

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. H. Karch -

**Untersuchungen zum Wachstum von Mikroorganismen  
in Trinkwasseranlagen in Abhängigkeit  
von Temperatur und Leitungsmaterial**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur  
Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:  
Eddie Michael Alexander Thoneick  
aus Geldern

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**Dekan:** **Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz**

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. W. Mathys

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. W. Fegeler

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Karch-  
Referent: Prof. Dr. W. Mathys  
Koreferent: Prof. Dr. W. Fegeler

## ZUSAMMENFASSUNG

### **Untersuchungen zum Wachstum von Mikroorganismen in Trinkwasseranlagen in Abhängigkeit von Temperatur und Leitungsmaterial**

Eddie Thoneick

Hygienisch unerwünschte Biofilme können sich in allen wasserbenetzten Kompartimenten bei der Trinkwassergewinnung und Trinkwasserverteilung bilden und Lebensraum für Krankheitserreger werden. Da die begünstigenden Wachstumsfaktoren noch nicht vollständig bekannt sind untersuchten wir hier das Wachstum von Mikroorganismen Abhängigkeit von Temperatur und Rohrmaterial.

Um das Wachstum eines Biofilms unter praxisnahen Bedingungen zu simulieren, wurde ein Testsystem hergestellt, das Leitungsmaterialien aus Kupfer und verschiedenen organischen Rohrmaterialien beinhaltet. Die Messung der Biofilmmasse erfolgte mittels einer kulturellen Nachweises von Homogenaten auf R2A-Agar und DEV-Agar und durch Messung des ATP mittels Luminometrie.

Zusätzlich wurde der Faktor „Rohrmaterial“ im Flaschenversuch durch Beimpfung von Testmaterialien mit *Legionella pneumophila* und *P.aeruginosa* analysiert.

Im praxisnahen Versuch wuchsen Mikroorganismen am schlechtesten auf Kupfer und Verbundrohr und am besten auf den organischen PVC Materialien wie dem Testmaterial Gartenschlauch und Gummischlauch weiss .

Im Flaschenexperiment wuchsen die Legionellen in Abhängigkeit von Temperatur auf allen Materialien, wobei bei höherer Temperatur (36°C) das beste Wachstum zu verzeichnen war. Pseudomonaden wuchsen auf allen Materialien ausgenommen auf Gummi braun. In diesem Versuch konnte die Biofilmbildung auf keinem Material vermieden werden. Jedoch erwiesen sich Kupfer- und Verbundrohr im Vergleich zu den untersuchten organischen Rohrmaterialien am wenigsten Biofilmwachstum fördernd. PVC und Gummi förderten das Wachstum von Biofilm und Mikroorganismen teilweise extrem und sollten deshalb nicht im Bereich von Trinkwasseranlagen Verwendung finden.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>Seite 10</b>
<b>2. Material &amp; Methoden</b>	<b>Seite 15</b>
2.1. Bestimmung der Biofilmbildung in durchflossenen Rohrmaterialien	Seite 15
2.1.1 Probenentnahme	Seite 17
2.2. Bestimmung der Bakterienaktivität im Biofilm	Seite 18
2.2.1 Nicht kulturelle Methode: Luminometrische ATP Messung „LUMINO“	Seite 18
2.2.2 Kulturelle Methode: R2A-Agar	Seite 19
2.2.3 Kulturelle Methode: Plattengussverfahren DEV-Agar	Seite 20
2.3. Experimente unter kontrollierten Bedingungen: Flaschenansätze	Seite 20
2.3.1 Identifikation <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mittels des API 20 NF	Seite 23
2.3.2 Identifikation <i>Legionella pneumophila</i>	Seite 23
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>Seite 24</b>
3.1. Vorversuche: Bakterienaktivitätsbestimmung durch ATP-Messung	Seite 24
3.2. Bestimmung der Bakterienaktivität im Feldexperiment	Seite 24
3.2.1 Bestimmung der Bakterienaktivität im Biofilm mittels ATP-Messung	Seite 25
3.2.1.1 Kupferrohr	Seite 25
3.2.1.2 Verbundrohr	Seite 25
3.2.1.3 PVC Schlauch der Zahnklinik	Seite 26
3.2.1.4 Gartenschlauch	Seite 27
3.2.1.5 weißer Gummischlauch 6,0 mm	Seite 27
3.2.2 Bestimmung der Bakteriendichte im Biofilm mittels der Bestimmung koloniebildender Einheiten auf dem R2A-Agar	Seite 29
3.2.2.1 Kupferrohr	Seite 29
3.2.2.2 Verbundrohr	Seite 29
3.2.2.3 PVC Schlauch der Zahnklinik	Seite 30
3.2.2.4 Gartenschlauch	Seite 31
3.2.2.5 weißer Gummischlauch 6,0 mm	Seite 31

3.2.3 Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung	Seite 33
3.2.3.1 Kupferrohr	Seite 33
3.2.3.2 Verbundrohr	Seite 33
3.2.3.3 PVC Schlauch der Zahnklinik	Seite 34
3.2.3.4 Gartenschlauch	Seite 35
3.2.3.5 weißer Gummischlauch 6,0 mm	Seite 35
3.2.4 Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels der Bestimmung koloniebildender Einheiten auf dem R2A-Agar	Seite 37
3.2.4.1 Kupferrohr	Seite 37
3.2.4.2 Verbundrohr	Seite 37
3.2.4.3 PVC Schlauch der Zahnklinik	Seite 38
3.2.4.4 Gartenschlauch	Seite 39
3.2.4.5 weißer Gummischlauch 6,0 mm	Seite 39
3.3. Biofilmentwicklung in Flaschenansätzen	Seite 41
3.3.1 Entwicklung der Legionellenpopulation: Legionellen bei 20°C Messmethode: ATP Messung	Seite 41
3.3.2 Entwicklung der Legionellenpopulation: Legionellen bei Raumtemperatur (26°C) Messmethode: ATP Messung	Seite 42
3.3.3 Entwicklung der Legionellenpopulation: Legionellen bei 36°C Messmethode: ATP Messung	Seite 43
3.3.4 Entwicklung der Legionellenpopulation: <i>P.aeruginosa</i> bei Raumtemperatur (26°C) Messmethode: ATP Messung	Seite 45
3.4. Bestätigung von <i>P. aeruginosa</i> und <i>L. pneumophila</i>	Seite 46
<b>4. Diskussion</b>	<b>Seite 48</b>
4.1. Vergleich der Meßmethoden zur Bestimmung der Bakterienaktivität	Seite 48
4.2. Bestimmung der Bakterienaktivität im Feldexperiment	Seite 51
4.2.1 Bakterienaktivität im Biofilm	Seite 51
4.3. Biofilmentwicklung in Flaschenansätzen	Seite 54
4.3.1 Flaschenansätze Legionellen	Seite 54
4.3.2 Flaschenansätze <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Seite 55

4.4. Schlußfolgerung	Seite 56
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>Seite 58</b>
<b>6. Anhang „A“ Messergebnisse</b>	<b>Seite 64</b>

## 1. Einleitung

Wasser gilt als wichtigstes Lebensmittel, jedoch auch als bedeutsame Infektionsquelle. Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO werden 6% der weltweit auftretenden Krankheiten auf verunreinigtes Trinkwasser zurückgeführt, wobei Durchfallerkrankungen besonders häufig auftreten. Ein besseres Wassermanagement könnte jährlich mehr als 30 Millionen Erkrankungen weltweit verhindern.

In Deutschland sind die zentralen Anforderungen an Trinkwasser in der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) geregelt. Im §4 Allgemeine Anforderungen heisst es: „Wasser für den menschlichen Gebrauch muss frei von Krankheitserregern, genusstauglich und rein sein. Dieses Erfordernis gilt als erfüllt, wenn bei der Wassergewinnung, der Wasseraufbereitung und der Verteilung die allgemein anerkannten Regeln der Technik eingehalten werden und das Wasser für den menschlichen Gebrauch den Anforderungen der §§ 5 bis 7 entspricht“ (Tab. 1). „Trinkwasser muss frei sein von vermeidbaren Verunreinigungen und beim Verbraucher in einwandfreiem Zustand, gesundheitlich unbedenklich, farblos, klar, kühl, geruchlos und ohne anormalen Geschmack zu entnehmen und zu verbrauchen sein“.

Tabelle 1:

Anlage 1 (zu § 5 Abs. 2 und 3 TrinkwV 2001) Mikrobiologische Parameter		
Teil I:		
Allgemeine Anforderungen an Wasser für den menschlichen Gebrauch		
Lfd. Nr.	Parameter	Grenzwert (Anzahl/100 ml)
1	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	0
2	Enterokokken	0
3	Coliforme Bakterien	0

Etliche Studien weisen auch Haushaltsinstallationssysteme als Quelle für wasserbürtige Infektionserreger aus. Problemkeime sind hier in erster Linie Legionellen sowie fakultativ pathogene Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*.

Legionellen sind gram-negative, obligat-aerobe Keime. Ihr natürlicher Lebensraum sind warme Wässer. Man findet sie vor allem in Oberflächengewässern, wie Seen, Flüssen und Teichen, aber auch im Schlamm und feuchten Erdböden. Neben ihrem natürlichen Reservoir kommen Legionellen auch in Wasserleitungen und anderen

wasserführenden Systemen vor. Legionellen wurden bei Wassertemperaturen zwischen 5 °C und 65 °C nachgewiesen, vermehren sich aber bevorzugt zwischen 25°C und 50°C. Erkrankungen durch Legionellen werden unter dem Begriff „Legionellose“ zusammengefasst. Legionellose sind in Deutschland meldepflichtig gemäß §7 des Infektionsschutzgesetzes.

Man unterscheidet zwei Hauptformen, die eigentliche „Legionärskrankheit“ und das „Pontiac Fieber“. Der überwiegende Anteil der Legionellose in Deutschland wird sporadisch und ambulant erworben. Aktuell stehen etwa  $\frac{1}{4}$  aller gemeldeten Legionellose in Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt (Bayrisches Landesamt für Gesundheits- und Lebensmittelsicherheit, 2007). Die Übertragung der Legionellen erfolgt durch die Inhalation oder Mikroaspiration erregerehaltiger, lungengängiger Aerosole. Daher stellen gerade Warm- und Kaltwassersysteme (z.B. Duschen, Whirlpools), Luftbefeuchter, Klimaanlage und auch Kühltürme eine Quelle für Legionellen-infektionen dar. Beispielsweise verstarben am 5. Juli und am 9. Juli 2003 im Klinikum Frankfurt-Markendorf zwei Patientinnen im Alter von 66 und 72 Jahren an einer nosokomialen Legionärskrankheit, 5 weitere Patienten erkrankten. Aber auch in öffentlichen Einrichtungen wie Saunen, Schwimmbädern, Schulen, Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung und dem Eigenheim traten in den letzten Jahrzehnten Erkrankungen auf.

- Oktober 2002 (Kirchseen): Hallenbad geschlossen
- Mai 2003 (Ebersberg): 70 Haushalte von Legionellen betroffen
- Juli 2003 (Frankfurt / Oder): im Klinikum sterben zwei Patienten an Legionellose. Ursache war das Wasserversorgungssystem
- Februar 2004 (Augustdorfer Kaserne): Bundeswehr sperrt Wasserverteilungsnetz wegen Legionellen
- Mai 2004 (Göttingen): Mediziner weisen Erreger der Legionärskrankheit im Wassersystem vieler Gebäude nach, besonders in Krankenhäusern und Altenheimen
- Juli 2004 (Berlin): Nobelhotel Ritz-Carlton stoppt Zimmervermietung und baut Wasserversorgungssystem wegen Legionellen um
- April 2005 (Uetze und Seelze): in Schulzentren Legionellen entdeckt

Als Ursache konnten in allen Fällen kontaminiertes Trinkwasser als Quelle identifiziert werden. In großen und weit verzweigten Wasserverteilungsanlagen ist

das Risiko einer Legionellenbesiedlung höher als in Einfamilienhäusern, da sich dort vermehrt wenig durchströmte Bereiche finden, in denen sich Legionellen festsetzen und vermehren können. Daher treten Probleme mit Legionellen insbesondere in großen Gebäuden auf.

*P. aeruginosa* ist ein ubiquitär auftretender Nasskeim, für den in etlichen klinischen Studien ein Zusammenhang zwischen nosokomialen Infektionen und der Kontamination von Trinkwasser gesichert werden konnte. Insbesondere bei Patienten mit herabgesetzten Abwehrkräften wie Aids, bei Patienten unter Chemotherapie, kann er Ursache für Infektionen des Urogenitaltraktes, Infektionen des Respirationstraktes, Weichgewebsinfektionen, Dermatitis sowie Bakteriämien (Trautmann & Lepper et al, 2005, Zamberlan da Silva et al, 2007, Moolenaar et al, 2000, Matar et al, 2005) sein. Häufige Infektionen werden auch bei Brandopfern beschrieben. *Pseudomonas aeruginosa* ist ein Bakterium, welches unter sehr nährstoffarmen Bedingungen wachsen kann und Multiresistenzen gegen zahlreiche Antibiotika und antimikrobiellen Substanzen besitzt und somit eine signifikante Gefahr für Patienten darstellt (Trautmann & Lepper et al, 2005, Hernandez-Duquino & Rosenberg et al, 2001). Anaisse et al. 2002 berichten von 13 Veröffentlichungen über nachgewiesene, wasserassoziierte nosokomiale Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa*.

Nicht nur in Krankenhäusern und deren Intensivstationen, sondern auch im alltäglichen Leben spielen Legionellen und *Pseudomonas aeruginosa* eine immer wichtigere Rolle. Durch ihre Fähigkeit, in Biofilmen zu überleben und zu wachsen, erobern sich diese Bakterien immer mehr Lebensräume.

Die Organisation von Mikroorganismen auf wasserbenetzten Oberflächen geschieht über die Ausbildung eines Biofilmes. Dieser besteht aus Zellen und extrazellulärem Material von Bakterien, Pilzen, Algen. „Die Mikroorganismen sind im Biofilm von einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umgeben. Sie können etwa 70 bis 95 % der Trockenmasse von Biofilmen ausmachen. Biogene Partikel, wie Zellreste und Detritus und anorganische Partikel, Sand oder Korrosionsprodukte, können in den Biofilm eingelagert oder sorbiert werden“ (Flemming, 1995; Flemming und Leis, 2002)

Dabei schützt die Organisation im Biofilm gegen äußere, widrige Umstände, wie zum Beispiel desinfizierende Maßnahmen (Chlorung, Antibiose etc.). Nur planktonische,

freie Keime werden bei mikrobiologischen Kontrolluntersuchungen erfasst. Folgen von Biofilmbildung im Trinkwasser können sein:

- Bildung von Geruchsstoffen (z.B.: Actinomyceten)
- Verfärbung und Trübung von Trinkwasser
- Mikrobiell beeinflusste Korrosion
- Erhöhung des Strömungswiderstandes
- Schaffung eines Lebensraums für Krankheitserreger
- Ständige mikrobielle Kontamination des Trinkwassers
- Mögliches, schlagartiges Freisetzen von großen Bakterienmengen durch Ablösung von Biofilm
- Erhöhte Toleranz gegen Desinfektionsmittel

Dabei sind begünstigende Faktoren für das Biofilmwachstum: Stagnation, Fließgeschwindigkeit, Nährstoffangebot, Wassertemperatur, Oberflächenrauigkeit, Anwesenheit von Desinfektionsmitteln.

Unter diesem Gesichtspunkt spielt die Wahl des wasserführenden Materials eine große Rolle. Organische Materialien scheinen sich zu mindest in den ersten Wochen des Betriebes begünstigend auf die Biofilmentwicklung auszuwirken. (van der Kooij et al, 2005).

Unterschiedliche kulturelle und nicht-kulturelle Methoden stehen zur Quantifizierung von Bakterien in Wässern zur Verfügung. Zu den kulturellen Methoden gehört die Anzucht auf selektiven oder nicht-selektiven Nährböden, mit der Möglichkeit einer weiteren Differenzierung durch entsprechende Stoffwechselleistungen. Nicht-kulturelle Methoden können die Bakterienaktivität (z.B. ATP-Messung) oder enzymatische Aktivität messen. Ein wichtiger Parameter zur Auswahl eines Tests ist die Dauer bis zum Erhalt eines verwertbaren Ergebnisses. Die Luminometrie (z.B. Lumino® /Fa. Stratec) bietet in diesem Zusammenhang den Vorteil einer schnellen Verwertung der Probe und einer schnell verfügbaren Auswertung, so dass eine schnelle Reaktion auf Kontamination möglich ist.

Ziel war es, anhand eines dem Haushaltsinstallationssystem nachempfundenen Versuchsaufbaus herauszufinden, welchen Einfluss die unterschiedlichen Rohrmaterialien im alltäglichen Gebrauch auf die Biofilmbildung haben, wobei Strömungsdruck, Stagnation, Temperatur berücksichtigt werden sollten. Zugleich

sollten drei unterschiedliche Methoden auf kultureller und nicht-kultureller Ebene zur Quantifizierung der sich im Biofilm befindlichen Bakterien miteinander verglichen werden. Zusätzlich wurde anhand von Flaschenansätzen eruiert, welche Wirkung Stagnation, Temperatur und Oberflächenbeschaffenheit verschiedenster organischer Materialien auf das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* und Legionellen haben.

## **2. Material und Methoden:**

### **2.1 : Bestimmung der Biofilmbildung in durchflossenen Rohrmaterialien**

Zur Bestimmung der Biofilmbildung in Rohren aus unterschiedlichen Materialien wurde ein Testsystem aufgebaut (Abb. 1). Kaltwasser wurde in ein Rohrsystem geleitet, welches aus Kupfer, verschiedenen Gummisorten und Kunststoffen bestand. Die Wasserzufuhr erfolgt über einen Verteiler aus Kupfer, mit dem die Fließmenge für jedes Material eingeregelt werden konnte. Das Kaltwasser entstammte dem Wasserinstallationssystem des Hygieneinstitutes der Westfälischen Wilhelms Universität Münster und floss durch einen etwa 12 mm dicken und 1 Meter langen Hartgummischlauch in die Apparatur.

Die Verbindung der einzelnen Testrohre an den Verteiler wurde durch einen Edelstahlhahn hergestellt, durch den die Strömungsgeschwindigkeit des Wassers in den einzelnen Testrohren eingestellt werden konnte (siehe Abb.2).

Die Testrohre bestanden aus folgenden Materialien (von links nach rechts):

1. Kupfer 8,0 mm Durchmesser,
2. Gartenschlauch (Kreuzgewebter PVC-Gummi) 8,0 mm Durchmesser,
3. Weißer Gummischlauch 6,0 mm Durchmesser,
4. PVC Schlauch 3 mm Durchmesser (entstammt der Behandlungseinheit der Zahnklinik der Westfälischen-Wilhelms-Universität, Münster),
5. Verbundrohr (Kunststoff-Metallfolie-Kunststoff) 10,0 mm Durchmesser
6. Freier Anschluß

Abb.1: Anschluss der Testrohre an die Versuchsapparatur

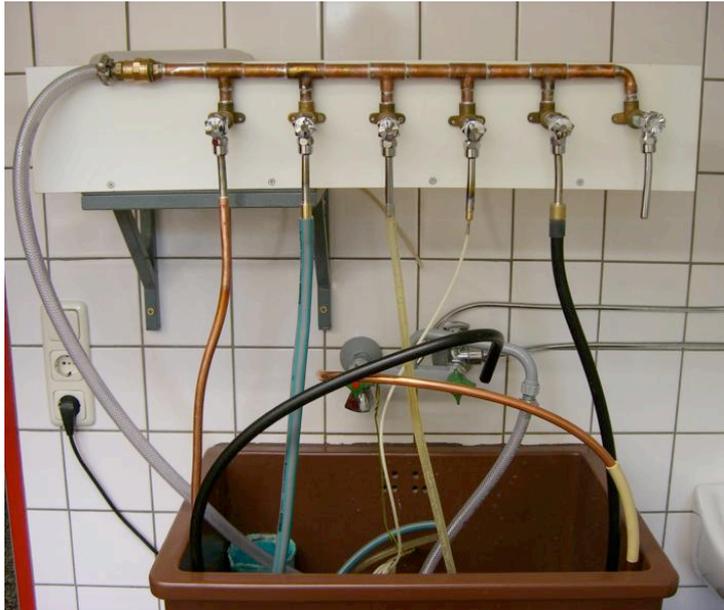


Abb.2: Verchromte Armatur zur Strömungsregulation des Wassers im Übergang In die Testrohre



Dieses Rohrsystem wurde so konfiguriert, dass am jeweiligen Ende eines jeden Testrohres das Wasser kontinuierlich heraustropfte, jedoch niemals stagnierte.

### 2.1.1. Probenentnahme:

Proben wurden wöchentlich aus dem Versuchsaufbau entnommen. Hierzu wurde von jedem Testmaterial ein 2 cm langes Stück mittels desinfizierter Schere oder Rohrschneider am Endstück abgeschnitten. Vorher wurden Schere & Rohrschneider mit 70% Isopropyl-Alkohol desinfiziert (siehe Abb.3, Abb.4).

Zur Herauslösung des Biofilms wurden autoklavierte Wattestäbchen verwendet und über die Innenseite der abgetrennten Testmaterialien geführt. Die Wattestäbchen mit dem anhaftenden Biofilm übertrug man in Testtubes des Lumino® mit HPLC-Wasser, welche im Vortexer für 10 Sekunden behandelt wurden.

Zusätzlich wurde das durchfließende Wasser auf Bakterienaktivität untersucht. Um ein möglichst exaktes Ergebnis zu erhalten, wurde eine Probenentnahme direkt aus der fließenden Welle in Testtubes durchgeführt. Aus diesen wurden die nötigen Mengen des Wassers zur Messung des Wasserbakteriengehaltes entnommen und weiterverarbeitet. Die Messung des Wasserbakteriengehaltes geschah wöchentlich (siehe Kapitel Ergebnisse).

Abb.3:  
Abtrennung des Testrohres (Kupfer) mittels  
desinfiziertem Rohrschneider zur Probenentnahme



Abb.4:  
Kupferrohr zur Biofilmentnahme in sterilem  
Gefäß



## **2.2. Bestimmung der Bakterienaktivität im Biofilm**

### **2.2.1 Nicht-kulturelle Methode:**

#### **Luminometrische ATP Messung mit Lumino®**

Die luminometrische Messung wurde mit dem Luminometer Lumino® der Firma Stratec durchgeführt. Das Gerät ist ein tragbares, sehr sensibles Luminometer, das für alle Messungen mit Einzelküvetten im Bereich Bio- und Chemolumineszenz eingesetzt werden kann. Zur Bestimmung des intrazellulären ATPs werden die Zellen mit Extractant B/S lysiert und das ATP freigesetzt. ATP wird durch das Enzym Luciferin-Luciferase in Licht umgewandelt. Die Stärke des emittierten Lichtes wächst proportional mit der Menge des vorhandenen ATP.

Gemessen wird in so genannten RLUs (Relative Light Units). RLU ist eine eigenständige Einheit und spiegelt die Lichtintensität wieder. Eine anschließende Umrechnung in den tatsächlichen ATP-Gehalt ist möglich.

Die von der Probe ausgehende Lichtemission hat eine Wellenlänge zwischen 400 und 500 nm. Während der Messung wird die Lichtquantität integriert, so dass minimale Schwankungen keinen Effekt auf das Ergebnis haben.

Von jeder Probe wurden 3 Messungen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Nach Entnahme des zu testenden Wassers gab man jeweils 50 µl der Probe in die Testtubes hinzu. Nach der Zell-Lyse und der darauf folgenden ATP Freisetzung durch die Zugabe von 50 µl Extractant B/S wurden 400 µl des ATP-Reagent beigemischt und die Lichtemission mittels des Luminometers gemessen.

Im Anschluss an die Entnahme des Biofilms mittels der Wattestäbchen wurde dieser in HPLC- Wasser homogenisiert (in 2000 µl). HPLC Wasser hatte sich in Vorversuchen als Wasser mit dem geringsten Kontaminationsgrad erwiesen.

Da es sich bei der Luminometrie um ein höchst sensibles System handelt, ist eine Anzahl von Fehlerquellen vorhanden. Die Lichtempfindlichkeit der mitgelieferten Testtubes stellt ein Problem dar, weil es sich erwies, dass diese bereits bei geringer Lichteinwirkung Licht für eine kurze Zeit speichern können, welches durch Fluoreszenz wieder frei wird. Ein vorangegangener Test mit dem Luminometer hat dies gezeigt.

Deshalb war es nötig, alle Messungen bei abgedunkeltem Raumlicht durchzuführen. Der Hersteller des Lumino®, Fa. Stratec, hat diesbezüglich eine

Sicherheitseinrichtung im Luminometer installiert, welches dieses Phänomen unterdrücken soll:

Ein weiteres Problem ergab sich bei der Biofilmentnahme der verschiedenen Rohrmaterialien. Der Biofilm wurde mittels autoklavierter Wattesticks per Hand entnommen. Das abgetrennte Rohrfragment der Zahnklinik musste, um für die Biofilmentnahme mit dem Wattestick zugänglich zu sein, in zwei Hälften durchtrennt werden, da es mit den Wattesticks nicht zugänglich war.

.Da sich unser Versuch über einen Zeitraum von 10 Wochen erstreckte, ergaben sich Temperaturschwankungen von Spätsommer bis Herbst 2006 (September-Dezember 2006). Somit schwankten auch die Raumtemperaturen zwischen Werten von 22-28°C. Dass die Bakterienentwicklung bei erhöhter Temperatur zunimmt und bei verringerter Temperatur abnimmt zeigen Untersuchungen von van der Kooij et al. 2005.

### 2.2.2 Kulturelle Methode: R2A-Agar

R2A-Agar ist ein Nährstoff-reduziertes Agarmedium. Bei der Inkubation von Wasserproben auf R2A Agar wird häufig eine höhere Bakterien-Koloniezahl als bei nährstoffreichen Agarmedien erzielt, vor allem nach Inkubation bei tieferen Temperaturen. Ursprünglich wurde das Medium 1985 entwickelt von Reasoner und Geldreich zur Ermittlung der Gesamtkeimzahl in Trinkwasser. Die Zusammensetzung ist in unten stehender Tabelle zu ersehen:

*Tabelle 2: Zusammensetzung R2A-Agar:*

Hefeextrakt	0,5 g/l
Pepton	0,5 g/l
Caseinhydrolysat	0,5 g/l
Glucose	0,5 g/l
Stärke	0,5 g/l
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,3 g/l
Magnesiumsulfat	0,024 g/l
Natriumpyruvat	0,3 g/l
Agar	15 g/l
pH-Wert	7,2 ±0,2

Die Inkubationszeit betrug 7 Tage bei einer konstanten Temperatur von 30°C im Brutschrank. Es hat sich herausgestellt, dass eine vorherige Trocknung der Platten

für 30 min sinnvoll war und hierdurch besser beurteilbare Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die verwendeten Proben entsprachen denen der Lumino® Proben. Sie mussten auf 1:1000 mit steriler Kochsalzlösung verdünnt werden. Nach Erstellung einer Verdünnungsreihe verspatelte man jeweils 1 ml der Probe auf den vorgetrockneten R2A-Agar und bebrütete diese im Anschluß. Die Ergebnisse wurden unter der Stereolupe ausgezählt.

Im Gegensatz zum Plattengussverfahren beim DEV-Agar wird eine 1 ml Probe mit einem Drigalski-Spatel auf der Oberfläche des Agars gleichmässig verteilt.

### 2.2.3 Kulturelle Methode: Plattengussverfahren

#### DEV-Agar

Dieser Nährbodenagar eignet sich zum Kultivieren, Anzüchten und zur Keimzahlbestimmung von Bakterien mit durchschnittlichen Nährstoffansprüchen aus dem Bereich Lebensmittel und Wasser. Seiner Bestandteile aus 1% Fleischpepton und Fleischextrakt die für das Wachstum der in Lebensmitteln und Gewässer vorkommenden Bakterien sehr gut geeignet sind, machen diesen Nachweis möglich.

*Tabelle 3: Zusammensetzung DEV-Agar pro Liter:*

Fleischpepton	10 g
Fleischextrakt	10 g
NaCl	5 g
Agar	16 g
pH-Wert	7,2 ±0,2

1 ml Probe bzw. einer adäquaten Verdünnung wurden mit verflüssigtem DEV-Agar im Plattengußverfahren mit dem Agar vermischt und die Platten 48 h bei 22°C und 36°C bebrütet. Die Auszählung der Kolonien erfolgte unter einer 8-fach Lupe.

### 2.3. Experimente unter kontrollierten Bedingungen: Flaschenansätze

Ergänzend zu der oben beschriebenen Versuchsreihe wurde im Flaschenansatz versucht, den Einfluss unterschiedlicher Materialien und Temperatur auf die Biofilmbildung zu analysieren.

Es wurden insgesamt 20 sterile Glasflaschen a 1Liter mit 2 g Glasperlen, Rührstab und mit 20 g der verschiedenen Testmaterialien versehen. Bei den verwendeten Materialien handelte es sich um (siehe Abb.5):

Abb.5: Auswahl von Kunststoffmaterialien, die zur Überprüfung der Wachstumsförderung von Keimen bei den Laborexperimenten eingesetzt wurden



Gummi schwarz (Kautschuk)	20 g
Gummi weiß klein(Polyethylen)	20 g
Gummi weiß groß (Polyethylen)	20 g
PVC	20 g
Gummi rot	20 g

Vor der Zugabe zum Testansatz wurden alle Materialien 30 Minuten im Dampfkochtopf bei 95°C desinfiziert. Eine Beschreibung der einzelnen Ansätze findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Testansätze für die Bestimmung der Wachstumsförderung durch Kunststoffmaterialien in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur

	Inokulation von <i>L.pneumophila</i>			Inokulation von <i>P.aeruginosa</i>
	Ans.1	Ans.2	Ans.3	Ansatz 1
Gummi schwarz (Kautschuk)	20°C	26°C	36°C	30°C
Gummi weiß klein	20°C	26°C	36°C	30°C
Gummi weiß groß	20°C	26°C	36°C	30°C
Silikon (PVC)	20°C	26°C	36°C	30°C
Gummi rot	20°C	26°C	36°C	30°C

Jede Flasche wurde mit 990 ml kaltem, sterilem Leitungswasser angesetzt. Die Ansätze zur Züchtung von Legionellen wurden mit 10 ml aus Reinstproben vorangegangener Versuche beimpft, um ein mögliches Legionellenwachstum zu gewährleisten.

Gleich dem Schema der Legionellenansätze wurden den Flaschenansätzen 10 ml einer angezüchteten *Pseudomonas aeruginosa* Reinstkultur eines Wildstammes beigemischt. Zur Gewinnung des Wildstammes wurde ungeklärtes Klärwasser der Kläranlage der Stadt Münster entnommen und mit Malachit-Grün-Boullion versetzt. Diese hemmt die Begleitflora und färbt sich bei Wachstum von *Pseudomonas* trüb. Die Bebrütung fand bei 36°C für 48 Stunden statt. Die Proben wurden auf Cetrimid Agar für eine Dauer von 7 Tagen angezüchtet. Cetrimid hemmt die Begleitflora und fördert die Fluoreszenz von *Pseudomonas aeruginosa* unter UV-Licht. Typische Kolonien sind grün-gelblich und können sich durch den Fluoreszenztest oder API20 NE Test weiter differenziert werden.

Nach Vervollständigung der Probenansätze wurden diese bei entsprechenden Temperaturen gelagert und nach einem Zeitraum von 2 Wochen erste Analysen durchgeführt.

Nach 5-minütigem Homogenisieren der einzelnen Flaschenansätze pipettierte und untersuchte man 1 ml des Wassers. Hierzu wurden alle Proben mit dem Luminometer gemessen, die Legionellenansätze zusätzlich auf Legionellenagar mittels Oberflächenspatelverfahren, die *Pseudomonas*ansätze auf Cetrimid-Agar mittels Oberflächenspatelverfahren quantitativ untersucht.

### **2.3.1 Identifikation *Pseudomonas aeruginosa* mittels des API 20 NE**

**(Fa. Biomerieux)**

Die Ersten Proben aus dem Pseudomonasansatz wurden mittels des API20 NE Tests auf *Pseudomonas aeruginosa* bestätigt.

### **2.3.2 Identifikation *Legionella pneumophila***

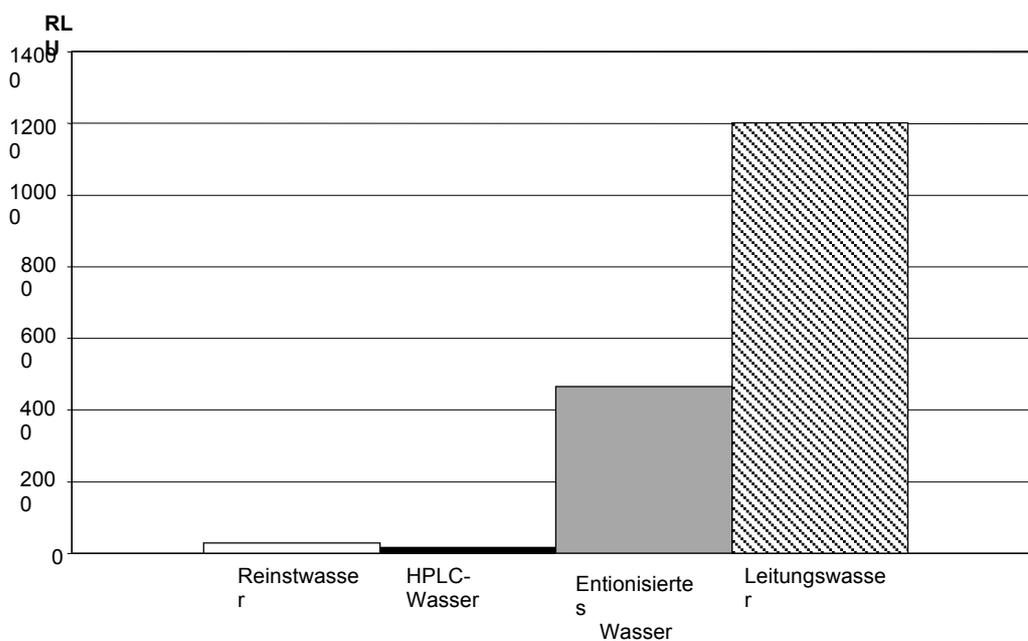
Falls die angezüchteten Kolonien der Legionellenansätze visuell nicht eindeutig den Legionellen zugeordnet werden konnten, wurden diese mittels eines 3-Ösenausstrichs auf Columbia Blutagar übertragen. Wiesen diese Ausstriche kein Wachstum auf, galt die Diagnose „Legionella“ als bestätigt.

### 3. Ergebnisse

#### **3.1. Vorversuche: Bakterienaktivitätsbestimmung durch ATP-Messung:**

Zur Überprüfung der Standardwässer, die im Labor verwendet werden, wurden diese Wässer mit dem Luminometer mittels ATP Messung auf Ihre Bakterienaktivität hin überprüft. Es zeigte sich, dass sowohl Leitungswasser als auch entionisiertes Wasser erhebliche Anteile an ATP enthielten und damit für Verdünnungsprozesse nicht in Frage kamen. Nur die Qualitäten Reinstwasser aus einer Millipore-Anlage und HPLC Wasser wiesen die nötigen geringen Gehalte an ATP auf, so dass nur diese für den Ansatz von Chemikalien und Verdünnungen in Frage kamen.

Abb.6: Bakterienaktivitätsbestimmung unterschiedlicher Wässer durch ATP-Messung



#### **3.2 Bestimmung der Bakterienaktivität im Feldexperiment**

Die zu den erstellten Grafiken gehörenden Messwerte sind im Anhang „A“ zu finden.

##### Wasserqualität:

Die physikalische und chemische Qualität des Wassers, welches im Versuch genutzt wurde, unterlag Schwankungen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Wasser dem Leitungswasser der Haushalte entsprach. Gründe mögen sowohl in Temperaturschwankungen, Stagnation und in der Qualität des zugeführten Wassers der Stadtwerke Münster liegen. Die durchschnittliche Temperatur betrug 13.7°C.

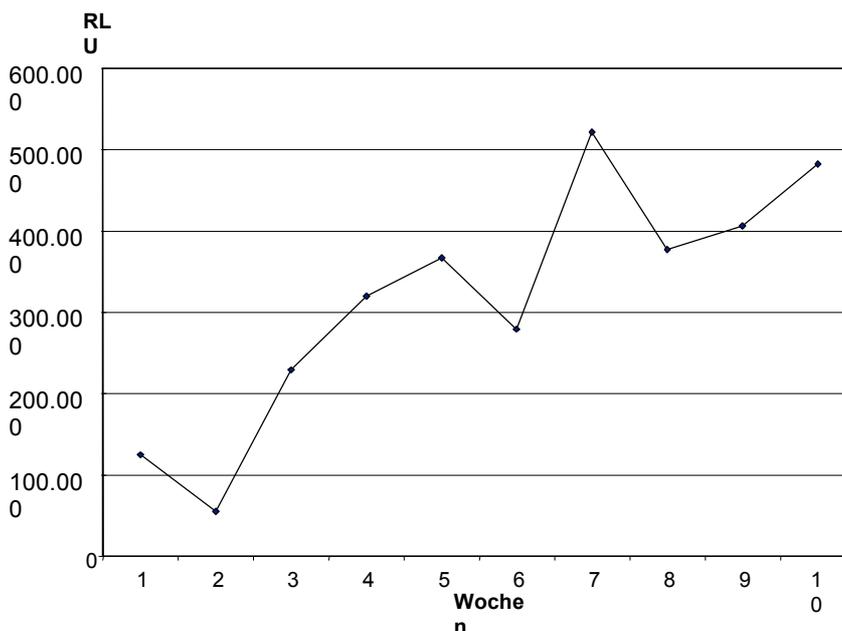
### 3.2.1 Bestimmung der Bakterienaktivität im Biofilm mittels ATP-Mesung:

Der Biofilm in den Schlauchsystemen formierte sich im Zeitraum von 10 Wochen sehr unterschiedlich. Während dieser Zeit wurden wöchentliche Messungen durchgeführt.

#### 3.2.1.1 Kupferrohr:

In der ersten Woche sanken die Biofilmwerte um 70.000 RLU ab, bevor sie bis zur 5. Woche konstant anstiegen. Nach einem leichten Abfall der Bakterienaktivität, erhöhte sich der Biofilmwert auf 521.210 RLU in der 7. Woche. Nach erneutem Abfall der Kurve in der 8. Woche, stellten sich die Werte bis zum Versuchsende auf einen Durchschnittswert von 444.077 RLU ein. (siehe Abb.7)

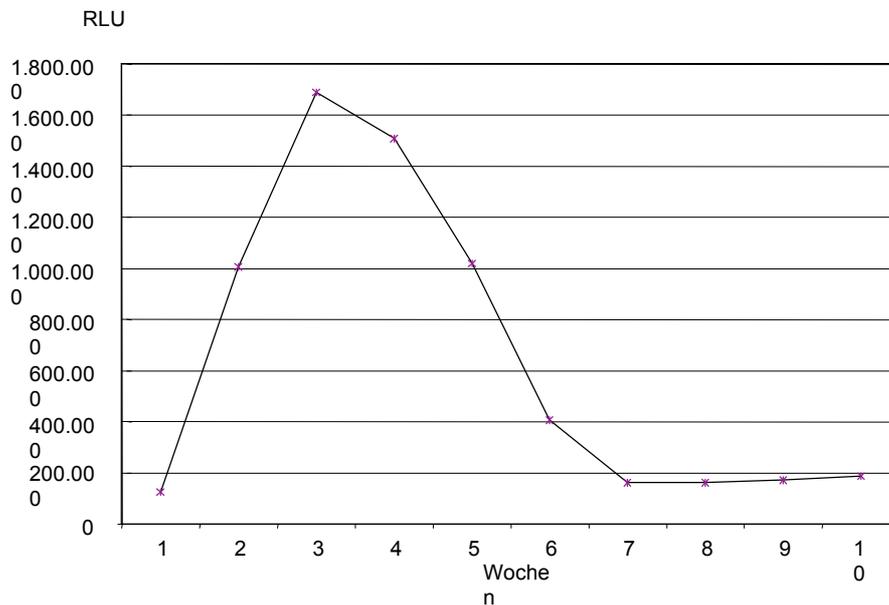
Abb.7: Zeitliche Entwicklung der ATP-Produktion im Biofilm aus Kupferrohr.  
Angaben in RLU (Relative Light Units)



#### 3.2.1.2 Verbundrohr:

. Bis zur 3. Woche stieg der Wert auf 1.688.159 RLU an. Die Werte fielen dann wieder kontinuierlich ab, bis sie sich in der 7. Woche in ein Plateau auf Werte um den Ausgangswert einstellten. Die Werte der 7.-10. Woche schwankten um den Durchschnittswert 169.233 RLU.(siehe Abb.8)

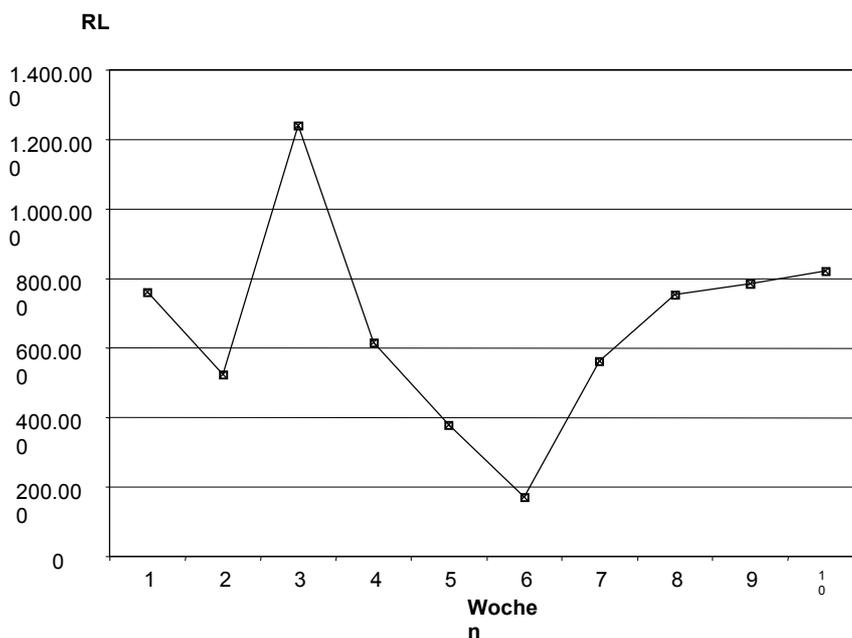
Abb.8: Zeitliche Entwicklung der ATP-Produktion im Biofilm aus Verbundrohr.  
Angaben in RLU (Relative Light Units)



### 3.2.1.3 PVC-Schlauch der Zahnklinik:

Der Ausgangswert von 760.366 RLU sank in der ersten Woche auf 524.007 RLU. In der nachfolgenden Woche stieg die Bakterienaktivität auf 1.239.813 RLU an. Bis zur 6. Versuchswoche sanken die Werte unter den Ursprungswert, bevor sie bis zur 10. Woche auf diesen anstiegen. (siehe Abb.9)

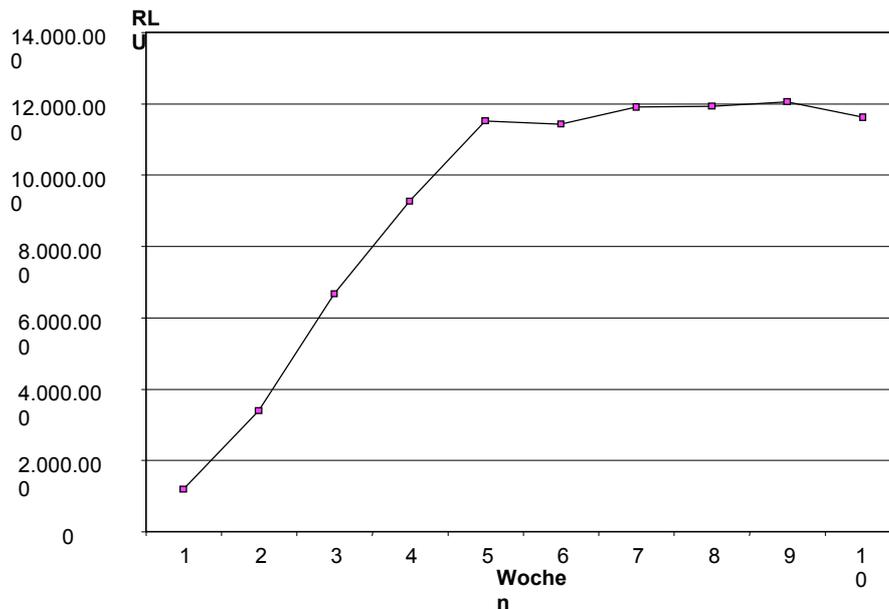
Abb.9: Zeitliche Entwicklung der ATP-Produktion im Biofilm aus PVC Schlauch.  
Angaben in RLU (Relative Light Units)



### 3.2.1.4 Gartenschlauch:

Diese Werte liegen im Bereich zwischen 1.184.897 RLU und 12.053.045 RLU. Ein konstanter Anstieg ist in den ersten 5 Wochen zu verzeichnen. Ab der 6. Woche flacht die Kurve ab und geht in ein Plateau über. (siehe Abb.10)

Abb.10: Zeitliche Entwicklung der ATP-Produktion im Biofilm aus Gartenschlauch.  
Angaben in RLU (Relative Light Units)



### 3.2.1.5 Weißer Gummischlauch 6,0 mm:

Bei diesem Material ist bereits in der 1. Woche ein Anstieg der Bakterienaktivität von 2.515.770 RLU auf 8.853.885 zu erkennen, die bis zur 3. Woche sehr schnell verläuft. Ab der 3. Woche bleiben die Gehalte an ATP konstant auf einem sehr hohen Niveau.

Abb11: Zeitliche Entwicklung der ATP-Produktion im Biofilm aus weißem Gummi.  
Angaben in RLU (Relative Light Units)

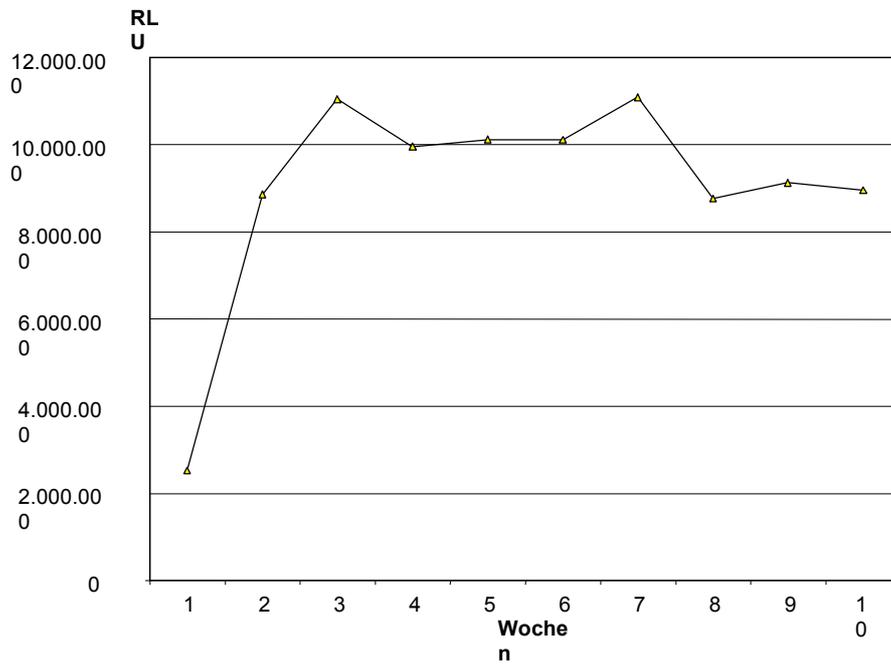
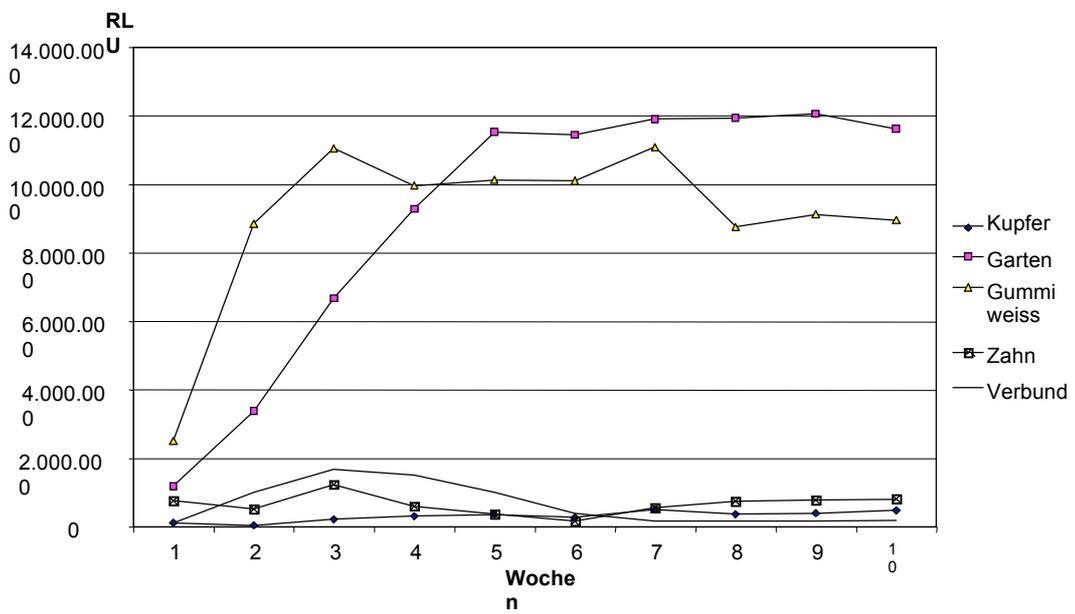


Abb.12: Zeitliche Entwicklung der ATP-Produktion im Biofilm: Gesamtübersicht.  
Angaben in RLU (Relative Light Units)



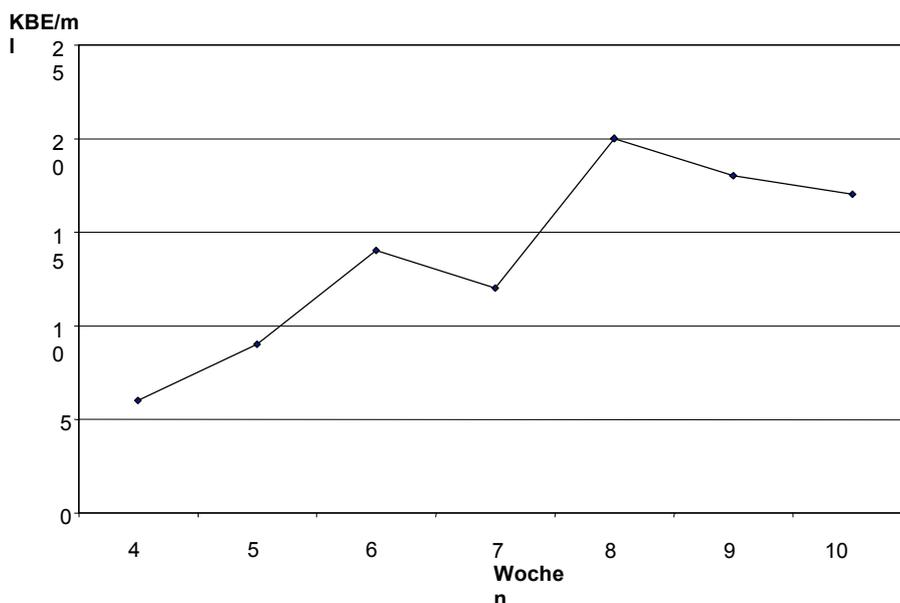
### 3.2.2. Bestimmung der Bakteriendichte im Biofilm mittels der Bestimmung koloniebildender Einheiten auf dem R2A-Agar:

Parallel zur Luminometermessung wurden die Proben ab der 3. Versuchswoche auf 1:10.000 verdünnt und anschließend auf R2A-Agar ausgestrichen und bebrütet. Messwerte finden sich im Anhang „A“ / A3.

#### 3.2.2.1 Kupferrohr:

Die KBE steigen bei einem leichten Rückgang in der 7. Woche bis zur 8. Woche kontinuierlich an. Danach erfolgt ein Rückgang der Werte.

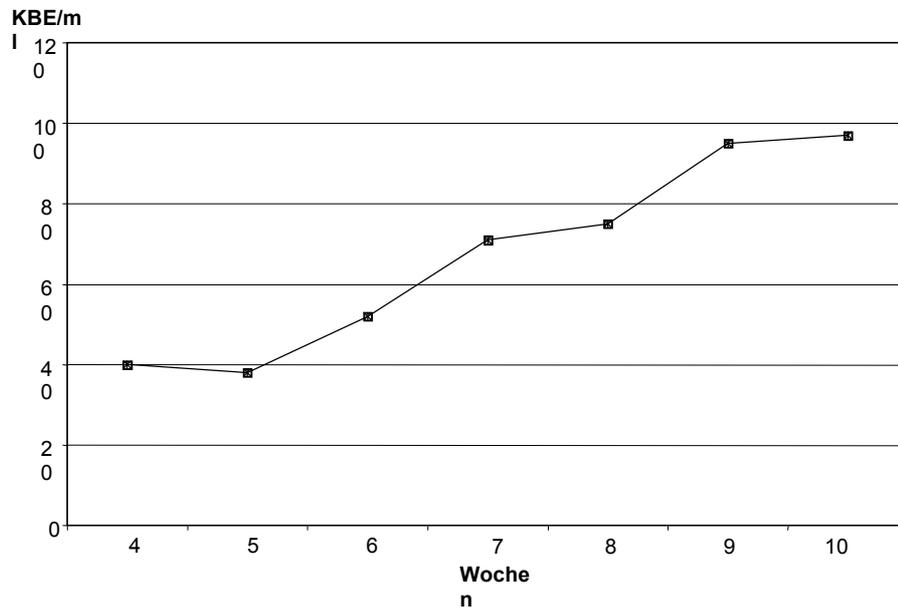
Abb.13 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) auf R2A-Agar im Biofilm aus Kupferrohr während der Testperiode.



#### 3.2.2.2 Verbundrohr:

Das Spektrum der koloniebildenden Einheiten im Versuchsverlauf bewegte sich zwischen  $40 \times 10^5$  und  $97 \times 10^5$ . Nach einem leichten Abfall in der 4.-5. Woche folgt ein konstanter Zuwachs der Kolonien. Eine Stagnation der Kolonisation erfolgte in der Zeit 9-10 Woche. (siehe Abb.14).

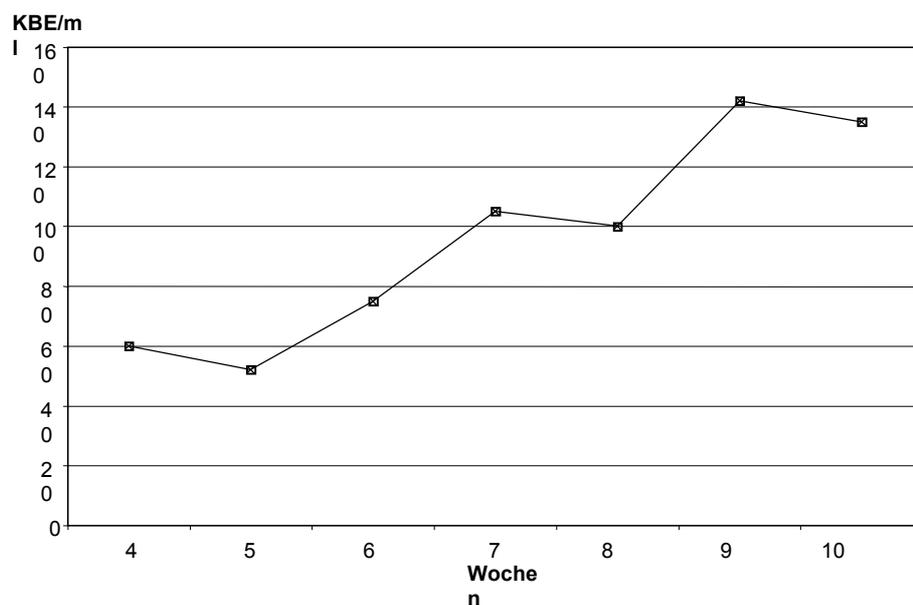
Abb.14 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) auf R2A-Agar im Biofilm aus Verbundrohr während der Testperiode.



### 3.2.2.3 PVC-Schlauch:

Der Kolonienzuwachs beläuft sich hier auf 225%. Beim Betrachten der Kurve lassen sich 3 Wachstumsplateaus erkennen. Diese befinden sich zwischen der 4. und 5. Versuchswoche, der 7. und 8. und der 9. und 10. Versuchswoche. (siehe Abb.15)

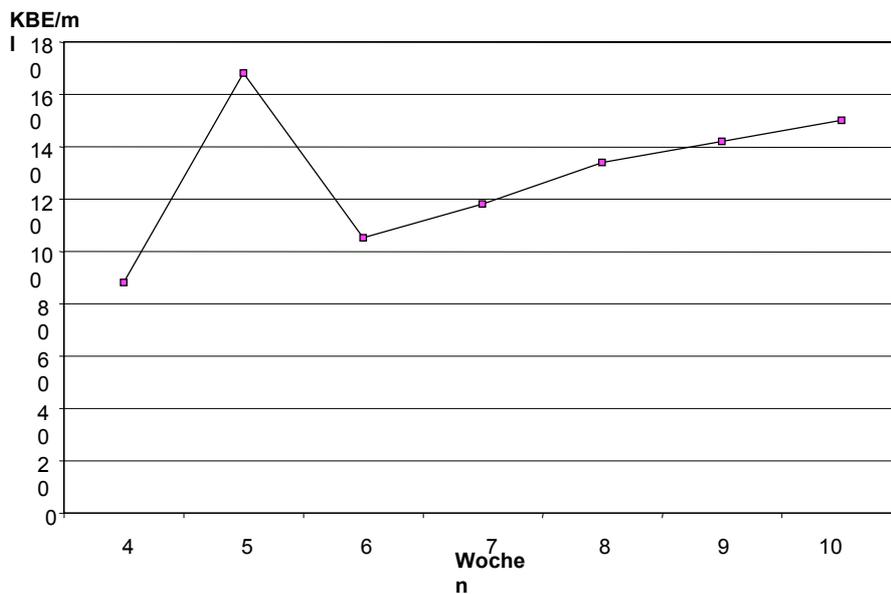
Abb.15 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) auf R2A-Agar im Biofilm aus PVC Schlauch während der Testperiode.



### 3.2.2.4 Gartenschlauch:

Anfangen bei einer KBE von  $88 \times 10^5$  in der 4. Versuchswoche lässt sich bereits in der darauf folgenden 5. Woche ein Zuwachs um 190% erkennen. In der 6. Woche fällt die Anzahl der Kolonien auf  $105 \times 10^5$  Kolonien ab. Anschliessend erfolgt ein linearer Anstieg bis zur 10. Woche auf  $150 \times 10^5$  Kolonien (siehe Abb.16)

Abb.16 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) auf R2A-Agar im Biofilm aus Gartenschlauch während der Testperiode.



### 3.2.2.5 Weißer Gummischlauch 6,0 mm:

Bei diesem Material schwanken die Werte zwischen  $41 \times 10^5$  und  $70 \times 10^5$  Kolonien. Von der 4. bis zur 6. Woche steigen die Werte konstant an, fallen in der 7. Woche bereits wieder auf Kolonienwerte von  $54 \times 10^5$  ab.

Der Wert steigt bis zum Versuchsende auf den Wert  $70 \times 10^5$  in der 10. Versuchswoche, mit zwischenzeitlicher Schwankung in der 9. Woche. (siehe Abb.17)

Abb.17 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) auf R2A-Agar im Biofilm aus weissem Gummischlauch während der Testperiode.

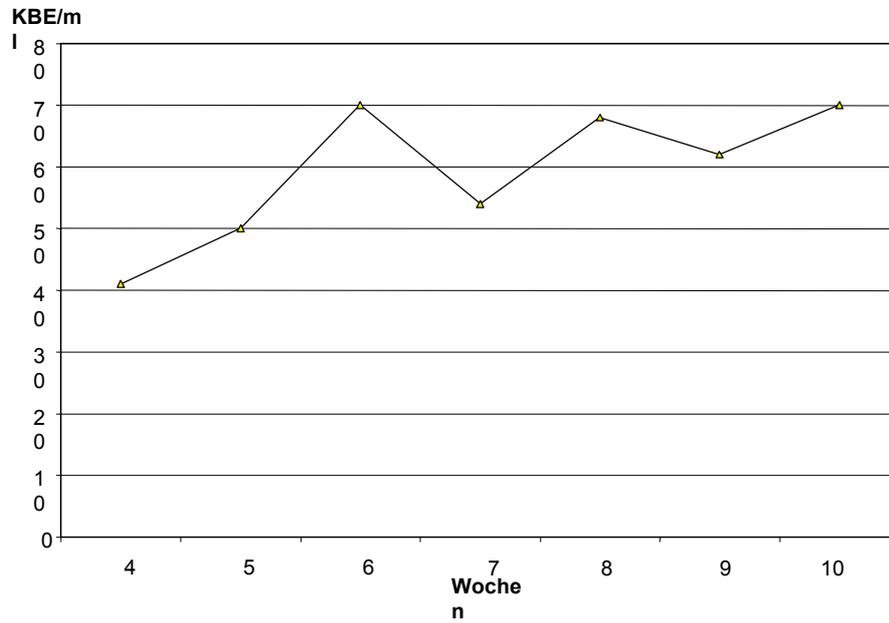
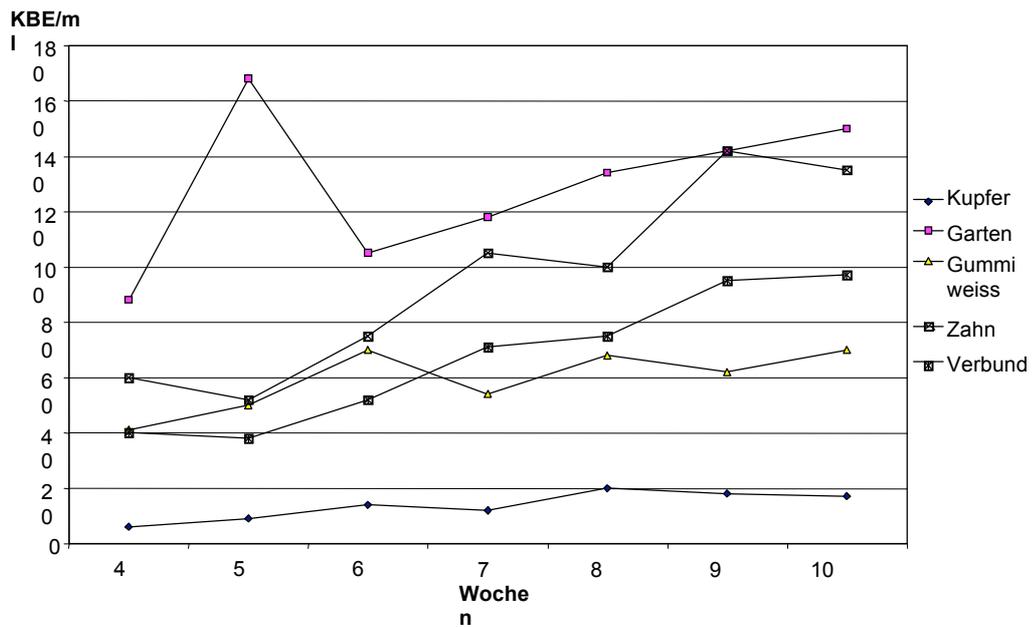


Abb.18 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) auf R2A-Agar im Biofilm Gesamtübersicht



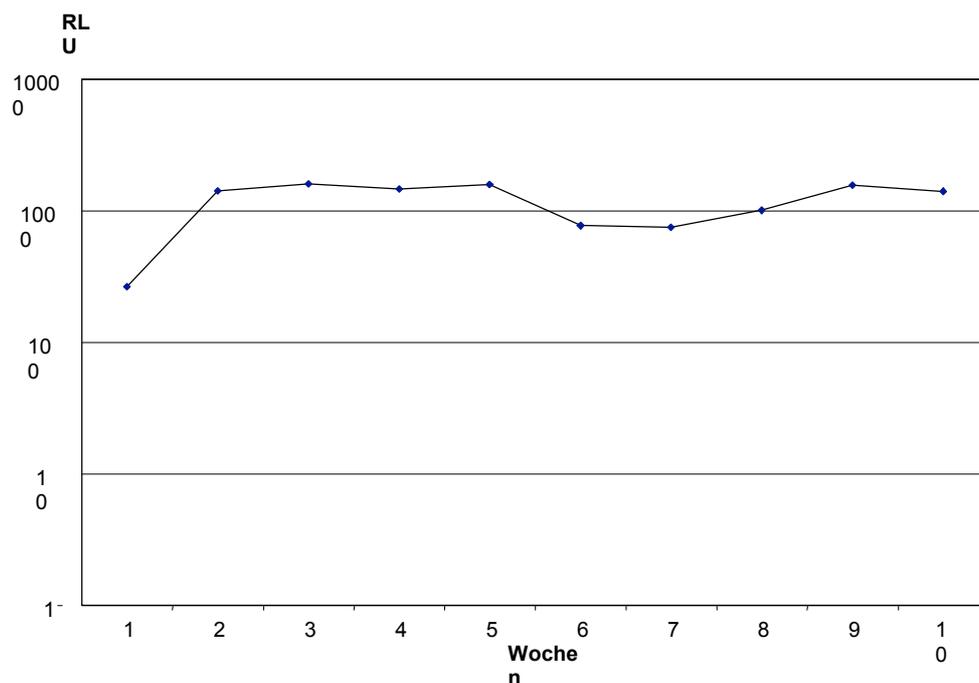
### 3.2.3. Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung:

Messwerte siehe Anhang „A“ / A4

#### 3.2.3.1 Kupferrohr:

Die Messergebnisse des Kupferrohres ergaben Ergebnisse, welche zwischen 263 RLU und 1598 RLU lagen. In der ersten Woche stieg die ATP-Aktivität um 1148 RLU an. Auf diesem Level verblieben die Wasserwerte bis zur 5. Woche. In der 6. und 7. Versuchswoche sanken die Werte ab, bevor sie sich in der darauf folgenden 8. Woche wieder erhöhten. Nachfolgend stiegen die Werte an, bis der Wert 1401 RLU in der 10. Woche erreicht wurde. (siehe Abb.19)

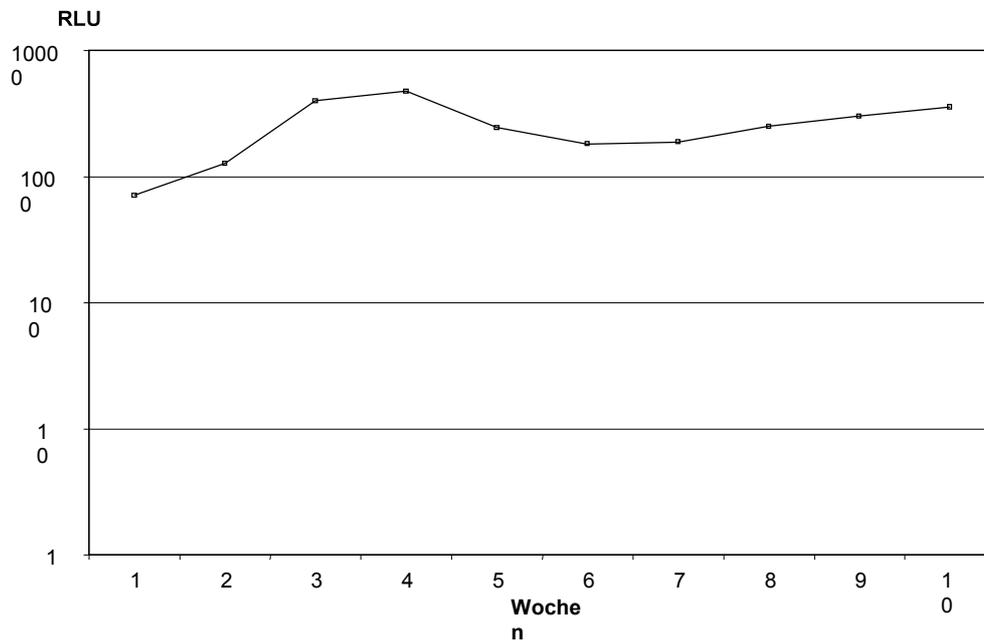
Abb.19 Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung: Kupfer



#### 3.2.3.2 Verbundrohr:

Der Anfangswert lag bei 708 RLU und stieg in bis zur 2. Woche um 178%, auf 1262 RLU an. Ein konstanter Anstieg bis zur 4. Woche auf 4719 RLU war zu verzeichnen, bevor die Bakterienaktivität im durchfließenden Wasser bis hin zur 7. Woche auf Werte von 1881 absank. In den darauf folgenden Wochen stiegen die Werte wieder an und erreichten in der 10. Woche 3568 RLU. (siehe Abb.20)

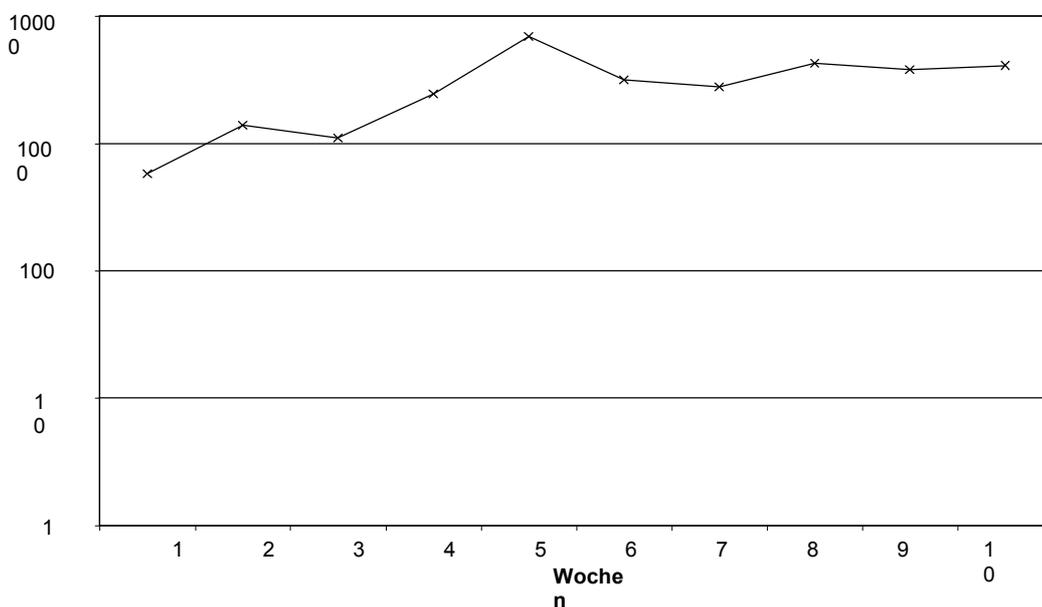
Abb.20 Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung: Verbundrohr.



### 3.2.3.3. PVC-Schlauch der Zahnklinik:

Der Anfangswert betrug 580 RLU, welcher in der 2. Versuchwoche auf 1388 RLU anstieg. Nach einem Abfall in der 3. Woche, stieg die Aktivität im durchfließenden Wasser bis zur 5. Woche auf das Maximum 6904 RLU an. In den kommenden Versuchswochen lassen sich Schwankungen im Kurvenverlauf erkennen, welche zwischen Werten von 2777 RLU und 4267 RLU lagen. (siehe Abb.21)

Abb.21 Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung: PVC Schlauch

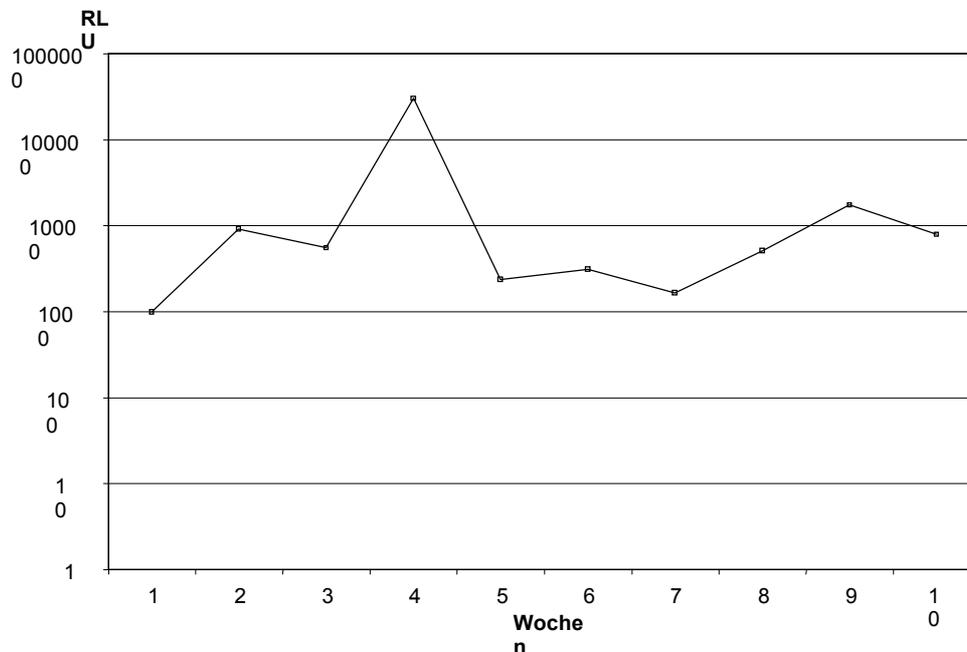


### 3.2.3.4 Gartenschlauch:

Die Messergebnisse des durchfließenden Wassers im Gartenschlauchsystem unterlag starken Schwankungen. Der Ausgangswert von 975 RLU vervielfältigte sich bereits in der 2. Woche auf 9018 RLU.

Nach einem Abfall in der 3. Woche, kam es in der 4. Woche zu einem Peak von 299.608 RLU. Danach folgte ein Abfall der Bakterienaktivität bis hin zur 7. Woche, bis zur 9. Woche stiegen die Werte wieder an, um in der 10. Woche auf Werte von 7856 RLU zu sinken. (siehe Abb.22)

Abb.22 Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung: Gartenschlauch.



### 3.2.3.5 Weißer Gummischlauch 6,0 mm:

Bei diesem Material lassen sich, wie auch bei dem Material des Gartenschlauches wesentlich höhere Werte erkennen, als bei den restlichen Testmaterialien. Nach einem Ausgangswert von 263 RLU stiegen die Werte bis zur 3. Woche auf Werte von 3711 RLU an, um anschließend in ein Tal auf 1067 RLU in der 4. Woche zu sinken. Nach einem leichten Abfall in der 6. Woche stieg die Kurve bis zur 7. Woche an. In den darauf folgenden Wochen sank die Aktivität bis auf den Wert 42458 RLU in der 10. Woche. (siehe Abb. 23)

Abb.23 Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung: Gummischlauch weiß 60mm

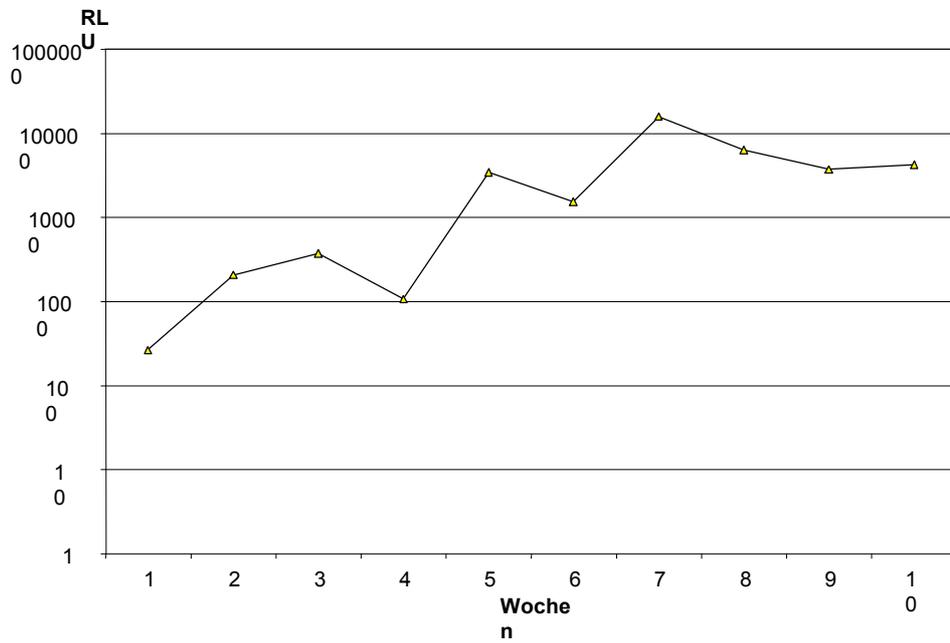
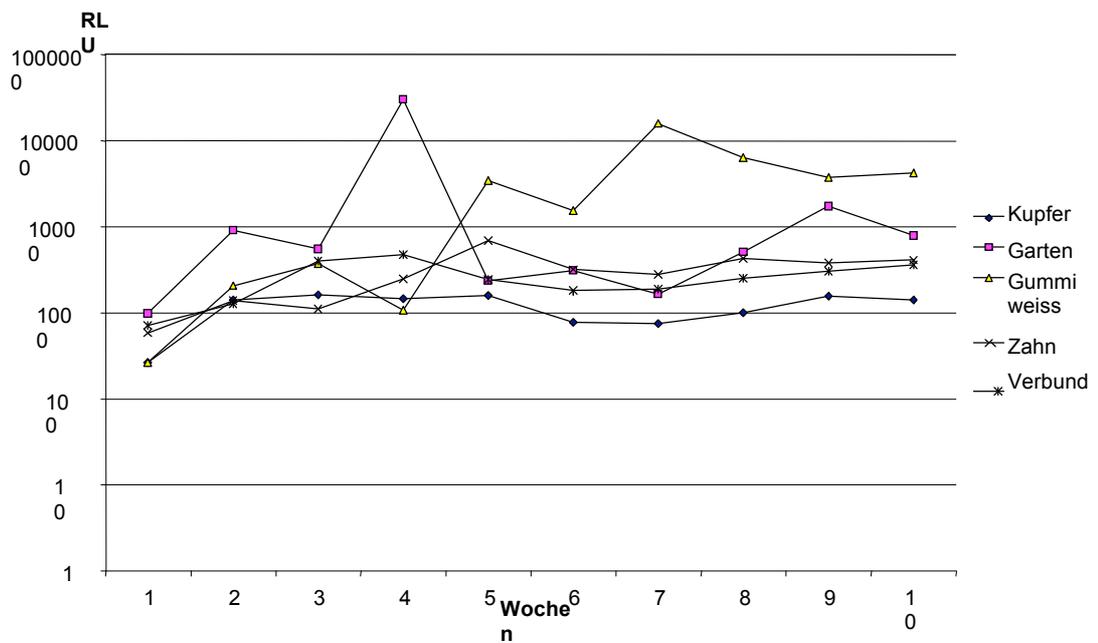


Abb.24 Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung: Gesamtübersicht



### 3.2.4. Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feld-experimentes mittels der Bestimmung koloniebildender Einheiten auf dem R2A-Agar:

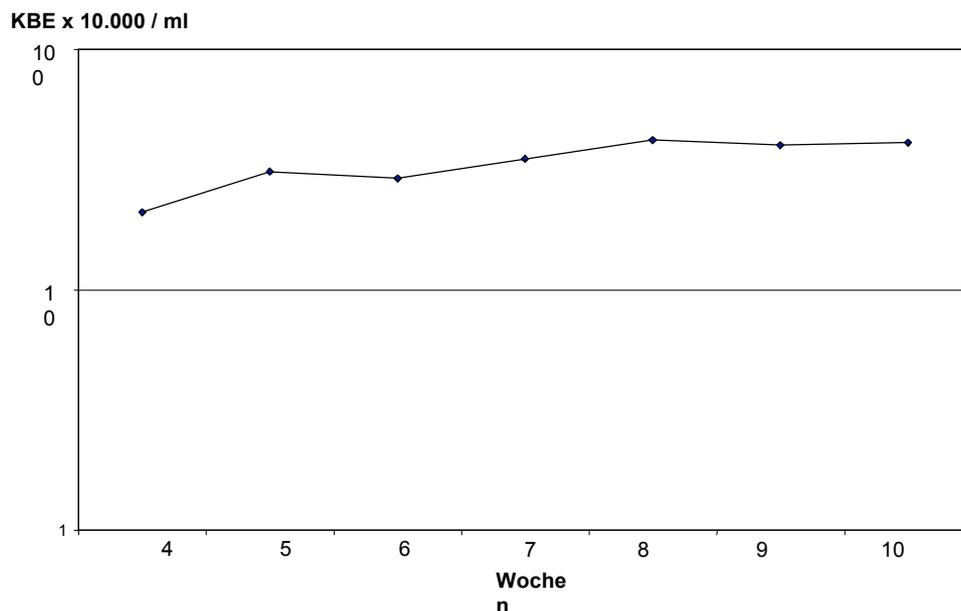
Es wurden die Kolonien ab der 4. Versuchswoche gezählt, da die ersten 3 Wochen keine nennenswert brauchbaren Ergebnisse lieferten.

Messwerte siehe Anhang „A“ / A5

#### 3.2.4.1 Kupferrohr:

Die Anfangsmessung in der 4. Woche liegt bei  $21 \times 10^5$  Kolonien. Im Verlauf der darauf folgenden 4.-7. Woche zeigte sich ein Anstieg der Kurve. Ab der 8. Woche bis zum Versuchsende in der 10. Woche stellt sich ein Plateau ein. (siehe Abb. 25)

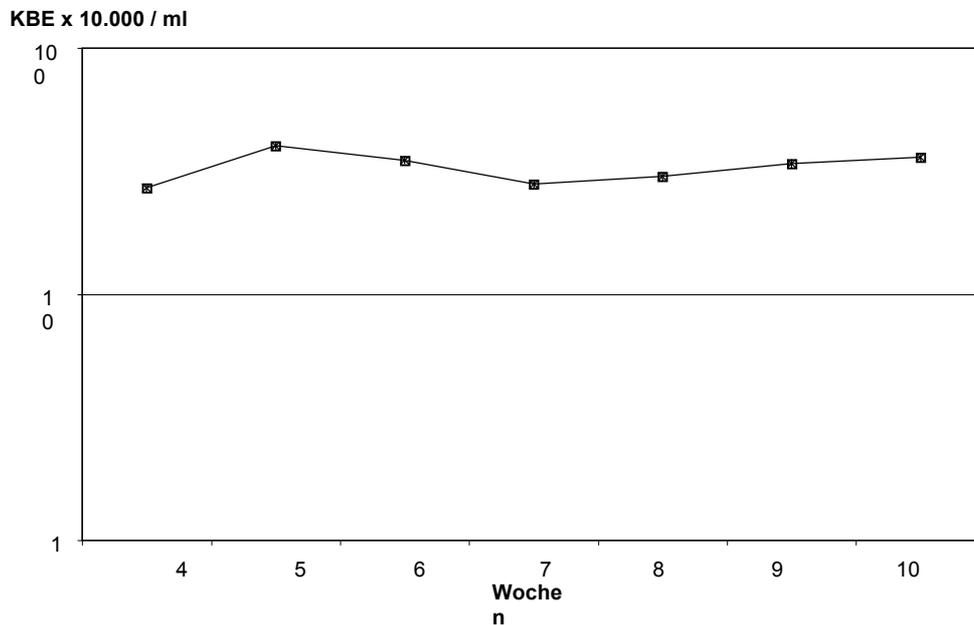
Abb.25. Bakterienmessung der fließenden Welle mittels R2A-Messung:  
(Angaben in  $\text{KBE} \times 10.000/\text{ml}$ )



#### 3.2.4.2 Verbundrohr:

Die Kurve steigt in der 5. Versuchswoche an, um bis hin zur 7. Woche den Ausgangswert zu erreichen. Ein erneuter leichter Anstieg der Aktivität lässt sich innerhalb der 8.-10. Woche feststellen. Die Schlusswerte liegen bei  $34 \times 10^5$  Kolonien in der 10. Woche. (siehe Abb. 26)

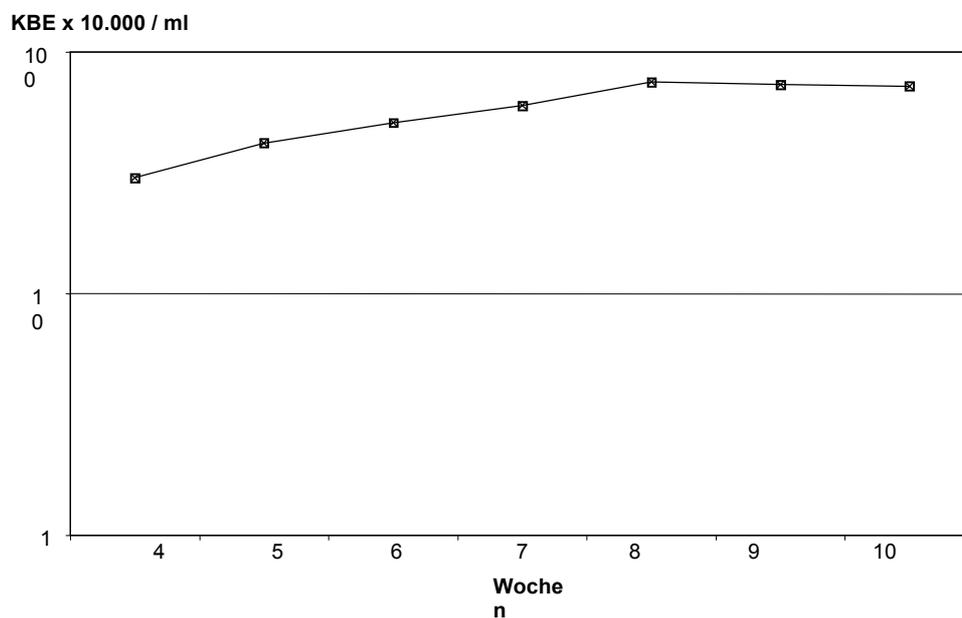
Abb.26 Bakterienmessung der fließenden Welle mittels R2A-Messung:  
(Angaben in KBE $\times 10.000$ /ml)



### 3.2.4.3 PVC-Schlauch der Zahnklinik:

Zu Beginn der Messung lässt sich ein Ausgangswert von  $30 \times 10^5$  messen, welcher sich in konstantem Wachstum als gradlinige Kurve bis hin zur 8. Versuchswoche darstellt. Ab der 8. Woche bis zum Versuchsende bleiben die KBE konstant. (siehe Abb.27)

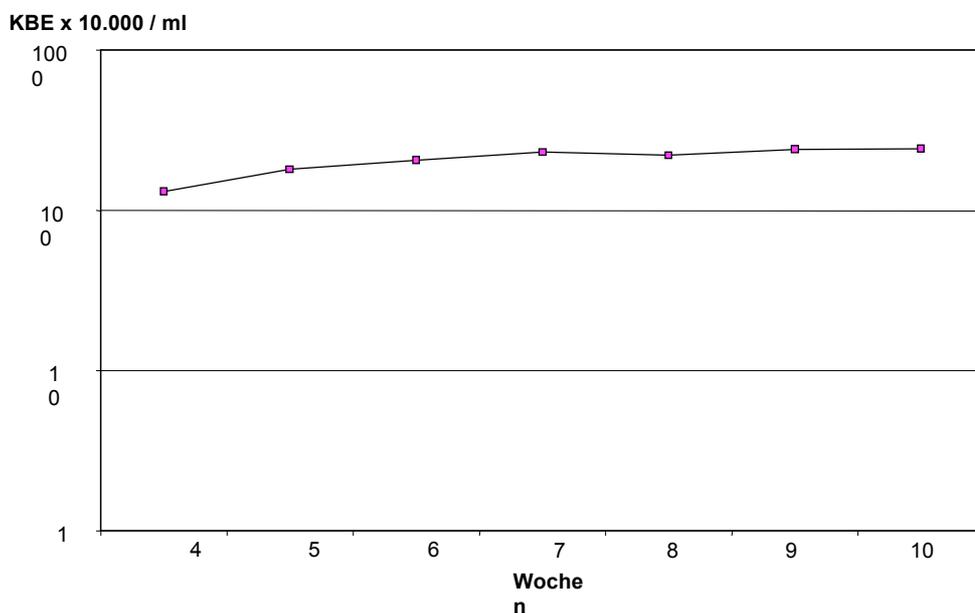
Abb.27 Bakterienmessung der fließenden Welle mittels R2A-Messung:  
PVC-Schlauch Zahnklinik (Angaben in KBE $\times 10.000$ /ml)



#### 3.2.4.4 Gartenschlauch:

Die Messergebnisse der gummielastischen Materialien weisen anhand der R2A-bebrütung einen deutlich höheren Koloniezuwachs auf als bei den restlichen Rohrmaterialien. Der Ausgangswert von  $131 \times 10^5$  Kolonien stieg nach einem Abfall in der 8. Woche auf einen Durchschnittswert von  $241 \times 10^5$  Kolonien bis zum Versuchsende an. (siehe Abb. 28)

Abb.28 Bakterienmessung der fließenden Welle mittels R2A-Messung:  
Gartenschlauch (Angaben in  $\text{KBEx}10.000/\text{ml}$ )



#### 3.2.4.5 Weißer Gummischlauch 6,0 mm:

Das Rohrmaterial weist einen hohen Anfangswert von  $142 \times 10^5$  Kolonien auf. Ein konstanter Anstieg ist in den Wochen 4. - 7. zu verzeichnen. In den anschließenden 3 Wochen gehen die Werte in ein Plateau über (siehe Abb. 29)

Abb.29 Bakterienmessung der fließenden Welle mittels R2A-Messung:  
Gummischlauch weiß 60mm (Angaben in KBE $\times$ 10.000/ml)

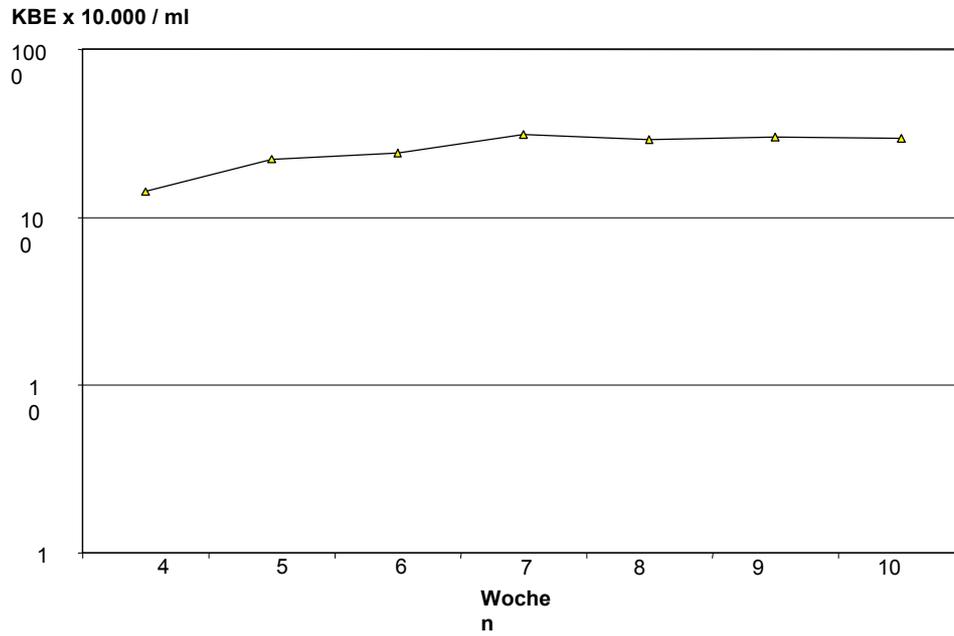
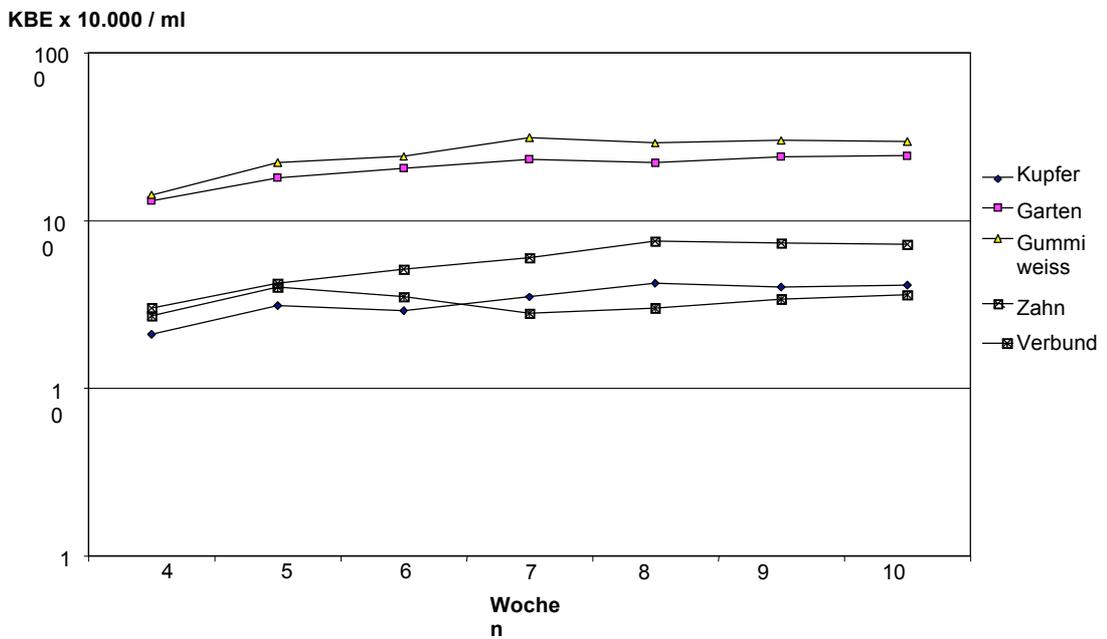


Abb.30 Bakterienmessung der fließenden Welle mittels R2A-Messung:  
Gesamtübersicht (Angaben in KBE $\times$ 10.000/ml)



### **3.3. Biofilmentwicklung in Flaschenansätzen**

Die Flaschenansätze von *Pseudomonas aeruginosa* und Legionellen wurden anhand der ATP-Messungen auf Bakterienaktivität überprüft. *Pseudomonas aeruginosa* wurde anschließend auf Cetrimidagar ausgestrichen und bebrütet. Die Legionellenflaschenansätze wurden zur Legionellenbestätigung auf Legionellenagar ausgestrichen und bebrütet. Es wurden jeweils 2 Messungen in einem Abstand von 6 Wochen mit dem Luminometer durchgeführt: die Erste 2 Wochen nach Bebrütung, die Zweite nach 8 Wochen.

#### **3.3.1. Entwicklung der Legionellenpopulation: Legionellen bei 20°C**

##### **Messmethode: ATP Messung**

###### *Gummi, braun:*

Die Legionellen konnten sich bereits nach 2 Wochen deutlich auf Werte von 113.839 RLU vermehren. Im weiteren Verlauf bis zur 8. Versuchswoche ging die Bakterienaktivität auf Werte von 47.269 RLU zurück (siehe Tabelle 3/4).

###### *Gummi, weiß:*

Der Ausgangswert von 30.930 RLU in der 2. Woche sank im Laufe von 6 Wochen auf 11.517 RLU ab (siehe Tabelle 3/4).

###### *Gummi, rot:*

Der Ausgangswert von 138.309 RLU in der 2. Woche wies dieses Schlauchmaterial als das Material mit der höchsten Bakterienaktivität aus. Der Ausgangswert sank bis zur 8. Woche auf 20.579 RLU ab (siehe Tabelle 3/4).

###### *PVC:*

Der Ausgangswert in der 2. Woche von 118.829 RLU stieg bis zur 8. Woche auf 268.322 RLU an (siehe Tabelle 3/4).

###### *Gummi, weiß klein:*

Der Ausgangswert von 131.064 RLU in der 2. Woche sank im Laufe von 6 Wochen auf 20.579 RLU ab (siehe Tabelle 3/4).

**3.3.2. Entwicklung der Legionellenpopulation:  
Legionellen bei Raumtemperatur (26°C)  
Messmethode: ATP Messung**

*Gummi, braun:*

Der Ausgangswert von 102.356 RLU in der 2. Woche stieg im Laufe von 6 Wochen auf 127.489 RLU ab (siehe Tabelle 3/4).

*Gummi, weiß:*

Der Ausgangswert von 76.822 RLU in der 2. Woche sank bis zur 8. Woche auf 24.282 RLU (siehe Tabelle 3/4).

*Gummi, rot:*

Der Ausgangswert von 246.708 RLU sank bis zur 8. Woche auf 181.898 RLU ab (siehe Tabelle 3/4).

*PVC:*

Der Ausgangswert von 3.403 RLU sank innerhalb der 8 Wochen auf Werte von 2.450 RLU ab (siehe Tabelle 3/4).

*Gummi, weiß klein:*

Ausgangswert dieses Materials war 185.104 RLU. Die Bakterienaktivität sank bis zur 8. Woche auf 107.926 RLU (siehe Tabelle 3/4).

### **3.3.3. Entwicklung der Legionellenpopulation: Legionellen bei 36°C**

#### **Messmethode: ATP Messung**

##### *Gummi, braun:*

Wie bereits in den vorherigen Ansätzen lässt sich bei diesem Schlauchmaterial nach 2 Wochen bereits eine hohe Bakterienaktivität von 113.150 RLU messen. Der Ausgangswert fiel bis zur 8. Woche auf 49.983 RLU (siehe Tabelle 3/4).

##### *Gummi, weiß:*

Der Ausgangswert von 86.002 RLU sank im Laufe von 6 Wochen auf 17.873 RLU (siehe Tabelle 3/4).

##### *Gummi, rot:*

Der Ausgangswert von 187.333 RLU wies dieses Schlauchmaterial als das Material mit dem höchsten Bakterienzuwachs aus. Die Bakterienaktivität stieg bis zur 8. Versuchswoche auf 255.405 RLU (siehe Tabelle 3/4).

##### *PVC:*

Der Ausgangswert von 4.559 RLU sank bis zur 8. Woche auf Werte von 2.739 RLU (siehe Tabelle 3/4).

##### *Gummi, weiß klein:*

Der Ausgangswert 47.043 RLU stiegen im Laufe der 8 Wochen auf 62.489 RLU (siehe (siehe Tabelle 3/4).

Tabelle 3 Entwicklung der Legionellenpopulation nach 2 Wochen  
 Messmethode: ATP Messung (Angaben in RLU)

	2.Woche		
	20°C	26°C	36°C
Gummi schwarz (Kautschuk)	113.839	102.356	113.150
Gummi weiß klein(Polyethylen)	30.930	76.822	86.002
Gummi weiß groß (Polyethylen)	138.309	246.708	187.333
PVC	118.829	3.403	4.559
Gummi rot	131.064	185.104	47.043

Tabelle 4 Entwicklung der Legionellenpopulation nach 8 Wochen  
 Messmethode: ATP Messung (Angaben in RLU)

	8.Woche		
	20°C	26°C	36°C
Gummi schwarz (Kautschuk)	47.269	127.489	49.983
Gummi weiß klein(Polyethylen)	11.517	24.282	17.873
Gummi weiß groß (Polyethylen)	1.154	181.898	255.405
PVC	268.322	2.450	2.739
Gummi rot	20.579	107.926	62.489

### **3.3.4. Entwicklung der Pseudomonadenpopulation:**

***Pseudomonas aeruginosa* bei Raumtemperatur (26°C)**

**Messmethode: ATP Messung**

*Gummi, braun:*

Der in der 2. Woche gemessene Ausgangswert von 43.596 RLU sank bis zur 8. Versuchswoche auf 10.718 RLU (siehe Tabelle 5)

*Gummi, weiß:*

Bei diesem Schlauchmaterial stieg die Bakterienaktivität von 22.772 RLU auf 26516 RLU. (siehe Tabelle 5)

*Gummi, rot:*

Der Ausgangswert von 48.850 RLU stieg bis zur 8. Woche auf 83.720 RLU (siehe Tabelle 5)

*PVC*

Der Anfangswert von 59.687 RLU sank bis zur 8. Woche auf 38.572 RLU (siehe Tabelle 5)

*Gummi, weiß klein:*

Der Ausgangswert 47.591 RLU stieg im Laufe der 8 Wochen auf 54.255 RLU. Dies entspricht einem Anstieg von 114 %.( siehe Tabelle 5)

Tabelle 5: Entwicklung der Pseudomonadenpopulation:

*Pseudomonas Aeruginosa* bei 26°C

Messmethode: ATP Messung (Angaben in RLU)

	26°C	
	2.Woche	8.Woche
Gummi schwarz (Kautschuk)	43.596	10.718
Gummi weiß klein(Polyethylen)	22.772	26.516
Gummi weiß groß (Polyethylen)	48.850	83.720
Silikon (PVC)	59.687	38.572
Gummi rot	47.591	54.255

### 3.4. Bestätigung von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila*

Ergänzend zur Messung der ATP-Aktivität wurden kulturelle Methoden angewandt, welche das Vorhandensein von *Pseudomonas aeruginosa* und Legionellen nachweisen sollten. Hierzu wurden die Flaschenansätze der Legionellen auf 0,1 verdünnt und anschließend auf Legionellen-Selektivagar für eine Woche bei 36°C kultiviert. Die Flaschenansätze mit *Pseudomonas aeruginosa* wurden auf Cetrimid-Selektivagar und auf R2A-Agar kultiviert. Hier betrug die Verdünnung 1:10.000. (Ergebnisse siehe Tabellen 6 und 7)

Bei den Proben 26°C Gummi weiß, Gummi weiß klein und 36°C Gummi weiß wurden Latexteste zur Bestätigung der Diagnose „Legionella“ durchgeführt, .Um einer Bakterienkolonie die Zugehörigkeit zu *Pseudomonas aeruginosa* zuordnen zu können, wurden ein Fluoreszenztest (unter UV-Lampe) und ein Oxidasetest durchgeführt.

Tabelle 6:

Legionellentest mittels Legionellen-Selektivagar: Endresultate KBE/ml

	Gummi braun	Gummi weiß	Gummi rot	PVC	Gummi weiß klein
20°C	flavobact.	62	12	59	120
26°C	9	126	-	8	7
36°C	-	200	-	200	220

Tabelle 7:

*Pseudomonas aeruginosa* Testung mittels Cetrimid-Agar: Endresultate KBE/ml

	Gummi braun	Gummi weiß	Gummi rot	PVC	Gummi weiß klein
36°C	-	2	180	1	16

## **4. Diskussion**

### **4.1 Vergleich der Meßmethoden zur Bestimmung der Bakterienaktivität:**

Zur Bestimmung der Bakterienmasse in Biofilmen werden in der Literatur unterschiedliche Methoden verwendet (van der Koji et al, 2003). Ein Ziel dieser Arbeit war der Vergleich kultureller mit nicht-kulturellen Methoden bezüglich des Analysenaufwandes und der Aussagekraft.

Die ATP-Messung kann sowohl stationär, als auch im Feld verwendet werden (Deininger et al, 2003). Ein Vorteil ist, dass die Messungen innerhalb weniger Minuten durchgeführt werden können und ein Ergebnis quasi online zur Verfügung steht. Bei den Messungen von 30 Proben wurde ein Zeitraum von maximal 45 min benötigt. Der Umgang mit den verschiedenen Reagenzien zur Gewinnung des bakteriellen ATPs erwies sich als einfach.

Mit der Luminometrie ist es möglich die Quantität der Bakterienaktivität nachzuweisen, sie gibt jedoch keine Aussage über die vorhandene Species. Da es sich um ein hochsensitives System handelt, lassen sich bereits sehr niedrige ATP Konzentrationen messen. Dies bedeutet auch, dass geringe Verunreinigungen die Messung stark verfälschen und zu keinen verwertbaren Ergebnissen führen können. Zu den möglichen Fehlerquellen zählt nebst den bereits Genannten der Arbeitsbereich der Luminometrie. Oberflächen und alle nötigen Utensilien wie Pipetten und Probenständer wurden deshalb vor Gebrauch mit 70% Alkohol desinfiziert. Die Luminometrie erwies sich als gut reproduzierbare Methode zur Erfassung der Bakterienaktivität. Voraussetzung war die präzise Probenentnahme, der exakte Umgang mit dem Biomass-Kit HS und die Beachtung der hygienischen Bedingungen im Versuchsbereich.

Die ATP-Messung wird von anderen Untersuchern als Standardmethode für die Aktivität von Bakterien angesehen (Holm-Hansen et al, 1996, Karl et al, 1980, van der Kooij et al, 2003, Schoenen et al, 1988, Rogers et al, 1994, Deininger and Lee, 2003) und kann als Schnelltest bei Verdacht auf verunreinigte Wässer hinzugezogen werden.

„Dieser Test ist nicht neu und wird als Standardmethode beschrieben. Was neu ist, ist die erhöhte Sensitivität neuester Luminometer. Das Instrument passt auf jede Ablage und kann an Ort und Stelle der Probenentnahme genutzt werden. Sind die

Ergebnisse erhöht, so können weitere Schritte zur Identifizierung der möglichen Pathogenität der Wasserprobe nötig sein“ (Deininger et al 2003)

Bei den kulturellen Methoden ist die Anzucht von Bakterien auf R2A-Agar Standard. Ein negativer Aspekt ist die lange Vorbereitungszeit der Proben von ca. 1,5h sowie die lange Bebrütungszeit von 7 Tagen des R2A-Agars. Die Kultivierungszeit sollte nicht unterschritten werden, denn eine kürzere Bebrütungszeit liefert keine eindeutigen, verwertbaren Ergebnisse (Deininger et al, 2005). Desweiteren gibt diese Methode keinen Aufschluß darüber, ob die Wasserprobe für den Menschen gefährlich ist oder nicht, jedoch auf die Sauberkeit des Wassers (Deininger et al, 2005). Trotz des hohen zeitlichen Aufwands waren die Ergebnisse eindeutig und gut reproduzierbar. Die Nutzung des R2A-Agars scheint sinnvoll, denn das Bakterienwachstum wird bereits durch den Nährboden selektiert. Die Bakterienkolonien können anhand Form, Farbe und Größe bereits zugeordnet werden. R2A-Agar ist eine zuverlässige Methode und gilt als „Goldstandard“ wenn es um die Messung heterotropher Bakterien in Wässern geht (Bertoloni et al 2006).

Die zweite in dieser Arbeit verwendete kulturelle Methode (DEV-Agar) entsprach der Vorgabe der TrinkwV 2001. Es waren oft keine eindeutigen auswertbaren Ergebnisse zu erzielen. Entweder es war kein Wachstum zu finden oder es bildete sich ein nicht auszählbarer Bakterienrasen. Da diese Methode auch nach 3 Wochen für uns ungenügende Ergebnisse lieferte, wurde der Fokus auf den Vergleich der Luminometrie und der kulturellen Methode R2A-Agar gelegt.

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Methoden, so lässt sich erkennen, daß die Bakterienaktivität im Biofilm des Kupferrohres die niedrigsten Werte aufweisen. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für die Materialien dieser Art (Thurmann et al, 1989, Staub et al, 1995, Kinn et al, 2002, Artz et al, 2002, Teitzel et al 2003, van der Kooij et al, 2003/2005, Rogers et al, 1994).

Die Werte des Gartenschlauches ergeben bei beiden Methoden die höchsten Messungen, jedoch weist der Kurvenverlauf der ATP-messung einen kontinuierlicheren Anstieg mit anschließender Plateaubildung auf, was charakteristisch für dieses Material ist (van der Kooij et al, 2003, Rogers et al, 1994, Schwartz et al, 2003).

Die Bakterienaktivität im Biofilm des Verbundrohres ähnelt sich im direkten Vergleich nur in der Anfangsphase. Bei der ATP-messung fallen die Werte nach der 3. Versuchswoche ab, bei der R2A Auswertung steigen die Werte stetig an. In der

Literatur wird ein Anstieg der Bakterienaktivität mit anschließendem Abfall beschrieben (Brocca et al, 2002, Letohla et al, 2002).

Vergleicht man die Ergebnisse des weissen Gummischlauches 6,0 mm, so lässt sich eine Diskrepanz feststellen. Die Werte sind bei der ATP-messung wesentlich höher als die des R2A Agars. Da das Material weitestgehend mit dem des Gartenschlauches übereinstimmt, sollte der Kurvenverlauf ähnlich hoch sein. Dies lässt die Vermutung zu, daß die ATP-Messung das aussagekräftigere Ergebnis liefert. Die Probenentnahme des PVC Schlauches der Zahnklinik war aufgrund des geringen Durchmessers und der damit verbundenen problematischen Probenentnahme mit hohen Fehlerquellen behaftet. Somit ist eine korrekte Interpretation dieser Ergebnisse nicht möglich.

Die Ergebnisse der Wasserproben ähneln sich in beiden Methoden. Kupfer und Verbundrohr weisen die konstant niedrigsten Werte auf. Die ATP-Werte sind bei Kupfer am niedrigsten, die des R2A-Agars wiesen das durchfließende Wasser im Verbundrohr als am bakterienärmsten aus.

Die Untersuchung der fließende Welle im Gartenschlauch und Gummi weiss 6,0mm ergaben mit beiden Methoden Übereinstimmungen.

Das wichtigste Kriterium für die Auswahl der Methode ist die Messbarkeit der momentan aktiven Bakterien im Biofilm und der Bakterienaktivität in der fließenden Welle zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Hierbei sollte die Reproduzierbarkeit, der zeitliche Aufwand und die Einfachheit der Methode berücksichtigt werden. Die Pathogenität der Bakterien in diesem Vergleich spielt eine untergeordnete Rolle, denn die genannten Methoden geben hierüber keinen Aufschluss.

Bei der Kultivierung ist es nur möglich kultivierbare Mikroorganismen zu untersuchen (van der Kooij et al, 2003). Diese machen jedoch nur einen kleinen Anteil der Gesamtbakterienzahl aus. Deiniger und Lee beschrieben 2001, dass die ATP-Messung gegenüber der HPC-R2A eine direkte Handlungsmöglichkeit zulässt, wenn hohe Bakterienaktivitäten in beispielsweise Haushaltsinstallationssystemen gemessen werden.

Bei den heutzutage verwendeten kulturellen Methoden für die Evaluation von Trinkwasserproben ist eine lange Inkubationszeit notwendig, die das Ergebnis erst liefert, wenn das Wasser längst verbraucht ist. Betreiber von Wasseraufbereitungsanlagen sollten in kürzester Zeit Informationen über den erhöhten Bakterienbefall erhalten. Kontaminierte Systeme müssen wesentlich früher

diagnostiziert werden, um mögliche Desinfektionen oder Spülungen direkt durchführen zu können. Dies untersuchten 2001 Deininger et al und konnte beweisen, daß „die ATP-messung höchst ähnliche Ergebnisse liefert wie herkömmliche HPC. Die Signifikanz der ATP-messung ist, daß sie nach weniger als 5 Minuten verwertbare Ergebnisse über die Trinkwasserqualität liefert“. Die Nutzung der nicht kulturellen Methode scheint somit sinnvoll.

## **4.2 Bestimmung der Bakterienaktivität im Feldexperiment**

### **4.2.1 Bakterienaktivität im Biofilm:**

Bereits in vorangegangenen Studien wurden Versuche durchgeführt, um den Einfluss von Rohrmaterial, Fließgeschwindigkeit und Temperatur des durchfließenden Wassers auf die Entwicklung des Biofilmes und der Bakteriendichte zu testen (van der Kooij et al, 2003/2005, Rogers et al, 1994, Schwartz et al, 2003).

Die Fließgeschwindigkeit des durchfließenden Wassers ist ein wichtiger Parameter bei der Entstehung eines Biofilmes. Rohre mit grossem Durchmesser haben eine niedrigere Durchflussgeschwindigkeit als Rohrsysteme mit kleinem Durchmesser und fördern die Biofilmbildung (Léon Ohl et al, 2003). Starke turbulente Strömungsvorgänge mindern die Formation eines Biofilmes, indem der oberflächliche Biofilm abgetragen wird.

In allen 5 Testrohren lies sich in den ersten 3 Wochen Bakterienaktivität nachweisen. Vergleichbare Effekte sind auch in vorangegangenen Studien beobachtet worden und sind ein Bestandteil der Biofilmentwicklung (Lehtola et al, 2004).

Es hat sich in unserer Studie gezeigt, dass das Kupferrohr die stabilste und niedrigste Bakteriendichte aufwies. Dass Kupfer eine inhibitorische Wirkung auf die Ausbildung von Biofilmen hat, ist bekannt. Unser Ergebnis unterstützt die Aussage, dass bereits eine geringe Freisetzung von Kupfer in das Wasser toxisch und somit inhibitorisch auf das Wachstum von Bakterien wirkt (Thurmann et al, 1989, Staub et al, 1995, Kinn et al, 2002, Artz et al, 2002, Teitzel et al, 2003, van der Kooij et al, 2003/2005, Rogers et al, 1994).

Lehtola et al, 2004, konnten beweisen, dass Kupfer auf Bakterienbestandteile wie respiratorische Enzyme und Nucleinsäuren einen inhibitorischen Einfluss hat. In Versuchen vorangegangener Studien schwankte der Kupfergehalt zwischen 0,12-1,37 mg/l (Lehtola et al, 2004, Schwartz et al, 2003). In der TrinkwV 2001 ist ein

Grenzwert für Kupfer von 2 mg/L definiert worden. Die Kupferwerte in Experimenten von Tuschewitzki et al, 1990, Rogers et al, 1994, van der Kooij et al, 1999/2003/2005, Niquette et al, 2001 lagen deutlich unter diesem Grenzwert (sowohl Stagnationsproben als auch reale Verbrauchsproben). Im Hinblick auf Korrosion des Kupfers ist dieses Material stark abhängig vom pH-Wert des durchfließenden Wassers. Ein Zinnüberzug des Kupferrohres kann dieses Material jedoch korrosionsbeständiger machen (Schlosser et al, 2007).

Nach einem Zeitraum von 51 Tagen waren bei unseren Untersuchungen grüne Oxidationsspuren innerhalb des Kupferrohres zu finden. In wieweit eine Oxidation des Materials Einfluss auf die Biofilmbildung hat, wurde in diesem Experiment nicht geklärt. Im Vergleich der Bakterienaktivitätsbestimmung des Biofilms und der fließenden Welle lassen sich Parallelen in der Entwicklung erkennen. Die Bakterienaktivität im Biofilm ist sehr viel höher als in der fließenden Welle. Dies ist darauf zurückzuführen, daß in der fließenden Welle der Biofilm durch das strömende Wasser nur oberflächlich ausgespült wird. Die hohen Biofilmwerte ergaben sich, da der gesamte Biofilm für die Messungen abgetragen wurde. Dies ist nicht auf die Materialeigenschaften des Kupfers zurückzuführen, sondern ein generelles Geschehen in Rohrsystemen (Léon Ohl et al, 2003).

Das Verbundrohr besteht aus einem äußeren Kunststoffrohr, einer als Mittelschicht eingegliederten Metallfolie (bestehend aus Aluminium) und einem inneren Kunststoffrohr auf der Basis von Polyvinylchlorid, Polyethylen, Polypropylen oder Polybutylen. Es ist bekannt, dass Kunststoffe Phosphor in das durchfließende Wasser abgeben können (Lehtola et al, 2004). In Laborexperimenten von Lehtola et al (2002) wurde Phosphor und Weichmacher am stärksten in den ersten 3 Wochen in das Wasser freigesetzt. Diese Aussage lässt sich durch unseren Versuch unterstützen, denn in den ersten 3 Wochen wurde ein Zuwachs an Bakterienaktivität gemessen. Der Abfall der Bakterienaktivität ab der 3. Woche lässt sich vermutlich auf die Auswaschung des Restmonomergehaltes und den zugesetzten Additiva zurückführen, die den Nährboden der Bakterien bilden. Die neuerdings verwendeten Additiva sind Antioxidantien, Lichtstabilisatoren und Pigmente, welche die physikalische und chemische Belastbarkeit des Materials erhöhen sollen (Brocca et al, 2002). Der Vergleich der Bakterienaktivität der fließenden Welle und des Biofilms zeigen hier ebenfalls eine parallele Entwicklung. Die Biofilmwerte sind um ein vielfaches höher als in der fließenden Welle.

Der Gartenschlauch zählt zu den organischen Materialien und gehört der Gruppe der Elastomere an. Bakterien haben eine starke Affinität zu diesen Materialien. Besonders synthetisch hergestellte Rohrmaterialien begünstigen durch Freigabe biodegenerierbarer Bestandteile in Kontakt mit Wasser das Biofilmwachstum. Diese Eigenschaft wurde durch van der Kooij et al (2003) als „Biomass Production Rate“ (BPR) beschrieben. Die diesem Material zugesetzten Weichmacher verstärken das Wachstum von Bakterien und die Bildung des Biofilmes (Schlosser et al, 2007)

Anfänglich steigt der ATP Gehalt an, bevor er nach einiger Zeit in ein Plateau übergeht (van der Kooij et al, 2003). Die Maximalkonzentration an ATP lag bei Gummi- und Plastikmaterialien (van der Kooij et al, 2003, Rogers et al, 1994, Schwartz et al, 2003). Die während der Vulkanisierung der Polymere entstandenen Nebenprodukte (Amine) führen in Verbindung mit Wasser zusätzlich zu Geruchs- und Geschmacksveränderungen (Schlosser et al, 2007), was dieses Testmaterial für die Nutzung in Haushaltsinstallationssystemen für den Menschen unbrauchbar macht. Die Grundbestandteile des Gummischlauches 6,0mm sind mit denen des Gartenschlauches identisch. Als Zusatz findet man in diesem Material eine Polyestergewebungsverstärkung. Der Ausgangswert verfünffachte sich im Versuchsverlauf, was auf das Vorhandensein von Weichmachern als bakteriellen Nährboden hinweist (van der Kooij et al, 2003, Rogers et al, 1994, Schwartz et al, 2003, Schlosser et al, 2007). Vergleicht man die Bakterienaktivität der fließenden Welle mit den Werten des Biofilms, so lässt sich erkennen, daß die Wasserwerte bis zur 7. Woche auf ein Maximum steigen. Die Biofilmproben erreichen den Maximalwert bereits nach der 3. Versuchswoche. Die leicht abfallende Tendenz in ein Plateau ab der 7. Woche weist Parallelen auf. Exponentiell höhere Werte lassen sich bei der Biofilmmessung erkennen.

Die Ergebnisse des PVC-schlauches erwiesen sich als schwer interpretierbar, da sich die Probenentnahme als problematisch erwies. Die Notwendigkeit, die Proben exakt auf dieselbe Art und Weise zu entnehmen, ließ sich aufgrund der geringen Größe und des Querschnitts nicht bewerkstelligen (wie im Abschnitt 4.1 Fehlerquellen beschrieben). In wieweit die Werte nun in Bezug auf das Material aussagekräftig sind, ist fraglich, denn dieses Schlauchmaterial beinhaltet ebenso wie andere PVC Rohre Phosphat und Weichmacher, welche die Biofilmbildung fördern. Demnach ist nach unserer Einschätzung dieses Ergebnis nicht aussagekräftig für die Materialien dieser Art.

### 4.3 Biofilmentwicklung in Flaschenansätzen:

#### **4.3.1 Flaschenansätze Legionellen:**

Das Vorhandensein von *L. pneumophila* in Wässern kann starke gesundheitliche Probleme mit sich bringen (Cordes et al, 1981; Tobin et al, 1980). Um gut wachsen zu können benötigen Legionellen eine Umgebung, welche aus bestimmten Begleitkeimen, einer gewissen Wassertemperatur, Fließgeschwindigkeit und der Art des Materials besteht, in welchem sich das Wasser befindet.

Schwierigkeiten bei der Kultivierung von Legionellen bestehen aus folgenden Gründen:

Kuiper et al beschrieb 2004, dass Legionellen nur in so genannten 'komplexen Medien' wachsen können. Hierzu zählen die Bestandteile Cystein und Eisensalze, sowie eine Kette von Mikroorganismen. In vitro Studien haben gezeigt, dass *L. pneumophila* besonders intrazelluläres Wachstum in Amöben und Protozoen aufweist und deren Vorhandensein Grundvoraussetzung für das Bestehen von *Legionella pneumophila* ist. Um ein Amöben- oder Protozoenwachstum zu gewährleisten, muß deren Nahrungsquelle vorhanden sein, welche aus heterotrophen Bakterien besteht. Heterotrophe Bakterien (wie zum Beispiel: *P. aeruginosa*, Flavobakterien, *Klebsiella pneumoniae*) alleine fördern nicht das Wachstum der *L. pneumophila* (Kuiper et al, 2004). Ebenso wichtig für das Wachstum von Legionellen ist die Umgebungstemperatur des Wassers. Legionellen können Temperaturen bis 50°C problemlos überstehen, niedrige Temperaturen unter 20°C verlangsamen das Wachstum um ein vielfaches. Temperaturen zwischen 30°C und 40°C sind die Idealtemperatur. Erreichen Wassertemperaturen 60°C und höher, dann lässt sich kein Legionellenbestand mehr feststellen (Rogers et al 1994).

Bei unseren Untersuchungen ergab die erste ATP Messung mit dem Luminometer bei allen Ansätzen einen Anstieg der Aktivität, was auch in vorangegangenen Studien beobachtet wurde (Kuiper et al, 2002 , van der Kooij et al, 2005, Schwarz et al, 2003). Um eine aussagekräftige positive oder negative Bilanz am Ende des Versuchs ziehen zu können, wurde die Bestimmung der Bakterienaktivität durch ATP-Messung zweimal durchgeführt.

Kuiper et al (2004) und van der Kooij et al (2004) konnten nachweisen, dass nach hohem Vorkommen heterotropher Bakterien (ATP Messung) ein enormer Zuwachs an Protozoen gemessen werden konnte. Ein exponentielles Wachstum von *L.*

*pneumophila* war die Folge. Basierend auf diesen Studien wurden in unserem Feldexperiment keine weiteren Selektivtests durchgeführt.

Unsere verwendeten Rohrmaterialien bestanden aus Kautschuk, Polyethylen, PVC und deren Additiva. Zusätze, die eine gute Basis für Bakterienwachstum bilden (Lehtola et al, 2002/2004, Brocca et al, 2002). Es wurde auf eine Materialanalyse verzichtet. Eine Anzucht von Legionellen war in 70% der durchgeführten Versuche erfolgreich.

Dass die Bebrütungstemperatur eine Rolle spielt, ließ sich in unserem Versuchsaufbau beweisen, wobei der geringe Temperaturunterschied zwischen 20°C und 26°C keinen gravierenden Unterschied im Legionellenbestand erkennen lies. Vergleicht man jedoch die Resultate von 20°C und 36°C, ist eine erhöhte Aktivität bei 36°C erkennbar. Dies bestätigt die Studie von Rogers et al, 1994.

Ein entscheidender Punkt für das Wachstum von *L.pneumophila* ist die Stagnation des Wassers während der Bebrütung. Lange Ruhezeiten von Wasser in Kombination mit Temperaturen zwischen 26°C - 40°C fördern das Legionellenwachstum (Fischer-Hoch et al, 1982, Ciliesky et al, 1984, von der Kooij, 2005). Diese Studien konnten ebenfalls durch unsere Ergebnisse unterstützt werden.

Für die Praxis ergibt sich hieraus, dass vor allem in Haushaltsinstallationssystemen eine Stagnation und eine Temperatur über 20°C von Wässern in Rohrsystemen vermieden werden sollte.

#### **4.3.2 Flaschenansätze *Pseudomonas aeruginosa*:**

Unsere Versuche haben ergeben, daß Pseudomonaden gut auf Kunststoff- und Gummioberflächen wachsen können. Zamberlan da Silva fand heraus, daß *P. aeruginosa* bevorzugt die Materialien PET befällt, gefolgt von Silikon und Glas, welche Bestandteil unserer Versuchsreihe waren. Durch die Fähigkeit der Adhäsion und meist genügsamer Stoffwechselanforderungen konnten die Rohroberflächen besiedelt werden. Zusätzlich förderte die Stagnation und die warme Wassertemperatur das Wachstum von *P. aeruginosa*.

In Publikationen wurde der ausnahmslose Befall von medizinischen Utensilien auf Kuststoffbasis genannt. Hierzu zählen vor allem Katheter als Ersatz des Uro-Genital-Traktes, Intubationsschläuche, Endoskope, Bronchioskope, Dialyseutensilien, Bypasschläuche, Adapterschläuche verschiedener Beatmungs-geräte, Kühlungssysteme und Leitungswasserverteilungssysteme in Krankenhäusern. Aber

auch deren angestelltes Personal, welches im engen Kontakt mit den Patienten steht (Zamberlan da silva et al, 2007, Trautmann et al, 2005, Moolenaar et al, 2000, Matar et al, 2005, Petignat et al, 2006).

Das Bakterium *P.aeruginosa* besitzt Virulenzfaktoren, welche besonders bei immungeschwächten Patienten zur Mortalität führen können (Zamberlan da Silva et al, 2007). Zu diesen Virulenzfaktoren zählt die Möglichkeit der Bildung von Cytotoxin, Hämolysin und Proteasen.

## **5 Schlussfolgerung:**

- Unter den gegebenen Umständen scheint die Luminometrie ein geeignetes Verfahren zur Schnelldiagnostik der Bakterienaktivität in Wässern zu sein, ersetzt jedoch nicht die kulturelle Methode des R2A-Agars. Der Hauptvorteil ist die Mobilität und der geringe zeitliche Aufwand der Messung.
- Die ATP-Messung lässt eine sofortige Handlungsmöglichkeit in der Praxis zu (zum Beispiel: Spülungen bei hohen ATP-Werten).
- Die ATP-Messung gibt keine Aussage über Bakterienspezies.
- Stagnation, Fließgeschwindigkeit, Nährstoffangebot, Wassertemperatur, Rauigkeit der Oberfläche und die Abwesenheit von Desinfektionsmitteln in Installationssystemen scheinen förderlich für die Ausbildung eines Biofilms.
- Eine kontinuierliche Durchströmung von Rohrsystemen kann die Ausbildung eines Biofilmes verringern.
- Kupfer- und Verbundrohr scheinen vorteilhaft für die Inhibition von Biofilmen zu sein.
- Kupfer- und Verbundrohr scheinen für die Verwendung in Haushaltsinstallationssystemen mit dem Menschen als Endverbraucher sinnvoll.
- Elastomere, organische Materialien scheinen durch die Förderung der Bakterienbesiedlung und Wachstum fraglich für den Einsatz in Installationssystemen.

### Schlussfolgerung für die Praxis:

- Haushaltsinstallationssysteme sind so zu planen, daß sie das Biofilmwachstum nicht begünstigen.
- Es sollten Installationsmaterialien Verwendung finden, die eine geringe Nahrungsquelle für Bakterien darstellen (Kupfer, Verbundrohr).
- Die Stagnation in Installationssystemen, sowie große Rohrdurchmesser sollten vermieden werden.
- Der Kaltwasserbereich sollte Temperaturen von 20°C nicht überschreiten, um das Wachstum von krankheitserregenden Bakterien zu vermeiden.
- Kalt- und Warmwasser sollten in getrennten Kanälen verlaufen.
- Auf organische Schlauchmaterialien sollte verzichtet werden.

## Literaturverzeichnis:

1. **Bertoloni J., Nuala B. P., Lee A. Z.**, Measuring the validity of two in-office water test kits, American dental association (2006), Vol 137, No 3, pp. 363-371.
2. **Blanc D.S, Francioli P., Zanetti G.**, Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Units – A Review (2007). The open Microbiology Journal 2007, Vol. 1, pp. 8-11
3. **Brocca D., Arvin E., Mosbaek H.**, Identification of organic compounds migration from polyethylene pipelines into drinking water (2002). Water research 36 (15), pp. 3675-3680
4. **Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz**, 49; doi:10.1007/s00103-006-1284-x, Springer Medizin Verlag (2006), pp. 681-686
5. **Bundesgesundheitsamt**, Gesundheitliche Beurteilung von Kunststoffen und anderen nichtmetallischen Werkstoffen im Rahmen des LMBG für Trinkwasserbereich, 1. Mitteilung, Bundesgesundheitsblatt (1977), 20 pp.10-13
6. **Ciesielsky C.A., Blaser M. J., Wang W.L.**, Role of stagnation and obstruction of waterflow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing (1984), .Appl. Environ. Microbiol. 48, pp. 984-987.
7. **Deininger R. A. and Lee J.**, Modern Tools and Methods of Water Treatment for Improving Living Standards. Rapid Detection of Bacteria in Drinking Water, Springer Netherlands (2005), 10.1007/1-4020-3116-5\_4
8. **Deininger R. A. and Lee J.** , Modern Tools and Methods of Water Treatment for Improving Living Standards Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Modern Tools and Methods of Water Treatment for Improving Living Standards Dnepropetrovsk, Ukraine (2003), Springer Netherlands (2005)

9. **Deininger R. A. and Lee J.**, Rapid determination of bacteria in drinking water using an ATP assay, Papers from ICFAC III "Rapid Field Detection and Identification of Biological Agents" (2001), John Wiley & Sons, Inc.
  
10. **Exner W., Kramer A., Kistemann T., Gebel J., Engelhart S.**, Wasser als Infektionsquelle in medizinischen Einrichtungen, Prävention und Kontrolle, Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2007-50, DOI10.1007/s00103-007-0156-3, Springer Medizin Verlag 2007
  
11. **Fembacher I., Lehner-Reindl V., Biling J., Schindler P., Höller C.** , Untersuchung zur mikrobiologischen Belastung von Verdunstungskühlanlagen in Bayern, Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelversicherung (2007), ISBN 978-3-939653-23-6 Print
  
12. **Feuerpfeil I., Hummel A., Renner P.** Ausgewählte Aspekte bei der mikrobiologischen Überwachung der Trinkwasserqualität, Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2007-50, DOI10.1007/s00103-007-015306, Springer Medizin Verlag 2007
  
13. **Fischer-Hoch S.P., Smith M.G., Colbourne J.S.**, *Legionella pneumophila* in hospital hot water cylinders (1982). Lancet i, pp.932-936.
  
14. **Flemming, H.-C.**, Sorption sites in biofilms. (1995) *Wat. Sci. Tech.* 32, 27-33
  
15. **Flemming, H.-C., Leis, A.**, Sorption properties of biofilms. (2002) In: Bitton, G. (Hrsg.): Encyclopedia of Environmental Microbiology, Bd. 5, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp..2958-2967.
  
16. **Habash M., Henny C. van der Mei, Reid G., Busscher H.**, Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to silicone rubber in parallel plate flow chamber in the absence and presence of nutrition broth (1997), Microbiology (1997), 143, pp. 2569-2574
  
17. **Hentschel W., Voigt K., Heudorf U.**, Umsetzung der neuen Trinkwasserverordnung §18: Überwachung von Haushaltsinstallationen – Wasser für die Öffentlichkeit, Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz (2006), 49;804-817 doi:10.1007/s00103-006-0011-y, Springer Medizin Verlag 2006

18. **Hernandez-Chaves A., Corona-Nakamura A.L., Miranda-Novales M.G., Leanos-Miranda B, Portilho-Gomez L., Anthor-Rendon J., Aguilhar-Benavides S.**, Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoir (2001). Arch Med Res 32:238-242
19. **Kim B.R., Andersson J.E., Müller S.A., Gaines W.A., Kendall A.M.**, Literature review- efficiency of various disinfectants against bacteria in water systems (2002) Water research 36 (18), 4443-4444.
20. **Kuiper M.W, Wullings B.A., Akkermans A.D.L., Beumer R.R., van der Kooij D.**, Intracellular Proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmanella vermiformis* in Aquatic Biofilms grown on Plasticized Polyvinyl Chloride. Applied and Environmental Microbiology, Nov 2004, Vol. 70, No. 11 doi:10.1128/AEM.70.11.6826-6833.2004, pp.6826-6833
21. **Lehtola M.J., Miettinen I.T., Martikainen P.**, Biofilm formation in drinking water affected by low concentrations of phosphorus (2002). Can J. Microbiol. 48, 494-499.
22. **Lehtola M.J., Miettinen I.T., Vartianen T, Rantakokko P, Hirvonen A., Martikainen P.**, Impact of UV disinfection on microbially available phosphorus, organic carbon, and microbial growth in drinking water (2003). Water research 37, pp. 1064-1070
23. **Lehtola M.J., Miettinen I.T., Vartianen T, Rantakokko P, Hirvonen A., Martikainen P.**, Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes (2004). Water research 38 (2004) 3769-3779.
24. **Léon Ohi A., Horn H, Hempel D.C.**, Behaviour of biofilm systems under varying hydrodynamic conditions. Proceeding of International Biofilm Symposium (2003), organised by the IWA Specialist Group on Biofilms, September 2003, Cape Town, South Africa, pp. 14-18
25. **Matar G. M., Chaar M. H., Araj G. F., Srour Z., Jamaledine G., Haddi U.**, Detection of highly prevalent and potentially virulent strain of *Pseudomonas*

*aeruginosa* from nosocomial infections in a medical center, BMC Microbiology (2005), 5:29 doi:10.1186/1471-2180-5-29

26. **Mathys W., Stanke J., Harmuth M., Junge-Mathys E.**, Occurrence of *Legionella* in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating, International Journal of Hygiene and Environmental Health (2007), doi:10.1016/j.ijheh.2007.02.004
27. **Moolenaar R.L., Crutcher M., San Joaquin V.H., Sewell L., Hutwagner L.C., Carson L.A.C., Robinson D.A., Smithee L.M.K, Jarvis W.R.**, A Prolonged Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? (2000), Infection Control and Hospital Epidemiology 2000; Vol. 21, No. 2, pp. 80-85
28. **Murga Ricardo, Forster S. Terri, Brown Ellen, Pruckler M. Janet, Fields S. Barry, Donlan M. Rodney**, Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. Microbiology (2001), 147, pp. 3121-3126
29. **Petignat C., Francioli P., Nahimana I., Wenger A., Bille J., Schaller Marie-D., Revely Jean-P., Zanetti G., Blanc D.S.**, Exogenous Sources of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit patients: Implementation of Infection Control Measures and Follow-Up with Molecular Typing (2006). Infection Control and Hospital Epidemiology, Sept 2006, Vol.27, No. 9. The Society of Healthcare Epidemiology of America. 0899.823X/2006/2709-0012
30. **Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W.**, Influence of plumbing material on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a potable water system Containing Complex Microbial Flora (1994), Applied and Environmental Microbiology, May 1994 Vol. 60, No. 5, 0099-2240/94/\$04.00+0, pp. 1585-1592
31. **Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W.**, Influence of Temperature and Plumbing Material Selection on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in a Model Potable Water System

containing complex microbial flora (1994). Applied and Environmental Microbiology, May 1994, Vol. 60, No. 5, 0099-2240/94/\$4.00+0 pp.1585-1592

32. **Schaefer B.**, Legionellenuntersuchung bei der Trinkwasseranalyse, Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2007-50, doi:10.1007/s00103-007-0154-5, Springer Medizin Verlag (2007)
33. **Schlosser F. U., Schuster R., Rapp T.**, Gesundheitliche Anforderungen an Werkstoffe und Materialien im Kontakt mit Trinkwasser, Bundesgesundheitsblatt- Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz (2007), doi: 10.1007/s00103-007-0157-2
34. **Schoenen D, Schulze-Röbbecke R, Schirdewahn N.**, Mikrobielle Kontamination des Wassers durch Rohr- und Schlauchmaterialien. 2. Mitteilung: Wachstum von *Legionella pneumophila* (1984). Zb.Bakt.Hyg. B 186, 326-332.
35. **Schwartz T, Hoffmann S, Obst U.**, Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in public drinking water distribution system (2003). Journal of Applied Microbiology 2003, 95, doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02019.x pp. 591-601
36. **Thurman R.B., Gerba C. P.**, The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses (1989). CRC Crit. Rev. Environ. Control 18 (4), 295-315.
37. **Trautmann M., Lepper P.M., Haller M.**, Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism (2005). (Am J Infect Control 2005;33) doi:10.1016/j.ajic.2005.03.006, pp. 41-49
38. **Trautmann M, Michalsky T., Wiedecke H, Radosavljevic, Ruhnke M.**, Tap Water Colonization With *Pseudomonas aeruginosa* in a Surgical Intensive Care Unit (ICU) and Relation to *Pseudomonas* Infections of ICU Patients, Infection Control and Hospital Epidemiology (2001);22: pp. 49-51
39. **Tuschewitzki G.J.**, Induktion einer mikrobiellen Wandbesiedlung in Trinkwasserdurchströmten Kupferrohren (1990). Zbl.Hyg.190, pp. 62-67

40. **Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt**, Trinkwasser aus dem Hahn, Gesundheitliche Aspekte der Trinkwasser-Installation, (2006)
41. **Van der Kooij D., Oranje J.P., Hijnen W. A. M.**, Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in Tap Water in Relation to Utilization of Substrates at Concentrations of a Few Micrograms per Liter (1982). Applied and Environmental Microbiology, Nov 1982, Vol 44, No. 5, 0099-2240/82/111086-10, pp. 1086-1095
42. **Van der Kooij D., Veenendaal H.R., Scheffer Will J.H.**, Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene (2005). Water research 39 (2005), doi: 10.1016/j.watres.2006.04.075 pp.2789-2798, pp. 2789-2798
43. **Van der Kooij D., Vrouwenvelder J.S., Veenendaal H.R.**, Elucidation and control of biofilm formation processes in water treatment and distribution using the unified biofilm approach (2005). Water Science and Technology vol.47 No5 pp. 83-90
44. **Zamberlan da Silva M.E., Filho I.C., Endo E.H., Nakamura C.V., Nakamura T.U., Filho Diaz B.P.**, Characterisation of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water (2007). Antonie van Leeuwenhoek doi:10.1007/s10482-007-9209-8

## Anhang „A“

### **A1. Messergebnisse Abbildung 6 (Werte in RLU):**

Abb.6: Bakterienaktivitätsbestimmung unterschiedlicher Wässer durch ATP-Messung

277	151	4645	12005
Reinstw.	HPLC	Entio.Wass.	Leitungsw.

### **A2. Messergebnisse Abbildung 7 – Abbildung 12 (Werte in RLU):**

3.2.1 Bestimmung der Bakterienaktivität im Biofilm mittels ATP-Mesung :

Woche 1	124477	1184897	2515770	760366	123701
Woche 2	55016	3385080	8853885	524007	1005565
Woche 3	228939	6672915	11040165	1239813	1688159
Woche 4	319883	9270495	9959490	615128	1507503
Woche 5	366881	11517795	10119375	378562	1018125
Woche 6	279042	11434038	10106370	170320	405475
Woche 7	521210	11901493	11085340	561419	160360
Woche 8	376821	11932013	8762880	753099	160360
Woche 9	405895	12053045	9120445	785405	170682
Woche 10	482260	11614218	8952421	821556	185531
Durchschnitt:	316042,4	9096598,9	9051614,1	660967,5	642546,1
	KUPFER	GARTEN	GUMMI	ZAHN	VERBUND

### **A3. Messergebnisse Abbildung 13 – Abbildung 18 (Werte in RLU):**

3.2.2. Bestimmung der Bakteriendichte im Biofilm mittels der Bestimmung koloniebildender Einheiten auf dem R2A-Agar:

Woche 4	6	88	41	60	40
Woche 5	9	168	50	52	38
Woche 6	14	105	70	75	52
Woche 7	12	118	54	105	71
Woche 8	20	134	68	100	75
Woche 9	18	142	62	142	95
Woche 10	17	150	70	135	97
	KUPFER	GARTEN	GUMMI	ZAHN	VERBUND

#### **A4. Messergebnisse Abbildung 19 – Abbildung 24 (Werte in RLU):**

3.2.5. Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels ATP Messung:

Woche 1	263	975	262	580	708
Woche 2	1411	9018	2072	1388	1262
Woche 3	1598	5497	3711	1106	3969
Woche 4	1460	299608	1067	2456	4719
Woche 5	1579	2359	34061	6904	2434
Woche 6	768	3108	15328	3153	1809
Woche 7	745	1657	157611	2777	1881
Woche 8	1005	5052	63052	4267	2505
Woche 9	1559	17239	37015	3800	3003
Woche 10	1401	7856	42458	4102	3568
	KUPFER	GARTEN	GUMMI	ZAHN	VERBUND

#### **A5. Messergebnisse Abbildung 25 – Abbildung 30 (Werte in KBE/ml):**

3.2.6. Bakterienaktivitätsbestimmung der fließenden Welle des Feldexperimentes mittels der Bestimmung koloniebildender Einheiten auf dem R2A-Agar:

Woche 4	21	131	142	30	27
Woche 5	31	180	222	42	40
Woche 6	29	205	240	51	35
Woche 7	35	231	310	60	28
Woche 8	42	220	289	75	30
Woche 9	40	240	300	73	34
Woche 10	41	243	295	72	36
	KUPFER	GARTEN	GUMMI	ZAHN	VERBUND

## **Danksagung**

Besonderen Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Werner Mathys für seine Geduld und sein Engagement bei Analysen und Korrekturen.

Meinem Bruder Dr. Maurice Thoneick für seine beratende Hilfe und das Korrekturlesen.

Meinen Eltern Dr. Hans Ulrich Thoneick und Lonie Thoneick für die stetige Motivation.