

Abschlussbericht

Pseudomonas aeruginosa in Trinkwassersystemen – Wachstumsansprüche und nachhaltige Gegenmaßnahmen

31. Juli 2014

Dr. Beate Hambsch (Projektleitung)

TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe

Dr. Michael Hügler

TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe

Dr. Andreas Korth

TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe
Außenstelle Dresden

Dr. Heike Petzoldt

TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe
Außenstelle Dresden

Herausgeber

DVGW Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e. V.
Technisch-wissenschaftlicher Verein
Josef-Wirmer-Straße 1–3
53123 Bonn

T +49 228 91885
F +49 228 9188990
info@dvwg.de
www.dvgw.de

Pseudomonas aeruginosa in Trinkwassersystemen –
Wachstumsansprüche und nachhaltige
Gegenmaßnahmen

Abschlussbericht

DVGW-Förderkennzeichen W6-02-09 + W6-02-09-ERW

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
1 Einleitung und Zielsetzung	6
2 Stand des Wissens	7
3 Material und Methoden	9
3.1 Material	9
3.1.1 Eingesetzte Bakterienstämme	9
3.1.2 Verwendete Wässer	9
3.1.3 Untersuchte Materialien.....	9
3.2 Nachweismethoden.....	11
3.2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Parameter.....	11
3.2.2 Chemische Parameter.....	14
3.3 Biofilmablösung.....	14
3.4 Versuchsdurchführung	15
3.4.1 Wachstum in der Wasserphase.....	15
3.4.2 Wachstum mit Materialien: Batchversuche.....	16
3.4.3 Wachstum mit Materialien: Durchflussversuche.....	18
3.4.4 Desinfektion im Wasserkörper.....	22
3.4.5 Desinfektion auf Materialien	23
3.4.6 Spülungen	25
4 Ergebnisse	27
4.1 Vermehrung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> im Wasserkörper	27
4.1.1 Übersicht	27
4.1.2 Untersuchungen in verschiedenen Wässern	27
4.1.3 Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen.....	31
4.1.4 Auswertung	36
4.1.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	38
4.2 Vermehrung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mit verschiedenen Materialien.....	38
4.2.1 Übersicht der Materialien und Versuche.....	38

4.2.2	Batchversuche.....	39
4.2.3	Durchflussversuche	48
4.2.4	Molekularbiologische Untersuchungen.....	58
4.2.5	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	58
4.3	Effektivität von Desinfektions- und Reinigungsmaßnahmen	59
4.3.1	Übersicht	59
4.3.2	Desinfektion im Wasserkörper.....	59
4.3.3	Desinfektion auf Materialien	61
4.3.4	Spülungen	80
4.3.5	Molekularbiologische Untersuchungen.....	82
4.3.6	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	85
5	Prüfung der Kriterien der Materialprüfung in Bezug auf <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	88
6	Prozessmodell und Handlungsempfehlungen	90
6.1	Allgemeines zum Prozessmodell	90
6.2	Handlungsempfehlungen	92
7	Literaturverzeichnis	94

Zusammenfassung

Das Umweltbakterium *Pseudomonas aeruginosa*, das nach Baumaßnahmen im Trinkwassernetz, in neu verlegten Trinkwasserleitungen, sowie in neu errichteten Trinkwasser-Installationen auftreten kann, zählt zu den wichtigsten fakultativen Krankheitserregern. Herkömmliche Beseitigungsmaßnahmen sind oftmals nicht nachhaltig. Bisher lag kein umfassendes Prozessverständnis zum Verhalten von *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwassersystemen vor, so dass sich dementsprechend oftmals keine zielgerichteten Maßnahmen ableiten ließen.

Im Rahmen dieses DVGW-Forschungsprojektes wurden daher die Wachstumsansprüche von *Pseudomonas aeruginosa* und Maßnahmen zur Beseitigung untersucht. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Beurteilung der Vermehrung im Wasserkörper und auf unterschiedlichen Materialien. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen von Desinfektions- und Spülmaßnahmen überprüft.

Für die Untersuchungen wurden Reinkulturen von zwei *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen eingesetzt: ein Stamm aus der Stammsammlung (DSM 1117) und ein Umweltisolat (UI 9). Zur Untersuchung möglicher Konkurrenzeffekte wurden parallel autochthone Mischbiozöosen aus Trinkwasser eingesetzt.

Für die Untersuchungen zur Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* im **Wasserkörper** wurden beide *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme sowohl als Reinkulturen als auch in Anwesenheit einer natürlichen Mischbiozönose in 3 verschiedenen Testwässern eingesetzt, wobei zusätzlich der Einfluss eines gut abbaubaren Substrats (Acetat) und der Temperatureffekt geprüft wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass dieses Bakterium gut an die Nährstoffverhältnisse im Trinkwasser angepasst ist. In allen 3 untersuchten Wässern erfolgte in Reinkultur ein Wachstum bis zu Koloniezahlen von 10^6 bis 10^8 pro 100 ml auch ohne Zusatz von Acetat als externer Kohlenstoffquelle. In Reinkultur zeigte *Pseudomonas aeruginosa* bei allen untersuchten Temperaturen (10°C, 15°C und 20°C) eine Vermehrung. Das Wachstumsmaximum wurde bei den niedrigeren Temperaturen jedoch erst nach 10 bis 14 Tagen, bei 20°C dagegen bereits nach 2 bis 3 Tagen erreicht. In Anwesenheit einer natürlichen Trinkwasser-Mischbiozönose trat ein Konkurrenzeffekt um die Nährstoffe zwischen *Pseudomonas aeruginosa* und der Mischbiozönose auf. Die Untersuchungen zeigten, dass bei einer Temperatur von 20°C *Pseudomonas aeruginosa* in den untersuchten Wässern konkurrenzfähig ist, d.h. es fand ein deutliches Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* bis ca. 10^6 pro 100 ml statt, bei

15°C trat dagegen nur noch eine Vermehrung um ca. 1 Log-Stufe auf, bei 10°C trat bei gleichzeitiger Anwesenheit einer Mischbiozönose keine Vermehrung mehr auf.

Für die Untersuchung des Wachstums von *Pseudomonas aeruginosa* im **Biofilm auf Materialien** wurden sowohl Batchversuche, als auch Durchflussversuche durchgeführt. Das Materialscreening umfasste die Materialien Edelstahl (ES), PE, PP, PVC-u, sowie verschiedene Dichtmaterialien, v.a. EPDM und Weich-PVC, die zum einen als unbewachsene Träger verwendet wurden, zum anderen nach Etablierung eines Trinkwasserbiofilms. Es zeigte sich, dass bei einer Animpfung durch *Pseudomonas aeruginosa* alle Materialklassen besiedelt wurden. Sofern kein Trinkwasserbiofilm vorhanden war, wurden EPDM-Materialien stärker durch *Pseudomonas aeruginosa* besiedelt als andere Materialien. Ein vorhandener Trinkwasserbiofilm führte insbesondere bei EPDM-Materialien zu einer geringeren Ansiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* bei einer Animpfung. Bei allen Materialien mit oder ohne Trinkwasserbiofilm kam es im Durchfluss zu einer exponentiellen Abnahme der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa*, wobei ein vorhandener Trinkwasserbiofilm eine schnellere Verringerung bewirkte. In Abhängigkeit von der Startbesiedlung blieb *Pseudomonas aeruginosa* im Durchfluss über lange Zeiträume (Monate) im Biofilm nachweisbar. Im Batchansatz kam es bei Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms zu einem längeren Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper als auf den Oberflächen.

Die Versuche zur **Desinfektion** von *Pseudomonas aeruginosa* im **Wasserkörper** zeigten bei beiden Stämmen (DSM 1117 und UI 9) sowohl mit Chlor als auch mit Chlordioxid eine gute Abtötung über > 4 Log-Stufen bereits mit den Mindestkonzentrationen nach TrinkwV nach 0,5 h. Bei Chloraminen bzw. bei Chlorung mit gleichzeitiger Anwesenheit von Ammonium war dagegen erwartungsgemäß eine längere Einwirkzeit notwendig.

Die Versuche zur Überprüfung der Wirksamkeit von **Desinfektionsmitteln** auf *Pseudomonas aeruginosa* **auf Materialien** zeigten, dass auch hier durch Desinfektionsmittelkonzentrationen nach TrinkwV eine Reduktion um ca. 4 Log-Stufen in Batchversuchen erreicht wird. Eine Ausnahme stellten jedoch Dichtungsmaterialien und Weich-PVC-dar, bei denen nur maximal 1 Log-Stufe Reduktion erreicht wurde.

Im Durchfluss führte die Desinfektionsmittelrestkonzentration von 0,1 mg/l Chlor nach wenigen Tagen zu einer vollständigen Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* von den Oberflächen, mit Ausnahme von EPDM. Dort war dagegen selbst nach einer Expositionsdauer von zwei Wochen die Reduktion mit < 1 Log-Stufe gering. Die Ergebnisse für Chlordioxid mit einer Restkonzentration von 0,05 mg/l waren weitgehend

vergleichbar, d.h. mit Ausnahme von EPDM war nach 14 Tagen Expositionsdauer eine vollständige Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* von den Oberflächen zu erreichen, während der Effekt auf EPDM sehr gering war.

Bei einer Desinfektion entsprechend der Vorgabe für eine **Anlagendesinfektion** kam es ohne und mit einem Trinkwasserbiofilm mit den Desinfektionsmitteln Chlor, Chlordioxid und Wasserstoffperoxid bis auf die EPDM-Materialien zu einer vollständigen Beseitigung der Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*. Bei den EPDM-Materialien wurde unter Berücksichtigung aller Versuchsansätze in weniger als 50 % der Versuche eine vollständige Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* von den Oberflächen erreicht. Ein Einfluss des verwendeten Desinfektionsmittels war nicht zu verzeichnen.

Auch Sprühdesinfektionsmittel waren bei den Materialien wirksam (> 4 Log-Stufen).

Die **Spülversuche** mit Schläuchen bzw. Rohren aus den Materialien PE, PP, PVC-u und EPDM zeigten, dass ein vollständiger Austrag von *Pseudomonas aeruginosa* durch keines der Verfahren erreicht werden konnte. Bei der überwiegenden Anzahl der Versuche lag die Verringerung im Bereich von maximal 1 Log-Stufe.

Die Materialversuche zeigten, dass auch für *Pseudomonas aeruginosa* die **W 270-Kriterien** aussagekräftig sind. In Batchversuchen zeigte sich insbesondere bei Kurzzeitversuchen und ohne autochthonen Biofilm jeweils eine deutlich stärkere und im Zeitverlauf über 14 Tage noch zunehmende Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* bei den Materialien ohne generelle Zulassung nach W 270 (EPDM und Weich-PVC). Bei den Desinfektionsversuchen mit Materialien zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen zugelassenen und nicht oder nur eingeschränkt zugelassenen Materialien (Weich-PVC und EPDM). Während erstere durch Trinkwasserdesinfektionsverfahren gut erreicht wurden, d.h. *Pseudomonas aeruginosa* im Batch nach einer halben Stunde um mind. 4 Logstufen reduziert war bzw. im Durchfluss spätestens nach 2 Tagen mit 0,1 mg/l Cl₂ bzw. 0,05 mg/l ClO₂ nicht mehr nachweisbar war, ließ sich dies bei EPDM bzw. Weich-PVC nicht erreichen. Hier wurde je nach Einwirkzeit nur eine sehr geringe oder gar keine Reduktion erreicht. Es lässt sich festhalten, dass i. d. R. bei Einsatz von Materialien mit genereller Eignung nach W 270 für den Trinkwasserbereich auch in Bezug auf *Pseudomonas aeruginosa* gültige Aussagen getroffen werden können.

Aus den Ergebnissen des Forschungsprojekts ließen sich ein **Prozessmodell und Handlungsempfehlungen** ableiten.

1 Einleitung und Zielsetzung

Das Umweltbakterium *Pseudomonas aeruginosa* zählt zu den wichtigsten fakultativen Krankheitserregern. In der Praxis tritt dieses Bakterium häufiger nach Baumaßnahmen im Trinkwassernetz, in neu verlegten Trinkwasserleitungen, in Krankenhäusern sowie in neu errichteten Trinkwasser-Installationen auf. Herkömmliche Beseitigungsmaßnahmen sind oftmals nicht nachhaltig. Bisher lag kein umfassendes Prozessverständnis zum Verhalten von *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwassersystemen vor, so dass sich dementsprechend oftmals keine zielgerichteten Maßnahmen ableiten ließen.

Im Rahmen dieses DVGW-Forschungsprojektes wurden daher die Wachstumsansprüche von *Pseudomonas aeruginosa* und Maßnahmen zur Beseitigung untersucht. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Beurteilung der Vermehrung im Wasserkörper und auf unterschiedlichen Materialien. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen von Desinfektions- und Spülmaßnahmen überprüft. Das Projekt sollte es ermöglichen, das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* bei verschiedenen Randbedingungen zu beschreiben und die Wirksamkeit von Beseitigungsmaßnahmen zu beurteilen.

Die zu entwickelnden Prozessvorstellungen zum Verhalten von *Pseudomonas aeruginosa* im Trinkwasserbereich sollen in der Praxis dazu dienen, Kontaminationsursachen schnell zu identifizieren und zielgerichtete Maßnahmen zur Vermeidung und Beseitigung einer Kontamination abzuleiten.

2 Stand des Wissens

Bei dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* handelt es sich um ein Umweltbakterium, das zu den wichtigsten fakultativen Krankheitserregern zählt. In der Literatur sind insbesondere Fälle aus Krankenhäusern beschrieben, die auf Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* zurückzuführen sind (z. B. Exner et al. 2007; Mena and Gerba 2009; Trautmann et al. 2009). Als Ursache wird u. a. eine Vermehrung in der Trinkwasser-Installation diskutiert. Einträge können über Fremdwasserzufluss sowie bei Bau- und Reparaturarbeiten erfolgen.

Im öffentlichen Trinkwassernetz scheinen keine Bedingungen vorzuliegen, die die Vermehrung des Bakteriums besonders begünstigen. Bei einer Umfrage unter DVGW-Mitgliedsunternehmen (Wingender et al. 2009) wurden für das Verteilungssystem in weniger als 1 % der Proben *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen, wobei die Befundhöhe überwiegend in einem niedrigen Bereich von 1-5 KBE/100 ml lag. Deutlich häufiger und höher waren Befunde bei Neubauleitungen und in Trinkwasser-Installationen. Für Neubauleitungen waren ca. 9 % und für Trinkwasser-Installationen ca. 10 % der Befunde positiv. Eine Auswertung von Untersuchungen in Krankenhäusern durch Schoenen (2009) ergab eine erhöhte Befundrate von 2,5 %.

Pseudomonas aeruginosa hat in medizinischen Einrichtungen eine wichtige Bedeutung als Erreger nosokomialer Infektionen (Exner et al. 2007). Aufgrund der Problematik wurde in einer Empfehlung des Umweltbundesamtes eine Untersuchungspflicht auf *Pseudomonas aeruginosa* in medizinischen Einrichtungen festgelegt (Empfehlung des Umweltbundesamtes 2005). Der aktuelle Stand zum Vorkommen und zur Bewertung von *Pseudomonas aeruginosa* im Trinkwasser wurde in jüngster Zeit in mehreren Artikeln beleuchtet (Exner et al. 2007; Schoenen 2009; Trautmann et al. 2009; Wingender et al. 2009; Benölken et al. 2010; Moritz 2011). Obwohl in der Regel nicht von einer Gesundheitsgefährdung der Bevölkerung auszugehen ist, kann es beim Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* u. U. bis zu Abkochgeboten im Leitungsnetz kommen, da *Pseudomonas aeruginosa* von den zuständigen Behörden als Krankheitserreger bewertet wird (Robert-Koch-Institut 2002). In Krankenhäusern werden häufig endständige Filter installiert, um Infektionen über das Trinkwasser zu unterbinden (Schoenen 2009; Trautmann et al. 2009). Im Rahmen des BMBF-Verbundvorhabens „Vermeidung und Sanierung von Trinkwasser-Kontaminationen durch hygienisch relevante Mikroorganismen aus Biofilmen der Hausinstallation“ wurde ein Screening zur Verbreitung von *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwasser-Installationen durchgeführt (Kistemann et al. 2010). Eine Zusammenstellung von Kontaminationsfällen mit *Pseudomonas aeruginosa*

für die Jahre 1997 bis 2002 wurde im Rahmen des DVGW-Projektes W10/02/01 „Studie zur hygienischen Sicherheit von Wasserbehandlungsgeräten“ erarbeitet. Von insgesamt 6 Fallstudien mit *Pseudomonas aeruginosa* traten eine in der Wasseraufbereitung, drei in der Wasserverteilung und zwei in der Trinkwasser-Installation auf (Hamsch et al. 2004).

Labortechnische Untersuchungen mit *Pseudomonas aeruginosa* wurden am TZW im Rahmen von Forschungsvorhaben mit verschiedenen Fragestellungen durchgeführt. Im BMBF-Verbundforschungsvorhaben zur exportorientierten Forschung (02WT0280) wurde u. a. untersucht, ob sich *Pseudomonas aeruginosa* bei Anwendung hoher Chlorkonzentrationen nach vollständiger Chlorzehrung verstärkt vermehren kann, wie dies bei Mischbiozönosen beobachtet wird (Hamsch et al. 1993; Hamsch und Göbes 2000). Hier zeigte sich jedoch nur ein leicht fördernder Effekt der Chlorung unter mesophilen Bedingungen (22°C), der allerdings deutlich geringer ausgeprägt war als bei den Mischbiozönosen. Ein Absterben oder ein Rückgang bei gleichzeitiger Anwesenheit der Mischbiozönosen trat jedoch ebenfalls nicht auf (Hamsch 2005). Im Rahmen eines BMBF-Forschungsvorhabens zu biofilmhemmenden Beschichtungen auf Sol-Gel-Basis (02WT98470) zeigte sich, dass *Pseudomonas aeruginosa* sowohl im Biofilm als auch in Suspension mindestens 4 Wochen ohne direkte Zugabe organischer Nährstoffe überleben kann, so dass auf jeden Fall bereits geringste Spuren organischer Substanzen das Wachstum und die Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* fördern (Schmidt et al. 2002). Auch internationale Studien gaben bereits Hinweise darauf, dass *Pseudomonas aeruginosa* in sehr nährstoffarmen Wässern überleben und auch wachsen kann (Botzenhart und Röpke 1971; Favero et al. 1971; van der Kooij et al. 1982).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Eingesetzte Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden Reinkulturen von zwei *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen eingesetzt: *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 (Stamm aus der Stammsammlung, Isolat aus Blutkultur) und *Pseudomonas aeruginosa* UI 9. Bei letzterem handelt es sich um ein Umweltisolat, das vom TZW aus einer kontaminierten Trinkwasserprobe isoliert wurde. Außerdem wurden zur Untersuchung möglicher Konkurrenzeffekte auch Mischbiozöosen eingesetzt, die durch Filtration aus Karlsruher bzw. Dresdner Trinkwasser gewonnen wurden.

3.1.2 Verwendete Wässer

Die Versuche wurden mit Modellwasser (Reinstwasser: Simplicity 185) und mit zwei realen Trinkwässern durchgeführt. Beim Trinkwasser Karlsruhe (KA) handelt es sich um ein Grundwasser, welches durch Enteisenung und Entmanganung (Belüftung und anschließende Filtration über einen Mehrschichtfilter) aufbereitet und nicht desinfiziert wird. Das Trinkwasser Dresden (DD) wird aus einem mit Uferfiltrat angereicherten Grundwasser gewonnen, wobei die Aufbereitung eine Belüftung mit Entsäuerung sowie Filtration über Aktivkohle und Desinfektion mit Chlor beinhaltet. Für die Untersuchungen wurde Wasser vom Ablauf der Aktivkohlefiltration (vor Desinfektion), bzw. desinfiziertes Trinkwasser nach Passage eines kleintechnischen Aktivkohlefilters zur Beseitigung von freiem Chlor verwendet. Um eine Limitierung des Wachstums aufgrund eines Mangels an anorganischen Nährstoffen zu vermeiden, wurde dem Modellwasser zusätzlich Grundsatzlösung (Schweissfurth 1972) zugegeben. Eine organische Kohlenstoffquelle ist im Modellwasser nicht vorhanden. In einzelnen Versuchen wurde die Grundsatzlösung auch den Trinkwässern zugesetzt.

3.1.3 Untersuchte Materialien

Die Werkstoffe wurden in Abstimmung mit der Prüfstelle des TZW und der Projektbegleitgruppe ausgewählt. Es handelt sich um die Rohrleitungsmaterialien Edelstahl (ES), Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyvinylchlorid (PVC), sowie die Dichtmaterialien Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM), Nitril-Butadien-Kautschuk (NBR) und Styrol-Butadien-Kautschuk (SBR). Tabelle 3-1 gibt eine Übersicht über die

verwendeten Materialien, sowie ihre Einstufung gemäß Prüfung nach DVGW-Arbeitsblatt W 270.

Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten Werkstoffe, sowie deren Bewertung gemäß DVGW-Arbeitsblatt W 270.

Beschreibung	Abkürzung	Bewertung nach W 270-Prüfung, zugelassen für	Biofilm nach W 270 (in ml)
Edelstahl	ES	generellen Einsatz	< 0,05
Polyethylen	PE 1	generellen Einsatz	< 0,05
	PE 2	generellen Einsatz	(< 0,05)
Polypropylen	PP 1	generellen Einsatz	< 0,05
	PP 2	generellen Einsatz	(< 0,05)
Polyvinylchlorid, hart	PVC-u 1	generellen Einsatz	(< 0,05)
	PVC-u 2	generellen Einsatz	(< 0,05)
Dichtmaterialien	EPDM 1	großflächige Dichtungen	< 0,12
	EPDM 2	großflächige Dichtungen	< 0,12
	EPDM 3	großflächige Dichtungen	< 0,12
	EPDM 4	kleinflächige Dichtungen	ca. 0,1 -0,7
	EPDM 5	nicht zugelassen	> 2,0
	EPDM 6	nicht zugelassen	(> 2,0)
	EPDM 7	nicht zugelassen	(> 2,0)
	EPDM/SBR NBR	nicht zugelassen nicht zugelassen	(> 2,0) (> 2,0)
Teichfolie (Weich-PVC)	Weich-PVC	nicht zugelassen	(> 2,0)

ohne () Untersuchungsergebnisse des Materials liegen in der Prüfstelle vor
() wurde nicht direkt untersucht

3.2 Nachweismethoden

3.2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Parameter

3.2.1.1 Anzucht der Bakterien und Herstellung des Inokulums

Die Reinkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* wurden auf DEV-Nähragar-Schrägröhrchen ausgestrichen und bei 36°C für 1-2 Tage kultiviert. Für die Herstellung des Inokulums wurden die in den Schrägröhrchen gewachsenen Kolonien in 2 ml steriler 0,9 %ige NaCl-Lösung suspendiert. Diese Suspension wurde in 7 ml sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung überführt und homogenisiert (Vortex). Zur Abtrennung größerer Agglomerate und Partikel wurde die Suspension über einen sterilen Faltenfilter filtriert. Danach wurde das Filtrat über einen sterilen Membranfilter (0,2 µm) filtriert (Nachspülung mit 150 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung). Zur Resuspendierung der Bakterienzellen wurde der Membranfilter in 100 ml sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung überführt und für 30 min geschüttelt.

Für die Herstellung des Inokulums der Mischbiozönose wurden jeweils 40 l Trinkwasser über einen 0,2 µm Membranfilter filtriert. Danach wurde mit 150 ml steriler 0,9 %ige NaCl-Lösung gespült. Die Resuspendierung der Bakterien erfolgte in 40 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung (30 min Schütteln).

3.2.1.2 Nachweis und Zählung von *Pseudomonas aeruginosa*

Der kulturelle Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte entsprechend DIN EN ISO 16266 (05/2008) mittels Membranfiltration der Probe und Bebrütung bei 36 +/- 2 °C auf CN-Selektivagar. Die Bebrütungszeit wurde in Abwandlung der Norm nach anfänglicher Überprüfung auf 24 h verkürzt. Da sowohl der verwendete Laborstamm (DSM 1117) als auch das Umweltisolat (UI 9) das blaugüne Pigment als Nachweisreaktion beim Wachstum auf CN-Agar bzw. dem Membranfilter zeigten, waren weitere Nachweisschritte nicht erforderlich.

3.2.1.3 Koloniezahlen auf R2A-Agar

Die Bestimmung der Koloniezahl heterotropher Bakterien (Heterotrophic Plate Count – HPC) wurde entsprechend der Methode von Reasoner und Geldreich (1985) bestimmt. Hierbei wurde die Probe mittels Plattengussverfahren in R2A-Agar, einem nährstoffarmen Agar, inokuliert. Die Bebrütung erfolgte bei 20 +/- 2°C über 7 Tage. Mit dieser Methode werden gegenüber der Koloniezahlbestimmung nach TrinkwV (DEV-Agar, 2 d Bebrütung bei 22 bzw. 36°C) auch langsamer wachsende Bakterien mit erfasst.

3.2.1.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) erfolgte nach der Methode von Hobbie et al. (1977) mittels Anreicherung über Membranfiltration und Anfärben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange. Hierfür wurde ein definiertes Probenvolumen über einen 0,2 µm Membranfilter filtriert. Die Zellen wurden auf dem Filter mit Acridinorange-Lösung angefärbt und anschließend in einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Diese Methode erfasst alle Bakterien mit intakter Zellmorphologie, sowohl lebende als auch tote Zellen.

Für FISH-Proben wurde darüber hinaus eine Gegenfärbung zu der mit Fluoreszenzfarbstoff Cy3-markierten Sonde mittels DAPI durchgeführt (Benölken 2011; Moritz 2011).

3.2.1.5 Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* mittels FISH

Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) erfolgte mit dem Testkit „SCAN-VIT *Pseudomonas aeruginosa*“ der Fa. Vermicon (München). Die Arbeitsschritte erfolgten entsprechend Herstellerangaben. Alternativ zum Testkit wurden die Untersuchungen nach der von Benölken (2011) und Moritz (2011) beschriebenen Methode mit der Sonde Psae 16S-182 nach Wellinghausen et al. (2005) durchgeführt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in nachfolgendem Fließschema dargestellt:

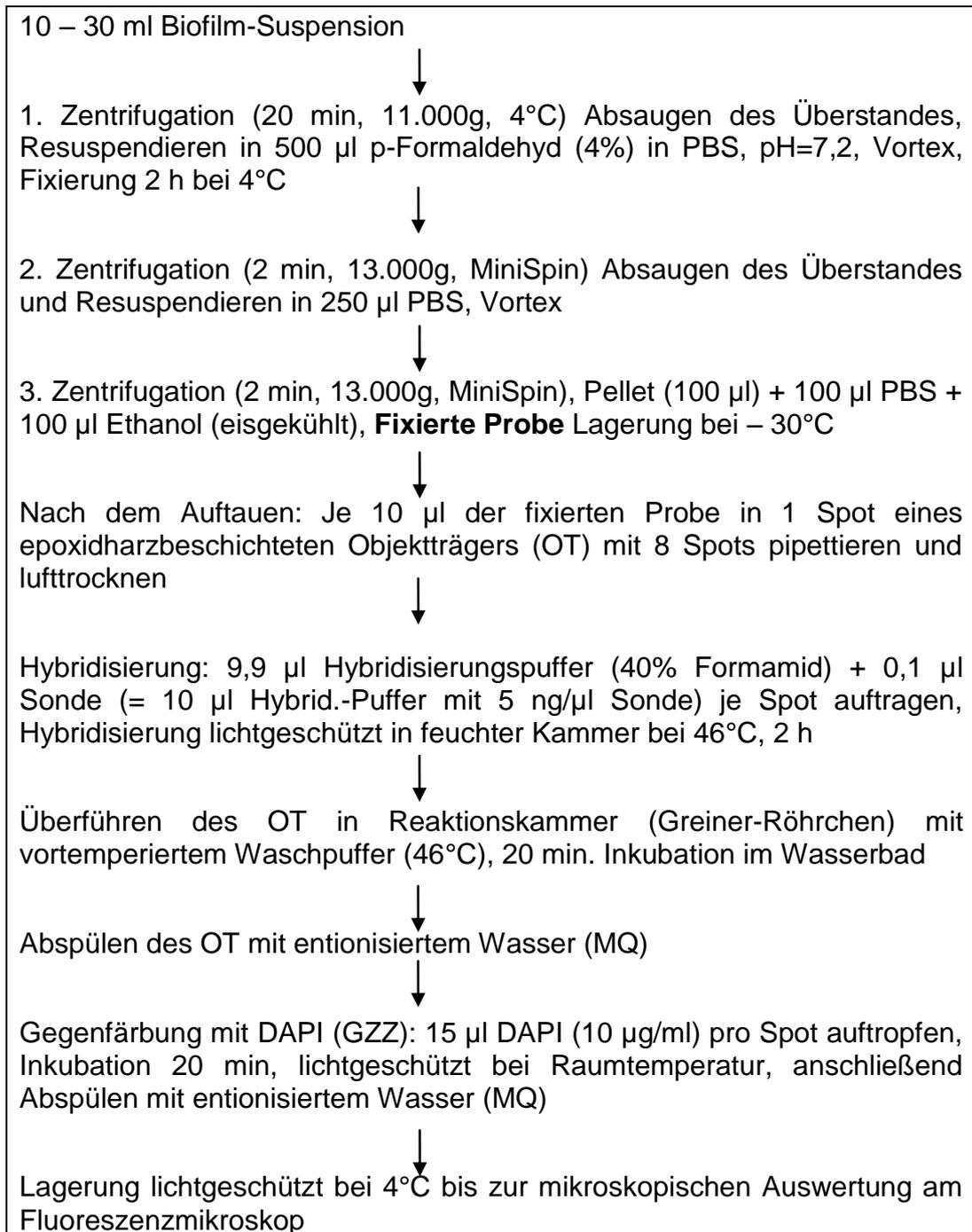


Abbildung 3-1: Schema des Ablaufs der Aufarbeitung der Proben für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse N-U) mit einem Filterblock DM 570 (Ex 552, BA 573-648) der Fa. AHF für die Cy3 markierte Sonde sowie einem Filterblock DM 400 (Ex 340-380, BA 435-485) der Fa. Nikon für DAPI.

3.2.2 Chemische Parameter

3.2.2.1 Chlor und Chlordioxid

Für die Bestimmung der Konzentration von Chlor und Chlordioxid in den Desinfektionsstammlösungen, Dosierlösungen sowie im Wasser wurde die am TZW etablierte und akkreditierte laborinterne Methode in Anlehnung an die DEGUSSA Firmenschrift verwendet. Hierbei wurden Chlor und Chlordioxid photometrisch mittels DPD-Reagenz nebeneinander bestimmt. Die Messung erfolgte mittels UV/VIS-Spektrometer Lambda 20 (Fa. Perkin Elmer) mit einer 5 cm - Küvette bei 552 nm (PVM 204-1). Für die Bestimmung von Chlor und Chlordioxid vor Ort an der Durchflussanlage wurde ein Handphotometer Allcon-Test 310-100 der Fa. Aldos verwendet (Messbereich: 0,03 – 10 mg/l ClO_2 bzw. 0,05 – 5,0 mg/l Cl_2) (PVM 204-2).

3.2.2.2 Wasserstoffperoxid

Zur Bestimmung der H_2O_2 -Konzentrationen kamen Herlisil®-Messstreifen zum Einsatz. Die Verwendung von Messstreifen war möglich, da in einem Konzentrationsbereich von ca. 150 mg/l gearbeitet wurde.

3.3 Biofilmlösung

Die Aufwuchsträger (AT) wurden zur Untersuchung der Etablierung von *Pseudomonas aeruginosa* auf den Materialien wie folgt bearbeitet:

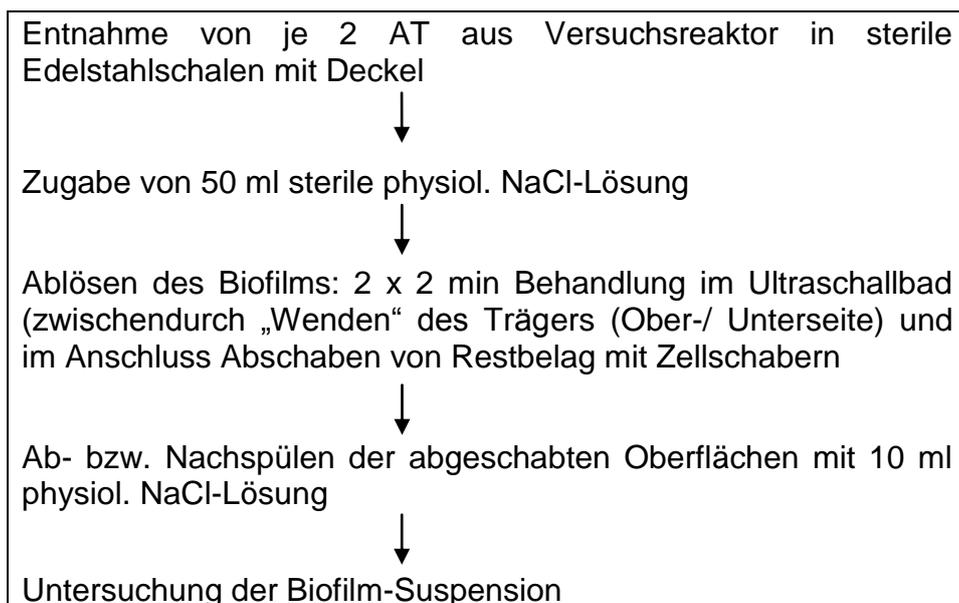


Abbildung 3-2: Schema des Ablaufs der Biofilmuntersuchungen auf den Aufwuchsträgern

3.4 Versuchsdurchführung

3.4.1 Wachstum in der Wasserphase

Für die Untersuchungen zur Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper wurden beide *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme (DSM 1117 und TZW-Isolat UI 9) eingesetzt. Die Untersuchungen wurden sowohl mit Reinkulturen als auch in Anwesenheit einer natürlichen Mischbiozönose in allen 3 Testwässern (Modellwasser, Trinkwasser (KA und DD)) durchgeführt. Allen Testwässern wurde eine anorganische Grundsatzlösung zugegeben. Um den Einfluss eines gut abbaubaren Substrats auf das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* zu untersuchen, wurde Acetat als Kohlenstoffquelle eingesetzt und den Versuchsansätzen in unterschiedlicher Konzentration zugegeben (0, 20, 50, 100, 150 µg C/l). Die Versuche fanden bei folgenden Temperaturen statt: Raumtemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $15 \pm 1^\circ\text{C}$ und $10 \pm 1^\circ\text{C}$.

Die Wachstumsversuche wurden in 250 ml Schottflaschen durchgeführt, die im Dunkeln auf einem Schüttler (100 rpm) inkubiert wurden. Die Versuchsdauer betrug in der Regel zwei Wochen, bei niedrigeren Temperaturen wurden Proben bis zu 65 Tagen nach Versuchsbeginn analysiert.

Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte durch Koloniezahlbestimmung auf CN-Agar (siehe Abschnitt 3.2.1.2). Die Mischbiozönose wurde durch die Bestimmung der Koloniezahl auf R2A-Agar (siehe Abschnitt 3.2.1.3) erfasst. Zusätzlich wurde jeweils zu Versuchsende die Gesamtzellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.1.4).

Die Versuchsdurchführung ist in Abbildung 3-3 schematisch dargestellt.

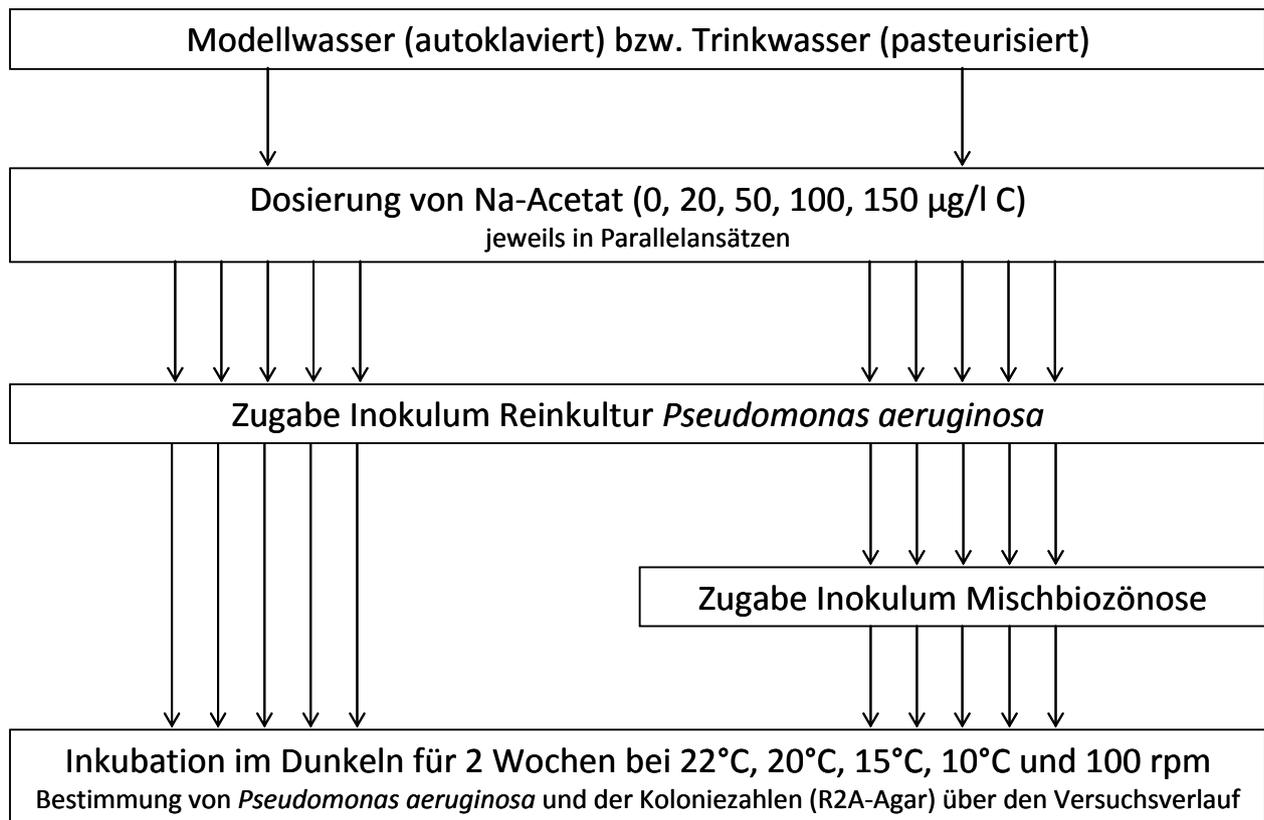


Abbildung 3-3: Versuchsdurchführung der Untersuchungen zum Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper.

3.4.2 Wachstum mit Materialien: Batchversuche

Für die Untersuchung des Wachstums von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm auf Materialien wurden sowohl Batchversuche, als auch Durchflussversuche durchgeführt. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Batchversuche ist in Abbildung 3-4 gezeigt.

Für diese Untersuchungen wurden folgende Materialien verwendet: Edelstahl (ES), Polyethylen (PE 1), Polypropylen (PP 1), Polyvinylchlorid hart (PVC-u 1), Dichtmaterialien (EPDM 2, EPDM 3, EPDM 5, EPDM 6) und Weich-PVC (siehe Tabelle 3-1). Die Materialien wurden in 6 x 8 cm große Trägerplatten zugeschnitten, die Gesamtoberfläche betrug somit 96 cm². Für die Versuche wurden zum einen unbewachsene Träger verwendet, zum anderen wurde darauf vorher ein Trinkwasserbiofilm etabliert. Die Etablierung des Biofilms wurde in Anlehnung an den Versuchsaufbau des Prüfverfahrens nach DVGW Arbeitsblatt W 270 durchgeführt. Die Platten wurden in Edelstahltanks

eingehängt, die von nicht desinfiziertem Trinkwasser durchflossen wurden. Die Mindestzeit für die Etablierung des Biofilms betrug zwei Monate.

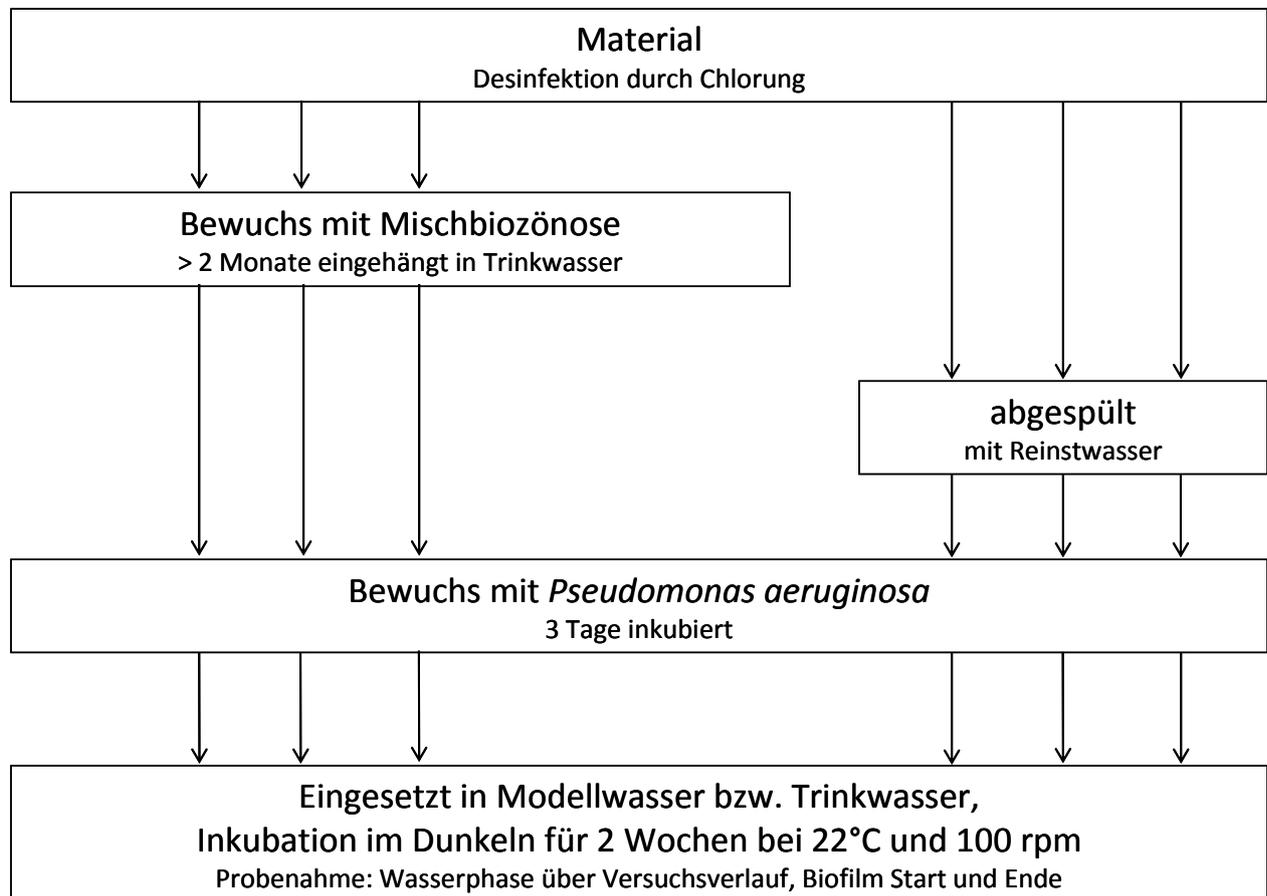


Abbildung 3-4: Versuchsdurchführung der Untersuchungen zum Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* auf Material im Batchansatz.

Die „neuen“ Materialien (ohne Biofilm-Bewuchs) wurden vor Verwendung zunächst mit Chlorklösung (10 g/l) desinfiziert, anschließend gewaschen und vor Versuchsbeginn für 24 h in steriles Reinstwasser gestellt. Anschließend wurden sie zum Bewuchs mit *Pseudomonas aeruginosa* in einer *Pseudomonas aeruginosa*-Lösung für drei Tage inkubiert (Konzentration der Lösung: 10^4 pro ml, Inkubation bei 22°C und 100 rpm). Die mit Trinkwasserbiofilm bewachsenen Träger wurden ohne vorangegangene Reinigung direkt in *Pseudomonas aeruginosa*-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten zweimal in steriles Reinstwasser getaucht, um lose anheftende Bakterien abzuwaschen. Danach wurden die Platten in 500 ml Weithals-Schottflaschen überführt. Abbildung 3-5 zeigt den Versuchsaufbau.

Die Wachstumsversuche auf den Materialien im Batchansatz wurden mit dem Umweltisolat *Pseudomonas aeruginosa* UI 9 in Modellwasser bei 22°C auf dem Schüttler (100 rpm) durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug i. d. R. 14 Tage. Während dieser Zeit wurde das Wasser regelmäßig beprobt und auf *Pseudomonas aeruginosa* sowie die Koloniezahl (R2A-Agar) untersucht. Der Biofilm auf den Trägern wurde zu Versuchsbeginn (Startwert) und nach 14 Tagen (Endwert) beprobt. Zur Untersuchung von Langzeiteffekten wurde in einigen Fällen der Biofilm nach 14 und zusätzlich nach 135 Tage beprobt. Für die Biofilmuntersuchungen wurde dieser mit sterilen Zellschabern abgeschabt und in 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. In dieser Suspension wurde *Pseudomonas aeruginosa*, die Koloniezahl auf R2A-Agar und die Gesamtzellzahl bestimmt. Aus diesen Werten wurde die Koloniezahl im Biofilm (Koloniezahl pro cm²) berechnet. Parallel zu den Versuchen mit Trägern wurden jeweils auch Negativkontrollen (Wasser ohne Materialien) durchgeführt.



Abbildung 3-5: Versuchsaufbau der Wachstumsversuche im Batchansatz.

3.4.3 Wachstum mit Materialien: Durchflussversuche

3.4.3.1 Allgemeines

Die Durchflussversuche mit verschiedenen Materialien wurden in einer eigens konstruierten Anlage durchgeführt. Das Schema der Durchflussanlage zeigt Abbildung 3-6. Als Reaktoren dienen Edelstahlbehälter mit einem Volumen von 8,5 Litern (Abbildung 3-7). Die Reaktoren wurden mit Trinkwasser gespeist, das zur Elimination einer möglichen Desinfektionsmittelrestkonzentration einen Aktivkohlefilter mit gealterter Kohle passierte.

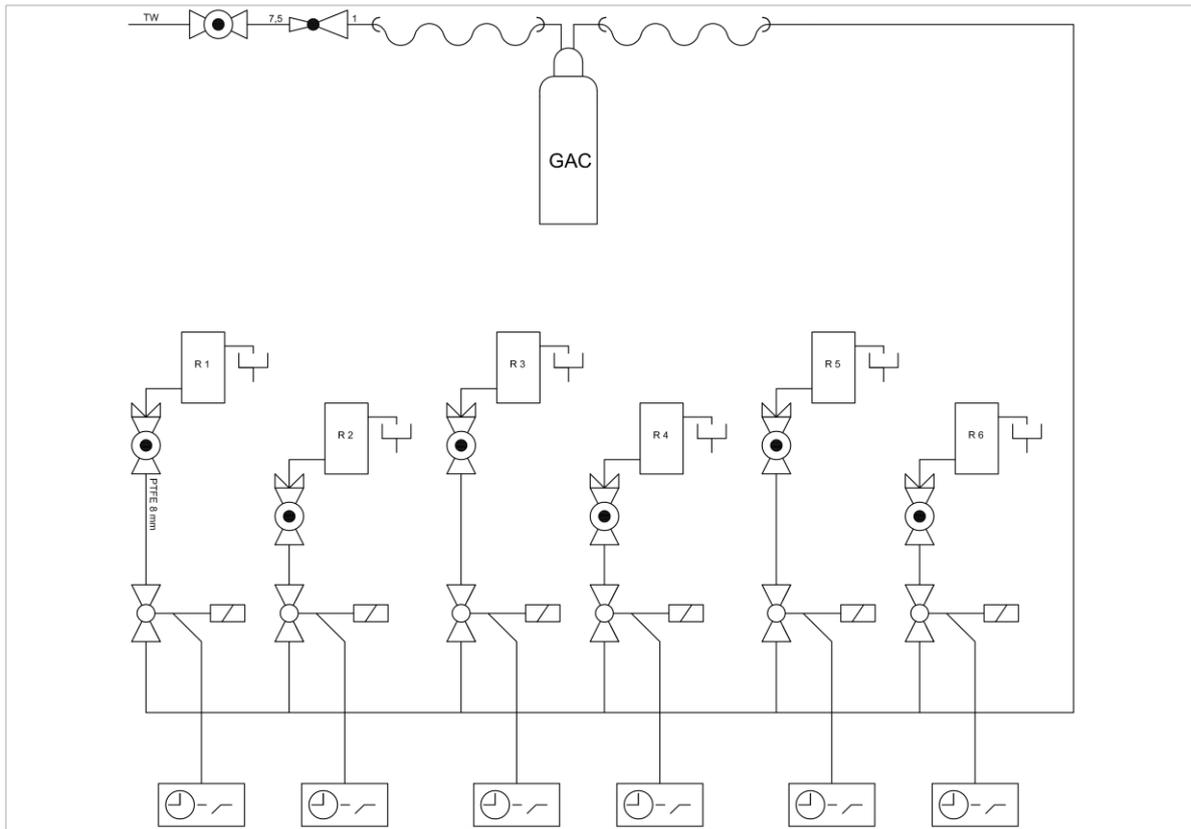


Abbildung 3-6: Durchflussversuchsanlage zur Untersuchung der Materialien.



Abbildung 3-7: Durchflussbehälter mit Materialträgern

Die verwendeten Materialträger entsprachen mit 7,5 cm x 2,5 cm der Größe von Objektträgern zur Mikroskopie. Zum Einhängen wurden diese mit Edelstahlhaken versehen und an einem Edelstahldrahtgestell in den Reaktoren befestigt. Zu Versuchsbeginn wurden pro Material ca. 25 Träger in einen Reaktor eingebracht.

3.4.3.2 Anzucht des Trinkwasserbiofilms auf Aufwuchsträgern

Die Anzucht eines autochthonen Trinkwasserbiofilms auf den Materialien erfolgte direkt im Wasserwerk in Durchflussreaktoren (Abbildung 3-8) mit Filtrat eines Aktivkohlefilters über einen Zeitraum von ≥ 12 Wochen. Der Durchfluss war so eingestellt, dass täglich das doppelte Volumen des Behälters ausgetauscht wurde. Vor dem Einbringen der Träger wurden diese 24 h gewässert und anschließend desinfiziert (30 min, 50 mg/l Cl_2).



Abbildung 3-8: Durchflussbehälter zur Anzucht eines Trinkwasserbiofilms auf den Materialien

3.4.3.3 Animpfung der Aufwuchsträger mit *Pseudomonas aeruginosa*

Die Materialträger ohne bzw. mit Trinkwasserbiofilm (AToBF bzw. ATmBF) wurden über einen Zeitraum von drei Tagen mit *Pseudomonas aeruginosa* bei 20°C in Rührreaktoren im Batchansatz angeimpft. Die Träger ohne TW-Biofilm wurden, wie unter „Anzucht des Trinkwasserbiofilms“ beschrieben, zuvor 24 h gewässert und desinfiziert. Die Konzentration von *Pseudomonas aeruginosa* in der Animpfsuspension betrug 10^5 pro ml. Nach der Animpfung wurden die Träger zweimal in Versuchswasser getaucht, um lose anhaftende Bakterienzellen abzuspülen und anschließend in die Versuchsreaktoren eingehängt.

Die Vorbereitung der Reinkulturen erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1 dargestellt. Die Versuche zum Materialscreening sowie zur Desinfektion und Spülung wurden ausschließlich mit dem Umweltisolat UI 9 durchgeführt.

3.4.3.4 Durchführung der Materialscreeningversuche

Bei jedem Behälter der Versuchsanlage wurde täglich über eine Zeitsteuerung das Wasser zweimal vollständig ausgetauscht. Im Versuchsverlauf wurden nach 2, 7, 14, 21 und 28 Tagen Durchfluss je zwei Träger zur Untersuchung entnommen. Die weitere Bearbeitung der Träger erfolgte wie in Abschnitt 3.3 beschrieben. Bei einigen Versuchsblöcken wurde zu Beginn und am Ende der Versuchsreihe ein Stagnationsversuch über 48 h durchgeführt, um den Übergang von *Pseudomonas aeruginosa* vom Biofilm in den Wasserkörper zu untersuchen.

Nach Abschluss des Versuchsblocks über 28 Tage wurden die restlichen Träger für Langzeitversuche im Durchflussbetrieb und im Batch-Stagnationsbetrieb genutzt. Für Durchflussversuche wurden die Materialträger in einem Durchflussgefäß eingehängt, wobei zweimal täglich das Wasser über eine Zeitsteuerung ausgetauscht wurde. Bei den Batchansätzen wurden die Träger in 1 l-Weckgläser mit Trinkwasser nach Aktivkohlefiltration überführt und bei 20°C im Dunkeln über einen Zeitraum von 160 bis 200 Tagen inkubiert. Aus den Durchflussgefäßen und den Batchansätzen wurden im Abstand von etwa vier Wochen Materialträger zur Untersuchung entnommen. Bei den Batchansätzen wurde zudem die Konzentration von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper bestimmt.

Die Materialträger ohne Trinkwasserbiofilm wurden im Versuchsverlauf zu den o. g. Entnahmezeiten auf *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Bei den Trägern mit Trinkwasserbiofilm erfolgte darüber hinaus zur Abschätzung einer möglichen

Beeinflussung der Etablierung von *Pseudomonas aeruginosa* auf den Materialoberflächen durch den autochthonen TW-Biofilm eine Bestimmung von HPC und GZZ am Start und Ende der Versuche. Sofern *Pseudomonas aeruginosa* kulturell am Versuchsende nicht mehr nachweisbar war, wurden ausgewählte Proben zusätzlich mittels FISH untersucht.

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 3-9 schematisch dargestellt.

Versuchsabschnitt	Versuchsdauer	Entnahme von Trägern zur Untersuchung	Untersuchungsparameter	
			Träger (BF)	Wasser
Kurzzeit-Durchfluss	Start nach Animpfen	→ 2 AT*	P.a. (+ HPC/GZZ ATmBF)	
	(2 d Stagnation)	→ 2 AT	P.a.	P.a.
	+ 5 d DF (= 7d)	→ 2 AT	P.a.	P.a.
	14 d DF	→ 2 AT	P.a.	P.a.
	28 d DF	→ 2 AT	P.a.	P.a.
	+ 2 d Stagnation	→ 2 AT	Pa. (+ HPC/GZZ ATmBF)	P.a.
Ende Kurzzeit-Durchfluss nach 30 d Umsetzen der restlichen Träger in Langzeit-Batch bzw. Langzeit-Durchfluss				
LZ-Batch (1 l Weck-Gläser) AToBF/ ATmBF	Regelmäßige Entnahme von je 2 AT im 4-wöchentlichen Rhythmus (160-200 d)		P.a.	P.a.
LZ-Durchfluss (ATmBF)	Regelmäßige Entnahme von je 2 AT im 4-wöchentlichen Rhythmus (160-200 d)		P.a.	-

*Bestimmung der Ausgangsbesiedlung nach Animpfen

Abbildung 3-9: Schematische Darstellung zum Versuchsablauf der Materialscreeningversuche mit AToBF + ATmBF

3.4.4 Desinfektion im Wasserkörper

Für die Versuche zur Desinfektion von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper wurden die beiden Stämme (DSM 1117 und UI 9) in Reinkultur verwendet. Die Untersuchungen fanden in 500 ml Weithals-Laborglasflaschen statt. Die

Ausgangskonzentration an *Pseudomonas aeruginosa* betrug ca. 2×10^6 Zellen pro 100 ml. Die Versuche fanden in Modellwasser und Trinkwasser (KA) statt. Als Desinfektionsmittel wurden Chlor und Chlordioxid eingesetzt. Die Dosierung erfolgte so, dass nach 30 min Einwirkzeit ein Restgehalt von 0,1 bzw. 0,3 mg/l freies Chlor vorlag. Im Versuchsverlauf wurden zu mehreren Zeitpunkten (0, 5, 10, 25 und 60 min) Proben entnommen, das Chlor mit Na-Thiosulfat (20 mg/l) inaktiviert, und anschließend die Koloniezahl von *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt.

3.4.5 Desinfektion auf Materialien

3.4.5.1 Allgemeines

Die Versuche zur Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf *Pseudomonas aeruginosa* auf Materialien wurden ohne und mit einem autochthonen Trinkwasserbiofilm durchgeführt. Die Anzucht des Biofilms und die Animpfung der Träger mit *Pseudomonas aeruginosa* erfolgten wie zuvor beschrieben, wobei die Animpfung der Träger mit Trinkwasserbiofilm auf sieben Tage verlängert wurde, um eine möglichst intensive Besiedlung zu erreichen. Eine Übersicht über die durchgeführten Desinfektionsversuche zeigt Tabelle 3-2. Für die Untersuchungen wurde das Umweltisolat UI 9 verwendet.

Tabelle 3-2: Übersicht Desinfektionsversuche

	Eingesetzte Desinfektionsmittel	Konzentration	Einwirkzeit
Sprühdesinfektion	Sprüh 1 + 3 (siehe 3.3.4.1)	nach Herstellerangaben	nach Herstellerangaben: 10-15 min
Anlagendesinfektion (W 291 + W 557)	Chlor Chlordioxid H ₂ O ₂	50 mg/l 6 mg/l 150 mg/l	24 h 24 h 12 h
Materialdesinfektion (Batchansatz)	Chlor	0,3 mg/l	30 min
Trinkwasserdesinfektion (kontinuierlich)	Chlor Chlordioxid	0,1 mg/l 0,04 mg/l	14 Tage 14 Tage

3.4.5.2 Sprühdesinfektion

Getestet wurden drei handelsübliche Sprühdesinfektionsmittel, auf Basis von Wasserstoffperoxid mit Silber bzw. quartärnärer Ammoniumverbindungen. Der Einsatz erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit Einwirkzeiten von 10 bzw. 15 min (siehe Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Übersicht Sprühdesinfektionsmittel, Wirkbasis und Einwirkzeit

Produkt	Inhaltsstoffe	Einwirkzeit
Sprühdesinfektion 1	3 % H ₂ O ₂ /Silber	10 min
Sprühdesinfektion 2	Quarternäre NH ₄ -Verbindungen	15 min
Sprühdesinfektion 3	Quarternäre NH ₄ -Verbindungen	15 min

3.4.5.3 Anlagendesinfektion

Die Versuche wurden entsprechend der DVGW-Arbeitsblätter W 291 und W 557 durchgeführt. Die Materialträger mit *Pseudomonas aeruginosa* und ohne und mit autochthonem Trinkwasserbiofilm wurden in Edelstahlgefäßen im Batch dem jeweiligen Desinfektionsmittel (Tabelle 3-2) unter langsamem Rühren bei Raumtemperatur ausgesetzt. Nach entsprechender Einwirkzeit (12 bzw. 24 h) wurden die Träger aus dem Reaktor zur Untersuchung entnommen und zur Beseitigung des Desinfektionsmittels in Trinkwasser getaucht. Die Probenaufarbeitung erfolgte entsprechend Abschnitt 3.3. Bei den Trägern mit Trinkwasserbiofilm wurden neben *Pseudomonas aeruginosa* noch die Parameter HPC und GZZ bestimmt. Sofern *Pseudomonas aeruginosa* nicht mehr nachweisbar war, wurden ausgewählte Proben mittels FISH untersucht.

Die Desinfektionsmittelkonzentration im Versuchsansatz wurde jeweils zu Beginn und am Ende des Versuches bestimmt (siehe Abschnitte 3.2.2.1 und 3.2.2.2).

3.4.5.4 Trinkwasserdesinfektion im Batchansatz

Für die Versuche zur Desinfektion von *Pseudomonas aeruginosa* auf Materialien im Batchansatz wurde eine Chlordosierung für einen Restgehalt von 0,3 mg/l freies Chlor nach 30 min verwendet. Die Versuche wurden mit Aufwuchsträgern ohne und mit Trinkwasserbiofilm durchgeführt. Auf diesen wurde wie oben beschrieben eine Animpfung von *Pseudomonas aeruginosa* vorgenommen. Danach wurden die Aufwuchsträger zweimal durch Tauchen in sterilem Wasser gewaschen und schließlich in 500 ml Weithals-

Laborglasflaschen überführt (siehe Wachstum auf Materialien im Batchansatz). Die Versuche wurden mit Modellwasser und Trinkwasser (KA) durchgeführt. In Vorversuchen wurde die Chlorzehrung durch die Aufwuchsträger bestimmt, so dass bei allen Versuchen mit unterschiedlichen Materialien vergleichbare Bedingungen vorlagen (Chlorrestgehalt: 0,3 mg/l nach 30 min). Die Wasserphase und die Materialträger wurden zunächst zu Versuchsbeginn (Referenz), nach 10 min, 30 min und 60 min auf *Pseudomonas aeruginosa* und HPC untersucht. In späteren Versuchsansätzen wurden die Werte nach 60 min nicht mehr bestimmt.

3.4.5.5 Trinkwasserdesinfektion im Durchfluss

Die Versuche mit kontinuierlicher Trinkwasserdesinfektion wurden mit einer Chlor- bzw. Chlordioxidrestkonzentration von 0,1 mg/l und 0,05 mg/l durchgeführt. Die Dauer der Versuchsreihen betrug 14 Tage, wobei kontinuierlich das zweifache Volumen der Gefäße ausgetauscht wurde. Zur Realisierung der Versuche wurde die Durchflussversuchsanlage um eine Desinfektionsmitteldosierung erweitert. Aus den Durchflussgefäßen wurden je zwei Materialträger nach einer Versuchsdauer von 2 h, 1 d, 2 d, 7 d und 14 d entnommen und auf *Pseudomonas aeruginosa* untersucht, sowie bei den Trägern mit Trinkwasserbiofilm zu Beginn und am Ende die HPC und GZZ bestimmt.

3.4.6 Spülungen

Die Spülversuche wurden mit Schläuchen bzw. Rohren aus den Materialien PE 2, PP 2, PVC-u 2 und EPDM 7 durchgeführt. Zur Etablierung eines Trinkwasserbiofilms wurden die Rohr bzw. Schlauchabschnitte von jeweils 2 m Länge über ≥ 12 Wochen im Durchfluss mit Wasser aus dem Ablauf eines Aktivkohlefilters beschickt.

Zur Animpfung mit *Pseudomonas aeruginosa* wurden die Rohr- bzw. Schlauchabschnitte direkt mit der Animpflösung befüllt. Die Rohre bzw. Schläuche ohne Trinkwasserbiofilm wurden für drei Tage, die mit Trinkwasserbiofilm für sieben Tage inkubiert, wobei nach drei Tagen die Animpfsuspension erneuert wurde.

Nach der Animpfung wurde die Flüssigkeit aus den Rohren bzw. Schläuchen entfernt und diese in einen für die Versuche entwickelten Spülstand eingebaut. Zur Entfernung lose haftender Zellen wurde ein einmaliger Wasseraustausch mit einer niedrigen Fließgeschwindigkeit von 0,1 m/s durchgeführt.

Die Einstellung der Spülgeschwindigkeit erfolgte mittels Durchflussmesser und nachgeschaltetem Regelventil. Bis zur Einstellung des gewünschten Durchflusses wurde

ein Bypass genutzt. Nach Erreichen der Spülgeschwindigkeit wurde der Wasserstrom vom Bypass auf das Versuchsrohr umgestellt.

Bei der Luft-/Wasserspülung wurde eine Apparatur, bestehend aus einer Pressluftflasche mit Regelventil sowie einem Magnetventil zur impulsartigen Zugabe des Luftvolumens genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper

4.1.1 Übersicht

Für die Untersuchungen zur Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper wurden sowohl ein Laborstamm (*Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117) als auch ein Umweltisolat aus Trinkwasser (*Pseudomonas aeruginosa* UI 9) eingesetzt. Die Untersuchungen fanden mit Reinkulturen sowie unter Zusatz einer natürlichen Mischbiozönose statt, die zuvor durch Filtration aus Trinkwasser gewonnen wurde. Als Testwässer dienten zum einen Modellwasser, zum anderen zwei verschiedene Trinkwässer (Karlsruhe und Dresden). Um den Einfluss eines gut abbaubaren Substrats auf das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* zu untersuchen, wurde Acetat als Kohlenstoffquelle eingesetzt und den Versuchsansätzen in unterschiedlicher Konzentration zugegeben (0, 20, 50, 100, 150 µg C/l). Um eine Limitierung des Wachstums aufgrund eines Mangels an anorganischen Nährstoffen zu vermeiden, wurde den Testwässern zusätzlich Grundsalzlösung zugesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* wurden neben Versuchen bei Raumtemperatur (22°C) auch Untersuchungen bei weiteren, niedrigeren Temperaturen (20°C, 15°C und 10°C) durchgeführt.

4.1.2 Untersuchungen in verschiedenen Wässern

Die Untersuchungen zum Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase fanden mit den beiden Stämmen (DSM 1117 und TZW-Isolat UI 9) im Batchansatz in den drei verschiedenen Wässern statt. Dabei wurden jeweils Versuche mit *Pseudomonas aeruginosa* in Reinkultur und in Anwesenheit einer natürlichen Trinkwasser-Mischbiozönose durchgeführt. In Parallelansätzen wurden je nach Versuchsansatz unterschiedliche Mengen Natriumacetat als organische C-Quelle hinzudosiert. Die Ansätze wurden mit einer *Pseudomonas aeruginosa*-Konzentration von ca. 200 KBE pro 100 ml angeimpft, anschließend im Dunkeln bei 100 U/min für mindestens zwei Wochen auf einem Schüttler inkubiert und regelmäßig Proben für die Bestimmung von *Pseudomonas aeruginosa* und der Koloniezahlen (HPC) entnommen.

Abbildung 4-1 zeigt exemplarisch das Wachstum der Reinkultur von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 bei 22°C in Modellwasser, Abbildung 4-2 das Wachstum bei gleichzeitiger Anwesenheit einer Mischbiozönose. In Tabelle 4-1 sind die Koloniezahlen zu

Versuchsbeginn und die Maximalwerte im Versuchsverlauf in einer Übersicht zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Koloniezahlen (*Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 bzw. HPC) zu Versuchsbeginn und maximal erreichte Koloniezahlen in Modellwasser bei 22°C ohne und mit Acetat-Dosierung (100 bzw. 150 µg C/L)

Wachstum in Modellwasser, 22°C	Koloniezahl pro 100 ml		
	Start	Maximal	
		ohne Acetat	mit Acetat
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117 in Reinkultur	$1,7 \times 10^2$	$3,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^6$
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117 mit Mischbiozönose	$1,7 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$
Mischbiozönose (+ <i>P. aeruginosa</i>)	$4,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$

Die entsprechenden Werte für das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 bei 20°C in Trinkwasser (DD) sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Koloniezahlen (*Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 bzw. HPC) zu Versuchsbeginn und maximal erreichte Koloniezahlen in Trinkwasser (DD) bei 20°C ohne und mit Acetat-Dosierung (150 µg C/L)

Wachstum in Trinkwasser (DD), 20°C	Koloniezahl pro 100 ml		
	Start	Maximal	
		ohne Acetat	mit Acetat
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117 in Reinkultur	$2,3 \times 10^2$	$8,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117 mit Mischbiozönose	$2,3 \times 10^2$	$8,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^5$
Mischbiozönose (+ <i>P. aeruginosa</i>)	$2,6 \times 10^4$	$6,0 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$

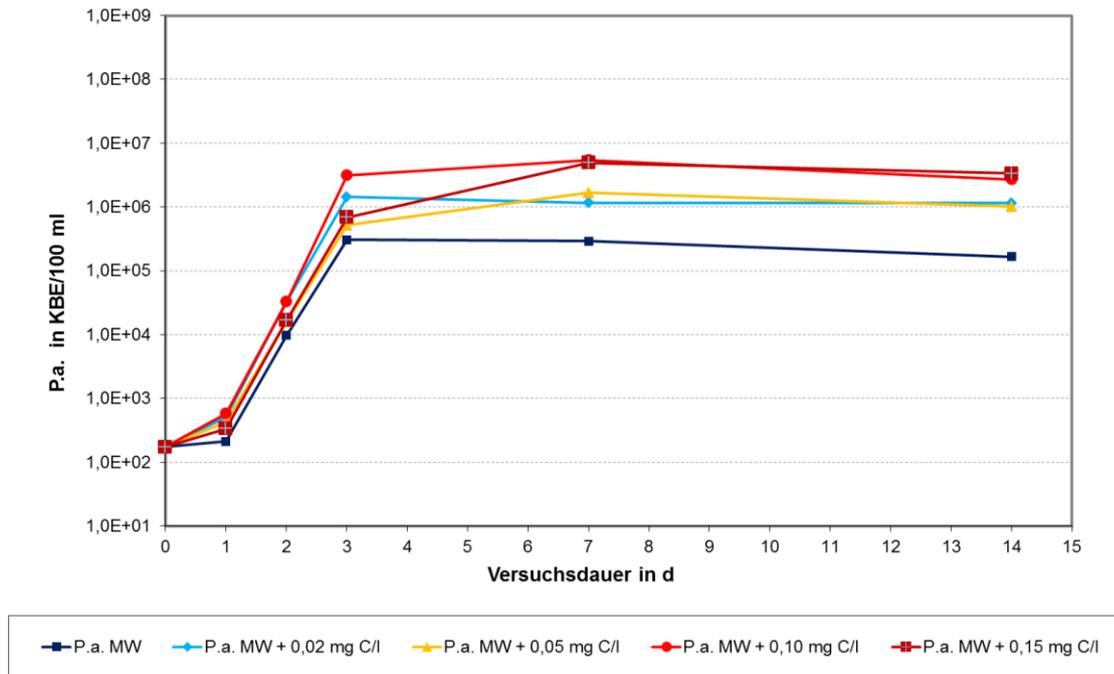


Abbildung 4-1: Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 in Modellwasser (MW) in Reinkultur bei unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen

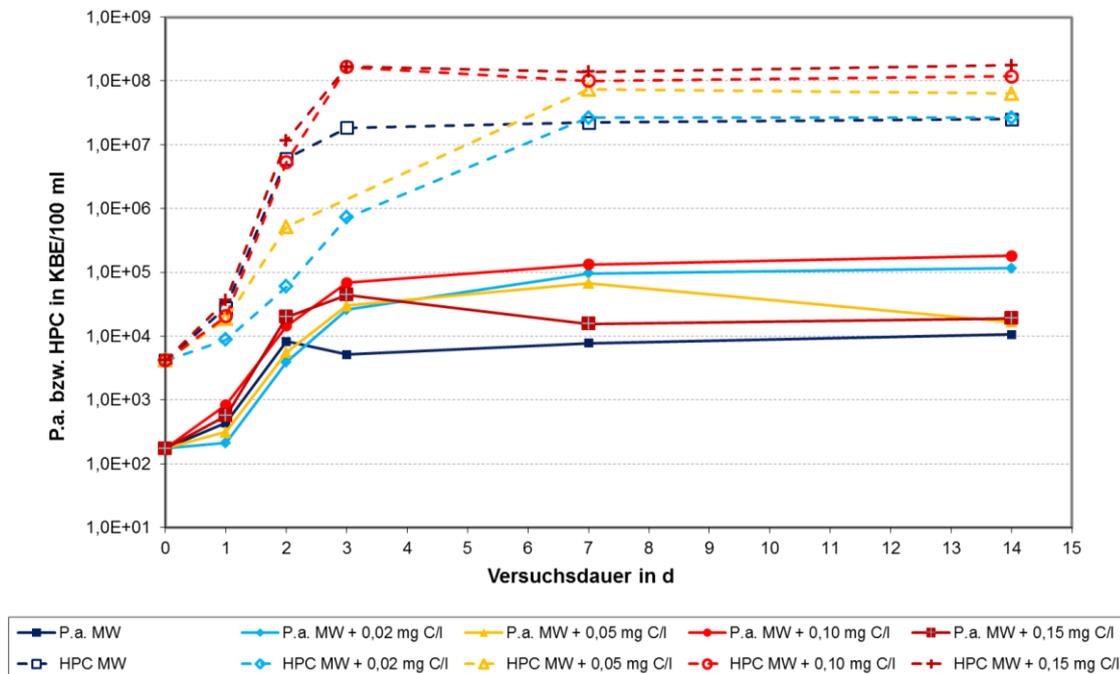


Abbildung 4-2: Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 und HPC in Modellwasser (MW) in Anwesenheit einer Trinkwasser-Mischbiozönose bei unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen

Für das Umweltisolat *Pseudomonas aeruginosa* UI 9 sind die Koloniezahlen zu Versuchsbeginn und die Maximalwerte im Versuchsverlauf für das Wachstum in Trinkwasser (KA und DD) in den Tabellen 4-3 und 4-4 aufgeführt.

Tabelle 4-3: Koloniezahlen (*Pseudomonas aeruginosa* UI 9 bzw. HPC) zu Versuchsbeginn und maximal erreichte Koloniezahlen in Trinkwasser (KA) bei 22°C ohne und mit Acetat-Dosierung (150 µg C/L)

Wachstum in Trinkwasser (KA), 22°C	Koloniezahl pro 100 ml		
	Start	Maximal	
		ohne Acetat	mit Acetat
<i>P. aeruginosa</i> UI 9 in Reinkultur	$2,0 \times 10^2$	$6,5 \times 10^6$	$8,8 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i> UI 9 mit Mischbiozönose	$1,9 \times 10^2$	$1,2 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$
Mischbiozönose (+ <i>P. aeruginosa</i>)	$3,4 \times 10^3$	$2,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$

Tabelle 4-4: Koloniezahlen (*Pseudomonas aeruginosa* UI 9 bzw. HPC) zu Versuchsbeginn und maximal erreichte Koloniezahlen in Trinkwasser (DD) bei 20°C ohne und mit Acetat-Dosierung (150 µg C/L)

Wachstum in Trinkwasser (DD), 20°C	Koloniezahl pro 100 ml		
	Start	Maximal	
		ohne Acetat	mit Acetat
<i>P. aeruginosa</i> UI 9 in Reinkultur	$2,3 \times 10^2$	$3,4 \times 10^7$	$9,1 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i> UI 9 mit Mischbiozönose	$2,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
Mischbiozönose (+ <i>P. aeruginosa</i>)	$8,1 \times 10^3$	$4,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$

Bei einer Inkubationstemperatur von ca. 20°C zeigten beide *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme eine schnelle und deutliche Vermehrung. Das Plateau der Wachstumsphase wurde nach 3 Tagen erreicht. In Reinkultur ergaben sich dabei abhängig von Stamm und Wasser bereits ohne Acetat-Zugabe hohe Koloniezahlen von 10^5 bis 10^7 pro 100 ml. Mit Acetat-Zugabe (max. 150 µg/l Acetat-C) lagen die Koloniezahlen etwa 0,5 bis 1 Zehnerpotenz höher (10^6 bis 10^8 pro 100 ml). Auch in Anwesenheit einer natürlichen Trinkwasser-Mischbiozönose zeigte *Pseudomonas aeruginosa* ein schnelles Wachstum. Mit 10^4 bis 10^6 pro 100 ml (ohne Acetat) und 10^5 bis 10^6 pro 100 ml (mit Acetat) lagen die maximalen Koloniezahlen jedoch 1 bis 2 Zehnerpotenzen unter den Koloniezahlen der Reinkulturen.

4.1.3 Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* wurden vergleichende Versuche bei 10°C und 20°C durchgeführt. Die Untersuchungen fanden mit beiden Stämmen (DSM 1117 und TZW-Isolat UI 9) jeweils mit und ohne Acetat-Zugabe sowohl in Reinkultur als auch in Anwesenheit einer Mischbiozönose in Trinkwasser (DD) statt. Die Abbildungen 4-3 bis 4-6 zeigen vergleichend das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 bei 10°C und 20°C jeweils in Reinkultur (Abbildungen 4-3 und 4-5) sowie in Anwesenheit der Mischbiozönose (Abbildungen 4-4 und 4-6). Die Koloniezahlen zu Versuchsbeginn und die Maximalwerte im Versuchsverlauf sind in den Tabellen 4-2 (DSM 1117, 20°C), 4-5 (DSM 1117, 10°C), 4-4 (UI 9, 20°C) und 4-6 (UI 9, 10°C) zusammengefasst.

Tabelle 4-5: Koloniezahlen (*Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 bzw. HPC) zu Versuchsbeginn und maximal erreichte Koloniezahlen in Trinkwasser (DD) bei 10°C ohne und mit Acetat-Dosierung (150 µg C/L)

Wachstum in Trinkwasser (DD), 10°C	Koloniezahl pro 100 ml		
	Start	Maximal	
		ohne Acetat	mit Acetat
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117 in Reinkultur	$2,3 \times 10^2$	$1,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117 mit Mischbiozönose	$2,3 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
Mischbiozönose (+ <i>P. aeruginosa</i>)	$2,6 \times 10^4$	$8,0 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$

Tabelle 4-6: Koloniezahlen (*Pseudomonas aeruginosa* UI 9 bzw. HPC) zu Versuchsbeginn und maximal erreichte Koloniezahlen in Trinkwasser (DD) bei 10°C ohne und mit Acetat-Dosierung (150 µg C/L)

Wachstum in Trinkwasser (DD), 10°C	Koloniezahl pro 100 ml		
	Start	Maximal	
		ohne Acetat	mit Acetat
<i>P. aeruginosa</i> UI 9 in Reinkultur	$2,3 \times 10^2$	$5,2 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i> UI 9 mit Mischbiozönose	$2,0 \times 10^2$	$6,2 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$
Mischbiozönose (+ <i>P. aeruginosa</i>)	$8,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^7$	$9,8 \times 10^7$

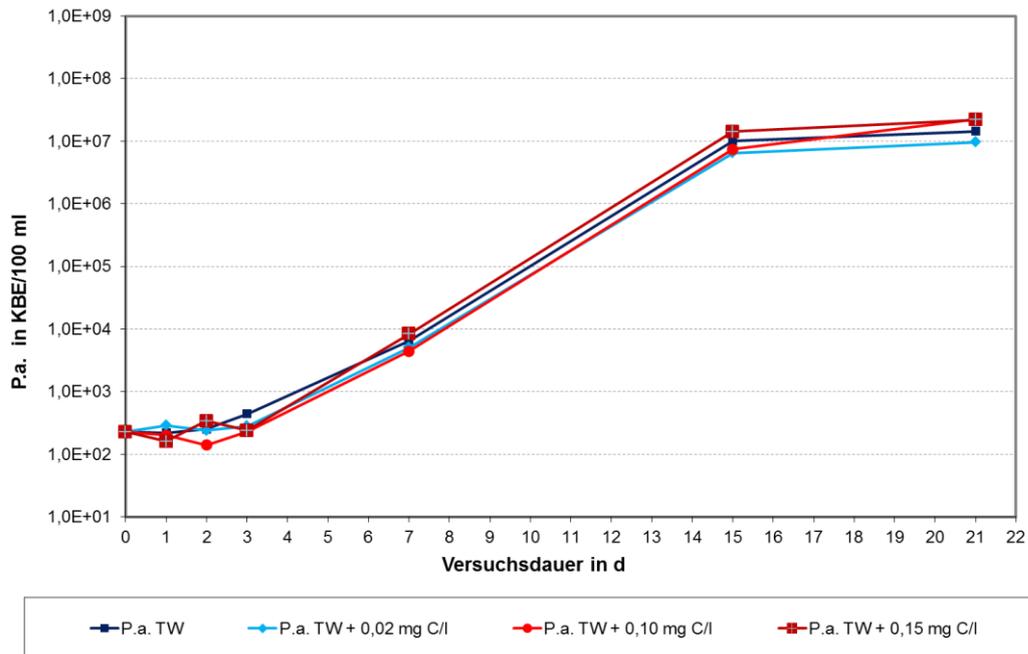


Abbildung 4-3: Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 in Reinkultur bei 10°C in Trinkwasser (TW DD) bei unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen

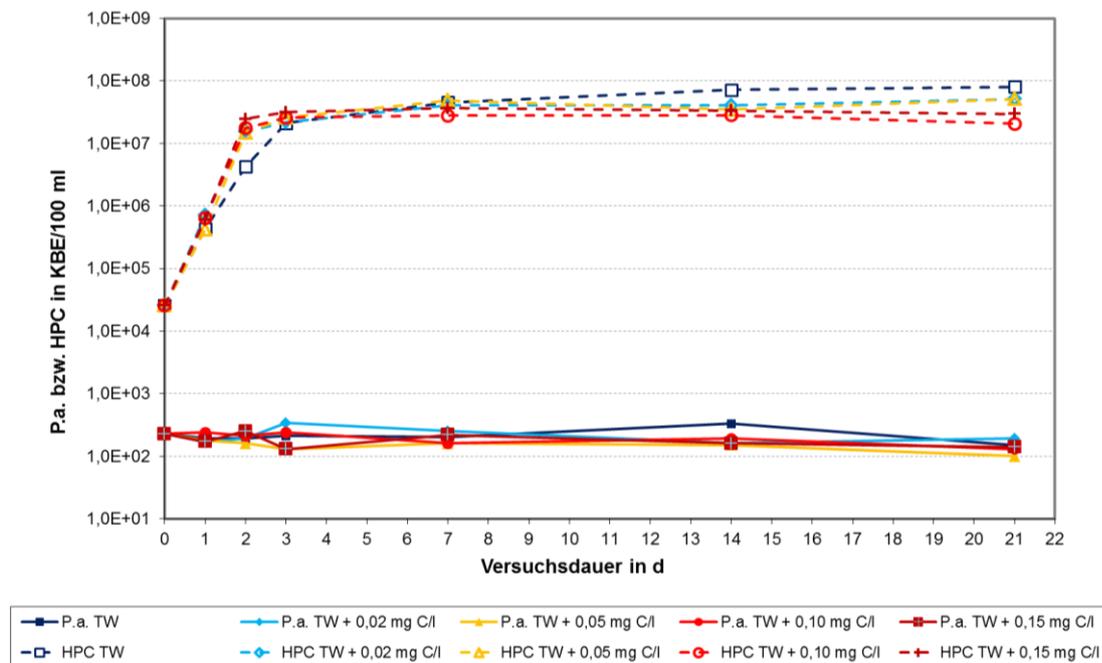


Abbildung 4-4: Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 und HPC in Anwesenheit einer Trinkwasser-Mischbiozönose bei 10°C in Trinkwasser (TW DD) bei unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen

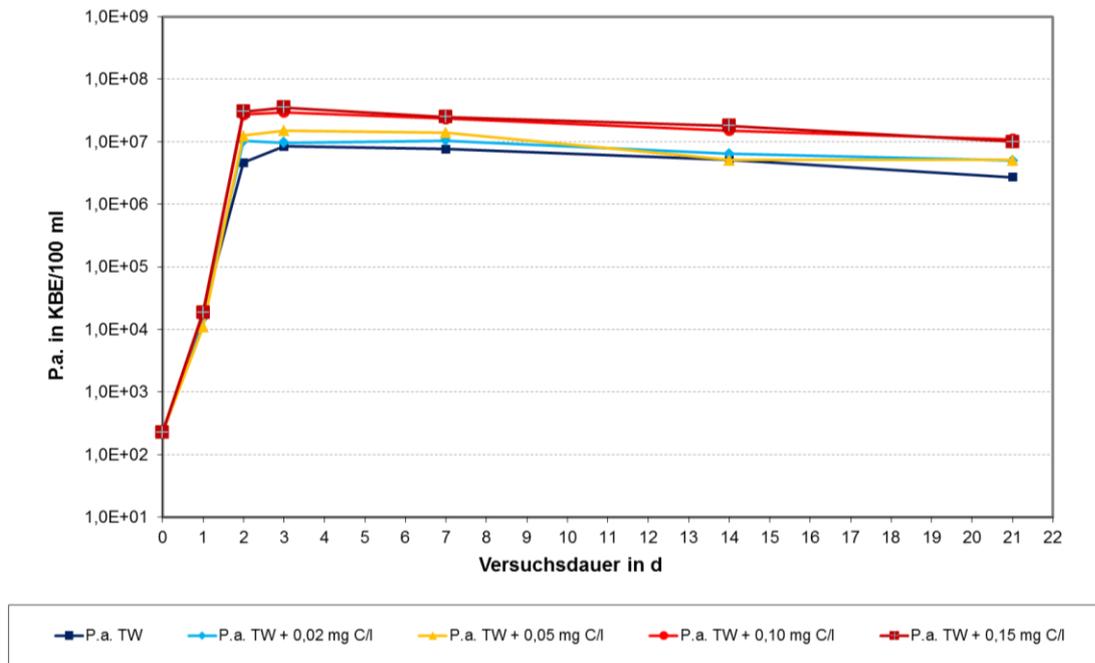


Abbildung 4-5: Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 in Reinkultur bei 20°C in Trinkwasser (TW DD) bei unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen

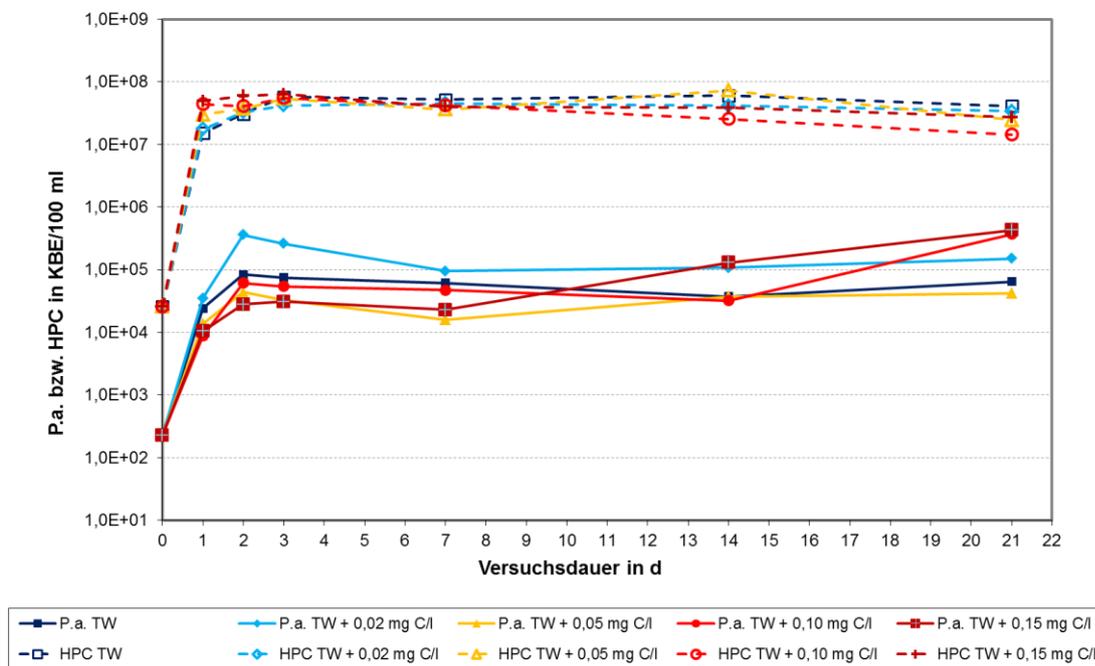


Abbildung 4-6: Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 und HPC in Anwesenheit einer Trinkwasser-Mischbiozönose bei 20°C in Trinkwasser (TW DD) bei unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen

Die Untersuchungen zeigten, dass *Pseudomonas aeruginosa* in Reinkultur bei einer Temperatur von 10°C deutlich langsamer wuchs als bei 20°C. Das Wachstumsplateau wurde bei 10°C frühestens nach 14 Tagen erreicht. Bei beiden Temperaturen ergaben sich jedoch vergleichbare Koloniezahlmaxima.

In Anwesenheit einer Mischbiozönose zeigte *Pseudomonas aeruginosa* bei 10°C kein signifikantes Wachstum. Wie aus Abbildung 4-4 ersichtlich, wuchs die natürliche Mischbiozönose bei 10°C deutlich schneller als *Pseudomonas aeruginosa* (Wachstumsmaximum nach 2-3 Tagen). Durch den Konkurrenzeffekt wurde somit die Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* unterbunden.

Ein weiterer Wachstumsversuch erfolgte bei 15°C mit dem Umweltisolat UI 9 in Modellwasser. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-7 aufgeführt. Abbildung 4-7 zeigt vergleichend den Wachstumsverlauf von *Pseudomonas aeruginosa* UI 9 bei 10°C und 20°C (Trinkwasser DD) und 15°C (Modellwasser).

Tabelle 4-7: Koloniezahlen (*Pseudomonas aeruginosa* UI 9 bzw. HPC) zu Versuchsbeginn und maximal erreichte Koloniezahlen in Modellwasser bei 15°C ohne und mit Acetat-Dosierung (150 µg C/L)

Wachstum in Modellwasser, 15°C	Koloniezahl pro 100 ml		
	Start	Maximal	
		ohne Acetat	mit Acetat
<i>P. aeruginosa</i> UI 9 in Reinkultur	2,4 x 10 ²	1,7 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁷
<i>P. aeruginosa</i> UI 9 mit Mischbiozönose	2,4 x 10 ²	1,1 x 10 ³	7,7 x 10 ³
Mischbiozönose (+ <i>P. aeruginosa</i>)	9,7 x 10 ²	9,0 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁸

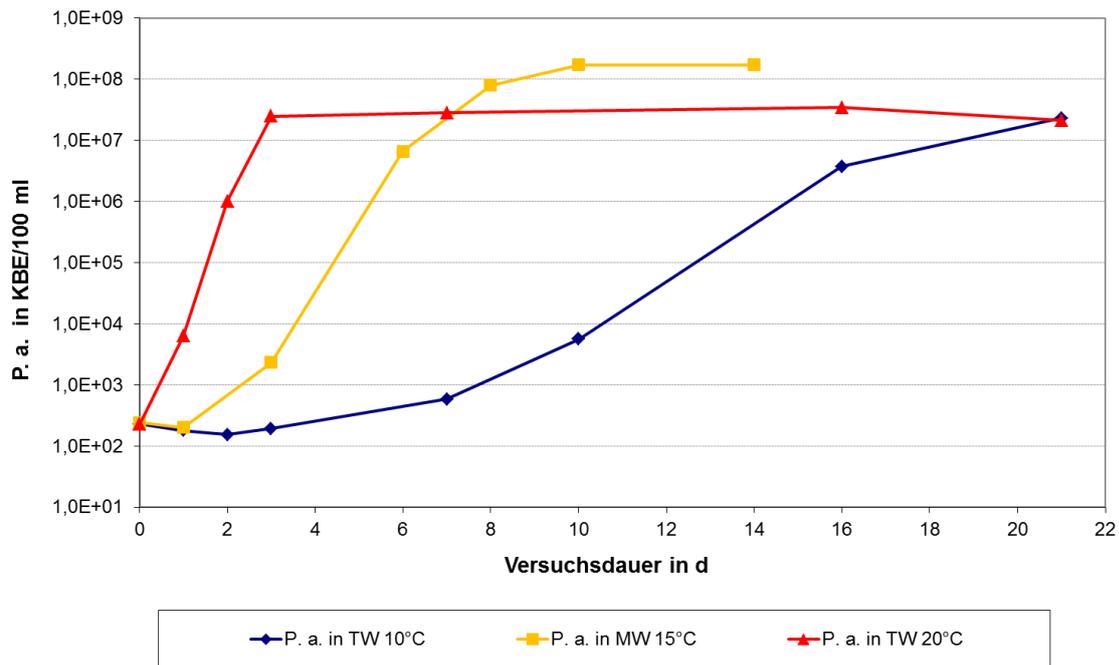


Abbildung 4-7: Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* UI 9 in Reinkultur in Trinkwasser (TW DD, 10°C und 20°) und Modellwasser (MW, 15°C)

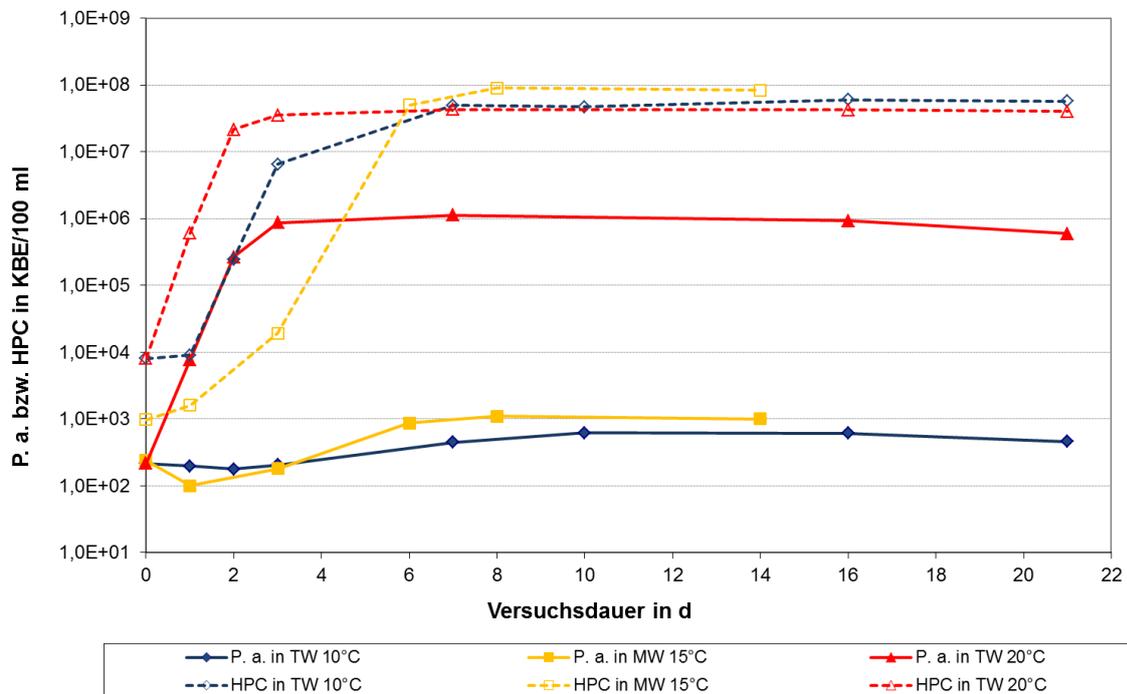


Abbildung 4-8: Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* UI 9 und HPC in Anwesenheit einer Trinkwasser-Mischbiozönose in Trinkwasser (TW DD, 10°C und 20°) und Modellwasser (MW, 15°C)

Aus Abbildung 4-7 wird die Temperaturabhängigkeit des Wachstums von *Pseudomonas aeruginosa* ersichtlich. Bei 20°C wurde das Wachstumsplateau bereits nach 3 Tagen erreicht, bei niedrigeren Temperaturen hingegen dauerte es deutlich länger (8-10 Tage bei 15°C, > 20 Tage bei 10°C). Auch in Anwesenheit einer Mischbiozönose (Abbildung 4-8) wurde bei 20°C das Wachstumsplateau nach 3 Tagen erreicht. Die maximalen Koloniezahlen lagen jedoch 1-2 Zehnerpotenzen niedriger als in Reinkultur. Bei 15°C konnte mit Mischbiozönose nur ein sehr geringes Wachstum des Umweltisolats UI 9 beobachtet werden (Koloniezahlerhöhung im Bereich einer Zehnerpotenz).

4.1.4 Auswertung

Die Ergebnisse der Untersuchung zum Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper zeigen, dass dieses Bakterium gut an die Nährstoffverhältnisse im Trinkwasser angepasst ist. In allen 3 untersuchten Wässern erfolgte in Reinkultur ein Wachstum bis zu Koloniezahlen von 10^6 bis 10^8 pro 100 ml auch ohne Zusatz von Acetat als externer Kohlenstoffquelle. Wird den Wässern Acetat als Kohlenstoffquelle zugesetzt, so erreicht *Pseudomonas aeruginosa* einen höheren Zellertrag. Die maximal erreichbaren Koloniezahlen sind dann etwa 0,5 bis 1 Zehnerpotenz höher. Der Zusammenhang zwischen zugesetzter Acetat-Konzentration und Koloniezahl ist in Abbildung 4-10 dargestellt.

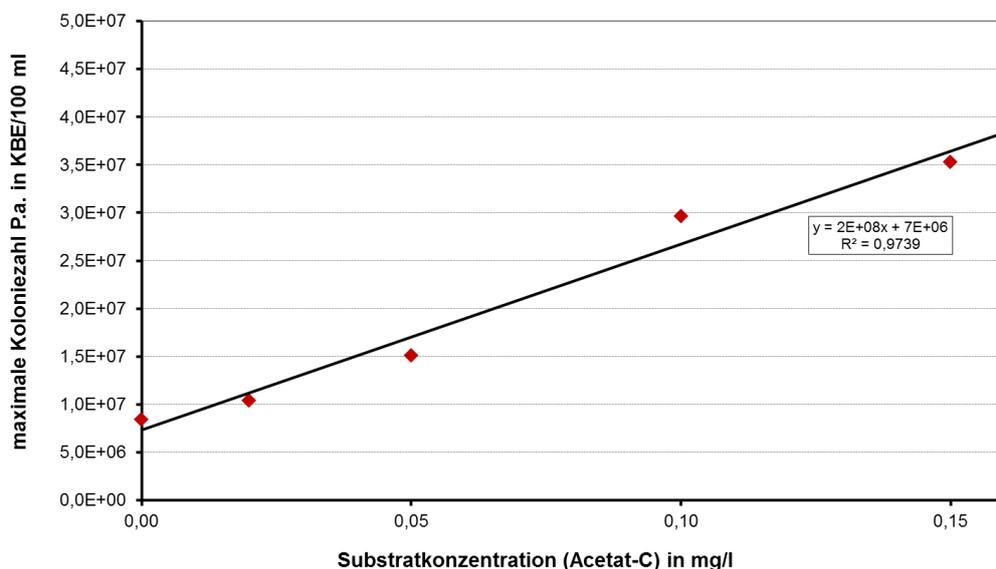


Abbildung 4-10: Korrelation zwischen maximaler Koloniezahl und zugesetzter Acetatkonzentration beim Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 in Reinkultur in Trinkwasser (DD)

In Reinkultur zeigte *Pseudomonas aeruginosa* bei allen untersuchten Temperaturen (10°C, 15°C und 20°C) ein Wachstum. Das Wachstumsplateau wurde allerdings bei niedrigeren Temperaturen sehr viel später erreicht als bei Raumtemperatur.

In Anwesenheit einer natürlichen Trinkwasser-Mischbiozönose tritt ein Konkurrenzeffekt um die Nährstoffe zwischen *Pseudomonas aeruginosa* und der Mischbiozönose auf. Die Untersuchungen zeigten, dass bei einer Temperatur von 20°C *Pseudomonas aeruginosa* in den untersuchten Wässern konkurrenzfähig ist, d.h. es findet ein Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* statt. Allerdings waren die Zellerträge aufgrund der Konkurrenzsituation im Vergleich zum Wachstum als Reinkultur um 1 bis 2 Zehnerpotenzen deutlich niedriger.

Bei niedrigen Temperaturen machte sich der Konkurrenzeffekt durch die Mischbiozönose stärker bemerkbar. Das wird bei einem Vergleich der Wachstumsraten (μ) und Verdopplungszeiten (t_d) deutlich. Diese Werte sind in Tabelle 4-8 aufgeführt. Bei den Temperaturen von 10°C und 15°C zeigte die Mischbiozönose deutlich höhere Wachstumsraten als *Pseudomonas aeruginosa*, so dass bei diesem bei 15°C nur noch ein geringes Wachstum (ca. 1 Zehnerpotenz, Verdopplungszeit ca. 30 h) beobachtet wurde. Bei 10°C fand nahezu kein Wachstum mehr statt (Erhöhung der Koloniezahlen um weniger als 0,5 Zehnerpotenzen, Verdopplungszeit fast 90 h).

Tabelle 4-8: Wachstumsraten (μ) und Generationszeiten (t_d) von *Pseudomonas aeruginosa* UI 9 und der Trinkwasser-Mischbiozönose bei verschiedenen Temperaturen

Wachstum <i>P. aeruginosa</i> UI 9	20°C		15°C		10°C	
	μ (1/h)	t_d (h)	μ (1/h)	t_d (h)	μ (1/h)	t_d (h)
<i>P. aeruginosa</i> in Reinkultur	0,172	4,0	0,111	6,3	0,045	15,4
<i>P. aeruginosa</i> mit Mischbiozönose	0,148	4,7	0,023	29,8	0,008	88,6
Mischbiozönose	0,164	4,2	0,109	6,3	0,137	5,1

Grundsätzlich zeigten die beiden untersuchten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme (DSM 1117 und UI 9) ein fast identisches Wachstumsverhalten in der Wasserphase. Im direkten Vergleich ergaben sich für das Umweltisolat allerdings höhere Zellerträge (höhere maximale Koloniezahlen). Außerdem zeigte das Umweltisolat bei 10°C in Anwesenheit einer Mischbiozönose noch ein geringes Wachstum, während beim Laborstamm keine Erhöhung der Koloniezahl zu verzeichnen war. Dies zeigt, dass das Umweltisolat besser an die Bedingungen im Trinkwasser (d.h. niedriger Nährstoffgehalt und niedrige Temperatur) angepasst ist.

4.1.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Zusammengefasst lassen sich folgende Punkte zur Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase festhalten:

- In allen Wasserarten vermehrt sich *Pseudomonas aeruginosa* auch ohne Zugabe einer zusätzlichen C-Quelle sehr gut, in Reinkultur bis max. 10^8 pro 100 ml.
- Bei Zugabe von Acetat wird in Abhängigkeit von der Konzentration ein höherer Zellertrag erreicht.
- Bei niedrigeren Temperaturen (10°C und 15°C) wird das Plateau bei der Reinkultur deutlich später erreicht (erst nach 14 Tagen gegenüber 2-3 Tagen bei 22°C)
- Es tritt ein deutlicher Konkurrenzeffekt durch die autochthone Mischbiozönose auf, der temperaturabhängig ist: bei 20°C ist *Pseudomonas aeruginosa* konkurrenzfähig, und kann sich bis zu einer Konzentration von ca. 10^6 pro 100 ml vermehren; bei 15°C dagegen nur noch um ca. 1 Log-Stufe, bei 10°C tritt bei gleichzeitiger Anwesenheit einer Mischbiozönose praktisch keine Vermehrung mehr auf.

4.2 Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* mit verschiedenen Materialien

4.2.1 Übersicht der Materialien und Versuche

Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen spielen Werkstoffe (Materialien) bei der Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* eine entscheidende Rolle. Zur Untersuchung des Wachstums von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm auf Materialien und zur Abgabe vom Biofilm in die Wasserphase wurden Untersuchungen mit verschiedenen Materialien, die in der Trinkwasser-Verteilung zum Einsatz kommen, durchgeführt. Bei diesen Materialien handelt es sich um Edelstahl (ES), die Kunststoffe Polyethylen (PE), Polypropylen (PP) und Polyvinylchlorid (PVC-u) sowie verschiedene Dichtmaterialien auf Kautschuk-Basis (EPDM). Darüber hinaus wurde auch Weich-PVC (Teichfolie) getestet. Tabelle 3-1 gibt einen Überblick über die verwendeten Materialien. In dieser Tabelle sind auch die Ergebnisse der Materialprüfung gemäß DVGW Arbeitsblatt W 270 aufgeführt.

Es wurden sowohl Versuche im Batch als auch im Durchfluss durchgeführt. Durch die Batchversuche sollte das maximale Wachstumspotential von *Pseudomonas aeruginosa* ermittelt werden (worst case-Bedingungen), die Durchflussversuche sollten die Bedingungen im Leitungsnetz simulieren.

4.2.2 Batchversuche

Für die Untersuchungen im Batchansatz wurden folgende Materialien verwendet: Edelstahl (ES), Polyethylen (PE 1), Polypropylen (PP 1), Polyvinylchlorid hart (PVC-u 1), Dichtmaterialien (EPDM 2, EPDM 3, EPDM 5, EPDM 6) und Weich-PVC (siehe Tabelle 3-1). Die Versuche erfolgten mit unbewachsenen Materialträgern und mit Materialträgern, auf denen vorher ein Trinkwasserbiofilm etabliert wurde.

Die Versuchsdauer betrug i. d. R. 14 Tage. Der Biofilm auf den Trägern wurde zu Versuchbeginn (Startwert) und nach 14 Tagen (Endwert) beprobt, die Wasserphase (Modellwasser) regelmäßig. Zur Untersuchung von Langzeiteffekten wurde in einigen Fällen der Biofilm nach 14 und zusätzlich nach 135 Tagen beprobt.

In Abbildung 4-11 sind die Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm der Materialien ES, PE, PP, PVC-u, EPDM 2 und Weich-PVC aufgetragen. Abbildung 4-12 zeigt für die Materialien ES, PE und PP die Ergebnisse weiterer Untersuchungen mit längerer Inkubationszeit (135 Tage). Die Werte wurden auf Trägern ohne und mit Trinkwasserbiofilm unmittelbar nach Animpfung mit *Pseudomonas aeruginosa* (Start), sowie nach 14 Tagen, bzw. 135 Tagen im Batchansatz bestimmt.

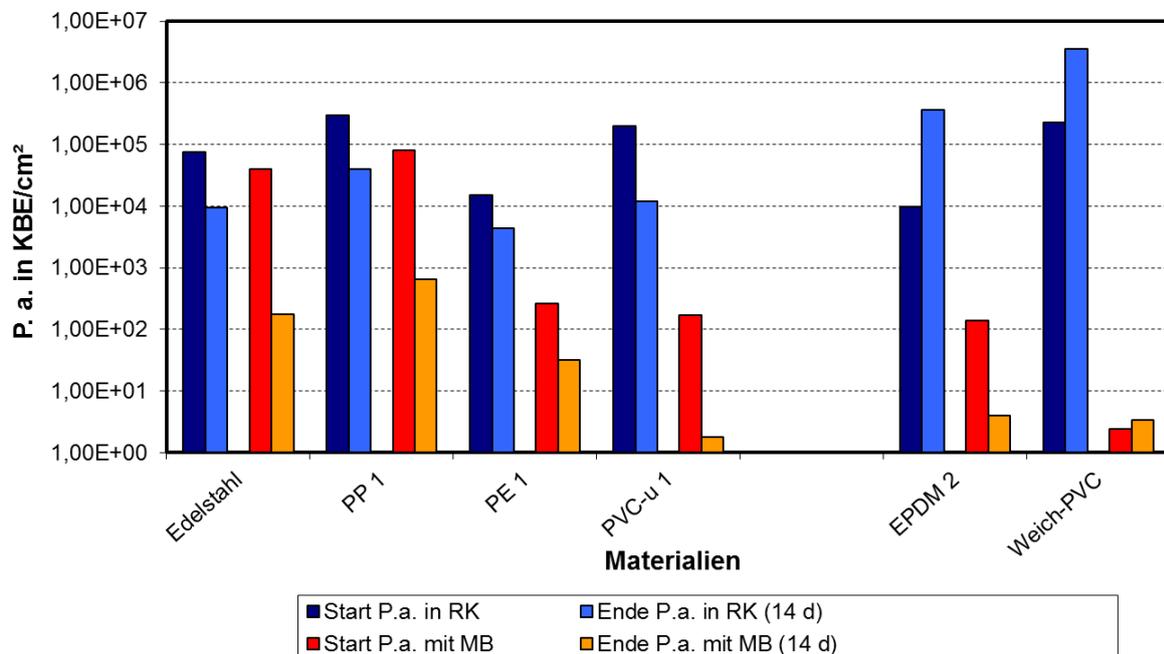


Abbildung 4-11: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm auf Trägern ohne (RK, blau) und mit Trinkwasserbiofilm (MB, rot und orange) zum Startzeitpunkt und nach 14 Tagen im Batchansatz

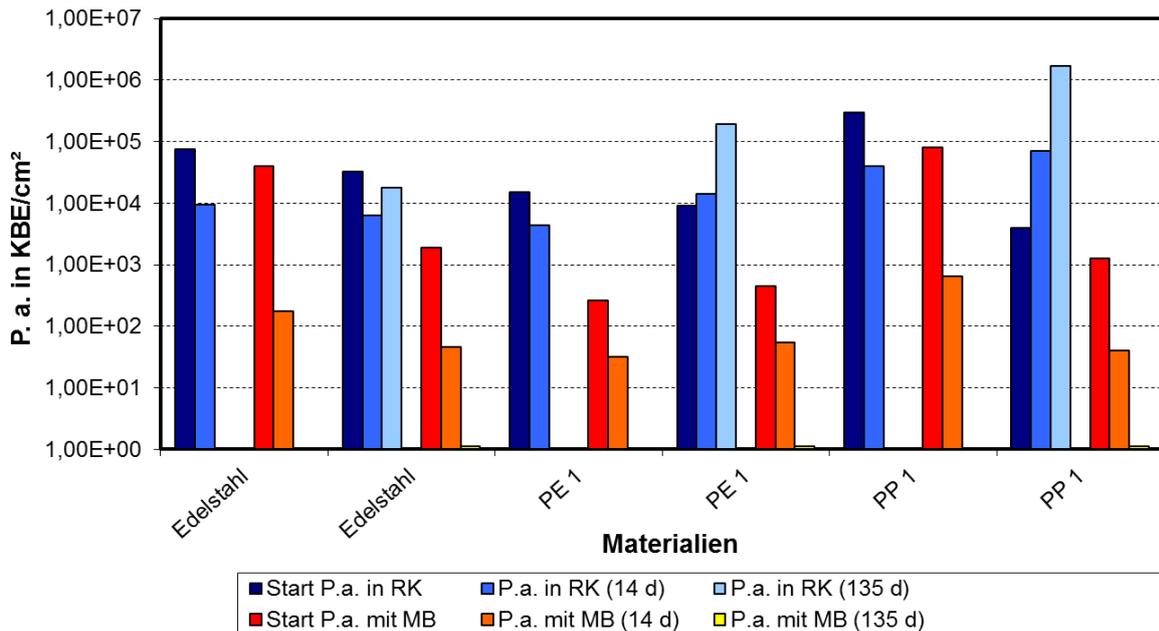


Abbildung 4-12: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm auf Trägern ohne (RK, blau) und mit Trinkwasserbiofilm (MB, rot, orange, gelb) zum Startzeitpunkt, nach 14 und 135 Tagen im Batchansatz

Wie aus den Abbildungen 4-11 und 4-12 erkennbar, erfolgte bei allen Materialien gleichermaßen eine schnelle und starke Besiedlung der unbewachsenen Platten durch *Pseudomonas aeruginosa*. Die Koloniezahlen zum Versuchsstart lagen zwischen $3,9 \times 10^3$ und $3,0 \times 10^5$ pro cm^2 , wobei die Schwankungsbreite innerhalb eines Materials (PP) größer war als zwischen den unterschiedlichen Materialien (siehe Abbildung 4-12). Auf den unbewachsenen Materialien ohne Trinkwasserbiofilm konnte sich *Pseudomonas aeruginosa* in Reinkultur sehr lange halten. Nach 14 Tagen im Batchansatz war hier keine bzw. nur eine minimale Abnahme der Koloniezahlen im Biofilm zu beobachten. Bei den Materialien EPDM 2 und Weich-PVC kam es in dieser Zeit zu einer signifikanten Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* (siehe Abbildung 4-11). Nach einer Versuchszeit von 135 Tagen waren die Koloniezahlen im Biofilm noch auf einem konstanten Niveau (ES) bzw. war sogar eine Zunahme zu verzeichnen (Kunststoffe PE und PP).

Auf den Trägern mit Trinkwasserbiofilm kam es ebenfalls zunächst zu einer Besiedlung des Biofilms durch *Pseudomonas aeruginosa*. Nach 14 Tagen Batchansatz war in allen Fällen eine Abnahme der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* um 1 bis 2 Zehnerpotenzen zu beobachten. Bei den Langzeitversuchen mit den Materialien ES, PE und PP konnte *Pseudomonas aeruginosa* nach 135 Tagen im Biofilm der mit einem

Trinkwasserbiofilm bewachsenen Träger nicht mehr nachgewiesen werden. Dies lässt auf einen Konkurrenzeffekt durch die Bakterien des natürlichen Trinkwasserbiofilms schließen.

In den Batchansätzen wurde neben dem Biofilm auch die Wasserphase untersucht. Die Ergebnisse sind nachfolgend für verschiedene Materialien in den Abbildungen 4-13 (ES), 4-14 (PE), 4-15 (PP), 4-16 (PVC-u), 4-17 (EPDM 2) und 4-18 (Weich-PVC) dargestellt. Die Untersuchungen zeigten, dass es in allen Fällen zu einer Abgabe von *Pseudomonas aeruginosa* aus dem Biofilm in die Wasserphase kam. Lag eine Reinkultur von *Pseudomonas aeruginosa* vor (Träger ohne Trinkwasserbiofilm), so wurde in allen Fällen eine schnelle und deutliche Zunahme von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase beobachtet. Im Falle der Träger mit Trinkwasserbiofilm blieb die *Pseudomonas aeruginosa*-Konzentration in der Wasserphase über den Untersuchungszeitraum von 14 Tagen auf konstantem Niveau. In diesen Fällen kam es somit nicht zu einem Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase. Im Gegensatz hierzu zeigte *Pseudomonas aeruginosa* in den Kontrollversuchen ohne Materialträger auch in Anwesenheit einer Trinkwassermischbiozönose in der Wasserphase ein deutliches Wachstum.

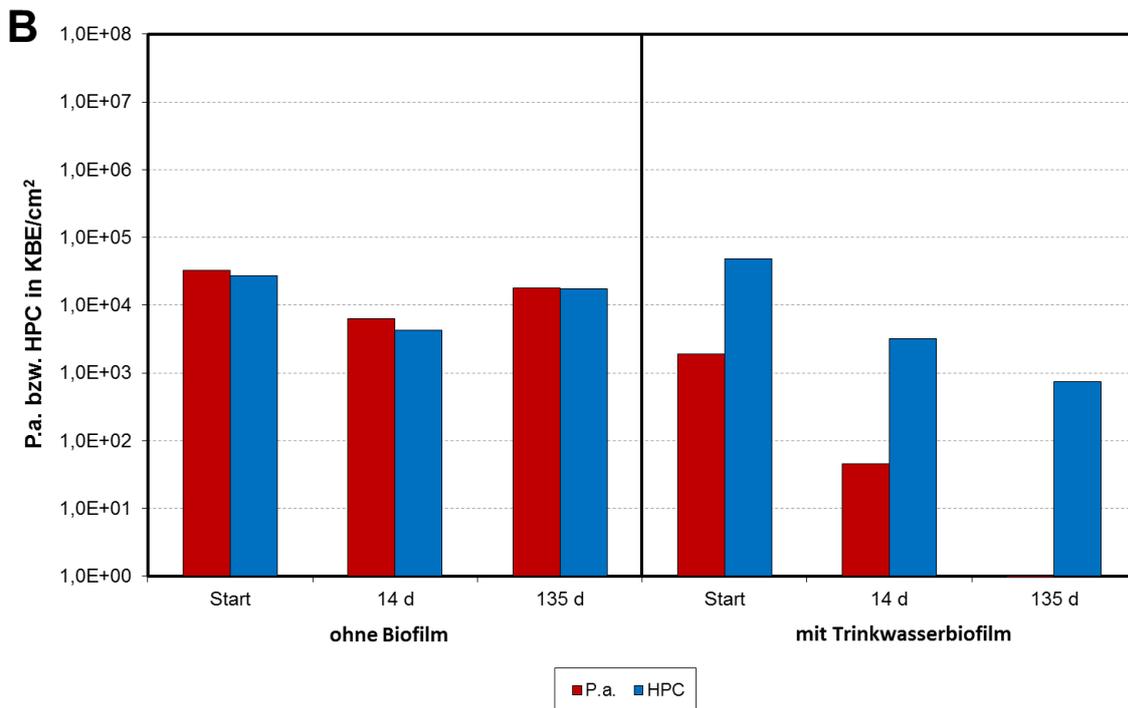
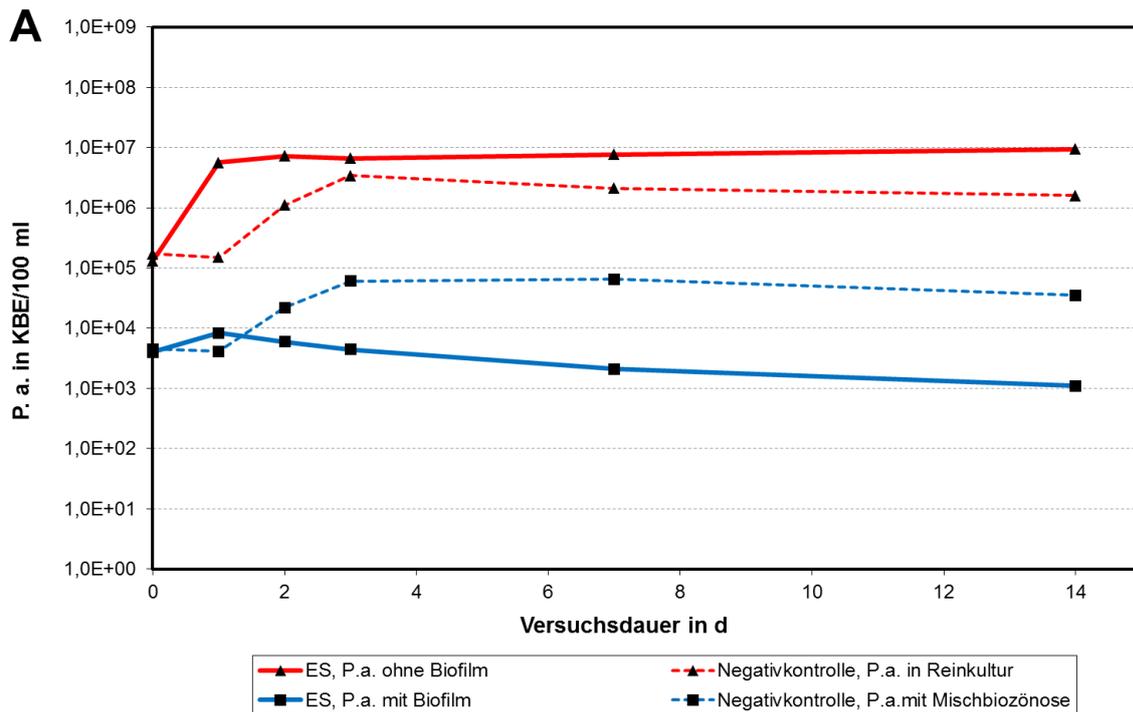


Abbildung 4-13: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase (A) und im Biofilm (B) auf Edelstahl-Trägern ohne (Reinkultur) und mit Trinkwasserbiofilm (im Biofilm sind auch die HPC aufgetragen)

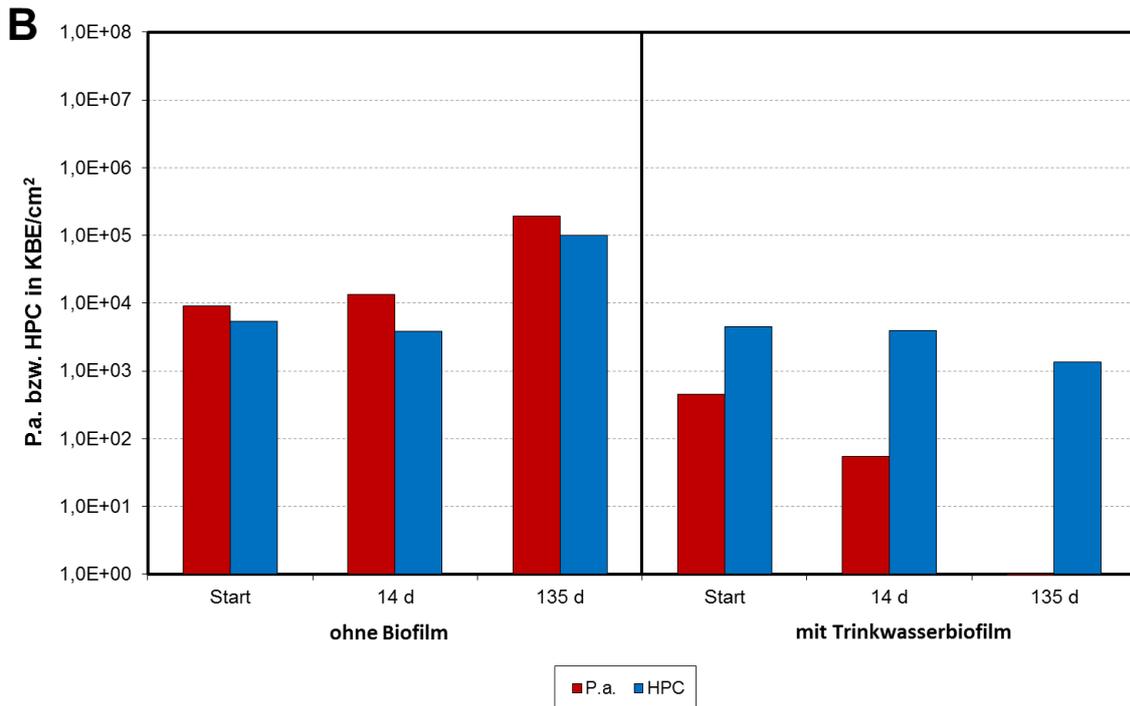
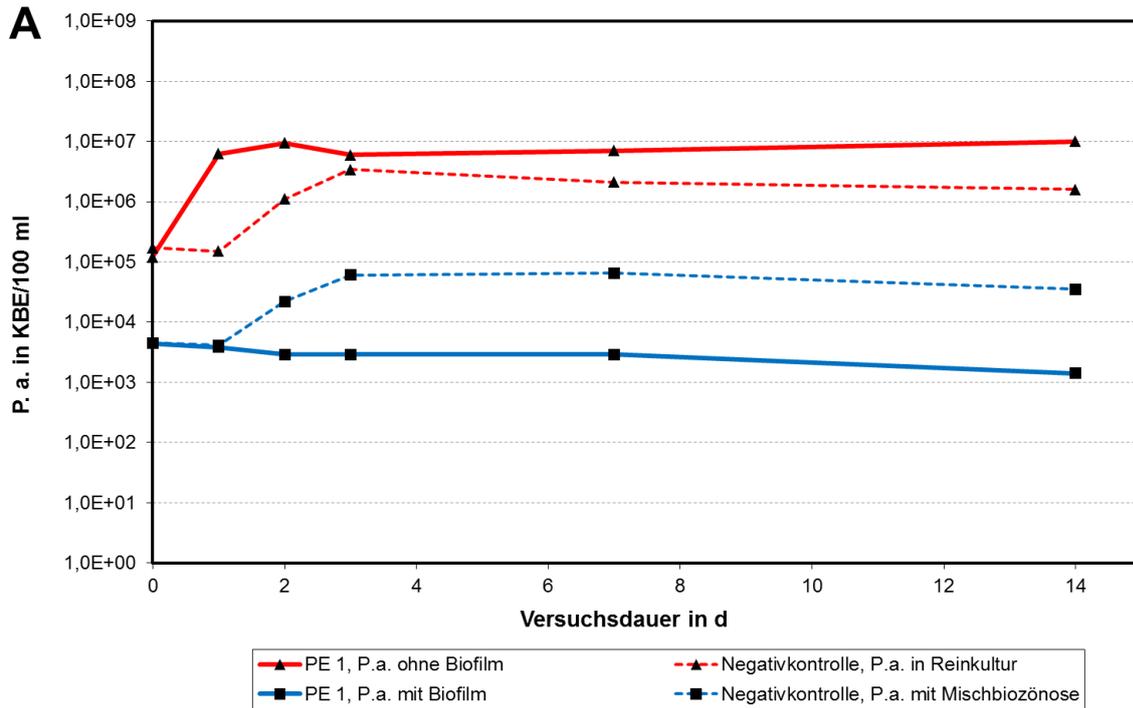


Abbildung 4-14: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase (A) und im Biofilm (B) auf PE-Trägern ohne (Reinkultur) und mit Trinkwasserbiofilm (im Biofilm sind auch die HPC aufgetragen)

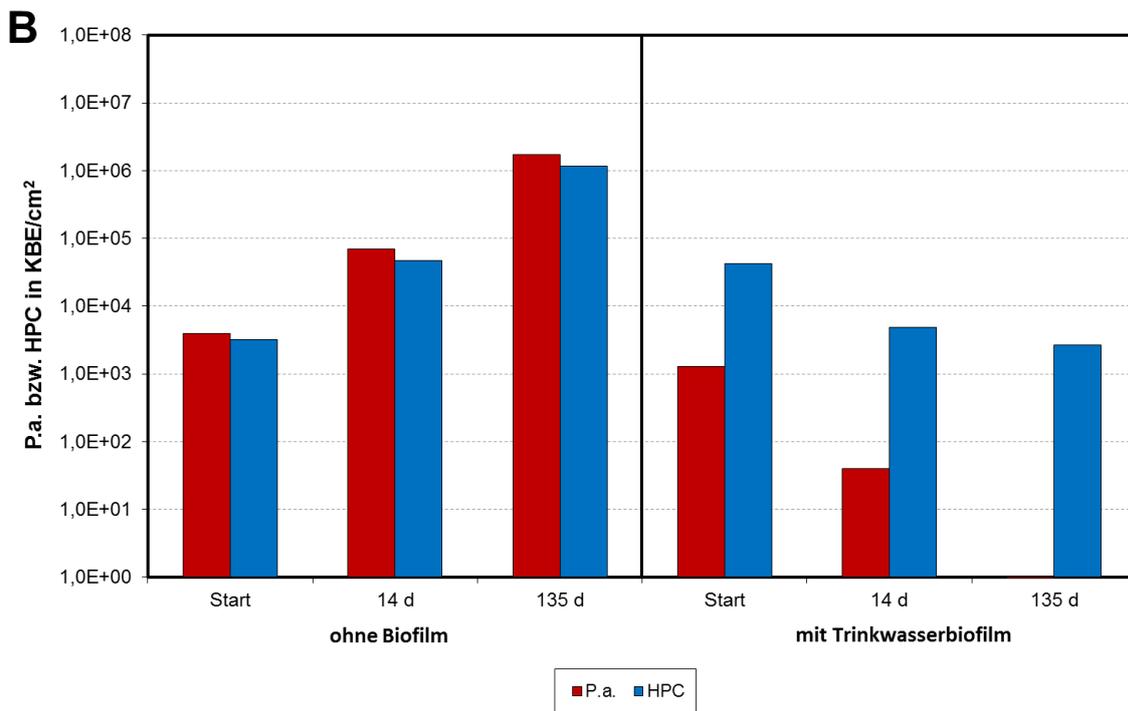
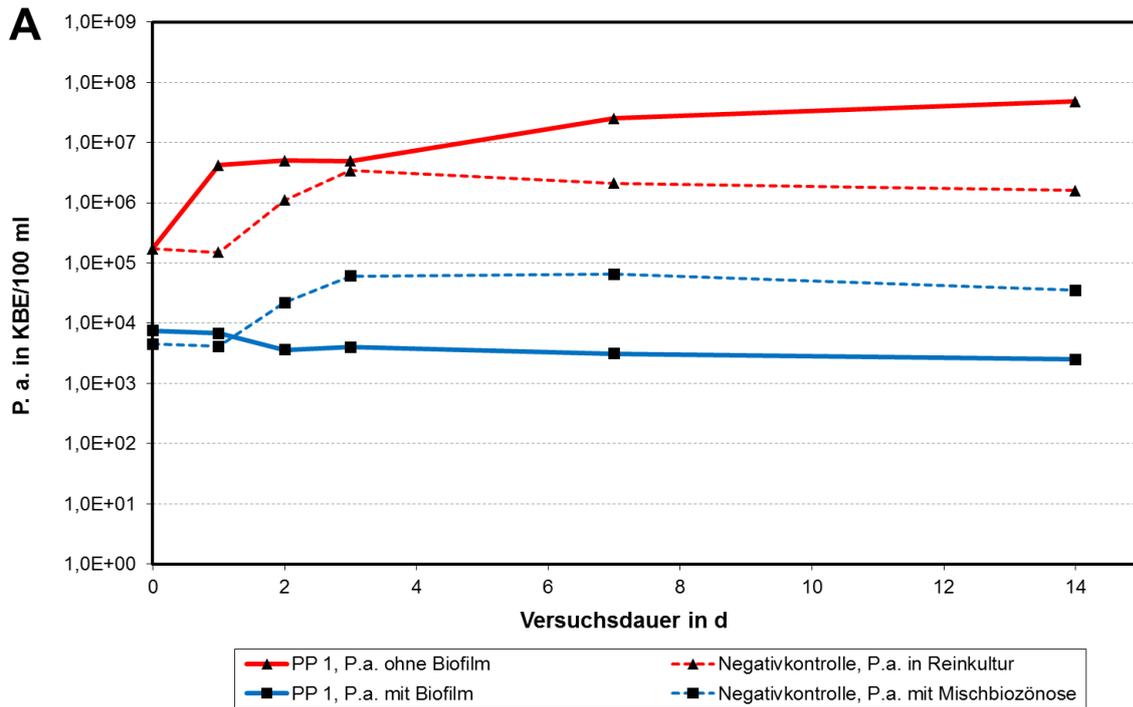


Abbildung 4-15: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase (A) und im Biofilm (B) auf PP-Trägern ohne (Reinkultur) und mit Trinkwasserbiofilm (im Biofilm sind auch die HPC aufgetragen)

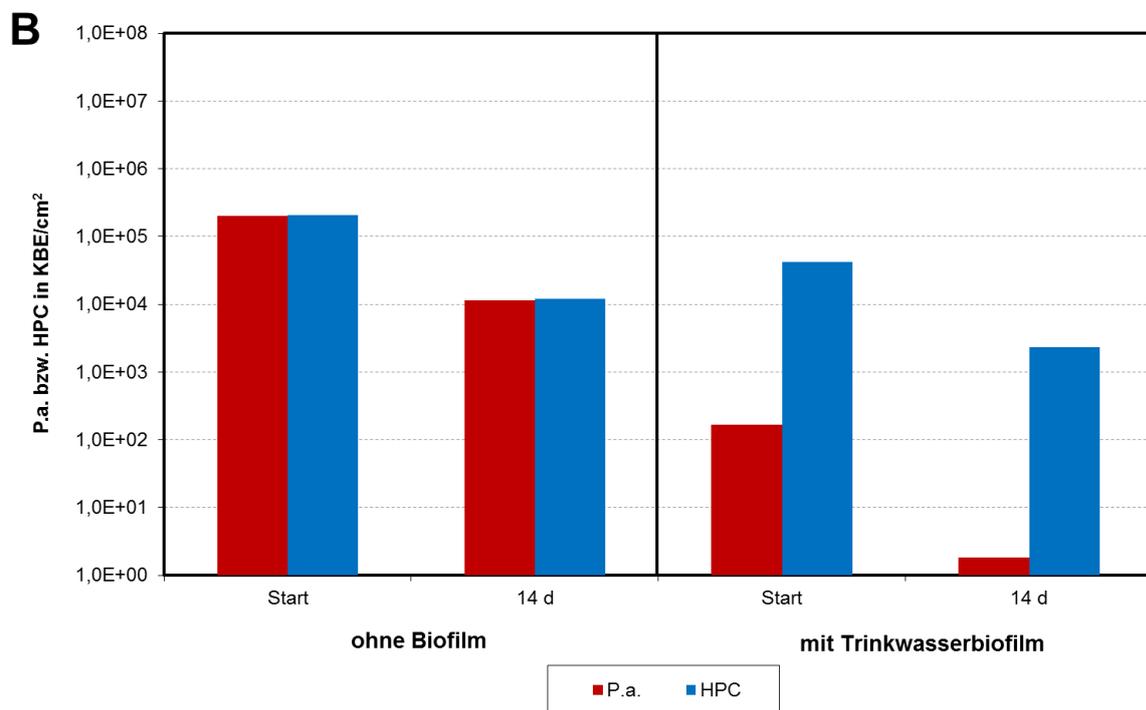
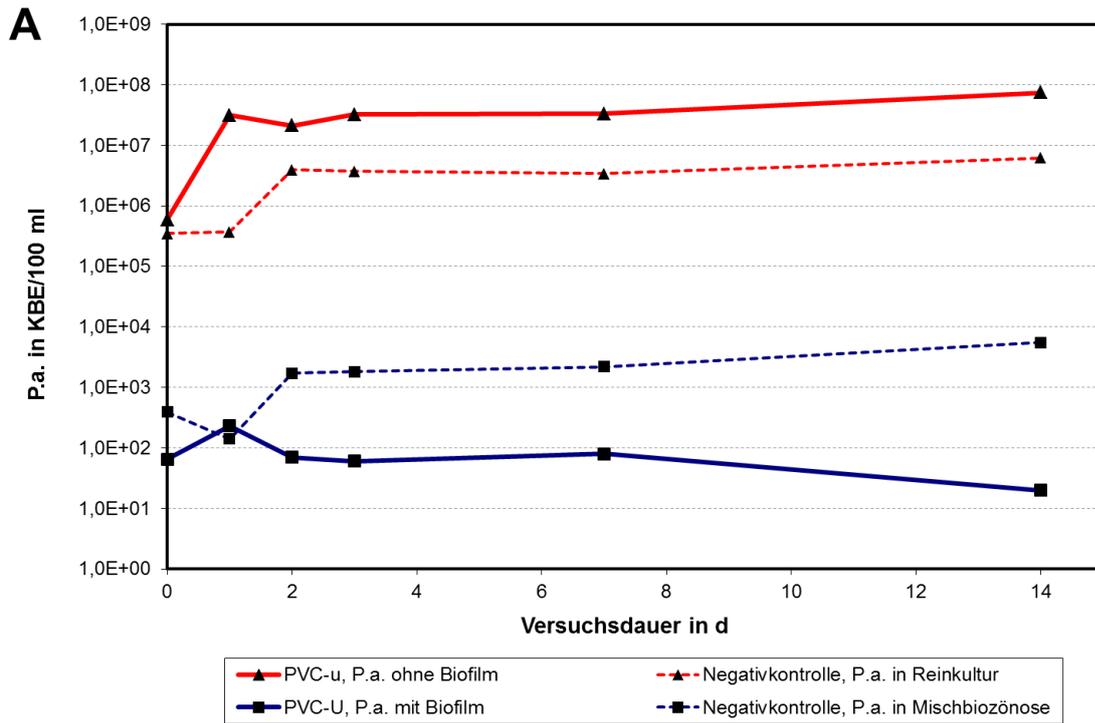


Abbildung 4-16: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase (A) und im Biofilm (B) auf PVC-u-Trägern ohne (Reinkultur) und mit Trinkwasserbiofilm (im Biofilm sind auch die HPC aufgetragen)

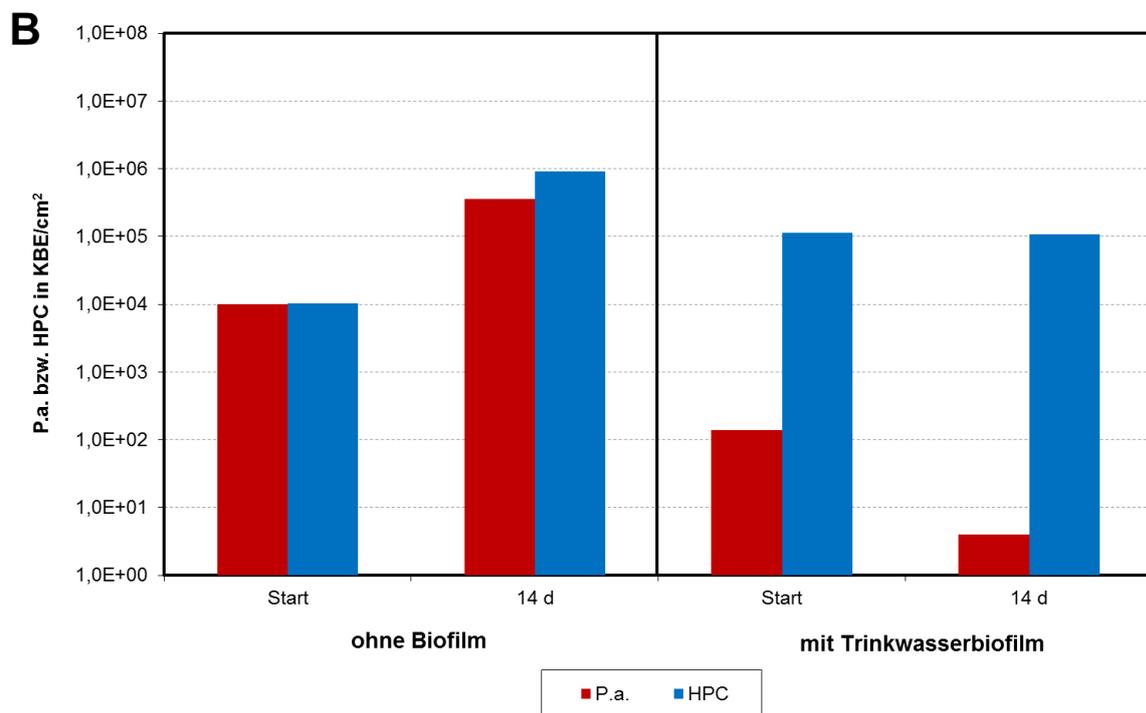
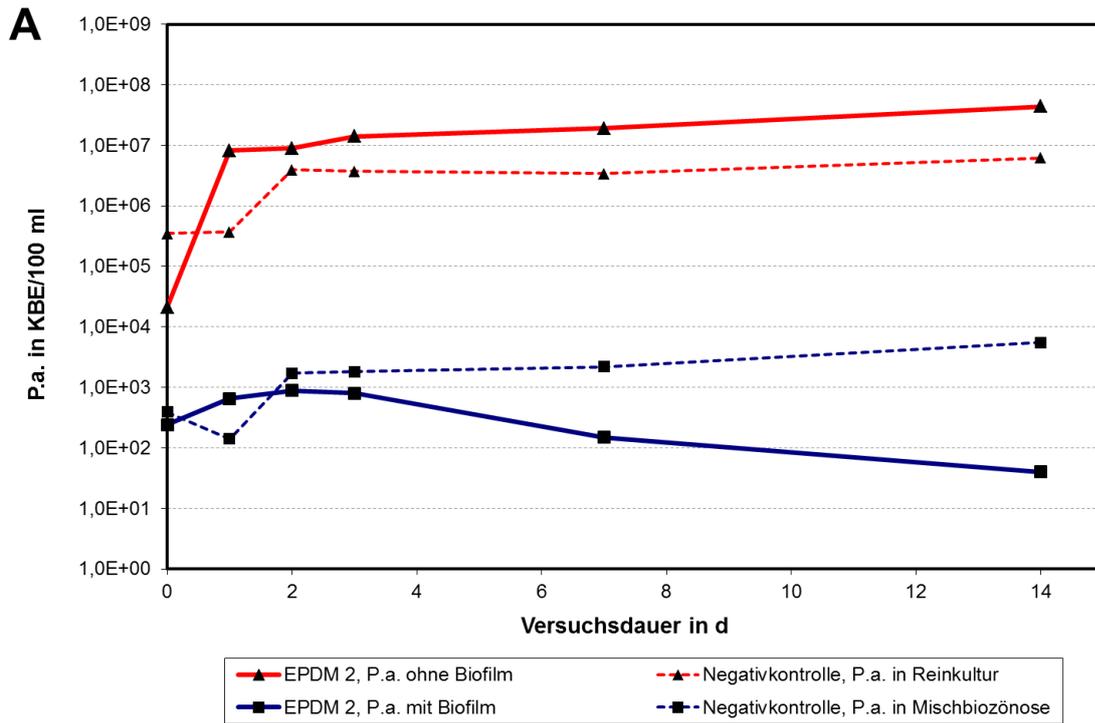


Abbildung 4-17: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase (A) und im Biofilm (B) auf EPDM 2-Trägern ohne (Reinkultur) und mit Trinkwasserbiofilm (im Biofilm sind auch die HPC aufgetragen)

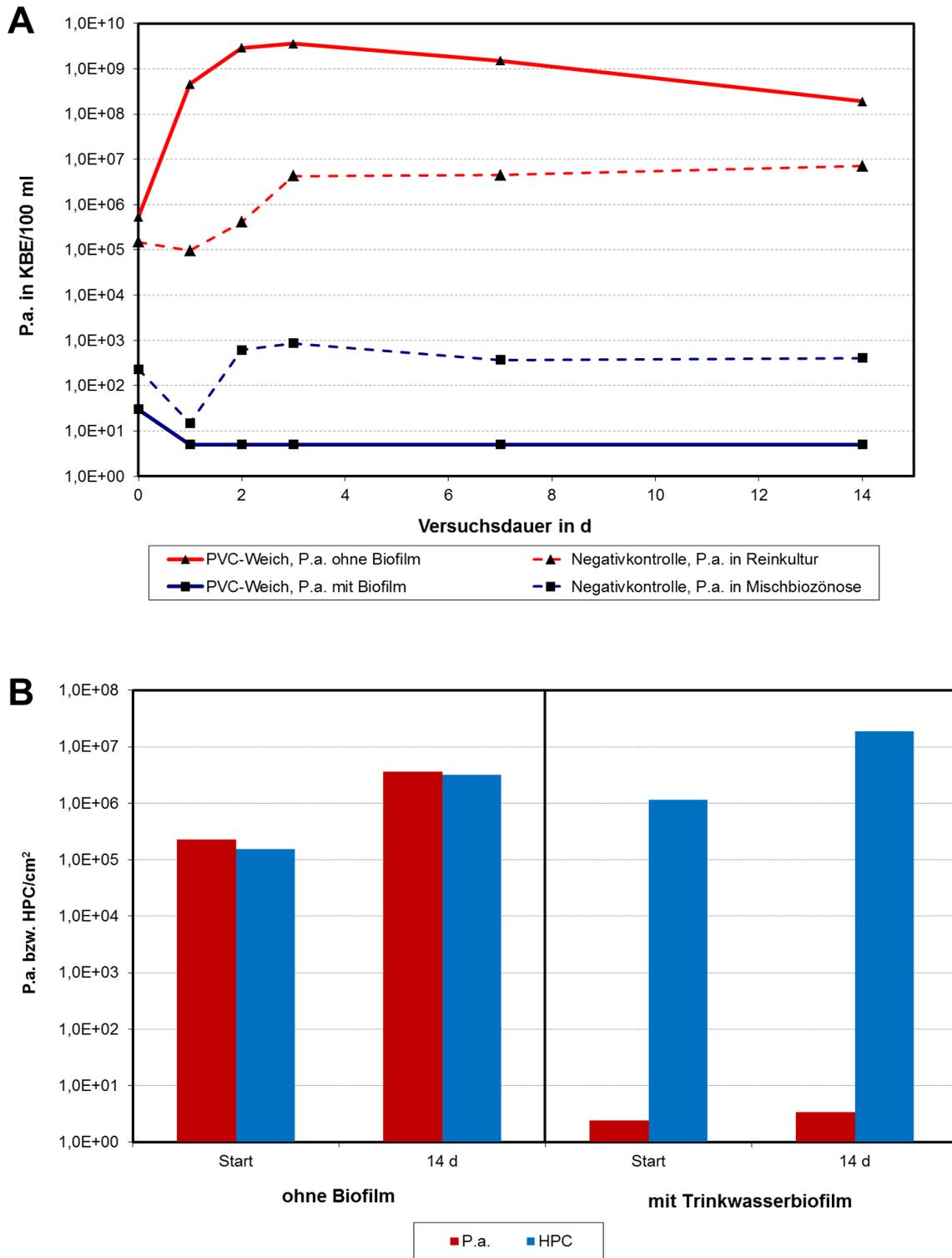


Abbildung 4-18: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase (A) und im Biofilm (B) auf Weich-PVC-Trägern ohne (Reinkultur) und mit Trinkwasserbiofilm (im Biofilm sind auch die HPC aufgetragen)

4.2.3 Durchflussversuche

Die Untersuchungen im Durchfluss zur Veränderung der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* auf verschiedenen Materialien wurden mit Trägern ohne Biofilm und mit Trägern mit einem Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn über einen Zeitraum von 4 bis 28 Wochen durchgeführt. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die Materialien ohne Trinkwasserbiofilm nur zu Versuchsbeginn mit einer Reinkultur von *Pseudomonas aeruginosa* besiedelt waren, da es mit der Exposition im Durchfluss zu einer Biofilmbildung durch autochthone Trinkwasserbakterien kam.

Die Startbesiedlung für *Pseudomonas aeruginosa* auf den Trägern ohne Trinkwasserbiofilm lag in einem Bereich von ca. 10^4 bis 5×10^5 KBE/cm². Die höheren Werte von $> 10^5$ KBE/cm² ergaben sich für die beiden EPDM-Materialien und für PVC, dagegen wurde die niedrigste Besiedlungsdichte bei ES gemessen. Bei den Kurzzeitversuchen über eine Versuchsdauer von 28 Tagen kam es bei allen Materialien zu einer sukzessiven Abnahme der Besiedlungsdichte (Abbildung 4-19), wobei sich für EDPM 6 innerhalb der ersten beiden Tage eine geringfügige Zunahme zeigte. Diese Erhöhung ließ auf ein Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* auf dem Material schließen.

Zur Überprüfung des Einflusses des Materials auf die Besiedlungsdichte wurde die Funktion der Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt und hierüber die Halbwertszeit nach dem Ansatz $T_{1/2} = \ln 2/k$ (k: Konstante der Exponentialfunktion) berechnet. Wie in Tabelle 4-9 dargestellt, war die Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa* über eine Exponentialfunktion beschreibbar, die zudem für alle Materialien ein hohes Bestimmtheitsmaß aufwies. Die Werte für die Halbwertszeit der Materialien ohne Trinkwasserbiofilm lagen in einem Bereich von ca. 2 bis 9 Tagen, wobei die höchsten Werte mit ca. 5 bzw. 9 Tagen bei den EPDM-Materialien vorlagen und die schnellste Abnahme (geringste Halbwertszeit) für PVC auftrat. Hieraus kann abgeleitet werden, dass die beiden verwendeten EPDM-Materialien ohne Trinkwasserbiofilm im Kurzzeitversuch für das Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* günstigere Bedingungen aufwiesen als die anderen Materialien.

Für die Träger mit einem Trinkwasserbiofilm lag nach der Animpfung die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* im Bereich von 10^4 KBE/cm² und somit für die beiden EPDM-Materialien und PVC um ca. eine Log-Stufe niedriger als ohne Trinkwasserbiofilm. Die Gesamtzellzahl der etablierten Biofilme befand sich bei den Materialien ES, PE, PP und PVC in einem Bereich von 5×10^5 Zellen/cm², wohingegen

EDPM 3 mit ca. 10^7 Zellen/cm² sowie EDPM 6 mit ca. 10^8 Zellen/cm² eine stärkere Biofilmbildung aufwiesen. Die geringeren Werte für *Pseudomonas aeruginosa* bei EPDM und PVC im Vergleich zum Material ohne Trinkwasserbiofilm ließen auf einen hemmenden Effekt des autochthonen Bewuchses auf die Ansiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* schließen.

Entsprechend der Träger ohne Trinkwasserbiofilm kam es mit der Versuchsdauer bei allen Materialien zu einer Verringerung der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* (Abbildung 4-20), die auch bei dieser Konstellation mit einer Exponentialfunktion beschreibbar war (Tabelle 4-10). Die berechneten Halbwertszeiten lagen zwischen 1,5 (PVC) und 3,7 Tagen (EPDM 3). Im Vergleich zu den Materialien ohne Biofilm traten somit durchgehend niedrigere Werte auf, wobei die Unterschiede für die EDPM-Materialien am deutlichsten ausfielen.

Die schnellere Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa* bei Anwesenheit eines etablierten Trinkwasserbiofilm ließ auf eine Konkurrenz durch die autochthonen Biofilmbakterien schließen. Dieser Effekt war besonders bei den beiden EPDM-Materialien erkennbar, die die höchste Gesamtzellzahl und somit die stärkste autochthone Biofilmbildung aufwiesen und zudem den deutlichsten Unterschied bei den Halbwertszeiten mit und ohne Trinkwasserbiofilm zeigten.

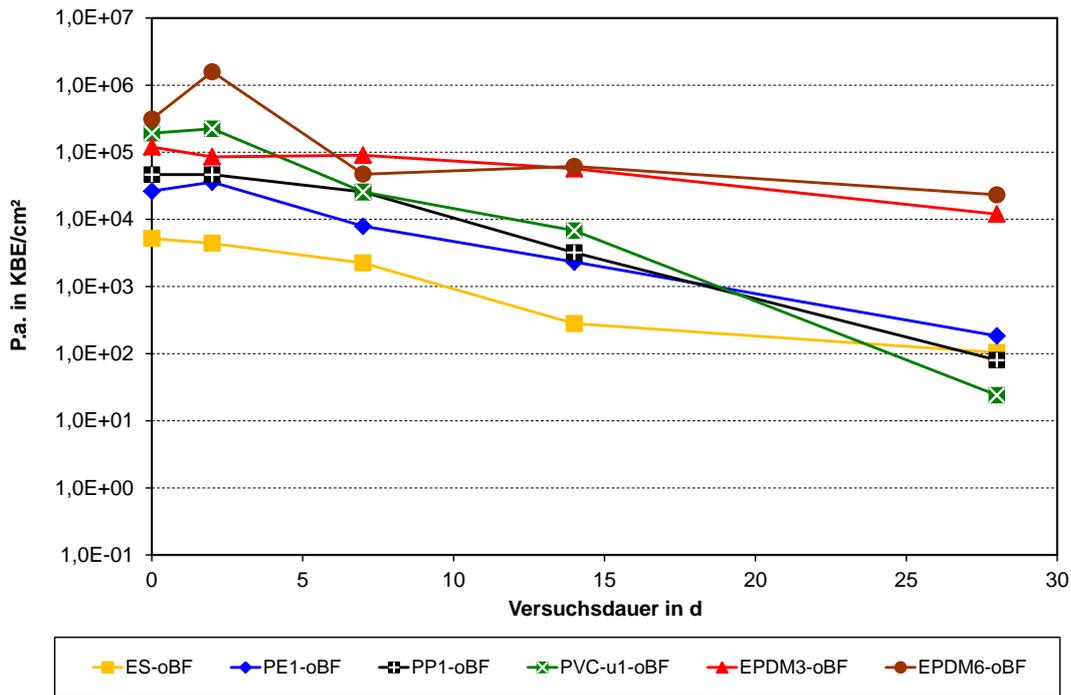


Abbildung 4-19: Besiedlungsdichte im Kurzzeitversuch bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn

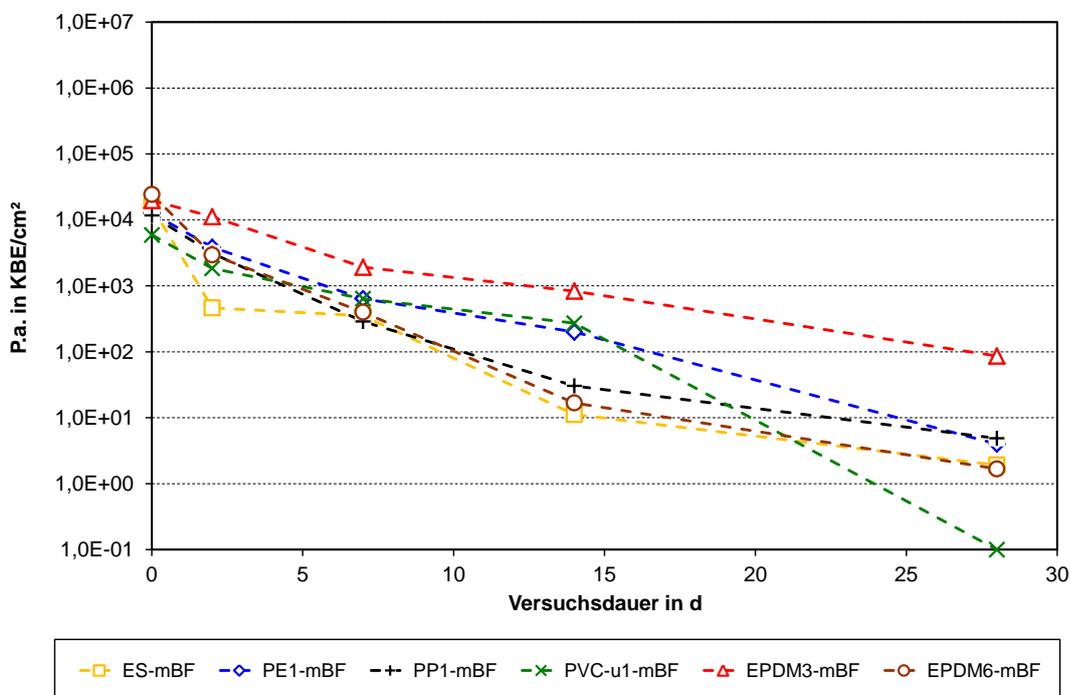


Abbildung 4-20: Besiedlungsdichte im Kurzzeitversuch bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn

Tabelle 4-9: Exponentialfunktion, Bestimmtheitsmaß und Halbwertszeit für die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* bei Trägern ohne Biofilm zu Versuchsbeginn im Kurzzeit- und Langzeitversuch sowie Langzeitversuch im Durchfluss und Batch

Parameter	ES-oBF	PE1-oBF	PP1-oBF	PVC-u1-oBF	EPDM3-oBF	EPDM6-oBF
Kurzzeitversuch im Durchfluss						
Funktion	$y = 4978,5^* e^{-0,15x}$	$y = 34161^* e^{-0,188x}$	$y = 75797^* e^{-0,237x}$	$y = 396567^* e^{-0,337x}$	$y = 127974 e^{-0,078x}$	$y = 764860^* e^{-0,131x}$
R ²	0,9339	0,985	0,9782	0,9712	0,9358	0,7804
Halbwertszeit in Tagen	4,6	3,7	3,0	2,1	8,9	5,3
Langzeitversuch im Durchfluss						
Funktion	$y = 611,69^* e^{-0,066x}$	$y = 4281,3^* e^{-0,061}$	$y = 3377^* e^{-0,052x}$		$y = 35923^* e^{-0,078x}$	$y = 163199^* e^{-0,067x}$
R ²	0,7887	0,889	0,7619		0,8622	0,9771
Halbwertszeit in Tagen	10,5	11,4	13,3		8,9	10,3
Langzeitversuch im Batch						
Funktion	$y = 11,679^* e^{-0,032x}$	$y = 13,605^* e^{-0,024x}$	$y = 10,719^* e^{-0,031x}$	$y = 1,7389^* e^{-0,066x}$	$y = 2412,5^* e^{-0,049x}$	$y = 17279^* e^{-0,036x}$
R ²	0,8488	0,9683	0,8134	0,8824	0,9423	0,9704
Halbwertszeit in Tagen	21,7	28,9	22,4	10,5	14,2	19,3

Tabelle 4-10: Exponentialfunktion, Bestimmtheitsmaß und Halbwertszeit für die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* bei Trägern mit Biofilm zu Versuchsbeginn im Kurzzeit- und Langzeitversuch im Durchfluss

Parameter	ES-mBF	PE1-mBF	PP1-mBF	PVC-u1-mBF	EPDM3-mBF	EPDM6-mBF
Kurzzeitversuch im Durchfluss						
Funktion	$y = 2627,1^* e^{-0,287x}$	$y = 7731^* e^{-0,273x}$	$y = 4226,8^* e^{-0,266x}$	$y = 11380^* e^{-0,452x}$	$y = 13524^* e^{-0,188x}$	$y = 6789,4^* e^{-0,327x}$
R ²	0,852	0,9835	0,9101	0,9148	0,976	0,9209
Halbwertszeit in Tagen	2,7	2,5	2,6	1,5	3,7	2,1
Langzeitversuch im Durchfluss						
Funktion	$y = 4360,2^* e^{-0,061x}$	$y = 3253,9^* e^{-0,031x}$	$y = 9156,6^* e^{-0,035x}$		$y = 9448,3^* e^{-0,073x}$	$y = 3797,7^* e^{-0,069x}$
R ²	0,9307	0,686	0,8879		0,9148	0,9104
Halbwertszeit in Tagen	11,4	22,4	19,8		9,5	10,1

Korrespondierend zu den Kurzzeitversuchen zeigte sich auch im Langzeitversuch über 165 Tage bei den Materialien ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn eine sukzessive Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa* (Abbildung 4-21). Am Versuchsende war bei allen Materialien mit Ausnahme von ES, *Pseudomonas aeruginosa* noch in geringer Besiedlungsdichte nachweisbar. Dagegen ergab sich für ES kein Nachweis mehr.

Die Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa* war wiederum über eine Exponentialfunktion beschreibbar, wobei das Bestimmtheitsmaß etwas niedriger ausfiel als bei den Kurzzeitversuchen. Die Halbwertszeit lag mit Werten von ca. 9 bis 13 Tagen für alle Materialien, unter Berücksichtigung des langen Untersuchungszeitraumes, auf einem ähnlichen Niveau. Dementsprechend war über den längeren Untersuchungszeitraum kein Effekt des Materials auf die Veränderung der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* zu verzeichnen. Die mit Ausnahme von EPDM 3 längeren Halbwertszeiten gegenüber dem Kurzzeitversuch lassen auf eine zunehmende Robustheit der verbleibenden Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber dem Einfluss durch den autochthonen Biofilm schließen.

Bei den Materialien mit einem Trinkwasserbiofilm bei der Animpfung von *Pseudomonas aeruginosa* wurden die Langzeitversuche über 197 Tage ausgedehnt. Auch bei dieser Konstellation war eine sukzessive Abnahme der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* zu verzeichnen (Abbildung 4-22). Die schnellste Verringerung ergab sich für PVC, wobei der Wert nach 30 Tagen im Bereich der Nachweisgrenze lag und bei den folgenden Untersuchungen *Pseudomonas aeruginosa* nicht mehr detektiert wurde. Für die Materialien ES, EPDM 3 und EPDM 6 befand sich die Besiedlungsdichte nach ca. 170 Tagen im Bereich oder unterhalb der Nachweisgrenze. Für PE und PP wurden am Ende der Untersuchungen noch ca. 10 KBE/cm² bestimmt.

Die Abnahme der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* zeigte auch in diesem Fall einen exponentiellen Verlauf mit einem überwiegend hohen Bestimmtheitsmaß. Für PVC wurde keine Funktion berechnet, da nur zwei Werte vorlagen. Bei der Berechnung der Halbwertszeit ergab sich für ES und die EDPM-Materialien mit Werten im Bereich von 10 Tagen ein identisches Niveau, ebenso wie für die Träger ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn. Dementsprechend war für die Langzeitbetrachtung kein Effekt eines zuvor vorhandenen Trinkwasserbiofilms sowie des Materials zu verzeichnen (Abbildung 4-25). Bei PE und PP lag eine Halbierung der Abnahmegeschwindigkeit im Vergleich zu den Trägern ohne Trinkwasserbiofilm vor. Da bei den Kurzzeitversuchen sowie im Langzeitversuch ohne Trinkwasserbiofilm keine korrespondierenden Effekte erkennbar waren, ist davon auszugehen, dass die Abweichungen gegenüber ES und EPDM nicht

durch das Material oder den Biofilm, sondern vermutlich durch die bei mikrobiologischen Untersuchungen möglichen Schwankungsbreiten bedingt waren.

Zusätzlich zu den Langzeitversuchen im Durchfluss wurden Langzeitversuche über 135 Tage im Batchansatz durchgeführt (Abbildung 4-23). Hierfür wurden Träger ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn nach Abschluss des Versuchsblockes „Kurzzeitversuch im Durchfluss“ genutzt. Die Startbesiedlung für *Pseudomonas aeruginosa* lag für EPDM 3 und EPDM 6 im Bereich von 10^4 KBE/cm², für die übrigen Materialien ergab sich eine Besiedlungsdichte von ca. 10 KBE/cm². Bei allen Materialien kam es mit der Inkubationsdauer zu einer sukzessiven Verminderung von *Pseudomonas aeruginosa*, wobei korrespondierend mit dem Langzeitversuch im Durchfluss die schnellste Verringerung bei PVC zu verzeichnen war. Auch für diesen Versuchsansatz war, mit Ausnahme von PVC, die Abnahme über eine Exponentialfunktion beschreibbar, wobei ein hohes Bestimmtheitsmaß vorlag. Für die Halbwertszeit kam es gegenüber dem Langzeitversuch im Durchfluss in etwa zu einer Verdopplung und dementsprechend zur Halbierung der Abnahmegeschwindigkeit.

Für den Batchversuch wurde neben der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* auch die Konzentration dieses Bakteriums im Wasserkörper untersucht. Exemplarisch für die verschiedenen Materialien, mit Ausnahme von EDPM 6, sind die Ergebnisse der Untersuchung des Wasserkörpers vom Material ES und im Vergleich dazu von EPDM 6 in Abbildung 4-24 dargestellt. Für ES wurde *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper, bei geringer Besiedlungsdichte, nicht nachgewiesen. Dementsprechend kam es zu keinem Übergang von Bakterien aus dem Biofilm in den Wasserkörper. Beim EPDM 6 wurde nach einer Inkubationsdauer von 35 Tagen ca. 10^4 KBE/100 ml im Wasserkörper bestimmt. Somit lag eine Anreicherung von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper vor, die sowohl durch ein Wachstum im Biofilm mit anschließender Abgabe in den Wasserkörper als auch durch ein Wachstum im Wasserkörper verursacht gewesen sein könnte. Aus dem anschließend stabilen Niveau ist abzuleiten, dass es zu keinem Absterben der Bakterien im Wasserkörper kam. Demgegenüber verminderte sich die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* im Zeitraum vom 35. Tag bis zum Versuchsende um 1,5 Log-Stufen, was auf einen Einfluss der autochthonen Biofilmbakterien hinweist. Die Ergebnisse dieses Untersuchungsansatzes weisen auf ein längeres Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper als im Biofilm hin.

Die höheren Werte für die Halbwertszeit und dementsprechend geringere Abnahmegeschwindigkeit von *Pseudomonas aeruginosa* bei den Langzeittests im Batchansatz im Vergleich zu den Langzeitversuchen im Durchfluss könnte auf die Aktivität

der Biofilmbakterien zurückzuführen sein. Im Durchfluss ist aufgrund der konstanten Nährstoffversorgung von einer höheren Aktivität der autochthonen Biofilmbakterien auszugehen als im Batchansatz ohne weitere Nährstoffzufuhr. Die höhere Aktivität führte möglicherweise auch zu einem höheren Konkurrenzdruck auf das nicht autochthone Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und dementsprechend zu einer schnelleren Verringerung.

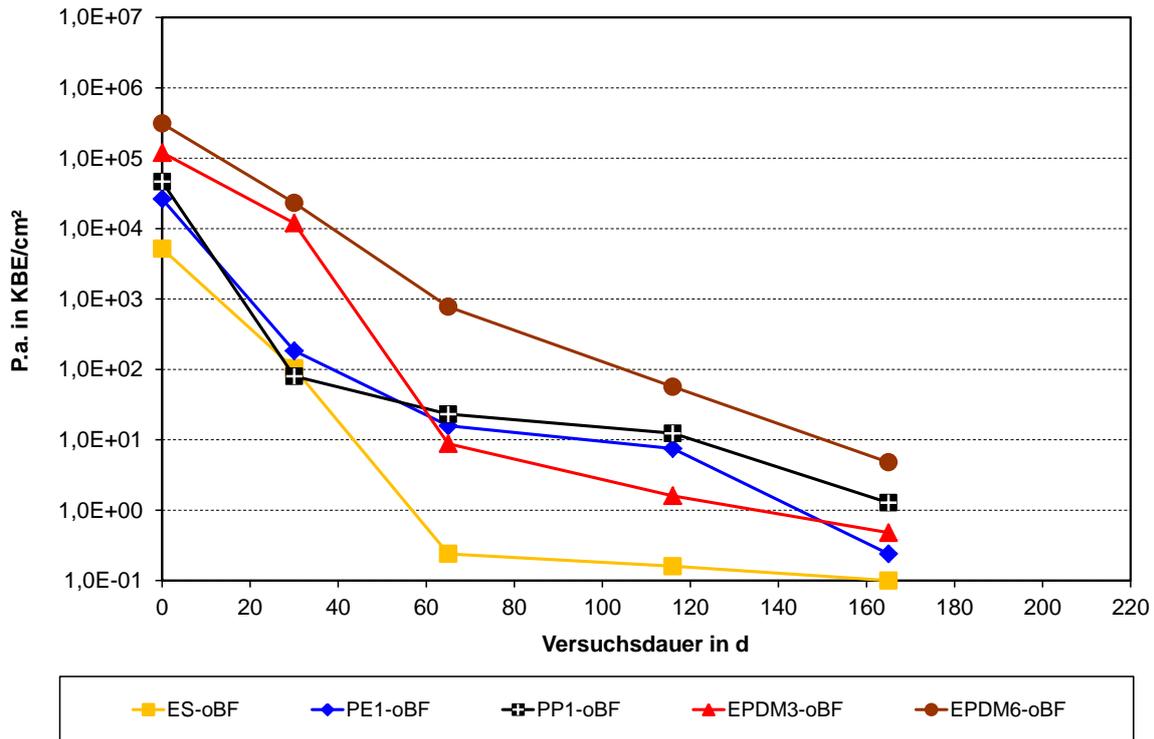


Abbildung 4-21: Besiedlungsdichte im Langzeitversuch mit Trägern ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn

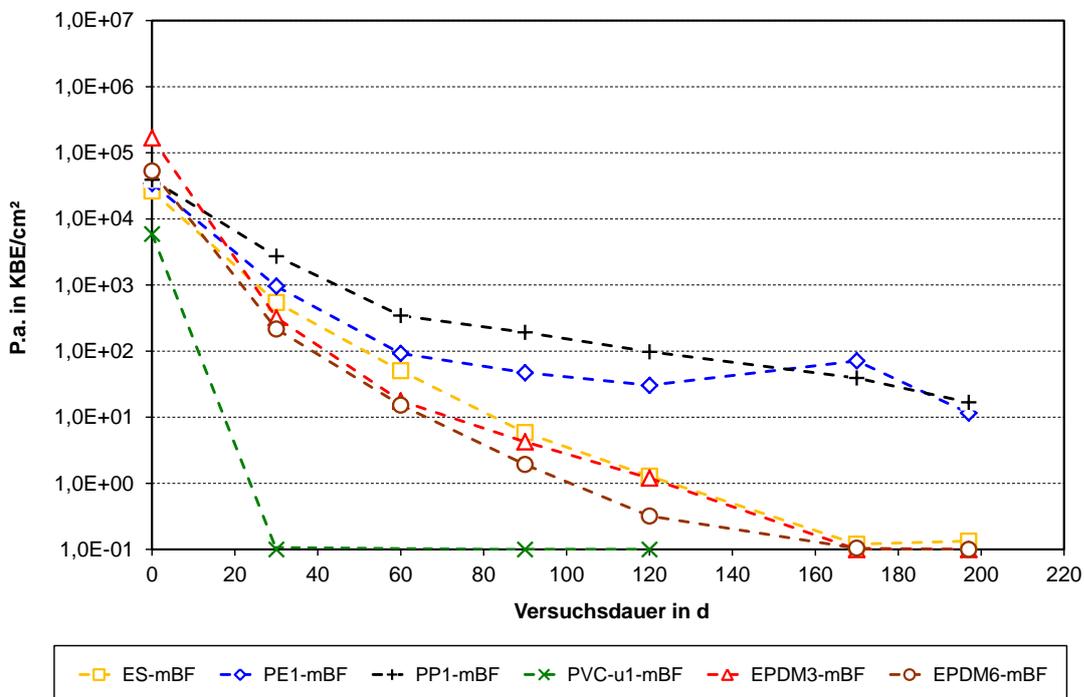


Abbildung 4-22: Besiedlungsdichte im Langzeitversuch für Träger mit Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn

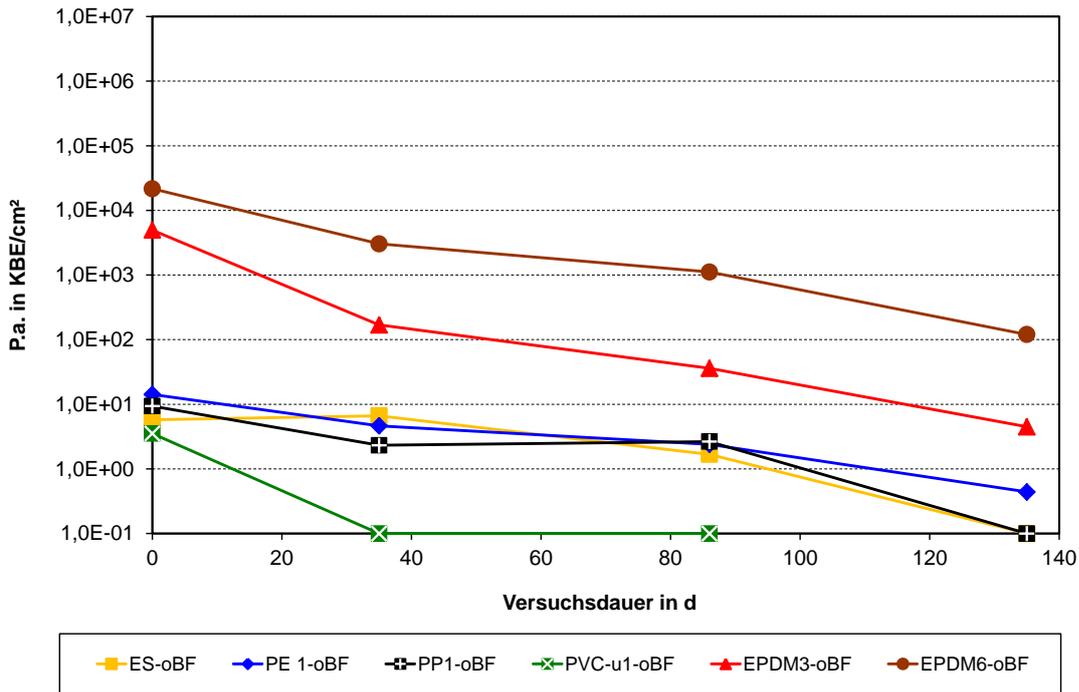


Abbildung 4-23: Besiedlungsdichte mit Trägern ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn im Batch (Verwendung von Trägern nach Abschluss der Kurzzeitversuche)

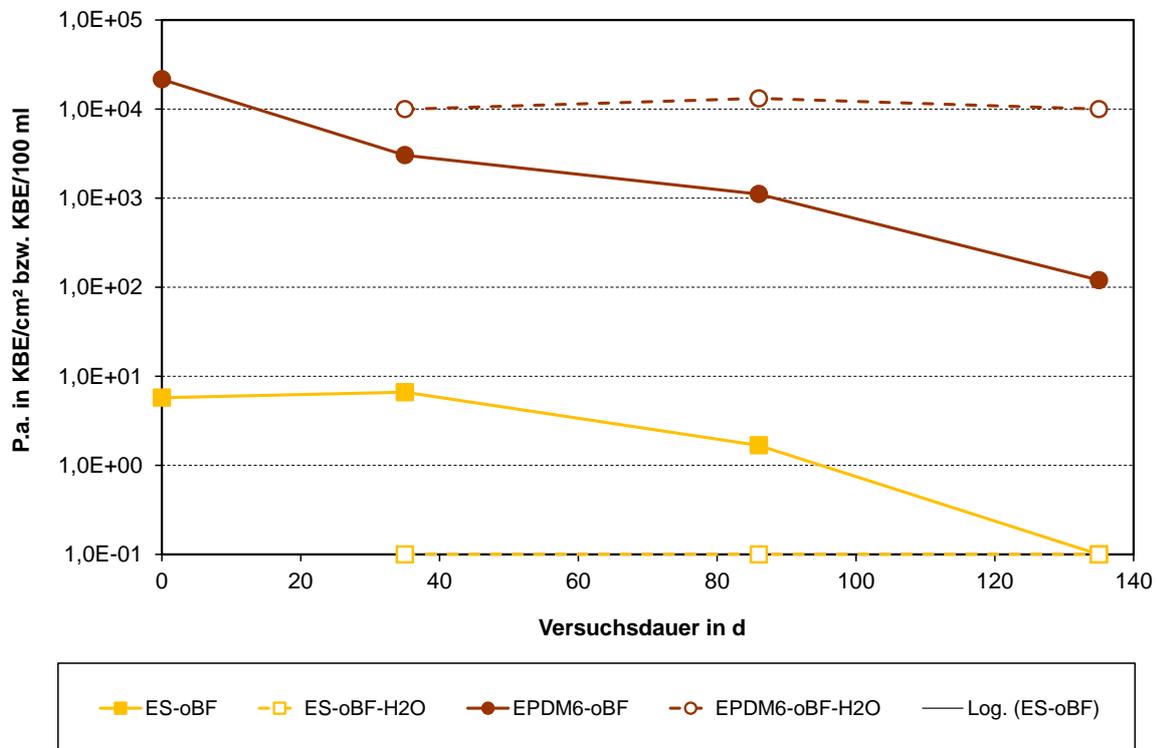


Abbildung 4-24: Langzeitversuch im Batch mit Trägern ohne Trinkwasserbiofilm bei Versuchsbeginn - Vergleich Besiedlungsdichte im Biofilm und Konzentration im Wasserkörper für ES und EPDM 6

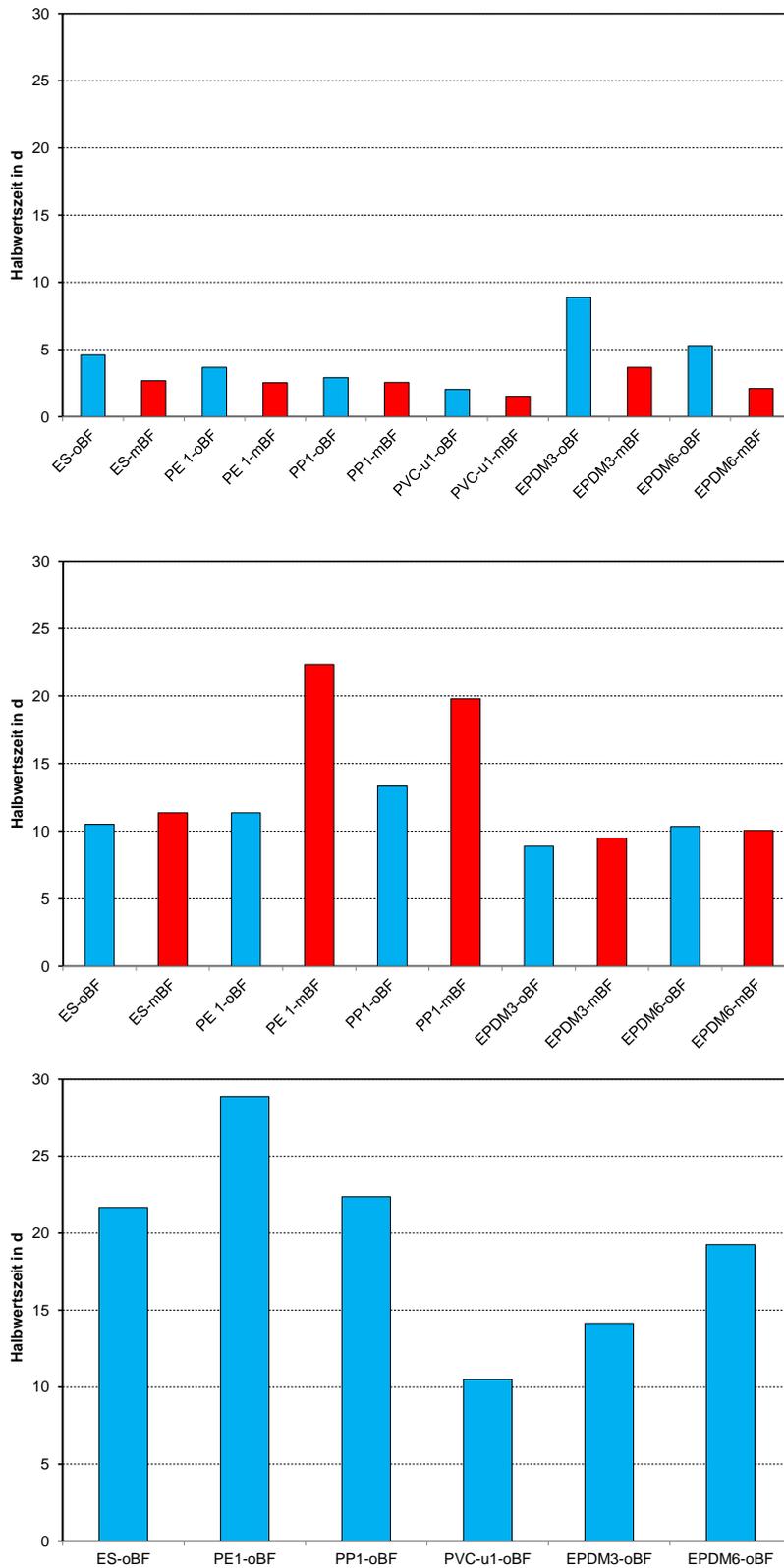


Abbildung 4-25: Halbwertszeit von *Pseudomonas aeruginosa* beim Kurzzeitversuch im Durchfluss (oben), Langzeitversuch im Durchfluss (Mitte) und Langzeitversuch im Batch (unten) (blaue Markierung: ohne Biofilm, rote Markierung: mit Biofilm)

4.2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* mittels FISH wurden bei ausgewählten Proben dann durchgeführt, wenn sich am Versuchsende kein kultureller Nachweis für *Pseudomonas aeruginosa* ergab. Dies war u.a. bei PVC mit Trinkwasserbiofilm nach 28 Tagen Inkubation sowie bei EPDM 3 und EPDM 6 im Langzeitversuch nach ca. 200 Tagen der Fall. Bei keiner Probe konnte *Pseudomonas aeruginosa* mittels FISH nachgewiesen werden. Somit korrespondierten die Ergebnisse mit dem Kulturverfahren. Zu beachten ist jedoch, dass durch die methodisch bedingten kleinen Probenvolumina die Nachweisgrenze in einem Bereich von 100 bis 1000 *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen pro cm² lag.

4.2.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* auf Materialien lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Alle Materialklassen werden bei einer Animpfung durch *Pseudomonas aeruginosa* besiedelt.
- Sofern kein Trinkwasserbiofilm vorhanden ist, werden EPDM-Materialien stärker durch *Pseudomonas aeruginosa* besiedelt als andere Materialien.
- Ein vorhandener Trinkwasserbiofilm führt insbesondere bei EPDM-Materialien zu einer geringeren Ansiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* bei einer Animpfung.
- Bei allen Materialien mit oder ohne Trinkwasserbiofilm kommt es im Durchfluss zu einer exponentiellen Abnahme der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa*, wobei ein vorhandener Trinkwasserbiofilm eine schnellere Verringerung bewirkt.
- In Abhängigkeit von der Startbesiedlung bleibt *Pseudomonas aeruginosa* im Durchfluss über lange Zeiträume (Monate) im Biofilm nachweisbar. Bei der Langzeitbetrachtung liegt kein Effekt des Materials oder eines vor der Animpfung vorhandenen Trinkwasserbiofilms vor.
- Im Batchansatz kommt es zu einem längeren Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper als auf Oberflächen bei Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms.

4.3 Effektivität von Desinfektions- und Reinigungsmaßnahmen

4.3.1 Übersicht

Zur Klärung der Fragestellung, welche Desinfektionsmittel und Desinfektionsmaßnahmen im Wasserkörper bzw. bei welcher Materialsituation zu einer nachhaltigen Entfernung von *Pseudomonas aeruginosa* führen, wurden Untersuchungen zur Effektivität von Desinfektions- und Reinigungsmaßnahmen durchgeführt. Die Desinfektionsversuche im Wasserkörper erfolgten mit Chlor und Chlordioxid gemäß Trinkwasserverordnung. Auch im Biofilm auf Materialien wurden Desinfektionsverfahren gemäß Trinkwasserverordnung angewandt. Diese wurden sowohl im Batchansatz als auch im Durchfluss durchgeführt. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen mit Desinfektionsmittelkonzentrationen zur Anlagendesinfektion gemäß den DVGW-Arbeitsblättern W 291 und W 557, sowie Untersuchungen mit Sprühdesinfektionsmitteln. Mit Schläuchen und Rohren wurden darüber hinaus noch Spülversuche zur mechanischen Entfernung von *Pseudomonas aeruginosa* aus dem Biofilm durchgeführt.

4.3.2 Desinfektion im Wasserkörper

Die Untersuchungen zur Desinfektion von *Pseudomonas aeruginosa* im Wasserkörper fanden mit beiden Stämmen (DSM 1117 und UI 9) in Reinkultur statt. Die Ausgangskonzentration an *Pseudomonas aeruginosa* betrug jeweils ca. 2×10^6 Zellen pro 100 ml. Die Dosierung der Desinfektionsmittel Chlor und Chlordioxid erfolgte so, dass nach 30 min Einwirkzeit ein Restgehalt von 0,1 mg/l freies Chlor vorlag. Aufgrund starker Zehrung durch den relativ hohen Ammoniumgehalt des Modellwassers wurde diesem eine deutlich höhere Ausgangskonzentration an Desinfektionsmittel zugesetzt.

In Abbildung 4-26 ist vergleichend die Überlebensrate der beiden *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme in der Wasserphase beim Einwirken von Chlor dargestellt. In Trinkwasser konnte bereits nach 10 min eine Reduktion von *Pseudomonas aeruginosa* um mehr als 4 Log-Stufen beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu konnte in dem Modellwasser erst nach einer Einwirkzeit von 60 min eine deutliche Reduktion von *Pseudomonas aeruginosa* festgestellt werden. Grund hierfür war der relative hohe Ammoniumgehalt des Modellwassers. Ammonium führt zu einer starken Chlorzehrung, die mit der Bildung von Chloraminen einhergeht. Diese Chloramine zeigen eine langsamere Desinfektionswirkung, so dass eine Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* um 3-4 Log-Stufen erst nach 60 min zu beobachten war.

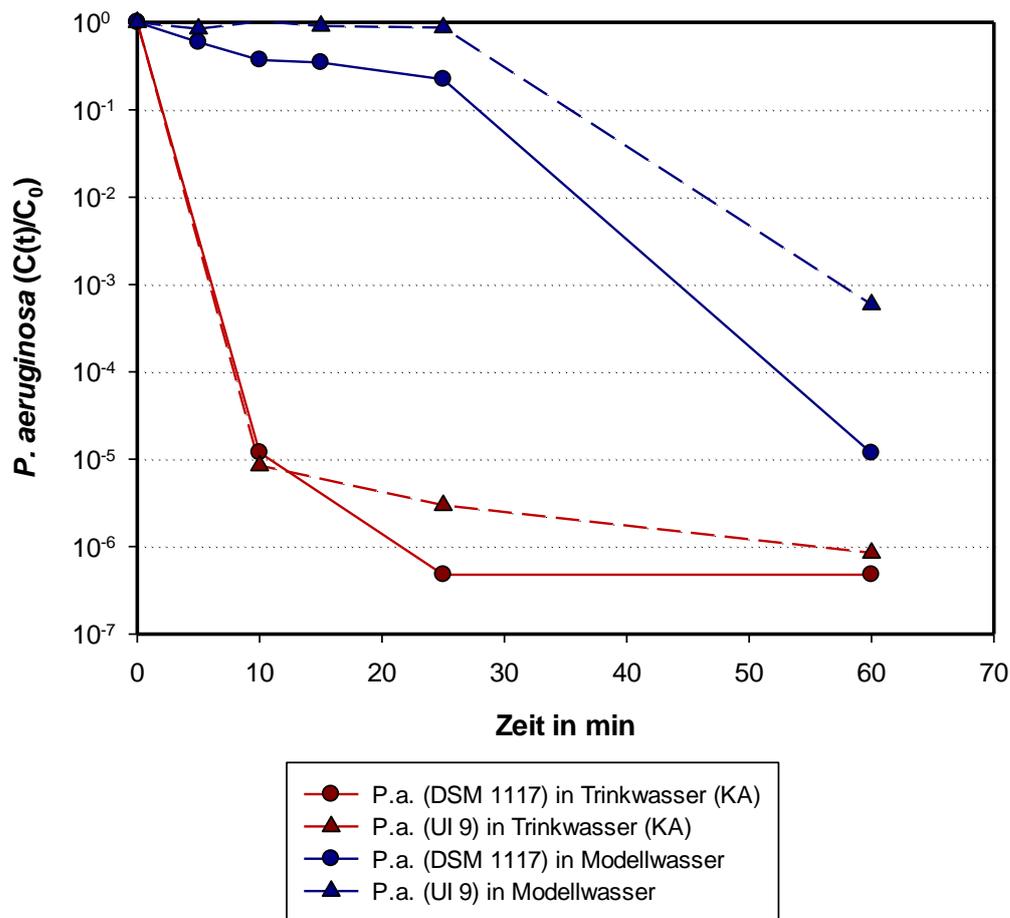


Abbildung 4-26: Desinfektionswirksamkeit von Chlor auf *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117 und UI 9 in Trinkwasser und Modellwasser (Restgehalte jeweils 0,1 mg/l freies Chlor nach 30 min).

In beiden Wässern zeigte das Umweltisolat UI 9 im Vergleich zum Laborstamm DSM 1117 eine etwas langsamere Abtötung.

Abbildung 4-27 zeigt vergleichend die Desinfektionswirksamkeit von Chlor und Chlordioxid für Untersuchungen mit dem Umweltisolat UI 9. Es zeigte sich, dass beide Desinfektionsmittel eine vergleichbare Desinfektionswirkung auf *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase aufweisen. Bei Chlordioxid war die schnelle Desinfektionswirkung auch in dem ammoniumhaltigen Modellwasser gegeben.

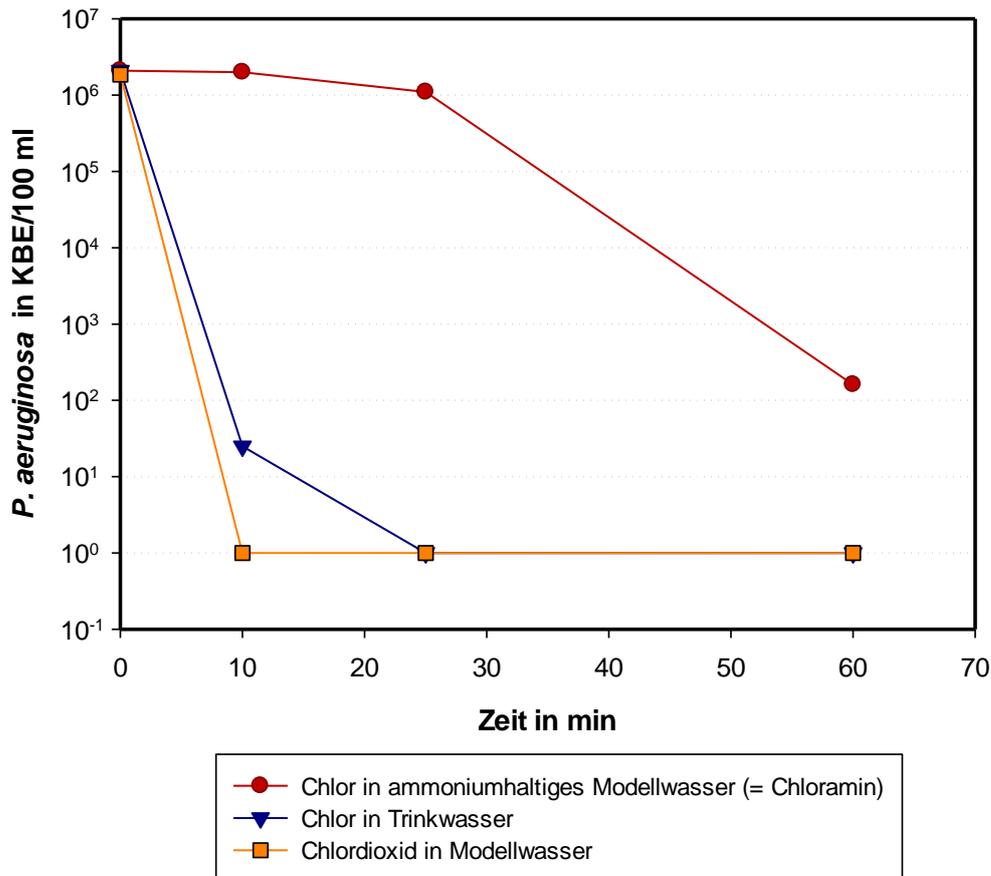


Abbildung 4-27: Desinfektionswirksamkeit von Chlor und Chlordioxid auf *Pseudomonas aeruginosa* UI 9 in Trinkwasser und Modellwasser (Restgehalte jeweils 0,1 mg/l nach 30 min).

4.3.3 Desinfektion auf Materialien

4.3.3.1 Trinkwasserdesinfektion (Batch und Durchfluss)

Trinkwasserdesinfektion mit Chlor im Batchansatz

Für die Versuche zur Desinfektion von *Pseudomonas aeruginosa* auf Materialien im Batchansatz wurden die Materialien Edelstahl, PE 1, PP 1, PVC-u 1, EPDM 6 und Weich-PVC verwendet. Die Versuche wurden mit Aufwuchsträgern ohne und mit Trinkwasserbiofilm durchgeführt. Um bei allen Materialien die gleichen Versuchsbedingungen zu erhalten, wurde die Chlordosierung so vorgenommen, dass nach 30 min noch ein Chlorrestgehalt von 0,3 mg/l freiem Chlor vorlag.

In Abbildung 4-28 ist die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* auf den Aufwuchsträgern ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchbeginn und nach 30 min Desinfektion mit Chlor im Batchansatz in Trinkwasser (KA) dargestellt. Die Besiedlungsdichten von *Pseudomonas aeruginosa* lagen zu Versuchsbeginn zwischen $5,4 \times 10^3$ und $1,3 \times 10^5$ KBE/cm², d.h. alle untersuchten Materialien wurden in etwa im gleichen Ausmaß durch *Pseudomonas aeruginosa* besiedelt. Nach 30 min Einwirkzeit von Chlor konnte auf allen Materialien noch *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden. Bei den Materialien Edelstahl, PE, PP und PVC-u zeigte sich jeweils eine Abtötung um ca. 4 Log-Stufen. Bei EPDM 6 hingegen war keine signifikante Reduktion nachweisbar, bei Weich-PVC lag lediglich ein Rückgang um ca. 1 Log-Stufe vor.

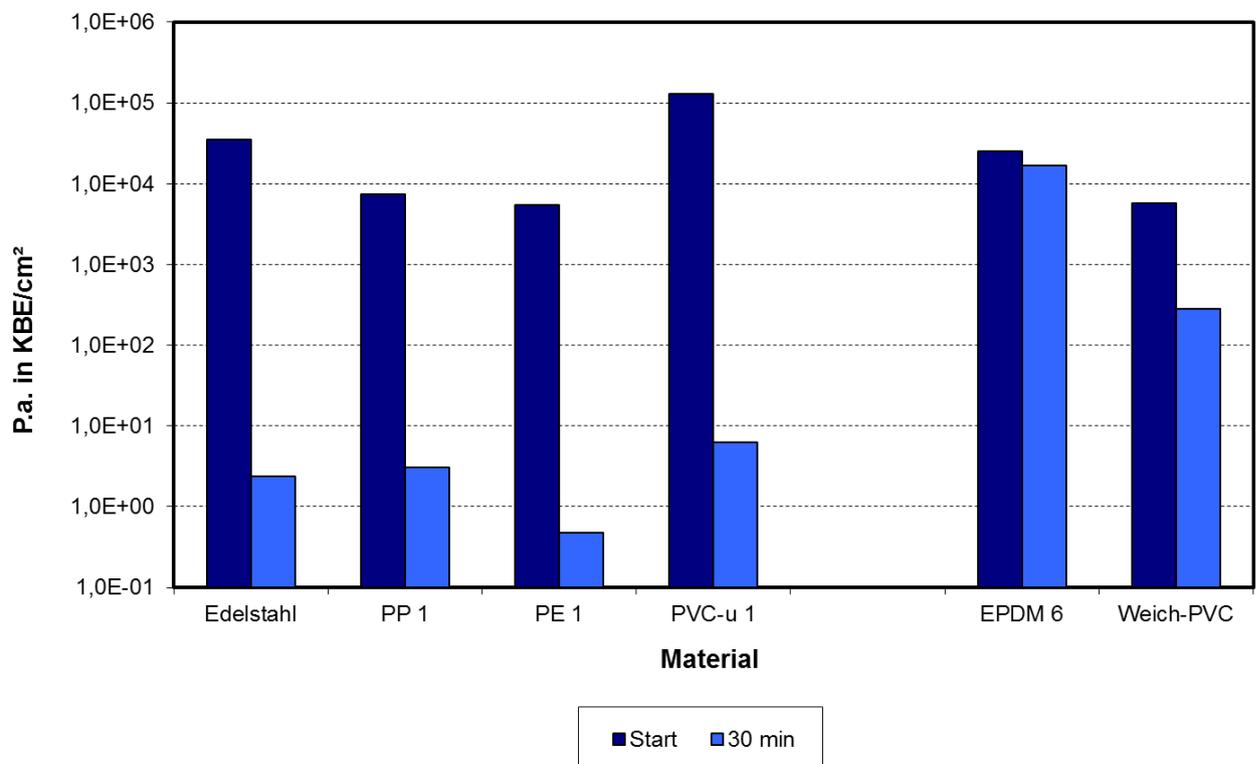


Abbildung 4-28: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm auf Trägern ohne Trinkwasserbiofilm zum Startzeitpunkt und nach 30 min Desinfektion mit Chlor im Batchansatz (Restgehalt: 0,3 mg/l).

Abbildung 4-29 zeigt zusätzlich die Werte für die Untersuchungen der Aufwuchsträger mit einem Trinkwasserbiofilm. Die Materialien Edelstahl, PE, PP und PVC-u wurden dabei von *Pseudomonas aeruginosa* in einer Konzentration von $2,6 - 8,8 \times 10^4$ KBE/cm² besiedelt, bei EPDM 6 und Weich-PVC trat eine etwas geringere Besiedlung auf ($4,0 \times 10^3$ bzw. $1,8 \times 10^2$ KBE pro cm²). Bei diesen Materialien wurde auch auf den Aufwuchsträgern mit

Trinkwasserbiofilm nach Chlordesinfektion kein signifikanter Rückgang der Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten die Kunststoffmaterialien PE, PP und PVC-u eine deutliche Reduktion von *Pseudomonas aeruginosa* um ca. 4 Log-Stufen. Auf Edelstahl mit Trinkwasserbiofilm wurde eine Reduktion von ca. 2 Log-Stufen festgestellt.

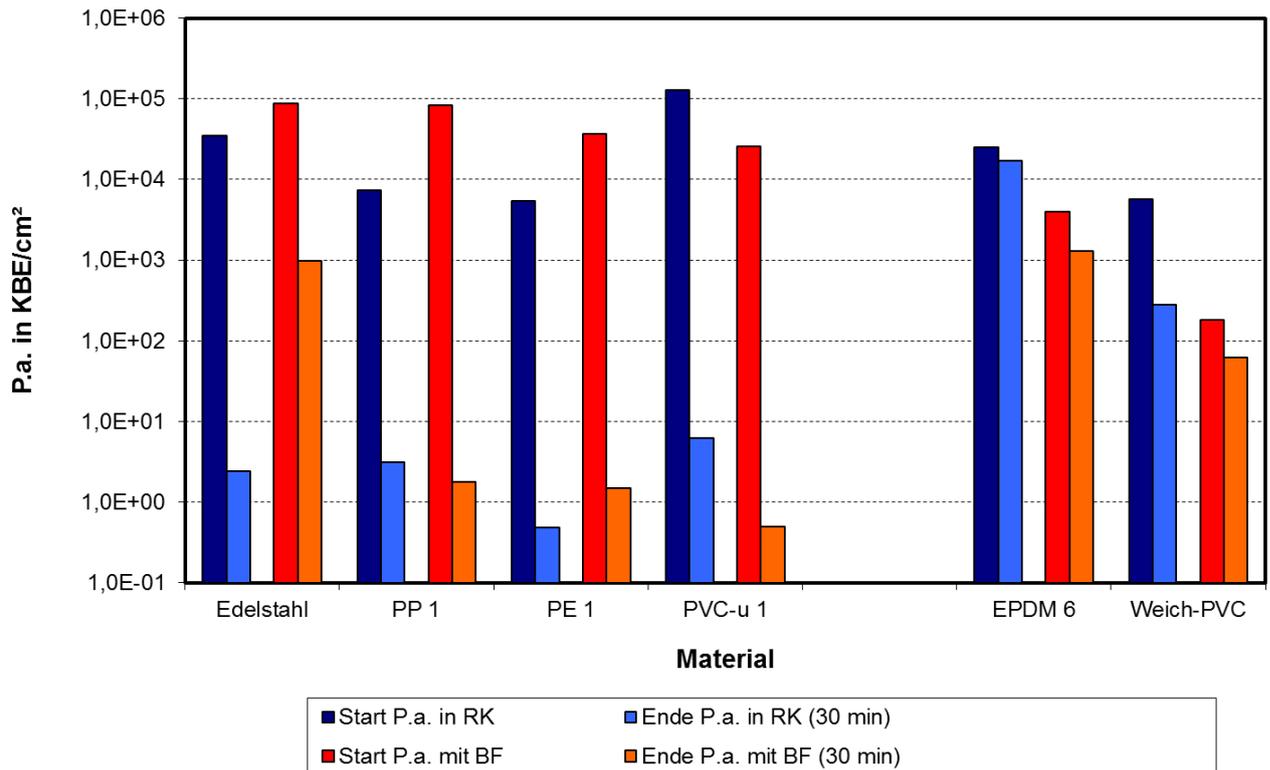


Abbildung 4-29: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm auf Trägern ohne (RK, blau) und mit Trinkwasserbiofilm (BF, rot und orange) 30 min Desinfektion mit Chlor im Batchansatz (Restgehalt: 0,3 mg/l).

In den Batchansätzen wurde neben dem Biofilm auch die Wasserphase untersucht. Diese Ergebnisse sind nachfolgend exemplarisch für zwei Materialien in den Abbildungen 4-30 (PVC-u 1) und 4-31 (EPDM 6) dargestellt.

Bei PCV-u war sowohl mit als auch ohne Trinkwasserbiofilm eine gute Desinfektionswirksamkeit von > 4 Log-Stufen gegeben, während bei EPDM 6 in der Wasserphase nach 30 min nur eine Abnahme um knapp 1 Log-Stufe erreicht wurde.

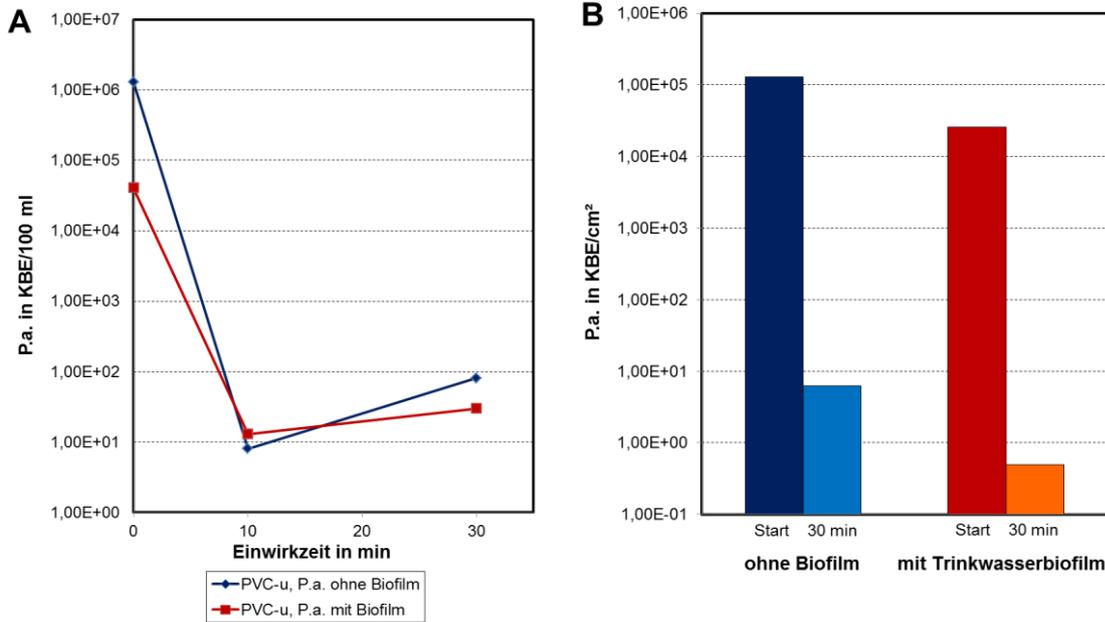


Abbildung 4-30: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase (A) und im Biofilm (B) auf PVC-u-Trägern ohne (Reinkultur) und mit Trinkwasserbiofilm bei Desinfektion mit Chlor (Restgehalt: 0,3 mg/l nach 30 min)

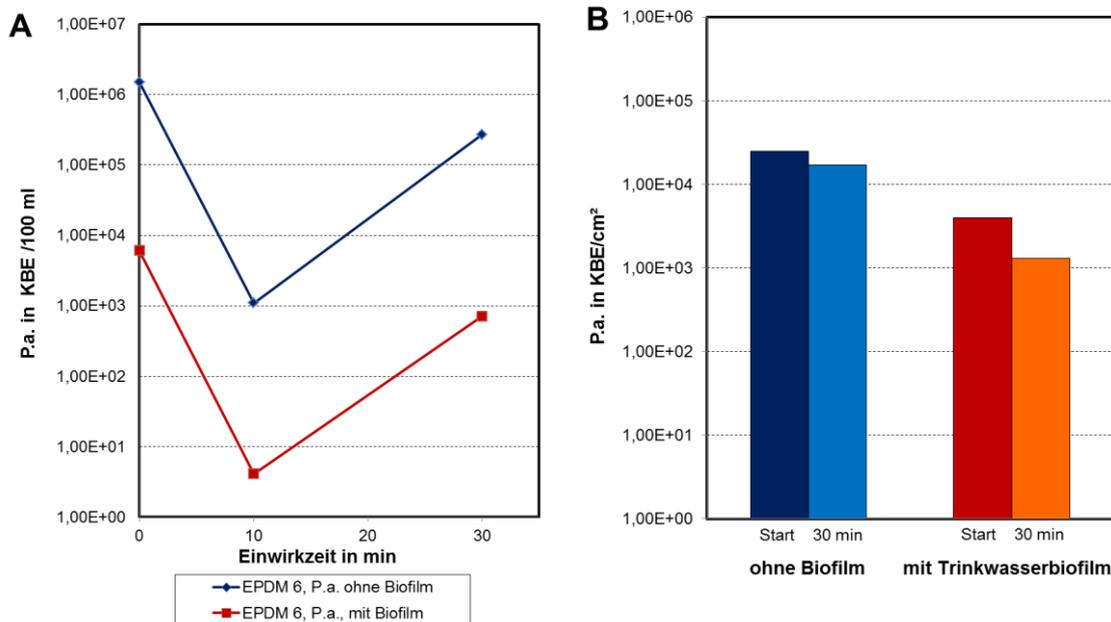


Abbildung 4-31: Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Wasserphase (A) und im Biofilm (B) auf EPDM 6-Trägern ohne (Reinkultur) und mit Trinkwasserbiofilm bei Desinfektion mit Chlor (Restgehalt: 0,3 mg/l nach 30 min)

Trinkwasserdesinfektion mit Chlor im Durchfluss

Der Effekt von 0,1 mg/l freiem Chlor auf *Pseudomonas aeruginosa* bei Trägern ohne und mit Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn wurde im Durchfluss über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Für die Träger aus ES, PE, PP und PVC ohne Trinkwasserbiofilm lag die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* bei Versuchsbeginn zwischen 10^2 und 10^4 KBE/cm². Wiederum wurden für die beiden EPDM-Materialien höhere Werte im Bereich von 10^5 KBE/cm² bestimmt. Unter dem Einfluss von Chlor kam es auf den Oberflächen bei ES, PE, PP und PVC zu einer schnellen Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa* (Abbildung 4-32). Bereits nach einer Expositionszeit von zwei Stunden ergab sich eine Reduktion um ca. 2 Log-Stufen (Abbildung 4-32). Für ES lag die Besiedlungsdichte zu diesem Zeitpunkt bereits unter der Nachweisgrenze. Im Vergleich dazu war für beide EPDM-Materialien keine wesentliche Veränderung der Besiedlungsdichte zu verzeichnen.

Für den Vergleich der Materialien wurde die Abnahme N/N_0 (N_0 : Besiedlungsdichte bei Versuchsbeginn, N : Besiedlungsdichte nach Expositionsdauer) für die Expositionsdauer von zwei und 14 Tagen berechnet (Abbildung 4-33). Bei den Materialien ES, PE und PP kam es bereits nach zwei Tagen zu einer vollständigen Beseitigung, was einer Reduktionsrate von mindestens 3 bzw. 4 Log-Stufen entsprach. Ebenso wurde *Pseudomonas aeruginosa* auch auf PVC um ca. 4 Log-Stufen vermindert, jedoch befand sich die Besiedlungsdichte noch über der Nachweisgrenze. Im Vergleich dazu war für die EPDM-Materialien kein wesentlicher Effekt feststellbar. Nach der Expositionsdauer von 14 Tagen wurde *Pseudomonas aeruginosa* auch auf PVC nicht mehr nachgewiesen, dementsprechend betrug die Reduktion mindestens 5 Log-Stufen. Für die beiden EPDM-Materialien ergab sich eine Abnahme von < 1 Log-Stufe. Somit wurde auf diesen Materialien die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* bei der vorliegenden Chlorkonzentration auf der Materialoberfläche nur geringfügig reduziert.

Da bei den Durchflussversuchen ohne Desinfektionsmittel keine Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* auf EPDM zu verzeichnen war (Abschnitt 4.2.3), ist die geringe Wirksamkeit des Chlors nicht auf eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit von *Pseudomonas aeruginosa* auf den EPDM-Materialien zurückzuführen, sondern vermutlich materialbedingt.

Für die Materialien mit einem Trinkwasserbiofilm ergaben sich nach der Animpfung mit *Pseudomonas aeruginosa* Besiedlungsdichten im Bereich von 10^3 KBE/cm². Unter dem Einfluss von 0,1 mg/l Chlor kam es bei allen Materialien bereits nach einer Expositionszeit

von zwei Stunden zu einer Reduzierung von *Pseudomonas aeruginosa*, die mit 2 bzw. 3 Log-Stufen für PE und PVC am deutlichsten ausfiel (Abbildung 4-34). Nach einer Expositionsdauer von zwei Tagen lag für PE und PVC eine vollständige Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* vor, d.h. die Reduktion betrug somit mindestens 4 Log-Stufen (Abbildung 4-35). Die gleiche Reduktion war auch für ES zu verzeichnen, jedoch wurde hier *Pseudomonas aeruginosa* noch mit geringer Besiedlungsdichte nachgewiesen. Für PP und die EDPM-Materialien war die Verringerung mit ca. 1 Log-Stufe deutlich geringer. Nach einer Versuchsdauer von 14 Tagen lag auch für ES und PP kein Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* mehr vor, woraus sich eine Reduktion um mindestens 4 Log-Stufen berechnet. Für die beiden EPDM-Materialien zeigte sich mit ca. 2 Log-Stufen eine deutlich geringere Abnahme. Beim Vergleich der Versuchsansätze mit und ohne Biofilm ergab sich für die EPDM-Materialien eine höhere Reduktion bei der Anwesenheit des Trinkwasserbiofilms, dementsprechend übte dieser gegenüber Chlor keine „Schutzfunktion“ für *Pseudomonas aeruginosa* aus.

Bei den Materialien mit dem Trinkwasserbiofilm wurde am Ende des Versuches auch der Effekt der Chlorung auf die HPC und GZZ überprüft. Für ES, PE, PP und PVC lag die Abnahme der HPC zwischen ca. 3 und 4 Log-Stufen, wobei keine vollständige Beseitigung gegeben war. Demgegenüber wurde dieser Parameter auf den EPDM-Materialien nur um eine 1 Log-Stufe reduziert. Für den Parameter GZZ war bei PE, PE, PP und PVC eine Abnahme um ca. 1,5 Log-Stufen zu verzeichnen, im Vergleich dazu lag auf EPDM keine relevante Veränderung vor. Die Ergebnisse zeigten somit, dass die Wirkung von 0,1 mg/l Chlor auf eine Oberflächenbesiedlung bei EPDM erheblich geringer ausfiel als bei den anderen Materialien und es in einem Zeitrahmen von 2 Wochen zu keiner vollständigen Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* kam.

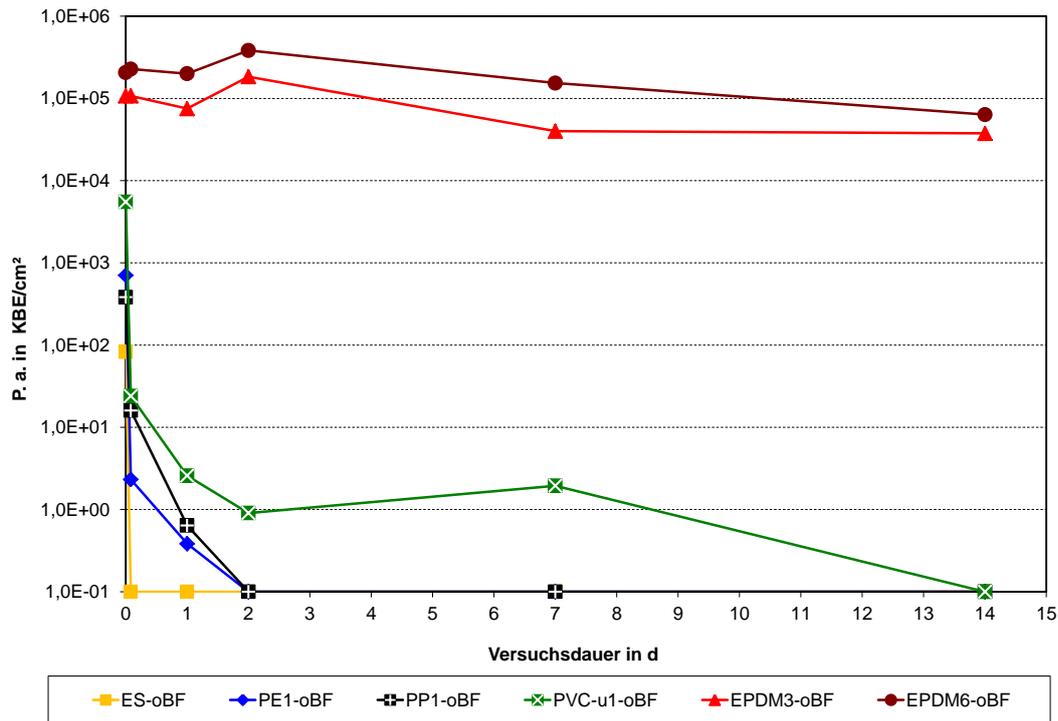


Abbildung 4-32: Effekt von 0,1 mg/l Chlor auf die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn

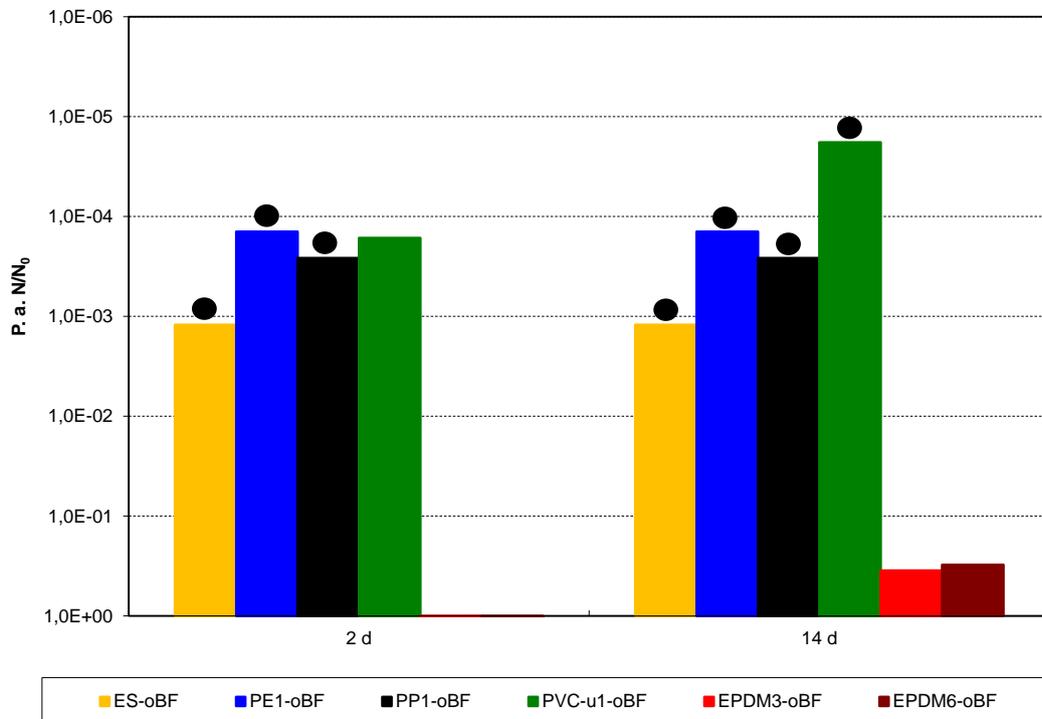


Abbildung 4-33: Abnahme N/N_0 für *Pseudomonas aeruginosa* bei 0,1 mg/l Chlor bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn nach einer Expositionszeit von zwei und 14 Tagen (Punkt-Markierung auf Balken: Kein Nachweis von P.a.)

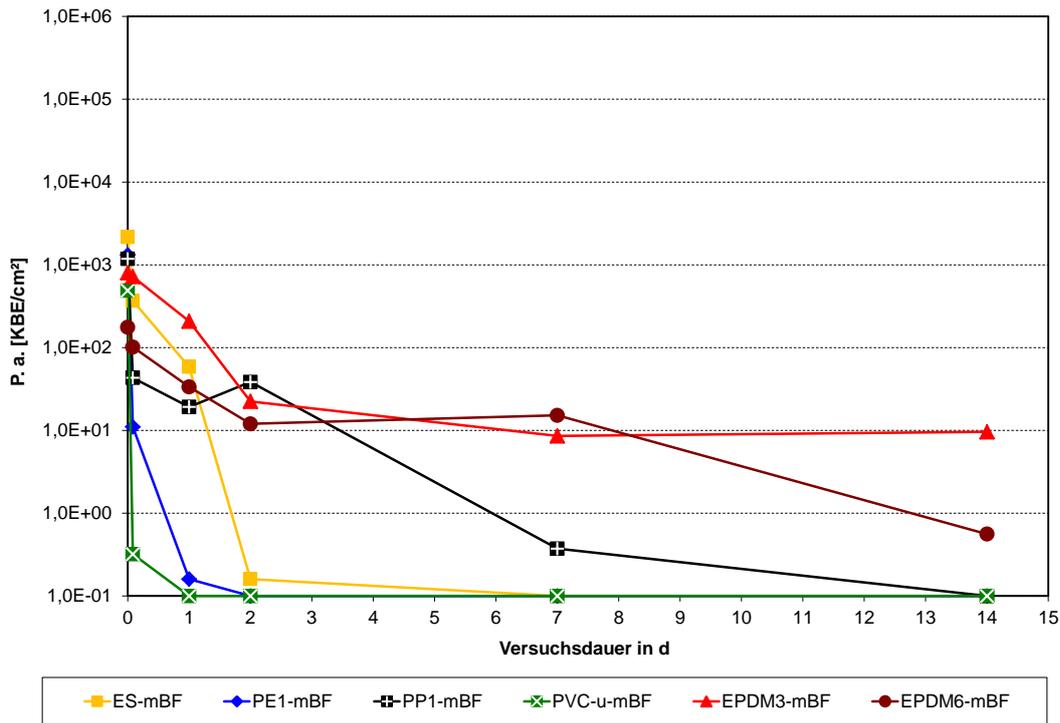


Abbildung 4-34: Effekt von 0,1 mg/l Chlor auf *Pseudomonas aeruginosa* bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn

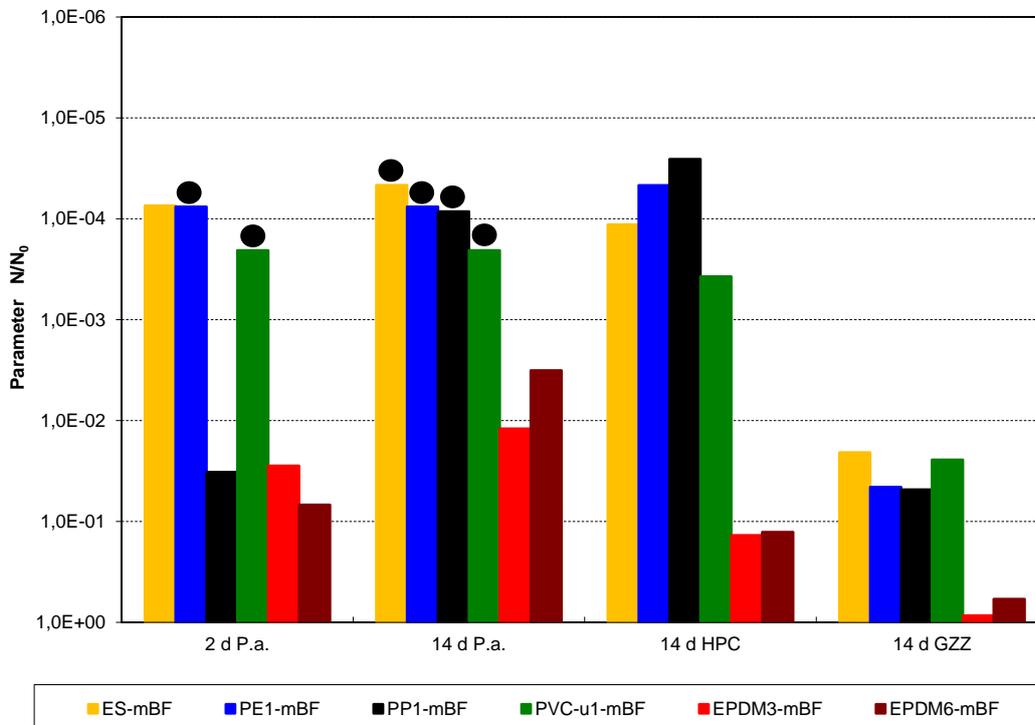


Abbildung 4-35: Abnahme N/N_0 für *Pseudomonas aeruginosa*, HPC und GZZ bei 0,1 mg/l Chlor bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn nach einer Expositionszeit von 2 und 14 Tagen (Punkt-Markierung auf Balken: Kein Nachweis von P.a.)

Trinkwasserdesinfektion mit Chlordioxid im Durchfluss

Neben Chlor wurde im Durchfluss auch die Wirkung von 0,05 mg/l Chlordioxid untersucht. Die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* nach der Animpfung auf Trägern ohne Trinkwasserbiofilm lag mit Werten von 10^2 bis 10^6 KBE/cm² in etwa im Bereich des Versuchsblocks mit Chordosierung. Wiederum ergaben sich die höchsten Besiedlungsdichten für die EPDM-Materialien. Unter dem Einfluss des Desinfektionsmittels kam es bei ES, PE, PP und PVC zu einer schnellen Verringerung von *Pseudomonas aeruginosa*. Bereits nach einer Expositionsdauer von zwei Stunden wurde die Besiedlung auf den genannten Materialien um 1 bis 2 Log-Stufen reduziert (Abbildung 4-36). Dagegen war bei den EDPM-Materialien keine Abnahme zu verzeichnen. Die Auswertung der Verringerung nach einer Expositionsdauer von zwei und 14 Tagen ergab für die Materialien ES, PE, PP und PVC nach 48 h eine Reduktion zwischen 2 und 4 Log-Stufen, wobei nur für ES und PP die Besiedlungsdichte unter der Nachweisgrenze lag (Abbildung 4-37). Für beide EDPM-Materialien war dagegen keine relevante Abnahme zu verzeichnen. Nach 14 Tagen wurde *Pseudomonas aeruginosa* bei ES, PE, PP und PVC nicht mehr nachgewiesen, wodurch sich eine Reduktion von mindestens 3 bis 5 Log-Stufen ergibt. Bei EPDM 3 lag die Abnahme bei ca. 0,5 Log-Stufen, dagegen kam es für EPDM 6 zu keiner relevanten Verringerung.

Für die Materialträger mit einem Trinkwasserbiofilm ergaben sich nach der Animpfung mit *Pseudomonas aeruginosa* Besiedlungsdichten im Bereich von 10^3 bis 10^4 KBE/cm². Wie bei den anderen Versuchsansätzen war für die EDPM-Materialien bei Anwesenheit des Biofilms eine geringere Ansiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* festzustellen als ohne autochthonen Bewuchs. Nach einer Inkubationsdauer von zwei Stunden fiel die Reduzierung von *Pseudomonas aeruginosa* mit < 1 Log-Stufe geringer aus als bei den Trägern ohne Biofilm (Abbildung 4-38). Nach einer Expositionsdauer von zwei Tagen ergab sich mit ca. 2 Log-Stufen für ES, PE, PP eine vergleichsweise geringere Reduktion (Abbildung 4-39). Nur für PVC lag die Abnahme mit 4 Log-Stufen auf einem höheren Niveau. Auffällig war, dass es bei keinem der genannten Materialien zur vollständigen Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* kam. Für die beiden EPDM-Materialien betrug die Verringerung ca. 1 Log-Stufe, somit fiel der Effekt des Desinfektionsmittels deutlicher aus als ohne Trinkwasserbiofilm. Nach 14 Tagen im Durchfluss lag die Elimination von *Pseudomonas aeruginosa* bei ES, PE, PP und PVC zwischen 3 und 4 Log-Stufen, jedoch war *Pseudomonas aeruginosa* noch auf allen Materialien nachweisbar. Für die beiden EPDM-Materialien ergab sich eine Verringerung um ca. 2 Log-Stufen, wodurch auch bei diesem Material keine Beseitigung gegeben war.

Bei dem Parameter HPC betrug die Abnahme für die Materialien ES, PE, PP und PVC nach 14 Tagen Exposition ca. 3 Log-Stufen, somit war gegenüber dem Versuchsblock mit Chlor die Reduktion um etwa 1 log-Stufe geringer. Deutlich niedriger fiel mit ca. 1 Log-Stufe die Abnahme der HPC auf EPDM aus. Für den Parameter GZZ war unabhängig vom Material kein Effekt des Chlordioxids zu verzeichnen.

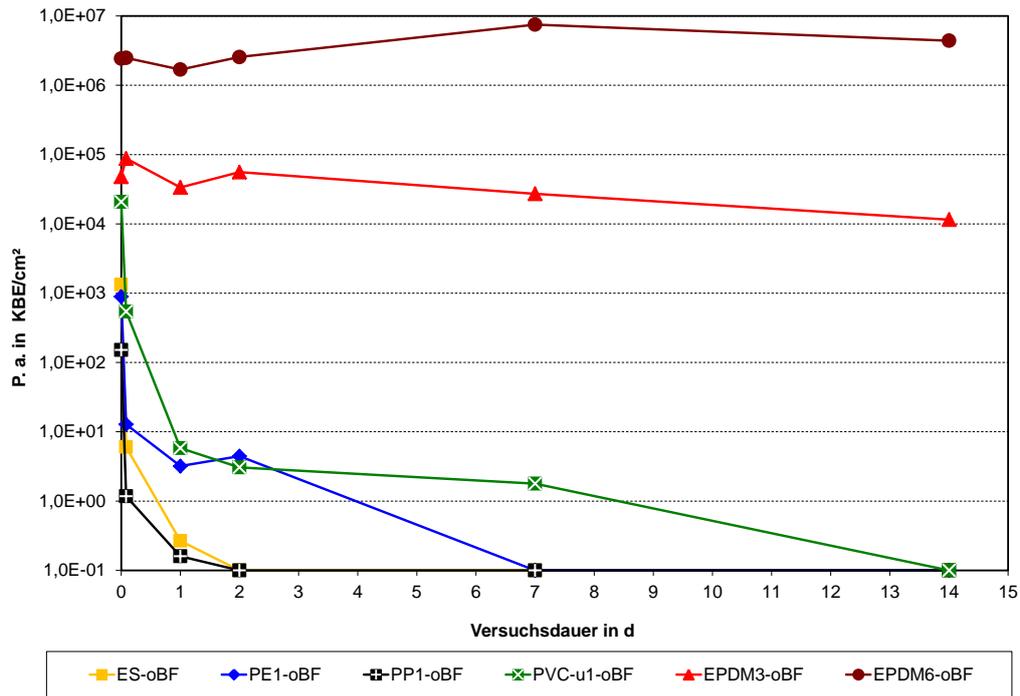


Abbildung 4-36: Effekt von 0,05 mg/l Chlordioxid im Durchfluss auf die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm bei Versuchsbeginn

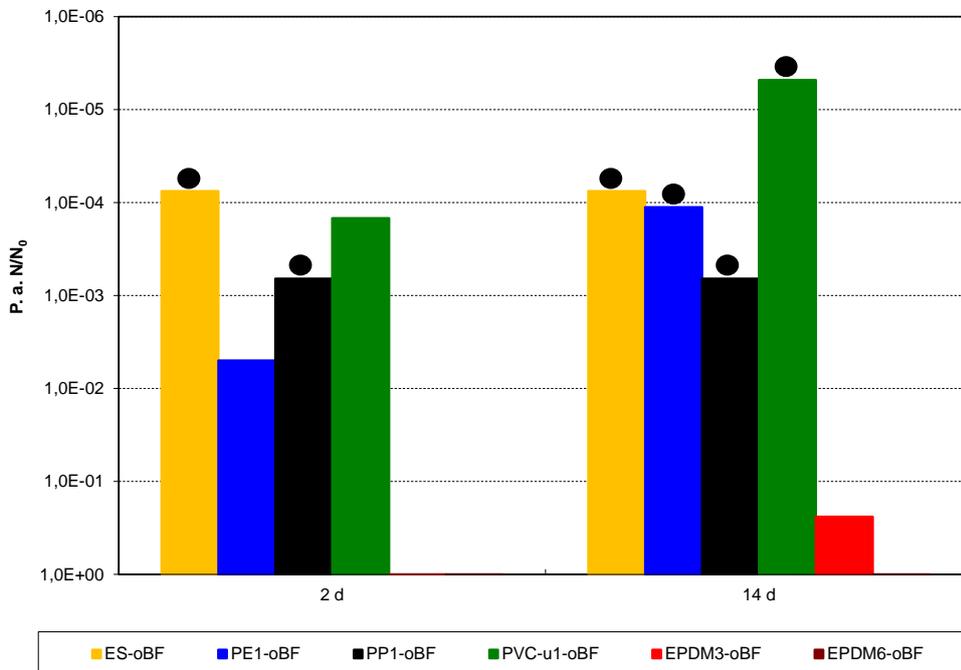


Abbildung 4-37: Abnahme N/N_0 für *Pseudomonas aeruginosa* bei 0,05 mg/l Chlordioxid im Durchfluss bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn nach einer Expositionszeit von 2 und 14 Tagen (Punkt-Markierung auf Balken: Kein Nachweis von P.a.)

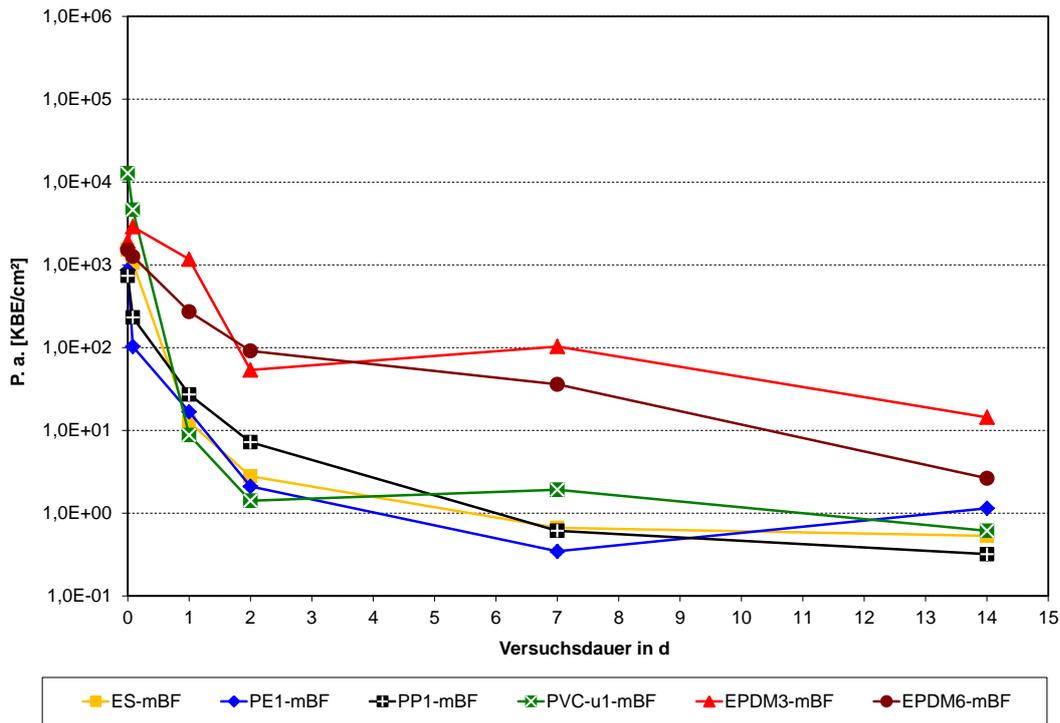


Abbildung 4-38: Effekt von 0,05 mg/l Chlordioxid im Durchfluss auf *Pseudomonas aeruginosa* bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm bei Versuchsbeginn

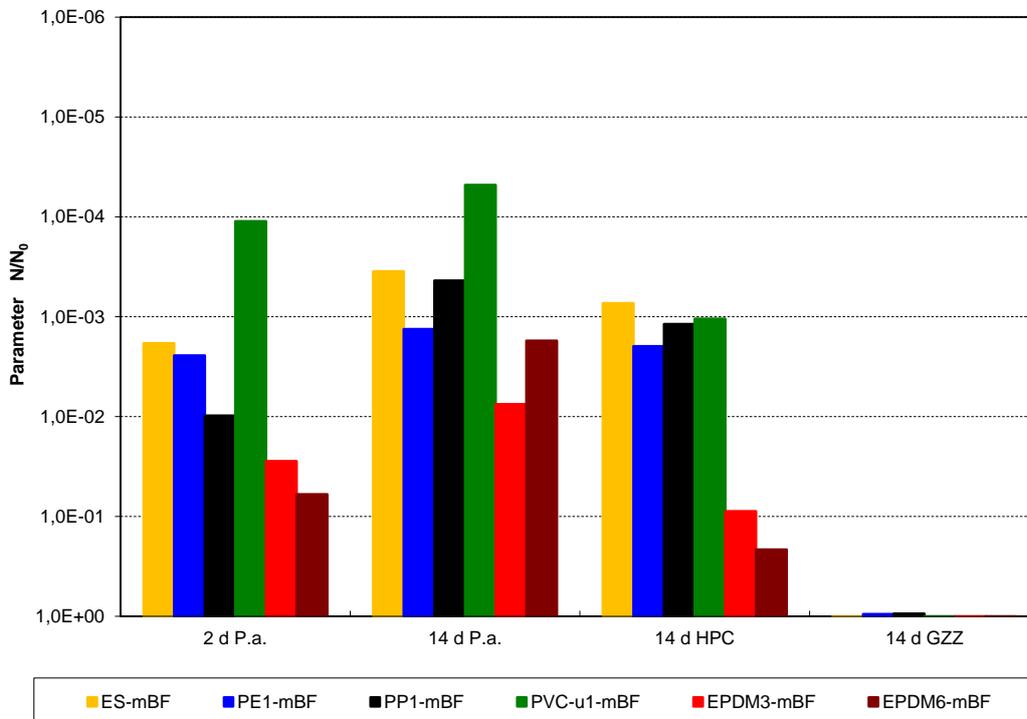


Abbildung 4-39: Abnahme N/N_0 für *Pseudomonas aeruginosa*, HPC und GZZ bei 0,05 mg/l Chlordioxid im Durchfluss bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm zu Versuchsbeginn nach einer Expositionszeit von 2 und 14 Tagen

4.3.3.2 Anlagendesinfektionen

Für den Versuchsblock Anlagendesinfektion wurden Untersuchungen mit Chlor, Chlordioxid und Wasserstoffperoxid durchgeführt. Die verwendeten Desinfektionsmittelkonzentrationen und Expositionszeiten entsprachen den Empfehlungen in den DVGW-Arbeitsblättern W 291 und W 557. Korrespondierend mit den anderen Versuchsblöcken wurden Materialien ohne und mit einem Trinkwasserbiofilm untersucht. Für die Träger ohne Biofilm lag die Startbesiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* bei ES, PE, PP und PVC in einem Bereich von 5×10^3 bis 5×10^4 KBE/cm². Für die EPDM-Materialien wurden mit Besiedlungsdichten von $> 10^6$ KBE/cm² wiederum deutliche höhere Werte bestimmt. Nach den Desinfektionsmaßnahmen war auf den Materialien ES, PE, PP und PVC unabhängig vom Desinfektionsmittel *Pseudomonas aeruginosa* nicht mehr nachweisbar (Abbildung 4-40). Im Gegensatz dazu wurde bei EDPM, mit Ausnahme der Kombination EPDM 3 und Wasserstoffperoxid, noch eine Besiedlung von 1 bis 100 KBE/cm² detektiert. Trotz der hohen Desinfektionsmittelkonzentration kam es somit bei den EPDM-Materialien zu keiner vollständigen Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa*.

Unter Berücksichtigung der Ausgangsbesiedlung betrug die Reduktion für *Pseudomonas aeruginosa* bei ES, PE, PP und PVC ≥ 5 log-Stufen (Abbildung 4-41). Im Vergleich dazu lag die Abnahme bei EDPM durch Chlor und Chlordioxid bei < 5 Log-Stufen. Für Wasserstoffperoxid betrug die Reduktion ≥ 6 Log-Stufen, wobei für EPDM 6 keine vollständige Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* erreicht wurde.

Bei den Trägern mit einem Biofilm ergaben sich nach der Animpfung für *Pseudomonas aeruginosa* Besiedlungsdichten in einem Bereich von 10^0 bis 10^4 KBE/cm². Auch bei diesem Untersuchungsblock war für EPDM die geringere Besiedlung durch die Anwesenheit des Trinkwasserbiofilms im Vergleich zu dem unbewachsenen Material zu verzeichnen. Nach der Desinfektionsmaßnahme war *Pseudomonas aeruginosa* auf den Trägern aus ES, PE, PP und PVC nicht mehr nachweisbar (Abbildung 4-42). Für EPDM 3 wurde beim Einsatz von Chlor und Wasserstoffperoxid *Pseudomonas aeruginosa* nicht mehr detektiert, allerdings wurde für Chlordioxid noch eine geringe Besiedlungsdichte detektiert. Für EDPM 6 lag *Pseudomonas aeruginosa* in geringer Besiedlungsdichte noch nach der Desinfektion mit Chlordioxid und Wasserstoffperoxid vor. Dagegen ergab sich für Chlor kein Befund.

Für die Träger mit Trinkwasserbiofilm wurde die Reduktion für *Pseudomonas aeruginosa* sowie zudem für die HPC und GZZ bestimmt. Entsprechend der vorliegenden

Besiedlungsdichten lag die Reduktion für *Pseudomonas aeruginosa* in einem Bereich von 1 bis 5 Log-Stufen, wobei sich für die Kombination Chlordioxid und EDPM eine Reduktion um 2 Log-Stufen ergab und *Pseudomonas aeruginosa* noch nachgewiesen wurde (Abbildung 4-41). Für die Kombination EDPM 6 und Wasserstoffperoxid betrug die Reduktion 3 Log-Stufen, wobei auch hier *Pseudomonas aeruginosa* nicht vollständig beseitigt wurde.

Für die HPC lag die Abnahme bei Chlor in einem Bereich von 5×10^3 bis 10^6 KBE/cm², die höchsten Werte waren für die EPDM-Materialien zu verzeichnen. Chlordioxid führte zu einer Verringerung der HPC um überwiegend 4 Log-Stufen, wobei für EPDM 6 mit 1 Log-Stufe der geringste Wert vorlag. Wasserstoffperoxid führte zu einer Abnahme der HPC um ca. 3 Log-Stufen, wiederum ergab sich für das EDPM 6 mit 2 Log-Stufen die geringste Reduktion. Bei allen Ansätzen waren nach der Desinfektionsmaßnahme noch HPC auf den Oberflächen vorhanden. Der Parameter GZZ wurde bei Chlor für alle Materialien um 1 bis 2 Log-Stufen vermindert. Dementsprechend kam es zu einer Zerstörung der Zellen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Materialien war nicht zu verzeichnen. Für Chlordioxid und Wasserstoffperoxid ergab sich eine geringere Reduktion von < 1 Log-Stufe, d.h. bei diesen Desinfektionsvarianten kam es im Vergleich zu Chlor zu einem geringeren Aufschluss von Bakterienzellen.

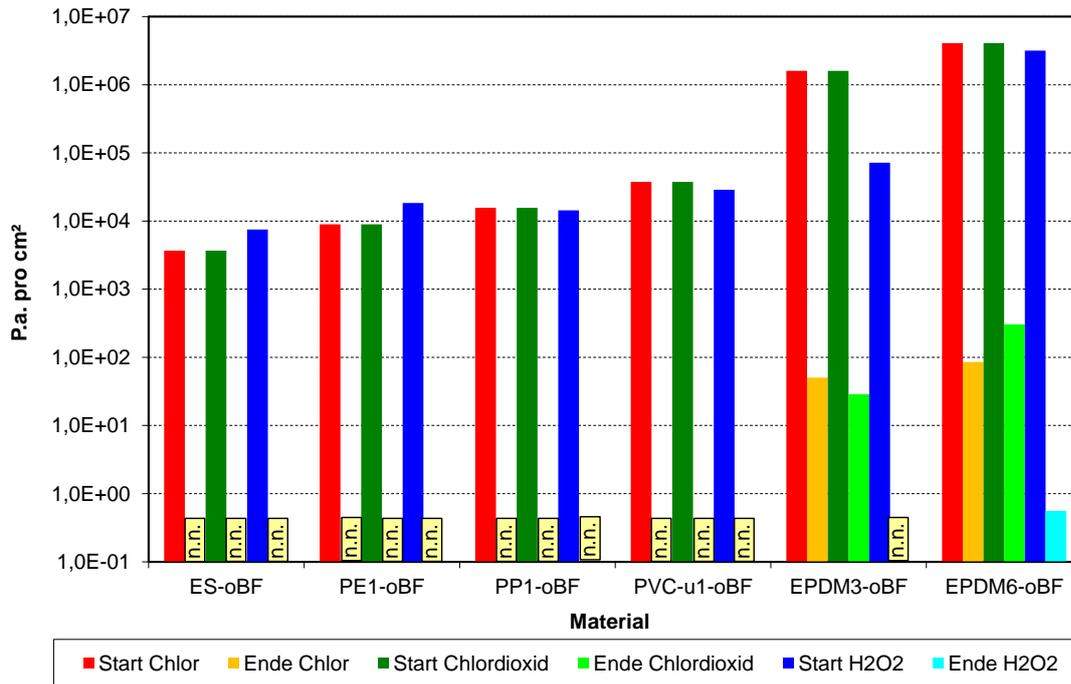


Abbildung 4-40: Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* vor und nach der Anlagendesinfektion bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm

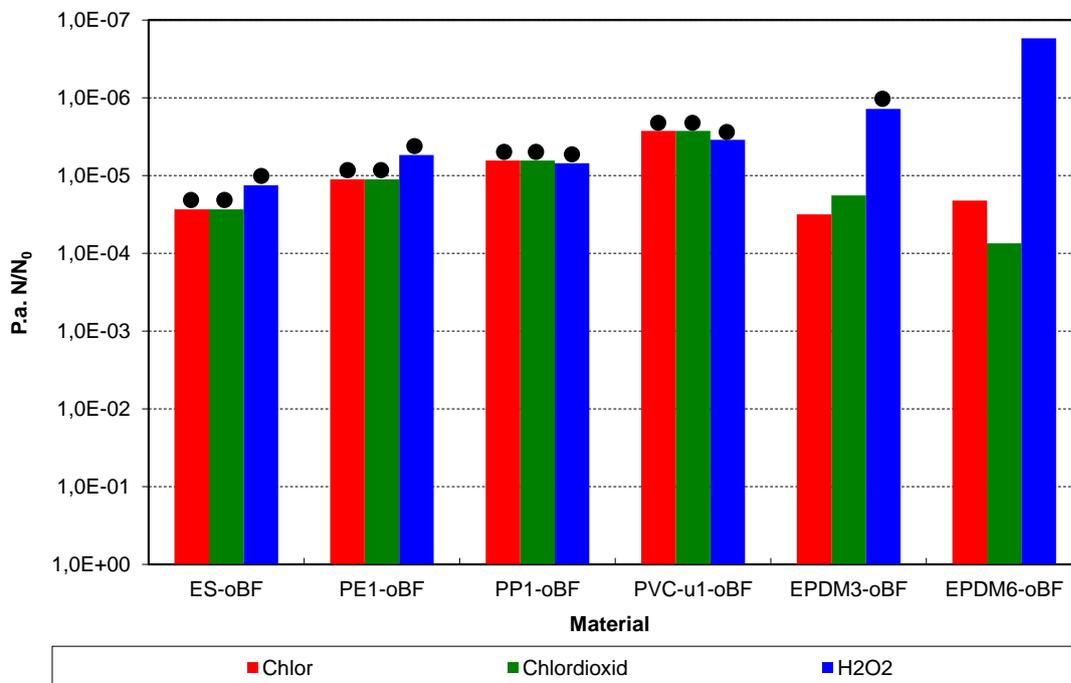


Abbildung 4-41: Abnahme N/N_0 für *Pseudomonas aeruginosa* durch die Anlagendesinfektion bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm (Punkt-Markierung auf Balken: Kein Nachweis von P.a.)

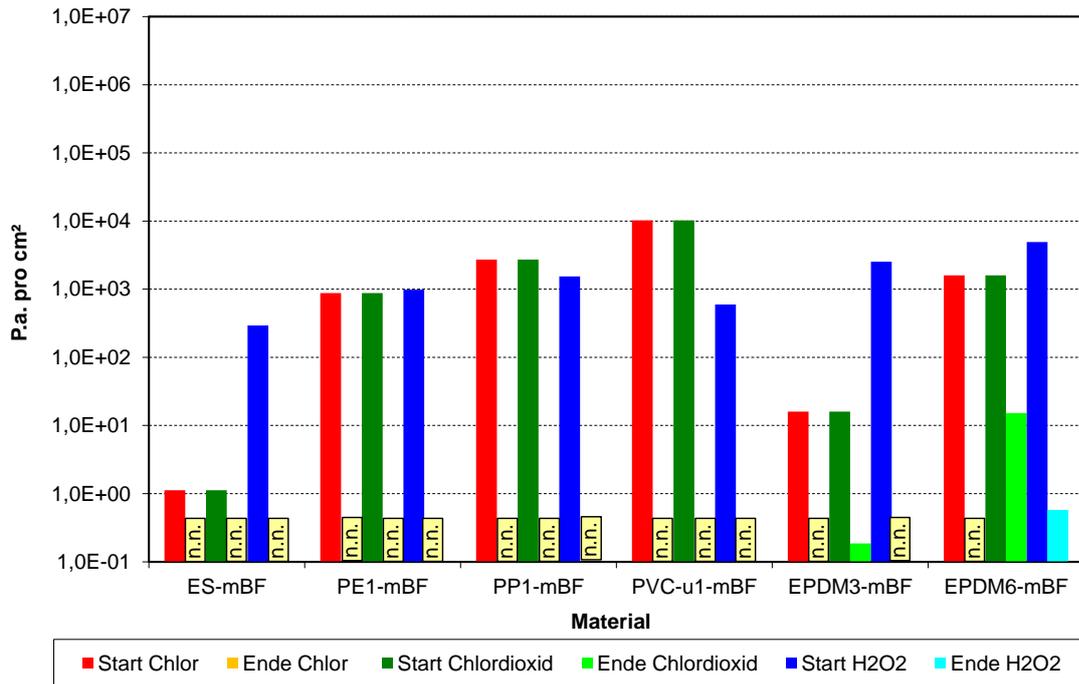


Abbildung 4-42: Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* vor und nach der Anlagendesinfektion bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm

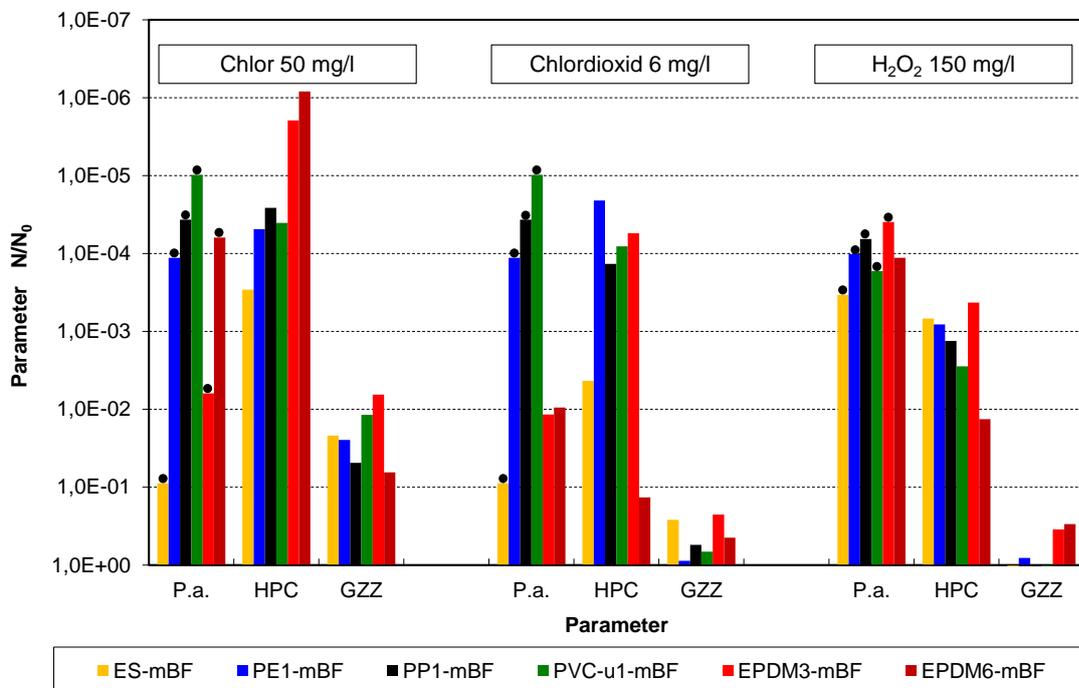


Abbildung 4-43: Abnahme N/N_0 für *Pseudomonas aeruginosa*, HPC und GZZ bei der Anlagendesinfektion bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm (Punkt-Markierung auf Balken: Kein Nachweis von P.a.)

4.3.3.3 Sprühdesinfektionsverfahren

Als weitere Variante der Desinfektion wurden drei kommerzielle Sprühdesinfektionsmittel untersucht, wobei auch bei diesem Versuchsblock Träger unterschiedlicher Materialien ohne und mit einem Trinkwasserbiofilm vor der Animpfung mit *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt wurden. Die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* bewegte sich in einem Bereich von ca. 10^4 bis ca. 5×10^5 KBE/cm². Bei den entsprechend der Herstellerinformationen durchgeführten Desinfektionsversuchen wurde bei den 18 Versuchsansätzen, die sich aus der Kombination der Materialien und den Sprühdesinfektionsmitteln ergaben, auf einem Drittel der Platten *Pseudomonas aeruginosa* noch in geringer Konzentration nachgewiesen (Abbildung 4-44). Ein eindeutiger Trend aus der Kombination Material und Sprühdesinfektionsmittel hinsichtlich des Nachweises ergab sich nicht. Die Reduktion der Besiedlungsdichten befand sich in einem Bereich von 3 bis nahezu 7 Log-Stufen (Abbildung 4-45)

Für die Träger mit einem Trinkwasserbiofilm lag nach der Animpfung die Besiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* in etwa bei 10^3 bis 10^4 KBE/cm² und somit um eine Log-Stufe niedriger als bei den Materialien ohne Trinkwasserbiofilm. Nach der Desinfektion mit den drei verschiedenen Produkten war nur bei der Kombination PVC mit Sprühdesinfektionsmittel 1 noch ein Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* mit geringer Besiedlungsdichte zu verzeichnen (Abbildung 4-46). Die Reduktion lag in einem Bereich von 10^4 bis 5×10^5 KBE/cm² (Abbildung 4-47). Aufgrund der höchsten Besiedlungsdichte ergab sich die höchste Abnahme für EPDM 3. Auch bei diesem Versuchsblock wurde der Effekt der Desinfektion auf die Parameter HPC und GZZ untersucht. Bei den HPC betrug die Abnahme für das Sprühdesinfektionsmittel 1 ca. 3 bis 4 Log-Stufen, wobei kein Zusammenhang zwischen Reduktion und Materialien erkennbar war. Bei dem Sprühdesinfektionsmittel 2 bzw. 3 wurden die HPC in etwa um 2 und 3 Log-Stufen reduziert, wobei sich auch bei diesen Mitteln kein Materialeinfluss ergab. Auf allen Materialien waren nach der Desinfektion noch HPC nachweisbar. Für den Parameter GZZ lag die Abnahme bei allen Kombinationen aus Material und Sprühdesinfektionsmittel bei $\ll 1$ Log-Stufe. Somit werden durch die Sprühdesinfektionsmittel nahezu keine Bakterienzellen aufgeschlossen.

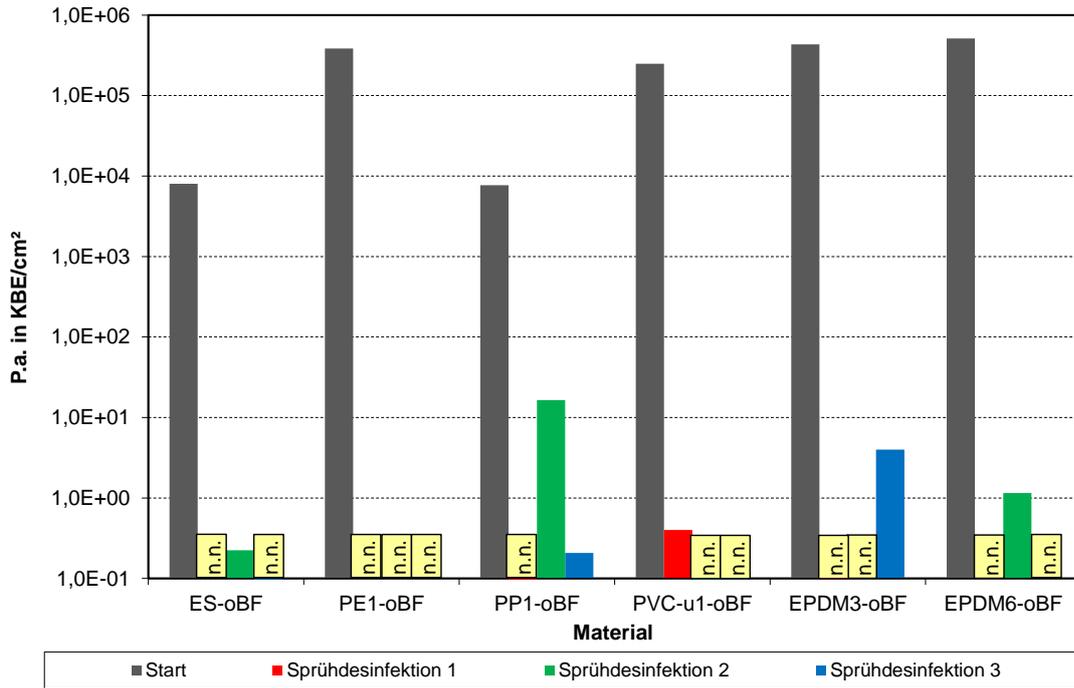


Abbildung 4-44: Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* vor und nach der Sprühdeseinfektion bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm

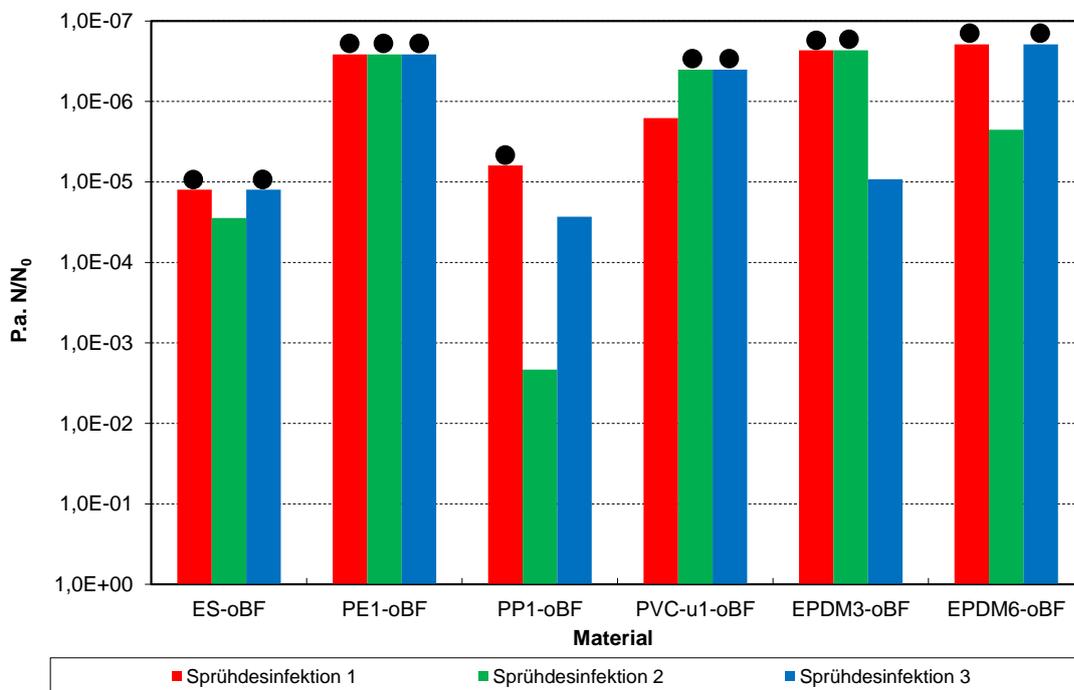


Abbildung 4-45: Abnahme N/N_0 für *Pseudomonas aeruginosa* durch die Sprühdeseinfektion bei Trägern ohne Trinkwasserbiofilm bei Versuchsbeginn (Punkt-Markierung auf Balken: Kein Nachweis von P.a.)

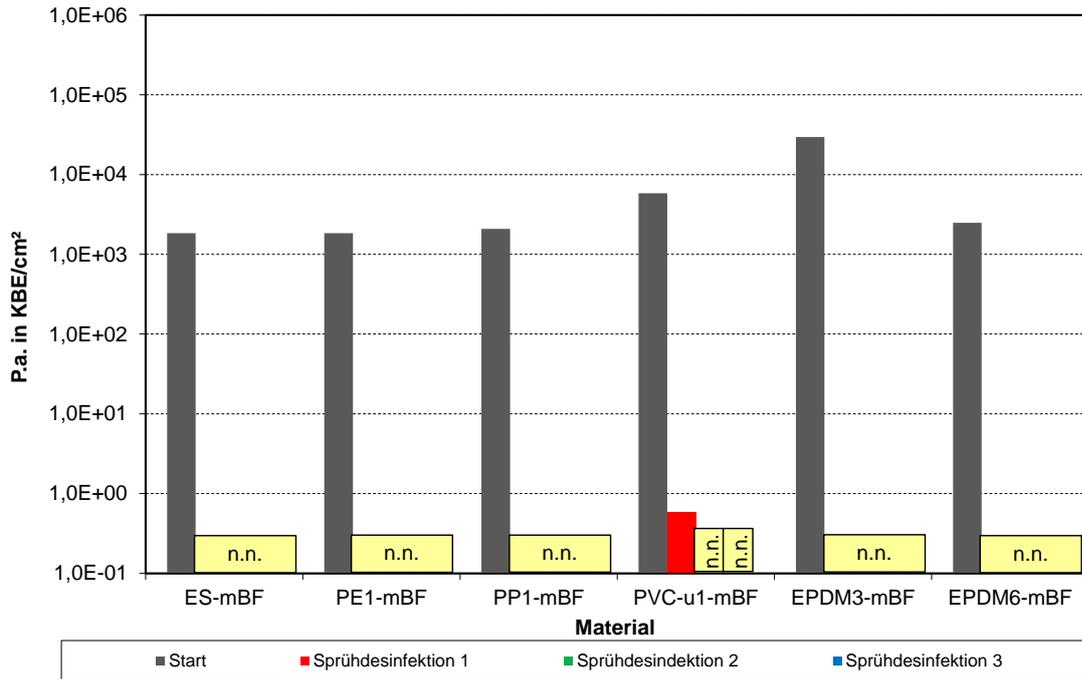


Abbildung 4-46: Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* vor und nach der Sprühdesinfektion bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm

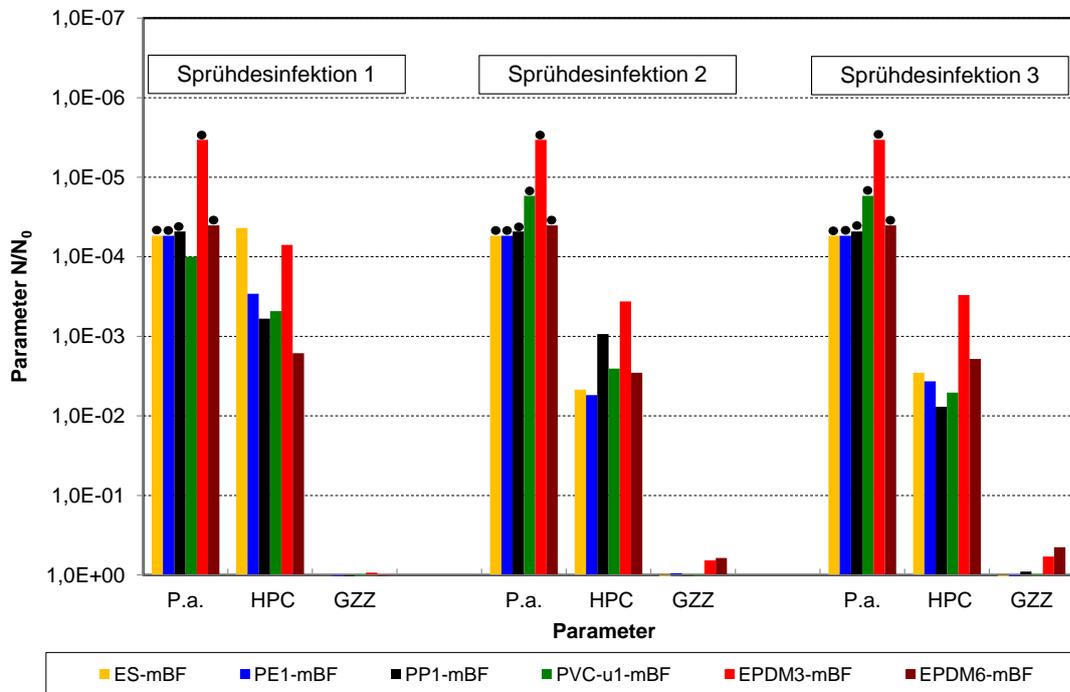


Abbildung 4-47: Abnahme N/N_0 für *Pseudomonas aeruginosa*, HPC und GZZ bei der Sprühdesinfektion bei Trägern mit Trinkwasserbiofilm bei Versuchsbeginn (Punkt-Markierung auf Balken: Kein Nachweis von P.a.)

4.3.4 Spülungen

Neben den Desinfektionsvarianten wurde der Effekt von Wasserspülungen und Luft/Wasser-Spülungen auf den Austrag von *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Hierfür wurden Rohre bzw. Schläuche aus den Materialien PE, PP, PVC und EPDM verwendet, die zur Unterscheidung von den Materialien der Träger mit PE 2, PP 2, PVC-u 2 und EPDM 7 bezeichnet wurden. Die Untersuchung zum Austrag von *Pseudomonas aeruginosa* wurde ohne und mit einem Trinkwasserbiofilm vor der Animpfung mit *Pseudomonas aeruginosa* umgesetzt. Bei den Wasserspülungen wurden Spülgeschwindigkeiten von 1 und 3 m/s verwendet und mit 14 bis 138 Leitungsvolumina gespült.

Die Besiedlungsdichten nach der Animpfung waren zu Versuchsbeginn bei den Materialien mit ca. 10^2 bis 10^6 KBE/cm² unterschiedlich, wobei sich ohne Trinkwasserbiofilm die höchsten Werte für PVC und die niedrigste Besiedlung für PP ergab. Bei den Materialien mit einem Trinkwasserbiofilm trat mit 10^4 KBE/cm² die höchste Besiedlungsdichte für *Pseudomonas aeruginosa* bei EPDM und mit 10 KBE/cm² das niedrigste Niveau bei PE auf.

Bei der Wasserspülung mit einer Spülgeschwindigkeit von 1 m/s lag ohne und mit Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms die Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa* überwiegend bei < 1 Log-Stufe (Abbildung 4-48). Die deutlichste Verringerung mit ca. 1 Log-Stufe trat bei PP ohne Trinkwasserbiofilm auf. Ein nahezu identisches Bild ergab sich auch für die Spülgeschwindigkeit von 3 m/s. Die Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* verringerte sich überwiegend um < 1 Log-Stufe. Die deutlichste Abnahme um ca. 2 Log-Stufen war für PE ohne Trinkwasserbiofilm zu verzeichnen. Somit kam es bei keiner Kombination aus Material, Spülgeschwindigkeit und gespültem Leitungsvolumen zu einem vollständigen Austrag von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Verringerung lag überwiegend in einem Bereich < 1 Log-Stufe.

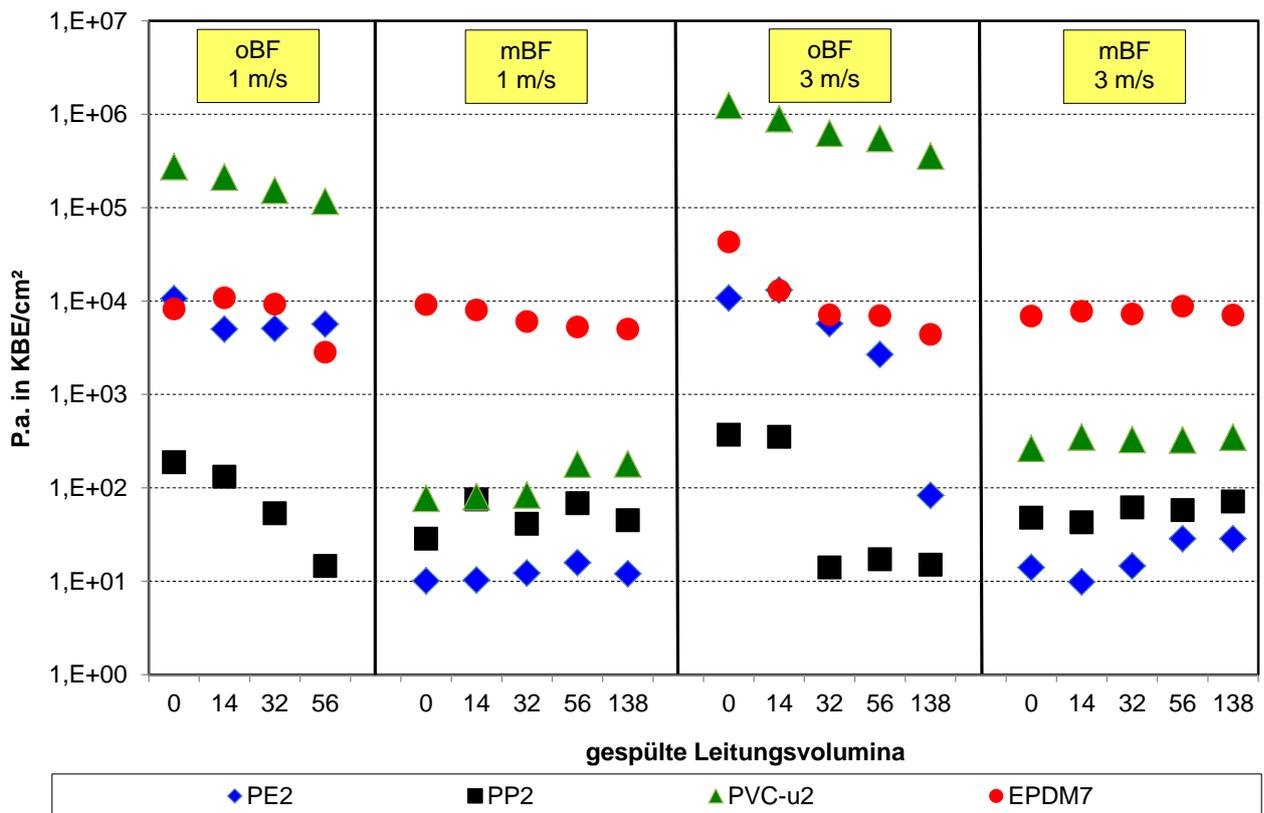


Abbildung 4-48: Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* nach Spülungen mit 1 und 3 m/s bei unterschiedlichen Spülvolumina sowie mit und ohne Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms

Die Besiedlungsdichten mit *Pseudomonas aeruginosa* vor den Luft/Wasser-Spülungen entsprachen in etwa denen der Versuche mit den Wasserspülungen. Die Abnahme bei diesem Spülverfahren lag sowohl nach 10 als auch nach 40 Luftimpulsen überwiegend bei < 1 Log-Stufe (Abbildung 4-49). Nur bei EPDM 7 mit Biofilm sowie PE ohne Biofilm ergab sich eine Abnahme, die geringfügig über 1 Log-Stufe lag. Bei keiner Kombination aus Material, Anwesenheit eines Biofilms und Anzahl der Luftimpulse wurde ein vollständiger Austrag von *Pseudomonas aeruginosa* erreicht.

Aus den Ergebnissen ist abzuleiten, dass weder die Wasserspülung noch eine Luft/Wasser-Spülung geeignet war, eine Besiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* kurzfristig zu beseitigen. Dies galt unabhängig vom Material.

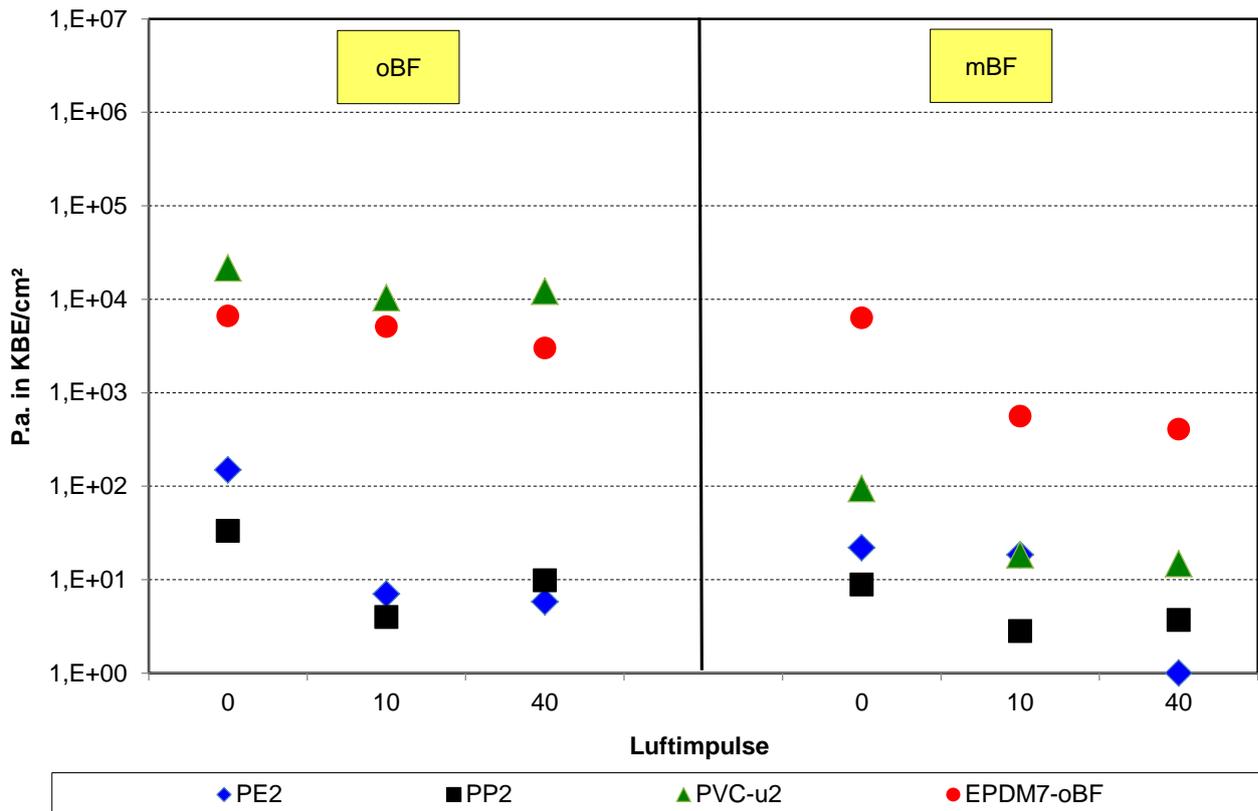


Abbildung 4-49: Besiedlungsdichte von *Pseudomonas aeruginosa* nach Luft/Wasserspülungen mit 10 und 40 Luftimpulsen, mit und ohne Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms

4.3.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Die FISH-Untersuchungen wurden u.a. mit Proben aus den Versuchen mit kontinuierlicher Desinfektion (Tabelle 4-11) sowie nach der Anlagendesinfektion (Tabelle 4-12) durchgeführt. Für die Versuchsreihe mit kontinuierlicher Desinfektion zeigte sich bis auf wenige Ausnahmen eine Übereinstimmung der beiden Untersuchungsverfahren. Nur bei drei Proben aus der Versuchsreihe mit 0,1 mg/l Chlor wurde mittels FISH *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Besiedlungsdichte von 10^2 bis 10^3 Zellen/cm² nachgewiesen. Hierbei ist zu beachten, dass bei der mikroskopischen Auszählung nur Einzelbefunde vorlagen. Die relativ hohe Besiedlungsdichte resultiert rechnerisch aus dem sehr geringen Probenvolumen.

Bei der Versuchsreihe mit Anlagendesinfektion war ebenfalls eine gute Übereinstimmung der kulturellen Ergebnisse mit den FISH-Untersuchungen zu verzeichnen. Bei den 31 mit FISH untersuchten Biofilmpuben war gegenüber dem kulturellen Verfahren nur in einem

Fall ein Nachweis zu verzeichnen, bei dem *Pseudomonas aeruginosa* kulturell nicht detektiert wurde. Insgesamt ist somit festzustellen, dass für *Pseudomonas aeruginosa* mittels FISH kein erhöhter Nachweis vorlag. Wie bereits zuvor erwähnt, liegt die Nachweisgrenze für die FISH-Untersuchungen im Bereich von 100 bis 1000 Zellen/cm² und damit höher als beim kulturellen Nachweis.

Tabelle 4-11: Ergebnisse P.a.-FISH - kontinuierliche Desinfektion mit 0,1 mg/l Cl₂ und 0,04 mg/l ClO₂ ohne und mit TW-Biofilm (ClO₂ mit TW-Biofilm keine Proben, da P.a. auf allen Materialien noch kulturell nachweisbar)

Desinfektionsmittel/Konz.	ohne/ mit BF	Material/Zeit	P.a./cm ² (kulturell)	P.a./cm ² FISH (STABW)
0,1 mg/l Cl ₂	ohne	ES 1d	n.n.	n.n.
		PE 7d	n.n.	3,07E+02 (8,39E+02)
		PE 14d	n.n.	n.n.
		PP 7d	n.n.	1,11E+03 (2,03E+03)
		PVC 14d	n.n.	6,55E+02 (1,73E+03)
		EPDM 3 14d	3,76E+04	1,47E+04 (1,17E+04)
	mit	ES 7d	n.n.	n.n.
		PE 2d	n.n.	n.n.
		PVC 2d	n.n.	n.n.
0,05 mg/l ClO ₂	ohne	ES 7d	n.n.	n.n.
		PE 7d	n.n.	n.n.
		PP 7d	n.n.	n.n.

Tabelle 4-12: Ergebnisse P.a.- FISH- Anlagendesinfektion mit 50 mg/l Cl₂ und 6 mg/l ClO₂ sowie 150 mg/l H₂O₂ mit/ ohne TW-Biofilm

Desinfektionsmittel/Konz.	Biofilm	Material/Zeit	P.a./cm ² (kulturell)	P.a./cm ² FISH (STABW)
50 mg/l Cl ₂	ohne	ES	n.n.	n.n.
		PE	n.n.	n.n.
		PP	n.n.	n.n.
		PVC	n.n.	n.n.
		EPDM 3	5,04E+01	n.n.
		EPDM 6	8,56E+01	n.n.
	mit	ES	n.n.	n.n.
		PE	n.n.	n.n.
		PP	n.n.	n.n.
		PVC	n.n.	n.n.
		EPDM 3	n.n.	n.n.
		EPDM 6	n.n.	n.n.
6 mg/l ClO ₂	ohne	ES	n.n.	n.n.
		PE	n.n.	n.n.
		PP	n.n.	n.n.
		PVC	n.n.	n.n.
		EPDM 3	2,88E+01	n.n.
		EPDM 6	3,04E+01	1,57E+04 (1,52E+04)
	mit	ES	n.n.	n.n.
		PE	n.n.	n.n.
		PP	n.n.	n.n.
		PVC	n.n.	n.n.
		EPDM 3	1,86E-01	n.n.
		EPDM 6	1,52E+01	3,58E+03 (4,70E+03)
150 mg/l H ₂ O ₂	ohne	ES	n.n.	n.n.
		PE	n.n.	n.b.
		PP	n.n.	n.b.
		PVC	n.n.	n.b.
		EPDM 3	n.n.	n.n.
	mit	ES	n.n.	n.n.
		PE	n.n.	n.n.
		PP	n.n.	n.n.
		PVC	n.n.	3,51E+02 (8,92E+02)
		EPDM 3	n.n.	n.n.

4.3.6 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Effektivität von Desinfektions- und Reinigungsmaßnahmen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Beide *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme wurden im **Wasserkörper** durch Chlor und Chlordioxid bei den Minimalkonzentrationen nach TrinkwV um > 4 Log-Stufen abgetötet. Dementsprechend wies *Pseudomonas aeruginosa* eine hohe Sensitivität gegenüber beiden Desinfektionsmitteln auf.
- *Pseudomonas aeruginosa* wurde ebenso auch durch Chloramine abgetötet, wobei im Vergleich zu Chlor oder Chlordioxid eine längere Expositionszeit erforderlich war.
- Im Batchansatz kam es auf den meisten **Materialien** sowohl in Reinkultur als auch mit einer Mischbiozönose (Trinkwasserbiofilm) bei Desinfektionsmittelkonzentrationen gemäß TrinkwV zu einer Reduktion um ca. 4 Log-Stufen. Eine Ausnahme stellten Dichtungsmaterialien und Weich-PVC dar, bei denen nur eine Reduktion um maximal 1 Log-Stufe erreicht wurde.
- Im Durchfluss führte eine Desinfektion nach TrinkwV mit einer Desinfektionsmittelkonzentration von 0,1 mg/l Chlor, mit Ausnahme von EPDM, bei allen Materialien sowohl mit als auch ohne Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms nach wenigen Tagen zu einer vollständigen Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* von den Oberflächen. Bei EPDM ohne Trinkwasserbiofilm war dagegen selbst nach einer Expositionsdauer von zwei Wochen die Reduktion mit < 1 Log-Stufe gering. Somit ergab sich bei EPDM nur eine sehr geringe Wirksamkeit von Chlor. Diese geringe Wirkung des Chlors bei EPDM war auch für die Parameter HPC und GZZ festzustellen.
- Die Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms hatte bei 0,1 mg/l Chlor, mit Ausnahme von EPDM, auf das Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* keinen wesentlichen Einfluss. Bei EPDM führte der Trinkwasserbiofilm zu einer höheren Reduktion als beim unbesiedelten Material, jedoch kam es im Untersuchungszeitraum zu keiner vollständigen Beseitigung von den Oberflächen. Somit fiel die Wirkung von 0,1 mg/l Chlor bei EPDM deutlich geringer aus als bei anderen Materialien.
- Bei Chlordioxid mit einer Restkonzentration von 0,05 mg/l kam es ohne Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms, mit Ausnahme von EPDM, nach 14 Tagen Expositionsdauer

zu einer vollständigen Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* von den Oberflächen. Der Effekt des Desinfektionsmittels war für EPDM dagegen sehr gering.

- Bei Anwesenheit eines Trinkwasserbiofilms wurde *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Desinfektionsmittelrestkonzentration von 0,05 mg/l Chlordioxid im Zeitraum von 14 Tagen von keinem Material vollständig beseitigt. Am geringsten fiel die Reduktion für die EPDM- Materialien aus. Die Parameter HPC und GZZ zeigten eine geringere Reduktion als bei einer Desinfektionsmittelrestkonzentration von 0,1 mg/l Chlor. Aus den Versuchen kann somit abgeleitet werden, dass 0,1 mg/l Chlor auf eine mikrobiologische Besiedlung eine höhere Desinfektionswirkung aufweist als 0,05 mg/l Chlordioxid.
- Bei einer Desinfektion entsprechend der Vorgabe für eine Anlagendesinfektion kam es ohne und mit einem Trinkwasserbiofilm mit den Desinfektionsmitteln Chlor, Chlordioxid und Wasserstoffperoxid bis auf die EPDM-Materialien zu einer vollständigen Beseitigung der Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*. Bei den EDPM-Materialien wurde unter Berücksichtigung aller Versuchsansätze in weniger als 50 % der Untersuchungen eine vollständige Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa* von den Oberflächen erreicht. Ein Einfluss des verwendeten Desinfektionsmittels war nicht zu verzeichnen.
- Für die Parameter HPC und GZZ ergab sich im Durchschnitt für Chlor die höchste Reduktion. Chlordioxid und Wasserstoffperoxid zeigten eine untereinander vergleichbare, etwas geringere Wirksamkeit.
- Bei den Sprühdesinfektionsmitteln war bei den Trägern ohne Trinkwasserbiofilm in 30 % der Ansätze vereinzelt noch *Pseudomonas aeruginosa* auf den Oberflächen nachweisbar, wobei sich kein Zusammenhang zwischen Material und Desinfektionsmittel ergab. Dagegen wurde bis auf einen Ansatz bei Anwesenheit des Trinkwasserbiofilms *Pseudomonas aeruginosa* nach der Behandlung nicht mehr nachgewiesen. Die Besiedlungsdichte mit *Pseudomonas aeruginosa* war in diesem Fall etwas geringer als ohne Trinkwasserbiofilm.
- Bei der Untersuchung zum Austrag von *Pseudomonas aeruginosa* bei Schlauch- bzw. Rohrmaterialien durch Wasser- bzw. Luft/Wasser-Spülung war bei keiner Kombination aus Material und Spülverfahren ein vollständiger Austrag von *Pseudomonas*

aeruginosa zu verzeichnen. Bei der überwiegenden Anzahl der Versuche lag die Verringerung im Bereich von 1 Log-Stufe.

5 Prüfung der Kriterien der Materialprüfung in Bezug auf *Pseudomonas aeruginosa*

Im Rahmen der Untersuchungen zur Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* mit verschiedenen Materialien (Kap. 3.2) und der Effektivität von Desinfektionsverfahren bei Materialien (Kap. 3.3.3) wurden vor allem solche Materialien eingesetzt, die nach dem DVGW-Arbeitsblatt W 270 als Materialien mit einer generellen Eignung für den Trinkwasserbereich eingestuft werden (ES, PE, PP, PVC-u). Daneben wurden Dichtungsmaterialien, v.a. EPDM, untersucht, deren Einsatz nur eingeschränkt für groß- oder kleinflächige Dichtungen zulässig ist oder solche, die überhaupt nicht zugelassen sind. Als solches Material wurde auch eine Teich-Folie aus Weich-PVC untersucht.

Mittlerweile existiert auch eine größere Anzahl EPDM, die auch zum generellen Einsatz nach W 270 zugelassen sind. Diese waren allerdings zu Beginn des Forschungsvorhabens noch nicht bei der Prüfstelle des TZW mit Rezeptur und in ausreichenden Mengen verfügbar und konnten daher nicht in das Untersuchungsprogramm aufgenommen werden.

Eine Ansiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* trat bei allen Materialien auf. Ebenso zeigte sich ein deutlicher Konkurrenzeffekt durch die autochthonen Bakterien bei allen Materialien.

Im Durchfluss zeigte sich eine exponentielle Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm. Dementsprechend ist die Nachweisbarkeit von der Besiedlungsdichte abhängig. Da neues EPDM stärker besiedelt wurde als die anderen Materialien ergab sich die längste Nachweisdauer für dieses Material.

In Batchversuchen zeigte sich insbesondere bei Kurzzeitversuchen und Versuchen ohne autochthonen Biofilm jeweils eine deutlich stärkere und im Zeitverlauf über 14 Tage noch zunehmende Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* bei den Materialien ohne generelle Zulassung nach W 270 (EPDM und Weich-PVC). Bei Betrachtung von Langzeitversuchen ergab sich hier allerdings wiederum eine Nivellierung, so dass dabei die Unterschiede nicht deutlich hervortraten.

Bei den Desinfektionsversuchen mit Materialien zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen zugelassenen und nicht oder nur eingeschränkt zugelassenen Materialien (EPDM). Während erstere durch Trinkwasserdesinfektionsverfahren gut erreicht wurden, d.h. *Pseudomonas aeruginosa* im Batch nach einer halben Stunde um mind. 4 Logstufen reduziert war bzw. im Durchfluss spätestens nach 2 Tagen mit 0,1 mg/l Cl₂ bzw. 0,05 mg/l

ClO_2 nicht mehr nachweisbar war, ließ sich dies bei EPDM bzw. Weich-PVC nicht erreichen. Hier lag je nach Einwirkzeit nur eine sehr geringe oder gar keine Reduktion vor (max. 2 Log-Stufen). EPDM mit genereller Eignung für den Trinkwasserbereich konnten allerdings, wie oben erwähnt, nicht in die Untersuchungen mit einbezogen werden, so dass hier noch Klärungsbedarf besteht.

Es lässt sich jedoch festhalten, dass i. d. R. bei Einsatz von Materialien mit genereller Eignung nach W 270 für den Trinkwasserbereich auch in Bezug auf *Pseudomonas aeruginosa* gültige Aussagen getroffen werden können.

6 Prozessmodell und Handlungsempfehlungen

6.1 Allgemeines zum Prozessmodell

Pseudomonas aeruginosa überlebt im **Wasserkörper** unter Stagnationsbedingungen über einen langen Zeitraum. Die Zellen bleiben somit auch nach der Verwertung der biologisch leicht verwertbaren Nährstoffe im Wasser und nach Einstellung des Wachstums sowie unter dem Konkurrenzdruck der autochthonen Trinkwasserbiozönose im Wasserkörper in einem aktiven Zustand.

Für die Praxis bedeutet dies, dass in nicht durchflossenen Bereichen trinkwasserführender Systeme, die eine Kontamination mit *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen, dieses Bakterium im Wasserkörper über einen langen Zeitraum persistieren kann und infolge einer Veränderung der hydraulischen Bedingungen von diesen Punkten in das System eingetragen werden kann.

Pseudomonas aeruginosa besiedelt ausgehend vom Wasserkörper die Oberfläche aller getesteten Materialien als Biofilm. Somit ist davon auszugehen, dass grundsätzlich alle Materialien besiedelt werden können, sofern diese keine bakteriziden Verbindungen abgeben. Die stärkste **Besiedlung** zeigte neues EPDM. Somit besitzt dieses Material spezifische Oberflächeneigenschaften, die eine Anheftung von *Pseudomonas aeruginosa* aus der Wasserphase an die Oberfläche gegenüber anderen Materialien begünstigt. Dieser Effekt wird durch einen vorhandenen Trinkwasserbiofilm, der die Oberflächeneigenschaften gegenüber einem neuen EPDM-Material verändert, ausgeschaltet.

Nach einer Anheftung von *Pseudomonas aeruginosa* auf Materialoberflächen liegt bei einem vorhandenen Trinkwasserbiofilm oder durch die Besiedlung eines neuen Materials mit Trinkwasserbakterien ein Konkurrenzdruck auf das nicht autochthone Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* vor. Sofern von dem Oberflächenmaterial keine derart hohe Nährstoffabgabe erfolgt, dass neben dem Wachstum der autochthonen Bakterien auch ein Wachstum von nicht autochthonen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* ermöglicht wird, kommt es zu einer sukzessiven Abnahme von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Abnahme beruht hierbei nicht auf der Bildung eines VBNC-Stadiums, sondern auf einem tatsächlichen Absterben. Auch eine Verringerung infolge eines Übergangs vom Biofilm in den Wasserkörper ist nicht gegeben. Da für Bakterien im Wasserkörper keine Abnahme zu verzeichnen war, ist die Abnahme im Biofilm auf die Aktivität der autochthonen Biofilmbakterien zurückzuführen.

Die Nachweisdauer von *Pseudomonas aeruginosa* auf **Materialien** ist von der Besiedlungsdichte nach einer Kontamination abhängig. Die Abnahme erfolgt exponentiell, wobei, basierend auf den Untersuchungsergebnissen, bei der Langzeitbetrachtung eine Halbwertszeit im Bereich von ca. 10 Tagen angesetzt werden kann. Dementsprechend steigt die Nachweisdauer mit der Kontaminationshöhe.

Die verwendeten Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* weisen eine generelle Empfindlichkeit gegen alle getesteten **Desinfektionsmittel** und Desinfektionsmittelkonzentrationen auf. Somit war keine spezifische Resistenz gegen ein Desinfektionsverfahren zu verzeichnen. Auffällig waren jedoch EPDM-Materialien, bei denen bei mehreren Versuchsansätzen, selbst bei hohen Desinfektionsmittelkonzentrationen, keine vollständige Beseitigung erreicht wurde. Hieraus ist abzuleiten, dass die Wirkung des Desinfektionsmittels gegeben ist, unabhängig davon, ob es sich um eine Oxidation, wie bei Chlor, Chlordioxid oder Wasserstoffperoxid oder um eine Schädigung der Funktion der Zellmembranen, wie bei quarternären Ammoniumverbindungen handelt. Dies lässt darauf schließen, dass der Kontakt zwischen Wasserphase und Material durch die Oberflächeneigenschaften von EPDM vermindert ist, was auch zu einer geringeren Wirksamkeit von flüssigen Desinfektionsmitteln führt.

Pseudomonas aeruginosa auf Oberflächen geht eine derart hohe Haftung ein, dass eine kurzfristige vollständige Beseitigung durch Wasserspülungen oder Luft/Wasser-**Spülungen** nicht erreichbar ist. Dementsprechend ist eine mechanische Spülung nur geeignet, um in der Wasserphase befindliche Bakterien bzw. Kontaminationen oder Verschmutzungen aus dem System auszutragen.

6.2 Handlungsempfehlungen

Pseudomonas aeruginosa kann über Verunreinigungen (z.B. bei Rohrbrüchen oder im Rahmen von Baumaßnahmen), z.B. mit Bodenbestandteilen in das Trinkwassernetz eingetragen werden. Der Eintrag von Verschmutzungen sollte durch Einhaltung der a. a. R. d. T. weitgehend vermieden werden. Ist ein Eintrag erfolgt, ist es zunächst zur Beseitigung der Kontamination erforderlich, die Verunreinigung vollständig auszutragen. Hierfür sollte eine Wasserspülung ausreichend sein, sofern Spülgeschwindigkeiten von $> 1,5$ m/s erreicht werden, wenn der Wasserauslass, z.B. der Hydrant, sich am Rohrscheitel befindet. Ist der Wasserauslass seitlich angebunden oder handelt es sich um einen freien Auslauf am Rohrende, sind Spülgeschwindigkeiten im Bereich von 0,7 m/s für einen Austrag von Bodenbestandteilen ausreichend. Lassen sich die erwähnten Spülgeschwindigkeiten nicht realisieren, sollte eine Luft/Wasser-Impulsspülung durchgeführt werden.

Kommt es im Rohr zur Stagnation von mit *Pseudomonas aeruginosa* kontaminiertem Wasser, so führt dies zur Besiedlung der Rohroberfläche aus dem Wasserkörper. Hierbei werden Oberflächen aus Dichtungsmaterialien wie EPDM stärker besiedelt als andere Materialien. Zur Beseitigung ist im ersten Schritt das kontaminierte Wasser auszuspülen. Hierfür sollte das zweifache Volumen der Leitung ausgetauscht werden. Sofern keine festen Bestandteile auszutragen sind, sind hierfür keine hohen Spülgeschwindigkeiten erforderlich. Um eine Beseitigung der Oberflächenkontamination zu erreichen, ist eine Anlagendesinfektion entsprechend DVGW-Regelwerk durchzuführen. Entsprechend der Ergebnisse aus dem Forschungsprojekt ist davon auszugehen, dass, mit Ausnahme von Dichtungsmaterialien, bei allen Materialien eine vollständige Beseitigung der Oberflächenkontamination erreicht wird, sofern die Oberflächen mit dem Desinfektionsmittel in Kontakt kommen. Für Dichtungsmaterialien ist nur eine unvollständige Beseitigung der Oberflächenkontamination möglich.

Ist zur Beseitigung einer Oberflächenkontamination keine Anlagendesinfektion umsetzbar, sollte eine kontinuierliche Desinfektion über mindestens vier Wochen durchgeführt werden. Hierbei ist sicherzustellen, dass im kontaminierten Bereich freies Desinfektionsmittel vorhanden ist und alle Innenoberflächen mit dem Desinfektionsmittel in Kontakt kommen. Zu beachten ist, dass die Wirkung von der vorliegenden Desinfektionsmittelkonzentration abhängig ist. Um zu überprüfen, ob durch die Desinfektionsmaßnahme eine nachhaltige Beseitigung erreicht wurde, ist die Desinfektionsmittelkonzentration schrittweise abzusenken und dies mit einem

entsprechenden Untersuchungsprogramm zu begleiten. Sollten während oder nach der Verringerung der Desinfektionsmittelkonzentration bzw. der Abschaltung weiterhin Befunde auftreten, ist im Rahmen eines Messprogramms die Kontaminationsstelle zu identifizieren und das entsprechende Anlagenteil zu entfernen.

Treten in Trinkwassersystemen anhaltend Befunde auf, so ist davon auszugehen, dass eine Nährstoffquelle vorliegt, die zu einer anhaltend hohen Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa* führt. Entsprechend der Ergebnisse mit EPDM ist eine vollständige Beseitigung mit üblichen Desinfektionsverfahren in einem solchen Fall eher unwahrscheinlich. Somit ist die Kontaminationsstelle zu identifizieren und das Anlagenteil auszutauschen.

Anlagenteile mit Dichtungsmaterialien, wie z.B. Schieber oder Klappen, sollten vor dem Einbau intensiv desinfiziert werden. Hierfür können z.B. Sprühdesinfektionsmittel zum Einsatz kommen. Im Rahmen der Versuche mit EPDM konnte z.T. in einem Arbeitsgang keine vollständige Beseitigung der Oberflächenkontamination erreicht werden. Bei solchen Bauteilen erhöhen mehrfache Desinfektionen die Chance auf eine vollständige Beseitigung von *Pseudomonas aeruginosa*.

7 Literaturverzeichnis

- Benölken, J.K. (2011): Praxisnahe Untersuchungen in halbtechnischen Versuchsanlagen zur Kontamination von Trinkwasser in Haus-Installationen. Shaker Verlag 2011, ISBN 978-3-8322-9788-6.
- Benölken, J.K., Dorsch, T., Wichmann, K., Bendinger, B. (2010): Praxisnahe Untersuchungen zur Kontamination von Trinkwasser in halbtechnischen Trinkwasser-Installationen. In: Flemming, H.-C. (Hrsg.): Vermeidung und Sanierung von Trinkwasser-Kontaminationen durch hygienisch relevante Mikroorganismen aus Biofilmen der Hausinstallation. Berichte aus dem IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH, Eigenverlag Band 54, ISSN 0941-0961, Seiten 101-180.
- Botzenhart, K., Röpke, S. (1971): Lebensfähigkeit und Verhalten von *Pseudomonas aeruginosa* in anorganischen Salzlösungen. Arch. Hyg. 154, 503-516.
- DIN EN ISO 16266 (2008): Nachweis und Zählung von *Pseudomonas aeruginosa* – Membranfiltrationsverfahren.
- DVGW-Arbeitsblatt W 270 (2007): Vermehrung von Mikroorganismen auf Werkstoffen für den Trinkwasserbereich – Prüfung und Bewertung.
- DVGW-Arbeitsblatt W 291 (2000): Reinigung und Desinfektion von Wasserverteilungsanlagen.
- DVGW-Arbeitsblatt W 557 (2012): Reinigung und Desinfektion von Trinkwasserinstallationen.
- Empfehlung des Umweltbundesamtes (2005): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchung im Kaltwasser von Wasserversorgungsanlagen nach § 3 Nr. 2 Buchstabe c TrinkwV 2001, aus denen Wasser für die Öffentlichkeit im Sinne des § 18 Abs. 1 TrinkwV 2001 bereit gestellt wird. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz 49, 693-696.
- Exner, M., Kramer, A., Kistemann, T., Gebel, J., Engelhart, S. (2007): Wasser als Infektionsquelle in medizinischen Einrichtungen, Prävention und Kontrolle. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz 50, 302-311.

- Favero, M.S., Carson, L.A., Bond, W.W., Petersen, N.J. (1971): *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in distilled water from hospitals. *Science* 173, 836-838.
- Flemming, H.-C. (2010): Vermeidung und Sanierung von Trinkwasser-Kontaminationen durch hygienisch relevante Mikroorganismen aus biofilmen der Hausinstallation "Biofilme in Hausinstallationen". Abschlussbericht eines BMBF-Verbundprojektes. Berichte aus dem IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH, Eigenverlag Band 54, ISSN 0941-0961.
- Hamsch, B. (2005): Problematik des Vorkommens von *Pseudomonas aeruginosa* in öffentlichen Wasserversorgungen. *TZW aktuell*, Ausgabe 19, 12/2005.
- Hamsch, B., Göbes, S. (2000): Chlor- bzw. Chlordioxid dosierung als Abschlussdesinfektion. *gwf-Wasser/Abwasser* 141, 113-118.
- Hamsch, B., Sacré, C., Wagner, I. (2004): Heterotrophic plate count and consumer's health under special consideration of water softeners. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 365-373.
- Hamsch, B., Schmiedel, U., Werner, P., Frimmel, F.H. (1993): Investigations on the biodegradability of chlorinated fulvic acids. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 21, 167-173.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S. (1977): Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
- Kistemann, T., Schreiber, C., Völker, S. (2010): Vorkommen mikrobieller Trinkwasserkontaminationen in Hausinstallationen. In: Flemming, H.-C. (Hrsg.): Vermeidung und Sanierung von Trinkwasser-Kontaminationen durch hygienisch relevante Mikroorganismen aus Biofilmen der Hausinstallation. Berichte aus dem IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH, Eigenverlag Band 54, ISSN 0941-0961, Seiten 31-100.
- Mena, K.D., Gerba, C.P. (2009): Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201, 71-115.
- Moritz, M. (2011): Integration of hygienically relevant bacteria in drinking water biofilms grown on domestic plumbing material. Dissertation Biofilm Centre, Aquatische Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen.

- Perbandt, A. (2014): Wirkung von Desinfektionsverfahren und Spülmaßnahmen auf *Pseudomonas aeruginosa*. Masterarbeit TU Dresden, Inst. für Hydrobiologie, betreut am DVGW-TZW Dresden.
- Prüfverfahren PVM 204-1 (2011): Photometrische Bestimmung von Chlordioxid, Chlor und Chlorit nebeneinander mittels DPD-Reagenz, Prüfverfahren TZW Dresden.
- Prüfverfahren PVM 204-2 (2011): Photometrische Bestimmung von Chlordioxid, Chlor und Chlorit nebeneinander mit dem Allcon Kompaktphotometer Fa. Alldos vor Ort, Prüfverfahren TZW Dresden.
- Reasoner D.J., Geldreich, E.E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. 49, 1-7.
- Robert-Koch-Institut (2002): *Pseudomonas aeruginosa* in einem Trinkwassernetz. Epidemiologisches Bulletin Nr. 40.
- Schoenen, D. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwasserversorgungssystemen. gwf-Wasser/Abwasser, 150, 264-272.
- Schmidt, W., Sawusch, S., Breuel, U., Garske, B., Petzoldt, H., Hamsch, B., Böttcher, H., Pompe, W. (2002): Biofilmbildung an modifizierten SiO₂-Schutzschichten. Vom Wasser, 98, 177-192.
- Schweisfurth, R. (1972): Manganoxidierende Mikroorganismen in Trinkwasserversorgungsanlagen. gwf-Wasser/Abwasser 113, 562-572.
- Trautmann, M., Halder, S., Lepper, P.M., Exner, M. (2009): Reservoir von *Pseudomonas aeruginosa* auf der Intensivstation. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz 52, 339-344.
- Van der Kooij, D., Oranje, J.P., Hijnen, W.A.M. (1982): Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilization of substrates at concentrations of a few micrograms per liter. Appl. Environ. Microbiol., 44, 1086-1095.
- Wellinghausen, N., Köthe, J., Wirths, B., Sigge, A. und Poppert, S. (2005): Superiority of molecular techniques for identification of gram-negativ, oxidase-positiv rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol., 43, 4070-4075.

Wingender, J., Hamsch, B., Schneider, S. (2009): Mikrobiologisch-hygienische Aspekte des Vorkommens von *Pseudomonas aeruginosa* im Trinkwasser. DVGW energiewasser-praxis, 60, 60-66.