

IWW Zentrum Wasser

Rheinisch Westfälisches Institut für Wasserforschung gGmbH
Rheinisch Westfälisches Institut für Beratung

Dr. Gabriela Schaule

Hygiene, Energie und Mikroorganismen

Biebesheim 26. Juni 2014



Institut an der
UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken



Biologie in technischen Systemen: Mikrobiologie – die Organismen leben in der Wasserphase & auf den Oberflächen

Im Bereich Angewandte Mikrobiologie werden Wasser- und Belagsproben charakterisiert, hygienisch relevante Mikroorganismen identifiziert und quantifiziert mittels kultureller und molekularbiologischer Methoden



Abb. 1. «Thames Water», Stich von William Heath um 1828.

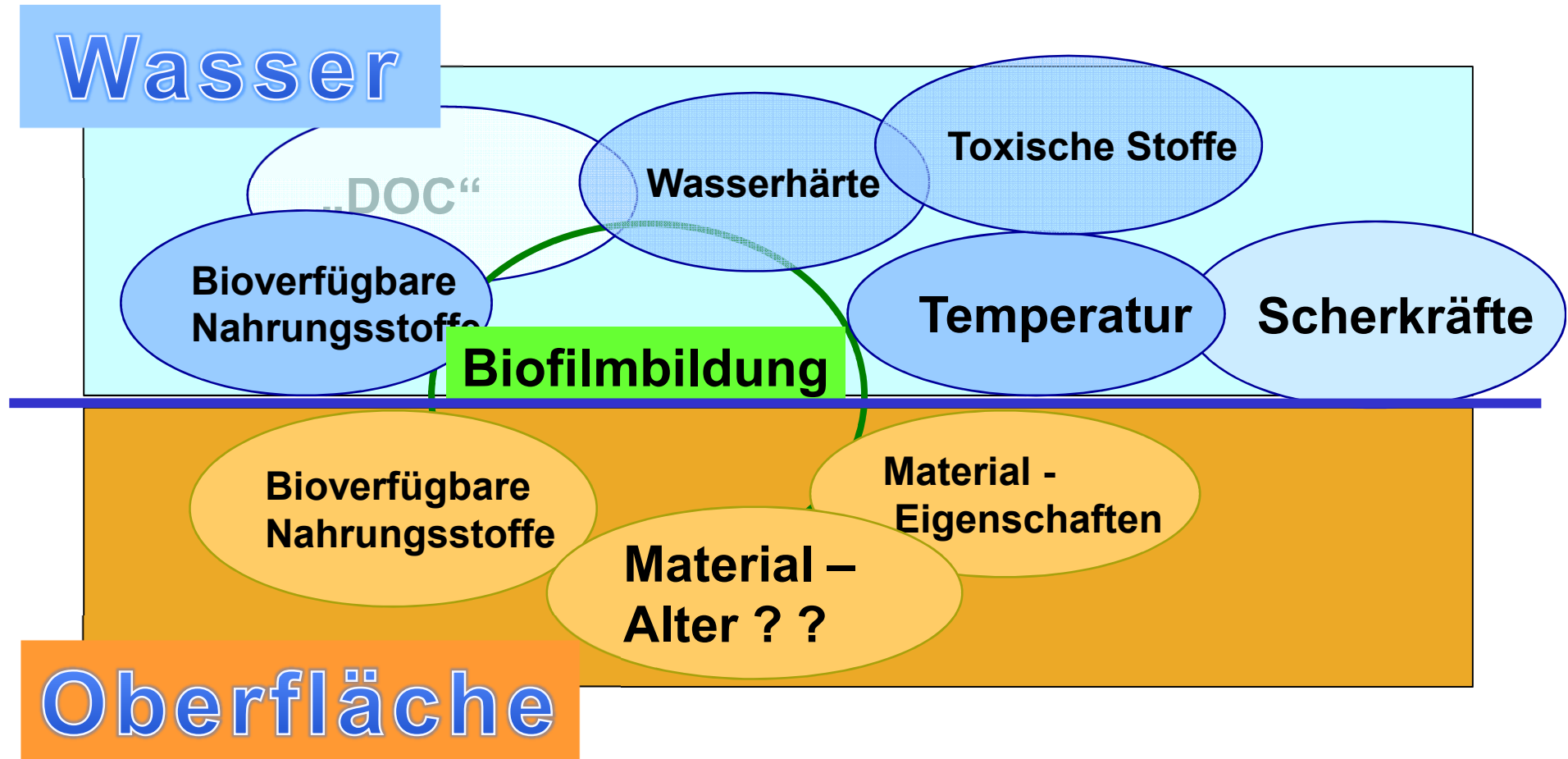
Der Blick durch ein Mikroskop in ein Flußwasser zeigt, dass dort sehr viele, unterschiedlichste kleine Organismen leben; auch in Grund-, Trink-, Prozess und Brunnenwässern sind sehr viel Mikroorganismen – vor allem Bakterien



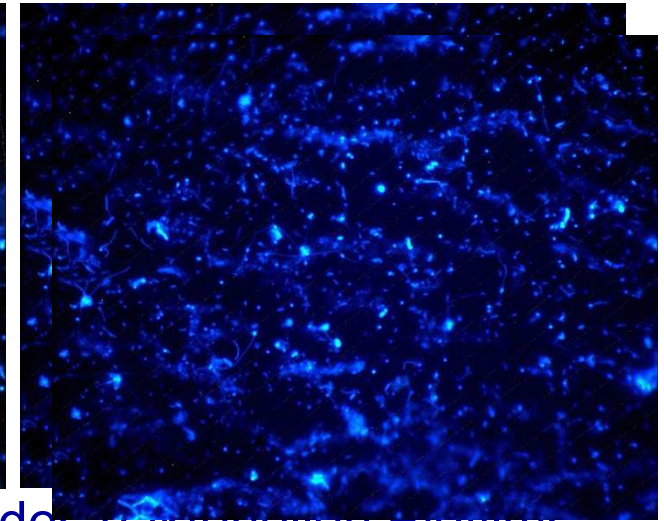
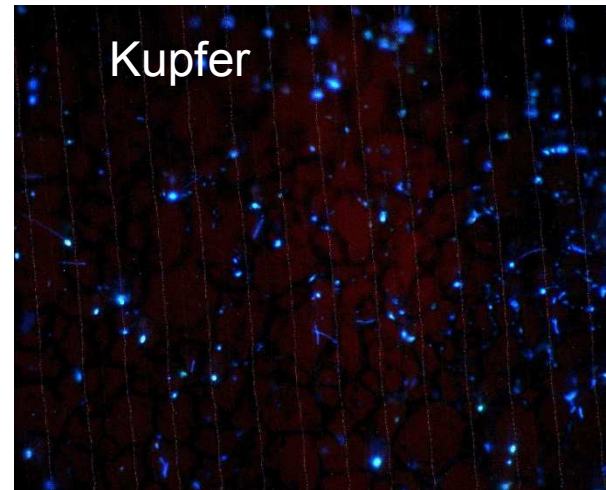
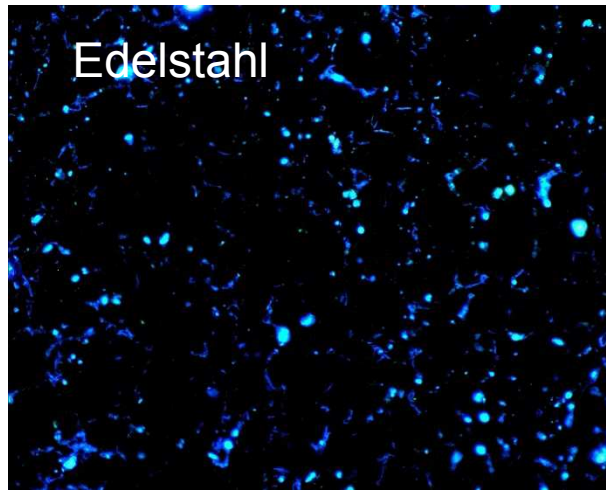
Der Blick auf eine Wasser benetzte Oberfläche zeigt im mikroskopischen Bild auch sehr viele Mikroorganismen, die in einem Biofilm / Deckschicht / Belag vergesellschaftet leben (Zementmörtel ausgeschleudertes TW-Rohr)

Biofilmbildung – Legionellen und andere hygienisch relevante Bakterien

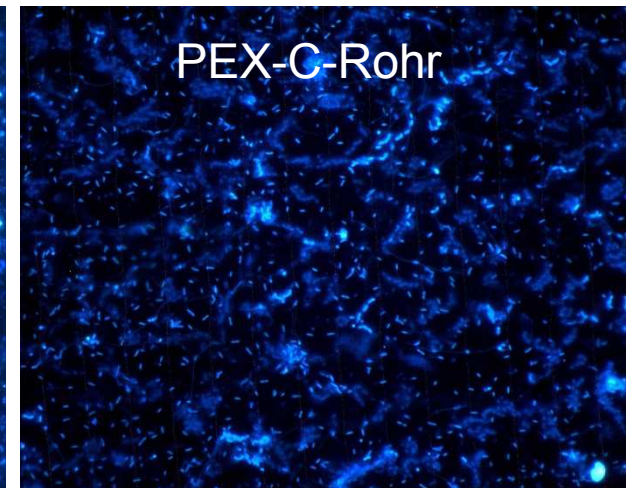
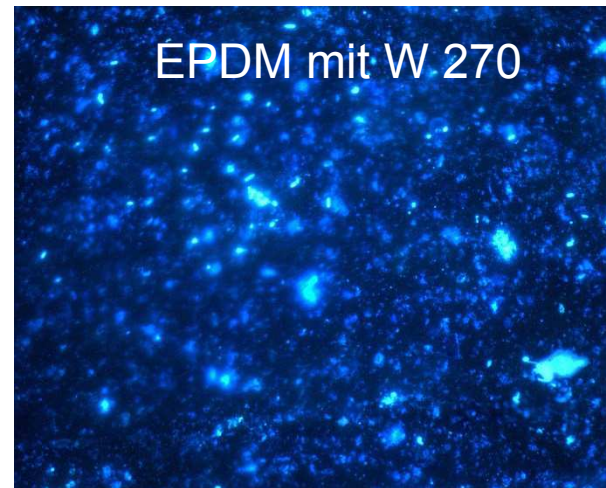
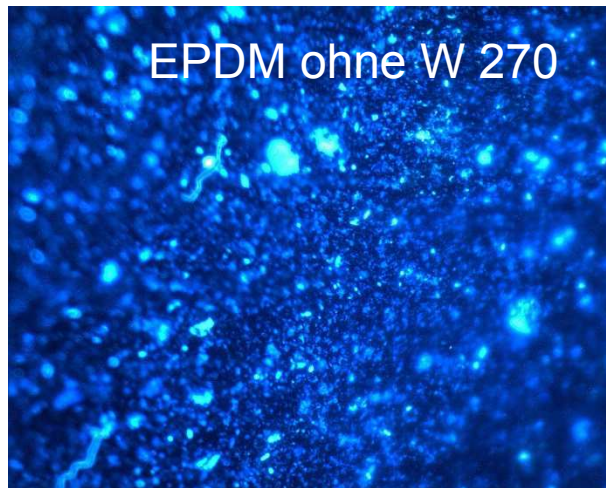
Die Ausbildung von Biofilmen wird von verschiedensten Faktoren beeinflusst



Biofilm auf unterschiedlichen neuen Werkstoffen nach 12 Wochen Exposition in Trinkwasser am IWW



Mikroskopisches Bild bei 100 facher Vergrößerung des bakteriellen Biofilms

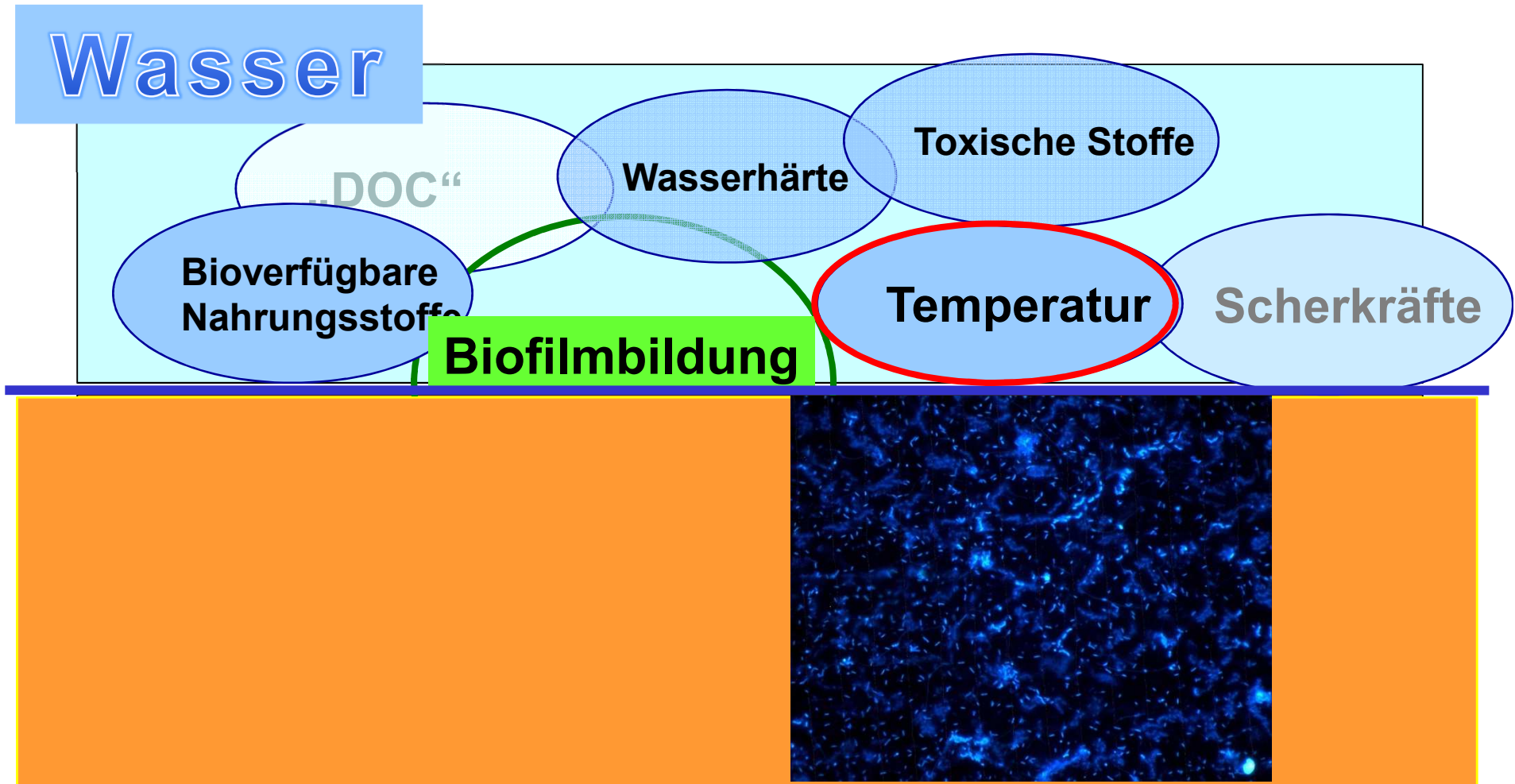


Mikroskopisches Bild bei 100 facher Vergrößerung des bakteriellen Biofilms



Biofilmbildung

Die Ausbildung von Biofilmen wird von verschiedensten Faktoren beeinflusst



Neu gestartetes Forschungsprojekt

**Vorhabenbeschreibung zum Verbundvorhaben
EnEff:Wärme**

**"Energieeffizienz und Hygiene in der
Trinkwasser-Installation,,**

**im Kontext: DHC Annex TS1 "Low Temperature District
Heating for Future Energy Systems"**

Kennwort:

EE+Hyg@TWI

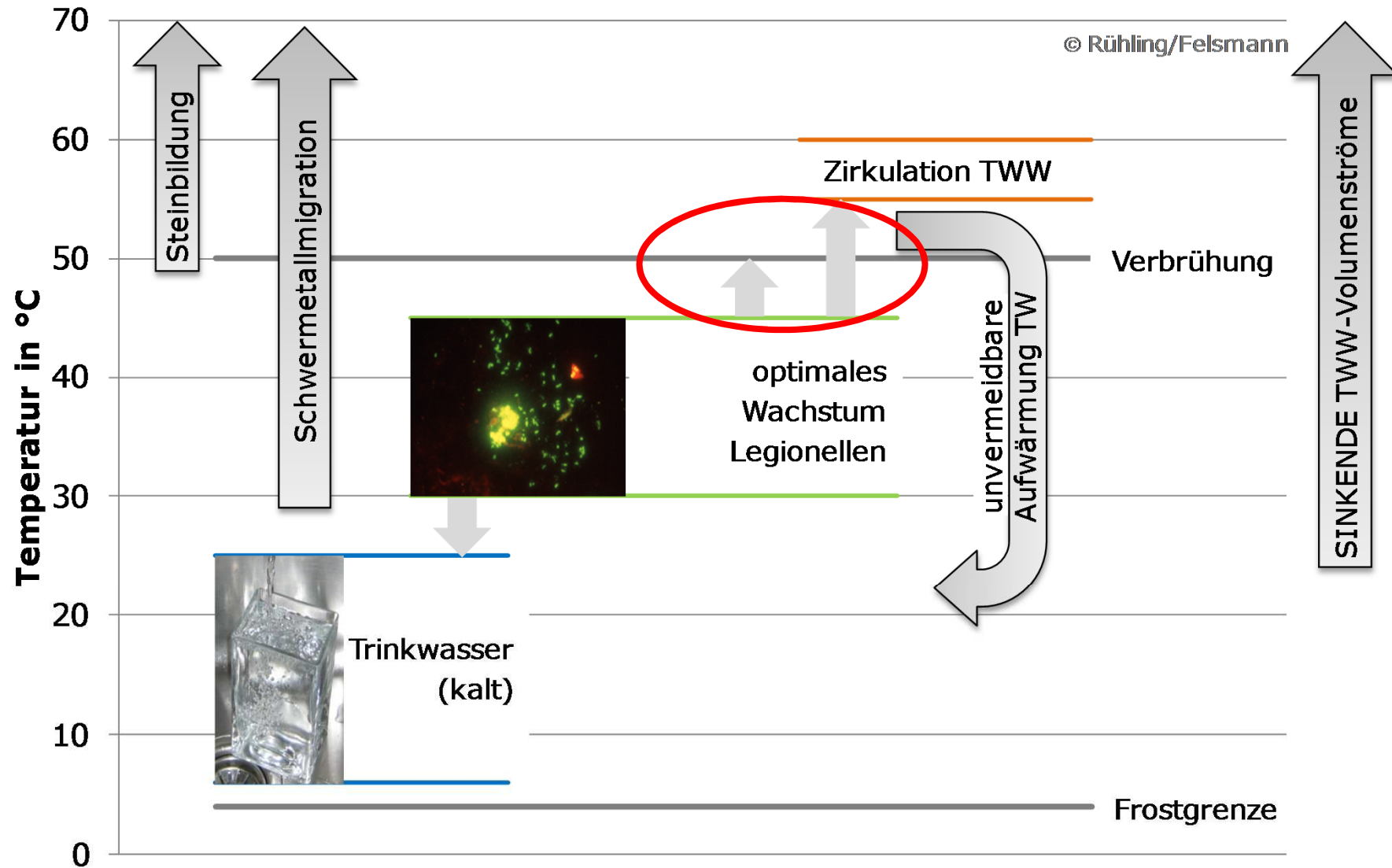
■ These

Wasser ist nicht nur Lebensmittel Nummer 1, sondern auch das umweltverträglichste, wirtschaftlichste und am meisten verbreitete Wärmeträgermedium.

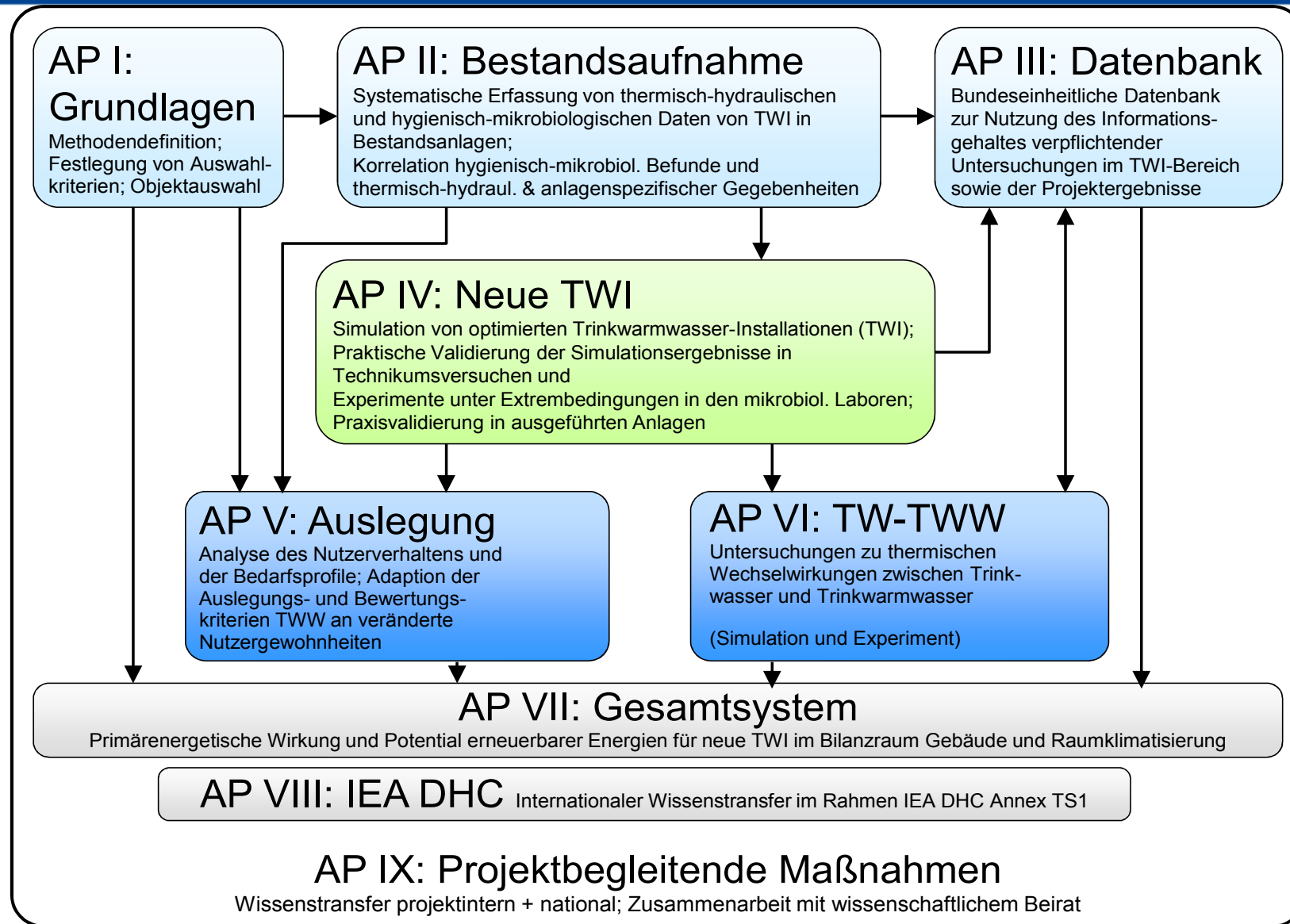
Für die Zwecke der Nutzung des erwärmten Trinkwassers (Trinkwarmwasser - TWW) sind 40 bis 50 °C völlig ausreichend.

■ Aber: was ist mit der Hygiene? Steigt die Gefährdung?

"Energieeffizienz und Hygiene in der Trinkwasser-Installation,,



Übersicht Arbeitspakete



1. Projekttreffen

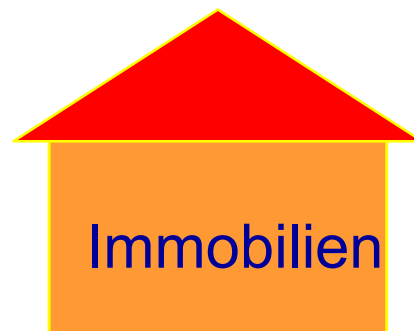
9

AP 1 (IWW, Hyg. Inst. Bonn, TU Dresden)

- Bestandsaufnahme: systemische Untersuchung von Trinkwarmwasserinstallation für zukünftige LOW TEMPERATURE-Wärmeversorgungskonzepte, Identifizierung von Ansätzen zur Nutzung erheblichen Energieeinsparpotentiale sowie zur Integration von erneuerb. Energien bei Beachtung des Primats der menschlichen Gesundheit.
- Ziel ist quantitative Identifikation des trinkwasserhygienisch abgesicherten Energiesparpotentials für zukünftig relevante Technologien der Trinkwarmwassererzeugung/–verteilung (Mehrfamilienhäuser, typische Nichtwohngebäude).

Temperatur

Hydraulik



100

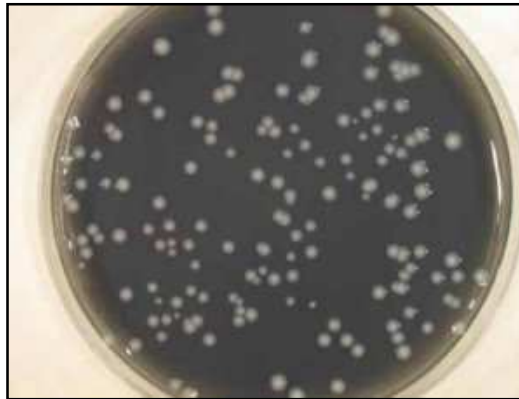
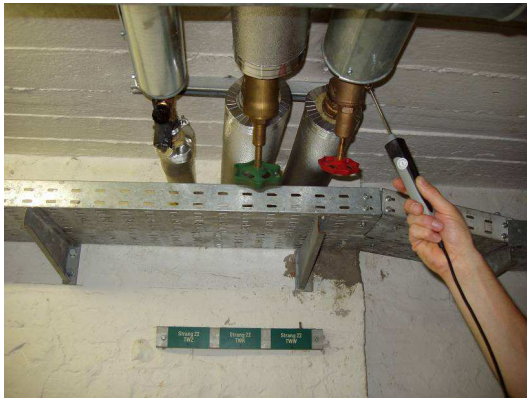
Pseudomonas aeruginosa

Legionellen

Gefährdungsanalysen nach TrinkwV (am IWW durchgeführt)

§ 16 Absatz 7 Nummer 2 TrinkwV 2001:

**Erstellung einer Gefährdungsanalyse bei Überschreitung des technischen
Maßnahmenwertes (Legionellen)**



- **Dokumentation der Trinkwasser-Installation**
- **Erfassung von bau- und betriebstechnischen Mängeln**
- **Bewertung auf Basis von Untersuchungen und Besichtigung**
- **Ableitung von Maßnahmen mit zeitlicher Priorisierung**

Durchführung einer Gefährdungsanalyse

- **Sichtung und Prüfung von Dokumenten und sonstigen Informationen**
 - z.B. Raumbuch, Sanitärpläne, Ergebnisse von mikrobiologischen Untersuchungen, Instandhaltungs- / Wartungspläne, mündliche Informationen, u. a.
- **Überprüfung der Einhaltung der a.a.R.d.T. und der bestimmungsgemäßen Nutzung**
- **Überprüfung wichtiger Betriebsparameter (z.B. Temperatur)**
- **Weitergehende Untersuchung gemäß DVGW W 551**
- **Dokumentation, Gesamtbewertung, Ableitung von Maßnahmen mit zeitlicher Priorisierung**

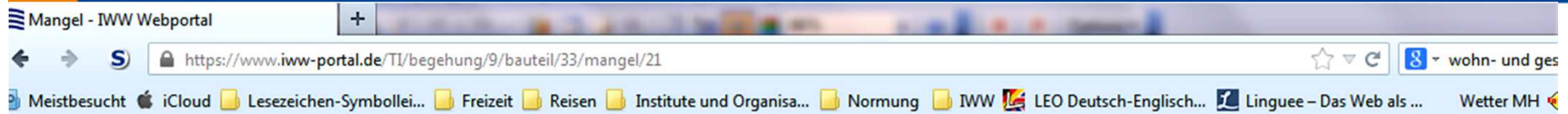
Durchführung der Inspektion

■ Unterstützung durch Smartphone

- Relevante Daten zum Objekt hinterlegt
- Sprachaufnahmen, Fotos
- Zuordnung Proben über QR-Code
- Anlegen der Mängel
- Hochladen ins Portal am Ende



IWW-Webportal



Logout

Begehung > Bauteile > Bauteil > Mängel > Mangel

Details Mangel

Fotos & Sprachaufnahmen



Stammdaten

Zuordnung zu Anlage / Bauteil:

Nicht-Trinkwasseranlagen - Typ: Heizungsanlage, ...

Zuordnung zu Komponente:

Direkt dem Bauteil zugeordnet

Priorität:

-

Kosten:

Allgemeine Beschreibung:

Die Befüllung der Heizungsanlage erfolgt über einen Schlauch ohne eine entsprechende Sicherungseinrichtung (nicht permanente Verbindung). Zur Befüllung der Heizungsanlage ist eine Sicherungseinrichtung vom Typ BA zwischen der Trinkwasser-Installation und der Heizungsanlage erforderlich. Es ist unklar, ob

-- Bitte auswählen --

- Heizung
- Kaffeemaschine
- Enthärtung für TW: Absicherung

Trinkwassercheck

Begehungen

- Barcodes
- App Download
- Unterschriften

Stammdaten

- Gebäude

Administration

- Benutzerübersicht
- Rollenübersicht

Benutzerdaten

- Passwort ändern

Berichterstellung

Anhang 2 – Fotodokumentation, Bewertung, Empfehlung

Nr	Probenahmestelle	Bewertung	Empfehlung / Maßnahmen	P
1	 <p>HNR 49, UG1, HAR Nach Wasserzähler, Entleerungsventil, Kaltwasserprobe;</p>	<p>Grenzwerte für mikrobiologische Parameter und Schwermetalle eingehalten.</p> <p>--- Bitte auswählen ---</p>	<p>Es wurden Spuren an Blei im Trinkwasser festgestellt. Daher wird empfohlen, ggf. eine Kontrolluntersuchung auf Blei durchführen; Leitungssystem auf bleihaltige Materialien prüfen.</p> <p>--- Bitte auswählen ---</p>	K
2	 <p>HNR 45, B15, OG4, WC Peripherie, Waschbecken, Einhebelmischer,</p>	<p>Grenzwerte für mikrobiologische Parameter und Schwermetalle eingehalten.</p> <p>--- Bitte auswählen ---</p>	<p>Es wurden Spuren an Blei im Trinkwasser festgestellt. Daher wird empfohlen, ggf. eine Kontrolluntersuchung auf Blei durchführen; Leitungssystem auf bleihaltige Materialien prüfen.</p> <p>--- Bitte auswählen ---</p>	K

TI-Check/ Gefährdungsanalysen

ZWEI KNOW-HOW STARKE PARTNER IWW ZENTRUM WASSER

IWW bietet ein breites Spektrum an instrumenteller Analytik, hygienischem Fachwissen und Beratung auf höchstem Qualitätsniveau. Wir verfügen über anerkannte Analytiker und Installations-Fachleute. Unsere Stärke ist die interdisziplinäre Bearbeitung komplexer hygienischer Fragestellungen.

EPM

EINFACH UND PROFESSIONELL, ÜBER 40 JAHRE ERFAHRUNG

Als Deutschlands führender Immobilien-Manager präsentiert sich die EPM als verlässlicher Partner für vollumfängliches Immobilien-Management. Das Dienstleistungsangebot reicht von allen relevanten Asset-Management-Leistungen bis hin zum vollumfänglichen operativen Property-Management sowie ergänzenden Services wie Vermietungsmanagement, Bau- & Projekt-Management und FM- & Energie-Consulting. Im Fokus stehen dabei Rentabilität und optimaler Service für Eigentümer und Nutzer.

IHRE ANSPRECHPARTNER

Dr. Achim Rübél | Chemische Analytik, Werkstoffe
+49 (0) 208 40 30 3-211 | a.ruebel@iww-online.de
Dr. Beate Kilb | Mikrobiologie und Hygiene
+49 (0) 208 40 30 3-438 | b.kilb@iww-online.de
Andreas Sydow | Bautechnik und Installation
+49 (0) 211 38059-317 | a.sydow@epm-world.com

Detaillierte Informationen zu unserem Leistungsangebot und zu aktuellen Veranstaltungen finden Sie auf unserer Homepage.

www.iww-online.de



KONTAKT

IWW RHEINISCH-WESTFÄLISCHES INSTITUT FÜR WASSER
BERATUNGS- UND ENTWICKLUNGSGESELLSCHAFT MBH

Moritzstraße 26 | 45476 Mülheim an der Ruhr

Telefon | +49 (0)208-4 03 03-0 | Fax -80

E-Mail | info@iww-online.de

Web | www.iww-online.de

TI-CHECK FÜR TRINKWASSER-INSTALLATIONEN

HYGIENISCHE ANALYSE DER TRINKWASSERQUALITÄT
MIT BETRIEBS- UND BAUTECHNISCHER BEWERTUNG
DER TRINKWASSERINSTALLATION SPEZIELL FÜR
GEWERBLICH GENUTZTE OBJEKTE

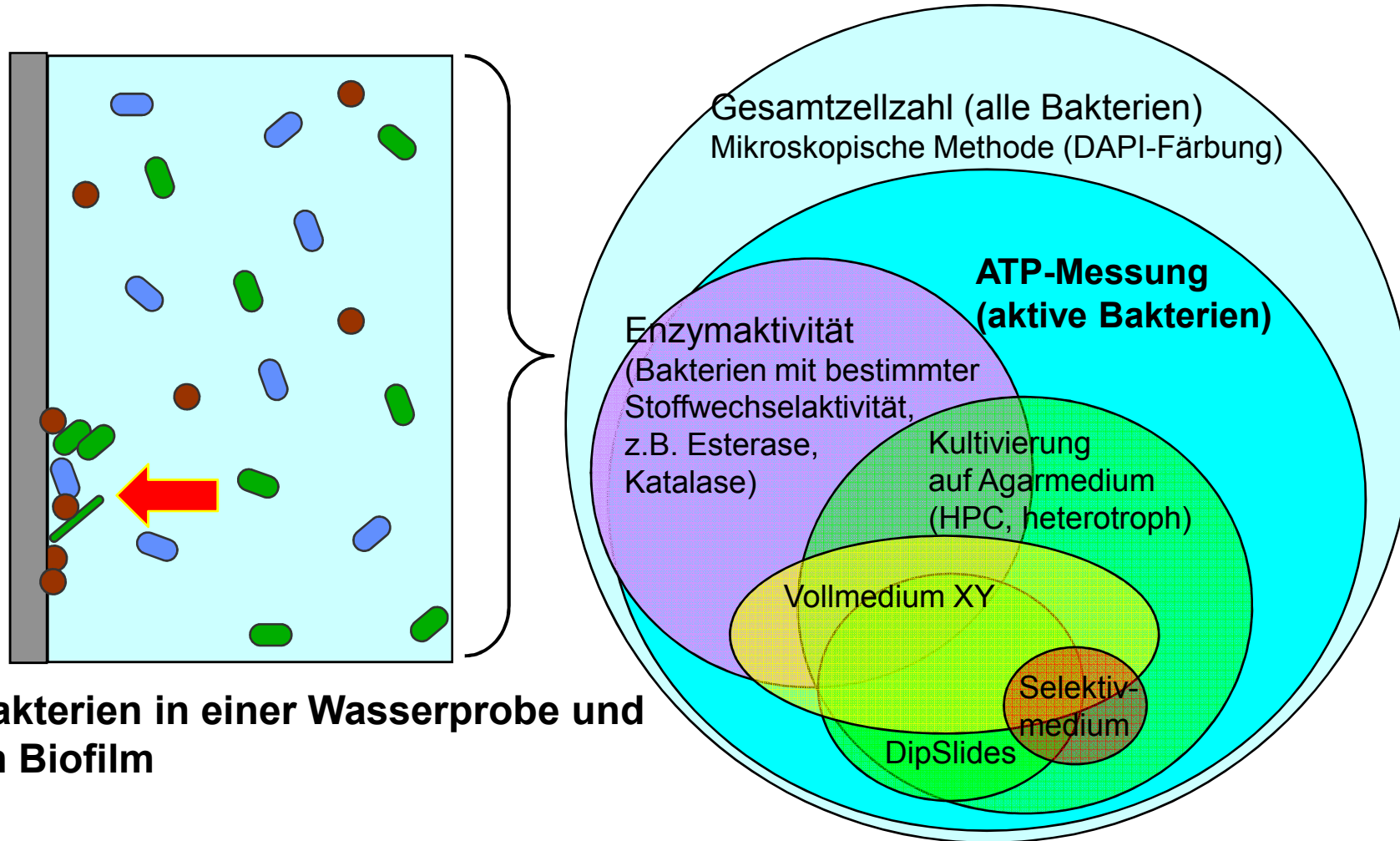


In Kooperation mit **EPM**
Einfach Professionell. Besitzt Bestleistungen



Welche Untersuchungsmöglichkeiten für Wasser – und Biofilmproben gibt es? Viele!

Erfassung von 100% mit der Gesamtzellzahlbestimmung ist Teilmenge x bestimmbar



**Bakterien in einer Wasserprobe und
im Biofilm**

Beendetes Forschungsprojekt (2014)

Untersuchung Wasser-relevanter Parameter auf ihren Effekt für den Übergang in das VBNC-Stadium/Wiederkultivierbarkeit

Teilprojekt 3 – Partner IWW

**G. Schaule, S. Grobe,
K. Bemann, D. Moschnitschka, K. Bemann**

April 2014, Bonn

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

VBNC Stadium durch

- **Nahrungsarme Umgebung**
- **Temperatur**
- **Kontakt mit großen Oberflächen**
- **Wasser und Biofilm und zurück ins Wasser**
- **Fallbeispiele – reale Welt der Wasserversorgung**
- **Toxizität**

- ❖ **Testorganismen**
- *Legionella pneumophila*
- *Pseudomonas aeruginosa* (Kultivierung auf CN-Nähragar)

Die Fähigkeit zur Bildung von VBNC-Stadien ist weit verbreitet bei „Wasserbakterien“ in nahrungsarmen Habitaten

Experimenteller Ansatz um Nahrungsmangel für *Pseudomonas aeruginosa* zu prüfen

- Erlenmeyerkolben (600 ml)
- *Pseudomonas aeruginosa* 1×10^7 Bakterien/ ml
- Temperatur: 15 °C
- Reinstwasser und Trinkwasser, „kupferfrei“
- AOC: $\ll 5 \mu\text{g/l}$ Acetateinheiten - ca. $55 \mu\text{g/l}$ Acetateinheiten



Eingesetzte Bakterienisolate:

1. *P. aeruginosa* DSMZ-Stamm 50071
2. *P. aeruginosa* Ads
3. *P. aeruginosa* SG81
4. *P. aeruginosa* SG81R1
5. *P. aeruginosa* Isolat 760-2008 (Fallbeispiel)
6. *P. aeruginosa* Isolat 920-3-2008 (Fallbeispiel)
7. *Legionella pneumophila* DSMZ-Stamm 7513
8. *Legionella pneumophila* AdS

Abkürzung:

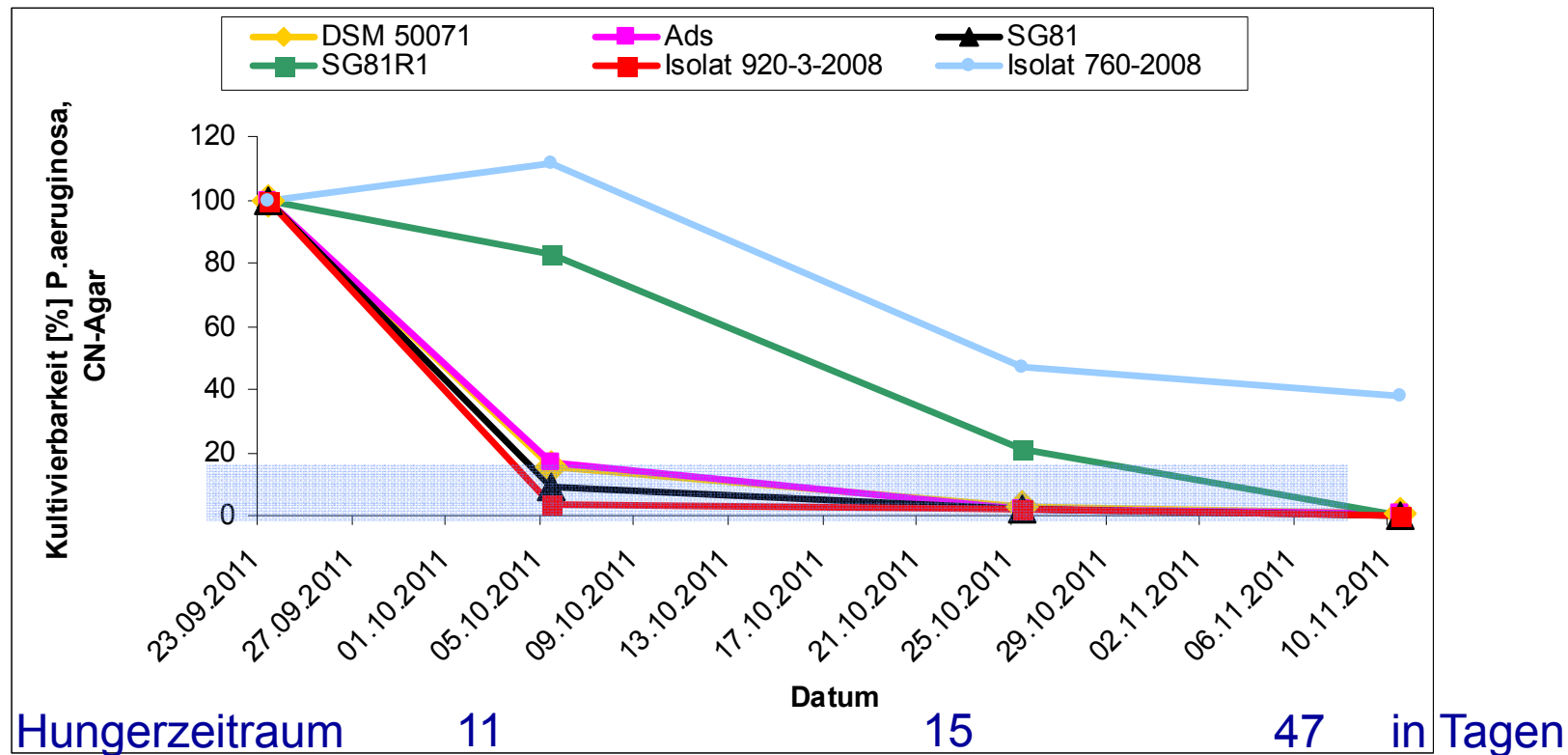
- DSM 50071
Ads
SG81
SG81R1
760-2008
920-3-2008
DSM 7513
AdS

700 Tage

These: Die Fähigkeit zur Bildung von VBNC-Stadien ist bei *Pseudomonas aeruginosa* in nahrungsarmen Habitaten gegeben

Experiment mit Reinstwasser und *Pseudomonas aeruginosa*

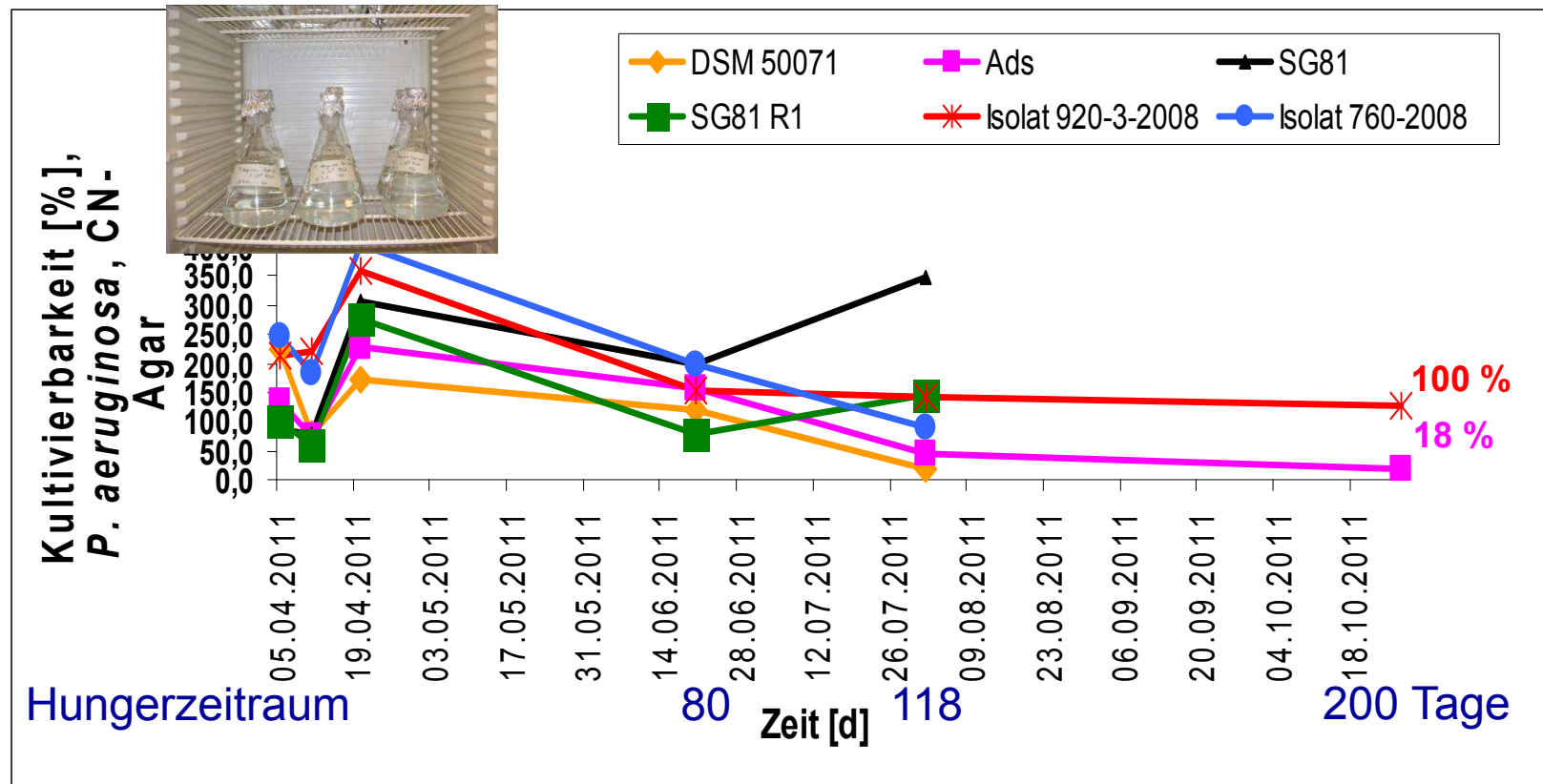
- Hungern in „sehr“ Nährstoff- und Ionen-armen Reinstwasser führt zu einem Verlust der Kultivierbarkeit bei 4 von 6 Stämmen innerhalb von ca. 15 Tagen und
- bei 5 der 6 Stämme nach ca. 50 Tagen



These: Die Fähigkeit zur Bildung von VBNC-Stadien ist bei *Pseudomonas aeruginosa* in nahrungsarmen Habitaten gegeben

Experiment mit sterilem, zellfreiem Trinkwasser und *Pseudomonas aeruginosa*

- Gesamtzellzahl (DAPI, Mikroskop) bleibt über den gesamten Zeitraum „gleich“
- Anzahl kultivierbarer Bakterien sinkt von Anfangs 100% auf geringere, Stamm abhängige Anteile ab



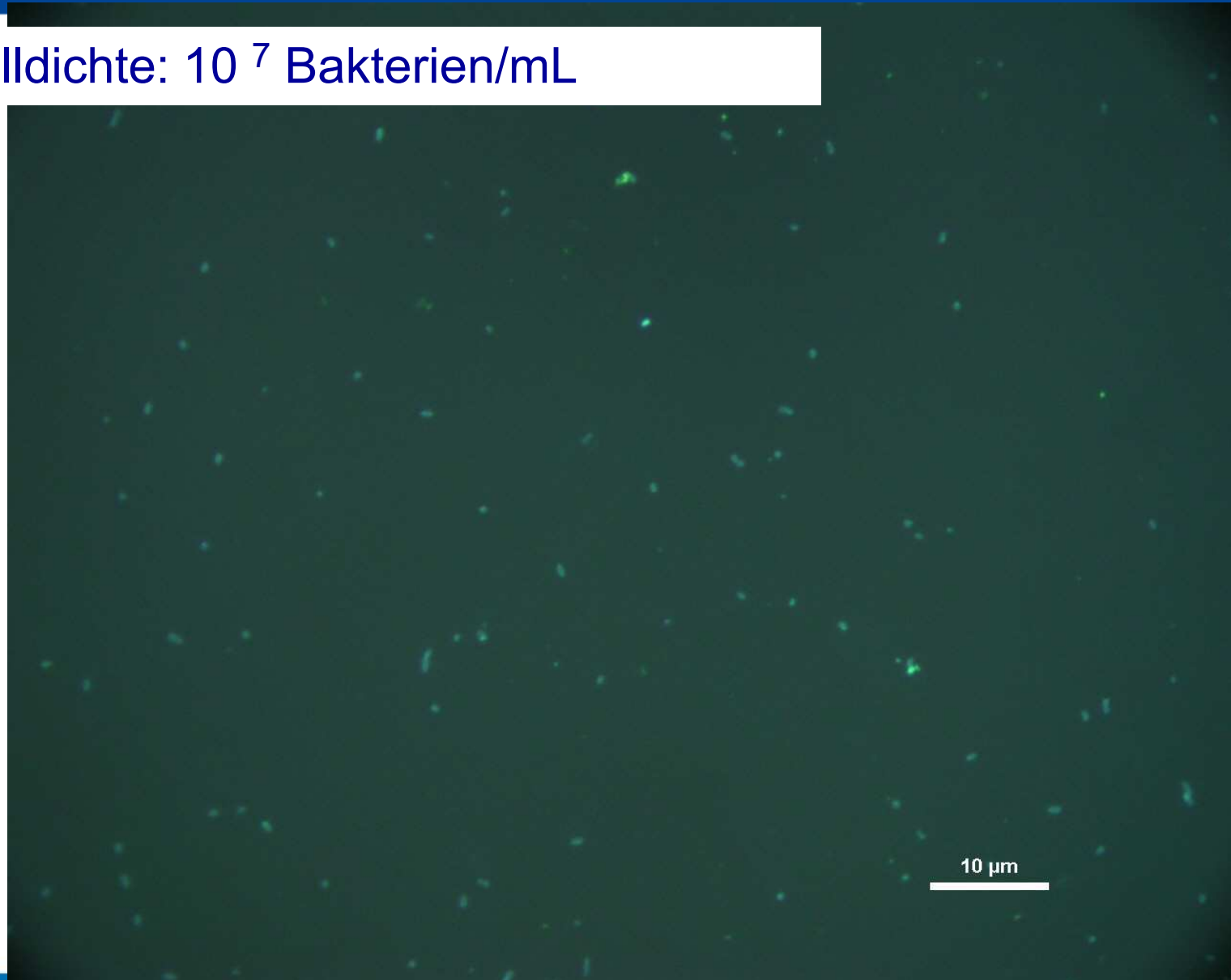
These: Die Fähigkeit zur Bildung von VBNC-Stadien ist bei *Pseudomonas aeruginosa* in nahrungsarmen Habitaten gegeben



Pseudomonas aeruginosa – seit 700 Tagen am Hungern

Nährstoffarme Umgebung & *Pseudomonas aeruginosa*

Anfangszelldichte: 10^7 Bakterien/mL



700 Tage hungern von *P. aeruginosa* in Trinkwasser

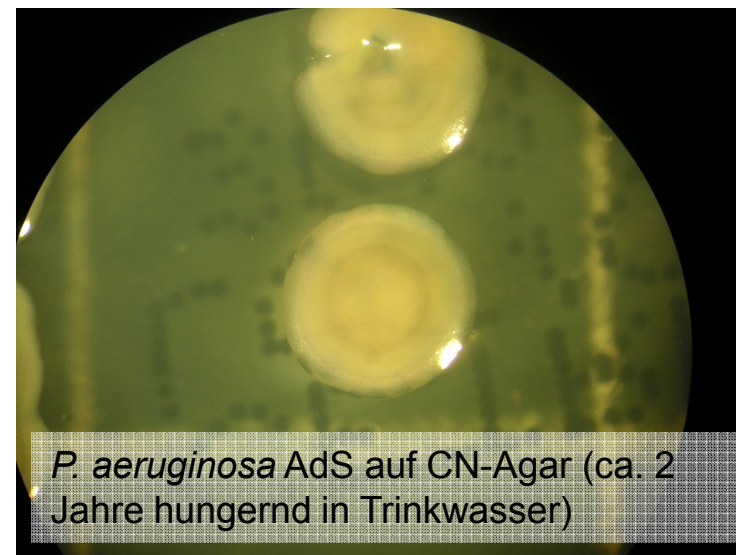
<i>P. aeruginosa</i> Stamm	AdS	920-3-2008	760-2008	SG81	SG81R1	DSM 50071
Bakterien/ml	$9,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$6,8 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
CN (KBE/ml)	$9,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$
kultivierbar in %	0,1	1,8	0,4	0,3	0,7	0,2
(HPC/R2A) KBE/ml	$7,0 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$
kultivierbar in %	10,5	21,1	18,2	12,1	8,3	5,3

Der Anteil lebender Zellen ist mindestens im zwei-stelligen Prozentbereich
 Sie sind „sofort“ in der Lage stoffwechselaktiv zu werden und sich zu vermehren

Nährstoffarme Umgebung & *Pseudomonas aeruginosa*

- Die Kolonie auf CN-Nähragar verändern sich so dass sie **nicht** als typische Kolonien von *P. aeruginosa* erkannt werden
- andere Koloniemorphologie und andere Farbe

Verändertes Bandenmuster bei der Pulsfeldelektrophorese



1. Marker,
2. Kolonie 1, *P. aeruginosa* AdS aus der Stammsammlung
3. Kolonie 2, *P. aeruginosa* AdS aus der Stammsammlung
4. Kolonie 1, hungernde *P. aeruginosa* AdS
5. Kolonie 2, hungernde *P. aeruginosa* AdS

Hungern im realen Leben

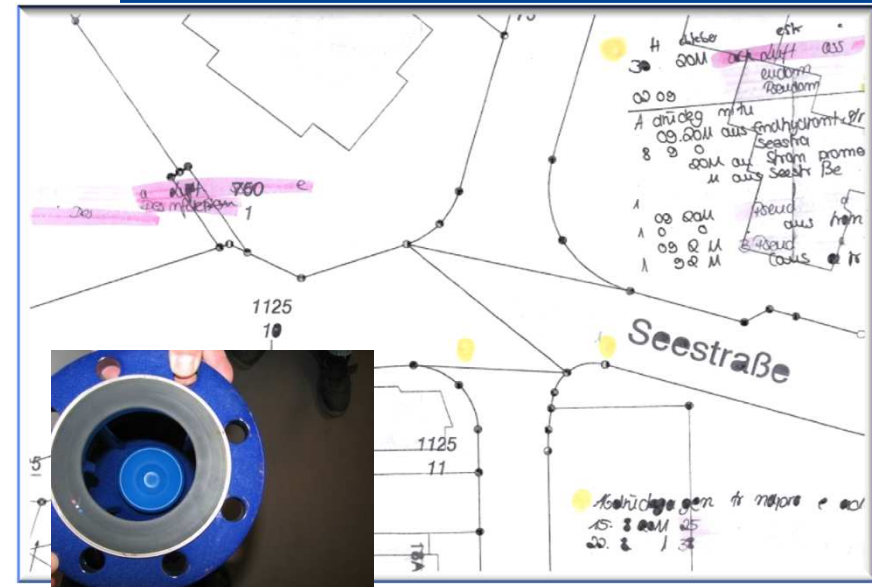
Fallbeispiele - Wasserversorgungsunternehmen (WVU)

1. WVU

- Nährstoffarmes Trinkwasser
- AOC: $\leq 5 \mu\text{g/L}$ Acetat-C
- DOC: $1,7 \text{ mg/L}$
- Keine Desinfektion
- Tiefengrundwasser
- Baumaßnahme nach NV

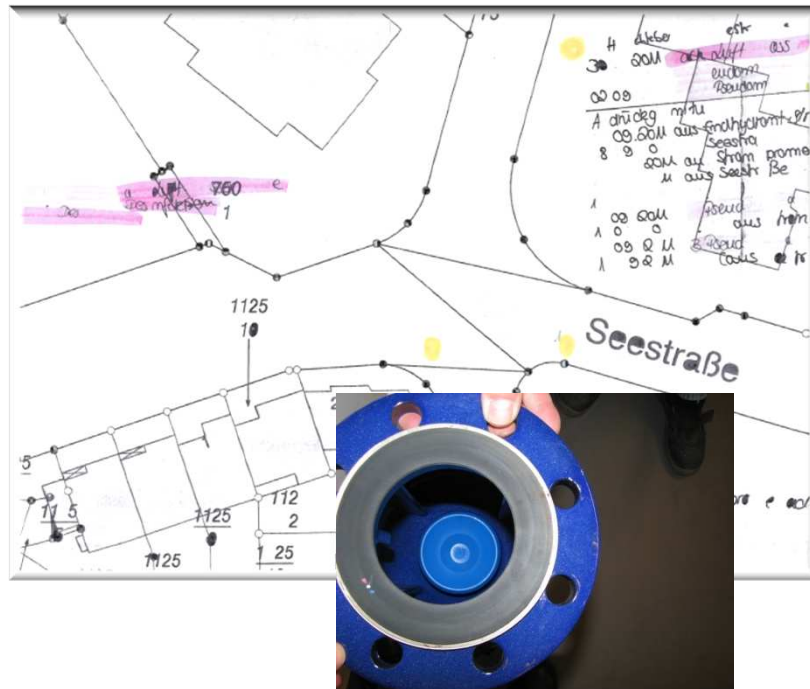
2. WVU

- Nährstoffarmes Trinkwasser
- AOC: $5 \mu\text{g/L}$ Acetat-C
- DOC: $0,6 \text{ mg/L}$
- UV-Desinfektion am WW-Ausgang
- Oberflächenwasser angereichertes Grundwasser
- Biofilmmessstrecke in der TrinkwVerteilung



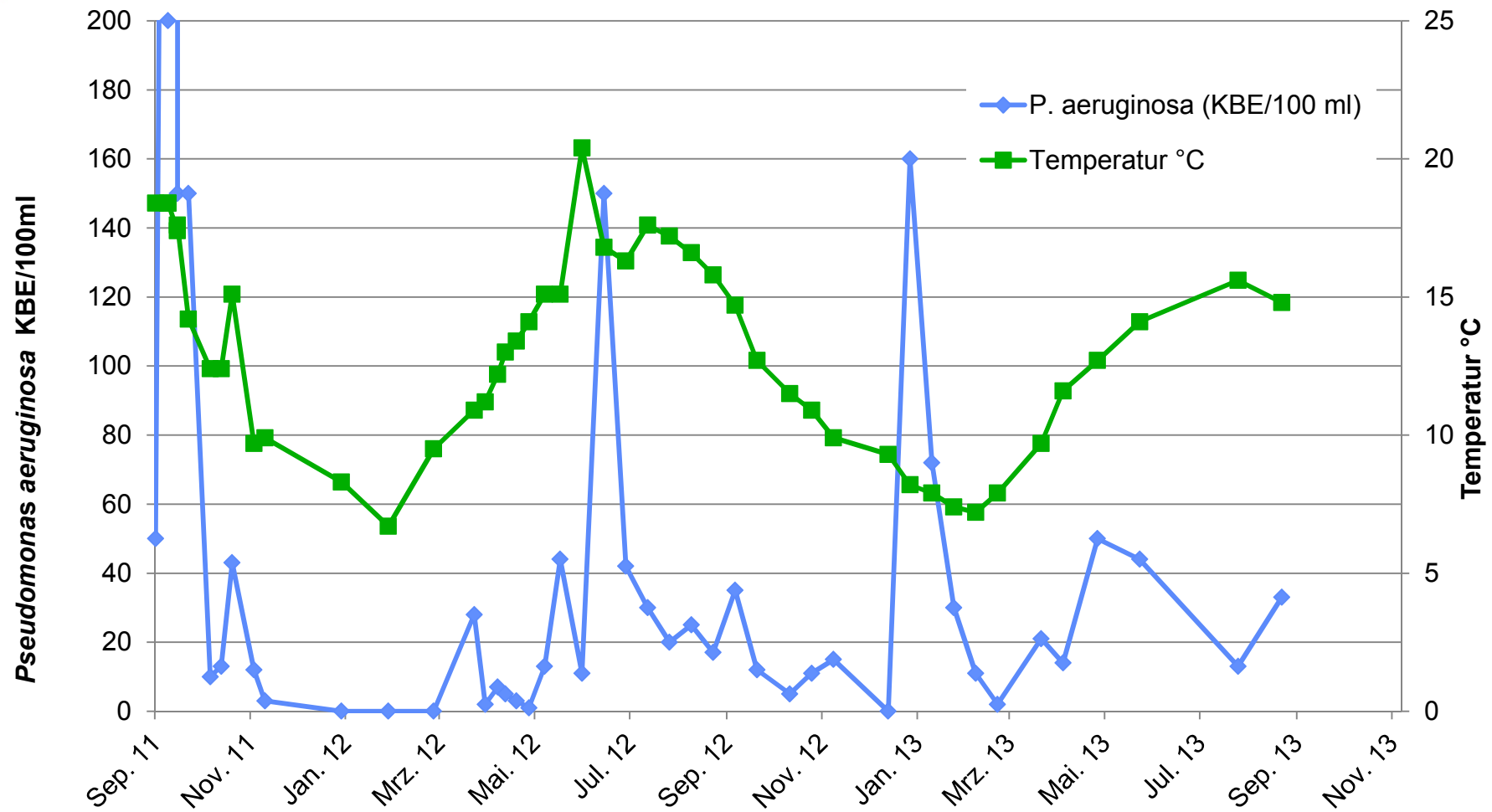
1. Wasserversorgungsunternehmen

Das Vorkommen von *P. aeruginosa* in einem Trinkwasserverteilungssystem wurde im Projekt begleitend analysiert.



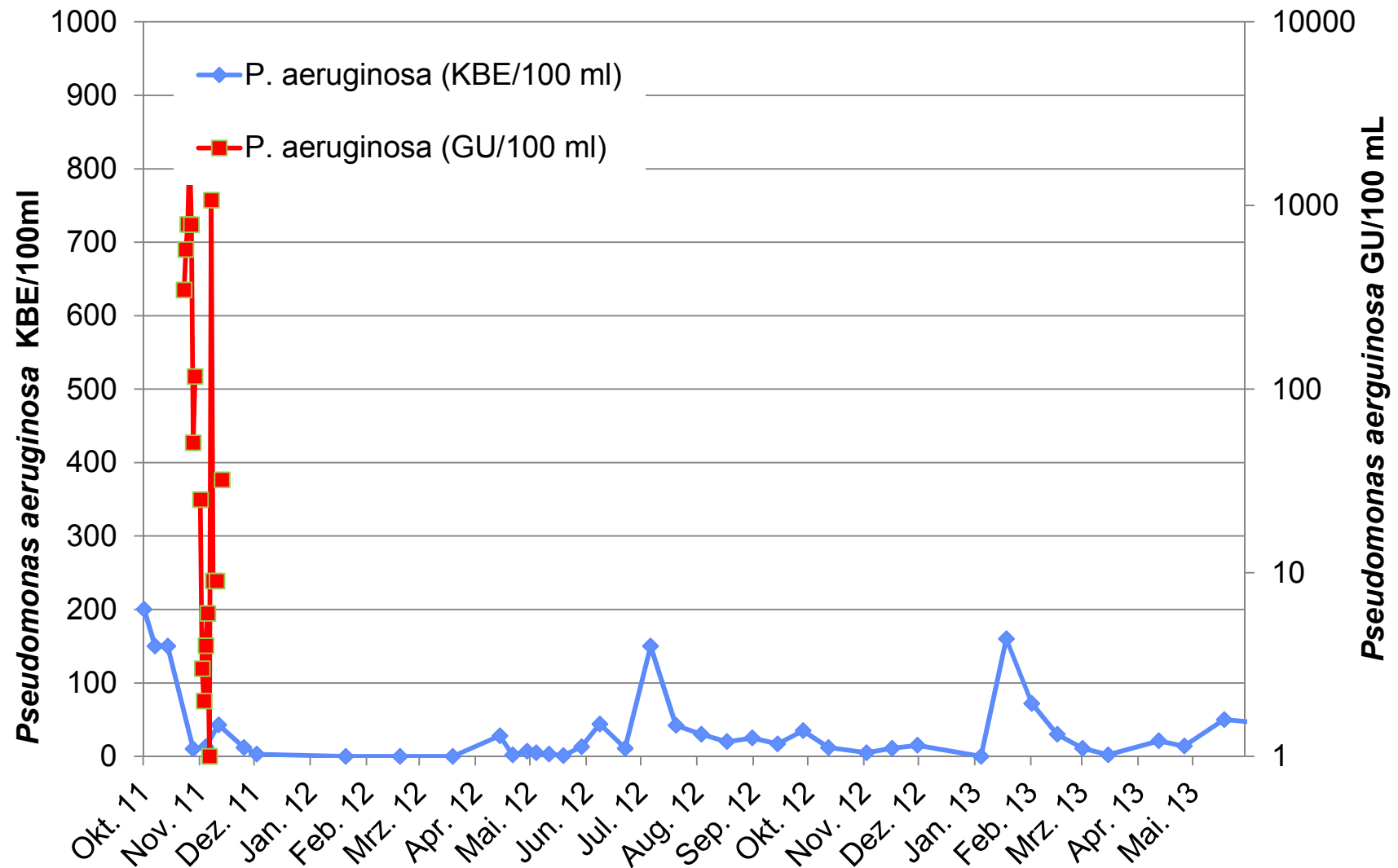
- Beginn der Arbeiten Juni 2011 mit Auftreten von *P. aeruginosa* im Trinkwasser
- Maßnahmen (Spülen, Desinfektion mit H₂O₂, Chlor)
- Inbetriebnahme, nachdem Wasserproben im Ortsnetz (Endverbraucher) mikrobiologische einwandfrei
- Aber!! lokal treten weiterhin *P. aeruginosa*-positive Befunde auf
- Alle 14 – 28 Tage Beprobung nach 40 min Spülen
- Nachweis von *P. aeruginosa* mittels kultureller und kulturunabhängiger Methoden (FISH, qPCR)

Vorkommen von *P. aeruginosa* im Trinkwasser



These: Es gibt einen Effekt der Wassertemperaturen auf den Anteil kultivierbarer *P. aeruginosa* (CN-Nähragarplatten)

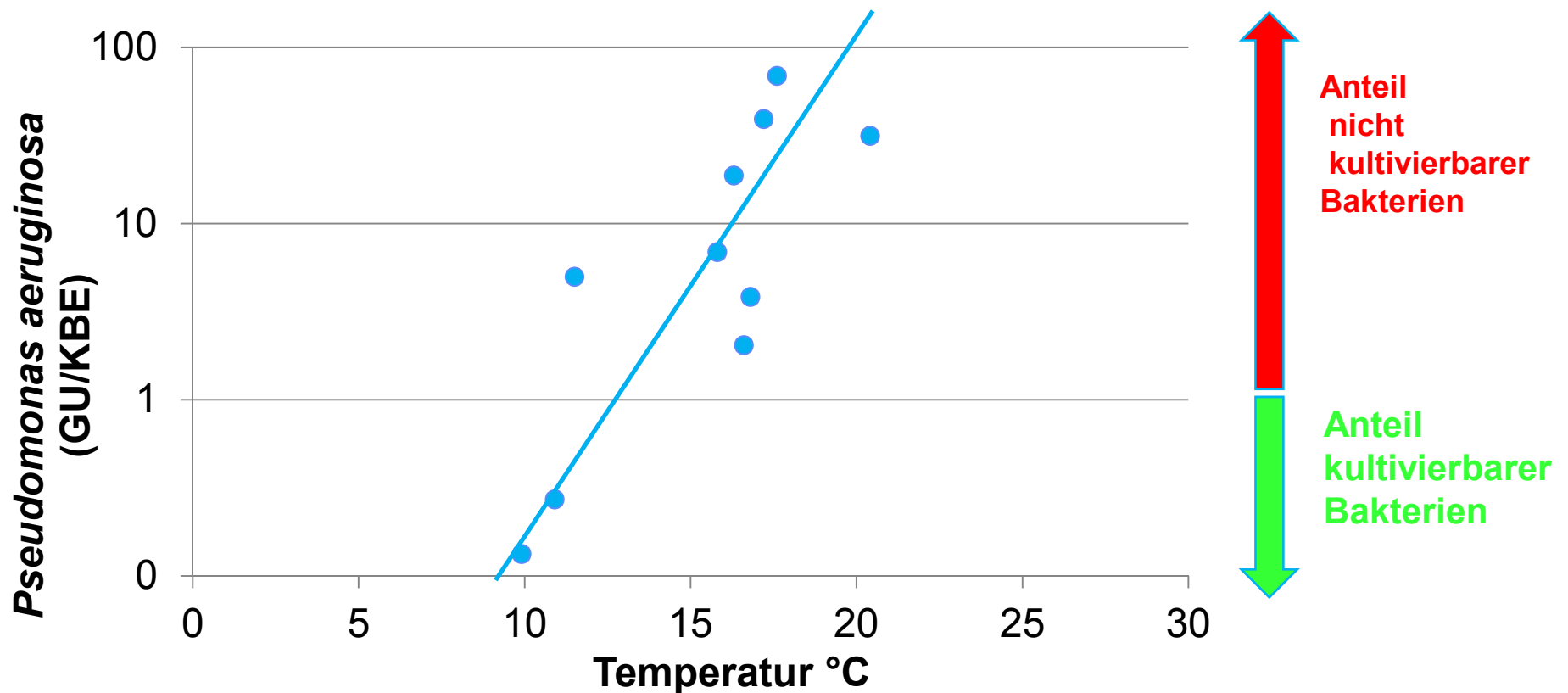
P. aeruginosa kommt im Trinkwasser auch in einem nicht kultivierbarem Zustand vor



Der Anteil der nicht kultivierbaren *P. aeruginosa* steigt mit der Wassertemperatur

Methode:

Koloniezahl auf CN-Nähragarplatten ins Verhältnis gesetzt zu Gesamtanzahl bestimmt mittels qPCR angegeben als genetic unit (GU)



Hungern im realen Leben

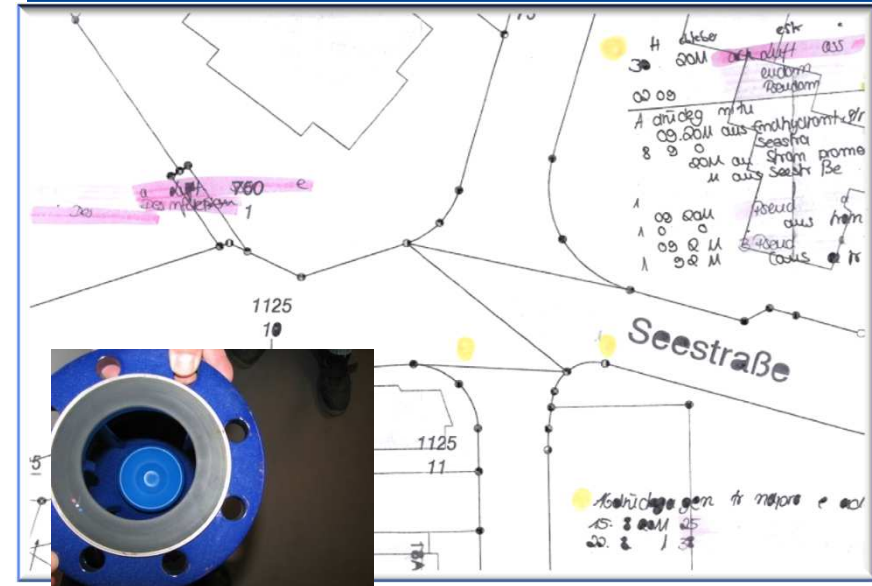
Fallbeispiele - Wasserversorgungsunternehmen (WVU)

1. WVU

- Nährstoffarmes Trinkwasser
- AOC: ≤ 5 $\mu\text{g/L}$ Acetat-C
- DOC: 1,7 mg/L
- Keine Desinfektion
- Tiefengrundwasser
- Baumaßnahme nach NV

2. WVU

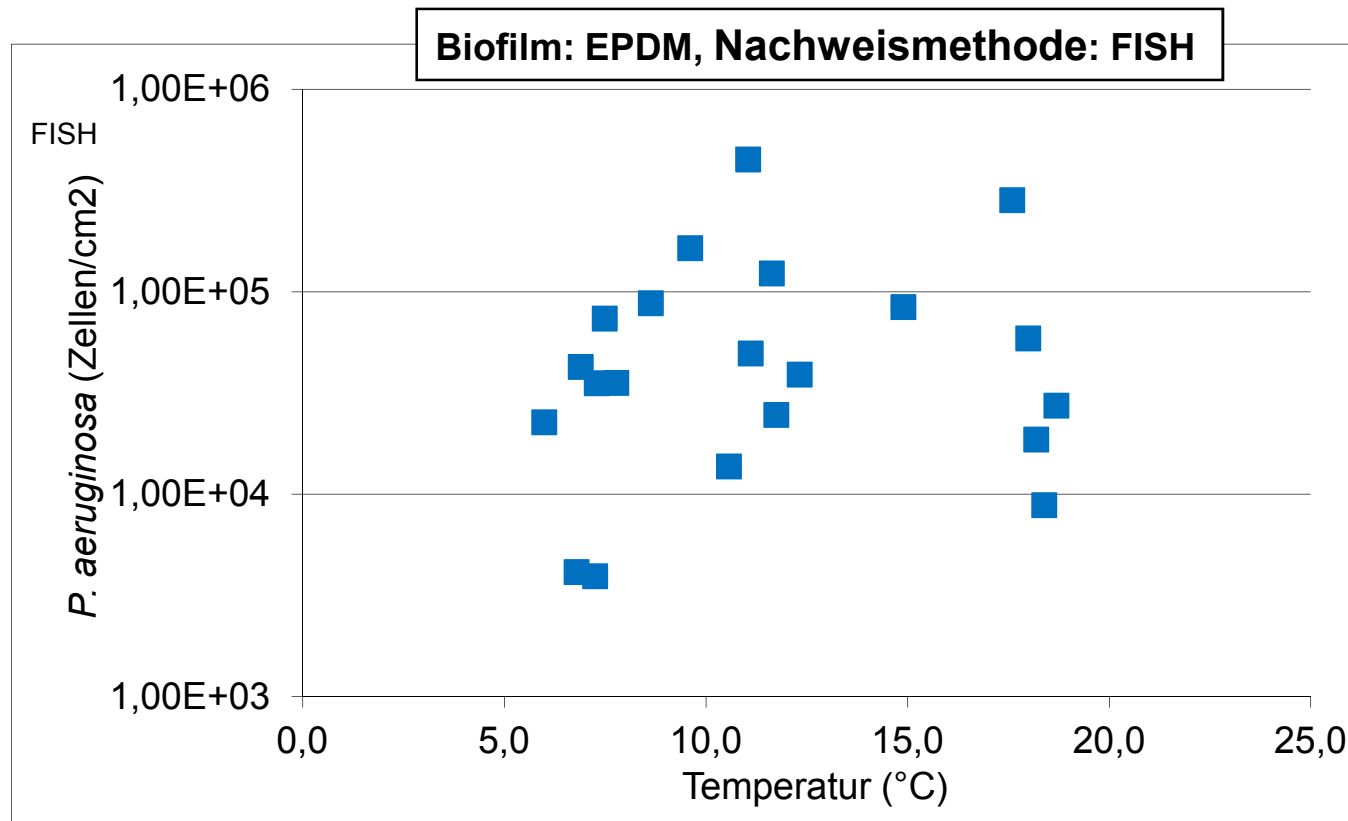
- Nährstoffarmes Trinkwasser
- AOC: 5 $\mu\text{g/L}$ Acetat-C
- DOC: 0,6 mg/L
- UV-Desinfektion am WW-Ausgang
- Oberflächenwasser
angereichertes Grundwasser
- Biofilmmessstrecke in der
TrinkwVerteilung des IWW



Vorkommen von *P. aeruginosa* im Trinkwasser und im Trinkwasserbiofilmen auf EPDM, PE und Edelstahl

In Wasser- und Biofilmproben wurde *P. aeruginosa* kulturell nicht nachgewiesen **jedoch**

war ein Nachweis mittels molekularbiologischer Methoden in Trinkwasserproben sowie auf ca. 10^2 cm Probenkörper positiv (53 von 78)



- Die Fähigkeit zur Bildung von VBNC-Stadien ist bei *Pseudomonas aeruginosa* in nahrungsarmem Trinkwasser gegeben
- Die Fähigkeit zur Vermehrung in nahrungsarmen Trinkwasserhabitaten (Biofilme) ist gegeben –
Voraussetzung dafür ist Einnistung, Verbleib und Wachstum
 - Material
 - Temperatur
 - Nahrung

Wasser und Biofilm und zurück ins Wasser –
bewirkt dies eine Veränderung der Kultivierbarkeit ?



Einnistung, Persistenz, Vermehrung von *Pseudomonas aeruginosa*: Nicht hungernd / hungernd / (Wasser; Biofilm)

Experimenteller Ansatz

- Biofilmdrehkolbenreaktoren
- Verweilzeit: 30 Minuten
- Innere Oberfläche: ca. 2000 cm²
- Inneres Volumen: 600 ml
- Temperatur: 10°C
- Durchflussgeschwindigkeit: 0,45 m/sec

- Animpfung mit dem Isolat 920-3-2008:

- **nicht hungernd**
- „hungernd“ (217 Tage)

- Prüfkörper im Reaktor

- EPDM
- PE 80
- Edelstahl

Zulauf



Ablauf



Einnistung, Persistenz, Vermehrung: Nicht hungernd / hungernd / (Wasser; Biofilm)

Betrieb des Reaktors mit Trinkwasser

Beprobung von

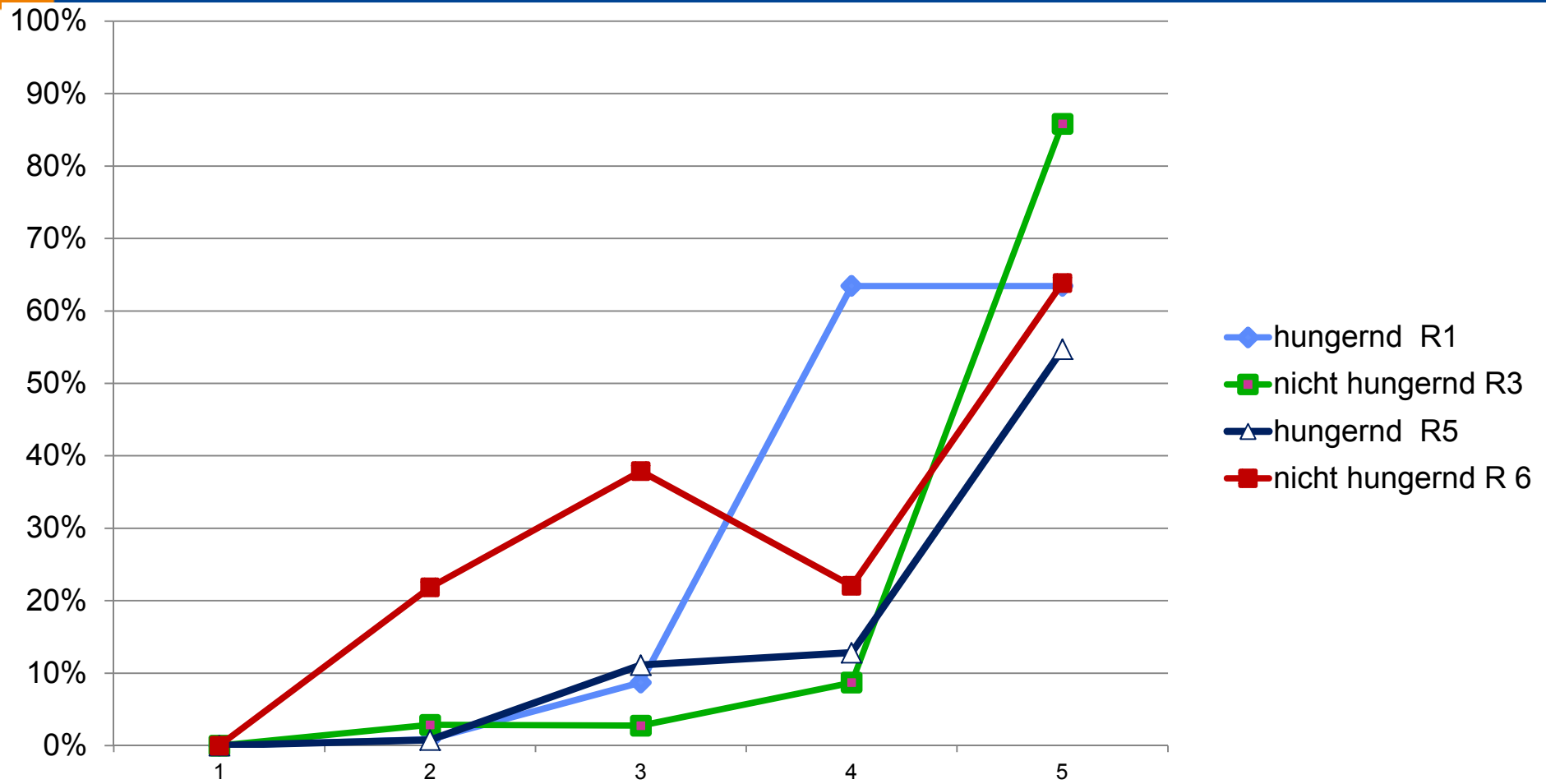
- Zulauf
- Ablauf
- Biofilm



Probenahme nach 1, 3, 8, 15 und 20 Tagen

- der Gesamtzellzahl mit DAPI (GZZ)
- der Koloniezahl
 - *P. aeruginosa* auf R2A Agar, 20°C
 - *P. aeruginosa* auf CN Agar, 36°C
- FISH, teilweise qPCR (alle *Pseudomonas aeruginosa*)

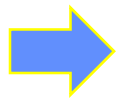
Einnistung, Persistenz, Vermehrung: Nicht hungernd / hungernd – (Wasser, Biofilm)



**Abtatt des Reaktors: Gesamtzahl an
P. aeruginosa im Verhältnis zur
Gesamtzahl an Bakterien**



- mittels Kultivierung auf CN-Nähragarplatten sind genauso viele *P. aeruginosa* nachzuweisen wie mit der molekularbiologischen FISH Methode



Im Ablauf des Reaktors sind alle *P. aeruginosa* kultivierbar d.h. kein VBNC

Probenahme 5: 12.12.2011 (21 Tage)		hungernd
Probe	Zulauf	Ablauf R1
Gesamtzellzahl [Zellen/ml]	1,26E+05	4,73E+05
Gesamtzellzahl [Zellen/cm²]	-	-
Koloniezahl CN [KBE/ml]	0/100ml	3,00E+05
Koloniezahl CN [KBE/cm²]	-	-
Kultivierbarkeit CN Agar [%]	-	63,45
FISH		3,21E+04

Einnistung, Persistenz, Vermehrung: Nicht hungernd / hungernd – (Wasser, Biofilm)

Biofilm (nach 3 Wochen im Reaktor R)

■ Material

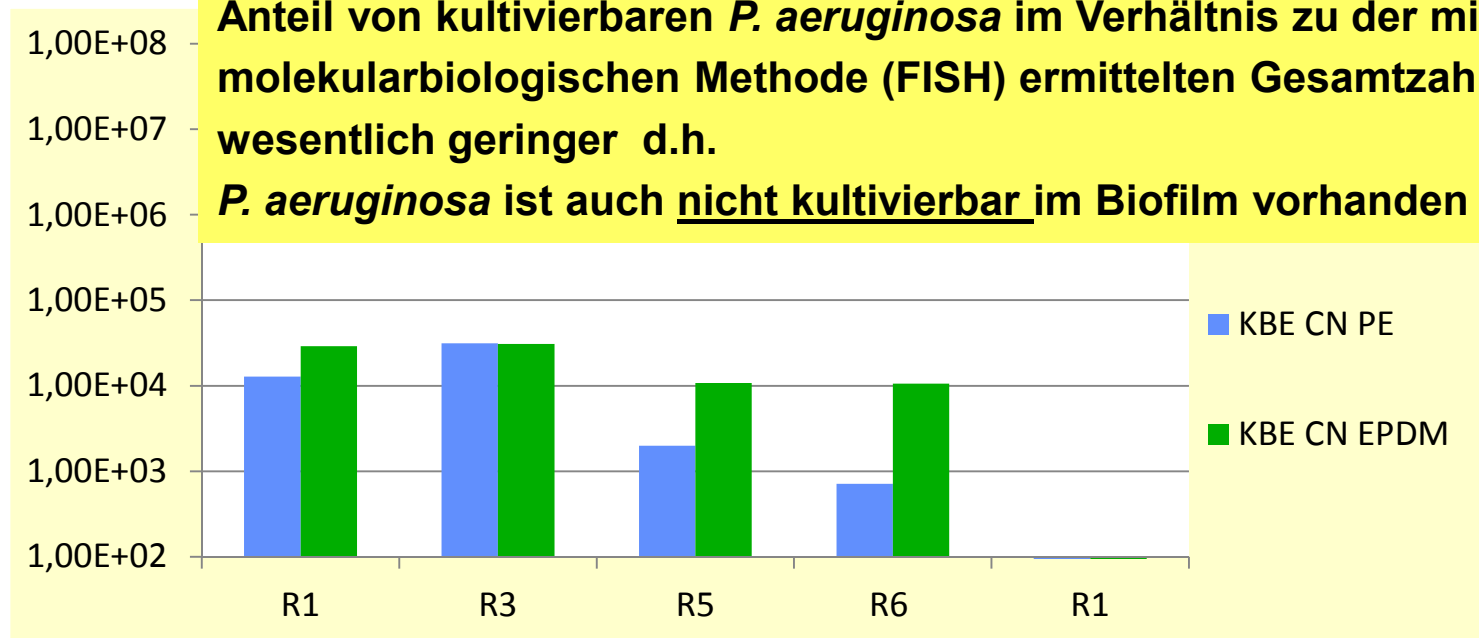
- Biofilm auf EPDM ca. 10^8 Bakterien/cm²
- Biofilm auf PE 80 ca. 5×10^6 Bakterien/cm
- *P. aeruginosa* auf EPDM
- *P. aeruginosa* auf PE 80

	Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4
	0,197%	1,325%	0,180%	0,013%
	0,026%	0,034%	0,011%	0,006%

FISH Methode

Anteil von kultivierbaren *P. aeruginosa* im Verhältnis zu der mit molekularbiologischen Methode (FISH) ermittelten Gesamtzahl ist wesentlich geringer d.h.

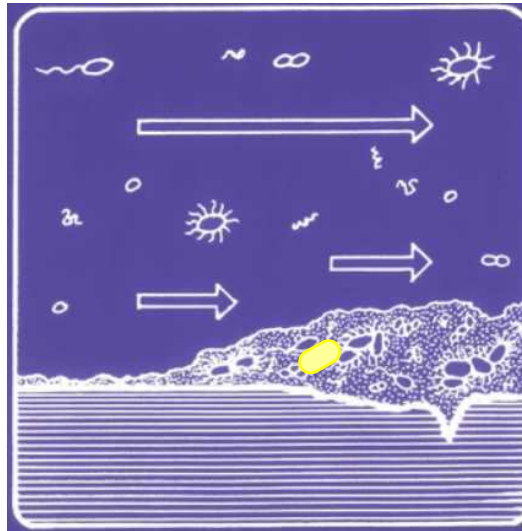
P. aeruginosa ist auch nicht kultivierbar im Biofilm vorhanden (VBNC)



Einnistung, Persistenz, Vermehrung: Nicht hungernd / hungernd

Wasser & Biofilm

Im Biofilm sind viele *P. aeruginosa* nicht kultivierbar (bis zu einem Anteil von 97%) d.h. im VBNC Stadium



Im Reaktorablauf sind alle *P. aeruginosa* kultivierbar d.h. nicht VBNC

Biofilm: 3 Wochen	
Probe	EPDM C1 R1
Gesamtzellzahl [Zellen/cm ²]	3,68E+07
Koloniezahl CN [KBE/cm ²]	2,90E+04
Kultivierbarkeit CN Agar [%]	0,08
FISH	9,17E+05

Alle *P. aeruginosa* im Wasser stammen aus dem Biofilm d.h. es findet eine Veränderung der Kultivierbarkeit durch den Übergang vom Biofilm ins Wasser statt