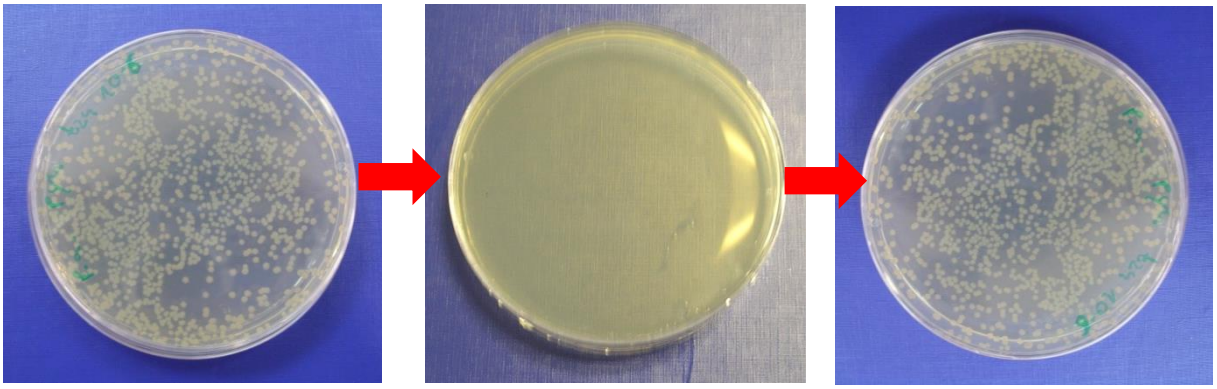
Erkenntnisse aus dem Projekt „Biofilm-Management“

Erkennung und Bekämpfung von vorübergehend unkultivierbaren Pathogenen in der Trinkwasser-Installation



Verbundprojekt der Universitäten Duisburg-Essen, Berlin und Bonn sowie der DVGW-Forschungsstelle TU Hamburg-Harburg und des IWW Zentrum Wasser, Mülheim

Förderkennzeichen 02WT1153 – 02WT1157

Koordination

Prof. Dr. Hans-Curt Flemming (Biofilm Centre und IWW Zentrum Wasser)

GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Biofilme im Trinkwasser

An praktisch allen Oberflächen von Trinkwasser-Systemen haften Mikroorganismen, aus denen mehr oder weniger flächendeckende Biofilme entstehen können. Die vorherrschenden Organismen in Trinkwasserbiofilmen stellen kein Gesundheitsrisiko für den Menschen dar. Gelegentlich können jedoch temporär Mikroorganismen mit krankheitserregenden Eigenschaften in Biofilmen vorkommen, wie zum Beispiel die fakultativ pathogenen Bakterien *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa* in der Trinkwasser-Installation. Bakterien in Biofilmen können sich unter günstigen Nährstoff- und Temperaturbedingungen vermehren und aus den Biofilmen freigesetzt werden, sodass es zu einer Kontamination des Trinkwassers kommt (Wingender, 2011). Vom gesundheitlichen Standpunkt aus ist festzustellen, dass von Biofilmen in Trinkwasser-Verteilungs- und Installationssystemen keine Krankheits-erreger in Konzentrationen ins Trinkwasser abgegeben werden dürfen, die eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen. Ziel des Projekts war es, einen Beitrag zur Erfüllung dieser Forderung zu leisten.

Im Biofilm können die Organismen wesentlich höhere Konzentrationen von Desinfektionsmitteln überleben als in der Wasserphase. Diese Eigenschaft kann im Falle einer Kontamination mit fakultativ pathogenen Bakterien langwierige Sanierungsmaßnahmen zur Folge haben, die sich im Einzelfall jahrelang hinziehen - dann summieren sich die Kosten auf hohe Beträge (Schauer et al., 2013). Dazu gehören nicht nur die direkten Aufwendungen für wiederholte Desinfektionsmaß-nahmen und Erfolgskontrollen, Personalaufwand sowie zeitweiliger Funktionsausfall der Trinkwasser-Installation, sondern auch Maßnahmen, um Situationen zu überbrücken, in denen die Sanierung noch nicht erfolgreich war. Hier werden - als kostspielige Zwischenlösung - oft endständige Sterilfilter an Entnahmestellen und Duschen verwendet.

Um solche Probleme zu vermeiden, wurde das Konzept des „Biofilm-Management“ entwickelt. Ziel ist es, alle Maßnahmen zu ergreifen, die geeignet sind, die Risiken zu minimieren, die von Biofilmen ausgehen können. Als beeinflussbare Variablen kommen dabei das Wasser, die Werkstoffe und die Betriebsbedingungen in Frage. Die Beeinflussung dieser Stellgrößen geschieht über verfahrenstechnische, physikalische und chemische Maßnahmen zur Limitierung von Biofilm-Wachstum durch die Auswahl geeigneter Werkstoffe und Anlagen-Planung sowie durch fachgerechten Betrieb und Instandhaltung. All dies muss bei Planung, Betrieb, Instandhaltung und Sanierung von Trinkwasser-Installationen berücksichtigt werden. Hierzu sind bereits wichtige Gesichtspunkte in der VDI/DVGW Richtlinie 6023 (S. 11 und 39 - 42) beschrieben. Besonders wichtig ist dabei die Vermeidung von unzureichend durchflossenen Räumen (Toträumen) im System. Ein Industriepartner kommentierte das Projekt so: „*Die Sicherstellung einer hohen Trinkwassergüte in Wohnobjekten ist besonders kritisch, wenn es sich um Bestandsobjekte handelt, bei denen ein bestimmungsgemäßer Betrieb nicht sichergestellt ist. Zahlreiche Praxisbeispiele zeigen, dass kontaminierten Trinkwasser-Installationen mit kurzfristiger Symptombekämpfung nicht beizukommen ist. Das hier vorgestellte*

Forschungsprojekt setzte bei den Bakterienzellen an; es untersuchte ihren Lebensraum und die Art und Weise, wie dieser die verschiedenen Pathogene beeinflusst. Daraus ergaben sich wichtige Erkenntnisse für die Praxis. Mit zunehmendem Wissen werden die Anforderungen an die Trinkwasser-Installation komplexer. Dies betrifft planerische Belange ebenso wie die richtige Werkstoff-auswahl. Die Trinkwasserverteilung, insbesondere im Wohnobjekt wird somit in all ihren Aspekten gesamtheitlich betrachtet werden müssen, um zuverlässig und nachhaltig eine hohe Trinkwassergüte zu gewährleisten. Damit wird deutlich, dass in Zukunft strömungsoptimierte Produkte eingesetzt werden sollten, die möglichst wenig Toträume enthalten."

Grundlage für ein wirksames Biofilm-Management ist die Überwachung durch aussagekräftige Probenahme und Analytik, um frühzeitig Risiken zu erkennen und die Wirksamkeit der Maßnahmen zu beurteilen.

Vorübergehend unkultivierbar – „viable but nonculturable" (VBNC)

„Gold-Standard" zur Bestimmung *lebender* Bakterien im Trinkwasser sind weltweit Kultivierungsmethoden, die auf der Fähigkeit dieser Organismen basieren, Kolonien auf Agar-Nährmedien zu bilden oder sich in flüssigen Nährmedien zu vermehren. Im Umkehrschluss wurde davon ausgegangen, dass Bakterien, die nicht mehr auf oder in Nährmedien wachsen, tot oder zumindest irreversibel inaktiviert sind. Kultivierungsmethoden haben eine zentrale Bedeutung in der Praxis – mit ihnen wird die hygienisch-mikrobiologische Qualität von Trinkwasser, Lebensmitteln und Getränken ebenso wie die Wirksamkeit der Desinfektion beurteilt, um nur einige Bereiche zu nennen. Kulturmethoden haben seit Jahrzehnten erfolgreich im Rahmen der mikrobiologisch-hygienischen Überwachung von Trinkwasser zur Prävention bzw. Verringerung von wasserbedingten Infektionskrankheiten beigetragen. Sie haben allerdings auch ihre Grenzen. Man weiß schon lange, dass auch Bakterien, die sich nicht kultivieren lassen, nicht notwendigerweise tot sind. Sie können vorübergehend vom „Radar der Überwachung" durch kulturelle Methoden verschwinden und in einen unkultivierbaren Zustand eintreten. Dieser Zustand wird als „viable but nonculturable" (VBNC) bezeichnet. Auf der Konferenz "How dead is dead?" in Bochum 2009 wurde auf Basis der Arbeiten von Oliver (2005, 2010), der diesen Begriff einführte, folgende Definition gefunden: *"A bacterial cell in the VBNC state may be defined as one which fails to grow at the routine bacteriological cultivation conditions under which it would normally grow, but which is in fact alive and has still metabolic activity."*

Dabei handelt es sich um eine rein operationale Definition, denn sie bezieht sich auf die Kulturbedingungen, unter denen das Bakterium normaler Weise nachgewiesen werden kann. Zugrunde liegt dieser operationalen Definition jedoch ein wichtiges Phänomen: im VBNC-Zustand betreiben die Zellen praktisch keinen Baustoffwechsel mehr – deshalb wachsen sie nicht – sondern nur noch Erhaltungsstoffwechsel. Dazu gehören auch Prozesse, die der Erneuerung von Zellbestandteilen (Membran,

Zellwand etc.) oder der Reparatur von DNA-Schäden dienen, die beispielsweise durch Desinfektionsmaßnahmen, UV-Strahlung oder die Einwirkung toxischer Stoffe entstanden sind.

Der Eintritt in den VBNC-Zustand kann als Überlebensmechanismus von Bakterien betrachtet werden; Oliver (2005) erwähnt, „*dass dies eine Antwort auf Stress ist, der für die Bakterien tödlich werden kann, wenn sie weiter wachsen würden*“. Solcher Stress kann z. B. durch Desinfektionsmaßnahmen, toxische Metallionen, Nährstoffmangel oder ungünstige Temperaturen hervorgerufen werden. Dann kann es bei Verwendung von kulturellen Nachweisverfahren zu falsch negativen Ergebnissen kommen, weil die Bakterien nicht tot, sondern nur inaktiv sind. Von *L. pneumophila* ist dies bereits bekannt. Für *P. aeruginosa,* ein fakultativ pathogenes Bakterium, das zunehmend an Bedeutung für die Trinkwasser-Hygiene gewinnt (Exner et al. 2010), gibt es bisher weniger Untersuchungen. Die Ergebnisse aus dem BMBF-Verbundprojekt „Biofilme in der Trinkwasser-Installation“ (Flemming et al., 2013) sowie das Thesenpapier „Biofilme in der Trinkwasserinstallation“ (Flemming et al. 2010) deuteten bereits darauf hin, dass auch für *P. aeruginosa* Gleiches zu erwarten war.

Besonders wichtig ist, dass der VBNC-Zustand vorübergehend sein kann. Aus ihm können die Bakterien wieder in den kultivierbaren und auch infektiösen Zustand zurückkehren (Dwidjosiswojo et al., 2011). Dieses Phänomen könnte eine Reihe von Beobachtungen aus der Praxis erklären, bei denen es wiederholt zu neu auftretenden Kontaminationen des Trinkwassers kommt. Plausible Erklärungen waren, dass die Organismen in Toträumen oder anderen geschützten Bereichen in Biofilmen überleben oder dass sich resistente Teilpopulationen entwickelt hatten. Der VBNC-Zustand muss hier als weitere wichtige und bisher wenig beachtete Erklärungsmöglichkeit mit einbezogen werden.

Es ist inzwischen eine ganze Reihe von pathogenen Bakterien bekannt, die in den VBNC-Zustand übergehen können (aktuelle Übersicht bei Li et al., 2014). Fast alle Trinkwasser-relevanten Bakterien mit krankheitserregenden Eigenschaften fallen in diese Kategorie. Wann sind sie also wirklich tot? Dieser Frage wurde in einer Publikation von Flemming und Wingender (2013) populärwissenschaftlich nachgegangen. Methoden, um VBNC-Organismen nachzuweisen, existieren bereits. Sie spüren Vitalitätsmarker auf, z B. ob die Zellmembran noch intakt ist, oder ob ribosomale RNA vorhanden ist, die als möglicher Indikator für Protein-Produktion gilt (Hammes und Egli, 2010; Rochelle et al., 2011; Jungfer et al., 2013).

Organismen im VBNC-Zustand könnten damit ein erhebliches und bisher unterschätztes Risiko für die hygienische Sicherheit von Trinkwasser darstellen. Sehr relevant sind sie etwa für Trinkwasser-Installationen von Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen, Schulen, Altenheimen, Kindergärten, Kasernen, Hotels und anderen größeren Einrichtungen, vor allem dann, wenn sich Menschen mit einem geschwächten Immunsystem oder anderen prädisponierenden Faktoren dort aufhalten. Um die Basis für wissenschaftlich fundierte Antworten zum Phänomen des VBNC-Zustands zu schaffen, müssen aber noch weitere

Erkenntnisse gewonnen werden. Dazu diente das hier vorgestellte Projekt. Der Schwerpunkt lag dabei auf Untersuchungen an *L. pneumophila* und *P. aeruginosa* als Index-Pathogene, wobei nicht nur der VBNC-Zustand in der Wasserphase, sondern speziell auch in Biofilmen einbezogen wurde.

Mit räumlich-zeitlichen Untersuchungsstrategien wurde die Verlässlichkeit der Erfassung von mikrobiellen Kontaminationen in Trinkwasser-Installationen großer Gebäude und die dabei auftretenden Probleme erforscht. In einem praxisnahen Versuchssystem wurde die Effektivität von Reinigungs- und Desinfektionsverfahren überprüft und nach der Ursache immer wiederkehrender Kontaminationen bzw. erfolgloser Desinfektions- und Sanierungsmaßnahmen gesucht. Es wurde am Beispiel der oben genannten Index-Pathogene untersucht, welche wasserrelevanten Parameter den VBNC-Zustand auslösen können, unter welchen Bedingungen die Kultivierbarkeit zurückerlangt wird und ob die wiederkultivierbaren Organismen anschließend auch wieder infektiös sind. In einem weiteren Teilprojekt wurde ermittelt, in wie weit die Desinfektionsmaßnahmen selbst den Übergang in das VBNC-Stadium auslösen können, und es wurde gezeigt, dass die Desinfektion einen Selektionsvorteil für schnellwachsende Pathogene darstellen kann. Sie können also nach einer Desinfektion besonders rasch wieder auftreten.

Die Ergebnisse aus dem Projekt sind von grundlegender Bedeutung für die Aufklärung und Sanierung von Kontaminationsfällen sowie für die Prävention. Sie sind auch für die Konzeption und den Betrieb von Trinkwasser-Installationen in öffentlichen ebenso wie in privaten Gebäuden wichtig. Damit wird es für Wasserversorger, den Betreiber von Trinkwasser-Installationen, für Gesundheitsbehörden und andere verantwortlich Beteiligte möglich, Entscheidungen über wirksame Maßnahmen zu treffen. Darüber hinaus sind die Erkenntnisse aus diesem Projekt auch von unmittelbarer Bedeutung für hygiene-sensitive Industriebetriebe, z. B. in der Lebensmittel-, Getränke-, Pharma- und Kosmetikproduktion. Insofern kommt den Ergebnissen des Projekts eine weitreichende Bedeutung zu.

Das hier vorgelegte Papier dient dem Ziel, die erzielten Erkenntnisse aus dreieinhalb Jahren Forschung in komprimierter, übersichtlicher und möglichst verständlicher Weise zur Verfügung zu stellen. Es soll die Gelegenheit bieten, Ansatzpunkte für Optimierungen zu erkennen.

Literatur:

Dwidjosiswojo, Z., Richard, J., Moritz, M.M., Dopp, E., Flemming, H.-C., Wingender, J. (2011): Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 485-492.

Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission (2012): Systemische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung.

Exner, M. et al. (2010): *Pseudomonas aeruginosa* – Plädoyer für die Einführung eines technischen Maßnahmewertes in die Novelle der Trinkwasserverordnung. Hyg. Med. 35, 370-379

Flemming, H.-C., Bendinger, B., Exner, Gebel, J., M., Kistemann, T., Schaule, G., Szewzyk, U., Wingender, J. (2010): Thesenpapier - Erkenntnisse aus dem BMBF-Verbundprojekt "Biofilme in der Trinkwasser-Installation". http://www.biofilm-hausinstallation.de/dokumente/Thesenpapie_2_0.PDF

Flemming, H.-C., Bendinger, B., Exner, M., Gebel, J., Kistemann, T., Schaule, G., Szewzyk, U., Wingender, J. (2014): The last meters before the tap: where drinking water quality is at risk. In: van der Kooij, D., van der Wielen, P. W. J. J. (eds.): Microbial growth in drinking water supplies. Problems, causes, prevention and research needs. IWA Publishing, London, UK, chapter 8, pp 207-238.

Flemming, H.-C., Wingender, J. (2013): Wann sind Bakterien wirklich tot? IKZ-Haustechnik Sonderheft Trinkwasserhygiene, 8-11

Hammes, F., Berney, M., Egli, T. (2011): Cultivation-independent assessment of bacterial viability. Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. 124, 123-150

Jungfer, C., Friedrich, F., Villareal, J., Brändle, K., Gross, H.-J., Obst, U., Schwartz, T. (2013): Drinking water biofilms on copper and stainless steel exhibit specific molecular responses towards different disinfection regimes at waterworks. Biofouling 29, 891-907

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P. (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Front. Microbiol. **5**:258. doi: 10.3389/fmicb.2014.00258

Oliver, J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol. 43, 93–100.

Oliver, J.D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 34, 415–425.

Rochelle, P.A., Camper, A.K., Nocker, A., Burr, M. (2011): Are they alive? Detection of viable organisms and functional gene expression using molecular techniques. In: Sen, K., Ashbolt, N. (eds.): Environmental Microbiology. Caister Acad. Press, Norfolk, UK, 179-202

Schauer, C., Köhler, H., Jakobiak, T., Wagner, C. (2013) Teurer „Totalschaden" – Sanierungskosten erreichen ungeahntes Ausmaß. Sanitär+Heizungstechnik 78, Heft 10, 52 - 57

Wingender, J. (2011): Hygienically relevant microorganisms in biofilms of man-made water systems. In: Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U. (eds.): Biofilm Highlights. Springer, Heidelberg, New York,189-238.

VDI/DVGW-Richtlinie 6023 (2013): Hygiene in Trinkwasser-Installationen. Anforderungen an Planung, Ausführung, Betrieb und Instandhaltung. Beuth Verlag, Berlin

Die wichtigsten Erkenntnisse in Schlagzeilen

1. Viable but nonculturable (VBNC)

1.1 Die Fähigkeit zur Bildung von VBNC-Stadien ist weit verbreitet bei Wasserbakterien in oligotrophen Habitaten S 10

1.2 Auch sehr geringe Konzentrationen an Nährstoffen können von VBNC-Zellen genutzt werden. S 10

1.3 VBNC-Zellen von Aquabakterien finden sich nicht nur in der Wasserphase, sondern auch in Biofilmen. S 11

1.4 Für viele Umweltbakterien stellen die VBNC-Stadien eine Anpassung an oligotrophe Habitate dar. S 11

1.5 *P. aeruginosa,* ein fakultativ pathogenes Bakterium, kann in Biofilmen wachsen, auch in Trinkwassersystemen unter oligotrophen Bedingungen. *S* 11

1.6 Unter dem Einfluss von Kupfer-Konzentrationen, wie sie in Trinkwasser-Installationen vorkommen, können *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in den VBNC-Zustand übergehen. S 11

1.7 Durch Anwendung von Chelatoren, z. B. Natriumdiethyldithiocarbamat (DDTC), kann eine Rückkehr von *P. aeruginosa* in den kultivierbaren Zustand erreicht werden. S 12

1.8 Nach der Rückkehr in den kultivierbaren Zustand ist *P. aeruginosa* wieder zytotoxisch. S 12

1.9 *L. pneumophila* ist ein Bakterium, das sich typischerweise intrazellulär in Protozoen vermehrt. Ein Wachstum in Biofilmen ohne Amöben ist vermutlich nur in metabolisch hoch aktiven und komplexen Biofilmen möglich. S 13

1.10 *L. pneumophila* kann ebenfalls in den VBNC-Zustand übergehen, z. B. nach längerem Nährstoff-Entzug. S 13

1.11 Nach einer Passage durch Amöben kann *L. pneumophila* in den kultivierbaren Zustand zurückkehren. S 14

1.12 Der VBNC-Zustand kann zu einer Unterschätzung der Anwesenheit von hygienisch relevanten Mikroorganismen und zu einer Überschätzung der Effektivität von Sanierungsmaßnahmen führen. S 14

2. Mikrobiologische und molekularbiologische Analysenmethoden

2.1 Die nach TrinkwV geforderten Untersuchungen mit klassischen Kulturverfahren allein zeigen Kontaminationen nicht immer sicher an. S 14

2.2 In der praktischen Routinebeprobung von Trinkwasser-Installationen können molekularbiologische Verfahren die klassischen kulturbasierten Verfahren nicht ersetzen. S 15

2.3 In Fällen hartnäckiger und wiederkehrender Kontaminationen ist die Möglichkeit einzubeziehen, dass die Kontaminanten vorübergehend in einen VBNC-Zustand übergehen. Kulturmethoden sind dann unzureichend und sollten durch weitere kultur-unabhängige Verfahren ergänzt werden. S 15

3. Erfassung, Beobachtung und Interpretation mikrobieller Kontaminationen

3.1 In Trinkwasser-Systemen, die mit *L. pneumophila* kontaminiert sind, ist das Vorkommen dieser Bakterien einer starken räumlichen und zeitlichen Variabilität unterworfen, und zwar sowohl kurz- als auch langfristig. S 16

3.2 Etablierte Beprobungsstrategien zur systemischen Untersuchung von Trinkwasser-Installationen können mikrobielle Kontaminationen nur eingeschränkt erfassen. S 17

3.3 Die Untersuchung von Vorlauf und Rücklauf scheint wenig Aussagekraft hinsichtlich des Kontaminationsgeschehens im PWH-Installationssystem zu besitzen (PHW = potable hot water, Warmwasser). S 18

3.4 Der Gesamtwasserverbrauch im Trinkwasser-Installationssystem eines Gebäudes sowie der Warmwasseraustausch im PWH-Installationssystem bieten nur einen unzureichenden Hinweis auf Stagnation und Kontaminationsgeschehen im Gebäude S 19

3.5 Die Berücksichtigung qualitativer Informationen bei der Bewertung von Trinkwasser-Installationen durch Begehungen und Befragungen liefert aussagekräftige Hinweise für die Auswahl geeigneter Probenahmestellen, besonders bei Einbeziehung von Stagnationsbereichen und wenig genutzten Entnahmestellen. S 20

3.6 Die PWH-Konstanztemperatur ist ein für das Vorkommen von *L. pneumophila* wichtiger Prädiktor. S 20

3.7 Die 5-K-Regel ist ebenfalls ein vergleichsweise guter Prädiktor für das Vorkommen von *L. pneumophila.* S 21

3.8 Für einzelne Entnahmestellen lässt sich mittels eines logistischen Regressionsmodells mit den Parametern Stagnation (qualitativ) und PWH-Konstanztemperatur eine gute Schätzung für das Risiko einer Legionellenkontamination berechnen. S 21

4. Einfluss von Werkstoff und Wasserbeschaffenheit auf *P. aeruginosa* und *L. pneumophila*

4.1 Unter gleichen Betriebsbedingungen befinden sich auf dem Werkstoff Kupfer weniger kultivierbare Zellen von *P. aeruginosa* als auf den Werkstoffen EPDM, PE-Xc und Edelstahl. Im Biofilm auf Kupferrohren kann *P. aeruginosa* in einen unkultivierbaren Zustand übergehen. S 22

4.2 In Kupferrohren führt eine erhöhte Phosphat-Konzentration (1 mg/L) im Trinkwasser zu erhöhter Biofilmbildung sowie zu erhöhten *P. aeruginosa*- und *L. pneumophila*-Konzentrationen S 23

4.3 Ein autochthoner Biofilm auf Kupfer bietet *P. aeruginosa* einen gewissen Schutz vor Kupferstress. S 23

5. Desinfektion

5.1 Die kultivierbaren und unkultivierbaren Stadien von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in den Trinkwasser-Biofilmen können grundsätzlich durch Desinfektion vollständig inaktiviert werden. Unter ungünstigen Betriebsbedingungen können die Pathogenen jedoch auch intensive Desinfektionsmaßnahmen überleben. S 23

5.2 *P. aeruginosa* kann intensive diskontinuierliche Desinfektionsmaßnahmen (mit oxidierenden Desinfektionsmitteln oder durch thermische Desinfektion) in den Biofilmen von Einbauteilen überleben und das System nach Abschluss der Maßnahme wieder kontaminieren. S 24

5.3 Bei Anwesenheit eines autochthonen Trinkwasser-Biofilms kann die Vermehrung von *P. aeruginosa* auf der Rohrinnenoberfläche im Vergleich zu einer unbesiedelten Oberfläche gehemmt sein. S 24

5.4 Eine diskontinuierliche Desinfektion des autochthonen Trinkwasser-Biofilms auf Rohrinnenoberflächen ohne gleichzeitige Entfernung der Kontaminationsquelle kann zu einer verstärkten Aufkeimung von *P. aeruginosa* im gesamten System führen. S 25

5.5 Für die langfristig erfolgreiche Sanierung einer kontaminierten Trinkwasser-Installation sollten folgende Maßnahmen Priorität vor intensiven Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen haben: S 25

- Elimination der Kontaminationsquelle
- Einhaltung der Betriebsbedingungen entsprechend den aaRdT

5.6 Zu gering dosierte Desinfektionsmittel verändern die Populationsstruktur in Biofilmen und selektieren nach Mikroorganismen mit erhöhten Toleranzen**.** S 25

5.7 Zu gering dosierte Desinfektionsmittel können die Ausbildung von VBNC-Stadien begünstigen bzw. induzieren. S 26

5.8 Die Wirksamkeit von Desinfektionsmaßnahmen kann durch begleitende physikalische Maßnahmen gesteigert werden. S 27

5.9 Der kontinuierliche Einsatz von Chlor/Chlordioxid (max. 0,3 bzw. 0,2 mg/L) kann zu einem verstärkten Auftreten von nicht kultivierbaren *P. aeruginosa* führen. S 27

5.10 Die Simulationsrechnung zeigt, wo unzureichend durchströmte Bereiche in Trinkwasser-Installationen vorkommen. Sie hilft, Bauteile zu optimieren, um Probleme im Betrieb und bei der Reinigung sowie Desinfektion zu vermeiden. S 28

5.11 Die Länge von wenig genutzten Abgängen sollte auf max. das Dreifache des Innendurchmessers des Durchganges beschränkt werden. S 28

6. Konsequenzen, Gesetze, Normen, Regelwerke und Biofilm-Management

6.1 Normen und Regelwerke setzen die gesetzlichen Anforderungen an die Trinkwasserbeschaffenheit technisch um S 29

6.2 Normen und Regelwerke nehmen – mit Ausnahme der VDI/DVGW-Richtlinie 6023 – allgemein keinen Bezug auf die Bedeutung der Biofilme für den hygienischen Betrieb von Trinkwasser-Installationen. S 29

6.3 Ein Biofilm-Management unter Berücksichtigung des VBNC-Zustandes von pathogenen Mikroorganismen ist die Voraussetzung für einen hygienisch einwandfreien Betrieb von Trinkwasser-Installationen. S 29

6.4 Das Biofilm-Management muss stärker in den technischen Regelwerken berücksichtigt werden, da es zum Verständnis der hygienischen Zusammenhänge und zur Begründung der in ihnen genannten Anforderungen beiträgt. S 30

6.5 In Gesetzen und Verordnungen über die Trinkwasserbeschaffenheit ist der Parameter *P. aeruginosa* einzuführen und mit einem technischen Maßnahmewert < 1 KBE/100 ml zu versehen. S 31

Erkenntnisse aus dem Projekt „Biofilm Management“: Erläuterungen

1 Viable but nonculturable (VBNC)

1.1 Die Fähigkeit zur Bildung von VBNC-Stadien ist weit verbreitet bei Wasserbakterien in oligotrophen Habitaten.

Das Trinkwasser stellt für Bakterien ein oligotrophes (nährstoffarmes) Habitat dar. Typische Biofilmbildner in Trinkwassersystemen sind z. B. Vertreter der Gruppe *Aquabacterium-Ideonella-Sphaerotilus* oder Pseudomonaden. Sie kommen in sehr vielen Trinkwassersystemen vor, allerdings in unterschiedlicher Zusammensetzung, und bilden unter realen Trinkwasser-Bedingungen zu über 99 % VBNC-Stadien aus. In beispielhaften Experimenten mit *L. pneumophila* und *Aquabacterium*, die zuvor kultiviert worden waren und anschließend in Trinkwasser suspendiert wurden, waren nach 2-3 Wochen bereits 80 % der Zellen in ein VBNC-Stadium übergegangen und daher nicht mehr kultivierbar. Diese Anpassung an limitierende Faktoren im Trinkwasser wurde bei sechs Arten von *Pseudomonas,* bei *L. pneumophila* sowie drei *Aquabacterium*-Arten experimentell und *in situ* genau untersucht. Da Aquabakterien in TW-Biofilmen bis zu 60% der Gesamtpopulation stellen können und nahe verwandte Arten aus der Sphaerotilus-Leptothrix-Ideonella-Aquabacterium-Gruppe zusätzlich vorkommen, sind dies sicher sehr repräsentative Biofilmbildner. Nur auf Materialien, die das Bakterienwachstum sehr stark fördern, kommen andere Arten noch häufiger vor. Es zeigte sich, dass zwar alle Aquabakterien die Eigenschaft zur Bildung von VBNC-Stadien besitzen, dass diese Eigenschaft aber auch bei eng verwandten Arten unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

1.2 Auch sehr geringe Konzentrationen an Nährstoffen können von VBNC-Zellen genutzt werden.

Analysen von *Aquabacterium*-Zellen unter Limitierung organischer Kohlenstoff-Verbindungen belegen, dass diese Zellen physiologisch aktiv sind und auf Zugabe niedrig konzentrierter organischer Kohlenstoff-Verbindungen mit (einigen) Zellteilungen reagieren. Trotzdem sind diese Zellen auf Standardnährböden der Routineanalytik nicht kultivierbar. Auch für *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass die VBNC Zellen nicht tot sind, da sie zwar auf Standardnährböden der Routineanalytik nicht kultivierbar waren, jedoch andere Substrate unter Zellteilung verstoffwechseln konnten. Ob allein die höhere Substratkonzentration oder auch die Überführung in vollständig andere Umgebungsbedingungen für dieses Verhalten verantwortlich ist, bleibt noch unklar. Deutlich geringere Intensität der FISH-Signale (wenige Ribosomen bedeutet geringe Proteinbiosynthese) beim Nachweis ausgehungerter, im VBNC-Zustand befindlicher Zellen deutet darauf hin, dass diese Zellen nur Erhaltungsstoffwechsel betreiben, aber kaum noch Baustoffwechsel. Bei *P. aeruginosa* wurde zudem eine Veränderung der typischen Koloniemorphologie auf den Standardnährböden der Routineanalytik beobachtet.

1.3 VBNC-Zellen von Aquabakterien finden sich nicht nur in der Wasserphase, sondern auch in Biofilmen.

Selbst in sehr dünnen Biofilmen (1-3 Zell-Lagen), die sich in Trinkwassersystemen ausbilden, findet man fast immer neben VBNC-Zellen auch einen Anteil kultivierbarer Zellen. Einige dieser Zellen können als sogenannte Schwärmerzellen („Pioniere“) in die Wasserphase wechseln und neue Lebensräume besiedeln. Diese Schwärmer sind in einem anderen physiologischen Zustand als der Rest der Biofilmzellen und es ist möglich, dass sie sich auch an die Bedingungen auf Standardnährböden anpassen. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass der Anteil von VBNC-Stadien an der natürlichen Flora (*Aquabacterium*-Arten) in Biofilmpopulationen höher ist als in den planktonischen Populationen.

1.4 Für viele Umweltbakterien stellen die VBNC-Stadien eine Anpassung an oligotrophe Habitate dar.

Wahrscheinlich ist der Zustand, der hier als VBNC bezeichnet wird, für viele Wasserbakterien sogar die natürliche Lebensweise, um in nährstoffarmen Lebensräumen über lange Zeiträume existieren zu können. Diese Anpassung bringt es aber mit sich, dass Zellen aus diesen Populationen mit den routinemäßigen Standardmethoden nicht nachgewiesen werden können. Viele Krankheitserreger können sich nach Freisetzung in die Umwelt ebenfalls an diese Bedingungen anpassen und Teilpopulationen können sehr lange überleben – viel länger als man aufgrund von Nachweisen mit Kulturmethoden dachte.

1.5 *P. aeruginosa,* ein fakultativ pathogenes Bakterium, kann in Biofilmen wachsen, auch in Trinkwassersystemen unter oligotrophen Bedingungen.

Weil *P. aeruginosa* auch in nährstoffarmen Systemen wie Trinkwasser wachsen kann, ist es besonders interessant zu wissen, ob dieses Bakterium VBNC-Stadien ausbildet und dadurch bei Routineuntersuchungen nicht mehr nachweisbar ist. Rein- und Mischkulturversuche in oligotrophem Medium zeigten widersprüchliche Ergebnisse, wobei *P. aeruginosa* auch bei Substratlimitierung nur zu einem geringen Teil in VBNC-Stadien übergeht, in anderen Untersuchungen fand der Übergang aber um mehrere Größenordnungen statt. Dies deutet darauf hin, dass dieses Bakterium zusätzlich über andere Anpassungsmechanismen an solche Umweltbedingungen verfügt. Es konnte aber nicht gezeigt werden, dass *Aquabacteria*, die sich in Biofilmen eingenistet haben, auch Pseudomonaden zum Übergang in den VBNC-Zustand stimulieren.

1.6 Unter dem Einfluss von Kupfer-Konzentrationen, wie sie in Trinkwasser-Installationen vorkommen, können *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in den VBNC-Zustand übergehen.

In Gegenwart von Kupferionen (~60 µg/L) im Wasser aus der Trinkwasser-Installation aus Kupferwerkstoffen (Rohrleitungen und Armaturen) kann *P. aeruginosa* in einen VBNC-Zustand übergehen (Dwidjosiswojo et al., 2011). In Experimenten mit deionisiertem Wasser, dem Kupfer in der gleichen Konzentration

zugesetzt wurde, kam es bei *L. pneumophila* ebenfalls zu einem Übergang in den VBNC-Zustand.

1.7 Durch Anwendung von Chelatoren, z. B. Natriumdiethyldithiocarbamat (DDTC), kann eine Rückkehr von *P. aeruginosa* in den kultivierbaren Zustand erreicht werden.

Der Kupferstress, der *P. aeruginosa* in den VBNC-Zustand bringt, kann durch den Kupferchelator Natriumdiethyldithiocarbamat (DDTC) aufgehoben werden. Dann kehrt *P. aeruginosa* wieder in den kultivierbaren Zustand zurück. Dieser Prozess dauert 7 bis 14 Tage (Dwidjosiswojo et al., 2011). Die Bedingungen, die zur Wiederkultivierbarkeit führen, sind spezifisch; die Art und Dauer der Einwirkung von Kupfer sowie der Kupfer-spezifischen Komplexbildner beeinflussen die Rückkehr in den kultivierbaren Zustand. Wichtig ist dabei, zu berücksichtigen, dass der VBNC-Zustand als operational definiertes Phänomen verschiedene Ursachen haben kann. Deshalb sind auch die Bedingungen für die Rückkehr in den kultivierbaren Zustand unterschiedlich. Das Beispiel mit *P. aeruginosa* und Kupferionen ist hier exemplarisch angeführt, um zu demonstrieren, dass der VBNC-Zustand reversibel ist.

1.8 Nach der Rückkehr in den kultivierbaren Zustand ist *P. aeruginosa* wieder zytotoxisch.

P. aeruginosa ist nur im kultivierbaren Zustand in der Lage, sowohl zell- als auch DNA-schädigend auf humane Lungenepithelzellen (BEAS-2B) zu wirken. Im VBNC-Zustand, induziert durch Kupfer, ist keine Zellschädigung zu beobachten. Die Rückführung von *P. aeruginosa* in den kultivierbaren Zustand führt zur Rückerlangung sowohl der Zyto- als auch der Gentoxizität. Am Beispiel von Kupfer konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* nach Aufhebung des Kupferstresses durch DDTC (Abbildung 1) wieder kultivierbar wird. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass *P. aeruginosa* mit der Rückerlangung der Kultivierbarkeit durch Aufhebung des Kupferstresses auch die Toxizität zurück erlangt.

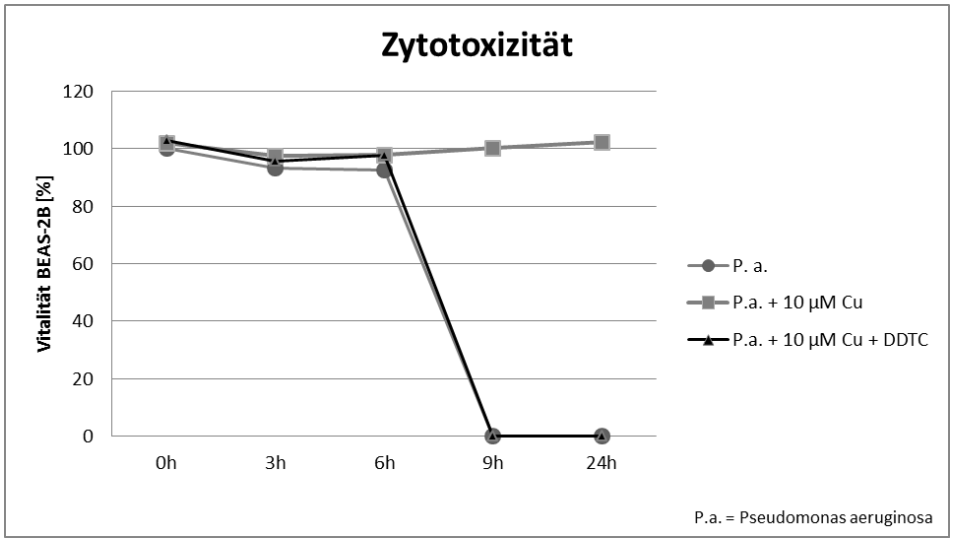


Abbildung 1: y-Achse: überlebende Lungenepithelzellen nach Kontakt mit den Bakterien (bis zu 24 h).

Zellschädigende (zytotoxische) Effekte durch *P. aeruginosa* (P.a.) sind zu beobachten, wenn der Mikroorganismus sich im kultivierbaren Zustand befindet sowie nach Rückkehr aus dem VBNC-Zustand durch den Kupfer-Chelator (Absterben aller BEAS-Zellen nach 9 Stunden). Wenn *P. aeruginosa* sich noch im VBNC-Zustand befindet (P. aeruginosa + 10 µM Cu), tritt jedoch keine Zellschädigung auf (100 % Vitalität der BEAS-Zellen).

Die Zytotoxizität von P. aeruginosa ist abhängig vom Stamm: Die Untersuchung verschiedener Stämme (isoliert aus Trinkwasser und –Biofilmen sowie Laborstämme aus der mikrobiologischen Stammsammlung) zeigten unterschiedliche (keine bis starke) zytotoxische Effekte. Bei den Umweltstämmen handelt es sich um einen mucoiden Stamm (SG81), der über eine Expositionsdauer von 24 h keine zytotoxischen Effekte zeigt, und 4 nicht mucoide Stämme (SG81-R, AdS, 760, 920) die nach ca. 6 – 8 h Exposition stark zytotoxische Effekte hervorrufen. Der Stamm aus der Stammsammlung (DSM) zeigte hingegen nur mäßig zytotoxische Effekte.

Die Zytotoxizität von P. aeruginosa ist abhängig vom Nährstoffangebot: in nährstoffarmer Umgebung konnten zytotoxische Effekte erst nach längerer Expositionsdauer (ca. 10 h) nachgewiesen werden, während dies in Trinkwasser, das mit Nährstoffen versetzt wurde, schneller (ca. 6 Stunden) der Fall war.

Die zytotoxischen Eigenschaften von P. aeruginosa basieren auf der Sekretion von Toxinen: Zellfreie Überstände einer *P. aeruginosa* Kultur führten zu einer Zellschädigung der humanen Lungenzellen

1.9 *L. pneumophila* ist ein Bakterium, das sich typischerweise intrazellulär in Protozoen vermehrt. Ein Wachstum in Biofilmen ohne Amöben ist vermutlich nur in metabolisch hoch aktiven und komplexen Biofilmen möglich.

Generell wird angenommen, dass sich Legionellen in Trinkwasser-Biofilmen nur intrazellulär in Protozoen vermehren können. Falls eine Vermehrung außerhalb überhaupt vorkommt, dann nur in Wassersystemen, in denen die Biofilmgemeinschaften hohe Nährstoffkonzentrationen vorfinden und damit hoch aktiv sind. Diese Nährstoffe können aus dem Wasser stammen (bei ungenügender Aufbereitung) oder aus Materialien des Installationssystems. Aktive Mischbiofilme könnten dann ein Milieu darstellen, wo Legionellen die benötigten Nährstoffe und Umweltbedingungen vorfinden. Versuche zeigen, dass sich die Legionellen in eindeutig amöbenfreien Biofilmen etablieren und dort über mehrere Wochen nachweisbar sind.

1.10 *L. pneumophila* kann ebenfalls in den VBNC-Zustand übergehen, z. B. nach längerem Nährstoff-Entzug.

Eine Einnistung von *L. pneumophila* in einem Trinkwasserbiofilm wurde in Laborversuchen in einem Temperaturspektrum von 8 – 20°C nachgewiesen. Dabei persistierten die Legionellen über mehrere Wochen, wie mit kultur-unabhängigen Methoden gezeigt werden konnte. Sie zeigten jedoch weder unter nährstoffarmen

noch unter nährstoffreichen Bedingungen und unabhängig von der Temperatur eine Vermehrung.

1.11 Nach einer Passage durch Amöben kann *L. pneumophila* in den kultivierbaren Zustand zurückkehren.

Zwei *L. pneumophila*-Stämme (*L. pneumophila* DSM 7513, *L. pneumophila* AdS), die sich aufgrund von Nährstoffmangel in einem nicht mehr kultivierbaren Zustand befanden, wurden bis zu 7 Tagen bei 30°C in Gegenwart von *Acanthamoeba castellanii* kultiviert. Unter diesen Bedingungen wurde die Einnistung der Legionellen in *A. castellanii* mikroskopisch nachgewiesen. Während die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl FISH-positiver Legionellen nicht deutlich zunahmen, wurden jedoch wieder kultivierbare Legionellen mittels des Standard-Kultivierungsverfahrens auf GVPC-Agar nachgewiesen. Nährstoffreiche Wassersysteme und besonders deren Biofilme können aufgrund des erhöhten Auftretens von Amöben möglicherweise verstärkt zu einer Rückkehr von Legionellen in den kultivierbaren Zustand führen, die zuvor im VBNC-Zustand überdauert hatten.

1.12 Der VBNC-Zustand kann zu einer Unterschätzung der Anwesenheit von hygienisch relevanten Mikroorganismen und zu einer Überschätzung der Effektivität von Sanierungsmaßnahmen führen.

Durch den Eintritt in den VBNC-Zustand lassen sich hygienisch relevante Mikroorganismen nicht mehr mit den dafür standardisierten Kulturmethoden nachweisen. Da VBNC-Zellen dadurch gekennzeichnet sind, dass sie immer noch Anzeichen von Vitalität zeigen (z. B. intakte Membran, Anwesenheit ribosomaler RNA, ATP, enzymatische Aktivität), sind sie nicht als irreversibel inaktiviert anzusehen, und eine Rückkehr in den kultivierbaren und auch infektiösen Zustand kann nicht ausgeschlossen werden. Daraus ergibt sich sowohl eine Unterschätzung ihrer Anwesenheit als auch eine Überschätzung der Effektivität von Desinfektions- und sonstigen Sanierungsmaßnahmen. Dies kann ein nicht zu vernachlässigendes hygienisches Risiko zur Folge haben.

2. Mikrobiologische und molekularbiologische Analysenmethoden

2.1 Die nach TrinkwV geforderten Untersuchungen mit klassischen Kulturverfahren allein zeigen Kontaminationen nicht immer sicher an.

Analysen von 768 Trinkwasserproben aus neun öffentlichen Gebäuden, die parallel mit klassischen Kulturverfahren und mit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) analysiert wurden, haben gezeigt, dass der Nachweis von *L. pneumophila* mit der qPCR-Methode auch bei negativem kulturellem Nachweis (0 KBE pro 100 ml) teilweise positiv war.

2.2 In der praktischen Routinebeprobung von Trinkwasser-Installationen können molekularbiologische Verfahren die klassischen kulturbasierten Verfahren nicht ersetzen.

Die qPCR erwies sich bei der Analyse von Umweltproben als eine sensitive und gut standardisierbare Methode, mit welcher eine absolute Quantifizierung der Pathogenen über einen großen Konzentrationsbereich mit sehr niedriger Nachweisgrenze möglich war. Bei Anwendung der qPCR ist allerdings zu berücksichtigen, dass sich dadurch die Zellen im VBNC-Zustand nicht von tatsächlich abgetöteten Zellen unterscheiden, so lange deren DNA noch existiert. Durch eine Erweiterung der Methode unter Einsatz von Propidiummonoazid (PMA) ist es allerdings möglich, intakte von stark geschädigten Zellen zu unterscheiden.

Die qPCR kann andererseits für Proben, in denen *L. pneumophila* Kolonien auf GVPC-Agarplatten kultivierbar waren, ein negatives Ergebnis haben. Nur ein Teil dieser negativen PCR-Ergebnisse ist auf fehlgeschlagene Analysen aufgrund von sog. Matrix-Effekten des untersuchten Trinkwasser-Systems zurückzuführen, welche den Gennachweis behinderten (d. h. auch die interne Kontrolle ist negativ, z. B. wegen sterischer Hinderung der Anlagerung von Primer/Sonde durch chemische Störstoffe wie z. B. hohe Metallgehalte im Wasser). Anders als in Laborversuchen mit Reinkulturen bleibt ein Anteil „echter“ falsch-negativer qPCR-Ergebnisse übrig. Daher können nach heutigem Kenntnisstand die molekularen Verfahren die klassische Kultivierung nicht ersetzen, aber unterstützen und sinnvoll ergänzen.

2.3 In Fällen hartnäckiger und wiederkehrender Kontaminationen ist die Möglichkeit einzubeziehen, dass die Kontaminanten vorübergehend in einen VBNC-Zustand übergehen. Kulturmethoden sind dann unzureichend und sollten durch weitere kultur-unabhängige Verfahren ergänzt werden.

Molekularbiologische Methoden (qPCR) können als unterstützende Methoden sinnvoll sein, um verdeckte Kontaminationen zu finden. Positive qPCR-Signale sind dabei – im Rahmen der oben diskutierten Einschränkungen - als Warnsignale zu verstehen, weil sie die grundsätzliche Möglichkeit anzeigen, dass hygienisch relevante Mikroorganismen anwesend sind.

- ⇨ **Das Live/dead-System:** Durch die Anwendung von Methoden von Vitalitäts-Indikatoren wie z. B. der Nachweis intakter Zellmembranen kann die Vitalität von nicht-wachsenden Zellen abgeschätzt werden. Eine zunehmend angewandte Methode für Zellen, deren Membran intakt bzw. geschädigt ist, besteht in der Anwendung des sog. Live/dead-Systems. Sie ist aber nicht spezifisch für hygienisch relevante Mikroorganismen, hat aber durchaus große praktische Bedeutung für die Bestimmung der Gesamtbelastung von Trinkwasser-Proben und wird bei der Durchflusszytometrie zunehmend eingesetzt. Dabei wird eine Doppelfärbung der Zellen durchgeführt, und zwar mit zwei nukleinsäurespezifischen, fluoreszierenden Farbstoffen. Der eine (Syto 9) dringt in sämtliche Zellen ein und führt zu einer grünen Fluoreszenz. Der andere (Propidiumjodid) wird von intakten Zellmembranen zurückgehalten

und dringt nur durch solche Membranen, die geschädigt sind und färbt die DNA rot. Eine Schädigung der Zellmembran wird als Zeichen für Zelltod interpretiert. Mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie kann eine Unterscheidung rasch und bei einer großen Anzahl von Proben durchgeführt werden. Auch für die qPCR existiert eine Methode, lebende und tote Zellen anhand des Membranzustands durch Behandlung mit Propidiummonoazid zu unterscheiden (PMA-qPCR).

- ⇨ **Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH):** Ein weiterer Vitalitäts-Indikator ist die Anwesenheit ribosomaler RNA. In den Ribosomen findet die Synthese der Proteine statt, die zur Erhaltung des Stoffwechsels und zum Wachstum erforderlich sind. Dabei handelt es sich um einen grundlegend wichtigen Lebensprozess. Wenn also rRNA vorhanden ist, dann ist dies ein (wenn auch nicht völlig sicherer) Hinweis auf aktive Proteinsynthese. Dies kann mit Hilfe der FISH nachgewiesen werden. Allerdings ist auch hier einschränkend zu bemerken, dass diese Methode nur einen Bereich von 0,1-100 % der Gesamtzellzahl abdecken kann. Dies hat bei einer hohen Gesamtzellzahl eine hohe Nachweisgrenze zur Folge. Hieraus resultiert auch, dass bereits ein einzelnes Hybridisierungssignal zu einer sehr hohen Überschätzung der Zellzahlen von Pathogenen führen kann. Daher ist das Verfahren besonders anfällig für falsch positive Signale. Andererseits besteht die Gefahr, dass geringe Konzentrationen von Pathogenen in der Probe nicht erkannt werden.

3. Erfassung, Beobachtung und Interpretation mikrobieller Kontaminationen

3.1 In Trinkwasser-Systemen, die mit *L. pneumophila* kontaminiert sind, ist das Vorkommen dieser Bakterien einer starken räumlichen und zeitlichen Variabilität unterworfen, und zwar sowohl kurz- als auch langfristig.

Neun Gebäude mit bekanntem systemischem Vorkommen von *L. pneumophila* wurden räumlich und zeitlich engmaschig beprobt. Auch wenn die Probenahmestellen nahe beieinander lagen, ergaben sich große Schwankungen. Innerhalb eines Gebäudes konnten Entnahmestellen negative Befunde für *L. pneumophila* aufweisen (0 KBE/100 ml), gleichzeitig konnten aber an anderen Entnahmestellen des gleichen Gebäudes hohe bis extrem hohe Kontaminationen mit *L. pneumophila* nachgewiesen werden (>1000 KBE/100 ml bzw. >10.000 KBE/100 ml). Auch bei der Beobachtung über ein halbes Jahr wurden an der gleichen Probenahmestelle teilweise höchst unterschiedliche Legionellen-Kontaminationen mit einer Schwankung um bis zu 5 log-Stufen gefunden. In exemplarischen Tagesverlaufsproben konnte zudem gezeigt werden, dass das Vorkommen von *L. pneumophila* innerhalb eines Tages an ein und derselben Entnahmestelle um 4 log-Stufen variieren kann (Messung 10 Uhr: 11.900 KBE/100 ml; Messung 20 Uhr:

18 KBE/100 ml). In keinem der untersuchten Gebäude konnte eine Periodik oder sonstige Systematik des Kontaminationsgeschehens festgestellt werden.

3.2 Etablierte Beprobungsstrategien zur systemischen Untersuchung von Trinkwasser-Installationen können mikrobielle Kontaminationen nur eingeschränkt erfassen.

Die Festlegung der Entnahmestellen erfolgte nach einschlägigen Richtlinien (UBA, 2012; DVGW, Arbeitsblatt W 551, 2004; DVGW-Information Wasser Nr. 74). Hiernach sind repräsentative Entnahmestellen einer Trinkwasser-Installation festzulegen, nämlich 1. am Abgang der Warmwasser (PWH[1])-Leitung vom Trinkwassererwärmer, 2. am Wiedereintritt in den Trinkwassererwärmer (Zirkulationswarmwasser, PWH-C[2]), 3. an repräsentativ ausgewählten Steigsträngen (bzgl. ähnlicher Bauweise, gleichartiger Versorgung von Gebäudebereichen, gleicher Nutzung, hydraulisch ungünstiger Lage), dabei 4. primär an Steigsträngen mit Duschen.

Die qualitative Analyse zeigte, dass nach etablierten, richtlinienkonformen Beprobungsstrategien nur selten Entnahmestellen ausgewählt wurden, mit denen langfristig über einen Zeitraum von sechs Monaten hinweg durchgehend eine Kontamination eines Gebäudes gefunden werden konnten. In einer quantitativen Analyse wurden der positive Vorhersagewert (PPV)[3], die Sensitivität und die Korrektklassifikationsrate (Irrtums*un*wahrscheinlichkeit) der richtlinienkonformen Beprobungsstrategien in den einzelnen Gebäuden berechnet (siehe Tabelle 1). In wenigen Gebäuden mit sehr hoher Kontamination (z. B. Gebäude K, Tabelle 1) erzielt die etablierte Beprobungsstrategie gute Ergebnisse mit einem hohen positiven Vorhersagewert und einer hohen Sensitivität. In größeren Gebäuden mit komplexen Einflüssen auf das Kontaminationsgeschehen (z. B. Gebäude F, Tabelle 1) ist die richtlinienkonforme Beprobungsstrategie zur Detektion einer Kontamination hingegen unzuverlässig. In der Gesamtschau aller untersuchten Gebäude werden über den Zeitraum eines halben Jahres mit richtlinienkonformer Beprobung nur 28,9% aller insgesamt bekannten Kontaminationen aufgedeckt, die Sensitivität der Aufdeckung einer systemischen Kontamination beträgt 37,8 % und die Korrektklassifikationsrate aller Proben 54,5%.

[1] PWH = „potable water hot“ = Warmwasser
[2] PWH-C = „potable water circulating“ = Zirkulationswarmwasser
[3] auch als Genauigkeit bezeichnet

Tabelle 1: Sensitivität, Positiver Vorhersagewert (PPV) und Korrektklassifikationsrate bei der Anwendung der richtlinienkonformen Beprobung nach einzelnen Untersuchungsobjekten (inkl. langfristiger Beprobung), sortiert nach Sensitivität

Gebäude	Anzahl PN-Stellen nach Richtlinien	Gesamtzahl beprobte PN-Stellen	Sensitivität [%]	PPV [%]	Korrektklassifikationsrate [%]	n
K	5	7	77,8	84,0	68,8	32
A	11	34	59,5	44,9	60,0	105
B	9	44	50,0	27,9	60,9	110
G	16	31	44,4	16,3	49,5	101
E	6	22	28,6	16,7	55,9	68
D	8	27	20,5	28,6	52,8	108
F	7	29	16,1	14,7	47,6	105
H	5	35	0,04	3,6	50,5	101
Gesamt	67	229	37,8	28,9	54,5	730

3.3 Die Untersuchung von Vorlauf und Rücklauf scheint wenig Aussagekraft hinsichtlich des Kontaminationsgeschehens im PWH-Installationssystem zu besitzen.

Die etablierte Beprobungspraxis von Warmwasser-Vorlauf und Zirkulations-Rücklauf deckt Kontaminationen nur unvollständig auf. Nur eines von acht kontaminierten, langfristig untersuchten PWH-Installationssystemen konnte durch Nutzung dieser Beprobungsstrategie als systemisch kontaminiert erkannt werden (Gebäude K). Alle anderen Proben in den weiteren Installationssystemen blieben dauerhaft unter dem technischen Maßnahmenwert (100 KBE/100 ml) für Legionellen. Die Aussagekraft für das Kontaminationsgeschehen des gesamten PWH-Installationssystems scheint aufgrund dieser Beobachtungen daher begrenzt. Wenn die Ergebnisse für *L. pneumophila* im PWH-Vorlauf und PWH-C-Rücklauf unter dem technischen Maßnahmenwert liegen, kann also im PWH-System trotzdem eine systemische Kontamination mit demselben Bakterienstamm vorliegen.

Ungeachtet dessen behält die etablierte Beprobungspraxis jedoch ihren Nutzen zur Eingrenzung der Ursachen bei Kontaminationen des Trinkwasser-Installationssystems: Positive Vorlauf-Proben weisen auf mögliche *L. pneumophila*-Reservoire noch vor dem Eintritt in die Warmwasser-Installation hin und lassen in Kombination

mit der Beprobung des Rücklaufs auch Rückschlüsse auf die Präsenz von *L. pneumophila* im gesamten System zu.

3.4 Der Gesamtwasserverbrauch im Trinkwasser-Installationssystem eines Gebäudes sowie der Warmwasseraustausch im PWH-Installationssystem bieten nur einen unzureichenden Hinweis auf Stagnation und Kontaminationsgeschehen im Gebäude.

Die VDI/DVGW-Richtlinie 6023 empfehlen, das Wasser des gesamten Trinkwasser-Installationssystems mindestens einmal alle drei Tage (besser jeden Tag) vollständig auszutauschen. Der Volumenaustausch des PWH-Installationssystems wurde, sofern vorhanden, zentral am Trinkwassererwärmer der Gebäude über einen Wasserzähler gemessen. Ebenso wurde in allen Fällen der Gesamtwasseraustausch des Trinkwasser-Installationssystems über den Wasserzähler am Hauswassereingang erfasst. Ein quantitativ ausreichender Wasseraustausch des Gesamtsystems ist aber nicht damit assoziiert, dass *L. pneumophila* im jeweiligen Gebäude nicht vorkommt (siehe Tabelle 2). Mögliche Erklärungen können sein, dass der Austausch nur über spezifische bzw. ausgewählte Entnahmestellen erfolgt, oder dass eine Rekontaminierung durch Biofilme im System erfolgt, die *L. pneumophila* enthalten. Durch die Wasserentnahme werden gewisse Rohrleitungsstränge intensiv gespült, mögliche Stagnationsbereiche werden jedoch nicht erfasst. Von diesen können in der Folge erneute Kontaminationen ausgehen.

Tabelle 2: Quantitativer Volumenaustausch des objektbezogenen PWH-Installationssystems (gemessen am Wasserzähler des Trinkwassererwärmers) und Überschreitung des technischen Maßnahmenwertes nach einzelnen Gebäuden. (n.a. = nicht auswertbar).

Gebäude	Volumen PWH-Installations-system inkl. Speicher [l]	Volumenaus-tausch PWH-Installations-system [pro Tag]	Überschreitung technischer Maßnahmewert [%]	Gesamtzahl entnommener Proben PWH
A	750	1,6	37,4	99
B	4000	2,1	25,0	104
D	4500	1,6	20,7	58
E	2900	0,4	23,4	64
F	n.a.	n.a.	25,0	136
G	n.a.	n.a.	18,4	98
H	2200	n.a.	27,7	94
K	2600	0,4	84,4	33

3.5 Die Berücksichtigung qualitativer Informationen bei der Bewertung von Trinkwasser-Installationen durch Begehungen und Befragungen liefert aussagekräftige Hinweise für die Auswahl geeigneter Probenahmestellen, besonders bei Einbeziehung von Stagnationsbereichen und wenig genutzten Entnahmestellen.

Durch eine Begehung der Gebäude konnte für jede Entnahmestelle ein individuelles Stagnationsrisiko ermittelt werden. Dies geschah nach qualitativen Aspekten. Hierzu zählten Nutzeraufkommen, Nutzerkreis, Frequenz und Regelmäßigkeit der Nutzung und generelle Hinweise durch Personal, Betreiber und Nutzer. Durch den hygienisch geschulten und erfahrenen Beobachter können auch Hinweise wie auf Stagnation hindeutende äußere Verschmutzung der Entnahmestelle oder Wasserspuren, die auf eine Nutzung hindeuten, erkannt und in die Bewertung einbezogen werden. Der Parameter „Stagnation (qualitativ), geringe Abnahme“ setzt hygienische Erfahrung voraus und schließt Erkenntnisse qualitativer Interviews mit Gebäudeverwaltern, Betreibern und Nutzern ein. Hygienisch-mikrobiologisch relevante Stagnationsbereiche können mit diesem Parameter erkannt werden. Es konnte eine Sensitivität[4] von 72,5% zur Aufdeckung einer systemischen Kontamination sowie eine Korrektklassifikationsrate[5] von ca. 65% (n=544) erreicht werden. Die quantitative Messung der Stagnation hingegen brachte keine validen Ergebnisse. *Die qualitative Herangehensweise war am erfolgreichsten von allen verwendeten Entnahmestellen-spezifischen Ansätzen, um eine Kontamination mit L. pneumophila in einem Gebäude zu prognostizieren.*

3.6 Die PWH-Konstanztemperatur ist ein für das Vorkommen von *L. pneumophila* wichtiger Prädiktor.

Die zapfstellenspezifische PWH-Konstanztemperatur (gemessen nach längerem Ablaufen bei der Probenahme) und das Vorkommen von *L. pneumophila* zeigen eine hoch signifikante, negative Korrelation (r=-0,36; p=<0,01; n=541): Die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen von *L. pneumophila* sinkt an einer Entnahmestelle mit steigender PWH-Konstanztemperatur. In allen untersuchten Gebäuden (mit jeweils bekannter systemischer *L. pneumophila*-Kontamination) trat z. B. nur in drei Proben eine Überschreitung des technischen Maßnahmenwertes auf, wenn die Temperatur bei Konstanz über 60°C lag (siehe roten Kreis in Abbildung 2).

[4] auch als Trefferquote oder Empfindlichkeit bezeichnet
[5] auch als Irrtums*un*wahrscheinlichkeit bezeichnet

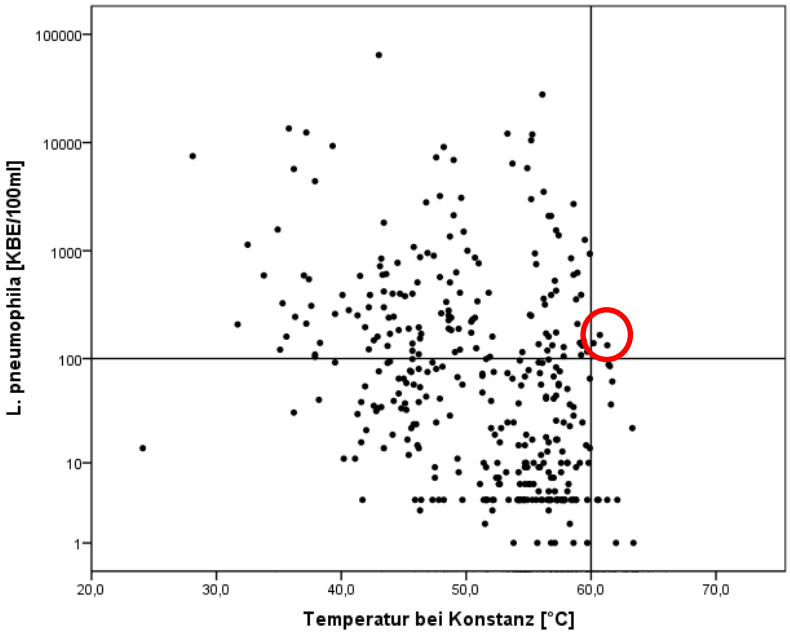


Abbildung 2: Streudiagramm des Vorkommens von *L. pneumophila* und der in der gleichen Probe gemessenen PWH-Konstanztemperatur (n=541).

3.7 Die 5-K-Regel ist ein vergleichsweise guter Prädiktor für das Vorkommen von *L. pneumophila.*

Der Parameter „keine Entsprechung der 5K-Regel“ basiert auf der Temperatur-differenz zwischen der Warmwasser-Vorlauftemperatur am Trinkwassererwärmer und der Konstanztemperatur an der Entnahmestelle (dies gilt auch für den Rücklauf). Beträgt diese Differenz mehr als 5K, so wird die 5K-Regel nach DVGW-Arbeitsblatt W 551 nicht eingehalten. Der temperaturbezogene Parameter „keine Entsprechung der 5K-Regel“ kann ebenso wie der Parameter „Konstanztemperatur 35-45 °C“ eine mögliche Kontamination mit *L. pneumophila* (Orientierungsbeprobung) im Vergleich zu anderen erhobenen Parametern, wie z. B. der Vorlauf-Rücklauf-Beprobung, besser prognostizieren (Sensitivität: 37,7 % bzw. 38,9 %, Korrektklassifikationsrate: 62,1 bzw. 68,6 %; jeweils n = 140).

3.8 Für einzelne Entnahmestellen lässt sich mittels eines logistischen Regressionsmodells mit den Parametern Stagnation (qualitativ) und PWH-Konstanztemperatur eine gute Schätzung für das Risiko einer Legionellenkontamination berechnen.

Über schrittweisen Ausschluss statistisch nicht geeigneter Parameter wurde ein logistisches Regressionsmodell zur statistisch basierten Prognose einer Kontamination mit Legionellen für einzelne Entnahmestellen entwickelt.[6] Mit sehr

[6] Formel des logistischen Regressionsmodells zur Vorhersage der Überschreitung des technischen Maßnahmenwertes für *Legionella* mit *T*= Konstanztemperatur; *A*=geringe Wasserentnahme beobachtet; u= „Fehlerwert“ (hier = 0, also Annahme: kein Fehler).

hoher Signifikanz verbleiben der metrische Parameter „PWH-Konstanztemperatur“ und der dichotome Parameter „Stagnation (qualitativ), geringe Wasserentnahme“ (jeweils p<0,001) im finalen Modell. Höhere PWH-Konstanztemperatur führt im Modell zu einem niedrigeren Risiko für eine Legionellenkontamination (Effektkoeffizient exp(B)=0,89, nicht-linearer Zusammenhang), das Vorliegen einer Stagnation mit geringer Wasserentnahme erhöht das Risiko hingegen um mehr als das Dreifache (Effektkoeffizient exp(B) = 3,3). Die statistische Überprüfung des Modells belegt eine gute Modellgüte. Es kann mit einem positiven Vorhersagewert[7] von 61,1% eine Überschreitung des technischen Maßnahmenwertes für *L. pneumophila* vorhersagen. Die Korrektklassifikationsrate[8] beträgt 69,8%. Mit Hilfe dieses Modells kann für jede Entnahmestelle innerhalb eines Gebäudes eine spezifische Prognose für die Kontamination mit *L. pneumophila* durchgeführt werden.

4. Einfluss von Werkstoff und Wasserbeschaffenheit auf *P. aeruginosa* und *L. pneumophila*

4.1 Unter gleichen Betriebsbedingungen befinden sich auf dem Werkstoff Kupfer weniger kultivierbare Zellen von *P. aeruginosa* als auf den Werkstoffen EPDM, PE-Xc und Edelstahl. Im Biofilm auf Kupferrohren kann *P. aeruginosa* in einen unkultivierbaren Zustand übergehen.

In halbtechnischen Versuchsanlagen wurden mit Trinkwasser bei einer Betriebstemperatur von 37°C mit und ohne Zudosierung von Nährstoffen[9] nach einer Stoß-Kontamination mit *P. aeruginosa* in den Kupferrohr-Biofilmen weniger kultivierbare Zellen von *P. aruginosa* nachgewiesen als in den Biofilmen auf Edelstahl, PE-Xc und EPDM[10]. Bei einer Betriebstemperatur von 10°C und ansonsten gleichen Versuchsbedingungen konnte *P. aeruginosa* in Kupferrohr-Biofilmen über einen Zeitraum von 6 Wochen nicht mehr kulturell detektiert werden. Gleichzeitig wurden jedoch unverändert hohe qPCR-Werte (≥ 1.000 Genkopien/cm^2) gefunden, was auf die Anwesenheit von *P. aeruginosa* schließen lässt, wobei anzunehmen ist, dass ein Teil davon im VBNC-Zustand vorliegt. Das korrespondierende Stagnationswasser (8 Stunden Stagnation vor der Probenahme) war in diesen Fällen nach beiden Methoden frei von *P. aeruginosa*. Das bedeutet, dass *P. aeruginosa* nicht bzw. nur in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von den Kupferrohr-Biofilmen ans Trinkwasser abgegeben oder durch die erhöhte Kupferkonzentration im Stagnationswasser abgetötet wurde.
Ähnliche Beobachtungen konnten unter denselben Bedingungen für *L. pneumophila*

$$p_k(y=1) = \frac{e^{4{,}673-0{,}120*T+1{,}199*A+u}}{1+e^{4{,}678-0{,}120*T+1{,}119*A+u}}$$

[7] auch als Genauigkeit bezeichnet
[8] auch als Irrtums*un*wahrscheinlichkeit bezeichnet
[9] 1 mg/L Phosphat, 10 mg/L Nitrat und 100 µg/L Acetat in Kombination
[10] Peroxidisch vernetztes Ethylen-Propylen-Dien-Monomer, Zulassungen nach DVGW W 270 und KTW Kategorie C (Stand 2007)

gemacht werden: 6 Wochen nach Kontamination konnte der Erreger im Kupferrohr-Biofilm und korrespondierendem Stagnationswasser nicht mehr mit Kulturmethoden nachgewiesen werden, während er mit qPCR noch bis zur Desinfektion und im Biofilm auch danach noch in geringen Konzentrationen erfassbar war. Auch hier waren nach der Desinfektion ein Rückgang der Pathogenenkonzentration und keine Abgabe von Zellen an die Wasserphase erkennbar.

4.2 In Kupferrohren führt eine erhöhte Phosphat-Konzentration (1 mg/L) im Trinkwasser zu erhöhter Biofilmbildung sowie zu erhöhten *P. aeruginosa*- und *L. pneumophila*-Konzentrationen.

Phosphat wird als Korrosionsinhibitor eingesetzt und bildet durch Adsorption eine Deckschicht auf der Rohroberfläche von Kupfer aus. Es verhindert die Abgabe von Kupfer an das Wasser, was dann geringere Konzentrationen an Kupfer enthält. In halbtechnischen Versuchsanlagen konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen höhere Befunde von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* auftraten. Die Anwesenheit von Kupferionen vermindert die Kultivierbarkeit von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* (siehe 1.6). Dieser Effekt könnte durch die Komplexierung des Kupfers mit Phosphat maskiert werden.

Bei Edelstahl, PE-Xc und EPDM führten erhöhte Phosphatwerte jedoch zu keinen wesentlichen Veränderungen der GZZ, HPC und der Anzahl von *P. aeruginosa* sowie *L. pneumohpila* in Biofilmen und in den Wasserphasen.

4.3 Ein autochthoner Biofilm auf Kupfer bietet *P. aeruginosa* einen gewissen Schutz vor Kupferstress.

Nach Desinfektion (Schädigung) des autochthonen Biofilms und anschließender experimenteller Kontamination mit *P. aeruginosa* war die Konzentration dieses Pathogenen auf der Rohrinnenoberfläche (sowohl mit kultivierungs-abhängigen als auch kultivierungs-unabhängigen Methoden) deutlich geringer als bei Rohren mit intaktem autochthonen Biofilm. Dies lässt vermuten, dass der autochthone Biofilm auf Kupferoberflächen *P. aeruginosa* einen gewissen Schutz vor schädigender Kupferionenkonzentration bietet.

5. Desinfektion

5.1 Die kultivierbaren und unkultivierbaren Stadien von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in den Trinkwasser-Biofilmen können grundsätzlich durch Desinfektion vollständig inaktiviert werden. Unter ungünstigen Betriebsbedingungen können die Pathogene jedoch auch intensive Desinfektionsmaßnahmen überleben.

Versuche im halbtechnischen Maßstab zeigen, dass unter Normalbedingungen eine erfolgreiche Anlagendesinfektion der Innenoberfläche des Rohrwerkstoffes möglich ist, auch wenn kulturunabhängige Methoden zum Nachweis eingesetzt werden. Die Konzentrationen der kultivierbaren *und* unkultivierbaren Stadien von *P. aeruginosa*

im Biofilm werden durch oxidierende Desinfektionsmittel (2 bis 50 mg/L ClO_2, 40 mg/L NaOCl und 150 mg/L H_2O_2; Kontaktzeit: bis zu dreimal 12 h) verringert. In vielen Versuchsstrecken konnten die Organismen anschließend weder mit Kultivierungsmethoden noch mit qPCR wiedergefunden werden – sie waren also vollständig eliminiert.

Unter ungünstigen Betriebsbedingungen ist jedoch trotz Einsatz intensiver Desinfektionsverfahren (z. B. sequenziell 24 h 50 mg/L ClO_2 / 3 min 70°C / 24 h 50 mg/L ClO_2) ein Überleben und/oder Aufwachsen von kultivierbaren bzw. unkultivierbaren Stadien von *P. aeruginosa* aus dem Biofilm möglich. Zu den ungünstigen Bedingungen gehören:

⇨ Erhöhter Nährstoffgehalt im Wasser und / oder aus dem Werkstoff, der zu einem starken Biofilm Wachstum führt (z. B. 100 µg L^{-1} Acetat-C im Wasser oder bei einem Werkstoff, der biologisch verwertbare Substanzen abgibt, z. B. EPDM, auch mit Empfehlung für Trinkwassereinsatz nach W 270)

⇨ Unzulässige Betriebstemperaturen gemäß den allgemein anerkannten Regeln der Technik (aaRdT) (~37°C), die im Falle der Krankheitserreger *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* eine starke Vermehrung der Bakterien begünstigen und sogar beschleunigen können.

5.2 *P. aeruginosa* kann intensive diskontinuierliche Desinfektionsmaßnahmen (mit oxidierenden Desinfektionsmitteln oder durch thermische Desinfektion) in den Biofilmen von Einbauteilen überleben und das System nach Abschluss der Maßnahme wieder kontaminieren.

In praxisnahen Versuchsreihen war *P. aeruginosa* nach einer Anlagendesinfektion sowohl mit kulturellen als auch mit kulturunabhängigen Methoden in der Wasserphase nachweisbar, nicht aber im Biofilm der Rohrinnenoberfläche. *P. aeruginosa* konnte in den Biofilmen in Toträumen von Einbauteilen der Installation überleben, weil er an diesen Stellen vor den Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen geschützt war. Bei diesen Einbauteilen handelte es sich um Kunststoffverbinder, Rückschlagventile oder Probenahme-Armaturen. Von diesen Stellen aus erfolgte dann eine Re-Kontamination des Systems. Erst durch Ausbau und separate Sterilisierung bzw. durch Austausch der Bauteile konnten die Versuchsstrecken erfolgreich saniert werden.

5.3 Bei Anwesenheit eines autochthonen Trinkwasser-Biofilms kann die Vermehrung von *P. aeruginosa* auf der Rohrinnenoberfläche im Vergleich zu einer unbesiedelten Oberfläche gehemmt sein.

In eintägigen Laborversuchen konnte beobachtet werden, dass ein stark ausgeprägter autochthoner Biofilm die Vermehrung von eingetragenen *P. aeruginosa* einschränken kann. Möglicherweise besteht eine Konkurrenzsituation um Nährstoffe und Lebensraum zwischen *P. aeruginosa*-Zellen und den Bakterien des autochthonen Trinkwasser-Biofilms. *P. aeruginosa* kann zwar im Biofilm überleben, sich jedoch nicht so stark vermehren, wie auf einer unbesiedelten Oberfläche. Diese Beobachtung wurde auf den Rohrwerkstoffen PE-Xc, Edelstahl und am deutlichsten

auf EPDM (jedoch nicht auf Kupfer) festgestellt und grundsätzlich in praxisnahen Langzeitversuchen bestätigt.

5.4 Eine diskontinuierliche Desinfektion des autochthonen Trinkwasser-Biofilms auf Rohrinnenoberflächen ohne gleichzeitige Entfernung der Kontaminationsquelle kann zu einer verstärkten Aufkeimung von *P. aeruginosa* im gesamten System führen.

In der Praxis kann häufig beobachtet werden, dass es nach einer Desinfektion zu einer verstärkten Aufkeimung von *P. aeruginosa* kommt. In den halbtechnischen Versuchsanlagen konnte ebenfalls 1 Tag nach Anlagendesinfektion unter bestimmten Bedingungen eine starke Aufkeimung von *P. aeruginosa* festgestellt werden. Die Gründe hierfür können zum einen *P. aeruginosa*-Zellen sein, welche die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen in Einbauteilen überlebt haben (siehe Kapitel 5.2) und wieder in die desinfizierten Bereiche eingespült wurden. Zum anderen können unter ungünstigen Randbedingungen *P. aeruginosa*-Zellen in Rohrstrecken der Installation überlebt haben. (siehe Kapitel 5.1). Dieses starke Aufwachsen wurde durch die Abwesenheit bzw. Inaktivierung des autochthonen Biofilms auf der Rohrinnenoberfläche in Folge der Anlagendesinfektion begünstigt (siehe Kapitel 5.3). Die beobachtete Aufkeimung nach Desinfektion war besonders stark auf EPDM und deutlich auf Stahl sowie auf PE-Xc ausgeprägt.

5.5 Für die langfristig erfolgreiche Sanierung einer kontaminierten Trinkwasser-Installation sollten folgende Maßnahmen Priorität vor intensiven Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen haben:

- **Elimination der Kontaminationsquelle**
- **Einhaltung der Betriebsbedingungen entsprechend den aaRdT**

Falls eine Sanierung notwendig ist, ist die zuverlässige Lokalisierung der Kontaminationsquelle erforderlich. Für die Sanierung selbst sind die allgemein anerkannten Regeln der Technik (aaRdT) hinsichtlich Planung und Ausführung gemäß DVGW-Arbeitsblatt W 551 unbedingt einzuhalten.

Die Durchführung diskontinuierlicher Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen kann jedoch in manchen Fällen erfolglos sein. Unter Umständen wird dadurch die Situation in der Installation sogar verschlechtert. Kontaminierte Einbauteile wie Absperrventile o.ä. müssen entfernt werden, wenn alle anderen Maßnahmen erfolglos sind.

5.6 Zu gering dosierte Desinfektionsmittel verändern die Populations-struktur in Biofilmen und selektieren nach Mikroorganismen mit erhöhten Toleranzen.

Durch den Einsatz subletaler Konzentrationen von verschieden oxidativen Substanzen auf Chlorbasis (Natriumhypochlorit, Chlordioxid und elektrochemisch-aktiviertes Chlor; kontinuierliche Behandlungen mit 0,15 mg/l Chlor oder Stoßbehandlungen mit 10 mg/l Chlor über 6 Stunden) konnte gezeigt werden, dass es im Anschluss an die Desinfektionsmaßnahmen immer wieder zum zyklischen Anwachsen des Biofilms kam. Dies könnte sowohl auf eine Toleranz gegenüber dem

Desinfektionsmittel als auch einer Neubesiedlung zurückgeführt werden. Die Desinfektionsmaßnahmen reduzierten zwar die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE/cm^2) deutlich, die Gesamtzellzahl (GZZ/cm^2) und der raster-elektronenmikroskopisch nachgewiesene Biofilm (Abbildung 3) verringerten sich hingegen nur geringfügig. Bei unzureichender Desinfektion nimmt die Biodiversität der Biozönose ab, bestimmte Spezies überleben jedoch. Diese weisen eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Desinfektionsmittel auf. Das bedeutet, dass die Desinfektion das erneute Auftreten von hygienisch relevanten Mikroorganismen begünstigen kann.

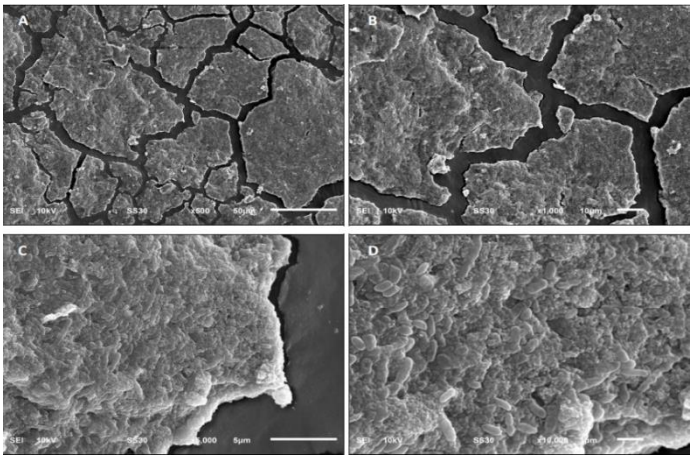


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener Vergrößerungen (siehe µ-Strich) nach Abschluss der Behandlung am 130. Ta

5.7 Zu gering dosierte Desinfektionsmittel können die Ausbildung von VBNC-Stadien begünstigen bzw. induzieren.

L. pneumophila ist in der Lage, VBNC-Stadien auszubilden. Bisher ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, inwiefern subletal dosiertes elektrochemisch-aktiviertes (ECA)-Chlor und Natriumhypochlorit einen Einfluss auf die Ausbildung dieser Stadien haben. Starke Indizien für die Ausbildung dieser Stadien ergeben sich unter Labor-bedingungen aus quantitativen Suspensionsuntersuchungen in Anlehnung an die EN 13623 in Kombination mit kulturunabhängigen Methoden (Membranintegritäts- und Esteraseaktivitäts-Untersuchungen). Der Konzentrationsbereich für die potentielle Ausbildung von VBNC-Stadien liegt bei 3 Tage alten Kulturen für beide Desinfektionsmittel im trinkwasserrelevanten Bereich von ca. 0,25-0,3 mg/l freiem Chlor bei 1 h Einwirkzeit. Bei jüngeren (2 Tage alten) Kulturen verschiebt sich der potentielle Induktionsbereich für VBNC-Stadien leicht nach oben auf ca. 0,4 mg/l.

Mit einem neu etablierten Microtiterplatten-PNA-FISH-Assay wurden vermutlich VBNC-Stadien bei *P. aeruginosa*, die durch ECA-Chlor, Chlordioxid und Natrium-hypochlorit induziert wurden, nachgewiesen. Nach 24 h Einwirkzeit konnten bei allen drei Chlorprodukten in den trinkwasserrelevanten Konzentrationsbereichen von 0,2–0,25 mg/l positive PNA-FISH-Signale detektiert werden, während der kulturelle Nachweis ausblieb. Die Kombination von Stoffwechselaktivität ohne Koloniebildung deutet auf das Vorliegen des VBNC-Zustandes hin.

5.8 Die Wirksamkeit von Desinfektionsmaßnahmen kann durch begleitende physikalische Maßnahmen gesteigert werden.

Kurze Desinfektionsmaßnahmen allein bergen das Risiko, dass sie aufgrund von vorhandenen Inkrustationen oder Biofilmen nur zu einer oberflächlichen Inaktivierung der Mikroorganismen führen. Gleichzeitig besteht durch die Zehrung des Wirkstoffes die Gefahr, dass die Konzentration des Desinfektionsmittels in den subletalen Bereich absinkt und zur Ausbildung von VBNC-Stadien führt. Nach Behandlung können die Bakterien aus dem VBNC-Stadium wieder in den kultivierbaren Zustand zurückkehren und zu erhöhten kulturellen Befunden beitragen. Nur eine intensive Entfernung der Biofilme, beispielsweise durch das Impulsspülverfahren, beseitigt den Biofilm weitgehend und minimiert die Zehrung des Desinfektionsmittels. Die Kombination von Impulsspülverfahren und Desinfektion kann Biofilme bis unter die Nachweisgrenze verringern. Auch die Heißwasserspülung bei Temperaturen über 80 °C, die zu einer weitgehenden Beseitigung des Biofilms führen, kann eine wirksame Kombination aus mechanischer Reinigung und thermischer Desinfektion darstellen. Dies wurde in Experimenten mit Biofilm-Monitoren gezeigt.

5.9 Der kontinuierliche Einsatz von Chlor/Chlordioxid (max. 0,3 bzw. 0,2 mg/L) kann zu einem verstärkten Auftreten von nicht kultivierbaren *P. aeruginosa* führen.

Die Trinkwasserdesinfektion mit freiem Chor oder Chlordioxid stellt einen Stressfaktor dar, der den kulturellen Nachweis von *P. aeruginosa* in der Wasserphase verringert, während der Organismus mittels molekularbiologischer Methoden noch nachgewiesen werden konnte. Ohne die kontinuierliche Zugabe von Desinfektionsmittel nach einer Desinfektionsmaßnahme wurde innerhalb weniger Wochen ein Wiederauftreten des Organismus im Wasser beobachtet, der dann sowohl kulturell als auch kulturunabhängig nachweisbar war.

Die Einnistung von *P. aeruginosa* als Vertreter der fakultativ-pathogenen Bakterien konnte unabhängig vom Alter des Biofilms (0,1 u. 3 Jahre), der Zusammensetzung der Biozönose oder den Einnistungsbedingungen (20°C, 37°C) in unterschiedlichen Biofilmmodellen erfolgen. Der Zielorganismus konnte die wöchentlichen Stoßbehandlungen (10 mg/l Chlor, 6 h) überdauern, wobei bereits ab dem ersten Behandlungstag ein kultureller Nachweis von *P. aeruginosa* ausblieb. Der Nachweis mittels qPCR war jedoch über die gesamte Dauer des Versuchs (115 Tage) positiv und deutet zusammen mit den parallel durchgeführten positiven PNA-FISH Signale auf die Induzierung von VBNC-Stadien hin. Diese Beobachtung unterstreicht noch einmal, dass für die Reduktion von VBNC im Vergleich zur Eradikation von koloniebildenden Einheiten höhere Wirkstoffkonzentrationen oder längere Einwirkzeiten erforderlich sind.

5.10 Die Simulationsrechnung zeigt, wo unzureichend durchströmte Bereiche in Trinkwasser-Installationen vorkommen. Sie hilft, Bauteile zu optimieren, um Probleme im Betrieb und bei der Reinigung sowie Desinfektion zu vermeiden.

Die Strömungssimulation von Bauteilen und Abschnitten der Trinkwasser-Installation ermöglicht eine Analyse von Schwachstellen. Dies sind z. B. Bereiche von Strömungsschatten in Verbindern mit rechtwinkeligen Umlenkungen, in Ventilen und in Abgängen von T-Stücken. Abbildung 4 zeigt die Verteilung unterschiedlicher Fließgeschwindigkeiten im Innern von Verbindern. Verursacht werden die Strömungsmuster durch die hydraulischen Verhältnisse in Verbindern mit niedrigen und hohen Druckverlusten.

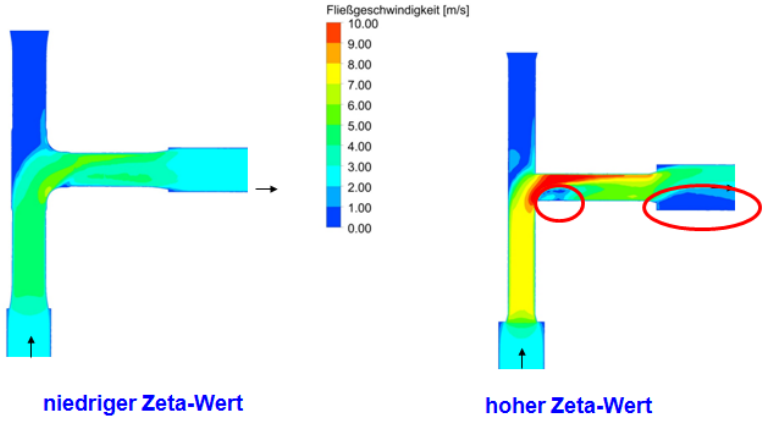


Abbildung 4: Hygienisch ungünstige Bereiche (blau) in Verbindern mit niedrigen (links) und hohen (rechts) Druckverlusten (Zeta-Werte)

Unzureichend durchströmte Bereiche in Verbindern und Bauteilen der Trinkwasser-Installation können im Betrieb zu einer erhöhten Biofilmbildung führen und sollten konstruktiv minimiert werden. Im Falle einer Kontamination werden diese Bereiche mit Wasser-Spülung bzw. Spülung mit Desinfektionsmittel-Lösungen nur unzureichend erreicht. Daher sind ausschließlich Reinigungsverfahren mit sehr hohen Fließgeschwindigkeiten wie das Spülen mit Luft/ Wasser nach EN 806 oder im Impulsspülverfahren zielführend. Gleiches gilt für die Desinfektion. Gegebenenfalls sind solche Bauteile gesondert zu desinfizieren (siehe DVGW Arbeitsblatt W 557).

5.11 Die Länge von wenig genutzten Abgängen sollte auf maximal das 3-fache des Innendurchmessers des Durchganges beschränkt werden.

Das Wasser in Abgängen von T-Stück-Installationen wird etwa bis zu einer Länge von 3 x ID (Innendurchmesser des Durchganges) ausreichend ausgetauscht. Darüber hinaus findet nur noch ein unzureichender Austausch statt (Abbildung 5) und es entstehen hygienische Risiken. Insofern ist das technische Regelwerk mit der 10 x ID-Regel zu überdenken. Dies gilt beispielsweise für Einzelzuleitungen von Trinkwasser-Installationen zu Löschwasserübergabestellen, aber auch für Verteiler und andere Abgänge.

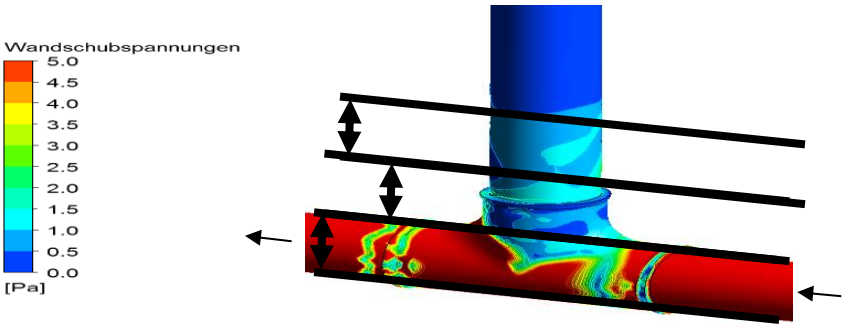


Abbildung 5: Ein Wasseraustausch findet in einem T-Stück-Abgang nur bis max. 3 x ID statt (Innendurchmesser der Durchgangsleitung)

6 Konsequenzen, Gesetze, Normen, Regelwerke und Biofilm-Management

6.1 Normen und Regelwerke setzen die gesetzlichen Anforderungen an die Trinkwasserbeschaffenheit technisch um.

In den Normen und Regelwerken werden die praktischen Erfahrungen bei Planung, Bau, Inbetriebnahme und Betrieb von Trinkwasser-Installationen niedergelegt. Eine theoretische Begründung erfolgt normalerweise nicht. Die „allgemein anerkannten Regeln der Technik“ haben einen hohen rechtlichen Stellenwert, besonders dann, wenn ihre Einhaltung in Gesetzen und Verordnungen ausdrücklich festgelegt ist. Eine bewusste Abweichung von diesen Regeln ist – im Schadensfall – begründet nachzuweisen (Vermutungs-Grundsatz).

6.2 Normen und Regelwerke nehmen – mit Ausnahme der VDI/DVGW-Richtlinie 6023 – allgemein keinen Bezug auf die Bedeutung der Biofilme für den hygienischen Betrieb von Trinkwasser-Installationen.

Biofilme sind in wasserführenden Systemen immer vorhanden, werden jedoch vom Praktiker als unerwünscht angesehen, weil sie bei der Wasserverteilung und in Trinkwasser-Installationen negative Auswirkungen auf die Wasserbeschaffenheit oder den Betrieb der Anlagen haben können. Dies führt zu teilweise unrealistischen Forderungen und Maßnahmen zur völligen Entfernung von Biofilmen. Erst in jüngster Zeit wurde das Thema in der Richtlinie VDI/DVGW 6023 aufgenommen. Die Prüfung und Bewertung von organischen Werkstoffen nach DVGW W 270 verwendet an Stelle von „Biofilm“ den Begriff „mikrobieller Bewuchs“.

6.3. Ein Biofilm-Management unter Berücksichtigung des VBNC-Zustandes von pathogenen Mikroorganismen ist die Voraussetzung für einen hygienisch einwandfreien Betrieb von Trinkwasser-Installationen.

Die Entstehung und weitere Anwesenheit von Biofilmen ist dahingehend zu beeinflussen, dass keine unerwünschten negativen Auswirkungen auf die Beschaffenheit des Trinkwassers auftreten. Ein Biofilm-Management umfasst die

Einflüsse auf die Wechselwirkung von Biofilm und Wasser und berücksichtigt, dass Anteile von Mikroorganismen-Populationen, die im Biofilm und im Trinkwasser vorkommen, mit Standardkulturverfahren nicht erfasst werden (VBNC-Zustand). Hygienisch relevante Mikroorganismen im VBNC-Zustand können in eine kultivierbare Form zurückkehren und dann auch wieder infektiös werden.

6.4. Das Biofilm-Management muss stärker in den technischen Regelwerken berücksichtigt werden, da es zum Verständnis der hygienischen Zusammenhänge und zur Begründung der in ihnen genannten Anforderungen beiträgt.

Die Analytik von Mikroorganismen muss die Erfassung des VBNC-Zustands berücksichtigen und in das Biofilm-Management mit einbeziehen. Aufwändige kulturunabhängige Untersuchungsverfahren müssen im Falle eines Verdachts auf eine Kontamination in deren Aufklärung einbezogen werden.

Das Biofilm-Management ist für die hinsichtlich der Trinkwasser-Installation geltenden Normen DIN EN 806 Teile 1 bis 5 und der nationalen Ergänzungsnormen DIN 1988 eine wichtige Ergänzung.

Die Prüfung der Eignung von Werkstoffen und Bauteilen im Kontakt mit Trinkwasser nach DVGW-Arbeitsblatt W 270 ist an die aus dem Forschungsvorhaben gewonnenen Erkenntnisse anzupassen. Gleiches gilt auch für die europäischen Prüfverfahren Biomasse-Produktions-Potenzial (BPP; ATP) und Messung der Sauerstoffzehrung (MDOD, BS 6920).

Für eine zukünftige Überarbeitung des DVGW-Arbeitsblattes W 551 ist die Einnistung von Legionellen in den Biofilm und die Abgabe an das Trinkwasser zu berücksichtigen. Dabei kann der VBNC-Zustand – besonders im Hinblick auf die Verwendung von Kupfer und Kupferlegierungen – von hygienischer Bedeutung sein.

Bei Verwendung von Kupferwerkstoffen kann eine hygienische Sicherheit anhand der Ergebnisse von Kulturverfahren nicht immer sichergestellt werden, weil beispielsweise Legionellen und *P. aeruginosa* in Anwesenheit von Kupferionen in den VBNC-Zustand übergehen.

Die technischen Regeln über die Desinfektion (DVGW-Arbeitsblätter W 224, W 225, W 229, W 291, W 557) sind an das Biofilm-Management unter Berücksichtigung des VBNC-Zustands anzupassen.

Ein fehlender intakter autochthoner Biofilm, wie z. B. nach einer Desinfektion, kann zu einer schnellen und starken Wiederverkeimung mit *P. aeruginosa* führen, wenn noch vereinzelte Zellen von *P. aeruginosa* die Desinfektion im Trinkwasser-System überlebt haben. Auch neu in Betrieb genommene Trinkwasser-Installationen ohne stabil ausgebildeten, autochthonen Biofilm sind besonders empfindlich für Wiederverkeimungen mit *P. aeruginosa*. Die natürliche Biofilmpopulation kann einen Einfluss auf das Ausmaß der Vermehrung von *P. aeruginosa* haben und sollte daher beim Biofilm-Management berücksichtigt werden.

6.5. In Gesetzen und Verordnungen über die Trinkwasserbeschaffenheit ist der Parameter *P. aeruginosa* einzuführen und mit einem technischen Maßnahmewert < 1 KBE/100 ml zu versehen.

P. aeruginosa kann sich im Biofilm einnisten, dort überdauern und auch vermehren. Die routinemäßige Überwachung auf diesen pathogenen Mikroorganismus kann wesentlich zur Verteilung eines hygienisch einwandfreien Trinkwassers beitragen (Exner et al., 2010).

Die ausbleibende Koloniebildungsfähigkeit bei gleichzeitigem Nachweis der Stoffwechselaktivität deutet auf VBNC-Zustände hin.

7 Glossar

5 K-Regel

Beim Vorliegen einer Trinkwasser-Installation mit einem Wasservolumen von größer als 3 L zwischen Trinkwassererwärmer und einer Entnahmestelle muss ein Zirkulationssystem eingebaut werden. Das Zirkulationssystem ist so zu bemessen und zu betreiben, dass im zirkulierenden Wasser die Temperatur zwischen Ausgang und Eintritt des Trinkwassererwärmers um nicht mehr als 5 Kelvin verringert wird.

AOC

Der AOC ist eine Fraktion des DOC und umfasst leicht assimilierbare organische Kohlenstoffe. Dies sind niedermolekulare, mikrobiell leicht verwertbare Substanzen, z. B. organische Säuren und Aminosäuren. Der AOC ist somit ein Maß für die Neigung zur Wiederverkeimung von Wasser. Trinkwasser mit einer AOC-Konzentration von 5 µg ac-C eq/L und DOC-Konzentration von 0,6 mg/L gilt als nährstoffarm.

BEAS-2B

BEAS-2B sind humane bronchiale Epithelzellen. Das bronchiale Epithel dient als Barriere gegenüber pathogenen Bakterien und besitzt die Möglichkeit, diese mittels einer spezifischen Immunantwort zu eliminieren (z. B. Zytokine). Da *Pseudomonoas aeruginosa* u. a. als Verursacher von Pneumonien bei der zystischen Fibrose bekannt ist, wurden für dieses Projekt humane Lungenzellen ausgewählt.

Biofilm

Unter dem Begriff „Biofilm“ werden alle Ansammlungen von Mikroorganismen an Grenzflächen (häufig: fest/flüssig) verstanden. Im Biofilm sind die Organismen in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet.

Biofilm-Populationen/Biozönose

Die Biozönose eines Biofilms besteht aus mikrobiellen Populationen und stellt die Gesamtheit aller Organismen dar, die eine Grenzfläche besiedeln. Die wichtigsten Vertreter in Trinkwasserbiofilmen sind Bakterien, Protozoen (Amöben, Flagellaten und Ciliaten) sowie auch Pilze. Diese verschiedenen Organismen bilden komplexe Lebensgemeinschaften (Biozönosen), die in vielfältiger Weise interagieren.

Chelator

Als Chelatoren bezeichnet man (meist organische) Verbindungen, die zwei oder mehr freie Elektronenpaare aufweisen und damit mehr als eine koordinative Bindung mit einem zentralen (Metall-)Ion eingehen können. Damit haben sie die Fähigkeit, zwei- oder mehrwertige Kationen in stabilen, ringförmigen Komplexen (sogenannte Chelate) zu fixieren. Beispiele: Natriumdiethyldithiocarbamat (DDTC), Ethylendiamintetraacetat (EDTA).

Chelatoren haben die Fähigkeit, in Lösung vorkommende freie Ionen (z. B. Cu^{2+}) zu binden und damit chemisch zu inaktivieren. Diese Eigenschaft benutzt man häufig,

um Ionen aus der Lösung auszukomplexieren und ihre toxische Wirkung auf den Organismus damit zu unterbinden.

Desinfektion
Desinfektion ist ein Prozess, durch den die Anzahl vermehrungsfähiger Mikroorganismen infolge Abtötung, Inaktivierung oder Entfernung unter Angabe eines standardisierten, quantifizierbaren Wirkungsnachweises reduziert wird mit dem Ziel, einen Gegenstand, einen Bereich oder ein Medium in einen solchen Zustand zu versetzen, dass von ihm keine Infektionsgefährdung mehr ausgehen kann. In der Regel geht man von einem desinfizierenden Effekt aus, wenn Bakterien um 5 log-Stufen, Mykobakterien, Hefen, Pilze und Viren um 4 log-Stufen und Sporen um 3 log-Stufen reduziert werden.

DOC
Der DOC (dissolved organic carbon) umfasst gelöste organische Kohlenstoffverbindungen.

Einnistung
Als Einnistung wird in diesem Projekt der Vorgang bezeichnet, bei dem sich hygienisch relevante Organismen (hier *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*) in einen bestehenden Biofilm integrieren, so dass sie darin zeitweise oder dauerhaft vorhanden sind (Persistenz).

Erhaltungsstoffwechsel:
Bei sehr geringen Nährstoffkonzentrationen nehmen die Zellen diese Nährstoffe auf und verwerten sie, allerdings nur dazu, die Zelle am Leben zu erhalten und nicht zu ihrem Wachstum. Vermutlich sind viele Bakterien unter natürlichen Bedingungen sehr lange im Erhaltungsstoffwechsel. Möglicherweise ist dies einer der Gründe dafür, dass an niedere Substratkonzentrationen angepasste Zellen, eben solche im Erhaltungsstoffwechsel, bei Zufuhr von hohen Substratkonzentrationen, wie sie in den Standardmedien (komplexe Medien) vorliegen, nicht wachsen. Die vergleichsweise sehr hohe Substratkonzentration könnte zu Fehlregulationen des gesamten Stoffwechsels führen.

Fakultativ-pathogene Erreger
Erreger, die zur Auslösung von Infektionskrankheiten spezifische Voraussetzungen benötigen, aber auch bei fehlender Immunsuppression Infektionskrankheiten auslösen können (z. B. *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*). Beispiele für spezifische Voraussetzungen: das Eröffnen des Zugangs zu normalerweise sterilen Körperbereichen (z. B. durch Kathetersysteme bzw. Fremdkörper), das Abtöten der physiologischen Mikroflora durch Antibiotika, Wunden oder eine Veränderung der physiologischen Abwehr.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)
Die FISH ist eine kultivierungsunabhängige Methode zum Nachweis von Mikroorganismen, bei der der Nachweis über fluoreszenzmarkierte Oligonucleotide („Gensonden“), die spezifisch an die ribosomale RNA der Zellen binden, erfolgt. Die markierten Zellen können dann mit einem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden. Die Spezifität der Gensonden kann beliebig gewählt werden, von art- bis familien- oder domänenspezifisch.

Gentoxizität
Als Gentoxizität bezeichnet man die Eigenschaft einer biologischen oder chemischen Substanz, eine Schädigung oder Veränderung des Erbguts (genetisches Material, DNA) in der Zelle zu verursachen.

Hygienisches Risiko
Der Begriff „Risiko“ umfasst entsprechend dem Bericht der Risikokommission (2003) die qualitative und/oder quantitative Charakterisierung eines Schadens hinsichtlich der Möglichkeit seines Eintreffens und der Tragweite der Schadenswirkung. Die Weltgesundheitsorganisation definiert Risiko als die Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses, einen Schaden in einer exponierten Population innerhalb eines bestimmten Zeitraumes und unter Berücksichtigung der Größe des Schadens auszulösen. Die Wahrscheinlichkeit, dass es in einem bestimmten Zeitraum zu Schäden bei einer Person, einer Gruppe von Personen, Pflanzen, Tieren und/oder der Ökologie in einer spezifischen exponierten Region auf eine spezifische Dosis oder Konzentration von einem schädigenden Agens kommt, hängt sowohl von dem Grad der Toxizität eines Agens als auch dem Ausmaß der Exposition ab.
Das „hygienische Risiko“ beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Gesundheitsschaden sowohl Individuen als auch die öffentliche Gesundheit betrifft. Die Wahrscheinlichkeit eines Schadens bezieht sich hierbei z. B. auf Infektionen, Erkrankung, Tod oder Behinderung, welche in einem spezifischen Zeitraum auftritt.
Im engeren Sinne wird der Begriff “hygienisches Risiko“ häufig auf das Risiko einer Infektion bezogen, wobei jedoch die Disziplin der Hygiene sich auch mit anderen Risiken befasst.

Koloniezahl
Die Koloniezahl ist die Zahl von sichtbar werdenden Kolonien, die sich aus einer definierten Probenmenge bei festgelegtem Nährstoffangebot, festgelegter Bebrütungstemperatur und innerhalb einer bestimmten Zeit in oder auf einem Agar-Nährmedium entwickeln. Es handelt sich um eine Methode zur Bestimmung der Konzentration kultivierbarer heterotropher Mikroorganismen ("heterotrophic plate count"-Methode, HPC-Methode). Die Angabe der Konzentration erfolgt als koloniebildende Einheiten (KBE) bezogen auf ein Volumen oder eine Fläche. Die Bestimmung der Koloniezahl als Indikatorparameter nach der Trinkwasser-verordnung in 1 mL des zu untersuchenden Wassers dient zur Erfassung von bestimmten hygienisch relevanten Mikroorganismen auf einem relativ nährstoffreichen Nährmedium. Zur Erfassung eines erweiterten Spektrums

heterotropher Bakterien in Wasser- und Biofilmproben werden häufig ein nährstoffarmes Nährmedium (R2A-Medium), längere Bebrütungszeiten (z. B. 7 Tage) und niedrige Temperaturen (z. B. 20 °C) verwendet.

Legionellen, *L. pneumophila*
Der Begriff Legionellen bezeichnet im deutschen Sprachgebrauch die Gattung *Legionella*. Diese Gram-negativen, schlank oder kokkoid stäbchenförmigen, aeroben Bakterien mit komplexen Nährstoffanforderungen sind monopolar begeißelt und damit beweglich. Man unterscheidet über 50 verschiedene Arten anhand unterschiedlicher morphologischer, physiologischer und genetischer Charakteristika. Legionellen sind an feuchten und bevorzugt warmen Standorten zu finden, natürliches Habitat sind Gewässer und feuchte Böden. Kühltürme, Klimaanlagen, Trinkwasser-Installationen etc. stellen durch Aerosolbildung eine Infektionsgefahr für den Menschen dar. *L. pneumophila* ist ein fakultativ humanpathogenes Bakterium innerhalb der Gattung *Legionella,* das 80 – 85 % aller Legionellosen (meist in Form einer Pneumonie) verursacht. Auch wenn in Dokumentation und Sprachgebrauch einiger Gesundheitsämter der Sammelbegriff „Legionellen“ weit verbreitet ist, werden Trinkwasserproben oft speziell auf die Art *L. pneumophila* hin untersucht.

Mikrokern-Test
Der Mikrokern Test wird zum Nachweis von DNA-Schäden (Gentoxizität) auf chromosomaler Ebene eingesetzt. Mikrokerne entstehen, wenn Zellen nicht mehr in der Lage sind, das Erbmaterial auf Grund von Chromosomenbrüchen oder –verlusten zu gleichen Teilen auf beide Tochterkerne zu verteilen. Die Chromosomen(-fragmente), die nicht in die Tochterkerne integriert werden, kondensieren und liegen dann als Mikrokern(e) vor. Der Nachweis erfolgt mikroskopisch.

MTT-Test
Der MTT-Test dient zur Messung der Lebensfähigkeit von eukaryotischen Zellen über die Bestimmung der Stoffwechselaktivität. Dabei wird das gelbe wasserlösliche MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in lebensfähigen Zellen metabolisch zu einem blau-violetten wasserunlöslichen Formazan reduziert. Der Anteil lebensfähiger Zellen korreliert dabei mit der Menge des umgesetzten Farbstoffes (DIN EN ISO 10993-5:2009-10).

Nährstofflimitierung:
Von einer Nährstofflimitierung spricht man, wenn die Zellen mit den verfügbaren Nährstoffen nicht mehr wachsen können, sondern nur noch Erhaltungsstoffwechsel betreiben.

Obligat-pathogene Erreger
Erreger, die bei fehlender spezifischer Immunität bei gesunden Personen Infektionskrankheiten auslösen (z. B. *Vibrio cholerae*, *Salmonella* Typhi, *Shigella* spp. etc.).

Opportunistisch-pathogene Erreger
Erreger, die nahezu ausschließlich bei deutlicher Einschränkung des Immunsystems Infektionskrankheiten auslösen (z. B. bei bestehender schwerer Immunsuppression).

Pathogen
Pathogene sind Krankheitserreger wie Bakterien, protozoische Parasiten, Pilze oder Viren.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten.

Proliferationstest (xCELLigence)
Das xCELLigence System erlaubt das Echtzeit-Monitoring von zellulären Veränderungen über die Messung des elektrischen Widerstands. Die Zellen wachsen dabei auf Mikroelektroden und eine Veränderung der Zellen (Anhaftung, Ablösen, strukturelle Veränderung) führt zu einer Veränderung der elektrischen Impedanz zwischen dem Zellkulturmedium und den Sensoren der Elektroden. Eine Verringerung der Impedanz ist daher einhergehend mit toxischen Effekten.

Pseudomonaden, *P. aeruginosa*
Der Begriff Pseudomonaden im morphologischen Sinne bezeichnet allgemein alle Gram-negativen, stäbchenförmigen Bakterien mit geringen Nährstoff-Anforderungen, die polar begeißelt und damit beweglich sind. Pseudomonaden sind ubiquitär verbreitet, also im Boden und Wasser sowie assoziiert mit Pflanzen, Tieren und Menschen zu finden.
P. aeruginosa ist ein fakultativ humanpathogenes, aerobes Bakterium innerhalb der Gattung *Pseudomonas*, das häufig nosokomiale Infektionen im Krankenhaus verursacht und bevorzugt immunsupprimierte Menschen infiziert. Pyocyanin- und Fluoreszein-Bildung sind charakteristische Merkmale, welche die Unterscheidung zu anderen Vertretern der Gattung ermöglichen und auf die im kulturellen Nachweis geprüft wird. Auch wenn in Dokumentation und Sprachgebrauch einiger Gesundheitsämter der Sammelbegriff „Pseudomonaden“ weit verbreitet ist, werden Trinkwasserproben meist speziell auf die Art *P. aeruginosa* hin untersucht.

Quantitative PCR (qPCR)
Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird mit Hilfe eines Fluoreszenzsignals die vervielfältigte Menge der DNA bei der Vervielfältigung mit gemessen.

Reinigung
Unter Reinigung wird ein Prozess zur Entfernung von Verunreinigungen (z. B. abiotische Substanzen, Mikroorganismen, organische Substanzen) unter Verwendung von Wasser u. U. mit reinigungsverstärkenden Zusätzen (z. B. Detergenzien oder enzymatische Produkte) oder mechanischen bzw. mechanisch-physikalisch wirkenden Hilfsmitteln oder Verfahren verstanden, ohne dass bestimmungsgemäß eine Abtötung/Inaktivierung von Mikroorganismen stattfindet bzw. beabsichtigt ist. Die Reinigungswirkung ist bisher nicht quantifiziert oder in anderer Weise standardisiert.

Technischer Maßnahmenwert für Legionellen
In der Trinkwasserverordnung besteht für *Legionella* spec. ein technischer Maßnahmenwert, der 100 KBE pro 100 ml Trinkwasser beträgt. Der technische Maßnahmenwert ist der Wert, bei dessen Überschreitung Maßnahmen zur hygienisch-technischen Überprüfung der Trinkwasser-Installation im Sinne einer Gefährdungsanalyse eingeleitet werden müssen.

Trinkwasser und erwärmtes Trinkwasser
Trinkwasser ist das für den menschlichen Gebrauch geeignete Wasser (TrinkwV § 3, 1a) mit den Güteeigenschaften nach DIN 2000 („Leitsätze für die zentrale Trinkwasserversorgung“ und nach DIN 2001 „Trinkwasserversorgung aus Kleinanlagen und nicht ortsfesten Anlagen“). Seine Beschaffenheit regelt die Trinkwasserverordnung (TrinkwV). Trinkwasser sollte eine Temperatur von ≤ 25 °C haben.
Erwärmtes Trinkwasser ist Trinkwasser aus Trinkwasser-Erwärmungsanlagen (TWE-Anlagen), welches für den menschlichen Gebrauch, insbesondere zum Trinken und zur Zubereitung von Nahrungsmitteln, verwendet wird. Im Regelfall gelangt es über dieselbe Armatur wie das (kalte) Trinkwasser zum Verbraucher. Der Temperaturbereich für Trinkwarmwasser liegt zwischen 25 °C und 85 °C.

Trinkwasser-Installation
Die Trinkwasser-Installation ist die Gesamtheit aller Rohrleitungen, Armaturen und Apparate, die sich zwischen dem Punkt des Übergangs von Trinkwasser aus einer Wasserversorgungsanlage an den Nutzer und dem Punkt der Entnahme von Trinkwasser befinden (TrinkwV § 3, 3).

Trypanblau-Test
Der Trypanblau-Test dient dem Nachweis der Vitalität von eukaryotischen Zellen. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der auf Grund seiner Größe nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringt und dort an Zellproteine bindet.

Überschreitung des technischen Maßnahmenwertes
Wird der technische Maßnahmenwert für Legionellen von 100 KBE/100 mL überschritten, so ist der Unternehmer oder sonstige Inhaber einer Wasserversorgungsanlage verpflichtet, unverzüglich:

1. Untersuchungen zur Aufklärung der Ursachen durchzuführen oder durchführen zu lassen; diese Untersuchungen müssen eine Ortsbesichtigung sowie eine Prüfung der Einhaltung der allgemein anerkannten Regeln der Technik einschließen,
2. eine Gefährdungsanalyse zu erstellen oder erstellen zu lassen und
3. die Maßnahmen durchzuführen oder durchführen zu lassen, die nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik (a. a. R. d. T.) zum Schutz der Gesundheit der Verbraucher erforderlich sind. Hierzu sind die Empfehlungen des Umweltbundesamtes zu beachten (s. Literaturliste).

VBNC ("viable but nonculturable"; lebend, aber nicht kultivierbar)
Zustand von Bakterien, die sich normalerweise auf konventionellen Nährmedien unter üblichen Bebrütungsbedingungen kultivieren lassen, sich aber nun im Erhaltungsstoffwechsel befinden und nicht mehr vermehren. Deshalb bilden sie auch keine Kolonien auf Agar-Nährmedien, obwohl ihre Lebensfähigkeit (Vitalität) potenziell erhalten bleibt. VBNC-Bakterien lassen sich mit kultivierungsunabhängigen (häufig biochemischen oder molekularbiologischen) Verfahren nachweisen. Bakterien im VBNC-Zustand besitzen funktionelle Zellmembranen, intakte DNA und weisen noch Stoffwechsel- und Atmungsaktivität auf. Den VBNC-Zustand auslösende Faktoren sind ungünstige Umgebungstemperatur, Nährstoffmangel oder die Anwesenheit von Desinfektionsmitteln und toxischen Metallionen. Unter günstigen Umweltbedingungen können VBNC-Bakterien wieder kultivierbar und im Fall von Krankheitserregern potenziell infektiös werden.

Zytotoxizität
Als Zytotoxizität bezeichnet man die Eigenschaft einer Substanz (z. B. bakterielle Toxine, Antikörper, Arzneistoffe); Zellen und Gewebe zu schädigen. Diese Schädigung kann im Zuge einer Immunreaktion auch durch Zellen des Immunsystems vermittelt werden, z. B. durch zytotoxische T-Zellen, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten.

Forschungspartner:

Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit Universität Bonn

AG Medizinische Geographie und Public Health:
Prof. Dr. Thomas Kistemann (Teilprojekt 1)
Dr. Christiane Schreiber (Teilprojekt 1)
Dr. Sebastian Völker (Teilprojekt 1)
Heike Müller B.Sc. (Teilprojekt 1)
Nicole Zacharias (Teilprojekt 1)
AG Desinfektionsmitteltestung:
Prof. Dr. Martin Exner (Teilprojekt 4)
Dr. Jürgen Gebel (Teilprojekt 4)
Dr. Stefan Linke (Teilprojekt 4)
Dr. Swapna Kuriakose (Teilprojekt 4)
Sebastian Fischer (Teilprojekt 4)

DVGW-Forschungsstelle TUHH, Technische Universität Hamburg-Harburg

Dr. Bernd Bendinger (Teilprojekt 2)
Thomas Meier (Teilprojekt 2)

IWW Zentrum Wasser, Mülheim an der Ruhr

Bereich Angewandte Mikrobiologie:
Dr. Gabriela Schaule (Teilprojekt 3)
Dr. Susanne Grobe (Teilprojekt 3)
Prof. Dr. Elke Dopp (Teilprojekt 3)
Dr. Jessica Richard (Teilprojekt 3)

Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen

Prof. Dr. Hans-Curt Flemming (Teilprojekt 5 und Koordination)
Dr. Jost Wingender (Teilprojekt 5)
Zenyta Dwidjosiswojo (Teilprojekt 5)

Institut für Technischen Umweltschutz, TU Berlin

Prof. Dr. Ulrich Szewzyk (Teilprojekt 6)
Michael Kliefoth (Teilprojekt 6)

Industriepartner:

Brita GmbH, Taunusstein, DB Regio AG, Frankfurt / Deutsche Bahn AG, Berlin, Domatec GmbH, Mühldorf, European Copper Institute, Düsseldorf, Geberit International AG, Jena, Georg Fischer JRG AG, Sissach/Schweiz, Grünbeck Wasseraufbereitung GmbH, Höchststädt/Donau, Hammann GmbH, Annweiler am Trifels, Pall GmbH, Dreieich, Rehau AG + Co, Erlangen, Stadtwerke Duisburg, Duisburg, Viega GmbH & Co. KG, Attendorn, Zweckverband Gruppenwasserwerk Dieburg, Babenhausen

Steering Committee:

Prof. Dr. Hans-Curt Flemming (Koordination), Dr. Bernd Bendinger, Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Exner, Dr. Jürgen Gebel, Prof. Dr. Thomas Kistemann, Dipl.-Ing. Werner Nissing, Dr. Gabriela Schaule, Prof. Dr. Ulrich Szewzyk, Dr. Jost Wingender

Hinweis

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WT1153 - 02WT1157 und des DVGW Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e. V., Bonn gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Dank

Das Projekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert. Es wird herzlich dafür gedankt, dass diese Arbeiten möglich gemacht wurden. Für die geduldige und kompetente Betreuung durch Frau Vera Horak und Frau Iris Bernhardt vom Projektträger Wasser in Dresden sind wir ganz besonders dankbar. Auch dem DVGW wird für die Förderung des Projekts gedankt.

Nicht weniger dankbar sind wir den Industriepartnern für ihre tatkräftige, inhaltliche, konstruktiv-kritische und immer wieder erfrischende Unterstützung des Projektes.