

Biofilme:



Nachweis, Desinfektion, Resistenz

Hans-Curt Flemming

Simone Schulte

Jost Wingender

IWW Zentrum Wasser

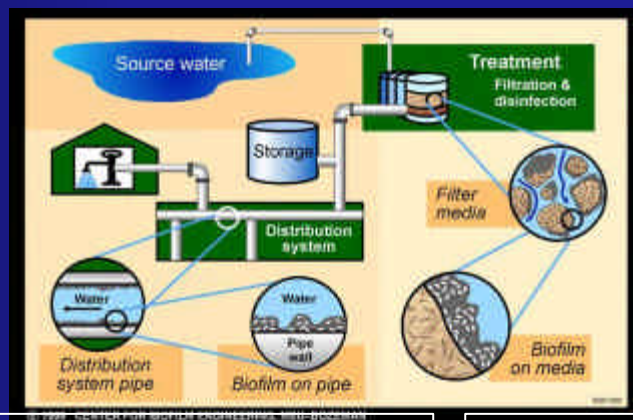
Biofilm Centre, Univ. Duisburg-Essen

Trinkwasser ist von Grenzflächen umgeben



Trinkwassergewinnung: Innenwandungen von Brunnenrohren, Pumpensteigleitungen, usw.

Aufbereitung: Oberflächen von Filtermaterialien (Sand, Aktivkohle), von Membranen (z. B. Umkehrosmose), usw.



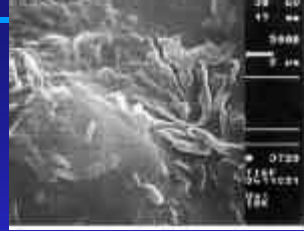
Trinkwasserverteilung: Innenwandungen von Rohrleitungen aus mineralischen, metallischen und nicht metallischen Werkstoffen, Schläuche, usw.

Trinkwasserbehälter: Wände, Böden, Decken, Calciumcarbonat-Schwimmschichten, Kahlhäute

Biofilme im Trinkwasserbereich



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



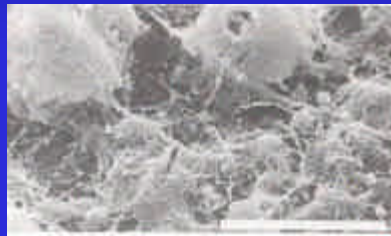
Kunststoffrohr Kaltwasserleitung
(Tiefenbrunner, 2002)



selten benutzter
Wasserhahn
(Exner u. Tuschwitzki, 1984)



Siliconschlauch, zahnärztliche
Einheit
(Exner u. Tuschwitzki 1984)



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

Hygienische und technische Probleme durch Biofilme in Trinkwassersystemen

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

Faktoren, welche das Ausmaß von Biofilmen in Trinkwassersystemen bestimmen



- Konzentration mikrobiell verwertbarer Nährstoffe (assimilierbarer organischer Kohlenstoff, AOC)
- Anwesenheit von Desinfektionsmitteln
- hydraulische Bedingungen (Fließgeschwindigkeit)
- Wassertemperatur
- Rauigkeit der Aufwuchsoberfläche
- Material (langfristig jedoch ohne Bedeutung, wenn keine Nährstoffe abgegeben werden)
- "Grazing" durch Protozoen

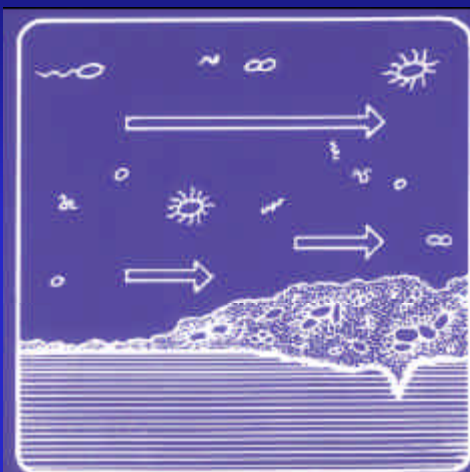
Wo ist der Biofilm?



- Daten aus der Wasserphase geben keine Informationen darüber,
 - wo Biofilme sich befinden,
 - welches Ausmaß sie haben
 - welche Organismen darin leben

- **Biofilm-Beprobung: Auf Oberflächen!**

- *Wasser-Daten bieten aber die Möglichkeit, Biofilm-Brennpunkte wenigstens grob einzugrenzen!*





Der sichere Weg zum Biofilm

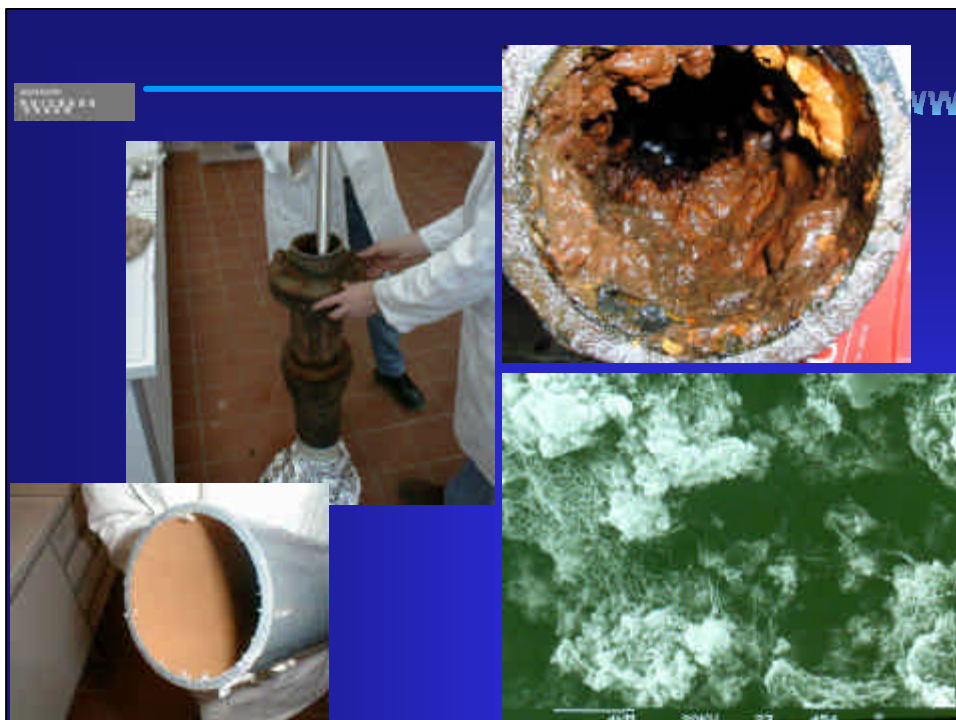


BMBF-Forschungsprojekt
„Biofilme in der
Trinkwasserverteilung“

10 Uni's, 5 Wasserversorger

Entnahme von Proben aus Leitungen, durch die nicht beanstandetes Wasser fließt („gesunde Rohre“)

- Wasserprobe am Standrohr
- Freilegen des Rohres, Reinigen, Abspülen, 10 % H_2O_2
- „Chirurgisches“ Heraustrennen eines 1 m langen Rohrstückes
- Verschließen der Rohr-Enden in der Baugrube
- Schnellstmöglicher Transport ins Labor
- Öffnen, Begutachtung des Belags
- Entfernen des Belages (Schaben, Glaskugeln)
- Bestimmung des Feuchtgewichts des Belages
- Herstellung einer Belags-Suspension, Homogenisierung
- Abfüllen und Versand von Proben für Projektteilnehmer



Fazit für „gesunde“ Trinkwasser-Rohre



- Biofilme sind flächendeckend im Rohrnetz vorhanden
- Keine Korrelation zu Material und Expositionszeit, Plateau nach 6 bis 18 Monaten erreicht
- „Gesundes Trinkwasser-Rohr“: Besiedlungsdichte deutlich höher als Zelldichte im Wasser, das im Kontakt mit Oberflächen steht
- Keine Korrelation zwischen Biofilm- und Wasser-Zellzahl
- Große Unterschiede der Populationen im Biofilm und im Wasser – „zwei verschiedene Welten“
- Keine obligat Pathogene, nur vereinzelt fakultativ Pathogene – Frage: „Dunkelziffer“?
- Keine signifikante Erhöhung des Biofilmbildungspotentials durch Verweilzeit im Rohrnetz

Wiederkehrendes Auftreten von Coliformen bei Neuverlegung:

Symptom für Kontamination durch Biofilme

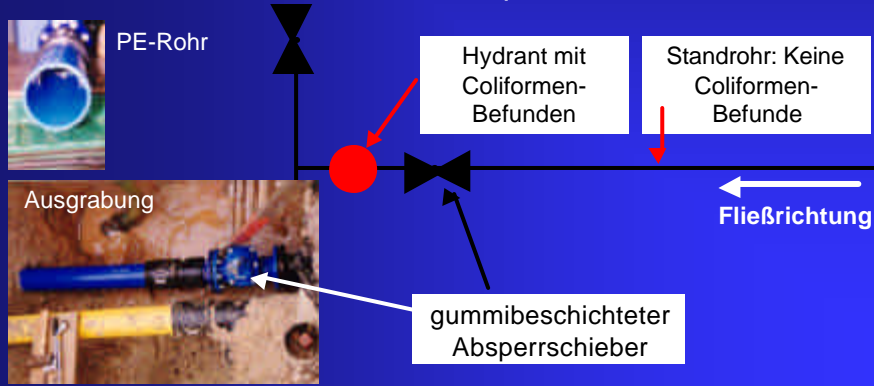


- Es treten z. B. im Anschluss an Neuverlegungsmaßnahmen mit zeitlicher Verzögerung immer wiederkehrende oder lang anhaltende Coliformen-Befunde bzw. stark schwankende Koloniezahlen auf.
- Desinfektionsmaßnahmen mit z. B. 50 mg/l Chlor oder 150 mg/l H₂O₂ führen nur zu einer kurzzeitigen Verbesserung der mikrobiologischen Trinkwasserbeschaffenheit.
- Bei kontinuierlicher Chlorung mit 0,1 - 0,3 mg/l Chlor, sind die Wasserproben mikrobiologisch nicht zu beanstanden.
- Sobald die Chlordosierung abgestellt wird, sind wieder coliforme Keime in den Wasserproben nachweisbar.
- Bei wiederholten Probenahmen in einem bestimmten Gebiet werden Coliforme nachgewiesen, die derselben Art angehören und dasselbe Stoffwechselprofil besitzen.

Spezialfall: Lokalisierung von Biofilmen in einem Trinkwassernetz



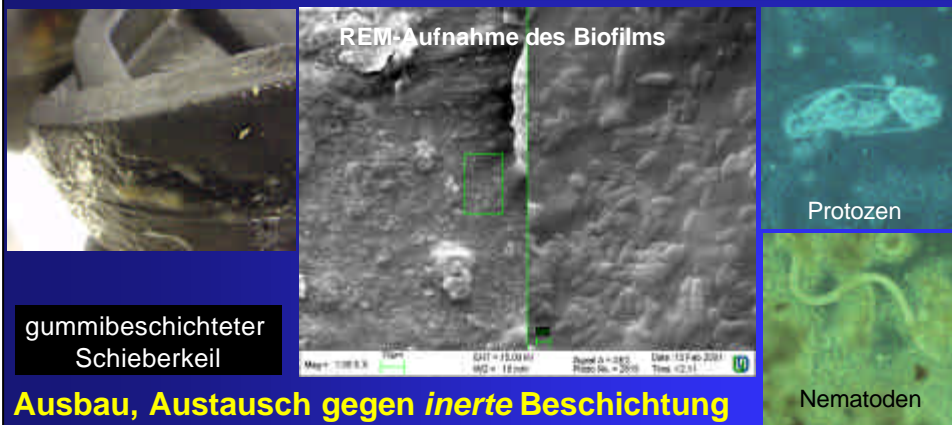
- nach Neuverlegungsmaßnahmen: wiederholt positive Coliformen-Befunde (*Citrobacter freundii*) im Trinkwasser trotz mehrerer Desinfektions- und Spülmaßnahmen
- Lokalisierung der Kontamination auf den Bereich eines Schieberkreuzes über Wasserproben!



Freilegung und Inspektion von Absperrarmaturen und Rohren



- Befund:
 - sichtbare Beläge auf der Oberfläche der Absperrschieber,
 - Rohrinnenflächen (PVC-Rohr) belagsfrei
 - Nachweis von coliformen Bakterien (*C. freundii*) im Belag
- Ursache: biologisch abbaubarer Weichmacher in Gummi-Beschichtung

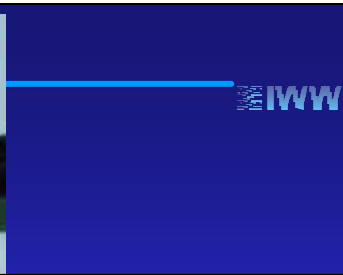


16 weitere Fälle: Untersuchung von Belägen und Wasserproben (1L) aus der Nähe der Absperrarmaturen



Nachweis von Coliformen	Anzahl
im Biofilm und im Trinkwasser	11
nur im Biofilm	1
nur in Trinkwasser	1
weder im Biofilm noch im Trinkwasser	3

► **Biofilm- und Wasserisolate: identische api 20 E-Profile**



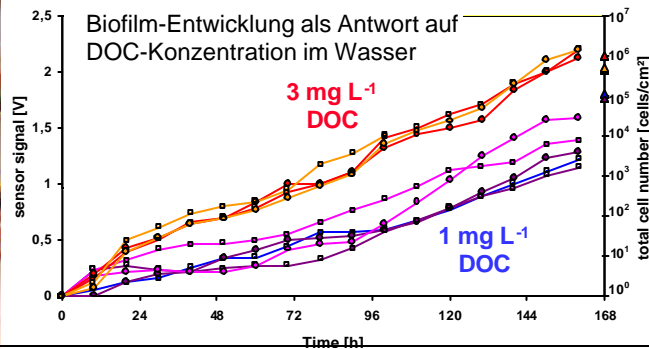
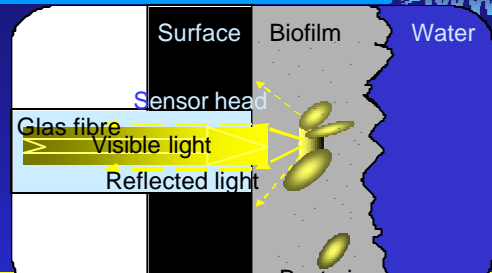
Der Biofilm zu Hause:

- Besiedlung von Dusch-Schläuchen, die Nährstoffe abgeben
- Habitat für hygienisch relevante Organismen
- Verteilung als Aerosol

(U. Szewzyk, TU Berlin)

Ein Blick in die Zukunft: Biofilm-Sensoren

Faseroptischer Sensor aus dem EU-Projekt „SAFER“



Bekämpfung bereits etablierter Biofilme

- mechanische Entfernung (z.B., Hochdruckreiniger, flexible Bürsten für Leitungssysteme); einfaches, oft wirkungsvolles Verfahren,
- **leider nicht überall anwendbar**



- Desinfektion: Abtötung hygienisch relevanter Organismen
- In Trinkwassersystemen (Beispiele):
 - Chlor/Chlordioxid
 - UV-Strahlung (wirkt nicht gegen Biofilme)
 - Wasserstoffperoxid (Anlagenteile)
 - Ozon (Aufbereitung)

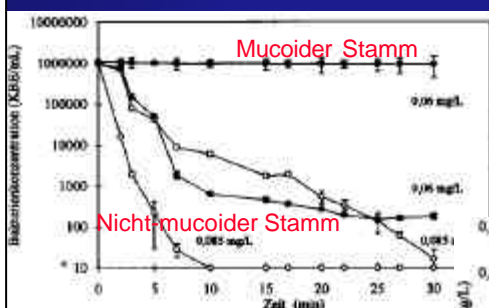
Beispiel: Kontrolle von Biofilm-Bildung im Trinkwasserbereich durch Chlorung

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

Problem: Organismen sind im Biofilm 10-1.000fach resistenter als im planktonischen Zustand – Warum?

Mechanismen der Resistenz von Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen

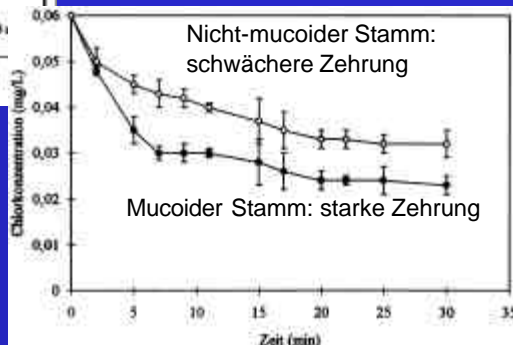
- Transportlimitierung durch **Reaktions-Diffusions-Wechselwirkung**



Zeitabhängige Inaktivierung des mucoiden Stammes *P. aeruginosa* SG41 (●) und der spontan nichtmucoiden Revertante SG41R1 (○) in Gegenwart von 0,06 mg/L Chlor

(Grobe, 1996)

Zeitabhängige Abnahme der Chlorkonzentration in den Desinfektionsversuchen mit dem mucoiden Stamm *P. aeruginosa* SG41 (●) und dem nichtmucoiden Stamm SG41R1 (○) in Gegenwart von 0,06 mg/L Chlor

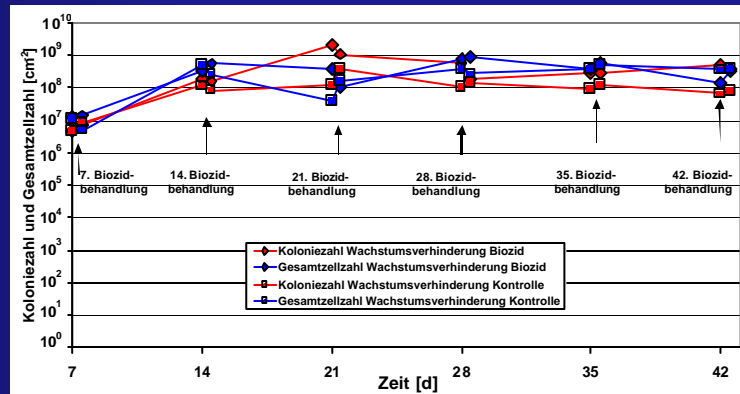


Mechanismen der Resistenz von Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen



IWW

- Enzymatische Inaktivierung des antimikrobiellen Wirkstoffs



Bestimmung der Koloniezahlen und der Gesamtzellzahlen vor und nach Biozidbehandlung mit 12,6 mg/L H₂O₂ und 9 mg/L PES für 15 min an 42 aufeinanderfolgenden Tagen. Biozidbehandlung ab dem ersten Tag (Schulte, 2003)

Mechanismen der Resistenz von Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen



IWW

Langsames Wachstum im Biofilm (verringerte Wachstumsraten)

- Die meisten Biozide wirken besser bei stoffwechselaktiven Mikroorganismen (Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase sind empfindlicher als Bakterien in der Stationären)
- Wachstumsraten können aufgrund von Nährstofflimitierung sehr gering sein (VBNC, non-growing organisms)
- Biofilme in oligotrophen Systemen; oligotrophe Bereiche im Biofilm durch Nährstoffgradienten, die zu einer physiologischen Heterogenität im Biofilm führen können

Zellen der gleichen Bakterienart im selben Biofilm können unterschiedlich resistent sein

Weitere Hypothesen zu Resistenzmechanismen



- Effluxsysteme („bacterial vomiting“)
- Biofilm-spezifischer Phänotyp mit erhöhter intrinsischer Resistenz: „persister cells“
 - Expression dieses biozidresistenten Phänotyps bei**
 - Substratlimitierung
 - Umweltstress
 - Einwirkung von subletalen Dosen von Bioziden
 - hohe Zelldichten
 - Induktion der EPS-Produktion
 - Zell- Zell- Kommunikation mit Signalmolekülen („quorum sensing“); gezielte Bildung geschützter Bereiche durch Struktur des Biofilms oder durch die Regulation der Bildung am Resistenzmechanismus beteiligter Moleküle
- Programmierter Zelltod („Apoptose“): Zehrung von Bioziden, „Nischen“, Nährstoffe für Überlebende

Davies, 1999; Mah und O'Toole, 2001; Miller und Basler, 2001



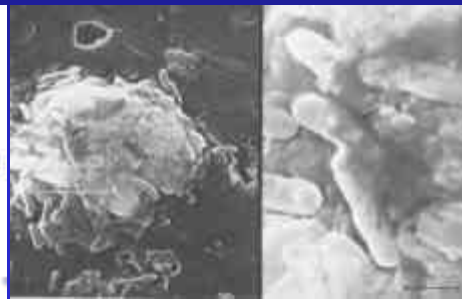
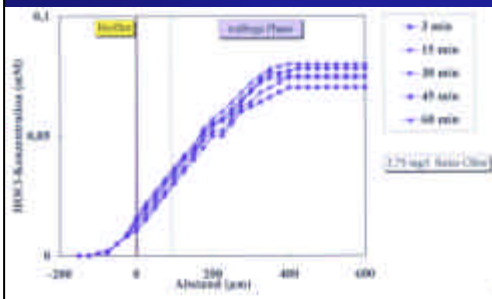
**Desinfektion ist Stress
– wie reagieren
Bakterien darauf?**

U. Obst

Mechanismen der Resistenz von Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen



➤ Transportlimitierung durch Reaktions-Diffusions-Wechselwirkung: Schutzmechanismus gegen Chlor



Diffusion von Chlor in Biofilmen aus *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae*
(deBeer et al., 1994)

Überleben von Pseudomonaden und Mykobakterien in PVC-Rohr
- in EPS eingebettet
- nach 7 d Exposition
- 10-15 mg L⁻¹ freies Chlor

(Vess et al., 1993)