

Qualitätskontrolle von Pharmawasser

Autoren: Dr. Olga Sosedov und Dr. Daniel Sack, BioChem

Korrespondenz: Dr. Olga Sosedov | BioChem Karlsruhe, Daimlerstr. 5B, 76185 Karlsruhe | Olga.Sosedov@biochem.de



Zusammenfassung

Wasser stellt eines der wichtigsten Medien in der pharmazeutischen Industrie dar. Aufgrund vielfältiger Einsatzgebiete des Wassers in der Arzneimittelherstellung ist dessen chemische und mikrobiologische Kontrolle von großer Bedeutung. Dieser Fachbeitrag beschreibt die aktuelle regulatorische Grundlage für die Qualitätskontrolle des Wassers für pharmazeutische Zwecke gemäß der gängigen Pharmakopöen European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), US Pharmacopoeia (USP) und Japanese Pharmacopoeia (JP). Am Beispiel einer Wasseraufbereitungsanlage wird die Herstellung des Wassers für Injektionszwecke (WFI) mittels Membranverfahren beschrieben. Aufbauend darauf wird das chemisch-physikalische und mikrobiologische Monitoring erläutert.

Weiterhin wird Wasser als mögliche mikrobiologische Kontaminationsquelle in der pharmazeutischen Herstellung näher diskutiert. Der Fachbeitrag vermittelt einen Einblick in die typischen Keimspektren verschiedener Wasserqualitäten und geht näher auf die Adaptationsmechanismen der Mikroorganismen ein, die es ihnen ermöglichen, im Pharmawasser zu überleben. Darüber hinaus gibt er einen Ausblick bzgl. des Online- und Offline-Monitorings von Pharmawasser. Die Parameter Leitfähigkeit und Total Organic Carbon (TOC) sind aktuell im Online-Monitoring gut etabliert. Die Kontrolle des mikrobiologischen Wachstums erfolgt jedoch nach wie vor stichprobenartig im Offline-Monitoring.

Keywords

Pharmawasser | Qualitätskontrolle | Keimspektrum | Oligotrophe Umgebung | Monitoring

Regulatorischer Hintergrund

Die gängigen Arzneibücher European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), US Pharmacopoeia (USP) und Japanese Pharmacopoeia (JP) definieren verschiedene Arten der Wasserqualität und deren Anforderungen. Die Vorgaben der Arzneibücher sind zwar weitgehend harmonisiert, jedoch gibt es leichte Unterschiede hinsichtlich des inhaltlichen Aufbaus und der Kategorisierung verschiedener Wasserqualitäten. Ein Überblick über die einzelnen Qualitätsklassen der Pharmakopöen ist in Tab. 1 dargestellt.

Die Ph. Eur. besitzt hauptsächlich 3 Wassermönografien (gereinigtes Wasser, Wasser für Injektionszwecke und Wasser für Extrakte) inkl. den Unterklassen zur Lagerungsform (Bulk vs. Behälter) sowie steriles Wasser. Im Gegensatz hierzu definiert die USP ein feineres Spektrum unterschiedlicher Wasserklassen je nach Anwendung und gibt einen tieferen Einblick. Es liefert neben den Monografien für gereinigtes Wasser und WFI eine Monografie für Reinstampf, mehrere Monografien zu sterilem Wasser und mit <1231> „*Water for Pharmaceutical Purposes*“ sogar ein Übersichts-kapitel, welches nicht nur die Wasserklassen beschreibt, sondern auch auf die Konzeption und Qualifizierung von Wasseranlagen

eingeht. Ein derartiges Übersichts-kapitel sucht man im europäischen Arzneibuch vergebens, jedoch gibt es eine entsprechende EMEA-Guideline. [4]

Der Aufbau des JP ähnelt stark dem europäischen Pendant. Auch hier gibt es keine separate Monografie zu Reinstampf. Zudem wird bei gereinigtem Wasser und WFI zwischen Bulk und in Behältern unterschieden. Weiterhin gibt es die entsprechenden sterilen Wasserqualitäten. Im allgemeinen Teil befindet sich mit <GZ-2-172> „*Quality Control of Water for Pharmaceutical Use*“ ebenfalls ein Übersichts-kapitel ähnlich zu USP <1231>. Das Kapitel legt im Vergleich weniger Fokus auf den Aufbau von Wasseranlagen, dafür aber mehr auf das entsprechende Monitoring. [1,2,3]

Die Pharmakopöen Ph. Eur., USP und JP unterstützen den industriellen Anwender mit einer Reihe von Prüfparametern zur effizienten Kontrolle der Wasserqualität. Wichtige Beispiele sind die Prüfungen auf organischen Kohlenstoff (Total Organic Carbon, TOC), Leitfähigkeit, Keimzahl (Bioburden) und Endotoxine (Tab.2). Die Anforderungen an die chemisch-physikalischen Parameter sind inkl. der Anpassung der Monografien des Europäischen Arzneibuchs im Juli 2026 (Ph. Eur. 12.3) harmonisiert. Die neueste Aktualisierung vereinheitlicht die Anzahl der Nachkommastellen der TOC-Spe-

Wasserqualitäten gem. Ph. Eur.	Wasserqualitäten gem. USP <1231>	Wasserqualitäten gem. JP <GZ-2-172>
(0169) Water for Injection, WFI (bulk, sterilised)	Water for Injection, WFI (bulk)	Water for Injection, WFI (sterilised in containers)
(0008) Purified Water (bulk, in containers)	Purified Water, AP (bulk)	Purified Water (in containers, sterilised in containers)
	Water for Hemodialysis	
	Pure Steam	
(2249) Water for Preparation for Extracts (complies with 0008)	Sterile Monographed Waters (AP, WFI, Inhalation usw.)	Water

Tabelle 1: Qualitätsklassen von Pharmawasser gemäß Arzneibüchern (Ph. Eur./USP/JP).

zifikation ($\leq 0,50$ mg C/L) gegenüber der USP bzw. JP. Zusätzlich wird der Prüfpunkt der oxidierbaren Substanzen zukünftig durch die TOC-Analytik ersetzt. Hierzu wurde das entsprechende Kapitel Ph. Eur. 2.2.44 um eine Methode B erweitert, welche die höheren TOC-Gehalte von sterilen Wasserzubereitungen berücksichtigt und so besser den aktuellen Stand der Technik bei den chemisch-physikalischen Prüfparametern abbildet. Außerdem sind TOC-Spezifikationen abhängig von der Behältergröße vorgegeben. Bisher basierte die Prüfung auf oxidierbare Substanzen auf einem nasschemischen Limit Test mit Kaliumpermanganat, ohne genaue Messwerte.

Während sich die Pharmakopöen hinsichtlich der Grenzwerte für die Keimzahlbelastung in WFI und gereinigtem Wasser einig sind, findet man bei den Prüfvolumina und Methoden der Keimzahlbestimmung wesentliche Unterschiede (Tab. 3). So gibt die USP einen nährstoffreichen Plate Count Agar (PCA) für die Detektion der Keimbelastung im Pharmawasser vor, dagegen verweisen die europäischen und japanischen Arzneibücher auf ein nährstoffarmes R2A-Medium. Die unterschiedliche Nährstoffverfügbarkeit in den Nährmedien resultiert in den entsprechenden Inkubationsbedingun-

gen, mit einer kürzeren Inkubationsdauer bei Verwendung von PCA bzw. längerer Inkubationsdauer bei Verwendung von R2A. Zudem beschränkt sich die Ph. Eur. auf die Verwendung der Membranfiltration als Methode der Wahl für beide Wasserqualitäten. Die USP und JP erwähnen hingegen zusätzlich die Plattengussmethode als Alternative für die Untersuchung von gereinigtem Wasser (Purified Water). Die Vorteile und Nachteile dieser Kultivierungsbedingungen werden später im Zusammenhang mit dem Keimspektrum des Pharmawassers näher betrachtet.

Aufbau einer Wasseraufbereitungsanlage

Die Konzeption einer Wasseranlage ist stark abhängig vom Standort und der individuellen Anwendung bzw. Anforderung an die Wasserqualität. Eine ausführliche Beschreibung aller möglichen Aufbereitungsschritte und technischen Komponenten würde den Rahmen des Fachbeitrags sprengen und ist in einschlägiger Fachliteratur detailliert beschrieben. [5,6,7]

Für eine bessere Verständlichkeit der Grundprinzipien wird sich im folgenden Abschnitt daher auf eine vereinfachte



■ Dr. Olga Sosedov

studierte Biologie an der Universität Karlsruhe (TH) und promovierte an der Universität Stuttgart im Bereich angewandte Mikrobiologie. Seit 2018 ist sie bei BioChem Labor für biologische und chemische Analytik tätig. Sie unterstützt die Abteilung Mikrobiologie als Laborleitung F&E und betreut neben produktspezifischen Eignungsprüfungen gem. Ph. Eur. und USP weitere Sonderprojekte mit mikrobiologischen Herausforderungen.



■ Dr. Daniel Sack

studierte Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) und promovierte dort im Bereich organischer Photokatalysatoren auf Peptidbasis. Anschließend arbeitete er als Projektleiter für analytische Dienstleistungen bei HWI Pharma Services. Seit 2023 ist er als Laborleitung für die Abteilungen Partikel-, Wasser- und Elementanalytik bei BioChem Labor für biologische und chemische Analytik tätig. Zudem betreut er Projekte im Bereich Reinigungsvalidierung.

	WFI (bulk)			Gereinigtes Wasser (bulk)		
Parameter	Ph. Eur. (0169)	USP <1231>	JP <GZ-2-172>	Ph. Eur. (0008)	USP <1231>	JP <GZ-2-172>
Herstellprozess	Destillation oder ein äquivalentes Verfahren (z. B. Membranverfahren)			Destillation, Ionenaustauscher, Umkehrosmose oder vergleichbare Verfahren		
Konduktivität	≤1,1 µS/cm (20 °C) ¹	≤1,1 µS/cm (20 °C) ¹	≤1,1 µS/cm (20 °C) ¹	≤4,3 µS/cm (20 °C)	≤1,1 µS/cm (20 °C) ¹	≤1,1 µS/cm (20 °C) ¹
Bioburden	<10 KBE/100 ml	<10 KBE/100 ml	<10 KBE/100 ml	<100 KBE/ml	<100 KBE/ml	<100 KBE/ml
Endotoxin	<0,25 IU/ml	<0,25 IU/ml	<0,25 IU/ml	<0,25 IU/ml ³	Keine Vorgabe	Keine Vorgabe
TOC	≤0,50 mg/l	≤0,50 mg/l	≤0,50 mg/l	≤0,50 mg/l	≤0,50 mg/l	≤0,50 mg/l
Nitrat und Schwermetalle	Keine Vorgaben, solange die Konduktivität (Stufenprüfung WFI) eingehalten wird ²			Nitrat ≤0,2 ppm und Screening auf Schwermetalle Entfällt, wenn die Konduktivität (Stufenprüfung WFI) eingehalten wird ²		
Lagerung, Verteilung	Keine Vorgabe	65 °C bis 80 °C (empfohlen), zirkulierend	≥80 °C, zirkulierend	Keine Vorgabe		

¹ Stufenprüfung Leitfähigkeit (weitere Stufen bei 25 °C und ggf. pH-Kontrolle)

² Sehr niedrige Leitfähigkeit (Kriterien Stufenprüfung WFI) ermöglicht den Verzicht auf diese Prüfparameter. Bei Dialysezwecke jedoch zusätzlich Prüfung auf Aluminium nötig

³ Nur bei Wasser für Dialysezwecke, falls keine adäquaten Maßnahmen zur Entfernung von Endotoxinen vorliegen

Tabelle 2: Prüfparameter für gereinigtes Wasser und WFI gemäß den Regelwerken Ph. Eur., USP und JP.

Darstellung beschränkt, mit Fokus auf die Qualitätskontrolle anhand einer Beispiel-Anlage.

Die Pharmakopöen geben nicht nur die Qualitätsmerkmale der verschiedenen Wasserklassen vor, sondern auch zulässige Aufbereitungsverfahren. So war bis 2017 in der EU vorgeschrieben, dass WFI nur über Destillation gewonnen werden darf, wodurch die Destillation, insbesondere bei älteren Anlagen, immer noch weit verbreitet ist. Energetisch ist die Destillation aufwendig, was alternative Membranverfahren zur Herstellung von kaltem WFI attraktiv macht. In Abb. 1 ist ein beispielhafter Aufbau einer solchen Anlage dargestellt, entsprechende Probenahmestellen für die Qualitätskontrolle wurden markiert und nummeriert.

Grundsätzlich sind Probenahmestellen vor und nach jedem Aufbereitungsschritt empfehlenswert, sodass Verän-

derungen oder Probleme im System besser erkannt und lokalisiert werden können. Das als Ausgangspunkt verwendete Speisewasser sollte Trinkwasserqualität (TW) besitzen und eingangs regelmäßig überprüft werden (Nr. 1). [2] Je nach Standort ist die Verfügbarkeit und Qualität des Speisewassers unterschiedlich, sodass ggf. zusätzliche Aufbereitungsschritte vorgeschaltet werden müssen, um die gewünschte Trinkwasserqualität zu erhalten. Anschließend wird das Trinkwasser vorfiltriert und im Enthärter (Ionenaustauscher) vorbehandelt. Das Ionenaustauscherharz muss regelmäßig mit Salz regeneriert werden, um nicht an Effizienz zu verlieren. Zusätzlich bietet sich eine weitere Probenahmestelle (Nr. 2) zur Überwachung an, da Ionenaustauscherharze eine große Oberfläche haben und somit eine Grundlage für mögliche Keimbelastungen bieten. An-

Parameter	Ph. Eur. (0169, 0008)	USP <1231>	JP <GZ-2-172>
Testverfahren	WFI, Purified Water: Membranfiltration	WFI: Membranfiltration Purified Water: Plattenguss oder Membranfiltration	WFI: Membranfiltration Purified Water: Plattenguss oder Membranfiltration
Minimales Prüfvolumen	WFI: 200 ml Purified Water: variabel	WFI: 200 ml Purified Water: 1 ml, 100 ml	WFI: 100 ml Purified Water: 1 ml
Medium	R2A-Agar (nährstoffarm)	Plate Count Agar (nährstoffreich), PCA	R2A-Agar (nährstoffarm)
Inkubationstemperatur	30 °C bis 35 °C	30 °C bis 35 °C	20 °C bis 25 °C oder 30 °C bis 35 °C
Inkubationsdauer	>5 Tage	48 h bis 72 h	4 Tage bis 7 Tage oder länger

Zusammensetzung von Plate Count Agar (PCA):

Pepton aus Casein (Trypton, 5,0 g/l), Hefeextrakt (2,5 g/l), Glucose (1,0 g/l), Agar (15,0 g/l)

Zusammensetzung von R2A-Agar [1]:

Hefeextrakt (0,5 g/l), Proteose-Pepton (0,5 g/l), Pepton aus Casein (0,5 g/l), Glucose (0,5 g/l), Stärke (0,5 g/l), di-Kaliumhydrogenphosphat (0,3 g/l), Magnesiumsulfat (0,024 g/l), Natriumpyruvat (0,3 g/l), Agar (15,0 g/l)

Tabelle 3: Keimzahlbestimmung gemäß Ph. Eur., USP und JP.

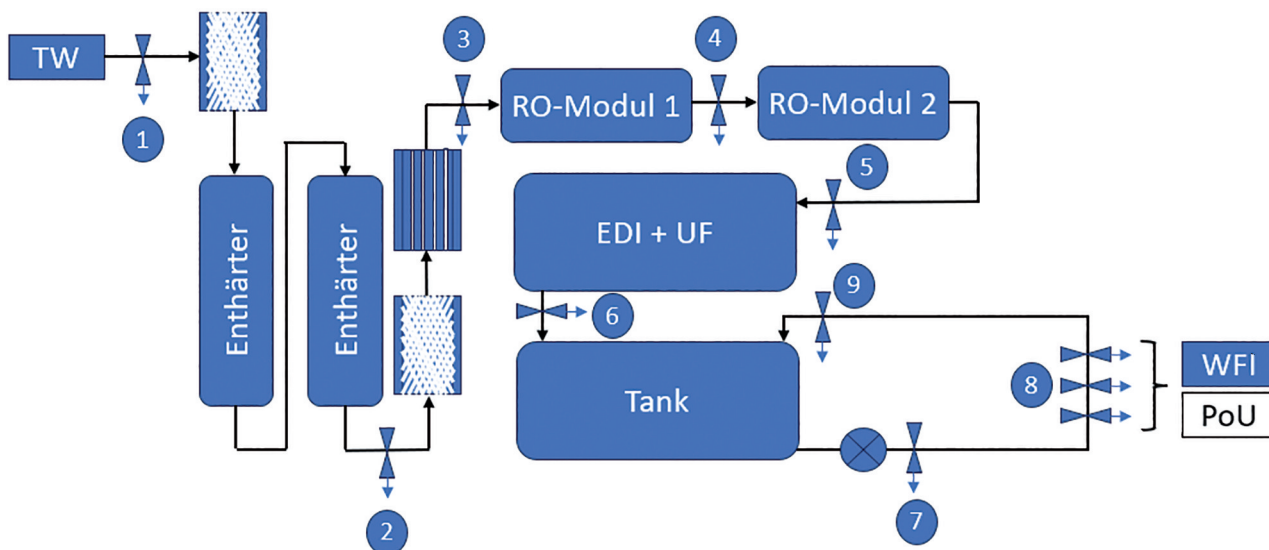


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Wasseraufbereitungsanlage (Quelle: [9]).

schließlich wird erneut filtriert und das Wasser mittels Membranentgasung von CO_2 befreit.

Die Membranentgasung ist ein wichtiger Schritt, um die Leitfähigkeit weiter zu senken, da durch Umkehrosmose kein CO_2 abgetrennt werden kann. Alternativ kann die CO_2 -Entfernung auch durch Zugabe von NaOH erfolgen, welches im Zuge der Umkehrosmose als Natriumcarbonat abgetrennt wird. Zwischen der Membranentgasung und der Umkehrosmose (Reverse Osmosis, RO) befindet sich Probenahmestelle Nr. 3. Danach folgen 2 RO-Module mit den Probenahmepunkten 4 und 5. Im letzten Abschnitt der Wasseraufbereitungsanlage befinden sich die Elektrodeionisation (EDI) und die Ultrafiltration (UF) zur Herstellung von kaltem WFI. In einer klassischen WFI-Anlage mittels Destillation befände sich hier die Destille statt der Ultrafiltrationseinheit. Am Ausgang der Wasseraufbereitung sollte sich ebenfalls ein Probenahmepunkt (Nr. 6) befinden.

Der zweite Teil von Abb. 1 bezieht sich auf die Lagerung und Verteilung des erzeugten WFI. In diesem Beispiel ist ein Loop mit 3 Entnahmestellen (Point of Use, PoU) und einer Umwälzpumpe dargestellt. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie ein entsprechender Loop betrieben werden kann, allen voran die Temperatur (heiß oder kalt). Sind der Tank und Loop dauerhaft beheizt (65°C bis 85°C), wird das Risiko einer Kontamination durch Keime gesenkt, jedoch steigen die Energiekosten. Zudem werden Korrosionsprozesse (Rouging) durch höhere Temperaturen unterstützt. [8]

Alternativ kann dieser Teil auch kalt betrieben werden, aber nur mit einer entsprechenden Sanitisierungsstrategie (z. B. Ozonisierung).

Chemisch-physikalische Kontrolle

Zur Kontrolle einer Wasseranlage und der zugehörigen Verteilung bzw. Lagerung wird im Zuge der Qualifizierung eine

individuelle Monitoring-Strategie etabliert, meist mit einer Kombination aus Online- und Offline-Messung. Hierbei handelt es sich beim Online-Monitoring um Echtzeitdaten von TOC- bzw. Leitfähigkeitsmessstellen an verschiedenen Punkten der Anlage. Die Offline-Messung umfasst die Probenahme mit anschließender externer Analytik in einem Labor.

Die Qualifizierung der Anlage folgt dem allgemeinen Schema: Designqualifizierung (DQ), Installationsqualifizierung (IQ), Funktionsqualifizierung (OQ) und Leistungsqualifizierung (PQ). [10]

Hierbei ist für das Monitoring v. a. die Leistungsqualifizierung (PQ) ausschlaggebend. Die PQ ist in 3 Phasen untergliedert, wobei Phase 1 zur Evaluierung der Betriebs- und Sanisierungsparameter dient. Hierzu erfolgt neben der Online-Überwachung der chemisch-physikalischen Parameter zusätzlich eine Probenahme an relevanten Stellen (Offline-Monitoring), während die mikrobiologische Probenahme an allen Stellen in täglichen Intervallen durchgeführt wird, um eine möglichst genaue Bewertung des Systems zu gewährleisten.

In den nachfolgenden beiden Phasen 2 und 3 werden die Bewertung der Phase 1 und das zukünftige Routine-Monitoring überprüft. In Phase 2 sollten nochmal alle Probenahmestellen (Sampling Points, PoUs) überprüft werden, um durch eine größere Datenlage gegen mögliche blinde Flecken der Evaluierungsphase vorzubeugen. Ab Phase 2 wird unter Produktionsbedingungen geprüft. Phase 3 bildet anschließend das Routine-Monitoring über den Zeitraum von 1 Jahr ab. Dabei müssen nicht mehr alle Stellen gleichzeitig beprobt werden, sondern im Wechsel. Zudem kann hinsichtlich der Probenahmeintervalle ein risikobasierter Ansatz verfolgt werden. Jedoch sollten innerhalb 1 Monats alle Stellen beprobt worden sein. Phase 3 dient zur Prüfung auf Langzeiteffekte und als „Feuerprobe“ für den zukünftigen Routine-Betrieb.

Die Freigabe aller Phasen kann nur mithilfe von Online- und Offline-Messungen erfolgen. Eine Datenlage, basierend allein auf Online-Messwerten, ist nicht ausreichend. Zur kontinuierlichen Überwachung des Systems sind Online-Messstellen jedoch unerlässlich, da eine Probenahme mit Offline-Messung keine Echtzeitdaten liefern kann. Offline-Messwerte sind immer nur Momentaufnahmen des Systems an der entsprechenden Stelle zur retrospektiven Bewertung.

Zudem gibt es immer ein gewisses Risiko für Sekundärkontaminationen durch den Probenzug, die Gefäße oder die externe Analytik/Transport. Bei der Interpretation des Ergebnisses ist aber auch wichtig, dass TOC-Messmethoden (Online und Offline) auf unterschiedlichen Verfahren basieren. Bei der Online-Messung wird die organische Kohlenstoffmenge durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe oxidiert und mittels differentieller Leitfähigkeitsmessung detektiert.

Im Online-Verfahren werden dafür organische Bestandteile zu Kohlenstoffdioxid oxidiert und die Änderung der Leitfähigkeit durch das Kohlensäuregleichgewicht für die Bestimmung genutzt. Die Detektion über die Leitfähigkeitsänderung ist sehr sensitiv, aber aufgrund der fehlenden Selektivität störungsanfällig durch andere Ionen. Offline kann ebenfalls die UV-Bestrahlung zur Anwendung kommen – meist in Kombination mit chemischer Oxidation. Jedoch ist es hierbei auch möglich, über Verbrennung mit einem Katalysator in einem Ofen bei ca. 900 °C, eine vollständige Zersetzung zu Kohlenstoffdioxid zu erreichen. Offline wird anschließend das gebildete Kohlenstoffdioxid mittels NDIR-Detektor analysiert. Die NDIR-Detektion ist im Vergleich zur Leitfähigkeit selektiv gegenüber Kohlenstoffdioxid. [11,12]

Weiterhin sollte gerade im Hinblick auf die Oxidierbarkeit verschiedener Substanzen der Unterschied der beiden Oxidationsverfahren nicht vernachlässigt werden. TOC ist zwar ein Summenparameter, dennoch ist der Messwert abhängig von der Oxidierbarkeit und dem Kohlenstoffgehalt der Analyten in der Lösung. Schwer oxidierbare Substanzen, z. B. Polymere, können zu einem niedrigeren Messwert als leicht oxidierbare Substanzen in der gleichen Konzentration führen. Ebenso verhält es sich mit dem Kohlenstoffanteil der jeweiligen Substanzen: Je höher der Kohlenstoffgehalt einer Substanz, desto höher fällt das erhaltene TOC-Signal im Vergleich zu einer Referenz aus.

Aus diesem Grund gibt es auch bei den Pharmakopöen hinsichtlich der Referenz- bzw. Kontrollstandards bei der TOC-Messung Unterschiede. Die Ph. Eur. und die USP kalibrieren mit Saccharose und verwenden Benzochinon als Kontrollstandard, während das japanische Arzneibuch mit dem schwerer oxidierbaren Kaliumhydrogenphthalat kalibriert. Als JP-Kontrollstandard wird Natriumdodecylbenzolsulfonat eingesetzt, da dieses eine tensid-ähnliche Struktur hat und ähnliche Eigenschaften zu bekannten Reinigern aus der Reinigungsvalidierung besitzt. Das Vorgehen der JP entspricht somit einem Worst-Case-Ansatz

mit schwer oxidierbaren Standardsubstanzen und setzt einen größeren Fokus auch in Richtung der Reinigungsvalidierung. Dennoch spielt der Unterschied hinsichtlich der Oxidierbarkeit und Selektivität bei Reinstwasseranlagen eine deutlich geringere Rolle aufgrund der Aufbereitung und der entsprechenden Eigenschaften: es ist ionenarm und sollte keine schwer oxidierbaren Substanzen enthalten. Somit liefert das Online-TOC-Monitoring präzise Echtzeitdaten, sollte aber sicherheitshalber regelmäßig mittels Offline-Messung überprüft werden.

Mikrobiologische Kontrolle

Grundsätzlich kann mit den oben beschriebenen Methoden (Destillation oder Membranverfahren) inkl. der heißen Lagerung ein keimfreies Wasser erzeugt werden. Darüber hinaus stellt das pharmazeutische Wasser selbst, durch geringe TOC- und Ionenkonzentrationen, einen extrem nährstoffarmen (oligotrophen) Lebensraum dar. Nichtsdestotrotz werden im Rahmen der regulären Wasserkontrollen gelegentlich Mikroorganismen detektiert, die offensichtlich das pharmazeutische Wasser als Lebensraum nutzen können. Aus diesem Grund ist neben den chemischen Parametern auch die mikrobiologische Überwachung des erzeugten Pharmawassers aufgrund potenzieller gesundheitlicher Risiken von großer Bedeutung.

Aktuell basiert die mikrobiologische Kontrolle des Pharmawassers auf einer stichprobenartigen Probenahme an definierten Kontrollpunkten/Probenahmestellen in der Anlage mit anschließender Analyse des Wassers mittels klassischer Kultivierungsmethoden (Tab. 3). Hierbei wird ein definiertes Wasservolumen mittels einer Membranfiltration oder im Plattengussverfahren auf mikrobielle Belastung untersucht (Tab. 3).

Es gibt leider keine universelle Kultivierungsmethode bestehend aus einem Nährmedium und Inkubationsbedingungen, die in der Lage wäre alle, im Wasser befindliche Mikroorganismen nachzuweisen. Darüber hinaus gewinnt die Thematik lebensfähiger, aber nicht kultivierbarer Bakterien (viable but non-culturable, VBNC) aktuell immer mehr an Bedeutung. Hierbei handelt es sich um Bakterien, die in einer ungünstigen Umgebung niedrige Stoffwechselaktivität (Erhaltungsstoffwechsel) aufweisen und in diesem Zustand auf den konventionellen Nährmedien nicht kultivierbar sind. Sie können jedoch ihre Vermehrungsfähigkeit unter günstigeren Bedingungen wieder erlangen [13,14].

Mikrobiologische Diversität pharmazeutischen Wassers

Die mikrobiologische Diversität pharmazeutischen Wassers wurde bereits in mehreren Studien genauer untersucht [15,16,17]. Hierbei wurde sowohl das Speisewasser als auch das gereinigte Wasser sowie WFI (erzeugt über ein Destillations- oder ein Membranverfahren) einer Wasseranlage genauer betrachtet. So wurden in einer auf 15 Jahre ausgelegten Untersuchung einer Anlage in England in allen 3 Was-

serqualitäten gram-negative Bakterien als Hauptvertreter identifiziert. Hierbei stellten *Pseudomonas fluorescens* und *Brevundimonas vesicularis* die Hauptvertreter im Speisewasser dar, während im gereinigten Wasser und WFI (erzeugt durch Destillation) die meisten Befunde durch *Ralstonia pickettii*, *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*-Komplex) und *Pseudomonas oryzae* repräsentiert waren. [15]

In einer ähnlichen Studie aus Japan waren im Pharmawasser ebenfalls gram-negative Bakterien als die dominante Bakteriengruppe identifiziert worden [17]. Interessanterweise waren hier die dominanten Vertreter im Speisewasser aus der Gattung *Phreatobacter* und in gereinigtem Wasser die Vertreter aus der Gattung *Methylobacterium*. In durch Membranverfahren erzeugtem WFI zeigte sich *Ralstonia pickettii* weiterhin als am häufigsten vorkommender Keim. In einer weiteren Studie, die mehrere Wasseraufbereitungsanlagen zur Erzeugung des Pharmawassers mittels Membranverfahren untersucht hat, wurden Vertreter aus den Gattungen *Pseudomonaden*, *Ralstonia* und *Bradyrhizobium* ebenso als die häufigen Isolate identifiziert. [16]

Aus der Erfahrung der Autoren, basierend auf einer mehrjährigen Untersuchung der Wasserproben aus verschiedenen pharmazeutischen Anlagen in Deutschland, können als häufigste Befunde zusätzlich zu *Ralstonia pickettii* weitere Vertreter aus den Gattungen *Stenotrophomonas* und *Sphingomonas* genannt werden.

Biologische Charakteristika der Pharmawasser-assoziierten Bakterien

Die genannten Bakterien verfügen über gemeinsame Charakteristika, die sie zu Überlebenskünstlern in Pharmawasser machen. Ein wichtiges Merkmal ist die Fähigkeit, in nährstoffarmer (oligotropher) Umgebung in Verbindung mit hoher Wasseraktivität des Mediums (a_w -Wert zwischen 0,98 und 1,0) zu wachsen bzw. zu überleben. Oligotroph wachsende Mikroorganismen werden nach Kuznetsov *et al.* in 4 Gruppen unterteilt [18]:

- Initial kultivierbar, weitere Anreicherung durch Subkultivierung nicht möglich
- Initiale Kultivierung auf einem nährstoffarmen Medium möglich, können in mehreren Schritten an nährstoffreiche Medien adaptiert werden
- Kultivierbar auf speziellen nährstoffarmen Medien bzw. mittels spezieller Kultivierungsmethoden
- Keine Kultivierung unter Laborbedingungen möglich, Visualisierung mittels Elektronenmikroskop

Als mögliche Ursachen für das Absterben oder die Wachstumshemmung oligotropher Bakterien auf nährstoffreichen Medien werden z. B. osmotischer Schock und eine rasche Bildung von giftigen Stoffwechselprodukten wie Superoxid oder freie Radikale diskutiert. [19]

Es wird angenommen, dass durch eine nährstoffarme Umgebung, wie sie z. B. im WFI vorliegt, einige Bakterien durch Hungerstress in ein VBNC-Stadium versetzt werden

können [13]. Daher kann die Kultivierung solcher Bakterien auf nährstoffreichen Medien im Rahmen einer mikrobiologischen Kontrolle zur Unterbewertung führen.

Darüber hinaus besitzen oligotrophe Mikroorganismen die Fähigkeit, ein breites Substratspektrum zu verstoffwechseln, sodass sie in ihrem Wachstum auf das Vorhandensein bestimmter Nährstoffquellen nicht limitiert sind [20,21]. Einige Stämme von *R. pickettii*, die aus hochgereinigtem Wasser isoliert worden waren, zeigten Wachstum mit Cellobiose als Kohlenstoffquelle, sodass Membranfilter auf Cellulosebasis (z. B. Cellulosenitrat oder Celluloseacetat) als mögliche Nährstoffquellen diskutiert werden können [22]. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass aus hochgereinigtem Wasser isolierte Bakterien imstande waren, hitze-inaktivierte (tote) Bakterien als Nahrungsquelle zu nutzen (Cryptic Growth). Somit könnte Cryptic Growth eine weitere Überlebensstrategie der Mikroorganismen in oligotropher Umgebung darstellen.

Anknüpfend an die beschriebenen Nährstoffanforderungen der Pharmawasser-assoziierten Bakterien würde man bei Verwendung eines Mediums mit reduzierter Nährstoffkonzentration (wie R2A-Medium) eine hohe Diversität und eine bessere Wiederfindung von oligotroph wachsenden Bakterien erwarten. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Arzneibücher in ihren Vorgaben bzgl. des Nährmediums für das mikrobiologische Monitoring des Wassers (Tab. 3). Auch in der Auswahl der Testbakterien für die Prüfung auf die wachstumsfördernden Eigenschaften der Nährmedien (PCA und R2A) gibt es Unterschiede. Die USP und die Ph. Eur. geben mindestens *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 und *Bacillus subtilis* ATCC 6633 als Testkeime vor. Angaben zur Vorbereitung der Testkeime werden nicht gemacht. Die JP gibt als Testkeime *Methylobacterium extorquens* NBRC 15911 und *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17386 an. Vor der Prüfung werden die Testbakterien zunächst im gereinigten Wasser für 3 Tage bei 20 °C bis 25 °C inkubiert, um so die Keime in einen Hungerzustand zu versetzen. Somit werden Testbedingungen geschaffen, die das Wachstumsverhalten oligotroph wachsender Bakterien am besten wiedergeben.

Hinsichtlich der Wachstumstemperatur zeigen Bakterienisolate aus Pharmawasser keine besonderen Anforderungen und wachsen am besten bei Temperaturen zwischen 25 °C und 40 °C (mesophile Bakterien). Daher kann durch eine Erhitzung des produzierten Pharmawassers auf 65 °C bis 85 °C während der Lagerung und Verteilung die Verbreitung und das Ansiedeln solcher Bakterien im Wassersystem erschwert bzw. verhindert werden.

Der Nährstoffmangel und die relativ niedrige Temperatur lassen die Bakterien langsam wachsen. Darüber hinaus passen sich viele oligotroph wachsende Bakterien an ihre Umgebung durch Änderung der Zellmorphologie an und weisen meistens eine geringe Größe auf [23]. Das Letztere würde sie dazu befähigen, Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm bis 0,22 µm zu passieren. Am Beispiel von *Ralstonia*

pickettii wurde bereits gezeigt, dass dieses Bakterium von einem Filter mit einer Porengröße 0,2 µm nicht vollständig zurückgehalten werden kann [24].

Eine weitere wichtige Eigenschaft solcher Bakterien ist die Fähigkeit, Biofilme zu bilden und sich somit vor der aggressiven Umgebung zu schützen. Hierbei spielt die Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS-Matrix) eine wichtige Rolle. Diese Polysaccharidschicht erlaubt den Mikroorganismen, sich an die Oberfläche zu haften, hält die Bakterien zusammen und bildet ein Medium für den Nährstoffaustausch. [25,26,27,28]

Ab einer bestimmten Populationsdichte kann ein kollektives Verhalten innerhalb der Population etabliert werden (Quorum Sensing). Dies geht mit einer Synchronisation der Genexpression zwischen den beteiligten Bakterien einher und ermöglicht eine optimale Regulation der Nährstoffverwertung im Biofilm, eine kontrollierte und der Umgebung angepasste Produktion der EPS-Matrix sowie die Bildung neuer Resistenzen und Virulenzfaktoren. [28]

Darüber hinaus ist eine dauerhafte Biofilmbildung erst nach der Etablierung der chemischen Kommunikation zwischen den Bakterien möglich. Daher zielen einige Strategien zur Biofilmbekämpfung auf die Zerstörung der molekularen Signalwege innerhalb des Biofilms durch Inhibierung der Quorum-Sensing-Mediatorsmoleküle [29,30].

Manifestiert sich ein Biofilm in einer Wasseranlage, gibt es kaum Möglichkeiten, diesen restlos zu entfernen. Daher sollte darauf geachtet werden, einen Biofilm z. B. durch geeignete Anlagenkonstruktion, strenge Kontrolle des Speisewassers und Implementierung einer effektiven Sanierungsstrategie, begleitet von einem Monitoringkonzept, nicht entstehen zu lassen.

Ein weiteres Charakteristikum, welches jedoch nicht die adaptiven Fähigkeiten der o. g. Bakterien beschreibt, ist deren Zugehörigkeit zu der Gruppe der gram-negativen Bakterien. Diese Bakteriengruppe beherbergt nicht nur mögliche Krankheitserreger, sondern ist auch eine Quelle für Endotoxine. Endotoxine sind Bestandteile der Zellwand von gram-negativen Bakterien und werden beim Zerfall der Bakterien freigesetzt. In die Blutbahn gelangt, können Endotoxine starke Fieberreaktionen bis zum septischen Schock auslösen. [31]

Die hohe Anpassung dieser Mikroorganismen an die nährstoffarme Umgebung sowie die Möglichkeit, die Filter mit Porengröße 0,22 µm zu passieren und (abhängig von der Bakterienart und Zusammensetzung der Filtermembranen) sie sogar zu durchwachsen, macht die Erzeugung von WFI mittels eines Membranverfahrens (kaltes WFI) für eine mikrobiologische Belastung besonders anfällig [32]. Die damit verbundenen Risiken und empfohlenen Maßnahmen zur Risikominimierung wurden eingehend in dem Q&A-Dokument der European Medicines Agency (EMA) „Questions and answers on production of water for injections by non-distillation methods – reverse osmosis and biofilms and control strategies“ diskutiert [33].

Ausblick

Grundsätzlich gilt: Die meisten mikrobiellen Kontaminationen in Wassersystemen sind oberflächen-assoziiert und bilden Biofilme. Daher kann die Prüfung des Wassers auf mikrobielle Kontamination nur indirekt erfolgen, durch die Detektion von Bakterien, die aus dem Biofilm für eine weitere Besiedlung freigesetzt worden sind (planktonische Bakterien) oder durch Ablösen ganzer Biofilmstücke. Der Nachweis von Mikroorganismen, die nicht als wasserassoziiert bekannt sind (z. B. *E. coli*, *M. luteus*, Schimmelpilze, Hefe usw.) kann darauf hinweisen, dass eine hohe mikrobiologische Belastung des Speisewassers vorliegt und/oder die Probenahme des Wassers nicht fachmännisch ausgeführt wurde (sekundäres Kontaminationsrisiko durch den Menschen).

Aufgrund einer stichprobenbasierten Kontrolle des Wassers und der sporadischen Natur der oben erwähnten Ereignisse kann ein realistischer Kontaminationsgrad eines Wassersystems nur schwer ermittelt werden.

Somit stellt die konventionelle mikrobiologische Überwachung des Wassers eine Momentaufnahme der mikrobiologischen Belastung an einem bestimmten Entnahmepunkt dar. Darüber hinaus liegen die Ergebnisse erst mehrere Tage nach der Probenahme vor, sodass das Pharmawasser „at risk“ produziert wird und die Qualität hinsichtlich mikrobiologischer Belastung nur rückwirkend bewertet werden kann. Im Grunde kann eine kontinuierliche mikrobiologische Kontrolle mit den konventionellen Offline-Methoden nicht erreicht werden. Mikrobiologische Schnelltestmethoden oder Monitoringsysteme können hierbei Abhilfe verschaffen und die Implementierung einer kontinuierlichen Contamination Control Strategy (CCS) gem. Annex 1 des EU-Leitfadens zur Good Manufacturing Practice (GMP) erleichtern [34].

Aktuell sind einige Monitoringsysteme auf dem Markt, die z. B. auf einer Durchflusszytometrie oder auf Biofluoreszenz basieren. Jedoch erfassen diese Monitoringsysteme nicht nur vermehrungsfähige Bakterien (die auf einem Nährmedium eine Kolonie bilden würden), sondern auch VBNC-Bakterien und den Biofilmbau. Als Ergebnis bekommt man pro Volumeneinheit eine deutlich höhere Zellzahl – bei der Durchflusszytometrie als Intact Cell Count (ICC) ausgegeben –, die mit der Koloniebildenden Einheit (KBE) nicht gleichgesetzt werden kann [35].

Darüber hinaus müssen mikrobiologische Online-Messungen als alternative Methode zu der klassischen Prüfung einer vollständigen Validierung gem. Ph. Eur. Kap. 5.1.6 und USP <1223> unterzogen werden. Ein weiterer Nachteil solcher Monitoringsysteme ist die geringe Vergleichbarkeit der gemessenen Werte zwischen verschiedenen Wasseraufbereitungsanlagen, da für jede Anlage die Grenzwertüberschreitungen individuell definiert werden müssen (basierend auf der Festlegung eines Grundrauschens, das für jede einzelne Wasseraufbereitungsanlage charakteristisch sein kann). Dies

würde eine künftige universelle Definition der Grenzwerte für ein mikrobiologisches Online-Monitoring erschweren. Analog zu Schwermetallen könnte jedoch in Zukunft ein risikobasierter Ansatz zur Festlegung der individuellen mikrobiologischen Grenzwerte auf Basis der Daten aus der PQ denkbar sein.

Derzeit kann eine mikrobiologische Online-Messung begleitend zu der konventionellen Kontrolle eingesetzt werden und zusammen mit einer Online-TOC-Messung eine kontinuierliche Überwachung des Herstellungsprozesses gewährleisten sowie über Trendanalysen eine frühzeitige Erkennung von Veränderungen im System (biologischer und chemisch-physikalischer Natur) erlauben.

Literatur

- [1] European Pharmacopoeia. 12th ed. EDQM; 2026.
- [2] USP-NF (1231) Water for Pharmaceutical Purposes. https://doi.org/https://doi.org/10.31003/USPNF_M99956_07_01
- [3] The Japanese Pharmacopoeia (JP). 18th ed. MHLW; 2021.
- [4] European Medicines Agency (EMA). Guideline on the quality of water for pharmaceutical use. 2020, EMA/CHMP/CVMP/QWP/496873/2018
- [5] Röder F. GMP-Fachwissen TECHNIK Auslegung, Installation und Qualifizierung von Pharmawasser-Systemen Reinstwasser für Herstellung und Labor. 1st ed. Schopfheim: GMP-Verlag Peither AG; 2019.
- [6] Röder F. Pharmawasser – Inhaltsstoffe, Grenzwerte und Anlagenkonzepte. 1st ed. Schopfheim: GMP-Verlag Peither AG; 2017.
- [7] Kudernatsch H., Beckmann G., Gattermeyer K., et al. Pharmawasser: Qualität, Anlagen, Produktion. 2nd ed. ECV Editio Cantor Verlag GmbH; 2015.
- [8] Veolia Water Technologies. Rouging: Ein unsichtbarer Feind. <https://blog.veoliawatertechnologies.de/rouging-ein-unsichtbarer-feind-derdie-qualitaet-c3a4t-und-sicherheit-ihrer-pharmazeutischen-produktion-bedroht>
- [9] Anders, Beckmann. Gute Hygiene Praxis. vol. 3. 2019.
- [10] ISPE. Good Practice Guide: Approaches to Commissioning and Qualification of Pharmaceutical Water and Steam Systems. 3rd ed. 2025.
- [11] Shetty A, Goyal A. Total organic carbon analysis in water – A review of current methods. Mater Today Proc 2022;65:3881–6. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.07.173>
- [12] Shimadzu. Grundlagen des Gesamtorganischen Kohlenstoffs (TOC). <https://www.shimadzu.de/service-support/analysis-basics/total-organic-carbon/index.html>
- [13] Stokell JR, Steck TR. Viable but Nonculturable Bacteria. Encyclopedia of Life Sciences, Wiley; 2012. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000407.pub2>
- [14] Moritz MM, Flemming HC, Wingender J. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. Int J Hyg Environ Health 2010;213:190–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.05.003>
- [15] Sandle T. Characterizing the Microbiota of a Pharmaceutical Water System – A Metadata Study. SOJ Microbiol Infect Dis 2015;3:01–8. <https://doi.org/10.15226/sojmid/3/2/00133>
- [16] Kulakov LA, McAlister MB, Ogden KL, et al. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. Appl Environ Microbiol 2002;68:1548–55. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1548-1555.2002>
- [17] Shikama S, Uchii K, Sadamitsu M, et al. Bacterial community structure and dominant species in pharmaceutical manufacturing water revealed by high-throughput sequencing. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2025;211. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107153>
- [18] Kuznetsov SL, Dubinina GA, Lapteva NA. BIOLOGY OF OLIGOTROPHIC BACTERIA. Ann Rev Microbiol 1979;33:377–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.33.100179.002113>
- [19] Koch AL. Oligotrophs versus copiotrophs. Bioessays 2001;23 (7):657–61. <https://doi.org/10.1002/bies.1091>
- [20] Upton AC, Nedwell DB. Nutritional flexibility of oligotrophic and copiotrophic Antarctic bacteria with respect to organic substrates. FEMS Microbiol Ecol 1989;62:1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03651.x>
- [21] Aylward FO, McDonald BR, Adams SM, et al. Comparison of 26 Sphingomonad Genomes Reveals Diverse Environmental Adaptations and Biodegradative Capabilities. Appl Environ Microbiol 2013;79:3724–33. <https://doi.org/10.1128/AEM.00518-13>
- [22] McAlister MB, Kulakov LA, O'Hanlon JF, et al. Survival and nutritional requirements of three bacteria isolated from ultrapure water. J Ind Microbiol Biotechnol 2002;29:75–82. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000273>
- [23] Hirsch P. Microbial life at extremely low nutrient levels. Adv Space Res 1986;6:287–98. [https://doi.org/10.1016/0273-1177\(86\)90097-9](https://doi.org/10.1016/0273-1177(86)90097-9)
- [24] Anderson RL, Bland LA, Favero MS, et al. Factors Associated with *Pseudomonas pickettii* Intrinsic Contamination of Commercial Respiratory Therapy Solutions Marketed as Sterile. 1985.
- [25] Adley C, Ryan MP, Pembroke JT. Ralstonia pickettii: Biofilm Formation in High Purity Water, Biofilm Club; 2005, 261–71.
- [26] Silva-Santana G, Sales FLS, Aguiar AR, et al. Pharmaceutical Contamination by Biofilms Formed of the *Burkholderia cepacia* Complex: Public Health Risks. Processes 2025;13. <https://doi.org/10.3390/pr13051270>
- [27] Xu FF, Morohoshi T, Wang WZ, et al. Evaluation of intraspecies interactions in biofilm formation by methylobacterium species isolated from pink-pigmented household biofilms. Microbes Environ 2014;29:388–92. <https://doi.org/10.1264/jisme2.ME14038>
- [28] Guzmá N-Soto I, Mctiernan C, Gonzalez-Gomez M, et al. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in *in-vitro* and *in-vivo* biofilm models. IScience 2021;24:102443. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102443>
- [29] Zhao YM, Zhang QY, Zhang L, et al. Inhibition of Quorum Sensing-Mediated Biofilm Formation and Spoilage Factors in *Pseudomonas fluorescens* by Plasma-Activated Water. Foods 2025;14. <https://doi.org/10.3390/foods14213773>
- [30] Hetta HF, Ramadan YN, Rashed ZI, et al. Quorum Sensing Inhibitors: An Alternative Strategy to Win the Battle against Multidrug-Resistant (MDR) Bacteria. Molecules 2024;29. <https://doi.org/10.3390/molecules29153466>
- [31] Madiga MT, Martinko JM, Brock PJ. Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag; 2000.
- [32] Kaushal S, Gervais B, Lute S, et al. Evidence for grow-through penetration of 0.2-µm-pore-size filters by *Serratia marcescens* and *Brevundimonas diminuta*. J Ind Microbiol Biotechnol 2013;40:327–34. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1232-3>
- [33] European Medicines Agency (EMA). Questions and answers on production of water for injections by non-distillation methods – reverse osmosis and biofilms and control strategies. 2017, EMA/INS/GMP/443117/2017
- [34] EU Commission. EU GMP Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products. European Commission; 2022.
- [35] BWT Aqua AG. Application of flow cytometry for microbiological monitoring of pharmaceutical grade water. European Pharmaceutical Review 2020;25. https://www.bwt.com/en/-/media/bwt/pharma/aquasense-mb-publications/documents/july-2023_pharming_publication.pdf

Die Links wurden zuletzt abgerufen am 18. Juni 2026.