



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

Version 1.0

5 Forschungspartner, 17 Industriepartner  
Koordination: Prof. Dr. Hans-Curt Flemming

## Inhalt

Die wichtigsten Erkenntnisse des Forschungsprojektes in Thesen-Form	Seite 3
1. Alle wasserbenetzten Oberfläche in der Trinkwasser-Installation sind von Biofilmen besiedelt	Seite 4
2. Werkstoffe und Trinkwasser sind die „ersten Verdächtigen“ als potenzielle Nährstoffquelle für verstärkte Biofilm-Bildung	Seite 4
3. Die Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaften variiert und wird von verschiedenen Einflüssen bestimmt	Seite 5
4. Thermo-oxidative Maßnahmen zur Anlagendesinfektion führen zu Werkstoffalterung	Seite 6
5. Durch Alterung verursachte Veränderungen der Werkstoffe haben einen Einfluss auf die Biofilmbildung	Seite 6
6. Die prophylaktische Desinfektion der Trinkwasser-Installation ist kritisch zu betrachten	Seite 9
7. Die Beurteilung des Biofilmwachstums ist abhängig von der angewandten Methode	Seite 9
8. Fakultativ pathogene Bakterien nisten sich in etablierte Biofilme ein und kontaminieren stagnierendes Wasser	Seite 10
9. <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> können sich in vorhandene Trinkwasser-Biofilme einnisten und in stagnierendes Trinkwasser ausgetragen werden	Seite 11
10. Die Trinkwasser-Installation: eine Grauzone in der Überwachung	Seite 13
11. Die Bestimmung der kultivierbaren Bakterien reicht allein nicht immer aus, um den hygienischen Status von Trinkwasser zu erfassen	Seite 14
12. Die Untersuchungen auf mikrobiologische Parameter lassen keine Rückschlüsse auf das Vorkommen von Legionellen und <i>P. aeruginosa</i> zu	Seite 16

13. In Anwesenheit von Metallionen kann der kulturelle Bakteriennachweis negativ sein, obwohl hygienisch relevante Organismen noch lebensfähig vorhanden sind	Seite 16
14. Eine wirksame Reinigung ist die Voraussetzung für den Erfolg von Desinfektionsmaßnahmen	Seite 17
15. Desinfektion ist nicht gleichbedeutend mit Reinigung	Seite 17
16. Desinfektionen können die Populationen verändern und schnellwüchsige Bakterien begünstigen	Seite 18
17. <i>P. aeruginosa</i> und <i>L. pneumophila</i> können Reinigung und Desinfektion überleben	Seite 19
18. Desinfektionsverfahren beeinflussen die Übergänge zwischen kultivierbaren und VBNC-Stadien von <i>L. pneumophila</i> und <i>P. aeruginosa</i>	Seite 19
Bezug zu bestehenden Regelwerken und Gesetzen	Seite 20
Schlussfolgerungen	Seite 21
Abkürzungsverzeichnis	Seite 22
Glossar	Seite 23
Teilnehmerliste	Seite 30

### 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 & CoKG

**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.**

## 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

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

## 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 Trinkwasserverteilungsnetz - 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 wasserführende 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 Trinkwasser-Verteilungsnetzen 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. Wasser- auslässe 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 Oberfläche 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 wachsender 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. 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 An-

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.

**Tabelle 2:** Werkstoffe, die im Projekt untersucht wurden

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

<sup>1)</sup> Plastomere erfüllen die „Leitlinie zur hygienischen Beurteilung von organischen Materialien im Kontakt mit Trinkwasser(KTW-Leitlinie)“ [Umweltbundesamt 2007]

<sup>2)</sup> 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)

<sup>3)</sup> für metallische Werkstoffe nicht notwendig

### Werkstoff-Alterung

Jeder Werkstoff verändert seine Eigenschaften (wie Werkstoffgefüge oder chemische Zusammensetzung) durch z. B. thermische, mechanische oder chemische Belastungen wie die des. 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 non culturable"; 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

forderungen nach DVGW Arbeitsblatt W 270 noch denen der KTW-Empfehlung entsprach.

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 ungünstige Kombination aus schlechter Werkstoffqualität (EPDM ohne Empfehlung) und 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 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 könnten. 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 erhöhte 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 Werkstoffeigenschaften wie Hydrophobizität, Oberflächenstruktur, Rauheit, bis zur Rissbildung bei langdauernder Einwirkung.

Versuche zur Biofilmbildung auf neuen und alten Werkstoffen wurden exemplarisch durchgeführt, wobei nach 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 ggf. Huminstoffgehalt 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

#### **Reinigung**

Unter Reinigung wird ein Prozess zur Entfernung von Verunreinigungen (z.B. Staub, 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 Genuss 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  $\leq 25$  °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 (oft auch Hausinstallation 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.

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

### Pseudomonaden, *Pseudomonas 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. Man unterscheidet verschiedene Gattungen und Arten. Pseudomonaden sind ubiquitär verbreitet, also auf Pflanzen, Boden, Wasser und Tieren sowie Menschen zu finden.

*Pseudomonas 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 Fluoreszin-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 quantifizierenden PCR (qPCR) wird mit Hilfe eines Fluoreszenzsignals die vervielfältigte Menge der DNA bei der Vervielfältigung mitgemessen.

### 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.  $RR = \text{Risiko exponierte Gruppe} / \text{Risiko nicht exponierte Gruppe}$

niedermolekularen Additiven verarmtes EPDM und HD-PEXb tendenziell ein geringeres Biofilmbildungspotential aufwiesen. Es ist anzunehmen, dass vom alten 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 Desinfektions-Aufwand, was sich nicht zuletzt auch Material schonend auswirken würde.

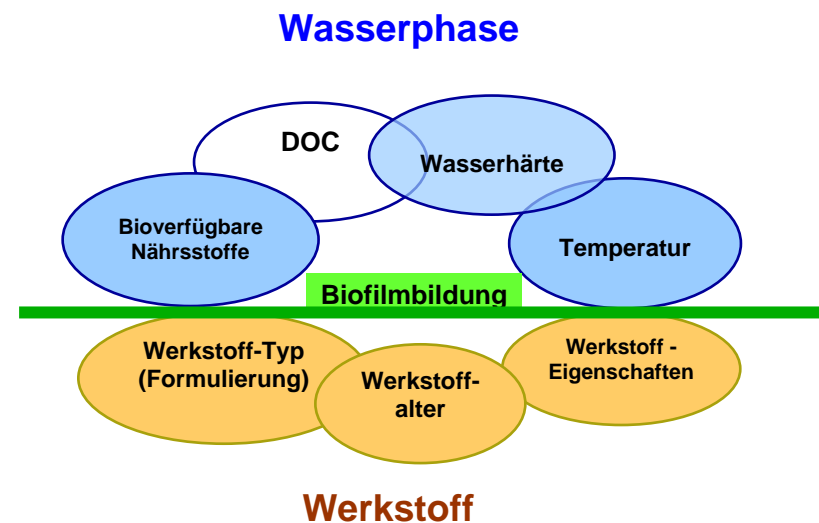


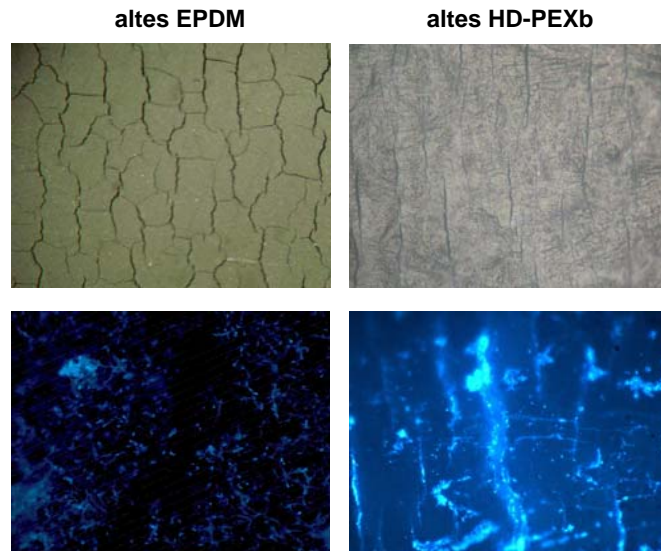
Abbildung 1: Faktoren mit Einfluss auf die Biofilmbildung

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 verfügbarem Nährstoffgehalt des Wassers und dem Werkstoffalter, jedoch nur gering von Wasserhärte und Huminstoffgehalt 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).



**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

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 Biofilmpollen werden häufig ein nährstoffarmes Nährmedium (R2A-Medium), längere Bebrütungszeiten (z. B. 7 Tage) und niedrige Bebrütungstemperaturen (z. B. 20 °C) verwendet.

### **Legionellen/ *Legionella pneumophila***

Der Begriff Legionellen im 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 22 verschiedene Arten anhand unterschiedlicher morphologischer und physiologischer 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.

*Legionella pneumophila* ist ein humanpathogenes Bakterium innerhalb der Gattung *Legionella*, das 80 – 85 % aller Legionelosen (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).

(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 bindet, 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

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

Eine prophylaktische Behandlung der Trinkwasser-Installation widerspricht dem Minimierungsgebot 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 kultivierungs-abhängige Methoden verwendet. Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (ob als Koloniezahl nach TrinkwV 2001, TrinkwV 1990, oder HPC auf R2A) 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 Erhaltungs-

stoffwechsel 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, Biofilmalter 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 Biofilmalter 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. Fakultativ pathogene Bakterien nisten sich in etablierte Biofilme ein und kontaminieren stagnierendes Wasser**

Werden fakultativ pathogenen 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

## **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/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. *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.). Beispiele für spezifische Voraussetzungen: das Eröffnen des Zugangs zu normalerweise sterilen Körperbereichen

## Abkürzungsverzeichnis Thesenpapier

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

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 *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa*.

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.

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

Die Ergebnisse der halbtechnischen Versuchsanlage zeigten, dass sich *L. pneumophila* im 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 bis 15 °C) entwickeln, konnte *L. pneumophila* mit den kulturellen Standarduntersuchungsverfahren (ISO 11731) nachgewiesen werden. Die Konzentration von *L. pneumophila* im Biofilm ist ab-

hängig 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.

*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. 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.

## 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.**

wiesen werden, obwohl dieser Organismus bis zu mehrere Monate lang vor der Desinfektion mit den kulturellen Standardmethoden nicht nachweisbar war. Fakultativ pathogene Bakterien, die sich in Biofilmen im VBNC-Stadium befinden, können offenbar zu erneuten positiven Befunden im stagnierenden Trinkwasser führen, wenn sie in den vegetativen Zustand zurückgekehrt sind.

### **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.***

### **10. 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 1 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 Hausinstallation (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 1:** Überschreitung von Grenz- und Maßnahmewerten mikrobiologischer und chemischer Parameter erwärmtes Trinkwasser

Mikrobiologische Parameter	Proben-Anzahl	Überschreitung [absolut]	Überschreitung [%]
<i>Legionella</i> sp., Warmwasser	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
<b>Chemische Parameter</b>			
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-Hochzeitspeichers auf mindestens 60 °C das relative Risiko für den Nachweis von Legionellen um 20 % senkt. Um 20-40 % wird dieses Risiko durch jedwede Form der zusätzlichen Wasseraufbereitung reduziert.

#### 11. 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 be-

#### 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-A, 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.

#### 18. Desinfektionsverfahren beeinflussen die Übergänge zwischen kultivierbaren und VBNC-Stadien von *L. pneumophila* und *P. aeruginosa*

Selbst wenn *L. pneumophila* auf den Werkstoffen direkt nach der chemischen Desinfektion kulturell nicht mehr nachweisbar war, konnten diese Bakterien mehrere Wochen nach der Desinfektion (z.B. Chlordioxid) mit den kulturellen Standardmethoden im Biofilm und in stagnierendem Wasser des Versuchssystems wieder aufgefunden werden. Bei den Werkstoffen handelte es sich um Kupfer, HD-PEXb, EPDM mit und ohne Empfehlung nach DVGW-Arbeitsblatt W 270. In diesen Fällen konnte mit der FISH-Methode bestätigt werden, dass noch *L. pneumophila* im Biofilm vorhanden war. Dies führte zu der Vermutung, dass *L. pneumophila* durch die Desinfektion in den VBNC-Zustand übergeht und später wieder kultivierbar werden kann.

*P. aeruginosa* war ebenfalls nach der Desinfektion auf allen Werkstoffen mit der kultivierungsunabhängigen FISH-Methode nachweisbar, obwohl mit den kulturellen Standardverfahren kein Nachweis erfolgte. *P. aeruginosa* konnte sogar nach der Desinfektion kulturell im stagnierenden Wasser und im Biofilm nachge-

me 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 Impulsspülvfahren – 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.

#### **16. 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 entstand 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.

währt, 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 zielführend und für die Praxis hilfreich sein.

Folgende Empfehlungen für die mikrobiologisch-hygienische Beurteilung von Trinkwasser 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.
- 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 Pulsfeldgelelektrophorese zur Genotypisierung („genetischer Fingerabdruck“) von Bakterienisolaten eingesetzt werden.

## **12. Die Untersuchungen auf mikrobiologische Parameter nach TrinkwV lassen keine Rückschlüsse auf das Vorkommen von Legionellen und *Pseudomonas 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 *Pseudomonas aeruginosa* 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.

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

Das Vorhandensein von Metallionen (z.B.  $\text{Cu}^{2+}$ ) 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.

## **14. 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 sicher stellen. Verunreinigungen enthalten Substanzen, 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 korrosionshemmende 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.

## **15. 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 bis zur Nachweisgrenze führten, wobei jedoch die Abnah-