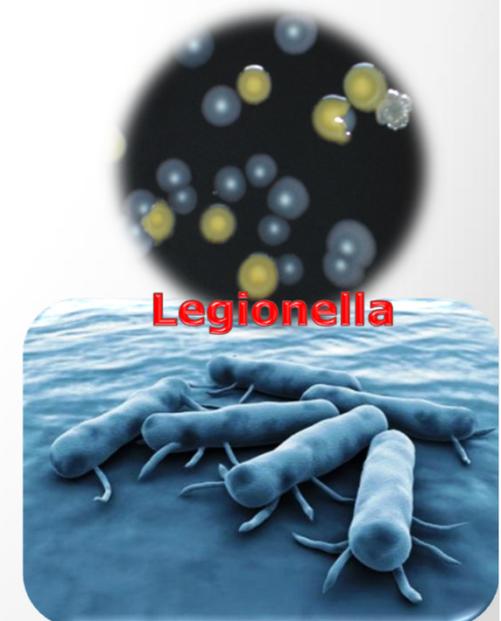
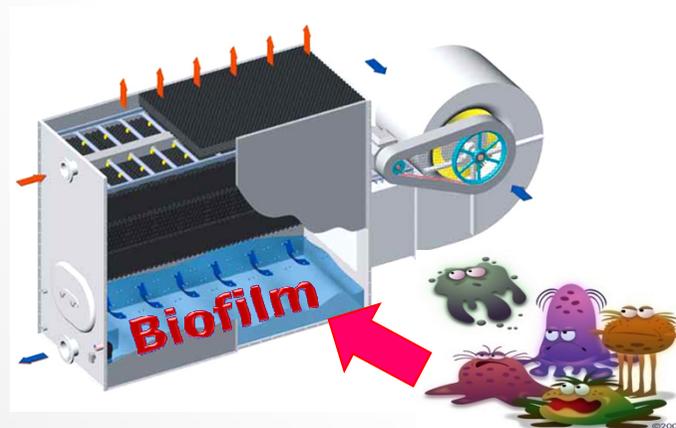


# Hygieneschulung VDI 2047



## Mikrobiologie im Kühlwasser: Relevante Grundlagen, Risiken, medizinische und analytische Aspekte

Dr. habil. Anna Salek



# Einleitung

**In den letzten Jahren wurde das Ökosystem der in Trinkwasser vorkommenden Legionellen ausführlich erforscht. Die Identifizierung ist unproblematisch.**

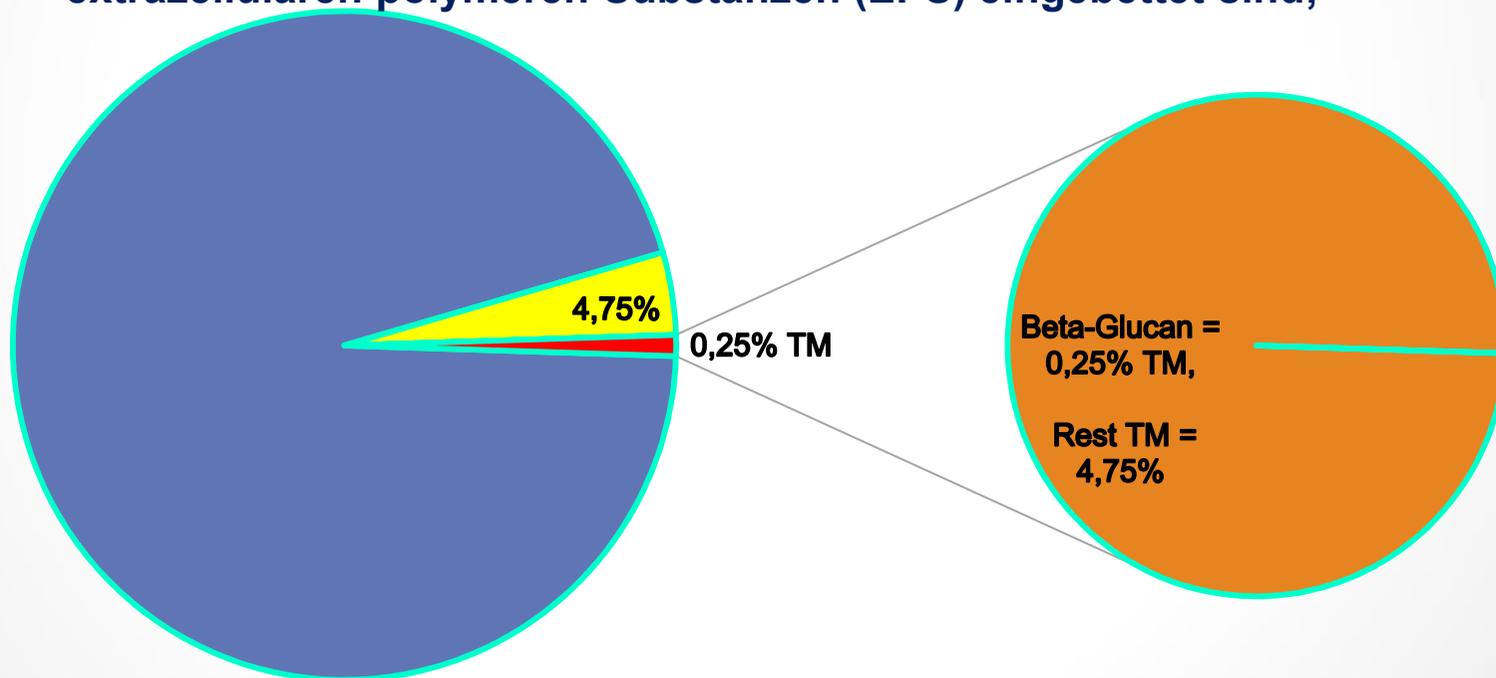
**Anders zeigt sich die Lage bei der Beurteilung von technischen Wassersystemen, z.B. Kühltürmen.**

**Die hier viel komplexere Zusammensetzung des Ökosystems (Biofilm) macht die Auswertung und Interpretation von Ergebnissen sehr viel schwieriger.**

## Biofilm - der natürliche Lebensraum von Mikroorganismen



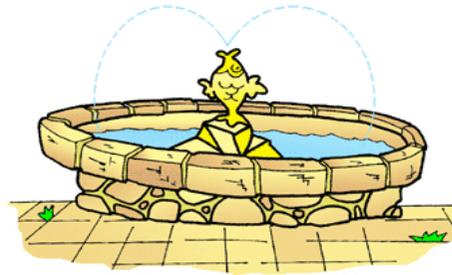
- Biofilme sind an Grenzflächen auftretende Ansammlungen von Mikroorganismen, die in eine wasserhaltige Matrix aus selbst gebildeten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind;



Dazu kommt eingebettete Partikel: organisch und anorganisch.

# Mögliche Infektionsquellen Kontamination: Erwärmtes Wasser und Aerosol

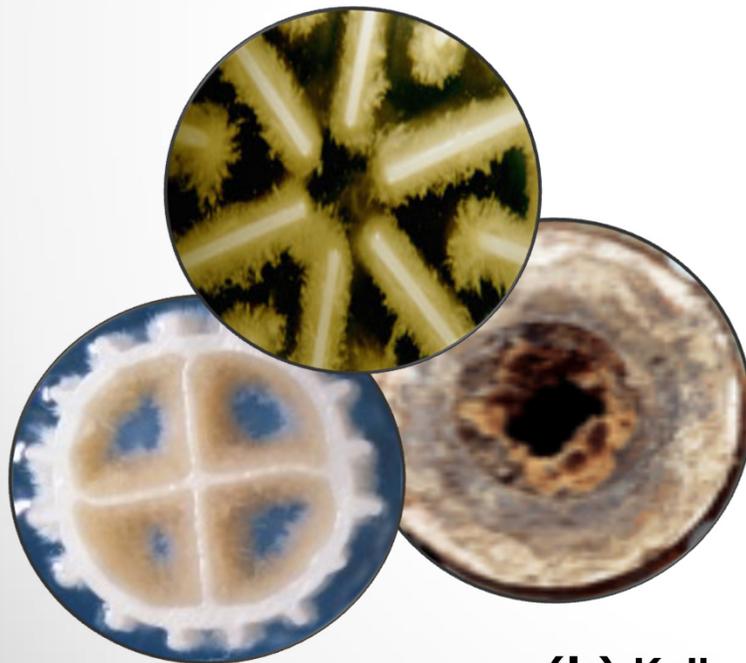
- Whirlpools
- Duschen
- Waschbecken
- Spülmaschinen, Kühlschränke
- Nebelmaschinen in Supermärkten
- Feuchte Böden, Blumenerde, Spring



## Mögliche Infektionsquellen Kontamination: Erwärmtes Wasser und Aerosol

**Biofilme in technischen Anlagen, wie:**

**Autowaschanlagen, Klimaanlage, Anlagen mit Prozesswasser,  
Verdunstungskühlanlagen mit Kühlwassersystemen.**



**a.**



**b.**



**(a) Bündelwärmetauscher,**

**(b) Kalk und Biofilm mit unterschiedlichen Mikroorganismen.**

# Inhalt:

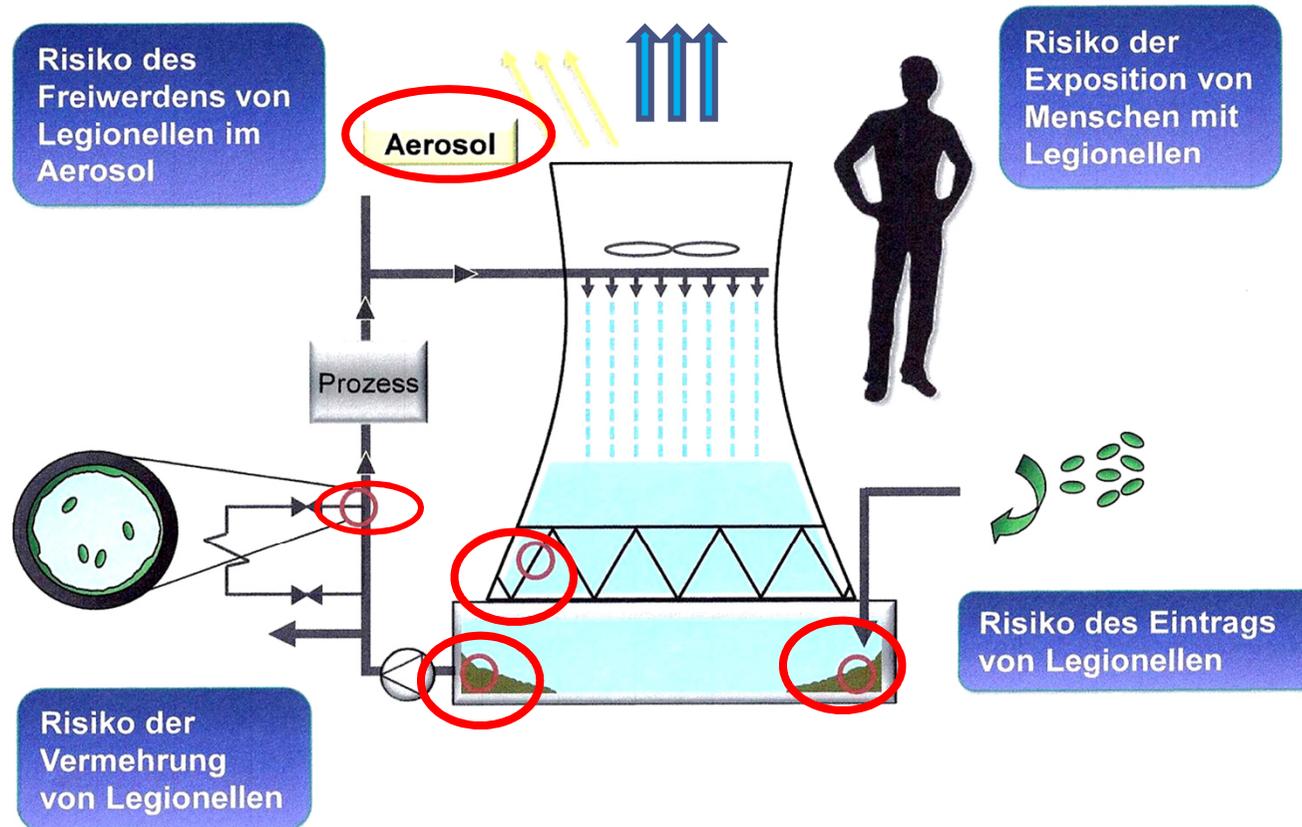
1. **Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).**
2. **Entstehung von Biofilmen & Biofouling.**
3. **Mikroorganismen im Biofilm: Bakterien und deren Ökosystem.**
4. **„Quorum sensing“, Inhibition und Interaktion zwischen Wassermikroorganismen.**
5. **Analytische Methoden – Nachweis von Bakterien im Kühlturmwasser.**



# 1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung)



## Risikobetrachtung Rückkühlwerke



Nach Dr. S. Schult, IWW-Kolloquium Mülheim

## Nachteilige Effekte von Biofilmen in Kühlwassersystemen

- **Mechanisches Verstopfen der Rohre, von Wärmeübertrager-Oberflächen mit lebendiger oder toter Biomasse,**
- **Mechanische Zerstörung von Kühltürme,**
- **Verlust der Wärmeleitfähigkeit durch Aufbau einer Isolationsschicht und Verlust der Kühlturmleistung,**
- **Qualitätsverlust bei direkt gekühlten Produkten,**
- **Mikrobiologisch beeinflusste/induzierte Korrosion,**
- **Hygienerisiko durch Freisetzung pathogener Organismen**

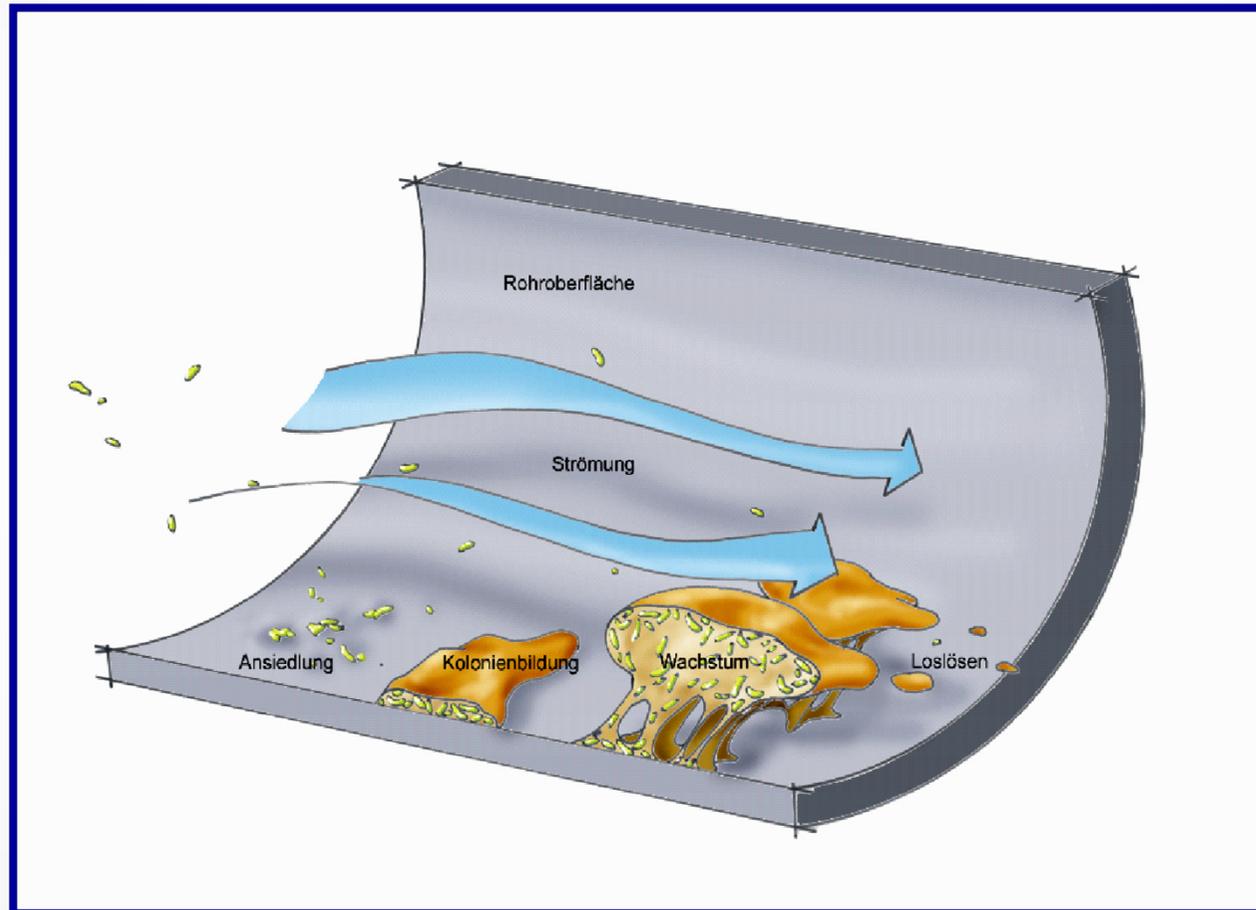


# Inhalt:

1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).
2. Entstehung von Biofilmen & Biofouling.



# Extrazelluläres Polysaccharide Matrix - Biofilm in Kühlswassersystemen

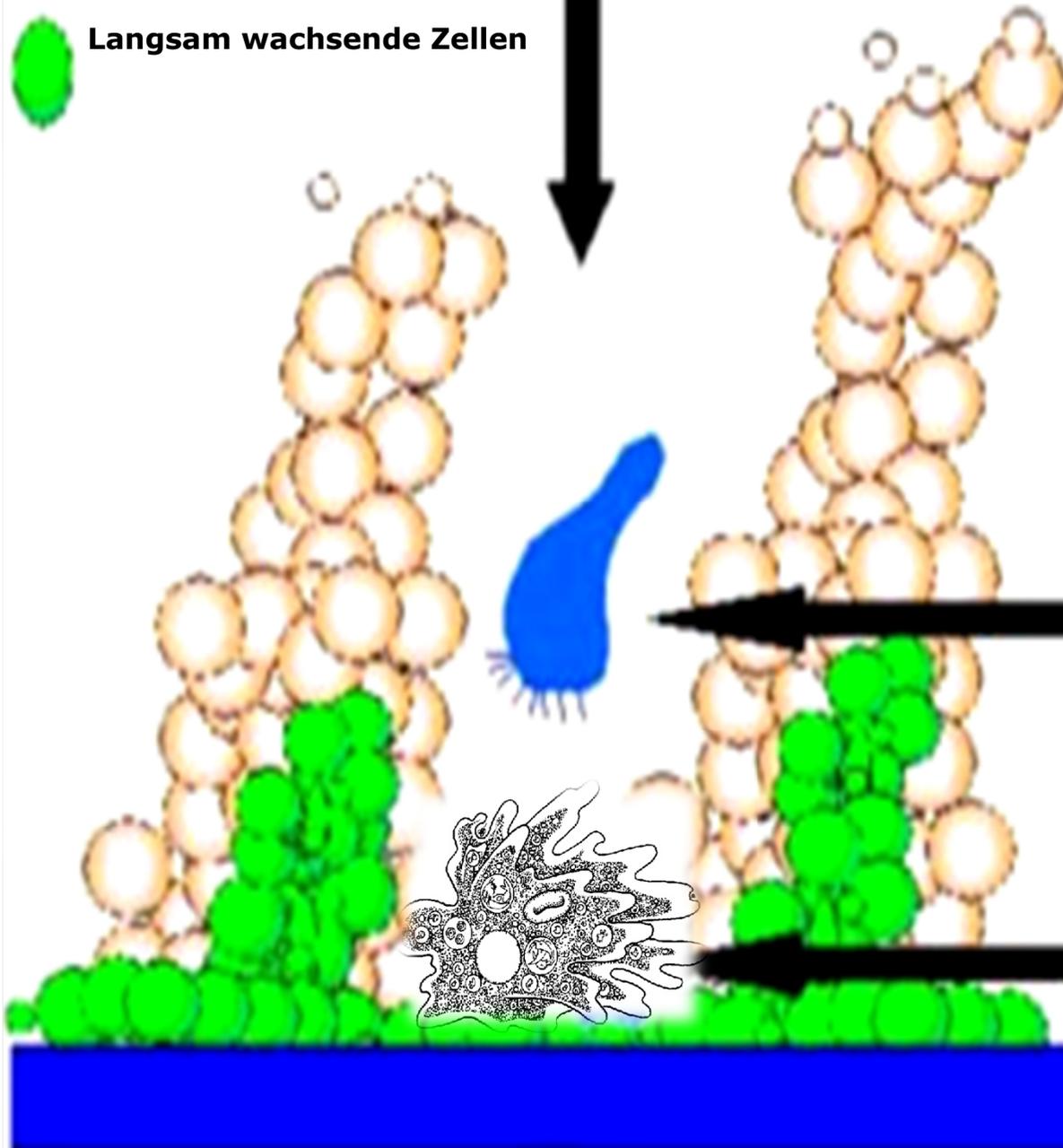




**Schnell wachsende Zellen**



**Langsam wachsende Zellen**

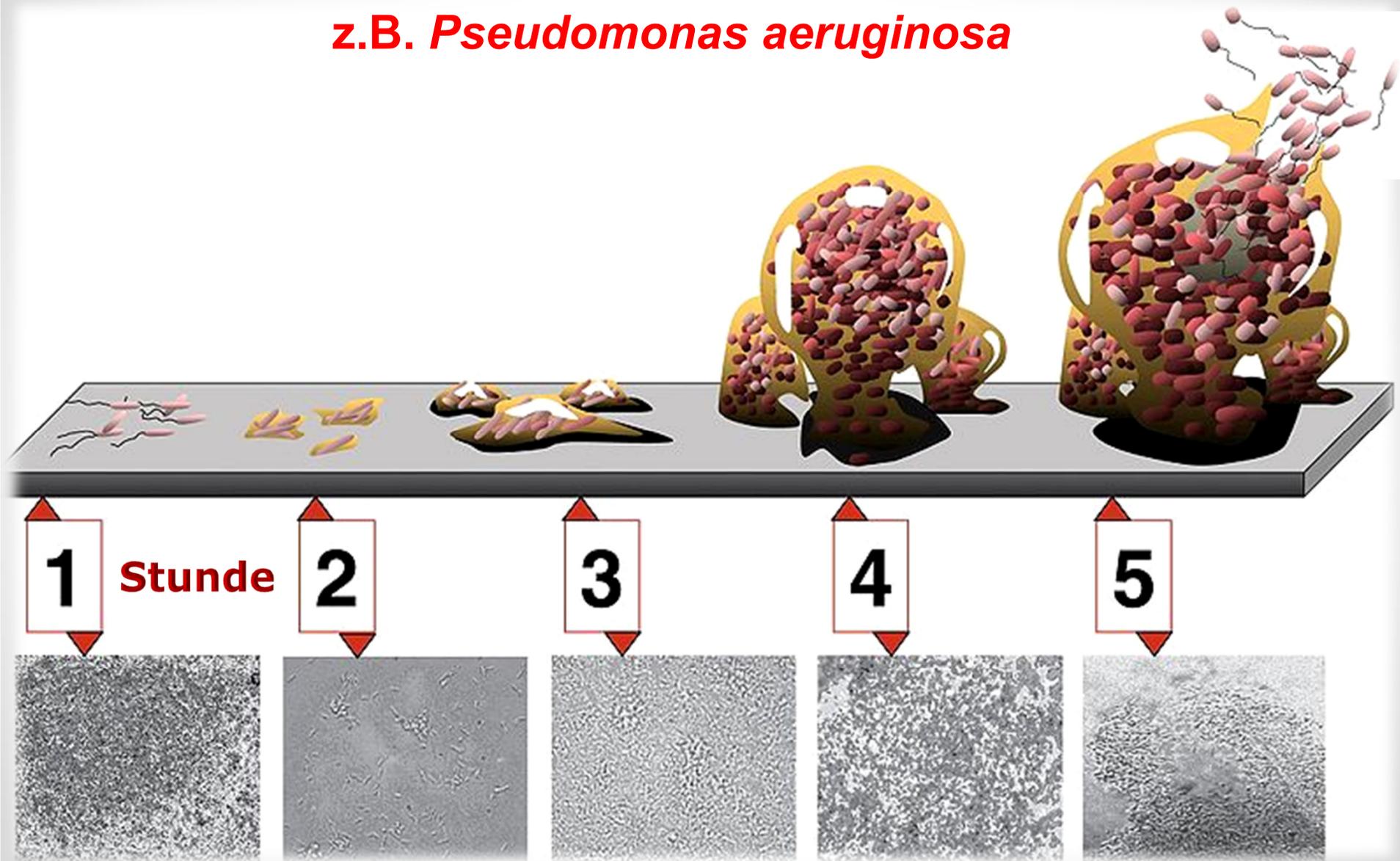


**Mikrokolonie**

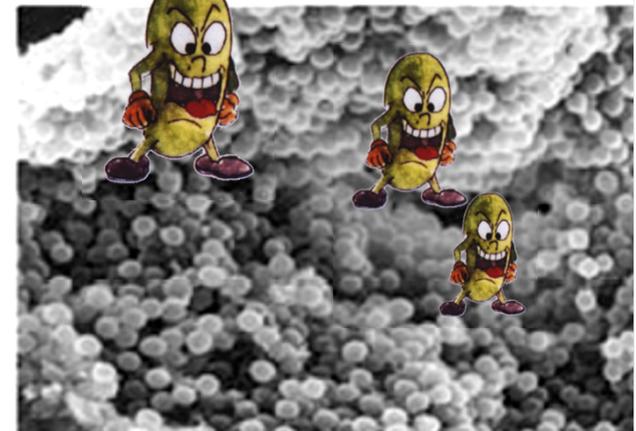
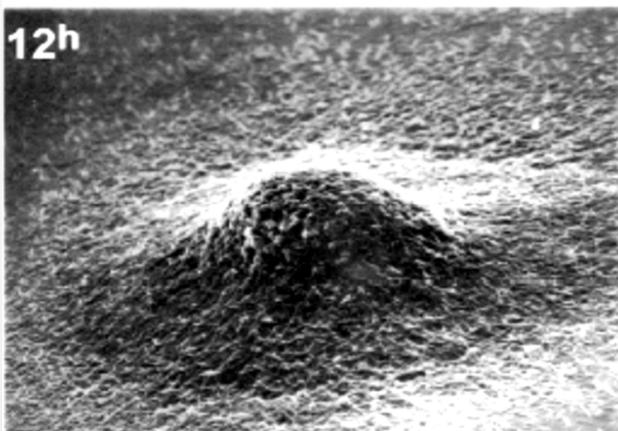
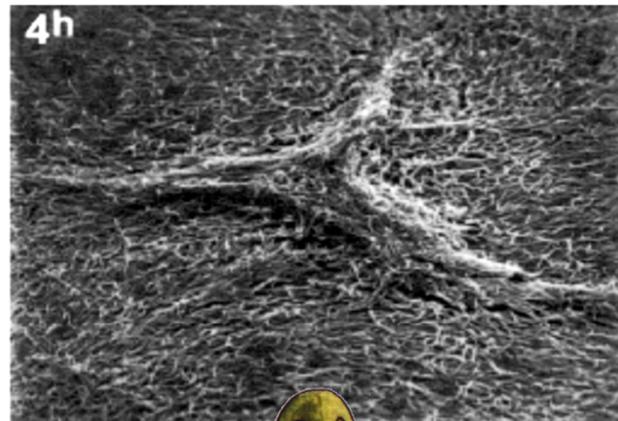
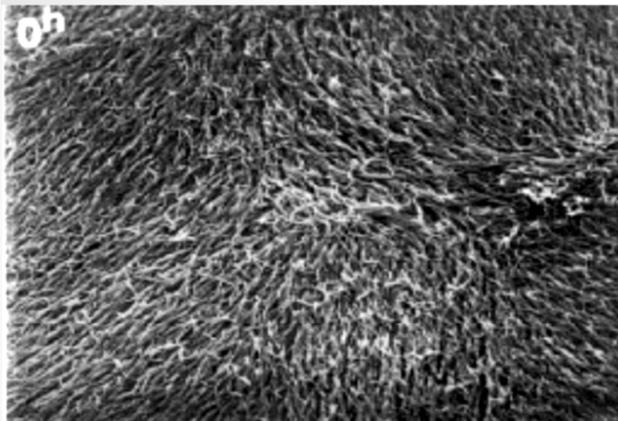
**Protozoa**

**Amöben**

# Biofilm Wachstum, z.B. *Pseudomonas aeruginosa*



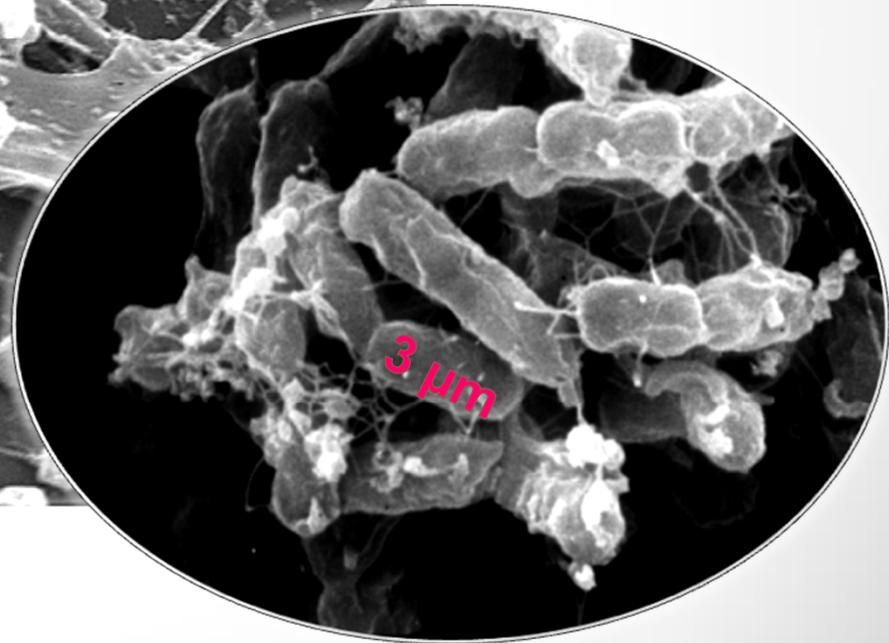
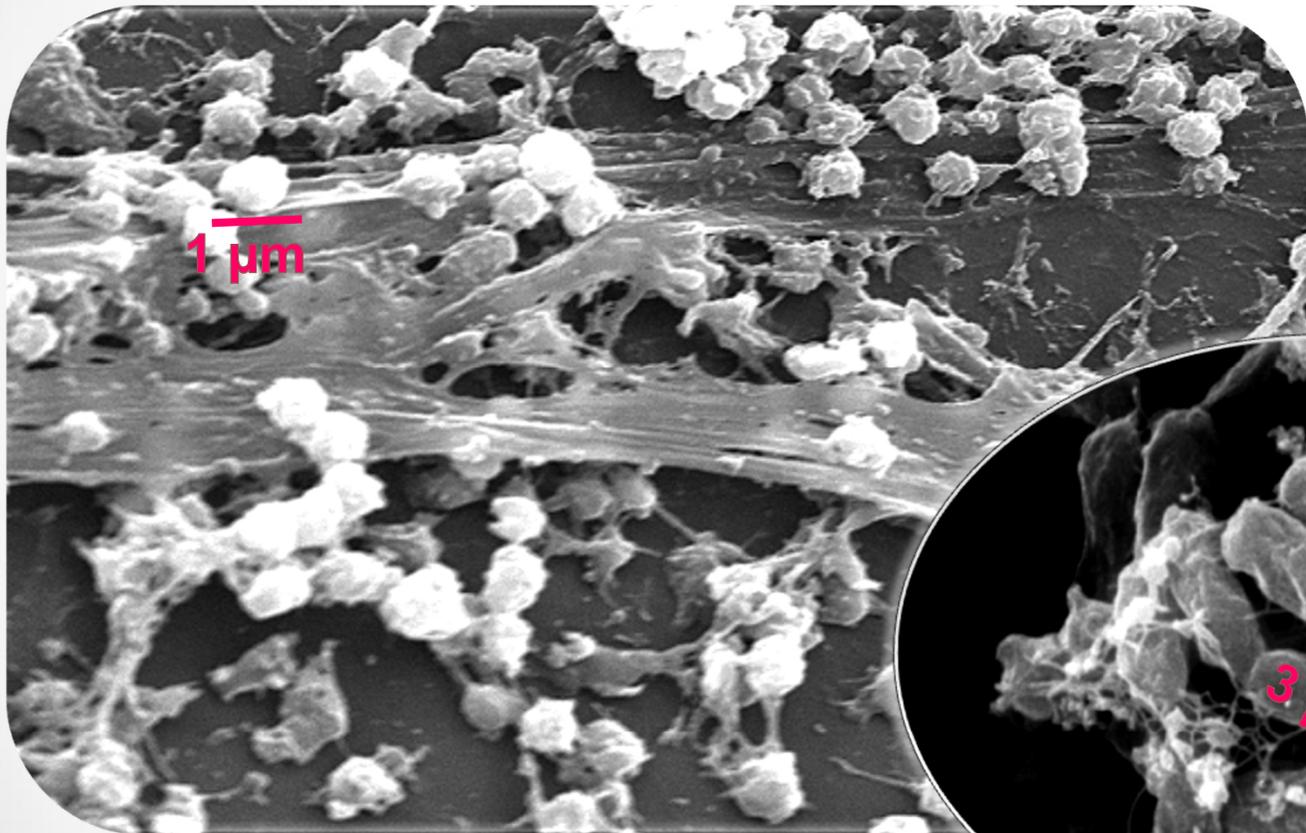
# Biofilmwachstum - Matrix EPS, z.B. *Pseudomonas* spp.



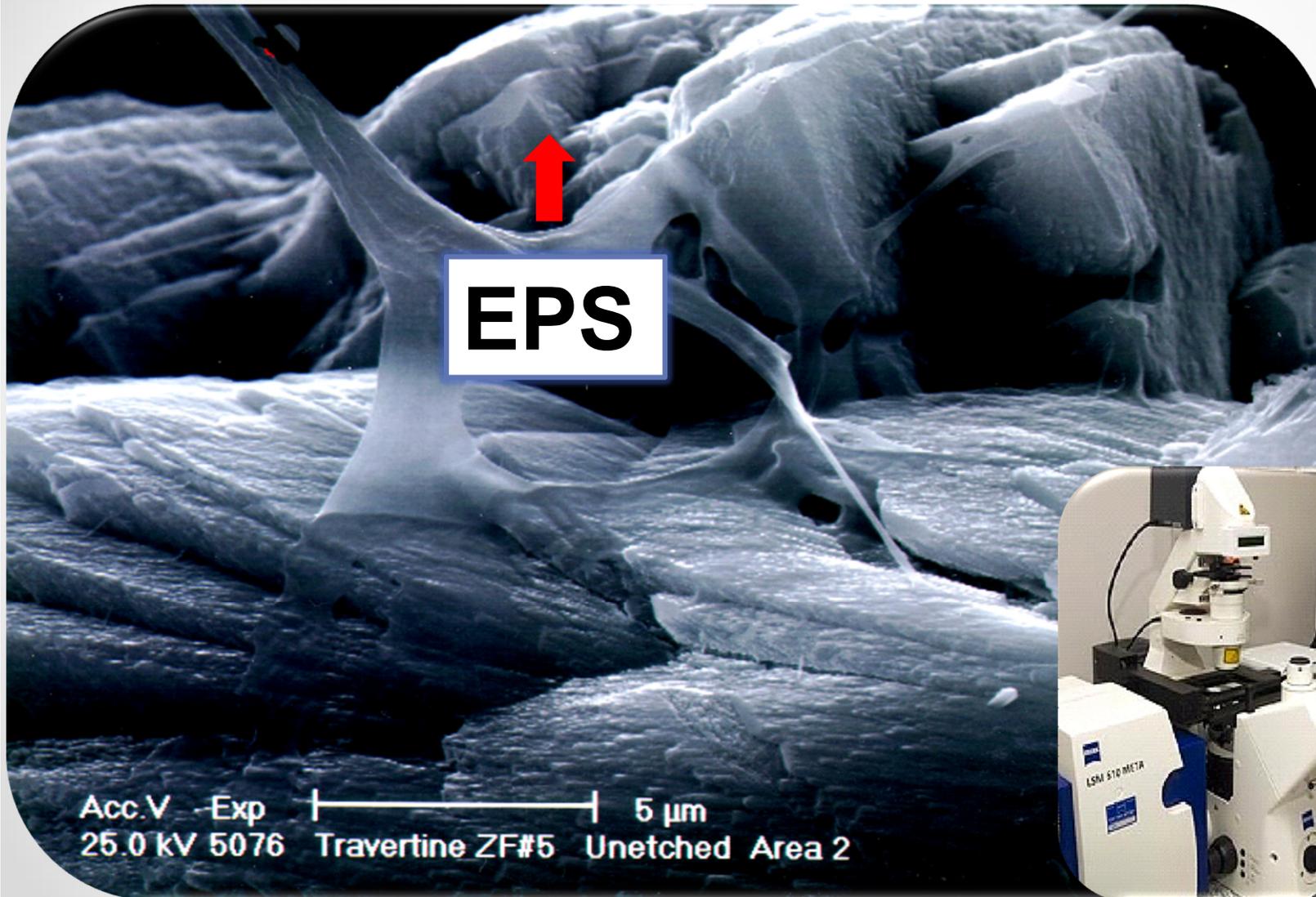
10µm

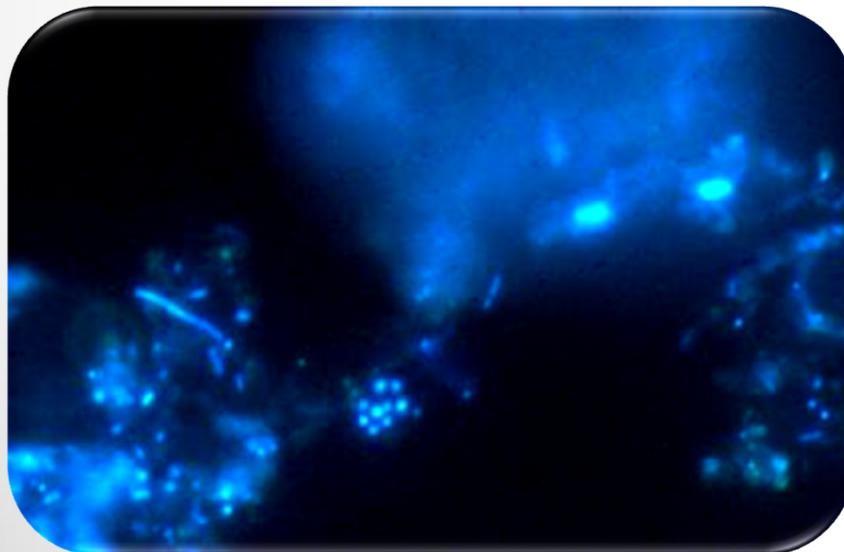
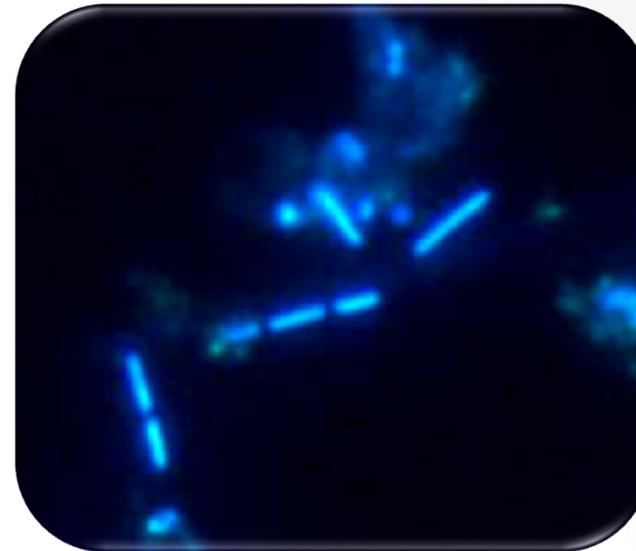
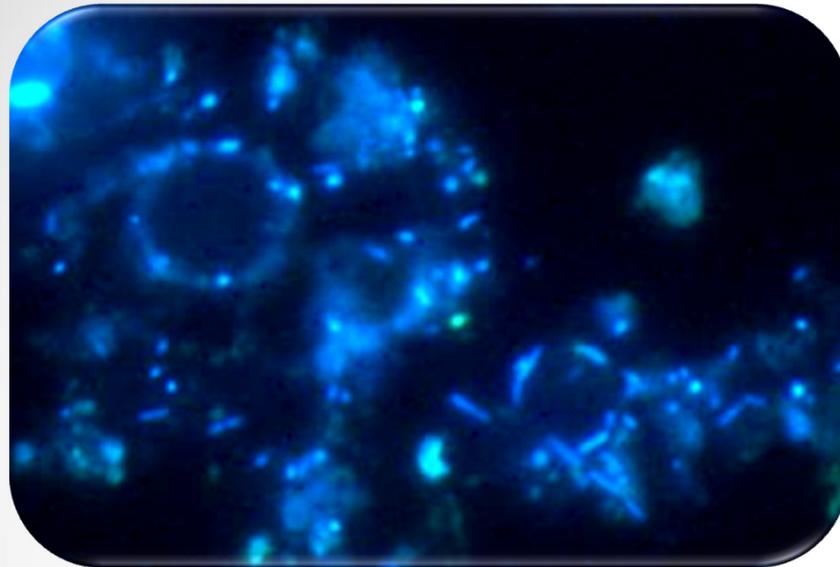
5µm

# Extrazelluläres Polysaccharide Matrix: Bakterien *Pseudomonas* spp. produzieren EPS für Biofilm bauen



# Extrazelluläres Polysaccharide Matrix (EPS) Biofilm





**Epifluoreszenz Mikroskop:  
Mikroskopische Bild,  
Schmutzdecke gefärbt mit DAPI,  
1000x Vergrößerung,  
Stäbchen und Kokken.**

## EPS, Mukoid von *Pseudomonas aeruginosa*



Distribution	in cells	in EPS
Polysaccharides	19,8 %	79,2 %
Uronic acids	15,0 %	85,0 %
Proteins	58,4 %	41,6 %

### EPS-components

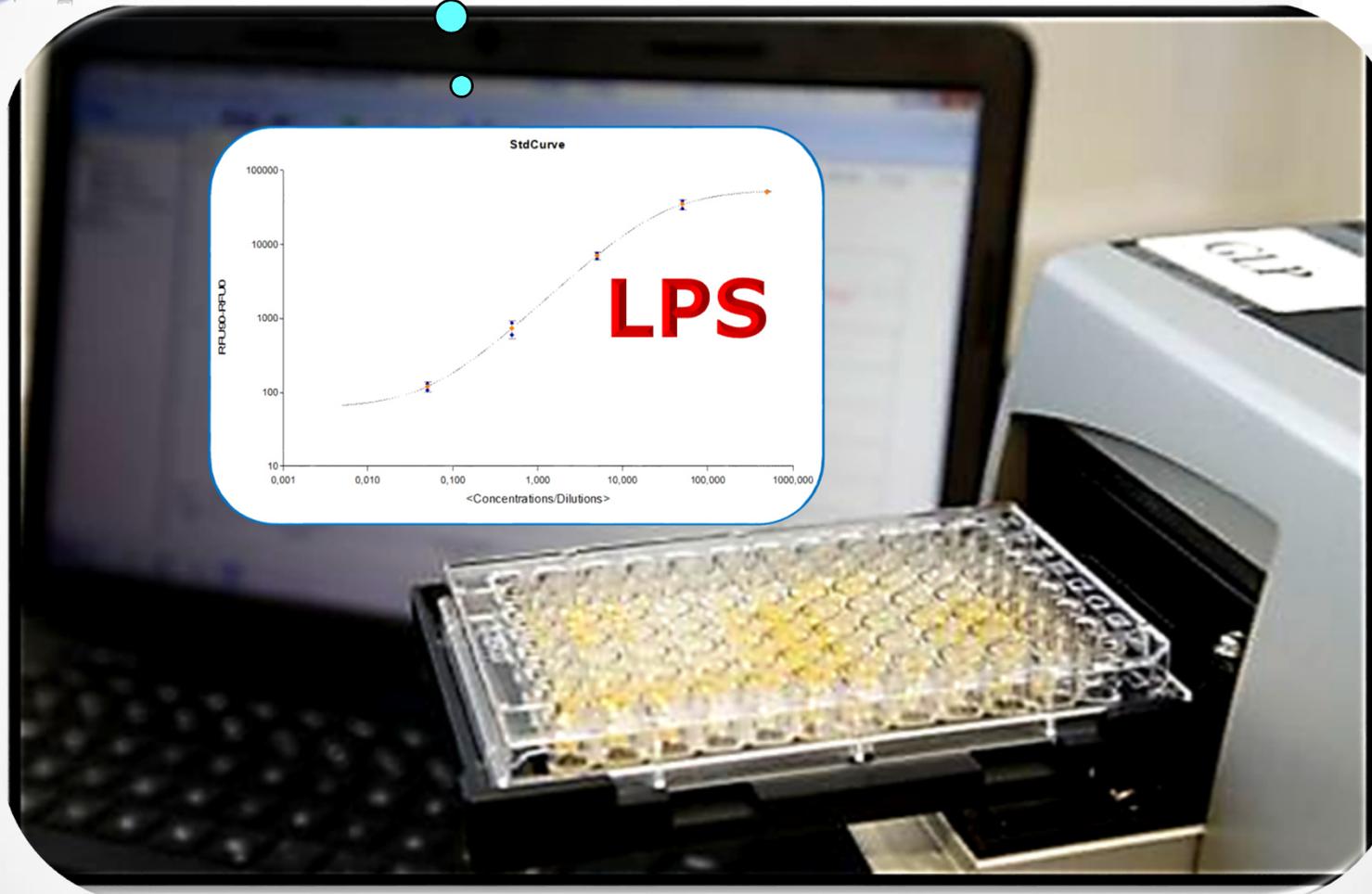
Polysaccharides	69,0 %
Lipopolysaccharides	0,5 %
Proteins	25,0 %
other components	5,5 %
[no nucleic acids detected]	

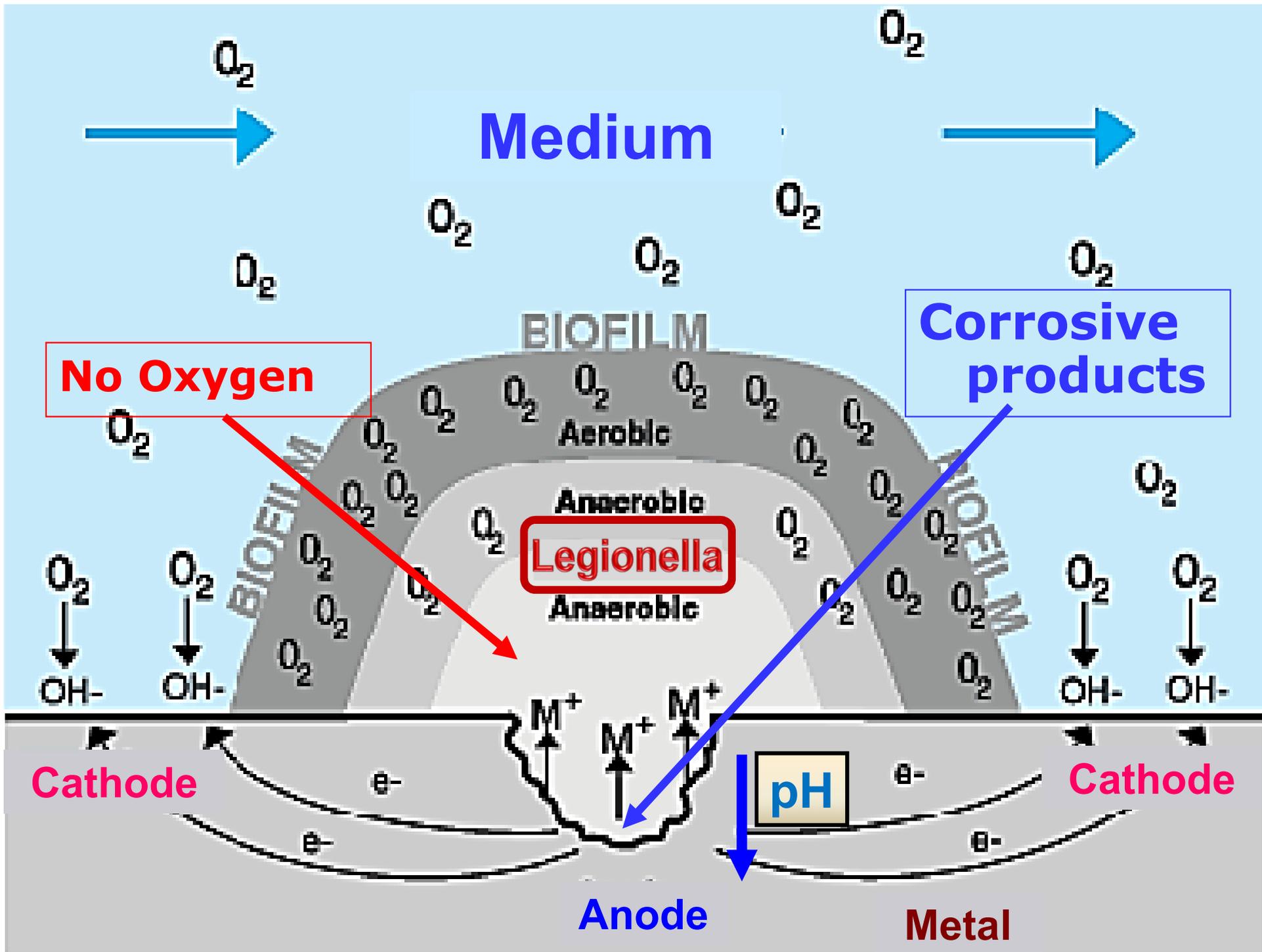
### Polysaccharides

Alginate	81,8 %
Neutral polysaccharides	18,2 %

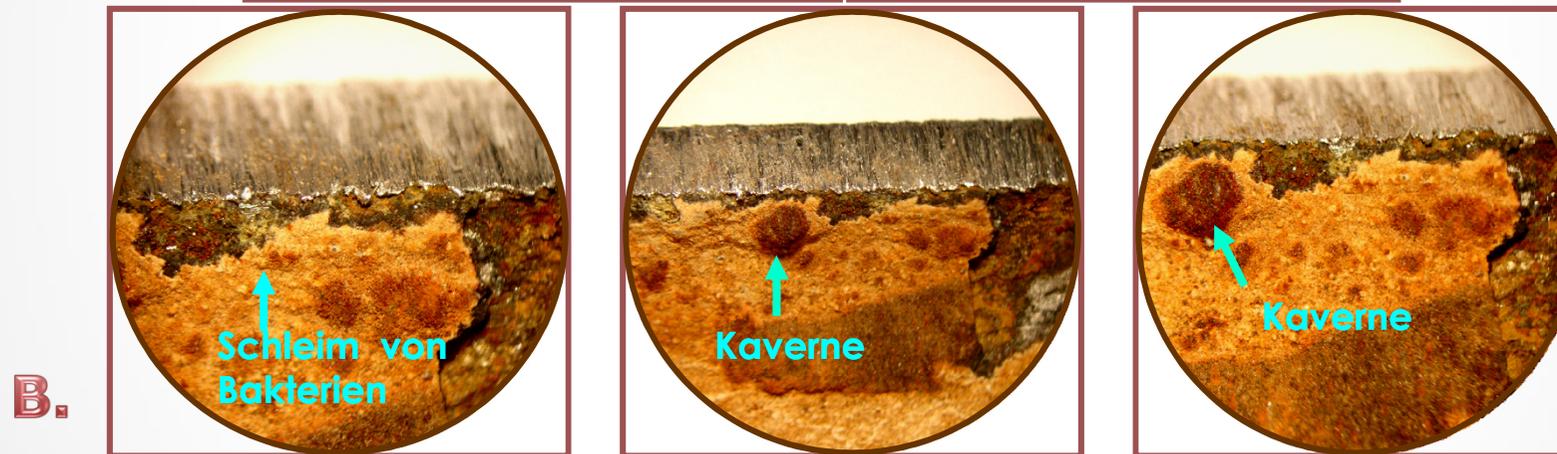
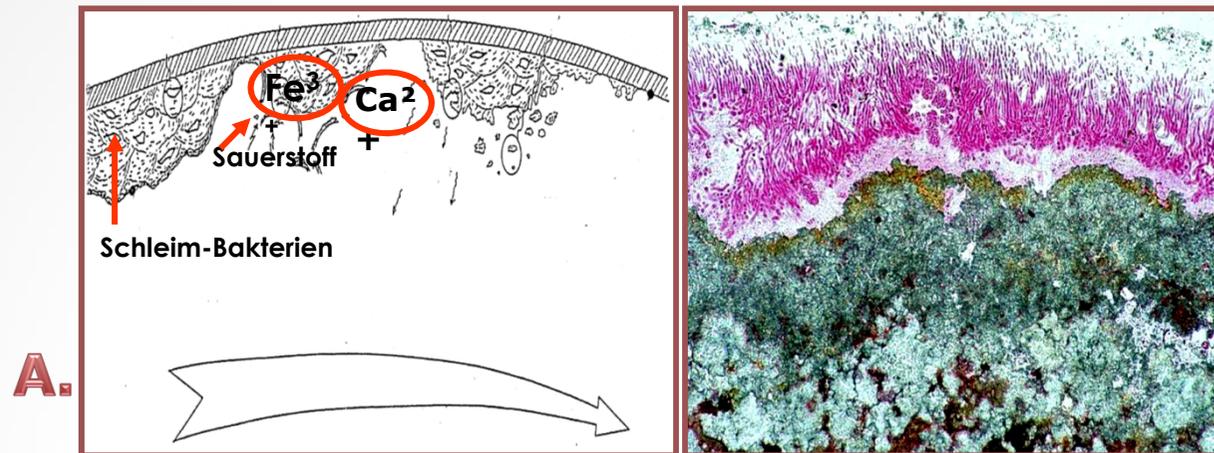


Endotoxine??





# Ablagerung in Warmwassersystemen



**Bild von Innerleitung für Warmwasser:  
(A.) Biofilm (Schleim) und Mineralien,  
(B.) Röhren mit Kalkstein und Biofilm zusammen (Photo: A. Salek)**

# Inhalt:

1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).
2. Entstehung von Biofilmen & Biofouling.

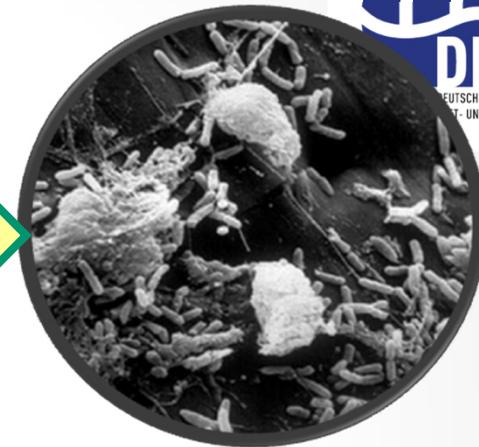
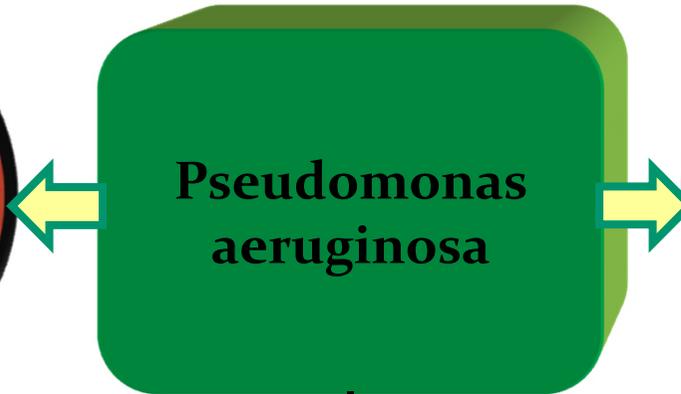
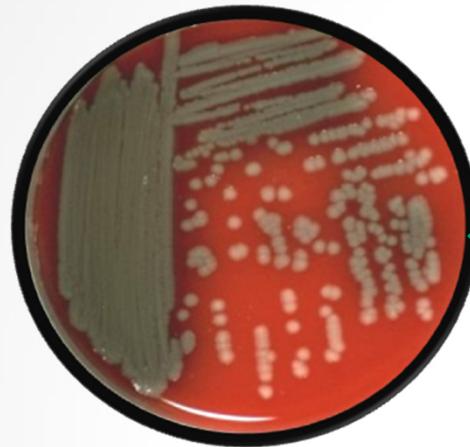
3. Mikroorganismen im  
Biofilm: Bakterien und  
deren Ökosystem.



***Pseudomonas aeruginosa***



## Pigmente von *Pseudomonas aeruginosa*



Fluorescein oder  
Pyoverdin (gelb)

**Fluoreszenz**

**Farbumschlag**

Pyocyanin  
(blau-grün)

**Toxine !!!**

Pyorubin  
(rot-braun)

# ***Pseudomonas aeruginosa:*** **Hygienische und technische Relevanz**

## **Herkunft & Beschaffenheit:**



- **Ubiquitär vorkommendes, feuchtigkeitsliebendes Bakterium,**
  - **Primärbesidler, guter Schleimbildner, Biofilmbildner,**
  - **Boden, Pflanzen, Abwasser, Oberflächenwasser und technischer Trinkwasser Herkunft,**
    - **Geringe Nährstoffansprüche,**
- **Vermehrung im Temperaturbereich von 10°C bis 42°C**

## ***Pseudomonas aeruginosa:*** **Hygienische und technische Relevanz**

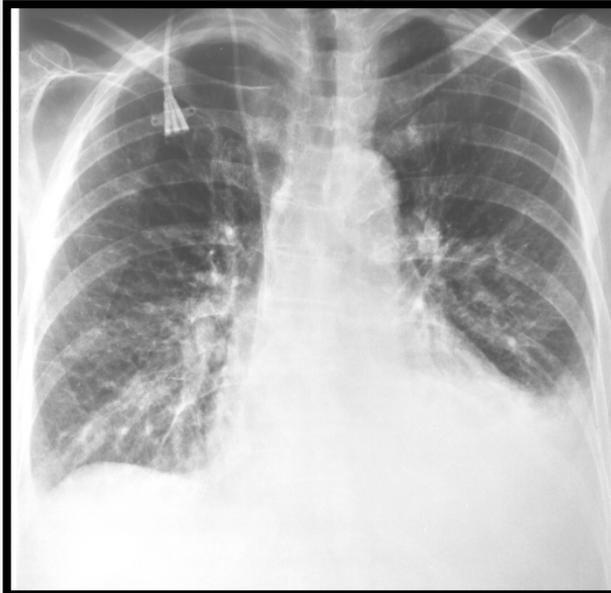


- **Vermehrung in Wasserverteilungs- und aufbereitungsanlagen, Strahlformer, Ausgüssen und Geruchsverschlüssen, in Filtern, im Bereich der Badewasser-aufbereitung und im Krankenhausbereich;**
- **Opportunistischer Krankheitserreger: Infektion des Ohres und der Haut, Bindehautentzündungen, Magen-Darm-Erkrankungen, Lungenentzündung, Harnwegs- und Wundinfektionen**

# *Pseudomonas aeruginosa*: Infektionen



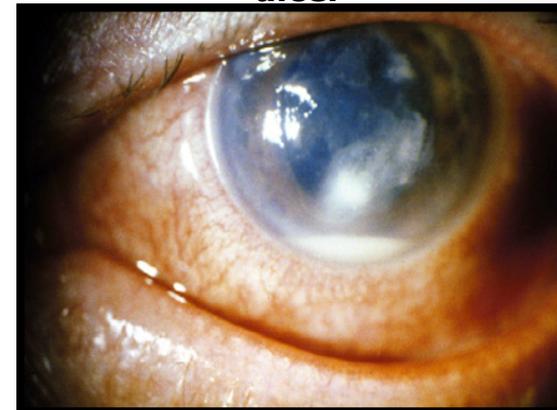
**Nosocomial pneumonia**



**Ear piercing infections**



**Contact lens associated corneal ulcer**



***P. aeruginosa* - Green nail**



**Hot tub dermatitis**



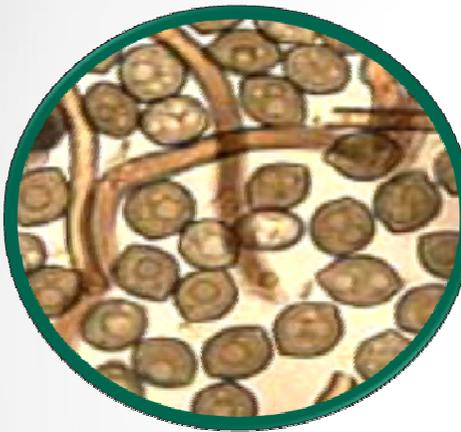
**Folliculitis**



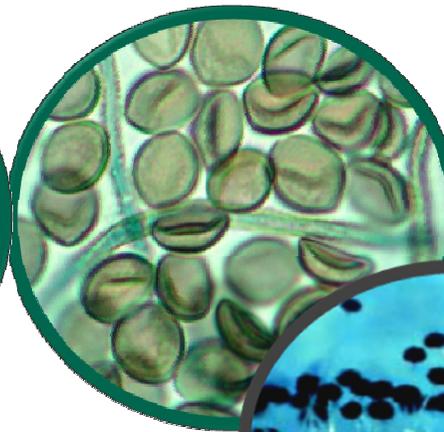
# Schimmelpilze in Biofilm: technischer Wassersysteme, z.B. im Kühlturm



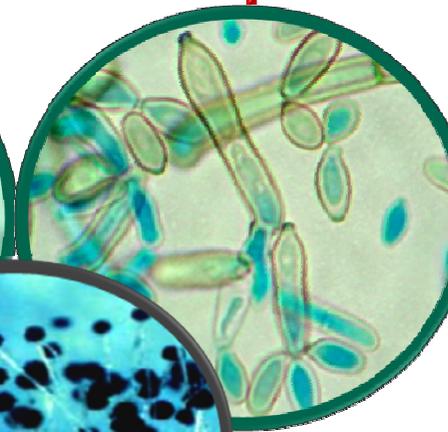
**Eurotium**



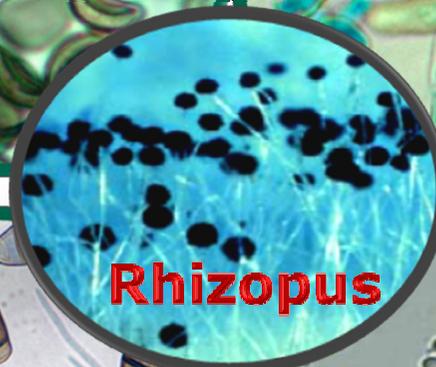
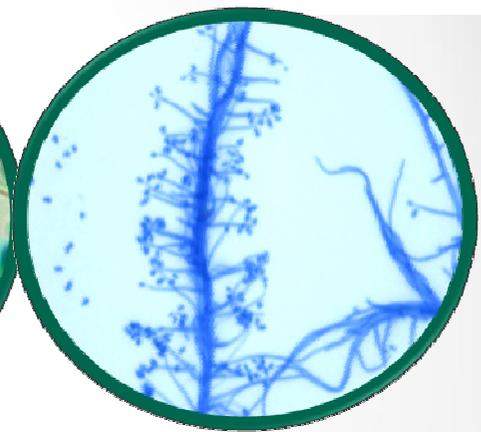
**Chaetomium**



**Cladosporium**



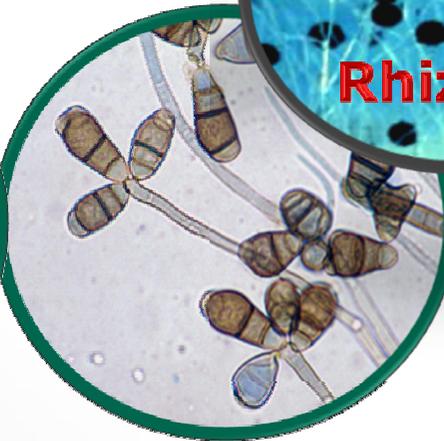
**Acremonium**



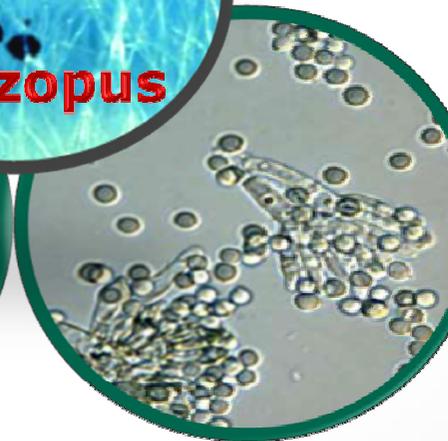
**Rhizopus**



**Fusarium**



**Curvularia**

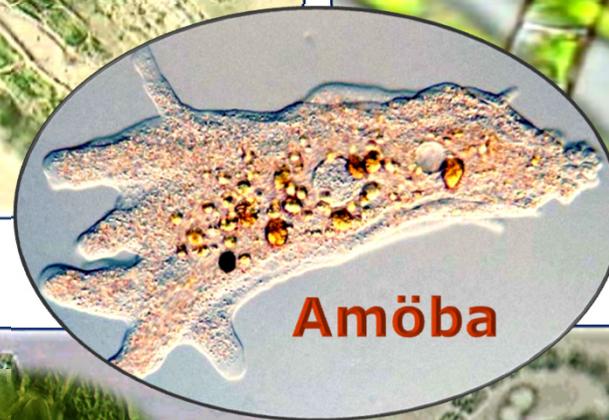
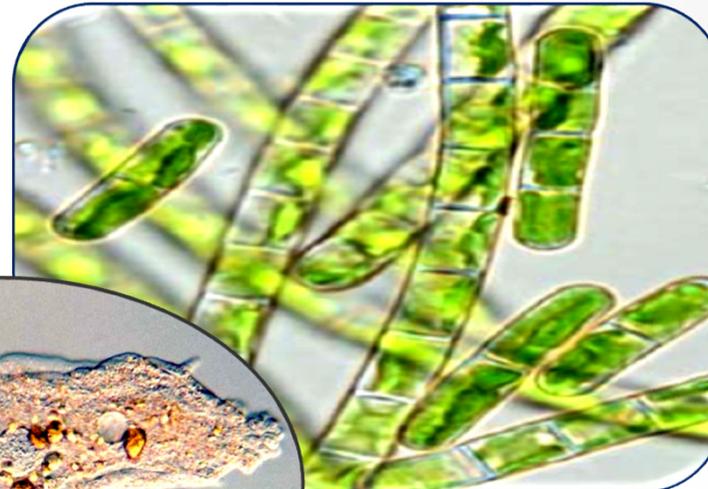
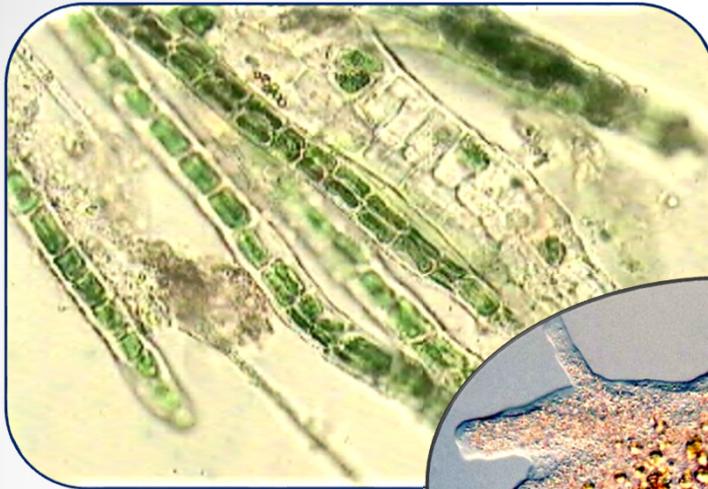


**Penicillium**

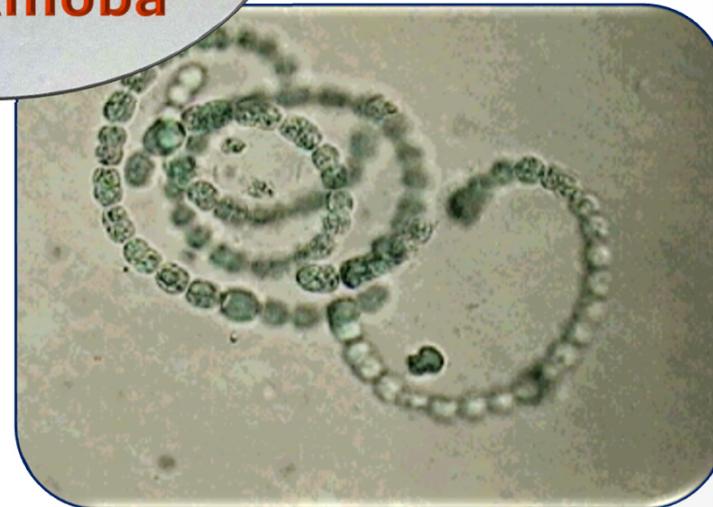


**Alternaria**

# Algen und Amöben in Biofilm



Amöba



## **Wachstum von Legionellen in einem Multi-Spezies-Biofilm**

**In aquatischen Systemen, insbesondere in  
Multi-Spezies-Biofilmen, überlebt  
die Bakteriengattung *Legionella*, inklusiv  
der Art *Legionella pneumophila*, lange Zeit.**

**Aus diesem Grund wurde die Vermehrungsfähigkeit  
von *Legionella pneumophila*  
in diesen Biofilmen untersucht.**

## Was ist in Kühltürmen?

# Legionella pneumophila

Quorum sensing

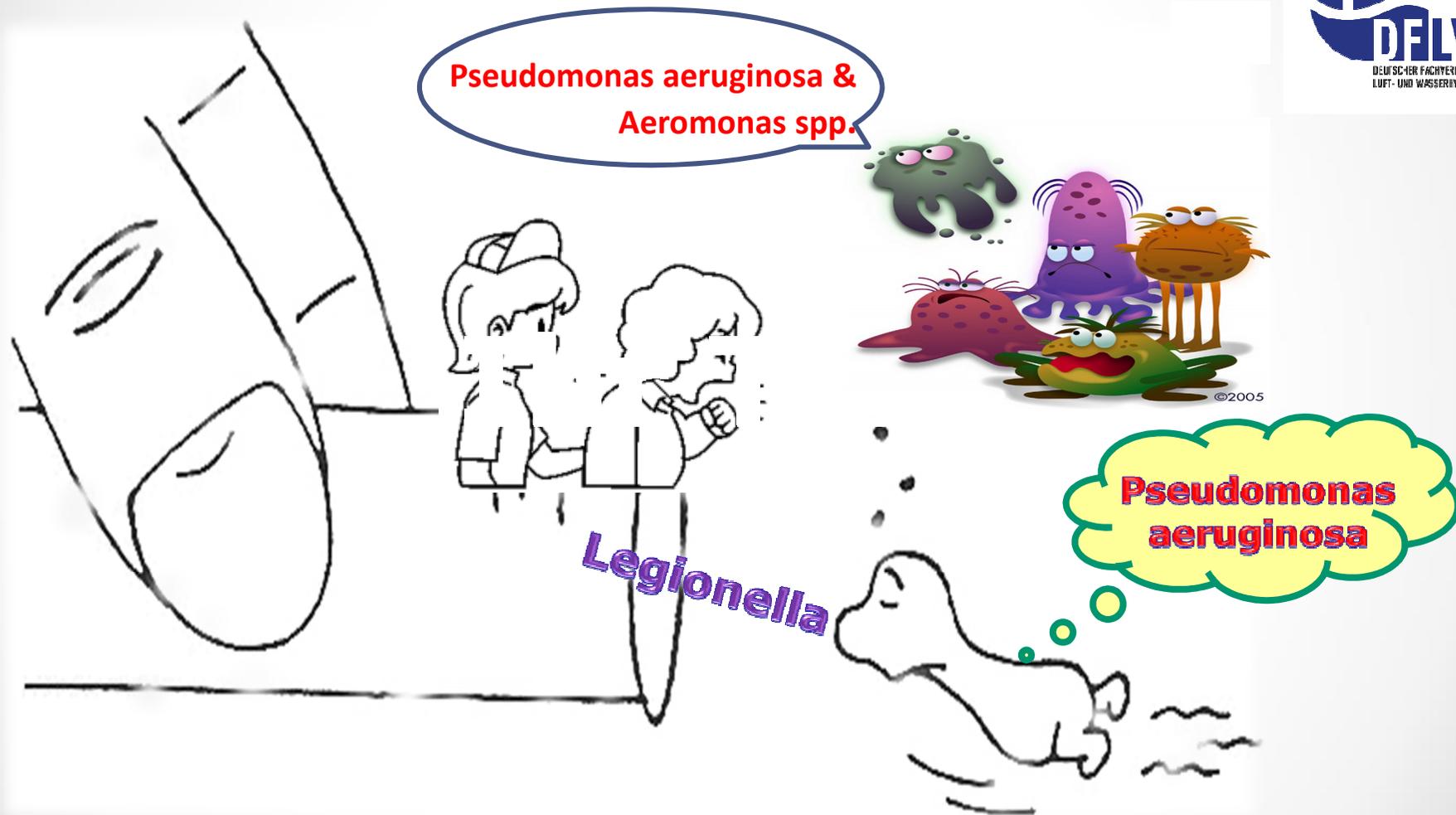
???

Kommensalismus

???



## Regelmäßige Kontrollen sind unverzichtbar



Was produzieren *Pseudomonas aeruginosa* gegen Legionellen?

# Legionella pneumophila

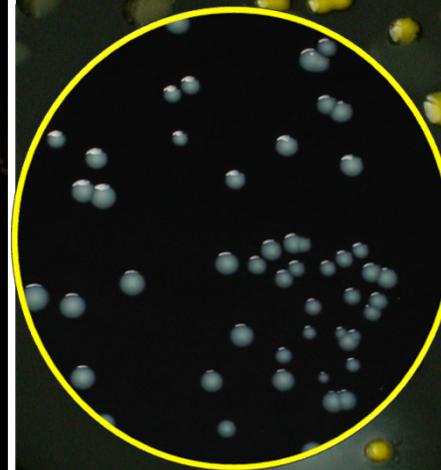
domatec  
Technology & Services for Facility and Hygiene

Serogruppe 1



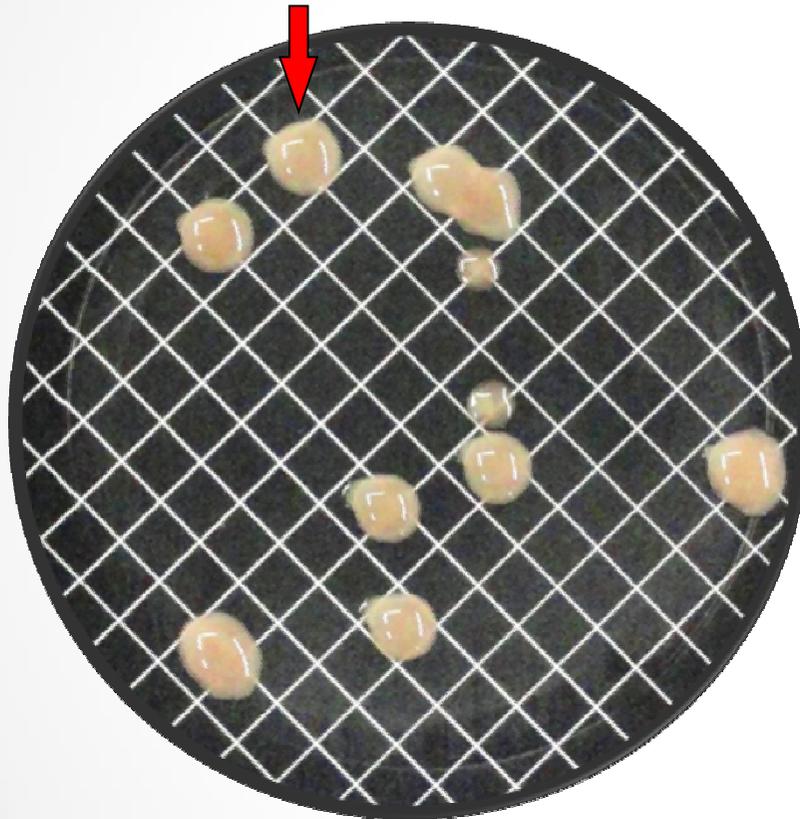
Serogruppen 2 - 15

Non- Legionella

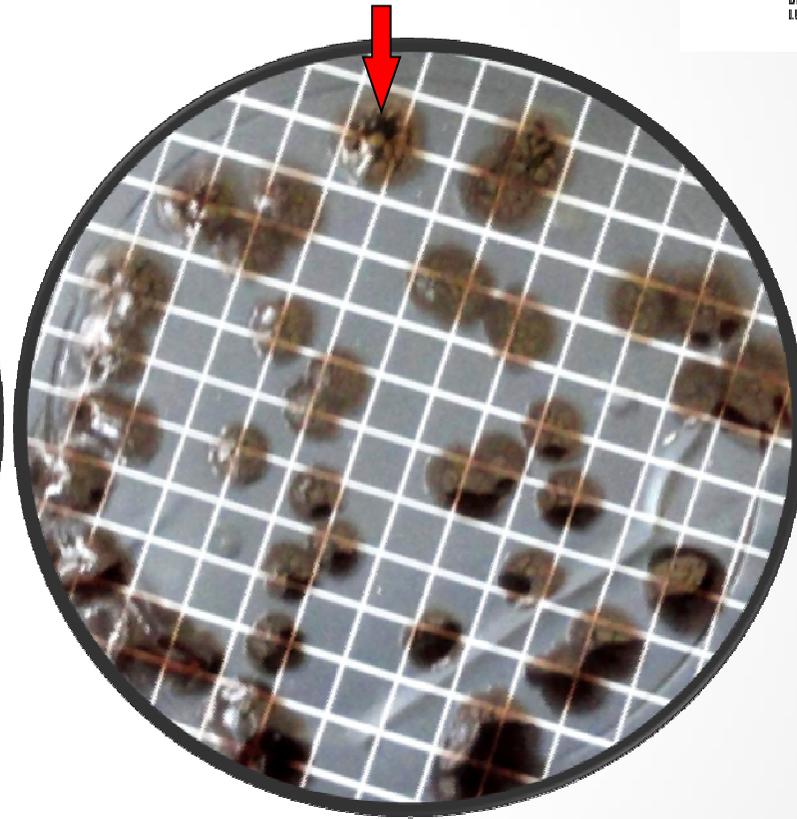


## Begleitflora in Kühlturmwässern: Inhibitoren hemmende *Legionellen*

*Aeromonas* sp.

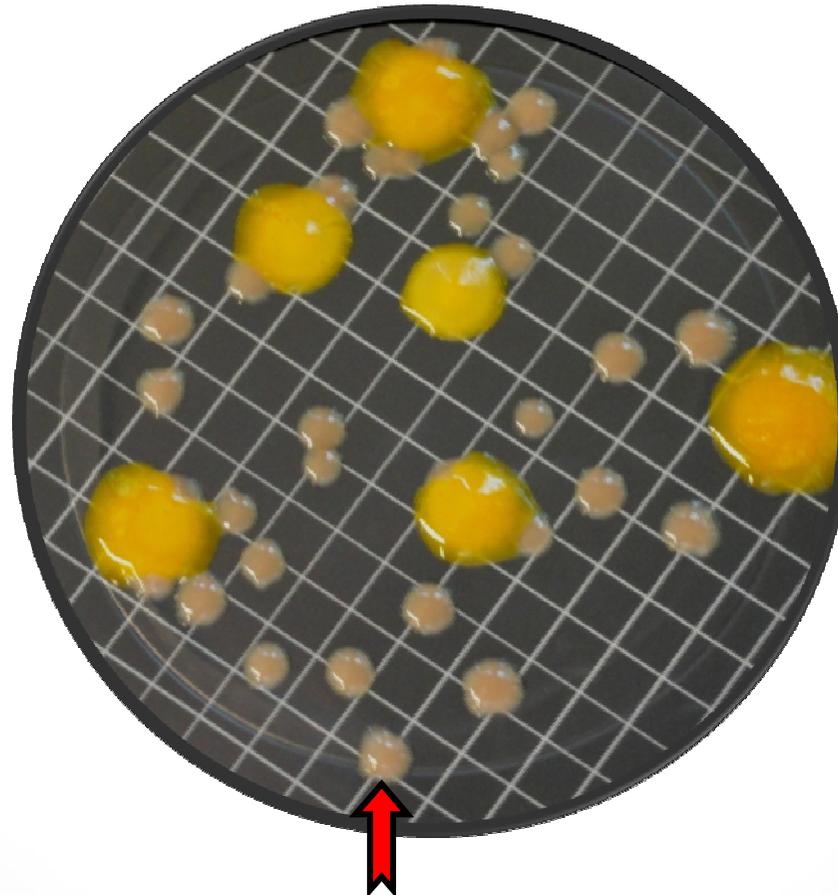


*Pseudomonas aeruginosa*



***Legionella* spp. nicht in einem Biofilm in Anwesenheit von  
*Pseudomonas aeruginosa* oder *Aeromonas* spp. wachsen.**

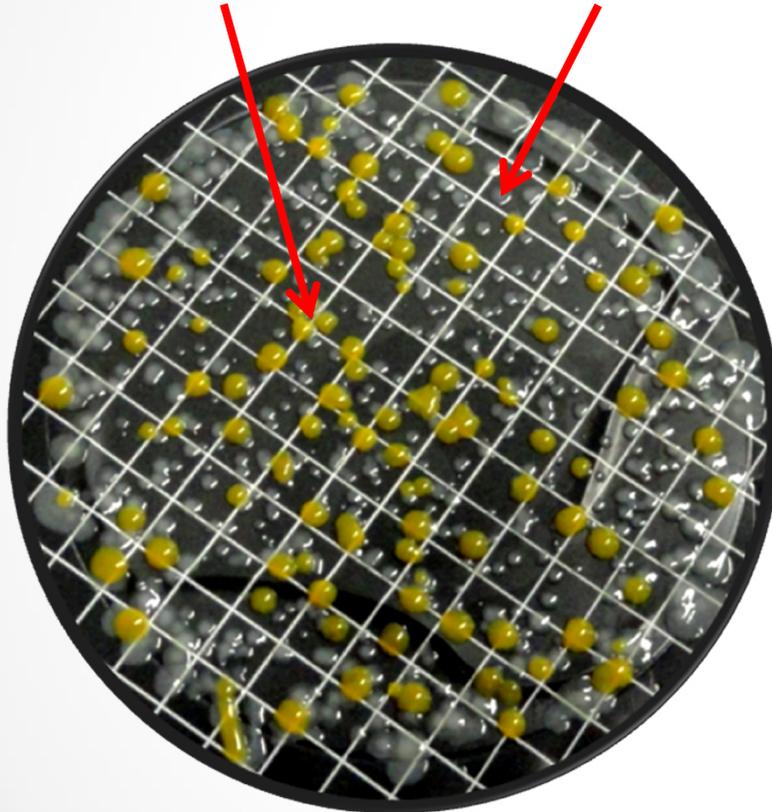
## Begleitflora in Kühlturmwässern: Inhibitoren - hemmende *Legionellen*



*Stenotrophomanas* sp.

**Flavobacterium sp. und Pseudomonas fluorescens  
zusammen mit Legionella sp.**

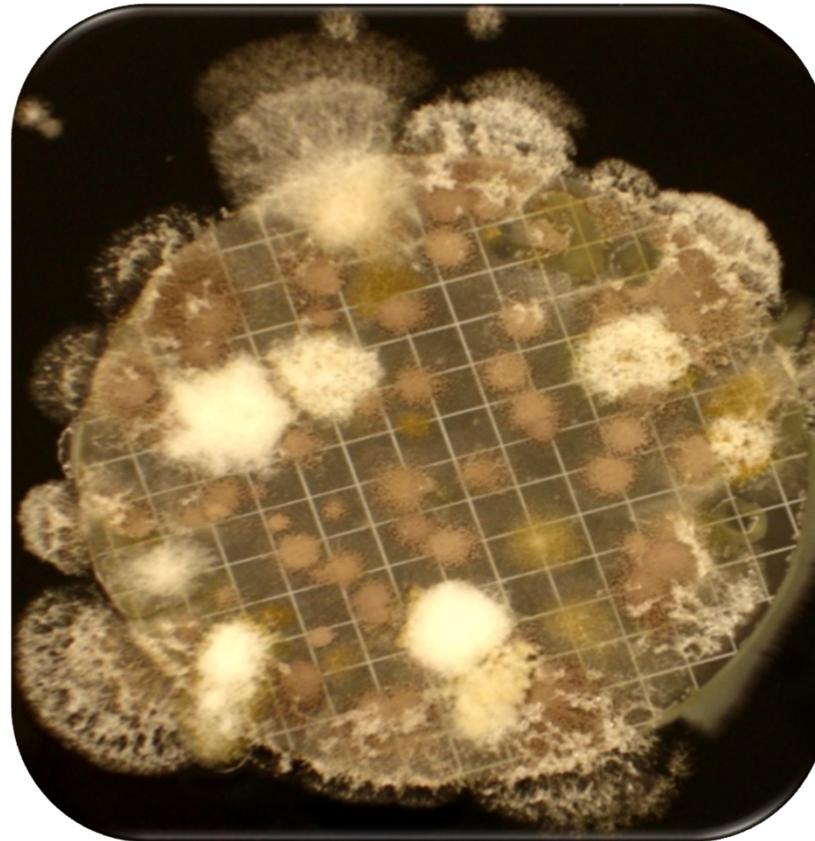
*Flavobacterium spp. & Legionella sp.*



*Pseudomonas fluorescens & Legionella sp.*



# Begleitflora in Kühlturmwasser bei *Legionella* spp. Untersuchung



# Inhalt:

1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).
2. Entstehung von Biofilmen & Biofouling - Genese.
3. Mikroorganismen im Biofilm: Bakterien und deren Ökosystem.
4. „Quorum sensing“, Inhibition und Interaktion zwischen Wassermikroorganismen.

## Quorum sensing (QS)

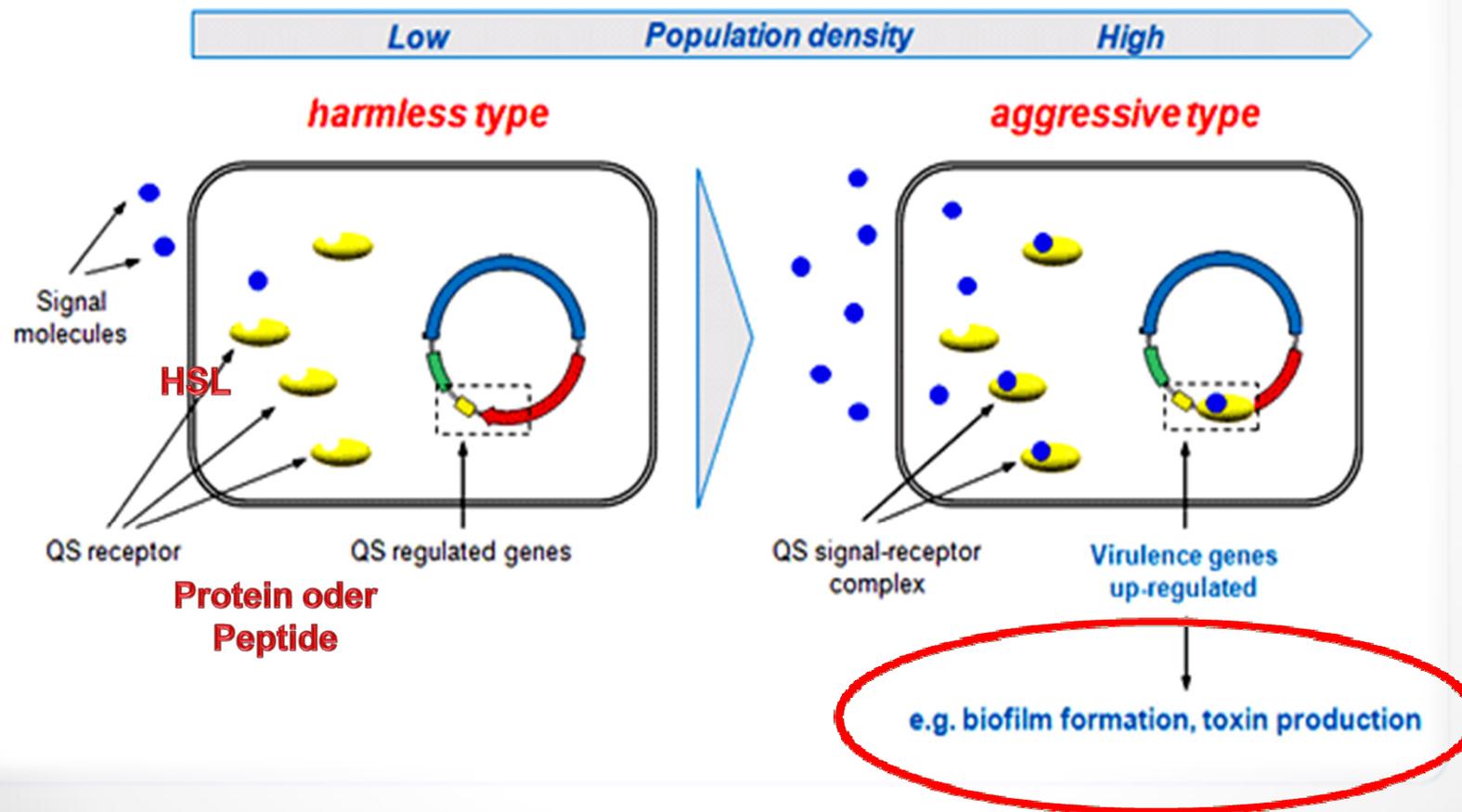


**Dabei handelt es sich um einen Mechanismus von Bakterien miteinander zu kommunizieren (*quorum sensing*).**

**Dieser ist abhängig vom Typ der Bakterien und deren Dichte.**

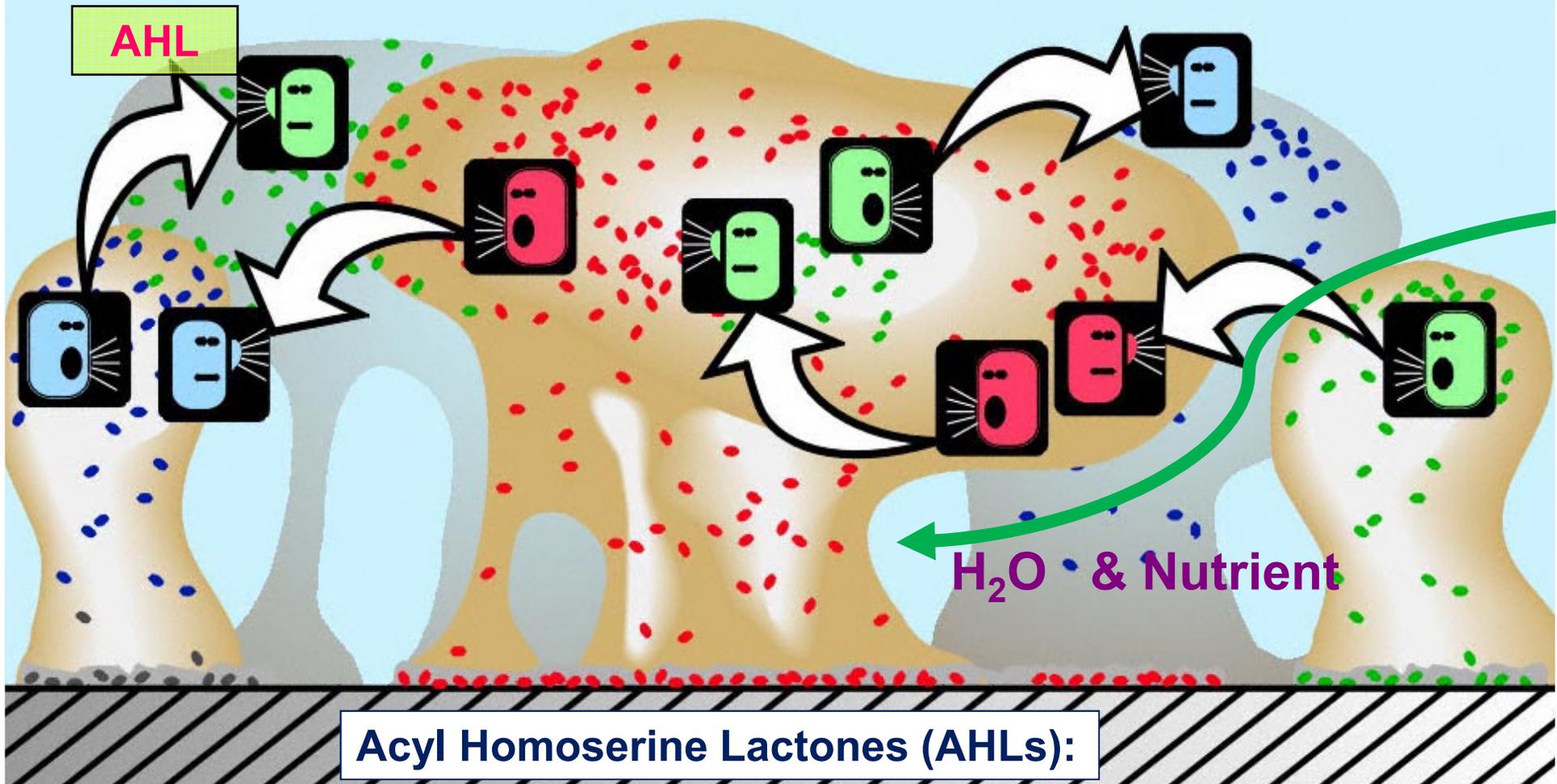
**Gram-negative Bakterien, wie zum Beispiel *P. aeruginosa*, produzieren Substanzen, N-Acyl-Homoserin-Lactone (AHL) als Signalmoleküle (Autoinducer) und bauen mit Proteinen eine „*signal-receptor*“ QS-Complex, als Regulator Metabolismus.**

# „Quorum sensing“: Biofilm und Toxin Produktion



## “Quorum sensing” in the biofilm

Signalmolecul: Acyl Homoserine Lactones (AHL)



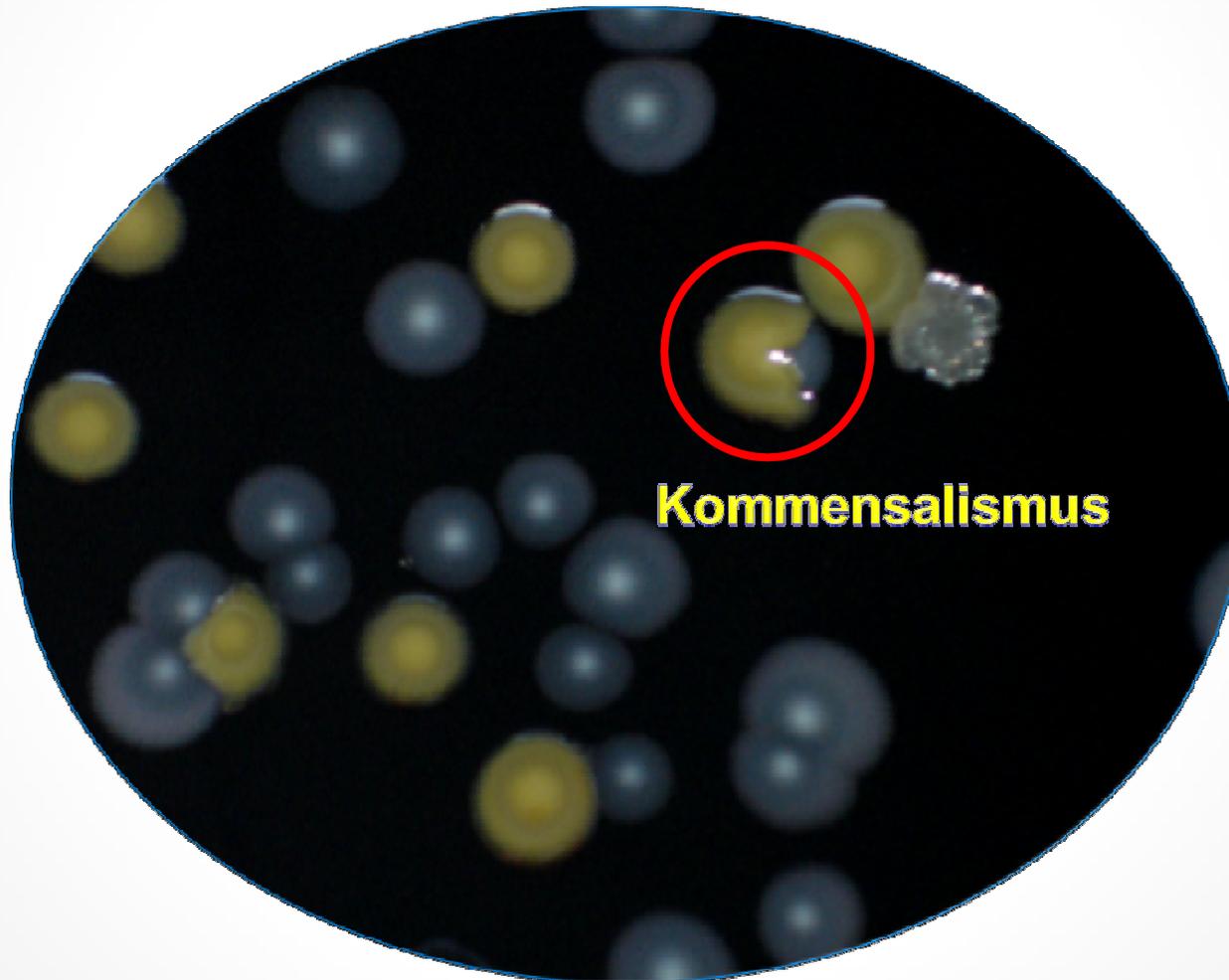
## „Quorum sensing“



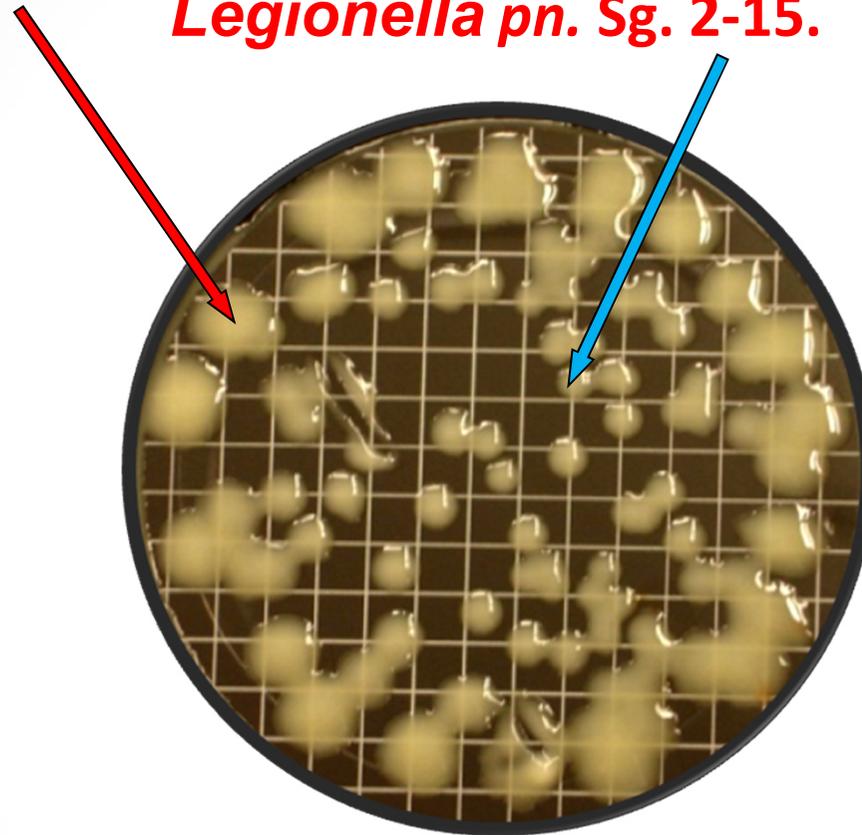
**Es wurde nachgewiesen, dass sich *L. pneumophila* in einer Biofilmmatrix aus *Flavobacterium* spp., *Klebsiella pneumoniae*, sowie *Pseudomonas fluorescens* einlagert und sich dabei vermehrt.**

**Diese spezifische Biofilmmatrix fördert das Wachstum und die Anwesenheit von *Legionella pneumophila*.**

***Legionella pneumophila* Sg. 1  
und *Flavobacterium* sp.**



***Klebsiella pneumoniae* zusammen mit  
*Legionella pn. Sg. 2-15.***



Einige Veröffentlichungen zeigen, dass *L. pneumophila* in der Lage ist, in einer Biofilmmatrix aus *K. pneumoniae*, auch *Flavobacterium sp.* oder *Pseudomonas fluorescens* auf hohem Niveau zu verharren (z.B.  $10^4 - 10^5$  KBE /  $\text{cm}^2$  Stahl)

## „Quorum sensing“



**Interessanterweise konnten Legionellen auch einen  
zwei-Spezies Biofilm aus *K. pneumoniae* und  
*P. aeruginosa* besiedeln - wobei nachgewiesen  
werden konnte, dass eine Spezies, wie  
*K. pneumoniae*, permissiv für Legionellen  
ist und andere, wie *P. aeruginosa*  
(nicht-permissiven) und hemmende Wirkung  
zeigen kann.**

## „Quorum sensing“

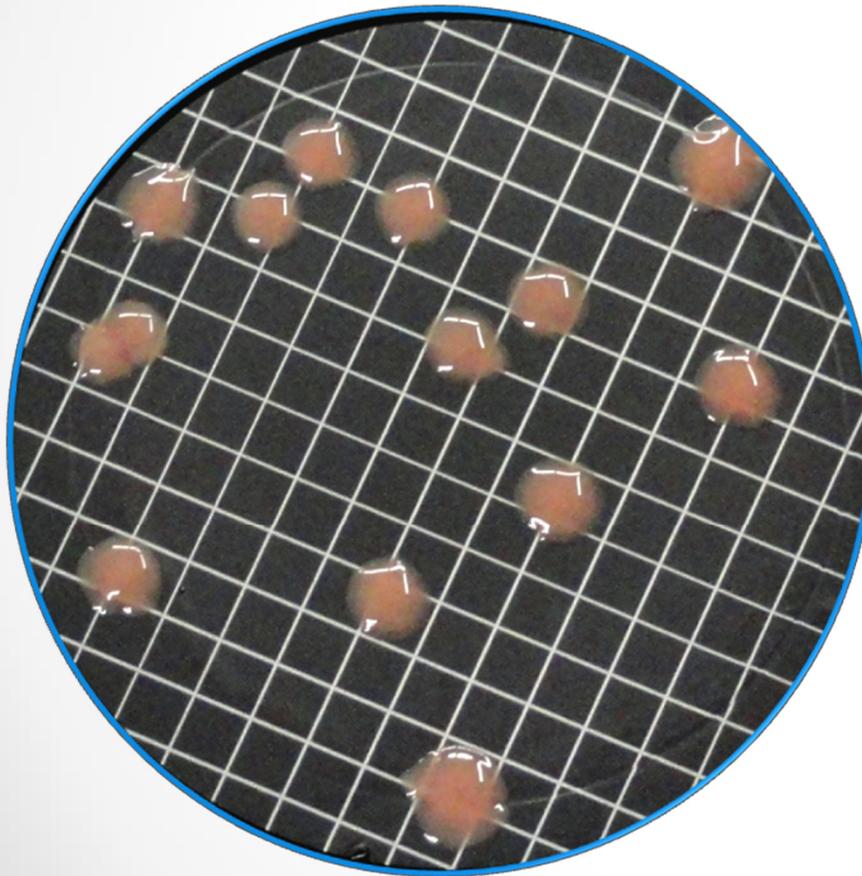


**Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in einem Biofilm mit großer Dichte, der *Pseudomonas aeruginosa* enthält, kein Wachstum und sogar eine Abtötung von *L. pneumophila* erfolgt.**

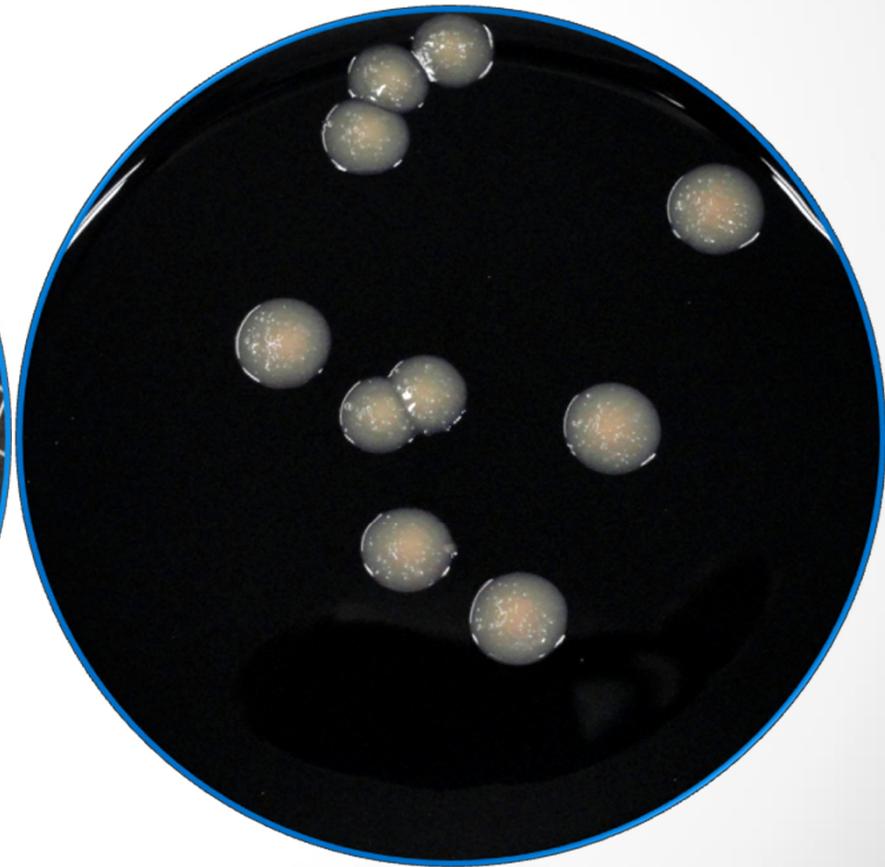
**Dies bestätigt, dass einige Bakterien die Kolonisierung mit Legionellen unterstützen (*Flavobacterium* sp.), während andere hemmend wirken, wie z.B. *Aeromonas* spp. oder *Stenotrophomonas* spp. (speziell *L. pneumophila* Sg. 1)**

## Begleitflora in Kühlturmwässern

*Aeromonas* sp.

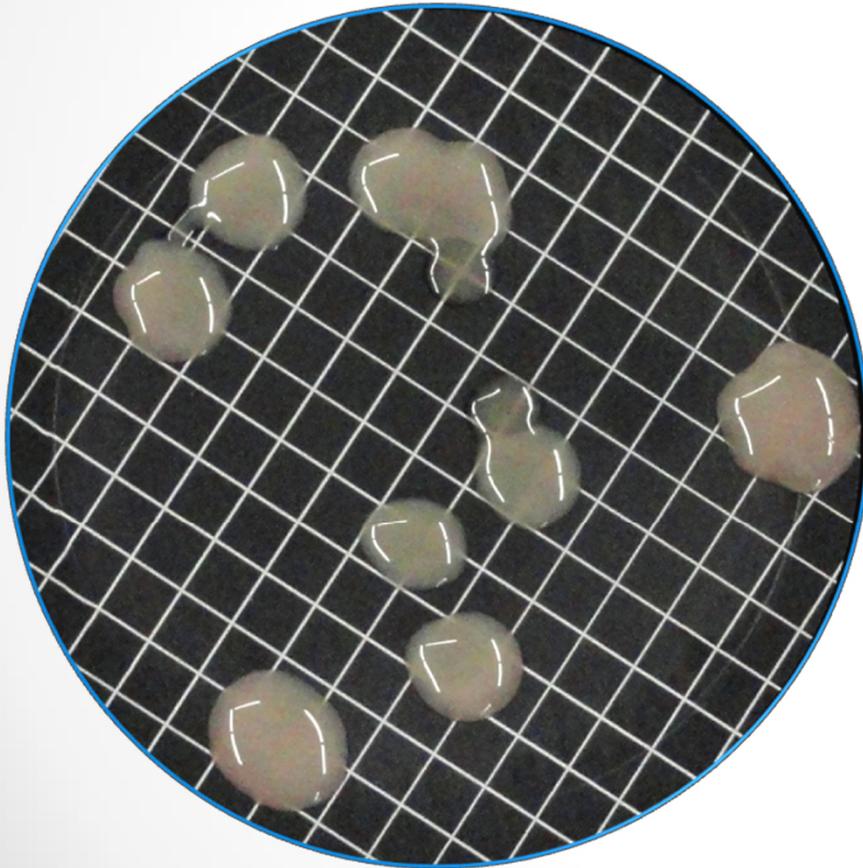


*Aeromonas* sp.

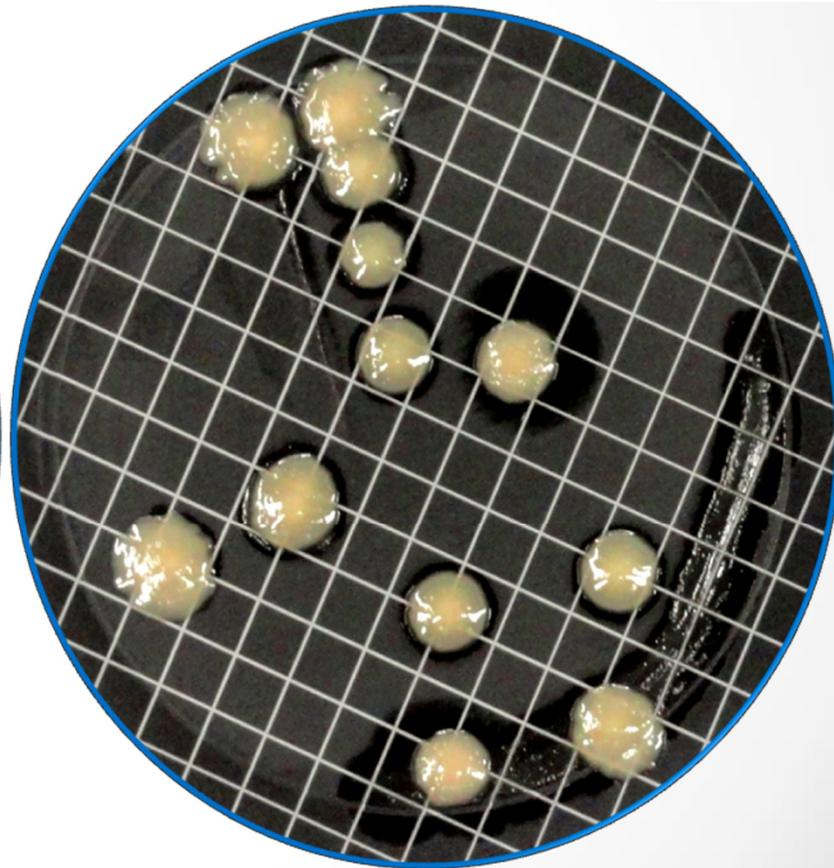


## Begleitflora in Kühlturmwässern

*Stenotrophomonas* sp.



*Stenotrophomonas* sp.



# Inhalt:

1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).
2. Entstehung von Biofilmen & Biofouling – Genese.
3. Mikroorganismen im Biofilm: Bakterien und deren Ökosystem.
4. „Quorum sensing“, Inhibition und Interaktion zwischen Wassermikroorganismen.
5. Analytische Methoden – Nachweis von Bakterien im Kühlturmwasser.

## **Legionella spp.: Nachweismethoden**

**Zusätzlich sehen wir in der Praxis Wachstum von Begleitflora auf GVPC-Agar, z.B.**

***Pseudomonas aeruginosa*, *Xantomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. und *Aeromonas* sp.).**

**Dies kann das Zählergebnis verfälschen, z.B. durch Verdrängung von *Legionella* Kolonien oder sogar vollständiger Inhibition von *Legionella*-Wachstum.**

## ***Legionella* spp.: Nachweismethoden**



- **Die vorgeschriebenen Nachweismethoden (ISO 11731-2 vom 6-2008) besagen, dass alle Kolonien, die auf GVPC-Agar wachsen, aber auf cysteinfreiem Medium (oder Blut-Agar) kein Wachstum zeigen, als *Legionellen* spp. betrachtet werden.**

## Untersuchung nur *Legionella*-Spezies

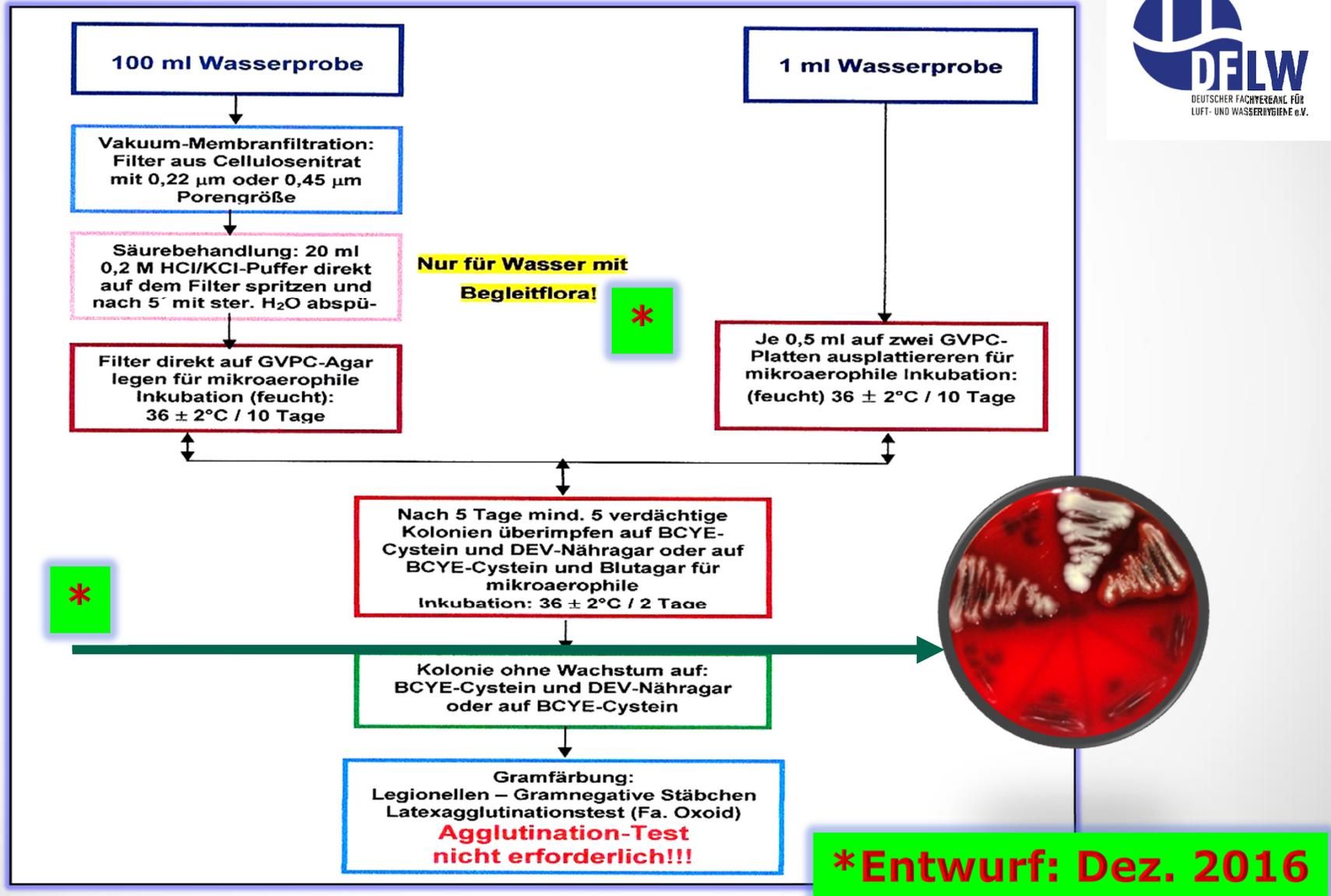


**Legionella-Spezies  
(bis 57, RKI, 2012)**

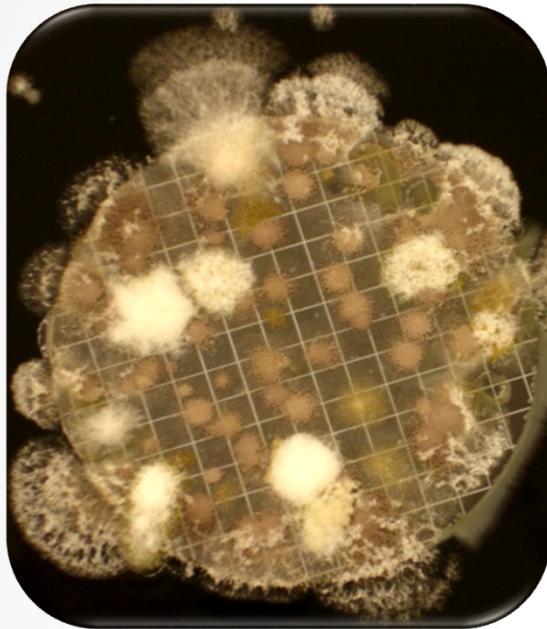
**Legionella Spezies  
Bis zu 79 Serogruppen**

**Legionella pneumophila  
Serogruppe 1 und 2-15;  
90% der Erkrankungen**

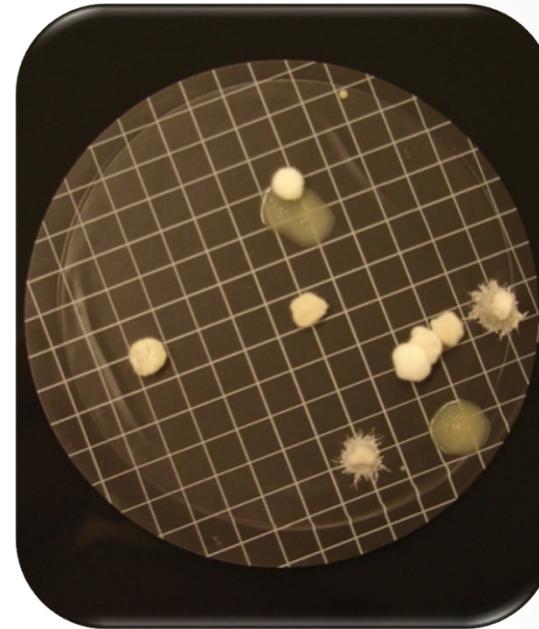
# Untersuchung nur *Legionella*-Spezies



# Begleitflora in Kühlturmwasser bei *Legionella* spp. Untersuchung

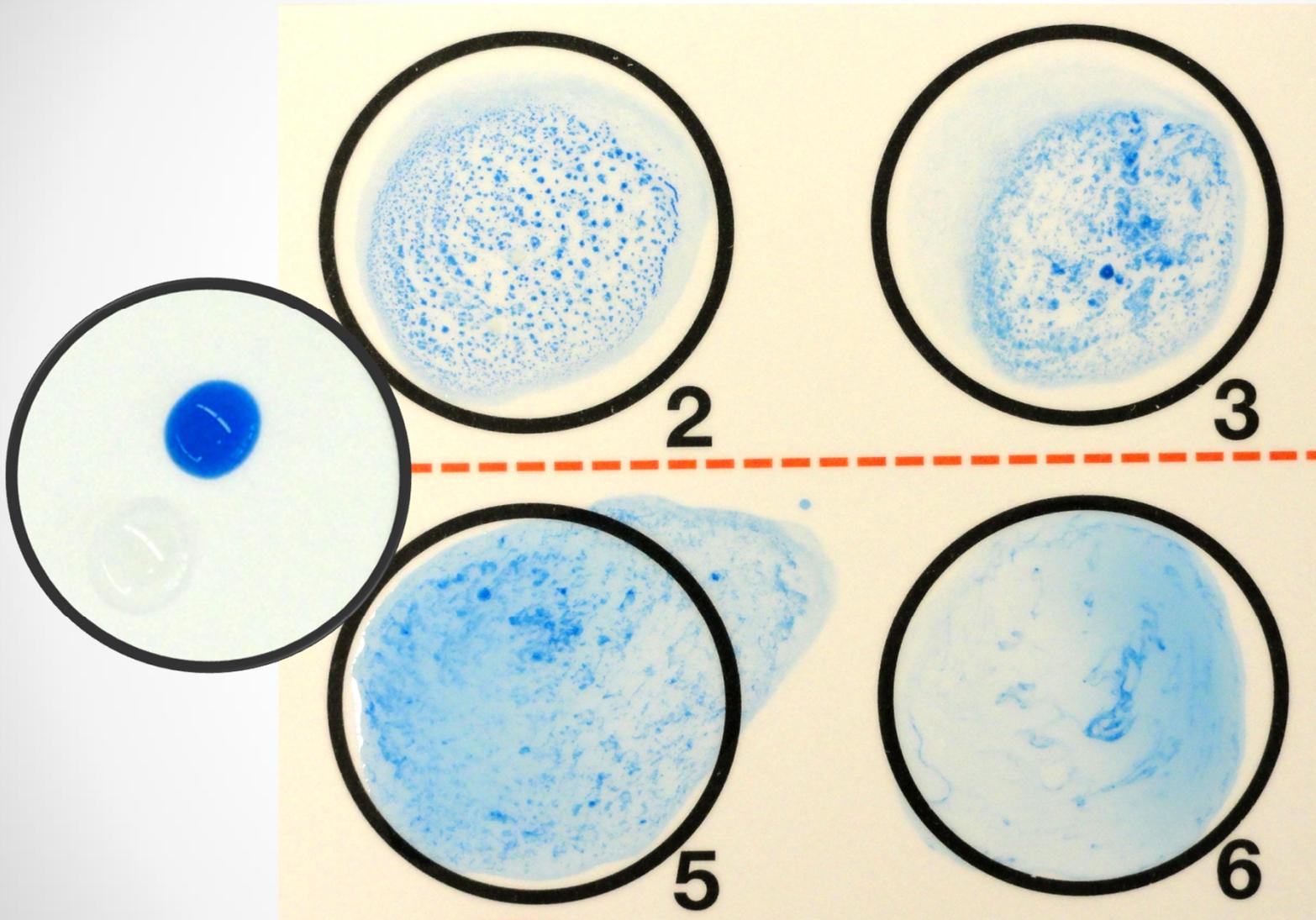


**Ohne  
Behandlung**



**Nach Säure-  
behandlung**

## Agglutinations-Test-*Legionella*: Beispiele

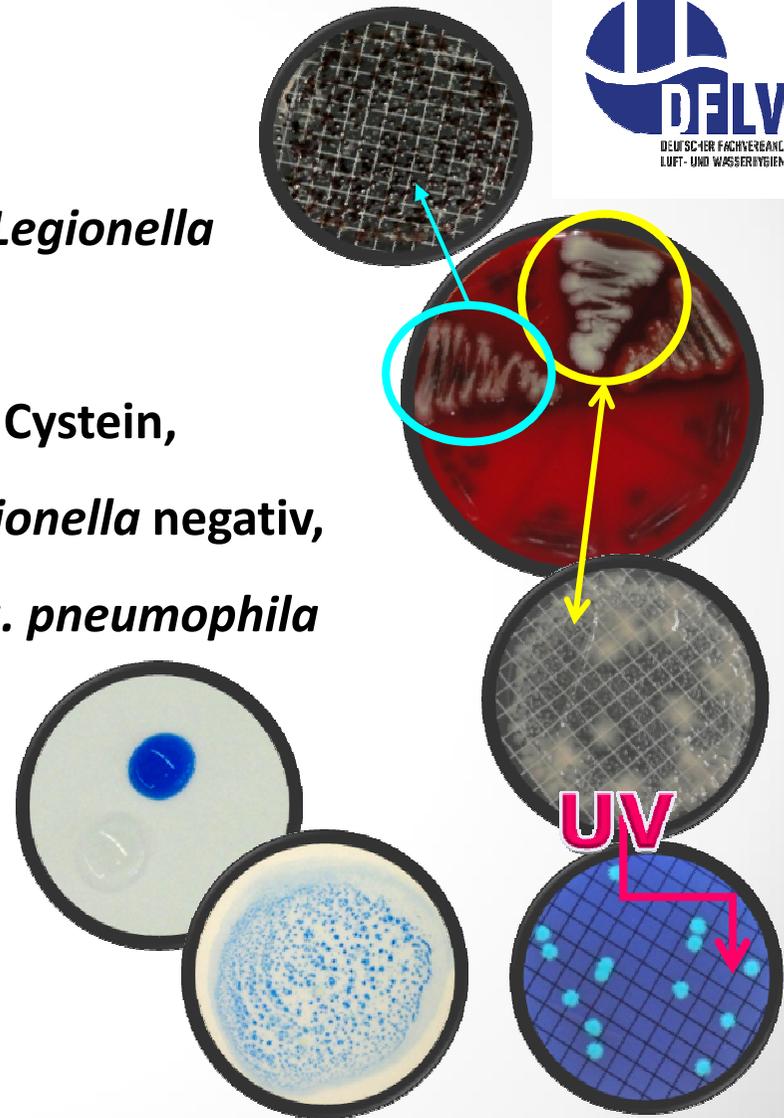


## Befund falsch negativ

### Beispiel:

- Wachstum auf GVPC Platten: optisch wie *Legionella pneumophila*, zusätzlich viel Begleitflora,
- Wachsen auf Blut und GVPC-Platten ohne Cystein,
- ohne Agglutinations-Test Ergebnis ist: *Legionella* negativ,
-  Agglutinations-Test mit Antikörper für *Leg. pneumophila* Serogruppe 2-15 ist positiv,
- Ergebnis: *Legionella pneumophila* positiv.

Befund nur nach Blut falsch negativ!

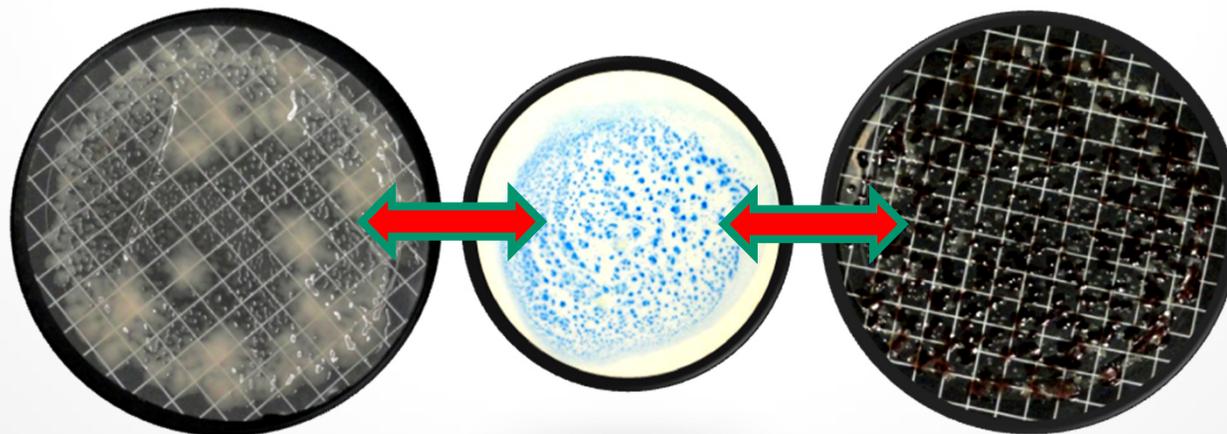


## Erklärung zum falsch negativ Befund

### Erklärung:

Es ist in diesem Fall nicht möglich, *Legionella pneumophila* ohne Begleitflora auf Blut- oder auf GVPC-Platten ohne Cystein zu überimpfen. Die Begleitflora überwächst auf Blut oder GVPC-Cystein die eventuell vorhandenen *Legionella pneumophila* Kolonien.

**Das führt ohne Agglutinations-Test zu einem falsch negativen Ergebnis!**



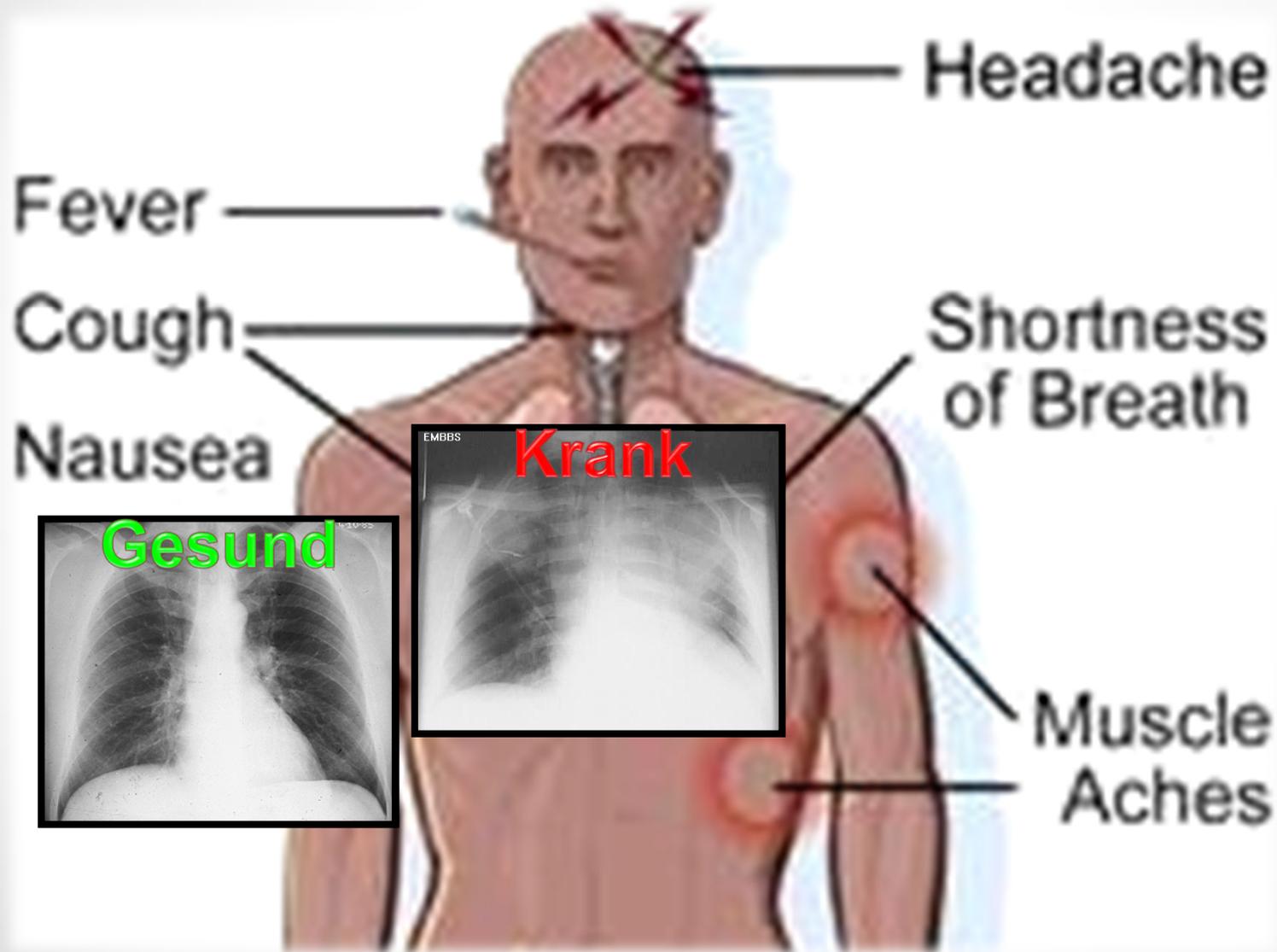
# Health hazards by biofilms:

# Legionellosis

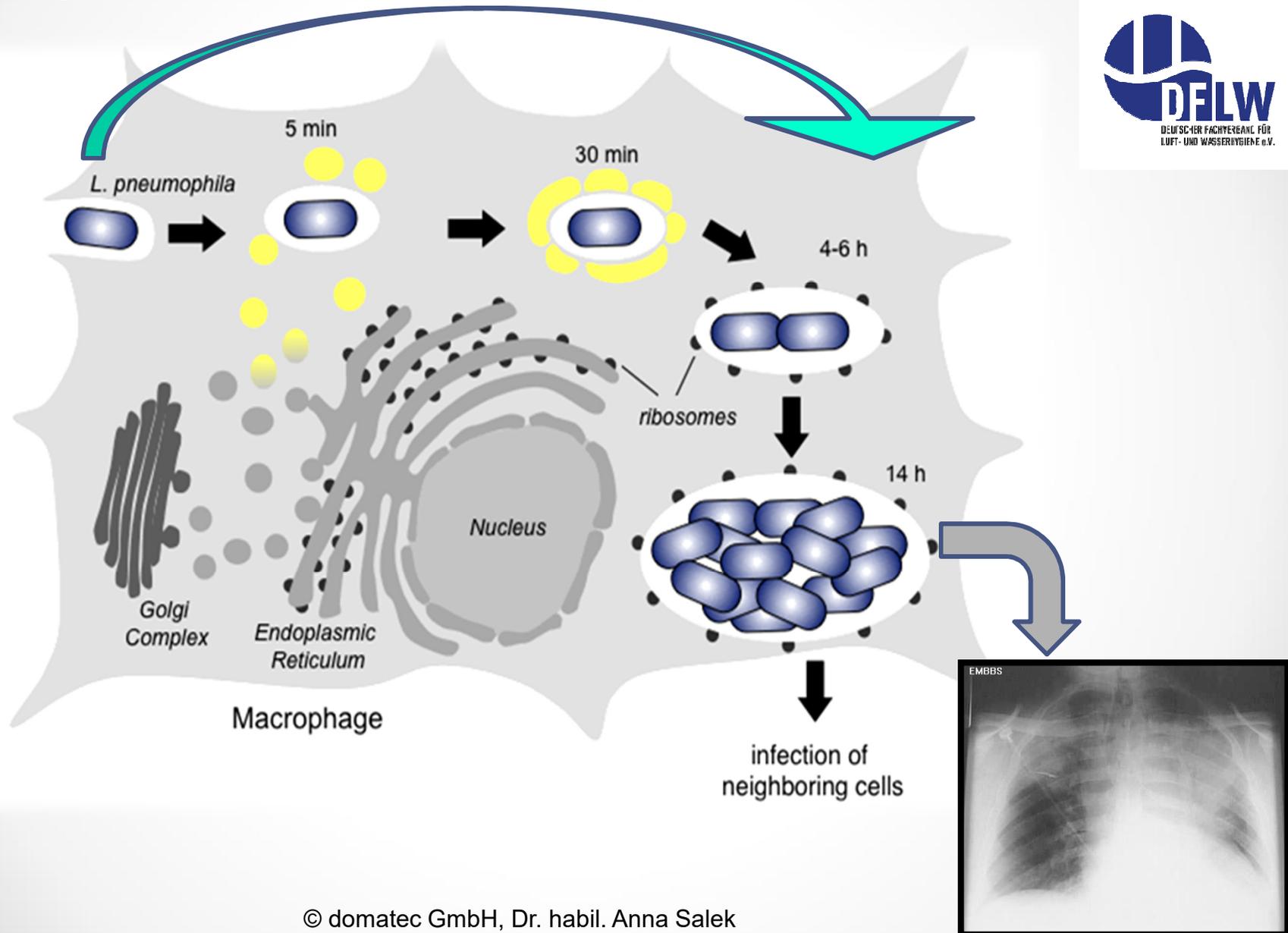
- Every case is proof of contact with an improperly managed water system
- Every case could have been prevented by applying practical scientific management principles
- Legionella are typical biofilm-related pathogens as they survive in protozoa which graze on biofilms



# Legionellose Krankheit



# Zyklus *Legionella pneumophila* Infektion



## Hygiene Kontrolle

**Angesichts der steigenden Zahl von bestätigten und des potentiellen Risikos einer Infektion über diskontinuierlich freigegebene Legionella-haltigen Aerosolen aus Kühltürmen, stellt sich die Frage:**

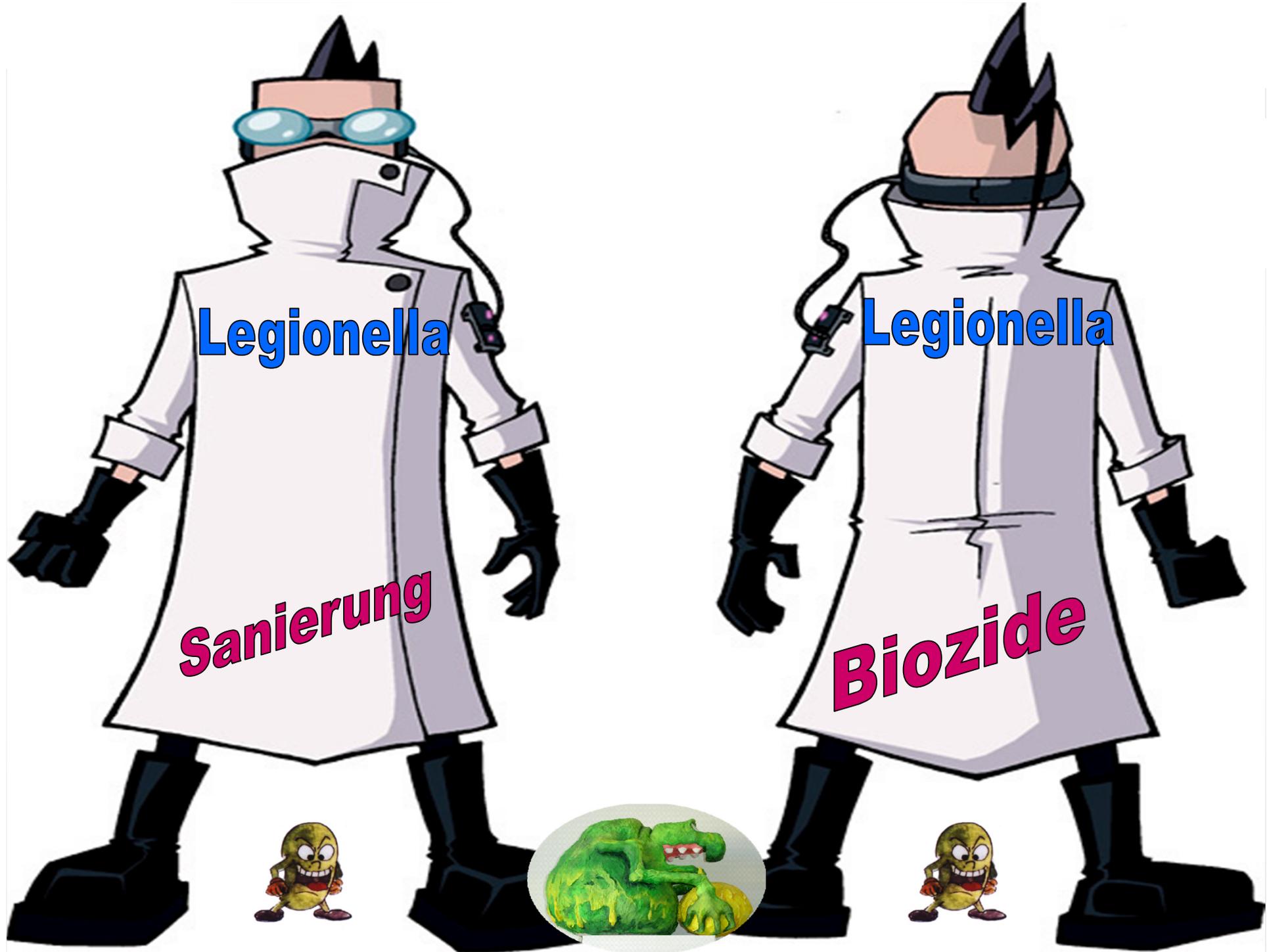
**ob die routinemäßige Bestimmung der Gesamtkeimzahl im Kühlwasser, z.B. einmal pro Woche, wie von der deutschen Leitlinie VDMA 24649 vorgeschlagen, ist ausreichend?**

**bzw. sinnvoll ist (nach VDI 6022 Blatt 1):**

**$GKZ \leq 10^4$  KBE/ml und *Legionella sp.*  $\leq 10^3$  KBE/100 ml ???**

**Wichtig ist auch *Pseudomonas aeruginosa*!**





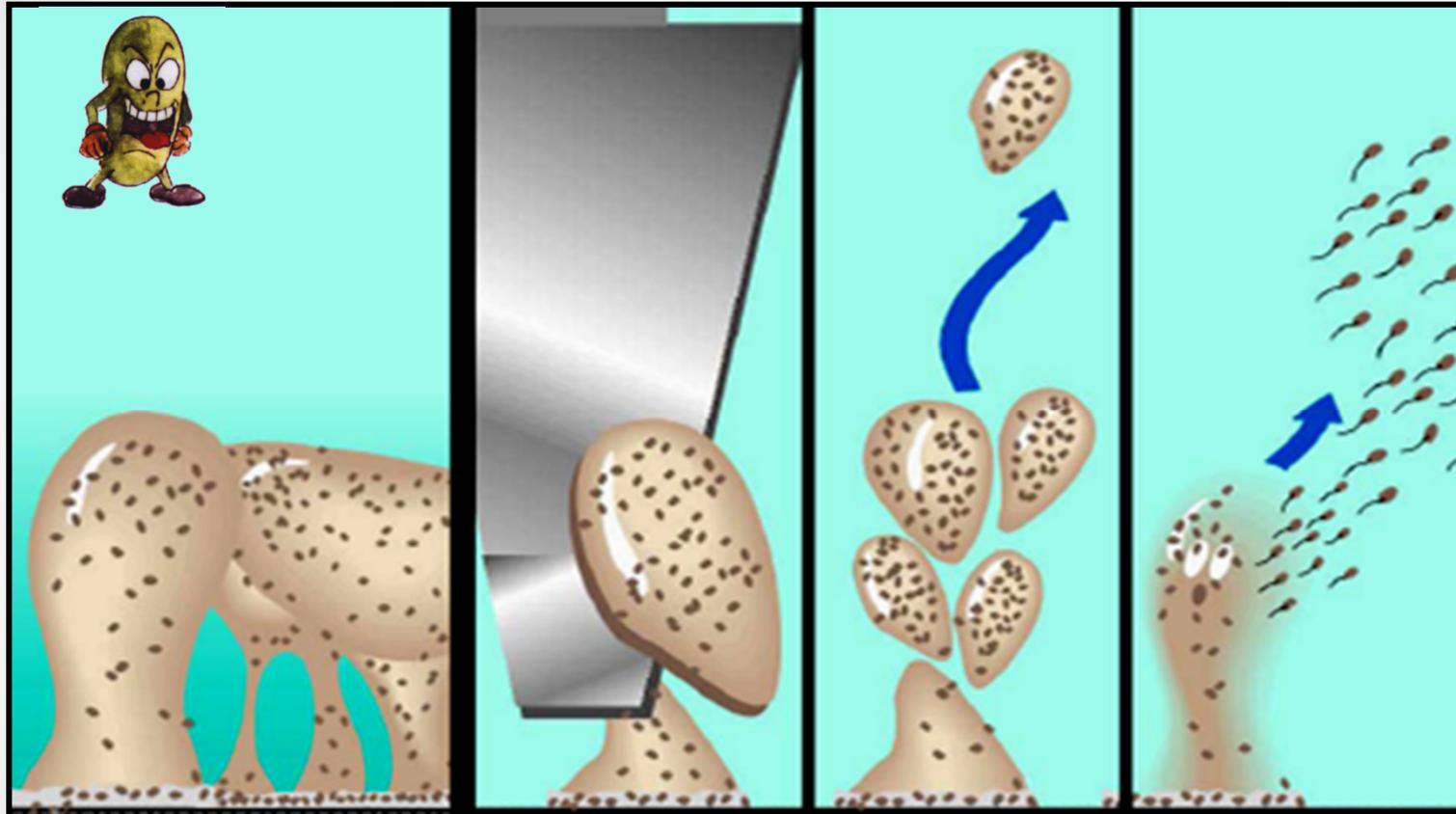
Legionella

Sanierung

Legionella

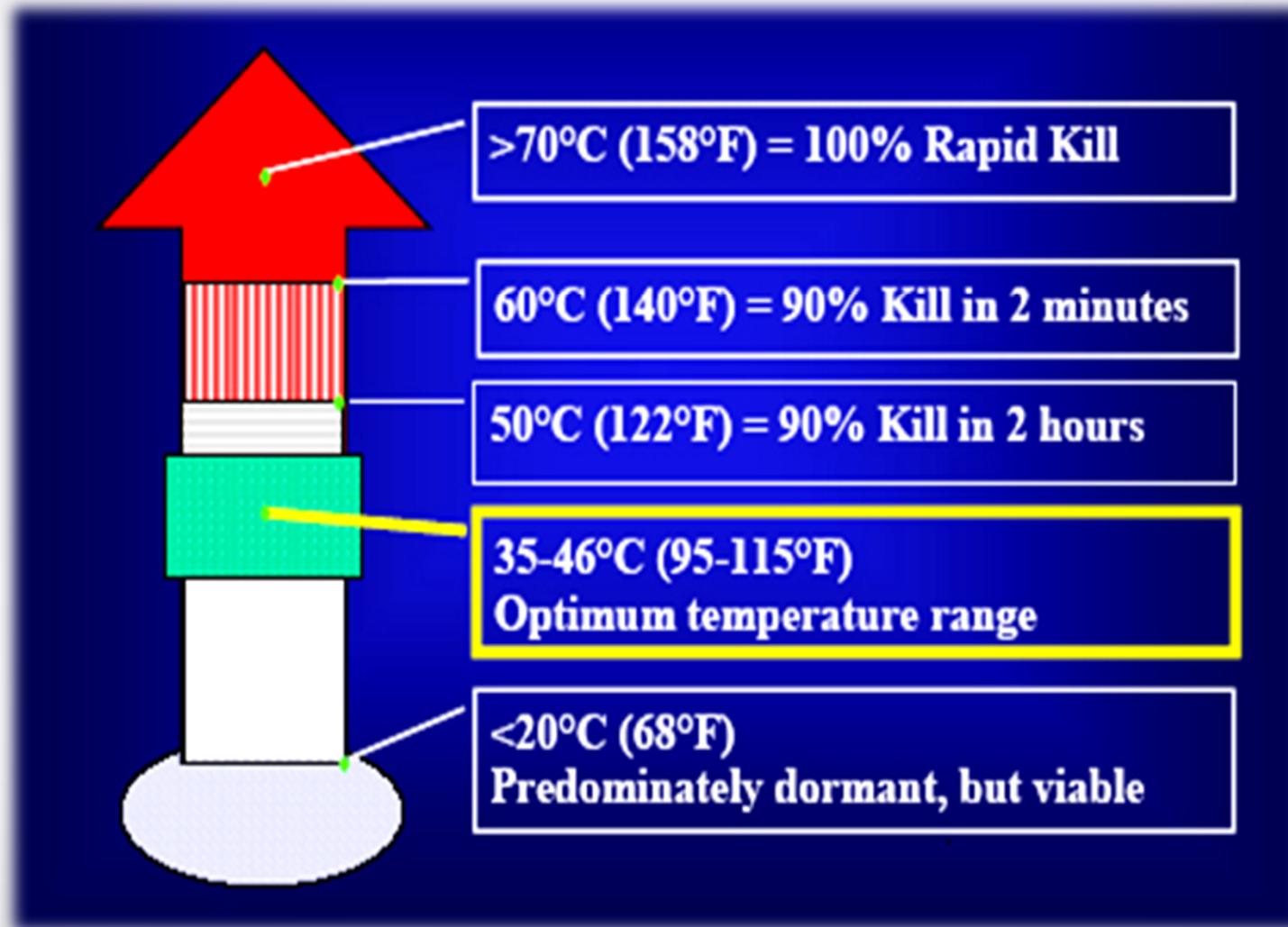
Biozide

## Mechanische Destruktion von Biofilm

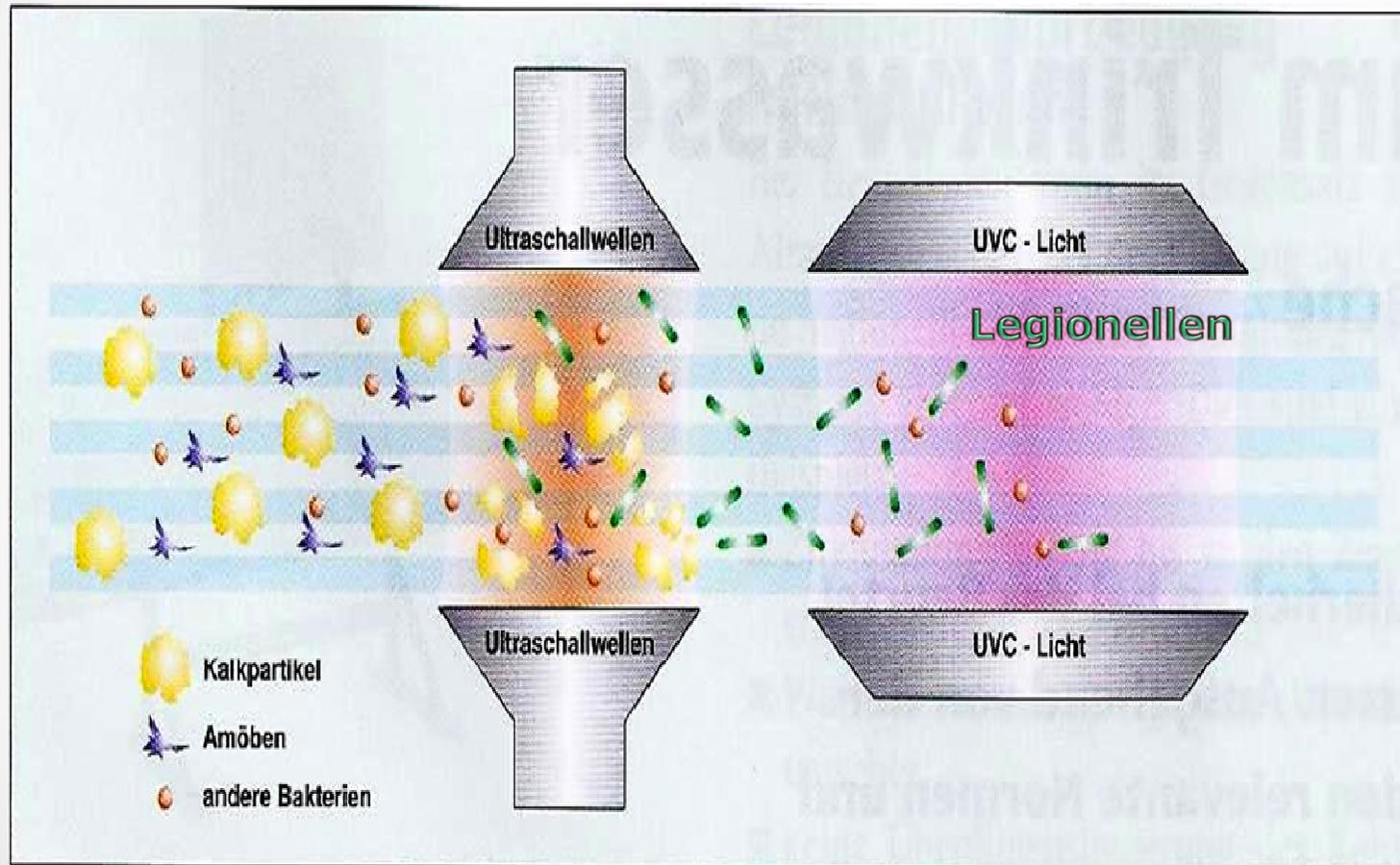


### Dyspersion der Biofilm und Entwicklung Einzel Bakterien

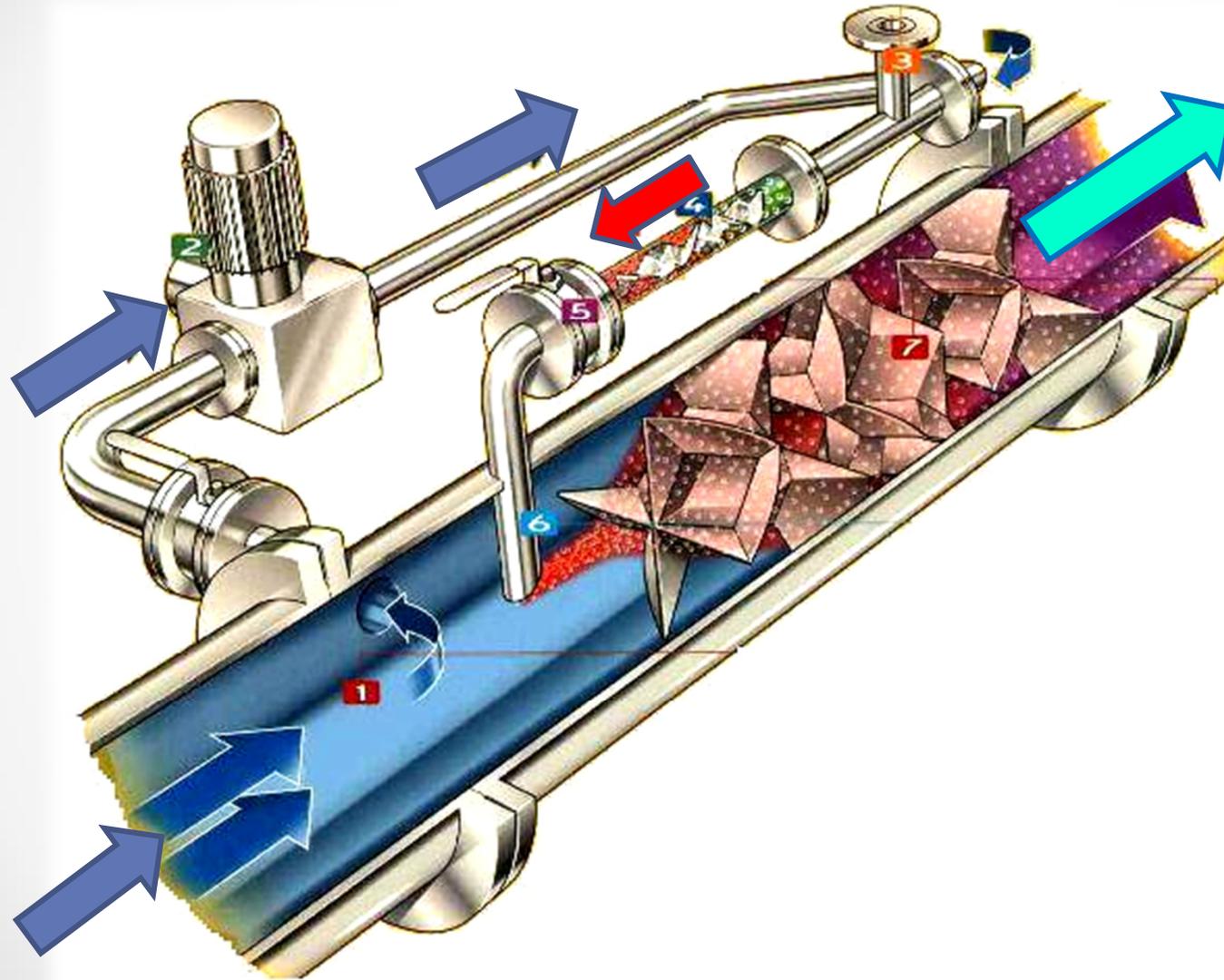
# Thermische Behandlung Wasser mit Legionellen



# Ultraschall-Behandlung und UV-Bestrahlung des Wassers mit *Legionella*



## Side-Stream Ozone Injection



## **Routineuntersuchungen**

**Aussagen zur Korrelation zwischen GKZ als Indikator  
und möglicher Legionellen-Kontamination**

**sind sehr riskant.**

**Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der  
regelmäßigen Bestimmungen von Legionellen-  
Konzentrationen im Kühlwasser, vor allem in Systemen  
ohne kontinuierliche Biozid-Anwendung.**

**Die deutsche Leitlinie VDI 6022 empfiehlt nur  
Routineuntersuchungen für Legionellen alle zwei Jahre  
in Kombination mit Routine-Hygieneinspektionen.**

**Das ist nicht ausreichend!**



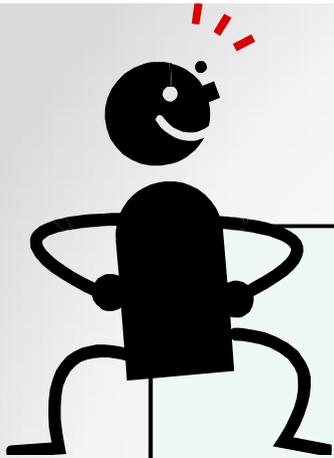
## Korrelation?

**Die Untersuchung der Gesamtkeimzahl ist für die Bestimmung einer Legionellen-Kontamination des Kühlsystems nicht geeignet, da die GKZ und der optisch beurteilte Grad der Verschmutzung (z.B. Biofilm) nicht mit der Legionellen-Konzentration im Kühlwasser korreliert.**

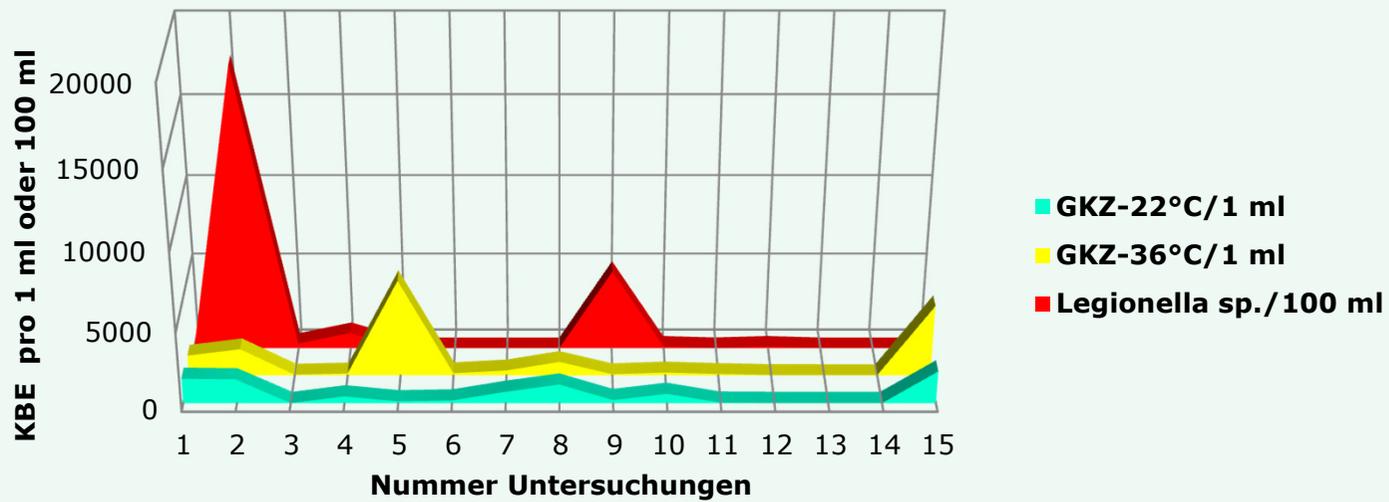
**Es wurden, z.B. relativ hohe Legionellen-Konzentrationen im Kühlwasser beobachtet, während die Gesamtzahl der Bakterien und die Biofilm-Konzentration sehr gering waren.**

**(Bentham, 2000; Salek, 2013)**





## Keine Korrelation zwischen GKZ und Legionellen in Kühlturmwasser



Salek, 2013



## Koloniezahlen ist kein Warnwert

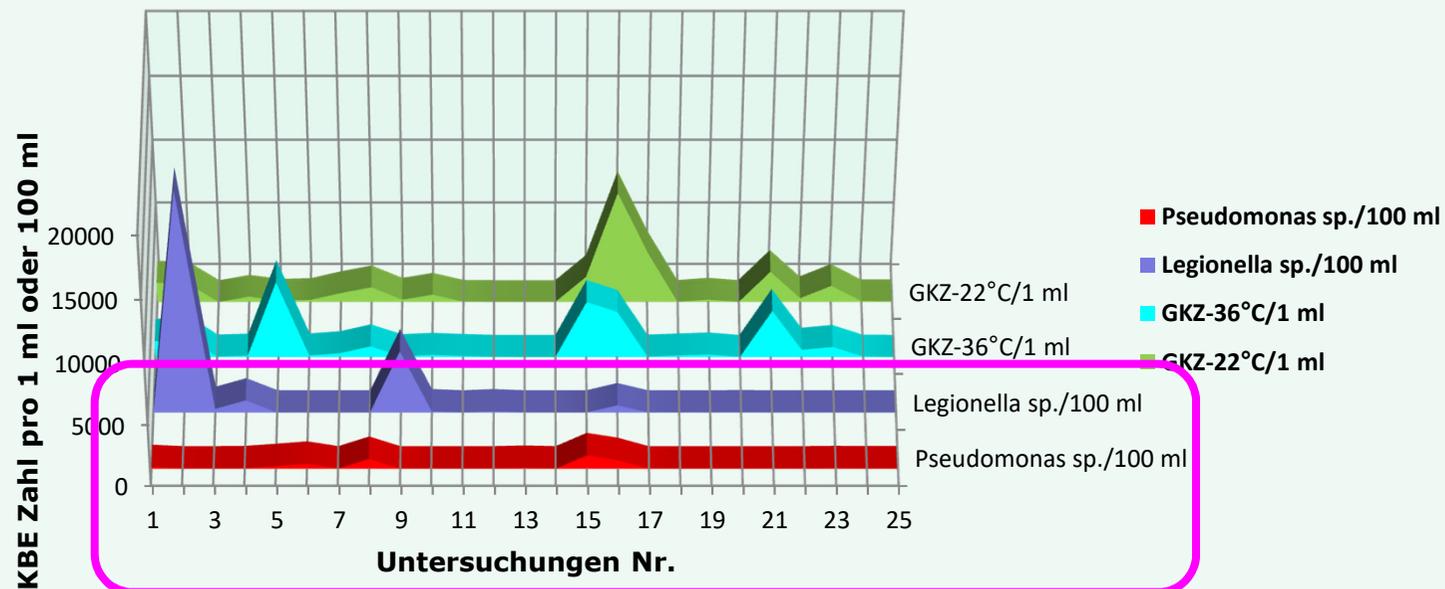


Im Technischen Regelwerk (VDMA 24639) wird die Untersuchung des Umlaufwassers auf Legionellen ab einer Gesamtkeimzahl von **10.000 KBE /ml** vorgeschrieben.

Dieser Wert ist praktisch bedeutungslos, weil es keine Korrelation der Koloniezahlen zu Legionellen gibt!

Es sind Zweifel angebracht, dass die Überwachung von Koloniezahlen im Umlaufwasser für ein Monitoring zur Verhinderung umweltbezogener Infektionen geeignet ist.

## Korrelation zwischen Mikroorganismen in Kühlturmwasser



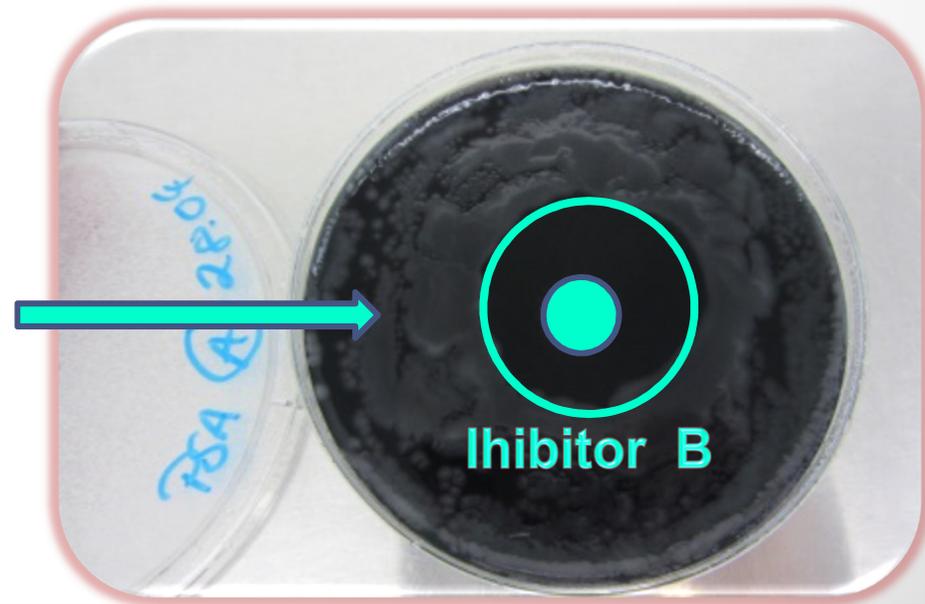
Salek, 2013

# Einfluss die bakteriellen Inhibitoren auf:



*Legionella pneumophila* Sg.1  
auf Hintergrund

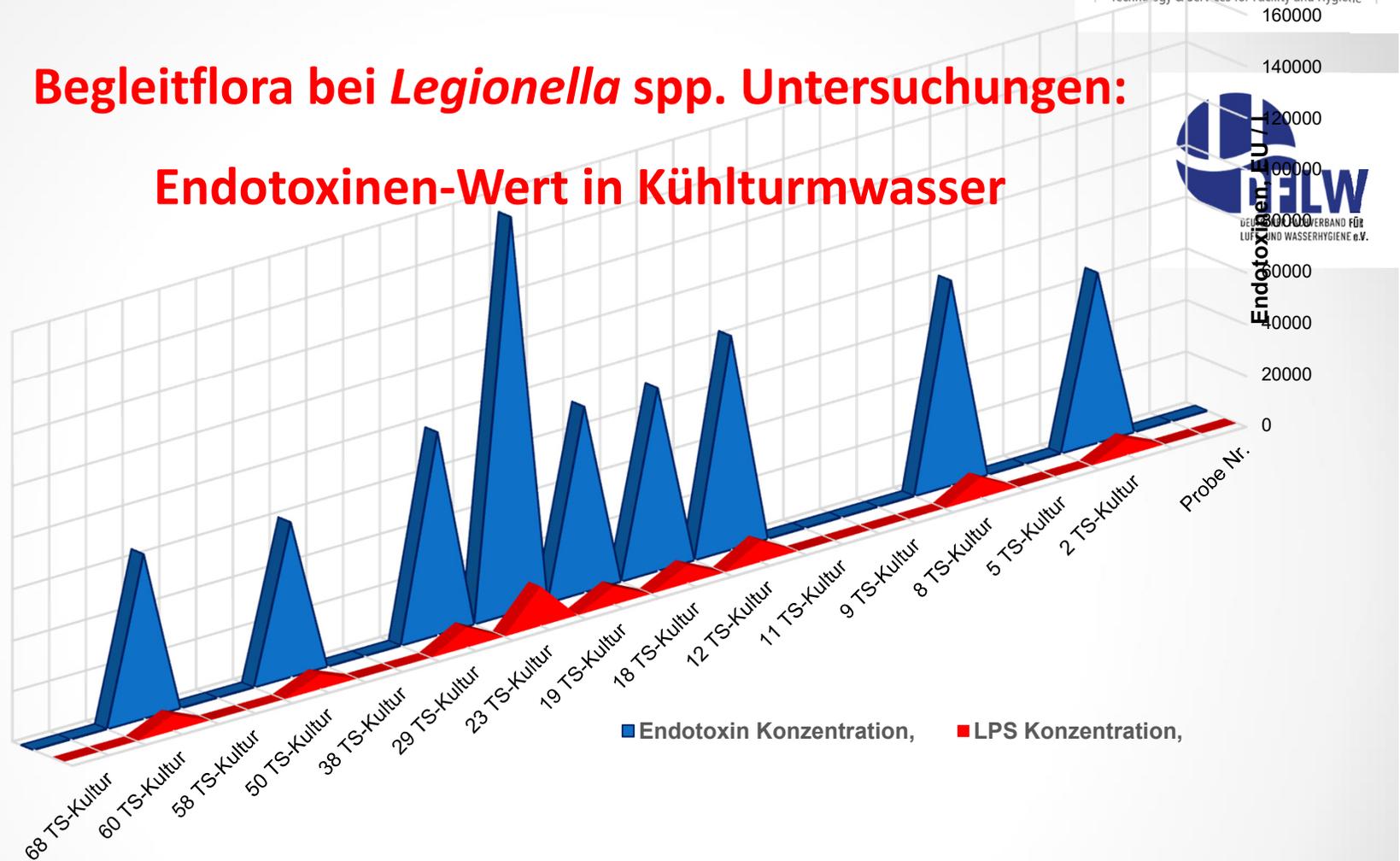
*Pseudomonas aeruginosa*  
auf Hintergrund



## Hämolitische Effekte von *P. aeruginosa* und *Bacillus licheniformis* auf *Legionella pneumophila* SG. 1



# Begleitflora bei *Legionella* spp. Untersuchungen: Endotoxinen-Wert in Kühlturmwasser



**In Kühlturmwasser Proben: gefunden keine Korrelation  
zwischen Legionellen, Pseudomonaden und  
Endotoxinen**

# Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

**Dr. habil. Anna Salek**

domatec GmbH | Laborleiterin  
Mühlbauerstraße 6 | 84453 Mühldorf  
T +49 8631 1676 251 | F +49 8631 1676 259  
[anna.salek@domatec.info](mailto:anna.salek@domatec.info)  
<http://www.domatec.info>