

Etablierung eines praxisnahen Prüfverfahrens
für chemische Desinfektionsverfahren zur
Wirksamkeit gegenüber Trinkwasserbiofilmen
Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsverfahren
im Silikonschlauchmodell

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Johannes Lenz

aus

Bremerhaven

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Exner
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Deppenmeier

Tag der Promotion: 01. März 2011

Erscheinungsjahr: 2011

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	BIOFILME.....	1
1.1.1	<i>Bildung von Biofilmen.....</i>	2
1.1.2	<i>Zusammensetzung von Biofilmen</i>	3
1.1.3	<i>Mikroorganismen in Biofilmen.....</i>	4
1.1.4	<i>Forschungsmodelle von Biofilmen</i>	6
1.2	TRINKWASSER	7
1.2.1	<i>Anforderungen an das Trinkwasser</i>	8
1.2.2	<i>Biofilmproblematik im Trinkwasser</i>	9
1.2.3	<i>Trinkwasserinstallation.....</i>	10
1.3	DESINFEKTIONS-/SANIERUNGSVERFAHREN.....	11
1.3.1	<i>Thermische Verfahren.....</i>	11
1.3.2	<i>Andere physikalische Verfahren.....</i>	12
1.3.3	<i>Mechanische Verfahren.....</i>	12
1.3.4	<i>Technische Verfahren.....</i>	13
1.3.5	<i>Chemische Desinfektion</i>	13
1.3.5.1	<i>Chlorverbindungen</i>	15
1.3.5.2	<i>Chlordioxid.....</i>	19
1.3.5.3	<i>Wasserstoffperoxid + Zusätze</i>	20
1.3.5.4	<i>Ozon</i>	22
1.4	ZIEL DER ARBEIT.....	23
2	MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1	MATERIAL	24
2.1.1	<i>Geräte.....</i>	24
2.1.2	<i>Verbrauchsgüter.....</i>	25
2.1.3	<i>Chemikalien.....</i>	26
2.1.4	<i>Puffer und Lösungen</i>	27
2.1.5	<i>Bakterienstämme</i>	28
2.1.6	<i>Nährmedien (Nährböden / Nährbouillon).....</i>	29
2.1.7	<i>Gelmarker und Größenstandards.....</i>	30
2.1.8	<i>Enzyme</i>	30
2.1.9	<i>Molekularbiologische Kits</i>	31
2.1.10	<i>Software.....</i>	31
2.2	WASSERQUALITÄT	31
2.2.1	<i>Silikonschlauchmodell.....</i>	32

2.2.2	<i>Varianten des Silikonschlauchmodells zur Simulation von Praxisfällen</i>	34
2.2.2.1	Dosieranlage zur Simulation einer kontinuierlichen Behandlung	34
2.2.2.2	Kreislaufsystem als Simulation einer Stoßbehandlung	35
2.2.2.3	Hygiene-Monitor zur Begleitung von Desinfektionsmaßnahmen	36
2.2.3	<i>Angewandte Desinfektionsverfahren</i>	37
2.2.4	<i>Formeln zur Berechnung</i>	38
2.2.4.1	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)/cm ²	38
2.2.4.2	Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ)/cm ²	39
2.2.4.3	Bestimmung des Reduktionsfaktors (RF)	39
2.2.5	<i>Mikroskopie</i>	39
2.2.5.1	Lupe.....	39
2.2.5.2	Fluoreszenzmikroskopie	39
2.2.5.3	Rasterelektronenmikroskopie	39
2.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	40
2.3.1	<i>Bestimmung der kultivierbaren Bakterien im Biofilm</i>	40
2.3.2	<i>Mikrobiologische Untersuchung auf Pseudomonas aeruginosa</i>	41
2.3.3	<i>Anzucht von Reinkulturen aus Biofilmmaterial</i>	41
2.3.4	<i>Membranfiltration</i>	41
2.3.5	<i>Bestimmung geeigneter Neutralisationsmittel zum Abstoppen der Desinfektionswirkung</i>	41
2.3.6	<i>Quantitativer Suspensionsversuch</i>	42
2.4	FÄRBETECHNIKEN	42
2.4.1	<i>Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Dapi – Färbung</i>	42
2.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	43
2.5.1	<i>DNA – Isolierung</i>	43
2.5.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	43
2.5.3	<i>PCR - Primer</i>	43
2.5.4	<i>Polymerase – Kettenreaktion (PCR)</i>	44
2.5.5	<i>Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR – Produkten und Agarosegelen</i>	45
2.5.6	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	45
2.5.7	<i>DNA – Sequenzierung</i>	46
2.5.8	<i>DNA – Sequenzvergleich</i>	46
2.5.9	<i>Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)</i>	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	WIRKSAMKEITSPRÜFUNG VON CHEMISCHEN DESINFIZIERUNGSVERFAHREN GEGENÜBER TRINKWASSERBIOFILMEN	48
3.1.1	<i>Prüfprodukt 1: Chlordioxid pH 2 (vor Ort hergestellt)</i>	49
3.1.1.1	Wirksamkeitsprüfung im Quantitativen Suspensionsversuch	49
3.1.1.2	Wirksamkeitsprüfung im Silikonschlauchmodell	50
3.1.2	<i>Freies Chlor aus ECA - Verfahren</i>	53

3.1.2.1	Prüfprodukt 2: ECA - Verfahren im sauren Bereich (pH 2,5 - 4,0)	54
3.1.2.2	Prüfprodukt 3: ECA - Verfahren im sauren Bereich (pH 3)	55
3.1.2.3	Prüfprodukt 4: ECA - Verfahren im neutralen Bereich (pH 7)	57
3.1.2.4	Prüfprodukt 5: ECA - Verfahren im neutralen Bereich (pH 7)	59
3.1.3	<i>Wasserstoffperoxid pH 2</i>	61
3.1.3.1	Prüfprodukt 6: Wasserstoffperoxid als Reinsubstanz (~pH 2)	61
3.1.3.2	Prüfprodukt 7: Wasserstoffperoxid + Silber (~pH 2)	63
3.1.3.3	Prüfprodukt 8: Wasserstoffperoxid + Fruchtsäuren (~pH 2)	67
3.1.4	<i>Prüfprodukt 9: Ozon</i>	69
3.1.5	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse chemischer Desinfektionsverfahren</i>	70
3.1.5.1	Behandlungen nach TrinkwV §11	71
3.1.5.2	Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion	72
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR REMANENZWIRKUNG DER DESINFEKTIONSMITTEL	73
3.2.1	<i>Untersuchungen zur Wiederverkeimung</i>	73
3.2.2	<i>Vergleich der Populationsdynamik der Biofilmorganismen vor und nach einer Desinfektion am Beispiel Wasserstoffperoxid</i>	74
3.3	BIOFILMWACHSTUM IM SILIKONSCHLAUCHMODELL IM VERGLEICH ZUM PRAXISRELEVANTEN MATERIAL EPDM	76
3.3.1	<i>Ergebnisse der Biofilmuntersuchungen im EPDM-Schlauch</i>	76
3.3.2	<i>Überprüfung der Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsverfahren auf Biofilme im EPDM - Schlauch</i>	78
3.3.2.1	Prüfprodukt 1: Chlordioxid (pH 2)	79
3.3.2.2	Prüfprodukt 4: freies Chlor aus ECA – Verfahren (pH 7)	80
3.3.2.3	Prüfprodukt 8: Wasserstoffperoxid + Fruchtsäuren (pH 2)	81
3.3.3	<i>Zusammenfassung der Untersuchungen mit dem Material EPDM im Vergleich zum Silikon</i>	83
3.4	UNTERSUCHUNGEN MIT DEM HYGIENE-MONITOR	84
3.4.1	<i>Untersuchungen zur Biofilmbildung</i>	84
3.4.2	<i>Begleitung von Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion</i>	86
3.4.3	<i>Begleitung einer kontinuierlichen Behandlung in einer mit Pseudomonas aeruginosa kontaminierten Trinkwasserinstallation</i>	87
4	DISKUSSION	93
4.1	ÜBERPRÜFUNG DER WIRKSAMKEIT VON CHEMISCHEN DESINFEKTIONSVERFAHREN GEGENÜBER TRINKWASSERBIOFILMEN	94
4.1.1	<i>Kontinuierliche Behandlung nach TrinkwV §11</i>	95
4.1.1.1	Chlordioxid	95
4.1.1.2	Freies Chlor aus ECA - Verfahren	96
4.1.1.3	Ozon	101
4.1.2	<i>Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion</i>	102
4.1.2.1	Chlordioxid	102
4.1.2.2	Freies Chlor aus ECA - Verfahren	103

4.1.2.3	Wasserstoffperoxid + Zusätze	104
4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR REMANENZWIRKUNG	107
4.2.1	<i>Untersuchungen auf Wiederverkeimung</i>	107
4.2.2	<i>Untersuchungen zur Populationsdynamik</i>	108
4.3	SCHLUSSFOLGERUNGEN & KONSEQUENZEN	110
4.3.1	<i>Beurteilung der getesteten Desinfektionsverfahren</i>	110
4.3.2	<i>Mikrobiologische Anforderungen der Trinkwasserverordnung sind nicht uneingeschränkt für die Beurteilung von Desinfektionsverfahren anwendbar</i>	114
4.4	TESTMODELLE ZUR VALIDIERUNG VON CHEMISCHEN DESINFIZIERUNGSVERFAHREN GEGENÜBER TRINKWASSERBIOFILMEN	115
4.4.1	<i>Untersuchungen zur Praxisnähe des Silikonschlauchmodells</i>	116
4.4.2	<i>Testmodell zur Begleitung von Praxismaßnahmen</i>	117
4.5	EMPFEHLUNG FÜR ÜBERPRÜFUNG DER WIRKSAMKEIT VON DESINFIZIERUNGSVERFAHREN ZUR ENTFERNUNG VON BIOFILMEN IM TRINKWASSERBEREICH IN 3 PHASEN, IN ANLEHNUNG AN EN 14885	119
4.5.1	<i>1.Phase: Test des Prüfprodukts im quantitativen Suspensionsversuch</i>	120
4.5.2	<i>2.Phase: Test des Prüfprodukts im quantitativen Keimträgertest</i>	120
4.5.3	<i>3.Phase: Test des Prüfprodukts im Feldversuch</i>	120
4.6	FAZIT.....	122
5	ZUSAMMENFASSUNG	123
6	LITERATUR	125
7	DANKSAGUNG	146

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.dest	destilliertes Wasser
a.d.R.	an der Ruhr
Ag	Silber
a.a.R.d.T.	Allgemein anerkannten Regeln der Technik
ATP	Adenosintriphosphat
bzgl.	bezüglich
CaOCl ₂	Calciumhypochlorit
CASO	Casein-Soja-Pepton
CEN	Europäisches Komitee für Normung
CKW	Chlorkohlenwasserstoffe
Cl	Chlor
ClO ₂	Chlordioxid
DAB	Deutsches Arzneibuch
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Medizin
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVGW	Dachverband des Gas- und Wasserfaches
EC	Europäische Kommission
ECA	elektrochemisch aktiviert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN	Europäische Norm
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk
EPS	extrapolymere Substanzen
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FS	Fruchtsäuren
g	Gramm
GZZ	Gesamtzellzahl
H	Wasserstoff
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
Hz	Hertz
i.d.R.	in der Regel
IHPH	Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit
K	Kelvin
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
KBE	koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration

KTW	Kunststoffe im Trinkwasser
l	Liter
M	Mol
m	Meter
m...	milli...
min	Minuten
mV	Millivolt
μ...	mikro...
n...	nano...
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n.n.	nicht nachweisbar
O	Sauerstoff
O ₃	Ozon
OH	Hydroxidion
p...	pico...
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PES	Peressigsäure
QuSus	Quantitativer Suspensionsversuch
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
REM	Rasterelektronenmikroskop
RF	Reduktionsfaktor
RKI	Robert Koch-Institut
S	Siemens
T	Tenside
T _M	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TLH	Tween + Lecithin + Histidin
THM	Trihalogenmethane
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
TU	Technische Universität
U	Unit
u.a.	unter anderem
UBA	Umweltbundesamt
UV	Ultraviolett
u.N.	unter Nachweisgrenze
V	Volt
VAH	Verbund für angewandte Hygiene e.V.
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
vgl.	vergleiche
W	Watt
WHO	World Health Organisation
WSH	Wasser standardisierter Härte

z.B.
ZVSHK

zum Beispiel
Zentralverband Sanitär Heizung Klima

1 Einleitung

1.1 Biofilme

Als Biofilm bezeichnet man mikrobielle Schleime auf einer festen Oberfläche, die durch Aggregate von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Protozoen, Algen und exogenen Bestandteilen, gebildet werden. Die Mikroorganismen sind in eine hydratisierte, extrazelluläre Matrix eingebunden (O'Toole et al., 2000; Ramey et al., 2004).

Die erste dokumentierte Beobachtung von Biofilmen machte der Niederländer Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) als er Bakterien aus Zahnbelägen untersuchte (Mikx, 1983). Erste Untersuchungen mit Mikroorganismen, die sich auf Oberflächen ansiedeln, wurden Mitte der 20er Jahre des 20. Jahrhunderts durchgeführt (Lappin-Scott, 1999). Winogradsky (1928), Cholodny (1930) und Conn (1932) tauchten Glasträger für verschiedene Zeitintervalle in den Erdboden ein, um die anhaftenden Mikroorganismen unter dem Mikroskop zu beobachten. Sie stellten fest, dass sich die Bakterien von denen, die sie in der Wasserphase kultivierten, unterschieden. Anfang der 30er Jahre konstruierte Claude Zobell einen so genannten „slide-carrier“, in den Glasträger eingespannt ins Wasser abgesenkt werden konnten, um zu beobachten, ob sich Wasser - assoziierte Bakterien auf ihnen ansiedeln (Zobell und Allen, 1933, 1935). Die Entstehung von Biofilmen wurde erstmals in den 70er Jahren untersucht (Marshall und Cruickshank, 1973). In den 80er Jahren konnte gezeigt werden, dass der Großteil der Mikroorganismen in Biofilmen lebt (Costerton et al., 1987). Im Trinkwasser sind bis zu 95% der auftretenden Mikroorganismen in Biofilmen organisiert und nur 5% befinden sich in der Wasserphase (Flemming et al., 2002). Donlan und Costerton (2002, S.167) erarbeiteten eine bis heute gültige Definition für Biofilme: „Ein Biofilm ist eine mikrobielle, sessile Gemeinschaft, charakterisiert durch Zellen, die irreversibel an eine Ober- bzw. Grenzfläche oder aneinander angeheftet sind.“ Sie ist eingebettet in eine selbst aufgebaute Matrix aus extrapolymeren Substanzen und hat einen veränderten Phänotyp bzgl. ihrer Wachstumsrate und Genexpression im Vergleich mit suspendiert lebenden Zellen (Strathmann, 2003).

1.1.1 Bildung von Biofilmen

Biofilme können auf nahezu allen feuchten Oberflächen gebildet werden (Flemming und Wingender, 2001a). Grenzflächen des Wassers jeglicher Art sind bevorzugte Besiedlungsräume von Mikroorganismen, weil sie sich leicht akkumulieren und Biofilme bilden können (Flemming und Wingender, 2002). Generell hat bei der Entstehung von Biofilmen eine Vielzahl von Faktoren Einfluss auf deren Eigenschaften. Die Umgebungstemperatur, der pH-Wert, der Druck, wirkende Scherkräfte, die Ladung der Zelloberfläche oder die chemische Zusammensetzung des Substratums wirken auf den Biofilm ein (Stoodley et al., 1999; Donlan, 2002; Fitzpatrick et al., 2005).

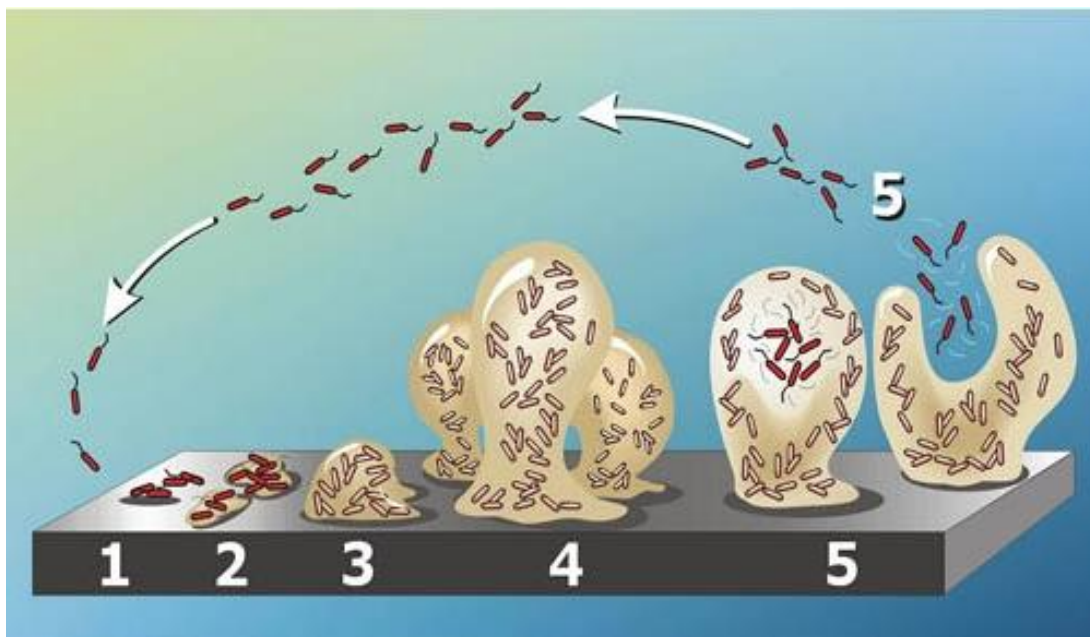


Abb. 1 Die fünf Phasen der Biofilmentwicklung: (1) reversible Adhäsion (2) irreversible Adhäsion und EPS - Produktion (3) Vermehrung und frühe Biofilmbildung (4) Reifung des Biofilms (5) Plateauphase (Stoodley et al., 2002).

Der Prozess der Biofilmbildung in aquatischen Systemen wird in 5 Phasen eingeteilt (Abb. 1). Es beginnt mit einer reversiblen Adhäsion von Makromolekülen, wie Huminstoffen, Polysacchariden, Proteinen und hydrophoben Molekülen aus der flüssigen Phase an eine Oberfläche („conditioning film“) (Schneider und Leis, 2002). Am „conditioning film“ können sich Mikroorganismen über Pili anheften (Boonaert et al., 2002). Erste sessile Zellen fangen an sich zu vermehren und beginnen mit der Formation von Mikrokolonien und der Produktion von extrapolymeren Substanzen (EPS) (Vandevivere und Kirchman, 1993). Durch das

Zusammenwachsen der daraufhin entstandenen ersten Makrokolonien wird eine geschlossene Biofilmmatrix gebildet. In der Plateauphase hat sich ein Gleichgewicht zwischen absterbenden und sich replizierenden Mikroorganismen eingestellt. Planktonische Mikroorganismen werden absorbiert und an die Umgebung abgegeben, zudem lösen sich ständig kleinste Teile aus der Biofilmmatrix heraus (Rittmann, 1989).

1.1.2 Zusammensetzung von Biofilmen

Biofilme bestehen aus Wasser, extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Mikroorganismen (Flemming und Wingender, 2001a). Der Hauptbestandteil ist mit einem Anteil von 80 - 98% das Wasser. Die Trockenmasse kann bis zu 50 kg/m^3 betragen, von der bis zu 90% die EPS ausmachen (Choong und Whitfield, 2000; Flemming und Wingender, 2002). Bei den EPS handelt es sich hauptsächlich um Lipide, Polysaccharide, Proteine und auch Nukleinsäuren. Es gibt aerobe und anaerobe Zonen, nährstoffreichere und nährstoffärmere Bereiche. Biofilme sind durchzogen von Gängen und Tunneln über die Wasser wie auch Nährstoffe alle Bereiche des Biofilms erreichen können (Abb. 2). So umfließt das Wasser alle enthaltenen Mikroorganismen. Nährstoffe und Stoffwechselprodukte werden dabei über Diffusion innerhalb des Biofilms transportiert (Costerton, 1995; Flemming und Wingender, 2001b).

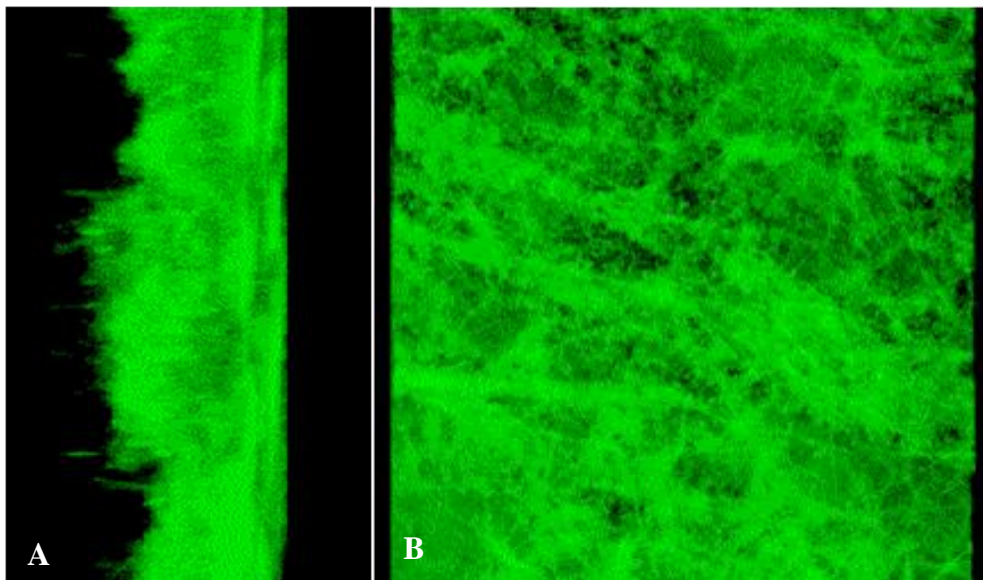


Abb. 2 Fluoreszenzaufnahmen der Matrix eines Trinkwasserbiofilm mit sichtbaren Gängen und Hohlräumen von A) der Seite B) von oben (Exner et al., 2002b)

Substanzen, die mit dem Biofilm entstehen oder aus ihm geformt werden, wie die EPS, haben heutzutage einen industriellen Wert. Sie werden u. a. bei der Herstellung von Ketchup, Zahnpasta oder Klebstoff verwendet (Flemming und Wingender, 2002).

In der Biotechnologie werden schon seit einiger Zeit Biofilmverfahren zur Abwasserreinigung eingesetzt. Dabei sind z.B. Mikroorganismen an eine Feststoff - Oberfläche gebunden und werden somit nicht von dem Abwasser abgetragen. Gleichzeitig sind die Verunreinigungen des Wassers Energiequelle und Nahrung für die Mikroorganismen. Durch die schwammartige Struktur des Biofilms besitzen sie eine große Adsorptionsfläche, was ihnen ermöglicht viele der im Wasser unerwünschten Stoffe zurückzubehalten und nach und nach abzubauen. Hierbei wird jeweils nach dem Reaktortyp zwischen Tropfkörper, Scheibentauchkörper, aeroben und anaeroben Festbetten und Schwebbetten unterschieden (Madigan und Martinko, 2006; Fuchs und Schlegel, 2007).

1.1.3 Mikroorganismen in Biofilmen

Biofilme haben im Vergleich zu umgebenden Medien mit bis zu 10^{12} Zellen/cm³ eine relativ hohe Zelldichte. Bis zu 95% der auftretenden Mikroorganismen sind in Biofilm organisiert (Flemming et al., 2002). Bei mikrobiellen Analysen von Wasserproben wird in der Regel nur die Wasserphase untersucht, somit wird ein Großteil der Mikroorganismen nicht erfasst (Characklis, 1990).

Biofilme bestehen aus einer Vielzahl von Mikroorganismen, hauptsächlich jedoch aus Bakterien (LeChevallier et al., 1987). In Abhängigkeit vom Standort variieren die Anteile an Algen, Pilzen (Göttlich und Flemming, 2002) und Protozoen, wie Ciliaten oder Amöben (Exner und Gornik, 1990; Manz et al., 1995). Auch höher entwickelte Organismen wie Fadenwürmer (Nematoden), Rädertierchen (Rotatorien), Wenigborster (Oligochaeten), Milben, Schnecken oder Insektenlarven, die sich von den im Biofilm lebenden Mikroorganismen ernähren, wurden entdeckt (Flemming und Wingender, 2001b). Zudem konnten vereinzelt Viren (Enteroviren) nachgewiesen werden (Hedberg und Osterholm, 1993; Schmitt et al., 1997). Biofilm - assoziierte Mikroorganismen sind in der Regel sessil und unterscheiden sich von suspendierten Zellen durch die Produktion von EPS, reduzierte Wachstumsraten und einer modifizierten Regulation von spezifischen Genen (Bhinu, 2005). Die Kommunikation der in Biofilmen organisierten Mikroorganismen vollzieht sich häufig mittels „Quorum sensing“, dem nach wissenschaftlichen Erkenntnissen sogar eine

entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Biofilmen zukommt. Über die Ausschüttung bestimmter Hormone können Bakterien einer Population auf chemischer Basis miteinander kommunizieren und interzelluläre Vorgänge steuern und regulieren (Parsek und Greenberg, 2005).

Trinkwasserbiofilme können fakultativ - pathogene Mikroorganismen wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* oder *Legionella pneumophila* beherbergen (Eboigbodin et al., 2008; Exner und Hartemann, 2009). Als fakultativ - pathogen werden Erreger bezeichnet, die zur Auslösung von Infektionskrankheiten spezifische Voraussetzungen benötigen oder diese aufgrund fehlender Immunsuppression auslösen (RKI, 2010). Eine deutschlandweite Studie zu mikrobiellen Kontaminationen des Trinkwassers in öffentlichen Einrichtungen identifizierte Legionellen und Pseudomonaden als den mikrobiologischen Parameter mit den häufigsten Grenzwertüberschreitungen (Völker et al., 2010). *Pseudomonas aeruginosa* gilt zudem als einer der wichtigsten durch Trinkwasser übertragenen Erreger nosokomialer Infektionen (Exner et al., 2010a). Im Trinkwasserbiofilm konnten zudem auch schon andere fakultativ pathogene Mikroorganismen wie *Helicobacter pylori* nachgewiesen werden (Linke et al., 2010). Pathogene können im Biofilm auch in infektiösen Mengen auftreten und verursachten in der Vergangenheit zahlreiche Epidemien (Colbourne et al., 1984; Ferroni et al., 1998; Rangel-Frausto et al., 1999; RKI, 2004). Das Gesundheitsrisiko der fakultativ - pathogenen Mikroorganismen, speziell für immunsupprimierte Menschen, unterstreicht die Relevanz hygienisch - medizinischer Biofilm - Forschung (Armon et al., 1997; Murga et al., 2001; Wilson et al., 2004).

Weil Biofilme Lebensraum für Krankheitserreger sein können, werden verstärkt Maßnahmen ergriffen, die eine Biofilmbildung verhindern oder unter Kontrolle halten sollen. Dabei spricht man im Allgemeinen, speziell in wasserführenden Systemen, von Desinfektion. Der Begriff Desinfektion ist definiert als eine Reduktion bzw. eine Inaktivierung der vorhandenen Mikroorganismen um 5 log₁₀ - Stufen (DAB, 2010).

Im industriellen Bereich wird dabei häufig eine Kombination aus der mechanischen Zerstörung des Biofilms und dem Einsatz von Desinfektionsmitteln eingesetzt (Donlan und Costerton, 2002). Im medizinischen Bereich werden zudem Antibiotika eingesetzt, um Bakterien unschädlich zu machen und es wird versucht Oberflächen, insbesondere von medizinischen Geräten (z.B. Katheter), so zu gestalten, dass eine Biofilmbildung minimiert bzw. verhindert wird. Dazu gehören antibiotische Oberflächen, die mit z.B. Minocyclin -

Rifampicin versetzt sind, antiseptische Oberflächen mit Chlorhexin - Silbersulfadiazin oder metallbeschichtete Oberflächen mit Silber, Platin oder Bismut (Choong und Whitfield, 2000; Donlan und Costerton, 2002). Immer häufiger kommen auch Oberflächen mit einer Nanostruktur zum Einsatz, wie es sie beim Lotuseffekt gibt oder Oberflächen mit hydrophoben Eigenschaften (Flemming, 2002).

1.1.4 Forschungsmodelle von Biofilmen

Der „slide-carrier“ von Zobell war Anfang der 30er Jahre das erste bekannte Forschungsmodell für Biofilme (Zobell und Allen, 1933). Bis heute wurde eine Vielzahl von Modellen zur Biofilmuntersuchung entwickelt. Die meisten Biofilm - Studien beschäftigen sich mit Monokulturen (Baldry, 1983; Johnston und Jones, 1995; Cochran et al., 2000; Spoering und Lewis, 2001; Moritz et al., 2010). Aufgrund ihrer definierten Zusammensetzung, zumeist kurzer Generationsdauer und einfacher Reproduzierbarkeit eignen sich künstliche Monokulturbiofilme für Laborversuche. Mit Modellbiofilmen die aus Mischkulturen bestehen wird deshalb nur selten gearbeitet (Alasri und Moal, 1992; Fatemi und Frank, 1999). undefinierte Biofilme weisen eine weitaus höhere Komplexität an Mikroorganismen und Bestandteilen der Matrix auf, so dass diese nur bedingt vergleichbar sind. Sie sind dafür jedoch besser geeignet um praxisnahe Untersuchungen durchzuführen. U. a. werden natürliche Biofilme häufig für die Testung von Desinfektionsmitteln eingesetzt (Exner et al., 1987; Morin, 2000; Holtmann und Sell, 2001; Otte et al., 2005; Gebel et al., 2009; Lenz et al., 2010).

Für die Generierung von Biofilmen werden ebenfalls unterschiedliche Methoden verwendet. Grob kann man dabei zwischen Batch - und Durchflussverfahren differenzieren. Im Batch - Verfahren werden Trägermaterialien in Nährmedien eingelegt, so dass auf ihnen mit wenig Material- und Zeitaufwand ein Biofilm wächst. Diese Biofilme werden für Tests unter definierten Umweltbedingungen und für Biozid – Tests eingesetzt. Hier besteht z.B. die Möglichkeit der Verwendung von Mikrotiterplatten als Substrat, die einen hohen Probendurchsatz ermöglichen und unter verschiedenen Bedingungen getestet werden können (Davis, 1999; O'Toole et al., 1999). Im Bereich der Desinfektionsmitteltestung wird dieses Verfahren für Voruntersuchungen zur Bestimmung von Einwirkzeiten oder optimalen Wirkkonzentrationen von Desinfektionsmitteln eingesetzt (Jones et al., 1996; von Rège und Sand, 1998).

Für weitergehende Untersuchungen werden in der Regel Biofilme verwendet, die in Durchflussverfahren generiert wurden. Dafür werden meistens Schlauchsysteme eingesetzt auf deren Oberfläche sich der Biofilm bilden kann. Die meisten Leitungsmaterialien haben einen Einfluss auf die Biofilmbildung (Lehtola et al., 2004). Zur möglichst schnellen und dichten Besiedlung werden Schlauchmaterialien eingesetzt, die durch ihre Materialeigenschaften ein Biofilmwachstum fördern. Ein erhöhter Kohlenstoffgehalt z.B. fördert das Wachstum von Mikroorganismen (Davis, 1999). Mikroorganismen assimilieren organischen Kohlenstoff um neues Zellmaterial zu produzieren und nutzen ihn als Energiequelle (LeChevallier et al., 1991). Somit ist Silikon als Trägermaterial auch Nährstoffquelle für Mikroorganismen. Diese Schläuche werden kontinuierlich mit frischem Trinkwasser durchspült und nur durch die autochthone Wasserflora entsteht ein Biofilm (Mathieu und Dollard, 1990; Lenz et al., 2010). Aufgrund einer, im Verhältnis zum Batch - Verfahren, langen Generationszeit von mehr als einem Jahr und der Komplexität der Mikroorganismen, bieten diese Biofilme die Möglichkeit einen natürlichen Biofilm aus wasserführenden Systemen zu simulieren und in praxisnahen Untersuchungen eingesetzt zu werden.

1.2 Trinkwasser

Wasser ist der Grundbaustein für Leben. Trinkwasser ist das wichtigste und einzige Lebensmittel, das durch keinen anderen Stoff ersetzt werden kann (Täufel et al., 1993).

Im Sinne der TrinkwV §3 (2001) ist Trinkwasser Wasser für den menschlichen Gebrauch und für Lebensmittelbetriebe. Dabei ist Trinkwasser alles Wasser, im ursprünglichen Zustand oder nach Aufbereitung, das zum Trinken, zum Kochen, zur Bereitung von Speisen und Getränken oder insbesondere zu häuslichen Zwecken wie Körperpflege und –reinigung; Reinigung von Gegenständen, die bestimmungsgemäß mit Lebensmitteln in Berührung kommen oder die bestimmungsgemäß nicht nur vorübergehend mit dem menschlichen Körper in Kontakt kommen. Das für den menschlichen Gebrauch bestimmte Trinkwasser muss frei von Mikroorganismen, Parasiten oder Substanzen in Konzentrationen sein, die ein Gesundheitsrisiko darstellen können (TrinkwV, 2001; Sobsey und Bartram, 2003; WHO, 2008).

Die TrinkwV hat somit die Aufgabe die menschliche Gesundheit vor schädigenden Einflüssen zu schützen, die sich aus Verunreinigungen aus dem Wasser ergeben, das für den menschlichen Gebrauch gedacht ist (TrinkwV, 2001). Es gilt der Grundsatz, dass an der Übergabestelle des Wassers an den Verbraucher (z.B. Zapfhahn, Duschkopf) die Anforderungen an die Trinkwasserqualität erfüllt sein müssen.

Seit der Novellierung der TrinkwV im Jahr 2001 erfährt die Trinkwasserinstallation eine neue Bedeutung. In Deutschland ist seitdem der Wasserversorger für die Qualität des gelieferten Trinkwassers bis zur Wasseruhr verantwortlich, welches in der Regel bis zu diesem Punkt in sehr guter Qualität vorliegt (Grummt, 2007). Danach ist der Betreiber der Trinkwasserinstallation für die Sicherstellung der Trinkwasserqualität bis zum Wasserhahn bzw. zur Zapfstelle verantwortlich. Durch den Einfluss von Biofilmen, die sich in den Leitungen bilden, wie z.B. Biofilme, kann diese Qualität des Trinkwassers wieder herabgesetzt werden (Exner et al., 2007).

1.2.1 Anforderungen an das Trinkwasser

Mit der am 01.01.2003 in Kraft getretenen TrinkwV wurde im Gegensatz zur bis dahin gültigen TrinkwV auch die Trinkwasserinstallation mit in den Regelungsbereich der TrinkwV einbezogen. Die Trinkwasserinstallation umfasst alle wasserführenden Teile der Trinkwasserversorgung und ihr bekommt in den Bereichen Prävention und Kontrolle aus infektiologischer Sicht eine entscheidende Bedeutung zu. Darüber hinaus gilt in der neuen TrinkwV der Grundsatz, dass auch an der Übergabestelle des Wassers an den Verbraucher – also am Zapfhahn – die Anforderungen an die Trinkwasserqualität erfüllt sein müssen. Diese Anforderung können im Falle des Vorkommens von mikrobiellen Schleimen bzw. Biofilmen nicht sicher erfüllt werden.

Das Auftreten von Biofilmen in der Trinkwasserinstallation und deren Begleiterscheinungen werden in zunehmendem Maße wahrgenommen. So weist z.B. die WHO als Ergebnis einer Tagung im November 2001 in Kopenhagen in ihrer „Consultation on Prevention and Management of Substance Terrorism against Water Services“ (Exner, 2002) darauf hin, dass der Einfluss und die Kontrolle des Biofilms zukünftig besondere Berücksichtigung finden muss (Exner et al., 2002a; Exner und Kistemann, 2004).

Das Ziel ist, die menschliche Gesundheit vor negativen Einflüssen durch mikrobielle Kontaminationen zu schützen (Exner et al., 2009). Es wurden Grenz- und Maßnahmenwerte

für mikrobiologische Parameter ausgearbeitet, um im Gebiet der europäischen Union eine vergleichbare Trinkwasserqualität zu erreichen (98/83/EC, 1998). Diese gelten bis heute allerdings nur für die Wasserphase und wurden nicht für Biofilme formuliert. Derzeit gibt es somit keine nationalen oder internationalen Richtlinien zum Umgang mit Biofilmen in der Trinkwasserinstallation. Die in Deutschland im Bereich Trinkwasser für die Risikoregulierung verantwortlichen, das Umweltbundesamt (UBA), das Robert Koch-Institut (RKI) bzw. maßgeblichen Institutionen wie die Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches (DVGW) oder die Trinkwasserkommission des UBA, haben bisher keine Empfehlungen oder Regelungen, die den Verantwortlichen in der Wasserversorgung oder für die Haus-/Trinkwasserinstallation konkrete Hilfestellungen in dieser Frage geben, herausgegeben.

1.2.2 Biofilmproblematik im Trinkwasser

Trotz der Verfügbarkeit und der Anwendung eines breiten Spektrums von Bioziden werden Biofilme und mikrobielle Schleime meistens nicht vollständig eliminiert und können fortlaufende Probleme im medizinischen, hygienischen und technischen Bereich hervorrufen. Biofilm – assoziierte Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit sich die durch die Produktion großer Mengen an extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) vor den letalen Auswirkungen von Bioziden schützen zu können. Dies liegt zum einen an der durch die EPS stark verminderte Diffusionsgeschwindigkeit der Biozide, als auch an der Präsenz von persistierenden Zellen, der Ausbildung von immer häufiger auftretenden resistenten Phänotypen oder durch Adaptation an neu entstandene Umweltbedingungen (Stewart et al., 2000a; Spoering und Lewis, 2001). Hinzu kommt, dass sessile Mikroorganismen im Biofilm im Vergleich zu planktonischen Zellen der selben Spezies niedrigere Wachstumsraten und veränderte Nährstoffansprüche aufweisen (Strathmann, 2003). Bestandteile der EPS, die an die Wasserphase grenzen, können außerdem Biozide direkt abschwächen. So werden Biguanide und quaternäre Ammoniumverbindungen durch die EPS absorbiert und so aus der wässrigen Phase, in der sie aktiv sind, entfernt. Die Schleime enthalten außerdem Enzyme von toten oder sterbenden Zellen, von denen einige Biozide abzubauen oder transformieren (Costerton, 1995; Cochran et al., 2000; Morton und Gaylarde, 2001; Donlan und Costerton, 2002; Exner et al., 2002b).

Ein weitere Schwierigkeit bei der Kontrolle von Biofilmen ist, dass beim Abreißen von Biofilmfragmenten in wasserführenden Systemen Mikroorganismen in hoher Zahl durch Verschleppung in normalerweise sterile Körperbereiche des Menschen, wie z. B. durch Aspiration in die Lunge, eingetragen werden können. Dabei sind sie aufgrund ihrer Existenz im Biofilmaggregat auch vor Antibiotika geschützt (Lasa et al., 2005).

1.2.3 Trinkwasserinstallation

Probleme mit Biofilmen in der Trinkwasserinstallation bekommen eine immer größere Bedeutung und Beachtung (Donlan und Costerton, 2002; Exner et al., 2005).

Für die Inbetriebnahme und Instandhaltung einer Trinkwasserinstallation wurden deutsche und europäische Richtlinien formuliert. Generell wird davon ausgegangen, dass durch die Einhaltung der „allgemein anerkannten Regeln der Technik“ (a.a.R.d.T.) eine mikrobielle Kontamination verhindert werden kann (DIN, 2008). Diese Regeln beruhen auf Erfahrungswerten und stellen eine Minimalforderung für den Sollzustand einer baulichen Anlage dar, eine Nichteinhaltung entspricht einem Mangel (DIN, 2000; Bürschgens, 2009; Kuhlmann und Winter, 2009). Zu beachten ist jedoch, dass es sich bei dem Begriff „allgemein anerkannte Regeln der Technik“, um einen so genannten „unbestimmten Rechtsbegriff“ handelt, der für den Einzelfall stets der Auslegung und Konkretisierung durch die Gerichte bedarf (VOB/B, 2009). Dadurch können dem schnellen Wandel der a.a.R.d.T. und den real existierenden Bedingungen Rechenschaft geleistet werden. Zu dieser Auslegung des Rechtsbegriffs der a.a.R.d.T. kam schon 1910 das Reichsgericht (DIN, 1979).

Metallische Werkstoffe, die in der Trinkwasserinstallation verbaut sind können einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des Trinkwassers haben (DIN, 2010). Deshalb ist in der DIN 1988 festgehalten, dass alle Anlagenteile so beschaffen sein müssen, dass sie die Lebensmittelqualität des Trinkwassers nicht unzulässig beeinträchtigen (DIN, 2008). Für alle zulässigen Werkstoffe gibt es zudem noch gesonderte Regeln, wenn sie als Rohre oder Rohrverbindungen eingesetzt werden, die im „TWIN – Werkstoffe in der Trinkwasserinstallation“ (DVGW, 2002) zusammengefasst sind. Alle Werkstoffe müssen außerdem geprüft werden, ob sie den hygienischen Anforderungen entsprechen. Dafür werden sie, bevor sie verbaut werden dürfen, nach den KTW - Empfehlungen „Leitlinien des Umweltbundesamtes zur hygienischen Beurteilung von organischen Materialien im Kontakt mit Trinkwasser“ (DVGW, 1977) und dem Arbeitsblatt W 270 (DVGW, 2008a) geprüft. Zur

Prävention von mikrobiellen Kontaminationen gibt es auf der Basis der a.a.R.d.T. weitere europäische Normen, wie die EN 806 (DIN, 2007) und EN 1717 (DIN, 2001) sowie Richtlinien des DVGW, wie die Arbeitsblätter W291 (2000) und W551 (2004). Für die Einhaltung der Trinkwasserhygiene sind grundsätzlich sowohl Betreiber, als auch Planer und Installateure verantwortlich. Die Planungsgrundsätze sind in der VDI 6023 (1998) aufgeführt und unterliegen ebenfalls den a.a.R.d.T. (Röttlich, 2010).

1.3 Desinfektions-/Sanierungsverfahren

Unter dem Begriff Desinfektion versteht man eine Reduktion von Mikroorganismen durch Abtötung, Inaktivierung bzw. Entfernung von Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen) um mindestens 5 Zehnerpotenzen (\log_{10} -Stufen). Ziel ist, das nach der Behandlung vom desinfizierten Material keine Infektion mehr ausgehen kann (DAB, 2010).

Zur Instandhaltung bzw. Desinfektion/Sanierung der Trinkwasserinstallation gibt es für den Betreiber verschiedene Möglichkeiten.

1.3.1 Thermische Verfahren

Die thermische Sanierung, die im DVGW Arbeitsblatt W551 (2004) beschrieben ist. Dabei muss jede Zapfstelle für 3 Minuten mit 70°C heißem Wasser beaufschlagt werden. Problematisch hierbei ist häufig, dass nicht gewährleistet ist, dass die benötigten Temperaturen über das gesamte Verteilungsnetz gehalten werden können und der Desinfektionseffekt folglich ausbleibt (Röttlich, 2010). Dies kann zur Folge haben, dass die Temperaturen so weit absinken, dass sie ein Wachstum von Mikroorganismen fördern können. Legionellen beispielsweise haben ihr Vermehrungsoptimum bei Temperaturen von 30 - 50°C. Viele Warmwasseranlagen werden in genau diesem Temperaturbereich betrieben (Hentschel und Waider, 2004). Um das Wachstum von Legionellen im System zu verhindern darf laut DVGW im gesamten Wasserumlauf die Abkühlung nicht größer als 5 K sein. Dabei wird am Warmwasseraustritt in Großanlagen eine Temperatur von 60°C gefordert (DVGW, 2004). Dazu besagen Studien, dass es bei den hygienisch bedingten kleinen Temperaturdifferenzen von kleiner als 5 K wirtschaftlich sinnvoll ist, die volle - eine praxisgerechte Sicherheit einkalkuliert - Temperaturdifferenz auszunutzen mit dem Ziel, die Gesamtkosten der Zirkulationsanlage zu minimieren (Rudat, 1994). Zudem gibt es

thermotolerante Mikroorganismen, die kurzfristig höhere Temperaturen überleben können (Hager et al., 1995). Außerdem ist ein sehr hoher Energie- und Wasserverbrauch, sowie Personalaufwand vonnöten, was einen erhöhten finanziellen Aufwand mit sich bringt (Röttlich, 2010).

1.3.2 Andere physikalische Verfahren

Eine weitere Möglichkeit sind physikalische Verfahren, wie die Installation von UV-Anlagen. Durch Quarzlampen, die mit Quecksilber gefüllt sind, werden UV- Strahlen bei einer Wellenlänge von 254 nm erzeugt (Lehtola et al., 2003). UV-Geräte, die im Trinkwasserbereich eingesetzt werden, müssen nach dem DVGW Arbeitsblatt W 294 (1997) zertifiziert sein (Röttlich, 2010). Die Verwendung von UV-Strahlen ist ein häufig eingesetztes Verfahren zur Desinfektion von Trinkwasser. Mit dem Verfahren können sowohl Bakterien, als auch Viren inaktiviert werden (Wolfe, 1990). Hochenergetische Photonen werden von der Zell - DNA absorbiert und führen zur Bildung von Thymin - Dimeren. Wenn eine ausreichende Anzahl dieser Dimere in der Zelle vorliegt, werden die Replikation der DNA und die Bildung von RNA inhibiert. Die Zelle ist somit nicht mehr reproduktionsfähig und durch das Ausbleiben der enzymatischen Reparatur stirbt sie ab (Lawryshyn und Cairns, 2003). Es handelt sich dabei um eine punktuelle Desinfektion des Trinkwassers. Vorteile des Verfahrens sind, dass keine Chemikalien benötigt werden und auch keine Nebenprodukte entstehen. Weil für die Durchführung nur eine UV - Lampe und elektrische Energie benötigt werden, ist das Verfahren umweltfreundlich und zudem noch kostengünstig (Dyksen et al., 1998). Allerdings muss das zu behandelnde Wasser eine gewisse Qualität haben, damit eine effektive Wirksamkeit vorliegt. Verunreinigungen durch z.B. Rostpartikel oder Trübungsstoffe absorbieren die UV-Strahlen und die desinfizierende Wirkung bleibt aus. Studien zeigten, dass z.B. das Vorhandensein von Alginat mucoide *Pseudomonas aeruginosa* vor UV-Strahlung schützen kann (Elasri und Miller, 1999; Stoodley et al., 2002). Zudem werden Legionellen in Amöben nur teilweise von der Strahlung erfasst (Röttlich, 2010).

1.3.3 Mechanische Verfahren

Mechanische Verfahren, wie die Installation von endständigen Filtern, haben in Krankenhäusern nachweislich zu deutlichen Reduktionen von *Pseudomonas* – Infektionen

geführt (Sabria und Yu, 2002; Trautmann et al., 2004; Exner et al., 2005; Vianelli et al., 2006). Jedoch muss dabei beachtet werden, dass die Filter nur eine geringe Lebensdauer haben und ein regelmäßiger Austausch alle 30 Tage stattfinden muss. Die Kosten der einzelnen Filter sind zwar gering, der Personalaufwand und der Aufbau der notwendigen Fachkenntnisse jedoch höher. Um eine effektive Filtrationsleistung zu erreichen, wird zum Teil ein Wechsel der Filter im Abstand von einer Woche empfohlen (Vonberg et al., 2005).

Teile der EPS - Matrix können Filtermaterialien, speziell körnige wie Sand oder Aktivkohle, verstopfen und teilweise so stabile Aggregate bilden, dass sogar Rückspülungen nicht mehr helfen die Filter zu säubern (Flemming und Wingender, 2002). Eine andere Möglichkeit ist die Zuführung von Luftimpulsen (DVGW, 2009). Studien zeigten, dass durch den Einsatz von Luftimpulsen in den Leitungen zu Verwirbelungen kommt und dadurch organische Bestandteile, wie auch Biofilme, leichter von der Oberfläche abgelöst werden (Exner et al., 2010b).

1.3.4 Technische Verfahren

Durch technische Verfahren, wie der Neu- oder Umbau von Teilen der Trinkwasserinstallation (DVGW, 2004) oder den Austausch von nicht geeigneten Materialien (Exner et al., 2007), können Probleme in der Trinkwasserinstallation kostenintensiv behoben werden. Zudem werden durch das bauliche Entfernen von Tot- und Stichleitungen, in denen Stagnationen auftreten, potentielle Brutstätten von Mikroorganismen beseitigt (Röttlich, 2010).

1.3.5 Chemische Desinfektion

Als Begründer der chemischen Desinfektion zur Prävention von Infektionen gilt Ignaz Semmelweis (1818-1865), als er 1847 in der Wiener Gebärklinik die Händedesinfektion mit einer Chlorkalklösung anordnete und dadurch das Kindbettfieber eindämmen konnte.

Chemische Desinfektionsverfahren werden u.a. bei der Flächen-, Instrumenten-, Hände-, Haut- und der Trinkwasserdesinfektion eingesetzt (RKI, 2007). Bei behördlich angeordneten Desinfektionsmaßnahmen, dürfen nur Mittel und Verfahren verwendet werden, die vom RKI als wirksam getestet wurden und in der Desinfektionsmittelliste des RKI aufgeführt sind. Um in die Liste aufgenommen zu werden sind Gutachten über die Eignung des Mittels bei der

Anwendung unter Praxisbedingungen erforderlich. Zudem müssen vom Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte bzw. vom Umweltbundesamt (UBA) Unterlagen zur Bewertung eventueller schädlicher Wirkungen auf Mensch und Umwelt eingereicht werden. Für routinemäßige Desinfektionsmaßnahmen wird von der Desinfektionsmittel - Kommission des Verbunds für angewandte Hygiene (VAH) eine Liste, der nach den „Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren“ (Gebel et al., 2001) wirksam geprüften Desinfektionsverfahren, herausgegeben. Es besteht generell keine Verpflichtung an den Hersteller Desinfektionsverfahren listen zu lassen. Dem Anwender ist es freigestellt, welches Verfahren eingesetzt wird, ausgenommen es handelt sich, wie beschrieben um eine behördliche Anordnung (RKI, 2007).

Chemische Stoffe können die Zelle der Mikroorganismen soweit schädigen, dass sie inaktiviert oder abgetötet werden. Dies kann durch Schädigung der Zellmembran, Zerstörung essentieller Proteine oder morphologische Veränderungen zustande kommen (Cho et al., 2010). Weil die derzeit zur Verfügung stehenden Wirkstoffe Zellen jeglicher Art schädigen können, somit auch menschliche, ist im § 11 der TrinkwV geregelt, welche Wirkstoffe zur Trinkwasseraufbereitung verwendet werden dürfen. Dazu gehören freies Chlor, Chlordioxid, Natriumhypochlorit und Ozon. Zudem sind Grenzwerte für die jeweiligen Wirkstoffe festgelegt, in welchen Konzentrationen diese zur Aufbereitung des Trinkwassers eingesetzt werden dürfen und wie hoch die chemische Belastung des Wassers nach Abschluss des Prozesses sein darf. Dadurch wird sichergestellt, dass das desinfizierte Wasser den gesundheitlichen und hygienischen Anforderungen entspricht. Für eine kurzzeitige Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion sind auch andere chemische Desinfektionsverfahren zugelassen. Während der Desinfektion der Anlage steht dem Verbraucher kein Trinkwasser aus der Trinkwasserinstallation zur Verfügung. Gegebenenfalls muss Trinkwasser anderweitig bereitgestellt werden. Eine Anlagendesinfektion ist nur nachhaltig, wenn die Ursachen der Kontamination beseitigt werden. Ansonsten ist der Erfolg nur temporär. Die Anlagendesinfektion erfolgt in der Praxis thermisch oder durch den Einsatz chemischer Desinfektionsmittel. Die Wirksamkeit kann durch eine vorhergehende Spülung ausschließlich mit Wasser oder durch pulsierenden Luftzusatz erhöht werden. Nach einer Anlagendesinfektion ist die mikrobielle Beschaffenheit des Wassers durch eine zugelassene Trinkwasseruntersuchungsstelle zu überprüfen (DVGW, 2009). Nach Abschluss der Desinfektion ist die Anlage bis zur völligen Entfernung des Desinfektionsmittels mit

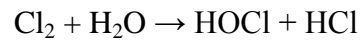
Trinkwasser zu spülen (ZVSHK, 2004), das den Anforderungen der TrinkwV entspricht (DVGW, 2000). Allerdings ist dabei zu beachten, dass eine falsche Anwendung genau den gegenteiligen Effekt haben kann. Die Wirkweise von Chemikalien ist häufig temperatur- oder pH- abhängig (Klischies et al., 2008). Bei einer falschen Dosierung (i. d. R. durch zu hohe Konzentrationen) kann es schon bei einmaliger Anwendung zu Werkstoffveränderungen von verbauten Materialien kommen, was zu massiven Folgeschäden führen kann (DVGW, 2009). Bei einigen Reaktionen von chemischen Wirkstoffen können Nebenprodukte entstehen, die sowohl die menschliche Gesundheit, als auch die Umwelt schädigen können (z.B. Trihalogenmethane) (Chowdhury et al., 2010). Planung, Bau und Inbetriebnahme von Desinfektionsanlagen sollten nur durch Fachunternehmen erfolgen (DVGW, 2009).

Ein weiteres Problem, jedoch kein spezielles von chemischen Desinfektionsverfahren, sind so genannte Totstränge. Häufig sind Leitungsabschnitte, die nicht mehr in Betrieb sind, nicht vom restlichen System abgetrennt. Diese werden nicht mehr von Trinkwasser durchflossen, so dass der Wirkstoff dort nicht hingelangt. Dort vorhandene mikrobielle Belastungen werden nicht beseitigt und können ein saniertes System in kürzester Zeit wieder vollständig kontaminieren. Nicht erreichbare Komponenten sind auszutauschen bzw. zu entfernen (DVGW, 2009).

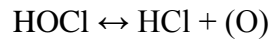
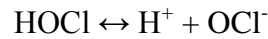
1.3.5.1 Chlorverbindungen

Das am häufigsten eingesetzte und auch empfohlene chemische Desinfektionsmittel ist freies Chlor. Laut § 11 der TrinkwV darf für die Aufbereitung von Trinkwasser eine Konzentration von 1,2 mg/l freies Chlor eingesetzt werden. Nach Abschluss der Aufbereitung müssen noch 0,1-0,3 mg/l freies Chlor nachgewiesen werden können, damit eine effektive Desinfektion vorliegt. Für Schadensfälle ist in § 11 festgelegt, dass kurzzeitig auch höhere Konzentrationen an freiem Chlor von bis zu 6 mg/l zur Aufbereitung (maximal 0,6 mg/l nach der Aufbereitung nachweisbar) eingesetzt werden dürfen (Umweltbundesamt, 2005b). Es darf zur kontinuierlichen Desinfektion und zur Stoßbehandlung für die Anlagendesinfektion eingesetzt werden.

Chlor wird in den USA seit Beginn des 20. Jahrhunderts zur Trinkwasserdesinfektion verwendet (Ridgway und Olson, 1982). Wenn Chlorgas mit Wasser in Kontakt kommt, wird es hydrolysiert es und entstehen hyperchlorige Säure und Salzsäure:



Die hyperchlorige Säure ionisiert dabei in einer reversiblen Reaktion:

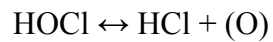
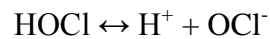


Die biozide Wirkung von Chlor resultiert aus der hohen Oxidationskraft, die wiederum durch den Anteil der hypochlorigen Säure (HOCl) bestimmt wird. Zusätzlich wirkt der atomare Sauerstoff ebenfalls oxidierend. Hypochlorige Säure hat die 50 bis 100 fache biozide Wirksamkeit von Hypochlorit - Ionen. Die Zellmembran der Mikroorganismen wird geschädigt, so dass der bestehende Protonengradient zusammenbricht (Davis et al., 1994). Die undissoziierte Form (HOCl) kann zudem leicht die Zellmembran durchdringen und zusätzlich essentielle Stoffwechselfunktionen, wie die Proteinbiosynthese, stören.

Chlor reagiert mit allen organischen Substanzen, wie z.B. im Wasser mit vorhandenen Algen, Schleimen, organische Ablagerungen oder auch Chemikalien, beispielsweise Schwefelwasserstoff (Liu und Li, 2010). Dieser Aspekt muss bei einer Chlordesinfektion berücksichtigt werden. Hinzu kommt, dass der Zustand von Chlor stark pH - abhängig ist. Mit steigendem pH muss mehr Wirkstoff eingesetzt werden, damit ausreichend freies Restchlor für die Desinfektion zur Verfügung steht. Die Oxidation von Chlor führt unvermeidlich zur Entstehung von Nebenprodukten. In Abhängigkeit von den zur Reaktion zur Verfügung stehenden organischen Substanzen können dabei umwelt- und gesundheitsschädliche Stoffe, wie Trihalogenmethane (THM) oder Chlorkohlenwasserstoffe (CKW), gebildet werden. (Guo und Chen, 2009; Chang et al., 2010; Mincher et al., 2010). Diese Stoffe stehen im Verdacht karzinogen zu sein (Umweltbundesamt, 1996; Chowdhury et al., 2010).

Eine weitere Form des bioziden Chlors sind Hypochlorite, Salze der hypochlorigen Säure. In der Praxis werden hauptsächlich Natriumhypochlorit (NaOCl) und Calciumhypochlorit (CaOCl_2) eingesetzt, wobei Natriumhypochlorit häufiger zum Einsatz kommt, weil es deutlich günstiger ist. Wird das zu behandelnde Wasser mit Natriumhypochlorit versetzt laufen folgende Gleichgewichtsreaktionen ab:





Transport und Lagerung sollten bei niedrigen Temperaturen und in lichtundurchlässigen Behältern erfolgen. Bei hohen Temperaturen und UV – Strahlung werden Hypochlorite schneller zersetzt und toxisches Chlorgas entsteht (Rutala und Weber, 1997).

Generell kann eine Behandlung mit Chlorverbindungen zu Geschmacksbeeinträchtigungen des Trinkwassers führen. Wenn Phenole im Wasser vorhanden sind, entstehen Chlorphenole, die zu den CKWs zählen und zudem als karzinogen gelten (Chang et al., 2010). Ein heutzutage zunehmend häufiger beschriebenes Problem sind Resistenzen von Mikroorganismen gegenüber Chlor (Le Dantec et al., 2002; Schwartz et al., 2003; Sohn et al., 2004; Cooper und Hanlon, 2010).

1.3.5.1.1 Elektrochemisch aktiviertes Wasser (ECA - Verfahren)

Das Verfahren des elektrochemisch aktivierten Wassers zur Desinfektion wird seit mehreren Jahren verstärkt in Asien, speziell in Japan im Lebensmittelbereich, verwendet (Huang et al., 2008). Zur Trinkwasserdesinfektion wurde es erstmals in den 1970ern in Russland eingesetzt (Bakhir et al., 2001). Dort kommt es auch bei der Desinfektion von Swimmingpools oder in Krankenhäusern zum Ausspülen von Wunden zum Einsatz (Paola, 2006; Wolvos, 2006). Studien zeigten, dass die bei dem Verfahren erzeugten Lösungen antimikrobielle Wirkung gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen besitzen (Venkitanarayanan et al., 1999a; Fabrizio und Cutter, 2003; Kimura et al., 2006; Zeng et al., 2010). In der Folge wurde das Verfahren vermehrt in der Landwirtschaft, Medizin, in Zahnarztpraxen und in der Lebensmittelindustrie eingesetzt (Huang et al., 2008). Untersuchungen ergaben, dass es u. a. eine sehr gute antimikrobielle Wirkung auf Oberflächen von Eiern (Russell, 2003), Tomaten (Bari et al., 2003) oder Schneidebrettern (Venkitanarayanan et al., 1999b) hat.

Im Gegensatz zu den traditionellen chemischen Desinfektionsverfahren, wie Glutaraldehyd, soll es günstiger sein. Zudem ist es trotz des hohen bioziden Wirkungsgrads weniger schädlich für die Umwelt und es stellt keine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar (Mori et al., 1997; Sakurai et al., 2003).

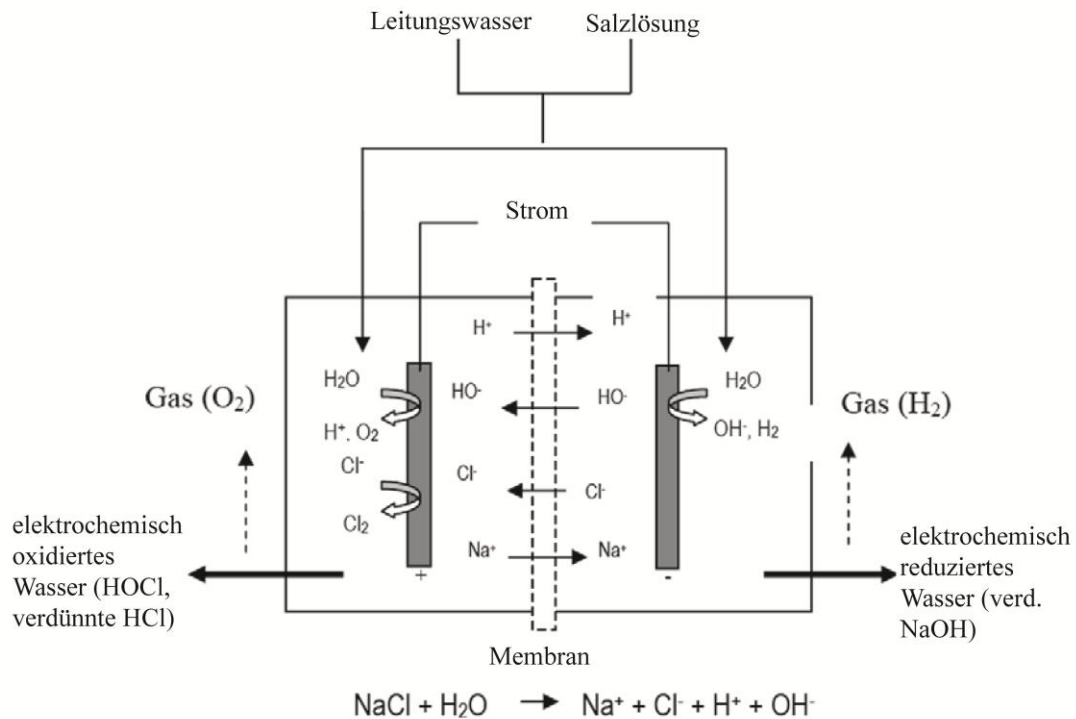
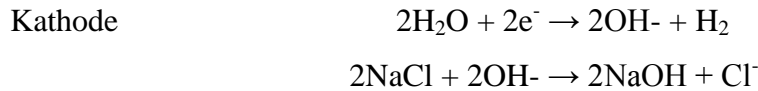
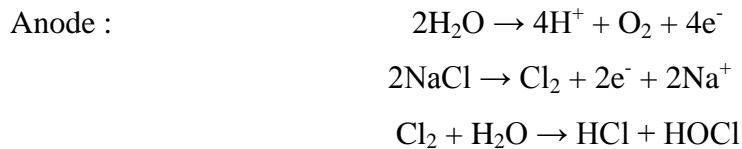


Abb. 3 Schematische Darstellung einer Zellmembranelektrolysekammer mit den Reaktionsprodukten (modifiziert nach Huang et al., 2008).

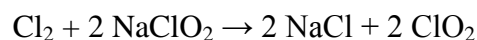
Die Herstellung von elektrochemisch aktiviertem Chlor erfolgt mittels Zellmembranelektrolyse (Huang et al., 2008). Durch das Erzeugen eines Stromflusses in der Elektrolysekammer wandern negativ geladene Ionen (Cl^- , OH^-), die in der Salzlösung vorliegen, zur Anode, um Elektronen abzugeben (Abb. 3). Bei diesem Vorgang entstehen Chlorgas, Hypochlorit - Ionen, hypochlorige Säure und Salzsäure. Die positiv geladenen Ionen (H^+ , Na^+) wandern zur Kathode um Elektronen aufzunehmen. Dabei entstehen Wasserstoffgas und Natriumhydroxid (Hsu, 2005). Somit werden in einem Prozess zwei verschiedene Arten von Wasser hergestellt. Auf der Anodenseite entsteht das elektrochemisch aktivierte Wasser im sauren Bereich (pH 2,3-2,7), mit einem hohen Redoxpotential (>1000 mV), erhöhten Mengen an gelösten Sauerstoff und freiem Chlor. Auf der Kathodenseite entsteht elektrochemisch reduziertes Wasser im basischen Bereich (pH 10-11,5), mit einem niedrigen Redoxpotential (-800 bis -900 mV). Dieses Wasser wird teilweise zur Beseitigung von Verschmutzungen oder zur Reinigung von Küchenutensilien verwendet (Hsu, 2005). Die Reaktionen zur Herstellung von elektrochemisch aktiviertem Wasser lauten wie folgt:



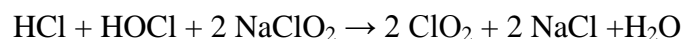
Elektrochemisch aktiviertes Wasser kann sich in seinen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden. Variable Faktoren wie die Temperatur des Wassers, die eingesetzte Salzkonzentration und die Durchflussrate beeinflussen die Effizienz des Elektrolysevorgangs (Hsu, 2003). In Abhängigkeit von den Einstellungsparametern bei der Herstellung kann somit gezielt Einfluss auf die Eigenschaften der Desinfektionslösung genommen werden. Das Redoxpotential wird z.B. durch eine Erhöhung des Durchflusses deutlich herabgesetzt (Hsu, 2005). Zudem kann durch eine Erhöhung der Spannung oder der Salzkonzentration der pH-Wert vermindert und das Redoxpotential erhöht werden (Gabriel und Hung, 2004).

1.3.5.2 Chlordioxid

Chlordioxid wird seit Mitte des 20. Jahrhunderts für die Trinkwasserdesinfektion in den USA eingesetzt (Bryant et al., 1992). In Deutschland darf Chlordioxid zur Aufbereitung von Trinkwasser mit einer Konzentration von bis zu 0,4 mg/l eingesetzt werden. Nach dem Aufbereitungsprozess müssen noch 0,05 - 0,2 mg/l Chlordioxid nachgewiesen werden. In der Regel wird es am Einsatzort durch Mischung einer starken Chlorklösung mit Natriumchlorit hergestellt:



Es kann jedoch auch in kleineren Mengen aus Salzsäure und Natriumhypochlorit erzeugt werden:



Es liegt im Gegensatz zu Chlor als gelöstes Chlordioxid im Wasser vor. In der Folge entstehen deutlich weniger Nebenprodukte, weil nur oxidierende Vorgänge und keine Chlorreaktionen stattfinden (Krasner, 2009). Die produzierten Nebenprodukte Chlorit und Chlorat gelten jedoch generell als gesundheitlich bedenklich (Korn et al., 2002; Fantuzzi et

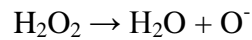
al., 2003b). Die Entstehung von Halogenalkanen ist jedoch deutlich niedriger, als bei freiem Chlor (Hofmann et al., 1999) und die Wirkung ist nicht so stark pH - abhängig (Chang et al., 2000; Chauret et al., 2001). Außerdem hat Chlordioxid sowohl höhere antibakterielle Wirkung, als auch eine längere Verweildauer im System als Chlor (Schwartz et al., 2003; Loret et al., 2005). Mehrere Studien mit Legionellen (Walker et al., 1995; Srinivasan et al., 2003), Cryptosporidien (Clark et al., 2003), verschiedenen Viren (Eleraky et al., 2002; Li et al., 2004) und Biofilmen (LeChevallier et al., 1988; Schwartz et al., 2003; Gagnon et al., 2005) belegen diese Desinfektionsleistung von Chlordioxid. Zudem können auch chlorresistente Parasiten, wie z.B. *Cryptosporidium parvum*, inaktiviert werden (Chauret et al., 2001).

Das Wirkprinzip ist im Vergleich zu Chlor ein anderes. Chlordioxid dringt über die Zellmembran in die Zelle ein und reagiert durch Oxidationsvorgänge über freie Radikale (Baribeau et al., 2002). Jedoch reagiert es nicht mit reduzierten Schwefelverbindungen, sowie sekundären- und tertiären Aminen, was z.B. zu einem erhöhten Chlorbedarf führen würde (Thompson, 1993). Ein weiterer Vorteil von Chlordioxid ist, dass es im Vergleich zu freiem Chlor weniger korrosiv ist. Untersuchungen mit Eisenrohren zeigten, dass bei einer Behandlung mit Chlordioxid die Korrosionsraten sogar niedriger waren, als in nicht - behandelten Rohren (Eisnor et al., 2004).

1.3.5.3 Wasserstoffperoxid + Zusätze

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde erstmals 1904 zur Desinfektion von Milch eingesetzt (Lück und Jager, 1997). Zur Aufbereitung von Trinkwasser darf es mit maximal 17 mg/l eingesetzt werden. In der Trinkwasserdesinfektion darf es ausschließlich in der Stoßbehandlung verwendet werden (Umweltbundesamt, 2005b). Es gilt als Aktiv - Sauerstoff freisetzende Substanz (Exner et al., 1987; Ditommaso et al., 2005). Die antibakterielle Wirkung basiert jedoch nicht direkt auf der oxidativen Eigenschaft, sondern erfolgt über daraus resultierende Folgereaktionen (Halliwell und Gutteridge, 1984) Obwohl die Mechanismen, über die durch H_2O_2 bakterizide Produkte entstehen, nicht genau erforscht sind, ist bekannt, dass es Nukleinsäuren, Enzyme und Bestandteile der Zellmembran schädigt (Lynch und Fridovich, 1978; Schurmann, 2001). In der Praxis hat sich gezeigt, dass es sich sehr gut eignet, um die Biofilmmatrix von der Oberfläche zu lösen (Exner et al., 1987; Gebel et al., 2005).

Wasserstoffperoxid gilt im Allgemeinen als sehr umweltfreundlich, weil es sich unter Abspaltung von Sauerstoff zu Wasser zersetzt:



Allerdings ist es sehr instabil und weil es zudem leicht entzündlich ist, muss es je nach Wirkstoffgehalt speziell gelagert werden (BArbBl, 1998).

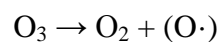
Viele Organismen schützen sich mittels Katalasen vor Wasserstoffperoxid. Bisher sind mehr als 300 Varianten des Enzyms, das in der Lage ist Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff zu spalten, bekannt (Chelikani et al., 2004). Eine Möglichkeit diesen für die Desinfektion nachteiligen Effekt zu umgehen, ist die Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen, wie Tensiden. Einige Tenside besitzen in ihrer Struktur funktionelle Gruppen, die eine hohe Affinität zu polaren Substanzen haben und somit die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzen. Dies führt zu einer höheren Löslichkeit von organischen Substanzen und erleichtert der Zugang von Stoffen in die Bakterienzelle (Falbe und Regitz, 1997). Zudem haben sie teilweise eine bakterizide Wirkung (Räbiger und Hövelmann, 2001). Eine weitere Alternative ist der Zusatz von Säuren, wie einerseits Peressigsäure, die durch Oxidationsvorgänge eine hohe biozide Wirkung haben. Außerdem ist es weniger toxisch als andere Wirkstoffe und in den empfohlenen Konzentrationen nicht korrosiv (Henoun Loukili et al., 2004; Kovaleva et al., 2010). Andererseits werden Fruchtsäuren eingesetzt, die helfen, das Wasserstoffperoxid vor den Katalasen zu schützen, damit es in die Zelle eindringen kann (Jati, 2008).

Durch Zusätze wie z.B. Silber wird die biozide Wirkung von Wasserstoffperoxid erhöht (Russell und Hugo, 1994). Silberionen können auf drei Arten bakterizid wirken. Einerseits können sie an die Zellmembran binden oder sich in diese einlagern und somit wichtige Funktionen, wie die Permeabilität stören, andererseits können sie an Schwefel- bzw. Phosphat-haltige Enzyme binden und diese in ihrer Form und Funktion beeinflussen. Zudem können sie die Ansiedlung von Mikroorganismen auf Oberflächen verhindern (Morones et al., 2005). Untersuchungen zeigten, dass *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus epidermidis* nach einer Behandlung mit Silber - Nanopartikeln nicht mehr fähig waren, einen Biofilm zu bilden (Kalishwaralal et al., 2010). Allerdings werden auch hier immer häufiger auftretende Resistenzen wahrgenommen. Erste Berichte über silberresistente Bakterien und Viren

stammen aus den 1950er Jahren (Franke 2007). So wird u. a. von mutanten *Escherichia coli* berichtet (Li et al., 1997) und auch bei Staphylokokken wurden Resistenzen gegenüber Silberionen nachgewiesen (Roempp, 2007). Die Ausbildung von Silberresistenzen kann auf verschiedenen Mechanismen, wie beispielsweise auf einem Silberionen bindenden Protein oder einer geringeren Permeabilität der Zellmembran, beruhen (Franke, 2007). Die Silberung zur Trinkwasseraufbereitung ist nur noch in Form von reinem Silber und Silberchlorid zulässig (TrinkwV, 2001).

1.3.5.4 Ozon

Ozon ist ein weiteres oxidierendes Biozid, das zur Trinkwasserdesinfektion eingesetzt wird (Korol et al., 1995; Robbins et al., 2005). Es wurde erstmals 1906 in Frankreich zur Trinkwasserdesinfektion eingesetzt (Rice, 1985). In den USA und Kanada fand Ozon z. B. verstärkt zum Ende der 70er Jahre im Trinkwasserbereich Verwendung, weil aufgrund von neu eingeführten Grenzwerten für Trihalogenmethane der Einsatz von Chlor reduziert werden musste (Glaze, 1987). In Deutschland darf es zur Trinkwasseraufbereitung mit einer maximalen Konzentration von 10 mg/l eingesetzt werden. Nach der Aufbereitung dürfen nicht mehr als 0,05 mg/l nachweisbar sein (Umweltbundesamt, 2005b). Ozon ist aber ein sehr instabiles Gas, zerfällt folglich sehr schnell und ist in reiner Form toxisch (Dusseau et al., 2004; Tarrass et al., 2010). Es gilt trotzdem als sehr umweltfreundliches Desinfektionsverfahren, weil bei der Reaktion keine die Gesundheit gefährdenden Stoffe entstehen. Es wird jeweils am Einsatzort aus Luft und Sauerstoff in Ozongeneratoren erzeugt. Weil es zu einer ständigen Abspaltung eines Sauerstoffatoms neigt, hat es eine sehr hohe Oxidationswirkung:



Ozon hat eine sehr hohe biozide Wirkung (Edward, 1998; Hoenich und Levin, 2008), so dass es Bakterien, Sporen und Viren in kürzester Zeit inaktiviert (Amato und Curtis, 2002). Es verbindet sich mit Eiweißen und hemmt somit die, für die Zellatmung, essentiellen Enzyme. Die Wirkung wird jedoch wie beim Chlor durch Umgebungsparameter beeinflusst. Der pH hat z.B. einen Einfluss auf die Halbwertszeit, die bei pH 8 weniger als eine Stunde beträgt (Rice, 1985). Hinzukommt, dass es durch seine Reaktionsfreudigkeit auch mit andern organischen Substanzen reagiert (Vilve und Sillanpaa, 2010).

1.4 Ziel der Arbeit

Durch die TrinkwV ist geregelt, dass keine die Gesundheit gefährdende mikrobielle Belastung im Trinkwasser vorliegen darf. Die bestehenden Grenzwerte beziehen sich jedoch ausschließlich auf die frei in der Wasserphase befindlichen Mikroorganismen. Bis zu 95% der im Trinkwasser auftretenden Mikroorganismen sind jedoch auf den Leitungsmaterialien in Biofilmen organisiert und nur 5% befinden sich als planktonische Zellen in der Wasserphase (Flemming et al., 2002). Somit können, auch wenn es sich nach den Vorschriften um eine gute Trinkwasserqualität handelt, weiterhin Pathogene bzw. fakultativ pathogene Bakterien unentdeckt bleiben und die Gesundheit der Verbraucher gefährden.

Alle Desinfektionsverfahren müssen, bevor sie für die Trinkwasserdesinfektion zugelassen werden, mehrere Wirksamkeitsprüfungen durchlaufen. Aufgrund fehlender Vorschriften zur Biofilmkontrolle gibt es jedoch keine gültigen und reproduzierbaren Prüfverfahren, ob Desinfektionsverfahren Trinkwasserbiofilme abbauen und deren Mikroorganismen inaktivieren können.

Ziel war es, diese Lücke in der Wirksamkeitsprüfung von chemischen Desinfektionsmitteln für den Trinkwasserbereich zu schließen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden derzeit verfügbare chemische Desinfektionsverfahren auf ihre Wirksamkeit gegenüber Biofilmbakterien getestet. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Beurteilung der immer häufiger im Bereich der Trinkwasserdesinfektion eingesetzten ECA – Verfahren im Vergleich zu herkömmlichen chemischen Desinfektionsverfahren. Zudem sollte die Remanenzwirkung der eingesetzten Desinfektionsverfahren bestimmt werden.

Außerdem sollte das Silikonschlauchmodell in weiterführenden Untersuchungen einem Vergleich mit einem in der Trinkwasserinstallation verbauten Material unterzogen werden um es auf seine Praxisrelevanz bewerten zu können.

Basierend auf diesen Untersuchungen sollte ein reproduzierbares und praxisnahes Modell zur Wirksamkeitsprüfung von chemischen Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen entwickelt werden. Ziel war es, eine Verbindung zwischen den etablierten Prüfverfahren zur Wirksamkeit gegen frei vorliegende Monokulturen, den teilweise noch sehr praxisfernen Untersuchungsmodellen und der Anwendung in Praxisfällen herzustellen. Dieses Prüfmodell soll als Grundlage für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen in die Desinfektionsmittelliste des Verbunds für angewandte Hygiene e.V. (VAH) dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Im Folgenden aufgelistet, sind alle im Labor verwendeten Geräte mit Modell- und Herstellerangaben (Tab. 1)

Tab. 1 Im Labor verwendete Geräte

Gerät	Modell-Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel - Kamera	Direct Screen Instant Camera DS 34	Polaroid
Agarosegel – Kamera - Aufsatz	Standard Electrophoresis - Hood	Bio - Rad
Brutschrank 20°C	Typ B 6200	Heraeus
Brutschrank 36°C	Typ ST 5042	Heraeus
Filtrationsgerät	3-place Manifold (47mm, stainless steel)	Millipore
Filtrationstrichter mit Silikonstopfen	Sterifil 250 Filterhalter	Millipore
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Plan - NEOFLUAR 10/40/100	Zeiss Axioplan
Fluoreszenzmikroskop-Kamera	Zeiss Axioplan MRc	Zeiss Axioplan
Gelelektrophoresekammer	Minnie.the.Gel Cicle HE33	Hoefer Scientific Instruments
Gelelektrophoresekammer Trafo/Spannungsgerät	SN 63500 (230 V/ 50-60 Hz/ 80 W)	Biometra
Homogenisator	15 ml	B. Braun
Magnetrührer / Heizgerät	ARE Heating Magnetic Stirrer	Velp Scientifica
Tauchpumpe	seliger® 280 L	Seliger
Petrischalen - Drehtisch	Petriturn E ^{plus}	Schütt
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo

Fortsetzung **Tab. 1**

Gerät	Modell-Bezeichnung	Hersteller
Rasterelektronenmikroskop	Typ Leitz AMR 1600T	Leitz
Reinstwassersystem	MilliQ Plus mit QPak2	MilliQ
UV - Vis - Spektrophotometer	NanoDrop – ND 1000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Sputter - Coater	Sputter-Coater D 005	Bal - Tec
Steril - Werkbank	Safeflow 1.2	Nunc
UV - Gerät	Mini Transilluminator	Bio-Rad
Vakuumpumpe	N 022 AN.18	KNF
Vortexer	Scientific 2x ³	Velp
Waage	BP110 (0,02 g- 110 g)	Sartoris
Wasserbad	Thermostatic Water bath WBS Model: WBS 5	Fried Electric
Zentrifuge	Zentrifuge Mikro 120	Hettich

2.1.2 Verbrauchsgüter

Eine Liste der Bezugsquellen für Verbrauchsgüter kann der folgenden Tab. 2 entnommen werden. Auf eine Auflistung der jeweiligen Materialien, wie z. B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Filter etc. wird an dieser Stelle verzichtet.

Tab. 2 Bezugsquellen für Verbrauchsgüter

Hersteller	Standort
Brand	Gießen
Deutsch & Neumann	Berlin
Eppendorf	Wesseling - Berzdorf
Fermentas	St.Leon-Rot
Greiner	Frickenhausen
KFM Laborchemie	Lohmar
Millipore	Schwalb
Oxoid	Wesel

Fortsetzung **Tab. 2**

Hersteller	Standort
Promega	Mannheim
Quiagen	Hilden
Roche	Mannheim
Schleicher & Schüll	Dassel
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich	Hamburg
TIB Molbiol	Berlin

2.1.3 Chemikalien

Im Folgenden aufgelistet, sind alle im Labor verwendeten Chemikalien, ihre chemische Summenformel, der Hersteller und das Molekulargewicht (Tab. 3).

Tab. 3 Verwendete Chemikalien und Substrate

Chemikalien	Formel	Hersteller	Molekulargewicht (g/mol)
Agarose low EEO (Agarose Standard)	$[C_{12}H_{18}O_9]_n$	AppliChem	-
Calciumchlorid	$CaCl_2$	AppliChem	110,99
Dapi	$C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$	AppliChem	350,25
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Merck	292,25
Ethanol (absolut)	C_2H_6O	Merck	234,15
Ethidiumbromid (1 %)	$C_{12}H_{20}BrN_3$	Serva	30,03
Folin – Ciocaelteus - Phenolreagenz	-	Sigma-Aldrich	-
Formaldehyd (37%)	CH_2O	KFM Laborchemie	30,03
Formamid	CH_3NO	AppliChem	45,04
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	AppliChem	180,16
Glutardialdehyd (25 %)	$C_5H_8O_2$	Merck	100,12
Kaliumchlorid	KCl	AppliChem	74,56
Kaliumhydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck	136,09
Lecithin aus Ei	-	AppliChem	-

Fortsetzung **Tab. 3**

Chemikalien	Formel	Hersteller	Molekulargewicht (g/mol)
L - Histidin	$C_6H_9N_3O_2$	AppliChem	155,16
Magnesiumchlorid – Hexahydrat	$Cl_2Mg \cdot 6H_2O$	AppliChem	203,30
Natriumcacodylat	$C_2H_6AsO_2$ Na_3H_2O	Merck	214,03
Natriumchlorid	NaCl	AppliChem	58,44
Natriumhydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Merck	141,96
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Merck	84,01
Natriumhydroxid	NaOH	Merck	39,99
Natriumthiosulfat	$Na_2S_2O_3$	Merck	158,11
Natronlauge – Maßlösung (1 M)	NaOH	AppliChem	40,00
Osmiumtetroxid-Lösung (4 %)	OsO_4	Merck	254,20
Paraformaldehyd	$(CH_2O)_n$	AppliChem	30,03
Peressigsäure (39%)	CH_3CO_3H	Merck	76,05
Phenol	C_6H_6O	Merck	94,11
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	-	Merck	-
Salzsäure, konz.	HCl	AppliChem	36,46
Schwefelsäure, konz.	H_2SO_4	AppliChem	98,08
Tris-Base	$C_4H_{11}NO_3$	Merck	121,14
Trypton	-	Becton Dickinson	-

2.1.4 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser aus der MilliQ - Anlage (Fa. Millipore) oder demineralisiertes Wasser verwendet. (Tab. 4). Falls erforderlich wurde der pH-Wert mit NaOH (1M) bzw. HCl (1M) (+/- 0,05) eingestellt. Das Auffüllen auf 1 l erfolgte mit a.dest.

Tab. 4 Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	pH - Wert	Zusammensetzung	Menge auf 1 l
Dapi – Lösung (10 µg/ml in 2% Formaldehyd)	k.A.	Dapi Formaldehyd (37%)	10 mg 54,05 ml
Glutardialdehyd-Lösung (25 %)	k.A.	Glutardialdehyd-Lösung (50 %)	500,0 ml
Natriumchloridlösung (0,9 %) mit Trypton	7,0	Natriumchlorid Trypton	8,5 g 1,0 g
Natriumcacodylat-Puffer	7,4	Natriumcacodylat Natriumhydroxid	21,4 g 6,5 g
Osmiumtetroxid-Lösung (0,2 %)	k.A.	Osmiumtetroxid-Lösung (4 %)	50,0 ml
PBS – Puffer (1x)	7,4	KCl KH ₂ PO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl	0,2 g 0,2 g 1,15 g 8,0 g
TAE-Puffer (50x) (Tris-Acetat-EDTA)	8,5	Tris-Base Essigsäure EDTA 0,5 M	242,0 g 57,1 g 100,0 ml
– Thio	7,4	Tween 80 Lecithin L- Histidin Natriumthiosulfat	30,0 g 3,0 g 1,0 g 5,0 g
Tris-HCl-Puffer 75 mM mit 125 mM KCl	8,3	C ₄ H ₁₁ NO ₃ ·HCl KCl	11,83 g 9,33 g
Wasser standardisierter Härte (WSH)	7,0	WSH Lösung A WSH Lösung B	6,0 ml 8,0 ml
WSH Lösung A	k. A.	MgCl ₂ CaCl ₂	19,84 g 46,24 g
WSH Lösung B	k. A.	NaHCO ₃	35,02 g

2.1.5 Bakterienstämme

Im Folgenden sind alle Bakterienstämme und ihre Bezugsquellen aufgelistet, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen (Tab. 5).

Tab. 5 Verwendete Bakterienstämme

Name	Bezugsquelle	Stamm	Referenz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSMZ, Braunschweig	DSM 939 ATCC 15442	(Borneff et al., 1981)

2.1.6 Nährmedien (Nährböden / Nährbouillon)

Die verwendeten Mikroorganismen (Tab. 5) wurden mit Nährmedien kultiviert, die den jeweiligen Nährstoffansprüchen entsprechen. Sofern die Nährmedien nicht gebrauchsfertig vom Hersteller bezogen wurden, wurden sie nach Herstellerangaben auf ein Endvolumen von 900 ml mit Reinstwasser eingestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Petrischalen mit dem ausgehärteten Nährmedium wurden bei 4 °C für eine Dauer von maximal 4 Wochen aufbewahrt. Die Bezugsquellen und die Zusammensetzung der Nährmedien können Tab. 6 entnommen werden. Der jeweilige Verwendungszweck wird im Folgenden erklärt.

Tab. 6 Verwendete Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller	Inhaltsstoffe	Menge auf 1l
R2A - Agar	Becton Dickinson	Agar	15,0g
		Casaminosäure	0,5 g
		Dextrose	0,5 g
		Dikaliumphosphat	0,3 g
		Hefeextrakt	0,5 g
		Magnesiumsulfat	0,05 g
		Natriumpyruvat	0,5 g
		Protease-Pepton Nr.3	0,5 g
		Stärke	0,5 g
Casein - Soja - Pepton-Medium (CASO) - Agar	Becton Dickinson	Agar	15,0 g
		Caseinpepton	15,0 g
		Natriumchlorid	5,0 g
		Sojamehlpepton	5,0 g
		K ₂ HPO ₄	2,5 g
CASO - Bouillon (ohne Agar + K ₂ HPO ₄)			

Fortsetzung **Tab. 6**

Bezeichnung	Hersteller	Inhaltsstoffe	Menge auf 1l
Cetrimid – Agar	Oxoid	Agar	13,6 g
		Cetrimid	0,3 g
		Kaliumsulfat	10,0 g
		Magnesiumchlorid	1,4 g
		Pepton	20,0 g

2.1.7 Gelmarker und Größenstandards

Tab. 7 Verwendete DNA-Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller	Enthaltene DNA-Fragmentgrößen (in bp)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas Life Sciences	8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250
6x Loading Dye Solution	Fermentas Life Sciences	-

2.1.8 Enzyme

Tab. 8 Verwendete Enzyme

Name	Quelle	Hersteller
Proteinase K	<i>Tritrachium album</i>	Qiagen
Taq DNA Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i>	Eppendorf
Katalase	<i>Bos pirimengius</i>	Sigma

2.1.9 Molekularbiologische Kits

Tab. 9 Verwendete molekularbiologische Kits

Name	Verwendungszweck	Hersteller
DNeasy Blood and Tissue Kit	Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien	Quiagen
MasterMix (2.5x)	Amplifizierung von DNA – Fragmenten mittels PCR	Eppendorf
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Isolierung von DNA Fragmenten aus TAE Agarosegelen	Promega

2.1.10 Software

Tab. 10 Genutzte Software und Internet - Datenbanken

Bezeichnung	Verwendungszweck	Version
Axio Vision	Fluoreszenzmikroskop	3.1
D.I.P.S (Digital Image Processing System)	Rasterelektronenmikroskop	2.3.2.2
NanoDrop Software	UV - Vis - Spektrophotometer	3.5.2
Chromas	Umwandlung von Chromatogrammdaten in Textformat	-
Nucleotide -BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)	Sequenzvergleich	-

2.2 Wasserqualität

Für die Generierung der Biofilme wurde das Trinkwasser aus dem Verteilungssystem des Instituts für Hygiene und Öffentliche Gesundheit (IHPH) der Universität Bonn verwendet. Bei diesem Wasser handelt es sich um ein Mischwasser aus Grund- und Oberflächenwasser. Die in dem Wasser gelösten Inhaltsstoffe und Mikroorganismen dienen zum einen als Nährstoffquelle und zum anderen zur Induktion des Biofilmwachstums. Dabei wurde die Wasserqualität nicht verändert. Während der Versuchsdauer konnte kein freies Chlor im

Testwasser gemessen werden. In Tab. 12 sind einige chemische Spezifikationen des Testwassers zusammengefasst.

Tab. 11 Physikalische Kenngrößen des Wassers

Parameter	Wert
Temperatur	11,4 ± 1,3 °C
elektrische Leitfähigkeit (bei 25 °C)	29 ± 3,0 mS/m
pH (bei 10 °C)	8,3 ± 0,1

Tab. 12 Chemische Kenngrößen des Wassers (Stadtwerke Bonn, Mai-Dezember, 2009)

Parameter	Kenngröße	Wert
Anionen	Chlorid	25 ± 2 mg/l
	Fluorid	< 0,1 mg/l
	Nitrat	14 ± 3 mg/l
	Nitrit	< 0,01 mg/l
	Phosphat	< 0,01 mg/l
	Sulfat	29 ± 3 mg/l
Kationen	Ammonium	< 0,02 mg/l
	Natrium	13,4 ± 1,5 mg/l
	Kalium	2,6 ± 0,3 mg/l
	Calcium	31,9 ± 3,5 mg/l
	Magnesium	6,5 ± 0,7 mg/l

2.2.1 Silikonschlauchmodell

Die Generierung der für die Untersuchungen verwendeten Biofilme erfolgte im, am IHPH entwickelten, Silikonschlauchmodell. Das Modell dient als Simulation von wasserführenden Systemen. In bis zu 100 m langen Silikonschläuchen (Fa. Deutsch & Neumann), die einen Innendurchmesser von 4 mm und eine Wandstärke von 1mm haben, wird durch einen ständigen Durchfluss von Leitungswasser (30 l/h) auf der Schlauchoberfläche ein Trinkwasserbiofilm gebildet. Der Silikonschlauch dient als Nährstoffquelle für Trinkwasser – assoziierte Mikroorganismen und fördert somit die Biofilmbildung. Für die Generierung von Biofilmen werden die Schläuche auf beweglichen Führungsrollen (Abb. 4) aufgewickelt, die

in regelmäßigen zeitlichen Abständen gedreht werden, um eine gleichmäßige Sedimentation von organischen und anorganischen Substanzen zu gewährleisten. Da es sich um einen farblosen, durchsichtigen Schlauch handelt, kann die Entstehung des Biofilms makroskopisch gut verfolgt werden. Die Anlage wird im Dunkeln betrieben, um möglichen Algenbewuchs zu verhindern.

Zu Beginn der Untersuchung waren die Silikonschläuche neu und steril. Für die Untersuchungen wurden nur Schläuche mit einem mindestens ein Jahr alten Biofilm verwendet. Somit wurde sichergestellt, dass in dem Biofilm eine Besiedlung mit $> 5,0 \times 10^6$ koloniebildenden Einheiten (KBE) pro cm^2 und einer Gesamtzellzahl (GZZ) von $> 2,0 \times 10^7$ Zellen pro cm^2 vorlag. Das verwendete Wasser ist Leitungswasser aus dem Hausinstallationssystem des IHPH. Dieses setzt sich zu 1/3 aus aufbereitetem Oberflächenwasser der Wahnbach - Talsperre und zu 2/3 aus Grundwasser zusammen. Die physikalischen und chemischen Kenngrößen des Trinkwassers können Tab. 11 und Tab. 12 entnommen werden. Die Trinkwasseruntersuchung wurde von den Laboren des Wahnachtalsperrenverbands und der chemischen Abteilungen der Wasserhygiene am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit durchgeführt.

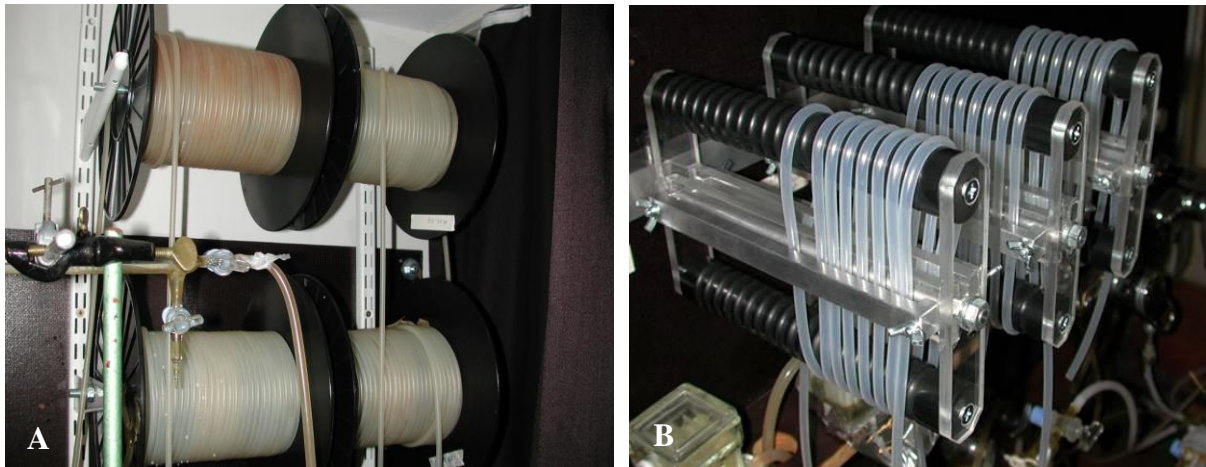


Abb. 4 Silikonschlauchmodell zur Generierung von Biofilmen. A) Die beweglichen Führungsrollen für die Generierung von Biofilmen. B) Die Führungssysteme für Langzeitversuche.

Der Wasserzulauf erfolgt über Glasadapter mit vier Zuläufen für die Schläuche und einem Probehahn für Kontrollproben. Die Kontrollproben werden genommen bevor das Trinkwasser die Schläuche durchfließt (Abb. 5).

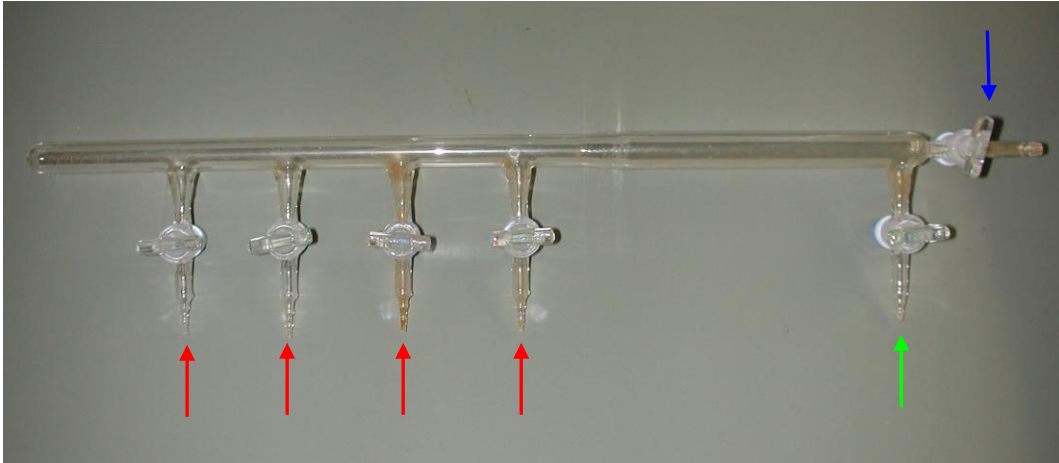


Abb. 5 Glasadapter des Silikonschlauchmodells mit 4 Zuläufen für die Silikonschläuche (rote Pfeile), einem Probehahn (grüner Pfeil) und dem Wasserzulauf (blauer Pfeil).

2.2.2 Varianten des Silikonschlauchmodells zur Simulation von Praxisfällen

2.2.2.1 Dosieranlage zur Simulation einer kontinuierlichen Behandlung

Über ein speziell angefertigtes Dosiersystem der Fa. Prominent, bestehend aus ProMinent[®] Magnetdosierpumpe Typ gamma/L; Magnetkreislumppe Baugruppe 1, 230 V/50 Hz/45 W; Chlorregler DULCOMETER D1C; Chlormesszelle CLE 2.2, kann ein Desinfektionsmittel in einer vorher festgelegten Konzentration dem Trinkwasser zugefügt werden. Das System besteht aus einem 250 l fassenden Vorratsbehälter, in dem das Trinkwasser mit der gewünschten Desinfektionsmittelkonzentration versetzt wird (Abb. 6). Die Einstellung der Konzentration erfolgt über eine mengenproportionale Zudosierung mit einer Dosierpumpe aus einem Vorlagebehälter mit entsprechendem Desinfektionsmittel. Zudem wird die Konzentration im Vorratsbehälter mittels einer ständig durchströmten Messzelle exakt eingestellt.

Aus dem Vorratsbehälter wird das mit Desinfektionsmittel versetzte Wasser über Glasverteiler (Abb. 5) mit konstanter Fließgeschwindigkeit (30 l/h) durch Silikonschläuche geleitet. Diese sind entweder mit Biofilm bewachsen, um den Effekt der Desinfektion auf den Biofilm zu untersuchen, oder steril, um zu untersuchen, ob eine Biofilmbildung durch die Behandlung verhindert wird.

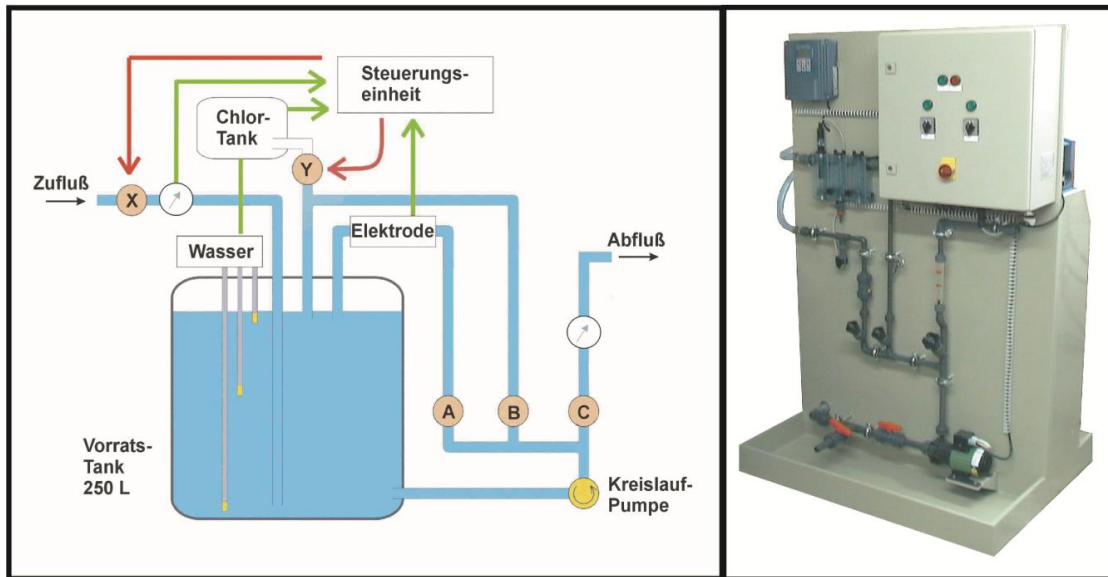


Abb. 6 Zudosiersystem zur praxisnahen Simulation einer kontinuierlichen Behandlung.

2.2.2.2 Kreislaufsystem als Simulation einer Stoßbehandlung

In einem Kreislaufsystem, bestehend aus einem Behälter, einer Tauchpumpe (Fa. Seliger) und wenn erforderlich einem Wasserbad (Fa. Fried Electrics), wird Trinkwasser mit einer definierten Desinfektionsmittelkonzentration versetzt und mittels einer Tauchpumpe über einen definierten Zeitraum durch einen mit Biofilm bewachsenen Silikonschlauch geleitet (Abb. 7). Die Untersuchung wird begleitet durch die regelmäßige Bestimmung der Wirkstoffkonzentration, des pH - Wertes und ggf. der Temperatur. Hierbei soll der Effekt der Desinfektion auf den Biofilm untersucht werden.

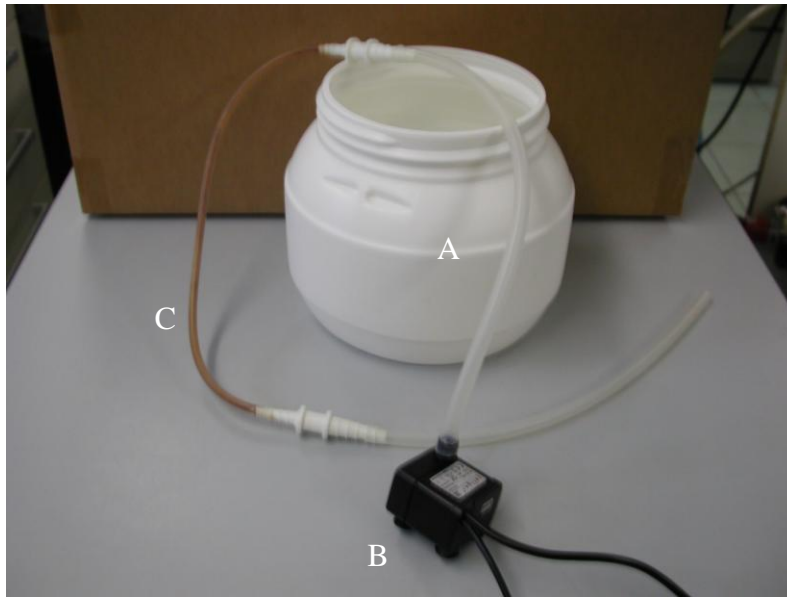


Abb. 7 Kreislaufsystem zur Simulation von Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion mit
A) Behälter B) Pumpe C) kontaminiertem Silikonschlauch.

2.2.2.3 Hygiene-Monitor zur Begleitung von Desinfektionsmaßnahmen

Der Hygiene - Monitor stellt ein System dar, mit dem Desinfektionsmaßnahmen in der Praxis begleitet werden können. Dabei ist der Hygiene - Monitor mit einem biofilmkontaminierten Silikonschlauch ausgestattet (Abb. 8). Mittels abschließender Untersuchungen kann protokolliert werden, ob die Maßnahme erfolgreich war. Zur Überprüfung des Biofilmbildungspotentials wird der Hygiene-Monitor mit einem sterilen Silikonschlauch ausgestattet. In regelmäßigen Untersuchungen des Silikonschlauchs kann festgestellt werden, ob eine Verkeimung des Systems stattfindet. Der Hygiene - Monitor wird endständig an das zu desinfizierende System angeschlossen, und der integrierte Silikonschlauch ist von Rückschlagventilen umgeben, um eine retrograde Verkeimung des Systems durch den kontaminierten Silikonschlauch zu vermeiden. Es wurden jeweils die KBE/cm^2 (Abschnitt 2.3.1) und die GZZ/cm^2 (Abschnitt 2.4.1) bestimmt. Zudem wurden REM – Aufnahmen (Abschnitt 2.2.5.3) zur Visualisierung der Biofilmmatrix auf der Schlauchoberfläche angefertigt.

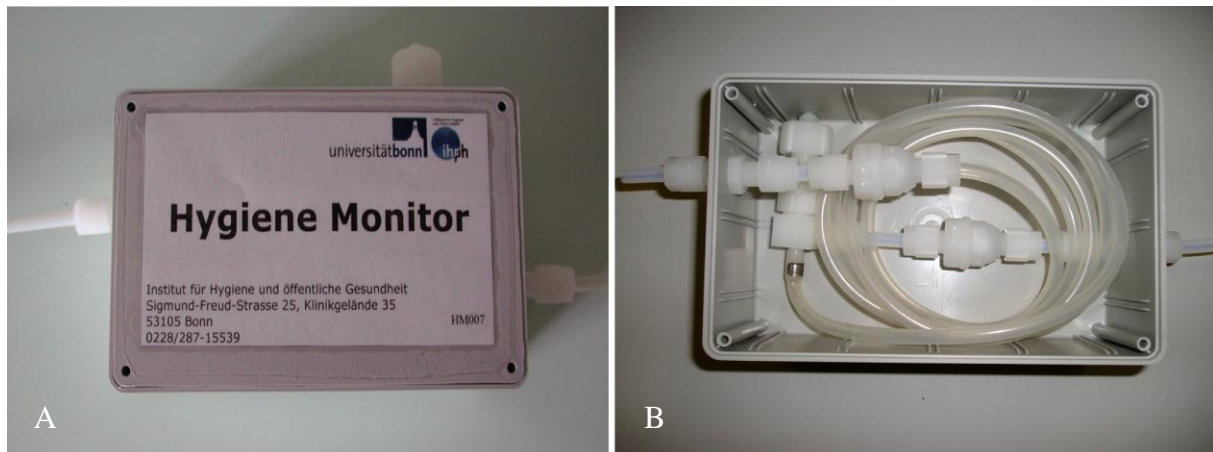


Abb. 8 Hygiene-Monitor mit Silikonschlauch zur Überprüfung des Biofilmbildungspotentials (A). mit Deckel (B) offen

2.2.3 Angewandte Desinfektionsverfahren

In Tab. 13 sind die untersuchten Desinfektionsverfahren aufgelistet. Die final eingesetzten Konzentrationen wurden jeweils aus den Stammlösungen mit A.dest angesetzt.

Tab. 13 Auflistung der getesteten Desinfektionsverfahren

Prüf- produkt	Wirkstoff	Konz. der Stammlösung	Herstellung der Testlösungen
1	Chlordioxid	2 g/l (pH 2)	Herstellung aus Wasser, Salzsäure und Natriumchlorit (vor Ort) im OxipermPro (Fa. GrundfosAlldos)
2	Freies Chlor aus ECA - Verfahren	25 mg/l (pH 2,5/3,0/4,0)	gebrauchsfertig (aus Vorlage, Fa. ActiDes)
3		60 mg/l (pH 3)	Herstellung aus Wasser und Salzlösung (vor Ort) im Stericold-Generator (Fa.Biostel Global Health Care)
4		200 mg/l (pH 7)	Herstellung aus Wasser und Salzlösung (vor Ort) im Trustwater™ Dental Manuell (Fa. P+K Trustwater)

Fortsetzung **Tab. 13**

Prüf- produkt	Wirkstoff	Konz. der Stammlösung	Herstellung der Testlösungen
5	Freies Chlor aus ECA - Verfahren	300 mg/l (pH 7)	Herstellung aus Wasser und Salzlösung (vor Ort) im DesDos (Fa. FrankeAquaRotter)
6	Wasserstoffperoxid	300 g/l	gebrauchsfertig (aus Vorlage, Merck)
7	Wasserstoffperoxid + Silber	ca. 500 g/l + 50 mg/l	gebrauchsfertiges Sanosil UniDes (aus Vorlage, Fa. Sanosil)
	Wasserstoffperoxid + Silber + Peressigsäure	ca. 500 g/l + 50 mg/l + 2.000 mg/l	gebrauchsfertige Sondermischung (aus Vorlage), (Fa. Sanosil)
8	Wasserstoffperoxid + Fruchtsäuren	100 g/l +ca. 2,5 g/l Benzoesäure + ca. 1,5 g/l Sorbinsäure	gebrauchsfertige Sondermischung (aus Vorlage, Fa. JatiProducts,)
	Wasserstoffperoxid + Fruchtsäuren + Tenside	100 g/l +ca. 2,5 g/l Benzoesäure + ca. 1,5 g/l Sorbinsäure + 5 mg/l Tenside	gebrauchsfertige Sondermischung (aus Vorlage) + Tenside (Fa. JatiProducts,)
9	Ozon	5 g/l	vor Ort erzeugt mit der Ozonfilt Ozonanlage (Fa. PromAqua)

2.2.4 Formeln zur Berechnung

2.2.4.1 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)/cm²

$$c = \Sigma_C \times (n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1)^{-1}$$

$$\text{KBE/cm}^2 = c \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Schlauchoberfläche}^{-1}$$

c = gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

Σ_C = Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden

n_1 = Anzahl der Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 = Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe

Schlauchoberflächen:

$$\text{Silikonschlauch (5 cm lang; 0,4 cm } \varnothing) = 6,28 \text{ cm}^2$$

$$\text{EPDM - Schlauch (5 cm lang; 1,2 cm } \varnothing) = 18,84 \text{ cm}^2$$

2.2.4.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ)/cm²

bei 1000x – Vergrößerung:

$$\text{GZZ/cm}^2 = \text{Größe Gesichtsfeld} \times \text{Fläche Filter} \times \text{Anzahl gezählte Zellen pro Gesichtsfeld}^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Fläche Schlauchoberfläche}^{-1}$$

Größe Gesichtsfeld: (0,02268 mm²)

Fläche Filter: (1734,1 mm²)

Schlauchoberflächen:

Silikonschlauch (5 cm lang; 0,4 cm Ø) = 6,28 cm²

EPDM - Schlauch (5 cm lang; 1,2 cm Ø) = 18,84 cm²

2.2.4.3 Bestimmung des Reduktionsfaktors (RF)

$$\log_{10} (\text{KBE/cm}^2 \text{ vor Behandlung}) - \log_{10} (\text{KBE/cm}^2 \text{ nach der Behandlung}) = \text{RF}$$

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Lupe

Die makroskopischen Untersuchungen von Kolonien und das Auszählen von Kolonien erfolgten mit einer Handlupe (10fache Vergrößerung).

2.2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Verwendet wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Typ „Axioplan“). Die Aufnahmen erfolgten bei 1000facher Vergrößerung (Objektiv Typ „Plan Neofluar 100:1/ 1,30 Öl) und wurden durch eine Digitalkamera (Typ „AxioCam MRC“ mit 1,4 Megapixel) und die Bildverarbeitungs-Software „AxioVision 3.1“ dokumentiert.

2.2.5.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Aufnahmen erfolgten an einem modifizierten Rasterelektronenmikroskop der Firma Leitz (Typ „Leitz AMR 1600T“) bei 20 bis 1.000facher Vergrößerung und wurden mit der Bildbearbeitungs-Software Digital - Image - Processing - Software dokumentiert.

Als Probe für die Untersuchungen am REM dienten Silikonschläuche von ca. 1 cm Länge. Diese Schlauchstücke wurden zunächst für 2 h in Glutardialdehyd (25%), dann für 5 h in

Osmiumtetroxid (0,2%) und abschließend für 30 min in Cacodylat - Puffer fixiert. Hiernach wurden die Proben in partikelfreiem Wasser (2 x 5 min) gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 10 - 100% Ethanol (partikelfrei) für je 10 min entwässert, wobei die Alkoholkonzentration in Zehner - Schritten erhöht wurde. Nach der Präparation wurden die Proben mit beidseitigem Klebeband auf speziellen Trägern befestigt und mit dem Sputter - Coater der Firma Bal – Tec Typ „SCD 005“ mit Gold beschichtet. Die Detailaufnahmen dienten der Dokumentation von Oberflächenbesiedelung durch Mikroorganismen und der Ausbildung von Biofilmen.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Bestimmung der kultivierbaren Bakterien im Biofilm

Die im Silikonschlauchmodell und EPDM - Schlauch generierten Biofilme dienten als Ausgangsmaterial für molekular- und mikrobiologische Nachweise. Für den molekularbiologischen Nachweis wurden jeweils 5 cm des Schlauchs mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten und weiterverarbeitet. Die Länge der verwendeten Biofilmschläuche wurde auf die Dauer des entsprechenden Versuchs und der Häufigkeit der Probenahme angepasst.

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) im Biofilm des Silikonschlauchs wurde der gesamte Biofilm mit einem maßgenauen sterilen Metallstab aus einem 5 cm langen Stück heraus geschabt und in 10 ml Trypton - NaCl - Lösung (0,9 %ig) mit einem Glashomogenisator in Suspension gebracht. Beim EPDM - Schlauch wurden ebenfalls 5cm lange Stücke abgeschnitten, der Biofilm mit einem kleinen Schwamm und einem Tupfer von der Schlauchoberfläche entfernt und in 10 ml Trypton - NaCl - Lösung (0,9 %ig) mit einem Glashomogenisator in Suspension gebracht. Ausgehend von dieser Suspension wurden Verdünnungsreihen bis 10^{-6} hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden 100 μ l in Doppelbestimmung auf R2A-Agar ausplattiert und für 7 Tage bei 20 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde durch Auszählung der koloniebildenden Einheiten (KBE) die Zahl der kultivierbaren Bakterien im Biofilm bestimmt.

2.3.2 Mikrobiologische Untersuchung auf *Pseudomonas aeruginosa*

Für die Bestimmung wurde zunächst die Oberfläche des Silikonschlauchs, wie in 2.3.1 beschrieben, abgeschabt und für 24 h in CASO - Bouillon bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl auf Cetrimid - Agar ausplattiert und für 24 - 48 h bei 37 °C inkubiert.

2.3.3 Anzucht von Reinkulturen aus Biofilmmaterial

Zur Anzucht von Reinkulturen von Biofilmbakterien wurden einzelne Kolonien der kultivierten Mikroorganismen, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, mit einer sterilen Impföse gepickt, erneut auf R2A - Agar ausgestrichen und für 7 Tage bei 20°C inkubiert. Diese Vorgehensweise wurde mindestens ein weiteres Mal wiederholt.

2.3.4 Membranfiltration

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Biofilmmatrix in 10 ml Trypton – NaCl - Lösung (0,9 %ig) homogenisiert und nach der Dapi – Färbung (Abschnitt 2.4.1) in einem Vakuumfiltrationssystem der Fa. Millipore durch schwarze Polycarbonatfilter mit einer Porengröße 0,2 µm Durchmesser (Fa. Millipore) filtriert. Anschließend wurde jeweils mit 100 ml 0,5%iger NaCl - Lösung nachgespült, damit keine Mikroorganismen im Filteraufsatz zurückbleiben. Die Auszählung der auf dem Filter gewachsenen Kolonien erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Typ „Axioplan“).

2.3.5 Bestimmung geeigneter Neutralisationsmittel zum Abstoppen der Desinfektionswirkung

Um die Wirksamkeit eines Desinfektionsverfahrens nach einer definierten Kontaktzeit zu ermitteln muss die Reaktion des Prüfprodukts beendet werden können. Vor den ersten Untersuchungen wird ein quantitativer Suspensionsversuch (Abschnitt 2.3.6) durchgeführt, um den optimalen Neutralisator zu finden. Nach einer vorher festgelegten Kontaktzeit wird die Reaktion mit den zur Verfügung stehenden Neutralisationsmitteln abgestoppt. Anhand der quantitativen Auswertung der noch kultivierbaren Mikroorganismen kann ermittelt werden, welches Mittel am geeignetsten ist (Tab. 14).

Tab. 14 Übersicht der ausgewählten Neutralisationsmittel für die getesteten Wirkstoffe.

Wirkstoff	Neutralisationsmittel
Freies Chlor	Natriumthiosulfat
Chlordioxid	
Wasserstoffperoxid + Silber	TLH - Thio (Tab. 4) + Katalase
Wasserstoff + Fruchtsäuren	

2.3.6 Quantitativer Suspensionsversuch

Die verwendeten Lösungen wurden durch Verdünnungsreihen aus einer Stammlösung hergestellt. Die Bakteriensuspensionen wurden in 4,5 ml physiologischer (0,9%) Natriumchlorid-Lösung (NaCl) aufgenommen (Prüfsuspension). Die Proben wurden mit einem Potter S (B. Braun Biotech Melsungen) für 10 min mit einem Teflonstab homogenisiert.

Der quantitative Suspensionstest wurde in Anlehnung an die europäischen Richtlinien (CEN, 2005) durchgeführt. In je 9 ml der Produktprüflösungen mit definierten Wirkstoffkonzentrationen wurden je 1 ml Prüfsuspension eingebracht (Prüfgemisch) und gemischt. Nach der entsprechenden Einwirkzeit wurde die Desinfektionswirkung durch Überführung von 0,5 ml des Prüfgemisches neutralisiert (Prüfneutralisationsgemisch).

Im Anschluss an die Neutralisation wurden Verdünnungen bis 10^{-4} hergestellt. Parallel wurde ein Kontrollversuch (KO1) mit WSH statt der Produktprüflösung durchgeführt.

Darüber hinaus wurden noch eine Neutralisationskontrolle (KO2) und eine Toxizitätskontrolle (KO3) durchgeführt. Bei der KO2 wurden 9 ml des Neutralisationsmittels mit 1 ml Produktprüflösung (der höchsten eingesetzten Konzentration) gemischt. Nach einer Neutralisationszeit von 5 min wurden 100 µl Prüfsuspension zugeführt und für die längste Kontaktzeit inkubiert. Danach wurden Verdünnungen bis 10^{-4} hergestellt. Die KO3 wurde parallel zur KO2 durchgeführt, enthielt jedoch anstelle der Produktprüflösung 1 ml WSH.

2.4 Färbetechniken

2.4.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Dapi – Färbung

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) erfolgte mittels Dapi - Färbung (Bredholt et al., 1999). Von einem kontaminierten Silikon- bzw. EPDM - Schlauch wurden 5 cm lange Stücke abgeschnitten, ausgeschabt und in 10 ml Trypton - NaCl - Lösung (0,9 %ig) homogenisiert. Dann wurde Dapi - Lösung (10 µg/ml) zugegeben, das Gemisch für 20 Minuten im Dunkeln

inkubiert und über einen schwarzen Polycarbonatfilter (0,2 µm) filtriert (Abschnitt 2.3.4). Mit einem spezifischen Filterset wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan, AxioCam MRc digital camera system) 20 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgezählt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA – Isolierung

Für die Isolierung von DNA wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit (Fa. Quiagen) verwendet. Für die Isolierung von gramnegativen Bakterien wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll verfahren. Auf diese Weise isolierte DNA diente anschließend als Template für die PCR - Analyse.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA erfolgte am Spektralphotometer ND-1000 (Fa. NanoDrop) bei 260 bis 280 nm. Die DNA-Konzentration wurde über die Software (NanoDrop ND-1000 v. 3.51) berechnet und in ng/µl angegeben.

Gleichzeitig gab das Programm Auskunft über die Reinheit der verwendeten DNA. Dazu wurden die Quotienten aus den Absorptionen bei 260 und 280 nm und 260 und 230 nm berechnet. Die Werte für den Quotienten der Absorption von 260 und 230 nm sollten über denen von 260 und 280 nm liegen. Für reine DNA liegen die Werte zwischen 1,8 und 2,2. Niedrigere Werte geben Hinweis auf störende Verunreinigungen wie Proteine.

Für die Messung wurde jeweils ein Volumen 2 µl eingesetzt.

2.5.3 PCR - Primer

Die Primer zur Amplifizierung des 16S rRNA - Gens (Beier et al., 2002) wurden so gewählt, dass sie an die im Bereich der Bakterien hochkonservierten 5' - bzw. 3'- Enden der 16S rDNA komplementär binden und so eine Amplifizierung des gesamten 16S rRNA - Gens der Bakterien mit den konservierten und variablen Bereichen ermöglichten. Folgende

Oligonukleotide wurden als Forward- (1) und Reverse - Primer (2) in der PCR verwendet (T_m = Schmelztemperatur):

- (1) UNIV 16SrDNAforw.: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' T_m : 48°C
(2) UNIV 16SrDNArev.: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' T_m : 50°C

Die verwendeten Primer wurden von der Fa. TIB Molbiol, Berlin bezogen.

2.5.4 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Die von K.B. Mullis 1983 entwickelte und von Saiki und Gelfand (Saiki et al., 1988) veröffentlichte Methode der Polymerase - Kettenreaktion ermöglicht die gezielte Amplifikation spezifischer DNA - Sequenzen. Das Prinzip der PCR (polymerase chain reaction) beruht auf der exponentiellen Vervielfältigung von DNA - Abschnitten. Ausschlaggebend ist eine genaue Kenntnis der Ziel - DNA. Man verwendet dafür kurze, zur Ziel - DNA komplementäre Oligonukleotide (Primer), die die gewünschte DNA - Sequenz flankieren und als Startpunkte der DNA - Neusynthese dienen.

Ausgangspunkt der in Zyklen ablaufenden PCR ist jeweils die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95 °C. Im zweiten Schritt können sich nun die komplementären Primer an die entsprechende Einzelstrangsequenz anlagern (Annealing). Die Temperatur dieses Schritts ist abhängig von der Anzahl der Aminosäuren und dem Verhältnis der Basen GC zu AT. Anschließend kann durch die thermostabile *Taq* - Polymerase, die von den Primern flankierte DNA-Sequenz synthetisiert werden. Durch mehrfaches Wiederholen der einzelnen Zyklusschritte wird die DNA exponentiell vervielfältigt. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Typ „Mastercycler personal“ Fa. Eppendorf) durchgeführt. Das Standardprotokoll für den PCR-Ansatz, sowie das verwendete Temperatur- und Zyklusprofil des Thermocyclers können den nachstehenden Tab. 15 und Tab. 16 entnommen werden.

Tab. 15 Standardprotokoll für den PCR-Ansatz

Komponente	Verwendete Konzentration	Verwendete Menge (Ansatz á 50µl)
Primer (forward)	50 pmol	0,5 µl
Primer (reverse)	50 pmol	0,5 µl
Eppendorf MasterMix: <i>Taq</i> -Polymerase	1,25 U	20 µl
dNTPs	200 µM	
KCL	50 mM	
Mg ⁺	1,5 mM	
Tris-HCl	30 mM	
Template-DNA	variabel	0,5 µl
A.dest (nukleasefrei)	-	28,5 µl

Tab. 16 Temperatur- und Zyklusprofil der PCR.

Zyklus-Abschnitt	Temperatur des Zyklus [°C]	Dauer des Zyklus [min]	Anzahl der Wiederholungen
1) Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
2.1) Denaturierung	95 °C	1 min	35x
2.2) Annealing	60 °C	1 min	
2.3) Elongation	72 °C	0,5 min	
3) Finale Elongation	72 °C	5 min	1
4) Kühlung	4 °C	∞	-

2.5.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR – Produkten und Agarosegelen

Dazu wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean - Up System (Fa. Promega) verwendet. Die Proben wurden nach Herstellerangaben „DNA - Aufreinigung durch Zentrifugation“ behandelt und in 50 µl nukleasefreiem Wasser (Fa. Promega) aufgenommen.

2.5.6 Agarosegelelektrophorese

Die Detektion und Identifizierung des PCR-Produktes erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Das Prinzip beruht auf der Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe und Ladung entlang eines elektrischen Feldes. Die verwendeten Gele wurden aus 1x TAE-Puffer mit einem 4 %igen Anteil an Agarose hergestellt. Die

Auftrennung wurde bei einer Spannung von 110 Volt durchgeführt. Um anschließend die voneinander getrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde vor dem Gießen der Gele bei einer Temperatur von ca. 50 °C 1 µl des DNA - Interkalators Ethidiumbromid pro 50 ml Agarosegel hinzugegeben. Das sich in DNA einlagernde Ethidiumbromid, konnte mittels UV - Licht über die entstehende Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

2.5.7 DNA – Sequenzierung

Die Sequenzierungen der bei der 16SrDNA-PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden von der Fa. SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Für die Analyse mussten vom aufgereinigten PCR-Produkt ca. 250 ng/µl mit ca. 20 pmol Primer versetzt werden und in 100 µl-Gefäße überführt werden. Die DNA-Sequenz wurde von SeqLab per E-Mail übermittelt.

2.5.8 DNA – Sequenzvergleich

Die von der Fa. SeqLab erhaltenen Chromatogrammdaten wurden mit der Software Chromas (Technelysium LTD, Australien) in ein Textformat umgewandelt. Diese konnte mit der Software „nucleotide – BLAST“ in der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) unter www.ncbi.nlm.gov/BLAST mit hinterlegten Sequenzen verglichen werden. Als Ergebnis wurden jeweils die Sequenzen angezeigt, die die größten Übereinstimmungen mit der eingegebenen Sequenz hatten. Spezies, die eine Sequenzübereinstimmung von >97% aufweisen sind als artverwandt definiert, Übereinstimmungen zwischen 95 und 97% sind als gattungsverwandt definiert.

2.5.9 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die DGGE wurde für den Vergleich der Biofilmpopulationen vor und nach einer Behandlung eingesetzt. Die Analyse wurde mit dem INGENY phorU Kit (Ingeny International, Niederlande) durchgeführt. Es wurde ein 8%iges Polyacrylamidgel in 1x TAE (40mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1mM EDTA, pH 8,3) mit einem linear chemischen Denaturierungsgradienten von 45-80% hergestellt. 100% ist definiert als 7 M Harnstoff in 40% deionisiertem Formamide. Zunächst wurden zu jedem PCR-Produkt 10µl Loading Dye (60% Glycerol, 0,1 mM EDTA (pH 8) 0,05% Xylencyanol FF, 0,05% Orange G) zugegeben. Ein definiertes Volumen des spezifischen PCR-Produkts wurde in jede Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 60°C und einer Spannung von 120 Volt in 0,5 TAE Puffer für 18 Stunden gefahren. Die Banden wurden durch eine 20minütige Ethidiumbromid-Färbung

(0,5 µg/l Ethbr in 1x TAE) mit dem Alphamager EC (AlphaInnotech, San Leandro, CA, USA) sichtbar gemacht. Die DGGE wurde in Kooperation mit der TU Berlin durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die Prüfungen von chemischen Desinfektionsverfahren auf ihre Wirksamkeit gegenüber Biofilmen und Biofilmmikroorganismen wurden mit in Silikonschläuchen generierten Trinkwasserbiofilmen aus dem Silikonschlauchmodell im IHPH durchgeführt. Diese Biofilme wurden über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr ausschließlich durch die autochthone Wasserflora aufgebaut. Die im Wasser auftretenden Mikroorganismen können den Kohlenstoff, der im Silikonschlauch vorliegt, verwerten, was zu einem verstärkten Wachstum und zu einer schnellen und gleichzeitig natürlichen Biofilmbildung führt.

3.1 Wirksamkeitsprüfung von chemischen Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen

Derzeit verfügbare chemische Desinfektionsverfahren wurden auf ihre Wirksamkeit gegenüber Trinkwasserbiofilmen und zur Inaktivierung von Biofilmbakterien untersucht. Dabei wurden einerseits Verfahren ausgewählt, deren Wirkstoffe nach §11 der TrinkwV zur Trinkwasseraufbereitung in der kontinuierlichen Behandlung eingesetzt werden dürfen (freies Chlor, Chlordioxid, Ozon). Zum anderen wurden Verfahren ausgewählt, die nur zur Stoßbehandlung für eine Anlagendesinfektion zulässig sind (Wasserstoffperoxid + verschiedene Zusätze). Alle Biofilme, mit denen die Testungen stattfanden, wurden im Silikonschlauchmodell (Abschnitt 2.2.1) am IHPH generiert. Zu Beginn der jeweiligen Behandlung wurden im Biofilm $\sim 5 \times 10^6$ KBE/cm² (Abschnitt 2.2.4.1) und $\sim 2 \times 10^7$ GZZ/cm² (Abschnitt 2.2.4.2) nachgewiesen.

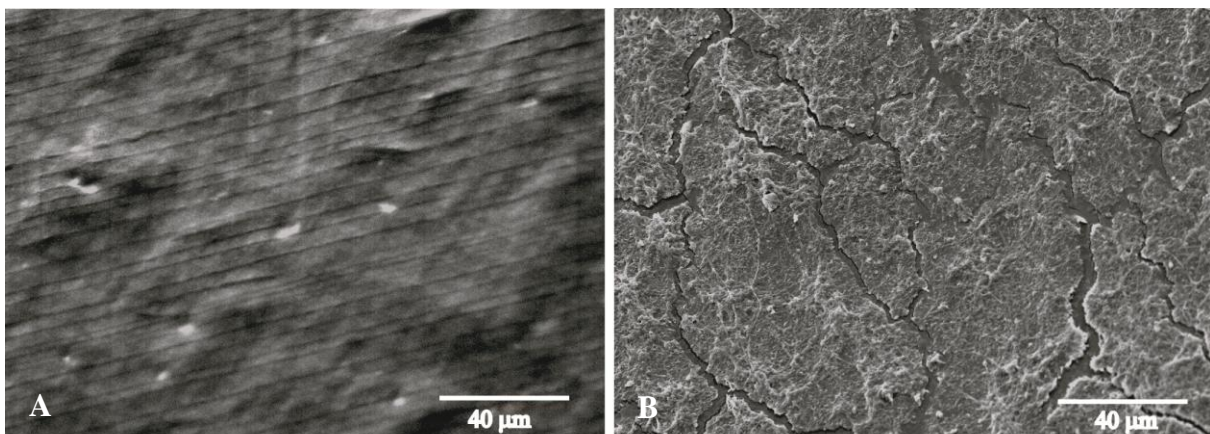


Abb. 9 REM-Aufnahmen der Oberfläche eines A) sterilen Silikonschlauchs und B) mit einem 1 Jahr alten Biofilm. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

REM - Aufnahmen (Abschnitt 2.2.5.3) der Schlauchoberfläche zeigten, dass wenn die Schläuche noch steril sind das Produktionsmuster zu erkennen ist (Abb. 9 A). Nach einem Jahr ist die Oberfläche vollständig mit einer Biofilmmatrix bedeckt (Abb. 9 B).

Alle getesteten Desinfektionsverfahren wurden vor Beginn der Biofilmuntersuchungen im quantitativen Suspensionsversuch (Abschnitt 2.3.6) auf ihre Wirksamkeit zur Inaktivierung von hygienisch relevanten Mikroorganismen untersucht. Dieser Test galt als Grundlage für weiterführende Biofilmuntersuchungen mit dem jeweiligen Prüfprodukt. Zur Veranschaulichung werden die Ergebnisse von Chlordioxid im Folgenden exemplarisch dargestellt. Alle in den Biofilmuntersuchungen eingesetzten Verfahren wurden in dieser Prüfung als wirksam getestet.

3.1.1 Prüfprodukt 1: Chlordioxid pH 2 (vor Ort hergestellt)

Beim Prüfprodukt 1 handelte es sich um Chlordioxid (ClO_2), das im sauren Milieu (pH 2) produziert wird. Die Desinfektionslösung wird vor Ort aus Wasser, Salzsäure und Natriumchlorit mit einer Ausgangskonzentration von 2 g/l ClO_2 hergestellt.

3.1.1.1 Wirksamkeitsprüfung im Quantitativen Suspensionsversuch

Vor Beginn der Biofilmuntersuchungen wurde im quantitativen Suspensionsversuch in Anlehnung an EN 13623 (2007) die antibakterielle Wirksamkeit des Prüfprodukts gegenüber hygienisch relevanten Mikroorganismen überprüft: Als Prüforganismus wurde *Pseudomonas aeruginosa* gewählt. Er ist ein wasserübertragener Krankheitserreger und gilt als einer der wichtigsten durch Trinkwasser übertragenen Erreger nosokomialer Infektionen (Exner et al., 2010a). Die Neutralisation des Wirkstoffs nach der festgelegten Kontaktzeit erfolgte mit 0,3% Natriumthiosulfat.

Die Untersuchung zeigte, dass bei einer Kontaktzeit von 5 Minuten eine Ausgangsbelastung von 10^6 KBE/ml *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Wirkstoffkonzentration von 0,2 mg/l ClO_2 um 5,80 \log_{10} -Stufen reduziert werden konnte. Für eine vollständige Inaktivierung der koloniebildenden Einheiten (5,96 \log_{10} -Stufen Reduktion) war eine Kontaktzeit von 15 Minuten notwendig (Abb. 10). Dem Prüfprodukt 1 konnte aufgrund dieser Resultate eine ausreichende Wirksamkeit zur Inaktivierung von hygienisch relevanten Mikroorganismen bescheinigt werden, so dass es für die Biofilmuntersuchungen ausgewählt wurde.

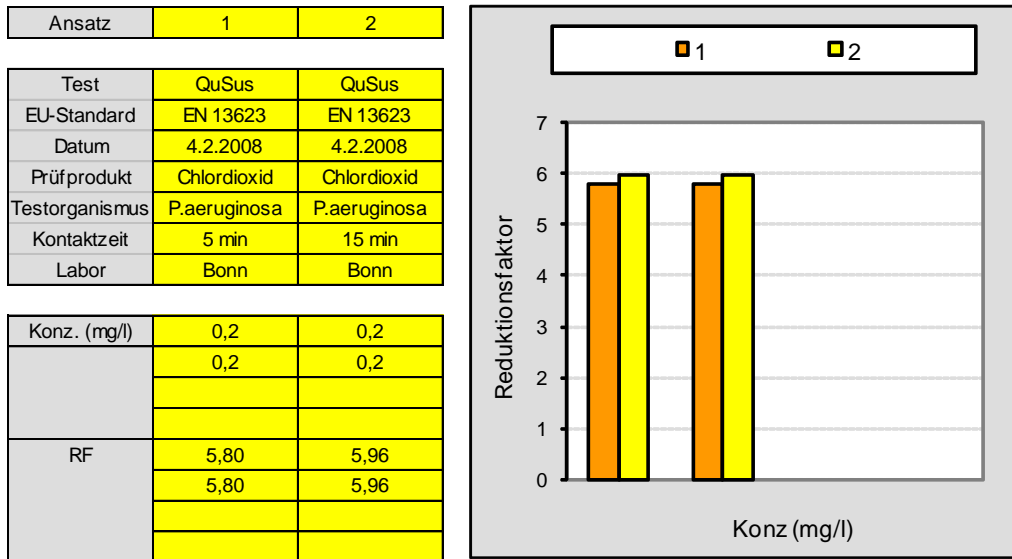


Abb. 10 Graphische Darstellung der Wirksamkeitsprüfung gegenüber hygienisch relevanten Mikroorganismen (*Pseudomonas aeruginosa*) des Prüfprodukts 1 (Chlordioxid) im quantitativen Suspensionsversuch (Abschnitt 2.3.6). Bei einer Kontaktzeit von 15 Minuten konnten 10^6 KBE/ml *Pseudomonas aeruginosa* vollständig inaktiviert werden (5,96 \log_{10} -Stufen Reduktion). Auszug aus einer Auswertungsmaske am IHPH.

3.1.1.2 Wirksamkeitsprüfung im Silikonschlauchmodell

Das Prüfprodukt 1 wurde mit der für Chlordioxid nach TrinkwV §11 zulässigen Konzentration von 0,2 mg/l in der kontinuierlichen Behandlung (Abschnitt 2.2.2.1) und in höheren Konzentrationen (1 - 10 mg/l) in der Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion (Abschnitt 2.2.2.2) untersucht.

Die kontinuierliche Behandlung der Biofilme zeigte, dass in einem ein Jahr alten Trinkwasserbiofilm eine stetige Abnahme der KBE/cm² stattfand. Nach einem Behandlungszentrum von 70 Tagen waren die KBE/cm² im Biofilm bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) reduziert (Abb. 11). Im nicht behandelten Biofilm waren die Konzentrationen der KBE/cm² mit $> 10^6$ über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant. Eine parallel durchgeführte Behandlung eines initial sterilen Silikonschlauchs zeigte zudem, dass die Behandlung mit 0,2 mg/l ClO₂ ein Wachstum von koloniebildenden Einheiten auf der Schlauchoberfläche verhindern kann. Es konnten keine KBE/cm² nachgewiesen werden.

Nach vollständiger Reduktion der KBE/cm² wurde zum Vergleich die Gesamtzellzahl (GZZ) in allen untersuchten Silikonschläuchen bestimmt. Die Gesamtzellzahl konnte im gesamten Untersuchungszeitraum von 84 Tagen im behandelten Schlauch von $2,0 \times 10^7$ GZZ/cm² um

3,13 \log_{10} -Stufen auf $7,4 \times 10^3$ GZZ/cm² reduziert werden (Tab. 17). Im unbehandelten Silikonschlauch blieben die Werte konstant $> 10^7$ und im initial sterilen Schlauch konnten keine GZZ/cm² nachgewiesen werden. Auf REM - Aufnahmen war auf der Schlauchoberfläche nach 84 Behandlungstagen keine Biofilmmatrix mehr zu sehen. Die Oberflächenstruktur des Silikonschlauchs war jedoch durch die dauerhafte Desinfektion verändert worden (Abb. 12 A).

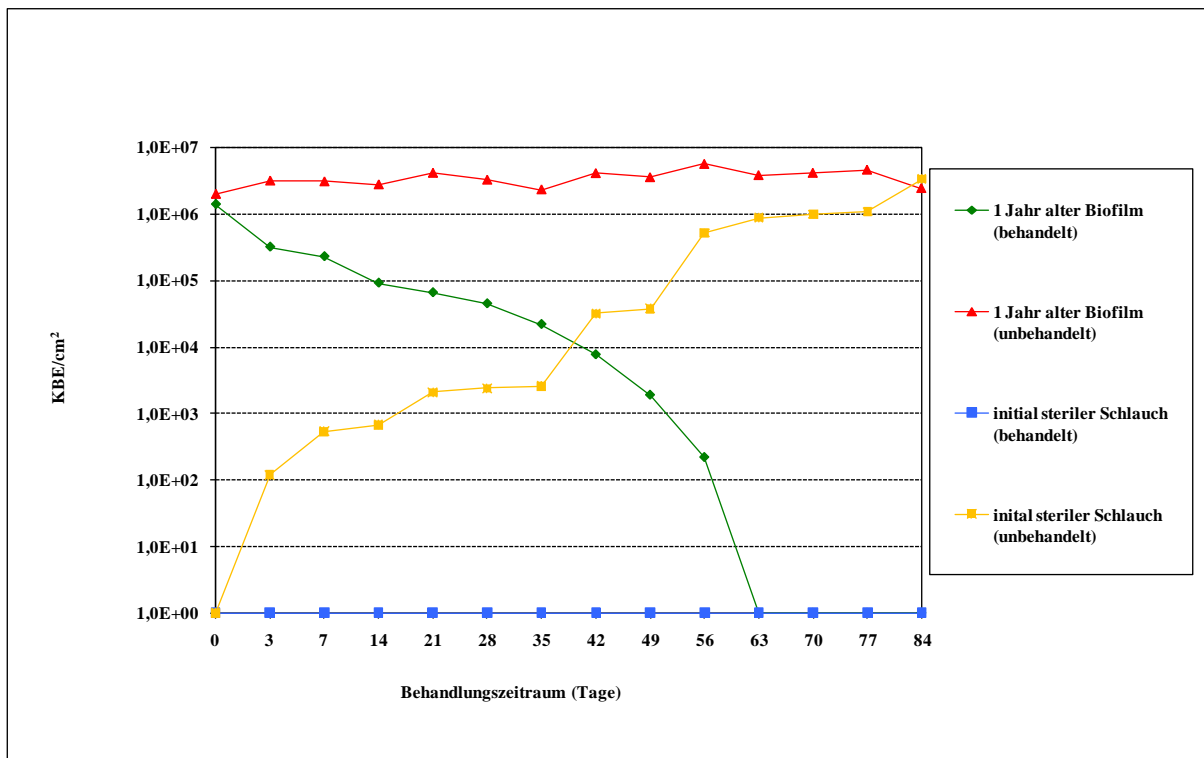


Abb. 11 Entwicklung der KBE/cm² in einem ein Jahr alten Trinkwasserbiofilm aus dem Silikonschlauchmodell (grün) und einem initial sterilen Schlauch (blau) bei einer kontinuierlichen Behandlung mit 0,2 mg/l ClO₂ über einen Behandlungszeitraum von 84 Tagen. Zum Vergleich sind die KBE/cm² in einem unbehandelten ein Jahr alter Trinkwasserbiofilm (rot) und einem initial sterilen Silikonschlauch (gelb) dargestellt.

Bei der Simulation einer Anlagendesinfektion wurden Stoßbehandlungen mit 1, 2, 5 und 10 mg/l ClO₂ durchgeführt. Die Neutralisation des Wirkstoffs nach der festgelegten Kontaktzeit erfolgte mit 0,3% Natriumthiosulfat.

Nach einem Behandlungszeitraum von sechs Stunden wurden die KBE/cm² bei einer Ausgangskonzentration von 10 mg/l ClO₂ bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) reduziert. Die niedrigeren Ausgangskonzentrationen führten bei identischer Behandlungszeit zu einer Reduktion der KBE/cm² von maximal 4,38 \log_{10} -Stufen (auf $2,1 \times 10^2$ KBE/cm² bei 5 mg/l).

Bei 1 und 2 mg/l ClO_2 konnten nur Reduktionen von 1,18 \log_{10} -Stufen (auf $3,3 \times 10^5$ KBE/cm² bei 1 mg/l) und 1,34 \log_{10} -Stufen (auf $2,3 \times 10^5$ KBE/cm² bei 2 mg/l) erreicht werden. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl nach sechs Stunden Behandlung machte deutlich, dass bei allen untersuchten Konzentrationen maximal eine Reduktion von 0,49 \log_{10} -Stufen (auf $4,8 \times 10^6$ KBE/cm² bei 10 mg/l ClO_2) erreicht werden konnte (Tab. 17). Trotz der Behandlungen mit bis zu 10 mg/l ClO_2 war auf den REM - Aufnahmen kein Abbau der Biofilmmatrix zu erkennen (Abb. 12 B, C).

Tab. 17 Ergebnisse der Untersuchungen zu KBE/cm² und GZZ/cm² bei der Wirksamkeitsprüfung von Chlordioxid (pH 2) im Silikonschlauchmodell. Das Prüfprodukt wurde in den praxisnahen Simulationen zur kontinuierlichen Behandlung und als Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion getestet.

Typ	Konz. [mg/l]	Behandlungszeitraum	KBE/cm ² (nach Behandlung)	GZZ/cm ² (nach Behandlung)
Ausgangswert			~5,0x10⁶	~2,0x10⁷
Kontinuierlich	0,2	84 Tage	u.N.	7,4 x 10 ³
Anlagendesinfektion	1	6 Stunden	3,3 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁷
	2		2,3 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁷
	5		2,1 x 10 ²	6,8 x 10 ⁶
	10		u.N.	4,8 x 10 ⁶

u.N. = unter Nachweisgrenze (0 KBE/cm²; $3,65 \times 10^3$ GZZ/cm²)

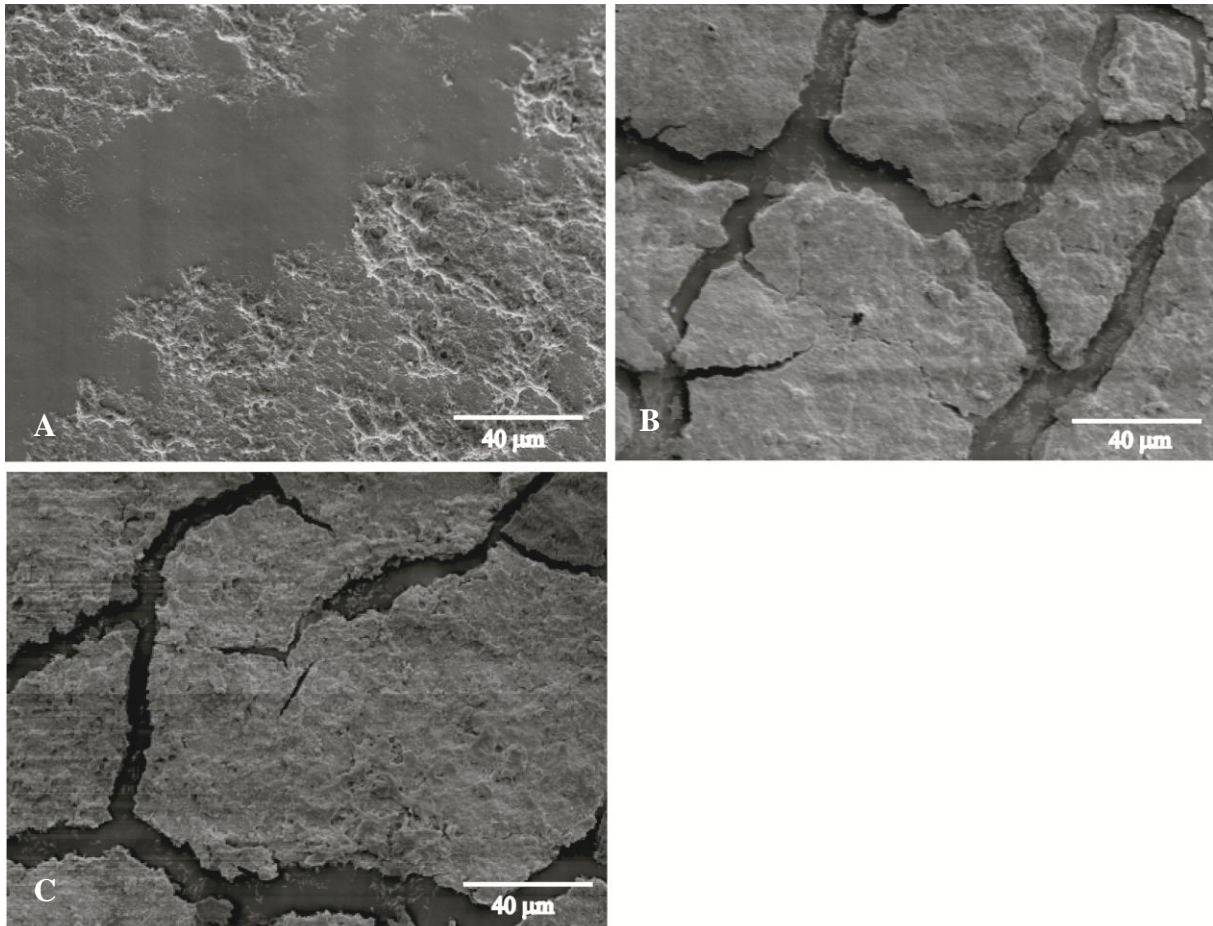


Abb. 12 REM-Aufnahmen der Oberfläche von Silikonschläuchen mit einem 1 Jahr alten Biofilm nach A) kontinuierlicher Behandlung mit 0,2 mg/l ClO_2 für 84 Tage B) einer Stoßbehandlung mit 1 mg/l ClO_2 für 6 Stunden C) einer Stoßbehandlung mit 10 mg/l ClO_2 für 6 Stunden. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.1.2 Freies Chlor aus ECA - Verfahren

Bei diesem Desinfektionsverfahren wird mittels Zellmembranelektrolyse aus einer Salzlösung und Wasser eine Desinfektionslösung erzeugt, deren Wirkung hauptsächlich auf hyperchloriger Säure beruht. Der Wirkstoff ist als freies Chlor messbar und somit nach TrinkwV §11 zugelassen. Die Desinfektionslösung kann in einem breiten pH - Bereich (3-8) produziert werden. In der Regel werden die Lösungen entweder im sauren (um pH 3) oder im neutralen Bereich (pH 7) hergestellt. Im sauren Bereich ist der Anteil hypochloriger Säure höher, im neutralen Bereich ist die Lösung vergleichsweise stabiler. Im Rahmen der Untersuchungen wurden ECA - Verfahren getestet, die entweder im sauren oder neutralen Bereich hergestellt werden.

3.1.2.1 Prüfprodukt 2: ECA - Verfahren im sauren Bereich (pH 2,5 - 4,0)

Beim Prüfprodukt 2 handelte es sich um ein ECA - Verfahren, das im sauren pH (2,5 - 4) hergestellt wird. Es sollte untersucht werden, bei welchem pH die höchste Wirksamkeit vorliegt. Getestet wurden Prüfprodukte mit den pH-Werten 2,5; 3,0 und 4,0. Die Prüfung erfolgte im quantitativen Suspensionsversuch in Anlehnung an EN 13623 (2007). Als Testorganismus wurde mit *Pseudomonas aeruginosa* ein hygienisch relevanter Mikroorganismus ausgewählt. Die Ausgangsbelastung lag bei 10^5 KBE/ml. Die Untersuchungen wurden ohne organische Belastung durchgeführt, da ansonsten Anteile des Wirkstoffs vom organischen Material aufgezehrt und somit die Bewertung der reinen Desinfektionsmittelkapazität des Prüfprodukts verfälscht worden wäre. Die Ausgangskonzentration des Wirkstoffs der Prüfprodukte lag zu Beginn der Untersuchungen bei 25 mg/l freiem Chlor und wurde, um die gewünschten Prüfkonzentrationen zu erhalten, entsprechend mit WSH verdünnt. Die Prüfkonzentrationen lagen bei 0,25; 0,5 und 24,5 mg/l, die Kontaktzeit betrug im ersten Versuch 5 Minuten. Die Neutralisation des Wirkstoffs nach der festgelegten Kontaktzeit erfolgte mit 0,3% Natriumthiosulfat.

Bei einem Wirkstoffgehalt von 24,5 mg/l konnte mit allen Prüfprodukten eine vollständige Reduktion der Testorganismen um 4,89 \log_{10} -Stufen erreicht werden. Bei den Testungen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,5 mg/l konnte die höchste Reduktionleistung von 3,06 \log_{10} -Stufen mit dem Prüfprodukt mit pH 3 erzielt werden. Bei den Durchführungen mit 0,25 mg/l freiem Chlor lagen die Reduktionen bei allen drei Prüfprodukten mit maximal 0,41 \log_{10} -Stufen bei den Prüfprodukten mit pH 2,5 und pH 4 unterhalb einer \log_{10} -Stufe und wurden deshalb für die weiteren Untersuchungen nicht hinzugezogen (Abb. 13 A). Die Prüfprodukte wurden basierend auf den Resultaten der ersten Untersuchung anschließend mit der Wirkstoffkonzentration von 0,5 mg/l auf ihre Biozidität bei verschiedenen Kontaktzeiten von 5, 15 und 30 Minuten getestet. Die anderen Versuchsparameter wurden beibehalten. Diese Versuche ergaben, dass bei einer Kontaktzeit von 5 und 15 Minuten mit dem Prüfprodukt mit pH 3 erneut die höchste Reduktion erzielt wurde (3,53 \log_{10} -Stufen bei 5 min und 4,89 \log_{10} -Stufen bei 15 min). Bei einer Kontaktzeit von 30 Minuten konnte mit allen Prüfprodukten eine vollständige Reduktion der Testorganismen (4,89 \log_{10} -Stufen) erzielt werden (Abb. 13 B). Somit konnte verdeutlicht werden, dass ECA - Verfahren im sauren Bereich ihr Wirkungsoptimum bei einem pH von 3 haben.

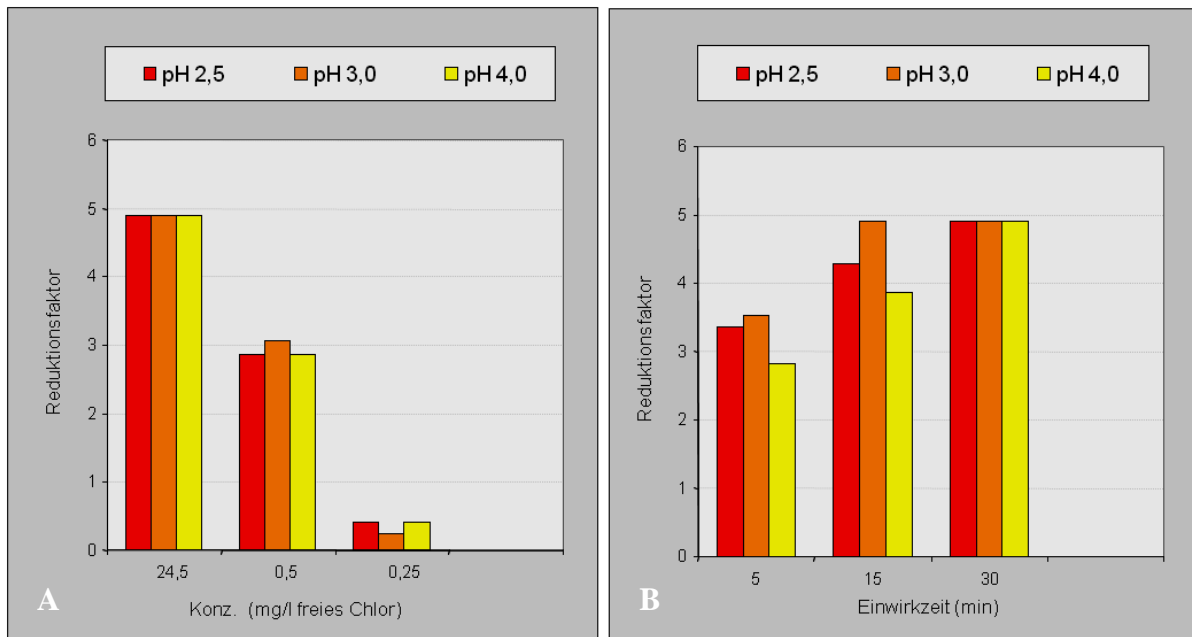


Abb. 13 A) Testung eines ECA-Verfahrens mit verschiedenen pH-Werten (2,5; 3,0; 4,0) zur Bestimmung der höchsten Wirksamkeit gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* bei einer Kontaktzeit von 5 Minuten. B) Testung eines ECA - Verfahrens mit pH-Werten 2,5; 3,0; 4,0 zur Bestimmung der höchsten Wirksamkeit gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* bei verschiedenen Kontaktzeiten (5, 15, 30 Minuten). Die Ausgangsbelastung lag bei 10^5 KBE/ml, die Reduktionen der KBE/ml sind in \log_{10} -Stufen dargestellt.

3.1.2.2 Prüfprodukt 3: ECA - Verfahren im sauren Bereich (pH 3)

Beim Prüfprodukt 3 handelte es sich um eine weitere Desinfektionslösung aus einem ECA - Verfahren, die im sauren Bereich eingesetzt wird (pH 3). Die Desinfektionslösung wird vor Ort hergestellt und kann direkt verwendet werden. Dieses Prüfprodukt wurde in der kontinuierlichen Behandlung auf seine biozide Wirkung gegenüber Biofilmmikroorganismen untersucht. Die Behandlung wurde mit 0,3 mg/l freiem Chlor, der nach TrinkwV §11 zulässigen Höchstkonzentration, durchgeführt.

Die Untersuchungen zeigten, dass eine kontinuierliche Behandlung nach TrinkwV §11 mit dem Prüfprodukt 3 zu einer stetigen Abnahme der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze nach einem Behandlungszeitraum von 21 Tagen führt (Abb. 14). Im nicht behandelten Biofilm waren die Konzentrationen der KBE/cm² konstant $> 10^6$. In einer parallel durchgeführten Behandlung eines zu Beginn des Versuchs sterilen Silikonschlauchs mit ebenfalls 0,3 mg/l freiem Chlor war über den gesamten Untersuchungszeitraum kein Wachstum von KBE nachweisbar.

Nach vollständiger Reduktion der KBE/cm² wurde zum Vergleich die Gesamtzellzahl (GZZ) in allen untersuchten Silikonschläuchen bestimmt. Die GZZ/cm² konnte im Untersuchungszeitraum von 35 Tagen im behandelten Schlauch von $2,0 \times 10^7$ um 1,80 log₁₀-Stufen auf $2,4 \times 10^5$ GZZ/cm² reduziert werden.

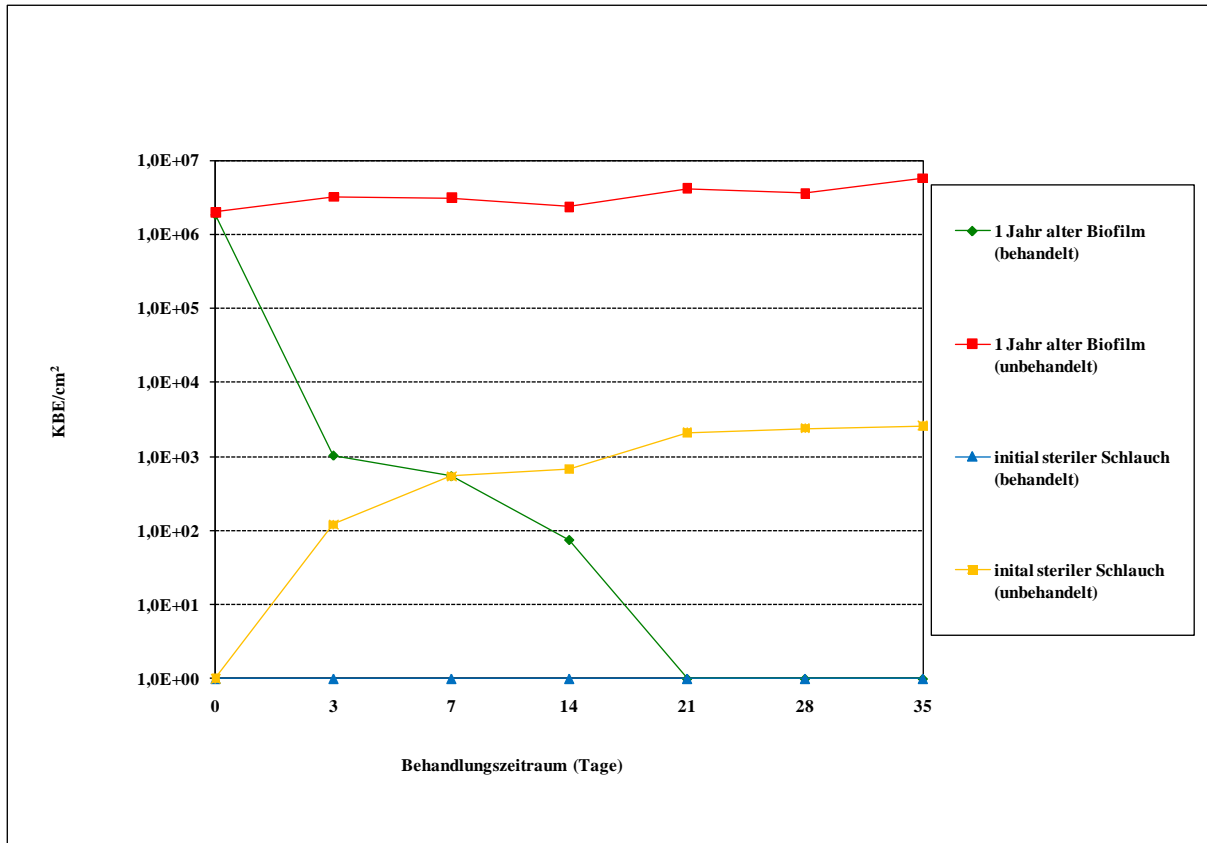


Abb. 14 Entwicklung der KBE/cm² in einem ein Jahr alten Trinkwasserbiofilm aus dem Silikonschlauchmodell grün) und einem initial sterilen Schlauch (rot) bei einer kontinuierlichen Behandlung mit 0,3 mg/l freiem Chlor aus einem ECA-Verfahren mit pH 3 über einen Behandlungszeitraum von 35 Tagen. Zum Vergleich sind die KBE/cm² in einem unbehandelten ein Jahr alter Trinkwasserbiofilm (rot) und einem initial sterilen Silikonschlauch (gelb) dargestellt.

Im unbehandelten Silikonschlauch blieben die Werte konstant $> 10^7$ und im initial sterilen Schlauch konnten keine GZZ/cm² nachgewiesen werden. Auf der Schlauchoberfläche waren nach 35 Behandlungstagen noch deutliche Rückstände der Biofilmmatrix zu sehen (Abb. 15).

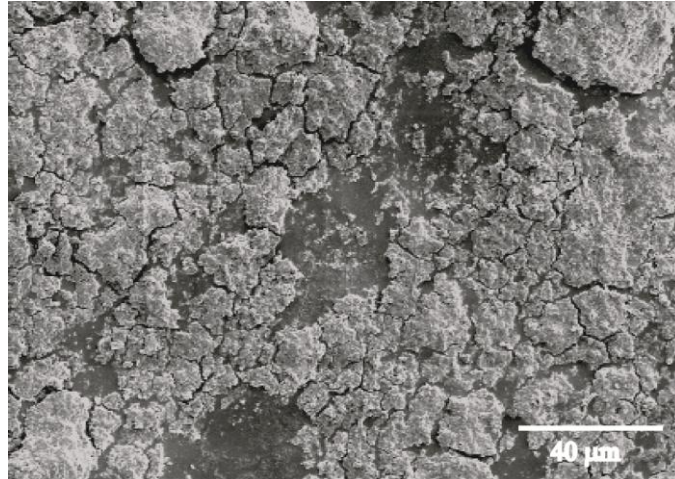


Abb. 15 REM-Aufnahme der Oberfläche von Silikonschläuchen mit einem 1 Jahr alten Biofilm nach einer kontinuierlicher Behandlung mit 0,3 mg/l freiem Chlor aus einem ECA – Verfahren mit pH 3 für 35 Tage. Aufnahme bei 1000x Vergrößerung.

3.1.2.3 Prüfprodukt 4: ECA - Verfahren im neutralen Bereich (pH 7)

Beim Prüfprodukt 4 handelte es sich um eine Desinfektionslösung aus einem ECA - Verfahren, das im neutralen Bereich (pH 7) hergestellt wird. Die Desinfektionslösung wird vor Ort produziert und kann direkt eingesetzt werden. Es wurde mit 0,3 mg/l freiem Chlor in der kontinuierlichen Behandlung und in höheren Konzentrationen (1, 10, 25 mg/l) in der Simulation zur Stoßbehandlung einer Anlagendesinfektion untersucht. Die Neutralisation des Wirkstoffs nach der festgelegten Kontaktzeit erfolgte mit 0,3% Natriumthiosulfat.

Die kontinuierliche Behandlung der Biofilme mit dem Prüfprodukt führte über einen Behandlungszeitraum von 70 Tagen zu einer stetigen Abnahme der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²). Im nicht behandelten Biofilm waren die Konzentrationen der KBE/cm² konstant > 10⁶. Die Behandlung eines zu Beginn des Versuchs sterilen Silikonschlauchs mit 0,3 mg/l freiem Chlor verhinderte ein Wachstum von koloniebildenden Einheiten auf der Schlauchoberfläche (Abb. 16).

Nach vollständiger Reduktion der KBE/cm² wurde zum Vergleich die Gesamtzellzahl in allen untersuchten Silikonschläuchen bestimmt. Die GZZ/cm² konnte im gesamten Untersuchungszeitraum von 84 Tagen im behandelten Schlauch von 2,0x10⁷ um 1,57 log₁₀-Stufen auf 4,0x10⁵ GZZ/cm² reduziert werden (Tab. 18). Im unbehandelten Silikonschlauch blieben die Werte konstant > 10⁷ und im zu Beginn sterilen Schlauch waren keine GZZ/cm² detektierbar. Auf der Schlauchoberfläche waren nach 84 Behandlungstagen keine Biofilmrückstände mehr zu sehen (Abb. 17 A).

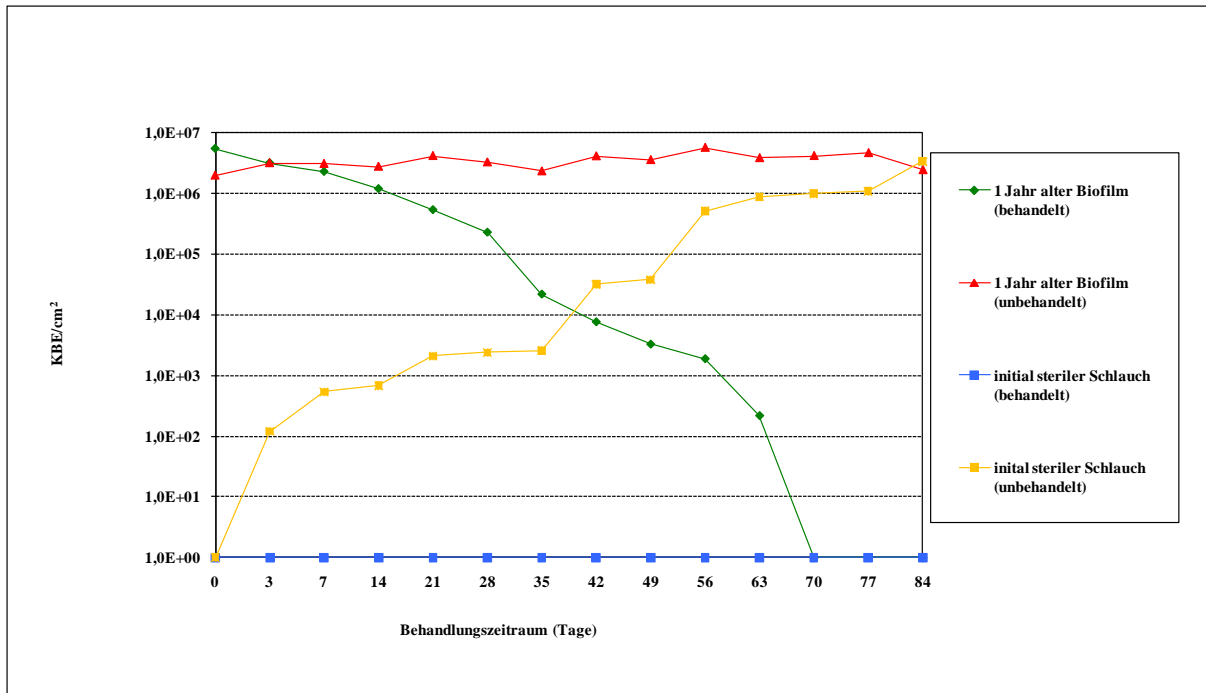


Abb. 16 Entwicklung der KBE/cm² in einem ein Jahr alten Trinkwasserbiofilm aus dem Silikonschlauchmodell (grün) und einem initial sterilen Schlauch (rot) bei einer kontinuierlichen Behandlung mit 0,3 mg/l freiem Chlor aus einem ECA-Verfahren mit pH 7 über einen Behandlungszeitraum von 84 Tagen. Zum Vergleich sind die KBE/cm² in einem unbehandelten ein Jahr alter Trinkwasserbiofilm (rot) und einem initial sterilen Silikonschlauch (gelb) dargestellt.

Bei der Simulation zur Anlagendesinfektion führte die Stoßbehandlung mit 25 mg/l freiem Chlor nach einem Behandlungszeitraum von sechs Stunden zur vollständigen Reduktion der KBE/cm². Niedrigere Wirkstoffkonzentrationen von 1 mg/l und 10 mg/l führten zu Reduktionen der KBE/cm² von 2,30 log₁₀-Stufen (auf 2,5x10⁴ KBE/cm²) und 4,98 log₁₀-Stufen (auf 5,2x10¹ KBE/cm²). Die GZZ/cm² konnte bei der Behandlung mit 25 mg/l freiem Chlor bis zur Nachweisgrenze (3,65x10³ GZZ/cm²) reduziert werden. Die anderen getesteten Wirkstoffkonzentrationen führten nur zu einer Reduktion von 0,76 log₁₀-Stufen (auf 2,6x10⁶ GZZ/cm² bei 1 mg/l) bzw. 1,61 log₁₀-Stufen (3,7x10⁵ GZZ/cm² bei 10 mg/l) (Tab. 18). Auf den REM - Aufnahmen des mit 25 mg/l freiem Chlor behandelten Silikonschlauchs waren trotz der vollständigen Reduktionen der Mikroorganismen noch Biofilmfragmente unterschiedlicher Größe zu erkennen (Abb. 17 B).

Tab. 18 Ergebnisse der Untersuchungen zu KBE/cm^2 und GZZ/cm^2 bei der Wirksamkeitsprüfung des Prüfprodukts 3 (pH 7) im Silikonschlauchmodell. Das Prüfprodukt wurde in den praxisnahen Simulationen zur kontinuierlichen Behandlung und als Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion getestet.

Typ	Konz. [mg/l]	Behandlungszeitraum	KBE/cm^2 (nach Behandlung)	GZZ/cm^2 (nach Behandlung)
Ausgangswert			$\sim 5,0 \times 10^6$	$\sim 2,0 \times 10^7$
Kontinuierlich	0,3	84 Tage	u.N.	$4,0 \times 10^5$
Anlagendesinfektion	1	6 Stunden	$2,5 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$
	10	6 Stunden	$5,2 \times 10^1$	$3,7 \times 10^5$
	25	6 Stunden	u.N.	u.N.

u.N. = unter Nachweisgrenze ($0 \text{ KBE}/\text{cm}^2$; $3,65 \times 10^3 \text{ GZZ}/\text{cm}^2$)

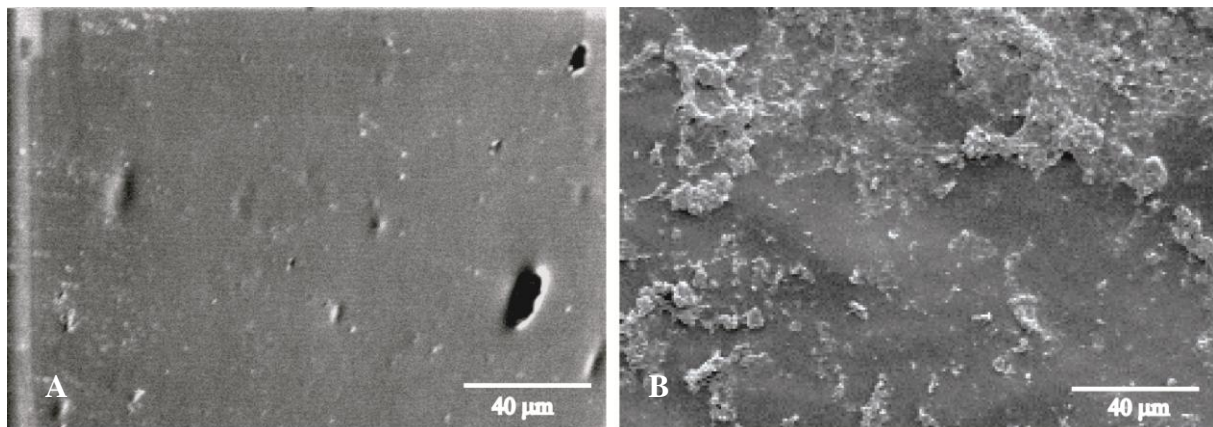


Abb. 17 REM-Aufnahmen der Oberfläche von Silikonschläuchen mit einem 1 Jahr alten Biofilm nach A) kontinuierlicher Behandlung mit 0,3 mg/l freiem Chlor für 84 Tage B) einer Stoßbehandlung mit 25 mg/l freiem Chlor für 6 Stunden. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.1.2.4 Prüfprodukt 5: ECA - Verfahren im neutralen Bereich (pH 7)

Beim Prüfprodukt 5 handelte es sich wie beim Prüfprodukt 4 um ein ECA - Verfahren, das im neutralen Bereich (pH 7) produziert wird. Die Desinfektionslösung wird vor Ort hergestellt und kann ebenfalls direkt verwendet werden. Es wurde zunächst mit 0,3 mg/l freiem Chlor in der kontinuierlichen Behandlung untersucht.

Die kontinuierliche Behandlung der Biofilme mit 0,3 mg/l freiem Chlor zeigte, dass innerhalb der ersten 30 Behandlungstage eine Abnahme der KBE/cm^2 bis zu $3,9 \times 10^2 \text{ KBE}/\text{cm}^2$ ($4,11 \log_{10}$ -Stufen) erfolgte. Im weiteren Behandlungszeitraum bis nach 77 Tagen fand keine weitere Reduktion statt (Abb. 18 grün). Aufgrund dieser Ergebnisse

wurde die Untersuchung mit einer erhöhten Wirkstoffkonzentration von 0,6 mg/l freiem Chlor wiederholt. Laut TrinkwV §11 darf in Schadensfällen für einen gewissen Zeitraum die Chlorkonzentration erhöht werden, muss jedoch anschließend wieder vermindert werden. Bei dieser Behandlung war bereits nach 21 Behandlungstagen die Reduktion der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) erreicht und die Untersuchung wurde nach 35 Tagen beendet (Abb. 18 braun). In zusätzlich durchgeführten Untersuchungen mit initial sterilen Silikonschläuchen hemmten sowohl Behandlungen mit 0,3 mg/l, als auch mit 0,6 mg/l freiem Chlor ein Wachstum von koloniebildenden Einheiten auf der Schlauchoberfläche (Abb. 18 blau).

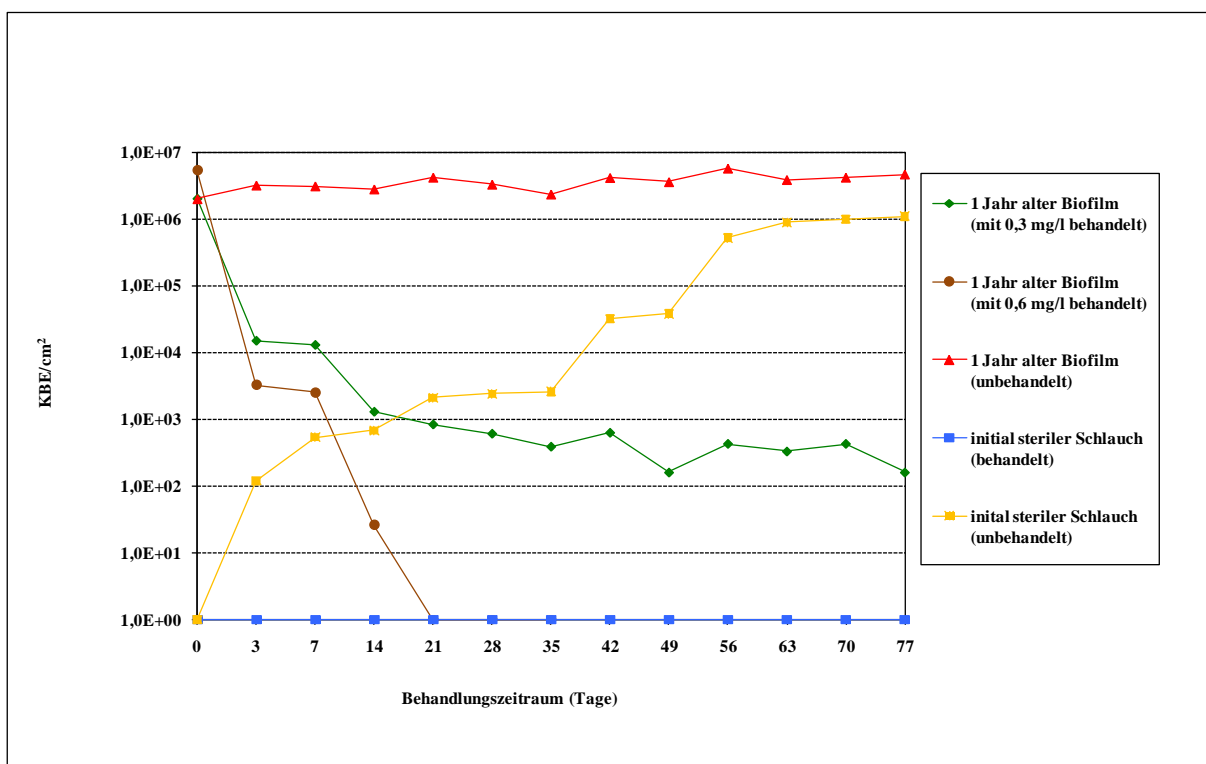


Abb. 18 Entwicklung der KBE/cm² in einem ein Jahr alten Trinkwasserbiofilm aus dem Silikonschlauchmodell und einem initial sterilen Schlauch (rot) bei einer kontinuierlichen Behandlung mit 0,3 mg/l (grün) und 0,6 mg/l (braun) freiem Chlor aus einem ECA-Verfahren mit pH 7 über einen Behandlungszeitraum von 77 Tagen. Zum Vergleich sind die KBE/cm² in einem unbehandelten ein Jahr alter Trinkwasserbiofilm (rot) und einem initial sterilen Silikonschlauch (gelb) dargestellt.

Zudem wurde in allen untersuchten Silikonschläuchen die GZZ bestimmt. Die GZZ/cm² wurde bei der Behandlung mit 0,3 mg/l freiem Chlor im gesamten Untersuchungszeitraum von 77 Tagen um 1,61 log₁₀-Stufen auf 1,2x10⁶ GZZ/cm² reduziert. Bei der Behandlung mit

0,6 mg/l freiem Chlor für 35 Tage wurde die GZZ/cm² um 1,34 log₁₀-Stufen auf 2,3x10⁵ GZZ/cm² vermindert. Im unbehandelten Silikonschlauch blieben die Werte konstant > 10⁷ und in den zu Beginn sterilen Schlauch konnten bei beiden eingesetzten Konzentrationen an freiem Chlor keine GZZ/cm² nachgewiesen werden. Die Auswertung der REM - Aufnahmen verdeutlichte, dass nach 42 Behandlungstagen mit 0,3 mg/l freiem Chlor, auf der Schlauchoberfläche die Biofilmmatrix nur oberflächlich entfernt wurde (Abb. 19 A). Durch die Behandlung mit 0,6 mg/l konnte der Biofilm im gleichen Zeitraum optisch zwar effektiver, jedoch auch nur partiell entfernt werden (Abb. 19 B).

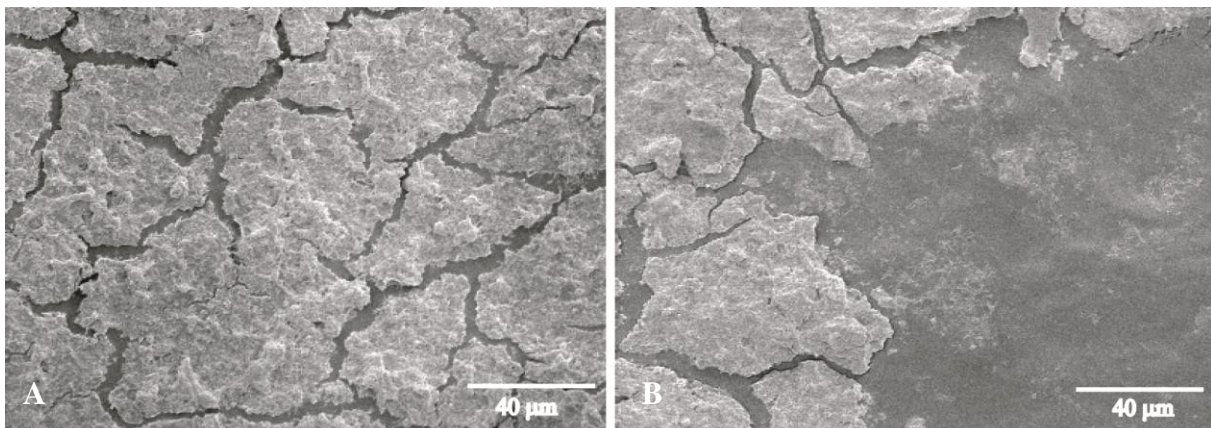


Abb. 19 REM-Aufnahmen der Oberfläche von Silikonschläuchen mit einem 1 Jahr alten Biofilm nach A) kontinuierlicher Behandlung mit 0,3 mg/l freiem Chlor für 42 Tage B) kontinuierlicher Behandlung mit 0,6 mg/l freiem Chlor für 35 Tage. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.1.3 Wasserstoffperoxid pH 2

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) darf laut TrinkwV nur für die Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion verwendet werden. Im Rahmen der Untersuchungen wurde H₂O₂ sowohl als Reinsubstanz, als auch in Kombination mit Silber (und Peressigsäure) oder Fruchtsäuren (und Tensiden) in der Simulation zur Stoßbehandlung über einen Behandlungszeitraum von vier Stunden getestet. Die Prüfprodukte standen als einsatzbereite Vorlagen zur Verfügung (Abschnitt 2.2.3). Die Neutralisation des Wirkstoffs nach der festgelegten Kontaktzeit erfolgte mit TLH - Thio + Katalase (Abschnitt 2.3.5).

3.1.3.1 Prüfprodukt 6: Wasserstoffperoxid als Reinsubstanz (~pH 2)

Eine Stoßbehandlung mit 10.000 mg/l H₂O₂ führte in einen Behandlungszeitraum von drei Stunden zur Reduktion der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²). Die GZZ/cm²

wurden im gesamten Behandlungszeitraum von vier Stunden um 0,64 \log_{10} -Stufen auf $2,3 \times 10^6$ reduziert. Mit einer erhöhten Wirkstoffkonzentration von 30.000 mg/l H_2O_2 wurde eine vollständige Reduktion der KBE/cm² bereits nach zwei Stunden erreicht (Abb. 20).

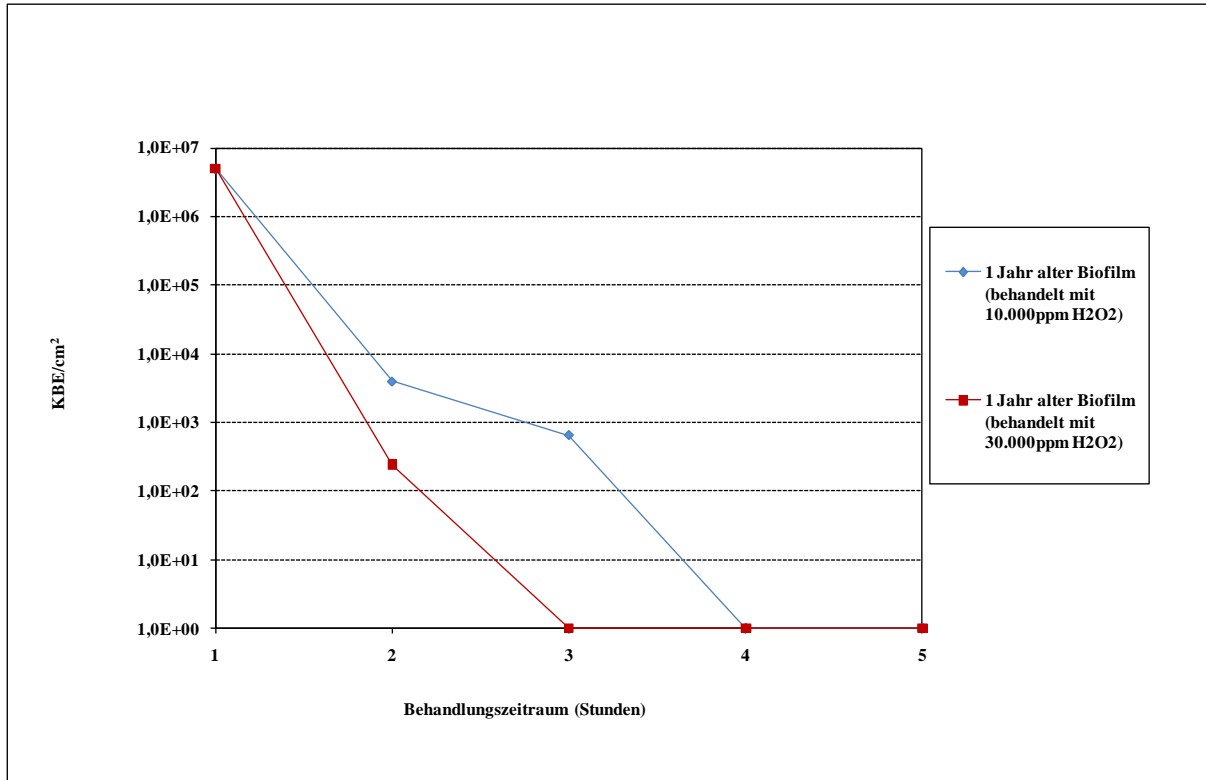


Abb. 20 Entwicklung der KBE/cm² in einem ein Jahr alten Trinkwasserbiofilm aus dem Silikonschlauchmodell Stoßbehandlung mit 10.000 mg/l (blau) und 30.000 mg/l (rot) H_2O_2 über einen Behandlungszeitraum von 4 Stunden.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl ergab, dass noch $2,1 \times 10^6$ GZZ/cm² im Silikonschlauch vorhanden waren, das entsprach einer Reduktion von 0,68 \log_{10} -Stufen (Tab. 19). Auf den REM - Aufnahmen waren nach den durchgeführten Behandlungen, unabhängig von der Wirkstoffkonzentration, jeweils noch kleine Biofilmfragmente über die gesamte Schlauchoberfläche verteilt (Abb. 21 A, B).

Tab. 19 Ergebnisse der Untersuchungen auf KBE/cm^2 und GZZ/cm^2 bei der Wirksamkeitsprüfung von Wasserstoffperoxid als Reinsubstanz (pH 2) im Silikonschlauchmodell. Das Prüfprodukt wurde in der praxisnahen Simulationen einer Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion getestet.

Typ	Konz. [mg/l]	Behandlungszeitraum	KBE/cm^2 (nach Behandlung)	GZZ/cm^2 (nach Behandlung)
Ausgangswert			$\sim 5,0 \times 10^6$	$\sim 2,0 \times 10^7$
Anlagendesinfektion	10.000	4 Stunden	u.N.	$2,3 \times 10^6$
	30.000	4 Stunden	u.N.	$2,1 \times 10^6$

u.N. = unter Nachweisgrenze ($0 \text{ KBE}/\text{cm}^2$; $3,65 \times 10^3 \text{ GZZ}/\text{cm}^2$)

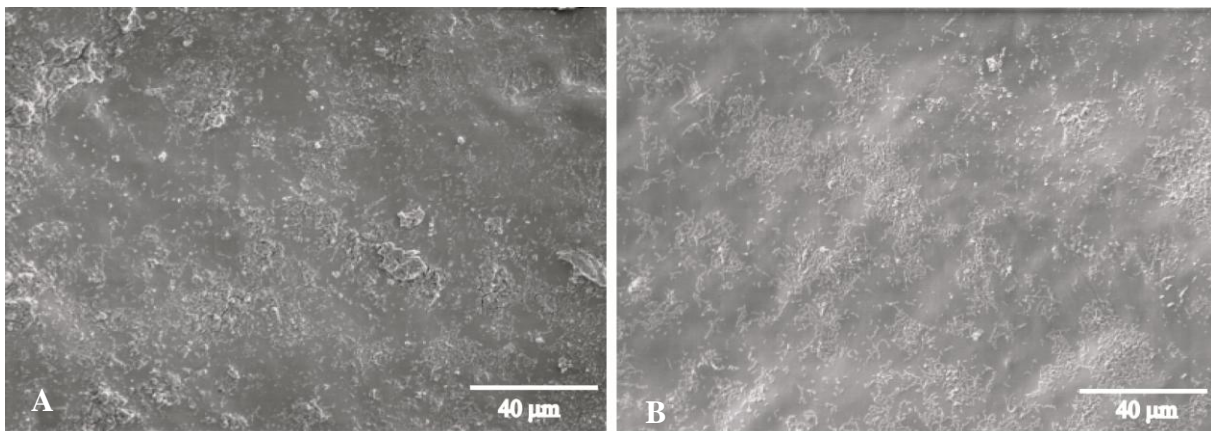


Abb. 21 REM-Aufnahmen der Oberfläche von Silikonschläuchen mit einem 1 Jahr alten Biofilm nach A) Stoßbehandlung mit 10.000 mg/l H_2O_2 für 4 Stunden B) Stoßbehandlung mit 30.000 mg/l H_2O_2 für 4 Stunden. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.1.3.2 Prüfprodukt 7: Wasserstoffperoxid + Silber (~pH 2)

Die in den Untersuchungen eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen erfolgten nach Herstellerangaben. Es wurden H_2O_2 - Konzentrationen von 1.000, 5.000 und 10.000 mg/l eingesetzt. Der Silberanteil in der Vorlage betrug 50 mg/l.

Bei einer Stoßbehandlung mit der Wirkstoffkonzentration von 10.000 mg/l H_2O_2 konnten die KBE/cm^2 über den gesamten Behandlungszeitraum von vier Stunden bis zur Nachweisgrenze ($0 \text{ KBE}/\text{cm}^2$) kontinuierlich reduziert werden. Bzgl. der GZZ/cm^2 wurde eine Reduktion um $0,85 \log_{10}$ -Stufen auf $7,0 \times 10^5$ erzielt. Niedrigere Wirkstoffkonzentrationen von 1.000 bzw. 5.000 mg/l H_2O_2 führten innerhalb des Untersuchungszeitraums nur zu einer Reduktion der KBE/cm^2 von $0,74 \log_{10}$ -Stufen (auf $9,25 \times 10^4 \text{ KBE}/\text{cm}^2$) bzw. $3,52 \log_{10}$ -Stufen (auf $1,53 \times 10^3 \text{ KBE}/\text{cm}^2$) (Abb. 22). Die Bestimmung der GZZ/cm^2 ergab mit Reduktionen von

0,11 \log_{10} -Stufen auf $3,9 \times 10^6$ bei 1.000 mg/l H_2O_2 und 0,14 \log_{10} -Stufen auf $3,6 \times 10^6$ GZZ/cm² bei 5.000 mg/l H_2O_2 nur eine minimale Veränderung (Tab. 20). Die Begutachtung der Schlauchoberfläche belegt, dass nach der Behandlung mit 10.000 mg/l H_2O_2 noch Rückstände der Biofilmmatrix vorhanden waren. Zudem war die Oberflächenstruktur des Silikonschlauchs verändert (Abb. 24 A).

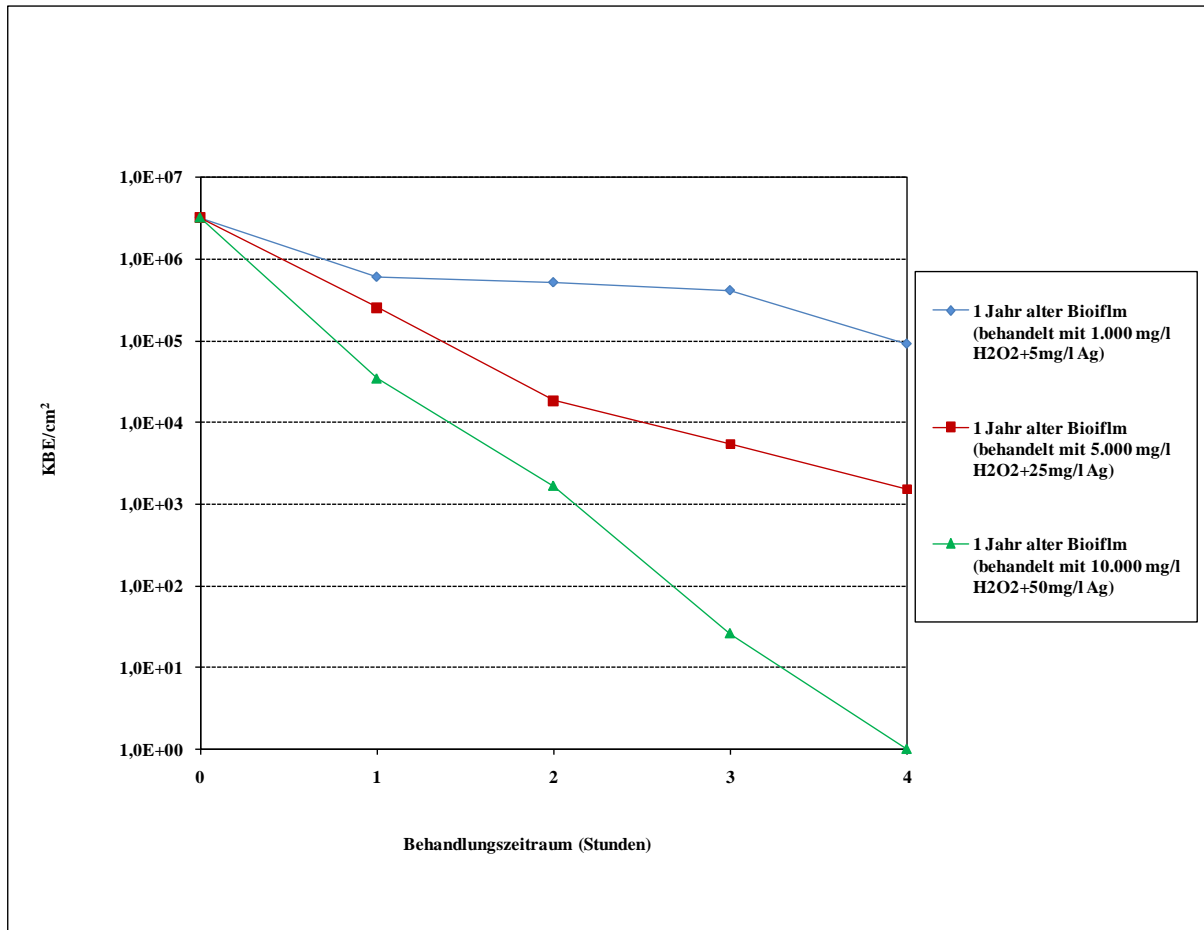


Abb. 22 Entwicklung der KBE/cm² in einem 1Jahr alten Trinkwasserbiofilm bei einer Stoßbehandlung für vier Stunden mit 1.000 mg/l Wasserstoffperoxid (H_2O_2) + 25 mg/l Silber (Ag) (blau), 5.000 H_2O_2 + 25 mg/l Ag (rot) und 10.000 mg/l H_2O_2 + 50 mg/l Ag (grün).

Zusätzlich wurde eine Untersuchung durchgeführt bei der dem Prüfprodukt in der Vorlage 2.000 mg/l Peressigsäure (PES) zugegeben waren. Die Versuche wurden unter den gleichen Testbedingungen wie ohne den Zusatz durchgeführt. Bei einer Anlagendesinfektion konnten die KBE/cm² bei einer Ausgangskonzentration von 10.000 mg/l H_2O_2 hier schon bei einer Kontaktzeit von drei Stunden bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) reduziert werden. Niedrigere Konzentrationen von 1.000 bzw. 5.000 mg/l H_2O_2 führten bei der kompletten

Kontaktzeit von vier Stunden zu einer Reduktion der KBE/cm² von 2,74 log₁₀-Stufen (auf 9,2x10³ KBE/cm²) bzw. 5,00 log₁₀-Stufen (auf 5,0x10¹ KBE/cm²) (Abb. 23).

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl zeigte hier, dass durch die Behandlung mit 10.000 mg/l H₂O₂ die GZZ/cm² bei einer Kontaktzeit von vier Stunden nur um 1,70 log₁₀-Stufen auf 2,0x10⁵ reduziert werden konnte. Die niedrigeren eingesetzten H₂O₂ - Konzentrationen führten bei gleicher Kontaktzeit nur zu einer Reduktion von 1,12 log₁₀-Stufen auf 7,6x10⁵ GZZ/cm² (bei 1.000 mg/l H₂O₂) und 1,16 log₁₀-Stufen auf 6,9x10⁵ GZZ/cm² (bei 5.000 mg/l H₂O₂) (Tab. 20).

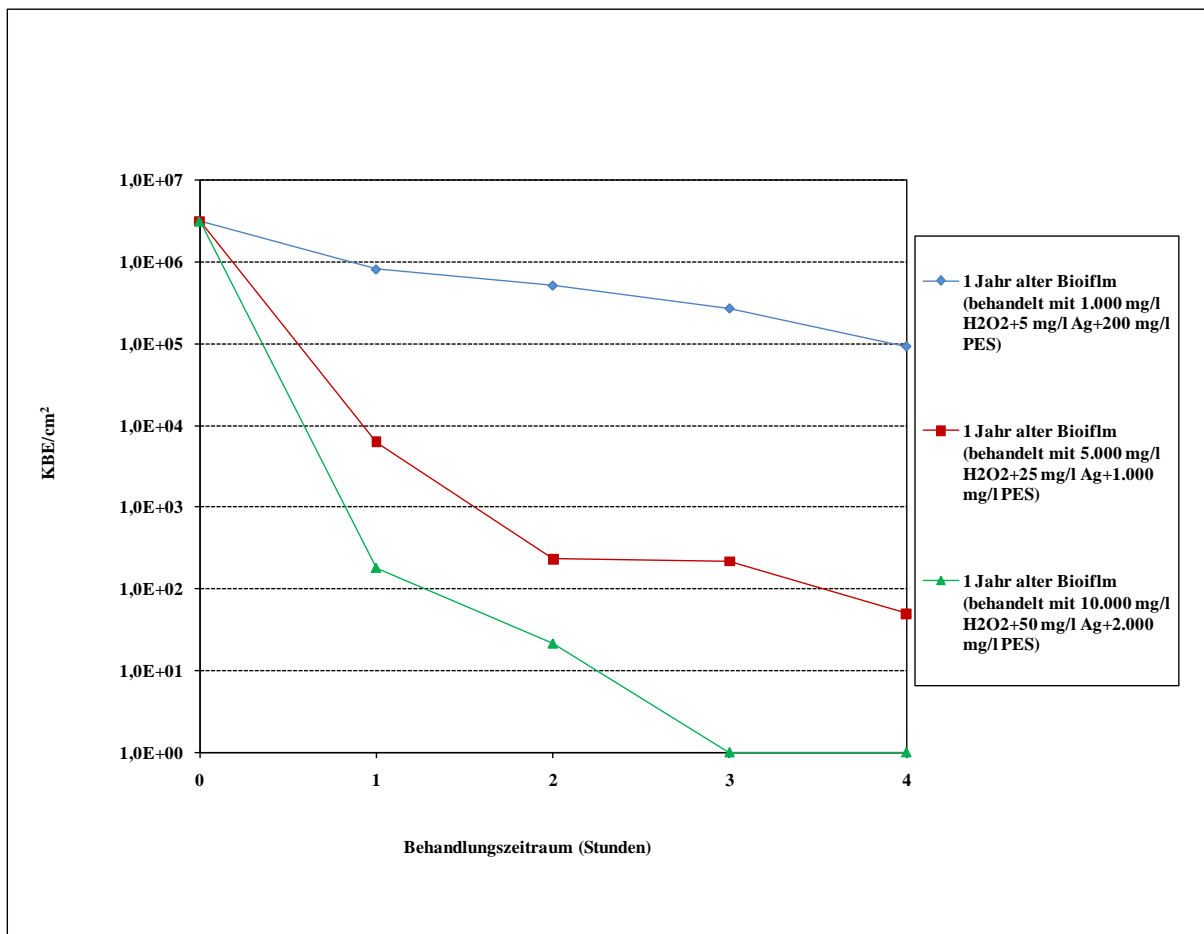


Abb. 23 Entwicklung der KBE/cm² in einem 1Jahr alten Trinkwasserbiofilm bei einer Stoßbehandlung für vier Stunden mit 1.000 H₂O₂ + 25 mg/l Silber (Ag) + 1.000 mg/l Peressigsäure (PES) (blau), 5.000 H₂O₂ + 25 mg/l Ag + 1.000 mg/l PES (rot) und 10.000 mg/l H₂O₂ + 50 mg/l Ag + 2.000 mg/l PES (grün).

Die Untersuchungen verdeutlichen, dass durch den Zusatz von Peressigsäure erhöhte Reduktionen sowohl bei den KBE/cm², als auch bei der GZZ/cm² erreicht werden. Ein Vergleich der behandelten Schlauchoberflächen veranschaulicht, dass nach allen Einsätzen

noch kleinste Biofilmreste zurückbleiben. Die Oberflächenstruktur des Silikonschlauchs sah speziell nach der Zusatz von Peressigsäure stark verändert aus (Abb. 24 B).

Tab. 20 Ergebnisse der Untersuchungen zu KBE/cm² und GZZ/cm² bei der Wirksamkeitsprüfung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Kombination mit Silber (Ag) und dem Zusatz von Peressigsäure (PES; pH 2) im Silikonschlauchmodell. Das Prüfprodukt wurde in der praxisnahen Simulationen einer Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion getestet.

Typ	Konz. H ₂ O ₂ [mg/l]	Behandlungszeitraum	KBE/cm ² (nach Behandlung)	GZZ/cm ² (nach Behandlung)
Ausgangswert			~5,0x10⁶	~2,0x10⁷
Anlagendesinfektion	1.000 + Ag	4 Stunden	9,2 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁶
	5.000 + Ag	4 Stunden	1,5 x 10 ³	3,6 x 10 ⁶
	10.000 + Ag	4 Stunden	u.N.	7,0 x 10 ⁵
	1.000 + Ag + PES	4 Stunden	9,2 x 10 ³	7,6 x 10 ⁵
	5.000 + Ag + PES	4 Stunden	5,0 x 10 ¹	6,9 x 10 ⁵
	10.000 + Ag+PES	4 Stunden	u.N.	2,0 x 10 ⁵

u.N. = unter Nachweisgrenze (0 KBEcm²; 3,65 x 10³ GZZ/cm²)

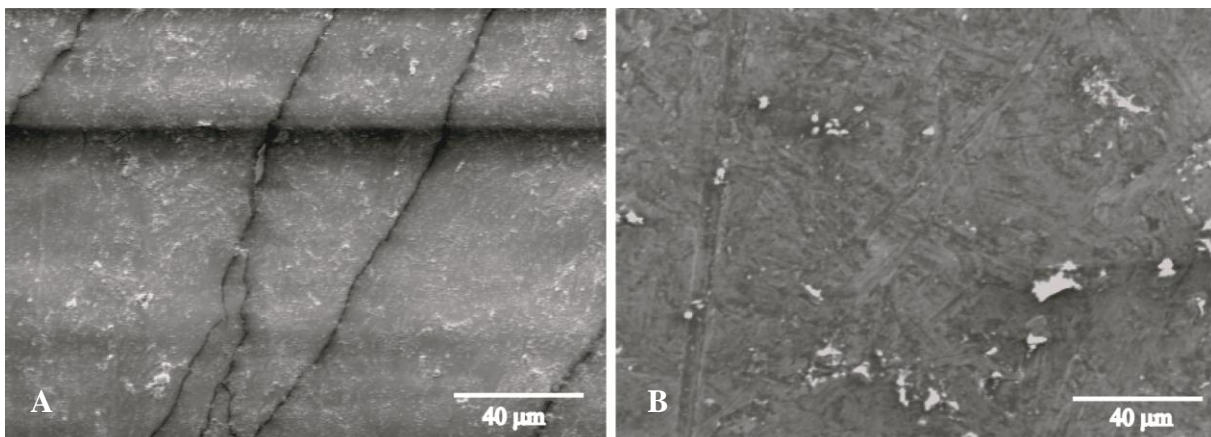


Abb. 24 REM-Aufnahmen der Oberfläche von Silikonschläuchen mit einem 1 Jahr alten Biofilm nach A) Stoßbehandlung mit 10.000 mg/l H₂O₂ + 50 mg/l Ag für 4 Stunden B) Stoßbehandlung mit 10.000 mg/l H₂O₂ + 50 mg/l Ag + 2.000 mg/l PES für 4 Stunden. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.1.3.3 Prüfprodukt 8: Wasserstoffperoxid + Fruchtsäuren (~pH 2)

Das Prüfprodukt 8 wurde in einsatzfertigen Vorlagen bereitgestellt. Es wurde in der Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion getestet. Die in den Untersuchungen eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen erfolgten nach Herstellerangaben. Es wurden folgende H₂O₂-Konzentrationen getestet: 10.000, 30.000 und 100.000 mg/l. Bei den Fruchtsäuren, die dem Prüfprodukt beigelegt sind, handelt es sich um 1,5 mg/l Sorbin- und 2,5 mg/l Benzoesäure.

Bei einer Stoßbehandlung über einen Untersuchungszeitraum von vier Stunden konnten bei allen getesteten Wirkstoffkonzentration die KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) reduziert werden. Die Gesamtzellzahl konnte mit Wirkstoffkonzentrationen von 10.000 mg/l H₂O₂ um 1,40 log₁₀-Stufen auf 4,0x10⁵ GZZ/cm² reduziert werden, bei 30.000 mg/l um 2,52 log₁₀-Stufen auf 3,0x10⁴ und bei 100.000 mg/l um 0,64 log₁₀-Stufen auf 2,3x10⁶. Eine höhere Wirkstoffkonzentration führte somit bzgl. der GZZ/cm² nicht zu einem besseren Resultat (Tab. 21).

Anschließend wurden Untersuchungen durchgeführt bei denen dem Prüfprodukt jeweils 5 mg/l Tenside zugegeben wurden. Die Versuche wurden mit den gleichen Wirkstoffkonzentrationen und unter den gleichen Testbedingungen wie ohne den Zusatz durchgeführt. Bei den Stoßbehandlungen konnten die KBE/cm² ebenfalls bei allen Untersuchungen bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) reduziert werden. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl zeigte hier im Gegensatz zu den Untersuchungen ohne Tenside mit steigender H₂O₂ - Konzentration höhere Reduktionen. Diese lagen bei den Behandlungen mit 10.000 mg/l bei 0,41 log₁₀-Stufen auf 3,9x10⁶ GZZ/cm², mit 30.000 mg/l H₂O₂ bei 0,51 log₁₀-Stufen auf 3,1x10⁶ GZZ/cm² und mit 100.000 mg/l bei 1,60 log₁₀-Stufen auf 2,5x10⁵ GZZ/cm². Allerdings waren die Reduktionen alle niedriger, als bei den Behandlungen ohne die Tenside (Tab. 21).

Tab. 21 Ergebnisse der Untersuchungen zu KBE/cm² und GZZ/cm² bei der Wirksamkeitsprüfung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Kombination mit Fruchtsäuren (FS) und dem Zusatz von Tensiden (T; pH 2) im Silikonschlauchmodell. Das Prüfprodukt wurde in der praxisnahen Simulationen zur Anlagendesinfektion getestet.

Typ	Konz. H ₂ O ₂ [mg/l]	Behandlungszeitraum	KBE/cm ² (nach Behandlung)	GZZ/cm ² (nach Behandlung)
Ausgangswert			~5,0x10⁶	~2,0x10⁷
Anlagendesinfektion	10.000+ FS	4 Stunden	u.N.	4,0 x 10 ⁵
	30.000 + FS	4 Stunden	u.N.	3,0 x 10 ⁴
	100.000 + FS	4 Stunden	u.N.	2,3 x 10 ⁶
	10.000 + FS + T	4 Stunden	u.N.	3,9 x 10 ⁶
	30.000 + FS + T	4 Stunden	u.N.	3,1 x 10 ⁶
	100.000 + FS + T	4 Stunden	u.N.	2,5 x 10 ⁵

u.N. = unter Nachweisgrenze (0 KBEcm²; 3,65 x 10³ GZZ/cm²)

Die REM - Aufnahmen der Schlauchoberfläche veranschaulichen, dass durch die Behandlung mit 100.000 mg/l H₂O₂ mit und ohne Tenside die Biofilmmatrix zu großen Teilen entfernt wurde. Zudem wiesen die Schlauchoberflächen nach den Maßnahmen Unebenheiten auf (Abb. 25 A).

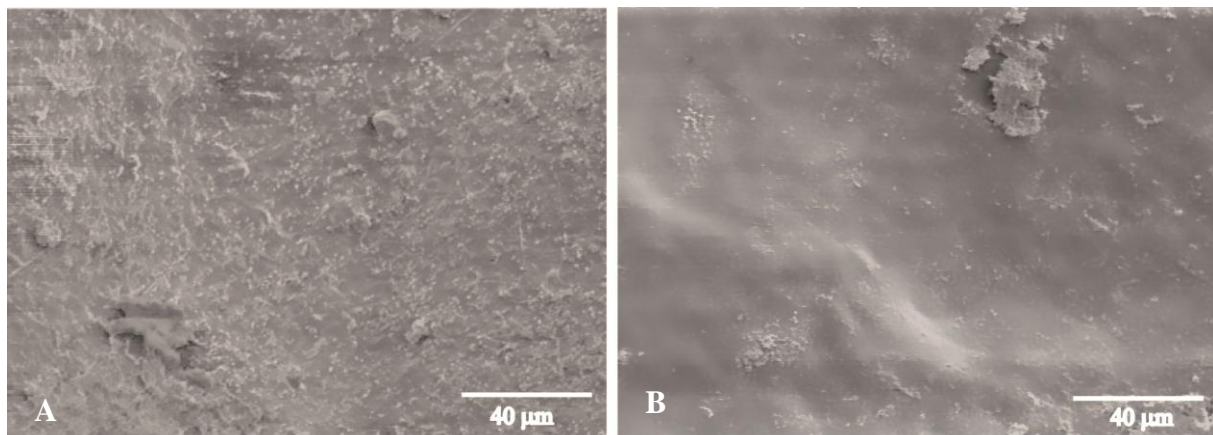


Abb. 25 REM-Aufnahmen der Oberfläche von Silikonschläuchen mit einem 1 Jahr alte Biofilm nach A) einer Stoßbehandlung mit 100.000 mg/l H₂O₂ + Fruchtsäuren für 4 Stunden B) einer Stoßbehandlung mit 100.000 mg/l H₂O₂ + Fruchtsäuren + 5 mg/l Tenside für 4 Stunden. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.1.4 Prüfprodukt 9: Ozon

Ozon darf laut TrinkwV §11 für die Aufbereitung von Trinkwasser eingesetzt werden. Nach dem Aufbereitungsprozess werden noch Konzentrationen bis 0,05 mg/l Ozon im Trinkwasser toleriert. Die Testung wurde als diskontinuierliche Behandlung durchgeführt. Die Untersuchungen konnten nicht im IHPH durchgeführt werden, weil der notwendige Ozongenerator anderweitig eingesetzt wurde. Deshalb wurde der Hygiene - Monitor (Abschnitt 2.2.2.3) eingesetzt und am Einsatzort an den Ozongenerator angeschlossen. In den Hygiene-Monitor wurde ein mit einem ein Jahr alten Biofilm kontaminierter Silikonschlauch aus dem Silikonschlauchmodell integriert. Dadurch konnte die Desinfektionsleistung in Bezug auf koloniebildende Einheiten und Gesamtzellzahl unter praxisnahen Bedingungen untersucht werden.

Dabei wurde der Biofilm an fünf Tagen in der Woche für acht Stunden am Tag mit 0,1 mg/l Ozon behandelt. Nach einem Behandlungszeitraum von 14 Tagen konnten sowohl die KBE/cm², als auch auf die GZZ/cm² bis zur Nachweisgrenze reduziert werden (Tab. 22). Auch optisch war der Biofilm vollständig von der Schlauchoberfläche entfernt (Abb. 26).

Um auszuschließen, dass Reduktionen allein durch den Transport und die Verweildauer im Hygiene - Monitor zum Untersuchungsort auftreten, wurde ein zweiter Silikonschlauch mit einem Kontrollbiofilm in den Hygiene - Monitor gelegt, mit Frischwasser gefüllt und an beiden Seiten verschlossen. Während des Behandlungszeitraums wurde dieser weder behandelt noch durchflossen. Die parallel zum Versuch durchgeführten Untersuchungen des Kontrollbiofilms zeigten, dass in den 14 Tagen Reduktionen der KBE/cm² um 1,25 log₁₀-Stufen auf $2,8 \times 10^5$ und der GZZ/cm² um 0,22 log₁₀-Stufen auftraten (Tab. 22). Eine Reduktion der GZZ/cm² ist eigentlich nicht möglich, weil keine Behandlung stattfand bzw. kein Durchfluss vorlag. Diese Resultate müssen bei der Bestimmung des Reduktionsfaktors beachtet werden.

Tab. 22 Ergebnisse von KBE/cm^2 und GZZ/cm^2 bei der Wirksamkeitsprüfung von Ozon im Silikonschlauchmodell. Das Prüfprodukt wurde mit dem Hygiene-Monitor in der praxisnahen Simulationen einer diskontinuierlichen Behandlung über 14 Tage für 8 Stunden am Tag getestet.

Typ	Konz. [mg/l]	Behandlungszeitraum	KBE/cm^2 (nach Behandlung)	GZZ/cm^2 (nach Behandlung)
Ausgangswert			$\sim 5,0 \times 10^6$	$\sim 2,0 \times 10^7$
diskontinuierlich	0,1	14 Tage, 8 Stunden pro Tag	u.N.	u.N.
Kontrollbiofilm	-	-	$2,8 \times 10^5$	$9,5 \times 10^6$

u.N. = unter Nachweisgrenze ($0 \text{ KBE}/\text{cm}^2$; $3,65 \times 10^3 \text{ GZZ}/\text{cm}^2$)

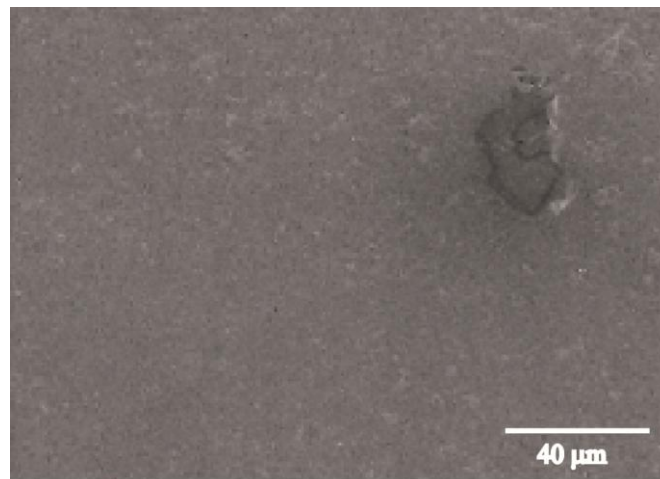


Abb. 26 REM-Aufnahme der Oberfläche von Silikonschläuchen mit einem 1 Jahr alten Biofilm nach diskontinuierlicher Behandlung mit 0,1 mg/l Ozon für 14 Tage, 8 Stunden pro Tag. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse chemischer Desinfektionsverfahren

Es wurden verschiedene derzeit verfügbare chemische Desinfektionsverfahren, die auf unterschiedlichen Wirkstoffen basieren (Chlordioxid, freies Chlor aus ECA - Verfahren, Ozon, Wasserstoffperoxid + Zusatzstoffe), auf ihre Wirksamkeit zur Inaktivierung von Mikroorganismen im Trinkwasserbiofilm untersucht. Die Untersuchungen erfolgten im Silikonschlauchmodell und wurden in praxisnahen Simulationen zur kontinuierlichen und

diskontinuierlichen Behandlung nach TrinkwV §11 sowie in Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion durchgeführt.

3.1.5.1 Behandlungen nach TrinkwV §11

Die Untersuchungen der nach TrinkwV §11 zulässigen Desinfektionsverfahren zur kontinuierlichen bzw. diskontinuierlichen Behandlung demonstrierten, dass mit allen getesteten Prüfprodukten eine Reduktion der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) erfolgte. Dies entspricht den derzeitigen mikrobiologischen Anforderungen der TrinkwV an das Trinkwasser. Bei Betrachtung der Gesamtzellzahl wurde deutlich, dass nur mit Ozon eine Reduktion bis zur Nachweisgrenze (3,6x10³ GZZ/cm²) möglich war. Dies schließt jedoch nicht die Existenz von Mikroorganismen im System aus. Mit den anderen Verfahren konnte maximal eine Reduktion der GZZ/cm² von 2,83 log₁₀-Stufen (ClO₂) erreicht werden (Tab. 23). Durch die Anfertigung von REM - Aufnahmen der Schlauchoberfläche nach den durchgeführten Maßnahmen, konnte zudem veranschaulicht werden, dass die Biofilmmatrix nicht mit allen Verfahren entfernt werden konnte.

Tab. 23 Zusammenfassung der untersuchten Desinfektionsverfahren zur Behandlung nach TrinkwV §11 im Silikonschlauchmodell. Reduktionen der KBE/cm² und GZZ/cm² in log₁₀-Stufen nach Behandlungen mit Chlordioxid (ClO₂), freiem Chlor (Cl₂) aus ECA - Verfahren und Ozon (O₃). Die Ausgangswerte lagen bei 5,0x10⁶ KBE/cm² und 2,0x10⁷ GZZ/cm². Daraus resultieren maximale Reduktionen der KBE/cm² um 6,69 log₁₀ - Stufen bzw. der GZZ/cm² um 7,00 log₁₀ - Stufen.

Prüf- produkt	Wirkstoff	Konz. (mg/l)	Behandlungs- zeitraum	Reduktion der KBE/cm ² (log ₁₀ -Stufen)	Reduktion der GZZ/cm ² (log ₁₀ -Stufen)
1	ClO ₂	0,2	84 Tage	6,69	2,83
3	Cl ₂ aus ECA - Verfahren	0,3	84 Tage	6,69	1,32
4			28 Tage	6,69	1,10
5			84 Tage	4,02	1,61
			0,6	35 Tage	6,69
9	O ₃	0,1	14 Tage	6,69	7,00

Fettdruck: Reduktion bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²; 3,65 x 10³ GZZ/cm²)

3.1.5.2 Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion

Die Untersuchungen der Desinfektionsverfahren in der Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion haben gezeigt, dass mit allen getesteten Prüfprodukten eine Reduktion der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) möglich war. Bei Betrachtung der Gesamtzellzahl wurde deutlich, dass nur mit einer hohen Wirkstoffkonzentration von 25 mg/l freiem Chlor (aus ECA - Verfahren) eine Reduktion bis zur Nachweisgrenze möglich war. Mit den anderen Prüfprodukten konnte maximal eine Reduktion der GZZ/cm² um 0,85 log₁₀-Stufen (10.000 mg/l H₂O₂+Silber) erreicht werden (Tab. 24). Durch die Betrachtung der Schlauchoberfläche nach den Behandlungen konnte dokumentiert werden, dass die Biofilmmatrix nur partiell entfernt werden konnte. Sogar nach der Behandlung mit 25 mg/l freiem Chlor (aus ECA - Verfahren) waren noch Rückstände der Biofilmmatrix sichtbar.

Tab. 24 25 Zusammenfassung der untersuchten Desinfektionsverfahren in der Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion im Silikonschlauchmodell. Reduktionen der KBE/cm² und GZZ/cm² in log₁₀-Stufen nach Behandlungen mit Chlordioxid (ClO₂), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Kombination mit Silber (Ag) + Peressigsäure (PES) der Fruchtsäuren (FS) + Tenside (T). Die Ausgangswerte lagen bei 5,0x10⁶ KBE/cm² und 2,0x10⁷ GZZ/cm². Daraus resultieren maximale Reduktionen der KBE/cm² um 6,69 log₁₀-Stufen bzw. der GZZ/cm² um 7,00 log₁₀-Stufen.

Prüf- produkt	Wirkstoff	Konz. (mg/l)	Behandlungs- zeitraum	Reduktion der KBE/cm ² (log ₁₀ -Stufen)	Reduktion der GZZ/cm ² (log ₁₀ -Stufen)
1	ClO ₂	10	6 Stunden	6,69	0,02
4	Cl ₂ aus ECA -Verfahren	25	4 Stunden	6,69	7,00
6	H ₂ O ₂	30.000		0,34	
7	H ₂ O ₂ + Ag + PES	10.000		0,85	
8	H ₂ O ₂ + FS + T	100.000		0,33	

Fettdruck: Reduktion bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²; 3,65 x 10³ GZZ/cm²)

3.2 Untersuchungen zur Remanenzwirkung der Desinfektionsmittel

3.2.1 Untersuchungen zur Wiederverkeimung

Die Untersuchungen mit den chemischen Desinfektionsmaßnahmen haben gezeigt, dass eine vollständige Reduktion der koloniebildenden Einheiten mit den getesteten Verfahren möglich war. Nach fast allen Behandlungen waren jedoch bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl noch Mikroorganismen in den behandelten Silikonschläuchen nachweisbar. In der Folge wurde untersucht, ob bei den getesteten chemischen Desinfektionsverfahren eine nachhaltige Wirkung vorhanden ist.

Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Silikonschläuche, die mit der jeweils höchsten Konzentration eines Wirkstoffs desinfiziert wurden, wie vor der Behandlung an das Trinkwasserinstallationssystem im IHPH angeschlossen und für 14 Tage durchgängig mit Frischwasser durchströmt. Eine erneute Bestimmung der KBE/cm² zeigte, dass in allen Silikonschläuchen koloniebildende Einheiten nachweisbar waren. Im zu Beginn sterilen Silikonschlauch wachsen ohne eine Behandlung in den ersten 14 Tagen bis zu maximal 10³ KBE/cm² (vgl. Abb. 28). Unabhängig vom angewandten Desinfektionsverfahren wurden in den Silikonschläuchen >10⁶ KBE/cm² wiedergefunden. Nur bei den mit reinem Wasserstoffperoxid (5,1x10³ KBE/cm²) und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Silber (1,8x10⁵ KBE/cm²) behandelten Schläuchen waren die Werte niedriger. Sogar in den Schläuchen, in denen nach der Behandlung die Gesamtzellzahl bis zur Nachweisgrenze reduziert werden konnte (Stoßbehandlung mit 25 mg/l freies Chlor aus ECA - Verfahren und diskontinuierliche Behandlung mit 0,1 mg/l Ozon), waren die KBE/cm² auf >10⁶ angewachsen (Tab. 26). Diese Resultate belegten, dass so eine Stoßdesinfektionsmaßnahme nicht nachhaltig ist und durch nachfolgende Maßnahmen zur Vermeidung bzw. Kontrolle einer Wiederverkeimung ergänzt werden müssen.

Tab. 26 Untersuchungen zur Wiederverkeimung von behandelten Biofilmen mit verschiedenen Wirkstoffen. Die KBE/cm² waren nach der Behandlung jeweils bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) reduziert. Vor Beginn der Desinfektionsmaßnahme waren die KBE/cm² in allen Silikonschläuchen bei >10⁶. Nach 14 Tagen an der Trinkwasserinstallation war in allen Fällen ein erneutes Aufkeimen zu sehen.

Prüf- produkt	Wirkstoff	Behandlungsart	Konzentration (mg/l)	14 Tage nach Behandlung (KBE/cm ²)
1	ClO ₂	kontinuierlich	0,2	3,2 x 10 ⁶
		Stoßbehandlung	10	2,5 x 10 ⁶
3	Cl ₂ (aus ECA)	kontinuierlich	0,3	3,4 x 10 ⁶
4		kontinuierlich	0,3	1,2 x 10 ⁶
		Stoßbehandlung	25	2,5 x 10 ⁶
5		kontinuierlich	0,6	5,4 x 10 ⁶
6	H ₂ O ₂	Stoßbehandlung	30.000	5,1 x 10 ³
7	H ₂ O ₂ + Ag + PES	Stoßbehandlung	10.000	1,8 x 10 ⁵
8	H ₂ O ₂ + FS + T	Stoßbehandlung	100.000	3,5 x 10 ⁶
9	Ozon	diskontinuierlich	0,1	2,8 x 10 ⁶

3.2.2 Vergleich der Populationsdynamik der Biofilmorganismen vor und nach einer Desinfektion am Beispiel Wasserstoffperoxid

In Zusammenarbeit mit der TU Berlin wurden die für die Wirksamkeitsprüfung der chemischen Desinfektionsverfahren verwendeten Biofilme vor und nach der Behandlung auf deren Populationsgenetik untersucht. Die Untersuchungen erfolgten mit der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) (Abschnitt 2.5.9) über einen Vergleich der 16S rDNA (Abschnitt 2.5), der im Biofilm vorkommenden Mikroorganismen.

Es wurden unbehandelte und mit Wasserstoffperoxid in Kombination mit Zusatzstoffen, Silber + Peressigsäure (Prüfprodukt 7) oder Fruchtsäuren (Prüfprodukt 8) behandelte Biofilme 14 Tage nach der Behandlung miteinander verglichen. Somit erfolgten die Untersuchungen zu einem Zeitpunkt, an dem die KBE wieder angestiegen waren (vergleiche Abschnitt 3.2).

Die Untersuchungen offenbarten, dass in unbehandelten Biofilmen, unterschiedlichen Alters von 10 bzw. 14 Monaten, die Populationen nur zu 73% identisch waren (Abb. 27 A, Spur 6 - 7). Die Biofilmpopulation verändert sich teilweise im Laufe der Biofilmentwicklung. Zwei unabhängig voneinander gewachsene Biofilme im Alter von 14 Monaten zeigten nahezu

identische Bandenmuster (Abb. 27 A, Spur 7; B Spur 11), so dass bewiesen ist, dass Biofilme im gleichen Alter die gleichen Populationen beherbergen.

Die 14 Tage nach der Behandlung mit H_2O_2 und Silber untersuchten Biofilme waren in ihrer Populationszusammensetzung im Vergleich zu den unbehandelten Biofilmen noch zu 56% identisch (Abb. 27 B, Spur 11-12). Die mit H_2O_2 und Fruchtsäuren behandelten Biofilme zu 41% (Abb. 27). Die mit H_2O_2 und Silber behandelten Biofilme sind untereinander bis zu 84% identisch (Abb. 27 B, Spur 5-6). Die mit Wasserstoffperoxid und Fruchtsäuren behandelten Biofilme sogar zu 96% (Abb. 27 A, Spur 4-5). Die Populationen im mit Ozon behandelten Biofilm sind im Vergleich mit den mit H_2O_2 behandelten Biofilmen zu 53% identisch. Die Untersuchungen verdeutlichten, dass der zur Desinfektion eingesetzte Wirkstoff einen Einfluss auf die Zusammensetzung der neuen Biofilmpopulation hat.

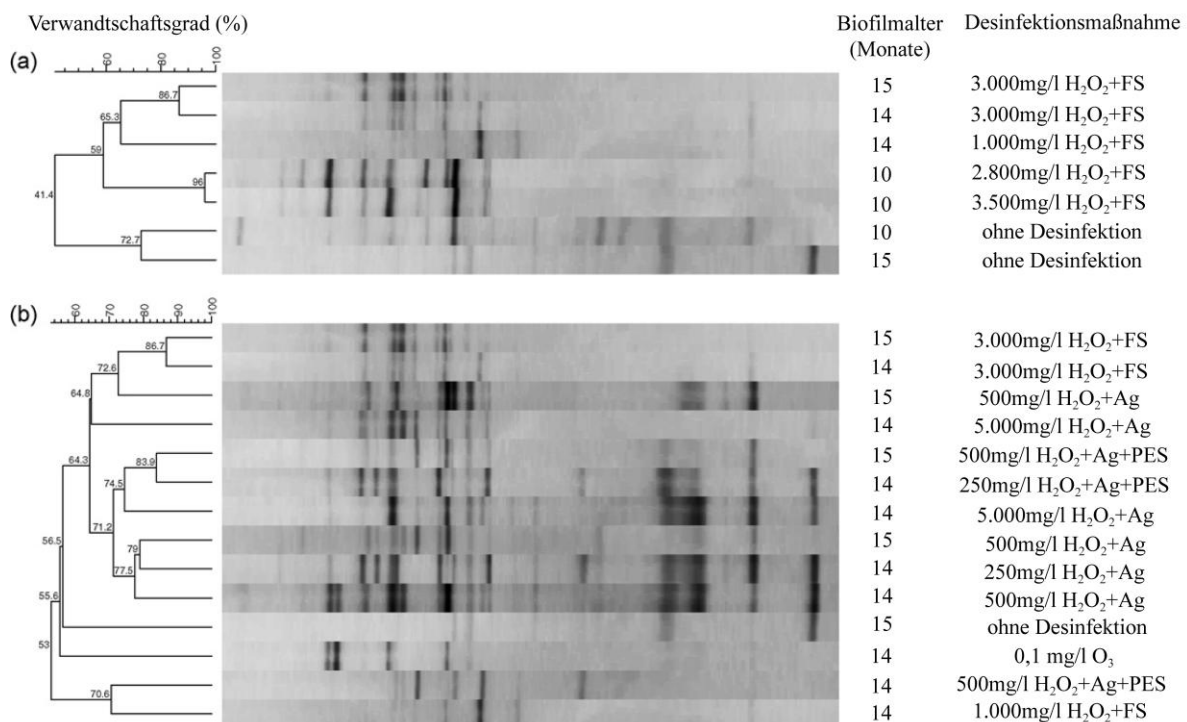


Abb. 27 Cluster-Analyse der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) - Banden der untersuchten Biofilme aus dem Silikonschlauchmodell. Die Unterschiede zwischen den DGGE - Mustern sind in Prozent angegeben. A) 10-15 Monate alte Biofilme vor und 14 Tage nach einer Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion mit verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) + Fruchtsäuren (FS). B) 14-15 Monate alte Biofilme vor und 14 Tage nach einer Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion mit verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 + FS; H_2O_2 + Silber (Ag) (+Peressigsäure (PES)) (modifiziert nach Roeder et al., 2010).

3.3 Biofilmwachstum im Silikonschlauchmodell im Vergleich zum praxisrelevanten Material EPDM

Welche Anforderungen an Schlauchmaterialien gestellt werden, die für die Wasserführenden Leitungen der Trinkwasserinstallation eingesetzt werden dürfen, ist im Arbeitsblatt W 543 des DVGW (2005) festgelegt. Außerdem müssen die Materialien nach dem Arbeitsblatt W 270 (2008a) und den KTW - Empfehlungen (DVGW, 1977) geprüft sein. Das im Silikonschlauchmodell zur Generierung von Biofilmen verwendete Silikon entspricht diesen Anforderungen nicht und ist somit kein zulässiges Material für die Verwendung in Trinkwasserleitungen. Um die Übertragbarkeit des Silikonschlauchmodells in die Praxis zu überprüfen wurden Biofilmuntersuchungen mit einem nach KTW geprüften und zugelassenen vergleichbaren Material durchgeführt, das in der Trinkwasserinstallation verbaut ist. Als Vergleichsmaterial wurde Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM) gewählt. Seitdem das UBA 2006 eine neue Leitlinie veröffentlicht hat, wird die 2. KTW - Empfehlungen für verschiedene Kunststoffe durch diese ersetzt. Seitdem erfüllt EPDM die Anforderungen nicht mehr, ist jedoch im Großteil der Trinkwasserinstallationen noch vorhanden und somit als relevantes Vergleichsmaterial geeignet.

3.3.1 Ergebnisse der Biofilmuntersuchungen im EPDM-Schlauch

Weil keine EPDM-Schläuche mit dem gleichen Innendurchmesser wie dem der verwendeten Silikonschläuche verfügbar waren, wurden die Versuche mit Schläuchen mit einem Innendurchmesser von 12 mm durchgeführt, wie sie auch in der Trinkwasserinstallation eingesetzt wurden. Die verwendeten EPDM - Schläuche waren KTW-C und W270 geprüft. Die EPDM - Schläuche wurden zunächst autoklaviert und, wie die verwendeten Silikonschläuche, an die Trinkwasserinstallation im IHPH angeschlossen und für einen Zeitraum von zwei Jahren mit Frischwasser durchflossen, damit sich aus der autochthonen Wasserflora ein Biofilm bilden konnte. In der Anfangsphase wurde alle sieben Tage die Anzahl der KBE/cm² bestimmt, wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben. In den ersten Wochen war eine stetige Zunahme der KBE/cm² zu beobachten. Nach 48 Tagen waren die KBE/cm² bis auf $2,8 \times 10^5$ angewachsen. Bei den Bestimmungen der folgenden Wochen und Monate blieb der Wert konstant in der stationären Phase in einer Größenordnung von 10^5 KBE/cm² (Abb. 28 blau). Im Silikonschlauch ist die stationäre Phase mit $\sim 5,0 \times 10^6$ KBE/cm² nach ca. drei Monaten erreicht (Abb. 28 rot). Im Vergleich zum Wachstum der KBE/cm² im

Silikonschlauch ist im EPDM - Schlauch die stationäre Phase bei einer um ca. eine \log_{10} -Stufe niedrigeren Besiedlung erreicht.

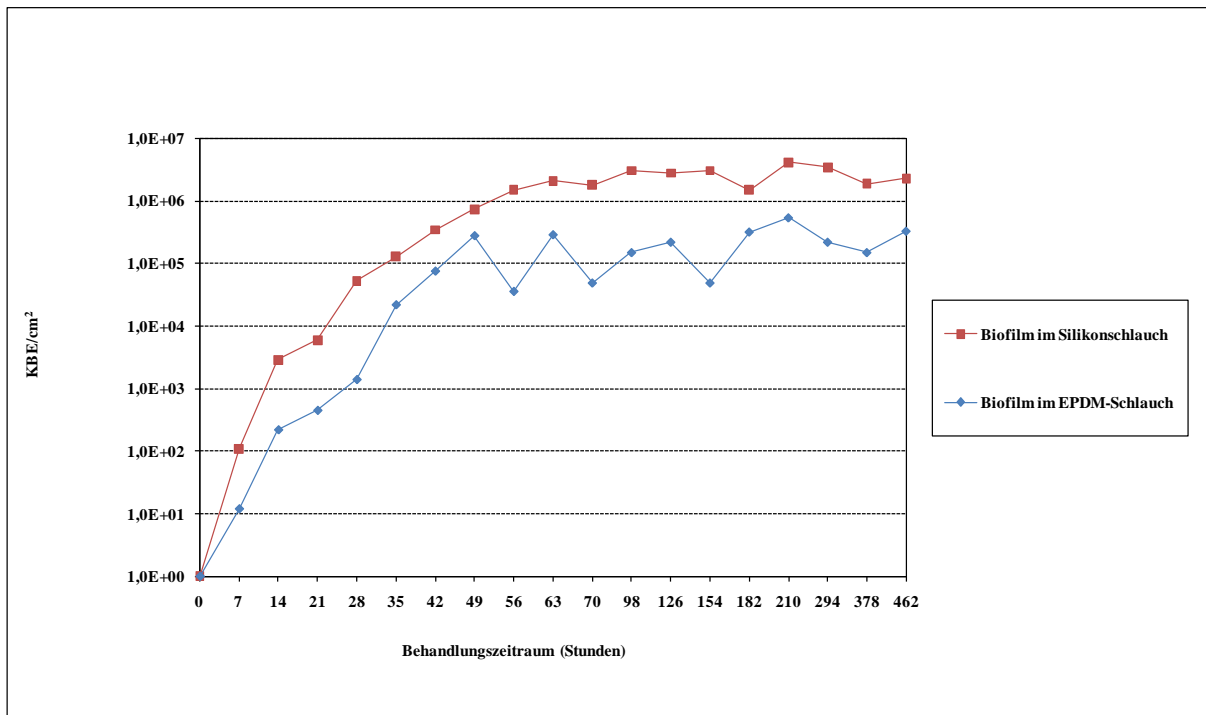


Abb. 28 Entwicklung der KBE/cm² im EPDM - Schlauch im Vergleich zum Silikon-schlauch über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr.

Außerdem wurde im EPDM-Schlauch nach dem Erreichen der stationären Phase der KBE/cm² die Gesamtzellzahl bestimmt. Die GZZ/cm² betrug nach einem Zeitraum von ca. einem Jahr $2,3 \times 10^6$ und war somit ebenfalls ca. eine \log_{10} -Stufe niedriger als im Silikon-schlauch (Tab. 27). REM - Aufnahmen zeigten, dass die Oberfläche des sterilen EPDM-Schlauchs nicht die für den Silikon-schlauch typischen Produktionsmuster aufweisen. Die Oberflächenstruktur ist jedoch vergleichbar (Abb. 29 A, C). Nach einem Jahr hat sich auf dem EPDM - Schlauch, wie auf dem Silikon-schlauch eine flächendeckende Biofilmmatrix gebildet (Abb. 29 B, D).

Tab. 27 Ausgangswerte Prüfmaterialien, Vergleich EPDM mit Silikon.

Material	Silikon	EPDM
Prüfsiegel	nein	KTW-C, W270
Innendurchmesser	4 mm	12 mm
Biofilmalter	1-2 Jahre	1-2 Jahre
KBE/cm ²	~5,0x10 ⁶	~6,0x10 ⁵
GZZ/cm ²	~ 2,0x10 ⁷	~3,0x10 ⁶

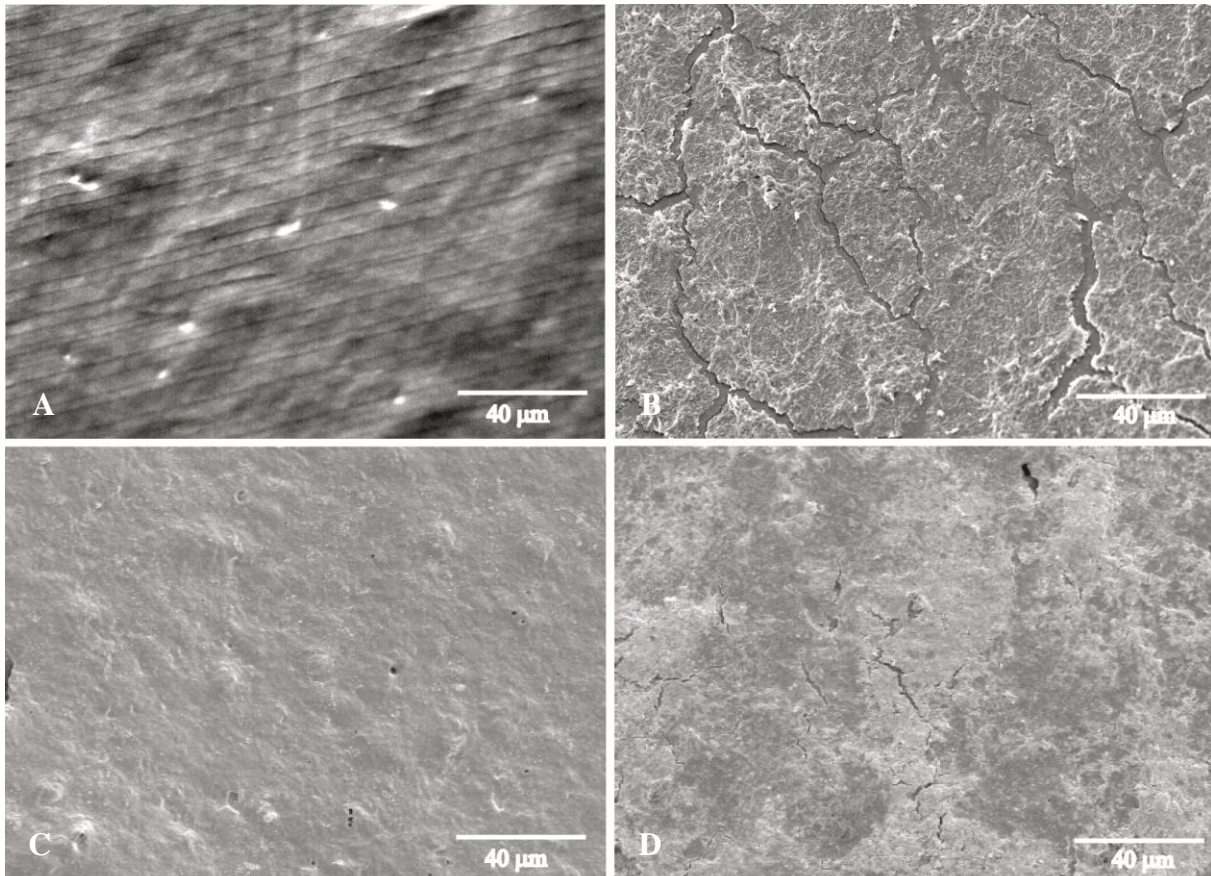


Abb. 29 REM-Aufnahmen der Oberflächen von Silikon - und EPDM - Schlauch im Vergleich. A) steriler Silikonschlauch B) Silikonschlauch mit 1 Jahr alten Biofilm C) steriler EPDM - Schlauch D) EPDM - Schlauch mit 1 Jahr alten Biofilm. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.3.2 Überprüfung der Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsverfahren auf Biofilme im EPDM - Schlauch

Die in Abschnitt 3.1 im Silikonschlauch untersuchten Prüfprodukte wurden zum Vergleich im EPDM-Schlauch getestet. Alle durchgeführten Untersuchungen mit dem EPDM -

Schlauch wurden als Stoßbehandlung (Abschnitt 2.2.2.2) äquivalent zu vorherigen Untersuchungen mit dem Silikonschlauchmodell durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit den Prüfprodukten 1 (Chlordioxid), 4 (freies Chlor aus ECA - Verfahren) und 8 (Wasserstoffperoxid in Kombination mit Fruchtsäuren) durchgeführt.

3.3.2.1 Prüfprodukt 1: Chlordioxid (pH 2)

Die Stoßbehandlungen mit dem Prüfprodukt 1 wurden in einem Behandlungszeitraum von sechs Stunden mit Wirkstoffkonzentrationen von 5 und 10 mg/l Chlordioxid durchgeführt. Die Behandlung mit 5 mg/l ClO_2 führte zu einer Reduktion der KBE/cm^2 um 3,55 \log_{10} -Stufen auf $8,0 \times 10^1 \text{ KBE}/\text{cm}^2$. Mit einer Wirkstoffkonzentration von 10 mg/l ClO_2 konnten die KBE/cm^2 um 4,45 \log_{10} -Stufen auf $1,0 \times 10^1 \text{ KBE}/\text{cm}^2$ reduziert werden. Bei der Gesamtzellzahl führten die Behandlungen zu Reduktionen von 1,74 \log_{10} -Stufen (auf $4,2 \times 10^4 \text{ GZZ}/\text{cm}^2$ bei 5 mg/l ClO_2) und 2,48 \log_{10} -Stufen (auf $1,3 \times 10^4 \text{ GZZ}/\text{cm}^2$ bei 5 mg/l ClO_2) (Tab. 28). Selbst mit der hohen getesteten ClO_2 - Konzentration von 10 mg/l konnte die Biofilmmatrix nur partiell entfernt werden. Der Großteil des Biofilms ist noch im Schlauch vorhanden (Abb. 30).

Tab. 28 Ergebnisse der Untersuchung von KBE/cm^2 und GZZ/cm^2 bei der Wirksamkeitsprüfung von Chlordioxid (pH 2) im EPDM-Schlauch. Das Prüfprodukt wurde in der Simulation zur Anlagendesinfektion getestet.

Typ	Konz. [mg/l]	Behandlungszeitraum	KBE/cm^2 (nach Behandlung)	GZZ/cm^2 (nach Behandlung)
Ausgangswert			$\sim 6,0 \times 10^5$	$\sim 3,0 \times 10^6$
Anlagendesinfektion	5	6 Stunden	$8,0 \times 10^1$	$4,2 \times 10^4$
	10	6 Stunden	$1,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^4$

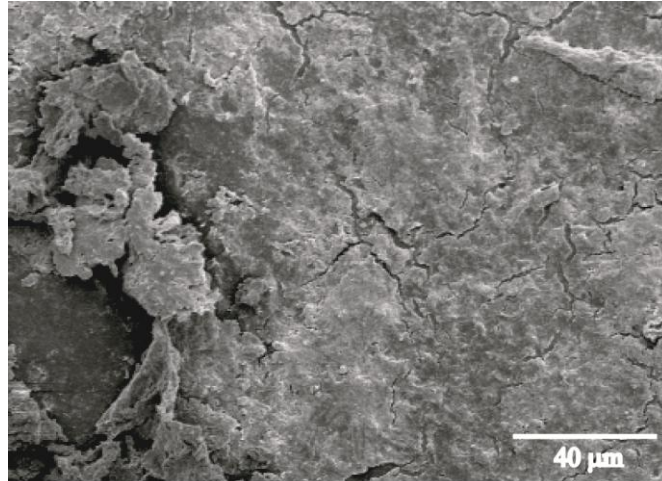


Abb. 30 REM - Aufnahmen der EPDM - Schlauchoberfläche nach der Behandlung mit 10 mg Chlordioxid für 6 Stunden bei 1000x Vergrößerung.

3.3.2.2 Prüfprodukt 4: freies Chlor aus ECA – Verfahren (pH 7)

Die Stoßbehandlungen mit dem Prüfprodukt 4 wurden mit Wirkstoffkonzentrationen von 1, 10 und 25 mg/l freiem Chlor aus einem ECA - Verfahren über einen Behandlungszeitraum von sechs Stunden durchgeführt. Mit höheren Wirkstoffkonzentrationen konnten entsprechend höhere Reduktionen der KBE/cm² erreicht werden: bei 1 mg/l von 2,24 log₁₀-Stufen auf 1,6x10³ KBE/cm² und bei 10 mg/l von 4,27 log₁₀-Stufen auf 1,5x10¹ KBE/cm². Die Gesamtzellzahl konnte bei 1 mg/l um 1,51 log₁₀-Stufen auf 7,1x10⁴ GZZ/cm² reduziert werden, bei 10 mg/l lag sie unterhalb der Nachweisgrenze (3,65x10³ GZZ/cm²). Bei der Behandlung mit 25 mg/l konnten sowohl die KBE/cm², als auch die GZZ/cm² bis zur Nachweisgrenze reduziert werden (Tab. 29). Nach der Behandlung mit der höchsten getesteten Wirkstoffkonzentration von 25 mg/l freiem Chlor war die Biofilmmatrix noch flächendeckend auf der Schlauchoberfläche sichtbar (Abb. 31).

Tab. 29 Ergebnisse der Untersuchungen auf KBE/cm² und GZZ/cm² bei der Wirksamkeitsprüfung von freiem Chlor aus einem ECA - Verfahren (pH 7) im EPDM-Schlauch. Das Prüfprodukt wurde in der Simulation zur Anlagendesinfektion getestet.

Typ	Konz. [mg/l]	Behandlungszeitraum	KBE/cm ² (nach Behandlung)	GZZ/cm ² (nach Behandlung)
Ausgangswert			~6,0x10⁵	~3,0x10⁶
Anlagendesinfektion	1	6 Stunden	1,6 x 10 ³	7,1 x 10 ⁴
	10	6 Stunden	1,5 x 10 ¹	u.N.
	25	6 Stunden	u.N.	u.N.

u.N.: unter Nachweisgrenze (0 KBE/cm²; 3,65 x 10³ GZZ/cm²)

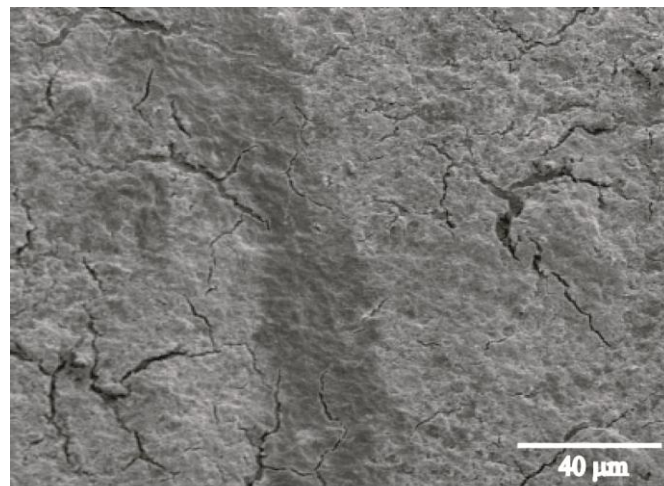


Abb. 31 REM - Aufnahmen der EPDM - Schlauchoberfläche nach der Behandlung mit 25 mg/l freiem Chlor aus einem ECA - Verfahren (pH 7) für 6 Stunden bei 1000x Vergrößerung.

3.3.2.3 Prüfprodukt 8: Wasserstoffperoxid + Fruchtsäuren (pH 2)

Stoßbehandlungen mit dem Prüfprodukt 8 wurden über einen Behandlungszeitraum von vier Stunden und bei Wirkstoffkonzentrationen von 10.000 mg/l und 100.000 mg/l H₂O₂ (+ Fruchtsäuren) durchgeführt. Parallel wurden die Versuche bei gleicher H₂O₂-Konzentration mit einem Zusatz von 5 mg/l Tensiden durchgeführt. Alle Behandlungen führten zur Reduktion der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²). Die GZZ/cm² konnte bei den Behandlungen mit H₂O₂ und Fruchtsäuren um 0,72 log₁₀-Stufen (auf 4,4 x 10⁵ GZZ/cm² bei 10.000 mg/l) und 0,75 log₁₀-Stufen (auf 4,1 x 10⁵ GZZ/cm² bei 100.000 mg/l) verringert werden. Die Behandlungen mit dem Zusatz von Tensiden führten

ebenfalls in allen Anwendungen zur Reduktion KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze. Die GZZ/cm² konnte bei einer H₂O₂ - Konzentration von 10.000 mg/l um 1,56 log₁₀-Stufen (auf 6,3x10⁴ GZZ/cm²) und bei 100.000 mg/l um 1,55 log₁₀-Stufen (auf 6,5x10⁴ GZZ/cm²) reduziert werden (Tab. 30). Die Behandlung mit 100.000 mg/l H₂O₂ + Fruchtsäuren führte nur zu einem partiellen Ablösen des Biofilms von der Schlauchoberfläche (Abb. 32).

Tab. 30 Ergebnisse der Untersuchung auf KBE/cm² und GZZ/cm² bei der Wirksamkeitsprüfung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Kombination mit Fruchtsäuren (FS) (pH 2) und vergleichsweise einem Zusatz von Tensiden (T) im EPDM - Schlauch. Das Prüfprodukt wurde in der Simulation zur Anlagendesinfektion getestet.

Typ	Konz. H ₂ O ₂ [mg/l]	Behandlungs- zeiraum	KBE/cm ² (nach Behandlung)	GZZ/cm ² (nach Behandlung)
Ausgangswert			~6,0x10⁵	~3,0x10⁶
Anlagendesinfektion	10.000 + FS	4 Stunden	u.N.	4,4 x 10 ⁵
	100.000 + FS	4 Stunden	u.N.	4,1 x 10 ⁵
	10.000 + FS + T	4 Stunden	u.N.	6,3 x 10 ⁴
	100.000 + FS +T	4 Stunden	u.N.	6,5 x 10 ⁴



Abb. 32 REM - Aufnahmen der EPDM - Schlauchoberfläche nach der Behandlung mit 100.000 mg/l H₂O₂ + Fruchtsäuren für 4 Stunden bei 1000x Vergrößerung.

3.3.3 Zusammenfassung der Untersuchungen mit dem Material EPDM im Vergleich zum Silikon

Das Biofilmwachstum auf EPDM ist sowohl bei den KBE/cm², als auch bei der GZZ/cm² eine log₁₀-Stufe niedriger, als auf Silikon. Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass sich die Reduktionen der KBE/cm² auf den Schlauchmaterialien Silikon und EPDM um weniger als eine log₁₀-Stufe unterschieden. Bei der Bestimmung der GZZ/cm² waren auf EPDM bei den meisten Behandlungen zum Silikon erhöhte Reduktionen erreicht worden (Tab. 31). Generell sind die Reduktionen auf beiden Materialien in einer vergleichbaren Größenordnung. Die Ergebnisse, die mit dem Silikonschlauchmodell erzielt werden, sind auf in der Trinkwasserinstallation verwendete Materialien übertragbar. Silikon ist so somit als Trägermaterial für Biofilmuntersuchungen geeignet.

Tab. 31 Reduktionen der KBE/cm² und GZZ/cm² in log₁₀-Stufen nach Stoßbehandlungen mit versch. Konzentrationen Chlordioxid (ClO₂), freiem Chlor (Cl₂) aus ECA - Verfahren, und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) + Fruchtsäuren (FS) + Tenside (T) im Vergleich im Silikon- und EPDM - Schlauch. Die Ausgangswerte im Silikonschlauch lagen bei 5,0x10⁶ KBE/cm² und 2,0x10⁷ GZZ/cm². Daraus resultieren maximale Reduktionen der KBE/cm² um 6,69 log₁₀ - Stufen bzw. der GZZ/cm² um 7,00 log₁₀ - Stufen. Im EPDM - Schlauch lagen sie bei 6,0x10⁵ KBE/cm² und 3,0x10⁶ GZZ/cm². Daraus resultieren maximale Reduktionen der KBE/cm² um 5,45 log₁₀ - Stufen bzw. der GZZ/cm² um 6,36 log₁₀ - Stufen.

Prüf- produkt	Wirkstoff	Konz. (mg/l)	Reduktion im Silikonschlauch (log ₁₀ -Stufen)		Reduktion im EPDM- Schlauch (log ₁₀ -Stufen)	
			KBE/cm ²	GZZ/cm ²	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
1	ClO ₂	5	4,37	0,34	3,55	1,74
		10	5,45	0,49	4,45	2,48
4	Cl ₂ aus ECA - Verfahren	1	2,30	0,76	2,24	1,51
		10	4,98	1,61	4,27	6,36
		25	6,69	7,00	5,45	6,36
8	H ₂ O ₂ + FS	10.000	6,69	1,40	5,45	0,72
		100.000	6,69	0,64	5,45	0,75
	H ₂ O ₂ + FS + T	10.000	6,69	0,41	5,45	1,56
		100.000	6,69	1,60	5,45	1,55

Fettdruck: Reduktion bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²; 3,65 x 10³ GZZ/cm²)

3.4 Untersuchungen mit dem Hygiene-Monitor

Der Hygiene - Monitor stellt ein praxisorientiertes System dar, welches die Untersuchung der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren am Durchführungsort einer Maßnahme ermöglicht. Der in den Hygiene - Monitor integrierte Silikonschlauch wird mit demselben behandelten Wasser durchströmt, wie das zu desinfizierende Leitungssystem (Abschnitt 2.2.2.3). Mit den Analysen des Silikonschlauchs kann dokumentiert werden, ob eine Maßnahme erfolgreich einen bestehenden Biofilm entfernen oder eine Biofilmneubildung verhindern kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Hygiene - Monitor Untersuchungen mit sterilen Silikonschläuchen auf eine mögliche Biofilmbildung durchgeführt. Zudem wurden mit kontaminierten Schläuchen zwei Desinfektionsmaßnahmen vor Ort die als Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion und mit einem sterilen Schlauch eine kontinuierliche Behandlung begleitet.

3.4.1 Untersuchungen zur Biofilmbildung

Der Hygiene - Monitor wurde an verschiedenen Standorten in Deutschland eingesetzt. Dies sollte zeigen, ob das Biofilmwachstum im Silikonschlauchmodell repräsentativ für alle Trinkwasserinstallationen ist oder nur bedingt durch die autochthone Wasserflora des Bonner Wassers aus dem Wahnbachtalsperrenverband auftritt. Dafür wurden parallel in Bonn, Berlin und Mülheim an der Ruhr (a.d.R.) Hygiene - Monitore mit integrierten sterilen Silikonschläuchen an eine Trinkwasserinstallation angeschlossen. Die Silikonschläuche wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen kontinuierlich mit Frischwasser aus der Trinkwasserinstallation durchflossen und abschließend wurden die KBE/cm² und die GZZ/cm² bestimmt. Zudem wurden REM - Aufnahmen der Schlauchoberfläche angefertigt, um eine potentielle Biofilmbildung zu visualisieren.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich an allen untersuchten Standorten innerhalb von 14 Tagen an allen Standorten ein Biofilm im Silikonschlauch gebildet hat. In Bonn lag die Zahl der KBE/cm² mit $3,33 \times 10^3$ KBE/cm² in einem vergleichbaren Bereich wie in Berlin mit $6,9 \times 10^3$ KBE/cm². In Mülheim a.d.R. lag die Zahl der KBE/cm² mit $2,22 \times 10^5$ deutlich höher. Die Gesamtzellzahl war in Bonn mit $1,02 \times 10^5$ GZZ/cm² und in Berlin mit $5,20 \times 10^5$ GZZ/cm² ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich. In Mülheim a.d.R. war der Wert mit $1,16 \times 10^6$ GZZ/cm² erneut höher, als an den anderen Standorten (Tab. 32). An allen drei

Untersuchungsorten war die Ansiedlung von Mikroorganismen und der Beginn der Ausbildung einer Biofilmmatrix zu erkennen (Abb. 33). An allen untersuchten Standorten konnte somit eine Biofilmbildung im Silikonschlauch beobachtet werden. Die Biofilmbildung im Silikonschlauchmodell am IHPH ist repräsentativ.

Tab. 32 Analyse der im Hygiene - Monitor integrierten sterilen Silikonschläuche, die an verschiedenen Standorten an Trinkwasserinstallationen angeschlossen waren. Es wurden jeweils die KBE/cm² und die GZZ/cm² bestimmt, zudem wurden REM - Aufnahmen der Schlauchoberfläche angefertigt. Der Untersuchungszeitraum betrug 14 Tage.

Bestimmung	vor Anschluss	Bonn	Berlin	Mülheim a.d.R.
KBE/cm ²	n.n.	3,33x10 ³	6,79x10 ³	2,22x10 ⁵
GZZ/cm ²	n.n.	1,02x10 ⁵	5,20x10 ⁵	1,19x10 ⁶

n.n. = nicht nachweisbar

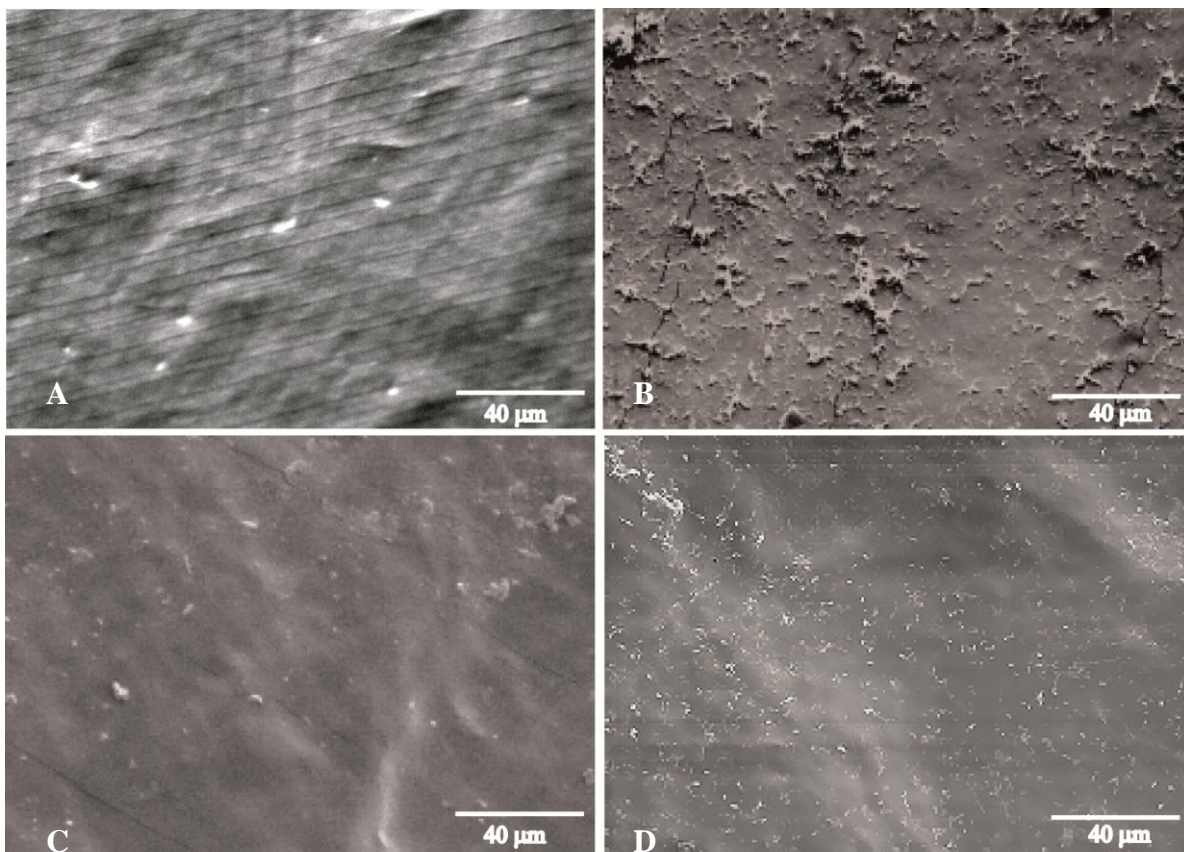


Abb. 33 REM - Aufnahmen von Oberflächen der Silikonschläuche, die für 14 Tage an eine Trinkwasserinstallation in verschiedenen Städten in Deutschland angeschlossen waren. A) steriler Schlauch vor dem Anschluss B) Biofilm in Bonn C) Biofilm in Berlin D) Biofilm in Mülheim a.d.R. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.4.2 Begleitung von Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion

Mit dem Hygiene - Monitor wurden zwei Desinfektionsmaßnahmen an verschiedenen Einsatzorten begleitet. Es wurden jeweils Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion mit 800 mg/l Wasserstoffperoxid + 25 mg/l Silber für 12 Stunden durchgeführt. In den Hygiene - Monitor war ein mit einem ein Jahr alten Biofilm kontaminierter Silikonschlauch integriert. Der Hygiene - Monitor wurde jeweils endständig an das System angeschlossen.

Am Einsatzort 1 konnten durch die Maßnahme die KBE/cm² im Silikonschlauch von $5,0 \times 10^6$ um $3,77 \log_{10}$ -Stufen auf $9,3 \times 10^2$ reduziert werden. Die GZZ/cm² wurde von $2,0 \times 10^7$ um $1,46 \log_{10}$ -Stufen auf $3,4 \times 10^5$ verringert. Auf der Schlauchoberfläche waren nach der Maßnahme nur noch vereinzelte Rückstände der Biofilmmatrix zu sehen (Abb. 34 A).

Die Untersuchungen des Biofilms im Hygiene - Monitor bei der zweiten Maßnahme am Einsatzort 2 zeigten, dass die KBE/cm² von $5,0 \times 10^6$ um $1,47 \log_{10}$ -Stufen auf $1,9 \times 10^5$ reduziert werden konnte. Die GZZ/cm² wurde von $2,0 \times 10^7$ um $0,2 \log_{10}$ -Stufen auf $9,5 \times 10^6$ herabgesetzt. Die Auswertungen der REM - Aufnahmen der Schlauchoberfläche ergaben, dass die Biofilmmatrix nach der Behandlung noch vollständig vorhanden war (Abb. 34 B). Die identisch durchgeführten Maßnahmen führten somit zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Tab. 33 Bestimmung der Untersuchung auf KBE/cm² und GZZ/cm² bei der Begleitung von Desinfektionsmaßnahmen mit 800 mg/l Wasserstoffperoxid (H₂O₂) + 25 mg/l Silber (Ag) über einen Behandlungszeitraum von 12 Stunden mit dem Hygiene - Monitor.

Typ	Konz. H ₂ O ₂ [mg/l]	Behandlungs- zeitraum	KBE/cm ² (nach Behandlung)	GZZ/cm ² (nach Behandlung)
Ausgangswert			~$5,0 \times 10^6$	~$2,0 \times 10^7$
Einsatzort 1	800 + Ag	12 Stunden	$9,3 \times 10^2$	$3,4 \times 10^5$
Einsatzort 2	800 + Ag	12 Stunden	$1,9 \times 10^5$	$9,5 \times 10^6$

u.N. = unter Nachweisgrenze (0 KBEcm^2 ; $3,65 \times 10^3 \text{ GZZ/cm}^2$)

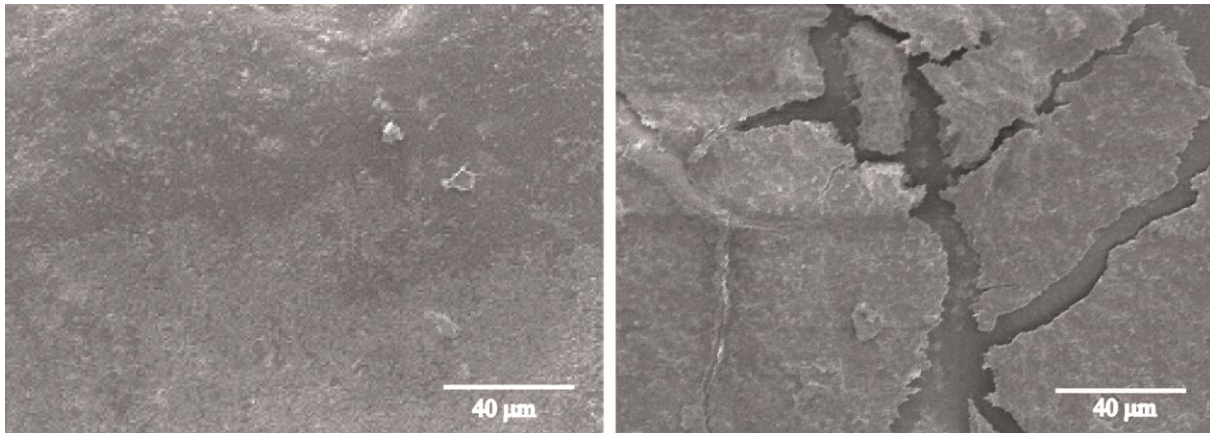


Abb. 34 REM - Aufnahmen von Oberflächen der Silikonschläuche, der mit Biofilm kontaminierten Schlauroberflächen bei der Begleitung von zwei Desinfektionsmaßnahmen. Die Stoßbehandlungen wurden jeweils für 12 h mit 800 mg/l H_2O_2 + 25 mg/l Ag durchgeführt A) Nach Desinfektionsmaßnahme am ersten Einsatzort B) Nach Desinfektionsmaßnahme am zweiten Einsatzort. Aufnahmen bei 1000x Vergrößerung.

3.4.3 Begleitung einer kontinuierlichen Behandlung in einer mit *Pseudomonas aeruginosa* kontaminierten Trinkwasserinstallation

In einer neu installierten Trinkwasserinstallation wurde im Trinkwasser *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen. Es wurde ermittelt, dass die Kontamination ihren Ursprung in einem Biofilm in der Trinkwasserinstallation hat. Um die Kontamination zu beseitigen, wurde mit einer, nach TrinkwV §11 zulässigen, kontinuierliche Behandlung mit 0,2 mg/l Chlordioxid begonnen. Um zu überprüfen, ob die Behandlung die Kontamination beseitigen konnte, wurden zu den regelmäßig entnommenen Wasserproben zusätzlich zwei Hygiene - Monitore installiert. In diese waren sterile Silikonschläuche integriert, um den Erfolg der Desinfektionsmaßnahme bzgl. einer Verhinderung der Biofilmbildung und speziell der Vermeidung einer Ansiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* auf der Schlauchoberfläche zu dokumentieren. Der erste Hygiene - Monitor wurde direkt an der Einimpfstelle des Chlordioxids installiert, um die Wirksamkeit der Behandlung mit der vollständigen zugesetzten Chlordioxidkonzentration überprüfen zu können (Abb. 35). Der zweite Hygiene - Monitor wurde am entferntesten Punkt der Trinkwasserinstallation ausgehend von der Einimpfstelle angebracht. Dadurch sollte überprüft werden, ob am Ende des Systems der Wirkstoff noch in ausreichender Konzentration zur Verhinderung einer Biofilmbildung vorliegt. (Abb. 36). Bei den Probenahmen wurden jeweils die KBE/cm² und die GZZ/cm² bestimmt, die gewachsenen Kolonien wurden mittels einer Analyse der 16Sr - DNA

(Abschnitt 2.5) bestimmt. Außerdem wurden REM - Aufnahmen der Schlauchoberflächen angefertigt.



Abb. 35 Hygiene-Monitor mit sterilem Silikonschlauch an der Einimpfstelle.



Abb. 36 Hygiene-Monitor mit sterilem Silikonschlauch am Systemende.

Die erste Untersuchung erfolgte nach 21 Behandlungstagen. An der Einimpfstelle wurden $4,6 \times 10^2$ KBE/cm² nachgewiesen. Nach 54 Behandlungstagen wurden mit $3,6 \times 10^1$ KBE/cm² weniger koloniebildende Einheiten nachgewiesen. Nach 92 Behandlungstagen war mit $8,2 \times 10^3$ KBE/cm² ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Nach 92 Tagen wurden neue sterile Silikonschläuche in die Hygiene-Monitore eingesetzt. 23 Tage nach dem Wechsel wurden auf dem neuen Schlauch an der Einimpfstelle $8,6 \times 10^1$ KBE/cm² detektiert. 53 Tage nach dem Wechsel betrug der ermittelte Wert $1,3 \times 10^3$ KBE/cm². Die GZZ/cm² lag an der Einimpfstelle über den gesamten Untersuchungszeitraum unterhalb der Nachweisgrenze ($3,65 \times 10^3$ GZZ/cm²).

Im Hygiene - Monitor am Systemende lag nach den ersten 21 Behandlungstagen mit $4,5 \times 10^4$ KBE/cm² ein stärkeres Wachstum als an der Einimpfstelle vor. Die GZZ/cm² betrug $4,6 \times 10^4$. Nach 54 Tagen war die KBE/cm² mit $5,1 \times 10^2$ niedriger als nach 21 Tagen. Die GZZ/cm² blieb mit $2,4 \times 10^4$ auf demselben Niveau. Bei der Untersuchung nach 92 Behandlungstagen lag die KBE/cm² mit $8,2 \times 10^3$ auf dem gleichen Level wie an der Einimpfstelle, die GZZ/cm² lag unterhalb der Nachweisgrenze. Nach dem Schlauchwechsel lag die Zahl der KBE/cm² mit $5,4 \times 10^3$ nach 23 Behandlungstagen und $2,0 \times 10^3$ nach 53 Tagen zwei log₁₀-Stufen über den Werten an der Einimpfstelle. Die GZZ/cm² lag an den Untersuchungstagen jeweils unterhalb der Nachweisgrenze (Tab. 14).

Das Wachstum von Mikroorganismen in den Silikonschläuchen konnte durch die kontinuierliche Behandlung mit 0,2 mg/l Chlordioxid nicht vollständig verhindert werden. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass im Vergleich zum Biofilmwachstum im Silikonschlauchmodell, die Biofilmbildung stark vermindert ist (vgl. Abb. 28).

Tab. 34 Bestimmung von KBE/cm² und GZZ/cm² in den Hygiene - Monitoren an der Einimpfstelle und am Systemende

Behandlungszeitraum (Tage)	Probenahmestelle	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
21	Einimpfstelle	4,6x10 ²	u.N.
21	Systemende	4,5x10 ⁴	4,6x10 ⁴
54	Einimpfstelle	3,6x10 ¹	u.N.
54	Systemende	5,1x10 ²	2,4x10 ⁴
92	Einimpfstelle	8,2x10 ³	u.N.
92	Systemende	2,8x10 ³	u.N.
Wechsel der Silikonschläuche			
23	Einimpfstelle	8,6x10 ¹	u.N.
23	Systemende	5,4x10 ³	u.N.
53	Einimpfstelle	1,3x10 ³	u.N.
53	Systemende	2,0x10 ³	u.N.

u.N. = unter Nachweisgrenze (3,65x10³ GZZ/cm²)

Durch die visuelle Dokumentation mittels REM - Aufnahmen war zu erkennen, dass sich auf den Silikonschläuchen in den eingesetzten Hygiene - Monitoren über den gesamten Untersuchungszeitraum Kolonien auf der Schlauchoberfläche angesiedelt haben (Abb. 37 C-F). Am Systemende waren mehr Kolonien und erste Ablagerungen von organischem Material zu sehen als an der Einimpfstelle. Zudem wurde die Oberflächenstruktur beider Silikonschläuche im Laufe der Chlordioxidbehandlung verändert. Es waren keine anfänglichen Strukturen der Schlauchoberfläche mehr zu erkennen (vgl. Abb. 37 A).

Diese erzielten Ergebnisse veranschaulichen, dass eine Ansiedlung von Mikroorganismen und die Ausbildung einer Biofilmmatrix auf der Schlauchoberfläche mit der durchgeführten Maßnahme nicht vollständig verhindert werden konnte. Im Vergleich zur Ausbildung der Biofilmmatrix im Silikonschlauchmodell nach 30 Tagen ist sie jedoch deutlich minimiert (Abb. 37 B).

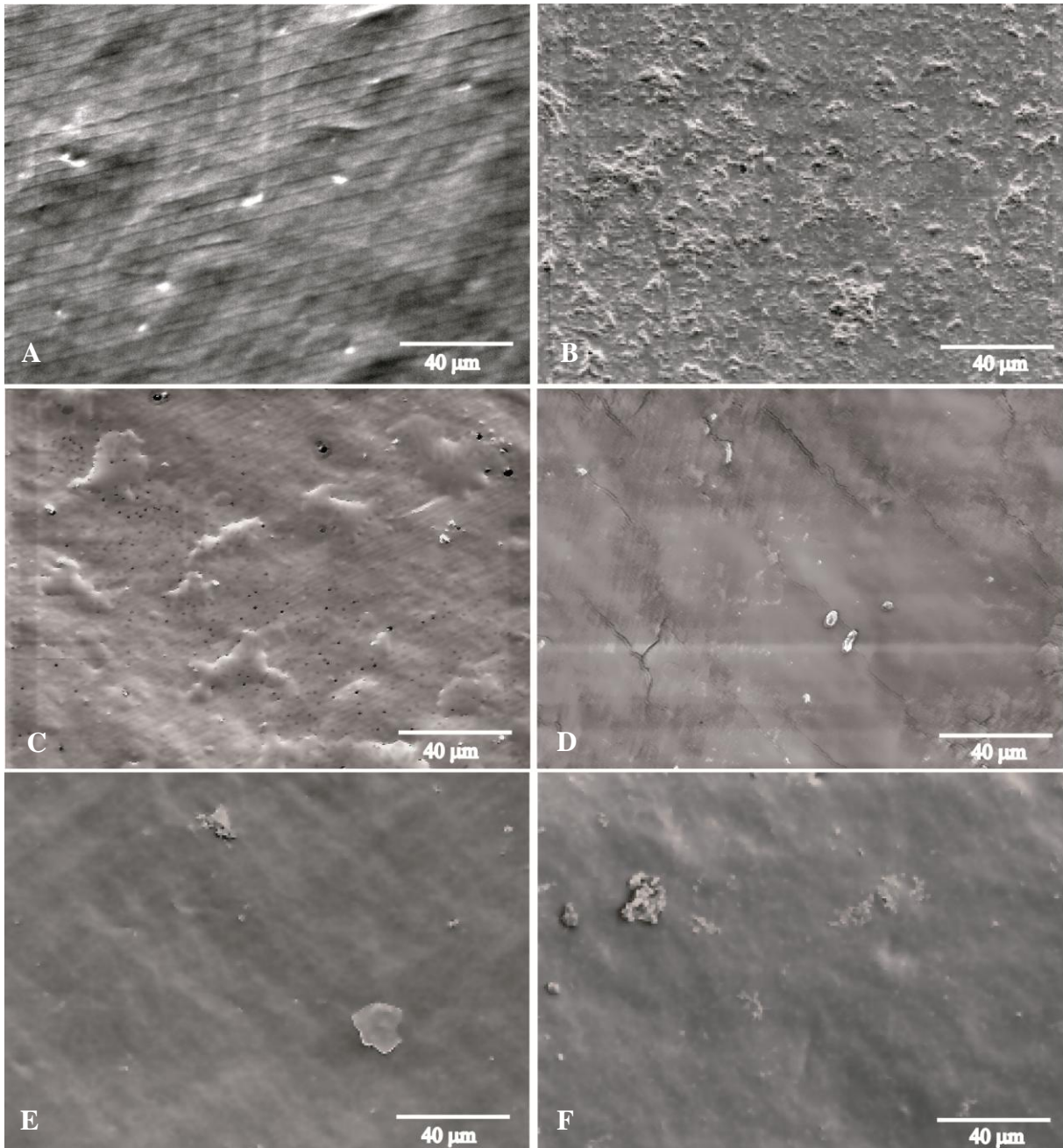


Abb. 37 REM - Aufnahmen der in die Hygiene - Monitore integrierten Silikonschläuche bei 1000x Vergrößerung. A) steriler Silikonschlauch B) natürlicher Biofilm im Silikonschlauch nach 30 Tagen C) Hygiene - Monitor an Einimpfstelle nach 54 Tagen D) Hygiene-Monitor am Systemende nach 54 Tagen E) Hygiene-Monitor nach Schlauchwechsel an Einimpfstelle nach 23 Tagen F) Hygiene-Monitor nach Schlauchwechsel am Systemende nach 23 Tagen.

Die mikrobiologische Untersuchung im Silikonschlauch auf *Pseudomonas aeruginosa* auf Cetrimid - Agar (Abschnitt 2.3.2) war zu allen Untersuchungszeitpunkten negativ. Mit der 16S rDNA Analyse (Abschnitt 2.5.7) konnten lediglich Angehörige der *Mycobacterium*

species identifiziert werden, deren Vorkommen in Trinkwasserbiofilmen bekannt ist (Schulze-Robbeke und Fischeder, 1989; Beumer et al., 2010). Nach Abgleich mit der NCBI - Datenbank handelt es sich dabei mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% um *Mycobacterium llatzerense*.

4 Diskussion

In Deutschland wird durch die Trinkwasserverordnung (TrinkwV) von 2001 geregelt, dass dem Verbraucher Trinkwassers in einer guten Qualität zur Verfügung gestellt wird. Seit der Novellierung der TrinkwV im Jahr 2001 ist der Versorger nur noch bis zur Wasseruhr für die Gewährleistung der Trinkwasserqualität verantwortlich. Sobald das Wasser in die hausinterne Trinkwasserinstallation eintritt, liegt die Verantwortung beim Betreiber der Trinkwasserinstallation. Seitdem hat das Thema Trinkwasserdesinfektion in der öffentlichen Wahrnehmung deutlich an Aufmerksamkeit gewonnen. Die TrinkwV fordert, dass Wasser für den menschlichen Gebrauch, d.h. zum Trinken, Waschen, für die Zubereitung von Speisen und Getränken, die Reinigung von Lebensmitteln und allen Gegenständen, die mit dem menschlichen Körper in Kontakt kommen, so beschaffen sein muss, dass die Gesundheit nicht beeinträchtigt wird.

Ein Faktor, der die Trinkwasserqualität beeinflussen kann, sind Biofilme in der Trinkwasserinstallation. Eine Hauptursache von Wasser-assoziierten nosokomialen Infektionen sind, neben Amöben, Biofilme in Rohrleitungen und Einbauten wie Filtern oder Kunststoffmaterialien, die ein Reservoir und Nährböden für Bakterien und andere Mikroorganismen bilden (Geldreich, 1996; Squier et al., 2000; Exner et al., 2005). Die Desinfektion von Trinkwasserinstallationen und der Abbau sowie die Prävention von Biofilmen ist ein sehr komplexer und aufwendiger Prozess. Für eine erfolgreiche Durchführung einer Desinfektionsmaßnahme ist ein erhebliches Fachwissen erforderlich. Falsche Handhabung oder ein nicht fachgerechter Einsatz können eher zum Schaden an der Trinkwasserinstallation, als zur Sanierung des Systems führen (DVGW, 2009).

Im Trinkwasserbereich eingesetzte Desinfektionsverfahren müssen, bevor sie in die Desinfektionsmittelliste des RKI oder des VAH aufgenommen werden, mehrere Prüfverfahren zur Wirksamkeit gegenüber Trinkwasser - assoziierten Mikroorganismen durchlaufen. Es gibt jedoch weder einheitliche Prüfverfahren, noch Richtlinien, ob ein Verfahren die Kapazität zur Inaktivierung oder Entfernung von Biofilmbakterien besitzt.

§5 der TrinkwV besagt, welche mikrobiologischen Untersuchungen im Trinkwasser durchzuführen sind. Dazu gehört auch die Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE). Diese vorgeschriebenen Analysen beziehen sich jedoch nur auf die Wasserphase. Für Untersuchungen auf Mikroorganismen in Biofilmen gibt es generell keine allgemeingültigen Richtlinien zur Prävention bzw. Kontrolle (Exner et al., 2005).

4.1 Überprüfung der Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden derzeit verfügbare Desinfektionsverfahren zur Kontrolle von Trinkwasserbiofilmen untersucht (Abschnitt 3.1). Dabei lag der Fokus auf der chemischen Desinfektion. Es wurden neun Prüfprodukte mit unterschiedlichen Wirkstoffzusammensetzungen auf ihre Wirksamkeit zur Reduktion von Biofilmmikroorganismen und zur Vermeidung einer Biofilmbildung getestet. Dabei handelte es sich um ein Prüfprodukt mit Chlordioxid, vier mit freiem Chlor aus ECA - Verfahren, Wasserstoffperoxid in Kombination mit Silber (und Peressigsäure) oder Fruchtsäuren (und Tensiden) und Ozon.

Die Verfahren der chemischen Desinfektion wurden in verschiedenen Varianten des Silikonschlauchmodells (Lenz et al., 2010) untersucht (Abschnitt 2.2.2). Die Auswahl der Varianten des Silikonschlauchmodells, Behandlungszeiten und Wirkstoffkonzentrationen der Desinfektionsverfahren wurden jeweils nach den Grenzwerten der TrinkwV §11 oder den Anwendungsempfehlungen des Herstellers gewählt. Zunächst wurden alle Desinfektionsverfahren im quantitativen Suspensionsversuch auf ihre Wirksamkeit gegenüber im Biofilm auftretende hygienisch relevanten Mikroorganismen untersucht. *Pseudomonas aeruginosa* tritt sporadisch nach baulichen Veränderung in Trinkwasserinstallationen auf (Clark et al., 1982; Hamsch et al., 2004) und kommt in einer höheren Dichte in der Trinkwasserinstallation vor als im Leitungswasser der zentralen Wasserversorgung (Wingender et al., 2009). Zudem stellen Pseudomonaden einen der am häufigsten überschrittenen mikrobiologischen Parameter im Trinkwasser dar (Völker et al., 2010). Aufgrund dieser Tatsachen stellte sich *Pseudomonas aeruginosa* für diese orientierenden Untersuchungen als optimaler Prüforganismus dar. Alle hier getesteten Verfahren sind in dieser Prüfung als wirksam getestet worden.

Die Untersuchungen mit dem Silikonschlauchmodell ergaben, dass mit den neun getesteten Desinfektionsverfahren eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten (KBE) im Trinkwasserbiofilm bis zur Nachweisgrenze möglich war. Dabei zeigten sich für kontinuierliche Behandlung nach TrinkwV §11 und für die Stoßbehandlung deutliche Unterschiede. Deshalb werden die beiden Anwendungsszenarien im Folgenden zunächst getrennt voneinander diskutiert.

4.1.1 Kontinuierliche Behandlung nach TrinkwV §11

Die Untersuchungen mit kontinuierlichen Behandlungen, die der TrinkwV §11 entsprachen, wurden mit fünf Prüfprodukten (Chlordioxid, drei ECA – Verfahren, Ozon) durchgeführt. Es wurden jeweils KBE/cm^2 , GZZ/cm^2 bestimmt und REM – Aufnahmen der Schlauchoberfläche angefertigt.

4.1.1.1 Chlordioxid

Bei Chlordioxid war mit einer nach TrinkwV §11 zulässigen Höchstkonzentration von 0,2 mg/l, ein Behandlungszeitraum von 70 Tagen erforderlich, um die KBE/cm^2 bis zur Nachweisgrenze zu reduzieren (Abschnitt 3.1.1). Dies entspricht früheren vergleichbaren Untersuchungen am IHPH (Otte, 2006). Nach dem vorgeschriebenen Bestimmungsparameter (KBE/cm^2) der TrinkwV ist das System somit desinfiziert. Die Gesamtzellzahl konnte im Behandlungszeitraum jedoch nur um 3,13 \log_{10} -Stufen auf $7,4 \times 10^3 \text{ GZZ}/\text{cm}^2$ reduziert werden. Es sind definitiv noch Mikroorganismen im System vorhanden, auch wenn aufgrund dieses Resultats keine Aussagen über ihren Zustand gemacht werden können. Auf REM - Aufnahmen von der Schlauchoberfläche nach der Behandlung war kein Biofilm mehr sichtbar (Abb. 12).

Die Behandlung eines initial sterilen Silikonschlauchs zeigte, dass mit der nach TrinkwV §11 zulässigen Höchstkonzentration eine Ansiedlung von Mikroorganismen im Silikonschlauch verhindert werden konnte. Es waren weder KBE/cm^2 , noch GZZ/cm^2 nachweisbar. Diese Ergebnisse decken sich bei Betrachtung der KBE ebenfalls mit früheren am IHPH durchgeführten Untersuchungen mit Chlordioxid (Otte et al., 2004; Otte, 2006). Die Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit Chlordioxid den derzeitigen Anforderungen einer Desinfektion entspricht. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl verdeutlicht jedoch, dass eine Entfernung der Mikroorganismen nur partiell erreicht wurde.

Chlordioxid zur Desinfektion von Trinkwasser hat einige Vorteile gegenüber anderen Desinfektionsverfahren. Die meisten Verfahren sind in ihrer Wirkweise stark pH – abhängig, wie z.B. Chlor (Chang et al., 2000). Chlordioxid wirkt in einem Bereich von pH 4 - 9 ohne Verlust der ursprünglichen Desinfektionsleistung (Chauret et al., 2001). Die Wirkung erfolgt über Oxidationsvorgänge, wobei im Gegensatz zur oxidativen Substitution beim Chlor, keine Chlorreaktionen stattfinden und somit nahezu keine Halogenalkale gebildet werden können (Hofmann et al., 1999). Es sind generell nur wenige Nebenprodukte von Chlordioxid bekannt. Eins dieser Nebenprodukte ist Chlorit, was durch Reaktionen mit organischen Bestandteilen entsteht (Gordon, 2001; Baribeau et al., 2002) und was als gesundheitlich

bedenklich identifiziert wurde (Korn et al., 2002; Fantuzzi et al., 2003a). Durch das Vorkommen von Biofilmen in der Trinkwasserinstallation kann dieser Vorgang somit nicht verhindert werden. Eine Zugabe von Eisensalzen, Enthärtern oder der Einsatz von Aktivkohlefiltern führt aber zu einem Abbau entstandener Nebenprodukte (Iaturu und Knocke, 1992; Simpson, 1995). Studien zufolge ist es außerdem weniger korrosiv als andere Desinfektionsmittel (Eisnor et al., 2004). Bei einem Einsatz über einen längeren Zeitraum oder in höheren Konzentrationen kann es jedoch trotzdem zu Korrosionen am Leitungsmaterial führen (Hubbard et al., 2009).

4.1.1.2 Freies Chlor aus ECA - Verfahren

Die Behandlungen mit Desinfektionslösungen aus drei verschiedenen ECA - Verfahren führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die kontinuierliche Behandlung mit dem Prüfprodukt 4 bei pH 3 führte bei einer Wirkstoffkonzentration von 0,3 mg/l freiem Chlor schon innerhalb von 21 Tagen zur vollständigen Reduktion der KBE/cm² (Abschnitt 3.1.2.2). 0,3 mg/l freies Chlor ist der Grenzwert der, nach der Trinkwasseraufbereitung im Trinkwasser noch vorhanden sein darf (TrinkwV, 2001). Mit den anderen eingesetzten ECA - Verfahren mit pH 7 war bei gleicher Wirkstoffkonzentration ein deutlich längerer Behandlungszeitraum notwendig. Bei Prüfprodukt 4 wurde nach 70 Tage die vollständige Reduktion der KBE erreicht (Abschnitt 3.1.2.3). Mit Prüfprodukt 5 war nur eine Reduktion der KBE um 4,02 log₁₀ - Stufen möglich. Dieser Wert war nach 35 Tagen erlangt und stagnierte bis zum Ende der Untersuchung nach 84 Tagen. Mit demselben Prüfprodukt war eine vollständige Reduktion der KBE nur durch eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration auf 0,6 mg/l freies Chlor möglich, Hierbei wurde die vollständige Reduktion bereits nach einem Behandlungszeitraum von 21 Tagen erzielt (Abschnitt 3.1.2.4). Laut TrinkwV §11 dürfen bei der Trinkwasseraufbereitung bis zu 6 mg/l Chlor eingesetzt werden, wenn die mikrobiologischen Anforderungen nach §1 auf anderem Wege nicht eingehalten werden können. An der Entnahmestelle dürfen dabei maximal 0,6 mg/l freies Chlor im Trinkwasser nachgewiesen werden (TrinkwV, 2001). Sobald die Anforderungen nach §1 erfüllt sind, muss die Behandlung wieder zurückgefahren werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass im gesamten Behandlungszeitraum die Gesamtzellzahl bei allen eingesetzten ECA - Verfahren um nicht mehr als 1,61 log₁₀-Stufen verringert werden konnte (Prüfprodukt 5). Dafür war die mit 0,6 mg/l freiem Chlor höchste eingesetzte Konzentration notwendig (Abschnitt 3.1.2.4). Es waren somit, wie nach der Behandlung mit Chlordioxid (Reduktion um 2,83 log₁₀-Stufen) auch bei den ECA - Verfahren noch Zellen im System vorhanden, obwohl der Nachweis der

KBE negativ ausfiel. Die Desinfektion war somit zwar den Anforderungen entsprechend erfolgreich, eine Entfernung der Mikroorganismen hat jedoch wie bei der Behandlung mit Chlordioxid nicht stattgefunden.

Die Betrachtung der Biofilmmatrix ergab, dass nach den kontinuierlichen Behandlungen mit freiem Chlor aus ECA - Verfahren (Prüfprodukt 3), auch nach einer erfolgreichen Reduktion der KBE, immer noch Rückstände auf der Schlauchoberfläche vorlagen (Abb. 15 A). Nur nach der Behandlung mit dem Prüfprodukt 4 war keine Biofilmmatrix mehr auf der Schlauchoberfläche zurückgeblieben (Abb. 12 A; Abb. 17 A). Nur nach dieser Behandlung waren keine Rückstände des Biofilms mehr sichtbar. Es war mit einem Umfang von 84 Tagen die längste Behandlungszeit. Die anderen Behandlungen waren mit maximal 42 Tagen deutlich kürzer. Durch den langfristige Einsatz von ECA - Verfahren kann somit auch die Biofilmmatrix entfernt werden. In allen Untersuchungen zeigte die Bestimmung der Gesamtzellzahl jedoch, dass noch Mikroorganismen im System vorhanden waren. Diese müssen somit entweder in den Silikonschlauch hinein gewachsen sein und wurden bei der Präparation für die REM - Aufnahmen herausgelöst. Oder es wurden Bereiche nicht erfasst, auf denen noch Biofilmmaterial zurückgeblieben war.

Die Untersuchungen mit initial sterilen Silikonschläuchen zeigten, dass eine TrinkwV §11 konforme Behandlung mit den hier getesteten Prüfprodukten ein Wachstum der KBE auf der Schlauchoberfläche verhindern kann. Bei den Behandlungen mit allen getesteten ECA - Verfahren konnten sowohl keine KBE/cm², als auch GZZ/cm² nachgewiesen werden.

Mit allen getesteten ECA - Verfahren war somit eine vollständige Reduktion der KBE im Biofilm möglich. Jedoch war die Wirksamkeit stark pH - abhängig. Das Prüfprodukt 3 wird im sauren Bereich (pH 3) hergestellt. Am IHPH konnten in vorherigen Untersuchungen mit einem anderen ECA - Verfahren im sauren Bereich die KBE innerhalb von 37 Behandlungstagen bis zur Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) reduziert werden (Otte et al., 2005). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem hier erzielten Resultat. Der Hauptwirkstoff in Desinfektionslösungen aus ECA - Verfahren ist die hypochlorige Säure (HOCl) (O'Donnell et al., 2009). Diese ist als wirksames Mikrobizid bekannt und wird u.a. auch im menschlichen Körper von neutrophilen Granulozyten produziert (Weiss et al., 1983). HOCl ist als freies Chlor messbar und kann in Lösungen, die im neutralen pH hergestellt werden, mehr als 79% davon ausmachen (Boyle et al., 2010). Im sauren Bereich ist der Anteil an hypochloriger Säure deutlich größer, als bei einem höheren pH. Zudem ist das Redoxpotential mit über 1000 mV ebenfalls höher als im neutralen Bereich mit 700 – 800 mV. Je höher das

Redoxpotential ist, desto größer ist die Wirksamkeit der erzeugten Desinfektionslösung (Hsu, 2005). Die in dieser Arbeit eingesetzten Verfahren bestätigen diesen Aspekt. Mit Prüfprodukt 3 mit pH 3 konnten die KBE am schnellsten reduziert werden (Abschnitt 3.1.2.2).

Die antibakterielle Wirkung von ECA - Verfahren wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht und beschrieben. So konnte z.B. gezeigt werden, dass auch hygienisch relevante Mikroorganismen wie *Pseudomonas aeruginosa* (Kiura et al., 2002; Vorobjeva et al., 2004), *Staphylococcus aureus* (Park et al., 2002; Vorobjeva et al., 2004) oder diverse Salmonellen (Venkitanarayanan et al., 1999a; Fabrizio und Cutter, 2003) mit der Desinfektionslösung inaktiviert werden können. Außerdem kann Studien zufolge durch den Einsatz von ECA - Verfahren die Keimfähigkeit von Pilzen wie *Cladosporium spec.* (Buck et al., 2002) oder *Aspergillus spec.* (Buck et al., 2002; Suzuki et al., 2002) herabgesetzt werden. Es wurde sogar von einer antiviralen Potenz gegenüber durch Blut übertragbare Viren, einschließlich dem Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis C Virus (HCV) und sogar dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV), berichtet (Morita et al., 2000).

Der genaue Wirkmechanismus von ECA - Verfahren ist bisher nicht eindeutig geklärt. Die aufgestellten Theorien reichen von einer durch den niedrigen pH bedingten Destabilisierung der Zellmembran, was den Eintritt von hypochloriger Säure in die Zelle erleichtert (McPherson, 1993), über eine Störung der Proteinsynthese, oxidative Decarboxylierung von Aminosäuren, direkten Reaktionen mit Aminosäuren, der Zerstörung von für den Stoffwechsel relevanten Enzymen oder der Entstehung einer chromosomalen Aberration (Mariott und Gravani, 2006). Diese Effekte werden entweder durch den veränderten pH, das erhöhte Redoxpotential oder das zugesetzte freie Chlor erzielt. Der Großteil der Bakterien wächst bei einem pH von 4 bis 9 (Huang et al., 2008). Durch den Einsatz von ECA - Verfahren mit einem niedrigen pH wird der vorherrschende pH verringert, wodurch essentielle Zellfunktionen gestört werden. Aerobe Bakterien haben ihr Wachstumsoptimum bei einem Redoxpotential zwischen +200 und +800 mV, Anaerobe Bakterien bei einem Redoxpotential zwischen -700 und +200 mV. Durch eine Erhöhung auf über +1000 mV liegt mehr ungelöster Sauerstoff und in der Regel auch mehr freies Chlor vor (Hsu, 2005). Dadurch könnte es durch eine Beeinflussung des Elektronenflusses zu Störungen im Stoffwechsel und der ATP - Produktion kommen (Huang et al., 2008). Kim et al. (2000) erzeugten aus deionisiertem Wasser ein chemisch modifiziertes Wasser mit vergleichbaren Werten des pH, Redoxpotentials und Gehalt an freiem Chlor ohne vorherige Elektrolyse.

Diese Untersuchungen ließen darauf schließen, dass das Redoxpotential der entscheidende Faktor ist.

Vergleichsuntersuchungen mit Ozon verdeutlichten jedoch, dass eine Desinfektion mit einer Ozonlösung die ein höheres Redoxpotential als ein ECA – Verfahren vorweist, keine höhere antibakterielle Wirkung hatte. Zum messbaren freien Chlor gehört auch die hochreaktive hypochlorige Säure (HOCl), die die Bildung von Hydroxylradikalen herbeiführt, die wiederum mit Bestandteilen der Bakterienzelle reagieren. Die Vergleichsuntersuchungen mit der Ozonbehandlung, wobei ebenfalls Hydroxylradikale erzeugt werden, zeigten, dass die Behandlungen mit größeren HOCl - Konzentrationen bessere Desinfektionswirkungen erbrachten (Koseki et al., 2001). Die Anwesenheit von Hydroxylradikalen führt zu Oxidationsvorgängen, wodurch die Zellmembran beschädigt wird. Die Hypothese eines hohen Oxidationspotentials von in ECA - Verfahren produzierten Desinfektionslösungen wurde u.a. von Liao et al. (2007) beschrieben. Die Theorie, dass das freie Chlor der entscheidende Faktor für die Desinfektionsleistung ist, deckt sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit dem Prüfprodukt 5 (Abschnitt 3.1.2.4). Bei der kontinuierlichen Behandlung konnten die KBE durch die Erhöhung der Konzentration an freiem Chlor von 0,3 auf 0,6 mg/l in kürzerer Zeit effektiver reduziert werden. Weil die Desinfektionslösung im neutralen Bereich hergestellt und eingesetzt wird, kann auch ein Effekt der Verschiebung des pHs ausgeschlossen werden. Der Anteil an HOCl soll nach Len et al. (2000) sein Maximum bei pH 4 haben. Die in Abschnitt 3.1.2.1 beschriebene Untersuchungen zur Bestimmung der höchsten antibakteriellen Wirksamkeit von ECA – Verfahren im sauren pH zeigten, dass die Wirksamkeit bei pH 3 höher ist als bei pH 4. Allerdings wurden die Untersuchungen von Len et al. (2000) mit *Bacillus cereus* durchgeführt, wohingegen in dieser Arbeit mit *Pseudomonas aeruginosa* gearbeitet wurde. Es ist jedoch bekannt, dass ECA - Verfahren bei verschiedenen Bakterien unterschiedliche Inaktivierungsleistungen haben (Huang et al., 2008).

Ein wichtiger Aspekt ist die Desinfektionsleistung von ECA - Verfahren im Vergleich zu traditionell eingesetzten Chlorverbindungen. In einer früheren Studie am IHPH wurden Untersuchungen zur Reduktion der koloniebildenden Einheiten im Biofilm mit freiem Chlor aus Natriumhypochlorit - Lösungen durchgeführt. Eine kontinuierlichen Behandlung mit 0,3 mg/l freiem Chlor führte bei einer mikrobiellen Ausgangsbelastung von $1,73 \times 10^6$ KBE/cm² zur Reduktion bis die Nachweisgrenze (0 KBE/cm²) in einem Behandlungszeitraum von 181 Tagen (Otte, 2006). Hypochlorite haben einen pH im

alkalischen Bereich. Bei einem pH von 11 – 12 liegt Chlor fast vollständig in der dissoziierten Form als Hypochlorit - Ion vor, welches um ein Vielfaches ineffektiver ist als HOCl (Wolf, 2009). Mit der Desinfektionslösung im neutralen Bereich (Prüfprodukt 4) dauerte es bei gleicher Wirkstoffkonzentration nur 70 Behandlungstage (Abschnitt 3.1.2.3), mit der im sauren Bereich sogar nur 21 Tagen (Abschnitt 3.1.2.2). Die erzielten Ergebnisse bestätigen somit eine höhere bakterizide Wirkung in den Desinfektionslösungen der ECA - Verfahren im Vergleich mit anderen Chlorprodukten.

Generell gilt aus ECA - Verfahren erzeugtes freies Chlor als nicht schädlich für den menschlichen Körper (Mori et al., 1997). Im Allgemeinen soll es effektiver und ungefährlicher für den Menschen und die Umwelt als andere auf freiem Chlor basierenden Desinfektionsmittel wie Natriumhypochlorit sein (Ayebah et al., 2005). Mehrere Studien belegten, dass Natriumhypochlorit um ein vielfaches toxischer ist und leicht zu Hautirritationen führen kann (Mori et al., 1997; Sekiya et al., 1997; Shimmura et al., 2000). Hinzukommt, dass ECA - Verfahren kostengünstiger als andere Desinfektionsverfahren sind (Sakurai et al., 2003). In der Milchwirtschaft führte der Einsatz von ECA - Verfahren zur Desinfektion von Melkmaschinen zu einer Kosteneinsparung, weil sich nur die Anschaffungskosten für die Generatoren als großer Kostenfaktor erwiesen haben. Die laufenden Kosten für Salz, Wasser und Energie, die zur Herstellung der Desinfektionslösung benötigt werden, sind deutlich niedriger, als der dauerhafte Einsatz anderer Chemikalien (Walker et al., 2005).

Nachteilig wirkt sich bei diesem Verfahren der sehr schnelle Verlust der antimikrobiellen Wirksamkeit der Desinfektionslösung nach der Herstellung aus (Kiura et al., 2002). Um die volle Desinfektionswirkung erzielen zu können, muss das Desinfektionsmittel bestenfalls direkt am Einsatzort hergestellt werden. Sobald die Desinfektionslösung in Kontakt mit Luft kommt, hat dies einen deutlichen Verlust an messbarem freiem Chlor zur Folge. Dieser kann bei zusätzlicher Bewegung der Lösung durch z.B. Schütteln bis zu 80% betragen (Len et al., 2002). Falls eine Lagerung notwendig ist, sollte diese bei niedrigen Temperaturen erfolgen. Fabrizio und Cutter (2003) konnten zeigen, dass die Desinfektionslösung bei 4°C länger stabiler ist als bei 25°C. Zudem wird die antibakterielle Wirkung durch die Anwesenheit von organischen Bestandteilen herabgesetzt, weil diese mit dem freien Chlor reagieren (Kotula et al., 1997; Oomori et al., 2000). In Untersuchungen konnte durch die Zugabe von Rinderserumalbumin das messbare freie Chlor in der Desinfektionslösung vollständig aufgezehrt werden (O'Donnell et al., 2009). Die Untersuchungen mit dem Prüfprodukt 5

wurden sowohl mit 0,3 mg/l, als auch mit 0,6 mg/l freiem Chlor durchgeführt (Abschnitt 3.1.2.4). Nur die Behandlung mit 0,6 mg/l führte zur vollständigen Reduktion der KBE. Durch die EPS wird ein Großteil des freien Chlors aufgezehrt, so dass bei niedrigeren Konzentrationen nicht ausreichend Wirkstoff vorliegt, um die Mikroorganismen zu erreichen. Bei der Produktion der Desinfektionslösung kann zudem durch die Freisetzung von Chlorionen Chlorgas gebildet werden, welches beim Einatmen in höchstem Maß gesundheitsschädigend ist. Unterhalb eines pH von 2,7 ist dieses Risiko stark erhöht, weshalb bei der Anwendung in Einrichtungen Entlüftungsmöglichkeiten dringend notwendig sind um die Gesundheit des Anwenders zu schützen (Huang et al., 2008). Zudem findet aufgrund der hohen Azidität eine kontroverse Diskussion über Korrosionen an Leitungsmaterialien wie Metallen oder Kunststoffen statt. In Studien im Bereich der Hämodialyse war dies jedoch nicht zu beobachten (Tanaka et al., 1999). Auch auf rostfreien Stahl hatte der Einsatz von ECA – Verfahren keinen nachteiligen Effekt (Ayebah und Hung, 2005). Desinfektionsmittel, deren Wirkspektrum im sauren pH liegt, gelten im Allgemeinen eher als materialschädigend. Die Gefahr der Chlorgasbildung ist im höheren pH - Wert Bereich minimiert. Die in der Diskussion stehenden Gefahrenpotentiale sollten demnach beim Einsatz eines ECA - Verfahrens im neutralen Bereich geringer sein, als bei einem im sauren Milieu.

4.1.1.3 Ozon

Die diskontinuierliche Behandlung mit 0,05 mg/l Ozon für 14 Tage führte zu einer vollständigen Reduktion der KBE/cm² und der GZZ/cm². Auf der Schlauchoberfläche waren ebenfalls keine Rückstände der Biofilmmatrix mehr sichtbar (Abschnitt 3.1.4). Somit war diese Behandlung sehr effektiv.

Ozon ist ein starkes Oxidationsmittel und hat eine hohe biozide Wirksamkeit (Edward, 1998; Hoenich und Levin, 2008). Durch seine hohe Reaktionsfreudigkeit reagiert es mit nahezu allen organischen Substanzen (Vilve und Sillanpaa, 2010), wodurch der vollständige Abbau der Biofilmmatrix zu erklären ist. Bzgl. der Behandlung von Biofilmen ist dokumentiert, dass es eine Formation verhindern kann und auch das mikrobielle Wachstum eingeschränkt wird. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaft des Biofilms und einem hohen Anteil an polaren Polysacchariden kann Ozon sehr effektiv wirken. Der Abbau eines bestehenden Biofilms sei jedoch nicht möglich (Shirliff und Leid, 2009). Die Eigenschaft zur Prävention einer Biofilmbildung konnte in einem Dialysezentrum mehrfach belegt werden (Moritz et al.,

2007; Brensing et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich Ozon auch als sehr effektives Mittel zur Biofilmbeseitigung.

Es wird hauptsächlich im Bereich der Hämodialyse eingesetzt (Edward, 1998; Amato und Curtis, 2002). Das große Problem ist, dass die Umgebungsparameter einen großen Einfluss auf die Halbwertszeit von Ozon haben. Sie liegt bei pH 8, einem charakteristischen Wert von Trinkwasser, bei weniger als einer Stunde (Glaze, 1987). Bei einer Temperatur von 20°C liegt sie sogar nur bei 25 Minuten (AAMI, 2004). Es ist toxisch und gesundheitsgefährdend, weshalb gerade bei der Anwendung im Dialysebereich sichergestellt sein muss, dass der Patient nicht damit in Kontakt kommt (Edward, 1998). Bei höheren Wirkstoffkonzentrationen ist es außerdem materialschädigend (Shirtliff und Leid, 2009). Gerade bei Kunststoffen wie Polyvinylchloride, die auch häufig in der Trinkwasserinstallation eingesetzt werden, verkürzt es nachweislich die Lebensdauer (Murphy, 1998; Amato und Curtis, 2002). Insgesamt gibt es jedoch verhältnismäßig wenig Literatur zur Desinfektion von Wasser mit Ozon (Tarrass et al., 2010). Deshalb müssen, auch basierend auf den hier erzielten Resultaten, weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um das Potential von Ozon zur Trinkwasserdesinfektion besser zu erforschen.

4.1.2 Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion

Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektionen, wie sie in Schadenfällen durchgeführt werden, wurden sowohl mit nach TrinkwV §11 für die kontinuierliche Behandlung zugelassenen (Chlordioxid, freies Chlor aus ECA - Verfahren), als auch mit anderen Wirkstoffen wie Wasserstoffperoxid in Kombination mit Silber (und Peressigsäure) oder Fruchtsäuren (und Tensiden) durchgeführt. Ein Vorteil von Stoßbehandlungen ist, dass sie mit erheblich höheren Wirkstoffkonzentrationen, als kontinuierliche Behandlungen durchgeführt werden können. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass während der Behandlungszeit der Zugang für den Verbraucher nicht möglich ist. Außerdem muss nach der Behandlung dafür gesorgt werden, dass keine Rückstände in der Trinkwasserinstallation zurückbleiben, die die Trinkwasserqualität beeinträchtigen können oder eine potentielle Gesundheitsgefährdung darstellen (DVGW, 2009).

4.1.2.1 Chlordioxid

Die durchgeführten Stoßbehandlungen zeigten, dass bei einer Behandlungszeit von sechs Stunden bei Betrachtung der KBE/cm^2 der Einsatz von höheren Wirkstoffkonzentrationen

auch zu gesteigerten Reduktionen führte (Abschnitt 3.1.1). Während mit einer Konzentration von 1 mg/l ClO_2 nur eine Reduktion der KBE/cm^2 um 1,18 \log_{10} - Stufen erreicht wurde, konnten mit 10 mg/l die KBE/cm^2 bis zur Nachweisgrenze ($0 \text{ KBE}/\text{cm}^2$) reduziert werden. Die GZZ/cm^2 konnte um maximal 0,49 \log_{10} - Stufen verringert werden. Es waren somit wie nach der kontinuierlichen Behandlung weiterhin Mikroorganismen im System. Die Biofilmmatrix konnte in Vergleich zum Zeitpunkt vor der Behandlung überhaupt nicht entfernt werden (Abb. 12 B, C).

Die Behandlung war somit zwar den Anforderungen der TrinkwV entsprechend erfolgreich. Trotz der hohen Wirkstoffkonzentrationen war eine Verminderung der Gesamtzellzahl oder ein Ablösen des Biofilms jedoch nicht möglich. Der Einsatz von erhöhten Konzentrationen von Chlordioxid ist nachweislich materialschädigend (Hubbard et al., 2009). Weitere Erhöhungen sind somit nicht empfehlenswert. Eine Möglichkeit für künftige Untersuchungen ist die Verlängerung der Behandlungszeit.

4.1.2.2 Freies Chlor aus ECA - Verfahren

Die durchgeführten Stoßbehandlungen mit dem Prüfprodukt 4 zeigten wie beim Chlordioxid, dass der Einsatz von höheren Wirkstoffkonzentrationen die KBE/cm^2 verstärkt reduziert werden konnten (Abschnitt 3.1.2.3). Mit 1 mg/l ClO_2 wurden die KBE/cm^2 um 2,30 \log_{10} - Stufen verringert, mit 10 mg/l um 4,98 \log_{10} - Stufen und mit 25 mg/l sogar bis zur Nachweisgrenze ($0 \text{ KBE}/\text{cm}^2$). Eine Reduktion der GZZ/cm^2 konnte mit 10 mg/l um maximal um 1,61 \log_{10} - Stufen erzielt werden. Die Behandlung mit 25 mg/l führte zur Reduktion der GZZ/cm^2 bis zur Nachweisgrenze. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Nachweisgrenze mit $3,65 \times 10^3 \text{ GZZ}/\text{cm}^2$ relativ hoch ist. Ein negativer Befund ist somit nicht mit einem Nichtvorhandensein gleichzusetzen. Zudem waren auch nach dieser Behandlung noch vereinzelte Rückstände der Biofilmmatrix erkennbar, in denen sich noch Mikroorganismen befinden können (Abb. 17 B).

Die Behandlung mit 25 mg/l war sehr effektiv. Auch wenn nach der Behandlung weniger Biofilm als nach der Chlordioxidbehandlung übrig war (vgl. Abb. 12 C), konnte dieser jedoch ebenfalls nicht vollständig entfernt werden. Weil freies Chlor in hohen Wirkstoffkonzentrationen korrosiver ist als Chlordioxid (Eisnor et al., 2004), ist eine Wirkstofferhöhung auch hier nicht ratsam. Erste Studien aus Japan ergaben jedoch, dass die Desinfektionslösung aus ECA - Verfahren nicht materialschädigend ist (Tanaka et al., 1999; Ayebah und Hung, 2005). Um konkrete Aussage machen zu können, müssen Vergleichsstudien mit anderen Chlorpräparaten durchgeführt werden. Eine andere

Möglichkeit ECA - Verfahren effektiver einzusetzen, ist eine Anhebung der Wassertemperatur. Untersuchungen am IHPH zur Entfernung von Trinkwasserbiofilmen veranschaulichten, dass die Desinfektionsleistung von ECA - Verfahren dadurch erhöht werden kann (Gebel et al., 2009). Außerdem ist bekannt, dass die Desinfektionslösung bei 25°C stabiler ist, als bei niedrigeren Temperaturen (Fabrizio und Cutter, 2003).

4.1.2.3 Wasserstoffperoxid + Zusätze

Behandlungen mit Wasserstoffperoxid als Reinsubstanz (Prüfprodukt 6) führten bei Wirkstoffkonzentrationen von 10.000 bzw. 30.000 mg/l zu einer vollständigen Reduktion der KBE/cm² nach einem Behandlungszeitraum von maximal drei Stunden (Abschnitt 3.1.3.1). Die GZZ/cm² konnte jedoch auch hier mit den getesteten Wirkstoffkonzentrationen nur um maximal 0,68 log₁₀ - Stufen reduziert werden. Die Reduktionen der GZZ/cm² sind somit im identischen Bereich, wie bei den Stoßbehandlungen mit Chlordioxid (vgl. Tab. 17). Auf den REM - Aufnahmen sind nach der Behandlung nur noch vereinzelte Fragmente der Biofilmmatrix zu erkennen (Abb. 21). Es ist somit deutlich mehr Biofilmmatrix, als durch die Chlordioxid - Behandlung entfernt worden und trotzdem war die Reduktion der GZZ/cm² nur um 0,19 log₁₀ - Stufen höher. Dies verdeutlicht, dass durch die noch vorhandene bzw. entfernte Biofilmmasse nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf die Anzahl noch vorhandener Mikroorganismen gezogen werden können.

H₂O₂ gilt als Aktiv - Sauerstoff freisetzende Substanz (Exner et al., 1987; Ditommaso et al., 2005). Die antibakterielle Wirkung basiert jedoch nicht direkt auf der oxidativen Eigenschaft, sondern erfolgt über daraus resultierende Folgereaktionen (Halliwell und Gutteridge, 1984). Der Einsatz von H₂O₂ als Desinfektionsmittel inaktiviert Mikroorganismen letztlich durch die Schädigung von Nukleinsäuren, Enzymen und essentiellen Bestandteilen der Zellmembran (Schurmann, 2001). Einige Mikroorganismen besitzen Schutzmechanismen gegenüber Wasserstoffperoxid. So tragen manche Bakterien das KatA Gen, das für die Produktion von Katalasen verantwortlich ist. Katalasen können Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff spalten und ihn somit für die Bakterienzelle unschädlich machen (Elkins et al., 1999; Stewart et al., 2000b).

Die Behandlungen mit Wasserstoffperoxid in Kombination mit Silber (Prüfprodukt 7) führten ab einer H₂O₂ - Konzentration von 10.000 mg/l zur Reduktion der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (Abschnitt 3.1.3.2). Die GZZ/cm² konnten jedoch um maximal 0,85 log₁₀ - Stufen reduziert werden. Die REM - Aufnahmen zeigten wie beim reinen

Wasserstoffperoxid, dass nach der Behandlung nur noch kleine Fragmente der Biofilmmatrix auf der Schlauchoberfläche vorhanden waren (Abb. 24 A). Durch Zusätze wie z.B. Silber wird die biozide Wirkung von Wasserstoffperoxid erhöht (Russell und Hugo, 1994). Zudem können sie die Adhärenz von Mikroorganismen an Oberflächen verhindern (Morones et al., 2005). Untersuchungen zeigten, dass *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus epidermidis* nach einer Behandlung mit Silber - Nanopartikeln nicht mehr fähig waren einen Biofilm zu bilden (Kalishwaralal et al., 2010). In den, in dieser Arbeit, durchgeführten Untersuchungen konnte durch den Silber - Zusatz nur bzgl. der GZZ/cm² eine um 0,16 log₁₀ - Stufen leicht verbesserte Reduktion festgestellt werden. Bei Betrachtung der KBE/cm² und der Biofilmmatrix war jedoch keine erhöhte Wirksamkeit erkennbar.

Allerdings werden immer häufiger auftretende Resistenzen gegenüber Silber wahrgenommen. Erste Berichte über silberresistente Bakterien und Viren stammen aus den 1950er Jahren (Franke 2007). So wird u. a. von mutanten *Escherichia coli* berichtet (Li et al., 1997) und auch bei Staphylokokken wurden Resistenzen gegenüber Silberionen nachgewiesen (Roempp, 2007). Die Ausbildung von Silberresistenzen kann auf verschiedenen Mechanismen, wie beispielsweise auf einem Silberionen bindenden Protein oder einer geringeren Permeabilität der Zellmembran, beruhen (Franke, 2007). Die Silberung zur Trinkwasseraufbereitung ist nur noch in Form von reinem Silber und Silberchlorid zulässig (TrinkwV, 2001).

In parallel durchgeführten Behandlungen konnte gezeigt werden, dass durch einen Zusatz von Peressigsäure die Desinfektionsleistung des Prüfprodukts leicht erhöht werden konnte (Tab. 20). Zur vollständigen Reduktion der KBE/cm² waren jedoch ebenfalls 10.000 mg/l H₂O₂ notwendig, die GZZ/cm² konnten um maximal 1,70 log₁₀ - Stufen reduziert werden. Die biozide Wirksamkeit von Peressigsäure gegenüber sessilen Mikroorganismen ist bekannt (Henoun Loukili et al., 2004; Kovaleva et al., 2010). Es reagiert über Oxidationsvorgänge mit Chemikalien, die im Biofilm vorhanden sind und kann die Biofilmmatrix von Oberflächen entfernen. Der Prozess, der letztlich die Zelle inaktiviert ist bisher jedoch unklar (Setlow et al., 1997). Laut Henoun Loukili et al. (2004) ist es in den zur Desinfektion empfohlenen Einsatzkonzentrationen nicht korrosiv. REM - Aufnahmen der Schlauchoberfläche gaben zu erkennen, dass durch die Peressigsäure die Oberflächenstruktur des Silikonschlauchs verändert wurde (Abb. 24 B). Diese Aussage ist somit nicht für alle Materialien zutreffend.

Die Behandlungen mit Wasserstoffperoxid in Kombination mit Fruchtsäuren (Prüfprodukt 8) führten ebenfalls ab einer H₂O₂ - Konzentration von 10.000 mg/l zur Reduktion der KBE/cm² bis zur Nachweisgrenze (Abschnitt 3.1.3.3). Die Bestimmung der GZZ/cm² zeigt keine

Relation zur Wirkstoffkonzentration, so wurde die höchste Reduktion mit 2,52 \log_{10} - Stufen bei einer H_2O_2 - Konzentration von 30.000 mg/l erreicht. Die REM - Aufnahmen verdeutlichten, dass wie bei den anderen Untersuchungen mit Wasserstoffperoxid, dass nach der Behandlung noch Rückstände der Biofilmmatrix auf der Schlauchoberfläche vorhanden waren (Abb. 25 A). Über saure Mittel ist bekannt, dass sie Schimmel abtöten können. Allerdings kann es auf mineralischen Flächen zu einer chemischen Neutralisation der Säure kommen, wodurch der pH-Wert erhöht und die Wirksamkeit gegenüber Schimmelfall deutlich reduziert wird (Umweltbundesamt, 2005a). Bei den hier eingesetzten Fruchtsäuren handelt es sich um Benzoesäure und Sorbinsäure, die u.a. in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel eingesetzt werden. Sie haben auf das Wachstum von Schimmelpilzen und Bakterien eine hemmende Wirkung (Lück und Jager, 1995; BGBl, 1998). Während z.B. die Wirkung der Essigessenz über eine pH - Veränderung erfolgt, beruht die Wirkung des hier eingesetzten Produkts auf Oxidationsvorgängen. Die Fruchtsäuren dienen laut Herstellerangaben nur dazu, dem Wasserstoffperoxid das Eindringen in die Zelle zu erleichtern und es vor den Katalasen zu schützen. Die maßgebliche Wirkung erfolgt aber weiterhin über den H_2O_2 - Anteil (Jati, 2008). Aufgrund der erzielten Ergebnisse erfüllt die Wirkstoffmischung mit den Fruchtsäuren die Anforderungen der TrinkwV sehr zuverlässig. Ein positiver Effekt speziell bzgl. der Betrachtung der Gesamtzellzahl oder der Entfernung der Biofilmmatrix ist jedoch nicht ersichtlich.

In parallel durchgeführten Behandlungen mit einem Zusatz von Tensiden waren zur vollständigen Reduktion der KBE/cm² ebenfalls 10.000 mg/l H_2O_2 notwendig, die GZZ/cm² konnten um maximal 1,60 \log_{10} - Stufen reduziert werden (Tab. 21). Die Biofilmmatrix konnte nicht sichtbar effektiver entfernt werden (Abb. 25 B). Somit konnte durch den Zusatz von Tensiden keine Erhöhung der Desinfektionsleistung erreicht werden. Tenside setzen aufgrund ihrer Struktur die Oberflächenspannung des Wassers herab und Stoffe können dadurch leichter in die Bakterienzelle eindringen (Falbe und Regitz, 1997). In Studien zum Einfluss von Tensiden auf die Abbaubarkeit von organischen Schadstoffen wurde festgestellt, dass manchen Tenside aufgrund ihrer Struktur für Bakterien toxisch sind (Tiehm, 1994). Das Wachstum von *Mycobacterium spec.* konnte durch die Anwesenheit der Tenside Marilal 130/90 und Triton X-102 gehemmt werden. Andere Tenside, wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Brij 35 konnten von Bakterien hingegen als Nährstoffquelle genutzt werden und waren wachstumsfördernd (Stelmack et al., 1999). Bei der Auswahl der zur Desinfektion eingesetzten Tenside ist somit eine sorgfältige Vorauswahl notwendig. Tenside sollen

außerdem das Ablösen von organischen Bestandteilen fördern (Falbe und Regitz, 1997). Zudem können sie die Adhäsion der Bakterien auf hydrophoben Oberflächen reduzieren. Dies wurde von Stelmack et al. (1999) in Untersuchungen mit Stämmen von *Mycobacterium spec.* und *Pseudomonas spec.* beschrieben. Auf den REM - Aufnahmen waren jedoch noch deutlich Biofilmrückstände zu sehen, so dass dieser Effekt hier nicht bestätigt werden konnte.

4.2 Untersuchungen zur Remanenzwirkung

Die Untersuchungen zur Wirksamkeit der getesteten chemischen Desinfektionsverfahren veranschaulichten, dass eine vollständige Reduktion der koloniebildenden Einheiten mit den getesteten Verfahren möglich ist. Nach fast allen Behandlungen waren jedoch bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl noch Mikroorganismen in den behandelten Silikonschläuchen nachweisbar. Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Silikonschläuche, die mit der jeweils höchsten Konzentration eines Wirkstoffs desinfiziert wurden, wie vor der Behandlung an das Trinkwasserinstallationssystem im IHPH angeschlossen und für 14 Tage stetig mit Frischwasser durchströmt und erneut untersucht.

4.2.1 Untersuchungen auf Wiederverkeimung

Eine erneute Bestimmung der KBE/cm² zeigte, dass in allen Silikonschläuchen koloniebildende Einheiten nachweisbar waren (Abschnitt 3.2). In den mit Wasserstoffperoxid behandelten Schläuchen lag die Besiedlung mit $5,1 \times 10^3$ KBE/cm² noch im Bereich des normalen Wachstums im Silikonschlauch (vergl. Abb. 28). In den mit Wasserstoffperoxid in Kombination mit Silber behandelten Schläuchen waren $1,8 \times 10^5$ KBE/cm² nachweisbar, in allen anderen mehr als 10^6 KBE/cm².

Kovaleva et al. (2010) konnten in Studien mit kontaminierten Endoskopen zeigen, dass wenn nach einer Desinfektion mit Peressigsäure keine Trocknung stattfindet, es zu einem schnellen Wiederbewuchs kommt. Auf getrockneten Endoskopen erfolgte keine Besiedlung. Feuchtigkeit ist demnach ein wichtiger Faktor bei einer potentiellen Wiederverkeimung. In wasserführenden Systemen ist das nicht zu verhindern. Das Risiko einer erneuten Kontamination ist folglich sehr hoch. Manche Mikroorganismen sind außerdem in der Lage unter Stressbedingungen in einen sogenannten „viable-but-non-culturable“-Zustand (VBNC) überzugehen (Weichart, 1999; Yamamoto, 2000). Sie sind somit nicht mehr kulturell nachweisbar, können jedoch noch infektiös sein. Dieser Zustand ist auch bei hygienisch

relevanten Mikroorganismen, wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver, 2005), *Legionella pneumophila* (Chang et al., 2007) oder *Helicobacter pylori* (Dunn et al., 1997), bekannt. Die im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung durchgeführte Bestimmung der Gesamtzellzahl veranschaulichte, dass in den meisten Fällen durch die Behandlung nicht alle Mikroorganismen entfernt wurden. Einige Bakterien könnten aufgrund des durch die Desinfektion erzeugten Stresses ihre Stoffwechselaktivitäten herunter reguliert haben und waren dadurch kulturell nicht mehr nachweisbar. Nach Beendigung der Behandlung haben sie sich wieder erholt und sind erneut aufgekeimt.

Eine andere Möglichkeit ist, dass es zu einer Neubesiedlung aus der Wasserphase gekommen ist. Wenn noch Biofilmmatrix oder tote Zellen im System vorhanden sind, können neue Mikroorganismen diese als Nährstoffquelle nutzen und möglicherweise einen Biofilm bilden, der sich vom vorherigen vollständig unterscheidet (Roeder et al., 2010). In den durchgeführten Untersuchungen konnte der Biofilm nur vereinzelt vollständig entfernt werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass sich Bakterien im Biofilm ansiedeln, die aufgrund bestimmter Eigenschaften oder eines bestehenden Selektionsdrucks vorher nicht etablieren konnten. Damit steigt auch das Risiko, dass sich als Folge einer Desinfektion schnellwüchsige und daher oft hygienisch relevante Bakterien entwickeln. Deshalb sind auch nach einer erfolgreichen Desinfektion regelmäßige Kontrollen und, wenn erforderlich, Nachbehandlungen, z.B. kontinuierliche Zudosierung von Desinfektionsmittel in niedriger Konzentration, unerlässlich (Exner et al., 2007).

Nach Absetzen des Desinfektionsmittels, unabhängig vom eingesetzten Wirkstoff, erfolgt somit eine direkte Wiederverkeimung des Systems. Die Werte sind zudem in den meisten Fällen höher, als vor der Desinfektion. Ob die Wiederverkeimung durch ein erneutes Aufkeimen oder eine Neubesiedlung verursacht wurde, konnte durch diese Untersuchungen nicht festgestellt werden. Deshalb erfolgten weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Populationsdynamik.

4.2.2 Untersuchungen zur Populationsdynamik

Aufgrund der vorliegenden Resultate sollte untersucht werden, ob sich die Biofilme, die nach einer Desinfektion auftraten von denen vor der Behandlung, in ihren Populationen unterscheiden. Für die Untersuchungen wurden die mit Ozon und die Wasserstoffperoxid (+ Zusätzen) behandelten Schläuche ausgewählt. Die Analyse zum Verwandtschaftsgrad der vorhandenen Biofilmpopulationen erfolgten mittels DGGE (Abschnitt 2.5.9).

Die Bestimmung der Populationsgenetik in Biofilmen vor einer Desinfektionsmaßnahme und nach einer mit vollständiger Reduktion der KBE zeigte, dass sich die Biofilmgemeinschaften im Biofilm vor und nach der Maßnahme deutlich voneinander unterschieden (Abschnitt 3.2.2). Nach der Behandlung mit Ozon waren die Populationen nur noch zu 53% mit den Populationen aus dem vorherigen Biofilm identisch (Abb. 27). Diese Veränderung in der Populationsgemeinschaft unterstützt die These, dass es zu einer Neubesiedlung kommt. Die inaktivierten Zellen können als Nährstoffquelle dienen und ein verstärktes Wachstum hervorrufen (Roeder et al., 2010). Außerdem entsteht ein neuer Selektionsdruck, wodurch die Ansiedlung von vorher nicht im Biofilm angesiedelten Mikroorganismen erleichtert wird (Roeder et al., 2010).

Auffällig war, dass die mit Wasserstoffperoxid in Kombination mit Zusatzstoffen behandelten Biofilme einen sehr hohen Verwandtschaftsgrad in ihren neuen Populationen aufwiesen. Zum unbehandelten Biofilm lag maximal eine Gemeinsamkeit von 64,3 % vor. Die mit Wasserstoffperoxid und Silber behandelten Biofilme wiesen aber untereinander eine Populationsäquivalenz von 84 % auf. Dies spricht dafür, dass der eingesetzte Wirkstoff einen Einfluss auf den Wieder- bzw. Neubewuchs eines Biofilms hat. Bakterien, die das KatA Gen tragen sind durch die Produktion von Katalasen gegen die Wirkung von Wasserstoffperoxid geschützt (Elkins et al., 1999; Stewart et al., 2000b). Diese wären in ihrem Wachstum durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid begünstigt (Roeder et al., 2010). Dadurch könnte die Desinfektion mit einem bestimmten Wirkstoff einen neuen Selektionsdruck erzeugen. Eichler et al. (2006) beschrieben u.a., dass Chlorungen für nitrifizierende Bakterien wachstumsfördernd sein können. Außerdem sind Resistenzen gegenüber Silber ein weit diskutiertes und häufig beschriebenes Thema (Li et al., 1997; Franke, 2007; Roempp, 2007), was einen weiteren Selektionsvorteil darstellen kann.

Die in einer Kombination aus Wasserstoffperoxid mit Fruchtsäuren behandelten Biofilme hatten sogar eine Übereinstimmung von 96%. Die Fruchtsäuren, dienen laut Herstellerangaben nur dazu, dem Wasserstoffperoxid das Eindringen in die Zelle zu erleichtern und es vor den Katalasen zu schützen (Jati, 2008). Die vorliegenden Ergebnisse deuten eher auf einen noch größeren Selektionsdruck durch den Zusatz der Fruchtsäuren hin. Saure Mittel können zwar nachweislich Schimmel abtöten. Auf mineralischen Flächen kann es jedoch zu einer chemischen Neutralisation der Säuren kommen. Dadurch wird der pH erhöht und die Wirksamkeit gegenüber Schimmelbefall wird deutlich reduziert. Im Einzelfall kann das Schimmelpilzwachstum dadurch sogar gefördert werden, weil die neutralisierte

Essiglösung als Nährsubstrat wirkt (Umweltbundesamt, 2005a). Dieser Effekt kann eventuell auch auf andere Mikroorganismen als Schimmelpilze zutreffen. Bei den hier eingesetzten Fruchtsäuren (Sorbinsäure, Benzoesäure) handelt es sich, wie beschrieben, ausschließlich um in der Lebensmittelindustrie verwendete Konservierungsmittel (Lück und Jäger, 1995; BGBl, 1998). Ein wachstumsfördernder Effekt kann jedoch aufgrund der erzielten Resultate nicht ausgeschlossen werden.

Weil die Biofilmpopulationen in unbehandelten Biofilmen und nach der Desinfektion zu maximal 64 % identisch waren, muss es zumindest partiell zu einer Neubesiedlung gekommen sein. Es ist anzunehmen, dass die autochthone Wasserflora zu einem gewissen Anteil dauerhaft gleichartige Mikroorganismen beherbergt. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Stämme vollständig entfernt wurden, sich jedoch erneut angesiedelt haben. Das Beispiel Wasserstoffperoxid zeigt zudem, dass durch die Wahl des Desinfektionsmittels ein Selektionsdruck entsteht. In weiterführenden Untersuchungen sollte ein wichtiger Aspekt die Charakterisierung der vor und nach einer Desinfektion im Biofilm auftretenden Mikroorganismen sein.

4.3 Schlussfolgerungen & Konsequenzen

4.3.1 Beurteilung der getesteten Desinfektionsverfahren

Alle getesteten Wirkstoffe haben ihr Vor- und Nachteile. Chlordioxid hat sich im Bereich der Trinkwasserdesinfektion über Jahre zu Recht etabliert. Es reduziert bereits in niedrigen Konzentrationen effektiv koloniebildende Einheiten (Abschnitt 3.1.1) und ist Studien zufolge materialschonender als andere Desinfektionsverfahren (Eisnor et al., 2004). Es können jedoch auch gesundheitsschädliche Substanzen wie Chlorit und Chlorat gebildet werden (Fantuzzi et al., 2003a). Freies Chlor aus ECA - Verfahren kann eine echte Alternative zu Natrium- bzw. Calciumhypochlorit - Lösungen darstellen. Es ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand weniger gesundheitsgefährdend, langfristig kostengünstiger, materialschonender und hat bei gleicher Wirkstoffkonzentration eine höhere Desinfektionsleistung und es sind bisher keine Resistenzen bekannt. Fakt ist jedoch, dass es bis heute größtenteils im Lebensmittelbereich eingesetzt wurde und dies hauptsächlich in Asien (Huang et al., 2008). Die Erfahrungen im Bereich der Trinkwasserdesinfektion beschränken sich auf wenige Publikationen aus Russland, wo es seit den 70ern u.a. auch in

Krankenhäusern zur Wunddesinfektion eingesetzt wird (Bakhir et al., 2001; Wolvos, 2006). Wasserstoffperoxid hat den Vorteil, dass es keine Nebenprodukte entstehen, es zerfällt in Wasser und Sauerstoff. Jedoch besitzen Bakterien eine Vielzahl von Schutzmechanismen gegenüber Wasserstoffperoxid (Chelikani et al., 2004). Der Zusatz von Silber soll einerseits zu einem synergetischen Effekt bzgl. der antibakteriellen Wirkung führen andererseits treten immer häufiger Resistenzen gegenüber Silber auf (Roempp, 2007). Der Zusatz von Fruchtsäuren führt einerseits zu einer erhöhten Desinfektionsleistung, andererseits kann ein Einfluss auf ein verstärktes Wiederverkeimen nicht ausgeschlossen werden (Umweltbundesamt, 2005a). Ozon hat eine sehr hohe antibakterielle Wirkung, ist jedoch verhältnismäßig instabil und hat eine hohe Toxizität.

Eine Empfehlung für einen bestimmten Wirkstoff und die Wahl der Maßnahme, ob eine kontinuierliche Behandlung über einen Zeitraum von mehreren Monaten oder eine Stoßbehandlung eingesetzt werden soll, kann aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht gegeben werden. In beiden Untersuchungsmodellen konnten die KBE erfolgreich reduziert werden. Generell muss jedoch festgestellt werden, dass die Problematik mit den teilweise noch sehr hohen Gesamtzellzahlen bei der Stoßbehandlung genauso auftritt wie bei der kontinuierlichen Behandlung und das trotz deutlich erhöhter Wirkstoffkonzentrationen. Die REM - Aufnahmen zeigten bei vielen Anwendungen deutliche Rückstände der Biofilmmatrix auf der Schlauchoberfläche. Zum Teil war, wie bei den Stoßbehandlungen mit Chlordioxid (Abb. 12 B, C), gar kein Unterschied zum Zeitpunkt vor der Behandlung erkennbar. Deshalb ist es hier umso wichtiger, dass nach einer Desinfektionsmaßnahme die Leitungen gründlich gespült werden, um dadurch möglicherweise weitere Mikroorganismen aus dem System zu entfernen und somit den Verbraucher zu schützen. Ein Wiederaufkeimen der koloniebildenden Einheiten nach Beenden der Behandlung konnte mit keinem getesteten Wirkstoff verhindert werden (Abschnitt 3.2). Es ist zudem nicht auszuschließen, dass manche Wirkstoffe wie Silber, Fruchtsäuren oder Tenside das Wachstum einiger Mikroorganismen fördern können oder einen neuen Selektionsdruck erzeugen.

Einige Desinfektionsmittelhersteller propagieren Präventivmaßnahmen zu ergreifen, um Kontaminationen im Trinkwasser vorzubeugen. In den Untersuchungen mit initial sterilen Silikonschläuchen konnte bestätigt wurde, dass durch den Einsatz von chemischen Desinfektionsmitteln eine Biofilmbildung verhindert werden kann. Nach der TrinkwV gilt jedoch das Minimierungsgebot (§ 6, Abs.3). Dieses schreibt vor, dass „Konzentrationen von chemischen Stoffen, die das Wasser für den menschlichen Gebrauch verunreinigen und

nachteilig beeinflussen können, so niedrig gehalten werden (sollen), wie dies nach den a.a.R.d.T. (DVGW, 2008b) mit vertretbarem Aufwand unter Berücksichtigung der Umstände des Einzelfalles möglich ist.“ Im Normalfall sollte ein den a.a.R.d.T. entsprechender Umgang mit der Trinkwasserinstallation einen Einsatz von Desinfektionsverfahren unnötig machen (DIN, 2008). Es muss jedoch darauf hingewiesen werden muss, dass es sich bei dem Begriff „allgemein anerkannte Regeln der Technik“, um einen so genannten „unbestimmten Rechtsbegriff“ handelt. Jeder Einzelfall bedarf der Auslegung und Konkretisierung durch ein Gericht (VOB/B, 2009). Es ist somit Ermessenssache, ob die a.a.R.d.T. eingehalten worden sind oder nicht. Eine prophylaktische Behandlung der Trinkwasserinstallation kann folglich in Einzelfällen durchaus als erforderlich betrachtet werden, bei denen schon eine minimale Kontamination des Trinkwassers gesundheitliche Beeinträchtigungen zur Folge hätte (z.B. Dialysezentren) oder es bekannt ist, dass an einem Standort stark schwankende Wasserqualitäten vorliegen. Es ist deshalb empfehlenswert eine hygienisch medizinische Risikoabschätzung vorzunehmen, um darauf basierend entscheiden zu können, ob Präventivmaßnahmen ergriffen werden sollen.

Festzuhalten ist, dass es bei der Durchführung einer Desinfektionsmaßnahme die korrekte Handhabung mit der Desinfektionslösung die Grundvoraussetzung ist und ein erhebliches Fachwissen vorhanden sein muss (DVGW, 2009). Überdosierungen können generell zu Materialschädigungen führen und gesundheitsgefährdend sein. Zu niedrige Wirkstoffkonzentrationen können dazu führen, dass eine vorliegende Kontamination nicht eliminiert wird oder es zur Resistenzbildung kommt. *Legionella pneumophila* kann innerhalb von wenigen Tagen Resistenzen gegenüber Chlor ausbilden und schützt sich u.a. durch die Ausbildung eines Biofilms. Generell ist die Ausbildung von Resistenzen in sessilen Gemeinschaften höher (Cooper und Hanlon, 2010).

Durch den Einsatz von Desinfektionsverfahren mit Chlorderivaten werden durch Oxidationsvorgänge unvermeidbare toxische Reaktions- und Nebenprodukte wie Trihalogenmethane (THM) gebildet (Uyak et al., 2008). Die Autoren konnten jedoch zeigen, dass durch den Einsatz von Nanofiltrationsmembranen die Abgabe von THMs an das Trinkwasser, welches den Verbraucher erreicht, minimiert werden kann. Zudem werden beim Einsatz von Oxidationsmitteln unvermeidlich korrosive Nebenprodukte gebildet, die das Leitungsmaterial angreifen können (Chien et al., 2009). Chlordioxid ist sogar ein stärkeres Oxidationsmittel als Chlor, was beim Einsatz über einen längeren Zeitraum oder in höheren Konzentrationen ebenfalls zu Korrosionen am Leitungsmaterial führen kann (Hubbard et al.,

2009). Eine Desinfektion mit freiem Chlor oder Chlordioxid hat nachweislich einen Alterungseffekt auf das Trägermaterial. Chlordioxid ist jedoch um ein Vielfaches aggressiver gegenüber Kunststoffmaterialien (Castagnetti et al., 2008).

Zudem müssen die Bedingungen vor Ort bekannt sein und beachtet werden. Für eine Stoßbehandlung muss die Trinkwasserinstallation für einen Zeitraum von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen von der Trinkwasserversorgung abgetrennt werden und der Zugang für den Verbraucher verhindert werden (DVGW, 2009). Besonders in öffentlichen Einrichtungen wie Krankenhäusern, in denen jederzeit Frischwasser benötigt wird, ist dies nicht möglich ohne den Betrieb einzustellen. In einem solchen Fall ist, wenn notwendig, eine kontinuierliche Behandlung zu empfehlen. Der Routinebetrieb ist somit nicht eingeschränkt. Ein weiterer wichtiger Punkt sind die entstehenden Kosten, die sich auch aus den gegebenen Voraussetzungen am Einsatzort ergeben.

Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass eine Desinfektion keine Reinigung darstellt bzw. eine solche mit einschließt oder sogar ersetzen kann. Die Wirksamkeit kann jedoch durch eine vorhergehende Spülung mit Wasser oder durch pulsierenden Luftzusatz erhöht werden (DVGW, 2009). In Studien im BMBF – Projekt „Biofilme in der Hausinstallation“ wurde, im auch hier verwendeten Silikonschlauchmodell, der Einsatz von Reinigungsmitteln in Kombination mit Luftimpulsen zur Entfernung von Trinkwasserbiofilmen getestet. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass durch zusätzliche Impulse vor und nach dem Einsatz des Reinigungsmittels höhere Reduktionen der koloniebildenden Einheiten und der Gesamtzellzahl erzielt werden konnten. Hinzukommt, dass auch die Biofilmmatrix optisch besser vom Trägermaterial entfernt wurde (Exner et al., 2010b).

Gerade in hoch frequentierten Gebäuden, speziell in Einrichtungen, in denen sich größtenteils immunsupprimierte Menschen aufhalten, wie in Krankenhäusern oder Altenheimen ist es daher empfehlenswert das Trinkwasser regelmäßig untersuchen zu lassen. Dadurch kann, wenn erforderlich, rechtzeitig reagiert und es können entsprechende Maßnahmen, einschließlich einer kontinuierlichen Desinfektion, ergriffen werden (Exner et al., 2007; Bloomfield et al., 2008).

4.3.2 Mikrobiologische Anforderungen der Trinkwasserverordnung sind nicht uneingeschränkt für die Beurteilung von Desinfektionsverfahren anwendbar

Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass die bisher geforderte Bestimmung der KBE nicht ausreicht, um die Situation sowohl nach einer nach TrinkwV §11 durchgeführten kontinuierlichen Behandlung, als auch nach einer Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion, ausreichend beurteilen zu können. Ein Nachteil der Bestimmung der KBE und im Allgemeinen von kultivierbaren Nachweismethoden ist, dass nur ein geringer Anteil der Bakterien (<1%) überhaupt kultivierbar ist (Ultee et al., 2004). Vorteil der Bestimmung der Gesamtzellzahl ist, dass, wie der Name schon sagt, alle Zellen, die im System vorhanden sind detektiert werden. Allerdings kann über den Zustand der Zellen keine Aussage gemacht werden. Beim Ergebnis der GZZ – Bestimmung muss zudem beachtet werden, dass das Verfahren mit einer Nachweisgrenze mit $3,65 \times 10^3$ GZZ/cm² nicht sehr sensitiv ist. Es ist somit nicht auszuschließen, dass sich eventuell doch Mikroorganismen auf der Schlauchoberfläche angesiedelt haben, diese jedoch nicht kultivierbar sind.

In der Regel wird der Erfolg einer Desinfektionsmaßnahme nur mit klassisch - mikrobiologischen Methoden wie Kultivierungsverfahren überprüft (Gagnon et al., 2004; Surdeau et al., 2006; Silvestry-Rodriguez et al., 2008). Um mehr über den Zustand dieser Zellen in Erfahrung zu bringen müssen weitere Methoden zum Einsatz kommen.

Eine Möglichkeit, um einen tieferen Einblick zu bekommen sind Färbetechniken, wie die Life/Dead – Färbung, mit der zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden kann (Boulos et al., 1999; Stocks, 2004). Mit dieser Methode kann zwischen Zellen mit einer intakten (grün) oder defekten Membran (rot) differenziert werden (Ericsson et al., 2000). Allerdings muss dabei beachtet werden, dass durch Faktoren wie Kultivierungsbedingungen, die Temperatur oder Wachstumsraten, das Ergebnis beeinflusst werden kann (Boulos et al., 1999). Mehrere Studien zeigten in vergleichenden Untersuchungen mit der Durchflusszytometrie, dass mit der Life/Dead – Färbung nicht immer eindeutig zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden kann und es zu falschpositiven Signalen kommen kann (Joux und Lebaron, 2000; Hoefel et al., 2003; Berney et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit ist der regelmäßige Einsatz von molekularbiologischen Methoden, wie der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) (Pernthaler et al., 2004). Mit Hybridisierungstechniken konnte z. B. gezeigt werden, dass hygienisch relevante Mikroorganismen, wie Legionellen, auch nach einer Desinfektion im Biofilm persistieren (Schwartz et al., 2003). Tote Zellen verlieren ihre Membranintegrität und ihre Ribosomen,

werden in kürzester Zeit abgebaut. Somit wird auch die RNA degradiert (Hannig et al., 2007). Der Abbau der RNA kann demnach als Richtwert zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen mit FISH herangezogen werden (Vieira-Pinto et al., 2008; Rathnayaka und Rakshit, 2010).

Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass keine Korrelation zwischen den KBE, der GZZ und der noch sichtbaren Biofilmmatrix besteht. Eine erfolgreiche Reduktion der KBE ist kein Hinweis für ein desinfiziertes System. Regelmäßige Untersuchungen mit molekularbiologischen Methoden, wie PCR (Labrenz et al., 2004) oder FISH (Pernthaler et al., 2004), müssen langfristig als Routineuntersuchungen durchgeführt werden. Zudem können mit diesen Verfahren innerhalb von wenigen Stunden (PCR) oder Tagen (FISH) Ergebnisse erzielt werden, die eine schnelle Aussage über die Aktivität von Mikroorganismen zulassen. Der Nachweis mittels kultureller Verfahren dauert z. B. bei Legionellen bis zu 10 Tage. Es können folglich eher notwendige Maßnahmen ergriffen werden, um eine auftretende Gefahr, speziell für Patienten oder immunsupprimierte Menschen, zu eliminieren. Kulturelle Nachweisverfahren sollten jedoch nicht durch molekularbiologische Verfahren ersetzt, sondern ergänzt werden. Molekularbiologische Verfahren wie die PCR sind sehr spezifisch und erfassen möglicherweise nicht alle Mikroorganismen. Für molekularbiologische Nachweise sind Informationen über das Genom eines Mikroorganismus erforderlich. Für den Nachweis von *Helicobacter pylori* wird z.B. das UreA Gen als Zielsequenz ausgewählt, welches nur in *H. pylori* vorkommt (Linke et al., 2010). Es werden spezifische Zielsonden verwendet, die sich nur an diese Gensequenz anlagern und somit falschpositive Signale verhindern.

4.4 Testmodelle zur Validierung von chemischen Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen

Als Testmodell wurde für alle Untersuchungen das Silikonschlauchmodell verwendet. Durch das als Trägermaterial verwendete Silikon entsteht ein „worst case“-Szenario. Mikroorganismen können organischen Kohlenstoff assimilieren, um neues Zellmaterial zu produzieren und ihn als Energiequelle nutzen (LeChevallier et al., 1991). Das Silikon kann somit als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen dienen. Durch diese Vorlage von genügend Nährstoffen und dem ständigen Durchfluss mit Frischwasser kann sich ein natürlicher Biofilm aus der autochthonen Wasserflora innerhalb von wenigen Wochen bilden, was auf

manchen in Trinkwasseranlagen verbauten Materialien, wie z.B. Kupfer, in einem vergleichbaren Zeitraum nicht möglich ist. Hinzukommt, dass der Einfluss von nicht geeigneten Materialien in der Trinkwasserinstallation simuliert wird (Exner et al., 2002a).

4.4.1 Untersuchungen zur Praxisnähe des Silikonschlauchmodells

Es sollte untersucht werden, wie praxisnah das Silikonschlauchmodell ist. Dafür wurden Vergleichsuntersuchungen mit einem in der Trinkwasserinstallation verbauten Material zum Biofilmbewuchs und dem Einsatz von Desinfektionsverfahren durchgeführt. Als Vergleichsmaterial wurde Ethylen - Propylen - Dien - Kautschuk (EPDM) ausgewählt. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass das Biofilmwachstum auf beiden Materialien vergleichbar ist. Innerhalb von wenigen Wochen steigt die Zahl der Mikroorganismen bis zur Plateauphase und nach einem Jahr ist auf beiden Materialien die Oberfläche vollständig mit einem Biofilm bewachsen (Abb. 29). Auch wenn die Höchstwerte der KBE/cm² mit ca. 10⁵ und GZZ/cm² mit ca. 10⁶ durchschnittlich eine log₁₀-Stufe niedriger waren, als im Silikonschlauch, konnten bei den Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion Reduktionen der gleichen Größenordnung erzielt werden (Abschnitt 3.3). Aufgrund des mit 12 mm größeren Innendurchmessers (4 mm beim Silikonschlauch) muss das Wasser mit einem größeren Druck und somit erhöhter Fließgeschwindigkeit durch den EPDM - Schlauch fließen, um die gesamte Oberfläche zu benetzen. Das erschwert es den Mikroorganismen sich auf der Oberfläche anzusiedeln und es kommt auch zu weniger Ablagerungen von Partikeln, die sich im Wasser befinden und den Biofilmaufbau unterstützen. Trotz alledem ist die Besiedlungsdichte auf dem EPDM - Schlauch für ein mit Trinkwasser in Kontakt kommendes Material sehr hoch. Welche Anforderungen an Schlauchmaterialien, die für die wasserführenden Leitungen der Trinkwasserinstallation eingesetzt werden dürfen, gestellt werden, ist im Arbeitsblatt W 543 des DVGW (2005) festgelegt. Außerdem müssen die Materialien nach dem Arbeitsblatt W 270 (2008a) und den KTW - Empfehlungen (DVGW, 1977) geprüft sein. EPDM war bis zum Jahr 2006 als Material für die Trinkwasserinstallation zulässig. Als das UBA eine neue Leitlinie veröffentlichte und diese die 2. KTW - Empfehlungen für verschiedene Kunststoffe ersetzt hat, wurden die hygienischen Anforderungen verschärft. Materialien, die für unzugängliche Bereiche der Trinkwasserinstallation verwendet werden dürfen, müssen seitdem die KTW-A - Empfehlung haben. Vorher war eine KTW-C - Empfehlung ausreichend (DVGW, 2007). EPDM entspricht seitdem nicht mehr den Anforderungen. Dennoch müssen die bis dahin verwendeten

Schläuche jedoch nicht zeitnah entfernt werden. Es muss nur bei einer Neubeschaffung am Lebensende der sich im Gebrauch befindlichen Schläuche darauf geachtet werden, dass das verwendete Material den Anforderungen der KTW-A Kategorie entspricht (Meyer, 2007).

Durch die mit $>10^6$ KBE/cm² und $>10^7$ GZZ/cm² hohe Besiedlungsdichte können mit dem Silikonschlauchmodell Extremsituationen simuliert werden. Die in den Untersuchungen mit EPDM - Schläuchen erzielten Ergebnisse zum Bewuchs und zur Reduktion von Biofilmen waren mit den Testungen im Silikonschlauchmodell vergleichbar. Das Silikonschlauchmodell stellt somit ein ideales Testmodell zur praxisnahen Validierung von chemischen Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen dar.

4.4.2 Testmodell zur Begleitung von Praxismaßnahmen

Wirksamkeitsprüfungen werden unter definierten Bedingungen im Labor durchgeführt. Auch wenn diese in praxisnahen Testverfahren durchgeführt werden besteht zu den realen Bedingungen vor Ort eine nicht zu verkennende Diskrepanz. Es sollte ein Verfahren etabliert werden mit dem, eine mögliche Biofilmbildung und die Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren in der Praxis untersucht werden können. Der in den Untersuchungen eingesetzte Hygiene - Monitor (Abschnitt 2.2.2.3) stellt eine Variante des Silikonschlauchmodells dar, die dies mit einfachen Mitteln ermöglicht.

In dieser Arbeit konnte durch die Installation von Hygiene - Monitoren mit sterilen Silikonschläuchen an verschiedenen Standorten gezeigt werden, dass eine Biofilmbildung generell in allen Trinkwasserinstallationen, unabhängig vom Standort, stattfindet (Abschnitt 3.4.1). Es wurde dokumentiert, ob und wie schnell sich ein Biofilm in einem System bildet und wie hoch deren Besiedlungsdichte ist.

Zudem wurden zwei Desinfektionsmaßnahmen in öffentlichen Einrichtungen mit dem Hygiene - Monitor mit biofilmkontaminierten Silikonschläuchen begleitet, die mit dem gleichen Wirkstoff bei identischer Konzentration (800 mg/l H₂O₂ + 25 mg/l Silber), durchgeführt wurden und mit 12 Stunden den gleichen Behandlungszeitraum hatten (Abschnitt 3.4.2). Die Analysen der Silikonschläuche ergaben, dass die Maßnahmen aufgrund der Ergebnisse unterschiedlich zu bewerten waren. Die Reduktion der KBE/cm² unterschied sich um 2,30 log₁₀ - Stufen, bei den GZZ/cm² waren es 1,26 log₁₀ - Stufen. Auch die Betrachtung der REM - Aufnahmen offenbarte, dass nach der Maßnahme am ersten Einsatzort nur noch vereinzelte Rückstände der Biofilmmatrix sichtbar waren. Am zweiten Einsatzort war nahezu kein Unterschied zum Zeitpunkt vor der Behandlung zu erkennen (Abb. 34). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Erfolg einer Maßnahme von mehr

Faktoren abhängt, als nur der Wahl des Desinfektionsmittels. Verbaute Materialien, Verwinkelungen im System, Durchmessersprünge und generell Größe der Trinkwasserinstallation beeinflussen das Resultat. Es wird deutlich, dass in Laborversuchen erzielte Ergebnisse nicht gänzlich auf den Praxisfall übertragbar sind.

Außerdem kam der Hygiene – Monitor bei einer Desinfektion nach einer Kontamination mit *Pseudomonas aeruginosa* in einer neu installierten Trinkwasserinstallation zum Einsatz. Dabei konnte dokumentiert werden, dass die dort durchgeführte kontinuierliche Behandlung mit 0,2 mg/l Chlordioxid eine Ansiedlung von Mikroorganismen im Silikonschlauch zwar nicht verhindern, jedoch stark eindämmen konnte. Außerdem wurde belegt, dass durch die Behandlung eine Ansiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* auf der Schlauchoberfläche unterbunden werden konnte (Abschnitt 3.4.3). Bei der Wirksamkeitsprüfung von Chlordioxid, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, konnte mit einer kontinuierlichen Behandlung mit 0,2 mg/l die Ansiedlung von Bakterien im initial sterilen Silikonschlauch vollständig verhindert werden (Abschnitt 3.1.1.2). Es wird auch hier deutlich, dass Ergebnisse aus Laborversuchen nicht eins zu eins auf die Praxis übertragbar sind. Auch wenn Modelle, wie das Silikonschlauchmodell mit dem natürlichen Trinkwasserbiofilm aus der autochthonen Wasserflora, der Realität sehr nahe kommen, besteht trotzdem eine Diskrepanz aufgrund von nur schwer bis nicht möglich simulierbaren Gegebenheiten vor Ort.

Diese Ergebnisse verdeutlichen jedoch auch, dass durch den Einsatz des Hygiene - Monitors wichtige Information bei akuten und für zukünftige Desinfektionen in der Praxis gewonnen werden können. Der Hygiene-Monitor stellt ein System dar, das es ermöglicht Desinfektionsmaßnahmen vor Ort zu begleiten und auf deren Effektivität zu überprüfen. Wenn ein System, welches mit einem bestimmten Desinfektionsverfahren behandelt wird, gewährleistet, dass auch bei dem Einsatz eines Hygiene - Monitors eine Biofilmbildung ausbleibt oder ein bestehender Biofilm abgebaut wird, ist dies ein Hinweis, dass selbst bei Rahmenbedingungen die eine Besiedlung stark begünstigen, eine entsprechende Biofilmbildung kontrolliert werden kann. In einem Dialysezentrum konnte bei einer regelmäßigen Ozonierung mehrfach der Erfolg der Maßnahme durch die Installation eines Hygiene-Monitors belegt werden (Moritz et al., 2007; Brensing et al., 2009). Vor Ort Versuche zur Biofilmentfernung, die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mit Ozon durchgeführt wurden (Abschnitt 3.1.4), bestätigten wiederholt, dass mit dem Hygiene-Monitor der Erfolg einer Desinfektion dokumentiert werden kann (Lenz et al., 2010).

4.5 Empfehlung für Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren zur Entfernung von Biofilmen im Trinkwasserbereich in 3 Phasen, in Anlehnung an EN 14885

Bis heute beziehen sich alle Vorschriften und empfohlenen Untersuchungen auf die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, reicht dieser Parameter nicht aus, um eine uneingeschränkte Aussage über den hygienischen Zustand der Trinkwasserinstallation zu machen. Desinfektionsverfahren müssen eine Reihe von Prüfverfahren durchlaufen, bevor sie für die Trinkwasserdesinfektion eingesetzt werden dürfen. Ohne Zulassung des Umweltbundesamtes (UBA) und des Dachverbandes des Gas – und Wasserfachs (DVGW) darf kein Verfahren bei angeordneten Maßnahmen eingesetzt werden. Bis heute beziehen sich alle Vorschriften und Empfehlungen nur auf die mikrobielle Belastung in der Wasserphase. Die Biofilmproblematik wird nicht behandelt. Folglich gibt es auch kein einheitliches Prüfverfahren, in dem getestet wird, ob ein Desinfektionsverfahren wirksam gegenüber Biofilmen ist. Immer mehr Hersteller propagieren sehr aggressiv die Wirksamkeit ihrer Verfahren gegenüber Biofilme. Um den Anwender und Verbraucher zu schützen sind klar definierte Prüfrichtlinien notwendig.

Das Silikonschlauchmodell mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Varianten, stellt ein reproduzierbares und praxisnahes Modell dar, um die Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen zu überprüfen. Durch die Varianten des Silikonschlauchmodells können sowohl Langzeitbehandlungen mit niedrigen Konzentrationen, als auch kurzfristige Anlagendesinfektionen simuliert werden.

Für die zukünftige Überprüfung der Wirksamkeit von neuen und auch bestehenden Desinfektionsverfahren oder Rezepturen zur Inaktivierung von Mikroorganismen in Biofilmen im Trinkwasserbereich wird basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Kenntnissen ein Untersuchungsmodell, in Anlehnung an die europäische Normierung im CEN, in drei Phasen empfohlen. Dieser Untersuchung sollten sowohl Wirkstoffe unterzogen werden, die in den §11 der TrinkwV aufgenommen werden sollen, als auch Wirkstoffe, die nur für die Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion eingesetzt werden dürfen.

4.5.1 1.Phase: Test des Prüfprodukts im quantitativen Suspensionsversuch

In der Desinfektionsmittelprüfung gilt generell, dass ein neues Desinfektionsverfahren zunächst im quantitativen Suspensionsversuch geprüft werden muss. Ziel einer derartigen Untersuchung ist es unter standardisierten Bedingungen – wie Temperatur, Wasserqualität, Einwirkzeit, Wirkstoffkonzentration – Erkenntnisse über die desinfizierenden Eigenschaften eines Desinfektionsverfahrens zu gewinnen. Gleichzeitig sind solche Untersuchungen wichtig, um das Wirkspektrum eines Verfahrens definieren zu können. Nur so können Wirkungslücken gegenüber spezifischen Mikroorganismen validiert herausgearbeitet werden. Die Kenntnis dieser Wirksamkeitslücken ist notwendig, um sicherzustellen, dass es bei einer späteren praktischen Anwendung aufgrund der Wirksamkeitslücken, nicht zu einer Selektion von Mikroorganismen bei hiermit desinfizierten Systemen kommt. Vor diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung der grundsätzlichen Anforderungen an die Prüfung von Desinfektionsmitteln ist eine entsprechende quantitative Prüfung *in vitro* unverzichtbar. Diese Untersuchungen sind Voraussetzung, um unwirksame Desinfektionsverfahren nicht in die aufwändige praxisnahe Prüfung aufnehmen zu müssen. Diese Vorgehensweise ist Grundlage jeder Desinfektionsmittelprüfung. Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an EN 13623 (CEN, 2007).

4.5.2 2.Phase: Test des Prüfprodukts im quantitativen Keimträgertest

Die Untersuchung im praxisnahen Keimträgertest ist ebenfalls Grundlage jeder Desinfektionsmittelprüfung. In den hier etablierten Varianten des Silikonschlauchmodells kann der Einsatz von Desinfektionsverfahren je nach Anwendungsbereich (kontinuierliche Behandlung nach TrinkwV, Stoßbehandlung zur Anlagendesinfektion) simuliert werden. Diese Untersuchung ist unerlässlich, um einem Prüfprodukt eine Wirksamkeit gegenüber Trinkwasserbiofilmen unter praxisnahen Bedingungen bescheinigen zu können. Die Untersuchungen enthalten grundsätzlich die Bestimmung der KBE/cm², der GZZ/cm² und eine visuelle Auswertung mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen der Schlauchoberfläche.

4.5.3 3.Phase: Test des Prüfprodukts im Feldversuch

Die Untersuchungen brachten zum Ausdruck, dass Ergebnisse aus Laborversuchen nicht eins zu eins auf den Praxisfall übertragbar sind. Zur Erfolgskontrolle von Sanierungen und zur

Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln eignet sich der Hygiene - Monitor. Nach Bedarf wird dieser entweder mit einem sterilen Silikonschlauch bestückt, um zu dokumentieren, ob durch eine Desinfektionsmaßnahme eine Ansiedlung von Mikroorganismen verhindert werden kann oder mit einem mit Biofilm bewachsenen Silikonschlauch, um die Wirkung der Maßnahme zu überprüfen. Im Rahmen der Untersuchung werden wie in Phase 2 KBE/cm² und die GZZ/cm² bestimmt. Ebenfalls werden Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Schlauchoberfläche durchgeführt. Bei bekannten Kontaminationen sollten zudem molekularbiologische Verfahren wie PCR oder FISH hinzugezogen werden, um die Mikroorganismen in allen möglichen Zuständen zu detektieren.

4.6 Fazit

In dieser Arbeit konnte ein Modell in 3 Phasen entwickelt werden, das eine effektive Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen zulässt. Durch die praxisnahen Varianten des Silikonschlauchmodells zur Simulation einer Desinfektionsmaßnahme und dem Hygiene - Monitor ist zudem eine Verbindung zwischen Laborversuchen und der Praxis hergestellt worden, die eine zeitnahe und schnelle Beurteilung eines Verfahrens ermöglicht.

5 Zusammenfassung

Die Einhaltung einer für den menschlichen Gebrauch hygienisch sicheren Wasserqualität wird durch die Vorgaben der TrinkwV geregelt. Dazu gehören auch Vorschriften zur Desinfektion des Trinkwassers. Viele Mikroorganismen können sich in Biofilmen organisieren. 95% der im Wasser vorkommenden Mikroorganismen befinden sich in Trinkwasserbiofilmen. Dieser bietet durch seine geringe Durchlässigkeit einen erhöhten Schutz vor äußeren Einflüssen wie Bioziden. Hygienisch relevante Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Legionella pneumophila* können in Biofilmen persistieren und somit ein Gesundheitsrisiko speziell für immunsupprimierte Menschen darstellen.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von derzeit verfügbaren chemischen Desinfektionsverfahren gegenüber Trinkwasserbiofilmen im Silikonschlauchmodell untersucht. Auch nach vollständiger Reduktion der koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden mittels Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) in nahezu allen Untersuchungen noch Mikroorganismen im System nachgewiesen. Zudem zeigten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der behandelten Schlauchoberflächen, dass die Biofilmmatrix durch eine Desinfektion nur bedingt entfernt werden kann. Die verstärkt auf den Markt dringenden ECA - Verfahren stellen für die Zukunft eine echte Alternative zu den herkömmlichen Verfahren dar. Es besteht jedoch für den Einsatz zur Trinkwasserdesinfektion noch ein großer Forschungsbedarf. Die nach der Trinkwasserverordnung geforderte Bestimmung der KBE ist somit nicht ausreichend, um eine uneingeschränkte Beurteilung über den Zustand einer Trinkwasserinstallation abzugeben. Durch den Einsatz von Färbetechniken und ggf. molekularbiologischen Methoden ist eine hygienische umfassende Bewertung möglich.

Zudem konnte in Untersuchungen zur Remanenzwirkung der getesteten Desinfektionsverfahren gezeigt werden, dass bereits 14 Tage nach einer erfolgreichen Desinfektion, d.h. vollständige Inaktivierung der KBE, ein verstärktes Wiederaufkeimen in den behandelten Schläuchen zu beobachten war. Die Analyse der Populationsdynamik vor und nach einer Behandlung offenbarte, dass es große Unterschiede in den Populationen gab. Diese wurden sichtlich durch einen vom eingesetzten Wirkstoff erzeugten Selektionsdruck beeinflusst. Regelmäßige Nachkontrollen und eventuelle Nachbehandlungen sind somit notwendig, um ein Wasser führendes System dauerhaft in einem hygienisch sicheren Zustand zu halten.

Zudem konnte dargestellt werden, dass im Silikonschlauchmodell vergleichbare Wachstumsraten und durch Desinfektionen erzielte Reduktionen wie in einem EPDM-Schlauch, der auch in der Trinkwasserinstallation vorhanden ist, erreicht werden. Das verwendete Silikon kann von Mikroorganismen als Nährstoffquelle genutzt werden und fördert dadurch die Biofilmbildung. Es stellt somit „ein worst case“ Szenario dar und simuliert den Einsatz von für die Trinkwasserinstallation nicht geeigneten Materialien. Das Silikonschlauchmodell ist ein praxisnahes Modell zur Simulation von Desinfektionsmaßnahmen zur Biofilmbehandlung im Trinkwasserbereich. Mit dem Hygiene-Monitor konnte außerdem eine Variante des Silikonschlauchmodells etabliert werden, die es ermöglicht Desinfektionen vor Ort zu begleiten und zeitnah bewerten zu können. Die erzielten Ergebnisse sind auf Laborversuche übertragbar und stellen somit eine Verbindung zwischen Simulation und Praxis dar. Bisher gibt es keine Richtlinien zur Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren oder Rezepturen zur Inaktivierung von Mikroorganismen in Biofilmen im Trinkwasserinstallationsbereich. Die Untersuchungen verdeutlichten, dass ein einheitliches und reproduzierbares Prüfverfahren erforderlich ist. Resultierend aus den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und Erkenntnissen wird in Anlehnung an die europäische Normierung im CEN ein Untersuchungsmodell in 3 Phasen empfohlen:

1.Phase: Test des Prüfprodukts im quantitativen Suspensionsversuch (in Anlehnung an EN 13623) zur Bestimmung des Wirkspektrums eines Desinfektionsverfahrens

2.Phase: Test des Prüfprodukts im quantitativen Keimträgertest: Simulation einer Desinfektionsmaßnahme im Silikonschlauchmodell, je nach Anwendung in den entsprechenden Varianten zur Behandlung nach TrinkwV und zur Anlagendesinfektion

3.Phase: Test des Prüfprodukts im Feldversuch, Begleitung einer Desinfektions- bzw. Sanierungsmaßnahme mit dem Hygiene-Monitor zur Überprüfung der Desinfektionsleistung in der Praxis

6 Literatur

98/83/EC, C.D. (1998). Council Directive on the quality of water intended for human consumption. OJ L 330, 32-54.

AAMI (2004). Dialysate for Hemodialysis. (Arlington, Association for the Advancement of Medical Instrumentation).

Alasri, A. und Moal, J.F. (1992). Désinfection d'un biofilm mixte: efficacité du chlore, du formol, de l'acide, du peroxyde d'hydrogène. *Sci Tech Eau*, 461-467.

Amato, R.L. und Curtis, J. (2002). The practical application of ozone in dialysis. *Nephrol News Issues* 16, 27-30.

Armon, R., Starosvetzky, J., Arbel, T. und Green, M. (1997). Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* in biofilm systems. *Water Science and Technology* 35, 293-300.

Ayebah, B. und Hung, Y.C. (2005). Electrolyzed water and its corrosiveness on various surface materials commonly found in food processing facilities *Journal of Food Process Engineering* 28, 247-264.

Ayebah, B., Hung, Y.C. und Frank, J.F. (2005). Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. *J Food Prot* 68, 1375-1380.

Bakhir, V.M., Zadorozhny, Y., Leonov, B.I., Panicheva, S.A. und Prilutsky, V.I. (2001). Electrochemical activation: water treatment and production of effective solutions. Paper presented at: Third International Symposium "Electrochemical Activation in Medicine, Agriculture and Industry (Moscow).

Baldry, M.G. (1983). The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Bacteriol* 54, 417-423.

BARbBl (1998). TRGS 515 "Technische Regeln für Gefahrstoffe- Lagern brandfördernder Stoffe in Verpackungen und ortsbeweglichen Behältern", 53.

Bari, M.L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T. und Isshiki, K. (2003). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *J Food Prot* 66, 542-548.

Baribeau, N., Prevost, M., Desjardins, R., Lafrance, P. und Gates, D.J. (2002). Chlorite and chlorate ion variability in distribution systems, Vol 94 (Denver, CO, USA, American Water Works Association).

Beier, C.L., Horn, M., Michel, R., Schweikert, M., Gortz, H.D. und Wagner, M. (2002). The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp. related to the Rickettsiales

- (Alphaproteobacteria) and to *Francisella tularensis* (Gammaproteobacteria). *Appl Environ Microbiol* 68, 6043-6050.
- Berney, M., Weilenmann, H.U. und Egli, T. (2006). Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Microbiology* 152, 1719-1729.
- Beumer, A., King, D., Donohue, M., Mistry, J., Covert, T. und Pfaller, S. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in drinking water and biofilms by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 76, 7367-7370.
- BGBI (1998). Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Bundesministerium der Justiz).
- Bhinu, V.S. (2005). Insight into biofilm-associated microbial life. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10, 15-21.
- Bloomfield, S., Exner, M., Fara, G.M. und Scott, E.A. (2008). Prevention of the spread of infection - the need for a family-centred approach to hygiene promotion. *Euro Surveill* 13.
- Boonaert, C.J.P., Dufrene, Y.F. und Rouxhet, P.G. (2002). Adhesion primary of microorganisms onto surfaces., Vol 1 (New York, John Wiley and Sons).
- Borneff, J., Eggers, H.-J., Grün, L., Gundermann, K.-O., Kuwert, E., Lammers, T., Primavesi, C.A., Rotter, M., Schmidt-Lorenz, W., Schubert, R., Sonntag, H.-G., Spicher, G., Teuber, M., Thofern, E., Weinhold, E. und Werner, H.-P. (1981). Richtlinien für die Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren; Erster Teilabschnitt (Stand 1.1.1981); I. In vitro Tests; II. Versuche unter praxisnahen Bedingungen; 1. Hygienische Händedesinfektion; 2. Chirurgische Händedesinfektion (DGHM).
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. und Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37, 77-86.
- Boyle, M.A., O'Donnell, M.J., Russell, R.J. und Coleman, D.C. (2010). Lack of cytotoxicity by Trustwater Ecasol used to maintain good quality dental unit waterline output water in keratinocyte monolayer and reconstituted human oral epithelial tissue models. *J Dent* 38, 930-940.
- Bredholt, S., Maukone, J., Kujanpää, K., Alanko, T., Olofson, U., Husmark, U., Sjöberg, A.M. und Wirtanen, G. (1999). Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in a low-pressure system. *Eur Food Res Technol* 209, 145-152.
- Breising, K.A., Neugebauer, E., Heidkamp, P., Raab, P., Pöge, U., Gerhardt, T., Dedenbach, M., Kluth, R., Speuser, W., Kistemann, T., Linke, S., Lenz, J., Büttgen, S., Exner, M. und Gebel, J. (2009). Intermittierende Ozonierung des Wasserringsystems in einem ambulanten Hämodialyse-Zentrum. *Hygiene und Medizin* 34, 176-182.

- Bryant, E.A., Fulton, G.P. und G.C., B. (1992). Disinfection alternatives for safe drinking water (Van Nostrand Reinhold).
- Buck, J.W., Iersel, M.W., Oetting, R.D. und Hung, Y.C. (2002). In Vitro Fungicidal Activity of Acidic Electrolyzed Oxidizing Water. *Plant Disease* 86, 278-281.
- Bürschgens, A. (2009). Normgerechte Absicherung von Trinkwasser-Installationen - die zehn Todsünden in privaten Hausinstallationen. *Energie Wasser Praxis* 5, 24-30.
- Castagnetti, D., Dragoni, E., Scirè Mammano, G., Fontani, N., Nuccini, I. und Sartori, V. (2008). Effect of sodium hypochlorite on the structural integrity of polyethylene pipes for potable water conveyance. Paper presented at: Proceedings of Plastic Pipes XIV, September 22–24 (Budapest, Hungary).
- CEN (2005). Chemical disinfectants and antiseptics. Application of European standards for chemical disinfectants and antiseptics. In prEN 14885, C.T. 216, ed. (European Committee for Standardization (CEN)).
- CEN (2007). Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity against *Legionella pneumophila* of chemical disinfectants for aqueous systems - Test method and requirements (phase 2, step 1). In prEN 13623, C.T. 216, ed. (European Committee for Standardization (CEN)).
- Chang, C.W., Hwang, Y.H., Cheng, W.Y. und Chang, C.P. (2007). Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J Appl Microbiol* 102, 1636-1644.
- Chang, C.Y., Hsieh, Y.H., Hsu, S.S., Hu, P.Y. und Wang, K.H. (2000). The formation of disinfection by-products in water treated with chlorine dioxide. *J Hazard Mater* 79, 89-102.
- Chang, E.E., Guo, H.C., Li, I.S., Chiang, P.C. und Huang, C.P. (2010). Modeling the formation and assessing the risk of disinfection by-products in water distribution systems. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 45, 1185-1194.
- Characklis, W.G. (1990). Kinetics microbial transformations. In *Biofilms* (New York, John Wiley and Sons), 195-231.
- Chauret, C.P., Radziminski, C.Z., Lepuil, M., Creason, R. und Andrews, R.C. (2001). Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Appl Environ Microbiol* 67, 2993-3001.
- Chelikani, P., Fita, I. und Loewen, P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 61, 192-208.
- Chien, C.C., Kao, C.M., Chen, C.W., Dong, C.D. und Chien, H.Y. (2009). Evaluation of biological stability and corrosion potential in drinking water distribution systems: a case study. *Environ Monit Assess* 153, 127-138.
- Cho, M., Kim, J., Kim, J.Y., Yoon, J. und Kim, J.H. (2010). Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Res* 44, 3410-3418.

- Cholodny, N. (1930). Über eine Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. Arch Mikrobiol *1*, 620.
- Choong, S. und Whitfield, H. (2000). Biofilms and their role in infections in urology. BJU Int *86*, 935-941.
- Chowdhury, S., Champagne, P. und McLellan, P.J. (2010). Factorial analysis of trihalomethanes formation in drinking water. Water Environ Res *82*, 556-566.
- Clark, J.A., Burger, C.A. und Sabatinos, L.E. (1982). Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water, and new main water samples. Can J Microbiol *28*, 1002-1013.
- Clark, R.M., Sivaganesan, M., Rice, E.W. und Chen, J. (2003). Development of a Ct equation for the inactivation of *Cryptosporidium* oocysts with chlorine dioxide. Water Res *37*, 2773-2783.
- Cochran, W.L., McFeters, G.A. und Stewart, P.S. (2000). Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. J Appl Microbiol *88*, 22-30.
- Colbourne, J.S., Pratt, D.J., Smith, M.G., Fisher-Hoch, S.P. und Harper, D. (1984). Water fittings as sources of *Legionella pneumophila* in a hospital plumbing system. Lancet *1*, 210-213.
- Conn, H.J. (1932). The Cholodny technic for the microscopic study of the soil microflora. Zentr Bakt Parasitenk, Abt II *87*, 233-239.
- Cooper, I.R. und Hanlon, G.W. (2010). Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. J Hosp Infect *74*, 152-159.
- Costerton, J.W. (1995). Overview of microbial biofilms. J Ind Microbiol *15*, 137-140.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. und Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol *41*, 435-464.
- DAB (2010). Deutsches Arzneibuch 2010. Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2008 inkl. Nachträge 6.1. - 6.7, Amtliche 6. deutsche Ausgabe.
- Davis, C.P., Shirtliff, M.E. und Trieff, N.M. (1994). Quantification, auqlification and microbial killing efficiency of antimicrobial chlorine-based substances produced by iontophoresis. Antimicrob Agents Chemother *38*, 2768-2774.
- Davis, D., G. (1999). Regulation of matrix polymer in biofilm formation and dispersion. In Microbial Extracellular Polimeric Substances (Heidelberg, Springer).
- DIN (1979). Technische Normung und Recht (Berlin, Deutsches Institut für Normung e.V.), 111.

DIN (2000). Leitsätze für Anforderungen an Trinkwasser, Planung, Bau, Betrieb und Instandhaltung der Versorgungsanlagen. In Technische Regeln des DVGW (Berlin, Deutsches Institut für Normung e.V.).

DIN (2001). EN 1717 Schutz des Trinkwassers vor Verunreinigungen in Trinkwasser-Installationen und allgemeine Anforderungen an Sicherheitseinrichtungen zur Verhütung von Trinkwasserverunreinigungen durch Rückfließen. In Technische Regeln des DVGW.

DIN (2007). EN 806-5 2009-05 Technische Regeln für Installationen innerhalb von Gebäuden für Wasser für den menschlichen Gebrauch.

DIN (2008). DIN 1988 Technische Regeln für Trinkwasser-Installationen - Technische Regeln des DVGW, Teile 1-8 (Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V.).

DIN (2010). DIN EN 15664 Einfluss metallischer Werkstoffe auf Wasser für den menschlichen Gebrauch - Dynamischer Prüfstandversuch für die Beurteilung der Abgabe von Metallen. (Berlin, Deutsches Institut für Normung e.V.).

Ditommaso, S., Biasin, C., Giacomuzzi, M., Zotti, C.M., Cavanna, A. und Ruggenini Moiraghi, A. (2005). Peracetic acid in the disinfection of a hospital water system contaminated with Legionella species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26, 490-493.

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881-890.

Donlan, R.M. und Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193.

Dunn, B.E., Cohen, H. und Blaser, M.J. (1997). Helicobacter pylori. *Clin Microbiol Rev* 10, 720-741.

Dusseau, J.Y., Duroselle, P. und Freney, J. (2004). Gaseous sterilization. In Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, H.A.s. Russell, ed. (Oxford, Blackwell), 401-435.

DVGW (1977). KTW-Empfehlungen (KTW = Kunststoffe und Trinkwasser) - Leitlinien des Umweltbundesamtes zur hygienischen Beurteilung von organischen Materialien im Kontakt mit Trinkwasser.

DVGW (1997). Arbeitsblatt W 294 - Anforderungen an UV-Desinfektionsgeräte und deren Betrieb (Dachverband des Gas- und Wasserfaches e.V.).

DVGW (2000). Arbeitsblatt W 291 - Reinigung und Desinfektion von Wasserverteilungsanlagen (Dachverband des Gas- und Wasserfaches e.V.).

DVGW (2002). Werkstoffe in der Trinkwasser-Installation (Dachverband des Gas- und Wasserfaches e.V.).

DVGW (2004). Arbeitsblatt W 551 - Trinkwassererwärmungs- und Trinkwasserleitungsanlagen; Technische Maßnahmen zur Verminderung des

Legionellenwachstums; Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasser-Installationen.

DVGW (2005). Arbeitsblatt W 543 - Druckfeste flexible Schlauchleitungen für Trinkwasser-Installationen - Anforderungen und Prüfungen (Dachverband des Gas- und Wasserfachs e.V.).

DVGW (2007). TWIN - Schläuche und Schlauchleitungen - Anforderungen in der Praxis (Dachverband des Gas- und Wasserfachs e.V.).

DVGW (2008a). Arbeitsblatt W 270 - Vermehrung von Mikroorganismen auf Materialien für den Trinkwasserbereich; Prüfung und Bewertung.

DVGW (2008b). Technische Regeln für Trinkwasser-Installationen - Technische Regeln des DVGW, Teile 1-8 (Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V.).

DVGW (2009). Desinfektion von Trinkwasser-Installationen zur Beseitigung mikrobieller Kontaminationen. (Dachverband des Gas- und Wasserfaches e.V.).

Dyksen, J., E., Marshall, M., M., Gera, A. und Clancy, J., L. (1998). Cost of advanced UV for inactivating crypto, Vol 90 (Denver, CO, ETATS-UNIS, American Water Works Association).

Eboigbodin, K.E., Seth, A. und Biggs, C.A. (2008). A review of biofilms in domestic plumbing. *J AmWater Works Assoc* 100, 131-138.

Edward, J. (1998). Ozone: the alternative for clean dialysis water. *Dial Transplant* 27, 706-712.

Eichler, S., Christen, R., Holtje, C., Westphal, P., Botel, J., Brettar, I., Mehling, A. und Hofle, M.G. (2006). Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 72, 1858-1872.

Eisnor, J.D., John, D., Gagnon, G.A. und Graham, A. (2004). Impact of secondary disinfection on corrosion in a model water distribution system, Vol 53 (London, Royaume-Uni, IWA).

Elasri, M.O. und Miller, R.V. (1999). Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 65, 2025-2031.

Eleraky, N.Z., Potgieter, L.N. und Kennedy, M.A. (2002). Virucidal efficacy of four new disinfectants. *J Am Anim Hosp Assoc* 38, 231-234.

Elkins, J.G., Hassett, D.J., Stewart, P.S., Schweizer, H.P. und McDermott, T.R. (1999). Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* 65, 4594-4600.

Ericsson, M., Hanstorp, D., Hagberg, P., Enger, J. und Nystrom, T. (2000). Sorting out bacterial viability with optical tweezers. *J Bacteriol* 182, 5551-5555.

- Exner, M. (2002). Prevention and Management of Substance Terrorism against Water Supply (Denmark WHO ECEH Rome, Kopenhagen, WHO).
- Exner, M., Christiansen, B., Flemming, H.C., Gebel, J., Kistemann, T., Kramer, A., Martiny, H., Mathys, W., Nissing, W., Pleischl, S., Simon, A., Trautmann, M., Zastrow, K. und Engelhart, S. (2010a). *Pseudomonas aeruginosa* - Plädoyer für die Einführung eines technischen Maßnahmewertes in die Novelle der Trinkwasserverordnung. *Hyg Med* 35, 370-376.
- Exner, M., Gebel, J. und Lenz, J. (2010b). Überprüfung der Wirkung von Desinfektionsmaßnahmen und Erarbeitung von Handlungsanweisungen in Schadensfällen. In "Vermeidung und Sanierung von Trinkwasser - Kontaminationen durch hygienisch relevante Mikroorganismen aus Biofilmen der Hausinstallation", F. H.C., ed. (Mülheim an der Ruhr, IWW), 181-230.
- Exner, M. und Gornik, V. (1990). Cryptosporidiosis - Charakterisierung einer neuen Infektion mit besonderer Berücksichtigung des Wassers als Infektionsquelle. *Zentralbl Hyg* 190, 13-25.
- Exner, M. und Hartemann, P. (2009). Summary of the second meeting of the International Forum on Water Hygiene in Buildings (IFOWAHB) from 01 to 02.06.2007 in Stockholm. *Int J Hyg Environ Health* 212, 449-458.
- Exner, M. und Kistemann, T. (2004). Bedeutung der Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung 2001) für die Krankenhaushygiene. *Bundesgesundhbl* 47, 384-391.
- Exner, M., Kramer, A., Kistemann, T., Gebel, J. und Engelhart, S. (2007). Wasser als Infektionsquelle in medizinischen Einrichtungen, Prävention und Kontrolle. *Bundesgesundhbl* 50, 1-10.
- Exner, M., Kramer, A., Lajoie, L., Gebel, J., Engelhart, S. und Hartemann, P. (2005). Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am J Infect Control* 33, S26-40.
- Exner, M., Pleischl, S. und Engelhart, S. (2009). Zur Entwicklung und Begründung von Maßnahmewerten für Legionellen in Hausinstallations-Systemen in Deutschland. *Umweltmed Forsch Prax* 14, 207-224.
- Exner, M., Tuschewitzki, G.-J. und Scharnagel, J. (1987). Influence of biofilms by chemical disinfectants and mechanical cleaning. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 183, 549-563.
- Exner, M., Vacata, V. und Gebel, J. (2002a). Biofilme in der Wasserversorgung - Bedeutung, Vorkommen, Prävention und Kontrolle. (Institut für Hygiene und öffentliche Gesundheit der Universität Bonn), 10.
- Exner, M., Vacata, V. und Gebel, J. (2002b). Wirksamkeit der Desinfektion auf Biofilme. In "Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser", F. H.C., ed. (Mülheim an der Ruhr, IWW), 303-339.

- Fabrizio, K.A. und Cutter, C.N. (2003). Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 66, 1379-1384.
- Falbe, J. und Regitz, M. (1997). *Roempp Lexikon, Chemie* (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Fantuzzi, G., Sansebastiano, G., Righi, E., Predieri, G., Cesari, C., Zoni, R., Veronesi, L., Saglia, S. und Aggazzotti, G. (2003a). Presence of disinfection by-products (DBPs) and other halogenated compounds in drinking water samples collected in the areas of Modena and Parma. *Ann Ig* 15, 663-670.
- Fantuzzi, G., Sansebastiano, G., Righi, E., Predieri, G., Cesari, C., Zoni, R., Veronesi, L., Saglia, S. und Aggazzotti, G. (2003b). [Presence of disinfection by-products (DBPs) and other halogenated compounds in drinking water samples collected in the areas of Modena and Parma]. *Ann Ig* 15, 663-670.
- Fatemi, P. und Frank, J.F. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *J Food Prot* 62, 761-765.
- Ferroni, A., Nguyen, L., Pron, B., Quesne, G., Brusset, M.C. und Berche, P. (1998). Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *J Hosp Infect* 39, 301-307.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. und O'Gara, J.P. (2005). Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 54, 509-510.
- Flemming, H.C. (2002). Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 629-640.
- Flemming, H.C., Percival, S.L. und Walker, J.T. (2002). Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Supply* 2, 271-280.
- Flemming, H.C. und Wingender, J. (2001a). Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit* 31, 169-180.
- Flemming, H.C. und Wingender, J. (2001b). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. *Water Sci Technol* 43, 9-16.
- Flemming, H.C. und Wingender, J. (2002). Was Biofilme zusammenhält: Proteine, Polysaccharide. *Chemie in unserer Zeit* 36, 30-42.
- Franke, S. (2007). Microbiology of the Toxic Noble Metal Silver. In "Molecular Microbiology of Heavy Metals", D.H. Nies, ed. (Berlin, Springer), 343-355.
- Fuchs, G. und Schlegel, H.G. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie*, 8 edn (Georg Thieme Verlag).
- Gabriel, O.I., E. und Hung, Y.-C. (2004). Acidic electrolyzed water properties as affected by processing parameters and their response surface models. In *Journal of Food Processing and Preservation*, 11-27.

- Gagnon, G.A., O'Leary, K.C., Volk, C.J., Chauret, C., Stover, L. und Andrews, R.C. (2004). Comparative Analysis of Chlorine Dioxide, Free Chlorine and Chloramines on Bacterial Water Quality in Model Distribution Systems. *Journal of Environmental Engineering* 130, 1269-1279.
- Gagnon, G.A., Rand, J.L., O'Leary K, C., Rygel, A.C., Chauret, C. und Andrews, R.C. (2005). Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water Res* 39, 1809-1817.
- Gebel, J., Lenz, J., Linke, S. und Exner, M. (2009). Biofilmbedingte Hygienerisiken in Trinkwasserinstallationen - Untersuchungen zur Wirksamkeit einer mittels Membranzellenelektrolyse hergestellten Desinfektionslösung. *Krankenhaus Hygiene + Management* 5, 17-20.
- Gebel, J., Otte, A. und Exner, M. (2005). Wirksamkeitsprüfung biozider Wirkstoffe in biofilmkontaminierten Systemen unter praxisnahen Bedingungen. *Hyg Med* 30, 72-79.
- Gebel, J., Werner, H., Kirsch-Altena, A. und Bansemir, K. (2001). Standardmethoden der DGHM zur Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren. mhp Verlag, 1-80.
- Geldreich, E.E. (1996). *Microbial Quality of Water Supply in Distribution Systems*. (Boca Raton, CRC Press, Inc).
- Glaze, W.H. (1987). Drinking-water treatment with ozone. *Environmental Science & Technology* 21, 224-230.
- Gordon, G. (2001). Is all chlorine dioxide created equal? *J Am Water Works Assoc* 93, 163-174.
- Göttlich, E. und Flemming, H.C. (2002). Auftreten von obligat und fakultativ pathogenen Organismen in Trinkwasser-Biofilmen. In *Berichte aus dem IWW*, 86-102.
- Grummt, H.-J. (2007). Trinkwasser in Deutschland ist gut bis sehr gut. Qualitätsbericht für den Zeitraum 2005 bis 2007. *Bundesgesetzblatt* 50, 276-283.
- Guo, G. und Chen, X. (2009). Halogenating reaction activity of aromatic organic compounds during disinfection of drinking water. *J Hazard Mater* 163, 1207-1212.
- Hager, H., Schneemann, H. und Wurm, G. (1995). Resistenz von Mikroorganismen und Viren. In *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Waren und Dienste* (Springer Verlag).
- Halliwell, B. und Gutteridge, J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219, 1-14.
- Hamsch, B., Sacre, C. und Wagner, I. (2004). Heterotrophic plate count and consumer's health under special consideration of water softeners. *Int J Food Microbiol* 92, 365-373.

- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E. und Al-Ahmad, A. (2007). Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 52, 1048-1056.
- Hedberg, C.W. und Osterholm, M.T. (1993). Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* 6, 199-210.
- Henoun Loukili, N., Becker, H., Harno, J., Bientz, M. und Meunier, O. (2004). Effect of peracetic acid and aldehyde disinfectants on biofilm. *J Hosp Infect* 58, 151-154.
- Hentschel, W. und Waider, D. (2004). Kommentar zum DVGW-Arbeitsblatt W 551. Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums in Trinkwasser-Installationen., 1 edn (Wirtschafts und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH).
- Hoefel, D., Grooby, W.L., Monis, P.T., Andrews, S. und Saint, C.P. (2003). Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J Microbiol Methods* 55, 585-597.
- Hoenic, N.A. und Levin, R. (2008). Water treatment for dialysis: technology and clinical implications. *Contrib Nephrol* 161, 1-6.
- Hofmann, R., Andrews, R.C. und Ye, Q. (1999). Impact of Giardia Inactivation Requirements on ClO₂ By-Products. *Environmental Technology* 20, 147 - 158.
- Holtmann, D. und Sell, D. (2001). Investigations into the application of a process for the determination of microbial activity in biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 826-830.
- Hsu, S.-Y. (2005). Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering* 66, 171-176.
- Hsu, S.Y. (2003). Effects of water flow rate, salt concentration and water temperature on efficiency of an electrolyzed oxidizing water generator. *Journal of Food Engineering* 60, 469-473.
- Huang, Y.-R., Hung, Y.-C., Hsu, S.-Y., Huang, Y.-W. und Hwang, D.-F. (2008). Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19, 329-345.
- Hubbard, H., Poppendieck, D. und Corsi, R.L. (2009). Chlorine dioxide reactions with indoor materials during building disinfection: surface uptake. *Environ Sci Technol* 43, 1329-1335.
- Iaturu, A. und Knocke, W.R. (1992). Removing chlorite by the addition of ferrous iron. *J Am Water Works Assoc* 84, 63-68.
- Jati (2008). Das Missverständnis mit den Fruchtsäuren (Hallenberg).
- Johnston, M.D. und Jones, M.V. (1995). Disinfection tests with intact biofilms: combined use of the Modified Robbins Device with impedance detection. *J Microbiol Methods* 21, 15-26.

- Jones, C., Handley, P., Robson, G., Eastwood, I. und Greenhalgh, M. (1996). Biocides incorporated into plasticized polyvinylchloride reduce adhesion of *Pseudomonas fluorescens* BL146 and substratum hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology* 81, 553-560.
- Joux, F. und Lebaron, P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect* 2, 1523-1535.
- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S.R., Deepak, V. und Gurunathan, S. (2010). Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 79, 340-344.
- Kim, C., Hung, Y.C. und Brackett, R.E. (2000). Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *J Food Prot* 63, 19-24.
- Kimura, M., Mikami, K., Hoshikawa, H., Mori, T., Kasai, H. und Yoshimizu, M. (2006). Effect of rearing using an electrolyzed seawater on reduction of *Vibrio parahaemolyticus* from sea urchin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 72, 1-5.
- Kiura, H., Sano, K., Morimatsu, S., Nakano, T., Morita, C., Yamaguchi, M., Maeda, T. und Katsuoka, Y. (2002). Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. *J Microbiol Methods* 49, 285-293.
- Klischies, R., Panther, U. und Singbeil-Grischkat, V. (2008). *Hygiene und medizinische Mikrobiologie*, 5. edn (Stuttgart, Schattauer GmbH).
- Korn, C., Andrew, R.C. und Escobar, M.D. (2002). Development of chlorine dioxide-related by-product models for drinking water treatment. *Water Res* 36, 330-342.
- Korol, S., Fortunato, M.S., Paz, M., Sanahuja, M.C., Lazaro, E., Santini, P. und D'Aquino, M. (1995). [Water disinfection: comparative activities of ozone and chlorine on a wide spectrum of bacteria]. *Rev Argent Microbiol* 27, 175-183.
- Koseki, S., Yoshida, K., Isobe, S. und Itoh, K. (2001). Decontamination of lettuce using acidic electrolyzed water. *J Food Prot* 64, 652-658.
- Kotula, K.L., Kotula, A.W., Rose, B.E., Pierson, C.J. und Camp, M. (1997). Reduction of Aqueous Chlorine by Organic Material. *Journal of Food Protection* 60, 276-282.
- Kovaleva, J., Degener, J.E. und van der Mei, H.C. (2010). Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. *J Hosp Infect* 76, 345-350.
- Krasner, S.W. (2009). The formation and control of emerging disinfection by-products of health concern. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 367, 4077-4095.
- Kuhlmann, J. und Winter, R. (2009). Sicherung der Trinkwasserqualität in Trinkwasser-Installationen. *Energie Wasser Praxis* 4, 34-39.

- Labrenz, M., Brettar, I., Christen, R., Flavier, S., Botel, J. und Hofle, M.G. (2004). Development and application of a real-time PCR approach for quantification of uncultured bacteria in the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* 70, 4971-4979.
- Lappin-Scott, H. (1999). Claude E. Zobell - his life and contributions to biofilm. Paper presented at: 8th International Symposium on Microbial Ecology (Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada).
- Lasa, I., Del Pozo, J.L., Penades, J.R. und Leiva, J. (2005). [Bacterial biofilms and infection]. *An Sist Sanit Navar* 28, 163-175.
- Lawryshyn, Y.A. und Cairns, B. (2003). UV disinfection of water: the need for UV reactor validation, Vol 3 (London, Royaume-Uni, IWA).
- Le Dantec, C., Duguet, J.P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. und Vincent, V. (2002). Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 68, 1025-1032.
- LeChevallier, M.W., Babcock, T.M. und Lee, R.G. (1987). Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl Environ Microbiol* 53, 2714-2724.
- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D. und Lee, R.G. (1988). Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol* 54, 2492-2499.
- LeChevallier, M.W., Schulz, W. und Lee, R.G. (1991). Bacterial nutrients in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 57, 857-862.
- Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Keinanen, M.M., Kekki, T.K., Laine, O., Hirvonen, A., Vartiainen, T. und Martikainen, P.J. (2004). Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res* 38, 3769-3779.
- Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Vartiainen, T., Rantakokko, P., Hirvonen, A. und Martikainen, P.J. (2003). Impact of UV disinfection on microbially available phosphorus, organic carbon, and microbial growth in drinking water. *Water Res* 37, 1064-1070.
- Len, S.V., Hung, Y.C., Chung, D., Anderson, J.L., Erickson, M.C. und Morita, K. (2002). Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *J Agric Food Chem* 50, 209-212.
- Len, S.V., Hung, Y.C., Erickson, M. und Kim, C. (2000). Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *J Food Prot* 63, 1534-1537.
- Lenz, J., Linke, S., Gemein, S., Exner, M. und Gebel, J. (2010). Verification of the efficiency of chemical disinfection and sanitation measures in in-building distribution systems. *Int J Hyg Environ Health* 213, 198-203.
- Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L. und Chao, F.H. (2004). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. *Water Res* 38, 1514-1519.

- Li, X.Z., Nikaido, H. und Williams, K.E. (1997). Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol* 179, 6127-6132.
- Liao, L.B., Chen, W.M. und Xiao, X.M. (2007). The generation and inactivation mechanism of oxidation-reduction potential of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering* 78, 1326-1332.
- Linke, S., Lenz, J., Gemein, S., Exner, M. und Gebel, J. (2010). Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. *Int J Hyg Environ Health* 213, 176-182.
- Liu, J.L. und Li, X.Y. (2010). Biodegradation and biotransformation of wastewater organics as precursors of disinfection byproducts in water. *Chemosphere*.
- Loret, J.F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A.J., McCoy, W.F. und Levi, Y. (2005). Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *J Water Health* 3, 423-433.
- Lück, E. und Jager, M. (1995). *Chemische Lebensmittelkonservierung*, 3. edn (Heidelberg, Springer Verlag).
- Lück, E. und Jager, M. (1997). *Antimicrobial food additives: characteristics uses, effects*. (Berlin, Springer).
- Lynch, R.E. und Fridovich, I. (1978). Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 253, 1838-1845.
- Madigan, M., T. und Martinko, J., M. (2006). *Brock - Mikrobiologie*, 11 edn (Pearson Studium).
- Manz, W., Amann, R. und Szewczyk, R. (1995). In situ identification of Legionellaceae using 16S rDNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 141, 29-39.
- Mariott, N.G. und Gravani, R.B. (2006). *Principles of food sanitation*, Vol 5th edition (New York, Springer).
- Marshall, K.C. und Cruickshank, R.H. (1973). Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces. *Arch Mikrobiol* 91, 29-40.
- Mathieu, L. und Dollard, M.A. (1990). Effet de l'acide peracétique sur des bactéries en suspension et fixées. *J Français d'Hydro* 21, 101-111.
- McPherson, L.L. (1993). Understanding ORP's in the disinfection process. *Water Engineering and Management* 140, 29-31.
- Meyer, V. (2007). Anforderungen und Prüfungen für Schlauchleitungen für den zeitlich befristeten Transport von Trinkwasser. *Energie Wasser Praxis* 6.

- Mikx, F.H. (1983). [The study of dental plaque by Antoni van Leeuwenhoek in 1683]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 90, 421-424.
- Mincher, B.J., Mezyk, S.P., Cooper, W.J., Cole, S.K., Fox, R.V. und Gardinali, P.R. (2010). Free-radical chemistry of disinfection byproducts. 3. Degradation mechanisms of chloronitromethane, bromonitromethane, and dichloronitromethane. *J Phys Chem A* 114, 117-125.
- Mori, Y., Komatsu, S. und Hata, Y. (1997). Toxicity of electrolyzed strong acid aqueous solution-subacute toxicity test and effect on oral tissue in rats. *Odontology* 84, 619-626.
- Morin, P. (2000). Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. *J Hosp Infect* 45, 218-224.
- Morita, C., Sano, K., Morimatsu, S., Kiura, H., Goto, T., Kohno, T., Hong, W., Miyoshi, H., Iwasawa, A., Nakamura, Y., Tagawa, M., Yokosuka, O., Saisho, H., Maeda, T. und Katsuoka, Y. (2000). Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations. *Journal of Virological Methods* 85, 163-174.
- Moritz, M.M., Flemming, H.C. und Wingender, J. (2010). Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int J Hyg Environ Health* 213, 190-197.
- Moritz, M.M., Otte, A., Kistemann, T., Speuser, W., Brensing, K.A., Büttgen, S., Kirsch-Altena, A. und Gebel, J. (2007). Intermittierende Ozonierung zur Optimierung der Wasserqualität und Reduzierung von Biofilm-Bildung in der Wasserversorgung von Dialysezentren. *Hyg Med* 32, 234-240.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T. und Yacaman, M.J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346-2353.
- Morton, L.H.G. und Gaylarde, C.C. (2001). The role of microbial slimes in biodeterioration. *Culture* 22, 1-4.
- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S. und Donlan, R.M. (2001). Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147, 3121-3126.
- Murphy, J.C. (1998). Materials compatibility for ozone. *Water Cond Purif* 40.
- O'Donnell, M.J., Boyle, M., Swan, J., Russell, R.J. und Coleman, D.C. (2009). A centralised, automated dental hospital water quality and biofilm management system using neutral Ecasol maintains dental unit waterline output at better than potable quality: a 2-year longitudinal study. *J Dent* 37, 748-762.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B. und Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* 310, 91-109.

- Oliver, J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43 *Spec No*, 93-100.
- Oomori, T., Oka, T., Inuta, T. und Arata, Y. (2000). The Efficiency of Disinfection of Acidic Electrolyzed Water in the Presence of Organic Materials. *Analytical Sciences* 16, 365-369.
- Otte, A. (2006). Wirksamkeitsprüfung verschiedener Desinfektionsverfahren und antimikrobieller Oberflächen zur Vermeidung bzw. Reduktion von Biofilmen in trinkwasserführenden Hausinstallationssystemen unter Verwendung des Silikonschlauchmodells mit molekularbiologischer Bestimmung der Biofilm-Population (Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn).
- Otte, A., Gebel, J. und Exner, M. (2005). Elektrochemische Aktivierung als potentielles Verfahren zur Vermeidung und Elimination von Biofilmen in Trinkwasserführenden Systemen. *Hyg Med* 30, 398-403.
- Otte, A., Vacata, V., Exner, M. und Gebel, J. (2004). Effect of chlorine dioxide on biofilm removal and prevention in silicone tubes with running tap water.
- Paola, L. (2006). Treating diabetic foot ulcers with super-oxidized water, a look at advances in this pH-neutral non-toxic treatment. *Wounds* 18, 14-16.
- Park, H., Hung, Y.C. und Kim, C. (2002). Effectiveness of electrolyzed water as a sanitizer for treating different surfaces. *J Food Prot* 65, 1276-1280.
- Parsek, M.R. und Greenberg, E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13, 27-33.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. und Amann, R. (2004). Sensitive multi-color fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microorganisms. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3, 711-726.
- Räbiger, N. und Hövelmann, S. (2001). Entwicklung eines Messverfahrens zur Tensiddosierung bei der biologischen Abwasserreinigung. *Kurzberichte über Forschungsarbeiten, Max-Buchner-Stiftung*, 1002-1107.
- Rangel-Frausto, M.S., Rhomberg, P., Hollis, R.J., Pfaller, M.A., Wenzel, R.P., Helms, C.M. und Herwaldt, L.A. (1999). Persistence of *Legionella pneumophila* in a hospital's water system: a 13-year survey. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20, 793-797.
- Rathnayaka, U.S.K. und Rakshit, S.K. (2010). The Stability of rRNA in Heat-killed *Salmonella enterica* Cells and Its Detection by Fluorescent *In Situ* Hybridisation (FISH). *Tropical Life Sciences Research* 21, 47-53.
- Rice, R.G. (1985). The Impact of Chemicals on a Limited Resource. In *Safe Drinking Water* (Chelsea, Lewis Publishers), 123-159.
- Ridgway, H.F. und Olson, B.H. (1982). Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 44, 972-987.

- Rittmann, B.E. (1989). Detachment from biofilms. In Structure and function of biofilms (New York, John Wiley and Sons), 49-58.
- RKI (2004). Zu einer Häufung von Norovirus-Erkrankungen als Folge verunreinigten Trinkwassers. (Epidemiologisches Bulletin, Robert-Koch-Institut), 301-302.
- RKI (2007). Vorwort zur Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren (Robert Koch-Institut), 1332-1334.
- RKI (2010). Anforderungen an die Hygiene bei der medizinischen Versorgung von immunsupprimierten Patienten (Robert Koch-Institut), 357-388.
- Robbins, J.B., Fisher, C.W., Moltz, A.G. und Martin, S.E. (2005). Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *J Food Prot* 68, 494-498.
- Roeder, R.S., Lenz, J., Tarne, P., Gebel, J., Exner, M. und Szewzyk, U. (2010). Long-term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms. *Int J Hyg Environ Health* 213, 183-189.
- Roempp (2007). Online-Version des Chemischen Lexikons unter www.roempp.com.
- Röttlich, H. (2010). Legionellenbekämpfung - Konsequente Umsetzung in der Praxis ist notwendig! *Der Hygieneinspektor* 01/2010, 65-67.
- Rudat, K. (1994). Bemessung von Zirkulationssystemen unter Beachtung wirtschaftlicher, betriebstechnischer und hygienischer Anforderungen. *IKZ-Haustechnik* 49, Teil 1: H. 16, S. 26-34, Teil 12: H. 18, S. 21-36, Teil 13: H. 19, S. 28-31, Teil 14: H. S. 38-48.
- Russell, A.D. und Hugo, W.B. (1994). Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem* 31, 351-370.
- Russell, S.M. (2003). The effect of electrolyzed oxidative water applied using electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria on the surface of eggs. *Poult Sci* 82, 158-162.
- Rutala, W.A. und Weber, D.J. (1997). Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev* 10, 597-610.
- Sabria, M. und Yu, V.L. (2002). Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *Lancet Infect Dis* 2, 368-373.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakurai, Y., Nakatsu, M., Sato, Y. und Sato, K. (2003). Endoscope contamination from HBV- and HCV-positive patients and evaluation of a cleaning/disinfecting method using strongly acidic electrolyzed water. *Digestive Endoscopy* 15, 19-24.

- Schmitt, J., Schaule, G., Krietemeyer, S. und Flemming, H.C. (1997). Biofilme in Trinkwasserversorgungsanlagen. In "Verhalten von Mikroorganismen und Viren in der Trinkwasseraufbereitung" (Bonn, BMBF), 115-145.
- Schneider, R.P. und Leis, A., eds. (2002). Conditioning films in aquatic environments. (New York, John Wiley and Sons).
- Schulze-Robbeke, R. und Fischeider, R. (1989). Mycobacteria in biofilms. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 188, 385-390.
- Schurmann, J.J. (2001). Antibacterial activity of hydrogen peroxide against *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella* spp. In fruit juices, both alone and in combination with organic acids. (Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University).
- Schwartz, T., Hoffmann, S. und Obst, U. (2003). Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *J Appl Microbiol* 95, 591-601.
- Sekiya, S., Ohmori, K. und Harii, K. (1997). Treatment of infectious skin defects or ulcers with electrolyzed strong acid aqueous solution. *Artif Organs* 21, 32-38.
- Setlow, B., Setlow, C.A. und Setlow, P. (1997). Killing bacterial spores by inorganic hydroperoxides. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18, 384-388.
- Shimmura, S., Matsumoto, K., Yaguchi, H., Okuda, T., Miyajima, S., Negi, A., Shimazaki, J. und Tsubot, K. (2000). Acidic electrolysed water in the disinfection of the ocular surface. *Exp Eye Res* 70, 1-6.
- Shircliff, M.E. und Leid, J.G. (2009). *The Role of Biofilms in Device-Related Infections*. (Berlin, Springer).
- Silvestry-Rodriguez, N., Bright, K.R., Slack, D.C., Uhlmann, D.R. und Gerba, C.P. (2008). Silver as a residual disinfectant to prevent biofilm formation in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 74, 1639-1641.
- Simpson, G.D. (1995). Biofilm: removal and prevention with chlorine dioxide. Paper presented at: Third International Symposium on Chlorine Dioxide (New Orleans, LA).
- Sobsey, M.D. und Bartram, S. (2003). Water quality and health in the new millennium: the role of the World Health Organization Guidelines for Drinking-Water Quality. *Forum Nutr* 56, 396-405.
- Sohn, J., Amy, G., Cho, J., Lee, Y. und Yoon, Y. (2004). Disinfectant decay and disinfection by-products formation model development: chlorination and ozonation by-products. *Water Res* 38, 2461-2478.
- Spoering, A.L. und Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 183, 6746-6751.

- Squier, C., Yu, V.L. und Stout, J.E. (2000). Waterborne Nosocomial Infections. *Curr Infect Dis Rep* 2, 490-496.
- Srinivasan, A., Bova, G., Ross, T., Mackie, K., Paquette, N., Merz, W. und Perl, T.M. (2003). A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control *Legionella* species in a hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24, 575-579.
- Stelmack, P.L., Gray, M.R. und Pickard, M.A. (1999). Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl Environ Microbiol* 65, 163-168.
- Stewart, P.S., McFeters, G. und Huang, C. (2000a). Biofilm control by antimicrobial agents. In *Biofilms II: Process Analysis and Applications*, J.D. Bryers, ed. (New York, Wiley-Liss), 373-405.
- Stewart, P.S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J.G., Lewandowski, Z., Ochsner, U.A. und Hassett, D.J. (2000b). Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 66, 836-838.
- Stocks, S.M. (2004). Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry A* 61, 189-195.
- Stoodley, P., Dodds, I. und Boyle, J.D.L.-S., H.M. (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol Symp Suppl* 85, 19S-28S.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. und Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56, 187-209.
- Strathmann, M. (2003). Visualisierung und Charakterisierung von extrazellulären polymeren Substanzen in Biofilmen (Osnabrück, Der Andere Verlag).
- Surdeau, N., Laurent-Maquin, D., Bouthors, S. und Gelle, M.P. (2006). Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent, Oxsil 320N. *J Hosp Infect* 62, 487-493.
- Suzuki, T., Noro, T., Kawamura, Y., Fukunaga, K., Watanabe, M., Ohta, M., Sugieue, H., Sato, Y., Kohno, M. und Hotta, K. (2002). Decontamination of aflatoxin-forming fungus and elimination of aflatoxin mutagenicity with electrolyzed NaCl anode solution. *J Agric Food Chem* 50, 633-641.
- Tanaka, N., Fujisawa, T., Daimon, T., Fujiwara, K., Yamamoto, M. und Abe, T. (1999). The effect of electrolyzed strong acid aqueous solution on hemodialysis equipment. *Artif Organs* 23, 1055-1062.
- Tarrass, F., Benjelloun, M. und Benjelloun, O. (2010). Current understanding of ozone use for disinfecting hemodialysis water treatment systems. *Blood Purif* 30, 64-70.
- Täufel, A., Ternes, W., Tunger, L. und Zobel, M. (1993). *Lebensmittellexikon* (Hamburg, Behr's Verlag).

- Thompson, A. (1993). Chlorine dioxide process treatment data and cost. Chlorine dioxide use in water treatment. Paper presented at: 2nd International Symposium on Chlorine Dioxide (Houston, TX).
- Tiehm, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl Environ Microbiol* 60, 258-263.
- Trautmann, M., Royer, H., Helm, E., May, W. und Haller, M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into transmission pathways between hospital water and patients. *Filtration Supplement 1*, 63-70.
- TrinkwV (2001). Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001 (BGBl. I S. 959), die durch Artikel 363 der Verordnung vom 31. Oktober 2006 (BGBl. I S. 2407) geändert worden ist.
- Ultee, A., Souvatzi, N., Maniadi, K. und König, H. (2004). Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. *J Appl Microbiol* 96, 560-568.
- Umweltbundesamt (1996). Trinkwasser - Desinfektion und Bewertung der Desinfektionsnebenprodukte - Merkblatt 181/5a der FKST für Gesundheitsämter. (Umweltmed. Informationsdienst), 17-19.
- Umweltbundesamt (2005a). Leitfaden zur Ursachensuche und Sanierung bei Schimmelpilzwachstum in Innenräumen (Berlin).
- Umweltbundesamt (2005b). Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß §11 Trinkwasserverordnung 2001.
- Umweltbundesamt (2006). Leitlinie des Umweltbundesamtes zur hygienischen Beurteilung von organischen Materialien im Kontakt mit Trinkwasser (KTW-Leitlinie).
- Uyak, V., Koyuncu, I., Oktem, I., Cakmakci, M. und Toroz, I. (2008). Removal of trihalomethanes from drinking water by nanofiltration membranes. *J Hazard Mater* 152, 789-794.
- Vandevivere, P. und Kirchman, D.L. (1993). Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl Environ Microbiol* 59, 3280-3286.
- VDI (1998). VDI 6023 Hygiene in der Trinkwasser-Installation (Verein Deutscher Ingenieure).
- Venkitanarayanan, K.S., Ezeike, G.O., Hung, Y.C. und Doyle, M.P. (1999a). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 65, 4276-4279.
- Venkitanarayanan, K.S., Ezeike, G.O., Hung, Y.C. und Doyle, M.P. (1999b). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing water. *J Food Prot* 62, 857-860.

- Vianelli, N., Giannini, M.B. und Quarti, C. (2006). Resolution of a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a hematology unit with the use of disposable sterile water filters., WHO, ed. (Geneva).
- Vieira-Pinto, M., Oliveira, M., Aranha, J., Martins, C. und Bernardo, F. (2008). Influence of an enrichment step on *Salmonella* sp. detection by fluorescent in situ hybridization on pork samples. *Food Control* 19, 286-290.
- Vilve, M.K. und Sillanpaa, M.E. (2010). The influence of reaction conditions in the oxidation of organic compounds of nuclear laundry water by ozone. *Water Sci Technol* 61, 2557-2561.
- VOB/B (2009). Vergabe- und Vertragsordnung für Bauleistungen Teil B: Allgemeine Vertragsbedingungen für die Ausführung von Bauleistungen (§ 13 Abs. 7 a). (Deutscher Vergabe- und Vertragsausschuss für Bauleistungen).
- Völker, S., Schreiber, C. und Kistemann, T. (2010). Drinking water quality in household supply infrastructure - A survey of the current situation in Germany. *Int J Hyg Environ Health* 213, 204-209.
- von Rège, H. und Sand, W. (1998). Evaluation of biocide efficacy by microcalorimetric determination of microbial activity in biofilms. *J Microbiol Methods* 33, 227-235.
- Vonberg, R.P., Eckmanns, T., Bruderek, J., Rüden, H. und Gastmeier, P. (2005). Use of terminal tap water filter systems for prevention of nosocomial legionellosis. *Journal of Hospital Infection* 60, 159-162.
- Vorobjeva, N.V., Vorobjeva, L.I. und Khodjaev, E.Y. (2004). The bactericidal effects of electrolyzed oxidizing water on bacterial strains involved in hospital infections. *Artif Organs* 28, 590-592.
- Walker, J.T., Mackerness, C.W., Mallon, D., Makin, T., Williets, T. und Keevil, C.W. (1995). Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water system by chlorine dioxide. *J Ind Microbiol* 15, 384-390.
- Walker, S.P., Demirci, A., Graves, R.E., Spencer, S.B. und Roberts, R.F. (2005). Cleaning milking systems using electrolyzed oxidizing water, Vol 48 (St. Joseph, MI, USA, American Society of Agricultural Engineers).
- Weichart, D.H. (1999). Stability and survival of VBNC cells - conceptual and practical applications. *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Paper presented at: 8th International Symposium on Microbial Ecology (Halifax, Canada).
- Weiss, S.J., Lampert, M.B. und Test, S.T. (1983). Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. *Science* 222, 625-628.
- WHO (2008). Guidelines for drinking water quality, Vol 1, 3 edn (Geneva).
- Wilson, S., Hamilton, M.A., Hamilton, G.C., Schumann, M.R. und Stoodley, P. (2004). Statistical quantification of detachment rates and size distributions of cell clumps from wild-

type (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70, 5847-5852.

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

Winogradsky, S. (1928). The Direct Method in Soil Microbiology and Its Application To the Study of Nitrogen Fixation *Soil Sci* 25, 37-44.

Wolf, D. (2009). Probleme und Perspektiven der Nutzung elektrodiaphragmatisch hergestellter Desinfektionsmittel. (Berlin, Fakultät III: Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin).

Wolfe, R.L. (1990). Ultraviolet disinfection of potable water. *Environmental Science & Technology* 24, 768-773.

Wolvos, T. (2006). Advanced wound care with stable, super-oxidized water, a look at how combination therapy can optimize wound healing. *Wounds* 17, 11-13.

Yamamoto, H. (2000). Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *J Infect Chemother* 6, 112-114.

Zeng, X., Tang, W., Ye, G., Ouyang, T., Tian, L., Ni, Y. und Li, P. (2010). Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci* 75, M253-260.

Zobell, C.E. und Allen, E.C. (1933). Attachment of marine bacteria to submerged slides. *Soc Exp Biol Med* 30, 1409-1411.

Zobell, C.E. und Allen, E.C. (1935). The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *J Bacteriol* 29, 239-251.

ZVSHK (2004). Merkblatt - Desinfizieren und Inbetriebnahme von Trinkwasser-Installationen. (Zentralverband Sanitär Heizung Klima).

7 Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Martin Exner für die Möglichkeit mich im Rahmen meiner Doktorarbeit mit diesem interessanten und wichtigen Forschungsthema befassen zu dürfen. Außerdem möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und den stetigen Rückhalt während der Entstehungszeit dieser Arbeit bei ihm bedanken.

Herrn Dr. Jürgen Gebel möchte ich für das Vertrauen in meine Arbeit danken. Viele Ideen und Anregungen, die in wissenschaftlichen Diskussionen entstanden sind, haben zu einem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier möchte ich mich herzlichst für die Übernahme des Koreferats und die Bereitschaft, als Zweitbetreuer einzutreten, bedanken.

Zudem gilt mein Dank der gesamten Desinfektionsmitteltestung, in die ich sehr herzlich aufgenommen worden bin, für die stetige Hilfsbereitschaft und sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Hier möchte ich mich speziell bei Stefan bedanken, der, wenn „mal etwas nicht so wollte wie es soll“, mit Rat und Tat zur Hilfe stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Hygiene-Instituts bedanken. Hier sind speziell Sebastian und Tobi (und auch nochmal Stefan) zu erwähnen, die mit Ihrem Fußballfach(un)wissen dafür gesorgt haben, dass es auch zwischen den Arbeitszeiten nicht langweilig wurde.

Hinzu kommt der Dank an das Bundesministerium für Bildung und Forschung. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des BMBF - geförderten Verbundprojekts „Biofilme in der Hausinstallation“ durchgeführt.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und allen Freunden bedanken, die während der letzten Jahre nicht aufgehört haben mich zu unterstützen. Dabei geht mein spezieller Dank an Kathrin, die es in der Zeit nicht immer einfach mit mir hatte, aber nicht aufgehört hat zu mir zu halten!