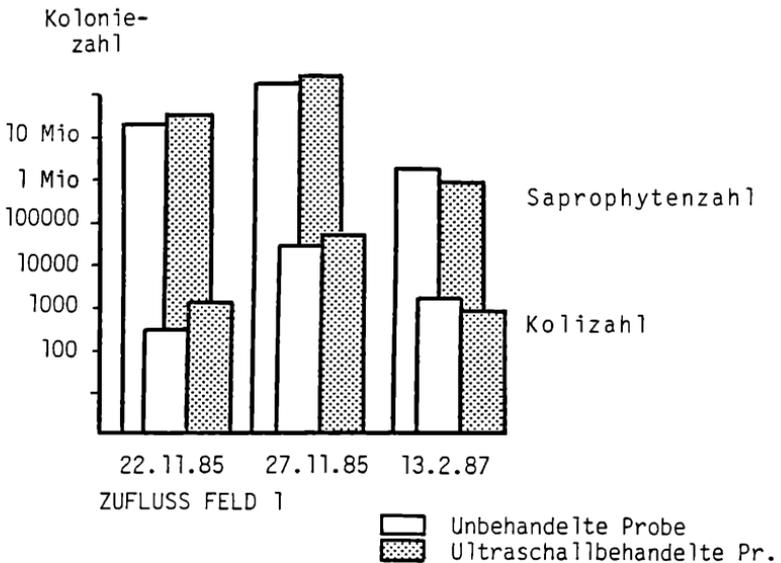
Welchen Einfluß Ultraschallbehandlungen auf die Koloniezahlen von Abwasserproben (Pflanzenkläranlage Mannersdorf/Leitha) nehmen können, soll im folgenden aufgezeigt werden.

Im Zuge der gegenständlichen Untersuchung ließ keine

*) Die Autoren danken für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der gegenständlichen Arbeit. Der Abt. Bakteriologie der Bundesanstalt für Wassergüte danken wir dafür, uns Laborgeräte für die Durchführung der Versuche zur Verfügung gestellt zu haben.

signifikante Änderung der Koloniezahl feststellen (Abb. 1) Die teilweise auftretenden Zu- und Abnahmen der Koloniezahlhöhe veranschaulichen vielmehr, daß sich die Auswirkungen einer Ultraschallbehandlung auf das Ergebnis von Abwasseruntersuchungen nicht eindeutig vorhersagen lassen.

Abb. 1:
Saprophyten- (BBL-Trypticase Soy Agar; +22°C, 48h) und
Kolzähl (Endoagar; +44,5°C, 24h) unbehandelter und ul-
traschallbehandelter Proben;
Zufluß Feld 1, Pflanzkläranlage Mannersdorf/Leitha



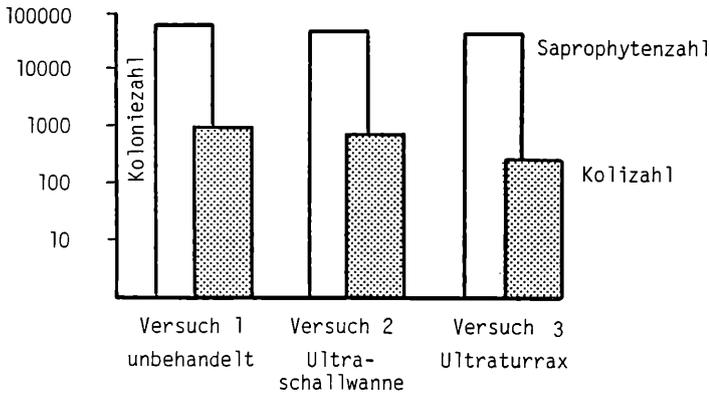
Um den statistischen Fehler zu minimieren, und somit besonders gesicherte Ergebnisse zu erzielen, wurde eine der Proben (6.5.1986; Kläranlagenablauf) besonders genau untersucht (Abb. 2 und 3; Tab. 1)

In die Beobachtung wurde unbehandeltes Probenmaterial, sowie solches Probenmaterial miteinbezogen, welches mit Ultraschall, oder 1,5 Min. lang mit dem Ultraturaxstab homogenisiert worden war. Unbehandelte Proben wurden lediglich vor dem Ansetzen von Hand aus aufgeschüttelt.

Bei Vorbehandlung der Probe mittels Ultraschall (Ultraschallwanne der Marke SONEX RK 100; HF-Leistung 80/160 W bei 35 KHz) wurden jeweils 100 ml Untersuchungsmaterial in einem Glasbehälter im Wasserbad 10 Minuten beschallt. Die genannte Zeitspanne wird auch in der Literatur (KASIMIR, 1984) als zweckmäßig angegeben. Ein Überschreiten der Beschallungsdauer ist zu vermeiden, da einerseits die Zellzertrümmerung den Homogenisierungseffekt zu überlagern beginnt, andererseits der stärkere Temperaturanstieg der Kontaktflüssigkeit ($>30^{\circ}\text{C}$) eine Kühlung der Apparatur war im gegenständlichen Fall nicht durchführbar auf die Koloniedichte Einfluß zu nehmen beginnt. Bei geringer Beschallungsdauer von nur wenigen Minuten unterblieb, wie Beobachtungen gezeigt haben, der Homogenisierungseffekt. Besonders deutlich zeigt sich dies bei Probenserien mit wechselnd hohem Detritusgehalt.

Abb. 2:

Saprophyten (BBL-Trypticase Soy Agar; +22°C, 48h) und Kolizahl (Endoagar, +44,5°C, 24h) unterschiedlich vorbehandelten Probenmaterials. Kläranlagenablauf (6.5.1986), Pflanzenkläranlage Mannersdorf/Leitha



Tab. 1:

Saprophyten- und Kolizahl unterschiedlich vorbehandelten Probenmaterials.
 Kläranlagenablauf (6.5.1986), Pflanzenkläranlage Mannersdorf/Leitha
 S. .Standardabweichung

1. Unbehandelte Probe

Saprophyten (BBL-Trypticase Soy Agar; +22°C, 48h) 63 000 Kolonien/ml (S= 8 000)
 Koli (Endoagar, +44,5°C, 24h) 942 Kolonien/ml (S= 90)

2. Ultraturax

Saprophyten (BBL-Trypticase Soy Agar; +22°C, 48h) 47 600 Kolonien/ml (S= 9 000)
 Koli (Endoagar, +44,5°C, 24h) 756 Kolonien/ml (S= 130)

3. Ultraschallwanne

Saprophyten (BBL-Trypticase Soy Agar; +22°C, 48h) 46 200 Kolonien/ml (S= 10 000)
 Koli (Endoagar, +44,5°C, 24h) 258 Kolonien/ml (S= 80)

Die oben angeführte Versuchsreihe diente dazu, die Untersuchungen unter größtmöglicher Genauigkeit durchzuführen, gleichzeitig aber praxisorientiert zu bleiben. Bei größeren Verdünnungen ergibt sich dabei zunehmend das Problem, kontaminationsfrei zu arbeiten. Darüber hinaus sollte überprüft werden, inwieweit Behandlungen des Probenmaterials mit Ultraschall geeignet sind, die Aussagekraft von Untersuchungsergebnissen zu erhöhen.

Zu diesem Zweck wurden daher mehrfache Ansätze einer Probe zur Kontrolle der Genauigkeit des Ergebnisses und des statistischen Fehlers durchgeführt. Die gegenseitige Beeinflussung wurde ausgeschlossen.

Bei den Versuchen wurden aus jeweils einer Probe zwei völlig getrennte Verdünnungsreihen angelegt und von jeder Stufe mindestens vier verschiedene Ansätze durchgeführt. Von den Auszählergebnisse wurde der Mittelwert notiert.

Das Ergebnis aus den insgesamt 20 Ansätzen je Probe und Parameter kann graphisch (Abb. 3) sehr anschaulich ausgewertet werden. Auf der Abszisse wurde die Verdünnung der Probe aufgetragen und auf der Ordinate die damit erzielte Koloniezahl. Die Schnittpunkte müßten theoretisch auf einer Geraden liegen, die die Ordinate in jenem Wert, der der Koloniezahl/ml entspricht, schneidet.

Es lassen sich deutlich zwei Arten von Fehlern unterscheiden: Der echte statistische Fehler, der sich abseits (meist rechts oberhalb) der theoretischen Verteilungsgeraden befindet. Rechts der Geraden liegende Werte bedeuten eine Verschleppung von Keimen bei der Titration oder eine externe Kontamination der Geräte, der Filter, der Nährböden oder des Aqua dest. Dies tritt naturgemäß um so stärker in Erscheinung, je höher die Verdünnungsstufe ist. Links der Geraden aufscheinende Werte entstehen durch unvollständig durchgeführte Titration.

Neben dem statistischen läßt sich auch ein systematischer Fehler erkennen: Die Werteverteilung weicht in ihrem rechten unteren Ast von der Geraden etwas nach rechts ab. Der scheinbare Wert ist daher größer als der tatsächliche.

Daraus folgt, daß der Fehler umso größer ist, je höher die Verdünnung gewählt wurde. Dieses Ergebnis stimmt gut mit Angaben in der Literatur (KOHL, 1975) überein, denen zufolge der Titerstufe besondere Aufmerksamkeit zuzuwenden ist.

Die Abweichung war bei Kolikolonien wesentlich geringer als bei den Saprophytenkolonien. Dies wahrscheinlich einerseits wegen der geringeren Verdünnung die gewählt werden mußte, andererseits aber auch wegen des selektiv wirkenden Nährbodens, der eine Kontamination seitens des Arbeitsplatzes weitgehend ausschließt.

Die Standardabweichung des obigen Versuchs lag bei 10-31% des Mittelwertes. Bei den übrigen Untersuchungen lag sie bei durchschnittlich 10-50%.

DUDLEY (1980) erzielte bei einer Ultraschallbehandlung von Klärschlamm nach einer Minute 12%, nach fünf Minuten 6,2% und nach zehn Minuten 2,8% Ausbeute an Kolonien, bei Direktansatz 100%. Eine zweiminütige Ultraturaxbehandlung ("Vortex mixing") ergab hingegen eine Ausbeute von 163%.

Die Wirkung von Ultraschall auf Mikroorganismen wird bei LAMANNA, MALLETTE und ZIMMERMANN (1973) diskutiert. Dabei halten die Autoren fest, daß die Wirkung der Beschallung weniger von der Frequenz als von der Amplitude beeinflußt wird. Geringer Energieeinsatz bewirkt noch keine dauernde Schädigung der Zellen.

JOHNSTON und GROSS (1976; zit. nach KASIMIR, 1984) beobachteten an Hand mehrerer Versuchsreihen ein Kolonienmaximum nach einer Beschallungszeit von zehn Minuten, das bei weiterer Beschallung wieder abnahm.

Teilweise läßt sich das Ansteigen der Koloniezahlen zu Beginn der Ultraschallbehandlung auf eine Vergleichmäßigung verketteter und verklumpter Organismen erklären, wobei dieser Zustand so lange anhält, "als noch keine signifikante Zahl von Organismen zerstört ist" (LAMANNA, MALLETTE und ZIMMERMANN, 1973) Das später einsetzende Absterben der Bakterienzellen ist darauf zurückzuführen, daß durch auftretende Kavitation die Zellwand aufgebrochen wird. Durch die Schwingungen der Schallwellen entstehen Gasbläschen, die sofort wieder implodieren. Dabei können lokale Drücke in der Größenordnung von 93 kN/cm^2 (60 tons/sq. inch) auftreten (LAMANNA, MALLETTE und ZIMMERMANN, 1973) Nach Meinung der genannten Autoren läßt sich die zerstörende Wirkung von Ultraschall auf Bakterien durch einige Maßnahmen verringern. Dazu zählt die Reduzierung der Kavitation durch Aufbringen eines hohen äußeren Gasdruckes, oder völlige

Entgasung des flüssigen Mediums. Ebenso setzt das Einbringen der Mikroorganismen in Flüssigkeiten mit hoher Viskosität und hoher Oberflächenspannung die Empfindlichkeit gegenüber Ultraschall herab.

Da die in der Umwelt lebenden Bakterien jedoch grundsätzlich eine stark unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Schallwellen aufweisen, zu nennen ist etwa die höhere Resistenz bei Kokken, werden allgemein gültige Aussagen zu diesem Fragenkreis erheblich erschwert.

Der Einsatz von Ultraschall zur Homogenisierung von Abwasser stößt somit auf eine Reihe schwer zu lösender Probleme. Offensichtlich kommt es zu selektiven Eingriffen in bakteriologische Anreicherungsprozesse, deren Ursache bevorzugt in der unterschiedlichen Reaktion der überaus heterogenen Biomasse zu suchen ist.

Ein "relativ einfaches", doch nicht minder schwer zu lösendes Problem stellte im gegenständlichen Fall die für den Ansatz der zahlreichen Proben benötigte, unterschiedlich lang dauernde Aufarbeitungszeit dar.

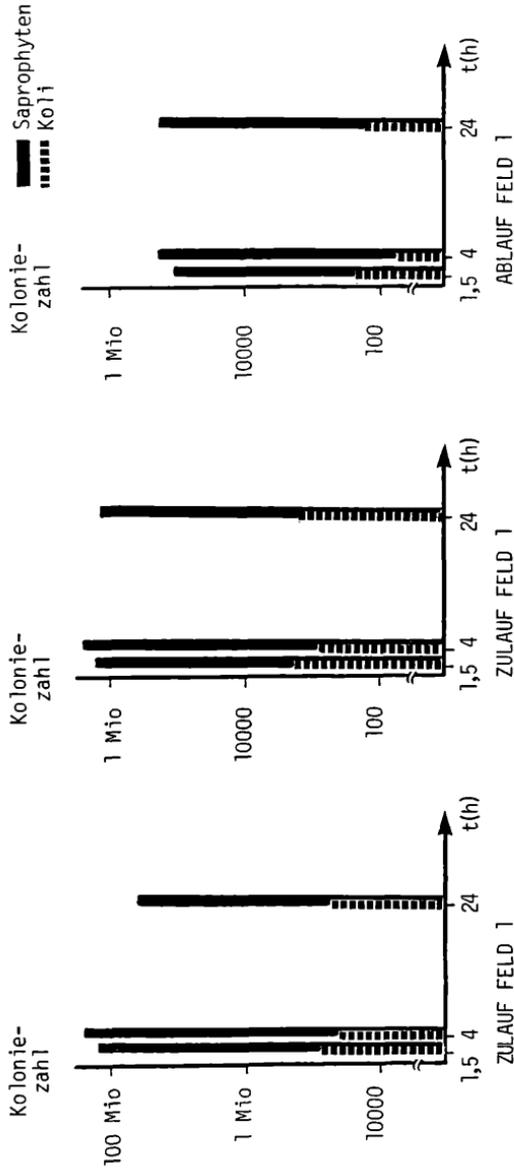
Einer Standardisierung wirkte auch die Tatsache entgegen, daß die entnommenen Abwasserproben stets einen unterschiedlich hohen Anteil an Schwebstoffen aufwiesen. Bei sehr wenig getrübbten Proben überwiegt bei einer Ultraschallbehandlung sicher die Zellertrümmerung gegenüber der Freisetzung von an Detritus gebundenen Mikroben.

Das Alter einer Probe, d.h. die Zeitspanne zwischen Entnahme und Ansatz, kann großen Einfluß auf das Untersuchungsergebnis haben. Grundsätzlich sollten Wasserproben so schnell wie möglich aufgearbeitet werden. Bei längerer Lagerung,

während des Transportes oder im Zuge von Vorbereitungsarbeiten ist mit einer Reihe selektiver Anreicherungs- und Eliminationsprozessen zu rechnen, wobei diese bereits nach Minuten, oder erst nach Stunden einsetzen können (REICHARDT, 1978). Über eine merkliche Koloniezunahme bei Saprophyten nach vier Stunden Lagerdauer berichtet PSENNER (1976). Auch KASIMIR (1984) stellte große Veränderungen, sowohl bei Saprophyten- als auch bei Kolikolonien innerhalb weniger Stunden fest. Vor allem bei stark eutrophiertem Probenmaterial kam es zu starken Zunahmen. Eine Aufbewahrung bei 22°C führte zu einer besonders auffälligen Vermehrung der Kolonien, während eine Lagerung bei nur 4°C Hemmwirkung ausübte, zumindest was die Vermehrung von Koliikeimen betraf.

Um den Einfluß der Lagerung der Probe auf die Koloniezahl zu untersuchen, wurden Proben mehrmals angesetzt, und zwar zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Entnahme. Dazwischen wurde der Probenbehälter bei ca. 6°C gelagert (Abb. 4)

Abb. 4:
Einfluß des Probenalters auf Saprophyten- und Kolizahl (schematische Darstellung)
Pflanzenkläranlage Mannersdorf/Leitha (Zu- und Ablauf, Versuchsfeld 1)



Erwartungsgemäß veränderten sich die Ergebnisse stark in Abhängigkeit vom Alter der Probe. Aufgrund der in diesen Proben extrem heterogenen Biomasse kommt es zu unkontrollierbaren selektiven Anreicherungs- und Eliminierungsprozessen. Bemerkenswert dabei ist, daß es sowohl zu deutlichen Abnahmen als auch Zunahmen der Koloniezahlen kam, und zwar bei beiden Parametern.

Bei den Saprophyten kam es innerhalb der ersten Stunden zu einer leichten Zunahme der Koloniezahl, später zu einer kontinuierlichen Abnahme. Im Abwasser finden die Saprophyten ideale Nährstoffverhältnisse vor und vermehren sich daher zunächst stark. Später kommt es bei einer Überpopulation wieder zu selektiven Eliminationsprozessen. Auch in der Bundesanstalt für Wassergüte kam man bei Routineuntersuchungen zu sehr ähnlichen Ergebnissen. (KAVKA, pers.Mitt.)

Bei den Kolikolonien zeigte sich ein genau umgekehrtes Bild. Nach einem Absinken auf etwa die Hälfte des anfangs erzielbaren Wertes stieg die Koloniezahl wieder leicht an. Inwieweit der "Kälteschock" bei der Kühlung der Probe eine Rolle spielte, oder ob die ungleichmäßige Verteilung des Keimmaterials in den jeweiligen Ansätzen zum Tragen kam, konnte nicht eindeutig eruiert werden.

Zusammenfassung

Im Rahmen einer interdisziplinären Untersuchung der Pflanzkläranlage Mannersdorf/Leitha wurden im Zeitraum von 1985 1987 mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt.

An Hand der beiden Parameter "Saprophyten" und "Koli-keime" wurde überprüft, inwieweit eine Vorbehandlung des Probenmaterials mit Ultraschall Einfluß auf das Ergebnis nehmen kann.

Im Zuge der gegenständlichen Versuchsreihen ließ sich keine signifikante Änderung der Koloniezahl feststellen (Abb.1 und 2) Die teilweise auftretenden Zu- und Abnahmen der Werte veranschaulichen vielmehr, daß sich die Auswirkungen einer Ultraschallbehandlung auf das Ergebnis von Abwasseruntersuchungen nicht eindeutig vorhersagen lassen.

Einer Standardisierung wirkte auch die, in der Natur des Abwassers begründete, Tatsache entgegen, daß die entnommenen Proben stets einen unterschiedlich hohen Anteil an Schwebstoffen enthielten. Bei sehr wenig getrübbten Proben überwiegt somit im Zuge einer Ultraschallbehandlung sicher die Zellzertrümmerung gegenüber der Freisetzung von an Detritus gebundenen Bakterien. Je länger die Zeitspanne zwischen der Probenentnahme und deren Aufarbeitung ausgedehnt wird, desto nachhaltiger werden die Untersuchungsergebnisse verändert werden.

Bei den Saprophyten kam es innerhalb der ersten Stunden zu einer leichten Zunahme der Koloniezahl, später dann zu einer kontinuierlichen Abnahme. Bei den Kolikolonien zeigte sich ein genau umgekehrtes Bild (Abb. 4)

SUMMARY

The influence of ultrasound and permanence of sample storage in connection with waste water investigations

The aim of the study was to discover the influence of ultrasound on the number of colonies of waste water samples. In general there was no clear effect (Fig. 1,2)

Once the number of colonies increased, there was no difference between the samples were treated with and without ultrasound. Probably the different densities of suspended matter in the samples, which is typically for

waste water, has caused this effect.

Depending on the permanence of the storage time, the heterotrophic bacteria showed a slight increase in the number of colonies during the first hours followed by a continuous decline. The behaviour of *E.coli* was contrary to this (Fig. 4)

Literatur

- DUDLEY, D., et al. (1980): Enumeration of Potentially Pathogenic Bacteria from Sewage Sludges.- Appl Microbiol Vol.39/1.
- KASIMIR, G. (1984): Beiträge zum Vorkommen und Nachweis von Actinomyceten in Gewässern.- Diss. an der Form-naturw. Fak., Univ. Wien.
- KOHL, W. (1975): Über die Bedeutung bakteriologischer Untersuchungen für die Beurteilung von Fließgewässern, dargestellt am Beispiel der österreichischen Donau.- Arch Hydrobiol Suppl.44, Donauforschung 5,392-461.
- LAMANNA, C., MALLETT, M.F., ZIMMERMANN, L. (1973): Basic Bacteriology. Its Biological and Chemical Background. 4th Edition, Baltimore.
- PSENNER, R. (1976): Bakterien (Gesamtkeimzahl, Biomasse, Koloniezahl, Produktion, Colikeime) im Piburger See.- Diss. an der Univ. Innsbruck.
- REICHARDT, W. (1978): Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie.- Vlg. G. Fischer, Stuttgart, New York.

Anschrift der Verfasser: Dr. Franziska ZIBUSCHKA, cand.ing. Marcus THEIL, Institut für Wasserwirtschaft, Abt. Hydrobiologie und Fischereiwirtschaft, Universität für Bodenkultur, Feistmantelstraße 4, A-1180 Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1987

Band/Volume: [1987](#)

Autor(en)/Author(s): Zibuschka Franziska, Theil M.

Artikel/Article: [Über den Einfluss von Ultraschall und Alter der Probe auf die Ergebnisse einer bakteriologischen Abwasseruntersuchung 471-485](#)