

**Wirkung von CO₂ auf Testkeime
und Beläge von RO-Membranen**

Auftraggeber: Letzner Pharmawasseraufbereitung

Ansprechpartner: Herr Letzner

Bestellung: 533

Auftragnehmer: IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser
Beratungs und Entwicklungsgesellschaft mbH
Abteilung Mikrobiologie
Moritzstr. 26
45476 Mülheim an der Ruhr

Bericht Datum: 16.11.1998

Bearbeitung: Prof. Dr. H.-C. Flemming, Dipl.-Biol. T. Griebe,
Dr. G. Schaule, Dipl.-Biol. S. Schulte

Seitenzahl: 23

Prüfbericht Nr.: 981011

Inhaltsverzeichnis

1 Auftrag	3
2 Zusammenfassung	3
3 Literaturstudie	3
3.1 BEGRIFFSDEFINITIONEN	3
3.2 DIE ROLLE VON CO ₂ ALS DESINFEKTIONS- UND KONSERVIERUNGSMITTEL	4
3.2.1 Einleitung	4
3.2.2 Zur antimikrobiellen Wirkung von CO ₂	4
3.2.3 Zur antimikrobiellen Wirkung von CO ₂ unter Druck	6
3.2.4 Anwendungsbeispiele	6
3.2.5 Sanierung von verkeimten Systemen durch CO ₂	7
3.2.6 Wachstumsstimulierende Effekte	7
3.2.7 Methoden	7
3.2.8 Einschätzung	7
4 Wirkung von CO ₂ auf Reinkulturen von Testkeimen im Batchversuch	8
4.1 MATERIAL UND METHODEN	8
4.1.1 Gesättigte CO ₂ Lösung	8
4.1.2 Mikroorganismen	8
4.1.3 Medien für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Candida albicans</i>	9
4.1.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl	9
4.1.5 Bestimmung der Koloniezahl	9
4.1.6 Vorgehensweise	10
4.2 ERGEBNISSE DER BATCH-VERSUCHE MIT REINKULTUREN	10
4.2.1 Wirkung gesättigter CO ₂ Lösung auf einen nichtmucoiden Stamm von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SG 81) in Suspension	10
4.2.2 Wirkung gesättigter CO ₂ Lösung auf einen mucoiden Stamm von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SG 81 R1) in Suspension	11
4.2.3 Wirkung gesättigter CO ₂ Lösung auf <i>Candida albicans</i> in Suspension	12
4.2.4 Wirkung gesättigter CO ₂ Lösung auf Biofilme aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid13	13
5 Wirkung von CO ₂ auf den Belag in einer Umkehrosmose-Testzelle	14
5.1 MATERIAL UND METHODEN	14
5.1.1 Anzucht von Biofilmen auf RO-Membranen	14
5.1.2 CO ₂ -Exposition der RO-Testzelle MemCell I	14
5.1.3 Probenahme und Aufarbeitung	14
5.2 ERGEBNISSE	16
6 Literatur	20

1 Auftrag

Das IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser, Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH wurde von der Fa. Letzner Pharmawasseraufbereitung beauftragt, gemäß dem Angebot vom 12.02.1998 eine Literaturstudie sowie experimentelle Untersuchungen über die Wirksamkeit von CO₂ gegenüber ausgewählten Reinkulturen und Mischkultur-Biofilmen auf Umkehrosmose-Membranen vorzunehmen.

2 Zusammenfassung

Die Literaturstudie ergab, daß nur mit einem geringen und selektiven biostatischen und bioziden Effekt von CO₂ auf Bakterien und Pilze zu rechnen ist. Über die Bekämpfung von Biofouling durch CO₂ sind keinerlei Angaben zu finden.

Batch-Versuche mit suspendierten Reinkulturen von *P. aeruginosa* (mucoid und nicht-mucoid) sowie mit *Candida albicans* zeigen geringe baktericidische bzw. bakterizide Wirkung. Bei Biofilmen ist eine Abnahme der lebensfähigen Keime um das Zehnfache zu verzeichnen. Bei der Behandlung von Biofouling-Schichten auf Umkehrosmose-Membranen ist ebenfalls eine zehnfache Abnahme der Besiedlung sowie des Anteils kultivierbarer Keime erkennbar. Unter den Versuchsbedingungen dieser Studie wirkte CO₂ jedoch auch verfestigend auf den verbliebenen Biofilm aus, sodaß der hydraulische Widerstand trotz Abnahme der Biomasse stieg.

3 Literaturstudie

3.1 Begriffsdefinitionen

Für das Verständnis der nachfolgenden Ausführungen erscheint eine Definition der Begriffe sinnvoll. Sie wurde aus Borneff und Borneff (1991)¹ übernommen.

-*Sterilisieren* ist das Abtöten bzw. das irreversible Inaktivieren aller vermehrungsfähigen Mikroorganismen

-*Desinfizieren* ist das Abtöten bzw. irreversible Inaktivieren aller Erreger übertragbarer Infektionskrankheiten.

-*Desinfektion* ist die gezielte Entkeimung mit dem Zweck, die Übertragung bestimmter, unerwünschter Mikroorganismen durch Eingriff in deren Struktur oder Stoffwechsel unabhängig von ihrem Funktionszustand zu verhindern.

¹ Hygiene: Ein Leitfaden für Studenten und Ärzte. 5. Aufl.- Thieme Verlag, 1991, Joachim Borneff und Marianne Borneff

-Zur Kennzeichnung des Wirkungsgrades von Chemikalien versteht man einige Begriffe mit der Endung „-zid“, (so germizid, fungizid, bakterizid, viruzid usw.), wenn ein abtötender bzw. inaktivierender Effekt einer Substanz oder eines Verfahrens gemeint ist; mit „-statisch“, (bakteriostatisch, funigistatisch usw.) wird die wachstumshemmende Wirkung charakterisiert.

3.2 Die Rolle von CO₂ als Desinfektions- und Konservierungsmittel

3.2.1 Einleitung

CO₂ ist ein Gas mit dem Molekulargewicht 44,21; es ist nicht brennbar und besitzt sauren Geruch und Geschmack. Bei Raumtemperatur löst sich ca 1 Liter L⁻¹. Häufig wird es als verflüssigtes Gas verwendet. Festes CO₂ (Trockeneis) wird als Kühlmittel eingesetzt.

Wenn die CO₂-Konzentration in der Atemluft 20% (v/v) erreicht, führt es rasch zum Tod von Tieren und Menschen. Das längere Einatmen von Konzentrationen über 10% kann gesundheitsschädlich sein (Block, 1991).

In der vorliegenden Studie wird untersucht, inwieweit CO₂ möglicherweise das Potential besitzt, in größerem Umfang für die Verhinderung bzw. Sanierung von Verkeimungen in Wassersystemen eingesetzt zu werden.

3.2.2 Zur antimikrobiellen Wirkung von CO₂

Die antimikrobielle Wirkung von CO₂ beruht auf mehreren Faktoren. Zum einen verdrängt es Sauerstoff, der für aerobe Organismen essentiell ist. Damit greift es in die Atmungskette verschiedener Arten von Mikroorganismen ein. Wenn es in höheren Konzentrationen angewandt wird, senkt es den pH-Wert indem sich nach Gleichung [1] Kohlensäure bildet:



Welche Spezies des CO₂ - also Bicarbonat, Carbonat oder gelöstes CO₂ - tatsächlich eine Inhibition verursacht, ist noch ungeklärt (McIntyre u. McNeil, 1997 a).

Ein wesentlicher Anteil des Effektes wird der pH-Absenkung zugeschrieben (Block, 1991; Santruckova u. Simek, 1997). Die antimikrobielle Wirkung ist jedoch bei weitem nicht so stark wie bei anderen bekannten Bioziden, z.B. Chlor, Ozon oder Wasserstoffperoxid und besteht eher in einer Inhibierung des Wachstums als auf nachhaltig toxischen Einflüssen (Block, 1991).

Die Wirkung hängt, wie bei allen Bioziden, von der Einwirkungszeit, der Konzentration, dem Druck und der Einwirkungstemperatur ab. Der Effekt manifestiert sich in einer verlängerten lag-Phase sowohl bei Pilzen als auch bei Bakterien (Ogilvy u. Ayres, 1951). Eine "Gewöhnung" der Mikroorganismen in Form einer Adaptation an CO₂ wird nicht beobachtet. Das drückt sich darin aus, daß die Wachstumsraten bei längerer Anwesenheit von CO₂ sich

nicht verändert; es gibt keine Selektion für Organismen, die höhere Konzentrationen an CO₂ tolerieren können (Block, 1991).

Wie nicht anders zu erwarten, unterdrückt CO₂ die Atmung aerober Organismen (MacFadyen, 1973; Nakadai et al., 1993). Eindeutig scheint nachgewiesen zu sein, daß es als metabolischer Regulator im Sinne einer Endprodukt-Hemmung wirkt (Dainty, 1971; Swanson u. Ogg, 1969; Foster u. Davis, 1948). Ein weiterer Wirkungsweg dürfte sein, daß decarboxylierende Enzyme durch die Anwesenheit hoher Carbonat-Konzentrationen gehemmt werden, so daß ihre Aktivität geschwindigkeitsbestimmend wird (King u. Nagel, 1975). Die Aktivität von Isocitrat- und Malat-Dehydrogenase wird durch CO₂ ebenfalls abgesenkt (Harary et al., 1953). Auch eine spezifische Wirkung auf einzelne Enzyme ist denkbar. Foster u. Davis (1949) stellten fest, daß CO₂ die Aktivität der Oxalacetat-Decarboxylase bei *P. aeruginosa* nicht beeinflusste, während bei *Rhizopus nigricans* eine deutliche Hemmung zu erkennen war. Die Hemmung einzelner Enzyme durch CO₂ könnte zu einer Akkumulation von Metaboliten oder Speicherstoffen führen; dies wurde von King u. Nagel (1975) untersucht, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (King u. Nagel, 1975), im Gegensatz zu sehr viel früheren Befunden von Eidsen (1938) bei *E. coli*, wo eine Veränderung der Enzymreaktionen und die Akkumulation bestimmter Metaboliten in Bakterien, speziell von Succinat bei zunehmender CO₂-Konzentration in der Atmosphäre.

King u. Nagel (1975) fanden bei *P. aeruginosa* durch Einwirkung von CO₂ eine deutliche Wachstumshemmung, die sich in einer Abnahme der Aktivität von Isocitrat- und Malat-Dehydrogenase niederschlägt; sie beginnt aber erst bei einer Konzentration von mehr als 50 % CO₂ (v/v) in der Atmosphäre. Bei verschiedenen Arten von Bakterien ist seine Wirkung unterschiedlich. Die Gattungen *Pseudomonas*, *Achromobacter* und *E. coli* sind verhältnismäßig sensitiv (Repaske u. Clayton, 1978; Lacoursiere et al., 1986), während milchsäurebildende Bakterien und Clostridien recht resistent sind (King u. Nagel, 1975; Gill u. Tan, 1979). Konzentrationen von 100 % CO₂ töten Stämme von *Bacillus*, *Flavobacterium* und *Micrococcus* ab, während Stämme von *Proteus*, *Lactobacillus* und *Clostridium perfringens* nur inhibiert werden (Parekh u. Solberg, 1970). Beim Wachstum von *Pseudomonas putida* in einer Atmosphäre von 40 % CO₂ kommt es zu einer Verlangsamung des Wachstums und zur bevorzugten Nutzung von Glucose als Substrat (Enfors u. Molin, 1980; Molin, 1985), d.h., die Präferenz von Nährstoffen wird in Anwesenheit von CO₂ verändert.

Bei Aflatoxin-bildenden Pilzen wurde beobachtet, daß mit Zunahme der Konzentration von 10 bis 90 % in der Gasphase entsprechend weniger Toxin produziert wird (Sanders et al., 1968; Shih u. Marth, 1973). Einige Pilze scheinen überaus resistent gegenüber CO₂ zu sein (Block, 1991). Auch viele Hefen sind wenig empfindlich gegenüber CO₂; erst ab einer Konzentration von 40 % (v/v) wird ihr Wachstum allmählich gehemmt (Chen u. Gutmanis, 1976). Die Auskeimung und Sporulation von *Neurospora sitophila* konnte hingegen durch CO₂ bereits in niedrigeren Konzentrationen unterdrückt werden (Ramirez, 1974).

Bei der Untersuchung der Wirkung von CO₂ auf die biologische Aktivität im Boden wurde beobachtet, daß im Bereich einer CO₂-Konzentration zwischen 0,05 und 5 % (v/v) eine Verlangsamung der Atmung der Boden-Mikroflora auftrat und die Mineralisierung von Glucose verlangsamt wurde (Santruckova u. Simek, 1997).

3.2.3 Zur antimikrobiellen Wirkung von CO₂ unter Druck

Kohlendioxid wirkt unter normalen Bedingungen nur schwach keimhemmend. In Lösung bei 1 bar und pH 3 werden *Escherichia coli*, Salmonellen spp. und Shigellen spp. nicht abgetötet (Wallhäußer, 1988). Stahl et al. (1985) benutzten eine Kohlendioxid-Druckbehandlung (PEX-[=Pressure-Expansion]-Verfahren) bei 50 bar über 20 min (im Autoklaven) zur Entwesung von Drogen, wobei Eier, Schadinsekten und Laven abgetötet wurden. Nach Memtrup et al (1986) lassen sich die in einem Polyethylenschlauch eingeschweißten Sporen von *Bac. subtilis*, *Bac. stearothermophilus* sowie Klebsiellen in einer thermostatisierbaren Druckkammer bei 60 °C und einem Druck von 200 bis 300 bar bei einer Einwirkungszeit von 7 Stunden abtöten.

3.2.4 Anwendungsbeispiele

CO₂ ist seit langem als Konservierungsmittel für die Aufbewahrung von Lebensmitteln bekannt. Beobachtungen aus der Praxis zeigen, daß Kohlendioxid ein Potential besitzt, das Wachstum von Mikroorganismen zu hemmen. Das ist einer der Gründe, warum zum Beispiel bei der Lagerung von Trinkwasser-Vorräten CO₂ zugesetzt wird, was zu einer längeren Einhaltung mikrobiologischer Grenzwerte führt (Klein, Stadtwerke Zürich, pers. Mitt.). Als Inhibitor für mikrobielles Wachstum wird CO₂ vor allem für Erfrischungsgetränke, Mineralwasser, bestimmte Weinsorten, Bier und Ale zugesetzt. Es verlängert auch die Haltbarkeit von gelagerter Milch (Block, 1991). Bei erhöhtem Zuckergehalt nimmt der biostatische Effekt von CO₂ jedoch ab (Insalata, 1952).

CO₂ wurde verwendet, um mikrobiell verursachtes Verderben von Lebensmitteln, z.B. Fleisch und Fleischprodukte (Baran et al., 1970; Clark u. Lentz, 1973; Adams u. Huffman, 1972), Geflügel, Fisch, Eier (Brooks u. Taylor, 1955), Früchte (Littlefield et al., 1966), Gemüse (Singh et al., 1972) während der Kühlung zu verhindern (Block, 1991). Bei kaltgeräuchertem Lachs konnte das Wachstum von *Listeria monocytogenes* in einer Atmosphäre von 100 % CO₂ vollständig inhibiert werden (Nilsson et al., 1997). Generell hemmen CO₂-Konzentrationen zwischen 5 und 50 % empfindliche Hefen, Pilze und Bakterien (Hales, 1962, Smith, 1963). CO₂ wird vakuumverpacktem Fleisch zugesetzt, weil es das Wachstum aerober Keime hemmt. Allerdings wird das Wachstum von Lactobacillen dadurch gefördert (Block, 1991). Die CO₂-Konzentration beträgt bei solchen Anwendungen 10-20% (v/v), weil bei höheren Gehalten unerwünschte Gerüche und Verfärbungen entstehen (Smith, 1963).

Die Wirkung von CO₂ als auf *Aspergillus niger* wurde sowohl in Oberflächenkulturen (Al-Rawi, 1982) als auch in Suspensionen (Gill u. Tan, 1979) untersucht. Sie scheint jedoch relativ gering zu sein (McIntyre u. McNeil, 1997).

3.2.5 Sanierung von verkeimten Systemen durch CO₂

Es konnten keinerlei Arbeiten gefunden werden, bei denen die Sanierung von verkeimten Systemen durch die Anwendung von CO₂ durchgeführt wurde.

3.2.6 Wachstumsstimulierende Effekte

CO₂ muß nicht in jedem Fall das Wachstum von Mikroorganismen hemmen, sondern es kann auch fördernd wirken. Ein Beispiel ist sein stimulierender Effekt auf die Auskeimung der Sporen von *Clostridium botulinum* (Block, 1991). Dieser Keim ist aufgrund seiner starken Toxine gerade für Lebensmittel besonders gefährlich.

3.2.7 Methoden

Für zahlreiche Untersuchungen wurde *Pseudomonas aeruginosa* als Testorganismus gewählt, weil dieser Keim häufig mit verdorbenen Lebensmitteln in Zusammenhang gebracht wird, z.B. bei Eiern (Brooks u. Taylor, 1955), Fleisch (Adams u. Huffman, 1972; Clark u. Lentz, 1973) und Gemüse (Splittstößer, 1970) und versucht wurde, sein Wachstum durch CO₂ zu verhindern. *P. aeruginosa* wurde auch in der vorliegenden Studie als Testkeim verwendet.

Prinzipiell lassen sich zwei Versuchssysteme unterscheiden:

- a) Suspensionsreaktoren, in die das CO₂ eingeblasen wird, wobei die Konzentration in der Gasphase eingestellt werden kann (z.B.: Molin, 1985; McIntyre u. McNeil, 1997 a,b; Repate u. Clayton, 1997; Lacoursière et al., 1986; King u. Nagel, 1975),
- b) Wachstum auf fester Matrix, z.B. Boden (Santruckova u. Simek, 1997; Nilsson et al., 1997).

3.2.8 Einschätzung

Nach den vorliegenden Informationen aus der Literatur ist davon auszugehen, daß der biozide Effekt von CO₂ als schwach anzusehen ist, daß aber für bestimmte Organismen ein biostatischer Effekt erwartet werden kann. Über Sanierungswirkungen läßt sich aus der Datenlage keinerlei Schluß ziehen.

4 Wirkung von CO₂ auf Reinkulturen von Testkeimen im Batchversuch

Untersuchung der wachstumshemmenden bzw. keimtötende Wirkung von CO₂ (gesättigte Lösung) auf 3 Testkeime (2 gram negative: ein mucoider und ein nicht mucoider Stamm von Pseudomonas aeruginosa) zur Erfassung der Schutzwirkung von Schleimen und als Repräsentant für Pilze: Candida spp..

Die Wirkung der gesättigten CO₂ Lösung wurde in Batchversuchen an planktonischen wie auch an sessilen Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* und an planktonischen *Candida albicans* getestet.

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Gesättigte CO₂ Lösung

Als gesättigte CO₂ Lösung wurde Mineralwasser eingesetzt. Der pH Wert betrug 5,0 und die Leitfähigkeit 990 µS cm⁻¹. Die Koloniezahl auf R2A-Nähragar (Reasoner u. Geldreich, 1985), der in allen Versuchen durchgängig als Nähragar verwendet wurde, betrug 29 KBE 500 mL⁻¹, also < 0,05 KBE mL⁻¹. Damit sind die im Mineralwasser vorhandenen Keime zu vernachlässigen.

Als Kontrolle wurde entgastes Mineralwasser eingesetzt. Die Entgasung erfolgte durch Anlegen von Vakuum über mehrere Stunden.

Die Zusammensetzung des Mineralwassers ist dem Etikett entnommen wie folgt:

Natrium	80 mg/L
Calcium	118 mg/L
Magnesium	31 mg/L
Kalium	3,5 mg/L
Chlorid	120 mg/L
Sulfat	94,2 mg/L
Fluorid	0,5 mg/L
Hydr. Carb.	396 mg/L

4.1.2 Mikroorganismen

Für die Versuche wurden die Bakterienstämme *Pseudomonas aeruginosa* SG 81 (mucoide Revertante), *Ps. aeruginosa* SG 81 RJ (nicht mucoide Revertante) und die Hefe *Candida albicans* ausgewählt. Die Auswahl erfolgte unter Berücksichtigung der Schutzwirkung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die bei Anwendung von Bioziden

beobachtet wird (LeChevallier et al., 1988); die Verwendung mucoider und nichtmucoider Stämme, die ansonsten isogen sind, erlaubt eine selektive Variation des Parameters EPS.

Der Anzucht erfolgte auf R2A-Nähragar bei 36 °C über 48 Stunden. *Candida albicans* wurde auf Malzextrakt Nähragar angezüchtet. Zur Herstellung einer Keimsuspension wurden die Kolonien von dem Nähragar abgeschabt und in steriler Pufferlösung suspendiert.

Der Nachweis von Wachstums erfolgte durch Bestimmung der Koloniezahl mit dem Oberflächenausplattierungsverfahren auf R2A-Nähragar. Die Bebrütungstemperatur betrug 36 °C. Die Kolonien wurden bei 6-facher Lupenvergrößerung nach 24 und 48 Stunden bei *P. aeruginosa* ausgezählt. Bei *Candida albicans* und Mischpopulationen wurde 7 Tage bebrütet.

4.1.3 Medien für *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*

Für *Pseudomonas aeruginosa* wurde R2A-Nähragar entsprechend den American Standard Methods eingesetzt. Für *Candida albicans* wurde Malzextrakt Nähragar verwendet. Die Bebrütungstemperatur betrug 30 °C.

4.1.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI markiert und mittels Epifluoreszenzmikroskop ausgezählt (Hobbie et al., 1977). Ein Aliquot einer Wasserprobe wurde mit Formalinlösung versetzt (2 % Endkonz.), falls nötig im Ultraschallbad (3-5 min) homogenisiert und dann über einen schwarzen Polycarbonat-Membranfilter (0,2 µm Porengröße, 25 mm Durchmesser) filtriert. Der Filter wurde mit ca. 1 ml DAPI-Lösung (10 µg/ml) überschichtet. Nach 10 - 15 Minuten wird die Lösung abgesaugt und das Filter luftgetrocknet. Die Gesamtzellzahl auf der Membranoberfläche wurde mittels Epifluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Membranfilter wurden 20 Mikrometernetze (100 µm²) oder mindestens 600 Zellen bei 1000facher Vergrößerung ausgezählt. Im Regelfall wurden zwei Membranfilter pro Probe hergestellt, ausgezählt und aus den Ergebnissen der Mittelwert bestimmt.

4.1.5 Bestimmung der Koloniezahl

Aus den hergestellten Suspensionen bzw. den Wasserproben und deren Verdünnungen wurden die Koloniezahl bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Oberflächenverfahrens auf R2A-Nähragarplatten und Bebrütung der Agarplatten für 1-2 Tage bei *Pseudomonas aeruginosa* sowie 7 Tage bei Mischpopulationen bei 36 °C. Die Auszählung der Kolonien erfolgte bei 6,5facher Vergrößerung mit dem Stereomikroskop.

Die Hefen wurden auf Malzextrakt Nährböden bei 30 °C über 7 Tage angezüchtet.

4.1.6 Vorgehensweise

Test mit planktonischen Zellen	Test mit sessilen Zellen (Biofilm)
<p>Anzucht auf Nähragar</p> <p>Herstellen einer Keimsuspension</p> <p>Zugabe eines Aliquotes der Keimsuspension zu den Testlösungen</p> <p>Endkonzentration ca. 2×10^6 Zellen/mL</p>	<p>Anzucht der Bakterien im Drehkolbenreaktor</p> <p>Ausbildung eines Biofilms auf Edelstahlcoupons über einen Zeitraum von 14 Tagen unter Zugabe von Medium</p>
<p>Ermittlung der Koloniezahl und Gesamtzellzahl in einem Milliliter Probe vor der Exposition</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Ermittlung der Koloniezahl und Gesamtzellzahl im Biofilm vor der Exposition</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <p>24 Stunden Exposition bei 20 °C</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Entnahme von 4 Coupons</p> <p>Exposition von 2 Coupons in CO₂ haltigem und CO₂ freiem Wasser</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<p>Ermittlung der Koloniezahl und Gesamtzellzahl</p>	<p>24 Stunden Exposition bei 20 °C Wasser</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Ermittlung der Koloniezahl und Gesamtzellzahl im Biofilms und in der Wasserprobe</p>

4.2 Ergebnisse der Batch-Versuche mit Reinkulturen

4.2.1 Wirkung gesättigter CO₂ Lösung auf einen nichtmucoiden Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* (SG 81) in Suspension

Die suspendierten Bakterien wurden 24 Stunden mit und ohne CO₂ inkubiert. Vor Exposition bildeten in beiden Ansätzen 90% bis 100% der Zellen Kolonien. Durch die Exposition der Zellen in gesättigter CO₂ Lösung verringerte sich die Gesamtzellzahl um ca. 50%, die Gesamtzellzahl im Kontrollansatz nahm nicht ab. Die Koloniezahl betrug nach 24

Stunden in CO₂ Lösung noch 15% der ursprünglichen Koloniezahl und nur 30% von der Gesamtzellzahl bildeten Kolonien. Ein geringer bakteriostatischer Effekt war gegeben.

In Tabelle 1 sind diese Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 1 : Gesamtzellzahl und Koloniezahl vor und nach Exposition (24 Stunden bei 20°C) von *P. aeruginosa* SG 81 in gesättigter CO₂-Lösung und Kontrolle ohne CO₂

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> nicht mucoid (<i>Ps. aerug.</i> SG 81); planktonisch				
	ohne CO ₂		mit CO ₂	
Gesamtzellzahl	vor Exposition	nach Exposition	vor Exposition	nach Exposition
	1- 5 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶	1- 5 x 10 ⁶	7,3 x 10 ⁵
Koloniezahl	vor Exposition	nach Exposition	vor Exposition	nach Exposition
	1,7 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵

4.2.2 Wirkung gesättigter CO₂ Lösung auf einen mucoiden Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* (SG 81 RI) in Suspension

Die Gesamtzellzahl war vor und nach der Exposition in allen Ansätzen gleich groß. Vor der Exposition war die Koloniezahl geringfügig höher als die Gesamtzellzahl. Dies ist mit einer Minderbestimmung bei der mikroskopischen Auszählung zu erklären, die dann auftritt, wenn die Bakterien sich auf dem auszählenden Filter überlagern. Es ist wie bei der nicht mucoiden Revertante (4.1) davon auszugehen, dass 100% der Bakterien Kolonien bilden konnten. Nach Exposition war die Koloniezahl in beiden Ansätzen auch dem Kontrollansatz geringer, von 26, die vorher Kolonien bilden konnten, waren es danach noch 18. Eine hemmende Wirkung war geringfügig zu erkennen.

Die Ergebnisse der Gesamtzellzahl- und Koloniezahlbestimmung sind in Tabelle 2 dargelegt.

Interessanterweise waren nach 29 Tagen Exposition noch Bakterien in den Ansätzen kultivierbar. Im Ansatz mit CO₂ von 2,61 x 10⁵ Bakterien/mL noch 4,65 x 10⁵ Bakterien/mL, im Ansatz ohne CO₂ von 2,61 x 10⁵ Bakterien/mL noch 6,1 x 10⁴ Bakterien/mL (Tabelle 2). Hier war der bakteriostatische Effekt von CO₂ zu erkennen.

Tabelle 2 : Gesamtzellzahl und Koloniezahl vor und nach Exposition (24 Stunden bei 20°C) von *Pseudomonas aeruginosa* (SG 81 RI) in gesättigter CO₂ Lösung

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid (Ps. aerug. SG 81 RI); planktonisch				
	ohne CO ₂		mit CO ₂	
Gesamtzellzahl	vor Exposition	nach Exposition	vor Exposition	nach Exposition
	1,33 x 10 ⁵	2,96 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	2,26 x 10 ⁶
nach 29 Tagen		7,00 x 10 ⁶ ***		1,6 x 10 ⁶ ***
Koloniezahl	vor Exposition	nach Exposition	vor Exposition	nach Exposition
	2,61 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	2,61 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶
nach 29 Tagen		4,65 x 10 ⁵		6,1 x 10 ⁴

4.2.3 Wirkung gesättigter CO₂ Lösung auf *Candida albicans* in Suspension

Die Gesamtzellzahl war in beiden Ansätzen nach Exposition geringfügig niedriger als vor der Exposition. Die Anzahl der koloniebildenden Hefen war nach 24 Stunden Exposition in beiden Ansätzen gleich groß. Nach Exposition in CO₂ waren 100 % aller Hefen in der Lage, Kolonien zu bilden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargelegt.

Gegenüber *Candida albicans* läßt sich im Suspensionsversuch kein Effekt des CO₂ erkennen

Tabelle 3: Gesamtzellzahl und Koloniezahl vor und nach Exposition (24 Stunden bei 20°C) von *Candida albicans* in gesättigter CO₂ Lösung

<i>Candida albicans</i> , planktonisch				
	ohne CO ₂		mit CO ₂	
Gesamtzellzahl	vor Exposition	nach Exposition	vor Exposition	nach Exposition
	9,9 x 10 ⁶	7,8 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁶	5,2 x 10 ⁶
Koloniezahl	vor Exposition	nach Exposition	vor Exposition	nach Exposition
	>6,2 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁵	>6,3 x 10 ⁵	5,3 x 10 ⁵

4.2.4 Wirkung gesättigter CO₂ Lösung auf Biofilme aus *Pseudomonas aeruginosa* mucoid

Nach 14 Tagen Anzucht eines Biofilms aus *Ps. aeruginosa* mucoid (SG 81 Ri) im Drehkolbenreaktor wurden vier Coupons entnommen. Auf einem der Coupons wurde die Gesamtzellzahl und die Koloniezahl bestimmt. Die Gesamtzellzahl betrug 5×10^6 Bakterien/cm². Davon waren mit $9,85 \times 10^3$ KBE/cm², d.h. 0,2 % der Zellen konnten noch Kolonien bilden.

Die anderen Coupons wurden für 24 Stunden in den Testlösungen (CO₂-haltiges und CO₂-freies Wasser) bei 20 °C exponiert. Danach wurden sie entnommen, der Biofilm abgeschabt, in einem definierten Volumen an sterilem Wasser suspendiert und die Gesamtzellzahl sowie die Koloniezahl der Suspension ermittelt. Diese wurde auf die Fläche umgerechnet. Folgende Werte wurden ermittelt:

Vor Einwirkung von CO ₂ -haltigem Wasser:	$5,00 \times 10^6$ Zellen cm ⁻²
Nach Einwirkung von CO ₂ -haltigem Wasser:	$2,18 \times 10^8$ Zellen cm ⁻²
davon Kolonien bildende Zellen	$1,70 \times 10^3$ KBE cm ⁻²
Kontrolle (ohne CO ₂)	$2,65 \times 10^6$ Zellen cm ⁻²
davon Konien bildende Zellen	$1,00 \times 10^4$ KBE cm ⁻²

Daraus ergibt sich, daß ca. 50 % der anhaftenden Zellen abgelöst wurden. Die Einwirkung des CO₂ führte zu einer Verminderung der Kolonien bildenden Zellen um eine Zehnerpotenz gegenüber der Kontrolle. Dies deutet auf einen bakteriziden Effekt hin.

5 Wirkung von CO₂ auf den Belag in einer Umkehrosmose-Testzelle

Um die Effektivität einer CO₂-Behandlung zur Sanierung von Umkehrosmose-Membranen bei Biofouling zu untersuchen, wurden zwei RO-Testzellen (Typ MemCell, Konstruktion Rautenbach) mit Ruhrwasser beaufschlagt. Eine der Zellen wurde mit CO₂ begast und die flächenbezogenen Zellzahlen mit der unbegasteten Kontrolle verglichen. Als Membranmaterial wurde Polyamid (FT 30 BW) eingesetzt.

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Anzucht von Biofilmen auf RO-Membranen

Für die Anzucht von Biofilmen auf RO-Membranen wurden die RO-Zellen mit natürlichen Mischpopulationen hier Ruhrwasser betrieben. Die Vorratsbehälter der RO-Testzellen, welche 2 Liter fassen, wurden bei Versuchsbeginn jeweils mit 2 Liter Wasser aus der Ruhr für zwei Stunden im Kreislauf bei 15 bar bei 22 °C und einem Überströmungsvolumen von 80 L/h betrieben, um eine Primärbesiedlung der RO-Membranen zu bewirken. Anschließend wurde das Wasser aus den Vorratsbehältern entnommen und Nährmedium (Nutrient-Broth) in 50facher Verdünnung zugegeben. Das Medium aus den Vorratsbehältern wurde täglich ausgewechselt. Als Betriebsparameter zur Erkennung der Auswirkung des Biofilms auf den Wirkungsgrad der Anlage wurde der Permeatfluß gemessen.

5.1.2 CO₂-Exposition der RO-Testzelle MemCell I

Nach fünftägiger Anzucht von Biofilmen wurde CO₂ über eine Gasflasche in die RO-Testzelle MemCell I geleitet. Zu diesem Zweck wurde es in den Zulauf geleitet und die Ventile von Bypass bzw. Permeat geschlossen. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Vor und nach der CO₂-Zugabe (4 bar) über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde die Permeatmenge in den RO-Testzellen gemessen.

5.1.3 Probenahme und Aufarbeitung

Der Druck in den RO-Testzellen wurde vor der Probenahme langsam heruntergefahren, d.h. sowohl Druck als auch Überströmung wurden über die Ventile langsam erniedrigt, um eine ungewollte Ablösung des Biofilms durch Druckstöße zu vermeiden. Die RO-Membranen mit dem Biofilm (Abbildung 1) wurden nach der Entnahme in ein steriles Gefäß überführt. Der Belag wurde mit einem sterilen Skalpell abgeschabt. Der abgeschabte Biofilm wurde in steril filtriertes Leitungswasser suspendiert und für 5 min bei 900 U_{pm} im Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden von mehreren Verdünnungen die

Koloniezahl auf R2A-Medium und die Gesamtzellzahl mit dem Epifluoreszenzmikroskop bestimmt.

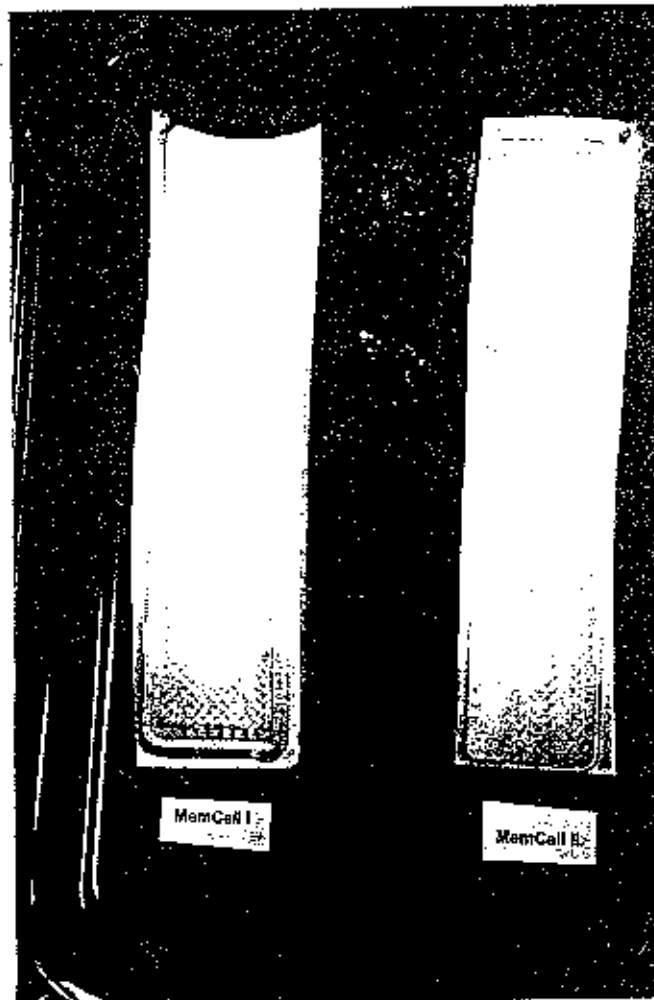


Abbildung 1: RO-Membran aus der Testzelle mit Biofilm

5.2 Ergebnisse

Als Betriebsparameter der RO-Testanlagen wurde die Permeatmenge täglich einmal während der Versuchszeit bestimmt. Die Einfahrphase der RO-Membranen (FT 30 BW) für die Kompaktierung der Kompositmembran war nach ca. 24 h Betriebszeit abgeschlossen. Danach erfolgte mit zunehmender Versuchsdauer eine lineare Abnahme der Permeatleistung in beiden Anlagen (Abbildung 2).

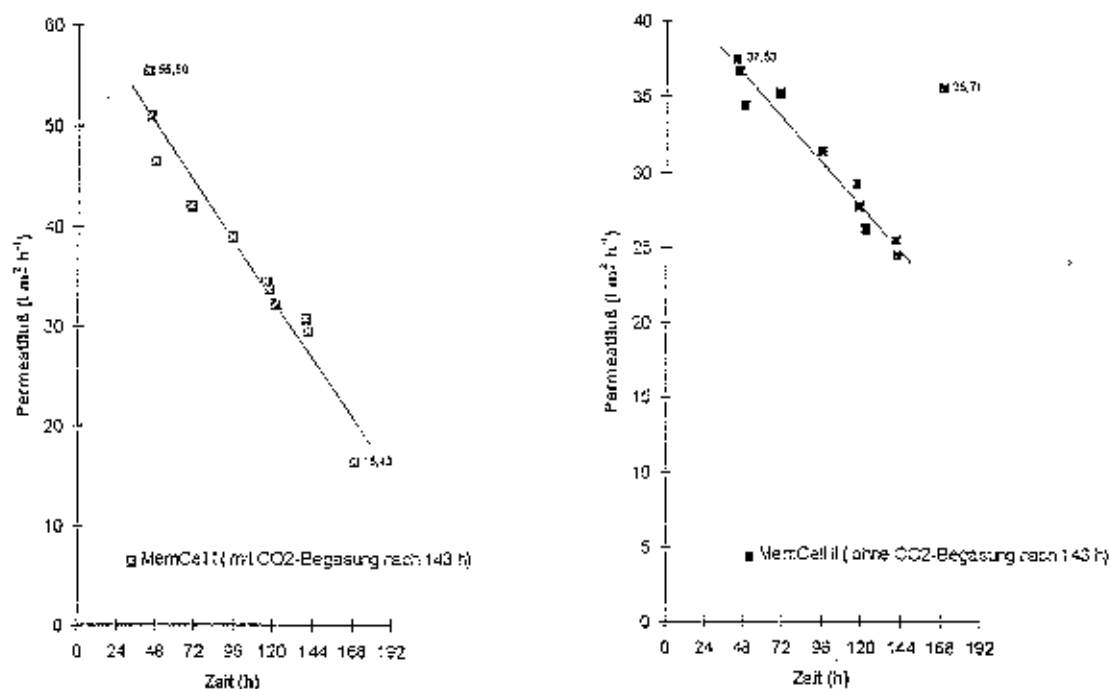


Abbildung 2: Veränderung der Permeatleistung während der Betriebszeit. Nach 143 Stunden wurde die Anlage MemCell I mit CO₂ für 24 h begast (linke Abbildung). Die Kontroll-Anlage MemCell II wurde nicht mit CO₂ begast (rechte Abbildung)

In der Anlage MemCell I nahm die Permeatleistung von 55,5 L m⁻² h⁻¹ auf 29,5 L m⁻² h⁻¹ innerhalb von fünf Tagen ab. Dies entspricht einer prozentualen Abnahme der Separationsleistung von 47 %. In der Anlage MemCell II nahm im gleichen Zeitraum die Permeatleistung von 37,5 L m⁻² h⁻¹ auf 24,5 L m⁻² h⁻¹ ab. Dies entspricht einer prozentualen Abnahme der Separationsleistung von 35 %. Diese starke Verminderung der Permeatmenge erfolgte mit zunehmender Belagsbildung auf den RO-Membranen und war als bewußte Induzierung von Biofouling durch den Zusatz von Nährstoffen im Wasser herbeigeführt worden.

Nach einer Gesamtversuchszeit von 143 Stunden wurden die Anlagen MemCell I und II langsam runtergefahren und die MemCell I absprachegemäß mit CO₂ für 24 bei 4 bar

exponiert. Der pH Wert im Konzentrat lag bei Versuchsende zwischen 5 bis 6. Im Konzentrat der Kontroll-Anlage ohne CO₂ -Exposition lag der pH Wert bei 7. Die Permeatmenge wurde nach einer zweistündigen Einfahrphase von beiden Anlagen bestimmt. Es zeigte sich, dass bei der mit CO₂ begasten Anlage ein starker Permeatverlust auftrat (16,43 L m⁻² h⁻¹). Demgegenüber nahm die Permeatmenge in dem Kontrollversuch ohne CO₂ Begasung deutlich zu und erreichte mit 35,71 L m⁻² h⁻¹ ca. 95 % der Ausgangsleistung. *Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die CO₂-Begasung insgesamt zu einer Verschlechterung der Leistung führte* (

Tabelle 4).

Tabelle 4: Veränderung der Permeatleistung während der Betriebszeit. Nach 143 Stunden wurde die Anlage MemCell I mit CO₂ für 24 h bei 4 bar inkubiert

Zeit (h)	Anlage MemCell I L m ⁻² h ⁻¹	Anlage MemCell II L m ⁻² h ⁻¹
19,75	43,50	55,50
24,16	42,75	46,50
43,25	55,50	37,50
44,75	51,00	36,75
48,00	46,50	34,50
69,50	42,00	35,25
95,00	39,00	31,50
115,80	34,50	29,25
117,30	33,75	27,75
121,25	32,25	26,25
139,30	30,75	25,50
140,50	29,50	24,50
168,25	16,43	35,71

Nach der 24 stündigen CO₂-Begasung wurden die RO-Membranen aus den beiden Anlagen entnommen und der Belag auf Kolonien bildende Bakterien und Gesamtzellzahl untersucht. Die Koloniezahl auf der RO-Membran nach der CO₂-Begasung war mit $(2,4 \pm 0,4) \cdot 10^3$ Zellen cm⁻² deutlich niedriger als auf der RO-Membran ohne Begasung mit $(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^3$ Zellen cm⁻² (Abbildung 3). Die Gesamtzellzahl, d.h. sowohl lebende als auch tote Bakterien, war auf der RO-Membran nach der CO₂-Begasung mit $(8,38 \pm 2,3) \cdot 10^7$ Zellen cm⁻² geringfügig niedriger als auf der Kontroll-Membran ohne CO₂-Begasung mit $(1,5 \pm 0,27) \cdot 10^8$

Zellen cm^{-2} . Auffällig war, dass unter Berücksichtigung der methodisch bedingten Meßwertstreuung alle Bakterien von dem Membran-Belag aus dem Kontrollversuch kultivierbar waren. Demgegenüber konnten von dem Membran-Belag nach der CO_2 -Begasung nur 0,3 % von der Gesamtzellzahl kultiviert werden - dies deutet auf einen leicht bakteriziden Effekt hin.

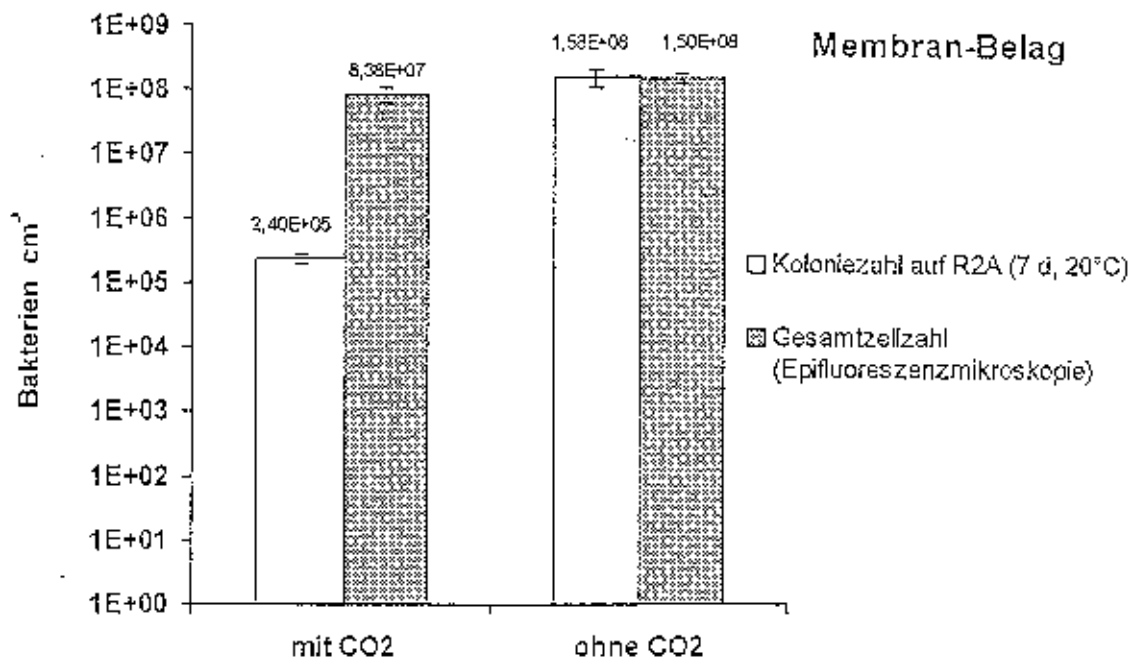


Abbildung 3: Flächenbezogene Gesamtzellzahl und Anzahl der kultivierbaren Bakterien (7d, 20°C auf R2A) in den Membran-Belägen. Nach 143 Stunden wurde die Test-Anlage MemCell I mit CO_2 für 24 Stunden inkubiert (links). Die Kontroll-Anlage MemCell II wurde nicht mit CO_2 begast (rechts)

Die Beläge auf den beiden Membranen zeigten unterschiedliche Eigenschaften beim Abschaben. Der Belag aus der CO_2 begasteten Anlage war klebrig und deutlich schwerer zu entfernen als der Belag aus der Kontroll-Anlage. Offensichtlich bewirkt das CO_2 Veränderungen in der Biofilm-Matrix, die zu erhöhtem hydraulischen Widerstand führen.

Das Retentat aus beiden Anlagen wurde auf die Anzahl der kultivierbaren Bakterien untersucht. Hierbei zeigte sich, dass im Retentat der mit CO_2 - begasteten Anlage eine Zehnerpotenz weniger Bakterien vorhanden waren als in der Kontroll-Anlage (Abbildung 4). Diese Ergebnisse weisen ebenfalls auf einen bakterioziden Effekt von CO_2 hin.

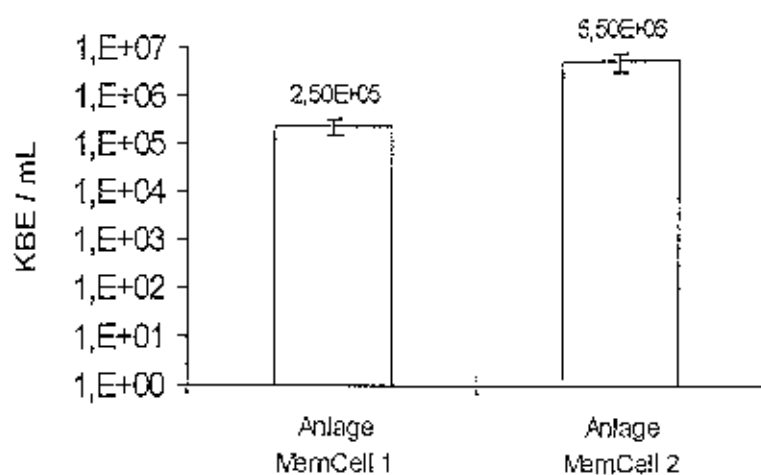


Abbildung 4: Anzahl der kultivierbaren Bakterien (7d, 20°C auf R2A) im Retentat der MemCell I-Anlage nach der 24 h CO₂-Begasung. Die Kontroll-Anlage MemCell II wurde nicht mit CO₂ begast (rechts)

6 Literatur

- Adams, J.R. and Huffman, D.L. (1972): Effect of controlled gas atmospheres and temperatures on quality of packaged pork. *J. Food Sci.* 37, 869ff
- Al-Rawi, A.: Microcycle condiation in *Aspergillus niger*. Ph.D: thesis, University of Strathclyde, Glasgow
- Baran, W.L., Kraft, A.A. and Walker, H.W. (197=): Effects of carbon dioxide and vacuum packaging on color and bacterial count of meat. *J. Milk & Food Technol.* 33, 77ff
- Bendall, D.S., Ranson, S.L. and Walker, D.A. (1960): Effects of carbon dioxide on the oxidation of succinate and reduced DPN by *Ricinus* mitochondria. *Biochemistry* 76, 221 ff
- Block, S.S. (1991): Disinfection, sterilization, and preservation. Lea and Febiger, Philadelphia, London. Fourth Edition.
- Bornside, G.H., Pakman, L.M. and Ordonez, A.A. Jr. (1975): Inhibition of pathogenic enteric bacteria by hyperbaric oxygen: enhanced antibacterial activity in the absence of carbon dioxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 682-687
- Brooks, J. and Taylor, D.J. (1955): Eggs and egg products. Dep. Sci. Ind. Res., Food Investig. Spec. Rep. 60, HMSO, London
- Chen, S.L. and Gutmanns, F. (1976): Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnol. Bioeng.* 18, 1455-1462
- Clark, D.S. and Lentz, C.P. (1973): Use of mixtures of carbon dioxide and oxygen for extending shelf-life of prepackaged fresh beef. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.* 6, 194ff
- Dainty, R.H. (1971): The control and evaluation of spoilage. *J. Food Technol.* 6, 209 ff
- Elsden, S.R. (1938): The effect of CO₂ on the production of succinic acid by *Bact. coli* commune. *Biochemistry* 37, 187ff
- Enfors, S.-O. and Molin, G. (1979): Effect of high concentrations of carbon dioxide on growth rate of *Pseudomonas fragi*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus cremoris*. *J. Appl. Bact.* 48, 409-416
- Foster, J.W. and Davis, J.B. (1948): Anaerobic formation of fumaric acid by the mold *Rhizopus nigricans*. *J. Bact.* 56, 329 ff
- Gill, C.O. and Tan, K.H. (1979): Effect of carbon dioxide on growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Envir. Microbiol.* 38, 237-240
- Griebe, T. u. Flemming, H.-C. (1996): Vermeidung von Bioziden in Wasseraufbereitungs-Systemen durch Nährstoffentnahme. *Vom Wasser* 86, 217-230
- Griffin, D.M. (1972): Ecology of soil fungi. Chapman and Hall, London
- Harary I., Korey, S.R. and Ochoa, S. (1953): Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. 7. Equilibrium of "Malic" enzyme reaction. *J. Biol. Chem.* 203, 595 ff

- Insalata, N.F. (1952): CO₂ versus beverage bacteria. *Food Eng.* 24, 84ff
- Janda, S. and Kotyk, A. (1985): Effects of suspension density on microbial metabolic processes. *Folia Microbiol.* 30, 465-473
- King, A.D. and Nagel, C.W. (1975): Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Food Sci.* 40, 362-366
- Lacoursiere, A., Thompson, B.G., Kole, M.M., Ward, D. and Gerson, D.F. (1986): Effects of carbon dioxide concentration on anaerobic fermentations of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 404-406
- Littlefield, N.A., Wankier, B.N., Salunkhe, D.K. and McGill, J.N. (1966): Fungistatic effects of controlled atmospheres. *Appl. Microbiol.* 14, 579ff
- MacFadyen, A. (1973): Inhibitory effects of carbon dioxide on microbial activity in soil. *Pedobiologica* 13, 140-149
- McIntyre, M. and McNeil, B. (1997 a): Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A 60. *Enz. Microb. Technol.* 20, 135-142
- McIntyre, M. and McNeil, B. (1997 b): Effect of carbon dioxide on morphology and product synthesis in chemostat cultures of *Aspergillus niger* A 60. *Enz. Microb. Technol.* 21, 479-483
- Moat, A.G. and Foster, J.W. (1988): *Microbial physiology*. Wiley, New York
- Molin, G. (1985): Effect of carbon dioxide on growth of *Pseudomonas putida* ATCC 11172 on asparagine, citrate, glucose, and lactate in batch and continuous culture. *Can. J. Microbiol.* 31, 763-766
- Nakadai, T., Koizumi, H., Usamy, Y., Satoh, M. and Oikawa, T. (1993): Examination of the method for measuring soil respiration in cultivated land: Effect of carbon dioxide concentration on soil respiration. *Ecol. Res.* 8, 65-70
- Nilsson, L., Huss, H.H. and Gram, L. (1997): Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int. J. Food Microb.* 38, 217-227
- Ramirez, C. (1974): Inhibition of germination and sporulation (conidiation) in *Neurospora sitophila* Shear and Dodge by carbon dioxide. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 52, 173-175
- Reasoner, D.J. and E.E. Geldreich, (1985): A new medium for the enumeration and subcultures of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1-7
- Repaske, R. and Clayton, M.A. (1978): Control of *Escherichia coli* growth by CO₂. *J. Bact.* 135, 1162-1164
- Santruckova, H. and Simek, M. (1996): Effect of soil carbon dioxide concentration on microbial biomass. *Biol. Fertil. Soils* 25, 269-273
- Simon, S.A. and Gutknecht, J. (1980): Solubility of carbon dioxide in lipid bilayer membranes and organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta* 596, 352-358

Smith, W.H. (1963): The use of carbon dioxide in the transport and storage of fruits and vegetables. In: Mrak, E.M. and Stewart, G.F. (eds.): Advances in food research Vol. 12. Chichester, New York; 95ff

Splittstößer, D.F. (1970): Predominant microorganisms on raw plant woods. J. Milk and Food Technol. 33, 500 ff

Stahl, E. et al (1985): Pharm. Industr. 47, 528ff

Swanson, H.D. and Ogg, J.E. (1969): Carbon dioxide regulation of formate hydrogenylase in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 567ff

Wallhäußer, K.H. (1988): Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung. Thieme Verlag, Stuttgart, 4. überarb. Aufl.

Wimpenny, J.W.T. (1969): Oxygen and carbon dioxide as regulators of microbial growth and metabolism. In: Meadow, P.W. and Pirt, S.J. (eds.): Microbial growth. Cambridge