

Erkenntnisse aus dem BMBF-Verbundprojekt
„Biofilme in der Trinkwasser-Installation“

Version 2.1 - mit Glossar

Projektdauer: 01.10.2006 – 30.04.2010
5 Forschungspartner, 17 Industriepartner
Koordination: Prof. Dr. Hans-Curt Flemming

Impressum:

Für das Projektkonsortium: Prof. Dr. Hans-Curt Flemming
IWW Mülheim, Moritzstraße 26, 45476 Mülheim
Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen, Universitätsstr. 2,
45141 Essen

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an
Prof. Flemming, e-mail: hc.flemming@uni-due.de

Inhalt

Presseerklärung: Die letzten Meter auf dem Weg zum Wasserhahn	Seite 4
Die wichtigsten Erkenntnisse des Forschungsprojektes in Thesen-Form	Seite 7
1. Alle wasserbenetzten Oberflächen in der Trinkwasser-Installation sind von Biofilmen besiedelt	Seite 8
2. Werkstoffe und Trinkwasser sind die „ersten Verdächtigen“ als potenzielle Nährstoffquelle für verstärkte Biofilm-Bildung	Seite 8
3. Die Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaften variiert und wird von verschiedenen Einflüssen bestimmt	Seite 10
4. Thermo-oxidative Maßnahmen zur Anlagen-desinfektion führen zu Werkstoffalterung	Seite 11
5. Durch Alterung verursachte Veränderungen der Werkstoffe haben einen Einfluss auf die Biofilmbildung	Seite 11
6. Die prophylaktische Desinfektion der Trinkwasser-Installation ist kritisch zu betrachten	Seite 14
7. Die Beurteilung des Biofilmwachstums ist abhängig von der angewandten Methode	Seite 14
8. <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> können sich in vorhandene Trinkwasser-Biofilme einnisten und in stagnierendes Trinkwasser ausgetragen werden	Seite 15
9. Die Trinkwasser-Installation: eine Grauzone in der Überwachung	Seite 18
10. Die Bestimmung der kultivierbaren Bakterien reicht allein nicht immer aus, um den hygienischen Status von Trinkwasser zu erfassen	Seite 19

11. Die Untersuchungen auf mikrobiologische Parameter lassen keine Rückschlüsse auf das Vorkommen von Legionellen und <i>P. aeruginosa</i> zu	Seite 21
12. In Anwesenheit von Metallionen kann der kulturelle Bakteriennachweis negativ sein, obwohl hygienisch relevante Organismen noch lebensfähig vorhanden sind	Seite 21
13. Eine wirksame Reinigung ist die Voraussetzung für den Erfolg von Desinfektionsmaßnahmen	Seite 22
14. Desinfektion ist nicht gleichbedeutend mit Reinigung	Seite 22
15. Desinfektionen können die Populationen verändern und schnellwüchsige Bakterien begünstigen	Seite 23
16. Ein Übergang vom VBNC in das kultivierbare Stadium von <i>P. aeruginosa</i> kann durch Desinfektionsverfahren möglicherweise beeinflusst werden	Seite 24
17. <i>P. aeruginosa</i> und <i>L. pneumophila</i> können Reinigung und Desinfektion überleben	Seite 24
Bezug zu bestehenden Regelwerken und Gesetzen	Seite 25
Schlussfolgerungen	Seite 26
Abkürzungsverzeichnis	Seite 28
Glossar	Seite 29
Liste der Forschungs- und Industriepartner	Seite 35

Die letzten Meter auf dem Weg zum Wasserhahn

Trinkwasser ist das am besten überwachte Lebensmittel. Und die Qualität des Trinkwassers in Deutschland ist weltweit vorbildlich – bis zur Wasseruhr. Dann aber beginnt eine Grauzone: die Hausinstallation. Ihr galt die Aufmerksamkeit eines Forschungsprojektes, an dem fünf Forschungseinrichtungen und 17 Industriepartner vier Jahre lang geforscht haben, unter Koordination von Prof. Dr. Hans-Curt Flemming (IWW Mülheim und Uni Duisburg-Essen) und gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung. Die Ergebnisse lassen aufhorchen. Eine landesweite Befragung der Gesundheitsämter brachte zum Vorschein, dass höchstens die Hälfte der Gebäude, die sie zu überwachen haben, seit Beginn der Überwachungspflicht untersucht worden sind. Das liegt aber nicht daran, dass die Ämter inaktiv sind, sondern sie sind einfach überfordert und unterbesetzt. Die Methoden, mit denen die Untersuchungen durchgeführt werden, sind sehr unterschiedlich und führen daher auch nicht immer zu vergleichbaren Ergebnissen. Aber selbst unter diesen Bedingungen zeigt die statistische Auswertung von über 20.000 Messungen, dass 12 % der Warmwasser-Proben Legionellen und fast 3 Prozent Pseudomonaden enthielten, beide wurden aber auch wesentlich häufiger als erwartet im kalten Trinkwasser gefunden. Eindeutig ist, dass bei strikter Einhaltung der Regeln der Technik für das Betreiben der Hausinstallation keine Probleme auftreten. Aber da ist es ähnlich wie im Straßenverkehr: bei strikter Einhaltung der Straßenverkehrsordnung gäbe es auch keine Unfälle. Die Inspektionen zeigten nämlich, dass diese Regeln oft nicht eingehalten werden. Für die Hausinstallation ist der Betreiber verantwortlich, und dort fehlen oft Fachwissen, Problembewusstsein und langfristige Kontrolle. Epidemien brechen deshalb noch nicht aus, aber nicht unterschätzen sollte man Erkrankungen, die zum Ausfall von Arbeitszeit und zum Verlust an Lebensqualität führen und die auf Kontaminationen durch das Trinkwasser zurückzuführen sind.

Wie kommen diese Kontaminationen zustande? Trinkwasser ist nicht steril und muss es auch nicht sein. Die sehr erfolgreiche Strategie der Wasserwerke beruht darauf, den verbleibenden Bakterien die Nährstoffe zu entziehen und dadurch ein „stabiles“ Trinkwasser zu erzeugen. So lässt sich die Chlorung vermeiden. Wenn diese Bakterien aber auf Werkstoffe treffen, die ihrerseits Nährstoffe abgeben, setzen sie sich dort fest und bilden so genannte Biofilme. Übliche Verdächtige für solche Fälle sind Kunststoffe, die keine Prüfung auf Zulassung im Trinkwasser haben. Zum Beispiel können Duschkäpfe oder selbst kleine Dichtungen zum Paradies für Bakterien werden. In diesen Biofilmen können sich auch potenzielle Krankheitserreger einnisten und unter Umständen auch vermehren. Zum Teil werden sie dann wieder an das Wasser abgegeben und stellen ein hygienisches Risiko dar. Dies wurde in praxisnahen Modellsystemen untersucht und nachgewiesen. Gezeigt wurde auch, dass Gegenmaßnahmen mit verschiedenen Desinfektionsmitteln die Situation zwar verbessern, aber nicht grundlegend sanieren können. Deshalb ist die Qualität der Werkstoffe in der Hausinstallation entscheidend. Und viele Werkstoffe, die auf dem Markt angeboten werden – vor allem die besonders preiswerten – führen geradeswegs zur verstärkten Biofilmbildung. In der Hausinstallation ist die Verwendung geprüfter Werkstoffe nicht zwingend vorgeschrieben – und wer könnte das auch überwachen?

Im Rahmen dieser Forschungen zeigte sich aber auch noch ein anderes Problem, nämlich das der Untersuchungsmethoden. Gold-Standard ist heute noch die Bestimmung von Koloniezahlen. Allerdings kann man damit nur solche Keime finden, die sich auch vermehren können, sonst gibt es keine Kolonien. Wenn die Bakterien aber gestresst sind, z.B. durch Desinfektionsmittel, UV-Strahlung oder Erhitzung, dann kann es sein, dass eben nicht alle abgetötet werden, sondern viele nur in einen vorübergehend nicht-kultivierbaren Zustand übergehen. Dann sind sie keineswegs tot, aber vom Radar der Standard-Überwachungsverfahren verschwunden. Wenn sie sich erholt haben, können sie sich wieder vermehren und u. U. auch wieder infektiös werden, wie im Forschungsprojekt eindeutig gezeigt werden konnte. Dieses Phänomen dürfte die Erklärung für schwierige Fälle sein, in denen die Sanierung in der Praxis immer wieder problematisch ist, lang dauert und die Kontaminationen immer wieder aufflammen. Methoden, um auch „schlafende“ Keime zu erkennen, sind verfügbar und sie wurden im Forschungsprojekt ebenfalls angewandt und erprobt. Die entscheidende Frage ist aber nun: unter welchen Umständen gehen die Mikroorganismen in den Dämmerzustand über und wann und warum wachen sie wieder auf? Hier sind die Standard-Methoden überfordert, die sich für den Normalfall seit über 100 Jahren bewährt haben. Hier empfiehlt es sich daher dringend, auch die modernen molekularbiologischen Methoden zu nutzen, um Problemfälle aufzuklären. Anhand praktischer Problemfälle konnte der Nutzen dieser Methoden bis hin zur erfolgreichen Sanierung demonstriert werden – aber hier sind noch grundlegende Fragen offen.

Eine Konsequenz dieses erfolgreichen Forschungsprojektes war es, der Hausinstallation vermehrte Aufmerksamkeit zu schenken, denn hier kann das beste Wasser seine Qualität verlieren. Es wurden wichtige Hinweise auf Möglichkeiten gegeben, dies zu verhindern. Es zeigte sich aber auch, dass hier noch ein großer Forschungs- und Regulierungsbedarf besteht – nicht nur bei den Materialien, sondern auch bei den Untersuchungsverfahren. Die letzten Meter bis zum Wasserhahn sind entscheidend.

In einem verständlich formulierten Thesenpapier wurden die wichtigsten Erkenntnisse aus den Forschungsarbeiten zusammengefasst. Auf Anfrage ist es erhältlich beim IWW Zentrum Wasser (a.postulka@iww-online.de). Die Vorträge sind zugänglich über die Website des Projekts (biofilm-hausinstallation.de und iww-online.de). Der Tagungsband, in dem die wissenschaftlichen Arbeiten dokumentiert sind, kann ebenfalls beim IWW Zentrum Wasser bestellt werden.

Die wichtigsten Erkenntnisse des Forschungsprojektes in Thesen-Form

An diesem Verbund-Forschungsprojekt haben fünf Forschungseinrichtungen und 17 Industriepartner vier Jahre lang gearbeitet. Ziel war es, die Bedeutung von Biofilmen in der Trinkwasser-Installation als Kontaminationsquellen für hygienisch relevante Bakterien besser zu charakterisieren sowie die Möglichkeiten ihrer Vermeidung und Beseitigung zu ermitteln.

In der Trinkwasser-Installation innerhalb von Gebäuden gibt es - gegenüber dem gut regulierten und kontrollierten öffentlichen Trinkwasserverteilungssystem - eine Vielzahl von Werkstoffen, die bei verschiedenen Temperaturen und Durchfluss-Regimes verwendet werden. Trinkwasser ist nicht steril und braucht es auch nicht zu sein. Das bedeutet, dass ständig Mikroorganismen in Wasser führende Systeme eingetragen werden, die sich auf allen wasserbenetzten Oberflächen anlagern und zu Biofilmen entwickeln können. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich darunter auch hygienisch relevante Organismen befinden, die dann das Trinkwasser kontaminieren. Normalerweise wird das Biofilm-Wachstum dadurch begrenzt, dass durch die Wasseraufbereitung die Konzentration aller Stoffe, die sie zum Wachsen brauchen, so weit wie möglich limitiert wird. Im Gegensatz zu zentralen Trinkwasserverteilungssystemen werden in der Trinkwasser-Installation u. U. auch Werkstoffe eingesetzt, die ihrerseits Nährstoffe abgeben und auf diese Weise das Biofilm-Wachstum unterstützen. Außerdem kommt es im Vergleich zum öffentlichen Wasserverteilungssystem zu häufigeren und oft längeren Stagnationszeiten sowie zu unregelmäßiger Wasserabnahme. Wasserauslässe von Armaturen (z.B. Zapfhähne, Duschköpfe) können retrograde Kontaminationen verursachen.

Prävention und Kontrolle von Biofilmen müssen sich daher nicht nur auf das öffentliche Verteilungsnetz, sondern auch auf die Trinkwasser-Installation erstrecken. Das Forschungsprojekt hat gezeigt, dass es hier noch ein erhebliches Präventions-Potenzial gibt, das bisher nur sehr unzureichend genutzt wird.

In diesem Papier werden die wichtigsten Erkenntnisse in Form von Thesen umrissen, in denen die Kern-Aussagen formuliert werden und die von erklärendem Text begleitet werden. Im Abschlussbericht zu diesem Projekt sind die zugrunde liegenden Daten dokumentiert.

1. Alle wasserbenetzten Oberflächen in der Trinkwasser-Installation sind von Biofilmen besiedelt

Unter dem Begriff „Biofilm“ werden alle Ansammlungen von Mikroorganismen an Grenzflächen verstanden. Im Biofilm sind die Organismen in eine Schicht aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet. Sie können mikrobielle Lebensgemeinschaften bilden, die Zell-Zell-Kommunikation zwischen ihnen wird begünstigt, sie können Gene austauschen und weit höhere Konzentrationen an Desinfektionsmitteln tolerieren als in Suspension. In der früheren deutschen Trinkwasser-Literatur und auch im DVGW-Arbeitsblatt W 270 wird unterschieden zwischen „Oberflächenbesiedlung“, womit ein sehr dünner Biofilm gemeint ist, und „Oberflächenbewuchs“, womit ein ausgeprägter, deutlich gewachsener Biofilm gemeint ist. Vor dem Hintergrund der obigen Definition ist aber deutlich, dass sowohl Besiedlung als auch Bewuchs auf das gleiche Phänomen, nämlich den Biofilm, zurückgehen und hier nur ein quantitativer Unterschied beschrieben wird.

2. Werkstoffe und Trinkwasser sind die „ersten Verdächtigen“ als potenzielle Nährstoffquelle für verstärkte Biofilm-Bildung

Auch sehr nährstoffarmes, biologisch stabiles Trinkwasser enthält Mikroorganismen. Wenn sie auf Nährstoffe stoßen, können sie sich vermehren. Als Nährstoff-Quelle dienen häufig polymere fabrikneue Werkstoffe in der Trinkwasser-Installation, weil sie oft biologisch verwertbare Additive wie Weichmacher, Antioxidationsmittel oder noch Reste von Trennmitteln enthalten, oder bei der Herstellung bzw. Verarbeitung und Installation mit Substanzen verunreinigt wurden, die als Nährstoffe dienen. Die in diesem Projekt berücksichtigten Werkstoffe sind in Tabelle 1 aufgeführt. Unter praxisnahen Bedingungen bildet sich auf fabrikneuen Werkstoffen innerhalb von 1-2 Wochen bereits ein Biofilm, der nach weiteren 6-10 Wochen (je nach Werkstoff und Nährstoffkonzentration im Wasser) bei allen im Verbundprojekt untersuchten Werkstoffen, Wasserbeschaffenheiten und Temperaturen einen mehr oder weniger quasi-stationären Zustand erreicht. Die Besiedlungsdichte ist im Wesentlichen von der Werkstoffbeschaffenheit abhängig. Im Verbundprojekt wurde dies bei einem Vergleich innerhalb der Polymer-Werkstoffe und auch auf Kupfer beobachtet. Besonders stark und sogar mit bloßem Auge sichtbar war die Biofilm-Bildung auf dem synthetischen Gummiwerkstoff Ethylen-Propylen-Dien-Monomer (EPDM) mit einer geringen Qualität, die weder den Anforderungen nach DVGW-Arbeitsblatt W 270 noch denen der KTW-Empfehlung entsprach.

Tabelle 1: Werkstoffe, die im Projekt untersucht wurden

Werkstoffbezeichnung	Bedarfsgegenstand	Verwendungszweck	erfüllt DVGW W 270	KTW Kategorie
Kupfer	Metallrohr	Trinkwasser-Installation	--	-- ¹⁾
HD-PEXb	Verbundrohr	Trinkwasser-Installation	ja	A ²⁾
HD-PEXc	Kunststoffrohr	Trinkwasser-Installation	ja	A ²⁾
EPDM mit Empfehlung	Druckfeste flexible Schlauchleitung	Anschluss von Armaturen und Apparaten für sichtbare und zugängliche Installationen (Gruppe I) bis 31.12.06 ³⁾ ; Anschluss von Wasch-/Geschirrspülmaschinen und Trommel Trocknern (Gruppe II)	ja	C
EPDM ohne Empfehlung	Druckfeste flexible Schlauchleitung	Armaturen und Apparateanschluss in Hausinstallationen bis 1995	nein	keine

¹⁾ für metallische Werkstoffe nicht notwendig

²⁾ Plastomere erfüllen die „Leitlinie zur hygienischen Beurteilung von organischen Materialien im Kontakt mit Trinkwasser (KTW-Leitlinie)“ [Umweltbundesamt 2008]

³⁾ Druckfeste flexible Schlauchleitungen der Gruppe II und ab 01.01.2007 auch die der Gruppe I müssen die Prüfanforderungen der KTW-A einhalten (DVGW W 543)

Allerdings hat auch die Trinkwasserbeschaffenheit eine wesentliche Bedeutung bei der Entwicklung der Biofilme auf Werkstoffen. Durch das Trinkwasser können dem Biofilm z.B. limitierende Nährstoffe zugeführt werden. Eine Kombination aus schlechter Werkstoffqualität (EPDM ohne Empfehlung) und ungünstiger Wasserbeschaffenheit (Trinkwasser mit z.B. 12 mg/L Nitrat und 1 mg/L Phosphat) führt zu starker Biofilm-Entwicklung.

3. Die Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaften variiert und wird von verschiedenen Einflüssen bestimmt

Die Biofilmgemeinschaften in einer Trinkwasser-Installation können sich abhängig von verschiedenen Einflussfaktoren (Werkstoffe, Trinkwasserbeschaffenheit, Wassertemperatur, Desinfektionsmittel), unterschiedlich entwickeln. Zu den kritischsten Faktoren gehören die in der Trinkwasser-Installation verwendeten Werkstoffe, Hilfsmittel zur Installation (Dichtungen u. ä.), sowie u. U. auch Werkstoffe zur Restauration bestehender Leitungen.

Abhängig von den Nährstoffen entwickeln sich auf den Oberflächen Biofilmpopulationen, die sich in Bezug auf Zusammensetzung und Diversität unterscheiden. Werkstoffe, die organische Substanzen abgeben, fördern nicht nur das Biofilmwachstum in Bezug auf Biomasseentwicklung, sondern erhöhen auch das Spektrum an Biofilmorganismen, die in nährstoffarmem Trinkwasser sonst nicht dominant vorkommen können. Dies stellt dann auch eine Risikoerhöhung hinsichtlich Einnistung und Austrag pathogener Mikroorganismen dar.

4. Thermo-oxidative Maßnahmen zur Anlagendesinfektion führen zu Werkstoffalterung

Neu waren die vergleichenden Untersuchungen zur Biofilmbildung auf neuen und „alten“, d.h. unter dem Einfluss chemischer, speziell oxidativer Medien (Desinfektionsmittel) und Temperatur, veränderter Polymerwerkstoffe. Durch die Anwendung von Desinfektionsmitteln (z.B. bei Sanierungen oder Anlagendesinfektionen) und erhöhten Temperaturen kommt es zu Reaktionen an den Additiven der Polymerwerkstoffe und den Polymerketten selbst. Bekannt ist, dass das Ausmaß der dadurch bedingten Veränderung sowohl vom Desinfektionsmittel, dessen Einwirkzeit, der Temperatur als auch dem Druck im System abhängt. Die Folgen sind generell Änderungen der Werkstoff-Eigenschaften wie Hydrophobizität, Oberflächenstruktur, Rauheit, bis zur Rissbildung bei lang andauernder Einwirkung.

Versuche zur Biofilmbildung auf neuen und gealterten Werkstoffen wurden exemplarisch durchgeführt, wobei nach DVGW-Arbeitsblatt W 270 geprüfte Polymerwerkstoffe, ein Kautschuk aus Ethylen-Propylen-Dien-Monomer (EPDM) und ein silanvernetztes Polyethylen (HD-PEXb) eingesetzt wurden.

HD-PEXb und EPDM wurden in einem speziellen Testsystem beschleunigt gealtert. Dazu wurden die Werkstoffe bei einem Druck von 4 bar und einer Temperatur von 40 °C in Gegenwart von Natriumhypochlorit (2,5 mg/l) bzw. Chlordioxid (4 mg/l) über einen Zeitraum von 4 Wochen ausgesetzt. Dabei zeigte die Behandlung mit Chlordioxid eine stärkere Auswirkung.

Die Biofilmbildung wurde im Rahmen eines Multifaktorenansatzes untersucht. Für die Auswahl der Faktoren war deren Relevanz für die Biofilmbildung maßgeblich. Gleichzeitig wurden unterschiedlicher Trinkwasserqualitäten simuliert.

5. Durch Alterung verursachte Veränderungen der Werkstoffe haben einen Einfluss auf die Biofilmbildung

Bekanntermaßen haben Faktoren wie Nährstoff-Abgabe des Werkstoffes, Nährstoffgehalt des Wassers, Temperatur, Wasserhärte und DOC-Gehalt einen Einfluss auf die Biofilm-Bildung (Abbildung 1). Neu war die Erkenntnis, dass auch das Alter des Werkstoffes (Bauteils), also das Maß der durch oxidative Reaktion bedingten Veränderung eine Rolle spielt. Die Auswertung des Multifaktorenansatzes zur Biofilmbildung zeigte, dass im Sinne der obigen Definition „altes“ und damit an niedermolekularen Additiven verarmtes EPDM und HD-PEXb tendenziell ein geringeres Biofilmbildungspotential aufwies. Es ist anzunehmen, dass vom gealterten Werkstoff geringere Mengen an biologisch abbaubaren Nährstoffen den Mikroorganismen an der Werkstoffoberfläche abgegeben werden. Die Folge für die Praxis wäre ein geringeres Potential der Biofilm-Bildung auf älteren Kunststoffen und folglich geringerer Desinfektionsaufwand, was sich nicht zuletzt auch Material schonend auswirken würde.

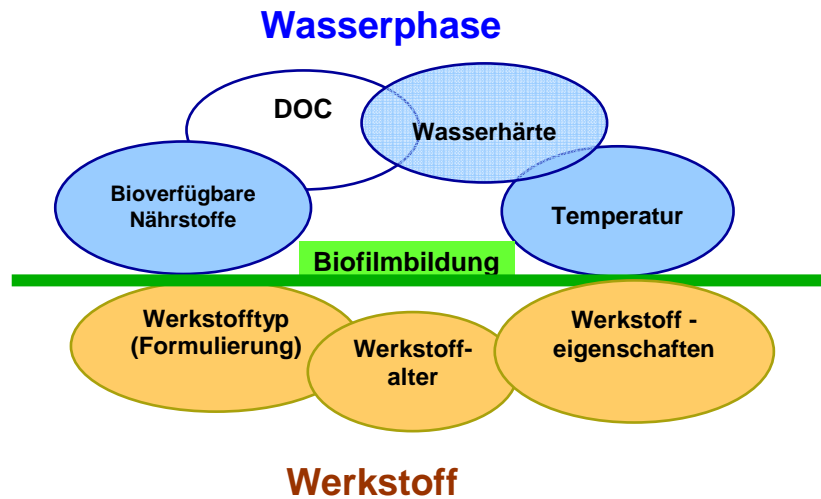


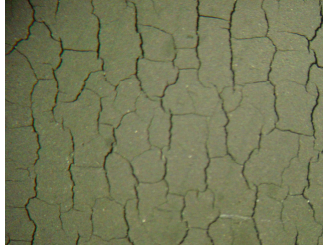
Abbildung 1: Faktoren mit Einfluss auf die Biofilmbildung

Die Ergebnisse der Multifaktorenversuche zeigten, dass die Biofilmbildung zwar von allen Faktoren beeinflusst wird, diese sich jedoch unterschiedlich stark auswirken:

- Der zur Verfügung stehende biologisch verfügbare Nährstoffgehalt stellte den wesentlichen Faktor bei der Biofilmbildung dar.
- Die Biofilmbildung war stark von der Temperatur, dem biologisch verfügbaren Nährstoffgehalt des Wassers und dem Werkstoffalter, jedoch nur gering von Wasserhärte und DOC-Gehalt abhängig.
- Alte Werkstoffe (EPDM, HD-PEXb) wiesen ein geringeres Biofilmbildungspotenzial auf.
- Wenn der Werkstoff wenig Nährstoffe abgab, kam der Nährstoffgehalt des Wassers deutlich mehr zum Tragen.
- Die Temperatur hatte einen Einfluss; dieser war dann gegeben, wenn Nährstoffe entweder aus dem Wasser oder dem Werkstoff zur Verfügung standen. Eine höhere Temperatur führt dann zu einer stärkeren Biofilmbildung.
- Die Qualität des Werkstoffes wirkte sich bei Wässern mit niedrigem Nährstoffgehalt stärker aus als bei einem Wasser mit hohem Nährstoffgehalt.

Die Rissbildung verringert vor allem die Funktionsdauer, Risse stellen allerdings auch ein indirektes hygienisches Risiko dar, da Bakterien sich in ihnen ansiedeln und schlechter entfernt bzw. vom Desinfektionsmittel nicht genügend erreicht werden (Abbildung 2).

altes EPDM



altes HD-PEXb

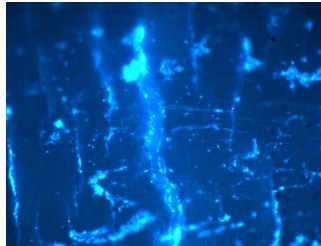
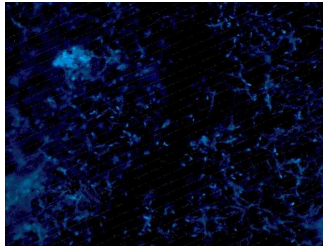


Abbildung 2: oben: Mikroskopische Bilder der Oberfläche von altem EPDM (links) und HD-PEXb (rechts)
unten: Fluoreszenzmikroskopische Bilder der besiedelten Oberflächen; Bakterien fluoreszieren als blaue Stäbchen

6. Die prophylaktische Desinfektion der Trinkwasser-Installation ist kritisch zu betrachten

Eine prophylaktische Behandlung der Trinkwasser-Installation widerspricht dem Minimierungsgebot der TrinkwV 2001 und kann folglich nur in begründeten Einzelfällen empfohlen werden. In jedem Fall bedarf eine Desinfektion einer klaren Indikation. Vorrangig ist, dass ein Trinkwasser von einwandfreier Beschaffenheit vorliegt und dass sich die Trinkwasser-Installation in einem Zustand befindet, der den allgemein anerkannten Regeln der Technik entspricht bzw. in einen solchen Zustand versetzt werden muss. Es muss hier auf §37 Abs. 1 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) hingewiesen werden, in dem folgende Anforderung formuliert ist: „Wasser für den menschlichen Gebrauch muss so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit, insbesondere durch Krankheitserreger, nicht zu besorgen ist.“

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens haben eindeutig die Bedeutung der Einhaltung der allgemein anerkannten Regeln der Technik bestätigt. Sie berücksichtigen das durchschnittliche Verbraucherverhalten und bieten dem Verbraucher eine hohe Sicherheit beim Genuss des Lebensmittels Trinkwasser. Abweichungen von diesen technischen Regeln erhöhen das Risiko einer hygienischen Beeinträchtigung des Trinkwassers. Diese Risiken können nicht durch eine prophylaktische Desinfektion oder andere Maßnahmen, z.B. Wasserbehandlung, beseitigt werden. Solche Maßnahmen sollten erst nach sorgfältiger Prüfung und ständiger Überwachung zeitlich begrenzt eingesetzt werden.

7. Die Beurteilung des Biofilmwachstums ist abhängig von der angewandten Methode

Die Wahl der Methode zur Quantifizierung der Mikroorganismen beeinflusst das Ergebnis. In der Trinkwasser-Überwachung werden ausschließlich kultivierungsabhängige Methoden verwendet. Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (ob als Koloniezahl nach TrinkwV 2001, TrinkwV 1990, oder als HPC auf R2A-Medium) gibt daher nur die Anzahl vermehrungsfähiger Organismen unter bestimmten Bedingungen wieder. Es ist aber bekannt, dass Mikroorganismen, die keine Kolonien bilden und nicht wachsen, also keinen Baustoffwechsel betreiben, deshalb nicht tot sein müssen. Vielmehr können sie über lange Zeit hinweg

reinen Erhaltungsstoffwechsel betreiben. Dies trifft für den größten Teil der Trinkwasser-Populationen zu. Sie tun dies oft als Antwort auf Stress-Situationen (Nährstoff-Mangel, Desinfektionsmittel, Strahlung, Metall-Belastung etc.) und können bei Aufhebung des Stresses in den kultivierbaren Zustand zurückkehren. In diesen Fällen handelt es sich nicht um eine Neu-Kontamination, sondern um die Erholung bereits vorhandener Organismen. Durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) mittels DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe und mikroskopischer Auszählung lässt sich die maximal vorhandene Menge an Zellen ermitteln, wobei allerdings nicht zwischen lebenden und toten Zellen differenziert werden kann. Dennoch gibt das Verhältnis zwischen GZZ und Koloniezahl bereits Hinweise auf den physiologischen Zustand einer mikrobiellen Population.

In allen Untersuchungen war die GZZ deutlich höher als die Anzahl der koloniebildenden Einheiten nach TrinkwV 2001 und 1990 sowie HPC auf R2A. In Abhängigkeit von Temperatur, Biofilmtalter und der Wasserbeschaffenheit variierte das Ergebnis der KBE-Bestimmungen (Koloniezahl nach TrinkwV 2001 und TrinkwV 1990, sowie HPC auf R2A). Generell waren die EPDM-Werkstoffe dichter besiedelt als Kupfer, HD-PEXc und HD-PEXb. Der Anteil der kultivierbaren Bakterien an der GZZ nahm mit zunehmendem Biofilmtalter ab.

Als eine der Konsequenzen aus dem Projekt wird empfohlen, in kritischen Fällen neben der Koloniezahl auch die GZZ zu bestimmen. Wenn das Verhältnis Koloniezahl zu Gesamtzellzahl hoch ist, dann deutet dies auf eine gut wachsende Population und damit auf das Vorhandensein günstiger Nährstoff-Bedingungen hin.

8. *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa* können sich in vorhandene Trinkwasser-Biofilme einnisten und in stagnierendes Trinkwasser ausgetragen werden

Werden fakultativ pathogene Bakterien in eine Trinkwasser-Installation eingetragen, so kann es unabhängig von Werkstoffqualität, Werkstoffalter, Wasserbeschaffenheit und Temperatur zur Einnistung dieser Organismen in vorhandene Trinkwasserbiofilme kommen. Die Organismen persistieren dort über Wochen bis Monate in kaltem und erwärmtem Trinkwasser. Unter günstigen Umgebungsbedingungen ist auch eine Vermehrung möglich. Durch die Freisetzung aus den Biofilmen gelangen sie in das Trinkwasser, so dass Biofilme eine Kontaminationsquelle und somit eine potentielle Infektionsquelle darstellen. Zu den fakultativ pathogenen Bakterien von medizinisch-hygienischer Bedeutung, die in der Praxis in Biofilmen der Trinkwasser-Installation nachgewiesen wurden, gehören *L. pneumophila* und *P. aeruginosa*.

Die Ergebnisse der halbtechnischen Versuchsanlage zeigten, dass sich *L. pneumophila* in Trinkwasser-Biofilme einnistete, besonders bei erhöhten Temperaturen, unabhängig von der Werkstoffqualität oder der Wasserbeschaffenheit. Eine Vermehrung fand besonders dann statt, wenn Amöben als Wirte für die intrazelluläre Vermehrung zur Verfügung standen, und wenn sehr dichte, aktive (wachsende) Biofilme vorlagen. Unter diesen Bedingungen ist grundsätzlich zu erwarten, dass Legionellen aus dem Biofilm freigesetzt und in das Trinkwasser ausgetragen werden. Die Konzentrationen an *L. pneumophila* in den Trinkwasserproben (gemäß DIN EN ISO 19458 „Analyse der Wasser-Beschaffenheit an einer Entnahme-Armatur im Haushalt“ (Zweck b)) können bei allen Werkstoffen über dem technischen Maßnahmewert von 100 KBE/100 mL gemäß DVGW-Arbeitsblatt W 551 liegen. Auch in den Biofilmen, die sich im Kaltwasser (12 °C bis 15 °C) entwickeln, konnte *L. pneumophila* mit den kulturellen Standarduntersuchungsverfahren (ISO 11731) sporadisch nachgewiesen werden. Die Konzentration von *L. pneumophila* im Biofilm ist abhängig von der Besiedlungsdichte. Werkstoffe, auf denen sich viel Biofilm bildet und sich viele Amöben entwickeln (z.B. EPDM-Werkstoffe ohne Empfehlung nach DVGW-Arbeitsblatt W 270), bieten das Potential für sehr hohe Konzentrationen an *L. pneumophila*. Hohe *L. pneumophila*-Konzentrationen im Biofilm führen zu hohen Konzentrationen im stagnierenden Trinkwasser. Die Temperatur spielt für die Vermehrung von *L. pneumophila* eine entscheidende Rolle. Daher ist darauf zu achten, dass Warmwasseranlagen dem Stand des DVGW-Arbeitsblattes W 551 entsprechen. Aber auch Kaltwasseranlagen können, wie im Rahmen des Verbundvorhabens durchgeführte experimentelle Untersuchungen sowie die bundesweite Erhebung und Risikoanalyse bestätigt haben, mit *L. pneumophila* kontaminiert sein und müssen daher bei Sanierungen von *L. pneumophila* Kontaminationsfällen bei der Gefährdungsanalyse mit berücksichtigt werden.

Auch *P. aeruginosa* nistet sich in Biofilme auf allen neuen und gealterten Werkstoffen der Trinkwasser-Installation ein und kann das umgebende stagnierende Wasser durch Freisetzung aus den Biofilmen kontaminieren. Die Dauer der Persistenz sowie die Konzentration der kulturell nachweisbaren *P. aeruginosa* können zwischen den einzelnen Werkstoffen variieren.

Eine neue Erkenntnis des Projektes ist, dass *L. pneumophila* und *P. aeruginosa* in Biofilmen auf Werkstoffen der Trinkwasser-Installation außer in kultivierbarer Form auch in einem nicht-kultivierbaren Zustand vorliegen können. In diesem als VBNC („viable-but-nonculturable“, siehe Glossar) bezeichneten Zustand sind die Bakterien auf üblichen Nährmedien nicht mehr anzüchtbar, obwohl sie lebensfähig sind. VBNC-Bakterien lassen sich mit kultivierungsunabhängigen Verfahren nachweisen. Bewährt haben sich Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung gattungs- bzw. artspezifischer Sonden und PCR-basierte Methoden.

Sowohl auf neuen als auch auf gealterten Werkstoffen war die Konzentration von *P. aeruginosa*, die mit der FISH-Methode bestimmt wurde, höher als jene, die kulturell bestimmt wurde. Gleiches gilt auch im Fall der Einnistung von *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilme. Während die Konzentration der kultivierbaren Zielorganismen schwankte, blieb die Konzentration der FISH-positiven Zielorganismen über den untersuchten Zeitraum relativ konstant. Dies lässt den Schluss zu, dass sich ein Teil der Zielorganismen im Biofilm in einem VBNC-Zustand befand. Darüber hinaus deutet es darauf hin, dass sich der physiologische Zustand der Bakterien im Biofilm durch eine Vielzahl komplexer Prozesse ändern kann. Dazu gehört die Wechselwirkung mit anderen Bakterien und Protozoen, die Änderung der Temperatur oder des Nährstoffgehalts. Daraus wiederum würden sich schwankende Befunde bei mikrobiologischen Routine- und Kontrolluntersuchungen von Trinkwasser-Installationen schlüssig erklären.

9. Die Trinkwasser-Installation: eine Grauzone in der Überwachung

Um die gesundheitliche Unbedenklichkeit des Trinkwassers in öffentlichen Einrichtungen sicherzustellen, sind die Gesundheitsbehörden gesetzlich durch die Trinkwasserverordnung verpflichtet, am Austritt aus denjenigen Zapfstellen, die zur Entnahme von Wasser für den menschlichen Gebrauch dienen, das Trinkwasser in regelmäßigen Abständen untersuchen zu lassen. Obwohl die Grenzwerte und technischen Maßnahmewerte an der Entnahmestelle des Verbrauchers eingehalten werden müssen, findet eine Überwachung privater Trinkwasser-Installationen nur in Ausnahmefällen statt. Die Überwachung der Trinkwasser-Installationen durch die Gesundheitsbehörden stellt sich hinsichtlich verschiedener Aspekte als lückenhaft und nicht einheitlich dar. Folgende Punkte sollten daher unbedingt bundesweit vereinheitlicht werden:

- Priorisierung von zu untersuchenden Einrichtungen
- Umfang und Intensität der Anlagenuntersuchung
- Umfang und Frequenz der Beprobungen
- Informationsdokumentation und -archivierung
- Expertise im personellen Bereich

Auswertungen umfangreicher Erhebungen deutscher Gesundheitsbehörden in über 4400 öffentlichen Gebäuden mit rund 30.000 Wasserprobenahmen aus 7 Jahren (2003 - 2009) zeigen, dass gesundheitsrelevante mikrobielle Kontaminationen in Trinkwasser-Installationssystemen sowohl für Legionellen auftreten (Überschreitung des technischen Maßnahmewertes in 13 % der Proben) als auch für Pseudomonaden (Überschreitung der UBA-Empfehlung: Nachweis in 3 % der Proben). Legionellen konnten vor allem in Warmwassersystemen nachgewiesen werden, jedoch zeigte die Überschreitung des technischen Maßnahmewertes im Kaltwassersystem in 5 % der Proben, dass sie auch außerhalb des Warmwassersystems gute Wachstumsbedingungen vorfinden können. Pseudomonaden treten im Kalt- und Warmwassersystem ähnlich häufig auf. Die wichtigsten Ergebnisse der Maßnahme- bzw. Grenzwertüberschreitungen für ausgewählte mikrobiologische und chemische Parameter sind in Tabelle 2 dargestellt.

Zudem werden beim Betrieb von Trinkwasser-Installationssystemen die allgemein anerkannten Regeln der Technik sehr häufig nicht eingehalten. Dazu zählen z. B. fehlende, regelmäßige Wartung der Trinkwasser-Installation (34 %, n = 498), nicht rückgebaute Totstränge (65 %, n = 327) oder auch eine fehlende Spülung nach längerer Nutzungsunterbrechung, wie z. B. nach den Sommerferien in Schulen (56 %, n = 290).

Tabelle 2: Überschreitung von Grenz- und Maßnahmewerten mikrobiologischer und chemischer Parameter im Trinkwasser

Mikrobiologische Parameter	Proben-Anzahl	Überschreitung [absolut]	Überschreitung [%]
<i>Legionella</i> sp.	22.786	2.908	12,8
Koloniezahl 36°C	10.928	380	3,5
<i>Pseudomonas</i> sp.	3.468	102	2,9
Coliforme Bakterien	8.652	152	1,8
Koloniezahl 20/22°C	10.869	129	1,2
<i>Escherichia coli</i>	8.330	25	0,3
Chemische Parameter			
Nickel	3.538	379	10,9
Eisen	1.115	85	7,6
Blei	3.560	167	4,7
Mangan	250	11	4,4
Kupfer	2.411	30	1,2

Die statistische Prüfung ergab, dass eine tägliche Erwärmung des Warmwasser-Hochheizspeichers auf mindestens 60 °C das relative Risiko für den Nachweis von Legionellen um 30 % senkt. Dieses Risiko wird durch jedwede Form der zusätzlichen Wasseraufbereitung um mindestens das Doppelte erhöht.

10. Die Bestimmung der kultivierbaren Bakterien reicht allein nicht immer aus, um den hygienischen Status von Trinkwasser zu erfassen

Mit Hilfe von Standard-Kultivierungsverfahren nach TrinkwV ist man in der Lage, eine Vielzahl von hygienisch relevanten Bakterien (z. B. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*) kostengünstig und einfach nachzuweisen. Diese standardmäßigen Verfahren haben sich in der Vergangenheit in der Trinkwasseranalytik bewährt, aber sie haben auch ihre Schwächen. Diese Methoden können die bereits erwähnten VBNC-Organismen nicht erfassen und zeigen nur die „Spitze des Eisbergs“ – VBNC-Organismen sind nämlich keineswegs tot. Dies könnte eine Erklärung für das Phänomen sein, dass in der Praxis gelegentlich zeitlich schwankende Befunde erhoben werden, da die Ziel-Organismen sich mal in einem kultivierbaren und dann wiederum in einem nicht kultivierbaren Zustand befinden.

Der Übergang vom kultivierbaren in den VBNC-Zustand ist reversibel und wird durch Umweltfaktoren (z. B. Wassertemperatur, Nährstoffsituation, Anwesenheit von Desinfektionsmitteln) kontrolliert. Für die Erfassung und Beurteilung mikrobieller Kontaminationen in der Trinkwasser-Installation kann daher *in kritischen Fällen* die kombinierte Anwendung konventioneller Kulturverfahren und kultivierungsunabhängiger molekularbiologischer Methoden Ziel führend und für die Praxis hilfreich sein.

Folgende Empfehlungen für die mikrobiologisch-hygienische Beurteilung von Trinkwasser in der Trinkwasser-Installation leiten sich aus diesen Gegebenheiten ab:

- Im Zweifel sollten nicht nur die Koloniezahlen nach TrinkwV, sondern auch die Gesamtzellzahlen ermittelt werden. Aus dem Verhältnis Koloniezahl zu Gesamtzellzahl lassen sich schon erste Rückschlüsse auf die Ernährungslage der Mikroorganismen ziehen. Eine Zunahme des Verhältnisses der Koloniezahl zur Gesamtzellzahl deutet auf das Auftreten günstiger Nährstoffbedingungen hin.
- Im Rahmen der Aufklärung von Kontaminations- bzw. Infektionsquellen oder der Erfolgskontrolle nach Sanierungsmaßnahmen gibt es die Möglichkeit, *im Bedarfsfall* ergänzend zu den konventionellen kulturellen Verfahren auch kultivierungsunabhängige Verfahren (FISH, PCR-basierte Methoden) zur Erfassung fakultativ pathogener Bakterien heranzuziehen.
- Für die Lokalisation von Kontaminationsquellen sollte die Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Genotypisierung („genetischer Fingerabdruck“) von Bakterienisolaten eingesetzt werden.

11. Die Untersuchungen auf mikrobiologische Parameter nach TrinkwV lassen keine Rückschlüsse auf das Vorkommen von Legionellen und *P. aeruginosa* zu

Die bundesweite Bestandsaufnahme der behördlichen Routineüberwachung in diesem Projekt hat gezeigt, dass die Analyse der mikrobiologischen Parameter nach TrinkwV (*E. coli*, coliforme Bakterien, Koloniezahlen) nicht geeignet ist, um Kontaminationen mit den fakultativ pathogenen Krankheitserregern *P. aeruginosa* oder *L. pneumophila* sicher zu erkennen. Die Auswertung von mehr als 100.000 Messwerten hat gezeigt, dass der Anteil der für Legionellen und *P.* zu beanstandenden Wasseranalysen weit über dem der Werte für *E. coli* und coliforme Bakterien liegt. Darüber hinaus zeigen die statistischen Analysen, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien und dem Vorkommen von Legionellen oder Pseudomonaden besteht.

12. In Anwesenheit von Metallionen kann der kulturelle Bakteriennachweis negativ sein, obwohl hygienisch relevante Organismen noch lebensfähig vorhanden sind

Das Vorhandensein von Metallionen (z.B. Cu^{2+}) ist einer der Faktoren, die zur Unterdrückung des Wachstums von Mikroorganismen in Trinkwasser und Trinkwasserbiofilmen führen können. Darauf ist vermutlich zurückzuführen, dass in der Literatur so unterschiedliche Befunde über die Biofilm-Bildung auf Kupfer zu finden sind, wenn die Studien auf der Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) beruhen. Es ist damit zu rechnen, dass die Bakterien, wenn sie Kupfer (bzw. Kupferionen) ausgesetzt sind, nur in einen vorübergehend nicht-kultivierbaren Zustand (VBNC) übergehen und – je nach Umweltbedingungen – wieder in den vegetativen Zustand zurückkehren. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass fakultativ pathogene Bakterien dann auch wieder infektiös werden können. Wie schnell diese Übergänge sind, wann und wodurch sie im Einzelnen ausgelöst werden, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

13. Eine wirksame Reinigung ist die Voraussetzung für den Erfolg von Desinfektionsmaßnahmen

Reinigen bedeutet, Verunreinigungen, Ablagerungen und andere unerwünschte Substanzen aus der Trinkwasser-Installation zu entfernen. Dadurch lässt sich einerseits die geplante Hydraulik der Rohrleitungen wiederherstellen, andererseits die Trinkwasserqualität während des Transportes durch die Rohrleitung sicherstellen. Verunreinigungen enthalten Substanzen, die die Trinkwasserqualität direkt beeinträchtigen, aber auch zur Vermehrung von Mikroorganismen auf benetzten Oberflächen und damit auch zur Kontamination des Wassers mit Mikroorganismen führen können. Alle lockeren Ablagerungen sind bei der Reinigung zu entfernen. Sie dürfen sich auf keinen Fall an anderer Stelle wieder ablagern und dadurch erneut zu Beeinträchtigungen des Trinkwassers führen. Fest anhaftende, anorganische Beläge können als Deckschichten Korrosion hemmende Eigenschaften aufweisen, sind andererseits aber kritisch zu betrachten, wenn ihre Rauigkeit die Ansiedlung von Mikroorganismen begünstigt. Das Entfernen von Ablagerungen reduziert die Einnistungsmöglichkeit von Mikroorganismen und optimiert den Betriebszustand der Trinkwasser-Installation.

14. Desinfektion ist nicht gleichbedeutend mit Reinigung

Vielfach wird implizit von der Annahme ausgegangen, dass eine Desinfektionsmaßnahme auch eine Entfernung der Biomasse bewirkt. Im Verbundprojekt wurde dies anhand eines Biofilm-Modells überprüft, das auf der Ansiedlung und Vermehrung von Mikroorganismen in Silikonschläuchen beruht. Diese Schläuche begünstigen durch Abgabe von Nährstoffen (Additive des Silikons) die Biofilm-Entwicklung stark und eignen sich daher als Testsystem für die Desinfektion und Beseitigung von Biofilmen. Es handelt sich hier um eine „worst case“-Situation, denn in diesem System sind die Biofilme besonders schwer zu beseitigen. Mittel und Verfahren, die den Biofilm im Biofilm-Modell bekämpfen, werden es mit großer Wahrscheinlichkeit auch unter ungünstigen Praxis-Bedingungen tun.

Es wurde gezeigt, dass Desinfektionsmittel, die in den Konzentrationen eingesetzt wurden, welche nach § 11 TrinkwV 2001 zur Desinfektion zugelassen sind, erst nach einem Behandlungszeitraum von mindestens 70 Tagen zu einer Abnahme der Koloniezahlen der Biofilme bis zur Nachweisgrenze führten, wobei jedoch die Abnahme der Gesamtzellzahlen nur gering war. Erheblich höhere Konzentrationen können bei notwendiger Sanierung eingesetzt werden, um eine Anlagen-Desinfektion durchzuführen. Hier kamen Chlor, Chlordioxid sowie Wasserstoffperoxid in Kombination mit Silberionen oder Fruchtsäuren zum Einsatz. Diese Maßnahmen führten abhängig von der Art der Wirkstoffe ebenfalls zu Abnahme der Koloniezahlen bis zur Nachweisgrenze. Die Verringerung der Gesamtzellzahl bis zur Nachweisgrenze konnte jedoch nur vereinzelt (z.B. durch 25 mg/L freies Chlor oder 0,1 mg/L Ozon sowie 10 % Wasserstoffperoxid + Fruchtsäuren + Tenside) erreicht werden. Soll eine nachhaltige Wirksamkeit erzielt werden, ist eine vorherige Reinigung der Systeme – z.B. mit dem Impulsspülverfahren – zu empfehlen.

Der Biofilm-Monitor – eine transportable Variante des Biofilm-Modells - wird inzwischen als Bypass-Gerät in Trinkwasser-Installationen genutzt und erlaubt eine realistische Überprüfung von Sanierungsmaßnahmen. Er wird auch als Bestandteil eines 3-Phasen-Prozesses bei der Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln eingesetzt.

15. Desinfektionen können die Populationen verändern und schnellwüchsige Bakterien begünstigen

Die langfristige Wirkung von Desinfektionsmitteln auf Biofilmpopulationen wurde in verschiedenen Ansätzen untersucht. Es zeigte sich, dass immer sofort nach Absetzen des Desinfektionsmittels eine Regeneration des Biofilms erfolgt: Entweder durch Erholung und Wachstum der noch vorhandenen Bakterien, oder durch Neubesiedlung aus dem Wasser. Die Biofilmpopulationen, die sich nach Absetzen neu etabliert hatten, unterschieden sich in Bezug auf Zusammensetzung und Diversität von den ursprünglichen Populationen. In Abhängigkeit der Zusammensetzung und Konzentration des Desinfektionsmittels entstanden ein Selektionsdruck und eine Populationsverschiebung in den Biofilmen.

Die Population war nach der Desinfektion deutlich verändert, was darauf zurückgeführt wird, dass abgetötete Biofilme nicht entfernt wurden und neu wachsenden Bakterien als leicht verwertbare Nährstoffquelle dienten. Damit besteht das Risiko, dass sich als Folge einer Desinfektion schnellwüchsige und daher oft hygienisch relevante Bakterien entwickeln.

16. Ein Übergang vom VBNC in das kultivierbare Stadium von *P. aeruginosa* kann durch Desinfektionsverfahren möglicherweise beeinflusst werden

Auf allen untersuchten Werkstoffen waren bei den verschiedenen Wasserqualitäten mehrere Wochen nach der Kontamination Biofilme vorhanden, in denen *P. aeruginosa* für mehrere Monate nur mit FISH aber nicht mit kulturellen Methoden nachweisbar war, was auf einen VBNC-Zustand der Zellen im Biofilm hinweist. Auch im stagnierenden Wasser konnte *P. aeruginosa* kulturell nicht nachgewiesen werden. Wurden diese Biofilme mit bis zu 20 mg/L Chlordioxid (auch mehrfach) desinfiziert, wurde *P. aeruginosa* in einigen Fällen sofort oder 3 Wochen nach Desinfektion sowohl im Biofilm als auch im stagnierenden Wasser wieder kulturell nachgewiesen. Die FISH-Signale im Biofilm blieben nach der Desinfektion fast unverändert hoch. Entweder wurde *P. aeruginosa* durch die Desinfektion aus seinem VBNC-Zustand erweckt oder er war aus Zellzahlen im Biofilm, die unterhalb der Nachweisgrenze mit den Kulturverfahren lagen, sehr schnell zu den hohen Zellzahlen angewachsen. Letzteres ist jedoch innerhalb von 24 h sehr unwahrscheinlich. Oxidativ wirkende Desinfektionsmittel erhöhen die Konzentration leicht verfügbarer organischer Verbindungen im Biofilm und könnten somit die Wiederbelebung von VBNC-Stadien von fakultativ Pathogenen ermöglichen (Benölken et al., 2010). Hier besteht weiterer Forschungsbedarf

17. *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* können Reinigung und Desinfektion überleben

Ein kontaminiertes Trinkwassersystem nachhaltig von Krankheitserregern zu befreien, ist nur mit sehr hohem Aufwand zu erreichen. Bildet sich ein kompakter Biofilm auf einem Werkstoff aus, können die fakultativ pathogenen Bakterien im Biofilm eine Kombination aus Reinigung und chemischer Anlagen-Desinfektion selbst mit hohen Chlordioxid-Konzentrationen überleben. Überlebende fakultativ pathogene Bakterien können sich in den Biofilmen wieder vermehren und erneut das Trinkwassersystem kontaminieren. Der Nachweis dieser überlebenden Zellen ist, wie schon erwähnt, von der Untersuchungsmethode abhängig. Werkstoffe, die den allgemein anerkannten Regeln der Technik entsprechen (KTW-Leitlinie UBA, 2008, DVGW-Arbeitsblatt W 270), verhindern zwar keine Kontamination der Biofilme mit fakultativ pathogenen Bakterien, bieten jedoch im Fall einer Kontamination aufgrund der nur dünnen Biofilme gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Reinigung und Desinfektion (Benölken et al., 2010).

Bezug zu bestehenden Regelwerken und Gesetzen

Die Trinkwasserverordnung, die die Basis für eine Versorgung der Bevölkerung mit Trinkwasser einwandfreier Beschaffenheit ist, nimmt an vielen Stellen Bezug auf die allgemein anerkannten Regeln der Technik. Obwohl die anerkannten Regeln der Technik aus juristischer Sicht ein unbestimmter Rechtsbegriff sind, der in Gesetzen nicht definiert ist, haben sie eine überragende Bedeutung bei der Bestimmung des Inhaltes von Sorgfalts- und Verkehrssicherungspflichten. Man geht davon aus, dass das Risiko einer mikrobiellen oder chemischen Kontamination einer Trinkwasser-Installation und damit des Trinkwassers dann sehr gering ist, wenn bei Planung, Bau, Inbetriebnahme und Betrieb die in Regelwerken, z.B. des DVGW, DIN, VDI, festgelegten Regeln der Technik eingehalten werden.

Durch die rasante technische Entwicklung von neuen Werkstoffen, Bauteilen und Verfahren, vor allem im Bereich der Trinkwasser-Installation, müssen die Regelwerke ständig an neue Entwicklungen und wissenschaftliche Erkenntnisse angepasst werden. Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens liefern wertvolle Hinweise für die Ergänzung und Überarbeitung der technischen Regeln mit dem Ziel, das Restrisiko einer Gefährdung der menschlichen Gesundheit auf ein Minimum zu vermindern. Außerdem leistet das Vorhaben einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der komplexen Verhältnisse und Vorgänge in einer Trinkwasser-Installation. Damit bildet das Forschungsvorhaben die Grundlage für die Innovation bei der Entwicklung neuer Werkstoffe, Bauteile und Verfahren.

Ganz eindeutig ist: Die konsequente, fachgerechte Umsetzung der allgemein anerkannten Regeln der Technik kann das Risiko für mikrobielle Kontaminationen mit Legionellen und Pseudomonaden deutlich verringern.

Schlussfolgerungen

Die Trinkwasser-Installation stellt eine hygienisch-mikrobiologisch empfindliche Komponente in der Versorgungskette dar, die zwar reguliert (DIN 1988, DVGW-Regelwerk), aber unzureichend überwacht wird. Um das eingangs genannte Präventions-Potenzial effektiv zu nutzen, erscheint es besonders wichtig, eine erhöhte Aufmerksamkeit auf die Auswahl und Prüfung der Werkstoffe zu richten. Die Methoden, die zur Beurteilung der hygienischen Qualität der Werkstoffe sowie des Trinkwassers angewandt werden, spielen für die Risikobewertung eine ganz entscheidende Rolle. Hier sollten neben den klassischen auch kulturunabhängige Verfahren genutzt werden, mit denen die tatsächlich vorhandene Biomasse sowie die hygienisch relevanten Organismen erfasst werden können. Ihr Auftreten im VBNC-Zustand ist dabei von großer Bedeutung, denn hierin könnte die Erklärung für zahlreiche hartnäckige Kontaminations- und Wiederverkeimungsprobleme gefunden werden. Darüber hinaus besteht noch ein deutlicher Forschungsbedarf, um zu verstehen, unter welchen Bedingungen Bakterien in diesen Zustand eintreten, wann und warum sie ihn wieder verlassen und kultivierbar werden und ob sie dann immer noch infektiös sind - wofür erste experimentelle Befunde sprechen.

Aus den Ergebnissen der bundesweiten Bestandsaufnahme der Überwachung von Trinkwasser-Installationen in diesem Projekt ergibt sich die Frage, wie unter Nutzung moderner Untersuchungsmethoden mikrobielle Kontaminationen in Trinkwasser-Installation im Haushalt schnell, einfach und sicher erkannt und lokalisiert werden können. Die Entwicklung eines reproduzierbaren, evaluierten, standardisierten Verfahrens zur schnellen, sicheren und kosteneffektiven Erkennung mikrobieller Kontaminationen in Trinkwasser-Installationen erscheint notwendig. Eine Vereinheitlichung hinsichtlich der Vorgaben für die Auswahl und Anzahl repräsentativer Probenahmestellen ist erforderlich, die auch die Frequenz der Beprobung, die Auswahl der Parameter sowie einer Evaluation der Anwendbarkeit innovativer mikrobiologischer Nachweismethoden mit einschließt.

Gerade für Problemfälle sollte das Potenzial genutzt werden, mit dem die modernen molekularbiologischen Verfahren die bewährten kulturellen Standardmethoden ergänzen können.

Abkürzungsverzeichnis

ChemG	Chemikaliengesetz
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DOC	Dissolved Organic Carbon (gelöster organischer Kohlenstoff)
DVGW	Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Monomer
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GZZ	Gesamtzellzahl
HD-PEXb	silanvernetztes Polyethylen
HD-PEXc	strahlenvernetztes Polyethylen
HPC	Heterotrophic Plate Count
IfSG	Infektionsschutzgesetz
KBE	Koloniebildende Einheiten
KTW	Kunststoffe im Trinkwasser
OIT	Oxidation Induction Time
PCR/qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RR	relatives Risiko
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
UBA	Umweltbundesamt
VBNC	viable but nonculturable (vital, aber nicht kultivierbar)
VDI	Verein Deutscher Ingenieure

Glossar

Biofilm

Unter dem Begriff „Biofilm“ werden alle Ansammlungen von Mikroorganismen an Grenzflächen (häufig: fest/flüssig) verstanden. Im Biofilm sind die Organismen in eine Schicht 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.

Desinfektion

Desinfektion ist ein Prozess, durch den die Anzahl vermehrungsfähiger Mikroorganismen infolge Abtötung bzw. Inaktivierung unter Angabe eines standardisierten, quantifizierbaren Wirkungsnachweises reduziert wird mit dem Ziel, einen Gegenstand/Bereich/Medium in einen Zustand zu versetzen, dass von ihm keine Infektionsgefährdung mehr ausgehen kann. Ziel der Desinfektion ist die definierte Verminderung der Anzahl pathogener oder fakultativ-pathogener Mikroorganismen, nicht aber die Eliminierung von Umweltkeimen ohne Bedeutung für die menschliche Gesundheit.

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).

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*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.). 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.

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 Trinkwasserverordnung 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 Biofilmprouben werden häufig ein nährstoffarmes Nährmedium (R2A-Medium), längere Bebrütungszeiten (z. B. 7 Tage) und niedrige Bebrütungstemperaturen (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, Klimaanlage, 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 Legionellose (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.

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).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

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.

Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Stücken eines gesamten Genoms. Es wird damit ein organismenspezifischer genetischer Fingerabdruck (Genotypisierung) erstellt, der zur Identifizierung der Kontaminationsquelle herangezogen werden kann.

Quantitative PCR (qPCR)

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

Relatives Risiko

Das relative Risiko (RR) vergleicht das Risiko zur Ausprägung eines Merkmals einer gegenüber einem bestimmten Faktor exponierten Gruppe mit dem entsprechenden Risiko einer gegenüber diesem Faktor nicht exponierten Gruppe. Es wird das Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten angegeben. $RR = \text{Risiko exponierte Gruppe} / \text{Risiko nicht exponierte Gruppe}$

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 wirkende Hilfsmittel 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.

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 Hausinstallation (hier Trinkwasser-Installation genannt) ist die Gesamtheit aller Rohrleitungen, Armaturen und Geräte, die sich zwischen dem Punkt der Entnahme von Wasser für den menschlichen Gebrauch durch den Verbraucher und dem Punkt der Übergabe von Trinkwasser aus einer Wasserversorgungsanlage an den Verbraucher befindet (TrinkwV § 3, 3).

Werkstoffe

Unter dem Begriff Werkstoffe versteht man alle Materialien wie z.B. Kunststoffe, Metalle, Keramik.

Werkstoff-Alterung

Jeder Werkstoff verändert seine Eigenschaften (wie Werkstoffgefüge oder chemische Zusammensetzung) durch z. B. thermische, mechanische oder chemische Belastungen. Bei Kunststoffen ist u. a. die Verarmung an Additiven (Komponenten), bei Stählen speziell der Einfluss von eindiffundierendem Stickstoff und die damit einhergehende Versprödung gemeint, wenn von Alterung die Rede ist.

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 Erhaltungstoffwechsel 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. Der VBNC-Zustand ist reversibel. Unter günstigen Umweltbedingungen können VBNC-Bakterien wieder kultivierbar und im Fall von Krankheitserregern potenziell infektiös werden.

Liste der Forschungs- und Industriepartner

Koordination:

Prof. Dr. Hans-Curt Flemming
Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen und IWW Zentrum Wasser

Forschungspartner:

Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit Universität Bonn

Prof. Dr. Martin Exner
Prof. Dr. Thomas Kistemann (Teilprojekt 1)
Dr. Jürgen Gebel (Teilprojekt 3)
Johannes Lenz (Teilprojekt 3)
Christiane Schreiber (Teilprojekt 1)
Sebastian Völker (Teilprojekt 1)

DVGW-Forschungsstelle Technische Universität Hamburg-Harburg

Prof. Dr. Knut Wichmann (Teilprojekt 2)
Dr. Bernd Bendinger (Teilprojekt 2)
Jens Benölken (Teilprojekt 2)

IWW Zentrum Wasser, Mülheim an der Ruhr

Dr. Gabriela Schaule (Teilprojekt 4a)
Dr. Susanne Grobe (Teilprojekt 4a)
Dr. Simone Schulte (Teilprojekt 4a)

Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen

Dr. Jost Wingender (Teilprojekt 4b)
Miriam Moritz (Teilprojekt 4b)

Institut für Technischen Umweltschutz, TU Berlin

Prof. Dr. Ulrich Szewzyk (Teilprojekt 5)
Rosemarie Röder (Teilprojekt 5)

Industriepartner:

ActiDes
Deutsche Messe AG
European Copper Institute
Franke Aquarotter AG
Freudenberg GmbH & Co. KG
Geberit International AG
Grünbeck Wasseraufbereitung
Grundfos GmbH
Hammann GmbH
Jati Products
Luffahrtgeräte Gauting GmbH
Pall GmbH
ProMinent ProMaqua GmbH
Sanosil Service GmbH
Scheideler Verfahrenstechnik
Stadtwerke Duisburg
Viega GmbH & Co. KG

Das Forschungskonsortium bedankt sich ausdrücklich beim BMBF für die Förderung des Projekts und die ausgezeichnete Betreuung bei seiner Durchführung. Großer Dank gilt auch den Industriepartnern, die das Projekt durch die ganze Laufzeit hindurch sowohl materiell als auch geistig unterstützt haben.