



## Wirkungsbezogene Analytik auf Basis von Leuchtbakterien, gekoppelt an Fließinjektionsanalyse und Ionenchromatographie

Frieder Junginger<sup>1,2</sup>, Oliver Happel<sup>1</sup>, Heinz-Jürgen Brauch<sup>1</sup>, Jan Hoinkis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DVGW-Technologiezentrum Wasser (Karlsruhe),

<sup>2</sup>Hochschule für Technik und Wirtschaft Karlsruhe

### Zusammenfassung

Im Bereich der wirkungsbezogenen Analytik (WBA) ist die Untersuchung der Hemmwirkung auf Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*) ein etabliertes Verfahren. Als Erweiterung zur Untersuchung der Gesamtprobe im Küvettentest wurde ein kombiniertes Fließinjektions- und Chromatographieverfahren entwickelt. Mit einem selbst aufgebauten Lumineszenzsensor in Kombination mit der Anionenaustauschchromatographie konnte die Realisierbarkeit einer solchen Kopplung anhand der WBA von Chromat und Azid gezeigt werden. Die Variation der Expositionsbedingungen führte zu plausiblen Dosis-Wirk-Kurven.

### Einleitung

Bei oxidativen Verfahren der Trinkwasseraufbereitung (z. B. Ozonung) entstehen aus organischen Spurenstoffen und Matrixbestandteilen oft anionische Transformationsprodukte, wie zum Beispiel Carbonsäuren [1]. Zu ihrer umfassenden Bewertung werden unter anderem Biotoxizitätstests angewendet. Ein etabliertes Verfahren ist die Untersuchung der Hemmwirkung von Gesamtproben auf die Biolumineszenz von marinen Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*) per Küvettentest nach DIN EN ISO 11348.

Mit dem Ziel, neben der Gesamtprobe auch anionische Einzelkomponenten wirkungsbezogen untersuchen zu können, wurde im Rahmen einer Masterarbeit am TZW Karlsruhe [2] erstmals eine Verfahrenskombination aus der Fließinjektionsanalyse (FIA), der Ionenchromatographie (IC) und der Lumineszenzdetektion entwickelt. Literaturbekannt waren davor nur wenige Beispiele, in denen eine Umkehrphasenchromatographie (RP), eine Sequentielle-Injektions-Analyse (SIA) oder eine FIA mit einem solchen „Leuchtbakterien-Sensor“ gekoppelt wurden [3-6]. In den zitierten Arbeiten wurde der Aufbau des kombinierten Sensorkonzeptes u.a. anhand der Trennbarkeit und der Toxizität verschiedener Phenole wie beispielsweise 3,4-Dichlorphenol oder 2,4-Dinitrophenol [3; 5] getestet. Eine automatisierte FIA, in der eine Leuchtbakterien-suspension in eine Trägerlösung mit Kupferionen injiziert wurde, um die Schwermetalltoxizität anhand der Lichtemission zu bewerten, wurde in [4] publiziert.

In diesem Beitrag werden das Design der selbstgebauten Detektionseinheit, deren Kopplung mit der IC und FIA sowie erste Ergebnisse vorgestellt.

### Lumineszenzdetektor

Das selbstgebaute Sensorsystem ist so gestaltet, dass es variabel in verschiedenen Fließsystemen als Detektor ein-

gesetzt werden kann, wobei die Spannungsversorgung, sowie die Datenaufnahme über dieselbe USB-Schnittstelle erfolgen. Die vom Lumineszenzdetektor erfasste Größe ist das Eigenleuchten der Bakterien, das unter für sie geeigneten und konstanten Umgebungsbedingungen aus Stoffwechsellvorgängen resultiert und stabil bleibt. Sind die Wachstumsbedingungen gut und ist die Bakteriendichte hoch genug, kann die Lichtemission auch gut mit den Augen im abgedunkelten Raum wahrgenommen werden (s. Langzeitbelichtung in Abbildung 1). Verschlechtern sich die Lebensbedingungen, so werden die Stoffwechsellvorgänge gehemmt, was sich an einer verminderten Lichtemission zeigt.



Abb. 1: Eigenleuchten der Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*)

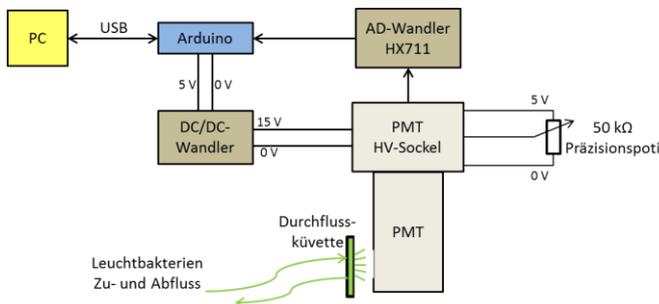
Für die Detektion der Lumineszenz wird ein Photomultiplier (PMT) verwendet. PMT wandeln einfallendes Licht in eine Spannung um und zeichnen sich durch ihre besonders hohen Verstärkungsfaktoren aus (standardmäßig bis zu  $v = 2^8$ ), die sie zu den empfindlichsten Sensoren für die Lichtmessung machen. Abgesehen von dem PMT konnte der Lumineszenzdetektor ausschließlich aus kostengünstiger Elektronik zum Gesamtpreis von ca. 100 € aufgebaut werden und ist in einem kompakten, lichtundurchlässigen Metallgehäuse mit den Maßen 23 cm × 18 cm × 5 cm (B×H×T) verbaut.

Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau der Detektionseinheit, bei der noch die USB-Verbindung zum PC ergänzt ist. Zur Erzeugung der PMT-Hochspannung von ca. 800 V werden zunächst die 5 V der USB-Schnittstelle über einen DC-DC-Wandler (LME 0515, Murata Power Solutions) auf 15 V gebracht. Diese Gleichspannung entspricht der notwendigen Versorgungsspannung für den Hochspannungssockel C6270 (Hamamatsu) und entkoppelt ihn zugleich galvanisch von der Restschaltung, was für die Signalverarbeitung nötig ist. Über die direkte Generierung der Hochspannung im gut isolierten

Sockel treten auch keine Gefährdungen durch Stromschlag in diesem Selbstbau auf.

Zur Lichtdetektion kommt ein PMT vom Typ *R1477-07* (Hamamatsu) zum Einsatz. Die Höhe der Betriebsspannung gibt die Verstärkung vor und kann über ein außen am Metallgehäuse angebrachtes 10-Gang Präzisionspotentiometer stufenlos eingestellt werden. Von der letzten Dynode des PMT zur Anode wird ein Lastwiderstand von 1 k $\Omega$  eingesetzt, der aus dem Elektronenstrom eine für den AD-Wandler verwertbare Spannung generiert, die sich linear zum einfallenden Licht verändert.

Durch den AD-Wandler vom Typ *HX711* mit einer Auflösung von 24 Bit wird das Analogsignal des PMT digitalisiert und über den Mikrocontroller (Arduino nano) mit Mini-USB-Schnittstelle an einen PC übertragen. Die Stromaufnahme der Schaltung liegt bei ca. 100 mA, welche die USB-Schnittstelle jedes PCs zur Verfügung stellt.



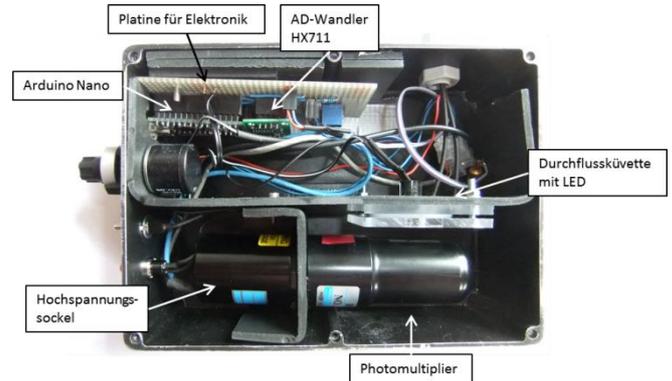
**Abb. 2:** Schematische Darstellung des selbstgebauten Lumineszenzensors

Nach dem Vorbild von [5] wurde eine spiralförmig gewickelte Durchflussküvette mit einem Innenvolumen von ca. 160  $\mu$ L (Abbildung 3), bestehend aus einer transparenten Teflonkapillare, gegenüber dem PMT positioniert. Als Halterung der Durchflussküvette dienen zwei Plexiglasscheiben, zwischen denen die gewickelte Kapillare verklemmt ist. Eine hinter der Wicklung angebrachte Silberfolie erhöht durch ihre Reflexion die Lichtausbeute. In der Mitte der Wicklung befindet sich eine grüne LED (Emissionwellenlänge  $\lambda = 565$  nm), die zum Funktionstest vor einer Messung über einen Kippschalter ein- und ausgeschaltet werden kann. Ein dünnes Teflonblättchen vor der LED sorgt für eine diffuse und abgeschwächte Abstrahlcharakteristik.



**Abb. 3:** Spiralförmige Durchflussküvette

Ein Foto des Detektorinneren ist in Abbildung 4 zu sehen.



**Abb. 4:** Innenansicht des Sensorsystems

Die notwendigen Medien zur Kultivierung und Stabilisierung der Bakterien und zur Aufreinigung der Bakteriensuspension für die Messung wurden aus den in der DIN [6] genannten Anweisungen auf die für den Durchflussbetrieb erforderlichen Randbedingungen adaptiert. Zur Kultivierung von ausreichenden Mengen an Bakteriensuspension wurde ein Nährmedium (30 g/L Natriumchlorid, 6,1 g/L Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 2,8 g/L Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, 0,2 g/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,5 g/L Diammoniumhydrogenphosphat, 3 mL/L Glycerin, 5 g/L Pepton aus Fleisch, 0,5 g/L Hefeextrakt, pH 7) hergestellt. Aus einem gefriergetrockneten Leuchtbakterienstamm wurden zunächst auf einem Nährboden aus Agar und Nährmedium über zwei bis drei Tage bei 20° C Einzelkolonien gezüchtet, die daraufhin als Stamm für größere Flüssigkulturen dienen. Die Suspension wurde später zentrifugiert, wobei der Überstand dekantiert wird, während die Leuchtbakterien als Pellet am Boden des Gefäßes erhalten werden. Um die Reste des Nährmediums auszuwaschen, wurden sie in 2%iger NaCl-Lösung resuspendiert und abermals zentrifugiert.

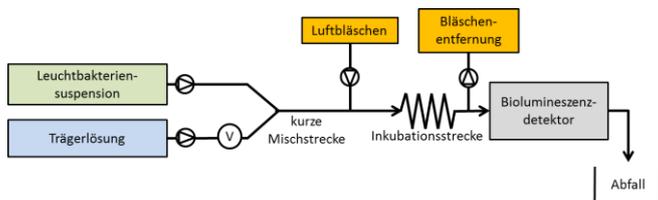
Um ideale Rahmenbedingungen für die Messung zu schaffen, in denen sowohl die Bakteriendichte, als auch deren Lichtemission konstant bleibt, wird in der DIN folgende Testlösung als Medium empfohlen: 8 g/L D(+)-Glucose-Monohydrat, 20 g/L Natriumchlorid, 2 g/L Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 0,3 g/L Kaliumchlorid, 11,9 g/L HEPES. Der pH-Wert ist auch hier auf 7 +/- 0,2 einzustellen.

## Einsatz in der Fließinjektionsanalyse

Die Hemmwirkung toxischer Stoffe auf das Eigenleuchten der Leuchtbakterien ist expositionsabhängig und wird über die Konzentration und die Inkubationszeit bestimmt. Die erforderliche Inkubationszeit von mehreren Minuten wird in der FIA durch die Installation einer verlängerten Inkubationsstrecke erreicht, die die Leuchtbakteriensuspension passieren muss und kann über die Flussrate, die Schlauchlänge und den Schlauchdurchmesser angepasst werden. In Abbildung 5 ist das eingesetzte Fließsystem schematisch dargestellt. Beim gewählten Design führte das gewollte 1-zu-1-Mischungsverhältnis aus Leuchtbakteriensuspension und Trägerlösung zu einem Ver-

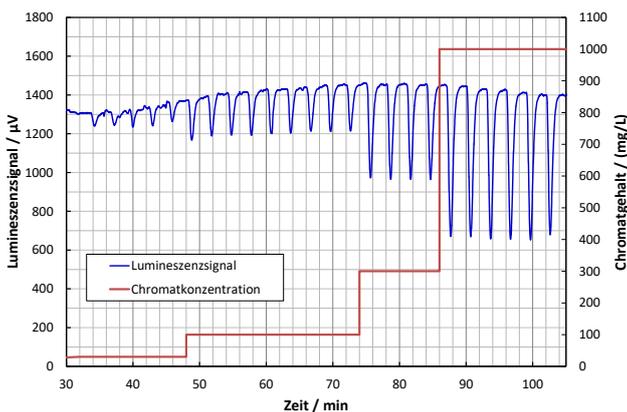
brauch der Suspension von etwa 1 mL/min. Für eine typische Messreihe wurden ca. 200 mL Suspension vorbereitet. Um die Beschaffenheit des Mediums im Fließsystem möglichst stabil zu halten, wurde der Salzgehalt der Trägerlösung dem des Testmediums angepasst. Versuche zur Untersuchung des Einflusses des Salzgehaltes der Trägerlösung zeigten bei der Verwendung von Reinstwasser als Träger einen ca. 50%igen Einbruch des Eigenleuchtens.

Zudem werden in der Abbildung das aktive Einbringen kleiner Luftblasen vor der Inkubationsstrecke und ihre aktive Entfernung jeweils über ein T-Stück angedeutet, was ein etabliertes Verfahren der *segmented flow analysis (SFA)* zur Vermeidung von Signalverbreiterungen ist.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des Aufbaus für den Einsatz der Leuchtakterien in der Fließ-injektionsanalyse

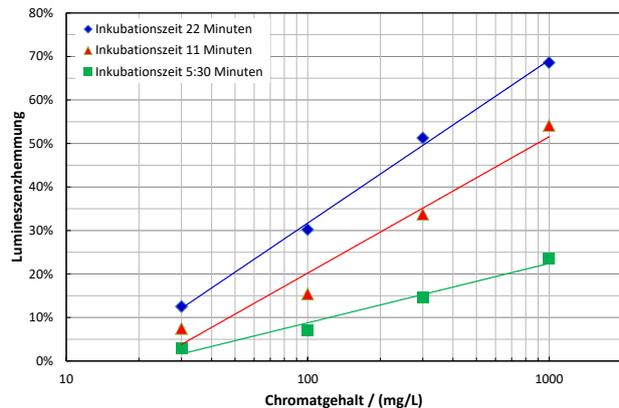
Zur Positivkontrolle des Leuchtbakterientests wird in der DIN unter anderem Kaliumdichromat (Chromat) als Testsubstanz genannt. Im typischen Küvettentest verringert sich die Lichtemission um die Hälfte, wenn die Bakterien einer Lösung mit einem Chromatgehalt von 3 mg/L für 15 Minuten exponiert werden. Ein Beispiel eines FIA-Laufes mit Injektionen von Chromatlösungen ansteigender Konzentration ist in Abbildung 6 zu sehen. In mehreren Versuchen dieser Art zeigte sich, dass mit diesem Aufbau typische Dosis-Wirkungs-Beziehungen erhalten werden (Abbildung 7).



**Abb. 6:** Einbruch der Lumineszenz bei Injektion von Chromatstandards ins FIA-System (Inkubationszeit: 11 min)

Die Unabhängigkeit des Sensorsystems von der Intensität des Eigenleuchtens der Leuchtakterien zeigen die Daten in Tabelle 1. Bei der Betrachtung der relativen Hemmwirkung der injizierten Standards werden bei sehr schwacher Lumineszenz und bei normaler Lumineszenz (ca. 200-fach stärker) kaum Unterschiede festgestellt. Trotzdem sollte eine starke Lumineszenz angestrebt werden, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei starker Lumineszenz besser ausfällt und sich die Datenqualität hierdurch erhöht.

nis bei starker Lumineszenz besser ausfällt und sich die Datenqualität hierdurch erhöht.



**Abb. 7:** Dosis-Wirkungs-Beziehung von Chromat bei verschiedenen Inkubationszeiten in halblogarithmischer Auftragung

**Tabelle 1:** Relative Hemmwirkungen von Chromat-Standards auf das Eigenleuchten der Leuchtakterien

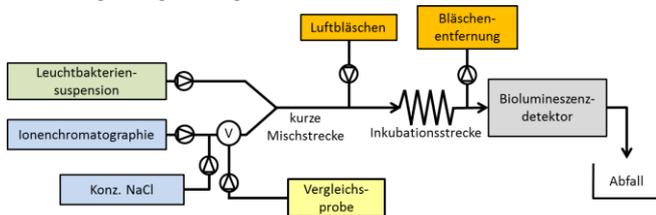
Chromatgehalt (mg/L)	Hemmung bei schwacher Lumineszenz	Hemmung bei normaler Lumineszenz
30	8,5% ± 0,7%	7,4% ± 1,0%
100	20,9% ± 0,7%	15,4% ± 0,7%
300	37,2% ± 1,9%	33,7% ± 0,1%
1000	55,4% ± 1,9%	54,1% ± 1,1%

## Kopplung an die Ionenchromatographie

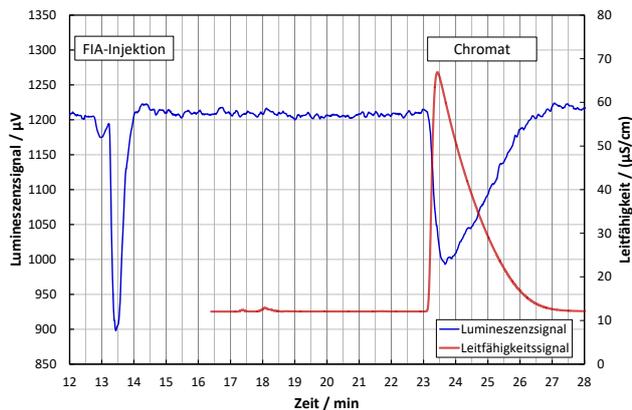
Um ionische Verbindungen nach einer IC-Trennung wirkungsbezogen untersuchen zu können, wird der in Abbildung 5 vorgestellte FIA-Aufbau um die IC-Einheit erweitert. Das Eluat des Chromatographen (1 mL/min) ersetzt nun die FIA-Trägerlösung (1 mL/min). Die Beschaffenheit des suppressierten IC-Eluents entspricht nahezu Reinstwasser und stellt kein optimales Medium für die marinen Leuchtakterien dar. Um den Salzgehalt im System konstant zu halten, wird das Eluat nach der Suppression und der Leitfähigkeitsmessung auf einen Natriumchloridgehalt von 20 g/L eingestellt. Zur Vermeidung einer unnötigen Verdünnung des Eluats und damit einhergehender verminderter toxische Wirkung toxischer Analyte, wird zu diesem Zweck eine konzentrierte Kochsalzlösung mit angepasster Flussrate über ein T-Stück beigemischt.

Die in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellten Messungen zeigen chromatographische Trennungen einer chromathaltigen Probe und einer Mischprobe aus Azid und Chromat, sowohl als Leitfähigkeitsmessung, als auch wirkungsbezogen über den neu aufgebauten Detektor. Im Lumineszenzsignal ist bei 13,5 Minuten (Abb. 9) bzw. bei 8 min (Abb. 10) ein erster Lumineszenzeinbruch zu sehen. Dieser stammt von einer FIA-Injektion vor dem chromatographischen Lauf und dient der Positivkontrolle oder der Messung der Gesamprobe,

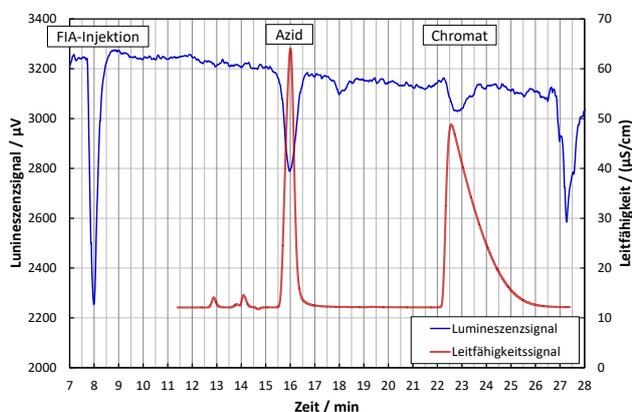
sowie der Markierung des IC-Messbeginns im Lumineszenzsignal zum späteren Abgleich der separaten Datenaufzeichnungen. Die Übereinanderlegung der Leitfähigkeits- und Lumineszenzsignale zeigt einen analogen Kurvenverlauf. Aus dem FIA-Signal mit einer Halbwertsbreite von ca. 30 Sekunden kann auch die chromatographische Auflösung abgeleitet werden, da beide Varianten das gleiche System durchlaufen. Dies ist vergleichbar mit typischen Halbwertsbreiten ionenchromatographischer Signale, wodurch keine übermäßigen Signalverbreiterungen auftreten. Die Inkubationszeit der hier gezeigten Messungen lag bei ca. 6 Minuten. Es ist zu vermuten, dass den Ergebnissen aus Abbildung 7 entsprechend, eine Erhöhung der Expositionsdauer eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung ermöglicht.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des gekoppelten Messsystems aus Ionenchromatographie, FIA und Biotoxizitätssensor.



**Abb. 9:** Chromatogramme mit Leitfähigkeits- und wirkungsbezogener Detektion einer chromathaltigen Probe (1000 mg/L Cr(VI)) mit zusätzlicher Vergleichsprobe per FIA-Injektion



**Abb. 10:** Chromatogramme einer chromat- und azidhaltigen Mischprobe mit beiden Detektionsmethoden mit zusätzlicher Vergleichsprobe per FIA-Injektion

## Fazit

Aufbauend auf den in der Literatur beschriebenen LC-Kopplungen mit RP-Säulen konnte erstmals eine Online-Kopplung der wirkungsbezogenen Analytik basierend auf *Vibrio fischeri* an einem Ionenchromatographen realisiert werden. Die zusätzliche Option des FIA-Modus ermöglicht zudem die Injektion von Referenzsubstanzen oder auch Gesamtwasserproben zur Positivkontrolle und synchronisiert die beiden Messsysteme. Da das IC-Eluat nach der Suppression rein wässrig vorliegt, treten bei diesem Aufbau nicht die Störungen durch Lösungsmittel auf, wie sie bei RP-Trennungen beschrieben wurden.

Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass die Sensitivität dieser Kopplung geringer ausfällt als beim etablierten Küvettentest nach DIN [7] und somit messbare Effekte in Umweltproben fraglich sind. Die Stärken dieses Verfahrens liegen vielmehr in der Charakterisierung von anionischen Transformationsprodukten, die im Rahmen von Laborversuchen erhalten werden. Aktuell wird in dem vom DVGW geförderten Vorhaben „WBA BeReiT“ (LW Langenau und TZW Karlsruhe) u. a. diese Kopplung zur Untersuchung anionischer Transformationsprodukte aus oxidativen Verfahren eingesetzt und weiterentwickelt.

## Literatur

- [1] H. Selçuk, M. Çakmakç, B. Kaszyk-Hordern, Ozonation in Drinking Water and By-Products Formation. In: Control of Disinfection By-Products in Drinking Water Systems, Editors: A. Nikolaou et al., pp. 79-96, **2007**.
- [2] F. Junginger, Kopplung der Fließinjektionsanalyse und der Ionenchromatographie an ein Lumineszenz-Sensorsystem zur Biotoxizitätsbestimmung auf Basis von Leuchtbakterien. Masterthesis, HS Karlsruhe, **2016**.
- [3] G. Eberz, H.G. Rast, K. Burger, W. Kreiss, C. Weisemann, Bioactivity Screening by Chromatography-Bioluminescence Coupling, *Chromatographia*, **1996**, 43(1/2), 5-9.
- [4] E. Komaritis, E. Vasiliou, G. Kremmydas, D.G. Georgakopolus, C. Georgiou, Development of a Fully Automated Flow Injection Analyzer Implementing Bioluminescent Biosensors for Water Toxicity Assessment, *Sensors* **2010**, 10, 7089-7098.
- [5] P. Stolper, Entwicklung von online-Toxizitätstests für die wirkungsbezogene Analyse von Wasserinhaltsstoffen. Dissertation, TU München, **2008**.
- [6] S.P. Costa, P.C. Pinto, R.A. Lapa, M.L. Saraiva, Toxicity Assessment of Ionic Liquids with *Vibrio fischeri*: An Alternative Fully Automated Methodology. *Journal of Hazardous Materials*, **2015**, 284, 136-142.
- [7] DIN EN ISO 11348-1, Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) – Teil 1: Verfahren mit gezüchteten Bakterien, Mai **2009**.

## Korrespondenzadresse:

Frieder Junginger  
 DVGW-Technologiezentrum Wasser  
 Abteilung Analytik und Wasserbeschaffenheit  
 Karlsruher Straße 84  
 76139 Karlsruhe  
 Tel.: 0721 9678-1932, Fax: 0721 9678-104  
 E-Mail: [frieder.junginger@tzw.de](mailto:frieder.junginger@tzw.de)