

# Einnistung von hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwasserbiofilme auf Materialien der Hausinstallation

Moritz, M. M., Duisburg/D, Eppmann, S., Duisburg/D, Flemming, H.-C., Duisburg/D, Wingender, J., Duisburg/D

Dr. Jost Wingender, Universität Duisburg-Essen, Fachbereich Chemie, Biofilm Centre, AG Aquatische Mikrobiologie, Geibelstraße 41, 47057 Duisburg

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Bildung von Trinkwasserbiofilmen sowie die Einnistung der hygienisch relevanten Bakterien *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* und *Enterobacter nimipressuralis* in diese Biofilme auf Elastomeren (Ethylen-Propylen-Dien-Monomer, EPDM, mit und ohne Empfehlung für den Trinkwasserbereich), Kunststoffen (PE-X b, PE-X c) und Kupfer untersucht. Auf den verschiedenen Materialien bildeten sich unter Durchflussbedingungen in Trinkwasser innerhalb von 14 Tagen Biofilme mit unterschiedlichen Zelldichten in folgender Rangfolge: EPDM ohne Empfehlung > EPDM mit Empfehlung > PE-X b und Kupfer > PE-X c. Die 14 Tage alten Biofilme wurden mit einem Gemisch der Zielorganismen (*P. aeruginosa*, *L. pneumophila* und *E. nimipressuralis*) angeimpft und deren Persistenz im Biofilm unter Durchflussbedingungen über 28 Tage verfolgt. Eine Einnistung von *E. nimipressuralis* fand in keinem Fall statt, während die Dauer der Persistenz sowie die Konzentrationen von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in den Biofilmen in Abhängigkeit des Materials variierten. *P. aeruginosa* war in Biofilmen auf EPDM ohne Empfehlung nur bis zu 7 Tage nach Animpfung kulturell nachweisbar, auf EPDM mit Empfehlung bis zu 14 Tage und auf den Kunststoffen PE-X b und c bis zu 28 Tage. In Biofilmen auf Kupfer fand keine Einnistung von *P. aeruginosa* statt. *L. pneumophila* konnte in Biofilmen auf allen Materialien bis zu 28 Tage nach Animpfung kulturell nachgewiesen werden. Untersuchungen mit der kultivierungsunabhängigen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigten, dass *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* oft über längere Zeiträume und in höheren Konzentrationen in den Biofilmen nachgewiesen wurden als mit den kulturabhängigen Methoden.

## Einleitung

Biofilme sind auf nahezu allen mit Wasser in Berührung kommenden Oberflächen zu finden. Praxisbeobachtungen und Laboruntersuchungen weisen darauf hin, dass solche Biofilme ein Reservoir für hygienisch relevante Mikroorganismen darstellen können, z. B. für opportunistische Krankheitserreger wie *Pseudomonas aeruginosa* und Legionellen (insbesondere *Legionella pneumophila*) oder für coliforme Bakterien wie *Enterobacter* spp. oder *Citrobacter* spp.. Diese Organismen sind in der Lage, sich in bereits bestehende Trinkwasserbiofilme unter verschiedenen Bedingungen einzunisten, dort über Wochen bis Monate zu persistieren und aus den Biofilmen freigesetzt zu werden, um dann zu einer Kontamination des Wassers zu führen <sup>[1, 2, 3, 4]</sup>. Das Überleben im Biofilm wird dadurch begünstigt, dass im Vergleich zu planktonischen Zellen Organismen im Biofilm eine deutlich erhöhte Toleranz gegenüber Desinfektionsmitteln in praxisrelevanten Konzentrationen aufweisen.

Biofilme können somit ein geschütztes Habitat, ein potenzielles Reservoir und eine Kontaminationsquelle für hygienisch relevante Bakterien darstellen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde schwerpunktmäßig die Situation in der Trinkwasser-Installation (Hausinstallation) berücksichtigt, da in diesem Bereich besondere Faktoren wie erhöhte Wassertemperaturen, die Auswahl der mit Trinkwasser in Berührung kommenden Materialien und verlängerte Stagnationszeiten die Biofilmbildung begünstigen können. Es wurde die Bildung von Trinkwasserbiofilmen, die Einnistung von *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* und *Enterobacter nimipressuralis* in diese Biofilme sowie die Persistenz dieser Organismen in den Biofilmen auf verschiedenen für Trinkwasser-Installationen relevanten Materialien (Elastomere, Kunststoffe, Kupfer) vergleichend untersucht. Der Nachweis der Zielorganismen erfolgte mit kulturellen Verfahren sowie mit der kultivierungsunabhängigen Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

## Methoden

Fünf verschiedene Materialien wurden bezüglich der Biofilmbildung und der Einnistung von *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* und *E. nimipressuralis* getestet: 1. EPDM (Ethylen-Propylen-Dien-Monomer) mit Empfehlung, entsprach den Anforderungen des Arbeitsblatts W 270 der Deutschen Vereinigung des Gas- und Wasserfaches (DVGW) sowie der KTW (Kunststoffe im Trinkwasser) Kategorie C der Trinkwasserkommission, 2. EPDM ohne Empfehlung, entsprach keinem der genannten Standards, 3. silanvernetztes Polyethylen (PE-X b), das den Bestimmungen des DVGW-Arbeitsblatts W 270 und der KTW Kategorie C entspricht, 4. strahlenvernetztes Polyethylen (PE-X c) gemäß DVGW-Arbeitsblatt W 270 und KTW Kategorie A und 5. Kupfer. Um den möglichen Einfluss von Desinfektions- und Sanierungsmaßnahmen auf die Biofilmbildung und Einnistung von hygienisch relevanten Mikroorganismen auf den verschiedenen Materialien zu untersuchen, wurden zusätzlich künstlich gealterte Materialien von EPDM mit Empfehlung, PE-X b und PE-X c verwendet, die vom IWW Zentrum Wasser (Mülheim an der Ruhr) zur Verfügung gestellt wurden. Die künstliche Alterung bestand aus einer Behandlung mit 5 ppm Hypochlorit bei 3 bar und 40°C für 4 Wochen. Bei den verwendeten Teststämmen *P. aeruginosa* AdS, *L. pneumophila* AdS und *E. nimipressuralis* Klon A handelte es sich um Trinkwasserisolate.

Auf Coupons (76 mm x 26 mm) der Materialien wurden Trinkwasserbiofilme in einem Edelstahltank unter Durchfluss-Bedingungen (20 L/h) bei Umgebungstemperatur angezüchtet. Nach 14 Tagen wurden die Coupons in Edelstahl-Durchflussreaktoren überführt, welche mit einer Suspension von *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* und *E. nimipressuralis* mit einer Zelldichte von jeweils  $10^6$  Zellen/mL in Trinkwasser angeimpft wurden. Nach 24 h statischer Inkubation wurden die Reaktoren an die Leitung einer Trinkwasser-Installation angeschlossen und bei einem Durchfluss von 3 L/h bei Raumtemperatur für 4 Wochen betrieben. Die Biofilme wurden 1, 7, 14 und 28 Tage nach der Animpfung von den Coupons abgeschabt und in entionisiertem Wasser dispergiert. In diesen Biofilmsuspensionen wurden die Gesamtzellzahl und Koloniezahl sowie die Konzentration der Zielorganismen ermittelt. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte fluoreszenzmikroskopisch nach Anfärbung der Zellen mit dem Fluorochrom 4',6-Diamidino-2-phenylindol. Die Koloniezahl heterotropher Bakterien wurde auf R2A-Medium nach Bebrütung für 7 d bei 20 °C ermittelt. Die quantitative Bestimmung der Zielorganismen wurde mit kulturellen Standardmethoden durchgeführt; der Nachweis von *P. aeruginosa* erfolgte auf CN-Agar nach DIN EN 12780 (2008), von *L. pneumophila* auf GVPC-Agar mit Säurebehandlung nach ISO 11731 und von *E. nimipressuralis* mit dem System

Colilert-18/QuantiTray/2000. Zusätzlich wurden *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* mit der kulturunabhängigen FISH-Methode unter Verwendung der Gensonden Psae16S-182 bzw. LEGPNE1 quantifiziert.

## Ergebnisse

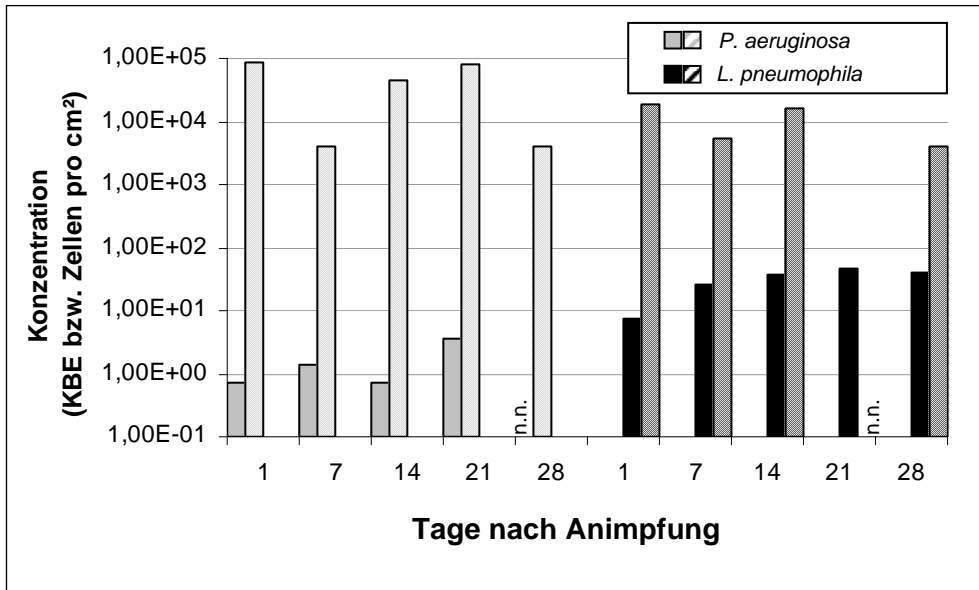
Zur Untersuchung der Einnistung von *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* und *E. nimipressuralis* in Biofilme auf unterschiedlichen Materialien wurden zunächst 14 Tage alte Trinkwasserbiofilme auf Coupons aus Elastomeren (EPDM mit und ohne Empfehlung), Kunststoffen (PE-X b, PE-X c) und Kupfer angezüchtet. Nach 14 Tagen hatten sich auf den verschiedenen Materialien Biofilme mit unterschiedlichen Zelldichten gebildet. Die höchste Zelldichte (Gesamtzellzahl ca.  $10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup>) wurde auf EPDM ohne Empfehlung erreicht, gefolgt von EPDM mit Empfehlung (ca.  $10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup>), PE-X b und Kupfer (jeweils ca.  $10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>) und PE-X c (ca.  $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>). Im Fall der Elastomeren und Kunststoffmaterialien lagen die Koloniezahlen jeweils 1 Log-Stufe unter denjenigen der Gesamtzellzahlen, während auf Kupfer die Koloniezahl etwa 2 Log-Stufen geringer war als die Gesamtzellzahl.

Die 14 Tage alten Biofilme wurden mit den entsprechend vorbereiteten Zielorganismen (*P. aeruginosa*, *L. pneumophila* und *E. nimipressuralis*) im Gemisch beaufschlagt und deren Persistenz im Biofilm unter Durchflussbedingungen sowohl kulturell als auch mit der kultivierungsunabhängigen FISH-Methode (*P. aeruginosa*, *L. pneumophila*) untersucht. Eine Einnistung von *E. nimipressuralis* wurde in keinem Fall beobachtet, während im Fall von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* die Dauer der Persistenz sowie der Gehalt der Bakterien in den Trinkwasserbiofilmen je nach Bakterienspezies und Art der Materialien unterschiedlich war.

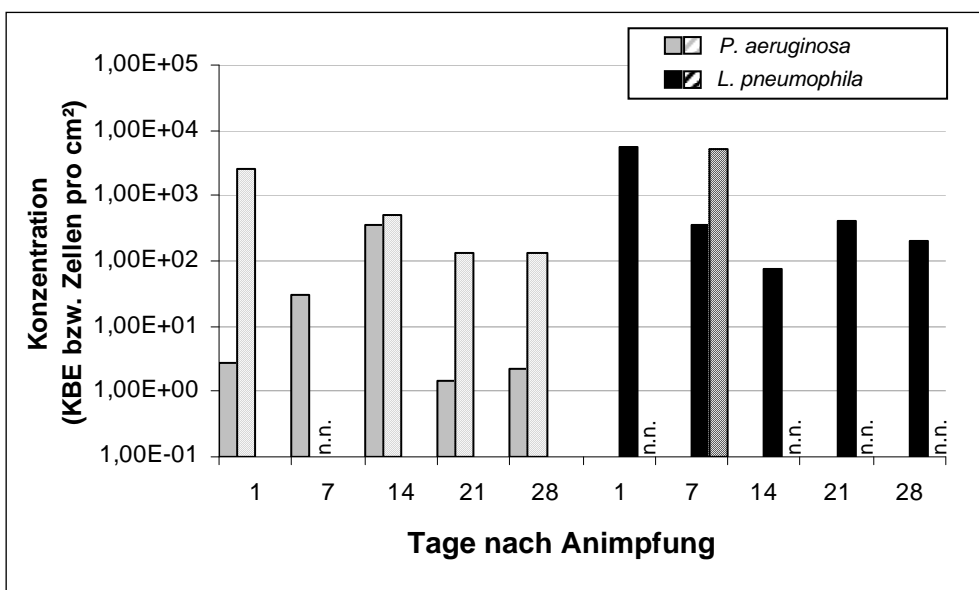
Während *P. aeruginosa* in Biofilmen auf EPDM ohne Empfehlung nur bis zu 7 Tage nach Animpfung kulturell nachweisbar war, konnten die Bakterien auf EPDM mit Empfehlung bis zu 14 Tage und auf den Kunststoffen PE-X b und c bis zu 28 Tage nach Animpfung detektiert werden. In Biofilmen auf Kupfer fand keine Einnistung von *P. aeruginosa* statt.

*L. pneumophila* konnte in Biofilmen auf allen Materialien bis zu 28 Tage nach Animpfung kulturell nachgewiesen werden, wobei die Konzentration der Bakterien in Biofilmen auf EPDM ohne Empfehlung am höchsten und auf Kupfer am niedrigsten war.

Untersuchungen mit der FISH-Technik, bei der die Zielorganismen mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden detektiert werden, zeigten, dass *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* oft über längere Zeiträume und in höheren Konzentrationen in den Biofilmen nachgewiesen wurden als mit den kulturabhängigen Methoden wie beispielhaft für EPDM mit Empfehlung und PE-X b in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.



**Abbildung 1:** Konzentrationen von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM mit Empfehlung. Die Bakterien wurden kulturell (ausgefüllte Balken) und mit FISH (gestreifte Balken) nachgewiesen. Nachweisgrenze der FISH:  $5,3 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>. n.n., nicht nachgewiesen



**Abbildung 2:** Konzentrationen von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen auf PE-X b. Die Bakterien wurden kulturell (ausgefüllte Balken) und mit FISH (gestreifte Balken) nachgewiesen. Nachweisgrenze der FISH:  $1,3 \times 10^2$  Zellen/cm<sup>2</sup>. n.n., nicht nachgewiesen

Erste Versuche mit den künstlich gealterten Materialien zeigten keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf die Einnistung der Zielorganismen in Trinkwasserbiofilme. Lediglich im Falle des PE-X b wurde auf dem unbehandelten Material eine um eine Log-Stufe höhere Konzentration von *P. aeruginosa* im Biofilm festgestellt als auf dem künstlich gealterten PE-X b. In Biofilmen auf den anderen Werkstoffen gab es keine bemerkenswerten Unterschiede bezüglich der Dauer der Persistenz oder der Konzentration von *P. aeruginosa*. Die Einnistung und Persistenz von *L. pneumophila* verhielten sich auf künstlich gealterten Materialien ebenso wie auf unbehandelten.

## Schlussfolgerungen

Das Wachstum von Trinkwasserbiofilmen war auf EPDM ohne Empfehlung am höchsten, gefolgt von EPDM mit Empfehlung, PE-X b, Kupfer und PE-X c. *P. aeruginosa* und *L. pneumophila*, nicht jedoch *E. nimipressuralis*, waren in der Lage, sich in Trinkwasserbiofilme auf Elastomeren und Kunststoffmaterialien einzunisten und dort zu persistieren, während Biofilme auf Kupfer nur von *L. pneumophila* kolonisiert wurden. Die Anwendung der FISH-Technik zeigte in vielen Fällen höhere Konzentrationen von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* als mit Kulturmethode bestimmt wurden. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil der Zielorganismen im Biofilm in einen nicht kultivierbaren, sogenannten „viable but non-culturable“ (VBNC)-Zustand übergehen und somit nicht mit kulturellen Standardmethoden detektiert werden, aber dennoch vorhanden sind und möglicherweise von hygienischer Bedeutung sein können.

## Literatur

[1] Flemming, H.-C., Percival, S. L., Walker, J. T. *Wat. Sci. Tech. Wat. Supply* **2002**, 2(1), 271-280. [2] Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., Keevil, C. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 1585-1592. [3] Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.-C., Wingender, J. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2003**, 206, 563-573. [4] Banning, N., Toze, S., Mee, B. J. *Microbiology* **2003**, 149, 47-55.

## Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes (Teilprojekt 4b) im Rahmen des Verbundprojekts „Vermeidung und Sanierung von Trinkwasser-Kontaminationen durch hygienisch relevante Mikroorganismen aus Biofilmen der Hausinstallation“.