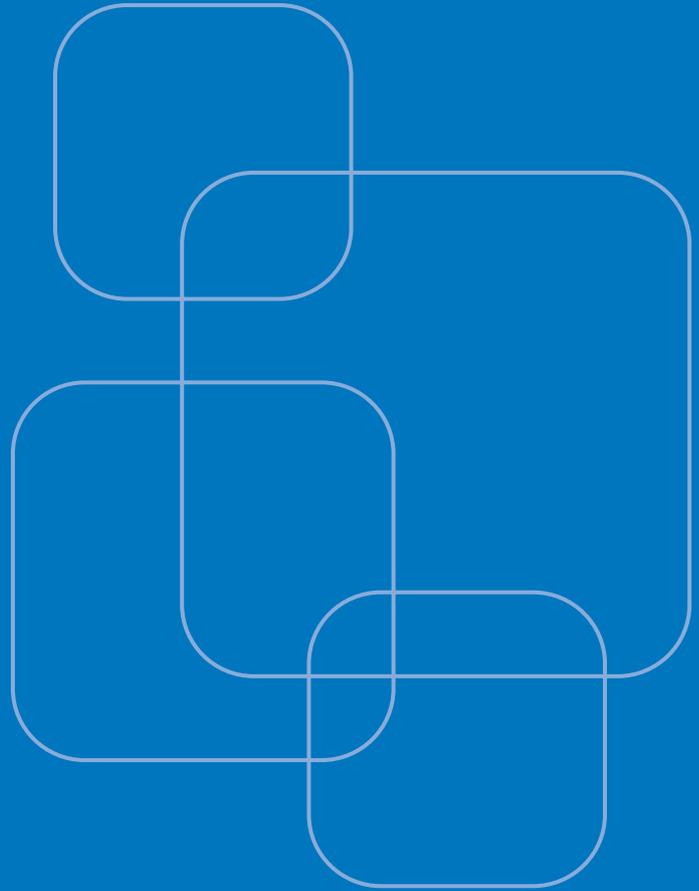


*dynaklim*-Publikation



Gefördert durch:





---

# SICHERUNG DER TRINKWASSERQUALITÄT BEI DER WASSERVERTEILUNG BEI VERÄNDERTEN BODENTEMPERATUREN

Aktivität A 4.1.3 im BMBF-Verbundprojekt *dynaklim*

Dr. Susanne Grobe

M.Sc. Janine Wagner

Dr. Jost Wingender

**IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser gGmbH,  
Mülheim an der Ruhr**

[www.iww-online.de](http://www.iww-online.de)

---

*dynaklim*-Publikation Nr. 52 / Juli 2014



---

## Abstract

Bedingt durch die globale Erwärmung findet eine Erwärmung der oberen Bodenschichten durch längere Hitzeperioden in den Sommermonaten statt. Dies wird besonders in Großstädten mit vielen hochversiegelten Flächen zu erwarten sein. Diese Erwärmung der oberen Bodenschichten und eine klimabedingte Erhöhung der Rohwassertemperaturen können zu einem Anstieg der Trinkwassertemperatur in Trinkwasserverteilungsnetzen führen. Der Einfluss der Wassertemperatur auf hygienisch relevante Mikroorganismen in Trinkwasser und Trinkwasserbiofilmen wurde daher in der vorliegenden Studie untersucht.

---

## Zusammenfassung

Trinkwasser in öffentlichen Trinkwasserverteilungssystemen enthält immer Mikroorganismen. Diese kommen frei im Trinkwasser, aber in überwiegender Mehrheit in Form von Biofilmen auf allen mit Trinkwasser in Kontakt stehenden Oberflächen vor. Die durch den Klimawandel bedingte globale Erwärmung kann zu steigenden Bodentemperaturen führen. Als mögliche Folge kann eine Erhöhung der Temperatur des Trinkwassers in Trinkwasserverteilungsnetzen auftreten. Die Sicherung der Trinkwasserqualität bei veränderten Wassertemperaturen war daher der Fokus dieser Studie. Dazu wurde der Einfluss der Trinkwassertemperatur auf hygienisch relevante Bakterien (coliforme Bakterien, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und Legionellen) im Trinkwasser und in Trinkwasserbiofilmen in Rahmen einer Feldstudie sowie in Laborexperimenten untersucht. Die Organismen wurden mittels konventionellen Kulturmethoden und zusätzlich mit der kultivierungsunabhängigen molekularbiologischen Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) analysiert. Begleitend wurden die Gesamtzellzahlen sowie die Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) bestimmt.

Die Feldversuche erfolgten im Trinkwasserverteilungssystem der Stadt Oberhausen an sieben Standorten, die unterschiedliche Klimatope repräsentierten, und zusätzlich am Ausgang des Wasserwerks, aus dem das aufbereitete und UV-desinfizierte Trinkwasser geliefert wurde. Es wurden Biofilmreaktoren mit verschiedenen Werkstoffen (Polyethylen (PE), Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM) und Edelstahl) als Bypass in das bestehende Rohrnetz eingebaut. In drei Probenahmekampagnen (Sommer, Herbst und Winter) wurden sowohl Biofilm- als auch Trinkwasserproben entnommen. Die Schwankungen der Wassertemperaturen im Trinkwassernetz zwischen den einzelnen Klimatopen betragen zum Zeitpunkt der Probenahmekampagnen bis zu 10 °C. Die minimale und maximale Temperatur während der gesamten Dauer der Exposition der Biofilmreaktoren im Trinkwasserverteilungsnetz betrug 2,3 °C bzw. 23 °C. Bezüglich der nach TrinkwV festgelegten Parameter zeigte sich mit erhöhten Temperaturen keine Verschlechterung der mikrobiologischen Befunde im Trinkwasser. Es wurde weder eine Zunahme der Gesamtzellzahl noch des Vorkommens hygienisch relevanter Bakterien beobachtet. Die Koloniezahlen (koloniebildende Einheiten pro ml) nach TrinkwV lagen auch bei Wassertemperaturen über 20 °C immer im einstelligen oder niedrigen zweistelligen Bereich.

In den Trinkwasserbiofilmen zeigten sich jedoch einige mikrobiologische Veränderungen in Abhängigkeit von der Temperatur. Mit zunehmender Wassertemperatur nahm die Biofilmbildung (Gesamtzellzahlen und Koloniezahlen pro cm<sup>2</sup>) auf den beiden Werkstoffen PE und EPDM zu. Die Trinkwasserbiofilme waren dabei auf den Werkstoffen, die Nährstoffe abgeben können (PE und EPDM), stärker ausgeprägt als auf Edelstahl. Unter den kulturell erfassten, hygienisch relevanten Organismen wurde für coliforme Bakterien (ohne *E. coli*) in den Biofilmen mit steigender Temperatur eine Zunahme der Befundhäufigkeit von 4 % auf 17 % festgestellt, während *E. coli*, *P. aeruginosa* und Legionellen kulturell in der Regel nicht nachweisbar waren. Mittels der kultivierungsunabhängigen FISH-Methode wurden coliforme Bakterien, *E. coli*, *P. aeruginosa* und Legionellen sowohl im Trinkwasser als auch in Trinkwasserbiofilmen nachgewiesen. Dies ist möglicherweise auf das Vorkommen dieser Bakterien im sogenannten „viable but nonculturable“ (VBNC)-Zustand zurückzuführen. In diesem Zustand sind die Bakterien mit Standardkulturverfahren nicht nachweisbar, aber dennoch stoffwechselaktiv.

In Laborversuchen wurde unter kontrollierten Bedingungen der Einfluss der Temperatur im Bereich von 8 °C bis 29 °C auf die Einnistung und Persistenz von hygienisch relevanten Bakterien nach einer künstlichen Kontamination von Trinkwasserbiofilmen untersucht. Dazu wurden Biofilme auf EPDM und PE in Drehkolbenreaktoren angezüchtet. Sie wurden mit biologisch stabilem Trinkwasser (geringer Gehalt an assimilierbarem Kohlenstoff (AOC) von 5,5 µg Acetat-C/L) und parallel unter nährstoffreichen Bedingungen mit Trinkwasser, das mit einer CASO-Nährlösung supplementiert wurde und einen AOC-Gehalt von 150 µg Acetat-C/L aufwies, betrieben. Nach 14 Tagen wurden die Reaktoren mit einem Gemisch von *E. coli* und dem coliformen Bakterium *Klebsiella pneumoniae* sowie parallel

mit *P. aeruginosa* und *Legionella pneumophila* beimpft. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurden die Zielorganismen in den Trinkwasserbiofilmen sowie in den Zu- und Abläufen der Reaktoren quantifiziert. Alle Zielorganismen nisteten sich in die etablierten Trinkwasserbiofilme ein. Die Persistenz der hygienisch relevanten Organismen in den Biofilmen wurde speziesabhängig von der Temperatur und/oder dem Nährstoffgehalt beeinflusst. *E. coli* und *K. pneumoniae* waren in den Biofilmen, die im biologisch stabilen Trinkwasser etabliert wurden, kulturell meist nur einen Tag nach Animpfen der Reaktoren nachweisbar. In Biofilmen von Reaktoren mit nährstoffreichem Trinkwasser dagegen persistierten sie unabhängig von der Temperatur deutlich länger und waren in der Mehrheit der Proben über den gesamten Versuchszeitraum von 28 Tagen kulturell nachweisbar. Zudem kam es unter nährstoffreichen Bedingungen zu einer Vermehrung dieser Organismen im Biofilm. Im Fall von *L. pneumophila* wurde die Persistenz in biologisch stabilem Trinkwasser (nährstoffarm) durch Temperaturen  $> 21$  °C begünstigt, während sie durch die Nährstoffzugabe deutlich verkürzt wurde. *P. aeruginosa* war unabhängig von Temperatur, Nährstoffangebot und Werkstoff bis auf wenige Ausnahmen über den gesamten Zeitraum der Experimente kulturell nachweisbar. Die Dauer der Nachweisbarkeit aller Zielorganismen in den Abläufen der Biofilmreaktoren war in der Mehrheit der untersuchten Proben gleich mit der Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit im Biofilm, was auf die Möglichkeit der Freisetzung der hygienisch relevanten Organismen in die Wasserphase hinwies.

Mit der FISH-Methode wurden *E. coli* und *K. pneumoniae* über die gesamte Dauer der Experimente (28 Tage) in den Trinkwasserbiofilmen nachgewiesen, während sie kulturell unter nährstoffarmen Bedingungen meist nur wenige Tage erfassbar waren. Die längere Dauer der Nachweisbarkeit und die Bestimmung höherer Konzentrationen mittels FISH verglichen mit den kulturellen Nachweisverfahren im Biofilm in den Laborversuchen deuten auch hier auf das Vorliegen von *E. coli* und *K. pneumoniae* im VBNC-Zustand hin.

Das Fazit dieser Studie ist, dass Temperaturänderungen in dem berücksichtigten Temperaturbereich der Feld- und Laborversuche von 2 °C bis 29 °C keinen deutlichen direkten Einfluss auf die mikrobiologische Qualität des Trinkwassers haben. Allerdings beeinflussen sie die Einnistung, Persistenz und mögliche Vermehrung hygienisch relevanter Bakterien in Trinkwasserbiofilmen in unterschiedlichem Ausmaß, je nach Bakterienspezies. Die Freisetzung dieser Organismen aus den Biofilmen resultiert in der Kontamination der Wasserphase, so dass die Wassertemperaturen unter Umständen über all diese biofilmvermittelten Prozesse indirekt die Trinkwasserqualität beeinflussen. Allerdings scheint die Nährstoffsituation alleine oder in Kombination mit den Wassertemperaturen eine wesentlichere Bedeutung für das Vorkommen von hygienisch relevanten Bakterien zu haben. Da in einem Trinkwasserverteilungssystem im Allgemeinen komplexe Wechselwirkungen zwischen einer Vielzahl von physikalischen, chemischen und biologischen Faktoren stattfinden, muss bei der Bewertung dieser Ergebnisse allerdings auch berücksichtigt werden, dass bei der Sicherung der Trinkwasserqualität die Temperatur nicht als isolierte Einflussgröße betrachtet werden darf, wenn es um die Überwachung und Risikobewertung des Vorkommens hygienisch relevanter Bakterien geht und Anpassungsstrategien im Rahmen von klimawandelbedingten Temperaturveränderungen entwickeln werden.

## Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1	Der globale Klimawandel .....	9
1.2	Der Klimawandel in der Emscher-Lippe Region .....	9
1.3	Einfluss der Temperatur auf hygienisch relevante Bakterien im Trinkwasser .....	10
1.3.1	Überleben von Bakterien im Trinkwasser .....	10
1.3.2	Rolle der Temperatur für das Wachstum von Bakterien .....	12
1.3.3	Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Bakterien in Trinkwasserverteilungssystemen .....	14
1.3.4	Einfluss der Wassertemperatur auf das Vorkommen von hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwasserverteilungssystemen .....	17
1.3.5	Fazit .....	25
1.4	Vorgehensweise .....	27
1.4.1	Feldversuche .....	28
1.4.2	Laborversuche .....	30
<b>2.</b>	<b>Einfluss der Temperatur auf hygienisch relevante Bakterien im Trinkwasser und in Trinkwasserbiofilmen</b> .....	<b>31</b>
2.1	Feldversuche .....	31
2.1.1	Trinkwasser .....	32
2.1.2	Trinkwasserbiofilme .....	35
2.2	Laborversuche .....	43
2.2.1	Einnistung .....	44
2.2.2	Persistenz .....	51
2.2.3	Vermehrung .....	57
2.2.4	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE).....	60
<b>3.</b>	<b>Anpassungsstrategien</b> .....	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>76</b>
5.1	Material und Methoden.....	76
5.1.1	Feldversuche .....	76
5.1.2	Laborversuche .....	76
5.1.3	Kulturelle Methoden .....	78
5.1.4	Molekularbiologische Methoden .....	78
5.1.5	Daten zur Einnistung der hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwasserbiofilme auf EPDM .....	82

5.1.6 Daten zur Persistenz der hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM..... 86

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kardinaltemperaturen für das Wachstum von Bakterien.

Abbildung 2: Experimentelles Vorgehen in Feld- und Laborversuchen zur Untersuchung des Einflusses der Wassertemperatur auf das Vorkommen und Wachstum von hygienisch relevanten Bakterien im Trinkwasser und in Biofilmen.

Abbildung 3: Beispiel für eine Biofilmreaktorstrecke als Bypass im Trinkwasserverteilungsnetz im Feldversuch (Standort Gewerbe 2 ; Quelle: IWW) und Ansicht der eingebauten Werkstoff-Coupons.

Abbildung 4: Drehkolbenreaktor der Laboruntersuchungen zur Einnistung, Persistenz und Vermehrung hygienisch relevanter Mikroorganismen in Trinkwasserbiofilmen (Quelle: IWW).

Abbildung 5: Temperaturverlauf des Trinkwassers der verschiedenen Klimatopie im Trinkwasserverteilungsnetz der Stadt Oberhausen sowie im aufbereiteten Trinkwasser im Wasserwerk Mülheim Styrum-Ost (Referenz WW) vor Abgabe des Trinkwassers in das Versorgungsnetz im Zeitraum September 2010 bis September 2011.

Abbildung 6: Koloniezahlen nach TrinkwV im Trinkwasser in Abhängigkeit von der Wassertemperatur an den untersuchten Standorten im Trinkwasserverteilungssystem im Zeitraum Juli 2010 bis September 2011

Abbildung 7: Gesamtzellzahl sowie Gesamtkoloniezahl (HPC) im Trinkwasser an ausgewählten Standorten im Verteilungsnetz im Zeitraum Juli 2010 bis September 2011.

Abbildung 8: Biofilmbildung auf PE80/100 in Abhängigkeit von der Trinkwassertemperatur. Die Biofilmbildung (Oberflächenbelegung) wurde anhand der Gesamtzellzahlen (GZZ) sowie der Gesamtkoloniezahlen (HPC) und der Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach TrinkwV (KZ 20 bzw. KZ 36) bestimmt.

Abbildung 9: Biofilmbildung auf EPDM in Abhängigkeit von der Trinkwassertemperatur. Die Biofilmbildung (Oberflächenbelegung) wurde anhand der Gesamtzellzahlen (GZZ) sowie der Gesamtkoloniezahlen (HPC) und der Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach TrinkwV (KZ 20 bzw. KZ 36) bestimmt.

Abbildung 10: Biofilmbildung auf Edelstahl in Abhängigkeit von der Trinkwassertemperatur. Die Biofilmbildung (Oberflächenbelegung) wurde anhand der Gesamtzellzahlen (GZZ) sowie der Gesamtkoloniezahlen (HPC) und der Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach TrinkwV (KZ 20 bzw. KZ 36) bestimmt.

Abbildung 11: Biofilmbildung in Abhängigkeit vom Werkstoff. Die Biofilmbildung (Oberflächenbelegung) wurde anhand der Gesamtzellzahlen (GZZ) sowie der Gesamtkoloniezahlen (HPC) und der Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach TrinkwV (KZ 20 bzw. KZ 36) bestimmt.

Abbildung 12: Prozentualer Anteil positiver Befunde hygienisch relevanter Bakterien in Abhängigkeit von der Jahreszeit.

Abbildung 13: Bandenmuster der DGGE von Biofilmpopulationen der Feldversuche. Spuren 1-3: Klimatop Innenstadt (Herbst, Winter, Sommer), Spuren 4-6: Klimatop Stadtrand (Herbst, Winter, Sommer), Spuren 7-9 Klimatop Park (Herbst, Winter, Sommer), Spuren 10-12: Klimatop Wald (Herbst, Winter, Sommer).

Abbildung 14: Einnistung von *E. coli* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung der Biofilmreaktoren unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 15: Einnistung von *E. coli* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 16: Einnistung von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilme auf PE 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 17: Einnistung von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilme auf PE 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 18: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 19: Einnistung von *L. pneumophila* in Biofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 20: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 21: Einnistung von *Legionella pneumophila* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 22: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme 1 Tag nach Animpfen in Abhängigkeit von Werkstoff, Nährstoffgehalt und Temperatur; n.n.: nicht nachgeiwesen.

Abbildung 24: Persistenz von *E. coli* in Trinkwasserbiofilmen auf PE80 und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 25: Persistenz von *E. coli* in Trinkwasserbiofilmen auf PE80 und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 26: Persistenz von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilmen auf PE80 und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 27: Persistenz von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilmen auf PE80 und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 28: Persistenz von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 29: Persistenz von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 30: Persistenz von *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 31: Persistenz von *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 32: Vergleich der Bandenmuster (PFGE) von *P. aeruginosa*-Isolaten aus den Drehkolbenreaktoren mit dem Referenzstamm *P. aeruginosa* AdS. Spuren 1 und 19: Marker; Spuren 2,6,9,12,17: Isolate aus der Wasserphase; Spuren 3,4,5,7,8,10,11,13,14,15,16: Isolate aus Trinkwasserbiofilmen; Spur 18: Referenzstamm *P. aeruginosa* AdS.

Abbildung 33: Temperaturabhängige Zu- bzw. Abnahme von *K. pneumoniae* nach 28 Tagen Inkubation unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 34: Temperaturabhängige Zu- bzw. Abnahme von *E. coli* nach 28 Tagen Inkubation unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 35: Temperatur-abhängige Zu- bzw. Abnahme von *P. aeruginosa* nach 28 Tagen Inkubation unter nährstoffarmen Bedingungen – bestimmt mit kulturellen Standardverfahren

Abbildung 36: Temperatur-abhängige Zu- bzw. Abnahme von *P. aeruginosa* nach 28 Tagen Inkubation unter nährstoffreichen Bedingungen – bestimmt mit kulturellen Standardverfahren

Abbildung 37: Einnistung von *E. coli* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 38: Einnistung von *E. coli* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 39: Einnistung von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 40: Einnistung von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 41: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 42: Einnistung von *Legionella* spp. in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 43: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 44: Einnistung von *Legionella* spp. in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 45: Persistenz von *E. coli* in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 46: Persistenz von *E. coli* in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM unter nährstoffreichen Bedingungen.

Abbildung 47: Persistenz von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM unter nährstoffarmen Bedingungen.

Abbildung 48: Persistenz von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM unter nährstoffreichen Bedingungen.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für Kardinaltemperaturen des Wachstums von hygienisch relevanten Bakterien, die im Trinkwasser auftreten können.

Tabelle 2: Übersicht der Messstationen mit den entsprechenden Klimatopen, Stationsnamen und kennzeichnenden Merkmalen (modifiziert nach Kuttler et al., 2012).

Tabelle 3: Zusammenstellung der mikrobiologisch-hygienischen Messparameter

Tabelle 4: Tagesmitteltemperaturen des Trinkwassers zu den drei Probenahmekampagnen Sommer, Herbst und Winter

Tabelle 5: Hygienisch relevante Mikroorganismen im Trinkwasser aus den Feldversuchen (n = 24 Proben)

Tabelle 6: Befundhäufigkeit (%) der mit der FISH-Methode nachgewiesenen Zielorganismen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Legionella* spp. und *L. pneumophila* im Trinkwasser in Abhängigkeit von der Jahreszeit (n = 24 Proben); n. b.: nicht bestimmt

Tabelle 7: Hygienisch relevante Bakterien in den Trinkwasserbiofilmen, nachgewiesen mittels konventioneller Kulturverfahren. Die Identifizierung von Coliformen und *E. coli* erfolgte mit dem API 20 E-System, die von Enterokokken mit dem API 20 Strep-System.

Tabelle 8: Befundhäufigkeiten (%) von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Legionella* spp. und *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen auf unterschiedlichen Werkstoffen in Abhängigkeit von der Jahreszeit (n = 24)

Tabelle 9: Durchschnittliche Temperaturdifferenzen des Trinkwasser am Probenahmetag und Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen; klimatopübergreifend

Tabelle 10: Durchschnittliche Temperaturdifferenz des Trinkwasser am Probenahmetag und Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen; betrachtet wurden die einzelnen Klimatope (nicht klimatopübergreifend)

Tabelle 11: Ähnlichkeiten (%) der Bandenmuster innerhalb eines nährstoffarmen Reaktors bei unterschiedlichen Temperaturen. PN1: Probenahme vor Animpfen; PN2: Probenahme 1 Tag nach Animpfen, PN6: Probenahme 28 Tage nach Animpfen.

Tabelle 12: Ähnlichkeiten (%) der Bandenmuster innerhalb eines nährstoffreichen Reaktors bei unterschiedlichen Temperaturen. PN1: Probenahme vor Animpfen; PN2: Probenahme 1 Tag nach Animpfen, PN6: Probenahme 28 Tage nach Animpfen.

Tabelle 13: PCR-Komponenten

Tabelle 14: PCR-Profil

Tabelle 15: Kalibration für hochkonzentrierte Proben

## 1. Einleitung

### 1.1 Der globale Klimawandel

Das Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) schreibt in seinem Synthesebericht von 2007, dass steigende Luft- und Meerestemperaturen, weit verbreitete Schnee- und Eisschmelzen und ein Anstieg des Meeresspiegels als eindeutige Zeichen des Klimawandels anzusehen sind. Als Beispiel wird erwähnt, dass elf Jahre in dem Zeitraum 1995 bis 2006 unter den zwölf wärmsten Jahren seit 1850 einzuordnen sind. Stanwell-Smith berichtet in dem Summary Report des Chartered Institute of Environmental Health (UK), dass 1998 als das wärmste Jahr der letzten tausend Jahre bezeichnet wird, gefolgt von 2005. Die World Meteorological Organization (WMO) bezeichnet die Dekade 2001 bis 2010 als „die Dekade der Klimaextreme“ (WMO Summary Report 2013). Globale Oberflächentemperaturen haben sich seit dem späten neunzehnten Jahrhundert um 0,4 °C bis 0,8 °C erhöht. Dieser Anstieg der Temperatur erfolgte hauptsächlich in den Zeiträumen von 1910 bis 1945 und seit 1976. Seit 1976 steigt die Temperatur um etwa 0,15 °C pro Dekade an (Folland et al., 2001; Stanwell-Smith, 2008; WMO Summary Report, 2013). Einhergehend mit der beobachteten Erwärmung der durchschnittlichen Temperatur weltweit ist der Rückgang der alpinen und kontinentalen Gletscher. In der nördlichen Hemisphäre ist die Schneedecke seit 1966 um 10% zurückgegangen. In dem Synthesebericht des IPCC aus 2007 wird ein weiterer Anstieg der mittleren globalen Temperatur um etwa 0,6 °C in den nächsten 100 Jahren als wahrscheinlichen erachtet, wenn die Emissionswerte vergleichbar mit denen aus dem Jahr 2000 bleiben. Für andere Szenarios sagen Klimaprojektionen Temperaturanstiege von 1,8 °C bis 4 °C voraus. Auch Stanwell-Smith (2008) bezeichnet einen Anstieg der Temperatur um 3 °C bis zum Ende dieses Jahrhunderts als wahrscheinlich. Betrachtet man einige Folgen des Klimawandels speziell für den Wassersektor, so wird dieser laut IPCC und dem Chartered Institute of Environmental Health unter anderem mit einer Zunahme an Starkregenereignissen und daraus folgenden Überflutungen, mit einem Rückgang der Wasserverfügbarkeit durch längere Trockenperioden, mit einer Erhöhung der Konzentration von hygienisch relevanten Mikroorganismen in Oberflächengewässern und mit der Verschlechterung der Effizienz von Wasserwerken aufgrund der Beeinträchtigung der chemischen Flockung durch erhöhte Temperaturen rechnen müssen.

### 1.2 Der Klimawandel in der Emscher-Lippe Region

Der weltweite Klimatrend lässt sich auf die Emscher-Lippe-Region (ELR) übertragen. Quirnbach et al. (2012a) berichten, dass in der letzten Dekade (2001-2010) ein Anstieg der mittleren Temperatur verglichen mit einer Referenzperiode (1961-1990) um etwa 0,8 °C stattgefunden hat. Der Anstieg der Temperatur beträgt laut verschiedener Klimamodelle schätzungsweise 1 °C in der nahen Zukunft (2050) und ist mit aktuellen 0,8 °C schon fast erreicht. In der fernen Zukunft (2071-2100) wird ein Anstieg von etwa 3 °C für die ELR angenommen. Die Anzahl der Sommertage ( $\geq 25$  °C) und der heißen Tage ( $\geq 30$  °C) wird überdurchschnittlich häufig sein, während die Zahl der Frosttage ( $T_{\min} < 0$  °C) und Eistage ( $T_{\max} < 0$  °C) abnehmen wird, was auf ein Auftreten von intensiveren und häufigeren Trockenperioden deutet.

In einer weiteren Publikation haben Quirnbach et al. (2012b) den Einfluss des Klimawandels auf Niederschlagsdaten in Nordrhein Westfalen bewertet. Dazu wurden verschiedene Klimamodelle, STAR2, WETTREG und CLM, herangezogen. In allen drei Modellen wurde der gleiche Trend beobachtet. Es wird ein Anstieg an trockenen Sommern einhergehend mit einer Zunahme von nasseren Wintern erwartet mit 16 % bis 20 % mehr Niederschlag in der fernen Zukunft (2071-2100) verglichen mit der Referenzperiode 1961 bis 1990. Jedoch unterscheiden sich die vorhergesagten Wetteränderungen je nach Klimamodell in der zeitlichen Entwicklung und der Bedeutung. So ist z.B. die Zunahme des Niederschlags in den Wintermonaten für die nahe Zukunft nur signifikant bei Lauf 2 des Modells CLM

und dem Modell STAR2, wohingegen bei Anwendung des Laufs 1 des Modells CLM und des Modells WETTREG ein signifikanter Einfluss des Klimawandels erst in der fernen Zukunft zu bemerken sein wird.

Da die Auswirkungen des Klimawandels auch auf regionaler Ebene von starker Bedeutung sind, wurde das Projekt *“dynaklim”* im Rahmen der KLMZUG-Ausschreibung des BMBF entwickelt. *“dynaklim”* steht für die *Dynamische Anpassung an die Auswirkungen des Klimawandels in der Emscher-Lippe-Region (Ruhrgebiet)*. Der Fokus des Projekts liegt auf möglichen Auswirkungen des Klimawandels auf den regionalen Wassersektor und der Entwicklung von Anpassungsstrategien für Umwelt, Bevölkerung und Ökonomie in der Region.

### 1.3 Einfluss der Temperatur auf hygienisch relevante Bakterien im Trinkwasser

#### 1.3.1 Überleben von Bakterien im Trinkwasser

Bakterien kommen im Trinkwasser frei (planktonisch) in der Wasserphase sowie in Form von Biofilmen auf allen mit Trinkwasser in Kontakt stehenden Oberflächen vor. Biofilme sind mikrobielle Lebensgemeinschaften, die sich an Grenzflächen ansiedeln (Hall-Stoodley et al., 2004). Sie leben in einer selbst gebildeten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), welche die Biofilmorganismen vor ungünstigen Umwelteinflüssen schützen (Flemming und Wingender, 2010). Aufgrund von Messungen der Gesamtzellzahlen in Wasser und auf Oberflächen von Rohrleitungen in einigen deutschen Trinkwassersystemen wurde geschätzt, dass ungefähr 95 % der Bakterien in Trinkwasserverteilungssystemen auf der Innenoberfläche von Rohrleitungen in Biofilmen vorkommen, während sich etwa 5 % planktonisch in der Wasserphase befinden (Flemming et al., 2002). Für ein französisches Trinkwassernetz wurde berechnet, dass in Rohrleitungen von 100 mm Durchmesser die Anzahl angehefteter Bakterien 53fach bis 77fach höher waren als die im entsprechenden Wasservolumen vorhandenen freien Zellen (Servais et al., 1992). Diese Beobachtungen zeigen, dass in Trinkwasserverteilungssystemen die überwiegende Mehrheit der Mikroorganismen angeheftet in Biofilmen an Oberflächen vorkommt und dort das Potenzial von mikrobiellem Wachstum existiert. Die größten Oberflächen für die Biofilmbildung bieten dabei die Rohrleitungen des Verteilungsnetzes.

Obwohl die Details der Biofilmbildung abhängig von den Organismen und Umweltbedingungen variieren, gibt es charakteristische Phasen der Entwicklung von Biofilmen. Zunächst nehmen die Mikroorganismen reversibel Kontakt mit der festen Oberfläche auf, gefolgt von der irreversiblen Anheftung und Vermehrung, der Bildung von Mikrokolonien und im weiteren zeitlichen Verlauf der Entstehung eines Biofilms, der sich in einem quasi-stationären Zustand befindet und durch eine maximale Zelldichte gekennzeichnet ist. Es handelt sich um ein dynamisches Gleichgewicht, das sich aus der Vermehrung im Biofilm und weiteren Anheftung von Zellen aus der Wasserphase an den Biofilm sowie der passiven Ablösung und aktiven Freisetzung von Zellen aus dem Biofilm ergibt.

In Trinkwassersystemen dauert die Ausbildung von Biofilmen je nach den vorherrschenden Bedingungen 2 bis 3 Wochen bis hin zu mehreren Monaten. Die Anzahl der Bakterien (Gesamtzellzahl) in Biofilmen auf Innenwandungen von Rohrleitungen oder auf Oberflächen von trinkwasserexponierten Werkstoff-Coupons wurde im Bereich von ungefähr  $10^4$  bis  $10^8$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  beobachtet (Block et al., 1993; Servais et al., 1995; Wingender und Flemming, 2004; Långmark et al., 2005). Der Anteil der kultivierbaren Bakterien macht dabei normalerweise nur einen geringen Anteil von etwa 0,01 bis einigen Prozent an den insgesamt vorhandenen Zellen aus.

Trinkwasserbiofilme bestehen aus einer Vielfalt von natürlicherweise vorkommenden Mikroorganismen (Mischpopulationen), die kein Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen. Dennoch beherbergen Trinkwasserbiofilme gelegentlich hygienisch relevante Mikroorganismen, die entweder fäkaler Herkunft sind oder aber aus der Umwelt (Boden, Wasser) stammen (Wingender, 2011; Wingender und Flemming, 2011). Fäkale Verunreinigungen sind die Ursache für den Eintrag von Krankheitserre-

gern wie darmpathogene Bakterien (z. B. *Campylobacter*, Salmonellen, pathogene Varianten von *Escherichia coli*), enterale Viren (z. B. Noroviren) und parasitische Protozoen (z. B. *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*). Bei diesen Erregern handelt es sich um obligat pathogene Organismen, die über den fäkal-oralen Kreislauf übertragen werden, typischerweise Durchfallerkrankungen beim Menschen verursachen und trinkwasserbedingte Krankheitsausbrüche auslösen können. Im Fall der hygienisch relevanten Umweltorganismen handelt es sich um bestimmte Wasserbakterien, die normale Biofilmbewohner sind, aber als fakultativ pathogene Krankheitserreger ein Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen. Bedeutsame fakultativ pathogene Bakterien sind vor allem *Legionella pneumophila* und andere Legionellen sowie *Pseudomonas aeruginosa*, aber auch Aeromonaden oder manche coliforme Bakterien wie zum Beispiel einige *Klebsiella*- oder *Enterobacter*-Spezies. Biofilme stellen ein temporäres Habitat und potenzielles Reservoir für hygienisch relevante Bakterien dar. Im Biofilm können diese Organismen über längere Zeiträume persistieren und sich unter günstigen Bedingungen vermehren. Im Schutz von Biofilmen überleben diese Organismen zudem praxisrelevante Konzentrationen an Desinfektionsmitteln. Biofilme stellen eine mögliche Kontaminations- und Infektionsquelle dar, da die pathogenen Organismen aus dem Biofilm in das umgebende Trinkwasser freigesetzt werden können.

Üblicherweise werden hygienisch relevante Bakterien im Trinkwasser kulturell durch Anzucht auf festen oder in flüssigen Nährmedien nachgewiesen. Im Rahmen von routinemäßigen mikrobiologisch-hygienischen Untersuchungen nach gesetzlichen Vorgaben wie zum Beispiel der Trinkwasserverordnung (TrinkwV, 2001) erfolgt dies nach festgelegten, meist genormten Nachweisverfahren. Die routinemäßige mikrobiologische Kontrolle der Trinkwasserqualität nach dem Überwachungsprinzip der Trinkwasserverordnung umfasst die Bestimmung der Koloniezahlen bei 22 °C und 36 °C sowie die Analyse auf coliforme Bakterien und *Escherichia coli* mit kulturellen Nachweisverfahren. Seltener erfolgt die aufwändigere Beprobung der Oberflächen wie zum Beispiel von Trinkwasserrohren, wodurch zusätzlich die Mikroorganismen im Biofilm erfasst werden. Für weitergehende Untersuchungen von Wasser und Biofilmen erfolgt die Quantifizierung von Mikroorganismen häufig durch die mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl, der Koloniezahl heterotropher Bakterien („heterotrophic plate count“, HPC) oder auch die Messung des Gehalts von Adenosintriphosphat (ATP) zur Bestimmung aktiver Biomasse (Liu et al., 2013). Diese Parameter zeigen jedoch nicht die Anwesenheit von Pathogenen an. Daher müssen pathogene Organismen mit spezifischen, für sie geeigneten Methoden nachgewiesen werden.

In vielen Habitaten kommen Bakterien in einem nicht kultivierbaren Zustand vor (Oliver, 2005, 2010). Damit entziehen sie sich den auf Kultivierungsverfahren basierenden Standarduntersuchungsverfahren. Solche Bakterien werden oft als „viable but nonculturable“ (VBNC) bezeichnet. In diesem VBNC-Zustand sind Bakterienzellen nicht tot, sondern noch stoffwechselaktiv. Für eine Vielzahl von wasserhygienisch relevanten Bakterien wie *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Campylobacter* spp. oder *Salmonella enterica* ist beschrieben worden, dass sie zum Übergang in das VBNC-Stadium befähigt sind (Oliver, 2005, 2010; Li et al., 2014). Unterschiedliche Umweltbedingungen, oft Stress-Faktoren, können den Übergang der Bakterien vom kultivierbaren Zustand in das VBNC-Stadium auslösen. In Trinkwassersystemen können dies Verschiebungen hin zu ungünstigen Umgebungstemperaturen, Nährstoffmangel oder die Anwesenheit von antimikrobiell wirksamen Substanzen wie Desinfektionsmittel oder Metall-Ionen wie  $\text{Cu}^{2+}$  sein (Oliver, 2010; Dwidjosiswojo et al., 2011). Die nicht mehr mit den konventionellen Nährmedien unter den üblichen Bedingungen kultivierbaren Bakterien im VBNC-Stadium lassen sich mit kultivierungsunabhängigen, molekularbiologischen Methoden nachweisen wie z. B. mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder mit auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basierenden Methoden. Hygienisch relevante Bakterien können daher im Trinkwassernetz durch Standardkulturverfahren unentdeckt als VBNC-Zellen im Biofilm persistieren und so ein dauerhaftes Kontaminationspotenzial für die Wasserphase darstellen. Unter für sie günstigen Umständen können sie erneut in den kultivierbaren Zustand übergehen und im Fall von Krankheitserregern auch wieder potenziell infektiös werden.

### 1.3.2 Rolle der Temperatur für das Wachstum von Bakterien

Das Wachstum von Bakterien bedeutet eine Zunahme der Anzahl von Zellen durch Zellteilung, sodass es zu einer Vermehrung der Bakterien kommt. Physikalische, chemische und biologische Faktoren bestimmen das Überleben und Wachstum von Bakterien in der Umwelt. In Trinkwasserverteilungssystemen sind hierbei insbesondere die Wassertemperatur, die Nährstoffverhältnisse, die hydraulischen Bedingungen und die Anwesenheit von Desinfektionsmitteln von Bedeutung. Episodische und saisonale Temperaturänderungen beeinflussen maßgeblich mikrobielle Prozesse sowie das Gleichgewicht und die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaften in Wassersystemen.

Die Temperaturabhängigkeit des Wachstums ist für jede Bakterienart charakteristisch und wird durch Kardinaltemperaturen in Form der minimalen, optimalen und maximalen Wachstumstemperatur beschrieben (Abbildung 1). Unter der minimalen Temperatur gibt es für den jeweiligen Organismus kein Wachstum, bei der optimalen Temperatur wächst der Organismus am schnellsten und oberhalb der maximalen Temperatur ist kein Wachstum möglich. Die optimale Temperatur liegt immer näher an der maximalen als an der minimalen Temperatur. Die Kardinaltemperaturen der einzelnen Bakterienspezies unterscheiden sich und sind für jeden Organismus charakteristisch. Die Spannbreite des Wachstums erstreckt sich für einen Organismus über einen Bereich von etwa 30 °C bis 40 °C. Die jeweiligen Minimal- und Maximaltemperaturen spiegeln im Allgemeinen die Spannbreite der Temperaturen bzw. die Durchschnittstemperaturen der natürlichen Lebensräume der Bakterien wider. Gelingen Bakterien in Temperaturbereiche unterhalb und oberhalb ihrer minimalen bzw. maximalen Wachstumstemperaturen, so können die Bakterien für eine gewisse Dauer unter diesen Umweltbedingungen überleben, z. B. im VBNC-Zustand, ohne abzusterben. Bei Veränderungen zu günstigen Umgebungstemperaturen können die Bakterien ihr Wachstum wieder aufnehmen.

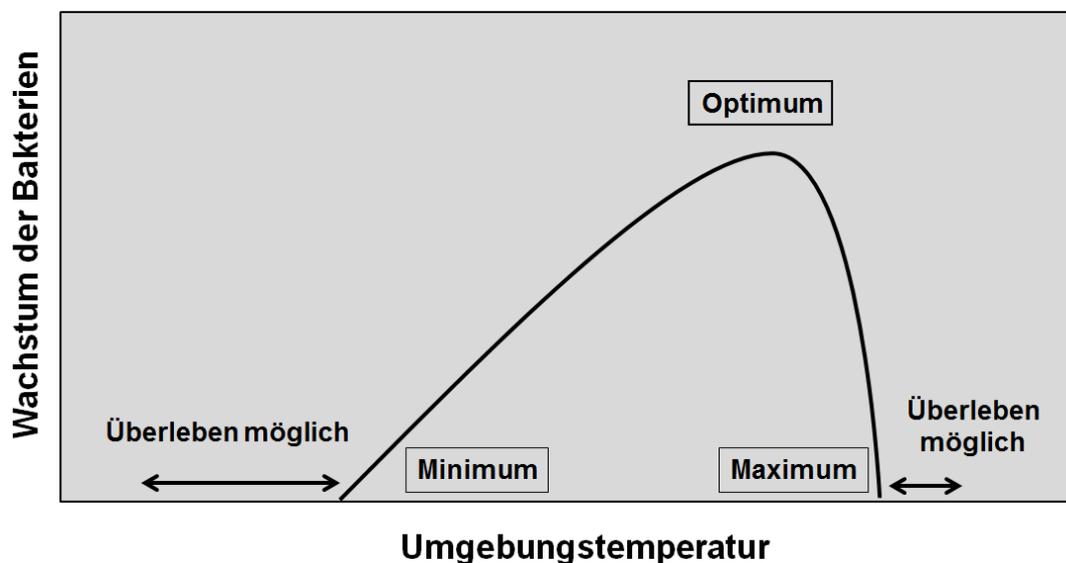


Abbildung 1: Kardinaltemperaturen für das Wachstum von Bakterien.

Unter den Temperaturklassen der Mikroorganismen im Rohwasser (Grund- und Oberflächenwasser) und im Trinkwasser finden sich vor allem psychrophile, psychrotolerante und mesophile Bakterien. Psychrophile Bakterien haben eine optimale Wachstumstemperatur bei etwa 15 °C oder darunter und eine minimale Wachstumstemperatur von 0 °C. Mesophile Bakterien weisen ein Temperaturoptimum zwischen 25 °C bis 40 °C auf. Zusätzlich gibt es psychrotolerante Organismen, deren Wachstumsoptimum im Bereich von 20 °C bis 40 °C liegt, die aber auch bei 0 °C noch wachsen können. Psychrophile und psychrotolerante Bakterien kommen häufig in Böden und Wasser gemäßigter Klimazonen vor, während mesophile Bakterien im Darmtrakt von Menschen und warmblütigen Tieren, aber auch in Böden und Wasser von gemäßigten und tropischen Breiten zu finden sind. Allerdings gibt es fließende Übergänge zwischen den Gruppen und es ist eine Anpassung von Bakterien an hö-

here oder niedrigere Temperaturen möglich. Im Trinkwasserbereich sind es überwiegend mesophile Bakterien, die von hygienischer Bedeutung sind. In Tabelle 1 sind Beispiele für meist experimentell ermittelte Kardinaltemperaturen von solchen Bakterien angegeben. Bei den Kardinaltemperaturen handelt es sich immer um ungefähre Angaben, da die Werte in Laborversuchen meist nur in größeren Temperaturintervallen von mehreren Grad Celsius bestimmt werden, die Werte von den experimentellen Bedingungen abhängen und zudem innerhalb einer Bakterienspezies stammsspezifische Unterschiede im temperaturabhängigen Wachstum auftreten. Außerdem können sich Bakterien an niedrigere Wassertemperaturen anpassen, so dass sie dann unter diesen Bedingungen ein beschleunigtes Wachstum aufweisen. Dies wurde zum Beispiel für coliforme Bakterien und Aeromonaden beschrieben (LeChevallier et al., 1996; Schubert und Matzinou, 1990).

Spezies	Minimal (°C)	Optimal (°C)	Maximal (°C)	Literatur
<b>Coliforme Bakterien fäkaler Herkunft</b>				
<i>Escherichia coli</i>	8 - 10	39	48	Leclerc et al., 2001; Madison und Martinko, 2013
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	36-38	46	Leclerc et al., 2001
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	38	44	Leclerc et al., 2001
<i>Citrobacter freundii</i>	6	34	42	Leclerc et al., 2001
<b>Umweltcoliforme Bakterien</b>				
<i>Enterobacter amnigenus</i>	12	32	38	Leclerc et al., 2001
<i>Serratia fonticola</i>	1	32-34	38	Leclerc et al., 2001
<i>Buttiauxella agrestis</i>	1	32-34	38	Leclerc et al., 2001
<i>Rahnella aquatilis</i>	1	30	38	Leclerc et al., 2001
<b>Fakultativ pathogene Umweltbakterien</b>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	37	45	Elliot, 1963; Kropinski et al., 1987
<i>Legionella pneumophila</i>	12	32-35	45	Wadowsky et al., 1985; Söderberg et al., 2004; Konishi et al., 2006; van der Kooij, 2014
<i>Aeromonas hydrophila</i> und andere <i>Aeromonas</i> -Spezies	0-15	15-35	40-55	Rouf und Rigney, 1971; Fransolet et al., 1985; Schubert und Matzinou, 1990; Eley et al., 1993; Pund und Theegarten, 2008

**Tabelle 1: Beispiele für Kardinaltemperaturen des Wachstums von hygienisch relevanten Bakterien, die im Trinkwasser auftreten können.**

Für die in Tabelle 1 aufgeführten Gruppen von hygienisch relevanten Bakterien ist bekannt, dass sie prinzipiell im VBNC-Zustand vorliegen können (Oliver, 2010). Allerdings gibt es nur sehr wenige Untersuchungen zur Induktion des VBNC-Zustands durch Veränderungen der Wassertemperatur. Besonders gut wurde dieser Effekt bei dem in Küstengewässern vorkommenden humanpathogenen Bakterium *Vibrio vulnificus* untersucht, das bei abwehrgeschwächten Menschen Durchfallerkrankungen und schwere Wundinfektionen verursachen kann. Beim Absenken der Umgebungstemperaturen von etwa 22 °C bis 25 °C auf 5 °C verlieren diese Bakterien vollständig ihre Kultivierbarkeit und gehen in den VBNC-Zustand über (Oliver et al., 1991; Oliver, 2005). Beim Anhe-

ben der Temperatur werden die Bakterien wieder kultivierbar. Es ist allerdings noch weitgehend unbekannt, inwieweit die Temperaturen speziell unter trinkwasserrelevanten Bedingungen in ähnlicher Weise den VBNC-Zustand von hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwasserverteilungssystemen beeinflussen können.

Im Zuge des Klimawandels und der damit verbundenen globalen Erwärmung wird angenommen, dass es regional zu längeren Perioden mit ansteigenden Temperaturen der Umgebung kommen kann. Die Temperaturen in Oberflächengewässern, die als Rohwasser zur Trinkwasseraufbereitung dienen, sowie in Böden, in denen die Rohrleitungen verlegt sind, haben einen Einfluss auf die Wassertemperatur im Verteilungsnetz. Somit ist bei zunehmenden Temperaturen des Rohwassers und der oberen Bodenschichten, bedingt durch den Klimawandel, ein temporärer Anstieg der Wassertemperatur in Trinkwasserverteilungssystemen denkbar (Meulemann et al., 2007; Blokker und Pieterse-Quirijns, 2013). In diesem Zusammenhang ist es daher von Interesse zu wissen, inwieweit auch das Vorkommen hygienisch relevanter Bakterien im Trinkwasser und in Biofilmen in Wasserverteilungssystemen von der Temperatur bestimmt wird und im Falle von Temperaturerhöhungen eventuell sogar begünstigt wird. Im Folgenden wird eine Übersicht zum Kenntnisstand des Temperatureinflusses auf die mikrobiologisch-hygienische Beschaffenheit von Trinkwasserverteilungssystemen gegeben unter Berücksichtigung der HPC-Bakterien, von Indikatorbakterien (z. B. coliforme Bakterien) sowie von fakultativ-pathogenen (Legionellen, *P. aeruginosa*, Aeromonaden) und obligat-pathogenen Bakterien (*Campylobacter* spp.).

### 1.3.3 Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Bakterien in Trinkwasserverteilungssystemen

In Untersuchungen, in denen ein Einfluss der Temperatur auf Bakterien im Wasser und in Biofilmen berücksichtigt worden ist, wurde das Vorkommen der Bakterien überwiegend kulturell anhand von Koloniezahlen der heterotrophen Bakterien (HPC-Bakterien) bestimmt, und nur selten wurde dabei die Gesamtheit der Mikroorganismen durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl ermittelt.

Aus Praxisbeobachtungen geht hervor, dass HPC-Bakterien sich bereits bei Kaltwassertemperaturen ab etwa 5 °C in Trinkwasserverteilungssystemen vermehren können und mit ansteigenden Temperaturen das Wachstum sowie die Stoffwechselaktivität dieser Bakterien zunehmen (Servais et al., 1992; Lund und Ormerod, 1995; van der Kooij und van der Wielen, 2013). So wurde ein Anstieg der Gesamtzellzahl in einem französischen Trinkwassernetz über einen Temperaturbereich von etwa 5 °C bis 20 °C beobachtet. In parallel durchgeführten Laborexperimenten im vergleichbaren Temperaturbereich wurden die Wachstumsraten der Bakterien im Trinkwasser bestimmt; sie lagen im Bereich von 0,005 bis 0,1 pro Stunde (entsprechend Generationszeiten der Bakterien von 7 bis 140 Stunden), wobei sie mit zunehmender Temperatur zu höheren Werten tendierten (Servais et al., 1992). Im Bereich der Endstränge von Trinkwasserverteilungssystemen in den USA wurde eine positive Korrelation zwischen der Wassertemperatur und den Koloniezahlen von HPC-Bakterien beschrieben (Carter et al., 2000; Reasoner et al., 1989). In Endsträngen mit Wassertemperaturen im Bereich zwischen 10,5 °C und 24,6 °C wurden bei Temperaturen  $\geq 15,5$  °C häufiger hohe Koloniezahlen von HPC-Bakterien (geometrisches Mittel:  $2,0 \times 10^4$  KBE/ml) gefunden im Vergleich zu niedrigeren Temperaturen (geometrisches Mittel:  $1,9 \times 10^3$  KBE/ml) (Reasoner et al., 1989). Die verlängerten Aufenthaltszeiten könnten ein Grund für die Verstärkung des Temperatureffekts in Endsträngen darstellen (Carter et al., 2000). In einer Versuchsanlage in einem Wasserwerk wurde durch eine experimentell erzeugte, sprunghafte Erhöhung der Wassertemperatur um 10 °C eine geringe Zunahme der Koloniezahlen von HPC-Bakterien sowohl unter Stagnation (einmal wöchentlich kurzzeitiger Durchfluss der Versuchsstrecken) als auch bei kontinuierlichem Durchfluss beobachtet im Vergleich zum nicht erwärmten Trinkwasser (Henning und Korth, 2013). In einigen der erwähnten Untersuchungen fiel auf, dass ein Temperatureffekt nur beobachtet wurde, wenn die Koloniezahlen der HPC-Bakterien auf dem nährstoffarmen R2A-Medium bestimmt wurden, aber nicht, wenn nährstoffreiche Agarnährmedien wie Blutagar oder Nähragar verwendet wurden (Carter et al., 2000; Henning und Korth, 2013). Dies könn-

te darauf hinweisen, dass vor allem an nährstoffarme Bedingungen angepasste Populationen von heterotrophen Bakterien auf Änderungen der Wassertemperaturen reagieren.

Da Bakterien im Wesentlichen in Biofilmen vorkommen und Biofilme ein Reservoir und somit eine Kontaminationsquelle von hygienisch relevanten Bakterien für das Trinkwasser darstellen, ist der Einfluss der Wassertemperatur insbesondere auf Trinkwasserbiofilme von Bedeutung. Aus Untersuchungen an realen Trinkwasserverteilungssystemen in verschiedenen geographischen Regionen geht hervor, dass bei relevanten Trinkwassertemperaturen Biofilme auf allen Komponenten von Trinkwassersystemen unabhängig von der Temperatur immer vorhanden sind. So wurden Biofilme in Trinkwassersystemen in den USA mit Temperaturen im Bereich von 4 °C bis 26 °C nachgewiesen (Donlan et al., 1994) oder in einem Trinkwasserverteilungssystem von Singapur bei Wassertemperaturen von 28,0 °C bis 29,2 °C (Hu et al., 2005).

Systematische Arbeiten zum Zusammenhang der Trinkwassertemperatur und der Biofilmbildung wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Dennoch gibt es aus einigen Untersuchungen an realen Verteilungssystemen sowie im Labor Hinweise zum Einfluss der Wassertemperatur auf die Entwicklung von Biofilmen. Donlan et al. (1994) beschrieben die Biofilmbildung auf Coupons aus Gusseisen, die in verschiedenen Trinkwassersystemen der Philadelphia Suburban Water Company (USA) exponiert wurden. Bezüglich der Wassertemperaturen wurde zwischen einer Kaltwasserperiode mit 4 °C bis 15 °C und einer Warmwasserperiode mit 15 °C bis 25 °C unterschieden. Die Biofilmbildung wurde anhand der flächenbezogenen Koloniezahlen der HPC-Bakterien verfolgt. Während der Warmwasserperiode wurden maximale Koloniezahlen nach etwa 30 Tagen erreicht (quasi-stationäres Gleichgewicht), während unter Kaltwasserbedingungen eine weitere Zunahme der Koloniezahlen bis über 80 Tage erfolgte. Die Koloniezahlen unter Kaltwasserbedingungen waren meist deutlich geringer als unter Warmwasserbedingungen. Ebenso war die Rate der Biofilmbildung unter Kaltwasserbedingungen niedriger als unter Warmwasserbedingungen. Bei Auftragung der Biofilmbildungsrate gegen die Wassertemperatur zeigte sich, dass über den gesamten Temperaturbereich die Rate der Biofilmbildung deutlich mit zunehmender Wassertemperatur anstieg. Andere Parameter wie der pH-Wert, die Alkalinität, die Konzentrationen von organischem Stickstoff, Nitrit, Nitrat, Gesamtphosphat, Orthophosphat und gesamten organischen Kohlenstoff korrelierten weder mit der Rate noch dem Ausmaß der Biofilmbildung. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass 1,3- bis 7,7-fach höhere Konzentrationen des zur Desinfektion des Trinkwassers eingesetzten Monochloramins in der Kaltwasserperiode im Vergleich zur Warmwasserperiode die Biofilmbildung in der Kaltwasserperiode zumindest teilweise limitiert haben könnte. Auch die Durchflussgeschwindigkeit wurde als mögliche Einflussgröße diskutiert, da ein höherer Durchfluss mit einer geringeren Biofilmbildung einherzugehen schien. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass außer der ansteigenden Wassertemperatur auch andere Faktoren die Biofilmbildung bestimmen könnten wie temperaturbedingte Unterschiede in der wirksamen Desinfektionsmittelkonzentration und der Durchflussrate, aber auch unterschiedliche Koloniezahlen im Wasser (höher unter Warmwasser- als unter Kaltwasserbedingungen) und vielleicht noch andere nicht erfasste Faktoren (Donlan et al., 1994).

In einigen Untersuchungen wurde der Einfluss der Wassertemperatur auf die Biofilmbildung anhand von Aktivitätsparametern bestimmt. Chang und Jung (2004) beschrieben den Einfluss der Temperatur auf die proteolytische Aktivität von Trinkwasserbiofilmen auf Gusseisen und PVC. Eine Zunahme von 5 °C (von 18 °C auf 23 °C) führte zu einer Zunahme der Enzymaktivität um etwa eine Zehnerpotenz, während eine Zunahme der Wassertemperatur von 23 °C auf 26 °C einen 5 bis 10fachen Anstieg der Aktivität bewirkte. Hallam et al. (2001) untersuchten die Biofilmmaktivität (gemessen als ATP/cm<sup>2</sup>) auf verschiedenen Materialien wie Polyethylen, PVC oder Zement in Biofilmmonitor-Reaktoren in einem englischen Trinkwasserverteilungssystem. Es wurde gefunden, dass die Biofilmmaktivität bei 7 °C ungefähr 50 % niedriger war als bei 17 °C. Allerdings war diese Beobachtung nur bei Chlorkonzentrationen < 0,1 mg/L möglich. Der hemmende Einfluss der Chlorkonzentrationen > 0,3 mg/L auf die Biofilmmaktivität war so ausgeprägt, dass ein möglicher Temperatureffekt nicht erkennbar wurde.

In einigen Laboruntersuchungen wurden Biofilmreaktoren verwendet, um den Einfluss der Wassertemperatur auf die Bildung von Biofilmen auf Trinkwasser exponierten Oberflächen unter kontrollierten Bedingungen zu ermitteln. Versuche mit Drehkolbenreaktoren, die mit Grundwasserbakterien beimpft und mit synthetischem Trinkwasser durchströmt wurden, zeigten, dass die Koloniezahlen (HPC) von Biofilmorganismen im quasi-stationären Gleichgewicht auf Polycarbonat-Coupons mit steigender Temperatur (8 °C, 17 °C und 26 °C) zunahm (Ollos et al., 2003). Bei 26 °C war die Koloniezahl etwa eine Zehnerpotenz höher als bei 8 °C; der Temperaturanstieg zwischen 8 °C und 17 °C war deutlicher als zwischen 17 °C und 26 °C. Die temperaturabhängige Zunahme der Koloniezahlen war bei Scherkräften von 2 N/m<sup>2</sup> ausgeprägter als bei 0,4 N/m<sup>2</sup>. Der Temperatureffekt schien im untersuchten Bereich somit bei niedrigeren Scherkräften weniger Einfluss auf die Biofilmentwicklung zu haben. Entsprechende Versuche mit realem Trinkwasser, allerdings nur im begrenzten Bereich von 16 °C bis 22 °C, zeigten keine wesentlichen Unterschiede in den Koloniezahlen der Trinkwasserbiofilme auf Polycarbonat und duktilem Gusseisen.

Ndiongue et al. (2005) untersuchten Trinkwasserbiofilme auf PVC in Drehkolbenreaktoren, die mit desinfektionsmittelfreiem Trinkwasser bei verschiedenen Temperaturen (6 °C, 12 °C und 18 °C) durchflossen wurden. Die Biofilmbildung, bestimmt anhand der Koloniezahlen (HPC), erfolgte am schnellsten bei 18 °C mit maximalen Koloniezahlen innerhalb von 20 Tagen, während die Biofilmbildung bei 6 °C und 12 °C langsamer als bei 18 °C erfolgte und maximale Koloniezahlen erst nach 30 Tagen erreicht wurden. Auch in dieser Studie wurde eine Zunahme der Konzentration der Koloniezahlen mit steigender Wassertemperatur beobachtet. Die Unterschiede der Koloniezahlen der Biofilme zwischen 6 °C und 12 °C bzw. 12 °C und 18 °C waren statistisch signifikant. Allerdings war die Zunahme der Koloniezahlen nur gering (0,5 log KBE/cm<sup>2</sup>) und wurde als nicht von Bedeutung für die Praxis bewertet. Wurden die Trinkwasserbiofilme in Gegenwart von Nährstoffen (Zugabe von Natriumacetat, 250 µg C/L) erzeugt, so wurde bei allen Temperaturen eine Erhöhung der Koloniezahlen um 0,8 bis 1,8 log KBE/mL beobachtet, wobei allerdings im Gegensatz zu nährstoffarmem Wasser keine Abhängigkeit mehr der Biofilmbildung von der Wassertemperatur auftrat.

Silhan et al. (2006) untersuchten die Biofilmbildung anhand der Koloniezahlen (HPC) und des ATP-Gehalts in kaltem Trinkwasser bei 15 °C und in erwärmtem Trinkwasser bei 35 °C unter statischen Bedingungen in Rohrstücken aus verzinktem Stahl, Polyethylen (PE), vernetztem Polyethylen (PEX) und Kupfer über maximal 58 Tage. Die Koloniezahlen der Biofilme waren immer bei 35 °C höher als bei 15 °C. Auf den metallischen Werkstoffen waren die Koloniezahlen nur leicht erhöht, während sie auf PE und PEX etwa 100fach höher bei 35 °C als bei 15 °C waren. Mittels der ATP-Messungen wurde dieser Trend bestätigt. In dieser Studie war somit eine Abhängigkeit der Biofilmbildung von der Wassertemperatur und dem Werkstoff festgestellt worden.

Insgesamt wird aus den Untersuchungen die Tendenz ersichtlich, dass im trinkwasserrelevanten Temperaturbereich ansteigende Wassertemperaturen mit einer in begrenztem Ausmaß erhöhten Konzentration und Stoffwechselaktivität von HPC-Bakterien in der Wasserphase und im Trinkwasserbiofilm einhergehen kann. Allerdings bestimmen nicht nur die Temperatur, sondern auch andere Faktoren wie vor allem die Konzentration von Nährstoffen und/oder die Anwesenheit von Desinfektionsmitteln das Vorkommen von Mikroorganismen im Trinkwasser und die Bildung von Trinkwasserbiofilmen. Daher erweist es sich unter realen Bedingungen schwierig, lediglich den Einfluss der Wassertemperatur eindeutig zu erfassen. Es ist jedoch erkennbar, dass in desinfektionsmittelfreiem Trinkwasser unter den üblichen Betriebsbedingungen bei einer Zunahme der Wassertemperaturen um einige Grad Celsius nur mit einem relativ begrenzten Wachstum von Bakterien im Wasser und in Biofilmen zu rechnen ist. Handelt es sich um ein sehr nährstoffarmes Trinkwasser und/oder sind Desinfektionsmittel vorhanden, so ist in der Regel kein nennenswertes Wachstum von HPC-Bakterien zu erwarten.

#### 1.3.4 Einfluss der Wassertemperatur auf das Vorkommen von hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwasserverteilungssystemen

##### **Coliforme Bakterien und *Escherichia coli***

Coliforme Bakterien und *E. coli* haben eine Indikatorfunktion, indem ihr Nachweis im Trinkwasser eine unerwünschte mikrobielle Verunreinigung und somit einen nicht einwandfreien Zustand im Trinkwasserverteilungssystem anzeigt. Das Vorkommen von coliformen Bakterien im Trinkwasser ist ein Hinweis auf fäkale und/oder nicht-fäkale Verunreinigungen. Coliforme Bakterien stellen für die Normalbevölkerung kein Gesundheitsrisiko dar; allerdings ist eine Gefährdung der Gesundheit von abwehrgeschwächten Personen durch einige fakultativ pathogene Spezies wie *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae* nicht auszuschließen. *E. coli*-Bakterien sind ein natürlicher Bestandteil der Darmflora vom Menschen und von warmblütigen Tieren, und ihr Nachweis im Trinkwasser ist immer ein eindeutiger Hinweis auf eine fäkale Verunreinigung. Einige fakultativ pathogene und obligat pathogene Stämme von *E. coli* können schwerwiegende Erkrankungen beim Menschen verursachen.

In einer Reihe von Praxisbeobachtungen wurden Zusammenhänge zwischen der Temperatur in realen Trinkwasserverteilungssystemen unterschiedlicher geographischer Regionen und der Häufigkeit des Auftretens von coliformen Bakterien festgestellt. In einer 18-monatigen Untersuchung von 31 Trinkwasserverteilungssystemen in den USA und Kanada wurde festgestellt, dass die Nachweishäufigkeit sowie die Konzentration coliformer Bakterien erhöht waren, wenn die Wassertemperatur 15 °C überstieg (LeChevallier et al., 1996). Es war ein statistisch signifikanter Unterschied im Vorkommen von coliformen Bakterien im Wasser < 15 °C und > 15 °C vorhanden. In Systemen mit gechlortem Trinkwasser trat eine 18fach erhöhte Nachweishäufigkeit von Coliformen auf, wenn die Wassertemperatur aus dem Bereich von 0 °C bis 5 °C auf Werte über 20 °C anstieg. Es wurde aber darauf hingewiesen, dass abhängig von der geographischen Lage auch bei niedrigeren Wassertemperaturen mit coliformen Bakterien gerechnet werden kann, wenn sie sich an niedrige Wassertemperaturen angepasst haben. So wurde in Trinkwassersystemen in nördlichen Breiten die höchsten Coliformen-Konzentrationen zwischen 10 °C und 15 °C gefunden. Smith (2002) berichtete über eine saisonal erhöhte Befundhäufigkeit coliformer Bakterien bei höheren Temperaturen im Trinkwasserverteilungssystem von New Haven (Connecticut, USA) im Untersuchungszeitraum von 1992 bis 1998. 73 % von 218 Coliformen-positiven Wasserproben entfielen auf die Monate Juni bis November mit einer durchschnittlichen Wassertemperatur von  $17,1 \pm 3,5$  °C; die höchsten Coliformen-Konzentrationen traten jeweils im September bei einer Durchschnittstemperatur des Trinkwassers von  $19,9 \pm 2,6$  °C auf.

In französischen Trinkwasserverteilungssystemen wurde eine erhöhte Häufigkeit positiver Coliformen-Befunde im Wasser bei Temperaturen  $\geq 15$  °C (76 % aller Wasserproben; Volk und Joret, 1994) bzw. in einer anderen Untersuchung im Bereich von 15 °C – 25 °C gefunden (71 % aller Wasserproben; Batté et al., 2006). Andere, mit dem Vorkommen von Coliformen assoziierte, Faktoren waren erhöhte Aufenthaltszeiten des Wassers, geringe Desinfektionsmittelkonzentration (< 0,1 mg/L freies Chlor), erhöhte Konzentrationen mikrobiell verwertbarer organischer Substanzen (BDOC) und Gesamtzellzahlen  $> 1,6 \times 10^5$  Zellen pro mL (Volk und Joret, 1994; Batté et al., 2006). In einem argentinischen Trinkwassersystem (La Plata) wurden die höchsten positiven Befunde coliformer Bakterien im Sommer bei einer Durchschnittstemperatur von 21,6 °C erhalten und die höchsten negativen Befunde im Winter bei einer Durchschnittstemperatur von 10,6 °C (Córdoba et al., 2010). Bei den nachgewiesenen Coliformen-Arten handelte es sich um *Enterobacter cloacae* (häufig im Sommer), *Enterobacter aerogenes* (häufig im Winter), *Enterobacter agglomerans* (häufig im Herbst) und *Klebsiella oxytoca* (häufig im Winter und Frühjahr). Diese unterschiedliche saisonale Häufigkeit wurde als Hinweis auf eine mögliche Abhängigkeit einzelner Coliformen-Spezies von der Wassertemperatur angesehen. *E. coli* wurde in keiner Wasserprobe nachgewiesen.

Auch in Laborversuchen wurde ein Einfluss der Wassertemperatur auf das Wachstum von coliformen Bakterien festgestellt. Fransolet et al. (1985) untersuchten die Vermehrung von Reinkulturen von *E. coli* und *E. aerogenes* (Wasserisolate), suspendiert in aufbereitetem Trinkwasser, im Temperaturbe-

reich von 15,0 °C bis maximal 32,5 °C. In dem verwendeten Wasser wiesen beide Arten noch ein langsames Wachstum bei 15 °C auf und mit zunehmender Wassertemperatur erfolgte ein Anstieg der Wachstumsrate bis etwa 27,5 °C. Diese Versuche bestätigen die aus Praxisbeobachtungen abgeleitete Erkenntnis, dass coliforme Bakterien in realen Trinkwasserverteilungssystemen das Potenzial haben, sich bei Temperaturen ab 15 °C vermehren zu können.

In Laboruntersuchungen wurde festgestellt, dass unter Bedingungen, unter denen keine Vermehrung von *E. coli* möglich ist, die Konzentration der Bakterien in kultivierbarer Form mit zunehmender Wassertemperatur abnimmt. Silhan et al. (2006) fanden, dass bei statischer Bebrütung von Trinkwasser, angeimpft mit *E. coli*, in Rohren aus verzinktem Stahl, PE und PEX die Bakterien in kultivierbarer Form länger bei 15 °C als bei 35 °C überlebten. Bei 15 °C war *E. coli* mehr als 4 Tage in Rohren aus verzinktem Stahl und 8 Tage in PE-Rohren nachweisbar, während sie bei 35 °C bereits nach 2 Tagen nicht mehr nachgewiesen wurden. In einer anderen Untersuchung wurde für *E. coli* gezeigt, dass das Überleben der Bakterien im kultivierbaren Zustand unter nährstoffarmen Bedingungen (0,9 % NaCl-Lösung) über 100 Tage bei 5 °C am höchsten war und mit zunehmenden Temperaturen von 20 °C, 25 °C und 37 °C die Kultivierbarkeit von *E. coli* stark abnahm (Arana et al., 2010). Allerdings wurde bei den höheren Temperaturen (25 °C und 37 °C) keine Abnahme der Konzentration membranintakter Zellen festgestellt, was darauf hinwies, dass der größte Teil der *E. coli*-Population zwar nicht mehr kultivierbar war, aber noch Vitalität aufwies und somit im VBNC-Zustand vorlag. Die Möglichkeit des Übergangs von *E. coli* in einen nicht kultivierbaren Zustand im Trinkwasser während der Inkubation über 20 bis 60 Tage bei 10 °C wurde von Bjergbæk und Roslev (2005) beschrieben. Wenn somit durch Nährstoffmangel, wie er üblicherweise im Trinkwasser vorherrscht, ein Wachstum von *E. coli* nicht möglich ist, so können die Bakterien dennoch temperaturabhängig über einen gewissen Zeitraum in kultivierbarer Form und/oder im VBNC-Zustand überleben.

Zur Anhängigkeit der Persistenz von coliformen Bakterien in Biofilmen von der Umgebungstemperatur gibt es nur wenig publizierte Informationen. Korth et al. (2008) berichteten, dass nach Animpfung von mehrere Monate alten Biofilmen auf Edelstahl mit *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* und *Enterobacter amnigenus* diese Bakterien anfänglich kulturell nachgewiesen wurden, es dann aber zu einer deutlichen Abnahme innerhalb weniger Tage kam. Es wurde keine Vermehrung bei den untersuchten Wassertemperaturen von 10 °C und 20 °C nachgewiesen. Es wurde dabei auch kein Einfluss der Nährstoffkonzentration (Zugabe zum Trinkwasser von bis zu 150 µg/L C) festgestellt. Als Ursache für die fehlende Vermehrung der coliformen Bakterien, selbst bei Zugabe von Nährstoffen, wurde der Konkurrenzeffekt mit der natürlichen Biozönose im Biofilm angesehen.

Insgesamt weisen die Literaturangaben darauf hin, dass unter bestimmten Bedingungen mit Zunahme der Wassertemperaturen ab etwa 15 °C eine erhöhte Befundhäufigkeit coliformer Bakterien (mit Ausnahme von *E. coli*) in Trinkwasserverteilungssystemen nicht auszuschließen ist. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus Praxisbeobachtungen und Laborversuchen werden in einem Handbuch der American Water Works Association Wassertemperaturen  $\geq 15$  °C als eine unter mehreren trinkwasserrelevanten Bedingungen angegeben, unter denen ein Auftreten von coliformen Bakterien in Trinkwasserverteilungssystemen erwartet werden kann (Fox und Reasoner, 2006).

### **Legionellen**

Legionellen sind fakultativ-pathogene Bakterien, die durch Inhalation von Aerosolen auf den Menschen übertragen werden und zu Erkrankungen der Atemwege (Legionärskrankheit, Pontiac-Fieber) führen können. *Legionella pneumophila* ist die medizinisch und epidemiologisch wichtigste Art in den meisten geographischen Regionen. Legionellen kommen verbreitet an natürlichen aquatischen Standorten über einen weiten Temperaturbereich vor. So wurde *L. pneumophila* in Wasserproben aus Oberflächengewässern mit Temperaturen zwischen 5 °C und 63 °C nachgewiesen (Fliermans et al., 1981). Legionellen können Trinkwassersysteme besiedeln und werden mit erhöhter Häufigkeit im erwärmten Trinkwasser der Trinkwasser-Installationen von Gebäuden gefunden (van der Kooij,

2014). Von besonderer hygienischer Bedeutung ist das Vorkommen von *L. pneumophila* im Warmwasserbereich von Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen. Legionellen sind typische Biofilmbewohner. Unter trinkwasserrelevanten Bedingungen vermehren sich Legionellen normalerweise nicht frei im Wasser, sondern vorzugsweise in Biofilmen und dort intrazellulär in Protozoen, meist Amöben, welche natürliche Wirtsorganismen für Legionellen darstellen (Abdel-Nour et al., 2013). Günstige Wassertemperaturen für die Vermehrung von *L. pneumophila* und seinen Wirten liegen im Bereich von etwa 25 °C bis 37 °C. Wadowsky et al. (1985) ermittelten die durchschnittlichen Verdopplungszeiten von *L. pneumophila* in Trinkwasser; sie betragen 36,1 h bei 25 °C, 16,8 h bei 32 °C und 35 °C und 28,8 h bei 37 °C. Ein Wachstum ist noch bis maximal etwa 45 °C möglich. Allerdings kann der Temperaturbereich der Vermehrung abhängig vom Stamm und den begleitenden Mikroorganismen variieren (Wadowsky et al., 1985). Es mehren sich die Hinweise, dass *L. pneumophila* und andere Legionellenarten mit hoher Häufigkeit auch in kaltem Trinkwasser zu finden sind. In einer Untersuchung der Trinkwasser-Installationen von vier medizinischen Einrichtungen (Hessen, Deutschland) wurden *L. pneumophila* und andere Legionellenarten kulturell in Kaltwasserproben ab 7 °C nachgewiesen (Arvand et al., 2011). In aufbereiteten Trinkwässern mit Temperaturen unter 15 °C aus verschiedenen Wasserwerken in den Niederlanden wurden Legionellen kultivierungsunabhängig mit der PCR-Methode in Konzentrationen von etwa  $10^4$  Zellen pro Liter nachgewiesen, während sie kulturell nicht nachweisbar waren (Wullings und van der Kooij, 2006). Die Art *L. pneumophila* wurde weder kulturell noch mit der PCR-Methode nachgewiesen. In einer weiteren breit angelegten Studie wurden Trinkwasserproben (überwiegend Kaltwasser) von 250 öffentlichen Gebäuden an unterschiedlichen Orten in den Niederlanden untersucht. Dabei wurden Legionellen in 2,2 % von 357 Wasserproben kulturell und in 87,1 % der Proben mit der PCR nachgewiesen (Diederer et al., 2007). Es handelte sich meist um andere Arten als *L. pneumophila*. Die Untersuchungen zum Vorkommen von Legionellen im Trinkwasser erfolgten üblicherweise an Verteilungssystemen in gemäßigten Breiten. In einem Fall wurde jedoch eine Bestandsaufnahme der Verteilung von Legionellen in drei Trinkwassersystemen in einer tropischen Region (Karibik) mit etwa 10 °C bis 15 °C höheren Wassertemperaturen als in gemäßigten Zonen berichtet, was Vergleiche zum möglichen Einfluss erhöhter Wassertemperaturen auf die mikrobiologische Wasserbeschaffenheit in realen Trinkwassersystemen erlaubt (Valster et al., 2011). Es handelte sich in allen Fällen um nährstoffarmes Trinkwasser mit Temperaturen im Bereich von 28 °C und 34 °C. Die Konzentrationen kultivierbarer Legionellen (*Legionella* spp.) in den drei Trinkwassernetzen waren  $1,3 \times 10^4$  KBE/L,  $7,1 \times 10^3$  KBE/L bzw.  $7,7 \times 10^2$  KBE/L (Median-Werte). Der Anteil der Art *L. pneumophila* betrug in zwei Verteilungssystemen jeweils 80 % bis 100 % und in einem System 40 % bis 100 %. Gleichzeitig wurden im Trinkwasser Amöben wie *Hartmannella vermiformis* nachgewiesen, welche als potenzielle Wirtsorganismen für die Vermehrung von Legionellen infrage kommen. Diese Befunde weisen darauf hin, dass erhöhte Wassertemperaturen einen derjenigen Umweltfaktoren darstellen, die das Vorkommen von *L. pneumophila* und anderen Legionellen im kultivierbaren Zustand in Trinkwasserverteilungssystemen fördern.

Wenn nicht ausreichend geeignete Nährstoffe vorhanden sind, können Legionellen in Trinkwasser über Wochen bis Monate überleben ohne sich zu vermehren, wobei über diesen Zeitraum die Kultivierbarkeit je nach Wasserbeschaffenheit konstant bleibt oder abnimmt. Die Persistenz im kultivierbaren Zustand ist dann von der Wassertemperatur abhängig. Söderberg et al. (2008) fanden, dass *L. pneumophila* bei 37 °C für 20 bis 38 Tage im kultivierbaren Zustand vorlagen, während bei 25 °C, 17 °C und 4 °C die Bakterien deutlich länger bis zu 318 Tage (Ende der Beobachtungsdauer) kultivierbar waren. In einer anderen Arbeit wurde das Überleben von *L. pneumophila* (Serogruppe 1) bei verschiedenen Temperaturen in sterilem (autoklaviertem) Trinkwasser untersucht (Ohno et al., 2003). Ausgehend von einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/mL wurde bei 42 °C über 60 Tage eine vollständige Abnahme (> 6 Log-Stufen) der Kultivierbarkeit beobachtet, während nur eine geringe Abnahme um 1,89 bzw. 1,27 Log-Stufen bei 35 °C und 25 °C auftrat. Die Vitalität der Bakterien (Konzentration von Zellen mit intakter Zellmembran, ermittelt mit dem Live/Dead-Kit) zeigte bei allen Temperaturen jedoch nur eine geringe Abnahme über den Untersuchungszeitraum. Die Zugabe von Amöben (*Acanthamoeba castellanii*) zu Ansätzen bei 42 °C mit nicht mehr kultivierbaren Bakterien bewirkte

innerhalb von 2 Tagen die Wiederkultivierbarkeit eines Teils der Bakterienpopulation. Steinert et al. (1997) beobachteten für *L. pneumophila* eine vollständige Abnahme der Kultivierbarkeit von  $10^4$  Zellen/mL über 125 Tage bei 20 °C in sterilem Trinkwasser und eine Rückkehr zur Kultivierbarkeit durch die Zugabe von Amöben (*A. castellanii*). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass bei trinkwasserrelevanten Temperaturen eine Persistenz von *L. pneumophila* im Trinkwasser über Wochen bis Monate möglich ist, wobei die Legionellen ihre Kultivierbarkeit temporär verlieren und in den VBNC-Zustand übergehen, aber unter günstigen Bedingungen die Kultivierbarkeit auch wiedererlangen können.

In Laborversuchen mit Kulturen auf Agarnährmedium (BCYE-Agar) oder in Flüssigmedien (BYE-Medium) wurde ein Wachstum von *L. pneumophila* bei Temperaturen zwischen 12 °C und 44 °C festgestellt, während bei 4 °C kein Wachstum erfolgte (Söderberg et al., 2004; Konishi et al., 2006). Mit Zunahme der Bebrütungstemperaturen (12 °C, 17 °C und 25 °C) war eine deutliche Steigerung der Vermehrung zu verzeichnen. Andere Legionellenarten sind auch in der Lage bei suboptimalen Temperaturen in Nährmedien zu wachsen. So wurde festgestellt, dass bei 17 °C folgende Spezies noch gutes Wachstum zeigten: *L. anisa*, *L. cincinnatiensis*, *L. erythra*, *L. feelei*, *L. longbeachae*, *L. micdadei*, *L. moravica* und *L. parisiensis* (Söderberg et al., 2008). Dies bedeutet, dass die Fähigkeit zur Vermehrung bei niedrigen Temperaturen unter Legionellen weit verbreitet ist; dies trifft aber nicht für alle Spezies zu. Das Wachstum bei niedrigen Temperaturen entspricht Beobachtungen, in denen auch andere Arten als *L. pneumophila* in vielen natürlichen Wässern und Trinkwassersystemen bei Temperaturen unter 15 °C nachgewiesen wurden, sowohl in der Wasserphase als auch in Biofilmen (Fliermans et al., 1981; Wullings und van der Kooij, 2006; Wullings et al., 2011).

Für die Fähigkeit von *L. pneumophila* bei niedrigeren Temperaturen zu wachsen, scheint die Bildung von extrazellulären Substanzen eine Rolle zu spielen, die über das Typ 2-Sekretionssystem (T2SS) ausgeschieden werden (Söderberg et al., 2004; 2008). Es wurde nämlich gezeigt, dass bei suboptimalen Wachstumstemperaturen (17 °C und 25 °C) das T2SS die Vermehrung von *L. pneumophila* fördert, während es bei 30 °C bis 37 °C keinen Einfluss auf das Wachstum hat. Es wird angenommen, dass die Vermehrung bei niedrigen Temperaturen durch die Expression des T2SS und einige der extrazellulären Proteine, die durch das T2SS ausgeschieden werden, ermöglicht oder gefördert wird (Söderberg et al., 2008). Bei den durch das T2SS ausgeschiedenen Proteinen handelt es sich um Enzyme, die organische Makromoleküle abbauen und somit an der Nährstoffverwertung beteiligt sind, sowie um Pathogenitätsfaktoren. Aber auch die Beteiligung einer Reihe zellgebundener Enzyme und anderer Proteine wurde für die Anpassung von *L. pneumophila* an niedrige Temperaturen identifiziert (Söderberg und Cianciotto, 2010), was auf komplexe Mechanismen der Temperaturanpassung bei *L. pneumophila* hinweist, die jedoch im Detail noch nicht bekannt sind.

Legionellen sind typische Biofilmorganismen, die in der Lage sind sowohl Reinkulturbiofilme zu bilden als auch bereits etablierte Biofilme aus mikrobiellen Mischpopulationen zu besiedeln (Abdel-Nour et al., 2013). In Laborversuchen wurde die Biofilmbildung von Reinkulturen von *L. pneumophila* und anderen Legionellenarten bei Temperaturen im Bereich von 25 °C bis 42 °C gezeigt (Piao et al., 2006; Konishi et al., 2006). Die Geschwindigkeit der Biofilmbildung, die gebildete Biomasse und die Stabilität der angehefteten Biofilme von *L. pneumophila* war abhängig von der Wachstumstemperatur und dem Aufwuchsmaterial. Auf Glas und Polystyrol war die Biofilmbildung bei 37 °C und 42 °C deutlich höher als bei 25 °C, wohingegen sie auf Polypropylen bei 25 °C höher als bei den beiden anderen Temperaturen war (Piao et al., 2006). Die Wachstumstemperatur hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Morphologie der Biofilme von *L. pneumophila*. Bei 37 °C bis 42 °C wiesen die Biofilme eine myzelartige Struktur auf und bestanden aus einem Geflecht von filamentösen Bakterien, während die bei 25 °C gewachsenen Biofilme dünner waren und aus stäbchenförmigen Zellen bestanden (Piao et al., 2006; Konishi et al., 2006).

Zur Temperaturabhängigkeit des Vorkommens von Legionellen in Trinkwasserbiofilmen gibt es relativ wenige Untersuchungen. In einem Chemostat-Modellsystem wurden natürlich vorkommende Trinkwasserpopulationen auf Werkstoffen der Trinkwasser-Installation bei verschiedenen Temperaturen

angezüchtet. Diese Populationen enthielten *L. pneumophila*-Bakterien, die in den Biofilmen bei Wassertemperaturen von 20 °C, 30 °C und 50 °C auf Polybutylen und chloriertem PVC über 21 Tage der Versuchsdauer nachgewiesen wurden, nicht aber bei einer Temperatur von 60 °C (Rogers et al., 1994a). Die höchsten Legionellen-Konzentrationen im Biofilm traten bei 40 °C auf. Auf Kupfer wurden nur bei 40 °C *L. pneumophila* nachgewiesen, in einer relativ geringen Konzentration im Vergleich zu Biofilmen auf Polybutylen und PVC.

*L. pneumophila* ist auch in der Lage, sich im Kaltwasserbereich in bereits bestehende Trinkwasserbiofilme einzunisten und dann dort über Wochen bis Monate zu persistieren (Gião et al., 2009, Moritz et al., 2010). Moritz et al. (2010) beschrieben die Einnistung und Persistenz von *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen über 4 Wochen bei einer durchschnittlichen Wassertemperatur von 18,8 °C. Gião et al. (2009) zeigten, dass *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen über 32 Tage bei 15 °C und 20 °C (in Plateau-Phase ca.  $10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup>) persistierte. Bei 15 °C war der Anteil von *L. pneumophila* an der Gesamtzellzahl höher als bei 20 °C. Die Schlussfolgerung der Autoren war, dass unter bestimmten Bedingungen die niedrigere Temperatur die Einnistung der Legionellen in den Biofilm begünstigte.

Wie oben erwähnt wird die Persistenz von *L. pneumophila* in Biofilmen von Wassersystemen durch die Wechselwirkung mit Amöben beeinflusst. Versuche an planktonischen Ko-Kulturen aus *L. pneumophila* und der Amöbe *A. castellanii* zeigten, dass das Überleben der Legionellen in Gegenwart der Amöben temperaturabhängig ist (Ohno et al., 2008). Bei 25 °C kam es zu einer Infektion der Trophozoiten der Amöben und einer intrazellulären Vermehrung in den Amöben, während es bei 15 °C und 20 °C zu einer Abnahme der Konzentration der Legionellen kam, was auf eine Abtötung (aktive Verdauung) der Legionellen durch die Amöben zurückgeführt wurde. Außerdem wurde bei den niedrigen Temperaturen die Enzystierung der Amöben beobachtet, wobei Legionellen durch Vesikelbildung aus den Amöbenzellen freigesetzt und damit eliminiert wurden. Diese Befunde deuten an, dass Amöben das Überleben von *L. pneumophila* in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur maßgeblich beeinflussen können. Die Virulenz von *L. pneumophila* ist ebenfalls temperaturabhängig. So wurde berichtet, dass Legionellen, die bei 37 °C angezüchtet wurden, eine deutlich höhere Virulenz aufwiesen (Tod von Meerschweinchen durch Inhalation von legionellenhaltigen Aerosolen) als Legionellen, die bei 24 °C angezüchtet worden waren (Mauchline et al., 1994). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Virulenz von *L. pneumophila* mit zunehmender Wachstumstemperatur zunimmt. In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass es auch bei niedrigen Temperaturen von 22 °C bzw. 25 °C zu einer Vermehrung von *L. pneumophila* in den Amöben *A. castellanii* und *H. vermiformis* durch *L. pneumophila* kam (Söderberg et al., 2008). Für die intrazelluläre Vermehrung bei diesen suboptimalen Wachstumstemperaturen ist ein funktionelles T2SS der Bakterien notwendig.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Legionellen in Trinkwasserverteilungssystemen unter den dort üblichen Temperaturbedingungen im Trinkwasser und vor allem in Biofilmen verbreitet vorkommen. In kaltem Trinkwasser handelt es sich in der Mehrheit meist nicht um *L. pneumophila*, sondern um andere Legionellenarten in einem nicht kultivierbaren Zustand. Kommt es zur Erwärmung von Trinkwasser mit Temperaturen über 25 °C, besteht ein potenzielles Risiko, dass unter günstigen Bedingungen (genügend Nährstoffe, Anwesenheit von Amöben als Wirte im Biofilm) ein Wachstum der Legionellen erfolgen kann und dabei der Anteil der hygienisch wichtigen Spezies *L. pneumophila* in Bezug auf andere Legionellenarten deutlich zunimmt.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* verursacht eine Reihe unterschiedlicher akuter und chronischer Erkrankungen, insbesondere bei abwehrgeschwächten Personen und Menschen mit anderen Grunderkrankungen. Beispiele sind Atemwegserkrankungen von Patienten mit Mukoviszidose und intubierten Patienten, Harnwegsinfektionen und Wundinfektionen; bei Menschen ohne prädisponierende Faktoren können Folliculitis sowie Infektionen der Augen und Ohren (Otitis externa) auftreten.

*P. aeruginosa* zählt zu fakultativ pathogenen Umweltbakterien, welche über ein Vermehrungspotenzial in Trinkwassersystemen verfügen (Mena und Gerba, 2009; Wingender et al., 2009). *P. aeruginosa* ist über einen weiten Bereich von Umgebungstemperaturen vermehrungsfähig, wie sie in wasserführenden Systemen anzutreffen sind (Rajkowski und Rice, 2001). Die minimale Wachstumstemperatur liegt bei etwa 9 °C (Elliot, 1963), aber auch bei 45 °C erfolgt noch eine Vermehrung (Kropinski et al., 1987). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei etwa 37 °C. In Wachstumsexperimenten in einem Vollmedium (CASO-Bouillon) betragen bei 10 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C und 45 °C die Generationszeiten von *P. aeruginosa* 2,1 Tage, 225 min, 96 min, 54 min bzw. 98 min (Kropinski et al., 1987). Es wurde keine Vermehrung bei 4 °C oder 50 °C festgestellt. In nährstoffarmer Umgebung wie destilliertem Wasser kann *P. aeruginosa* für mindestens einen Monat bei 10 °C bis 37 °C überleben, ohne eine deutliche Abnahme der Kultivierbarkeit aufzuweisen (Boyle, 1991). In gereinigtem Abwasser („reconditioned wastewater“) wies *P. aeruginosa* ein geringes Wachstum über 12 Tage im Bereich von 12 °C bis 32 °C auf; ohne sich zu vermehren überlebten die Bakterien bei niedrigen Temperaturen von 4,1 °C bis 9 °C und bei 45 °C über den untersuchten Zeitraum von 21 Tagen (Rajkowski und Rice, 2001). Erst ab einer Temperatur von 55 °C tritt eine Inaktivierung von *P. aeruginosa* auf. In Laborversuchen wurde festgestellt, dass eine Abnahme der Konzentration von in entionisiertem Wasser suspendierten Bakterien um 4 Zehnerpotenzen bei 55 °C innerhalb von etwa 20 min, bei 60 °C innerhalb von 3 min und bei 65 °C innerhalb von 20 Sekunden erfolgte (Spinks, 2006).

Soweit untersucht sind in Verteilungssystemen von Ländern mit gemäßigttem Klima positive Befunde von kulturell nachgewiesenen *P. aeruginosa* relativ selten, z. B. 0,1 % (von 19.853 Proben) in Kanada (Clark et al., 1982) oder 0,9 % (von 5.069 Proben) in Deutschland (Wingender et al., 2009), während die positiven Befunde in Leitungssystemen tropischer Gebiete deutlich höher liegen können. So wurde berichtet, dass in ca. 32 % von 43 Leitungswasserproben in Togo mit Wassertemperaturen von 26 °C bis 32 °C *P. aeruginosa* nachweisbar war (Schubert und Scheiber, 1975). Da in dieser Region die Rohwässer (Grund- und Oberflächenwasser) meist niedrigere Temperaturen und immer deutlich seltener positive *P. aeruginosa*-Befunde aufwiesen als das Trinkwasser, wurde eine Begünstigung der Vermehrung dieser Bakterien im Leitungssystem vermutet. Allerdings wurden andere potenzielle Einflussfaktoren wie die Nährstoffsituation nicht berücksichtigt.

*P. aeruginosa* ist ein typisches biofilmbildendes Bakterium. Zur Temperaturabhängigkeit des Vorkommens von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen gibt es jedoch wenige Informationen. Unter Verwendung von Laborreaktorsystemen wurde gezeigt, dass Reinkulturen von *P. aeruginosa* bei verschiedenen Temperaturen Biofilme auf unterschiedlichen Materialien bilden, und dass sich *P. aeruginosa* in bereits bestehende mikrobielle Biofilme einnisten kann. In Siliconschläuchen bildete *P. aeruginosa* Biofilme bei 27 °C in einem synthetischen Nährmedium mit 1 mM Citrat als einziger C-Quelle (Kroukamp et al., 2010). In einem Chemostat-Modellsystem wurden Biofilme aus natürlich vorkommenden Trinkwasserpopulationen auf Materialien der Trinkwasser-Installation angezüchtet. *P. aeruginosa* wurde unter den identifizierten Bakterien in Biofilmen auf Polybutylen nachgewiesen, die bei 20 °C, 40 °C und 50 °C gewachsen waren, nicht aber in Biofilmen bei Wassertemperaturen von 60 °C (Rogers et al., 1994 a). Bei 30 °C wurde *P. aeruginosa* in Biofilmen auf Polypropylen, Polyethylen und mildem Stahl gefunden (Rogers et al., 1994b). Die Persistenz von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen über mehrere Wochen unter Kaltwasserbedingungen bei durchschnittlich 19 °C wurde von Bressler et al. (2009) und Moritz et al. (2010) beschrieben.

Ebenso wie bei *L. pneumophila* wurde auch für *P. aeruginosa* festgestellt, dass bei suboptimaler Temperatur von 25 °C im Vergleich zu der optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C eine Stimulierung der Produktion von extrazellulären Produkten über verschiedene Sekretionssysteme erfolgt (Termine und Michel, 2009). Es handelt sich um die Proteasen AprA (T1SS) und PrpL (T2SS) sowie ein Hämolyisin-koreguliertes Protein (T4SS). Solche Substanzen könnten an der Verwertung von Nährstoffen beteiligt sein sowie als Pathogenitätsfaktoren wirken. Die Stimulierung der Bildung von sekretierten Produkten unter Bedingungen erniedrigter Temperaturen könnte für *P. aeruginosa* einen Über-

Lebensvorteil gegenüber anderen Umweltbakterien ermöglichen und die Infektionswahrscheinlichkeit begünstigen.

### **Aeromonaden**

Viele mesophile *Aeromonas*-Arten sind fakultativ-pathogene Bakterien, die beim Menschen Erkrankungen wie Magen-Darm-Infektionen, Wundinfektionen und Infektionen der inneren Organe sowie sekundär Septikämien verursachen (Pund und Theegarten, 2008). Spezies der Gattung *Aeromonas* (Aeromonaden) kommen autochthon in der aquatischen Umwelt vor und werden in Trinkwassersystemen nachgewiesen. In Rohrleitungen können sie in Trinkwasserbiofilmen vorkommen. Aeromonaden verwerten ein weites Spektrum an organischen Substanzen als Nährstoffe in geringen Konzentrationen, was eine Persistenz oder Vermehrung in Trinkwassersystemen begünstigt.

In Laborversuchen wurde die Kardinaltemperaturen für das Wachstum von *A. hydrophila* und *A. salmonicida* bestimmt (Rouf und Rigney, 1971). Innerhalb der Spezies traten stammspezifische Unterschiede auf. Für *A. hydrophila* lagen die minimalen, optimalen und maximalen Wachstumstemperaturen jeweils zwischen 0 °C und 15 °C, 15° und 35 °C bzw. 40 °C und 55 °C, und für *A. salmonicida* zwischen 5 °C und 15 °C, 25 °C und 35 °C bzw. 35 °C und 45 °C. In einer anderen Untersuchung wurde in Laborversuchen die Vermehrung von *A. hydrophila*, *A. sobria* und *A. caviae* in einem Flüssignährmedium bei 4 °C, 30 °C und 37 °C beschrieben (Eley et al., 1993). Auch hier wurde bei 4 °C noch eine Vermehrung der Bakterien gemessen; in Wachstumsversuchen wurden hierbei nach 14 Tagen Zelldichten von  $10^8$  bis  $10^9$  KBE/mL erreicht. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass ein Teil der Stämme von *A. hydrophila* und *A. sobria* ein Cytotoxin bei allen Temperaturen produzierte. Batchversuche mit *A. hydrophila* (Wasserisolat), suspendiert in aufbereitetem Wasser, zeigte eine deutliche Vermehrung der Bakterien im untersuchten Temperaturbereich von 15,0 °C bis 27,5 °C mit einem Anstieg der Wachstumsrate mit zunehmender Temperatur bis zu 25,0 °C (Fransolet et al., 1985). Die Wachstumsrate war deutlich höher als diejenige von *E. coli* und *E. aerogenes*, was auf eine schnellere Vermehrung von *A. hydrophila*-Bakterien im Vergleich zu coliformen Bakterien in Wasser hinweist. In einer anderen Arbeit wurde ebenfalls die Vermehrung verschiedener Stämme von *A. hydrophila* bei 15 °C in unterschiedlichen Trinkwässern bei niedrigen Kohlenstoffkonzentrationen von einigen µg C pro Liter beobachtet (van der Kooij und Hijnen, 1988). *A. hydrophila*-Bakterien, die an eine Wachstumstemperatur von 10 °C angepasst waren, wiesen eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf, wenn sie anschließend ansteigenden Temperaturen ausgesetzt waren im Vergleich zu Bakterien, die vorher bei 30 °C angezüchtet wurden (Schubert und Matzinou, 1990). Es wurde daraus geschlossen, dass an niedrigere Wassertemperaturen angepasste *A. hydrophila* sich relativ schnell vermehren können, wenn die Umgebungstemperatur steigt, was auch einhergeht mit einer erhöhten Pathogenität.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Temperatur einen wichtigen Faktor für das Vorkommen von Aeromonaden in Trinkwassersystemen darstellen kann, was durch Praxisbeobachtungen bestätigt wurde. In einigen Ländern wurde eine erhöhte Nachweishäufigkeit im Sommer und/oder bei höheren Wassertemperaturen beobachtet. Da selbst bei niedrigen Temperaturen eine Vermehrung der Aeromonaden möglich ist, besteht allerdings auch während der kalten Jahreszeit das Risiko des Vorkommens von Aeromonaden in Trinkwassersystemen. Im Allgemeinen erhöhen Temperaturen über 14 °C und, im Fall gechlorten Wassers, Chlorkonzentrationen unter 0,1 mg/L und verlängerte Aufenthaltszeiten des Wassers das Risiko für das Auftreten von Aeromonaden in Trinkwasserverteilungssystemen (Pund und Theegarten, 2008). Im Trinkwasserverteilungssystem von Perth (Australien) erfolgte der Nachweis von *Aeromonas* spp. erst bei Wassertemperaturen über 14,5 °C in Wasserproben, die aus dem chlorfreien Bereich des Systems stammten (Burke et al., 1984). In einer Untersuchung von verschiedenen Trinkwasserverteilungssystemen in den Niederlanden wurden die höchsten *Aeromonas*-Konzentrationen im Spätsommer gemessen, wenn auch die Wassertemperaturen am höchsten waren (Havelaar et al., 1990). In einem schottischen Trinkwasserverteilungssystem war die Nachweishäufigkeit von *Aeromonas* im Sommer bei Wassertemperaturen über

12 °C deutlich höher als im Winter bei niedrigeren Temperaturen (Gavriel et al., 1998). Die Nachweishäufigkeit nahm allgemein mit zunehmenden Chlorkonzentrationen ab, obwohl auch an einigen Stellen im Verteilungsnetz trotz der Anwesenheit von Chlor noch *Aeromonas* nachgewiesen wurde. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass stärkere und länger auftretende Niederschlagsereignisse mit einer Zunahme des Nachweises von *Aeromonas* im Trinkwassernetz einhergingen. Als mögliche Erklärung wurde aufgrund ungenügender Wasseraufbereitung die Infiltration von Aeromonaden aus dem Rohwasser sowie der Eintrag von Nährstoffen erwähnt, welche die Vermehrung der Bakterien im Verteilungsnetz fördern könnten. Auch bei einer landesweiten Studie von 293 Wasserversorgungssystemen in den USA wurde festgestellt, dass nicht nur die Wassertemperatur, sondern auch andere, in dieser Studie nicht identifizierte Faktoren als Ursache für den Sommerpeak des Vorkommens von Aeromonaden infrage kamen (Egorov et al., 2011).

### **Campylobacter**

*Campylobacter* spp. sind ein Beispiel für obligat pathogene Bakterien, die wasserbedingte Erkrankungen verursachen können. *Campylobacter* spp. gelten beim Menschen als die häufigsten bakteriellen Erreger von Gastroenteritiden. Wasserbedingte Erkrankungen treten sporadisch oder in Form von Epidemien auf. *Campylobacter* spp. gehören zu den Pathogenen, die als Auslöser von Krankheitsausbrüchen in Assoziation mit Extremwetterereignissen und damit einhergehenden fäkalen Kontamination von Trinkwasserleitungen identifiziert wurden (Cann et al., 2013). Für *Campylobacter* wie auch für sonstige obligat pathogene Darmbakterien (z. B. Salmonellen, *Shigella*) scheint es keine systematischen Untersuchungen an realen Trinkwasserverteilungssystemen zum Zusammenhang zwischen Temperatur und Vorkommen bzw. Wachstum zu geben. Ein möglicher Grund könnte sein, dass diese Organismen nur in seltenen Fällen und zeitlich begrenzt im Rahmen von trinkwasserbedingten Krankheitsausbrüchen auffällig werden. Dennoch gibt es im Fall von *Campylobacter* aufgrund von Untersuchungen an anderen Wasserstandorten und aus Laborversuchen eine Reihe von Hinweisen, dass die Wassertemperatur einen deutlichen Einfluss auf das Überleben und die Vitalität dieser Bakterien im Wasser und in Biofilmen hat.

In kanadischen Oberflächengewässern wurde festgestellt, dass die Häufigkeit von positiven Befunden für *Campylobacter* spp. im kältesten Intervall von 0 °C bis 5 °C 40 % betrug, am höchsten (60 %) im Intervall von 5,1 °C bis 10 °C war und danach mit zunehmender Temperatur abnahm, mit lediglich 5 % positiven Befunden bei Temperaturen > 25 °C (St-Pierre et al., 2009). In autoklaviertem Flusswasser war *Campylobacter jejuni* bei 4 °C stammabhängig für eine bis mehr als 4 Wochen kulturell nachweisbar, während bei 25 °C alle Stämme nach 4 Tagen kulturell nicht mehr nachgewiesen wurden (Blaser et al., 1980). Thomas et al. (1999) fanden ebenfalls eine Abnahme der Konzentration kultivierbarer Bakterien für verschiedene *Campylobacter*-Arten in sterilem Deionat und sterilem Flusswasser mit Zunahme der Wassertemperatur im Bereich von 5 °C bis 37 °C über einen Versuchszeitraum von 60 Tagen. *C. coli* und *C. upsaliensis* erwiesen sich dabei empfindlicher als *C. jejuni* und *C. lari*. Auch Buswell et al. (1998) beschrieben eine Abnahme des Überlebens (koloniebildende Einheiten) planktonischer Zellen von *C. jejuni* und *C. coli* in Batch-Versuchen bei zunehmender Wassertemperatur. Die durchschnittlicher Dauer des Überlebens war bei 4 °C und 10 °C deutlich länger (202 bzw. 176 Stunden) als bei 22 °C und 37 °C (43 bzw. 22 Stunden). In anderen Studien wurde an planktonischen Reinkulturen von *C. jejuni* ebenfalls gefunden, dass der quantitative kulturelle Nachweis bei niedrigen Temperaturen am höchsten war und mit zunehmender Temperatur abnahm (Kultivierbarkeit: 10 °C > 23 °C > 32 °C; Hanning et al., 2008; 4 °C > 12 °C > 25 °C: Verhoeff-Bakkenes et al., 2009). Im planktonischen Zustand scheint sich somit *Campylobacter* bei niedrigeren Temperaturen länger im kultivierbaren Zustand zu halten als bei höheren Umgebungstemperaturen.

Buswell et al. (1998) berücksichtigten die Persistenz von *C. jejuni* in Biofilmen in Abhängigkeit von der Temperatur. Es wurde gefunden, dass *C. jejuni* sich in etablierte Trinkwasserbiofilme bei 4 °C und 37 °C einnistete. Während der Persistenz im Biofilm waren die Bakterien deutlich länger mit kultivie-

rungsunabhängigen Methoden (FISH, Nachweis mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern) als mit Kulturmethode nachweisbar. *C. jejuni* war bei 4 °C für 42 Tage und bei 30 °C für 28 Tage in den Biofilmen vorhanden. Lehtola et al. (2006) beschrieben die Einnistung von *C. jejuni* in Trinkwasserbiofilme bei 15 °C. Die Bakterien waren kulturell nur einen Tag und mit der FISH-Methode über den Untersuchungszeitraum von einer Woche im Biofilm nachweisbar. Diese Befunde zeigen, dass die Wassertemperatur einen deutlichen Einfluss auf das Überleben von *Campylobacter* hat. Mit zunehmender Wassertemperatur nimmt der Gehalt bzw. Anteil an kultivierbaren Bakterien ab, aber sie können dann noch im VBNC-Zustand in Trinkwasserbiofilmen vorhanden sein.

### 1.3.5 Fazit

Im Rahmen des Klimawandels und der damit verbundenen globalen Erwärmung wird regional eine Zunahme der Häufigkeit und Intensität von Niederschlägen sowie von Hochwasserereignissen angenommen, was eine verstärkte Belastung von Rohwässern u. a. mit darmpathogenen Mikroorganismen fäkaler Herkunft erwarten lässt (Hunter, 2003; Delpla et al., 2009). Bei Defiziten in der Wassergewinnung und/oder Aufbereitung besteht eine erhöhte Gefahr der Kontamination des Trinkwassers und damit verbunden ein erhöhtes Gesundheitsrisiko (Cann et al., 2013). Für die Situation in Industrieländern vertritt Hunter (2003) die Meinung, dass die globale Erwärmung keinen wesentlichen Einfluss auf das Vorkommen von Darmpathogenen im Wasser aus öffentlichen Trinkwasserverteilungssystemen hat, da dies mit der dort üblichen, auch an ungünstige Rohwasserbeschaffenheit angepasste Infrastruktur minimiert werden kann. Es fällt auf, dass in den Untersuchungen zu Aspekten veränderter Muster der Niederschläge und Überflutungen sowie von Trockenperioden der Schwerpunkt auf dem Einfluss des Klimawandels und der damit verbundenen globalen Erwärmung auf das Vorkommen von Krankheitserregern im Rohwasser liegt und darüber indirekt mögliche Gefährdungen der mikrobiologisch-hygienischen Trinkwasser abgeleitet werden (Delpla et al., 2009). Es wird bisher jedoch nur selten die direkte Auswirkung zunehmender Wassertemperaturen auf das Vorkommen und die mögliche Vermehrung von hygienisch relevanten Mikroorganismen in Trinkwasserverteilungssystemen berücksichtigt.

Das Vorkommen von hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwassernetzen hängt von komplexen Wechselwirkungen zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Faktoren sowie der Betriebsweise der Verteilungssysteme ab. Die Wassertemperatur stellt dabei eine wichtige Einflussgröße dar. Zielgerichtete Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum an Reinkulturen einzelner Spezies von wasserhygienisch relevanten Bakterien wurden in der Regel unter kontrollierten Bedingungen im Labor durchgeführt, während der Temperatureinfluss in realen Trinkwassersystemen meist im Zusammenhang mit anderen Fragestellungen lediglich begleitend berücksichtigt wurde und meist nicht systematisch erfasst wurde. Reinkulturexperimente zeigen deutlich, dass bei Anwesenheit mikrobiell verwertbarer Nährstoffe im Wasser mit Zunahme der Temperatur ein Wachstum von hygienisch relevanten Bakterien erfolgt. Die Verhältnisse in realen Trinkwassersystemen sind weniger eindeutig, da hier unterschiedliche, wachstumsfördernde und -hemmende Einflussfaktoren vorhanden sein können. Dennoch gibt es Hinweise, dass Veränderungen der Temperatur einen Einfluss auf das Überleben von Bakterien im Trinkwasser haben, allerdings in unterschiedlicher Weise je nach Herkunft und biologischen sowie ökologischen Eigenschaften der Mikroorganismen. Beobachtungen an Trinkwasserverteilungssystemen zeigen, dass die größtenteils gesundheitlich unbedenklichen heterotrophen Bakterien (HPC-Bakterien) unter günstigen Bedingungen (vor allem in Abwesenheit von Desinfektionsmitteln) mit ansteigender Wassertemperatur eine Erhöhung der Konzentration und Stoffwechselaktivität von Bakterien im Wasser und in Biofilmen aufweisen. Dies trifft auch zu für fakultativ pathogene Bakterien, wie *P. aeruginosa*, Legionellen und einige coliforme Bakterien, die als natürliche heterotrophe Wasserbakterien an aquatische Umweltbedingungen angepasst sind. Im Gegensatz dazu nimmt im Fall von darmpathogenen Bakterien wie *Campylobacter* im Wasser das Überleben in kultivierbarer Form mit zunehmenden Wassertemperaturen ab. Allerdings ist noch unklar, inwieweit ein Überleben dieser Organismen im VBNC-Zustand bzw. in Biofilmen auch bei höheren Temperaturen möglich ist.

Insgesamt gibt es eine Reihe von Einschränkungen in Praxisuntersuchungen zum Zusammenhang der Wassertemperatur und dem Auftreten hygienisch relevanter Bakterien in Trinkwassersystemen, da andere Einflussfaktoren wie vor allem die Art und Konzentration mikrobiell verwertbarer Nährstoffe, die Anwesenheit von Desinfektionsmitteln sowie antagonistische oder synergistische Interaktionen zwischen den Organismen der verschiedenen Populationen im Wasser und in den Biofilmen mögliche Temperatureffekte überdecken. Viele Beobachtungen wurden an realen Trinkwassersystemen mit desinfiziertem (Chlor, Monochloramin) Trinkwasser durchgeführt, sodass eine mögliche wachstumsfördernde Wirkung durch höhere Wassertemperaturen durch die Anwesenheit der Desinfektionsmittel maskiert wurde.

Es wird deutlich, dass es noch eine Reihe offener Fragen gibt. So ist es zum Beispiel unklar, inwieweit im Rahmen des Klimawandels zu erwartende, trinkwasserrelevante Temperaturen einen Einfluss auf das VBNC-Stadium von bakteriellen Krankheitserregern haben und ob in Anhängigkeit vom Pathogen erhöhte Wassertemperaturen als Stressfaktoren den VBNC-Zustand induzieren können oder aber den Übergang aus dem VBNC-Stadium in den kultivierbaren und infektiösen Zustand der Krankheitserreger auslösen können. Diese Vorgänge sind vor allem in Biofilmen zu berücksichtigen, da in ihnen offensichtlich eine Akkumulation von hygienisch relevanten Bakterien stattfinden kann und solche Biofilme dann als wichtige Reservoirs für diese Organismen dienen. Zudem ist es noch weitgehend unbekannt, ob erhöhte Wassertemperaturen Populationsverschiebungen bewirken und diese möglicherweise hemmende oder fördernde Interaktionen zwischen den natürlichen Trinkwasserorganismen und den hygienisch relevanten Bakterien beeinflussen. Eine genauere Kenntnis dieser Vorgänge ist von Bedeutung für die Risikobewertung des Einflusses einer potenziellen Temperaturerhöhung auf die mikrobiologisch-hygienische Wasserbeschaffenheit von Trinkwasserverteilungssystemen. Für diese Aspekte besteht eindeutig noch Forschungsbedarf.

## 1.4 Vorgehensweise

Ziel des Projektes war es, die trinkwasserhygienischen Auswirkungen einer stärkeren Erwärmung der oberen Bodenzone und der damit verbundenen Erwärmung von Trinkwasserverteilungsnetzen zu betrachten. Ob damit eine verstärkte Aufkeimung (Erhöhung der Koloniezahlen) und eine Vermehrung von hygienisch relevanten Mikroorganismen sowohl in der Wasserphase als auch in Biofilmen zu beobachten ist, wurde in Feldversuchen in einem realen Trinkwasserverteilungssystem sowie begleitend in Laborversuchen untersucht (Abbildung 2). Die Bildung von Trinkwasserbiofilmen erfolgte jeweils in Biofilmreaktoren auf Coupons aus dem Elastomer Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM), dem Kunststoff Polyethylen (PE) und aus V4A-Edelstahl als Aufwuchsoberflächen. Neben Faktoren wie dem Netzmanagement in den Feldversuchen wurde dabei zusätzlich in den Laborversuchen der Einfluss des Nährstoffgehalts auf die Trinkwasserhygiene untersucht, indem aufbereitetes Trinkwasser, so wie es in das Verteilungsnetz gespeist wird (künftig als nährstoffarmes Trinkwasser bezeichnet) und mit Nährstoffen supplementiertes Trinkwasser (künftig als nährstoffreiches Trinkwasser bezeichnet) verglichen wurden.

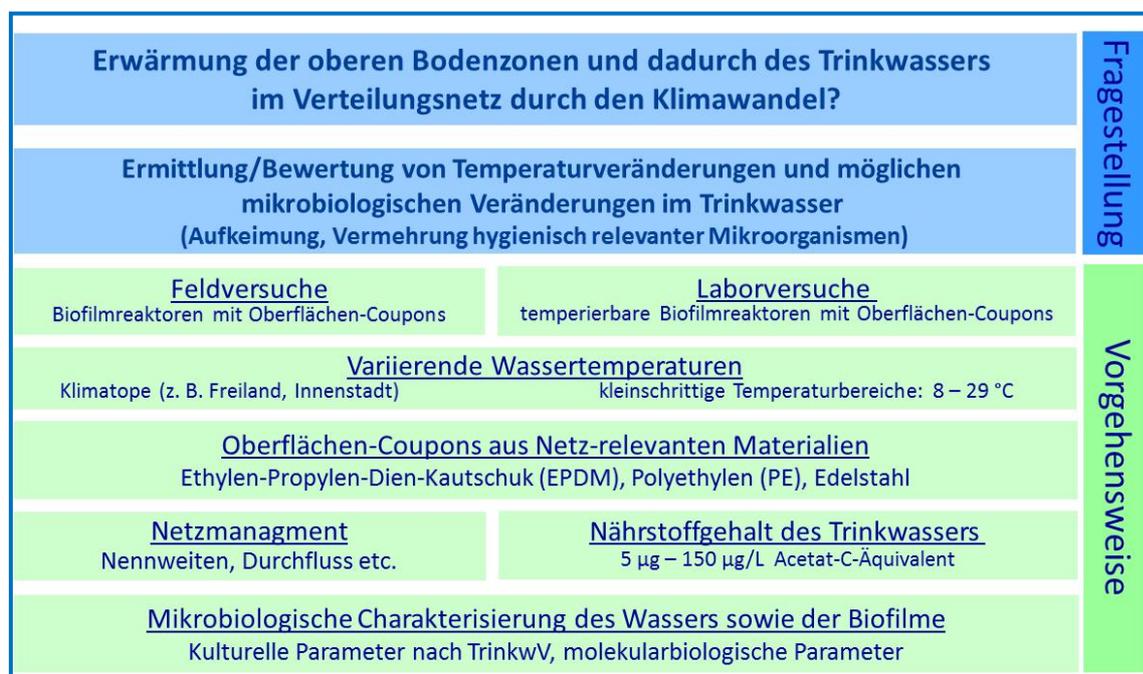


Abbildung 2: Experimentelles Vorgehen in Feld- und Laborversuchen zur Untersuchung des Einflusses der Wassertemperatur auf das Vorkommen und Wachstum von hygienisch relevanten Bakterien im Trinkwasser und in Biofilmen.

Sowohl in den Feld- als auch in den Laborversuchen wurden parallel zu den konventionellen Kulturverfahren weitergehende Untersuchungen des Wassers und der Biofilme mit der kultivierungsunabhängigen molekularbiologischen Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Damit lassen sich unter Umständen auch solche Bakterien erkennen, die mit den üblichen Kulturmethoden nicht nachweisbar sind, aber noch leben. Der Nachweis von Bakterien in diesem VBNC-Zustand ist von hygienischer Bedeutung, da die Bakterien unter geeigneten Umweltbedingungen wie z. B. günstiger Wassertemperatur und/oder günstigeren Nährstoffsituationen wieder kultivierbar und im Fall von pathogenen Mikroorganismen auch wieder infektiös werden können (1.3.1).

### 1.4.1 Feldversuche

Die möglichen Auswirkungen variierender Bodentemperaturen auf die Trinkwassertemperatur sowie auf die mikrobiologische Trinkwasserqualität im Rahmen der Trinkwasserverteilung wurden in Feldversuchen in einem realen Trinkwasserverteilungssystem in Oberhausen als Modellstadt untersucht. Die dafür erforderlichen Arbeiten wurden maßgeblich durch den Projektpartner Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung (IWW) mit Unterstützung durch den Arbeitskreis Aquatische Mikrobiologie am Biofilm Centre der Universität Duisburg-Essen (UDE-BC), die Angewandte Klimatologie und Landschaftsökologie der Universität Duisburg-Essen (UDE-AGAK) sowie dem regionalen Netzwerkpartner Rheinisch-Westfälische Wasserwerksgesellschaft mbH (RWW) durchgeführt. Die Untersuchungen in Oberhausen erfolgten im Zeitraum November/Dezember 2010 bis September 2011 in verschiedenen Klimatopen an sieben repräsentativen Standorten, an denen jeweils Messstationen eingerichtet wurden (Tabelle 2). Klimatope sind Gebiete, die auf Grund der Flächennutzung, Relief- und Bebauungsstruktur, Vegetationsbedeckung und Bodenart im mikro- bis mesoklimatischen Bereich ein relativ einheitliches, charakteristisches Klima ausbilden (VDI, 1997). Diese entsprechen weitestgehend den „thermal climate zones“ nach Stewart und Oke (2009), die sich nach mikrometeorologischen Parametern gliedern (Kuttler et al., 2012).

Klimatop	Stationsname	Kennzeichnende Merkmale
Innenstadt	Stadt	Stark versiegelt, geringer Rasenflächenanteil, wenige kleine Sträucher
Park	Park	Umgeben von hohen Laubbäumen
Gewerbe	Gewerbe 1	Kurzgehaltene Rasenfläche; Parkplatz; keine schattenspendenden Bäume; <b>geringe Durchflussgeschwindigkeit</b> des Trinkwassers
Gewerbe	Gewerbe 2	Straßen, Parkplatz, Gebäude, Gärten, Laubbäume; Kanal in 40 m Entfernung; beschattet; <b>hohe Durchflussgeschwindigkeit</b> des Trinkwassers
Stadtrand	Stadtrand	Einfamilienhäuser, Straße, Gartenflächen, Laubbäume; teils beschattet
Wald	Wald	Wald; Waldwege, Garten; überwiegend stark beschattet, Endstrang
Freiland	Freiland	Wäldchen; Straße; teils beschattet
Referenz	Wasserwerk	Ausgang des Reinwasserbehälters, aufbereitetes Trinkwasser

Tabelle 2: Übersicht der Messstationen mit den entsprechenden Klimatopen, Stationsnamen und kennzeichnenden Merkmalen (modifiziert nach Kuttler et al., 2012).

Für die Einrichtung der Messstationen wurden Biofilmreaktorstrecken verwendet, die an allen 8 in Tabelle 2 aufgeführten Standorten in Trinkwasserschächten als Bypass in das bestehende Rohrnetz eingebaut wurden (Abbildung 3). Die Reaktoren enthielten Werkstoffe aus dem Kunststoff PE80/100, dem Elastomer EPDM und Edelstahl als Aufwuchsmaterial für die Biofilmbildung. Die beiden Werkstoffe PE80/100 und EPDM entsprachen den KTW-Empfehlungen und den Anforderungen des DVGW-Arbeitsblatts W 270. Als Referenz zu den sieben Standorten in Oberhausen wurde im Wasserwerk Mülheim Styrum-Ost in Mülheim an der Ruhr nach Aufbereitung und UV-Desinfektion am Ausgang eines Reinwasserbehälters eine zusätzliche Messstelle installiert (Tabelle 2), bei der die Wassertemperatur nur durch die Temperatur des aufbereiteten Rohwassers beeinflusst wurde und keinen weiteren klimatischen Außeneinflüssen unterlag.

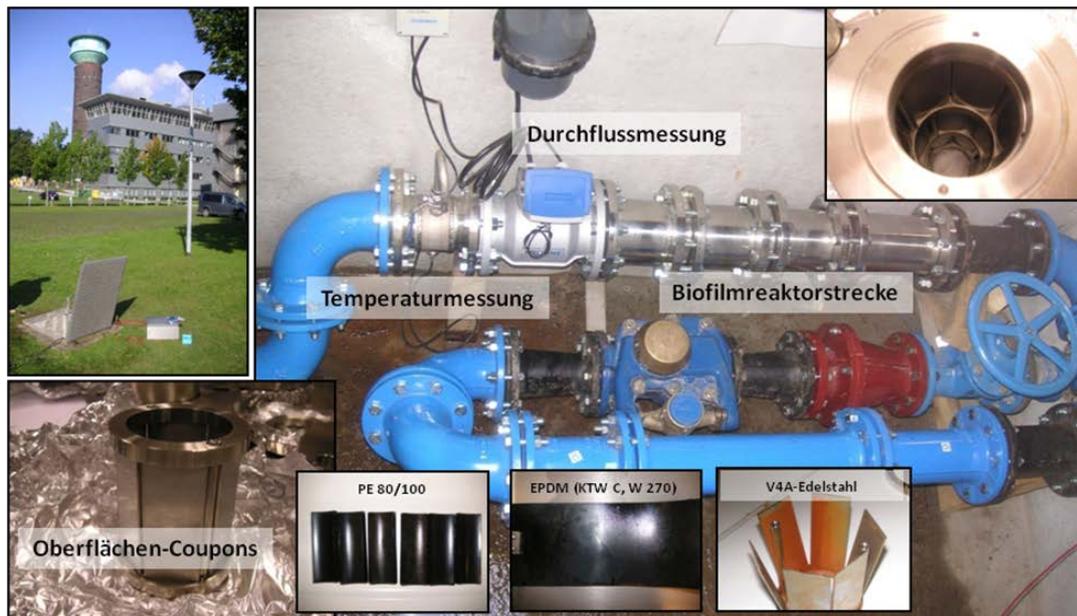


Abbildung 3: Beispiel für eine Biofilmreaktorstrecke als Bypass im Trinkwasserverteilungsnetz im Feldversuch (Standort Gewerbe 2 ; Quelle: IWW) und Ansicht der eingebauten Werkstoff-Coupons.

An den 8 Standorten erfolgten klimatopabhängig kontinuierliche Vor-Ort-Messungen der Trinkwassertemperatur und des Wasserdurchflusses sowie Untersuchungen der mikrobiologisch-hygienischen Beschaffenheit des Trinkwassers und der Biofilme auf den Trinkwasser-relevanten Materialien (PE80, EPDM, Edelstahl). Dabei wurden sowohl Standorte mit unterschiedlichen Nennweiten (DN 50 bis DN 150) als auch variierenden Wasserregimen betrachtet (hohe Wasserabnahme bis hin zu verlängerten Stagnationszeiten). Es erfolgten insgesamt drei Probenahmekampagnen, bei denen sowohl das Trinkwasser als auch Trinkwasserbiofilme vor Ort beprobt und anschließend im Labor untersucht wurden. Die Probenahmekampagnen wurden im November/Dezember 2010 (künftig benannt als Herbst), März 2011 (künftig benannt als Winter) und September 2011 (künftig benannt als Sommer) durchgeführt.

Parameter	Trinkwasser			Biofilm		
	mikroskopisch	kulturell	molekular-biologisch (FISH)	mikroskopisch	Kulturell	molekular-biologisch (FISH)
Koloniezahl bei 22 °C und 36 °C nach TrinkwV a. F.	-	+	-	-	+	-
<i>E. coli</i> und coliforme Bakterien	-	+	+ <sup>a</sup>	-	+	+ <sup>a</sup>
Enterokokken	-	+	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	-	+	+
<i>Legionella spec.</i>	-	+	+ <sup>b</sup>	-	+	+ <sup>b</sup>
Aeromonaden	-	+	-	-	+	-
HPC	+	-	-	+	-	-
Gesamtzellzahl	+	-	-	+	-	-

a, *E. coli*; b, *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila*

Tabelle 3: Zusammenstellung der mikrobiologisch-hygienischen Messparameter

In Tabelle 3 sind die mikrobiologisch-hygienischen Parameter der Untersuchungen des Trinkwassers und der Biofilme zusammengefasst. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Legionella* spp. und *L. pneumophila* wurden

sowohl mit Kulturmethoden als auch kultivierungsunabhängig mittels der molekularbiologischen Methode der FISH bestimmt. Zusätzlich wurden die Biofilme auf EPDM mit der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) analysiert, um einen genetischen Fingerabdruck der Biofilme zu erhalten. Detaillierte Informationen über die Vorbereitung sowie den Aufbau der Messstrecke und der Analysemethoden können dem Anhang entnommen werden (5.1).

Zusätzlich zu der Bestimmung der Trinkwassertemperatur und deren Einfluss auf die mikrobiologische Beschaffenheit des Trinkwassers wurde auch die Bodentemperatur während des Messzeitraums vom 01.08.2010 bis 30.09.2011 erfasst. Dies erfolgte durch die UDE-AGAK. Die Bodentemperaturen wurden in der standortabhängigen Tiefe des Trinkwasserleitungsnetzes an den oben genannten urbanen Standorten unterschiedlicher Flächennutzungen ermittelt. Die Messungen erfassten alle an den jeweiligen Standorten auftretenden Bodenhorizonte, um deren potentielle Auswirkungen auf das Temperaturprofil berücksichtigen zu können (Kuttler et al., 2012).

### 1.4.2 Laborversuche

Neben den Versuchen an Biofilmreaktorstrecken im Rohrnetz wurden Untersuchungen in temperierten Durchflussreaktoren im Labor unter Verwendung derselben Werkstoffe als Aufwuchsoberflächen wie im Feldversuch (EPDM und PE80) durchgeführt (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Drehkolbenreaktor der Laboruntersuchungen zur Einnistung, Persistenz und Vermehrung hygienisch relevanter Mikroorganismen in Trinkwasserbiofilme (Quelle: IWW).**

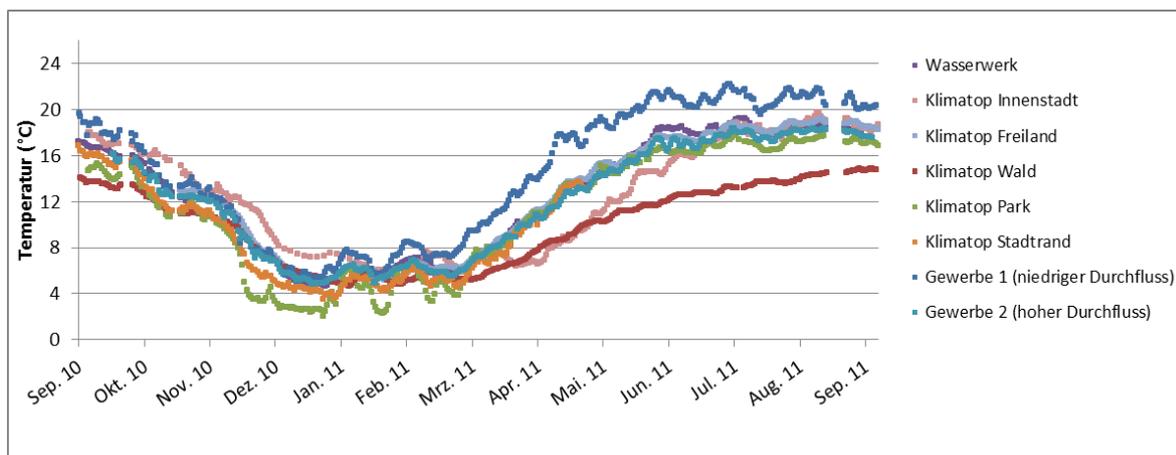
In dem temperierbaren Biofilm-Reaktorsystem (modifizierter RotoTorque-Drehkolbenreaktor) wurden Trinkwasserbiofilme auf Coupons aus EPDM und PE80 etabliert. Dazu wurden die Reaktoren mit Trinkwasser betrieben. Es handelte sich um nährstoffarmes Trinkwasser (aufbereitetes Trinkwasser aus dem Wasserwerk Mülheim Styrum-Ost) mit einer Konzentration von assimilierbarem organischen Kohlenstoff (AOC) von  $5,5 \mu\text{g Acetat-C/L}$  sowie um nährstoffreiches Trinkwasser, das zusätzlich mit 1:1000 verdünnter CASO-Lösung supplementiert wurde und dadurch einen erhöhten AOC-Gehalt von  $150 \mu\text{g Acetat-C/L}$  aufwies. Die Reaktoren wurden kontinuierlich ( $20 \text{ ml/min}$ ) in einem Temperaturbereich zwischen  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  mit den Trinkwässern durchströmt. Nach 14-tägiger Etablierung der Trinkwasserbiofilme auf den Coupons wurden die Reaktoren mit einer Mischkultur der Bakterien *E. coli*/K. *pneumoniae* sowie *P. aeruginosa*/L. *pneumophila* modifiziert nach Moritz et al. (2010) beimpft. Nach 20stündiger statischer Inkubation wurden die Reaktoren im Durchfluss über weitere 28

Tage betrieben. Die Zu- und Abläufe der Reaktoren sowie die Biofilme auf den Coupons wurden über den genannten Zeitraum beprobt und mikrobiologisch-hygienisch mittels kultureller und molekularbiologischer Methoden analysiert. Nähere Informationen über den Aufbau des Versuches sowie der Analysemethoden können dem Anhang entnommen werden (5.1).

## 2. Einfluss der Temperatur auf hygienisch relevante Bakterien im Trinkwasser und in Trinkwasserbiofilmen

### 2.1 Feldversuche

In Feldversuchen am Trinkwasserverteilungssystem der Modellstadt Oberhausen wurde an 7 Messstationen in unterschiedlichen Klimatopen untersucht, ob die Veränderung der Bodentemperatur einen Einfluss auf die Trinkwassertemperatur hat. Tatsächlich wurde ein Einfluss der Bodentemperatur sowie der Durchflussmenge auf die Temperatur des Trinkwassers im Netz festgestellt. Der Temperaturverlauf im Trinkwassernetz über den Zeitraum der drei Probenahmekampagnen in den verschiedenen Klimatopen ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Schwankungen im Trinkwassernetz zwischen den einzelnen Klimatopen betragen hier bis zu 10 °C.



**Abbildung 5: Temperaturverlauf des Trinkwassers der verschiedenen Klimatope im Trinkwasserverteilungsnetz der Stadt Oberhausen sowie im aufbereiteten Trinkwasser im Wasserwerk Mülheim Styrum-Ost (Referenz WW) vor Abgabe des Trinkwassers in das Versorgungsnetz im Zeitraum September 2010 bis September 2011.**

Zu den jeweiligen Probenahmekampagnen wurden im Sommer die höchsten Wassertemperaturen bis zu 21,0 °C gemessen, während im Herbst und im Winter die Temperaturen mit maximal 12,3 °C sowie 9,6 °C deutlich niedriger lagen (Tabelle 4). Die maximal im Netz gemessene Temperatur betrug 23 °C.

Klimatop	Tagesmitteltemperatur (°C)		
	Sommer	Herbst	Winter
WW Ausgang	18,2	11,8	6,9
Freiland	18,7	7,3	7,5
Wald	14,9	10,6	6,0
Park	17,6	11,1	7,8
Gewerbe 1	21,0	11,6	9,6
Gewerbe 2	18,0	6,8	7,3
Stadtrand	18,4	11,1	6,7
Innenstadt	18,8	12,3	8,6

Tabelle 4: Tagesmitteltemperaturen des Trinkwassers zu den drei Probenahmekampagnen Sommer, Herbst und Winter

### 2.1.1 Trinkwasser

Das Trinkwasserverteilungssystem, in dem sich die 7 Messstationen befanden, wurde mit Trinkwasser aus dem Wasserwerk Mülheim Styrum-Ost versorgt. Es handelte sich um aus Oberflächenwasser künstlich angereichertes Grundwasser, das nach der weiteren Aufbereitung und vor Abgabe in das Trinkwasserverteilungsnetz in der Regel durch eine UV-Desinfektion behandelt wurde (Donner et al., 2012). Das aufbereitete Trinkwasser wies einen AOC-Gehalt von 5,5 µg Acetat-C-Äquivalent/L und ein molares C:N:P-Verhältnis (AOC:NO<sub>3</sub>-N:PO<sub>4</sub>-P) von 100:45.000:380 auf. Das für bakterielles Wachstum erforderliche molare C:N:P-Verhältnis betrug etwa 100:10:1. Dies bedeutet, dass im vorliegenden Trinkwasser eine deutliche C-Limitierung vorlag. Der relativ niedrige AOC-Gehalt von unter 10 µg Acetat-C-Äquivalent/L sowie die Limitierung von organischem Kohlenstoff im Verhältnis zu Nitrat-N und Phosphat-P wiesen somit darauf hin, dass es sich um ein biologisch stabiles Trinkwasser mit ungünstigen Nährstoffverhältnissen für ein mikrobielles Wachstum handelte (van der Kooij, 1992; Hu et al., 2005).

Die im Zeitraum Juli 2010 bis September 2011 jeweils im Sommer, Herbst und Winter gewonnenen Daten zur mikrobiologischen Beschaffenheit des Trinkwassers zeigten bezüglich der nach TrinkwV festgelegten Parameter keine Veränderung der mikrobiologischen Befunde mit steigenden Trinkwassertemperaturen.

Die Koloniezahlen bei 22 °C und 36 °C nach TrinkwV lagen auch bei Temperaturen über 20 °C im einstelligen und niedrigen zweistelligen Bereich und erreichten in keiner Wasserprobe den Grenzwert von 100 KBE/ml (Abbildung 6). Dabei wiesen selbst Standorte mit hohen Stagnationszeiten bis zu 20 h pro Tag (Klimatope Park, Gewerbe 1 sowie Stadtrand) keine deutlich erhöhten Koloniezahlen auf. Die unter allen Bedingungen beobachteten, relativ geringen Koloniezahlen bestätigten, dass an allen Stellen im Verteilungssystem ein biologisch stabiles Trinkwasser vorlag, welches keine Tendenz zur Aufkeimung aufwies.

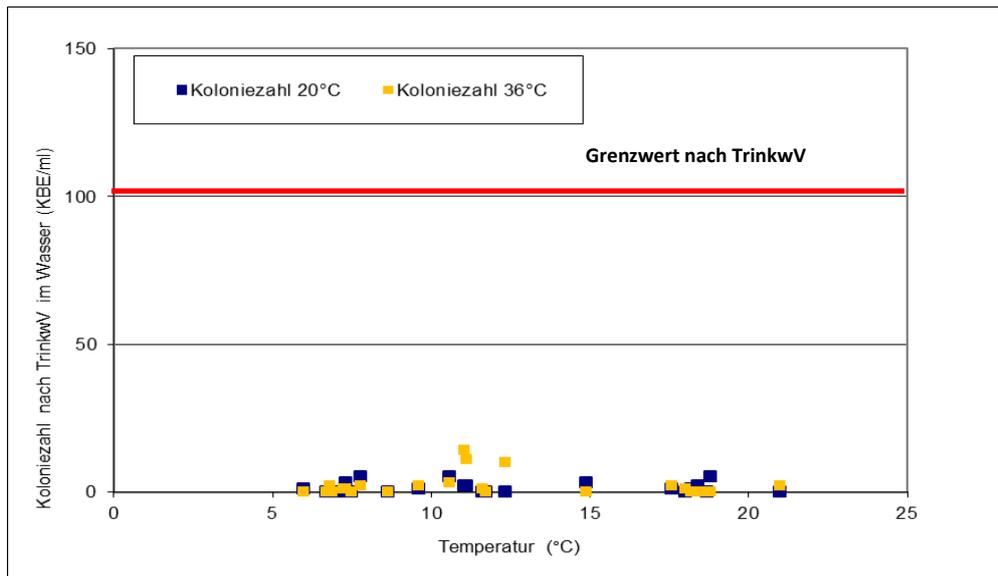


Abbildung 6: Koloniezahlen nach TrinkwV im Trinkwasser in Abhängigkeit von der Wassertemperatur an den untersuchten Standorten im Trinkwasserverteilungssystem im Zeitraum Juli 2010 bis September 2011.

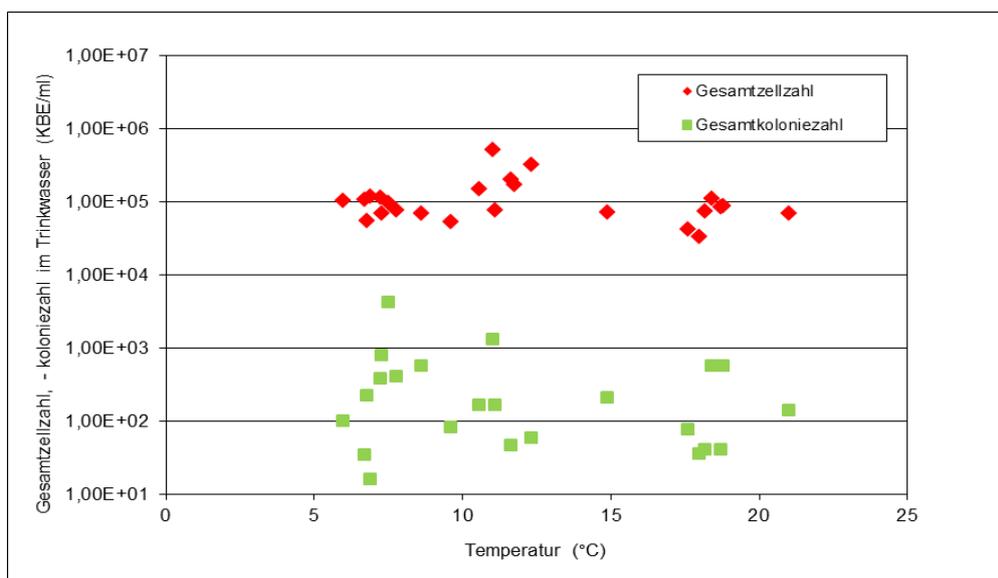


Abbildung 7: Gesamtzellzahl sowie Gesamtkoloniezahl (HPC) im Trinkwasser an ausgewählten Standorten im Verteilungsnetz im Zeitraum Juli 2010 bis September 2011.

Die Gesamtzellzahl als Parameter für alle im Wasser vorkommenden Bakterien zeigte temperaturabhängig Werte im Bereich von  $10^5$  Bakterien/ml (Abbildung 7). Der ebenfalls verwendete Parameter der Koloniezahl heterotropher Bakterien (HPC), der eine größere Anzahl kultivierbarer Bakterien als die Koloniezahlbestimmung nach TrinkwV erfasst, zeigte ebenfalls bei Temperaturerhöhungen im Trinkwasser keinen deutlichen Anstieg der Werte (Abbildung 7). Der Anteil kultivierbarer Bakterien lag im Mittel bei 0,4 % bezogen auf die Gesamtzellzahl. Dieses relative geringe Verhältnis der Koloniezahl von HPC-Bakterien zu der Gesamtzellzahl ist charakteristisch für nährstoffarme Wässer und bestätigt das Vorliegen eines biologisch stabilen Trinkwassers.

Zusätzlich wurde das Trinkwasser auf die Anwesenheit von hygienisch relevanten Bakterien (*E. coli*, coliforme Bakterien, *P. aeruginosa*, *Legionella* spp., Enterokokken, Aeromonaden) untersucht. Unabhängig von der Temperatur wurden nur in Einzelfällen (3 von 24 Proben) einige dieser Organismen in

niedrigen einstelligen Konzentrationsbereichen pro 100 ml nachgewiesen (Tabelle 5). Es wurden in einer Trinkwasserprobe sowohl *Aeromonas hydrophila/caviae* als auch das coliforme Bakterium *Enterobacter amnigenus* sowie in zwei weiteren Proben einmal Enterokokken bzw. einmal *Aeromonas hydrophila/caviae* nachgewiesen. Anschließende Nachbeprobungen an den gleichen Stellen wiesen immer die Abwesenheit dieser Bakterien auf. Ein gehäuftes Auftreten hygienisch relevanter Mikroorganismen durch erhöhte Temperaturen des Trinkwassers wurde nicht beobachtet.

Parameter	Anzahl der positiven Proben	Häufigkeit (%)	Konzentration (KBE bzw. MPN/100 ml)
<i>E. coli</i>	0	0	-
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	-
<i>Legionella</i> spp.	0	0	-
coliforme Bakterien (ohne <i>E. coli</i> )	1	4,2	1
Aeromonaden	2	8,3	1 bzw. 2
Enterokokken	1	4,2	3

Tabelle 5: Hygienisch relevante Mikroorganismen im Trinkwasser aus den Feldversuchen (n = 24 Proben).

Zur weitergehenden Charakterisierung der Trinkwasserproben wurden diese zusätzlich zu den kulturellen Verfahren molekularbiologisch mittels der FISH-Methode untersucht. Im Gegensatz zu den kulturellen Methoden, mit denen ein Nachweis der Zielorganismen nicht möglich war, konnten mit der FISH alle Zielorganismen in den Trinkwasserproben nachgewiesen werden. Betrachtet man die Befundhäufigkeit der FISH-positiven Zielorganismen abhängig von Jahreszeit, so ist auffällig, dass im Sommer die Zahl der Befunde der Zielorganismen im Trinkwasser am niedrigsten war (Tabelle 6). So wurde *P. aeruginosa* im Sommer mittels FISH nicht nachgewiesen. Die höchste Anzahl an positiven Befunden ließ sich für alle Zielorganismen im Winter beobachten. Hier konnten in 75 % bis 100 % der untersuchten Wasserproben die Zielorganismen nachgewiesen werden. Im Herbst lagen die Befundhäufigkeiten von *E. coli*, *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* bei 50 % bis 75 %. *Legionella* spp. wurde sowohl im Herbst als auch im Winter in 100 % der Trinkwasserproben nachgewiesen. Für *L. pneumophila* war der Trend zu erkennen, dass mit zunehmender Trinkwassertemperatur die Befundhäufigkeit abnahm (Sommer < Herbst < Winter).

Organismus	Befundhäufigkeit (%)		
	Herbst	Winter	Sommer
<i>E. coli</i>	50	75	50
<i>P. aeruginosa</i>	62,5	75	0
<i>Legionella</i> spp.	100	100	n. b.
<i>L. pneumophila</i>	75	100	12,5

Tabelle 6: Befundhäufigkeit (%) der mit der FISH-Methode nachgewiesenen Zielorganismen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Legionella* spp. und *L. pneumophila* im Trinkwasser in Abhängigkeit von der Jahreszeit (n = 24 Proben); n. b.: nicht bestimmt.

### Kernaussagen Trinkwasser:

- Die Trinkwässer zeigten mit zunehmender Trinkwassertemperatur bezüglich der nach TrinkwV (2001) festgelegten Parameter **keine** Verschlechterung der mikrobiologischen Beschaffenheit.
- Die Koloniezahlen nach TrinkwV lagen auch bei Temperaturen > 20 °C und langen Stagnationszeiten im einstelligen und niedrigen zweistelligen Bereich und erreichten in keinem Fall den Grenzwert von 100 KBE/ml.

- Die Gesamtzellzahl sowie Gesamtkoloniezahl (HPC) zeigten temperaturunabhängig relativ niedrige Werte, die auf ein **biologisch stabiles Trinkwasser** ohne Aufkeimungsneigung hindeuten.
- Ein gehäuftes Auftreten hygienisch relevanter Mikroorganismen durch Temperaturerhöhung im Trinkwasser war **nicht** vorhanden.
- Mit Hilfe der molekularbiologischen Methode FISH waren nicht kultivierbare hygienisch relevante Bakterien im Trinkwasser nachweisbar. Eine hygienische Beurteilung dieser Ergebnisse ist zurzeit noch nicht möglich, stellt aber einen möglichen Hinweis auf das Vorkommen von nicht kultivierbaren, hygienisch relevanten Bakterien im Trinkwasser dar.

### 2.1.2 Trinkwasserbiofilme

Da Biofilme auf Oberflächen, die mit Trinkwasser in Berührung kommen, einen entscheidenden Einfluss auf die mikrobiologisch-hygienische Qualität des Trinkwassers haben, wurde an ausgewählten Werkstoffen (PE80/100, EPDM, Edelstahl) untersucht, inwieweit eine mögliche Temperaturerhöhung zu einer Veränderung der hygienischen Situation im Biofilm beitragen könnte. Es handelte sich um Biofilme, die sich über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten auf den Werkstoffen in Biofilmreaktorstrecken im Trinkwasserverteilungssystem gebildet hatten (Abbildung 3). Die insgesamt vorhandenen sowie die kultivierbaren Bakterien in den Biofilmen wurden durch die Bestimmung der Gesamtzellzahlen, der Koloniezahlen heterotropher Bakterien (HPC) und der Koloniezahlen bei 22 °C und 36 °C nach der TrinkwV quantifiziert. Betrachtet man die Ergebnisse gruppiert in Intervallen der Trinkwassertemperaturen von < 10 °C, 10 °C – 15 °C sowie 16 °C – 25 °C konnte Folgendes festgestellt werden:

Die Gesamtzellzahlen der Biofilme auf Oberflächen von PE80/100 und EPDM zeigten keine deutliche Zunahme mit ansteigender Trinkwassertemperatur, während die Koloniezahlen (HPC, Koloniezahlen nach TrinkwV) tendenziell einen geringen Anstieg von maximal einer Log-Stufe aufwiesen (Abbildung 8, Abbildung 9). Somit waren die maximalen Zelldichten der etablierten Trinkwasserbiofilme auf dem jeweiligen Werkstoff über den gesamten Temperaturbereich ähnlich und unabhängig von der Wassertemperatur, aber der Anteil der kultivierbaren Bakterien schien bei den höheren Temperaturen geringfügig zuzunehmen. Auf Edelstahl wurden andere Verhältnisse beobachtet. Hier waren die höchsten Gesamtkoloniezahlen im Temperaturintervall von 10 °C bis 15 °C zu verzeichnen, die Koloniezahlen heterotropher Bakterien nahmen leicht zu über den Bereich von Temperaturen < 10 °C bis zu Temperaturen von 10 ° bis 15 °C und die Koloniezahlen nach TrinkwV zeigten die geringsten Werte im Bereich der höchsten Wassertemperaturen im Bereich von 10 °C bis 15 °C (Abbildung 10). Insgesamt wurden keine Temperaturen festgestellt, die eine Biofilmbildung im untersuchten Trinkwasserverteilungssystem deutlich förderten. Die oben erwähnten ungünstigen Nährstoffbedingungen für mikrobielles Wachstum könnten eine Ursache für diese Beobachtung sein. So wurde zum Beispiel in der Literatur berichtet, dass niedrige AOC-Werte, wie sie im hier untersuchten Trinkwasser auftraten, eine limitierende Wirkung auf die Bildung von Trinkwasserbiofilmen haben (Van der Kooij et al., 1995; Sun et al., 2012).

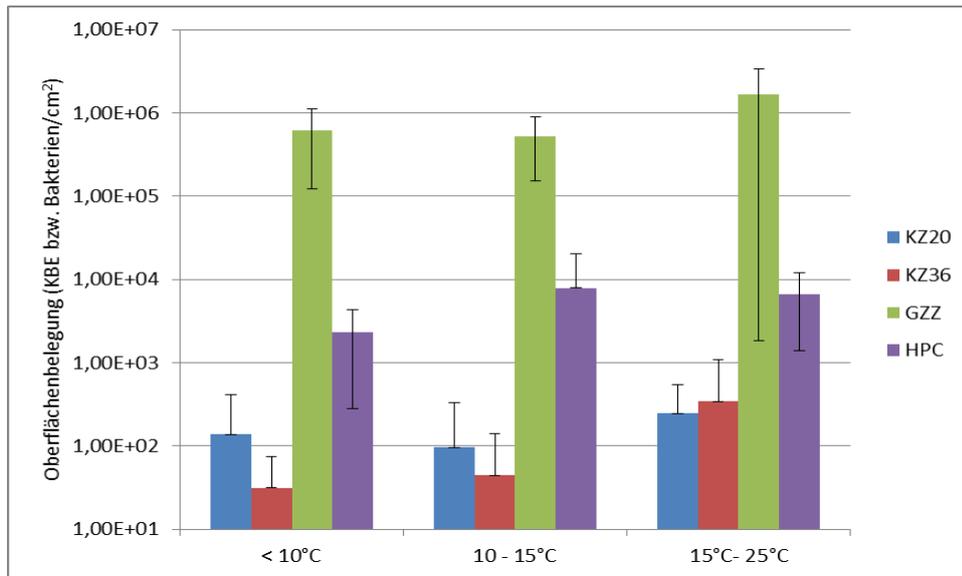


Abbildung 8: Biofilmbildung auf PE80/100 in Abhängigkeit von der Trinkwassertemperatur. Die Biofilmbildung (Oberflächenbelegung) wurde anhand der Gesamtzellzahlen (GZZ) sowie der Gesamtkoloniezahlen (HPC) und der Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach TrinkwV (KZ 20 bzw. KZ 36) bestimmt.

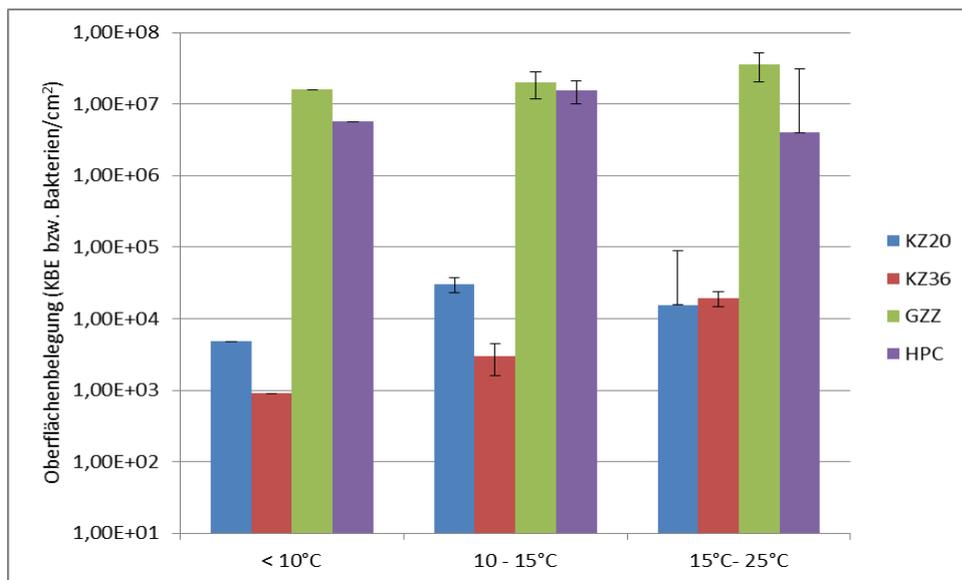
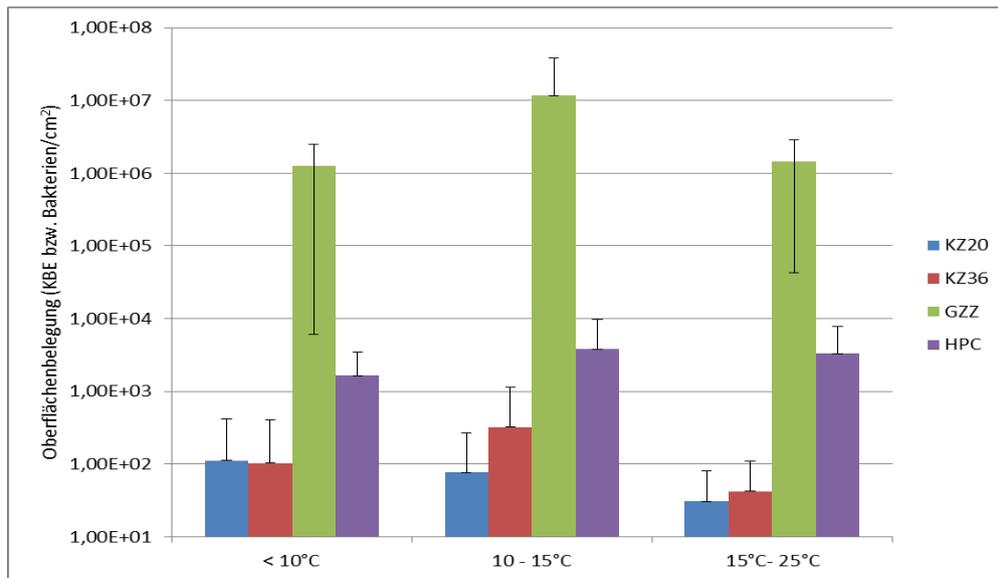
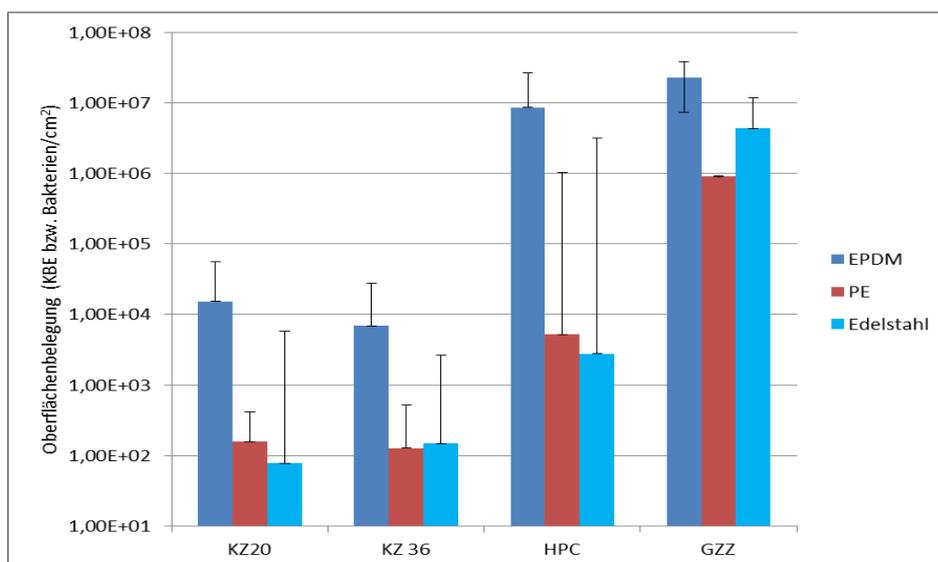


Abbildung 9: Biofilmbildung auf EPDM in Abhängigkeit von der Trinkwassertemperatur. Die Biofilmbildung (Oberflächenbelegung) wurde anhand der Gesamtzellzahlen (GZZ) sowie der Gesamtkoloniezahlen (HPC) und der Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach TrinkwV (KZ 20 bzw. KZ 36) bestimmt.



**Abbildung 10: Biofilmbildung auf Edelstahl in Abhängigkeit von der Trinkwassertemperatur. Die Biofilmbildung (Oberflächenbelegung) wurde anhand der Gesamtzellzahlen (GZZ) sowie der Gesamtkoloniezahlen (HPC) und der Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach TrinkwV (KZ 20 bzw. KZ 36) bestimmt.**

Die Zelldichte der etablierten Trinkwasserbiofilme war zudem materialabhängig. Die höchste Biofilmbildung erfolgte auf EPDM. Die Gesamtzellzahlen waren auf EPDM-Coupons etwa eine Log-Stufe, die Koloniezahlen nach TrinkwV bis zu 2 Log-Stufen und die HPC-Werte bis zu 3 Log-Stufen höher als auf PE und Edelstahl (Abbildung 11). Die Werte lagen für die Parameter Gesamtzellzahl bei  $9,0 \times 10^5$  bis  $2,3 \times 10^7$  Bakterien/cm<sup>2</sup>, für die Koloniezahl 22 °C bei  $7,8 \times 10^1$  bis  $1,5 \times 10^4$  KBE/cm<sup>2</sup>, für die Koloniezahl 36 °C bei  $1,5 \times 10^2$  bis  $6,9 \times 10^3$  KBE/cm<sup>2</sup> und für die Gesamtkoloniezahl (HPC) bei  $2,8 \times 10^3$  bis  $8,5 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup>. Diese Beobachtung entspricht anderen Untersuchungen mit Werkstoffen, die in Biofilmreaktoren in kaltem oder erwärmtem Trinkwasser über Wochen exponiert waren (Moritz et al., 2010; Waines et al., 2011). Es wurde jeweils die stärkste Biofilmbildung auf dem Elastomer EPDM im Vergleich zu PE-Werkstoffen und Edelstahl gefunden.

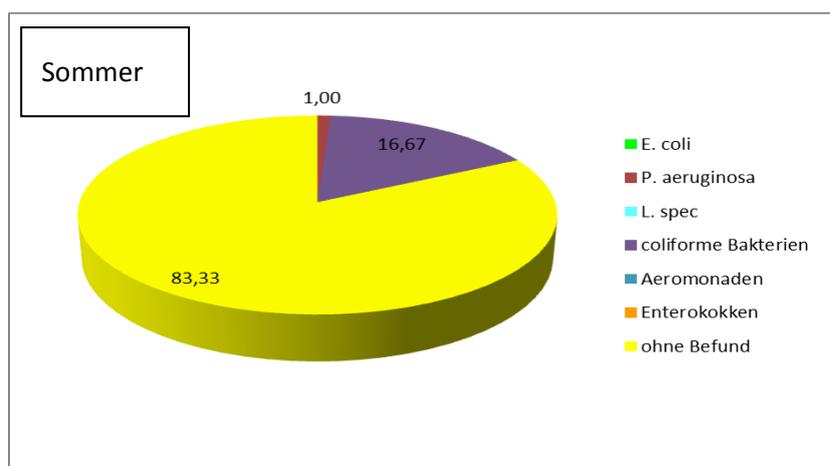


**Abbildung 11: Biofilmbildung in Abhängigkeit vom Werkstoff. Die Biofilmbildung (Oberflächenbelegung) wurde anhand der Gesamtzellzahlen (GZZ) sowie der Gesamtkoloniezahlen (HPC) und der Koloniezahlen bei 20 °C und 36 °C nach TrinkwV (KZ 20 bzw. KZ 36) bestimmt.**

Neben den Gesamtzellzahlen und Koloniezahlen wurden die Biofilme auf hygienisch relevante Bakterien (*E. coli*, coliforme Bakterien, *P. aeruginosa*, *Legionella* spp., Enterokokken, Aeromonaden) mit Kulturverfahren untersucht. Unabhängig von der Temperatur wurden in 18 % der untersuchten Biofilmproben (n = 72) hygienisch relevante Bakterien im einstelligen und niedrigen zweistelligen Konzentrationsbereichen pro cm<sup>2</sup> nachgewiesen, darunter siebenmal coliforme Bakterien (außer *E. coli*), zweimal *E. coli*, einmal Enterokokken sowie dreimal *Legionella* spp. (Tabelle 7). 6 von insgesamt 13 positiven Befunden wurden im Klimatop Wald erhalten. Bei dieser Probenahmestelle handelte es sich um einen Endstrang mit geringer Wasserabnahme. Auffallend war eine leichte Zunahme der Befundhäufigkeit von 4 % auf 17 % im Fall der coliformen Bakterien bei erhöhten Temperaturen (Sommer > Herbst > Winter; Abbildung 12). Zusätzlich war die Anzahl positiver Befunde im Winter am niedrigsten, während im Sommer und insbesondere im Herbst sowohl die höchsten Konzentrationen als auch die höchste Diversität verschiedener Arten nachweisbar waren (Abbildung 12).

Organismus	Konzentration
Coliforme Bakterien ( <i>Citrobacter braakii/freundii</i> , <i>Enterobacter amnigenus</i> , <i>Enterobacter intermedius</i> , <i>Enterobacter chloacae</i> )	0,1 bis 31 KBE/100 ml
<i>E. coli</i>	1 KBE/100 ml
Enterokokken ( <i>Enterococcus faecium</i> )	0,2 KBE/100 ml
<i>L. pneumophila</i>	3 bis 29 KBE/100 ml

Tabelle 7: Hygienisch relevante Bakterien in den Trinkwasserbiofilmen, nachgewiesen mittels konventioneller Kulturverfahren. Die Identifizierung von Coliformen und *E. coli* erfolgte mit dem API 20 E-System, die von Enterokokken mit dem API 20 Strep-System.



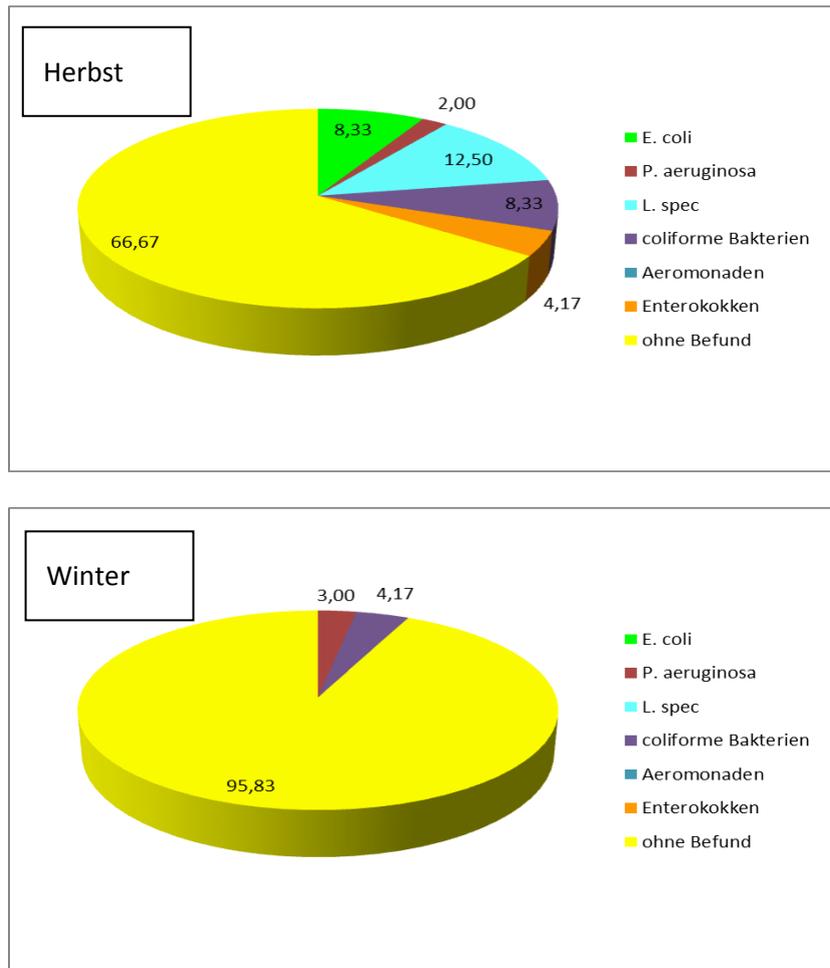


Abbildung 12: Prozentualer Anteil positiver Befunde hygienisch relevanter Bakterien in Abhängigkeit von der Jahreszeit.

Zusätzlich zu den kulturellen Parametern wurden die in den Feldversuchen gewonnenen Biofilme mittels der kulturunabhängigen FISH-Methode auf folgende Zielorganismen analysiert: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* und *Legionella* spp.. Es wurden im Rahmen der 3 Probenahmeaktionen insgesamt jeweils 24 Biofilmproben pro Material (PE80/100, EPDM, Edelstahl) gewonnen. Tabelle 8 zeigt die Befundhäufigkeiten der Zielorganismen in Abhängigkeit vom Werkstoff und der Jahreszeit. Für *E. coli* zeigte sich auf PE80 der Trend, dass mit zunehmender Temperatur auch die Befundhäufigkeit zunahm. Auf den Werkstoffen PE und EPDM wurde *E. coli* im Sommer am häufigsten nachgewiesen. *P. aeruginosa* wurde sowohl auf PE als auch auf EPDM im Sommer am seltensten nachgewiesen und im Herbst am häufigsten. Für *Legionella* spp. wurde kein Einfluss der Temperatur auf die Befundhäufigkeit im Trinkwasserbiofilm beobachtet. Für *L. pneumophila* traf dies nur für Biofilme auf PE80/100 zu; in Biofilmen auf EPDM und Edelstahl erfolgte der Nachweis jeweils häufiger im Winter als im Sommer und im Herbst.

Befundhäufigkeit (%)						
Werkstoff	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	Herbst	Winter	Sommer	Herbst	Winter	Sommer
PE80/100	37,5	25	62,5	100	100	75
EPDM	12,5	75	87,5	100	87,5	62,5
Edelstahl	12,5	0	12,5	37,5	50	37,5
Befundhäufigkeit (%)						
Werkstoff	<i>Legionella spp.</i>			<i>L. pneumophila</i>		
	Herbst	Winter	Sommer	Herbst	Winter	Sommer
PE80/100	100	100	100	75	75	75
EPDM	100	100	100	37,5	100	87,5
Edelstahl	75	100	100	37,5	57	12,5

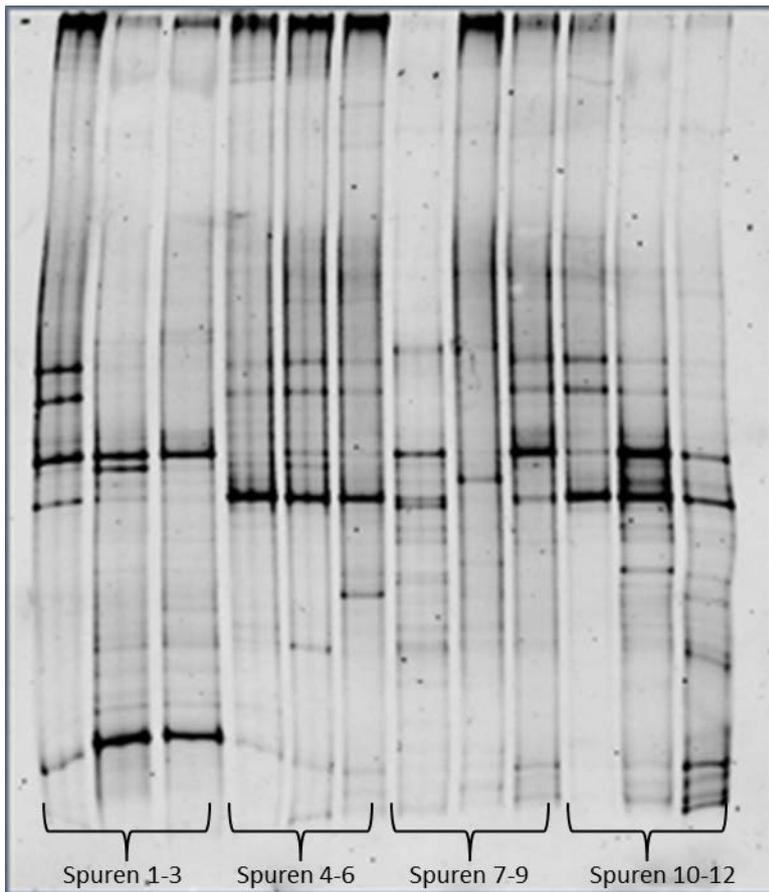
**Tabelle 8: Befundhäufigkeiten (%) von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Legionella spp.* und *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen auf unterschiedlichen Werkstoffen in Abhängigkeit von der Jahreszeit (n = 24).**

Die detailliertere Betrachtung der einzelnen Klimatope und Probenahmekampagnen ergab für *E. coli*, dass in jedem Klimatop die höchste Konzentration im Sommer auf dem Werkstoff EPDM bestimmt wurde. Einzige Ausnahme war das Klimatop Freiland. Hier wurde im Sommer *E. coli* nicht nachgewiesen. Im Klimatop Innenstadt war die Temperatur unter allen Klimatopen und allen Probenahmen am höchsten. Hier war auch die Konzentration von *E. coli* von allen analysierten Proben mit  $2 \times 10^5$  FISH-positiven Zellen/cm<sup>2</sup> am höchsten. Der Unterschied in den Konzentrationen von *E. coli* zwischen dem wärmsten Klimatop im Sommer (Klimatop Innenstadt) und dem kältesten Klimatop im Sommer (Klimatop Wald) betrug etwa eine halbe Log-Stufe. Die größte Differenz in der Konzentration von *E. coli* bestand zwischen den Klimatopen Innenstadt und Stadtrand (etwa 1,7 Log-Stufen). Auf PE waren die Proben entweder negativ oder die Konzentration der FISH-positiven *E. coli*-Zellen war 0,5 bis 1,5 Log-Stufen niedriger als auf EPDM. Die Konzentrationen von FISH-positiven *E. coli*-Zellen im Herbst und Winter variierten von  $3 \times 10^2$  bis  $5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>, wobei die Konzentrationen nur selten  $10^4$  FISH-positiven Zellen/cm<sup>2</sup> überschritten. Im Klimatop Stadtrand wurde im Biofilm nur im Sommer *E. coli* nachgewiesen. Für *P. aeruginosa* gab es keine Jahreszeit, in der die Konzentration der FISH-positiven Zellen in den Biofilmen auffällig hoch war. In vier Klimatopen waren die Konzentrationen von *P. aeruginosa* im Herbst am höchsten und in jeweils drei im Sommer oder Winter. Die Konzentrationen lagen immer in einem Bereich zwischen  $5 \times 10^4$  und  $5 \times 10^5$  FISH-positiven Zellen/cm<sup>2</sup>. Auf PE und Edelstahl waren die Konzentrationen vergleichbar, wobei die meisten Biofilme auf Edelstahl negativ für *P. aeruginosa* waren. Im Klimatop Innenstadt wurde im Sommer, dem Zeitpunkt der höchsten Wassertemperatur, weder im Biofilm noch in der Wasserphase *P. aeruginosa* nachgewiesen. *Legionella spp.* wurde in den höchsten Konzentrationen im Sommer auf EPDM nachgewiesen. Dabei schwankte die Zahl der FISH-positiven Zellen in den Klimatopen zwischen  $2 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Auf PE waren die Konzentrationen etwa 0,5 bis 1,5 Log-Stufen niedriger als auf EPDM. Es war kein jahreszeitlicher Trend bezüglich der Höhe der Konzentrationen zu beobachten. Für *L. pneumophila* wurden in vier Klimatopen (Freiland, Park, Stadtrand, Innenstadt) die höchsten Konzentrationen im Winter detektiert ( $2 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^5$  FISH-positiven Zellen/cm<sup>2</sup>), in den vier anderen untersuchten Klimatopen (Wasserwerk, Wald, Gewerbe 1 und 2) im Sommer ( $3 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>). Im Winter waren die Konzentrationen zwei Mal auf PE am höchsten, sonst immer auf EPDM. Wie schon bei *Legionella spp.* zeigte auch bei *L. pneumophila* die Jahreszeit keinen Einfluss auf die Höhe der Konzentration der FISH-positiven Zellen.

Bisher gibt es relativ wenige Literaturangaben zum Vorkommen der in dieser Untersuchung berücksichtigten hygienisch relevanten Bakterien in Biofilmen von realen Trinkwasserverteilungssystemen. *E. coli* wurde kulturell in Biofilmen von Rohren aus Trinkwassersystemen in Deutschland und Schweden nicht nachgewiesen (Wingender und Flemming, 2004; Långmark et al., 2005), während im Rahmen einer Coliformen-Kontamination eines Trinkwasserverteilungssystems in den USA *E. coli* in Ei-

senablagerungen gefunden wurde (LeChevallier et al., 1987). In einer anderen Studie wurde *E. coli* ebenfalls kulturell in einem von fünf Trinkwasserrohren aus Gusseisen nachgewiesen, die aus Frankreich, England, Lettland und Portugal stammten (Juhna et al., 2007). Mit der FISH-Methode (PNA-FISH) wurde *E. coli* in allen Rohren detektiert. Parallel wurde *E. coli* auf Coupons, die für 1 bis 6 Monate im Trinkwasser exponiert worden waren, in Konzentrationen von 200 bis 500 Zellen pro cm<sup>2</sup> nachgewiesen (Juhna et al., 2007). Es wurde festgestellt, dass es sich um metabolisch aktive Zellen handelte. Die Bakterien lagen auf den Oberflächen als einzelne Zellen und nicht als Mikrokolonien vor, was darauf hinwies, dass keine Vermehrung der Bakterien stattfand. Diese Beobachtungen und die eigenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass *E. coli* in Biofilmen von Trinkwasserverteilungssystemen in kultivierbarer Form nicht oder selten vorkommt, im nicht kultivierbaren Zustand aber häufiger anzutreffen ist. In einer Reihe von Felduntersuchungen unterschiedlicher Verteilungssysteme weltweit wurden coliforme Bakterien (vor allem *Citrobacter*-, *Enterobacter*- und *Klebsiella*-Arten) mit Kulturverfahren gelegentlich in Trinkwasserbiofilmen, z. B. auf Innenwandungen von Rohren oder auf exponierten Coupons aus Eisenwerkstoffen oder auf weichdichtenden Absperrschiebern aus elastomeren Werkstoffen wie EPDM nachgewiesen (LeChevallier et al., 1987; Sartory und Holmes, 1997; Kilb et al., 2003; Wingender und Flemming, 2004; Batté et al., 2006). Literaturangaben weisen darauf hin, dass unter bestimmten Bedingungen bei Wassertemperaturen ab etwa 15 °C eine erhöhte Befundhäufigkeit coliformer Bakterien im Trinkwasser von Verteilungssystemen auftreten kann (siehe Abschnitt 1.3.4). Die Ergebnisse der vorliegenden Feldversuche zeigten die Tendenz einer Saisonalität für das Vorkommen von coliformen Bakterien in Biofilmen des untersuchten Netzes mit der höchsten Befundhäufigkeit im Sommer als der wärmsten Jahreszeit. Dies ist ein möglicher Hinweis, dass mit zunehmender Wassertemperatur erhöhte Gehalte von coliformen Bakterien im Biofilm einhergehen können und die Freisetzung aus den Biofilmen unter diesen Bedingungen eine mögliche Erklärung für erhöhte Befundhäufigkeiten dieser Bakterien im Trinkwasser ist.

Um einen möglichen Einfluss der Temperatur auf die Biofilmpopulationen zu untersuchen, wurden die Biofilme auf EPDM mittels der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) weitergehend analysiert. Die DGGE-Methode erlaubt die Analyse der genotypischen Zusammensetzung bzw. Diversität von mikrobiellen Gemeinschaften wie z. B. von Trinkwasserbiofilmen. Die Unterscheidung einzelner Organsimen erfolgt durch die Erfassung der ubiquitär in Bakterien vorkommenden 16S rDNA, die sich in ihrer Sequenz organismenabhängig unterscheidet. Mit Hilfe der PCR werden die unterschiedlichen 16S rDNA-Fragmente vervielfältigt und mittels der DGGE in Gelen aufgetrennt. Die erhaltenen Bandenmuster stellen einen genetischen Fingerabdruck der jeweiligen mikrobiellen Gemeinschaft dar. Durch Vergleich der Bandenmuster lassen sich Ähnlichkeiten z. B. zwischen verschiedenen Biofilmen berechnen. Verglichen wurden im Folgenden Biofilme von 8 verschiedenen Standorten aus drei Probenahmekampagnen im Sommer, Herbst und Winter (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Bandenmuster der DGGE von Biofilmpopulationen der Feldversuche. Spuren 1-3: Klimatop Innenstadt (Herbst, Winter, Sommer), Spuren 4-6: Klimatop Stadtrand (Herbst, Winter, Sommer), Spuren 7-9: Klimatop Park (Herbst, Winter, Sommer), Spuren 10-12: Klimatop Wald (Herbst, Winter, Sommer).**

Die mittlere Ähnlichkeit der Biofilme innerhalb aller Klimatope der 8 Standorte war im Mittel 76 % für den Sommer-Winter-Vergleich, 66 % für den Sommer-Herbst-Vergleich und 84 % für den Herbst-Winter-Vergleich (Tabelle 9). Aus Tabelle 9 geht hervor, dass innerhalb der Klimatope die Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen bei der geringsten Temperaturdifferenz am höchsten sind. Jedoch sind die Ähnlichkeiten der Biofilme bei der größten Temperaturdifferenz nur 8 % geringer. Ein Vergleich der Biofilmpopulationen zwischen den verschiedenen Klimatopen zeigte Ähnlichkeiten von 46 % im Mittel für alle Jahreszeitenvergleiche (Tabelle 9). Die Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen am gleichen Standort waren also immer höher als zwischen den 8 unterschiedlichen Standorten. Die Unterschiede der durchschnittlichen mittleren Tagestemperaturen des Trinkwasser am Probenahmetag waren innerhalb der Klimatope zwischen Sommer und Winter 10,7 °C, zwischen Sommer und Herbst 7,9 °C und zwischen Herbst und Winter 2,9 °C. Klimatopübergreifend waren die Differenzen zwischen Sommer und Winter vergleichbar (Tabelle 10) Es wurde daher weder ein eindeutiger Einfluss der Temperatur auf die Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen innerhalb der einzelnen Klimatope festgestellt noch zwischen den Klimatopen.

	Temperaturdifferenz (°C)	Ähnlichkeit Biofilmpopulation (%)
Sommer/Winter	10,5	46
Sommer/Herbst	9,4	46
Herbst/Winter	3,1	46

**Tabelle 9 Durchschnittliche Temperaturdifferenzen des Trinkwasser am Probenahmetag und Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen; klimatopübergreifend**

	Temperaturdifferenz (°C)	Ähnlichkeit Biofilmpopulation (%)
Sommer/Winter	10,7	76
Sommer/Herbst	7,9	66
Herbst/Winter	2,9	84

Tabelle 10: Durchschnittliche Temperaturdifferenz des Trinkwasser am Probenahmetag und Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen; betrachtet wurden die einzelnen Klimatope (nicht klimatopübergreifend).

### Kernaussagen Trinkwasserbiofilme:

- Trinkwasserbiofilme waren stärker auf den Materialien ausgeprägt (höhere Zelldichten), die Nährstoffe abgeben können (EPDM > PE > Edelstahl).
- Die Biofilme auf EPDM und PE prägten sich durch zunehmende Trinkwassertemperaturen stärker aus, was zu einer erhöhten Kontaminationswahrscheinlichkeit des Trinkwassers führen kann.
- In den Biofilmen wurden in 18 % der kulturell untersuchten Proben hygienisch relevante Mikroorganismen in geringer Konzentration nachgewiesen (coliforme Bakterien, *E. coli*, Enterokokken, *Legionella* spp.). Dabei war die Befundhäufigkeit abhängig vom eingesetzten Prüfmaterial (EPDM > PE > Edelstahl).
- Eine leichte Zunahme der Befundhäufigkeit von 4 % auf 17 % von coliformen Bakterien wurde bei erhöhten Temperaturen (Sommer > Herbst > Winter) nachgewiesen.
- Mit Hilfe der molekularbiologischen FISH-Methode waren zusätzlich auch nicht kultivierbare hygienisch relevante Mikroorganismen in Trinkwasserbiofilmen nachweisbar (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Legionella* spp., *L. pneumophila*).
- Die Befundhäufigkeit von *E. coli* mittels FISH war abhängig von der Temperatur: Zunahme mit steigender Temperatur (Sommer > Herbst > Winter).
- Die Befundhäufigkeit von *E. coli* war abhängig vom Werkstoff (EPDM > PE > Edelstahl).
- Die Befundhäufigkeit von FISH-positiven *P. aeruginosa* nahm mit steigender Temperatur ab (Sommer ≤ Herbst < Winter). Die detaillierte Betrachtung der Klimatope mit den größten Temperaturdifferenzen (Innenstadt, Wald, Park) unterstützt dieses Ergebnis insofern, dass im wärmsten Klimatop im Sommer *P. aeruginosa* nicht nachgewiesen wurde, jedoch aber in den kühleren Klimatopen.
- Die detaillierte Betrachtung der Konzentrationen von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* in den Klimatopen mit den größten Temperaturdifferenzen (Innenstadt, Wald, Park) mittels FISH ergab keine eindeutigen Hinweise auf einen Temperatureinfluss.
- Innerhalb eines Klimatops waren die Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen bei den verschiedenen Probenahmekampagnen relativ vergleichbar. Es wurde zwischen den Klimatopen kein eindeutiger Einfluss der Temperatur auf die Biofilmpopulation festgestellt.

## 2.2 Laborversuche

In den Laborversuchen wurden in Drehkolbenreaktoren etablierte Trinkwasserbiofilme mit vier verschiedenen hygienisch relevanten Bakterienarten kontaminiert, um deren Einnistungsverhalten, ihre Persistenz und mögliche Vermehrung temperatur- und nährstoffabhängig zu untersuchen. Dazu wurden *E. coli* zusammen mit *K. pneumoniae* sowie *P. aeruginosa* zusammen mit *L. pneumophila* eingesetzt. Die Biofilmreaktoren wurden kontinuierlich mit Trinkwasser durchströmt, um Trinkwasserbiofilme auf Coupons aus PE80 und EPDM zu erzeugen. Es wurde Trinkwasser, wie es vom Wasserver-

sorger geliefert wurde (nährstoffarmes Trinkwasser), und in parallel betriebenen Reaktoren mit Nährstoffen versetztes Trinkwasser (nährstoffreiches Trinkwasser) verwendet. Das Trinkwasser wurde im Temperaturbereich von 8 °C bis 29 °C temperiert. Nach 14 Tagen wurden die Reaktoren mit den etablierten Biofilmen einmalig durch Zugabe von *E. coli* und *K. pneumonia* und parallel von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* angeimpft, um eine bakterielle Kontamination zu simulieren. Nach einer Stagnationsphase von 20 Stunden wurden die Reaktoren für weitere 28 Tage im Durchfluss unter den gleichen Bedingungen wie vor der Beimpfung betrieben. Die Bildung der Biofilme wurde anhand der Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Gesamtkoloniezahl (HPC) verfolgt. Die Einnistung der Zielorganismen in die Biofilme einen Tag nach der Kontamination sowie die Persistenz bzw. Vermehrung der Organismen in den Biofilmen über die gesamte Untersuchungsdauer von 28 Tagen wurde mit Kulturverfahren sowie der molekularbiologischen Methode der FISH untersucht.

### Biofilmbildung

Die maximalen Zelldichten (flächenbezogene Gesamtzellzahlen) der Trinkwasserbiofilme wurden unter allen Bedingungen nach 14 Tagen zum Zeitpunkt der Animpfung der Reaktoren erreicht und veränderten sich nicht wesentlich im Verlauf des weiteren Untersuchungszeitraums von 28 Tagen. Die Gesamtzellzahlen der Biofilme in Nährstoff-supplementiertem Trinkwasser waren mit ca. einer Log-Stufe auf EPDM bzw. zwei Log-Stufen auf PE80 immer höher als im nährstoffarmen Trinkwasser. Dabei waren die Gesamtzellzahlen der Biofilme auf EPDM um ca. eine bis zwei Log-Stufen erhöht im Vergleich zu Biofilmen auf PE80. Die maximalen Zelldichten (flächenbezogene Gesamtzellzahlen) der Trinkwasserbiofilme wurden unter allen Bedingungen nach 14 Tagen zum Zeitpunkt der Animpfung der Reaktoren erreicht und veränderten sich nicht wesentlich im Verlauf des weiteren Untersuchungszeitraums von 28 Tagen. Die Gesamtzellzahlen der Biofilme in Nährstoff-supplementiertem Trinkwasser waren mit ca. einer Log-Stufe auf EPDM bzw. zwei Log-Stufen auf PE80 immer höher als im nährstoffarmen Trinkwasser. Dabei waren die Gesamtzellzahlen der Biofilme auf EPDM erhöht (ca. eine bis zwei Log-Stufen) im Vergleich zu PE80. Unter nährstoffarmen Bedingungen lag die Gesamtzellzahl der Biofilme auf PE80 temperaturunabhängig bei etwa  $1 \times 10^5$  bis  $6 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Unter nährstoffreichen Bedingungen erhöhte sich die Gesamtzellzahl auf  $3 \times 10^7$  bis  $3 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Auf EPDM lag die Gesamtzellzahl bei etwa  $2 \times 10^6$  bis  $3 \times 10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> unter nährstoffarmen Bedingungen und bei etwa  $2 \times 10^7$  bis  $3 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> unter nährstoffreichen Bedingungen. Insgesamt waren unter den jeweiligen Bedingungen (unterschiedliche Werkstoffe und Nährstoffgehalte) keine deutlichen Veränderungen der Gesamtzellzahlen der Biofilme über den Temperaturbereich von 8 °C bis 29 °C zu beobachten. Auch der HPC änderte sich nicht wesentlich mit zunehmender Temperatur. Nach 14 Tagen der Biofilmetablierung lagen im nährstoffarmen System die Konzentrationen des HPC bei den unterschiedlichen Temperaturen bei  $2 \times 10^4$  (21 °C) bis  $4 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> (29 °C) (geometrisches Mittel beider nährstoffarmer Reaktoren). Unter nährstoffreichen Bedingungen waren die Konzentrationen mit Werten von  $2 \times 10^7$  (25 °C) bis  $1 \times 10^9$  KBE/cm<sup>2</sup> (12 °C) (geometrisches Mittel beider nährstoffreicher Reaktoren) deutlich höher, jedoch wurde auch unter nährstoffreichen Bedingungen der HPC nicht wesentlich von der Temperatur beeinflusst. Diese Beobachtungen zeigten, dass die Biofilmbildung abhängig vom Nährstoffgehalt und dem Werkstoff erfolgte, aber eine deutliche Abhängigkeit der Biofilmbildung von der Trinkwassertemperatur nicht vorhanden war.

#### 2.2.1 Einnistung

Um zu überprüfen, ob sich *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in die etablierten Trinkwasserbiofilme einnisten konnten, wurden die Biofilme unmittelbar vor und 1 Tag nach Beimpfung mittels konventionellen Kulturverfahren und der molekularbiologischen Methode der FISH analysiert.

***E. coli* und *K. pneumoniae***

Vor Animpfen der Biofilmreaktoren konnten *E. coli* und *K. pneumoniae* weder kulturell noch mittels FISH in den Biofilmen nachgewiesen werden. Unabhängig von der Wassertemperatur, dem Werkstoff und dem Nährstoffangebot fand eine Einnistung von *E. coli* und *K. pneumoniae* in die Trinkwasserbiofilme statt wie für PE80 in den Abbildungen 14 bis 17 gezeigt (Abbildungen für EPDM sind im Anhang zu finden). Dabei wurden mit kulturellen Methoden auf beiden Werkstoffen Konzentrationen der Organismen im Bereich von ca.  $10^1$ – $10^3$  MPN/cm<sup>2</sup> bestimmt. Die Konzentration der FISH-positiven Zellen, die kultivierbare und nicht kultivierbare Zellen umfassen, war für beide Organismen sowohl auf PE80 als auch auf EPDM verglichen mit der Konzentration der kultivierbaren Zellen 2 bis 3 Log-Stufen höher und lag je nach Nährstoffgehalt bei etwa  $10^4$  bis  $10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Unter nährstoffreichen Bedingungen war die Gesamtzellzahl immer 1 bis 3 Log-Stufen höher als die Konzentration der FISH-positiven-Zellen und 5 bis 6 Log-Stufen höher als die mit Kulturmethoden detektierten positiven Befunde. Die Konzentration der FISH-positiven Zellen in den Biofilmen wurde weitestgehend weder durch die Temperatur noch durch Werkstoff und Nährstoffzugabe beeinflusst. Unter nährstoffarmen Bedingungen war auf PE80 sowohl für *E. coli* als auch für *K. pneumoniae* eine um ca. 2 Log-Stufen verringerte Einnistung der kultivierbaren Zellen bei Temperaturen > 21 °C zu erkennen (Abbildungen 15 und 17). Dieser Effekt wurde auf EPDM unter nährstoffarmen Bedingungen nur für *K. pneumoniae* beobachtet. Unter nährstoffreichen Bedingungen war eine Abnahme der Konzentration der kultivierbaren Zielorganismen auf keinem der beiden Werkstoffe zu erkennen. Auffällig war, dass bei 25°C keiner der beiden Zielorganismen kulturell nachgewiesen werden konnte.

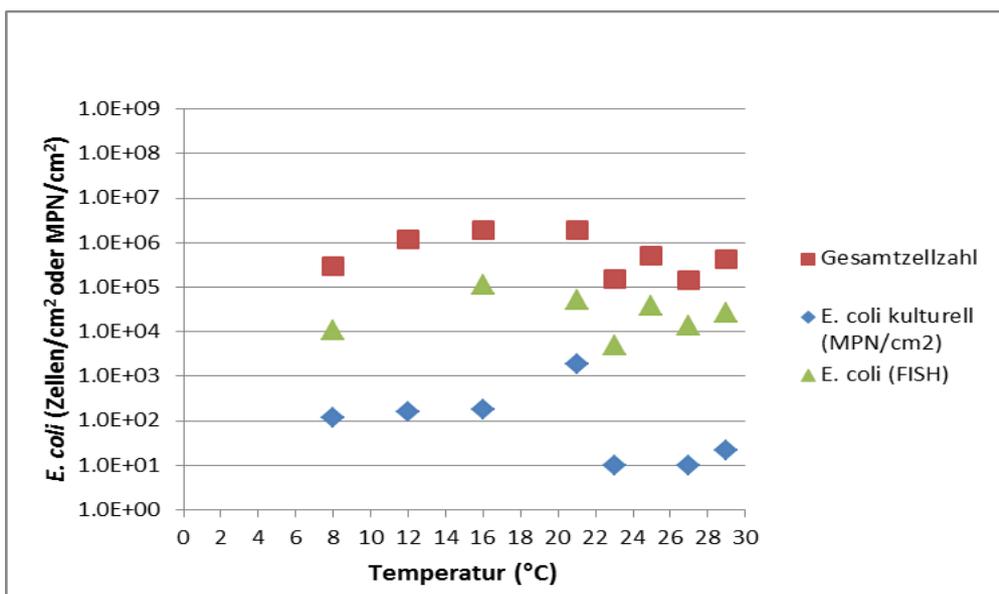


Abbildung 14: Einnistung von *E. coli* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung der Biofilmreaktoren unter nährstoffarmen Bedingungen.

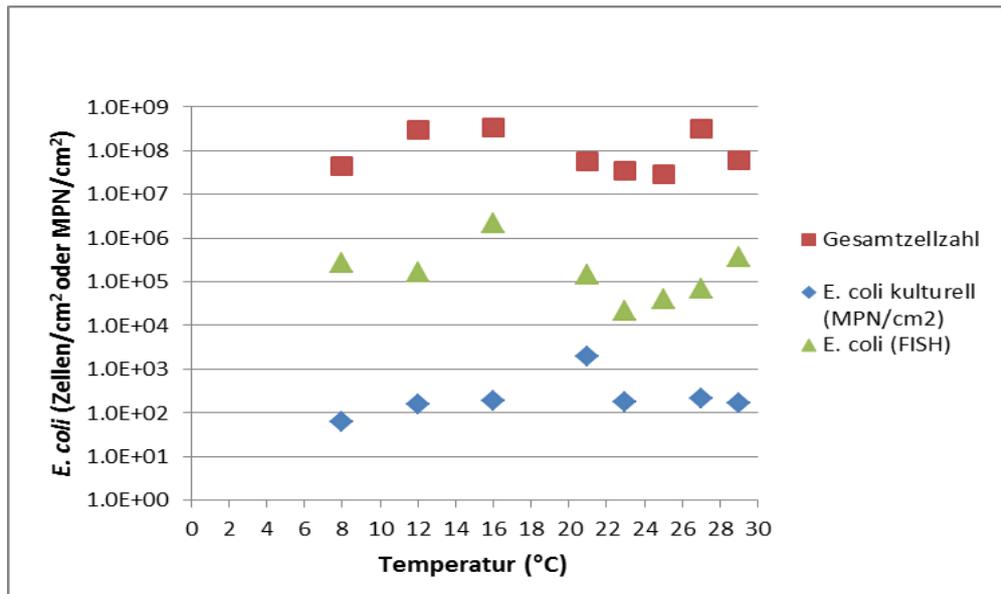


Abbildung 15: Einnistung von *E. coli* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

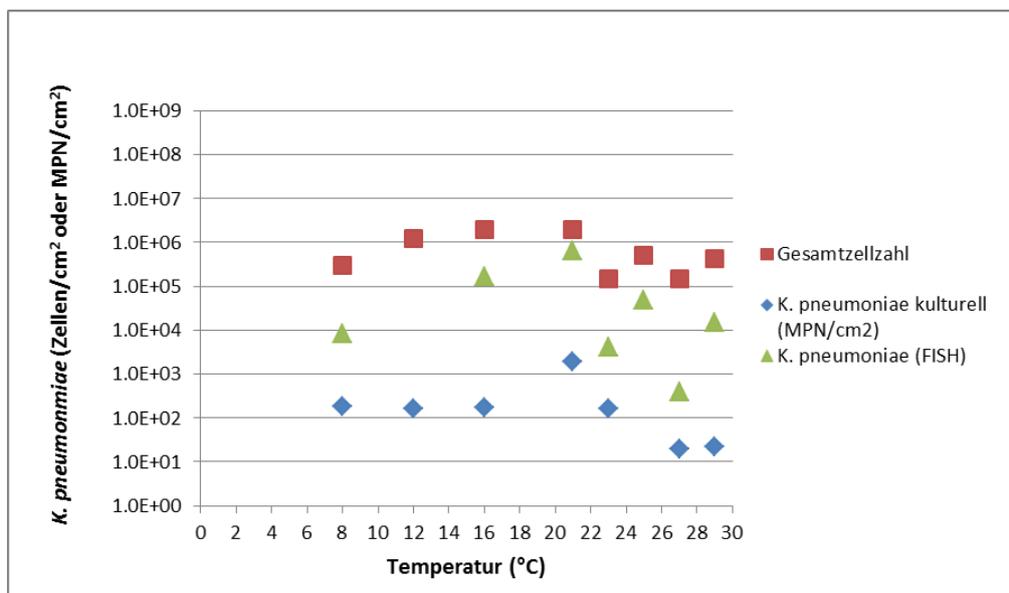


Abbildung 16: Einnistung von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilme auf PE 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

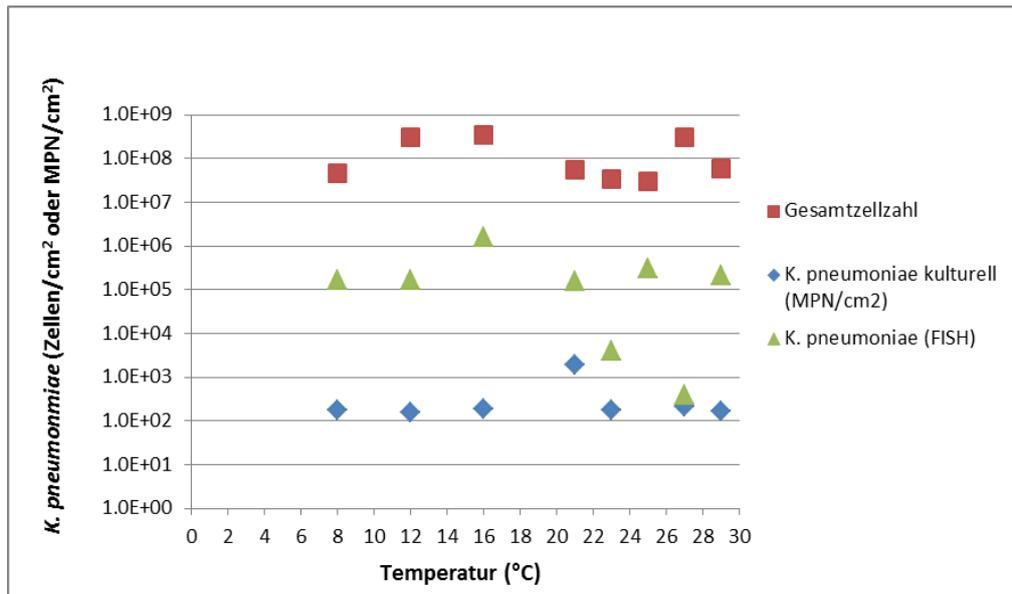


Abbildung 17: Einnistung von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilme auf PE 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

### *P. aeruginosa* und *Legionella pneumophila*

*P. aeruginosa* und *Legionella* spp. konnten vor Animpfen der Trinkwasserbiofilme mittels kultureller Verfahren nicht detektiert werden. Mittels FISH wurden die Zielorganismen jedoch schon vor dem Animpfen der Reaktoren in den etablierten Trinkwasserbiofilmen nachgewiesen.

*P. aeruginosa* nistete sich bei allen Temperaturen (8 °C bis 29 °C) in die etablierten Biofilme ein. Auf PE80 war ein Anstieg der Konzentration kultivierbarer *P. aeruginosa* bei Temperaturen > 21 °C zu beobachten. Dieser Effekt war auf EPDM deutlicher ausgeprägt und nährstoffunabhängig (Abbildung 41, Daten im Anhang). Unter nährstoffarmen Bedingungen stieg die Zahl der kultivierbaren *P. aeruginosa* auf PE80 bei Temperaturen über 21 °C um etwa 1 Log-Stufe an (Abbildung 18). Auf EPDM stieg sie sowohl unter nährstoffarmen als auch nährstoffreichen Bedingungen bei 23 °C um mehr als eine Log-Stufe auf  $4 \times 10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> an und bei 25 °C lag sie bei  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> (Abbildungen 41 und 43). Unter nährstoffreichen Bedingungen fand auf PE80 eine deutliche Zunahme bei 25 °C statt. Hier stieg die Zahl der kultivierbaren *P. aeruginosa* um 3 log-Stufen auf  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> an und fiel bei 29 °C wieder ab auf  $10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> (Abbildung 20).

Für *L. pneumophila* war sowohl auf PE80 als auch auf EPDM eine Zunahme der Konzentration an kultivierbaren Bakterien um ca. 1 bis 2 Log-Stufen bei Temperaturen über 8 °C zu beobachten. Dies geschah in gleicher Größenordnung sowohl unter nährstoffarmen als auch unter nährstoffreichen Bedingungen. Bei 25 °C war auf beiden Werkstoffen unter nährstoffarmen Bedingungen eine Abnahme der kultivierbaren *L. pneumophila* im Trinkwasserbiofilm zu beobachten. Bei 29 °C war eine Erhöhung der Konzentration sowohl auf PE als auch auf EPDM, zu erkennen (Abbildungen 19 und 42). Unter nährstoffreichen Bedingungen konnten auf PE80 kulturell keine *L. pneumophila* bei Temperaturen  $\geq 25$  °C nachgewiesen werden (Abbildung 21). Die Konzentration kultivierbarer Legionellen stieg bei konstanter Gesamtzellzahl bei Temperaturen ab 12 °C um 2 Log-Stufen auf  $10^2$  KBE/cm<sup>2</sup> verglichen zu 8 °C (Abbildungen 42 und 44). Bei 25 °C sank die Konzentration unter nährstoffarmen Bedingungen um eine Log-Stufe und stieg bei 29 °C wieder leicht an. Unter nährstoffreichen Bedingungen konnten auf beiden Werkstoffen bei Temperaturen  $\geq 25$  °C keine Legionellen mit der kulturellen Methode nachgewiesen werden.

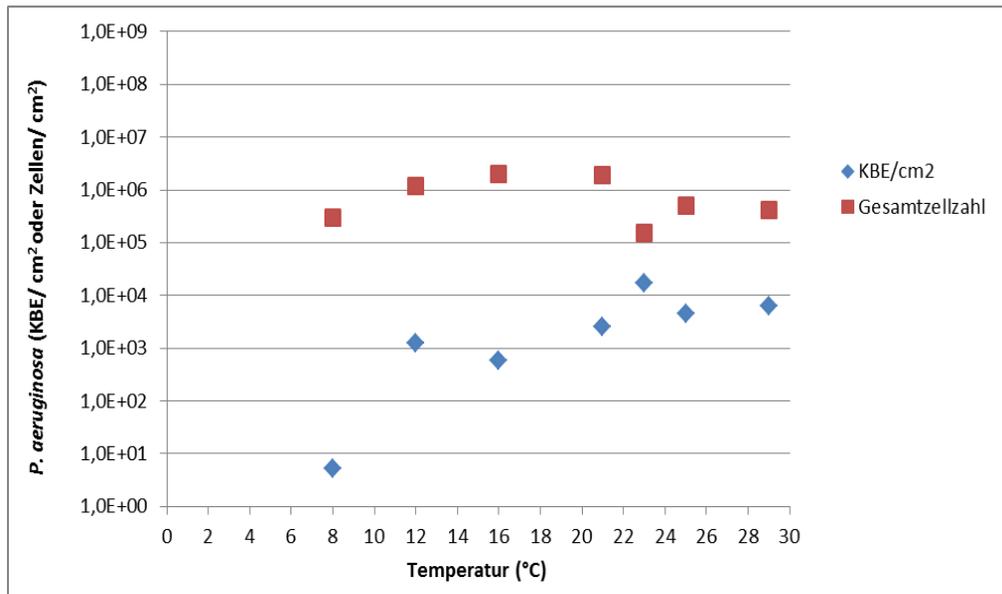


Abbildung 18: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

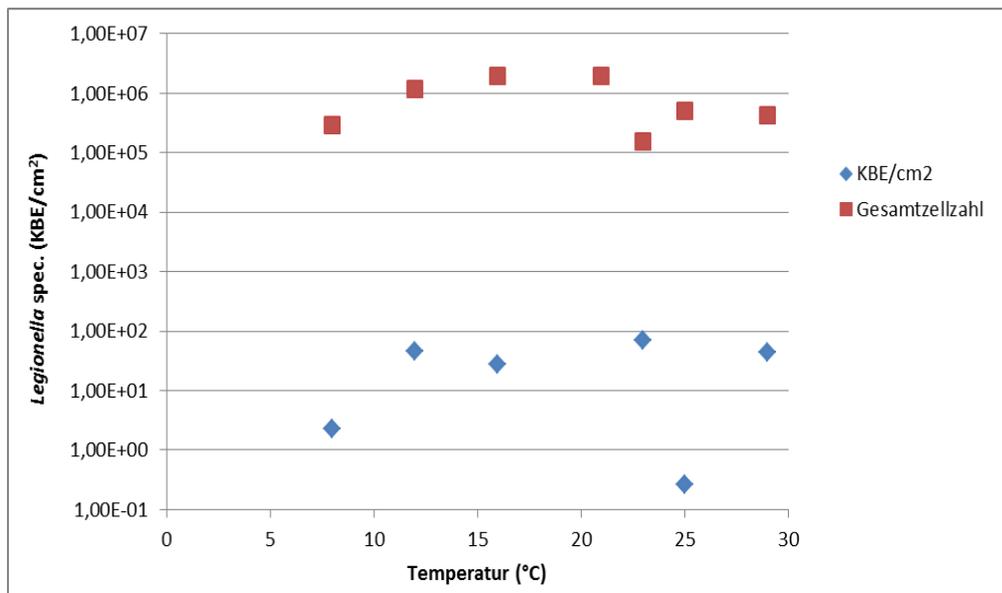


Abbildung 19: Einnistung von *L. pneumophila* in Biofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

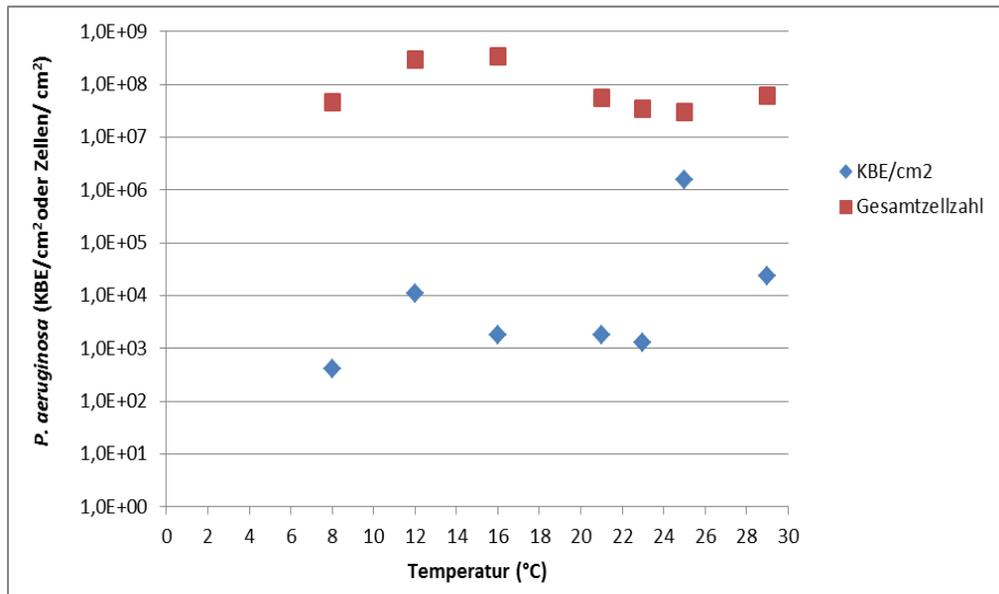


Abbildung 20: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

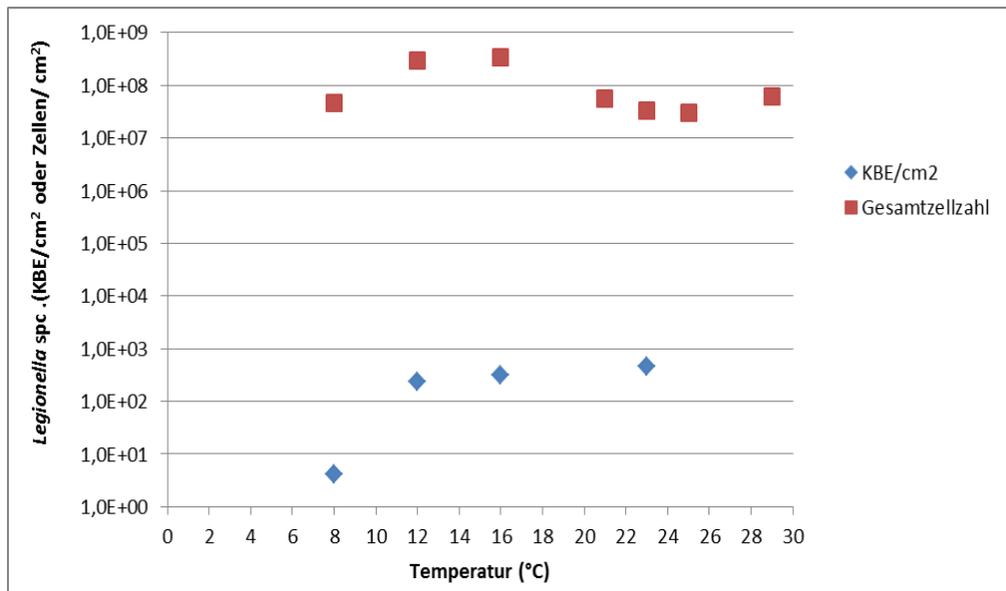


Abbildung 21: Einnistung von *Legionella pneumophila* in Trinkwasserbiofilme auf PE80 1 Tag nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

Betrachtete man den Einfluss der Nährstoffe in Abhängigkeit von der Temperatur, so ließ sich feststellen, dass die Konzentration (KBE/cm<sup>2</sup>) von eingesteten *P. aeruginosa* auf EPDM bei 12 °C, 21 °C und 29 °C unter nährstoffreichen Bedingungen immer etwa eine Log-Stufe höher war als unter nährstoffarmen Bedingungen (Abbildung 22). Bei 8 °C betrug der Unterschied der Konzentrationen an kultivierbarem *P. aeruginosa* zwischen dem nährstoffarmen und dem nährstoffreichem System weniger als eine halbe Log-Stufe. Auf PE80 zeigte sich bei 8 °C ein deutlicher Unterschied der Effektivität der Einnistung von *P. aeruginosa* unter nährstoffarmen und nährstoffreichen Bedingungen. Unter nährstoffreichen Bedingungen war die Konzentration an kultivierbarem *P. aeruginosa* fast zwei Log-Stufen höher als unter nährstoffarmen Bedingungen. Bei höheren Temperaturen war dieser Effekt nicht so ausgeprägt (Abbildung 22).

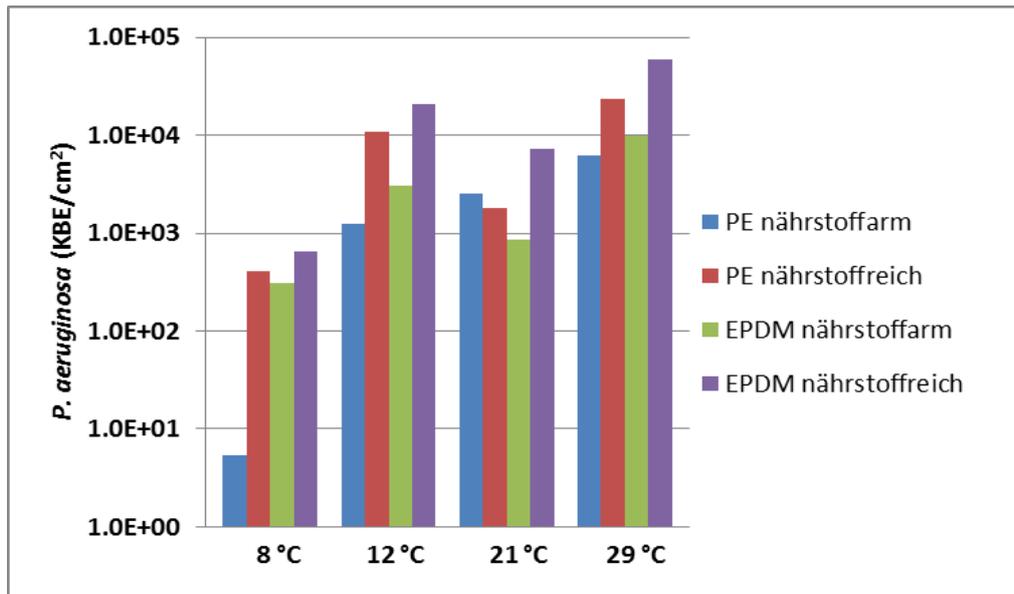


Abbildung 22: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme 1 Tag nach Animpfen in Abhängigkeit von Werkstoff, Nährstoffgehalt und Temperatur.

Die kulturelle Nachweisbarkeit von *L. pneumophila* nahm unter nährstoffreichen Bedingungen bei Temperaturen > 21 °C ab. Bei 8 °C war nur ein geringer Einfluss des Nährstoffgehaltes auf die Effektivität der Einnistung zu erkennen. Dieser Einfluss war auf PE80 bei 12 °C und 16 °C ausgeprägter. Auf EPDM hingegen war bei diesen Temperaturen kein Effekt durch Nährstoffzugabe zu beobachten (Abbildung 23).

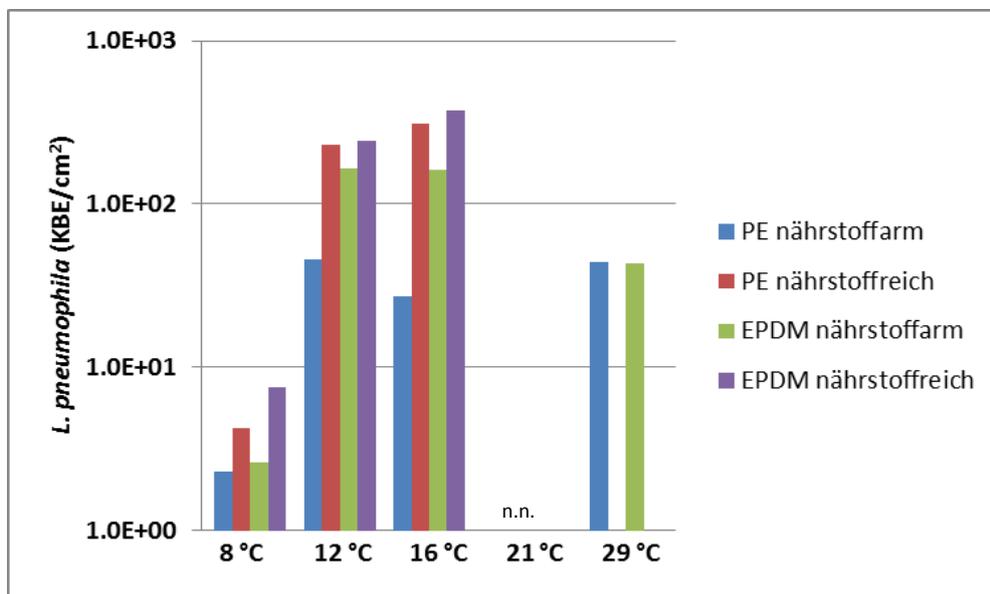


Abbildung 23: Einnistung von *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilme 1 Tag nach Animpfen in Abhängigkeit von Werkstoff und Nährstoffgehalt und Temperatur; n.n. : nicht nachgewiesen.

#### Kernaussagen Einnistung:

- Mit kulturellen Nachweismethoden wurden die vier untersuchten Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* vor Animpfen der Biofilmreaktoren weder in der Wasserphase noch in den etablierten Biofilmen detektiert.

- Alle Zielorganismen konnten in die etablierten Trinkwasserbiofilme eingenistet werden; *L. pneumophila* war unter nährstoffreichen Bedingungen jedoch nicht bei allen Temperaturen 1 Tag nach Animpfen der Biofilme kulturell nachweisbar.
- Die Zahl der positiven Befunde für *E. coli* und *K. pneumoniae* war mittels FISH höher als mit kulturellen Methoden, was auf ein mögliches Vorkommen der Organismen im VBNC-Zustand hinweisen kann.
- Die Effektivität der Einnistung von *E. coli* und *K. pneumoniae* in die etablierten Trinkwasserbiofilme war weitgehend unabhängig von der Temperatur, dem Werkstoff und dem Nährstoffangebot.
- Bei Temperaturen > 21 °C zeigte sich verringerte Einnistung der kultivierbaren *E. coli* und *K. pneumoniae*.
- Die Effektivität der Einnistung von *P. aeruginosa* war abhängig von der Temperatur: bei Temperaturen > 21 °C nahm die Zahl der kultivierbaren Zellen deutlich zu.
- Bei 8 °C erhöhte die Zugabe von Nährstoffen deutlich die Effektivität der Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf PE80.
- Die Effektivität der Einnistung von *L. pneumophila* war bei Temperaturen > 8 °C relativ konstant mit Ausnahme von 25 °C; hier nahm die Kultivierbarkeit ab.
- Für *L. pneumophila* zeigte sich unter nährstoffreichen Bedingungen eine Abnahme der Effektivität der Einnistung bei Temperaturen > 21 °C.

### 2.2.2 Persistenz

#### ***E. coli* und *K. pneumoniae***

Zur Überprüfung, wie lange die Zielorganismen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in den Trinkwasserbiofilmen persistieren können, wurden die Biofilme kulturell und kulturunabhängig über einen Zeitraum von 28 Tagen analysiert. Die beiden Zielorganismen *E. coli* und *K. pneumoniae* waren mittels der kulturunabhängigen FISH-Methode in den Biofilmen länger nachzuweisen als mit konventionellen Kulturverfahren. Unter nährstoffarmen Bedingungen auf PE80 konnte *E. coli* mittels FISH in 100 % der Biofilmproben über die gesamte Dauer der Experimente von 28 Tagen nachgewiesen werden, unter nährstoffreichen Bedingungen in 87,5 % der Proben (bei 12 °C wurde keine FISH durchgeführt; Abbildungen 24 und 25). Mit dem angewandten Kulturverfahren wurde *E. coli* unter nährstoffarmen Bedingungen bei allen Temperaturen auf PE maximal 1 Tag nach Animpfen detektiert mit Ausnahme von 16 °C; hier war *E. coli* über den gesamten Untersuchungszeitraum von 28 Tagen kulturell nachweisbar. Die kulturelle Nachweisbarkeit im Ablaufwasser des Biofilmreaktors war immer genauso lang wie die kulturelle Nachweisbarkeit in den Biofilmen. Die Zugabe von Nährstoffen erhöhte die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit. Bei 8 °C, 12 °C, 21 °C, 27 °C und 29 °C wurde *E. coli* unter nährstoffreichen Bedingungen 28 Tage im Biofilm nachgewiesen. Die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit im Ablauf erhöhte sich ebenfalls und betrug außer bei 12 °C, 16 °C und 25 °C immer 28 Tage (Abbildung 25). Bei 25 °C wurde *E. coli* sowohl auf PE80 als auch auf EPDM unter nährstoffarmen Bedingungen nur mittels FISH nachgewiesen. Auch im Reaktorablauf konnte bei dieser Temperatur *E. coli* kulturell nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse auf EPDM waren vergleichbar mit denen auf PE80 und sind im Anhang zu finden (Abbildung 45, Abbildung 46).

Die Ergebnisse für *K. pneumoniae* waren ähnlich wie diejenigen für *E. coli*. Die Dauer der Nachweisbarkeit mittels FISH war unter nährstoffarmen Bedingungen deutlich länger als der Nachweis mittels kultureller Verfahren. Die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit war bei der Mehrzahl der Temperaturen maximal 1 Tag. Ausnahme war auch hier die Temperatur von 16 °C. Genau wie bei *E. coli* lag die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit bei dieser Temperatur bei 28 Tagen. Bei 29 °C betrug die

Persistenz 14 Tage. Durch die Zugabe von Nährstoffen erhöhte sich die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit. *K. pneumoniae* war unter nährstoffreichen Bedingungen auf PE80 mindestens 14 Tage kulturell nachweisbar. Die Persistenz im Ablauf des Biofilmreaktors war unter nährstoffarmen Bedingungen fast immer so lang wie die im Biofilm. Ausnahme waren 27 °C und 29 °C. Bei 27 °C war *K. pneumoniae* im Ablauf deutlich länger nachweisbar als im Biofilm selbst. Bei 29 °C war die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit im Ablauf kürzer als in den Biofilmen (Abbildung 26, Abbildung 27).

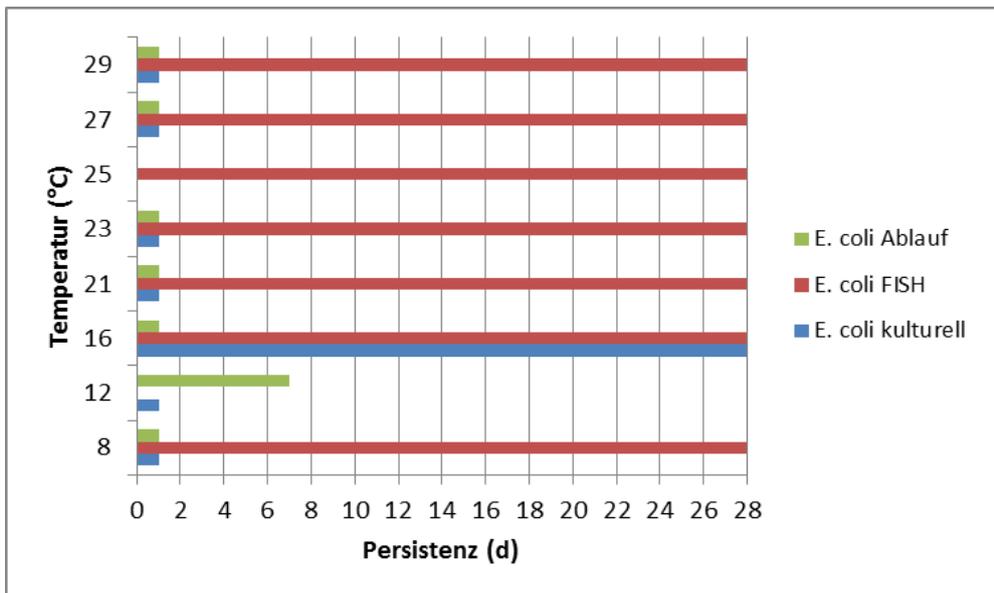


Abbildung 24: Persistenz von *E. coli* in Trinkwasserbiofilmen auf PE80 und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffarmen Bedingungen.

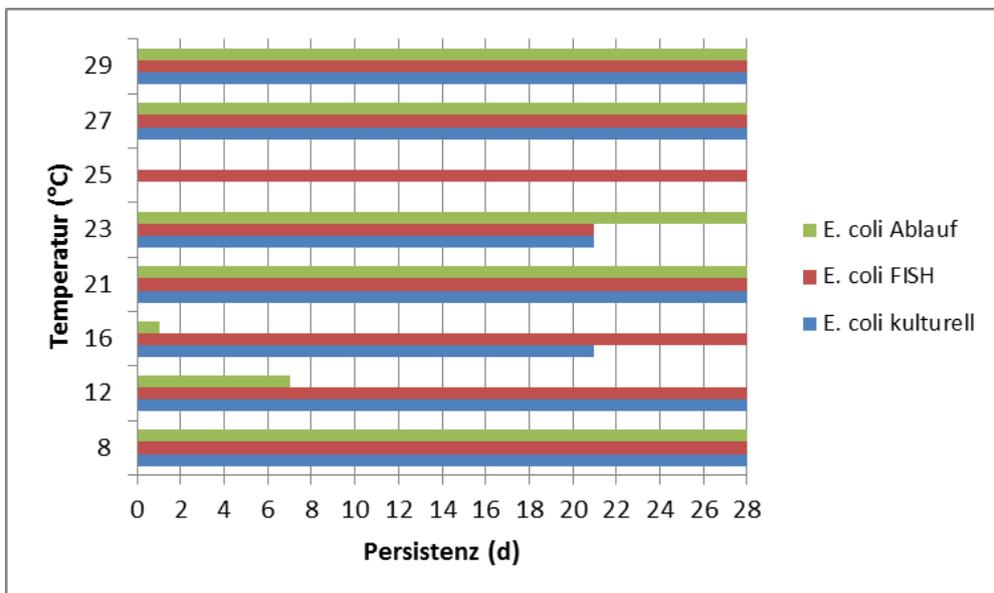


Abbildung 25: Persistenz von *E. coli* in Trinkwasserbiofilmen auf PE80 und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffreichen Bedingungen.

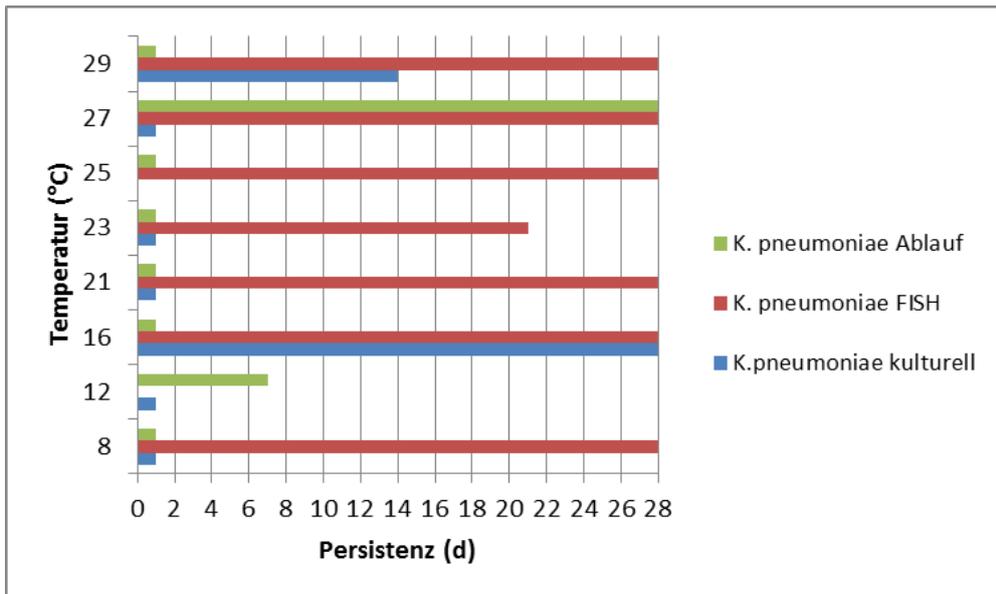


Abbildung 26: Persistenz von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilmen auf PE80 und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffarmen Bedingungen.

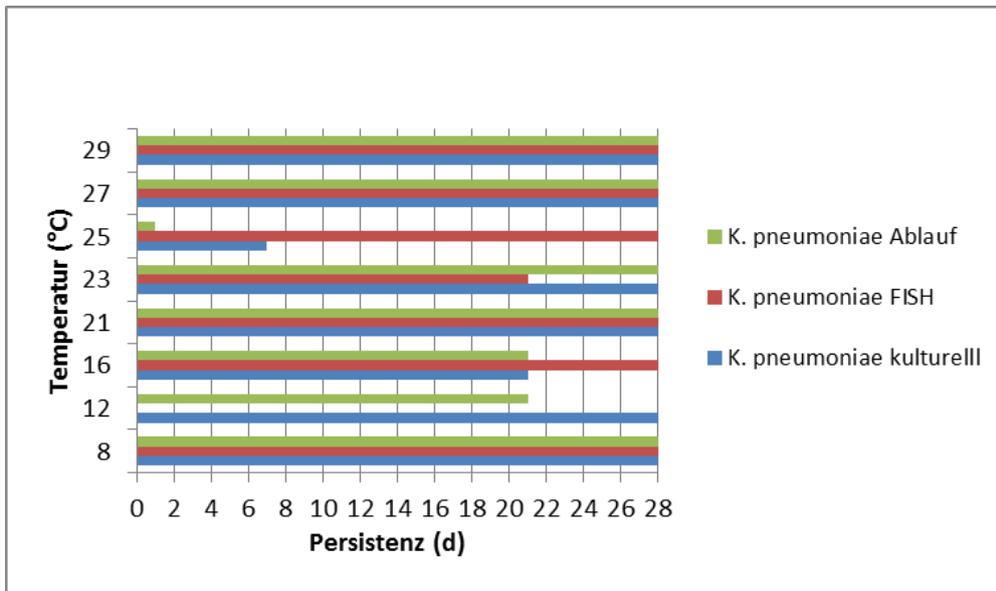


Abbildung 27: Persistenz von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilmen auf PE80 und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffreichen Bedingungen.

### *P. aeruginosa* und *L. pneumophila*

Für die Persistenz von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* in den Trinkwasserbiofilmen werden im Folgenden nur die Ergebnisse der kulturellen Analyse beschrieben, da wie oben bereits erwähnt, mit der FISH positive Befunde für beide Organismen in den Biofilmen schon vor Animpfen der Biofilmreaktoren vorlagen und daher eine Bewertung der FISH-Ergebnisse bezüglich der Persistenz der eingesteten Zielorganismen nicht eindeutig möglich war. Auf PE80 konnte *P. aeruginosa* unter nährstoffarmen Bedingungen mittels kultureller Methoden immer über den gesamten Zeitraum des Experiments von 28 Tagen nachgewiesen werden. Die Zugabe von Nährstoffen erhöhte die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit bei 25 °C auf 28 Tage (Abbildung 28, Abbildung 29). *L. pneumophila* konnte unter nährstoffarmen Bedingungen auf PE80 kulturell nur bei 21 °C nach 28 Tagen nachgewiesen

werden. Die Zugabe von Nährstoffen resultierte in einer Abnahme der Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit (Abbildung 30, Abbildung 31). Während unter nährstoffarmen Bedingungen *L. pneumophila* in allen Proben mindestens einen Tag nach Animpfen nachweisbar war, konnten auf PE80 unter nährstoffreichen Bedingungen bei drei von sieben Temperaturen kulturell keine Legionellen detektiert werden. Im Gegensatz zu *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa*, wurde bei *L. pneumophila* ein Temperatureffekt auf die Persistenz beobachtet. *L. pneumophila* persistierte bei Temperaturen > 21 °C auf PE länger in den Biofilmen als bei Temperaturen < 21 °C. Auf EPDM war *P. aeruginosa* unter nährstoffarmen und nährstoffreichen Bedingungen mit kulturellen Methoden, bis auf eine Ausnahme bei 25 °C, immer über den gesamten Zeitraum des Experiments von 28 Tagen nachweisbar. *L. pneumophila* konnte unter nährstoffarmen Bedingungen auf EPDM nur bei 12 °C über 28 Tage nachgewiesen werden, sonst maximal 21 Tage. Die Zugabe von Nährstoffen bewirkte eine Abnahme der Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit. Während unter nährstoffarmen Bedingungen *L. pneumophila* in allen Proben mindestens einen Tag nach Animpfen nachweisbar war, wurden unter nährstoffreichen bei drei Temperaturen kulturell keine Legionellen nachgewiesen.

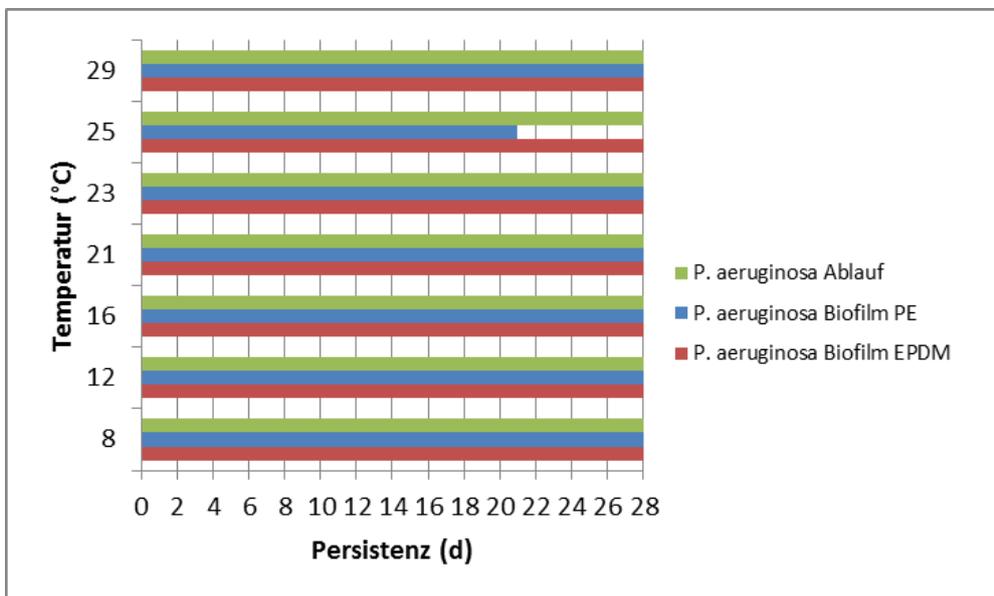


Abbildung 28: Persistenz von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffarmen Bedingungen.

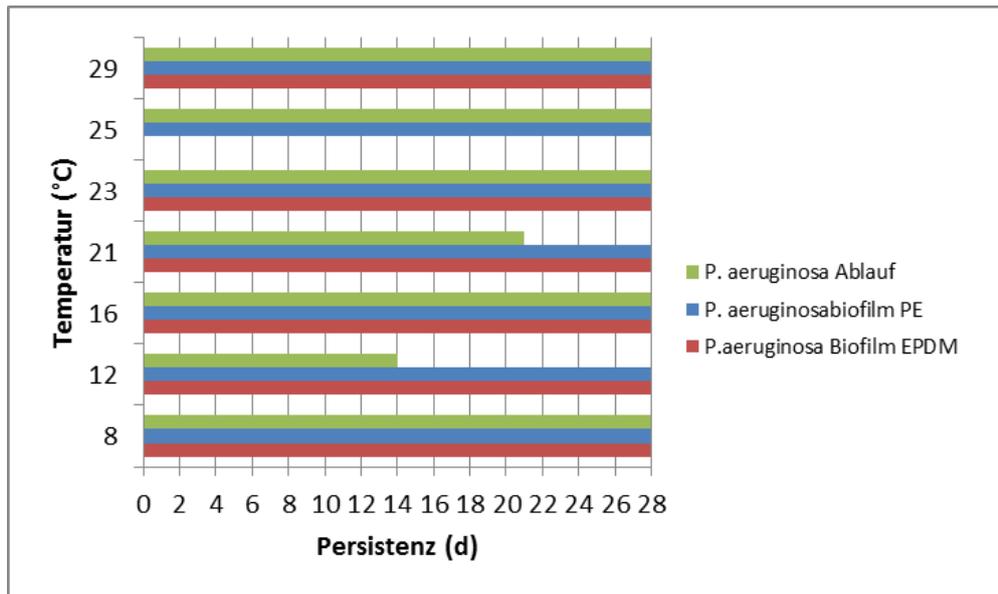


Abbildung 29: Persistenz von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffreichen Bedingungen.

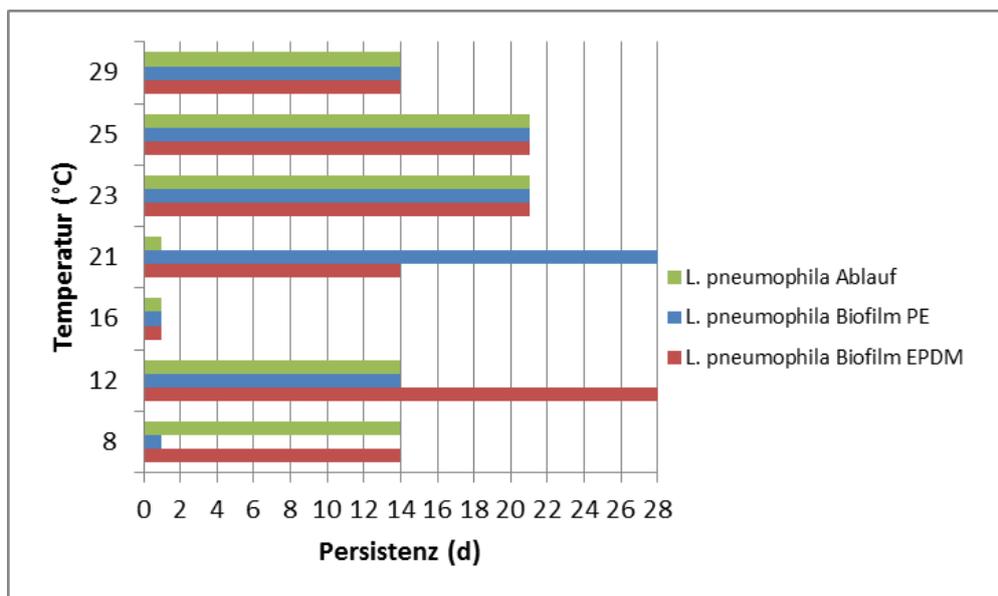


Abbildung 30: Persistenz von *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffarmen Bedingungen.

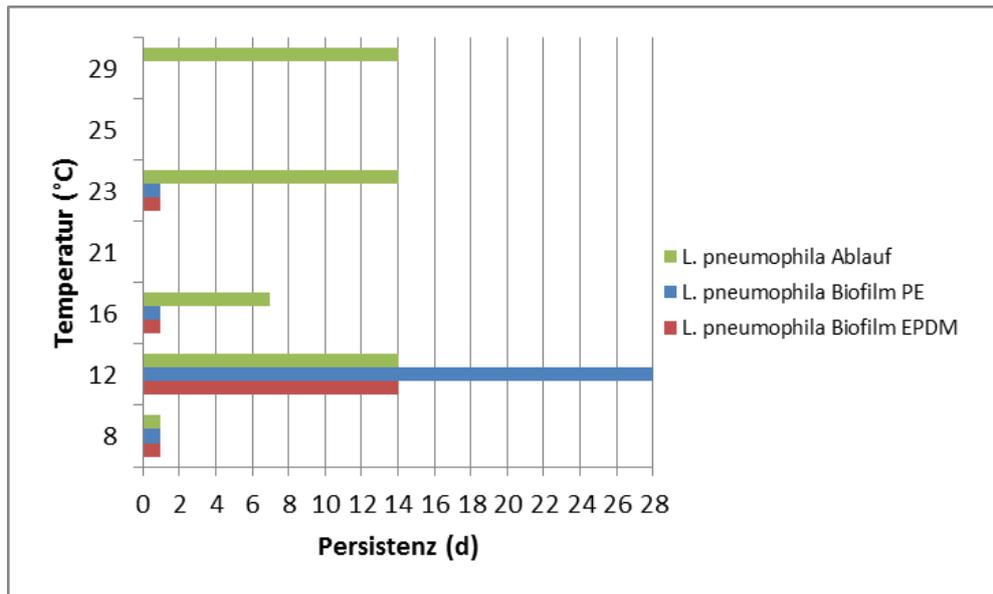


Abbildung 31: Persistenz von *L. pneumophila* in Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM und im Ablauf des Biofilmreaktors unter nährstoffreichen Bedingungen.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den positiven Befunden in den Laborexperimenten auch um die Zielorganismen handelte und nicht um eine Kontamination aus anderer Quelle, wurden die Isolate von *P. aeruginosa* exemplarisch mittels der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) analysiert. Als Kontrolle diente der Stamm AdS, der für das Animpfen der Reaktoren verwendet wurde. Es war anhand der identischen Bandenmuster eindeutig zu erkennen, dass es sich bei allen Isolaten aus den Reaktorläufen um den gleichen Stamm handelte, mit dem die Reaktoren angeimpft wurden (Abbildung 32).

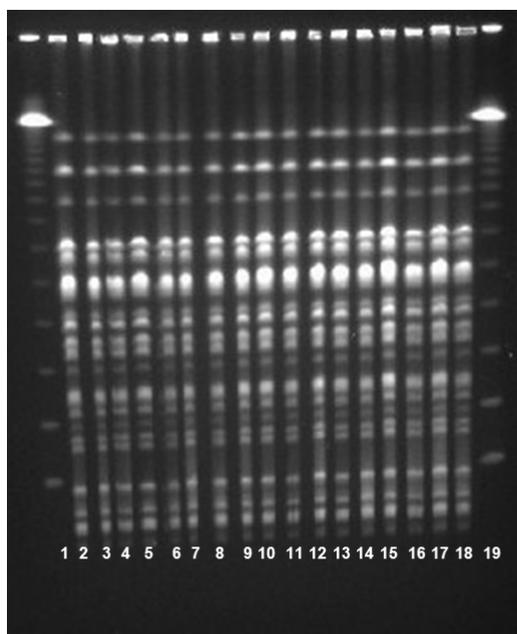


Abbildung 32: Vergleich der Bandenmuster (PFGE) von *P. aeruginosa*-Isolaten aus den Drehkolbenreaktoren mit dem Referenzstamm *P. aeruginosa* AdS. Spuren 1 und 19: Marker; Spuren 2,6,9,12,17: Isolate aus der Wasserphase; Spuren 3,4,5,7,8,10,11,13,14,15,16: Isolate aus Trinkwasserbiofilmen; Spur 18: Referenzstamm *P. aeruginosa* AdS.

Es wurde also für alle Zielorganismen kein Einfluss der Temperatur auf die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit in den Trinkwasserbiofilmen beobachtet. Jedoch zeigte sich eindeutig ein Einfluss

des Nährstoffgehaltes auf die Dauer der Kultivierbarkeit der Zielorganismen. Bei *E. coli* und *K. pneumoniae* nahm diese unter nährstoffreichen Bedingungen zu, bei *L. pneumophila* dagegen ab.

### **Kernaussagen Persistenz:**

- Nicht-kultivierbare (FISH-positive) *E. coli* und *K. pneumoniae*, wurden in den untersuchten Trinkwasserbiofilmen auf PE und EPDM über die gesamte Dauer der Experimente (28 Tage) nachgewiesen.
- Die längere Dauer der Nachweisbarkeit von *E. coli* und *K. pneumoniae* verglichen mit kulturellen Methoden und die Detektion höherer Konzentrationen mittels FISH deutet auf ein Vorliegen der Zielorganismen im VBNC-Zustand hin.
- Es konnte weder ein Temperatureffekt auf die mit FISH detektierten Zielorganismen beobachtet werden noch auf die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit.
- Es zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Zugabe von Nährstoffen auf die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit der Zielorganismen. Bei *E. coli* und *K. pneumoniae* nahm diese unter Nährstoffzugabe zu und bei *L. pneumophila* nahm diese ab.
- Die Persistenz von *P. aeruginosa* war weitestgehend unbeeinflusst von Temperatur, Material und Nährstoffsituation.
- Auf PE zeigte sich eine Verlängerung der Persistenz von *L. pneumophila* im kultivierbaren Zustand bei Temperaturen > 21 °C.
- Die Dauer der Nachweisbarkeit der Zielorganismen in den Abläufen der Biofilmreaktoren war in der Mehrheit der Proben mindestens genau so lang wie die Dauer der kulturellen Nachweisbarkeit der Zielorganismen auf einem oder beiden Werkstoffe. Somit ist ein Kontaminationsrisiko für das Trinkwasser vorhanden.

### **2.2.3 Vermehrung**

Zur Überprüfung, ob sich die Zielorganismen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* sowie *L. pneumophila* in den Trinkwasserbiofilmen vermehren können, wurden die Biofilme kulturell und kulturunabhängig über einen Zeitraum von 28 Tagen analysiert. In den nachfolgenden Abbildungen wurde der Quotient der Bakterienkonzentration nach 28tägiger Inkubation/Konzentration einen Tag nach Animpfen der Biofilmreaktoren aufgetragen.

#### ***E. coli* und *K.pneumoniae***

*E. coli* und *K. pneumoniae* wurden nur unter nährstoffreichen Bedingungen bis zu 28 Tagen nach Animpfen kulturell nachgewiesen. Im nährstoffarmen System nahm die Konzentration der Bakterien deutlich ab, so dass bereits nach 14 bis 21 Tagen ein kultureller Nachweis nicht mehr erfolgte. Damit war ein mittels kultureller Standardverfahren ermitteltes Wachstum im Trinkwasserbiofilm unter nährstoffarmen Bedingungen ausgeschlossen. Dagegen zeigten beide Bakterienarten im nährstoffreichen System nicht nur eine verlängerte Persistenz bis zu 28 Tagen, sondern ab 27° C ein Vermehrung. In Abhängigkeit vom verwendeten Werkstoff wurden für *K. pneumoniae* und *E. coli* auf PE80 bei drei Temperaturen (8 °C, 27 °C, 29 °C) und auf EPDM bei vier Temperaturen (8 °C, 23 °C, 27 °C, 29 °C) ein schwaches Wachstum um bis zu 0,6 Log-Stufen festgestellt (Abbildungen 33 und 34).

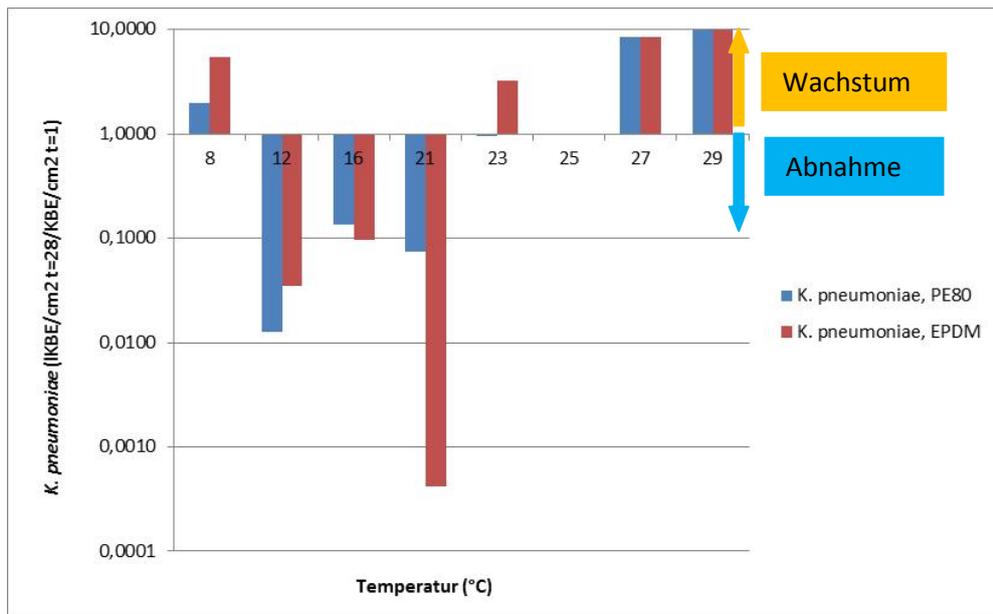


Abbildung 33: Temperaturabhängige Zu- bzw. Abnahme von *K. pneumoniae* nach 28 Tagen Inkubation unter nährstoffreichen Bedingungen.

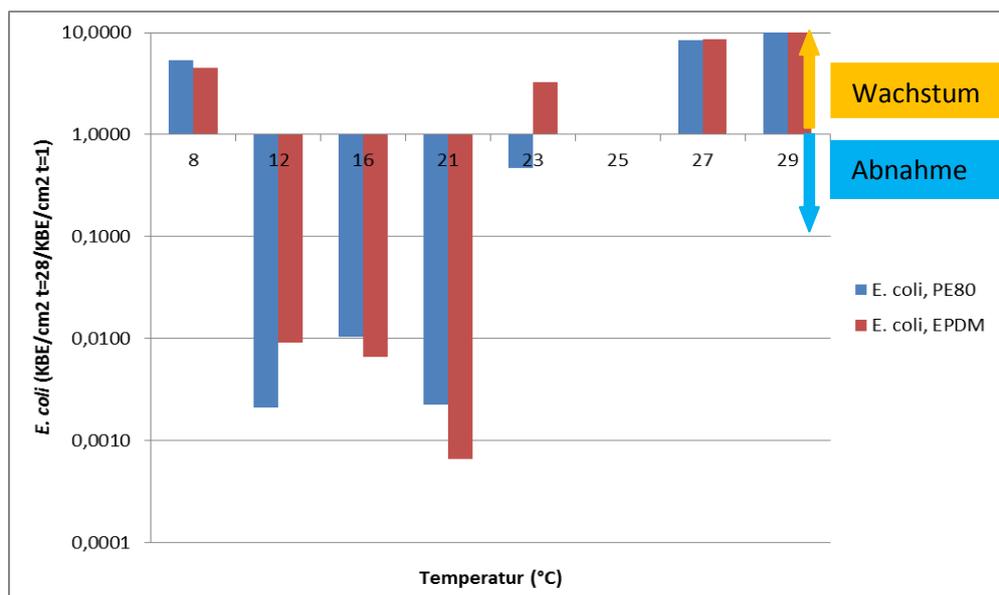


Abbildung 34: Temperaturabhängige Zu- bzw. Abnahme von *E. coli* nach 28 Tagen Inkubation unter nährstoffreichen Bedingungen

### *P. aeruginosa* und *L. pneumophila*

*P. aeruginosa* persistierte sowohl im nährstoffarmen als auch im nährstoffreichen System temperaturunabhängig über die gesamte Versuchszeit. Hier konnte festgestellt werden, dass bei keiner Temperatur ein Wachstum nachzuweisen war. Über den Temperaturbereich von 8 °C bis 29 °C nahm die Konzentration des Bakteriums im Trinkwasserbiofilm über 28 Tage ab (Abbildungen 35 und 36). Für *L. pneumophila* konnte ebenfalls kein Wachstum, unabhängig von der Temperatur, dem Nährstoffgehalt und den Werkstoffen, nachgewiesen werden.

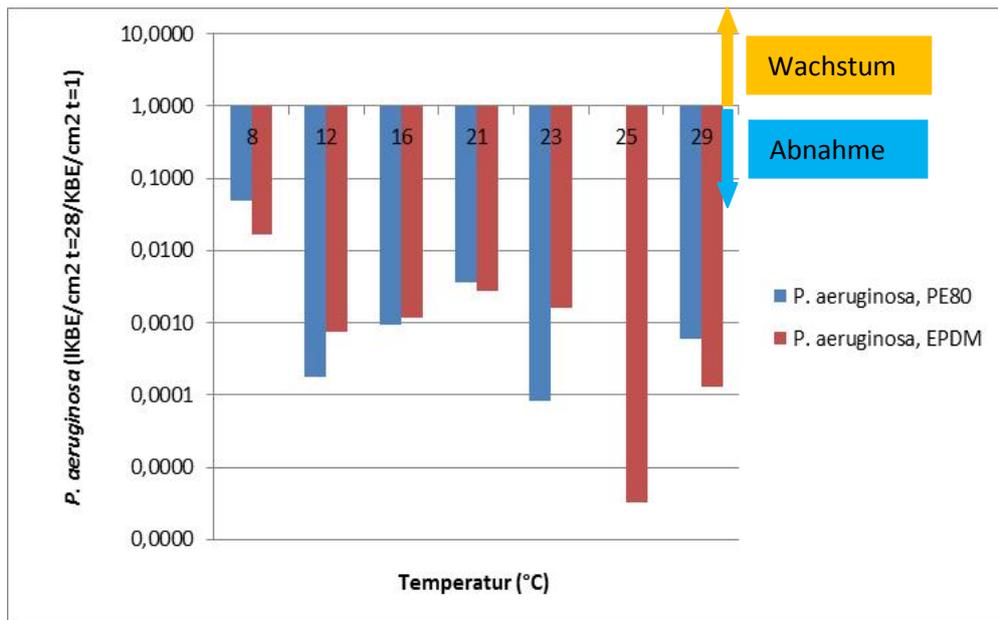


Abbildung 35: Temperatur-abhängige Zu- bzw. Abnahme von *P. aeruginosa* nach 28 Tagen Inkubation unter nährstoffarmen Bedingungen – bestimmt mit kulturellen Standardverfahren.

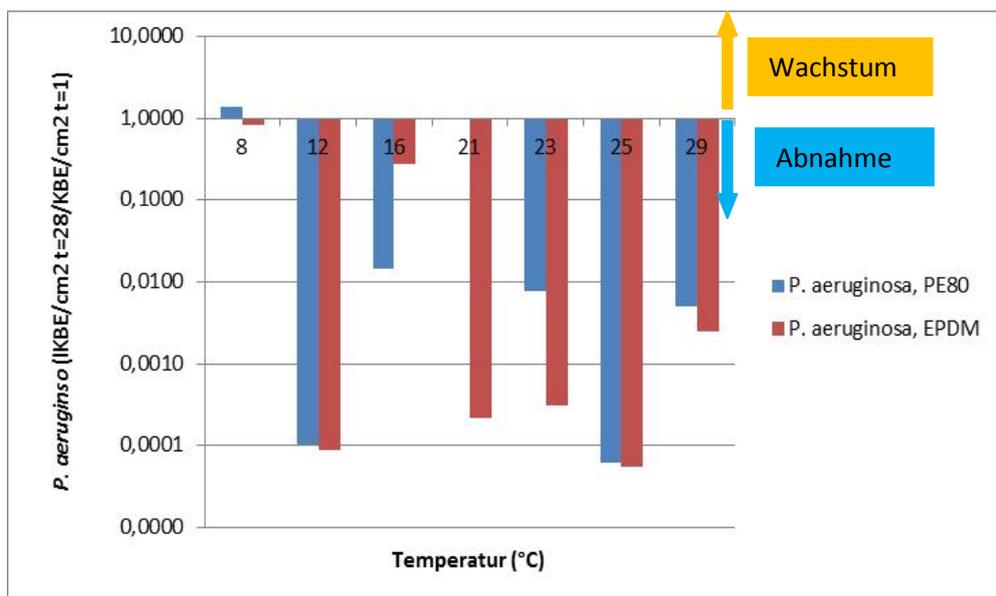


Abbildung 36: Temperatur-abhängige Zu- bzw. Abnahme von *P. aeruginosa* nach 28 Tagen Inkubation unter nährstoffreichen Bedingungen – bestimmt mit kulturellen Standardverfahren.

### Kernaussagen Vermehrung:

- Eine Vermehrung von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* fand im Trinkwasserbiofilm auch bei erhöhten Temperaturen von bis zu 29 °C nicht statt.
- Ein erhöhter Nährstoffgehalt von bis zu 150 µg/L AOC im Trinkwasser bewirkte ebenfalls keine Vermehrung. Dagegen war eine Vermehrung von *E. coli* und *K. pneumoniae* im Trinkwasserbiofilm in Anwesenheit von Nährstoffen und Temperaturen über 27 °C in geringfügigem Maß mittels kultureller Methoden nachweisbar.

- Dabei wurden mittels FISH nährstoff- und temperaturunabhängig nicht nur länger hygienisch relevante Bakterien nachgewiesen, sondern auch im Vergleich zu den Kulturverfahren in deutlich höheren Konzentrationen, teilweise um mehrere Zehnerpotenzen.

#### 2.2.4 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Wie auch in den Feldversuchen wurden die in den Drehkolbenreaktoren etablierten Trinkwasserbiofilme mittels DGGE analysiert, um einen möglichen Einfluss der Temperatur auf die Biofilmpopulationen zu erfassen. Dazu wurden die Bandenmuster der Biofilme aus einem nährstoffarmen Reaktor und aus einem nährstoffreichen Reaktor bei unterschiedlichen Temperaturen (8, 16, 21, 23, 29 °C) miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Ähnlichkeiten der Bandenmuster innerhalb eines Reaktors unter nährstoffarmen und unter nährstoffreichen Bedingungen bei der gleichen Temperatur am höchsten waren (Tabellen 11 und 12). Jedoch waren die Ähnlichkeiten unter nährstoffreichen Bedingungen nicht so hoch, wie unter nährstoffarmen Bedingungen. Die Bandenmuster eines Reaktors bei unterschiedlichen Temperaturen wiesen geringere Ähnlichkeiten auf als die Bandenmuster bei der gleichen Temperatur. Es konnte jedoch mit zunehmender Temperaturdifferenz keine Zunahme der Populationsunterschiede festgestellt werden. Das bedeutet, dass beispielsweise die Ähnlichkeiten der Biofilmpopulationen zwischen 8 °C und 12 °C nicht höher war als die zwischen 8 °C und 29 °C. Es wurde also insofern ein Einfluss der Temperatur auf die Diversität der Biofilmpopulationen festgestellt, dass diese bei gleicher Temperatur am ähnlichsten sind. Es gab jedoch keinen Trend, dass die Diversität mit zunehmenden Temperaturunterschieden ebenfalls zunimmt.

EPDM nährstoffarm	PN1 8°C	PN2 8°C	PN6 8°C	PN1 16°C	PN2 16°C	PN6 16°C	PN1 21°C	PN2 21°C	PN6 21°C	PN1 23°C	PN2 23°C	PN6 23°C	PN1 29°C	PN2 29°C
PN1 8°C														
PN2 8°C	86													
PN6 8°C	50	61												
PN1 16°C	67	70	62											
PN2 16°C	58	61	54	100										
PN6 16°C	62	64	57	64	64									
PN1 21°C	20	21	19	38	38	29								
PN2 21°C	32	33	30	55	55	40	67							
PN6 21°C	42	44	40	46	46	41	63	81						
PN1 23°C	35	36	32	40	40	21	26	31	29					
PN2 23°C	45	48	42	33	33	15	20	26	24	96				
PN6 23°C	64	67	58	50	50	38	47	58	48	61	55			
PN1 29°C	37	38	35	35	35	32	43	64	49	31	21	47		
PN2 29°C	26	27	25	30	30	41	39	51	37	31	21	42	93	
PN6 29°C	39	40	37	42	42	44	45	49	47	32	22	44	81	65

**Tabelle 11: Ähnlichkeiten (%) der Bandenmuster innerhalb eines nährstoffarmen Reaktors bei unterschiedlichen Temperaturen. PN1: Probenahme vor Animpfen; PN2: Probenahme 1 Tag nach Animpfen, PN6: Probenahme 28 Tage nach Animpfen.**

EPDM nährstofffrei ch	PN1 8°C	PN2 8°C	PN6 8°C	PN1 16°C	PN2 16°C	PN6 16°C	PN1 21°C	PN2 21°C	PN6 21°C	PN1 23°C	PN2 23°C	PN6 23°C	PN1 29°C	PN2 29°C
PN1 8°C														
PN2 8°C	78													
PN6 8°C	80	73												
PN1 16°C	36	24	59											
PN2 16°C	32	27	58	89										
PN6 16°C	39	29	53	48	60									
PN1 21°C	22	30	17	42	46	44								
PN2 21°C	30	33	38	48	38	44	43							
PN6 21°C	31	34	45	35	45	38	52	30						
PN1 23°C	32	36	33	30	17	33	40	38	26					
PN2 23°C	17	30	45	32	27	36	30	33	28	73				
PN6 23°C	25	29	61	31	35	28	41	24	40	55	45			
PN1 29°C	27	41	39	46	39	38	51	47	37	39	41	29		
PN2 29°C	21	32	22	37	30	27	42	33	34	30	32	22	72	
PN6 29°C	31	26	56	43	48	39	50	59	38	48	52	33	43	43

**Tabelle 12: Ähnlichkeiten (%) der Bandenmuster innerhalb eines nährstoffreichen Reaktors bei unterschiedlichen Temperaturen. PN1: Probenahme vor Animpfen; PN2: Probenahme 1 Tag nach Animpfen, PN6: Probenahme 28 Tage nach Animpfen.**

### 3. Anpassungsstrategien

Eine klimabedingte Erwärmung des Trinkwasserverteilungsnetzes ist gerade während sommerlicher längerer Hitzeperioden und in stark versiegelten Bereichen mit geringem Durchfluss in den Leitungen zu erwarten. Einen großen Einfluss üben dabei erwärmte obere Bodenschichten aus, wobei dieser Effekt durch höhere Rohwassertemperaturen, die zu einem Temperaturanstieg im Trinkwasser bereits am Wasserwerksausgang führen können, verstärkt wird (Blokker und Pieterse-Quirijns, 2013).

Da Trinkwasser und Trinkwasserbiofilme immer Mikroorganismen enthalten (Flemming und Wingender, 2010) können erhöhte Temperaturen, aber auch der Nährstoffgehalt, unter ungünstigen Umständen einen Effekt auf die mikrobiologisch-hygienische Qualität des Trinkwassers ausüben. Dabei können sowohl eine verstärkte Aufkeimung (Erhöhung der Koloniezahl) als auch eine erhöhte Nachweishäufigkeit hygienisch-relevanter Mikroorganismen ein Problem darstellen.

Untersuchungen an dem hier ausgewählten Trinkwassernetz zeigten zwar die bereits erwähnten Temperatureffekte, aber auch das im Falle eines in der Regel nicht Depot-desinfizierten und nährstoffarmen Trinkwassers die Grenzwerte der Trinkwasserverordnung selbst unter Stagnation und deutlicher Temperaturerhöhung eingehalten werden können. Eine temperaturabhängige Verschlechterung der mikrobiologischen Qualität des Trinkwassers war weder bezüglich einer Aufkeimung noch eines erhöhten Nachweises hygienisch relevanter Bakterien erkennbar.

Im Biofilm an den wasserbenetzten Oberflächen wurde in der Regel kein gehäuftes Auftreten hygienisch relevanter Mikroorganismen durch Temperaturerhöhung im Trinkwasser festgestellt. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass coliforme Bakterien bei erhöhten Temperaturen, wie sie nach längeren Hitzeperioden auftreten können, vermehrt im Biofilm nachgewiesen werden können. Ein Kontaminationspotential für die Wasserphase durch die Biofilme ist dann nicht vollständig auszuschließen. Die Laborversuche der vorliegenden Arbeit zeigten, dass in Trinkwasserbiofilmen eine Einnistung von hygienisch relevanten Mikroorganismen, zum Beispiel bei Kontaminationsereignissen,

stattfinden kann. Während die Effektivität der Einnistung von *K. pneumoniae* und *E. coli* Temperaturunabhängig war, nahm die Effektivität der Einnistung von *P. aeruginosa* mit zunehmender Temperatur zu. Die Persistenz der untersuchten Mikroorganismen wurde teilweise stark durch einen erhöhten Nährstoffgehalt verlängert.

Um dementsprechend einem möglichen klimabedingten negativen Einfluss auf die Trinkwasserqualität entgegen zu wirken, sind Anpassungsstrategien auf verschiedenen Ebenen denkbar. Sie umfassen dabei sowohl die Trinkwasseraufbereitung, die Planung und das Management der Trinkwasserverteilungssysteme sowie das mikrobiologisch-hygienische Monitoring des Trinkwassers und der wasserbenetzten Oberflächen.

### **Wassertechnologie/Wasseraufbereitung**

Optimierungsstrategien in der Wasseraufbereitung zur Erhöhung der Trinkwasserstabilität können bereits produktionsseitig zu einer Qualität führen, die gegenüber klimabedingten Einflüssen weniger empfindlich sind. Die Bereitstellung mikrobiologisch stabilen Trinkwassers stellt eine Schlüsselaufgabe bei der Bewältigung klimabedingter hygienischer Problematiken im Trinkwasser dar.

- Dabei werden insbesondere erhöhte Anforderungen an die mikrobiologische Stabilität des Trinkwassers gestellt. Eine deutliche Minimierung von assimilierbarem Kohlenstoff (AOC) am Ende der Aufbereitung durch verfahrenstechnische Schritte kann zu einem mikrobiologisch stabilen Trinkwasser führen, das auch bei verringertem Wasserverbrauch, überdimensionierten Verteilungsleitungen und/oder saisonal bedingten Erwärmungen des Wassers nicht mehr zur Aufkeimung durch autochthone Bakterien bzw. zur verstärkten Biofilmbildung neigt.
- Die Verminderung der Konzentration von Substraten, die ein Wachstum von Bakterien im Trinkwasser bewirken, kann durch Entzug der Grundlage für die AOC-bildung geschaffen werden (z. B. Methandesorption, Optimierung Flockung). Ein möglichst vollständiger Abbau der assimilierbaren Kohlenstoffverbindungen im Rohwasser im Rahmen der Aufbereitung ist anzustreben.
- Die Reduktion des AOC-Gehaltes kann dabei z. B. durch den Einsatz verschiedenster technologischer Verfahren wie z. B. optimierte Fällung/Flockung, Schnellfiltration, Aktivkohlefiltration und Langsamsandfiltration erfolgen (van der Kooj und van der Wielen, 2014).
- Die AOC-Methodik kann dabei zur Steuerung und Optimierung von Aufbereitungsprozessen eingesetzt werden.
- Der Einsatz von chemischen Desinfektionsverfahren mit Depot-Wirkung kann ebenfalls zu einer Verbesserung der mikrobiologisch-hygienischen Qualität des Trinkwassers führen. Hierbei ist jedoch neben dem Verfahren selbst zu berücksichtigen, ob damit den Bedürfnissen und der Akzeptanz des Endkunden z. B. bezüglich des Geschmackes und Geruches des Trinkwassers entsprochen wird.
- Daher könnte eine Reduktion des AOC-Gehaltes, wenn dieser alleine noch nicht ausreichend ist, in Kombination mit einer niedrigen Chlordosierung ein vielversprechender Weg sein, um wirtschaftlich günstig hygienisch einwandfreies Trinkwasser zu produzieren.

### **Wassernetze mit Netzplanung und Netzmanagement**

Um eine Wiederverkeimung oder das gehäufte Auftreten von hygienisch-relevanten Mikroorganismen im Trinkwasserverteilungsnetz durch höhere Temperaturen zu vermeiden, müssen die Betreiber dafür sorgen, dass sich das Wasser im Rohrnetz möglichst nicht weiter erwärmt.

- Primär müssen zuerst eine Festlegung und darauf folgende Kontrollen von zulässigen Temperaturspannen des Bodens sowie des Wassers erfolgen, um temperaturgefährdete Bereiche zu identifizieren. Hier bietet sich ein Computer-gestütztes Monitoring der Durchflüsse sowie der Boden- und Wassertemperaturen an.
- Parallel dazu sollte grundsätzlich eine Verhinderung bzw. Verminderung einer falschen Dimensionierung der Trinkwasserrohre bei Neu- bzw. Sanierungsarbeiten angestrebt werden, so dass mit einer bedarfsgerechten Vorgehensweise nötige Wasserverbräuche erzielt und Stagnation verhindert wird. Ein ausreichender Wasserwechsel unter Berücksichtigung von Spitzenverbräuchen ist dabei zu berücksichtigen. So wird beispielsweise bei RWW seit einigen Jahren bereits eine Querschnittsverkleinerung durchgeführt (RWW, 2010).
- Die Verminderung von Sticheleitungen und dementsprechend Todenden ist anzustreben.
- Eine tiefere Verlegung der Trinkwasserleitungen in unkritische Bereiche sowie die Verlegung außerhalb von Straßenkörpern in beschattete Bereiche wäre anstrebenswert, falls dies technisch und finanziell möglich ist.
- Die Verwendung von Bettungsmaterialien sowie Trinkwasserleitungen, die den Wärmeeintrag vermindern, wäre für temperaturgefährdete Bereiche anzustreben, bei denen die Temperatur durch geeignete Netzmanagementmaßnahmen nicht kontrollierbar ist.
- Nicht zuletzt kann zeitnah in der Regel ohne weitere Baumaßnahmen mit Rohrnetzpflegetechniken bereits Abhilfe geschafft werden. Die Einführung von Spülregimen kann eine schnelle Hilfsmaßnahme zur Vermeidung von Erwärmung und Stagnation darstellen.
- Zusätzlich zu berücksichtigen ist, dass während sommerlicher längerer Hitzeperioden in Zukunft wie auch bereits heute ein verstärkter temporärer Wasserverbrauch eintreten wird. Dies führt im Leitungssystem zu höheren Durchflüssen (kürzere Verweilzeiten), was wiederum einer Erwärmung des Trinkwassers in den erdverlegten Leitungen in diesem Zeitraum entgegenwirken kann.

### **Monitoring der Wasserqualität**

Die Abgabe von dauerhaft mikrobiologisch-hygienisch einwandfreiem Trinkwasser ist Aufgabe der Wasserversorger. Die in der Trinkwasserverordnung dafür genannten Parameter mit ihren Grenzwerten sowie der zu verwendenden kulturellen Methoden bieten die Grundlage dafür. Durch die klimabedingt zu erwartende Temperaturerhöhung im Trinkwasser kann unter ungünstigen Bedingungen eine Gefährdung der Trinkwasserhygiene im Verteilungsnetz und in Hochbehältern nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich kann bei der Abgabe des Trinkwassers in eine Hausinstallation eine weitere Erwärmung des Kaltwassers nicht ausgeschlossen werden. Die Einhaltung der 25 °C-Grenze in der Trinkwasser-Installation entsprechend der VDI/DVGW-Richtlinie 6023 (VDI, 2013) kann saisonal bedingt ein Problem darstellen und Veränderungen der mikrobiologischen Qualität der Wasserphase mit sich bringen. Eine Erweiterung der Monitoring-Maßnahmen ist daher zu bedenken, um frühzeitig auftretende Probleme zu erkennen und gegensteuern zu können.

- Die Kontrolle des Trinkwassers bezüglich mikrobiologisch verwertbarer Nährstoffe durch Bestimmung des Gehaltes an assimilierbarem organischen Kohlenstoff (AOC) und/oder der biologisch abbaubaren gelösten organischen Kohlenstoffe (BDOC) verschafft Informationen über den Anteil an biologisch abbaubaren Stoffen und damit möglicher Aufkeimungsproblematiken autochthoner Bakterien sowie über das Biofilmbildungspotential im Trinkwasser durch Temperaturerhöhung. Dabei ist die Bestimmung des AOC-Gehaltes ein deutlich sensitiveres Verfahren, als die Koloniezahlbestimmung nach Trinkwasserverordnung.

- Das frühzeitige identifizieren temperaturgefährdeten Bereiche bildet die Grundlage für ein zusätzliches mikrobiologisch-hygienisches Monitoring, bei dem nicht nur die Wasserphase sondern insbesondere auch der Biofilm als eine mögliche Kontaminationsquelle von hygienisch relevanten Mikroorganismen betrachtet wird.
- Im Trinkwasserverteilungsnetz können hygienisch relevante Bakterien vorkommen, die mit Hilfe der kulturellen Methoden nach Trinkwasserverordnung nicht oder nicht vollständig erfasst werden. Diese Bakterien können unter ungünstigen Bedingungen wie z. B. Temperaturerhöhung und Nährstoffeintrag wieder in einen kultivierbaren Zustand übergehen. Hier können ergänzend zur den konventionellen Kulturverfahren modernere molekularbiologische Methoden zum Einsatz kommen, die empfindlicher und gezielter Veränderungen detektieren können.

## 4. Literatur

Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D. E., Guyard, C. (2013) Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. Int. J. Mol. Sci. 14, 21660-21675.

Anonym (1977) Gesundheitliche Beurteilung von Kunststoffen und anderen nichtmetallischen Werkstoffen im Rahmen des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes für den Trinkwasserbereich. 1. Mitteilung. KTW-Empfehlung Teil 1.3.2 Polyäthylen. Bundesgesundheitsbl. 20, 56–60.

Anonym (1985) Gesundheitliche Beurteilung von Kunststoffen und anderen nicht-metallischen Werkstoffen im Rahmen des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes für den Trinkwasserbereich. 5. Mitteilung. KTW-Empfehlung. Teil 1.3.13 Gummi aus Natur- und Synthesekautschuk. Bundesgesundheitsbl. 28, 371-374.

Anonym (2007) Technische Regel W 270. Vermehrung von Mikroorganismen auf Werkstoffen für den Trinkwasserbereich - Prüfung und Bewertung. DVGW, Bonn.

Arana, I., Muela, A., Orruño, M., Seco, C., Garaizabal, I., Barcina, I. (2010) Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Ecol. 74, 500-509.

Arvand, M., Jungkind, K., Hack, A. (2011) Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: do we know the true dimensions? Euro Surveill. 16, 9-14.

Batté, M., Féliers, C., Servais, P., Gauthier, V., Joret, J.-C., Block, J.-C. (2006) Coliforms and other microbial indicators occurrence in water and biofilm in full-scale distribution systems. Water Sci. Technol. 54 (3), 41-48.

Bjergbæk, L. A., Roslev, P. (2005) Formation of nonculturable *Escherichia coli* in drinking water. J. Appl. Microbiol. 99, 1090-1098.

Blaser, M. J., Hardesty, H. L., Powers, B., Wang, W.-L. L. (1980) Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. J. Clin. Microbiol. 11, 309-313.

Block, J.C., Haudidier, K., Paquin, J.L., Miazga, J., Levi, Y. (1993) Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. Biofouling 6, 333-343.

Blokker, E. J. M., Pieterse-Quirijns, E. J. (2013) Modeling temperature in the drinking water distribution system. J. Am. Water Works Assoc. 105 (1), E19-E28.

Boyle, M., Ford, T., Maki, J. S., Mitchell, R. (1991) Biofilms and the survival of opportunistic pathogens in recycled water. *Waste Manag. Res.* 9, 465-470.

Bressler, D., Balzer, M., Dannehl, A., Flemming, H.-C., Wingender, J. (2009) Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. *Water Sci. Technol.: Water Suppl.* 9, 81-87.

Burke, V., Robinson, J., Gracey, M., Peterson, D., Partridge, K. (1984) Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 361-366.

Buswell, C.M., Herlihy, Y.M., Lawrence, L.M., McGuiggan, J.T.M., Marsh, P.D., Keevil, C.W., Leach, S.A. (1998) Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 733-741.

Cann, K. F., Thomas, D. Rh., Salmon, R. L., Wyn-Jones, A. P., Kay, D. (2013) Extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiol. Infect.* 141, 671-686.

Carter, J. T., Rice, E. W., Buchberger, S. G., Lee, Y. (2000) Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system. *Water Res.* 34, 1495-1502.

Chang, Y.-C., Jung, K. (2004) Effect of distribution system materials and water quality on heterotrophic plate counts and biofilm proliferation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 1114-1119.

Clark, J. A., Burger, C. A., Sabatinos, L. E. (1982) Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water, and new main water samples. *Can. J. Microbiol.* 28, 1002-1013.

Córdoba, M. A., Del Coco, V. F., Minvielle, M. C., Basualdo, J. Á. (2010) Influencing factors in the occurrence of injured coliforms in the drinking water distribution system in the city of La Plata, Argentina. *J. Water Health* 8, 205-211.

Delpa, I., Jung, A.-V., Baures, E., Clement, M., Thomas, O. (2009) Impacts of climate change on surface water quality in relation to drinking water production. *Environ. Int.* 35, 1225-1233.

Diederer, B. M. W., de Jong, C. M. A., Aarts, I., Peeters, M. F., van der Zee, A. (2007) Molecular evidence for the ubiquitous presence of *Legionella* species in Dutch tap water installations. *J. Water Health* 5, 375-382.

Donlan, R. M., Pipes, W. O., Yohe, T. L. (1994) Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. *Water Res.* 28, 1497-1503.

Donner, C., Panglisch, S., Grobe, S., Wingender, J. (2012) Strategien zur Anpassung von Versorgungsanlagen an neue Herausforderungen. *Energie Wasser-Praxis* 63(5), 40-46.

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

Egorov, A. I., Birkenhauer Best, J. M., Frebis, C. P., Karapondo, M. S. (2011) Occurrence of *Aeromonas* spp. in a random sample of drinking water distribution systems in the USA. *J. Water Health* 9, 785-798.

Elliott, R. P. (1963) Temperature-gradient incubator for determining the temperature range of growth of microorganisms. *J. Bacteriol.* 85, 889-894.

Eley, A., Geary, I., Wilcox, M. H. (1993) Growth of *Aeromonas* spp. at 4 °C and related toxin production. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 36-39.

Flemming, H.-C., Percival, S. I., Walker, J. T. (2002) Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Sci. Technol. Water Suppl.* 2 (1), 271-280.

Flemming, H.-C., Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nature Rev. Microbiol.* 8, 623-633.

Esperanza Torres, C., Gibello, A., Nande, M., Martin, M., Blanco, A. (2008) Fluorescent *in situ* hybridization and flow cytometry as tools to evaluate the treatments for the control of slime-forming enterobacteria in paper mills. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 889-897.

Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L., Pope, D. H. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 9-16.

Folland, C.K., T.R. Karl, J.R. Christy, R.A. Clarke, G.V. Gruza, J. Jouzel, M.E. Mann, J. Oerlemans, M.J. Salinger and S.-W. Wang, (2001) Observed Climate Variability and Change. In: *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Houghton, J.T., Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C.A. Johnson (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Fox, K. R., Reasoner, D. J. (2006) Water quality in source water, treatment, and distribution systems. In: *Waterborne Pathogens. AWWA Manual M48. Second edition*; American Water Works Association, Denver; pp. 21-34.

Fransolet, G., Villers, G., Masschelein, W. J. (1985) Influence of temperature on bacterial development in waters. *Ozone Sci. Eng.* 7, 205-227.

Gavriel, A. A., Landre, J. P. B., Lamb, A. J. (1998) Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. *J. Appl. Microbiol.* 84, 383-392.

Gião, M.S., Wilks, S.A., Azevedo, N.F., Vieira, M.J., Keevil, C.W. (2009) Comparison between standard cultures and peptide nucleic acid 16S rRNA hybridization quantification to study the influence of physico-chemical parameters on *Legionella pneumophila* survival in drinking water biofilms. *Biofouling* 25, 335-343.

Grimm, D., Merkert, H., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Hacker, J., Brand, B. C. (1998) Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2686–2690.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev. Microbiol.* 2, 95-108.

Hallam, N. B., West, J. R., Forster, C. F., Simms, J. (2001) The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Res.* 35, 4063-4071.

Hanning, I., Jarquin, R., Slavik, M. (2008) *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1199-1208.

Havelaar, A. H., Versteegh, J. F. M., During, M. (1990) The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in the Netherlands. *Zbl. Hyg.* 190, 236-256.

Henning, L., Korth., A. (2013) Planung und Betrieb von Trinkwasserverteilungssystemen im Hinblick auf die Vermeidung von Aufkeimungserscheinungen. Veröffentlichungen aus dem DVGW-Technologiezentrum Wasser, Band 57: Mikrobiologische Aspekte in Trinkwasserverteilungssystemen, pp. 41-129.

Hu, J. Y., Yu, B., Feng, Y. Y., Tan, X. L., Ong, S. L., Ng, W. J., Hoe, W. C. (2005) Investigation into biofilms in a local drinking water distribution system. *Biofilms* 2, 19-25.

Hunter, P. R. (2003) Climate change and waterborne and vector-borne disease. *J. Appl. Microbiol.* 94, 37S-46S.

IPCC, 2007: Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A.(eds.)). IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.

Juhna, T., Birzniece, D., Larsson, S., Zulenkovs, D., Sharipo, A., Azevedo, N.F., Ménard-Szczebara, F., Castagnet, S., Féliers, C., Keevil, C.W. (2007) Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7456-7464.

Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.-C., Wingender, J. (2003) Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 563-573.

Konishi, T., Yamashiro, T., Koide, M., Nishizono, A. (2006) Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 478-484.

Korth, A., Petzoldt, H., Böckle, K., Hamsch, B. (2008) Coliforme Bakterien in Trinkwasserverteilungssystemen – Vorkommen, Anreicherung und Vermehrung. *Energie Wasser-Praxis* 59 (4), 40-44.

Kropinski, A. M. B., Lewis, V., Berry, D. (1987) Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* 169, 1960-1966.

Kroukamp, O., Dumitrache, R. G., Wolfaardt, G. M. (2010) Pronounced effect of the nature of the inoculum on biofilm development in flow systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6025-6031.

Kuttler, W., Müller, N., Dütemeyer, D., Barlag, A.-B. (2012) Prognose- und Diagnoseanalysen zur Verbesserung des Stadtklimas. Stadtklimatische Untersuchungen in Oberhausen und Simulationen verschiedener Minderungsstrategien zur Reduktion der thermischen Belastung im Hinblick auf den Klimawandel. *Dynaklim*-Publikation Nr. 25 (April 2012).

Långmark, J., Storey, M.V., Ashbolt, N.J., Stenström, T.A. (2005) Biofilms in urban water distribution system: measurement of biofilm biomass, pathogens and pathogen persistence within the Greater Stockholm area, Sweden. *Water Sci. Technol.* 52 (8), 181-189.

LeChevallier, M. W., Welch, N. J., Smith, D. B. (1996) Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2201-2211.

Leclerc, H., Mossel, D. A. A., Edberg, S. C., Struijk, C. B. (2001) Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 201-234.

Lehtola, M. J., Pitkänen, T., Miebach, L., Miettinen, I. T. (2006) Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Sci. Technol.* 54 (3), 57-61.

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

Liu, G., Verberk, J. Q. J. C., van Dijk, J. C. (2013) Bacteriology of drinking water distribution systems: an integral and multidimensional review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9265-9276.

Lund, V., Ormerod, K. (1995) The influence of disinfection processes on biofilm formation in water distribution systems. *Water Res.* 29, 1013-1021.

Madison, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2013) *Brock Mikrobiologie*. 13., aktualisierte Auflage, Pearson Education Deutschland GmbH.

Mauchline, W. S., James, B. W., Fitzgeorge, R. B., Dennis, P. J., Keevil, C. W. (1994) Growth temperature reversibly modulates the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 62, 2995-2997.

Mena, K. D., Gerba, C. P. (2009) Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201, 71-115.

Meuleman, A. F. M., Cirkel, G., Zwolsman, G.J.J. (2007). When climate change is a fact! Adaptive strategies for drinking water production in a changing natural environment. *Water Sci. Technol.* 56 (4), 137-144.

Moritz, M. M., Flemming, H.-C., Wingender, J. (2010) Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 190-197.

Ndiongue, S., Huck, P. M., Slawson, R. M. (2005) Effects of temperature and biodegradable organic matter on control of biofilms by free chlorine in a model drinking water distribution system. *Water Res.* 39, 953-964.

Ohno, A., Kato, N., Yamada, K., Yamaguchi, K. (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2540-2547.

Ohno, A., Kato, N., Sakamoto, R., Kimura, S., Yamaguchi, K. (2008) Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4585-4588.

Oliver, J. D., Nilsson, L., Kjelleberg, S. (1991) Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2640-2644.

Oliver, J. D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43, 93-100.

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

Ollos, P.J., Huck, P. M., Slawson, R. M. (2003) Factors affecting biofilm accumulation in model distribution systems. J. Am. Water Works Assoc. 95 (1), 87-97.

Piao, Z., Sze, C. C., Barysheva, O., Iida, K., Yoshida, S. (2006) Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1613-1622.

Pund, R. P., Theegarten, D. (2008) Die Bedeutung der beweglichen Aeromonaden als Krankheitserreger für den Menschen. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 51, 569-576.

Quirnbach, M., Freistühler, E., Papadakis, I. (2012a) Auswirkungen des Klimawandels in der Emscher-Lippe-Region. *dynaklim-Kompakt*, No. 12.

Quirnbach, M., Freistühler, E., Papadakis, I. (2012b) Auswirkungen des Klimawandels in der Emscher-Lippe-Region. Analysen zu den Parametern Lufttemperatur und Niederschlag. *dynaklim-Publikation*, No. 30.

Rajkowski, K. T., Rice, E. W. (2001) Growth and recovery of selected gram-negative bacteria in reconditioned wastewater. J. Food Prot. 64, 1761-1767.

Reasoner, D. J., Blannon, J. C., Geldreich, E. E., Barnick, J. (1989) Nonphotosynthetic pigmented bacteria in a potable water treatment and distribution system. Appl. Environ. Microbiol. 55, 912-921.

Reasoner, D. J., Geldreich, E. E. (1985) A new medium for enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. 49, 1-7.

Regnault, B., Martin-Delautre, S., Lejay-Collin, M., Lefèvre, M., Grimant, P. A. D. (2000) Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization : specificity and potential applications. Res. Microbiol. 151, 521-533.

Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., Keevil, C. W. (1994a) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1585-1592.

Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., Keevil, C. W. (1994b) Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1842-1851.

Rouf, M. A., Rigney, M. M. (1971) Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. Appl. Microbiol. 22, 503-506.

Sartory, D.P., Holmes, P. (1997) Chlorine sensitivity of environmental, distribution system and biofilm coliforms. *Water Sci. Technol.* 35(11-12), 289-292.

Schubert, R., Scheiber, P. (1975) Das Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* im Grundwasser, Oberflächenwasser und in Wasserversorgungsanlagen in tropischen Gebieten. *Gwf wasser/abwasser* 116, 413-415.

Schubert, R. H. W., Matzinou, D. (1990) Temperature as an environmental factor influencing the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Zbl. Bakt.* 273, 327-331.

Servais, P., Billen, G., Laurent, P., Levi, Y., Randon, G. (1992) Studies of BDOC and bacterial dynamics in the drinking water distribution system of the Northern Parisian suburbs. *Revue des Sciences de l'Eau* 5, 69-89.

Servais, P., Laurent, P., Randon, G. (1995) Comparison of the bacterial dynamics in various French distribution systems. *J. Water SRT- Aqua* 44, 10-17.

Silhan, J., Corfitzen, C. B., Albrechtsen, H. J. (2006) Effect of temperature and pipe material on biofilm formation and survival of *Escherichia coli* in used drinking water pipes: a laboratory-based study. *Water Sci. Tech.* 54, 49-56.

Smith, D. B. (2002) Coliform bacteria – control in drinking water distribution systems. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Volume 2. Bitton, G. (Hrsg.), John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 905-914.

Söderberg, M. A., Rossier, O., Cianciotto, N. P. (2004) The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 186, 3712-3720.

Söderberg, M. A., Dao, J., Starkenburg, S. R., Cianciotto, N. P. (2008) Importance of type II secretion for survival of *Legionella pneumophila* in tap water and in amoebae at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5583-5588.

Söderberg, M. A., Cianciotto, N. P. (2010) Mediators of lipid A modification, RNA degradation and central intermediary metabolism facilitate the growth of *Legionella pneumophila* at low temperatures. *Curr. Microbiol.* 60, 59-65.

Spinks, A. T., Dunstan, R. H., Harrison, T., Coombes, P., Kuczera, G. (2006) Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Res.* 40,1326-1332.

Stanwell-Smith, R. (2008) Climate change and its health implications. A summary report for environmental health practitioners on the health implications of climate change. The Chartered Institute of Environmental Health (CIEH), Issue 1, Version2.

Steinert, M., Emody, L., Amann, R., Hacker, J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2047-2053.

Stewart, I., Oke, T. (2009) Newly developed „thermal climate zones“ for defining and measuring urban heat island magnitude in the canopy layer. In: Eighth Symposium on the Urban Environment, 10 January – 15 January 2009, Keystone, Co, USA.

St-Pierre, K., Lévesque, S., Frost, E., Carrier, N., Arbeit, R. D., Michaud, S. (2009) Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for *Campylobacter* spp. in environmental water. Appl. Environ. Microbiol. 75, 6736-6744.

Sun, W., Liu, W., Cui, L., Liu, L. (2012) Impact of AOC and chlorine residual on regrowth of microbes in a model distribution system receiving UV-treated potable water. J. Water Suppl.:Res. Technol. – Aqua, 372-380.

Termine, E., Michel, G. P. F. (2009) Transcriptome and secretome analyses of the adaptive response of *Pseudomonas aeruginosa* to suboptimal growth temperature. Int. Microbiol. 12, 7-12.

Thomas, C., Hill, D. J., Mabey, M. (1999) Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. J. Appl. Microbiol. 86, 1024-1032.

TrinkwV 2001. Zweite Verordnung zur Änderung der Trinkwasserverordnung vom 5. Dezember 2012. BGB Jahrgang 2012 Teil I, Nr. 58 vom 13.12.2012, 2562-2567.

Valster, R. M., Wullings, B. A., van den Berg, R., van der Kooij, D. (2011) Relationships between free-living protozoa, cultivable *Legionella* spp., and water quality characteristics in three drinking water supplies in the Caribbean. Appl. Environ. Microbiol. 77, 7321-7328.

Van der Kooij, D., Hijnen, W. A. M. (1988) Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2842-2851.

Van der Kooij, D. (1992) Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. J. Am. Water Works Assoc. 84(2), 57-63.

Van der Kooij, D., Vrouwenfelder, H. S., Veenendaal, H. R. (1995) Kinetic aspects of biofilm formation on surfaces exposed to drinking water. Water Sci. Technol. 32(8), 61-65.

Van der Kooij, D., van der Wielen, P. W. J. J. (2014) General introduction. In: Microbial growth in drinking-water supplies. Problems, causes, control and research needs. Van der Kooij, D., van der Wielen, P. W. J. J. (Hrsg.), IWA Publishing, London, 1-32.

Van der Kooij, D. (2014) *Legionella* in drinking-water supplies. In: Microbial growth in drinking-water supplies. Problems, causes, control and research needs. Van der Kooij, D., van der Wielen, P. W. J. J. (Hrsg.), IWA Publishing, London, 127-175.

VDI – Verein Deutscher Ingenieure (1997) VDI-Richtlinie 3787. Blatt 1 – Umweltmeteorologie. Klima- und Lüfthygienekarten für Städte und Regionen. Beuth Verlag, Berlin.

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

Verhoeff-Bakkenes, L., Hazeleger, W. C., de Jonge, R., Zwietering, M. H. (2009) *Campylobacter jejuni*: a study on environmental conditions affecting culturability and *in vivo* adhesion/invasion. J. Appl. Microbiol. 106, 924-931.

Volk, C., Joret, J.-C. (1994). Paramètres prédictifs de l'apparition des coliformes dans les réseaux de distribution d'eau d'alimentation. Revue des Sciences de l'Eau 7, 131-152.

Wadowsky, R. M., Wolford, R., McNamara, A. M., Yee, R. B. (1985) Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. Appl. Environ. Microbiol. 49, 1197-1205.

Waines, P. L., Moate, R., Moody, A. J., Allen, M., Bradley, G. (2011) The effect of material choice on biofilm formation in a model warm water distribution system. Biofouling 27, 1161-1174.

Wellinghausen, N., Köthe, J., Wirths, B., Sigge, A., Poppert, S. (2005) Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 43, 4070–4075.

Wingender, J., Flemming, H.-C. (2004) Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. Water Sci. Technol. 49 (11-12), 277-286.

Wingender, J., Hamsch, B., Schneider, S. (2009) Mikrobiologisch-hygienische Aspekte des Vorkommens von *Pseudomonas aeruginosa* im Trinkwasser. Energie Wasser-Praxis 60 (3), 60-66.

Wingender, J. (2011) Hygienically relevant microorganisms in biofilms of man-made water systems. In: Biofilm Highlights. Springer Series on Biofilms. Volume 5. Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 189-238.

Wingender, J., Flemming, H.-C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 417-423.

World Meteorological Organization (2013) The global climate 2001 - 2010. A decade of climate extremes; Summary report; WMO-No. 1119

Wullings, B. A., van der Kooij, D. (2006) Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15 °C. Appl. Environ. Microbiol. 72, 157-166.

Wullings, B. A., Bakker, G., van der Kooij, D. (2011) Concentration and diversity of uncultured *Legionella* spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. Appl. Environ. Microbiol. 77, 634-641.

## 5. Anhang

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Feldversuche

Die Monitoringstrecke wurde vor dem Einbau sterilisiert, unter aseptischen Bedingungen zusammengebaut und in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der RWW an den entsprechenden Standorten installiert. Für die Temperaturmessung im Trinkwasser wurden PT100-Temperaturfühler verwendet. Die Bestimmung des Durchflusses erfolgte mit elektronischen Durchflussmessern der Fa. Krohne. Die für das Biofilmmonitoring verwendeten Werkstoffe waren Edelstahl, Polyethylen (PE80 sowie PE100) und Ethylen-Propylen-Dien-Monomer-Kautschuk (EPDM), welche den deutschen physikalischen und chemischen Empfehlungen für Plastik und Gummi entsprechen (Anonym, 1977, 1985) als auch den mikrobiologischen Anforderungen des Deutschen Vereins des Gas- und Wasserfachs e.V. (DVGW) (Anonym, 2007) als Bedingung für deren Einsatz im Trinkwasserbereich entsprachen. Diese Werkstoffe wurden vor dem Einbau entweder durch Autoklavieren (Edelstahl) sterilisiert bzw. durch den Einsatz von Wasserstoffperoxid (150 mg/L über Nacht) desinfiziert.

Zusätzlich wurde bei jeder Probenahmekampagne jeweils ein Coupon pro Material entnommen, der Biofilm entfernt und ebenfalls entsprechend untersucht. Bei jeder Probennahme wurden jeweils 1 L des Zulaufs und der Abläufe in sterilen Schottflaschen entnommen. Außerdem wurden aus jedem Biofilmreaktor jeweils ein Edelstahl-Coupon, ein EPDM-Coupon und ein PE80-Coupon entnommen und die Biofilme mittels eines Teflonschabers von den Coupons entfernt und je nach Durchmesser des Reaktors in 60 bis 160 ml DEPC-behandeltem Wasser (Roth) suspendiert. Die Homogenisierung der Biofilmsuspensionen erfolgte mittels Spritzen mit verschiedenen Hohladeln. Zunächst wurde die Suspension durch eine Hohladel mit 0,6 mm Durchmesser in die Spritze aufgesogen und wieder herausgedrückt. Der Vorgang wurde mit einer Hohladel mit 0,4 mm Durchmesser wiederholt. Die Proben wurden mittels kultureller Verfahren nach TrinkwV und molekularbiologisch mittels FISH analysiert. Zusätzlich wurden die Biofilmsuspensionen auf EPDM noch mittels der DGGE analysiert.

#### 5.1.2 Laborversuche

##### **Bakterien**

*E. coli* ATCC 25922 und *K. pneumoniae* ATCC 13883 wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) bezogen. Bei dem Stamm *P. aeruginosa* AdS handelte es sich um ein Isolat aus dem Wasser einer Selbstschlussarmatur von einer kontaminierten Trinkwasser-Installation in einer Schule (Moritz et al., 2010). *L. pneumophila* AdS (Serogruppe 1) wurde aus einem Biofilm in derselben Selbstschlussarmatur isoliert (Moritz et al., 2010).

##### **Materialien**

Zwei Materialien wurden für die Coupons verwendet: Polyethylen (PE) und Ethylen-Propylen-Dien-Monomer(EPDM)-Gummi, welche den deutschen physikalischen und chemischen Empfehlungen für Plastik und Gummi entsprechen (Anonym, 1977, 1985) als auch den mikrobiologischen Anforderungen des Deutschen Vereins des Gas- und Wasserfachs e.V. (DVGW) (Anonym, 2007) als Bedingung für deren Einsatz im Trinkwasserbereich.

##### **Vorbereitung der Bakterien**

Für die Kultivierung von *P. aeruginosa* AdS, *E. coli*, und *K. pneumoniae* wurden jeweils 20 ml 10-fach verdünntes YEB-Medium mit Einzelkolonien, vorkultiviert auf Nähragar für 24 h bei 36 °C, angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln bei 180 rpm für 24 h inkubiert. Für die Kultivierung von *L. pneumophila*

AdS wurden 20 mL 5-fach verdünntes YEB-Medium mit einer Einzelkolonie, vorkultiviert auf BCYE $\alpha$ -Agar für 72 h bei 36 °C, angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln bei 180 rpm für 96 h inkubiert.

Zellen von der Flüssigkultur wurden durch Zentrifugation (1912 x g, 15 min, 10 °C) geerntet und zweimal mit sterilem Trinkwasser aus einer kupferfreien Leitung gewaschen. Nach dem Waschen wurden 20 ml des kupferfreien Trinkwassers mit den geernteten Zellen angeimpft. Die Endkonzentration der Bakterien in den Flüssigkulturen war  $2 \times 10^8$  Zellen/ml. Die Flüssigkulturen wurden für 24 h unter Schütteln bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) für 24 h inkubiert.

### **Biofilmentwicklung**

Die Trinkwasserbiofilme wurden in vier Drehkolbenreaktoren, in die 12 senkrechte Coupons aus zwei verschiedenen Materialien (EPDM und PE80) eingebaut wurden, für 14 Tage etabliert. Die Reaktoren wurden kontinuierlich mit Trinkwasser (Durchfluss 20 ml/min) bei unterschiedlichen Temperaturen (8 °C bis 29 °C) durchspült. Bevor das Trinkwasser in die Reaktoren geleitet wurde, wurde es in einem kleinen Tank gesammelt und temperiert. Die Trinkwassertemperatur wurde dann direkt in den Reaktoren mit Hilfe von Temperaturfühlern in 5 min Intervallen gemessen. Bei dem Zulauf der Reaktoren handelte es sich um UV-desinfiziertes Trinkwasser aus einem Wasserwerk, das Oberflächenwasser (Ruhrwasser) aufbereitet. Zwei der vier Drehkolbenreaktoren wurden mit 150  $\mu$ g/L CASO angereichert, so dass neben biologisch stabilem Trinkwasser (nährstoffarm) auch eine Kontamination mit organischen Stoffen (nährstoffreich) Bedingungen simuliert wurde.

### **Animpfen der Biofilme**

14 Tage nach Beginn der Biofilmbildung wurden die Drehkolbenreaktoren mit einer Mischkultur aus den Laborstämmen *E. coli* und *K. pneumoniae*, und separat den Umweltisolaten *P. aeruginosa* AdS und *L. pneumophila* AdS angeimpft. Die Endkonzentration der Bakterien in den Drehkolbenreaktoren war  $10^6$  Zellen/ml. Vor der Beimpfung mit den Bakterien wurden die Pumpen, die für die Wasserversorgung der Reaktoren zuständig waren, ausgestellt. Die Rotoren wurden erst 5 bis 10 min nach Animpfen ausgeschaltet, um eine gute Verteilung der Bakterien in den Reaktoren zu gewährleisten. Das Ausschalten der Rotoren war notwendig, da sich bei eingeschalteten Rotoren unter stagnierenden Bedingungen das Trinkwasser in den Reaktoren zu sehr erwärmt hat. Nach statischer Inkubation für 20 h wurden die Pumpen und Rotoren wieder eingeschaltet. 30 min nach Einschalten der Pumpen und Rotoren, was einem kompletten Austausch des Wassers in den Reaktoren gleichkommt, wurden die Biofilm- und Wasserproben entnommen.

### **Probenahme**

Sowohl die Biofilmproben, als auch Zulauf und Abläufe der Drehkolbenreaktoren wurden mittels verschiedener kultureller Parameter analysiert. Die Probenahmen der Biofilme auf EPDM und PE80 und der Wasserproben erfolgten unmittelbar vor der Animpfung der Reaktoren als auch 1, 7, 14, 21 und 28 Tage danach. Bei jeder Probenahme wurden jeweils 1 L des Zulaufs und der Abläufe in sterilen Schottflaschen entnommen. Außerdem wurden aus jedem Reaktor jeweils ein EPDM-Coupon und ein PE80-Coupon entnommen und die Biofilme mittels eines Teflonschabers von den Coupons entfernt und in 20 ml DEPC-behandeltem Wasser (Roth) suspendiert. Die Homogenisierung der Biofilmsuspensionen erfolgte mittels Spritzen mit verschiedenen Hohlnadeln. Zunächst wurde die Suspension durch eine Hohlnadel mit 0,6 mm Durchmesser in die Spritze aufgesogen und wieder herausgedrückt. Der Vorgang wurde mit einer Hohlnadel mit 0,4 mm Durchmesser wiederholt. Für jeden entnommenen Coupon wurde ein Edelstahlcoupon eingesetzt.

### 5.1.3 Kulturelle Methoden

#### **Gesamtzellzahl**

Die Gesamtzellzahl in den Biofilmsuspensionen und in den Trinkwasserproben (Zulauf und Abläufe) wurde durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Endkonzentration 5 µg/ml) bestimmt. Die Auszählung der Zellen erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskop.

#### **Gesamtkoloniezahl**

Die Gesamtkoloniezahl („heterotrophic plate count“, HPC) wurde auf R2A-Agar mittels Spatelplattenverfahren bestimmt. Dazu wurden unverdünnte und verdünnte Biofilm- und Wasserproben ausplattiert und die Platten bei 20 °C für 7 Tage inkubiert. Danach erfolgte die Auszählung der koloniebildenden Einheiten (KBE) (Reasoner und Geldreich, 1985).

#### ***E. coli* und coliforme Bakterien**

Zum Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien wurde das System Colilert 18/Quanti-Tray/2000 (Fa. IDEXX GmbH) eingesetzt.

#### ***P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* wurde entsprechend der Norm DIN EN ISO 16266 bestimmt. Verdünnungen der Biofilmsuspension wurden auf Cetrimid-Agar ausplattiert. Für den Nachweis von *P. aeruginosa* in den Wasserproben (Zulauf und Abläufe) wurden Volumina bis zu 100 mL über Cellulose-Ester-Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und die Filter auf Cetrimid-Agar übertragen. Die Platten wurden für 2 Tage bei 36 °C inkubiert und die KBE bestimmt.

#### ***L. pneumophila***

*L. pneumophila* wurde entsprechend der Normen ISO 11731 und ISO 11731 Teil 2 bestimmt. Verdünnungen der Biofilmsuspensionen wurden nach vorhergehender Hitzebehandlung (30 min, 50 °C) auf GVPC-Agar ausplattiert. In Zulauf und Abläufen wurde *L. pneumophila* AdS durch Filtration von Volumina von bis zu 100 mL über Cellulose-Ester-Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm und nachfolgender Inkubation der Filter auf GVPC-Agar bestimmt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 36 °C für 10 Tage.

### 5.1.4 Molekularbiologische Methoden

#### **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

##### **Fixierung**

##### **Feldversuche**

6 mL der Biofilmsuspension wurden 5 Minuten bei 16.000 x und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet anschließend zur Fixierung in 2 mL 4 % Paraformaldehyd resuspendiert. Die Mischung wurde für 60 min bei 4 °C inkubiert und im Weiteren erneut für 5 Minuten bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 2 mL PBS aufgenommen und erneut für 5 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde abschließend nach Entfernung des Überstandes in 250 µl Ethanol/PBS-Gemisch (1:1) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C eingefroren. Für die Trinkwasserproben wurde das maximal zu filtrierende Volumen der Probe über einen Acetatfilter (0,45 µm) filtriert. Der Filter wurde in kleine Stückchen zerteilt und in 10 mL sterilem entionisiertem Wasser für 10 min bei voller Stärke auf einem Vortex geschüttelt. Danach wurden 2 mL der Suspension in ein Eppendorfgefäß übertragen und zentrifugiert (5 min, 16.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und erneut wurden 2 mL der Suspension in das gleichen Eppendorfgefäß pipettiert und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang

wurde so lange wiederholt, bis die gesamte Suspension in einem Eppendorfgefäß gepoolt wurde. Die Fixierung erfolgte dann wie bei den Biofilmpollen.

### **Laborversuche**

1 mL der Biofilmsuspension wurde 5 Minuten bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend zur Fixierung in 2 ml 4 % Paraformaldehyd resuspendiert und für 60 min bei 4 °C inkubiert und im Weiteren erneut für 5 Minuten bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml PBS aufgenommen und nochmals für 5 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Entfernung des Überstandes in 250 µl Ethanol/PBS-Gemisch (1:1) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C eingefroren. Für die Trinkwasserproben wurde das maximal zu filtrierende Volumen der Probe über einen Acetatfilter (0,45 µm) filtriert. Der Filter wurde in kleine Stückchen zerteilt und in 10 ml sterilem entionisiertem Wasser für 10 min bei voller Stärke auf einem Vortex geschüttelt. Danach wurden 2 ml der Suspension in ein Eppendorfgefäß übertragen und zentrifugiert (5 min, 16.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und erneut wurden 2 ml der Suspension in das gleichen Eppendorfgefäß pipettiert und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die gesamte Suspension in einem Eppendorfgefäß gepoolt wurde. Die Fixierung erfolgte dann wie bei den Biofilmpollen.

### **Hybridisierung und Auswertung**

Sowohl die Trinkwasserbiofilmsuspensionen als auch die Trinkwasserproben wurden mittels FISH auf das Vorkommen der Zielorganismen hin untersucht. Dazu wurden für die Proben aus den Feldversuchen und den Laborversuchen die spezifischen Oligonukleotidsonden Psae 16S-182 (Wellinghausen et al., 2005) für den Nachweis von *P. aeruginosa*, LEGPNE 1 (Grimm et al., 1998) für den Nachweis von *L. pneumophila*, LEG705 für den Nachweis von Legionella spp, Colinsitu (Regnault et al., 2000) für den Nachweis von *E. coli*, und Kpn (Esperanza-Torres et al., 2008) für den Nachweis von *K. pneumoniae* (nur bei den Laborversuchen) verwendet. Alle Sonden waren mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy3 markiert. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyde in Phosphat-gepufferter Saline (PBS, pH 7,2) für 1 h bei 4 °C fixiert, mit PBS gewaschen und in einem Gemisch aus Ethanol (p.a.) und PBS (1:1) resuspendiert. 10 µl der resuspendierten Proben wurden auf Epoxy-beschichtete Glasobjektträger mit 8 Vertiefungen pipettiert. Zur Dehydratation der resuspendierten Proben wurden die Objektträger für jeweils 3 min in aufsteigend konzentrierten (50 %, 80 %, und 96 %) Ethanolbädern inkubiert. Nach der Ethanolbehandlung wurden 10 µl Hybridisierungspuffer (0,9 M NaCl, 20 mM Tris [pH 8,0], 0,01 % SDS, 40 % (v/v) Formamid und 5 ng/l Oligonukleotidsonde Psae 16S-182 oder 0,9 M NaCl, 20 mM Tris [pH 7,6], 0,01 % SDS, 25 % (v/v) Formamid und 5 ng/l Oligonucleotidsonde LEGPNE1 oder 0,9 M NaCl, 20 mM Tris [pH 7,6], 0,01 % SDS, 25 % (v/v) Formamid und 5 ng/l Oligonucleotidsonde LEG705 oder 0,9 M NaCl, 20 mM Tris [pH 8,0], 0,01 % SDS, 20 % (v/v) Formamid und 5 ng/l Oligonukleotidsonde Colinsitu oder 0,9 M NaCl, 20 mM Tris [pH 7,0] 30 % (v/v) Formamid und 5 ng/l Oligonukleotidsonde Kpn) auf die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Für die Sonden Psae 16S-182, LEGPNE1, LEG705, und Colinsitu wurde die Hybridisierung bei 46 °C für 90 min durchgeführt. Für die Sonde Kpn betrug die Hybridisierungstemperatur 40 °C. Nach der Hybridisierung wurden ungebundene Reste der Sonden durch Inkubation der Objektträger in Waschpuffer (56 mM NaCl, 20 mM Tris [pH 8,0], 0,01 % SDS und 5 mM EDTA für die Sonde Psae 16S-182 oder 160 mM NaCl, 20 mM Tris [pH 7,6], 0,01 % SDS und 5 mM EDTA für die Sonde LEGPNE1 oder 225 mM NaCl, 20 mM Tris [pH 7,6], 0,01 % SDS für die Sonde LEG705 oder 250 mM NaCl, 20 mM Tris [pH 8,0], 0,01 % SDS für die Sonde Colinsitu oder 0,9 M NaCl, 20 mM Tris [pH 7,0], 0,05 % SDS für die Sonde Kpn) bei 46 °C für 15 min entfernt. Für die Sonde Kpn erfolgte die Inkubation bei 40 °C für 15 min. Eine Gegenfärbung der Zellen erfolgte mit DAPI (1 µg/ml) für 20 min. Zur Auswertung wurden die Proben unter einem Epifluoreszenzmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung betrachtet. Dazu wurden 10 bis 20 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder mit Hilfe eines Zählfeldes (100 µm x 100 µm) ausgezählt.

## Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

### DNA-Isolierung

Je 20 ml der Biofilmsuspension aus den Feldversuchen (6 ml der Biofilmsuspension aus den Laborversuchen) wurden bei 20.000 x g, 4 °C, für 20 min zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml DEPC-Wasser (Roth) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2-ml Eppendorfgefäß (PCR-clean) überführt und in der Biofuge (Fresco) bei 16.000 x g, 4 °C, für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur DNA-Isolierung bei – 20 °C eingefroren. Die DNA wurde unter Verwendung eines Bead-Beaters mit dem PowerBiofilm™ Isolation Kit (MO BIO) gemäß den Herstellerangaben isoliert.

### PCR

Zur Amplifizierung der 16S rDNA in den DNA-Isolaten aus den Biofilmproben wurde ein PCR-Gemisch wie in Tabelle 13 beschrieben hergestellt. Als Negativkontrolle wurden statt des DNA-Templates 3 µl Rotipuran® Wasser verwendet. Es wurde das in Tabelle 14 beschriebene Temperaturprofil verwendet.

	Konzentration	Endkonzentration	µl pro Ansatz
Tag-Master	-	-	10,0
PCR-Puffer	-	-	5,0
dNTP-Mix	10 mM	200 µM	1,0
Forward-Primer	10 µM	0,5 µM	2,5
Reverse-Primer	100 µM	0,5 µM	2,5
TaqPolymerase	5 U/µl	2,5 U	0,5
DNA-Template	-	-	3,0
H <sub>2</sub> O (PCR-clean)	-	-	25,5
Gesamtvolumen	-	-	50,0

Tabelle 13: PCR-Komponenten.

T [°C]	T [min]
94	2:00
94	1:00
59	1:00
72	1:30
72	5:00
4	∞

} 30 Zyklen

Tabelle 14: PCR-Profil.

### Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNA. Dazu wurde ein 1% Agarosegel verwendet. Die Geltaschen wurden jeweils mit einer Mischung aus 1 µl TriTrack-Farbstoff und 5 µl PCR-Produkt befüllt. Auf jedem Gel wurden als Größenmarker 5 µl DNA-Leiter aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 50 min bei 100 V/cm<sup>2</sup>. Zur anschließenden Färbung wurde das Gel 20 Minuten in Ethidiumbromid inkubiert und danach 5 Minuten lang in entionisiertem Wasser entfärbt. Die Betrachtung erfolgte unter UV-Licht.

### Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in den DNA-Isolaten wurde mittels des PicoGreen® Kits bestimmt. Dazu wurde zunächst die Kalibration für hochkonzentrierte Proben entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt (Tabelle 15). Danach erfolgte die Messung der Proben ebenfalls nach Herstelleranga-

ben mit einem Fluorimeter SFM 25 (BIO-TEK KONTRON Instrumente) oder einem Mikrotiterplatten-Reader (Tecan).

Volumen ( $\mu$ l) des TE-Puffers	Volumen ( $\mu$ l) der DNA-Stammlösung (2 $\mu$ g/ml)	Endkonzentration (ng/ml)
0	1000	2000
900	100	200
990	10	20
999	1	2
1000	0	0 (Blindprobe)

**Tabelle15: Kalibration für hochkonzentrierte Proben.**

### Durchführung der DGGE

Zur Feststellung von Verschiebungen in der Spezieszusammensetzung der einzelnen Proben abhängig von der Temperatur und Nährstoffgehalt wurde die DGGE angewandt. Hierzu wurde ein 7,5 % Acrylamidgel mit einem Denaturierungsgradienten von 40 % - 60 % hergestellt. Mit Hilfe eines Gradienten-Delivery-Systems wurde das Gel langsam und kontinuierlich bis etwa 1 cm unter die obere Kante der kürzeren Gelplatte gegossen. Das Gel wurde mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet, damit sich eine gerade Gelkante bildete. Die Polymerisationszeit betrug 3 h bis 4 h bei Raumtemperatur. Das verbliebene 2-Butanol wurde abgegossen und die Gelkante drei Mal mit 2 ml TAE-Puffer (1 x) gewaschen. Danach wurde ein Sammelgel hergestellt, das mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle etwa 2,5 ml auf die Gelkante gegeben wurde. Zur Herstellung der Geltaschen wurde in das Sammelgel ein Gelkamm blasenfrei hineingesteckt. Die Polymerisation erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Kämmen herausgezogen, die Taschen drei Mal mit TAE-Puffer (1 x) gespült und dann mit TAE-Puffer (1 x) befüllt.

Zum Durchführen der Elektrophorese wurde ein Tank mit 7 L TAE-Puffer (1 x) befüllt. Mit Hilfe der Elektrophoresekontrolleinheit wurde dieser unter Rühren auf 68 °C erwärmt. Die Gelkassette wurde in den Sandwichkern eingespannt und in den Tank überführt. Die Proben (130-250 ng DNA) wurden mit TriTrack Beladungsfarbstoff (6 x) im Verhältnis 5:1 gemischt. Nachdem 0,5 L 60 °C heißer TAE-Puffer (1 x) in den Kathodenraum gegossen wurden, konnten die Geltaschen mit Probe beladen werden. Anschließend wurden nach dem Aufsetzen der Kontrolleinheit Rührer und Pumpe gestartet und die Temperatur auf 58 °C eingestellt. Am Spannungsgerät wurde folgendes Programm gewählt: 20 min bei 20 V/500 mA/250 W; 17 h bei 70 V/500 mA/250 W, 3 h bei 10 V/500 mA/250 W. Anschließend erfolgte die Färbung mit GelRed (Biotium). Dazu wurde das Gel in einer Färbewanne mit einer 3 % GelRed-Lösung für 60 min im Dunkeln inkubiert. Die Betrachtung des Gels erfolgte unter UV-Licht.

5.1.5 Daten zur Einnistung der hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwasserbiofilme auf EPDM

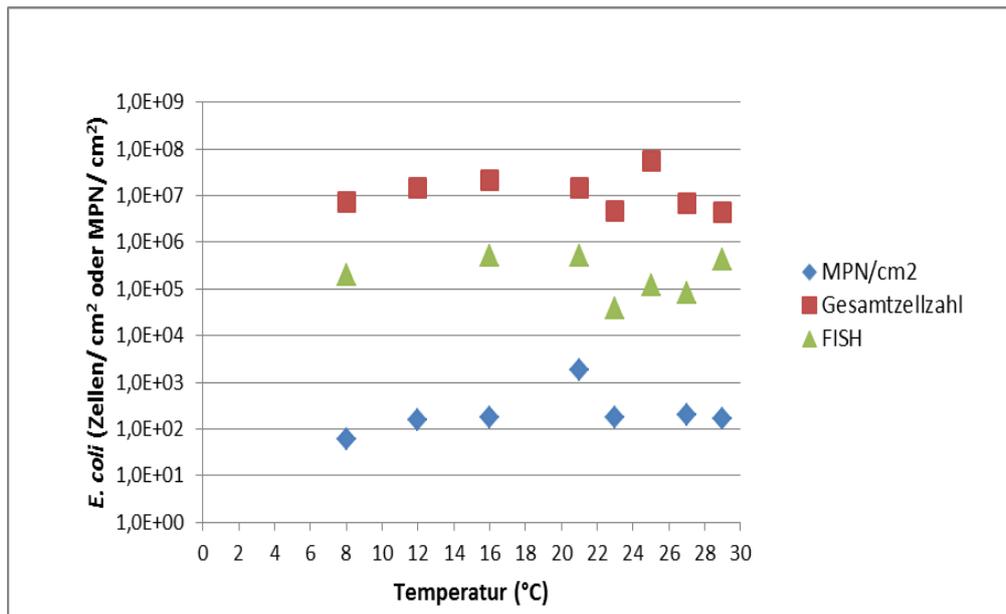


Abbildung 37: Einnistung von E. coli in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

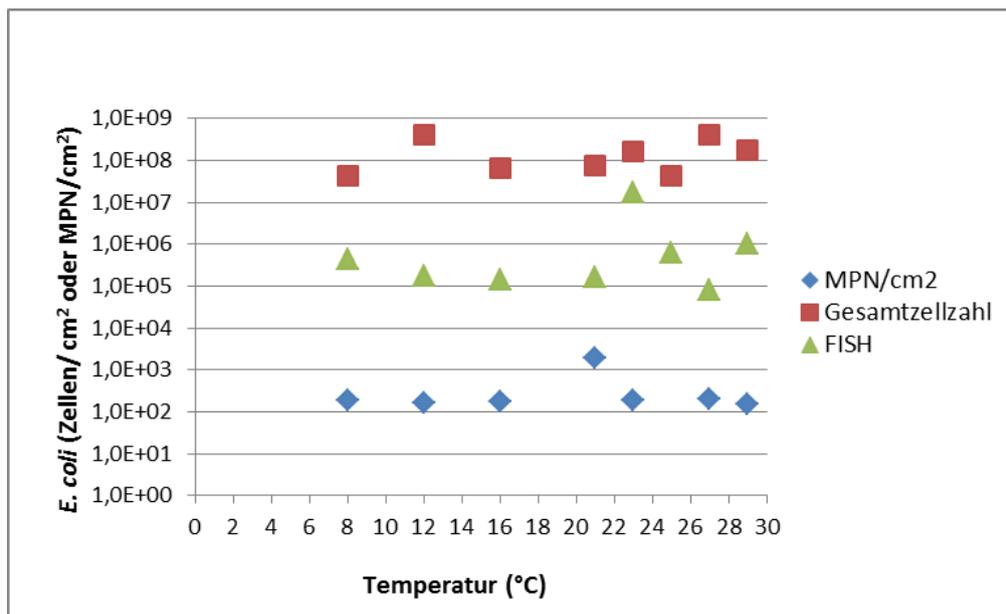


Abbildung 38: Einnistung von E. coli in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

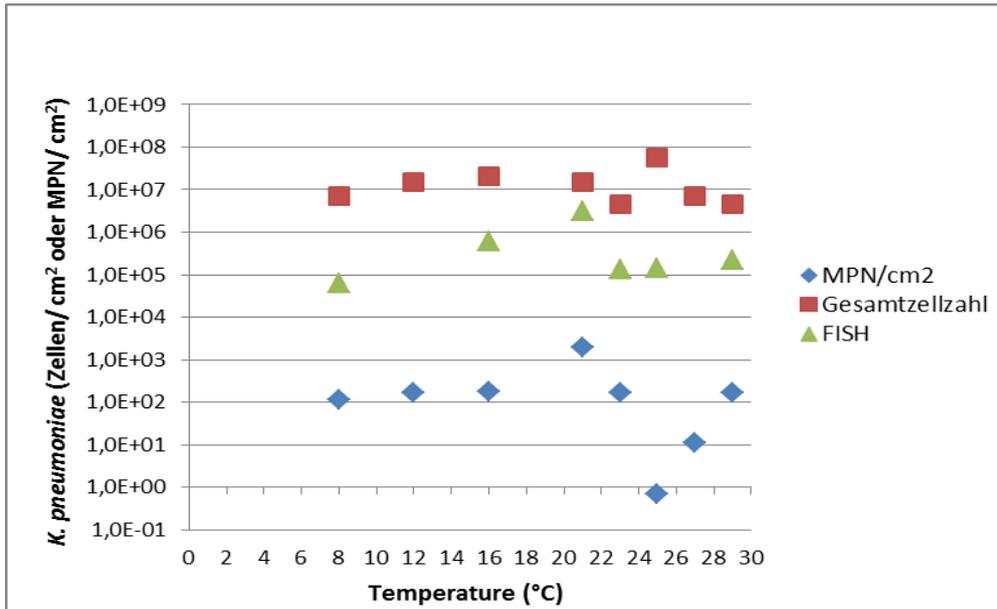


Abbildung 39: Einnistung von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

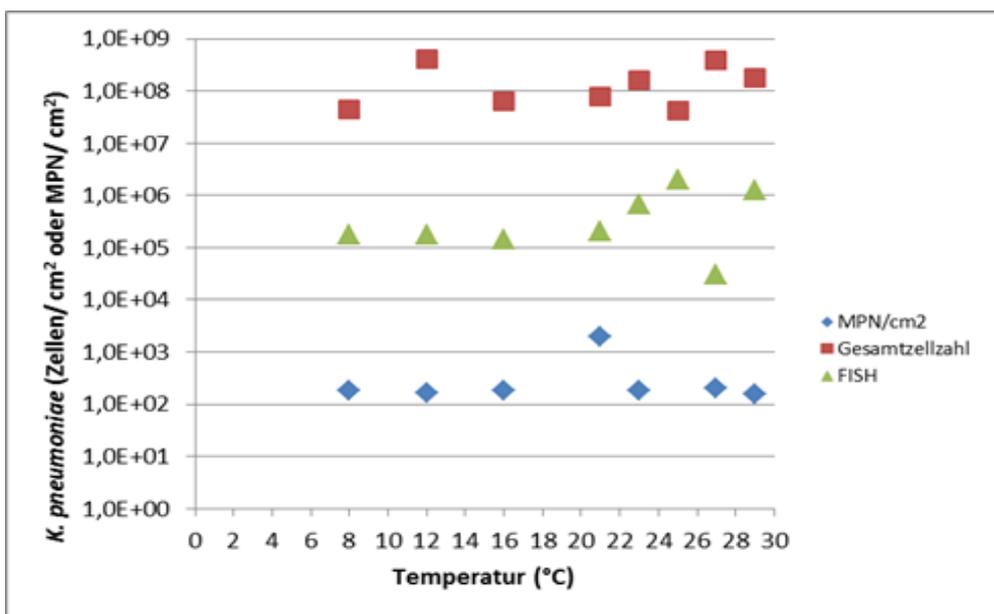


Abbildung 40: Einnistung von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

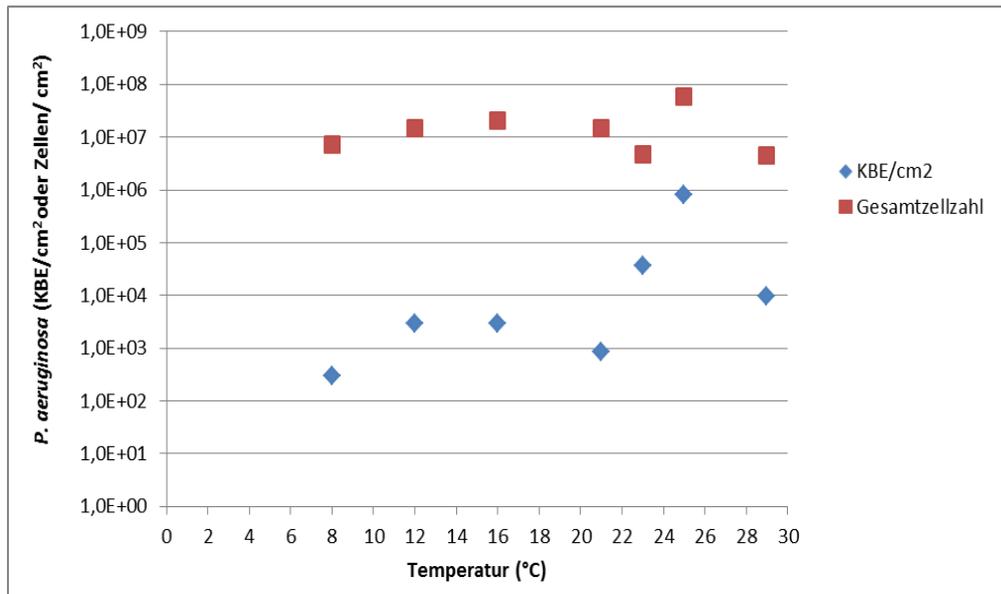


Abbildung 41: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

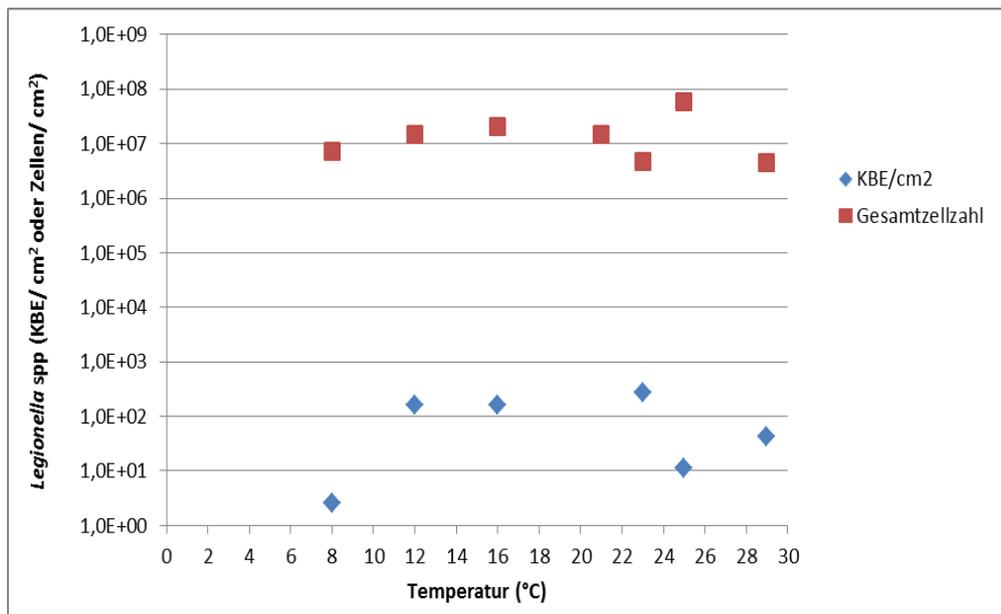


Abbildung 42: Einnistung von *Legionella* spp. in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffarmen Bedingungen.

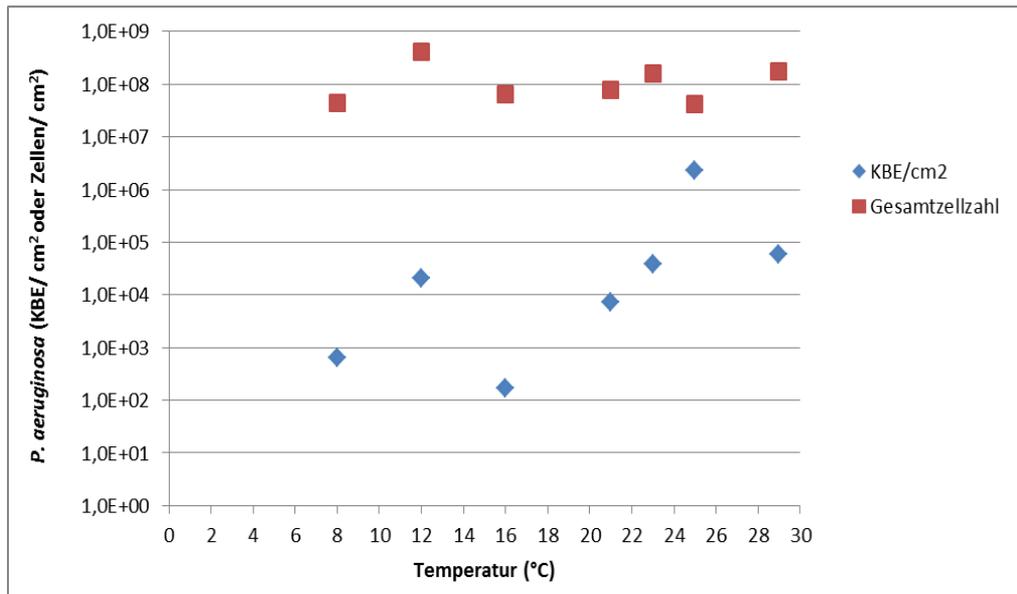


Abbildung 43: Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

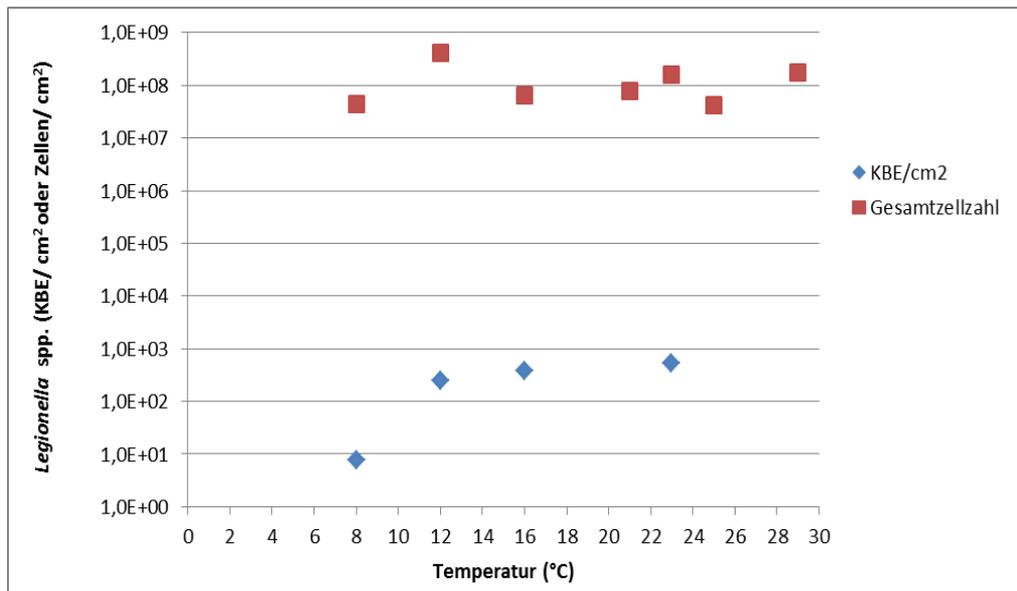


Abbildung 44: Einnistung von *Legionella* spp. in Trinkwasserbiofilme auf EPDM 1 d nach Animpfung unter nährstoffreichen Bedingungen.

5.1.6 Daten zur Persistenz der hygienisch relevanten Bakterien in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM

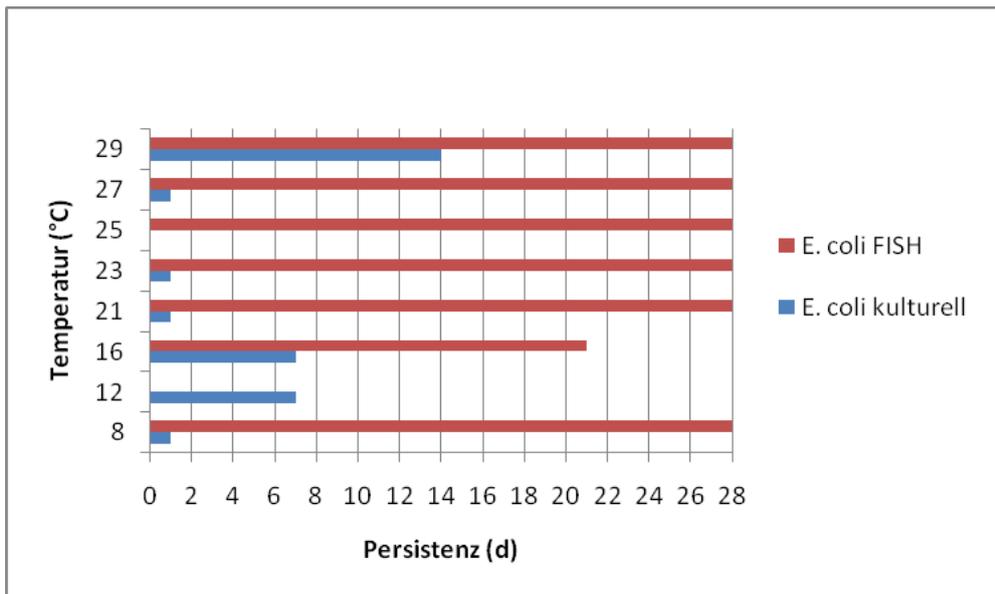


Abbildung 45: Persistenz von E. coli in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM unter nährstoffarmen Bedingungen.

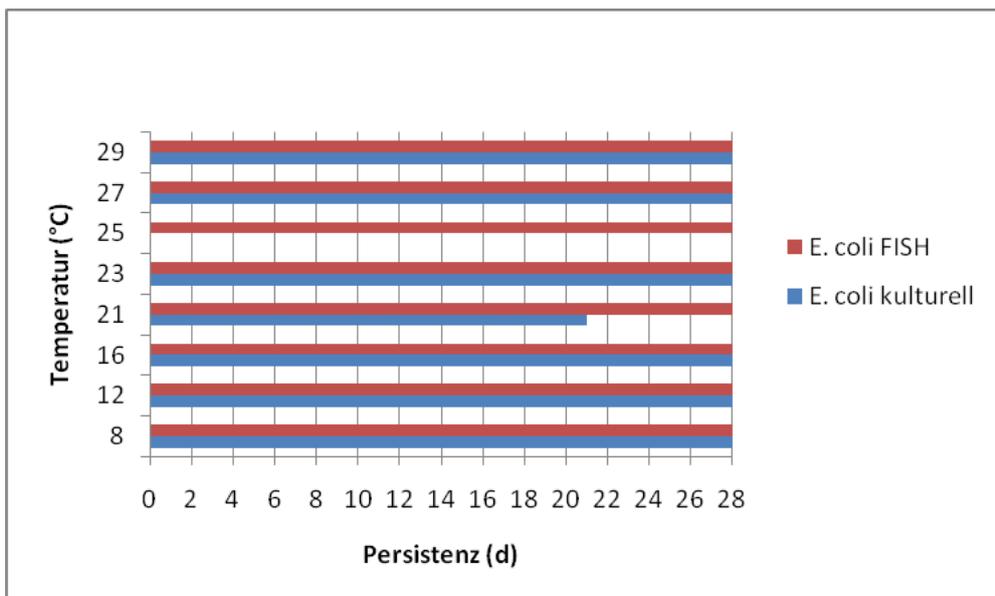


Abbildung 46: Persistenz von E. coli in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM unter nährstoffreichen Bedingungen.

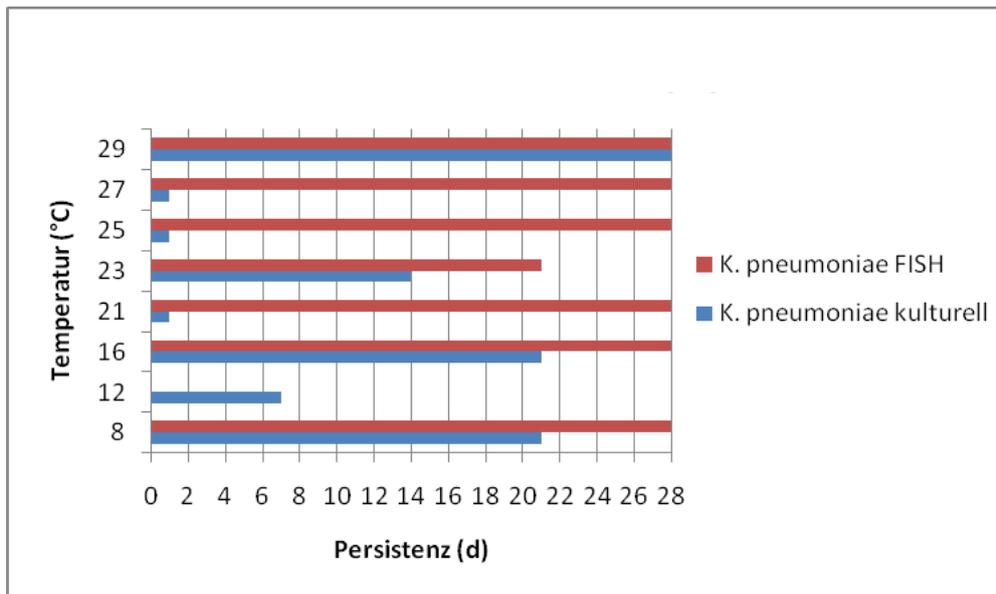


Abbildung 47: Persistenz von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM unter nährstoffarmen Bedingungen.

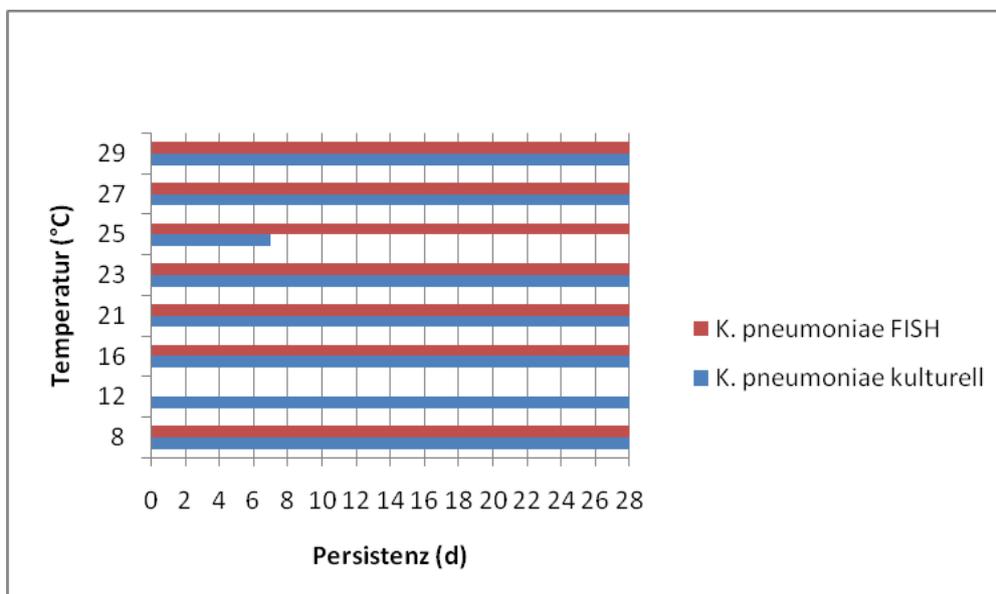


Abbildung 48: Persistenz von *K. pneumoniae* in Trinkwasserbiofilmen auf EPDM unter nährstoffreichen Bedingungen.



**Ansprechpartner**

Jens Hasse  
hasse@fiw.rwth-aachen.de

Michaela Stecking  
stecking@fiw.rwth-aachen.de

**Projektbüro *dynaklim***

Mozartstraße 4  
45128 Essen

Tel.: +49 (0)201 104-33 39

***www.dynaklim.de***