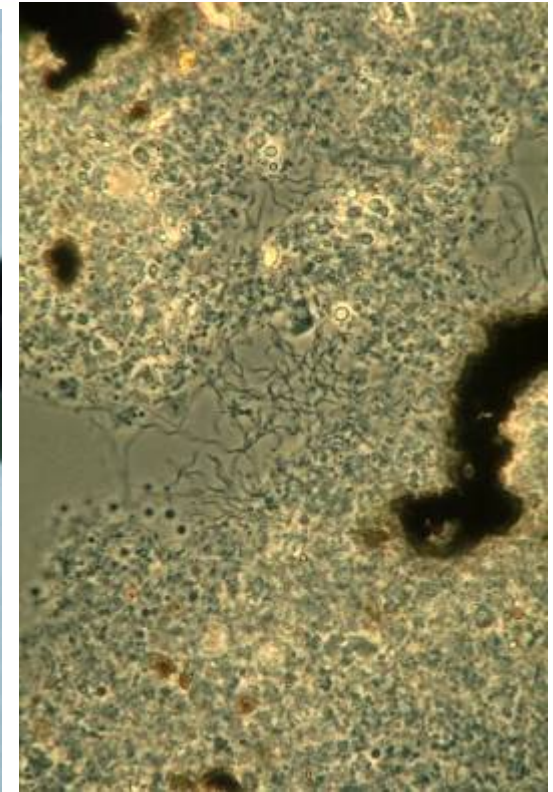


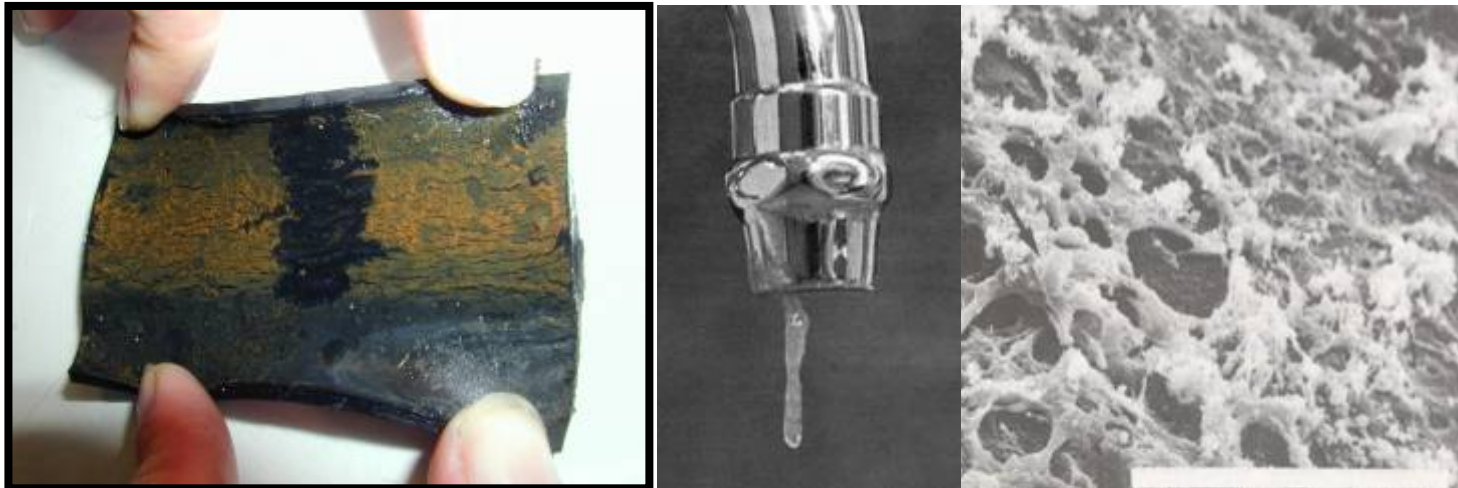
# Biofilme in Trinkwasser-Installationen – Konsequenzen für die Risikoeinschätzung



**Ergebnisse aus einem BMBF-Verbundprojekt  
Koordination: Hans-Curt Flemming  
IWW Zentrum Wasser  
Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen**

# Beobachtung:

- In Verteilungsleitungen der Trinkwasserversorgung und in der **Hausinstallation** kann es erwiesenermaßen in erheblichem Umfang zur Kontamination des Wassers durch hygienisch relevante Mikroorganismen kommen.
- Sie stammen weit überwiegend von Biofilmen auf Werkstoffen, die mikrobielles Wachstum unterstützen.
- Zu den bedenklichen Kontaminanten gehören *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa* u.a.



# Beispiel: *P. aeruginosa* in Armatur-Biofilm

Waschbecken im Duschraum  
einer Schule, Befund:  
Kontamination des Wassers mit  
*P. aeruginosa*



Armatur mit Biofilm, der die  
Quelle für Kontamination  
des Wassers mit *P.  
aeruginosa* ist

B. Lange, IWW



# Beispiele für weitere Kontaminationsfälle

- **Schule, Neuinstallation:**
  - *P. aeruginosa*: > 1.000 KBE pro 100 mL
- **Schule, alte Installation**
  - *Legionella*: > 10.000 KBE pro 100 mL
- **Verwaltungsgebäude, Neuinstallation**
  - *P. aeruginosa*: 200 KBE pro 100 mL
- **Sporthalle, alte Installation**
  - *Legionella*: > 10.000 KBE pro 100 mL
- **Asyl, Alte Installation**
  - *Legionella*: > 10.000 KEB pro 100 mL
- **Zahlreiche Fälle aus Krankenhäusern**
- **Betrifft nicht nur Kunststoffe, sondern auch Metalle!**
- **Ursache: Biofilme in Trinkwasser-Installationen**

# Verbundprojekt „Prävention und Kontrolle von Biofilmen in der Hausinstallation“

## Forschungspartner:

M. Exner, T. Kistemann, J. Gebel Hygiene-Institut Univ. Bonn

U. Szewzyk, TU Berlin

B. Bendinger, K. Wichmann, DVGW-Forschungsstelle TUHH

G. Schaule, IWW Mülheim

J. Wingender, Biofilm Centre Univ. Duisburg-Essen

H.-C. Flemming, IWW und Biofilm Centre, Koordination

Sowie 17 Industriepartner

## Gesamtziel des Projekts:

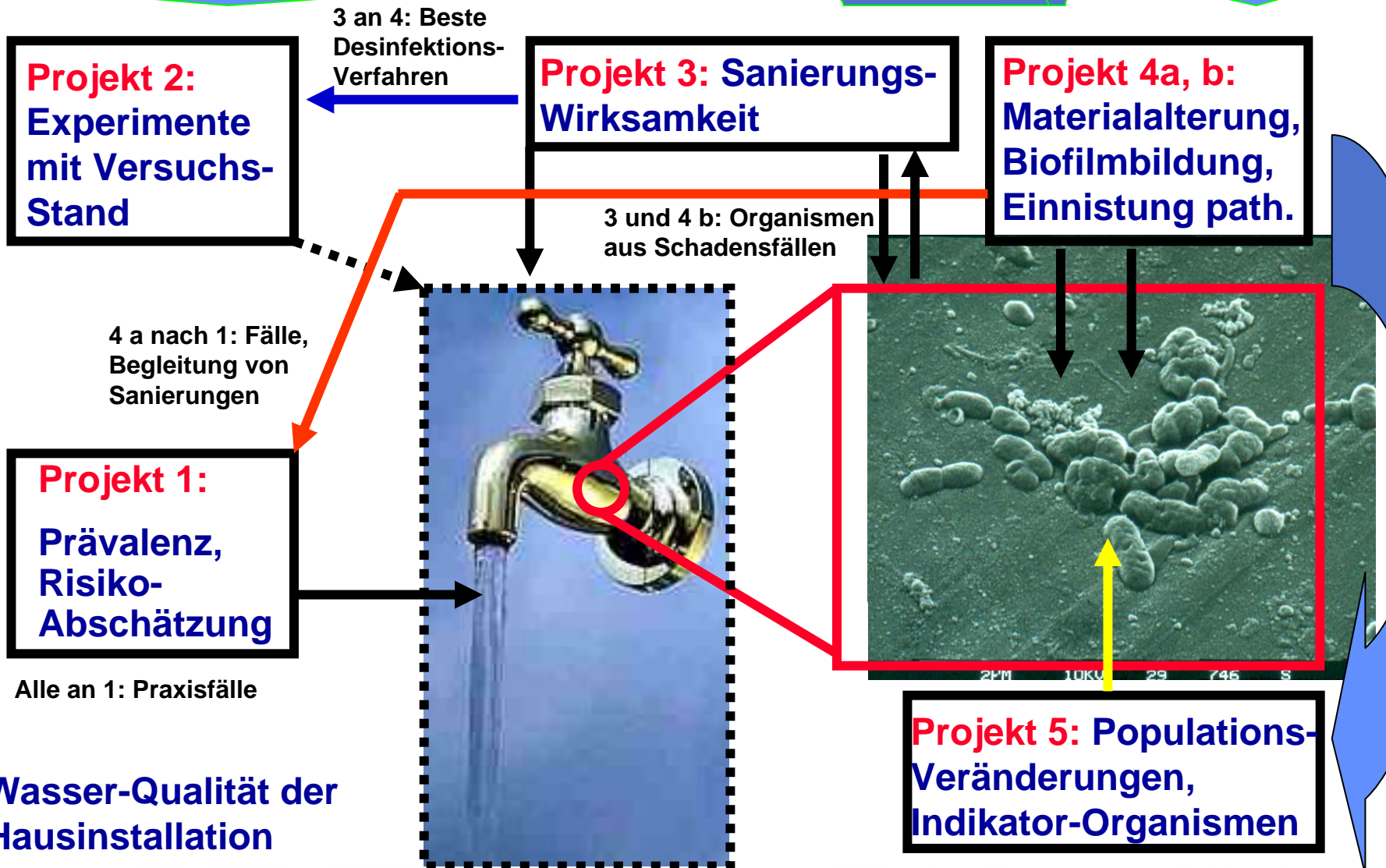
Eine wissenschaftliche Grundlage zu schaffen für einen Leitfaden

***„Prävention und Kontrolle von Biofilmen in der Hausinstallation“***

Beginn: Januar 2007

# Projekt-Struktur

4 a nach 4 b und 2: gealterte Materialien



4 b und 5: Amöben

# TP 1: Prävalenz, Risiko-Abschätzung

## Ziele

- I Erhebung zur behördlichen Praxis hinsichtlich § 18 TrinkwV
- II Statusanalyse zum Vorkommen mikrobieller Kontaminationen in Trinkwasser-Hausinstallationen
- III Identifikation von möglichen Risikofaktoren
- IV Entwicklung eines Algorithmus zur reproduzierbaren Risikobewertung

## Material & Methoden

- Befragung aller deutschen Gesundheitsämter (N=419; Rücklauf: 34%) zu Vorgehen und Stand vorgeschriebener Trinkwasserbeprobungen und Gebäudebegehungen (2003-2008)
- internationale Literatur- und Internetrecherche
- Aufbereitung von Daten (Mikrobiologie, Chemie, Hausinstallationsmerkmale) einer repräsentativen Stichprobe von Gesundheitsämtern (N=21)
- statistische Auswertung des Datensatzes
  
- **Ergebnisse: Befragung der Gesundheitsämter**
- Erhebungsstand und -vorgehen weichen z.T. erheblich von TrinkwV ab
- kein einheitliches Vorgehen der Gesundheitsämter, viele Insellösungen, aber vergleichbare Priorisierung bei der Überwachung verschiedener Gebäude
- Es gibt Befunde – genaue Angaben erst am Ende des Projekts möglich

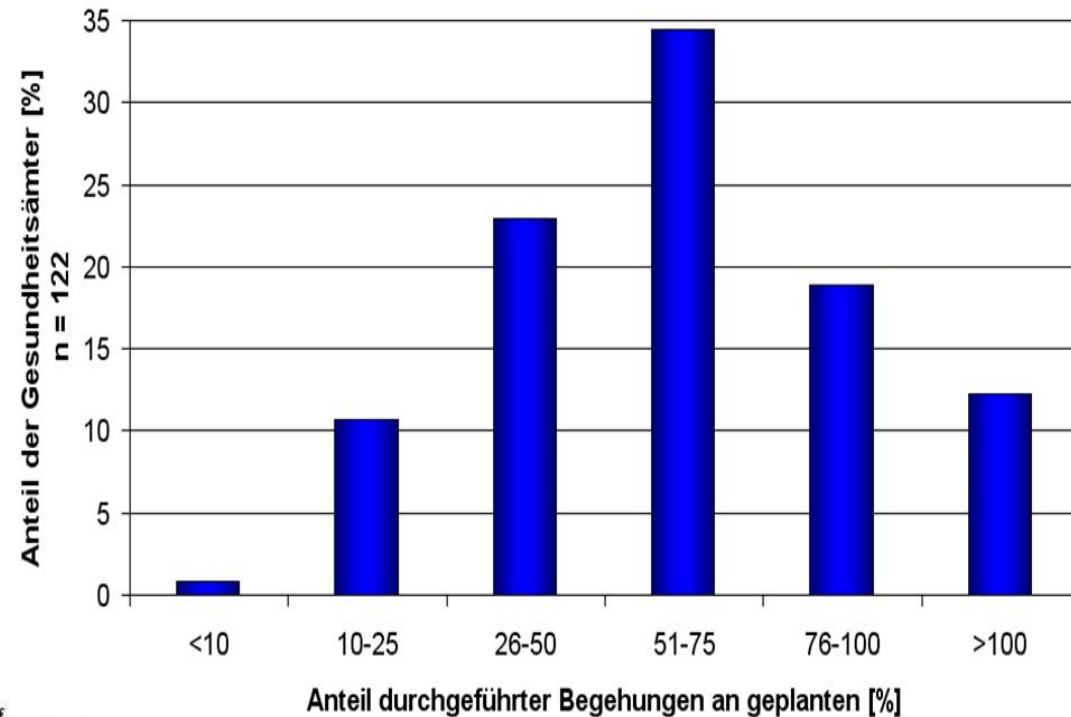
T. Kistemann



# TP 1: Beteiligung der Gesundheitsämter

Deutschlandweite Beteiligung der Gesundheitsämter an der Befragung (D: 142/419)

Anteil 2003-2006 durchgeführter an den gem. § 18 geplanten Begehungen von Hausinstallationen, nach Gesundheitsämtern (N=142)



► Nach vier Jahren TrinkwV hat knapp ein Drittel der GÄ mehr als 75% der relevanten Gebäude begutachtet

T. Kistemann



# TP 2: Versuchsstand (TUHH)

Standardisierte  
Bewirtschaftungs-  
bedingungen:  
DIN 50931-1

Rohr-/Schlauchwerkstoff

Trinkwasser-Qualität

Temperatur

**Austrag** von  
hyg. rel. Bakterien  
aus Biofilmen  
ins TW



Simulation  
realistischer Bedingungen

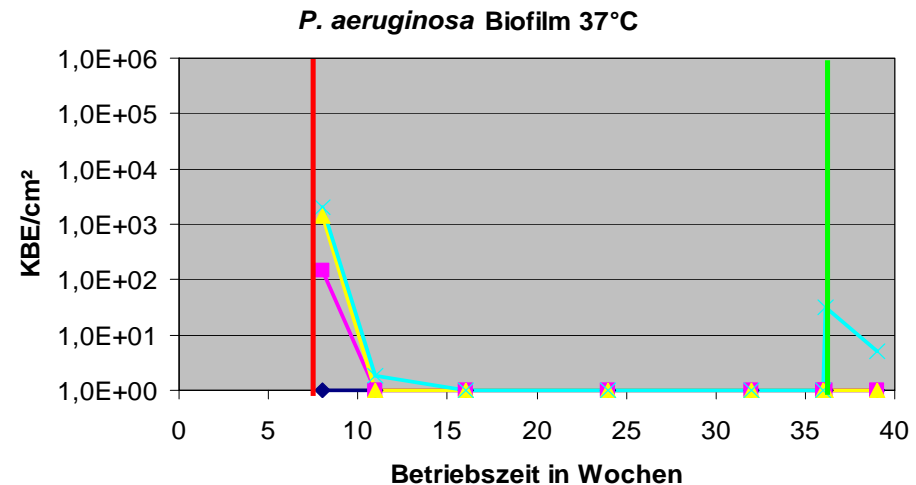
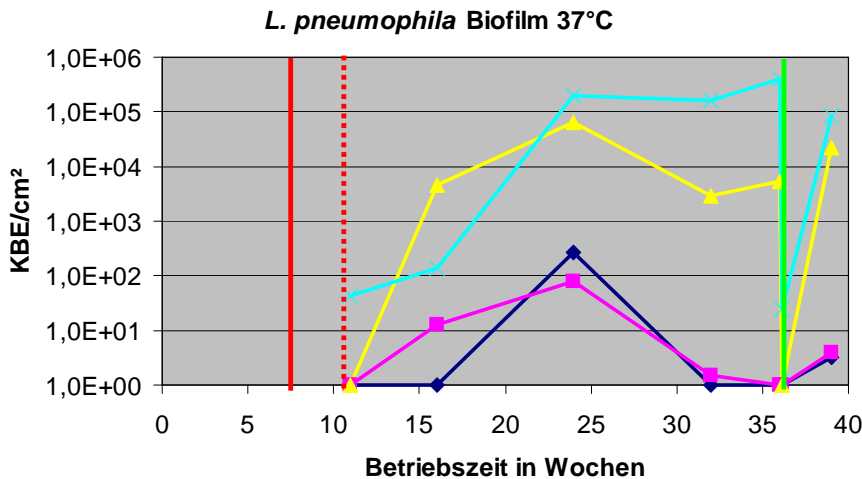
Wirksamkeit von  
Desinfektions-  
verfahren (TP3)



Kontinuierliche Desinfektion  
mit UV (am Beispiel einer  
separaten TW-Installation für eine  
mobile Einheit)

B. Bendinger, J. Benölken

# TP 2: Experimente mit Versuchsstand



➤ Vermehrung von *L. pneumophila* im Biofilm abhängig vom Werkstoff  
EPDM ohne Empf. > EPDM mit Empf. >> Cu > PEXc (KBE/cm<sup>2</sup>)

➤ *P. aeruginosa* konnte nach der Kontamination länger im Stagnationswasser als im Biofilm kulturell nachgewiesen werden (12°C > 37°C)

↪ Austrag kultivierbarer Zellen vom Biofilm ins Trinkwasser

➤ Nach Reinigung (Impulsspülverfahren) + Desinfektion (2 mg/L ClO<sub>2</sub>, 24h) wurde *P. aeruginosa* im Biofilm und Stagnationswasser wieder kulturell nachgewiesen (bei 37°C)

↪ Hinweis auf Übergang vom „VBNC“-Zustand in den kultivierbaren Zustand

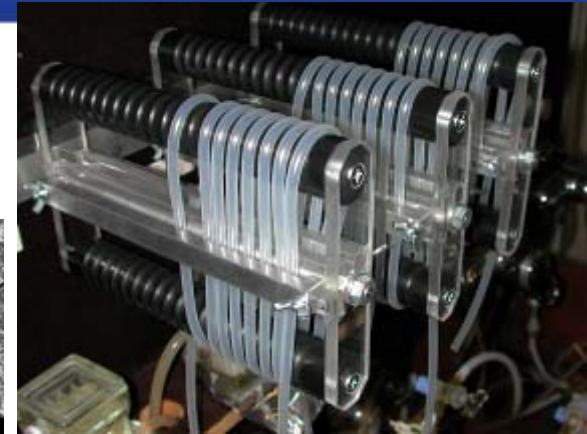
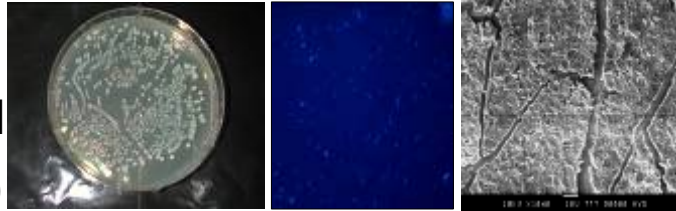
# TP 3: Überprüfung von Sanierungen

## Arbeitsziel:

Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmaßnahmen und Erarbeitung von Handlungsanweisungen in Schadensfällen

## Untersuchungen:

### I Silikonschlauchmodell („Härtetest“ für Reinigung!)



KBE/cm<sup>2</sup> (Kultivierung) + GZZ/cm<sup>2</sup> (DAPI)  
Visualisierung (REM)

### II Chemische Desinfektion

- Desinfektionsmittel-Anwendung

Cl<sub>2</sub>, ClO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Ag,  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fruchtsäuren, O<sub>3</sub>

- 3 praxisnahe Modelle:



Kont.Dosierung



Kreislauf



Hygiene-Monitor

### III Mechanische Reinigung

- Kombination: Impulsspülung + Desinfektion



M. Exner, J. Gebel, J. Lenz

# TP 3: Überprüfung von Sanierungen

## Ergebnisse der chemischen Desinfektion

Wirkstoff	Zudosierung	Konzentration [mg/l]	Behandlung	Reduktion [KBE/cm <sup>2</sup> ]	Reduktion [GZZ/cm <sup>2</sup> ]
Cl <sub>2</sub> (ECA)	kontinuierlich	0,3	70 Tage	> 6 lg	< 1 lg
ClO <sub>2</sub>	kontinuierlich	0,2	70 Tage	> 6 lg	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Ag	Stossbehandlung	10.000	6 Stunden	> 6 lg	< 1 lg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Fruchtsäure	Stossbehandlung	10.000	4 Stunden	> 6 lg	< 1 lg
O <sub>3</sub> (Hygiene-Monitor)	diskontinuierlich	0,1	14 Tage	> 6 lg	> 6 lg

> 6 lg = Nachweisgrenze

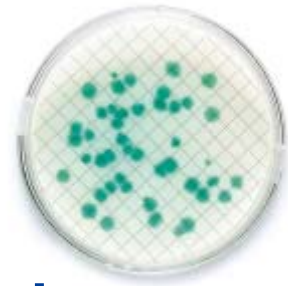
**Abtötung ist nicht gleich Reinigung!**

## Mechanische Reinigung

- Kombination Impulsspülung + Desinfektion zeigt unabhängig vom eingesetzten Desinfektionsmittel Reduktion von bis zu 1 lg KBE/cm<sup>2</sup> und 80% weniger Protein
- zur Zeit: Kombination mit Reinigern

M. Exner, J. Gebel, J. Lenz





## ■ Hygienisches Problem:

### *P. aeruginosa* in Teilen einer Trinkwasser-Installation

- Druckerhöhungsanlage

Nachweis der Verkeimung durch Untersuchung von Wasser- und Biofilmproben

## ■ Analytisches Vorgehen:

- kulturelle Methode + FISH (**kultivierungs-unabhängig**) für Wasser-, Biofilmproben
- FISH: Detektion von nicht-kultivierbaren Ziel-Organismen, die sich erholen und erneut kontaminieren können
- Organismen, die nicht kultiviert werden können, verdecken mögliche Kontaminations-Quellen



G. Schaule, S. Grobe

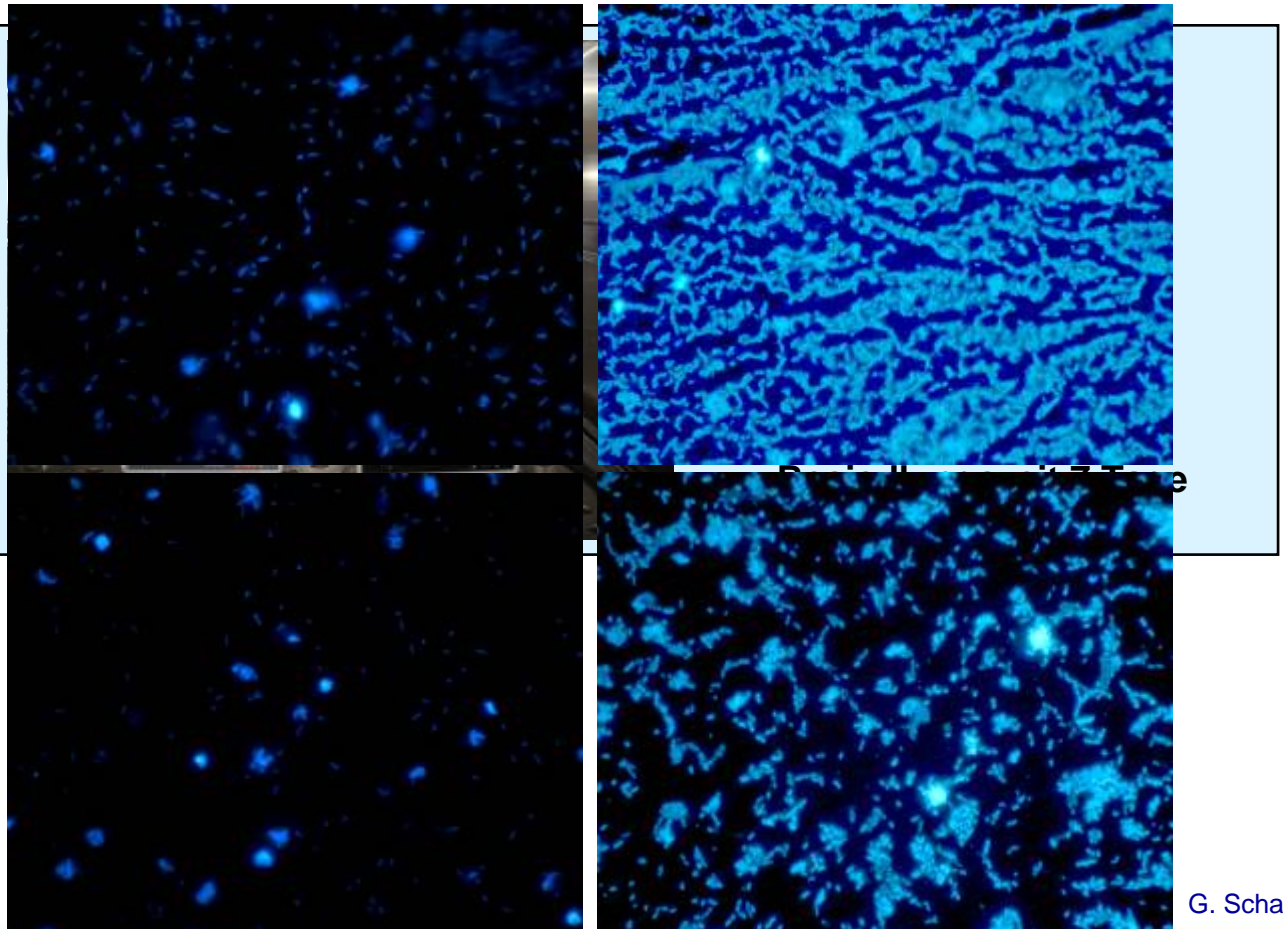
# TP 4a: Vergleich der Besiedlung von neuem mit durch Desinfektion veränderten Materialien

Multifaktorenversuchsansatz (statistische Versuchsplanung):  
 Besiedlungsversuche mit unterschiedlichsten Trinkwasserqualitäten  
 und neuem sowie durch Chlordioxid künstlich „gealtertem“ Material

## Wasserqualitäten:

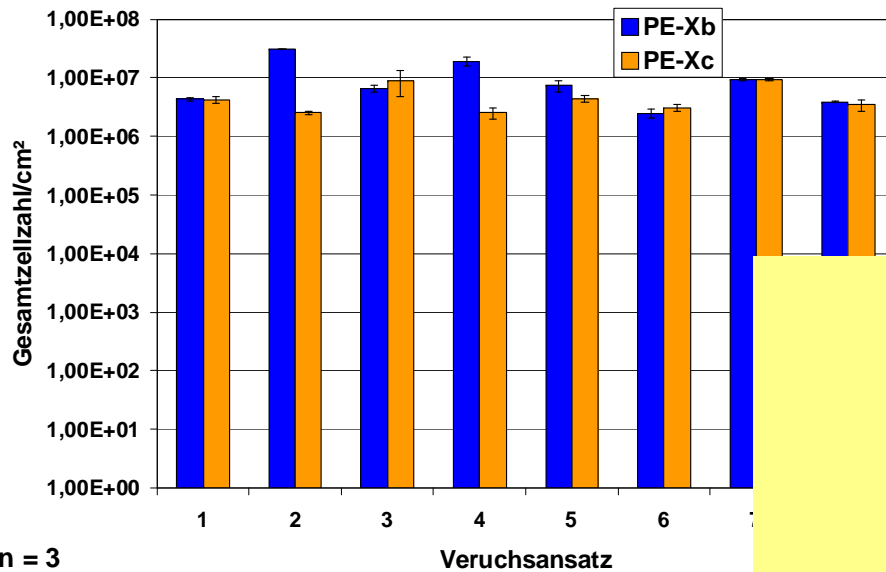
- Temperatur
- AOC
- Wasserhärte
- Huminstoffe
- pH-Wert
- Eisengehalt
- Alterung

V	1	2	3	4	5	6	7	8
T	-	-	-	-	+	+	+	+
AOC	-	-	+	+	-	-	+	+
W	-	+	-	+	-	+	-	+
H	+	+	-	-	-	-	+	+
pH	+	-	+	-	-	+	-	+
E	+	-	-	+	+	-	-	+
A	-	+	+	-	+	-	-	+



G. Schaule

# Besiedlung von neuem und durch Desinfektion veränderten Materialien

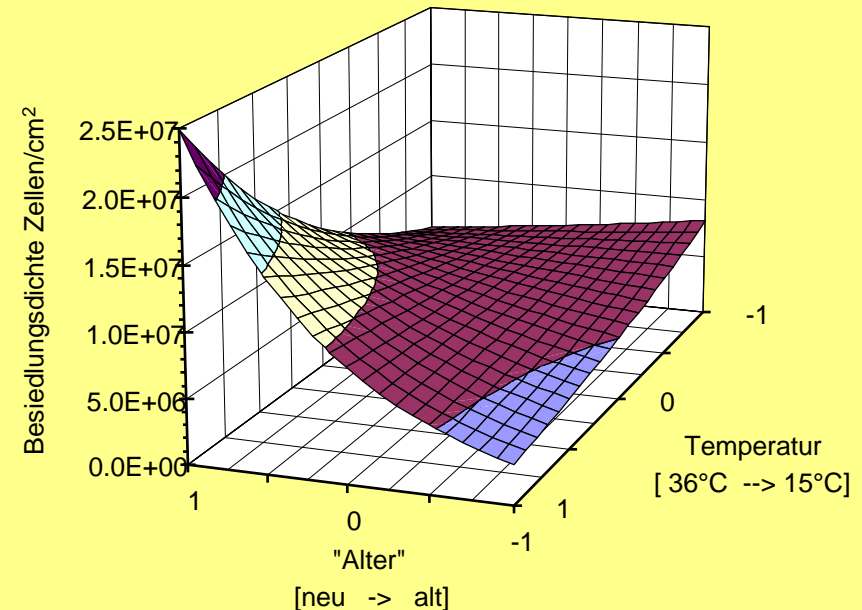


## „Qualitativ“:

- PE-Xb und PE-Xc werden meist unterschiedlich besiedelt
- Die Wasserqualität wirkt sich auf die Besiedlungsdichte aus

## „Quantitativ“:

Gesamtzellzahlen werden mit Auswerteprogramm in Bezug gesetzt, Faktoren werden in Bezug zueinander gesetzt



→ Höchste Besiedlung bei neuem Material und warmem Wasser

G. Schaule

# TP 4 b: Einnistung hygienisch relevanter Organismen in Trinkwasser-Biofilme

## Arbeitsziel:

Untersuchung einer möglichen Begünstigung der Einnistung hygienisch relevanter Keime in Biofilme aufgrund von Material-Veränderungen, bedingt durch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen

## Fazit:

- Bildung von Trinkwasserbiofilmen (Gesamtzellzahl, HPC) ist unterschiedlich ausgeprägt in Abhängigkeit vom Material:  
**EPDM ohne Empf. > EPDM mit Empf. > PE-X b ≥ PE-X c**
- *P. aeruginosa* und *L. pneumophila*, einzeln und in Kombination, nisten sich in bestehende Biofilme ein und persistieren dort in kultivierbarer Form in unterschiedlichen Konzentrationen und über unterschiedliche Zeiträume, abhängig vom Material:
  - **Persistenz von *P. aeruginosa* im Biofilm:**  
**PE-X c = PE-X b > EPDM mit Empf. > EPDM ohne Empf.**
  - **Persistenz von *L. pneumophila* im Biofilm:**  
**PE-X b > EPDM ohne Empf. > PE-X c ≥ EPDM mit Empf.**
- *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* werden aus Biofilmen freigesetzt und kontaminieren die Wasserphase.

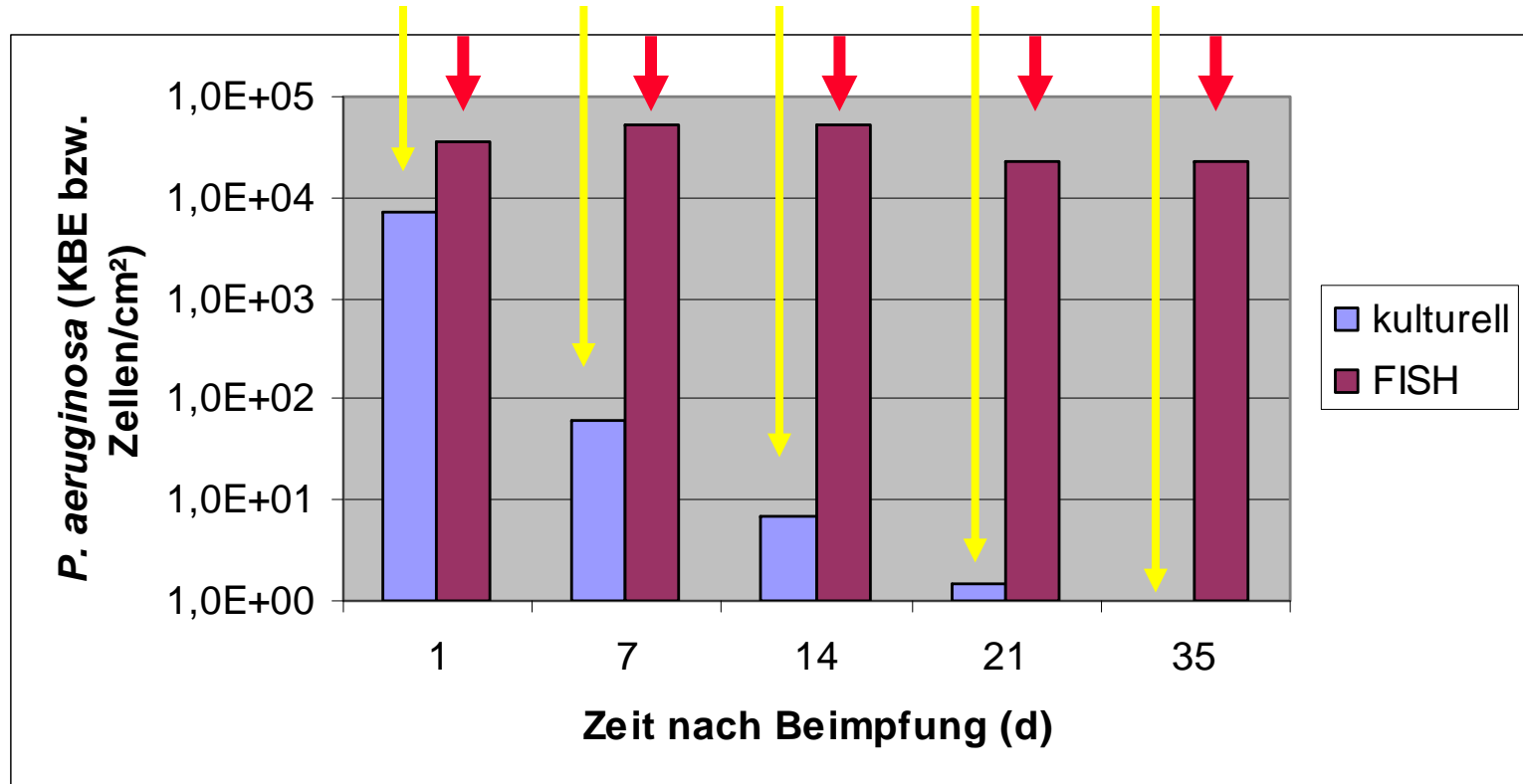
J. Wingender, M. Moritz



# Persistenz: *P. aeruginosa* kulturell vs. FISH

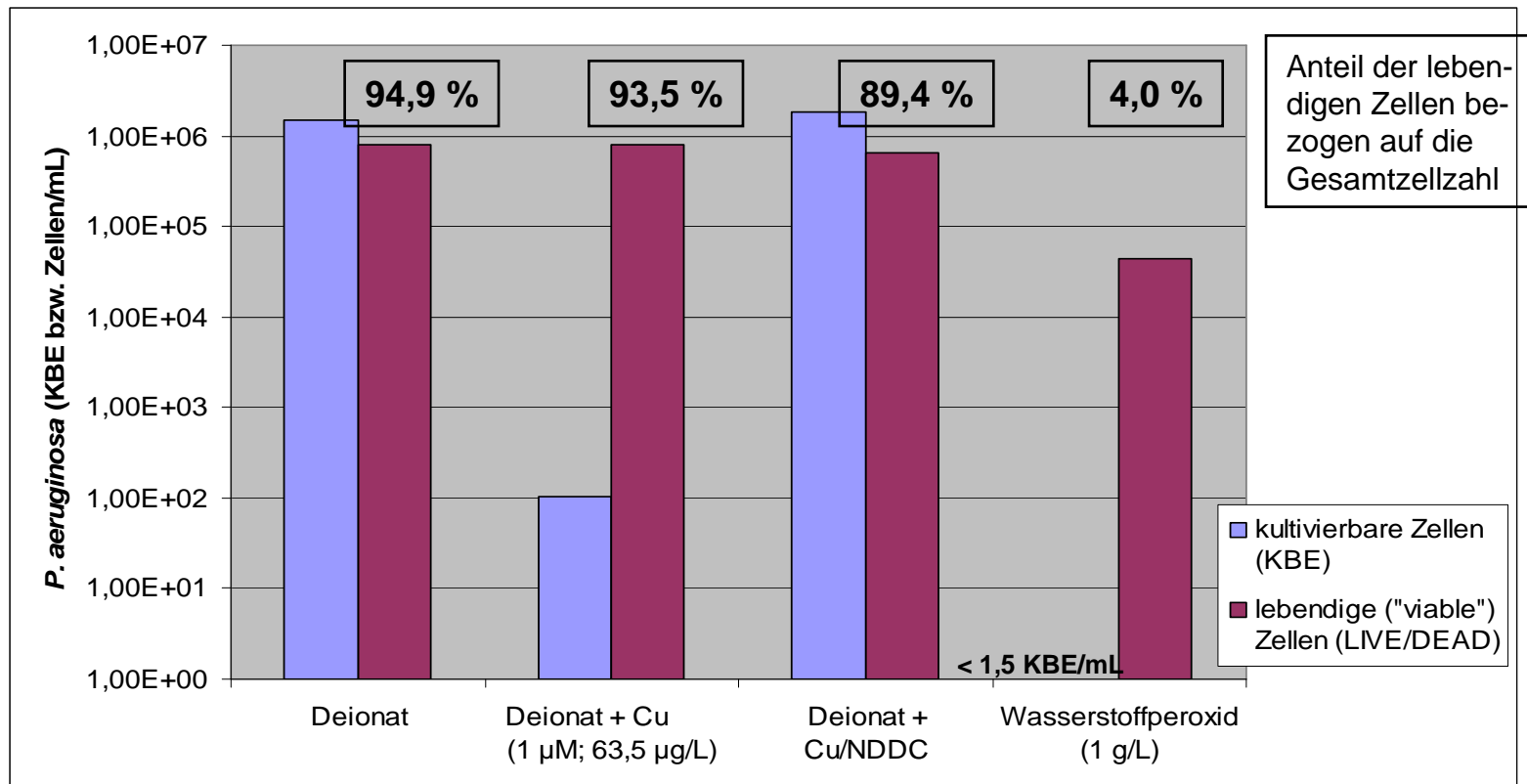
## *P. aeruginosa* AdS, Isolat aus einem Schadensfall

- im Biofilm (EPDM, W270) kulturell auf CN-Agar
- FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung), Gensonde Psae16S-182.



- Hinweis auf Persistenz von *P. aeruginosa* im Trinkwasser-Biofilm auf EPDM in nicht-kultivierbarem Zustand (VBNC)!

# TP 4b: Einfluss von $\text{Cu}^{2+}$ auf Wachstum von *P. aeruginosa* in Suspension



- Abnahme der Kultivierbarkeit,
- Aber: keine Abnahme der Lebensfähigkeit („viability“ mit live/dead-Färbung)
- Komplexierung von Kupfer: Wiederkehr der Kultivierbarkeit!
- Kultivierbarkeit „an- und abschaltbar“

# Teilprojekt 5: Populationsänderungen, Indikator-Organismen

## Arbeitsziel:

Untersuchung der Biofilm-Populationen mit molekularbiologischen Verfahren ➔ Entwicklung eines Indikatorsystems

- Einfluss verschiedener Materialien
- Einfluss verschiedener Standorte bzw. Trinkwässer in Deutschland
- Auswirkung von Desinfektionsmaßnahmen und Behandlungen
- exponierte Materialien aus Berlin, Raum Hamburg und Ruhrgebiet untersucht
- Wasserqualität: angereichertes reduziertes Grundwasser (Berlin), reduziertes Grundwasser (Raum Hamburg), Flusswasser (Ruhrgebiet)
- DNA-Extraktion, PCR, Vergleich der unbehandelten Biofilme mittels Fingerprinting (DGGE) und Klonierung
- Entwicklung von Primern für das Fingerprinting und Klonierung von Amöben, da mit bisherigen Methoden nicht alle Trinkwasser-Amöben erfasst werden

# Teilprojekt 5: Populationsänderungen, Indikator-Organismen

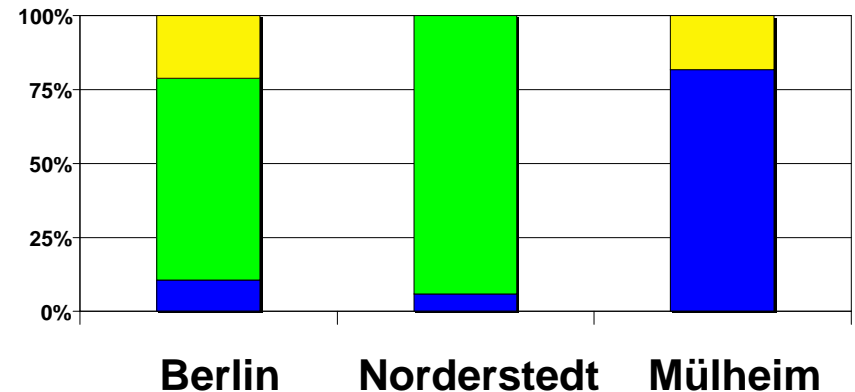
## Fazit:

- Ähnlichkeit der Biofilm-Population auf den verschiedenen Materialien gering
- sehr viel höhere Diversität auf EDPM als auf PE-X, Kupfer und Glas
- gleiche Materialien an verschiedenen Standorten zeigten unterschiedliche Populationen
- ☞ erster Hinweis, dass der Ursprung des Trinkwassers einen starken Einfluss hat
- Ist die Entwicklung eines Indikatorsystems basierend auf Indikatororganismen möglich?

## Beispiel: PE-Xc

Standort	Dominierend im PE-Xc Biofilm	
Berlin	<i>Dechloromonas sp.</i>	
Norderstedt	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax temperans</i>
Mülheim	<i>Candidatus Reyranelia massiliensis</i>	

### PE-Xc



■ Alphaproteobacteria ■ Betaproteobacteria ■ Gammaproteobacteria

U. Szewzyk, R. Röder



# Wann sind Bakterien tot?



## Was wir mit Kulturmethoden finden

Was wir nicht finden, weil die Organismen nicht wachsen, denn sie brauchen:

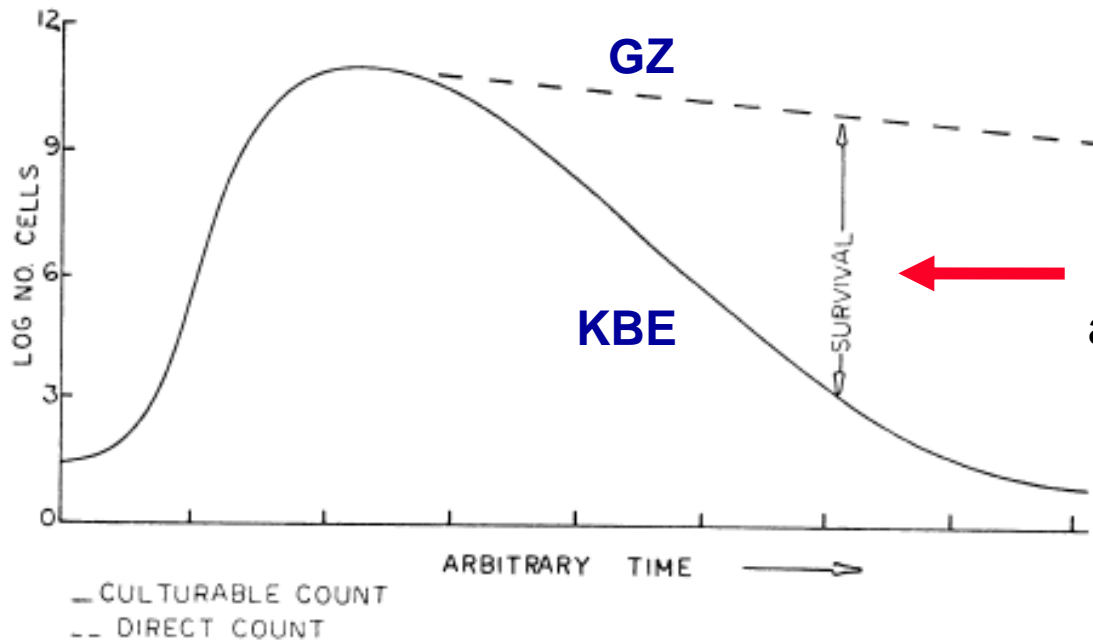
- andere Nährstoffe
- andere Bedingungen (pH, T)
- andere Bakterien
- sehr lange Zeit zum Wachsen

**Oder sie sind geschädigt**

**Diese Organismen sind nicht tot, sondern können sich erholen**



# Lebensfähig, aber nicht kultivierbar (VBNC)



← Zellen, die nicht tot sind, aber auch nicht unter den üblichen Bedingungen kultivierbar

- *Bakterien im VBNC-Zustand wachsen nicht auf den üblichen mikrobiologischen Nährmedien, auf denen sie normalerweise nachgewiesen werden!*
- Sie leben jedoch und sind zu erneuter Stoffwechselaktivität fähig.
- Zellen im VBNC-Zustand weisen extrem niedrige Stoffwechselaktivität auf, sind aber nach einer Wiederbelebung erneut kultivierbar *und virulent*.
- **Sie dürften für hartnäckige Kontaminationen verantwortlich sein**

# Schlussfolgerungen

- Biofilme können in Trinkwasser-Installationen auftreten, hygienisch relevante Organismen enthalten und das Wasser kontaminieren
- Öffentliche Überwachung noch uneinheitlich und z.T. lückenhaft
- Entscheidender Faktor: Material-Eigenschaften (W 270!)
- Desinfektion von Biofilmen bislang noch nicht ganz befriedigend, vor allem, weil keine Reinigung damit verbunden ist
- „Präventive Desinfektion“ führt auf die Dauer zu Materialschäden
- Organismen wie *L. pneumophila* und *P. aeruginosa* können in VBNC-Zustand übergehen, in dem sie dem kulturellen Nachweis entgehen, aber wieder kultivierbar werden können
- Konsequenzen für Risiko-Einschätzung: keine Überreaktion, aber:
  - Sorgfältige Materialauswahl besonders wichtig, geprüfte Werkstoffe!
  - Bei Problemfällen: unbedingt molekularbiologische Methoden!
  - Verbraucherrisiko noch nicht abschließend einschätzbar, auf jeden Fall für immunsupprimierte Menschen zu erkennen
  - VBNC-Zustand in Risikobetrachtung einbeziehen!

# Danksagung

Dem Projektträger Wasser im BMBF wird für die Förderung herzlich gedankt, besonders Frau S. Gräber und Frau V. Horak,

Dank auch an die Forschungs- und Industriepartner:

Teilprojekt 1:	Fa. Viega, Attendorn	<b>Dr. Kistenmann, Univ. Bonn</b>
Teilprojekt 2:	Deutsche Messe AG, Hannover Luftfahrtgeräte Gautling GmbH, Hamburg	<b>Dr. Bendinger, TU Hamburg-Harburg</b>
Teilprojekt 3:	ActiDes, Absteinbach AquaRotter, Ludwigshafen Jati Products, Hallenberg Pall GmbH, Dreieich ProMinent Dosiertechnik GmbH, Heidelberg Sanosil Service GmbH, Farchant	<b>Prof. Exner, Dr. Gebel, Univ. Bonn</b>
Teilprojekt 4a:	Fa. Hammann, Annweiler Scheideler Verfahrenstechnik, Duisburg Stadtwerke Duisburg	<b>Dr. Schaule, Prof. Flemming, IWW</b>
Teilprojekt 4b:	European Copper Institute, Brussels Freudenberg Forschungsdienste KG, Weinheim Geberit International AG, Jona, Schweiz Grünbeck Wasseraufbereitung, Höchststadt/Donau Grundfos GmbH, Leonberg	<b>Dr. Wingender, Prof. Flemming, UDE</b>

[www.biofilm-hausinstallation.de](http://www.biofilm-hausinstallation.de)