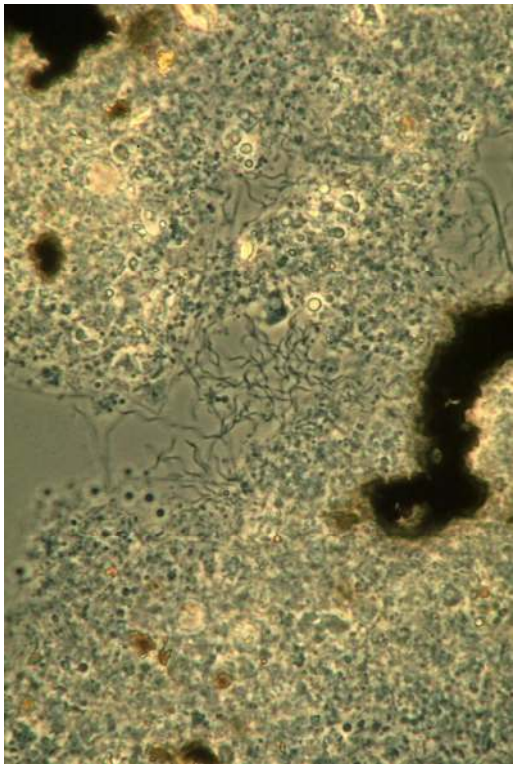
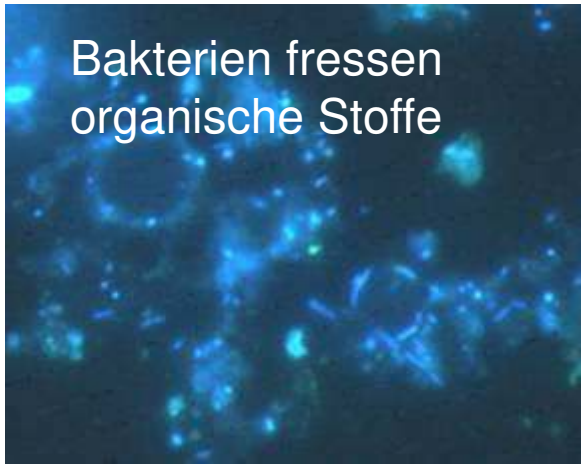
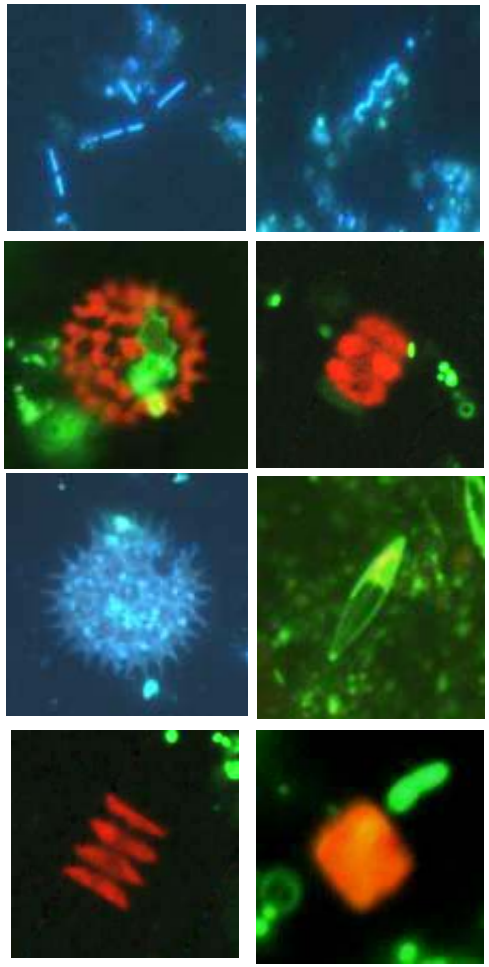
Biofilme im Trinkwasser – Schwachpunkt Hausinstallation



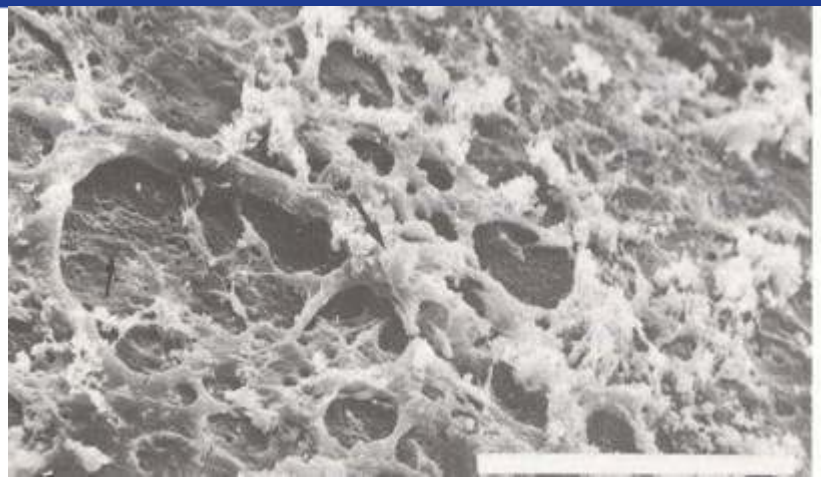
Hans-Curt Flemming
Jost Wingender
IWW Zentrum Wasser
Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen

Erwünschte Biofilme: z.B. Sandfilter, wo die Reinigungsleistung erbracht wird

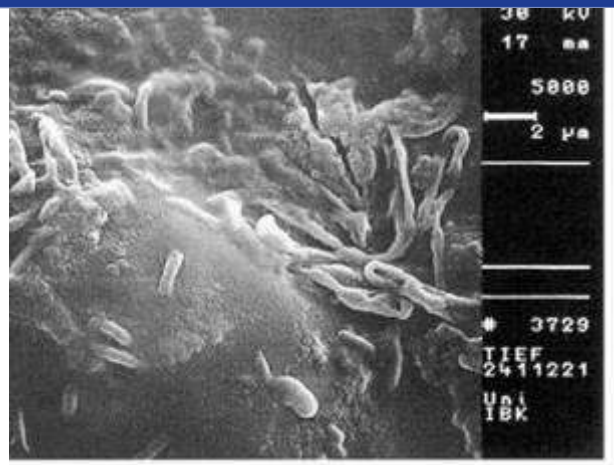




Beispiele für Biofilme in der Hausinstallation

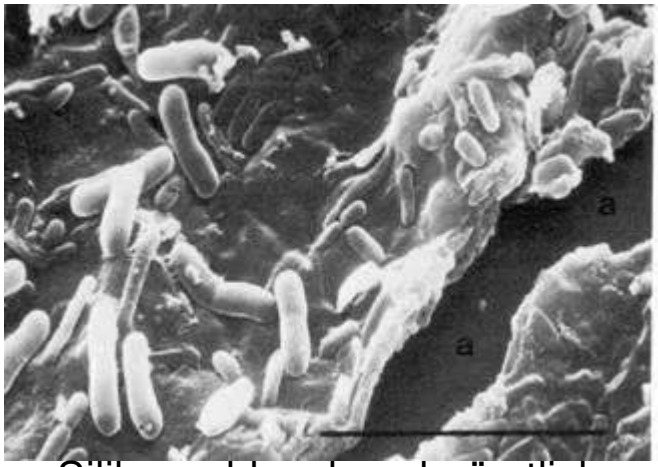


16 Jahre alte Hausanschlussleitung aus Stahl (500 x)
(Grubert et al., 1991)

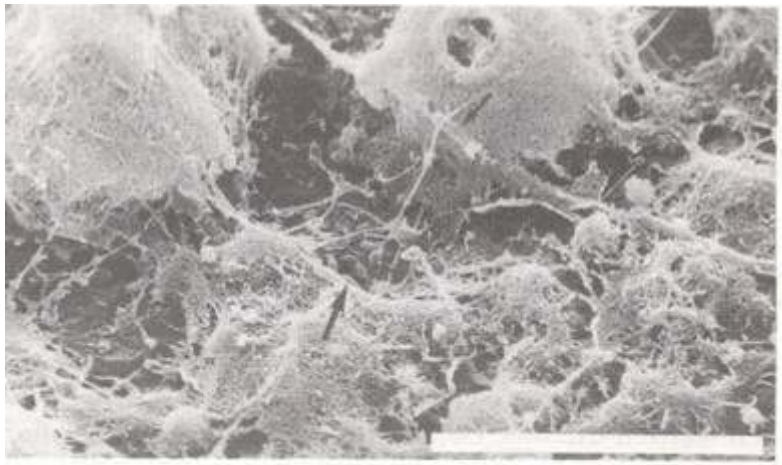


Kunststoffrohr Kaltwasserleitung
(Tiefenbrunner, 2002)

selten benutzter Wasserhahn
(Exner u. Tuschwitzki, 1984)

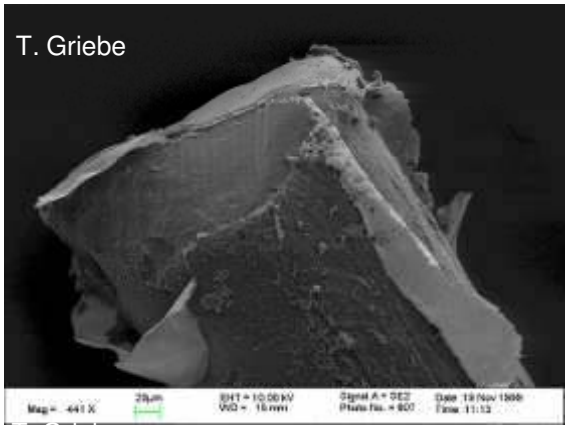


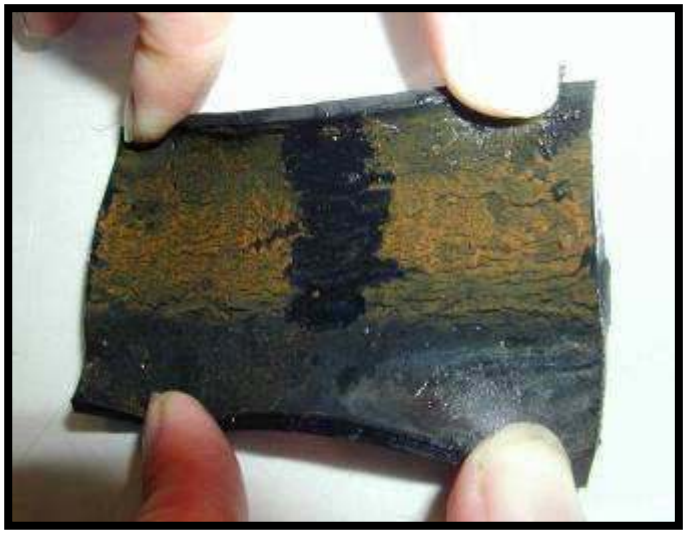
Silikonschlauch, zahnärztliche Einheit (Exner u. Tuschwitzki, 1984)



Hausanschlussleitung aus PE, mehrere Monate alt
(Grubert et al., 1991)

Der Biofilm zuhause

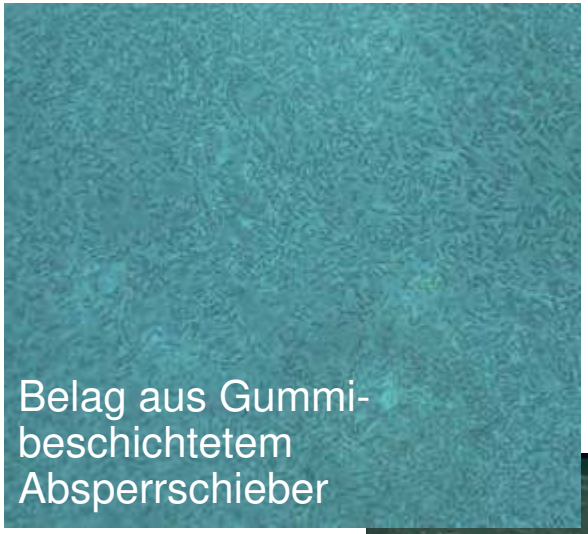


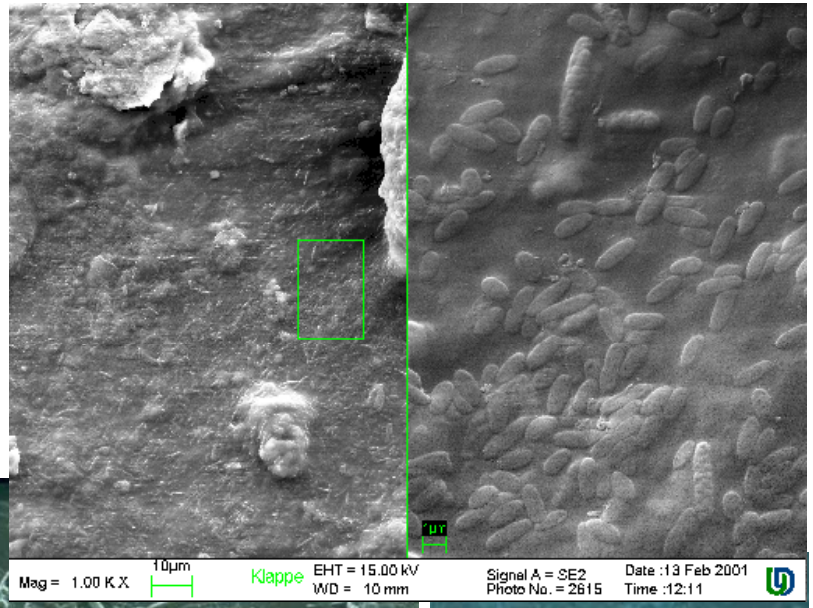


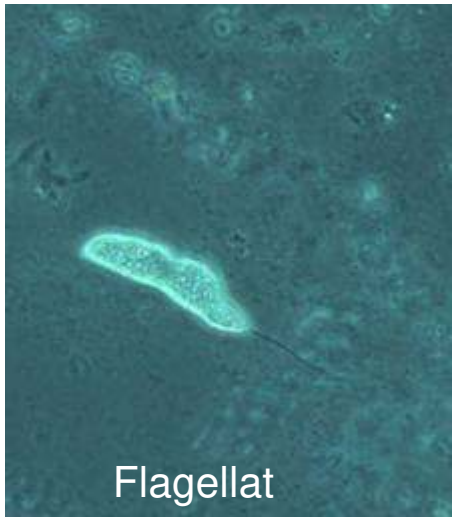
(U. Szewzyk, TU Berlin)

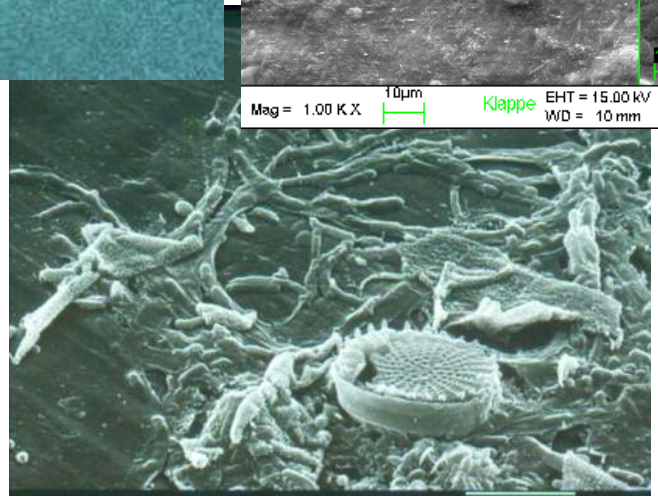
Organismen in Trinkwasserbiofilmen

- **Mikroorganismen:** Bakterien, Mikroalgen, Pilze, Protozoen
- **Vielzellige Organismen:** Fadenwürmer, Rädertiere, Wenigborster, Kleinkrebse, Wasserasseln

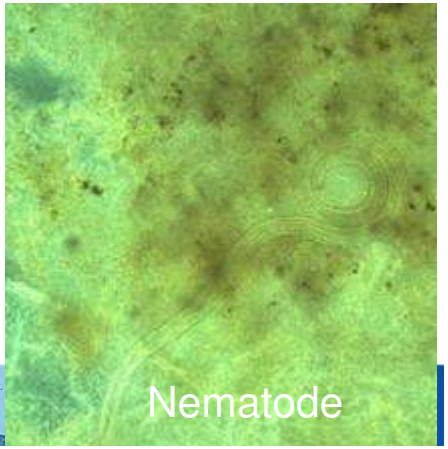

Belag aus Gummi-beschichtetem Absperrschieber




Flagellat


Bakterien und Kieselalge, Trinkwasserbiofilm auf Stahl

Rädertierchen


Nematode

Hygienische und technische Probleme durch Biofilme in Trinkwassersystemen

- Kontamination des Wassers durch Biofilm-Mikroorganismen (Aufkeimung, Freisetzung von Mikroorganismen mit krankheits-erregenden Eigenschaften)
- Erhöhte Toleranz gegenüber Desinfektionsmitteln, Zehrung von Desinfektionsmitteln sowie Bildung von Desinfektions-nebenprodukten
- Bildung von Geruchsstoffen (z. B. durch Actinomyceten)
- Ursache für Verfärbung und Trübung von Trinkwasser (z. B. durch Eisen- und Manganoxid ablagernde Bakterien)
- Mikrobiell beeinflusste Korrosion (Biokorrosion)
- Erhöhung des Strömungswiderstands in Rohren

Wie kommen die Mikroorganismen ins System?

- Über Roh-/Trinkwasser (Infiltration durch vereinzelte Organismen, die im Biofilm ein günstiges Habitat finden)
- Durch Kontamination aus Herstellung, Lagerung, Einbau von Werkstücken
- Über Rohrbrüche, Reparaturarbeiten
- Im Rückfluss von kontaminiertem Wasser
- Über Schwitzwasser oder einströmende Luft in Wasser-behältern

Wovon ernähren sich die Organismen?

- Wasserinhaltsstoffe
- Ausgelaugte Substanzen aus Werkstoffen und Geräten
- Stoffwechselprodukte der Begleitflora
- Verschmutzungen (im Rahmen von Rohrbrüchen und Reparaturarbeiten, beim Einbau, z. B.: Fett, andere Gleitmittel)

Haupt-Verdächtige: Polymere im Kontakt mit Trinkwasser

- **Absperr-Armaturen**
- **Ausgleichsgefäße**
- **Beschichtungen, Anstriche**
- **Chemikalien-Mischgeräte**
- **Dichtungen**
- **Enthärtungsanlagen**
- **Filter**
- **Folien zum Auskleiden**
- **Gummidichtungen**
- **Isolierstücke**
- **Kaffeemaschinen**
- **Kleber**
- **Rohrbelüfter**
- **Schläuche**
- **Schwimmer**
- **Ventile**

Freigabe nach KTW-Empfehlung heißt nicht, dass keine Biofilme mehr wachsen

An der Oberfläche: höchste Nährstoff-Konzentration, direkt für den Biofilm verfügbar

Prüfung auf Biofilm-Wachstum: Nach Arbeitsblatt W 270!

G. Tuschewitzki

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.

U. Szewzyk, TU Berlin

Bekanntes Problem: Legionellen

Ärzte warnen vor Erreger der Legionärs-Krankheit

Legionellen tropfen auch zu Hause aus der Dusche

„Wasser morgens einige Minuten laufen lassen“

Von SUSANNE MÄDER

UV-Licht stoppt gefährliche Viren

Neues Verfahren tötet Legionellen

Bereits 18 Tote durch Legionellen

Auf einer Blumenschau infiziert

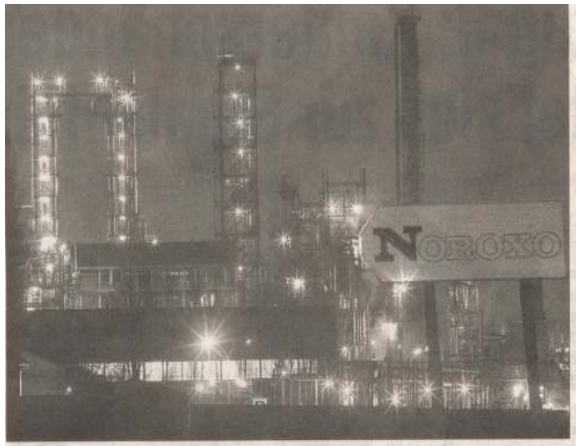
Legionärskrankheit

Die Gefahr lauert in jeder Dusche

HÖRZU sprach mit dem Mikrobiologen Prof. G. Ruckdeschel über die gefährlichste Form der Lungenentzündung

Prof. Ruckdeschel, Uni München

HÖRZU: Herr Professor Ruckdesc
6000 bis 9000 Menschen, so sch
man, infizieren sich pro Jahr mi
Legionella-Bakterien, den Erreger
der Legionärskrankheit. In den l
Jahren häufen sich Meldungen ü
die todbringende Infektion. Kom
eine neue Seuche auf uns zu?
PROF. RUCKDESCHEL: Die Bakterie
gibt's schon seit Urzeiten. Sie leb
im Süßwasser und in feuchter Er
und inzwischen leider auch fast
jeder Dusche und jedem Boiler,
wir uns die Erreger mit der mod



Sicherheitshalber geschlossen wurde das Noroxo-Chemiewerk in Harnes bei Lille. Dort waren schon im Oktober und November erhöhte Legionellen-Werte gemessen worden. dpa-Bild

Sieben Tote nach Ausbruch der Legionärskrankheit

Verdacht: Chemiefabrik könnte Infektionsherd sein - 59 Infizierte

20.9.93

Badeverbot für Legionellen

Sanierung im Volkspark-Hallenbad

Kreuzfahrt-Passagier starb an Legionellen

Nach Grönland-Tour auf der „Ocean Monarch“ - Zwei weitere Teilnehmer infizierten sich

Die Legionärskrankheit

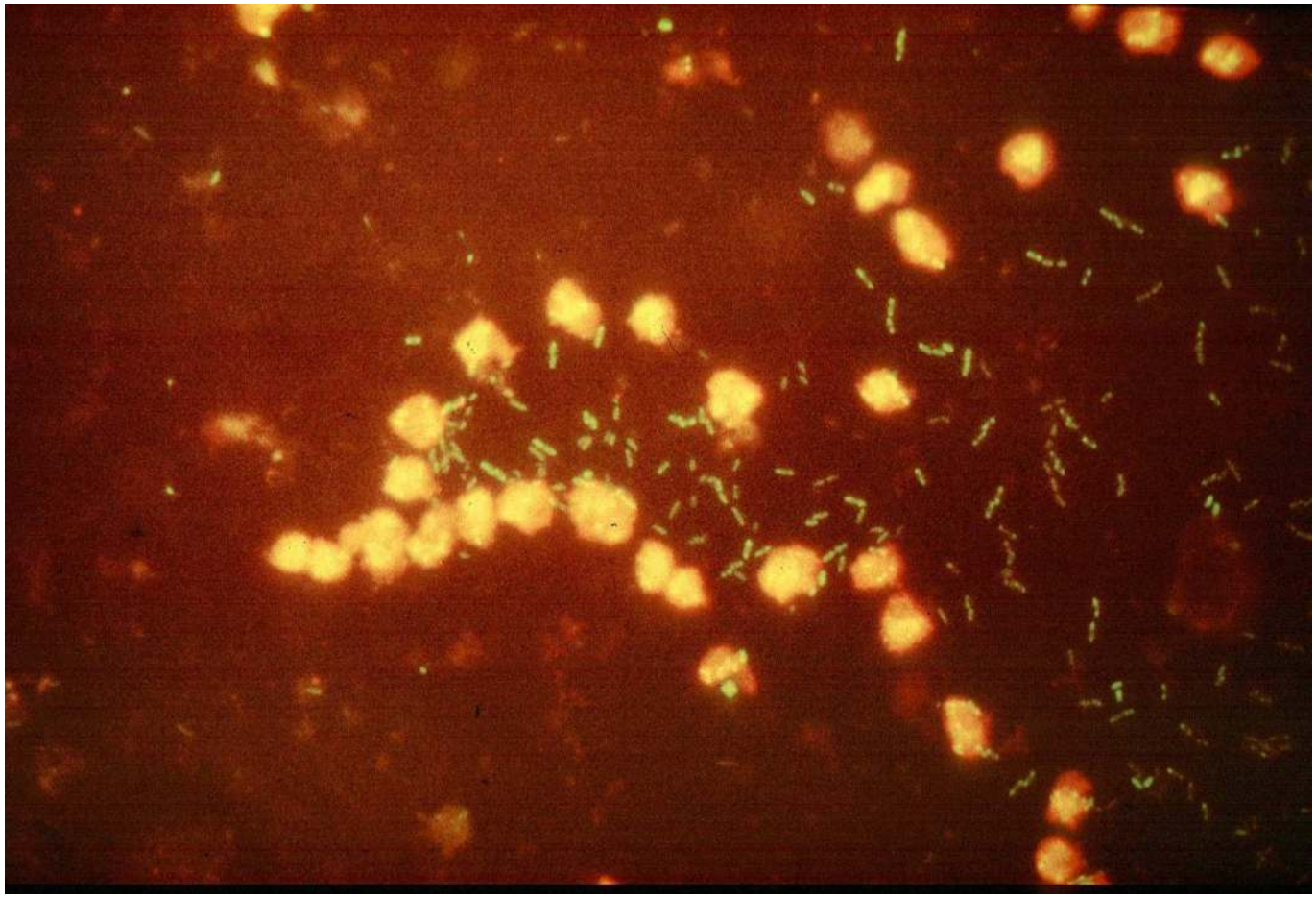
Tourist starb in Slowenien

Fünf Tote durch Legionärskrankheit in Spanien

In einem spanischen Hospital sind fünf Menschen an der Legionärskrankheit gestorben. Die Infektion habe sich über die Klimaanlage des Gebäudes in Saragossa ausgebreitet, erklärten die Gesundheitsbehörden. Die Legionärskrankheit ist eine schwere Form von Lungenentzündung. (ap)

Adlon-Gast leidet an Legionärskrankheit

Legionellen gehören zur Beute von Amöben



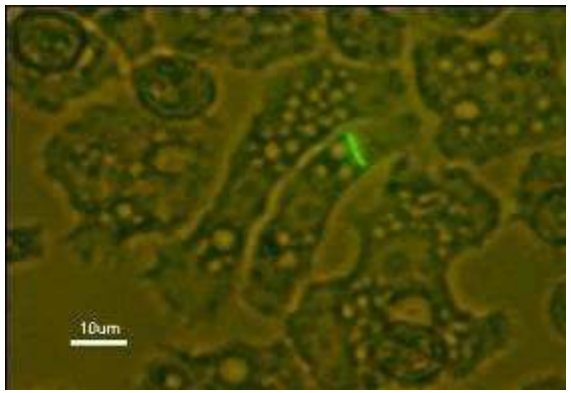
Amöben-Rudel (gelb) und Bakterien (grün) durch „Gensonden“ (FISH) sichtbar gemacht.

U. Szewzyk, TU Berlin

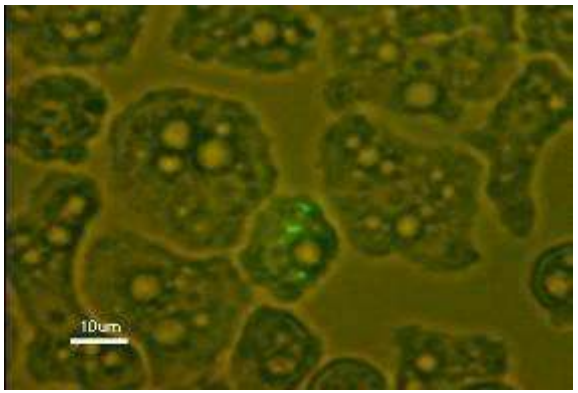
Legionellen vermehren sich in Amöben

Photos Université Paris Sud – Pharmacie – Labo Santé Publique Environnement

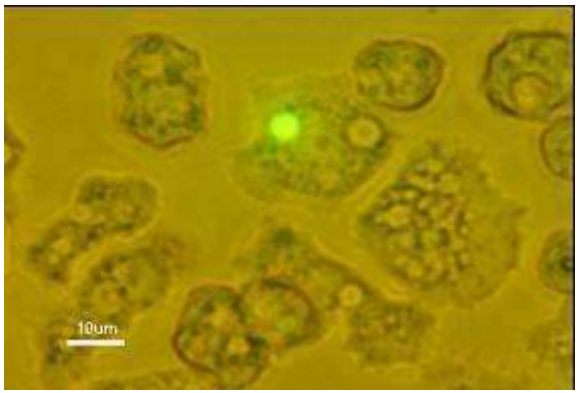
- *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010
- *L. pneumophila* JR 32 (pBC(gfp)-Pmip), Dr Michael Steinert, Univ. Würzburg



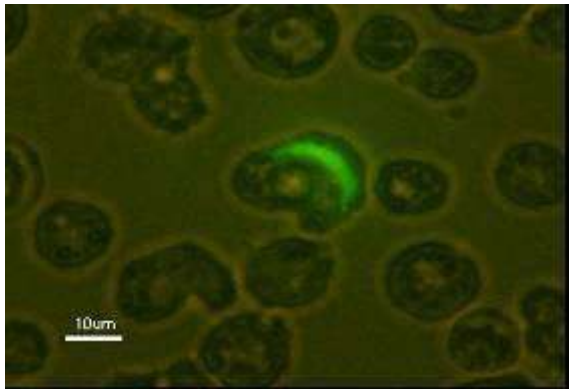
2h00



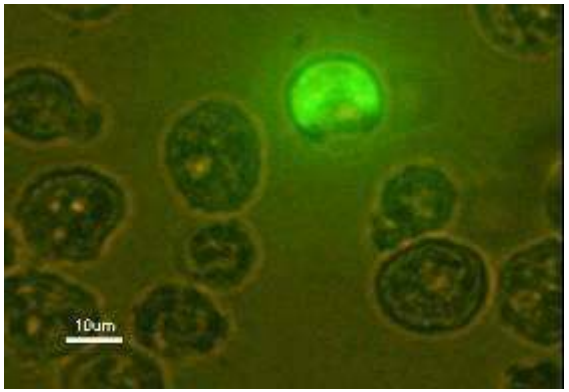
4h00



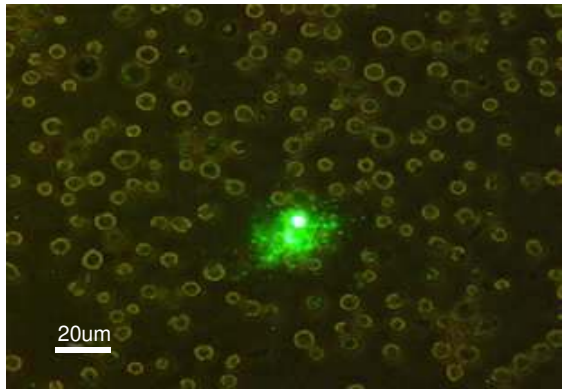
6h00



12h00



18h00



24h00

In Amöben: Von 1 *Legionella* zu 1000 in 24h

W.F. McCoy, 2004

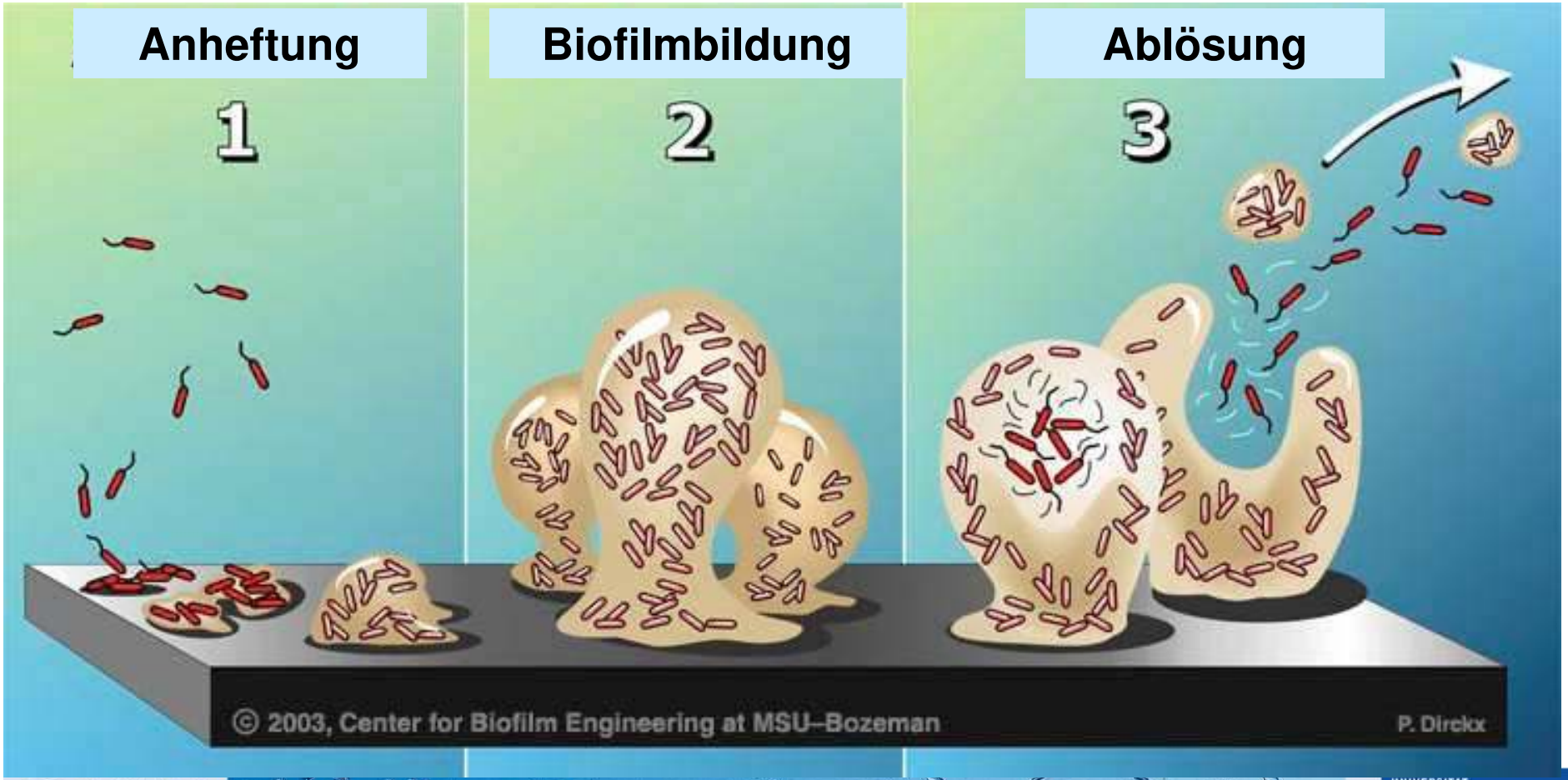
Pseudomonas aeruginosa in Biofilmen

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

Freisetzung von hygienisch relevanten Mikroorganismen aus Biofilmen

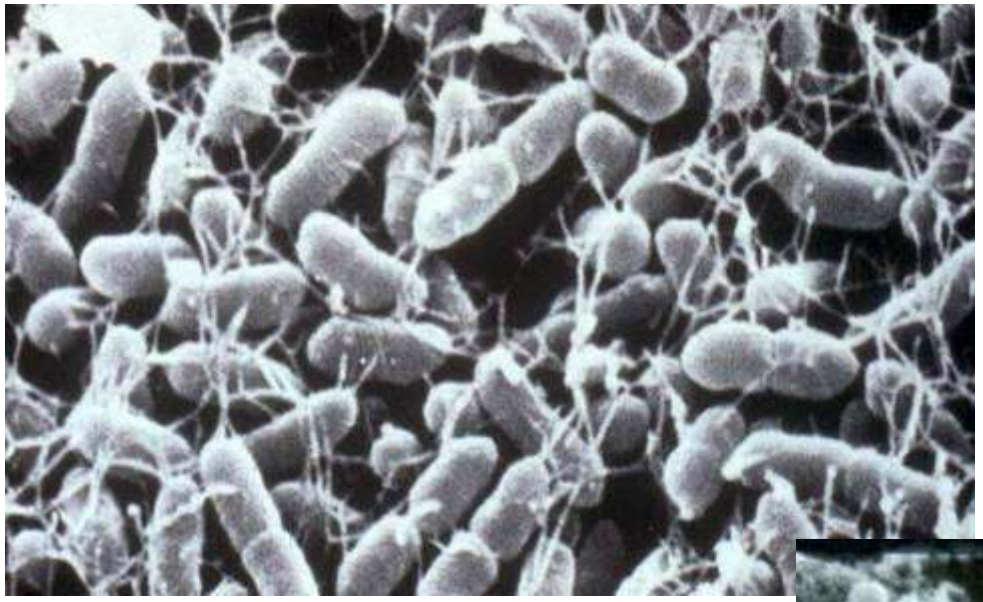
Kontamination des Wassers!



Beispiele für Kontaminationsfälle

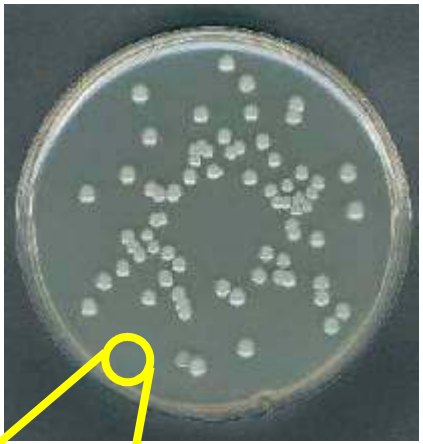
- **Schule, Neuinstallation:**
  - ***P. aeruginosa:*** **> 1.000 KBE pro 100 mL**
- **Schule, alte Installation**
  - ***Legionella:*** **> 10.000 KBE pro 100 mL**
- **Verwaltungsgebäude, Neuinstallation**
  - ***P. aeruginosa:*** **200 KBE pro 100 mL**
- **Sporthalle, alte Installation**
  - ***Legionella:***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

Wann sind Mikroorganismen wirklich tot?



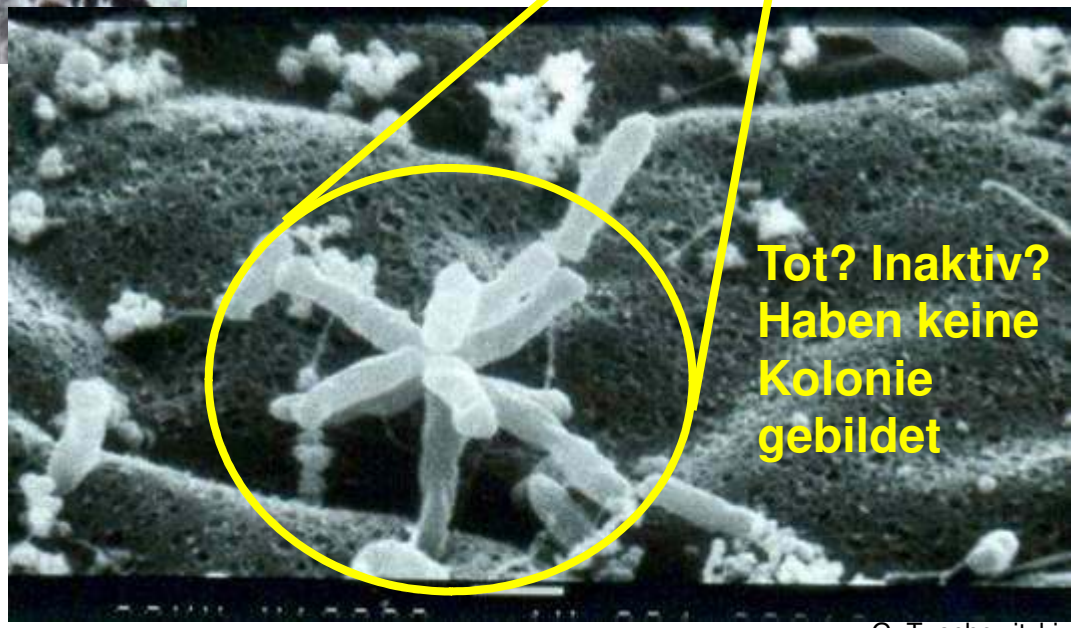
Kolonie (KBE)

Nur voll lebensfähige Zellen bilden Kolonien



Kultivierung ist der Gold-Standard der Überwachung von Wasser, Lebensmitteln etc.

Zwischen den Kolonien



G. Tuschewitzki

Grenzen der Kultivierungsmethode

Was wir mit Kulturmethoden finden, muss nicht tot sein

Kein Baustoffwechsel, aber noch Erhaltungsstoffwechel!
Organismen nicht wachsen, denn sie brauchen:

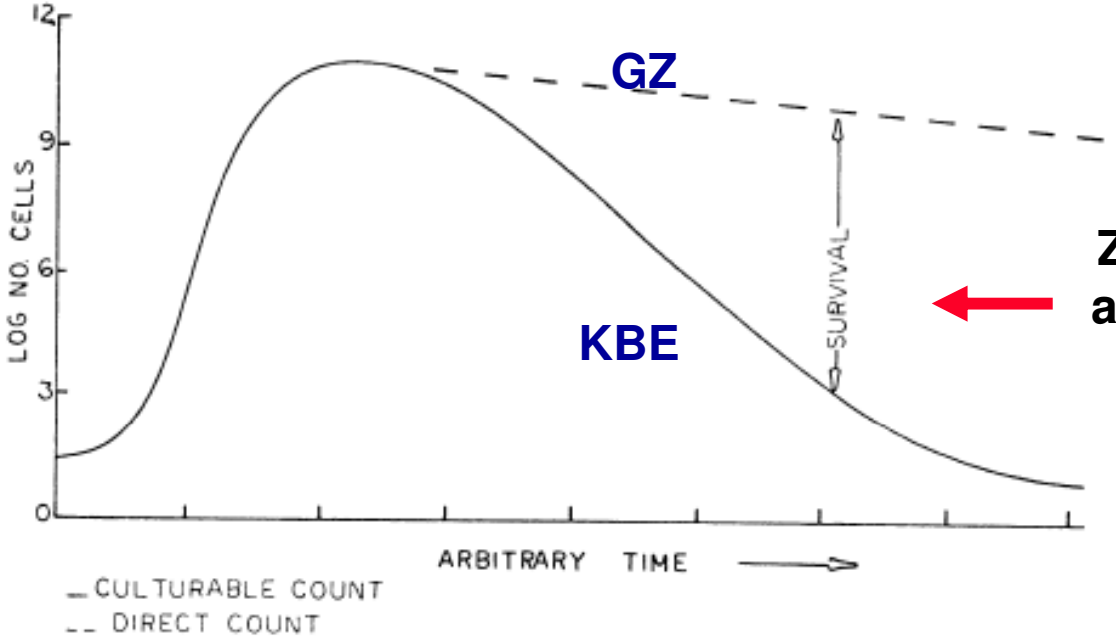
- andere Nährstoffe
- andere Bedingungen (pH, T)
- andere Bakterien
- sehr lange Zeit zum Wachsen

Oder sie sind geschädigt

Diese Organismen sind nicht tot, sondern können sich wieder erholen

Lebensfähig, aber nicht kultivierbar (VBNC)

VBNC = Viable but not culturable



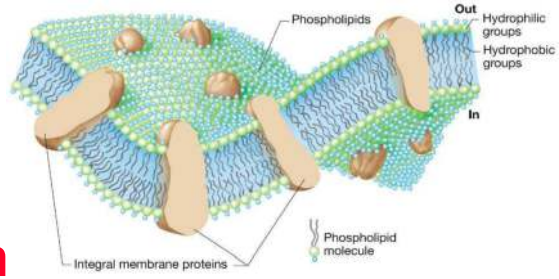
Zellen, die nicht tot sind, aber auch nicht unter den üblichen Bedingungen kultivierbar:

Kein Baustoffwechsel, nur Erhaltungsstoffwechsel

- ***Bakterien im VBNC-Zustand wachsen nicht auf den üblichen mikrobiologischen Nährmedien, auf denen sie normalerweise nachgewiesen werden!***
- **In diesem Zustand weisen sie niedrige Stoffwechselaktivität auf, können sich u.U. aber erholen und sind dann erneut kultivierbar – auch infektiös?**

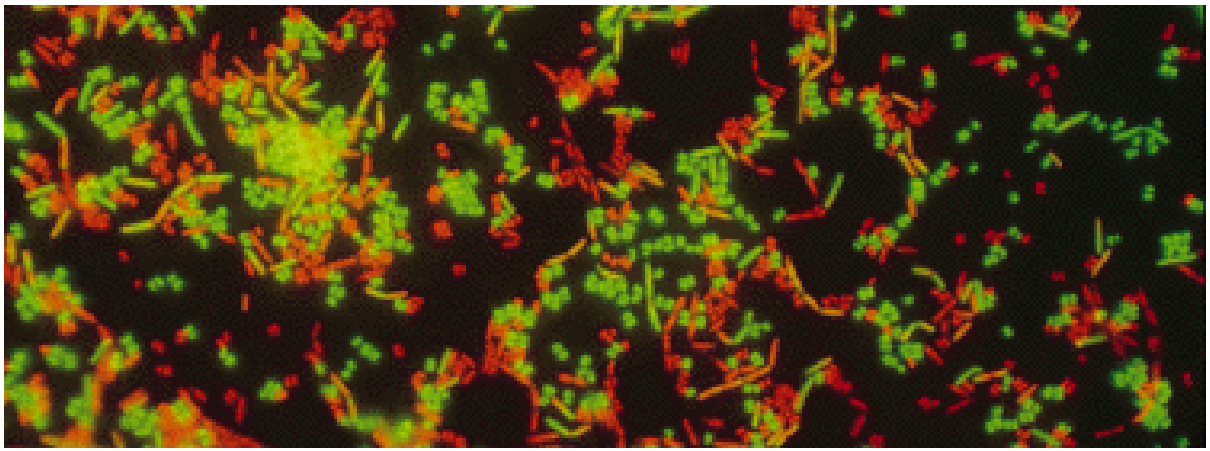
Methoden zur Erkennung von VBNC-Bakterien existieren!

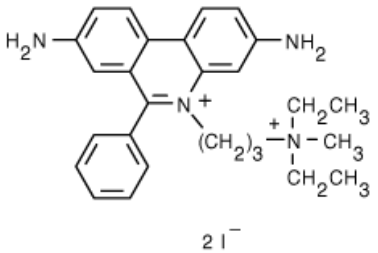
- Membran-Integrität („live/dead“-System)
- Zellverlängerung („direct viable count“)
- Enzymatische Aktivität (Fluoresceindiacetat)
- Proteinsynthese (FISH)
- Intact polar membrane lipids Analyse



Bei Re-Kontaminationen könnte es sich oft um „Wiederbelebung“ von VBNC-Organismen handeln

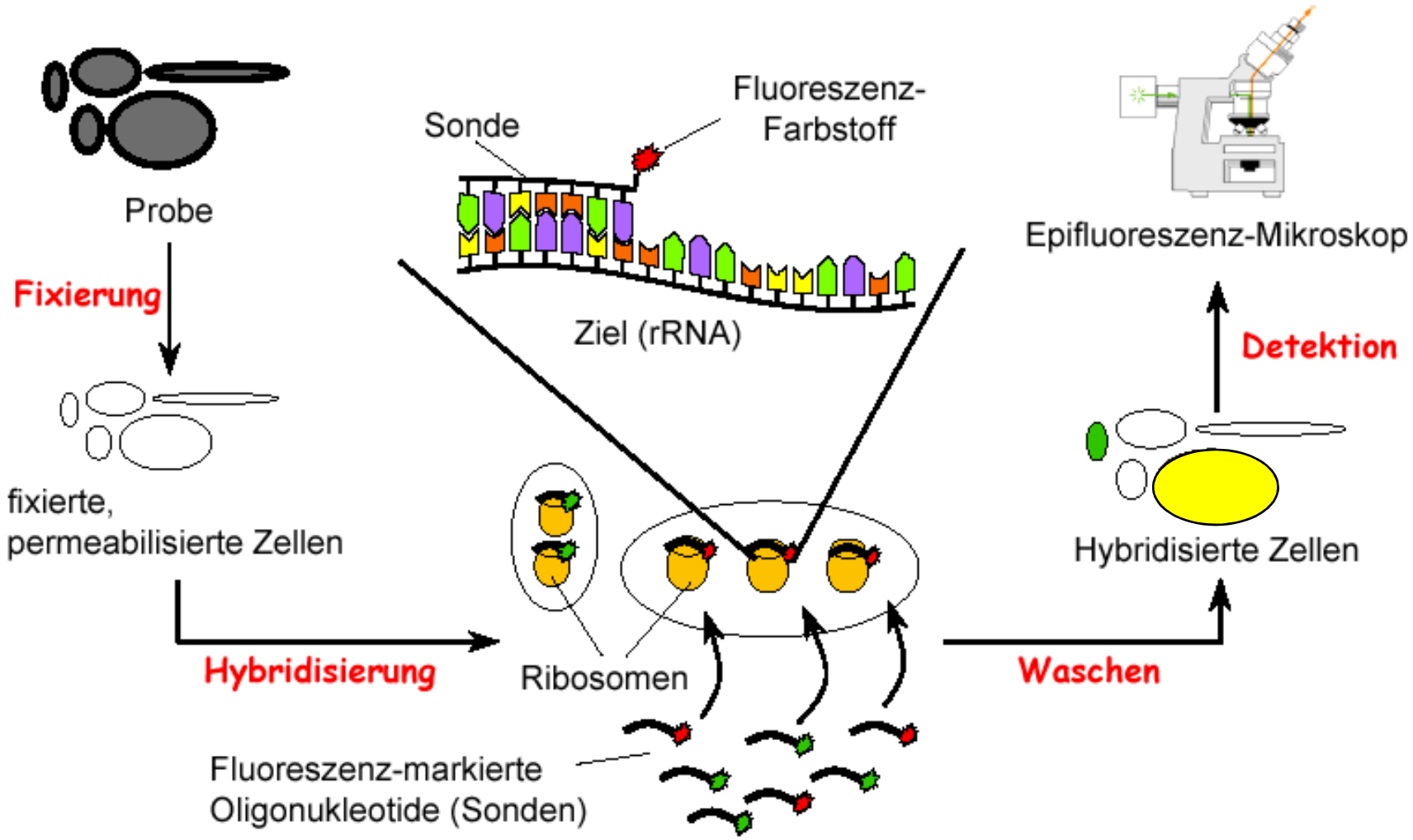
Forschungsbedarf: Faktoren, die VBNC-Zustand auslösen bzw. revidieren – beeinflussen durch Management!





Doppelfäbrung Syto 9 und Propidiumjodid – das dringt nur durch geschädigte Membranen

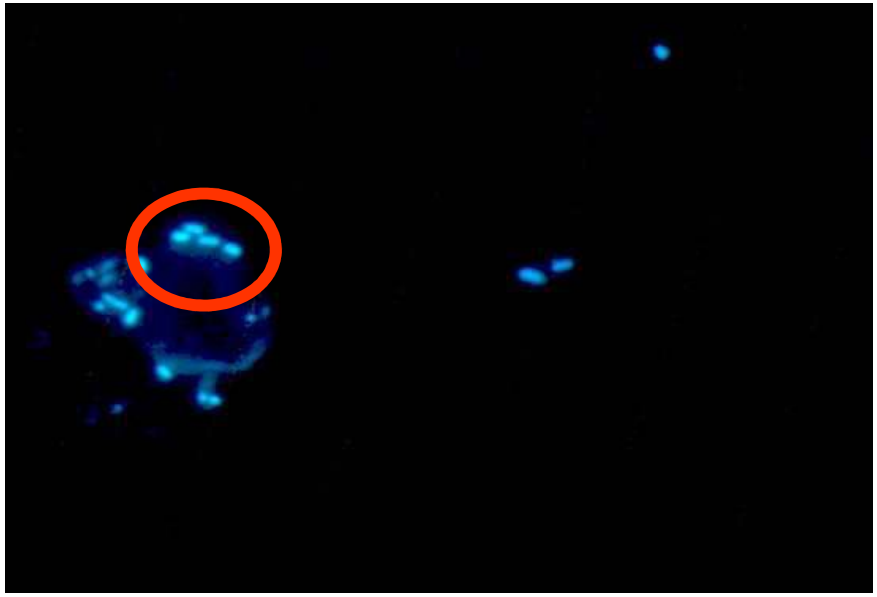
Lebenszeichen (5) Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)



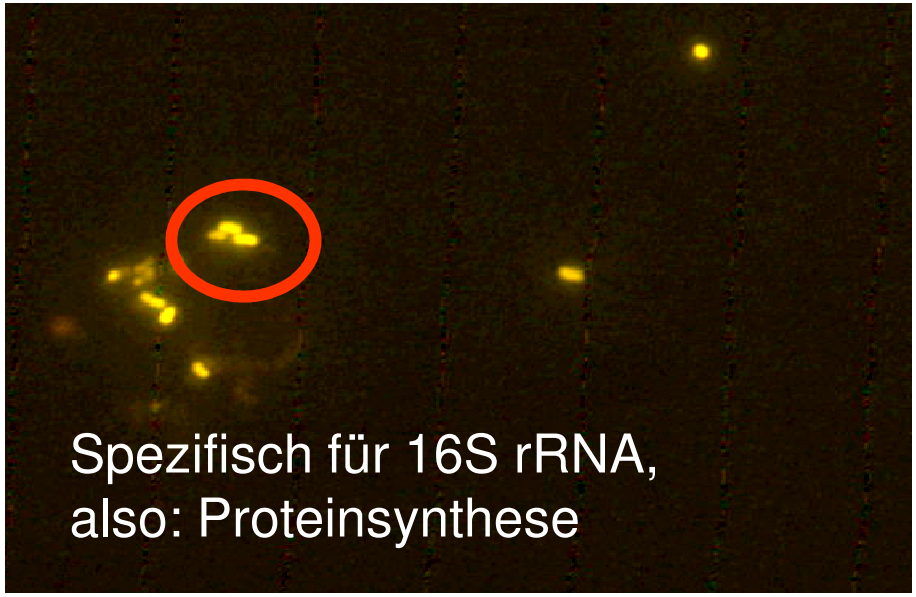
Protein-Biosynthese in Ribosomen – auch im Erhaltungsstoffwechsel!

Lebenszeichen (5): Proteinsynthese
Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

DAPI (Gesamtzellzahl)



Gen-Sonde (FISH-Färbung)

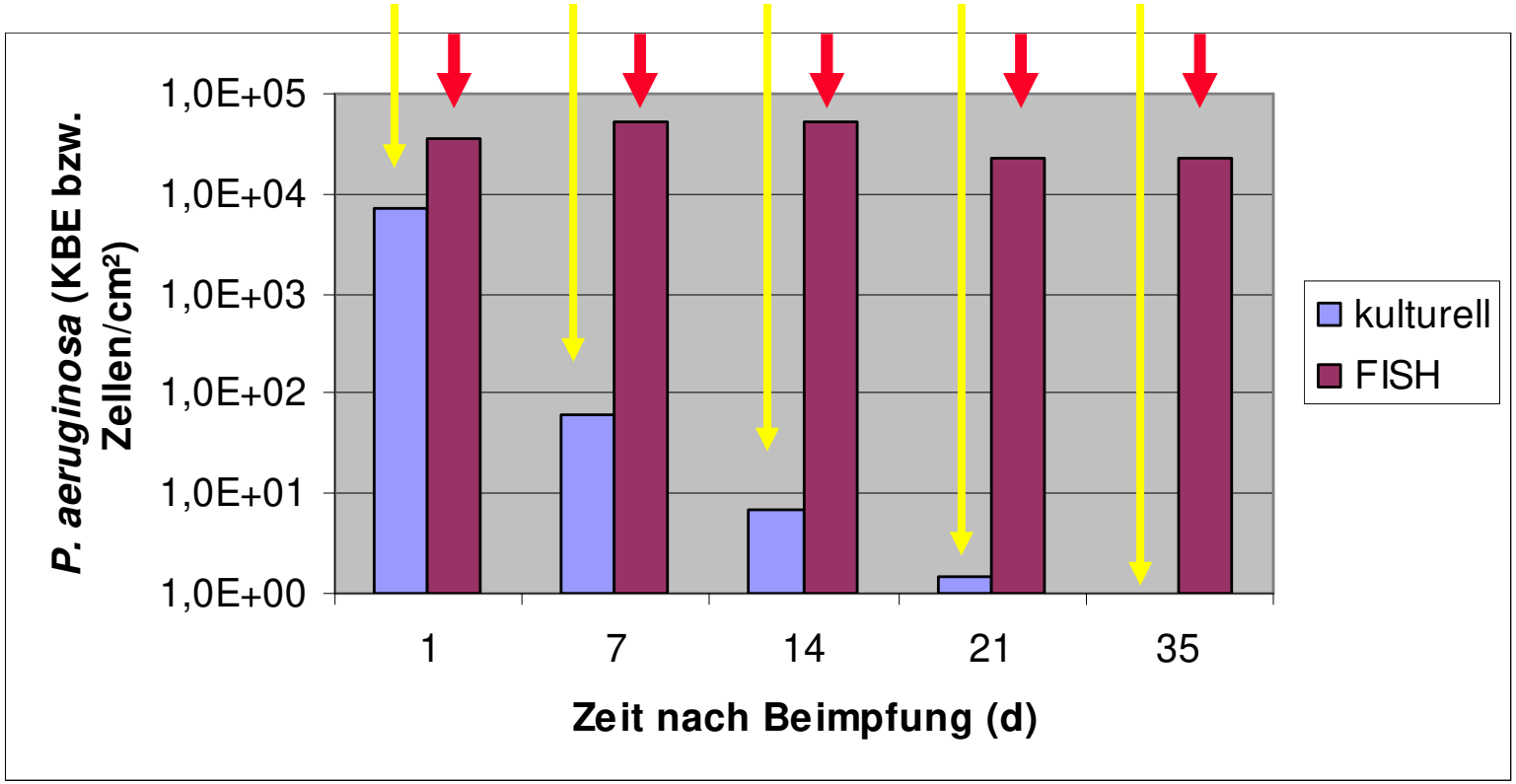


- Spezifischer, kulturunabhängiger Nachweis von Bakterien auf Art, Gattungs- und Großgruppenebene
- Beruht auf Bindung der Sonde an rRNA
- Nachweis von Bakterien im VBNC-Stadium möglich
- 16S rRNA ist Vitalitätsmarker
- **Zellen, die Protein synthetisieren, sind nicht tot!**

Überleben von *P. aeruginosa* in Trinkwasser-Biofilm

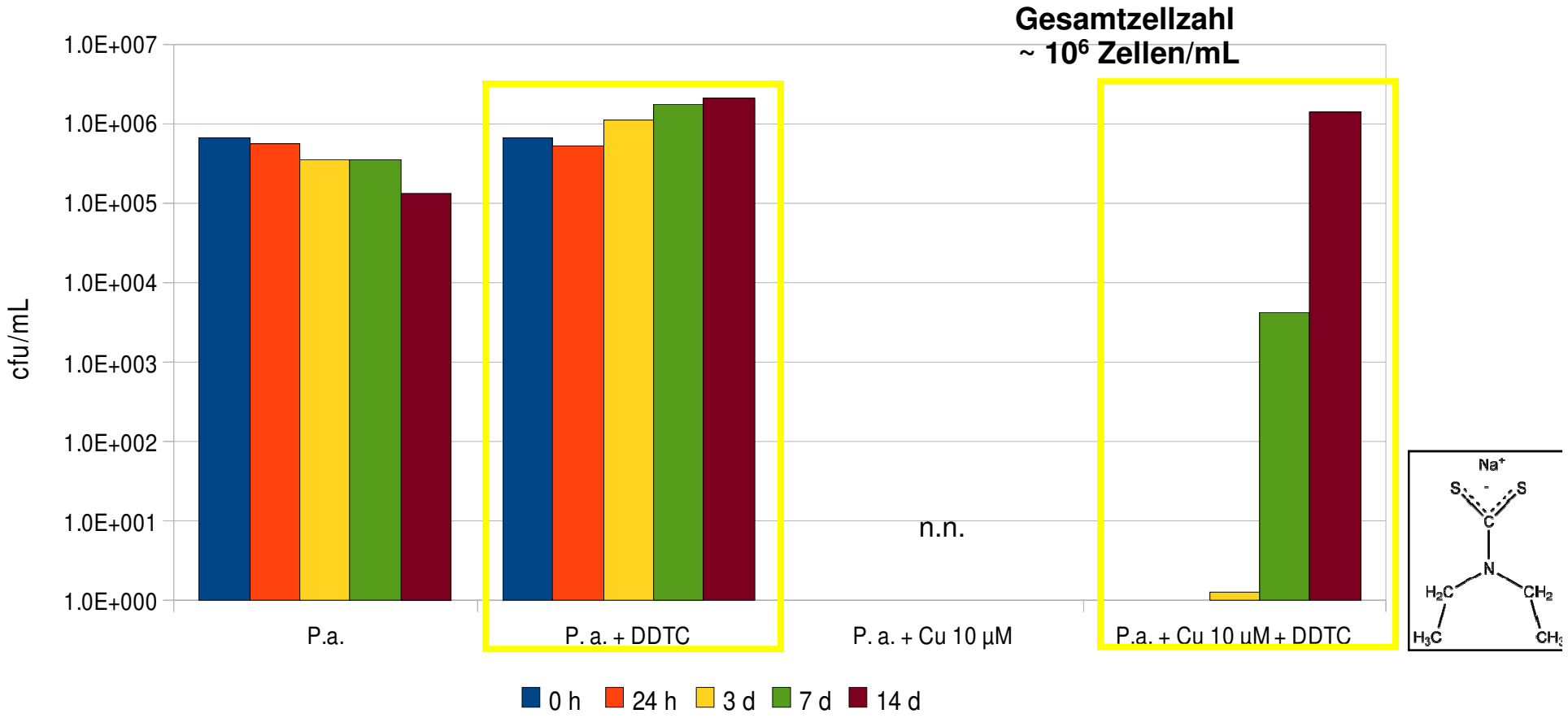
***P. aeruginosa* AdS, Isolat aus einem Schadensfall**

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



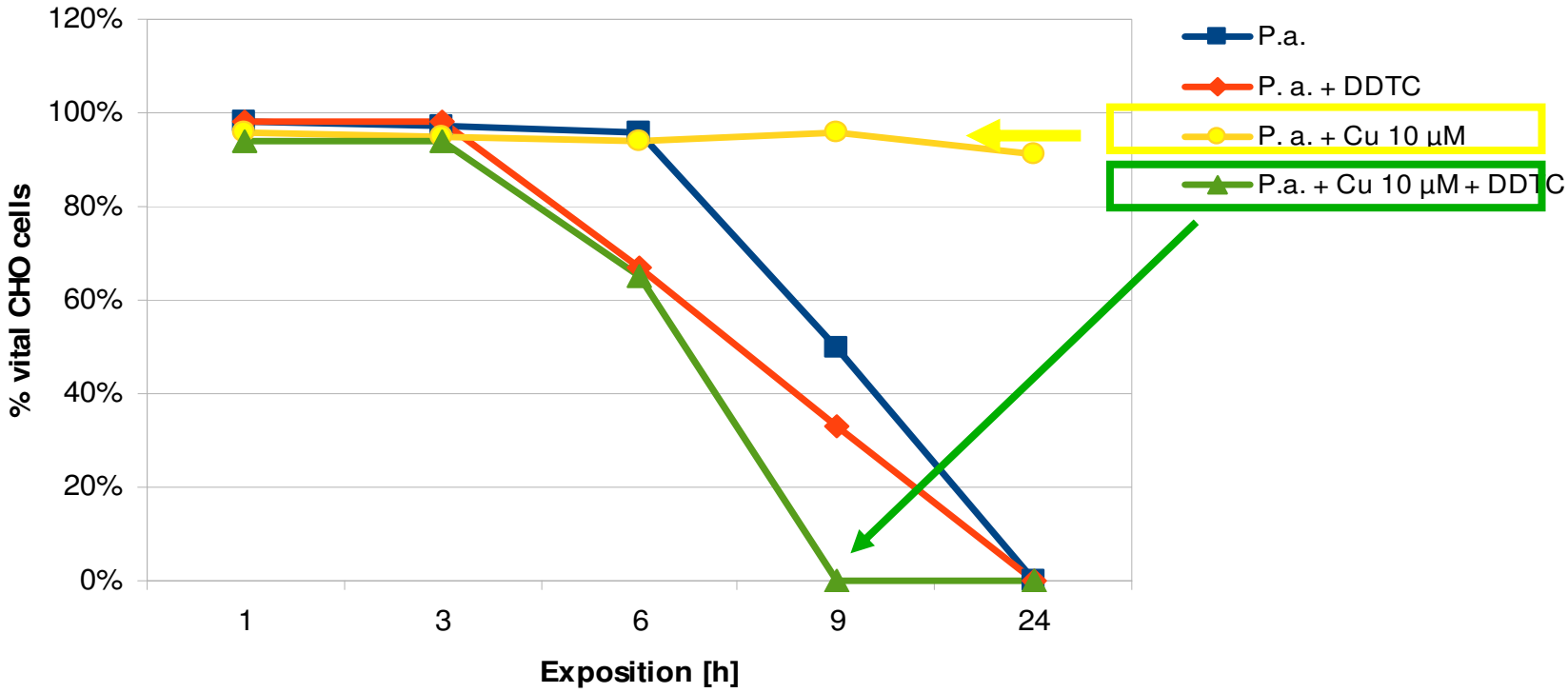
- **Hinweis auf Persistenz von *P. aeruginosa* im Trinkwasser-Biofilm auf EPDM in nicht-kultivierbarem Zustand (VBNC)!**

Cu^{2+} (60 µg/L) als Auslöser für VBNC – und Wiederbelebung bei *Pseudomonas aeruginosa*



- Cu^{2+}-induzierte Inaktivierung von *P. aeruginosa* konnte durch Kupfer-Chelator DDTC (Na-Diethyldithiocarbamat) aufgehoben werden
- Völlige Wiederherstellung der Kultivierbarkeit nach 14 Tagen
- ⇨ Cu^{2+}-Ionen induzieren *reversiblen* VBNC-Zustand in *P. aeruginosa*

VBNC-Pseudomonas nach Komplexierung des Kupfers wieder infektiös



- ➢ *P. aeruginosa* inaktiviert (Cu^{2+} 10 µM): CHO-Zellen nicht geschädigt
- ➢ Cu^{2+}-Chelator DDTC hebt Inaktivierung von *P. aeruginosa* auf
- ⇨ Infektiosität wieder hergestellt

Kooperationsprojekt mit PD Dr. Elke Dopp, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Klinikum der Universität Duisburg-Essen

Einige Ergebnisse aus dem Verbundprojekt „Biofilme in der Hausinstallation“

3 an 4: Beste Desinfektions-Verfahren

Projekt 2: Experimente mit Versuchs-Stand

Projekt 3: Sanierungs-Wirksamkeit

Projekt 4a, b: Materialalterung, Biofilmbildung, Einnistung path.

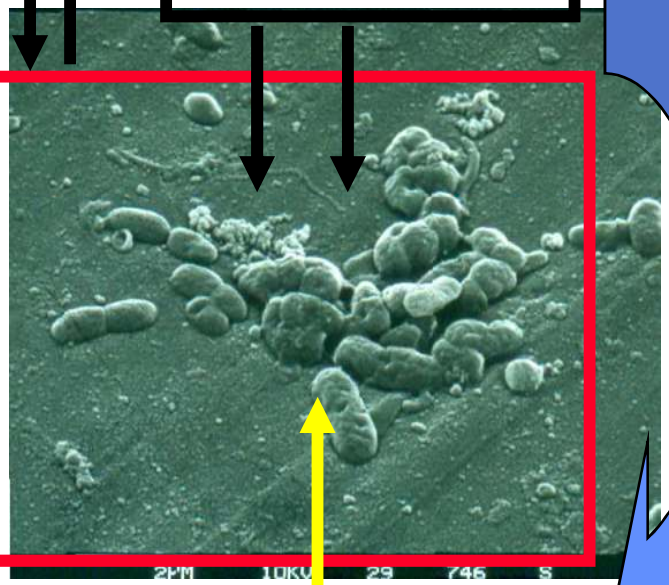
3 und 4 b: Organismen aus Schadensfällen

4 a nach 1: Fälle, Begleitung von Sanierungen

Projekt 1:

Prävalenz, Risiko-Abschätzung

Alle an 1: Praxisfälle

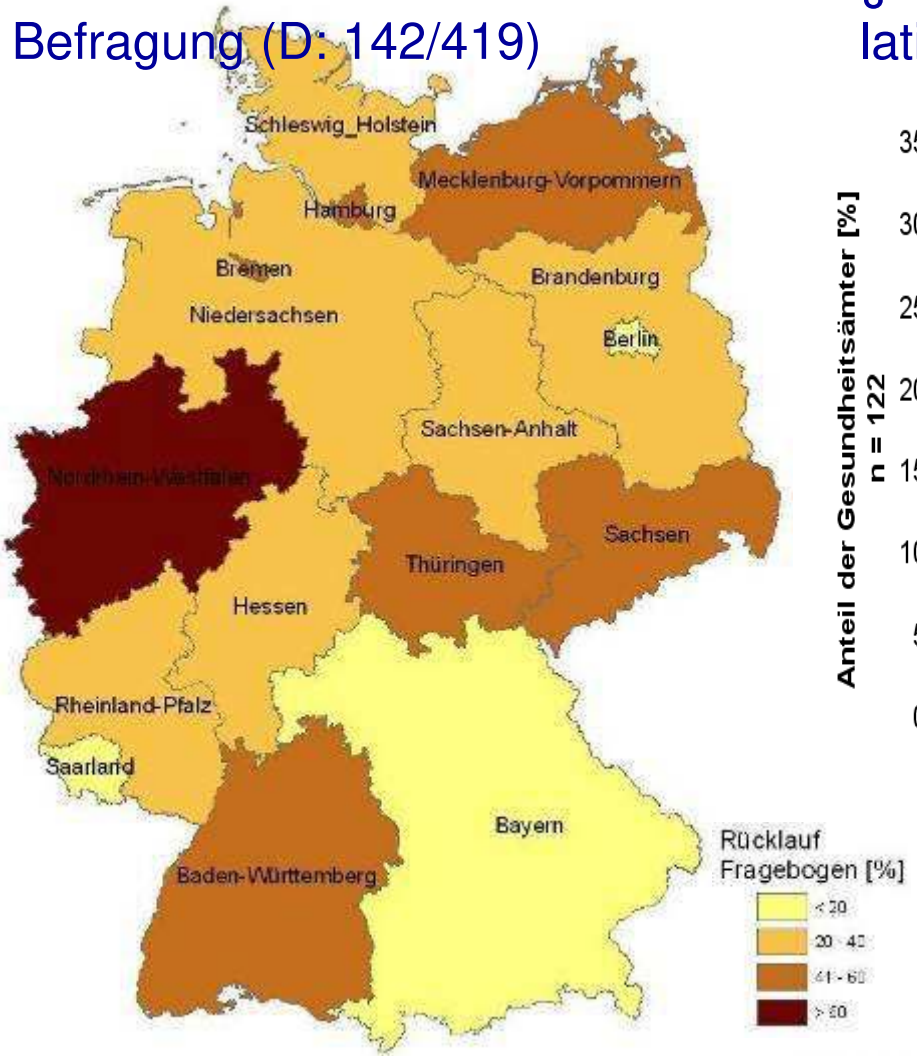


Projekt 5: Populations-Veränderungen, Indikator-Organismen

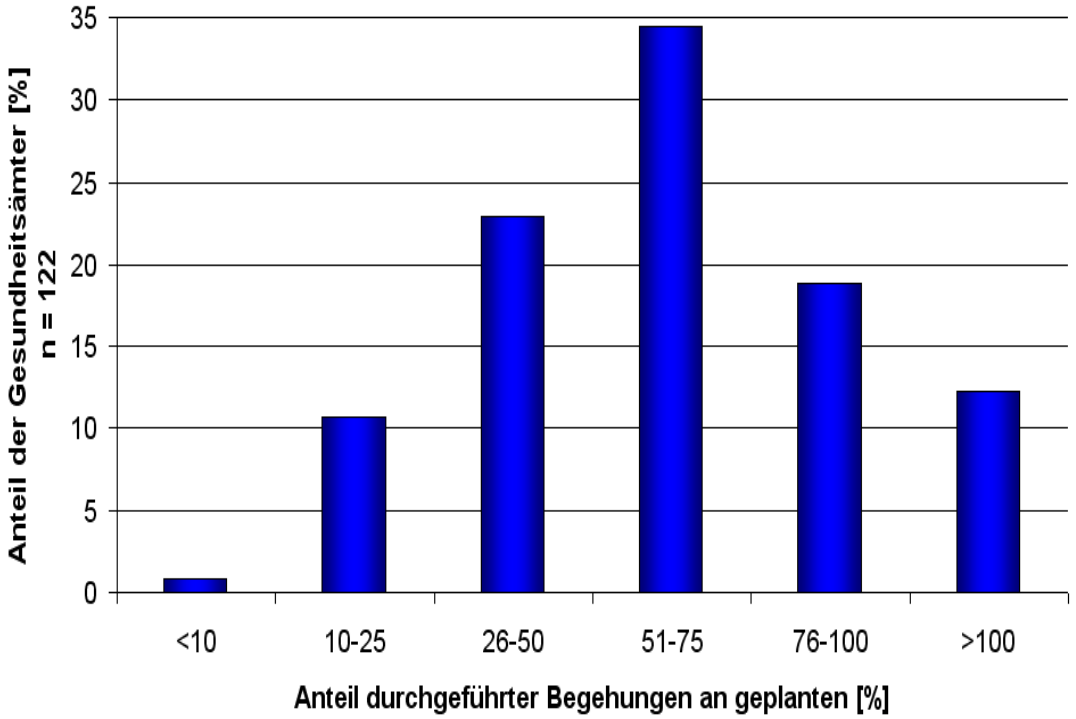
Wasser-Qualität der Hausinstallation

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

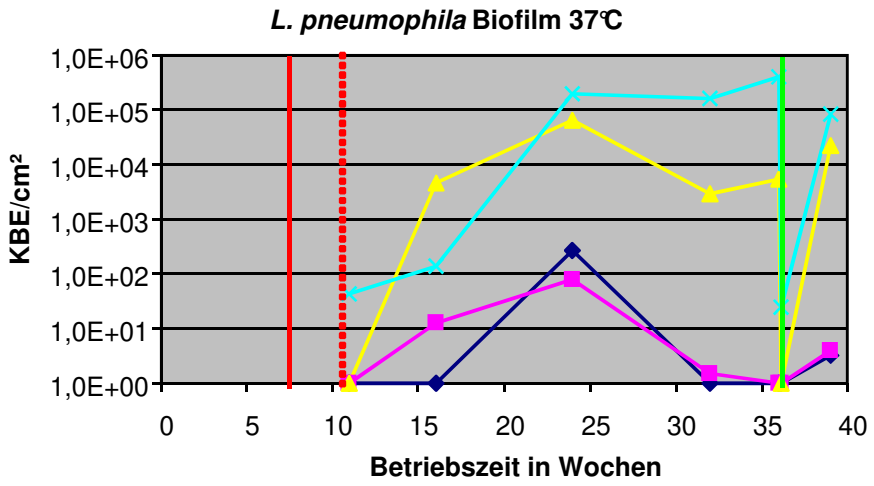
Simulation realistischer Bedingungen

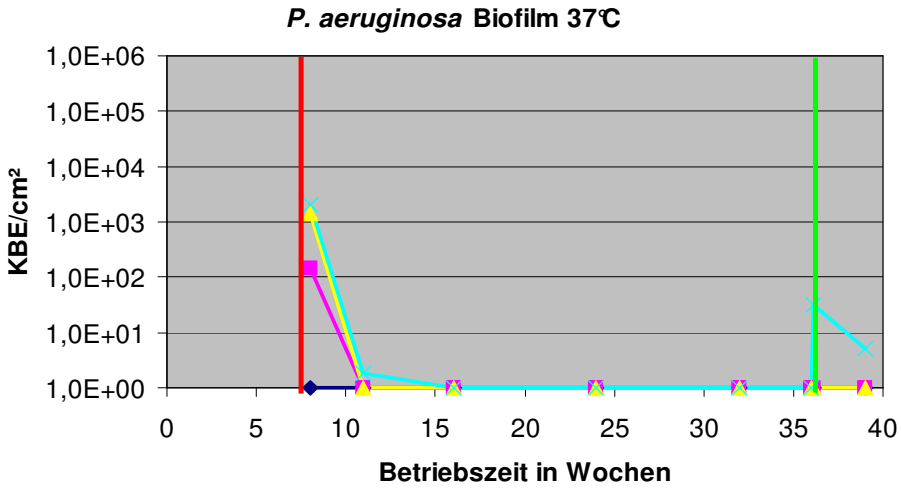
Wirksamkeit von Desinfektions-verfahren (TP3)

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/cm²)

- ***P. aeruginosa* konnte nach der Kontamination länger im Stagnationswasser als im Biofilm kulturell nachgewiesen werden (12℃ > 37℃)**
  ↳ **Austrag kultivierbarer Zellen vom Biofilm ins Trinkwasser**
- **Nach Reinigung (Impulsspülverfahren) + Desinfektion (2 mg/L ClO_2, 24h) wurde *P. aeruginosa* im Biofilm und Stagnationswasser wieder kulturell nachgewiesen (bei 37℃)**
  ↳ **Hinweis auf Übergang vom „VBNC“-Zustand in den kultivierbaren Zustand**

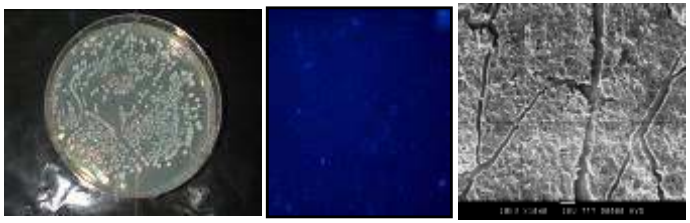
B. Bendinger, J. Benölken

TP 3: Überprüfung von Sanierungen

Arbeitsziel:

Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmaßnahmen und Erarbeitung von Handlungsanweisungen in Schadensfällen

Untersuchungen:



I Silikonschlauchmodell

(„Härtetest“ für Reinigung!)

KBE/cm² (Kultivierung) + GZZ/cm² (DAPI)

Visualisierung (REM)

Kont.Dosierung

Kreislauf

Hygiene-Monitor

II Chemische Desinfektion

- Desinfektionsmittel-Anwendung

  Cl_2, ClO_2, H_2O_2+Ag,
  H_2O_2+Fruchtsäuren, O_3

- 3 praxisnahe Modelle:

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 ^{2}]	Reduktion [GZZ/cm ^{2}]
Cl_2 (ECA)	kontinuierlich	0,3	70 Tage	> 6 lg	< 1 lg
ClO_2	kontinuierlich	0,2	70 Tage	> 6 lg	-
H_2O_2 +Ag	Stossbehandlung	10.000	6 Stunden	> 6 lg	< 1 lg
H_2O_2 +Fruchtsäure	Stossbehandlung	10.000	4 Stunden	> 6 lg	< 1 lg
O_3 (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/cm² und 80% weniger Protein**
- **zur Zeit: Kombination mit Reinigern**

M. Exner, J. Gebel, J. Lenz

TP 4 a – Praxisfälle

Hygienisches Problem:

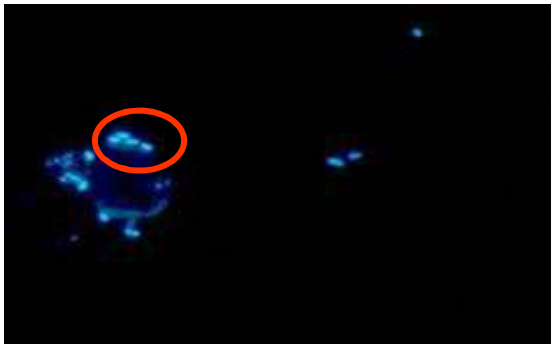
P. aeruginosa in Teilen einer Trinkwasser-Installation

- **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

Materialien

- PE-Xb
- PE-Xc
- EPDM mit W 270

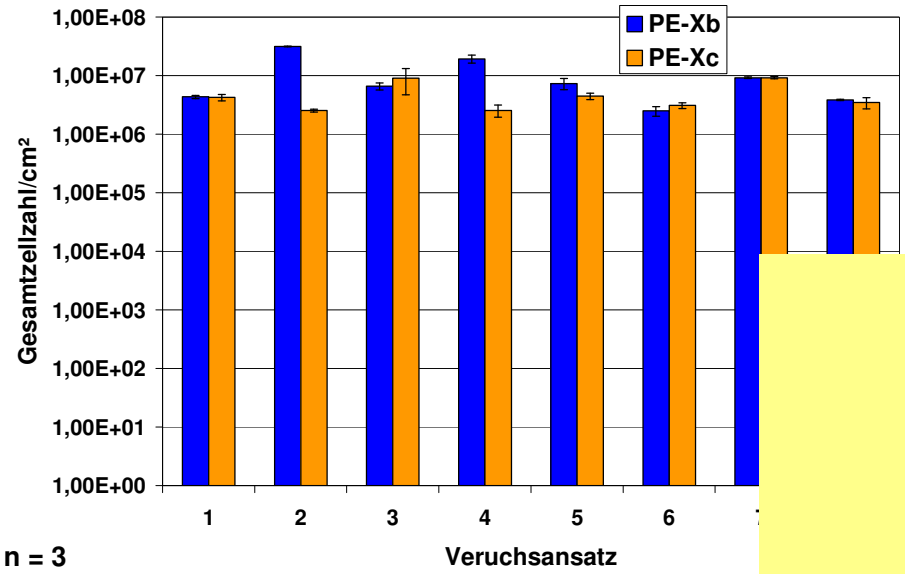
Versuchbedingungen

- Austausch 1x pro Tag
- Besiedlungszeit 7 Tage

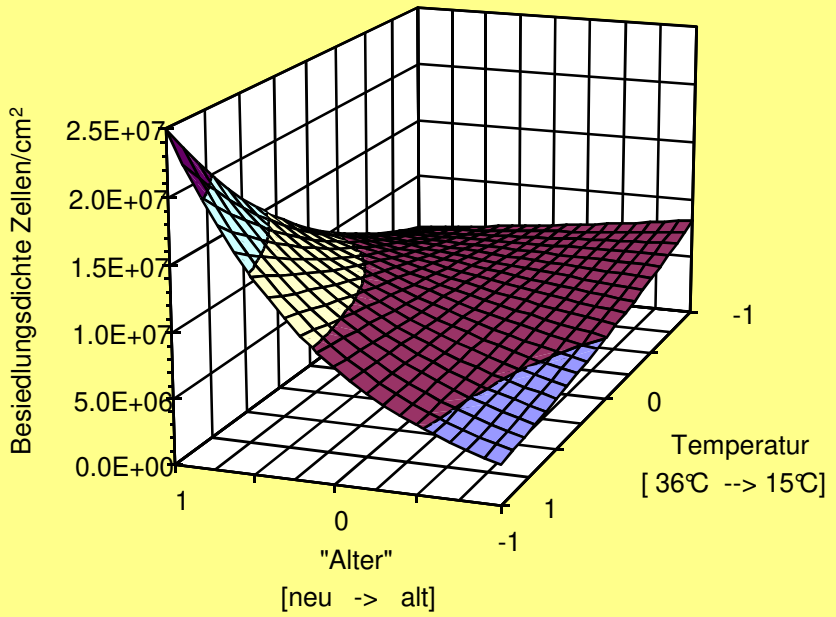
V	1	2	3	4	5	6	7	8
T	-	-	-	-	+	+	+	+
AOC	-	-	+	+	-	-	+	+
W	-	+	-	+	-	+	-	+
H	+	+	-	-	-	-	+	+
pH	+	-	+	-	-	+	-	+
E	+	-	-	+	+	-	-	+
A	-	+	+	-	+	-	-	+

G. Schaule

Besiedlung von neuem und durch Desinfektion veränderten Materialien



„Quantitativ“:
Gesamtzellzahlen werden mit Auswerteprogramm in Bezug gesetzt, Faktoren werden in Bezug zueinander gesetzt



„Qualitativ“:

➔ PE-Xb und PE-Xc werden meist unterschiedlich besiedelt

➔ Die Wasserqualität wirkt sich auf die Besiedlungsdichte aus

➔ Höchste Besiedlung bei neuem Material und warmem Wasser

G. Schaule

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

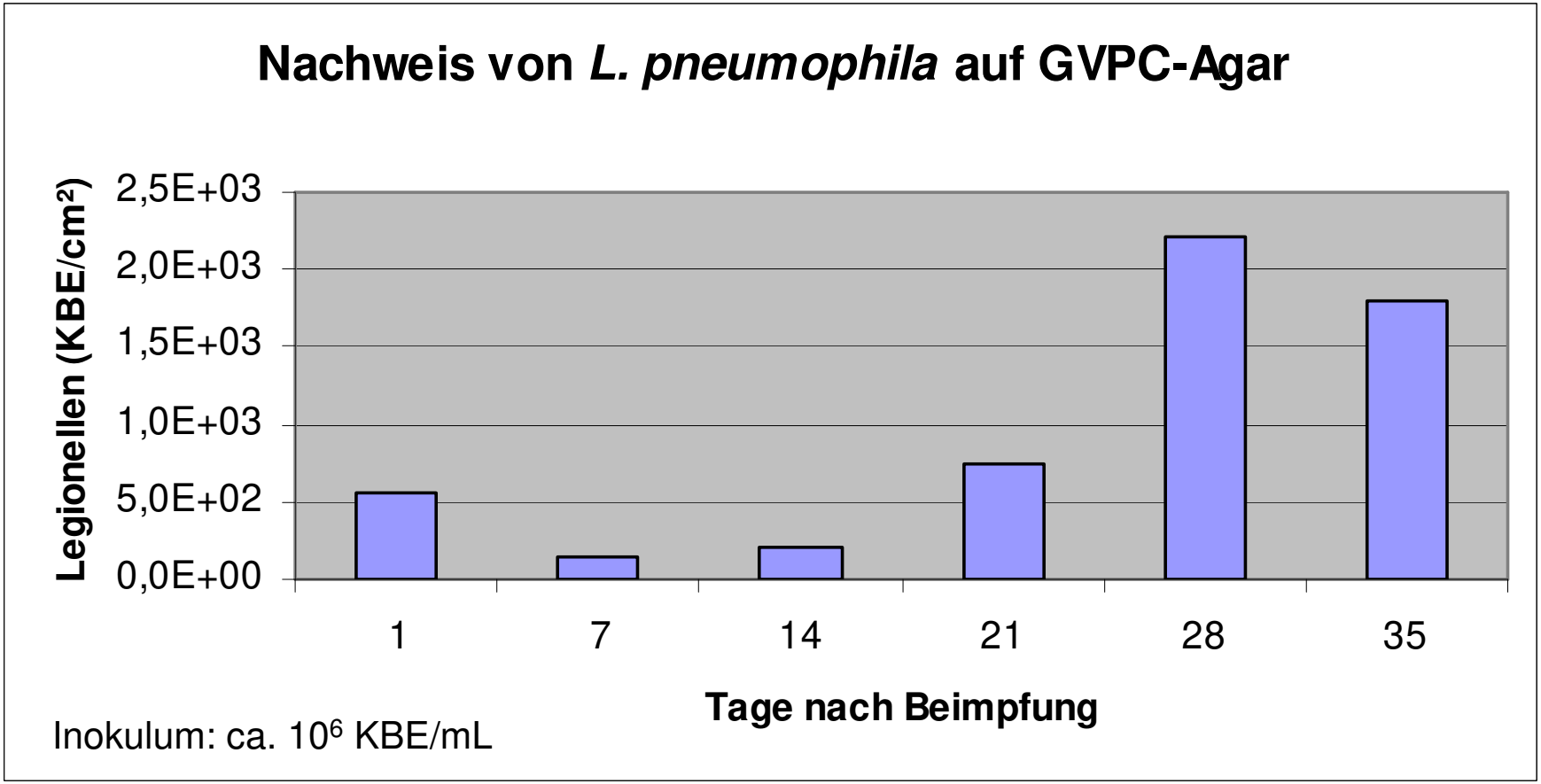
Arbeitsziel:
Untersuchung einer möglichen Begünstigung der Einnistung hygienisch relevanter Keime in Biofilme aufgrund von Material-Veränderungen, bedingt durch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen

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

Einnistung von *L. pneumophila* AdS



- Bestätigung von Biofilm-Isolaten mit Latex-Agglutinationstest als *L. pneumophila* (Serogruppe 1)
- Vermehrung im Biofilm!

L. pneumophila im Biofilm und Wasser

Stamm	Herkunft	EPDM	Nachweis im	
			Biofilm	Reaktorablauf (100 mL)
AdS	Hausinstal-lation	KTW	Noch nach 35 d	Noch nach 35 d
ATCC 33152	Typstamm	KTW	Keine Einnistung	n.n.

➢ Der Stamm aus dem Schadensfall nistet sich ein,
der Typstamm aus der Stammsammlung nicht!

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!**

Was tun?

- **Prävention:**
  Anfangs-Chlorung neu installierter Anlagenteile
  (z.B., Trinkwasserrohre) ⇒ ca. 0,1 bis 0,3 mg/l freies Chlor
  Materialauswahl!
- **Abtötung und Entfernung etablierter Biofilme:**
  mindestens mehrere Milligram pro Liter freies Chlor
  (10 – 50 mg/l, ggf. höhere Konzentration notwendig)
  Aber: Abtötung bedeutet nicht Reinigung!
  ⇨ **Wiederverkeimung begünstigt**
- **Mikrobiologische Analytik: Weitergehende Methoden einbeziehen und VBNC berücksichtigen**
- **Anwendung von Wasserstoffperoxid häufig unwirksam**
  (auch in Konzentrationen bis 1 %!)

Wichtigster Ansatz: Limitierung aller Substanzen, die zum Wachstum von Mikroorganismen dienen können: im Wasser, von Werkstoffen und von Verarbeitung!

Danksagung

Ein großer Teil der hier vorgestellten Erkenntnisse stammt aus dem vom BMBF geförderten Verbundprojekt

GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

„Biofilme in der Hausinstallation“

Steering Comitee:

Prof. Dr. Hans-Curt Flemming (Koordination)

Dr. Bernd Bendinger, DVGW-Forschungsstelle TU HH

Prof. Dr. Martin Exner, Inst. Öff. Hyg. Univ. Bonn

Dr. Jürgen Gebel, Inst. Öff. Hyg. Univ. Bonn

Prof. Dr. Thomas Kistemann, Inst. Öff. Hyg. Univ. Bonn

Dr. Gabriela Schaule, IWW Mülheim

Prof. Dr. Ulrich Szewzyk, TU Berlin

Dr. Jost Wingender, Biofilm Centre, Univ. Duisburg-Essen

Dem BMBF wird für die Förderung und ausgezeichnete Betreuung herzlich gedankt!