

**Quantifizierung und Reduzierung von Biofilmen
verschiedener Trinkwasserisolate**



Dissertation

Zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät 4 Mathematik und Naturwissenschaften
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von

Jessica Kerstin Czirr

Wuppertal

Februar 2017

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20170523-105454-8

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20170523-105454-8>]

Die vorliegende Dissertation entstand unter der Anleitung von Priv. Doz. Dr. Eberhard Schmidt in der Arbeitsgruppe der chemischen Mikrobiologie im Zeitraum von August 2013 bis Februar 2017 an der Bergischen Universität Wuppertal in der Fakultät 4 für Mathematik und Naturwissenschaften.

Mein herzlicher Dank gilt...

... Herrn Priv. Doz. Dr. Eberhard Schmidt, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit der selbstständigen und freien Durchführung, sowie für sein stetiges Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit und ein immer offenes Ohr.

... Frau Dr. Andrea Franck-Mokroß, für ihre aufmunternden Worte, die freundliche Hilfe und die Übernahme des Korreferats.

... den guten Feen Frau Natalie Fabis, Frau Melanie Möller und Frau Sarah Rau, für ihr Krisenmanagement in allen Bereichen der täglichen Katastrophen.

... Herrn Darko Babić, meinem Leidensgenossen, für seine (fast) immer hilfreichen Anmerkungen und unzählige Stunden im Labor.

... allen meinen Arbeitskollegen gemeinsam, für die freundliche und persönliche Arbeitsatmosphäre, die für Spaß bei der Arbeit und Produktivität gesorgt hat. Ich weiß, solche Kollegialität ist nicht selbstverständlich, herzlichen Dank an euch alle!

...der Firma a.p.f. Aquasystems AG, sowie dem Technischen Gebäudemanagement der Uni Wuppertal, insbesondere Herrn Helmut Uhlmann und Herrn Dirk Volker Hermann, für die Kooperation.

... Herrn Frank Fenn für die Hilfe beim englischsprachigen Abstract, sowie Frau Corinna Tietz für das Korrekturlesen.

... nicht zuletzt Herrn Sascha Drees, meinem Gefährten, für sein Verständnis, die schier endlose Geduld, Unterstützung in jeder Hinsicht und alles andere.

I. Abkürzungsverzeichnis	I
II. Abbildungsverzeichnis.....	IV
III. Tabellenverzeichnis.....	VIII
IV. Zusammenfassung.....	X
V. Abstract.....	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Anlass der Forschung	1
1.2 Trinkwasser	2
1.3 Biofilme in Trinkwassersystemen.....	2
1.4 Legionellen-Problematik	5
1.5 Chlordioxid als Desinfektionsmittel	8
1.6 Mikrotiterplatten-Biofilm-Assay (MBA)	10
1.7 Becherglasreaktor	12
1.8 Zielsetzung dieser Forschung	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Nährmedien	16
2.1.1.1 Flüssige Nährmedien	16
2.1.1.1.1 TSB-Medium.....	16
2.1.1.1.2 YEB3-Medium	17
2.1.1.2 Feste Nährmedien	18
2.1.1.2.1 TSB-Agar	19
2.1.1.2.2 BCYE-Agar	19
2.1.1.2.3 R2A-Agar	20
2.1.2 Bakterien	20
2.1.3 Geräte	21
2.1.4 Chemikalien	22
2.1.4.1 Allgemein.....	23
2.1.4.2 Legionellen-Untersuchung nach DIN EN ISO 11731-2:2008.....	26
2.1.4.3 PCR-Assays zur Charakterisierung von Bakterien-Isolaten	27
2.1.4.4 Kristallviolett-Färbung.....	29
2.1.4.5 Desinfektionsversuche	29
2.2 Methoden	31
2.2.1 Stammhaltung der Bakterien	31

2.2.2	Trübungsmessung.....	31
2.2.3	Lebendzellzahlbestimmung.....	31
2.2.4	Trinkwasseruntersuchungen.....	32
2.2.4.1	Untersuchung auf Legionellen nach DIN EN ISO 11731-2:2008.....	32
2.2.4.2	Gewinnung von Trinkwasserisolaten.....	34
2.2.4.2.1	Grobcharakterisierung.....	35
2.2.4.2.2	Aufnahme von Wachstumskurven.....	36
2.2.4.2.3	PCR-Assays zur Charakterisierung von Trinkwasserisolaten.....	38
2.2.5	Biofilmanzucht im Becherglasreaktor.....	41
2.2.5.1	Aufbau des Reaktors.....	41
2.2.5.2	Anzucht von Biofilmen.....	42
2.2.5.2.1	Vorbehandlung der Wachstumsoberfläche.....	43
2.2.5.3	Quantifizierung mittels Lebendzellzahl.....	44
2.2.5.3.1	Auftrennung von Zellaggregaten durch Ultraschall.....	44
2.2.5.4	Mikroskopische Qualifizierung von Biofilmen.....	44
2.2.6	Biofilmanzucht in 24-well-Mikrotiterplatten.....	45
2.2.6.1	Anzucht.....	45
2.2.6.2	Quantifizierung mittels Kristallviolett.....	46
2.2.6.3	Einfluss des Anzuchtmediums auf die Leerwerte.....	46
2.2.6.4	Modifizierung der Hitzefixierung von Biofilmen.....	46
2.2.6.5	Zusammenhang zwischen Absorption und optischer Dichte von Biofilmkulturen.....	47
2.2.6.6	Biofilmbildung in Reinkultur.....	47
2.2.6.7	Nekrotrophes Biofilmwachstum von <i>L. pneumophila</i> LP1.....	48
2.2.6.8	Quantifizierung mittels Lebendzellzahlbestimmung.....	48
2.2.7	Desinfektionsversuche.....	48
2.2.7.1	Konzentrationsbestimmung von Wasserstoffperoxid.....	49
2.2.7.2	Konzentrationsbestimmung von Chlordioxid.....	49
2.2.7.2.1	Iodometrische Titration.....	49
2.2.7.2.2	Photometrische Quantifizierung.....	51
2.2.7.3	Auftrennung von Zellaggregaten.....	52
2.2.7.4	Ablösung von Biofilmen.....	53
2.2.7.4.1	Qualitative Ablösung im Becherglasreaktor.....	53
2.2.7.4.2	Quantifizierung mittels Kristallviolett.....	53
2.2.7.5	Desinfektionswirkung im Becherglasreaktor.....	54

2.2.7.5.1	Chlordioxidverbrauch durch Nährmedien.....	56
2.2.7.5.2	Abhängigkeit von der Einwirkzeit	56
2.2.7.5.3	Wachstumsparameter abgelöster Biofilme.....	57
2.2.7.5.4	Biofilme und planktonischen Kulturen	57
2.2.7.5.5	Abhängigkeit von der Biofilmstruktur	58
2.2.7.5.6	Planktonische Kulturen unterschiedlicher Lebendzellzahl	58
3	Experimente und Ergebnisse.....	59
3.1	Trinkwasseruntersuchungen an der bergischen Universität Wuppertal	59
3.1.1	Untersuchungen auf Legionellen nach DIN EN ISO 11731-2:2008.....	61
3.1.2	Gewinnung von Trinkwasserisolaten	73
3.1.2.1	Grobcharakterisierung	73
3.1.2.2	Wachstumsparameter ausgewählter Isolate	76
3.1.2.3	Gensequenzierung ausgewählter Isolate	77
3.2	Anzucht von Biofilmen im Laborversuch.....	78
3.2.1	Biofilmanzucht im Becherglasreaktor	78
3.2.1.1	Methodenoptimierung zur Quantifizierung von Biofilmen	79
3.2.1.1.1	Vorbehandlung der Wachstumsoberfläche	80
3.2.1.1.2	Auftrennung von Zellaggregaten ausgewählter Isolate.....	81
3.2.1.2	Biofilmbildung von Trinkwasserisolaten.....	84
3.2.1.2.1	Qualifizierung mittels Mikroskopie	84
3.2.1.3	Biofilmbildung von Indikatororganismen nach Trinkwasserverordnung..	88
3.2.1.4	Biofilmbildung von Legionellen.....	90
3.2.2	Biofilmanzucht in 24-well-Mikrotiterplatten	92
3.2.2.1	Quantifizierung von Biofilmen mittels Kristallviolett-Färbung	92
3.2.2.1.1	Methodenoptimierung	92
3.2.2.1.2	Biofilme der <i>Staphylococcus</i> sp. JCBK5	97
3.2.2.1.3	Biofilme der Indikatororganismen	98
3.2.2.1.4	Biofilme der <i>Legionella pneumophila</i> sp. LP1	101
3.2.2.2	Quantifizierung der Lebendzellzahl von Biofilmen	103
3.2.2.3	Nekrotropes Biofilmwachstum von <i>Legionella pneumophila</i> LP1	105
3.2.2.3.1	Nekrotrophe Kultivierung von <i>Legionella pneumophila</i> LP1 auf abgetöteten <i>Staphylococcus</i> sp. JCBK5-Biofilmen	105
3.2.2.3.2	Nekrotrophe Kultivierung von <i>Legionella pneumophila</i> auf abgetöteten Biofilmen von Indikatororganismen	106

3.2.2.3.3	Kultivierung von <i>Legionella pneumophila</i> auf lebenden <i>Escherichia coli</i> -Biofilmen	108
3.3.	Desinfektionsversuche mit Chlordioxid	109
3.3.1	Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Chlordioxid-Lösungen	109
3.3.2	Auftrennung von Zellaggregaten mittels geringer Chlordioxid-Konzentrationen	111
3.3.3	Ablösung von Biofilmen durch Chlordioxid-Behandlung	112
3.3.3.1	Qualitative Ablösung im Becherglasreaktor	113
3.3.3.2	Quantifizierung der Ablösung von Biofilmen	115
3.3.3.2.1	Ablösung von lebenden Biofilmen.....	115
3.3.3.2.2	Ablösung von getrockneten Biofilmen	118
3.3.4	Desinfektionsversuche im Becherglasreaktor	120
3.3.4.1	Methodenoptimierung.....	121
3.3.4.2	Desinfektionswirkung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit	125
3.3.4.3	Desinfektionswirkung auf abgelöste Biofilme	127
3.3.4.4	Desinfektionswirkung auf Biofilme und planktonische Kulturen	129
3.3.4.5	Desinfektionswirkung in Abhängigkeit von der Biofilmstruktur	132
3.3.4.6	Desinfektionswirkung auf planktonische Kulturen mit variierender Lebendzellzahl.....	134
4	Diskussion	136
4.1	Trinkwasseruntersuchungen des Trinkwassersystems am Campus Griffenberg	136
4.2	Nachweis und Zählung von Legionellen mittels Membranfiltrationsverfahren	141
4.3	Versuche im Becherglasreaktor	145
4.4	Mikrotiter-Biofilm-Assay	150
4.5	Vergleichbarkeit von Becherglas-Methode und Mikrotiterplatten-Biofilm-Assays	158
4.6	Desinfektionsversuche	159
5	Literatur	165
6	Eidesstattliche Erklärung	177

I. Abkürzungsverzeichnis

§	Paragraph
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
16 SE2	Primerbezeichnung
16 SE2_1	Primerbezeichnung
Abb.	Abbildung
AOX	adsorbierbare Organisch gebundene Halogene
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract (engl.): gepufferter Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, Online-Datenbank des National Center of Biotechnology Information
bp	Basenpaare
c	Konzentration
D	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphate
DOC	dissolved organic carbon/ gelöster organisch gebundener Kohlenstoff
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
DVGW	Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V., Bonn
E	Extinktion
<i>E. coli</i> K12	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM20478
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
et al.	et alii
f	folgend
ff	fortfolgend
g	Gramm
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
GVPC	Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide
h	Stunde
HAA	halogenierte Essigsäuren
KBE	koloniebildende Einheiten
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
L	Liter
<i>L. adelaidensis</i>	<i>Legionella adelaidensis</i>
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> LP1
<i>L. shakespearei</i>	<i>Legionella shakespearei</i>
Leg-F1	Primerbezeichnung
Leg-R1	Primerbezeichnung
ln	Logarithmus naturalis
LW	Leitungswasser

LVHT	Lehr- und Versuchsgesellschaft für innovative Hygienetechnik
LZZ	Lebendzellzahl
M	Stoffmengenkonzentration mol/L
MBA	Mikrotiterplatten-Biofilm-Assay
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimol
mol	Stoffmenge
MWG	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland
n.u.	nicht untersucht
n.z.	nicht zählbar
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysis
pA	Primerbezeichnung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii (pH-Wert)
ppb	parts per billion
PS	Polystyrol
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM346
SDS	Sodiumdodecylsulfate (engl.): Natriumlaurylsulfat
sec.	Sekunde
sp.	Spezies
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
THM	Trihalogenmethane
TRBA	Technischen Regel für Biologische Arbeitsstoffe
TrinkwV 2001	Trinkwasserverordnung von 2001
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TSB	Typtic-Soja-Bouillon
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VBNC	viable-but-nonculturable
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
vgl.	vergleiche
w/v	Konzentrationsangabe (Gewichtsanteil/Volumenanteil)
wl-40987	Primerbezeichnung
wl-40988	Primerbezeichnung
YEB	Yeast Extract Broth
z. B.	zum Beispiel

ε	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Umgebende Einflüsse bei der Biofilmbildung.....	4
Abb. 2	Beispiele für Reaktoren zur Anzucht von Biofilmen.....	13
Abb. 3	Darstellung von Vakuumfiltrationsapparatur und BCYE-Agar-Platte mit aufgebrachtem Filter.....	33
Abb. 4	Becherglasreaktor zur Anzucht von bakteriellen Biofilmen.....	42
Abb. 5	Definierte Aufwuchsfläche für die Biofilmbildung im Becherglasreaktor.....	43
Abb. 6	Schematischer Aufbau und Positionierung der Wetbox während der Bebrütung (seitliche Ansicht).....	45
Abb. 7	Schematische Darstellung des Versuchs zur Aggregatauftrennung mit Chlordioxid.....	52
Abb. 8	Zusammensetzung der Raumnummern am Campus Griffenberg der Bergischen Universität.....	59
Abb. 9	Campusplan des Campus Griffenberg der Bergischen Universität Wuppertal.....	60
Abb. 10	Offizielle <i>Legionella</i> -Beprobungen nach DIN EN ISO 11731-2:2008 des Trinkwassernetzes am Campus Griffenberg.....	61
Abb. 11	Beprobungsstandorte mit <i>Legionella</i> -Befund und Ergebnisse der Nachbeprobung.....	62
Abb. 12	<i>Legionella</i> -Befund im 2. und 3. Liter des Standwassers verschiedener Probenahmestellen am Campus Griffenberg.....	64
Abb. 13	Auswahl von <i>Legionella</i> -verdächtigen Kolonien der Trinkwasseruntersuchung (20.10.2016) am Campus Griffenberg.....	67
Abb. 14	Agarosegel nach <i>Legionella</i> -PCR mit <i>Legionella</i> -verdächtigen Isolaten der Trinkwasseruntersuchung am Campus Griffenberg.....	68
Abb. 15	Agarosegel nach <i>L. pneumophila</i> -PCR mit <i>Legionella</i> -verdächtigen Isolaten der Trinkwasseruntersuchung am Campus Griffenberg.....	69
Abb. 16	Falsch-positive <i>Legionella</i> -Isolate erhalten nach Säurebehandlung gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008.....	70
Abb. 17	Wachstumskurve des Isolats JCBK5.....	76
Abb. 18	Reproduzierbarkeit der Biofilmbildung des Isolats JCBK5 in unterschiedlichen Bechergläsern (Einzelwerte aller Objektträger)....	79
Abb. 19	Optimierung der Wachstumsoberfläche bei der Biofilmbildung des Isolats JCBK5 (100 % = LZZ bei Objektträgern ohne Vorbehandlung).....	80
Abb. 20	Mikroskopische Betrachtung einer JCBK5-Suspension.....	82

Abb. 21	Lebendzellzahl von Suspensionen verschiedener Trinkwasserisolate in Abhängigkeit von der Beschallungsdauer mit Ultraschall.....	83
Abb. 22	Optische Qualifizierung von Biofilmen.....	85
Abb. 23	Biofilmbildung der Isolate des Warmwassertanks in F.06.74.....	86
Abb. 24	Biofilmbildung der Isolate des Wasserhahns in H.14.10.....	87
Abb. 25	Biofilmbildung verschiedener Trinkwasser-Indikatororganismen.....	89
Abb. 26	Biofilmbildung verschiedener <i>Legionella</i> -Stämme.....	90
Abb. 27	Biofilmbildung von <i>Legionella pneumophila</i> LP1.....	91
Abb. 28	Absorption der Leerwerte in Abhängigkeit von der Nährmedien-Konzentration.....	93
Abb. 29	Hitzefixierung im 24-well-Mikrotiterplatten-Versuch mit dem Isolat JCBK5.....	94
Abb. 30	Korrelation zwischen optischer Dichte und Absorption von Biofilmen des Isolats JCBK5.....	96
Abb. 31	Biofilmbildung des Trinkwasserisolats JCBK5 in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums und der Bebrütungszeit.....	97
Abb. 32	Biofilmbildung der Indikatororganismen in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums und der Bebrütungszeit.....	99
Abb. 33	Verhältnis zwischen Biofilmen und planktonischen Suspensionen der Indikatorkeime.....	100
Abb. 34	Biofilmbildung des Isolats <i>L. pneumophila</i> LP1 in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums und der Bebrütungszeit.....	102
Abb. 35	Prozentualer Anteil der Lebendzellzahlen des Isolats JCBK5 in den Fraktionen des 24-well-Mikrotiterplatten-Versuchs.....	103
Abb. 36	Korrelation zwischen Absorption und Lebendzellzahl von Biofilmen des Isolats JCBK5.....	104
Abb. 37	Nekrotrophes Biofilmwachstum von <i>Legionella pneumophila</i> LP1 hitzefixierten JCBK5-Biofilmen.....	105
Abb. 38	Nekrotrophes Biofilmwachstum von <i>Legionella pneumophila</i> LP1 hitzefixierten Biofilmen der Indikatororganismen.....	107
Abb. 39	Biofilmbildung eines Mischbiofilms aus <i>E. coli</i> K12 und <i>L. pneumophila</i> LP1 in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums und der Bebrütungszeit.....	108
Abb. 40	Methodenvergleich zur Konzentrationsbestimmung von Chlordioxid.....	110
Abb. 41	Wirkung von geringen Chlordioxid-Konzentrationen auf Suspensionen von <i>Staphylococcus</i> sp. JCBK5.....	111
Abb. 42	Ablösung von JCBK5-Biofilmen in Abhängigkeit von Desinfektionsmitteln.....	114

Abb. 43	Ablösungswirkung von Chlordioxid und Wasserstoffperoxid auf JCBK5-Biofilme.....	115
Abb. 44	Ablösungswirkung von Chlordioxid auf Biofilme (Ausgangsabsorption ca. 0,5).....	116
Abb. 45	Ablösungswirkung von Chlordioxid auf Biofilme (Ausgangsabsorption ca. 0,1).....	117
Abb. 46	Strukturveränderung von eintrocknenden Biofilmen (mikroskopische Darstellung bei 400facher Vergrößerung).....	119
Abb. 47	Ablösungswirkung von Chlordioxid auf lebende und getrocknete <i>L. pneumophila</i> sp. LP1-Biofilme (Ausgangsabsorption ca. 0,3).....	120
Abb. 48	Allgemeiner Ablaufplan für die Desinfektionsversuche im Becherglasreaktor.....	121
Abb. 49	Chlordioxidverbrauch durch TSB-Lösungen.....	122
Abb. 50	Einfluss des Wascheffekts bei Desinfektionsversuchen mit <i>Staphylococcus</i> sp. JCBK5.....	124
Abb. 51	Desinfektionsversuch des Isolats JCBK5 mit Chlordioxid (Einwirkzeit 10 min und 20 min).....	125
Abb. 52	Wachstumskurven von abgelösten JCBK5-Biofilmen nach Desinfektion mit Chlordioxid (Einwirkzeit 10 min und 20 min).....	128
Abb. 53	Methoden zur Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilme und planktonische Kulturen des Becherglasreaktors (Schematische Darstellung).....	130
Abb. 54	Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilme und planktonische Kulturen von <i>Staphylococcus</i> sp. JCBK5.....	131
Abb. 55	Methoden zur Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilme des Becherglasreaktors (Schematische Darstellung).....	132
Abb. 56	Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilm-Kulturen von <i>Staphylococcus</i> sp. JCBK5 mit unterschiedlicher Vorbehandlung.....	133
Abb. 57	Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf planktonische Kulturen von JCBK5.....	134
Abb. 58	<i>Legionella</i> -Befunde nach DIN EN ISO 11731-2:2008 im Trinkwassernetz des Campus Griffenberg als Anteil des Gesamtprobenumfangs.....	137
Abb. 59	<i>Legionella</i> -Verkeimung der Trinkwasserbeprobungen am Campus Griffenberg.....	138
Abb. 60	Verlaufsplan der Wasserleitungen und korrelierende Verkeimung des Trinkwassers im Gebäude U.....	140
Abb. 61	Membranfilter der Trinkwasserprobe aus U.08.90 (Dusche) nach der Bebrütung.....	142
Abb. 62	Maximale Biofilmbildung verschiedener Bakterien im Becherglasreaktor (mikroskopische Qualifizierung).....	147

Abb. 63	Biofilm von <i>E. coli</i> K12 nach 72 Stunden Bebrütung im Becherglasreaktor.....	149
Abb. 64	Maximale Biofilmbildung verschiedener Bakterien in 24-Well-Mikrotiterplatten.....	152
Abb. 65	Biofilmbildung und optische Dichte der korrespondierenden planktonischen Kulturen von <i>S. aureus</i> DSM346 und dem Isolat JCBK5.....	155
Abb. 66	Biofilmbildung von <i>L. pneumophila</i> in Reinkultur und auf abgetöteten JCBK5-Biofilmen.....	156
Abb. 67	Biofilmbildung von <i>L. pneumophila</i> in Reinkultur und in Kombination mit <i>E. coli</i> K12-Biofilmen.....	157
Abb. 68	Lebendzellzahlen von JCBK5-Biofilmen nach Anzucht im Becherglasreaktor, bzw. in 24-Well-Mikrotiterplatten.....	158
Abb. 69	Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf planktonische und Biofilm-Kulturen.....	161
Abb. 70	Wachstum von JCBK5-Suspensionen auf TSB-Agar in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Kulturen.....	163

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Auszug aus den Anlagen 1 und 3 der Trinkwasserverordnung 2001..	5
Tab. 2	Verfahren zur Herstellung von Chlordioxid.....	9
Tab. 3	Charakterisierung des verwendeten TSB-Mediums.....	17
Tab. 4	Charakterisierung des verwendeten YEB3-Mediums.....	18
Tab. 5	Herstellung der BCYE-Agar-Platten laut Herstellerangaben.....	19
Tab. 6	Herstellung der R2A-Agar-Platten laut Herstellerangaben.....	20
Tab. 7	Verwendete Mikroorganismen.....	21
Tab. 8	Verwendete Geräte.....	21
Tab. 9	Verwendeten Chemikalien.....	23
Tab. 10	Herstellung des Säurepuffers nach DIN EN ISO 11731-2:2008.....	26
Tab. 11	Chemikalien für PCR-Analysen.....	27
Tab. 12	Übersicht der verwendeten Primer.....	28
Tab. 13	Lösungen für die Kristallviolett-Färbung.....	29
Tab. 14	Lösungen der Desinfektionsversuche.....	29
Tab. 15	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.....	38
Tab. 16	Temperaturprogramm zur Amplifizierung des 16s-rDNA-Gens.....	40
Tab. 17	Temperaturprogramm für das spezifische PCR-Produkt der Gattung <i>Legionella</i>	40
Tab. 18	Temperaturprogramm des spezifischen PCR-Assays für die Art <i>Legionella pneumophila</i>	41
Tab. 19	Varianten zur Vorbehandlung der Wachstumsoberfläche.....	43
Tab. 20	Anzuchtbedingungen der für die Versuche in 24-well-Mikrotiterplatten verwendeten Stämme.....	47
Tab. 21	Anzuchtbedingungen der verwendeten Mikroorganismen für den Desinfektionsversuch in 24- well-Mikrotiterplatten.....	54
Tab. 22	Probennahmen im Desinfektionsversuch.....	55
Tab. 23	Beprobung des Trinkwassernetzes des Campus Griffenberg der Universität Wuppertal.....	65
Tab. 24	Klassifizierung ausgewählter falsch-positiver Legionella-Isolate mit Wachstum auf TSB-Agar.....	72
Tab. 25	Gewinnung und Grobidentifizierung von Trinkwasserisolaten.....	74

Tab. 26	Weitere Charakterisierung von Isolaten mit guter Biofilmbildung....	77
Tab. 27	Klassifizierung von Trinkwasserisolaten mit guter Biofilmbildung...	78
Tab. 28	Wachstumsparameter von abgelösten JCBK5-Biofilmen nach Desinfektion mit Chlordioxid (Einwirkzeit 10 min und 20 min).....	130

IV. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mikrobiologische Untersuchungen an dem Trinkwassersystem des Campus Griffenberg der Bergischen Universität Wuppertal durchgeführt und begleitet. Nach DIN EN ISO 11731-2:2008 wurden Untersuchungen zu Legionellen-Belastungen und damit den Vorgaben der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) entsprechend, durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass Legionellen in dem System vorhanden waren. Die durchgeführten Gegenmaßnahmen wie thermische Desinfektion, Spülungen und Rückbau von Totleitungen führten zu einer Reduzierung der Legionellen, sodass der vorgegebene technische Maßnahmenwert für *Legionella* sp. von 100 KBE/100 mL Leitungswasser eingehalten wurde. Außerdem belegten die Ergebnisse, dass eine höhere Legionellen-Verkeimung maßgeblich durch lange Standzeiten von Trinkwasser, sowie durch begünstigende Temperaturen im Leitungssystem, gefördert wurde.

Die kritische Betrachtung der Quantifizierungsmethode für Legionellen nach DIN EN ISO 11731-2:2008 zeigte einige Ungenauigkeiten in der vorgegebenen Durchführung. Variationen im Probenvolumen führten teilweise zu erheblichen Unterschieden in der detektierten *Legionella*-Anzahl. Außerdem wies die Methode Defizite in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf.

In Laborversuchen wurden Biofilme verschiedener Isolate des Trinkwassersystems und von Indikatororganismen nach Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) generiert und deren Eigenschaften untersucht. Dafür erfolgte die Biofilmanzucht zum einen nach einer modifizierten Methode auf den Grundlagen von Hübel (2013) und Dudek (2015) in einem Becherglasreaktor und zum anderen mit Hilfe von Mikrotiterplatten-Biofilm-Assays nach Stepanovic et al. (2000), Wisbauer (2016) und Laufer (2016). Beide Methoden bieten eine Bandbreite von variierbaren Anzuchtparametern, was die Anpassung der Methoden auf eine Vielzahl von Mikroorganismen ermöglicht. In dieser Arbeit wurden insbesondere Einflüsse von Bebrütungszeit und Nährmedienkonzentration auf die Biofilmbildung von *L. pneumophila* LP1,

E. coli K12, *E. faecalis* DSM20478, *S. aureus* DSM346 und einigen *Staphylococcus*-Isolaten, in Rein- und Mischkultur, untersucht.

Mit dem Trinkwasserisolat *Staphylococcus* sp. JCBK5 durchgeführte Desinfektionsversuche im Becherglasreaktor zeigten, dass die Struktur von Biofilmen einen Schutz der darin enthaltenen Bakterien vor dem Desinfektionsmittel Chlordioxid bewirkte. Bei planktonischen Kulturen des verwendeten *Staphylococcus*-Isolats wurden im Vergleich deutlich höhere Wirkungsraten von Chlordioxid festgestellt. Planktonische Kulturen mit unterschiedlicher Zelldichte wiesen dabei keinen Inokulum-Effekt auf. Desinfizierte Biofilme, in denen ein Teil der Bakterien die Desinfektion überlebt hatte, zeigten innerhalb weniger Tage wieder massive Vermehrung sowohl in der Biofilmpopulation, als auch durch die Ausbildung einer neuen planktonischen Kultur.

Mit Hilfe der optimierten Methode des Mikrotiterplatten-Biofilm-Assays wurde die ablösende Wirkung von Chlordioxid, in Abhängigkeit von der Chlordioxid-Konzentration, auf Biofilme der oben genannten Mikroorganismen nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied bei der Ablösung von lebenden und ausgetrockneten Biofilmen war nicht feststellbar.

V. Abstract

Within the Scope of this thesis project microbiological investigations were conducted and accompanied on the drinking water system of the Griffenberg campus of the Bergische Universität Wuppertal. According to DIN EN ISO 11731-2:2008 investigations were carried out on legionella exposure meeting the criteria of the Drinking Water Ordinance (TrinkwV 2001) and its strict demands. The results of the investigations showed that *Legionella* was present in the existing system. The countermeasures carried out such as thermal disinfection, rinsing and removal of dead lines led to a reduction in *Legionella* so that the predefined technical measures for *Legionella* sp. of 100 CFU /100 mL of tap water was maintained. In addition, the results showed that a higher *Legionella* contamination was caused by stale drinking water, as well as by beneficial temperatures within the pipeline system.

The critical reflection of the quantification method for *Legionella* according to DIN EN ISO 11731-2:2008 showed some inaccuracies in the predetermined execution method. Variations in the sample volume partly led to considerable differences in the number of detected *Legionella*. Furthermore, the method showed deficits in the reproducibility of the results.

In accordance to the Drinking Water Ordinance (TrinkwV 2001), biofilms of various isolates of the drinking water system and of indicator organisms were generated within laboratory tests and their characteristics were subsequently investigated. For this purpose, a biofilm cultivation was carried out. On the one hand according to a modified method based on Hübel (2013) and Dudek (2015) in a beaker glass reactor. On the other hand using microtiter plate biofilm assays according to Stepanovic et al (2000), Wisbauer (2016) and Laufer (2016). Both methods offer a range of variable breeding parameters, which allows the methods to be adapted to a variety of microorganisms. Especially the influence on incubation time and nutrient concentration on the biofilm formation of *L. pneumophila* LP1, *E. coli* K12, *E. faecalis* DSM20478, *S. aureus* DSM346 alongside some *Staphylococcus* isolates, in pure and mixed culture, were investigated within this thesis.

Disinfection experiments carried out with the drinking water isolate JCBK5 in the beaker glass reactor showed that the structure of biofilms caused a protection of the bacteria contained therein from the disinfectant chlorine dioxide. In plankton cultures of the used *Staphylococcus* isolates, significantly higher chlorine dioxide ratios were found. Planktonic cultures with different cell densities showed no inoculum effect. However, within a few days, disinfected biofilms, where a part of the bacteria had survived the disinfection, showed a massive proliferation not only in the biofilm population but also in the formation of a new plankton culture.

With the help of the optimized method of the microtiter plate biofilm assay, the detachment effect of chlorine dioxide, depending on the chlorine dioxide concentration, was evidenced on biofilms of the above-mentioned microorganisms. No significant difference in the removal of live and dried up biofilms could be determined.

1 Einleitung

1.1 Anlass der Forschung

Pflanzliches und tierisches Leben aller Art beruht auf der Grundlage von Wasser. Hygienisch einwandfreies Trinkwasser wird damit zu einer sehr kostbaren Ressource und der freie Zugang zu sauberem Wasser gilt als zentrale Voraussetzung für eine menschenwürdige Existenz (Völkerversammlung der vereinten Nationen, 2010). Daraus ergibt sich eine besondere Bedeutung für die Aufbereitung von Trink- und Brauchwasser sowohl unter chemischer, als auch mikrobiologischer Betrachtung. Mikrobiologische Relevanz besteht dabei besonders in der Erforschung biologischer Vorgänge an Grenzflächen der aquatischen Systeme. Mikroorganismen siedeln sich dort in Form von sogenannten Biofilmen an. Diese Biofilme verursachen vermehrt wirtschaftliche und humanmedizinische Probleme in dem sie Biofouling und Biokorrosion auslösen sowie, durch die Ansiedlung fakultativ pathogener Keime, Infektionsrisiken für den Endverbraucher darstellen (Madigan et al., 2009).

Ein detailliertes Verständnis der Mechanismen, welche dem mikrobiellen Bewuchs von Oberflächen zugrunde liegen, sowie der Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen untereinander und zu den Materialien des durch sie besiedelten umgebenden Systems, kann daher zur Verbesserung von biotechnologischen Prozessen und zur Minderung von gesundheitlichen Risiken genutzt werden. Die Generierung und Untersuchung dieser sehr komplexen und inhomogenen Lebensgemeinschaft „Biofilm“ in Laborversuchen stellt sich dabei allerdings mitunter als kompliziert und wenig authentisch dar. Für die Entfernung natürlich gewachsener Biofilme aus Rohrleitungen sind verschiedene Wartungs- und Aufbereitungsmethoden, insbesondere auch Desinfektionsverfahren gebräuchlich. Die Behandlung von Leitungssystemen mittels Chlordioxid-Lösung als Desinfektionsmittel bewirkt dabei neben der desinfizierenden Wirkung auch die Ablösung von Biofilmen (Roeske, 2006).

In Kooperation mit der Firma a.p.f. Aquasystem AG, dem Labor Dr. Fülling aus Remscheid, sowie dem Gebäudemanagement der Bergischen Universität wurden im Zuge dieser Arbeit, daher Biofilme in verschiedenen Laborversuchen angezogen und die Mortalität von Biofilmbakterien gegenüber Chlordioxid dokumentiert, sowie mikrobiologische Beprobungen

von Trinkwassersystemen durchgeführt und begleitet um die Lebensgemeinschaft „Biofilm“ näher zu untersuchen.

1.2 Trinkwasser

Trinkwasser ist das wichtigste Lebensmittel des Menschen und unterliegt daher auch in vielen Ländern, zum Beispiel in Österreich, Frankreich, den Niederlanden und auch Deutschland, den strengsten Kontrollen im Lebensmittelbereich (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2017). In Deutschland ist die Trinkwasserüberwachung durch die Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) geregelt. Die Bundesregierung hat mit dieser Verordnung die Vorgaben der Trinkwasserrichtlinie der Europäischen Union aus dem Jahr 1998 in nationales Recht umgesetzt. In der Trinkwasserverordnung wird demnach Trinkwasser definiert als „alles Wasser, im ursprünglichen Zustand oder nach Aufbereitung, das zum Trinken, zum Kochen, zur Zubereitung von Speisen und Getränken oder [...] anderen häuslichen Zwecken bestimmt ist.“ (TrinkwV 2001 §3). Dazu zählen auch der Bereich der Körperpflege, sowie die Reinigung von Gegenständen die mit Lebensmittel in Kontakt kommen. In der Trinkwasserverordnung heißt es ferner: „Zweck der Verordnung ist es, die menschliche Gesundheit vor den nachteiligen Einflüssen, die sich aus der Verunreinigung von Wasser ergeben, das für den menschlichen Gebrauch bestimmt ist, durch Gewährleistung seiner Genusstauglichkeit und Reinheit [...] zu schützen.“ (TrinkwV 2001 §1). Diese Erfordernisse gelten als erfüllt, wenn bei der Wassergewinnung, der Aufbereitung und der Verteilung die allgemein anerkannten Regeln der Technik eingehalten werden und das Wasser den Anforderungen der §§ 5 bis 7 der Trinkwasserverordnung entspricht. In § 5 sind dabei die mikrobiologischen Anforderungen und in § 6 die chemischen Anforderungen an Trinkwasser zusammengefasst. Der § 7 beschreibt die Indikatorparameter, deren Grenzwerte nach Anlage 3 eingehalten werden müssen.

1.3 Biofilme in Trinkwassersystemen

Im Allgemeinen wird ein Biofilm als eine Gemeinschaft verschiedener Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Hefen und auch Protozoen bezeichnet, welche in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingelagert und miteinander oder aber auch an Grenzflächen angeheftet sind (Costerton et al., 1995).

Umfangreiche Untersuchungen selbst exotischer Lebensräume wie heiße Quellen, die Antarktis, marine Sedimente oder auch diverse technische Anlagen belegten übereinstimmend das ubiquitäre Vorkommen von Biofilmen in allen wässrigen Systemen, wobei die angesiedelten Mikroorganismen dabei überwiegend harmlos für die menschliche Gesundheit sind. Trotz intensiver Bemühungen im Bereich der Material- und Grenzflächenforschung ist derzeit kein Werkstoff bekannt, der dauerhaft einer Besiedlung widersteht (Kerr et al., 1997). In manchen Lebensräumen scheint die sessile Lebensweise an Grenzflächen sogar von den Organismen bevorzugt zu werden. Typische Beispiele sind dafür meist nährstoffarme Systeme mit hohen Anteilen an Grenzflächen wie geologische Formationen oder auch Wasserleitungssysteme (Götz, 2002). Durch den Kontakt des Trinkwassers mit den Werkstoffen eines wasserführenden Systems kommt es nahezu zwangsläufig zu chemischen, physikalischen und mikrobiellen Änderungen der Wasserbeschaffenheit. Diese Veränderungen zeigen Abhängigkeiten zu den Betriebsbedingungen des Systems, den Inhaltsstoffen des Trinkwassers selbst und den Wechselwirkungen mit den Werkstoffen (VDI/DVGW 6023). Neben der richtigen Dimensionierung und Temperatur des Leitungssystems stellen in erster Linie Kunststoffe ein Problem für die mikrobiologische Wasserqualität da (Höll, 2011). Die Emissionen, zum Beispiel in Form von Weichmachern, bieten Nährstoff für Mikroorganismen und fördern somit deren Vermehrung. Biofilme in Trinkwassersystemen gewinnen mit zunehmender Ausbildung an Hygienerelevanz, da innerhalb der schützenden EPS-Schicht der Biofilme sich auch Krankheitserreger wie Legionellen und Pseudomonaden einnisten und davon ausgehend immer wieder vorbeifließendes Trinkwasser infizieren können. Bei massiver Biofilmbildung kann es außerdem zu Verfärbungen des Wassers, Gas- und Geruchsbildung kommen, was dann als „Biofouling“ bezeichnet wird (Messal, 2008). Die Wasserqualität entspricht dann nicht mehr den Vorgaben der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001 § 1) und die Anlage verliert ihre Betriebsfähigkeit. Daher müssen Kunststoffe und auch andere Materialien den Anforderungen nach DVGW W270 entsprechend, möglichst wenig verwertbare Nährsubstrate abgeben.

Neben den Auswirkungen durch die Mikroorganismen selbst können Biofilme die Korrosion von mineralischen, metallischen und polymeren Werkstoffen beschleunigen. Dieser Prozess wird als "Biokorrosion" bezeichnet und geschätzt für 10-20 % der Korrosionsschäden in Leitungssystemen verantwortlich gemacht. Bei der Biokorrosion wird durch mikrobiellen Abbau von organischen Stoffen eine Vielzahl von Säuren gebildet, sowie durch Oxidations-

und Reduktionsprozesse die Auflösung von Mineralen begünstigt. Die Struktur des Biofilms kann die Biokorrosion dabei verstärken, weil das mechanische Abspülen der reaktiven Substanzen vom Substratum durch das Fließwasser teils massiv gehindert wird. Der Biofilm ersetzt dabei faktisch die Grenzfläche und die Korrosionsbeständigkeit hängt nicht mehr vom umgebenden Medium und dem Leitungsmaterial, sondern von den Eigenschaften des Biofilms ab (Heidemann et al., 2014).

Der Biofilm gewährleistet den Mikroorganismen in erster Hinsicht einen Schutz vor Umwelteinflüssen wie pH- Schwankungen, oder osmotischem oder hydraulischem Stress. Gleichzeitig können durch Sorption in der Biofilmmatrix Nährstoffe angereichert werden. Die Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bildet das Grundgerüst des Biofilms und gibt ihm somit mechanische Stabilität. Außerdem werden die Mikroorganismen durch EPS vor äußeren Einflüssen wie Bioziden oder Desinfektionsmitteln geschützt, verhindern über längere Zeiträume eine Austrocknung der Biofilme bei wasserarmen Bedingungen und fördern die Akkumulation von Nährstoffen aus der flüssigen Phase. In der Matrix werden Diffusionsprozesse behindert und somit der Verlust von extrazellulären Enzymen an die Wasserphase reduziert, wodurch die Effektivität der Nährstoffverwertung gesteigert wird (Flemming, 2000). Neuere Erkenntnisse deuten ferner darauf hin, dass sich die Mikroorganismen im Biofilm über Autoinduktoren, wie Homoserin-Lactone, verständigen und dadurch das An- bzw. Abschalten bestimmter Gene bewirken (Decho, 1999).

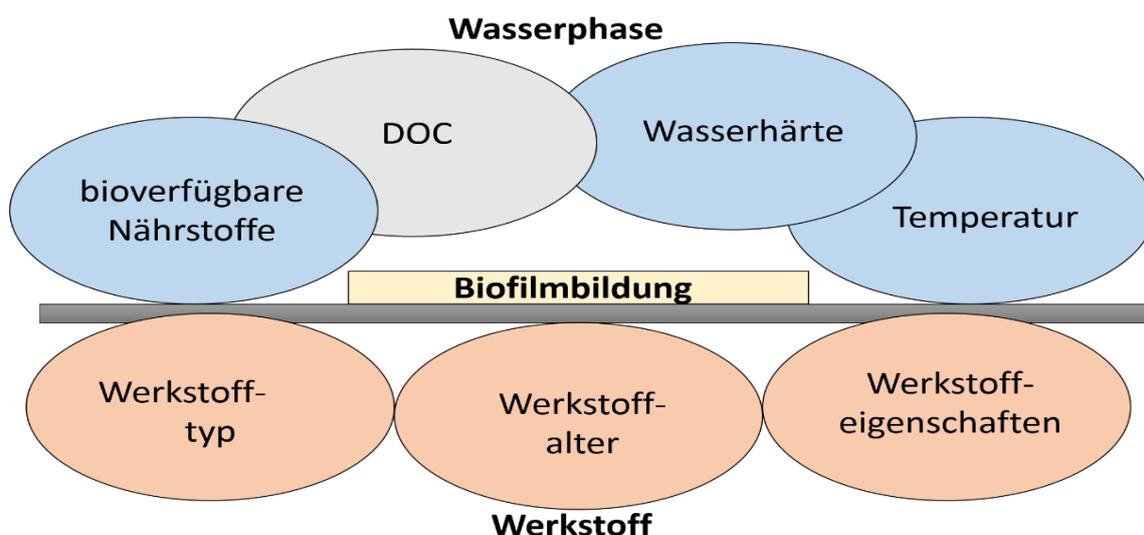


Abbildung 1: Umgebende Einflüsse bei der Biofilmbildung. DOC = dissolved organic carbon/ gelöster organisch gebundener Kohlenstoff (Flemming, 2002).

1.4 Legionellen-Problematik

Die mikrobiologischen Anforderungen an Wasser für den menschlichen Gebrauch nach § 5 der Trinkwasserverordnung geben vor, dass Trinkwasser keine durch Wasser übertragbaren Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nummer 1 des Infektionsschutzgesetzes, in Konzentrationen enthalten darf, die „eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen“ (TrinkwV 2001 § 5). Der § 7 der Trinkwasserverordnung gibt daher einzuhaltende Parameter zur Sicherung der mikrobiologischen Unbedenklichkeit des Trinkwassers vor (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Auszug aus den Anlagen 1 und 3 der Trinkwasserverordnung 2001.

<i>Anlage 1 Teil I Allgemeine Anforderungen an Trinkwasser</i>		
Laufende Nummer	Parameter	Grenzwert
1	<i>Escherichia coli</i>	0/100 mL
2	<i>Enterokokken</i>	0/100 mL
<i>Anlage 1 Teil II Anforderungen an Trinkwasser das zur Abgabe in verschlossenen Behältnissen bestimmt ist</i>		
Laufende Nummer	Parameter	Grenzwert
1	<i>Escherichia coli</i>	0/250 mL
2	Enterokokken	0/250 mL
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250 mL
<i>Anlage 3 Teil II Spezieller Indikatorparameter für Anlagen der Trinkwasser-Installation</i>		
Parameter		Technischer Maßnahmenwert
<i>Legionella sp.</i>		100/ 100 mL

Die in der Trinkwasserverordnung aufgeführten mikrobiologischen Indikatorparameter sind dabei nicht zwangsläufig als pathogen einzustufen. Zwar gibt es von allen mikrobiologischen Indikatoren auch krankheitserregende Stämme, die Parameter *E. coli* und Enterokokken wurden

aber insbesondere als Indikator für mittelbare und unmittelbare fäkale Verunreinigung festgelegt, da sie als natürliche Darmbewohner in großer Zahlen in den Ausscheidungen von Mensch und Tier vorhanden sind. Durch den Nachweis einer fäkalen Verunreinigung über diese Indikatororganismen, ist die Anwesenheit von pathogenen Darmbakterien, wie Salmonellen oder auch Noroviren, nicht mehr auszuschließen, sodass eine Schädigung der menschlichen Gesundheit befürchtet werden muss. Eine direkte Detektion von pathogenen Organismen ist dagegen sehr aufwändig und oftmals durch die massive Überzahl von natürlichen Darmbewohnern wie *E. coli* deutlich erschwert (Umweltbundesamt, 2009). Der aquatische Indikatorparameter *Legionella* sp. zeigt ebenfalls hygienische Mängel in Trinkwassersystemen, wie Undichtigkeiten aber auch unzureichenden Wasseraustausch oder nachteilige Temperaturen im Leitungssystem an. (Roeske, 2006).

Nichtsdestotrotz gibt es Stämme der Indikatororganismen, die Beispiele für Auslöser wasserinduzierter Erkrankungen sind. Als humanpathogene Bakterien sind beispielsweise einige Stämme von *Legionella pneumophila* der Serogruppe I zu nennen, die in der großen Mehrheit der Fälle Auslöser für Erkrankungen sind (Flemming, 2010). Infektiös sind dabei *Legionella*-haltige Aerosole wie sie in Duschen, Klimaanlage oder Whirlpool vorkommen (Schoenen, 2011). Unterschieden werden im Allgemeinen zwei Hauptformen der Legionellose, die Legionärskrankheit und das Pontiak-Fieber. Während die Legionärskrankheit mit einer meist schweren Lungenentzündung einhergeht, verläuft das Pontiak-Fieber mit grippeähnlichen Symptomen, die in der Regel ohne weitere Behandlung binnen weniger Tage abklingen. Neben dem Ausmaß der Wasserkontamination, Art und Umfang der Exposition sowie der Virulenz des jeweiligen Stammes hängt die pathogene Wirkung von Legionellen entscheidend von der gesundheitlichen Konstitution und Immunabwehr der betroffenen Personen ab, wobei alte und Immunabwehr-geschwächte Menschen besonders zu der Risikogruppe zählen (von Baum et al., 2010).

In Leitungssystemen sind Legionellen zumeist in Biofilme oder intrazellulär in Amöben in diesen Biofilmen eingelagert (Höll, 2011). Der prozentuale Anteil liegt nach Büschgens (2015) bei ca. 80 %. Die Beprobung von Leitungssystemen kann allerdings nur über das durchströmende Trinkwasser erfolgen, da die direkte Beprobung der Biofilme technisch nicht möglich ist. Somit können nur ca. 20 % der Legionellen über das Trinkwasser detektiert

werden. Diesen Umstand gilt es also bei der Festlegung von Grenz- und Maßnahmenwerten zu berücksichtigen, damit die erhaltenen Ergebnisse eine authentische Aussage über den Biofilmbewuchs des Systems ermöglichen (Bürschgens, 2015). Nach den Vorgaben der Trinkwasserverordnung wird der technische Maßnahmenwert für *Legionella* sp. gemäß der DIN EN ISO 11731-2:2008 bestimmt. Bei dieser Methode erfolgt die Detektion von Legionellen durch eine Filtration auf einen Cellulosemembranfilter und Kultivierung auf einem geeigneten Nährstoff-Agar, der L-Cystein als essenzielles Wachstumssupplement enthält (z. B. BCYE-Agar). Durch die Behandlung des Filters mit einem Säurepuffer (pH 2,2) wird die Begleitflora reduziert und damit die erhöhte Säuretoleranz der Legionellen ausgenutzt. Dieser Schritt bietet besonders den Vorteil, dass Legionellen eine lange Generationszeit haben und sonst überwachsen werden könnten. Die Kultivierung der Platten nimmt daher auch 10 Tage in Anspruch, was zu einer großen Zeitspanne zwischen Probennahme und vorliegenden Ergebnissen führt.

Werden in einem System *Legionella*-Zahlen detektiert, die den technischen Maßnahmenwert von 100 KBE/ 100 mL Wasserprobe überschreiten, müssen Reduzierungsmaßnahmen eingeleitet werden. Empfohlen werden Spülungen des Systems, oder betroffener Systemteile, bzw. Spülungen in Kombination mit einer thermischen Desinfektion (DVGW W 551). Bei der thermischen Desinfektion handelt es sich um ein physikalisches Desinfektionsverfahren, bei dem das Wasser in dem zu desinfizierenden Leitungssystem soweit aufgeheizt wird, dass eine Temperatur von mindestens 70 °C an den Auslässen des Systems erreicht wird. Diese Temperatur ist an allen Entnahmestellen zu prüfen und bei vollem Spülfluss über mindestens drei Minuten zu halten. Damit Zirkulationssysteme zur Gänze auf die vorgegebene Temperatur aufgeheizt werden können, müssen während der Aufheizphase des Trinkwassererwärmers alle Entnahmestellen geschlossen und die Zirkulationspumpe in Dauerbetrieb geschaltet sein. Erst nach dem Erreichen der vorgegebenen Temperatur in der Zirkulationsleitung kann die Desinfektion der einzelnen Leitungsstränge erfolgen (DWGW W 551). In großen Trinkwassersystemen besteht allerdings oftmals die Problematik, dass durch Wärmeverlust nicht in allen Bereichen des Systems die notwendige Temperatur von 70 °C erreicht wird. Dadurch bedingt ist die Methode sehr energie-, sowie mit steigender Größe des Systems, zunehmend personalaufwändig und nicht immer effektiv und auch eine Depotwirkung zum Schutz vor Wiederverkeimung der Anlage ist dabei nicht gegeben. Bei diesem Verfahren

kommt es außerdem zu teils großen Materialbelastungen der Leitungssysteme und eine Desinfektion ist nur in Warmwasserleitungen möglich (Roeske, 2006).

1.5 Chlordioxid als Desinfektionsmittel

Im Rahmen der chemischen Desinfektion von Wassersystemen finden oftmals Chlorgas, Hypochlorid (Chlorbleichlauge) oder auch immer häufiger Chlordioxid Verwendung. Chlordioxid ist in Wasser gut löslich, wirkt noch stärker oxidierend als Chlor und weist eine massiv biozide Wirkung bei der Wasserdesinfektion auf (McDonell, 2009). Zudem ist „Chlordioxid als einziges Desinfektionsmittel bekannt, welches in der Lage ist, Biofilme abzulösen und krankheitserregende Bakterien in diesen Biofilmen abzutöten“ (Roeske, 2006). Weitere Vorteile von Chlordioxid gegenüber anderen Bioziden wie Chlor, stellt zum Beispiel der flexiblere Einsatz bei höheren pH-Werten ($\text{pH} > 8$) dar. Desinfektionsnebenprodukte wie Trihalogenmethane, chlorierte Furanone und andere halogenierte Stoffe, wie sie bei der Desinfektion mit Chlor entstehen (Grohmann et al., 2011) werden beim Einsatz von Chlordioxid nicht gebildet, wodurch unangenehme Geruchs- und Geschmackstoffe die Wasserqualität nicht beeinflussen (Roeske, 2006).

In den Arbeitsblättern W 224 und W 624 des Deutschen Vereins des Gas- und Wasserfaches (DVGW) sind die Herstellungsverfahren für Chlordioxid im Rahmen der Trinkwasserdesinfektion beschrieben. Unterschieden wird darin zwischen dem Salzsäure-Chlorit- und dem Chlor-Chlorit-Verfahren. Ebenfalls beschrieben wird die Herstellung aus Peroxodisulfat. Die wichtigsten Eckdaten dieser Methoden sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Verfahren zur Herstellung von Chlordioxid.

Herstellungsverfahren	Anmerkung	Reaktion
Chlor-Chlorit-Verfahren	saurer pH < 2 Natriumchlorit im Überschuss	$2 \text{NaClO}_2 + \text{Cl}_2 \rightarrow 2 \text{ClO}_2 + 2 \text{NaCl}$
Salzsäure-Chlorit-Verfahren	Natriumchlorid als Neben- produkt	$5 \text{NaClO}_2 + 4 \text{HCl} \rightarrow 4 \text{ClO}_2 + 5 \text{NaCl} + 2 \text{H}_2\text{O}$
Peroxodisulfat	Natriumsulfat als Neben- produkt	$2 \text{NaClO}_2 + \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 \rightarrow 2 \text{ClO}_2 + 2 \text{Na}_2\text{SO}_4$

Quelle: DVGW Arbeitsblatt W 224 und W 624.

Nachteilig bei diesen Verfahren ist, dass Chlordioxid in solchen Lösungen bisher nicht in ausreichender Reinheit hergestellt werden kann, was innerhalb kurzer Zeit zu einer Umsetzung zu Chlorat und Chlorid führt. Dadurch wird die unmittelbare Herstellung der Desinfektionslösung vor Ort notwendig („point of use“ Herstellung). Die Verfahren nach anerkanntem Stand der Technik setzen die Handhabung von gasförmigen Chlor oder auch von hypochloriger Säure voraus, was ein gesundheitliches Risiko für den Anwender bedeutet (S. Wilhelm, 2008). Außerdem weisen diese Herstellungsverfahren das Problem auf, dass die optimale Umsetzungstemperatur der Reaktionen oberhalb der Raumtemperatur liegt und damit verlängerte Reaktionszeiten entstehen, oder Reaktionsbeschleuniger eingesetzt werden müssen, die dann wieder die Reinheit der Lösung und damit ihre Stabilität herabsetzen (DVGW W 224 und W 624).

Die Firma a.p.f. Aqua System AG hat ein modifiziertes Chlorit-/Persulfat-Verfahren entwickelt bei dem der patentierte a.p.f.-Generator kontinuierlich eine Chlordioxid-Lösung bis zu einer Konzentration von 20 g/L (2 %) herstellt. Diese Lösung ist dabei besonders rein, da weder Katalysatoren noch puffernde Substanzen benötigt werden. „Das im Patent beschriebene Verfahren garantiert eine vollständige Umsetzung des Edukts Chlorit auch in großen Mengen. Dafür wird weder Salzsäure noch Chlor/Hypochlorit benötigt. Die resultierende Lösung trägt

daher in der Anwendung nur vernachlässigbar zur Korrosion bei, und es entstehen keine chlorhaltigen Nebenprodukte (AOX, THM, HAA) aus Chlorüberschüssen.“ (a.p.f. Aqua Systems AG). Durch den Aufbau des Generators und die Auswahl von möglichst reinen Edukten (Natriumchlorit und Natriumperoxodisulfat) wird das Verfahren besonders benutzerfreundlich und sicher. Die entstehende Chlordioxidlösung ist lagerfähig und kann daher sowohl vor Ort, als auch im Vorfeld hergestellt werden (Patent WO2012084247 A1). Eine Vielzahl von Sensoren erlaubt einen vollautomatischen Betrieb des Generators auch über Fernsteuerung, sowie eine frühzeitige Fehlererkennung und Kontrolle über Füllstände und Verbrauch (a.p.f. Aqua Systems AG).

Die Desinfektionsversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden mit 0,6 %igen Chlordioxid-Lösungen durchgeführt, die von der Firma a.p.f. Aquasystems AG zur Verfügung gestellt wurden.

1.6 Mikrotiterplatten-Biofilm-Assay (MBA)

Als einfache Vorläufermethode zum Mikrotiterplatten-Biofilm-Assay ist der sogenannte „Tube Test“ beschrieben (Stepanovic et al., 2000). Dort wird Biofilm an der Innenwand eines Kulturröhrchens generiert, indem der zu untersuchende Stamm in Flüssigkultur in diesem Röhrchen inkubiert wird. Das Kulturmedium wird nach der Bebrütung verworfen und der verbleibende Biofilm ohne weitere Vorbehandlung mit Safranin-Lösung gefärbt. Diese Methode hat den Nachteil, dass sie sehr stark subjektiv geprägt ist, da die Klassifizierung der Biofilme durch optische Vergleiche des Anwenders erfolgt und somit nur eine qualitative Auswertung der Ergebnisse erfolgen kann. Des Weiteren kommt es leicht zu einem Überbefund an Biofilm, da die Abtrennung der planktonischen Kultur lediglich durch Abgießen erfolgt und somit auf dem Biofilm aufliegende planktonische Zellen ebenfalls gefärbt und mitdetektiert werden (Stepanovic et al., 2000).

Eine Weiterentwicklung dieser Methode stellt der Mikrotiterplatten-Test nach Christensen et al. (1985) dar. Bei dieser Methode werden Biofilme in Mikrotiterplatten angezogen und in

einem entsprechenden Reader über ihre optische Dichte quantifiziert. Diese Methode ist Grundlage für eine Vielzahl von weiterführenden Modifizierungen, die die Adhäsion von unterschiedlichsten Mikroorganismen an abiotische Oberflächen untersuchbar machen. Durch die große Zahl von Variationsmöglichkeiten, wie Temperatur, Bebrütungszeit, Nährmedien, oder auch Material der Oberfläche sind die Anwendungsmöglichkeiten weit gefächert. Die Biofilme werden nach diesem Protokoll mit Natriumchlorid-Lösung gewaschen, durch Methanol-Zugabe fixiert und mittels Kristallviolett gefärbt. Diese Färbung kann dann in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 600 nm photometrisch quantifiziert werden (Merritt et al., 2005). Der Waschschrift verbessert die Reproduzierbarkeit der Methode, da so die Reste der planktonischen Kultur von dem Biofilm entfernt werden und erhöht somit natürlich auch die Richtigkeit der Ergebnisse. Die Fixierung der Biofilme sorgt außerdem dafür, dass der Biofilm beim Entfernen von überschüssigem Färbereagenz durch Waschen nicht mit entfernt wird. Als Fixierungsmethoden werden neben der bereits erwähnten Anwendung von Methanol (Christensen et al., 1985) beispielsweise auch thermische Verfahren verwendet (Stepanovic et al., 2000).

Eine der wichtigsten Modifizierungen der Quantifizierung von Biofilmen mittels MBA liefert die Versuchsanordnung von Stepanovic et al. (2000). Nachteilig bei der Methode nach Christensen et al. (1985) ist die gerätebedingte Auswertung des Biofilmwachstums, welche nur durch die Quantifizierung der Biofilme am Boden der Kavernen erfolgt. Viele Stämme bilden aber auch besonders an den Seitenwänden Biofilme aus, teils auch in anderem Ausmaß als am Boden der Kavernen. Um eine repräsentative Quantifizierung des gesamten Biofilms in einem Ansatz zu erhalten, führte Stepanovic et al. (2000) daher einen Ablöseschritt in seine modifizierte Methode ein. Die Ablösung und Homogenisierung der Biofilme in einem definierten Volumen an Lösung erfolgt dabei durch die Zugabe von Essigsäure zu dem gefärbten und getrockneten Biofilm. Die Konzentration der Essigsäure, sowie die Einwirkzeit wurden bei der Methode so gewählt, dass die Materialoberfläche der Kavernen nicht angegriffen wird und es zu keiner Abgabe von Substanzen aus dem Material in die Biofilmsuspension kommt. Die Färbung der Lösung kann dann, aussagekräftig für die jeweilige Kaverne, photometrisch quantifiziert werden. Durch diese Modifikation wird die Aussagekraft der Ergebnisse verbessert und eine geringere Streuung erreicht. Neben dieser Methode zur Ablösung sind außerdem noch einige andere Chemikalien wie Ethanol (95 %), Ethanol in

Kombination mit Aceton (O'Toole et al., 1999) oder DMSO (Danhorn et al., 2004) gebräuchlich.

Übertragen wurde diese Methode durch Wisbauer (2016) in 24-Well-Mikrotiterplatten, um eine Auswertung auch ohne Reader, mittels normalem Photometer, zu ermöglichen. Die abgelöste Biofilmsuspension wird dafür in eine Küvette überführt und bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert. Ebenfalls wurde durch Wisbauer (2016) festgestellt, dass der Einsatz einer „Wetbox“ die Biofilmbildung in 24-Well-Mikrotiterplatten verbesserte. Dafür wurden die Platten während der Bebrütung in einer verschlossenen Plastiktüte mit etwas Wasser (bidestilliert) gelagert. Durch die Generierung dieser wassergesättigten Umgebung wurde die Verdunstung aus den flüssigen Nähransätzen verhindert, sodass es zu keiner Veränderung der Anzuchtbedingungen, wie Nährstoffkonzentration oder gar Austrocknung der Ansätze, kommen kann. Die Platte sollte bei dieser Art der Bebrütung weitestgehend „schwebend“ gelagert werden, damit das Wasser der Wetbox nicht direkt mit der Platte in Kontakt steht und es zu keiner lokalen Beeinflussung von einzelnen Kavernen kommen kann.

Aus den bisherigen Ausführungen lässt sich zusammenfassen, dass die Mikrotiterplatten-Biofilm-Assays eine gute Methode für Biofilmuntersuchungen im Labormaßstab darstellen. Sie erlauben einen großen Probenumsatz und eine Bandbreite von spezifisch variierbaren Parametern. Generell ist das MBA besonders gut geeignet für die Erforschung der frühen Stadien der Biofilmbildung (wenige Stunden bis einige Tage), da es sich um ein geschlossenes System handelt und das vorhandene Nährstoffangebot, sowie die Anhäufung von toxischen Stoffwechselprodukten die limitierenden Faktoren darstellen (Merritt et al., 2005).

1.7 Becherglasreaktor

Reaktoren zur Generierung von Biofilmen sind gebräuchliche Aufbauten, die in nahezu allen Größenmaßstäben Nutzung finden (siehe Abbildung 2). Neben Systemen die unmittelbar in Trinkwasseranlagen eingebaut werden gibt es Reaktoren für die Anzucht von Biofilmen im Labormaßstab, sowie Aufbauten in denen die Biofilme in Rohren oder Schläuchen generiert werden. Gemein haben alle Reaktoren, dass in ihnen Biofilme gezielt erzeugt und dem System

zur weiteren Untersuchung leicht entnommen werden können. Die einzelnen Parameter der Anzucht können dabei, je nach verwendetem Reaktor, mehr oder weniger stark variiert und die Biofilme über Zeitspannen von wenigen Stunden bis hin zu mehreren Jahren angezogen werden.

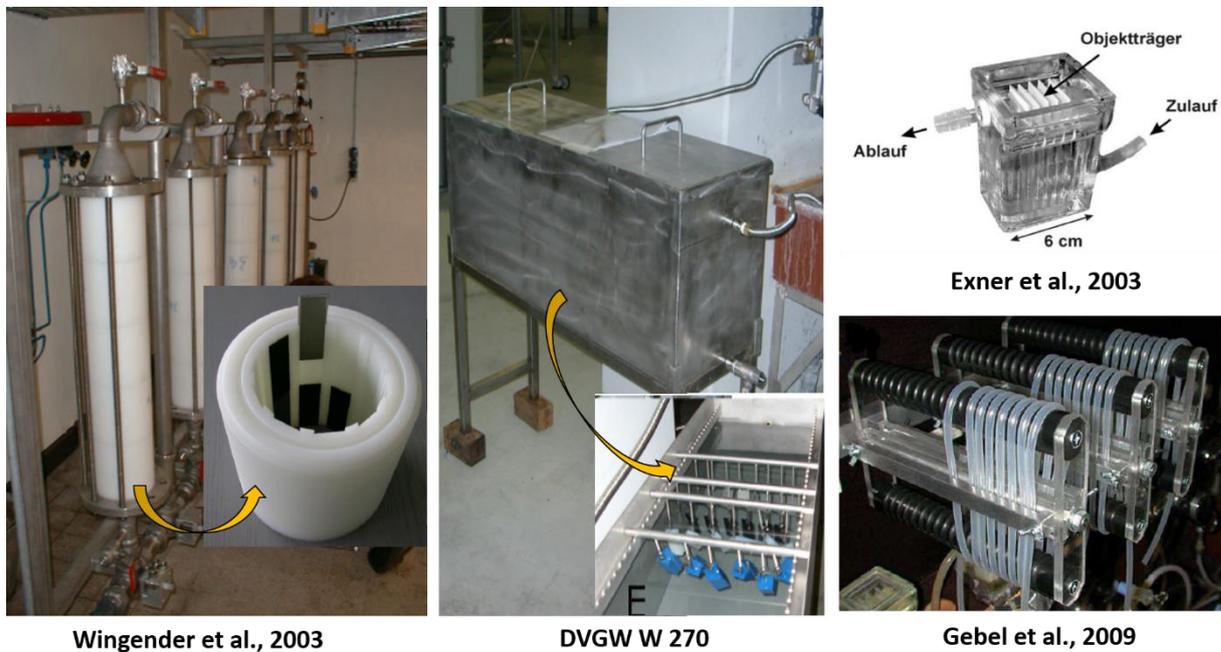


Abbildung 2: Beispiele für Reaktoren zur Anzucht von Biofilmen.

Für die Biofilmbildung in dieser Arbeit wurde ein Becherglasreaktor nach Hübel (2013) verwendet. Die Darstellung eines solchen Becherglasreaktors zeigt die Abbildung 4 unter Material und Methoden 2.2.4.1. Im Wesentlichen ist der Aufbau gekennzeichnet durch Trägereinheiten, die als Substratum (meist aus Glas) für die Biofilmbildung dienen und als senkrechte Flächen in das entsprechende Anzuchtmedium eingebracht werden. Nach Zugabe der Startkultur des zu verwendenden Bakterienstammes wird der Reaktor verschlossen und unter Rühren bebrütet. Die gebildeten Biofilme können durch die verwendeten Hängeklammern bequem und steril entnommen werden. So können verschiedene Stadien der Biofilmbildung in einem Reaktor untersucht werden. Desweiteren bietet dieser Aufbau die Möglichkeit auf Grundlage von sterilem Ausgangsmaterial Biofilme zu generieren und ist wiederverwertbar. Durch Variation der verwendeten Nährmedien, Anzuchtbedingungen und auch Substratum-Materialien ergeben sich viele Anwendungsmöglichkeiten für dieses System (Wisbauer, 2016). Die senkrechte Anordnung der Objektträger setzt dabei ein gewisses Maß an Adhäsionsfähigkeit der verwendeten Bakterien voraus. Sedimentationsprozesse beeinflussen

die Biofilmbildung in diesem System eher nicht. Limitierender Faktor dieser Methode ist dagegen das begrenzte Nährstoffangebot, sowie die Anreicherung von Stoffwechselprodukten, allerdings nur bei längerer Bebrütungszeit. Generell ist aber auch die sterile Überführung der Biofilme in frisches Nährmedium möglich, da das gesamte Gestell an dem die Klammern mit den Trägern befestigt sind, entnommen und in einen neuen Becherglasreaktor überführt werden kann. Damit ist diese Methode nicht nur für Versuche zu frühen Stadien der Biofilmbildung verwendbar, sondern auch für längere Kultivierung.

Die nach dieser Methode generierten Biofilme können für eine Vielzahl von weiterführenden Versuchen verwendet werden. Zum einen können beispielsweise durch die Anzucht auf Glasträgern nahezu unmittelbar Qualifizierungen der Biofilme durch Mikroskopie vorgenommen und somit Aussagen über die Anzahl von Bakterien oder die Struktur im Biofilm getroffen werden (Hübel, 2013). Zum anderen werden Methoden beschrieben mit denen eine Quantifizierung der Biofilme über deren Lebendzellzahl erfolgen kann. Die dafür notwendige Ablösung der Biofilme und die Bildung einer homogenen Biofilmsuspension stellen dabei die Schwierigkeit dar. Dudek (2015) zeigte in verschiedenen Untersuchungen, dass die Kombination aus Abschaben der Biofilme mittels eines Zellschabers und anschließende Behandlung mit Ultraschall den besten Erfolg in Bezug auf Vollständigkeit der Ablösung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse lieferte. Die Intensität der Ultraschallbehandlung ist dabei spezifisch für den verwendeten Bakterienstamm zu wählen, um ein Absterben der Mikroorganismen, oder eine unzureichende Homogenisierung zu vermeiden.

1.8 Zielsetzung dieser Forschung

Die Aufgabenstellung umfasste im Einzelnen die folgenden Untersuchungen:

- ❖ Mikrobiologische Betrachtung des Trinkwassersystems am Campus Griffenberg der Bergischen Universität. Insbesondere Detektion und Quantifizierung von *Legionella* sp.
- ❖ Kritische Betrachtung der DIN EN ISO 11731-2:2008 (Nachweis und Zählung von Legionellen mittels Membranfiltrationsverfahren)
- ❖ Qualifizierung der Biofilmbildung und Quantifizierung der Lebendzellzahlen von Biofilmen im Becherglasreaktor
- ❖ Quantifizierung der Masse von Biofilmen in 24-Well-Mikrotiterplatten
- ❖ Anwendung der Methoden zur Biofilmquantifizierung auf Desinfektionsversuche mit Chlordioxid

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Nährmedien

Die Zusammensetzungen der verwendeten Nährmedien und deren Herstellung sind im Folgenden angegeben. Das jeweilige Trockenmedium wurde dafür in Wasser (bidestilliert) gelöst und die so erhaltene Lösung zur Sterilisation standardmäßig für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Lagerung der sterilen Nährmedien erfolgte möglichst lichtgeschützt bei Temperaturen zwischen 2 °C und 8 °C.

2.1.1.1 Flüssige Nährmedien

2.1.1.1.1 TSB-Medium

Als Universal-Anreicherungsmedium wurde in dieser Arbeit Tryptic Soy Broth (TSB) der Firma Carl Roth GmbH + Co verwendet. Bei diesem Medium handelt es sich um ein nährstoffreiches Medium, welches das Wachstum einer Vielzahl von Mikroorganismen unterstützt, insbesondere von häufig vorkommenden aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien (Marshall, 1993). Die durch den Hersteller angegebene Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Charakterisierung des verwendeten TSB-Mediums.

Herstellerfirma	Carl Roth GmbH + Co	
Zusammensetzung	Pepton aus Casein (Pankreashydrolysat)	17 g/L
	Pepton aus Soja (Papainhydrolysat)	3 g/L
	di-Kaliumhydrogenphosphat	2,5 g/L
	Natriumchlorid	5 g/L
	Glucose-Monohydrat	2,5 g/L
pH-Wert	7,3 ± 0,2	
verwendete Konzentrationen	30,0 g/L	3,0 g/L
	10,0 g/L	1,0 g/L
	5,0 g/L	

2.1.1.1.2 YEB3-Medium

Das nach Stemann, (2015) modifizierte Hefeextrakt-Medium (**Y**est **E**xtract **B**roth) wurde zur Kultivierung von Legionellen verwendet. Das YB3-Medium hatte dabei die in Tabelle 4 angegebene Zusammensetzung. Die hitzeempfindlichen Zusätze wurden dabei nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugesetzt.

Tabelle 4: Charakterisierung des verwendeten YEB3-Mediums.

Zusammensetzung	Hefeextrakt	1 g/L
	Fleischextrakt	5 g/L
	Kaliumhydroxid	1 g/L
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,5 g/L
	Pepton	5 g/L
	Saccharose	5 g/L
Hitzeempfindliche Zusätze	Eisen-Pyrophosphat	0,2 g/L
	ACES-Puffer	0,5 g/L
	α -Ketoglutar säure	0,5 g/L
	Rinderserumalbumin	2,5 g/L
pH-Wert	6,9 \pm 0,2	
verwendete Konzentrationen	100 %	10 %
	75 %	5 %
	50 %	3 %
	25 %	1 %

2.1.1.2 Feste Nährmedien

Die Herstellung von festen Nährmedien erfolgte durch die Zugabe von Agar zu dem jeweiligen Flüssigmedium. Nach dem Autoklavieren wurden die Agar-Medien auf eine Temperatur von ≤ 50 °C abgekühlt, ggf. hitzeempfindliche Zusätze ergänzt und in Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen der Agar-Platten bei Raumtemperatur wurden diese bei 7 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.1.2.1 TSB-Agar

Als festes Nährmedium wurde eine Mischung aus dem unter 2.1.1.11 beschriebenen TSB-Medium in Kombination mit Agar verwendet. Dafür wurden 30 g/L TSB und 15 g/L Agar in Wasser (bidestilliert) gelöst, bzw. suspendiert, autoklaviert und in Petrischalen gegossen.

2.1.1.2.2 BCYE-Agar

Der Buffered Charcoal Yest Extrakt-Agar (BCYE) ist ein selektives Medium zur Isolierung und Kultivierung von Legionella-Spezies (Edelstein, 1981). Die CYE-Agar-Basis wurde dafür suspendiert und autoklaviert und anschließend mit den hitzeempfindlichen Zusätzen (BCYE Growth Supplements, VWR Chemicals) versetzt.

Tabelle 5: Herstellung der BCYE-Agar-Platten laut Herstellerangaben.

Herstellerfirma	Oxoid	
CYE-Agar-Base		
Zusammensetzung	Agar	13 g/L
	Hefeextrakt	10 g/L
	Aktivkohle	2 g/L
Hitzeempfindliche Zusätze (BCYE Growth Supplement der Firma VWR Chemicals)	ACES-Puffer	7,2 g/L
	Kaliumhydroxid	2,8 g/L
	Kalium- α -Ketoglutarat	0,5 g/L
	L-Cystein-HCL x H ₂ O	0,2 g/L
	Eisen-Pyrophosphat	0,125 g/L
pH-Wert	6,9 \pm 0,2	

2.1.1.2.3 R2A-Agar

Bei diesem Medium handelt es sich um ein nährstoffreduziertes Agar-Medium zur Zählung heterotropher Bakterien aus Wasserproben (Reasoner und Geldreich, 1985). Die Zusammensetzung des Nährbodens ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Herstellung der R2A-Agar-Platten laut Herstellerangaben.

Herstellerfirma	Carl Roth GmbH + Co	
Zusammensetzung	Hefeextrakt	0,5 g/L
	Proteosepepton	0,5 g/L
	Glucose	0,5 g/L
	Stärke	0,5 g/L
	di-Kaliumhydrogenphosphat	0,3 g/L
	Magnesiumsulfat	0,024 g/L
	Natriumpyruvat	0,3 g/L
	Agar	15 g/L
pH-Wert	7,2 ± 0,2	

2.1.2 Bakterien

Die Mehrheit der in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen wurde aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Alle genutzten Bakterienstämme sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: verwendete Mikroorganismen.

Bakterium	Herkunft	Risiko- gruppe*	DSM- Nummer
<i>Enterococcus faecalis</i>	Andrewes und Horder, 1906	2	20478
<i>Escherichia coli K12</i>	Castellani und Chalmers, 1919	1	4858
<i>Legionella adeleicensis</i>	Benson et al., 1991	1 +	19888
<i>Legionella pneumophila LP1</i>	Trinkwasserisolat	2	-
<i>Legionella shakespearei</i>	Brenner et al., 1985	1	23087
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rosenbach, 1884	2	346

* Nach der Technischen Regel für Biologische Arbeitsstoffe 466 (TRBA 466)

2.1.3 Geräte

Die genutzten Geräte sind mit Angabe von Hersteller und Model in der Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Model
Autoklav	Geringe Infection Control	HS6606
Analysenwaage	Sortorius AG Göttingen	Typ AC 210S
Brutschrank	Binder	37°C
Bürette	Hirschmann EM Techcolor	25 mL ± 0,03
Feinwaage	Sartorius GmbH	AC 210S
Filtereinheit	Satorius Stedim Biotech	Edelstahl 500 mL
Grobwaage	Sartorius GmbH	1204 C MP
Kühlzentrifuge	Sigma Laboratory Centrifuges	4 K15 ©
Kühlzentrifuge	Sigma Laboratory	Centrifuges 4K15©
Magnetrührer	Janke & Kunkel	IKAMAG RCT und IKA-COMBIMAG RCT
	Heidolph	MR 2002

Gerät	Hersteller	Model
Membranfilter	Whatman	Cellulosenitrat, \varnothing 47 mm, Porengröße 45 μ m
Mikroskopkamera	Motic	Moticam 2300, 3,0 Mpixel
Mikrotiterplatten	Greiner	Bio-one, 24-well-Microplatten, tissue-culture
Multipette	Brand	HandyStep®S
Phasenkontrastmikroskop	Motic	Typ 102M
pH-Elektrode	Mettler Toledo	Inlab® Routine pH
Schüttler	Infors AG	Typ RC 106
Spektrometer	Varian	Cary 50 Bio, UV-Visible Spectrophotometer
Trockenschrank	Memmert	Typ UL 80
Ultraschallsonde	Bandelin electronic	Sonopuls HD60; max. 48 Watt
Vortexer	Janke & Kunkel	Vibrofix VF1 Electronic
Wasserbad	New Brunswick Scientific	Gyrotory Water Bath Shaker G76
Zellschaber	Sarstedt	18 mm, mit abnehmbaren Blatt

2.1.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und daraus hergestellte Lösungen sind in diesem Unterkapitel fortfolgend aufgelistet und mittels Herstellerangaben beschrieben.

2.1.4.1 Allgemein

Tabelle 9: Verwendeten Chemikalien

Chemikalie		Hersteller
ACES-Puffer	PUFFERAN® ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co
Chlordioxid	0,6% wässrige Lösung	a.p.f Aqua Systems AG
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ROTIPURAN® p.a. $C_{10}H_{16}N_2O_8$ M 292,25 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Eisen(III)pyrophosphat	$Fe_4O_{21}P_6$ M 745,21 g/mol	Sigma-Aldrich
L-Cystein	MicroSelect; ≥ 99,5 % (NT) $C_3H_7NO_2S$ M 121,16	Fluka Chemie AG
Essigsäure	ROTIPURAN® 100 % p.a. $C_2H_4O_2$ M 60,05 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Ethanol	96% C_2H_6O M 46,07 g/mol	Kannenware
Fleischextrakt	pulv., für Nährböden Gesamtstickstoff ≥ 10 % Trocknungsverlust ≤ 6 % Asche ≤ 16 %	Carl Roth GmbH + Co

Chemikalie	Hersteller
Hefeextrakt Bacto™ Technischer Hefeextrakt wasserlöslicher Anteil autolyzierter Hefe mit Vitamin-B-Komplex	DIFCO
Glycerin ROTIPURAN® ≥ 99,5 %, p.a., wasserfrei C ₃ H ₈ O ₃ M 92,10 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Kaliumchlorid ≥ 99,5 %, p.a. KCL M 74,56 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Kaliumhydroxid ≥ 85 %, in Schuppen KOH M 56,11 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Kaliumiodid ≥ 99,5 %, p.a., ISO M 166,01 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Kaliumpermanganat Krist. Ph. Eur. M 158,04 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
α-Ketoglutarsäure 98 % C ₅ H ₆ O ₅ M 146,11 g/mol	Alfa Aesar GmbH & Co KG

Chemikalie		Hersteller
Kristallviolett	96 % M 407,98 g/mol	unbekannt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	p.a. MgSO ₄ *7 H ₂ O M 246,48 g/mol	MERCK KGaA
Natriumchlorid Natriumchlorid	99,5% f. analyt. Zwecke NaCl M 58,44 g/mol	Grüssing GmbH
Natriumdodecylsulfat	≥ 99 % für Biochemie NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄ M 288,37 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Natrumthiosulfat-Pentahydrat	> 98,5% Na ₂ S ₂ O ₃ *5H ₂ O M 248,18 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Rinderserumalbumin	≥ 98 %, pulv., bovina Albumin Fraktion V M 69,00 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ M 342,30 g/mol	MERCK KGaA
Schwefelsäure	≥95%, p.a., ISO H ₂ SO ₄ M 98,079 g/mol	Carl Roth GmbH + Co

Chemikalie		Hersteller
Salzsäure	37 %, reinst HCL M 36,46 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
Stärke	löslich zu Analyse	Merck KGaA
Wasserstoffperoxid	≥ 30% p.a., ISO, stabilisiert H ₂ O ₂ M 34,01 g/mol	Carl Roth GmbH + Co

2.1.4.2 Legionellen-Untersuchung nach DIN EN ISO 11731-2:2008

Die Herstellung der benötigten Lösungen für die Membranfiltration von Wasserproben zur Legionellen-Untersuchung, sowie die Zusammensetzung des daraus gemischten Säurepuffers sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Herstellung des Säurepuffers nach DIN EN ISO 11731-2:2008.

Chemikalie ⁹	
Salzsäure (0,2 molar) Lösung A	17,4 mL konzentrierte HCl ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
Kaliumchlorid (0,2 molar) Lösung B	14,9 g konzentrierte HCl ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
Kaliumhydroxid-Lösung (1 molar)	56,1 g ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
Säurepuffer*	3,9 mL Lösung A 25 mL Lösung B pH 2,2 ± 0,2 Einstellung mit KOH

* Kühl und unter Lichtausschluss gelagert ca. 2 bis 3 Wochen haltbar.

2.1.4.3 PCR-Assays zur Charakterisierung von Bakterien-Isolaten

Die verwendeten Chemikalien, Lösungen und Primer für die in dieser Arbeit angewandten PCR-Assays (*Legionella*, *Legionella pneumophila* und 16s-rDNA) und Gelelektrophoresen sind in den fortfolgenden Tabellen (Tabelle 11 und Tabelle 12) zusammengefasst.

Tabelle 11: Chemikalien für PCR-Analysen

Chemikalie		Hersteller
Agarose	NEEO Ultra-Qualität Roti®GAROSE für DNA/RNA- Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co
Ethidiumbromid	10 % (w/v) $C_{21}H_{20}BrN_3$ M 394,29 g/mol	Carl Roth GmbH + Co
50x TAE-Puffer	242 g Trizma®-Base 57,1 mL konz. Essigsäure 100 mL 0,5 M EDTA ad 1000 mL $H_2O_{bidest.}$	selbst hergestellt
1x TAE-Puffer	pH $7,7 \pm 0,1$ 40 mL 50x TAE-Puffer ad 2000 mL $H_2O_{bidest.}$	
10x Loading Buffer	3 mL Glycerin 99,5 % 2 mL 0,5 M EDTA pH 8 1 mL Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10 % 4 mL $H_2O_{bidest.}$	
dNTPs	1,25 mM/dNTP 10 μ L dATP (100 mM) 10 μ L dTTP (100 mM) 10 μ L dCTP (100 mM) 10 μ L dGTP (100 mM) ad 1000 μ L $H_2O_{bidest.}$	Carl Roth GmbH + Co
leichtes Mineralöl	PCR geeignet	Sigma

Chemikalie		Hersteller
	RNase-, Dnase- und Protease-frei	
Tris-HCl-Puffer	2-amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol-hydrochlorid C ₄ H ₁₁ NO ₃ *HCL 10 nM pH 8,5 M 157,56 g/mol	Boehringer Mannheim GmbH
PCR Kit	25 mM MgCl ₂ 10x Puffer "B" <i>Taq</i> -Polymerase 5 units/μL	Bio&Sell
DNA-Leiter	GeneRuler DNA Ladder Mix 0,5 μg/μL	Thermo scientific

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Primer

Bezeichnung	Nucleotidsequenz 5' → 3'	Herkunft
Primer für die Amplifizierung des 16S-rDNA-Gens		
16 SES_1	CATAAAGGAGGTGATCC	
16 SE2	CAGAAAGGAGGTGATCC	Edwards <i>et al.</i> (1989)
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
27 forward	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	
1492 reverse	TACGGTTACCTTGTTACGACTT	Schmidt, pers. Mitteilung
1492 reverse 1	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	
Primer für den spezifischen PCR-Assay für die Gattung <i>Legionella</i>		
Leg F-1	TACCTACCCTTGACATACAGTG	
Leg R-1	CTTCTCCGGTTTGTCAC	Diederer <i>et al.</i> (2007)
Primer für den spezifischen PCR-Assay für die Art <i>Legionella pneumophila</i>		
wl-40987	CTAAAAGATTACGTGAATTG	
Wl-40988	ATATRGTTTCTTGATAGCC	Zhou <i>et al.</i> (2011)

2.1.4.4 Kristallviolett-Färbung

Die Herstellung der Lösungen für die Biofilmquantifizierung mittels Kristallviolett (siehe Methoden 2.2.6.4) wird in der Tabelle 13 beschrieben.

Tabelle 13: Lösungen für die Kristallviolett-Färbung

Chemikalie	
Essigsäure (33%ig)	333 mL konzentrierte Essigsäure ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
Kristallviolett -Lösung (0,1 %ig)	1,0 g Kristallviolett ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}

2.1.4.5 Desinfektionsversuche

Die für die unter Methoden 2.2.7 beschriebenen Desinfektionsversuche benötigten Lösungen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Lösungen der Desinfektionsversuche

Reaktionslösung	
Kaliumiodid-Lösung (5 %ig)	10,0 g ad 200 mL H ₂ O _{bidest.} Messkolben verwenden
Kaliumpermanganat-Maßlösung (0,02 molar)	0,6321 g ad 200 mL H ₂ O _{bidest.} Messkolben verwenden
Stärke-Indikator (1 %ig)	1,0 g lösliche Stärke in heißem H ₂ O _{bidest.} lösen und erkalten lassen. ad 100 mL H ₂ O _{bidest.} Messkolben verwenden

Reaktionslösung	
Schwefelsäure (0,5 molar)	25,00 mL konzentrierte Schwefelsäure ($\geq 95\%$ ig; bzw. ca. 18 molar) tropfenweise zu 10 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ geben. Stark exotherme Reaktion, daher mit Eis kühlen. ad 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (= Verd. 1) 50 mL Verd. 1 ad 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (= Verd. 2) 50 mL Verd. 2 ad 150 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (= 0,5 molar) Messkolben verwenden
Thiosulfat-Maßlösung (0,1 molar)	25 g Natrium-Thiosulfat-Pentahydrat 0,2 g Natriumcarbonat ad 1000 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ Messkolben verwenden

2.2 Methoden

2.2.1 Stammhaltung der Bakterien

Für die Stammhaltung der Bakterien wurden Glycerin-Stocks aus exponentiell wachsenden Bakterienkulturen (Verhältnis 1:2) angelegt und bei -80 °C kryokonserviert. Aus diesen Stocks wurde jede zweite Woche ein neuer Verdünnungsausstrich des jeweiligen Stammes ausgestrichen und als Stammkultur verwendet. Außerdem wurden die Reinkulturen regelmäßig mikroskopisch (400fach, Motoc Phasekontrast) untersucht.

2.2.2 Trübungsmessung

Die Trübungsmessung kann als Bestimmungsmethode für die Zellmasse einer Flüssigkultur verwendet werden. Dafür wurde die Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 546 nm (CARY 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer) vermessen und ggf. mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung soweit verdünnt, dass die optische Dichte (OD) im linearen Bereich des Photometers von 0,1-0,3 lag. Auf diese Art erfolgte unter anderem die Einstellung von verwendeten Vorkulturen.

2.2.3 Lebendzellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von Bakteriensuspensionen wurden Verdünnungsreihen dieser Suspensionen angelegt. Dafür wurden in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen 0,9 mL 0,85%ige NaCl-Lösung vorgelegt und eines dieser Gefäße anschließend mit 0,1 mL der Bakteriensuspension versetzt. Nach gründlichem Mischen wurden aus diesem Tube wiederum 0,1 mL der nun 1:10 verdünnten Suspension entnommen, in ein zweites der vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt und ebenfalls gut gemischt. Dieser Vorgang wurde noch einige Male wiederholt, sodass letztendlich eine dekadische Verdünnungsreihe daraus resultierte. Von den verschiedenen Verdünnungsstufen wurden anschließend jeweils 100 µL auf eine geeignete Agarplatte (TSB, BCYE, etc.) ausplattiert und bebrütet. Durch Auszählung der gewachsenen Kolonien wurde dann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die ursprüngliche

Lebendzellzahl pro Volumen oder Fläche berechnet. Verwendung dafür fanden Platten, deren Koloniezahl zwischen 20 und 250 Kolonien lag und der Fehler durch Koinzidenz möglichst ausgeschlossen werden konnte. Wenn möglich wurde dabei der gewichtete Mittelwert aus mehreren der Verdünnungsstufen, wie in Formel 1 beschrieben, gebildet.

$$LZZ_{Stamm-Lsg.} = \frac{(KBE_{<Genauigk.} + KBE_{>Genauigk.} \times 10)}{11} * Verdünnungsstufe \quad (\text{Formel 1})$$

$LZZ_{Stamm-Lsg.}$ = Lebendzellzahl der zu untersuchenden, unverdünnten Ausgangssuspension pro mL

$KBE_{<Genauigk.}$ = Ausgezählte koloniebildende Einheiten der Platte mit dem wahrscheinlich größeren Fehler

$KBE_{>Genauigk.}$ = Ausgezählte koloniebildende Einheiten der Platte mit dem wahrscheinlich kleineren Fehler

2.2.4 Trinkwasseruntersuchungen

In diesem Unterkapitel sind die Anleitungen für die verschiedenen Versuche zur Isolierung und Quantifizierung von Mikroorganismen in Trinkwasserproben zusammengefasst. Untersucht wurden dabei Proben des Trinkwassernetzes am Campus Griffenberg der Bergischen Universität Wuppertal.

2.2.4.1 Untersuchung auf Legionellen nach DIN EN ISO 11731-2:2008

Gemäß den Vorgaben der Trinkwasserverordnung (DIN EN ISO 19458) wurden die jeweiligen Probenahmestellen zunächst vorbereitet, indem Perlatoren oder Duschschräume entfernt und der Wasserauslass mit einer Desinfektionslösung (70 %iges Ethanol, bzw. Sagrotan©) behandelt wurde. Die Probenahme begann nach einer Einwirkzeit von ca. 30 s. Für die Temperaturerfassung des Trinkwassers zum Zeitpunkt der Probenahme wurde der erste Liter

zunächst in einem Becherglas aufgefangen und die Temperatur gemessen. Die zu untersuchenden Proben wurden direkt im Anschluss in sterilen Laborglasflaschen aufgefangen, dicht verschlossen und beschriftet. Für die Ermittlung der maximalen Temperatur des Trinkwassers im Leitungssystem blieb die Leitung solange geöffnet, bis sich eine konstante Temperatur eingestellt hatte. Die Proben wurden nach der Entnahme schnellstmöglich, spätestens aber nach 24 Stunden weiter bearbeitet. Die Lagerung erfolgte dabei im Kühlschrank bei 4 – 8 °C möglichst lichtarm.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mittels Membranfiltration auf einem Cellulosemembranfilter (Porengröße 0,45µm). Dafür wurde eine autoklavierte Edelstahl-Filtrationseinheit mit Anschluss an eine Vakuumpumpe (siehe Abbildung 1) mit dem Filter bestückt und ein Aliquot (10 bis 100 mL) der zuvor gründlich homogenisierten Trinkwasserprobe darüber abgesaugt und die enthaltenen Mikroorganismen so auf dem Filter fixiert. Für die Abtötung nichtsäuretoleranter Bakterien wurden anschließend 30 ± 5 mL Säurepuffer (siehe Material 2.1.4.2) auf den Filter gegeben und dort für 5 min belassen. Nach dem Absaugen des Puffers und Waschen mit 20 ± 5 mL sterilem Wasser (destilliert) wurde der Membranfilter mit einer sterilen Pinzette mit der Oberseite nach oben auf eine BCYE-Agarplatte gelegt und diese für 10 Tage bei 36 °C in einer Wetbox (verschließbarer Beutel mit Wasserzusatz) mikroaerophil bebrütet.

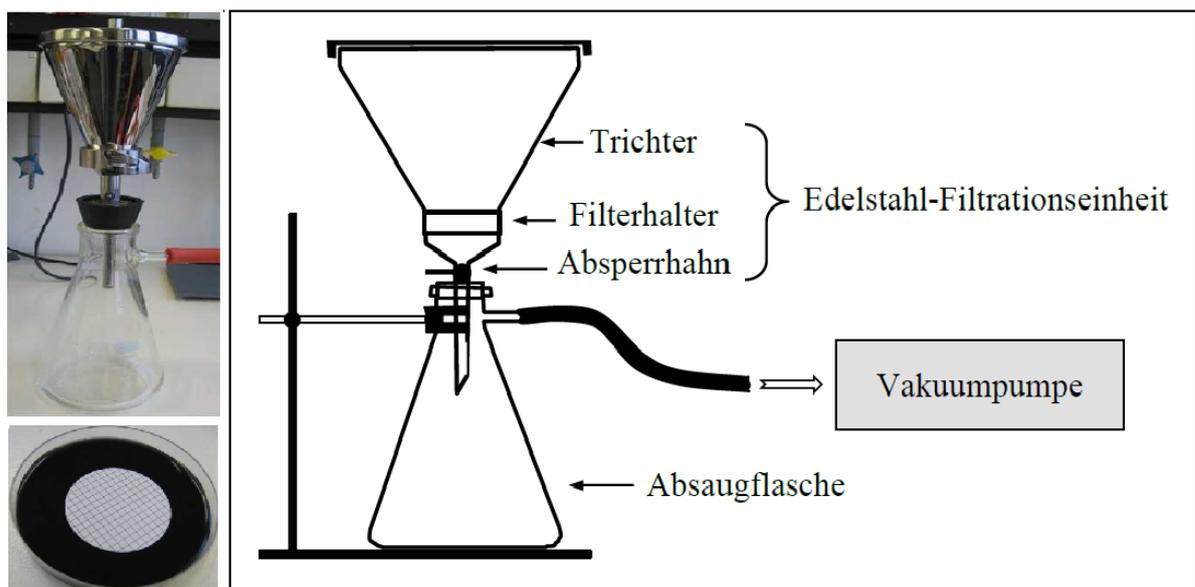


Abbildung 3: Darstellung von Vakuumfiltrationsapparat und BCYE-Agar-Platte mit aufgebrachtem Filter.

Zeigte die untersuchte Probe nach der Inkubation Bakterienwachstum, wurde dieses dokumentiert, die Kolonien gezählt und in Bezug auf die *Legionella*-Verdächtigkeit gemäß den Vorgaben der DIN EN ISO 11731-2:2008 eingeordnet:

„Kolonien von Legionellen auf schwarzen Medien oder schwarzen Membranen sind häufig weiß-grau-blau-purpurn gefärbt, können aber auch braun, pink (rosa), limettengrün oder dunkelrot sein. Sie sind glatt mit ganzem Rand und haben ein charakteristisches milchähnliches Aussehen. [...] Es ist anzumerken, dass neue Spezies von Legionellen Eigenschaften besitzen können, die sich von den oben beschriebenen unterscheiden.“

Wurde eine entsprechende Kolonie als *Legionella*-verdächtig klassifiziert, wurde sie mit einer Impföse steril entnommen und erneut auf eine BCYE-, sowie auf TSB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C bebrütet. Die Kultur auf BCYE-Agar diente dabei zur Konservierung des Isolats und zur Überprüfung, ob es sich um eine Reinkultur handelte. Das Ausbringen auf TSB-Agar diente zur weiteren Analyse der Kolonie. Isolate, die kein Wachstum auf TSB-Agar zeigen sind nach DIN EN ISO 11731-2:2008 als Legionellen identifiziert.

2.2.4.2 Gewinnung von Trinkwasserisolaten

Die in dieser Arbeit für Biofilmversuche verwendeten Trinkwasserisolate, wurden aus dem Trinkwassersystem am Campus Griffenberg der Bergischen Universität gewonnen. Dafür wurde in Raum F.06.74 ein zur Wartung entleerter Warmwassertank beprobt, indem zum einen die Innenwand des Tanks mit sterilen Wattetupfern abgerieben und zum anderen aus dem verbliebenen Bodensatz Aliquote entnommen wurden. Von diesen Aliquoten wurden 100 µL-Einheiten auf verschiedenen Nähr-Agarplatten (TSB-, BCYE- und R2A-Agar) ausplattiert. Die Wattetupfer wurden in 1 mL Natriumchlorid-Lösung (0,85 %ig) feucht gehalten und die isolierten Mikroorganismen, durch Ausstreichen mit dem Tupfer, auf Platten der bereits beschriebenen Medien überführt. Außerdem wurde ein ausgebauter Laborwasserhahn aus H.14.10 mit Wattetupfern analog beprobt und anschließend der Biofilm der Innenwandung mit Glaskügelchen in Natriumchlorid-Lösung abgelöst. Von dieser Biofilmsuspension wurden dann ebenfalls 100 µL-Aliquote auf die verschiedenen Agar-Platten ausgebracht. Die Bebrütung aller angelegten Agar-Platten erfolgte folgend bei 36 °C. Die so kultivierten Kolonien wurden aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung gruppiert, mit

Verdünnungsausstrichen aufgereinigt und aus den gewonnenen Reinkulturen Subkulturen zur Konservierung angelegt. Ebenfalls wurden Glycerinstocks zur Stammhaltung der Isolate (siehe Methoden 2.2.1) angefertigt und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2.1 Grobcharakterisierung

Die Grobcharakterisierung von gewonnenen Isolaten umfasst einige schnell bestimmbare Eigenschaften morphologischer und physiologischer Merkmale, die zur Klassifizierung des Organismus beitragen können. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind fortfolgend aufgeführt.

2.2.4.2.1.1 Makroskopische und mikroskopische Gestalt

Die makroskopische Gestalt von Isolaten wurde durch das Anlegen von Verdünnungsausstrichen und der anschließenden Betrachtung von einzelnen Kolonien bestimmt. Der jeweils verwendete Aufzucht-Agar kann dabei einen Einfluss auf die optische Erscheinung der Kolonien haben und ist deshalb bei den Ergebnissen der Auswertung mit angegeben.

Für die mikroskopische Betrachtung wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Isolats auf einen Objektträger gebracht, leicht in einem Tropfen Natriumchlorid-Lösung (0,85%ig) verrieben, mit einem Deckgläschen überschichtet und bei 400facher Vergrößerung im Motic „Phasenkontrast“ in Bezug auf Zellform, -größe und -beweglichkeit hin untersucht.

2.2.4.2.1.2 Gram-Verhalten

Zur Bestimmung des Gram-Verhaltens wurden ein bis zwei Tropfen 3%ige Kaliumhydroxid-Lösung auf einen Objektträger gegeben und mit einer ausgeglühten Impföse eine Kolonie des zu untersuchenden Isolats darin verrieben. Bei gramnegativen Bakterien kommt es dadurch zu einer Lyse der Zellwand und die DNA wird als schleimiger Faden sichtbar (Mikrobiologisches

Praktikum für Lebensmittelchemiker, Skript 2015). Konnte nach einigen Sekunden eine deutliche Fadenbildung festgestellt werden, wurde das Ergebnis als positiv bewertet und der untersuchte Stamm als grampositiv klassifiziert.

2.2.4.2.1.3 Oxidase-Test

Der Oxidase-Test ist ein einfaches und schnelles biochemisches Verfahren zum Nachweis des Enzyms Cytochrom-*c*-Oxidase in der Atmungskette von Zellen. Dafür wird das Oxidase-Reagenz Tetramethyl-p-phenylendiamin-dihydrochlorid (1 %) auf ein Filterpapier aufgetropft und unverzüglich mit einer ausgeglühten Impföse eine Kolonie des zu untersuchenden Isolats darauf verrieben. Das zunächst farblose Reagenz fungiert dabei als künstlicher Elektronenakzeptor und wird durch die Cytochrom-*c*-Oxidase und Luftsauerstoff zu einem Indophenolkomplex oxidiert. Das positive Ergebnis wird durch die kräftige Blaufärbung dieses Komplexes angezeigt (Mikrobiologisches Praktikum für Lebensmittelchemiker, Skript 2015).

2.2.4.2.1.4 Katalase-Test

Bei der Katalase-Reaktion wandelt das bakterielle Enzym Katalase Wasserstoffperoxid unter sichtbarer Schaumbildung zu Wasser und Sauerstoff um (chem. Mikrobiologie Uni Wuppertal, Skript 2015). Zeigt eine Kolonie in einem Tropfen 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung eine solche Schaumbildung, ist der untersuchte Stamm als Katalase-positiv anzusehen. Dabei ist es wichtig eine möglichst frische Kolonie zu verwenden, da die Katalaseaktivität mit dem Altern der Zellen verloren gehen kann.

2.2.4.2.2 Aufnahme von Wachstumskurven

Aus einer Übernachtskultur des Isolats, bebrütet bei 36 °C in 30 g/L TSB, wurde eine Vorkultur mit einer $OD_{546nm} = 1,0$ hergestellt. 1,0 mL dieser Vorkultur wurden zu 100 mL vortempetriertes TSB-Lösung (10 g/L) gegeben und der Ansatz im Schüttelwasserbad bei 30 °C inkubiert. Im Abstand von jeweils 60 min wurden Proben entnommen (je 1,0 mL) und photometrisch die

Trübung bei 546 nm verfolgt. Bei optischen Dichten $> 0,3$ wurde die Probe entsprechend mit Natriumchlorid-Lösung (0,85%ig) verdünnt.

Die so erhaltenen optischen Dichten, die ein Maß für die Bakterienmasse darstellen, wurden gegen die Zeit aufgetragen und so die Isolat-spezifische Wachstumskurve für die gewählten Bedingungen erhalten. Durch die Logarithmierung der optischen Dichte und Auftragung gegen die Bebrütungszeit wurde der lineare Wachstumsbereich der Kultur bestimmt. Die Steigung in diesem Bereich entspricht der Wachstumsrate μ , aus der die Verdopplungszeit der Kultur berechnet werden kann. Die dafür verwendeten Formeln sind folgend (Formeln 2 und 3) dargestellt.

$$\mu = \frac{\ln(x) - \ln(x_0)}{t - t_0} \quad (\text{Formel 2})$$

μ = Wachstumsrate pro Stunde

x = Bakteriendichte zum Zeitpunkt x

x_0 = Bakteriendichte zum Zeitpunkt $t = 0$

Mit der Wachstumsrate wurde denn die Verdopplungszeit der Bakterienkultur berechnet.

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu[h^{-1}]} \quad (\text{Formel 3})$$

t_d = Verdopplungszeit in Stunden

μ = Wachstumsrate pro Stunde

2.2.4.2.3 PCR-Assays zur Charakterisierung von Trinkwasserisolaten

In der vorliegenden Arbeit kamen drei verschiedene PCR-Methoden zur Anwendung. Es wurden *Legionella*-verdächtige Trinkwasserisolate mittels PCR zunächst auf ihre Zugehörigkeit zur Gattung *Legionella* hin untersucht und bei einem positiven Nachweis zusätzlich eine *Legionella pneumophila* – spezifische PCR durchgeführt (siehe Experimente und Ergebnisse 3.1.1). Außerdem erfolgte bei einigen Isolaten die Amplifizierung des 16S- rDNA-Gens (siehe Experimente und Ergebnisse 3.1.1 und 3.1.2.3) zur taxonomischen Einordnung der isolierten Organismen.

Die Zusammensetzung der PCR – Ansätze ist folgend (Tabelle 15) aufgeführt und erfolgte bei allen PCR-Assays analog. Unterschiede bestanden lediglich in der Wahl der verwendeten Primer und des Thermocycler-Programms. Die verwendeten Reagenzien und Primer sind unter Material 2.1.4.1 aufgelistet, die spezifischen Temperaturprogramme sind fortfolgend (Tabellen 16 bis 18) aufgeführt.

Tabelle 15: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [µL]
Steriles Wasser	30,5
10x Puffer B	5,0
MgCl ₂	3,0
dNTPs	8,0
Primer	je 1,0
<i>Taq</i> -Polimerase	0,5
Template	1,0
Endvolumen	50,0

Die zu untersuchende Kolonie wurde mit Hilfe einer ausgeglühten Impfföse von der Agarplatte abgenommen und in steriler Natriumchlorid-Lösung suspendiert. Anschließend wurde diese Suspension 3 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das so erhaltene Zell-Pellet wurde in 100 µL Tris-HCl-Puffer resuspendiert und als Template für den PCR-Ansatz

eingesetzt. Dieser PCR-Ansatz wurde mit 60 µL sterilem Mineralöl überschichtet und anschließend zur vollständigen Trennung der wässrigen und organischen Phase einige Sekunden bei geringer Drehzahl pro Minute zentrifugiert. Der so vorbereitete PCR-Ansatz wurde im Thermocycler mit dem, der verwendeten Primer spezifischen, Temperaturprogramm (siehe Tabelle 16 bis 18) inkubiert und anschließend bei 10 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Für die gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte wurden Agarosegele unterschiedlichen Gehalts hergestellt. Nach Einwaage der entsprechenden Menge Agarose wurde diese in der entsprechenden Menge 1x TAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen vollständig in Lösung gebracht. Die homogene Agarose-Lösung wurde mit 2 µL Ethidiumbromid-Lösung je 100 mL Agarose-Lösung versetzt und zu einem für die Gelelektrophorese geeignetem Gel gegossen. Das fertige Gel wurde in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten horizontalen Elektrophorese-Kammer platziert. Amplifiziert wurden die Proben als Gemisch aus 1 bis 10 µL des PCR-Ansatzes und 6 bis 8 µL des 5 x Loading Buffers in einer Geltasche des Agarosegels. Zudem wurden, zur Bestimmung der Größe der PCR-Produkte, 6 µL eines geeigneten Größenmarkers (siehe Material 2.1.4.3) in eine weitere Geltasche eingebracht. Zusätzlich wurden 2 µL Ethidiumbromid-Lösung in den in der Elektrophorese-Kammer enthaltenen 1x TAE-Puffer auf Seiten des Minuspols gegeben. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V an die Elektrophorese-Kammer erfolgt die elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte, welche durch das Gel zu der positiv geladenen Elektrode wanderten. Nach Erreichen einer geeigneten Laufstrecke, die etwa $\frac{2}{3}$ der Länge des Gels entsprach, wurde die Elektrophorese durch Abschalten der Spannung angehalten. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte anhand der Fluoreszenz des Ethidiumbromids im UV-Bereich. Mit Hilfe des Gel-Dokumentations-Systems Gerix® 1020 wurde eine Fotografie des Gels im UV-Licht aufgenommen und die amplifizierten PCR-Produkte so sichtbar gemacht.

Die für die Amplifizierung verwendeten Temperaturprogramme variierten je nach verwendeten Primern. Zur Amplifizierung des 16S rDNA-Gens wurden die zu untersuchenden Kolonien, wie zuvor beschrieben, in einen PCR-Ansatz eingesetzt und folgendem Temperaturprogramm im Thermocycler (s. Tabelle 16) unterworfen.

Tabelle 16: Temperaturprogramm zur Amplifizierung des 16s-rDNA-Gens

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	94	10 min	1
Denaturierung	94	30 s	40
Annealing	50	45 s	
Elongation	72	1 min	
finale Elongation	72	7 min	1

Für die anschließende elektrophoretische Trennung wurde ein 1 %iges Agarosegel verwendet. Das erhaltene PCR-Produkt bestand aus rund 800 bis 1500 Basenpaaren.

Die Amplifizierung des 200 Basenpaare langen PCR-Produkts, spezifisch für die Gattung *Legionella*, wurde mit folgendem Temperaturprogramm (Tabelle 17) durchgeführt.

Tabelle 17: Temperaturprogramm für das spezifische PCR-Produkt der Gattung *Legionella*.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 s	35
Annealing	60	1 min	
Elongation	60	1 min	
finale Elongation	60	5min	1

Für die anschließende elektrophoretische Trennung wurde ein 2 %iges Agarosegel verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente der Stamm *L. pneumophila* LP1.

Um das für *Legionella pneumophila* spezifischen PCR-Produkt, bestehend aus 237 Basenpaaren zu erhalten, wurden die zu untersuchenden Kolonien, wie zuvor beschrieben, in einen PCR-Ansatz eingesetzt und folgendem Temperaturprogramm (s. Tabelle 18) unterworfen.

Tabelle 18: Temperaturprogramm des spezifischen PCR-Assays für die Art *Legionella pneumophila*.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 s	35
Annealing	60	1 min	
Elongation	60	1 min	
Denaturierung	95	15 s	35
Annealing	60	1 min	
Elongation	60	1 min	
Denaturierung	95	15 s	35
Annealing	60	1 min	
Elongation	60	1 min	
finale Elongation	60	5min	1

Für die anschließende elektrophoretische Trennung wurde ein 2 %iges Agarosegel verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente der Stamm *L. pneumophila* LP1.

2.2.5 Biofilmanzucht im Becherglasreaktor

Der für die Biofilmbildung verwendete Anzuchtreaktor entsprach dem von Hübel (2013) beschriebenen Aufbau. Die Versuchsdurchführung wurde an einigen Stellen modifiziert und ist in diesem Unterkapitel genau erläutert.

2.2.5.1 Aufbau des Reaktors

Für die Anzucht der Biofilme wurde ein Becherglasreaktor mit dem folgend dargestelltem Aufbau (Abbildung 4) verwendet. In ein 1000 mL Becherglas mit Rührfisch wurde ein Metallgestell gegeben, welches als Einhängvorrichtung für die Aufwuchsflächen der Biofilme diente. Als Bewuchsfläche wurden Glasobjektträger in senkrechter Ausrichtung verwendet. Der Reaktor wurde mit 600 mL Anzuchtmedium befüllt und mit Alufolie verschlossen. Der Rührfisch diente der Durchmischung des Mediums und somit der gleichmäßigen Nährstoff- und Sauerstoffversorgung.

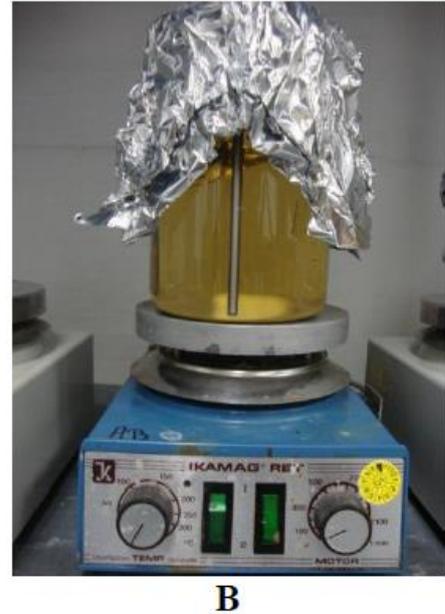
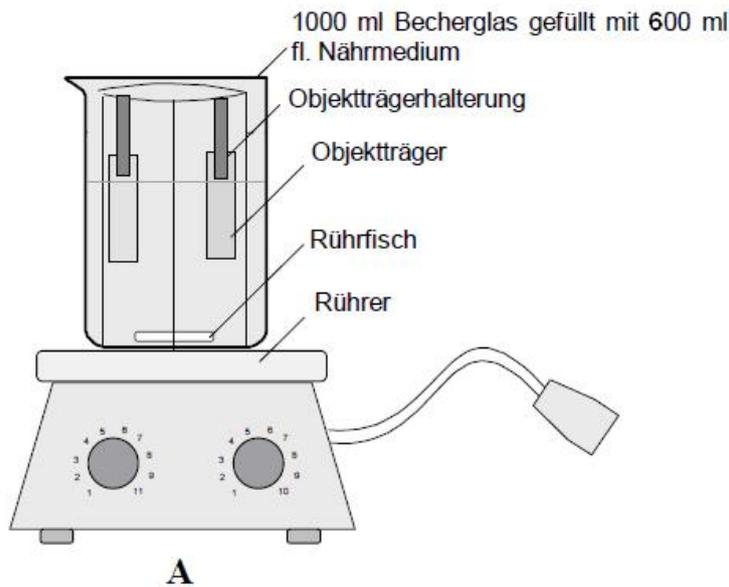


Abbildung 4: Becherglasreaktor zur Anzucht von bakteriellen Biofilmen. Die Starterkultur des Bakteriums wurde auf eine $OD = 1,0$ ($\lambda = 546 \text{ nm}$) eingestellt und je 1 mL Suspension zur Beimpfung der Becherglasreaktoren verwendet. Die Anzucht der Biofilme erfolgte dabei in gering konzentriertem Flüssigmedium über einen Zeitraum von einem bis mehreren Tagen bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Der so erhaltene Biofilm wurde entweder mikroskopisch untersucht (Motic, 400fach, „Phasenkontrast“) oder in 45 mL steriler 0,85%iger NaCl-Lösung mit Hilfe eines Zellkulturschabers (30 sec jede Seite) und anschließender Beschallung mit Ultraschall (1 min, Intensität 80%, kontinuierlicher Betrieb, Ultraschall-Sonde Modell Sonopuls HD60 der Firma Bandelin) abgelöst und die Lebendzellzahl durch Ausplattieren von 0,1 mL der eingeeigneten Suspension (Gesamtvolumen 2 mL) auf TSB-Agar und Bebrütung für 24 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erhalten. **A** = schematische Darstellung des Reaktors mit den einzelnen Komponenten. **B** = Foto des Becherglasreaktors.

2.2.5.2 Anzucht von Biofilmen

Der autoklavierte Becherglasreaktor wurde mit 600 mL Nährmedium (verwendetes Medium und Konzentration variabel) befüllt und anschließend mit 1,00 mL einer eingestellten Vorkultur ($OD = 1$) zum Animpfen zugegeben. Die Inkubation erfolgte dann unter Rühren bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ für einen bis mehrere Tage. Die Biofilmbildung erfolgte dabei auf den Glasoberflächen der Objektträger. Die Größe der Aufwuchsfläche wurde durch die Abmessungen des Reaktors genau definiert (siehe Abbildung 5).

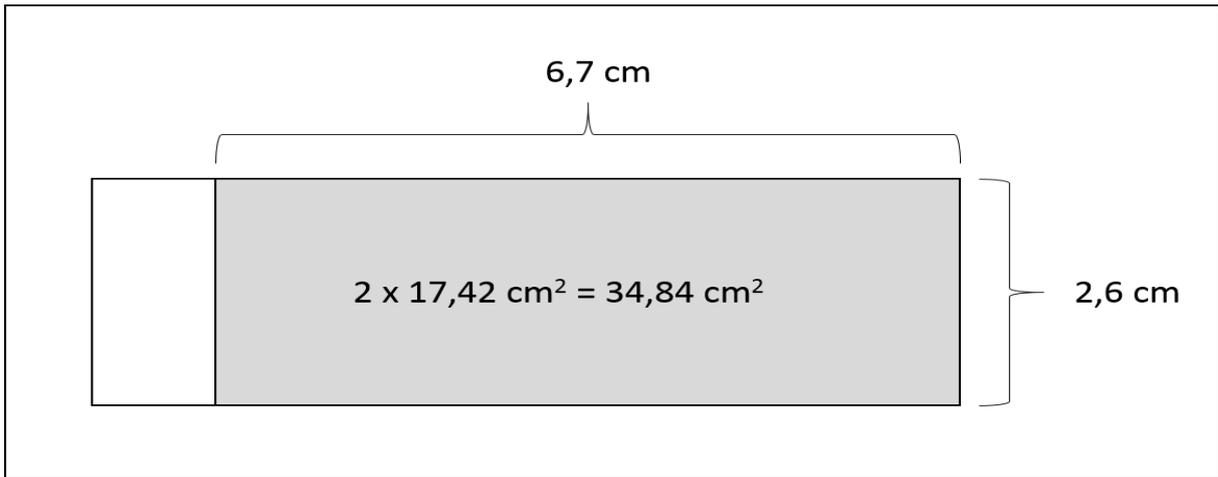


Abbildung 5: Definierte Aufwuchsfläche für die Biofilmbildung im Becherglasreaktor. Der grau unterlegte Bereich stellt die Fläche dar, die in das Nährmedium eintauchte und somit als Aufwuchsfläche zur Verfügung stand. Durch die frei hängende Anordnung der Objektträger standen beide Seiten der Glasoberfläche für die Besiedlung zur Verfügung. Daraus ergab sich eine absolute Aufwuchsfläche von $34,84 \text{ cm}^2$ für die Biofilmbildung.

2.2.5.2.1 Vorbehandlung der Wachstumsoberfläche

Für eine möglichst gleichmäßige Biofilmbildung auf den Wachstumsoberflächen wurden die Objektträger auf verschiedene Weisen vorbehandelt und die erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen. Die verwendeten Varianten sind nachfolgend (Tabelle 19) aufgeführt.

Tabelle 19: Varianten zur Vorbehandlung der Wachstumsoberfläche

Ohne Vorbehandlung	Die Objektträger wurden lediglich mit einem Ledertuch poliert und nicht weiter vorbehandelt.
mit 1%igem SDS vorbehandelt	Die Objektträger wurden für 5 min in einer 1%igen Natriumdodecylsulfat-Lösung gewaschen, danach gründlich mit VE-Wasser abgespült und poliert.
mit Aceton vorbehandelt	Die Objektträger wurden für 5 min in Aceton gewaschen und anschließend in einer Färbekammer vollständig abgedampft.
Superfrost-Objektträger	Bei diesen Objektträgern handelt es sich um Adhäsionsobjektträger der Firma Thermo Scientific aus extra-weißem Glas hergestellt. Die Oberflächen sind laut Herstellerangaben gewaschen und sauber poliert.

2.2.5.3 Quantifizierung mittels Lebendzellzahl

Für die Quantifizierung von Biofilmen im Becherglasreaktor wurde das Isolat JCBK5 verwendet. Die, wie unter Methoden 2.2.5.2 beschrieben, angezogenen Biofilme wurden für 5 min in einem Zentrifugenröhrchen mit 45,0 mL 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, dann in ein weiteres Zentrifugenröhrchen mit der gleichen Befüllung überführt und der Biofilm mit Hilfe eines Zellschabers in Suspension gebracht. Dafür wurden die Seiten des Objektträgers für jeweils 30 sec mit dem Zellschaber behandelt. Der Kopf des Schabers wurde anschließend in die Suspension abgetrennt und der Ansatz homogenisiert.

2.2.5.3.1 Auftrennung von Zellaggregaten durch Ultraschall

Bei dem verwendeten Isolat JCBK5 handelte es sich um Staphylococcen (siehe Experimente und Ergebnisse 3.1.2.3). Diese Organismen bilden traubenförmige Zellaggregate, die bei einer Lebendzellzahlbestimmung einen Minderbefund ergeben. Daher wurde untersucht, wie diese Aggregate mittels Ultraschall aufgetrennt werden können.

Eine Vorkultur des Isolats wurde dafür in 30 g/L TSB-Medium bebrütet und für den Versuch auf eine $OD = 0,2$ ($\lambda = 546$ nm) eingestellt. Die Beschallung mit Ultraschall erfolgte über einen Zeitraum von 1 – 4 min, mit einer Intensität von 80 % in kontinuierlichem Betrieb (Ultraschall-Sonde Modell Sonopuls HD60 der Firma Bandelin). Die Kultur wurde dabei kontinuierlich gekühlt um ein Absterben der Zellen durch Wärmeentwicklung zu verhindern. Die Lebendzellzahl wurde anschließend durch das Anlegen von Verdünnungsreihen und Ausplattieren von 0,1 mL der Suspensionen auf TSB-Agar ermittelt (siehe Methoden 2.2.3). Die Bebrütung erfolgte dafür über 24 Stunden bei 36 °C.

2.2.5.4 Mikroskopische Qualifizierung von Biofilmen

Für die Beurteilung des Biofilmwachstums auf der Wachstumsoberfläche wurde der Objektträger mit dem Biofilm des jeweilig verwendeten Stammes für 5 min in einem

Zentrifugenröhrchen mit 45,0 mL 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, anschließend eine Seite des Trägers mit einem Papiertuch vom Biofilm befreit und die andere Seite mit einem Deckgläschen überschichtet. Die Beurteilung des Biofilms erfolgte dann bei 400facher Vergrößerung im Motic „Phasenkontrast“. Die genaue Klassifizierung der Biofilme ist in Abbildung 22 dargestellt.

2.2.6 Biofilmanzucht in 24-well-Mikrotiterplatten

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Quantifizierung von Biofilmen in 24-well-Mikrotiterplatten mittels Kristallviolett-Färbung basiert auf der Methode nach Stepanovic et al. (2000), modifiziert nach Wisbauer (2016). Die vorgenommenen Abweichungen von dieser Methode sind in diesem Unterkapitel aufgeführt.

2.2.6.1 Anzucht

In die Kavernen des 24-well-Mikrotiterplatten wurden 950 μL Nährmedium vorgelegt und anschließend 20 der Kavernen mit 50 μL Vorkultur ($\text{OD}_{546\text{nm}} = 1$) angeimpft. Die vier übrigen Kavernen dienten als Blindwert der Bestimmung und wurden zunächst nicht weiter behandelt. Die so vorbereitete Platte wurde in einen Autoklavierbeutel überführt, einige mL VE-Wasser zugegeben und die Tüte verschlossen. Die so erhaltene Wetbox wurde anschließend „schwebend“ gelagert, sodass das enthaltene Wasser die Platte nicht berührte (siehe Abb. 6) und, je nach Stamm statisch, oder unter leichtem Schwenken (ca. 65 rpm) inkubiert.

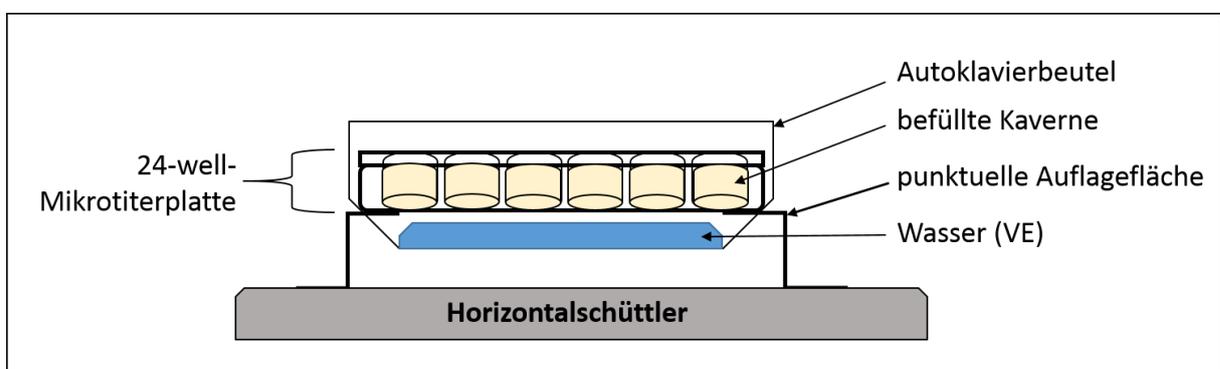


Abbildung 6: Schematischer Aufbau und Positionierung der Wetbox während der Bebrütung (seitliche Ansicht).

2.2.6.2 Quantifizierung mittels Kristallviolett

Nach der Anzucht der Biofilme (siehe wurde die planktonische Kultur aus den Kavernen entfernt und der Biofilm dreimal mit Wasser (bidestilliert) gespült. Die bisher leeren Kavernen wurden zur Leerwertbestimmung analog behandelt. Die Einwirkzeit betrug dabei jeweils 5 min. Anschließend erfolgte eine Hitzefixierung bei 80 °C für 15 min. Die so getrockneten Biofilme wurden nun für 15 min mit 1,0 mL einer Kristallviolett-Lösung (0,1 %ig) überschichtet und anschließend dreimal mit bidest. Wasser gewaschen. Die Einwirkzeit betrug auch hier 5 min je Waschschrift. Die so gefärbten Biofilme wurden nun bei 37 °C komplett getrocknet (ca. 15 bis 25 min) und folgend in 33%iger Essigsäure (2 mL) von der Polystyrol-Oberfläche abgelöst. Diese farbige Lösung wurde zur Quantifizierung des Biofilms photometrisch bei 570 nm vermessen. Ab einer Absorption von 2,0 wurde die Lösung entsprechend verdünnt.

2.2.6.3 Einfluss des Anzuchtmediums auf die Leerwerte

Dieser Versuch wurde zur Methodenoptimierung der unter 2.2.6.2 beschriebenen Biofilmquantifizierung durchgeführt. Eine 24-well-Mikrotiterplatte wurde dafür mit verschiedenen konzentriertem Nährmedium (TSB- oder YEB3-Medium) befüllt und ohne Startkultur eines Bakteriums in einer Wetbox bebrütet. Die Inkubation erfolgte bei den TSB-Lösungen für 24 Stunden bei 28°C und unter leichtem Schwenken (ca. 65 rpm), bei den YEB3-Medien über einen Zeitraum von 72 Stunden bei 36 °C unter statischen Bedingungen. Die Färbung erfolgte dann analog zu der Beschreibung unter Methoden 2.2.6.2.

2.2.6.4 Modifizierung der Hitzefixierung von Biofilmen

In diesem Versuch wurden die unter 2.2.6.2 beschriebene Biofilmquantifizierung und eine abgewandelte Variante miteinander verglichen. Die Variation bestand dabei in einer auf 15 min verkürzten Hitzefixierung bei 80 °C. Durchgeführt wurde der Versuch mit Biofilmen des Isolats JCBK5 nach 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C.

2.2.6.5 Zusammenhang zwischen Absorption und optischer Dichte von Biofilmkulturen

Die Relation zwischen optischer Dichte und Absorption von Biofilmsuspensionen wurde in diesem Versuch am Beispiel des Isolats JCBK5 untersucht. Dafür wurden Biofilme des Stammes in 1 g/L TSB-Medium über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden angezogen und entweder wie unter Methoden 2.2.6.2 beschrieben gefärbt und über die Absorption bei 570 nm quantifiziert, oder aber nach dem Waschen mittels Zellschaber in 0,85%ige Natriumchlorid-Lösung (Volumen 1,0 mL pro Kaverne) abgelöst. Die Kavernen wurden in diesem Fall mit jeweils 1,0 mL der Salzlösung nachgespült und die Spüllösung mit der jeweiligen Biofilmsuspension vereinigt. Die optische Dichte dieser Suspensionen wurde wie unter Methoden 2.2.2 beschrieben photometrisch quantifiziert.

2.2.6.6 Biofilmbildung in Reinkultur

Die Biofilmbildung von Reinkulturen wurde mit den, in der folgenden Tabelle (Tabelle 20) aufgeführten Organismen unter den angegebenen Anzuchtbedingungen, wie unter 2.2.6.2 angegeben untersucht.

Tabelle 20: Anzuchtbedingungen der für die Versuche in 24-well-Mikrotiterplatten verwendeten Stämme.

JCBK5	Bebrütung bei 28 °C unter leichtem Schwenken für 24 bis 72 Stunden.
<i>E. coli</i>	Bebrütung bei 28 °C unter leichtem Schwenken für 24 bis 72 Stunden.
<i>E. faecalis</i>	Bebrütung bei 28 °C unter leichtem Schwenken für 24 bis 72 Stunden.
<i>S. aureus</i>	Bebrütung bei 28 °C unter leichtem Schwenken für 24 bis 72 Stunden.
<i>L. pneumophila</i>	Statische Bebrütung bei 37 °C für 96 bis 144 Stunden.

2.2.6.7 Nekrotrophes Biofilmwachstum von *L. pneumophila* LP1

Zunächst wurde ein Reinkulturbiofilm, wie unter 2.2.6.1 beschrieben, angezogen und hitzefixiert (alle Kavernen animpfen). Danach wurde die planktonische Kultur in den Kavernen verworfen, der Biofilm dreimal mit Nährmedium gespült und anschließend bei 80 °C für 15 min getrocknet. Die so vorbereitete Platte wurde erneut mit sterilem YEB3-Nährmedium (950 µL) bestückt und mit 1,0 mL einer Vorkultur von *L. pneumophila* angeimpft (OD = 1; 50 µL.). An diese Stelle wurden nun vier Kavernen zur Ermittlung des Leerwerts zwar mit Medium gefüllt, aber das Animpfen ausgespart.

2.2.6.8 Quantifizierung mittels Lebendzellzahlbestimmung

Biofilme des Isolats JCBK5 wurden in 1 g/L TSB-Medium bei 28 °C generiert. Nach der Anzucht der Biofilme (siehe 2.2.6.1) wurde die planktonische Kultur verworfen und die Kavernen dreimal mit sterilem Nährmedium (1 g/L TSB) gespült. Anschließend wurden jeweils 1,0 mL 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung in die Kavernen vorgelegt und die Biofilme mit einem Zellschaber von dem Boden der Kaverne entfernt (je 30 sec.). Der abgelöste Biofilm, sowie der Kopf des Zellschabers wurden in ein steriles Reagenzglas überführt, die Kaverne mit einem weiteren mL Salzlösung gespült und jener mit der Biofilmsuspension vereint. Der so erhaltene suspendierte Biofilm wurde gekühlt und zur Homogenisierung einer Ultraschallbehandlung unterzogen (1 min; 80 % Intensität). Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte dann durch die Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe, ausplattieren von jeweils 100 µL auf einem geeigneten Nährstoff-Agar und anschließende Bebrütung bei 36 °C (siehe Methoden 2.2.3).

2.2.7 Desinfektionsversuche

Für die Desinfektionsversuche wurden Chlordioxid-Lösungen mit einem Chlordioxidgehalt von 0,6 % (entspricht 6 g/L, bzw. 90 mmol/L) durch die Firma a.p.f. Aqua Systems AG zur Verfügung gestellt. Da Chlordioxid in wässrigen Lösungen sehr flüchtig, sowie lichtempfindlich ist (Roeske, 2006), wurden die Vorratsflaschen stets gut verschlossen und

lichtgeschützt gelagert. Trotz dieser Maßnahmen wurde vor jeder Nutzung eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

2.2.7.1 Konzentrationsbestimmung von Wasserstoffperoxid

Eine 30 %ige (8,8 mol/L) Wasserstoffperoxid-Lösung wurde mit Wasser (bidestilliert) soweit verdünnt, bis die gemessene Extinktion eine Größenordnung von 0,3 nicht übertraf. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 240 nm. Die Berechnung der Wasserstoffperoxid-Konzentration dieser Stammlösung gelang mit der folgenden Formel.

$$c(H_2O_2) = \frac{E_{\lambda=240}}{\varepsilon \times d} \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad (\text{Formel 4})$$

$c(H_2O_2)$	Wasserstoffperoxid-Konzentration in mol/L
E	Extinktion
λ	Wellenlänge = 240 nm
ε	molarer Extinktionskoeffizient = 43,6
d	Schichtdicke der Küvette = 1 cm

2.2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Chlordioxid

Trotz lichtgeschützter Lagerung nahm die Konzentration dieser Chlordioxid-Stammlösungen mit der Zeit stetig ab. Daher wurde unmittelbar vor jedem Versuch eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und deren Herstellung sind in Tabelle 14 aufgeführt.

2.2.7.2.1 Iodometrische Titration

Die maßanalytische Methode der iodometrischen Titration eignet sich zur Konzentrationsbestimmung von Oxidations- sowie Reduktionsmitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wird diese zur Konzentrationsbestimmung der verwendeten Chlordioxid-Lösung

herangezogen. Konzentrationen von Oxidationsmitteln, zu denen auch das Chlordioxid gehört, werden bei dieser Methode in saurem Medium mit Hilfe eines Iodid-Überschusses bestimmt. Durch seine Oxidationswirkung wird dabei das Chlordioxid reduziert und dadurch die, der Konzentration des Chlordioxids, äquivalente Menge an elementarem Iod freigesetzt. Durch eine anschließende Rücktitration mit einer Thiosulfat-Maßlösung wird das entstandene Iod wieder zu Iodid umgesetzt und so die genaue Menge an entstandenem Iod erfasst (Schulze, 2003).

Für den Reaktionsansatz wurden in einem Erlenmeyerkolben 100 mL Wasser (bidestilliert) mit 5,00 mL Kaliumiodid-Lösung (5%ig) und 2 mL Schwefelsäure (0,5 mol/L) vorgelegt und 1,00 mL Chlordioxid zugegeben. Unter Rühren wurde der braunefärbte Ansatz unverzüglich mit 0,1 mol/L Thiosulfat-Maßlösung titriert und kurz vor Entfärbung einige Tropfen Stärkeindikator zugeben, was die Lösung durch Bildung eines Iod-Stärke-Komplexes blau färbte. Der Äquivalenzpunkt wurde durch Entfärbung der Lösung von blau zu farblos angezeigt.

Da die Genauigkeit der Methode maßgeblich durch die Konzentration der Thiosulfat-Lösung bestimmt wird, wurde deren Titer mit Hilfe einer, zu der 0,1 molaren Thiosulfat-Lösung äquivalenten, Kaliumpermanganat-Lösung (0,02 mol/L), nach folgender Formel (Formel 5) bestimmt.

$$Titer(S_2O_3^{2-}) = \frac{V(KMnO_4)}{V(S_2O_3^{2-})} \quad \text{(Formel 5)}$$

$Titer(S_2O_3^{2-})$	Titer der Thiosulfat-Maßlösung
$V(KMnO_4)$	Volumen der Kaliumpermanganat-Lösung in mL
$V(S_2O_3^{2-})$	Verbrauchtes Volumen an Thiosulfat-Lösung in mL

Aus dem Verbrauch an Thiosulfat und unter Berücksichtigung des stöchiometrischen Verhältnisses der Reaktion, sowie des Titors, lässt sich dann die eingesetzte Konzentration des Chlordioxids nach folgender Formel (Formel 6) berechnen.

$$c(\text{ClO}_2) = \frac{c(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times \text{Titer}(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})}{\text{stöchiometrischer Faktor} \times V(\text{ClO}_2)} \quad (\text{Formel 6})$$

$c(\text{ClO}_2)$	Konzentration an Chlordioxid in mol/L
$c(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$	Konzentration der Thiosulfat-Maßlösung in mol/L
$\text{Titer}(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$	Titer der Thiosulfat-Maßlösung
$V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$	Volumen der Thiosulfat-Maßlösung in mL
<i>stöchiom. Faktor</i>	Stöchiometrischer Faktor der Reaktion = 5
$V(\text{ClO}_2)$	Volumen der eingesetzten Chlordioxid-Lösung in mL

2.2.7.2.2 Photometrische Quantifizierung

Die Chlordioxid-Lösung wurde mit Wasser (bidestilliert) soweit verdünnt, bis die gemessene Extinktion eine Größenordnung von 0,3 nicht übertraf. Die photometrische Messung erfolgte dann unverzüglich bei einer Wellenlänge von 359 nm. Die Berechnung der Chlordioxid-Konzentration dieser Stammlösung wurde dann mit der folgenden Formel (Nr. 7) durchgeführt.

$$c(\text{ClO}_2) = \frac{E_{\lambda=359 \text{ nm}}}{\varepsilon \times d} \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad (\text{Formel 7})$$

$c(\text{ClO}_2)$	Chlordioxid-Konzentration in mol/L
E	Extinktion
λ	Wellenlänge = 359 nm
ε	Extinktionskoeffizient = 43,6
d	Schichtdicke der Küvette = 1 cm

2.2.7.3 Auftrennung von Zellaggregaten

Eine JCBK5-Vorkultur wurde einmal mit Natriumchlorid-Lösung (0,85 %ig) gewaschen, abzentrifugiert (5500 rpm, 5 min) und anschließend 50,0 mL einer Suspension mit $OD_{546nm} = 0,2$ daraus hergestellt. Von dieser Suspension wurden zunächst drei Aliquote von 10,0 mL Volumen in sterile Einwegreagenzgläser aufgeteilt. Zu diesen Ansätzen wurde im Versuchsverlauf jeweils 10,0 mL Chlordioxid-Lösung verschiedener Konzentrationen gegeben. Die restlichen 20,0 mL wurden mit dem gleichen Volumen an Natriumchlorid-Lösung verdünnt und die so erhaltene Suspension in zwei 20 mL-Aliquote aufgeteilt. Diese Ansätze wurden im weiteren Versuch entweder unbehandelt als Nullprobe verwendet, oder mit Ultraschall behandelt. Die Reaktionsansätze wurden während des Versuchs kühl, dunkel und verschlossen gelagert. Die Desinfektion wurde nach 30 min Einwirkzeit durch die Zugabe von jeweils 1,0 mL Thiosulfat-Lösung (30 mg/mL) gestoppt. Die jeweilige Anzahl an koloniebildenden Einheiten wurde durch Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe, anschließendem Ausplattieren auf TSB und Bebrütung bei 37 °C ermittelt (siehe Methoden 2.2.3). Der Versuchsablauf ist in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

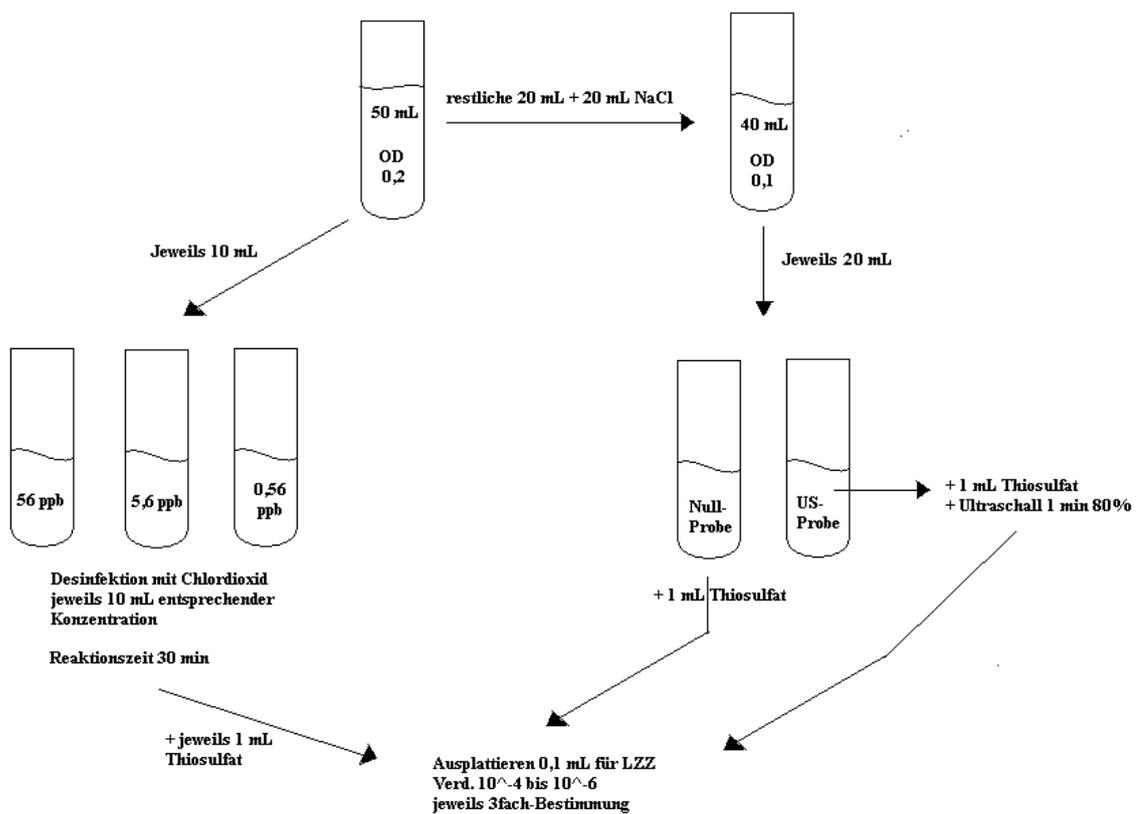


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchs zur Aggregatauftrennung mit Chlordioxid.

Nullprobe = Bakteriensuspension ohne weitere Behandlung; **US-Probe** = Die Bakteriensuspension wurde mit Ultraschall behandelt.

2.2.7.4 Ablösung von Biofilmen

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt um zu überprüfen, ob Chlordioxid Biofilme ablöst.

2.2.7.4.1 Qualitative Ablösung im Becherglasreaktor

Im Becherglasreaktor wurden JCBK5-Biofilme angezogen, indem 1 g/L TSB- Medium in den Reaktor vorgelegt wurde. Die Anzucht erfolgte im Weiteren wie unter 2.2.5.2 beschrieben. Die Bebrütungszeit betrug 24 Stunden bei 28 °C. Die so erhaltenen Biofilme wurden in Zentrifugenröhrchen mit 45 mL 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung für 5 min gewaschen und dann in 45 mL Chlordioxid-Lösung (5 mg/L, 10 mg/, 20 mg/L, 40 mg/L und 60 mg/L) für 10 min desinfiziert. Der Versuch wurde außerdem mit Wasserstoffperoxid als Desinfektionsmittel durchgeführt. Verwendet wurden dabei die gleichen Konzentrationen wie bei der Chlordioxid-Versuchsreihe, die Desinfektionszeit betrug auch hier 10 min. Gestoppt wurde die Desinfektion durch die Überführung in 45 mL Thiosulfat-Lösung (300 mg/L) gestoppt. Für den Vergleichswert ohne Desinfektion wurde ein bewachsener Objektträger analog behandelt, nur wurde statt Desinfektions-Lösung ein weiteres Mal Natriumchlorid-Lösung verwendet. Der Grad der Ablösung wurde mikroskopisch bei einer 400fachen Vergrößerung im Motic „Phasenkontrast“ untersucht und wie in der Abbildung 22 beschrieben kategorisiert.

2.2.7.4.2 Quantifizierung mittels Kristallviolett

In der 24-well-Multiplatte wurden Reinkulturbiofilme verschiedener Stämme gemäß der Anleitung unter 2.2.6.1 angezogen. Die verwendeten Mikroorganismen und die genauen Anzuchtbedingungen sind in der nachstehenden Tabelle 21 einsehbar. Die so erhaltenen Biofilme wurden dreimal mit 2,0 mL bidest. Wasser gewaschen, anschließend mit Chlordioxid-Lösung (2,0 mL) der angegebenen Konzentrationen überschichtet und für 10 min zur Reaktion gebracht. Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wurden die Desinfektions-Lösungen verworfen und

die Reaktion durch Zugabe von Thiosulfat-Lösung (2,0 mL; 300 mg/L) gestoppt. Für die Quantifizierung des Biofilms ohne Desinfektion wurde der Desinfektionsschritt bei einigen Kavernen durch eine weitere Behandlung mit destilliertem Wasser ersetzt. Die Absorption dieser Biofilme diente bei der Auswertung als 100 % Wert für die Biofilmquantifizierung. Alle Biofilme wurden im nächsten Versuchsteil einer Hitzeinaktivierung bei 80 °C (15 min) und anschließend einem Färbeschritt mit Kristallviolett-Lösung, unterzogen. Nachzulesen ist das genaue Vorgehen unter 2.2.6.2.

Tabelle 21: Anzuchtbedingungen der verwendeten Mikroorganismen für den Desinfektionsversuch in 24- well-Mikrotiterplatten.

JCBK5	Vorkultur → OD _{546nm} = 0,2 - 0,5 Bebrütung bei 28 °C unter leichtem Schwenken für 24 Stunden in 1 g/L TSB-Lösung.
<i>E. coli</i>	Vorkultur → OD _{546nm} = 0,5 Bebrütung bei 28 °C unter leichtem Schwenken für 24 Stunden in 1 g/L TSB-Lösung.
<i>E. faecalis</i>	Vorkultur → OD _{546nm} = 0,5 Bebrütung bei 28 °C unter leichtem Schwenken für 24 Stunden in 5 g/L TSB-Lösung.
<i>S. aureus</i>	Vorkultur → OD _{546nm} = 1,0 Bebrütung bei 28 °C unter leichtem Schwenken für 24 Stunden in 5 g/L TSB-Lösung.
<i>L. pneumophila</i>	Vorkultur → OD _{546nm} = 0,5 Statische Bebrütung bei 37 °C für 120 Stunden in 25 % YEB-Lösung.

2.2.7.5 Desinfektionswirkung im Becherglasreaktor

Die Desinfektionsversuche im Becherglasreaktor wurden mit Reinkulturen des Isolats JCBK5 durchgeführt. Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor in TSB-Medium (1 g/L) binnen 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C, gemäß den Ausführungen in Material und Methoden 2.2.5.2 angezogen. Die bewachsenen Objektträger wurden im ersten Schritt, mit dem Anzuchtgestell in ein neues Becherglas mit sterilem Leitungswasser überführt und dort für 5 min gewaschen, anschließend durch eine weitere Überführung des Gestells in ein Becherglas mit Chlordioxid-Lösung (60 mg/L) für eine genau festgelegte Reaktionszeit desinfiziert und die Desinfektion

durch das Umsetzen des Gestells in eine Thiosulfat-Lösung (300 mg/L) gestoppt. Die Restkonzentration des Chlordioxids wurde unmittelbar nach Entnahme des Anzuchtgestells, photometrisch wie unter 2.2.7.2.2 angegeben bestimmt. Dafür erfolgte zunächst eine Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation (1 min, 13000 rpm). Nach dem Desinfektionsschritt wurden einige der Biofilme in frisches Nährmedium (1g/L TSB) überführt und für weitere 24 bis 96 Stunden bei 28 °C bebrütet. Während des Versuchs wurden Biofilme zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und beprobt. Die Klassifizierung dieser Proben wird in der Tabelle 22 genauer erläutert. Die Bestimmung der Lebendzellzahlen der Proben erfolgte gemäß den Ausführungen unter 2.2.3. Als Vergleichswert wurden die Biofilme eines Reaktors nicht desinfiziert und stattdessen in Natriumchlorid-Lösung (0,85 %ig) gegeben, die restliche Versuchsdurchführung erfolgte analog. Eine schematische Darstellung der Versuchsdurchführung ist unter Experimente und Ergebnisse in Abbildung 48 einzusehen.

Tabelle 22: Probennahmen im Desinfektionsversuch

PI	Die Probennahme erfolgte nach dem Waschschrift. Die so erhaltene Lebendzellzahl wird als Ausgangswert für die Biofilmquantifizierung ohne Desinfektion herangezogen.
PII	Die Probennahme erfolgte nach dem Neutralisationsbad und spiegelt den Anteil des Biofilms wieder, der die Desinfektion unmittelbar überlebt hat.
PIII	Die Probennahme erfolgte 24 Stunden nach der Überführung des desinfizierten Biofilms in frisches Anzuchtmedium.
PIV	Die Probennahme erfolgte 48 Stunden nach der Überführung des desinfizierten Biofilms in frisches Anzuchtmedium.
PV	Die Probennahme erfolgte 72 Stunden nach der Überführung des desinfizierten Biofilms in frisches Anzuchtmedium.
PVI	Die Probennahme erfolgte 96 Stunden nach der Überführung des desinfizierten Biofilms in frisches Anzuchtmedium.

2.2.7.5.1 Chlordioxidverbrauch durch Nährmedien

Um die Zehrung von Chlordioxid-Lösungen durch die Reduktion mit Nährmedien-Bestandteilen zu untersuchen wurde aus einer TSB-Lösung (10 g/ L) eine Verdünnungsreihe mit geringen TSB-Anteilen (1,0 bis 0,1 g/ L) in sterilem Wasser (bidestilliert) angelegt. Als Vergleichs-Ansätze wurden 0,85 % ige Natriumchlorid-Lösung, bzw. Wassers (bidestilliert) verwendet. Die Probenansätze hatten dabei jeweils ein Volumen von 10,0 mL, von dem 1,0 mL entnommen und zur Bestimmung des Leerwertes verwendet wurde. Zu den restlichen 9,0 mL wurde dann 1,0 mL Chlordioxid-Lösung (220 mg/L) gegeben, sodass eine effektive Konzentration von 22 mg/ L Chlordioxid in den Probenansätzen generiert wurde. Die Proben wurden unmittelbar nach der Zugabe von Chlordioxid gründlich homogenisiert und 1,0 mL des Gemischs in eine verschließbare Küvette überführt und bei einer Wellenlänge von 359 nm vermessen. Aus den ermittelten Absorptionen, die über einen Zeitraum von 20 min alle 60 sec abgelesen wurden, erfolgte die Berechnung der Chlordioxid-Konzentrationen wie unter Methoden 2.2.7.2.2 beschrieben.

2.2.7.5.2 Abhängigkeit von der Einwirkzeit

Um die Desinfektionswirkung von Chlordioxid-Lösung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit zu untersuchen wurde der Desinfektionsversuch im Becherglas wie zuvor beschrieben (siehe 2.2.7.5) durchgeführt und die Desinfektionszeit dabei auf 10 min, bzw. auf 20 min festgelegt. Verwendet wurden dafür Biofilme des Isolats JCBK5. Als Vergleich wurde ein Versuchsdurchgang statt mit Desinfektionslösung mit Natriumchlorid-Lösung behandelt. Die Desinfektion wurde durch Zugabe von 1,0 mL Thiosulfat-Lösung (300 mg/L) beendet. Die Quantifizierung erfolgte durch Ablösung der Biofilme und Lebendzellzahlbestimmung auf TSB-Agar nach Bebrütung bei 36 °C gemäß Methoden 2.2.5.3 und 2.2.3. Zu den gleichen Zeitpunkten wurden ebenfalls die planktonischen Kulturen des jeweiligen Becherglasreaktors beprobt und deren Lebendzellzahlen pro mL bestimmt (Methoden 2.2.3).

2.2.7.5.3 Wachstumsparameter abgelöster Biofilme

Für diesen Versuch wurde ein JCBK5-Biofilm wie unter 2.2.5.2 beschrieben im Becherglasreaktor angezogen. Das Becherglas wurde dafür mit 1g/L TSB befüllt und bei 28 °C für 24 Stunden bebrütete. Die Objektträger wurden anschließend entnommen und wie unter 2.2.7.5 beschrieben, mit 60 mg/L Chlordioxid desinfiziert. Die Einwirkzeit der Desinfektionslösung betrug dabei 10 min, bzw. 20 min. Außerdem wurde ein Kontrollansatz mitgeführt, der nicht desinfiziert aber ansonsten gleich behandelt wurde. Nach Beendigung der Desinfektion durch den Neutralisationsschritt wurde der Biofilm mit einem Zellschaber in 45 mL 0,85 %ige Natriumchlorid-Lösung abgelöst und das Volumen durch Zentrifugation (siehe 2.2.5.3f) auf 2,0 mL eingengt. Die so erhaltenen Biofilmsuspensionen wurden auf die $OD_{546nm} = 0,06$ eingestellt und davon jeweils 500 µL zum Animpfen von 100 mL 1 g/L TSB-Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C über einen Zeitraum von 50 Stunden. Das Wachstum der Kultur wurde über die Veränderung der optischen Dichte bei 546 nm entsprechend der Beschreibung unter Methoden 2.2 durchgeführt und anschließend die Wachstumsparameter bestimmt und verglichen. Die weitere Behandlung der Biofilme erfolgte gemäß der Beschreibung unter 2.2.4.2.2.

2.2.7.5.4 Biofilme und planktonischen Kulturen

Für den Vergleich der Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilme und planktonische Kulturen wurden in einem Becherglasreaktor JCBK5-Biofilme angezogen (Durchführung siehe 2.2.5.2) und für 10 min mit 15 mg/L Chlordioxid wie unter 2.2.5.2 beschrieben desinfiziert. Die planktonische Kultur wurde mit Natriumchlorid-Lösung so verdünnt, dass 45 mL Suspension eine ähnliche Gesamtlebendzellzahl wie die Biofilme aufwies. Auch die Suspension wurde 10 min mit einer Konzentration von 15 mg/L Chlordioxid behandelt. Gestoppt wurde die Desinfektion durch die Zugabe von Thiosulfat-Lösung (150 mg/L). Nach der Neutralisation und der Ablösung der Biofilme gemäß Methoden 2.2.5.3f wurden die Suspensionen für 1 min einer Ultraschall-Behandlung (Intensität 80%) unterzogen, das Volumen durch Zentrifugation (5500 rpm, 15 min) auf 2,0 mL eingengt und eine Lebendzellzahlbestimmung, wie unter Methoden 2.2.3 beschrieben, durchgeführt. Die Abbildung 53 in Experimente und Ergebnisse zeigt eine schematische Darstellung des Vorgehens.

2.2.7.5.5 Abhängigkeit von der Biofilmstruktur

Um zu überprüfen, ob die Struktur des Biofilms auf die Desinfektionswirkung von Chlordioxid einen Einfluss hat, wurden JCBK5-Biofilme wie unter 2.2.5.2 beschrieben angezogen. Diese Biofilme wurden dann entweder mit einem Zellschaber in 45,0 mL Natriumchlorid-Lösung abgelöst (0,85 %ig) und als Suspension desinfiziert, oder direkt in 45,0 mL Desinfektionslösung gegeben. Die Einwirkzeit betrug 10 min, die Konzentration des Chlordioxids 15 mg/L. Die Desinfektion wurde durch Zugabe von Thiosulfat-Lösung (150 mg/L) gestoppt und die Biofilme mit einem Zellschaber, wie unter 2.2.5.3 beschrieben abgelöst. Die so erhaltenen Suspensionen wurden für 1 min einer Ultraschall-Behandlung (Intensität 80%) unterzogen, das Volumen durch Zentrifugation (5500 rpm, 15 min) auf 2,0 mL eingengt und eine Lebendzellzahlbestimmung, wie unter Methoden 2.2.5.3f beschrieben, durchgeführt. Die Abbildung 55 in Experimente und Ergebnisse zeigt eine schematische Darstellung des Vorgehens.

2.2.7.5.6 Planktonische Kulturen unterschiedlicher Lebendzellzahl

Die verwendete planktonische Kultur wurde einem Becherglasreaktor nach 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C in 1 g/L TSB entnommen, aliquotiert und unverdünnt, oder 1:3 mit Natriumchlorid-Lösung (0,85%ig) verdünnt, desinfiziert. Die Desinfektion wurde nach 10 min mit Thiosulfat-Lösung (150 mg/L) gestoppt und mit einer 15 mg/L Ausgangskonzentration an Chlordioxid durchgeführt. Die Quantifizierung der Desinfektionswirkung erfolgte mittels Lebendzellzahlbestimmung, beschrieben unter 2.2.3. Die Restkonzentration an Chlordioxid erfolgte unverzüglich nach Beendigung der Desinfektion mittels photometrischer Bestimmung. Dafür wurde ein Aliquot (2 mL) des Reaktionsansatzes in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wie unter 2.2.7.2.2 beschrieben zur Quantifizierung der Restkonzentration vermessen.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Trinkwasseruntersuchungen an der bergischen Universität Wuppertal

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen des Trinkwassernetzes in Gebäuden des Campus Griffenberg durchgeführt, sowie Beprobungen durch das Labor Dr. Füllig Wassertechnologie GmbH begleitet. Das Labor Füllig setzt, im Auftrag des Gebäudemanagement der Universität, die Vorgaben der Trinkwasserverordnung in Bezug auf die Kontrolle von *Legionella*-Verkeimungen in Trinkwassersystemen um und führt dafür regelmäßig Beprobungen der Warmwassersysteme durch.

Der Aufbau des Campus Griffenberg ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Um die im Folgenden beschriebenen Wasserproben besser ihrer Herkunft zuordnen zu können wird in der Abbildung 8 beschrieben wie sich die Raumnummern des Campus zusammensetzen.

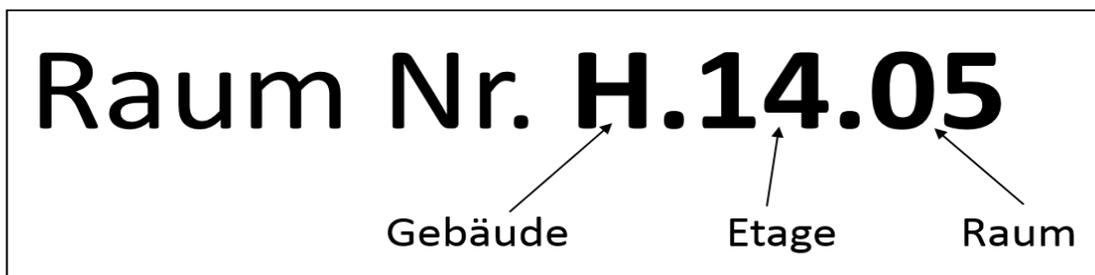


Abbildung 8: Zusammensetzung der Raumnummern am Campus Griffenberg der Bergischen Universität. Die verwendeten Raumnummern setzen sich aus dem Großbuchstaben für das Gebäude, der Etage auf der der jeweilige Raum liegt und der Nummerierung des Raumes zusammen. Die einzelnen Angaben werden dabei durch Punkte voneinander getrennt.

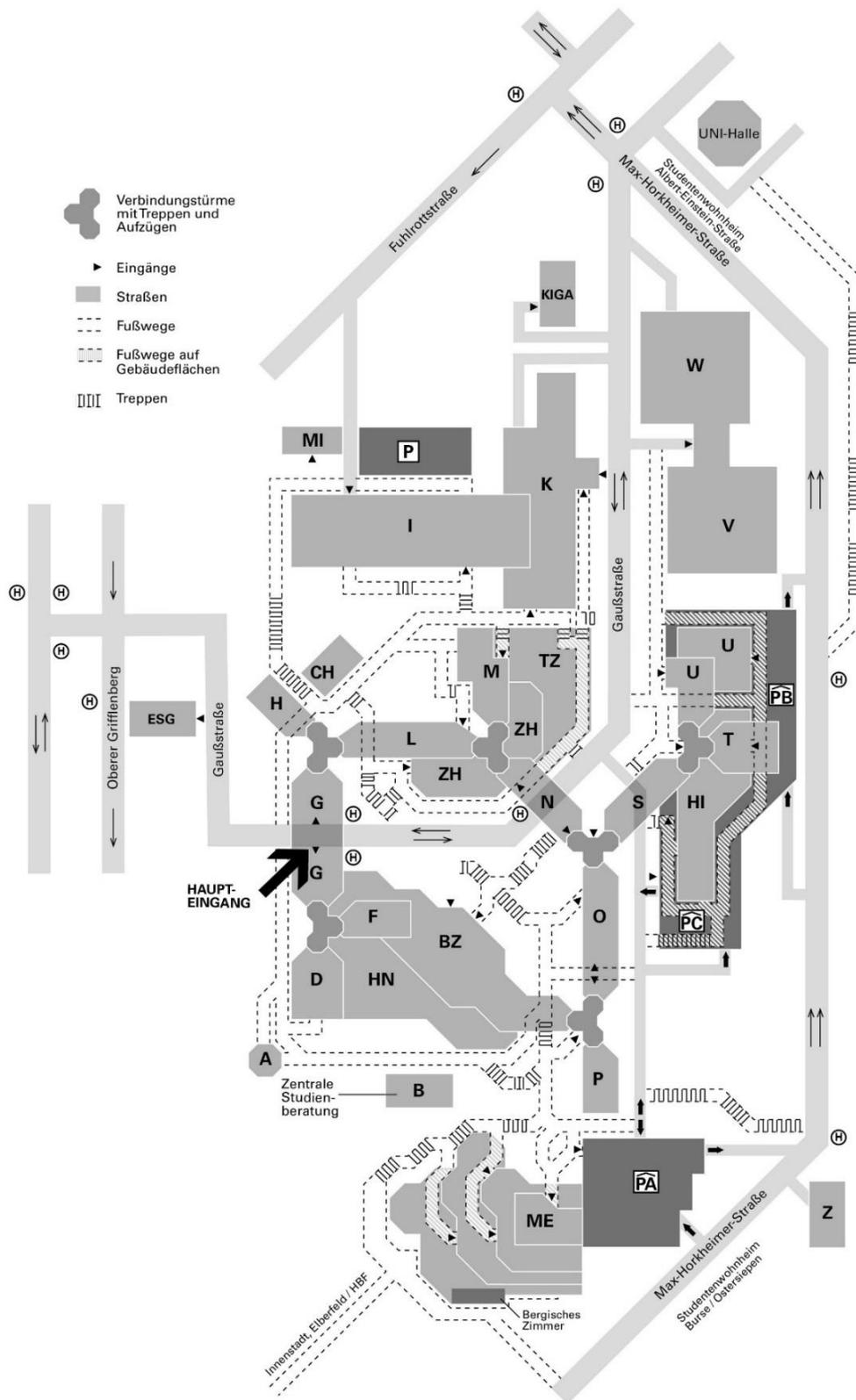


Abbildung 9: Campusplan des Campus Griffenberg der Bergischen Universität Wuppertal. (Universität Wuppertal, 2017)

3.1.1 Untersuchungen auf Legionellen nach DIN EN ISO 11731-2:2008

Die Beprobung von Wasserleitungen der Campus-Gebäude auf Legionellen-Befall ist seit 2010 gemäß der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) verpflichtend durchzuführen. In Abbildung 10 sind der Beprobungsumfang sowie die Verteilung der Ergebnisse der Beprobungen in Bezug auf eine vorliegende Verkeimung mit Legionellen zusammengefasst.

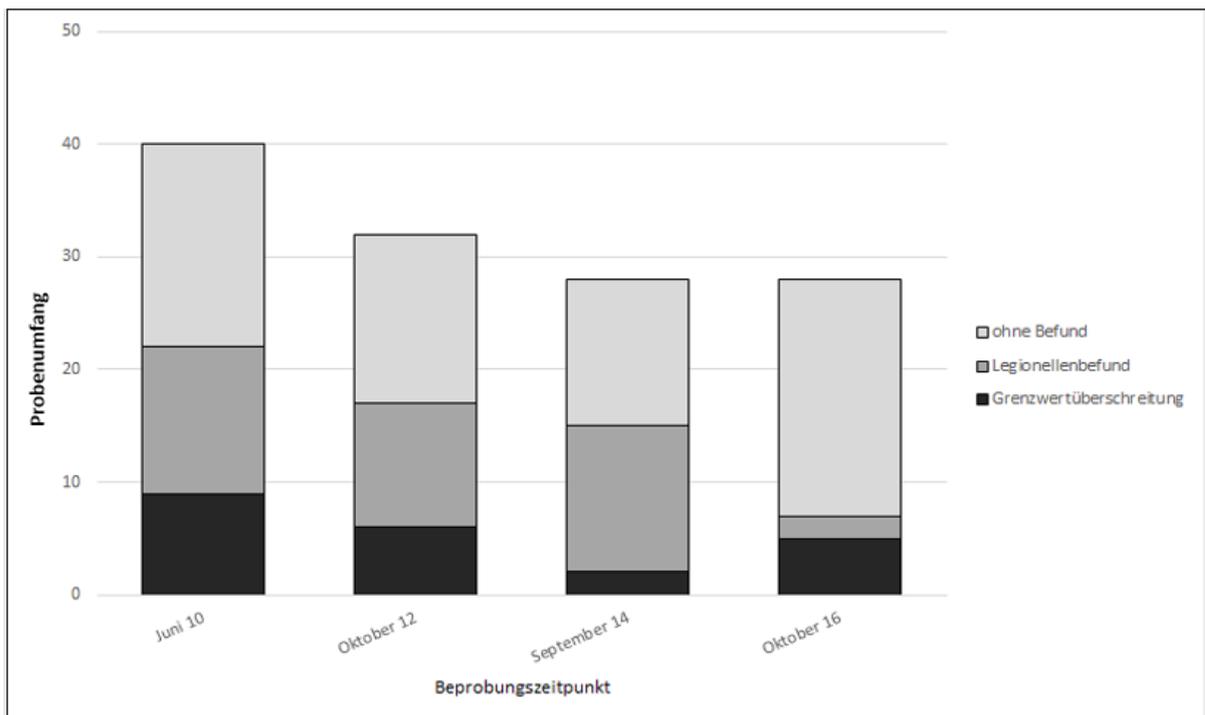


Abbildung 10: Offizielle *Legionella*-Beprobungen nach DIN EN ISO 11731-2:2008 des Trinkwassernetzes am Campus Griffenberg. Dargestellt sind die Ergebnisse der Beprobungen durch das Labor Dr. Fülling seit Einführung der Beprobungspflicht auf Legionellen. **Ohne Befund** = In den entsprechenden Proben wurden ≤ 1 KBE/100 mL Legionellen detektiert. **Legionellen-Befund** = In den Proben wurde eine *Legionella*-Anzahl unterhalb des technischen Maßnahmenwertes von 100 KBE/100 mL ermittelt. **Grenzwertüberschreitung** = Legionellen-Befunde ≥ 100 KBE/100 mL. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.4.1 zu finden.

Die Abbildung 10 zeigt die offiziellen Beprobungsergebnisse nach DIN EN ISO 11731-2:2008 aufgeschlüsselt nach Beprobungsjahr. Es ist erkennbar, dass sich der Probenumfang von 2010 bis 2016 von 40 auf 28 Beprobungsstellen verringert wurde. Ebenfalls erkennbar ist, dass das beprobte Leitungssystem bei einer Vielzahl der Proben einen Befall mit *Legionella* sp. aufwies, dieser aber in der Mehrheit der Fälle unterhalb des technischen Maßnahmenwertes von 100 KBE/ 100 mL lag. Der Umfang an Proben mit Legionellen-Befund (mit und ohne

Grenzwertüberschreitung) betrug von der ersten Untersuchung 2010 bis einschließlich 2014 jeweils rund 50 %; 2016 wurden lediglich in 25 % der Proben Legionellen nachgewiesen. Die Anzahl an Standorten mit Grenzwertüberschreitung nahmen von 2010 bis 2014 immer weiter ab, machten bei der Beprobung 2016 dann aber wieder einen sehr großen Anteil vom Gesamt-Legionellen-Befund aus. Berücksichtigt werden muss dabei allerdings, dass die Gesamtheit der Proben mit *Legionella*-Befund in 2016 im Vergleich zu den anderen Jahren sehr gering ausfiel und damit schon wenige Beprobungsorte mit Grenzwertüberschreitung einen großen Anteil an dieser Gesamtheit ausmachten.

Probenahmestellen, bei denen eine Grenzwertüberschreitung festgestellt wurde, müssen gemäß Trinkwasserverordnung gewartet und anschließend nochmal beprobt werden (TrinkwV 2001). Bei großen und verzweigten Trinkwasseranlagen empfiehlt sich als wirksame Wartungsmaßnahme zur *Legionella*-Reduktion, die thermische Desinfektion. Dafür wird der entsprechende Trinkwasserstrang mit 70 °C heißem Wasser für mindestens 3 min bei vollem Durchfluss gespült. Alle Entnahmestellen dieses Leitungsabschnitts sind dabei zu öffnen (Labor Dr. Füllung). Diese Maßnahme wurde auch bei den in Abbildung 11 aufgeführten Beprobungsstellen durchgeführt. Die Ergebnisse der *Legionella*-Untersuchungen vor und nach der thermischen Desinfektion zeigt das folgende Balkendiagramm.

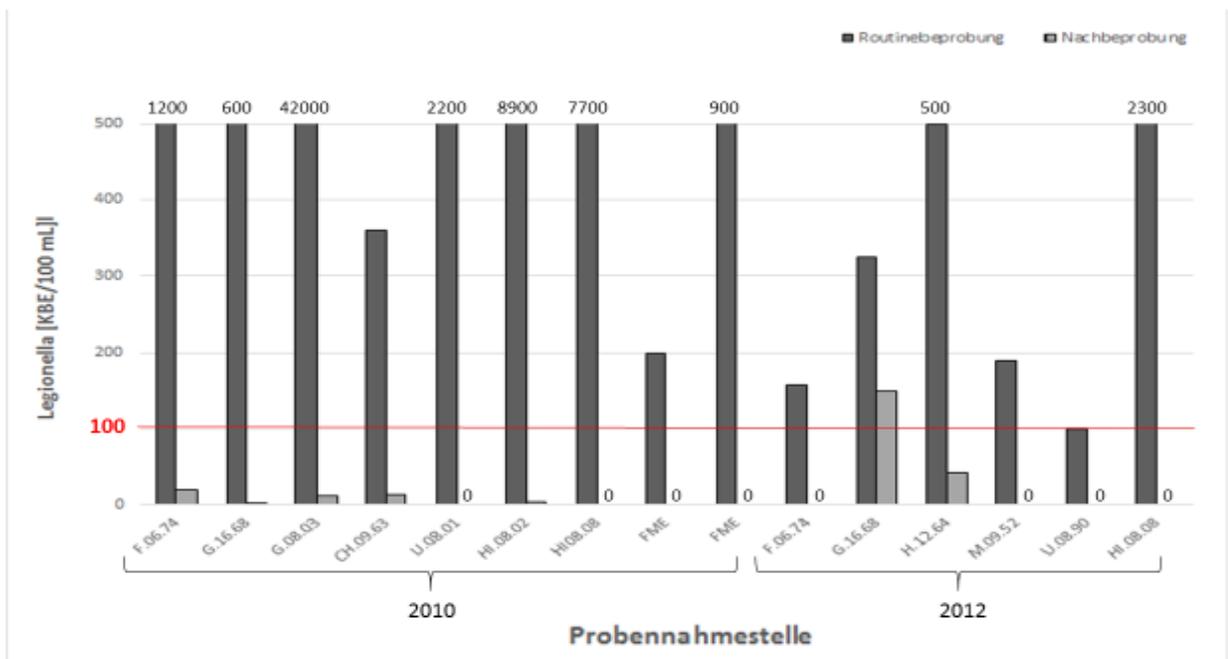


Abbildung 11: Beprobungsstandorte mit *Legionella*-Befund und Ergebnisse der Nachbeprobung. Dargestellt sind die Standorte des Campus Griffenberg, bei denen eine Verkeimung mit Legionellen über dem

Grenzwert nach Trinkwasserverordnung (100 KBE/ 100 mL) festgestellt wurde. Die Beprobung wurde durch das Labor Dr. Füllung gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008 durchgeführt. **Routinebeprobung** = durchgeführt am 26.06.2010, bzw. am 30.10.2012. **Nachbeprobung** = durchgeführt nach thermischer Desinfektion am 27.09.2010, bzw. am 17.01.2013. **0** = die Anzahl der detektierten Legionellen lag unterhalb der Nachweisgrenze der Methode oder betrug 0 KBE/100 mL. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.4.1 zu finden.

Abbildung 11 zeigt, dass in der großen Mehrzahl der Proben mit Grenzwertüberschreitung die Legionellen-Verkeimung um ein Vielfaches über dem Maßnahmenwert von 100 KBE/100 mL lag. Der Maximalwert wurde dabei in G.08.03 mit einer Lebendzellzahl von 42.000 KBE/100 mL detektiert. Bei nahezu allen Standorten konnte aber auch durch thermische Desinfektion die Anzahl an Legionellen, unabhängig von der Ausgangsverkeimung, weit unter den technischen Maßnahmenwert reduziert werden. In der Mehrheit der Fälle wurden sogar gar keine Legionellen mehr detektiert. Die Entnahmestelle G.16.68 bildet dabei die einzige Ausnahme und wurde als weiterführende Maßnahme zurückgebaut. Es handelte sich um ein Waschbecken mit sehr geringer Nutzungsrate (Gebäudemanagement Uni Wuppertal).

Nachdem die Ergebnisse der Legionellenbeprobungen in den Gebäuden des Campus Griffenberg nun zusammengetragen und dargestellt wurden, sollte darüber hinaus die Methode der Membranfiltration nach Din EN ISO 11731-2:2008 selbst genauer betrachtet werden. Dafür wurde zunächst verglichen, wie sich die *Legionella*-Befunde der Proben in Abhängigkeit von der Probennahme unterschieden. Der erste Liter wurde dabei wie gehabt zur Bestimmung der vorherrschenden Temperatur in der Wasserleitung bestimmt, dann der zweite Liter Probe durch das Labor Dr. Füllung abgenommen und beprobt und zuletzt noch der dritte Liter der Entnahmestelle als Probe durch die Autorin der vorliegenden Arbeit untersucht. Die ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

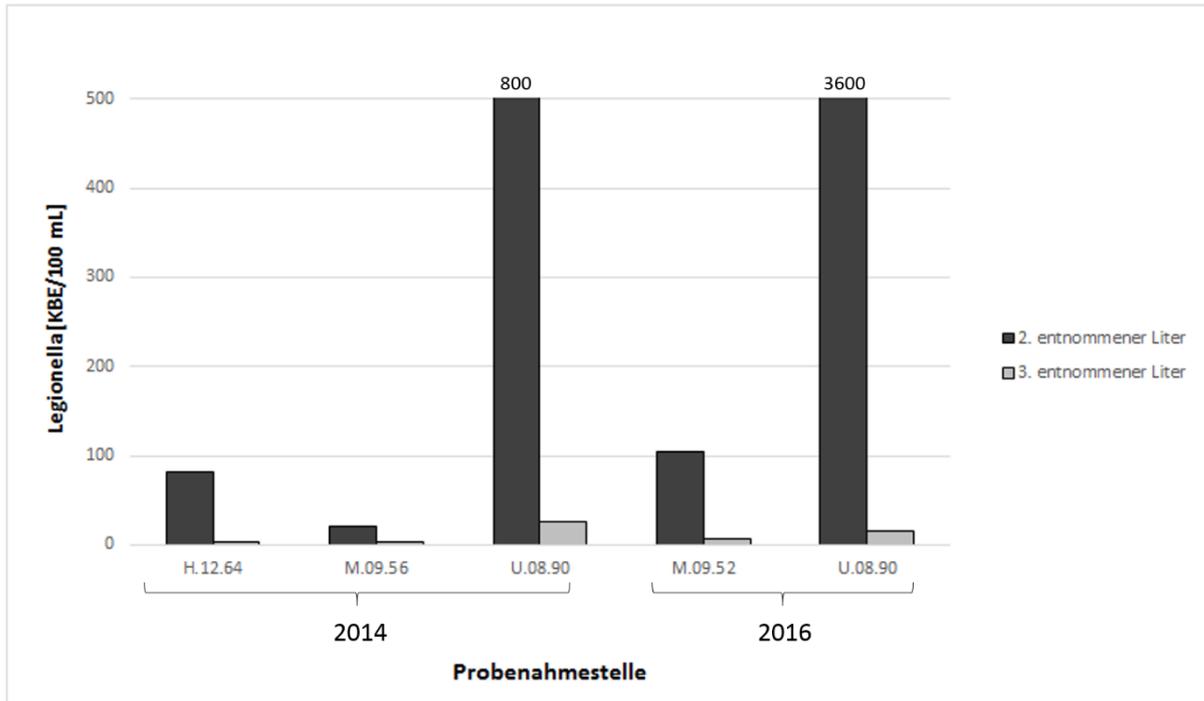


Abbildung 12: Legionella-Befund im 2. und 3. Liter des Standwassers verschiedener Probenahmestellen am Campus Griffenberg. Die Beprobung erfolgte gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008 am 16.09.2014, bzw. am 31.10.2016. **2. entnommener Liter** = die Proben wurden durch das Labor Dr. Füllung entnommen und untersucht. **3. entnommener Liter** = die Proben wurden direkt im Anschluss an die Probennahme durch Füllung von der Autorin der vorliegenden Arbeit aufgefangen und analog behandelt. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.4.1 zu finden.

Die Abbildung 12 zeigt an einigen ausgewählten Probenahmestellen die Legionellen-Verteilung pro 100 mL im zweiten sowie im dritten Liter Probevolumen. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den bestimmten Lebendzellzahlen, obwohl beide Beprobungen gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008 analog durchgeführt wurden. Der massivste Unterschied bestand in Raum U.08.90, bei dessen Beprobung des 2. Liters ein Befund von 3600 KBE/ 100 mL, einem Befund von 16 KBE/ 100 mL im 3. Liter gegenüber stand. Dieser Unterschied bedeutet eine Reduktion der *Legionella*-Anzahl um einen Faktor von mehr als 200.

In der folgenden Tabelle 23 wurden weitere Ergebnisse einer Trinkwasserbeprobung detailliert aufgelistet. Es erfolgte auch hier eine Beprobung der Trinkwasserverordnung entsprechend. Es wurden die Temperatur des ersten Liters Probevolumen, sowie die maximale Wassertemperatur an der jeweiligen Entnahmestelle bestimmt und pro Standort drei Aliquote der Probe untersucht. Die angegebene Gesamt-Lebendzellzahl wurde nach der Bebrütung des Filters durch Auszählen aller gewachsenen Kolonien bestimmt. Die Lebendzellzahl der *Legionella* sp.

erfolgte durch die Zählung derjenigen Kolonien, die kein Wachstum auf TSB-Agar zeigten (DIN EN ISO 11731-2:2008).

Tabelle 23: Beprobung des Trinkwassernetzes des Campus Griffenberg der Universität Wuppertal

Raum	Entnahmestelle	Prüf-Nr.	T _l , Liter [°C]	T _{max} [°C]	Aliquot [mL]	LZZ _{Gesamt} [$\frac{\text{KBE}}{100 \text{ mL}}$]	LZZ _{Legionella} [$\frac{\text{KBE}}{100 \text{ mL}}$]	Mittelwert LZZ _{Legionella} [$\frac{\text{KBE}}{100 \text{ mL}}$]
F.06.74	WWB 2	5	18,0	18,0	10	40	0	0
					100	Schimmel		
					100	0	0	
G.16.68	Waschbecken	12	14,5	14,5	10	20	0	0
					100	2	0	
					100	0	0	
HL.08.08	Dusche	50	41,5	56,0	10	60	50	26 ± 35
					100	1	1	
					100	Schimmel		
L.08.08	Austritt Wasser- erwärmer	18	34,0	55,5	10	0	0	1 ± 2
					100	4	3	
					100	0	0	
M.09.52	Damen- umkleide, Dusche	24	37,5	59,5	10	40	40	24 ± 17
					100	29	27	
					100	8	6	
U.8.90	Herren-WC, Dusche	42	54,0	54,0	10	30	0	255 ± 407
					100	> 725	> 725	
					100	41	41	

Die Untersuchung wurde am 20.10.2016 nach DIN EN ISO 11731-2:2008 durchgeführt (siehe Material und Methoden 2.2.4.1). Das Probenvolumen umfasste den 2. Liter der jeweiligen Wasserleitung und wurde wie angegeben aliquotiert. **LZZ_{Gesamt}** = Auszählung aller gewachsenen KBE. **LZZ_{Legionella}** = Auszählung der Kolonien, die kein Wachstum auf TSB zeigten.

Es zeigte sich, dass die Säurebehandlung der Membranfilter zwar zu einer Hemmung der Begleitflora führte, aber dennoch ein großer Anteil der gewachsenen Kolonien nicht zur Gattung *Legionella* gehörten. Bei den Beprobungsstellen mit Legionellen-Befund handelte es sich in diesem Probenumfang ausschließlich um Duschen. Ebenfalls zeigte die Methode in der Mehrfachbestimmung eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit. So wurden in Aliquoten derselben Probe massive Unterschiede in der detektierten *Legionella*-Zahl festgestellt. Die

Proben wurden vor dem Aliquotieren gründlich homogenisiert und trotzdem traten Abweichungen von bis zu mehr als 1700 % in den Einzelbestimmungen der Gesamt-Lebendzellzahl auf (siehe U.08.90), was untragbar hohe Standardabweichungen zur Folge hatte. Die schlechte Reproduzierbarkeit spiegelte sich ebenfalls bei der Betrachtung der unterschiedlichen Aliquotvolumina wieder. Bei den Proben aus U.08.90 ergaben das Volumen von 10 mL und das Volumen von 100 mL fast die gleiche Gesamt-Lebendzellzahl nach Membranfiltration. Bei der Probe aus M.09.52 wurden in dem 10 mL-Aliquot sogar deutlich mehr Mikroorganismen detektiert als in dem 100 mL-Aliquot.

Nach DIN EN ISO 11731-2:2008 sind koloniebildende Einheiten dann als *Legionella* sp. detektiert, wenn sie zum einen die Säurebehandlung bei $\text{pH } 2,2 \pm 0,2$ überleben, eine Legionellen-typische Erscheinung aufweisen und kein Wachstum auf Nähragar ohne Cystein zeigen. Um die Kolonien der Bestimmungen aus Tabelle 23 genauer zu untersuchen wurden von allen optisch Legionellen-verdächtigen Kolonien Subkulturen angelegt und zunächst das Wachstum auf TSB-Medium überprüft. Anschließend erfolgte, wie in Abbildung 13 dargestellt eine weitere Klassifizierung über die mikroskopische Erscheinung der isolierten Kulturen. Es zeigte sich, dass alle Isolate, die kein Wachstum auf TSB-Agar gezeigt hatten, eine Stäbchenform bei 400facher Vergrößerung aufwiesen.

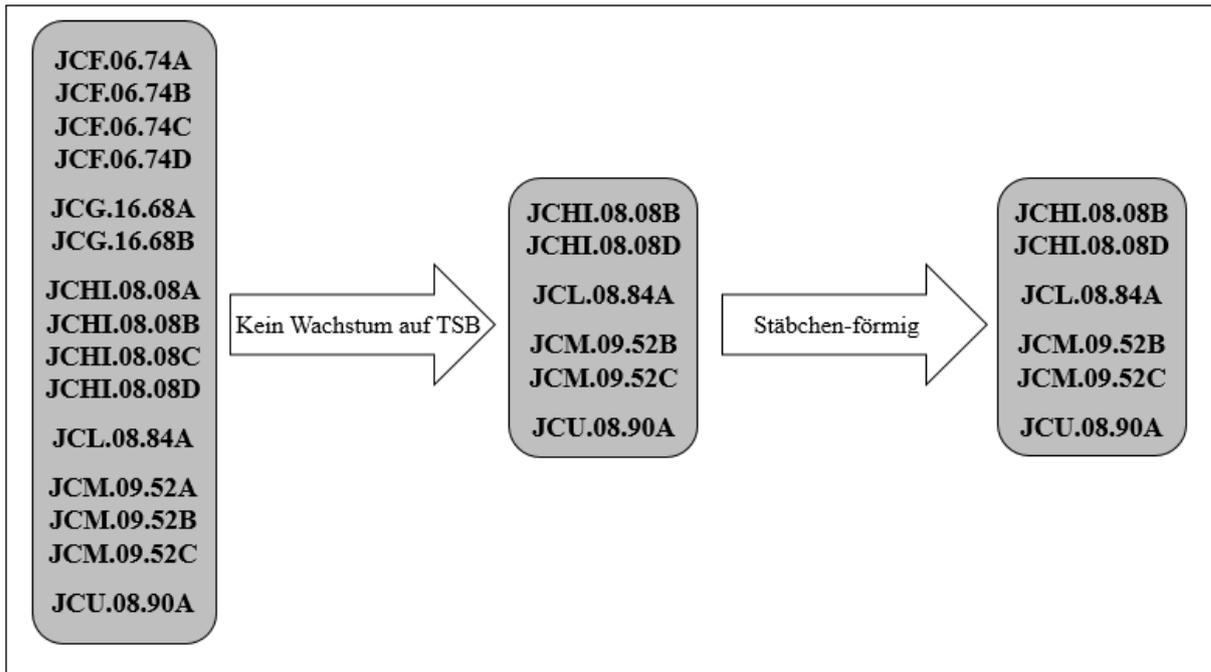


Abbildung 13: Auswahl von *Legionella*-verdächtigen Kolonien der Trinkwasseruntersuchung (20.10.2016) am Campus Griffenberg. Die grundlegende Auswahl der verdächtigen Kolonien wurde durch deren makroskopische Erscheinung gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008 getroffen. Diese Kolonien wurden auf ihr Wachstumsverhalten auf TSB-Agar bei 36 °C untersucht und anschließend bei den Isolaten, die kein Wachstum zeigten, die Zellform durch Mikroskopie (400fach, Motoc Phasenkontrast) bestimmt.

Aus den bestimmten Grobeigenschaften in Abbildung 13 ergaben sich sechs *Legionella*-verdächtige Isolate, die im Weiteren mittels PCR auf die Gattung *Legionella*, sowie auf den Stamm *Legionella pneumophila* getestet wurden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 14 und 15 fotografisch veranschaulicht. Die genaue Durchführung ist in Material und Methoden unter 2.2.4.2.3 hinterlegt.

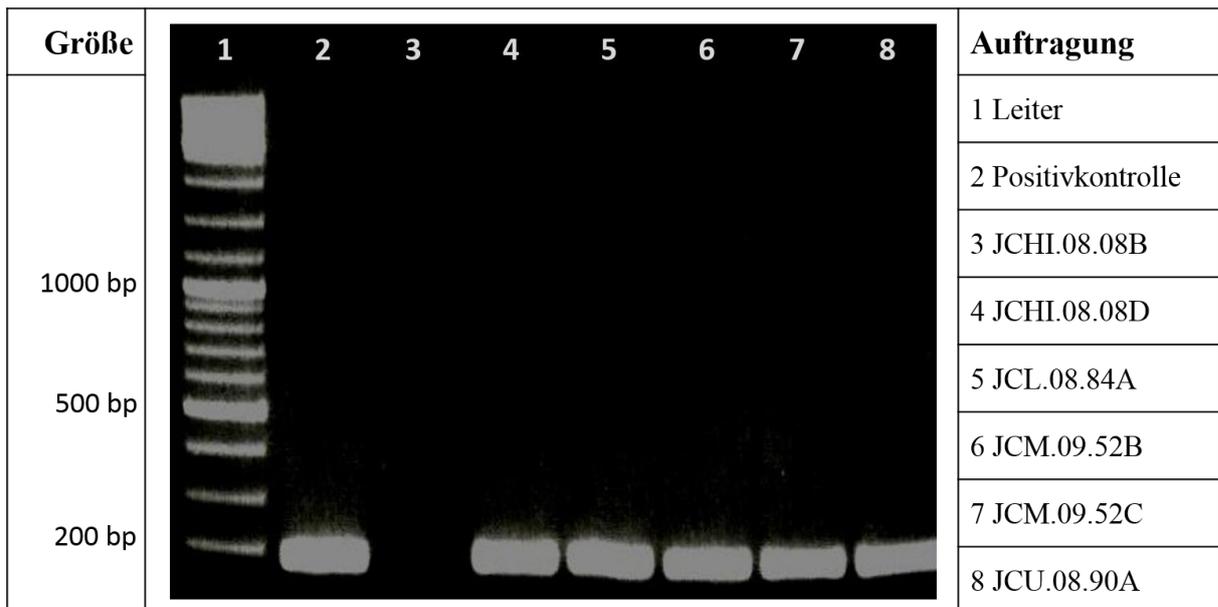


Abbildung 14: Agarosegel nach *Legionella*-PCR mit *Legionella*-verdächtigen Isolaten der Trinkwasseruntersuchung am Campus Griffenberg. Die elektrophoretische Trennung der 200 Basenpaar (bp) großen PCR-Produkte erfolgte innerhalb eines 2%igen Agarosegels. Als **Positiv-Kontrolle** wurde *L. pneumophila* LP1 eingesetzt. Als Größenmarker wurden 6 μ L des O'GeneRuler™ DNA Ladder-Mix, ready-to-use der Firma Fermentas verwendet. **Legionella-verdächtige Isolate** = die Isolate, die kein Wachstum auf TSB zeigten und bei denen es sich um Stäbchen-förmig Zellen handelte. Durchführung siehe Material und Methoden 2.2.4.2.3.

Die Abbildung 14 zeigt auf den Spuren 3 bis 8 die Amplifizierungsergebnisse der *Legionella*-spezifischen PCR. Das durch die spezifischen Primer erhaltene PCR-Fragment weist typischerweise eine Länge von 200 bp auf. An der Basenpaarleiter auf Spur 1 ist deutlich zu erkennen, dass ein Fragment dieser Größe auf allen Spuren außer Spur 3 amplifiziert wurde. Daraus ergibt sich, dass es sich bei allen Isolaten außer bei dem Isolat JCHI.08.08B um Mikroorganismen der Gattung *Legionella* handelte.

Die weitere Klassifizierung dieser Isolate erfolgte mit der Durchführung einer *Legionella pneumophila*-PCR, dargestellt in Abbildung 15.

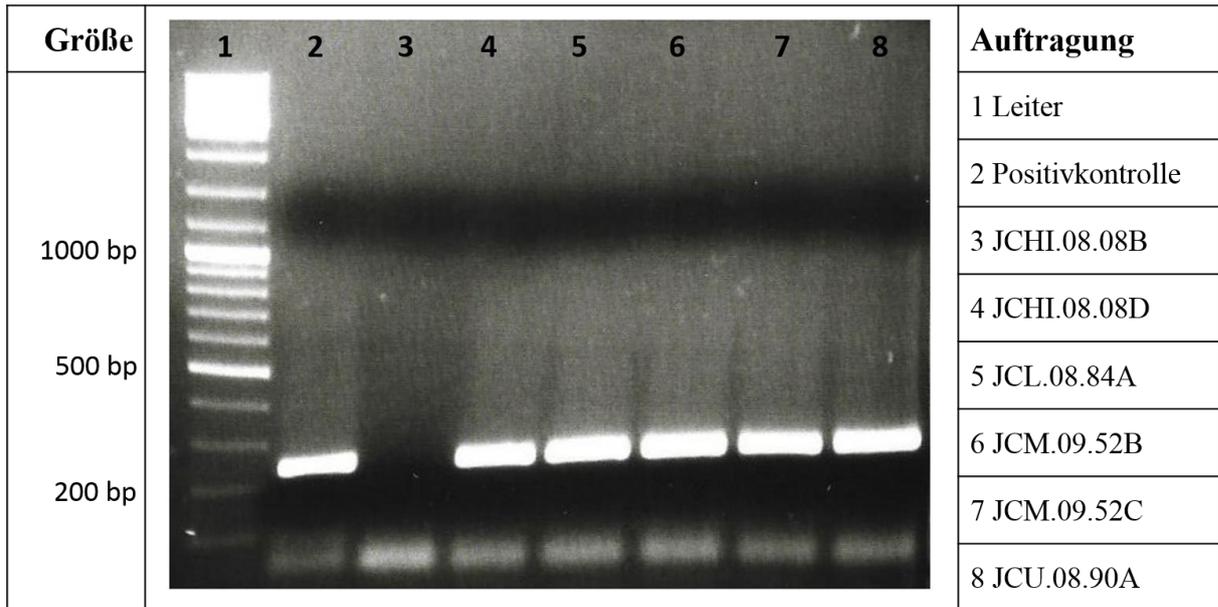


Abbildung 15: Agarosegel nach *L. pneumophila*-PCR mit *Legionella*-verdächtigen Isolaten der Trinkwasseruntersuchung am Campus Griffenberg. Die elektrophoretische Trennung der 237 Basenpaar (bp) großen PCR-Produkte erfolgte innerhalb eines 2%igen Agarosegels. Als **Positiv-Kontrolle** wurde *L. pneumophila* LP1 eingesetzt. Als Größenmarker wurden 6 µL des O'GeneRuler™ DNA Ladder-Mix, ready-to-use der Firma Fermentas verwendet. **Legionella-verdächtige Isolate** = die Isolate, die kein Wachstum auf TSB zeigten und bei denen es sich um Stäbchen-förmig Zellen handelte. Durchführung siehe Material und Methoden 2.2.4.2.3.

Nach dieser Gelelektrophorese ergab sich ein ähnliches Bild wie schon nach der *Legionella*-PCR. Alle Isolate bis auf JCHI.08.08B konnten als *Legionella pneumophila* identifiziert werden, da sie das spezifische PCR-Produkt mit einer Länge von 237 bp aufwiesen. Da das Isolat JCHI.08.08B weder in der *L. pneumophila*-PCR, noch in der *Legionella*-PCR die spezifischen Fragmente aufwies, ist dieses Isolat als falsch-positiver Keim der DIN EN ISO 11731-2:2008 anzusehen.

Eine Übersicht aller potentiell falsch-positiver Trinkwasserisolate, erhalten nach Membranfiltration gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008, ist in Abbildung 16 dargestellt.

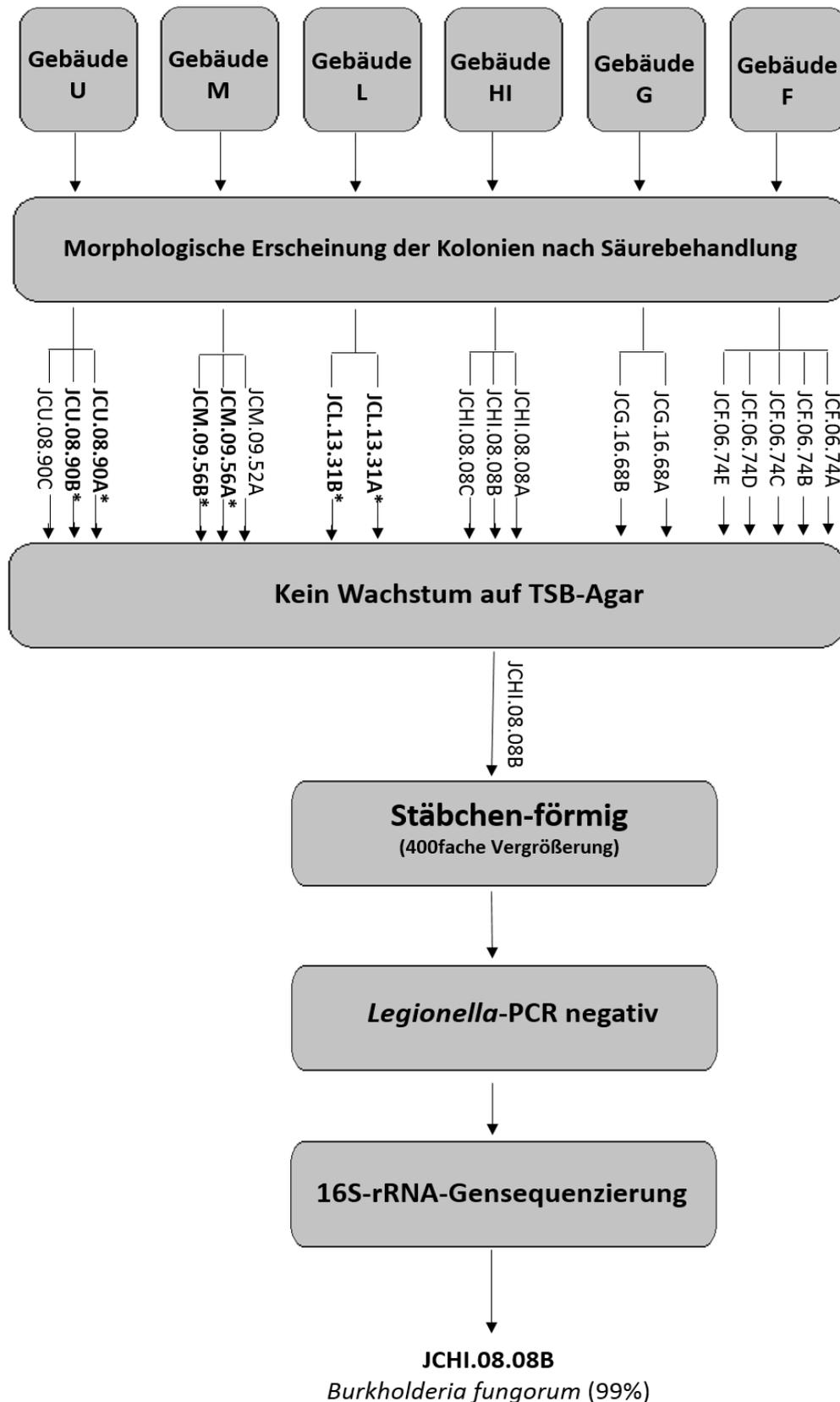


Abbildung 16: Falsch-positive Legionella-Isolate erhalten nach Säurebehandlung gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008. Die Trinkwasserproben wurden in den aufgeführten Gebäuden des Campus Griffenberg gewonnen, Membran-filtrierte und mit Säurepuffer behandelt. Die mit * markierten Isolate wurden einer 16s-rRNA-Gensequenzierung unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Die verwendeten Methoden sind unter 2.2.4.2.3 nachzulesen.

Die Abbildung 16 zeigt die verschiedenen Klassifizierungsschritte zur Bestätigung von Legionellen gemäß der DIN EN ISO 11731-2:2008 und darüber hinaus. Die Trinkwasserproben der aufgeführten Gebäude wurden membranfiltriert und mit Säurepuffer behandelt. Nach der Bebrütung der Filter wurden *Legionella*-verdächtige Kolonien aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung DIN-entsprechend, zur weiteren Untersuchung ausgewählt (siehe Material und Methoden 2.2.4.1). Auf diese Weise wurden 18 *Legionella*-verdächtige Isolate für den nächsten Untersuchungsschritt generiert und dafür auf BCYE-Agar kultiviert. Das Wachstum auf Nährmedium ohne Cystein (hier TSB-Medium) ist dann das nächst und letzte Prüfmerkmal gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008. Alle Kulturen, die kein Wachstum auf TSB- oder entsprechendem Agar zeigen werden dementsprechend der Gattung *Legionella* zugeordnet. Von den 18 ursprünglichen Isolaten zeigte nur das Isolat JCHI.08.08B kein Wachstum auf TSB-Agar und würde somit nach DIN als *Legionella*-Isolat eingestuft werden. Mit diesem Isolat wurden nun noch die weiteren in Abbildung 16 aufgeführten Untersuchungen durchgeführt. Die Mikroskopie einer Kultur des Isolats bei 400facher Vergrößerung im Motic „Phasenkontrast“ zeigte, dass es sich um Stäbchen-förmige Bakterienzellen handelte, was den Legionellen-Verdacht weiter untermauerte. Daher wurde im nächsten Schritt eine *Legionella*-PCR mit dem Isolat JCHI.08.08B durchgeführt, dessen Ergebnis sich als negativ herausstellte (siehe auch Abbildung 14 und 15). Es handelte sich also nicht um einen *Legionella*-Stamm. Die anschließende Gensequenzierung mittels 16S-rDNA-PCR (siehe Material und Methoden 2.2.4.2.3) ergab eine 99 %ige Übereinstimmung des Genmaterials mit *Burkholderia fungorum*, sodass das Isolat JCHI.08.08B eindeutig als diese Art klassifiziert werden konnte.

Die Isolate, die in Abbildung 16 mit einem Sternchen (*) markiert sind, wurden ebenfalls mittels Vergleich der 16s-rDNA genauer klassifiziert. Die erhaltenen Übereinstimmungen aus diesen Analysen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Klassifizierung ausgewählter falsch-positiver *Legionella*-Isolate mit Wachstum auf TSB-Agar

Isolat	Organismus	Übereinstimmung
JCL.13.31A	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. licheniformis</i> <i>B. sonorensis</i>	87 %
JCL.13.31B	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	88 %
JCM.09.56A	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. subtilis</i> , <i>B. mycooides</i> , <i>B. thuringensis</i>	90 %
JCM.09.56B	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	95 %
JCU.08.90A	<i>Staphylococcus</i> sp.	90 %
JCU.08.90 B	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>S. aureus</i>	89 %

Die, aus der 16s-rDNA-PCR erhaltenen Produkte (siehe Material und Methoden 2.2.4.2.3) wurden durch die Firma MWG Eurofins Genomics sequenziert, mit dem Programm BioEdit Sequence Alignment Editor bearbeitet und die so erhaltenen Sequenzen mit Hilfe von Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), der Online-Datenbank des National Center for Biotechnology Information, taxonomisch eingeordnet.

Der Abgleich der generierten Gensequenzen mit der Datenbank BLAST ergab Übereinstimmungen von maximal 95 % mit den in Tabelle 24 aufgeführten Organismen. Die genaue Art der Isolate konnte damit nicht mit ausreichender Sicherheit bestimmt werden, die Gattung der Mikroorganismen dagegen schon (fett unterlegt). Es handelte sich in der Mehrheit um *Bacillus* sp., in den Proben aus Gebäude U wurden dagegen *Staphylococcus*-Arten isoliert.

3.1.2 Gewinnung von Trinkwasserisolaten

Die Isolierung von Trinkwasserisolaten diente zum einen zur Untersuchung der im Trinkwassersystem der Gebäude des Campus Griffenberg vorkommenden Biofilmbakterien und zum anderen dazu, geeignete Isolate für die Versuche zur Biofilmbildung zu gewinnen. Nach welchen Methoden und an welchen Standorten die Mikroorganismen isoliert wurden ist unter Material und Methoden 2.2.4.2 nachzulesen.

3.1.2.1 Grobcharakterisierung

Für eine erste Charakterisierung der gewonnenen Isolate wurden einige Schnelltests zur Bestimmung von morphologischen und physiologischen Eigenschaften durchgeführt. Dabei wurden Katalase- und Oxidase-Aktivität bestimmt, die Form der Zellen mikroskopisch, sowie auf das Gram-Verhalten hin untersucht und die morphologische Erscheinung der Kolonien betrachtet (siehe Material und Methoden 2.2.4.2.1). Die ermittelten Informationen sind in der Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Gewinnung und Grobidentifizierung von Trinkwasserisolaten

Isolat	Herkunft	Medium	makroskopische Gestalt	mikroskopische Gestalt	Gram-Verhalten	Katalase	Oxidase
JC BK1	F.06.74 Tupferproben	R2A	cremefarbene Kolonie	Kokken	+	+	+
JC BK2			gelbe Kolonie	Kokken	+	+	+
JC BK3			weiße Kolonie	Kokken	+	+	+
JC BK4		TSB	milchig durchscheinende Kolonie	Kokken	+	+	+
JC BK5			weiße Kolonie	Kokken	+	+	+
JC BK6			farblose, Fäden ziehende Kolonie	Kokken	+	+	+
JC BK7		BCYE	cremefarbene Kolonie	Kokken	+	+	+
JC BK8			milchig durchscheinende Kolonie	Kokken	+	+	+
JC BK9			farblose, Fäden ziehende Kolonie	Kokken	+	+	+
JC WK1	F.06.74 Bodensatz	R2A	farblose, Fäden ziehende Kolonie	Kokken	+	+	+
JC WK2		TSB	cremefarbene Kolonie	Kokken	+	+	+
JC WK3			zitronengelbe, schleimige Kolonie	Kokken	+	+	-
JC WK4			milchig durchscheinende Kolonie	Kokken	+	+	-
JC WK5			gelbe Kolonie	Kokken	+	+	+
JC WK6		BCYE	farblose, Fäden ziehende Kolonie	Kokken	+	+	+
JC WK7			farblose Kolonie	Kokken	+	+	+
JC WK8			cremefarbene Kolonie	Kokken	+	+	+

Fortführung siehe nächste Seite.

Tabelle 25 (Fortführung): Gewinnung und Grobidentifizierung von Trinkwasserisolaten

Isolat	Herkunft	Medium	makroskopische Gestalt	mikroskopische Gestalt	Gram-Verhalten	Katalase	Oxidase
JC TK1	H.14.10 Tupferproben	R2A	gelbe Kolonie	Kokken	-	+	+
JC TK2			weiße, erhabene Kolonie	Kokken	+	+	+
JC TK3			elfenbeinfarbene Kolonie	Kokken	-	+	+
JC TK4		BCYE	zitronengelbe Kolonie	Kokken	-	+	+
JC TK5			elfenbeinfarbene Kolonie	Kokken	-	+	+
JC TK6			milchig durchscheinende Kolonie	Kokken	-	+	+
JC TK7			weiße, erhabene Kolonie	Kokken	+	+	+
JC TK8		TSB	zitronengelbe Kolonie	Kokken	-	+	+
JC TK9			cremefarbene Kolonie	Kokken	+	+	-
JC TK10			milchig durchscheinende Kolonie	Kokken	+	+	+
JC SK1	H.14.10 Biofilm	TSB	klare, schleimige Kolonie	nadelartige Stäbchen	-	+	-
JC SK2		BCYE	klare, schleimige Kolonie	nadelartige Stäbchen	-	+	-

Die Proben aus F.06.74 wurden aus einem zur Wartung entleerten Warmwassertank, entweder durch Abrieb der Innenwand mit sterilen Wattetupfern (**Tupferproben**), oder durch sterile Entnahme des im Tank verbliebenen Wasserrückstandes (**Bodensatz**) erhalten. Die Proben aus H.14.10 wurden aus einem ausgebauten Laborwasserhahn, entweder durch Abrieb der Innenwand mit sterilen Wattetupfern (**Tupferproben**), oder durch Ablösung des Biofilms mit Hilfe von sterilen Glaskugeln (**Biofilmproben**) erhalten. Die Tupferproben wurden in je 1 mL steriler 0,085 %iger NaCl-Lösung feucht gehalten und die Mikroorganismen durch Ausstreichen von je einem Wattestäbchen pro Platte auf die angegebenen Nährböden überführt. Von den Bodensatzproben wurden je 100 µL auf die angegebenen Nährböden ausplattiert. Der abgelöste Biofilm (Biofilmproben) wurde in einem Gesamtvolumen von 100 mL steriler 0,085 %iger NaCl-Lösung aufgenommen, durch Zentrifugation auf ein Volumen von 1 mL eingengt und darin resuspendiert. Von dieser eingengten Suspension wurden je 100 µL auf die angegebenen Nährböden ausplattiert. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 72stündiger (bei den Proben aus F.06.74) bzw. nach 48stündiger (bei den Proben aus H.14.10) Bebrütung der Agar-Platten bei 36 °C. Für die Grobidentifizierung wurden die Isolate durch mehrfache Verdünnungsausstriche auf TSB zu Reinkulturen aufgereinigt. Die Bestimmung der **Zellform** erfolgte im Motic „Phasenkontrast“ bei 400facher Vergrößerung. Der Test auf **Oxidaseaktivität** wurde über die Farbreaktion mit Tetramethyl-p-phenyldiamin-dihydrochlorid überprüft. Der **Katalase-Test** wurde mit 3%igem Wasserstoffperoxid durchgeführt und das Gramverhalten mit 3%iger Kaliumhydroxid-Lösung bestimmt. Die genauen Versuchsdurchführungen, sowie die Zusammensetzungen der verwendeten Medien sind dem Methodenteil unter 2.2.4.2f bzw. 2.1.1.2 zu entnehmen.

3.1.2.2 Wachstumsparameter ausgewählter Isolate

Die Wachstumsrate (μ), sowie die Verdopplungszeit (t_d) von einigen ausgewählten Isolaten wurden, wie unter 2.2.4.2.2 beschrieben, durch die Auftragung der optischen Dichte gegen die Zeit bestimmt. Dafür wurde durch die Logarithmierung der optischen Dichte der lineare Wachstumsbereich der Kulturen bestimmt und die Wachstumsparameter gemäß den Formeln 2 und 3 berechnet. Die Wachstumskurve des Isolats JCBK5 ist in Abbildung 17 als Beispiel dargestellt.

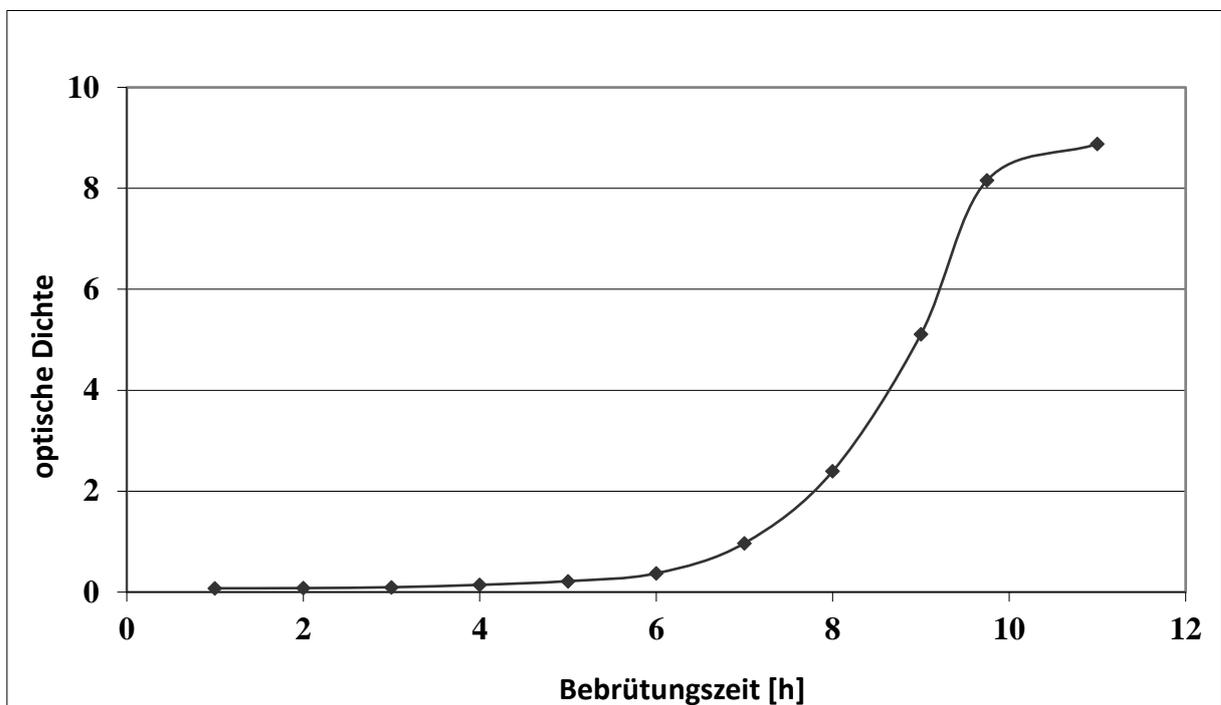


Abbildung 17: Wachstumskurve des Isolats JCBK5. Diese Wachstumskurve wurde durch die Bebrütung des Isolats in 10 g/L TSB-Medium bei 36 °C und die Bestimmung der optischen Dichte dieser Kultur bei 546 nm generiert. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.4.2.2 aufgeführt.

Die errechnete Generationszeit, sowie die Verdopplungsrate des Isolats und einiger anderer ausgewählter Trinkwasserisolate, zeigt Tabelle 26. Die Auswahl dieser Isolate erfolgte dabei auf den Ergebnissen ihrer Biofilmbildung im Becherglasreaktor, die in den Abbildungen 23 und 24 zusammengefasst sind. Gewählt wurden diejenigen Isolate, die gute Biofilmbildung im Becherglasversuch zeigten.

Tabelle 26: Weitere Charakterisierung von Isolaten mit guter Biofilmbildung

Isolat	Wachstumsrate μ [h ⁻¹]	Verdopplungszeit [min]
JCBK1	0,66	63
JCBK5	0,88	47
JCBK6	0,81	53
JCWK7	0,60	70
JCTK3	0,69	61
JCTK10	0,71	59

Wachstumsrate und Verdopplungszeit der Isolate wurden, wie im Methodenteil unter 2.2.4.2.2 beschrieben, berechnet.

3.1.2.3 Gensequenzierung ausgewählter Isolate

Die Gensequenzierung über eine 16s-rDNA-PCR erfolgte wie unter Material und Methoden 2.2.4.2.3 beschrieben. Sequenziert wurde dabei das Genmaterial von den Isolaten die im Becherglasversuch gute Biofilmbildung zeigten (siehe Abbildung 23 und 24). Die, aus der 16s- rDNA-PCR erhaltenen Produkte wurden dann durch die Firma MWG Eurofins Genomics sequenziert, mit dem Programm BioEdit Sequence Aligment Editor bearbeitet und die so erhaltenen Sequenzen mit Hilfe von Basic Local Aligment Searche Tool (BLAST), der Online-Datenbank des National Center for Biotechnology Information, taxonomisch eingeordnet. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Der Abgleich der generierten Gensequenzen mit der Datenbank BLAST ergab Übereinstimmungen von maximal 93 % mit den in Tabelle 27 aufgeführten Organismen. Die genaue Art der Isolate konnte damit nicht mit ausreichender Sicherheit bestimmt werden, die Gattung der Mikroorganismen dagegen schon. Es handelte sich bei allen Isolaten um *Staphylococcus*-Stämme.

Tabelle 27: Klassifizierung von Trinkwasserisolaten mit guter Biofilmbildung

Isolat	Organismus	Übereinstimmung
JCBK1	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>S. epidermidis</i>	89 %
JCBK5	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>S. warneri</i> , <i>S. pasteurii</i>	91 %
JCBK6	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>S. epidermidis</i>	93 %
JCWK7	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	92 %
JCTK3	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>S. epidermidis</i>	93 %
JCTK10	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>S. warneri</i> <i>S. pasteurii</i>	92 %

3.2 Anzucht von Biofilmen im Laborversuch

In dieser Arbeit sollten verschiedene Laboransätze zur Biofilmbildung entwickelt, verbessert und verglichen werden. Die gewonnenen Ergebnisse wurden in diesem Kapitel zusammengefasst und als Grundlage für die unter 3.3 beschriebenen Desinfektionsversuche verwendet.

3.2.1 Biofilmanzucht im Becherglasreaktor

Die Methode zur Biofilmanzucht im Becherglasreaktor beruht auf den Ausführungen von (Hübel, 2013). Die Methode wurde in einer Vielzahl von Versuchen überprüft und optimiert und aus den gewonnenen Ergebnissen Anwendungen für diese Methode entwickelt.

3.2.1.1 Methodenoptimierung zur Quantifizierung von Biofilmen

Die Reproduzierbarkeit der Biofilmbildung im Becherglasreaktor wurde zunächst überprüft. Dafür wurden Biofilme des Isolats JCBK5 in mehreren Reaktoren unter gleichbleibenden Bedingungen angezogen und miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 18.

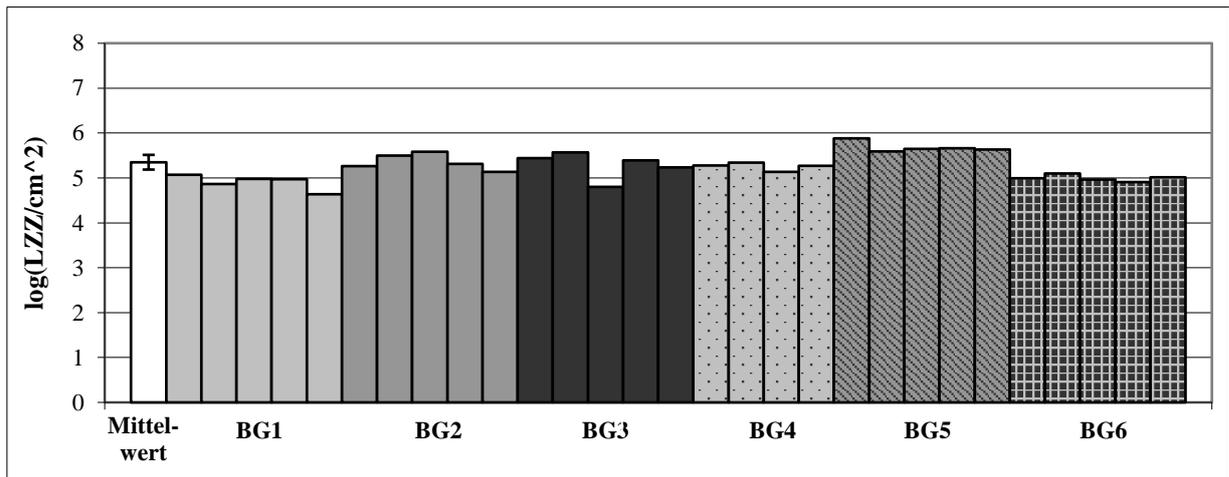


Abbildung 18: Reproduzierbarkeit der Biofilmbildung des Isolats JCBK5 in unterschiedlichen Bechergläsern (Einzelwerte aller Objektträger). Die Bechergläser wurden mit Aliquoten derselben Vorkultur analog angeimpft. Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor in 1 g/L TSB binnen 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C generiert. Ablösung des Biofilms und Lebendzellzahlbestimmung erfolgten wie in Material und Methoden 2.2.5.3ff beschrieben.

Aufgetragen in Abbildung 18 sind die Lebendzellzahlen der JCBK5-Biofilme pro Quadratzentimeter Objektträger. Gewählt wurde dafür eine logarithmische Darstellung der Einzelwerte. Der weiße Balken zeigt den Mittelwert aus allen Einzelbestimmungen und die einfache Standardabweichung +/- dieses Wertes an. Die Bewachsung der einzelnen Objektträger, angezogen in dem gleichen Becherglas, zeigte nur geringe Unterschiede und auch der Vergleich der Ergebnisse verschiedener Anzuchtansätze war ohne große Fehler möglich. Im Mittel wurde unter den festgelegten Bedingungen eine logarithmierte Lebendzellzahl von 5,3 pro Quadratzentimeter Bewuchsfläche und eine Standardabweichung von +/-0,16 ermittelt. Daraus, und auch aus den Darstellungen der Einzelwerte, zeigt sich, dass die Methode mit dem gewählten Isolat vergleichbare Werte mit geringer Streuung lieferte und somit gut geeignet als Methode für Laborversuche zur Biofilmbildung war.

3.2.1.1.1 Vorbehandlung der Wachstumsoberfläche

Um die Anhaftung des Biofilms am Objektträger zu verbessern, wurde überprüft, ob durch verschiedene Vorbehandlungen der Objektträger eine bessere Voraussetzung für das Wachstum des Biofilms gegeben war. Die Behandlung der Objektträger erfolgte, wie in Material und Methoden 2.2.5.2.1 beschrieben. Um die Biofilmbildung der verschiedenen Varianten der Vorbehandlung zu vergleichen, wurden in Becherglasreaktoren vorbehandelte und unvorbehandelte Objektträger in 1 g/L TSB-Medium mit einer Kultur des Stammes JCBK5 für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Die, wie unter 2.2.5.3ff beschrieben, ermittelten Lebendzellzahlen wurden auf die Lebendzellzahl bei unbehandelten Glasträgern bezogen und in Abbildung 19 als prozentualer Anteil aufgetragen.

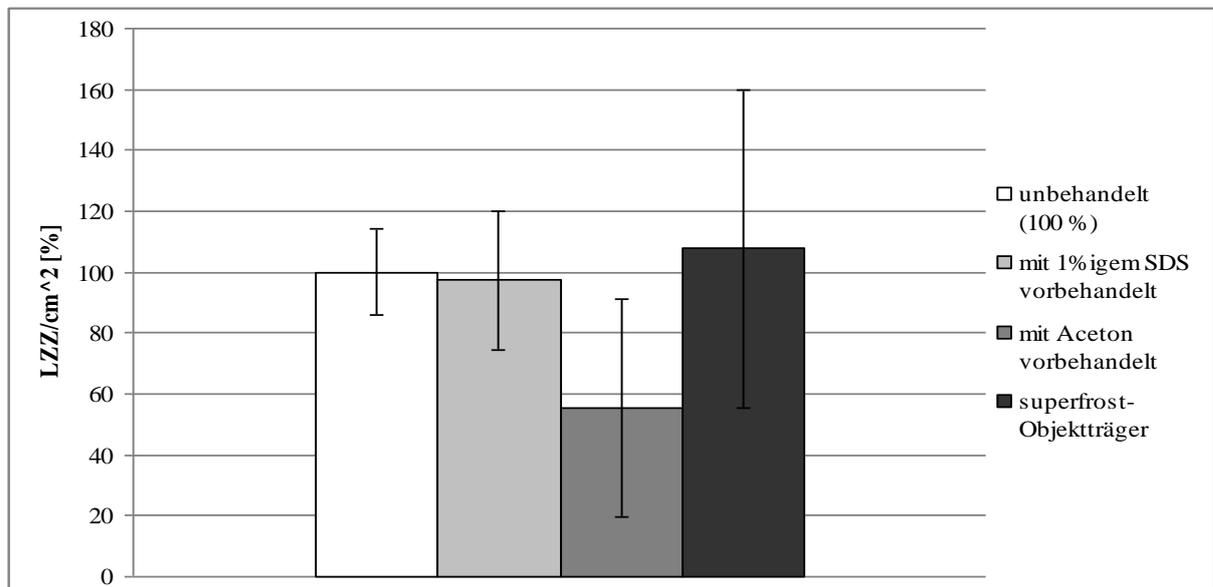


Abbildung 19: Optimierung der Wachstumsoberfläche bei der Biofilmbildung des Isolats JCBK5 (100 % = LZZ bei Objektträgern ohne Vorbehandlung). Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor in 1 g/L TSB nach 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C erhalten. Ablösung des Biofilms und Lebendzellzahlbestimmung erfolgten wie in 2.2.5.2.3ff beschrieben. **Ohne Vorbehandlung** = Objektträger der Firma Roth, aus der Packung entnommen und poliert (=100 %). **Mit 1 % SDS vorbehandelt** = Objektträger der Firma Roth wurden 5 min in 1 % Natriumdodecylsulfat gewaschen, gründlich mit VE-Wasser abgespült und poliert. **Mit Aceton vorbehandelt** = Objektträger der Firma Roth wurden 5 min in Aceton gewaschen und anschließend in einer Färbekammer vollständig abgedampft. **Superfrost-Objektträger** = Objektträger der Firma Thermo Scientific, aus extra-weißem Glas hergestellt, sauber gewaschen und poliert. Den Messreihen liegt je eine 3fache Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.5.2.1 zu entnehmen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei den Mittelwerten der verschiedenen Methoden vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden, die keinen signifikanten Unterschied aufwiesen. Die einzige Ausnahme bildete dabei die Messreihe der mit Aceton vorbehandelten Objektträger. Im Mittel konnte dort nur gut die Hälfte an lebenden Zellen pro Flächeneinheit bestimmt werden. Die

Standardabweichungen der Vorbehandlungsverfahren zeigten dagegen bei allen Messreihen deutliche Unterschiede. Die geringste Streuung wurde dabei bei den unbehandelten Flächen erreicht. Die Spanne der Streuung nach einer Behandlung mit SDS-Lösung war im Vergleich etwas größer. Die Werte der mit Aceton vorbehandelten Objektträger und der Superfrost-Objektträger lieferten nahezu keine reproduzierbaren Ergebnisse. Es zeigte sich also, dass die rein mechanische Vorbehandlung durch einfaches Polieren mit einem Ledertuch, die Methode der Wahl darstellen sollte und wurde daher als fester Bestandteil der Methode beibehalten.

Als mögliche Gründe für die schlechten Ergebnisse der anderen Vorbehandlungen könnten Chemikalienrückstände durch unzureichendes Spülen (SDS-Messreihe) oder auch Abdampfen (Aceton-Messreihe) sein. Ebenfalls wäre bei der Behandlung mit Aceton auch ein verbleibender Rückstand durch nicht flüchtige Verunreinigungen denkbar. Die Superfrost-Objektträger sind durch den Hersteller oberflächenbehandelt. Sie sollen die Adhäsion von Gewebeschnitten oder anderen Präparaten an den Objektträger fördern (Thermo scientific). Daher wurde vermutet, dass die dafür zugrunde liegende Oberflächenbehandlung ebenfalls bei der Bildung von Biofilmen vorteilhaft sein könnte, was durch die generierten Ergebnissen allerdings nicht bestätigt werden konnte.

3.2.1.1.2 Auftrennung von Zellaggregaten ausgewählter Isolate

Mikroskopische Untersuchungen von Suspensionen haben gezeigt, dass das *Staphylococcus*-Isolat JCBK5 in Aggregate bildet (siehe Abbildung 20). Dies führt dazu, dass eine zu kleine LZZ vorgetäuscht wird. Ähnliches ist auch bei abgelösten Biofilmen dieses Isolats, aber auch anderer Stämme, zu erwarten.

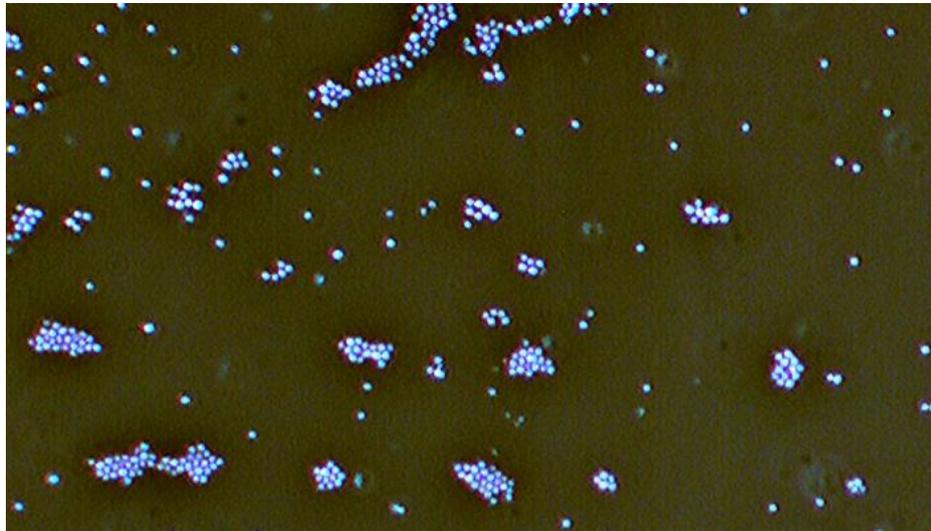


Abbildung 20: Mikroskopische Betrachtung einer JCBK5-Suspension. Die Fotografie wurde bei 400facher Vergrößerung im Motic „Phasenkontrast aufgenommen.

Die Ablösung der Biofilme übt zwar sicherlich einen Einfluss auf die Biofilmstruktur aus, eine komplette Vereinzelung der Biofilmbakterien ist dabei aber eher unwahrscheinlich. Deshalb wurde ein Versuch durchgeführt, in dessen Verlauf überprüft wurde, welche Auswirkungen eine Ultraschallbehandlung auf die Lebendzellzahlen von verschiedenen Isolat-Kulturen ausübt. Es wurde demnach getestet, ob durch mechanische Einwirkung die Aggregate gelöst werden können und somit die Bestimmung der Lebendzellzahl reproduzierbarer durchgeführt werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden Bakteriensuspensionen verschiedener Trinkwasserisolate, wie unter Material und Methoden 2.2.5.3.1 beschrieben, aliquotiert und die Abhängigkeit von Lebendzellzahl und Dauer der Beschallung untersucht. Die ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 21 zusammengetragen.

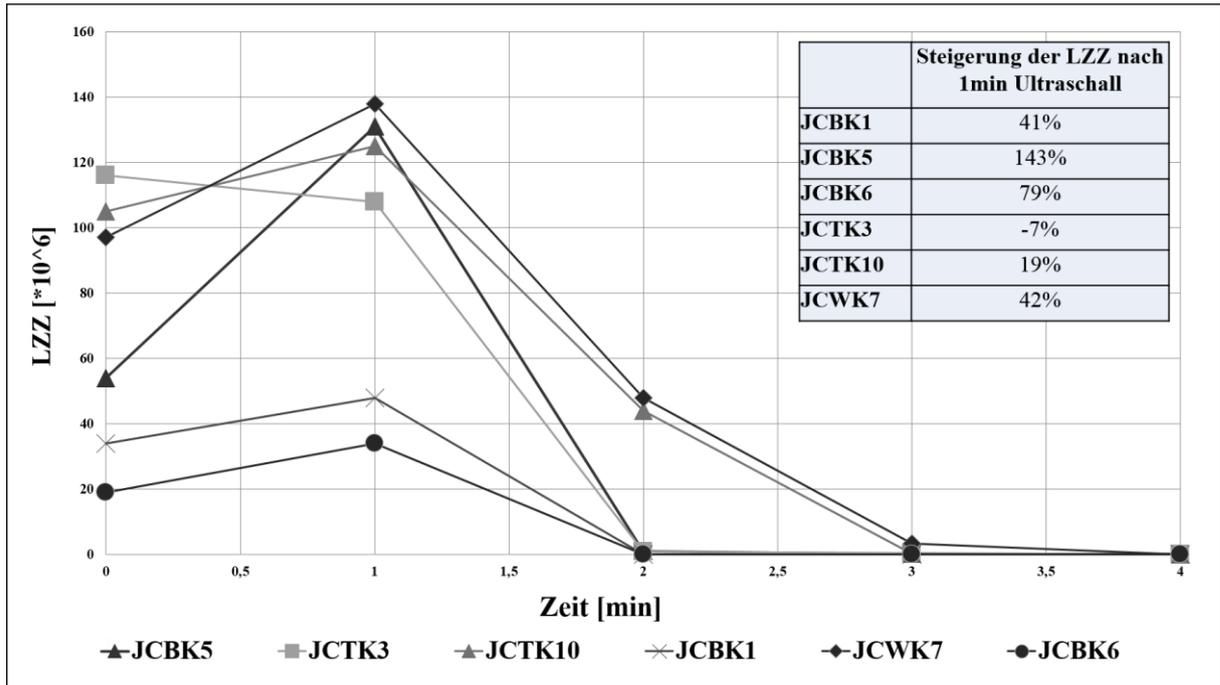


Abbildung 21: Lebendzellzahl von Suspensionen verschiedener Trinkwasserisolate in Abhängigkeit von der Beschallungsdauer mit Ultraschall. Für den Versuch wurden Suspensionen auf eine OD = 0,2 ($\lambda = 546 \text{ nm}$) eingestellt. Die Beschallung mit Ultraschall erfolgte über die angegebenen Zeiträume mit einer Intensität von 80 % in kontinuierlichem Betrieb. Die Lebendzellzahl wurde durch Ausplattieren auf TSB-Agar und Bebrütung bei 36 °C ermittelt. Die prozentuale Steigerung der Lebendzellzahlen wurde auf den Ausgangswert der jeweiligen Reihe ohne Ultraschallbehandlung bezogen (=100 %). Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.5.3.1 zu entnehmen.

Die Ergebnisse der Ultraschallbehandlung zeigten bei allen untersuchten Isolaten nach einer Minute einen mehr oder weniger deutlichen Anstieg in der Lebendzellzahl an. Lediglich das Isolat JCTK3 bildete diesbezüglich eine Ausnahme und zeigte eine Reduzierung der Zelldichte um 7 %. Mit zunehmender Beschallungszeit wurden auch die Keimgehalte der anderen Suspensionen deutlich geringer, sodass bereits nach 2 min in vier der sechs Versuchsansätze nahezu keine lebenden Zellen mehr bestimmt werden konnten. Die Isolate JCTK10 und JCWK7 zeigten dagegen auch noch nach 3 min Ultraschallbehandlung Vitalität, wenn auch mit stark fallender Tendenz. Eine Vergrößerung der Lebendzellzahl konnte also nur in den ersten 60 sec der Ultraschallbehandlung erreicht werden. Der massivste Anstieg wurde dabei bei dem Isolat JCBK5, mit einer Zunahme von 143 % im Vergleich zum Ausgangswert, festgestellt. Die Ergebnisse zeigten somit, dass durch Ultraschall Zellcluster und –aggregate aufgetrennt werden können, was die Zunahme der Lebendzellzahlen nach 60 sec Ultraschall bestätigte. Die Wärmeentwicklung wurde zwar durch eine Kühlung der Proben reduziert, könnte aber im jeweiligen Probenansatz lokal doch eine negative Beeinflussung der Zellen bewirkt haben. Generell bestätigen die Ergebnisse allerdings die Vermutung, dass durch Ultraschallanwendung

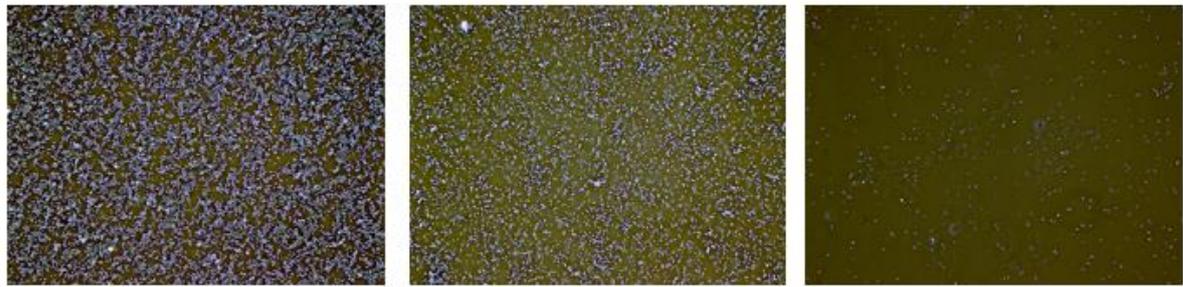
eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit von Lebendzellzahlbestimmungen in Biofilmversuchen erreicht werden konnte. Die optimale Auftrennung der Mikroorganismen-Aggregate, bei gleichzeitig möglichst geringer Mortalitätsrate, ist dabei die Schwierigkeit. Für die untersuchten Isolate, insbesondere den Stamm JCBK5, ergab sich das optimale Verhältnis bei 80 % Intensität und 1 min Beschallungsdauer. Diese Methodenerweiterung wurde daher für die weiteren Versuche in die bestehende Methode integriert.

3.2.1.2 Biofilmbildung von Trinkwasserisolaten

Das Vermögen der Trinkwasserisolate Biofilme unter verschiedenen Bedingungen im Becherglasreaktor zu bilden wurde, wie unter Material und Methoden 2.2.5.2 bis 2.2.5.4 beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind fortfolgend aufgeführt.

3.2.1.2.1 Qualifizierung mittels Mikroskopie

Die qualitative Beurteilung der Biofilme wurde wie in Material und Methoden 2.2.5.4 mikroskopisch durchgeführt. Die Klassifizierung erfolgte wie in Abbildung 22 veranschaulicht. Die Biofilme der verwendeten Trinkwasserisolate wurden dafür über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden in TSB-Medium unterschiedlicher Konzentrationen bei einer Temperatur von 28 °C angezogen. Die daraus resultierenden Ergebnisse fassen die Abbildungen 23 und 24 zusammen.



„gut“

Dichte Besiedlung der Objektträger, teilweise mehrschichtige Anlagerung

„mittel“

ca. 50% der Glasoberfläche sind einschichtig mit Bakterien besiedelt

„schlecht“

Keine, oder nur sehr geringe Besiedlung der Objektträger

Abbildung 22: Optische Qualifizierung von Biofilmen. Die dargestellten Photographien wurden bei 400facher Vergrößerung im Motic „Phasenkontrast“ aufgenommen. Die dafür notwendigen Biofilme wurden durch Bebrütung im Becherglasreaktor generiert und die Klassifizierung wie unter den Bildern beschrieben festgelegt.

Die Abbildung 23 gibt nun zunächst die Ergebnisse in Bezug auf die Biofilmbildung der Isolate aus dem Warmwassertank in F.06.74 wieder. Die Mehrheit der Isolate bildete binnen 24 Stunden in keinem der Medien einen flächendeckenden Biofilm aus. Die Isolate JCBK2, JCWK3 und JCWK4 zeigten über den gesamten Bebrütungszeitraum hinweg keine Biofilmbildung auf den Glasobjektträgern und das Isolat JCBK1 benötigt drei Tage zur Ausbildung eines stabilen und flächendeckenden Biofilms. JCWK7 bildete in 1 g/L TSB-Medium nach 48 Stunden einen dichten Biofilm aus, der sich nach 72 Stunden schon wieder reduziert hatte. Die Stämme JCBK5 und JCBK6 zeigten die beste Eignung um in diesem Versuchsaufbau schnell Biofilme auszubilden (siehe 1 g/L TSB nach 24 Stunden) und zeigten generell die beste Biofilmbildung der hier untersuchten Isolate. JCBK5-Kulturen bildeten in 3 g/L TSB nach 48 Stunden einen guten Biofilm. Bei höherem Nährstoffangebot wurde ein im Vergleich weniger ausgeprägter Biofilm beobachtet. Die Biofilmbildung war demnach nicht nur von der Bebrütungszeit, sondern auch von der Nährmedienkonzentration abhängig, wobei niedrige Konzentrationen vorteilig zu sein schienen. Abnahme der Biofilmstärke, wie zum Beispiel bei Isolat JCWK7 beobachtet, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Biofilm zu dick geworden war und so von der Glasoberfläche abrutschen konnte.

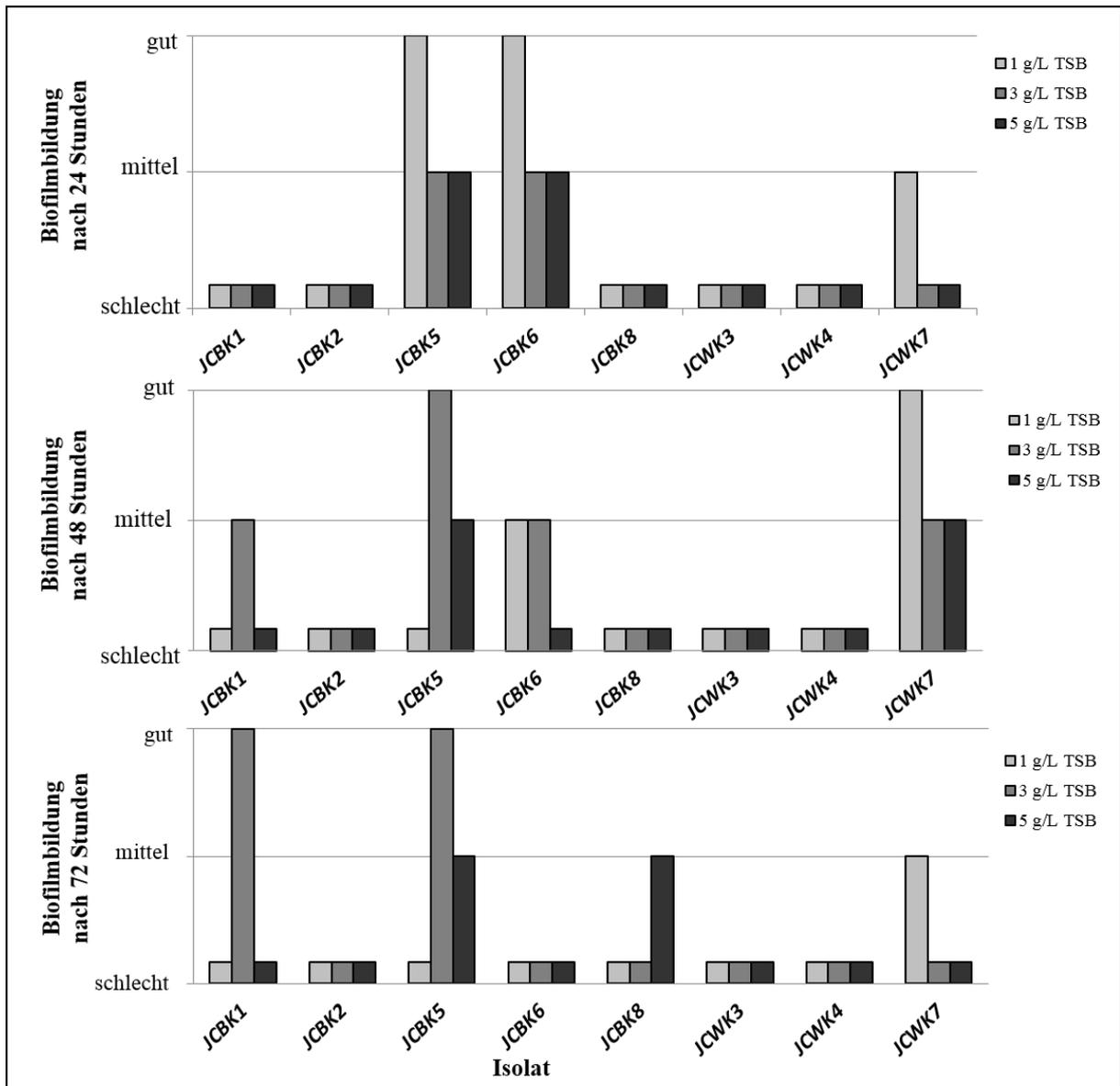


Abbildung 23: Biofilmbildung der Isolate des Warmwassertanks in F.06.74. In den Becherglasreaktoren erfolgte die Bebrütung bei 28 °C, die jeweilige TSB-Konzentration ist der Legende zu entnehmen. Die Biofilmbildung erfolgte auf Glasobjektträgern unter ständigem Rühren und wurde mikroskopisch bestimmt (siehe dafür Abbildung 22). **gut:** dichte Besiedlung der Objektträger, teilweise mehrschichtige Anlagerung; **mittel:** ca. 50 % der Glasoberfläche sind einschichtig mit Bakterien besiedelt; **schlecht:** keine oder nur sehr geringe Besiedlung der Objektträger. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.5.4 zu entnehmen.

Die meisten der in Abbildung 23 aufgeführten Isolate bildeten nur in geringem Maße Biofilme aus. Die Isolate JCTK1, JCTK2, JCTK4, JCTK8 und JCSK1 zeigen gar keine Biofilmbildung. Die ausgeprägteste Eigenschaft zur Ausbildung eines Biofilms zeigten die Isolate JCTK3 und JCTK10 über den gesamten Bebrütungszeitraum hinweg. Die TSB-Konzentration machte bei dem Isolat JCTK3 dabei binnen der ersten 24 Stunden keinen Unterschied, über längere Zeit erwies sich die Biofilmbildung aber in 3 g/L TSB als am zuverlässigsten. Das Isolat JCTK10

bevorzugte für eine stabile Biofilmausprägung dagegen eine Nährmedium-Konzentration von 5 g/L TSB.

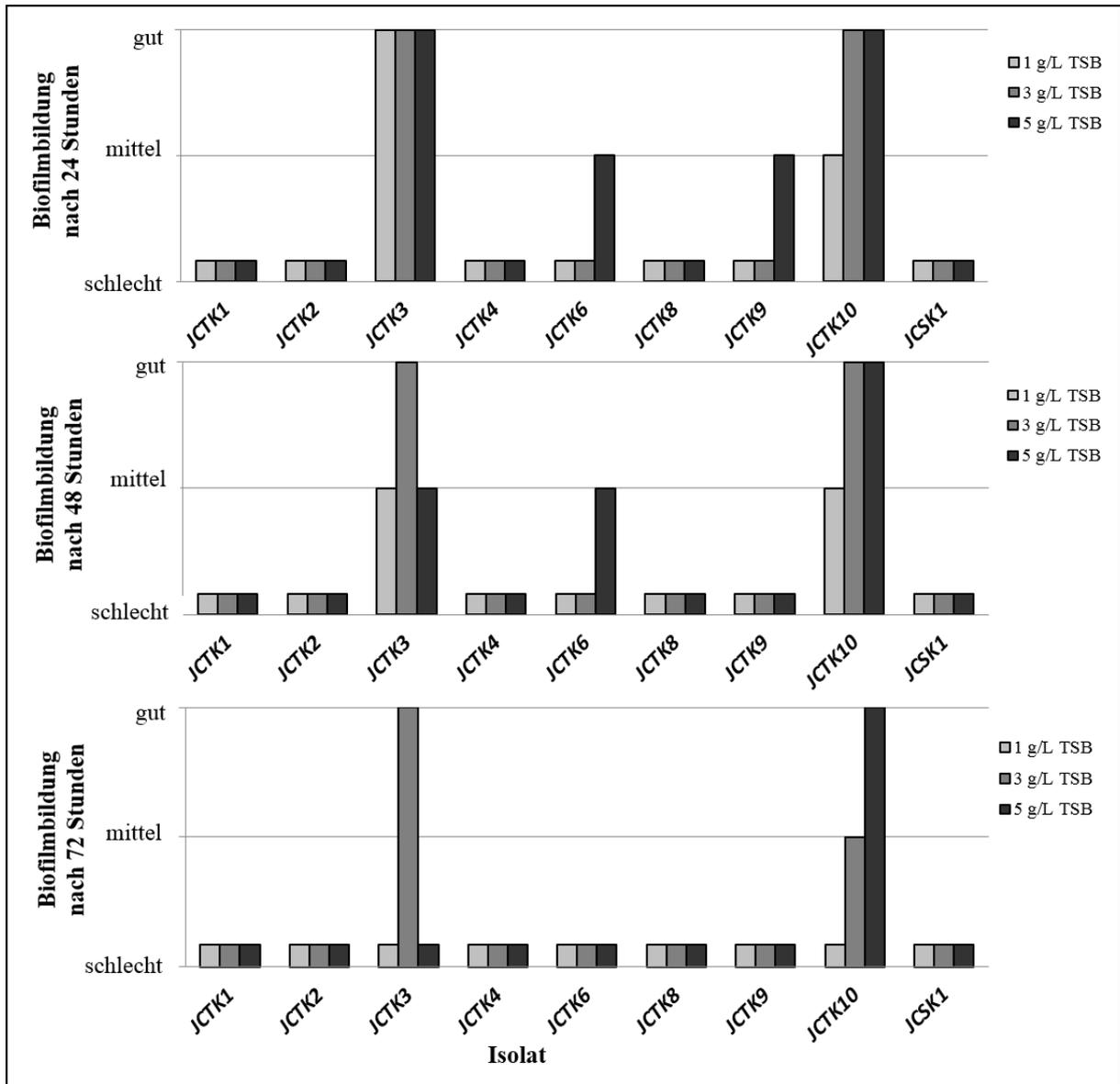


Abbildung 24: Biofilmbildung der Isolate des Wasserhahns in H.14.10. In den Becherglasreaktoren erfolgte die Bebrütung bei 28 °C, die jeweilige TSB-Konzentration ist der Legende zu entnehmen. Die Biofilmbildung erfolgte auf Glasobjektträgern unter ständigem Rühren und wurde mikroskopisch bestimmt (siehe dafür Abbildung 22). **gut:** dichte Besiedlung der Objektträger, teilweise mehrschichtige Anlagerung; **mittel:** ca. 50 % der Glasoberfläche sind einschichtig mit Bakterien besiedelt; **schlecht:** keine oder nur sehr geringe Besiedlung der Objektträger. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.5.4 zu entnehmen.

3.2.1.3 Biofilmbildung von Indikatororganismen nach Trinkwasserverordnung

Die Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) gibt einige Indikatororganismen an, die exemplarisch für mikrobiologische Verunreinigungen von Trinkwasser bestimmt werden (siehe Einleitung 1.4). Die Biofilmbildung einiger Vertreter dieser Mikroorganismen wurde für dieses Unterkapitel untersucht und mittels Mikroskopie qualifiziert (Material und Methoden 2.2.5.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 zusammengefasst.

S. aureus DSM346 bildete über den Zeitraum der Bebrütung nur mäßig Biofilme aus und die Biofilmbildung war, wenn überhaupt, nur in höheren TSB-Konzentrationen zu beobachten. *E. coli* K12 zeigte dagegen sehr schnelles Wachstum in der planktonischen Kultur und nach 48 Stunden eine sehr gute Biofilmbildung bei den höheren Konzentrationen des Nährmediums. Die Biofilme in 3 g/L TSB-Medium waren auch nach 72 Stunden noch stabil, der Biofilm in 5 g/L TSB-Lösung war nach 48 Stunden aber schon so massiv ausgebildete, dass er nach 72 Stunden zu einem großen Teil von der Glasoberfläche abgerutscht war.

E. faecalis DSM20478 bildet in diesem Versuch die stabilsten Biofilme mit guter Haftung auf der Glasoberfläche. Als geeignet zeigten sich besonders die Kombination aus 3 g/L TSB-Medium und 48 Stunden Bebrütung, sowie 5 g/L TSB-Medium und 72 Stunden Bebrütung. Verbessern ließe sich die Biofilmbildung aller Indikatorkeime wahrscheinlich durch eine Erhöhung der Bebrütungstemperatur von 28 °C auf 36 °C, da diese Organismen bei dieser Temperatur ihr Wachstumsoptimum aufweisen (Fuchs, 2014).

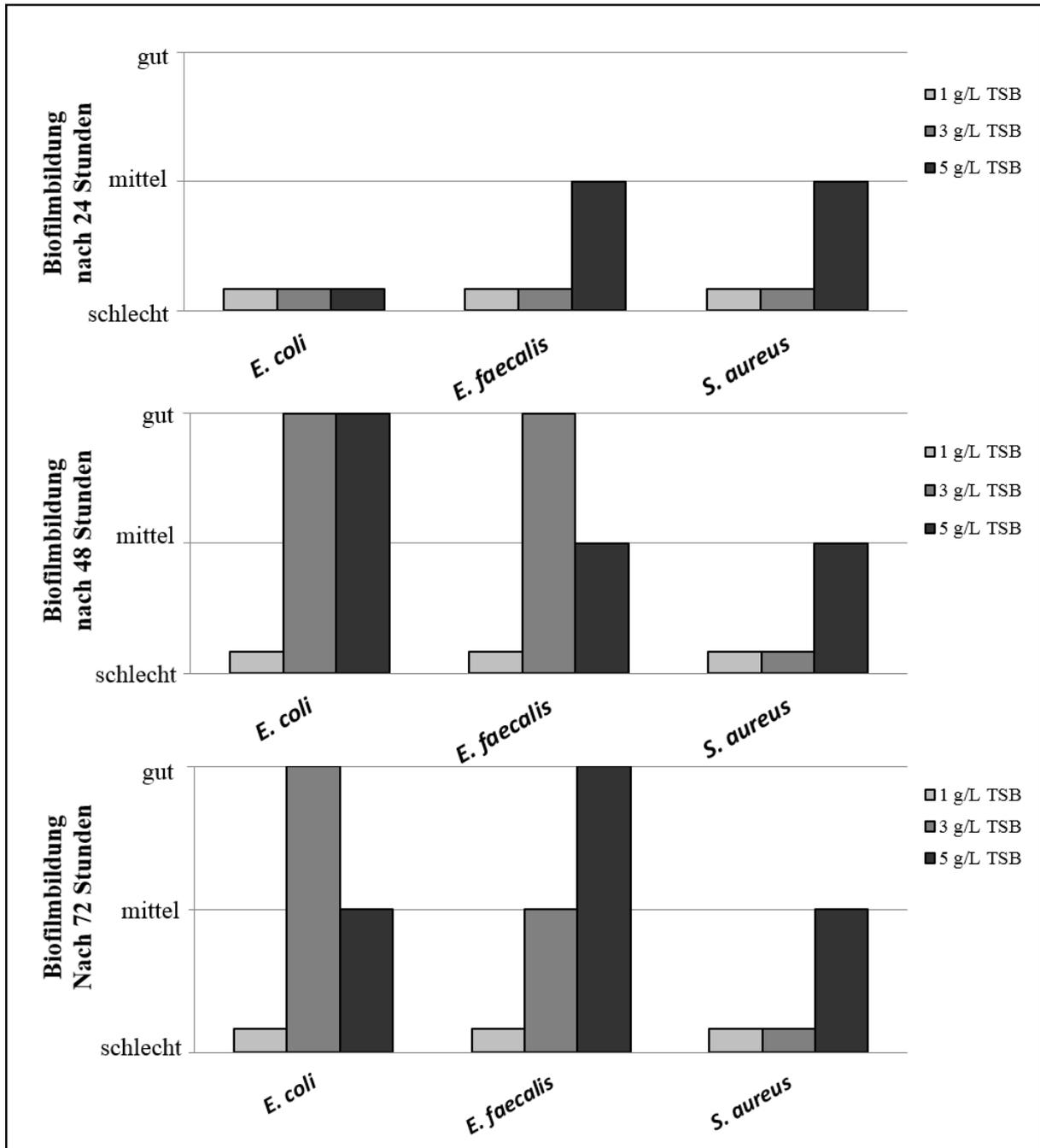


Abbildung 25: Biofilmbildung verschiedener Trinkwasser-Indikatororganismen. In den Becherglasreaktoren erfolgte die Bebrütung bei 28 °C, die jeweilige TSB-Konzentration ist der Legende zu entnehmen. Die Biofilmbildung erfolgte auf Glasobjektträgern unter ständigem Rühren und wurde mikroskopisch bestimmt (siehe dafür Abbildung 22). **gut:** dichte Besiedlung der Objektträger, teilweise mehrschichtige Anlagerung; **mittel:** ca. 50 % der Glasoberfläche sind einschichtig mit Bakterien besiedelt; **schlecht:** keine oder nur sehr geringe Besiedlung der Objektträger. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.5.4 zu entnehmen.

3.2.1.4 Biofilmbildung von Legionellen

Auch Legionellen können in Trinkwassersystemen eine gesundheitliche Gefährdung darstellen und müssen laut Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) darin quantifiziert und gegebenenfalls reduziert werden. Die Biofilmbildung einiger *Legionella*- Stämme zeigt Abbildung 26.

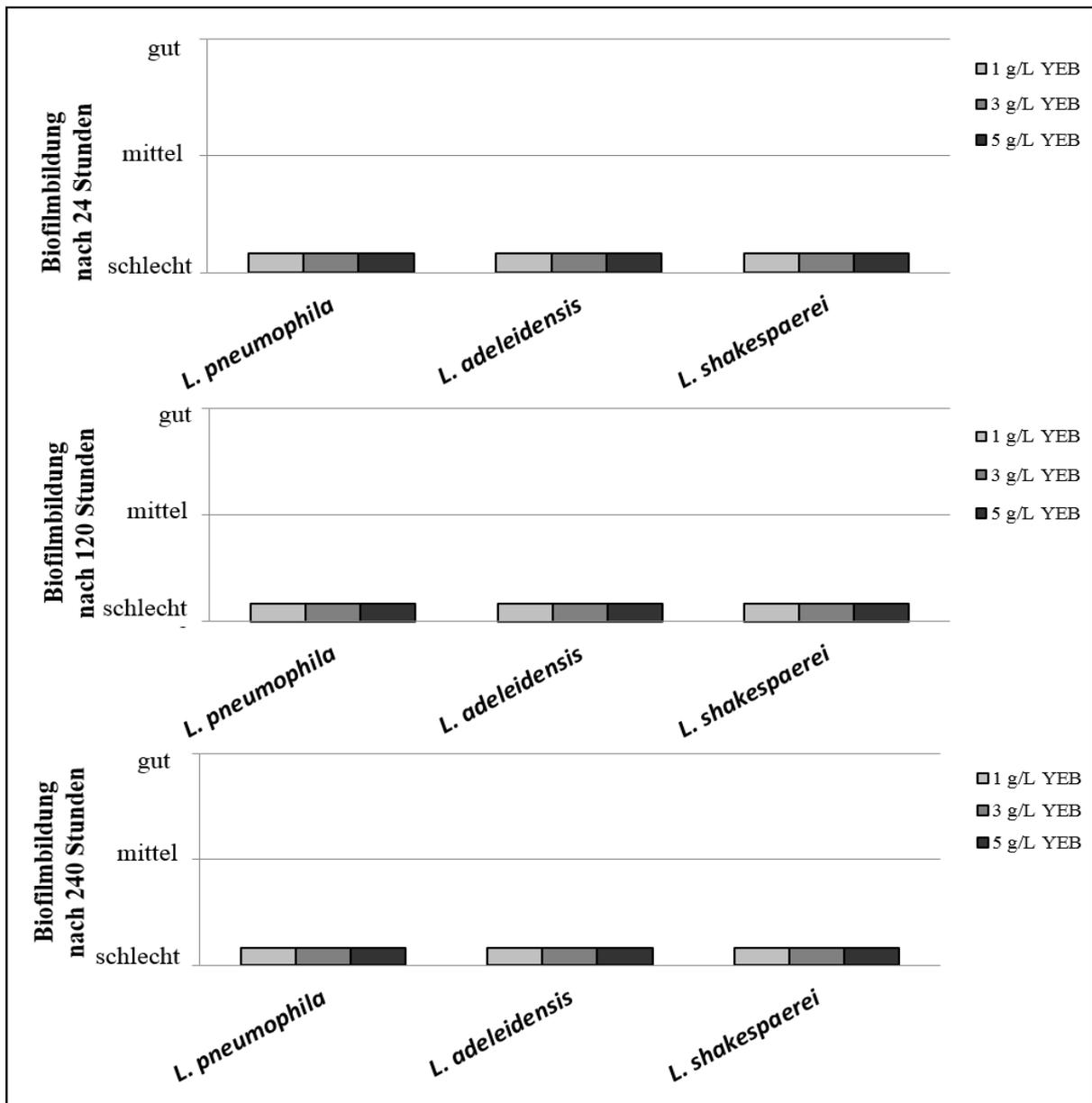


Abbildung 26: Biofilmbildung verschiedener *Legionella*-Stämme. In den Becherglasreaktoren erfolgte die Bebrütung bei 28 °C, die jeweilige YEB3-Konzentration ist der Legende zu entnehmen. Die Biofilmbildung erfolgte auf Glasobjektträgern unter ständigem Rühren und wurde mikroskopisch bestimmt (siehe dafür Abbildung 22). **gut:** dichte Besiedlung der Objektträger, teilweise mehrschichtige Anlagerung; **mittel:** ca. 50 % der Glasoberfläche sind einschichtig mit Bakterien besiedelt; **schlecht:** keine oder nur sehr geringe Besiedlung der Objektträger. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.5.4 zu entnehmen.

Wie die Abbildung 26 zeigt, konnten bei den verwendeten Konzentrationen an Nährmedium in dem gewählten Bebrütungszeitraum keine Biofilme der Legionellen-Stämme angezogen werden. Dies könnte zum einen bedeuten, dass Legionellen keine guten Biofilmbildner sind, zum anderen aber auch, dass die Versuchsbedingungen für die Mikroorganismen nachteilig gewählt wurden. Eine Erhöhung von Bebrütungstemperatur oder Nährstoff-Konzentration, oder ggf. beidem, könnte eine verbesserte Biofilmbildung bewirken. Auch könnten die Beprobungszeitpunkte nach einem, fünf und 10 Tagen Bebrütung nicht richtig gewählt worden sein, sodass ein ggf. dazwischen generierte Biofilm sich schon wieder abgelöst haben könnte. Der Einfluss der Nährmedien-Konzentration wurde in einem weiteren Versuchsaufbau an dem Stamm *Legionella pneumophila* LP1 untersucht und die Ergebnisse in Abbildung 27 zusammengestellt.

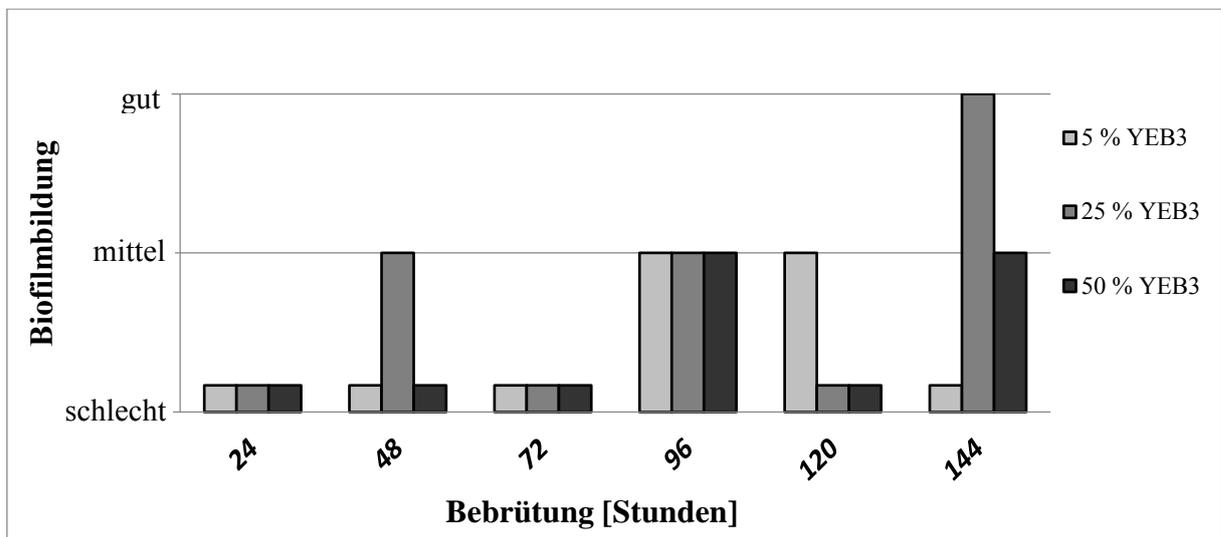


Abbildung 27: Biofilmbildung von *Legionella pneumophila* LP1. In dem Reaktor erfolgte die Bebrütung bei 28 °C, die jeweilige YEB3-Konzentration ist der Legende zu entnehmen. Die Biofilmbildung erfolgte auf Glasobjektträgern unter ständigem Rühren und wurde mikroskopisch bestimmt (siehe dafür Abbildung 22). **gut:** dichte Besiedlung der Objektträger, teilweise mehrschichtige Anlagerung; **mittel:** ca. 50 % der Glasoberfläche sind einschichtig mit Bakterien besiedelt; **schlecht:** keine oder nur sehr geringe Besiedlung der Objektträger. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.5.4 zu entnehmen.

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich, zeigte sich die Bebrütung mit höher konzentriertem Medium erfolgreich. Nach 144 Stunden in 25 % YEB3-Medium wurde ein flächendeckender und teilweise mehrschichtiger Biofilm generiert. Das deutet darauf hin, dass dieser Stamm offensichtlich ein größeres Nährstoffangebot für eine ausreichende Vermehrung benötigt und sich Biofilme erst nach entsprechender Kultivierungszeit vermehrt ausbilden. Die erhöhte Bebrütungszeit der *Legionella*-Biofilme ist dabei wahrscheinlich der im Vergleich zu den

anderen untersuchten Mikroorganismen langen Generationszeit der Legionellen von ca. 3 Stunden geschuldet (Müller et al., 2007). Eine weitere Verlängerung der Bebrütungszeit könnte auch bei den anderen YEB3-Konzentrationen die Biofilmbildung begünstigen.

3.2.2 Biofilmanzucht in 24-well-Mikrotiterplatten

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Quantifizierung von Biofilmen in 24-well-Mikrotiterplatten mittels Kristallviolett-Färbung basiert auf der Methode nach Stepanovic et al. (2000), modifiziert nach Wisbauer (2016).

3.2.2.1 Quantifizierung von Biofilmen mittels Kristallviolett-Färbung

Die ersten Versuche zur Quantifizierung von Biofilmen mittel Kristallviolett-Färbung wurden zur Überprüfung und ggf. Optimierung der Methode durchgeführt. Für diese Versuche wurde das *Staphylococcus*-Isolat JCBK5 ausgewählt, da es bereits im Becherglasversuch eine gute Biofilmbildung zeigte (siehe Ergebnisse 3.2.1).

3.2.2.1.1 Methodenoptimierung

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurde zunächst der Leerwert genauer betrachtet. Dieser ist aufgrund der höchst sensitiven Färbung mittels Kristallviolett zu berücksichtigen. Daher wurde ein Versuch durchgeführt, in dem untersucht werden sollte, ob eine Inkubation der Leerwert-Kavernen mit Medium während der Anzucht der Biofilme, sinnvoll wäre. Außerdem sollte der Einfluss der verwendeten Nährmedien, sowie unterschiedlicher Nährmedium-Konzentrationen untersucht werden. Vorgegangen wurde dabei wie unter Material und Methoden 2.2.6.3 beschrieben. Durchgeführt wurde die Versuchsreihe mit YEB3-Medium und TSB-Medium in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigt Abbildung 28.

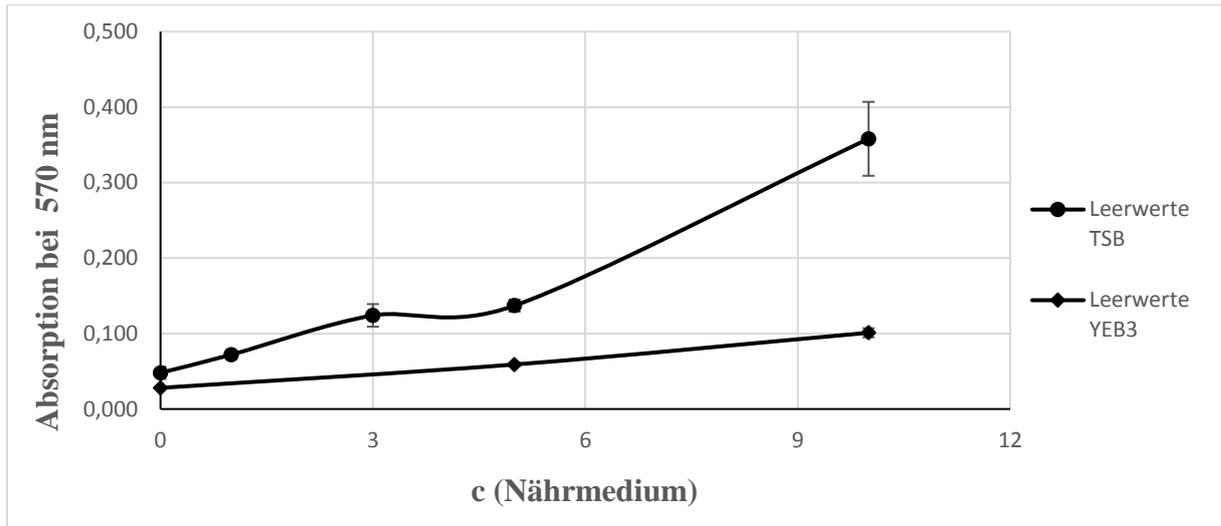


Abbildung 28: Absorption der Leerwerte in Abhängigkeit von der Nährmedien-Konzentration. Dargestellt ist die Absorption verschiedener Leerwerte nach Färbung mit Kristallviolett, aufgetragen gegen die verwendete Nährmedienkonzentration. Der Versuch wurde mit TSB-Medium nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 28 °C und mit YEB3-Medium nach 72 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Die Konzentrationen sind für das TSB-Medium in g/L und bei dem YEB3-Medium in Prozent-Anteil der üblichen Zusammensetzung (siehe Tabelle 3 und 4) angegeben. Den Messreihen liegt je eine 4fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.3 zu entnehmen.

In der Abbildung 28 dargestellt ist die Absorption der Leerwerte nach Färbung mit Kristallviolett bei unterschiedlichen Konzentrationen an TSB- bzw. YEB3-Medium. Aus der Graphik wird ersichtlich, dass es eine Zunahme der Absorption mit steigender Konzentration bei beiden Nährmedien gab, wobei sich die Absolutwerte der verglichenen Medien unterschieden. Die ermittelten Werte legten dabei, zumindest für die untersuchten eher niedrigen Konzentrationen, sogar einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption nach Kristallviolett-Färbung nahe.

Zu begründen ist das Ergebnis dieses Versuchs mit der unspezifischen Bindung von Kristallviolett an verschiedenste organische Verbindungen der untersuchten Medien. Da deren Menge natürlich von der Konzentration der Nährlösung abhängig ist, konnte auch vermehrt Kristallviolett binden, was die höheren Absorptionen der Nährmedien-Proben mit steigender Konzentration erklärte. Für die Richtigkeit des Versuchs zur Biofilmbildung in der Mikrotiterplatte, wie unter Material und Methoden 2.2.6.2 beschrieben, bedeutet das, dass die mitgeführten Leerwerte in den gleichen Konzentrationen an Nährmedium wie die

Versuchsansätze kultiviert werden sollten, was bei diesen Versuchen fortan auch umgesetzt wurde.

Ein weiterer Ansatz war die Verkürzung der Hitzeфикierung der Biofilme von 60 min auf 15 min bei gleichzeitiger Temperaturerhöhung. Daher wurde wie in Material und Methoden 2.2.6.4 beschrieben eine verkürzte Hitzeфикierung im Vergleich zu der üblichen Vorgehensweise untersucht und die Ergebnisse folgend in Abbildung 29 dargestellt.

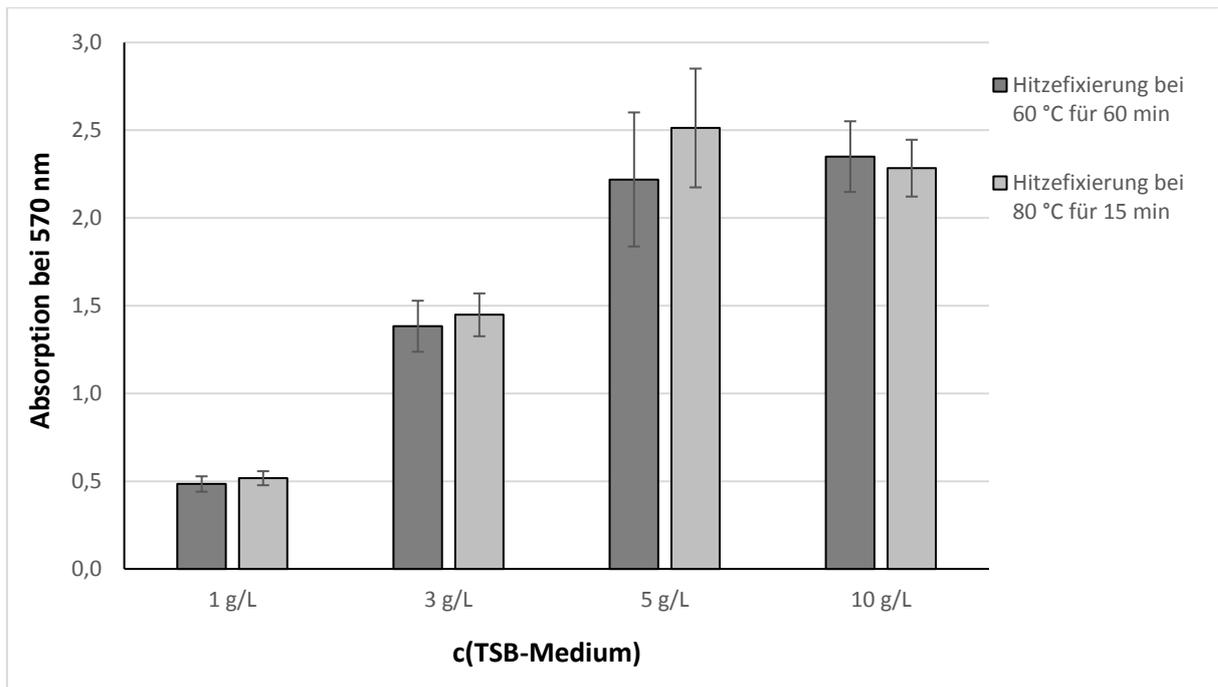


Abbildung 29: Hitzeфикierung im 24-well-Mikrotiterplatten-Versuch mit dem Isolat JCBK5. Die verwendeten Biofilme wurden in 1 g/L TSB-Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 28 °C angezogen. Die Hitzeфикierung wurde wie im Diagramm angegeben durchgeführt und die Biofilme anschließend, wie in Material und Methoden 2.2.6.2 beschrieben, mit Kristallviolett gefärbt und die Absorption bei 570 nm photometrisch bestimmt. Den Messreihen liegt jeweils eine 4fache Bestimmung zugrunde, die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder.

Die Modifizierung der Hitzeфикierung im 24-well-Mikrotiter-Versuch, wie sie in Abbildung 29 dargestellt ist, wurde zur Verkürzung der Wartezeiten durchgeführt. Dargestellt sind die Absorptionen von JCBK5-Biofilmen gleicher Anzucht, die entweder 60 min bei 60 °C (Methode nach Wisbauer) oder bei 80 °C für 15 min (Modifizierung) getrocknet wurden. Evident ist, dass sich bei allen untersuchten TSB-Konzentrationen sehr ähnliche Werte für die unterschiedlichen Trocknungsverfahren ergaben. Es konnte weder ein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten, noch in dem Ausmaß der Streuung beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigten damit, dass die Verkürzung der Trocknungsphase bei gleichzeitiger

Erhöhung der Temperatur keinen Nachteil gegenüber der bisher verwendeten Methode aufwies. Auch die Dicke des Biofilms, die in diesem Versuch abhängig von der Nährmedium-Konzentration in den Kavernen war, hatte keinen Einfluss auf die Vergleichbarkeit der Resultate. Daraus ergab sich für folgende Durchführungen des Versuchs, dass der Hitzeschritt auf 15 min bei 80 °C verkürzt wurde.

Als letzte Überprüfung der Methode wurde der Zusammenhang zwischen der Absorption nach Kristallviolett-Färbung und der optischen Dichte von Biofilmen näher betrachtet. Da die optische Dichte von Bakteriensuspensionen als Quantifizierungsmethode für die Zellmasse herangezogen werden kann (Fuchs, 2014) stellte sich die Frage, ob sich das auch auf Biofilme übertragen ließe. Es sollte überprüft werden, ob die Färbung ggf. durch die schneller und einfacher zu bestimmende optische Dichte ersetzt werden könnte. Dafür wurde die Versuchsanordnung 2.2.6.5 befolgt und die daraus resultierenden Ergebnisse in Abbildung 32 dargestellt. Der Schritt der Färbung mittels Kristallviolett wäre damit überflüssig und somit die Quantifizierung der Biofilme deutlich vereinfacht. Die Abbildung 30 zeigt daher die Abhängigkeit zwischen Absorption der gefärbten Biofilme und der optische Dichte von entsprechenden Biofilmsuspensionen. Aufgeführt sind dabei die Ergebnisse für JCBK5-Biofilme nach einer Anzuchtzeit von 24 bis 72 Stunden.

Die Auftragung zeigt, dass die optischen Dichten aller Biofilmsuspensionen unter einem Wert $OD_{(546\text{ nm})} = 0,1$ lagen. Die Absorptionen nach Färbung waren dagegen deutlich größer, bis hin zu Werten von etwa $Abs_{(570\text{ nm})} = 0,8$. Die Ergebnisse der Diagramme zeigen zwar, dass mit steigender optischer Dichte auch die Absorptionen der korrespondierenden Biofilmproben zunahmen, ein linearer Zusammenhang konnte allerdings nicht festgestellt werden, wobei die Ergebnisse nach 48 Stunden Biofilmanzucht noch am ehesten einen linearen Zusammenhang erahnen ließen. Daraus ergab sich, dass die Färbung der Biofilme ein notwendiger Schritt ist um Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der Methode zu gewährleisten. Durch die im Vergleich größeren Absolutwerte bei der Absorption wurde die Quantifizierung genauer und der Fehler gleichzeitig geringer. Daher wurde der Färbeschritt auch bei den weiteren Versuchen verwendet um die Biofilmbildung zu quantifizieren.

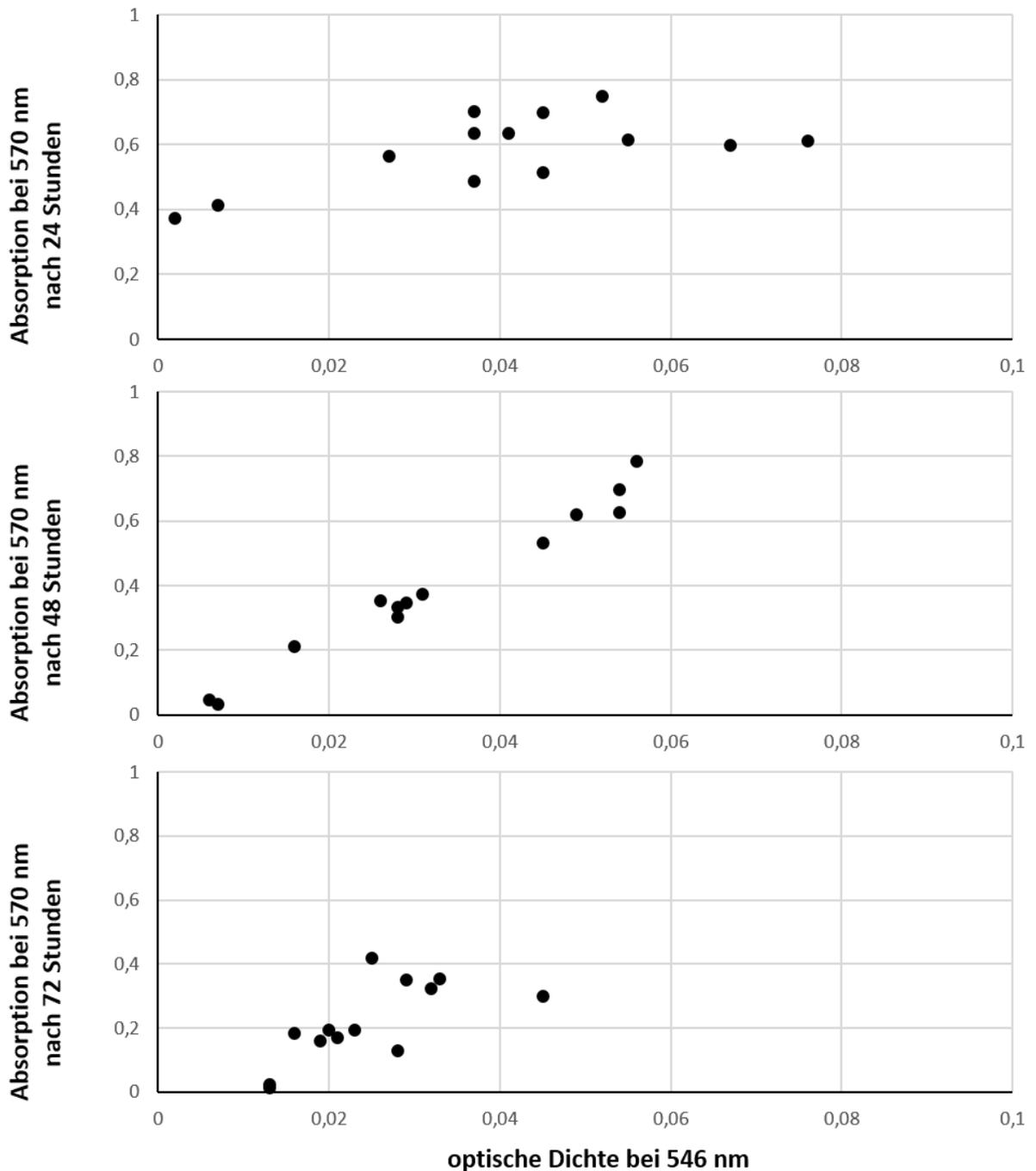


Abbildung 30: Korrelation zwischen optischer Dichte und Absorption von Biofilmen des Isolats JCBK5. Die Biofilme wurden in 24-well-Mikrotiterplatten in 1 g/L TSB-Medium binnen 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C generiert. Dargestellt sind die durch Kristallviolett-Färbung bestimmten Absorptionen der abgelösten Biofilme bei 570 nm aufgetragen gegen deren optische Dichte bei 546 nm. Den Messreihen liegt je eine 4fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.5 zu entnehmen.

3.2.2.1.2 Biofilme der *Staphylococcus* sp. JCBK5

Die optimierte Quantifizierungsmethode der Färbung von Biofilmen mit Kristallviolett (vergl. Material und Methoden 2.2.6.6) wurde genutzt um Biofilme des Trinkwasserisolats JCBK5 in verschiedenen Konzentrationen an TSB-Medium und nach unterschiedlich langer Bebrütung zu quantifizieren. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 31.

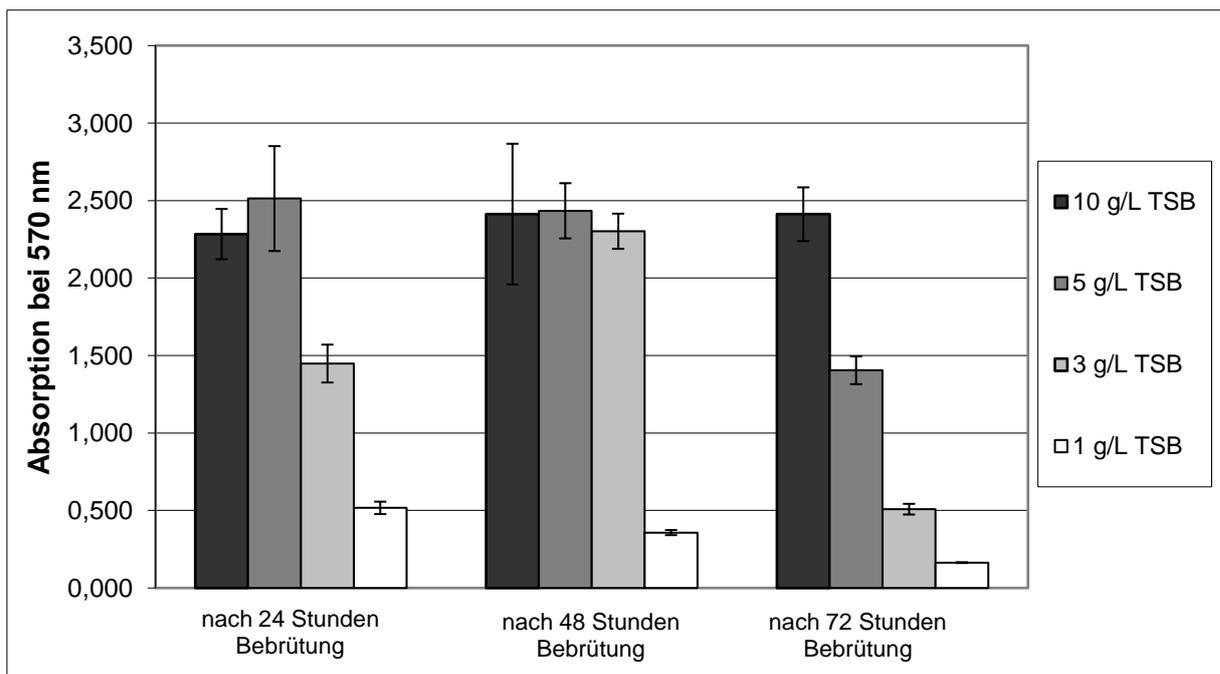


Abbildung 31: Biofilmbildung des Trinkwasserisolats JCBK5 in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums und der Bebrütungszeit. Die Biofilme wurden in 24-well-Mikrotiterplatten, in der jeweilig angegebenen TSB-Konzentration, nach den angegebenen Zeitenräumen bei 28 °C Bebrütung generiert. Dargestellt sind die nach Kristallviolett-Färbung erzeugten Absorptionen der abgelösten Biofilme bei 570 nm. Den Messreihen liegt je eine 4fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.6 zu entnehmen.

Die maximale Absorption der meisten Messreihen wurde durch die Biofilme des Isolats JCBK5 nach 48 Stunden Bebrütung erreicht, wobei es zu diesem Zeitpunkt keinen signifikanten Unterschied in den Mittelwerten der Absorptionen gab. Lediglich die Konzentration von 1 g/L TSB-Medium bewirkte eine deutlich geringere Biofilmbildung. In Kombination mit den Medienkonzentrationen 10 g/L, bzw. 1 g/L TSB wurde die maximale Absorption der jeweiligen Messreihe und damit der ausgeprägteste Biofilm bereits nach 24 Stunden Bebrütung erreicht, auch wenn sich die absoluten Werte dabei um den Faktor fünf unterschieden und die Ausprägung der Biofilme bei Messreihe 1 g/L TSB-Medium deutlich kleiner war. Bei der

höheren der beiden TSB-Konzentrationen blieb dieser Maximalwert über den gesamten Beprobungszeitraum hinweg konstant. Bei der Messreihe in 1 g/L-Medium zeigte sich dagegen mit zunehmender Inkubation eine Abnahme in der Absorption. Auch die Ergebnisse der Ansätze in 5 g/L TSB-Medium blieben in dem Zeitraum von 24 bis 48 Stunden konstant, nahmen danach allerdings wieder ab. In 3 g/L Medium bildete sich der Biofilm binnen 48 Stunden komplett aus und nahm dann im weiteren Zeitverlauf deutlich reduzierte Werte (Absorption von ca. 2,3 auf 0,5) an.

3.2.2.1.3 Biofilme der Indikatororganismen

Auch für die Quantifizierung der Indikatororganismen gemäß Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) wurde die optimierte Methode (siehe 2.2.6.6) der Kristallviolett-Färbung genutzt. Die Abbildung 32 stellt die Biofilmbildung von *E. coli* K12, *E. faecalis* DSM20478 und *S. aureus* DSM346 im 24-well-Mikrotiterplatten-Versuch vergleichend dar.

Die Biofilme wurden in TSB-Medium der angegebenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden angezogen und anschließend quantifiziert. Die dargestellte Absorption bei 570 nm nach Färbung mit Kristallviolett wurde dabei als Maß für die Biofilmbildung verwendet. Im direkten Vergleich der untersuchten Mikroorganismen zeigte sich zunächst, dass *E. coli* K12 im Mittel den massivsten Biofilm ausbildete. Die Biofilme dieses Stammes zeigten in 10 g/L TSB-Medium über den Zeitraum der Bebrütung eine stetige Zunahme, bis hin zu einem Maximalwerte der Absorption von knapp 3,0. Bei den mittleren TSB-Konzentrationen von 3 g/L, bzw. 5 g/L TSB-Lösung wurden jeweils Anstiege in der Ausprägung der Biofilme im Zeitraum von 24 auf 48 Stunden, und dann eine Abnahme zu 72 Stunden hin festgestellt. In 1g/L TSB-Medium war die maximale Biofilmdicke bereits nach 24 Stunden Bebrütung erreicht, eine signifikante Zunahme im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden gab es nicht. Mit längerer Inkubation reduzierte sich auch hier der Biofilm wieder. *E. faecalis* DSM20478 erreichte in 10 g/L TSB-Medium seine maximale Biofilmdicke bei einer Absorption von ca. 1,2 rel. Einheiten, was nur gut einem Drittel der Maximalstärke der *E. coli* K12-Biofilme (10 g/L TSB, nach 72 Stunden) entsprach. Bei *E. faecalis* DSM20478 zeigte sich besonders deutlich eine Abhängigkeit zwischen der Biofilmausprägung und der Konzentration des Nährmediums, der annähernd lineare Proportionalität zugrunde lag. Die Bildung des Biofilms

schien bei diesem Organismus bereits nach 24 Stunden weitestgehend abgeschlossen zu sein und veränderte sich über den weiteren Bebrütungszeitraum nur noch sehr gering. Die Biofilmbildung des verwendeten Stammes *S. aureus* DSM346 stellte sich als die geringste der untersuchten Bakterienkulturen heraus, der Maximalwerte wurde bei einer Absorption von weniger als 0,7 erreicht. Wobei es über den Beprobungszeitraum eine stetige Zunahme in der Biofilmbildung bei den Ansätzen in 10 g/L Nährstofflösung gab. In den anderen Konzentrationen bildeten sich binnen 24 Stunden Biofilme die sich über die nächsten 24 Stunden nicht veränderten und nach 72 Stunden in ihrer Ausprägung rückläufig waren. Generell wurde bei allen Stämmen eine Zunahme der maximalen Biofilmbildung mit steigender Konzentration der TSB-Lösung festgestellt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war bei allen Versuchsreihen hoch, was sich in den geringen Standardabweichungen widerspiegelte.

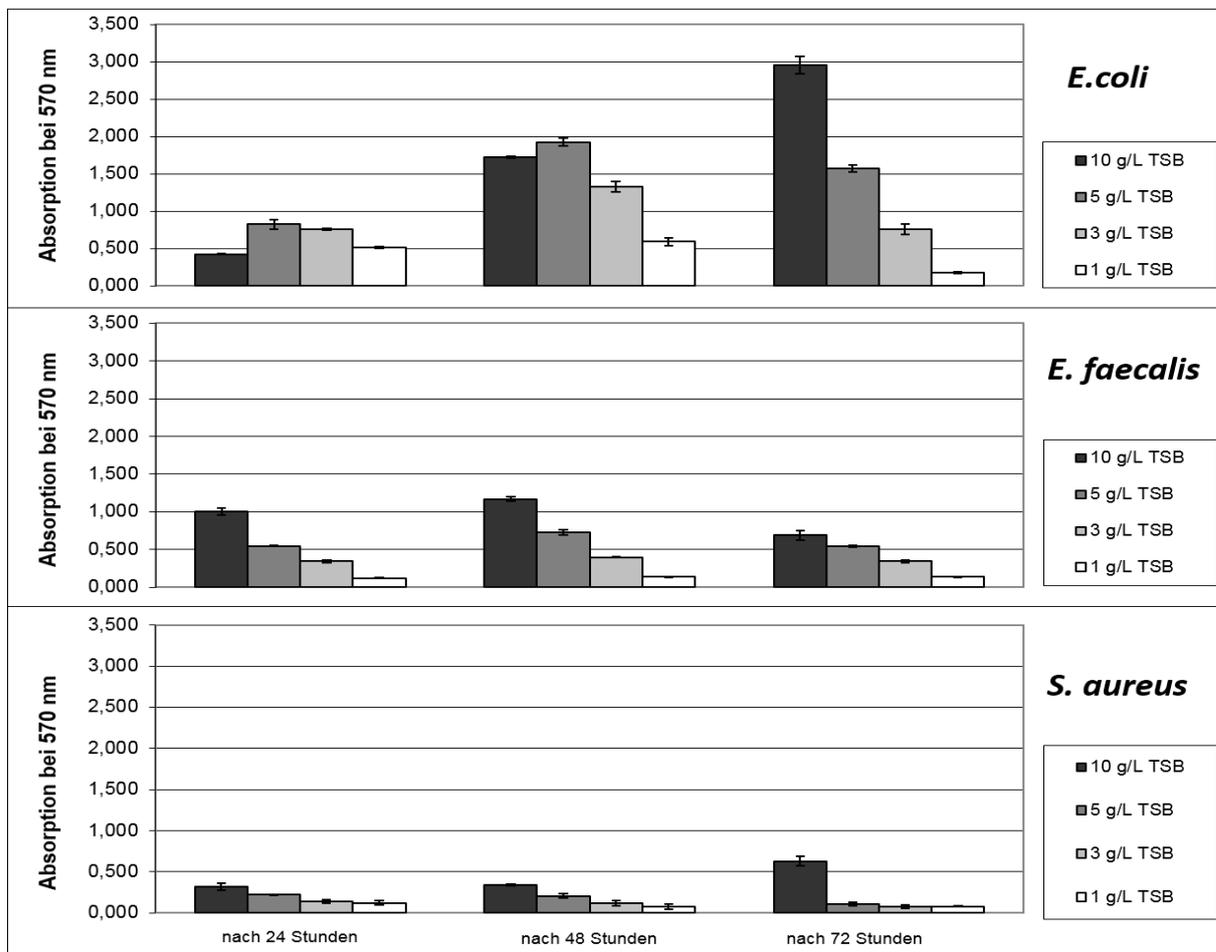


Abbildung 32: Biofilmbildung der Indikatororganismen in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums und der Bebrütungszeit. Die Biofilme wurden in 24-well-Mikrotiterplatten in der jeweilig angegebenen TSB-Konzentration nach den aufgeführten Zeiten bei 28 °C Bebrütung erhalten. Dargestellt sind die nach Kristallviolett-Färbung erzeugten Absorptionen der abgelösten Biofilme bei 570 nm. Den Messreihen liegt

je eine 4fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.6 zu entnehmen.

Abbildung 33 zeigt den Quotienten aus der Absorption der Biofilme nach Färbung mit Kristallviolett und der optischen Dichte der planktonischen Kultur des Überstands der jeweiligen Kaverne. Beide Parameter wurden in diesem Versuch als Maß für die Bakterienmasse genutzt. Durch den dargestellten Quotienten lässt sich somit abschätzen wie groß der Anteil der Bakterien im Reaktionsansatz war, der von der planktonischen in eine sessile Lebensweise gewechselt hatte. Wenn die Absorption steigt oder die optische Dichte sinkt, zeigt sich dieses durch einen größeren Wert im Diagramm. Zu beachten ist in der Abbildung 33 die unterschiedliche Skalierung der y-Achse.

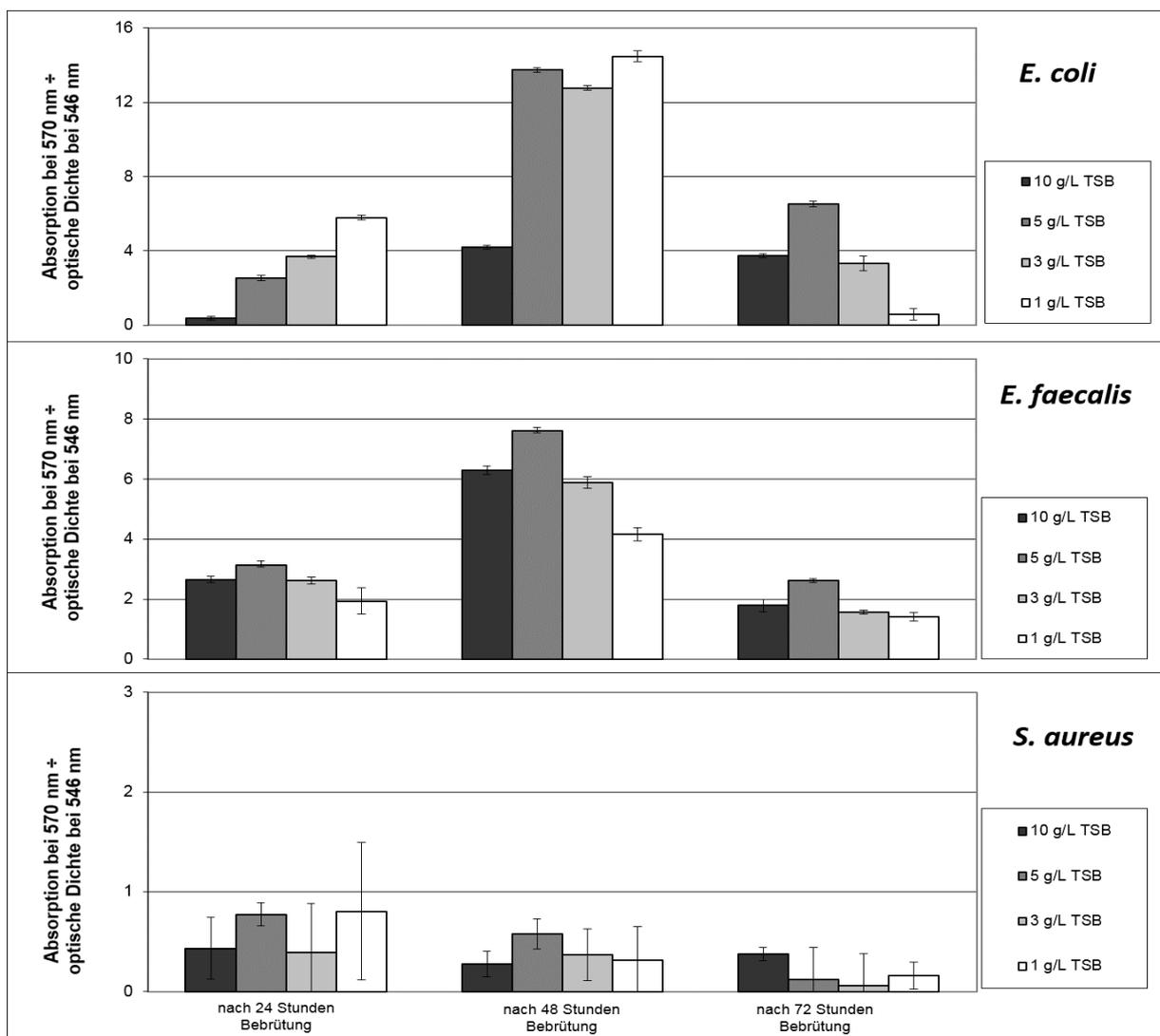


Abbildung 33: Verhältnis zwischen Biofilmen und planktonischen Suspensionen der Indikatorkeime. Die Biofilme wurden in 24-well-Mikrotiterplatten, in der jeweilig angegebenen TSB-Konzentration nach den angegebenen Zeiten bei 28 °C Bebrütung, erzeugt. Dargestellt sind die Quotienten aus der Absorptionen der abgelösten und gefärbten Biofilme bei 570 nm und der optischen Dichte der planktonischen Kulturen der

entsprechenden Kavernen bei 546 nm. Den Messreihen liegt je eine 4fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.6 zu entnehmen.

Bei *E. coli* K12 verschob sich das Verhältnis zwischen Biofilm und planktonischer Kultur bei allen TSB-Konzentrationen über den Zeitraum von 48 Stunden zu Gunsten des Biofilms, was in der Abbildung 33 durch einen größeren Wert für den jeweiligen Quotienten abzulesen ist. Bei längerer Bebrütung wurde im Verhältnis weniger *E. coli* K12-Biofilm detektiert. Ein sehr ähnliches Bild zeigten auch die Ergebnisse des Stammes *E. faecalis* DSM20478, bei dem sich zunächst auch eine Zunahme und nach 72 Stunden dann ein Abfall in den Werten der Quotienten zeigte. Werden die verschiedenen TSB-Konzentrationen betrachtet, wird deutlich, dass für *E. faecalis* DSM20478 in 5 g/L TSB-Medium der größte Wert für den Quotienten aus Biofilm und planktonischer Kultur erreicht wurde und das über den gesamten Bebrütungszeitraum hinweg. Bei der niedrigsten Konzentration schienen dagegen die meisten Bakterien die planktonische Lebensweise zu bevorzugen. Bei *E. coli* K12 zeigte sich diesbezüglich ein gegenteiliges Bild. Bei diesem Bakterium bildete sich aus der planktonischen Kultur mit abnehmender Nährstoff-Konzentration zunehmend mehr Biofilm aus, wenn auch nur über einen Zeitraum von 48 Stunden hinweg. Die Ergebnisse für den *S.aureus*-Stamm (DSM346) lassen dagegen keinen Trend erkennen. Die Standardabweichungen zeigen, dass in diesem Versuch keine einheitlichen Ergebnisse in den jeweiligen Messreihen erzielt wurden. Als Erklärung dafür kommt in erster Linie die sehr geringe Biofilmbildung dieses Stammes, dargestellt in Abbildung 32, in Frage. Durch die geringe Biofilmbildung und das generell wenig ausgeprägte Wachstum der Bakterien, auch in der planktonischen Kultur der Kavernen, ergaben sich sehr geringe Werte für die dargestellten Quotienten. Daraus resultierend kam es zu einer hohen Streuung um den Mittelwert.

3.2.2.1.4 Biofilme der *Legionella pneumophila* sp. LP1

Auf den Untersuchungen von Stepanovic et al. (2000) und Wisbauer (2016) basierend, wurden zur Quantifizierung von *Legionella pneumophila*-Biofilmen in Mikrotiterplatten ebenfalls Modifikationen der ursprünglichen Methode, wie bereits unter 2.2.6.3 ff. beschrieben, vorgenommen. Die folgenden Versuche orientieren sich außerdem an der von Mampel et al. (2006) beschriebenen Methode zur Quantifizierung der Biofilmbildung von *L. pneumophila*

unter statischen Anzuchtbedingungen mittels Kristallviolett-Färbung in Mikrotiterplatten. Die Abbildung 34 fasst die Ergebnisse zusammen.

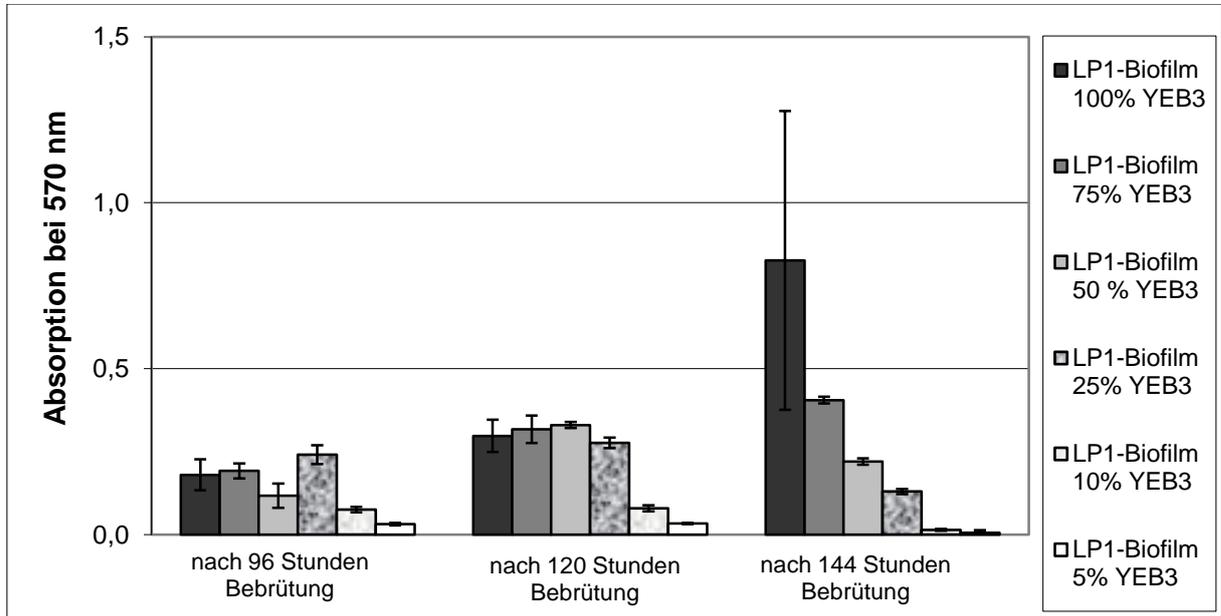


Abbildung 34: Biofilmbildung des Isolats *L. pneumophila* LP1 in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums und der Bebrütungszeit. Die Biofilme wurden in 24-well-Mikrotiterplatten, in der jeweilig YEB3-Konzentration über die angegebenen Zeiten bei 36 °C Bebrütung generiert. Dargestellt sind die nach Kristallviolett-Färbung ermittelten Absorptionen der abgelösten Biofilme bei 570 nm. Den Messreihen liegt je eine 6fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.6 zu entnehmen.

Bei den geringen Nährmedien-Konzentrationen von 5 % und 10 % YEB3 bildeten sich nur im sehr geringen Maße Biofilme aus. Die Beprobungen der höheren Konzentrationen zeigten kaum signifikante Unterschiede in der Masse der gebildeten Biofilme, besonders nach 122 Stunden Bebrütung. Bei 100 % YEB3-Medium und 144 Stunden Bebrütung wurde im Mittel der meiste Biofilm detektiert, die Streuung zeigt allerdings große Schwankungen in den einzelnen Kavernen an. Die geringste Streuung mit gleichzeitig solider Biofilmbildung wurde nach 122 Stunden in 50 % YEB3-, bzw. nach 144 Stunden in 75 % YEB3-Medium erreicht. Ein stetiges Wachstum der Biofilme wurde nur bei den Konzentrationen 100 % und 75 % Medium festgestellt. Alle anderen Konzentrationen bewirkten einen geringen Zuwachs der Biofilme von 96 zu 122 Stunden, gefolgt von einer Reduzierung bei weiterer Bebrütung.

3.2.2.2 Quantifizierung der Lebendzellzahl von Biofilmen

Die Masse der Biofilme wurde nach Kristallviolett-Färbung über die Absorption bestimmt. Eine andere Möglichkeit der Biofilmquantifizierung ist dagegen die Bestimmung der Lebendzellzahl von Biofilmkulturen, wie sie in dieser Arbeit bereits in den Versuchen im Becherglasrektor genutzt wurde (siehe Material und Methoden 2.2.5.3). Die Ablösung der Biofilme mit Zellschabern und die anschließende Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren wurden daher auf die Versuche in 24-well-Mikrotiterplatten übertragen und wie in Material und Methoden 2.2.6.8 beschrieben durchgeführt. Die Versuchsreihe wurde mit dem Isolat JCBK5 durchgeführt und die Ergebnisse zeigt Abbildung 35.

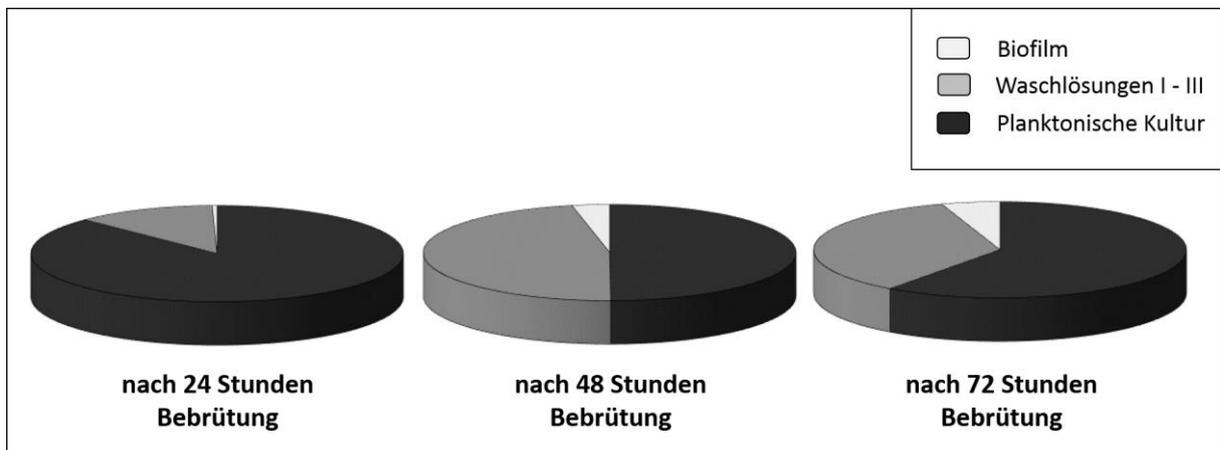


Abbildung 35: Prozentualer Anteil der Lebendzellzahlen des Isolats JCBK5 in den Fraktionen des 24-well-Mikrotiterplatten-Versuchs. Die Biofilme wurden in 1 g/L TSB während der angegebenen Zeiten bei 28 °C Bebrütung generiert. **Planktonische Kultur** = Der flüssige Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Lebendzellzahl durch Ausplattieren auf TSB-Agar bestimmt. **Waschlösungen I - III** = Die Biofilme wurden mit 1 g/L TSB-Medium gewaschen (3x), die Waschlösungen vereint und die Lebendzellzahl dieser Waschlösungen durch Ausplattieren ermittelt. **Biofilm** = Die Ablösung, sowie die Aufarbeitung der Biofilme erfolgten wie in Material und Methoden 2.2.6.8 beschrieben. Das Diagramm zeigt den Anteil der Lebendzellzahl in Prozent, des so erhaltenen Biofilmsuspension. **100 %** = Gesamtzellzahl der untersuchten Fraktionen zum jeweils angegebenen Zeitpunkt. Den Messreihen liegt je eine 6fach-Bestimmung zu Grunde.

In der Abbildung 35 sind die Verteilungen der lebenden Zellen in den einzelnen Fraktionen des Mikrotiterplatten-Versuchs (siehe Material und Methoden 2.2.6.8) als Tortendiagramm dargestellt. Der allergrößte Anteil der lebenden Zellen befand sich in der planktonischen Kultur. In den Biofilmen wurden die wenigsten Bakterien der Gesamtpopulation detektiert. Die größte Veränderung über den Beprobungszeitraum hinweg ergab sich in der Lebendzellzahl der Waschlösungen, die mit zunehmender Inkubationszeit erst deutlich zunahm und dann nach

72 Stunden einen leichten Abfall zeigte. Auch die Biofilme vergrößerten ihren Anteil an der Lebendzellzahl mit der Zeit.

Durch die Färbung mit Kristallviolett erfolgt eine Quantifizierung der Biofilme über ihre Masse. Diese Masse sollte in der folgenden Abbildung 36 ins Verhältnis mit der Bakterienanzahl in den Biofilmen gesetzt werden, was durch die Auftragung der Absorption der gefärbten Biofilmsuspensionen gegen die Lebendzellzahl eines analogen Biofilms erreicht wurde. Es zeigte sich zunächst, dass mit zunehmender Bebrütungszeit die Lebendzellzahl der Biofilme sehr deutlich abnahm, wohingegen die Absorptionen in der gleichen Größenordnung blieben. Ein linearer Zusammenhang zwischen den dargestellten Parametern konnte nicht festgestellt werden.

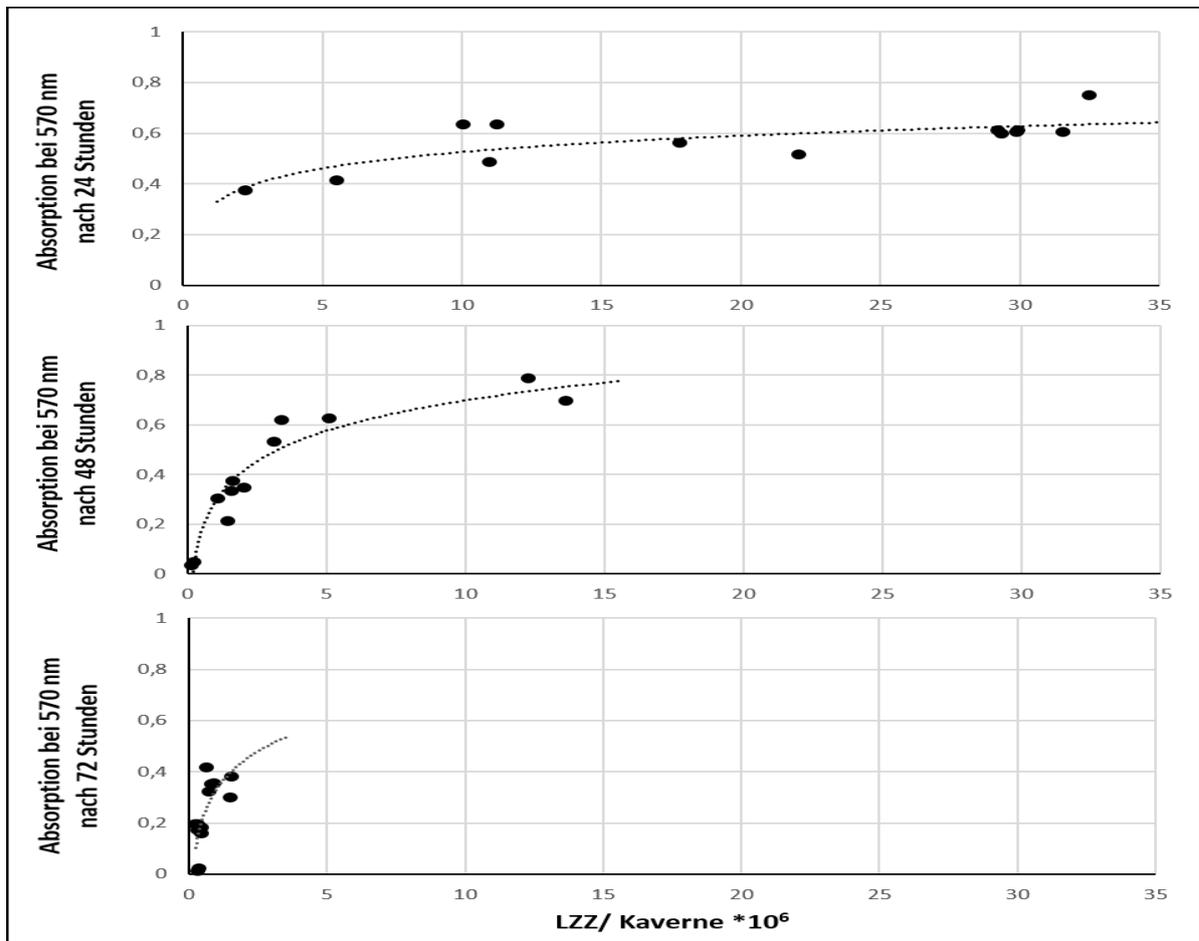


Abbildung 36: Korrelation zwischen Absorption und Lebendzellzahl von Biofilmen des Isolats JCBK5. Die Biofilme wurden in 24-well-Mikrotiterplatten in 1 g/L TSB-Medium binnen 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C generiert und entweder entsprechend Material und Methoden 2.2.6.2 mit gefärbt, oder mittels Zellschaber abgelöst und eine Lebendzellzahlbestimmung gemäß Material und Methoden 2.2.6.8 durchgeführt. Dargestellt sind die durch Kristallviolett-Färbung bestimmten Absorptionen der abgelösten Biofilme bei 570 nm aufgetragen gegen deren Lebendzellzahlen. Den Messreihen liegt je eine 4fach-Bestimmung zu Grunde.

3.2.2.3 Nekrotropes Biofilmwachstum von *Legionella pneumophila* LP1

In den bisherigen Versuchen wurden Reinkulturbiofilme verschiedener Mikroorganismen in den 24-well-Mikrotiterplatten gebildet und hinsichtlich der optimalen Biofilmbildung untersucht. In diesem Versuchsteil wurden *Legionella pneumophila*-Biofilme auf Ablagerungen verschiedener durch Hitze abgetöteter Bakterienkulturen (Reinkultur) erzeugt und quantifiziert. Dafür wurde wie in Material und Methoden 2.2.6.7 vorgegangen.

3.2.2.3.1 Nekrotrophe Kultivierung von *Legionella pneumophila* LP1 auf abgetöteten *Staphylococcus* sp. JCBK5-Biofilmen

Zunächst wurde als Bewuchsfläche für die *Legionella*-Biofilme das Isolat JCBK5 in den 24-well-Mikrotiterplatten durch Hitze fixiert. Die Biofilmbildung des *Legionella*-Stammes LP1 ist in Abbildung 37 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Nährmedienkonzentration dargestellt.

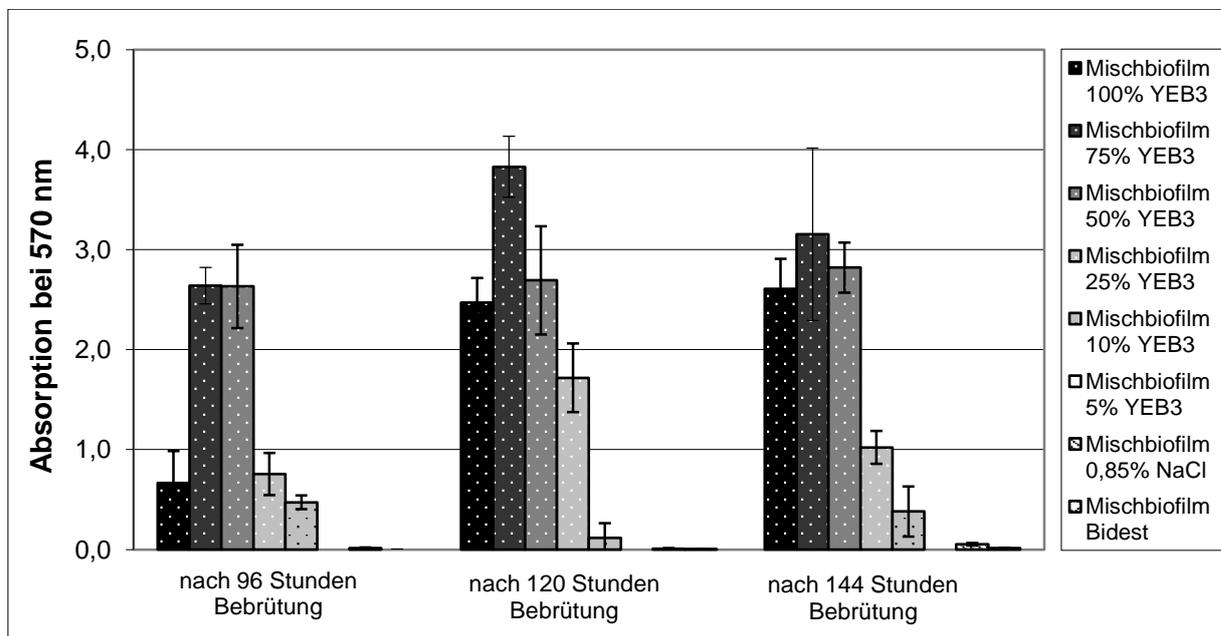


Abbildung 37: Nekrotropes Biofilmwachstum von *Legionella pneumophila* LP1 hitzefixierten JCBK5-Biofilmen. Zunächst wurden JCBK5-Biofilme in 24-well-Mikrotiterplatten herangezogen, anschließend gewaschen und hitzefixiert. Auf diese fixierten Biofilme wurde dann YEB3-Medium der angegebenen Konzentrationen gegeben, mit einer LP1-Kultur angeimpft und für die angegebenen Zeiten bei 37°C bebrütet. Dargestellt sind die nach Kristallviolett-Färbung erhaltenen Absorptionen der abgelösten Biofilme bei 570 nm. Den Messreihen liegt je eine 6fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Abweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.7 zu entnehmen.

Die Biofilmbildung von *L. pneumophila* LP1 auf abgetöteten Biofilmen von JCBK5 war abhängig von der Nährmedienkonzentration. Die Ansätze, die ohne Nährmedium nur in Natriumchlorid bzw. Wasser (bidestilliert) inkubiert wurden, bildeten so gut wie keinen Biofilm. Auch die Konzentrationen von 5 % und 10 % YEB3-Medium lieferten eher geringer ausgeprägte Biofilme. Ab einer Konzentration von 50 % YEB-Medium wurden dagegen massiv ausgeprägte Biofilme detektiert. Die größte Masse wurde in 75 % YEB3-Medium nach 120 Stunden Inkubation erreicht. Generell konnte bei der Mehrheit der Versuchsreihen nach 120 Stunden Inkubation, ein Maximum in der Biofilmausprägung festgestellt werden.

3.2.2.3.2 Nekrotrophe Kultivierung von *Legionella pneumophila* auf abgetöteten Biofilmen von Indikatororganismen

Die Biofilmbildung von *L. pneumophila* LP1 wurde auf hitzefixierten Biofilmen der Organismen *E. coli* K12, *E. faecalis* DSM20478 und *S. aureus* DSM346, gemäß der Anleitung in Material und Methoden 2.2.6.7, untersucht. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 38.

Die Biofilmbildung von *Legionella pneumophila* LP1 war deutlich unterschiedlich, je nachdem auf welchem abgetöteten Mikroorganismus die Ansiedlung erfolgte. Der dickste Biofilm wurde dabei in Kombination mit *E. coli* K12 und 50 % Nährmediumkonzentration nach 96 Stunden Bebrütung erreicht. In höheren Konzentrationen (100 % und 75%) zeigten die Absorptionen massive Streuung der Einzelwerte. Mit Zunahme der Bebrütungszeit konnte dann allerdings in allen *E. coli* K12-Ansätzen nur noch in sehr geringem Maße, bzw. gar kein Biofilm mehr detektiert werden. Eine akzeptable Besiedlung der Oberflächen über den gesamten Inkubationszeitraum hinweg zeigte nur die Kombination mit *E. faecalis* DSM20478, wobei kein deutlicher Trend in der zu bevorzugenden YEB3-Konzentration festzustellen war. Die konstanteste Ausprägung, auch mit geringer Streuung, wurde in den Proben mit 25 % YEB-Medium festgestellt. Diese Ausprägung war etwa halb so groß wie die maximale Biofilmbildung der *E. coli* K12-Messreihe. Die Biofilmbildung in Kombination mit *S. aureus* DSM346 lieferte dagegen Ergebnisse mit durchweg geringen Absorptionen. Lediglich in 100 % Nährmedium nach 96 Stunden Bebrütung konnte eine vergleichbare Absorption mit dem entsprechenden Wert der *E. faecalis* DSM20478-Messreihe festgestellt werden.

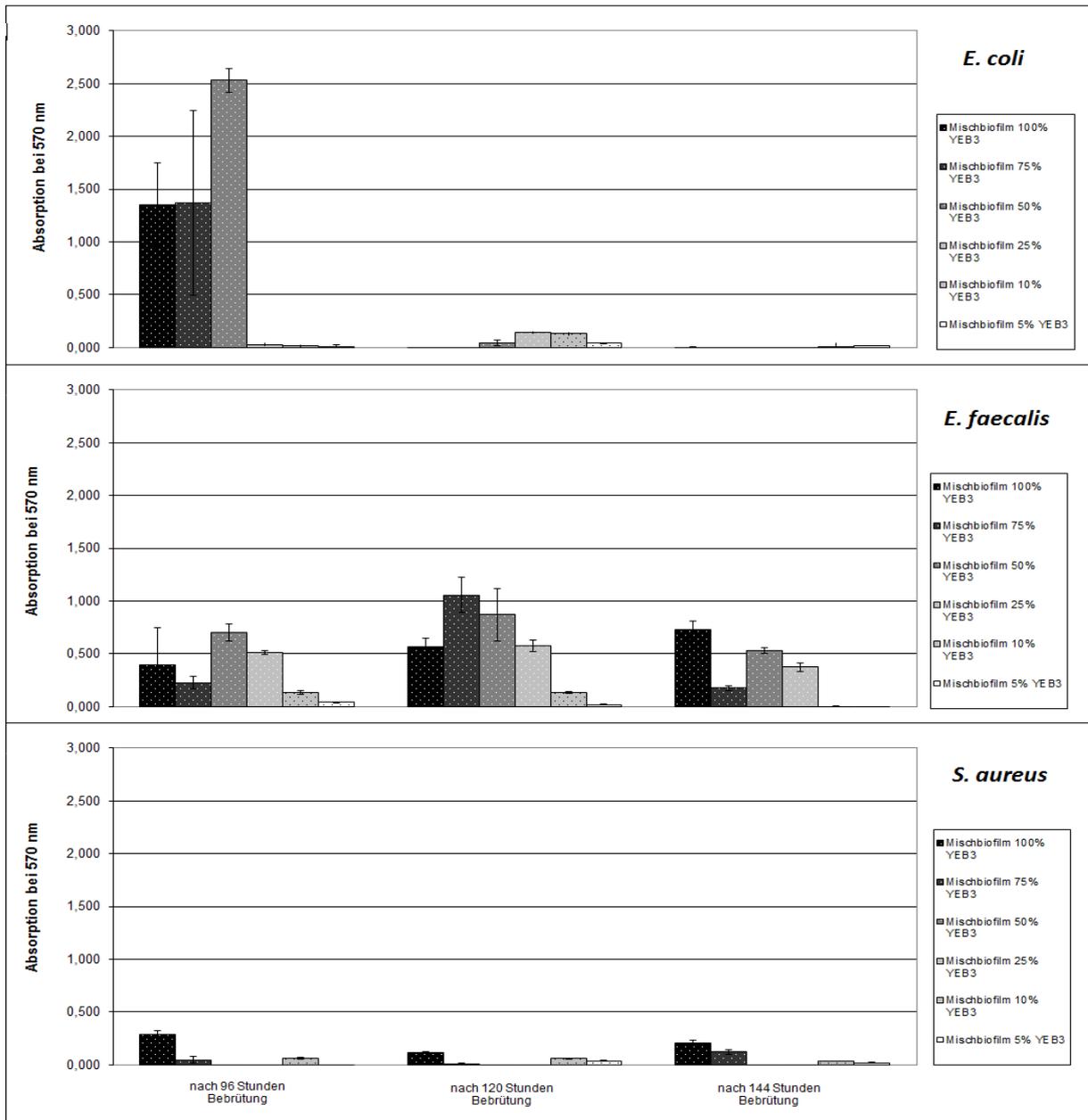


Abbildung 38: Nekrotrophes Biofilmwachstum von *Legionella pneumophila* LP1 hitzefixierten Biofilmen der Indikatororganismen. Zunächst wurden Reinkulturbiofilme der angegebenen Indikatororganismen in 24-well-Mikrotiterplatten herangezogen, anschließend gewaschen und hitzefixiert. Auf diese fixierten Biofilme wurde dann YEB3-Medium der angegebenen Konzentrationen gegeben, mit einer LP1-Kultur angeimpft und für die angegebenen Zeiten bei 37°C bebrütet. Dargestellt sind die nach Kristallviolett-Färbung ermittelten Absorptionen der abgelösten Biofilme bei 570 nm. Den Messreihen liegt je eine 6fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Abweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.7 zu entnehmen.

3.2.2.3.3 Kultivierung von *Legionella pneumophila* auf lebenden *Escherichia coli*-Biofilmen

Um den Mischkulturbiofilmen, die sich unter realen Bedingungen in Habitaten ausbilden, im Laborversuch näher zu kommen, wurde die Versuchsdurchführung zur nekrotrophen Biofilmbildung unter Material und Methoden 2.2.6.7 dahingehend verändert, dass der *E. coli* K12- Biofilm, der als Fläche für die Ansiedlung von *Legionella*-Biofilmen dienen sollte, nicht hitzefixiert, sondern nur gewaschen wurde. Damit wurden die *E. coli* K12-Bakterien nicht getötet. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der folgenden Abbildung 39 dargestellt.

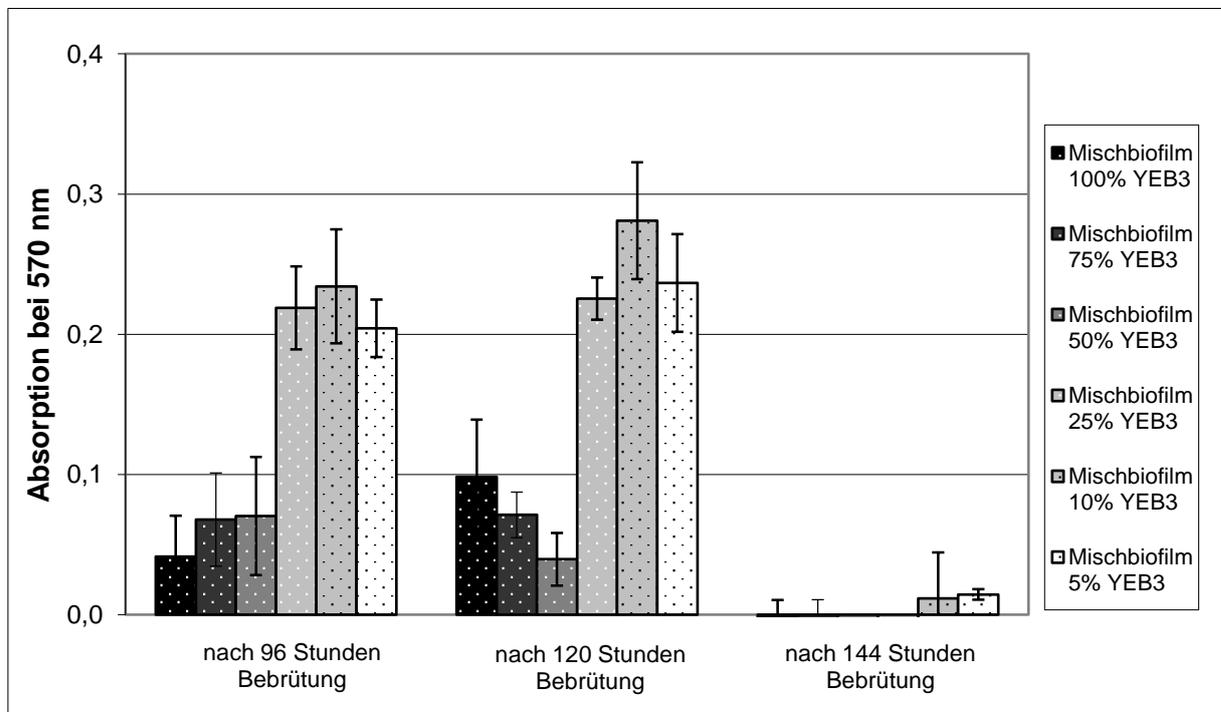


Abbildung 39: Biofilmbildung eines Mischbiofilms aus *E. coli* K12 und *L. pneumophila* LP1 in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums und der Bebrütungszeit. Zunächst wurden *E. coli*-Biofilme in 24-well-Mikrotiterplatten herangezogen und anschließend gewaschen. Auf diese fixierten Biofilme wurde dann YEB3-Medium der angegebenen Konzentrationen gegeben, mit einer LP1-Kultur angeimpft und für die angegebenen Zeiten bei 37°C bebrütet. Dargestellt sind die nach Kristallviolett-Färbung bestimmten Absorptionen der abgelösten Biofilme bei 570 nm. Den Messreihen liegt je eine 6fach-Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Abweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.6.7 zu entnehmen.

Zunächst wird auffällig, dass nach einer Bebrütungszeit von 144 Stunden bei keiner der verwendeten YEB3-Konzentrationen ein nennenswerter Biofilm im Vergleich zu den anderen Beprobungszeitpunkten gebildet wurde. In der höchsten Konzentration an YEB3-Medium (100 %) zeigte sich ein Anstieg in der Biofilmmasse von 96 Stunden zu 120 Stunden

Inkubation, während die Ausprägung in den Konzentrationen 75 % und 50 % im Rahmen der Fehlergrenzen relativ unverändert blieben. In den niedrigeren Konzentrationen (25 %, 10 % und 5 %) bildete sich teilweise mehr als doppelt so viel Biofilm aus als in den Ansätzen mit konzentrierterem Nährmedium.

3.3. Desinfektionsversuche mit Chlordioxid

Die Anwendungen von Chlordioxid als Desinfektionsmittel beruhen auf seiner oxidativen Wirkung. Es findet in der Trinkwasserdesinfektion immer häufiger Anwendung anstelle von Chlor, da die Bildung von giftigen oder gesundheitsschädlichen chlorierten organischen Verbindungen bei dieser Art der Desinfektion weitestgehend entfällt (Roeske, 2006). Trotz dieses wichtigen Vorteils gegenüber anderen gebräuchlichen Verfahren zur Desinfektion, ist die Wirkung auf Mikroorganismen das wichtigste Kriterium für ein Desinfektionsmittel. Diese Wirkung sollte durch die Versuche dieses Kapitels näher untersucht werden.

3.3.1 Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Chlordioxid-Lösungen

Chlordioxid besitzt stark oxidierende Wirkung und ist somit in der Lage Iodid zu Iod umzusetzen (Schulze, 2003). Diese Eigenschaft bietet die Grundlage für eine Konzentrationsbestimmung mittels iodometrischer Rücktitration. Wie unter Material und Methoden 2.2.7.2.1 beschrieben wird dabei Iodid in sauer-wässriger Lösung, äquivalent zur enthaltenen Chlordioxid-Konzentration, zu elementarem Iod umgesetzt, welches dann durch eine Rücktitration mit Thiosulfat-Maßlösung quantifiziert werden kann.

Eine weitere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung von Chlordioxid-Lösungen stellt die Photometrie dar. Durch die spezifische und konzentrationsabhängige Absorption von Chlordioxid im nahen UV-Bereich, wird mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten die Konzentration, wie unter Material und Methoden 2.2.7.2.2 erläutert, berechnet.

Die Abbildung 40 zeigt die nachgewiesenen Konzentrationen von zwei Aliquoten derselben Chlordioxid-Lösung als Vergleich der beiden Quantifizierungsmethoden. Dargestellt ist jeweils

die errechnete prozentuale Konzentration an Chlordioxid unter Berücksichtigung der einfachen Standardabweichung.

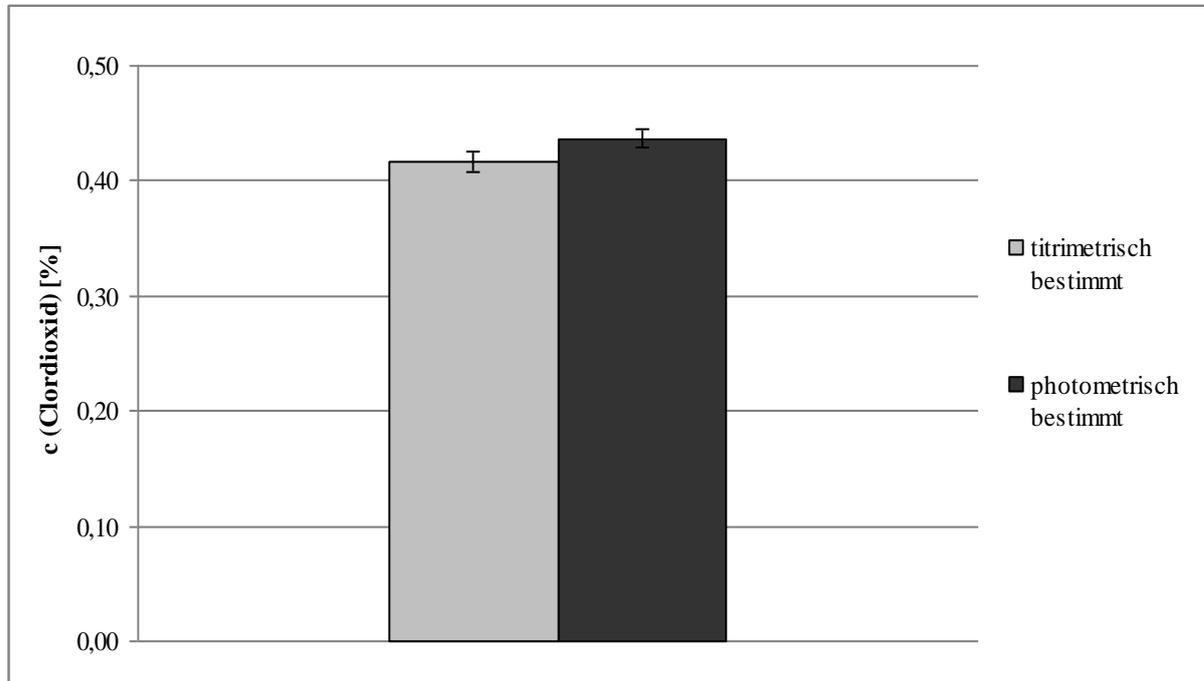


Abbildung 40: Methodenvergleich zur Konzentrationsbestimmung von Chlordioxid. Beprobte wurden Aliquote derselben Chlordioxid-Lösung, die einen Gehalt von 0,6 % (90 mmol/L) Chlordioxid enthalten sollte (Angabe a.p.f.). Bei der Titrationsmethode wurde eine iodometrische Rücktitration mit Na-Thiosulfat-Maßlösung (0,1 mol/L) durchgeführt. Die photometrische Bestimmung wurde bei einer Wellenlänge von 359 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 1100 L/(mol*cm) durchgeführt. Den Messreihen liegt je eine 3fache Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.2 ff zu entnehmen.

Die Ergebnisse in Abbildung 40 zeigen keinen signifikanten Unterschied in den ermittelten Chlordioxidkonzentrationen. Die Titrationsmethode lieferte einen etwas höheren Befund, die Streuung ist allerdings bei der photometrischen Bestimmung geringfügig niedriger. Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Chlordioxid bietet außerdem eine wesentlich schnellere, einfachere und mit weniger Materialaufwand durchzuführende Alternative zu der iodometrischen Titration. Außerdem zeigte sich an den Ergebnissen deutlich die Flüchtigkeit von Chlordioxid, da bei beiden Bestimmungsmethoden ein deutlich geringerer Gehalt ermittelt wurde als die durch a.p.f. angegebenen 0,6 %, bzw. 90 mmol/L. Da die Ergebnisse beider Quantifizierungsmethoden in Präzision und Streuung sehr ähnliche Ergebnisse lieferten wurde im Weiteren die photometrische Chlordioxidbestimmung als Methode der Wahl verwendet.

3.3.2 Auftrennung von Zellaggregaten mittels geringer Chlordioxid-Konzentrationen

Die desinfizierende Wirkung von Chlordioxid beruht auf seiner Eigenschaft als sehr starkes Oxidationsmittel. Durch diese oxidative Wirkung werden Mikroorganismen bei ausreichender Konzentration irreversibel geschädigt. Die Wirkung auf die einzelne Zelle kann dabei allerdings je nach Gegebenheit unterschiedlich ausfallen. Viele Mikroorganismen bilden beispielsweise Zellaggregate, die eine gewisse Abschirmung einzelner Zellen vor dem Desinfektionsmittel zur Folge haben können (Roeske 2006). In dem nachstehend beschriebenen Versuch sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss geringe Chlordioxid-Konzentrationen auf Zellaggregate des *Staphylococcus*-Isolats JCBK5 ausüben. Eine Übernachtskultur des Isolats wurde dafür in Natriumchlorid gewaschen, auf eine $OD_{546nm} = 0,2$ eingestellt und in Aliquote des gleichen Volumens aufgeteilt. Diese Aliquote wurden anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen an Chlordioxid behandelt und die Lebendzellzahl durch Ausplattieren auf TSB-Agar bestimmt. Als Vergleichswerte wurden eine unbehandelte, sowie eine mit Ultraschall behandelte Probe verwendet (siehe Material und Methoden 2.2.7.3). Das Diagramm in Abbildung 41 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchsaufbaus.

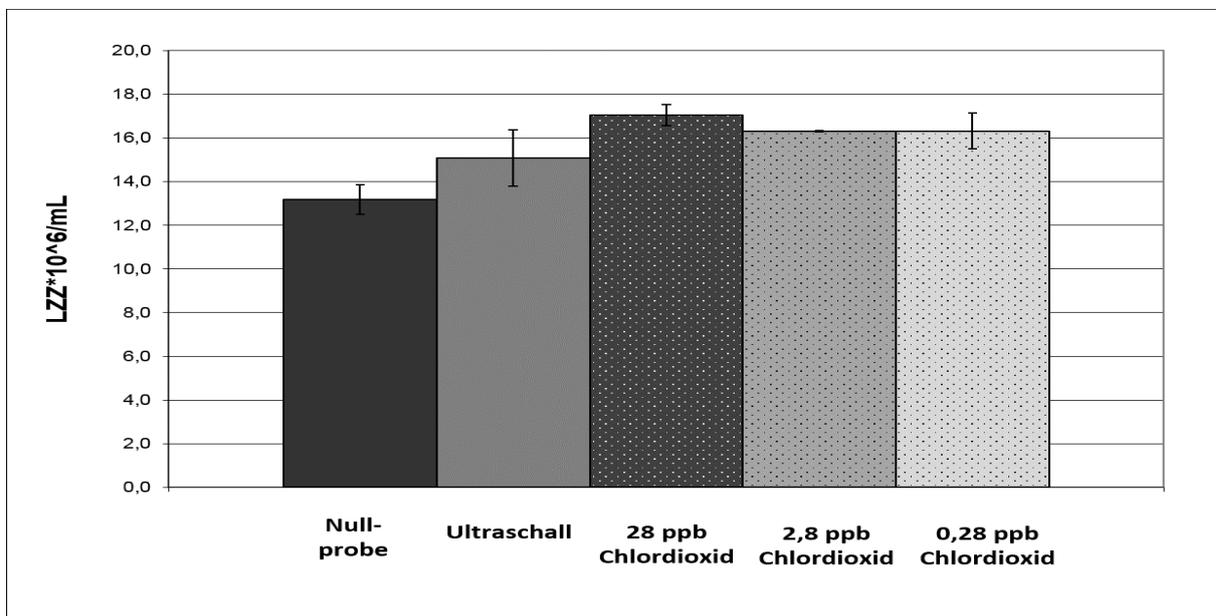


Abbildung 41: Wirkung von geringen Chlordioxid-Konzentrationen auf Suspensionen von *Staphylococcus* sp. JCBK5. Dargestellt ist die Wirkung verschiedener Chlordioxid-Konzentrationen auf die Anzahl an koloniebildenden Einheiten einer JCBK5-Suspension im Vergleich zu einer Ultraschallbehandlung. Dafür wurde eine JCBK5-Suspension aliquotiert, für 30 min mit Chlordioxid-Lösungen behandelt und anschließend die jeweilige Anzahl an koloniebildenden Einheiten ermittelt. **Nullprobe** = Bakteriensuspension ohne weitere Behandlung. **Ultraschall** = Bakteriensuspension für 1 min mit Ultraschall behandelt. Den Versuchsreihen liegen jeweils Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.3 zu entnehmen.

In dem Diagramm (Abb. 41) dargestellt sind die Lebendzellzahlen der unterschiedlich behandelten Aliquote der *Staphylococcus*-Suspension. Im Mittel zeigte die Nullprobe ohne weitere Behandlung die geringste Lebendzellzahl, gefolgt von dem mit Ultraschall behandelten Aliquot. Die mit Chlordioxid behandelten Ansätze wiesen eine größere Lebendzellzahl auf. Die Unterschiede relativieren sich allerdings unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen. Die ermittelten Lebendzellzahlen der Chlordioxid-Ansätze lagen im Bereich der Streuung des Ultraschallansatzes, im Fall von 28 ppb aber auch leicht darüber. Im Vergleich zu der Nullprobe ohne Vorbehandlung ergab sich bei allen untersuchten Chlordioxid-Konzentrationen ein signifikant erhöhter Befund an lebenden Bakterien.

Bei dem verwendeten *Staphylococcus*-Isolat ist durch mikroskopische Untersuchungen bereits bekannt, dass es Aggregate in Form von Trauben bildete (siehe Abbildung 20). Dadurch lässt sich erklären, warum die Nullprobe die geringste Lebendzellzahl aufwies. Durch das Aneinanderhaften der Zellen entsteht beim Ausplattieren auf dem Nährstoffagar eine Kolonie aus mehreren Ursprungszellen. Durch den Ultraschall konnten dagegen offensichtlich einige dieser Aggregate aufgetrennt werden, was den höheren Befund in der Lebendzellzahl begründete. Die Vereinzelung der Zellen scheint durch die Behandlung mit Chlordioxid am besten erfolgt zu sein. Die meisten koloniebildenden Einheiten wurden bei der größten Chlordioxid-Konzentration ermittelt. Ebenfalls denkbar ist außerdem, dass die Behandlung mit Ultraschall ebenfalls zu einer vollständigen Auftrennung der Zellcluster geführt hat, aber durch zu hohe Intensität oder zu lange Beschallungszeit ein Teil der Zellen abgestorben war und somit der geringere Befund im Vergleich zu den Ansätzen mit Desinfektionsmittel zustande kam. Es zeigte sich, dass mit geringen Konzentrationen von Chlordioxid Zellaggregate des untersuchten Stammes aufgetrennt werden konnten.

3.3.3 Ablösung von Biofilmen durch Chlordioxid-Behandlung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Chlordioxid Zellcluster von Bakterien in Suspensionen aufgetrennt werden können. Daraus lässt sich das Postulat ableiten, dass Chlordioxid bei Biofilmkulturen ebenfalls einen Einfluss auf die Struktur der Bakterienanordnung und nicht nur eine desinfizierende Wirkung haben könnte. Durch die Firma a.p.f. Aquasystems AG werden die guten Ablöseeigenschaften von Chlordioxid im

Vergleich zu anderen Desinfektionsmitteln ebenfalls als vorteilhaft für die Anwendung beworben (a.p.f. Aquasystems AG). Um diese Annahmen zu überprüfen, wurden die Ablöseigenschaften in den folgenden Versuchen näher untersucht.

3.3.3.1 Qualitative Ablösung im Becherglasreaktor

Zunächst sollte die Veränderung in der Struktur der Biofilme durch die Behandlung mit Desinfektionsmitteln veranschaulicht werden. Die Abbildung 42 zeigt mikroskopische Aufnahmen von JCBK5-Biofilmen nach der Behandlung mit Chlordioxid bzw. Wasserstoffperoxid. Die Biofilme wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden in 1 g/L TSB-Lösung generiert. Im Einzelnen ist die Anzucht unter Material und Methoden 2.2.7.4.1 beschrieben. Die Biofilme wurden den Desinfektionslösungen unterschiedlicher Konzentration für einen Zeitraum von 10 min ausgesetzt und anschließend die Auswirkungen der Behandlung bei 400facher Vergrößerung im Mikroskop betrachtet.

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass das Isolat JCBK5 sehr gleichmäßige, flächendeckende und dreidimensionale Biofilme bildete. Durch die Behandlung mit Chlordioxid wurde mit steigender Konzentration die Struktur der Biofilme zunehmend verändert. Schon bei der sehr geringen Konzentration von 5 mg/L sind deutliche Löcher in der Struktur des Biofilms zu sehen. Mit zunehmender Konzentration des Desinfektionsmittels erhöhte sich der Grad der Ablösung des Biofilms. Bei der höchsten untersuchten Chlordioxidkonzentration, die auch bei Trinkwasserdesinfektionen durch die Firma a.p.f. Verwendung findet (a.p.f., Uhlmann, mündliche Mitteilung), hat eine deutliche Reduktion des Biofilms auf der Aufwuchsfläche stattgefunden. Der verbleibende Biofilm wies außerdem nahezu keine dreidimensionale Struktur mehr auf. Die Betrachtung der Biofilme mit Wasserstoffperoxid-Behandlung zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied zum unbehandelten Biofilm auf. Selbst bei der höchsten verwendeten Konzentration konnte keine Ablösung des Biofilms festgestellt werden. Aus den Ergebnissen zeigte sich somit, dass Chlordioxid durchaus ablösende Eigenschaften auf die Biofilme des untersuchten Trinkwasserisolats aufwies, die durch das genutzte Wasserstoffperoxid, nicht gezeigt werden konnten.

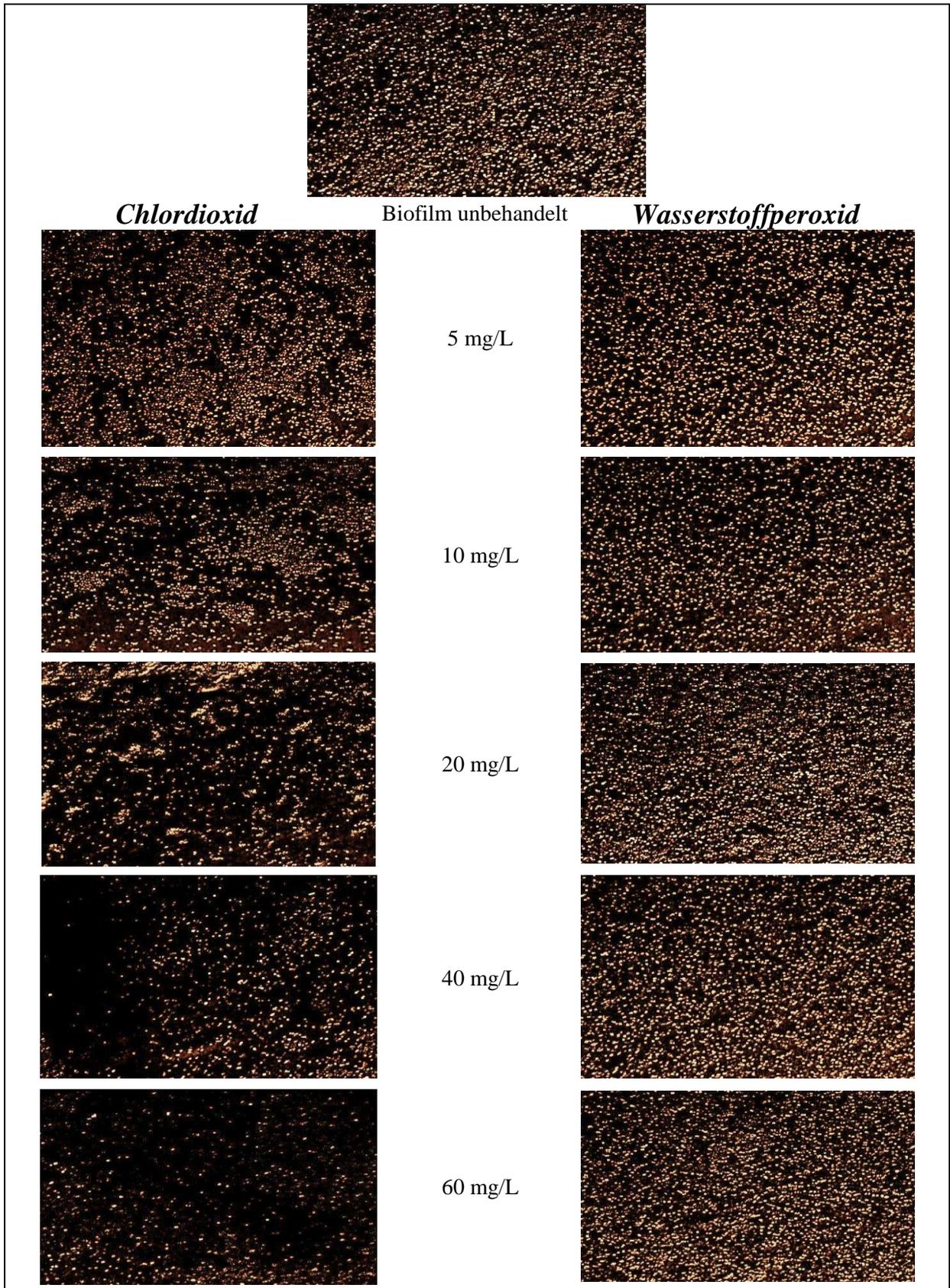


Abbildung 42: Ablösung von JCBK5-Biofilmen in Abhängigkeit von Desinfektionsmitteln. Die Desinfektion wurde mit den angegebenen Konzentrationen an Chlordioxid, bzw. Wasserstoffperoxid durchgeführt, die Einwirkzeit betrug jeweils 10 min. Die Konzentration von 5 mg/L entspricht dabei einer Stoffmenge von 0,074 mmol/L bei der Chlordioxid-Lösung und 0,15 mmol/L bei der Wasserstoffperoxid-Lösung. Die

Abbildungen zeigen die Biofilme in 400facher Vergrößerung im Motic „Phasenkontrast“. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.4.1 zu entnehmen.

3.3.3.2 Quantifizierung der Ablösung von Biofilmen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Chlordioxid ablösende Eigenschaften auf Biofilme aufweist, sollte im nächsten Schritt der Grad dieser Ablösung quantifiziert werden. Dafür wurde der unter Material und Methoden 2.2.7.4.2 beschriebene Versuchsaufbau entwickelt. Die Biofilme wurden in 24-well-Mikrotiterplatten angezogen, gewaschen und dem Desinfektionsmittel ausgesetzt. Durch die Färbung mit Kristallviolett konnte der Grad der Ablösung als Differenz aus unbehandeltem und desinfiziertem Biofilm prozentual dargestellt werden.

3.3.3.2.1 Ablösung von lebenden Biofilmen

Die Quantifizierung der ablösenden Wirkung von Chlordioxid wurde zunächst wieder in Vergleich zu der Wirkung von Wasserstoffperoxid betrachtet und in Abbildung 43 dargestellt.

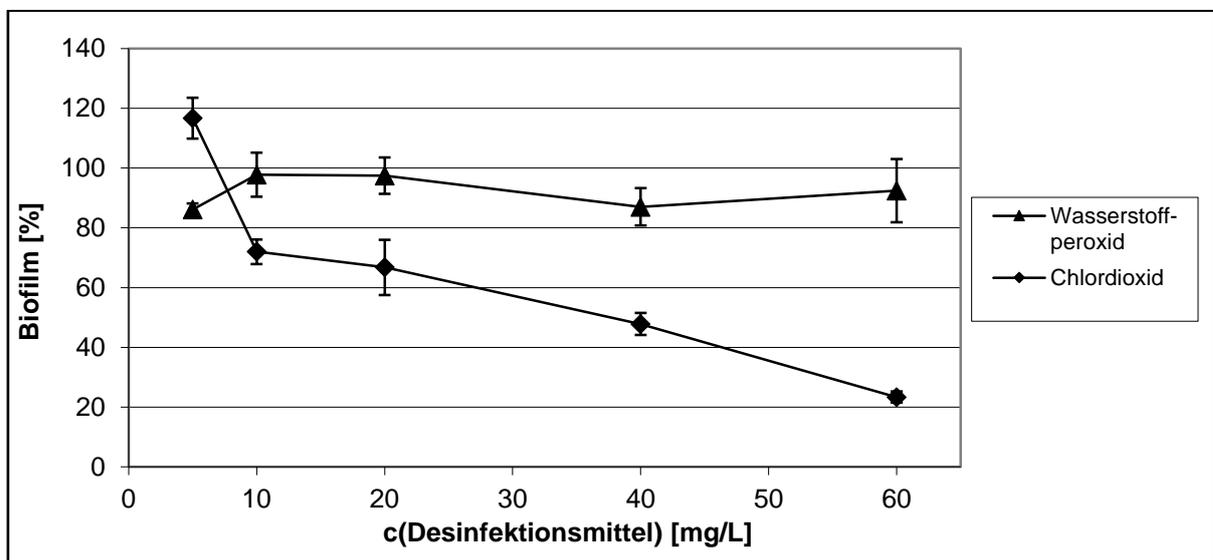


Abbildung 43: Ablösungswirkung von Chlordioxid und Wasserstoffperoxid auf JCBK5-Biofilme. Auf einer 24-well-Mikrotiterplatte wurden Biofilme von *Staphylococcus* sp. JCBK5 angezogen, mit den Desinfektionsmitteln in angegebener Konzentration für 10 min behandelt und der verbleibende Biofilm durch eine Kristallviolett-Färbung und anschließende photometrische Bestimmung quantifiziert. **100 %** entspricht der mittleren Absorption nach Kristallviolett-Färbung ($\lambda = 570$ nm) der nicht desinfizierten Biofilme. Den Versuchsreihen liegen jeweils 4fache Bestimmungen zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.4.2 zu entnehmen.

Auch hier zeigte sich, wie schon bei der qualitativen Bestimmung, durch die Behandlung mit Chlordioxid eine deutliche, Konzentrations-abhängige Ablösung des Biofilms durch Chlordioxid, sodass bei einer Konzentration von 60 mg/L nur etwa 20 % des ursprünglichen Biofilms auf der Aufwuchsoberfläche verblieben. Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid zeigte dagegen auch in dieser Versuchsanordnung keinen Effekt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den erhaltenen Ergebnissen um stammspezifische Phänomene handelte, wurde der Versuch mit verschiedenen Mikroorganismen durchgeführt und in den fortfolgenden Graphiken miteinander verglichen. Ausgewählt wurden dafür Bakterien, die gemäß Trinkwasserverordnung problematisch für die Wasserqualität sind und/ oder als Indikatorkeim angesehen werden. Die Ergebnisse wurden so sortiert, dass über die Bestimmung der Ausgangsabsorption ohne Desinfektion Biofilme mit ähnlicher Ausgangsdicke zueinander ins Verhältnis gesetzt wurden.

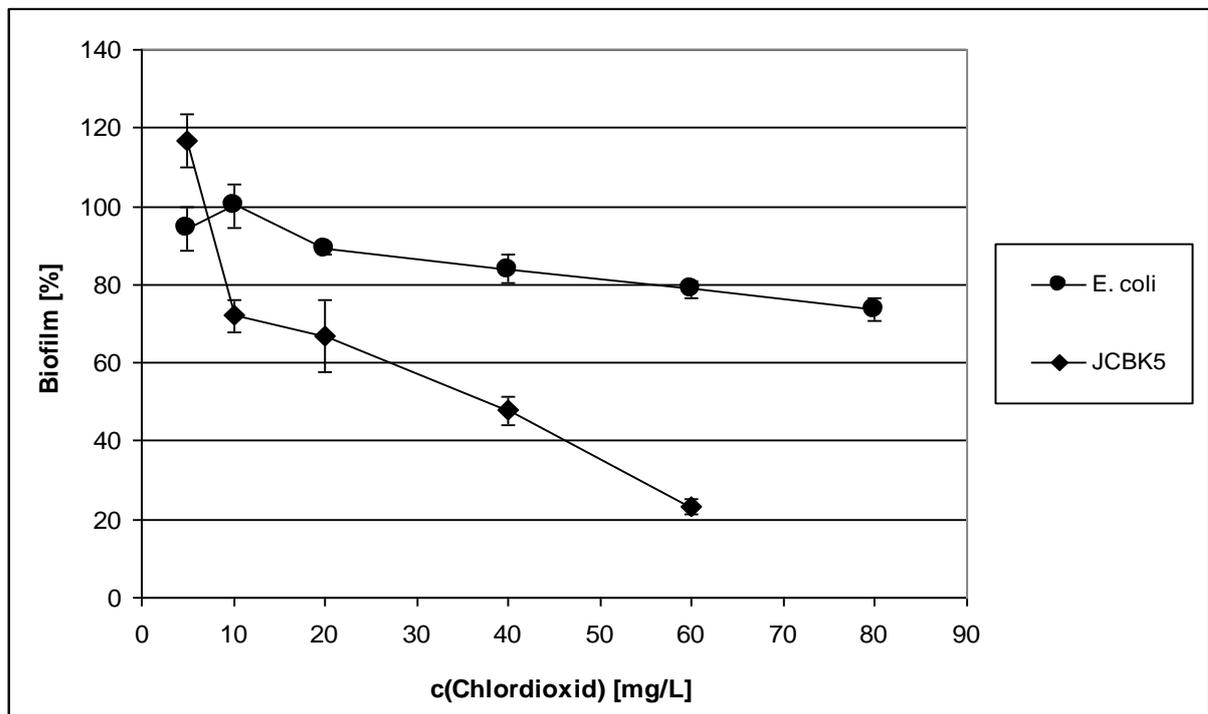


Abbildung 44: Ablösungswirkung von Chlordioxid auf Biofilme (Ausgangsabsorption ca. 0,5). Auf einer 24-well-Microtiterplatte wurden Biofilme der aufgeführten Stämme angezogen, mit Chlordioxid in den angegebenen Konzentrationen für 10 min behandelt und der verbleibende Biofilm durch eine Kristallviolett-färbung und anschließende photometrische Bestimmung ($\lambda = 570 \text{ nm}$) quantifiziert. **100 %** entspricht der mittleren Absorption nach Kristallviolett-färbung der nicht desinfizierten Biofilme, welche in der Größenordnung von Absorption = 0,5 lag. Den Versuchsreihen liegen bei *E. coli* eine 4fache, für JCBK5 eine 6fache Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.4.2 zu entnehmen.

Abbildung 44 vergleicht die Ergebnisse in Bezug auf Ablösung durch Chlordioxid bei *E. coli* K12 und *Staphylococcus* sp. JCBK5. Es zeigte sich eine deutlich verminderte Ablösung des *E. coli*-Stammes im direkten Vergleich. Selbst bei weiterer Erhöhung der Konzentration an Chlordioxid konnte zwar eine Reduzierung des Biofilms festgestellt werden, das Ausmaß dieser Ablösung lag allerdings um ein Vielfaches unter der des Isolats JCBK5. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die *E. coli* K12-Biofilme eine andere Struktur aufwiesen oder auch die Anheftung an eine Oberfläche anders, oder zumindest stärker ausgeprägt war. Dieses zeigte sich auch in der nächsten Abbildung (Abb. 45).

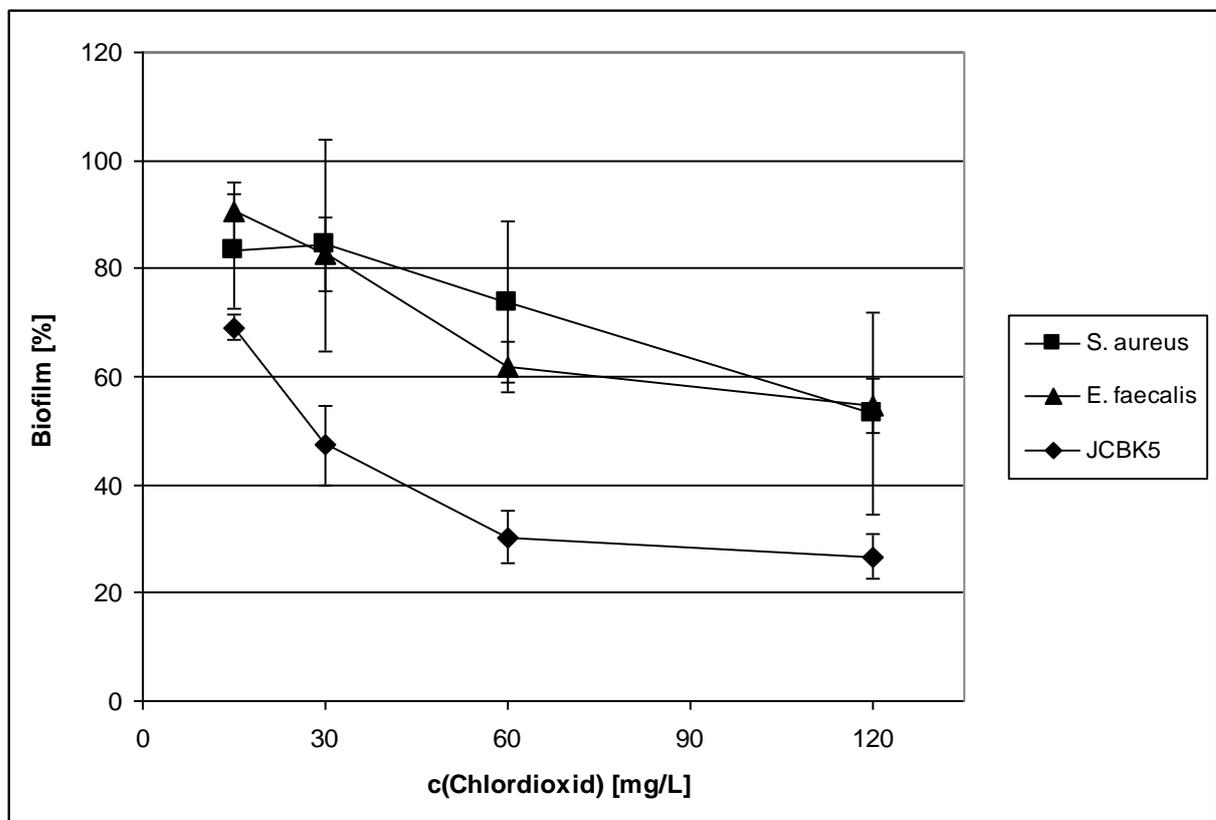


Abbildung 45: Ablösungswirkung von Chlordioxid auf Biofilme (Ausgangsabsorption ca. 0,1). Auf einer 24-well-Microtiterplatte wurden Biofilme der aufgeführten Stämme angezogen, mit Chlordioxid, in den angegebenen Konzentrationen, für 10 min behandelt und der verbleibende Biofilm durch eine Kristallviolett-Färbung und anschließende photometrische Bestimmung quantifiziert. 100 % entspricht der mittleren Absorption nach Kristallviolett-Färbung der nicht desinfizierten Biofilme, welche in der Größenordnung von Absorption = 0,1 lag. Den Versuchsreihen liegen jeweils 3fache Bestimmungen zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.4.2 zu entnehmen.

Vergleichend untersucht, wurden in dieser Abbildung der Suspensionen von *S. aureus* DSM346, *E. faecalis* DSM20478 und JCBK5 in Bezug auf die Reaktion ihrer Biofilme auf eine Behandlung mit Chlordioxid. Untersucht wurden dabei Biofilme mit einer

Ausgangsabsorption von ca. 0,1, da die Stämme *S. aureus* DSM346 und *E. faecalis* DSM20478 nur schwerlich dickere Biofilme bildeten und die Schwankungen in der Beschaffenheit der Biofilme dann recht groß ausfielen. Auch bereits bei den dargestellten Ergebnissen zeigt sich dieser Effekt in den Fehlerbalken, besonders bei *S. aureus* DSM346. Es war aber trotzdem wieder eine konzentrationsabhängige Ablösung der Biofilme festzustellen, wenn auch hier wieder in geringerem Maße. Zeigte sich bei niedrigen Konzentrationen nahezu eine Proportionalität zwischen Erhöhung der Konzentration und Ausmaß der Ablösung, so konnte bei der Verdopplung der Konzentration von 60 mg/L auf 120 mg/L nur noch wenig mehr Ablösung des Biofilms festgestellt werden. Dieses könnte als Eigenschaft des Isolats betrachtet werden, aber auch dem Einfluss des zugrunde liegenden Fehlers der Methode geschuldet sein, der mit dünner werdendem Biofilm größer wird.

Generell kann zusammengefasst werden, dass eine konzentrationspezifische Ablösung von Biofilmen durch Chlordioxid festgestellt wurde. Da die Ablösung außerdem von dem verwendeten Bakterium abgängig war, konnte daraus geschlossen werden, dass es Unterschiede in der Struktur und den Eigenschaften von Reinkulturbiofilmen zu geben scheint.

3.3.3.2.2 Ablösung von getrockneten Biofilmen

Aus den vorherigen Versuchen wurde deutlich, dass die Struktur von Biofilmen einen Einfluss auf die Ablöseeigenschaften von Chlordioxid auszuüben scheint. Eine Strukturveränderung geht auch mit dem Austrocknen von Biofilmen einher, wie sie in Abb. 46 dargestellt ist und z. B. bei Wartungsarbeiten in Wassersystemen vorkommen kann.

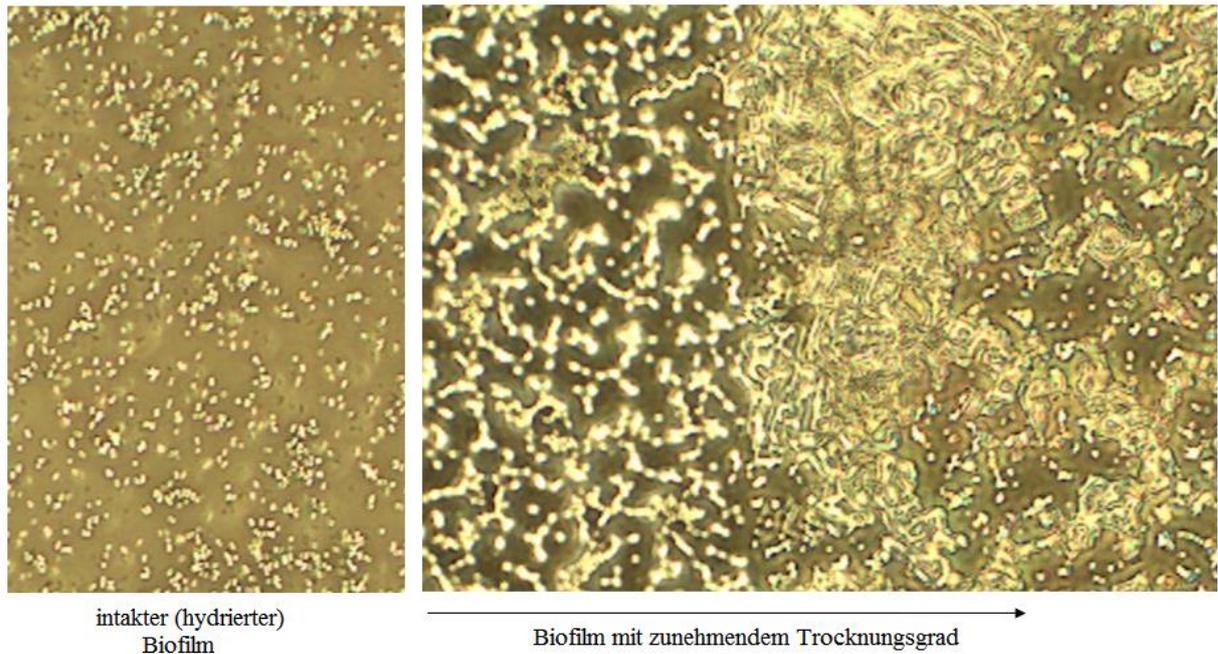


Abbildung 46: Strukturveränderung von eintrocknenden Biofilmen (mikroskopische Darstellung bei 400facher Vergrößerung). Die dargestellten *Staphylococcus aureus* DSM346-Biofilme wurden im Becherglasreaktor in 5 g/L TSB binnen 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C angezogen. Die Abbildungen zeigen den Biofilm bei 400facher Vergrößerung im Motoc „Phasenkontrast“.

Die mikroskopische Fotografie zeigt von links nach rechts betrachtet einen Biofilm der in zunehmendem Maße austrocknete. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass sich die Struktur dabei veränderte, bis es bei vollständiger Austrocknung zur Kristallisation von Salzen, Medienbestandteilen und EPS kam. Solch eine Veränderung in der Struktur könnte auch einen Einfluss auf die Ablösbarkeit von Biofilmen haben. Der Einfluss trocknungsbedingter Veränderungen von Biofilmen auf die Ablösung durch Chlordioxid wurde an *Legionella pneumophila*-Biofilmen untersucht und die Ergebnisse in der nachstehenden Abbildung 47 veranschaulicht.

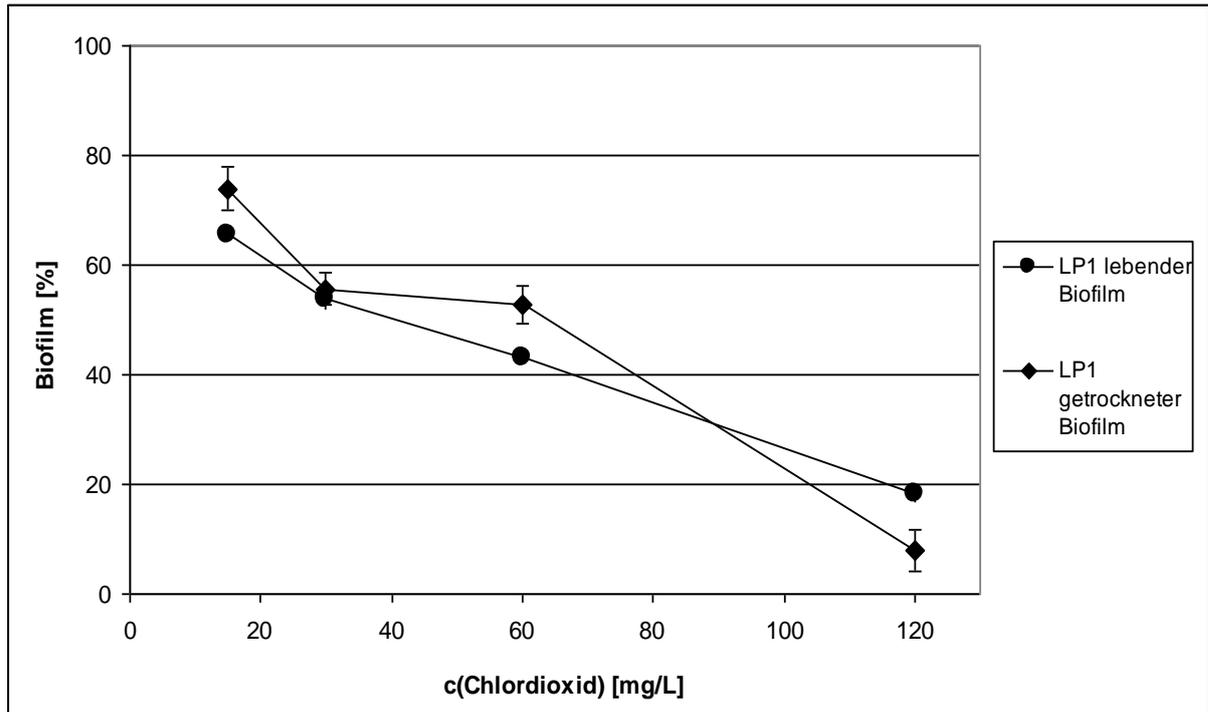


Abbildung 47: Ablösungswirkung von Chlordioxid auf lebende und getrocknete *L. pneumophila* LP1-Biofilme (Ausgangsabsorption ca. 0,3). Auf einer 24-well-Microtiterplatte wurden Biofilme des Legionellen-Stammes *L. pneumophila* LP1 angezogen, entweder zunächst hitzefixiert (**LP1 getrockneter Biofilm**), oder direkt (**LP1 lebender Biofilm**) mit Chlordioxid, in den angegebenen Konzentrationen, für 10 min behandelt. Der verbleibende Biofilm wurde dann durch eine Kristallviolett-färbung und anschließende photometrische Bestimmung quantifiziert. **100 %** entspricht der mittleren Absorption nach Kristallviolett-färbung der nicht desinfizierten Biofilme, welche in der Größenordnung von Absorption = 0,3 lag. Den Versuchsreihen liegen je eine 3fache Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.4.2 zu entnehmen.

Zu sehen ist eine deutliche Reduktion des Biofilms in annähernd linearem Ausmaß bis hin zu einer Konzentration von 120 mg/L Chlordioxid. Die getrockneten Biofilme zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied zu den vitalen Biofilmen des gleichen Stammes, lediglich die Streuung war bei den ausgetrockneten Biofilmen etwas größer. Generell zeigten die *Legionella*-Biofilme durch die Chlordioxidbehandlung eine größere Ablösung als die anderen untersuchten Stämme.

3.3.4 Desinfektionsversuche im Becherglasreaktor

Der Aufbau des Becherglasreaktors erlaubt eine Quantifizierung von Biofilmen mittels Lebendzellzahlbestimmung. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Desinfektionswirkung

von Chlordioxid auf Biofilmkulturen zu untersuchen. In der folgenden Abbildung 48 ist der Ablauf eines solchen Desinfektionsversuchs als Schema dargestellt.

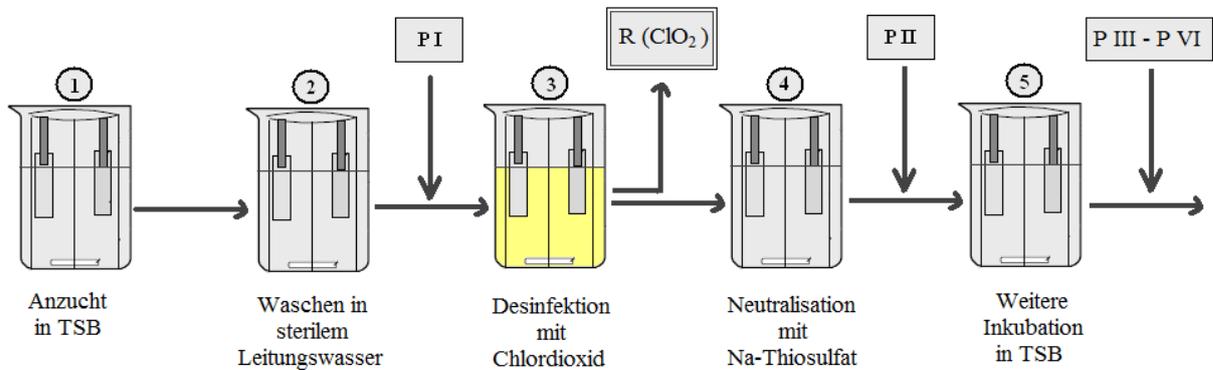


Abbildung 48: Allgemeiner Ablaufplan für die Desinfektionsversuche im Becherglasreaktor. Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor in gering konzentriertem TSB-Medium (1 g/L) binnen 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C auf Glasobjektträgern angezogen (1). Das Anzuchtgestell mit den entstandenen Biofilmen wurde im weiteren Verlauf in die Bechergläser (2) bis (5) überführt. Zunächst erfolgte ein fünfminütiger Waschschrift der Biofilme in sterilem Leitungswasser (2). Die Desinfektion (3) erfolgte dann mit einer Chlordioxidlösung unter festgelegter Einwirkzeit und wurde durch das Überführen der Objektträger in eine Thiosulfatlösung beendet (4). Um die Wirksamkeit der Desinfektion zu beurteilen, wurde die Restkonzentration an Chlordioxid in Becherglas (3) unmittelbar nach Entnahme des Anzuchtgestells, photometrisch bestimmt (**R (ClO₂)**); siehe Material und Methoden 2.2.7.2.2) und ein Teil der behandelten Objektträger in frischem TSB-Medium erneut inkubiert (5). Die Beprobung der Biofilme erfolgte zu den Zeitpunkten **PI bis PVI** durch Entnahme und weitere Behandlung von Objektträgern aus dem Reaktor. Diese Objektträger wurden in 45 mL steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung mit Hilfe eines Zellkulturschabers und anschließender Beschallung mit Ultraschall (1 min, Intensität 80 %, kontinuierlicher Betrieb) abgelöst und die Lebendzellzahl durch Ausplattieren von 0,1 mL des eingegengten Extrakts (Gesamtvolumen 2 mL) auf TSB-Agar und Bebrütung für 24 Stunden bei 37 °C bestimmt. Die vollständige Ablösung der Biofilme wurde durch Mikroskopie (Motic, 400fach, „Phasenkontrast“) überprüft. Die Varianten der Versuchsdurchführung sind dem Methodenteil unter 2.2.7.5 zu entnehmen.

3.3.4.1 Methodenoptimierung

Die Biofilmbildung im Becherglasreaktor, wie unter 2.2.5.2 beschrieben lieferte reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse. Auf Grundlage dessen wurde der in Abbildung 48, beschriebene Aufbau für den Desinfektionsversuch im Becherglasreaktor erdacht und zunächst geprüft, welchen Einfluss dieser Aufbau auf das Desinfektionsergebnis mit Chlordioxid ausübt. Die Resultate dieser Vorversuche sind in den nachstehenden Abbildungen zusammengefasst.

Da es sich bei Chlordioxid um eine radikalische Verbindung mit stark oxidierenden Eigenschaften handelt, sollte zunächst der Einfluss des Reaktionsmediums auf die Chlordioxid-

Konzentration untersucht werden. Die Biofilme wurden wie unter 2.2.5.2 beschrieben in TSB-Medium unterschiedlicher Konzentrationen angezogen. Diese Nährmedien enthalten verschiedenste oxidierbare Komponenten, die mit Chlordioxid reagieren und die Desinfektionswirkung auf diese Weise reduzieren könnten. Diese Minderung der Chlordioxid-Konzentration wurde wie in Material und Methoden 2.2.7.2.2 beschrieben ermittelt. Sterile Ansätze von TSB-Medium unterschiedlicher Konzentrationen wurden dafür mit Chlordioxid-Lösung versetzt und die Abnahme der Chlordioxid-Konzentration mit der Zeit photometrisch verfolgt. Die Auftragung der prozentualen Abnahme der Chlordioxid-Konzentration in Abhängigkeit vom Ausgangswert zum Zeitpunkt $t = 0$ min gegen die Zeit, ergibt das Diagramm in Abbildung 49.

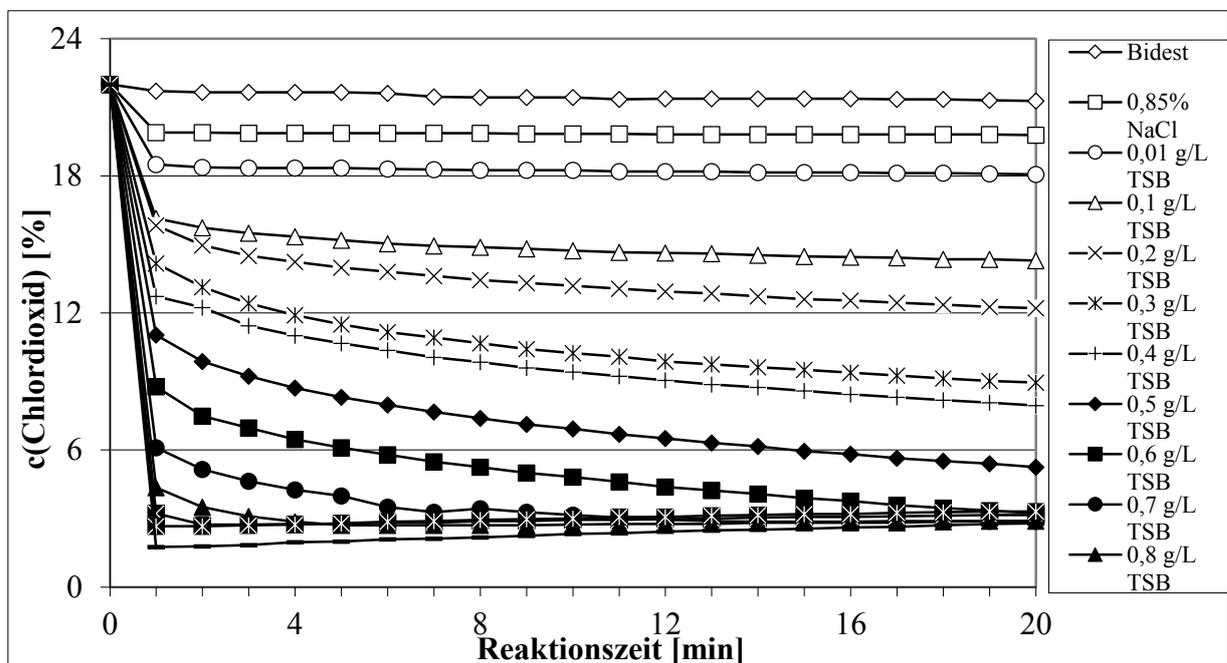


Abbildung 49: Chlordioxidverbrauch durch TSB-Lösungen. Aus einer sterilen 10 g/L TSB-Lösung wurden durch eine Verdünnungsreihe die aufgeführten TSB-Konzentrationen hergestellt. Durch Zugabe von Chlordioxid wurde in den Ansätzen eine ClO_2 -Startkonzentration von 22 mg/L eingestellt. Die prozentuale Änderung der ClO_2 -Konzentration wurde, über einen Zeitraum von 20 min bei $\lambda = 359$ nm, photometrisch verfolgt. Als Vergleichswerte dienen die Messreihen „Bidest.“ und „0,85% NaCl“, bei denen keine TSB-Zugabe erfolgte. **100 %** = die Konzentration an Chlordioxid in Bidest. zum Zeitpunkt 0 min. Den Messreihen liegt je eine Doppelbestimmung zu Grunde. Die Standardabweichungen sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt, σ lag in einem Bereich von 0,0 % bis 4,3 %. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.5.1 zu entnehmen.

Es zeigt sich, dass das Chlordioxid, wie erwartet, mit dem Medium reagierte und sich die Konzentration an Desinfektionsmittel dadurch mindert. Diese Abnahme ist dabei stark von der Konzentration des Nährmediums abhängig. So zeigte die Reaktion mit der höchsten verwendeten TSB-Konzentration einen Abfall der Chlordioxid-Konzentration von ca. 90 % im

Vergleich zum Ausgangswert. Aber auch sehr geringe Anteile an Medium (0,01 g/L TSB) sorgten schon für einen detektierbaren Verlust an Desinfektionsmittel von etwa 15 %. Auffällig ist dabei die die extrem hohe Reaktionsgeschwindigkeit, die einen sprunghaften Abfall der Chlordioxid-Konzentration binnen der ersten Minute der Reaktion bewirkte. Danach sank die Konzentration nur noch geringfügig weiter ab. Durch dieses Ergebnis zeigt sich die extreme Reaktivität von Chlordioxid. Die Vergleichsproben mit Wasser (bidestilliert) zeigten dagegen kaum eine Abnahme und lieferten unter Berücksichtigung des Fehlers nahezu konstante Werte in der Chlordioxid-Konzentration, auch über einen längeren Zeitraum hinweg. Damit bestätigt sich, dass die Richtigkeit der Ergebnisse bei Desinfektionsversuchen mit Chlordioxid durch das Entfernen von Nährmedienbestandteilen verbessert werden konnte.

Für den Aufbau des Desinfektionsversuchs ergibt sich aus diesen Erkenntnissen, dass es notwendig ist die Biofilme möglichst gründlich auch von geringen Nährmedienrückständen zu befreien und dann erst für den Desinfektionsversuch zu verwenden. Außerdem sollte der Reaktor während der Desinfektion zwar möglichst dicht Verschluss sein, der Verlust durch Verdampfung sollte sich, auf Grund der schnell stattfindenden Reaktion der Chlordioxid-Lösung, aber in geringen Grenzen halten. Optimal wäre die Desinfektion der Biofilme in einem Ansatz aus Chlordioxid in Wasser (bidestilliert) um die volle Desinfektionsleistung gewährleisten zu können. Allerdings vertragen die meisten Zellen die Lagerung in destilliertem Wasser, aufgrund dessen osmotischer Wirkung, nur schlecht und sterben schnell ab, was einen Überbefund in der Desinfektionsleistung zur Folge hätte. Daher wurde für die Desinfektionsversuche als Reaktionsmedium im Folgenden autoklaviertes Leitungswasser verwendet.

Wie bereits beschrieben, sollten Nährmedienbestandteile möglichst vollständig entfernt werden, bevor die Desinfektion mit Chlordioxid durchgeführt wird. Daraus resultierte die Notwendigkeit einen Waschschrift der Biofilme in die Methode einzubinden. Ebenfalls sinnvoll war ein solcher Waschschrift um planktonische Zellen von dem Biofilm abzuspülen und die Reproduzierbarkeit der Methode somit zu verbessern. Allerdings bestünde die Möglichkeit, dass sich Teile des Biofilms durch das Waschen ebenfalls ablösen und dadurch ein gegenteiliger Effekt in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Lebendzellzahlen pro Aufwuchsfläche eintritt.

Aus dem Ablaufplan für die Desinfektionsversuche in Abbildung 48 ist zu entnehmen, dass die Biofilme drei Waschschrritten unterzogen werden. Zunächst durch den eigentlichen Waschschrtritt beim Überführen in steriles Leitungswasser (2), dann bei der Überführung in die Desinfektionslösung (3) und anschließend durch den Neutralisationsschrtritt in Thiosulfat-Lösung (4). Die dabei entstehenden, mechanischen Einflüsse wurden durch Tauchbäder mit 0,85 %iger Natriumchlorid-Lösung simuliert, die Einwirkzeit betrug jeweils 5 min unter Rühren (siehe Material und Methoden 2.2.7.5). Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte nach Ablösung mittels Zellschaber durch Ausplattieren auf TSB, wie unter 2.2.5.3 beschrieben. Die so resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 50 dargestellt.

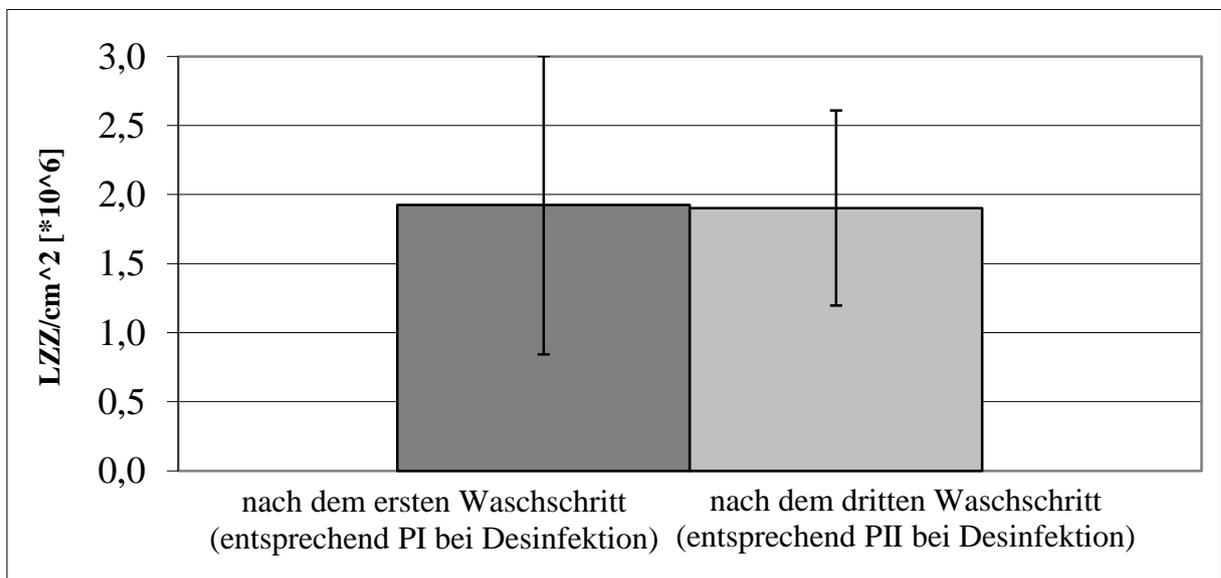


Abbildung 50: Einfluss des Wascheffekts bei Desinfektionsversuchen mit *Staphylococcus* sp. JCBK5. Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor in 1 g/L TSB binnen 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C generiert. Die Ablösung erfolgte mit Hilfe eines Zellkulturschabers und anschließender Beschallung mit Ultraschall. Die Lebendzellzahl wurde durch Ausplattieren der eingeeigneten Suspension auf TSB-Agar und Bebrütung bei 36 °C bestimmt. Die Desinfektion mit Chlordioxid, sowie der Neutralisationsschrtritt mit Na-Thiosulfat wurden in diesem Fall durch jeweils ein weiteres Tauchbad mit Bidest. H₂O ersetzt. Den Messreihen liegt je eine 5fache Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.5 zu entnehmen.

Die Abbildung 50 zeigt die Lebendzellzahlen der JCBK5-Biofilme pro Quadratzentimeter Aufwuchsfläche nach dem ersten Waschschrtritt, sowie nach dem dritten Waschschrtritt, entsprechend PII im Desinfektionsversuch. Es ist zu sehen, dass das Eintauchen und Verweilen der Biofilme unter Rühren alleine keinen Einfluss auf die mittlere bestimmbare Lebendzellzahl des Biofilmes aufwies, auf die Streuung der Methode aber sehr wohl. An der Standardabweichung ist deutlich zu erkennen, dass sich die Reproduzierbarkeit der Methode

durch das Abwaschen von auf dem Biofilm „aufliegenden“ planktonischen Zellen deutlich verbesserte, der Biofilm selbst schien nicht Methoden-relevant verändert zu werden.

3.3.4.2 Desinfektionswirkung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit

In diesem Versuch sollte das Desinfektionsergebnis von Chlordioxid in Abhängigkeit von der Einwirkzeit und insbesondere die Rückbesiedlung der Wachstumsoberfläche durch den Biofilm untersucht werden. Angezogen wurde ein JCBK5-Biofilm in 1 g/L TSB gemäß der Beschreibung unter Material und Methoden 2.2.5.2. Die Versuchsdurchführung ist in Abbildung 50 schematisch dargestellt. Die Desinfektion wurde mit einer Chlordioxid-Konzentration von 60 mg/L für 10 min, bzw. 20 min durchgeführt und anschließend in Thiosulfat-Lösung gestoppt.

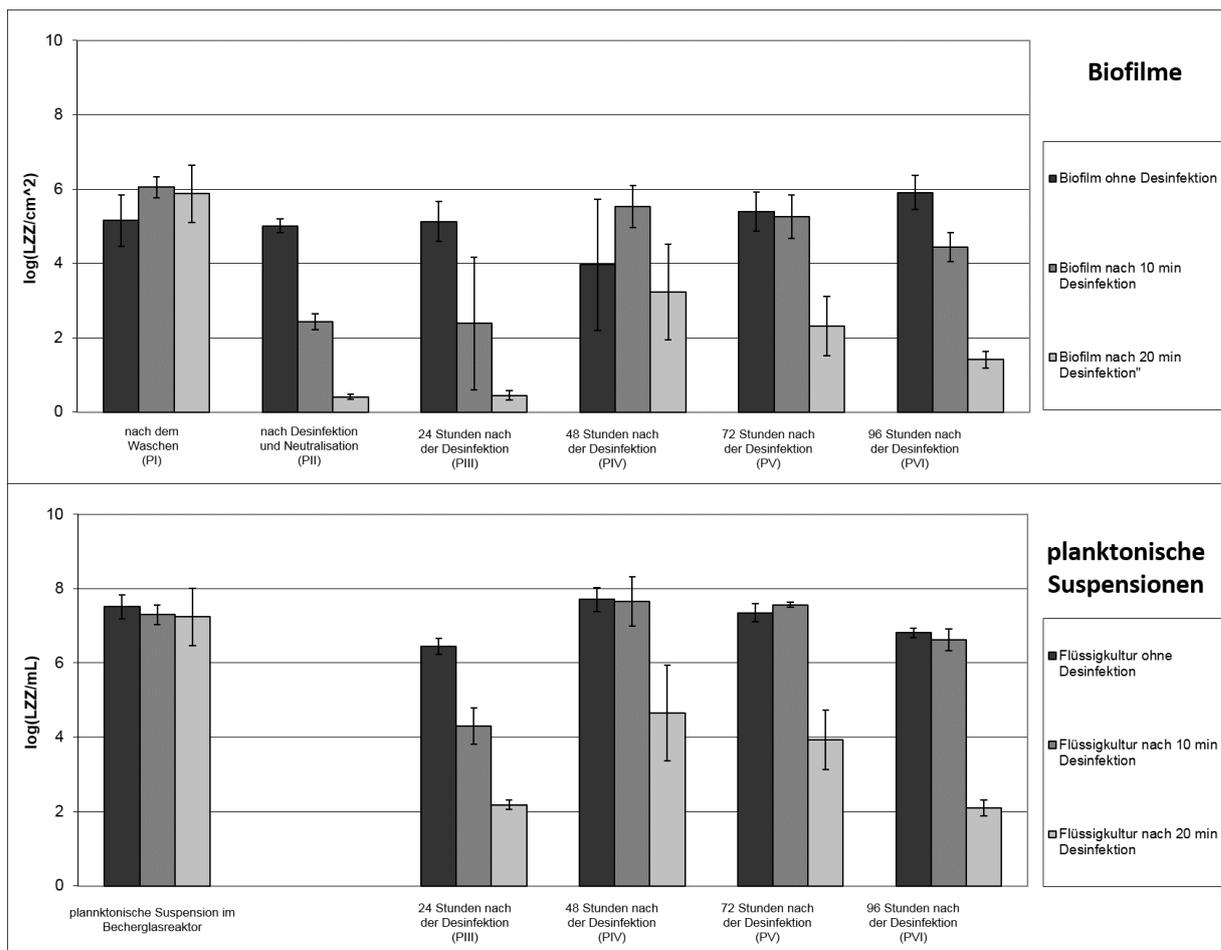


Abbildung 51: Desinfektionsversuch des Isolats JCBK5 mit Chlordioxid (Einwirkzeit 10 min und 20 min). Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor in 1 g/L TSB nach 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C angezogen. Die Desinfektion wurde mit einer ClO₂-Konzentration von 60 mg/L durchgeführt, die Restkonzentration an ClO₂

betrug ca. 25 mg/L. **Biofilme** = Biofilme auf den Objektträgern; Ablösung und Lebendzellzahlbestimmung erfolgten wie in 2.2.5.3 beschrieben und wurde als Logarithmus der Lebendzellzahl pro Quadratcentimeter aufgetragen. **Planktonische Suspensionen** = Planktonische Kultur, die sich nach der Desinfektion aus den überlebenden Zellen des Biofilms in TSB-Medium gebildet hat; Die Lebendzellzahl der planktonischen Zellkultur im jeweiligen Reaktor wurde ebenfalls durch Ausplattieren bestimmt und als Logarithmus der Lebendzellzahl pro Milliliter aufgetragen. **Kontrollreaktor ohne Desinfektion** = Die Biofilme wurden statt in die Desinfektions- und Neutralisationslösungen für 10 min in steriles Leitungswasser gegeben. Die restliche Behandlung erfolgte analog zu den Desinfektionsreaktoren. **Desinfektionsreaktoren** = Die Biofilme wurden mit der Chlordioxidlösung behandelt und die Desinfektion in Thiosulfat-Lösung gestoppt. Den Messreihen liegt je eine 2-3fache Bestimmung zu Grunde. Die Fehlerbalken geben die prozentuale Abweichung vom Mittelwert +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.5 zu entnehmen.

Die Abbildung 51 zeigt das Verhalten von JCBK5-Biofilmen im Becherglasreaktor bei der Desinfektion mit Chlordioxid und unterschiedlichen Einwirkzeiten, sowie die Regenerierung von Biofilmen und umgebender planktonischer Kultur binnen mehrerer Tage nach der Desinfektion.

Im oberen Abbildungsteil sind die ermittelten, logarithmierten Lebendzellzahlen der Biofilme pro Quadratcentimeter Aufwuchsfläche vor, unmittelbar nach und ein bis vier Tagen nach der Desinfektion dargestellt. Durchgeführt wurde der Versuch mit Desinfektionszeiten von 10 min und 20 min, als Kontrolle wurde außerdem ein Reaktor beprobt, der nicht desinfiziert, aber ansonsten analog behandelt wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Lebendzellzahl der Biofilme pro Quadratcentimeter Fläche bei dem unbehandelten Biofilm über den Beprobungszeitraum hinweg innerhalb der Fehlergrenzen nahezu konstant blieb. Die Behandlung mit Chlordioxid führte dagegen zu einer deutlichen Reduktion der Lebendzellzahl im Umfang von zwei Zehnerpotenzen bei einer Desinfektionszeit von 10 min und um mehr als vier Zehnerpotenzen bei einer Einwirkzeit von 20 min. Die Rückbesiedlung der Oberfläche durch den Biofilm erreichte bei den Proben, die 10 min behandelt wurden, bereits 48 Stunden nach der Desinfektion ein ähnliches Ausmaß, wie die Bewachsung der unbehandelten Biofilme. Wurde die Reaktionszeit des Chlordioxids verdoppelt konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden. Der Biofilm regenerierte sich zwar zu einem gewissen Maß, erreichte dabei aber um mehr als zwei Zehnerpotenzen geringere Maximallebendzellzahlen im Vergleich zu vor der Desinfektion. Die Lebendzellzahl blieb innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Desinfektion konstant und auch über mehrere weitere Tage Bebrütung konnte der Anfangslevel nicht erreicht werden, eher noch wurde ein leichter Abwärtstrend festgestellt.

Der untere Abbildungsteil zeigt die logarithmische Auftragung der Lebendzellzahlen in einem mL der planktonischen Kultur des jeweiligen Becherglasreaktors. Nach den 24 Stunden Bebrütungsphase des Reaktors vor der Desinfektion zeigten alle planktonischen Kulturen eine ähnliche Lebendzellzahl/mL. Direkt nach der Desinfektion konnte natürlich keine Beprobung der planktonischen Kultur erfolgen, da lediglich die Biofilme desinfiziert und anschließend in frisches (steriles) Nährmedium überführt wurden. Im Laufe der weiteren Bebrütung zeigte sich, dass die planktonischen Kulturen des Vergleichsreaktors und des kürzer desinfizierten Reaktors, nach 48 Stunden ihren Maximalwert in der Lebendzellzahl erreichten, der dem der Kultur vor der Desinfektion entsprach. Nach 96 Stunden schien es einen leichten Abfall in der Lebendzellzahl der Kulturen zu geben. Das Verhalten der Vergleichskultur und der 10 min desinfizierten Kultur zeigte somit innerhalb der Fehlergrenzen keinen signifikanten Unterschied. Die 20 min desinfizierten Biofilme sorgten dagegen für eine deutlich langsamere und auch geringere Rückbesiedlung des Anzuchtmediums. Die maximale Lebendzellzahl/mL Medium wurde zwar auch nach 48 Stunden Bebrütung ermittelt, aber der Maximalwert der anderen beiden Kulturen um mehr als zwei Zehnerpotenzen nicht erreicht. Auch in dieser planktonischen Kultur kam es nach Erreichen des Maximalwerts zu einer stetigen Abnahme der Lebendzellzahl.

3.3.4.3 Desinfektionswirkung auf abgelöste Biofilme

Mit diesem Versuchsansatz sollte das Vermehrungsverhalten von Biofilmbakterien nach einer Desinfektion mit Chlordioxid im Vergleich zu unbehandelten Kulturen näher untersucht werden. Dafür wurden, wie unter Material und Methoden 2.2.7.5.3 beschrieben, Biofilme des *Staphylococcus*-Isolats JCBK5 im Becherglasreaktor angezogen und für 10 min, bzw. 20 min desinfiziert, abgelöst und als Startkultur für den Reaktionsansatz verwendet. Das Wachstum der Kulturen wurde während der Inkubation bei 30 °C photometrisch verfolgt, indem die Zunahme der Zellmasse als optische Dichte bei 546 nm gemessen wurde. Aufgetragen gegen die Bebrütungszeit ergaben sich daraus die Wachstumskurven, dargestellt in Abbildung 52.

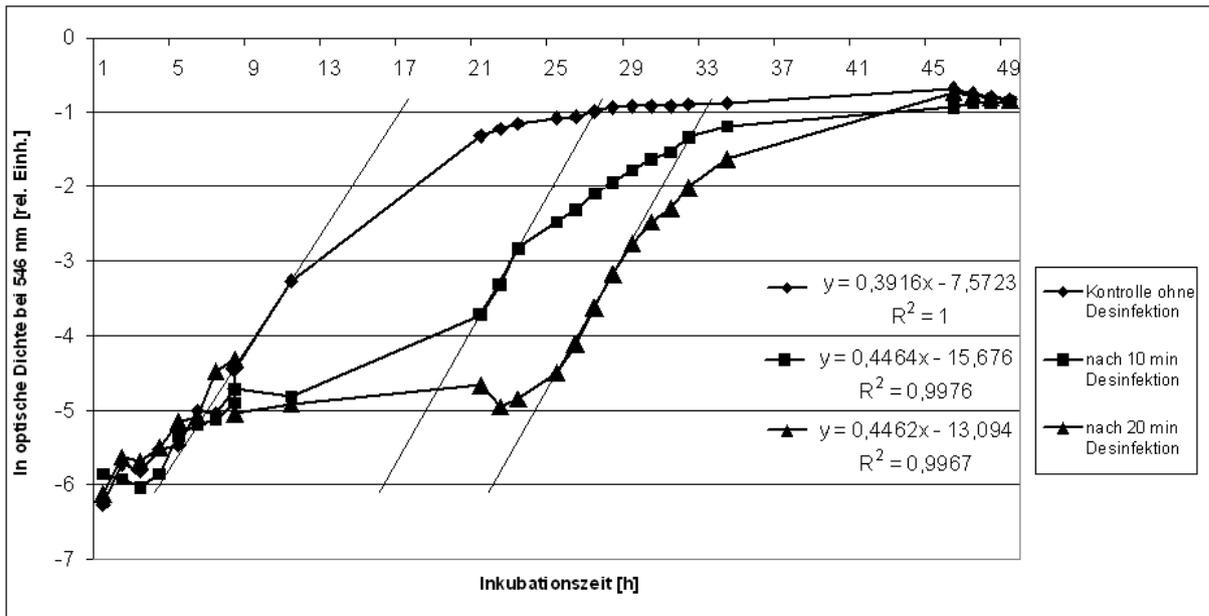


Abbildung 52: Wachstumskurven von abgelösten JCBK5-Biofilmen nach Desinfektion mit Chlordioxid (Einwirkzeit 10 min und 20 min). Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor angezogen. Die Desinfektion wurde mit einer ClO_2 -Konzentration von 60 mg/L durchgeführt, die Restkonzentration an ClO_2 betrug ca. 23 mg/L. Die Inkubation erfolgte nach Ablösung der Biofilme bei 30 °C im Schüttelwasserbad und das Wachstum der Kulturen wurde photometrisch verfolgt. **Kontrolle ohne Desinfektion** = Der verwendete Biofilm wurden statt in die Desinfektions- und Neutralisationslösungen für 10 min in steriles Leitungswasser gegeben. Die restliche Behandlung erfolgte analog zu den Desinfektionsansätzen. **Desinfektionsansätze** = Die Biofilme wurden mit der Chlordioxidlösung behandelt und die Desinfektion jeweils nach den angegebenen Zeiten in Thiosulfat-Lösung gestoppt. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.5.3 zu entnehmen.

Die Abbildung 52 zeigt die logarithmische Auftragung der optischen Dichte gegen eine Inkubationszeit der abgelösten Biofilme von 50 Stunden. Es ist zu sehen, dass alle Kulturen über den untersuchten Zeitraum hinweg ein deutliches Wachstum aufwiesen. Sie unterschieden sich in der Länge ihrer Latenzphase (lag-Phase), wobei diese sich mit zunehmender Desinfektion verlängerte und bei der unbehandelten Vergleichskultur mit ca. 6 Stunden am kürzesten war. Die sich anschließende exponentielle Wachstumsphase zeigte dagegen bei allen Ansätzen eine nahezu gleiche Generationszeit, im Diagramm dargestellt durch die Steigung der jeweiligen Kurve und abzulesen in Tabelle 28. Das Plateau der Stationären Phase wurde in allen Kulturen bei einer sehr ähnlichen maximalen optischen Dichte erreicht.

Tabelle 28: Wachstumsparameter von abgelösten JCBK5-Biofilmen nach Desinfektion mit Chlordioxid (Einwirkzeit 10 min und 20 min).

	Kontrolle ohne Desinfektion	nach 10 min Desinfektion	nach 20 min Desinfektion
Wachstumsrate μ [h ⁻¹]	0,3916	0,4464	0,4462
Verdopplungszeit t_a [h]	1,77	1,55	1,55

Aus den Ergebnissen in Tabelle 28 wurde geschlossen, dass sich die Wachstumsparameter der Kulturen im Rahmen der Fehlergrenzen nicht unterschieden, was darauf schließen lässt, dass Chlordioxid keine Auswirkung auf die Vermehrung von Biofilmbakterien des untersuchten Isolats hatte. Die um einige Stunden verlängerte lag-Phase ist dabei mit der verringerten Ausgangslebenszellzahl des Biofilmextrakts zu erklären, da diese mit zunehmender Desinfektionszeit, aber gleichbleibender optischen Dichte, abnimmt.

3.3.4.4 Desinfektionswirkung auf Biofilme und planktonische Kulturen

Bakterien können in Abhängigkeit von ihrer Lebensweise unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, auch wenn sie demselben Stamm angehören (Fuchs, 2014). Die Empfindlichkeit von planktonischen und Biofilmzellen auf das Desinfektionsmittel Chlordioxid sollte daher im folgenden Versuch am Beispiel des *Staphylococcus*-Stammes JCBK5 untersucht werden.

Der Versuchsaufbau dafür ist in Abbildung 53 schematisch dargestellt und unter Material und Methoden 2.2.7.5.4 genauer erläutert.

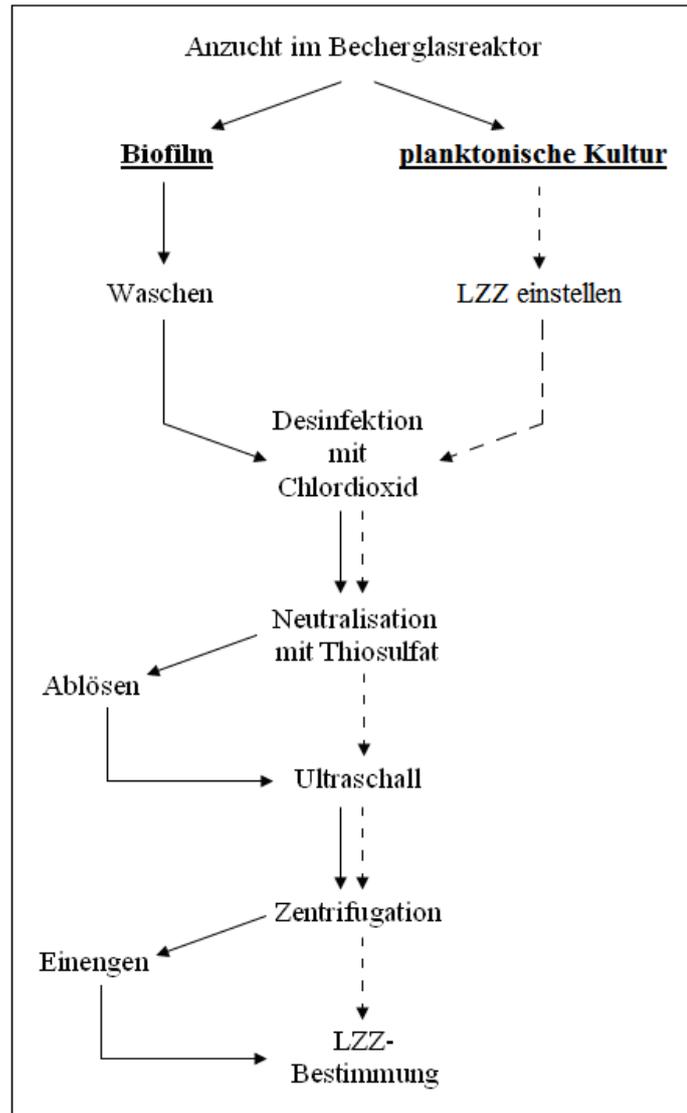


Abbildung 53: Methoden zur Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilme und planktonische Kulturen des Becherglasreaktors (Schematische Darstellung).

Um die Auswirkungen des Desinfektionsmittels vergleichen zu können, wurde ein Aliquot der planktonischen Reaktorkultur so verdünnt, dass die Gesamtlebendzellzahl in den Desinfektionsansätzen von Biofilm und planktonischer Kultur in der gleichen Größenordnung lag. Die Desinfektion erfolgt mit einer Chlordioxid-Konzentration von 15 mg/L über einen Zeitraum von 10 min. Die ermittelten Lebendzellzahlen sind in Abbildung 54 vergleichen dargestellt.

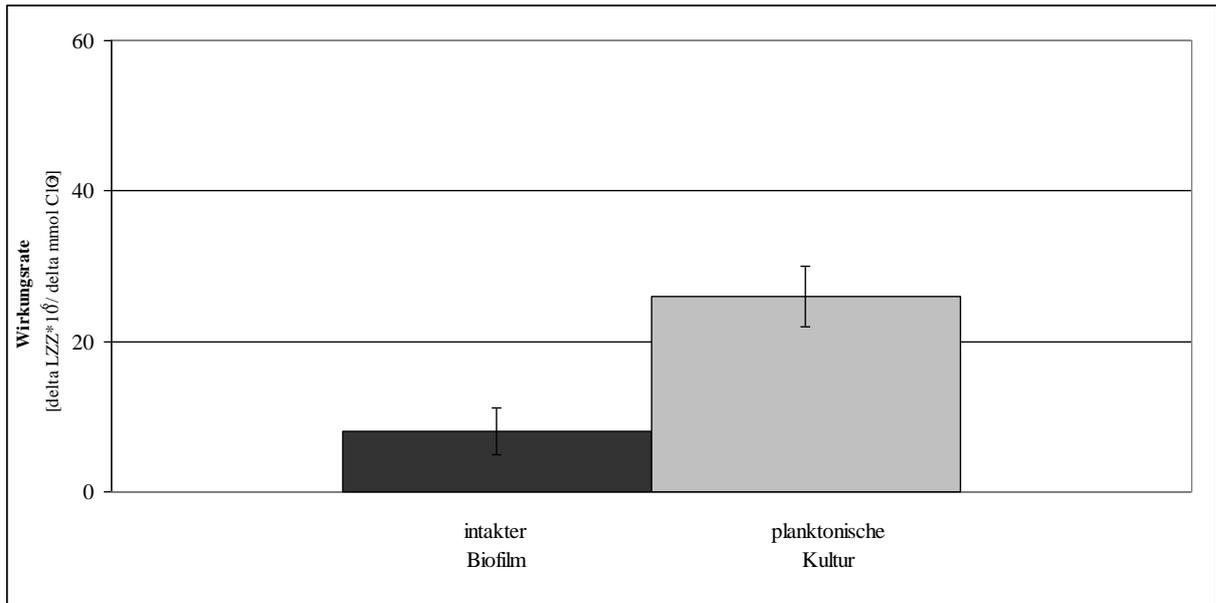


Abbildung 54: Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilme und planktonische Kulturen von *Staphylococcus sp. JCBK5*. Biofilme und planktonische Kulturen wurden im Becherglasreaktor angezogen und anschließend für 10 min einer Behandlung mit Chlordioxid (15 mg/L) ausgesetzt. Unmittelbar danach erfolgte die Beendigung der Desinfektion durch Thiosulfat-Zugabe, sowie die Bestimmung der Restkonzentration an Chlordioxid. Die Lebendzellzahl wurde durch Ausplattieren bestimmt. Für die jeweiligen Versuchsreihen wurden 3fach-Bestimmungen durchgeführt. Dargestellt ist die Wirkungsrate als Differenzenquotient aus Lebendzellzahl und verbrauchter Chlordioxidkonzentration. **Biofilm** = Die Biofilme wurden direkt auf dem Objektträger desinfiziert und erst danach abgelöst. **Planktonische Kultur** = Die Kultur wurde aliquotiert, auf eine ähnliche Gesamtlebendzellzahl der Biofilme verdünnt und desinfiziert. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.5.3 zu entnehmen.

Die Abbildung 54 zeigt die Wirkungsrate von Chlordioxid als Quotient aus dem Anteil an abgestorbenen Zellen und verbrauchter Chlordioxid-Konzentration für die untersuchten Biofilme und planktonischen Kulturen. Dabei ist eine deutlich geringere Wirkungsrate bei den Biofilmen, als bei den planktonischen Kulturen aus dem Diagramm ablesbar. Mit einer geringen Wirkungsrate geht dabei eine höhere Resistenz der Zellen in Bezug auf die Behandlung mit Chlordioxid einher, sodass sich das Resultat ergibt, dass die Biofilme in diesem Versuch eine größere Resistenz gegenüber dem Desinfektionsmittel aufwiesen als die planktonischen Zellen des gleichen Stammes.

3.3.4.5 Desinfektionswirkung in Abhängigkeit von der Biofilmstruktur

Die Ergebnisse aus 3.2.3.4 zeigten, dass Biofilmzellen des Isolats JCBK5 eine größere Toleranz gegenüber Chlordioxid aufwiesen, als planktonische Zellen dieses Stammes. Diese Ergebnisse könnten auf der Struktur der Biofilme beruhen, da möglicherweise durch die Schichtung der Zellen im Biofilm mehr Mikroorganismen vor dem Kontakt mit dem Desinfektionsmittel abgeschirmt wurden. Eine andere mögliche Erklärung wäre aber auch, dass die Zellen selbst eine größere Resistenz gegenüber Chlordioxid entwickelt haben könnten. Um den Einfluss der Biofilmstruktur auf das Desinfektionsergebnis zu untersuchen wurde der unter 2.2.7.5.5 beschriebene Versuch durchgeführt. Eine schematische Darstellung der wichtigsten Versuchsparameter ist in Abbildung 55 dargestellt.

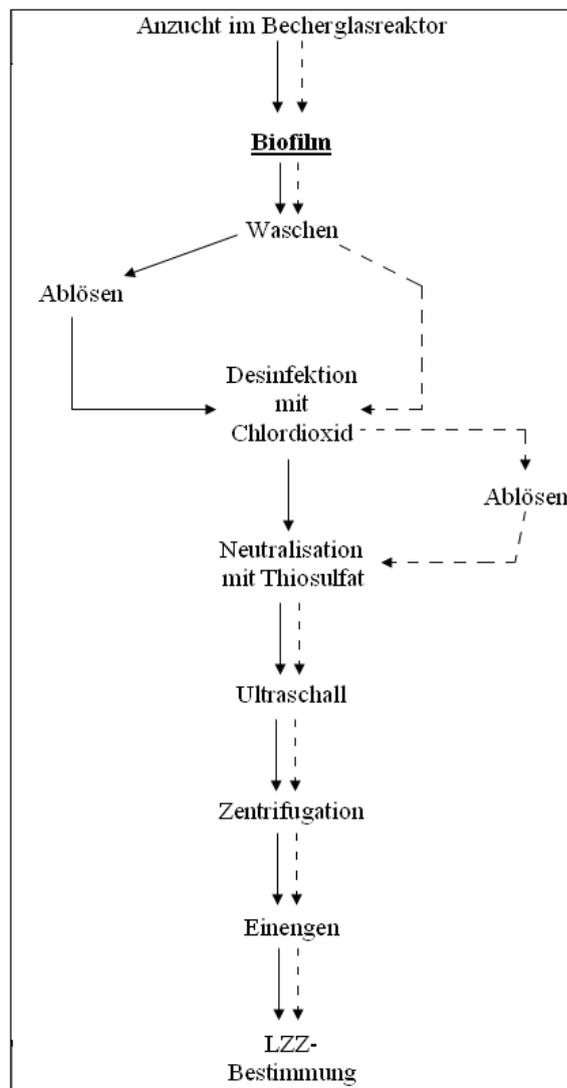


Abbildung 55: Methoden zur Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilme des Becherglasreaktors (Schematische Darstellung). Dargestellt sind die Vorgehensweisen der Desinfektion von intakten und abgelösten Biofilmen.

Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor angezogen, gewaschen und anschließend desinfiziert. Dabei erfolgte die Ablösung entweder vor (intakter Biofilm) oder nach der Desinfektion (abgelöster Biofilm). Das Diagramm in Abbildung 56 zeigt die errechneten Wirkungsrate von Chlordioxid auf die jeweiligen Biofilme. Diese wurden als Quotient aus den Differenzen der Lebendzellzahlen, bestimmt vor und nach der Desinfektion und der dafür verbrauchten Konzentration an Chlordioxid berechnet.

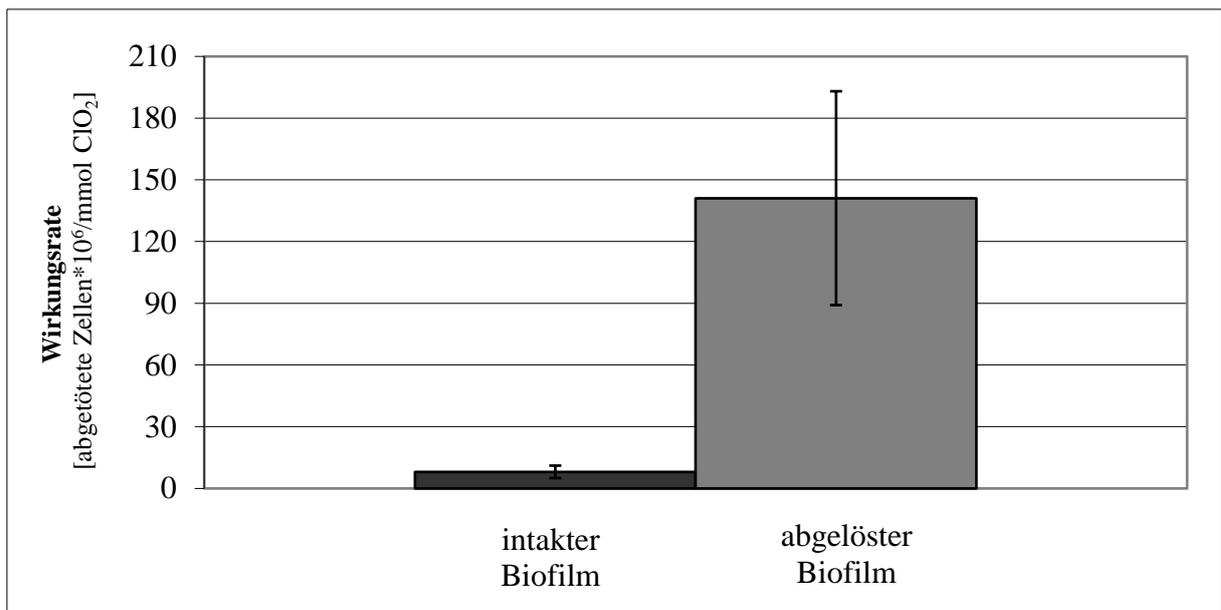


Abbildung 56: Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf Biofilm-Kulturen von *Staphylococcus* sp. JCBK5 mit unterschiedlicher Vorbehandlung. Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor angezogen. Die Biofilme wurden für 10 min einer Behandlung mit Chlordioxid (15 mg/L) ausgesetzt, danach die Restkonzentration an Chlordioxid bestimmt und die Reaktion durch Thiosulfat-Zugabe gestoppt. Die Lebendzellzahl wurde durch Ausplattieren ermittelt. Für die jeweiligen Versuchsreihen wurden 3fach-Bestimmungen durchgeführt. Dargestellt ist die Wirkungsrate als Differenzenquotient aus Lebendzellzahl und verbrauchter Chlordioxidkonzentration. **Intakter Biofilm** = die Biofilme wurden direkt auf dem Objektträger desinfiziert und erst danach abgelöst. **Abgelöster Biofilm** = Der Biofilm wurde zunächst von dem Objektträger abgelöst und die so erhaltene Suspension desinfiziert. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.5.5 zu entnehmen.

Die Abbildung 56 zeigt im Mittel eine größere Wirkungsrate bei abgelösten Biofilmen, als bei Biofilmen mit intakter Struktur. Allerdings wurde bei den abgelösten Biofilmen auch eine deutlich größere Streuung der Werte festgestellt. Die Ergebnisse zeigen damit eine größere Resistenz der Zellen gegenüber des verwendeten Desinfektionsmittels, bedingt durch die Struktur des Biofilms.

3.3.4.6 Desinfektionswirkung auf planktonische Kulturen mit variierender Lebendzellzahl

Bei einigen Mikroorganismen ist der sogenannte Inokulum-Effekt bei Desinfektionen bekannt. Dieser besagt, dass mit zunehmender Zelldichte die desinfektionsmittelbedingte Reduktionsrate, bei gleicher Desinfektionsmittelkonzentration, sinkt (Johnston, 2000). Das bedeutet, die Desinfektionswirkung wird mit zunehmender Zellzahl pro Volumeneinheit schlechter. Für eine Wirkungsrate würde das bedeuten, dass mehr Desinfektionsmittel pro Zelle verbraucht wird um die Zelle abzutöten und dass die Wirkungsrate somit kleiner wird. Der unter Material und Methoden 2.2.7.5.6 beschriebene Versuch diente zur Überprüfung, ob ein solcher Effekt bei dem Isolat JCBK5 ebenfalls beobachtet werden kann. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 57 dargestellt.

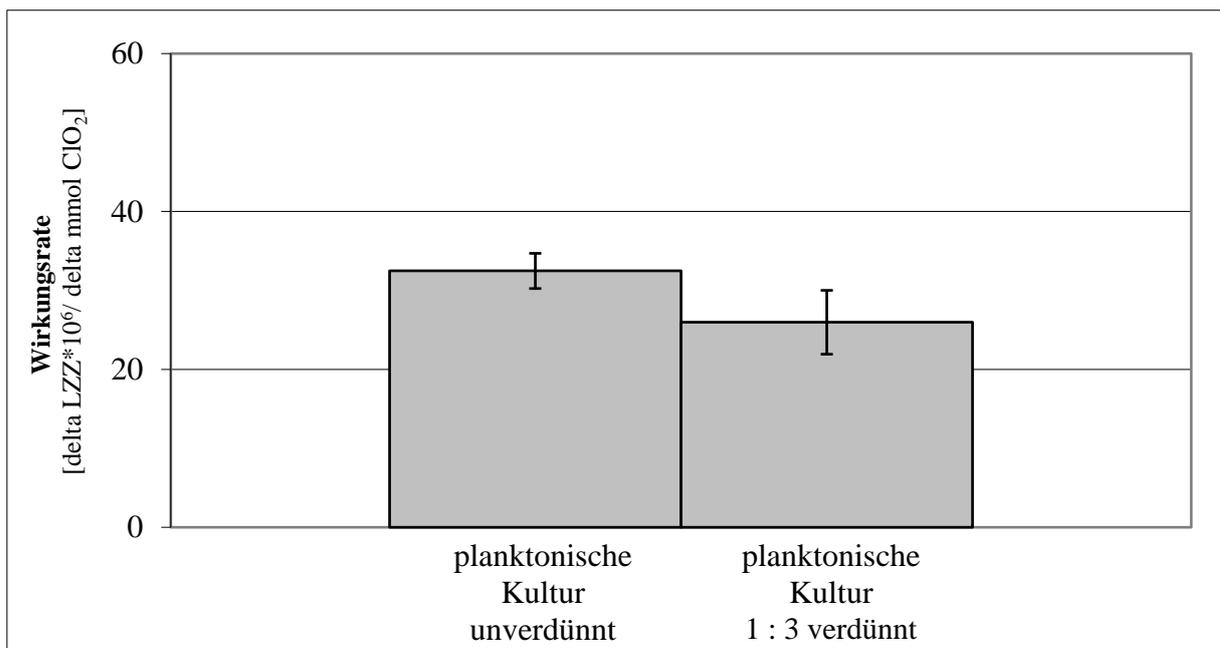


Abbildung 57: Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf planktonische Kulturen von JCBK5 mit unterschiedlichen Ausgangslebendzellzahlen. Die Staphylococce-Kultur wurde im Becherglasreaktor in 1 g/L TSB binnen 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C angezogen und entweder verdünnt (1:3 mit NaCl 0,85%), oder unverdünnt verwendet. Dafür wurden die Kulturen für 10 min einer Behandlung mit Chlordioxid (15 mg/L) ausgesetzt, danach die Restkonzentration an Chlordioxid bestimmt und die Reaktion durch Thiosulfat-Zugabe gestoppt. Die Lebendzellzahl wurde durch Ausplattieren von 0,1 mL der jeweiligen Kultur auf TSB-Agar und Bebrütung bei 36 °C bestimmt. Für die Versuchsreihen wurden jeweils 3fach-Bestimmungen durchgeführt. Dargestellt ist die Wirkungsrate als Differenzenquotient aus Lebendzellzahl und verbrauchter Chlordioxidkonzentration. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung +/- wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.5.6 zu entnehmen.

Die Abbildung 57 zeigt die Wirkungsrate von Chlordioxid als Quotient aus dem Anteil an abgestorbenen Zellen und verbrauchter Chlordioxid-Konzentration für die untersuchten planktonischen Kulturen. Dabei wurde im Mittel bei der Kultur mit der größeren Zelldichte auch eine etwas größere Wirkungsrate als bei der verdünnten Zellkultur bestimmt. Daraus ergibt sich, dass sich in diesem Versuch bei dem geprüften Isolat JCBK5 kein Inokulum-Effekt feststellen ließ.

4 Diskussion

4.1 Trinkwasseruntersuchungen des Trinkwassersystems am Campus Griffenberg

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mikrobiologische Untersuchungen an dem Trinkwassersystem des Campus Griffenberg der Bergischen Universität Wuppertal durchgeführt und begleitet. Bei der untersuchten Trinkwasseranlage handelt es sich nach DVGW Arbeitsblatt W 551 um eine technische Großanlage, die gemäß den Vorgaben der Trinkwasserverordnung 2001 seit 2010 einer Beprobungspflicht auf Legionellen unterliegt. Diese Beprobungen werden durch das akkreditierte Labor Dr. Fülling aus Remscheid gemäß der DIN EN ISO 11731-2:2008 durchgeführt.

Die Auswahl der Probeentnahmestellen erfolgte dabei durch das Labor Dr. Fülling und das Gebäudemanagement der Universität nach den Vorgaben der Richtlinie für Hygiene in Trinkwasser-Installationen (VDI 6023) und des Arbeitsblatts W 551. Gemäß diesen sollte die Auswahl der Entnahmestellen, sowie der Probenumfang repräsentativ für das beprobte System sein. Da die Proben durch die Raumnummer und die Definition der Entnahmestellen (Dusche, Zirkulation, etc.) gekennzeichnet wurden, konnte aus den Ergebnissen die Repräsentativität abgeleitet werden. Bei der Betrachtung des Campusplans (Abbildung 9) wird deutlich, dass die Entnahmestellen gleichmäßig über die verschiedenen Gebäude des Campus verteilt lagen. Anhand der Raumnummern der Proben zeigte sich außerdem, dass Entnahmestellen in endständigen Systemteilen (z. B. obere Etagen der Gebäude) genauso beprobt wurden, wie Auslassleitungen direkt nach einem Wassererwärmer oder Zirkulationsleitungen. Die Beprobungsstellen spiegeln damit die Beschaffenheit des wasserführenden Systems wieder und sind somit als repräsentativ einzustufen.

Die Ergebnisse aller Beprobungen des Trinkwassersystems am Campus Griffenberg von 2010 bis 2016 zeigten, dass die regelmäßige Kontrolle und die daraus resultierend eingeleiteten Desinfektions- und Sanierungsmaßnahmen bei vielen Beprobungsstellen eine Reduzierung der *Legionella*-Verkeimung unter den technischen Maßnahmenwert von 100 KBE/ 100 mL Trinkwasser bewirkte. Da die Anzahl der Proben, mit Überschreitung des technischen Maßnahmenwerts von 9 Entnahmestellen (2010) auf bis zu 2 Entnahmestellen (2014) reduziert werden konnte (siehe Abbildung 10). Der Anteil der Proben in denen überhaupt Legionellen

identifiziert wurden, unabhängig von einer Überschreitung des technischen Maßnahmenwerts, blieb allerdings in den meisten Jahren konstant bei etwa 50 % des Gesamtprobenumfangs, mit Ausnahme der jüngsten Beprobungsergebnisse aus dem Jahr 2016 (siehe Abbildung 58).

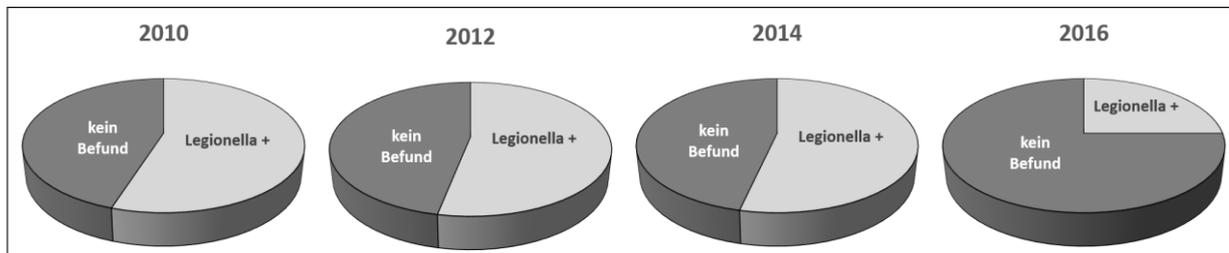


Abbildung 58: Legionella-Befunde nach DIN EN ISO 11731-2:2008 im Trinkwassernetz des Campus Griffenberg als Anteil des Gesamtprobenumfangs. Dargestellt sind die Ergebnisse der Beprobungen durch das Labor Dr. Füllung seit Einführung der Beprobungspflicht auf Legionellen. **kein Befund** = In den entsprechenden Proben wurden ≤ 1 KBE/100 mL Legionellen detektiert. **Legionella +** = In den Proben wurden Legionellen detektiert. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.4.1 zu finden.

Ähnliche Ergebnisse wurden durch das TZW (Technikzentrum Wasser des DVGW) im Rahmen einer Erhebung ermittelt. Dafür wurden die Ergebnisse der Legionellen-Untersuchungen von 660 Wasserproben in mehreren städtischen Gebäuden, wie Schulen, Kindergärten und Turnhallen einer mittelgroßen deutschen Stadt detailliert untersucht. Hier ergab sich in 47 % der Proben aus Warmwasser-Installationen ein Vorkommen von Legionellen und in knapp 27 % der Proben eine Überschreitung des technischen Maßnahmenwertes (Hügler et al., 2011).

Aus dieser Erhebung von Hügler et al. (2011) wurde ebenfalls deutlich, dass die in der Wasserleitung vorherrschende Temperatur einen Einfluss auf das Vorkommen von *Legionella* sp. hatte. Auch dieses Phänomen konnte aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abgeleitet werden (siehe Abbildung 59). Die Temperatur im ersten Liter Trinkwasser, in dem die Bestimmung erfolgt, spiegelt die vorherrschende Temperatur, wenn über längere Zeit keine Wasserabnahme in der entsprechenden Wasserleitung erfolgt, wider. Liegen diese Temperaturbedingungen in einem für Legionellen günstigen Bereich, kommt es zu einer vermehrten Verkeimung. Die genaue Temperaturspanne in der sich Legionellen gut vermehren können, wird je nach Quelle etwas anders definiert. Durch das Arbeitsblatt W 551 wird sie auf den Bereich zwischen 30 °C und 45 °C festgelegt, das Technologiezentrum Wasser (IZW) gibt

dagegen einen noch weiter gefassten Bereich von 25 °C bis 55 °C an. Die Abbildung 59 zeigt, dass die Leitungen des Wassersystems am Campus Griffenberg mit Legionellen-Befall in knapp 80 % der Proben eine Temperatur von 30 °C bis 50 °C im ersten Liter Wasserprobe aufwiesen und damit genau in dem als kritisch angesehenen Bereich lagen. Die Proben ohne Nachweis von Legionellen wiesen dagegen zum größten Teil eine Temperatur von über 50 °C auf.

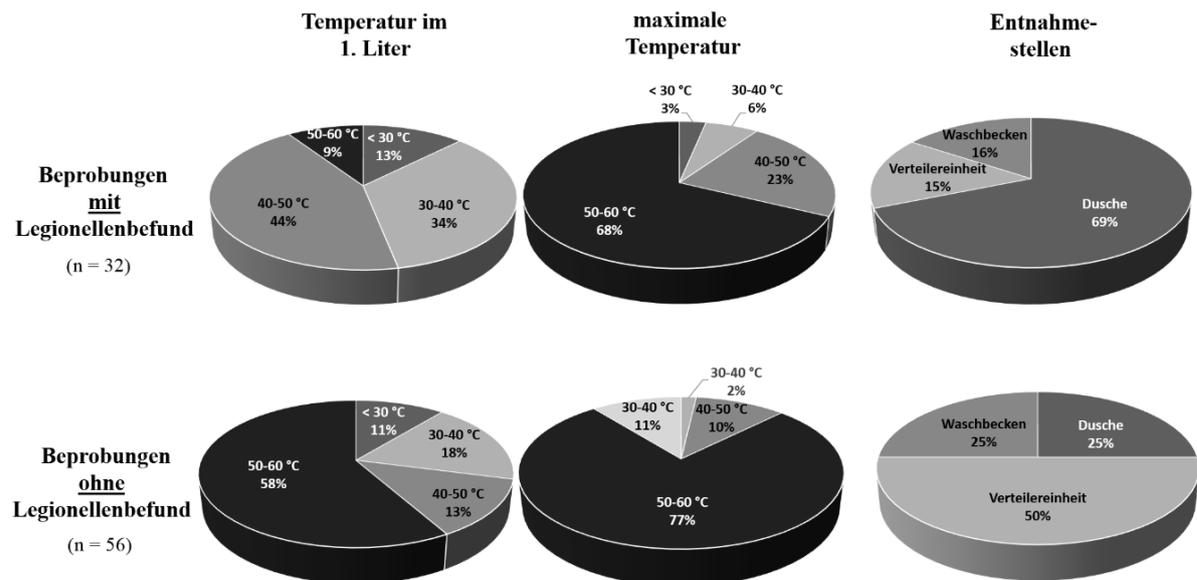


Abbildung 59: Legionella-Verkeimung der Trinkwasserbeprobungen am Campus Griffenberg. Die Beprobungen erfolgten gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008 durch das Labor Dr. Füllung im Zeitraum von 2012 bis 2016. Dargestellt sind die Verteilungen der Temperatur im 1. Liter, die maximale Temperatur, sowie die Verteilung auf die Entnahmestellen in Prozent. **Beprobungen mit Legionellenbefund** = in den entsprechenden Proben wurden Legionellen detektiert (mit und ohne Grenzwertüberschreitung). **Beprobungen ohne Legionellenbefund** = in den entsprechenden Proben wurden ≤ 1 KBE/100 mL Legionellen detektiert. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.4.1 zu finden.

Die Vorgabe des DVGW gemäß Arbeitsblatt W551 besagt, dass die Kaltwassertemperatur in Leitungssystemen unter 25 °C und die Warmwassertemperatur im gesamten Warmwassersystem mindestens über 55 °C liegen sollen, um einen Befall des System mit Legionellen zu vermeiden. Unter der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse sind diese Vorgaben als sinnvoll zu erachten. Gründe für die zu niedrigen Temperaturen bei einigen der Beprobungsstellen könnten dabei unzureichende Isolierung der Leitungen und längere Standzeiten des Wassers durch niedrige Frequentierung der Entnahmestelle sein. Oftmals sind, besonders in älteren Systemen, Kalt- und Warmwasserleitungen auch unmittelbar nebeneinander verlegt, was den Wärmeaustausch begünstigt und sowohl im Kaltwasser- als

auch Warmwassersystem zu einer Vermehrung von Legionellen führen kann (Hügler, 2011). Aus den Beprobungsergebnissen am Campus Griffenberg wurde ebenfalls deutlich, dass die Temperaturvorgabe von über 55 °C im gesamten Warmwassersystem zwar in der Mehrheit der Leitungen erreicht wurde, es aber auch Bereiche gab, in denen diese Temperatur nach langer Durchlaufzeit des Wassers geringer blieb. In diesen Bereichen könnte die Entfernung zum Warmwasserbereiter, oder der Zirkulationsleitung zu lang und damit mit einem zu großen Wärmeverlust behaftet sein, auch wenn die 3- Liter- Regel eingehalten wurde. Diese Regel gibt vor, dass das Volumen der Leitung von der Entnahmestelle bis zur Zirkulationsleitung oder zum Erwärmer nicht mehr als 3 Liter betragen sollte um eben diese Effekte zu vermeiden (DVGW, W551).

In der Literatur (DVGW, W551) wird außerdem immer wieder beschrieben, dass besonders lange Standzeiten des Wassers in der Leitung eine Anreicherung von Legionellen im Trinkwasser begünstigen. Das hängt zum einen damit zusammen, dass Legionellen eine relativ geringe Teilungsrate aufweisen (Generationszeit 3 bis 72 Stunden) und ihre Vermehrung erst mit längeren Inkubationszeiten ein kritisches Ausmaß annimmt (Müller et al., 2007). Zum anderen kommt es mit zunehmender Stagnation auch vermehrt zu Wechselwirkungen mit dem Biofilm in der Leitung, was die Emission von Legionellen aus dem Biofilm begünstigt (Flemming, 1994). Durch die Wechselwirkung von Wasser und Leitungsmaterialien kann es außerdem zu einer Anreicherung von Nährstoffen wie z. B. Weichmachern in der Wasserphase kommen, die das Legionellen-Wachstum zusätzlich fördern (Höll, 2011).

Bei der Betrachtung der Entnahmestellen selbst konnte eine Tendenz zu Legionellen-Befall in Duschen festgestellt werden. Verteilereinheiten und Zirkulationsleitungen wiesen dagegen deutlich seltener Befunde auf. Auch dieses Ergebnis bestätigt die nachteilige Kombination aus Standzeiten des Wassers und Temperatur in der entsprechenden Leitung, da Zirkulationsleitung und Erwärmer/Verteiler in ständigem Durchstrom von frisch erwärmten Wasser stehen. Die Duschen an diesem Campus der Universität werden dagegen immer nur von speziellen Personengruppen (Angestellte der Schreinerei, oder Sportstudenten, etc.) genutzt, was die Nutzungshäufigkeit im Vergleich von z. B. Waschbecken in Toilettenräumen, potentiell deutlich herab setzt. Diesen Umstand geben auch die Ergebnisse aus der Untersuchung eines Trinkwasserstrangs in Gebäude U (siehe Abbildung 60) wider. Bei dem Raum U.08.33 handelt

es sich um einen Wasserverteiler-Raum in dem sich ein Warmwasserhauptverteiler und ein Warmwasserzirkulationsverteiler befinden. Von diesem Raum aus werden über einen Leitungsstrang die Werkstätten und über einen anderen die untersuchten Waschräume U.08.88 bis U.08.90 mit Warmwasser versorgt. Die Waschräume verfügen über mehrere Abnahmestellen in Form von Duschen und Waschbecken, die alle auf Legionellen-Befall untersucht wurden. Der direkte Vergleich der Ergebnisse von Duschen und Waschbecken in den gleichen Räumen, ausgehend von der gleichen Zuleitung, zeigen deutlich höhere mikrobielle Belastungen in den Duschen, als an den Waschbecken. Nach Angabe der Angestellten der benachbarten Werkstatt (Bereich Technik und Didaktik) werden die Duschen in den beprobten Räumen nahezu nie benutzt, da in den angrenzenden Werkstatträumen lediglich Studenten-Praktika stattfinden, nach denen üblicherweise nicht geduscht wird (mündliche Mitteilung Herr Hermann, techn. Gebäudemanagement), was die verlängerten Standzeiten belegt und die erhöhte Anzahl von Legionellen erklärt.

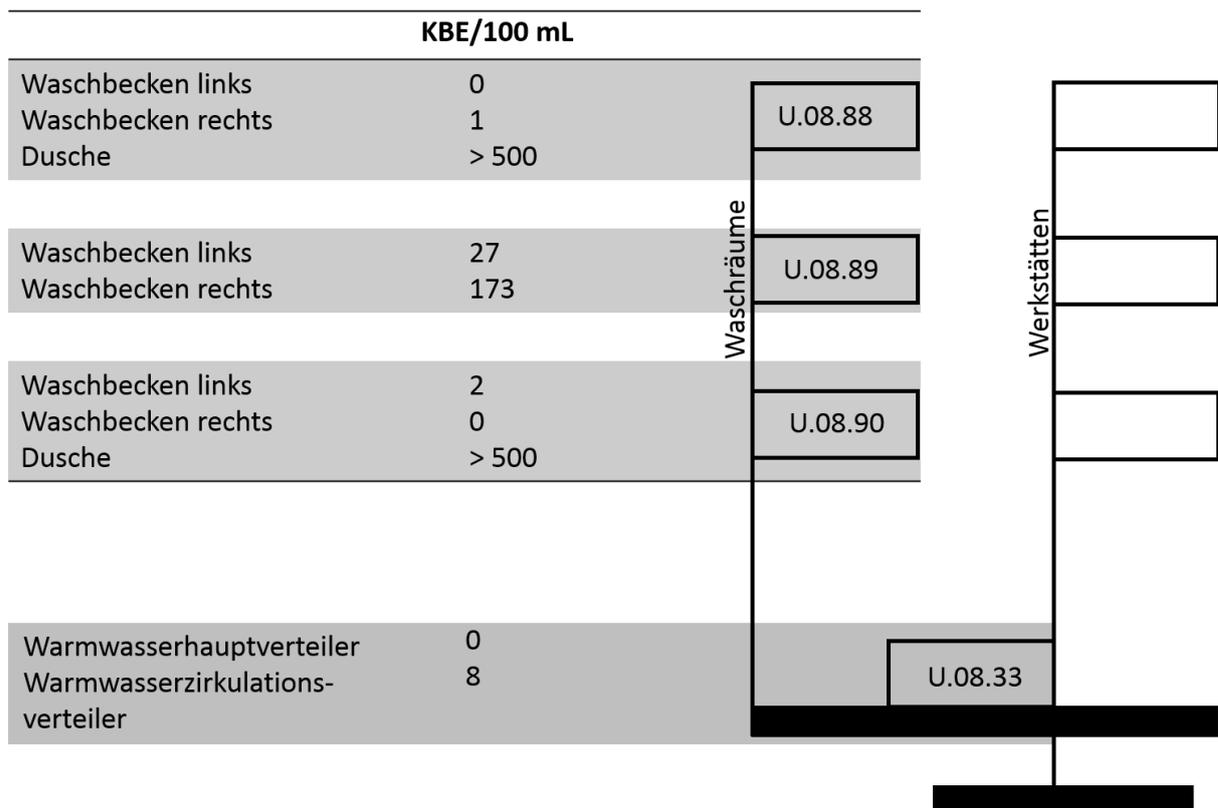


Abbildung 60: Verlaufsplan der Wasserleitungen und korrelierende Verkeimung des Trinkwassers in Gebäude U. Dargestellt sind Ergebnisse der Beprobung vom 14.01.2015 gemäß DIN EN ISO 11731-2:2008. Beprobte wurde der Wasserverteiler-Raum U.08.33 des Campus Griffenberg, sowie die Mitarbeiter-Waschräume U.08.88 bis U.08.90. Der Auszug aus dem Verlaufsplan der Wasserleitungen entstammt dem Gebäudemanagement der Uni Wuppertal. Die Vorgehensweise ist in Material und Methoden 2.2.4.1 zu finden.

An den Leitungssträngen, in denen ein Legionellen-Befund detektiert wurde, wurden Maßnahmen zur Reduzierung eingeleitet. Gemäß der Vorgaben im DVGW Arbeitsblatt W 551, einigen Fachaufsätzen (z. B. Saby et al., 2005; Abdel-Nour, 2013), sowie den Empfehlungen des Labors Dr. Füllung ist das Mittel der Wahl zur Bekämpfung von Legionellen die thermische Desinfektion, die auch in den Leitungssystemen der Universität Anwendung fand. Bei diesem Verfahren wird das System mit Temperaturen $> 70\text{ °C}$ über einen Zeitraum von mindestens 3 Minuten gespült. Die Ergebnisse der Nachbeprobung zeigten den Erfolg der Desinfektionsmaßnahme in der großen Mehrheit der Standorte. Lediglich am Standort G.16.68 konnte der technische Maßnahmenwert von 100 KBE/ 100 mL auch nach der thermischen Desinfektion nicht eingehalten werden (siehe Abbildung 11). Bei diesem Standort handelt es sich um ein sehr gering frequentiertes Waschbecken in einem endständigen Teil des Wassersystems mit daraus resultierenden langen Standzeiten und geringer Wassertemperatur. Dieses Waschbecken wurde dann als weiterführende Maßnahme zurückgebaut. Für andere Standorte, die bei mehreren Untersuchungen auffällige Legionellen-Befunde aufwiesen, wurden Spülpläne erstellt, die den regelmäßigen Wasseraustausch in den Leitungen gewährleisten sollten. Aus den Ergebnissen der Nachbeprobung zeigte sich die Wirksamkeit der thermischen Desinfektion, aber auch der Nachteil durch die fehlende Depotwirkung der Methode. Farhat et al. (2010) und Andere (Flemming et al., 2010) zeigten diesen Effekt ebenfalls und beschrieben schnell ansteigende *Legionella*-Zahlen schon wenige Tage nach der thermischen Desinfektion.

4.2 Nachweis und Zählung von Legionellen mittels Membranfiltrationsverfahren

Die DIN EN ISO 11731-2:2008 ist die nach Trinkwasserverordnung vorgeschriebene Methode zur Bestimmung von Legionellen in Trinkwassersystemen. Bei dieser Methode erfolgt die Detektion von Legionellen durch Membranfiltration und Kultivierung auf einem geeigneten Nährstoff-Agar (z. B. BCYE-Agar), also durch klassische Kultivierung.

Die Vorgaben der DIN EN ISO 11731-2:2008 sind allerdings in einigen Punkten nicht eindeutig. Bei der Probennahme beispielsweise ist auch unter Berücksichtigung der DIN 19458 (Probennahme für mikrobiologische Untersuchungen) das Volumen der zu entnehmenden Probe nicht genau definiert. Es wird lediglich angegeben, dass das Probenvolumen für die

geplanten Untersuchungen angemessen gewählt werden und bis zu einem Liter betragen soll. Aus den Ergebnissen der unmittelbar aufeinanderfolgenden Beprobungen des zweiten und des dritten Liters an der gleichen Entnahmestelle (dargestellt in Abbildung 12) ergaben sich reduzierte Befunde um bis zu einem Faktor von mehr als 200. Ähnliches wurde durch Kotzybik (2014) bei der Beprobung von Augenduschen festgestellt, bei der die Keimzahl vom ersten zum dritten entnommenem Liter ebenfalls drastisch abnahm. Dieser Umstand ist mit der zunehmenden Verdünnung des Standwassers in der Leitung durch nachströmendes Frischwasser zu erklären. Beim Durchströmen der Leitung entstehen turbulente Strömungen die eine Durchmischung bewirken (Hof, 2012). Die Größe des Probenvolumens kann daraus bedingt Einfluss auf die Anzahl an detektierten Legionellen haben.

Bestimmungen von mehreren Aliquoten derselben Wasserprobe streuten in ihren Ergebnissen teils massiv in der detektierten Anzahl an Legionellen und zeigten somit schlechte Reproduzierbarkeit der Methode (siehe Tabelle 23). Um diese Unterschiede zu veranschaulichen sind in Abbildung 61 die bewachsenen Membranfilter einer Beprobung nach DIN EN ISO 11731-2:2008 aus U.09.80 beispielhaft dargestellt.

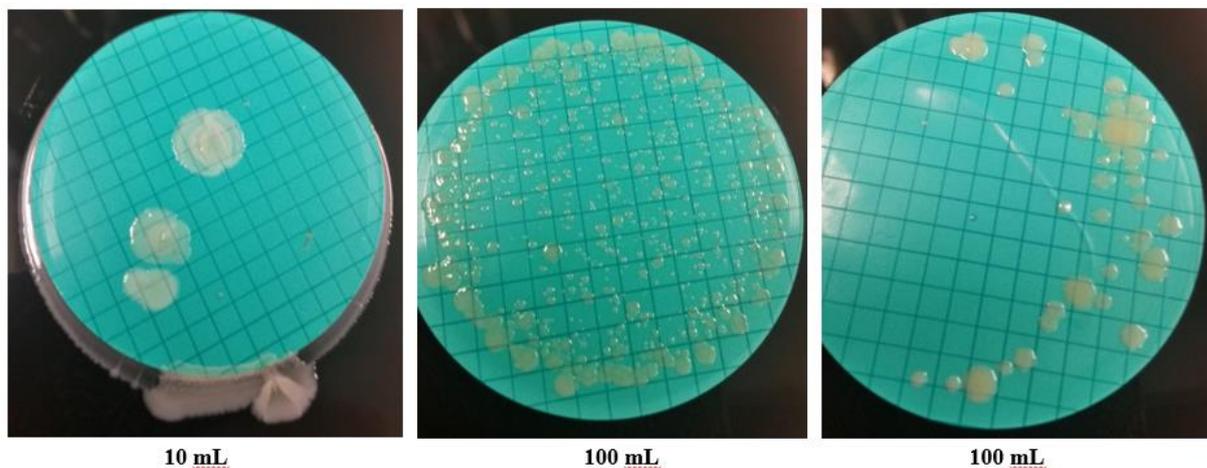


Abbildung 61: Membranfilter der Trinkwasserprobe aus U.08.90 (Dusche) nach der Bebrütung. Dargestellt sind die bewachsenen Membranfilter nach 10 Tagen Bebrütung bei 36 °C verschiedener Aliquote der gründlich homogenisierten Probe. Das abgesaugte Volumen ist unter den Fotos angegeben. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.4.1 zu finden.

Zurückgeführt könnte diese Streuung auf die inhomogene Verteilung der Legionellen in der Wasserprobe werden. 80 % der Legionellen in Leitungssystemen sind ansässig in den Biofilmen (Büschgens, 2015) und können sich durch verschieden Prozesse in das Fließwasser

ablösen. Von der Ablösung können sowohl einzelne Bakterienzellen (Erosion) oder periphere Teile des Biofilms (Sloughing) betroffen sein. Zusätzlich zu diesen beiden Mechanismen wird auch ein aktives Absetzen von Bakterien in Form von sogenannten “Schwärmerzellen“ beschrieben (Flemming, 1994). Außerdem ist die Vermehrung von Legionellen in Amöben bekannt (Schoenen, 2011). Wird eine infizierte Amöbe, oder auch eine Biofilmschuppe in der Probe aufgefangen, so können lokal in der Probe hohe *Legionella*-Konzentrationen festgestellt werden, die auch durch gründliches Homogenisieren (Schütteln und Vortexen) nicht immer gleichmäßig verteilt werden. Die DIN EN ISO 11731-2:2008 schreibt keine Mehrfachbestimmung für eine Beprobungsstelle vor und auch das Labor Dr. Füllung beprobte alle Entnahmestellen nur einfach, da sich sonst bei der Beprobung eines so großen Systems wie es am Campus Griffenberg vorliegt, Probleme bei der Bewältigung des Gesamtprobenumfangs ergeben würden. Daraus folgt, dass die Beprobungsergebnisse kritisch zu betrachten sind und ein unauffälliger Befund nicht unbedingt die real vorherrschenden Bedingungen in der untersuchten Wasserleitung darstellt. Probleme in der Reproduzierbarkeit der DIN-Methode wurden auch in einem Ringversuch der Lehr- und Versuchsgesellschaft für innovative Hygienetechnik (LVHT, 2014) in Proben aus Schwimm- und Badebecken die nach DIN EN ISO 11731-2:2008 behandelt wurden, festgestellt. Es ergaben sich dabei sowohl Abweichungen bei Mehrfachbestimmungen, als auch beim Vergleich der Ergebnisse von verschiedenen Labors.

Eine Reduzierung von möglicherweise vorhandener Begleitflora und damit Verbesserungen der Ergebnisse, soll in der DIN EN ISO 11731-2:2008 durch eine vorgeschriebene Säurebehandlung der Proben erreicht werden. Diese Säurebehandlung beeinflusste allerdings auch die KBE-Zahlen der Legionellen. Erbe (2016) konnte in Laborversuchen zeigen, dass durch die Säurebehandlung verschiedene *Legionella*-Arten, darunter auch *L. pneumophila*, deutlich verringerte Wiederfindungsraten von durchweg unter 50 % aufwiesen. Außerdem können auch nicht-*Legionella* Stämme die Säurebehandlung überleben. Aus Wasserproben des Campus Griffenberg konnten nach Säurebehandlung *Bacillus* sp., sowie *Staphylococcus* sp. isoliert werden (siehe Tabelle 24). Die nach Kultivierung erhaltenen Kolonien werden für eine weitere Klassifizierung einer optischen Kontrolle auf Legionellen-Verdacht unterzogen. Nach den Vorgaben der DIN EN ISO 11731-2:2008 besteht ein Legionellen-Verdacht bei Kolonien mit folgender Erscheinung:

„Kolonien von Legionellen auf schwarzen Medien oder schwarzen Membranen sind häufig weiß-grau-blau-purpurn gefärbt, können aber auch braun, pink (rosa), limettengrün oder dunkelrot sein. Sie sind glatt mit ganzem Rand und haben ein charakteristisches milchähnliches Aussehen. [...] Es ist anzumerken, dass neue Spezies von Legionellen Eigenschaften besitzen können, die sich von den oben beschriebenen unterscheiden.“

Da diese Vorgabe recht weitgefasst und damit unpräzise ist, werden mitunter unterschiedliche Ergebnisse, zumindest bei dem Vergleich von Untersuchungen die von unterschiedlichen Personen durchgeführt wurden, generiert, da die Auswahl von *Legionella*-Verdächtigen subjektiv behaftet ist. Einen zuverlässigeren Selektionsschritt stellt dagegen das Wachstum der Kulturen auf TSB- oder einem anderen Vollmedium ohne L-Cystein dar, da Legionellen ohne dieses Supplement nicht wachsen. Nach diesem Selektionsschritt wurde in Wasserproben der Universität nur noch ein Isolat detektiert, das nach *Legionella pneumophila*-PCR kein Stamm dieser Art war. Es handelte sich bei diesem Isolat um *Burkholderia fungorum* (99 % Übereinstimmung nach 16s-rDNA-PCR), einen ubiquitär verbreiteten Organismus, von dem auch humanpathogene Stämme bekannt sind. Es handelt sich um ein bewegliches, gram-negatives Stäbchenbakterium mit aerober Lebensweise (Neumeister, et al., 2009).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einige Mängel in der DIN EN ISO 11731-2:2008 bzw. Ungenauigkeiten in der Methode auf, was die Aussagekräftigkeit der Ergebnisse herabsetzt. Ein besonderer Schwachpunkt ist dabei die recht subjektive Auswahl der Legionellen-verdächtigen Kolonien. Werden dabei allerdings verdächtige Kolonien im Zweifel eher als Legionellen eingestuft als aussortiert, so zeigt die Methode tendenziell einen Überbefund durch falschpositive Kulturen an, was zumindest keine gesundheitlichen Nachteile für den Verbraucher bedeutet. Aus wirtschaftlicher Sicht führt ein falsch-positives Ergebnis der Untersuchung allerdings zu einem Mehrkostenaufwand und ist somit nachteilig. Neben den aufgeführten Nachteilen, auch in Bezug auf die Reproduzierbarkeit, ist unter der Betrachtung aktueller Forschung ebenfalls aufzuführen, dass die Methode der DIN EN ISO 11731-2:2008 ausschließlich auf der Kultivierbarkeit der Legionellen beruht. Durch das langsame Wachstum von Legionellen ist eine Bebrütungszeit von 10 Tagen festgelegt, was eine große Zeitspanne zwischen Probennahme und Ergebnis bedeutet und die daraus getroffene Einschätzung des „Ist-Zustandes“ im untersuchten System nicht unbedingt aktuell sein muss. Außerdem wurde schon gezeigt, dass ein großer Anteil der Legionellen die in Wassersystemen leben, keine

Kultivierbarkeit zeigen und damit in einem VBNC-Zustand (viable but nonculturable) vorliegen. Farhat et al. (2009) gibt nach einer umfassenden Untersuchung an, dass nur etwa 0,1 % der Legionellen kultivierbar waren, insbesondere dann, wenn Hitzedesinfektionen im untersuchten System durchgeführt wurden. Dennoch ist die DIN-Methode momentan noch konkurrenzlos bei der diagnostischen Anwendung und es ist keine alternative Vorgehensweise nach Trinkwasserverordnung erlaubt. Der relativ geringe Aufwand, sowohl zeitlich (Arbeitsaufwand), als auch bezüglich Materialverbrauch, sowie das Fehlen von belastbaren Alternativmethoden, macht die Methode nach DIN aktuell noch nicht ersetzbar.

4.3 Versuche im Becherglasreaktor

Für die Induktion der Biofilmbildung im Laboransatz ist es notwendig Systeme zu nutzen, in denen sich möglichst viele Anzuchtparameter berücksichtigen und variieren lassen. Diese Notwendigkeit ergibt sich daraus, dass die Biofilmbildung ein hochkomplexer Vorgang ist, der durch eine Vielzahl unterschiedlicher Parameter, wie z. B. Nährstoffangebot, Beschaffenheit der Wachstumsoberfläche oder der Strömungsverhältnisse beeinflusst wird (siehe Einleitung 1.3). Der in dieser Arbeit verwendete Becherglasreaktor nach (Hübel, 2013) bietet die Vorteile, dass er klein und kompakt, und somit transportabel ist. Aufgrund seiner Wiederverwertbarkeit kann er mit geringem Materialaufwand betrieben werden und ermöglicht dabei trotzdem die Anzucht von mehreren Biofilmeinheiten gleichzeitig. Er ist autoklavierbar, was die Bildung von Reinkulturbiofilmen ohne Kontamination gewährleistet. Durch den Deckel aus Alufolie wird die Verdunstung von Wasser aus dem Nährmedium minimiert, sodass sich dadurch kaum Änderungen in den Nährstoffkonzentrationen ergeben. Zudem kann die Biofilmbildung in Abhängigkeit von der Zeit, durch die Entnahme von einzelnen Trägern zu verschiedenen Zeitpunkten, aus demselben Reaktoransatz erfasst und auch das Trägermaterial, sowie die Rührgeschwindigkeit variiert werden.

Bei den durchgeführten Versuchen im Becherglasreaktor wurden für die Optimierung der Biofilmbildung, neben der Auswahl des Nährmediums, insbesondere die Nährstoffkonzentrationen mit unterschiedlich langer Bebrütungsdauer kombiniert. In den Anzuchtversuchen erwies sich die Verwendung von TSB-Medium als Nährstoffquelle für die Mehrheit der verwendeten Mikroorganismen (verschiedene Staphylococci, *E. coli* K12 und *E.*

faecalis DSM20478) als geeignet, da es als Vollmedium eine große Bandbreite von Nährstoffen beinhaltet (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 3). Bei der Kultivierung von *Legionella* sp. wurde dagegen das YEB3-Medium nach (Stemann, 2015) verwendet, welches einen L-Cystein-Zusatz als essentiellen Wachstumsfaktor (Bartram, 2007) enthält. Die Konzentrationen des Nährmediums wurden in den Versuchen zunächst gering (1 g/L bis 5 g/L TSB, bzw. 1 % bis 5 % YEB3) gehalten, da in der Literatur von einer bevorzugten Biofilmbildung bei niedrigem Nährstoffangebot berichtet wird (Götz, 2002). Während der Bebrütung wurden die Medien permanent bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten (ca. 100 rpm) in Bewegung gehalten, was zum einen eine homogene Verteilung von Nährstoffen und Sauerstoff bewirken und zum anderen eine Sedimentation der Bakterien in der Kultur vermeiden sollte. Die Ergebnisse aus den qualitativen Beurteilungen der Biofilmbildung verschiedener Mikroorganismen durch mikroskopische Betrachtung (siehe Abbildung 23 bis 27) zeigten deutliche Unterschiede bei den Biofilmen der verwendeten Bakterienarten, sowohl in Abhängigkeit von dem Nährmedium, als auch von der Inkubationszeit.

Die Bedingungen unter denen sich Biofilme von Indikatororganismen nach Trinkwasserverordnung bevorzugt bildeten sind in Abbildung 62 dargestellt. *E. coli* K12 ist der einzige Stamm, der bei mehreren Anzuchtvarianten gute Biofilme auf der Trägeroberfläche zeigte. Der verwendete *E. faecalis* DSM20478, sowie der Stamm *L. pneumophila* LP1 bildeten nur unter einer der Kombinationen aus Nährstoffangebot und Inkubationszeit Biofilme und *S. aureus* DSM346 zeigte keine Biofilmbildung. Die Tendenz schien dabei zur bevorzugten Bildung von Biofilmen bei eher geringem Nährstoffangebot zu gehen und auch die Kultivierung sollte über mindesten 48 Stunden erfolgen, bei *L. pneumophila* LP1 sogar über einen Zeitraum von 6 Tagen.

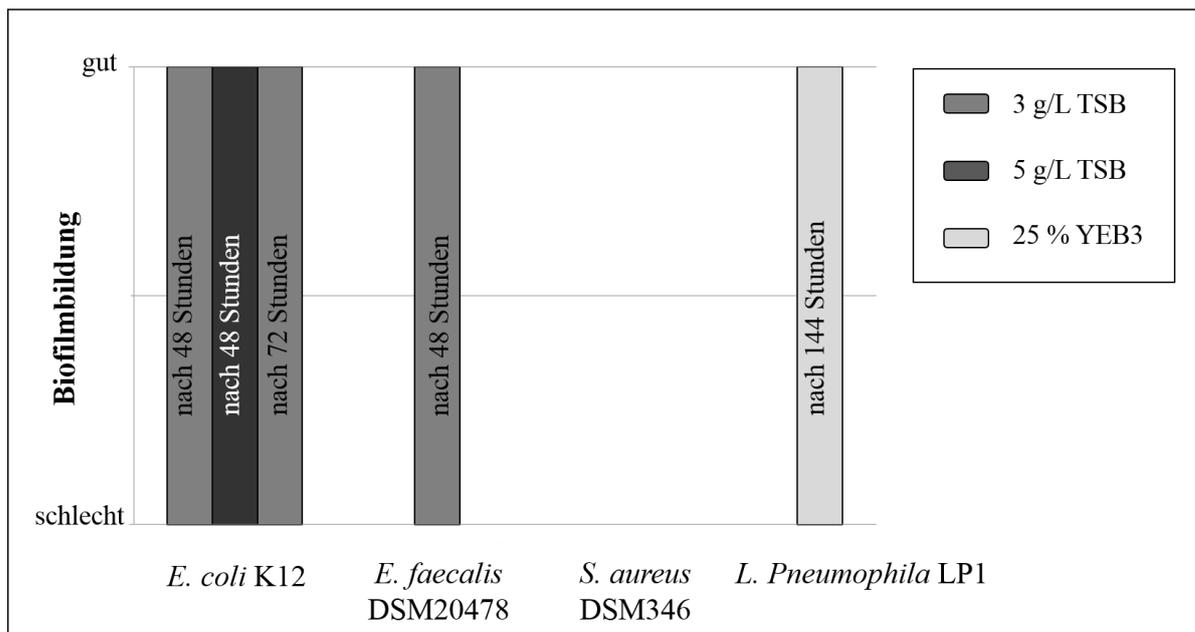


Abbildung 62: Maximale Biofilmbildung verschiedener Bakterien im Becherglasreaktor (mikroskopische Qualifizierung). Dargestellt ist jeweils die Kombination aus Nährmedien-Konzentration und Inkubationszeit unter der, nach Abbildung 22, als „gut“ definierte Biofilme generiert wurden. Als Nährmedium wurde für die Versuche mit *L. pneumophila* LP1 YEB3-Medium verwendet, die anderen Bakterien wurden in TSB-Medium angezogen. Die genaue Versuchsanordnung ist in Material und Methoden 2.2.5.2 dargestellt.

Die bevorzugte Biofilmbildung bei nährstoffarmem Milieu entsprach den Erwartungen, gemäß den Ausführungen von Götz (2002). Die unterschiedlich langen Inkubationszeiten für die Biofilmbildung könnten durch die unterschiedlichen Generationszeiten der Mikroorganismen erklärt werden. Während *E. coli* sich unter optimalen Bedingungen alle 20 min verdoppelt (Rolle, 2007), ist die Generationszeit von Legionellen deutlich länger und kann in Extremfällen sogar bis zu 72 Stunden betragen (Müller et al., 2007). Außerdem sollten die spezifischen Adhäsionsmechanismen und deren Ausprägung einen Einfluss auf Qualität und Quantität der Biofilmbildung ausüben.

Unterschiede in der Biofilmbildung zeigten sich auch bei Mikroorganismen mit engerem Verwandtschaftsgrad. Aus dem Trinkwassersystem am Campus Griffenberg der bergischen Universität wurden 18 *Staphylococcus*-Isolate generiert und deren Biofilmbildung im Becherglasreaktor mikroskopisch begutachtet. Die Ergebnisse der einzelnen Isolate zeigten teils deutliche Unterschiede in ihrem Biofilmbildervermögen. Die große Mehrheit *Staphylococcus*-Isolate (11 Isolate) wies unter den gegebenen Bedingungen keine Biofilmbildung auf. Bei dreien der Isolate konnte unter einer der ausprobierten Kombinationen

von Medienkonzentration und Inkubationszeit eine flächendeckende bis mehrschichtige Biofilmbildung generiert werden. Lediglich drei Isolate (Isolat JCBK5, JCTK3 und JCTK 10) lieferten gut ausgebildete Biofilme bei verschiedenen der gewählten Varianten. Höll (2011) beschreibt Staphylococccen nicht nur als Bakterien die häufig in aquatischen Systemen wie Wasserleitungen detektiert werden, sondern auch als gute Biofilmbildner, besonders die Art *Staphylococcus aureus*. Neben aquatischen Habitaten werden allerdings besonders häufig Biofilme auf medizinischen Implantaten und Kathetern beschrieben (Lister, et al, 2014; Geipel et al., 2004; Malanoski et al., 1995). Im Becherglasreaktor konnte unter den gewählten Bedingungen kein Biofilm von *S. aureus* DSM346 generiert werden. Die Ergebnisse aus allen Versuchen mit *Staphylococcus* sp. im Becherglasreaktor sprechen daher dafür, dass die Biofilmbildung innerhalb einer Gattung oder sogar innerhalb einer Art sehr spezifisch ist. Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse von Zmantar et al. (2010), die ebenfalls unterschiedliches Verhalten von verschiedenen *S. aureus*-Stämmen (n = 46) in Bezug auf die Biofilmbildung in 96-Well-Mikrotiterplatten detektierten. Nur rund die Hälfte der untersuchten Stämme wurde als Biofilmbildner kategorisiert.

Die qualitative Beurteilung der gebildeten Biofilme erfolgte wie in Abbildung 22 dargestellt. Als besonders gut wurde der Biofilm dabei eingestuft, wenn die mikroskopische Betrachtung eine flächendeckende und teilweise mehrschichtige Anlagerung von Bakterienzellen zeigte. Ein als lückenhaft und wenig ausgeprägt detektierter Biofilm kann dabei aus einer geringen Affinität des verwendeten Bakteriums zur sessilen Lebensweise resultieren, aber auch in einer massiven Biofilmbildung, welche die Stabilität zur Aufwuchsfläche überschreitet, begründet sein. Flemming (1994) beschreibt diese Erosion von ganzen Biofilmfragmenten als „Sloughing“. Bei den Untersuchungen mit *E. coli* K12 konnte dieses Phänomen festgestellt werden, gerade bei höheren Medienkonzentrationen und mehreren Tagen Inkubation. Wie in Abbildung 63 zu sehen lösten sich dann vermehrt Teile des Biofilms in Form von größeren Schuppen von der Oberfläche der Träger ab, oder wurden durch den Waschschrift von der Oberfläche gelöst, sodass ein deutlich verminderter Biofilm im Mikroskop sichtbar wurde. Dudek (2015) beschreibt ähnliche Beobachtungen bei Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* WR1 und *Stenotrophomonas* sp. MDGEG1 nach Anzucht im Becherglasreaktor.



Abbildung 63: Biofilm von *E. coli* K12 nach 72 Stunden Bebrütung im Becherglasreaktor. Das Foto zeigt den bewachsenen Objektträger unmittelbar nach der Entnahme aus dem Reaktor.

Bei der quantitativen Bestimmung der Lebendzellzahlen von in Becherglasreaktoren produzierten Biofilmen, wurde die ursprüngliche Methode von Hübel (2013) aufgrund der Resultate aus den durchgeführten Vorversuchen und den Ergebnissen von Dudek (2015) und Wisbauer (2016), wie unter Material und Methoden 2.2.5.2 beschrieben, modifiziert. Dudek (2015) konnte zeigen, dass die Ablösung der Biofilme am effektivsten und schonendsten durch eine Behandlung der Träger mit einem Zellschaber erreicht wird. Die anschließende Homogenisierung der Biofilmsuspension ist dann durch eine Behandlung mit Ultraschall möglich. Intensität und Dauer der Ultraschallbehandlung sind dabei spezifisch für das verwendete Bakterium zu bestimmen, was durch einen Vorversuch mit Bakteriensuspensionen der *Staphylococcus*-Isolate (siehe Abbildung 21) umgesetzt wurde. Die Zellen des Isolats JCBK5 wurden dabei bei einer Intensität von 80 % für eine Dauer von 1 Minute optimal in Suspension gebracht. Mit dieser modifizierten Methode wurden mit dem Isolat JCBK5 reproduzierbare Ergebnisse der Lebendzellzahlen von Biofilmen, mit geringer Streuung sowohl innerhalb eines Reaktors, als auch beim Vergleich von verschiedenen, analog bebrüteten Reaktoren erreicht (siehe Abbildung 18). Der Mittelwert ergab dabei einen Wert von $2,2 \cdot 10^5$ KBE/ cm^2 . Wisbauer (2016) erzielte mit dieser Methode einen Mittelwert von $2,1 \cdot 10^5$ KBE/ cm^2 für das Isolat JCBK5, was auch die Reproduzierbarkeit der Methode unabhängig von der durchführenden Person bestätigt. Dudek (2015) zeigte außerdem, dass mit dem Isolat JCTK10 ebenfalls reproduzierbare Resultate erzielt wurden, was die grundsätzliche Übertragbarkeit der Methode auf andere Arten und Stämme von Bakterien belegte.

Zusammenfassend stellt die Biofilmanzucht mit der vorgestellten Becherglasreaktor-Methode eine gute Möglichkeit zur Kultivierung von Reinkulturbiofilmen im Laborversuch dar. Durch die Verwendung von Glasträgern ermöglicht sie es, die Struktur des Biofilms mikroskopisch zu untersuchen. Auch verschiedene Färbungen der Biofilme wären in diesem Zusammenhang denkbar und durch den Einsatz von z.B. FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) (Quelle) könnten auch gezielt Organismen in einem Mischbiofilm detektiert werden. Die Ablösemethode mittels Zellschaber ermöglicht außerdem eine zuverlässige Aussage über die Lebendzellzahlen in Biofilmen, die im Becherglasreaktor angezogen wurden.

4.4 Mikrotiter-Biofilm-Assay

Die von Wisbauer (2016) entwickelte Methode zur Anzucht von Biofilmen in 24-Well-Mikrotiterplatten diente als Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche. Wisbauer (2016) konnte zeigen, dass unter der Verwendung einer Wetbox, die eine wassergesättigte Atmosphäre in den 24-Well-Mikrotiterplatten während der Biofilmbildung ermöglichte, reproduzier- und vergleichbare Biofilme in allen Kavernen der Anzuchtplatten generiert wurden. Durch Variation verschiedener Parameter während der Anzucht ermöglicht diese Methode Biofilme bakteriumspezifisch zu generieren. Laufer (2016) passte die Methode auf die bevorzugten Bedingungen zur Biofilmbildung von Legionellen an und konnte damit auch für diese Organismen aussagekräftige Resultate erzielen. Variationen in Medien, deren Konzentrationen, sowie bei der Inkubationstemperatur können dafür beispielsweise angewandt werden. Außerdem ermöglicht die Methode die Anzucht von vielen Biofilmen gleichzeitig, auch in unterschiedlichen Nährstoffkonzentrationen oder von verschiedenen Inokulum-Mengen ausgehend, in derselben Mikrotiterplatte.

Die von Wisbauer (2016) durchgeführte Hitzefixierung wurde abgewandelt und bei erhöhter Temperatur (80 °C) und verringerter Trocknungszeit (15 min) durchgeführt, da Untersuchungen mit dem Isolat JCBK5 zeigten, dass die Ergebnisse dadurch nicht signifikant verändert wurden und sich gleichzeitig ein Zeitersparnis im Vergleich zu der ursprünglichen Methode ergab. Für *L. pneumophila* konnte durch Laufer (2016) gezeigt werden, dass die

Verkürzung der Fixierungszeit bei gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur zu vergleichbaren Fixierungsergebnissen auch bei *Legionella* sp. führte.

Die Quantifizierung des Biofilmwachstums erfolgte bei dieser Methode durch eine Färbung mit Kristallviolett und die anschließende photometrische Vermessung der gefärbten und abgelösten Biofilme. Um Überbefunde zu vermeiden zeigte es sich dabei als unverzichtbar einen möglichst authentischen Leerwert mitzuführen. Für die Reinkultur-Versuche wurden dafür Kavernen mit Nährmedium der entsprechenden Konzentration mitgeführt. Bei Versuchen zur nekrotrophen Biofilmbildung wurden hitzefixierte Biofilme mit Nährmedium der jeweiligen Konzentration überschichtet und als Leerwert inkubiert. Aus den Ergebnissen in Abbildung 28 wird deutlich, dass das verwendete Anzuchtmedium mit zunehmender Konzentration auch einen größeren Einfluss auf die Intensität des Färbeergebnisses ausübte. Dieser Umstand resultiert daraus, dass das verwendete Färbereagens Kristallviolett unspezifisch an organisches Material bindet (Merriett et al., 2005) und somit auch Bestandteile des Anzuchtmediums angefärbt werden. Viele Autoren (Nomura et al. 2013; O'Toole, 2011; Reiter et al., 2010; Stepanovic et al., 2000) erwähnen zwar einen Leerwert, definieren diesen aber nicht explizit. In dieser Arbeit wurden, resultierend aus den Ergebnissen in Abbildung 28, immer mehrere authentische Leerwerte mit den entsprechenden Medien-Konzentrationen mitgeführt und berücksichtigt. Auch bei der Initiierung von Biofilmen auf bereits bestehenden lebendigen oder toten Biofilmen wurde der Leerwert entsprechend angepasst. Außerdem ist bei der Kristallviolett-Färbung zu beachten, dass immer eine Quantifizierung von lebenden und toten Bakterien, sowie der EPS-Matrix erfolgte und damit die Gesamtmasse des Biofilms bestimmt wurde. Daraus ergibt sich auch wahrscheinlich die fehlende Korrelation zwischen der Quantifizierung mittels Kristallviolett-Färbung und der Lebendzellzahl von entsprechenden Biofilmen, wie sie in der Abbildung 36 dargestellt ist.

Die Biofilmbildung zeigte bei allen untersuchten Bakterienarten eine Abhängigkeit von der Nährmedienkonzentration, sodass bei höherem Nährstoffgehalt ausgeprägtere Biofilme generiert wurden. Dieses Ergebnis war zunächst unerwartet, da von Götz (2002) und Szewzyk et al. (2003) eine allgemein bevorzugte Biofilmbildung bei nährstoffarmer Umgebung beschrieben wird. Allerdings sollte bei steigendem Nährstoffangebot auch die Zellzahl der Kultur vermehrt ansteigen, was induziert, dass tendenziell auch mehr Bakterien für die

Biofilmbildung zur Verfügung stehen. Besonders stark war die Abhängigkeit vom Nährstoffgehalt bei Biofilmen von *L. pneumophila* LP1 feststellbar, die ab einer YEB3-Konzentration von 50 % vermehrte Biofilmbildung zeigten. Bei allen anderen untersuchten Mikroorganismen (*E. coli* K12, *E. faecalis* DSM20478 und verschiedene *Staphylococcus* sp.) betrug die höchste untersuchte Konzentration dagegen 10 g/L TSB, was 33 % der herstellereempfohlenen Konzentration entspricht. In Bezug auf die Biofilmbildung bei *Legionella* sp. konnte Laufer (2016) ähnliche Ergebnisse vorstellen und auch andere Autoren beschreiben die Anzucht von Legionella-Biofilmen häufig in unverdünnten Nährmedium (Piao et al., 2006; Andreozzi et al., 2016).

Neben den zur Verfügung stehenden Nährstoffen ist das Maximum in der Ausprägung von Biofilmen von dem jeweiligen Organismus abhängig. Die Maximalwerte, die durch die untersuchten Mikroorganismen in den Absorptionen der gefärbten Biofilmlösungen detektiert wurden, sind in Abbildung 64 veranschaulicht.

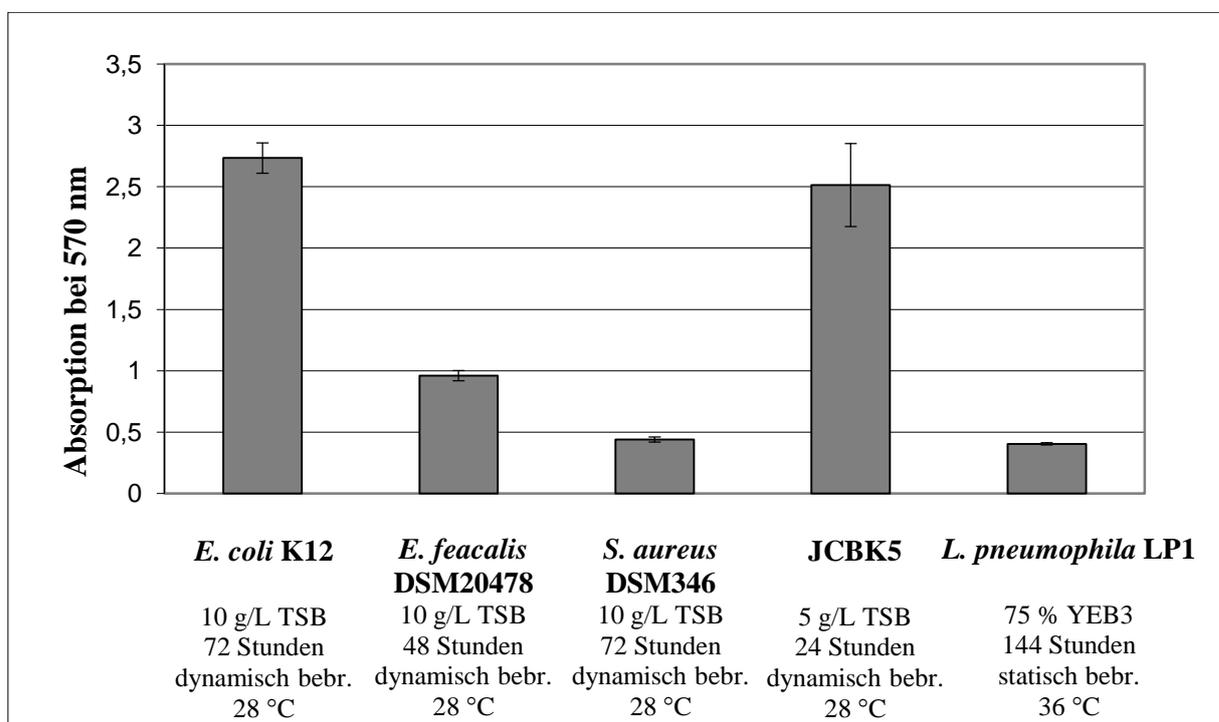


Abbildung 64: Maximale Biofilmbildung verschiedener Bakterien in 24-Well-Mikrotiterplatten. Dargestellt ist die maximal erreichte Absorption der Biofilm-Lösungen bei 570 nm, nach Färbung mit Kristallviolett. Die spezifischen Inkubationsparameter sind unter dem jeweiligen Balken angegeben. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.6.1f nachzulesen.

Die Darstellung zeigt, dass der Stamm *E. coli* K12 und das *Staphylococcus*-Isolat JCBK5 die größte Biofilmbildung aufwiesen. Die individuellen Bebrütungsparameter variierten dabei aber sowohl in Nährstoffanspruch als auch in der Inkubationsdauer. Die Biofilme von *E. faecalis* DSM20478 und insbesondere bei *S. aureus* DSM346 und *L. pneumophila* LP1 waren dagegen deutlich weniger ausgeprägt. Andreozzi et al. (2016) zeigte für einen *Legionella pneumophila*-Stamm nach Anzucht und Färbung in Mikrotiterplatten ähnliche Absorptionen wie sie auch in der vorliegenden Arbeit für *L. pneumophila* LP1 detektiert wurden. Der Vergleich der Biofilme von den Staphylococcen (*S. aureus* DSM346 und JCBK5) lieferte erwartete Ergebnisse, da sich deutliche Unterschiede in der Biofilmbildung, sowohl in Nährstoffanspruch, als auch in der Inkubationszeit, auch innerhalb einer Gattung ergaben, die im Rahmen dieser Arbeit auch schon bei der Biofilmbildung im Becherglasreaktor beobachtet wurden.

Die Abbildung 64 verdeutlicht außerdem, dass der verwendete Legionellen-Stamm in Bezug auf Nährstoffanspruch, Inkubationsdauer, sowie Art der Bebrütung andere Ansprüche stellt, als die zuvor beschriebenen Mikroorganismen. Laufer (2016) konnte zeigen, dass Legionellen eine verbesserte Biofilmbildung bei statischer Bebrütung als bei dynamischer Bebrütung erreichen und auch andere Autoren (Piao et al., 2006; Liguori et al., 2014) empfehlen die statische Bebrütung bei der Anzucht von *Legionella*-Biofilmen. Diese Methode wurde daher auch in der vorliegenden Arbeit für die Kultivierung von *Legionella pneumophila* LP1 angewandt. Die anderen Mikroorganismen wurden dagegen dynamisch bebrütet, resultierend aus den Ergebnissen von Wisbauer (2016) für das Isolat JCBK5. Die verbesserte Biofilmbildung von *L. pneumophila* LP1 bei statischer Bebrütung und auch die lange Inkubationszeit lassen darauf schließen, dass dieser Stamm wenig ausgeprägte Anhaftungseigenschaften und daraus resultierend eine lange reversible Adhäsionsphase aufweist. Um die vergleichsweise langsame Vermehrung der Legionellen nicht zu begünstigen, wurde die Bebrütungstemperatur der 24-Well-Mikrotiterplatten für die *Legionella*-Versuche auf 36 °C festgelegt und damit im optimalen Temperaturbereich für Legionellen nach Piao et al. (2006) und Roeske (2006) gewählt.

Der Quotient aus der Besiedlung der planktonischen Phase und der Biofilmbildung im gleichen Reaktionsansatz wurde in dieser Arbeit ebenfalls zur Beurteilung der Biofilmbildung verwendet. In der Abbildung 33 sind die Verhältnisse von Biofilm zu der umgebenden

planktonischen Kultur von *E. coli* K12, *E. faecalis* DSM20478 und *S. aureus* DSM346 als Quotient aus der Absorption der gefärbten Biofilme und der optischen Dichte der planktonischen Kultur aufgetragen. Hohe Werte für diesen Quotienten zeigen dabei die Tendenz zur Biofilmbildung an, während zunehmend kleinere Werte für die bevorzugte Lebensweise in der planktonischen Kultur sprechen. Die Quotienten von *E. coli* K12 und *E. faecalis* DSM20478 geben ein Maximum an Zellen in der sessilen Lebensweise nach 48 Stunden Inkubationszeit wieder, während 24 Stunden zuvor und auch 24 Stunden danach ein deutlich geringerer Anteil der Zellen als Biofilm vorlag. Begründet könnte dieses Ergebniss darin sein, dass die Bakterien nach 24 Stunden zu einem größeren Teil noch nicht irreversibel in den Biofilm eingebettet waren, oder sich noch in einem Zwischenstadium von planktonischer und sessiler Lebensweise befanden, und somit bedingt durch das Abpipettieren der planktonischen Kultur mit erfasst wurden. Auf der anderen Seite könnte eine zu lange Bebrütung (72 Stunden) zur Folge haben, dass die maximale Biofilmdicke bereits erreicht worden ist und es dadurch zur teilweisen Ablösung von oberen Biofilmschichten gekommen sein könnte. Die dynamische Bebrütung könnte diesen Effekte verstärken und so zu einem Abschleifen der Biofilmoberfläche beitragen. Der aus der Betrachtung der maximalen Biofilmbildung als eher schlechter Biofilmbildner charakterisierte Stamm von *S. aureus* DSM346 zeigte dagegen über den ganzen Bebrütungszeitraum hinweg, auch unter der Betrachtung der Zellverteilung zwischen planktonischer und Biofilmkultur, eine eher bevorzugte planktonische Lebensweise. Die Quotienten (planktonische Phase/ Biofilm) ergaben allesamt Werte von < 1 , was diese Vermutung unterstützt. Die graphische Auftragung zeigte aber auch, dass bei allen untersuchten Stämmen die Nährstoffkonzentrationen einen geringeren Einfluss auf die Verteilung und damit auch auf die Biofilmbildung hatten, als durch die maximale Biofilmausprägung suggeriert wurde. Einige Quotienten (z. B. *E. coli* K12 nach 24 Stunden) zeigten sogar eine Tendenz zur Biofilmbildung bei eher niedriger Nährstoffkonzentration an und bestätigten damit die Ausführungen von Götz (2002) und Szewzyk et al. (2003). Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien wurden anhand der beschriebenen Verteilung auf planktonische und Biofilmkulturen in zwei Typen eingeteilt, da die Bakterien entweder mehr Zellen in der planktonischen Kultur als unter sessiler Lebensweise (*S. aureus* DSM346 und *L. pneumophila* LP1) oder umgekehrt aufwiesen (*E. coli* K12, *E. faecalis* DSM20478, JCBK5). Als Beispiele für diese Typisierung sind in Abbildung 65 die Absorptionen der gefärbten Biofilme und die optischen Dichten der dazu korrelierenden planktonischen Kulturen von JCBK5 und *S. aureus* DSM346 dargestellt.

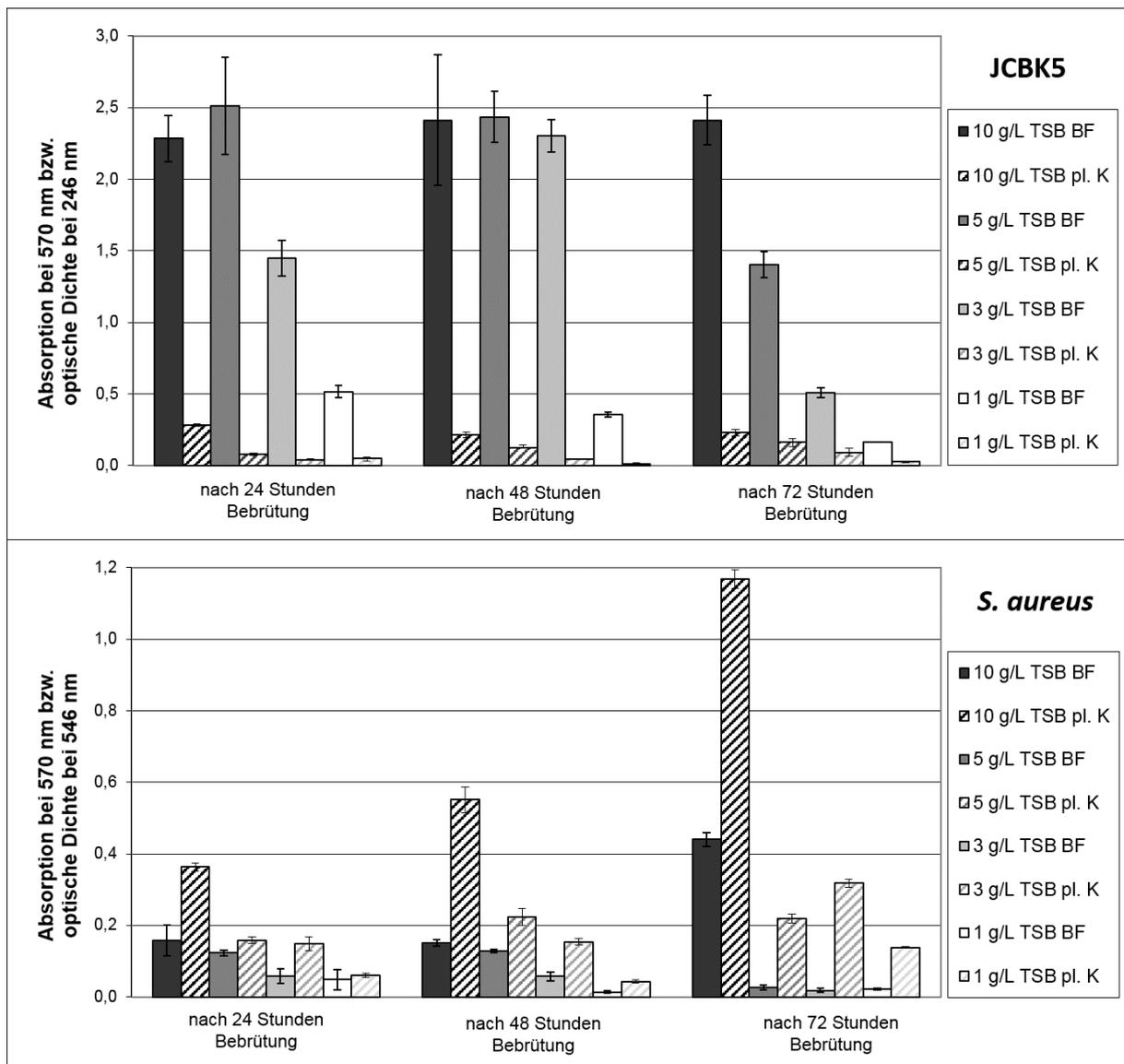


Abbildung 65: Biofilmbildung und optische Dichte der planktonischen Kulturen von *S. aureus* DSM346 und dem Isolat JCBK5. Dargestellt sind die Absorptionen der Biofilme bei 570 nm (einfarbige Balken) nach Kristallviolett-Färbung und die optischen Dichten bei 546 nm der planktonischen Überstände (gestreifte Balken) bei verschiedenen Medienkonzentrationen und in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit bei 28 °C. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.6.1f nachzulesen.

Untersuchungen zum nekrotrophen Wachstum von Legionellen haben gezeigt, dass die Biofilmbildung von *L. pneumophila* LP1 bei der Kultivierung auf abgetöteten Biofilmen begünstigt sein kann. Bei Trinkwassersystemen wird immer wieder darauf hingewiesen, dass neben der Desinfektion auch die Ablösung von abgetöteten Biofilmen einen hygienischen Vorteil darstellt (DVGW, W551), da sich Mikroorganismen auf totem, organischen Material schnell wieder ansiedeln und durch das erhöhte Nährstoffangebot sich auch besser vermehren können (Temmermann et al, 2006). Diese Vermutung konnte von Laufer (2016) für die

Biofilmbildung von *L. pneumophila* LP1 auf abgetöteten Biofilmen des Isolats JCBK5 bestätigt und durch Ergebnisse dieser Arbeit zusätzlich verifiziert werden (siehe dafür die Abbildungen 34 und 37) Das Wachstum der sessilen *Legionella*-Kultur konnte dabei wieder in Kombination mit höheren Nährmedienkonzentrationen gefördert werden und die Beschaffenheit der hitzefixierten Biofilme hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Besiedlung mit *L. pneumophila* LP1 zu haben, was aus den unterschiedlichen Ergebnissen in Abbildung 66 hervorgeht. Dort wurden Kulturen des *Legionella*-Stamms auf *E. coli* K 12, *E. faecalis* DSM20478 und *S. aureus* DSM346 generiert, mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen in der gebildeten Biofilmmasse von *L. pneumophila* LP1. Von Laufer (2016) konnte außerdem gezeigt werden, dass *L. cherrii* bei nekrotrophen Wachstum auf JCBK5 eine verringerte Biofilmbildung zeigte, was die Annahme unterstützt, dass optimale Aufwuchsflächen stammspezifisch sind.

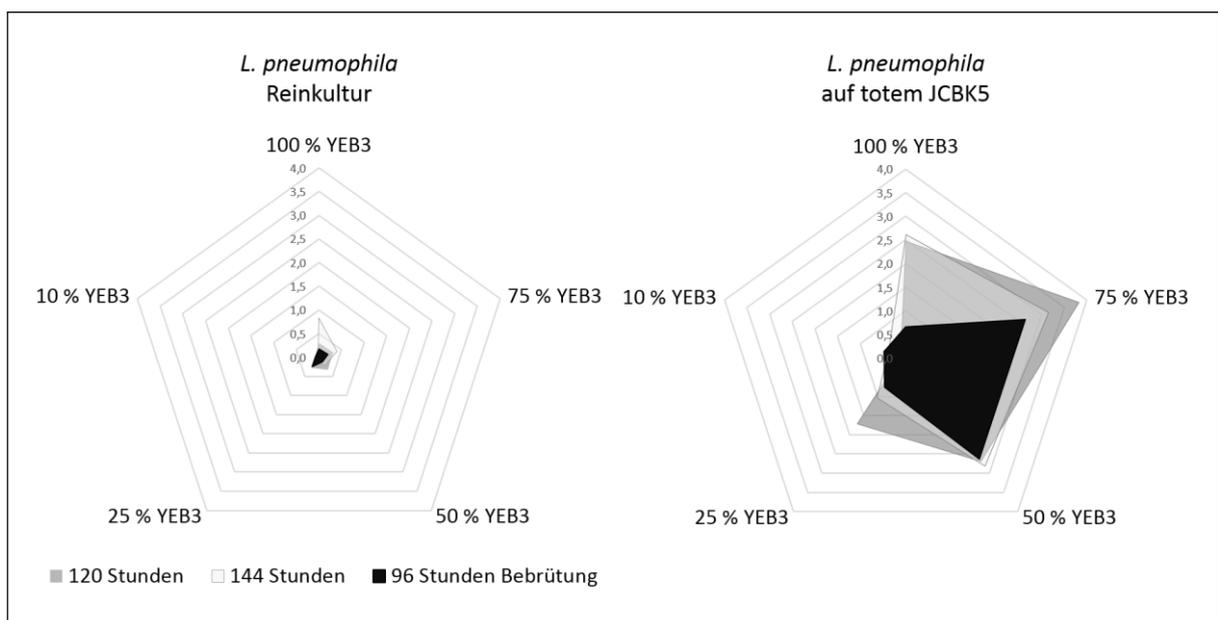


Abbildung 66: Biofilmbildung von *L. pneumophila* LP1 in Reinkultur und auf abgetöteten JCBK5-Biofilmen. Dargestellt sind die Absorptionen der *L. pneumophila*- Biofilme nach Kristallviolett-Färbung bei 570 nm in Abhängigkeit von der YEB3-Konzentration und der Inkubationszeit. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.6.1ff nachzulesen.

Eine verbesserte Adhäsion von *L. pneumophila* an einen lebenden Biofilm konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 67).

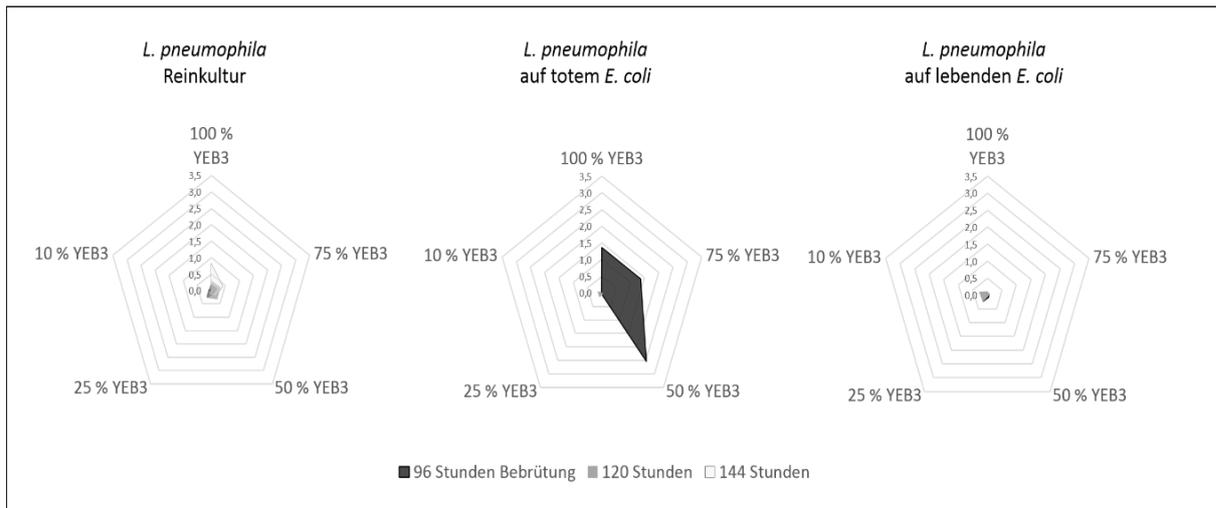


Abbildung 67: Biofilmbildung von *L. pneumophila* LP1 in Reinkultur und in Kombination mit *E. coli* K12-Biofilmen. Dargestellt sind die Absorptionen der *L. pneumophila*-Biofilme nach Kristallviolett-Färbung bei 570 nm in Abhängigkeit von der YEB3-Konzentration und der Inkubationszeit. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.6.1ff nachzulesen.

Die Abbildung 67 zeigt die Biofilmbildung von *Legionella pneumophila* LP1 in Reinkultur, sowie in Kombination mit lebenden und abgetöteten Biofilmen von *E. coli* K12. Der ausgeprägteste Biofilm von *L. pneumophila* LP1 wurde nach 96 Stunden Kultivierung auf einem zuvor durch Hitze-fixierung abgetöteten Biofilm von *E. coli* K12 ausgebildet. Im Vergleich zum nekrotrophen Wachstum von *L. pneumophila* LP1 auf JCBK5 blieb die Biofilmbildung auf einem toten Biofilm von *E. coli* K12 allerdings deutlich geringer (vergleiche Abbildung 66), auch hier aber nur bei zusätzlich hohen YEB3-Konzentrationen im Anzuchtmedium. Daraus leitet sich ab, dass der abgetötete Biofilm die Adhäsion der Legionellen an die Oberflächen der Kavernen begünstigte. Die Nutzung des toten Zellmaterials als Nahrung für die Legionellen scheint dagegen keinen großen Einfluss gehabt zu haben, da die Biofilme besonders in Anwesenheit von größeren Nährmedienkonzentrationen vermehrt wuchsen. Bei geringen Konzentrationen zeigten die Mischkultur-Biofilme im Vergleich zur Reinkultur kein vermehrtes Wachstum. Das Optimum der Adhäsion ergab sich dabei bei der Konzentration von 50 % YEB3-Medium. Bei der Kombination mit lebenden *E. coli* K12 wurde keine verbesserte Biofilmbildung durch *L. pneumophila* LP1 festgestellt, gegebenenfalls dadurch bedingt, dass *E. coli* K12 in Reinkultur bereits nach deutlich kürzerer Bebrütung massive Biofilme ausbildete, die durch weitere Bebrütung zur Ablösung neigten (siehe Abbildung 32), was auch in Kombination mit *L. pneumophila* LP1 zu erwarten ist. Andreozzi et al. (2016) generierte bei Mischkulturbiofilmen von *L. pneumophila* und *E. coli* ebenfalls ähnliche Biofilmbildungen im Vergleich zu Reinkulturbiofilmen von *L. pneumophila*. In

Mischkulturen aus *L. pneumophila* und anderen Bakterien konnten von Andreozzi et al. (2016) aber auch deutlich vergrößerte Absorptionen nach Kristallviolett-Färbung erzielt werden. Aus den Ergebnissen des nekrotrophen Wachstums von *L. pneumophila* LP1 und den aufgeführten Resultaten von Andreozzi et al. (2016) zeigte sich, dass die Adhäsion von *L. pneumophila* LP1 abhängig von den Eigenschaften der kombinierten Mikroorganismen war.

4.5 Vergleichbarkeit von Becherglas-Methode und Mikrotiterplatten-Biofilm-Assays

Sowohl die Biofilmanzucht im Becherglasreaktor, als auch die Methode in 24-Well-Mikrotiterplatten, bieten eine Bandbreite von Modifikationen (Inkubationstemperatur, Nährmedien, Bebrütungszeit, etc.) und sind damit anpassbar auf eine Vielzahl von Mikroorganismen. Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien zeigten bei beiden Methoden ähnliche Ergebnisse in der Biofilmbildung, auch in Bezug auf Wachstumsparameter wie bevorzugte Medien-Konzentration und Bebrütungszeit. Die Quantifizierung von Lebendzellzahlen der Biofilme von Isolat JCBK5 lieferte nach beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede, was in Abbildung 68 zu sehen ist. Daraus wird ersichtlich, dass die Biofilmbildung dieses Isolats in beiden verwendeten Systemen ähnlich verläuft und damit keine große Abhängigkeit von der Methode selbst aufweist, auch wenn das Material des Substratums nicht identisch war (Glas, bzw. Polystyrol).

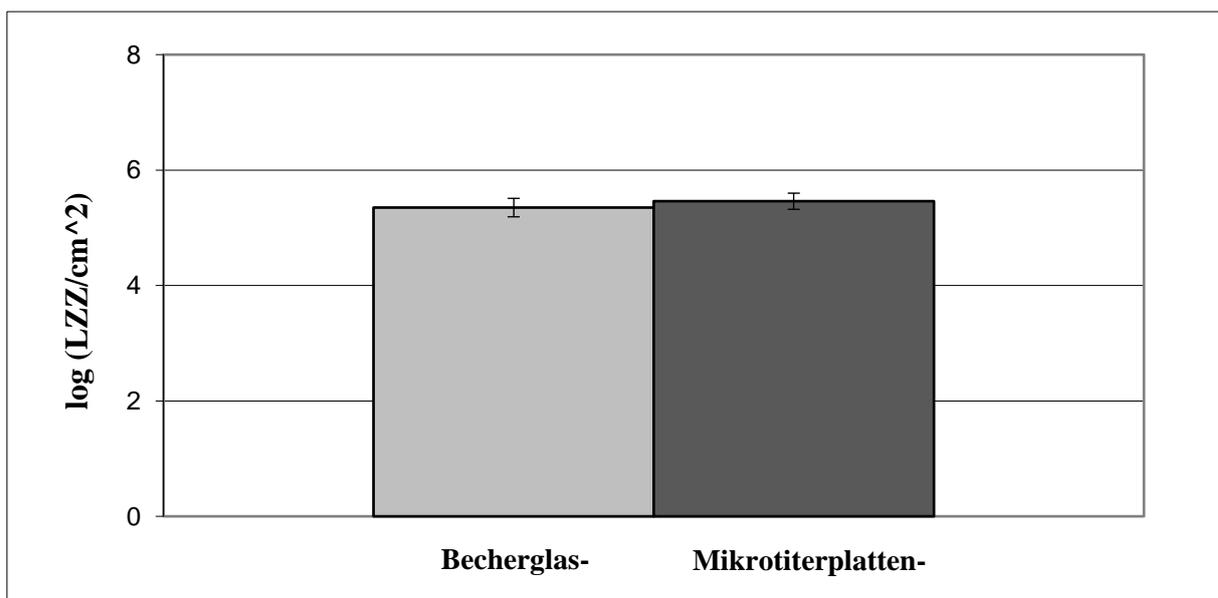


Abbildung 68: Lebendzellzahlen von JCBK5-Biofilmen nach Anzucht im Becherglasreaktor, bzw. in 24-Well-Mikrotiterplatten. Dargestellt sind die Lebendzellzahlen pro cm² von Biofilmen nach 24 Stunden Bebrütung in 1 g/L TSB. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Material und Methoden 2.2.5.3 und 2.2.6.8 nachzulesen.

Die Methoden ergänzen sich gut in ihren Möglichkeiten, da jede ihre Vorzüge in Bezug auf bestimmte Fragestellungen aufweist. Die Struktur von Biofilmen kann beispielsweise durch die Anzucht von Biofilmen auf Glaträgern schnell und einfach mikroskopisch untersucht werden. Bei der Quantifizierung von Biofilmen, bei der die Lebendzellzahl für die zu untersuchende Fragestellung nicht unbedingt erforderlich ist, bietet die 24-Well-Mikrotiter-Methode eine schnelle Möglichkeit zur Quantifizierung über deren Masse und stellt besonders bei größerem Probenumfang eine zeitsparende Alternative zur klassischen Kultivierung dar. Berücksichtigt werden muss allerdings, dass durch die Färbung mit Kristallviolett die EPS-Matrix des Biofilms mitdetektiert wird und die Biofilmbildung ggf. durch Sedimentationsprozesse begünstigt sein kann. Bei der Becherglasmethode nimmt die Sedimentation, durch die senkrechte Aufhängung der Träger, keinen größeren Einfluss. Eine Lebendzellzahlbestimmung ist prinzipiell in beiden Systemen möglich, allerdings einfacher im Becherglasreaktor durchzuführen.

4.6 Desinfektionsversuche

Sowohl die Becherglas- als auch die 24-Well-Mikrotiterplatten-Methode wurden in dieser Arbeit als Ausgangspunkt für verschiedene Desinfektionsversuche mit Chlordioxid-Lösung verwendet. Die ablösende Wirkung von Chlordioxid auf Biofilme wurde dabei qualitativ an Biofilmen aus dem Becherglasreaktor untersucht und nach der Mikrotiterplatten-Methode durch Färbung mit Kristallviolett quantifiziert. Um die keimreduzierende Wirkung von Chlordioxid zu untersuchen wurde außerdem ein Desinfektionsversuch im Becherglasreaktor entwickelt, bei dem das Desinfektionsergebnis über die Lebendzellzahlen der Biofilme quantifiziert wurde (siehe Material und Methoden 2.2.7.5).

Chlordioxid zeigte ablösende Wirkung sowohl bei der mikroskopischen Betrachtung von Biofilmen des Isolats JCBK5, als auch bei Versuchen mit verschiedenen Mikroorganismen in 24-Well-Mikrotiterplatten. Durch die mikroskopische Betrachtung von desinfizierten Biofilmen, in Abhängigkeit von der Konzentration an Chlordioxid als Desinfektionsmittel, konnte in Abbildung 42 gezeigt werden, dass Chlordioxid in der Lage ist große Teile der Biofilme von dem Substratum abzulösen. Diese Ablösung wird mit steigender Konzentration begünstigt. Hübel (2013) zeigte bei Biofilmen von *S. aureus* und *Acinetobacter baylyi* ebenfalls eine deutliche Ablösung durch die Behandlung mit Chlordioxid. Diese ablösenden

Eigenschaften wurden durch weitere Versuche in 24-Well-Mikrotiterplatten quantifiziert (siehe Abbildung 43 bis 47). Die resultierenden Ergebnisse bestätigten die mikroskopischen Beobachtungen und zeigten eine deutliche Reduktion der Biofilme, die mit höherer Konzentration des Desinfektionsmittels größer wurde. Diese Ablösung schien dabei von dem verwendeten Bakterienstamm abgänglich zu sein. So wurde bei Biofilmen von *L. pneumophila* LP1 eine deutlich größere Ablösung erreicht als bei Biofilmen von *S. aureus* DSM346 und *E. faecalis* DSM20478, und dies obwohl der *Legionella*-Biofilm zu Anfang des Versuchs deutlich ausgeprägter war (Absorption bei 570 nm nach Färbung = 0,3) als die Biofilme der beiden anderen Mikroorganismen (Absorption bei 570 nm nach Färbung = 0,1). Auch die Vermutung, dass die ablösenden Eigenschaften von Chlordioxid bei guten Biofilmbildnern reduziert sein könnten, konnte nicht bestätigt werden, da sowohl der Stamm *E. coli* K12 als auch das Isolat JCBK5 aus den vorangegangenen Versuchen als gute Biofilmbildner klassifiziert wurden, JCBK5-Biofilme im direkten Vergleich allerdings eine wesentlich bessere Ablösung zeigten (siehe Abbildung 44). Ebenfalls wurde kein Unterschied bei der Wirkung von Chlordioxid auf lebende bzw. getrocknete Biofilme festgestellt (Abbildung 47).

Um die ablösenden Eigenschaften von Chlordioxid besser in Relation zu anderen Desinfektionsmittel setzen zu können, wurden Versuche mit Wasserstoffperoxid als alternatives Desinfektionsmittel durchgeführt. Sowohl die mikroskopische Betrachtung, als auch die Versuche in 24-Well-Mikrotiterplatten (siehe Abbildung 42 und 43) belegten, dass Wasserstoffperoxid keine ablösenden Eigenschaften aufwies und bestätigt somit den als entscheidend beschriebenen Vorteil von Chlordioxid (Roeske, 2006).

Um die desinfizierende Wirkung von Chlordioxid zu untersuchen, wurden verschiedene Versuche auf Grundlage der Biofilmanzucht und Quantifizierung im Becherglasreaktor entwickelt. Der grundlegende Ablauf der Versuche ist in Abbildung 48 veranschaulicht. Aus Vorversuchen ergab sich dabei, dass die Konzentration von Chlordioxid durch Rückstände des Nährmediums deutlich vermindert wurde. Negativ beeinflusst wurde die Reproduzierbarkeit der Lebendzellzahlen in den Biofilmen durch Zellen aus der planktonischen Kultur, die nach der Entnahme der Träger aus dem Reaktor auf der Biofilmoberfläche verblieben waren. Daher war das Waschen der Biofilme vor den Desinfektionsversuchen notwendig, um sowohl

Nährmedienreste als auch die planktonischen Zellen zu entfernen, weshalb ein Waschschrift fest in die Methode integriert wurde. Die Quantifizierung des Desinfektionsergebnisses erfolgte über eine Wirkungsrate, die die Reduktion der lebenden Bakterien als Lebendzellzahl in Abhängigkeit von der verbrauchten Chlordioxid-Konzentration angibt (siehe Material und Methoden 2.2.7.5). Der Wert für die Wirkungsrate ist dabei umso größer, je empfindlicher die Bakterien auf Chlordioxid reagieren.

Die Wirkungsraten verschiedener Kulturen des Isolats JCBK5 sind in Abbildung 69 zusammengefasst.

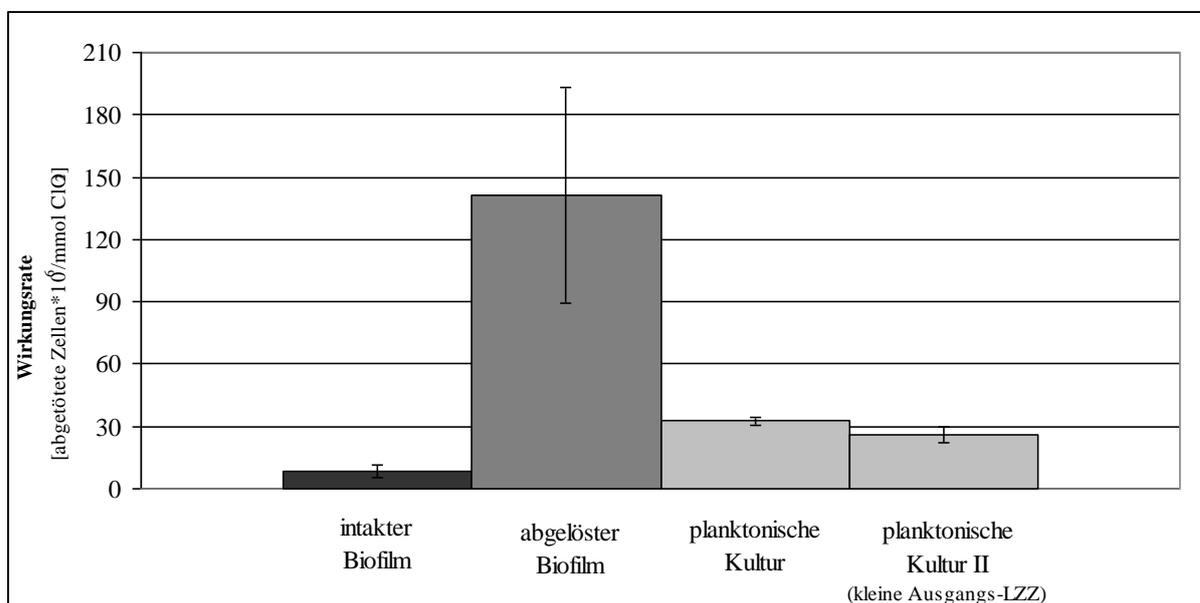


Abbildung 69: Desinfektionswirkung von Chlordioxid auf planktonische und Biofilm-Kulturen. Die Biofilme wurden im Becherglasreaktor in 1 g/L TSB nach 24 Stunden Bebrütung bei 28 °C erhalten. Die Flüssigkultur wurde ebenfalls dem Becherglasreaktor entnommen. Für die jeweiligen Versuchsreihen wurden 3fach-Bestimmungen durchgeführt. **Intakter Biofilm** = Die Biofilme wurden direkt auf dem Objektträger desinfiziert und erst danach abgelöst. **Abgelöster Biofilm** = Der Biofilm wurde zunächst von dem Objektträger abgelöst und die so erhaltene Suspension desinfiziert. **Planktonische Kultur** = Die Zellsuspension wurde dem Becherglas entnommen (ggf. 1:3 verdünnt), mit Ultraschall behandelt und desinfiziert. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Methodenteil unter 2.2.7.5ff zu entnehmen.

Chlordioxid zeigte bei planktonischen und Biofilmkulturen auf Trägerflächen signifikante Unterschiede in der Wirksamkeit der Desinfektion. In planktonischen Kulturen wurden deutlich mehr Bakterien durch die gleiche Konzentration an Chlordioxid getötet, als es in Biofilmen der Fall war. Reuter et al. (2010) beschreibt, dass Bakterien in Biofilmen deutlich resistenter gegenüber Desinfektionsmitteln sein sollten, wobei die Resistenz mehr als den Faktor 1000 betragen kann (Fux, et al., 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese

Annahme zunächst, die Ursachen hierfür konnten nicht ermittelt werden. Es wird beschrieben, dass verschiedene Genexpressionen bei Bakterien, je nachdem ob sie in einem Biofilm angesiedelt sind oder einer planktonischen Kultur entstammen, beobachtet wurden. Bei *Staphylococcus aureus* konnten bei über 250 Genen differenzielle Expressionen (Resch et al., 2006) detektiert werden, bei *P. aeruginosa* wurden sogar über 800 Gene differenziell exprimiert und somit mehr als die Hälfte (Sauer et al., 2002). So könnten vermehrt Substanzen generiert werden, die die Zelle vor dem Desinfektionsmittel schützen. Der Schutz durch die EPS könnte eine Ursache für die gesteigerte Resistenz von Biofilmbakterien sein. Die EPS-Matrix wird in der Literatur (Wingender et al., 1999) und (Flemming, 1994)) als eine Schicht aus verschiedenen organischen Materialien beschrieben, die je nach Bakterium sehr heterogen zusammengesetzt sein kann. Da Chlordioxid ein Oxidationsmittel, ist könnte es zu verschiedenen Reaktionen mit Bestandteilen der Matrix kommen und der Kontakt des Desinfektionsmittels aufgrund der Biofilmstruktur mit einigen, oder sogar allen Zellen erschwert bzw. verhindert werden. Al Fattani (2006) beschreibt Ergebnisse aus Beprobungen von *Candida albicans*-Biofilmen, die belegen, dass eine Resistenz dieser Mikroorganismen mit der Zusammensetzung und der Dicke der EPS-Matrix einhergehen.

Der Einfluss der Struktur von Biofilmen zeigte sich in weiteren Versuchen als wahrscheinlicher Hauptgrund für die größere Resistenz von Biofilmbakterien des Isolat JCBK5, wie aus dem Vergleich der Wirkungsraten von intakten und abgelösten Biofilmen deutlich wurde. Ablösung und Suspension der Biofilme führte zu weit höheren Wirkungsraten sogar im Vergleich mit planktonischen Kulturen. Indizien für den Schutz von Bakterien durch die vermehrte Bildung von schützenden Substanzen (z. B. Radikalfänger) konnten nicht gefunden werden, da sonst die Biofilmbakterien eine höhere Toleranz gegenüber Chlordioxid im Vergleich zu der planktonischen Kultur aufweisen müssten, was nicht der Fall war. Die Struktur der Biofilme wurde dagegen durch deren Homogenisierung in einer Suspension weitestgehend zerstört, wodurch die Bakterien nicht mehr räumlich vor dem Desinfektionsmittel geschützt waren, was die verringerten Überlebensraten erklären könnte.

Bei dem Vergleich von planktonischen Kulturen des Isolats JCBK5 mit unterschiedlichen Konzentrationen an Bakterienzellen pro Volumen wurde kein Inokulum-Effekt beobachtet. Als Inokulum-Effekt wird das Phänomen beschrieben, dass in Bakteriensuspensionen mit

steigender Anzahl an Zellen mit der gleichen Desinfektionsmittelkonzentration weniger Zellen abgetötet werden und somit schlechtere Desinfektionsergebnisse erreicht werden (Johnston, 2000). Für das verwendete Isolat konnte kein signifikanter Unterschied in den Wirkungsraten von Chlordioxid auf Bakteriensuspensionen mit unterschiedlicher Zellzahl festgestellt werden. Unter Vernachlässigung der Fehlergrenzen wurde sogar in den Suspensionen mit höherer Zelldichte ein besseres Desinfektionsergebnis erzielt. Bei der Kultivierung von Bakterien des Isolats JCBK5 wurde nach einigen Desinfektionsversuchen eine verzögerte Kultivierbarkeit festgestellt, die sich durch unterschiedlich große Kolonien auf dem Nährstoff-Agar zeigte, dargestellt in Abbildung 70. Der Einfluss von Chlordioxid auf die Vermehrung der Bakterien wurde daher in einem Versuch untersucht, in dem Biofilme unterschiedlich lange mit Chlordioxid (eingesetzte Konzentrationen jeweils gleich) desinfiziert, anschließend abgelöst und als Suspension erneut bebrütet wurden. Das Wachstum der Kulturen wurde dabei über die Veränderung der optischen Dichte als Wachstumskurve verfolgt und die Wachstumsparameter Generations- und Verdopplungszeit aus der Kurve bestimmt (siehe Abbildung 52 und Tabelle 28). Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede in den Wachstumsparametern der desinfizierten Kulturen im Vergleich zu der nicht desinfizierten Kontrollkultur. Lediglich eine verlängerte Latenzphase bei den Kulturen, die länger desinfiziert wurden, konnte festgestellt werden. Die verlängerte lag-Phase könnte zwar die verzögerte Rekultivierung nach einer Desinfektion mit Chlordioxid bestätigen, wird aber wahrscheinlich durch die geringeren Ausgangslebenszellzahlen in den desinfizierten Ansätzen resultieren. Die Kulturen wurden vor der erneuten Kultivierung auf gleiche optische Dichten eingestellt, dadurch resultierten aber nur vergleichbare Zellmassen und keine vergleichbaren Lebenszellzahlen.

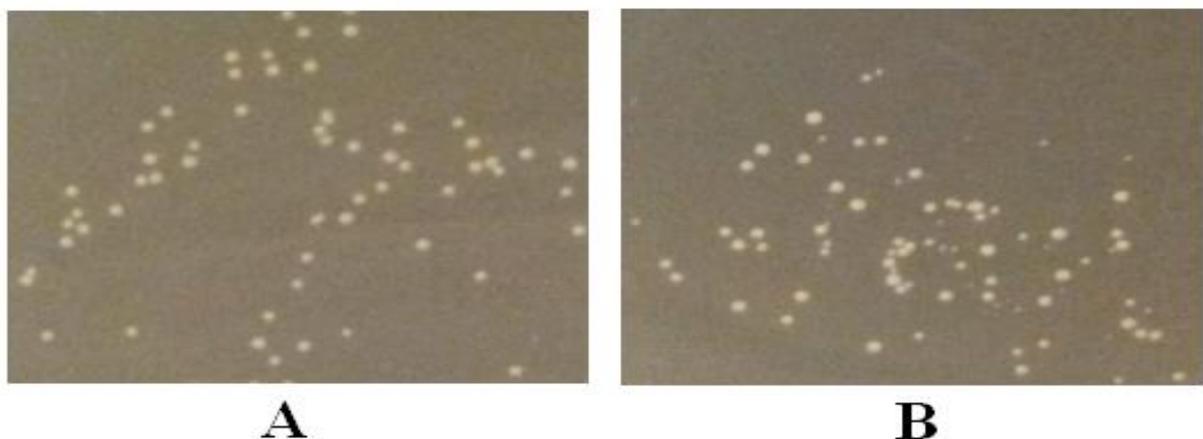


Abbildung 70: Kolonien von JCBK5-Suspensionen auf TSB-Agar in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Kulturen. Dargestellt sind Fotografien von mit JCBK5-Kulturen beimpften Platten nach 24 Stunden Bebrütung bei 36 °C. Die Fotografien wurden unter denselben Bedingungen angefertigt, sodass die dargestellten

Größenverhältnisse der Realität entsprechen. **A** = Wachstum ohne Vorbehandlung. **B** = Wachstum nach 20 min Desinfektion mit 60 mg/L Chlordioxid.

Unzureichend desinfizierte Biofilme von JCBK5 führten zu einer raschen Kontamination eines vorher autoklavierten Becherglasreaktors. Biofilm-Objektträger wurden mit Chlordioxid (60 mg/L) desinfiziert und anschließend in einem neuen Becherglasreaktor mit sterilem Medium überführt. Innerhalb der ersten 24 Stunden veränderte sich die Lebendzellzahl auf den Trägeroberflächen nicht, allerdings wurde in dem umgebenden Flüssigmedium eine planktonische Kultur ausgebildet. Obwohl die Nährstoffkonzentration mit 1 g/L TSB-Medium sehr gering gewählt wurde, erreichten Biofilme die lediglich 10 min desinfiziert wurden, binnen 48 Stunden ähnliche Lebendzellzahlen wie vor der Desinfektion. Lediglich die Biofilmkulturen, die dem Desinfektionsmittel für 20 Minuten ausgesetzt waren bildeten im Vergleich geringere Zellkonzentrationen pro Volum, bzw. pro Fläche aus, die sich auch über eine längere Bebrütungszeit nicht mehr erhöhten (siehe Abbildung 51). Aus diesen Ergebnissen zeigt sich, dass eine Desinfektion nur dann über einen längeren Zeitraum effektiv ist, wenn möglichst viele Zellen in den Biofilmen abgetötet werden, da sich die Kulturen sonst schnell erholen und es so zur Ausbildung von neuen Biofilmen und auch planktonischen Kulturen in der umgebenden flüssigen Phase, kommen kann. Cilgin (2015) konnte bei ähnlichen „statischen“ Desinfektionsversuchen von Trinkwasserschläuchen zeigen, dass wesentlich länger anhaltende Desinfektionsergebnisse erzielt werden können, wenn die Desinfektionsparameter (Desinfektionsmittel-Konzentration, Reaktionszeit, Restkonzentration) ausreichend berücksichtigt werden. Übertragen auf Trinkwassersysteme zeigt diese schnelle Rekontamination des Systems, dass bereits geringe Standzeiten von Wasser in einer Leitung in Bezug auf die Hygiene problematisch sein können und unterstützt die Empfehlung des DVGW, das Standwasser der Leitung am besten immer zu verwerfen und auf keinen Fall für die Zubereitung von Lebensmittel zu nutzen (VDI/DVGW 6023).

5 Literatur

Abdel-Nour, M.; Duncan, C.; Low, D. E.; Guyard, C. (2013): Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. In: *International journal of molecular sciences* 14 (11), S. 21660–21675. DOI: 10.3390/ijms141121660.

Al-Fattani, M. A.; Douglas, L. J. (2006): Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. In: *Journal of medical microbiology* 55 (Pt 8), S. 999–1008. DOI: 10.1099/jmm.0.46569-0.

Andreozzi, E.; Barbieri, F.; Ottaviani, M. F.; Giorgi, L.; Bruscolini, F.; Manti, A. (2016): Dendrimers and Polyamino-Phenolic Ligands: Activity of New Molecules Against *Legionella pneumophila* Biofilms. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 289. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00289.

a.p.f. Aquasystems AG, <http://www.apf-aquasystem.de/produkte>; zuletzt geprüft am 12.02.2017.

Bartram, J. (2007): *Legionella* and the Prevention of Legionellosis: World Health Organization. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=rAoI8DzB7YgC>.

Benarde, M. A.; Snow, W. B.; Olivieri, V. P.; Davidson, B. (1967): Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. In: *Applied microbiology* 15 (2), S. 257–265.

Bürschgens, A.; (2015): Legionellen in Trinkwasser-Installationen: Gefährdungsanalyse und Sanierung: *Beuth Verlag GmbH*. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=pLQFCwAAQBAJ>.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Wasser - Das Grundnahrungsmittel Nummer eins. Online verfügbar unter http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/03_Verbraucher/15_Wasser_Mineralwasser/01_Trinkwasser/Trinkwasser_basepage.html, zuletzt geprüft am 10.02.2017.

Chem. Mikrobiologie (2015): Mikrobiologisches Praktikum für Lebensmittelchemiker; Chemische Mikrobiologie der Universität Wuppertal; Skript Stand 2015.

- Christensen, G. D.;** Simpson, W. A.; Younger, J. J.; Baddour, L. M.; Barrett, F. F.; Melton, D. M.; Beachey, E. H. (1985): Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. In: *Journal of clinical microbiology* 22 (6), S. 996–1006.
- Cilgin, S.** (2015): Reduzierung von Keimen in Wassersystemen: Desinfektion von Augenduschkäufen. Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung vor Lebensmittelchemiker. Bergische Universität Wuppertal.
- Costerton, J. W.;** Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M. (1995): Microbial biofilms. In: *Annual review of microbiology* 49, S. 711–745. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- Danhorn R.;** Hentzer M.; Givskov M.; Parsek M. R.; Fuqua C. (2004): Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through PhoR-PhoB regulatory system. *J Bacteriol.*; 186;4492 – 4501. [PubMed: 15231781]
- Decho A.W. (1999):** Chemical communication within microbial biofilms – chemotaxis and quorum sensing in bacterial cells, in: *Microbial extracellular polymer substances*, (Eds.) Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C., Springer, Heidelberg, Berlin, 155 – 169
- Descours, G.;** Cassier, P.; Forey, F.; Ginevra, C.; Etienne, J.; Lina, G.; Jarraud, S. (2014): Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples. In: *Journal of microbiological methods* 98, S. 119–121. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.01.001.
- Diederer, B. M. W.,** de Jong, C. M. A., Marmouk, F., Kluytmans, J. A. J. W., Peters, M. F., Van der Zee, A. (2007): Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples, *J med microbiol*, 56: 94-101, DOI 10.1099/jmm.0.46714-0.
- DIN 1988-100,** August 2011: Technische Regeln für Trinkwasser-Installationen – Teil 100: Schutz des Trinkwassers, Erhaltung der Trinkwassergüte; Technische Regel des DVGW.
- DIN 1988-200,** Mai 2012: Technische Regeln für Trinkwasser-Installationen – Teil 200: Installation Typ A (geschlossenes System) – Planung, Bauteile, Apparate, Werkstoffe; Technische Regel des DVGW.
- DIN 2000,** Oktober 2000: Leitsätze für Anforderungen an Trinkwasser, Planung, Bau, Betrieb und Instandhaltung der Versorgungsanlagen.

DIN 2001-1, Mai 2007: Trinkwasserversorgung aus Kleinanlagen und nicht ortsfesten Anlagen – Teil 1: Kleinanlagen – Leitsätze für Anforderungen an Trinkwasser, Planung, Bau, Betrieb und Instandhaltung der Anlagen; Technische Regel des DVGW.

DIN 38411, Juni 1991: Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Nachweis von E. coli und coliformen Keimen.

DIN 50930-6, August 2001: Korrosion metallischer Werkstoffe im Innern von Rohrleitungen, Behältern und Apparaten bei Korrosionsbelastung durch Wässer Teil 6: Beeinflussung der Trinkwasserbeschaffenheit.

DIN EN 806-5, April 2012: Technische Regeln für Trinkwasser-Installationen - Teil 5: Betrieb und Wartung.

DIN EN 1717, August 2011: Schutz des Trinkwassers vor Verunreinigungen in Trinkwasser-Installationen und allgemeine Anforderungen an Sicherungseinrichtungen zur Verhütung von Trinkwasserverunreinigungen durch Rückfließen.

DIN EN ISO 6222, Juli 1999: Wasserbeschaffenheit - Quantitative Bestimmung der kultivierbaren Mikroorganismen.

DIN EN ISO 7393-2, April 2000: Bestimmung von freiem Chlor und Gesamtchlor - Teil 2: Kolorimetrisches Verfahren mit N,N-Diethyl-1,4-Phenylendiamin für Routinekontrollen.

DIN EN ISO 8199, Januar 2008: Wasserbeschaffenheit – Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren.

DIN EN ISO 11731-2, Juni 2008: Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Legionellen – Teil 2: Direktes Membranfiltrationsverfahren mit niedriger Bakterienzahl.

DIN EN ISO 16266, Mai 2008: Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Pseudomonas aeruginosa - Membranfiltrationsverfahren.

DIN EN ISO 19458, Dezember 2006: Wasserbeschaffenheit – Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen.

DVGW W224, Februar 2010: Verfahren zur Desinfektion von Trinkwasser mit Chlordioxid

DVGW W270, November 2007: Vermehrung von Mikroorganismen auf Werkstoffen für den Trinkwasserbereich – Prüfung und Bewertung.

- DVGW W551**, April 2004: Trinkwassererwärmungs- und Trinkwasserleitungsanlagen; Technische Maßnahmen zur Vermeidung des Legionellenwachstums; Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasser-Installationen; ISSN 0176-3504
- DVGW W553**, Dezember 1998: Bemessung von Zirkulationssystemen in zentralen Trinkwassererwärmungsanlagen.
- DVGW W624**, Dezember 2015: Dosieranlagen für Desinfektionsmittel und Oxidationsmittel; Bereitungs- und Dosieranlagen für Chlordioxid
- DVGW**, März 2007: Schläuche und Schlauchleitungen - Anforderungen in der Praxis.
- DVGW**, April 2009: Desinfektion von Trinkwasser-Installationen zur Beseitigung mikrobieller Kontaminationen.
- Dudek, Marie-Luise** (2015): Reduzierung von Keimen in Wassersystemen - Quantifizierung von Biofilmen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung vor Lebensmittelchemiker*. Bergische Universität Wuppertal.
- Edelstein**, P. H. 1981. Improved semi-selective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Mikrobiol.* 14:298-303.
- Edwards**, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA, *Nucleic Acids Res* 17(19): 7843-7853.
- Exner, M.**, Gebel, J., Vacata, V. (2003): Wirksamkeit der Desinfektion von Biofilmen. Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn.
- Farhat, M.**; Trouilhe, M-C; Briand, E.; Moletta-Denat, M.; Robine, E.; Frere, J. (2010): Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. In: *Journal of applied microbiology* 108 (3), S. 1073–1082. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04541.x.
- Farhat, M.**; Moletta-Denat, M.; Frere, J.; Onillon, S.; Trouilhe, M. C.; Robine, E. (2012): Effects of disinfection on *Legionella* spp., eukarya, and biofilms in a hot water system. In: *Applied and environmental microbiology* 78 (19), S. 6850–6858. DOI: 10.1128/AEM.00831-12.

- Flemming H.C.** (1994): Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen, Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft 129, Oldenburg Verlag, München.
- Flemming, H. C.** (2000): Biofilme - das Leben am Rande der Wasserphase. In: *Nachr. Chem.* 48 (4), S. 442–447. DOI: 10.1002/nadc.20000480406.
- Flemming, H. C.;** Wingender, J. (2001): Biofilme — die bevorzugte Lebensform der Bakterien. Flocken, Filme und Schlämme. In: *Biologie in unserer Zeit* 31 (3), S. 169–180. DOI: 10.1002/1521-415X(200105)31:3<169::AID-BIUZ169>3.3.CO;2-L.
- Flemming, H. C.;** Wingender, J. (2002): Was Biofilme zusammenhält. Proteine, Polysaccharide. In: *Chemie in unserer Zeit* 36 (1), S. 30–42. DOI: 10.1002/1521-3781(200202)36:1<30::AID-CIUZ30>3.0.CO;2-O.
- Flemming, H. C.;** Neu, T. R.; Wozniak, D. J. (2007): The EPS matrix: the "house of biofilm cells". In: *Journal of bacteriology* 189 (22), S. 7945–7947. DOI: 10.1128/JB.00858-07.
- Flemming, H. C.** (2010): Vermeidung und Sanierung von Trinkwasser-Kontaminationen durch hygienisch relevante Mikroorganismen aus Biofilmen der Hausinstallation. Verbundstudie, Universität Duisburg-Essen, Biofilm Center.
- Flemming, H. C.** (2011): The perfect slime. In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 86 (2), S. 251–259. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.025.
- Fuchs, G.** (2014): Allgemeine Mikrobiologie: Thieme. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=Rp37AwAAQBAJ>; S. 161; S. 171
- Fux, C. A.;** Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Stoodley, P. (2005): Survival strategies of infectious biofilms. In: *Trends in microbiology* 13 (1), S. 34–40. DOI: 10.1016/j.tim.2004.11.010.
- Gebäudemanagement Uni Wuppertal:** Dezernat 5 – Gebäude-, Sicherheits- und Umweltmanagement der bergischen Universität; Ansprechpartner D. V. Hermann.
- Geipel, U.;** Herrmann, M. (2004): Das infizierte Implantat. Teil 1. Bakteriologie. In: *Der Orthopäde* 33 (12), 1411-26; 1427-8. DOI: 10.1007/s00132-004-0741-1.
- Götz, Friedrich** (2002): *Staphylococcus* and biofilms. In: *Molecular microbiology* 43 (6), S. 1367–1378.

-
- Gray, Michael J.;** Wholey, Wei-Yun; Jakob, Ursula (2013): Bacterial responses to reactive chlorine species. In: *Annual review of microbiology* 67, S. 141–160. DOI: 10.1146/annurev-micro-102912-142520.
- Grohmann, A. N.;** Jekel, M.; Grohmann A.; Szewzyk, R.; Szewzyk, U. (2011): Wasser – Chemie, Mikrobiologie und nachhaltige Nutzung. *De Gruyter Verlag*; S. 290 ff.
- Heidemann, A.;** Kistemann, T.; Stolbrink, M.; Kasperkowiak, F.; Heikrodt, K. (2014): Integrale Planung der Gebäudetechnik: Erhalt der Trinkwassergüte - Vorbeugender Brandschutz - Energieeffizienz: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=PaigBAAAQBAJ>.
- Höll, K.;** Niessner, R. (2011): Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung: De Gruyter. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=UMeoNdioQZYC>.
- Hübel, L.** (2013): Keimreduzierung in Biofilmen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker*. Bergische Universität Wuppertal.
- Hügler, M.,** Hamsch, B. (2011) :Legionellen in öffentlichen Gebäuden - Erfahrungsbericht zum Vorkommen von Legionellen in öffentlichen Gebäuden. *DVGW energie/wasser praxis* 62, S. 40-43, Dezember 2011.
- Johnston, M. D.;** Simons, E.-A.; Lambert, R. J. W. (2000): One explanation for the variability of the bacterial suspension test. In: *J Appl Microbiol* 88 (2), S. 237–242. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00951.x.
- Kerr C.J.,** Osborn K.S., Robson G.D., Handley P.S. (1997): The effect of substratum on bio-film formation in drinking water systems, in: *Biofilms - community interactions and control*, (Eds.) Wimpenny J., Handley P., Glibert P., Lappin-Scott H., Jones M., Bioline (1997), 167 – 174.
- Kott, M.** (2016): Wirkung von Chlordioxid auf Bakterien in geklärtem Abwasser. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker*. Bergische Universität Wuppertal.
- Kotzybik, K.** (2014): Untersuchung von Augenduschen/Notduschen auf Verkeimung. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker*. Bergische Universität Wuppertal.

- Labor Dr. Fülling** (2010 – 2016): Prüfberichte zur hygienischen Untersuchung; Chemische Laboratorium Dr. R. Fülling Remscheid.
- Laufer, Louisa** (2016): Keimreduzierung in Wassersystemen - Quantifizierung von Legionella-Biofilmen in Wellplates. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker*. Bergische Universität Wuppertal.
- Lenz, J.**; Linke, S.; Gemein, S.; Exner, M.; Gebel, J. (2010): Verification of the efficiency of chemical disinfection and sanitation measures in in-building distribution systems. In: *International journal of hygiene and environmental health* 213 (3), S. 198–203. DOI: 10.1016/j.ijheh.2010.04.006.
- Liguori, G.**; Di Onofrio, V.; Gallè, F.; Liguori, R.; Nastro, R. A.; Guida, M. (2014): Occurrence of *Legionella* spp. in thermal environments. Virulence factors and biofilm formation in isolates from a spa. In: *Microchemical Journal* 112, S. 109–112. DOI: 10.1016/j.microc.2013.09.023.
- Lister, J. L.**; Horswill, A. R. (2014): *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4, S. 178. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00178.
- LVTH**, (2014): Legionellen in Schwimm- und Badebeckenwasser; Lehr- und Versuchsgesellschaft für innovative Hygienetechnik mbH.
- Madigan, M. T.**; Brock, T. D. (2013): Brock Mikrobiologie. 13., aktualisierte Aufl. München u.a.: Pearson (Bio - Biologie).
- Malanoski, G. J.** (1995): *Staphylococcus aureus* Catheter-Associated Bacteremia. In: *Arch Intern Med* 155 (11), S. 1161. DOI: 10.1001/archinte.1995.00430110069007.
- Mampel, J.**; Spirig, T.; Weber, S. S.; Haagensen, J. A. J.; Molin, S.; Hilbi, H. (2006): Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. In: *Applied and environmental microbiology* 72 (4), S. 2885–2895. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2885-2895.2006.
- Marshall, R.T.** (ed.). 1993. Standard methods for the examination of dairy products, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- McDade, J. E.**; Shepard, C. C.; Fraser, D. W.; Tsai, T. R.; Redus, M. A.; Dowdle, W. R. (1977): Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. In: *The New England journal of medicine* 297 (22), S. 1197–1203. DOI: 10.1056/NEJM197712012972202.

- McDonnell G.** (2009): Sterilization and Disinfection, *Elsevier Verlag*, 536, 540-42
- Merritt, J. H.;** Kadouri, D. E.; O'Toole, G. A. (2005): Growing and analyzing static biofilms. In: *Current protocols in microbiology* Chapter 1, Unit 1B.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.
- Moffat, J. F.;** Tompkins, L. S. (1992): A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. In: *Infection and immunity* 60 (1), S. 296–301.
- Mohamed, J. A.;** Huang, D. B. (2007): Biofilm formation by enterococci. In: *Journal of medical microbiology* 56 (Pt 12), S. 1581–1588. DOI: 10.1099/jmm.0.47331-0.
- Müller, H- E.;** Dünninger, W. (2007): Legionellen - ein aktuelles Problem der Sanitärhygiene. Infektion und Bekämpfung. 3. Aufl. Renningen: *expert-Verl.* (Kontakt & Studium, 342). Online verfügbar unter http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=3007308&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
- Neumeister, B.;** Geiss, H. K.; Braun, R.; Kimmig, P. (2009): Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie: *Thieme*. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=zBeSYMnzVFYC>.
- Nogueira, R.;** Utecht, K-U; Exner, M.; Verstraete, W.; Rosenwinkel, K-H (2016): Strategies for the reduction of *Legionella* in biological treatment systems. In: *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 74 (4), S. 816–823. DOI: 10.2166/wst.2016.258.
- Nomura, H.;** Isshiki, Y., Sakuda, K., Sakuma, K., Kondo, S. (2013): Effects of oakmoss and its components on biofilm formation of *Legionella pneumophila*. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(5):833-7. PMID: 23649339.
- O'Toole, George A.** (1999): Microtiter dish biofilm formation assay. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (47). DOI: 10.3791/2437.
- Patent WO2012084247 A1** (2012): Verfahren zur Herstellung einer wässrigen stabilen Chlordioxidlösung; Erfinder Helmut Uhlmann; Antragssteller a.p.f. Aquasystems AG
- Piao, Z.;** Sze, C.; Barysheva, O.; Iida, K.; Yoshida, S. (2006): Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. In: *Applied and environmental microbiology* 72 (2), S. 1613–1622. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1613-1622.2006.

- Pine, L.;** George, J. R.; Reeves, M. W.; Harrell, W. K. (1979): Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. In: *Journal of clinical microbiology* 9 (5), S. 615–626.
- Reasoner, D. J.;** Geldreich, E. E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1):1-7.
- Reinthal, F. F.;** Sattler, J.; Schaffler-Dullnig, K.; Weinmayr, B.; Marth, E. (1993): Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. In: *Journal of clinical microbiology* 31 (5), S. 1213–1216.
- Remde, A.;** Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (1998): Mikrobiologische Charakterisierung aquatischer Sedimente: Methodensammlung: Oldenbourg. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=dz0tSJZv9pMC>.
- Resch, A.;** Leicht, S.; Saric, M.; Pasztor, L.; Jakob, A.; Gotz, F.; Nordheim, A. (2006): Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. In: *Proteomics* 6 (6), S. 1867–1877. DOI: 10.1002/pmic.200500531.
- Reuter, Mark;** Mallett, Arthur; Pearson, Bruce M.; van Vliet, Arnoud H. M. (2010): Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. In: *Applied and environmental microbiology* 76 (7), S. 2122–2128. DOI: 10.1128/AEM.01878-09.
- Rodrigues, L. B.;** Dos Santos, Luciana Ruschel; Tagliari, Vinicius Zancanaro; Rizzo, Natalie Nadin; Trenhago, Graciela; Oliveira, Amauri Picollo de et al. (2010): Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. In: *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 41 (4), S. 1082–1085. DOI: 10.1590/S1517-838220100004000029.
- Roeder, R.** (2011): Biofilmpopulationen in der häuslichen Trinkwasserinstallation: Untersuchung der Auswirkung von eingesetzten Materialien und Desinfektionsmaßnahmen. Dissertation. Technische Universität Berlin. Fakultät III - Prozesswissenschaften.
- Roeder, R.;** Lenz, J.; Tarne, P.; Gebel, J.; Exner, M.; Szewzyk, U. (2010): Long-term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms. In: *International journal of hygiene and environmental health* 213 (3), S. 183–189. DOI: 10.1016/j.ijheh.2010.04.007.

- Roeske, W.;** Ritter, K. (2006): Trinkwasserdesinfektion: Grundlagen, Verfahren, Anlagen, Geräte, Mikrobiologie, Chlorung, Ozonung, UV-Bestrahlung, Membranfiltration, Qualitätssicherung: *Oldenbourg Industrieverlag*. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=2BntWGUqwhcC>.
- Rogers, J.;** Dowsett, A. B.; Dennis, P. J.; Lee, J. V.; Keevil, C. W. (1994): Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. In: *Applied and environmental microbiology* 60 (6), S. 1842–1851.
- Rolle, M.;** Mayr, A. (2007): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre: Enke. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=qg2U6efl9WoC>.
- Schoenen, D.** (2011): Mikrobiologie des Trinkwassers - Grundlegendes Fachwissen zum Betrieb einer seuchenhygienisch einwandfreien Trinkwasserversorgung, *Oldenbourg Industrieverlag*, München, S. 26 f, 172 ff.
- Saby, S.;** Vidal, A.; Suty, H. (2005): Resistance of *Legionella* to disinfection in hot water distribution systems. In: *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 52 (8), S. 15–28.
- Sauer, K.;** Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. In: *Journal of bacteriology* 184 (4), S. 1140–1154. DOI: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002.
- Schulte, S.;** Flemming, Hans-Curt (2006): Ursachen der erhöhten Resistenz von Mikroorganismen in Biofilmen. In: *Chemie Ingenieur Technik* 78 (11), S. 1683–1689. DOI: 10.1002/cite.200600088.
- Schulze, G.;** Simon, J. (2003): Jander Jahr – Maßanalyse – Theorie und Praxis der Titration mit chemischen und physikalischen Indikatoren. 16. Auflage; *De Gryter Verlag*; S. 184 ff
- Stemann, T.** (2015): Reduzierung von Keimen in Wassersystemen - Eigenschaften von Legionella-Isolaten. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker*. Bergische Universität Wuppertal.
- Stepanovic, S.;** Vukovic, D.; Dakic, I.; Savic, B.; Svabic-Vlahovic, M. (2000): A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. In: *Journal of microbiological methods* 40 (2), S. 175–179.

-
- Stepanovic, S.;** Vukovic, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukic, S.; Cirkovic, I.; Ruzicka, F. (2007): Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 115 (8), S. 891–899. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- Szewzyk** (2003): Biofilm - die etwas andere Lebensweise. Biospektrum, 3/03, 9. Jahrgang.
- Temmermann, R.;** Vervaeren, H.; Nosedá, B.; Boon, N.; Verstraeter, W.; Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. In: *Applied and environmental microbiology* 72 (2006), Nr.6, S. 4323 – 4328; ISSN 0099-2240.
- Thielemann, H.** (1978): Das Chlordioxidverfahren in der Trinkwasseraufbereitungspraxis - Überwachung und Analytik. In: *Acta hydrochim. hydrobiol.* 6 (2), S. 167–170. DOI: 10.1002/aheh.19780060210.
- TRBA 466** (2015): Technischen Regel für Biologische Arbeitsstoffe 466; Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen; Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.
- TrinkwV 2001:** Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die durch Artikel 4 Absatz 21 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist
- Umweltbundesamt (2009):** Coliforme Bakterien in Trinkwasser. Bundesgesundheitsbl 2009-52:474–482DOI 10.1007/s00103-009-0823-7. Online publiziert: 28. März 2009 © Springer Medizin Verlag 2009.
- Universität Wuppertal** (2017): Campusplan Griffenberg; <http://www.jackstaedt.uni-wuppertal.de/anfahrt-und-lageplan.html>; zuletzt geprüft am 05.01.2017
- VDI 6023**, Juli 2006: Hygiene in Trinkwasser-Installationen Anforderungen an Planung, Ausführung, Betrieb und Instandhaltung.
- Völkerversammlung der vereinten Nationen** (2010): General assembly adopts recognizing access to clear water, Sanitation as Human Right, by recorded vote of 122 favour, none against, 41 abstentions, Department of Public Information, News and Media Division, New York. In: *General Assembly GA/10967*. United Nations, 28. Juli 2010.

-
- Von Baum, H. G Härter; A Essig; C Lück; T Gonser; A Embacher; S Brockmann (2010):** Preliminary report: outbreak of legionnaires´disease in the cities of Ulm and New-Ulm in Germany, decemder 2009 – January 2010. 0. Euro Surveill. 2010;15(4):pii=19472. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19472>.
- Wingender, J., Grobe, S., Fieder, S., Flemming, H. C. (2003):** Effect of extracellular polysaccharides on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chlorine and hydrogen peroxide. In: Keevil, C. W., Godfree, A. F., D. M. Hoelt, D. M. & Dow, C. S. (ed.): Biofilms in the aquatic environment, *Royal Society of Chemistry, Cambridge*. 93 – 100.
- Wingender, J.; Nielsen, P. H.; Jahn, A. (1999):** Microbial Extracellular polymeric substances; *Springer Verlag Berlin Heidelberg*; S. 50 ff
- Wisbauer, B. (2016):** Keimreduzierung in Wassersystemen - Quantifizierung von Biofilmen auf unterschiedlichen Materialien. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker*. Bergische Universität Wuppertal.
- Zhou, G., Cao, B., Dou, Y., Liu, Y., Feng, L., Wang, L. (2011):** PCR methods for the rapid detection and identification of four pathogenic *Legionella* spp. and two *Legionella pneumophila* subspecies based on the gene amplification of gyrB, *Appl Microbiol Biotechnol*, 91: 777-787, DOI 10.1007/s00253-011-3283-6
- Zmantar, Tarek; Kouidhi, Bochra; Miladi, Hanene; Mahdouani, Kacem; Bakhrouf, Amina (2010):** A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. In: *The new microbiologica* 33 (2), S. 137–145.

6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)
