

Übersetzung der spanischen Studie – Universität Barcelona
Original liegt dem Hersteller vor – 01/2004

Studie zur Inaktivierung von Mikroben durch das Gerät AQUA HP-SYSTEM

Universität Barcelona

Heck Trade S.L. - Spanien

Studie zur Inaktivierung von Mikroben
durch das Gerät
Aqua Hydro Physical System
(AQUA HP-Systeme)



Barcelona, im Juli 2003

Dieser Bericht entspricht dem Abschlussbericht der Arbeit „Studie zur Inaktivierung von Mikroben durch das Gerät AQUA HP-System“ gemäss der Vereinbarung zur Zusammenarbeit zwischen dem Unternehmen Heck Trade, S.L., Spanien und den Professoren des mikrobiologischen Instituts der Universität Barcelona Joan Jofre Torroella und Francisco Gutiérrez.

Außerdem haben an der Verwirklichung der vorliegenden Studie mitgewirkt:

Dr. Xavi Mèndez

Dr. Maite Muniesa,

Mitglieder des mikrobiologischen Instituts.

Barcelona, im Juli 2003

Vorläufiger Bericht der Laborexperimente mit dem Gerät AQUA HP-SYSTEM

1. Einführung

Der vorliegende Bericht möchte einige grundlegende Bedingung für die Durchführung der vorläufigen Versuche und Experimente mit dem AQUA Hydro Physical System (künftig HP-SYSTEM) definieren, mit dem Ziel, die Inaktivierung von Mikroben während ihrer Tätigkeit in einem geschlossenen Wasserkreislauf bewerten zu können.

Die Funktionsweise des Gerätes lässt sich auf der Website des Unternehmens nachlesen, dass das Gerät vertreibt:

www.crystal-nte.ch

CRYSTAL NTE
Av. des Baumettes 9
1020 Renens - Switzerland

TECHNIK

Das Herzstück der AQUA HP-SYSTEM Technologie ist ein Hochleistungs-Wasserreaktor. Unter Vorschaltung einer entsprechenden Druckpumpe (erforderlicher Betriebsdruck 5-8 bar) werden innerhalb des Reaktors hohe Über- und Unterdruckverhältnisse sowie enorme zentrifugal und zentripetal wirkende Wasser-Scherkräfte aufgebaut. Über- und Unterdruckverhältnisse und die auftretenden Scherkräfte sind so hoch, dass Bakterien, Keime und andere organische Verbindungen nachhaltig zerstört werden.

In einem weiteren Schritt wird aufgrund der Unterdruckverhältnisse innerhalb des Reaktors zwangsweise Umgebungsluft angesaugt und dem Behandlungsprozess zugeführt. Der gelöste Sauerstoff und der anteilige Sauerstoff (21%) aus der angesagten Umgebungsluft stehen somit für einen natürlichen Oxidationsprozess (Kaltverbrennung) zur Verfügung. Die Kombination aus Überdruck/ Unterdruck, enorm hohen Wasser-Scherkräften und natürlicher Sauerstoffoxidation baut organische Belastungen und Verschmutzungen succesive ab und verhindert nachhaltig Rück bzw. Neuverkeimung. Ein weiterer Vorteil der AQUA HP-SYSTEM Technologie ist darin zu sehen, dass die bereits genannte Beeinflussung der Molekularstruktur auch eine Veränderung der Oberflächenspannung und Viskosität des behandelten Wassers nach sich zieht. Das behandelte Wasser ist physikalisch weicher, so dass Wasch- und Reinigungsprozesse erheblich verbessert bzw. optimiert werden.

2. Ziel der Experimente

Das Ziel der durchgeführten Versuche und Experimente war es, nachzuweisen, dass das AQUA HP-SYSTEM Mikroorganismen in einem geschlossenen Wasserkreislauf inaktivieren kann. Zuerst wurden deshalb die Funktionsbedingungen der Wasserbehandlungsanlage AQUA HP-SYSTEM für die Umsetzung der Versuche festgelegt.

Das Gerät wurde gemäss den Empfehlungen des Herstellers in zahlreiche Heißwasserkreisläufe, Kühltürme, Zierbrunnen etc. installiert, um dort die Vermehrung von Bakterien, Sporen, Pilzen etc. zu verhindern.

Sollte die Fähigkeit des Gerätes zur Inaktivierung von Mikroorganismen / Mikroben nach der Auswertung der Versuche und der daraus gewonnenen Resultate bewiesen werden, können neue Versuche und Experimente geplant werden, die über diesen vorläufigen Bericht hinausreichen.

3. Versuchsanlage

Die Experimente wurden mit einem Gerät AQUA HP-System Modell K0 Junior durchgeführt, einem sehr kompakten Gerät, das aus einer Zentrifugalpumpe und dem Reaktor HP in einem geschlossenen Gehäuse besteht, an das nur noch die Leitungen für den Zu- und Abfluss des Wassers angeschlossen werden müssen. Die äußeren Maße des Geräts K0-Junior sind: Länge 350 mm, Breite 480 mm, Höhe: 620 mm, Gewicht: 40 kg.

4. Durchflussmenge

Das Gerät erlaubt eine Durchflussmenge von 0.5 bis 2,5 m³/h. Für die Versuche wurde eine Durchflussmenge von 1 m³/h gewählt, um zu große Wassermengen zu vermeiden.

5. Wasserproben und Muster

Für die Wasserproben der Experimente wurden 200 Liter Wasser dem Wassernetz von Barcelona entnommen und mit Triosulfat behandelt, um die Wirkung des Chlores zu neutralisieren.

Die Proben wurden mit verschiedenen Bakterien und Bakteriophagen angeimpft, wobei neben der Probe für das Experiment immer auch eine Kontrollprobe hergestellt wurde. Nach der Homogenisierung fiel eine Fraktion von 1 Liter angeimpfte Probe an, die außerhalb des Kreislaufes aufbewahrt wurde und als Kontrollprobe während des Experimentes diente.

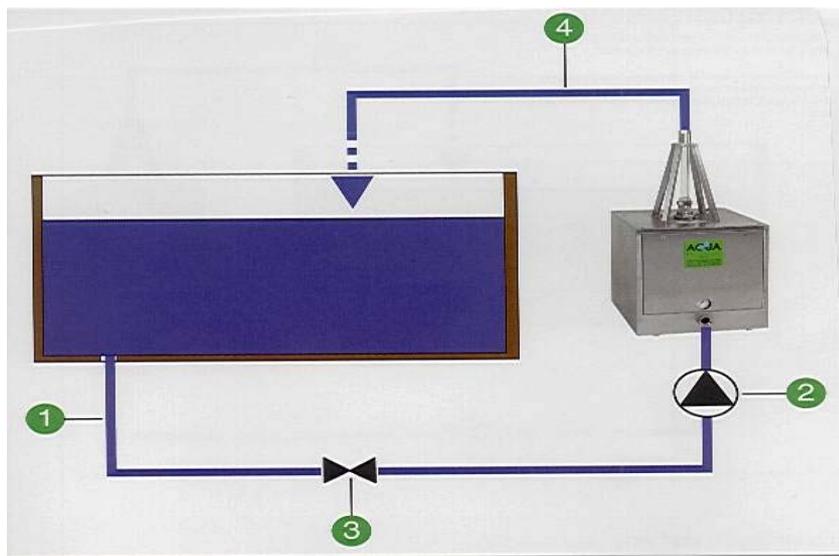
200 Liter angeimpftes Wasser wurden durch das AQUA HP-SYSTEM geleitet unter Berücksichtigung der im Versuchsprotokoll beschriebenen Zeitprogramme.

6. Versuchskreislauf

Der Wasserkreislauf in den Experimenten enthielt folgende Bestandteile:

- Wasserspeicher mit 200 Liter Wasser.
- Flexibler Wasserschlauch (im Zubehör) zum Ansaugen des Wassers am Zulaufstutzen des Gerätes AQUA HP-SYSTEM.
- das Gerät AQUA HP-SYSTEM, Modell K0 Junior, inklusive Hochdruckpumpe.
- flexibler Wasserschlauch (im Zubehör) zur Ableitung des Wassers aus dem Gerät.
- Messgerät für die Wassermenge.

Das folgende Schema zeigt die Zusammensetzung der Anlagen bei der Durchführung der Experimente.



7. Verwendete Mikroorganismen und Mikroben

Verwendete Bakterienstämme, Bakteriophagen und Nährboden

7.1.1 Bakterienstämme

Es wurde eine gram + und eine gram – Bakterienart ausgewählt, welche die am häufigsten vorkommenden Stämme repräsentieren:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (gram +)
- *Escherichia coli* WG5 (ATCC 700078) (Gravox Cobrough 1986) (gram-)

7.2 Bakteriophagen

Es wurden zwei unterschiedliche Bakteriophagen ausgewählt:

- MS2 (ATCC 15597-B1) ISO 10805-1 (Anonymous 1995)
- B56-3 (ATCC 700786-B1) ISO 10705-4 (Anonymous 2002)

7.3 Nährböden

- mFC-Agar (Difco, Becton Dickinson, USA). Ref: 267720
- Chromocult Coliforme Agar (Merck Darmstadt, BRD). Ref: 1.10426
- m Enterococcus Agar (Difco, Becton Dickinson, USA) Ref: 274620

8. Versuchsprotokoll

Die verschiedenen Experimente wurden in folgenden Schritten durchgeführt:

- a) Vorbereitung des Gerätes durch Anschluss der flexiblen Wasserschläuche für den Zu- und Ablauf des Wassers und Anschluss an den Wassertank
- b) Vorbereitung einer Wassermenge von 200 Litern durch Zugabe von Thiosulfat
- c) Inbetriebnahme der Pumpe und Festlegung der Wasserdurchflussmenge (1 m³/h).
Bei dieser Durchflussmenge und einem Vorratsvolumen von 200 Litern dauert ein Versuchszyklus höchstens 12 Minuten.
- d) Stoppen einer Vorlaufzeit zur Stabilisierung von weniger als 60 Sekunden. Überprüfung des Durchflusskreislaufes. Verwerfen des behandelten Wassers während dieser Zeit.
- e) Hinzufügen der entsprechen Mikrobe nmenge für das Experiment im Verhältnis von 1000 cfu bzw. 1000 pfu pro ml Wasser.
(cfu/ml= Bakterientiter =Konzentrationsangabe; pfu/ml= Phagentiter = Konzentrationsangabe)
- f) Homogenisierung
- g) Entnahme einer Wasserprobe von 1 Liter als Kontrollmenge.
- h) Für die Durchführung von Kontrolle xperimenten wurde ein baugleicher Wasserspeicher von 200 Litern aufgestellt mit derselben Menge an Mikroben versetzt, um zu beweisen, dass die Mikroben nicht im Kreislauf absorbieren. Das Wasservolumen in den Schläuchen und im HP -Reaktor betrug weniger als 4 Liter, also höchstens 2 % des Gesamtvolumens der Probe.

- i) Entnahme der gleichen Probenmenge aus dem Wasserkreislauf und dem Kontrollwasser zu Beginn des Experimentes („Stunde Null“) und danach zu unterschiedlichen Zeiten.
- j) Durchführung von Maßanalysen /Titeranalysen der verschiedenen Mikroben gemäß standardisierten Protokollen.
- k) Die Wassertemperatur wurde kontinuierlich überprüft und blieb während der Experimente unter 27° Celsius.
- l) Die Experimente wurden mit folgendem Tagesprogramm durchgeführt: 8 Stunden Aufbereitung ab der Stunde Null, danach 16 Stunden Stillstand. Dieses Tagesprogramm wurde mehrfach wiederholt.

9. Ergebnisse

Die Ergebnisse werden grafisch dargestellt. Die Grafiken zeigen die Konzentrationen der Mikroben im Versuchsverlauf, sowohl im Kontrollwasser als auch im aufbereitetem Wasser. Die erreichte Kinetik der Inaktivierung nähert sich in den meisten Fällen einer geraden Linie mit R^2 größer als 0,70.

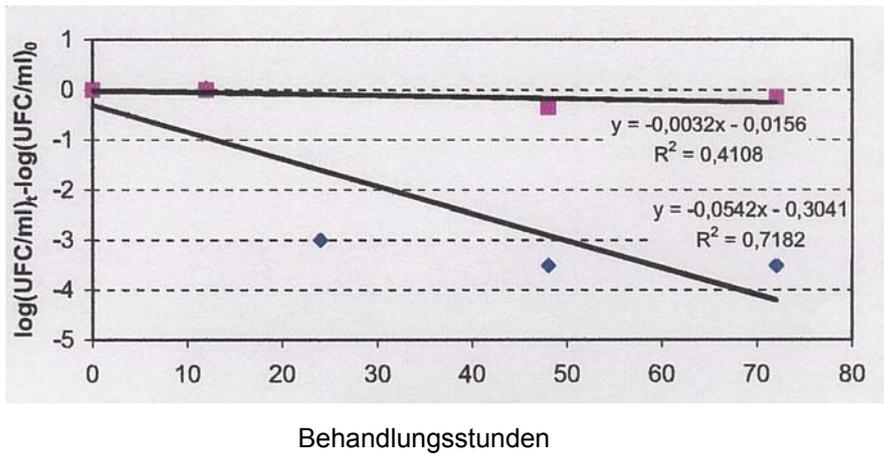
Dieses sensible Modell erlaubt eine Inaktivierungszeit T_{90} zu bestimmen. Das ist die Zeit, in der 90 Prozent der in der Probe vorhandenen Mikroben inaktiviert werden. Dieser Wert dient dazu, die Inaktivierung der verschiedenen Mikroben zu messen; er liegt in den durchgeführten Experimenten mit dem HP - Reaktor jeweils unter 100 Stunden.

In den Kontrollexperimenten (ohne HP-Reaktor) wurde ebenfalls ein (natürlicher) Verfall und eine Inaktivierung der Mikroben festgestellt, jedoch mit einer Inaktivierungszeit T_{90} von über 100 Stunden. Das heißt, die natürliche Inaktivierung von Mikroorganismen war viel geringer als die durch den Reaktor ausgelöste.

10 Resultate

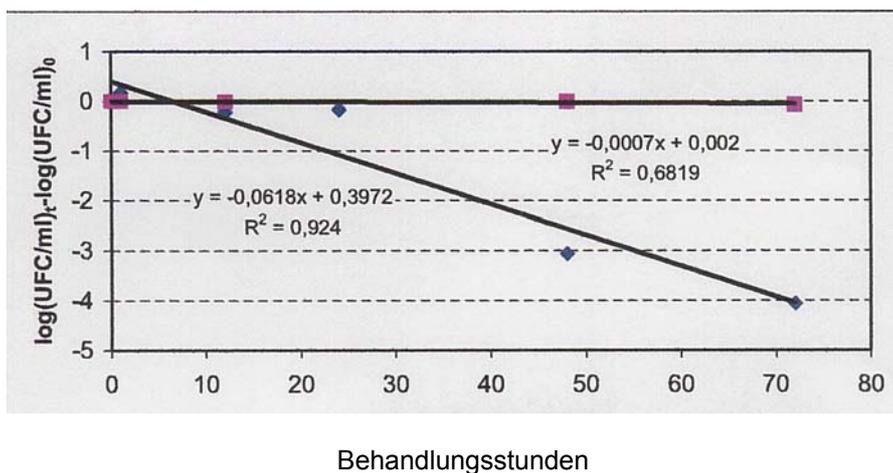
10.1. Inaktivierung der Enterokokken

Experiment 1:



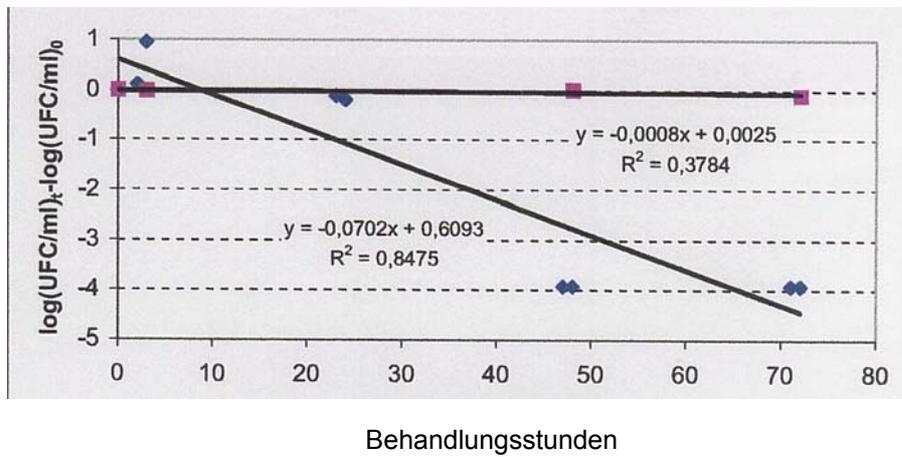
- ◆ behandeltes Wasser mit HP-Reaktor ■ Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

Experiment 2:



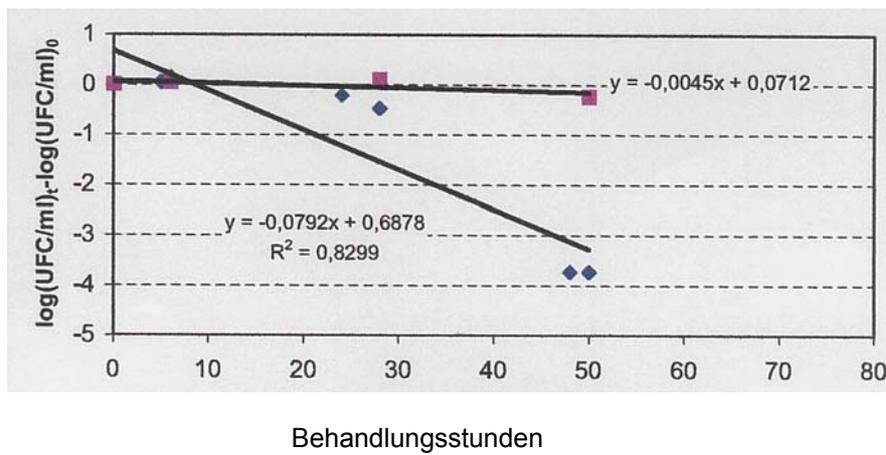
- ◆ behandeltes Wasser mit HP-Reaktor ■ Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

Experiment 3:



- ◆ behandeltes Wasser mit HP-Reaktor
- Kontrollwasser ohne HP- Reaktor

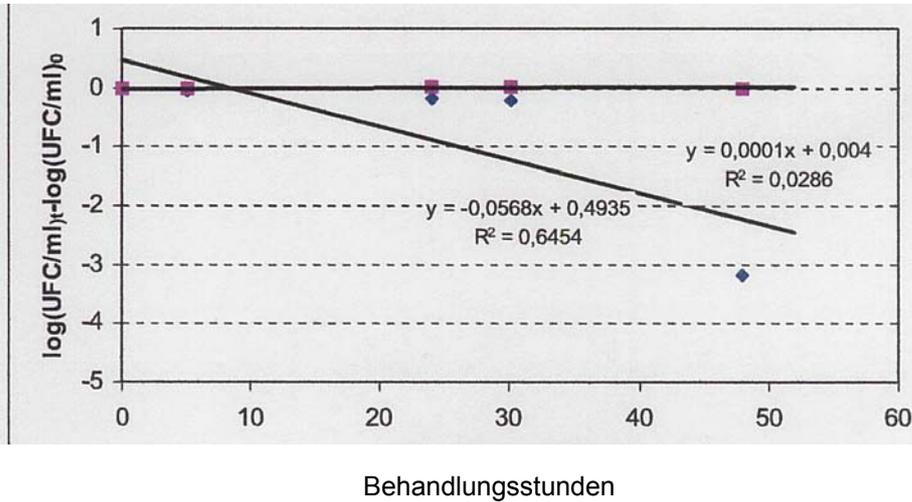
Experiment 4:



- ◆ behandeltes Wasser mit HP-Reaktor
- Kontrollwasser ohne HP- Reaktor

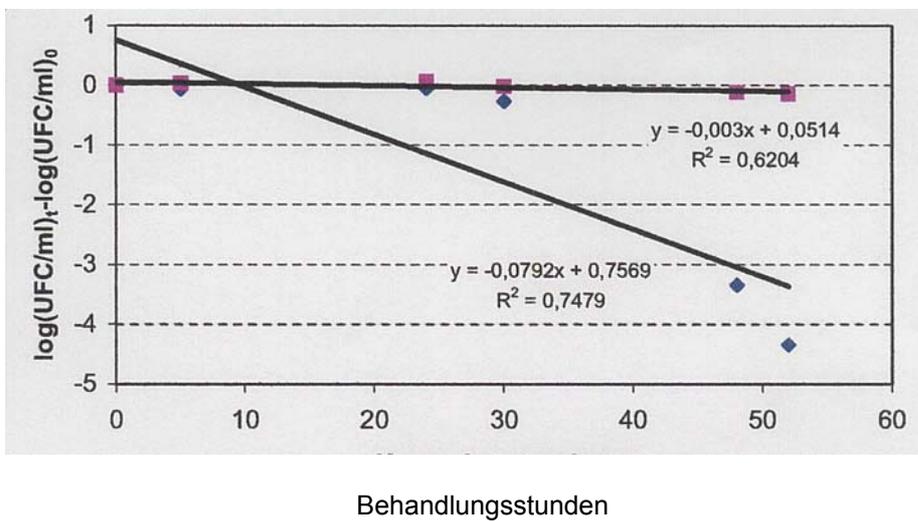
10.2. Inaktivierung der *Escherichia coli*

Experiment 1:



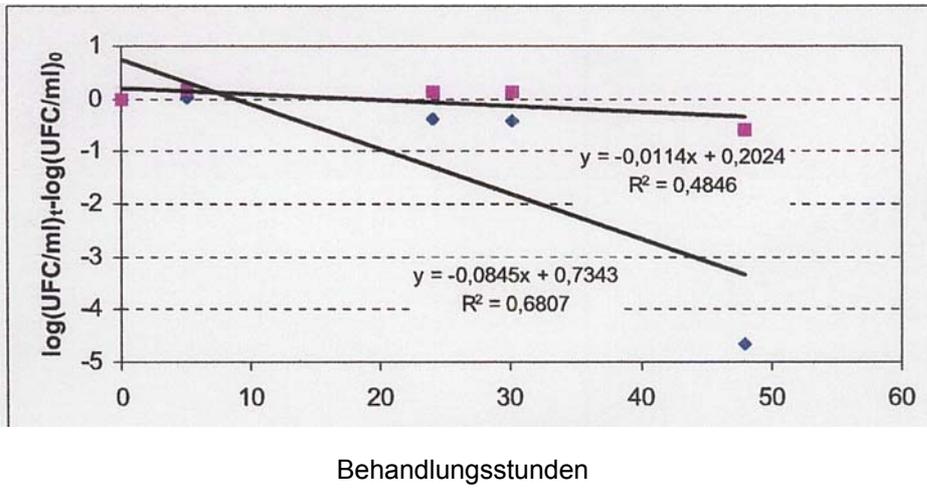
- ◆ behandeltes Wasser mit HP-Reaktor
- Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

Experiment 2:



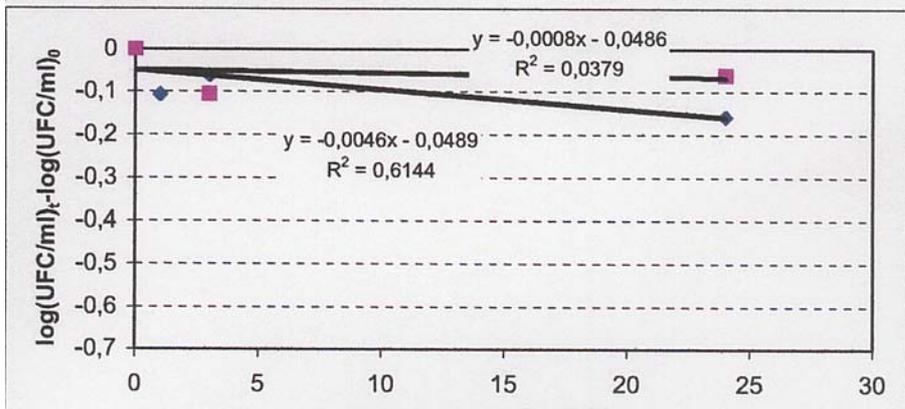
- ◆ behandeltes Wasser mit HP-Reaktor
- Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

Experiment 3:



10.3. Inaktivierung der Bakteriophagen B56-3

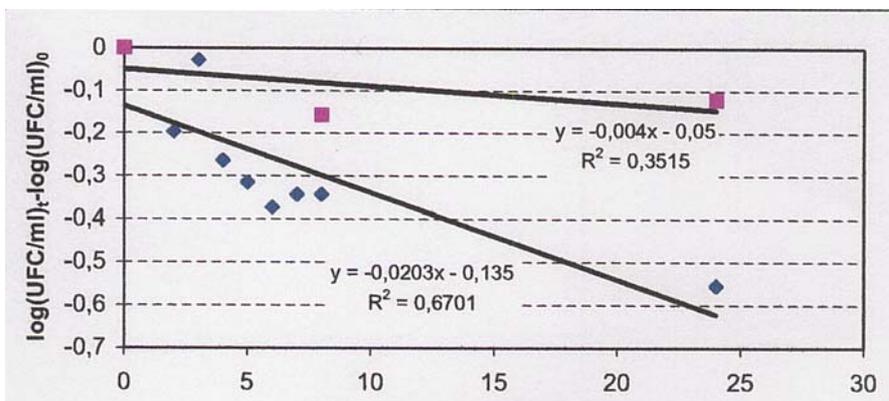
Experiment 1:



Behandlungsstunden

- ◆ behandeltes Wasser mit HP- Reaktor
- Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

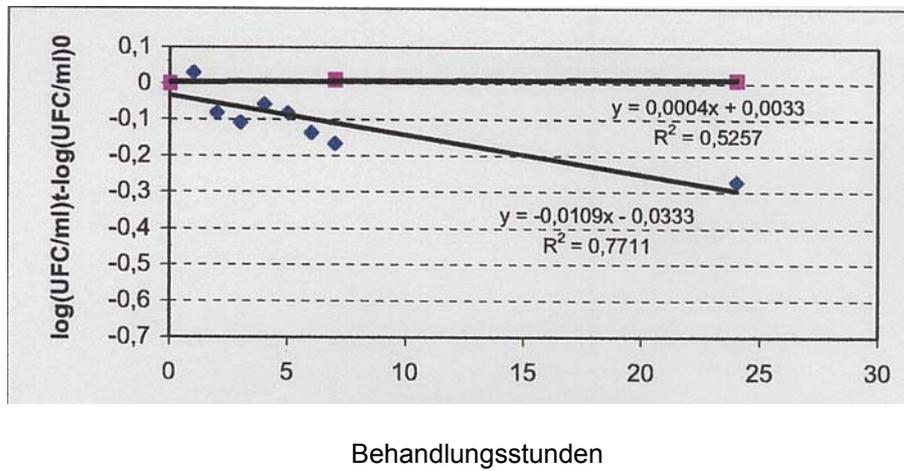
Experiment 2:



Behandlungsstunden

- ◆ behandeltes Wasser mit HP- Reaktor
- Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

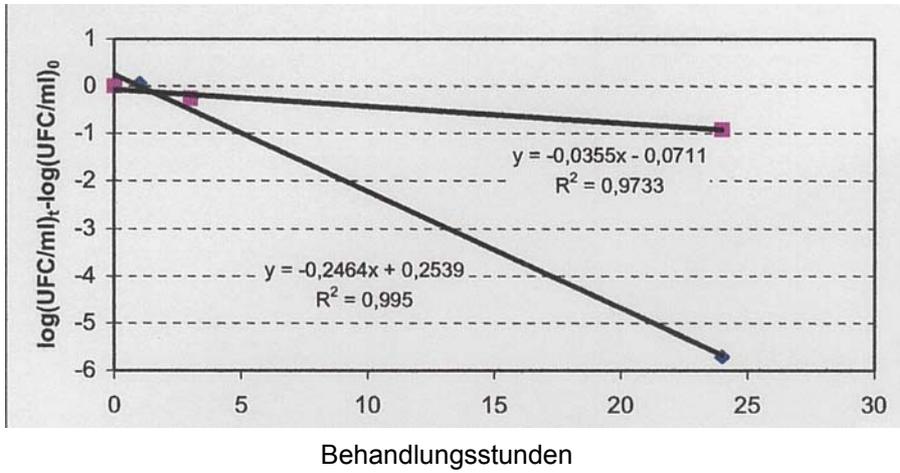
Experiment 3:



- ◆ behandeltes Wasser mit HP- Reaktor ■ Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

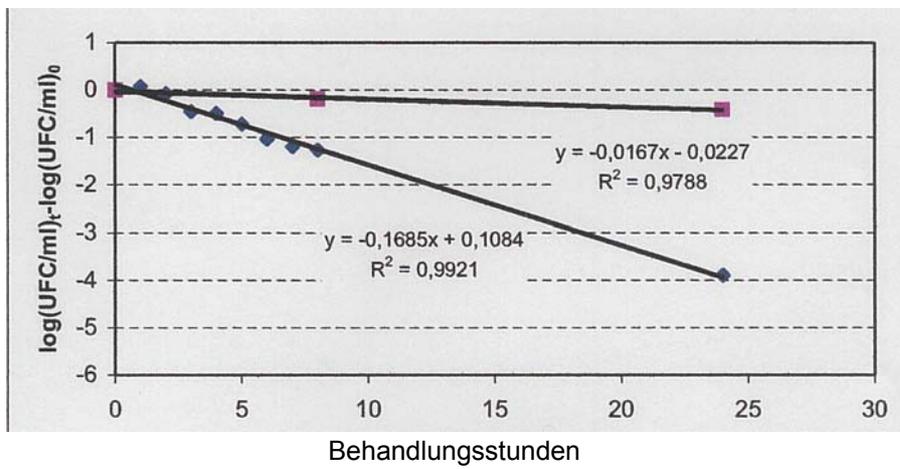
10.4. Inaktivierung der Bakteriophagen MS2

Experiment 1:



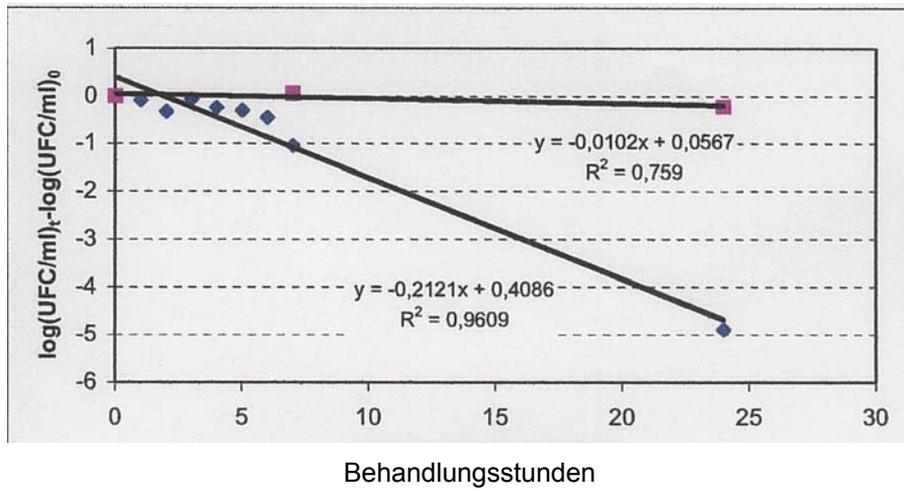
◆ behandeltes Wasser mit HP- Reaktor ■ Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

Experiment 2:



◆ behandeltes Wasser mit HP- Reaktor ■ Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

Experiment 3:



◆ behandeltes Wasser mit HP- Reaktor ■ Kontrollwasser ohne HP-Reaktor

Ergebnisse

Neben der „Kinetik der Inaktivierung“ wurden die Inaktivierungszeiten T90 und T99 der verschiedenen zugefügten Mikroben berechnet (in Stunden).

Ergebnisse der Inaktivierungszeiten T90 und T99:

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		<i>Escherichia coli</i> ATCC 700078		Bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1		Bacteriófago B56-3 ATCC 700786-B1	
T90	T99	T90	T99	T90	T99	T90	T99
12,8	31,2	26,3	43,9	5,1	9,1	20,8	42,5
22,6	38,8	22,2	34,8	6,6	12,5	42,6	91,9
22,9	37,2	20,5	32,4	6,6	11,4	88,7	180,4
21,3	33,9	-	-	-	-	-	-

Statistik der Inaktivierungszeiten T90 und T99 der verwendeten Mikroorganismen und Mikroben:

	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		<i>Escherichia coli</i> ATCC 700078		Bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1		Bacteriófago B56-3 ATCC 700786-B1	
	T90	T99	T90	T99	T90	T99	T90	T99
Media	19,9	35,2	23,0	37,0	6,1	11,0	50,7	104,9
Des.est.	4,7	3,3	2,9	6,0	0,8	1,7	34,6	69,9
I.C. 95%	7,6	5,4	7,3	15,0	2,1	4,3	85,9	173,2
I.C. 99%	13,9	9,9	16,8	34,2	4,8	9,7	195,7	394,5
V. mín.	12,8	31,2	20,5	32,4	5,1	9,1	20,8	42,5
V. máx.	22,9	38,8	26,3	43,9	6,6	12,5	88,7	180,4

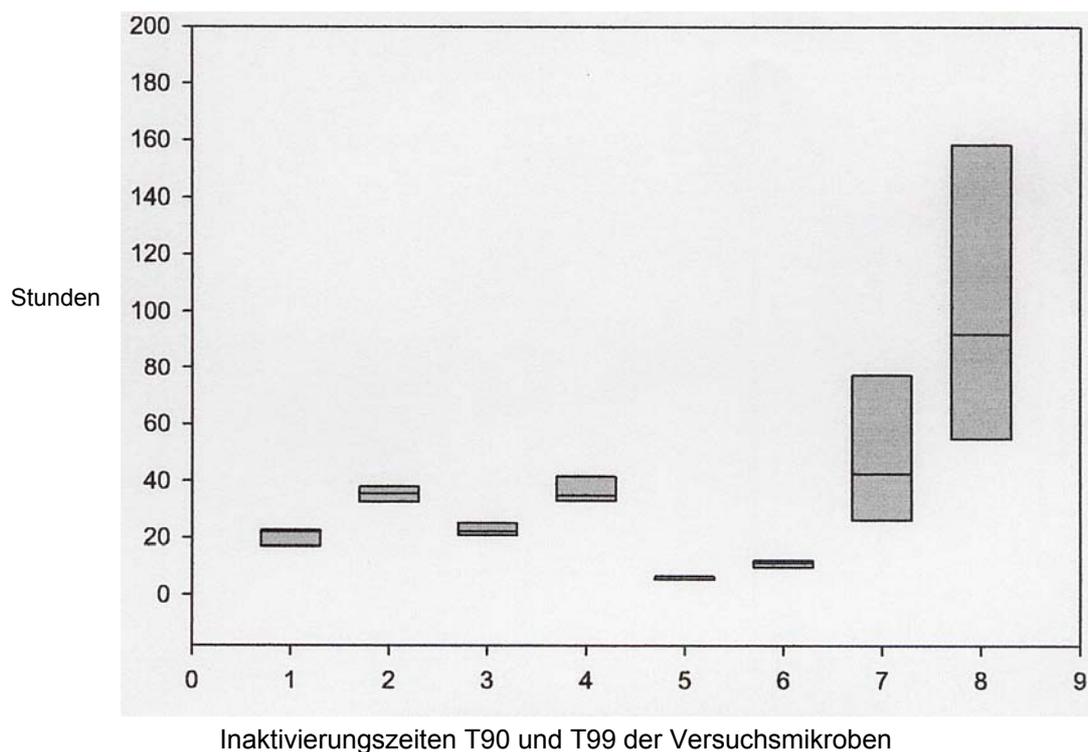
Des est.: Standardabweichung

I.C.: Vertrauensbereich, Konfidenzintervall

V. min: geringster Wert (Minimum)

V. max: höchster Wert (Maximum)

Diagramme der Inaktivierungszeiten T90 und T99 der verwendeten Mikroorganismen und Mikroben:



1: T90 von *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

2: T99 von *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

3: T90 von *Escherichia coli* QTCC 7000078

4: T99 von *Escherichia coli* QTCC 7000078

5: T90 des Bakteriophagen MS2 ATCC 15597-B1

6: T99 des Bakteriophagen MS2 ATCC 15597-B1

7: T90 des Bakteriophagen B56-3 QTCC 700786-B1

8: T99 des Bakteriophagen B56-3 QTCC 700786-B1

11. Schlusswort

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur Inaktivierung von Mikroorganismen durchgeführt. Dabei wurden in einem geschlossenen Wasserkreislauf 200 Liter Wasser aus dem Netz mit verschiedenen Mikroorganismen versetzt und durch das Gerät Aqua Hydro Physical System (AQUA HP-SYSTEM) geleitet (zwei Bakterienarten: *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* sowie zwei verschiedene Bakteriophagen: MS-2 und B56-3).

Bei den Versuchsbedingungen war es möglich, die Inaktivierungszeit T90, d.h. die notwendige Zeit zur Inaktivierung von 90 % der Population, zu bestimmen, oder – was dasselbe ist – die Reduzierung der vorliegenden Verseuchung gemäss einer logarithmischen Einheit zu bestimmen.

Die Inaktivierungszeiten T90 hängen von den Charakteristiken der im Versuch verwendeten Mikroben ab. So liegt der mittlere Wert von T90 für den *Enterococcus faecalis* bei 20 Stunden; für *Escherichia coli* bei 23 Stunden, für den Bakteriophagen MS2 bei 6 Stunden und für den Bakteriophagen B56-3 bei 51 Stunden. Die Ergebnisse der Inaktivierung der verwendeten Bakteriophagen als **Virus – Indikatoren zeigen, dass auch Viren durch das AQUA HP-System inaktiviert werden.**

Diese Ergebnisse beweisen die Inaktivierung der Mikroben unter den geschilderten Versuchsbedingungen durch die Aktivität des HP-Reaktors, da parallele Kontrollexperimente zeigten, dass dort einige Inaktivierungszeiten T90 über 100 Stunden lagen. Die Inaktivierung durch den Reaktor ist also deutlich höher als die natürliche Inaktivierung der untersuchten Mikroben im Wasser.

Die in den beschriebenen Experimenten ermittelten Überlebensraten ergeben in jedem Fall eine gerade Linie des Rückganges, was vereinfachend auf ein Modell einer Kinetik ersten Ranges schließen lässt. Diese Kinetik erlaubt, die Inaktivierungszeiten T90 und T99 zu bestimmen. Wir können aber nicht die Möglichkeit ausschließen, dass sich in einer ausführlicheren Studie eine andere Kinetik der Inaktivierung ergeben würde.

Die Inaktivierungszeiten T90 der im Experiment verwandten Bakterien liegen mit 20 bis 23 Stunden sehr nahe beieinander, ebenso wie bei den Inaktivierungszeiten T99, die zwischen 35 und 37 Stunden für Enterokokken und *E. coli* liegen. Weile diese für Wasser typische Mikroorganismen sind, stehen sie stellvertretend für eine Inaktivierung eines breiten Bakterienspektrums durch die Anwendung des HP-Reaktors. **Innerhalb dieses Spektrums befindet sich auch die Bakteriengattung *Legionella*.**

Somit werden die Angaben des Herstellers in Bezug auf die Inaktivierung von Bakterien und die Verwendung vom AQUA HP-SYSTEM in verschiedenen Wasseranwendungs - bereichen bewiesen.

Für die untersuchten Bakteriophagen, beides sind Modell – Viren, war das Ergebnis nicht dasselbe. Hier stand der Inaktivierungszeit T90 des Bakteriophagen MS2 von 6 Stunden einer Inaktivierungszeit T90 von 51 Stunden des Bakteriophagen B56-3 gegenüber. Die unterschiedlichen Ergebnisse können sowohl auf die unterschiedlichen Charakteristiken von Bakterien und Bakteriophagen zurückzuführen sein als auch auf die Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Bakteriophagen selbst.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die genannten Ergebnisse die Effektivität des AQUA HP-Systems bei der Beseitigung von Bakterien und Viren unter den Versuchsbedingungen beweisen. Außerdem kann man davon ausgehen, dass die Anlage AQUA HP-System unter ähnlichen Bedingungen die Zunahme von Bakterien in geschlossenen Wasserkreisläufen minimiert und die Konzentration jeglichen Mikroorganismus auf niedrigem Niveau hält, so wie es der Hersteller des AQUA HP-Systems in seiner Produktinformation beschreibt.

12. Referenzen

Anonymous (1995) ISO 10705-1: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Genf, Schweiz, International Standardisation Organisation.

Anonymous (2000) ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages. Genf, Schweiz, International Standardisation Organisation.

Anonymous (2002) ISO 10705-4: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. Genf, Schweiz, International Standardisation Organisation.

Grabow WO & Cobrough P (1988): Practical direct plaque assay for coliphages in 100 ml samples of drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 52: 430-433.