

Untersuchungen zur erhöhten Toleranz von
biofilmassoziierten Mikroorganismen
und die Ausbildung von vbnc-Zuständen bei
Pseudomonas aeruginosa
gegenüber chlorabspaltenden Verbindungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stefan Linke

aus

Siegburg

Bonn 2012

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: 13.12.2012

Erscheinungsjahr: 2013

„Servandis et augendis civibus“

nach Johann Peter Frank

„Es ist nicht die stärkste Spezies die überlebt, auch nicht die intelligenteste, es ist diejenige, die sich am ehesten dem Wandel anpassen kann.“

Charles Darwin

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Biofilme	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Biofilmbildung	4
1.1.2.1 Allgemein	4
1.1.2.2 Der „conditioning film“ oder Die reversible Bindung	5
1.1.2.3 Die irreversible Bindung	6
1.1.3 Zusammensetzung eines Biofilms	8
1.1.4 Lebensraum für Mikroorganismen	8
1.1.5 Ablösung und Verteilung	9
1.1.6 Verhindern und Beseitigen von Biofilmen	10
1.1.7 Problematik der Biofilme im Hinblick auf gesundheitliche Gefährdung	10
1.1.8 Nutzen von Biofilmen	14
1.1.9 Studium von Biofilmen	14
1.1.10 Resistenzfaktoren im Biofilm	15
1.2 Pseudomonas aeruginosa	17
1.2.1 Allgemeines	17
1.2.2 Epidemiologie/Transmissionspfade	17
1.2.3 Virulenzfaktoren	18
1.2.4 Diagnose und Therapie	19
1.3 VBNC-Zustand	19
1.4 Anforderungen an das Trinkwasser	22
1.5 Desinfektionsverfahren	25
1.5.1 Technische Verfahren	25
1.5.2 Mechanische Verfahren	27
1.5.3 Physikalische Verfahren	27
1.5.3.1 Thermische Desinfektionen	27
1.5.3.2 Ultraviolette-Strahlung	27
1.5.3.3 Impuls-Luftdruck-Verfahren	28
1.5.4 Chemische Desinfektion	28
1.5.4.1 Freies Chlor	28
1.5.4.2 Elektrochemisch aktiviertes Wasser (ECA - Verfahren)	28
1.5.4.3 Chlordioxid	30
1.6 Ziel der Arbeit	31
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Materialien	32
2.1.1 Geräte	32
2.1.2 Verbrauchsgüter	33

2.1.3 Chemikalien	34
2.1.4 Lösungen und Puffer	36
2.1.5 Bakterienstämme	37
2.1.6 Nährmedien (Nährböden/ Nährbouillon)	38
2.1.7 Gel-Marker für DNA-Größenstandards	39
2.1.8 Oligonukleotide	40
2.1.9 Enzyme	40
2.1.10 Molekularbiologische Kits	41
2.1.11 Software	41
2.1.12 Das Silikonschlauchmodell	42
2.1.13 Varianten des Silikonschlauchmodells zur Simulation von Praxisfällen	44
a) Das Kreislaufsystem	44
b) Dosieranlage zur Simulation einer kontinuierlichen Behandlung	45
c) Kreislaufsystem als Simulation einer Stoßbehandlung	45
2.1.14 Angewandte Desinfektionsverfahren	47
2.1.15 Formeln zur Berechnung	48
2.1.15.1 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)/cm ²	48
2.1.15.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ)/cm ²	48
2.1.15.3 Bestimmung des Reduktionsfaktors (RF)	48
2.1.16 Mikrokopie	48
2.1.16.1 Lupe	48
2.1.16.2 Fluoreszenzmikroskopie	48
2.1.16.3 Rasterelektronenmikroskopie	49
2.2 Mikrobiologische Methoden	49
2.2.1 Stammhaltung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 939)	50
2.2.2 Kultivierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
2.2.3 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
2.2.4 Mikrobiologische Untersuchung auf <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Biofilmen	50
2.2.5 Probenahme am Silikonschlauchmodell	50
2.2.6 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten in Biofilmen	50
2.2.7 Anzucht von Reinkulturen aus Biofilmmaterial	51
2.2.8 Biofilmgenerierung im geschlossenen Kreislaufsystem	51
2.2.9 Aufkonzentrierung von Zellen und DNA	52
2.2.9.1 Vakuumfiltration	52
a) Vakuumfiltration von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
b) Aufkonzentrierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aus geringen Volumina	52
c) Vakuumfiltration zur Bestimmung der Gesamtzellzahl im Biofilm	52
2.2.9.2 Rückgewinnung der Mikroorganismen durch Aufreinigung von DNA aus Filterproben	52

2.2.10 Bestimmung geeigneter Neutralisationsmittel zum Abstoppen der Desinfektionswirkung	52
2.2.11 Quantitativer Suspensionsversuch	53
2.2.12 Methode zur Testung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln angelehnt an den Quantitativen Suspensionsversuch mittels Micro-Plate-Reader	53
2.3 Mikroskopische Methoden	54
2.3.1 Nativ-Präparate	54
2.3.2 Gramfärbungen	54
2.3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels DAPI – Färbung	55
2.3.4 Life/Dead-Färbung	55
2.3.5 PNA-FISH	56
2.3.5.1 PNA – FISH Prinzip	56
2.3.5.2 PNA – FISH Prozedur	56
2.3.6 Rasterelektronenmikroskopie	57
2.4 Molekularbiologische Methoden	57
2.4.1 DNA-Isolierung	57
2.4.2 Aufkonzentrierung von DNA	57
2.4.3 DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	58
2.4.4 Berechnung der Genomäquivalente	58
2.4.5 Primer- und Sondendesign	58
2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
2.4.7 Agarosegelelektrophorese	60
2.4.8 Aufreinigung amplifizierter DNA aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen	60
2.4.9 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	60
2.4.10 DNA-Sequenzierung	62
2.4.11 DNA-Sequenzvergleich	62
3 ERGEBNISSE	63
3.1 Charakterisierung von Biofilmen unterschiedlichen Alters	63
3.1.1 Verlauf von Gesamtzellzahl und der Anzahl koloniebildenden Einheiten bei Biofilmen unterschiedlichen Alters	63
3.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbeschaffenheit	64
3.1.3 Identifikation der Biofilmpopulation durch Sequenzierung	66
3.2 Einfluss chemischer Desinfektionsmittel auf die Entwicklung von Biofilmen	70
3.2.1 Einfluss chemischer Desinfektionsmittel als Stossbehandlung zur Anlagendesinfektion	70
3.2.1.1 Prüfprodukt 1: freies Chlor aus einem Verfahren zur Herstellung von Elektrochemisch aktiviertem Wasser (ECA-Produkt 1)	71
3.2.1.2 Prüfprodukt 2: freies Chlor aus einem Verfahren zur Herstellung von elektrochemisch aktiviertem Wasser (ECA-Verfahren 2)	73
3.2.1.3 Prüfprodukt 3: Chlordioxid (pH2)	77

3.2.2 Subletale Dosierung von chemischen Desinfektionsmitteln in kontinuierlicher Behandlung von Biofilmen	82
3.2.2.1 Prüfprodukt 4: Natriumhypochlorit	82
3.2.2.2 Prüfprodukt 2: freies Chlor aus Verfahren zur Herstellung von elektrochemisch aktiviertem Wasser (ECA-Verfahren 1)	86
3.3 Untersuchungsmodelle zur Einnistung von <i>P. aeruginosa</i> in Trinkwasserbiofilme	89
3.3.1 Untersuchung des Silikonschlauchmodells auf natürliches Vorkommen des Zielorganismus	89
3.3.2 Einnistung von <i>P. aeruginosa</i> in Modellbiofilme	90
3.3.2.1 Modellbiofilm A – Übersicht	90
3.3.2.2 Modellbiofilm B – Übersicht	93
3.3.2.3 Modellbiofilm C – Übersicht	95
3.3.2.4 Modellbiofilm D – Übersicht	97
3.4 Etablierung eines Verfahrens zur Detektion möglicher vbnc-Zustände bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nach der Behandlung mit Desinfektionsmitteln	100
3.4.1 Etablierung des Micro-Plate-Reader Modells	100
3.4.1.1 Prüfprodukt 2: ECA-Wasser	102
3.4.1.2 Prüfprodukt 3: Chlordioxid	104
3.4.1.3 Prüfprodukt 4: Natriumhypochlorit	106
3.4.1.4 Test auf vbnc-Zustände	108
3.4.2 Einsatz des Micro-Plate-Reader Verfahrens zur Detektion von vnbc-Zuständen	108
3.4.2.1 Test auf vbnc-Zustände	109
4 DISKUSSION	111
4.1 Charakterisierung der Biofilme unterschiedlichen Alters	112
4.1.1 Verlauf von Gesamtzellzahl und Anzahl koloniebildender Einheiten in Biofilmen unterschiedlichen Alters	113
4.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbeschaffenheit	113
4.1.3 Identifikation der Biofilmpopulation durch Sequenzierung	114
4.2 Einfluss chemischer Desinfektionsmittel auf die Entwicklung von Biofilmen	115
4.2.1 Einfluss chemischer Desinfektionsmittel als Stossbehandlung zur Anlagendesinfektion	115
4.2.1.1 Vergleich der Prüfprodukte 1 (ECA-Produkt 1), Prüfprodukt 2 (ECA-Produkt 2) und Prüfprodukt 3 (Chlordioxid)	116
4.2.2 Subletale Dosierung von chemischen Desinfektionsmitteln in kontinuierlicher Behandlung von Biofilmen	118
4.2.2.1 Vergleich der Prüfprodukte 1 (ECA-Produkt 1) und 4 (Natriumhypochlorit)	119
4.3 Untersuchungsmodelle zur Einnistung von fakultativ-pathogenen Erregern in Trinkwasserbiofilme des Silikonschlauchmodells	120
4.3.1 Einnistung von <i>P. aeruginosa</i> in Modellbiofilme	120

4.4 Etablierung eines Verfahrens zur Detektion möglicher vbnc-Zustände bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nach der Behandlung mit Desinfektionsmitteln	121
4.4.1 Etablierung des Micro-Plate-Reader Modells	122
4.4.2 Einsatz des Micro-Plate-Reader Verfahrens zur Detektion von vnbc-Zuständen	122
4.4.2.1 <i>Test auf vbnc-Zustände</i>	123
4.4.3 Falsch-positive vbnc-Zustände	123
4.4.4 Umkehr des vbnc-Zustands	124
5 ZUSAMMENFASSUNG	126
6 LITERATURVERZEICHNIS	128
7 DANKSAGUNG	154

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a.a.R.d.T.	allgemein anerkannten Regeln der Technik
ABAS	Ausschuss für Biologische Arbeitstoffe
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
BBQ	Blue Berry Quencher
BLASTn	“Basic Local Alignment Search Tool”, n = nucleotide
bp	Basenpaare
BVerfGE	Bundesverfassungsgericht
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaOCl ₂	Calciumhypochlorit
CEN	Europäisches Komitee für Normung
cm	Zentimeter
CKW	Chlorkohlenwasserstoffe
Cl	Chlor
ClO ₂	Chlordioxid
Cp	crossing point
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Medizin
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	„deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVGW	Dachverband des Gas- und Wasserfaches
EC	Europäische Kommission
ECA	elektrochemisch aktiviert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN	Europäische Norm
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
et al.	und andere
etc.	„et cetera“
EU	Europäische Union
Fa.	Firma

FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
GZZ	Gesamtzellzahl
h	hours (Stunden)
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HOCl	Hypochlorige Säure
Hz	Hertz
IHPH	Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
KBE	koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
konz.	Konzentration
k	Kilo
KTW	Kunststoffe im Trinkwasser
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol
m	Meter
m...	milli...
MCT	„mixed culture theory“
μ...	mikro...
min	Minuten
n...	nano...
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n.n.	nicht nachweisbar
O	Sauerstoff
o.g.	oben genannte
OH	Hydroxidion
p...	pico...
PCR	„polymerase-chain-reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)

PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PNA	„Peptic nucleic acids“
PTFE	Polytetrafluorethylen
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
QuSus	Quantitativer Suspensionsversuch
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
R2A	Reasoner's 2A Agar
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RF	Reduktionsfaktor
RKI	Robert Koch-Institut
S	Siemens
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sp.	spezies
sog.	sogenannte
TM	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TLH	Tween + Lecithin + Histidin
THM	Trihalogenmethane
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
u.a.	unter anderem
UBA	Umweltbundesamt
upm	Umdrehungen pro Minute
u.N.	unter Nachweisgrenze
UV	Ultraviolett
V	Volt
VAH	Verbund für Angewandte Hygiene e.V.
VBNC	„viable but non culturable“ (lebensfähig aber nicht kultivierbar)
vgl.	vergleiche
W	Watt
WHG	Wasserhaushaltsgesetz
WHO	World Health Organisation
WSH	Wasser standardisierter Härte
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Biofilme

1.1.1 Allgemeines

Unter Biofilmen versteht man im Allgemeinen Ansammlungen von Bakterienzellen bzw. mikrobielle Gemeinschaften, die eingebettet in eine selbstproduzierte Matrix aus adhäsiven extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) irreversibel an einer Oberfläche haften [Flemming 2000; Flemming, H.C. und Wingender, J., 2001 und 2002; O'Toole et al., 2000; Ramey et al., 2004; Wingender et al., 1999].

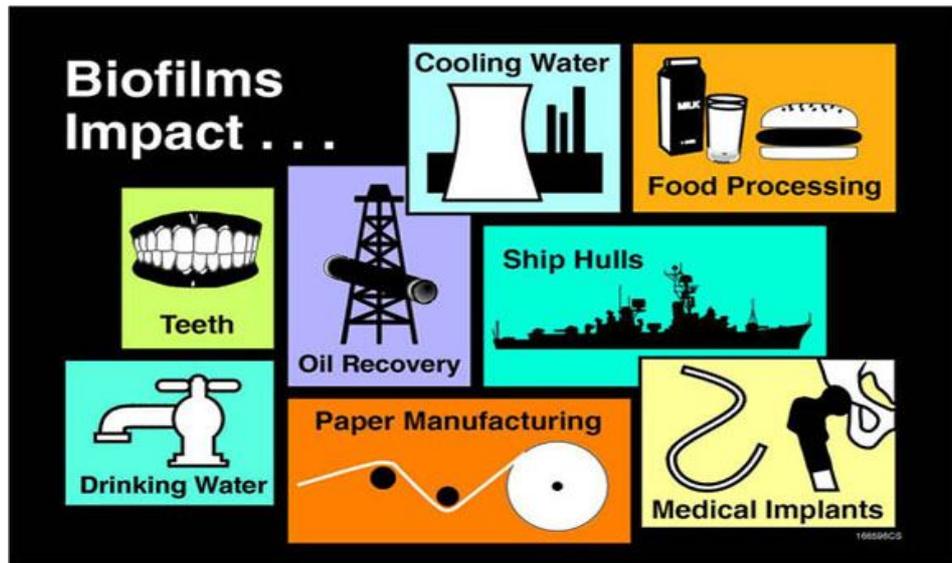


Abbildung 1: Relevante Orte an denen Biofilmbildung von Bedeutung ist. © P. Dirckx, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman

Biofilme sind ubiquitär verbreitet und diese Art des Zusammenlebens stellt keinesfalls einen Sonderfall der Natur dar. Das Leben als frei suspendierte Zelle ist in der Natur eher die Ausnahme als die Regel, und der weitaus größere Teil der natürlichen Mikrobiota ist mit Oberflächen assoziiert und lebt in Form von Biofilmen [Donlan und Costerton 2002; Flemming und Wingender 2001a]. Aktuellen Erkenntnissen nach handelt es sich bei Biofilmen um eine Form der mikrobiellen Organisation, die sich bereits sehr früh entwickelte. Ein paar der ältesten bekannten Fossilien mit einem Alter von mehr als 3,5 Milliarden Jahren stammen von Mikroorganismen in Biofilmen [Donlan und Costerton 2002; Flemming und Wingender 2001a]. Die Vielfältigkeit dieser Lebensweise macht es schwer eine Definition für den Biofilm im Allgemeinen zu geben. Selbst in vermeintlich lebensfeindlichen Umgebungen, wie in schwefelhaltigen und heißen Quellen, hypersalinen und sauren Seen, den Gletschern der Antarktis und in Wüsten kommt es zur Biofilmbildung. Man findet Biofilme in jeglicher Art von wasserführenden Systemen, so auch in technischen Systemen für Heißwasser oder in Kühlkreisläufen (s. Abb.1) [Exner und Kistemann 2004; Flemming und Wingender 2001a; Flemming und Wingender 2002; Szewzyk und Szewzyk 2003]. Des Weiteren zählen Böden, Gestein, Pflanzen, Tiere und Menschen zu den Lebensumgebungen von Biofilmpopulationen. Sobald sie vom Wirt profitieren, werden diese als Kommensale bezeichnet. Beim Mensch handelt es sich meist um

apathogene Bakterien die einen Biofilm auf der Haut des Menschen bilden, eine interdisziplinäre Wechselwirkung mit diesem eingehen, und krankheitserregende Bakterien vom Menschen fernhalten. Aber auch im Mund bzw. auf den Zähnen gibt es Biofilme, in oder auf denen einige Milchsäurebakterien, z.B. *Streptococcus mutans* oder *Streptococcus salivarius* durch die Bildung von Milchsäure aus Zucker Karies verursachen können. Im menschlichen Darm helfen sie bei der Verdauung [Donlan und Costerton 2002; Flemming und Wingender 2001a]. Der menschliche Körper besteht aus ca. 10^{13} eukaryotischen Zellen, gleichzeitig hat er aber ca. 10^{14} Bakterienzellen und Pilze in und auf sich. Der menschliche Körper besteht somit zu etwa 90% aus nicht-eukaryotischen Zellen [Wilson 2008].

Die Grundbedingungen für die Bildung eines Biofilms sind einfach. Benötigt werden die zum Wachstum erforderlichen Nährstoffe, eine Grenzfläche zu einer wässrigen Phase und die Bakterien selbst. Zur Biofilmbildung kann es demnach auch an allen wasserangrenzenden Flächen kommen. Zwischen Wasser und Luft, Wasser und festem Medium, Wasser und einer anderen Flüssigkeit (z.B. Öl). Solange genug Nährstoffe vorhanden sind, können Mikroorganismen dort Biofilme bilden [Donlan und Costerton 2002; Flemming und Wingender 2001a; Flemming und Wingender 2002; Szewzyk und Szewzyk 2003].

Seit der wohl frühesten bekannten Beobachtung von Biofilmen in Form von Zahnplaque durch Antonie van Leeuwenhoek [Costerton et al. 1999; Mikx 1983] im 17. Jahrhundert hat sich viel getan.

Lange blieben Biofilme als mikrobielle Lebensgemeinschaft unberücksichtigt. Als Robert Koch seine nach ihm benannten Postulate erstellte und durch die Konzentration des wissenschaftlichen Fokus auf Reinkulturen das goldene Zeitalter der Mikrobiologie einläutete und damit ein Siegeszug gegen eine Vielzahl bakteriell bedingter Krankheiten begann [Schlegel 1999], trat die Forschung an Biofilmen oder die Frage nach der natürlichen Lebensweise von Bakterien in den Hintergrund. Mit Beginn des 20. Jahrhunderts entdeckte man die Biofilme als Forschungsobjekt erneut.

Bereits in den 20er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden Untersuchungen zur Anheftung von Mikroorganismen an Oberflächen durchgeführt [Lappin-Scott 1999]. Winogradsky (1928), Cholodny (1930) Conn (1932) und Henrici (1933) benutzten Objektträger, die sie in den Erdboden steckten, um sie nach festgelegten Zeiträumen mikroskopisch auf anhaftende Bakterien bzw. bakteriellen Bewuchs hin zu untersuchen. Auf sie gehen die wichtigen Beobachtungen zurück, dass sich sessil wachsende Bakterien von planktonisch wachsenden Bakterien unterscheiden.

Den ersten beschriebenen Apparat zur Untersuchung von bakterieller Anheftung an Oberflächen wurde von Claude ZoBell entwickelt. Der sog. „Slide carrier“, eine Konstruktion aus Blei mit einer Holzverkleidung und Paraffinüberzug, diente als Halterung für Objektträger, auf denen das Wachstum mariner Bakterien als Biofilm beobachtet werden konnte, den ZoBell damals noch „attached film“ nannte (s. Abb. 2) [ZoBell und Allen 1933, 1935].

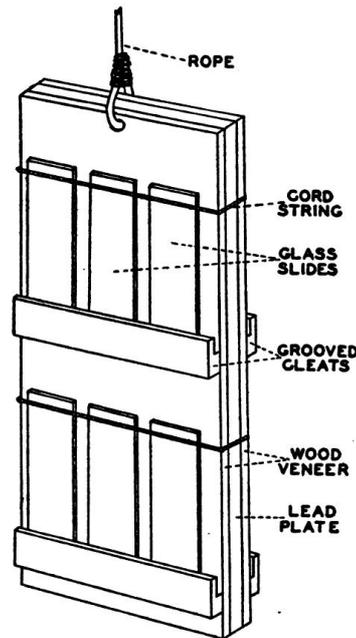


Abbildung 2: Schematische Darstellung des „slide carrier“ bestehend aus einer mit Holz umhüllten Bleiplatte an deren Außenseite die Objektträger befestigt werden. © ZoBell und Allen 1935.

Der Mikrobiologe Arthur Henrici schrieb als einer der ersten über nicht-planktonische Bakterien in der Natur und erkannte, dass die Mehrzahl der im Wasser lebenden Bakterien nicht planktonisch vorkommt, sondern sich im Benthos befindet [Henrici 1933].

Heukelekian und Heller (1940) erkannte den Zusammenhang, dass mit einem größer werdenden Verhältnis von Oberfläche zu Volumen auch die Anzahl der sich auf Oberflächen anhaftenden und in Form von Schleimen oder Kolonien wachsenden Bakterien steigt.

Erste Beobachtungen zur Entstehung von Biofilmen wurden in den 1970er Jahren durchgeführt. Dazu gehören die Annäherung der Zellen an die Oberflächen zum wässrigen Milieu und die Beobachtung, dass extrazelluläre polymere Substanzen eine Rolle bei der Anheftung und Ausbildung von Biofilmen spielen [Marshall und Cruickshank 1973].

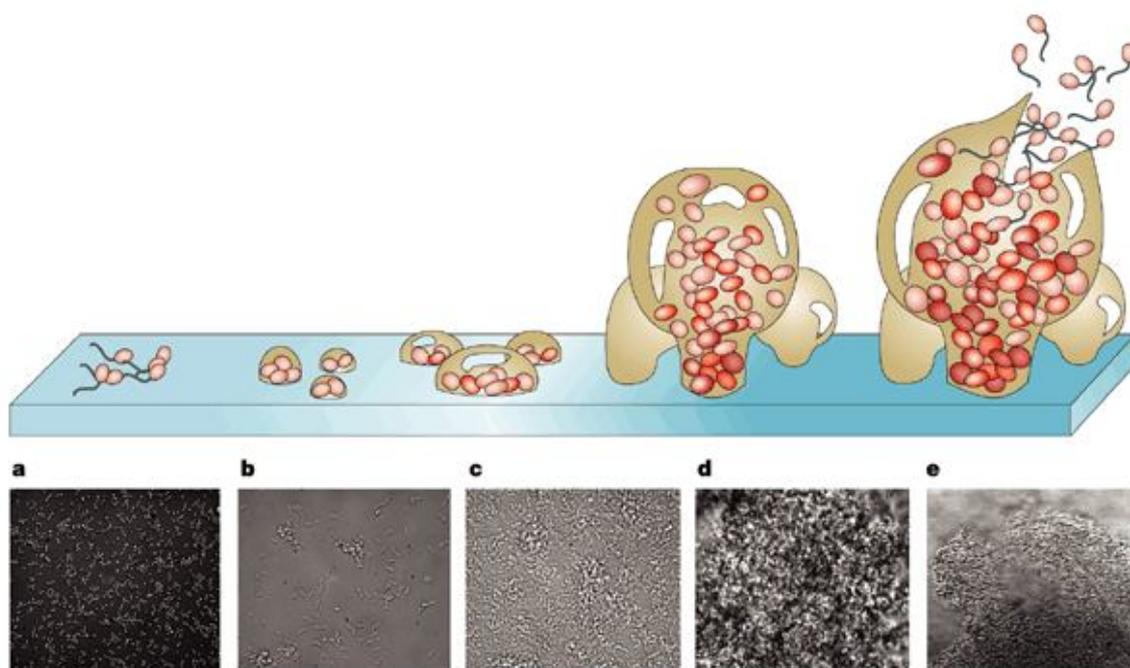
Geesey et al. (1977) konnten in ihren Untersuchungen zu natürlichen Habitaten von Mikroorganismen zeigen, dass der Großteil der Bakterien, oftmals sogar mehr als 99%, in Biofilmen aggregiert ist und das Verhältnis von sessilen Biofilmbakterien zu planktonischen Bakterien oftmals über einem Verhältnis von 1.000-10.000:1 liegt.

Diese Beobachtungen wurden in den 1980er Jahren von Costerton et al. (1987) erneut belegt. Sie zeigten, dass die sich im Trinkwasser befindlichen Bakterien bzw. Mikroorganismen zu bis zu 95% in Biofilmen organisiert sind, und dass nur ca. 5% als planktonische Zellen in der Wasserphase vorliegen [Flemming 2002].

Mit der Erkenntnis, dass es sich bei Biofilmen, um die natürliche Lebensform der meisten Bakterien handelt, wird den Biofilmen und ihrer Beschaffenheit nun mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Und mit dem anhaltenden Fortschritt bei der Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden ist es möglich geworden, den komplexen Aufbau des Biofilms und die Vielzahl an Stoffwechselaktivitäten in seinem Inneren zu untersuchen [Flemming und Wingender 2001a].

1.1.2 Biofilmbildung

1.1.2.1 Allgemein



Nature Reviews | Drug Discovery

Abbildung 3: Die Phasen der Biofilmentwicklung. Die fünf Phasen der Biofilmentwicklung: (a) reversible Adhäsion (b) irreversible Adhäsion und EPS-Produktion (c) Vermehrung und Bildung von Mikrokolonien (d) Reifung des Biofilms (e) Plateauphase © Davies 2003

Beim Prozess der Biofilmbildung unterteilt man den Ablauf in fünf aufeinanderfolgende Phasen (siehe Abb. 3). Sind alle Voraussetzungen an die Nährstoffversorgung erfüllt, so können Mikroorganismen sich z.B. an der Grenzfläche zwischen Wasser und einem Feststoff ansiedeln [Flemming und Wingender 2001a]. Allerdings existiert eine Vielzahl an Faktoren, die Einfluss auf die Biofilmbildung ausüben. Neben der Temperatur, dem pH-Wert, der Ladung der zu besiedelnden Oberfläche oder des Drucks, entscheidet vor allem die Zusammensetzung des Substratums über die sich ansiedelnden Zellen und Scherkräfte über die Form des Biofilms [Donlan 2002; Fitzpatrick et al. 2005; Stoodley et al. 1999].

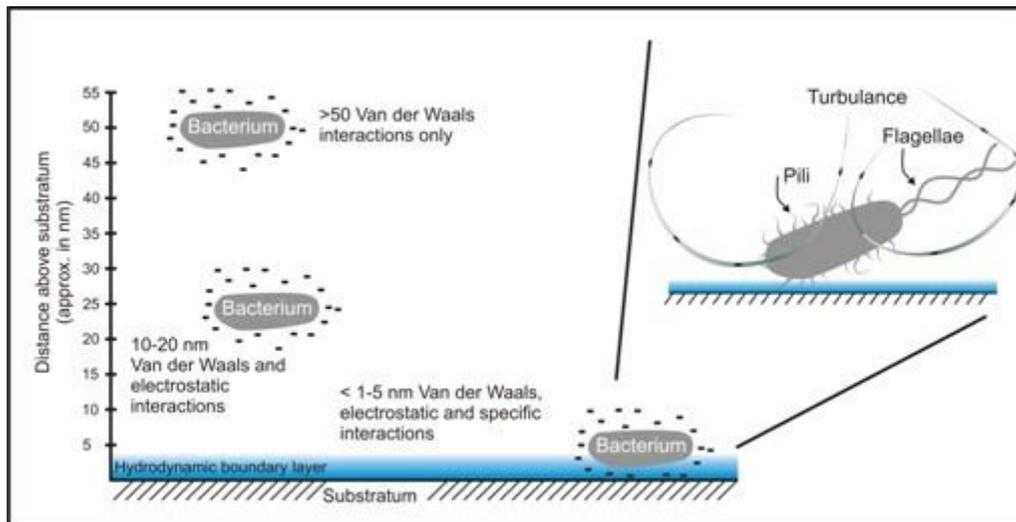


Abbildung 4: Annäherung der bakteriellen Zelle ans Substratum durch Van der Waals Kräfte und elektrostatische Interaktionen (links) und die Darstellung von Strömungsturbulenzen, Pili und Flagellen (rechts). © Brian G. Murakami, Center for Biofilm Engineering, Montana State University.

1.1.2.2 Der „conditioning film“ oder die reversible Bindung

Bakterien sind in der Lage innerhalb kürzester Zeit Biofilme zu bilden. Das geht prinzipiell an jeder Oberfläche, die an ein wässriges Milieu grenzt. Voraussetzung ist ein initialer Biofilm aus Proteinen, Polysacchariden und anderen hydrophoben Makromolekülen, die sich innerhalb kürzester Zeit auf der Oberfläche absetzen. Diese bilden das Substrat (auch Substratum genannt), für die sich anschließend anheftenden Bakterien.

In einem ersten Schritt binden die Bakterienzellen über elektrostatische Wechselwirkungen oder auch unter Zuhilfenahme der Flagellen lose an die vorhandenen Polysaccharide, Proteine, Huminstoffe und anderen organischen Substanzen, die sich auf der Oberfläche ablagern, das sogenannte Substratum (s. Abb. 4) [Donlan und Costerton 2002; Flemming und Wingender 2001a; Pang et al., 2005] und bilden dabei den sog. „conditioning film“ [Exner et al. 1987; Schneider und Leis 2002].

Bei der ersten reversiblen Bindung von Bakterien wirken verschiedene Kräfte auf die Bakterien. Je näher das Bakterium dem Substratum kommt, desto stärker wirken diese Kräfte. Bereits auf eine Distanz von einhundert Nanometern wirken bereits die Van-der-Waals-Kräfte, die die Zellen näher an die Substratumwand bringen. Ab einer Distanz von ca. 20 nm kommen zusätzlich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Ladungen von Zelle und Substratum hinzu. Ab einem Abstand von ca. 5 nm steigt die Wahrscheinlichkeit physischen Kontakts durch Flagellen und Pili (s. Abb. 4)

Hinzu kommt die Tatsache, dass Scherkräfte und Strömung in direkter Nähe zum Substratum geringer werden und so die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines Zellkontakts erhöht wird (Hydrodynamic boundary) (Abb.4) [Donlan 2002].

Im zweiten Schritt wird der entstandene Kontakt intensiviert. Das geschieht durch Veränderungen der Struktur der Zelloberfläche bzw. durch die Ausbildung von spezifischen Adhäsionsproteinen, Fimbrien oder Pili [Boonaert et al. 2002; Flemming und Wingender 2001a; Pang et al. 2005].

Nach dem ersten Kontakt zwischen Bakterienzelle und Substratum kann beobachtet werden, wie die Zellen selbst sich drehen, vibrieren oder zu zucken scheinen. Zurückzuführen ist das auf die reversible Bindung von Flagellum ans Substratum. Da der Motor der Flagellen weiterläuft, beginnt nun die Zelle selbst sich zu drehen. Andererseits kann die Bewegung der Zellen aber ebenso durch „Brown'sche Bewegung“ der sich stetig bewegenden Wassermoleküle erklärt werden [Marshall 1985]. Tatsächliche Fortbewegung entlang des Substratum während der reversiblen Bindung von Bakterienzellen geschieht durch die sog. „twitching motility“, also dem Ausbilden eines Pilus hin zum Substrat, der eine Kontraktion ausführt und die Zelle zieht, während auf der anderen Seite die Bindung des Pilus gelöst wird. So konnten O'Toole et al. (1998) darstellen, dass die Beteiligung von Motilität und der Ausbildung von Pili als Voraussetzung zur Biofilmbildung bei *Pseudomonas aeruginosa* gilt [O'Toole und Kolter 1998].

Twitching motility spielt eine übergeordnete Rolle bei der anschließenden Entstehung von ersten Mikrokolonien [Costerton et al. 1999]. Belegt wurden die Rollen von Flagellen und Pili bei der Biofilmbildung u.a. durch die Untersuchungen von O'Toole und Kolter, die mit *Pseudomonas aeruginosa* Mutanten arbeiteten. Während *P. aeruginosa* Mutanten ohne Fähigkeit zur Ausbildung von Flagellen kaum in der Lage waren überhaupt initiale Kontakte zum Substratum herzustellen, konnten *P. aeruginosa* Mutanten ohne Fähigkeit zu Ausbildung von Typ IV Pili keine Mikrokolonien ausbilden, nachdem sie einen reversiblen Kontakts zum Substratum ausgebildet hatten [O'Toole und Kolter 1998].

1.1.2.3 Die irreversible Bindung

Die zweite und dann irreversible Form der Bindung zwischen Bakterienzelle und Substratum ist bedingt durch die Einbettung der Zelle in die Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), wie Polysacchariden und Proteinen während der eigentlichen Reifung des Biofilms.

Diese Matrix aus EPS, welche die Mikroorganismen umgibt, kann bis zu 90 Prozent des Biofilms ausmachen [Choong und Whitfield 2000; Flemming und Wingender 2001a; Flemming und Wingender 2002]. Geregelt wird die EPS Produktion durch quorum sensing. Quorum sensing ist ein regulatorisches System bei einem Organismus, für das eine bestimmte Zelldichte der gleichen Spezies benötigt wird, bevor Regulationsvorgänge ablaufen können. So wird auch der Übergang von frei suspendierten Zellen zu in Biofilmen aggregierten Zellen über Quorum sensing gesteuert [Madigan und Martinko 2006]. So ist *P. aeruginosa* z.B. auch als Biofilmbildner bekannt und wie bei vielen anderen gramnegativen Bakterien geschieht dies bei *P. aeruginosa* ebenfalls durch Quorum sensing über N-acyl Homoserin Lactone. Sie sind auf Pheromonen basierende chemische Moleküle, die den Bakterien als Messinstrument für die Populationsdichte dienen. Untersuchungen konnten belegen, dass die Zell-Zell-Kommunikation über Homoserin Lactone maßgeblich an der Ausbildung und Reifung von Biofilmen beteiligt sind. Bei geringer Zelldichte werden diese Pheromone in das Umgebungsmedium abgegeben und dort weitestgehend verdünnt. Mit steigender Zelldichte steigt auch die Konzentration im Umgebungsmedium der Zellen. Das sich immer weiter akkumulierende Pheromon erreicht einen Schwellwert, bindet an die passenden Rezeptoren der Zellen, die dadurch

Genexpression stimulieren oder hemmen. Während Flagellen und Pili unverzichtbar für die initiale Phase der Biofilmentwicklung sind, so hat sich gezeigt, dass Quorum sensing einen erheblichen Anteil an der Reifung des Biofilms hat [Hentzer et al. 2002; Smith et al. 2003]. Die Bakterienzellen werden dazu veranlasst große Mengen an extrazellulären polymeren Substanzen, wie Polysaccharide oder Proteine zu bilden [Costerton 1995; Costerton et al. 1999]. Dazu gehört auch die Produktion von Alginate, einem Polysaccharid, das einen der Hauptbestandteile der EPS Matrix darstellt (z.B. bei *P. aeruginosa*). Aber auch die Bildung vieler Pathogenitätsfaktoren oder Antibiotika wird auf diese Weise gesteuert z.B. aufgrund hoher Populationsdichten und der damit steigenden Konkurrenz um Nährstoffe [Flemming und Wingender 2001a; Parsek und Greenberg 2005].

Durch das Anlagern weiterer Mikroorganismen und durch Wachstum der vorhandenen Bakterien beginnen sich die ersten Mikrokolonien zu bilden, die sich bei fortgesetzter Vermehrung und der Bildung der EPS [Vandevivere und Kirchmann 1993] als Makrokolonien zu einem Bakterienrasen verschmelzen.

Im Folgenden wächst und reift der Biofilm. Das geschieht durch die weitere Co-Aggregation anderer Zellen, die zur Diversität des Biofilms beitragen [Buswell et al. 1997; Rickard et al. 2002; Rickard et al. 2003] durch verwertbares organisches Material, das den verschiedenen Bakterienstämmen als Nährstoff dienen kann, während andere nur als strukturelle Elemente (z.B. Schlamm und Sand) des Biofilms dienen.

Allerdings haben auch äußere Faktoren Einfluss auf die Gestalt des Biofilms [Palmer, Jr. und White 1997; Pringle und Fletcher 1986; Stoodley et al. 1999]. So erhöhen Nährstoffmangel und starke Strömung z.B. die Robustheit und die Stärke der Anheftung des Biofilms, während unter schwachen Strömungen oder hohem Nährstoffangebot weniger kompakte und schwächer anhaftende Biofilme ausgebildet werden.

Durch die Stoffwechselaktivität der verschiedenen Organismen verändern sich auch die Lebensbedingungen vor Ort. Der anfängliche Vorteil der besseren Nährstoffversorgung auf der Oberfläche wird mit dem wachsenden Biofilm langsam zum Nachteil für aerobe Bakterien. Weil die Sauerstoffversorgung in den tiefer liegenden Bereichen durch den nur langsam diffundierenden Sauerstoff nicht ausreichend gewährleistet werden kann, bilden sich bald anoxische Bereiche [Flemming und Wingender 2001a].

Es kommt zur Ausdifferenzierung unterschiedlicher Stoffwechselbereiche innerhalb des Biofilms. So kommt es in den tiefer liegenden Schichten zur Ausbildung einer überwiegend anaeroben Schicht und einer mehr aeroben Schicht, je weiter man im Biofilm nach außen gelangt [Stewart und Costerton 2001].

Mit zunehmendem Wachstum und der fortgesetzten Reifung des Biofilms kommt dieser in die sogenannte Plateauphase. In dieser Phase befinden sich Aufnahme neuer sessiler Zellen in den Biofilm und die Abgabe von Zellen bzw. ganzen Teilen des Biofilms an das wässrige Milieu im ständigen Fluss und der Zuwachs an neuen Bakterien durch Zellteilung und Absterben von Zellen steht im Gleichgewicht [Rittmann 1989, Trulear und Charaklis 1982].

Beim Ablösen ganzer Teile des Biofilms von der Oberfläche spricht man auch von „sloughing“ (engl. Häutung). Grund dafür sind die auf den Biofilm wirkenden Scherkräfte. Durch Wachstum des Biofilms

steigt der Strömungswiderstand stetig an und als Konsequenz werden immer wieder kleine Stücke des Biofilms abgelöst [Flemming und Wingender 2001a]. Abhängig von den wirksamen Scherkräften können so entstandene Biofilme eine Dicke von wenigen Mikrometern bis zu einigen Millimetern erreichen [Flemming und Wingender 2001a; Pang et al. 2005].

1.1.3 Zusammensetzung eines Biofilms

Nach seiner Reifung besteht der Biofilm außer aus Wasser und den enthaltenen Mikroorganismen hauptsächlich aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Bei den EPS handelt es sich im weitesten Sinne um diverse Lipide, Polysaccharide, Proteine und auch Nukleinsäuren. In seinem Inneren wechseln aerobe und anaerobe Zonen, nährstoffreichere und nährstoffärmere Bereiche [Costerton 1995; Flemming und Wingender 2001a; Flemming und Wingender 2002]. Der von außen weitestgehend homogen aussehende Biofilm, besitzt einen komplexen Aufbau. Vergleichbar mit der Aufsicht auf einen Wald erscheint der Biofilm von oben betrachtet geschlossen. Tatsächlich ist er aber im Inneren durchgängig (s. Abb. 5) [Fuchs 2007].

Der Biofilm ist durchzogen von Gängen und Tunneln, über die Wasser und auch Nährstoffe alle Bereiche des Biofilms erreichen können. So umfließt das Wasser alle enthaltenen Mikroorganismen. Nährstoffe und Stoffwechselprodukte werden dabei über Diffusion innerhalb des Biofilms transportiert [Costerton 1995; Flemming und Wingender 2001a und 2002].

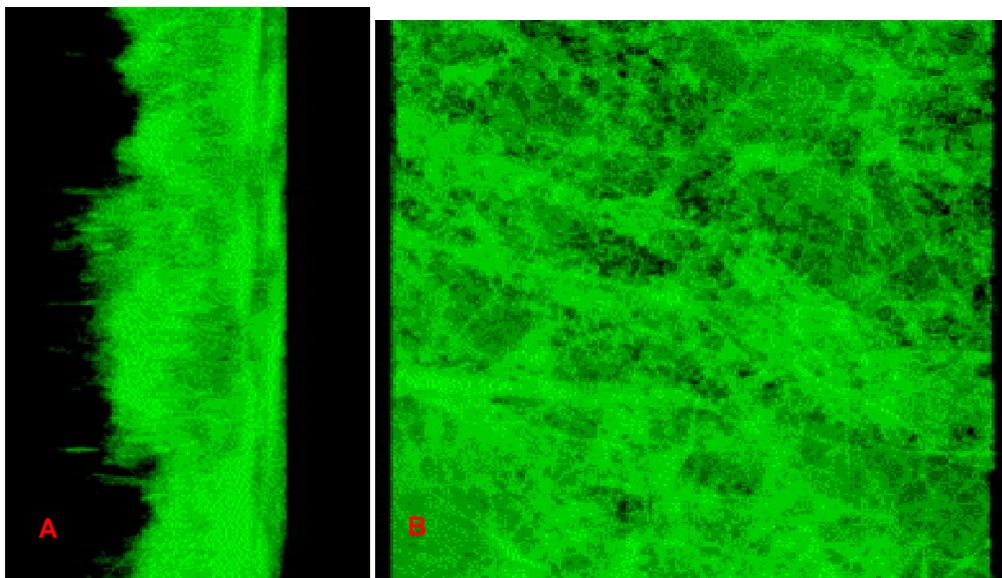


Abbildung 5: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie Bilder eines Trinkwasserbiofilms von der Seite (A) und von oben (B), bei denen Hohlräume und Tunnel innerhalb der Matrix sichtbar werden © Exner, M. et al., 2002b

1.1.4 Lebensraum für Mikroorganismen

Durch die EPS wird es den Mikroorganismen möglich, dauerhaft nährstoffreiche Regionen zu besiedeln. Durch seine Festigkeit verhindert der Biofilm ein Wegspülen der Bakterien. Das enge Zusammenleben bietet außerdem den Vorteil einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von horizontalem

Gentransfer z.B. durch Plamidaustausch mittels Konjugation [Molin und Tolker-Nielsen 2003; Thomas und Nielsen 2005]. Der Biofilm bietet aber auch Schutz vor chemischen Desinfektionsmitteln, Antibiotika, Fressfeinden (Immunzellen, Protozoen etc.), UV- oder Röntgenstrahlung bzw. Temperatur und pH-Wert Schwankungen. Für die o.g. schädlichen chemischen Einflüsse ist es schwer den Biofilm durch Diffusion gänzlich zu durchdringen, bzw. sie werden durch enzymatischen Abbau oder chemischer Neutralisation unwirksam gemacht. Ein weiterer Vorteil besteht in der hohen Regenerierungsfähigkeit von Biofilmen, so dass selbst nach Desinfektionsmaßnahmen einige wenige überlebende Bakterien genügen, um den Biofilm schnell neu zu besiedeln. [Choong und Whitfield 2000; Costerton 1995; Costerton et al. 1999; Donlan und Costerton 2002; Flemming und Wingender 2001a und 2002; Szewzyk und Szewzyk 2003].

Da die Mehrzahl von ca. 95% aller Mikroorganismen in Biofilmgemeinschaften organisiert ist, lassen sich theoretisch Zelldichten von bis zu 10^{12} Zellen/cm³ feststellen, die die Konzentration im umgebenden Milieu deutlich übersteigt [Flemming et al. 2002].

Der Biofilm im Allgemeinen ist eine heterogene Lebensgemeinschaft und setzt sich aus einer variierenden Vielzahl von Mikroorganismen zusammen. Als Architekten dieses Konstrukts sind Bakterien die vorherrschende Lebensform. Mit der Reifung des Biofilms und zunehmendem Alter, finden sich aber auch andere Mikroorganismen und Kleinstlebewesen im Biofilm wieder [Henne et al. 2012; LeChevallier et al. 1987].

Es lassen sich neben Algen und Pilzen [Göttlich und Flemming 2002] aber auch Protozoen, wie z.B. Ciliaten oder Amöben [Exner und Gornik 1990; Manz et al. 1995] im Biofilm finden. Höher entwickelte Organismen wie Fadenwürmer (Nematoden), Rädertierchen (Rotatorien), Wenigborster (Oligochaeten), Milben, Schnecken oder Insektenlarven sind in Biofilmen ebenfalls anzutreffen. Sie ernähren sich u.a. von den im Biofilm lebenden Mikroorganismen [Flemming und Wingender 2001b]. Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich außerdem mit der Frage nach dem Risiko, ob Biofilme als Reservoir für Viren dienen könnten, die man in unterschiedlichen Studien in Biofilmen fand [Andersson und Banfield 2008; Skraber et al. 2005; Sutherland 2004; Vasickova et al. 2010].

1.1.5 Ablösung und Verteilung

Bei allen Vorteilen, die der Biofilm Bakterien bietet, kann die Möglichkeit die sessile Lebensweise vorübergehend zu verlassen, essentiell für das Überleben einzelner Stämme oder der ganzen Gemeinschaft sein. Das ist zum Beispiel der Fall, wenn die Konkurrenz der Bakterien untereinander zu groß wird oder die Versorgung mit Nährstoffen nicht mehr gewährleistet ist [Watnick und Kolter 2000].

An dieser Stelle unterscheidet man zwischen passiver und aktiver Ablösung vom Biofilm. Passive Ablösung kann hervorgerufen werden durch Abrasion z.B. durch kleinere Partikel in der wässrigen Lösung oder durch Erosion [Morgenroth und Wilderer 1999; Rochex et al. 2009] bedingt durch die Strömungsverhältnisse an der Oberfläche des Biofilms, die einzelne Zellen vom Biofilm lösen können, oder bei zunehmendem Scherkräften ganze Teile des Biofilms herauslösen. Aber auch menschengemachte Einflüsse, wie der Einsatz von Reinigern und Bürsten spielen eine Rolle.

Auf der anderen Seite ist bekannt, dass Bakterien in der Lage sind, ihre Ablösung vom Biofilm selbst zu initiieren. So besitzen Pseudomonaden z.B. das Gen „alg L“, welches für das Enzym Alginat-Lyase codiert. Das Enzym ist in der Lage die Biofilmmatrix, in der die Zellen eingebettet sind, weitestgehend zu hydrolysieren, so dass sich die Zellen aus dem Biofilm herauslösen können [Boyd und Chakrabarty 1994; Lewis 2001; Sutherland 2001a].

Die gelösten Zellen bewegen sich dann entweder als Gemeinschaft entlang des Strömungsgradienten oder als vereinzelt Zelle durch ihre Flagellen, um an geeigneter Stelle einen neuen Biofilm zu begründen.

Neben dem Verhindern der Ausbildung von Biofilmen, liegt im Ablösen von Biofilm und dem Verstehen dieser Mechanismen, eine der größten Herausforderung für den medizinischen und den industriellen Sektor [Costeron et al. 2005].

1.1.6 Verhindern und Beseitigen von Biofilmen

Es gibt unterschiedliche Strategien und Maßnahmen zur Desinfektion des Wassers oder der wasserführenden Systeme. Neuerdings setzt man im industriellen Bereich auf eine Kombination aus der mechanischen Zerstörung der Biofilme und dem Einsatz von Desinfektionsmitteln [Donlan und Costerton 2002]. Daneben gibt es verschiedene Versuche die Oberflächeneigenschaften von Materialien so zu gestalten, dass eine Biofilmbildung verhindert oder zumindest minimiert wird. Dazu gehört die Herstellung von antibiotischen Oberflächen mit Minocyclin-Rifampicin, antiseptischen Oberflächen mit Chlorhexidin-Silbersulfadiazin oder metallbeschichteten Oberflächen mit Silber, Platin, Bismut oder Kupfer [Airey und Verran 2007; Choong und Whitfield 2000; Donlan und Costerton 2002]. Aber auch die Vermeidung rauher Oberflächen oder der Einsatz nanostrukturierter Oberflächen, wie sie es z.B. beim Lotuseffekt gibt, werden ebenso diskutiert wie der Einsatz hydrophober Oberflächen [Flemming 2002], oder der von Ultraschall, um bereits besiedelte Oberflächen von Biofilmen zu befreien [Mott et al. 1998]. Umfassende Untersuchungen belegen, dass das Inaktivieren von Bakterien und das Beseitigen von Biofilmen zwei unterschiedliche Dinge sind, die nicht miteinander einhergehen müssen [Chen und Stewart 2000; DVGW 2009; Vickery et al 2004].

1.1.7 Problematik der Biofilme im Hinblick auf gesundheitliche Gefährdung

Seit längerem hat man auch die gesundheitsschädlichen Aspekte solcher Biofilme erkannt. Im klinisch-medizinischen Bereich stellen sie ein ernstzunehmendes Problem dar. Da die derzeit üblichen mikrobiologischen Trinkwasseranalysen nur ca. 5% der vorhandenen Mikroorganismen nachweisen können, stellt der überwiegende Rest ein nur schwer kalkulierbares Risiko u.a. für Gesundheitseinrichtungen dar [Characklis 1990]. Diverse Krankheitsbilder sind u.a. auf Mikroorganismen in Biofilmen zurückzuführen. Dazu gehören Mukoviszidose, Karies, Parodontose, Nierensteine, Tuberkulose, die Legionärskrankheit und Staphylococcus-Infektionen. [Madigan und Martinko 2006].

Die Kontamination von Instrumenten, Kathetern und Implantaten führen immer wieder zu nosokomialen Infektionen [Anaissie et al. 2002; Choong und Whitfield 2000; Costerton et al. 1999; Donlan und Costerton 2002; Exner et al. 1999; Flemming und Wingender 2001a; Høiby et al. 2010; Szewzyk und Szewzyk 2003]. Außerdem können ablösende Teile eines Biofilms z.B. in wasserführenden Leitungen zu einer Quelle von stetig wiederkehrenden Kontaminationen werden [Anaissie et al. 2002; Kelley et al. 2004]. Eine nicht zu unterschätzende Gefahr besteht insbesondere dann, wenn Personen mit einem geschwächten Immunsystem Biofilmbakterien ausgesetzt werden, wie es zum Beispiel in Krankenhäusern der Fall ist [Anaissie et al. 2002; Exner et al. 2007]. In diesen Fällen sind besonders die fakultativ pathogenen Krankheitserreger von Bedeutung, die Infektionen unter spezifischen Voraussetzungen, wie z.B. einem supprimierten Immunsystem auslösen können [RKI 2010]. Darunter fallen auch die zu den am weitesten verbreiteten nosokomialen Krankheitserreger *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und *Legionella pneumophila* [Eboigbodin et al. 2008; Exner und Hartemann 2009].

Zusätzliche Gefahr geht dann von Bakterienstämmen aus, wenn sie Antibiotikaresistenzen entwickelt haben. Eine Entwicklung, die in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen hat und immer öfters beschrieben wird [Aloush et al. 2006; Costerton et al. 1999; Flemming und Wingender 2001a; Exner et al. 1999]. So sind z.B. eine Vielzahl an *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen bekannt die via Mutationen Resistenzen gegen viele der bekannten Antibiotika entwickelt haben [Livermore 2002]. Weitere Beispiele von medizinisch relevanten Biofilmen sind solche auf Fremdkörpern, wie z.B. Endoprothesen, Venenkathetern, Herzschrittmachern, Herzklappen und Shuntventilen [Fuchs 2007; Wilson 2001]. So werden nach der Operation diese Fremdkörper im Menschen mit Matrixproteinen wie Fibrinogen oder Fibronectin überzogen. Staphylokokken z.B. besitzen auf ihrer Oberfläche Proteine - z.B. den Clumping factor - der an Fibrinogen oder das Fibronectin Bindeprotein, das an Fibronectin bindet, mit dem sie sich an die entsprechenden Proteine spezifisch binden können. Einmal daran gebunden, vermehren sich die Bakterien, bilden EPS und sind damit ein ernstzunehmender Infektionsherd [Donlan und Costerton 2002].

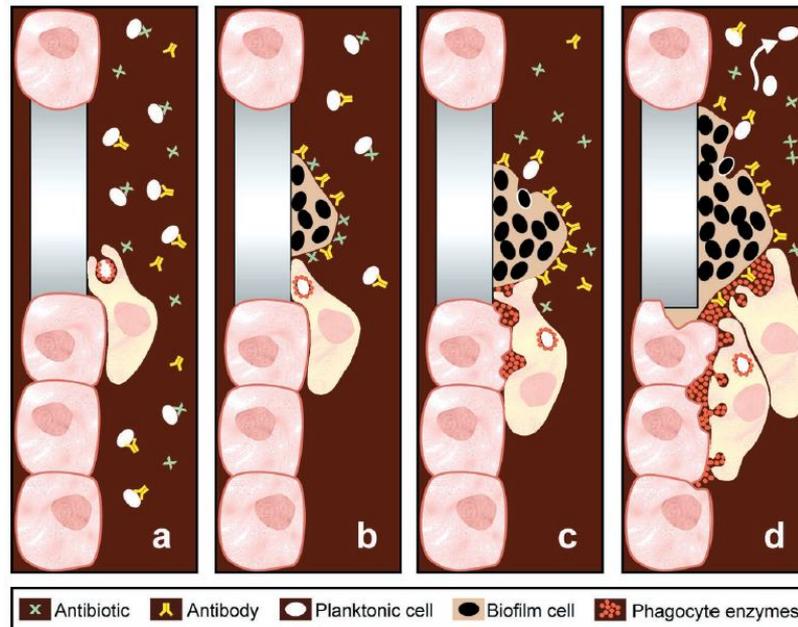


Abbildung 6: Darstellung eines medizinischen Biofilms. (a) Planktonische Zellen sind anfällig für Antikörper, Antibiotika und Phagozytose. (b) Sessile Zellen im Biofilm sind hingegen geschützt. (c) Phagozyten wandern zum Infektionsherd und beginnen mit der Produktion von Enzymen. (d) Die Enzyme der Phagozyten schädigen umliegendes Gewebe, welches durch Biofilmbakterien neu infiziert werden kann. © Costerton et al. 1999

Der menschliche Körper und sein Immunsystem sind zwar in der Lage planktonische Zellen zu bekämpfen, geraten aber bei Biofilmen (z.B. auf Implantaten) an ihre Grenzen (s. Abb. 6) [Costerton et al. 1999].

Prominentes Beispiel ist eine Reihe von Infektionen in den USA in den Jahren 1993 und 1994 unter Asthmapatienten, bei der einhundert Patienten starben. Gemeinsam waren den Patienten die Symptome einer bakteriellen Pneumonie und die Verwendung des gleichen Albuterolinhalators, der bei Asthmaattacken kurzzeitig Linderung verschafft. Zurückgeführt werden konnten die Infektionen auf eine *Pseudomonas aeruginosa* Kontamination des Albuteroltanks des Herstellers. Zwar hielt der sich an die Vorgaben zur Reinigung und Desinfektion der Tanks, konnte aber das Bakterium offensichtlich nicht abtöten. Grund war die Fähigkeit von *Pseudomonas aeruginosa* Biofilme zu bilden, in denen es vor Reinigern und Desinfektionsmitteln geschützt war. So wurden vom bestehenden Biofilm stetig Zellen an die Flüssigkeit im Tank abgegeben, die dann in die Inhalatoren umgefüllt wurde. Durch den Inhalator gelangten die Bakterien also tief in die Bronchien von Asthmapatienten, die bereits gesundheitlich angeschlagen waren, wo der opportunistische Krankheitserreger erneut begann einen Biofilm zu generieren [Potera 1996].

Obwohl die Wasserleitungen von Trinkwasserinstallationen zumeist von harmlosen Bakterien besiedelt werden, trifft man hier auch auf fakultativ-pathogene Bakterienstämme, die Auslöser von Infektionen sein können [Exner et al. 2005; Exner et al. 2007].

In Trinkwasserinstallations- sowie Abwasser -Systemen wird die Biofilmbildung insbesondere durch sog. Stagnationszonen, wie Siphons (s. Abb.7), bzw. Bereichen mit geringer Durchflussmenge begünstigt. Dies können Abzweigungen, stillgelegte Bereiche oder Filter sein. Studien belegen, dass 36 bis 42 % der nosokomialen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen auf kontaminiertes

Leitungswasser zurückzuführen sind [Anaisie et al. 2002; Costerton 1995; Fuchs 2007; Reuter et al. 2002].

Völker et al. (2010) identifizierten in einer von ihnen durchgeführten Studie in öffentlichen Einrichtungen die Anzahl koloniebildender Einheiten von Legionellen und Pseudomonaden als die beiden mikrobiologischen Parameter, bei denen am häufigsten Überschreitungen der Grenzwerte festgestellt wurden. Zudem gelang es bereits *Helicobacter pylori* in Trinkwasserbiofilmen mittels quantitativer real-time PCR nachzuweisen [Linke et al. 2010].



Abbildung 7: Abbildung eines Siphons mit Biofilm. © 1999-2012, MSU Center for Biofilm Engineering

Pathogene können im Biofilm auch in infektionsrelevanten Konzentrationen auftreten und verursachen in der Vergangenheit zahlreiche Epidemien [Colbourne et al. 1984; Ferroni et al. 1998; Rangel-Fausto et al. 1999; RKI 2004]. Das Gesundheitsrisiko durch fakultativ-pathogene Mikroorganismen, speziell für immunsupprimierte Menschen, unterstreicht die Relevanz hygienisch-medizinischer Biofilm – Forschung [Armon et al. 1997; Murga et al. 2001; Wilson et al. 2004]. *Pseudomonas aeruginosa* z.B. besitzt eine ganze Reihe intrinsischer Resistenzmechanismen, wie die Bildung von β -Lactamasen, Efflux-Pumpen und herabgesetzter Permeabilität der Membran, die im Biofilm nochmals verstärkt werden und damit nur schwer zu behandelnde Infektionen verursacht [Hancock 1998; Li et al. 1994; Strateva und Yordanov 2009].

Die WHO empfiehlt daher für signifikant immungeschwächte Patienten steriles, abgekochtes Leitungswasser zu verwenden, um schädliche Effekte durch Bakterien aus dem Trinkwasser ausschließen zu können [Anaisie et. al. 2002; Clark 2006; WHO 2011].

Neben den medizinischen Aspekten besitzen Biofilme eine nicht zu unterschätzende industrielle Relevanz. Man bezeichnet die unerwünschte Entwicklung von Biofilmen hier auch als Biofouling [Flemming und Wingender 2002]. So setzen sie durch Ablagerungen in Pipelines deren Durchflussleistung herab und sorgen gleichzeitig durch ihre Stoffwechselprodukte für eine verstärkte Korrosion der Pipelines selbst, die sogenannte Biokorrosion. Aber auch andere technische Systeme sind davon betroffen, wie z.B. Kühlkreisläufe, Wasseraufbereitungssysteme und die Energieerzeugung in Kraftwerken [Choong und Whitfield 2000; Szewzyk und Szewzyk 2003].

Biofilme zerstören eine große Anzahl mit Wasser in Kontakt stehender Objekte, wie z.B. Bohrinseln, Piers, Kaianlagen und Schiffsrümpfe. Sie führen zu erhöhter Reibung an den Schiffsrümpfen und dadurch zu erhöhtem Brennstoffverbrauch. Ein Biofilm von nur einem Zehntel Millimeter verringert die Geschwindigkeit eines Tankers um 10 bis 15 Prozent [Flemming und Wingender 2002]. Im Kampf gegen den Bewuchs hat man einen speziellen Schutzanstrich für Schiffe entwickelt, dessen Wirkstoffe an der Grenzfläche zum Wasser verhindern, dass sich Biofilme bilden. Allerdings stellen diese Stoffe eine starke Umweltbelastung dar und werden deshalb bereits in vielen Ländern nicht mehr eingesetzt [Flemming 2002].

1.1.8 Nutzen von Biofilmen

Allerdings haben Biofilme auch einen Nutzen. Es besteht bereits ein großer Markt für Produkte, die mit oder aus Biofilmen entstehen. So werden z.B. die EPS-Bestandteile verwendet bei der Herstellung von Ketchup, Zahnpasta und Klebstoff [Sutherland 1998].

Die Biotechnologie macht sich Grenzflächen bereits in vielfacher Weise nutzbar. So werden schon seit längerer Zeit Biofilmverfahren zur Abwasserreinigung angewendet. Die Mikroorganismen sind 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 der Biofilme besitzen sie eine große Adsorptionsfläche, was ihnen ermöglicht, viele der im Wasser unerwünschten Stoffe zurückzubehalten und nach und nach abzubauen. Nach den jeweiligen Reaktortypen unterscheidet man Tropfkörper, Scheibentauchkörper, aerobe und anaerobe Festbetten und Schwebbetten [Fuchs 2007; Gebara 1999; Madigan und Martinko 2006; Nicoletta et al. 2000].

1.1.9 Studium von Biofilmen

Der ersten beschriebenen Vorrichtung zum Nachweis von Biofilmbildung, dem „Slide carrier“ von ZoBell folgten bis heute eine ganze Reihe weiterer Forschungsmodelle anhand derer die Bildung und Beseitigung von Biofilmen dokumentiert wurde [ZoBell und Allen 1933].

Monokultur Biofilme bieten sich als Forschungsmodell an. Sie sind aufgrund ihrer hohen Reproduzierbarkeit, der definierten Zusammensetzung und vergleichsweise kurzen Generierungszeiten gut geeignet für Laborversuche, die z.B. die Wirkung von Desinfektionsmitteln nicht an planktonischen sondern sessilen Bakterien demonstrieren sollen [Baldry 1983; Cochran et al. 2000; Johnston und Jones 1995; Moritz et al. 2010; Spoering und Lewis 2001]. Mit Modellbiofilmen die aus Mischkulturen bestehen wird deshalb nur selten gearbeitet [Alasri und Moal 1992; Fatemi und Frank 1999]. undefinierte bzw. natürliche 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; Gebel et al. 2009; Holtmann und Sell 2001; Lenz et al. 2010; Otte et al. 2005].

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, sodass auf ihnen mit wenig Material- und Zeitaufwand ein Biofilm wächst. Hier kommt oftmals auch der „modifizierte Robbins Device“ zum Einsatz, mit dem beispielsweise die Anheftung von Zellen an Oberflächen im Durchflussverfahren getestet werden kann [Nickel et. al 1985].

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. Dabei hängt die Art der Biofilmbildung auch von den verwendeten Leitungsmaterialien ab [Lethola et al. 2004]. Zur möglichst schnellen und dichten Besiedlung werden u.a. auch Silikonschlauchmaterialien eingesetzt, die durch ihre Materialeigenschaften ein Biofilmwachstum fördern. Ein erhöhter Kohlenstoffgehalt z.B. fördert das Wachstum von Mikroorganismen [Exner et al. 1987; 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 Trinkwasserflora entsteht ein Biofilm [Mathieu und Dollard 1990]. So auch am IHPH, wo ein solches Modell ursprünglich etabliert wurde [Exner et al. 1984; 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.

1.1.10 Resistenzfaktoren im Biofilm

Einer der wichtigsten Faktoren für eine erhöhte Widerstandskraft bzw. auch Toleranz liegt im Biofilm selbst begründet. Biofilme widerstehen den auf sie einwirkenden Kräften, denen einzelne Zellen schutzlos ausgeliefert wären. Sie schützen vor Phagozytose, vor Antibiotika und Bioziden. Sie erlauben es Bakterien z.B. an Nischen wie nährstoffreichen Oberflächen zu haften und dort zu verharren. Bakterienzellen profitieren von der Nähe zu anderen Zellen, da sie die Vorteile der Zell/Zell-

Kommunikation nutzen können und sich die Chance für genetischen Austausch erhöht [Hausner et al. 1999; Pearson et al. 1999; Sutherland 2001b].

Der Biofilm bietet Bakterien einen besseren Schutz vor Antibiotika, als ihn z.B. planktonische Zellen besitzen. Die Polysaccharidmatrix des Biofilms bildet aber auch eine Barriere gegen Biozide. Die Polysaccharidmatrix bietet dabei in erster Linie allerdings nur eine verzögernde Wirkung, die das Durchdringen des Biozids verlangsamt, bei dauerhafter Behandlung aber nicht aufhält. Des Weiteren besitzen viele biofilmassoziierte Bakterien veränderte Wachstumsraten, die mit anderen physiologischen Veränderungen, wie dem Ausbilden von Stressfaktoren einhergehen und gleichermaßen Schutz bieten. So werden z.B. Antibiotika oder Biozide langsamer aufgenommen und das Bakterium hat länger Zeit auf die Gefahr zu reagieren bzw. kann länger überleben [Donlan et al. 2002; Poole 2002; Stewart et al. 2001].

So zeigten Bridier et al. (2011) in ihren Untersuchungen zur Wirkungsweise von quatären Ammoniumverbindungen und Peressigsäuren innerhalb von Biofilmen, dass es je nach Biozid vor allem bei quatären Ammoniumverbindungen zu einer verzögerten Wirkung kommt, die vermutlich auf die erschwerte Diffusion durch die Biofilmmatrix zurückzuführen ist. Die Versuche mit Peressigsäure zeigten einen stetigen Anstieg inaktiver Zellen in der Biofilmmatrix. Allerdings kam es auch hier zum Wirkverlust des Biozids durch Interaktion mit den extrapolymere Substanzen [Bridier 2011]. DeQueiroz und Day (2006) konnten mit ihren Versuchen zeigen, dass eine Kombination aus Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit am effektivsten gegen *P. aeruginosa* bzw. *P. aeruginosa*-Biofilme wirkt.

Auch Tote et al. (2009) konnten mit ihren Versuchen demonstrieren, dass nicht alle Biozide in der Lage sind, gleichzeitig Biofilmbakterien zu inaktivieren und die Biofilmmatrix abzubauen. Sie sprechen sich nachdrücklich für aktualisierte und einheitliche Biozidtests für Biofilme aus. Loughlin et al. (2002) konnten das Potential aufzeigen, dass *Pseudomonas aeruginosa* bei nicht letalen Dosierungen z.B. von Benzalkoniumchlorid eine stetig zunehmende Widerstandskraft gegenüber diesem und ähnlichen Desinfektionsmitteln entwickeln kann. Auch wenn nicht zwangsläufig eine Kreuzresistenz gegen Antibiotika damit einhergeht.

Über Antibiotika ist bekannt, dass der wiederholte Einsatz nur einen Teil der biofilmassoziierten Bakterien erreicht. Die nicht betroffenen Zellen sind entweder persistierende Bakterien, die tief genug im Biofilm integriert sind und nicht vom Antibiotikum erreicht werden oder phänotypisch veränderte Zellen, die z.B. keine passende Zielregion für die Antibiotika besitzen. Diese Zellen sind nach abgeschlossener Behandlung am Wiederaufbau des Biofilms beteiligt. Durch Wiederholung dieses Vorgangs könnten damit Biofilmpopulationen herangezüchtet werden, die eine geringere Suszeptibilität gegenüber Antibiotika besitzen [Harmsen et al. 2010].

Auch die Ausbildung von Efflux-Pumpen gilt als einer der Faktoren, die zur erhöhten Widerstandskraft bzw. Resistenz gegen Antibiotika bei biofilmassoziierten Bakterien führt [Masuda et al. 2000; Yoneda et al. 2004]. Ihre Ausbildung erfolgt hauptsächlich bei subletaler Dosierung von biozid wirkenden Stoffen. Ideale Voraussetzung dafür ist das verlangsamte Durchdringen von Bioziden der Polysaccharidmatrix.

Der Übergang von Bakterien aus planktonischer in die sessile oder stationäre Phase geht mit einer Veränderung der Genexpression und einer möglichen phänotypischen Änderung einher [Sauer et al. 2002], mit der die Bakterien im Biofilm besser vor Stressoren geschützt sind [Drenkard 2003]. Die erhöhte Toleranz von *Pseudomonas aeruginosa* resultiert zum einen aus einer geringeren Permeabilität der Zellen, so wie der Fähigkeit zur Ausbildung von Efflux-Pumpen [Chuanchien et al. 2002, Lomovskaya et al. 2000; Schweizer 2003]. Zusätzlich sorgen Sauerstoff- und Nährstofflimitierung im Biofilm zur Ausbildung der bakterieneigenen Stressantwort (bei *P. aeruginosa* auch über Quorum sensing mit Ausbildung von Virulenzfaktoren verbunden) [Pesci et al. 1999; Smith et al. 2003] und verlangsamen Wachstum, was beides zusätzlich zur erhöhten Widerstandskraft beiträgt. In Biofilmen lebende Bakterien sind bis zu 1000-mal widerstandsfähiger gegen Biozide [Drenkard 2003; Lewis 2001]. Aktuell laufen die Errungenschaften der modernen Hygiene Gefahr durch die stetige Zunahme antibiotikaresistenter Bakterien zunichte gemacht zu werden. Ein wichtiges Standbein der Hygiene ist die präventive Medizin mit deren Hilfe die Anzahl der Erkrankungen, die Anzahl der Behandlungen mit Antibiotika und damit auch die Anzahl antibiotikaresistenter Stämme reduziert werden kann [Exner 2008]. Das erweiterte Verständnis dieses Lebensraumes und seine Kontrolle könnten damit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der hohen hygienischen Standards leisten.

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Allgemeines

Pseudomonas aeruginosa gehört zu den aeroben, gramnegativen und oxidasepositiven Stäbchen und ist ca. 2-4 µm groß. *P. aeruginosa* ist lipotrich begeißelt und besitzt eine Vielzahl an Fimbrien, die es ihm ermöglichen an Oberflächen zu haften. Das Bakterium ist ubiquitär vorkommend und sowohl boden-, als auch wasserassoziiert. Weiterhin ist *P. aeruginosa* zur Bildung von extrazellulären polymeren Schleimen und damit auch zur Bildung von Biofilmen befähigt. Diese Eigenschaften in Kombination mit einer kommensalen Lebensweise machen ihn zu einem der relevantesten humanpathogenen, trinkwasser- und krankenhaussassoziierten Keime überhaupt [Kayser et al. 2010].

1.2.2 Epidemiologie/Transmissionspfade

Aufgrund seiner besonderen Relevanz in Krankenhäusern und der Assoziation mit dem feuchten Milieu kommt eine Vielzahl an Infektionsquellen in Betracht. Dazu gehören Wasserhähne, Abflüsse, Siphons, Toiletten, Inhalatoren, Beatmungsgeräte, Dialysegeräte aber auch Personen bzw. medizinisches Personal im Umfeld des Patienten.

Die meisten mit *P. aeruginosa* assoziierten nosokomialen Infektionen sind opportunistischer Natur. Dazu gehören Pneumonien durch Infektion des tieferen Respirationstrakts, postoperative Wundinfektionen, die häufiger bei immunsupprimierten Patienten auftreten, Harnwegsinfektionen und seine Assoziation mit zystischer Fibrose [Madigan und Martinko 2006; Smith et al. 2003]. Studien belegen, dass aktuell ca. 30 % aller Beatmungspneumonien, 20 % der Wundinfektionen, 15–20 % der

Harnwegsinfektionen und ca. 4 % der nosokomialen Septikämien durch diesen Erreger verursacht werden [NNIS 2004; Pawar et al. 2003; Richards 2000]. In den USA ist *P. aeruginosa* neben *E. coli* der häufigste gram-negative Erreger von Pneumonien [Gaynes et al. 2005].

Aufgrund ihrer Relevanz und der damit verbundenen gezielten Behandlung von darmassoziierten Keimen über die vergangenen 10 Jahre hat auf den Intensivstationen eine deutliche Verschiebung im Erregerspektrum stattgefunden. *Pseudomonas aeruginosa* hat sich dabei zu einem der häufigsten Erreger auf Intensivstationen entwickelt. Untersuchungen ergaben eine Assoziation mit besiedelten Wasserhahnauslässen, auf die bis zu 50% aller Infektionen auf Intensivstationen zurückgehen [Trautmann et al. 2009].

In der jüngeren Vergangenheit konnte immer wieder belegt werden, dass *Pseudomonas aeruginosa* insbesondere in Wasserhähnen und Siphons in Patientenzimmern ein Reservoir darstellen kann, von denen gerade für immunsupprimierten Patienten eine erhöhte Gefahr von Infektionen ausgeht [Aumeran et al. 2007; Hota et al. 2009; Pena et al. 2003; Pitten et al. 2001].

Die Nachweisraten von *Pseudomonas aeruginosa* im Leitungswasser variieren zwar stark in den Studien der vergangenen Jahre zwischen 4,5 und 97 %, allerdings ließ sich auch zeigen, dass die Nachweisraten stark von der verwendeten Testmethode abhingen. So erweis sich das Filtern größerer Wassermengen als ergiebiger, als der Direktausstriche von geringeren Mengen [Cholley et al. 2008; Ferroni et al. 1998; Reuter et al. 2002].

Nicht zuletzt Aufgrund dieser Erkenntnisse, der Vielzahl an Virulenzfaktoren und der durch zunehmende Resistenzausbildung erschwerten Therapie, gilt *Pseudomonas aeruginosa* als einer der wichtigsten durch Trinkwasser übertragenen Erreger nosokomialer Infektionen [Aloush et al. 2006; Exner et al. 2010]. Die Investitionen in eine Prophylaxe durch Reduktion möglicher Reservoirs von *P. aeruginosa* und dem Versuch Patienten vor einer möglichen Exposition zu bewahren ist bei Berücksichtigung der Zunahme an Resistenzen den durch Therapie entstehenden Folgekosten vorzuziehen [Craven 2006; de Lyssovoy et al. 2009; Howard et al. 2003; Kerr et al. 2009; Trautmann et al. 2009; Wood et al. 2003].

1.2.3 Virulenzfaktoren

P. aeruginosa besitzt gleich mehrere Virulenzfaktoren und eine ganze Reihe von Sekretionssystemen um diese aus der Zelle zu schleusen. Mittlerweile sind 6 Sekretionssysteme beschrieben (Typ I-VI) von denen dem Typ III Sekretionssystem die größte Bedeutung zukommt. Zu den wichtigeren Enzymen gehören dabei das Exotoxin A (eine ADP-Ribosyltransferase), die die Translation während der Proteinsynthese durch Inaktivierung eines Elongationsfaktors blockiert. Des Weiteren das Exoenzym S (eine ADP-ribosyltransferase), welche Zytoskelett Proteine und GTP-Bindeproteine eukaryotischer Zellen inaktiviert und ein Zytotoxin, welches Zellen durch Bildung transmembraner Poren schädigt [Engel et al. 2009; Kerr et al. 2009; Madigan und Martinko et al. 2006].

1.2.4 Diagnose und Therapie

Die Diagnose erfolgt in der Regel durch Isolation aus dem entsprechenden Material und Identifikation seiner spezifischen Stoffwechseleigenschaften z.B. mittels kulturellen Nachweises auf Cetrimid-Agar oder dem Oxidase-Test. So werden im kulturellen Nachweis die Farbpigmente Pyocyanin (blau-grün) und Pyoverdin/Fluoreszein (gelblich) nachgewiesen oder beim Oxidase-Test die am Elektronentransport der Atmung beteiligte Cytochrom Oxidase (Sauerstoff wird zu Wasser reduziert) bzw. das Elektronen Transportmolekül Cytochrom c mittels blauem Farbumschlag nachgewiesen.

Gängig sind ebenfalls PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese) oder PCR (Polymerase Kettenreaktion) [Kayser et al. 2010]. Bei der Therapie sind gehäuft auftretende Mehrfachresistenzen gegen Antibiotika ein verstärkt auftretendes Problem über das zunehmend in Studien berichtet wird. Da *Pseudomonas aeruginosa* β -Lactamasen produziert, sind die meisten Penicilline und Cephalosporine wirkungslos. Die Behandlung erfolgt mit Carbapenemen (z.B. Meropenem oder Imipinem), Piperacillin, Fluorchinolone (z.B. Ciprofloxacin) oder Ceftazidim bzw. je nach Diagnose auch als Kombinationstherapie z.B. mit Aminoglykosiden (z.B. Tobramycin), die in der Regel nicht mehr alleine verabreicht werden. Auch das Antibiotikum Polymyxin (z.B. Colistin) ist trotz der erheblichen Nebenwirkungen vielversprechend bei der Therapie von mehrfachresistenten Stämmen [Carmeli et al. 1999; Gales 2001; Gaynes et al. 2005; Hancock 1998; Hermsen et al. 2003; Kerr et al. 2009; Livermore 2002]. Neben den intrinsischen Resistenzen durch Efflux-Pumpen (früher erklärt durch geringe Zellpermeabilität), und die Produktion von β -Lactamasen, neigt *Pseudomonas aeruginosa* leicht dazu durch Mutationen und die Aufnahme von Plasmiden Resistenzen zu erwerben [Hancock 1998; Livermore 2002; Mesaros et al. 2007; Schweizer 2002].

1.3 VBNC-Zustand

Laut Definition handelt es sich bei Bakterien im „viable but non culturable“ Zustand (vbnc) um Bakterien die auf den routinemäßig verwendeten Nährböden nicht wachsen bzw. sich vermehren, aber eine nachweisbare Zellaktivität besitzen [Oliver 2000b]. Zellen die sich im vbnc-Zustand befinden zeichnen sich durch geringe metabolische Aktivität aus, sind aber nach erneuter „Wiederbelebung“ kultivierbar [Kell et al. 1998; Oliver (2000a, 2000b, 2000c, 2005)].

Das erste Mal beschrieben wurde der vbnc-Zustand von Xu et al. 1982. Damals noch für *E. coli* und *V. cholerae* beschrieben erkannten die Autoren aber bereits die Relevanz ihrer Entdeckung.

Dieser lange unbekannte Zustand hat sich im Laufe der letzten Jahre als gängige Eigenschaft der Bakterien herauskristallisiert, um mit den in der Natur selten optimalen Umweltbedingungen zurechtzukommen. Außerhalb von Laboratorien und Brutschränken finden Bakterien in den seltensten Fällen optimale Wachstumsbedingungen. Das in Laboren oftmals mit hohem Aufwand hergestellte Milieu in dem Bakterien jeglicher Art wachsen kann aber nicht die einzige Möglichkeit sein bakterielles Leben sicherzustellen. Bakterien und ihr scheinbar anspruchsvoller Stoffwechsel sind in der Lage Situationen in denen Temperatur, Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Nährstoffangebot oder eben auch die Anwesenheit letal wirkender Agenzien innerhalb von Toleranzgrenzen zu überdauern [Grimes et al. 1986; McKay 1992; Nyström 2001, Oliver 2000c; Oliver 2005]. Die Induktion eines solchen Zustands

kann demnach z.B. bereits durch das Verlassen einer Bakterienkultur aus dem optimalen Temperaturmilieu eines Brutschranks induziert werden [Linke et al. 2008].

Seit längerer Zeit bekannt, wurde der vbnc-Zustand von seiner ersten Erwähnung an bereits kontrovers diskutiert. So wurden die Statistiken, trotz des Nachweises metabolistischer Aktivität in nichtkultivierbaren Zellen, gegen eine Gefahr ausgehend von diesem Zustand sprechen und einzig die Demonstration der Umkehrbarkeit wäre der tatsächliche Beleg für den vbnc-Zustand [Bogosian et al. 2001].

Zunächst geleugnet oder als „Tod auf Raten“ beschrieben, der nur die letzten Bemühungen des Mikroorganismus darstellt dem unausweichlichen Zelltod zu entgehen [Barcina et al. 2009; Nyström 2001], musste solche Meinungen in den letzten Jahren revidiert werden. Mit der Darstellung der Umkehrbarkeit des vbnc-Zustands konnten jedoch schon früh viele Zweifel an der Theorie des vbnc ausgeräumt werden und die Thematik gewann neue Relevanz [Steinert et al. 1997; Whitesides et al. 1997]. Mittlerweile ist eine Vielzahl an Stämmen beschrieben, die in den vbnc Zustand übergehen können. Dazu gehören *Vibrio* [Colwell et al. 1985; Xu et al. 1982], *Escherichia* [Xu et al. 1982], *Salmonella* [Roszak et al. 1984], *Aeromonas* [Allen-Austen et al. 1984], *Legionella* [Hussong et al. 1987], *Campylobacter* [Rollins et al. 1986], und *Shigella* [Colwell et al. 1985]. Eine komplettere Liste kann der folgenden Abbildung entnommen werden (siehe Abb. 8).

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
	<i>M. smegmatis</i>	
<i>C. lari</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>R. meliloti</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1&2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	
<i>K. planticola</i>		

Abbildung 8: Auflistung von Bakterien für die der vbnc-Zustand bereits beschrieben wurde. [Oliver 2005]

Auch konnte gezeigt werden, dass Unkultivierbarkeit nicht gleichgesetzt werden kann mit dem Zustand des sog. „starvation survival“ bei dem die Bakterien zwar ebenfalls eine dramatische Veränderung ihres Metabolismus durchmachen, aber weiterhin kultivierbar bleiben [Oliver et al. 1991]. Allerdings blieb die Frage nach der Differenzierung zwischen vbnc Zellen und solchen, die aufgrund von Umwelteinflüssen angegriffen waren ein vieldiskutiertes Problem (s. Abb.9) [Bogosian et al. 2001].

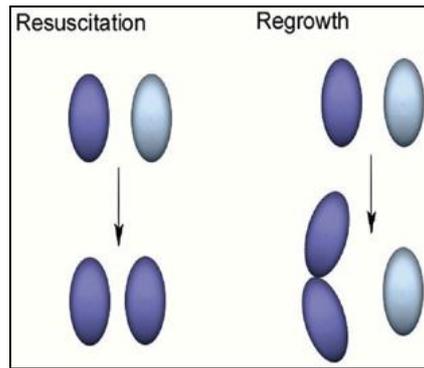


Abbildung 9: Der Unterschied zwischen „Wiederbelebung“ und „Wiederverkeimung“. Dunkelblau = kultivierbare Zellen; hellblau = vbnc Zellen. Bei „Wiederbelebung“ würde die Anzahl nicht kultivierbarer Zellen geringer werden, während sie bei „Wiederverkeimung“ konstant bleibt und eine Zunahme der Anzahl kultivierbarer Zellen von den bereits ursprünglich kultivierbaren Zellen ausgeht. [Bogosian et al. 2001]

Ein Konzept zur Differenzierung ist das der „mixed culture theory“ (MCT). Hierbei sollen kultivierbare Zellen in kleinen Mengen zu einer Suspension mit einer Reinkultur unkultivierbarer Zellen gegeben werden und durch ihre Anwesenheit bzw. ihre Stoffwechselprodukte als Signal zur Umkehr aus dem vbnc-Zustand für andere Zellen fungieren (siehe Abb.10) [Bogosian et al. 1998; Votyakova et al. 1994].

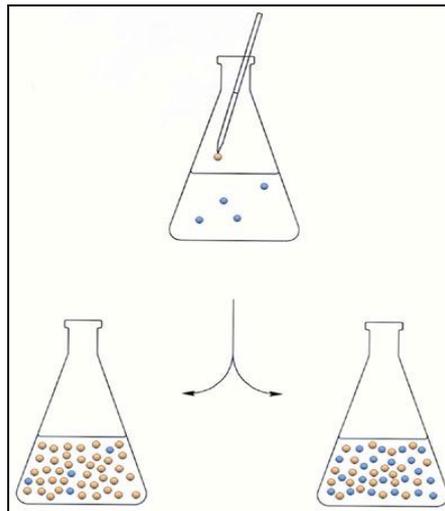


Abbildung 10: Der MCT Test: Zu einer Suspension nicht kultivierbarer Zellen wird eine geringe Menge kultivierbarer Zellen gegeben. Entweder wachsen anschließend nur die hinzu gegebenen kultivierbaren Zellen oder beide. Voraussetzung ist die leichte Differenzierbarkeit beider verwendeter Stämme [Bogosian et al. 2001].

Ein prominentes Beispiel ist hier sicherlich *Helicobacter pylori* und das gleich aus mehreren Gründen. Das Bakterium mit der Eigenschaft den menschlichen Magen trotz des niedrigen pH-Werts zu besiedeln wurde rasch als Vertreter der vbnc-Bakterien erkannt, jedoch ohne die gesamte Tragweite dieser Entdeckung wirklich deuten zu können. Bei der Anzucht von *H. pylori* bedarf es u.a. einer mikroaerophilen Atmosphäre. Sobald *H. pylori* diese und damit auch den Temperaturbereich des Brutschranks verlässt, kann mit fortschreitender Zeit eine deutliche Abnahme der Kultivierbarkeit bereits innerhalb der ersten Stunden festgestellt werden.

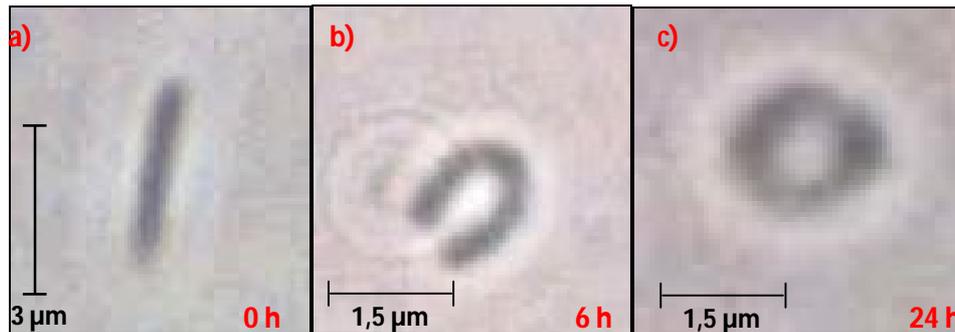


Abbildung 11: Lebendpräparate von *H. pylori*

Die in den Bildern a) bis c) gezeigten Formen bzw. Übergangsformen stellen zum jeweiligen Zeitpunkt die überwiegende Mehrheit dar. a) *H. pylori* in Stäbchenform, b) *H. pylori* in der stark gekrümmten U-Form beim Übergang in den VBNC-Zustand, c) *H. pylori* im VBNC-Zustand bzw. O-Form. Der Zeitpunkt nach Probenahme kann der jeweiligen Aufnahme entnommen werden [Linke et al. 2008].

Die Abnahme der Kultivierbarkeit geht einher mit einer morphologischen Änderung des Organismus. Die spiralförmig gewundenen Bakterien beginnen sich zu biegen bis das Bakterium zunächst eine „U“- und abschließend eine „O“-förmige Struktur aufweist. Bei gleichzeitigem Einsatz von Fluoreszenzfärbungen wie „Life-Dead“ lässt sich zeigen, dass abnehmende Kultivierbarkeit und Änderung der Form eng miteinander hergehen, während die Inaktivierung der Zellen erst deutlich verzögert einsetzt (s. Abb. 11) [Linke et al. 2008].

Die Veränderung der Zellmorphologie wird im Zusammenhang mit der Ausbildung des Öfteren beschrieben und äußert sich durch Verkürzung der Zellen bzw. die Ausbildung von kokkoiden oder „O“-förmigen Zellen [Hood et al. 1986; Morita 1982; Rollins et al. 1986; Rosef et al. 1987].

1.4 Anforderungen an das Trinkwasser

Im Sinne der Trinkwasserverordnung §3 ist „Trinkwasser“ für jeden Aggregatzustand des Wassers und ungeachtet dessen, ob es für die Bereitstellung auf Leitungswegen, in Wassertransportfahrzeugen oder verschlossenen Behältnissen bestimmt ist, alles Wasser, im ursprünglichen Zustand oder nach Aufbereitung, das zum Trinken, zum Kochen, zur Zubereitung von Speisen und Getränken oder insbesondere zu den folgenden anderen häuslichen Zwecken bestimmt ist. Dazu gehören Körperpflege und -reinigung, Reinigung von Gegenständen, die bestimmungsgemäß mit Lebensmitteln in Berührung kommen, Reinigung von Gegenständen, die bestimmungsgemäß nicht nur vorübergehend mit dem menschlichen Körper in Kontakt kommen und alles Wasser, das in einem Lebensmittelbetrieb verwendet wird für die Herstellung, Behandlung, Konservierung oder zum Inverkehrbringen von Erzeugnissen oder Substanzen, die für den menschlichen Gebrauch bestimmt sind [TrinkwV 2001, 2011].

Die Beschaffenheit des Trinkwassers muss laut § 4 „Allgemeine Anforderungen“ der TrinkwV 2011 so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit insbesondere durch Krankheitserreger nicht zu besorgen ist. Es muss rein und genusstauglich sein. Diese Anforderung gilt als erfüllt, wenn bei der Wasseraufbereitung und der

Wasserverteilung mindestens die allgemein anerkannten Regeln der Technik (a.a.R.d.T.) eingehalten werden und das Trinkwasser den Anforderungen der § 5 bis 7 entspricht.

In Paragraph 5 der Trinkwasserverordnung sind die mikrobiologischen Anforderungen an das Trinkwasser festgelegt. Dort heißt es, dass Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nummer 1 des Infektionsschutzgesetzes, die durch Wasser übertragen werden können, nicht in Konzentrationen enthalten sein dürfen, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen. Das beinhaltet alle vermehrungsfähigen Agenzien (Virus, Bakterium, Pilz, Parasit) oder ein sonstiges biologisches transmissibles Agens, das bei Menschen eine Infektion oder übertragbare Krankheit verursachen kann.

Dabei sollen laut Paragraph 5 Absatz (4) Konzentrationen von Mikroorganismen, die das Trinkwasser verunreinigen oder seine Beschaffenheit nachteilig beeinflussen können, so niedrig gehalten werden, wie dies nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik mit vertretbarem Aufwand unter Berücksichtigung von Einzelfällen möglich ist.

Beschrieben werden die sog. „allgemein anerkannten Regeln der Technik“ in § 17 (Anforderungen an Anlagen für die Gewinnung, Aufbereitung oder Verteilung von Trinkwasser der Trinkwasserverordnung). Dort heißt es erstmals, dass für die dabei betroffenen Verfahren und Produkte insbesondere sichergestellt werden, indem durch einen akkreditierten Branchenzertifizierer Verfahren und Produkte eingesetzt werden.

Tritt eine Verunreinigung bzw. Kontamination des Wassers auf, die zum Auftreten einer übertragbaren Krankheit im Sinne des § 2 Nummer 3 des Infektionsschutzgesetzes (...eine durch Krankheitserreger oder deren toxische Produkte, die unmittelbar oder mittelbar auf den Menschen übertragen werden, verursachte Krankheit) führen können, oder annehmen, dass solche Tatsachen vorliegen, muss eine Aufbereitung, erforderlichenfalls unter Einschluss einer Desinfektion nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik unter Beachtung von § 6 Absatz 3 erfolgen. Paragraph 6 Absatz 3 regelt die Konzentration von chemischen Stoffen, die das Trinkwasser verunreinigen oder seine Beschaffenheit nachteilig beeinflussen können. Sie sollen entsprechend des Minimierungs-Gebotes niedrig gehalten werden. Damit sind vorbeugende bzw. dauerhafte Desinfektionen oder solche zur Absenkung von Temperaturen ausgeschlossen. Geeignete Desinfektionsmittel können der Liste des Bundesumweltamtes entnommen werden (Siehe Abb. 12: Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß § 11 Trinkwasserverordnung 2001 Stand: November 2011)

Die Aufgabe der Trinkwasserverordnung ist es also den Verbraucher vor schädlichen Einflüssen zu schützen, die sich aus verunreinigtem Trinkwasser ergeben können. Seit der Novellierung der Trinkwasserverordnung in 2001 gilt die Verantwortlichkeit des Wasserversorgers aber nur noch bis zur Übergabestelle an der Wasseruhr. Der Betreiber der daran angeschlossenen Trinkwasserinstallation ist danach selbstverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Wasserqualität bis zur Entnahme des Wassers an Wasserhähnen, Duschköpfen oder Ähnlichem.

Die geforderte Unbedenklichkeit des Trinkwassers an der Übergabestelle im Sinne der Trinkwasserverordnung, kann aber durch den Einfluss von Biofilmen erheblich beeinträchtigt werden. Dabei beziehen sich bestehende Regelwerke (darunter auch die Trinkwasserverordnung) bei der Festlegung mikrobiologischer Parameter lediglich auf die Wasserphase und nicht auf sessile Zellen

eines Biofilms. Auf internationaler Ebene existiert hier nur die „Council Directive on the quality of water intended for human consumption“, die eine gleichmäßige Trinkwasserqualität innerhalb der EU gewährleisten soll [98/83/EC, C.D. 1998].

Allerdings existieren zurzeit weder auf nationaler noch auf internationaler Ebene Richtlinien oder anderweitig geltende gesetzliche Regelungen, die sich explizit auf die Überwachung oder Beseitigung von Biofilmen in der Trinkwasserinstallation beziehen, obwohl die Relevanz der Biofilmproblematik in den vergangenen Jahren immer öfter thematisiert wurde [Donlan und Costerton 2002; Exner et al. 2005]. In der jüngeren Vergangenheit sind Biofilme in Trinkwasserinstallationen dabei immer wieder als mögliches Reservoir von Pathogenen und als Infektionsquelle diskutiert worden und die Forderung nach einheitlichen Regelungen wurden lauter.

Sei es als Biofilm in zahnärztlichen Behandlungseinheiten, wo Mykobakterien, Legionellen und Pseudomonaden ernste Infektionen hervorrufen können [Exner et al. 2005; Barbeau et al. 1998] oder in den Trinkwasserleitung von Gesundheitseinrichtungen, wo sie stetige Quelle nosokomialer Infektionen sein können [Anaissie et al. 2002; Parsek et al. 2003]. Selbst als mögliche Bedrohung in Form eines terroristischen Angriffs bedarf der Biofilm in zukünftigen Untersuchungen einer differenzierteren Berücksichtigung [Exner et al. 2002; Exner und Kistemann 2002; Exner und Kistemann 2004; Ginsberg et al. 2004]. Ein Risiko auf auch schon die WHO hinwies [Exner 2002]. Dabei ist es verwunderlich, dass es diese geforderten Richtlinien nicht gibt, wo es doch das oberste Ziel sein sollte die menschliche Gesundheit vor schädlichen Einflüssen durch mikrobielle Kontaminationen zu schützen [Exner et al. 2009]. Neben den mikrobiologischen Parametern sind vor allem bauliche Maßnahmen geregelt, die einen sicheren Betrieb von Trinkwasserleitungen gewährleisten sollen. Für den Entwurf und die Ausführung von baulichen Anlagen oder technischen Objekten sind dies die „allgemein anerkannten Regeln der Technik“ (a.a.R.d.T.), deren Einhaltung mikrobiologische Kontaminationen z.B. in Trinkwasserleitungen minimieren bzw. verhindern sollen [DIN 2008, WHG 1957]. Laut Definition handelt es sich bei den a.a.R.d.T. um technische Festlegungen von Prinzipien und Lösungen, die sich in der Praxis bewährt haben und die von einer Mehrheit repräsentativer Fachleute als Wiedergabe des Standes der Technik angesehen werden [CEN 2006; BVerfGE 1979]. Es handelt sich also um Empfehlungen, die jedoch auch vor dem Gesetz als Maßstab für die Bestimmung der Pflichtwidrigkeit eines Handelns, insbesondere bei der Prüfung der Fahrlässigkeit herangezogen werden können [Strafgesetzbuch § 319 - Baugeschädigung]. Dort steht unter anderem „Wer bei der Planung, Leitung oder Ausführung eines Baues oder des Abbruchs eines Bauwerks gegen die allgemein anerkannten Regeln der Technik verstößt und dadurch Leib oder Leben eines anderen Menschen gefährdet, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft“. Bei den a.a.R.d.T. handelt es sich gleichzeitig aber auch lediglich um Minimalanforderungen, deren Nichteinhaltung als Mangel auszulegen ist.

1.5 Desinfektionsverfahren

Das Deutsche Arzneibuch versteht unter Desinfektion „*Totes oder lebendes Material in einen Zustand versetzen, dass es nicht mehr infizieren kann*“. In Zahlen entspricht das einer Reduktion aller Mikroorganismen durch Inaktivierung oder Entfernung um einen Faktor von mindestens 10^{-5} (5 Logstufen) [DAB 2010]. Im Folgenden sind die möglichen Verfahren zur Desinfektion und Sanierung von Trinkwasserinstallationssystemen kurz zusammengefasst.

1.5.1 Technische Verfahren

Hier wird durch Aus – und Umbau bestehender Trinkwasserinstallationen eine Verbesserung der mikrobiologischen Belastung erzielt [DVGW, 2004]. Dies kann z.B. durch den Austausch ungeeigneter Materialien [Exner et al. 2007], und das Entfernen von Tot- bzw. Stichleitungen, die als stetige Quelle von Kontaminationen dienen können geschehen [Röttlich 2010].

Teil I c: Aufbereitungsstoffe, die zur Desinfektion des Wassers eingesetzt werden								
Stoffname	CAS-Nummer	EINECS-Nummer	Verwendungszweck	Reinheitsanforderungen	Zulässige Zugabe	Konzentrationsbereich nach Abschluss der Aufbereitung *)	zu beachtende Reaktionsprodukte	Bemerkungen
Calciumhypochlorit	7778-54-3	231-908-7	Desinfektion	DIN EN 900 Tab 1: Typ1	1,2 mg/L freies Cl ₂	max. 0,3 mg/L freies Cl ₂ min. 0,1 mg/L freies Cl ₂	Trihalogenmethane, Bromat	Zusatz bis zu 6 mg/L freies Cl ₂ und Gehalte bis 0,6 mg/L freies Cl ₂ nach der Aufbereitung bleiben außer Betracht, wenn anders die Desinfektion nicht gewährleistet werden kann oder wenn die Desinfektion zeitweise durch Ammonium beeinträchtigt wird.
Chlor	7782-50-5	231-959-5	Desinfektion, Herstellung von Chlordioxid	DIN EN 937 Tab 1 Bei Herstellung des Chlor nach dem Amalgam-Verfahren: Hg-Gehalt max. 0,1 mg/kg Cl ₂	1,2 mg/L freies Cl ₂	max. 0,3 mg/L freies Cl ₂ min. 0,1 mg/L freies Cl ₂	Trihalogenmethane	Zusatz bis zu 6 mg/L freies Cl ₂ und Gehalte bis 0,6 mg/L freies Cl ₂ nach der Aufbereitung bleiben außer Betracht, wenn anders die Desinfektion nicht gewährleistet werden kann oder wenn die Desinfektion zeitweise durch Ammonium beeinträchtigt wird.
Chlordioxid	10049-04-4	233-162-8	Desinfektion	DIN EN 12671 Nur Angaben zu den Ausgangsstoffen (EN 937, 938, 939, 12678, 12926)	0,4 mg/L ClO ₂	max. 0,2 mg/L ClO ₂ min. 0,05 mg/L ClO ₂	Chlorit	Ein Höchstwert für Chlorit von 0,2 mg/L ClO ₂ nach Abschluss der Aufbereitung muss eingehalten werden. Der Wert für Chlorit gilt als eingehalten, wenn nicht mehr als 0,2 mg/L Chlordioxid zugegeben werden. Möglichkeit von Chloratbildung beachten.
Natriumhypochlorit	7681-52-9	231-668-3	Desinfektion	DIN EN 901 Tab 1: Typ 1 Grenzwert für Verunreinigungen mit Chlorat (NaClO ₃): < 5,4 % (m/m) des Aktivchlors	1,2 mg/L freies Cl ₂	max. 0,3 mg/L freies Cl ₂ min. 0,1 mg/L freies Cl ₂	Trihalogenmethane, Bromat	Zusatz bis zu 6 mg/L freies Cl ₂ und Gehalte bis 0,6 mg/L freies Cl ₂ nach der Aufbereitung bleiben außer Betracht, wenn anders die Desinfektion nicht gewährleistet werden kann oder wenn die Desinfektion zeitweise durch Ammonium beeinträchtigt wird.
Ozon	10028-15-6	233-069-2	Desinfektion, Oxidation	DIN EN 1278 Anhang A.3.2	10 mg/L O ₃	≤ 0,05 mg/L O ₃	Trihalogenmethane Bromat	Siehe auch Liste Teil I a

Abbildung 12: Teil I c Aufbereitungsstoffe, die zur Desinfektion des Wassers eingesetzt werden (Auszug aus „Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß § 11 der TrinkwV 2011

1.5.2 Mechanische Verfahren

Zu den mechanischen Verfahren, zählen Maßnahmen, wie die Installation von endständigen Filtern. Auf diese Weise wird z.B. die Exposition eines Patienten in Krankenhäusern mit Wasser aus kontaminierten Trinkwasserleitungen reduziert. Das Verfahren ist aber bedingt durch die maximale Standzeit von 30 Tagen eines Filters verhältnismäßig kosten- und personalintensiv. Das Anbringen von endständigen Filtern bietet jedoch als kurzfristige Maßnahme die Möglichkeit z.B. in Krankenhäusern schnell zu einer Verbesserung der Inzidenzzahlen bei nosokomialen Erkrankungen zu führen [Camps et al. 2011; Exner et al. 2005; Ortolano et al. 2007; Sheffer et al. 2004].

Aber gerade in Bezug auf Biofilme spielen gerade dessen extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eine übergeordnete Rolle. Sie sind in der Lage die Filtermaterialien zu verstopfen, wobei sich bei körnigen Filtermaterialien (z. B.: Sand, Aktivkohle etc.) so stabile Aggregate bilden, dass sie in manchen Fällen auch durch starke Rückspülung nicht mehr getrennt werden können [Flemming et al. 2002]

1.5.3 Physikalische Verfahren

1.5.3.1 Thermische Desinfektionen

Die thermische Sanierung, ist im DVGW Arbeitsblatt W551 [DVGW 2004] beschrieben. Dabei muss jede Zapfstelle für 3 Minuten mit 70°C heißem Wasser beaufschlagt werden.

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].

Bei diesem Verfahren besteht ein sehr hoher Energie- und Wasserverbrauch, was einen erhöhten finanziellen Aufwand mit sich bringt [Röttlich 2010]. Neben dem hohen Energie- und Wasserverbrauch sind die Schwierigkeiten bei der Gewährleistung, dass die geforderte Temperatur im gesamten System der Trinkwasserinstallation aufrecht erhalten werden kann am höchsten.

1.5.3.2 Ultraviolette-Strahlung

Hier handelt es sich um eine punktuelle Desinfektion mit Niederdruck Quecksilberdampflampen, die ihre Hauptwellenlänge bei 265 nm besitzen. UV-Geräte, die im Trinkwasserbereich eingesetzt werden, müssen nach dem DVGW Arbeitsblatt W 294 [DVGW 1997] zertifiziert sein.

Das Prinzip beruht auf der Schädigung bakterieller oder viraler DNA durch Dimerbildung benachbarter Thyminbasen die in ausreichender Anzahl zu Mutationen führen oder die Replikation von DNA vollständig verhindern. Eine chemische Belastung des Trinkwassers entfällt genauso, wie die Geruchsbildung bei chemischer Behandlung. Von Vorteil sind ebenfalls die geringeren Kosten einer UV-Desinfektion [Scheible et al. 1981]. Verunreinigungen im Trinkwasser wie Partikel und Schwebeteilchen können allerdings die Wirkung der UV-Strahlung mindern [Johnson et al. 1981]

1.5.3.3 Impuls-Luftdruck-Verfahren

Eine andere Möglichkeit ist die Zuführung von Luftimpulsen [DVGW 2009]. Studien zeigten, dass es 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., 2010].

1.5.4 Chemische Desinfektion

1.5.4.1 Freies Chlor

Freies Chlor ist das am häufigsten eingesetzte chemische Desinfektionsmittel. Entsprechend der Vorgaben der Trinkwasserverordnung (TrinkwV § 11) beträgt die maximal zulässige Konzentration für den Einsatz von freiem Chlor für die Aufbereitung von Trinkwasser 1,2 mg/l bzw. 0,1-0,3 mg/l freies Chlor nach Abschluss der Aufbereitung.

Die in Schadensfällen kurzzeitig erlaubte Höchstmenge freien Chlors, welches dem Trinkwasser hinzugegeben werden darf beträgt 6mg/l bzw. 0,6mg/l nach der Aufbereitung [UBA 2005]. Es darf zur kontinuierlichen Desinfektion und zur Stoßbehandlung für die Anlagendesinfektion eingesetzt werden.

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 et al. 2010].

Dieser Aspekt muss bei einer Chlordesinfektion berücksichtigt werden. Hinzu kommt, dass der Zustand von Chlor stark pH-abhängig ist. Mit steigendem pH-Wert 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. [Chang et al. 2010; Guo und Chen 2009; Mincher et al. 2010]. Diese Stoffe stehen im Verdacht karzinogen zu sein [Chowdhury et al. 2010; UBA 1996].

1.5.4.2 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 Trinkwasserdessinfektion 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, wie postoperativen Wunden, Traumata oder diabetischer Ulcer zum Einsatz [Paola 2006; Wolvos 2006].

Studien zeigten, dass die bei dem Verfahren erzeugten Lösungen antimikrobielle Wirkung gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen besitzen, z.B. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* [Fabrizio und Cutter 2003; Kimura et al. 2006; Venkitanarayanan et al. 1999a; 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], frischem Gemüse [Bari et al. 2003] oder Schneidbrettern [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].

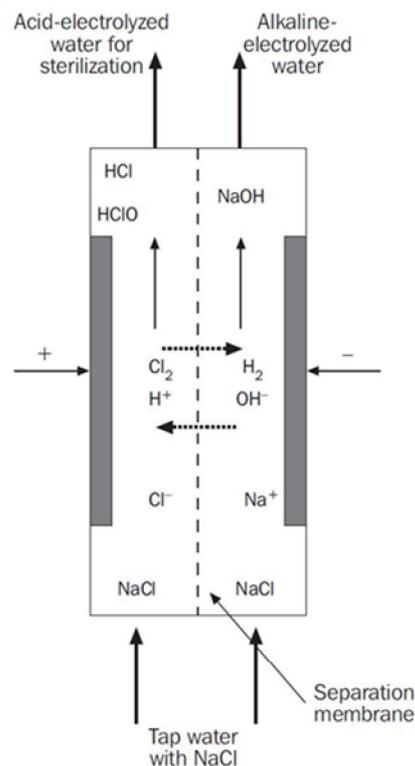


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer Zellmembranelektrolysekammer mit den Reaktionsprodukten [nach: Isobe et al. 2004].

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 (s. Abb. 13). 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].

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, da die Lösung sich zu kurz in der Elektrolysekammer befindet [Gabriel et al. 2004; Hsu 2005]. Zudem kann durch eine Erhöhung der Spannung oder der Salzkonzentration der pH - Wert vermindert und das Redoxpotential erhöht werden [Gabriel et al. 2004].

1.5.4.3 Chlordioxid

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. Hergestellt wird es aus einer Vorlage von Salzsäure und Natriumhypochlorit (Reaktionsgleichung: $\text{HCl} + \text{HOCl} + 2 \text{NaClO}_2 \rightarrow 2 \text{ClO}_2 + 2 \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$).

Die entstehende Nebenprodukte wie Trihalogenmethane, Chlorit und Chlorat stehen jedoch im Verdacht karzinogen zu sein [Fantuzzi et al. 2003; Korn et al. 2002; Li et al. 1996; Muttamara et al. 1995]. Im Vergleich zum Einsatz von Freiem Chlor ist die Konzentration an entstehenden Trihalogenmethanen beim Einsatz von Chlordioxid geringer [Hofmann et al. 1999] und die Wirkung ist in einem Bereich zwischen pH 5 und pH 9 weniger stark pH - abhängig [Chang et al. 2000; Chauret et al. 2001]. Außerdem besitzt Chlordioxid neben einer höhere antibakteriellen Wirkung, auch eine längere Verweildauer im zu desinfizierenden System im Vergleich zu Chlor [Loret et al. 2005; Schwartz et al. 2003]. Mehrere Studien mit Legionellen [Walker et al. 1995; Srinivasan et al. 2003], Cryptosporidien [Chauret et al. 2001; Clark et al. 2003], diverse Viren, wie z.B. Hepatitis A Virus, Feline Herpesvirus, Feline Calicivirus, und Feline Parvovirus [Eleraky et al. 2002; Li et al. 2004] und Biofilmen [Gagnon et al. 2005; LeChevallier et al. 1988; Schwartz et al. 2003] belegen diese Desinfektionsleistung von Chlordioxid. Zudem können auch die Oozysten von *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 vergleichbar niedrig waren, wie in nicht behandelten Vergleichsrohren [Eisnor et al. 2004].

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit ist das Klären der Frage, welchen Einfluss Desinfektionsmittel auf Biofilme und bakterielle Biofilmpopulationen haben können, wenn diese wiederholt oder dauerhaft in zu geringer Konzentration dosiert werden. Dazu wird untersucht, wie sich Biofilme nach einer solchen Behandlung entwickeln. Es soll überprüft werden, ob die Möglichkeit besteht, dass die nach einer selektiven Behandlung mit verschiedenen Desinfektionsmitteln neuaufwachsende Population des Biofilms widerstandsfähiger werden kann. Gleichsam sollen die im Biofilm befindlichen Bakterien vor und nach der Behandlung charakterisiert werden. Ein Vergleich der durch den Einfluss der Desinfektion entstandenen Biofilme mit denen der autochtonen Biofilmflora kann Aufschluss geben, welche Bakterien in der Lage sind, einen Biofilm mit erhöhter Widerstandskraft zu generieren.

In weiterführenden Untersuchungen soll die Reaktion von biofilmassoziiertem *Pseudomonas aeruginosa* auf die wiederholten Behandlungen mit subletal dosierten Desinfektionsmitteln untersucht werden. Damit soll zum einen gezeigt werden, ob die derzeit geltenden Richtlinien für den Einsatz von Desinfektionsmitteln, wie sie in der Trinkwasserverordnung festgelegt sind, dauerhaft auch auf Biofilme anwendbar sind, bzw. ob die Notwendigkeit der Einführung einer Regelung besteht, die die Überwachung und Beseitigung von Biofilmen festlegt.

Zu diesem Zweck sollen Biofilme der autochtonen Trinkwasserflora, sowie mit *P. aeruginosa* beimpfte Trinkwasserbiofilme dauerhaft gering dosierten Mengen an Desinfektionsmitteln ausgesetzt werden. Die Dokumentation der Koloniezahlen und der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* sollen in Relation gesetzt werden zu denen des Biofilms selbst. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollen Aufschluss geben können, ob *P. aeruginosa* in der Lage ist, in einem solchen Trinkwasserbiofilm zu überdauern und welchen Anteil er an einem Neubewuchs des Biofilms haben kann, wenn der aufgrund nicht ausreichend dosierter Desinfektionsmittel nicht vollständig inaktiviert wird. Dazu soll die verbleibende Zellaktivität von *Pseudomonas aeruginosa* durch PNA-FISH belegt werden. Bei einem Ausbleiben eines kulturellen Nachweises würde ein positiver Nachweis belegen, dass die Zellen weiterhin Stoffwechselaktivität in Form von Proteinbiosynthese besitzen.

In einem zweiten Schritt soll ermittelt werden, ob es möglich ist, durch Desinfektionsmittel *P. aeruginosa* in den vbnc-Zustand zu überführen. Sollte *P. aeruginosa* in der Lage sein bei nicht letaler Dosierung von Desinfektionsmitteln in einen lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zustand überzugehen, könnten Desinfektionsmaßnahmen fälschlicherweise als erfolgreich gewertet werden.

Der Nachweis erfolgt hier mittels PNA-FISH. Zu diesem Zweck soll ein Verfahren etabliert werden, mit dem es möglich sein soll, Bakterienstämme auf ihre Suszeptibilität gegenüber Desinfektionsmitteln zu testen und gleichzeitig überprüft werden kann, ob Desinfektionsmittel in der Lage sind, den Zielorganismus in einen vbnc-Zustand zu überführen.

MATERIAL UND METHODEN**2.1 Materialien****2.1.1 Geräte**

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

Tabelle 1: Im Labor verwendete Geräte

Gerät	Modell-Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank 20°C	Typ B 6200	Heraeus
Brutschrank 36°C	Typ ST 5042	Heraeus
Faseroptische Ultra-Mikro-messzelle	TrayCell	Hellma
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 mit PTFE-Pistill	15 ml	B. Braun
Magnetrührer/Heizgerät	ARE Heating Magnetic Stirrer	Velp Scientifica
Mehrkanalpumpe	Pumpdrive 5101	Heidolph
Mehrkanalpumpenzubehör	Medium size Cassette	Heidolph
Mehrkanalpumpenzubehör	Mehrkanal Pumpenkopf C8	Heidolph
Petrischalen-Drehtisch	Petriturn E ^{PLUS}	Schütt
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo
Micro-Plate-Reader	MWGt Sirius HT	Bio-Tek Instruments
Rasterelektronenmikroskop	JSM-6510 LV	JEOL
qPCR Real-time Thermocycler	LightCycler 1.5	Roche
Reinstwassersystem	MilliQ Plus mit QPak2	MilliQ
UV-Vis- Spektrophotometer	GeneQuant 1300	GE Healthcare

Tabelle 1: Im Labor verwendete Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Modell-Bezeichnung	Hersteller
UV-Vis-Spektrophotometer	NanoDrop – ND 1000 Spektrophotometer	NanoDrop
Sputter-Coater	Sputter-Coater D 005	Bal-Tec
Steril-Werkbank	Safeflow 1.2	Nunc
Tauchpumpe	Micro-Jet MC 320	Aquarium Systems NEWA
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf
Trockenkammer FISH-Proben	PNA-FISH Workstation	AdvanDx
Trockenkammer REM-Proben	Critical Point Dryer CPD 030	Bal-Tec
Vakuumpumpe	N 022 AN.18	KNF
Vortexer	Scientific 2x ³	Velp
Waage	BP110 (0,02 g- 110 g)	Sartoris
Wasserbad	PNA-FISH Water bath	AdvanDX
Wasserbad	Thermostatic Water bath WBS Model: WBS 8	Fried Electric
Zentrifuge	Zentrifuge Mikro 120	Hettich

2.1.2 Verbrauchsgüter

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

Tabelle 2: Bezugsquellen für Verbrauchsgüter

Hersteller	Standort
Brand GmbH + Co. KG	Gießen
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Deutsch & Neumann GmbH	Berlin
Eppendorf AG	Wesseling-Berzdorf
Fermentas GmbH	St.Leon-Rot
Greiner Bio-One GmbH	Frickhausen
KFM Laborchemie Handels GmbH	Lohmar
Millipore GmbH	Schwalb
Oxoid Deutschland GmbH	Wesel
Promega GmbH	Mannheim
Qiagen GmbH	Hilden
Roche Deutschland Holding GmbH	Mannheim

Tabelle 2: Bezugsquellen für Verbrauchsgüter (Fortsetzung)

Hersteller	Standort
Schleicher & Schüll GmbH	Dassel
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
TIB Molbiol Syntheselabor GmbH	Berlin

2.1.3 Chemikalien

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

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Substrate

Chemikalien	chemische Summenformel	Hersteller	Molekulargewicht (g/mol)
Agarose low EEO (Agarose Standard)	$[C_{12}H_{18}O_9]_n$	AppliChem, Darmstadt	-
Calciumchlorid	$CaCl_2$	AppliChem, Darmstadt	110,99
DAPI	$C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$	AppliChem, Darmstadt	350,25
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Merck, Darmstadt	292,25
Essigsäure (99, 9 %)	$C_2H_4O_2$	AppliChem, Darmstadt	60,05
Ethanol (absolut)	C_2H_6O	Merck, Darmstadt	234,15
Ethidiumbromid (1 %)	$C_{12}H_{20}BrN_3$	Serva, Heidelberg	30,03
Formaldehyd (37%)	CH_2O	VWR International Langenfeld	30,03
Formamid	CH_3NO	AppliChem, Darmstadt	45,04
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	AppliChem, Darmstadt	180,16

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Substrate (Fortsetzung)

Chemikalien	chemische Summenformel	Hersteller	Molekulargewicht (g/mol)
Glutardialdehyd (25 %)	$C_5H_8O_2$	Merck, Darmstadt	100,12
Kaliumchlorid	KCl	AppliChem, Darmstadt	74,56
Kaliumhydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck Darmstadt	136,09
Lecithin aus Ei	-	AppliChem, Darmstadt	-
L - Histidin	$C_6H_9N_3O_2$	AppliChem, Darmstadt	155,16
Magnesiumchlorid – Hexahydrat	$Cl_2Mg \cdot 6H_2O$	AppliChem, Darmstadt	203,30
Natriumcacodylat	$C_2H_6AsO_2$ Na_3H_2O	Merck, Darmstadt	214,03
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt	58,44
Natriumhydroxid	NaOH	Merck, Darmstadt	39,99
Osmiumtetroxid-Lösung (4 %)	OsO_4	Merck, Darmstadt	254,20
Phenol	C_6H_6O	Merck, Darmstadt	94,11
Tris-Base	$C_4H_{11}NO_3$	Merck, Darmstadt	121,14
Trypton	-	Becton Dickinson Heidelberg	-
Natriumhydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Merck Darmstadt	141,96
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Merck Darmstadt	84,01
Natriumthiosulfat	$Na_2S_2O_3$	Merck Darmstadt	158,11
Natronlauge – Maßlösung (1 M)	NaOH	AppliChem, Darmstadt	40,00

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Substrate (Fortsetzung)

Chemikalien	chemische Summenformel	Hersteller	Molekulargewicht (g/mol)
Paraformaldehyd	(CH ₂ O) _n	AppliChem, Darmstadt	30,03
Peressigsäure (39%)	CH ₃ CO ₃ H	Merck Darmstadt	76,05
Salzsäure, konz.	HCl	AppliChem, Darmstadt	36,46
Schwefelsäure, konz.	H ₂ SO ₄	AppliChem, Darmstadt	98,08

2.1.4 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben wurde zur Herstellung aller Puffer und Lösungen (Tab.4) Reinstwasser aus der MilliQ-Anlage (Fa. Millipore) verwendet. Falls nötig wurde der pH-Wert mit NaOH (1M) bzw. HCl (1M) (Toleranz 0,05) eingestellt. Das Auffüllen auf 1 l erfolgte mit a.dest.

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	pH- Wert	Zusammensetzung	Menge pro Liter
DAPI – Lösung (10 µg/ml in 2% Formaldehyd)	k.A.	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid Formaldehyd (37%)	10 mg 54,05 ml
Glutardialdehyd-Lösung (25,0 %)	k.A.	Glutardialdehyd-Lösung (50 %)	500,0 ml
Natriumchloridlösung (0,9 %) mit Trypton	7,0	Natriumchlorid Trypton	8,5 g 1,0 g
Kristallviolett- Stammlösung	k.A.	Kristallviolett Phenol 96 % Ethanol	20,0 g 20,0 g ad 1,0 l
Lugol'sche Lösung	k.A.	Iod Kaliumiodid	3,33 g 6,66 g
Natriumcacodylat-Puffer	7,4	Natriumcacodylat Natriumhydroxid	21,4 g 6,5 g

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer (Fortsetzung)

Bezeichnung	pH- Wert	Zusammensetzung	Menge pro Liter
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
TLH-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 ± 0,2	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).

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme

Name	Bezugsquelle	Stamm / Antibiotikaresistenz	Referenz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSMZ, Braunschweig	DSM 939 ATCC 15442	[Borneff et al. 1981; Schroeter 1872]

2.1.6 Nährmedien (Nährböden/ Nährbouillon)

Im Folgenden sind alle Nährmedien, ihre Zusammensetzung und ihre Bezugsquellen aufgelistet, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen (Tab.6).

Tabelle 6: Verwendete Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller	Inhaltsstoffe	Menge pro Liter
Casein - Soja - Pepton-Medium (TSA) - Agar	Becton Dickinson	Agar Caseinpepton Natriumchlorid Sojamehlpepton K ₂ HPO ₄	15,0 g 15,0 g 5,0 g 5,0 g 2,5 g
Cetrimid – Agar	Oxoid	Agar Cetrimid Kaliumsulfat Magnesiumchlorid Pepton	13,6 g 0,3 g 10,0 g 1,4 g 20,0 g
TSB - Bouillon (ohne Agar + K ₂ HPO ₄)	Becton Dickinson	Caseinpepton Natriumchlorid Sojamehlpepton Dextrose	15,0 g 5,0 g 5,0 g 2,5 g
R2A - Agar	Becton Dickinson	Agar Casaminosäure Dextrose Dikaliumphosphat Hefeextrakt Magnesiumsulfat Natriumpyruvat Protease-Pepton Nr.3 Stärke	15,0 g 0,5 g 0,5 g 0,3 g 0,5 g 0,05 g 0,5 g 0,5 g 0,5 g

Die verwendeten Mikroorganismen (siehe auch Tab. 5) wurden mit Nährmedien kultiviert, die den jeweiligen Nährstoffansprüchen entsprechen. Sofern die Nährmedien nicht gebrauchsfertig von einer kommerziellen Quelle bezogen wurden, wurden sie nach Herstellerangaben auf ein Endvolumen von 1 Liter 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 Tabelle 9 entnommen werden. Der jeweilige Verwendungszweck wird im Folgenden erklärt.

Casein-Soja-Pepton-Agar (TSA) ist ein Agarmedium, das der Anreicherung von wenig bis nicht anspruchsvollen Bakterienkulturen dient. Die enthaltenen Peptone dienen als Stickstoffquelle für

Aminosäuren oder langkettige Peptide. Natriumchlorid dient der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts.

Casein-Soja-Pepton–Boullion (TSB) ist ein nährstoffreiches Anreicherungsmedium, dass zur Anreicherung und Kultivierung einer Vielzahl von aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien ohne gesonderte Nährstoffansprüche dient. Die enthaltene Dextrose dient als Energiequelle.

Cetrimid–Agar dient der selektiven Isolierung von *Pseudomonas aeruginosa* aus Probenmaterial. Das enthaltene Cetrimid ist eine bakterizide, quatäre Ammoniumverbindung und hemmt das Wachstum einer Vielzahl anderer Bakterienstämme, einschließlich anderer Pseudomonas-Arten. Das enthaltene Magnesiumchlorid und Kaliumsulfat fördern die Pyocyanin- und Pyoverdinbildung, die für farblich charakteristische Kolonien verantwortlich zeigen und einer zusätzlichen Differenzierung dienen.

R2A-Agar ist ein nährstoffarmes „Mangelmedium“ und diente der Anreicherung von Trinkwasser-Mikroorganismen. Durch das geringe Nährstoffangebot in Kombination mit geringerer Inkubationstemperatur und verlängerter Inkubationsdauer wachsen bevorzugt Bakterienstämme von gestressten und auch chlorresistenten trinkwasserassoziierten Bakterien [Reasoner et al. 1985], welche sonst von schneller wachsenden Bakterienstämmen überwachsen bzw. im Wachstum gehemmt werden. Der Hefeextrakt dient als Quelle für Spurenelemente und Vitamine, Peptone und Casaminosäuren sind Lieferant von Stickstoffen, Aminosäuren und Mineralien. Dextrose dient als Kohlenstoffquelle. Die enthaltene Stärke absorbiert toxische Nebenprodukte des Stoffwechsels und Natriumpyruvat dient der Regeneration gestresster Zellen.

2.1.7 Gel-Marker für DNA-Größenstandards

Im Folgenden sind alle Gel-Marker für DNA-Größenstandards, die damit darstellbaren Fragmentgrößen und ihre Bezugsquellen aufgelistet, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 7: Verwendete DNA-Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller	Enthaltene 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
GeneRuler DNA Ladder, Ultra Low Range	Fermentas Life Sciences,	300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10
6x Loading Dye Solution	Fermentas Life Sciences, (mitgeliefert mit GeneRuler DNA Ladder)	

2.1.8 Oligonukleotide

Im Folgenden sind alle Oligonukleotide, ihre Sequenz, die Länge und ihre Bezugsquellen aufgelistet, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' nach 3')	Länge der Sequenz/Amplicon	Quelle
16SrDNA forward-Primer	AgAgTTTgATCCTggCTCAg	20	[Weisburg et al. 1991]
16SrDNA Reverse-Primer	ACggCTACCTTgTTACgACTT	21	[Weisburg et al. 1991]
Gesamtzellzahl forward-Primer	ACTCCTACgggAggCAg	17/468	[Yu et al. 2005]
Gesamtzellzahl reverse-Primer	gACTACCAgggTATCTAATCC	21/468	[Yu et al. 2005]
Gesamtzellzahl Fluoreszenzsonde	6FAM- TgCCAgCAgCCgCggTAATA --BBQ	21/468	[Yu et al. 2005]
<i>P. aeruginosa</i> forward-Primer	TgCTggTggCACAggACAT	19	[Shannon et al. 2007]
<i>P. aeruginosa</i> reverse-Primer	TTgTTggTgCAgTTCCTCATTg	22	[Shannon et al. 2007]
<i>P. aeruginosa</i> Fluoreszenzsonde	6FAM- CAgATgCTTTgCCTCAACgTCgA --BBQ	23	[Shannon et al. 2007]

2.1.9 Enzyme

Im Folgenden sind alle Enzyme, der ursprüngliche Organismus und ihre Bezugsquellen aufgelistet, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 9: Verwendete Enzyme

Name	Quelle	Hersteller
Proteinase K	<i>Tritrachium album</i>	Qiagen
Proteinase K	<i>Tritrachium album</i>	AppliChem
<i>Taq</i> DNA Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i>	Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i>	Roche

2.1.10 Molekularbiologische Kits

Im Folgenden sind alle Molekularbiologischen Kits, ihr Verwendungszweck und ihre Bezugsquellen aufgelistet, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 10: Verwendete molekularbiologische Kits

Name	Verwendungszweck	Hersteller
AdvanDX PNA-FISH <i>E. coli</i> / <i>P. aeruginosa</i>	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung von Bakterien	AdvanDx
DNeasy Blood and Tissue Kit	Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien	Qiagen
FastPrep - DNA Spin Kit	Isolation von genomischer DNA aus Filterproben	MP Biomedicals
Live-Dead <i>BacLight</i> Bacterial Viability Kit	Differenzierung von Zellen mit intakter und defekter Zellwand	Invitrogen
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Isolierung von DNA Fragmenten aus TAE Agarosegelen	Promega

2.1.11 Software

Im Folgenden sind alle verwendeten Internetdatenbanken, genutzte Software und ihr Verwendungszweck aufgelistet, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 11: Genutzte Software und Internet-Datenbanken

Bezeichnung	Verwendungszweck	Version
Axio Vision	Fluoreszenzmikroskop-Bilderdokumentationssoftware	4.8.2
Chromas lite	Sequenzauswertung von Chromatogrammdaten	2.01
KC4 Software	Micro Plate Reader	3.4
LightCycler Software	Real-time Thermocycler	3.5
NanoDrop Software	UV-Vis-Spektrophotometer	3.5.2
SEM Control User Interface	Rasterelektronenmikroskop-Bilderdokumentationssoftware	3.09
www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	Sequenzvergleiche	-
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/	Literatursuche	-

2.1.12 Das Silikonschlauchmodell

Als Quelle für Biofilme diente das am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit Bonn (IHPH) entwickelte Silikonschlauchmodell, mit dem Biofilmwachstum in wasserführenden Systemen imitiert werden soll [Exner et al. 1987]. In diesem Modell wird Trinkwasser (bei 30 l/h) durch Silikonschläuche geführt. Der Silikonschlauch (Fa. Deutsch & Neumann) dient hier durch die in ihm enthaltenen und für Bakterien verwertbaren Kohlenstoffe zum einen als Nährstoffquelle und fördert damit die Entwicklung des Biofilms, zum anderen lässt sich das Modell leicht beproben und bildet durch die einfache Handhabung die Grundlage vielfacher Untersuchungen, wie Kultivierung oder verschiedene mikroskopische und molekulargenetische Analysen. Zusätzlich kann eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt werden, zur Simulation von Desinfektions- und Sanierungsmaßnahmen. So kann z.B. über eine Zudosierungsanlage dem Wasser Chlor, Chlordioxid, Wasserstoffperoxid oder ein anderes Desinfektionsmittel hinzugefügt werden.

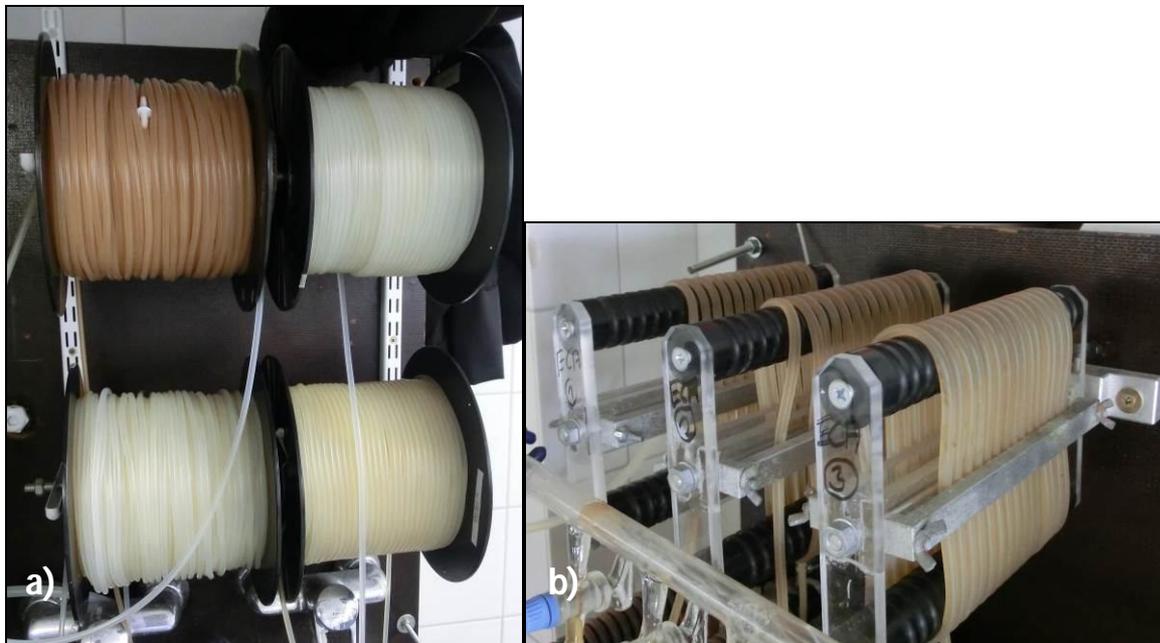


Abbildung 14: Silikonschlauchmodell zur Generierung und Behandlung von Biofilmen.

a) Beweglichen Führungsrollen für die Generierung von Biofilmen. Die Färbung der Schläuche ist ein Maß für das Alter der Biofilme b) Die Führungssysteme für Langzeitbehandlungen mit Desinfektionsmitteln.

Die Silikonschläuche zur Biofilmanzucht besitzen einen Innendurchmesser von 4 mm und eine Länge von bis zu 100 m. Für die Generierung von Biofilmen werden die Schläuche auf beweglichen Führungsrollen (siehe Abb. 14a) aufgewickelt, die in festen zeitlichen Abständen gedreht werden können, um eine gleichmäßige Sedimentation von organischen und anorganischen Bestandteilen des Trinkwassers bzw. des Biofilms zu gewährleisten. Für die jeweiligen Untersuchungen kann die Länge der Schläuche entsprechend variiert werden. Zur Durchführung von Langzeitversuchen können die Silikonschläuche bis zu einer Länge von 12 m auf speziellen Führungssystemen aufgewickelt werden (siehe Abb. 14b), die das Zudosieren von Desinfektionsmitteln und die damit einhergehenden Beprobungen vereinfachen. Das verwendete Wasser ist Leitungswasser aus dem

Trinkwasserinstallationssystem des Instituts für Hygiene und Öffentliche Gesundheit Bonn. 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 Tabelle 12 und 13 entnommen werden. Die Trinkwasseruntersuchungen wurden von den Laboren des Wahnachtalsperrenverbands und der chemischen Abteilungen der Wasserhygiene am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit durchgeführt [SWB 2011].

Mit Beginn der Anzucht einer neuen Charge Biofilms werden neue und sterile Silikonschläuche verwendet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden nur Biofilme verwendet, die ein Mindestalter von 12 Monaten besaßen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass im Biofilm die Anzahl von $\geq 5,0 \times 10^6$ koloniebildende Einheiten (KBE) pro cm^2 und eine Gesamtzellzahl von $\geq 2,0 \times 10^7$ Zellen pro cm^2 Biofilm vorlag. Da es sich um einen farblosen und durchsichtigen Schlauch handelt, kann die Entstehung des Biofilms makroskopisch gut verfolgt werden. Die Gesamte Anlage muss dabei im Dunkeln betrieben werden, um möglichen Algenbewuchs zu verhindern. Der Trinkwasserzulauf erfolgt über Glasadapter mit vier Zuläufen für die angeschlossenen Silikonschläuche und einem Probehahn für Kontrollproben. Die Kontrollproben werden genommen bevor das Trinkwasser die Schläuche durchfließt (siehe Abb. 15).

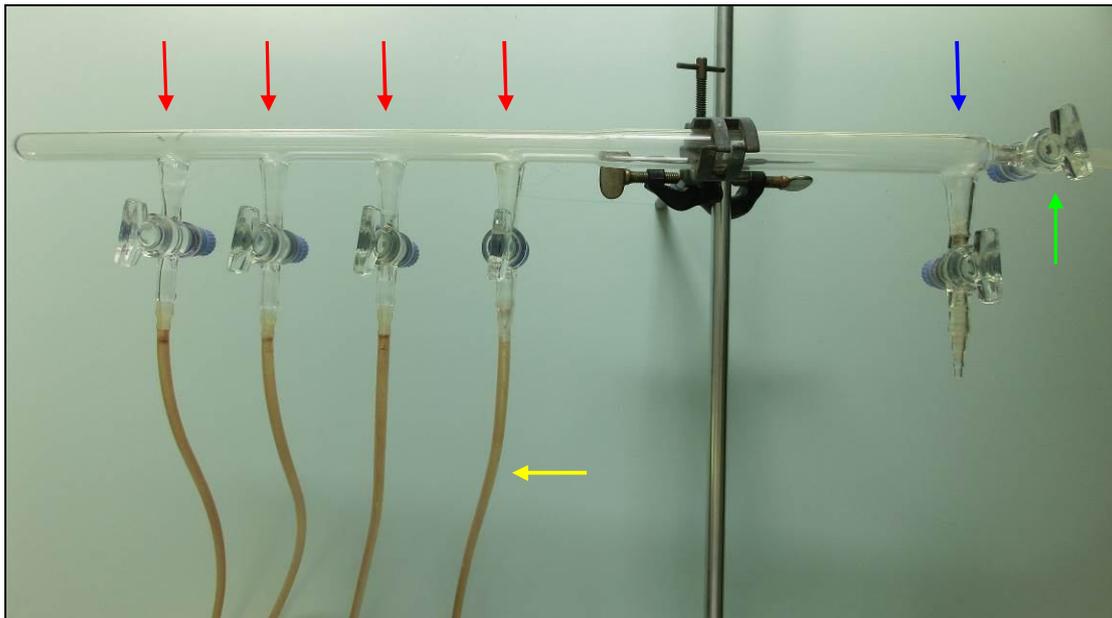


Abbildung 15: Glasadapter des Silikonschlauchmodells

Mit 4 Zuläufen für die Silikonschläuche (rote Pfeile), einem Probehahn (blauer Pfeil), dem Wasserzulauf (grüner Pfeil) und Silikonschläuchen mit Biofilm (gelber Pfeil).

Tabelle 12: Physikalische Kenngrößen des Wassers (Auszug aus der Trinkwasseranalyse der SWB 2011)

Parameter	Wert
Temperatur	11 ± 1,8 °C
elektrische Leitfähigkeit (bei 25 °C)	33 ± 4,0 mS/m
pH-Wert (bei 10 °C)	8,2 ± 0,2
Calcitlösekapazität bei 10 °C (berechnet)	0,6 ± 0,4
Sauerstoffsättigung	>95 %

Tabelle 13: Chemische Kenngrößen des Wassers (Auszug aus der Trinkwasseranalyse der SWB 2011)

Parameter	Kenngröße	Wert
Anionen	Borat (als Bor)	0,04 ± 0,01 mg/l
	Bromat	< 0,0005 mg/l
	Bromid	< 0,3 mg/l
	Chlorid	30 ± 1 mg/l
	Fluorid	< 0,1 mg/l
	Nitrat	18 ± 3 mg/l
	Nitrit	< 0,01 mg/l
	Phosphat	< 0,01 mg/l
	Sulfat	30 ± 4 mg/l
	Silikat (als Si)	3,4 ± 1,0 mg/l
	Säurekapazität bis pH 4,3	1,4 ± 0,3 mg/l
Kationen	Ammonium	< 0,02 mg/l
	Natrium	15,8 ± 2,2 mg/l
	Kalium	3,1 ± 0,5 mg/l
	Calcium	35,7 ± 5,1 mg/l
	Magnesium	7,2 ± 1,1 mg/l

2.1.13 Varianten des Silikonschlauchmodells zur Simulation von Praxisfällen

a) Das Kreislaufsystem

Für die Anzucht von Monokulturbiofilmen oder das Beimpfen von Biofilmen mit Zielorganismen, wird ein System auf Basis einer Peristaltikpumpe eingesetzt (Abb. 16a und b). Dabei wird die Flüssigkeit in dem eigens dafür modifizierten Erlenmeyerkolben über ein Schlauchsystem mittels der Peristaltikpumpe, bei einer konstanten Geschwindigkeit von 3l/h umgewälzt. Die Belüftung erfolgt über die mit Filteraufsätzen versehenen Auslässe an der Oberseite. Zu- und Ablauf der Testsuspension

erfolgt an den beiden Auslässen an der Unterseite des Erlenmeyerkolbens. Am Ablauf befestigt ist der Silikonschlauch (Abb. 16d), der anschließend das Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen darstellt. Am Zulauf befestigt, ist der TYGON®-Schlauch, der in das Pumpwerk integriert wird und durch seine Beschaffenheit der stetigen Belastung durch das Pumpwerk standhält. Je nach Zielorganismus kann die Inkubationstemperatur über ein Wasserbad reguliert werden (Abb. 16e). Die Suspension besteht je nach Untersuchung aus 400 ml Trinkwasser oder TSB-Medium und einer Bakteriensuspension mit einer Menge von etwa 10^7 Bakterien/ml. (siehe Abb. 16c)



Abbildung 16: Generierung und Animpfen von Biofilmen im geschlossenen Kreislauf

Abgebildet ist ein Beispiel für den Aufbau eines geschlossenen Kreislaufs: a) Peristaltikpumpe, b) Schlauchführungssystem (Medium Cassette) und Tygon-Schlauch, c) Erlenmeyerkolben mit 400 ml Bakteriensuspension, Zu- und Ablauf (unten) und Be- und Entlüftung (oben), d) Silikonschlauch für Probenahme, e) Wasserbad

b) Dosieranlage zur Simulation einer kontinuierlichen Behandlung

Über ein eigens für das Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit Bonn angefertigtes Dosiersystem der Fa. Prominent, bestehend aus einer ProMinent® Magnetdosierpumpe Typ gamma/L; einer Magnetkreiselpumpe Baugruppe 1, 230 V/50 Hz/45 W; einem Chlorregler DULCOMETER D1C und einer Chlormesszelle Typ 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 verwendeten Desinfektionsmittelkonzentration versetzt wird (Abbildung 17). Die Einstellung der Konzentration erfolgt über eine mengenproportionale Zudosierung mit einer Dosierpumpe aus einem vorgelagerten Behälter, in dem sich das jeweilige

Desinfektionsmittel befindet. Zudem wird die Konzentration im Vorratsbehälter mittels einer vorgeschalteten und ständig durchströmten Messzelle exakt eingestellt.

Aus dem Vorratsbehälter wird das mit Wasser hergestellte Desinfektionsmittelgemisch über Glasverteiler (Abb. 15) mit konstanter Fließgeschwindigkeit (30 l/h) durch Silikonschläuche geleitet. Hierbei werden hauptsächlich zwei Varianten unterschieden. Entweder sind die angeschlossenen Silikonschläuche mit bereits mit Biofilm bewachsen, um den Effekt des Desinfektionsmittels auf den Biofilm zu untersuchen, oder es handelt sich um sterile Silikonschläuche, um zu untersuchen, ob eine Biofilmbildung durch das eingesetzte Desinfektionsmittel unterdrückt werden kann.

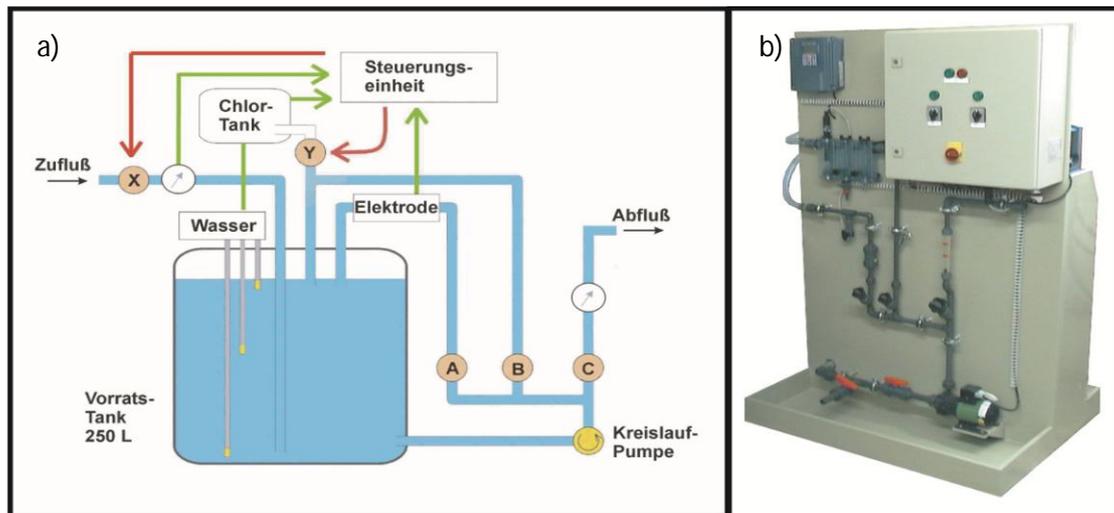


Abbildung 17: a) Skizze des Zudosierungssystems zur praxisnahen Simulation einer kontinuierlichen Behandlung mit Desinfektionsmitteln b) Aufsicht auf die Zudosierungsanlage

c) Kreislaufsystem als Simulation einer Stoßbehandlung

In einem Kreislaufsystem, bestehend aus einem Vorlagebehälter, einer Tauchpumpe (Fa. Aquarium Systems NEWA) 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. 18). 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. 18: Kreislaufsystem zur Simulation von Stoßbehandlungen zur Anlagendesinfektion mit a) Vorlagebehälter b) Pumpe (zur Veranschaulichung außerhalb des Vorlagebehälters) c) mit Biofilm kontaminierter Silikonschlauch.

2.1.14 Angewandte Desinfektionsverfahren

In Tabelle 14 sind die untersuchten Desinfektionsverfahren aufgelistet. Die final eingesetzten Konzentrationen wurden jeweils aus den Stammlösungen mit a.dest angesetzt.

Tabelle 14: Auflistung der getesteten Desinfektionsverfahren

Prüfprodukt	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	200 mg/l (pH 7)	Herstellung aus Wasser und Salzlösung (vor Ort) im Blue Safety™ Dental Manuell (Fa. Blue Safety GmbH)
3	Natriumhypochlorit	14%ige Stammlösung	Gebrauchsfertig (aus Vorlage Fa. VWR International)

2.1.15 Formeln zur Berechnung

2.1.15.1 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)/cm²

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

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

c = gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

\sum_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

Oberfläche Silikonschlauch: (Länge = 5 cm; Innendurchmesser = 0,4 cm) = 6,283 cm²

2.1.15.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ)/cm²

GZZ/cm² (bei 1000facher Vergrößerung) = Größe Gesichtsfeld x Fläche Filter x Anzahl gezählte Zellen pro Gesichtsfeld⁻¹ x Verdünnungsfaktor x Fläche Schlauchoberfläche⁻¹

$$\text{Größe Gesichtsfeld} = 0,02268 \text{ mm}^2$$

$$\text{Fläche Filter} = 1734,1 \text{ mm}^2$$

Oberfläche Silikonschlauch (Länge = 5 cm; Innendurchmesser 0,4 cm) = 6,28 cm²

2.1.15.3 Bestimmung des Reduktionsfaktors (RF)

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

2.1.16 Mikroskopie

2.1.16.1 Lupe

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

2.1.16.2 Fluoreszenzmikroskopie

Verwendet wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Typ „Axioplan“). Die Aufnahmen erfolgten bei bis zu 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 Bildverarbeitungssoftware „AxioVision v. 4.8.2“ dokumentiert.

Gramfärbungen wurden bei Hellfeld-Einstellung betrachtet. Kontrastärmere Präparate, wie z.B. Lebendpräparate wurden unter Phasenkontrasteinstellung mikroskopiert. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten für DAPI bei Wellenlängen von 365 nm. Die Anregungs-/Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe für PNA-FISH liegen bei 490-505 nm und 560-580 nm. Die Anregungs-/Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe für Life/Dead liegen bei 480/500 nm für den Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 und 490/635 nm für Propidium Iodid.

Für die Gramfärbung (Hellfeldmikroskopie) verwendete Farbstoffe und Chemikalien:

- 96 %iges Ethanol
- Fuchsinlösung
- Kristallviolettlösung
- Lugol'sche Lösung

Für die LIVE/DEAD-Färbung (Fluoreszenzmikroskopie) verwendete Farbstoffe:

- Propidiumiodid
- SYTO9

2.1.16.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Aufnahmen erfolgten an einem Rasterelektronenmikroskop der Firma Jeol (Typ „JSM 6510LV“) bei 20 bis 100.000facher Vergrößerung und wurden mit der Bildbearbeitungs-Software „SEM Control User Interface v. 3.09“ dokumentiert.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit einem Sputter-Coater der Firma Bal-Tec Typ „SCD 005“ mit Gold beschichtet und zuvor mit einem Critical Point Dryer (Fa. Bal-Tec) getrocknet. Die Detailaufnahmen dienten der Dokumentation von Oberflächenbesiedelung durch Mikroorganismen und der Ausbildung bzw. dem Abbau von Biofilmen.

Für die Rasterelektronenmikroskopie verwendete Chemikalien:

- 0,2 %ige Osmiumtetroxid-Lösung
- 25 %iges Glutardialdehyd
- Ethanolreihe (10-96 %)
- Natriumcacodylat-Puffer

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Stammhaltung von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 939)

Für die Stammhaltung wurden die gefriergetrockneten *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien wie folgt behandelt. Das Lyophilisat wurde in 0,5 ml Tryptic Soy Broth für 5 min gelöst und anschließend in 5 ml TSB für 30 min vorsichtig homogenisiert. Etwa 15 min vor Inokulation des Tryptic Soy Agars, wurden die Nährböden auf 37°C erwärmt. Je 1 ml des gelösten Lyophilisats wurde auf je eine Agarplatte gegeben. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37 °C für 24 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden die Nährböden mit 2 ml Tryptic Soy Broth + Glycin abgeschwemmt und in 100 ml TSB (mit 10 % Glycerin) überführt. Zur Lagerung wurde die gesamte Suspension in Mengen zu je 1 ml auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -79 °C eingefroren.

2.2.2 Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte immer aus der Stammhaltung. Dazu wurden Tryptic Soy Broth Agarplatten im Brutschrank für 15 min auf 37 °C vorgewärmt. Die Kultivierung wurde wie folgt durchgeführt. Auf jeden Nährboden wurden 250 µl der Stammlösung pipettiert und verteilt. Die Inkubation erfolgte aerob für 24 Stunden bei 37°C.

2.2.3 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten bei *Pseudomonas aeruginosa*

Zur Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten wurde zunächst eine Bakteriensuspension mit definierter optischer Dichte hergestellt. Ausgehend von der Bakteriensuspension wurden Verdünnungsreihen angelegt bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} Zellen. Von den Verdünnungen wurden jeweils 100 µl in einer Doppelbestimmung auf vorgewärmte Tryptic Soy Agarplatten ausplattiert und inkubiert (siehe 2.2.2). Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Ausgehend von der Annahme, dass jedes lebensfähige Bakterium eine Kolonie bildet, konnte so die Menge an koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml bestimmt werden und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt werden.

2.2.4 Mikrobiologische Untersuchung auf *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilmen

Für den Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilmen wurde die Oberfläche des Silikonschlauchs, wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, abgeschabt und verarbeitet. Für quantitative Nachweise wurden je Verdünnung 100 µl der Biofilmsuspension in Doppelbestimmung auf Cetrimid-Agar ausplattiert und für 44-48 h bei 37 °C inkubiert. Für qualitative Nachweise wurde die Biofilmsuspension für 24 h in Tryptic Soy Broth bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden 100 µl in Doppelbestimmung auf Cetrimid-Agar ausplattiert und für 24 - 48 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 Probenahme am Silikonschlauchmodell

Die im Silikonschlauchmodell generierten Biofilme dienten als Ausgangsmaterial für molekular- und mikrobiologische Nachweise. Für die durchgeführten Nachweise wurden jeweils 5 cm Silikonschlauch 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.

2.2.6 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten in Biofilmen

Für die Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten im Biofilm wurde der gesamte Biofilm eines 5 cm langen Stücks Silikonschlauch verwendet. Das 5 cm lange Stück Probenmaterial wird mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten. Der Biofilm wird dann mit einem eigens hergestellten passgenauem Schaber aus dem Silikonschlauch herausgeschabt und in 9 ml Trypton-NaCl-Lösung

(0,9 %ig) mittels eines Homogenisators suspendiert und homogenisiert. 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 Anzahl der koloniebildenden Einheiten im Biofilm bestimmt.

2.2.7 Anzucht von Reinkulturen aus Biofilmmaterial

Zur Vereinzelung von Kolonien und zur Anzucht von Reinkulturen aus Biofilmmaterial, wurden einzelne Kolonien der wie in Abschnitt 2.2.6 erstellten KBE mit einer Impföse gepickt und auf R2A – Agar für die Dauer von 7 Tagen bei 20°C inkubiert. Der Vorgang wurde mindestens ein Mal wiederholt.

2.2.8 Biofilmgenerierung im geschlossenen Kreislaufsystem

Das Kreislaufsystem diente dem gezielten Anzüchten von Monokulturbiofilmen im Trinkwasser unter definierten Bedingungen und anschließenden Untersuchung zur Ermittlung von Wiederauffindungsraten in bestehenden Biofilmen nach gezielter Animpfung der Biofilme mit einem Zielorganismus. Durch Probenahmen zu festgelegten Zeiten, konnte die Bildung der Biofilm-Monokulturen durch mikroskopische Untersuchungen sowie die Wiederfindungsrate aus Biofilmen durch molekularbiologische Methoden dokumentiert werden. Dazu wurden verschiedene Kreisläufe, in Reproduktion, über einen längeren Zeitraum wöchentlich beprobt. Dabei sollten die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

- 1) Wiederfindungsrate von *Pseudomonas aeruginosa* aus bestehenden Biofilmen: Hierzu wurden Kreisläufe mit Biofilmen unterschiedlichen Alters im Kreislauf mit einer *P. aeruginosa* Bakterienkultur von 10^6 Zellen/ml beimpft. Sie sollten Aufschluss über die Wiederfindungsraten des Testorganismus aus bestehenden Biofilmen geben.
- 2) Veränderung der Biofilmpopulation nach der Behandlung mit Desinfektionsmitteln und dem erneuten Aufkeimen der Biofilmflora im Hinblick auf das Verhältnis von autochtoner Trinkwasserflora und *Pseudomonas aeruginosa*.

Für jeden Kreislauf wurden jeweils 200 ml Trinkwasser mit 200 ml Tryptic Soy Broth und ca. 10^6 Bakterienzellen *Pseudomonas aeruginosa* kontaminiert. Die durchgeführten Untersuchungen waren: Kultureller Nachweis der Trinkwasserbakterien auf R2A-Agar, kultureller Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* auf Cetrimid-Agar, molekularbiologischer Nachweis aller vorhandenen DNA, so wie der molekularbiologische Nachweis von *P. aeruginosa* DNA mittels quantitativer real-time PCR und der molekularbiologischer Nachweis von Proteinbiosynthese mittels PNA-FISH bei ausbleibendem kulturellem Nachweis zur Darstellung verbleibender Zellaktivität.

2.2.9 Aufkonzentrierung von Zellen und DNA

2.2.9.1 Vakuumfiltration

a) Vakuumfiltration von *Pseudomonas aeruginosa*

Für den Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* aus der Wasserphase wurden Wasserproben durch Vakuum über Cellulose-Nitrat-Filter (Fa. Schleicher & Schuell) mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Dabei wurden Lösungen mit definierten Mengen von *P. aeruginosa* verwendet.

b) Aufkonzentrierung von *Pseudomonas aeruginosa* aus geringen Volumina

Für den Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* aus geringen Volumina (<500 µl), wie es bei die den Versuchen mittels Micro-Plate-Reader der Fall ist (<330 µl), wurden die Proben mittels Millipore Ultrafree – MC Centrifugal Filter Units (0,22 µm) aufkonzentriert.

c) Vakuumfiltration zur Bestimmung der Gesamtzellzahl im Biofilm

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Biofilmmatrix in 9 ml Trypton – NaCl - Lösung (0,9 %ig) homogenisiert und nach der DAPI – Färbung (siehe Abschnitt 2.3.3) 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“).

2.2.9.2 Rückgewinnung der Mikroorganismen durch Aufreinigung von DNA aus Filterproben

Zur Rückgewinnung der DNA aus Filterproben wurde das FastDNA SPIN Kit (Fa. MP Biomedicals) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in einer Gesamtmenge 100 µl a. dest. aufgenommen. Vor der Verwendung in einem molekularbiologischen Nachweis, wurde die DNA zusätzlich mittels Microcon YM-100 Zentrifugenfilter (Fa. Millipore) aufkonzentriert (siehe Abschnitt 2.4.2).

2.2.10 Bestimmung geeigneter Neutralisationsmittel zum Abstoppen der Desinfektionswirkung

Um die Wirksamkeit eines Desinfektionsverfahrens nach einer definierten Kontaktzeit zu ermitteln muss der Wirkstoff des Prüfprodukts neutralisiert und die Reaktion damit abgestoppt werden. Vor den ersten Untersuchungen wird ein quantitativer Suspensionsversuch (siehe Abschnitt 2.2.11) 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. 15)

Tabelle 15: Übersicht der ausgewählten Neutralisationsmittel für die getesteten Wirkstoffe.

Wirkstoff	Neutralisationsmittel
Freies Chlor	Natriumthiosulfat
Chlordioxid	

2.2.11 Quantitativer Suspensionsversuch

Die eingesetzten Produktprüflösungen wurden durch Verdünnungsreihen aus einer Stammlösung des Desinfektionsmittels hergestellt (siehe Tab.14). Die Bakteriensuspensionen bzw. Prüfsuspensionen wurden in 4,5 ml einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung (NaCl) aufgenommen. Die Proben wurden in einem Homogenisator Typ „Potter S“ (Fa. B. Braun Biotech Melsungen) für 10 min mit einem PTFE-Pistill homogenisiert.

Der quantitative Suspensionsversuch wurde in Anlehnung an die europäischen Richtlinien [CEN, 2005] durchgeführt. Zur Herstellung des Prüfgemisches wurden je 9 ml der Produktprüflösungen mit definierten Wirkstoffkonzentrationen in je 1 ml Prüfsuspension eingebracht und gemischt. Nach dem Ablauf der zu testenden Einwirkzeit wurde die Reaktion des Desinfektionsmittels mit der Bakteriensuspension durch Überführung von 0,5 ml des Prüfgemisches in ein geeignetes Prüfneutralisationsgemisch abgestoppt.

Im Anschluss an die Neutralisation wurden Verdünnungen bis 10^{-4} hergestellt. Parallel zum Suspensionsversuch wurde ein Kontrollversuch (KO1) mit WSH anstelle 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. Diese Kontrolle stellt sicher, dass das Abstoppen der Reaktion für jede der eingesetzten Desinfektionsmittelkonzentrationen gewährleistet ist. Die bei der anschließenden Auswertung errechnete Anzahl KBE, sollte der der WSH-Kontrolle entsprechen. Die KO3 Kontrolle wurde analog zur KO2 Kontrolle durchgeführt, enthielt jedoch anstelle der Produktprüflösung 1 ml WSH. Mittels dieser Kontrolle kann ausgeschlossen werden, dass das eingesetzte Prüfneutralisationsgemisch selbst eine bakterieninaktivierende Wirkung besitzt.

2.2.12 Methode zur Testung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln angelehnt an den Quantitativen Suspensionsversuch mittels Micro-Plate-Reader

Der Versuchsablauf ist angelehnt an den quantitativen Suspensionsversuch nach CEN 2005 bzw. in Anlehnung an die Richtlinien der DGHM zur Durchführung von quantitativen Suspensionsversuchen bei der Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln. Der Versuchsablauf wurde hier auf 96-well Platten übertragen. Die anschließende Auswertung erfolgt dann in einem Micro-Plate-Reader Typ „SynergyHT“ (Fa. BioTek) mittels Extinktionsmessung. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt hier in Tryptic Soy Broth anstatt auf Tryptic Soy Agar. Während Einwirkzeiten und Konzentrationen gleich

bleiben erfolgt die Wirksamkeitskontrolle in einem kleineren Volumen. Eine quantitative Auswertung kann über den zeitlichen Verlauf der Trübungsmessung anhand einer zuvor erstellten Wachstumskinetik definierter Bakterien suspensionen in dekadischen Verdünnungen errechnet werden. Durch die Verwendung des flüssigen Nährmediums kann das Prüfgemisch auch nach Abschluss des Suspensionsversuchs für Folgeuntersuchungen herangezogen werden. Auf diese Weise kann, bei Behandlung mit subletalen Dosen eines Desinfektionsmittels ein möglicher Übergang der Bakterien in einen nicht kultivierbaren Zustand bei verbleibender Stoffwechselaktivität dargestellt werden (siehe Abschnitt 2.3.5). In diesem Fall können bei ausbleibendem Wachstum bereits geringe Volumina mittels PNA-FISH auf verbleibende Zellaktivität in Form von Proteinbiosynthese überprüft werden. Dies wäre ein Hinweis auf mögliche vbnc-Zustände bei Bakterien nach subletal Dosierung von Desinfektionsmitteln (siehe Abb. 19).



Abbildung 19: Schematische Darstellung des Untersuchungsprinzips auf verbleibende Zellaktivität nach der Behandlung mit Desinfektionsmitteln

2.3 Mikroskopische Methoden

2.3.1 Nativ-Präparate

Lebendpräparate dienen einer ersten morphologischen Überprüfung, ob verwendete Reinkulturen beispielsweise Verunreinigungen aufweisen und geben Aufschluss über die Motilität und damit auch über die Viabilität des Mikroorganismus.

Die Betrachtung des Präparates erfolgte bei Phasenkontrast und 1.000facher Vergrößerung.

2.3.2 Gramfärbungen

Die Färbung basiert auf dem unterschiedlichen Aufbau von Bakterienzellwänden. Dabei wurden auf einem Objektträger hitzefixierte Bakterien mehreren Färbe- und Entfärbeschritten unterzogen. Die Bakterien weisen in Abhängigkeit vom Zellwandaufbau ein unterschiedliches Gramverhalten auf und ermöglichen eine erste Differenzierung. Die erste Anfärbung erfolgt mit dem Farbstoff Kristallviolett, der sich an die negativ geladenen Zellbestandteile der Zelle anlagert. Durch anschließende Beizung mit Lugol'scher Lösung entsteht ein wasserunlöslicher Komplex, der durch Ethanol gelöst werden kann. Bei grampositiven Bakterien wird der Farbstoff jedoch durch das vielschichtige Mureinnetz zurückgehalten, während sich gramnegative Bakterien entfärben lassen.

Durch erneutes Anfärben mit dem Farbstoff Karbol-Fuchsin lassen sich die gramnegativen Bakterien erneut anfärben. Unter dem Mikroskop erscheinen grampositive Bakterien im Hellfeld bei 1.000facher Vergrößerung blau-violett und gramnegative Bakterien erscheinen rot.

Die Differenzierung von gramnegativen und grampositiven Bakterien vereinfacht zudem häufig die Aussage über mögliche Verunreinigungen mit morphologisch ähnlichen Bakterien. Außerdem ist die Kenntnis des Zellwandaufbaus wichtig für später folgende DNA-Isolierungen, bei denen sich die Versuchsdurchführung nach dem Zellwandaufbau richtet.

2.3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels DAPI – Färbung

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) erfolgte mittels DAPI - Färbung [Bredholt et al., 1999]. Von einem mit Biofilm besiedelten Silikonschlauch wurde 5 cm langes Stück mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten, mit einem speziell angefertigtem Metallschaber ausgeschabt und in 9 ml Trypton - NaCl - Lösung (0,9 %ig) homogenisiert. Zur homogenisierten Biofilmsuspension wurde dann DAPI - Lösung (10 µg/ml) hinzugegeben, das Gemisch wurde dann für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und über einen schwarzen Polycarbonatfilter (0,2 µm) filtriert. Mit einem spezifischen Filterset wurden bei einer Wellenlänge von 365 nm am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan, AxioCam MRc digital camera system) 20 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgezählt.

2.3.4 Life/Dead-Färbung

Mit dem Life/Dead *BacLight* Viability and Counting Kit (Fa. Invitrogen) lassen sich fluoreszenzmikroskopisch Zellen differenzieren und quantifizieren. Die Differenzierung erfolgt anhand der des Zustands der Zellwandintegrität der Zellen. Die Färbung basiert auf zwei unterschiedlich fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoffen.

Der Farbstoff SYTO9 dringt in alle Zellen gleichermaßen ein und lässt die Zellen grün fluoreszieren. Der Farbstoff Propidiumiodid dringt nur in Zellen mit defekter Zellmembran ein und fluoresziert orange-rot.

Zum Herstellen eines geeigneten Pellets wurde eine frische Bakteriensuspension von einer Agarplatte verwendet. 1 ml der Suspension mit ca. 10^6 bis 10^8 Zellen wurde für 2 min bei 12.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml WSH resuspendiert. Die Suspension wurde nach Hinzugabe von jeweils 1,5 ml der Farbstoffe für 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgten drei Waschschrte mit WSH bei 12.000 upm, um mögliche Hintergrundfluoreszenz zu beseitigen. Vor dem Mikroskopieren wurde der Suspension *BacLight* Mounting Oil hinzugefügt. Das Öl fixiert noch lebende Zellen, ohne sie zu beeinträchtigen, wodurch die Quantifizierung vereinfacht und die Auswertung nicht verfälscht wird.

Die angefärbten Zellen wurden dann bei 1.000facher Vergrößerung und bei einer Wellenlänge von 450 bis 480 nm mikroskopiert.

2.3.5 PNA-FISH

2.3.5.1 PNA – FISH Prinzip

Mit dieser Methode lassen sich über Fluoreszenzmarker Nukleinsäuren im Allgemeinen und ribosomale RNA im speziellen nachweisen. Die Sonde bindet an die komplementäre Struktur in der Bakterienzelle und ermöglicht somit den Nachweis von Stoffwechselaktivität bzw. Proteinbiosynthese. Durch die kurze Halbwertszeit von ribosomaler RNA in inaktiven Zellen, ist es auf diesem Wege möglich den Beweis für aktive Zellen zu erbringen, auch wenn kein kultureller Nachweis möglich ist. Bei dieser Variante der Fluoreszenz In-situ Hybridisierung werden künstlich synthetisierte „Peptic nucleic acids“ (PNA) Sonden verwendet.

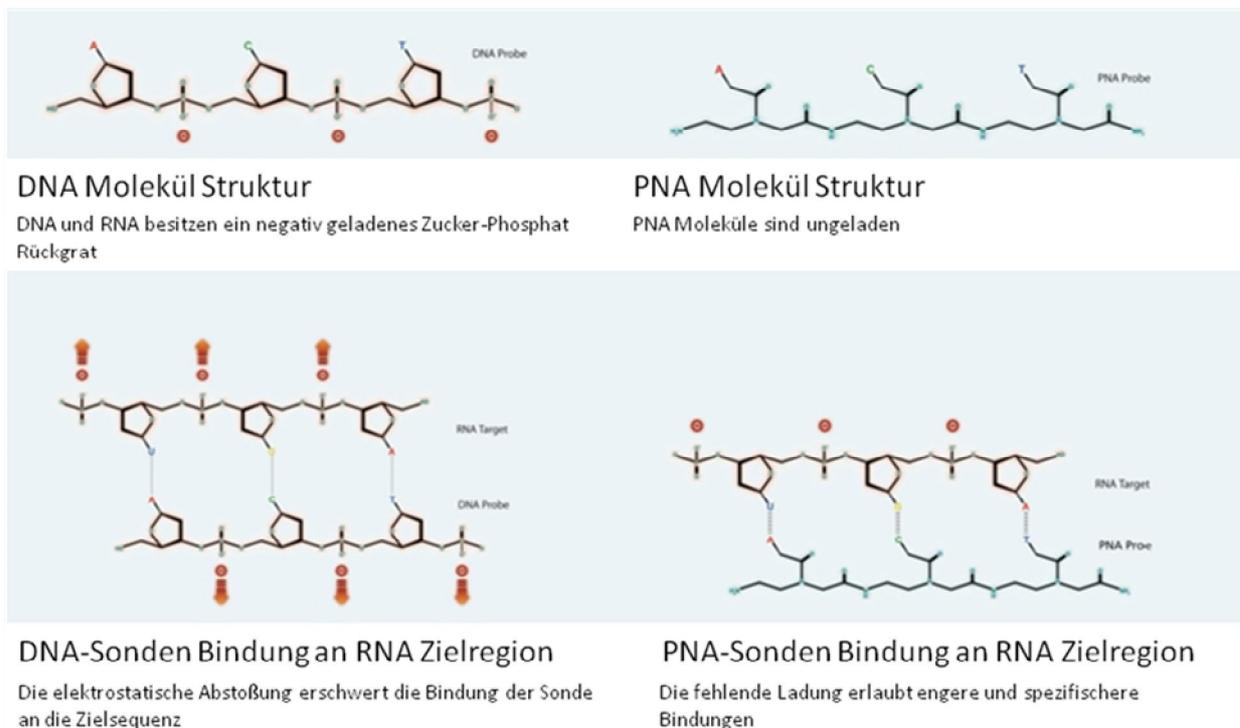


Abbildung 20: Darstellung der ladungsungebundenen Bindung von PNA-FISH Sonden an die Zielsequenz. © AdvanDX (modifiziert)

Aufgrund ihrer Eigenschaften eignen sie sich besser für FISH, als andere Oligomere. Sie binden ladungsungebunden, werden aufgrund ihrer künstlichen Form weniger von Enzymen erkannt und abgebaut und bilden stärkere Bindungen aus, was es erlaubt kleinere Oligomere herzustellen, deren Größe allein durch die Spezifität begrenzt wird (siehe Abb.20).

2.3.5.2 PNA – FISH Prozedur

Zur Herstellung von PNA-FISH markierten Proben erfolgte nach dem Protokoll der Fa. AdvanDx. Dazu wurden zunächst 10 µl der zu untersuchenden Bakterienkultur auf einem Objektträgerglas plaziert und

mit einem Tropfen der Fixationslösung vermischt und anschließend bei 55°C für 20 min in der Trockenkammer fixiert. Die fixierten Proben wurden anschließend durch Zugabe der PNA-Lösung zur Hybridisierung der Sonde mit einem Deckglas erneut für 30 min bei 55°C in der Trockenkammer inkubiert. Um überflüssige Sonde zu entfernen werden die Deckgläschen in einem ersten Schritt in a. dest. von den Objektträger gelöst, die anschließend für 30 min bei 55°C in einer stringenten Waschlösung inkubiert werden. Anschließend wurden die Proben luftgetrocknet. Abschließend können die Proben nach Zugabe von „Mounting Oil“ am Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert werden.

2.3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Silikonschlauchproben mit Biofilm für die Rasterelektronenmikroskopie wurden wie folgt behandelt. Ein 1 cm langes Schlauchstück wurde vorsichtig längsseitig geviertelt, ohne den Biofilm dabei zu zerstören. Das Schlauchstück wurde jeweils für zwei Stunden in einer 25 %igen Glutardialdehydlösung fixiert. Anschließend wurde das Schlauchstück für mindestens vier Stunden oder über Nacht in 0,2 %iger Osmiumtetroxidlösung fixiert. Danach wurde das Material für 30 min in Natriumcacodylat-Puffer einlegt. Als Zwischenschritt erfolgte zwei Waschschriffe in partikelfreiem Wasser für 2x5 min. Abschließend wurde die Probe in einer dekadisch aufsteigenden Ethanolreihe (10 bis 96 Prozent) für jeweils 5 min dehydriert und für 24 Stunden luftgetrocknet. Nach der Trocknung der Proben wurden die Schlauchstücke mit Gold besputtert, ggf. vorher in einem Critical Point Dryer getrocknet und anschließend mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 DNA-Isolierung

Für die Isolierung von DNA wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Für die Isolierung von gramnegativen Bakterien wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll verfahren. Die Isolierung der DNA wurde sowohl für Proben von *Pseudomonas aeruginosa*, als auch für Biofilme durchgeführt. Auf diese Weise isolierte DNA diente anschließend als Vorlage für PCR und quantitative real-time PCR.

2.4.2 Aufkonzentrierung von DNA

Für die Aufkonzentrierung von DNA wurden Microcon YM-100 Zentrifugenfilter (Fa. Millipore) verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass der Filter die DNA bei einem ersten Zentrifugation zurückhält. Beim zweiten Zentrifugationsschritt wird der Filter in umgekehrter Richtung in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA in einem geringeren Restvolumen eluiert. Der Reaktionsverlauf ist wie folgt. Die Proben wurden für 12 min bei 12.500 upm zentrifugiert. Der Überstand im Reaktionsgefäß wurde verworfen und durch ein neues Reaktionsgefäß ersetzt. Anschließend wurde der Filter um 180 Grad gedreht in das Reaktionsgefäß gesetzt und erneut für 3 min bei 3.500 upm zentrifugiert, um ein geringes Volumen aufkonzentrierter DNA zu erhalten.

2.4.3 DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA erfolgte an einem Spektralphotometer ND-1000 (Fa. NanoDrop) bei 260 bis 280 nm. Die DNA-Konzentration wurde über die Software (NanoDrop ND-1000 v. 3.5.2) 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 etwa 1.8 und 2.2. Niedrigere Werte geben Hinweis auf störende Verunreinigungen wie Proteine. Für die Messung wurde jeweils ein Volumen 2 µl eingesetzt.

2.4.4 Berechnung der Genomäquivalente

Anhand der zuvor bestimmten DNA-Konzentration (Abschnitt 2.4.3), konnte die enthaltene Menge Genomäquivalente berechnet werden. Dazu wurde mittels dem durchschnittlichen Gewicht eines Basenpaars (1.096×10^{-21} g/bp), das Gewicht des Genoms von *Pseudomonas aeruginosa* (6.264.404 bp) errechnet und auf die gemessene DNA-Konzentration umgerechnet.

2.4.5 Primer- und Sondendesign

Die verwendeten Primer und Sonden für den Nachweis von *P. aeruginosa* und zur Darstellung der Gesamtzellzahl mittels real-time PCR entstammen aktuellen Forschungsberichten [Shannon et al. 2007], [Yu et al. 2005] (siehe Tab. 8). Die Zielsequenz liegt auf dem *regA* Gen, welches die Synthese des Toxin A bei *P. aeruginosa* reguliert.

Die Zielsequenz für die Gesamtzellzahlbestimmung mittels real-time PCR liegt auf dem 16SrDNA Abschnitt von Bakterien. Primer und Sonden wurden speziell angefertigt (Fa. TIB MolBiol). Mittels sequenzvergleichender Analyse durch das Programm BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) wurde die Spezifität der Primer und Sonden überprüft.

Die Primer zur Amplifikation des für 16S rRNA codierende Gen mittels PCR [Weisburg et al. 1991] wurden so gewählt, dass sie an die im Bereich der Bakterien hochkonservierten 5´ - bzw. 3´- Enden der 16S rDNA komplementär binden und so eine Amplifikation des gesamten 16S rRNA - Gens der Bakterien mit den konservierten und variablen Bereichen ermöglichten (siehe Tabelle 8).

Die verwendeten Primer wurden von der Fa. TIB Molbiol, Berlin bezogen. Mittels sequenzvergleichender Analyse durch das Programm BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) wurde die Spezifität der Primer überprüft.

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von K.B. Mullis 1983 entwickelte und von 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 Codierung 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. Eine thermostabile *Taq*-Polymerase synthetisiert aus Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) dann die gewünschte Zielregion neu.

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 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 im Idealfall 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 Tabellen 16 und 17 entnommen werden.

Tabelle 16: Standardprotokoll für den PCR-Ansatz

Komponente	Verwendete Konzentration	Verwendete Menge (pro Ansatz á 50µl)
Primer (forward)	50 pmol	0,5 µl
Primer (reverse)	50 pmol	0,5 µl
<u>Eppendorf MasterMix:</u> <i>Taq</i> -Polymerase dNTPs KCL Mg ⁺ Tris-HCl	1,25 U 200 µM 50 mM 1,5 mM 30 mM	20 µl
Template-DNA	variabel	0,5 µl
Ad H ₂ O (nukleasefrei)	-	28,5 µl

Tabelle 17: 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	∞	-

2.4.7 Agarosegelelektrophorese

Die Detektion und Identifizierung des PCR-Produktes erfolgt 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.

2.4.8 Aufreinigung amplifizierter DNA aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen

Um das Amplifikat einer PCR z.B. für eine Sequenzierung verwenden zu können, muss der PCR-Ansatz zunächst aufgereinigt werden.

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.

2.4.9 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Basierend auf dem Prinzip der konventionelle PCR erhält man durch die quantitative real-time PCR die Möglichkeit einer schnelleren Vervielfältigung von Nukleinsäuren bei einer gleichzeitigen Quantifizierung. Die quantitative real-time PCR ist schneller als die konventionelle PCR, da die verwendete Polymerase bereits bei niedrigeren Temperaturen arbeitet und Annealing und Elongation in einem Schritt ablaufen können. Die Quantifizierung erfolgt durch eine Fluoreszenzmessung während der real-time PCR, am Ende eines jeden PCR-Zyklus (daher der Begriff „real-time“). Die gemessene Menge an Fluoreszenz steigt proportional zur Menge des generierten Amplifikates. Somit fällt die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente weg und man erhält sofort ein Ergebnis.

In dieser Arbeit wurde die real-time PCR mit Fluoreszenz-Sonden durchgeführt, die aus einem Fluorophor (FAM) und einem Quencher (BBQ) bestehen. Das Prinzip der Sonde ist wie folgt. Die Sonden lagern sich an das zu vervielfältigende Stück DNA an und werden erst bei der Hybridisierung des Komplementärstranges durch die *Taq*-Polymerase abgebaut und entfernt. Dabei werden auch Fluorophor und Quencher voneinander getrennt. Solange der Quencher am Fluorophor gebunden bleibt, wird dessen Fluoreszenz unterdrückt. Mit dem Trennen von Fluorophor und Quencher durch die *Taq*-Polymerase, wird auch die Fluoreszenz des Fluorophors sichtbar bzw. messbar.

Die real-time PCR lässt sich in ihrem Verlauf in drei Phasen einteilen. In der ersten Phase findet noch keine exponentielle Vermehrung der Template-DNA statt, aufgrund der verhältnismäßig geringen Menge an Nukleinsäuren. Die zweite Phase ist die des exponentiellen Anstiegs an Fluoreszenz bzw. DNA. In der dritten Phase verhindern der Verbrauch der Substrate, Hitzedenaturierung und Fehlpaarungen einen weiteren exponentiellen Anstieg. Die verwendete Software (LightCycler

Software v. 3.5) ermittelt automatisch den Schwellenwert (auch cp-Wert oder crossing point) an dem die exponentielle Phase beginnt.

Die exponentielle Phase ist Grundlage für die Berechnung der Effizienz der PCR, die aussagt, ob in jedem Zyklus eine Verdoppelung der Template-DNA stattfindet. Sie kann über die Formel „ $E = 10^{-1/m} - 1$ “ anhand der Steigung berechnet werden. Eine Effizienz von 100 % läge demnach bei einer Steigung von 3,32 vor.

Der Logarithmus der eingesetzten Menge Template-DNA und der cp-Wert sind zueinander umgekehrt proportional. Das bedeutet, wenn die Menge der verwendeten Template-DNA bekannt ist kann man anhand einer zuvor erstellten Standardgerade aus Proben einer bekannten Menge DNA für jede unbekannte Probe den Logarithmus der Kopienzahl mit Hilfe der Geradengleichung ($x = (cp - b)/m$) ermitteln.

Die Durchführung der real-time PCR ist dem Herstellerprotokoll (Fa. Fermentas) angelehnt. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten und die Dauer der Zyklusschritte wurden optimiert. Das Protokoll für den real-time PCR-Ansatz, sowie das verwendete Temperatur- und Zyklusprofil des real-time Thermocyclers können den Tabellen 18 und 19 entnommen werden.

Tabelle 18: Protokoll für den real-time PCR-Ansatz

Komponente	Verwendete Konzentration	Verwendete Menge (pro Ansatz á 20µl)
Primer (forward)	0,3 µM	0,3 µl
Primer (reverse)	0,3 µM	0,3 µl
Sonde	0,2 µM	0,2 µl
<u>Fermentas Maxima Probe qPCR Master Mix (x2):</u> Taq-Polymerase dNTPs MgCl Reaktions-Puffer	k.A.	12,5 µl
Template-DNA	variabel	1,0 µl
Ad H ₂ O (nukleasefrei)	-	10,7 µl

Tabelle 19: Temperatur- und Zyklusprofil der real-time PCR

Zyklus-Abschnitt	Temperatur des Zyklus [°C]	Dauer des Zyklus [Sek.]	Anzahl der Wiederholungen
1) Initiale Denaturierung	95 °C	600	1
2.1) Denaturierung	95 °C	15	} 45x
2.2) Annealing + Elongation	60 °C	60	
4) Kühlung	40 °C	60	1

2.4.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der bei der 16S rDNA-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 eines der verwendeten Primer versetzt werden und in 200 µl-Gefäße mit Flachdeckel überführt werden. Die DNA-Sequenz wurde von Seqlab per E-Mail übermittelt.

2.4.11 DNA-Sequenzvergleich

Die von der Fa. Seqlab erhaltenen Chromatogrammdaten wurden mit der Software Chromas (Fa. Technelysium LTD, Australien) in ein Textformat umgewandelt. Diese konnte mit dem frei zugänglichen Online-Programm "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.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung von Biofilmen unterschiedlichen Alters

Die für die hier gezeigten Versuche verwendeten Trinkwasserbiofilme stammten aus dem Silikonschlauchmodell des IHPH. Die Mikroorganismen der Trinkwasserbiofilme sind, sofern nicht anders angegeben, ausschließlich die der autochthonen Trinkwasserflora aus der Trinkwasserinstallation des IHPH. Das Alter der in diesen Untersuchungen verwendeten Trinkwasserbiofilme betrug zwischen 1 und 3 Jahren. Durch den geringen Durchmesser der verwendeten Silikonschläuche und dem für die Bakterien verwertbaren Kohlenstoff des Silikonschlauchs wird gewährleistet, dass der verwendete Biofilm weitestgehend gleichmäßig die komplette Oberfläche des Silikonschlauchs bedeckt. Sowohl der im Folgenden dargestellte strukturelle Aufbau, als auch der mikrobielle Bewuchs sind demnach als stellvertretend für den gesamten Biofilm zu betrachten.

3.1.1 Verlauf von Gesamtzellzahl und der Anzahl koloniebildender Einheiten bei Biofilmen unterschiedlichen Alters

Die in Tabelle 20 dargestellten Werte sind Durchschnittswerte für Biofilme des jeweiligen Alters. Mit zunehmendem Alter erreichen sowohl die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE), als auch die der Gesamtzellzahl (GZZ) eine Plateauphase, in der die Werte nur noch langsam ansteigen. Die Biofilme für die hier gezeigten Versuche hatten ein Alter von 1, 2 und 3 Jahren. Die Werte dienen als Ergänzung der Eindrücke der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die mit steigendem Alter der Biofilme größer werdende Schichtdicke der Biofilmmatrix (s. Abschnitt 3.1.2) deckt sich mit der gleichzeitig steigenden Anzahl an Bakterien in KBE und Gesamtzellzahl.

Während einjährige Biofilme noch eine durchschnittliche Anzahl koloniebildender Einheiten von $7,0 \times 10^6$ haben, steigt der Wert im zwei Jahre alten Biofilm auf knapp $1,3 \times 10^7$ KBE. Im 3 Jahre alten Biofilm ist ein geringerer Anstieg auf $3,3 \times 10^7$ KBE zu beobachten.

Die Gesamtzellzahl steigt im gleichen Zeitraum von ca. $2,0 \times 10^7$ Zellen auf ca. $9,5 \times 10^7$ Zellen nach 2 Jahren und auf ca. $1,2 \times 10^8$ Zellen nach 3 Jahren Biofilmwachstum.

Tabelle 20: Durchschnittliche Anzahl koloniebildender Einheiten und der Gesamtzellzahl (GZZ) in Abhängigkeit vom Alter des Biofilms (n=5)

Alter (Jahre)	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
1	Ø $7,0 \times 10^6$	Ø $2,0 \times 10^7$
2	Ø $1,3 \times 10^7$	Ø $9,5 \times 10^7$
3	Ø $3,3 \times 10^7$	Ø $1,2 \times 10^8$

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbeschaffenheit

Zur Verdeutlichung der Unterschiede in Bewuchs und Ausprägung der Biofilmbildung in Abhängigkeit des Alters, wurden Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von ein-, zwei- und dreijährigen Biofilmen angefertigt. Dargestellt sind jeweils repräsentative Ausschnitte der Biofilmoberflächen in unterschiedlichen Vergrößerungen.

In Abbildung 21 ist ein 1 Jahr alter Biofilm aus dem Silikonschlauchmodell des IHPH dargestellt. In Abbildung 21 A zeigt sich bei 200x Vergrößerung, dass der Biofilm bereits die gesamte Oberfläche des Schlauchinneren bedeckt. Die Risse in der sonst geschlossenen Biofilmmatrix entstehen während der Trocknungsvorgänge im Zuge der Probenpräparation. Bei 500x Vergrößerung wird darunter die Oberfläche des Silikonschlauchs sichtbar (s. Abb. 21 B). Zu diesem Zeitpunkt können auf der Oberfläche noch vereinzelt Makrokolonien ausgemacht werden (s. Abb. 21 C). Bei 5000x Vergrößerung sind die in der Biofilmmatrix eingebetteten Bakterien erkennbar (s. Abb. 21 D).

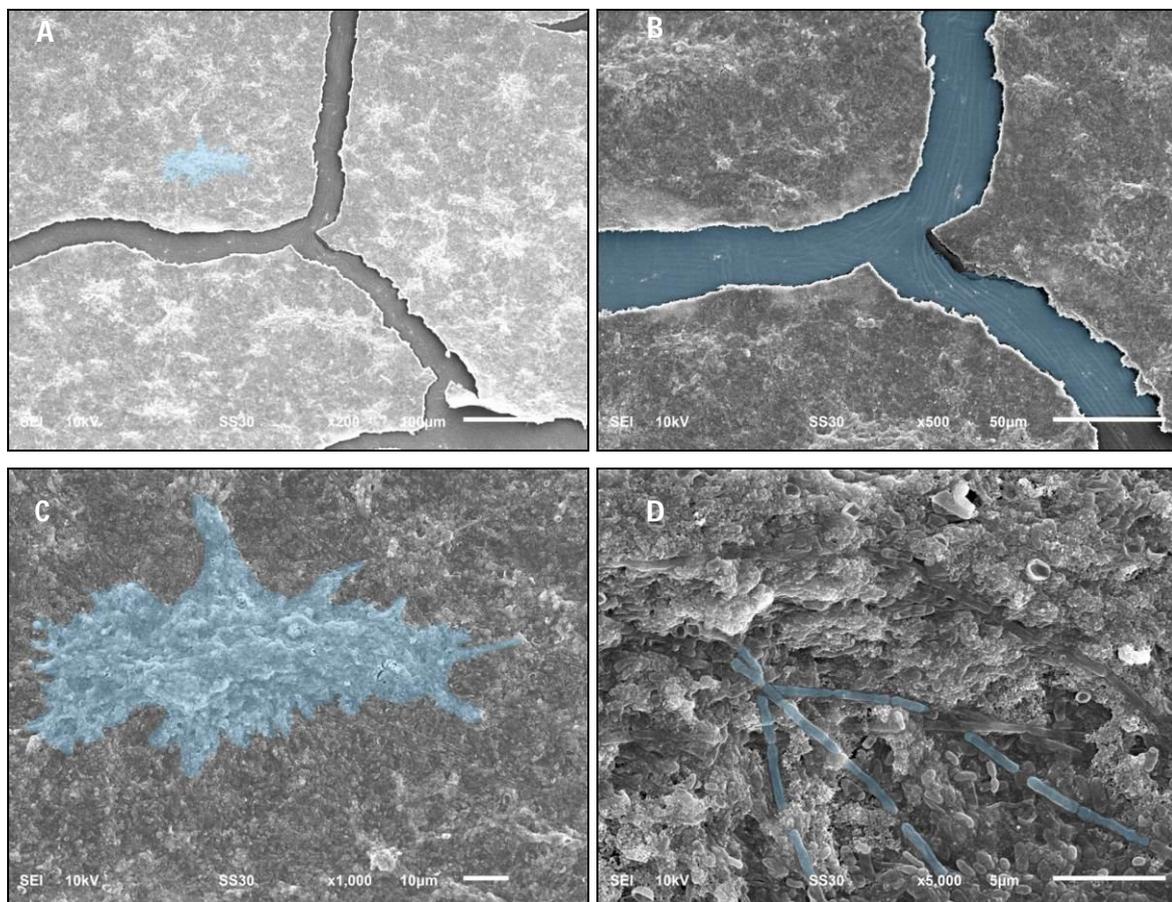


Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 1 Jahr alten Biofilms im Silikonschlauch. A) 200x Vergrößerung; B) 500x Vergrößerung; C) 1000x Vergrößerung; D) 5000x Vergrößerung. Farblich hervorgehoben sind die Silikonschlauchoberfläche (in B), eine Makrokolonie (in A und C) und in der Biofilmmatrix eingebettete Bakterien (in D).

In Abbildung 22 dargestellt ist ein 2 Jahre alter Biofilm des Silikonschlauchmodells des IHPH. Der Biofilm bildet bis auf wenige Ausnahmen eine geschlossene Schicht (s. Abb. 22 A). Die durch die Trocknungsvorgänge entstandenen Risse in der Biofilmmatrix veranschaulichen die Schichtdicke des Biofilms (s. Abb. 22 B). Auf der, im Vergleich zum 1 Jahr alten Biofilm, dickeren und homogener erscheinenden Biofilmoberfläche sind weniger einzelne Bakterien sichtbar (s. Abb. 22 D).

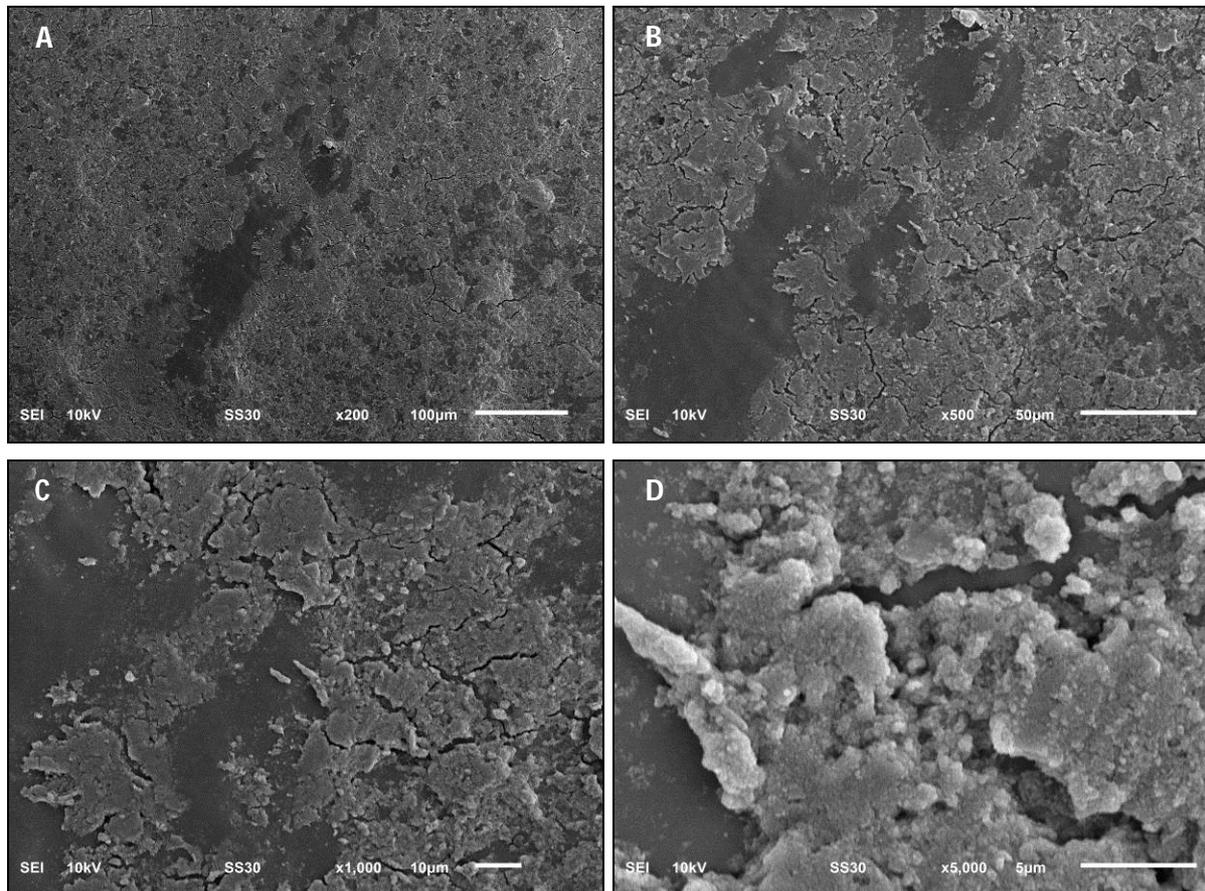


Abbildung 22: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 2 Jahre alten Biofilms auf Silikonoberfläche. A) 200x Vergrößerung; B) 500x Vergrößerung; C) 1000x Vergrößerung; D) 5000x Vergrößerung

In Abbildung 23 dargestellt ist ein 3 Jahre alter Biofilm des Silikonschlauchmodells des IHPH. Die Oberfläche ist komplett mit der Biofilmmatrix bedeckt (s. Abb. 23 A). Die Schichtdicke wird anhand der Trocknungsrissen der Präparate sichtbar (s. Abb. 23 B und D). In den Trocknungsrissen ist die Silikonschlauchoberfläche sichtbar. In Abbildung 23 D wird die Struktur des Biofilms anhand der Trocknungsrisse sichtbar. Hier sind in den tiefer liegenden Schichten die Bakterien des Biofilms zu erkennen.

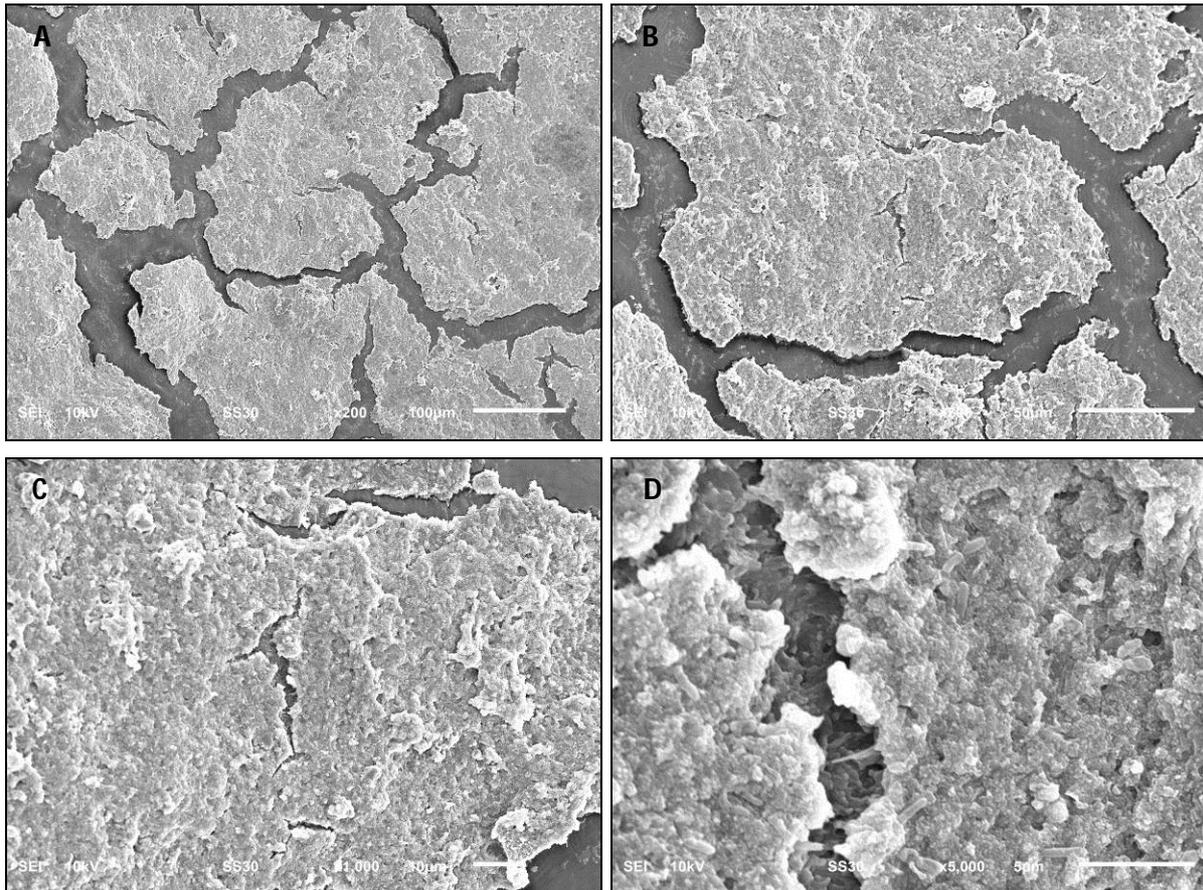


Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 3 Jahre alten Biofilms auf Silikonoberfläche. A) 200x Vergrößerung; B) 500x Vergrößerung; C) 1000x Vergrößerung; D) 5000x Vergrößerung

3.1.3 Identifikation der Biofilmpopulation durch Sequenzierung

Ziel dieser Untersuchungen war es, die aus dem Trinkwasserbiofilm des Silikonschlauchmodells des IHPH kultivierbaren Stämme zu isolieren und per Sequenzierung zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden Reinkulturen der im autochthonen Trinkwasserbiofilm des Silikonschlauchmodells vorkommenden Bakterien angelegt (s. Abschnitt 2.2.7). Die DNA der angelegten Reinkulturen wurde mittels „Blood & Tissue Kit“ (Fa. Qiagen) isoliert (s. Abschnitt 2.4). Für die anschließende Amplifizierung der DNA der Reinkulturen mittels quantitativer real-time PCR (s. Abschnitt 2.4.9) wurden spezifische Primer verwendet (s. Abschnitt 2.1.8 Tab. 8). Zur weiteren Untersuchung wurde die in der quantitativen real-time PCR amplifizierte 16S-rDNA unter Verwendung des „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Fa. Promega) aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgte in einem Fremdlabor (Fa. Seqlab). Die Sequenzvergleiche bzw. die Auswertung der erhaltenen Chromatogrammdaten erfolgte mit der Software „Chromas lite“ (Fa. Technelysium). Die Sequenzabfolgen konnten dann durch das Online-Programm „nucleotide BLAST“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) mit den dort hinterlegten Sequenzen aller erfassten Arten verglichen werden. Spezies, die eine Sequenzübereinstimmung von $\geq 97\%$ aufweisen sind als artverwandt definiert, Übereinstimmungen zwischen 95 und 97% sind als gattungsverwandt definiert.

Die Tabelle (s. Tab. 21) zeigt die Gesamtheit aller durch Sequenzierung erhaltenen Stämme. Angegeben sind Gattungs- und Artnamen und Stammbezeichnung (sofern bestimmbar). Zur weiteren

Charakterisierung sind Ergebnisse der Gramfärbung und die ermittelte phylogenetische Gruppe mit aufgeführt. Desweiteren ist die Übereinstimmung der Sequenz in Prozent angegeben.

Tabelle 21: Liste aller durch Sequenzierung ermittelten Stämme. Zusätzlich angegeben sind die Daten der Gramfärbung der Zugehörigkeit zu einer phylogenetischen Gruppe und die ermittelte prozentuale Sequenzübereinstimmung. k.A. = keine Angaben. (+) = entspricht einer positiven Gramfärbung.

Gattung/ Art	Stamm	Gram	Phylogenetische Gruppe	Sequenzübereinstimmung (%)
<i>Acidovorax facilis</i>	hswX127	-	β-Proteobacteria	99
<i>Acidovorax facilis</i>	C3RO1	-	β-Proteobacteria	99
<i>Aquabacterium commune</i>	B8	k.A.	β-Proteobacteria	99
<i>Aquabacterium parvum</i>	B6	-	β-Proteobacteria	97
<i>Aquatic bacterium</i>	R1-B9	k.A.	k.A.	99
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	PM1	-	β-Proteobacteria	99
<i>Methylibium sp.</i>	PM5	-	β-Proteobacteria	99
<i>Methylibium sp.</i>	BAC199	-	β-Proteobacteria	99
<i>Moraxella ovis</i>	199/55	-	γ-Proteobacteria	97
<i>Mycobacterium massiliense</i>	GO 06	(+)	Actinobacteria	99
<i>Mycobacterium ratisbonense</i>	SD4	(+)	Actinobacteria	98
<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	ATCC 13758	(+)	Actinobacteria	99
<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	NVI_6594	(+)	Actinobacteria	99
<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	NVI_6609	(+)	Actinobacteria	99
<i>Perlucidibaca piscinae</i>	NBRC 102354	-	γ-Proteobacteria	98
<i>Polaromonas sp.</i>	BAC23	-	β-Proteobacteria	99
<i>Polaromonas sp.</i>	BAC25	-	β-Proteobacteria	99
<i>Polaromonas sp.</i>	BAC136	-	β-Proteobacteria	98
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	k.A	-	γ-Proteobacteria	97
<i>Pseudomonas monteilii</i>	k.A	-	γ-Proteobacteria	97
<i>Pseudomonas straminea</i>	k.A	-	γ-Proteobacteria	99
<i>Ralstonia pickettii</i>	BGS2	-	β-Proteobacteria	98

Tabelle 21 (Fortsetzung): Liste aller durch Sequenzierung ermittelten Stämme. Zusätzlich angegeben sind die Daten der Gramfärbung der Zugehörigkeit zu einer phylogenetischen Gruppe und die ermittelte prozentuale Sequenzübereinstimmung. k.A. = keine Angaben. (+) = entspricht einer positiven Gramfärbung.

Gattung/ Art	Stamm	Gram	Phylogenetische Gruppe	Sequenzübereinstimmung (%)
<i>Sphingobium amiense</i>	T3AP11	-	α-Proteobacteria	97
<i>Sphingomonas sp.</i>	SRS2	-	α-Proteobacteria	98
<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	W-50	-	α-Proteobacteria	98
<i>Uncultured bacterium clone</i>	LIB051	k.A.	k.A.	99

Von denen in Tabelle 21 aufgeführten Isolaten ergibt sich die in folgender Abbildung (s. Abb. 24) prozentuale Aufteilung. Bei allen sequenzierten Actinobacteria handelt es sich um Vertreter der Gattung *Mycobacterium* (19 %). Bei den Vertretern der α-Proteobacteria handelt es sich ausschließlich um Mitglieder der Familie der Sphingomonadaceae (12 %). Die γ-Proteobacteria setzen sich zusammen aus Vertretern der Familien Moraxellaceae und Pseudomonadaceae (19 %). Die überwiegende Mehrheit der sequenzierten Stämme gehört zur Gruppe der β-Proteobacteria (42 %). Bei 8 % der Isolate konnte keine phylogenetische Gruppe eindeutig zugeordnet werden.

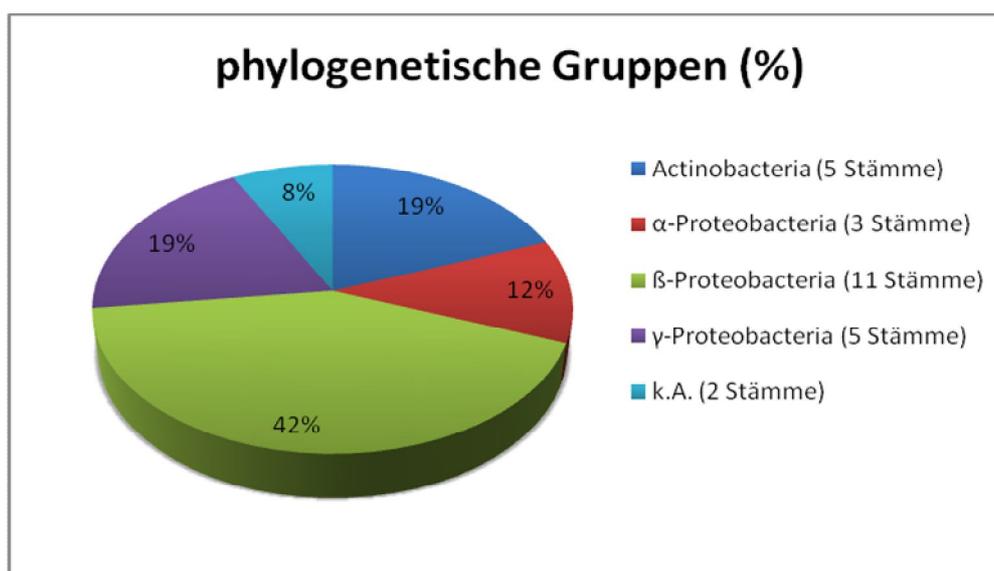


Abbildung 24: Die prozentuale Aufteilung in phylogenetische Gruppen aller kultivierbaren und sequenzierten Stämme.

Zusätzlich wurden die identifizierten Stämme in Risikogruppen unterteilt. Die Einteilung erfolgte entsprechend der technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe des „Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe“ [ABAS 2012]. Für die Einstufung ist das von den Bakterien ausgehende Infektionsrisiko für den gesunden Menschen maßgebend und es erfolgt eine Zuordnung zu den Risikogruppen 2 bis 4. Bakterien bei denen es wahrscheinlich ist, dass sie beim Menschen eine Infektionskrankheit verursachen, wurden der Risikogruppe 1 zugeordnet. Der überwiegende Teil lässt sich in Stufe 1 (55 %) einordnen und etwa ein Fünftel (20 %) ist der Gruppe 2 zugehörig. Bei etwa einem Viertel war eine genaue Zuordnung zu einer Risikogruppe nicht möglich (25 %) (s. Abb. 25).



Abbildung 25: Prozentuale Aufteilung der Isolate auf Risikogruppen. k.A. = keine Angabe

Tabelle 22 zeigt die Gattungen und Arten des Trinkwasserbiofilms geordnet nach ihrer Zugehörigkeit zur jeweiligen phylogenetischen Gruppe. Neben der Einteilung nach Vorgabe des ABAS sind Zusatzhinweise zur Pathogenität angegeben. Der Zusatz „t“ steht dabei für Pathogene bei Wirbeltieren, von denen der Mensch unter natürlichen Bedingungen nicht befallen wird. Der Zusatz „ht“ steht für Pathogene für Mensch und Wirbeltiere, aber i.d.R. keine Übertragung zwischen beiden Wirtsgruppen. Der Zusatz „t2“ bezieht sich auf die Wirbeltierpathogenität, wegen der aus tierseuchenrechtlicher Sicht Sicherheitsmaßnahmen erforderlich werden können, die vergleichbar mit den Sicherheitsmaßnahmen der Schutzstufe 2 ein Entweichen des Prokaryonten in die äußere Umgebung bzw. in andere Arbeitsbereiche minimieren sollen. Der Zusatz „+“ steht für Pathogene, die in Einzelfällen als Krankheitserreger nachgewiesen oder vermutet wurden und überwiegend bei erheblich abwehrgeminderten Menschen auftreten.

Bei 2 der 4 zur Risikogruppe 2 zugeordneten Arten handelt es sich um Mykobakterien. Die zwei anderen gehören der Gruppe der Gammaproteobakterien an. Alle anderen gehören, sofern genau festzulegen, der Risikogruppe 1 an.

Tabelle 22: Zuordnung der Biofilmisolate zu Risikogruppen nach Vorgabe des ABAS. k.A. = keine Angabe

Gattung/ Art	Phylogenetische Gruppe	Risikogruppe
<i>Mycobacterium massiliense</i>	Actinobacteria	2ht
<i>Mycobacterium ratisonense</i>	Actinobacteria	2
<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	Actinobacteria	1t2
<i>Sphingobium amiense</i>	α-Proteobacteria	1
<i>Sphingomonas sp.</i>	α-Proteobacteria	k.A.
<i>Sphingopyxis wifflariensis</i>	α-Proteobacteria	1

Tabelle 22 (Fortsetzung): Zuordnung der Biofilmisolate zu Risikogruppen nach Vorgabe des ABAS. k.A. = keine Angabe

Gattung/ Art	Phylogenetische Gruppe	Risikogruppe
<i>Acidovorax facilis</i>	β -Proteobacteria	1
<i>Aquabacterium commune</i>	β -Proteobacteria	1
<i>Aquabacterium parvum</i>	β -Proteobacteria	1
<i>Aquatic bacterium</i>	β -Proteobacteria	k.A.
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	β -Proteobacteria	1
<i>Methylibium sp.</i>	β -Proteobacteria	k.A.
<i>Polaromonas sp.</i>	β -Proteobacteria	k.A.
<i>Ralstonia pickettii</i>	β -Proteobacteria	1+
<i>Moraxella ovis</i>	γ -Proteobacteria	2t
<i>Perlucidibaca piscinae</i>	γ -Proteobacteria	1
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	γ -Proteobacteria	2t
<i>Pseudomonas monteilii</i>	γ -Proteobacteria	1+
<i>Pseudomonas straminea</i>	γ -Proteobacteria	1
<i>Uncultured bacterium clone</i>	k.A.	k.A.

3.2 Einfluss chemischer Desinfektionsmittel auf die Entwicklung von Biofilmen

In dieser Untersuchungsreihe sollte gezeigt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Desinfektionsmittel auf die Zusammensetzung der Biofilmpopulation haben. Dabei wurde entweder über einen zu kurzen Zeitraum Desinfektionsmittel zudosiert, oder in zu geringer Konzentration. Bei der Durchführung musste darauf geachtet werden, dass die Art der Behandlung nicht alle Bakterien im Biofilm inaktiviert. Nach Abschluss der Behandlung wurden die koloniebildungsfähigen Einheiten zu Reinkulturen vereinzelt, ihre DNA isoliert (s. Abschnitt 2.4), aufgereinigt (s. Abschnitt 2.4.8) und anschließend sequenziert. Die hier verwendeten Biofilme hatten ein Alter von ca. 2 Jahren.

3.2.1 Einfluss chemischer Desinfektionsmittel als Stossbehandlung zur Anlagendesinfektion

In den Untersuchungen zur Auswirkung von Stossbehandlungen zur Anlagendesinfektion wurden die verwendeten Desinfektionsmittel einmal wöchentlich bei einer Desinfektionsmittelkonzentration von 10 mg/l für die Dauer von 6 Stunden zudosiert. Die Werte zur Anzahl koloniebildender Einheiten und der Gesamtzellzahl repräsentieren jeweils den Stand nach Abschluss einer wöchentlichen Behandlung. Vor jeder Zudosierung wurden die Ergebnisse der vorherigen Zudosierung ausgewertet. Unterschritt die Anzahl koloniebildender Einheiten einen auf Erfahrungswerten für jeden Biofilm festgelegten Grenzwert, so wurde die Zudosierung ausgesetzt, bis die Anzahl koloniebildender Einheiten wieder ausreichend angestiegen war.

3.2.1.1 Prüfprodukt 1: freies Chlor aus einem Verfahren zur Herstellung von elektrochemisch aktiviertem Wasser (ECA-Produkt 1)

Die Wirkung von ECA-Produkten beruht auf freiem Chlor in Form von hypochloriger Säure. Hergestellt wird das Desinfektionsmittel durch das Prinzip der Zellmembranelektrolyse, bei der aus Wasser und einer Salzlösung unter elektrischer Spannung hypochlorige Säure als Hauptprodukt entsteht (s. Abschnitt 1.6.4.2).

Bei dem hier zudosierten Desinfektionsmittel handelt es sich um ein im neutralen pH-Bereich (pH 7) hergestelltes Produkt. Im neutralen Bereich hergestellte ECA-Produkte sind reaktionsstabiler, während bei den im sauren Bereich hergestellten ECA-Produkten im Verhältnis höhere Konzentrationen an hypochloriger Säure entstehen würden. Das ECA-Produkt wurde vor Ort frisch hergestellt. Die Neutralisation erfolgte jeweils nach Abschluss der Behandlung mit 0,3% Natriumthiosulfat.

Abbildung 26a zeigt den zeitlichen Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten über den Untersuchungszeitraum von 126 Tagen. Um den Verlauf im Detail darstellen zu können, wurde der Verlauf mit einer kleineren Skalierung mit angefügt (s. Abb. 26b). Auf diese Weise wird der zwischenzeitliche Anstieg in der Anzahl der koloniebildenden Einheiten nach 63 Tagen deutlich. Aufgrund des Erreichens des vorher festgelegten Grenzwerts der KBE, wurde zu diesem Zeitpunkt die Behandlung mit ECA-Wasser ausgesetzt. Nach 105 Tagen wurde mit der Behandlung erneut fortgefahren. Der Versuch wurde mit drei gleichalten Biofilmen (ca. 2 Jahre alt) des Silikonschlauchmodells durchgeführt.

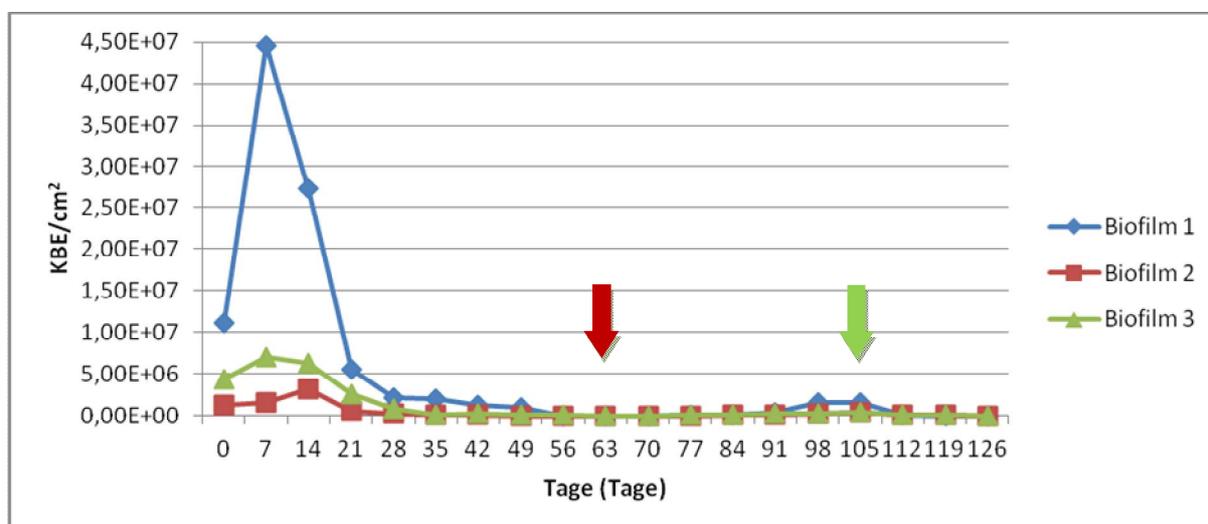


Abbildung 26a: Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten über die Dauer einer wöchentlichen Behandlung mit freiem Chlor (ECA-Produkt 1) mit einer Konzentration von 10 mg/l. Roter Pfeil = Stopp der Zudosierung. Grüner Pfeil = Start der Zudosierung.

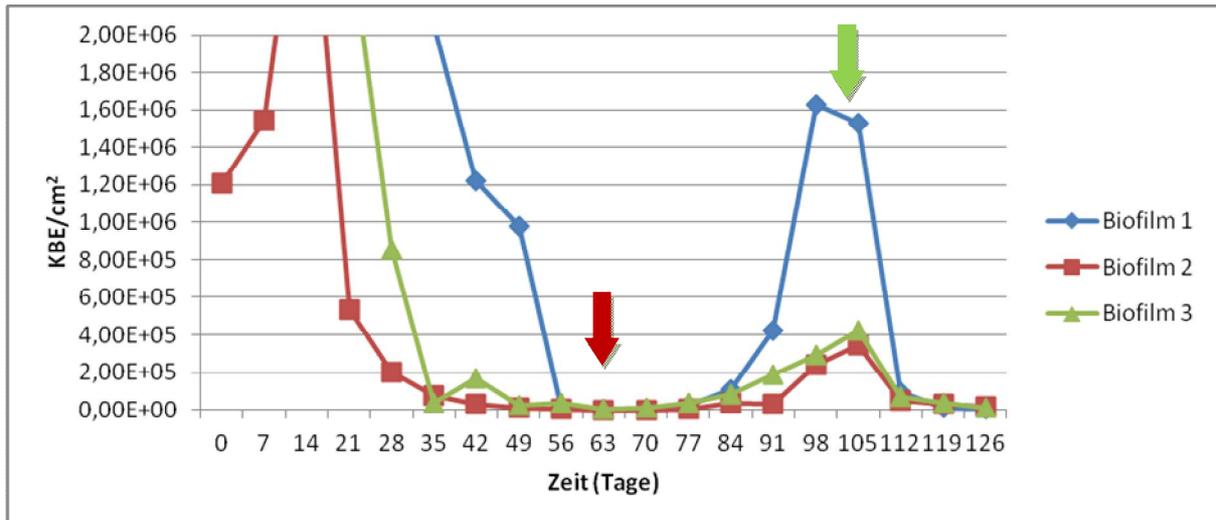


Abbildung 26b: Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten über die Dauer einer wöchentlichen Behandlung mit freiem Chlor (ECA-Produkt 1) mit einer Konzentration von 10 mg/l. Hier mit kleinerer Skalierung um den Verlauf im Detail optisch darstellen zu können. Roter Pfeil = Stopp der Zudosierung. Grüner Pfeil = Start der Zudosierung.

Tabelle 23 zeigt die zeitliche Korrelation von koloniebildenden Einheiten und Gesamtzell im Biofilm. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte. Die anfänglichen ca. $5,5 \times 10^6$ Zellen wurden nach einer Untersuchungsdauer von 63 Tagen auf ca. $1,1 \times 10^3$ Zellen reduziert. Um die vollständige Inaktivierung aller koloniebildenden Einheiten zu verhindern, wurde die Behandlung ab dem 63 Tag ausgesetzt. Die Gesamtzellzahl wurde im gleichen Zeitraum von ca. $3,5 \times 10^7$ Zellen um etwas mehr als eine Log-Stufe auf ca. $1,9 \times 10^6$ Zellen reduziert.

Nach einer Untersuchungsdauer von 105 Tagen war die Anzahl koloniebildender Einheiten auf ca. $7,7 \times 10^5$ gestiegen und Gesamtzellzahl auf ca. $2,9 \times 10^7$ Zellen. Nach erneutem Einsetzen der Desinfektion wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten innerhalb von 3 Wochen auf ca. $1,1 \times 10^4$ und die Gesamtzellzahl auf ca. $6,3 \times 10^6$ Zellen reduziert.

Tabelle 23: Auflistung des zeitlichen Verlaufs der koloniebildenden Einheiten und der Gesamtzellzahl (Durchschnittswerte)

Zeit (Tage)	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
0	5,55x10 ⁶	3,45x10 ⁷
7	1,77x10 ⁷	2,78x10 ⁷
14	1,22x10 ⁷	3,02x10 ⁷
21	2,89x10 ⁶	1,75x10 ⁷
28	1,05x10 ⁶	8,79x10 ⁶
35	7,21x10 ⁵	7,67x10 ⁶
42	4,74x10 ⁵	1,43x10 ⁷
49	3,38x10 ⁵	2,46x10 ⁷
56	1,58x10 ⁴	4,35x10 ⁶
63	1,09x10 ³	1,94x10 ⁶
70	5,19x10 ³	3,22x10 ⁶
77	2,12x10 ⁴	1,18x10 ⁶
84	7,67x10 ⁴	1,01x10 ⁶
91	2,16x10 ⁵	2,13x10 ⁷
98	7,19x10 ⁵	1,71x10 ⁷
105	7,65x10 ⁵	2,92x10 ⁷
112	7,38x10 ⁴	9,82x10 ⁶
119	2,61x10 ⁴	7,75x10 ⁶
126	1,12x10 ⁴	6,34x10 ⁶
Gesamtreduktion	5,54x10 ⁶	2,82x10 ⁷

3.2.1.2 Prüfprodukt 2: freies Chlor aus einem Verfahren zur Herstellung von elektrochemisch aktiviertem Wasser (ECA-Verfahren 2)

Bei dem hier zudosierten Desinfektionsmittel handelt es sich wie bei ECA-Produkt Nr. 1 um ein im neutralen Bereich (pH 7) hergestelltem Produkt. Hauptwirkstoff ist hypochlorige Säure, die als freies Chlor messbar ist und damit nach TrinkwV § 11 als Trinkwasserdesinfektionsmittel eingesetzt werden darf. Das ECA-Produkt wurde vor Ort aus einem Gemisch aus Wasser und einer Salzsole frisch hergestellt. Die Neutralisation erfolgte jeweils nach Abschluss der Behandlung mit 0,3% Natriumthiosulfat.

Abbildung 27 zeigt den zeitlichen Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten über den Untersuchungszeitraum von 118 Tagen. Ausgesetzt wurde die Behandlung nach dem 15. Tag bis zum 43. Tag und nach dem 91. bis zum 104. Tag. Der Versuch wurde mit drei gleich alten Biofilmen (ca. 2 Jahre) des Silikonschlauchmodells durchgeführt.

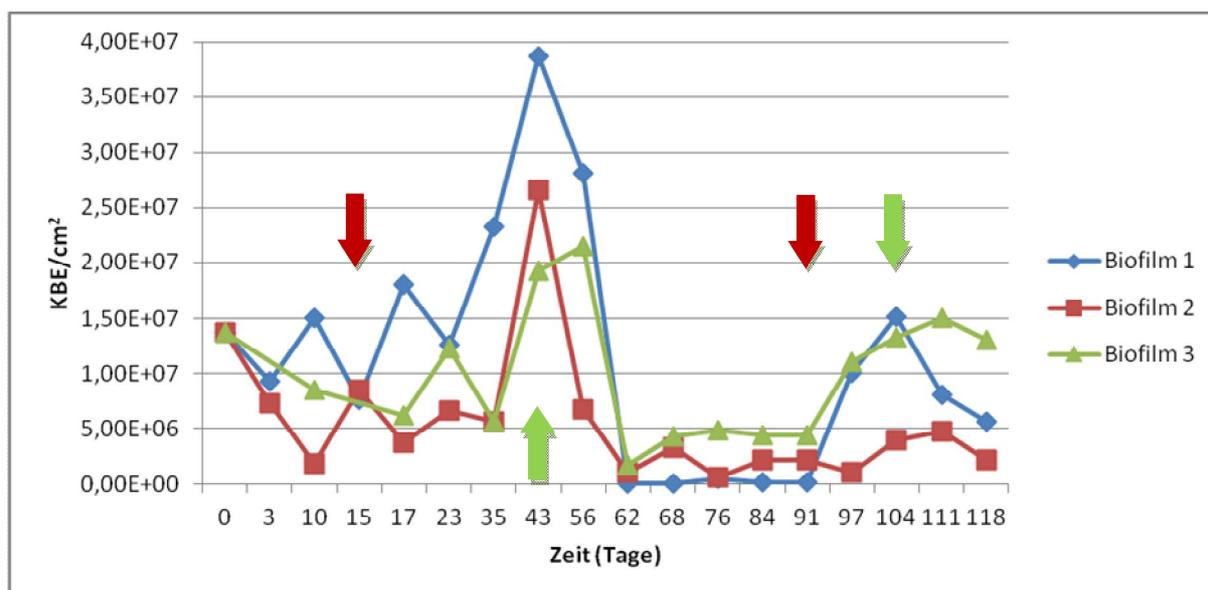


Abbildung 27: Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten nach wöchentlicher Behandlung mit ECA-Produkt Nr. 2 (Wirkstoff: hypochlorige Säure) bei einer Konzentration von 10 mg/l (Durchschnittswerte). Roter Pfeil = Stopp der Zudosierung. Grüner Pfeil = Start der Zudosierung.

Tabelle 24 beschreibt die zeitliche Korrelation von koloniebildenden Einheiten und Gesamtzell im Biofilm. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte. Die anfängliche Anzahl koloniebildender Einheiten von ca. $1,4 \times 10^7$ reduzierte sich bis zum ersten Aussetzen der Zudosierung auf durchschnittlich ca. $8,3 \times 10^6$. Die Gesamtzellzahl wurde im gleichen Zeitraum von ca. $8,2 \times 10^7$ auf ca. $6,5 \times 10^6$ Zellen reduziert. Nach insgesamt 43 Tagen wurde die Zudosierung erneut aufgenommen. Die Anzahl koloniebildender Einheiten betrug zu diesem Zeitpunkt ca. $2,8 \times 10^7$. Die Gesamtzellzahl stieg im gleichen Zeitraum auf ca. $7,4 \times 10^7$. Am 91. Tag wurde die Zudosierung bei einem KBE Wert von ca. $2,3 \times 10^6$ Zellen erneut ausgesetzt. Die Gesamtzellzahl wurde im gleichen Zeitraum auf ca. $1,4 \times 10^7$ Zellen reduziert. Ab Tag 104 wurde mit der Zudosierung bei Werten von ca. $1,1 \times 10^7$ KBE und ca. $6,2 \times 10^7$ GZZ erneut begonnen. Mit Ende der Behandlung lagen die Werte bei ca. $6,9 \times 10^6$ KBE und ca. $2,3 \times 10^7$ GZZ.

Tabelle 24: Auflistung des zeitlichen Verlaufs der koloniebildenden Einheiten und der Gesamtzellzahl

Zeit (Tage)	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
0	1,37x10 ⁷	8,23x10 ⁷
3	8,31x10 ⁶	1,26x10 ⁸
10	8,46x10 ⁶	7,79x10 ⁷
15	8,02x10 ⁶	6,45x10 ⁷
17	9,31x10 ⁶	6,31x10 ⁷
23	1,05x10 ⁷	8,94x10 ⁷
35	1,15x10 ⁷	5,52x10 ⁷
43	2,82x10 ⁷	7,42x10 ⁷
56	1,88x10 ⁷	7,58x10 ⁷
62	8,99x10 ⁵	6,12x10 ⁷
68	2,54x10 ⁶	4,96x10 ⁷
76	1,97x10 ⁶	5,35x10 ⁷
84	2,26x10 ⁶	3,92x10 ⁷
91	2,26x10 ⁶	1,42x10 ⁷
97	7,37x10 ⁶	3,68x10 ⁷
104	1,08x10 ⁷	6,23x10 ⁷
111	9,29x10 ⁶	3,98x10 ⁷
118	6,92x10 ⁶	2,31x10 ⁷
Gesamtreduktion	6,78x10 ⁶	5,92x10 ⁷

Nach Abschluss der Behandlung wurden erneut wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben Reinkulturen der verbleibenden Biofilmpopulationen erstellt, deren 16s-rDNA in einer quantitativer real-time PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Hier stellvertretend für ECA-Produkte. Tabelle 25 zeigt eine Übersicht über die isolierten Stämme. In Abbildung 28 dargestellt ist die Aufteilung der nach der Behandlung im Biofilm kultivierbaren Bakterien in ihre Zugehörigkeit zu einer phylogenetischen Gruppe.

Tabelle 25: Liste aller nach der Behandlung mit ECA-Produkt (Nr.2) nach 118 Tagen durch Sequenzierung ermittelten Stämme. Weiterhin angegeben sind die Zugehörigkeit zu einer phylogenetischen Gruppe, die ermittelte prozentuale Sequenzübereinstimmung und die Risikogruppe. k.A. = keine Angaben. Fettgedruckt = bereits im unbehandelten Biofilm gefundenen Stämme

Gattung/ Art	Stamm	Phylogenetische Gruppe	Sequenzübereinstimmung (%)	Risikogruppe
<i>Nocardia salmonicida</i>	8405	Actinobacteria	98	1t2
<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	k.A	α-Proteobacteria	98	1
<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	W-50	α-Proteobacteria	97	1
<i>Aquabacterium parvum</i>	B6	β-Proteobacteria	98	1
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	PM1	β-Proteobacteria	98	1
<i>Polaromonas sp.</i>	BAC136	β-Proteobacteria	97	k.A.
<i>Dokdonella sp.</i>	PYM5	γ-Proteobacteria	99	k.A.
<i>Aquatic bacterium</i>	R1-B9	k.A.	99	k.A.
<i>Uncultured bacterium clone</i>	LIB051	k.A.	98	k.A.
<i>Uncultured bacterium clone</i>	LIB115	k.A.	98	k.A.

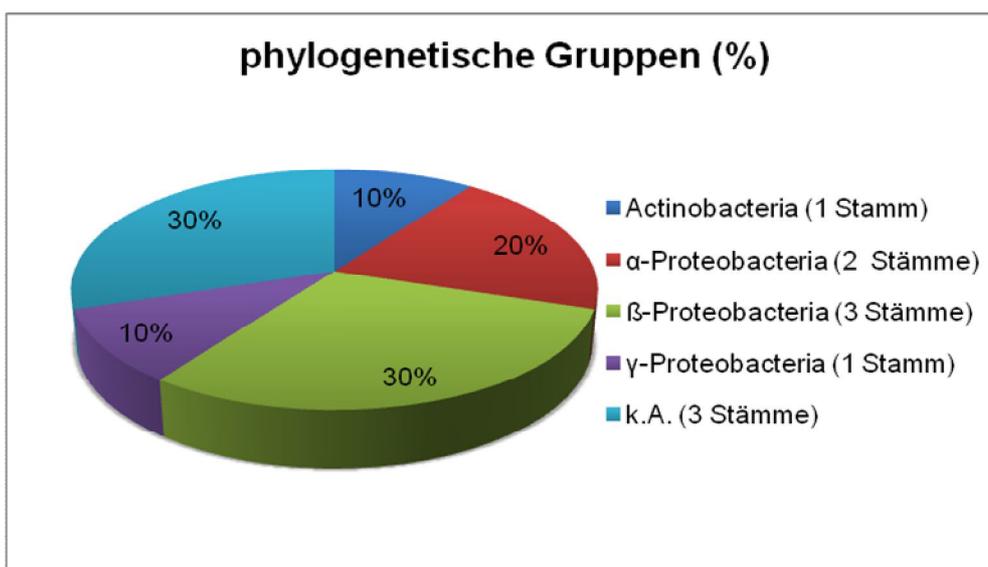


Abbildung 28: Die prozentuale Aufteilung in phylogenetische Gruppen aller kultivierbaren und sequenzierten Stämme nach der Behandlung mit dem ECA-Produkt (Nr.2) nach 118 Tagen.

In Abbildung 29 ist die Aufteilung in Risikogruppen der verbleibenden Stämme nach der Behandlung mit einem ECA-Produkt abgebildet. Die Hälfte der isolierten Bakterienstämme konnte der Risikogruppe 1 zugeordnet werden. Zu den verbleibenden 50% kann keine abschließende Aussage gemacht werden. Vertreter der Risikogruppe 2 wurden nicht gefunden.

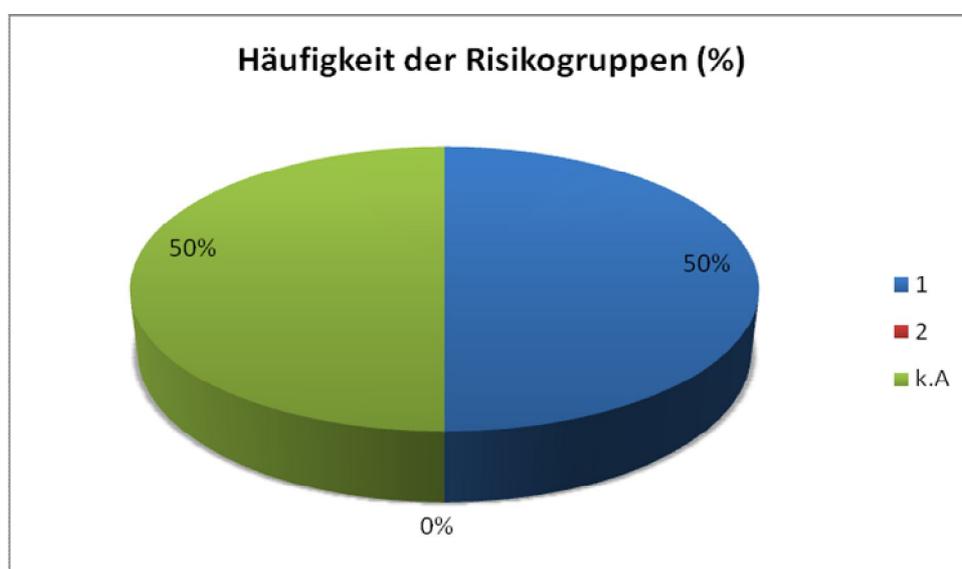


Abbildung 29: Prozentuale Aufteilung der Isolate auf Risikogruppen nach der Behandlung mit ECA-Produkt (Nr.2) nach 118 Tagen. k.A. = keine Angabe.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 30 zeigen die noch durchgehende Biofilmschicht auf dem behandelten Silikonschlauch, die im Vergleich zum unbehandelten Biofilm eine geringere Schichtdicke aufweist (s. Abb. 30 A und B). In den Teilabbildungen 30 C und D ist sichtbar, dass der Biofilm an manchen Stellen stärker abgebaut wurde, als an anderen. Es sind vereinzelt liegende Zellen erkennbar.

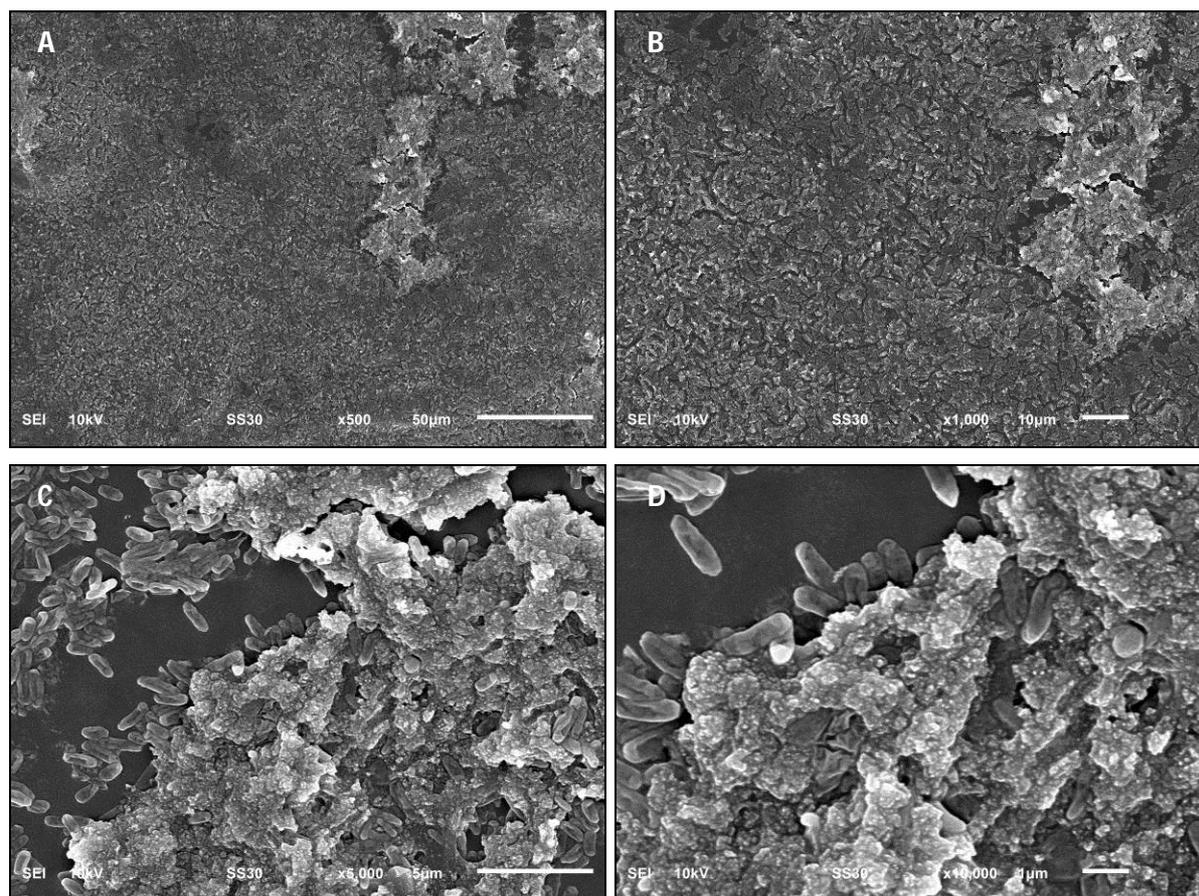


Abbildung 30: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 2 Jahre alten Biofilms auf Silikonoberfläche nach Behandlung mit elektrochemisch aktiviertem Wasser. A) 500x Vergrößerung; B) 1000x Vergrößerung; C) 5000x Vergrößerung; D) 10000x Vergrößerung

3.2.1.3 Prüfprodukt 3: Chlordioxid (pH2)

Bei dem hier zudosierten Desinfektionsmittel handelt es sich um ein im sauren pH-Bereich (pH 2) hergestelltem Produkt. Das Produkt wurde vor Ort hergestellt aus Trinkwasser und zwei Vorlagebehältern mit Salzsäure und Natriumchlorit. Die Konzentration des Chlordioxid im Produkt betrug 2 g/l. Die Neutralisation erfolgte jeweils nach Abschluss der Behandlung mit 0,3% Natriumthiosulfat.

Abbildung 31 zeigt den zeitlichen Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten über den Untersuchungszeitraum von 117 Tagen. Ausgesetzt wurde die Behandlung nach dem 17. Tag bis zum 43. Tag und nach dem 97. bis zum 111. Tag. Der Versuch wurde mit drei gleichalten Biofilmen (ca. 2 Jahre) des Silikonschlauchmodells durchgeführt.

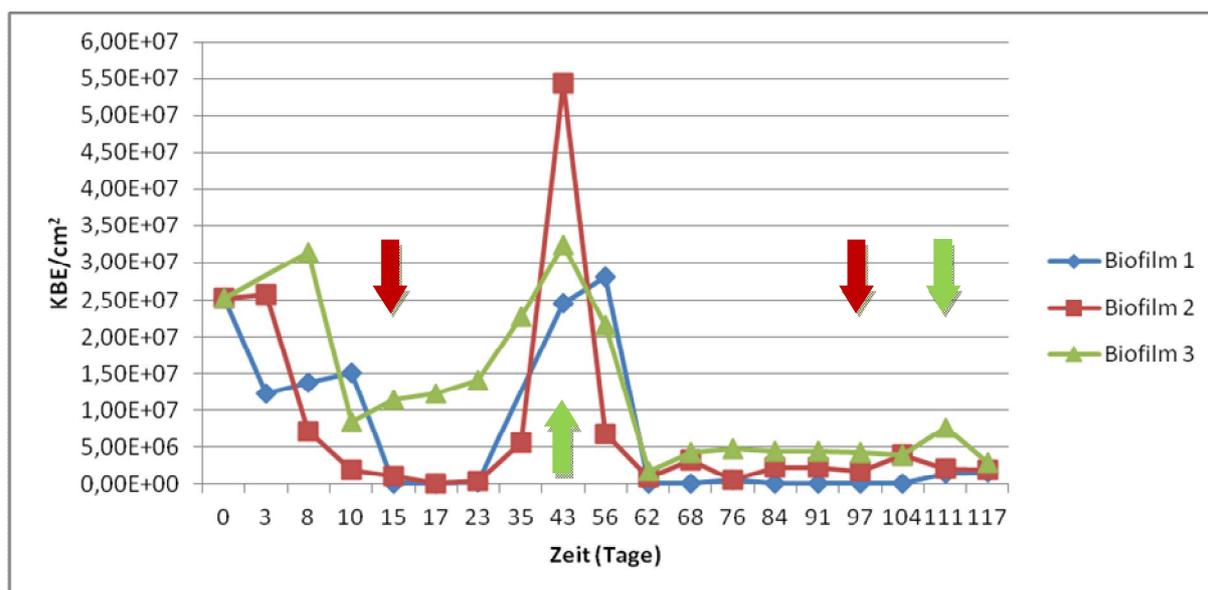


Abbildung 31: Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten über die Dauer einer wöchentlichen Behandlung mit Chlordioxid mit einer Konzentration von 10 mg/l (Durchschnittswerte). Roter Pfeil = Stopp der Zudosierung. Grüner Pfeil = Start der Zudosierung.

Tabelle 26 beschreibt die zeitliche Korrelation von koloniebildenden Einheiten und Gesamtzellzahl im Biofilm. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte. Die anfängliche Anzahl koloniebildender Einheiten von ca. $2,5 \times 10^7$ lag beim ersten Aussetzen der Zudosierung bei durchschnittlich ca. $4,2 \times 10^6$ Zellen. Die Gesamtzellzahl wurde im gleichen Zeitraum von ca. $7,4 \times 10^7$ auf ca. $4,7 \times 10^6$ Zellen reduziert. Nach insgesamt 43 Tagen wurde die Zudosierung erneut aufgenommen. Die Anzahl koloniebildender Einheiten betrug zu diesem Zeitpunkt ca. $3,7 \times 10^7$. Die Gesamtzellzahl stieg im gleichen Zeitraum auf ca. $5,4 \times 10^7$ Zellen. Am 97. Tag wurde die Zudosierung bei einem KBE Wert von ca. $2,1 \times 10^6$ erneut ausgesetzt. Die Gesamtzellzahl wurde im gleichen Zeitraum auf ca. $8,7 \times 10^6$ Zellen reduziert. Ab Tag 111 wurde mit der Zudosierung bei Werten von ca. $3,7 \times 10^6$ KBE und ca. $6,6 \times 10^6$ GZZ erneut begonnen. Mit Ende der Behandlung lagen die Werte bei ca. $2,1 \times 10^6$ KBE und ca. $9,2 \times 10^6$ GZZ.

Tabelle 26: Auflistung des zeitlichen Verlaufs der koloniebildenden Einheiten und der Gesamtzellzahl

Zeit (Tage)	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
0	$2,52 \times 10^7$	$7,44 \times 10^7$
3	$1,91 \times 10^7$	$8,29 \times 10^7$
8	$1,74 \times 10^7$	$7,62 \times 10^7$
10	$8,46 \times 10^6$	$7,25 \times 10^7$
15	$4,20 \times 10^6$	$6,45 \times 10^7$
17	$4,20 \times 10^6$	$4,76 \times 10^7$
23	$4,87 \times 10^6$	$5,18 \times 10^7$
35	$1,42 \times 10^7$	$6,21 \times 10^7$
43	$3,71 \times 10^7$	$5,39 \times 10^7$
56	$1,88 \times 10^7$	$5,47 \times 10^7$
62	$8,99 \times 10^5$	$2,43 \times 10^7$
68	$2,54 \times 10^6$	$1,56 \times 10^7$

Tabelle 26 (Fortsetzung): Auflistung des zeitlichen Verlaufs der koloniebildenden Einheiten und der Gesamtzellzahl

Zeit (Tage)	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
76	1,97x10 ⁶	1,22x10 ⁷
84	2,26x10 ⁶	8,79x10 ⁶
91	2,26x10 ⁶	9,23x10 ⁶
97	2,05x10 ⁶	8,65x10 ⁶
104	2,64x10 ⁶	1,16x10 ⁷
111	3,69x10 ⁶	6,55x10 ⁶
117	2,09x10 ⁶	9,15x10 ⁶
Gesamtreduktion	2,27x10 ⁷	6,53x10 ⁷

Nach Abschluss der Behandlung wurden erneut wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, Reinkulturen der verbleibenden Biofilmpopulationen hergestellt, deren 16s-rDNA in einer quantitativer real-time PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Tabelle 27 zeigt eine Übersicht über die isolierten Stämme nach Chlordioxidbehandlung über 117 Tage. In Abbildung 32 dargestellt ist die Aufteilung der nach der Behandlung im Biofilm kultivierbaren Bakterien in ihre Zugehörigkeit zu einer phylogenetischen Gruppe.

Tabelle 27: Liste aller nach der Behandlung mit einem ClO₂-Produkt ermittelten Stämme. Angegeben sind die jeweilige phylogenetischen Gruppe, die Sequenzübereinstimmung und Risikogruppe. k.A. = keine Angaben. Fettgedruckt = bereits im unbehandelten Biofilm gefundenen Stämme.

Gattung/ Art	Stamm	Phylogenetische Gruppe	Sequenzübereinstimmung (%)	Risikogruppe
<i>Nocardia salmonicida</i>	8405	Actinobacteria	98	1t2
<i>Sphingomonas sp.</i>	ASRB18-5	α-Proteobacteria	97	k.A.
<i>Sphingopyxis panaciterrae</i>	k.A.	α-Proteobacteria	98	k.A.
<i>Sphingopyxis sp.</i>	KW066	α-Proteobacteria	98	k.A.
<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	W-50	α-Proteobacteria	97	1
<i>Aquabacterium parvum</i>	B6	β-Proteobacteria	98	1
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	PM1	β-Proteobacteria	99	1
<i>Methylibium sp.</i>	BAC199	β-Proteobacteria	99	k.A.
<i>Methyloversatilis sp.</i>	K2S193	β-Proteobacteria	98	k.A.
<i>Dokdonella sp.</i>	PYM5	γ-Proteobacteria	98	k.A.
<i>Aquatic bacterium</i>	R1-B9	k.A.	99	k.A.
Uncultured bacterium clone	LIB115	k.A.	98	k.A.

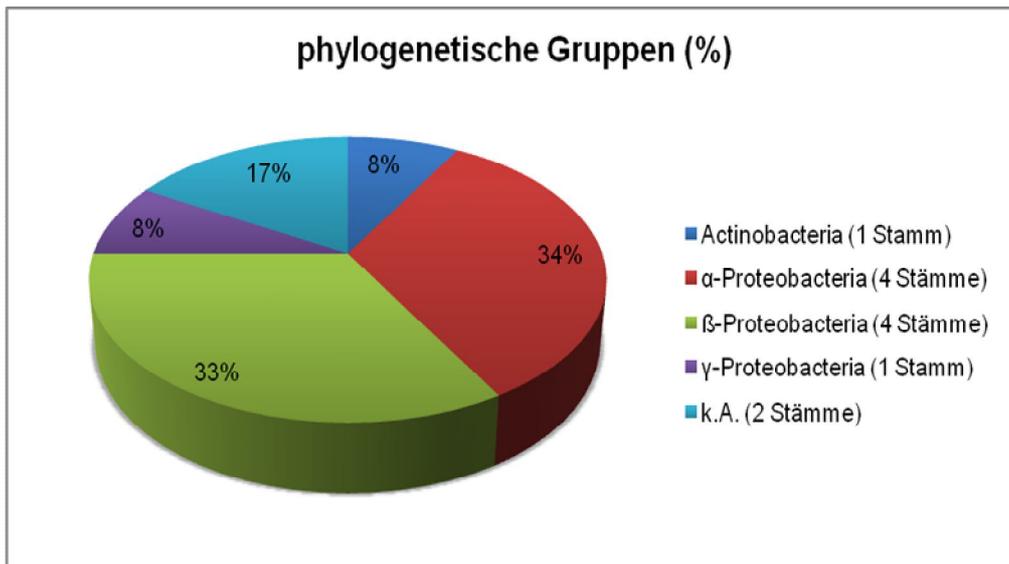


Abbildung 32: Die prozentuale Aufteilung in phylogenetische Gruppen aller kultivierbaren und sequenzierten Stämme nach der Behandlung mit dem ClO₂-Produkt nach 117 Tagen.

In Abbildung 33 ist die Aufteilung in Risikogruppen der verbleibenden Stämme nach der Behandlung mit dem verwendeten ClO₂-Produkt abgebildet. Circa ein Drittel kann der Risikogruppe 1 zugeordnet werden. Der überwiegende Teil kann keiner Gruppe zweifelsfrei zugeordnet werden. Vertreter der Risikogruppe 2 wurden nicht gefunden.



Abbildung 33: Prozentuale Aufteilung der Isolate auf Risikogruppen nach der Behandlung mit dem Chlordioxid-Produkt nach 117 Tagen. k.A. = keine Angabe.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 34 zeigen die nach Abschluss der Behandlung noch durchgehende Biofilmschicht auf dem Silikonschlauch. Im Vergleich zum unbehandelten Biofilm (s. Abb. 22 A und B) ist sichtbar, dass die Schichtdicke abgenommen hat und der Biofilm über den Verlauf der Behandlung teilweise abgebaut wurde. In den Teilabbildungen 35 C

und D ist sichtbar, dass der Biofilm an manchen Stellen stärker abgebaut wurde, als an anderen. Vereinzelt liegende Zellen sind kaum erkennbar.

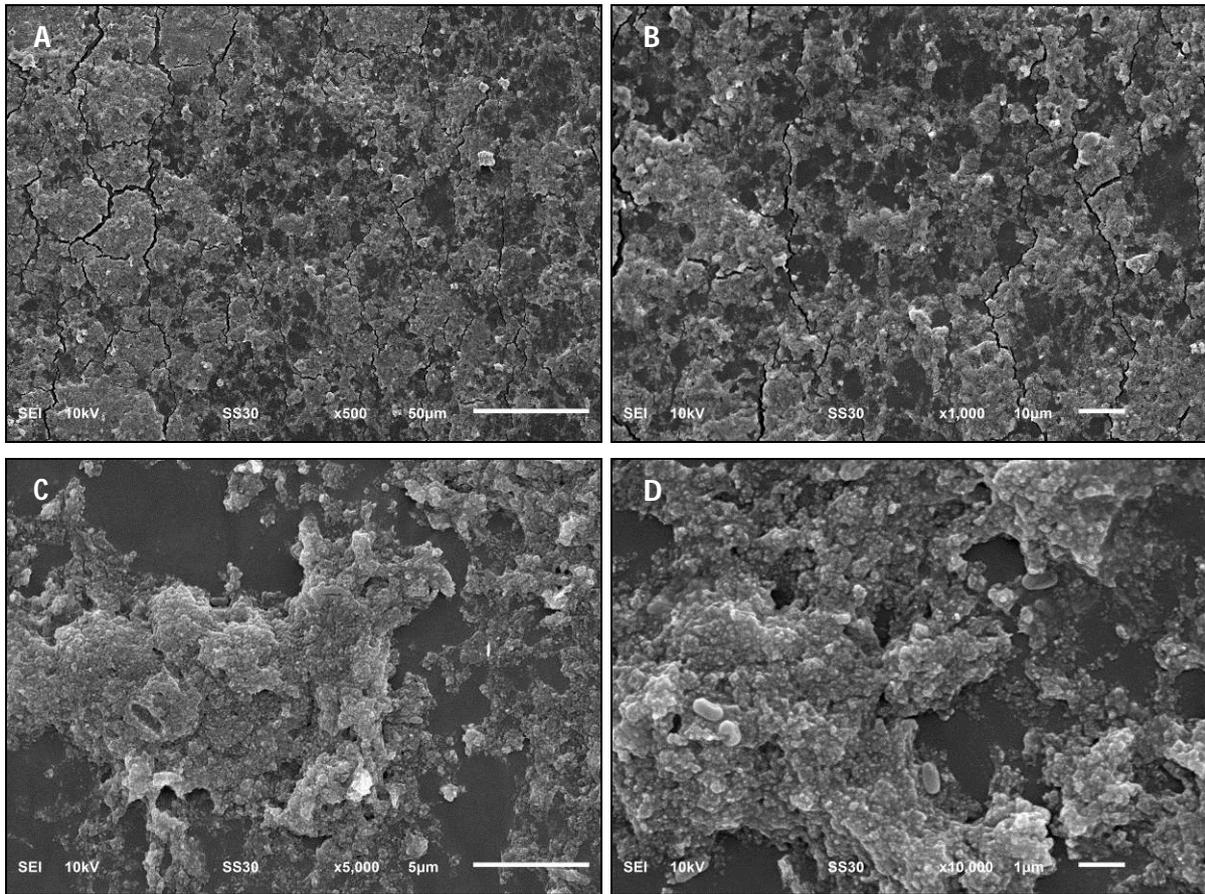


Abbildung 34: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 2 Jahre alten Biofilms auf Silikonoberfläche nach 117 Tagen Behandlung mit Chlordioxid. A) 500x Vergrößerung; B) 1000x Vergrößerung; C) 5000x Vergrößerung; D) 10000x Vergrößerung

3.2.2 Subletale Dosierung von chemischen Desinfektionsmitteln in kontinuierlicher Behandlung von Biofilmen

In dieser Untersuchungsreihe wurden Biofilme des Silikonschlauchmodells kontinuierlich mit gering dosiertem Desinfektionsmittel behandelt. Die Konzentration betrug bei Zudosierung in allen Fällen 0,15 mg/l Chlor und lag damit bei 50% der nach TrinkwV §11 zugelassenen Konzentration.

3.2.2.1 Prüfprodukt 4: Natriumhypochlorit

Das verwendete Natriumhypochlorit entstammt einer Vorlage. Die Konzentration wurde durch die Zudosierungsanlage eingestellt und entsprechend zudosiert (s. Abschnitt 2.1.13b). Die Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten und die der Gesamtzellzahl erfolgten in der Regel alle 7 Tage. Abbildung 35 zeigt den zeitlichen Ablauf der Zudosierung über den Untersuchungszeitraum von 130 Tagen. Ausgesetzt wurde die Behandlung nach dem 20. Tag bis zum 54. Tag und nach dem 81 bis zum 104. Tag. Der Versuch wurde mit drei gleichalten Biofilmen (ca. 2 Jahre) des Silikonschlauchmodells durchgeführt.

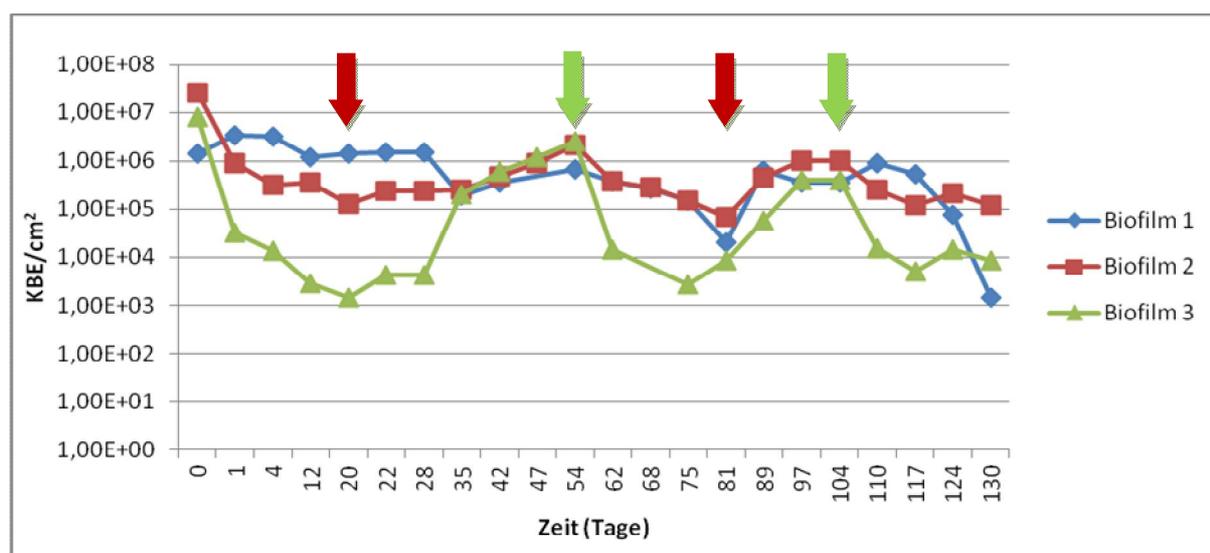


Abbildung 35: Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten während eine kontinuierlichen Behandlung mit Natriumhypochlorit mit einer Konzentration von 0,15 mg/l. Roter Pfeil = Stopp der Zudosierung. Grüner Pfeil = Start der Zudosierung.

Tabelle 28 beschreibt die zeitliche Korrelation von koloniebildenden Einheiten und Gesamtzellzahl im Biofilm über den gesamten Untersuchungszeitraum von 130 Tagen. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte. Die anfängliche Anzahl koloniebildender Einheiten von ca. $1,2 \times 10^7$ lag beim ersten Aussetzen der Zudosierung bei durchschnittlich ca. $5,3 \times 10^5$ KBE. Die Gesamtzellzahl wurde im gleichen Zeitraum von ca. $3,9 \times 10^7$ auf ca. $1,6 \times 10^7$ Zellen reduziert. Nach insgesamt 54 Tagen wurde die Zudosierung erneut aufgenommen. Die Anzahl koloniebildender Einheiten betrug zu diesem Zeitpunkt ca. $1,8 \times 10^6$ KBE. Die Gesamtzellzahl stieg im gleichen Zeitraum auf ca. $2,8 \times 10^7$ Zellen. Am 81. Tag wurde die Zudosierung bei einem KBE Wert von ca. $3,3 \times 10^4$ Zellen erneut ausgesetzt. Die Gesamtzellzahl wurde im gleichen Zeitraum auf ca. $1,1 \times 10^7$ reduziert. Ab Tag 104 wurde mit der

Zudosierung bei Werten von ca. $5,9 \times 10^5$ (KBE) und ca. $1,7 \times 10^7$ (GZZ) erneut begonnen. Mit Ende der Behandlung lagen die Werte bei ca. $4,4 \times 10^4$ (KBE) und ca. $9,3 \times 10^6$ (GZZ).

Tabelle 28: Auflistung des zeitlichen Verlaufs der koloniebildenden Einheiten und der Gesamtzellzahl

Zeit (Tage)	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
0	$1,18 \times 10^7$	$3,91 \times 10^7$
1	$1,43 \times 10^6$	$4,66 \times 10^7$
4	$1,19 \times 10^6$	$5,25 \times 10^7$
12	$5,13 \times 10^5$	$2,26 \times 10^7$
20	$5,34 \times 10^5$	$1,56 \times 10^7$
22	$6,02 \times 10^5$	$1,14 \times 10^7$
28	$6,02 \times 10^5$	$2,39 \times 10^7$
35	$2,16 \times 10^5$	$2,16 \times 10^7$
42	$4,73 \times 10^5$	$4,87 \times 10^7$
47	$1,07 \times 10^6$	$3,02 \times 10^7$
54	$1,77 \times 10^6$	$2,81 \times 10^7$
62	$2,65 \times 10^5$	$9,24 \times 10^6$
68	$2,84 \times 10^5$	$2,40 \times 10^7$
75	$1,01 \times 10^5$	$1,39 \times 10^7$
81	$3,28 \times 10^4$	$1,06 \times 10^7$
89	$3,88 \times 10^5$	$2,78 \times 10^7$
97	$5,90 \times 10^5$	$9,86 \times 10^6$
104	$5,90 \times 10^5$	$1,86 \times 10^7$
110	$3,86 \times 10^5$	$2,14 \times 10^7$
117	$2,19 \times 10^5$	$1,92 \times 10^7$
124	$1,02 \times 10^5$	$1,02 \times 10^7$
130	$4,37 \times 10^4$	$9,25 \times 10^6$
Gesamtreduktion	$1,176 \times 10^7$	$2,985 \times 10^7$

Nach Abschluss der Behandlung mit Natriumhypochlorit wurden, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, Reinkulturen der verbleibenden Biofilmpopulationen erstellt, deren 16s-rDNA in einer quantitativer real-time PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Hier dargestellt für Natriumhypochlorit. Tabelle 29 zeigt eine Übersicht über die isolierten Stämme.

Tabelle 29: Liste aller nach der Behandlung mit Natriumhypochlorit durch Sequenzierung ermittelten Stämme. Zusätzlich angegeben sind die Zugehörigkeit zu einer phylogenetischen Gruppe, die ermittelte prozentuale Sequenzübereinstimmung und die Risikogruppe. k.A. = keine Angaben. Fettgedruckt = bereits im unbehandelten Biofilm gefundenen Stämme.

Gattung/ Art	Stamm	Phylogenetische Gruppe	Sequenzübereinstimmung(%)	Risiko-gruppe
<i>Mycobacterium llutzerense</i>	MG18	Actinobacteria	98	k.A.
<i>Mycobacterium sp.</i>	M060824-8	Actinobacteria	98	k.A.
<i>Mycobacterium phocaicum</i>	BCMUCO06711	Actinobacteria	98	2
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	PM1	β-Proteobacteria	98	1
<i>Methylibium sp.</i>	BAC199	β-Proteobacteria	99	k.A.
<i>Polaromonas sp.</i>	BAC23	β-Proteobacteria	98	k.A.
<i>Sphingomonadaceae bac</i>	65	α-Proteobacteria	98	k.A.
<i>Sphingomonas kaistensis</i>	PB56	α-Proteobacteria	98	1
<i>Sphingopyxis sp.</i>	DNG2	α-Proteobacteria	97	k.A.
<i>Sphingopyxis sp.</i>	KW066	α-Proteobacteria	98	k.A.
<i>Aquatic bacterium</i>	R1-B9	k.A.	99	k.A.
<i>Uncultured bacterium clone</i>	LIB051	k.A.	99	k.A.

In Abbildung 36 dargestellt ist die Aufteilung der nach der Behandlung im Biofilm kultivierbaren Bakterien in ihre Zugehörigkeit zu einer phylogenetischen Gruppe.

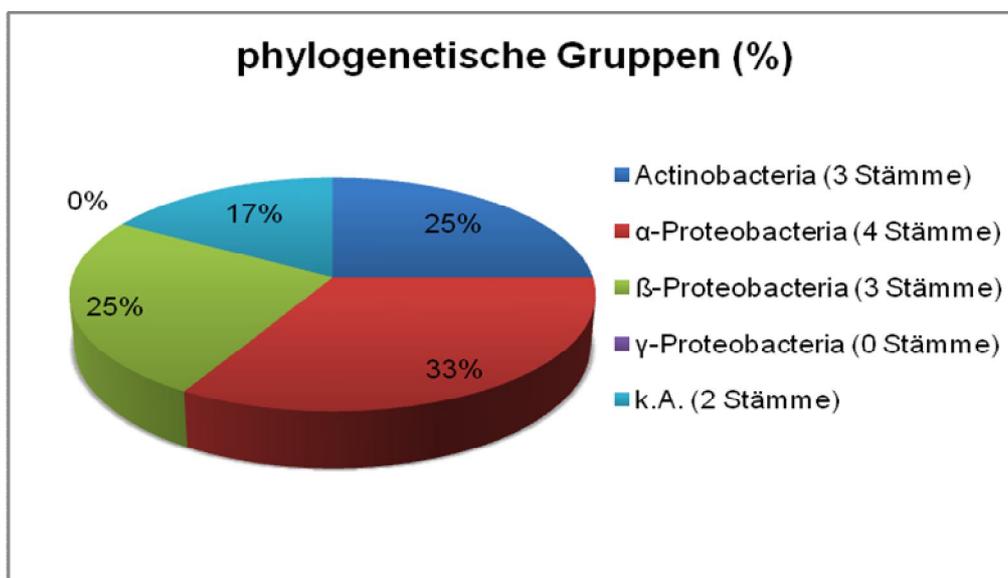


Abbildung 36: Die prozentuale Aufteilung in phylogenetische Gruppen aller kultivierbaren und sequenzierten Stämme nach der Behandlung mit Natriumhypochlorit für 130 Tage.

In Abbildung 37 ist die Aufteilung in Risikogruppen der verbleibenden Stämme nach der Behandlung mit Natriumhypochlorit abgebildet. Je ein Viertel können den Gruppen der Actinobacteria und Betaproteobacteria zugeordnet werden. Ein Drittel gehört der Gruppe der Alphaproteobacteria an. Der Rest kann nicht eindeutig zugeordnet werden.

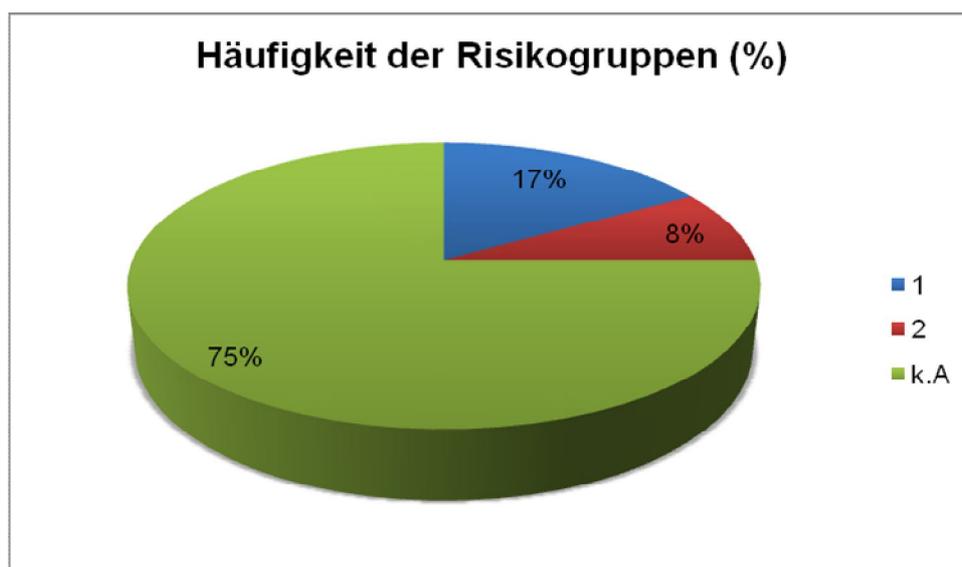


Abbildung 37: Prozentuale Aufteilung der Isolate auf Risikogruppen nach der Behandlung mit Natriumhypochlorit für 130 Tage. k.A. = keine Angabe.

Abbildung 38 zeigt die Oberflächenbeschaffenheit des Biofilms nach Abschluss der Behandlung. Nach der diskontinuierlichen Behandlung über einen Zeitraum von 126 Tagen zeigt sich in der 500fachen Vergrößerung eine vollständig mit Biofilm bedeckte Oberfläche des Silikonschlauchs (s. Abb. 38 A). Die bei 1000facher Vergrößerung sichtbaren Lücken in der Biofilmmatrix sind bei der Präparation der Biofilme entstehende Trocknungsrisse (s. Abb. 38 B). Bei 5000facher Vergrößerung wird die Schichtdicke des Biofilms im Verhältnis zur Silikonschlauchoberfläche sichtbar (s. Abb. 38 C). Bei 10.000facher Vergrößerung werden die in der Biofilmmatrix eingebetteten Bakterien sichtbar (s. Abb. 38 D).

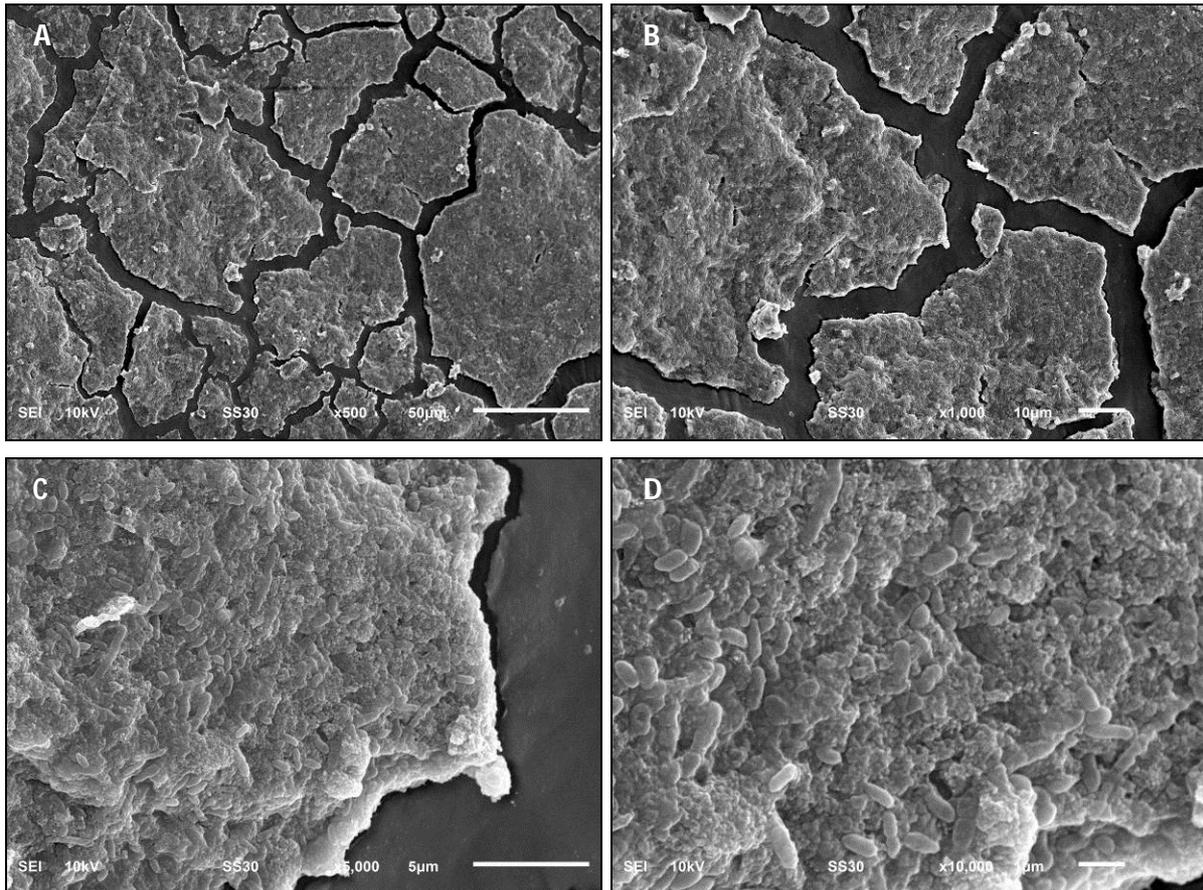


Abbildung 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 2 Jahre alten Biofilms auf Silikonoberfläche nach Behandlung mit Natriumhypochlorit. A) 500x Vergrößerung; B) 1000x Vergrößerung; C) 5000x Vergrößerung; D) 10000x Vergrößerung

3.2.2.2 Prüfprodukt 2: freies Chlor aus Verfahren zur Herstellung von elektrochemisch aktiviertem Wasser (ECA-Verfahren 1)

Das verwendete ECA-Produkt wurde im pH-neutralen Bereich hergestellt (pH 7). Hauptwirkstoff bei diesem durch Zellmembranelektrolyse hergestelltem Desinfektionsmittel ist hypochlorige Säure, die als freies Chlor messbar ist. Das ECA-Produkt wurde vor Ort frisch aus Wasser und einer Salzsole hergestellt. Die Neutralisation erfolgte jeweils nach Abschluss der Behandlung mit 0,3% Natriumthiosulfat.

Abbildung 39 zeigt den zeitlichen Ablauf der Zudosierung über den Untersuchungszeitraum von 126 Tagen. Ausgesetzt wurde die Behandlung zwischen dem 70. Tag und dem 105. Tag. Der Versuch wurde mit drei gleichalten Biofilmen (ca. 2 Jahre) des Silikonschlauchmodells durchgeführt.

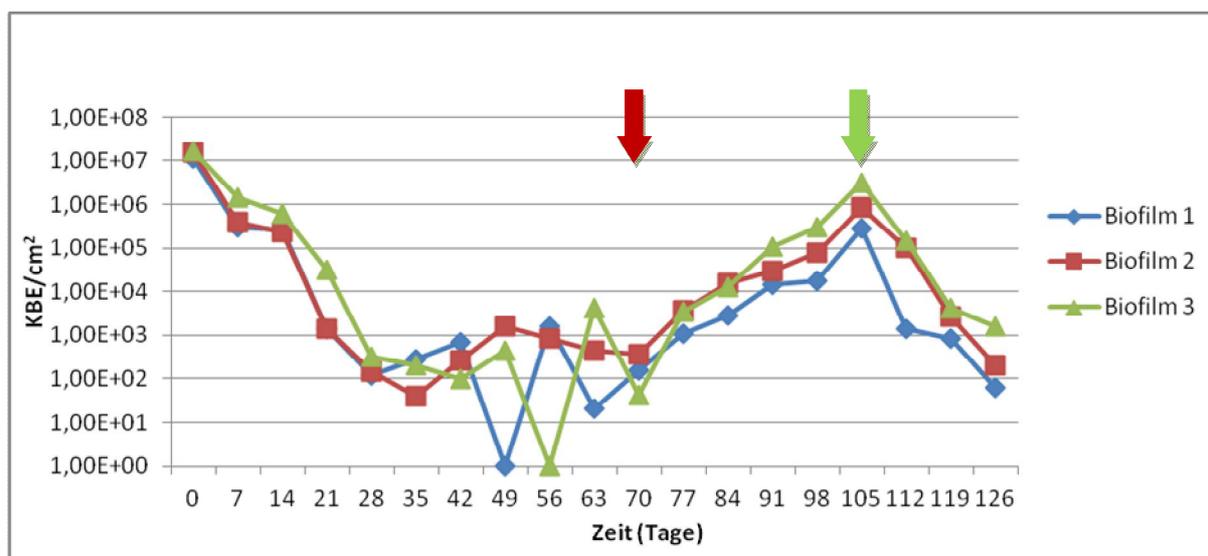


Abbildung 39: Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten während eine kontinuierlichen Behandlung mit freiem Chlor (ECA-Verfahren) mit einer Konzentration von 0,15 mg/l (Durchschnittswerte). Roter Pfeil = Stopp der Zudosierung. Grüner Pfeil = Start der Zudosierung.

Tabelle 30 beschreibt die zeitliche Korrelation von koloniebildenden Einheiten und Gesamtzellzahl im Biofilm über den gesamten Untersuchungszeitraum von 126 Tagen. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte. Die anfängliche Anzahl koloniebildender Einheiten von ca. $1,4 \times 10^7$ lag beim ersten Aussetzen der Zudosierung bei durchschnittlich ca. $1,9 \times 10^2$ Zellen. Die Gesamtzellzahl wurde im gleichen Zeitraum von ca. $6,3 \times 10^7$ auf ca. $4,5 \times 10^6$ Zellen reduziert. Nach insgesamt 105 Tagen wurde die Zudosierung erneut aufgenommen. Die Anzahl koloniebildender Einheiten betrug zu diesem Zeitpunkt ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen. Die Gesamtzellzahl stieg im gleichen Zeitraum auf ca. $7,5 \times 10^6$ Zellen. Mit Ende der Behandlung lagen die Werte bei ca. $6,2 \times 10^2$ (KBE) und ca. $8,3 \times 10^5$ (GZZ).

Tabelle 30: Auflistung des zeitlichen Verlaufs der koloniebildenden Einheiten und der Gesamtzellzahl

Zeit (Tage)	KBE/cm ²	GZZ/cm ²
0	1,43x10 ⁷	6,25x10 ⁷
7	7,01x10 ⁵	4,75x10 ⁷
14	3,71x10 ⁵	4,49x10 ⁷
21	1,12x10 ⁴	8,64x10 ⁶
28	1,97x10 ²	5,34x10 ⁶
35	1,73x10 ²	4,72x10 ⁶
42	3,52x10 ²	6,12x10 ⁶
49	9,99x10 ²	4,35x10 ⁶
56	1,22x10 ³	8,26x10 ⁵
63	1,61x10 ³	3,61x10 ⁶
70	1,86x10 ²	4,47x10 ⁶
77	2,76x10 ³	5,23x10 ⁶
84	1,02x10 ⁴	7,83x10 ⁶
91	4,98x10 ⁴	6,97x10 ⁶
98	1,31x10 ⁵	6,21x10 ⁶
105	1,46x10 ⁶	7,49x10 ⁶
112	8,25x10 ⁴	3,65x10 ⁶
119	2,59x10 ³	1,93x10 ⁶
126	6,16x10 ²	8,29x10 ⁵
Gesamtreduktion	1,4299x10 ⁷	6,17x10 ⁷

3.3 Untersuchungsmodelle zur Einnistung von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilme

Ziel dieser Untersuchungsreihe war es die Einnistung von *Pseudomonas aeruginosa* (s. Abb. 40) in verschiedene Biofilmmodelle, basierend auf dem Silikonschlauchmodell des IHPH, zu dokumentieren und den Verbleib des Zielorganismus, sowie seine Kultivierbarkeit mit kulturellen und seine Gesamtzellzahl und Viabilität mit molekularbiologischen Methoden über den zeitlichen Verlauf einer Zudosierung darzustellen. Vergleichend wurden die Anzahl koloniebildender Einheiten auf R2A und die Entwicklung der Gesamtzellzahl im Biofilm mittels quantitativer real-time PCR dokumentiert. Die Einnistung erfolgte im Kreislaufmodell (s. Abschnitt 2.1.13a)

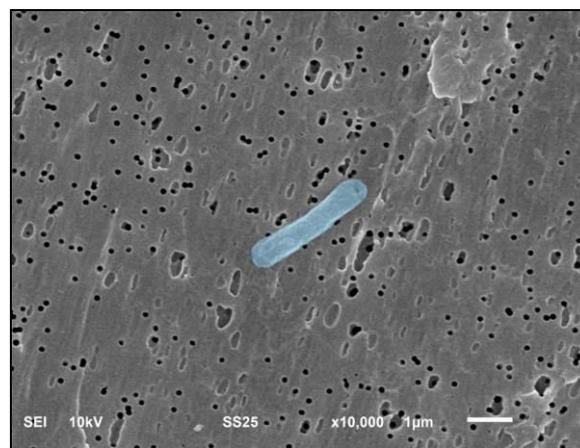


Abbildung 40: Zielorganismus *P. aeruginosa* (ATCC 15442) auf Filtern (0,2 µm Porengröße (farblich hervorgehoben)).

3.3.1 Untersuchung des Silikonschlauchmodells auf natürliches Vorkommen des Zielorganismus

Ziel dieser Untersuchung war die mögliche Detektion von *P. aeruginosa* im Biofilm mittels quantitativer real-time PCR ohne vorherige künstliche Einnistung. Der Versuch diente der Bestimmung eines möglichen Hintergrundrauschens durch den unter Umständen natürlich im Biofilm vorkommenden Zielorganismus. Damit nach einer gezielten Einnistung von *P. aeruginosa* der Erfolg der Einnistung besser in Relation gesetzt werden kann.

Dargestellt ist der Verlauf einer real-time PCR für den spezifischen Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilmen des Silikonschlauchmodells. Neben einer Negativkontrolle sind Biofilme unterschiedlichen Alters jeweils im dreifachen Ansatz getestet worden. Das Alter der Biofilme betrug 1, 2 und 3 Jahre. Der Abbildung kann entnommen werden, dass *P. aeruginosa* nicht im Biofilm der autochthonen Trinkwasserflora am IHPH vorkommt (s. Abb. 41). Keine der Proben zeigt einen Anstieg in der Fluoreszenz, der mit der Vervielfältigung von DNA des vorhandenen Zielorganismus gleichzusetzen wäre. Aufgrund einer Nachweisgrenze von ca. 1×10^1 bis 3×10^1 Zellen wäre *P. aeruginosa* demnach nur in sehr geringen Konzentrationen oder überhaupt nicht im Trinkwasserbiofilm des Silikonschlauchmodells des IHPH vorhanden.

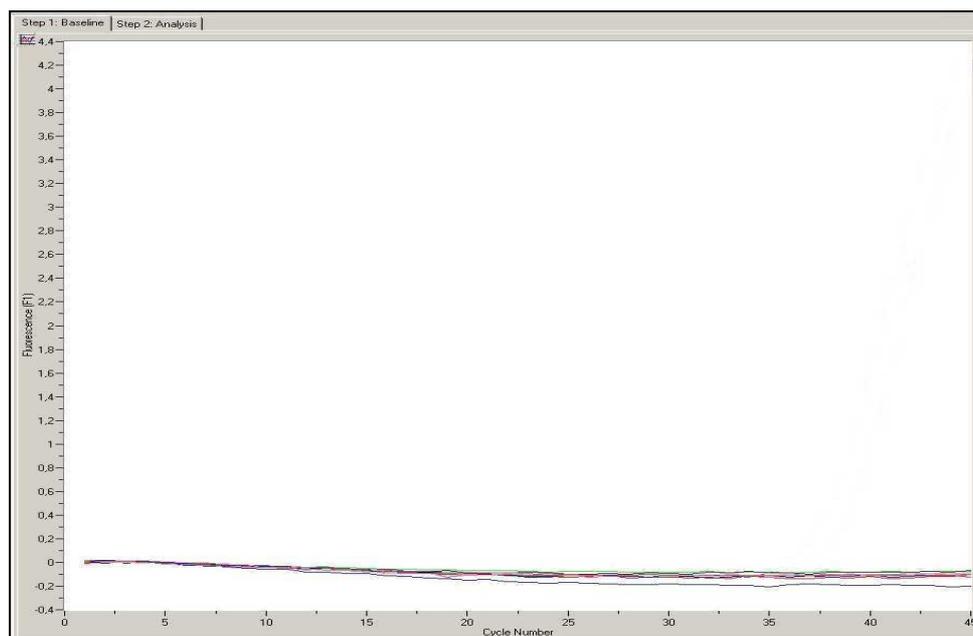


Abbildung 41: Darstellung der während der real-time PCR gemessenen Fluoreszenz für einen gezielten Nachweis von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen verschiedenen Alters (1, 2, und 3 Jahre alt).

3.3.2 Einnistung von *P. aeruginosa* in Modellbiofilme

In dieser Untersuchungsreihe wurden mehrere Ansätze verfolgt. In einem ersten Schritt wurden Biofilme im Kreislaufsystem (s. Abschnitt 2.1.13a) mit dem Zielorganismus *P. aeruginosa* versetzt um dessen Einnistung in den Biofilm zu forcieren.

Im Folgenden wurden diese Biofilme wöchentlich mittels einer Stossbehandlung zur Anlagendesinfektion einem Desinfektionsmittel ausgesetzt. Durch den Einsatz von Selektivnährmedien (R2A-Agar, Cetrimid-Agar s. Abschnitt 2.1.6) sollte gezeigt werden, ob *P. aeruginosa* im Biofilm seine Kultivierbarkeit behält. Der Einsatz von quantitativer real-time PCR sollte seinen Verbleib im Biofilm dokumentieren. Mittels PNA-FISH sollte bei ausbleibender Kultivierbarkeit und positivem qPCR-Nachweis dargestellt werden, ob der Zielorganismus weiterhin über einen nachweisbaren Stoffwechsel in Form von Proteinbiosynthese verfügt. Parallel wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten mittels heterotrophic plate count bestimmt und durch eine quantitative real-time PCR die Gesamtzellzahl der vorhandenen Bakterien bestimmt.

3.3.2.1 Modellbiofilm A – Übersicht

Modellbiofilm A wurde eigens für die Untersuchungen im Silikonschlauchmodell generiert. Das Kreislaufmodell wurde dafür mit einem sterilen Silikonschlauch bestückt mit ca. 5×10^6 Zellen *Pseudomonas aeruginosa* und 1×10^7 Zellen einer Bakteriensuspension der kulturell am häufigsten auftretenden Arten angeimpft. Die Liste der verwendeten Bakterien kann der folgenden Tabelle entnommen werden (s. Tabelle 31). Die Versuchsdurchführung erfolgte bei Raumtemperatur.

Tabelle 31: Liste der für die Anzucht eines künstlichen Biofilms verwendeten Bakterienstämme.

Gattung/ Art	Stamm	Phylogenetische Gruppe
<i>Acidovorax facilis</i>	C3RO1	β-Proteobacteria
<i>Methylibium sp.</i>	PM5	β-Proteobacteria
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	PM1	β-Proteobacteria
<i>Polaromonas sp.</i>	BAC23	β-Proteobacteria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939/ ATCC 15442	γ-Proteobacteria
<i>Ralstonia pickettii</i>	BGS2	β-Proteobacteria
<i>Sphingobium amiense</i>	T3AP11	α-Proteobacteria
<i>Sphingomonas sp.</i>	SRS2	α-Proteobacteria
<i>Sphingopyxis wifflariensis</i>	W-50	α-Proteobacteria

Abbildung 42 zeigt den zeitlichen Verlauf der KBE's und qPCR's für Modellbiofilm A. Abgebildet sind die Ergebnisse der qPCR für die Gesamtzellzahl (lila) und *P. aeruginosa* (blau). Gleichzeitig abgebildet sind die Anzahlen der koloniebildenden Einheiten auf R2A-Agar (grün) und für *P. aeruginosa* auf Cetrimid-Agar (rosa). Der Versuchszeitraum betrug 115 Tage.

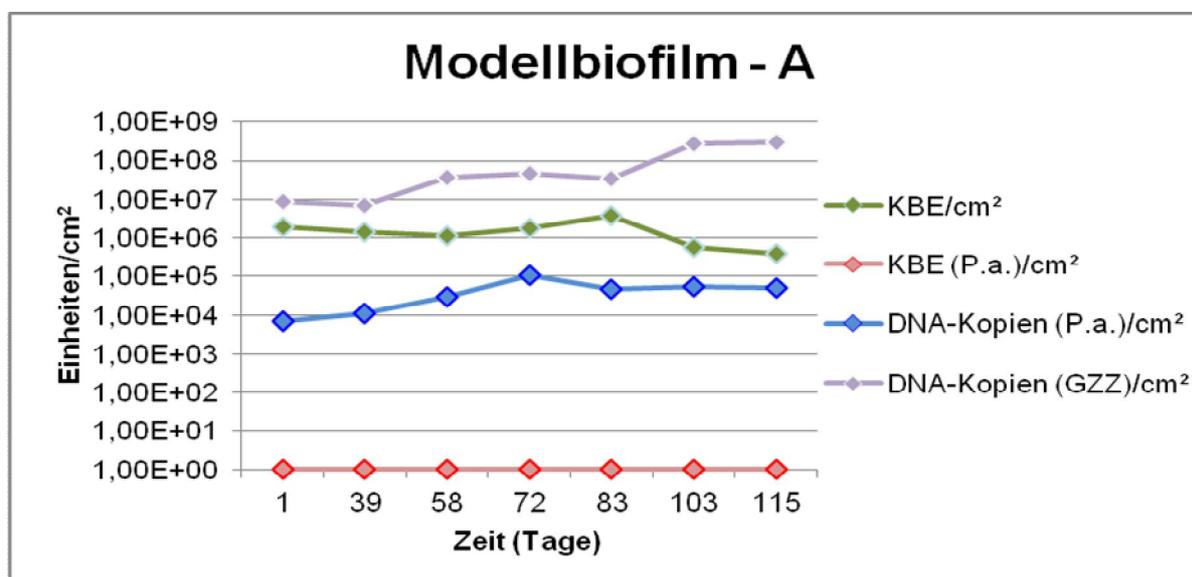


Abbildung 42: Grafische Darstellung des Verlaufs der Kultivierbarkeit von Trinkwasserbakterien (grün) und *P. aeruginosa* (rosa) und dem qPCR-Nachweis für die Gesamtzellzahl (lila) und *P. aeruginosa* (blau).

Tabelle 32 zeigt die Untersuchungsergebnisse zur Anzahl der KBE/cm² so wie die der Genomkopien/cm². Über den zeitlichen Verlauf betrachtet zeigt sich, dass die Anzahl koloniebildender Einheiten von anfänglichen ca. 2,0x10⁶ auf ca. 3,9x10⁵ Zellen/cm² Biofilm reduziert wird. Im gleichen Zeitraum ist ein Anstieg der GZZ mittels qPCR von ca. 9,1x10⁶ auf ca. 3,0x10⁸ Zellen/cm² zu beobachten. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *P. aeruginosa* ist nach der ersten Zudosierung über den gesamten Versuchszeitraum gleich Null. Gleichzeitig schwankt der Wert der mittels qPCR nachgewiesenen Genomkopien/cm² Biofilm zwischen anfänglich ca. 6,7x10³ und maximal ca. 1,1x10⁵. Der Nachweis auf Proteinbiosynthese für *Pseudomonas aeruginosa* mittels PNA-FISH war über den gesamten Versuchszeitraum positiv.

Tabelle 32: Anzahl kultivierbarer Einheiten auf R2A- und Cetrimid-Agar, so wie den Nachweis mittels qPCR

Modellbiofilm - A	KBE/cm ²		Genomkopien/cm ²		
	Tag	R2A	<i>P. aeruginosa</i>	GZZ	<i>P. aeruginosa</i>
	1	1,97x10 ⁶	0	9,11x10 ⁶	6,70x10 ³
	39	1,43x10 ⁶	0	7,26x10 ⁶	1,07x10 ⁴
	58	1,12x10 ⁶	0	3,79x10 ⁷	2,91x10 ⁴
	72	1,72x10 ⁶	0	4,54x10 ⁷	1,11x10 ⁵
	83	3,88x10 ⁶	0	3,39x10 ⁷	4,77x10 ⁴
	103	5,73x10 ⁵	0	2,66x10 ⁸	5,49x10 ⁴
	115	3,91x10 ⁵	0	2,96x10 ⁸	4,90x10 ⁴

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Modellbiofilms A ist die weitestgehend geschlossene Biofilmmatrix zu erkennen (s. Abb. 43 A). Die heterogene Entwicklung des Biofilms zeigt sich durch die unterschiedliche Schichtdicke (s. Abb. 43 B) und die teilweise noch erkennbaren Makrokolonien die in der Biofilmmatrix noch auszumachen sind. Ab einer 5000fachen Vergrößerung sind vermehrt freiliegende Zellen auszumachen (s. Abb. 43 C und D).

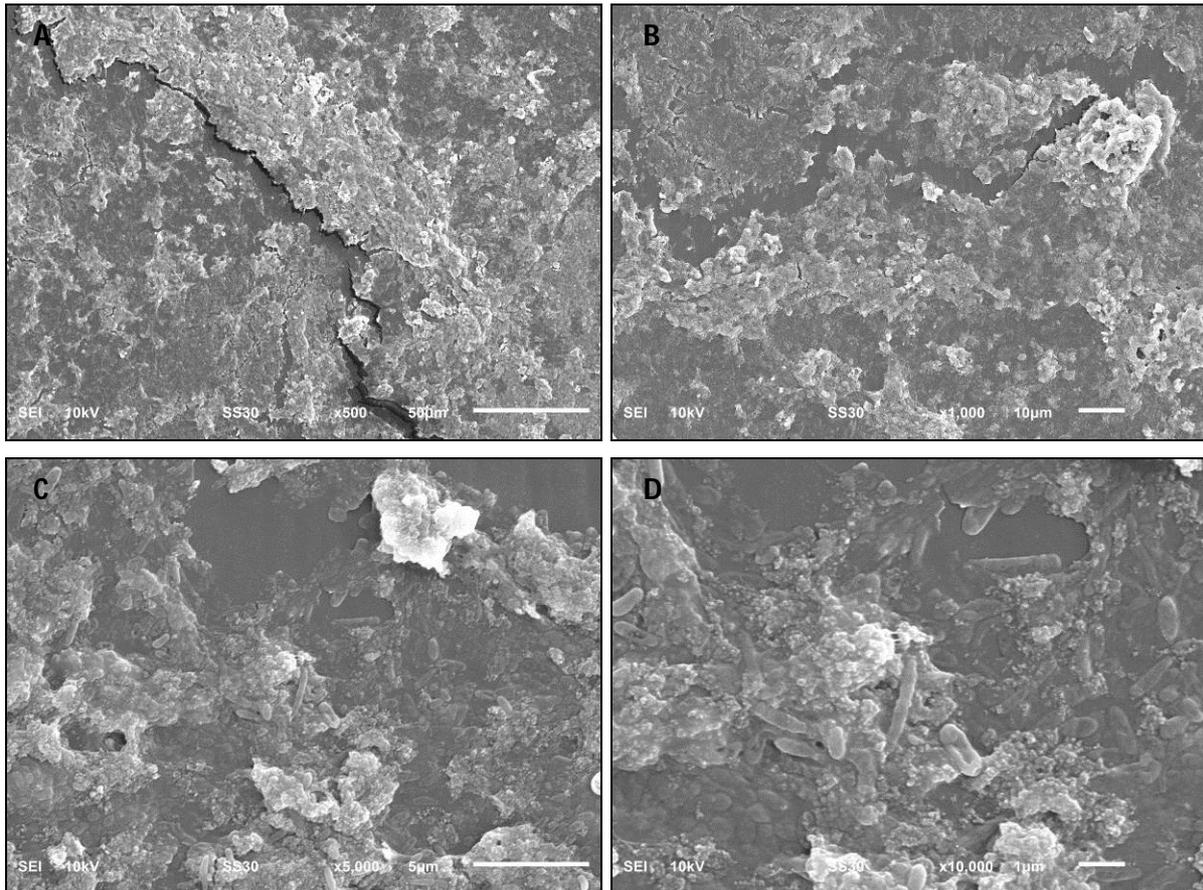


Abbildung 43: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Modellbiofilms A auf der Silikonoberfläche nach Abschluss der Behandlung. A) 500x Vergrößerung; B) 1000x Vergrößerung; C) 5000x Vergrößerung; D) 10000x Vergrößerung

3.3.2.2 Modellbiofilm B – Übersicht

Für die Einnistungsuntersuchungen in Modellbiofilm B wurde ein bestehender Trinkwasserbiofilm des Silikonschlauchmodells verwendet. Das Kreislaufmodell wurde dafür mit einem Silikonschlauch mit einem drei Jahre alten Biofilm bestückt und ca. 5×10^6 Zellen *Pseudomonas aeruginosa* angeimpft. Die Versuchsdurchführung erfolgte bei Raumtemperatur.

Abbildung 44 zeigt den zeitlichen Verlauf der KBE's und qPCR's für Modellbiofilm B. Abgebildet sind die Ergebnisse der qPCR für die Gesamtzellzahl (lila) und *P. aeruginosa* (blau). Gleichzeitig abgebildet sind die Anzahlen der koloniebildenden Einheiten auf R2A-Agar (grün) und für *P. aeruginosa* auf Cetrimid-Agar (rosa). Der Versuchszeitraum betrug 115 Tage.

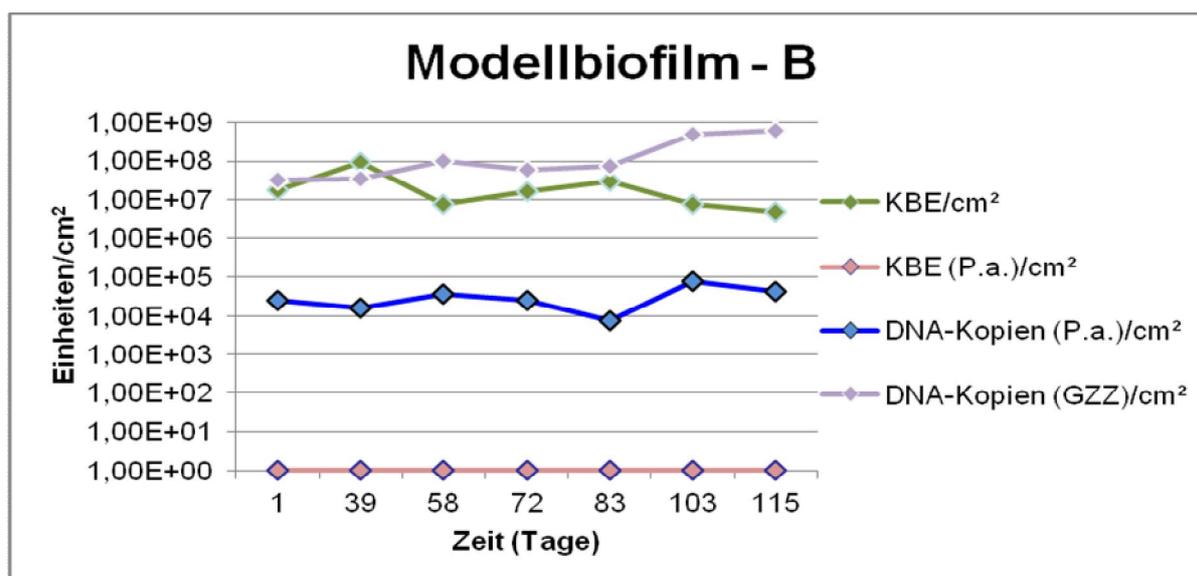


Abbildung 44: Grafische Darstellung des Verlaufs der Kultivierbarkeit von Trinkwasserbakterien (grün) und *P. aeruginosa* (rosa) und dem qPCR-Nachweis für die Gesamtzellzahl (lila) und *P. aeruginosa* (blau).

Tabelle 33 zeigt die Untersuchungsergebnisse zur Anzahl der KBE/cm² so wie die der Genomkopien/cm². Die Anzahl koloniebildender Einheiten über den zeitlichen Verlauf betrachtet zeigt, dass von den zu Beginn vorhandenen ca. $1,7 \times 10^7$ Zellen/cm² nach Abschluss des Behandlungszeitraums noch ca. $5,0 \times 10^6$ Zellen/cm² Biofilm verbleiben. Im gleichen Zeitraum ist ein Anstieg der GZZ mittels qPCR von ca. $3,3 \times 10^7$ zu Beginn auf ca. $6,0 \times 10^8$ Zellen/cm² nach Abschluss der Untersuchung zu beobachten. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *P. aeruginosa* ist nach der ersten Zudosierung über den gesamten Versuchszeitraum kulturell nicht nachweisbar d.h. gleich Null. Gleichzeitig schwankt der Wert der mittels qPCR nachgewiesenen Genomkopien/cm² Biofilm für *P. aeruginosa* zwischen anfänglich ca. $2,6 \times 10^4$ und ca. $4,2 \times 10^4$ nach Ende der Untersuchung. Der Nachweis auf Proteinbiosynthese für *P. aeruginosa* mittels PNA-FISH war über den gesamten Versuchszeitraum positiv.

Tabelle 33: Anzahl kultivierbarer Einheiten auf R2A- und Cetrimid-Agar, so wie den Nachweis mittels qPCR.

Modellbiofilm - B	KBE/cm ²		Genomkopien/cm ²	
	R2A	<i>P. aeruginosa</i>	GZZ	<i>P. aeruginosa</i>
1	$1,69 \times 10^7$	0	$3,31 \times 10^7$	$2,55 \times 10^4$
39	$9,12 \times 10^7$	0	$3,42 \times 10^7$	$1,64 \times 10^4$
58	$7,68 \times 10^6$	0	$9,70 \times 10^7$	$3,55 \times 10^4$
72	$1,64 \times 10^7$	0	$5,95 \times 10^7$	$2,58 \times 10^4$
83	$2,90 \times 10^7$	0	$7,34 \times 10^7$	$7,63 \times 10^3$
103	$7,55 \times 10^6$	0	$4,98 \times 10^8$	$7,90 \times 10^4$
115	$4,95 \times 10^6$	0	$6,01 \times 10^8$	$4,21 \times 10^4$

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des 3 Jahre alten Biofilms (Modellbiofilm B) ist die im Vergleich sehr dicht bewachsene Oberfläche des Silikonschlauchs zu sehen (s. Abb. 45 A). An

denen durch Trocknung entstandenen Rissen in der Oberfläche des Biofilms, werden die Oberfläche des Silikonschlauchs und die Stärke der Schichtdicke sichtbar (s. Abb. 45 B)

Ab einer 5000fachen Vergrößerung wird die trotz der Behandlung mit Desinfektionsmitteln nur leicht angegriffene Oberfläche sichtbar. Freiliegende Bakterien können kaum ausgemacht werden (s. Abb. 45 C und D).

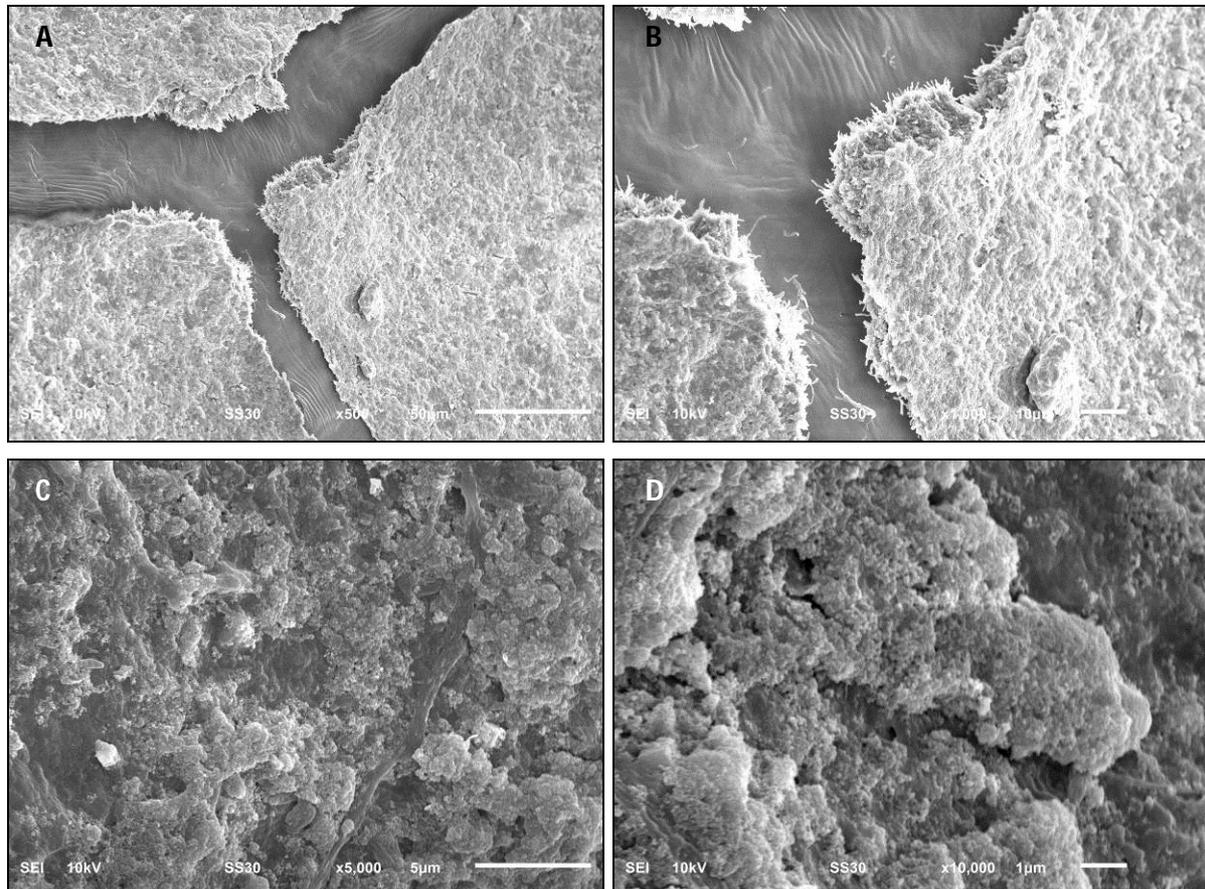


Abbildung 45: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 3 Jahre alten Biofilms auf Silikonoberfläche angeimpft mit *P. aeruginosa* [Modellbiofilm B] nach Abschluss der Behandlung. A) 500x Vergrößerung; B) 1000x Vergrößerung; C) 5000x Vergrößerung; D) 10000x Vergrößerung

3.3.2.3 Modellbiofilm C – Übersicht

Für die Einnistungsuntersuchungen in Modellbiofilm C wurde ein bestehender Trinkwasserbiofilm des Silikonschlauchmodells verwendet. Das Kreislaufmodell wurde dafür mit einem Silikonschlauch mit einem ein Jahr alten Biofilm bestückt und ca. 5×10^6 Zellen *P. aeruginosa* angeimpft. Die Versuchsdurchführung erfolgte bei Raumtemperatur.

Abbildung 46 zeigt den zeitlichen Verlauf der KBE's und qPCR's für Modellbiofilm C. Abgebildet sind die Ergebnisse der qPCR für die Gesamtzellzahl (lila) und *P. aeruginosa* (blau). Gleichzeitig abgebildet sind die Anzahlen der koloniebildenden Einheiten auf R2A-Agar (grün) und für *P. aeruginosa* auf Cetrimid-Agar (rosa). Der Versuchszeitraum betrug 115 Tage.

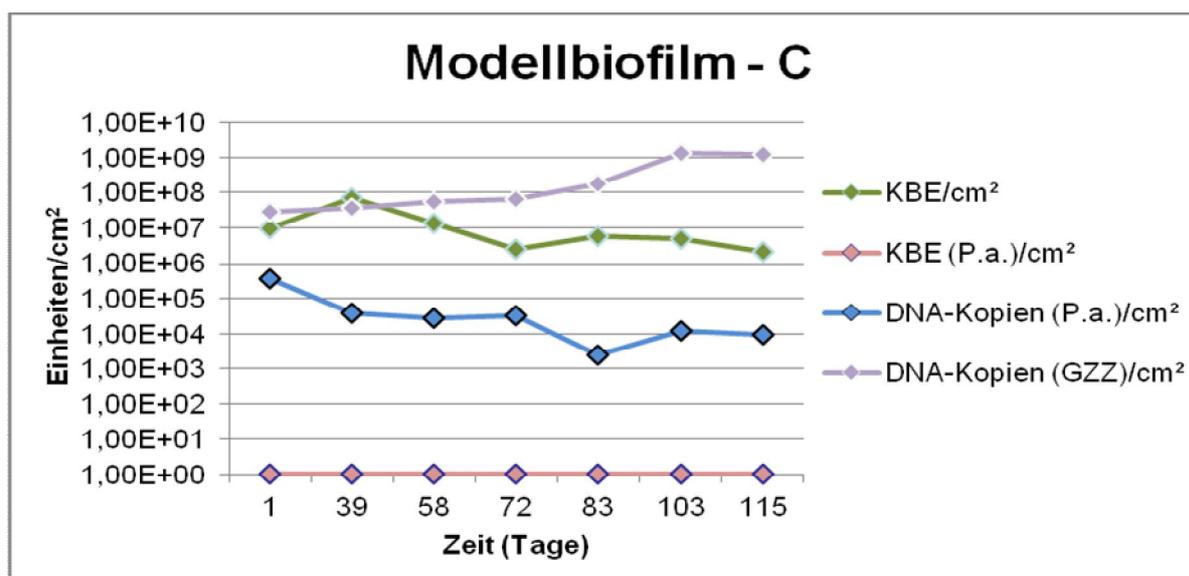


Abbildung 46: Grafische Darstellung des Verlaufs der Kultivierbarkeit von Trinkwasserbakterien (grün) und *P. aeruginosa* (rosa) und dem qPCR-Nachweis für die Gesamtzellzahl (lila) und *P. aeruginosa* (blau).

Tabelle 34 zeigt die Untersuchungsergebnisse zur Anzahl der KBE/cm² so wie die der Genomkopien/cm² im Biofilm über den zeitlichen Verlauf des 115 Tage dauernden Untersuchungszeitraums. Es zeigt sich, dass die Anzahl koloniebildender Einheiten von anfänglichen ca. $9,7 \times 10^6$ auf ca. $2,29 \times 10^6$ Zellen/cm² im Biofilm reduziert wird. Im gleichen Zeitraum ist ein Anstieg der GZZ mittels qPCR von ca. $2,9 \times 10^7$ auf ca. $1,2 \times 10^9$ Zellen/cm² zu beobachten. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *P. aeruginosa* ist nach der ersten Zudosierung über den gesamten Versuchszeitraum kulturell nicht nachweisbar d.h. gleich Null. Gleichzeitig schwankt der Wert der mittels qPCR nachgewiesenen Genomkopien/cm² für *P. aeruginosa* im Biofilm zwischen anfänglich ca. $3,7 \times 10^5$ und ca. $9,6 \times 10^3$ zum Ende der Untersuchung. Der Nachweis auf Proteinbiosynthese für *P. aeruginosa* mittels PNA-FISH war über den gesamten Versuchszeitraum positiv.

Tabelle 34: Anzahl kultivierbarer Einheiten auf R2A- und Cetrimid-Agar, so wie den Nachweis mittels qPCR

Modellbiofilm - C	KBE/cm ²		Genomkopien/cm ²	
	R2A	<i>P. aeruginosa</i>	GZZ	<i>P. aeruginosa</i>
1	9,68x10 ⁶	0	2,92x10 ⁷	3,65x10 ⁵
39	7,16x10 ⁷	0	3,50x10 ⁷	3,97x10 ⁴
58	1,32x10 ⁷	0	5,43x10 ⁷	2,69x10 ⁴
72	2,60x10 ⁶	0	6,32x10 ⁷	3,29x10 ⁴
83	5,60x10 ⁶	0	1,81x10 ⁸	2,49x10 ³
103	4,82x10 ⁶	0	1,31x10 ⁹	1,22x10 ⁴
115	2,21x10 ⁶	0	1,20x10 ⁹	9,55x10 ³

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des 1 Jahr alten Biofilms (Modellbiofilm C) ist die im Vergleich bereits dicht bewachsene Oberfläche des Silikonschlauchs zu sehen (s. Abb. 47 A). An denen durch Trocknung entstandenen Rissen in der Oberfläche des Biofilms, werden die Oberfläche des Silikonschlauchs und die Stärke der Schichtdicke sichtbar (s. Abb. 47 B)

Ab einer 5000fachen Vergrößerung wird die trotz der Behandlung mit Desinfektionsmitteln nur leicht angegriffene Oberfläche sichtbar. Trotz der größeren Schichtdicke im Vergleich zu Modellbiofilm A (s. Abb. 43) können im Gegensatz zu Modellbiofilm B (s. Abb. 45) vergleichsweise viele freiliegende Bakterien gesehen werden (s. Abb. 47 C und D).

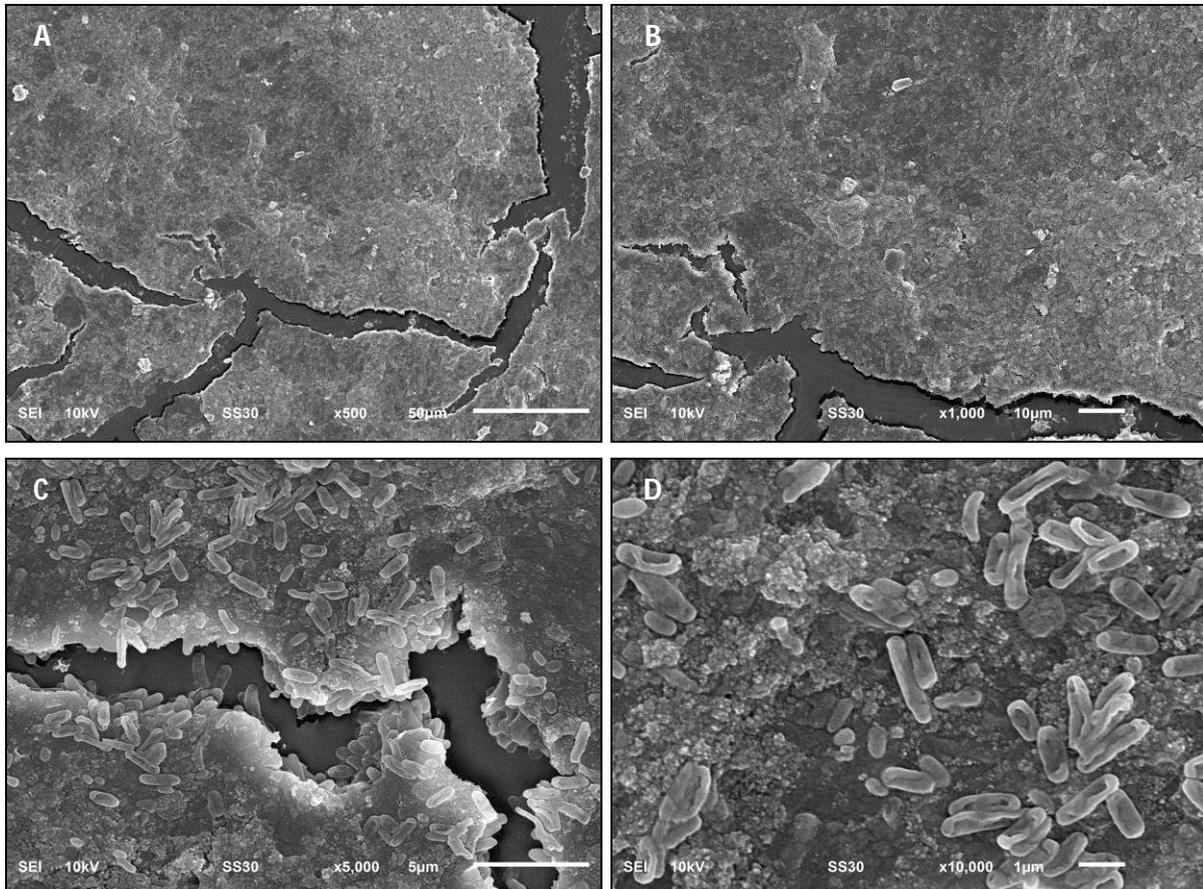


Abbildung 47: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 1 Jahr alten Biofilms auf Silikonoberfläche angeimpft mit *P. aeruginosa* [Modell C] nach Abschluss der Behandlung. A) 500x Vergrößerung; B) 1000x Vergrößerung; C) 5000x Vergrößerung; D) 10000x Vergrößerung

3.3.2.4 Modellbiofilm D – Übersicht

Für die Einnistungsuntersuchungen in Modellbiofilm D wurde ein bestehender Trinkwasserbiofilm des Silikonschlauchmodells verwendet. Das Kreislaufmodell wurde dafür mit einem Silikonschlauch mit einem ein Jahr alten Biofilm bestückt und ca. 5×10^6 Zellen *Pseudomonas aeruginosa* angeimpft. Die Versuchsdurchführung erfolgte bei 36 °C.

Abbildung 48 zeigt den zeitlichen Verlauf der KBE's und qPCR's für Modellbiofilm D. Abgebildet sind die Ergebnisse der qPCR für die Gesamtzellzahl (lila) und *P. aeruginosa* (blau). Gleichzeitig abgebildet sind die Anzahlen der koloniebildenden Einheiten auf R2A-Agar (grün) und für *P. aeruginosa* auf Cetrimid-Agar (rosa). Der Versuchszeitraum betrug 115 Tage.

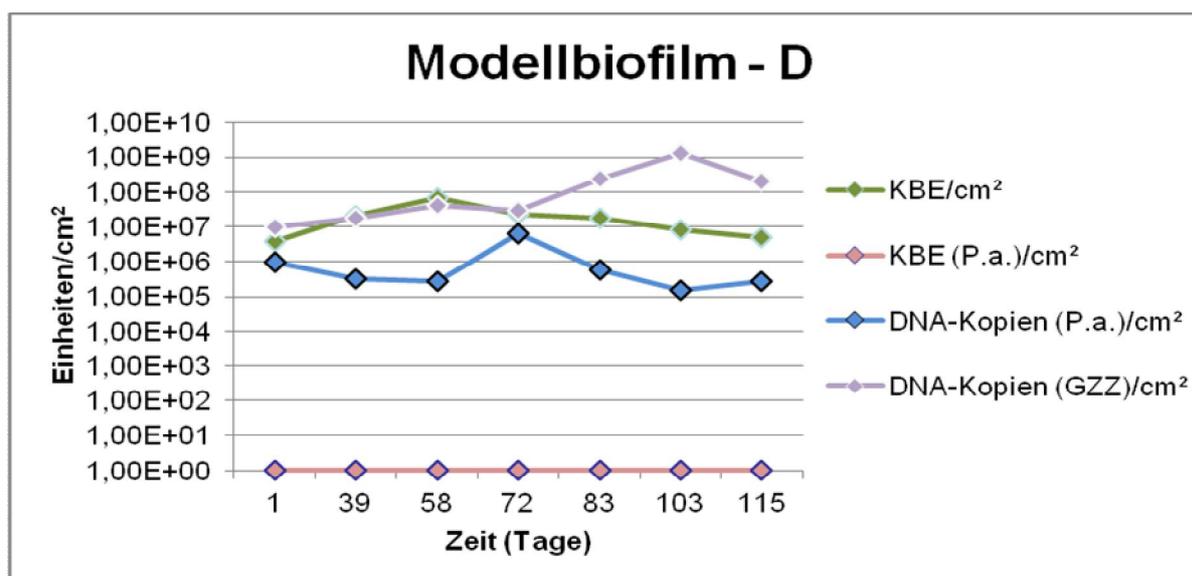


Abbildung 48: Grafische Darstellung des Verlaufs der Kultivierbarkeit von Trinkwasserbakterien (grün) und *P. aeruginosa* (rosa) und dem qPCR-Nachweis für die Gesamtzellzahl (lila) und *P. aeruginosa* (blau).

Tabelle 35 zeigt die Untersuchungsergebnisse zur Anzahl der KBE/cm² so wie die der Genomkopien/cm². Im zeitlichen Verlauf betrachtet zeigt sich, dass die Anzahl koloniebildender Einheiten auf R2A-Agar sich von anfänglichen ca. 3,7x10⁶ auf ca. 5,0x10⁶ Zellen/cm² Biofilm kaum verändert. Im gleichen Zeitraum ist ein Anstieg der GZZ mittels qPCR von ca. 9,8x10⁶ auf ca. 2,0x10⁸ Zellen/cm² zu beobachten. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *P. aeruginosa* ist nach der ersten Zudosierung über den gesamten Versuchszeitraum gleich Null. Gleichzeitig schwankt der Wert der mittels qPCR nachgewiesenen Genomkopien/cm² von *P. aeruginosa* im Biofilm zwischen minimal ca. 1,5x10⁵ und ca. 9,95x10⁵ kaum. Der Nachweis auf Proteinbiosynthese für *Pseudomonas aeruginosa* mittels PNA-FISH war über den gesamten Versuchszeitraum positiv.

Tabelle 35: Anzahl kultivierbarer Einheiten auf R2A- und Cetrimid-Agar, so wie den Nachweis mittels qPCR

Modellbiofilm - D	KBE/cm ²		Genomkopien/cm ²	
	R2A	<i>P. aeruginosa</i>	GZZ	<i>P. aeruginosa</i>
1	3,65x10 ⁶	0	9,84x10 ⁶	9,95x10 ⁵
39	2,10x10 ⁷	0	1,68x10 ⁷	3,14x10 ⁵
58	6,59x10 ⁷	0	3,89x10 ⁷	2,82x10 ⁵
72	2,27x10 ⁷	0	2,85x10 ⁷	6,25x10 ⁶
83	1,77x10 ⁷	0	2,47x10 ⁸	6,00x10 ⁵
103	7,94x10 ⁶	0	1,26x10 ⁹	1,47x10 ⁵
115	5,01x10 ⁶	0	2,05x10 ⁸	2,77x10 ⁵

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des 1 Jahr alten Biofilms (Modellbiofilm D) ist die im Vergleich stark bewachsene Oberfläche des Silikonschlauchs zu sehen (s. Abb. 49 A). An denen durch Trocknung entstandenen Rissen in der Oberfläche des Biofilms, werden die Oberfläche des Silikonschlauchs und die Stärke der Schichtdicke sichtbar (s. Abb. 49 B)

Ab einer 500fachen Vergrößerung wird die trotz der Behandlung mit Desinfektionsmitteln nur leicht angegriffene Oberfläche sichtbar. Trotz der größeren Schichtdicke im Vergleich zu Modellbiofilm A (s. Abb. 43) können im Gegensatz zu Modellbiofilm B (s. Abb. 45) vergleichsweise viele freiliegende Bakterien gesehen werden (s. Abb. 49 C und D).

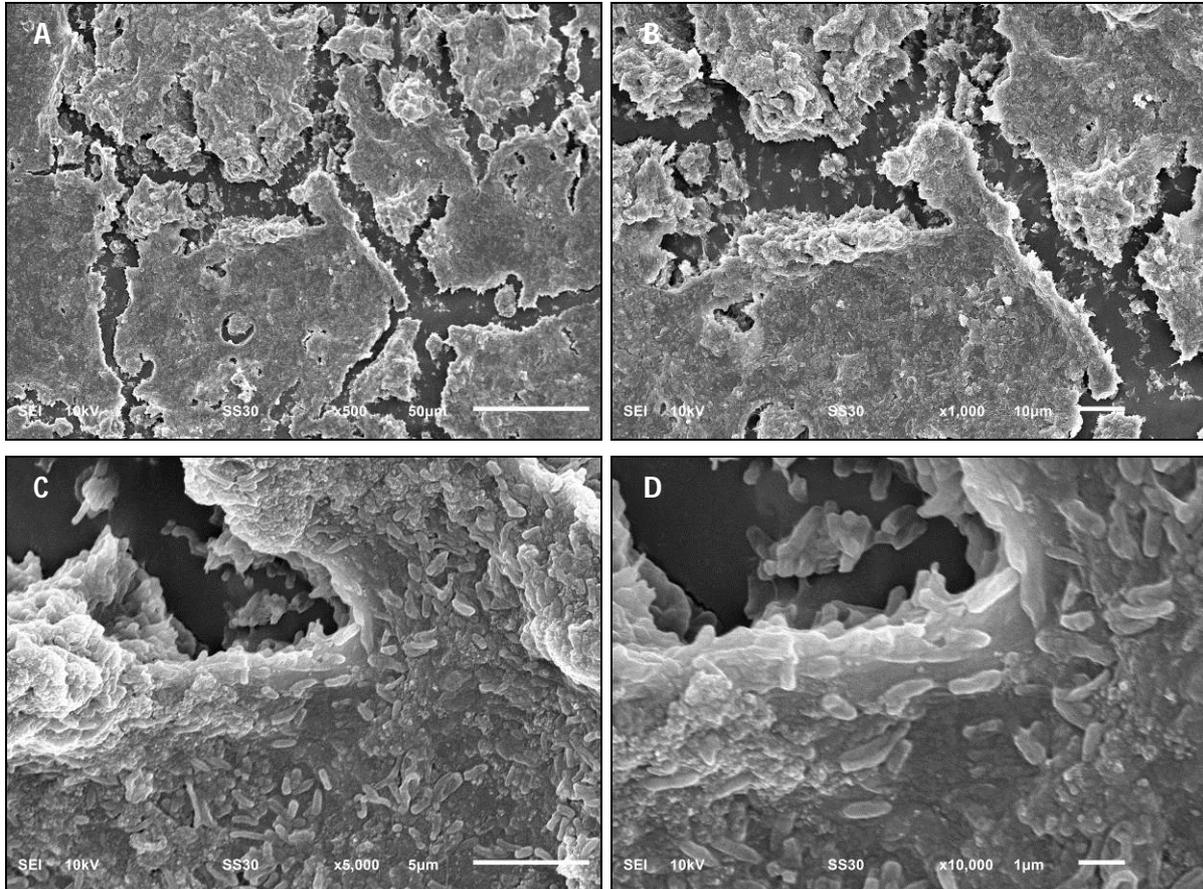


Abbildung 49: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines ca. 1 Jahr alten Biofilms auf Silikonoberfläche angeimpft mit *P. aeruginosa* [Modell D] nach Abschluss der Behandlung. A) 500x Vergrößerung; B) 1000x Vergrößerung; C) 5000x Vergrößerung; D) 10000x Vergrößerung

3.4 Etablierung eines Verfahrens zur Detektion möglicher vbnc-Zustände bei *Pseudomonas aeruginosa* nach der Behandlung mit Desinfektionsmitteln

Ziel dieser Untersuchungen war es, eine Methode zu etablieren, mit der ein desinfektionsmittel-induzierter Übergang in den vbnc-Status reproduzierbar ausgelöst werden kann. Kernstück dieser Untersuchungen war das Einbinden eines Micro-Plate-Readers in das Untersuchungsdesign, der bakterielles Wachstum durch Messung der Absorption sichtbar macht.

In einem ersten Schritt wurden hierbei diejenigen Konzentrationen festgelegt, die mindestens notwendig sind, um bakterielles Wachstum zu verhindern. Der gleiche Versuchsansatz konnte dann zur Untersuchung auf verbliebene Stoffwechselaktivität mittels PNA-FISH untersucht werden. Ein positives Fluoreszenzsignal der In-Situ Hybridisierung wäre ein Hinweis darauf, dass die Zellen der untersuchten Probe zumindest vorübergehend keine Zellteilung aber weiterhin Stoffwechselaktivität besitzen.

Um sicher zu gehen, dass keine teilungsfähigen Zellen im Versuchsansatz verblieben sind, die nur eine teilweise Schädigung durch die eingesetzten Desinfektionsmittel erlitten haben, wurde die Inkubationszeit verlängert, um die Anzahl falsch negativer Ergebnisse zu minimieren.

Diese Untersuchungen wurden mit *P. aeruginosa* als Testkeim und mit Natriumhypochlorit, Chlordioxid und elektrochemisch aktiviertem Wasser (ECA-Produkt) als zu testende Desinfektionsmittel durchgeführt.

3.4.1 Etablierung des Micro-Plate-Reader Modells

Ziel der Untersuchungen war es, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglichen sollte innerhalb kürzester Zeit den Übergang eines Zielorganismus in den vbnc-Zustand durch die Behandlung mit Desinfektionsmitteln darstellen zu können. Zu diesem Zweck wurde versucht nach dem Vorbild des „Quantitativen Suspensionsversuchs“ nach den Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren [Gebel et al. 2002] ein daran angelehntes Verfahren auf einen Micro-Plate-Reader (Fa. Biotek) zu übertragen.

In der folgenden Abbildung ist erklärt, wie ein Pipettierschema eines solchen Versuchs aussehen kann (s. Abb. 50). Abgebildet sind die „wells“ der Mikrotiterplatte. Zur besseren Übersicht sind Einzelheiten des Versuchsansatzes farblich hervorgehoben. In Reihe A befinden sich die Kontrollen (grün) für das verwendete Wasser (Well A1 - A4) und die verwendete Tryptic Soy Broth (Well A9 – A12).

In Reihe B befindet sich der eigentliche Versuchsansatz (rot). In diesem Beispiel wurden 3 Verdünnungen der Verdünnungsreihe der Ausgangssuspension verwendet. Für jede Verdünnung wurde jeweils ein Dreifachansatz und ein WSH-Kontrolle pipettiert (B1 – B4, B5 – B8, B9 – B12). Das Gesamtvolumen eines „wells“ betrug 300µl. Für den Versuchsansatz wurden jeweils 150µl der Bakteriensuspension und 150µl des Desinfektionsmittels verwendet. Zum Einsatz kamen die Konzentrationen 0,3 und 0,6mg/l Chlor. In den Reihen C bis H befanden sich die

Neutralisationsansätze für die festgelegten Einwirkzeiten. In jedem dieser „wells“ befanden sich jeweils 140µl 0,3% Natriumthiosulfat und 140µl Tryptic Soy Broth. Natriumthiosulfat diente der Neutralisation des Desinfektionsmittels und das TSB diente als Nährbouillon, um Wachstum nicht-inaktivierter Zellen darstellen zu können. Nach der jeweiligen Einwirkzeit wurden jeweils 20µl des Versuchsansatzes (Reihe B) in den jeweiligen Neutralisationsansatz pipettiert. Die Einwirkzeiten waren 0,5 min (Reihe C), 1 min, 5 min, 15 min, 30 min und 60 min (Reihe H).

Mit dem Abstoppen nach Ablauf der letzten Einwirkzeit wurde die Mikrotiterplatte im Micro-Plate-Reader für mindestens 24 Stunden bei 37°C inkubiert und stündlich die Absorption gemessen. Die Absorptionsmessungen erfolgte bei 620nm. Die Eingangskonzentration der *P. aeruginosa* Bakteriensuspension beträgt ca. 1,5 bis 2,5x 10⁸ KBE.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Kontrollen	A. dest (300 µl)	A. dest (300 µl)	A. dest (300 µl)	A. dest (300 µl)					A. dest (150 µl) + TSB (150 µl)	A. dest (150 µl) + TSB (150 µl)	A. dest (150 µl) + TSB (150 µl)	A. dest (150 µl) + TSB (150 µl)
B Versuchs- ansatz	P.a. -8 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -8 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -8 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -8 (150 µl) + WSH (150 µl)	P.a. -7 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -7 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -7 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -7 (150 µl) + WSH (150 µl)	P.a. -6 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -6 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -6 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -6 (150 µl) + WSH (150 µl)
C 0,5 min	20 µl + TSB (140 µl) + Na.-Thio. (140 µl)											
D 1 min	20 µl + TSB (140 µl) + Na.-Thio. (140 µl)											
E 5 min	20 µl + TSB (140 µl) + Na.-Thio. (140 µl)											
F 15 min	20 µl + TSB (140 µl) + Na.-Thio. (140 µl)											
G 30 min	20 µl + TSB (140 µl) + Na.-Thio. (140 µl)											
H 60 min	20 µl + TSB (140 µl) + Na.-Thio. (140 µl)											

Abbildung 50: Beispiel für ein Pipettierschema. Reihe A = Kontrollen; Reihe B = Versuchsansatz, Reihe C bis H = Neutralisationsansätze. Zur besseren Übersicht wurden die Neutralisationsansätze der Reihen 5 bis 12 weggelassen.

Im Folgenden dargestellt sind die für die getesteten Desinfektionsmittel erstellten Wachstumskinetiken nach unzureichender Desinfektion. Dargestellt sind die Zeitpunkte (in Stunden) nach Beginn der Inkubation zu denen Wachstum in Form einer Trübung messbar war. In diesen Fällen reichte die Konzentration bzw. Einwirkzeit nicht aus, um alle Bakterien zu inaktivieren, so wie die Konzentration und Einwirkzeit ab der kein bakterielles Wachstum mehr messbar war.

3.4.1.1 Prüfprodukt 2: ECA-Wasser

Dargestellt sind die Ergebnisse und Wachstumskinetiken für den Einsatz des elektrochemisch aktivierten Wassers (Prüfprodukt 2) bei Konzentrationen von 0,3 und 0,6 mg/l freiem Chlor.

Die Abbildung zeigt den Einfluss von elektrochemisch aktiviertem Wasser bei einer Konzentration von 0,3 mg/l (links) und 0,6 mg/l (rechts) auf *Pseudomonas aeruginosa* und das daraus resultierende Wachstum (s. Abb. 51). In der Abbildung wird anschaulich, wie zum einen die Konzentration der Bakteriensuspension Einfluss hat auf den frühestmöglichen Zeitpunkt, an dem Wachstum gemessen werden kann. Wachstum der 10^{-7} -Verdünnung setzt bei der gleichen Einwirkzeit regelmäßig später ein, als bei der 10^{-6} -Verdünnung. Gleichzeitig wird der Einfluss der Einwirkzeit deutlich. Mit steigender Einwirkzeit setzt das bakterielle Wachstum später ein.

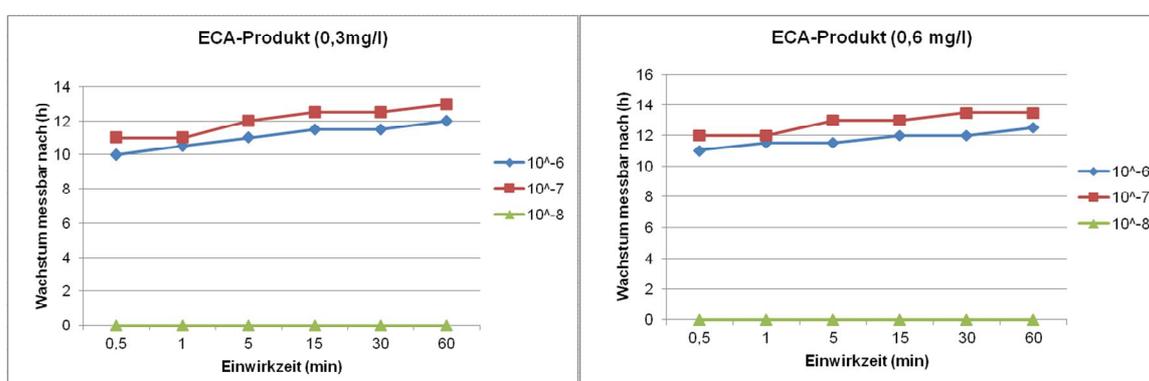


Abbildung 51: Darstellung des Zeitpunktes einsetzendes Wachstums für drei Bakterienkonzentrationen nach der Behandlung mit 0,3 mg/l und 0,6 mg/l elektrochemisch aktiviertem Wasser in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.

In Tabelle 36 aufgelistet sind die durchschnittlichen Zeitpunkte, an denen Wachstum nach der Behandlung mit 0,3 mg/l ECA-Wasser messbar war. Bei einer Verdünnung von 10^{-8} war kein Wachstum mehr messbar. In der 10^{-6} -Verdünnung war Wachstum bei der kürzesten Einwirkzeit von 30 Sekunden durchschnittlich erst nach ca. 10 Stunden messbar. In der 10^{-7} -Verdünnung war Wachstum bei der geringsten Einwirkzeit nach ca. 11 Stunden messbar. Im Durchschnitt war Wachstum in der 10^{-7} -Verdünnung ca. 1 Stunde später messbar, als in der 10^{-6} -Verdünnung. Durch die Verlängerung der Einwirkzeit verzögerte sich das Einsetzen messbaren Wachstums für beide Verdünnungen bei der maximalen Einwirkzeit von 60 Minuten durchschnittlich um zwei Stunden von 10 auf 12 Stunden (10^{-6} -Verdünnung) bzw. von 11 auf 13 Stunden (10^{-7} -Verdünnung).

Tabelle 36: Auflistung der Zeitpunkte (in Std.) zu denen Wachstum im Versuchsansatz nach der Behandlung mit 0,3 mg/l ECA-Wasser erstmals detektierbar war. Die Auflistung erfolgte in Abhängigkeit von eingesetzter Bakterienkonzentration und Einwirkzeit des Desinfektionsmittels.

Konz. ECA	0,3 mg/l		
Verdünnung	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Einwirkzeit (min)			
0,5	10	11	0
1	10,5	11	0
5	11	12	0
15	11,5	12,5	0
30	11,5	12,5	0
60	12	13	0

In Tabelle 37 aufgelistet sind die durchschnittlichen Zeitpunkte an denen Wachstum nach der Behandlung mit 0,6 mg/l ECA-Wasser messbar war. Bei einer Verdünnung von 10⁻⁸ war kein Wachstum messbar. In der 10⁻⁶-Verdünnung war Wachstum bei der kürzesten Einwirkzeit von 30 Sekunden durchschnittlich nach ca. 11 Stunden messbar. In der 10⁻⁷-Verdünnung war Wachstum bei der geringsten Einwirkzeit nach ca. 12 Stunden messbar. Im Durchschnitt war Wachstum in der 10⁻⁷-Verdünnung ca. 1 Stunde später messbar, als in der 10⁻⁶-Verdünnung. Durch die Verlängerung der Einwirkzeit verzögerte sich das Einsetzen messbaren Wachstums für beide Verdünnungen bei der maximalen Einwirkzeit von 60 Minuten durchschnittlich um eineinhalb Stunden von 11 auf 12,5 Stunden (10⁻⁶-Verdünnung) bzw. von 12 auf 13,5 Stunden (10⁻⁷-Verdünnung).

Tabelle 37: Auflistung der Zeitpunkte (in Std.), zu denen Wachstum im Versuchsansatz nach der Behandlung mit 0,6 mg/l ECA-Wasser erstmals detektierbar war. Die Auflistung erfolgte in Abhängigkeit von eingesetzter Bakterienkonzentration und Einwirkzeit des Desinfektionsmittels.

Konz. ECA	0,6 mg/l		
Verdünnung	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Einwirkzeit (min)			
0,5	11	12	0
1	11,5	12	0
5	11,5	13	0
15	12	13	0
30	12	13,5	0
60	12,5	13,5	0

3.4.1.2 Prüfprodukt 3: Chlordioxid

Dargestellt sind die Ergebnisse und Wachstumskinetiken für den Einsatz von Chlordioxid (Prüfprodukt 3) bei Konzentrationen von 0,3 und 0,6mg/l freiem Chlor.

Die Abbildung zeigt den Einfluss Chlordioxid bei einer Konzentration von 0,3 mg/l (links) und 0,6 mg/l (rechts) auf *Pseudomonas aeruginosa* und das daraus resultierende Wachstum (s. Abb. 52). In der Abbildung wird anschaulich, wie zum einen die Konzentration der Bakteriensuspension Einfluss auf den frühestmöglichen Zeitpunkt hat, an dem Wachstum gemessen werden kann. Wachstum der 10^{-7} -Verdünnung setzt bei der gleichen Einwirkzeit regelmäßig später ein, als bei der 10^{-6} -Verdünnung. Gleichzeitig wird der Einfluss der Einwirkzeit deutlich. Mit steigender Einwirkzeit setzt das bakterielle Wachstum später ein bzw. bleibt vollständig aus.

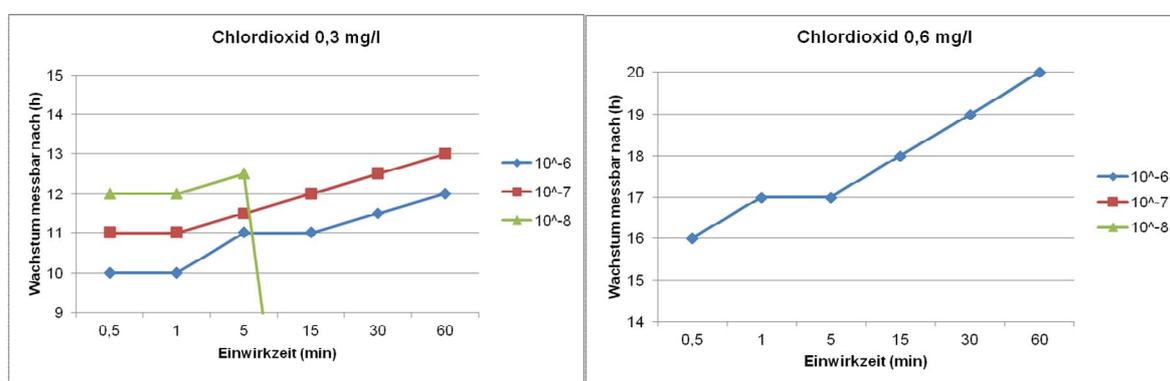


Abbildung 52: Darstellung des Zeitpunktes einsetzenden Wachstums für drei Bakterienkonzentrationen nach der Behandlung mit 0,3 mg/l (links) und 0,6 mg/l (rechts) Chlordioxid in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.

In Tabelle 38 aufgelistet sind die durchschnittlichen Zeitpunkte, an denen Wachstum nach der Behandlung mit 0,3 mg/l Chlordioxid messbar war. In der 10^{-6} -Verdünnung war Wachstum bei der kürzesten Einwirkzeit von 30 Sekunden durchschnittlich nach ca. 10 Stunden messbar. In der 10^{-7} -Verdünnung war Wachstum bei der geringsten Einwirkzeit nach ca. 11 Stunden messbar. Im Durchschnitt war Wachstum in der 10^{-7} -Verdünnung ca. 1 Stunde später messbar, als in der 10^{-6} -Verdünnung. Durch die Verlängerung der Einwirkzeit verzögerte sich das Einsetzen messbaren Wachstums für beide Verdünnungen bei der maximalen Einwirkzeit von 60 Minuten durchschnittlich um eineinhalb Stunden von 10 auf 11,5 Stunden (10^{-6} -Verdünnung) bzw. von 11 auf 12,5 Stunden (10^{-7} -Verdünnung). Bei einer Verdünnung von 10^{-8} war nur bis zu einer Einwirkzeit von 5 Minuten Wachstum messbar. Für eine Einwirkzeit von 30 Sekunden war Wachstum nach 12 Stunden messbar. Nach 5 Minuten lag der Wert im Schnitt bei 12,5 Stunden.

Tabelle 38: Auflistung der Zeitpunkte (in Std.) zu denen Wachstum im Versuchsansatz nach der Behandlung mit 0,3 mg/l Chlordioxid erstmals detektierbar war. Die Auflistung erfolgte in Abhängigkeit von eingesetzter Bakterienkonzentration und Einwirkzeit des Desinfektionsmittels.

Konz. ClO ₂	0,3 mg/l		
Verdünnung	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Einwirkzeit (min)			
0,5	10	11	12
1	10	11	12
5	11	11,5	12,5
15	11	12	0
30	11,5	12,5	0
60	12	13	0

In Tabelle 39 aufgelistet sind die durchschnittlichen Zeitpunkte an denen Wachstum nach der Behandlung mit 0,6 mg/l Chlordioxid messbar war. Für diese Desinfektionsmittelkonzentration war nur für die 10⁻⁶-Verdünnung Wachstum messbar. Für die kürzeste Einwirkzeit von 30 Sekunden lag der Wert durchschnittlich bei ca. 16 Stunden. Mit ansteigender Einwirkzeit lag Wert dann maximal bei 20 Stunden bei einer Einwirkzeit von 60 Minuten.

Tabelle 39: Auflistung der Zeitpunkte (in Std.) zu denen Wachstum im Versuchsansatz nach der Behandlung mit 0,6 mg/l Chlordioxid erstmals detektierbar war. Die Auflistung erfolgte in Abhängigkeit von eingesetzter Bakterienkonzentration und Einwirkzeit des Desinfektionsmittels.

Konz. ClO ₂	0,6 mg/l		
Verdünnung	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Einwirkzeit (min)			
0,5	16	0	0
1	17	0	0
5	17	0	0
15	18	0	0
30	19	0	0
60	20	0	0

3.4.1.3 Prüfprodukt 4: Natriumhypochlorit

Dargestellt sind die Ergebnisse und Wachstumskinetiken für den Einsatz von Natriumhypochlorit (Prüfprodukt 3) bei Konzentrationen von 0,3 und 0,6mg/l freiem Chlor.

Die Abbildung zeigt den Einfluss von Natriumhypochlorit bei einer Konzentration von 0,3 mg/l (links) und 0,6 mg/l (rechts) auf *Pseudomonas aeruginosa* und das daraus resultierende Wachstum (s. Abb. 53). In der Abbildung wird anschaulich, wie zum einen die Konzentration der Bakteriensuspension Einfluss hat auf den frühestmöglichen Zeitpunkt, an dem Wachstum gemessen werden kann. Wachstum der 10⁻⁷-Verdünnung setzt bei der gleichen Einwirkzeit regelmäßig später ein, als bei der 10⁻⁶-Verdünnung. Gleichzeitig wird der Einfluss der Einwirkzeit deutlich. Mit steigender Einwirkzeit setzt das bakterielle Wachstum später ein bzw. bleibt vollständig aus.

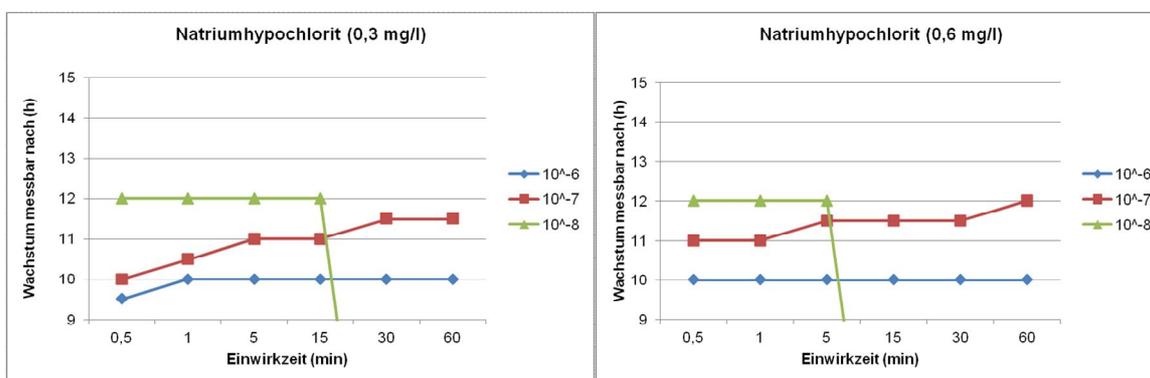


Abbildung 53: Darstellung des Zeitpunktes einsetzendes Wachstums für drei Bakterienkonzentrationen nach der Behandlung mit 0,3 mg/l (links) und 0,6 mg/l (rechts) Natriumhypochlorit in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.

In Tabelle 40 aufgelistet sind die durchschnittlichen Zeitpunkte, an denen Wachstum nach der Behandlung mit 0,3 mg/l Natriumhypochlorit messbar war. In der 10⁻⁶-Verdünnung war Wachstum bei der kürzesten Einwirkzeit von 30 Sekunden durchschnittlich bereits nach ca. 9,5 Stunden messbar. In der 10⁻⁷-Verdünnung war Wachstum bei der geringsten Einwirkzeit nach ca. 10 Stunden messbar. Im Durchschnitt war Wachstum in der 10⁻⁷-Verdünnung ca. 1 Stunde später messbar, als in der 10⁻⁶-Verdünnung. Eine Verlängerung der Einwirkzeit auf maximal 60 Sekunden verzögerte das Einsetzen von Wachstum für eine 10⁻⁶-Verdünnung lediglich auf 10 Stunden Inkubationszeit. Für die 10⁻⁷-Verdünnung verzögerte sich bei maximaler Einwirkzeit der Zeitpunkt messbaren Wachstums von 10 Stunden um eineinhalb Stunden auf 11,5 Stunden Inkubationszeit. Bei den Verdünnungen von 10⁻⁸ war nur bis zu einer Einwirkzeit von 15 Minuten Wachstum messbar. Unabhängig von der Einwirkzeit lag messbares Wachstum nach durchschnittlich 12 Stunden vor.

Tabelle 40: Auflistung der Zeitpunkte (in Std.) zu denen Wachstum im Versuchsansatz nach der Behandlung mit 0,3 mg/l Natriumhypochlorit erstmals detektierbar war. Die Auflistung erfolgte in Abhängigkeit von eingesetzter Bakterienkonzentration und Einwirkzeit des Desinfektionsmittels.

Konz. NaClO	0,3 mg/l		
Verdünnung	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Einwirkzeit (min)			
0,5	9,5	10	12
1	10	10,5	12
5	10	11	12
15	10	11	12
30	10	11,5	0
60	10	11,5	0

In Tabelle 41 aufgelistet sind die durchschnittlichen Zeitpunkte, an denen Wachstum nach der Behandlung mit 0,6 mg/l Natriumhypochlorit messbar war. In der 10⁻⁶-Verdünnung war Wachstum unabhängig von der Einwirkzeit nach 10 Stunden messbar. Für die 10⁻⁷-Verdünnungen lag der am frühesten messbare Zeitpunkt für Wachstum bei der kürzesten Einwirkzeit von 30 Sekunden durchschnittlich bei ca. 11 Stunden. Bei der maximalen Einwirkzeit von 60 Minuten verzögerte sich das Einsetzen von Wachstum um eine Stunde auf 12 Stunden Inkubationszeit. Bei den Verdünnungen von 10⁻⁸ war nur bis zu einer Einwirkzeit von 5 Minuten Wachstum messbar. Unabhängig von der Einwirkzeit lag messbares Wachstum nach durchschnittlich 12 Stunden vor.

Tabelle 41: Auflistung der Zeitpunkte (in Std.) zu denen Wachstum im Versuchsansatz nach der Behandlung mit 0,6 mg/l Natriumhypochlorit erstmals detektierbar war. Die Auflistung erfolgte in Abhängigkeit von eingesetzter Bakterienkonzentration und Einwirkzeit des Desinfektionsmittels.

Konz. NaClO	0,6 mg/l		
Verdünnung	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Einwirkzeit (min)			
0,5	10	11	12
1	10	11	12
5	10	11,5	12
15	10	11,5	0
30	10	11,5	0
60	10	12	0

3.4.1.4 Test auf vbnc-Zustände

Um die tatsächliche Inaktivierung der Zellen des Ansatzes bei ausbleibendem Wachstum darstellen zu können, wurden zwei zusätzliche Untersuchungen durchgeführt.

Um ausschließen zu können, dass die durch das Desinfektionsmittel angegriffenen Zellen lediglich angeschlagen sind und sich durch zelleigene Reparaturprozesse wieder erholen können und anschließend wieder vermehren, wurde die Inkubation der Mikrotiterplatten auf bis zu 7 Tage ausgedehnt. Keiner der Ansätze zeigte ein verspätet einsetzendes Wachstum.

Des Weiteren musste gezeigt werden, ob es möglich wäre, dass die Zellen sich in einem vbnc-Zustand befanden. Dafür wurden „wells“, in denen kein Wachstum messbar war, nach Ablauf der ersten 24 Stunden Inkubationszeit mittels PNA-FISH auf verbleibende Proteinbiosynthese untersucht. In keinem der untersuchten Ansätze war ein Fluoreszenzsignal erkennbar.

3.4.2 Einsatz des Micro-Plate-Reader Verfahrens zur Detektion von vbnc-Zuständen

Zur Detektion möglicher vbnc-Zustände wurde die Versuchsdurchführung geändert. Zum einen musste sichergestellt werden, dass das Neutralisationsmittel keinen Einfluss auf die Ausbildung möglicher vbnc-Zustände bei *P. aeruginosa* hat. Deshalb musste ausgeschlossen werden, dass die Neutralisation des Desinfektionsmittels bereits ausreicht, den Übergang in den vbnc-Zustand zu verhindern bzw. rückgängig zu machen.

In den folgenden Testreihen wurde dementsprechend ganz auf eine Neutralisation verzichtet. Stattdessen wurde das Verhältnis von Bakteriensuspension zu Desinfektionsmittel verändert, um das gesuchte Konzentrationsverhältnis darstellen zu können, bei dem zwar Wachstum ausbleibt, gleichzeitig aber Stoffwechselaktivität vorhanden ist. Die angegebenen Konzentrationen des Desinfektionsmittels beziehen sich auf den finalen Ansatz in TSB.

In der folgenden Abbildung ist erklärt, wie ein Pipettierschema eines Versuchs zur Detektion möglicher vbnc-Zustände aussehen kann (s. Abb. 54). Abgebildet sind die „wells“ der Mikrotiterplatte. Zur besseren Übersicht sind Einzelheiten des Versuchsansatzes farblich hervorgehoben. In Reihe A befinden sich die Kontrollen (grün) für das verwendete Wasser (Well A1 - A4) und die verwendete Tryptic Soy Broth (Well A9 – A12). In Reihe B befindet sich eine Verdünnungsreihe des Zielorganismus (hier jeweils im Doppelansatz die Verdünnungen 10^{-2} bis 10^{-7}) (rot). Die Reaktionsansätze befinden sich in den Reihen E (10^{-7} -Verdünnung) und G (10^{-5} -Verdünnung) (blau). Das Gesamtvolumen eines „wells“ betrug jeweils 300µl. Für jede Verdünnungsreihe wurden vier unterschiedliche Mischungsverhältnisse aufgetragen. Die Mischungsverhältnisse von Bakteriensuspension zu Desinfektionsmittelansatz sind 150µl zu 150µl, 100µl zu 200µl, 50µl zu 250µl und 25µl zu 275µl.

Die Inkubation der Mikrotiterplatte erfolgt direkt nach dem Ansetzen des Tests, da die Einwirkzeit entfällt. Die Mikrotiterplatte wurde für mindestens 24 Stunden bei 37°C inkubiert und stündlich die Absorption gemessen. Die Absorptionsmessungen erfolgten bei 620nm. Die Eingangskonzentration der *P. aeruginosa* Bakteriensuspension betrug ca. 1,5 bis $2,5 \times 10^8$ Zellen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Kontrollen	A. dest. (300 µl)	A. dest. (300 µl)	A. dest. (300 µl)	A. dest. (300 µl)					A. dest. (150 µl) + TSB (150 µl)			
B												
C Verdünnungsreihe	P.a. -2 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -2 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -3 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -3 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -4 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -4 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -5 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -5 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -6 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -6 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -7 (150 µl) + A. dest. (150 µl)	P.a. -7 (150 µl) + A. dest. (150 µl)
D												
E Versuchsansatz	P.a. -7 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -7 (100 µl) + Desinf.-Mittel (200 µl)	P.a. -7 (50 µl) + Desinf.-Mittel (250 µl)	P.a. -7 (25 µl) + Desinf.-Mittel (275 µl)								
F												
G Versuchsansatz	P.a. -5 (150 µl) + Desinf.-Mittel (150 µl)	P.a. -5 (100 µl) + Desinf.-Mittel (200 µl)	P.a. -5 (50 µl) + Desinf.-Mittel (250 µl)	P.a. -5 (25 µl) + Desinf.-Mittel (275 µl)								
H												

Abbildung 54: Beispiel für ein Pipettierschema zur Detektion möglicher vbnc-Zustände. Reihe A = Kontrollen; Reihe C = Verdünnungsreihe, Reihe E und G = Reaktionsansätze ohne Neutralisationsmittel. Zur besseren Übersicht wurden weitere Reaktionsansätze weggelassen.

3.4.2.1 Test auf vbnc-Zustände

Um einen möglichen vbnc-Zustand für vermeintlich inaktivierte Zellen im Reaktionsansatz darstellen zu können wurden zwei zusätzliche Untersuchungen durchgeführt.

Um ausschließen zu können, dass die durch das Desinfektionsmittel angegriffenen Zellen lediglich angeschlagen sind und sich durch zelleigene Reparaturprozesse wieder erholen können und anschließend wieder vermehren, wurde die Inkubation der Mikrotiterplatten auf bis zu 7 Tage ausgedehnt. Keiner der Ansätze zeigte ein verspätet einsetzendes Wachstum.

Der Nachweis auf verbleibende Zellaktivität erfolgte anhand ausgewählter Reaktionsansätze. Mit der folgenden Abbildung (s. Abb. 55) soll erklärt werden, wie die Auswahl von „wells“ zum Test auf Stoffwechselaktivität in Form von Proteinbiosynthese mittels PNA-FISH getroffen wird. Die Versuchsansätze sind farblich hervorgehoben. In den Ansätzen mit den Verdünnungsreihen -5 bis -7 (blau) ist in diesem Beispiel kein Wachstum nach 24 Stunden sichtbar. Da kein Wachstum sichtbar ist, muss davon ausgegangen werden, dass die Desinfektionsmittelkonzentration bereits bei der 10⁻⁵-Verdünnungsreihe ausreichend war, alle Zellen zu inaktivieren.

In den Ansätzen zu den Verdünnungsreihen 10⁻⁴ und 10⁻³ ist in den jeweils ersten beiden Ansätzen Wachstum detektiert worden.

Für Folgeuntersuchungen auf verbleibende Stoffwechselaktivität kommen demnach nur die „wells“ G11, G12, H7 und H8 in Frage. Die Wahrscheinlichkeit für ein positives Signal durch PNA-FISH wäre in „well“ H7 am höchsten. Da die Desinfektionsmittelkonzentration bereits in der zweithöchsten Konzentration ausgereicht hat Wachstum zu verhindern, sinkt die Wahrscheinlichkeit in den „wells“ G12 und H8 mit der jeweils höchsten Desinfektionsmittelkonzentration, noch Zellaktivität nachzuweisen. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit auf Zellaktivität in „well“ G11 geringer, da die Anzahl der Bakterien im Ansatz eine Log-Stufe geringer ist.

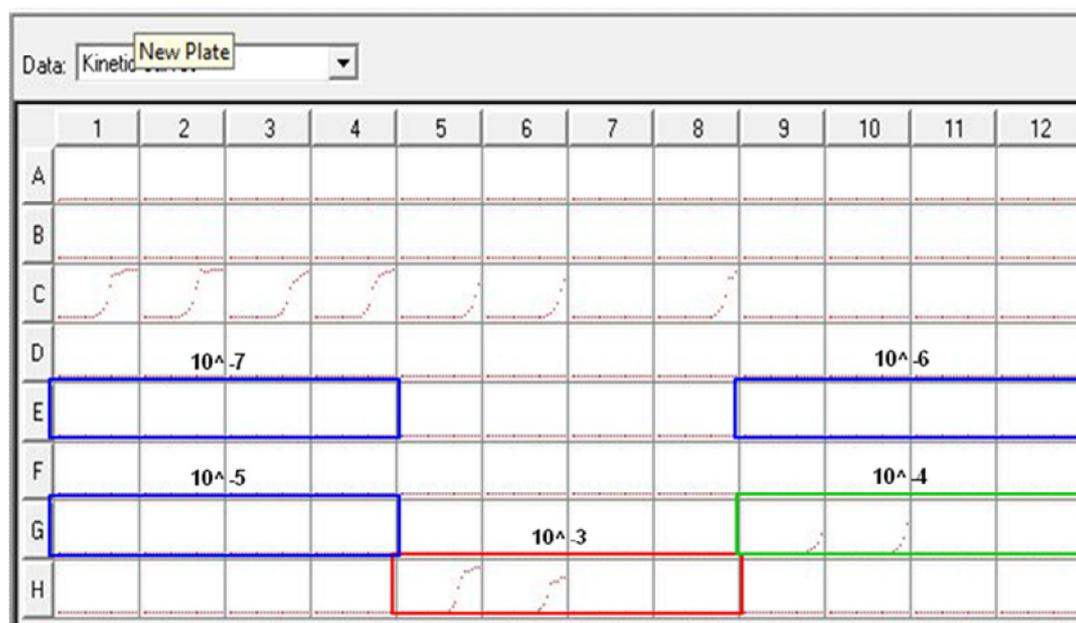


Abbildung 55: Beispiel für die Auswahl von Reaktionsansätzen zu Untersuchung auf Stoffwechselaktivität mittels PNA-FISH. Kein Wachstum in den Ansätzen der Verdünnungsreihen -5 bis -7 (blau). Verdünnungsreihe mit geringer Wahrscheinlichkeit aus positives PNA-FISH Signal (grün). Hohe Wahrscheinlichkeit auf positives Signal (rot).

Die folgende Tabelle zeigt die Reaktionsansätze für die ein positiver Nachweis mittels PNA-FISH erfolgt ist.

Tabelle 42: Versuchsparameter von positiven Nachweisen auf Stoffwechselaktivität (n=3).

Nummer	Desinfektionsmittel	Chlorkonzentration im Ansatz (mg/l)	Bakteriensuspension	Reaktionsansatz
1	ECA- Wasser	0,20	10 ⁻⁴ - Verdünnung	Nr. 2 (100µl zu 200µl)
2	Natriumhypochlorit	0,25	10 ⁻³ - Verdünnung	Nr. 3 (50 µl zu 250µl)
3	Natriumhypochlorit	0,20	10 ⁻⁴ - Verdünnung	Nr. 2 (100µl zu 200µl)
4	Chlordioxid	0,25	10 ⁻³ - Verdünnung	Nr. 3 (50 µl zu 250µl)
5	Chlordioxid	0,20	10 ⁻⁴ - Verdünnung	Nr. 2 (100 µl zu 200µl)

4 DISKUSSION

Zu den wichtigsten Aufgabenbereichen der modernen Hygiene gehören die Kontrolle, Aufrechterhaltung und Verbesserung einer Trinkwasserversorgung, und damit verbunden auch die Bereitstellung von Trinkwasser einer Qualität, durch dessen Gebrauch ein Schädigung der Gesundheit insbesondere durch mikrobielle Krankheitserreger nicht zu besorgen ist.

Im Zusammenhang mit dem Risiko nosokomialer Infektionen in Gesundheitseinrichtungen [Exner et al. 2007], hat die Trinkwasserinstallation eine wachsende Bedeutung erhalten. Sie besteht aus allen wasserführenden Leitungen und Armaturen zwischen dem Punkt der Übergabe des Wassers vom Wasserversorger an den Verbraucher und dem Punkt der Wasserentnahme am Ende der Leitung. Mit der Novellierung der Trinkwasserverordnung von 2001 liegt die Verantwortung für die Trinkwasserinstallation beim Verbraucher und hat nicht zuletzt deswegen an öffentlicher Aufmerksamkeit gewonnen. Mit der Novellierung aus dem Jahr 2011 ist neben neuen Prüf- und Anzeigepflichten erstmals ein Grenzwert der Legionellenkonzentration mit 100 KBE (kolonienbildende Einheiten) pro 100 Milliliter in Anlage 3, Teil II zu § 7 TrinkwV konkret definiert und geht einher, mit der Verpflichtung zur jährlichen Untersuchung des Wassers der Trinkwasserinstallation auf Legionellen.

Zur Qualitätssicherung wasserführender Systeme, bedarf es neben der Einhaltung der sog. allgemein anerkannten Regeln der Technik, auch der Überwachung und Beseitigung von Biofilmen, die in beinahe jedem wasserführenden System zu finden sind [Exner und Kistemann 2004]. Ein solches Regelwerk, das die Überwachung und Beseitigung von Biofilmen in der Trinkwasserinstallation beschreibt, existiert zur Zeit nicht.

Der Trinkwasserbiofilm, als Ansammlung von Mikroorganismen eingebettet in eine selbstproduzierte Matrix, bestehend aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), hat in diesem Zusammenhang im Bereich der Forschung deutlich an Bedeutung gewonnen. Mit den Erkenntnissen der letzten Jahre aus dem Bereich der Biofilmforschung, hat sich ein neues hygienisches Risiko herauskristallisiert, ausgehend von Biofilmen, die als Reservoir für fakultativ-pathogene Erreger dienen können. Veröffentlichungen belegen das Risiko von fakultativ-pathogenen Bakterien in der Biozönose von Biofilmen [Anaissie et al. 2002; Parsek und Singh 2003; Szewzyk et al. 2000].

Ein gesondertes Risiko geht zusätzlich von Bakterien im vbnc-Zustand aus. Diese Bakterien sind mit den gängigen Nachweismethoden bzw. auf den üblicherweise verwendeten Nährböden nicht kultivierbar und bilden keine Kolonien [Adams et al. 2003]. Unter den Bakterienstämmen, für die der Übergang in einen solchen vbnc-Zustand bereits demonstriert werden konnte, befinden sich einige der relevantesten fakultativ-pathogenen Krankheitserreger, wie z.B. *P. aeruginosa* oder *L. pneumophila*. Zusammengenommen ergibt sich daraus die Gefahr, dass sich Biofilme zu einer Quelle potentieller Infektionen entwickeln [Costerton et al. 1999; Donlan und Costerton 2002; Anaissie et al. 2002].

Ziel dieser Arbeit war es zu demonstrieren, ob und wenn ja, welche Gefahren von Biofilmen ausgehen können, wenn sie unzureichend mit Desinfektionsmitteln behandelt werden. Kann also eine subletale oder zu kurz andauernde Dosierung zu einem Selektionsdruck innerhalb der Biozönose des Biofilms führen, die nur widerstandfähigere Bakterien überleben lässt, die ihrerseits die Grundlage für allgemein widerstandfähigere Biofilme bilden? Des Weiteren sollte gezeigt werden, ob und unter welchen Umständen es einem fakultativ-pathogenen Erreger, wie z.B. *P. aeruginosa* gelingt, in einem

Biofilm unter eben diesen Umständen zu überdauern. Entscheidend für die Einschätzung der Gefahr des Überdauerns von *P. aeruginosa* in Biofilmen, waren die durchgeführten Untersuchungen zu dessen Fähigkeit in einen vorübergehenden Zustand der Nichtkultivierbarkeit bei anhaltender Viabilität überzugehen. Auf diese Weise sollte gezeigt werden, welche Gefahren von falsch dosierten Desinfektionsmitteln ausgehen können, wenn sich potentielle Krankheitserreger in Biofilme einnisten ohne dort mit den konventionellen Kultivierungsmethoden nachweisbar zu sein, während die Biozönose des Trinkwasserbiofilms eine Selektion erfährt, die ihn gleichzeitig widerstandfähiger machen kann und das eigene Überdauern, wie das des Zielorganismus fördern könnte.

Um den beschriebenen Fragestellungen nachgehen zu können, stand mit dem am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit etablierten Systems des Silikonschlauchmodells [Exner et al. 1984] dafür ein bewährtes Verfahren zur Verfügung, das es ermöglichte realitätsnahe Biofilme der autochthonen Trinkwasserflora zu erzeugen und zu untersuchen. Es muss dabei beachtet werden, dass es sich dabei um eine Art „worst-case“ Szenario handelt. Mit der Wahl des Silikons als Trägermaterial ermöglicht man den Bakterien dessen verwertbare Kohlenstoffe als Nährstoffquelle zu verwenden.

Weiterhin ist anzumerken, dass durch den geringen Durchmesser die Grenzfläche zwischen Trägermaterial und Wasser prozentual erhöht wird, was ebenfalls von Vorteil bei der Biofilmbildung ist. Nachteilig bei dieser Art der Untersuchungen sind die langen Reifephase bei der Generierung von Biofilmen. Bis ein Biofilm die Plateauphase erreicht hat, vergehen bis zu 2 Jahre [Boe-Hansen et al. 2002; Donlan et al. 1994].

Durch den Verzicht auf die Zugabe zusätzlicher Nährstoffe zum Wasser und die lange Reifungsphase, wird jedoch die Bildung eines realitätsnahen Biofilms in Zusammensetzung und Struktur gefördert, der die tatsächlichen Verhältnisse in Trinkwasserbiofilmen am besten abbildet.

Bei Biofilmen handelt es sich um sehr heterogene und komplexe Gebilde, die je nach Standort, der Zusammensetzung des Trinkwassers und den in verschiedenen Trinkwasserinstallationssystemen verbauten Materialien variieren. Durch die stetigen Kontrollen und Trinkwasseranalysen durch das IHPH und den Wahnachtsperrenverband wurde bestätigt, dass das zur Biofilmgenerierung verwendete Trinkwasser in seiner Zusammensetzung über Jahre hinweg weitestgehend konstant geblieben ist (s. Tab. 12 u. 13/ S. 44). Als Folge daraus sind auch die Voraussetzungen zur Ausbildung von Biofilmen konstant geblieben und ermöglichen den Vergleich durchgeführter Untersuchungen über Jahre hinweg. Damit bietet das Silikonschlauchmodell des IHPH die Grundlage biochemischer, mikroskopischer und molekularbiologischer Untersuchungen und gewährleistet eine gleichbleibende Aussagekraft und reproduzierbare Ergebnisse.

4.1 Charakterisierung der Biofilme unterschiedlichen Alters

Im ersten Teil der Untersuchungen wurden Biofilme unterschiedlichen Alters genauer charakterisiert. Die zu diesem Zweck untersuchten Biofilme besaßen zur besseren Vergleichbarkeit mit weiteren durchgeführten Untersuchungen ebenfalls ein Alter zwischen 1 und 3 Jahren.

Zur Bestimmung der Zellzahlen im Biofilm wurden jeweils die Anzahl der koloniebildenden Einheiten und der Gesamtzellzahl ermittelt. Zur Darstellung des Reifungsgrades des Biofilms wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zur Identifizierung der kultivierbaren Stämme

im Biofilm wurden Sequenzierungen durchgeführt und die ermittelten Sequenzen entsprechend ihres Grades an Übereinstimmung taxonomischen Gruppen und Arten zugeordnet. Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen den Zustand der unbehandelten Biofilme beschreiben und nach Abschluss anderweitiger Untersuchungen als Referenz dienen.

4.1.1 Verlauf von Gesamtzellzahl und Anzahl koloniebildender Einheiten in Biofilmen unterschiedlichen Alters

Die Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten und der Gesamtzellzahl zeigt, dass sowohl die Anzahl der koloniebildenden Einheiten, als auch die der Gesamtzellzahl bis zu einem Biofilmalter von 3 Jahren ansteigen. Ab einem Alter von 2 Jahren, lässt sich aber beobachten, dass der Anstieg verlangsamt wird und sich einer Plateauphase annähert, wie es für Biofilme üblich ist, zumal eine Nährstoff- und Platzlimitierung einen weiteren Anstieg verhindern (s. Tab. 20/ S. 63). Zusätzlich limitieren die durch den Wasserstrom auf den Biofilm wirkenden Scherkräfte weiteres Wachstum. Die Annäherung an eine Plateauphase entspricht damit weitestgehend den in der Literatur gemachten Angaben [Boe-Hansen et al. 2002; Donlan et al. 1994].

Die deutlich höhere Gesamtzellzahl im Vergleich zur Anzahl koloniebildender Einheiten hat mehrere Gründe. Zwar ist die Anzucht auf R2A-Agar ein speziell auf die Nährstoff- und Umweltansprüche von Trinkwasserbakterien ausgerichtete Methode, kann jedoch aufgrund der hohen Diversität in der Biozönose eines Trinkwasserbiofilms nicht allen Ansprüchen gerecht werden. Dafür sorgen die unterschiedlichen Anforderungen der Bakterien an Inkubationsdauer, -temperatur, Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Nährstoffe. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass ein Großteil der Bakterien durch die Nährstofflimitierung im Trinkwasser und die Konkurrenz im Biofilm einen veränderten Stoffwechsel aufweisen kann [Sauer et al. 2002; Drenkardd 2003] bzw. vorübergehend nicht kultivierbar ist. Es wird davon ausgegangen, dass nur etwa 0,1 – 1,0% aller Bakterien überhaupt aus dem Trinkwasser kultivierbar sind [Ultee et al 2004; Roszak und Coldwell 1987]

4.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Biofilmbeschaffenheit

Die Ergebnisse der Gesamtzellzahlen und KBE werden durch die Beobachtungen und Rückschlüsse, die aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gezogen werden können, unterstützt. Die Aufnahmen können aufgrund ihres Detailgrades einen zusätzlichen Einblick in Struktur und Zustand eines Biofilms vermitteln. So zeigt sich für jeden der 3 untersuchten Biofilme unterschiedlichen Alters, dass die EPS-Matrix bereits eine geschlossene Schicht darstellt. Beim 1 Jahr alten Biofilm sind allerdings noch Makrokolonien auszumachen, die mittlerweile miteinander verschmolzen sind. Der Biofilm befindet sich demnach in der Reifephase (s. Abb. 3d/ S. 4). Auch können noch freiliegende Bakterien beobachtet werden, die noch nicht vollständig in die EPS-Matrix eingeschlossen sind (s. Abb. 21/ S. 64) Mit zunehmendem Alter, kann eine Zunahme der Schichtdicke der EPS-Matrix anhand der Trocknungsrisse der Präparate nachvollzogen werden. Auch sind deutlich weniger Bakterien in der EPS-Matrix auszumachen, in der sie mehr und mehr eingebettet sind (s. Abb. 22-23/ S. 65-66). Das wird deutlich, wenn man in Abbildung 23 D die durch den Riss in der Oberfläche erst sichtbar gewordenen Bakterien betrachtet. Der Biofilm befindet sich nun in der Plateauphase (s. Abb. 3e/ S. 4).

Bestätigt wird dies durch Untersuchungen von [Costerton 1995; Costerton et al. 1999], die postulierten, dass die vermehrte Bildung von EPS über quorum sensing reguliert wird, und damit erst ab einem Schwellwert der Dichte an Mikroorganismen initiiert bzw. vorangetrieben wird.

Die genaue Kenntnis der Oberflächenbeschaffenheit unbehandelter Biofilme ermöglicht es den Einfluss einer Behandlung mit Desinfektionsmitteln auf die Struktur bzw. den möglichen Abbau der EPS-Matrix genauer zu beschreiben.

4.1.3 Identifikation der Biofilmpopulation durch Sequenzierung

Zur Identifizierung und taxonomischen Einordnung der kultivierbaren Bakterienstämme im Biofilm wurde zunächst die genomische DNA von den erstellten Reinkulturen isoliert. Eine Probe der jeweiligen DNA wurde anschließend in einer PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer amplifizierten die Abschnitte der DNA die für die 16s rDNA codieren. Die Amplifikate wurden anschließend aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzen wurden dann gegen die in Datenbanken abgelegten Sequenzen verglichen und entsprechend der höchsten Sequenzübereinstimmung zugeordnet.

Von den 26 bestimmten Stämmen gehörte der Großteil von 73% der Gruppe der Proteobacteria an und deckt sich damit weitestgehend mit den Beobachtungen von Schmeisser et al. (2003), die in ihrer Analyse etwa 86% aller Trink- und Frischwasserbakterien dieser Abteilung zugeordnet hatten. Knapp 20% gehörten der Abteilung der Actinobacteria an und in diesem Fall alle zur Gattung der Mycobacteria. Die verbleibenden 7% konnten keiner phylogenetischen Gruppe zweifelsfrei zugeordnet werden. Zur Abschätzung einer möglichen Pathogenität der isolierten Stämme, wurden sie, entsprechend der Vorgaben des Ausschusses für biologische Arbeitsstoffe [ABAS 2012] in die ihnen zugehörige Risikogruppe eingeordnet. Der überwiegende Teil der Stämme lässt sich mit 55% der niedrigsten Risikogruppe 1 zuordnen. Etwa ein Viertel aller Stämme konnte keiner Risikogruppe eindeutig zugeordnet werden. Zirka ein Fünftel gehörte der Risikogruppe 2 an. Sie sind aufgrund ihrer Relevanz im Folgenden gesondert aufgeführt.

- 1) *Mycobacterium massiliense* (Risikogruppe - 2ht) gehört zu den schnell wachsenden nicht-tuberkulösen Mycobakterien und wurde früher zur Spezies *Mycobacterium abscessus* gezählt. Es wird als Erreger nosokomialer Infektionen insbesondere der Atemwege beschrieben. [Sexton und Harrison 2008; Simmon et al. 2007].
- 2) *Mycobacterium ratisbonense* (Risikogruppe - 2) ist ein erst vor kurzer Zeit beschriebener Stamm der auch mit Atemwegsinfektionen in Verbindung gebracht wird [Tortoli et al. 2001].
- 3) *Moraxella ovis* (Risikogruppe - 2t) verursacht die Infektiöse Bovine Keratokonjunktivitis (IBK) bei Rindern [Fraser und Gilmour 1979]
- 4) *Pseudomonas anguilliseptica* (Risikogruppe 2t) ist Krankheitserreger für eine Reihe von Fischarten [Berthe et al. 1995].

Die genaue Bestimmung der kultivierbaren Stämme des Biofilms mittels Sequenzierung sollte als Referenz dienen, um nach einer Behandlung mit Desinfektionsmitteln beurteilen zu können, ob und wie sich die Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaft, auch im Hinblick auf eine mögliche Pathogenität, dadurch verändert.

4.2 Einfluss chemischer Desinfektionsmittel auf die Entwicklung von Biofilmen

Im zweiten Teil der Untersuchungen war es das Ziel darzustellen, welchen Einfluss Desinfektionsmittel auf die Biozönose des Biofilms haben können, wenn der Biofilm nicht vollständig beseitigt und nicht alle Bakterien inaktiviert werden. Zu diesem Zweck wurden 2 Jahre alte Biofilme verschiedenen Desinfektionsverfahren ausgesetzt. Die Untersuchungen umfassten dabei sowohl Stossbehandlungen mit hohen Konzentrationen von 10 mg/l Chlor, als auch kontinuierliche Behandlungen mit niedrigen Konzentrationen von 0,15 mg/l Chlor. Ausschlaggebend bei den Untersuchungen war es, dass verhindert wurde, dass die Anzahl koloniebildender Einheiten unter die Nachweisgrenze fällt bzw. alle Bakterien inaktiviert wurden. Auf diese Weise sollten nur die resistenten bzw. die persistierenden Bakterienstämme nach der Behandlung übrig bleiben [Harmsen et al. 2010]. Ähnlich wie bei einer unzureichenden Behandlung mit Antibiotika können auf diese Weise Stämme einen Selektionsvorteil erhalten, die bereits durch vorher stattgefundene zufällige Mutationen in der Lage sind, die Behandlung zu überstehen bzw. länger zu überstehen, als andere.

In Biofilmen kann man dazu hauptsächlich zwei Kategorien von Bakterien unterscheiden, die einen Selektionsvorteil besitzen. Zum einen die Bakterien, die tief genug im Biofilm sitzen, dass sie überleben. In diesem Fall durchdringt das Desinfektionsmittel den Biofilm nicht bis in die tiefer liegenden Schichten. Die andere Kategorie sind die Bakterien, die durch den Aufenthalt im Biofilm und die damit verbundene Veränderung in Stoffwechsel oder Morphologie der Wirkung des Desinfektionsmittels besser widerstehen können [Lewis 2005, 2008].

Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden die Anzahl der koloniebildenden Einheiten und die der Gesamtzellzahl dokumentiert. Nach dem Abschluss der Behandlung wurden zur genauen Bestimmung der im Biofilm verbleibenden Stämme auch hier Reinkulturen der verbliebenen kultivierbaren Biofilmbakterien angelegt, deren DNA isoliert, ihre 16S rDNA in einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert und abgeglichen.

Ein Vergleich mit denen in Abschnitt 3.1.3 (vergl. Tab. 22/ S. 69) gemachten Untersuchungen kann dann Aufschluss darüber geben, welches Desinfektionsmittel wie gut geeignet ist eben solche Bakterien zu inaktivieren bzw. welchen Selektionsdruck ein Desinfektionsmittel ausüben kann aufgrund der womöglich unterschiedlichen Suszeptibilität der Bakterien (und auch des Biofilms) gegenüber dem verwendeten Desinfektionsmittel.

4.2.1 Einfluss chemischer Desinfektionsmittel als Stossbehandlung zur Anlagendesinfektion

In diesem Untersuchungsansatz wurden 2 Jahre alte Biofilme wiederholt Konzentrationen eines Desinfektionsmittels von 10 mg/l ausgesetzt. Die Dauer der Behandlung betrug jeweils 6 Stunden.

Hier war die Konzentration des Desinfektionsmittels so gewählt, dass sie unweigerlich zu einer Inaktivierung der Bakterien Biofilm führt. Durch die auf 6 Stunden begrenzte Dauer wurde gleichzeitig aber sichergestellt, dass es zu keiner vollständigen Reduktion kommen konnte.

Die Untersuchung simulierte also den Einfluss von zu geringen Einwirkzeiten, die verhindern, dass der Biofilm vollständig durchdrungen und inaktiviert wird.

4.2.1.1 Vergleich der Prüfprodukte 1 (ECA-Produkt 1), Prüfprodukt 2 (ECA-Produkt 2) und Prüfprodukt 3 (Chlordioxid)

Die Abbildungen des zeitlichen Verlaufs der KBE zeigen, dass das alle drei Prüfprodukte in der Lage sind die Anzahl koloniebildender Einheiten im Biofilm zu reduzieren (Abb. 26, 27 und 31/ S. 71, 74, 78).

Die Abbildungen der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Biofilmoberflächen nach den Behandlungen mit einem ECA-Produkt und Chlordioxid (s. Abb. 30 u. 34/ S. 77 u. 81) zeigen das beide Produktgruppen in der Lage sind, den Biofilm zumindest teilweise abzubauen.

Die Daten des direkten Vergleichs von koloniebildenden Einheiten und Gesamtzellzahl zeigen aber auch, dass die der generell höher liegenden Gesamtzellzahl deutlich langsamer reduziert wird, als die der koloniebildenden Einheiten. Während mit Prüfprodukt 1 die zwischenzeitlich maximale Reduktion der KBE von anfänglichen $5,55 \times 10^6$ auf $1,09 \times 10^3$ KBE/cm² erreicht wurde, konnte die Gesamtzellzahl im gleichen Zeitraum lediglich von $3,45 \times 10^7$ auf $1,94 \times 10^6$ Zellen/cm² reduziert werden. Für Prüfprodukt 2 zeigte sich ebenfalls, dass die Gesamtzellzahl im Gegensatz zur Anzahl koloniebildender Einheiten kaum schwankt. Über den Verlauf der Untersuchung wurden die koloniebildenden Einheiten von anfänglich $1,37 \times 10^7$ KBE/cm² auf maximal $8,99 \times 10^5$ KBE/cm² reduziert. Die Gesamtzellzahl schwankte im gleichen Zeitraum zwischen anfänglichen $8,23 \times 10^7$ Zellen/cm² und $2,31 \times 10^7$ Zellen/cm². Für Prüfprodukt 3 konnte eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten von $2,52 \times 10^7$ KBE/cm² auf $8,99 \times 10^5$ KBE/cm² und für die Gesamtzellzahl von $7,44 \times 10^7$ Zellen/cm² auf $6,55 \times 10^6$ Zellen/cm² beobachtet werden.

Es lässt sich also festhalten, dass mit der Reduktion der Anzahl koloniebildender Einheiten zwar auch eine Reduktion der Gesamtzellzahl einhergeht, die aber im Verhältnis betrachtet geringer ausfällt.

Gründe hierfür liegen in der Beschaffenheit des Biofilms selbst. Die näher an der Wasserphase liegenden Schichten werden demnach zuerst vom eingesetzten Desinfektionsmittel durchdrungen und die in diesen Schichten liegenden Zellen als erstes inaktiviert. Weiter im Inneren des Biofilms liegende sog. persistierende Bakterien, nur langsam inaktiviert werden [Simoes et al. 2011]. Neubewuchs findet zwischen den Behandlungen auf zwei mögliche Arten statt. Durch Eintrag aus dem Trinkwasser besiedeln neue Bakterien den Biofilm. Auf der an der Wasserphase liegenden Schicht finden sie dafür gute Voraussetzungen. Mit dem Fortsetzen der Behandlung werden sie als erstes wieder inaktiviert. Die zweite Form von Neubewuchs kommt aus dem Biofilm selbst. Bakteriengemeinschaften, die die Behandlung mit einem Desinfektionsmittel überlebt haben, beginnen sich im Anschluss zu vermehren. Das Ausbleiben des „Stressors“ Desinfektionsmittel, so wie die Reduktion der Zelldichte in unmittelbarer Umgebung, können zu erneutem Wachstum persistierender Bakterien führen. Gründe liegen in der geringeren Konkurrenz um limitierte Nährstoffe begründet, so wie in einer möglichen

Veränderung in „quorum sensing“ Signalen, die zu einer vorübergehenden Umstellung des Stoffwechsels führen können (s. Abschnitt 1.1.2.3/ S. 6). In Abhängigkeit der Wachstumsphasen können die persistierenden Bakterien auf diese Art einen größeren Anteil an der Gesamtheit der Biofilmpopulation stellen und somit gleichzeitig für eine höhere Widerstandskraft im Biofilm sorgen.

Vergleicht man die nach Abschluss der Desinfektionsmaßnahmen mit einem ECA-Produkt (s. Abschnitt 3.2.1.2 Tab. 25/ S. 75) identifizierten Stämme und die nach der Behandlung mit Chlordioxid (s. Abschnitt 3.2.1.3 Tab. 27/ S. 79) gefundenen Stämme mit denen der unbehandelten Biofilmschläuche (s. Abschnitt 3.1.3 Tab. 21/ S. 67) so fallen gleich mehrere Dinge auf.

Die Behandlung hat zu einer allgemeinen Reduktion in der Diversität der Biofilmbiozönose geführt. Von der in unbehandelten Biofilmen identifizierten Menge von 26 Stämmen sind nach der Behandlung mit einem ECA-Produkt noch 10 Stämme zu finden und nach der Behandlung mit Chlordioxid noch 12 Stämme. Dabei stimmen 6 der 10 Stämme nach der Behandlung mit einem ECA-Produkt mit den zuvor isolierten Stämmen überein. Im Falle des Wirkstoffs Chlordioxid sind es 6 von 12 isolierten Stämmen (s. Tab. 43/ 117). Jeweils 4 der 6 Isolate sind nach der Behandlung mit beiden Desinfektionsmitteln identisch. Es kann also geschlussfolgert werden, dass beide Mittel auf annähernd gleiche Weise die Biozönose im Biofilm beeinflussen; zumindest im Falle der 4 Isolate, die sowohl vor der Behandlung, als auch bei beiden Wirkstoffen nach der Behandlung vorhanden sind. Hier handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Bakterien, die in der Lage sind im Biofilm zu persistieren. Ein auf die unterschiedlichen Desinfektionsmittel zurückzuführender Unterschied ist nicht ersichtlich.

Tabelle 43: Auflistung der nach der Behandlung verbleibenden und mit den unbehandelten Biofilmen übereinstimmenden Isolate. Fett gedruckt = Isolate die sowohl vor der Behandlung, als auch nach der Behandlung mit beiden Desinfektionsmitteln nachgewiesen wurden.

Wirkstoff: ECA-Produkt		Wirkstoff: Chlordioxid	
<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	W-50	<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	W-50
<i>Aquabacterium parvum</i>	B6	<i>Aquabacterium parvum</i>	B6
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	PM1	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	PM1
<i>Polaromonas sp.</i>	BAC136	<i>Sphingomonas sp.</i>	ASRB18-5
<i>Aquatic bacterium</i>	R1-B9	<i>Aquatic bacterium</i>	R1-B9
<i>Uncultured bacterium clone</i>	LIB051	<i>Methylibium sp.</i>	BAC199

Ebenfalls auffällig sind die im Anschluss an die Desinfektionsmaßnahmen auftretenden Stämme, die zuvor nicht aus den unbehandelten Biofilmen isoliert wurden. So wurden 3 Isolate nach Abschluss der jeweiligen Behandlung aus beiden Versuchsansätzen isoliert. Entweder handelt es sich hierbei um Stämme, die im Behandlungszeitraum aus der Trinkwasserleitung in die Biofilme eingetragen wurden, und in der Lage waren im Biofilm zu persistieren oder um Stämme, die erst mit einer Abnahme der Zellzahlen und der Diversität begannen sich zu vermehren.

Tabelle 44: Auflistung der erst nach der Behandlung auftretenden Stämme. Fett gedruckt = Isolate die nur nach der Behandlung in beiden Versuchsansätzen gefunden wurden.

Wirkstoff: ECA-Produkt		Wirkstoff: Chlordioxid	
<i>Nocardia salmonicida</i>	8405	<i>Nocardia salmonicida</i>	8405
<i>Dokdonella sp.</i>	PYM5	<i>Dokdonella sp.</i>	PYM5
<i>Uncultured bacterium clone</i>	LIB115	<i>Uncultured bacterium clone</i>	LIB115
<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	k.A.	<i>Sphingopyxis sp.</i>	KW066
		<i>Methyloversatilis sp.</i>	K2S193
		<i>Sphingopyxis panaciterrae</i>	k.A.

In beiden Fällen sind nach der Behandlung keine Pseudomonaden oder Mykobakterien mehr isoliert worden und unter den verbliebenen Stämmen fanden sich keine Vertreter der Risikogruppe 2, die zuvor noch isoliert wurden.

Das legt nahe, dass es basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen zu keiner Selektion der Biofilmbakterien kommt, bei der potentielle Krankheitserreger bei Neubewuchs einen Vorteil hätten. Der Verbleib der gleichen Stämme im Biofilm nach Abschluss der Behandlung mit beiden Wirkstoffen belegt aber die These, dass einige Stämme in der Lage sind, im Biofilm zu persistieren. Diese Stämme erschweren zum einen die Beseitigung bzw. vollständige Inaktivierung von Biofilmbakterien und sind gleichzeitig nach dem Abschluss einer, wie in diesem Fall, unzureichenden Desinfektionsmaßnahme mit am Wiederaufbau bzw. Wiederbesiedlung eines Biofilms beteiligt und können so zu einer erhöhten Widerstandskraft beitragen.

4.2.2 Subletale Dosierung von chemischen Desinfektionsmitteln in kontinuierlicher Behandlung von Biofilmen

In diesem Untersuchungsansatz wurden 2 Jahre alte Biofilme kontinuierlich Konzentrationen eines Desinfektionsmittels von 0,15 mg/l ausgesetzt. In dieser Untersuchungsreihe war die Konzentration des Desinfektionsmittels so gewählt, dass sie nur bei 50% der laut TrinkwV zugelassenen Höchstmenge von 0,3 mg/l freiem Chlor liegt. Hier sollte durch die geringere Konzentration in kontinuierlicher Behandlung sichergestellt werden, dass es zu keiner vollständigen Reduktion kommen konnte. Die Untersuchung simulierte also den Einfluss von zu gering dosierten Desinfektionsmitteln, die verhindern, dass der Biofilm vollständig durchdrungen werden kann bzw. alle Bakterien inaktiviert werden können.

4.2.2.1 Vergleich der Prüfprodukte 1 (ECA-Produkt 1) und 4 (Natriumhypochlorit)

Die Abbildungen des zeitlichen Verlaufs der KBE zeigen, dass beide Prüfprodukte in der Lage sind, die Anzahl koloniebildender Einheiten im Biofilm bei einer Konzentration von 0,15 mg/l freiem Chlor zu reduzieren (Abb. 35 und 39/ S.82 u. 87).

Die Abbildungen der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Biofilmoberflächen nach den Behandlungen mit einem Natriumhypochlorit (s. Abb. 36/ S. 84) zeigen, dass das Mittel den Biofilm weniger stark abbauen konnte, als die Mittel in den Untersuchungen zur Stossbehandlung.

Die Daten des direkten Vergleichs von koloniebildenden Einheiten und Gesamtzellzahl zeigen aber auch, dass auch bei einer kontinuierlichen Behandlung die generell höher liegenden Gesamtzellzahlen deutlich langsamer reduziert werden, als die der koloniebildenden Einheiten. Während mit Prüfprodukt 1 die zwischenzeitlich maximale Reduktion der KBE von anfänglichen $1,43 \times 10^7$ auf $1,86 \times 10^2$ KBE/cm² erreicht wurde, konnte die Gesamtzellzahl im gleichen Zeitraum lediglich von $6,25 \times 10^7$ auf $8,26 \times 10^5$ Zellen/cm² reduziert werden. Für Prüfprodukt 4 zeigte sich ebenfalls, dass die Gesamtzellzahl im Verhältnis zur Anzahl koloniebildender Einheiten kaum schwankt. Über die Dauer der Untersuchungen wurden die koloniebildenden Einheiten von anfänglich $1,18 \times 10^7$ KBE/cm² auf maximal $3,28 \times 10^4$ KBE/cm² reduziert. Die Gesamtzellzahl schwankte im gleichen Zeitraum zwischen anfänglichen $3,91 \times 10^7$ Zellen/cm² und $9,25 \times 10^6$ Zellen/cm².

Für die kontinuierliche Zudosierung lässt sich also festhalten, dass mit der Reduktion der Anzahl koloniebildender Einheiten zwar auch eine Reduktion der Gesamtzellzahl einhergeht, die aber gleichzeitig geringer ausfällt.

Vergleicht man die nach Abschluss der Desinfektionsmaßnahmen mit Natriumhypochlorit (s. Tab. 29/ S. 84) identifizierten Stämme mit denen nach der Behandlung mit einem ECA-Produkt und Chlordioxid (s. Tab. 25 und 27/ S. 75 u. 79) und den isolierten Stämme der unbehandelten Biofilmschläuche (s. Tab. 21/ S. 68) so ergeben sich eindeutige Übereinstimmungen.

Wie die Stossbehandlung hat auch die kontinuierliche Behandlung zu einer allgemeinen Reduktion in der Diversität der Biofilmbiozönose geführt. Von den in unbehandelten Biofilmen identifizierten 26 Stämmen sind nach der Behandlung mit Natriumhypochlorit nur noch 12 Stämme zu finden. Dabei stimmen 5 der 12 Stämme nach der Behandlung mit den vorher isolierten Stämmen überein. Jeweils 4 der Isolate sind mit den Isolaten nach der Behandlung mit einem ECA-Produkt und Chlordioxid identisch (s. Tab. 29 und Tab. 44/ S. 84 u. 118). Auch Natriumhypochlorit beeinflusst in kontinuierlicher Behandlung die Biozönose des Biofilms auf ähnliche Weise wie Chlordioxid und elektrochemisch aktiviertes Wasser in Stossbehandlung. Die Untersuchungen zeigen, dass die Art der Beeinflussung der Diversität koloniebildender Einheiten im Biofilm nicht vorrangig mit der Art der Zudosierung zu tun hat.

Das Auftreten anderer Spezies nach einer Zudosierung deckt sich aber mit den Untersuchungen von Lenz (2011) und Roeder (2011), die in ihren Untersuchungen bereits zeigten, wie sich die taxonomischen Zusammensetzungen eines Biofilms nach einer Zudosierung und anschließendem Neubewuchs auch in Abhängigkeit eines zuvor eingesetzten Desinfektionsmittels bei Neubewuchs unterscheiden.

4.3 Untersuchungsmodelle zur Einnistung von fakultativ-pathogenen Erregern in Trinkwasserbiofilme des Silikonschlauchmodells

Im dritten Teil der Arbeit, sollte anhand von Einnistungsversuchen von *Pseudomonas aeruginosa* unter Verwendung des Silikonschlauchmodells des IHPH demonstriert werden, ob *Pseudomonas aeruginosa* in der Lage ist in einem Trinkwasserbiofilm trotz der Zudosierung von Desinfektionsmitteln zu überdauern.

Neben der Erfassung der koloniebildenden Einheiten auf R2A-Agar für trinkwasserassoziierte Bakterien, wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten für *P. aeruginosa* auf Cetrimid-Agar erfasst. Die Erfassung der Gesamtzellzahl aller Bakterien, so wie für die Gesamtzellzahl von *P. aeruginosa*, wurde mittels quantitativer real-time PCR durchgeführt. Der Nachweis von nicht kultivierbarem *P. aeruginosa* erfolgte mittels PNA-FISH.

Die in Voruntersuchungen durchgeführten real-time PCRs zur Detektion von *P. aeruginosa* in den Biofilmen des Silikonschlauchmodells zeigten, dass *P. aeruginosa* hier nicht auf natürliche Weise vorkommt.

Mit den hier durchgeführten Einnistungsversuchen wurden verschiedene Fragestellungen bearbeitet. Es sollte gezeigt werden, ob der Zielorganismus *P. aeruginosa* als Vertreter der fakultativ-pathogenen Bakterien in der Lage ist, einen Biofilm zu besiedeln, kultivierbar zu bleiben und trotz Behandlung mit Desinfektionsmitteln im Biofilm zu verbleiben. Des Weiteren sollte bei ausbleibender Kultivierbarkeit gezeigt werden, ob er seine Viabilität behält.

4.3.1 Einnistung von *P. aeruginosa* in Modellbiofilme

Die verwendeten Modellbiofilme basierten auf den Biofilmen des Silikonschlauchmodells. Mit jedem der Modelle sollte zusätzlich ein weiterer Aspekt der Einnistung von *P. aeruginosa* untersucht werden. Bei Modellbiofilm A handelte es sich um einen eigens hergestellten Biofilm aus den am häufigsten kultivierten Stämmen (s. Tab. 31/ S. 91) und *Pseudomonas aeruginosa*. Auf diese Weise sollte gezeigt werden, welchen Unterschied es macht, wenn der Zielorganismus von Beginn an der Biofilmbildung beteiligt ist. Die Modellbiofilme B und C sollten dann zeigen, ob das Alter eines bestehenden Biofilms Einfluss auf die Einnistung von *P. aeruginosa* hat. Modellbiofilm D wurde unter Versuchsbedingungen angeimpft, die denen von *P. aeruginosa* entsprechen.

Modellbiofilm A zeigte trotz vergleichbarer Zellzahlen einen im Verhältnis zu den anderen Biofilmen vergleichsweise dünnen Biofilm (s. Abb. 43/ S. 93) der sich durch das geringe Alter erklärt. Eine mögliche Erklärung für die trotzdem verhältnismäßig hohen Zellzahlen könnten die zur Biofilmanzucht verwendeten Bakterienstämme sein, die aufgrund ihrer guten Kultivierbarkeit ausgewählt wurden und im Biofilm für die Aufrechterhaltung der Zellzahlen sorgen.

Generell weisen die Biofilme der Modellbiofilme B und C aufgrund ihres Alters und damit auch des längeren Zeitraums zur Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen eine größere Schichtdicke als Modellbiofilm A auf (s. Abb. 45 und 47/ S. 95 u. 97).

Verglichen mit den unbehandelten Biofilmen (s. Abb. 21-23/ S. 64-66) sind die Schichtdicken des ursprünglich einjährigen Modellbiofilms C mit der des in Abbildung 21 gezeigten einjährigen Biofilms vergleichbar. Auch in Modellbiofilm C können noch Reste von miteinander verwachsenen Makrokolonien ausgemacht werden. Auf der Oberfläche sind noch Bakterien erkennbar, die noch nicht vollständig in der biofilmeigenen EPS eingebettet sind (s. Abb. 47/ S. 97). Gleiches gilt für den dreijährigen Biofilm des Biofilmmodells B der die gleichen Charakteristika wie sein unbehandeltes Gegenstück besitzt. In Bezug auf die Einnistung von *P. aeruginosa* scheint der Zielorganismus demnach keinen sichtbaren Einfluss auf die Morphologie des Biofilms auszuüben.

Die größte Schichtdicke weist Modellbiofilm D auf. Der vor der Animpfung einem einjährigen Biofilm entsprechende Biofilm, besitzt eine Schichtdicke, die der eines 3 Jahre alten Biofilms entspricht. Hauptunterschied während der Einnistung von *P. aeruginosa* war eine Temperatur von 37°C. Die im Schnitt ca. ein Log-Stufe über denen der anderen Nachweise mittels real-time PCR liegende Genomkopienzahlen pro Quadratzentimeter zeigt, dass die daraus resultierende Einnistung besser funktioniert haben muss. Der massiver wirkende Biofilm könnte demnach auch auf die Ausbildung von EPS durch *P. aeruginosa* zurückzuführen sein.

In keinem der Ansätze war *P. aeruginosa* nach der ersten Behandlung mit Desinfektionsmittel noch kulturell nachweisbar. Mittels real-time PCR konnte aber über den gesamten Zeitraum der 115 Tage andauernden Untersuchung der Nachweis von *P. aeruginosa* erbracht werden. Obwohl der quantitative Nachweis von DNA im eigentlichen Sinne keine Aussage über die Viabilität eines Mikroorganismus zulässt, kann in den hier durchgeführten Versuchen davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil der auf diesem Weg nachgewiesenen Genomkopien zu lebensfähigen Zellen gehörte. In einer verhältnismäßig nährstoffarmen Umgebung wie einem Trinkwasserbiofilm und der aufgrund hoher Zellzahlen auf engem Raum herrschenden Nährstoffkonkurrenz der im Biofilm befindlichen Bakterien, gilt es als unwahrscheinlich, dass es sich bei der in der beschriebenen Höhe nachgewiesener Anzahl von Genomkopien um inaktivierte Zellen handelte. Die Folge wäre in diesem Fall der Abbau toter Zellen und frei vorliegender DNA durch andere Bakterien, was unweigerlich zu einem deutlichen Rückgang der Signalstärke der real-time PCR geführt hätte.

Die sich über den gesamten Zeitraum der Versuche erstreckenden positiven Nachweise mittels PNA-FISH unterstreichen dies. Durch die Einbettung in den Biofilm ließ sich allerdings keine exakte Aussage über genaue Zellzahl stoffwechselaktiver Zellen von *P. aeruginosa* machen.

4.4 Etablierung eines Verfahrens zur Detektion möglicher vbnc-Zustände bei *Pseudomonas aeruginosa* nach der Behandlung mit Desinfektionsmitteln

In vierten Teil dieser Arbeit wurde sich auf die Etablierung einer Methode zum Nachweis von vbnc-Zuständen konzentriert. Die unter Abschnitt 3.3 beschriebenen nicht kultivierbaren Zustände von *P. aeruginosa* in Trinkwasserbiofilmen warfen die Frage nach der Induzierbarkeit von vbnc-Zuständen für den Zielorganismus auf bzw. nach der Induzierbarkeit durch den falschen Einsatz von Desinfektionsmitteln.

Ziel war es eine Methode zu entwickeln, die es ermöglichen sollte, systematisch und in kurzen Zeiträumen Bakterienkonzentration bzw. Desinfektionsmittelkonzentrationen auf die Induktion eines vbnc-Zustands hin testen zu können. Die Einbindung eines Micro-Plate-Readers ermöglichte dieses in einem zusätzlich kleinen Maßstab mit einem geringen Aufwand im Vergleich zur Durchführung quantitativer Suspensionsversuche oder der Beprobung von Trinkwasserinstallationen oder Modellen einer Trinkwasserinstallation. Mit dem Verfahren der OD-Messung in einer Bouillon ist es möglich frühzeitig bakterielles Wachstum durch Trübung nachzuweisen. Bleibt das Wachstum aus, besitzt man im Vergleich zu Kultivierungsmethoden auf Nährböden durch den Einsatz einer Bouillon die Möglichkeit, Proben der einzelnen Ansätze einer Mikrotiterplatte z.B. durch den Einsatz von Fluoreszenzmarkern auf molekularer Ebene einen Zielorganismus zu markieren und mikroskopisch nachzuweisen.

4.4.1 Etablierung des Micro-Plate-Reader Modells

Die Versuche mit den Prüfprodukten 2, 3 und 4 zeigten das der Einfluss eines Desinfektionsmittels reproduzierbar dargestellt werden kann. Allgemein lässt sich sagen, dass je höher die Konzentration des Desinfektionsmittels ist, desto später setzt Wachstum ein. Vergleicht man die Konzentrationen 0,3 und 0,6 mg/l, so zeigt sich für das ECA-Produkt ein verzögertes Wachstum von ca. 1 Stunden, für Natriumhypochlorit etwa eine Verzögerung von einer halben Stunde und im Fall von Chlordioxid um mehrere Stunden. Zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen der Bakteriensuspensionen liegt hier etwa eine Stunde, bis Wachstum der nächstniedrigeren Log-Stufe detektierbar ist. Bei einer Generationszeit von ca. 20 min unter Idealbedingungen für *P. aeruginosa* entspräche eine Stunde zirka der jeweiligen Log-Stufe.

Der Einfluss der Einwirkzeit beträgt durchgehend für die drei getesteten Desinfektionsmittel maximal ca. 1,5 bis 2 Stunden nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten. Übertragen würde das Ergebnis einer Reduktion von ca. 2 Log-Stufen entsprechen. Damit deckt es sich mit den Zeitpunkten, zu denen spätestens mit Wachstum zu rechnen wäre. Frühester Zeitpunkt für Wachstum ist bei den eingesetzten Bakterienkonzentrationen nach ca. 9,5 bis 10 Stunden und spätestens nach ca. 12,5 bis 13 Stunden. Längere Einwirkzeiten bzw. höher dosierte Desinfektionsmittel würden so mit Sicherheit zu einer Inaktivierung aller Zellen führen.

Die Methode der Messung der optischen Dichte führt hier also zu reproduzierbaren und in sich schlüssigen Ergebnissen, die eine Übertragung auch auf andere Mikroorganismen theoretisch möglich macht.

Weder zeigte eine der untersuchten Proben, bei verlängerter Inkubationsdauer, ein nach den ersten 24 Stunden einsetzendes Wachstum, noch war es möglich mittels PNA-FISH verbleibende Stoffwechselaktivität nachzuweisen. Folglich war es mit diesem Versuchsssetup nicht möglich *P. aeruginosa* in einen vbnc-Zustand zu versetzen.

4.4.2 Einsatz des Micro-Plate-Reader Verfahrens zur Detektion von vbnc-Zuständen

In den anschließenden Untersuchungen zur Induktion und Detektion von vbnc-Zuständen bei *P. aeruginosa* durch den Einsatz von Desinfektionsmitteln musste das Versuchsdesign der Micro-Plate-Reader Methode dahingehend abgeändert werden, dass mögliche Faktoren, die Einfluss auf die Ausbildung eines vbnc-Zustands haben könnten, eliminiert werden. Zusätzlich wurde der Fokus auf die Darstellung des richtigen Konzentrationsverhältnisses von Bakterien und Prüfprodukt gelegt.

4.4.2.1 Test auf vbnc-Zustände

Die Neutralisation des in den vorausgehenden Versuchen eingesetzten Desinfektionsmittels war als Hauptgrund für das Ausbleiben eines Nachweises auf vbnc-Zustände anzusehen. Durch die Neutralisation des Desinfektionsmittels wurde auch der eigentliche Auslöser des möglichen vbnc-Zustands eliminiert. Erst durch den Verzicht auf die Neutralisation, konnte der Nachweis auf Stoffwechselaktivität in Form von Proteinbiosynthese bei gleichzeitig ausbleibendem Wachstum erbracht werden. Das Vorhandensein eines solchen „Schalters“ wird auch in der Fachliteratur beschrieben. Normalerweise handelt es sich bei diesem „Schalter“ um den Antagonisten zum Auslöser des vbnc-Zustands; zum Beispiel auch im Falle von Kupferionen, deren Bindung durch einen Chelator zur „Wiederbelebung“ der Bakterien führt [Dwidjosiswojo et al. 2011].

Einschränkungen erhält die Methode zum Nachweis von vbnc-Zuständen mittels Micro-Plate-Reader durch die einsetzbaren Volumina. Die geringen Volumina von 300µl pro well sind vergleichsweise anfällig für Schwankungen in den eingesetzten Bakterien- oder Desinfektionsmittelkonzentrationen. Da es sich bei dem zu untersuchenden Auslöser für den Übergang in einen vbnc-Zustand um ein Desinfektionsmittel handelt, dass per se bereits dazu gedacht ist, Bakterien zu inaktivieren, ist es hier im Vergleich zu anderen Einflüssen wie Temperatur oder pH-Wert vergleichsweise schwierig, ein Verhältnis von Bakterien und Desinfektionsmittel bereitzustellen, das zum einen Wachstum verhindert, und auf der anderen Seite nicht gleichzeitig alle Zellen inaktiviert. Die Verwendung von Mikrotiterplatten die größere Volumina fassen, würde auf der anderen Seite aber zu einer deutlichen Reduktion des Probendurchsatzes führen.

Die verlängerte Inkubation von Proben zum Ausschluss von verlangsamtem Wachstum ist ebenfalls limitiert. Verdunstungsprozesse in den einzelnen Ansätzen verhindern Inkubationszeiten die deutlich über eine Woche hinausgehen. Die Verwendung entsprechender Folien zum Verschließen der Platten würde möglicherweise Sauerstoffmangel nach sich ziehen.

Durch den positiven Nachweis auf Proteinbiosynthese in *P. aeruginosa* mittels PNA-FISH nach einer Behandlung mit Desinfektionsmitteln und der gleichzeitig ausbleibenden Kultivierbarkeit, deuten die Ergebnisse auf den Übergang von *P.aeruginosa* in einen vbnc-Zustand hin.

Der vbnc-Zustand in *P. aeruginosa* konnte in dieser Arbeit für den Einsatz von Natriumhypochlorit, Chlordioxid und freiem Chlor (ECA-Produkt) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen in dieselbe Richtung, wie Ergebnisse früherer Studien. So zeigten Bej et al. (1991) und Singh et al. (1986), dass der Einsatz von Natriumhypochlorit Auslöser für den vbnc-Zustand bei *L. pneumophila* und vorübergehender Unkultivierbarkeit bei *E.coli sein kann*.

4.4.3 Falsch-positive vbnc-Zustände

Um einen vbnc-Zustand vollständig darstellen zu können, sind zwei Dinge unerlässlich. Zum einen muss demonstriert werden, dass der Zustand der Nichtkultivierbarkeit umkehrbar ist und dass es sich dabei nicht um verzögertes Wachstum handelt. Durch die Behandlung mit Desinfektionsmitteln werden die Bakterienzellen bei den ablaufenden oxidativen Prozessen angegriffen.

Erneut einsetzendes Wachstum darf nicht auf Bakterienzellen beruhen, die bei der Behandlung erlittenen Schäden mittels zelleigener Reparaturprozesse beheben und anschließend erneut wachsen.

In der Literatur ist dieses Phänomen mehrfach beschrieben, bei dem Bakterienzellen um ein vielfaches erhöhte Generationszeiten an den Tag legen, die den Eindruck erwecken können, es handle sich um einen vermeintlichen vbnc-Zustand. Ebenfalls diskutiert wurde die Möglichkeit, dass vbnc lediglich das Überleben einer oder weniger Zellen wäre, die in einer sonst vollständig inaktivierten Bakterienkultur für den erneuten Anstieg der Anzahl kultivierbarer Zellen verantwortlich wären [Bogosian und Bourneuf 2001; Whitesides und Oliver 1997].

Zu diesem Zweck wurden bei dieser Arbeit die Inkubationszeiten verlängert. Für die Kultivierung von Proben auf Ceftrimid-Agar wurde die Inkubationszeit auf bis zu 10 Tage ausgedehnt (s. Abschnitt 3.3.2). Die Inkubation von *P. aeruginosa* aus den Micro-Plate-Reader Versuchen in Tryptic Soy Broth wurde auf maximal 7 Tage ausgedehnt (s. Abschnitt 3.4.1.4 u. 3.4.2.1). Hier beschränken Verdunstungsprozesse der geringen Volumina in den einzelnen wells der Mikrotiterplatten eine längere Inkubation.

In keinem der Fälle konnte verspätetes Wachstum gezeigt werden. Bei gesunden Zellen liegt die Generationszeit von *P. aeruginosa* etwa bei 20-30 min. Die Ausdehnung der Inkubationszeit auf 10 Tage entspricht für die auf Selektivnährböden basierende Anzucht einer Verfünffachung der Inkubationszeit. In Umweltproben hätte dies zudem die Konsequenz, dass mögliche Pathogene, die sich im vbnc-Zustand befinden, bei Kultivierungsversuchen unter Umständen von anderen, möglicherweise nicht-pathogenen Zellen überwachsen werden.

Innerhalb der Micro-Plate-Reader Versuche ist Wachstum bereits nach ca. 10 Stunden messbar. Die verlängerte Inkubation der Micro-Plate-Reader Versuche stellt also eine mehr als Verfünffachung der eigentlich benötigten Inkubationszeit dar.

4.4.4 Umkehr des vbnc-Zustands

Während sich Bakterienzellen im vbnc-Zustand befinden, kann dieser am besten durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden beschrieben werden. Eine mögliche Methode ist der Nachweis einer intakten Zellmembran durch Live/Dead-Färbung („Bac-Light“). Bei dieser Art der Zellfärbung werden zwei Farbstoffe eingesetzt, die mit der DNA der Bakterien eine Bindung eingehen. Der Farbstoff Syto 9 kann in die Zellen eindringen und färbt sie grün. Der Farbstoff Propidiumiodid kann aufgrund seiner starken Ladung nur dann in die Zelle eindringen, wenn die Zellwand nicht mehr intakt ist und färbt die Zellen rot [Leuko et al. 2004]. Der Nachweis verbleibender Zellatmung ist möglich durch das Sichtbarmachen von Redoxvorgängen in der Bakterienzelle. Das ist möglich durch den Einsatz eines

Tetrazoliumsalzes. Bei intakter Atmung wird dieses enzymatisch durch die zelleigene mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase in das dunkelrot fluoreszierende Formazan umgewandelt. [Rich et al. 2001]. Zellwachstum kann mittels Pipemidinsäure nachgewiesen werden, die dafür sorgt, dass sich die Zellen zwar verlängern aber nicht teilen. [Kogure 1979].

Durch den in dieser Arbeit verwendeten Einsatz von FISH-Fluoreszenzsonden kann verbleibende Proteinbiosynthese nachgewiesen werden. Alle diese Methoden umschreiben den vbnc-Zustand aber nicht umfassend. Ziel muss es daher stets sein Zellen aus dem vbnc-Zustand zurückzuführen. Im Normalfall geschieht dies durch das Entfernen oder Neutralisieren des Stressors, der letzten Endes den vbnc-Zustand ausgelöst hat. Im Falle dieser Arbeit ist dies die Neutralisation des Desinfektionsmittels, dass den vbnc-Zustand ausgelöst hat [Oliver 2005]. Für diese Theorie sprechen die erzielten Ergebnisse, die in den Micro-Plate-Reader Versuchen mit und ohne den Einsatz eines Neutralisationsmittels erzielt wurden. So war es nicht möglich Zellen im vbnc-Zustand darzustellen, wenn das Desinfektionsmittel nach der Einwirkzeit neutralisiert wurde. Bisher war es aber nicht möglich *P. aeruginosa* aus dem vbnc-Zustand zurückzuführen.

Diese Arbeit zeigt jedoch, dass durch den vbnc-Zustand und denen zur Darstellung eines solchen Zustands ungeeigneten standardmäßigen Nachweisen auf Nährböden, den Mikroorganismen und im Besonderen auch pathogenen Mikroorganismen ein Reservoir geschaffen werden kann, welches von erheblicher medizinischer Bedeutung ist [Lleo` et al. 2007; Sardesai 2005].

Offen bleibt die Frage nach der Dauer, die ein Mikroorganismus wie *P. aeruginosa* im vbnc-Zustand verbleiben kann. Bunker et al. 2004 beschrieben in ihren Beobachtungen, dass beispielsweise *Pseudomonas fluorescens* im Erdboden bis zu einem Jahr im vbnc-Zustand überdauern kann.

Je nach Umwelteinfluss, der für den Übergang in den vbnc-Zustand verantwortlich ist, kann bei solchen Zeiträumen sicherlich nicht mehr von einem „Tod auf Raten“ gesprochen werden [Barcina et al. 2009; Nyström 2001], obwohl die Frage wie lange ein solcher Zustand (auch absichtlich) aufrecht erhalten werden kann, in Zukunft sicherlich beantwortet werden muss.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse legen nahe, dass der falsche Einsatz von Desinfektionsmitteln widerstandsfähige Biofilme heranzüchten kann.

Die Untersuchungen zum Einfluss von Desinfektionsmitteln auf die Biozönose der getesteten Biofilme zeigten auf der einen Seite die Wirksamkeit aller getesteten Desinfektionsmittel bzgl. der Reduktion von koloniebildenden Einheiten und in Bezug auf die Breite in der Diversität selbst, bei der hier kaum ein Vertreter der zuvor in Sequenzierungen ermittelten Risikogruppe 2 überlebte.

Auf der anderen Seite, zeigten die nach den Desinfektionen im Biofilm verbleibenden Spezies, unabhängig vom eingesetzten Desinfektionsmittel, hohe Übereinstimmung untereinander, so dass damit zu rechnen ist, dass diese persistierenden Stämme mitverantwortlich sind für die stete Neubesiedlung von Trinkwasserinstallationen. So konnten die folgenden Arten und Gattungen mindestens in jeweils zwei der behandelten Biofilme nachgewiesen werden: *Methylibium petroleiphilum*, *Sphingopyxis wittlariensis*, *Aquabacterium parvum*, *Methylibium sp.*, *Polaromonas sp.* Eine Neubesiedlung eines nach einer Desinfektion noch teilweise bestehenden Biofilms durch eben diese persistierenden Stämme kann bei dem falschen Einsatz von Desinfektionsmitteln zu einer Ausbildung von Biofilmgemeinschaften führen, die durch Selektion zunehmend widerstandsfähiger werden können. Der Anteil Bakterien, welcher bei Neubewuchs aus der Trinkwasserinstallation eingetragen werden, kann hier nicht bestimmt werden.

Die Untersuchungen zur Einnistung von *P. aeruginosa* in dieser Arbeit machten deutlich, dass der Verbleib von fakultativ-pathogenen Mikroorganismen trotz der Behandlung mit Desinfektionsmitteln wahrscheinlich ist. Die mit dem Wirkstoff „freiem Chlor“ aus elektrochemisch aktiviertem Wasser behandelten Modelle zeigten alle, dass *P. aeruginosa* mit wöchentlichen Stossbehandlungen von ca. 10mg Chlor/l (über einen Zeitraum von 6 Stunden) nicht vollständig inaktiviert werden kann. Der Verbleib von *P. aeruginosa* im Biofilm, war in den durchgeführten Untersuchungen nicht abhängig vom Alter des Biofilms (Modellbiofilm B und C), der Zusammensetzung der Biozönose (Modellbiofilm A), oder den Einnistungsbedingungen (Modellbiofilm D).

Die Versuche der mit *Pseudomonas aeruginosa* angeimpften Trinkwasserbiofilme zeigen, dass der Zielorganismus im Biofilm mittels einer heutzutage gängigen quantitativen real-time PCR oder auch mittels PNA-FISH nachweisbar ist bzw. weiterhin Stoffwechselaktivität belegt werden kann. Das Persistieren von fakultativ-pathogenen Mikroorganismen in Biofilmen auch nach wiederholter Behandlung mit Desinfektionsmitteln stellt ein Risiko dar.

Mittels des eingesetzten Micro-Plate-Reader Verfahrens, ist es zudem möglich geworden den Übergang von Mikroorganismen (hier: *Pseudomonas aeruginosa*) gezielt herbeizuführen. Die Ergebnisse zeigen, dass bereits ein geringes Unterschreiten der im Trinkwasser erlaubten Desinfektionsmittelkonzentration von 0,3 mg Chlor/l den vbnc-Zustand bei *Pseudomonas aeruginosa* auslösen kann. So waren in Abhängigkeit von der eingesetzten Bakterienkonzentration (s. Tab. 42) ca. 0,2-0,25 mg freies Chlor/l notwendig, um den vbnc-Zustand auszulösen.

Mangelnde Beprobungen in Umfang und Regelmäßigkeit, sowie in Problemfällen der fehlende Einsatz molekularbiologischer Methoden, sind momentan das größte Defizit bei der Überwachung von Trinkwasserinstallationen.

FAZIT

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, welchen Einfluss zu gering bzw. falsch eingesetzte Desinfektionsmittel auf die bakterielle Biofilmpopulation haben können. In Bezug auf die eingangs gestellten Fragestellungen konnte festgestellt werden, dass:

1. Alle eingesetzten Desinfektionsmittel die Anzahl der koloniebildenden Einheiten reduzieren.
2. Die nach der jeweiligen Behandlung aus dem Biofilm isolierten Stämme, deutliche Übereinstimmungen untereinander aufweisen, was, unabhängig vom eingesetzten Desinfektionsmittel, auf einen vergleichbaren Selektionsdruck hinweist.
3. *Pseudomonas aeruginosa* trotz wöchentlicher Zudosierung für Zeiträume von über 100 Tagen in den untersuchten Biofilmmodellen persistiert und trotz ausbleibender Kultivierbarkeit noch nachweisbaren Stoffwechsel besitzt.
4. Es möglich war, mit dem eigens etablierten Verfahren, für alle eingesetzten Desinfektionsmittel den vbnc-Zustand bei *P. aeruginosa* zu induzieren.

Die Tatsächliche Toleranz, eines nach unzureichender Behandlung mit Desinfektionsmitteln neu aufgewachsenen Biofilms, konnte hier nicht gezeigt werden. Weiterhin offen ist die Frage, wie der vbnc-Zustand umgekehrt werden kann.

Als Konsequenz kann zusammengefasst werden, dass die unzureichende Behandlung von Biofilmen mit falsch dosierten Desinfektionsmitteln zur Selektion innerhalb der Biofilme führen kann, was nach dem Absetzen einer Behandlung zu Neubewuchs durch persistierende Bakterien führen kann. Des Weiteren können fakultativ-pathogene Bakterien diese Art Behandlung nicht nur überdauern, sondern suggerieren auch durch ihre Unkultivierbarkeit eine falsche Sicherheit bei ausbleibendem Nachweis mittels Kultivierung auf Nährböden.

Zusammengenommen ergibt sich ein Bild, dass eine Neubewertung der Bedeutung von Biofilmen notwendig macht. Fehlende Regelwerke für die Kontrolle von Biofilmen können dazu führen, dass Biofilme unbemerkt eine Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen entwickeln, die neben den biofilmeigenen Schutzmechanismen auch vermehrt Mikroorganismen beherbergt, die erhöhte Toleranzen gegenüber Desinfektionsmitteln besitzen und gleichzeitig als Reservoir von fakultativ-pathogenen Mikroorganismen wie *P. aeruginosa* fungieren können.

LITERATURVERZEICHNIS

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

Adams, B.L., Bates, T.C., Oliver, J.D. (2003): Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. Applied Environmental Microbiology, 69, 7462-7466

Airey, P. und Verran, J. (2007): Potential use of copper as a hygienic surface; problems associated with cumulative soiling and cleaning. Journal of Hospital Infection, 67, 271-277

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

Allen-Austin, D., Austin, B., und Colwell, R.R. (1984): Survival of *Aeromonas salmonicida* in river water. FEMS Microbiol. Lett., 21, 143-146

Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S. und Carmeli, Y. (2006): Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006, 50(1), 43-48

Anaissie, E.J., Penzak, S.R., Dignani, M.C. (2002): The Hospital Water Supply as a Source of Nosocomial Infections - A plea for Action: Arch Intern Med, 162, 1483-1492

Andersson, A.F. und Banfield, J.F. (2008): Virus Population Dynamics and Acquired Virus Resistance in Natural Microbial Communities. Science 23 May 2008, 320(5879), 1047-1050

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

Aumeran, C., Paillard, C., Robin, F., Kanold, J., Baud, O., Bonnet, R., Souweine, B. und Traore, O. (2007): *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* outbreak associated with contaminated water outlets in an oncohaematology pediatric unit. J Hosp Infect 2007, 65, 47-53

Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe - ABAS (2012): Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe - Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen (TRBA 466). Gemeinsamen Ministerialblatt (GMBI) Nr. 68-80 vom 6. Dezember 2010 (Ergänzung April 2012, GMBI Nr. 15-20 vom 25.04.2012, S. 380)

- 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
- Barbeau, J., Gauthier, C. und Payment, P.** (1998): Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 1998, 44(11), 1019-1028
- Barcina, I. und Arana, I.** (2009): The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Rev Environ Sci Biotechnol*, 8, 245–255
- Baribeau, N., Prevost, M., Desjardins, R., Lafrance, P. und Gates, D.J.** (2002): Chlorite and chlorate ion variability in distribution systems. *American Water Works Association*, 94(7), 96-105
- 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
- Bej, A.K., Mahbubani, H. und Atlas, R.M.** (1991): Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 597-600
- Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H.-J., Arvin, E. und Jorgensen, C.** (2002): Dynamics of biofilm formation in a model drinking water distribution system. *J Water SRT – Aqua*, 51, 399-406.
- Berthe, F.C.J., Michel, C. und Bernardet J.-F.** (1995): Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. *Dis. aquat. Org.* 1995, (21), 151-155
- Bogosian, G., Morris, P.J.L., und O'Neill, J.P.** (1998): A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1736-1742
- Bogosian, G. und Bourneuf, E.V.** (2001): A matter of bacterial life and death. *EMBO Rep*, 9, 770–774
- Boonaert, C.J.P., Dufrene, Y.F. und Rouxhet, P.G., eds.** (2002): Adhesion (primary) of microorganisms onto surfaces. (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. Zentralbl.Bakteriol.Hyg.I Abt.Orig.B, 172, 534-562

Boyd, A. und Chakrabarty, A.M. (1994): Role of Alginate Lyase in Cell Detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology 1994, 60(7), 2355-2359

Bredholt, S., Maukonen, 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

Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Greub, G., Thomas, V. und Briandet R. (2011): Dynamics of the Action of Biocides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55(6), 2648-2654

Bunker ST, Bates TC & Oliver JD (2004): Effects of temperature on detection of plasmid and chromosomally encoded gfp- and lux-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. Environ Biosafety Res, 3, 1–8

Buswell, C.M., Herlihy, Y.M., Marsh, P.D., Keevil, C.W. und Leach, S.A. (1997): Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. Journal of Applied Microbiology, 83, 477–484

BVerfGE 49, 89 (135) = NJW 1979, 359; BVerwG, Buchholz 401.64 § 7 AbwAG Nr. 2 = NVwZ 1993, 998; Buchholz 406.25 § 3 BImSchG Nr. 9; vgl. auch § 2 X UGBI; 215 E.

Camps, S.M., Rijs, A.J., de Graaf, B., Paulitsch, A.H., Verweij, P.E. und Voss, A. (2011): Hospital point-of-use water filtration to prevent exposure to waterborne pathogens. BMC Proceedings 2011, 5(6), 310

Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G.M. und Samore, M.H. (1999): Emergence of Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Risks Associated with Different Antipseudomonal Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(6), 1379–1382

CEN (2005): Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika. In: EN 14885:2006, TC 216, Europäisches Komitee für Normung

- CEN** (2006): Normung und damit zusammenhängende Tätigkeiten – Allgemeine Begriffe (ISO/IEC Guide 2:2004); In: EN 45020:2006, Europäisches Komitee für Normung
- 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 of microbial transformations. In: *Biofilms* (New York, John Wiley and Sons), 233-264
- 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
- Chen, X. und Stewart, P.S.** (2000): Biofilmremoval caused by chemical treatments. *Water research* 2000, 34(17), 4229-4233
- Cholley, P., Thouverez, M., Floret, N., Bertrand, X. und Talon, D.** (2008): The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med.*, 34, 1428–1433
- Cholodny, N.** (1930): Über eine Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. *Arch Mikrobiol*, 1, 620
- Choong, S., Whitfield, H.** (2000): Biofilms and their role in infections in urology. *BJU International*, 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
- Chuanchuen, R., Narasaki, C.T. und Schweizer, H.P.** (2002): The MexJK Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprM for Antibiotic Efflux but Not for Efflux of Triclosan. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 5036–5044
- Clark, A.P.** (2006): Nosocomial Infections and Bath Water: Any Cause for Concern? *Clinical Nurse Specialist*, 20(3), 119-123

- 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
- Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A. und Palmer, L.M.** (1985): Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology*, 3, 817-820
- Conn, H.J.** (1932): Titel ? *Z Bakt*, 87, 233
- Costerton, J.W.** (1995): Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 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
- Costerton, J.W., Montanaro, L., Arciola, C.R.** (2005): Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs* 2005, 28(11), 1062-1068
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P.** (1999): Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284, 1318-1322
- Craven, D.E.** (2006): Preventing ventilator-associated pneumonia in adults: sowing seeds of change. *Chest* 2006, 130, 251-260
- DAB** (2010): Deutsches Arzneibuch 2010. Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2008 inkl. Nachträge 6.1. - 6.7, Amtliche 6. deutsche Ausgabe
- Davis, C.P., Shirliff, M.E. und Trieff, N.M.** (1994): Quantification, qualification 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 Polymeric Substances* (Heidelberg, Springer)

Davies, D. (2003): Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 114-122

de Lissovoy, G., Fraeman, K., Hutchins, V., Murphy, D., Song, D. und Vaughn, B.B. (2009): Surgical site infection: Incidence and impact on hospital utilization and treatment costs. *AJIC: American Journal of Infection Control*, 37(5), 387-397

DeQueiroz, G.A. und Day, D.F. (2006): Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 794–802

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

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 Clinical Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 167-193

Donlan, R.M., Pipes, W.O. und Yohe, T.L. (1994): Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. *Wat. Res.*, 28(6), 1497-1503.

Drenkard, E. (2003): Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *Microbes and Infection*, 5(13), 1213–1219

DVGW (1997): Arbeitsblatt W 294 - Anforderungen an UV-Desinfektionsgeräte und deren Betrieb (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 (2009): Desinfektion von Trinkwasser-Installationen zur Beseitigung mikrobieller Kontaminationen. (Dachverband des Gas- und Wasserfaches e.V.)

Eboigbodin, K.E., Seth, A. und Biggs, C.A. (2008): A Review of Biofilms in Domestic Plumbing. *Journal AWWA*, 100(10), 131-138

Dwidjosiswojo, Z., Richard, J., Moritz, M.M., Dopp, E., Flemming, H.-C. und Wingender, J. (2011): Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under

conditions relevant to drinking water environments. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 485-492.

Eisnor, J.D. und Gagnon, G.A. (2004): Impact of secondary disinfection on corrosion in a model water distribution system, *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA*, 53(7), 441-452

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

Engel, J. und Balachandran, P. (2009): Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 2009, 12, 61-66

BMBF (2010): Erkenntnisse aus dem BMBF-Verbundprojekt. „Biofilme in der Trinkwasser-Installation“ Version 2.1 - mit Glossar. Projektdauer: 01.10.2006 – 30.04.2010

Exner, M. (2002): Prevention and Management of Substance Terrorism against Water Supply (Denmark WHO ECEH Rome, Kopenhagen, WHO)

Exner, M. (2008): Hygiene und Öffentliche Gesundheit in Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft. Online unter: http://www.hygiene-und-oeffentliche-gesundheit.de/publikationen/Hygiene_oeffentlGesundheit.pdf

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. (2010): *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. (2010): 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., Kistemann, T., Unger, G., Hansis, M. und Nassauer, A. (1999): Zukünftige Präventions- und Kontrollstrategien in der Krankenhaushygiene. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz*, 42, 789-801

Exner, M., Kramer, A., Kistemann, T., Gebel, J. und Engelhart, S. (2007): Wasser als Infektionsquelle in medizinischen Einrichtungen, Prävention und Kontrolle. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz*, 50, 302-311

Exner, M., Kramer, A., Lajoie, L., Gebel, J., Engelhart, S., Hartemann, P. (2005): Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am. J. Infect. Control*, 33, 26-40

Exner, M., Möller, M., und Dott, W. (1984): Experimentelle Untersuchungen zur Ablösung und Verhinderung der Ausbildung mikrobieller Beläge durch Desinfektionsmittel. *Goldschmidt informiert*, 3, 27-31

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 Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene*, 183, 549-563

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. (2002): Zur Bedeutung der Wasserhygiene in der Trinkwasserversorgung. *Gas- und Wasserfach. Wasser, Abwasser* 2002, 143(13), 12-14

Exner, M. und Kistemann, T. (2004): Bedeutung der Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung 2001) für die Krankenhaushygiene. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, 47, 384-391

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 (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
- Fantuzzi, G., Sansebastiano, G., Righi, E., Predieri, G., Cesari, C., Zoni, R., Veronesi, L., Saglia, S. und Aggazzotti, G.** (2003): 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(5), 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
- Filhol, J.-S. und Neurock, M.** (2006): Elucidation of the Electrochemical Activation of Water over Pd by First Principles. Angewandte Chemie 2006, 118(3), 416–420
- 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.** (2000): "Biofilme - das Leben am Rande der Wasserphase." Nachr. Chemie Tech. Lab. 2000, 48, 442-447
- Flemming, H.-C.** (2002): Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. Applied Microbiology and Biotechnology, 59(6), 629-640
- 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 (EPS)--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(1), 30-42
- Fraser, J. und Gilmour, N.J.** (1979): The identification of *Moraxella bovis* and *Neisseria ovis* from the eyes of cattle and sheep. Res Vet Sci. 1979, 27(1), 127-128

Fuchs, G. (Hrsg.) (2007): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag 2007, 8. Auflage

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, 28(1), 11-27

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

Gales, A.C., Reis, A.O. und Jones, R.N. (2001): Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. J Clin Microbiol 2001, 39, 183–90

Gaynes, R. und Edwards, J.R. (2005): Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005, 41, 848–854

Gebara, F. (1999): Activated sludge biofilm wastewatertreatment system. Water Research 1999, 33(1), 230-238

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., Werner, H.-P., Kirsch-Altena, A., Bansemir, K. (2002): Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren. Mhp-Verlag 2002, 68 Seiten

Geesey, G.G., Richardson, W.T., Yeomans, H.G., Irvin, R.T. und Costerton, J.W. (1977): Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. Can J Microbiol., 23(12), 1733-1736

Ginsberg, M.D. und Hock, V.F. (2004): Terrorism and Security of Water Distribution Systems: A Primer. Defense & Security Analysis 2004, 20(4), 373-380

Göttlich, E. und Flemming, H.-C. (2002): Auftreten von obligat und fakultativ pathogenen Organismen in Trinkwasser-Biofilmen. IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung, 86-102

Grimes, D.J., Atwell, R.W., Brayton, P.R., Palmer, L.M., Rollins, D.M., Roszak, D.M., Singleton, F.L., Tamplin, M.L. und Colwell, R.R. (1986): The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiol. Sci.*, 3, 24-329

Guo, G. und Chen, X. (2009): Halogenating reaction activity of aromatic organic compounds during disinfection of drinking water. *J Hazard Mater*, 163, 1207-1212

Hancock, R.E.W. (1998): Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 1998, 27(1), 93–99

Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S.J. und Tolker-Nielsen, T. (2010): An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010, 59, 253–268

Hausner, M. und Wuertz, S. (1999): High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3710-3713

Henne, K., Kahlisch, L., Brettar, I. und Höfle, M.G. (2012): Analysis of structure and composition of bacterial core communities in mature drinking water biofilms and bulk water of a citywide network in Germany. *Appl Environ Microbiol.*, 78(10), 3530-3538

Henrici, A.T. (1933): Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique. *J Bacteriol*, 25(3), 277-286

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Anderson, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S. und Givskov, M.et al. (2002): Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. 148(1), 87-102

Hermesen, E.D., Sullivan, C.J. und Rotschafer J.C. (2003): Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am* 2003, 17, 545-562

Heukelekian, H., and Heller, A. (1940): Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *J. Bacteriol.* 40, 547–558

Hofmann, R., Andrews, R.C. und Ye, Q. (1999): Impact of Giardia Inactivation Requirements on ClO₂ By-Products. *Environmental Technology*, 20(2), 147 – 158

- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. und Ciofu, O.** (2010): Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010, 35, 322–332
- 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
- Hood, M.A., Guckert, J.B., White, D.C. und Deck, F.** (1986): Effect of nutrient deprivation on lipid, carbo-hydrate, DNA, RNA and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 788-793
- Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G. und Gardam, M.A.** (2009): Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Colonization and Infection Secondary to Imperfect Intensive Care Unit Room Design. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 30(1), 25-33
- Howard, D.H., Scott II, R.D., Packard, R. und Jones, D.** (2003): The global impact of drug resistance. *Clin Infect Dis* 2003, 36, 4-10
- 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
- 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(2), 171-176
- Huang, Y.-R., Hsu, S.-Y., Huang, Y.-W. und Hwang, D.-F.** (2008): Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control*, 19, 329–345
- Hussong, D., Colwell, R.R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A.D., Weiner, R.M., und Burge, W.D.** (1987): Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Bio/Technology*, 5, 947-950
- Isobe, S., Lee, C.-Y. und Yoshida, K.** (2004): Conference paper - Rice is life: scientific perspectives for the 21st century. *Proceedings of the World Rice Research Conference held in Tsukuba, Japan*, 4-7 November 2004, 270-272
- Jefferson, K.K.** (2004): What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163–173
- Johnson, J.D. und Qualls, R.G.** (1981): Ultraviolet disinfection of secondary effluent: measurement of dose and effects of filtration. Report of EPA project R 804770010, Municipal Environmental Research Laboratory, Cincinnati, Ohio

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

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

Kayser, F.H., Böttger, E.C. und Zinkernagel, R.M. (Hrsg.) (2010): Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag, 12. Auflage

Kell, D.B., Kapreylants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.L. und Barer, M.R. (1998): Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Ant.van Leeuwenhoek*, 73,169-187

Kelley, S.T., Theisen, U., Angenent, L.T., St. Amand, A. und Pace, N.R. (2004): Molecular Analysis of Shower Curtain Biofilm Microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4187-4192

Kerr, K.G. und Snelling, A.M. (2009): *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection* (2009), 73, 338-344

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

Kogure, K., Simidu, U., Taga, N. (1979): A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol.* 1979, 25(3), 415-420

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

Lappin-Scott, H. (1999): Claude E. ZoBell - his life and contributions to biofilm. *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology (Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada 1999)*

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(10), 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

Lenz, J. (2011): Etablierung eines praxisnahen Prüfverfahrens für chemische Desinfektionsverfahren zur Wirksamkeit gegenüber Trinkwasserbiofilmen. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Jahrgang 2011

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

Leuko, S., Legat, A., Fendrihan, S. und Stan-Lotter, H. (2004): Evaluation of the LIVE/DEAD *BacLight* Kit for Detection of Extremophilic Archaea and Visualization of Microorganisms in Environmental Hypersaline Samples. *Appl Environ Microbiol*. 2004, 70(11), 6884–6886

Lewis, K. (2001): Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001, 45(4), 999-1007

Lewis, K. (2005): Persister Cells and the Riddle of Biofilm Survival. *Biochemistry*, 20(2), 267-274.

Lewis, K. (2008): Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells. *Current topics I Microbiology and Immunology*, 322, 107-131

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(6), 1514-1519

Li, J.-W., Yu, Z., Cai, X., Gao, M. und Chao F. (1996): Trihalomethanes formation in water treated with chlorine dioxide. *Water Res* 1996, 30(10), 2371–2376

Li, X.Z., Livermore, D.M. und Nikaido, H. (1994): Role of Efflux Pump(s) in Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to Tetracycline, Chloramphenicol, and Norfloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994, 38(8), 1732-1741

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* 2010, 81(9), 1075-1083

Livermore, D.M. (2002): Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases* 2002, 34, 634–340

Lleo` MM, Benedetti D, Tafi MC, Signoretto C & Canepari P (2007): Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ Microbiol* 9: 2313–2320

Lomovskaya, O., Warren, M.S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H. und Lee, V.J. (2001): Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(1), 105–116

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(4), 423-433

Loughlin, M.F., Jones, M.V. und Lambert, P.A (2002): *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002, 49, 631-639

McCaig, A.E., Glover, L.A. und Prosser, J.I. (1999): Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved upland grass pastures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1721–1730

McKay, A.M. (1992): Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Letters in Applied Microbiology*, 14, 129-135

Madigan M.T., Martinko, J.M. (Hrsg.) (2006): *Brock Mikrobiologie*. Pearson Education, 2006, 11. Auflage

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

Marshall, K.C. (1985): Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In: D. C. Savage and M. Fletcher (ed.), *Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance*. Plenum Press, New York, N.Y., 133-141

Marshall, K.C. und Cruickshank, R.H. (1973): Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces. *Arch Mikrobiol*, 91, 29-40

Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. und Nishino, T. (2000): Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2242–2246

Mathieu, L. und Dollard, M.A. (1990): Effet de l'acide peracetique sur des bacteries en suspension et fixtees. *J Francais d'Hydro*, 21, 101-111

Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., Tulkens, P.M. und Van Bambeke, F. (2007): *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13, 560-578

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

Molin, S. und Tolker-Nielsen, T. (2003): Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 255-261.

Morgenroth, E. und Wilderer, P.A. (1999): Influence of Detachment Mechanisms on Competition in Biofilms. *Wat. Res.* 2000, 34(2), 417-426

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

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(3), 190-197

- 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
- Muttamara, S., Sales, C.I. und Gazali, Z.** (1995): The formation of trihalomethane from chemical disinfectants and humic substances in drinking water. *Water Supply* 1995, 13(2), 105–117
- Morita, R.Y.** (1982): Starvation-survival of heterotrophs in the marine environment. *Advances in Microbial Ecology*, 6, 171-198
- Mott, I.E.C., Stickler, D.J., Coakley, W.T. und Bott, T.R.** (1998): The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound. *Journal of Applied Microbiology* 1998, 84, 509–514
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)** (2004): System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*, 32, 470–485
- Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M. und Heijnen, J.J.** (2000): Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology* 2000, 80, 1–33
- Nickel, J.C., Ruseska, I. und Costerton, J.W.** (1985): Tobramycin resistance of cells of *Pseudomonas aeruginosa* growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother*, 27, 619-624
- Nyström, T.** (2001): Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch Microbiol*, 176, 159–164
- O'Toole, G.A., Kaplan, H.B. und Kolter, R.** (2000): Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol*, 54, 49-79
- O'Toole, G.A., Kolter R.** (1998): Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*. 1998, 30(2), 295-304
- 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.** (2000a): Problems in detecting dormant (VBNC) cells and the role of DNA elements in this response. In: Jansson, J.K., van Elsas, J.D. und Bailey, M.J. (eds.), *Tracking Genetically-Engineered Microorganisms*. Landes Biosciences, Georgetown, TX, 1-15

- Oliver, J.D.** (2000b): The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In: Colwell, R.R. und Grimes, D.J. (eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., 277-299
- Oliver, J.D.** (2000c): The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. In: Bell, C.R., Brylinsky, M. und Johnson-Green, P. (eds.), *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Atlantic Canada Soc. Microb. Ecol., Halifax, Canada, 723-730
- Oliver, J.D.** (2005): Viable but nonculturable bacteria in food environments. *Food-Borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology* (Fratamico PM, Bhunia AK & Smith JL, eds), Caister Academic Press, Norfolk, UK, 99-112
- Ortolano, G., Canonica, F. und Cervia, J.** (2007): Point-of-Use Water Filtration Complements Systemic Treatment to Reduce Health Care-Associated Legionnaires Disease. *Clin Infect Dis.* 2007, 45(1), 135-136
- Otte, A., Gebel, J. und M. Exner** (2005): Elektrochemische Aktivierung als potentielles Verfahren zur Vermeidung und Elimination von Biofilmen in Trinkwasserführenden Systemen. *Hyg Med* 2005, 30(11), 398-403
- Palmer, R.J. Jr., und White, D.C.** (1997): Developmentalbiology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology*, 1997, 5(11), 435–440
- Pang, C.M., Hong, P., Guo, H. und Liu, W.-T.** (2005): Biofilm Formation Characteristics of Bacterial Isolates Retrieved from a Reverse Osmosis Membrane. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 7541-7550
- Paola, L.** (2006): Treating diabetic foot ulcers with super-oxidized water, a look at advances in this pH-neutral non-toxic treatment. *Wounds*, 1, 14-16
- Parsek, M.R. und Greenberg, E.P.** (2005): Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol*, 13, 27-33
- Parsek, M.R. und Singh, P.K.** (2003): Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003, 57, 677–701
- Pawar, M., Mehta, Y., Khurana, P., Chaudhary, A., Kulkarni, V. und Trehan, N.** (2003): Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factors, outcome, and microbiology. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 17, 22–28

Pearson, J.P., Delden, C.V., und Iglewski, B.H. (1999): Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of Bacteriology*, 181, 1203–1210

Pena, C., Dominguez, M.A., Pujol, M., Verdaguer, R., Gudiol, F., Ariza, J. (2003): An outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a urology ward. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9, 938-943

Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P. und Iglewski, B.H. (1999): Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, 96, 11229–11234

Pitten, F.A., Panzig, B., Schroder, G., Tietze, K., Kramer, A. (2001): Transmission of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* at a German university hospital. *J Hosp Infect* 2001, 47, 125-130

Poole, K. (2002): Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 2002, 92, 55–64

Potera, C. (1996): Biofilms Invade Microbiology. *Science*, 27(273), 1795-1797

Pringle, J.H. und Fletcher, M. (1986): Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 51(6), 1321-1325

Ramey, B.E., Koutsoudis, M., von Bodman, S.B. und Fuqua, C. (2004): Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr Opin Microbiol*, 7, 602-609

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

Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. (1985): A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1-7

Reuter, S., Sigge, A., Wiedeck, H. und Trautmann, M. (2002): Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit. Care. Med.*, 30(10), 2222-2228

Rich, P.R., Mischis, L.A., Purton, S. und Wiskich, J.T. (2001): The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiol Lett.* 2001, 202(2), 181-187

Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H. und Gaynes, R.P. (2000): Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 21, 510–515

Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E. und Handley, P.S. (2003): Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology* 2003, 11(2), 94-100

Rickard, A.H., Leach, S.A., Hall, L.S., Buswell, C.M., High, N.J., und Handley, P.S. (2002): Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3644–3650

Rittmann, B.E. (1989): Detachment from biofilms. In: *Structure and function of biofilms* (John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, USA), 49-58

RKI (2004): Zu einer Häufung von Norovirus-Erkrankungen als Folge verunreinigten Trinkwassers. *Epidemiologisches Bulletin* 2004, 36, 301-302

RKI (2010): Anforderungen an die Hygiene bei der medizinischen Versorgung von immunsupprimierten Patienten (Robert Koch-Institut), *Bundesgesundheitsbl* 2010, 53, 357–388

Rochex A., Masse A., Escudie R., Godon J.J. und Bernet N. (2009): Influence of abrasion on biofilm detachment: Evidence for stratification of the biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(3), 467–470

Rollins, D.M. und Colwell, R.R. (1986): Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 531-538

Rosef, O., Kapperud, G. und Skjerve, E. (1987): Comparison of media and filtration procedures for qualitative recovery of thermotolerant *Campylobacter* spp. from naturally contaminated surface water. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 29-39

Roszak, D.B., Grimes, D.J. und Colwell, R.R. (1984): Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.*, 30, 334-338

Röttlich, H. (2010): Legionellenbekämpfung - Konsequente Umsetzung in der Praxis ist notwendig! *Der Hygieneinspektor* 2010, (01), 65-67

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

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

Sardesai YN (2005): Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health. *Curr Sci*, 89, 1650

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. und Davies, D.G. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140–1154

Scheible, O.K., Bassel, C.D. und Venosa, A.D. (1981): Ultraviolet disinfection of a secondary wastewater treatment plant effluent. *Environmental Protection Agency*, 600(2), 81-152

Schlegel, H.G. (1999): Geschichte der Mikrobiologie. *Acta Historica Leopoldina*, Vol. 28 Halle (Saale): Deutsche Akademie der naturforscher Leopoldina

Schmeisser, C., Stöckigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.-C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.-E. und Streit, W.R. (2003): Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), 7298-7309

Schneider, R.P. und Leis, A., eds. (2002): Conditioning films in aquatic environments. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, USA)

Schroeter, J. (1872): Ueber einige durch Bacterien gebildete Pigmente. In: Cohn, F., *Beiträge zu Biologie der Pflanzen*, 1(2), 109-126

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(3), 591-601

Schweizer, H.P. (2003): Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res.* 2003, 2(1), 48-62

Sexton, P. und Harrison A.C. (2008): Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. *Eur Respir J* 2008; 31, 1322–1333

Shannon, K.E., Lee, D.-Y., Trevors, J.T., Beaudette, L.A. (2007): Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of the total Environment*, 382(1), 121-129

Sheffer, P., Stout, J., Muder, R. und Wagener, M. (2004): Efficacy of new point-of-use water filters to prevent exposure to *Legionella* and waterborne bacteria [poster]. *Am J Infect Control* 2004, 32, 87

Simmon, K.E., Pounder, J.I., Greene, J.N., Walsh, F., Anderson, C.M., Cohen, S. und Petti C.A. (2007): Identification of an Emerging Pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* Sequencing of Clinical Isolates Collected in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1978–1980

Simões, L.C., Lemos, M., Pereira, A.M., Abreu, A.C., Saavedra, M.J. und Simões, M. (2011): Persister cells in a biofilm treated with a biocide. *Biofouling*, 27(4)

Singh, A., Yeager, R. und McFeters, G.A. (1986): Assessment of in vivo revival, growth and pathogenicity of *Escherichia coli* strains after copper and chlorine induced injury. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 832-837

Skraber, S., Schijven, J., Gantzer, C. und de Roda Husman, A.M. (2005): Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? *Biofilms* 200), 2, 105-117

Smith, K.M., Bu, Y. und Suga, H. (2003): Induction and Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Synthetic Autoinducer Analogs *Microbiology* 2002, 148, 87–102

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

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(8), 575-579

Sritharan, M. und Sritharan, V. (2004): Emerging problems in the management of infectious diseases: The biofilms. *Indian J Med Microbiol* 2004, 22, 140-142

Stackebrandt, E. und Goebel, B.M. (1994): Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44(4), 846–849

- Stadtwerke Bonn (SWB) Hrsg.** (2011): Trinkwasseranalyse 2011. www.stadtwerke-bonn.de/fileadmin/bilder/EnW_Relaunch_final/PDFs/Wasser/Wasseranalyse_2011.pdf (abgerufen am 21.Juni 2012)
- Steinert, M., Emödy, L., Amann, R. und Hacker, J.** (1997): Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2047-2053
- Strateva, T. und Yordanov, D.** (2009): *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* 2009, 58, 1133–1148
- 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, 19-28
- Stewart, P.S. und Costerton, J.W.** (2001): Antibiotic Resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 2001, 358(9276), 135,138
- Sutherland, I.W.** (1998): "Novel and established applications of microbial polysaccharides." *TIBTech* 1998, 16, 41-46
- Sutherland, I.W.** (2001a): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001, 147, 3–9
- Sutherland, I.W.** (2001b): The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9, 222–227
- Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C. und Tait, K.** (2004): The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 2004, 232, 1-6
- Szewzyk, U., Szewzyk, R.** (2003): Biofilme – die etwas andere Lebensweise. *BIOspektrum*, 3, 253-255
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W. und Schleifer, K.-H.** (2000): Microbiological Safety of Drinking Water. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000, 54, 81-127
- Thomas, C.M. und Nielsen, K.M.** (2005): Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 711-721
- 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)

- Tortoli, E., Bartoloni, A., Böttger, E.C., Emler, S., Garzelli, C., Magliano, E., Mantella, A., Rastogi, N., Rindi, L., Scarparo, C., und Urbano, P.** (2001): Burden of Unidentifiable Mycobacteria in a Reference Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4058–4065
- Toté, K., Horemans, T., Vanden Berghe, D., Maes, L. und Cos, P.** (2011): Inhibitory Effect of Biocides on the Viable Masses and Matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 3135–3142
- Trautmann, M., Halder, S., Lepper, P.M., Exner, M.** (2009): Reservoir von *Pseudomonas aeruginosa* auf der Intensivstation - Die Bedeutung des Wassers als Infektionsquelle. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2009, 52, 339–344
- Trulear, M.G. und Characklis, W.G.** (1982): Dynamics of Biofilm Processes. *Journal - Water Pollution Control Federation*, 54(9), 1288-1301
- Ultee, A., Souvatzi, N., Maniadi, K. et al.** (2004): Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. *Journal of Applied Microbiology*; 96: 560–568
- Umimoto, K., Emori, Y., Fujita, H. und Jokei, K.** (2003): Evaluation of strong acidic electrolyzed water for the disinfection. *Biomedical Engineering 2003. IEEE EMBS Asian-Pacific Conference on 20-22 Oct. 2003*, 360-361
- Umweltbundesamt** (1996): Trinkwasser - Desinfektion und Bewertung der Desinfektionsnebenprodukte - Merkblatt 181/5a der FKST für Gesundheitsämter. (Umweltmed. Informationsdienst), 17-19
- Umweltbundesamt** (2005): Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß §11 Trinkwasserverordnung 2001
- Vandevivere, P. und Kirchman, D.L.** (1993): Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl Environ Microbiol* 59, 3280-3286
- Vasickova, P., Pavlik, I., Verani, M. und Carducci, A.** (2010): Issues Concerning Survival of Viruses on Surfaces. *Food and Environmental Virology* 2010, 2(1), 24-34
- 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
- Vickery, K., Pajkos, A., Cossart, Y.** (2004): Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. *Am J Infect Control* 2004, 32(3), 170-6
- 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
- Votyakova, T.V., Kaprelyants, A.S. und Kell, D.B.** (1994): Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase: the population effect. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3284-3291
- 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(4), 384-390
- Watnick, P., Kolter, R.** (2000): Biofilm, City of Microbes. *J. Bacteriol.* 2000, 182(10), 2675-2679
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. und Lane D.J.** (1991): 16S ribosomal DNA for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173, 697-703
- Whitesides, M.D. und Oliver, J.D.** (1997): Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3025-3028
- WHG** (2002): Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushaltes (Wasserhaushaltsgesetz – WHG); 27.07.1957; Wasserhaushaltsgesetz in der Fassung in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. August 2002, BGBl. I S. 3245), geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 10. Mai 2007 (BGBl. I S. 666)
- WHO** (2011): Guidelines for drinking water quality 4th Ed. (Geneva)
- Wilson, M.** (2001): Bacterial Biofilm and human disease. *Science Progress*, 84(3), 235-254
- Wilson, M.** (2008): *Bacteriology of Humans: An Ecological Perspective*. Wiley-Blackwell 2008

- 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 wildtype (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70, 5847-5852
- Wingender, J., Neu, T.R. und Flemming H.-C.** (1999): Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, Structure, and Function. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999, 258
- Winogradsky, S.** (1928): The Direct Method in Soil Microbiology and Its Application to the Study of Nitrogen Fixation *Soil Sci* 25, 37-44
- Wolvos, T.** (2006): Advanced wound care with stable, super-oxidized water, a look at how combination therapy can optimize wound healing. *Wounds*, 1, 11-13
- Wood, M.J. und Moellering Jr., R.C.** (2003): Microbial resistance: bacteria and more. *Clin Infect Dis* 2003, 36, 2-3
- Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F.L., Atwell, R.W., Grimes, D.J. und Colwell R.R.** (1982): Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, 8, 313-323
- Yoneda, K., Chikumi, H., Murata, T., Gotoh, N., Yamamoto, H., Fujiwara, H., Nishino, T. und Shimizu, E** (2004): Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters* 2005, 243, 125–131
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. Und Hwang, S.** (2005): Group-Specific Primer and Probe Sets to Detect Methanogenic Communities Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, 89(6), 670-679
- 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, 253-260
- 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

7 DANKSAGUNG

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Martin Exner, der es mir überhaupt ermöglicht hat diese Arbeit anzufertigen. Insbesondere gilt ihm mein Dank auch dafür, dass er mir ein solch interessantes und relevantes Thema anvertraute und mich während meiner Zeit am Institut stets fachlich unterstützte und meine Arbeit mit Interesse verfolgt hat.

Herrn Dr. Jürgen Gebel danke ich dafür, dass er es mir ermöglichte diese Arbeit in seiner Abteilung anzufertigen. Seine stets offene Tür, seine Bereitschaft zur fachlichen Diskussion und sein Interesse an meinem Fortkommen sorgten dafür, dass ich nie den roten Faden verlor.

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier möchte ich mich ganz herzlich für die so bereitwillige Übernahme des Koreferats bedanken.

Mein Dank gilt zudem der gesamten Desinfektionsmitteltestung, die mich so freundlich aufgenommen hat und durch ihre unermüdliche Bereitschaft mir mit Rat und Tat zu Seite zu stehen eine große Unterstützung war. Namentlich erwähnt an dieser Stelle seinen Sylvia, Lena, Kerstin, Steffi, Swapna und Steffi. An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere Johannes hervorheben, der mich auf meinem Weg so lange begleitete und mich für eine tolle Zeit bei ihm bedanken.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Öffentliche Gesundheit. Hier möchte ich besonders Sebastian und Tobi (und auch nochmal Johannes) erwähnen, die mir auch abseits des Instituts viel Freude bereitet haben.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Bundesministerium für Bildung und Forschung. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des BMBF - geförderten Verbundprojekts „Erkennung und Bekämpfung von vorübergehend unkultivierbaren Pathogenen in der Trinkwasser-Installation“ durchgeführt.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte und mich stets uneingeschränkt unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an Carmen, die während all der Zeit mein Ansporn war und mir, wenn nötig, einen Tritt verpasst hat. Ihr bedingungsloser Rückhalt, ihre Geduld und ihr in mich gesetztes Vertrauen, haben mir stets Kraft gegeben.