

Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit  
Prof. Dr. M. Exner

---

Entwicklung von Oberflächenbesiedlungen unter dem Einfluss verschiedener  
Modellsubstanzen und deren Auswirkung auf die Wasserphase

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften

(Dr.oec.troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 08. November 2005

von

Judith Gerhards

aus

Salzkotten

Referent: Prof. Dr. D. Schoenen

Korreferent: Prof. Dr. J. Krämer

Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

D 98

## **Zusammenfassung:**

### **Entwicklung von Oberflächenbesiedlungen unter dem Einfluss verschiedener Modellsubstanzen und deren Auswirkung auf die Wasserphase**

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher organischer Substanzen auf die Besiedlung einer inerten Oberfläche durch wasserbürtige Mikroorganismen. Dabei sollte der Einfluss einer bestehenden Besiedlung bzw. eines Biofilms auf die Wasserphase aufgezeigt werden. Ein weiterer Aspekt bestand darin, die verschiedenen Strukturen der Besiedlungen bzw. Biofilme miteinander zu vergleichen und anhand der untersuchten Wasserproben ein Kontaminationspotential abzuleiten. Standversuche im Labor und Fließversuche an einem praxisnahen Leitungssystem sollten den Vergleich einer Oberflächenbesiedlung in einem ruhenden System mit einmaligem Nährstoffeintrag mit einer Besiedlung in einem fließenden System unter kontinuierlicher Nährstoff-Zudosierung ermöglichen.

Die Untersuchungen ergaben, dass im stehenden Wasser das Vorhandensein einer hohen Nährstoffkonzentration nicht zwangsläufig zur Ausbildung einer ausgeprägten Oberflächenbesiedlung führt. Die Art des im Wasser befindlichen Nährstoffs ist den Ergebnissen zufolge wichtiger als die Konzentration. Wie schwer eine Voraussage über die mikrobiologische Verwertbarkeit einer Substanz und ein damit verbundenes Wachstumspotential zu treffen ist, zeigten insbesondere die Versuche mit den Stoffen Ligninsulfonsäure und Tween 80. Bei der als schwer abbaubar geltenden Ligninsulfonsäure wurde eine ausgeprägte, bei dem leicht verwertbaren Stoff Tween 80 lediglich eine geringe Oberflächenbesiedlung beobachtet. Darüber hinaus besteht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Besiedlungsdichte auf der Oberfläche und Koloniezahl im Wasser. So wurden bei Tween 80 zum Teil höhere Koloniezahlen festgestellt als bei Ligninsulfonsäure. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Ausmaß einer Besiedlung letztlich nur anhand von Oberflächenuntersuchungen beurteilt werden kann. Im Gegensatz zu den Standversuchen wurden in den Fließversuchen bei allen eingesetzten Substanzen ausgeprägte Besiedlungen beobachtet. Selbst bei der als schwer abbaubar geltenden Ligninsulfonsäure wurde eine deutliche Besiedlung festgestellt. Die rasche Oberflächenbesiedlung bei fließendem Wasser scheint aus der Tatsache zu resultieren, dass Nährstoffe, Mikroorganismen und Oberflächen wesentlich schneller aufeinandertreffen als in einem ruhenden System. Es wurde ein klarer Zusammenhang zwischen Koloniezahl im Wasser und Oberflächenbesiedlung festgestellt. Je ausgeprägter der Biofilm war, desto höher war die Koloniezahl im Wasser. Außerdem wurde festgestellt, dass die Abgabe ganzer Plaques aus einer Besiedlung ab einem bestimmten Zeitpunkt kontinuierlich erfolgt. Größe und Struktur der Plaques lassen Rückschlüsse auf Besiedlungsstruktur und -dichte zu und weisen auf das vorhandene Kontaminationspotential hin. Das Ausmaß einer Kontamination wurde durch die Versuche mit geänderter Fließgeschwindigkeit dokumentiert. Durch eine kurzzeitige Erhöhung der Fließgeschwindigkeit stieg die Koloniezahl in der Wasserphase sprunghaft an. Trotz der hohen Abtragung aus der Besiedlung konnte jedoch keine gravierende Reduktion der Oberflächenbesiedlung festgestellt werden.

Die Beständigkeit ausgeprägter Besiedlungen gegenüber äußeren Einflussfaktoren ist hoch. Das wurde in Reinigungs- und Desinfektionsversuchen mit Wasserstoffperoxid nachgewiesen. Ab einer bestimmten Besiedlungsdicke dringt Wasserstoffperoxid nicht mehr tief genug in die Besiedlung ein und kann somit weder eine Beseitigung noch eine Abtötung vorhandener Mikroorganismen bewirken. Infolgedessen ist die frühzeitige Erkennung einer Besiedlung für eine erfolgreiche Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahme von entscheidender Bedeutung.

## **Abstract:**

### **Surface colonization by microorganisms under the influence of different model substances and its effect on the aqueous phase**

The emphasis of the present work was the investigation of the influence of different organic substances on the colonization of inert surfaces by waterborne microorganisms. Furthermore the release of microorganisms from already colonized surfaces (biofilms) into the water was studied. Another aspect was to compare the different biofilm structures and their potential for contamination from the examined water samples. Laboratory tests in stagnant water (Batch tests) and pilot tests with flowing water in a 21 m <sup>3</sup>/<sub>4</sub> "stainless steel plumbing system were performed to compare surface colonization in a stagnant system with a single nutrient dose at the start to a flow through system with constant nutrient level maintained by continuous dosage.

The experiments showed that a high concentration of nutrients in stagnant water does not necessarily cause a strong surface colonization. The results showed that the *type (kind)* of nutrients is more important than the *concentration*. How difficult it can be to predict the digestibility of a substance and the corresponding growth potential was shown by the tests using lignin-sulphonic acid and Tween 80. While the tests with lignin-sulphonic acid (considered to be not a simply degradable substance) showed a pronounced surface colonization; the tests with Tween 80 (considered to be easily digestible) showed only a slight surface colonization. Furthermore, no distinct correlation between biofilm density and the number of cfu (colony forming units) in the water could be found. E.g. number of cfu were sometimes higher with Tween 80 than with lignin-sulphonic acid. These results show that the extent of a biofilm formation can only be determined through the examination of the surface. In contrast to the results of the tests with stagnant water, the flow tests resulted distinct biofilms with all tested substances. Even lignin-sulphonic acid which was expected to be difficult to degrade produced pronounced biofilms in the tests. The rapid surface colonization in flowing water, seems to result from the fact that the nutrients, microorganisms and surface meet significantly faster and more effective compared to stagnant water. There was a clear correlation between the cfu number in the water and the surface colonization. The more biofilm was formed, the larger was the number of microorganisms in the flowing water. It was also observed that after a certain time, the detachment rate of plaques from a biofilm became constant. The size and structure of the floating plaques allowed to deduce the biofilm structure and density and the potential for contamination. The extent of a contamination was documented with tests at changing flow velocities. A brief rise in the flow velocity caused the number of cfu to rapidly increase. However, the high release from the surface colonization was not found to cause a serious reduction of the biofilm.

The persistence of biofilms against external influences were found to be high. This was demonstrated by cleaning- and disinfectant tests using hydrogen peroxide. Beyond a certain level of biofilm density, hydrogen peroxide is not able to penetrate sufficiently deep into the biofilm and achieve both the elimination and destruction of the microorganisms. Consequently, the timely detection of surface colonization is crucial to allow successful cleaning and disinfection measures.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeine Einführung.....	1
1.2	Biofilm-Entstehung.....	2
1.3	Mikroorganismen in Biofilmen.....	3
1.4	Biofilme im Trinkwasserbereich.....	4
1.5	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	7
1.5.1	Standversuche.....	7
1.5.2	Fließversuche.....	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>9</b>
2.1	Standversuche im Labor.....	9
2.1.1	Versuchsaufbau.....	9
2.1.2	Vorbehandlung der Edelstahlcoupons.....	10
2.1.3	Beprobung der Versuchsansätze.....	10
2.1.4	Mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben.....	10
2.1.5	Koloniezahlberechnung.....	10
2.1.6	Präparation und rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Edelstahlcoupons.....	11
2.2	Fließversuche.....	11
2.2.1	Standort der Testanlage.....	11
2.2.2	Aufbau der Testanlage.....	12
2.2.2.1	Aufbau eines Reaktors.....	13
2.2.3	Reinigung und Betrieb der Testanlage.....	14
2.2.3.1	Mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben.....	15
2.2.3.1.1	Koloniezahlbestimmung.....	15
2.2.3.1.2	Nachweis von <i>Escherichia coli</i> und Coliformen Bakterien.....	15
2.2.3.1.3	Nachweis von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
2.2.4	Fließversuche unter Zudosierung der Modellsubstanzen.....	17
2.2.4.1	Ablauf einer Versuchsreihe.....	17
2.2.4.2	Versuchsreihen.....	17
2.2.4.3	Vorbereitung und Zudosierung der Modellsubstanzen.....	17
2.2.4.4	Entnahme der Wasserproben während der Zudosierungsphase.....	18
2.2.4.5	Entnahme der Wasserproben während der Spülung.....	18
2.2.4.6	Coupon-Entnahme.....	18
2.2.4.7	Mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben.....	18
2.2.4.7.1	Mikroskopische Untersuchung der Wasserproben während der Zudosierung.....	18

2.2.4.8	Mikroskopische Untersuchung der Edelstahlcoupons .....	19
2.2.5	Reinigungs- und Desinfektionsversuche .....	19
2.2.5.1	Versuchsaufbau.....	20
2.2.5.2	Ablauf der Reinigungs- und Desinfektionsversuche .....	20
2.2.5.3	Mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben .....	21
2.2.5.4	Chemische Untersuchung der Wasserproben.....	21
2.2.5.5	Mikroskopische Untersuchung der Edelstahlcoupons .....	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
3.1	Standversuch Nr.1: Oberflächenbesiedlung und Koloniezahleentwicklung in stehendem Wasser mit organischen Substanzen in hohen Konzentrationen.....	22
3.1.1	Oberflächenbesiedlung .....	22
3.1.2	Koloniezahlen im überstehenden Wasser .....	32
3.2	Standversuch Nr.2: Oberflächenbesiedlung und Koloniezahleentwicklung in stehendem Wasser mit organischen Substanzen in geringen Konzentrationen.....	38
3.2.1	Oberflächenbesiedlung .....	38
3.2.2	Koloniezahlen im überstehenden Wasser .....	43
3.3	Mikrobiologische Untersuchungen der Wasserproben während der Einlaufzeit der Testanlage .....	48
3.4	Fließversuch: Oberflächenbesiedlung und Koloniezahleentwicklung in fließendem Wasser mit organischen Substanzen in geringen Konzentrationen.....	49
3.4.1	Rasterelektronenmikroskopische Oberflächenuntersuchung .....	49
3.4.2	Fluoreszenzmikroskopische Oberflächenuntersuchung .....	55
3.4.3	Koloniezahleentwicklung während der Zudosierung .....	58
3.4.4	Koloniezahl in den Wasserproben vor, während und nach der Spülung.....	61
3.4.5	Untersuchung der Wasserproben auf Plaques.....	62
3.4.6	Vergleich unterschiedlicher Besiedlungsstrukturen .....	63
3.5	Reinigungs- und Desinfektionsversuche .....	65
3.5.1	Koloniezahleentwicklung während der Zudosierung .....	66
3.5.2	Koloniezahl während der Spülungen, vor und nach Reinigung und Desinfektion	68
3.5.3	Rasterelektronenmikroskopische Oberflächenuntersuchung vor und nach Reinigung und Desinfektion.....	69
3.5.4	Fluoreszenzmikroskopische Oberflächenuntersuchung vor und nach Reinigung und Desinfektion .....	71
3.5.5	Trübungswerte vor, während und nach den Spülungen .....	73

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>74</b>
4.1	Oberflächenbesiedlung und Koloniezahentwicklung im stehenden Wasser unter dem Einfluss verschiedener organischer Substanzen .....	74
4.1.1	Oberflächenbesiedlung .....	74
4.1.2	Koloniezahentwicklung.....	76
4.2	Oberflächenbesiedlung und Koloniezahentwicklung im fließenden Wasser unter dem Einfluss verschiedener organischer Substanzen .....	77
4.2.1	Oberflächenbesiedlung .....	77
4.2.2	Koloniezahentwicklung.....	77
4.3	Ausbildung morphologisch unterschiedlicher Besiedlungsstrukturen unter dem Einfluss verschiedener organischer Substanzen.....	78
4.4	Vorkommen von Plaques im fließenden Wasser in Gegenwart verschieden strukturierter Besiedlungen .....	79
4.5	Auswirkung einer Fließgeschwindigkeitserhöhung auf verschieden strukturierte Besiedlungen.....	80
4.6	Verteilung lebender und toter Zellen in einer im fließenden Wasser entstandenen Besiedlung.....	81
4.7	Beständigkeit von Besiedlungen unterschiedlicher Dicke gegenüber Reinigung und Desinfektion mit Wasserstoffperoxid .....	82
4.8	Trübung im Wasser in Gegenwart von Besiedlungen unterschiedlicher Dicke vor, während und nach Reinigung und Desinfektion .....	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

d	Tag(e)
°H	Grad deutsche Härte
DVGW	Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
FNU	Formazine Nephelometric Units
h	Stunde(n)
m/sec	Meter pro Sekunde
min	Minute(n)
TOC	Total Organic Carbon
KBE	Koloniebildende Einheit(en)
WTV	Wahnachtalsperrenverband

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung

Biofilme können als Matrix-umschlossene Bakterienpopulationen definiert werden, die aneinander gebunden vorkommen und/oder an Oberflächen oder Grenzflächen anhaften (16). Die Matrix besteht aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), welche von den anhaftenden Mikroorganismen gebildet werden oder aus der Wasserphase stammen. Dabei handelt es sich um Polysaccharide, Proteine, Glycoproteine und andere stark wasserhaltige Substanzen (21), die, bezogen auf die Trockenmasse, 50 bis 90 % der organischen Masse des Biofilms ausmachen (14). Voraussetzung für die Ausbildung eines Biofilms ist das Vorhandensein von Grenzflächen, Mikroorganismen, genügend Feuchtigkeit und Nährstoffen. Die Dicke von Biofilmen kann wenige Mikrometer betragen oder auch mehrere Zentimeter (20).

Die Lebensgemeinschaft im Biofilm bietet den Mikroorganismen viele Vorteile, die sich hauptsächlich aus der Struktur und den Eigenschaften der EPS ergeben. Die EPS haben weit mehr Funktionen als den Zusammenhalt von Bakterien in einer Matrix und auf Oberflächen. EPS sind hydrophil, binden Wasser und schützen den Biofilm vor dem Austrocknen. Sie verleihen auch ursprünglich hydrophoben Oberflächen einen hydrophilen Charakter (20). Die EPS-Schicht wird auch als „Nährstoff-Falle“ bezeichnet (15), da ihre „klebrige“ Oberfläche die Adhäsion von Partikeln aus der Wasserphase erleichtert, die gemeinsam mit Nährstoffen aus dem besetzten Material im Biofilm angereichert werden können (10). Das auf diese Weise entstandene Nährstoff-Depot sichert den Biofilm-Organismen auch unter Nährstofflimitierung ein Überleben. Außerdem bietet die Nährstoffanreicherung im Biofilm solchen Mikroorganismen ein geeignetes Habitat, die mit einem geringeren Angebot aus der Wasserphase nicht überleben bzw. wachsen könnten (20). Die EPS-Matrix ermöglicht die Ausbildung stabiler Mikroorganismen-Aggregate, die sich zu synergistischen Mikrokonsortien entwickeln können. Die hohe Zelldichte und der Austausch zwischen den unterschiedlichen Mikroorganismen ermöglicht z.B. den sequenziellen Abbau von Substanzen, die für eine einzelne Spezies nicht verwertbar wären. Die Mikroorganismen-Vielfalt in der EPS-Matrix begründet sich außerdem durch das Entstehen von Arealen mit unterschiedlicher Sauerstoffkonzentration. Aerobe und anaerobe Habitate können dicht nebeneinander bestehen (22). Die EPS schaffen nicht nur optimale Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen unterschiedlicher Spezies, sondern stellen auch einen physikalischen und chemischen Schutz vor Antibiotika und Bioziden dar. Die EPS-Schicht kann als Diffusionsbarriere fungieren, die ein Eindringen von Desinfektionsmitteln in die Matrix erschwert oder unmöglich macht. Außerdem können biozide Mittel bereits auf der Matrix-Oberfläche gebunden und inaktiviert werden (41).

Biofilme sind ubiquitär und treten auch unter extremen Bedingungen auf. Costeron et al. vertreten die Ansicht, dass der weitaus größte Teil der Mikroorganismen auf der Erde an Oberflächen gebunden lebt – im Boden, in Sedimenten, in Gesteinssporen und auf Schwebstoffen im Wasser (15). Biofilme sind jedoch nicht nur in der natürlichen aquatischen Umwelt anzutreffen, sondern auch in industriellen Systemen, die mit Wasser in Verbindung stehen. Hier findet man häufig ein hohes Nährstoffangebot und große Oberflächen, die geradezu prädestiniert für Besiedlungen und Biofilmbildung sind. Biofilme führen in vielen Bereichen zu Problemen. Ein konkretes Problem ist die bakterielle Besiedlung der wassergekühlten Seite von Wärmeaustauschern. Biofilme bewirken eine Isolierung bzw. eine Abschwächung der Wärmeabgabe. Durch die Isolierung kann die angestrebte Wärmeabgabe-Leistung unter 10% sinken (15). In Rohrleitungen können Biofilme zu einer Erhöhung des Strömungswiderstandes und zu einer Abnahme der maximalen Transportkapazität führen (40). Das Auftreten von Biofilmen hat weitreichende Folgen. Betroffene Geräte oder Leitungen müssen gereinigt oder sogar ausgetauscht werden. Die dabei entstehenden Kosten werden durch die zu berücksichtigenden Ausfallzeiten noch weiter in die Höhe getrieben. Die durch Biofilme entstandenen Probleme haben den Begriff Biological Fouling geprägt. Darunter versteht man die Akkumulation und Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen auf Oberflächen von technischem Gerät, wodurch die Leistung des Gerätes signifikant herabgesetzt oder die Betriebsdauer stark verkürzt wird (12).

## 1.2 Biofilm-Entstehung

Die Entwicklung eines Biofilms verläuft in 3 Phasen, die fließend ineinander übergehen. Die Beseitigung gestaltet sich mit fortschreitender Phase schwieriger. Daher ist die frühzeitige Entdeckung einer Besiedlung von entscheidender Bedeutung, um Abhilfemaßnahmen anzuwenden, die zu einem späteren Zeitpunkt evtl. nicht mehr greifen.

### 1. Induktionsphase

Sobald Oberflächen von Wasser benetzt werden, erfolgt innerhalb weniger Sekunden eine irreversible Adsorption von Makromolekülen. Darunter sind Polysaccharide, Lipopolysaccharide, Huminstoffe und Proteine zu finden (20). Ein sogenannter „Conditioning Film“ entsteht. Mikroorganismen aus der Wasserphase treffen auf diesen Film und lagern sich an. Dieser als Primäradhäsion bekannte Prozess kann zunächst noch reversibel sein. Auf die primäre Adhäsion kann die irreversible Adhäsion folgen. Die Zellen haften auf der Oberfläche fest an und bilden extrazelluläre polymere Substanzen (9). Die Induktionsphase kann innerhalb weniger Stunden ablaufen, jedoch auch Monate bis Jahre dauern. Selten kommt es in dieser Phase schon zu Beeinträchtigungen technischer Systeme. Der Beginn einer Biofilm-Entwicklung stellt jedoch insbesondere für die Wassertechnologie einen wichtigen Handlungszeitraum dar. Kenntnisse über die Faktoren, die die Induktionsphase beeinflussen,

können bei der Verhinderung einer Besiedlung oder der Beseitigung hilfreich sein. Zu den Faktoren gehören Art und Rauigkeit des Oberflächenmaterials, Scherkräfte des Mediums, die Anwesenheit von konditionierenden Makromolekülen, Mikroorganismen und Nährstoffen in der Wasserphase (20).

### 2. Wachstumsphase (logarithmische Akkumulation)

Diese Phase ist vom Wachstum der adsorbierten Mikroorganismen geprägt. Neben dem Wachstum der Primärbesiedler werden weitere Mikroorganismen aus der Wasserphase adsorbiert. Nicht nur das Zellwachstum, sondern auch die Bildung von EPS tragen zum Biofilmaufbau bei. Auf diese Weise entstehen Mikrokonsortien verschiedener Spezies (20). Diese zeichnen sich durch eine Fülle an möglichen Interaktionen innerhalb des Films aus. Die Biofilm-Entwicklung wird in dieser Phase auch von Transportprozessen innerhalb der Matrix bestimmt. Die maßgebenden Einflussfaktoren sind das Nährstoffangebot und die Temperatur (11).

### 3. Plateau-Phase (stationäre Phase)

Die logarithmische Wachstumsphase geht über in eine stationäre Phase, in der die maximale Biofilmdicke erreicht ist und die Zellzahl konstant erscheint. Auf diesem Niveau entspricht die Zunahme durch Wachstum und Adhäsion der Ablösung. Die Höhe des erreichten Plateaus wird im Wesentlichen durch das Nährstoffangebot in der Wasserphase, die physikalische Stabilität des Biofilms und die Scherkräfte bestimmt (20). In den meisten aquatischen Systemen ist die stationäre Phase nach wenigen Wochen erreicht. Beim gezielten Einsatz von Biofilmen in Reaktoren ist die Höhe des Plateaus von entscheidender Bedeutung. Oftmals gilt es dicke Biofilme von 100 - 200  $\mu\text{m}$  zu vermeiden, da sie ab diesen Dicken nicht mehr am Stoffumsatz mit der flüssigen Phase teilnehmen und zum Ablösen neigen. Andererseits gibt es Systeme, die erst ab einer bestimmten Schichtdicke reagieren und funktionieren (20).

## 1.3 Mikroorganismen in Biofilmen

Biofilme können bis zu  $10^{12}$  Zellen/mL enthalten, was einer Gesamtoberfläche von  $3 \text{ m}^2/\text{mL}$  entspricht (11). Dabei ist eine Vielzahl von Mikroorganismen-Arten im Biofilm anzutreffen. Die Wachstumsrate der Organismen hängt von den unmittelbaren Umweltbedingungen des Biofilms ab. Dazu gehören das Nährstoffangebot in der Wasserphase, die Substrateigenschaften der belegten Oberfläche und die Lage innerhalb des Biofilms. Die Lage der Mikroorganismen spielt insofern eine wesentliche Rolle, da beispielsweise der Nährstoff- und Sauerstoffgehalt nicht in allen Kompartimenten des Biofilms gleich ist (8). Weitere Umweltfaktoren wie z.B. Temperatur und Licht üben ebenfalls einen Einfluss auf das Leben und Wachstum im Biofilm aus. Biofilme werden häufig von heterotrophen Bakterien gebildet, was dafür spricht, dass sie genügend Nährstoffe aus dem vorbeifließenden Wasser erhalten. Die

Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen in oligotropher Umgebung besitzen nur anspruchslose Arten, z.B. bestimmte Pseudomonaden (20). Die Effizienz, mit der Bakterien Oberflächen besiedeln und bewachsen scheint begründet durch ihre geringe Größe, hohe Wachstumsraten und ihre Fähigkeit sich an Umweltveränderungen zu adaptieren. Die Produktion von extrazellulären Strukturen und Substanzen (z.B. Fimbrien und EPS) ermöglicht Bakterien die Adsorption an Oberflächen und die Bildung von Aggregaten (8). Zu den häufig nachgewiesenen Bewohnern von Biofilmen gehören Vertreter der Gattungen Pseudomonas, Alcaligenes, Acinetobacter, Arthrobacter, Bacillus, Flavobacterium, Moraxella usw. Ferner konnten auch verschiedene filamentöse Pilze nachgewiesen werden (21).

#### 1.4 Biofilme im Trinkwasserbereich

Biofilme spielen im Trinkwasserbereich eine ambivalente Rolle. Sie sind in ihrer Wirkung als „biologischer Filter“ ein entscheidender und bewährter Bestandteil der Aufbereitungstechnik. Sie bestehen aus gemischten Mikroorganismen-Populationen, vorwiegend Bakterien, die dem Wasser gelöste, biologisch abbaubare Inhaltsstoffe entnehmen. Die Mikroorganismen mineralisieren die Inhaltsstoffe und bilden lokal immobilisierte Biomasse, die durch Rückspülung entfernt werden kann (36). Neben diesem gezielten Einsatz treten Biofilme auch unkontrolliert auf und können an bestimmten Stellen der Trinkwasserspeicherung und Trinkwasserverteilung zu Problemen führen (36). Insbesondere das Verteilungsnetz bietet ein großes, von Mikroorganismen besiedeltes Oberflächenareal. Schwartz et al. gehen davon aus, dass sich 95% der Biomasse im Verteilungsnetz an den Wänden befindet (36). In Tabelle 1 sind Probleme aufgeführt, die durch Biofilme in Trinkwassersystemen auftreten können.

Tabelle 1 Probleme durch Biofilme in Trinkwassersystemen (36)

Kontamination des Trinkwassers <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhte Koloniezahlen</li> <li>• Freisetzung fakultativ pathogener Keime</li> <li>• Schlechtere Eignung als Brauchwasser: geringere Haltbarkeit von Endprodukten der Pharma-, Kosmetik-, Farben-, Lebensmittelindustrie usw.</li> </ul>
Ästhetik <ul style="list-style-type: none"> <li>• „Schleimbart“</li> <li>• Geschmack und Geruch (Stoffwechselprodukte, Reaktionsprodukte von Desinfektionsmitteln)</li> </ul>
Desinfektion <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhte Zehrung durch Biofilmkomponenten</li> <li>• Erhöhte Toleranz/Resistenz durch Biofilm-Organismen</li> </ul>
Mikrobiell beeinflusste Korrosion (MIC)

Die Besiedlung einer Materialoberfläche hängt entscheidend vom Nährstoffangebot ab. Mineralien und organische Substanzen werden von Mikroorganismen zum Wachstum benötigt und gelten daher als wachstumslimitierend (34). Zu den natürlichen organischen



Wasserinhaltsstoffen (NOM = natural organic matters) gehören u.a. Huminstoffe, Polysaccharide, Proteine und niedermolekulare Säuren (26). In das Wasser eingetragene Nährstoffe können beispielsweise aus Werkstoffen stammen, die organische Bestandteile enthalten. Insbesondere im Trinkwasserbereich können dadurch Probleme auftreten. Baustoffe und Auskleidungsmaterialien, mit denen das Wasser in Kontakt kommt, können den bakteriellen Aufwuchs auf der Oberfläche fördern und zu einer Verschlechterung der Wasserqualität führen (18, 33). Die im Trinkwasserbereich einzusetzenden Materialien sollten daher nicht nur auf ihre physiologische Unbedenklichkeit untersucht werden, sondern auch auf ihre Zusammensetzung hin, bakterielles Wachstum zu fördern. Das DVGW-Arbeitsblatt W 270 (2) beschreibt ein Verfahren zur Prüfung und Bewertung von Werkstoffen für den Trinkwasserbereich. Sofern Werkstoffe organische Bestandteile enthalten, ist eine Prüfung nach diesem Arbeitsblatt erforderlich. Tabelle 2 zeigt weitere Eintragspfade von Nährstoffen in Trinkwassersysteme (34).

Tabelle 2      Mögliche Eintragspfade für Nährstoffe in Trinkwassersysteme (34)

1. Rohrbrüche
2. Reparaturarbeiten
3. Kontaminiertes Fremdwasser
4. Rückfluss von kontaminiertem Wasser
5. Luft, die in Reinwasserbehälter strömt
6. Werkstoffe
7. Reinigungsmittel für Reinwasserbehälter
8. Regenerationsmittel für Brunnen
9. Bohrspüladditive
10. Wasserinhaltsstoffe, die bereits bei der Gewinnung oder nach abgeschlossener Aufbereitung ins Verteilungsnetz gelangen

Eine Kontamination des Trinkwassers kann durch Abgabe von Mikroorganismen aus einem Biofilm in die Wasserphase erfolgen (30). Die mikrobiellen Gemeinschaften in der Trinkwasseraufbereitung und im Verteilungsnetz bestehen überwiegend aus oligotrophen Bakterien (36). Dabei kann es sich um unspezifische, für den Menschen ungefährliche Mikroorganismen handeln. Als problematisch ist jedoch die Ansiedlung von Arten anzusehen, die eine hygienische Relevanz haben und zur Vermehrung im Verteilungsnetz fähig sind (35). Die Vermehrung und unkontrollierte Abgabe dieser, zum Teil fakultativ-pathogenen Bakterien, stellt für den Menschen eine besondere Gefahr dar. Die Koloniezahlbestimmung liefert einen ersten Hinweis auf eine Kontamination des Wassers. Eine Koloniezahlerhöhung im Wasser wird bei routinemäßig durchgeführten Untersuchungen festgestellt. Nach Trinkwasserverordnung (4) darf eine Koloniezahl von 100/mL nicht überschritten werden. Nach abgeschlossener Desinfektion soll die Koloniezahl 20/mL nicht übersteigen. Werden diese Werte überschritten, müssen sofort Abhilfemaßnahmen eingeleitet werden. Dabei ist es

wichtig zu wissen, auf welchem Wege die Mikroorganismen in das Wasser gelangt sind. Es gibt zwei unterschiedliche Ursachen für eine Koloniezahlerhöhung. Entweder werden die Mikroorganismen auf dem Transportwege von außen in das Wasser eingetragen (z.B. durch Rohrbrüche, Einspeisung von kontaminiertem Fremdwasser usw.) oder sie wachsen im Wasser im Verteilungsnetz heran (34). Im letzten Fall kann man von einer Besiedlung der Materialoberfläche ausgehen, die in einen Aufwuchs übergehen kann. Durch die Abgabe von Mikroorganismen aus dem Aufwuchs bzw. Biofilm kommt es zur Aufkeimung bzw. Koloniezahlerhöhung im Wasser. Auch wenn bei einer erhöhten Koloniezahl eine Seuchengefahr ausgeschlossen wird, kann diese doch ungünstige Auswirkungen in verschiedenen Bereichen haben. So kommt es beispielsweise in der Lebensmittelindustrie immer wieder zu einem vorzeitigen Verderb von Lebensmitteln durch die Verwendung von kontaminiertem Wasser bei der Zubereitung (34, 42). Dass aus einer vorhandenen Besiedlung bzw. einem Biofilm Mikroorganismen an die Wasserphase abgegeben werden, ist ein bekanntes Problem. Es besteht allerdings Klärungsbedarf, ob die Besiedlungsdichte mit der Zell-Abgabe korreliert und ab welcher Besiedlungsstärke ganze Plaques an das Wasser abgegeben werden.

Der Einsatz von Desinfektionsmitteln kann sich aus verschiedenen Gründen schwierig gestalten. Das verwendete Desinfektionsmittel kann z.B. mit dem Trägermaterial des Biofilms, mit Biofilmkomponenten, partikulären Stoffen und anderen organischen und anorganischen Materialien, die in einem Verteilungsnetz präsent sind, reagieren und dadurch in seiner Desinfektionswirkung abgeschwächt werden (27). Selbst wenn Desinfektionsmittel nicht gebunden werden, ist es für die bioziden Substanzen oftmals schwer, die dicke, stark hydratisierte Biofilm-Matrix zu durchdringen (15). Die Schutzwirkung eines Biofilms gegenüber Desinfektionsmitteln zeigt sich insbesondere anhand der Ergebnisse von Exner et al. (19). Sie fanden Biofilme an den Innenflächen von Desinfektionsmittel-Rohrleitungen. Untersuchungen über die Wirksamkeit von Bioziden beziehen sich in der Regel auf suspendierte Mikroorganismen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich nur eingeschränkt auf Biofilm-Organismen projizieren, da der Schutz der EPS-Schicht nicht berücksichtigt wird. Chen und Stewart verglichen die Wirkung von Chlor und Monochloramin auf Biofilme (13). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Monochloramin und freies Chlor bei einer Chlor-Konzentration von 5 – 100 mg/L zu einer Reduzierung des Biofilms führten. Während die entfernte Biofilm-Menge bei beiden Stoffen ungefähr gleich war, konnte festgestellt werden, dass die bakterielle Abtötungsrate im Film durch Monochloramin höher war als durch reines Chlor. Grobe et al. verglichen die Wirkung von Wasserstoffperoxid und Chlor auf Bakterienalginat. Bakterienalginat besteht aus Exopolysacchariden, die in Schleimkapseln mucoider Bakterienstämme und in EPS-Schichten von Biofilmen zu finden sind. Das verwendete Wasserstoffperoxid reagierte nicht mit den Exopolysacchariden und konnte somit seine Wirkung

entfalten. Chlor hingegen reagierte mit dem Bakterienalginat unter rascher Chlorzehrung (23). Versuche von Blanchard et al. zeigten, dass sich der Einsatz von Wasserstoffperoxid in einem fließenden System auf die Biofilm-Bakterien auswirkt. Dabei blieb jedoch unbeantwortet, ob das Wasserstoffperoxid die Biofilm-Matrix auflockert, für Scherkräfte angreifbar macht und Biofilm abgeschwemmt wird, oder ob durch das Wasserstoffperoxid ein oxidativer Zellschaden verursacht wird, der die Zahl der lebenden Bakterien im Biofilm reduziert (5). Letztendlich zeigen alle angeführten Studien, dass die Desinfektion und Beseitigung von Biofilmen zahlreiche Probleme aufwirft, die nur durch weitergehende Untersuchungen gelöst werden können.

## **1.5 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit**

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher organischer Substanzen auf die Besiedlung einer inerten Oberfläche durch wasserbürtige Mikroorganismen. Dabei war sowohl die Besiedlungsgeschwindigkeit als auch die erreichte Besiedlungsdicke in einer definierten Zeit von Interesse. Ferner sollte der Einfluss einer bestehenden Besiedlung bzw. eines Biofilms auf die Wasserphase aufgezeigt werden. Vor diesem Hintergrund bestand ein weiterer Aspekt darin, die verschiedenen Strukturen der Besiedlungen bzw. Biofilme miteinander zu vergleichen und anhand der untersuchten Wasserproben ein Kontaminationspotential abzuleiten. Standversuche im Labor und Fließversuche an einem praxisnahen Leitungssystem sollten den Vergleich einer Oberflächenbesiedlung in einem ruhenden System mit einmaligem Nährstoffeintrag mit einer Besiedlung in einem fließenden System unter kontinuierlicher Nährstoff-Zudosierung ermöglichen.

### **1.5.1 Standversuche**

In den Standversuchen wurden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, die beispielhaft für organische Wasserinhaltsstoffe stehen. Ligninsulfonsäure wurde als Modellsubstanz für Huminstoffe ausgewählt. Dieser Stoffklasse kommt besondere Bedeutung zu, da 50 – 80% der organischen Wasserinhaltsstoffe aus Huminstoffen bestehen (39). Zudem gelten sie als mikrobiologisch schwer verwertbar, da der enzymatische Abbau dieser hochmolekularen Stoffe nur sehr langsam vonstatten geht (28). Weitere Modellsubstanzen waren Natriumacetat und Glucose, die beide mikrobiologisch leicht abbaubar sind und häufig in Versuchsansätzen als Nährsubstrat Anwendung finden (24, 28). Das Polysorbat Tween 80 wurde als 4. Modellsbstanz ausgewählt. In diesem Fall wurde ebenfalls von einer guten Verwertbarkeit ausgegangen, da die enthaltenen organischen Säuren bestimmten Mikroorganismen als Nährsubstrat dienen können (32).

### **1.5.2 Fließversuche (Testanlage)**

In den Fließversuchen wurde Natriumacetat als mikrobiologisch leicht verwertbare Substanz eingesetzt und Ligninsulfonsäure als mikrobiologisch schwer abbaubar geltende. Neben den unter 1.5 erwähnten Untersuchungszielen war bei den Fließversuchen von besonderem Interesse, ab welcher Schichtdicke ganze Plaques aus einem Biofilm an die Wasserphase abgegeben werden. Spülungen bzw. kurzzeitige Erhöhungen der Fließgeschwindigkeit sollten die Auswirkung erhöhter Scherkräfte auf verschieden strukturierte Biofilme dokumentieren. Darüber hinaus war die Koloniezahleentwicklung in der Wasserphase von Interesse. Mit einer speziellen Färbemethode sollte außerdem die Verteilung lebender und toter Mikroorganismen im Biofilm untersucht werden.

Die Beständigkeit gegenüber Reinigung und Desinfektion wurde an unterschiedlich starken Biofilmen untersucht. Dafür wurden Reinigungs- und Desinfektionsversuche nach Vorgabe des DVGW-Arbeitsblattes W-291 (3) durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Standversuche im Labor

#### 2.1.1 Versuchsaufbau

Für die Standversuche wurden sterile 1-L-Gefäße aus Klarglas mit Deckel verwendet. Das in den Versuchen eingesetzte Leitungswasser war ein Mischwasser aus Grund- und Oberflächenwasser. Auszüge einer chemischen Analyse des Leitungswassers sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die ausgewählten Modellsubstanzen sowie die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Edelstahlcoupons für die Oberflächenuntersuchungen wurden nach der unter 2.1.2 beschriebenen Methode präpariert und anschließend sterilisiert. Die Glasgefäße wurden mit je 1 Liter Leitungswasser gefüllt und die abgewogenen Modellsubstanzen in das Wasser eingemischt. Auf dem Grund eines jeden Gefäßes wurden 5 Edelstahlcoupons mit einer sterilen Pinzette positioniert. Als Kontrolle diente ein Gefäß mit Leitungswasser und Coupons, jedoch ohne Zusatz organischer Substanz. Um das Eindringen von Schmutz und Staub zu verhindern, wurden die Ansätze mit einem Glasverschluss abgedeckt und zum Schutz vor Tageslicht mit blauer Folie abgedunkelt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Tabelle 3 Wasserinhaltsstoffe (Untersuchung der chemischen Abteilung des Institutes für Hygiene und Öffentliche Gesundheit)

Anionen	Menge (mg/L)	Kationen	Menge (mg/L)
Cl <sup>-</sup>	29,7	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<0,03
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	44	Ca <sup>2+</sup>	38,1
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	< 0,03	Fe <sup>2+ / 3+</sup>	< 0,03
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<0,02	Mg <sup>2+</sup>	7,3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25,6		

Der gemessene TOC-Wert (total organic carbon) des Leitungswassers betrug 1,9 mg/L. Des Weiteren wurde ein pH-Wert von 7,7, eine Karbonathärte von 3,9°dH und eine Nichtkarbonathärte von 3,1°dH festgestellt.

Tabelle 4 Einwaagen der in den Standversuchen verwendeten Substanzen

Substanz	1. Standversuch Einwaagen in mg/L	2. Standversuch Einwaagen in mg/L
D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck, 1.08342.1000)	50, 100, 300, 500	1 und 5
Natriumacetat-Trihydrat (Merck, 1.06265.5000)	Nicht verwendet	1 und 5
Ligninsulfonsäure (Natriumsalz) (Roth, Art. 8999.1)	50, 100, 300, 500	1 und 5
Tween®80 (Polysorbat) (Merck, 8.17061.1000)	1 und 100	nicht verwendet

### **2.1.2 Vorbehandlung der Edelstahlcoupons**

Die Coupons wurden aus V2A-Edelstahlplatten gestanzt. Da der Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit, z.B. tiefe Riefen, weitestgehend ausgeschlossen werden sollte, wurden die Coupons mit Nassschleifpapier (Matador; Siliciumcarbid, wasserfest, 991 A SOFTFLEX ) unterschiedlicher Körnung (P1000 und P1200) glatt geschliffen. Letzte Unebenheiten wurden mit Hilfe eines Scheuermittels (Haushaltsreiniger) und einer Schleifpaste (3M Deutschland GmbH; PERFECT-IT™09374) manuell beseitigt. Abschließend wurden die Coupons mit Wasser abgespült und mit Aceton (Merck; 1.00014.) abgerieben, um Schleif- und Scheuermittelreste zu entfernen.

### **2.1.3 Beprobung der Versuchsansätze**

Aus den Versuchsansätzen wurden mit einer Pipette (Eppendorf; variabel 100-1000 mL) Wasserproben direkt nach dem Einlegen der Coupons sowie nach 8, 14 und 28 Tagen Inkubation entnommen. Zeitgleich erfolgte bei jeder Beprobung die Entnahme eines Edelstahlcoupons mit einer sterilen Pinzette. Im 2. Standversuch wurde die Untersuchung des Wassers und der Coupons auf drei Probenahmen beschränkt, die zu Beginn des Versuchs sowie nach 8 und 21 Wochen Standzeit durchgeführt wurden. Nach jeder Probenahme wurden die Versuchsansätze sofort wieder abgedeckt und weiterhin abgedunkelt inkubiert.

### **2.1.4 Mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben**

Zur Bestimmung der relativ rasch wachsenden und mesophilen Bakterien wurden die Proben im Plattengussverfahren mit DEV-Agar (Merck; 1.10685.) angesetzt (25). Da mit einer hohen Bakterienzahl zu rechnen war, wurden die Proben mit physiologischer Kochsalz-Lösung (0,9%) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Je 1 mL der unverdünnten Proben und der dazugehörigen Verdünnungsstufen wurden im Doppelansatz in DEV-Agar (47°C) eingegossen und bei  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sowie bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  für 48 h inkubiert. Neben dieser Methode kam das nährstoffarme Medium R2A (Difco; 218263) zum Einsatz, um Wasserbakterien zu bestimmen, die an ein nährstoffarmes Milieu adaptiert sind und auf einem Vollmedium evtl. nicht wachsen würden (31). Bei dieser Methode, die ebenfalls im Doppelansatz erfolgte, wurde 0,1 mL Probe auf das R2A-Medium pipettiert, mit einem sterilen Drigalski-Spatel ausplattiert und über 5 Tage bei  $11^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und bei  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Auswertung der bebrüteten Platten ist unter 2.1.5 beschrieben.

### **2.1.5 Koloniezahlberechnung**

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die ausgebildeten Kolonien unter einem Binokular (Leica, Wild M8) bei 9-facher Vergrößerung ausgezählt. Zur Berechnung der KBE/mL diente das arithmetische Mittel, welches nach folgender Formel ermittelt wurde:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n X_i \cdot d$$

$\bar{X}$  = arithmetischer Mittelwert

$X_i$  = Anzahl der KBE/mL

$n$  = Anzahl der ausgewerteten Platten

$d$  = Verdünnungsfaktor

### 2.1.6 Präparation und rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Edelstahl-coupons

Die Coupons wurden für die Rasterelektronenmikroskopie in mehreren Schritten aufbereitet. Die chemische Fixierung und anschließende Trocknung der Präparate gewährleistet eine lange Haltbarkeit und macht eine elektronenmikroskopische Betrachtung der vorhandenen Oberflächenbesiedlung erst möglich. Um ein vorzeitiges Austrocknen des evtl. vorhandenen Biofilms zu vermeiden, wurden die Coupons nach der Entnahme direkt in die erste Fixierlösung getaucht. Die einzelnen Aufbereitungsschritte wurden wie folgt durchgeführt:

1. Fixierung des organischen Materials auf den Coupons durch Einlegen in Glutardialdehyd (25%, Merck; 1.04239.) für 2 h
2. Überführung der Proben in 0,2%ige Osmiumtetroxid-Lösung (Plano; R1022) für mind. 5 h
3. Einlegen der Coupons in Cacodylat-Puffer für 30 min, Herstellung des Puffers aus Cacodylsäure Natriumsalz-Trihydrat (CNT) (Merck; 1.03256.) und Natriumhydroxid (NaOH) (Merck; 642 C 605298)
4. Dreimaliges Waschen mit partikelfreiem Wasser für je 5 min, um Reste der Chemikalien abzuschwemmen
5. Herstellung von Ethanol-Lösungen: 10%, 20%, 30%...100% (Ethanol absolut, Merck; 1.00983.). Beginnend mit der höchsten Verdünnung (10%) wurden die Präparate zur Trocknung für je 10 min in die Lösungen mit aufsteigender Ethanol-Konzentration getaucht.

Im Anschluss an diese Präparationsschritte wurde die Oberfläche der Coupons mit einer Goldschicht bedampft, um die Leitfähigkeit des organischen Belags zu erhöhen. Dieses Verfahren wurde in einem Sputter (BAL-TEC; SCD 005) durchgeführt. Die Coupons wurden dafür mit einem Spezialklebstoff (Leit-C; Neubauer) auf Träger fixiert und im Sputter beschichtet. Die Untersuchung der präparierten Coupons erfolgte unter dem Rasterelektronenmikroskop (Leitz; AMR 1600T) mit digitaler Bildbearbeitung (Digital Image Processing System Version 2.3.2.2.).

## 2.2 Fließversuche

### 2.2.1 Standort der Testanlage

Die Versuche wurden an einer Testanlage durchgeführt, die in einem Grundwasserwerk errichtet wurde. Dieser Standort eignete sich insbesondere wegen des nährstoffarmen

Grundwassers für die Versuche, da ausgewählte Modellsubstanzen in das Wasser eingebracht werden sollten. Eine ursprünglich hohe Nährstoffkonzentration hätte einen Rückschluss von der Koloniezahleentwicklung in der Wasserphase und der Oberflächenbesiedlung auf das Nährstoffpotential des eingesetzten Stoffes erschwert. Das Grundwasser eignete sich auch aus mikrobiologischer Sicht, da für die Versuche ein mikrobiologisch unbelastetes Wasser benötigt wurde. Tabelle 5 liefert Informationen über die Beschaffenheit des Grundwassers.

Tabelle 5 Analyse der Grundwasserbeschaffenheit (Chemisches Labor des WTV)

Parameter	Einheit	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sep.	Okt.	Nov.	Dez.
Temperatur	°C	11,1	11,1	11,3	11,3	11,5	11,4	11,5	11,4	11,3	11,5	11,3	11,2
Trübung	FNU	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sauerstoff	mg/L	3,4	3,4	3,9	2,9	5,2	6,1	6	6,3	5,3	3,4	5,5	4
PH		6,62	6,59	6,64	6,66	6,59	6,62	6,56	6,59	6,58	6,6	6,6	6,59
Leitfähigkeit	mS/m	41,2	41	41,2	36,2	42,7	43,8	44,4	43,6	42,7	41,3	40,7	37,6
TOC	mg/L	0,5	0,7	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7	0,3	0,4	0,3	0,4
Chlorid	mg/L	29	27	27	25	28	28	29	28	30	28	28	27
Sulfat	mg/L	47	48	45	37	47	49	49	44	45	44	43	38
Nitrat	mg/L	25	26	25	21	29	31	32	32	31	31	29	24
Nitrit	mg/L	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ammonium	mg/L	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Calcium	mg/L	42,1	43,8	43,1	36	44,8	47,9	48,2	47,3	44,9	43,5	43,3	38,6
Magnesium	mg/L	8,9	9,1	9,1	7,8	9,5	10,1	10,1	9,8	9,5	9,2	9,3	8,5
Eisen ges.	mg/L	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Gesamthärte	°dH	8	8,2	8,1	6,8	8,5	9	9,1	8,9	8,5	8,2	8,2	7,4
KBE 20°C	1/mL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KBE 36°C	1/mL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Colif. Bakt.	1/100 mL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### 2.2.2 Aufbau der Testanlage

Die Anlage besteht aus 3 identischen V2A-Edelstahl-Rohrstrecken, wovon jede 21,3 m lang ist und in Serpentinaen verläuft (Bild 1). Der Rohrrinnendurchmesser beträgt 2,4 cm. Die 3 Leitungen werden über einen Zulauf mit Grundwasser versorgt, welches von unten nach oben durch die Leitungen strömt. Die Fließgeschwindigkeit in jeder Leitung wird über Kugelhähne reguliert und kann an eingebauten Wasseruhren abgelesen werden. An 2 der 3 Leitungen sind Magnet-Membrandosierpumpen angeschlossen, über die dem durchfließenden Wasser organische Substanzen oder Desinfektionsmittel zugesetzt werden können (Bild 2). Die Anschlussstelle für die Dosierpumpen befindet sich direkt am Anfang der Leitungen. Hinter den Dosierstellen sind kleine Mischbleche für eine gleichmäßige Verteilung der zudosierten Stoffe in die Rohre geschweißt. Die 3. Leitung, an der keine Dosiervorrichtung angebracht ist, fungierte während der Versuchsdurchgänge als Kontrolle. Jede



Leitung endet mit einem Reaktoraufsatz, in den 10 Edelstahlcoupons eingesetzt werden können. Eine genaue Beschreibung des Reaktor-Aufbaus erfolgt unter 2.2.2.1. Für die Entnahme von Wasserproben wurden Zapfhähne direkt vor den Reaktoraufsätzen in die Leitungen eingebaut. Über einen Zapfhahn am Zulaufrohr der 3 Testleitungen ist die Beprobung des zufließenden Grundwassers möglich.



**Bild 1** Übersicht Testanlage

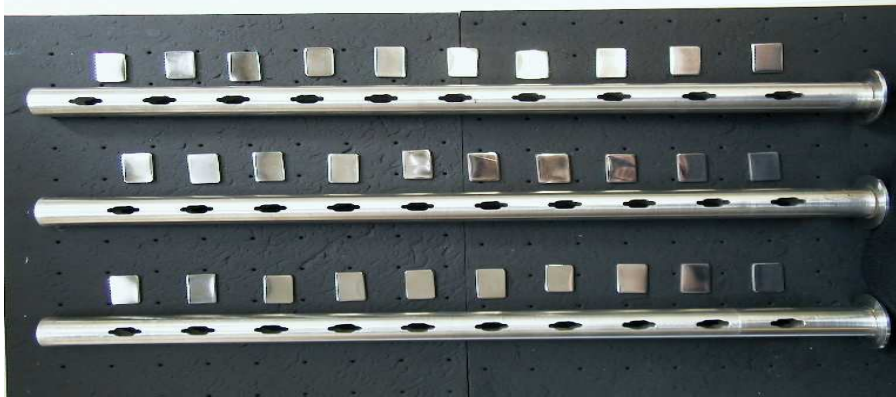


**Bild 2** Testanlage mit Dosier-Apparatur

### 2.2.2.1 Aufbau eines Reaktors

Der Reaktor ist ein teleskopartiges Rohr-in-Rohr-System, das 40 cm lang ist und aus 2 ineinander geschobenen Edelstahlrohren besteht. In das innere Rohr sind 2 cm lange längsgerichtete Schlitzte gefräst, in die 3 cm<sup>2</sup> große Edelstahlcoupons eingesetzt werden (Bild 3). Dieses mit 10 Coupons ausgestattete Rohr wird in ein um wenige mm Durchmesser größeres Edelstahlrohr (gleicher Durchmesser wie die Rohre der übrigen Teststrecke) geschoben, welches ein seitliches Herausgleiten der Coupons verhindert. Die eingefrästeten Schlitzte sind an beiden Enden so weit verjüngt, dass die Coupons genau in die Enden passen und beim Herausziehen den Schlitzrand nur minimal berühren. Somit wird gewährleistet, dass eine vorhandene Oberflächenbesiedlung im mittleren Coupon-Bereich nicht abgestreift wird. Der Reaktor ist über eine Verschraubung mit dem Ende der Teststrecke

verbunden. Für eine Entnahme kann der Reaktor problemlos abgeschraubt, das Innenrohr herausgezogen und der Coupon entnommen werden.



**Bild 3** Innenrohre der endständigen Reaktoren mit Coupons



**Bild 4** aufgesetzter Reaktor



**Bild 5** geöffneter Reaktor

### 2.2.3 Reinigung und Betrieb der Testanlage

Die Testanlage wurde direkt nach Fertigstellung in Betrieb genommen. Da durch den Zusammenbau der Anlage mit Verschmutzungen im Inneren der Rohre, z.B. durch Schneideöle und Staub, gerechnet werden musste, wurden die Leitungen über 1h lang mit Grundwasser gespült. Die Fließgeschwindigkeit des Wassers während der Spülung betrug 0,73 m/sec. Um einen Reinigungseffekt dokumentieren zu können, wurden während der Spülung die ersten Wasserproben genommen. An den Testleitungen erfolgte die Wasserentnahme am Ende jeder Leitung direkt vor dem Reaktoraufsatz. Das zufließende Grundwasser wurde über eine Entnahmemarmatur am Zulaufrohr der 3 Leitungen beprobt. Die 1. Probenahme wurde direkt zu Beginn der Spülung vorgenommen. Weitere Entnahmen folgten nach 10 min und nach 60 min. Im Anschluss daran wurde die Fließgeschwindigkeit von 0,73 m/sec auf 0,37 m/sec gesenkt. Diese Fließgeschwindigkeit wurde über den gesamten Versuchszeitraum beibehal-

ten und lediglich für spezielle Spülversuche kurzzeitig geändert. Als Probengefäße dienten sterile helle Glasflaschen mit 250 mL Volumen. Vor der Probenahme wurden die Hähne mehrmals voll geöffnet und wieder geschlossen, um evtl. vorhandene Schmutzpartikel auszuspülen. Anschließend wurden die Auslauföffnungen rotglühend abgeflammt, um anhaftende Mikroorganismen abzutöten. Vor der Probenahme wurden die Hähne voll geöffnet und 5 min betrieben. Dann wurden pro Entnahmestelle 3 Proben abgefüllt. Dabei wurden die Flaschen zu 4/5 gefüllt, um den Inhalt vor dem Ansetzen gut durchmischen zu können. Die Anlage wurde 15 Monate mit Grundwasser durchflossen. Während dieser Zeit erfolgte durchschnittlich 2 mal pro Woche eine Probenahme, um die mikrobiologische Stabilität der Testanlage zu überwachen.

### **2.2.3.1 Mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben**

#### **2.2.3.1.1 Koloniezahlbestimmung**

Die Bestimmung der Koloniezahl in den Wasserproben erfolgte nach Trinkwasserverordnung (4). Als Koloniezahl wurde die Zahl der bei 9-facher Lupenvergrößerung sichtbaren Kolonien definiert, die sich aus den in 1 mL Wasserprobe befindlichen Bakterien in Plattengusskulturen mit DEV-Agar bei einer Inkubationstemperatur von  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  nach  $44 \pm 4$  h gebildet hatten. Nach 4-monatigem Betrieb der Anlage wurden die entnommenen Wasserproben zusätzlich mit R2A-Medium untersucht. 0,1 mL der unverdünnten Probe wurde auf das R2A-Medium pipettiert und mit einem sterilen Drigalski-Spatel ausplattiert und für 5 Tage bei  $11^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und bei  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Berechnung der Koloniezahl erfolgte bei beiden Nährmedien anhand der unter 2.1.5 angegebenen Formel.

#### **2.2.3.1.2 Nachweis von *Escherichia coli* und Coliformen Bakterien**

Neben der Koloniezahlbestimmung wurden die Wasserproben auch speziell auf das Vorhandensein von *Escherichia coli* (*E.coli*) und Coliformen Bakterien untersucht. Das Auftreten dieser Bakterien im Grundwasser ist normalerweise nicht üblich. Eine Kontamination der Testanlage durch den Einsatz von verschmutztem Material oder Werkzeug beim Bau konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde gemäß Trinkwasserverordnung der Nachweis von *E. coli* und Coliformen Bakterien in 100 mL Probe geführt (4). Dafür wurden 100 mL Probe in konzentrierte Laktose-Bouillon (in einer Endkonzentration von 1% Laktose) gebracht und bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  für minimal  $24 \pm 4$  h, wenn negativ für maximal  $44 \pm 4$  h inkubiert. Konnte eine Säure- und Gasbildung festgestellt werden, wurden von der verdächtigen Bouillon Sub- bzw. Reinkulturen auf Endo-Agar (Laktose-Fuchsin-Sulfit-Agar) angelegt. Bei Wachstum verdächtiger Kolonien auf diesem Medium nach  $24 \pm 4$  h, wurden diese zur weiteren Abklärung in einer „Bunten Reihe“ untersucht. Dabei werden die Bakterien auf verschiedene Stoffwechselmerkmale untersucht, die für *E. coli* bzw. Coliforme

Bakterien typisch sind. Dazu gehören die Oxidase-Reaktion, Indolbildung aus Tryptophan, Spaltung von Laktose unter Gas- und Säurebildung bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , Spaltung von Dextrose unter Gas- und Säurebildung bei  $44^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und die Verwertung von Citrat als einzige Kohlenstoffquelle. Ergibt die „Bunte Reihe“ als Ergebnis Coliforme Bakterien, so können diese mit Hilfe eines Api-Streifens (Api 20E, Biomerieux; 20100) weiter differenziert werden. Diese Teststreifen ermöglichen die Identifizierung von Bakterien anhand standardisierter und miniaturisierter Stoffwechselreaktionen und einer speziellen Datenbasis. Um die Identifizierung von Bakterien verdächtiger Bouillons zu beschleunigen, wurde CC-Agar (Chromocult-Coliformen-Agar) angewandt. Dieses Medium ist nicht in der Trinkwasserverordnung (4) vorgeschrieben, ermöglicht aber durch eine Farbreaktion die Unterscheidung von *E.coli* und Coliformen Bakterien.

#### **2.2.3.1.3 Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa***

Abschließend wurden die Wasserproben auf *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Die Untersuchung sollte sicherstellen, dass eine Kontamination der Testanlage bei Bau und Inbetriebnahme nicht stattgefunden hat. *Pseudomonas aeruginosa* ist ein wasserhygienisch relevantes, fakultativ-pathogenes Bakterium (23). *Pseudomonas aeruginosa* vermehrt sich u.a. in Wasserleitungs-, Wasseraufbereitungs- und Vorratssystemen (32) und wird oftmals für die Generierung von Biofilmen verwendet (24). Eine Kontamination und evtl. Oberflächenbesiedlung im Anlagensystem hätten vor Beginn der Zudosierungsversuche aufwendige Reinigungsmaßnahmen erfordert. Der Ansatz der Wasserproben erfolgte gemäß der DIN 19643 „Aufbereitung und Desinfektion von Schwimm- und Badebeckenwasser“ (1). Nach diesem Verfahren wurden 100 mL des zu untersuchenden Wassers zu 50 mL konzentrierter Malachit-Pepton-Bouillon gegeben. Die beimpfte Bouillon wurde für  $44 \pm 4$  h bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Probe wurde als verdächtig gewertet, wenn die Bouillon trüb wurde und/oder eine Kahlhaut aufwies. In diesem Fall erfolgte das Herstellen von Reinkulturen auf einer Cetrimid-Nährbodenplatte (selektiv für *Pseudomonas aeruginosa*), die  $24 \pm 4$  Stunden bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  bebrütet wurde. Die auf dem Cetrimid-Nährboden gewachsenen Kolonien wurden weiter differenziert, indem sie mit Cytochromoxidase-Reagenz betropft wurden. Eine blau-violette Verfärbung wurde als positive Reaktion gewertet. Im weiteren Verlauf erfolgte ein Ausstrich der positiven Kolonien auf King F(Fluorescein)- und King P(Pyocyanin)-Nährboden, die  $44 \pm 4$  h bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  bebrütet wurden. Fielen die Ansätze negativ aus, konnte *Pseudomonas aeruginosa* ausgeschlossen werden. Bei Bildung von Pyocyanin (Blaufärbung des Nährmediums) war der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* erbracht. Bei Bildung von Fluorescein wurde die verdächtige Kultur mit Hilfe von Acetamid-Bouillon weiter differenziert. Diese auf Ammoniak-Bildung basierende Untersuchungsmethode gab Aufschluss darüber, ob es sich evtl. um einen apyocyanogenen *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm handelt.

## **2.2.4 Fließversuche unter Zudosierung ausgewählter Modellsubstanzen**

### **2.2.4.1 Ablauf einer Versuchsreihe**

Nach dem Einsetzen von jeweils 10 Edelstahlcoupons (Vorbereitung der Coupons unter 2.1.2) in die endständigen Reaktoren einer jeden Leitung erfolgte die Zudosierung über einen Zeitraum von 6 Wochen. Der Austausch der Vorratsgefäße, aus denen die Dosierpumpen gespeist wurden, sowie die Beprobung der Versuchsleitungen erfolgte 2 mal pro Woche. Das Vorgehen bei der Probenahme ist unter 2.2.3 beschrieben. Nach 2, 3, 5 und 6 Wochen wurden je 2 Coupons für eine Oberflächenuntersuchung entnommen. Nach der 4. Entnahme wurde eine Spülung durchgeführt. Für die Spülung wurde die Fließgeschwindigkeit für 1 min von ca. 0,37 m/sec auf 0,73 m/sec erhöht. In dieser Zeit wurden nacheinander Wasserproben genommen, um festzustellen, ob die Fließgeschwindigkeitserhöhung zu einem Ablösen der Oberflächenbesiedlung führt. Als Probengefäße dienten während der Spülung helle sterile Flaschen mit einem Volumen von 1000 mL. Abschließend erfolgte eine letzte Coupon-Entnahme. Der Vergleich der vor und nach der Spülung entnommenen Coupons sollte die Auswirkung der Spülung dokumentieren.

### **2.2.4.2 Versuchsreihen**

1. Zudosierung von Ligninsulfonsäure mit einer Endkonzentration im Testwasser von 1,0 mg/L über 6 Wochen. Stopp der Zudosierung und Durchführung einer Spülung.
2. Zudosierung von Natriumacetat und Ligninsulfonsäure mit einer Endkonzentration im Testwasser von 0,5 mg/L über 6 Wochen. Stopp der Zudosierung und Durchführung einer Spülung.

Nach Abschluss jeder Versuchsreihe wurden die Leitungen, in dessen Wasser organisches Material dosiert wurde, gereinigt. Dafür wurde Wasserstoffperoxid (30%, Merck; 8.22287.) unverdünnt über Dosierpumpen eingeleitet und nach 24 h Einwirkzeit wieder ausgespült. Dabei wurde solange gespült, bis kein Wasserstoffperoxid anhand eines Teststreifens (Test Peroxydes, Merck; 1.10011.) im ablaufenden Wasser mehr nachweisbar war. Die Effektivität der Reinigung wurde anhand der unter 2.2.3.1 beschriebenen Untersuchungen von Wasserproben aus den behandelten Leitungen überprüft.

### **2.2.4.3 Vorbereitung und Zudosierung der Modellsubstanzen**

Mit Hilfe der Magnet-Membrandosierpumpen wurden definierte Volumina der ausgewählten Substanzen (Natriumacetat und Ligninsulfonsäure) in die Teststrecken eingeleitet. Die Zudosierung erfolgte kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der Versuchsreihen. Lediglich für die Entnahme der Wasserproben und der Edelstahlcoupons sowie für den Wechsel des Vorratsbehälters wurden die Pumpen kurzzeitig ausgeschaltet. Die organi-

schen Substanzen wurden im Labor abgewogen und in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Diese Konzentrate wurden autoklaviert und zur Testanlage transportiert. Dort wurden sie in gereinigten und sterilisierten Vorratsbehältern mit Grundwasser auf 10 Liter aufgefüllt und den Testleitungen zudosiert. Die Sterilität der Ausgangsmaterialien sollte das Auftreten einer Fremdkontamination der Teststrecken weitestgehend ausschließen. Eine Aufkeimung in der Wasserphase bzw. eine Oberflächenbesiedlung sollte nur durch die autochthone Grundwasser-Flora erfolgen. Der Austausch der Vorratsbehälter erfolgte 2 mal pro Woche.

#### **2.2.4.4 Entnahme der Wasserproben während der Zudosierungsphase**

2 mal pro Woche wurden je 3 Wasserproben an beiden Testleitungen, der Kontrollleitung sowie am Zulauf genommen. Das Vorgehen bei der Entnahme ist unter 2.2.3 erläutert.

#### **2.2.4.5 Entnahme der Wasserproben während der Spülung**

Die Leitungen wurden nacheinander gespült. Dafür wurde die Durchflussgeschwindigkeit verdoppelt (von 0,37 m/sec auf 0,73 m/sec). Während der 1-minütigen Spülung wurden nacheinander 6 Wasserproben ( $\emptyset$  750 mL pro Probe) genommen. Während dieser Zeit wurde das Wasser in den Leitungen ungefähr 2 mal komplett ausgetauscht. Nach der Spülung wurde die Durchflussgeschwindigkeit wieder auf 0,37 m/sec reduziert.

#### **2.2.4.6 Coupon-Entnahme**

Für die Entnahme wurde die Wasserzufuhr über einen Kugelhahn gestoppt und der Reaktoraufsatz vom Leitungsende abgeschraubt. Somit war es möglich das Innenrohr herauszuziehen und zwei Coupons zu entnehmen. Die Coupons wurden mit Hilfe einer Pinzette in zwei sterile Plastikgefäße überführt. Die Gefäße wurden direkt verschlossen, um ein Austrocknen der evtl. vorhandenen Oberflächenbesiedlung auf dem Weg zum Labor zu vermeiden. Nach der Entnahme wurden die Rohre des Reaktors wieder zusammengeschieben und mit der Leitung verschraubt. Der Wasserzulauf wurde wieder geöffnet und die Durchflussgeschwindigkeit sehr langsam auf die normale Geschwindigkeit von 0,37 m/sec erhöht.

#### **2.2.4.7 Mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben**

Alle Wasserproben, die während der Zudosierung und den Spülungen genommen wurden, wurden nach den unter 2.2.3.1 beschriebenen Methoden untersucht und ausgewertet.

##### **2.2.4.7.1 Mikroskopische Untersuchung der Wasserproben während der Zudosierung**

Um den Zeitpunkt des Auftretens von aus einer Oberflächenbesiedlung gelösten Plaques bestimmen zu können, wurden definierte Volumina (10 -100 mL) der Wasserproben über einen schwarzen Polycarbonatfilter filtriert und direkt auf dem Filter LIVE/DEAD-gefärbt. Der

LIVE/DEAD-Farbstoff (MoBiTec; L-7012 LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit) besteht aus 2 Komponenten, SYTO<sup>®</sup> 9 und Propidiumiodid, die tote und lebende Bakterienzellen sichtbar machen (6). Beide Komponenten wurden vor Gebrauch nach Herstellerangaben gemischt und direkt verwendet. 0,5 mL dieses Farbgemischs wurden auf das Filtrat aufgebracht. Nach 15 min Einwirkzeit an einem dunklen Ort wurde die Färbelösung abfiltriert und das Filtrat mit 10 mL partikelfreiem Wasser gespült, um überschüssige Farbstoffreste zu entfernen. Das Filter wurde anschließend in eine sterile Petrischale überführt und im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Filter wurde auf einen Objektträger gelegt, mit einem zum Färbe-Set gehörendem Öl überschichtet und mit einem Deckglas eingedeckt. Die Auswertung der Präparate erfolgte unter dem Fluoreszenz-Lichtmikroskop (Leitz; Dialux 20) bei 1000-facher Vergrößerung. Im mikroskopischen Bild erscheinen tote Zellen rot und lebende grün. Die mit einer Kamera (Hitachi; HV-20A 3CCD) aufgenommenen Bilder wurden direkt an einem angeschlossenen Computer digital bearbeitet (DISKUS Version 4.20.34) und gespeichert. Es wurde mit Fluoreszenzfiltern N2 (530-560/580 nm; Artikel 513609) und I2/3 (450-490/510/ nm; Artikel 613604) sowie einem Durchlichtfilter A (Artikel 513596) gearbeitet.

#### **2.2.4.8 Mikroskopische Untersuchung der Edelstahlcoupons**

Bei jedem Entnahme-Termin wurden den Reaktoren jeweils 2 Coupons entnommen. Davon wurde 1 Coupon rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Präparation der Coupons ist unter 2.1.6 beschrieben. Der 2. Coupon wurde einer LIVE/DEAD-Färbung unterzogen, die unter einer Sterilbank vorgenommen wurde. Für die Färbung wurde das gleiche Kit verwendet wie für die Färbung der Wasserproben-Filtrate (siehe 2.2.4.7.1). Das Mischungsverhältnis beider Komponenten war ebenfalls identisch. Die Oberfläche des Coupons wurde zunächst vorsichtig mit partikelfreiem Wasser abgespült, um lose Bestandteile zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die Färbelösung direkt auf die Oberfläche aufgetragen. Nach 15-minütiger Einwirkzeit an einem abgedunkelten Ort wurde die überschüssige Färbelösung abgespült. Das fertige Präparat wurde mit einem zum Färbe-Set gehörendem Öl überschichtet und mit einem Deckglas eingedeckt. Die Untersuchung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (siehe 2.2.4.7.1).

#### **2.2.5 Reinigungs- und Desinfektionsversuche**

Die Reinigungs- und Desinfektionsversuche wurden nach Vorgaben des DVGW-Arbeitsblattes W 291 (3) durchgeführt. In diesem Arbeitsblatt werden verschiedene Maßnahmen zur Reinigung und Desinfektion empfohlen, die auch kombiniert angewendet werden können. Der erste Schritt zur Beseitigung einer Kontamination sollte jedoch in jedem Fall eine Reinigung sein. Die Reinigung kann mechanisch und/oder chemisch erfolgen. Die Desinfektion ist als zusätzliche Sicherheitsmaßnahme zu sehen, wenn mit Reinigungs-



verfahren keine einwandfreie mikrobiologische Wasserbeschaffenheit erzielt werden kann. An der Testanlage, an der auch die unter 2.2.4 erläuterten Versuche stattfanden, wurde eine mechanische Reinigung in Verbindung mit einer Desinfektion angewandt. Die mechanische Reinigung bestand in der Durchführung von Spülungen. Dabei wurde auf den Einsatz von Reinigungsmitteln verzichtet, da Reinigungsmittelreste das Wachstum von Mikroorganismen im Wasser fördern können. Für den Erfolg einer Spülung ist eine ausreichende Fließgeschwindigkeit von 2 bis 3 m/sec wesentlich. Die maximal erreichbare Fließgeschwindigkeit in der Testanlage beträgt jedoch nur 0,73 m/sec. Diese Tatsache machte die Kombination der Spülungen mit einer Desinfektion notwendig. Als Desinfektionsmittel wurde Wasserstoffperoxid ( 30%, Merck; 8.22287.) eingesetzt, welches in der Praxis bei der Desinfektion von Rohrleitungen und Behältern Anwendung findet. Für die an der Testanlage durchgeführte Desinfektion wurde das statische Verfahren gewählt. Während beim dynamischen Verfahren ein Pfropfen Desinfektionsmittellösung durch den vollständig gefüllten Leitungsabschnitt bewegt wird, verbleibt bei der statischen Methode die Desinfektionsmittellösung für mindestens 12 h in der Leitung.

#### **2.2.5.1 Versuchsaufbau**

Für die Reinigungs- und Desinfektionsversuche wurden Edelstahlcoupons wie unter 2.1.2 beschrieben vorbehandelt, sterilisiert und in die am Ende der Leitungen befindlichen Reaktoren eingesetzt. Die Fließgeschwindigkeit des Wassers betrug 0,37 m/sec. Durch Zudosierung von Natriumacetat in das fließende Wasser von 2 Testleitungen wurden innerhalb von 3 Wochen Oberflächenbesiedlungen generiert. Die 3. Leitung fungierte als Kontrolle. Um unterschiedlich starke Besiedlungen zu generieren, wurde dem Wasser der einen Leitung soviel Natriumacetat zudosiert, dass die Endkonzentration im Testwasser 0,05 mg/L betrug und im Testwasser der 2. Leitung 0,5 mg/L. Die Vorbereitung der für die Zudosierung bestimmten Konzentrate ist unter 2.2.4.3 beschrieben. Während der Zudosierungsphase wurden 2 mal pro Woche Wasserproben genommen. Die Vorgehensweise bei der Probenahme ist unter 2.2.3 erläutert.

#### **2.2.5.2 Ablauf der Reinigungs- und Desinfektionsversuche**

Vor Beginn der Versuche wurden allen Testleitungen Wasserproben und Coupons entnommen. Die Entnahme der Coupons ist unter 2.2.4.6 beschrieben. Nach der Probenahme erfolgte die Spülung aller 3 Leitungen, indem die Durchflussgeschwindigkeit von 0,37 m/sec auf 0,73 m/sec für ca. 1 min verdoppelt wurde. Bei der erhöhten Durchflussgeschwindigkeit wurden die Leitungen in 1 min ungefähr 2 mal komplett durchströmt. Während der Spülung wurden nacheinander 6 Wasserproben genommen. Anschließend erfolgte die Desinfektion. Dafür wurde Wasserstoffperoxid mit einer Endkonzentration von 150 mg/L in die Testleitungen dosiert und nach 24-stündiger Einwirkzeit mit hoher Fließgeschwindigkeit (0,73



m/sec) wieder ausgespült. Nach dem Ausspülen wurde die Fließgeschwindigkeit wieder um die Hälfte reduziert. Diese wurde für 1 h beibehalten. Eine im Anschluss daran durchgeführte Spülung, in deren Verlauf wieder 6 Wasserproben genommen wurden, sollte das Ergebnis der Reinigung und Desinfektion dokumentieren. Die Entnahme der Wasserproben während der Spülungen erfolgte auf die gleiche Weise wie unter 2.2.4.5.

### **2.2.5.3 Mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben**

Die mikrobiologische Untersuchung der Wasserproben, die während der Zudosierung und der Spülungen genommen wurden, erfolgte wie unter 2.2.3.1.

### **2.2.5.4 Chemische Untersuchung der Wasserproben**

In den vor, während und nach den Spülungen genommenen Wasserproben wurde die Trübung gemessen. Die Messung erfolgte mit Küvetten in einem Trübungsmessgerät.

### **2.2.5.5 Mikroskopische Untersuchung der Edelstahlcoupons**

Bei jeder Probenahme wurden jeweils 2 Coupons entnommen. Davon wurde 1 Coupon rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Präparation der Coupons ist unter 2.1.6 beschrieben. Der 2. Coupon wurde einer LIVE/DEAD-Färbung unterzogen und mit Hilfe eines Fluoreszenz-Lichtmikroskops betrachtet. Die LIVE/DEAD-Färbung der Coupons ist unter 2.2.4.8 erläutert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Standversuch Nr.1:

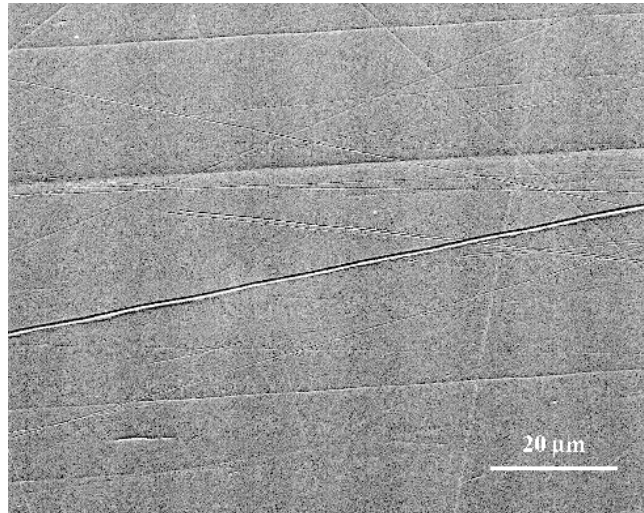
##### **Oberflächenbesiedlung und Koloniezahleentwicklung in stehendem Wasser mit organischen Substanzen in hohen Konzentrationen**

Für den Versuch wurden 50, 100, 300 und 500 mg/L Ligninsulfonsäure, 50, 100, 300 und 500 mg/L Glucose sowie 100 mg/L und 1.000 mg/L Tween 80 in je 1 Liter Leitungswasser gelöst und in Glasgefäßen bei Raumtemperatur ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Als Kontrolle diente 1 Liter Leitungswasser ohne Zusatz. Auf dem Boden der Gefäße wurden Edelstahlcoupons für die Untersuchungen der Oberflächenbesiedlung platziert. Zum Schutz vor Tageslicht wurden die Glasgefäße mit blauer Folie abgedunkelt. Die Koloniezahlbestimmung im überstehenden Wasser erfolgte mit DEV-Agar und R2A-Medium direkt nach dem Einmischen der organischen Substanzen sowie nach 8, 14, 21 und 28 Tagen. Zeitgleich erfolgte eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Oberflächenbesiedlung anhand der in den Ansätzen befindlichen Edelstahlcoupons.

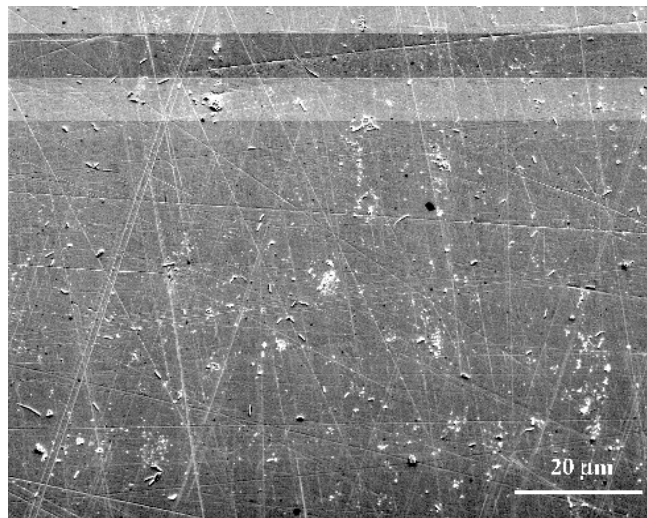
##### **3.1.1 Oberflächenbesiedlung**

Die auf den Edelstahlcoupons gefundene Besiedlung ließ sich in 6 verschiedene Kategorien einteilen. Die Kategorien werden in den Bildern 6a bis 6f veranschaulicht:

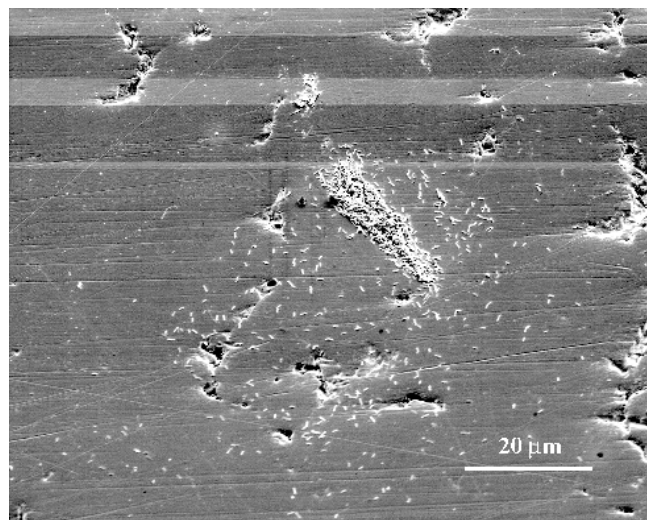
- Kategorie 1: Keine Besiedlung erkennbar (Bild 6a).
- Kategorie 2: Sehr geringe Besiedlung, bei der Bakterien vereinzelt auf der Couponoberfläche vorliegen (Bild 6b).
- Kategorie 3: Geringe Besiedlung, bei der Bakterien überwiegend vereinzelt auf der Oberfläche zu erkennen sind und stellenweise in Clustern zusammenliegen (Bild 6c).
- Kategorie 4: Mäßige Besiedlung, bei der die Oberfläche von einer einschichtigen Besiedlung überzogen ist, die stellenweise von mehrschichtigen Bereichen überdeckt wird (Bild 6d).
- Kategorie 5: Deutliche Besiedlung, bei der ein- und mehrschichtige Beläge etwa 50 % der Materialoberfläche überziehen. Übergang von Besiedlung zu Aufwuchs ist erkennbar (Bild 6e).
- Kategorie 6: Starke Besiedlung, bei der ein mehrschichtiger Aufwuchs zu erkennen ist (Bild 6f).



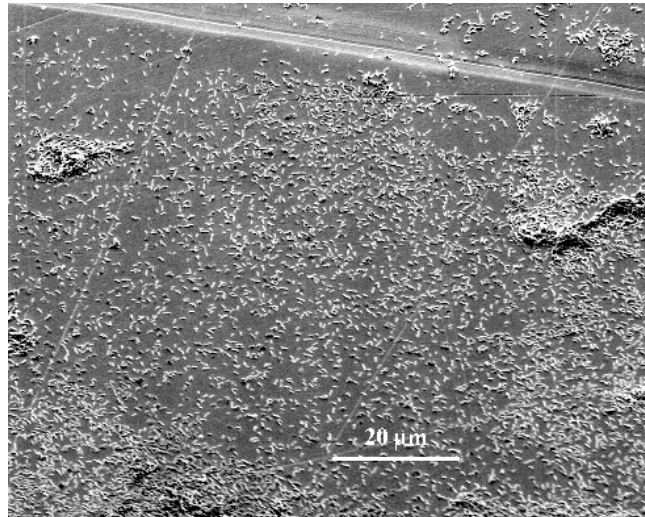
**Bild 6a** Kategorie 1: Keine Besiedlung



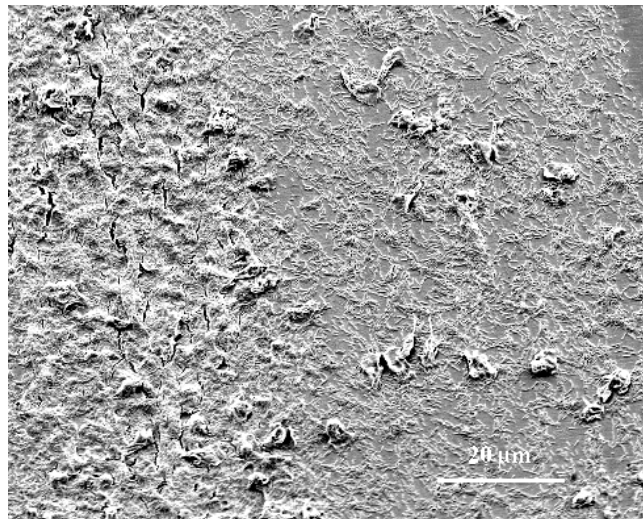
**Bild 6b** Kategorie 2: Sehr geringe Besiedlung



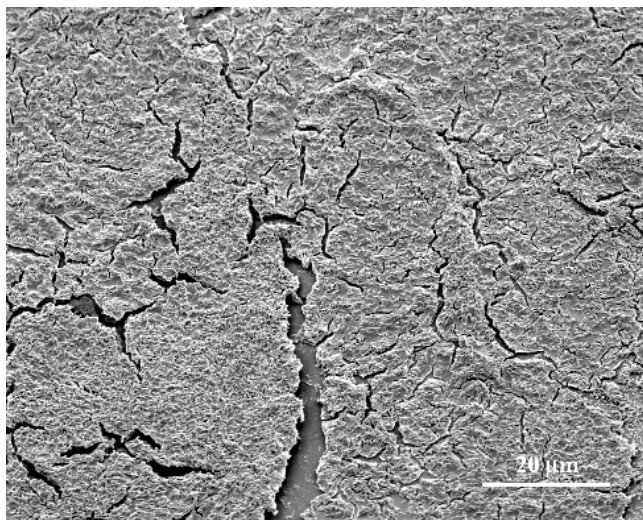
**Bild 6c** Kategorie 3: Geringe Besiedlung



**Bild 6d** Kategorie 4: Mäßige Besiedlung



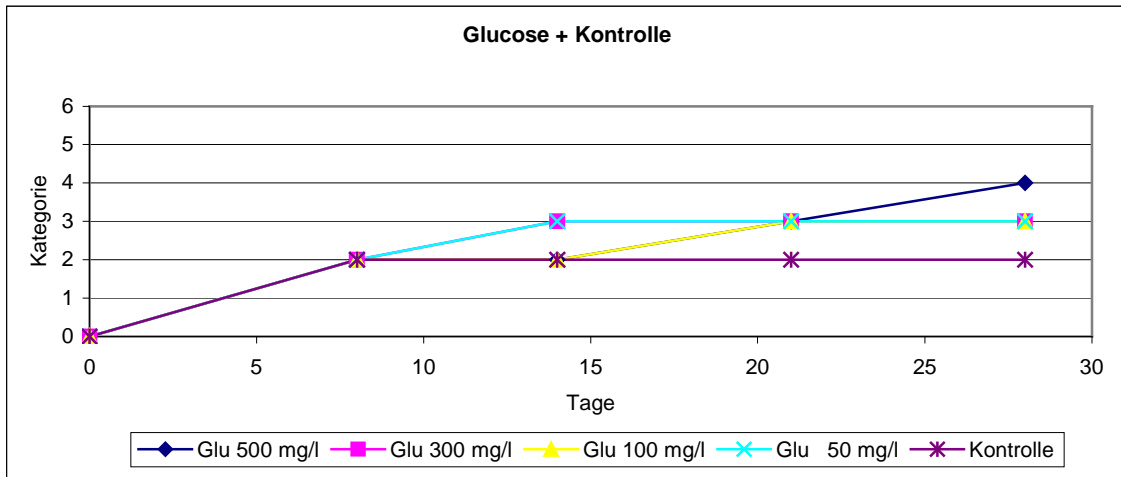
**Bild 6e** Kategorie 5: Deutliche Besiedlung



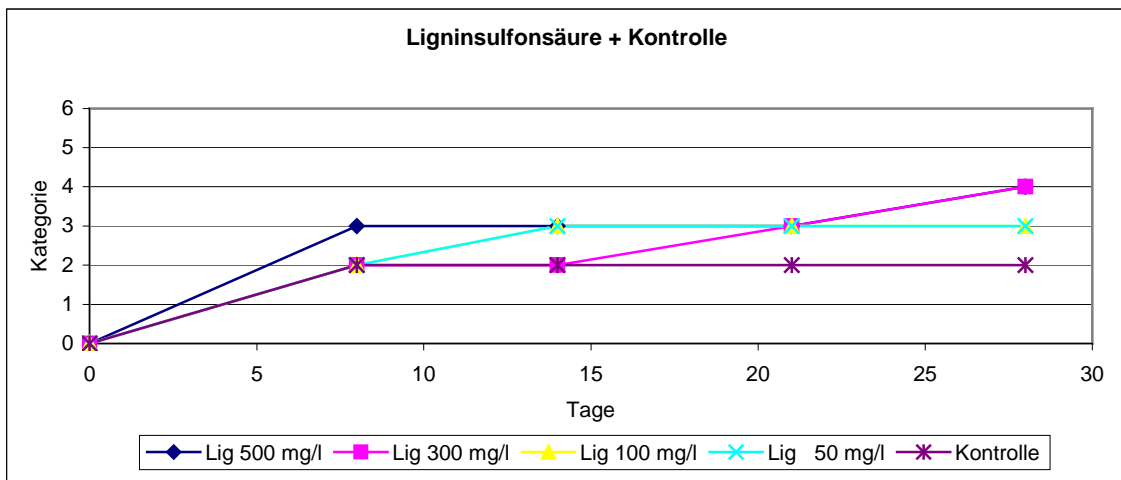
**Bild 6f** Kategorie 6: Starke Besiedlung

Die Besiedlungsentwicklung in den Ansätzen mit organischer Substanz im Vergleich zum Kontrollansatz ist in den Bildern 7a bis c grafisch dargestellt. Die Verbindungslinien zwischen den Punkten dienen dabei der leichteren Zuordnung und Bewertung. Um eine Vorstellung von der Besiedlung nach 28 Tagen bei den verschiedenen Ansätzen zu geben, sind diese Aufnahmen in den Bildern 8 bis 11 wiedergegeben.

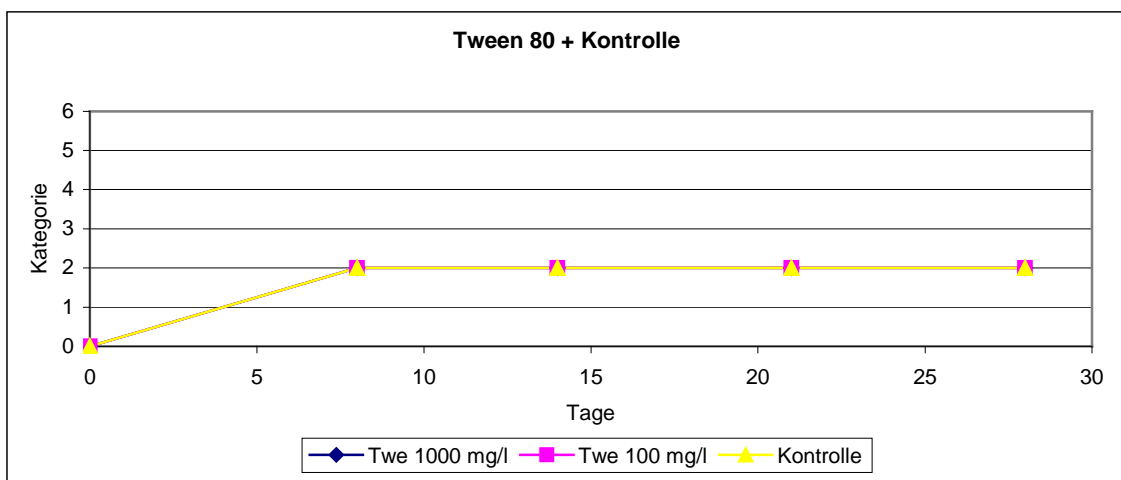
Bei allen Ansätzen lag bereits nach 8 Tagen eine Besiedlung der Kategorie 2 vor, nur bei 500 mg/L Ligninsulfonsäure wurde die Kategorie 3 gefunden. Mit Ausnahme des Kontrollansatzes und der Ansätze mit Tween 80 nahm die Besiedlungsdichte im weiteren Versuchsverlauf zu. Auf dem Coupon des Kontrollansatzes entsprach die Besiedlungsdichte zu jedem Untersuchungszeitpunkt der Kategorie 2. Auch in den Ansätzen mit Tween 80 entsprachen die Besiedlungen zum Ende des Versuchs immer noch der Kategorie 2. Bei den Ansätzen mit 300 und 500 mg/L Ligninsulfonsäure und 500 mg/L Glucose wurden nach 28 Tagen die höchsten Besiedlungsdichten beobachtet, die der Kategorie 4 entsprachen.



**Bild 7a** Zeitliche Entwicklung der Oberflächenbesiedlung bei den 1-Liter-Standversuchen mit 50, 100, 300 und 500 mg/L Glucose (Glu)

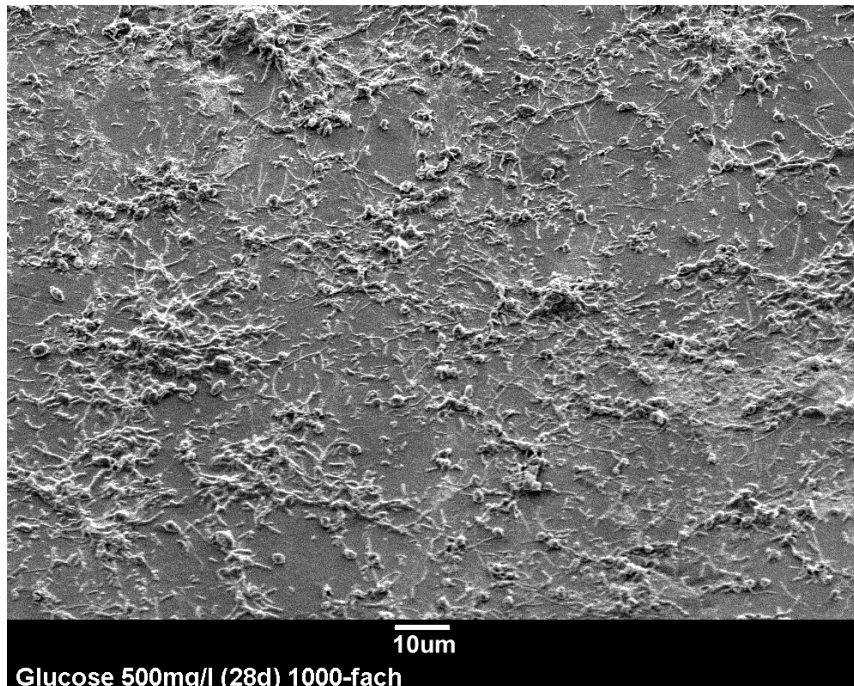


**Bild 7b** Zeitliche Entwicklung der Oberflächenbesiedlung bei den 1-Liter-Standversuchen mit 50, 100, 300 und 500 mg/L Ligninsulfonsäure (Lig)



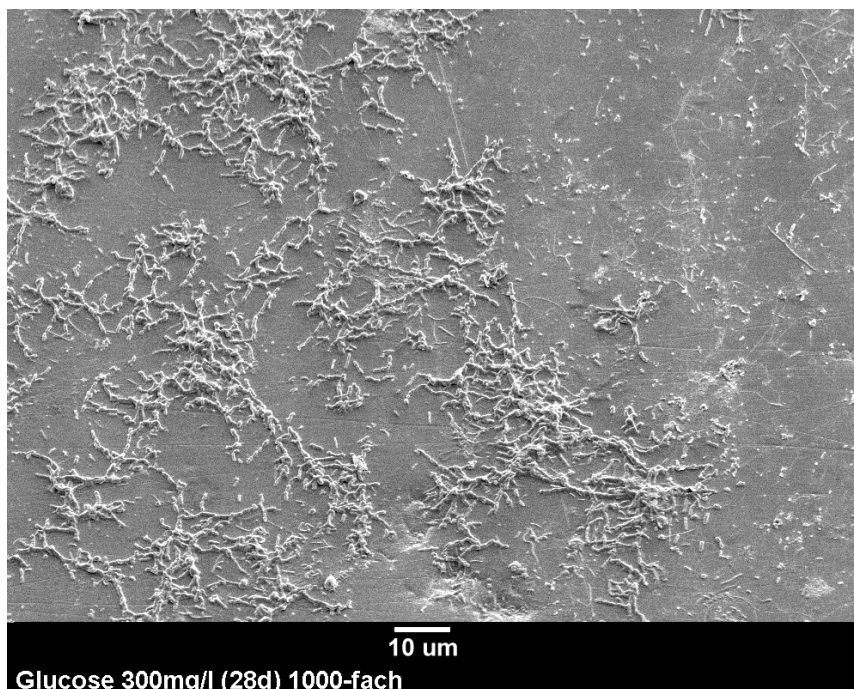
**Bild 7c** Zeitliche Entwicklung der Oberflächenbesiedlung bei den 1-Liter-Standversuchen mit 100 und 1.000 mg/L Tween 80 (Twe)

Die folgenden Aufnahmen zeigen die Oberflächenbesiedlung in den 10 Ansätzen sowie der Kontrolle nach 28 Tagen.



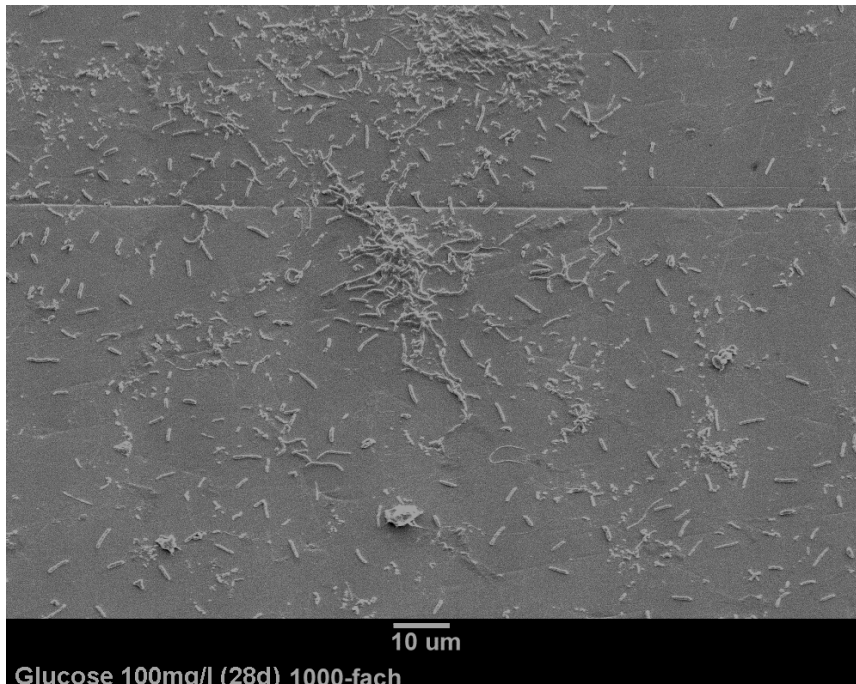
**Glucose 500mg/l (28d) 1000-fach**

**Bild 8a** 500 mg/L Glucose nach 28 Tagen  
(Kategorie 4)

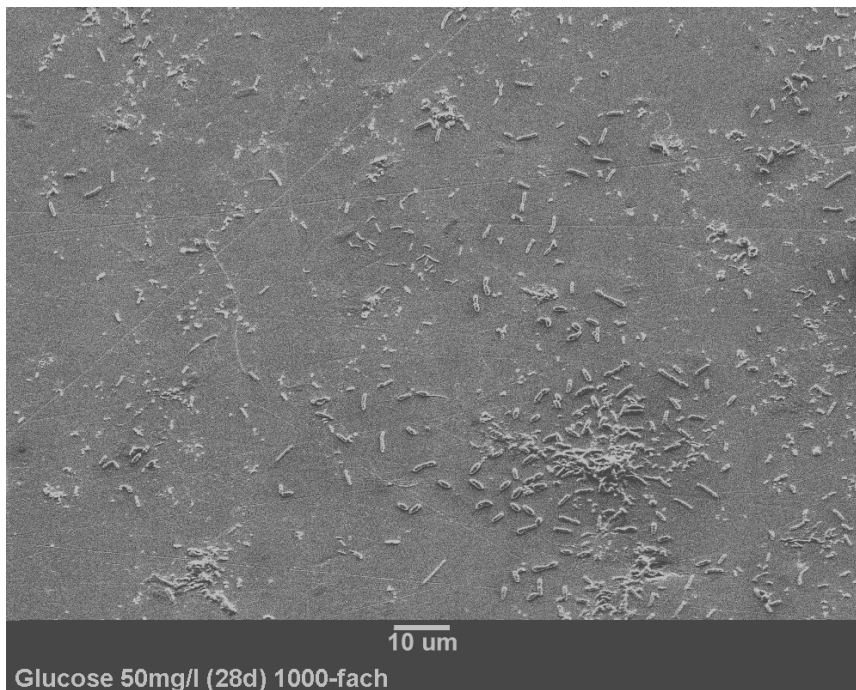


**Glucose 300mg/l (28d) 1000-fach**

**Bild 8b** 300 mg/L Glucose nach 28 Tagen  
(Kategorie 3)

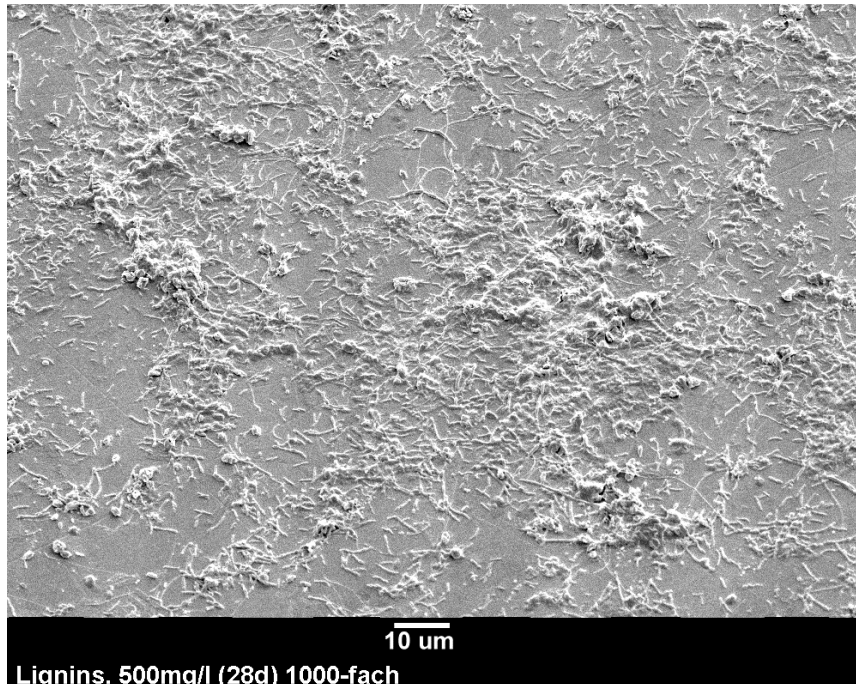


**Bild 8c** 100 mg/L Glucose nach 28 Tagen  
(Kategorie 3)

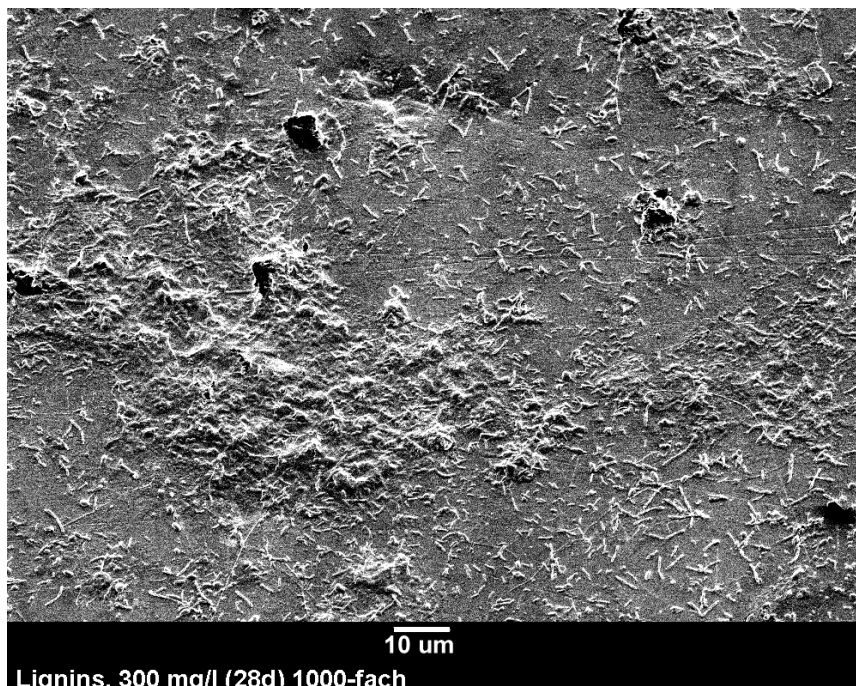


**Bild 8d** 50 mg/L Glucose nach 28 Tagen  
(Kategorie 3)

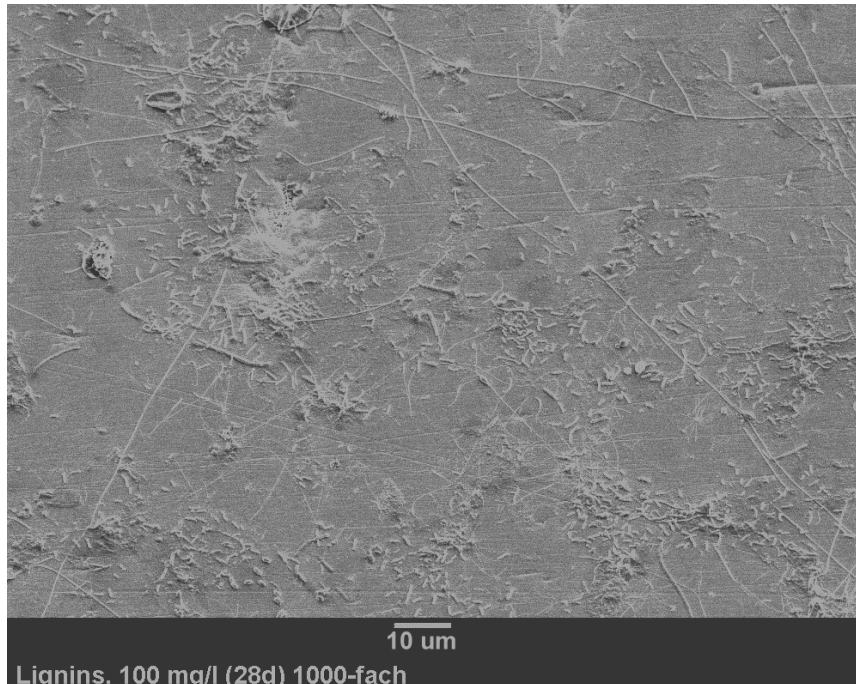




**Lignins. 500mg/l (28d) 1000-fach**  
**Bild 9a** 500 mg/L Ligninsulfonsäure nach 28 Tagen  
(Kategorie 4)

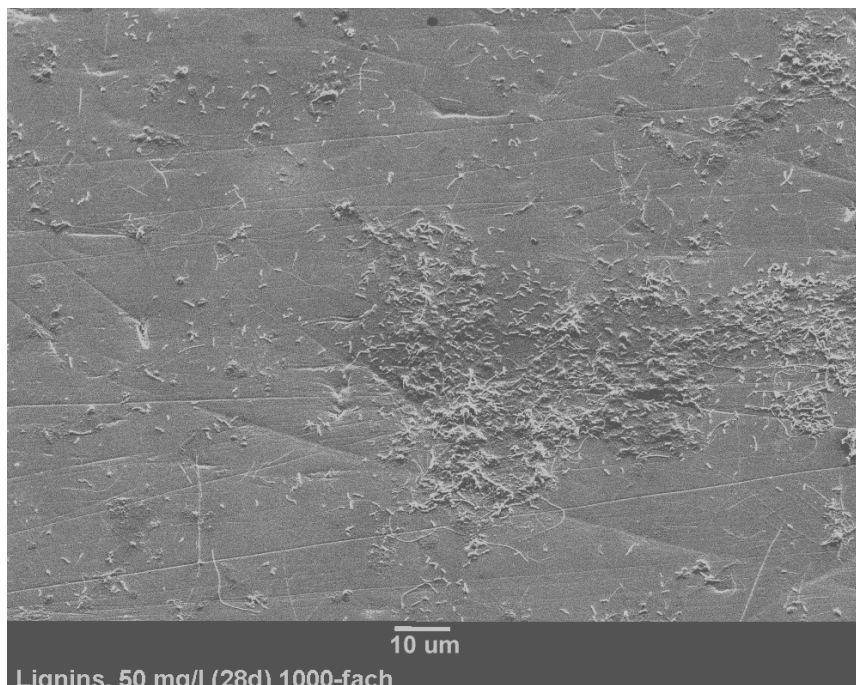


**Lignins. 300 mg/l (28d) 1000-fach**  
**Bild 9b** 300 mg/L Ligninsulfonsäure nach 28 Tagen  
(Kategorie 4)



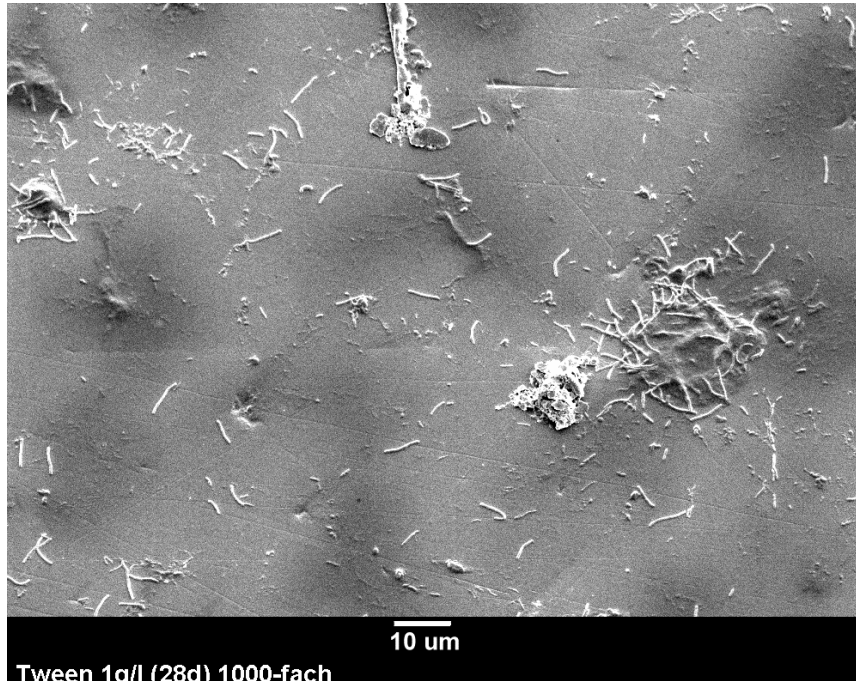
Lignins. 100 mg/l (28d) 1000-fach

**Bild 9c** 100 mg/L Ligninsulfonsäure nach 28 Tagen  
(Kategorie 3)

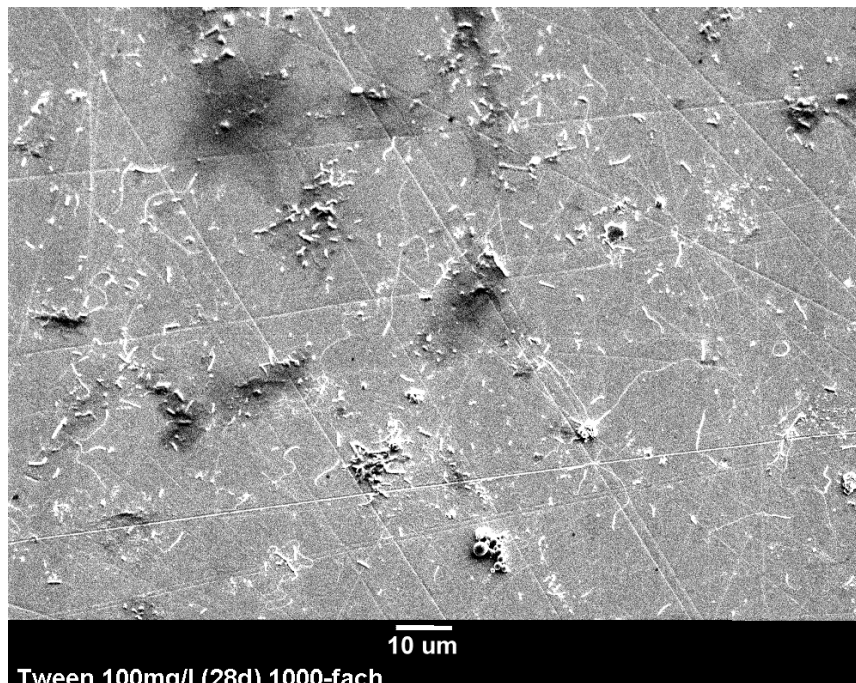


Lignins. 50 mg/l (28d) 1000-fach

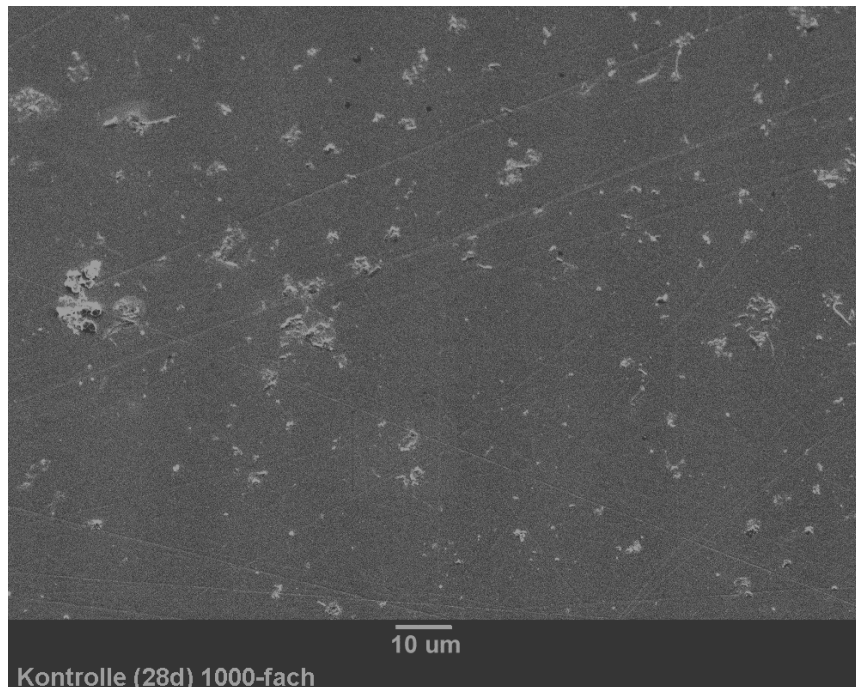
**Bild 9d** 50 mg/L Ligninsulfonsäure nach 28 Tagen  
(Kategorie 3)



Tween 1g/l (28d) 1000-fach  
**Bild 10a** 1000 mg/L Tween 80 nach 28 Tagen  
(Kategorie 2)



Tween 100mg/l (28d) 1000-fach  
**Bild 10b** 100 mg/L Tween 80 nach 28 Tagen  
(Kategorie 2)



**Bild 11** Kontrolle nach 28 Tagen  
(Kategorie 2)

### 3.1.2 Koloniezahlen im überstehenden Wasser

In den Bildern 12 bis 15 ist die Koloniezahleentwicklung in den verschiedenen Ansätzen in Abhängigkeit von zugesetzter Substanz und Konzentration dargestellt. Jeweils verglichen werden die Ansätze mit Glucose (oberes Bild), Ligninsulfonsäure (mittleres Bild) und Tween 80 (unteres Bild). Mit eingetragen sind jeweils die Ergebnisse des Kontrollansatzes ohne Zusatz. Auch in diesen Darstellungen dienen die Verbindungslinien zwischen den einzelnen Punkten der leichteren Bewertung und Zuordnung.

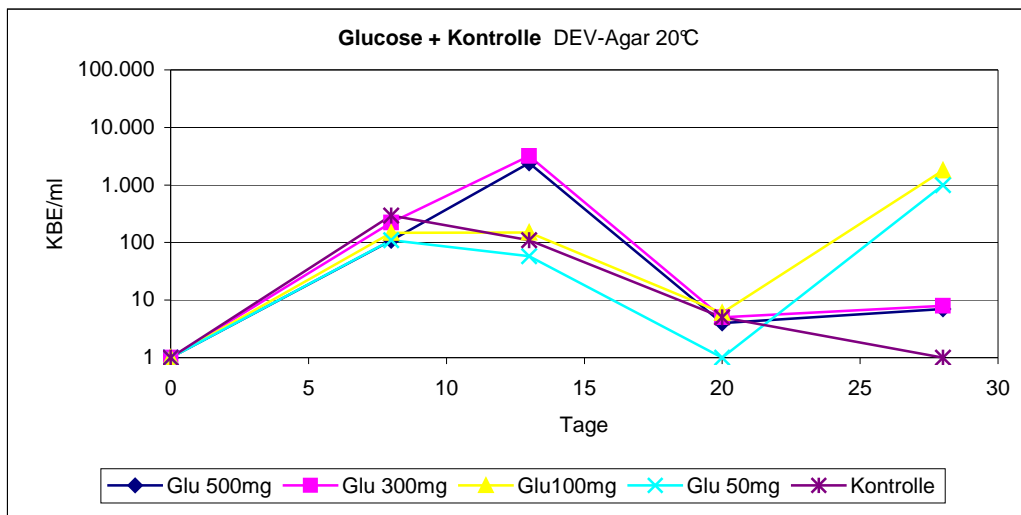
Anhand der verwendeten Nährmedien zeigte sich bereits nach 1 Woche in allen Versuchsansätzen eine Koloniezahlerhöhung um mehrere log-Stufen. Die Koloniezahleentwicklung über den gesamten Versuchszeitraum verlief beim Ansatz mit DEV-Agar und einer Inkubationstemperatur von 20°C in allen Probenansätzen ähnlich (Bild 12). Nachdem die Koloniezahlen bis auf ein Maximum angestiegen waren, fielen sie mit fortschreitender Standzeit der Ansätze wieder ab. Zum Ende des Versuchs wurde in den meisten Fällen ein erneutes Ansteigen der Koloniezahlen beobachtet, wobei zum Teil höhere Werte erreicht wurden als beim 1. Maximalpunkt. In den Ansätzen mit Tween 80 wurden die höchsten Koloniezahlen festgestellt. Bereits nach 8 Tagen betrug die Koloniezahl bei 1.000 mg/L Tween 80 ca. 17.000 KBE/mL und bei 100 mg/L Tween 80 ca. 5.000 KBE/mL. Nach 28 Tagen lag die Koloniezahl bei 100 mg/L Tween 80 bei ca. 50.000 KBE/mL und überstieg damit die Koloniezahl in der Kontrolle um 5 log-Stufen (Bild 12c). Alle Ansätze mit Glucose zeigten ähnliche

Maximalwerte von ca. 1.000 KBE/mL (Bild 12a). Ähnlich stellten sich die Ergebnisse bei Ligninsulfonsäure dar. Ausnahme war der Ansatz mit 500 mg/L Ligninsulfonsäure, in dem maximale Koloniezahlen von knapp unter 10.000 KBE/mL festgestellt wurden (Bild 12b). Im Kontrollansatz stieg die Koloniezahl auf über 100 KBE/mL und sank zum Ende des Versuchs bis auf < 5 KBE/mL ab.

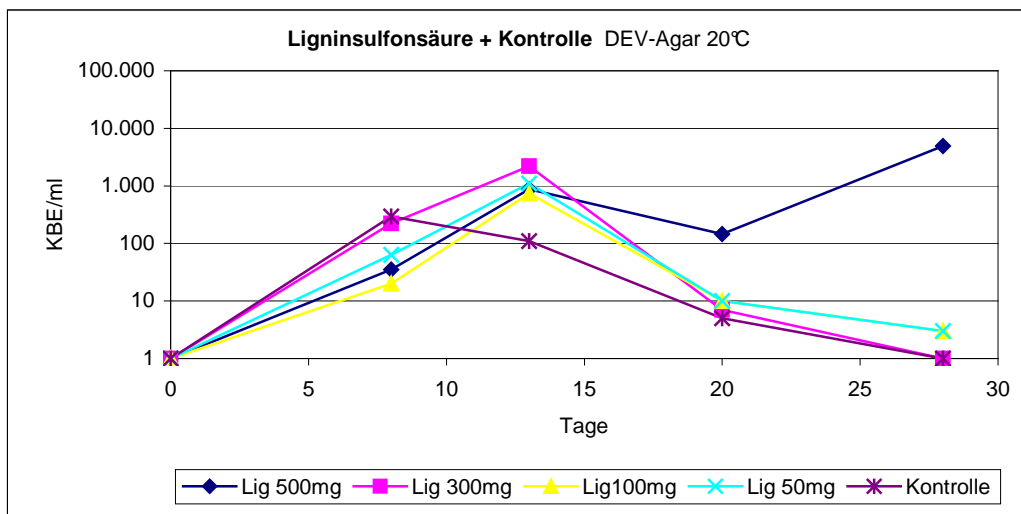
Die Untersuchung der Koloniezahlen mit DEV-Agar bei 36°C Inkubationstemperatur (Bild 13) ergab bei den Ansätzen mit organischer Substanz ein anderes Bild der zeitlichen Koloniezahsentwicklung im Vergleich mit der Inkubation bei 20°C. Die Koloniezahlen lagen nach 8 Tagen bei 500 und 300 mg/L Glucose mit durchschnittlich 300 KBE/mL eine log-Stufe höher als bei 100 und 50 mg/L (Bild 13a). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Ligninsulfonsäure. Auch hier waren die Koloniezahlen in den Ansätzen mit höherer Substratkonzentration um eine halbe bis ganze log-Stufe höher als bei den geringeren Konzentrationen (Bild 13b). Bei geringeren Konzentrationen Glucose und Ligninsulfonsäure lag die Koloniezahl auf dem Niveau der Kontrolle (ca. 35 KBE/mL). Im Ansatz mit 1.000 mg/L Tween 80 wurden nach 8 Tagen ca. 100 KBE/mL gezählt. Bei 100 mg/L Tween 80 lag die Koloniezahl zu diesem Zeitpunkt noch unter 5 KBE/mL. Nach 14 Tagen war jedoch auch in diesem Fall ein Koloniezahlanstieg auf ca. 500 KBE/mL feststellbar (Bild 13c). Im weiteren Verlauf nahm die Koloniezahl in allen Ansätzen kontinuierlich ab und war zum Ende des Versuchs auf unter 10 KBE/mL gesunken.

Die Koloniezahlbestimmungen mit R2A-Medium und einer Inkubationstemperatur von 11°C zeigten im Vergleich mit DEV-Agar nach 8 Tagen in allen Ansätzen einen wesentlich höheren Anstieg der Werte um mindestens 1 log-Stufe (Bild 14). Dieser Unterschied wurde auch in der Kontrolle festgestellt. Bei Tween 80 wurden die höchsten Koloniezahlen aller Ansätze bestimmt. Bereits nach 8 Tagen lag die Koloniezahl bei 1.000 mg/L Tween 80 bei ca. 25.000 KBE/mL und am Ende des Versuchs bei ca. 50.000 KBE/mL (Bild 14c). Im Vergleich dazu wurden im Ansatz mit 500 mg/L Glucose nach 8 Tagen ca. 2.000 KBE/mL festgestellt und am Ende des Versuchs nur noch 500 KBE/mL (Bild 14a).

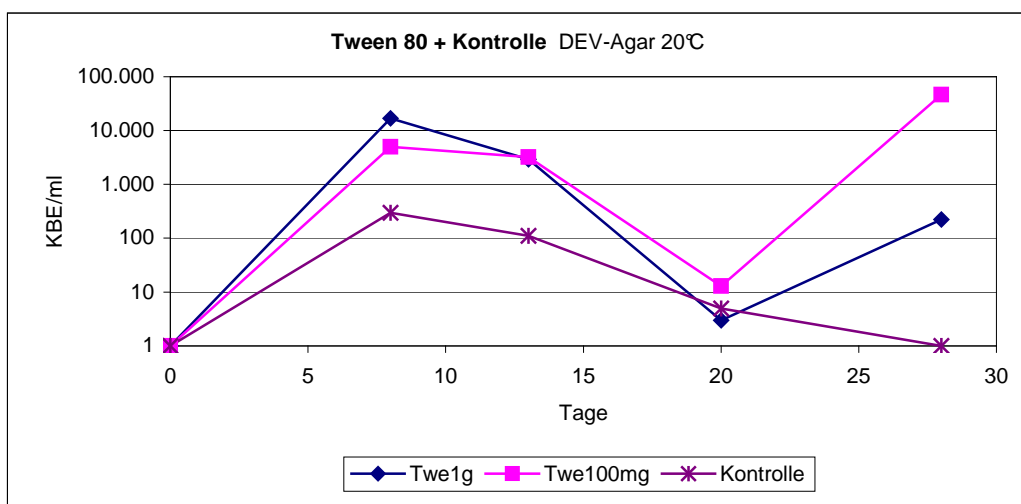
Bild 15 zeigt die Ergebnisse mit R2A-Medium bei einer Inkubationstemperatur von 20°C. In allen Ansätzen wurden Koloniezahlen zwischen 10.000 und 100.000 KBE/mL erreicht. Lediglich in den Ansätzen mit 50 und 100 mg/L Glucose sowie in der Kontrolle, lagen die Zahlen der KBE/mL während des gesamten Versuchszeitraums unter 10.000 (Bild 15a).



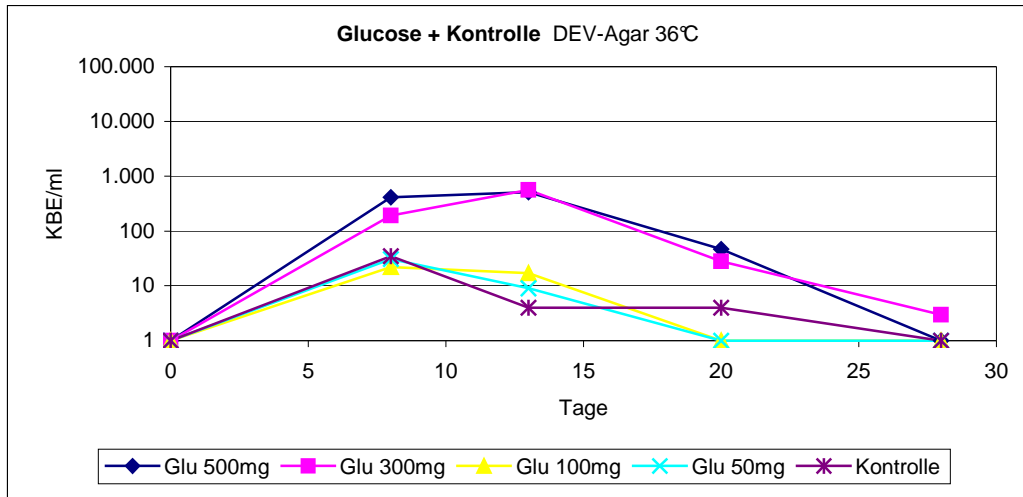
**Bild 12a** KBE/mL auf DEV (20°C), Ansätze mit Glucose (Glu)



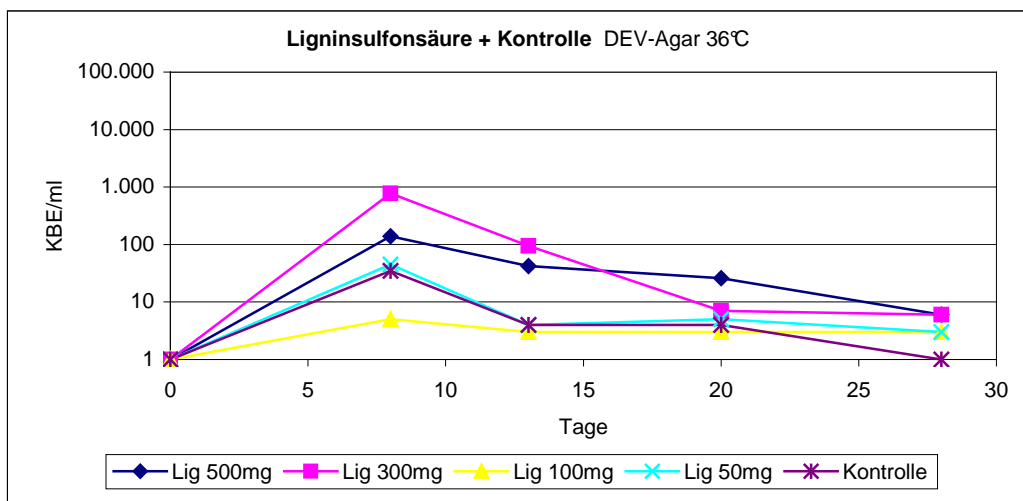
**Bild 12b** KBE/mL auf DEV (20°C), Ansätze mit Ligninsulfonsäure (Lig)



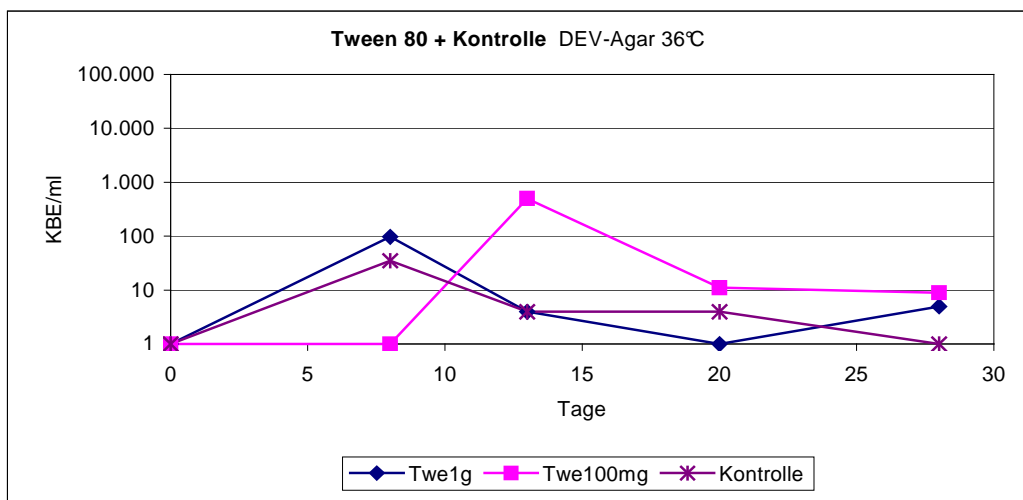
**Bild 12c** KBE/mL auf DEV (20°C), Ansätze mit Tween 80 (Twe)



**Bild 13a** KBE/mL auf DEV (36°C), Ansätze mit Glucose (Glu)

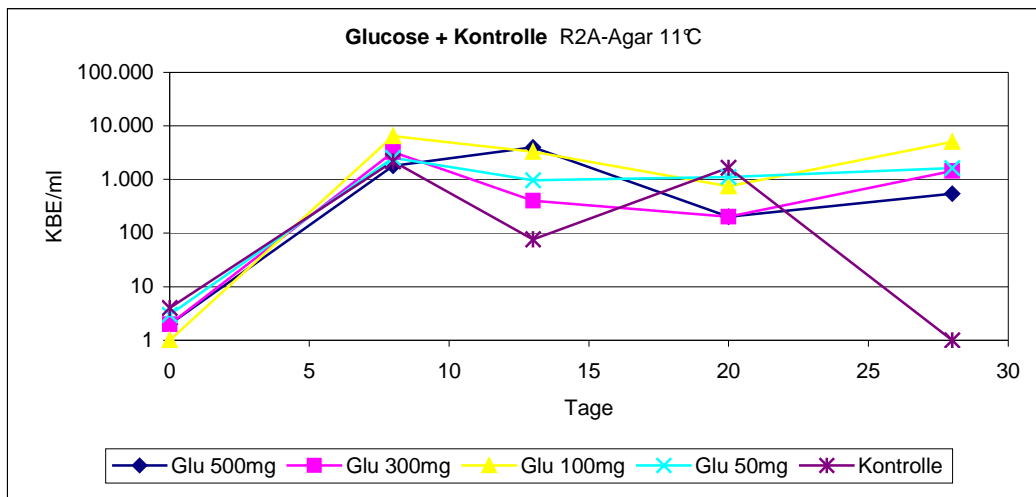


**Bild 13b** KBE/mL auf DEV (36°C), Ansätze mit Ligninsulfonsäure (Lig)

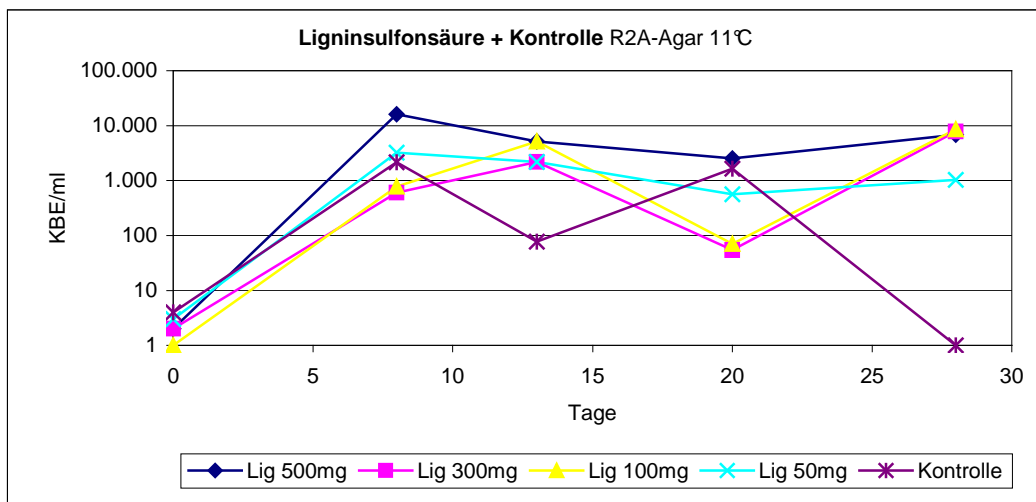


**Bild 13c** KBE/mL auf DEV (36°C), Ansätze mit Tween 80 (Twe)

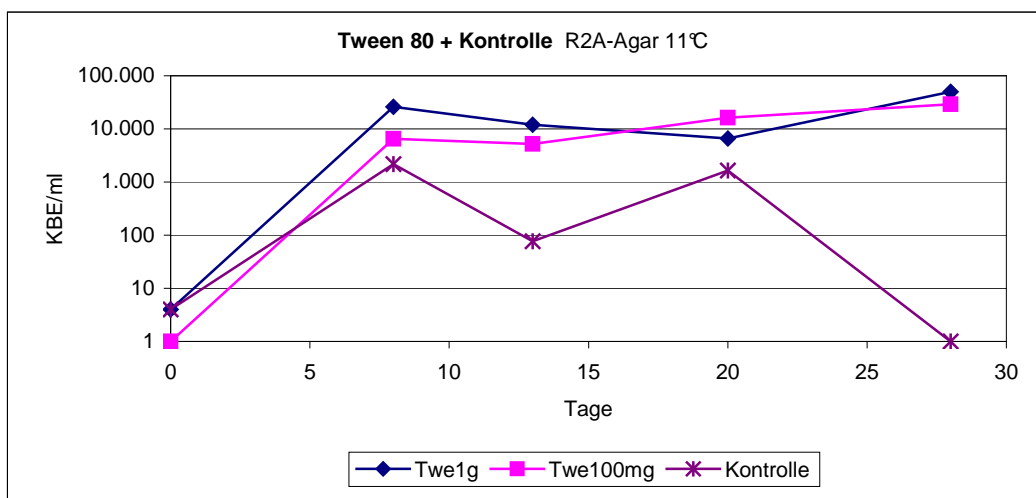




**Bild 14a** KBE/mL auf R2A (11°C), Ansätze mit Glucose (Glu)

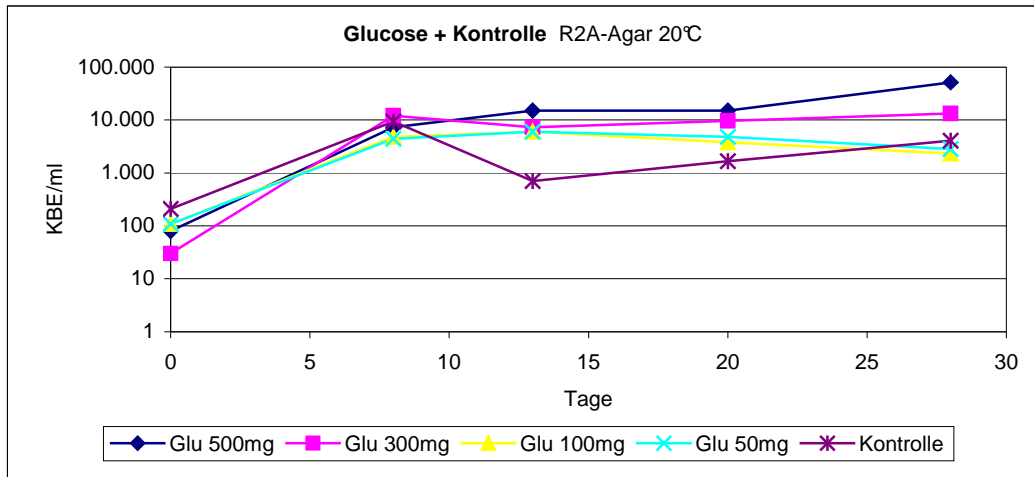


**Bild 14b** KBE/mL auf R2A (11°C), Ansätze mit Ligninsulfonsäure (Lig)

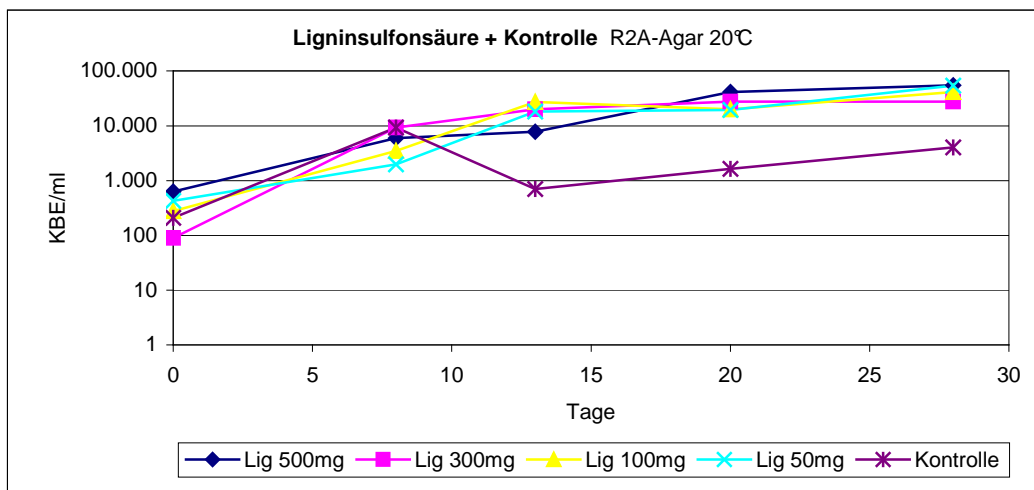


**Bild 14c** KBE/mL auf R2A (11°C), Ansätze mit Tween 80 (Twe)

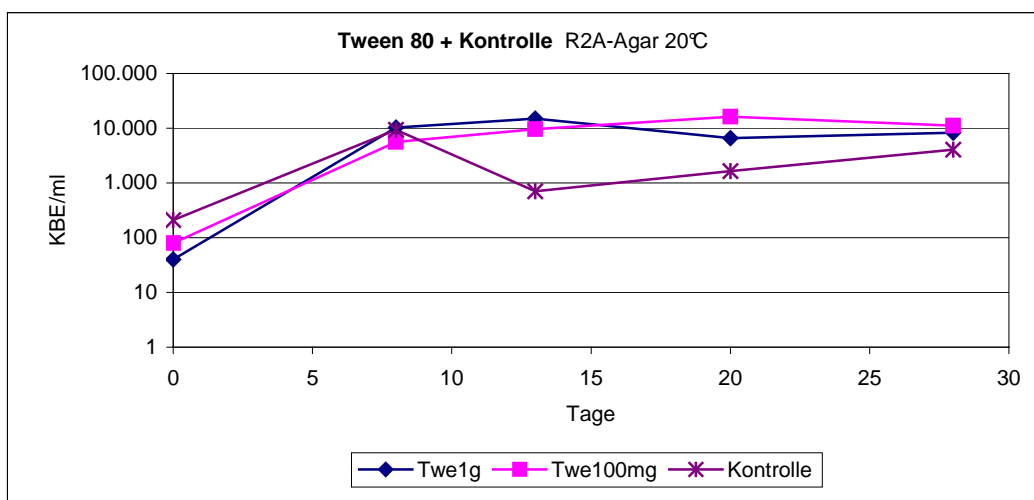




**Bild 15a** KBE/mL auf R2A (20°C), Ansätze mit Glucose (Glu)



**Bild 15b** KBE/mL auf R2A (20°C), Ansätze mit Ligninsulfonsäure (Lig)



**Bild 15c** KBE/mL auf R2A (20°C), Ansätze mit Tween 80 (Twe)

### 3.2 Standversuch Nr. 2:

#### Oberflächenbesiedlung und Koloniezahentwicklung in stehendem Wasser mit organischen Substanzen in geringen Konzentrationen

Die Versuchsbedingungen entsprachen denen in Abschnitt 3.1, jedoch wurden den Versuchsansätzen nur 1 bzw. 5 mg/L zugegeben. Als Modellsubstanzen wurden wieder Glucose und Ligninsulfonsäure verwendet. Anstelle von Tween 80 wurde in diesem Versuch Natriumacetat eingesetzt. Die Untersuchungen auf Oberflächenbesiedlung der Edelstahlcoupons und der Koloniezahlen im überstehenden Wasser erfolgten zu Beginn des Versuchs sowie nach 8 und 21 Tagen Standzeit.

#### 3.2.1 Oberflächenbesiedlung

Die Auswertung der Coupons erfolgte nach der unter 3.1.1 dargestellten Kategorisierung. Die Ergebnisse der Oberflächenuntersuchungen im 2. Standversuch sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

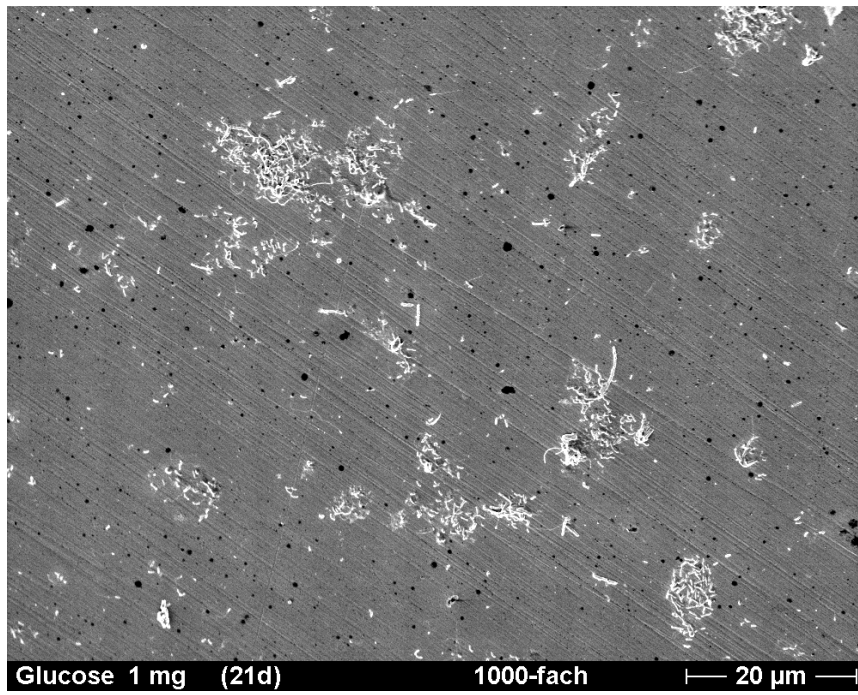
Tabelle 6 Oberflächenbesiedlung nach 8 und 21 Tagen, ausgedrückt in Kategorien gemäß Abschnitt 3.1.1

		8 Tage Standzeit	21 Tage Standzeit
Glucose	1 mg/L	2	2
Glucose	5 mg/L	2	2
Natriumacetat	1 mg/L	2	2
Natriumacetat	5 mg/L	2	3
Ligninsulfonsäure	1 mg/L	3	2
Ligninsulfonsäure	5 mg/L	2	2
Kontrolle		2	2

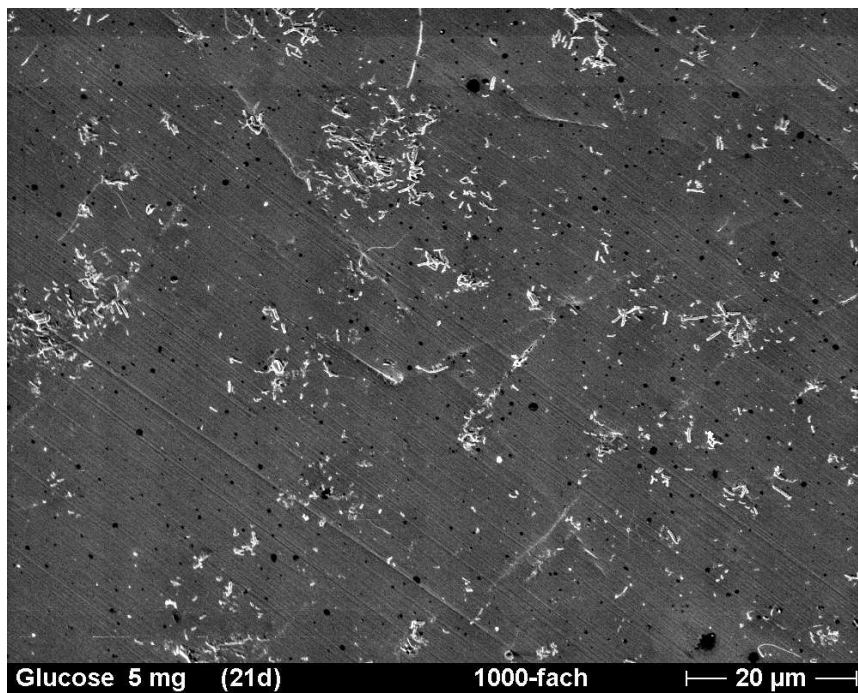
1: keine Besiedlung  
3: geringe Besiedlung  
5: deutliche Besiedlung

2: sehr geringe Besiedlung  
4: mäßige Besiedlung  
6: starke Besiedlung

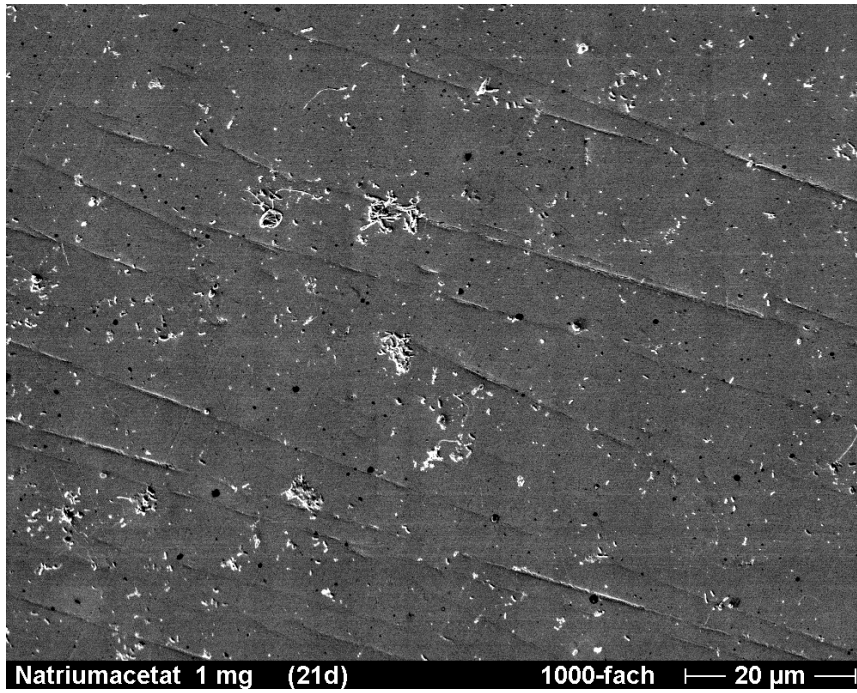
Die Besiedlung auf den Coupons nach 21 Tagen Standzeit ist in den Bildern 16 bis 19 wiedergegeben. Nach 8 Tagen wurde auf allen Coupons eine sehr geringe Besiedlung (Kategorie 2) festgestellt, die mit fortschreitender Standzeit nicht wesentlich zunahm. Eine Ausnahme stellte der Ansatz mit 5 mg/L Natriumacetat dar, in dem nach 21 Tagen eine Oberflächenbesiedlung der Kategorie 3 beobachtet wurde.



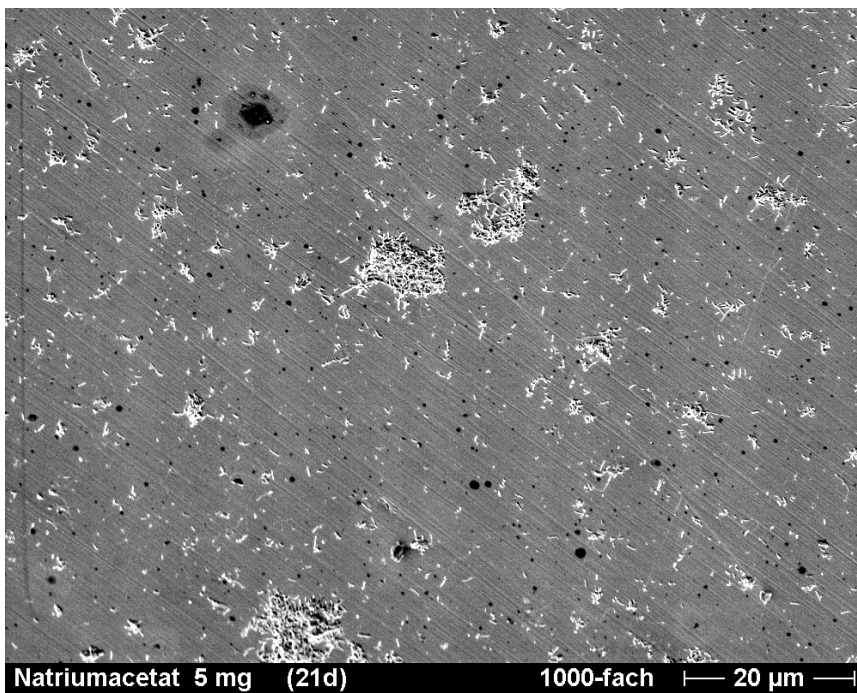
**Bild 16a** 1 mg/L Glucose nach 21 Tagen  
(Kategorie 2)



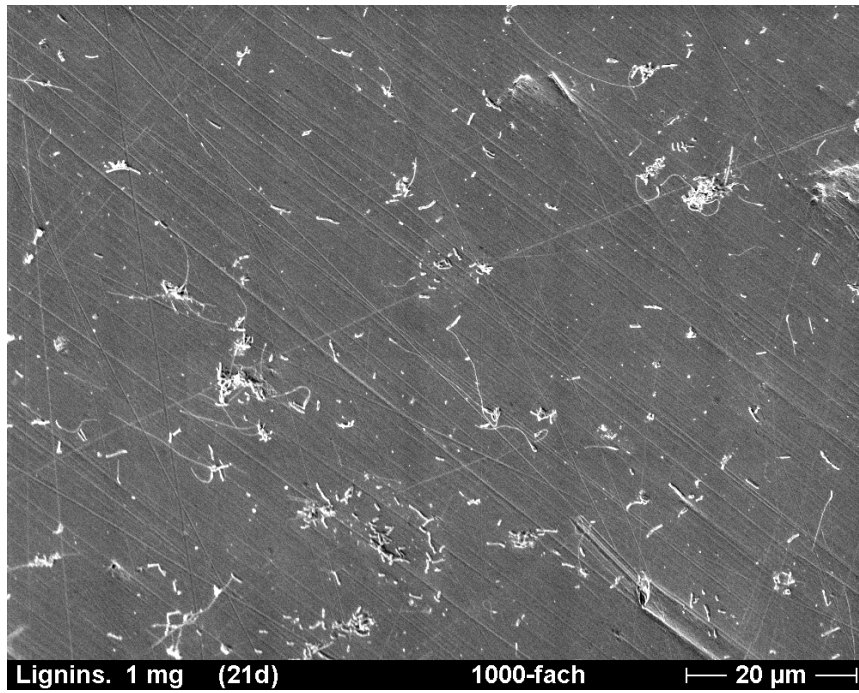
**Bild 16b** 5 mg/L Glucose nach 21 Tagen  
(Kategorie 2)



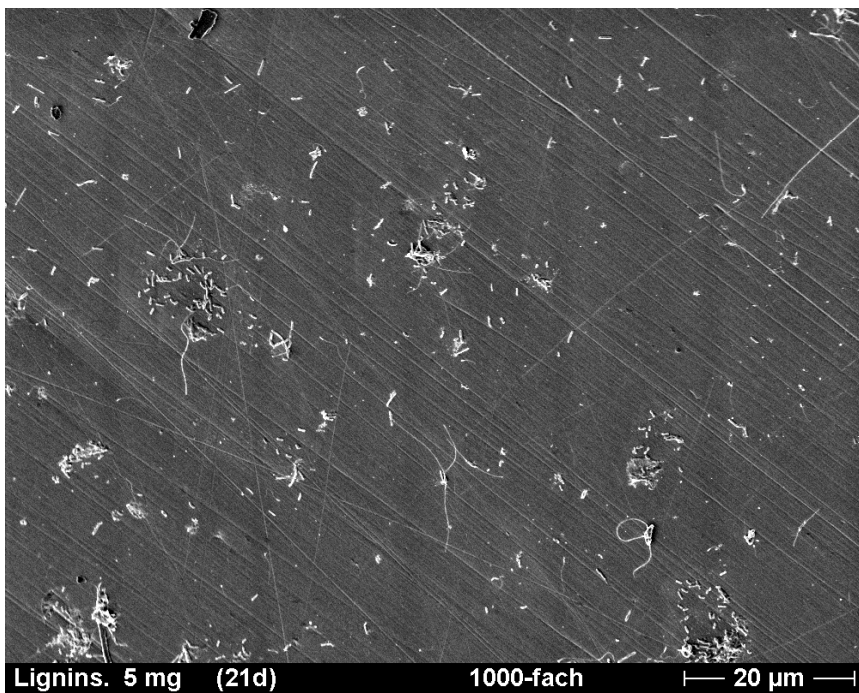
**Bild 17a** 1 mg/L Natriumacetat nach 21 Tagen  
(Kategorie 2)



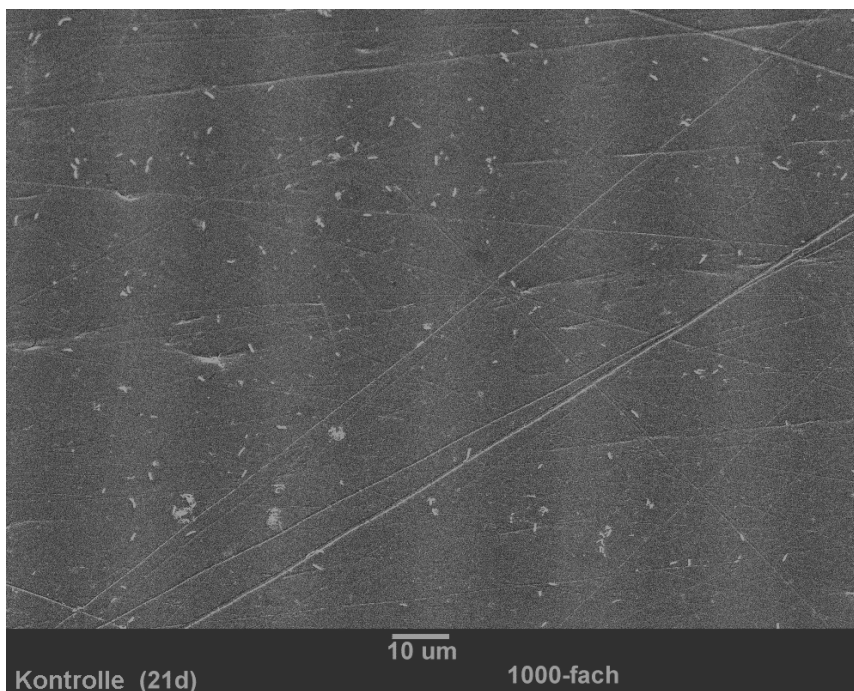
**Bild 17b** 5 mg/L Natriumacetat nach 21 Tagen  
(Kategorie 3)



**Bild 18a** 1 mg/L Ligninsulfonsäure nach 21 Tagen  
(Kategorie 2)



**Bild 18b** 5 mg/L Ligninsulfonsäure nach 21 Tagen  
(Kategorie 3)



**Bild 19** Kontrolle nach 21 Tagen  
(Kategorie 2)

### 3.2.2 Koloniezahlen im überstehenden Wasser

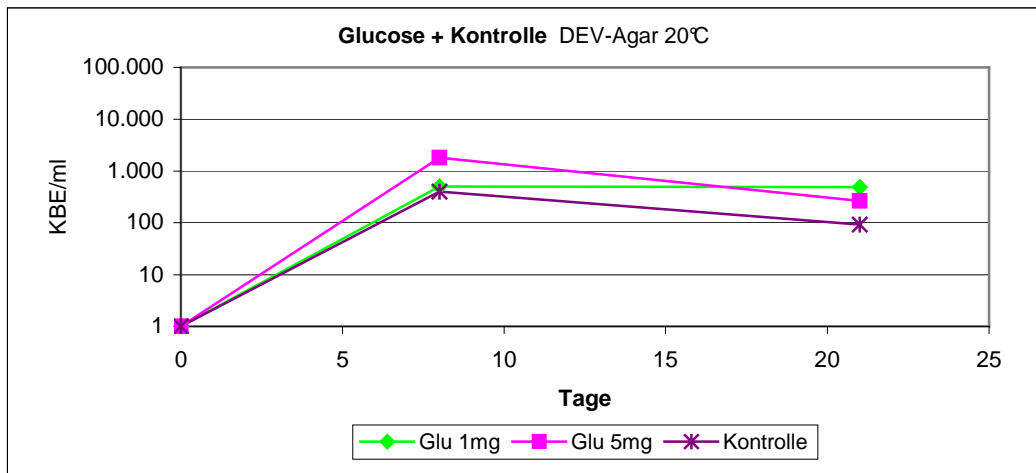
Die Koloniezahentwicklung in den Ansätzen ist in den Bildern 20 bis 24 dargestellt. Jeweils verglichen werden die Ansätze mit Glucose (oberes Bild), Natriumacetat (mittleres Bild) und Ligninsulfonsäure (unteres Bild). Mit eingetragen sind jeweils die Ergebnisse des Kontrollansatzes ohne Zusatz. Die Verbindungslinien zwischen den einzelnen Punkten dienen der leichteren Bewertung und Zuordnung.

Bild 20 zeigt die Ergebnisse mit DEV-Agar bei einer Inkubationstemperatur von 20°C. In allen Ansätzen wurde bereits nach 8 Tagen eine Koloniezahlerhöhung um 2 bis 3 log-Stufen festgestellt. Dabei wurden in den Ansätzen mit Natriumacetat die höchsten Koloniezahlen bestimmt (Bild 20b). Diese lagen bei ca. 9.000 KBE/mL und überstiegen die in den übrigen Ansätzen um 1 log-Stufe. Nach 21 Tagen war die Koloniezahl in fast allen Ansätzen gesunken. Einzige Ausnahme war der Ansatz mit 1 mg/L Glucose (Bild 20a). In diesem war die Koloniezahl genauso hoch wie nach 8 Tagen.

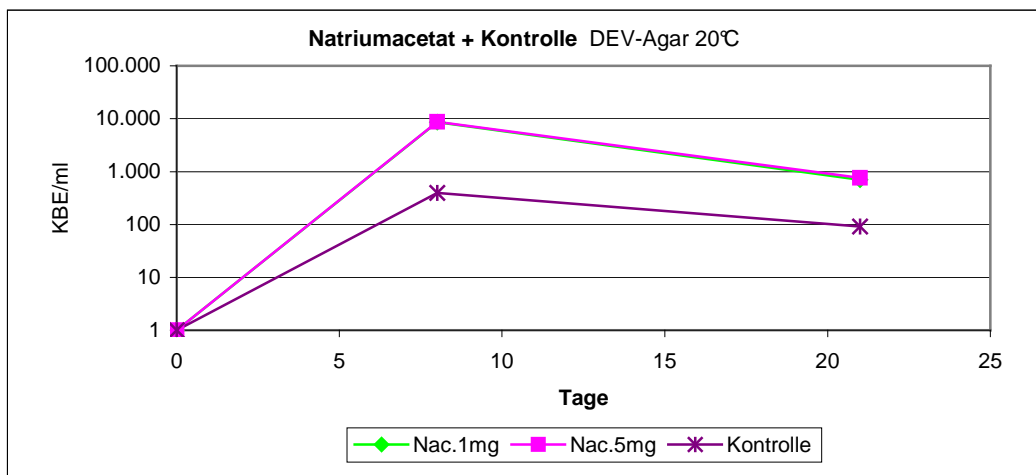
Die Bestimmung der Koloniezahlen mit DEV-Agar bei 36°C Inkubationstemperatur ergab ein ähnliches Ergebnis wie bei 20°C Inkubation. Die Maximalwerte waren jedoch geringer und überstiegen in keinem Fall 1.000 KBE/mL (Bild 21).

Bild 22 zeigt die Ergebnisse mit R2A-Medium und einer Inkubationstemperatur von 11°C. Die höchsten Koloniezahlen wurden bei 5 mg/L Natriumacetat festgestellt. Diese lagen nach 8 Tagen Standzeit bei ca. 16.000 KBE/mL. Im Vergleich dazu wurden bei Glucose und Ligninsulfonsäure zu diesem Zeitpunkt Koloniezahlen von ca. 5.000 KBE/mL bestimmt. Nach 21 Tagen war die Koloniezahl in allen Ansätzen um durchschnittlich 1 log-Stufe gesunken.

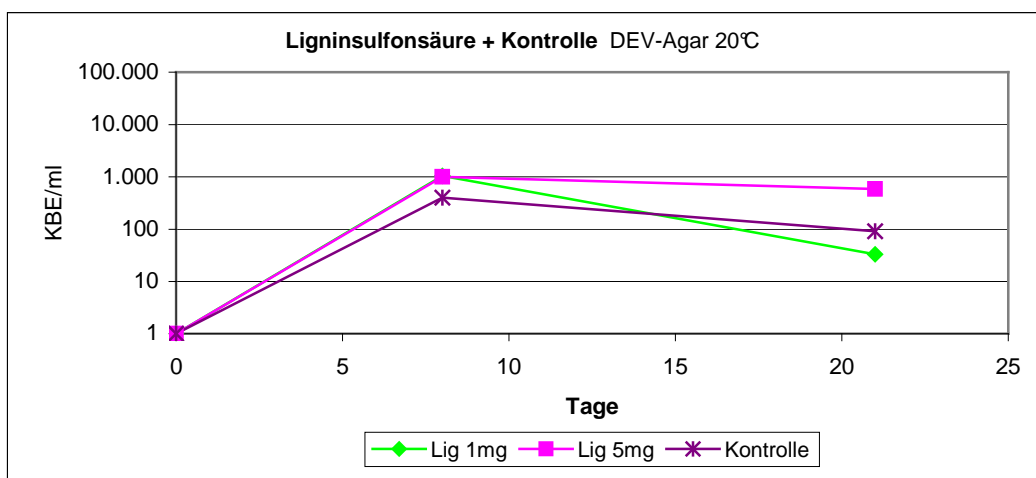
Mit R2A-Medium und einer Inkubationstemperatur von 20°C wurden nach 8 Tagen in allen Ansätzen, mit Ausnahme der Kontrolle, ca. 10.000 KBE/mL bestimmt. Nach 21 Tagen waren die KBE/mL um ca. eine halbe log-Stufe gesunken.



**Bild 20a** KBE/mL auf DEV (20°C), Ansätze mit Glucose (Glu)

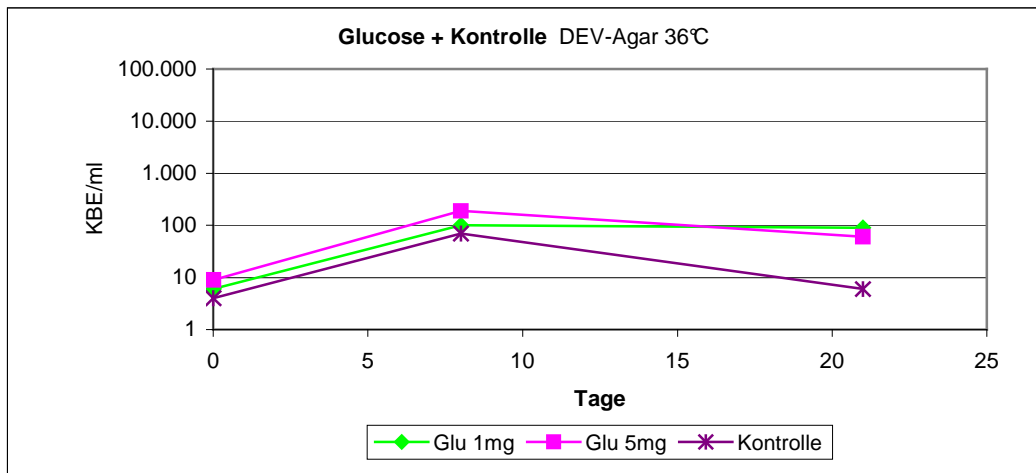


**Bild 20b** KBE/mL auf DEV (20°C), Ansätze mit Natriumacetat (Na c)

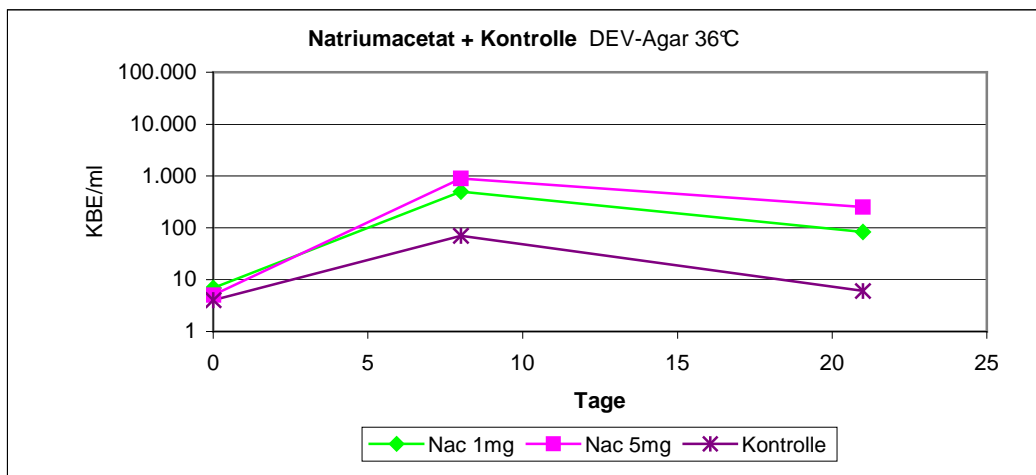


**Bild 20c** KBE/mL auf DEV (20°C), Ansätze mit Ligninsulfonsäure (Lig)

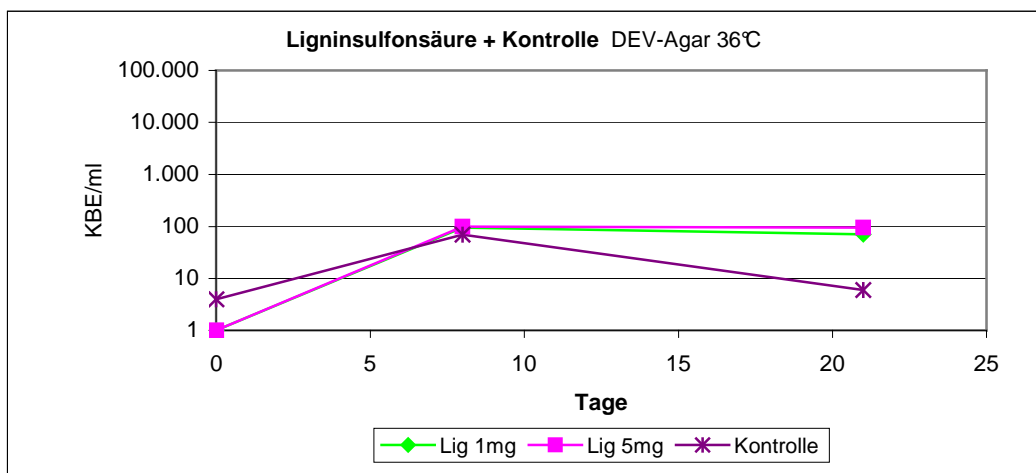




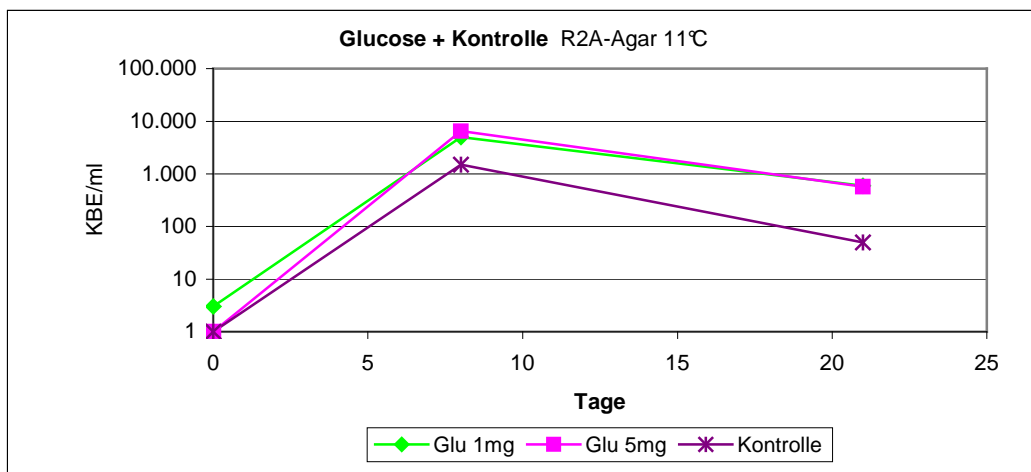
**Bild 21a** KBE/mL auf DEV (36°C), Ansätze mit Glucose (Glu)



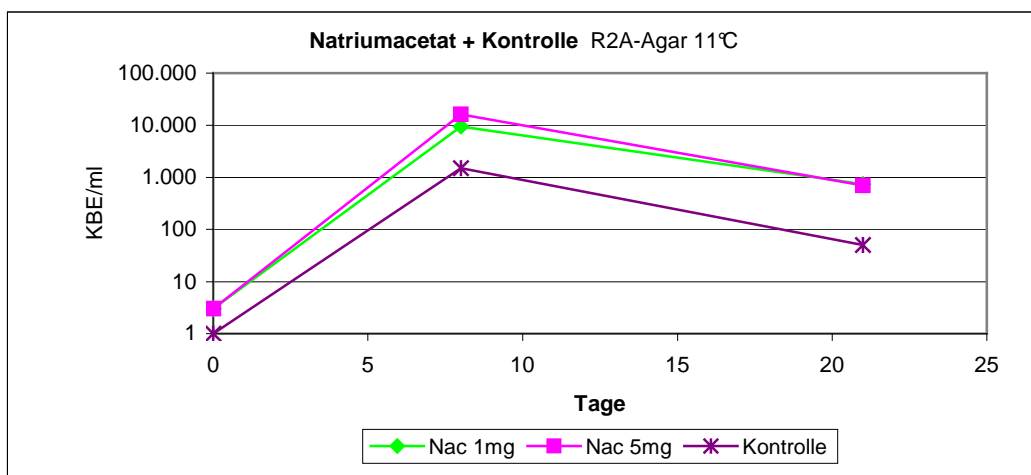
**Bild 21b** KBE/mL auf DEV (36°C), Ansätze mit Natriumacetat (Na c)



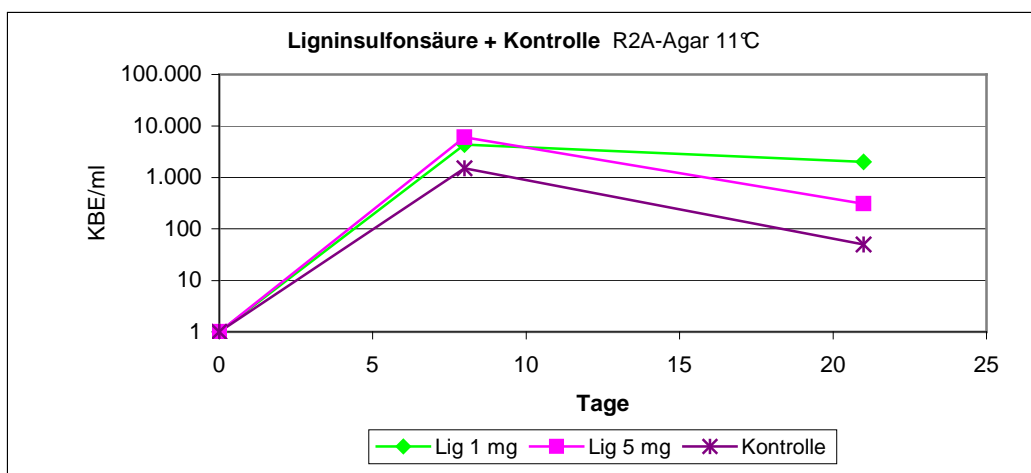
**Bild 21c** KBE/mL auf DEV (36°C), Ansätze mit Ligninsulfonsäure (Lig)



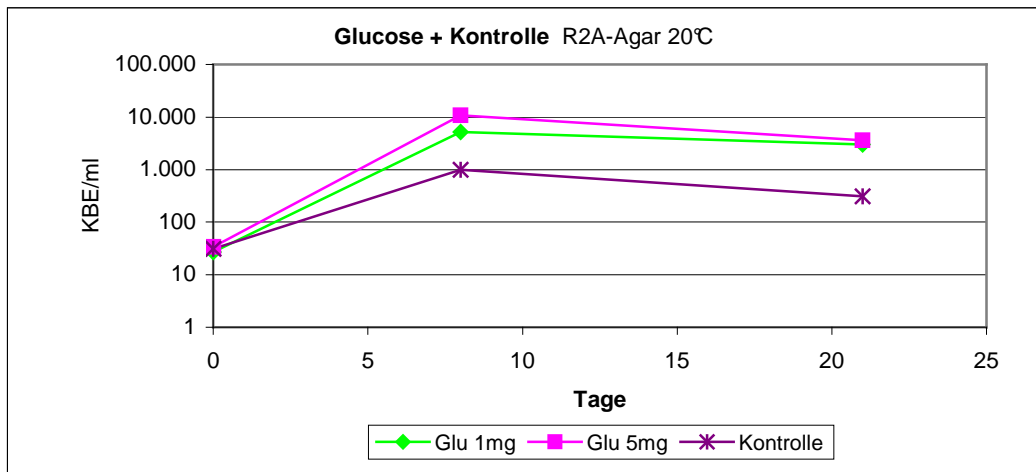
**Bild 22a** KBE/mL auf R2A (11°C), Ansätze mit Glucose (Glu)



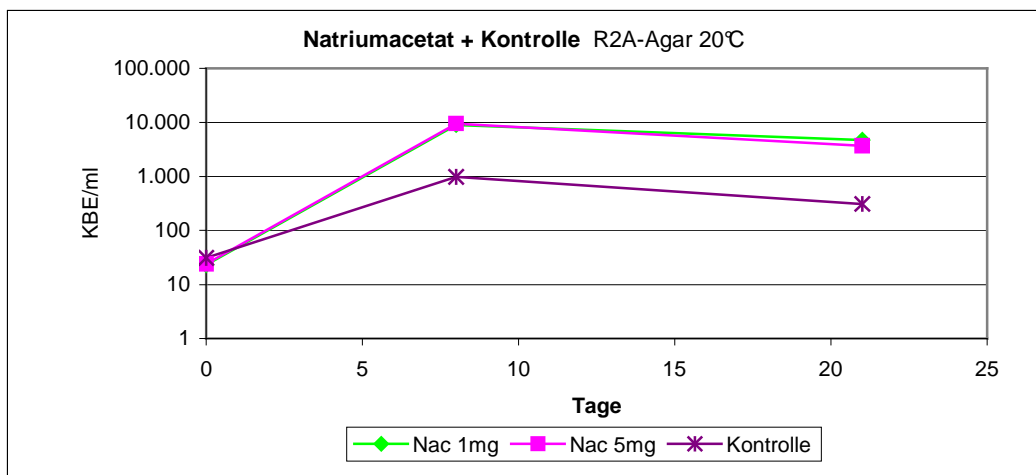
**Bild 22b** KBE/mL auf R2A (11°C), Ansätze mit Natriumacetat (Na c)



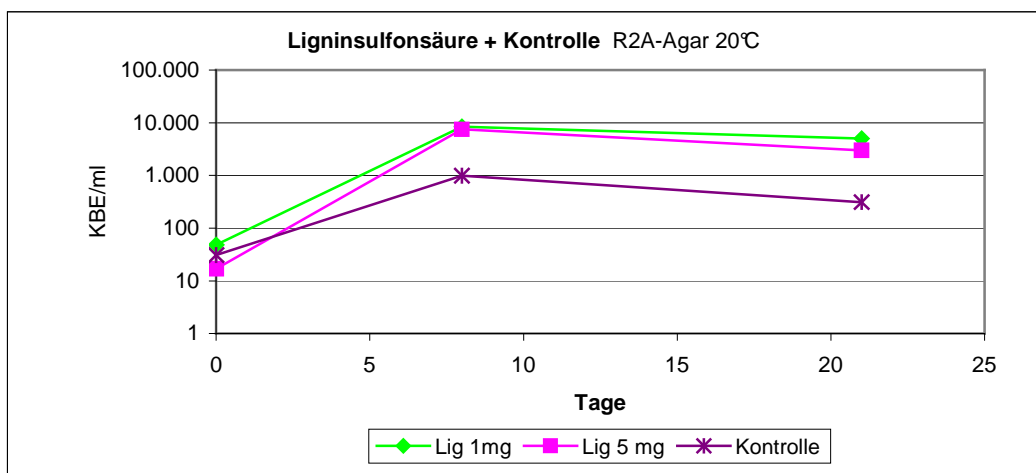
**Bild 22c** KBE/mL auf R2A (11°C), Ansätze mit Ligninsulfonsäure (Lig)



**Bild 23a** KBE/mL auf R2A (20°C), Ansätze mit Glucose (Glu)



**Bild 23b** KBE/mL auf R2A (20°C), Ansätze mit Natriumacetat (Na c)



**Bild 23c** KBE/mL auf R2A (20°C), Ansätze mit Ligninsulfonsäure (Lig)

### 3.3 Mikrobiologische Untersuchungen der Wasserproben während der Einlaufzeit der Testanlage

Die Einlaufzeit der Anlage dauerte 15 Monate. Die mittels DEV-Agar ermittelte Koloniezahle-entwicklung zeigte bei beiden Inkubationstemperaturen (20°C und 36°C) einen abfallenden Verlauf. Direkt nach Inbetriebnahme der Anlage konnte in allen 3 Testleitungen eine erhöhte Koloniezahl festgestellt werden. Dabei zeigten sich in der Testleitung Nr.1 die höchsten Koloniezahlen, die zwischen  $10^3$  und  $10^4$  KBE/mL lagen. In den beiden anderen Leitungen wurden Koloniezahlen zwischen  $10^2$  und  $10^3$  KBE/mL festgestellt. Nach 10-minütigem Betrieb waren die Koloniezahlen in allen Leitungen um 1 log-Stufe, nach 60 Minuten Laufzeit um 2 log-Stufen gesunken. Nach 1 Woche Durchfluss lagen die Koloniezahlen unter 10 KBE/mL. Die Koloniezahle-entwicklung schwankte im weiteren Verlauf und pendelte sich nach ca. 3 Monaten auf unter 10 KBE/mL ein. Zum Ende der ersten 4 Monate war das Koloniezahl-Niveau auf unter 5 KBE/mL gesunken. Die Untersuchungen auf *Pseudomonas aeruginosa* fielen in allen 3 Leitungen negativ aus. *E.coli* und Coliforme Bakterien wurden bis auf eine Ausnahme nicht nachgewiesen. Bei der Ausnahme handelte es sich um einen positiven Befund in Leitung 1. Untersuchungen ergaben, dass es sich um *Citrobacter freundii* handelte.

In den Wasserproben, die ab dem 5. Monat genommen wurden, konnten bis zum Ende der Vorlaufzeit *E. coli*, Coliforme Bakterien und *Pseudomonas aeruginosa* nicht nachgewiesen werden. Die mittels DEV-Agar erfasste Koloniezahl lag bei beiden Inkubationstemperaturen (20°C und 36°C) stets unter 10 KBE/mL. Die Wasserproben wurden zusätzlich auf R2A-Agar angesetzt. Bei einer Inkubationstemperatur von 11°C lagen die Koloniezahlen, bis auf wenige Ausnahmen, unter 5 KBE/mL. Bei den Ausnahmen konnten Koloniezahlen von max. 20 KBE/mL festgestellt werden. Ähnlich verhielt es sich bei einer Inkubationstemperatur von 20°C. Während die Koloniezahlen in den meisten Fällen unter 5 KBE/mL lagen, wurden an wenigen Tagen Werte von max. 40 KBE/mL ermittelt.

In den Wasserproben der Zuleitung lagen die bestimmten Koloniezahlen über den gesamten Vorlaufzeitraum stets unter 5 KBE/mL. *E.coli*, Coliforme Bakterien und *Pseudomonas aeruginosa* konnten nicht nachgewiesen werden.

### 3.4 Fließversuch:

#### Oberflächenbesiedlung und Koloniezahleentwicklung in fließendem Wasser mit organischen Substanzen in geringen Konzentrationen

Die Versuche mit fließendem Wasser wurden mit demselben Brunnenwasser parallel in 3 Edelstahlleitungen durchgeführt. An 2 Leitungen waren Dosierpumpen angeschlossen, mit denen dem fließenden Wasser die organischen Modellsubstanzen Natriumacetat und Ligninsulfonsäure zugemischt wurden. Die 3. Leitung wurde nur von Wasser ohne Zusätze mit derselben Fließgeschwindigkeit durchströmt und diente als Kontrolle.

Alle Versuchsreihen liefen über einen Zeitraum von 6 Wochen. 2 mal pro Woche wurden Wasserproben genommen, in denen die Koloniezahl mit DEV-Agar und R2A-Medium bestimmt wurde. Nach 2, 3, 5 und 6 Wochen wurden je 2 Coupons für eine Oberflächenuntersuchung entnommen. Die Durchführung einer Spülung und die anschließende Entnahme von 2 Coupons schloss eine Versuchsreihe ab.

#### 3.4.1 Rasterelektronenmikroskopische Oberflächenuntersuchung

Die Auswertung der Coupons erfolgte nach der unter 3.1.1 dargestellten Kategorisierung. Die Ergebnisse der Oberflächenuntersuchungen im Fließversuch sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7 Oberflächenbesiedlung nach 2, 3, 5 und 6 Wochen sowie vor und nach der Spülung (ausgedrückt in Kategorien gemäß Abschnitt 3.1.1)

	2 Wochen	3 Wochen	5 Wochen	6 Wochen vor Spülung	6 Wochen nach Spülung
Ligninsulfonsäure 0,5 mg/L	1	3	4	4	3
Ligninsulfonsäure 1,0 mg/L	3	4	5	5	5
Natriumacetat 0,5 mg/L	3	4	5	6	6
Kontrolle	1	2	2	2	2

1: keine Besiedlung  
3: geringe Besiedlung  
5: deutliche Besiedlung

2: sehr geringe Besiedlung  
4: mäßige Besiedlung  
6: starke Besiedlung

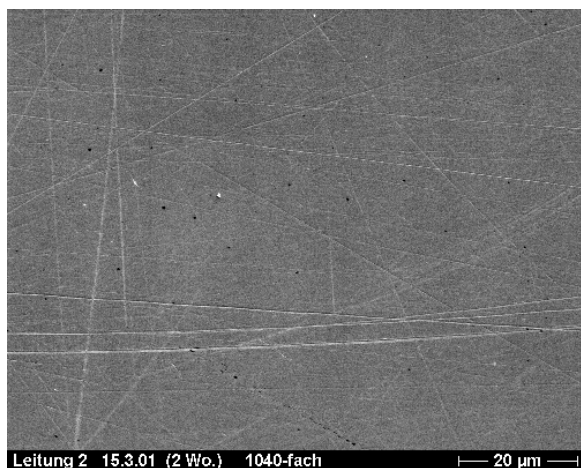
Bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure war nach ca. 3 Wochen eine geringe Besiedlung (Kategorie 3) erkennbar. Diese nahm im weiteren Verlauf zu und erreichte nach 5 Wochen ihr Maximum (Kategorie 4). Im Vergleich dazu war bei 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure bereits nach 2 Wochen eine Besiedlung der Kategorie 3 feststellbar. Zu diesem Zeitpunkt war bei der geringeren Ligninsulfonsäure-Konzentration (0,5 mg/L) noch keine Besiedlung erkennbar. Im Wasser mit der höheren Ligninsulfonsäure-Konzentration wurde am Ende der Versuchsreihe, nach 6 Wochen, eine deutliche Besiedlung (Kategorie 5) festgestellt.

Die stärkste Besiedlung wurde bei 0,5 mg/L Natriumacetat beobachtet. Während die Besiedlung in den ersten 3 Wochen ähnlich stark war wie bei 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure, wurde nach 5 Wochen eine deutliche (Kategorie 5) und nach 6 Wochen eine starke Besiedlung (Kategorie 6) gefunden. In der Kontrollleitung (ohne organische Substanz) war nach 2 Wochen nur eine sehr geringe Besiedlung (Kategorie 2) erkennbar, die bis zum Ende der Versuchsreihe nicht weiter zunahm.

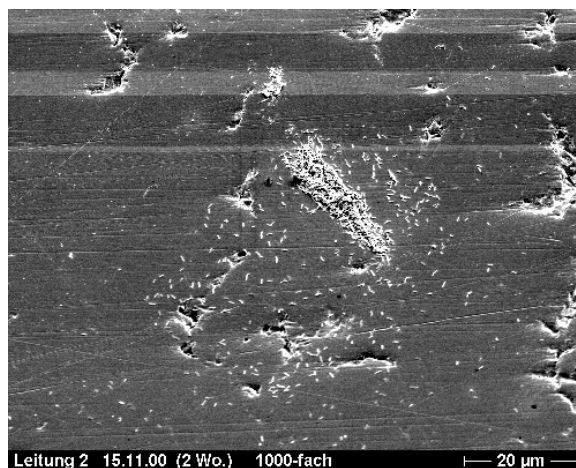
Der Vergleich der vor und nach der Spülung (1-minütige Fließgeschwindigkeitserhöhung von 0,37 m/sec auf 0,73 m/sec) entnommenen Coupons zeigte sowohl in den Leitungen mit Dosierung als auch in der Kontrollstrecke keine erkennbare Auswirkung der Durchflusserhöhung auf die gebildeten Besiedlungen bzw. Aufwüchse. Einzige Ausnahme war die Besiedlung bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure. In diesem Fall zeigte sich nach der Spülung eine geringere Besiedlung (Kategorie 3) als vorher (Kategorie 4).

In den Bildern 24a-c ist die Besiedlungsentwicklung bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure (Lig) nach 2, 3 und 5 Wochen wiedergegeben. Dem gegenübergestellt, in den Bildern 25a-c, ist die Besiedlungsentwicklung bei 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure. Die vor und nach der Spülung aus beiden Teststrecken entnommenen Coupons sind in den Bildern Bild 24d-e sowie 25d-e zu sehen.

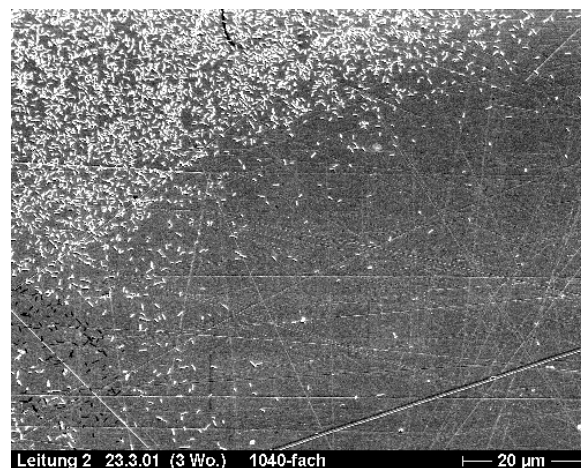
Die Bilder 26a-c zeigen die Besiedlungsentwicklung bei 0,5 mg/L Natriumacetat (Nac). Im Vergleich zu diesen Bildern und den aus den Teststrecken mit Ligninsulfonsäure ist in den Bildern 27a-c die Besiedlungsentwicklung in der Kontrollstrecke dargestellt. Die Besiedlung vor und nach der Spülung in der Leitung mit 0,5 mg/L Natriumacetat und in der Kontrollstrecke werden in den Bildern 26d-e und 27d-e miteinander verglichen.



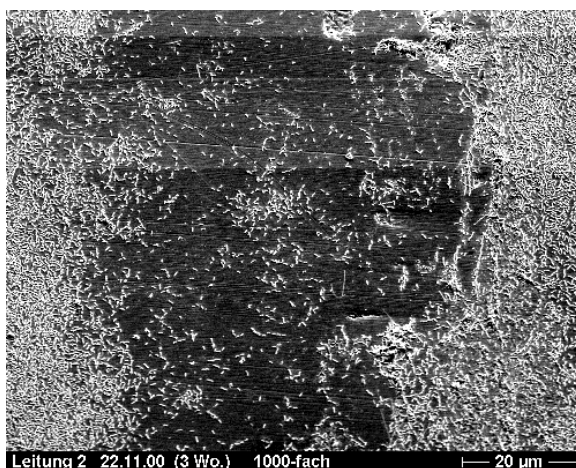
**Bild 24a** 0,5 mg/L Lig nach 2 Wochen  
(Kategorie 1)



**Bild 25a** 1,0 mg/L Lig nach 2 Wochen  
(Kategorie 3)



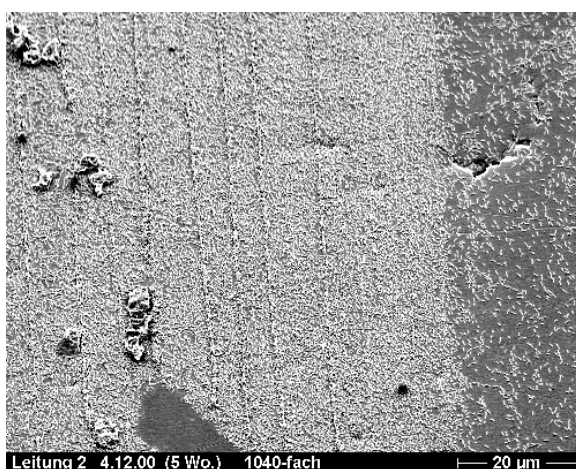
**Bild 24b** 0,5 mg/L Lig nach 3 Wochen  
(Kategorie 3)



**Bild 25b** 1,0 mg/L Lig nach 3 Wochen  
(Kategorie 4)



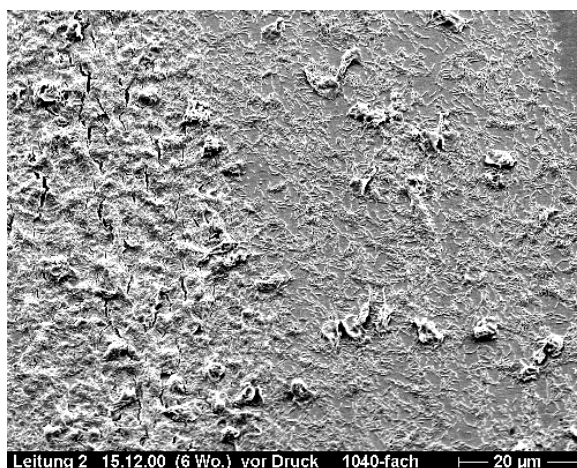
**Bild 24c** 0,5 mg/L Lig nach 5 Wochen  
(Kategorie 4)



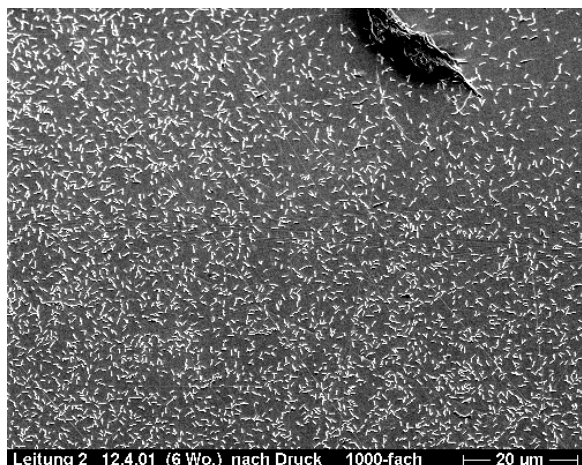
**Bild 25c** 1,0 mg/L Lig nach 5 Wochen  
(Kategorie 5)



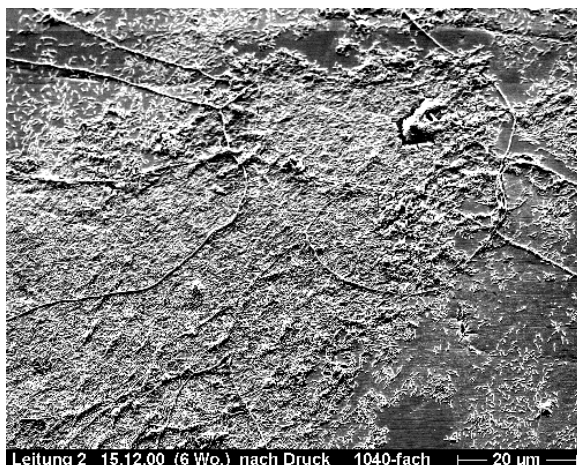
Leitung 2 12.4.01 (6 Wo.) vor Druck 1000-fach 20 µm  
**Bild 24d** 0,5 mg/L Lig nach 5 Wochen  
vor Spülung  
(Kategorie 4)



Leitung 2 15.12.00 (6 Wo.) vor Druck 1040-fach 20 µm  
**Bild 25d** 1,0 mg/L Lig nach 5 Wochen  
vor Spülung  
(Kategorie 5)

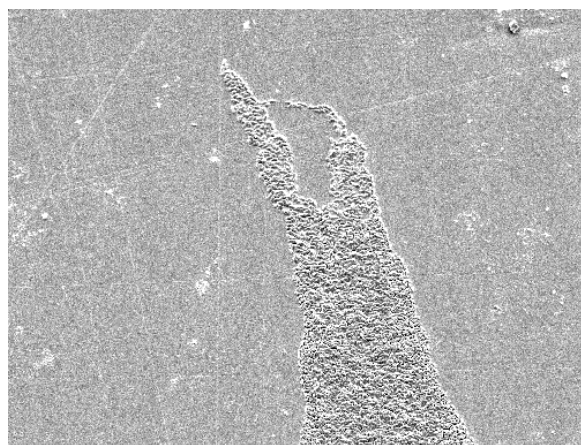


Leitung 2 12.4.01 (6 Wo.) nach Druck 1000-fach 20 µm  
**Bild 24e** 0,5 mg/L Lig nach 6 Wochen  
nach Spülung  
(Kategorie 3)



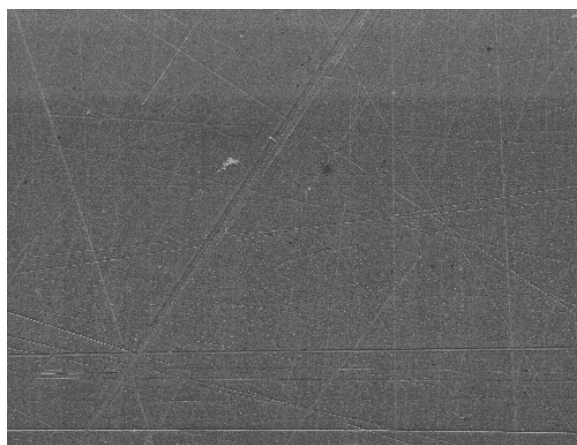
Leitung 2 15.12.00 (6 Wo.) nach Druck 1040-fach 20 µm  
**Bild 25e** 1,0 mg/L Lig nach 6 Wochen  
nach Spülung  
(Kategorie 5)





Leitung 1 15.3.01 (2 Wo.) 1040-fach 20 µm

**Bild 26a** 0,5 mg/L Nac nach 2 Wochen  
(Kategorie 3)



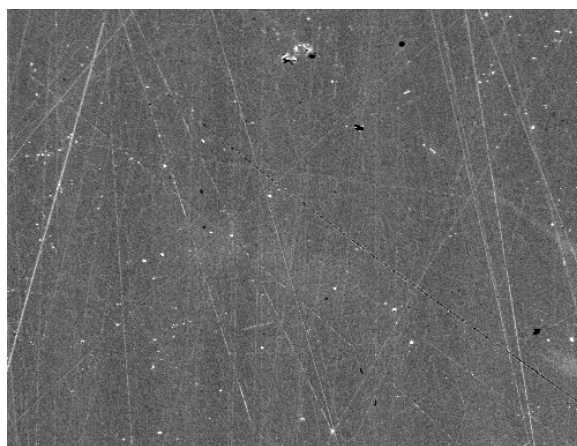
Leitung 3 15.3.01 (2 Wo.) 1000-fach 20 µm

**Bild 27a** Kontrollstrecke nach 2 Wochen  
(Kategorie 2)



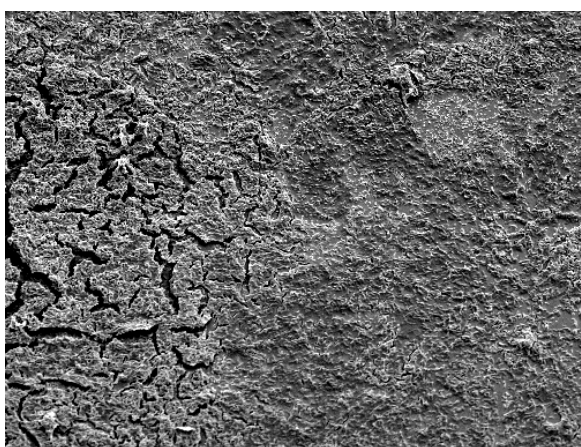
Leitung 1 23.3.01 (3 Wo.) 1040-fach 20 µm

**Bild 26b** 0,5 mg/L Nac nach 3 Wochen  
(Kategorie 4)



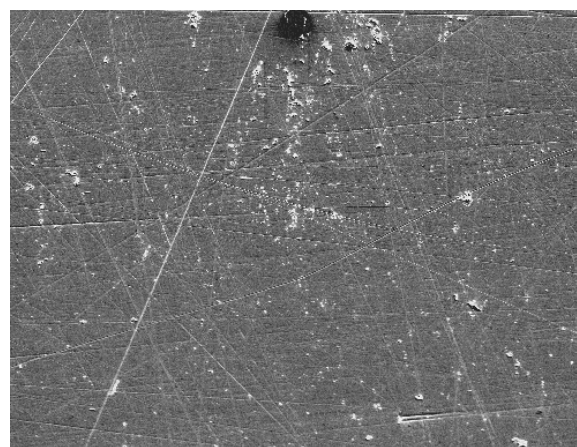
Leitung 3 23.3.01 (3 Wo.) 1040-fach 20 µm

**Bild 27b** Kontrollstrecke nach 3 Wochen  
(Kategorie 2)



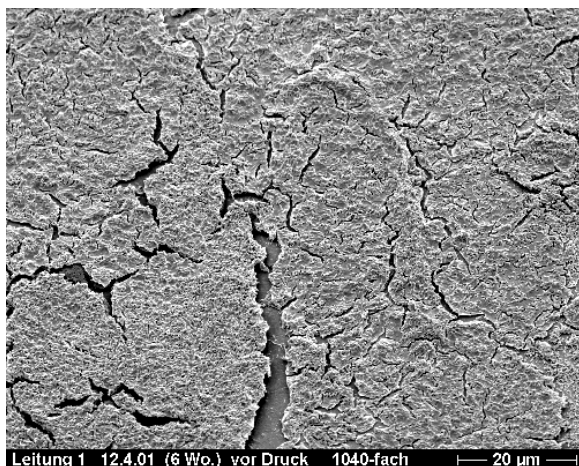
Leitung 1 4.4.01 (5 Wo.) 1000-fach 20 µm

**Bild 26c** 0,5 mg/L Nac nach 5 Wochen  
(Kategorie 5)

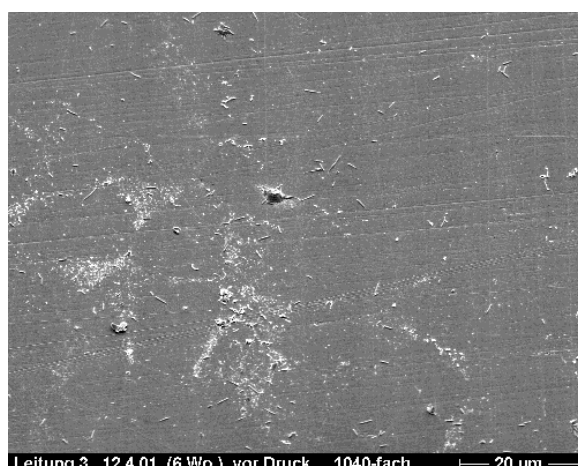


Leitung 3 4.4.01 (5 Wo.) 1000-fach 20 µm

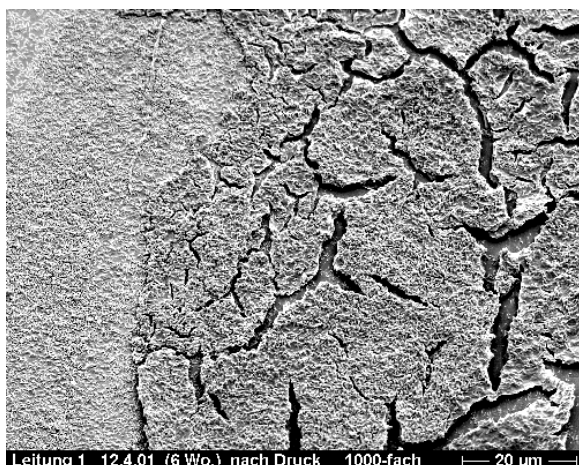
**Bild 27c** Kontrollstrecke nach 5 Wochen  
(Kategorie 2)



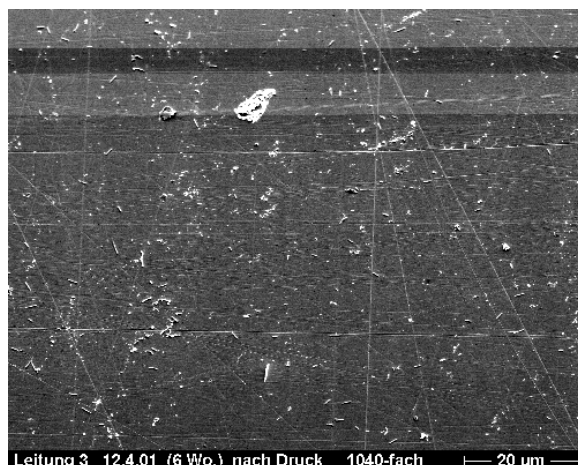
**Bild 26d** 0,5 mg/L Nac nach 6 Wochen  
**vor Spülung**  
(Kategorie 6)



**Bild 27d** Kontrollstrecke nach 6 Wochen  
**vor Spülung**  
(Kategorie 2)



**Bild 26e** 0,5 mg/L Nac nach 6 Wochen  
**nach Spülung**  
(Kategorie 6)



**Bild 27e** Kontrollstrecke nach 6 Wochen  
**nach Spülung**  
(Kategorie 2)

### 3.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Oberflächenuntersuchung

Die Beurteilung der Besiedlungsdichte anhand der LIVE/DEAD-gefärbten Coupons erbrachte in allen Fällen ein ähnliches Ergebnis wie die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (siehe 3.3.1). Ein Unterschied wurde bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure festgestellt. Während durch die rasterelektronenmikroskopische Auswertung nach der Spülung weniger Mikroorganismen beobachtet wurden als vorher, zeigte sich durch die LIVE/DEAD-Färbung kein Unterschied zwischen der Besiedlungsdichte vor und nach der Spülung.

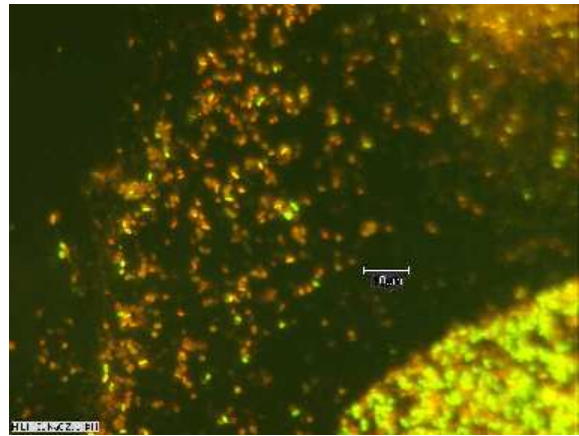
Neben der Beurteilung der Besiedlungsdichte war es mit der LIVE/DEAD-Färbung möglich, tote und lebende Mikroorganismen zu unterscheiden. Tote Mikroorganismen erscheinen durch die Färbung rot und lebende fluoreszieren grün. Die Oberflächenbesiedlung, die sich im Wasser mit 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure gebildet hatte, wies zum Ende des Versuchs, nach 6 Wochen, überwiegend lebende Zellen auf. Vereinzelt waren rote bzw. tote Mikroorganismen zu erkennen. Dieses Verhältnis zeigte sich auch nach der Spülung. Die Besiedlung bei 0,5 mg/L Natriumacetat wies hauptsächlich grün-fluoreszierende, das heißt lebende Mikroorganismen auf. Nach der Spülung wurden jedoch auch rote Bereiche sichtbar, die der Farbe nach tote Mikroorganismen enthielten.

In den Bildern 28a-c sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Oberflächenbesiedlung bei Zudosierung von 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure (Lig) nach 2, 3 und 5 Wochen dargestellt. Diesen Bildern gegenübergestellt ist die Besiedlungsentwicklung bei 0,5 mg/L Natriumacetat (Nac) (Bild 29a-c). Die vor und nach der Spülung aus beiden Teststrecken entnommenen Coupons sind in den Bildern 28d-e sowie 29d-e zu sehen.

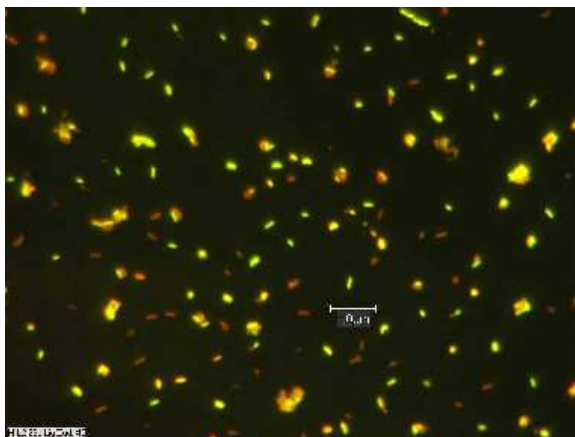




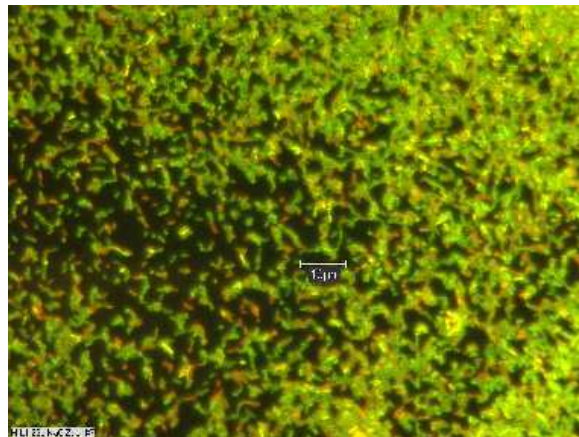
**Bild 28a** 0,5 mg/L Lig nach 2 Wochen  
(Kategorie 1)



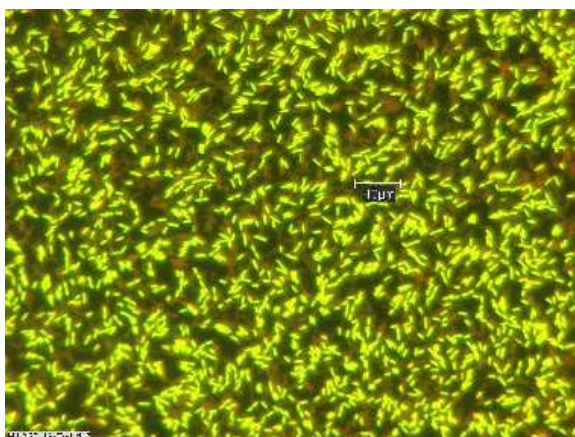
**Bild 29a** 0,5 mg/L Nac nach 2 Wochen  
(Kategorie 3)



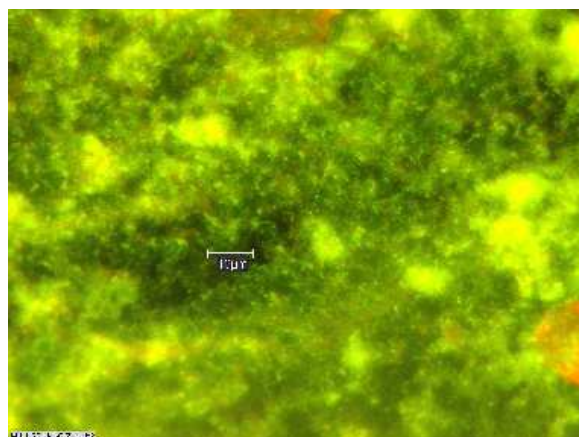
**Bild 28b** 0,5 mg/L Lig nach 3 Wochen  
(Kategorie 3)



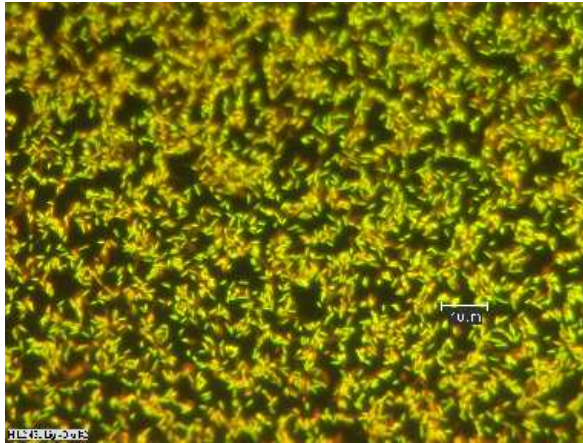
**Bild 29b** 0,5 mg/L Nac nach 3 Wochen  
(Kategorie 4)



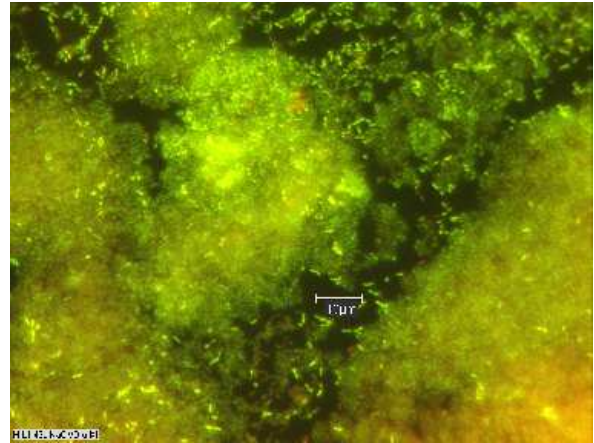
**Bild 28c** 0,5 mg/L Lig nach 5 Wochen  
(Kategorie 4)



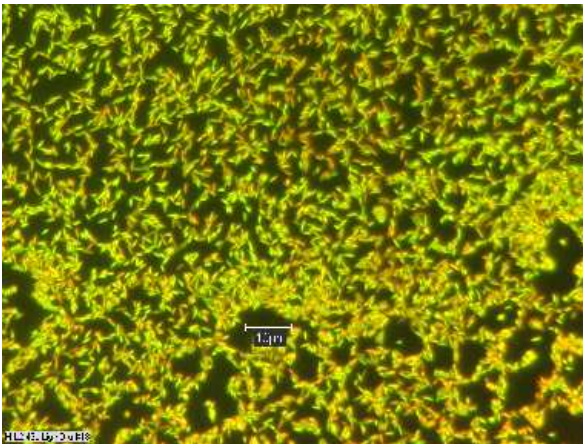
**Bild 29c** 0,5 mg/L Nac nach 5 Wochen  
(Kategorie 6)



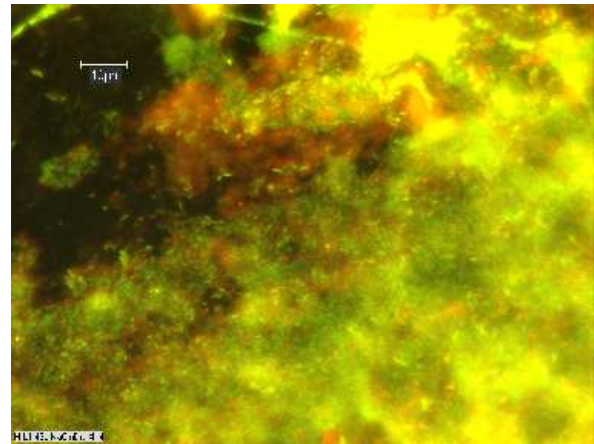
**Bild 28d** 0,5 mg/L Lig nach 6 Wochen  
**vor Spülung**  
(Kategorie 4)



**Bild 29d** 0,5 mg/L Nac nach 6 Wochen  
**vor Spülung**  
(Kategorie 6)



**Bild 28e** 0,5 mg/L Lig nach 6 Wochen  
**nach Spülung**  
(Kategorie 4)



**Bild 29e** 0,5 mg/L Nac nach 6 Wochen  
**nach Spülung**  
(Kategorie 6)

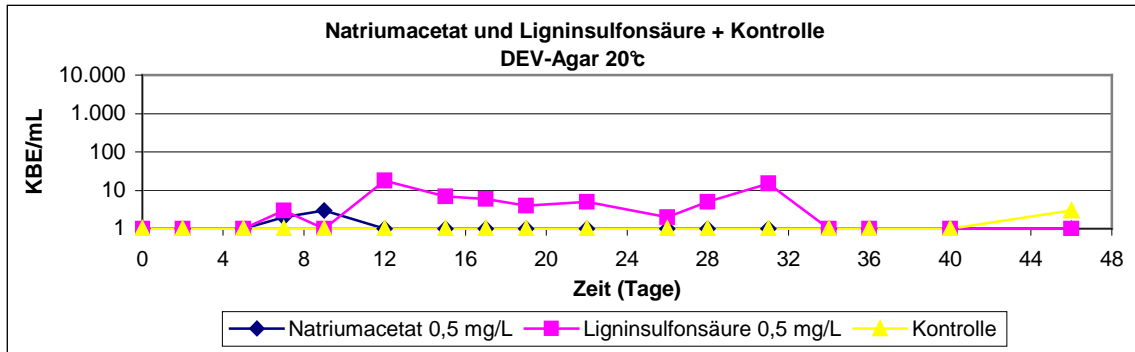
### 3.4.3 Koloniezahsentwicklung während der Zudosierung

Die Koloniezahsentwicklung im fließenden Wasser mit 0,5 mg/L Natriumacetat und Ligninsulfonsäure, im Vergleich zur Kontrollstrecke, ist in den Bildern 30a-d grafisch dargestellt. Die Bilder 31a-d zeigen die Ergebnisse der Koloniezahlbestimmungen im Wasser mit 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure im Vergleich zur Kontrollstrecke. Die Verbindungslinien zwischen den Punkten dienen dabei der leichteren Zuordnung und Bewertung.

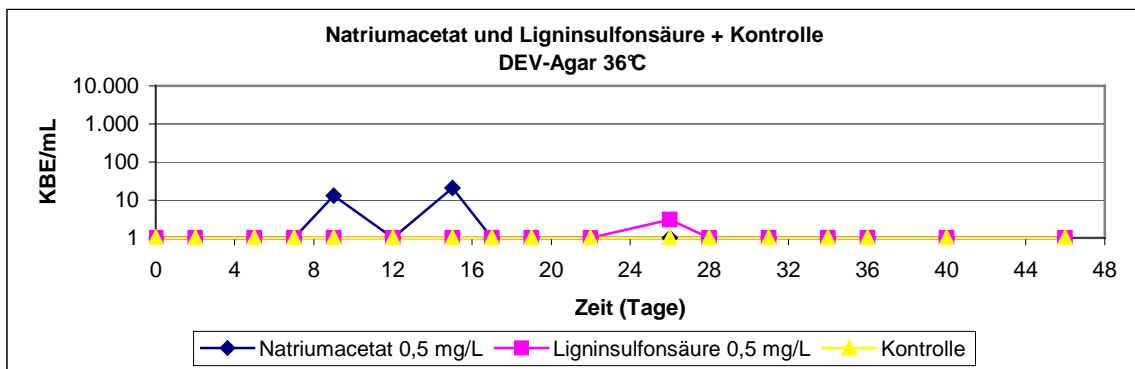
Während der gesamten Versuchsdauer zeigte sich in der Kontrollleitung ein konstant niedriges Niveau von  $< 5$  KBE/mL. Bei Zudosierung von 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure wurden mit DEV-Agar (20°C) höhere Koloniezahlen festgestellt als in der Kontrolle, jedoch lagen diese bei maximal 20 KBE/mL. Auch mit R2A-Medium wurden bei einer Inkubationstemperatur von 11°C erhöhte Koloniezahlen festgestellt, die jedoch stets unter 10 KBE/mL lagen (Bild 30c). Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich mit R2A-Medium und einer Inkubationstemperatur von 20°C. Auch in diesem Fall lagen die Koloniezahlen bis auf 1 Untersuchungstag (25 KBE/mL) unter 10 KBE/mL. Bei höherer Ligninsulfonsäure-Konzentration von 1 mg/L stiegen die Koloniezahlen während der Zudosierung stärker an als bei Zusatz von 0,5 mg/L. Das ließ sich insbesondere mit DEV-Agar (20°C/36°C) nachweisen. Hier lagen die festgestellten Koloniezahlen bis zu 2 log-Stufen höher als bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure. Werden diese Werte mit den Koloniezahlen bei 0,5 mg/L Natriumacetat verglichen, so fällt auf, dass die mit DEV-Agar bestimmte Koloniezahl bei 20°C stets unter 10 KBE/mL lag und bei 36°C nur in 2 Fällen über 10 KBE/mL. Mit R2A-Medium und einer Inkubationstemperatur von 11°C wurde bei 0,5 mg/L Natriumacetat nach wenigen Tagen ein Koloniezahlanstieg auf ca. 200 KBE/mL festgestellt. Dieses Niveau wurde über den weiteren Verlauf beibehalten und sank zum Schluss der Versuchsreihe um 1 log-Stufe ab. Im Vergleich dazu wurden mit R2A-Medium und 20°C Inkubationstemperatur in den letzten Tagen des Versuchsdurchgangs Werte von ca. 1.500 KBE/mL bestimmt, jedoch auch hier gefolgt von einem Koloniezahlabfall um 1 log-Stufe am Schluss des Versuchs.

*E. coli*, Coliforme Bakterien und *Pseudomonas aeruginosa* wurden während der Zudosierungsphase weder in den Wasserproben der Zuleitung noch in Proben der Testleitungen nachgewiesen.

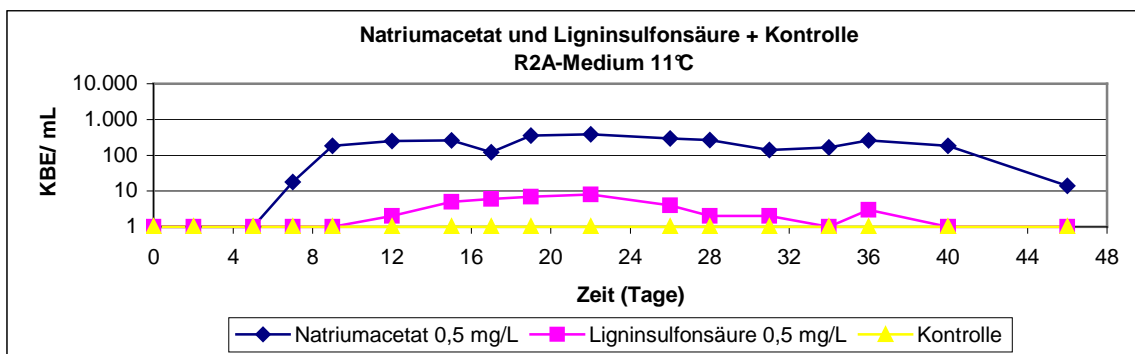




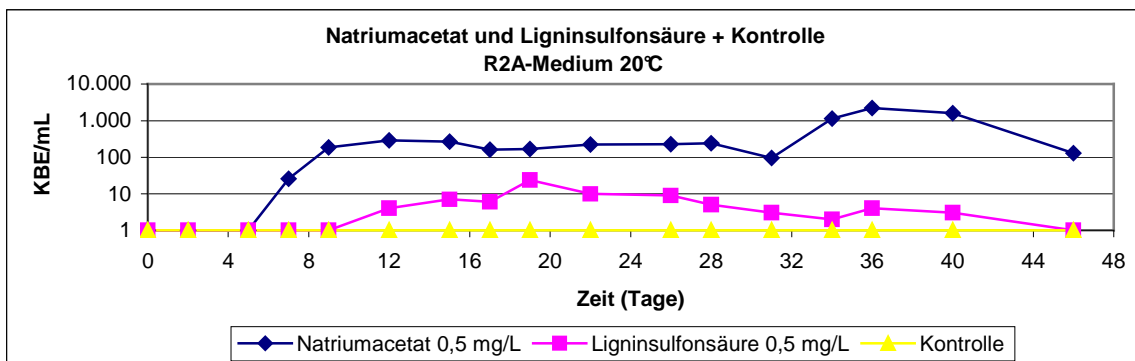
**Bild 30a** Vergleich der mit DEV-Agar bei 20°C bestimmten KBE/m L im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



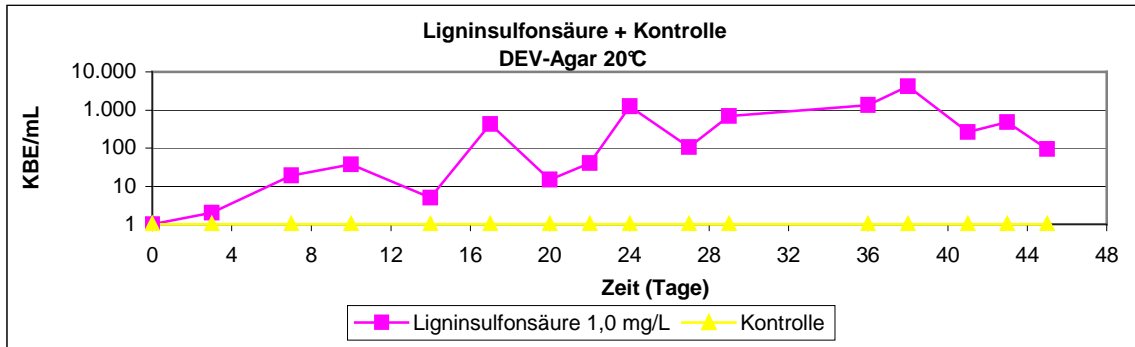
**Bild 30b** Vergleich der mit DEV-Agar bei 36°C bestimmten KBE/m L im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



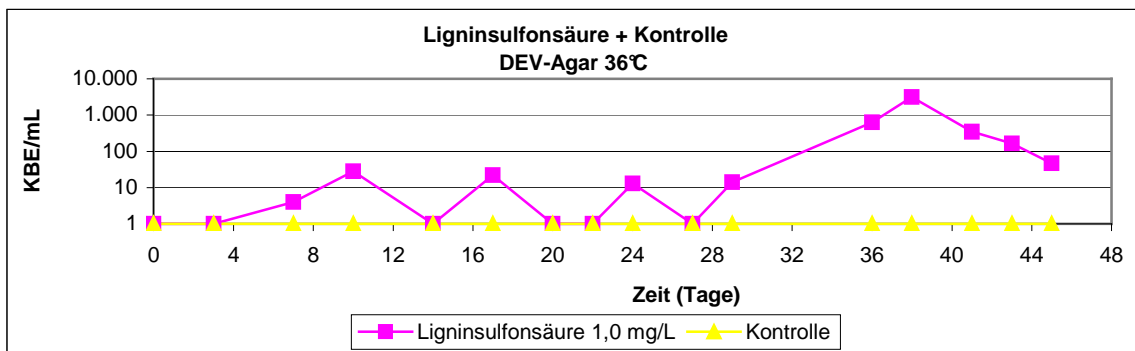
**Bild 30c** Vergleich der mit R2A-Medium bei 11°C bestimmten KBE /mL im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



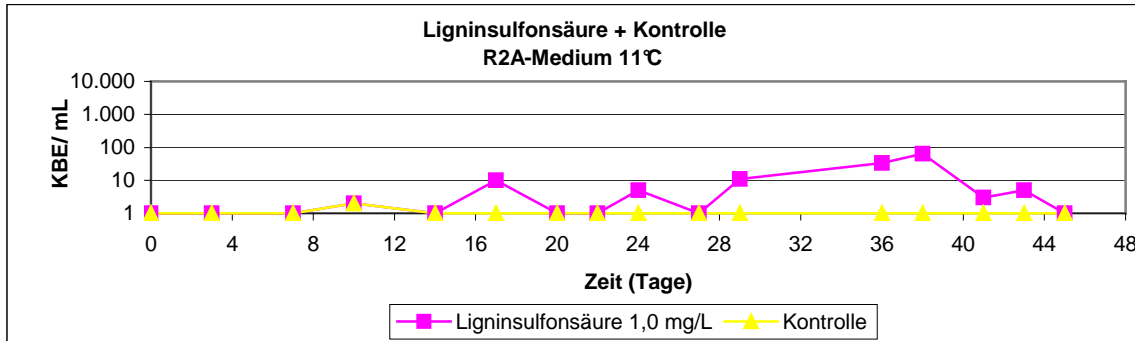
**Bild 30d** Vergleich der mit R2A-Medium bei 20°C bestimmten KBE /mL im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



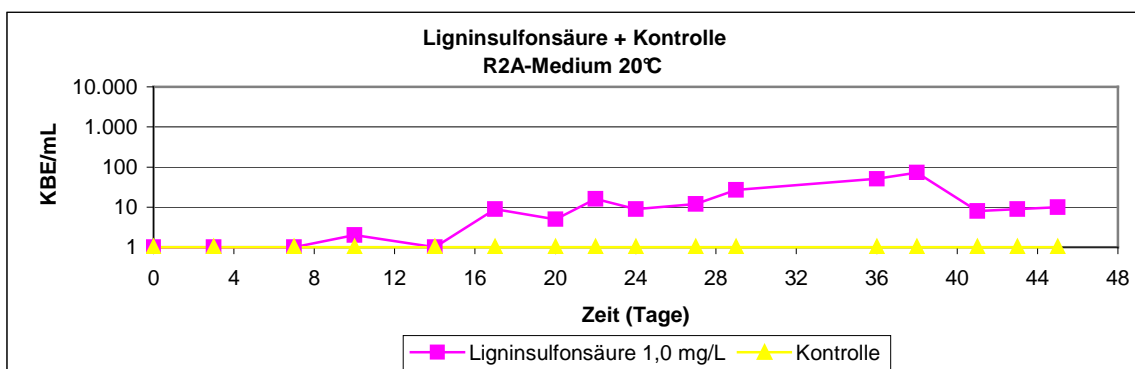
**Bild 31a** Vergleich der mit DEV-Agar bei 20°C bestimmten KBE/m L im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



**Bild 31b** Vergleich der mit DEV-Agar bei 36°C bestimmten KBE/m L im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



**Bild 31c** Vergleich der mit R2A-Medium bei 11°C bestimmten KBE /mL im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen

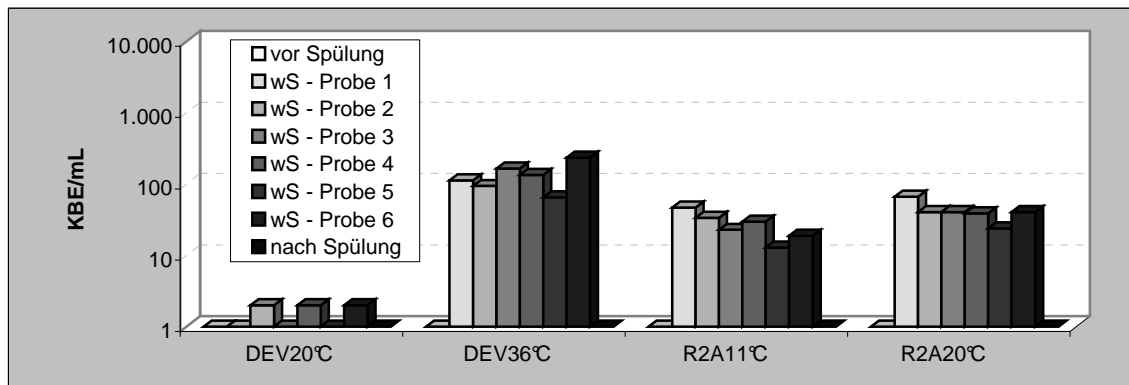


**Bild 31d** Vergleich der mit R2A-Medium bei 11°C bestimmten KBE /mL im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



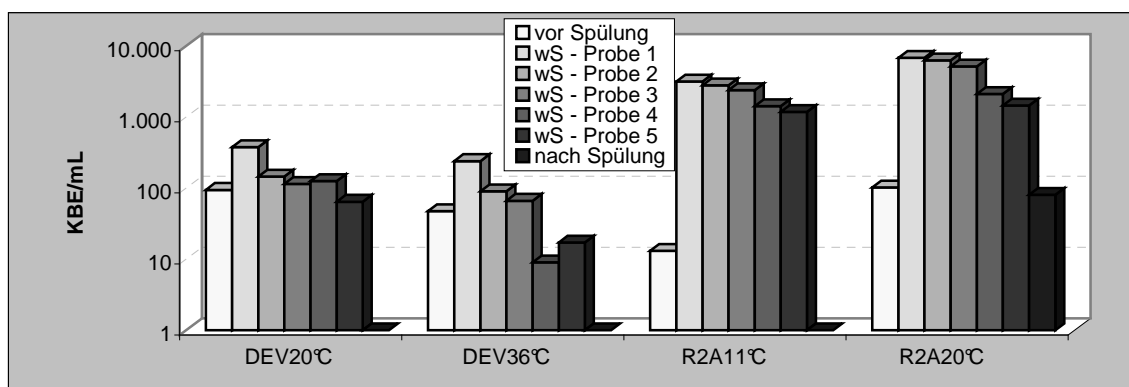
### 3.4.4 Koloniezahl in den Wasserproben vor, während und nach der Spülung

Im Wasser mit 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure wurde direkt vor und 1 h nach der Spülung mit DEV-Agar (20 und 36°C) und R2A-Medium (11 und 20°C) eine Koloniezahl von  $\leq 5$  KBE/mL ermittelt. In den 6 Proben, die während der Spülung genommen wurden, ließ sich mit DEV-Agar und einer Inkubationstemperatur von 36°C ein Anstieg der KBE/mL auf über 100 feststellen. Die Bestimmung der Koloniezahl in diesen Proben mit R2A-Medium (11 und 20°C) ergab Koloniezahlen zwischen 10 und 100 KBE/mL (Bild 32).



**Bild 32** KBE/mL auf DEV und R2A vor, während (wS) und nach der Spülung, bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure

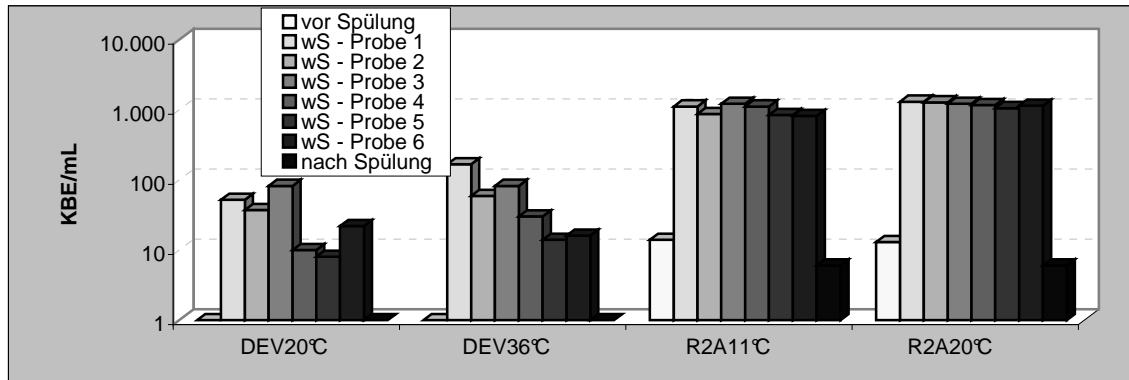
Im Wasser mit 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure wurde während der Spülung mit R2A-Medium (11 und 20°C) ein deutlicher Anstieg der Koloniezahl auf über 1.000 KBE/mL festgestellt. 1 h nach der Spülung lag die mit R2A-Medium (11°C) ermittelte Koloniezahl bei  $\leq 5$  KBE/mL. Die durch den Probenansatz auf R2A-Medium bei einer Inkubationstemperatur von 20°C erhaltenen Koloniezahlen lagen bei 80 KBE/mL. Das entsprach in etwa dem vor der Spülung festgestellten Wert (Bild 33).



**Bild 33** KBE/mL auf DEV und R2A vor, während (wS) und nach der Spülung, bei 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure

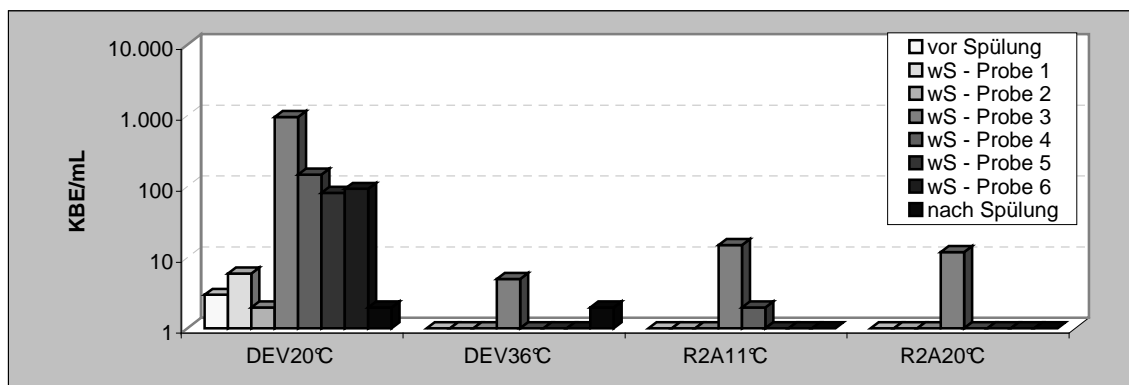
Im Wasser der Leitung, in die 0,5 mg/L Natriumacetat dosiert wurde, wurde mit DEV-Agar ebenfalls ein Anstieg der Koloniezahl auf ca. 100 KBE/mL und mit R2A-Medium auf ca. 1.000 KBE/mL nachgewiesen (Bild 34). Die mit R2A-Medium (11 und 20°C) festgestellten Koloniezahlen waren jedoch nicht so hoch wie im Spülungswasser mit 1 mg/L Ligninsulfon-

säure. In diesem Fall wurden maximale Koloniezahlen von ca. 5.000 KBE/mL festgestellt (Bild 33).



**Bild 34** KBE/mL auf DEV und R2A vor, während (wS) und nach der Spülung, bei 0,5 mg/L Natriumacetat

Auffällig sind die Ergebnisse der Wasserproben aus der Kontrollleitung (Bild 35). Während sich über die gesamte Versuchsdauer mit DEV-Agar und R2A-Medium ein konstant niedriges Koloniezahl-Niveau zeigte, wurde während der Spülung ein Anstieg der KBE/mL auf ca. 1.000 festgestellt (DEV-Agar 20°C).



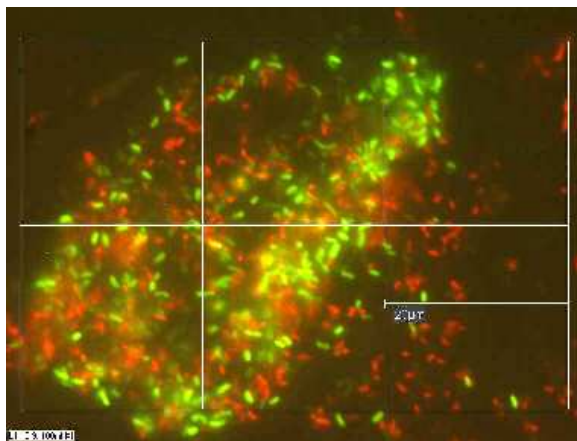
**Bild 35** KBE/mL auf DEV und R2A vor, während (wS) und nach der Spülung der Kontrollleitung

*E. coli*, Coliforme Bakterien und *Pseudomonas aeruginosa* wurden in den Wasserproben vor, während und nach den Spülungen nicht nachgewiesen.

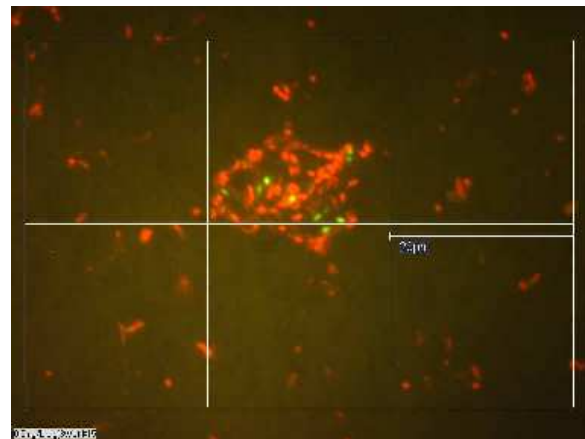
### 3.4.5 Untersuchung der Wasserproben auf Plaques

Während der Zudosierung von 0,5 mg/L Natriumacetat und 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure wurde das Wasser neben der Koloniezahl auch auf das Vorhandensein von Bakterienaggregaten bzw. Plaques hin untersucht. Dafür wurden definierte Volumina (10 - 100 mL) der Wasserproben filtriert und im Anschluss daran die Filteroberfläche LIVE/DEAD-gefärbt. Die für diese Untersuchung entnommenen Wasserproben wurden vor ihrer Aufbereitung keiner Homogenisation (z. B. Vortex, Ultraschall usw.) unterzogen, um evtl. aufgefangene Plaques nicht zu zerstören. In den Wasserproben mit 0,5 mg/L Natriumacetat

zeigten sich nach ca. 3 Wochen erste Plaques im mikroskopischen Feld. Die zuvor untersuchten Proben aus dieser Leitung wiesen einzeln vorkommende Zellen auf. Von der 3. Woche an bis zum Versuchsende wurden bei jeder Probenahme Plaques im Wasser nachgewiesen. Die Wasserproben mit 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure enthielten etwa vom gleichen Zeitpunkt an Plaques. Außerdem wurde festgestellt, dass die im Wasser losgelösten Stücke wesentlich größer (ca. 40×60 µm) waren als im Wasser mit Ligninsulfonsäure (ca. 20×20 µm). Die Plaques aus der Besiedlung bei Ligninsulfonsäure enthielten jeweils ca. 50 Zellen (Bild 36b). Die durchschnittliche Zellzahl in den Plaques bei Natriumacetat betrug ca. 400 pro Plaques (Bild 36a).



**Bild 36a** Plaques bei Zudosierung von Natriumacetat

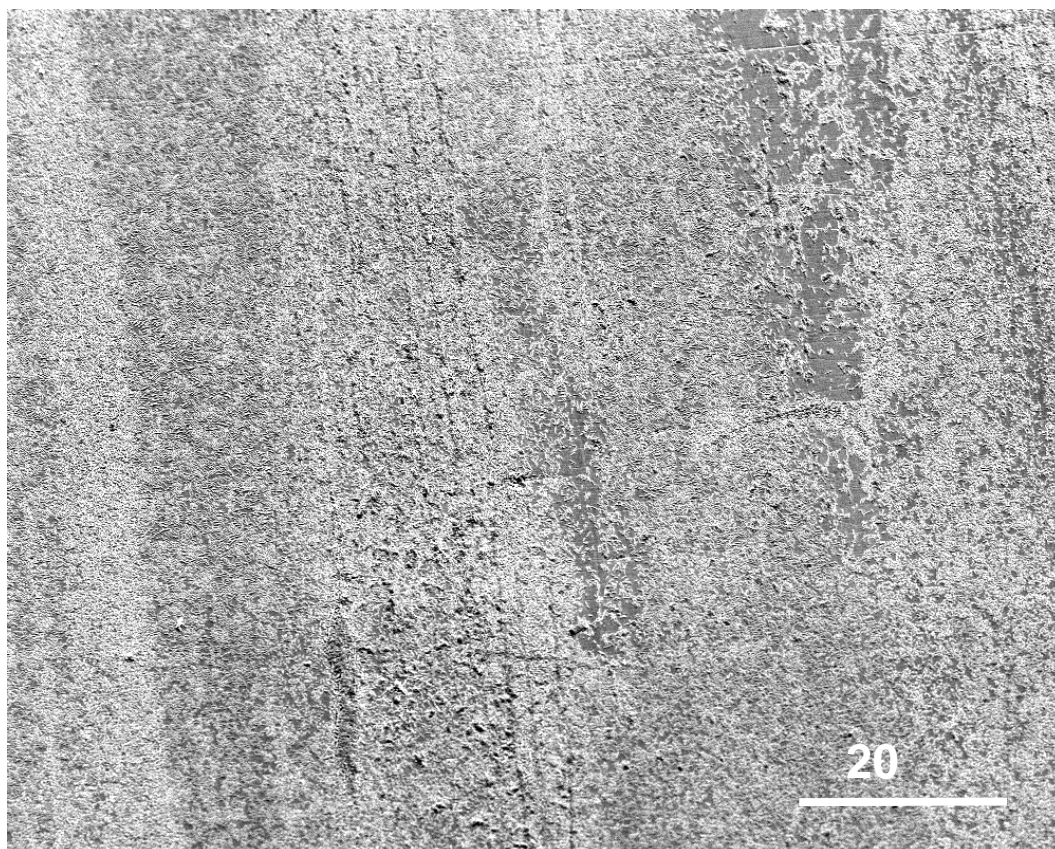


**Bild 36b** Plaques bei Zudosierung von Ligninsulfonsäure

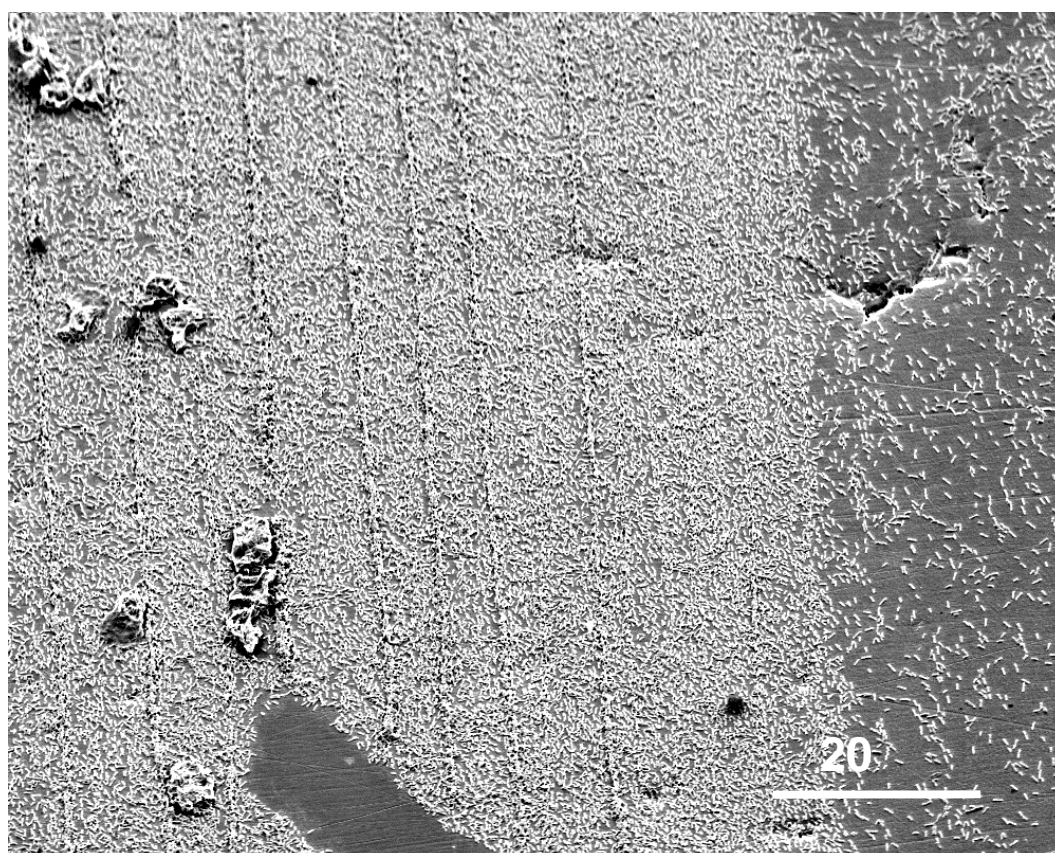
### 3.4.6 Vergleich unterschiedlicher Besiedlungsstrukturen

Die Besiedlungsstruktur zeigte im Wasser mit Ligninsulfonsäure und Natriumacetat deutliche Unterschiede auf. Die Bakterien waren bei Natriumacetat größtenteils in eine ausgeprägte EPS-Schicht eingebettet. In dieser Schicht lagen die Mikroorganismen sowohl in Clustern, als auch einzeln vor (Bild 39). Bei Ligninsulfonsäure waren ebenfalls Bereiche zu erkennen, in denen die Bakterien in einer EPS-Schicht vorlagen. Jedoch waren diese wesentlich schwächer ausgeprägt als bei Natriumacetat (Bild 37 u. 38). Bei Ligninsulfonsäure-haltigem Wasser schien der Film hauptsächlich aus Bakterien zu bestehen. Bei Natriumacetat erschienen die meisten Bakterien sowohl einzeln als auch in Verbänden von EPS umhüllt.

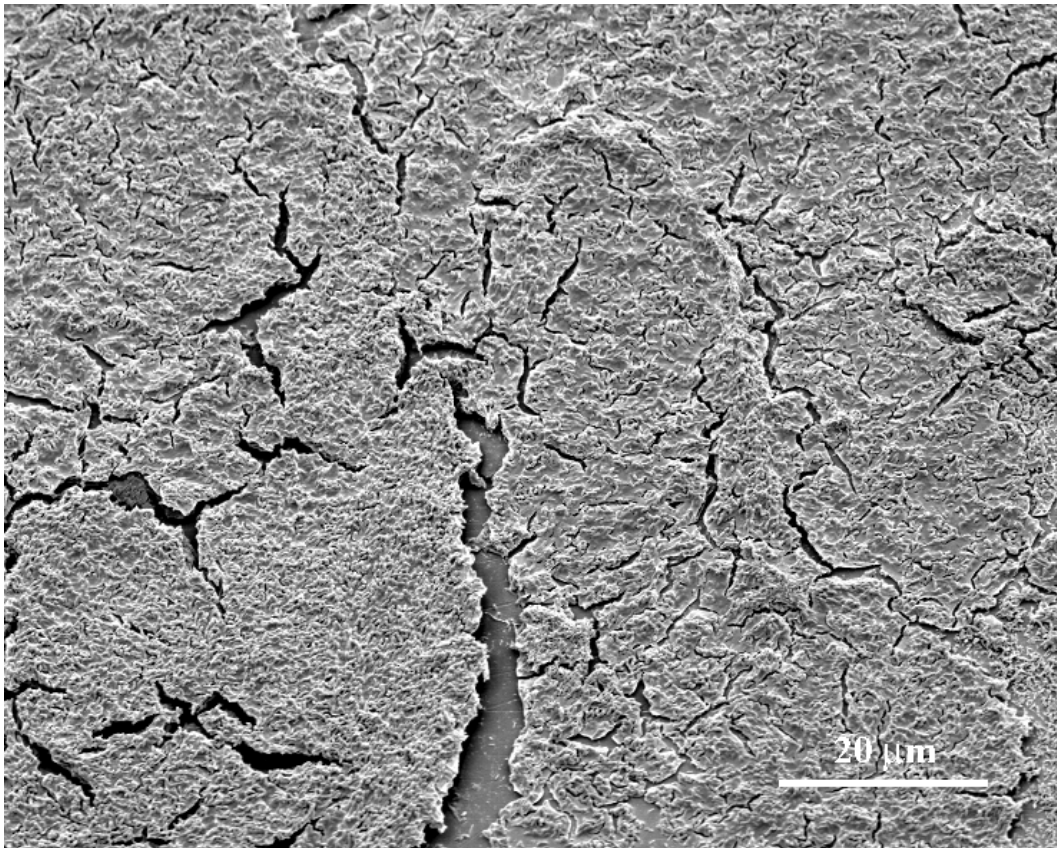
Vergleicht man die Besiedlungsstrukturen bei den Versuchen mit 0,5 mg/L und 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure miteinander, so zeigt sich ein ähnlicher Aufbau. Bei der geringeren Konzentration bildete sich vorwiegend eine einschichtige Besiedlung aus, in der stellenweise Bakterien angehäuft bzw. mehrschichtig vorlagen (Bild 37). Solche Bereiche überwogen im Erscheinungsbild bei der höheren Konzentration (Bild 38).



**Bild 37** Besiedlungsstruktur bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure



**Bild 38** Besiedlungsstruktur bei 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure



**Bild 39** Besiedlungsstruktur 0,5 mg/L Natriumacetat

### 3.5 Reinigungs- und Desinfektionsversuche

Für die Versuche wurden zunächst in 2 Testleitungen über 3 Wochen lang verschieden starke Besiedlungen generiert. Dafür wurde dem Wasser der 1. Leitung 0,5 mg/L und dem Wasser der 2. Leitung 0,05 mg/L Natriumacetat zugesetzt. Die 3. Leitung wurde von Wasser ohne Zusätze durchflossen und stellte die Kontrolle dar.

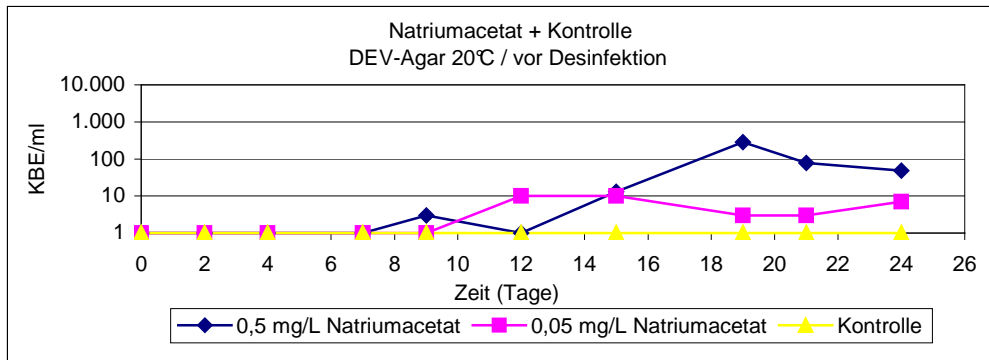
Das Wasser jeder Leitung wurde ca. 2 mal pro Woche auf seine Koloniezahl untersucht. Die Koloniezahlbestimmung erfolgte mit DEV-Agar und R2A-Medium. Vor der Desinfektion wurden aus jeder Leitung Coupons für eine Oberflächenuntersuchung entnommen und im Anschluss daran erfolgte eine Spülung bzw. eine Fließgeschwindigkeitserhöhung von 0,37 m/sec auf 0,73 m/sec. Während der Spülung wurden nacheinander 5 Wasserproben genommen, anhand derer die Koloniezahleentwicklung untersucht wurde. Für die Desinfektion wurde Wasserstoffperoxid mit einer Konzentration von 150 mg/L in die Testleitungen eingebracht und nach 24-stündiger Einwirkzeit wieder ausgespült. 1 Stunde später erfolgte in gleicher Weise wie vor der Desinfektion eine Spülung, bei der wieder Wasserproben genommen wurden. Abschließend erfolgte eine Couponentnahme. Von den jeweils 2 entnommenen Coupons wurde einer rasterelektronenmikroskopisch betrachtet, die Oberfläche des 2. Coupons LIVE/DEAD-gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

### 3.5.1 Koloniezahsentwicklung während der Zudosierung

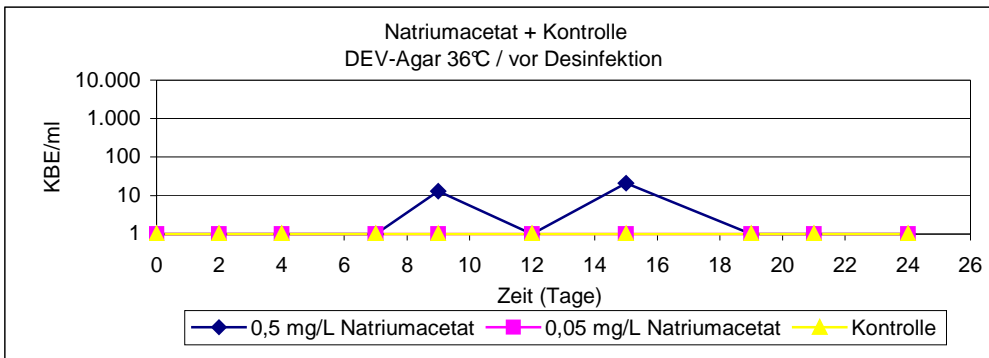
Die Kontrollleitung wies über den gesamten Verlauf ein konstant niedriges Koloniezahlniveau von unter 5 KBE/mL auf. Mit DEV-Agar (20°C) wurden im Wasser mit 0,5 mg/L Natriumacetat maximale Koloniezahlen von ca. 300 KBE/mL bestimmt. Im Vergleich dazu lagen die Koloniezahlen bei 0,05 mg/L Natriumacetat zu keinem Untersuchungszeitpunkt über 10 KBE/mL. Der bei 36°C inkubierte Parallelansatz zeigte bei 0,5 mg/L Natriumacetat an 2 Untersuchungstagen erhöhte Koloniezahlen zwischen 10 und 20 KBE/mL. Bei 0,05 mg/L Natriumacetat lagen die Koloniezahlen stets unter 5 KBE/mL. Auch mit R2A-Medium und einer Inkubationstemperatur von 11°C zeigten sich im Wasser mit 0,5 mg/L Natriumacetat höhere Koloniezahlen (bis zu 200 KBE/mL) als im Wasser mit 0,05 mg/L Natriumacetat. In diesem Fall lagen die Koloniezahlen stets unter 100 KBE/mL. Ähnliche Ergebnisse wurden mit R2A-Medium bei einer Inkubationstemperatur von 20°C festgestellt.

*E. coli*, Coliforme Bakterien und *Pseudomonas aeruginosa* wurden während der Zudosierungsphase weder in den Wasserproben der Zuleitung noch in Proben der Testleitungen nachgewiesen.

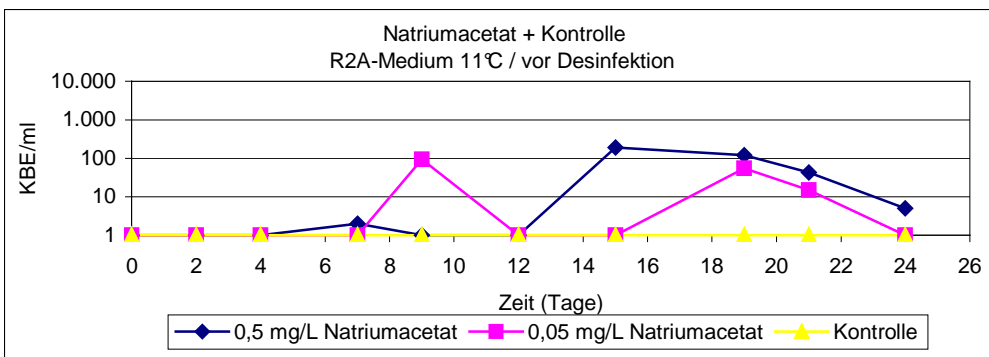




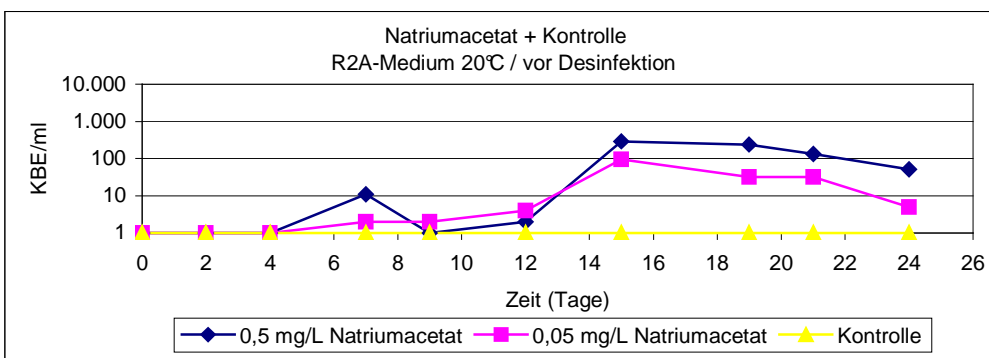
**Bild 40a** Vergleich der mit DEV-Agar bei 20°C bestimmten KBE/ mL im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



**Bild 40b** Vergleich der mit DEV-Agar bei 36°C bestimmten KBE/ mL im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



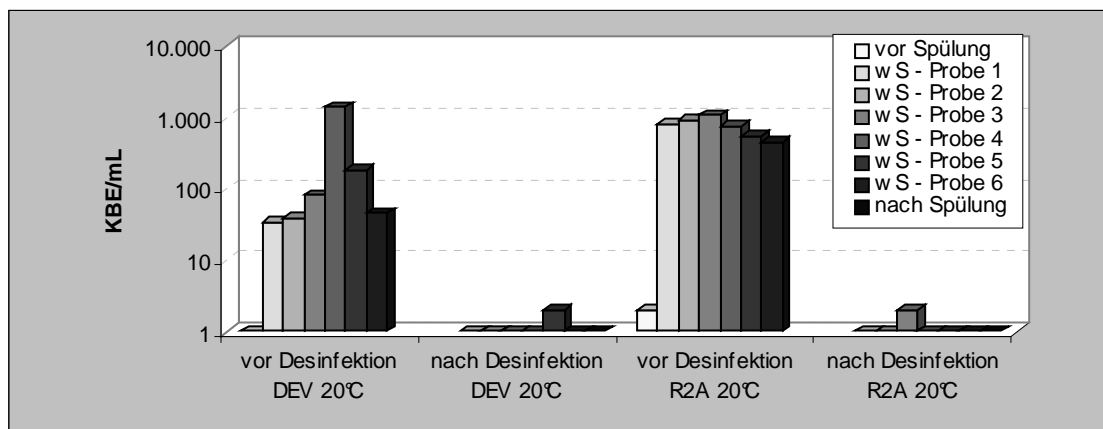
**Bild 40c** Vergleich der mit R2A-Medium bei 11°C bestimmten KBE /mL im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen



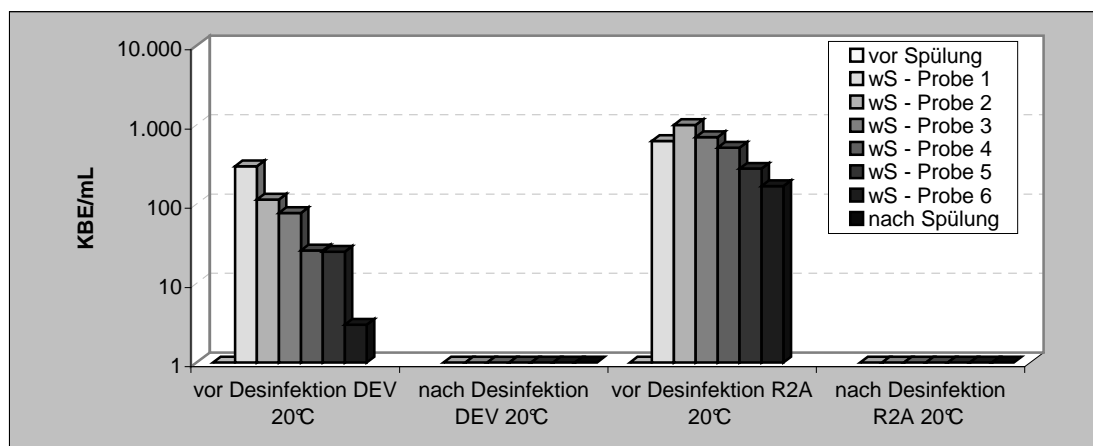
**Bild 40d** Vergleich der mit R2A-Medium bei 20°C bestimmten KBE /mL im fließenden Wasser mit und ohne organische Substanzen

### 3.5.2 Koloniezahl während der Spülungen, vor und nach Reinigung und Desinfektion

Während der Spülung zeigte sich in den Wasserproben ein Koloniezahlanstieg um mehrere log-Stufen. Dabei wurden mit DEV-Agar (20°C) im Wasser mit höherer Natriumacetat-Konzentration Maxima von knapp über 1.000 KBE/mL ermittelt (Bild 41) und bei geringerer Konzentration Maxima von ca. 300 KBE/mL (Bild 42). Mit R2A-Medium (20°C) wurden in beiden Wässern ähnliche hohe Koloniezahlen von ca. 1.000 KBE/mL festgestellt. Nach Ausspülen des Wasserstoffperoxids und 1 h Wartezeit erfolgte die 2. Spülung. Die Koloniezahlen in den während dieser Spülung genommenen Wasserproben lagen sowohl in der mit 0,5 mg/L Natriumacetat durchströmten Leitung (Bild 41) als auch in der mit 0,05 mg/L Natriumacetat durchflossenen Leitung (Bild 42) aller unter 5 KBE/mL.



**Bild 41** KBE/mL auf DEV und R2A (20°C) während der Spülungen vor und nach der Desinfektion, bei 0,5 mg/L Natriumacetat (wS = während Spülung)



**Bild 42** KBE/mL auf DEV und R2A (20°C) während der Spülungen vor und nach der Desinfektion, bei 0,05 mg/L Natriumacetat (wS = während Spülung)

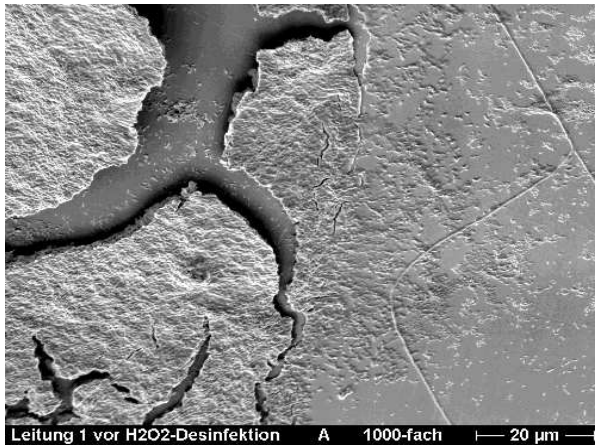
*E. coli*, Coliforme Bakterien und *Pseudomonas aeruginosa* wurden in den Wasserproben vor, während und nach den Spülungen nicht festgestellt.



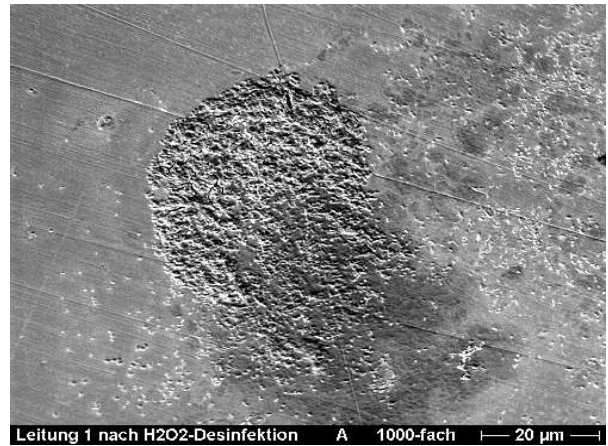
### **3.5.3 Rasterelektronenmikroskopische Oberflächenuntersuchung vor und nach Reinigung und Desinfektion**

Die Auswertung der Coupons erfolgte nach der unter 3.1.1 dargestellten Kategorisierung. In den Bildern 43a und 43b ist die Besiedlung bei 0,5 mg/L Natriumacetat vor und nach der Desinfektion dargestellt. Die Besiedlung vor und nach der Desinfektion bei 0,05 mg/L Natriumacetat ist in den Bildern 44a und 44b wiedergegeben. Die Auswirkung der Desinfektion auf die Besiedlung in der Kontrollstrecke ist in den Bildern 45a und 45b zu sehen.

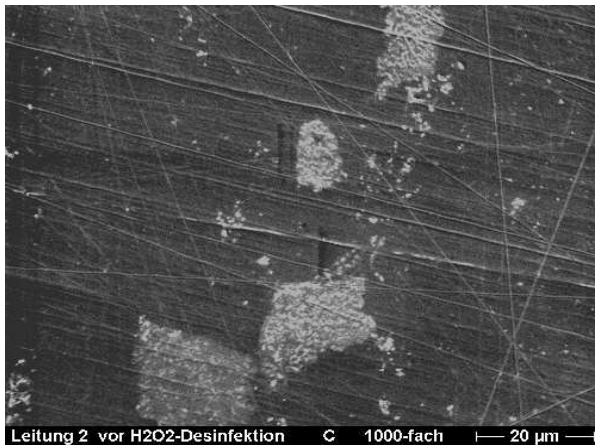
Die nach 3-wöchiger Zudosierung entnommenen Coupons wiesen deutliche Unterschiede auf. Während der Coupon aus der Leitung mit höherer Natriumacetat-Konzentration (0,5mg/L) eine ausgeprägte, mehrschichtige Besiedlung der Kategorie 5 aufwies, ließ sich auf dem Coupon aus der Leitung mit niedrigerer Konzentration (0,05 mg/L) lediglich eine schwach ausgebildete, einschichtige Besiedlung der Kategorie 3 erkennen. Nach der Desinfektion (mit anschließender Spülung) zeigte sich beim höheren Natriumacetat-Zusatz auf dem entnommenen Coupon stellenweise immer noch Besiedlung, die jedoch wesentlich geringer ausgeprägt war als vor der Desinfektion und der Kategorie 3 zugeordnet wurde. Der Coupon war überwiegend einschichtig besiedelt. Es waren jedoch auch Bereiche zu erkennen, die eine mehrschichtige Besiedlung aufwiesen. Der nach der Desinfektion aus der Leitung mit geringerer Konzentration (0,05 mg/L) entnommene Coupon schien überwiegend von der Besiedlung befreit und wurde aus diesem Grund der Kategorie 2 zugeordnet. Es waren nur noch einzeln liegende Zellen zu erkennen. Der Coupon aus der Kontrollstrecke, der vor den Spülungen entnommen wurde, zeigte eine schwache Besiedlung der Kategorie 2, die sich nach den Spülungen kaum verändert hatte.



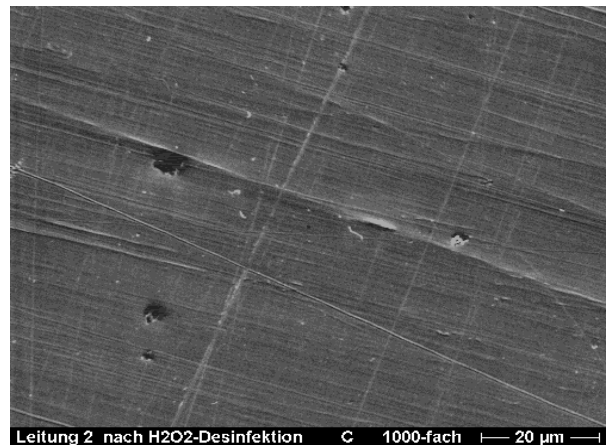
**Bild 43a** 0,5 mg/L Natriumacetat  
nach 3 Wochen  
vor Reinigung und Desinfektion



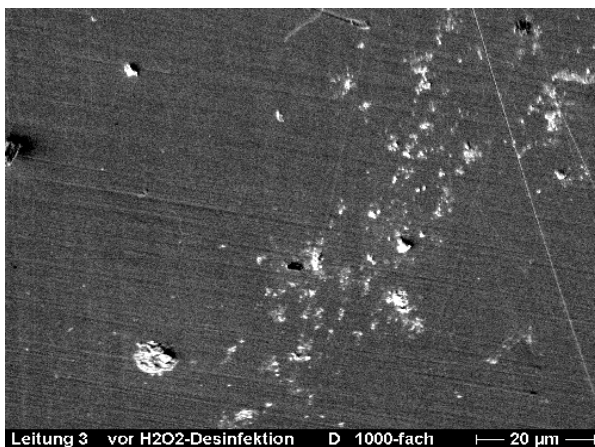
**Bild 43b** 0,5 mg/L Natriumacetat  
nach 3 Wochen  
nach Reinigung und Desinfektion



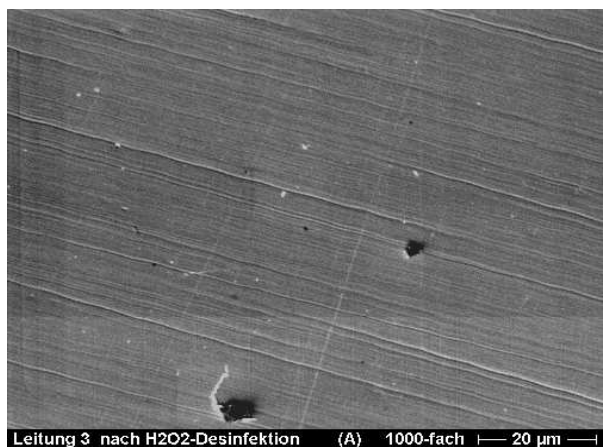
**Bild 44a** 0,05 mg/L Natriumacetat  
nach 3 Wochen  
vor Reinigung und Desinfektion



**Bild 44b** 0,05 mg/L Natriumacetat  
nach 3 Wochen  
nach Reinigung und Desinfektion



**Bild 45a** Kontrolle  
nach 3 Wochen  
vor Reinigung und Desinfektion

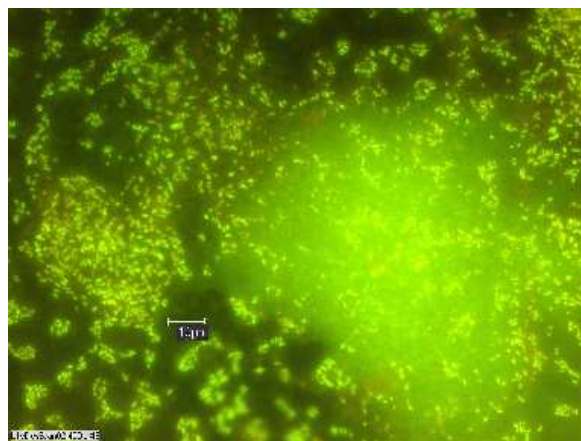


**Bild 45b** Kontrolle  
nach 3 Wochen  
nach Reinigung und Desinfektion

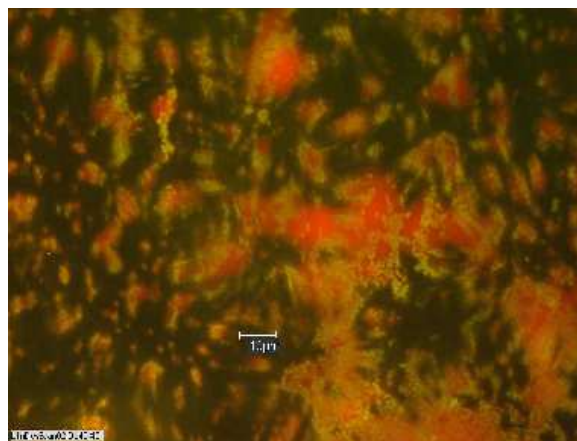
### **3.5.4 Fluoreszenzmikroskopische Oberflächenuntersuchung vor und nach Reinigung und Desinfektion**

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten die gleichen Ergebnisse wie die rasterelektronenmikroskopischen. In den Bildern 46a und 46 b sind die LIVE/DEAD-gefärbten Besiedlungen bei 0,5 mg/L Natriumacetat vor und nach der Desinfektion wiedergegeben und in den Bildern 47a und 47b die bei 0,05 mg/L Natriumacetat. Die Bilder 48a und 48b geben die Oberflächenbesiedlung der Kontrollstrecke vor und nach Desinfektion wieder.

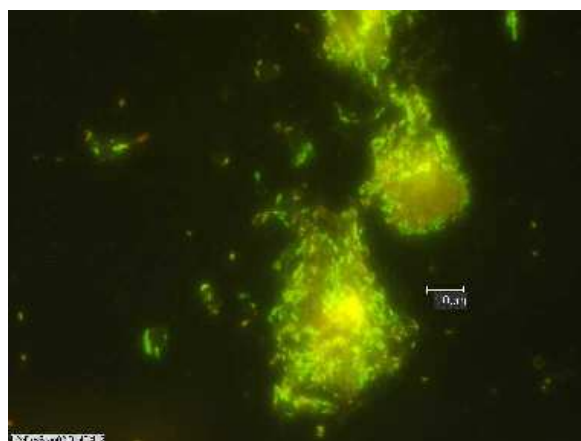
Während auf den Coupons aus der Leitung mit höherem Natriumacetat-Zusatz (0,5mg/L) eine mehrschichtige Besiedlung der Kategorie 5 zu erkennen war, zeigte der Coupon bei niedrigerer Konzentration (0,05 mg/L) wiederum eine schwächer ausgeprägte Besiedlung der Kategorie 3. Die Desinfektion schien den mehrschichtigen Biofilm stark reduziert zu haben. Es wurden jedoch noch partiell mehrschichtige Areale beobachtet. Aus diesem Grund wurde die verbliebene Besiedlung der Kategorie 3 zugeordnet. Die bei 0,05 mg/L Natriumacetat gebildete Besiedlung war stark reduziert, jedoch nicht gänzlich entfernt und entsprach der Kategorie 2. Die Coupons aus der Kontrollstrecke unterschieden sich geringfügig. Der vor der Spülung erkennbare Belag der Kategorie 2 schien hauptsächlich aus nicht-mikrobiellen Ablagerungen zu bestehen.



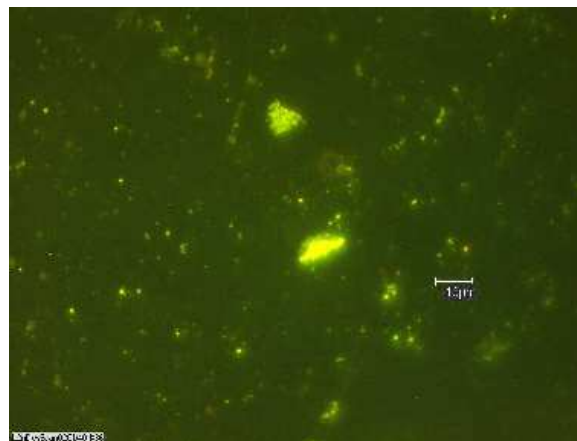
**Bild 46a** 0,5 mg/L Natriumacetat  
nach 3 Wochen  
vor Reinigung und Desinfektion



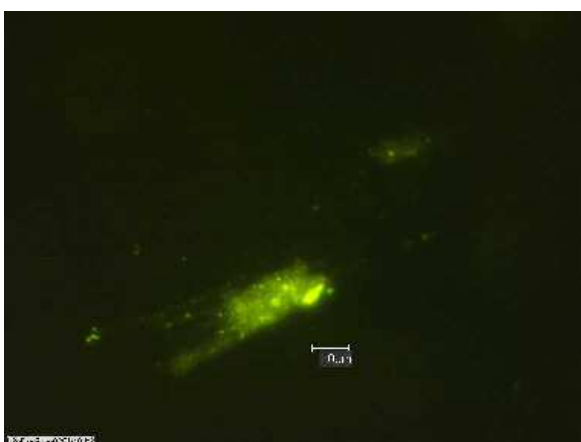
**Bild 46b** 0,5 mg/L Natriumacetat  
nach 3 Wochen  
nach Reinigung und Desinfektion



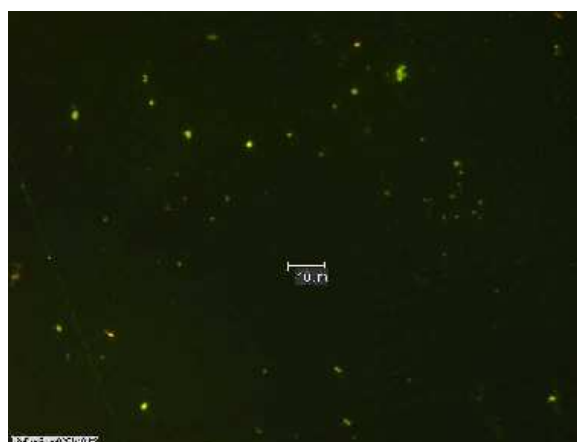
**Bild 47a** 0,05 mg/L Natriumacetat  
nach 3 Wochen  
vor Reinigung und Desinfektion



**Bild 47b** 0,05 mg/L Natriumacetat  
nach 3 Wochen  
nach Reinigung und Desinfektion



**Bild 48a** Kontrolle  
nach 3 Wochen  
vor Reinigung und Desinfektion



**Bild 48b** Kontrolle  
nach 3 Wochen  
nach Reinigung und Desinfektion

### 3.5.5 Trübungswerte vor, während und nach den Spülungen

In den vor, während und nach den Reinigungs- und Desinfektionsversuchen genommenen Wasserproben wurde die Trübung gemessen. Außerdem wurde das Wasser der Zuleitung auf diesen Parameter untersucht.

Die Trübungsmessungen zeigten vor der Desinfektion in allen Leitungen höhere Werte an als nachher (Tabelle 8). Während der Spülung wurden in allen 3 Leitungen erhöhte Werte festgestellt werden (Tabelle 9). Die Messwerte der Proben aus der Kontrollleitung waren vor der Desinfektion ähnlich hoch wie nachher.

Tabelle 8 Trübungswerte der bei normaler Fließgeschwindigkeit (0,37 m/sec) entnommenen Wasserproben, vor und nach der Desinfektion

	vor Desinfektion	nach Desinfektion
	Trübung (FNU)	Trübung (FNU)
Zuleitung	0,26	0,28
Leitung 1 (0,5 mg/L Natriumacetat)	0,30	0,29
Leitung 2 (0,05 mg/L Natriumacetat)	0,30	0,22
Kontrollleitung	0,22	0,16

Tabelle 9 Trübungswerte der während der Spülungen entnommenen Wasserproben, vor und nach Desinfektion

		Spülung vor Desinfektion	Spülung nach Desinfektion
		Trübung (FNU)	Trübung (FNU)
Leitung 1	Probe A	3,06	0,45
Leitung 1	Probe B	3,28	0,34
Leitung 1	Probe C	3,22	0,56
Leitung 1	Probe D	1,08	0,24
Leitung 1	Probe E	0,91	0,48
Leitung 1	Probe F	0,98	0,25
Leitung 2	Probe A	1,41	0,60
Leitung 2	Probe B	0,52	0,21
Leitung 2	Probe C	0,83	0,51
Leitung 2	Probe D	0,36	0,67
Leitung 2	Probe E	0,20	0,43
Leitung 2	Probe F	0,54	0,48
Kontrolle	Probe A	0,36	0,39
Kontrolle	Probe B	0,76	0,46
Kontrolle	Probe C	0,74	0,69
Kontrolle	Probe D	0,66	0,51
Kontrolle	Probe E	0,40	0,55
Kontrolle	Probe F	0,74	0,37

## 4 Diskussion

### 4.1 Oberflächenbesiedlung und Koloniezahentwicklung im stehenden Wasser unter dem Einfluss verschiedener organischer Substanzen

#### 4.1.1 Oberflächenbesiedlung

Die Ausbildung einer Oberflächenbesiedlung im stehenden Wasser hängt nach vorliegenden Ergebnissen von mehreren Faktoren ab. Neben der im Wasser befindlichen Substratart und seiner Verteilung im Wasser spielt die Konzentration des Substrats eine entscheidende Rolle. Dies zeigte sich insbesondere durch die Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von Glucose und Ligninsulfonsäure. Aus Tabelle 10 geht hervor, dass die Besiedlungsdichte bei 500 mg/L Glucose und 300 und 500 mg/L Ligninsulfonsäure nach 28 Tagen am höchsten war. Die Besiedlungsdichte entsprach in den genannten Fällen der Kategorie 4, bei der die Oberfläche von einer einschichtigen Besiedlung überzogen war, die teilweise von mehrschichtigen Bereichen überdeckt wurde. Bei geringeren Konzentrationen wurden zum gleichen Zeitpunkt lediglich Besiedlungsdichten der Kategorie 3 beobachtet, bei der die Bakterien überwiegend vereinzelt und nur stellenweise in Clustern auf der Oberfläche vorlagen.

Tabelle 10 Oberflächenbesiedlung, ausgedrückt in Kategorien, in Gegenwart organischer Substanzen

		Besiedlung nach 8 Tagen	Besiedlung nach 28 Tagen
Glucose	500 mg/L	2	4
Glucose	300 mg/L	2	3
Glucose	100 mg/L	2	3
Glucose	50 mg/L	2	3
Ligninsulfonsäure	500 mg/L	3	4
Ligninsulfonsäure	300 mg/L	2	4
Ligninsulfonsäure	100 mg/L	2	3
Ligninsulfonsäure	50 mg/L	2	3
Tween 80	1000 mg/L	2	2
Tween 80	100 mg/L	2	2
Kontrolle		2	2

1: keine Besiedlung  
3: geringe Besiedlung  
5: deutliche Besiedlung

2: sehr geringe Besiedlung  
4: mäßige Besiedlung  
6: starke Besiedlung

Die Ergebnisse der Versuche mit Tween 80 zeigten jedoch eindrucksvoll, dass eine hohe Substratkonzentration nicht unweigerlich zu einer starken Besiedlung führt. Die Ergebnisse waren umso auffälliger, da von einer guten mikrobiellen Verwertbarkeit ausgegangen wurde. Schließlich handelt es sich bei Tween 80 um ein Polysorbat, das unter anderem Fettsäuren enthält. Da organische Säuren von bestimmten Mikroorganismen als Nährsubstrat verwertet werden (32), wurde mit einer raschen Oberflächenbesiedlung gerechnet. Obwohl in den Versuchen hohe Konzentrationen (100/1000 mg/L) im Wasser vorlagen, zeigte sich in beiden Fällen am Ende des Versuchs lediglich eine Besiedlung der Kategorie 2, bei der Bakterien vereinzelt auf der Oberfläche vorlagen.

Unerwartet waren auch die Untersuchungsergebnisse der Ansätze mit Ligninsulfonsäure. Für die Versuche im stehenden Wasser wurden gezielt Substanzen eingesetzt, die als mikrobiologisch leicht und mikrobiologisch schwer verwertbar gelten. Als Modellsubstanz für einen leicht verwertbaren Stoff wurde u.a. Glucose ausgewählt, die auch in anderen Studien experimentell als Nährstoff für die Generierung von Besiedlungen eingesetzt wurde (24). Die hohe Besiedlungsdichte in Gegenwart von Glucose war demnach in den eigenen Versuchen nicht überraschend. Ligninsulfonsäure hingegen kam in den eigenen Versuchen als Modellsubstanz für einen mikrobiologisch schwer verwertbaren Stoff zum Einsatz. Ligninsulfonsäure ähnelt den Huminstoffen, die laut Literaturangaben (28) aufgrund der makromolekularen Struktur relativ langsam abgebaut werden. In den Versuchen stellte sich jedoch heraus, dass bereits nach 1 Woche bei 300 und 500 mg/L Ligninsulfonsäure höhere Besiedlungsdichten vorlagen als bei gleichen Konzentrationen Glucose. Die nähere Betrachtung der Zusammensetzung von Ligninsulfonsäure liefert eine Erklärung für diese Beobachtung. Ligninsulfonsäure enthält neben Lignin Reste an Hemicellulosen und geringe Mengen Zucker wie z.B. Glucose, Mannose, Xylose und Arabinose (37). Wird das Molekülgerüst enzymatisch aufgespalten, sind diese Bausteine verfügbar und können Mikroorganismen als Nährstoff dienen.

Eine mikrobielle Verwertung von Huminstoffen räumten auch Camper et al. ein (7). Nach ihren Aussagen schafft die Anlagerung von Huminstoffen der Huminsäuren an Oberflächen die Voraussetzung für eine mikrobiologische Verwertung, denn die Anlagerung bzw. Immobilisierung bietet Mikroorganismen die Möglichkeit zur Aufspaltung der Moleküle. Dass in den eigenen Versuchen eine Anlagerung stattgefunden hatte, ließ sich bereits durch makroskopische Betrachtung der Oberfläche erkennen. Diese wies eine für Ligninsulfonsäure charakteristische Braunfärbung auf. Camper et al. sahen keinen Zusammenhang zwischen der Huminstoffmenge und dem Bakterienwachstum (7). Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch einen Zusammenhang erkennen. Die Besiedlung entsprach bei 500 mg/L Ligninsulfonsäure nach 8 Tagen der Kategorie 3 und bei 50 mg/L Ligninsulfonsäure der Kategorie

2. Am Ende des Versuchs, nach 28 Tagen, wurde bei 500 mg/L Ligninsulfonsäure eine Besiedlung der Kategorie 4 festgestellt und bei 50 mg/L Ligninsulfonsäure eine Besiedlung der Kategorie 3. Eine höhere Nährstoffkonzentration ging demnach mit einem stärkeren Bakterienwachstum einher.

Am Beispiel von Ligninsulfonsäure und Tween 80 wird die Schwierigkeit deutlich, Stoffe nach ihrer mikrobiellen Verwertbarkeit einzuordnen und ein Wachstumspotential vorauszusagen. Die vorgestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Ausbildung einer Besiedlung im stehenden Wasser in erster Linie von der Art des Substrats abhängt. Ist das Substrat mikrobiell verwertbar, spielt die Substratkonzentration eine entscheidende Rolle. Bei bestimmten Nährstoffen findet jedoch erst nach Anlagerung an Oberflächen bzw. durch Immobilisierung des Substrats eine Verwertung statt.

#### 4.1.2 Koloniezahleentwicklung

Bereits nach 8 Tagen war die Koloniezahl in den Wässern mit zugefügter organischer Substanz um mehrere log-Stufen angestiegen. Dabei lagen die mit R2A-Medium (11°C) bestimmten Koloniezahlen zwischen  $10^3$  und  $10^4$  KBE/mL. Im weiteren Verlauf wurde dieses Niveau in den meisten Fällen bis zum Ende des Versuchs gehalten. Nur bei Tween 80 wurde noch ein weiterer Koloniezahlanstieg um ca. eine halbe log-Stufe festgestellt. Bei einer Inkubationstemperatur des Nährmediums von 20°C wurden bei Glucose und Ligninsulfonsäure maximale Koloniezahlen zwischen  $10^4$  und  $10^5$  KBE/mL festgestellt. Bei Tween 80 lagen die maximalen Koloniezahlen in diesem Fall bei ca.  $10^4$  KBE/mL. Insgesamt gesehen waren die Koloniezahlen (R2A-Medium/20°C) am Ende des Versuchs in den Wässern mit zugesetzter organischer Substanz nur eine halbe bis ganze log-Stufe über denen des Kontrollwassers. Aus diesem Grund können die erhöhten Koloniezahlen nicht allein dem Nährstoffpotential der zugesetzten Substanzen zugeschrieben werden, zumal bekannt ist, dass es selbst im nährstoffarmen Milieu zu Bakterienwachstum kommen kann (17). Der Vergleich der Koloniezahlhöhe im Wasser mit der jeweils im Ansatz entstandenen Besiedlung ergab, dass zwischen Besiedlung und Koloniezahl im Wasser kein eindeutiger Zusammenhang besteht. Das zeigten insbesondere die Untersuchungen mit Tween 80 und Ligninsulfonsäure. Obwohl im Wasser mit Tween 80 verhältnismäßig hohe Koloniezahlen (R2A-Medium/11°C) von bis zu  $10^4$  KBE/mL festgestellt wurden, entsprach die Besiedlung lediglich der Kategorie 2. Umgekehrt lagen die Koloniezahlen bei Ligninsulfonsäure (R2A-Medium/11°C) etwa eine halbe log-Stufe tiefer als bei Tween 80, die Besiedlung war jedoch stärker ausgeprägt (Kategorie 4). Eine erhöhte Koloniezahl kann demnach auf eine Besiedlung hindeuten, sagt aber nicht unbedingt etwas über die Besiedlungsstärke aus. Diese kann letztendlich nur durch Oberflächenuntersuchungen beurteilt werden.



## **4.2 Oberflächenbesiedlung und Koloniezahleentwicklung im fließenden Wasser unter dem Einfluss verschiedener organischer Substanzen**

### **4.2.1 Oberflächenbesiedlung**

Den Ergebnissen zufolge hängt die Ausbildung einer Oberflächenbesiedlung bei fließendem Wasser in erster Linie von der im Wasser befindlichen Substratart ab. Bei kontinuierlicher Zudosierung von 0,5 mg/L Natriumacetat zeigte sich bereits nach 2 Wochen eine Besiedlung der Kategorie 3. Im Vergleich dazu wurde unter Zudosierung von 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure zum gleichen Zeitpunkt noch keine Besiedlung beobachtet. Nach 6 Wochen hatte die Besiedlung bei 0,5 mg/L Natriumacetat eine Stärke der Kategorie 6 erreicht. Bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure wurde die Besiedlung nach 6 Wochen der Kategorie 4 zugeordnet.

Neben der Bedeutung der Substratart konnte in den Versuchen auch eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden. Dafür wurde die Ligninsulfonsäurekonzentration von 0,5 mg/L auf 1,0 mg/L verdoppelt. Während bei 0,5 mg/L erst nach 3 Wochen eine Besiedlung festgestellt wurde, zeigte sich bei 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure bereits nach 2 Wochen eine Besiedlung der Kategorie 3 und nach 6 Wochen eine Besiedlung der Kategorie 5.

Eine Konzentrationsabhängigkeit wurde auch in den Versuchen im stehenden Wasser (siehe Punkt 4.1.1) nachgewiesen. Dort wurden jedoch wesentlich höhere Substratkonzentrationen eingesetzt (z.B. 500 mg/L Ligninsulfonsäure). Im fließenden Wasser hingegen reichten bereits geringe Mengen von 0,5 bis 1,0 mg/L aus, um ähnlich starke und zum Teil dickere Besiedlungen zu generieren. Diese Beobachtung lässt sich durch die Tatsache erklären, dass Nährstoffe im fließenden Wasser wesentlich schneller an Oberflächen gelangen und anlagern als im ruhenden System. Hinzu kommt, dass die organischen Substanzen kontinuierlich zudosiert wurden und somit ein Nährstoff-Nachschub für eine entstehende Besiedlung gewährleistet war.

### **4.2.2 Koloniezahleentwicklung**

Im fließenden Wasser stieg die Koloniezahl in Gegenwart der eingesetzten organischen Substanzen bereits nach 1 Woche an. Bei 0,5 mg/L Ligninsulfonsäure wurden im gesamten Versuchsverlauf Maxima von ca. 70 KBE/mL (R2A-Medium/20°C) festgestellt. Bei 1,0 mg/L Ligninsulfonsäure lagen die maximalen Koloniezahlen bei ca. 20 KBE/mL (R2A-Medium/20°C). Die höchsten Koloniezahlen wurden mit ca. 2000 KBE/mL bei 0,5 mg/L Natriumacetat festgestellt. Die in der Wasserphase befindlichen Mikroorganismen stammten höchstwahrscheinlich aus den auf der Rohrwand gebildeten Besiedlungen. Für diese Annahme gibt es mehrere Gründe. Eine Vermehrung der Mikroorganismen in der Wasserphase konnte ausgeschlossen werden, da die Verweilzeiten des Wassers in den Leitungen zu kurz waren. Außerdem hätten die Koloniezahlen im Falle einer Vermehrung im

Wasser direkt zu Beginn der Testreihe ansteigen müssen. Ein weiterer Beweis dafür, dass sich die erhöhten Koloniezahlen durch Austragung aus den Besiedlungen ergaben, waren die Ergebnisse der Kontrolle. Im fließenden Kontrollwasser wurden konstant niedrige Koloniezahlen erfasst. Aus der Besiedlung, die in Gegenwart von Natriumacetat gebildet wurde, wurden deutlich mehr Mikroorganismen an die Wasserphase abgegeben als aus der Besiedlung, die in Gegenwart von Ligninsulfonsäure entstanden war. Beweis dafür waren die höheren Koloniezahlen bei Natriumacetat. Der Vergleich der Koloniezahlen mit der Ausprägung der Besiedlungen ergab, dass bei stärkeren Aufwüchsen höhere Austragungen stattfanden. Während im stehenden Wasser keine eindeutige Beziehung zwischen Koloniezahl und Besiedlung hergestellt werden konnte (siehe 4.1.2), zeigte sich im fließenden Wasser eine positive Korrelation zwischen Koloniezahl und Besiedlungsdicke. Diese Beobachtung lässt sich mit dem Entwicklungsverlauf einer Besiedlung erklären. Eine Besiedlung erreicht nach der Wachstumsphase die sogenannte Plateau-Phase, in der die maximale Dicke erreicht ist und die Mikroorganismenzahl konstant erscheint. Auf diesem Niveau entspricht die Zunahme durch Wachstum und Adhäsion der Ablösung (20). Da die Besiedlungsdicke bei Natriumacetat wesentlich höher war als bei Ligninsulfonsäure, war somit auch die Austragung bzw. die Koloniezahl in der Wasserphase entsprechend höher.

#### **4.3 Ausbildung morphologisch unterschiedlicher Besiedlungsstrukturen unter dem Einfluss verschiedener organischer Substanzen**

Neben der Abgabe von Mikroorganismen aus einer Besiedlung war die in Anwesenheit verschiedener Substanzen ausgebildete Besiedlungsstruktur von Interesse. Die Untersuchungen ergaben, dass das Aussehen einer Besiedlung nicht nur vom zur Verfügung stehenden Substrat abhängt, sondern auch von der Wasserbewegung. Diese Feststellungen lassen sich am Beispiel von Ligninsulfonsäure und Natriumacetat belegen. Im stehenden Wasser sahen die in Gegenwart von Ligninsulfonsäure und Natriumacetat ausgebildeten Besiedlungsstrukturen ähnlich aus. In beiden Fällen waren die auf der Oberfläche liegenden Mikroorganismen in eine ausgeprägte EPS-Schicht eingebettet.

Im fließenden Wasser zeigten sich dagegen Unterschiede. Bei Natriumacetat waren die Mikroorganismen in eine dicke EPS-Schicht eingebettet; bei Ligninsulfonsäure waren wenig EPS zu erkennen und die Mikroorganismen bildeten kompakte Cluster. Beide Substrate führten demnach zur Synthese von EPS. Auffallend war jedoch, dass die Besiedlung bei Ligninsulfonsäure im stehenden Wasser ausgeprägter war als im fließenden. Diese Beobachtung lässt sich mit den im fließenden Wasser vorherrschenden Scherkräften erklären, die je nach mechanischer Stabilität der Besiedlung Abtragungen bewirken. Diese Erklärung deckt sich mit der Aussage, dass Scherkräfte die Entstehung von festeren und dünneren Besiedlungen forcieren (14).

Im Gegensatz zu Ligninsulfonsäure war die Besiedlung bei Natriumacetat im fließenden Wasser wesentlich stärker ausgeprägt. Da die Fließgeschwindigkeit und somit die Intensität der Scherkräfte genauso hoch war wie bei Ligninsulfonsäure, ist davon auszugehen, dass die mechanische Stabilität der in Gegenwart von Natriumacetat gebildeten Besiedlung höher war als bei Ligninsulfonsäure.

#### **4.4 Vorkommen von Plaques im fließenden Wasser in Gegenwart verschieden strukturierter Besiedlungen**

Mikroorganismen werden nicht nur einzeln, sondern auch in ganzen Plaques aus Besiedlungen an die Wasserphase abgegeben. In der Literatur wird dieser Prozess als zufällig und unregelmäßig beschrieben (21). Die eigenen Untersuchungen sollten zeigen, ab welchem Zeitpunkt mit der Ablösung von Plaques zu rechnen ist und ob Ablösungen tatsächlich zufällig und unregelmäßig auftreten oder gleichmäßig. Ferner war die Größe und Struktur der Plaques von Interesse und ob es einen Zusammenhang zwischen Besiedlungsstruktur und Austragungshäufigkeit gibt.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Besiedlungsstruktur keinen erkennbaren Einfluss auf die Austragungshäufigkeit hat. Trotz unterschiedlicher Besiedlungsstrukturen wurden aus 2 verschiedenen Besiedlungen nach ca. 3 Wochen Plaques herausgelöst und an die Wasserphase abgegeben. Bis zum Versuchsende konnten in jeder Wasserprobe Plaques nachgewiesen werden. Die Plaqueabgabe erfolgte demnach regelmäßig. Characklis beschrieb eine Abhängigkeit zwischen der Ablösung ganzer Plaques, den im Wasser vorherrschenden Scherkräften und der Besiedlungsdicke (9). Letzteres konnte in den eigenen Untersuchungen nur bedingt bestätigt werden. Obwohl die Besiedlungen unterschiedlich dick waren, wurden ab dem gleichen Zeitpunkt (nach 3 Wochen) Plaques im Wasser nachgewiesen. Neben der Dicke ist demnach auch die physikalische Stabilität der Besiedlung ausschlaggebend.

Die Plaques wiesen eine ähnliche Struktur auf wie die Besiedlungen aus denen sie herausgelöst wurden. Die Plaques, die aus der in Gegenwart von Natriumacetat gebildeten Besiedlung stammten, waren ca. 40 x 60 µm groß und wiesen eine lockere gallertige Struktur auf. Die durchschnittliche Zellzahl betrug ca. 400 pro Plaque. Bei Ligninsulfonsäure waren die Plaques wesentlich kleiner (20 x 20 µm) und kompakter. Sie schienen nicht von einer sichtbaren Matrix umhüllt zu sein und wiesen Zellzahlen von ca. 50 pro Plaque auf. In diesem Zusammenhang wird die Ansiedlung und Vermehrung hygienisch relevanter Mikroorganismen in einer Besiedlung als besonders kritisch gesehen, da sich auf diese Weise ein Keimreservoir bilden kann, von dem unter Umständen beträchtliche Kontaminationen ausgehen können (36). Die Versuchsergebnisse zeigen, dass eine Kontamination nicht nur

zufällig erfolgen kann, sondern auch regelmäßig. Die Zellzahlen der Plaques weisen darüber hinaus auf das mögliche Ausmaß einer solchen kontinuierlichen Kontamination hin; dies hat insbesondere dann eine wesentliche Bedeutung, wenn es sich wie im oben genannten Beispiel um hygienisch relevante oder gar pathogene Bakterien handeln würde.

#### **4.5 Auswirkung einer Fließgeschwindigkeitserhöhung auf verschieden strukturierte Besiedlungen**

Die Austragung einzelner Mikroorganismen und ganzer Plaques aus einer Besiedlung bei konstanter Fließgeschwindigkeit (0,37 m/sec) hängt wie unter 4.4 erläutert unter anderem von den im Wasser vorherrschenden Scherkräften und von der Zusammensetzung und Stabilität der Besiedlung ab. Durch eine Spülung bzw. eine kurzzeitige Erhöhung der Fließgeschwindigkeit sollte die Auswirkung erhöhter Scherkräfte auf verschiedene Besiedlungsstrukturen untersucht werden. Darüber hinaus wurde die Koloniezahrentwicklung in der Wasserphase beobachtet.

Die in Gegenwart von Natriumacetat und Ligninsulfonsäure entstandenen Besiedlungen wurden über 1 min einer Fließgeschwindigkeitserhöhung von 0,37 m/sec auf 0,73 m/sec ausgesetzt. Diese Maßnahme führte bei beiden Besiedlungsformen zu einer Koloniezahlerhöhung im Wasser, die bei Natriumacetat stärker war als bei Ligninsulfonsäure. Obwohl durch die Fließgeschwindigkeitserhöhung bei beiden Besiedlungen der Austrag erhöht wurde, ließen sich anhand der rasterelektronenmikroskopischen Analyse der Oberfläche vor und nach der Fließgeschwindigkeitserhöhung keine Unterschiede feststellen. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass in beiden Fällen nur äußere Bereiche abgetragen wurden. Die höheren Koloniezahlen im Wasser bei Natriumacetat lassen sich wiederum mit einem höheren Plateau-Niveau der Besiedlung erklären. Da dieses höher war als bei der in Gegenwart von Ligninsulfonsäure gebildeten Besiedlung war auch die Koloniezahl im Wasser entsprechend höher.

Wenn es auch Unterschiede im Ausmaß der Abtragung gab, so wurde doch mit der Fließgeschwindigkeitserhöhung in keinem der beiden Fälle eine wesentliche Reduktion bewirkt. Eine längere und höhere Fließgeschwindigkeitsänderung hätte wahrscheinlich zum selben Ergebnis geführt. Diese Vermutung stützt sich auf Ergebnisse von Percival et al. (29). Sie generierten bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 0,32 m/sec innerhalb eines Jahres Besiedlungen. Im Anschluss daran erhöhten sie die Fließgeschwindigkeit 1 Monat lang auf 0,96 m/sec. Auch diese Maßnahme führte nicht zur Entfernung der generierten Besiedlungen. Um eine Reinigung zu erzielen sind demnach andere oder zusätzliche Maßnahmen zu ergreifen.

#### **4.6 Verteilung lebender und toter Zellen in einer im fließenden Wasser entstandenen Besiedlung**

Mit Hilfe der LIVE/DEAD-Färbung wurde die Verteilung von lebenden und toten Zellen in verschiedenen Besiedlungen bestimmt. Ähnliche Untersuchungen waren bislang nicht beschrieben.

Die in Gegenwart von Ligninsulfonsäure ausgebildete Besiedlung war von wenig EPS bedeckt und wies überwiegend grün-fluoreszierende, das heißt lebende Zellen auf. Vereinzelt waren rote und somit tote Zellen zu erkennen. Nach einer 1-minütigen Fließgeschwindigkeitserhöhung von 0,37 m/sec auf 0,73 m/sec war das Verhältnis von lebenden und toten Zellen ähnlich wie vor der Maßnahme. Wie unter 4.5 erläutert, lösten sich während der erhöhten Fließgeschwindigkeit wesentlich kleinere Plaques aus dieser Besiedlung als aus der in Gegenwart von Natriumacetat ausgebildeten Besiedlung. Der Substanzverlust war demnach geringer. Diese Feststellung könnte auch die Ergebnisse der LIVE/DEAD-Färbung erklären. Da nur wenig Substanz durch die Fließgeschwindigkeitserhöhung verloren ging, zeigten sich vor und nach der Maßnahme ähnliche Färbebilder.

Auffallend waren die Färbungen der in Gegenwart von Natriumacetat gebildeten Besiedlung. Diese war von einer dicken EPS-Schicht belegt. Vor der Fließgeschwindigkeitserhöhung wurden überwiegend lebende Zellen nachgewiesen, die in eine ausgeprägte EPS-Schicht eingebettet waren. Nach der Maßnahme wurden rote Bereiche sichtbar, die somit tote Zellen aufwiesen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass durch die erhöhte Fließgeschwindigkeit äußere Schichten der Besiedlung abgetragen und tiefere Schichten frei gelegt wurden. Da die äußeren abgetragenen Bereiche lebende Zellen enthielten, wird das mögliche Ausmaß einer Kontamination deutlich.

Für das Vorkommen toter Zellen in tieferen Besiedlungsschichten gibt es mehrere Erklärungsansätze. In der Literatur ist beschrieben, dass sich beim Aufbau einer EPS-Matrix Areale mit unterschiedlicher Nährstoff- und Sauerstoffkonzentration ausbilden können (8). Daraus kann für die eigenen Untersuchungen geschlossen werden, dass der Sauerstoffgehalt in den tieferen Schichten möglicherweise so gering war, dass die dort befindlichen aeroben Mikroorganismen nicht überleben konnten. Eine weitere Erklärung für den Zelltod könnte sein, dass die Nährstoffe aus der Wasserphase nicht tief genug in die EPS-Matrix eindringen können und somit für die in tieferen Bereichen liegenden Mikroorganismen nicht verfügbar waren. Diese Überlegung wird durch die Tatsache gestützt, dass die Dichte einer Besiedlungsmatrix zur Trägeroberfläche und somit in die Tiefe hinein zunimmt und die Porengröße kleiner wird (14). In den Versuchen hätte auch ein eventueller Nährstoffmangel

nicht durch Abgabe von Nährstoffen aus dem Trägermaterial ausgeglichen werden können, da es sich hierbei um inerten Edelstahl handelte.

#### **4.7 Beständigkeit von Besiedlungen unterschiedlicher Dicke gegenüber Reinigung und Desinfektion mit Wasserstoffperoxid**

Unter 4.5 wurde die Stabilität von Besiedlungen gegenüber Scherkräften erläutert. Durch die Anwendung von Wasserstoffperoxid sollte die chemische Beständigkeit überprüft werden. Für die Versuche wurden in Gegenwart von 0,5 mg/L und 0,05 mg/L Natriumacetat zwei unterschiedlich starke Besiedlungen generiert, um zu prüfen, ob das Desinfektionsmittel auch in tiefere Schichten eindringen und wirken kann.

Die Ergebnisse der Koloniezahlbestimmung vor und nach Spülung und Desinfektion ließen zunächst auf einen Reinigungserfolg schließen. Während vorher im Wasser erhöhte Koloniezahlen von bis zu 300 KBE/mL festgestellt wurden, lagen diese nach der Maßnahme unter 5 KBE/mL. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten den zunächst angenommenen Reinigungserfolg nur teilweise. Während bei der dünneren Besiedlung eine fast vollständige Beseitigung festgestellt wurde, war bei der ausgeprägteren Besiedlung nur eine Reduktion erkennbar.

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder warfen die Frage auf, warum bei der ausgeprägteren Besiedlung keine Beseitigung erfolgte. Eine Zehrung des Wasserstoffperoxids durch Matrix-Polymere wurde ausgeschlossen. In früheren Studien wurde beschrieben, dass Wasserstoffperoxid nicht mit Exopolysacchariden reagiert und seine Wirkung entfalten kann (23). Blanchard et al. erbrachten ebenfalls einen Beleg für die Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid. Eine ihrer Erklärungen war, dass Wasserstoffperoxid die Besiedlungsmatrix auflockert und damit für Scherkräfte angreifbar macht (5). Diese Aussage konnte in den eigenen Versuchen nur bedingt bestätigt werden: Für äußere Bereiche scheint sie zuzutreffen, jedoch wurden tiefere Schichten anscheinend nicht erreicht. Wäre die gesamte Matrix aufgelockert gewesen, hätte eine vollständige Beseitigung der Besiedlung stattfinden müssen. Es bleibt zu vermuten, dass die Matrix als Barriere fungiert und Wasserstoffperoxid nicht tief genug eindringen kann. Die Dichte einer Besiedlung nimmt bekanntlich von der Oberfläche zur Aufwuchsfläche hin zu (14), parallel dazu wird die Porengröße immer kleiner. Ein weiteres Indiz für die Undurchdringlichkeit der tieferen Schichten war neben der unvollständigen Beseitigung der Besiedlung das Vorkommen lebender Mikroorganismen in diesen Schichten. Beweis dafür waren die LIVE/DEAD-Färbungen der verbliebenen Besiedlung. Ein Vordringen des Wasserstoffperoxids bis in diese Zonen hätte zur Abtötung der Mikroorganismen führen müssen.

#### **4.8 Trübung im Wasser in Gegenwart von Besiedlungen unterschiedlicher Dicke vor, während und nach Reinigung und Desinfektion**

Bei konstanter Fließgeschwindigkeit von 0,37 m/sec zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Trübungswerten im Wasser der Testleitungen mit den generierten Besiedlungen und dem Wasser aus dem Zulauf.

Nach Erhöhung der Fließgeschwindigkeit auf 0,73 m/sec stieg die Trübung im Wasser in Gegenwart der Besiedlungen sprunghaft an. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Einwirkung verstärkter Scherkräfte Teile der Besiedlungen abgeschwemmt wurden, was durch die unter 4.5 beschriebene Koloniezahlerhöhung im Wasser bestätigt wurde. Außerdem traten bereits bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,37 m/sec Plaques im Wasser auf (siehe 4.4). Durch Erhöhung der Fließgeschwindigkeit wurde das Ablösen von Plaques verstärkt und führte offenbar zur gemessenen Trübung des Wassers. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Besiedlungsstärke und Trübung. In den im Laufe der erhöhten Fließgeschwindigkeit (0,73 m/sec) genommenen Wasserproben nahm die Trübung wieder ab. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder bewiesen jedoch, dass die Besiedlung nicht vollständig entfernt war. Damit ist die Grenze der Aussagekraft einer Trübungsmessung aufgezeigt. Während einer Spülung können erhöhte Trübungsmesswerte auf eine Besiedlung hindeuten. Unauffällige Trübungswerte können jedoch nicht zu dem Schluss führen, dass eine Oberfläche frei von Besiedlung ist.

## 5 Zusammenfassung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher organischer Substanzen auf die Besiedlung einer inerten Oberfläche durch wasserbürtige Mikroorganismen. Dabei sollte der Einfluss einer bestehenden Besiedlung bzw. eines Biofilms auf die Wasserphase aufgezeigt werden. Ein weiterer Aspekt bestand darin, die verschiedenen Strukturen der Besiedlungen bzw. Biofilme miteinander zu vergleichen und anhand der untersuchten Wasserproben ein Kontaminationspotential abzuleiten. Standversuche im Labor und Fließversuche an einem praxisnahen Leitungssystem sollten den Vergleich einer Oberflächenbesiedlung in einem ruhenden System mit einmaligem Nährstoffeintrag mit einer Besiedlung in einem fließenden System unter kontinuierlicher Nährstoff-Zudosierung ermöglichen.

Die Untersuchungen ergaben, dass im stehenden Wasser das Vorhandensein einer hohen Nährstoffkonzentration nicht zwangsläufig zur Ausbildung einer ausgeprägten Oberflächenbesiedlung führt. Die Art des im Wasser befindlichen Nährstoffs ist den Ergebnissen zufolge wichtiger als die Konzentration. Wie schwer eine Voraussage über die mikrobiologische Verwertbarkeit einer Substanz und ein damit verbundenes Wachstumspotential zu treffen ist, zeigten insbesondere die Versuche mit den Stoffen Ligninsulfonsäure und Tween 80. Bei der als schwer abbaubar geltenden Ligninsulfonsäure wurde eine ausgeprägte, bei dem leicht verwertbaren Stoff Tween 80 lediglich eine geringe Oberflächenbesiedlung beobachtet. Darüber hinaus besteht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Besiedlungsdichte auf der Oberfläche und Koloniezahl im Wasser. So wurden bei Tween 80 zum Teil höhere Koloniezahlen festgestellt als bei Ligninsulfonsäure. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Ausmaß einer Besiedlung letztlich nur anhand von Oberflächenuntersuchungen beurteilt werden kann. Im Gegensatz zu den Standversuchen wurden in den Fließversuchen bei allen eingesetzten Substanzen ausgeprägte Besiedlungen beobachtet. Selbst bei der als schwer abbaubar geltenden Ligninsulfonsäure wurde eine deutliche Besiedlung festgestellt. Die rasche Oberflächenbesiedlung bei fließendem Wasser scheint aus der Tatsache zu resultieren, dass Nährstoffe, Mikroorganismen und Oberflächen wesentlich schneller aufeinander treffen als in einem ruhenden System. Es wurde ein klarer Zusammenhang zwischen Koloniezahl im Wasser und Oberflächenbesiedlung festgestellt. Je ausgeprägter der Biofilm war, desto höher war die Koloniezahl im Wasser. Außerdem wurde festgestellt, dass die Abgabe ganzer Plaques aus einer Besiedlung ab einem bestimmten Zeitpunkt kontinuierlich erfolgt. Größe und Struktur der Plaques lassen Rückschlüsse auf Besiedlungsstruktur und -dichte zu und weisen auf das vorhandene Kontaminationspotential hin. Das Ausmaß einer Kontamination wurde durch die Versuche mit geänderter Fließgeschwindigkeit dokumentiert. Durch eine kurzzeitige Erhöhung der Fließgeschwindigkeit stieg die Koloniezahl in der



Wasserphase sprunghaft an. Trotz der hohen Abtragung aus der Besiedlung konnte jedoch keine gravierende Reduktion der Oberflächenbesiedlung festgestellt werden.

Die Beständigkeit ausgeprägter Besiedlungen gegenüber äußeren Einflussfaktoren ist hoch. Das wurde in Reinigungs- und Desinfektionsversuchen mit Wasserstoffperoxid nachgewiesen. Ab einer bestimmten Besiedlungsdicke dringt Wasserstoffperoxid nicht mehr tief genug in die Besiedlung ein und kann somit weder eine Beseitigung noch eine Abtötung vorhandener Mikroorganismen bewirken. Infolgedessen ist die frühzeitige Erkennung einer Besiedlung für eine erfolgreiche Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahme von entscheidender Bedeutung.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Anonym: DIN 19643-1**, Aufbereitung von Schwimm- und Badebeckenwasser, Teil 1: Allgemeine Anforderungen, Ausgabe 1997-04
2. **Anonym:** Vermehrung von Mikroorganismen auf Werkstoffen für den Trinkwasserbereich; Prüfung und Bewertung, Technische Regel, DVGW-Arbeitsblatt W 270. (Nov 1999)
3. **Anonym:** Reinigung und Desinfektion von Wasserverteilungsanlagen; Technische Regel, DVGW-Arbeitsblatt W 291. (März 2000)
4. **Anonym:** Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung-TrinkwV). Bundesgesetzblatt I (1990)
5. **Blanchard, A. P.**, Bird, M. R., Wright, S. J. L. (1998) Peroxygen disinfection of *pseudomonas aeruginosa* biofilms on stainless steel discs. *Biofouling* **13 (3)**: 233-253
6. **Boulos, L.**, Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. (1999) LIVE / Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* **37**: 77-86
7. **Camper, A.**, Burr, M., Ellis, B., Butterfield, P., Abernathy, C. (1999) Development and structure of drinking water biofilms and techniques for their study. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* **85**: 1 – 12
8. **Characklis, W. G.**, Marshall, K. C., McFeters, G. A. (1990) The microbial cell. In: *W.G. Characklis und K. C. Marshall.: Biofilms.*(Hrsg) John Wiley, New York: 131 – 159
9. **Characklis, W. G.** (1990) Biofilm processes. In: *W.G. Characklis und K. C. Marshall.: Biofilms.*(Hrsg) John Wiley, New York: 195 – 231
10. **Characklis, W. G.**, Turakhia, M. H., Zilver, N. (1990) Transport and interfacial transfer phenomena. In: *W.G. Characklis und K. C. Marshall.: Biofilms.*(Hrsg) John Wiley, New York: 265 – 340
11. **Characklis, W. G.**, McFeters, G. A., Marshall; K. C. (1990) Physiological ecology in biofilm systems. In: *W.G. Characklis und K. C. Marshall.: Biofilms.*(Hrsg) John Wiley, New York: 341 – 394
12. **Characklis, W. G.** (1991) Biofouling: Effects and control. In: *H.-C. Flemming und G.G. Geesey:* In: *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems.* Springer-Verlag: 7 – 27
13. **Chen, X.**, Stewart, P. S. (2000) Biofilm removal caused by chemical treatments. *Wat. Res.* **Vol. 34, No.17**: 4229-4233

14. **Christensen, B. E.**, Characklis, W. G. (1990) Physical and chemical properties of biofilms. In: *W.G. Characklis und K. C. Marshall.: Biofilms.*(Hrsg) John Wiley, New York: 93 – 130
15. **Costeron, J. W.**, Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 435-464
16. **Costeron, J. W.**, Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. (1995) Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745
17. **Dott, W.** (1983) Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 6. Mitteilung: Wiederverkeimung im Trinkwasser *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. B* **178**: 263-279
18. **Dott, W.**, Schoenen, D. (1985) Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 7. Mitteilung: Entwicklung der Aufwuchsflora auf Werkstoffen im Trinkwasser *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. B* **180**: 436-447
19. **Exner, M.**, Tuschewitzki, G. J., Thofern (1983) Untersuchungen zur Wandbesiedlung der Kupferrohrleitung einer zentralen Desinfektionsmitteldosieranlage. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. B* **177**: 170-181
20. **Flemming, H.-C.** (1991) Biofilme und Wassertechnologie. *gwf Wasser-Abwasser* **132** Nr.4: 197-207
21. **Flemming, H.-C.** (1998) Biofilme in Trinkwassersystemen. *gwf Wasser Special* **139** Nr.13: -72
22. **Flemming, H.-C.**, Wingender, J., Moritz, R., Borchard W., Mayer, C. (1999) Physico-chemical properties of biofilms – A short review. In: *C.W. Keevil, A. Godfree, D. Holt and C. Dow: Biofilms in the aquatic environment. The Royal Society of Chemistry: 1 – 12*
23. **Grobe, S.**, Fiedler, S., Wingender J., Overath, H (1994) Wirkung von Chlor und Wasserstoffperoxid auf schleimbildende Bakterien aus wasserführenden Systemen. *Vom Wasser* **83**: 407-224
24. **Griebe, T.** (??) Desinfektion von Biofilmen. *International na*:1-25
25. **Jaeggi, N. E.**, Schmidt-Lorenz, W. (1988) Bakterielle Wieder-Verkeimung im Trinkwasser. 1. Mitteilung: Trinkwasseraufbereitung *Zbl. Bakt. Hyg., B* **186**: 311-325
26. **LeChevallier, M. W.**, Schulz, W., Lee, R.G. (1991) Bacterial nutrients in drinking water. *Applied and environmental microbiology*: 857-862
27. **Morin, P.**, Gauthier, V., Saby, S., Block, J.-C. (1999) Bacterial resistance to chlorine through attachment to particles and pipe surfaces in drinking water distribution

- systems. In: C.W. Keevil, A. Godfree, D. Holt and C. Dow: Biofilms in the aquatic environment. The Royal Society of Chemistry: 171 – 190
- 28. Palinski, A.** (1999) Reaktionstechnische Modellierung der AOC-Entfernung in Filtern. *Vom Wasser* **93**: 195-214
- 29. Percival, S. L.,** Knapp, J. S., Wales, D. S., Edyvean, R. G. J. (1999) Biofilm development in potable quality water. *Biofouling* **13 (4)**: 259-277
- 30. Percival, S. L.,** Knapp, J. S., Edyvean, R. G. J., Wales, D. S. (1998) Biofilm development on stainless steel in mains water. *Wat. Res.* **32 (1)**: 243-253
- 31. Reasoner, D. J.,** Geldreich, E. E. (1984) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*: 1-7
- 32. Schoenen, D.,** Gödde C.-D. (1985) Reinigungsmittel für Behälter und Koloniezählerhöhungen im Trinkwasser. *Z. Wasser- Abwasser-Forsch.* **18**: 121-123
- 33. Schoenen, D.** (1990) Influence of materials on the microbiological colonization of drinking water. In: P. Howsam: Microbiology in civil engineering. *Spon* : 121 – 145
- 34. Schoenen, D.** (1991) Bakteriologische Veränderungen des Trinkwassers im Verteilungssystem. *DVGW-Schriftenreihe Wasser Nr. 67*: 169-189
- 35. Schoenen, D.** (2001) Requirements for the catchment, treatment and surveillance of drinking water to avoid the transmittance of pathogenic bacterial, viral and parasitic organisms. *Acta hydrchim.hydrobiol.* **29**: 187-196
- 36. Schwartz, T.,** Schmitt, J., Flemming, H.-C., Obst, U. (1999) Die Untersuchung von Biofilmen in Trinkwassersystemen. *gwf Wasser-Abwasser* **140 Nr.3**: 182-190
- 37. Sohn, A.W.** (??) Lignin. In: *Ullmann Bd. 11*. S. 771-782
- 38. Strathmann, M.,** Griebe, T., Flemming, H.-C. (2000) Artificial biofilm model – a useful tool for biofilm research. *Appl.Microbiol Biotechnol* **54**: 231-237
- 39. Wichmann, K.** (1998) Natürliche organische Wasserinhaltsstoffe in der Grundwasseraufbereitung. *gwf Wasser Special* **139 Nr.13**: 59-64
- 40. Wilderer, P. A.,** Characklis, W.G. (1989) Structure and function of biofilms. In: *W.G.Characklis und P.A. Wilderer*: Structure and function of biofilms. John Wiley: 5 – 17
- 41. Wingender, J.,** Neu T. R., Flemming, H.-C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? In: *J. Wingender, T. R. Neu, H.-C. Flemming*: Microbial extracellular polymeric substances. Springer-Verlag: 1-19
- 42. Wuhrmann, K.** (1980) Mikrobiologische Aspekte der Gewinnung, Aufbereitung und Verteilung von Trink- und Brauchwasser. *Swiss Food (Separatdruck)* **2 Nr.3**: 15-23

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. D. Schoenen danke ich für die Überlassung des Themas, für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. J. Krämer danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dipl. Chem. O. Hoyer und Frau Dipl. Ing. B. Weißbach. Ihre konstruktive Kritik war eine wertvolle Hilfe bei der Fertigstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Hygiene und Öffentliche Gesundheit bedanke ich mich für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann G. Gerhards und meiner Mutter M. Willekes, deren moralische Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.