

## Simulierung eines unbeabsichtigten Austritts von Mikroorganismen aus dem Labor in das Abwasser

### Ziel des Projektes

Biotech-Betriebe oder Laboratorien, die mit Mikroorganismen umgehen, müssen geeignete Sicherheitsmassnahmen treffen, um den Austritt der Organismen in die Umwelt zu minimieren bzw. zu verhindern. Die Art und der Umfang der Massnahmen richten sich dabei nach der Risikoklasse der Tätigkeit und sind in der Einschliessungsverordnung ESV vom 25. August 1999 vorgegeben.

Mit diesem Projekt sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen mit den zur Verfügung stehenden Methoden ein unabsichtlich aus einer Biotech-Anlage ins Abwasser gelangter Mikroorganismus in der Kanalisation nachgewiesen werden kann.

### Ausgangslage

Im Simulationsversuch sollte eine grössere Menge an Bäckerhefe (*Sacharomyces cerevisiae*) in einem Labor der Novartis in das Abwassersystem eingeleitet werden. Anschliessend sollten an verschiedenen Stellen der Kanalisation sowie beim Eintritt und innerhalb des Teiles der Kläranlage ProRhen AG, in dem die Laborabwasser der Kleinbasler Chemiewerke geklärt werden <sup>1</sup>, Proben entnommen werden.

Für die Detektion des natürlichen und harmlosen Modellorganismus Hefe entlang des Abwasserpfades sind in Vorexperimenten geeignete quantitative Verfahren validiert worden. Mit diesen ist es möglich, einerseits lebende Hefezellen (durch Kultivierung auf Hefe-Agar) und andererseits Hefe-DNA (durch DNA Extraktion und quantitative PCR, d.h. Polymerasenkettenreaktion) im Abwasser nachzuweisen. Die Sensitivität dieser Nachweissysteme ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

	DNA-Nachweis (quantitative PCR)	Lebendnachweis
Nachweisgrenze <sup>2</sup>	100 cfu-Equ./ml <sup>3</sup>	10 cfu/ml
Bestimmungsgrenze	1'000 cfu-Equ./ml	100 cfu/ml

Der Kulturnachweis ist sensitiver, hat aber den Nachteil, dass die Zellen nur solange detektiert werden, als die Organismen lebend sind bzw. sich kultivieren lassen. Die Hefe-DNA war jedoch gemäss den Vorexperimenten stabiler und daher länger detektierbar als die lebenden Zellen.

### Durchführung

Vier Liter einer konzentrierten Hefesuspension ( $\approx 3 \times 10^9$  Zellen/ml; total  $10^{13}$  Hefezellen) wurden in einem Gebäude der Novartis auf dem Klybeck-Areal in die Kanalisation eingeleitet. Daraufhin wurden vom Gebäudeabwasser (Falleitung im Keller), in den Pumpwerken 1 und 2 sowie beim Eintritt in die Kläranlage ProRhen insgesamt 86 Proben erhoben. Innerhalb der Chemie-Kläranlage erfolgte die Probenahme im Mischbecken und bei den Abläufen des Misch- und Neutralisationsbeckens (siehe Schema [Figur 1](#)).

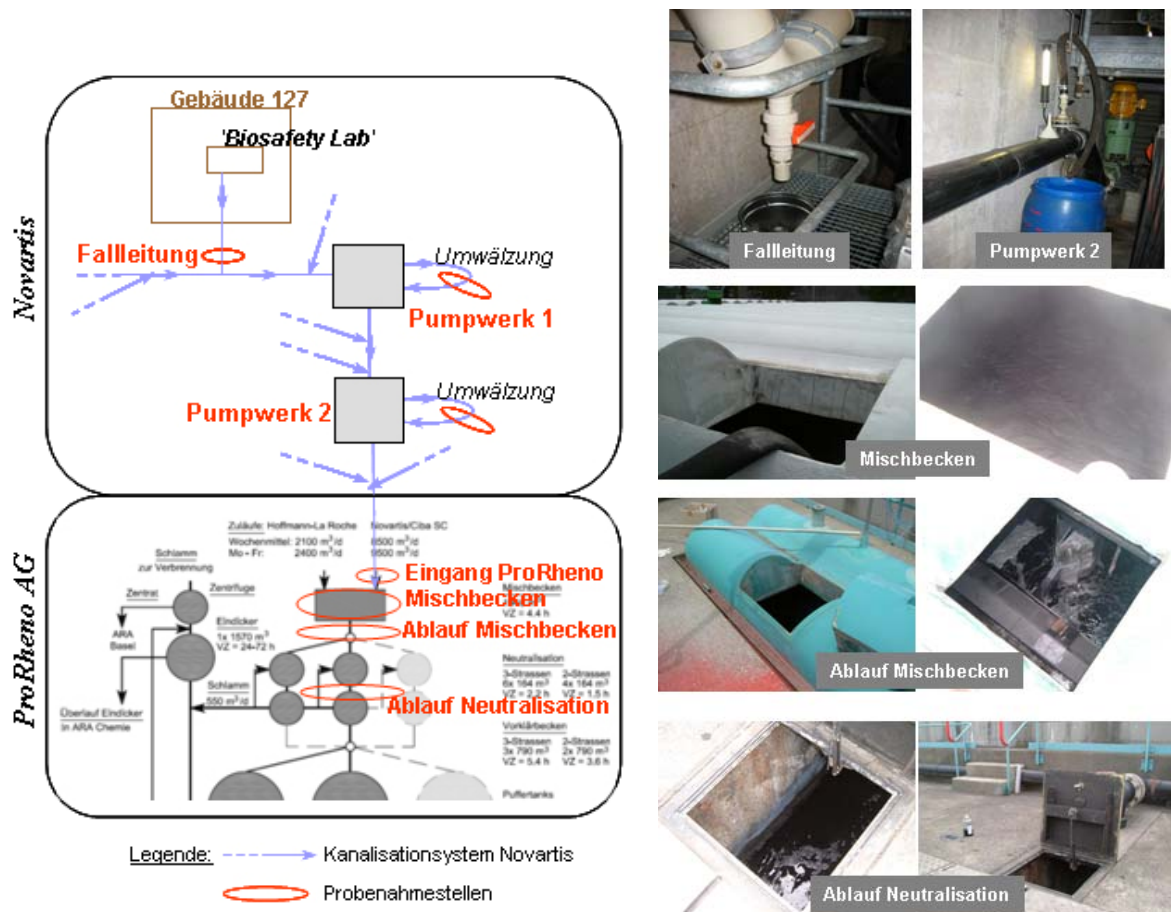
Von den Proben wurden jeweils 100  $\mu$ l auf Hefe-Selektivagar ausgestrichen und weitere 900  $\mu$ l der DNA-Extraktion zugeführt. Von der extrahierten DNA wurde mittels quantitativer PCR die Anzahl Hefegenome bzw. Hefe-cfu-Equivalente gemessen. Bei dieser PCR-Reaktion wird ein Hefe-spezifisches Fragment des ERG11 <sup>4</sup> Genes amplifiziert.

<sup>1</sup> Wir danken den Firmen Novartis, Valorec und ProRhen für ihre Unterstützung bei der Durchführung des Versuches.

<sup>2</sup> Nachweisgrenze: kleinste Analytmenge, welche sich mit dieser Methode zuverlässig von der Negativkontrolle unterscheiden lässt. Bestimmungsgrenze: kleinste Analytmenge, welche sich mit einer definierten statistischen Genauigkeit quantitativ bestimmen lässt.

<sup>3</sup> cfu/ml: 'colony forming unit' = Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter. Die Werte beziehen sich auf Messungen in reinen Proben (d.h. Puffer oder Medium) im Gegensatz zu Abwasserproben.

<sup>4</sup> Das ERG11-Gen kodiert für ein Enzym des Ergosterol-Metabolismus.



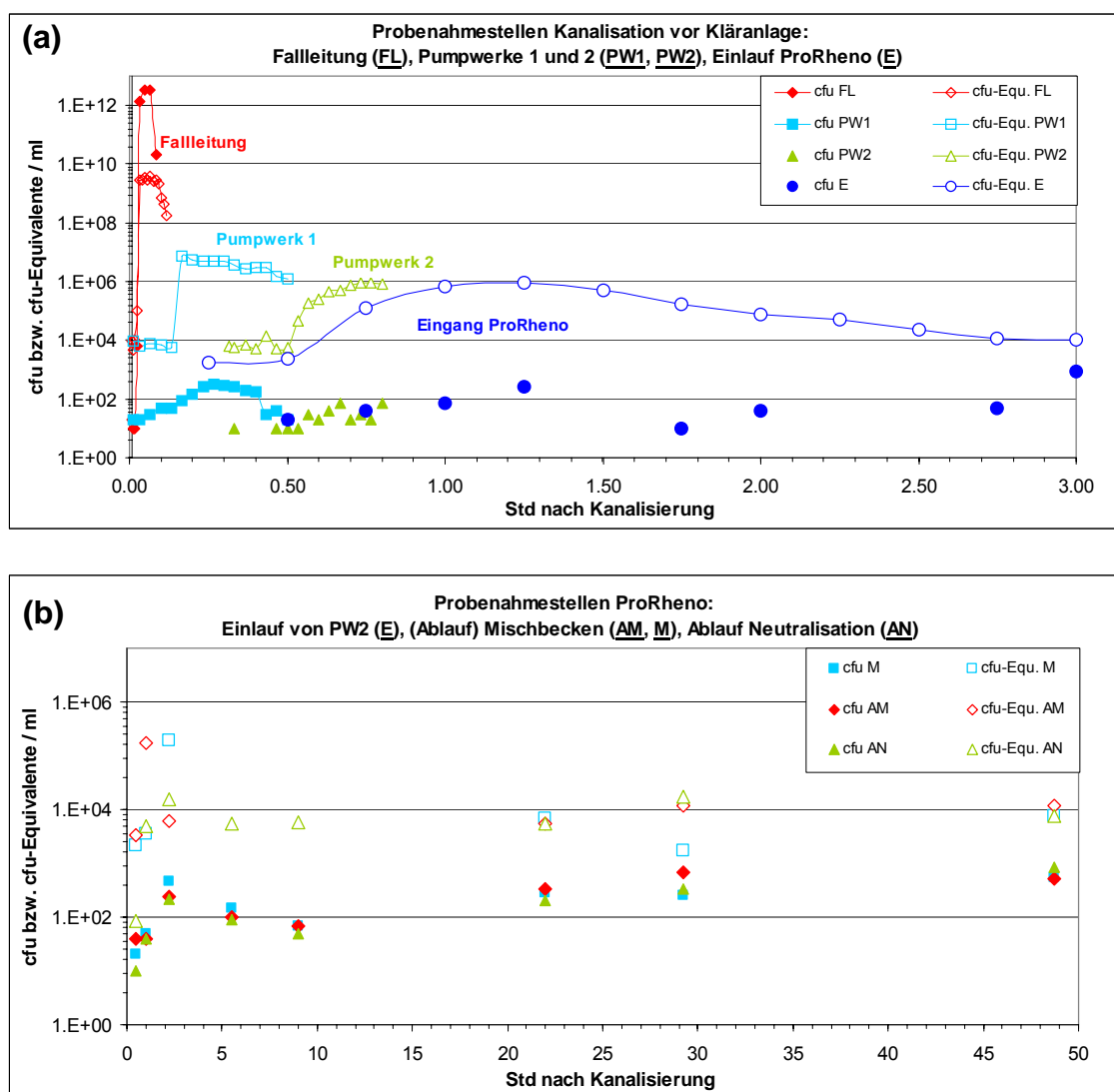
Figur 1: Schematische Darstellung des Kanalisationssystems vom Gebäude auf dem Novartis-Gelände, in dem die Hefesuspension eingeleitet wurde, bis zum Eintritt in die Kläranlage und des ersten Teils der Chemie-Kläranlage der ProRhedo AG Basel. Die Entnahmestellen sind rot eingekreist und beschriftet und teilweise fotografisch dargestellt.

## Resultate

Beim Vergleich der beiden Analysemethoden zeigte sich, dass die Hefezellen mittels Lebendnachweis nur gerade am ersten Punkt (Falleitung) definitiv nachgewiesen werden konnten (Figur 2). Beim zweiten Probenahmepunkt (PW1) wurde zwar nach 10 Min. ebenfalls ein Anstieg beobachtet, ein Teil der Werte lag jedoch unter der Bestimmungsgrenze von 100 cfu/ml. Die maximale Konzentration an lebenden Zellen (300 cfu/ml) ist rund 10'000-mal niedriger als der Höchstwert der Hefe-DNA von  $8 \times 10^6$  cfu-Equivalente/ml. Diese starke Reduktion an lebenden bzw. auf Agar vermehrungsfähigen Hefezellen gegenüber der detektierbaren Hefe-DNA könnte durch den alkalischen pH-Wert von 10.5 oder die Anwesenheit von zelltoxischen Substanzen im Abwasser erklärt werden.

Im Gegensatz zum Lebendnachweis war die Hefe-DNA bei den zwei anschliessenden Probenahmestellen bis zum Eintritt in die Klärbecken (PW2 und Eingang Kläranlage) 32 bzw. 45 Min. nach Einleitung weiterhin eindeutig detektierbar. Die Höchstwerte betragen jeweils  $1 \times 10^6$  cfu-Equivalente/ml. Auch unter Berücksichtigung der Fehlerrate des Analyseverfahrens von ca. 30% sind diese Werte signifikant über der Bestimmungsgrenze sowie über dem 'Hintergrundsignal' von jeweils 1'000 cfu-Equivalenten/ml.

Innerhalb der Kläranlage war der Verlauf der cfu-Werte des Lebendnachweises und der cfu-Equivalente des DNA-Signals relativ ähnlich. Neben vereinzelt höheren Werten, konnte bei allen drei Probenahmestellen kein signifikanter Anstieg mehr beobachtet werden. Beide Signale verloren sich im 'Hintergrundrauschen' des Klärwassers, das bei ungefähr 6'000 cfu-Equ./ml (DNA-Signal) bzw. 200 cfu/ml (Zellsignal) lag. Die Werte des Hintergrundrauschens deuten auf das Vorhandensein gewisser natürlich im Klärwasser vorkommender Hefen hin.



Figur 2:

- (a) Resultate des Lebendnachweises (→ cfu/ml: geschlossene Symbole) und 'real-time' PCR-Nachweises (→ cfu Äquivalente/ml: offene Symbole) für alle Proben der Probenahmestellen vor der Kläranlage (Falleitung (FL rot), Pumpwerk 1 (PW1 hellblau), Pumpwerk 2 (PW2 grüne), Eingang Kläranlage (E royal-blau)). Hinweis: Um den Verlauf übersichtlicher darzustellen, wurden die Punkte z.T. miteinander verbunden.
- (b) Resultate für alle Proben der Probenahmestellen in der Kläranlage (Mischbecken (M hellblau), Ablauf Mischbecken (AM rot), Ablauf Neutralisation (AN grün)).

## Diskussion

Zweck des Hefe-Ausbringungsversuches war es, das Entweichen von Mikroorganismen aus einer Biotech-Anlage ins Abwasser zu simulieren und zu untersuchen, ob diese in der Industriekanalisation bzw. in der Chemie-Kläranlage mit der verwendeten Methodik noch nachgewiesen werden können.

Für die Beurteilung der Methoden dienten der zeitliche und räumliche Abstand vom Ausbringungspunkt, an dem die Hefe noch detektierbar war, als Kriterien. Die Resultate zeigen, dass sich diesbezüglich der Lebendnachweis wesentlich weniger gut eignet. Mit dieser Methode konnten lebendige Zellen nur gerade während 30 Min. auf Agar detektiert werden und dies auch bereits in stark reduzierter Zahl. Im Gegensatz dazu war die quantitative PCR-Methode in der Lage, Hefe-spezifische DNA bis zu 2 Std. nach Ausbringung bzw. bis zum Eintritt des Abwassers in die Kläranlage in signifikanten Mengen zu detektieren.

Für eine allfällige Überwachung des Abwassers auf eine mögliche mikrobielle Kontaminante aus einem Biotech-Betrieb ist somit der DNA-Nachweis besser geeignet. Da die Organismen-DNA über eine längere Zeit und Distanz vom Punkt des Entweichens nachweisbar ist, ergibt sich ein grösserer Spielraum für die Probenahmen.