

Biofilme – eine Gefahr für das Trinkwasser?

Biofilme – l'eau potable en danger ?

La colonisation microbiologique des réseaux d'eau potable a fait l'objet d'un projet d'études coordonnées visant également à déterminer les variations de croissance des microorganismes en fonction du substrat.

L'analyse porte sur la fonte grise, la fonte revêtue de mortier de ciment et le PVC. Les résultats montrent que les biofilms sont ubiquitaires dans les conduites de distribution d'eau.

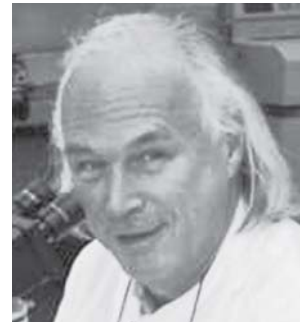
Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le nombre total d'unités et le nombre de colonies, ni entre le taux de colonisation et le matériau du substrat, ni entre l'âge des conduites et l'épaisseur des biofilms.

Biofilms – Potable Water at Risk?

A study was conducted on biofilm formation and presence of hygienically relevant organisms on pipe sections of drinking water distribution systems. The materials of the pipes included cast iron, galvanized steel, cement and PVC. Biofilms were ubiquitous on the inner surface of the distribution net.

There was no correlation found between extent of deposit and colonization, neither between material and colonization, nor between age of pipes and colonization.

Hans-Curt Flemming



Im Rahmen eines Verbundprojektes wurde der Status der Besiedlung von Rohrleitungen in Trinkwasser-Versorgungssystemen sowie das Aufwuchsverhalten von Trinkwasser-Organismen auf verschiedenen Materialien untersucht. Bei den untersuchten Materialien handelte es sich um Grauguss sowie um zementbeschichtete Rohre und PVC. Es zeigte sich klar, dass Biofilme ubiquitär auf den inneren Oberflächen der Verteilungsnetze zu finden sind. Eine Korrelation zwischen Gesamtzellzahl und Koloniezahl besteht nicht, auch nicht zwischen dem Material und der Besiedlung. Es wurde auch keine Korrelation zwischen dem Alter der Rohre und der Besiedlungsdichte gefunden.

1. Einleitung

Trinkwasserverteilungsnetze sind Systeme mit sehr grossen Oberflächen. Damit bieten sie Mikroorganismen sehr viele Möglichkeiten, sich anzusiedeln und Biofilme zu bilden. Es lässt sich abschätzen, dass im Verteilungssystem mindestens 95 % der Biomasse auf den Oberflächen sitzt, während unter Normalbedingungen nicht mehr als 5 % in der Wasserphase zu finden sind [1] – und nur hier werden routinemässig Proben für die mikrobiologische Trinkwasseruntersuchung genommen. Solche Proben sagen aber nichts über Ort und Umfang von Biofilm-Wachstum auf den Oberflächen aus. Biofilme treten oft in Form von *Mikrokolonien* auf [2], es kann aber auch zu *mehrlagigen Biofilmen* kommen [3]; häufig handelt es sich um Kolonisierung von

Inkrustationen (s. Kapitel 2). Der Umfang der Besiedlung durch Biofilme entgeht also der Überwachung. In der Literatur gibt es immer wieder ernstzunehmende Hinweise darauf, dass Biofilme ein Habitat für hygienisch relevante Keime darstellen können [4, 5, 6]. Im Schutz von Biofilmen überleben Mikroorganismen um Größenordnungen höhere Konzentrationen an Desinfektionsmitteln [7]; trinkwasserrelevante

Konzentrationen von Desinfektionsmitteln sind praktisch unwirksam gegenüber Biofilm-Organismen [8]. Wenn Biofilme sozusagen ein Reservoir für solche Mikroorganismen darstellen, wäre dies ein ernstes Problem für die Wasserversorgung. Tatsache ist aber auch, dass es sich bei den Literatur-Berichten bisher nur um Einzelbefunde handelt. Ausserdem spielt die Frage des Aufwuchsmaterials eine entscheidende Rolle.



Abb. 1 Innere Oberfläche eines Graugussrohres (seit 99 Jahren in Betrieb), liefert hygienisch einwandfreies Wasser.

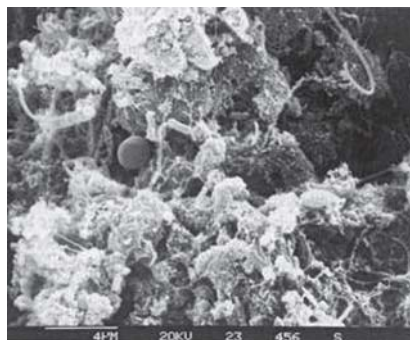


Abb. 2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme besiedelter Inkrustationen in einem Graugussrohr.

2. Mikrobiologischer Status der Oberflächen von Trinkwasser-Rohren

Im Rahmen eines Verbundprojektes, das vom deutschen Ministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert wurde, wurde der Status der Besiedlung von Rohrleitungen in Trinkwasser-Versorgungssystemen sowie das Aufwuchsverhalten von Trinkwasser-Organismen auf verschiedenen Materialien untersucht. Um den mikrobiologischen Zustand von Rohrleitungen zu ermitteln, aus denen hygienisch einwandfreies Trinkwasser entnommen wird, wurden Rohrstücke ausgegraben, entnommen und beprobt; insgesamt wurden 18 Proben aus verschiedenen Trinkwassersystemen untersucht. Besonders in den Grauguss-Rohren wurden starke mineralische Inkrustationen, überwiegend Korrosionsprodukte, gefunden (*Abb. 1*). *Abbildung 2* zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme besiedelter Inkrustationen in einem Trinkwasserrohr.

Bei den untersuchten Materialien handelte es sich um Grauguss sowie um zementbeschichtete Rohre und PVC. Die Beläge auf den Innenseiten wurden entfernt und mikrobiologisch untersucht. Die flächenbezogene Gesamtzellzahl, die Koloniezahl (KBE) auf Nähragar nach der Trinkwasserverordnung und auf einem speziell für die Anzucht von Organismen aus oligotropher Umgebung entwickelten Nährboden (R2A-Medium [9]) wurden bestimmt. Darüber hinaus wurde auf die Anwesenheit der Indikator-Organismen *Escherichia coli* und coliforme Keime sowie einer ganzen Reihe obligat und fakultativ pathogener Organismen geprüft. Hier sind zu nennen: *Pseudomonas aeruginosa*, Legionellen, atypische Mykobakterien, Aeromonaden, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Helicobacter* sowie Amöben, Giardien, Kryptosporidien, enterale Viren und Pilze. Diese Untersuchungen wurden von darauf spezialisierten Arbeitsgruppen durchgeführt (siehe Liste am Ende des Artikels).

Es zeigte sich klar, dass Biofilme ubiquitär auf den inneren Oberflächen der Verteilungsnetze zu finden sind. Die flächenbezogene Gesamtzellzahl liegt bei zirka 10^5 bis 10^7 Zellen cm^{-2} , die Koloniezahl auf R2A-Medium, nach sieben Tagen bestimmt, schwankt zwischen 10 und 10^5 KBE cm^{-2} . Die Daten zeigen, dass ein sehr unterschiedlicher Anteil der Gesamtpopulation kultivierbar ist. Eine Korrelation zwischen Gesamtzellzahl und Koloniezahl besteht nicht – die Koloniezahl kann zwischen ei-

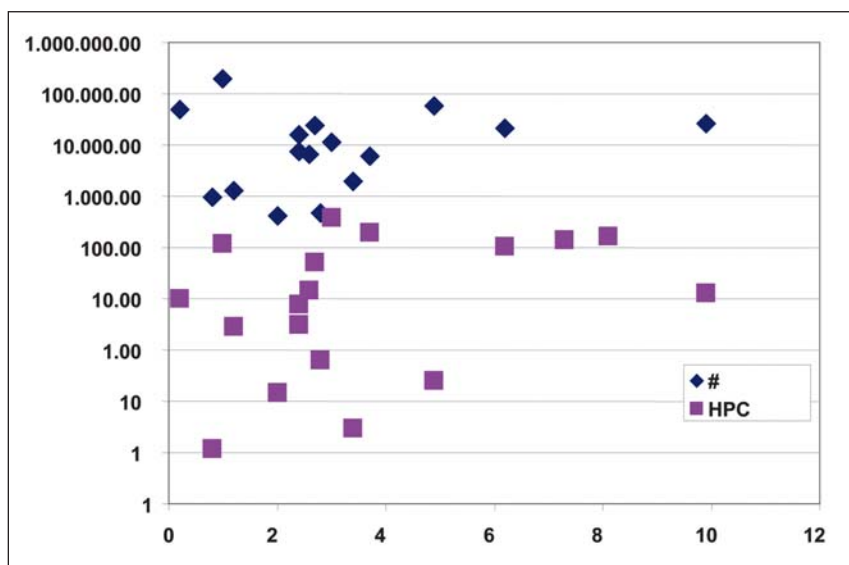


Abb. 3 Besiedlungsdichte am Beispiel der Grauguss-Rohre, nach zunehmendem Alter geordnet.

ner und drei Zehnerpotenzen unter der Gesamtzellzahl liegen. Es besteht auch keine Korrelation zwischen dem Material und der Besiedlung – auf allen Werkstoffen wurden ähnliche Besiedlungsdichten ermittelt. Die Besiedlung scheint nach spätestens zwei Jahren ein Plateau erreicht zu haben, denn es wurde auch keine Korrelation zwischen dem Alter der Rohre und der Besiedlungsdichte gefunden (Abb. 3).

Auf Rohren, die mit Zementmörtel ausgekleidet waren und die dadurch einen deutlich höheren pH-Wert an der Oberfläche aufweisen als Rohre aus anderen Werkstoffen, wurden jedoch geringere Gesamtzellzahlen und Koloniezahlen gefunden. Eine interessante Beobachtung ist, dass die Zelldichte an den Oberflächen erheblich über jener im Wasser liegt, das mit diesen Oberflächen in Kontakt steht. Dennoch ist keine Erhöhung der mikrobiellen Belastung durch diese Biofilme zu erkennen. Pathogene Organismen – in dieser Untersuchung: *Yersinia*, *Campylobacter*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, darmzelladhäsive Aeromonaden, Dauerformen von Darmparasiten (*Giardia lamblia* und *Cryptosporidium parvum*) sowie enterale Viren – konnten aus keiner Probe isoliert werden. Atypische Mykobakterien, Aeromonaden und Pilze mit apathogenem oder niedrigem pathogenem Potenzial wurden gelegentlich gefunden, ebenso Pseudomonaden (vor allem *Pseudomonas fluorescens*) und frei lebende Amöben, die selten mit Infektionen in Zusammenhang gebracht werden.

3. Beginnende Biofilm-Entwicklung

Um die Anfangsstadien der Biofilm-Entwicklung und den Einfluss der Verweilzeit des Trinkwassers im Netz zu erkennen, wurden speziell konstruierte *Reaktoren* mit entnehmbaren Aufwuchsflächen aus verschiedenen Werkstoffen verwendet (Abb. 4).

Sie wurden direkt hinter dem Wasserwerk und in einer Entfernung von mehreren Kilometern Netzstrecke davon eingebaut. Auch hier sollte der *Einfluss der Werkstoffe* ermittelt werden; es handelte sich um Materialien, wie sie auch in Hausinstallationen verwendet werden: Kupfer, Edelstahl, Polyvinylchlorid und Polyethylen. Über zwei Jahre hinweg wurden Proben nach jeweils sechs Monaten entnommen und auf die gleichen Parameter wie die Rohrnetzproben untersucht. Es zeigte sich, dass die Biofilmentwicklung nach 12 bis 18 Monaten ein Plateau erreicht. Alle Materialien wurden in

der gleichen Größenordnung wie die oben beschriebenen Rohrnetzproben besiedelt. Überraschenderweise lag die flächenbezogene Gesamtzellzahl sowie die Koloniezahl auf R2A-Medium auf Kupfer am höchsten, während hier die Koloniezahl auf Nährboden nach Trinkwas-

ser-Verordnung sehr niedrig war. Dies deutet auf besondere Eigenschaften der kupferbesiedelnden Population hin. Zwischen der Besiedlung am Wasserwerksausgang und tief im Netz war kein signifikanter Unterschied erkennbar (Abb. 5). Auch bei den Reaktor-Proben konnten



Abb. 4 Biofilm-Reaktoren mit entnehmbaren Aufwuchsflächen (links: Einzelmodul mit einer herausgeschobenen Testfläche, rechts: Anlage mit fünf Säulen à fünf Module).

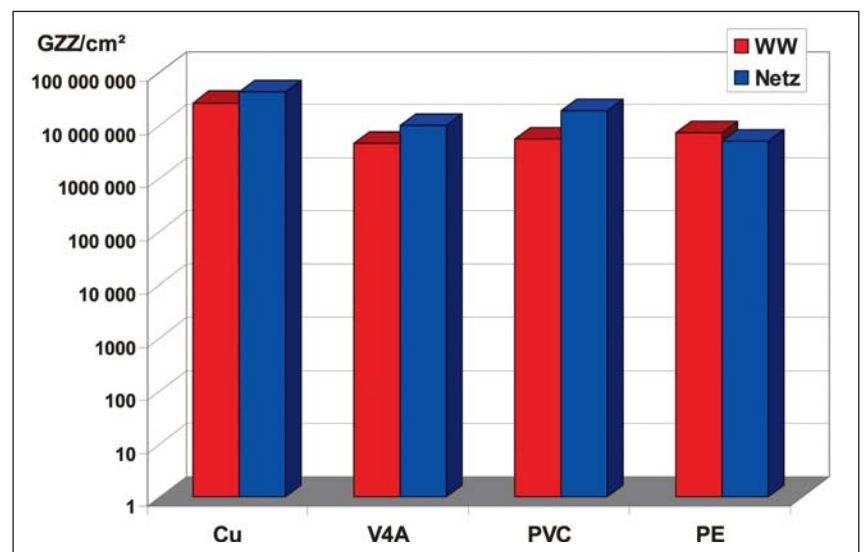


Abb. 5 Besiedlungsdichte nach 18 Monaten Expositionszeit; Vergleich: Wasserwerksausgang (rote Säulen) – Netz (blaue Säulen).



Abb. 6 Makroskopisch sichtbarer Biofilm auf gummibeschichtetem Absperrschieber (mit Spatel abgetragen, um Belagsdicke zu demonstrieren).

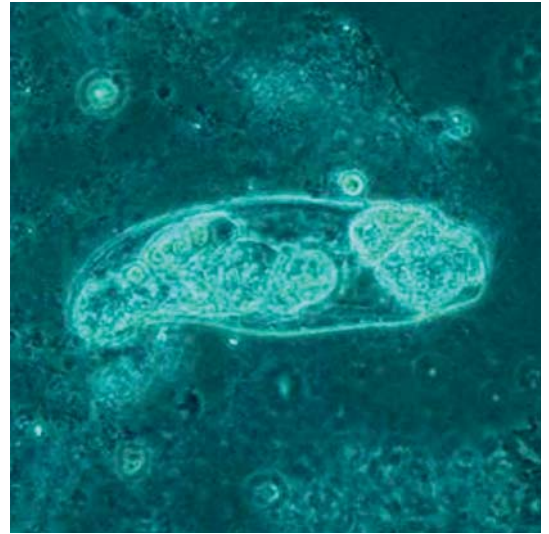


Abb. 8 Lichtmikroskopische Aufnahme von Protozoen im Biofilm der Probe von Abbildung 6.



Abb. 9 Lichtmikroskopische Aufnahme von Nematoden im Biofilm der Probe von Abbildung 6.

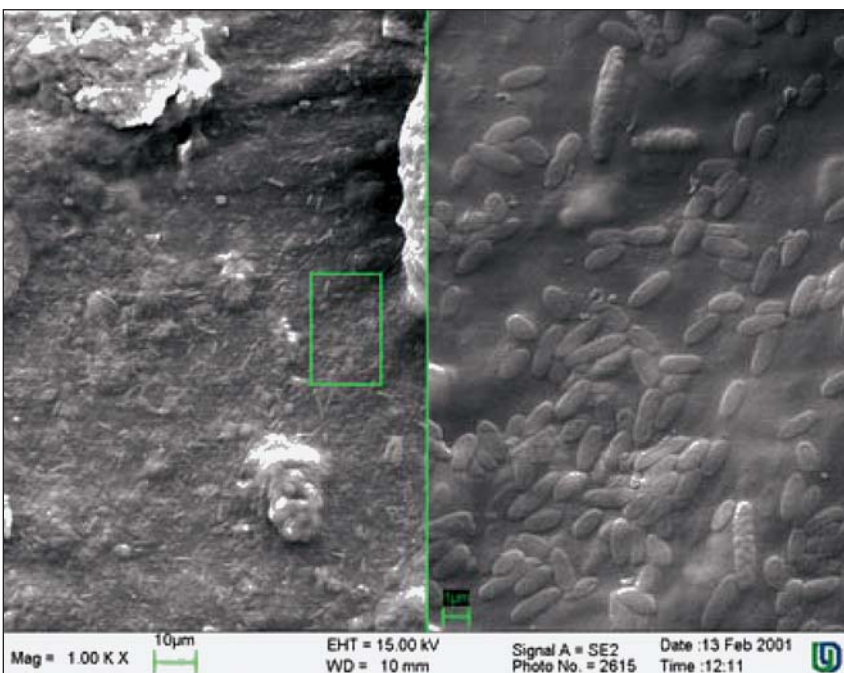


Abb. 7 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Biofilms aus Abbildung 6.



Abb. 10 Innenfläche des Gummis in einem Panzerschlauch einer Hausinstallation. (U. Szewzyk, Berlin)

weder mit klassischen noch mit molekularbiologischen Methoden hygienisch relevante Organismen nachgewiesen werden.

4. Einfluss von Materialien, die abbaubare Stoffe abgeben

Sobald eine Erhöhung des Nährstoff-Angebotes im Wasser auftritt, führt sie zu einem signifikant stärkeren Biofilm-Wachstum, das sich auch in einer erhöhten Kontamination des Wassers ausdrückt, das mit den Biofilmen in Kontakt steht. Eine direkte Korrelation zwischen den Zellzahlen im Wasser und denen im Biofilm konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Das zeigt erwartungsgemäss, dass Biofilme nicht über Wasserproben quantifizierbar oder lokalisierbar sind – erhöhte Gehalte an Mikroorganismen im Wasser deuten jedoch auf Biofilme hin.

Wenn Materialien eingesetzt werden, die mikrobiell verwertbare Stoffe abgeben, kommt es zu einem massiven Biofilm-Wachstum, bei dem auch höhere trophische Ebenen erreicht werden, was durch die Anwesenheit von Protozoen und Nematoden gekennzeichnet wird (Abb. 6 bis 9).

Hier wurden auch hygienisch relevante Organismen wie coliforme Keime und Legionellen nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde an einer ganzen Reihe von gummibeschichteten Absperrschiebern aus verschiedenen Verteilungssystemen gemacht. In solchen Fällen kam es auch zu Kontaminationen des Trinkwassers, was als gesundheitliches Risiko bewertet werden muss. Die abgegebenen Keime konnten durch Chlorung des Wassers unterdrückt werden, sobald die Chlorung jedoch abgestellt wurde, traten sie wieder auf. Die Untersuchungen weisen damit auf die grosse Bedeutung der Nährstoff-Abgabe durch die verwendeten Materialien hin [10].

Eine Dauerchlorung von Anfang an ist geeignet, um die Bildung von Biofilmen zu verhindern. Einmal entstandene Biofilme lassen sich jedoch durch die Anwendung von Desinfektionsmitteln nur noch schwer bekämpfen. Zum einen liegt dies daran, dass die Biofilm-Organismen, wie bereits erwähnt, eine höhere Desinfektionsmittel-Toleranz aufweisen; inwieweit eine tatsächliche Resistenz besteht, bleibt noch zu klären; es wurde häufig beobachtet, dass Organismen, die im Biofilm hohe Biozid-Konzentrationen ertragen, im suspendierten Zustand gegenüber den gleichen Bioziden sehr empfindlich sind. Zum andern ist zu beachten, dass

eine Desinfektion noch keine Reinigung darstellt, sodass selbst bei einem Erfolg noch inaktive Biomasse verbleibt, die ein Reservoir abbaubaren Materials darstellt, das rasch besiedelt und verwertet wird und zu starker Wiederverkeimung führen kann.

5. Konsequenzen aus dem Verbundprojekt

Als wichtigste Massnahme zur Limitierung des Biofilm-Wachstums ergibt sich klar die Limitierung

der Nährstoffe und hier vor allem des *assimilierbaren organischen Kohlenstoffs* (AOC). Daraus leitet sich ab, wie wichtig die Einhaltung niedriger AOC-Werte im Trinkwasser ist; dies zeigten auch die Untersuchungen am Düsseldorfer Trinkwasser-Verteilungsnetz ganz deutlich, wo bei AOC-Konzentrationen zwischen 2,2 und 7,8 $\mu\text{m l}^{-1}$ ein sehr geringes Biofilmbildungspotenzial gefunden wurde. Wenn jedoch Werkstoffe verwendet werden, von denen bioverfügbare Substanzen abgegeben wer-

Verbundpartner

- Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universität Bonn (Prof. Dr. M. Exner, Schirmherr)
- Biofilm Centre der Universität Duisburg-Essen und IWW Zentrum für Wasserforschung, Mülheim (Prof. Dr. H.-C. Flemming, Koordination)
- Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene der Universität Tübingen (Prof. Dr. K. Botzenhart)
- Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Bad Elster (Frau Dr. I. Feuerpfeil)
- Ernst-Rodenwald-Institut Koblenz (Dr. Michel, Dr. Hoffmann)
- Institut für Hygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Priv.-Doz. Dr. Schulze-Röbbecke)
- Hygiene-Institut der Universität Bonn (Prof. Dr. Schoenen)
- AGEF-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Prof. Dr. Schultze)
- Zentrum für Hygiene, Universität Frankfurt (Prof. Dr. Schubert)
- Technische Universität Berlin, FB Ökologie der Mikroorganismen (Prof. Dr. Szewzyk)
- Berliner Wasserversorgungs-Betriebe (Dipl.-Ing. Ehbrecht)
- Rheinisch-Westfälische Wasserwerksgesellschaft (RWW) Mülheim (Dr. e.h. G. Müller, Dr. Bundermann)
- Stadtwerke Düsseldorf (Dr. H.P. Rohns)
- Stadtwerke Duisburg (Dr. E. Denecke)
- Wahnbach-Talsperrenverband (Dr. J. Claasen)

den, nützt auch biologisch stabiles Trinkwasser nichts – dann ist mit einer starken Biofilm-Entwicklung zu rechnen. Dies betrifft nicht nur die gummibeschichteten Absperrschieber, sondern in noch grösserem Umfang Werkstoffe, die heute noch in der Hausinstallation verwendet werden; *Abbildung 10* zeigt die stark bewachsene Innenfläche des Gummis in einem Panzerschlauch einer Dusche.

Im Verlauf des Projektes ergaben sich Hinweise darauf, dass in solchen Fällen Biofilme entstehen, die eine Ansiedlung hygienisch relevanter Keime, z. B. coliforme oder Legionellen, speziell begünstigen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass hier entweder Stoffe abgegeben werden, die für bestimmte Organismengruppen besonders attraktiv sind, oder dass eine Population selektiert wird, in der sie sich besonders gut etablieren können.

Insgesamt wurde festgestellt, dass im Trinkwasser-Verteilungsnetz zwar überall Biofilme auftreten, dass sie aber in der Regel *nicht* als Reservoir für hygienisch relevante Keime zu betrachten sind. Eine Erhöhung des Biofilmbildungspotenzials im Netz ist nicht zu erkennen. Obwohl das Trinkwasser also flächendeckend mit relativ hohen Keim-Konzentrationen an den Oberflächen in Kontakt steht, kommt es zu keiner relevanten Kontamination. Dies liegt sicherlich auch daran, dass es sich um dünne Biofilme handelt, die häufig als Besiedlung von porenreichen mineralischen Inkrustationen auftreten. Die Massnahmen zur Bereitstellung von biologisch stabilem Trinkwasser bewähren sich, ebenso die Verwendung von Werkstoffen, die nach dem DVGW-Arbeitsblatt W 270 zugelassen sind.

Wenn aber Werkstoffe eingesetzt werden, die diese Zulassung nicht besitzen, wie dies z. B. bei gummi-

beschichteten Absperrschiebern im Leitungssystem oder – in grossem Umfang – in der Hausinstallation der Fall ist, dann ist auch mit hygienischen Problemen zu rechnen. Das bedeutet, dass hygienisch einwandfreies Wasser möglicherweise erst beim Verbraucher kontaminiert wird. Wenn immunsupprimierte Personen diesem Wasser exponiert werden, etwa in Krankenhäusern, Pflege- oder Altersheimen, dann besteht ein deutliches gesundheitliches Risiko. Es ist auch daran zu denken, dass aufgrund der Kostendämpfung im Gesundheitswesen Rekonvaleszente immer früher entlassen und zu Hause gepflegt werden. Auch für sie gilt dieses Risiko. Hier ergibt sich ein ganz klarer Forschungs- und Handlungsbedarf.

Verdankung

Für die Förderung dieses umfangreichen und komplexen Verbundprojektes durch das BMBF und die Betreuung durch den Projektträger Wasser, speziell Dr. Möller und Frau Horak, soll an dieser Stelle herzlich gedankt werden. Gleicher Dank gilt den Wasserversorgungsunternehmen, die sich bereit erklärt haben, dieses Projekt finanziell, inhaltlich und materiell zu unterstützen – ohne sie wäre es nicht realisierbar gewesen. An dieser Stelle soll den Projektpartnern ebenso herzlich gedankt werden, die im Verlauf dieses Projektes zu einer sehr konstruktiven und fruchtbaren Zusammenarbeit gefunden haben.

Literaturverzeichnis

- [1] Wingender, J.; Flemming, H.-C. (2004): Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Wat. Sci. Tech.* 49, 277–285.
- [2] Ridway, H. F. and Olson, B. H. (1981). Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking-water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 274–287.
- [3] Grubert, L.; Tuschewitzki, G.-J. and Pättsch, B. (1992): Raster-Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur mikrobiellen Besiedlung der Innenflächen von Wasseranschlussleitungen aus Polyethylen und Stahl. *gwf Wasser/Abwasser*, 133, 310–313.
- [4] Flemming, H.-C. (1998): Biofilme in Trinkwassersystemen. Teil I: Übersicht. *Wasser Abwasser gwf* 139, 65–72.
- [5] Percival, S.L.; Walker, J.T.; Hunter, P.R. (eds.) (2000): Microbiological aspects of biofilms and drinking water. CRC Press, Florida.
- [6] Flemming, H.-C.; Percival, S. and Walker, J.T. (2002): Contamination potential of biofilms in drinking water distribution systems. *Wat. Sci. Technol.*, *Wat. Supply* 2, 271–280.
- [7] LeChevallier, M.W.; Cawthon, C.D. and Lee, R.G. (1988): Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2492–2499.
- [8] LeChevallier, M.W. (1991): Biocides and the current status of biofouling control in water systems. In: Flemming, H.-C. and Geesey, G.G. (eds.): *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, 113–132; Springer, Heidelberg.
- [9] Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E. (1985): A new medium for the enumeration and subcultures of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1–7.
- [10] Kilb, B.; Lange, B. (2001): Trinkwasserkontamination durch Biofilme auf weich dichtenden Absperrschiebern. *Bbr* 52, 55–56.
- [11] Hallam, N. B.; West, J. R.; Forster, C. F. and Simms, J. (2001): The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Wat. Res.*, 35, 4063–4071.
- [12] Pedersen, K. (1990). Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Wat. Res.*, 24, 239–243.
- [13] Zacheus, O. M.; Ilvanainen, E. K.; Nissinen, T. K.; Lehtola, M. J. and Martikainen, P. J. (2000). Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Wat. Res.*, 34, 63–70.
- [14] Zacheus, O. M.; Lehtola, M. J.; Korhonen, L. K. and Martikainen, P. J. (2001). Soft deposits, the key site for microbial growth in drinking water distribution networks. *Wat. Res.*, 35, 1757–1765.

Keywords

Biofilm – Rohrleitungen – Verbundprojekt

Adresse der Autoren

Hans-Curt Flemming, Prof. Dr.
Tel. +49 (0)208 4030 3400
Fax +49 (0)208 4030 384
hanscurtflemming@compuserve.com

Jost Wingender, Dr. rer. nat
hh239wi@uni-duisburg.de

Biofilm Centre
Universität Duisburg-Essen
Geibelstrasse 41
D-47057 Duisburg