

Biokontrolle von Mikroorganismen In Kühlturm Wasser: Das Ökosystem für Legionellen



Dr. habil. Anna Salek, DOMATEC GmbH

Einleitung

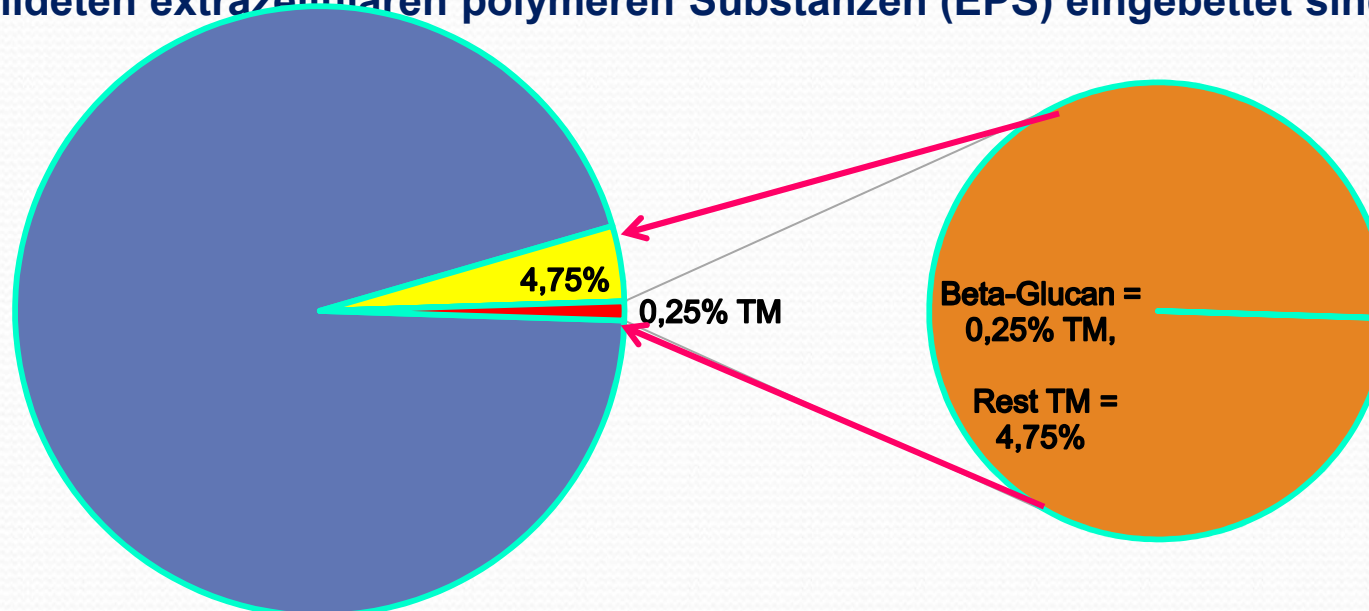
In den letzten Jahren wurde das Ökosystem der in Trinkwasser vorkommenden Legionellen ausführlich erforscht.

Die Identifizierung ist deshalb unproblematisch. Anders zeigt sich die Lage bei der Beurteilung von technischen Wassersystemen, z.B. Kühltürmen.

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

Der natürliche Lebensraum von Mikroorganismen ist der Biofilm

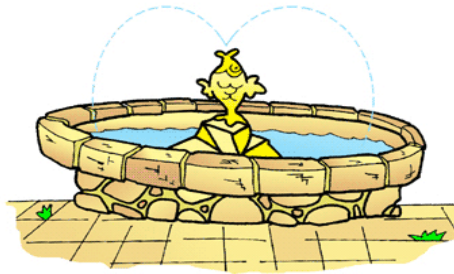
- Biofilme sind an Grenzflächen auftretende Ansammlungen von Mikroorganismen, die in eine wasserhaltige Matrix aus selbst gebildeten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind;



- Allgemeine Bezeichnung des makroskopischen Erscheinungsbildes von Biofilmen (Schleim) mit Mikroorganismen (ggf. vielzellige Organismen, auch Krankheitserreger) Eingebettete Partikel (anorganisch, organisch);

Mögliche Infektionsquellen Kontamination: Erwärmtes Wasser und Aerosol

- Whirlpools
- Duschen
- Waschbecken
- Spielmaschinen
- Nebelmaschinen, z.B. in Supermärkten
- Feuchte Böden, Blumenerde, Springbrunnen



Inhalt:

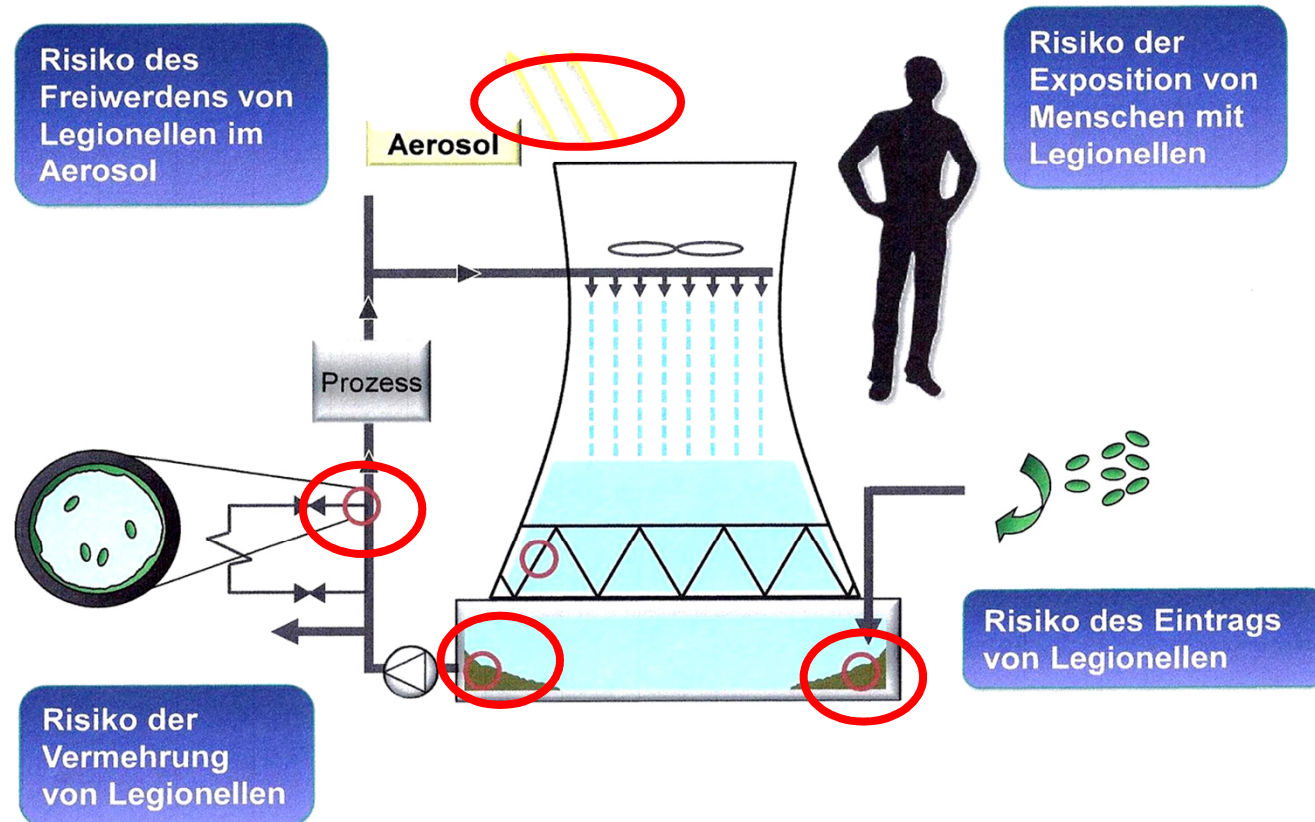
- 1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).**
- 2. Entstehung von Biofilmen & Biofouling - Genese.**
- 3. Mikroorganismen im Biofilm: Bakterien und deren Ökosystem.**
- 4. *Quorum sensing*, Inhibition und Interaktion zwischen Wassermikroorganismen.**
- 5. Analytische Methoden – Nachweis von Bakterien im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

Kühlturm Anlagen



Potsdam, 17.09.2015

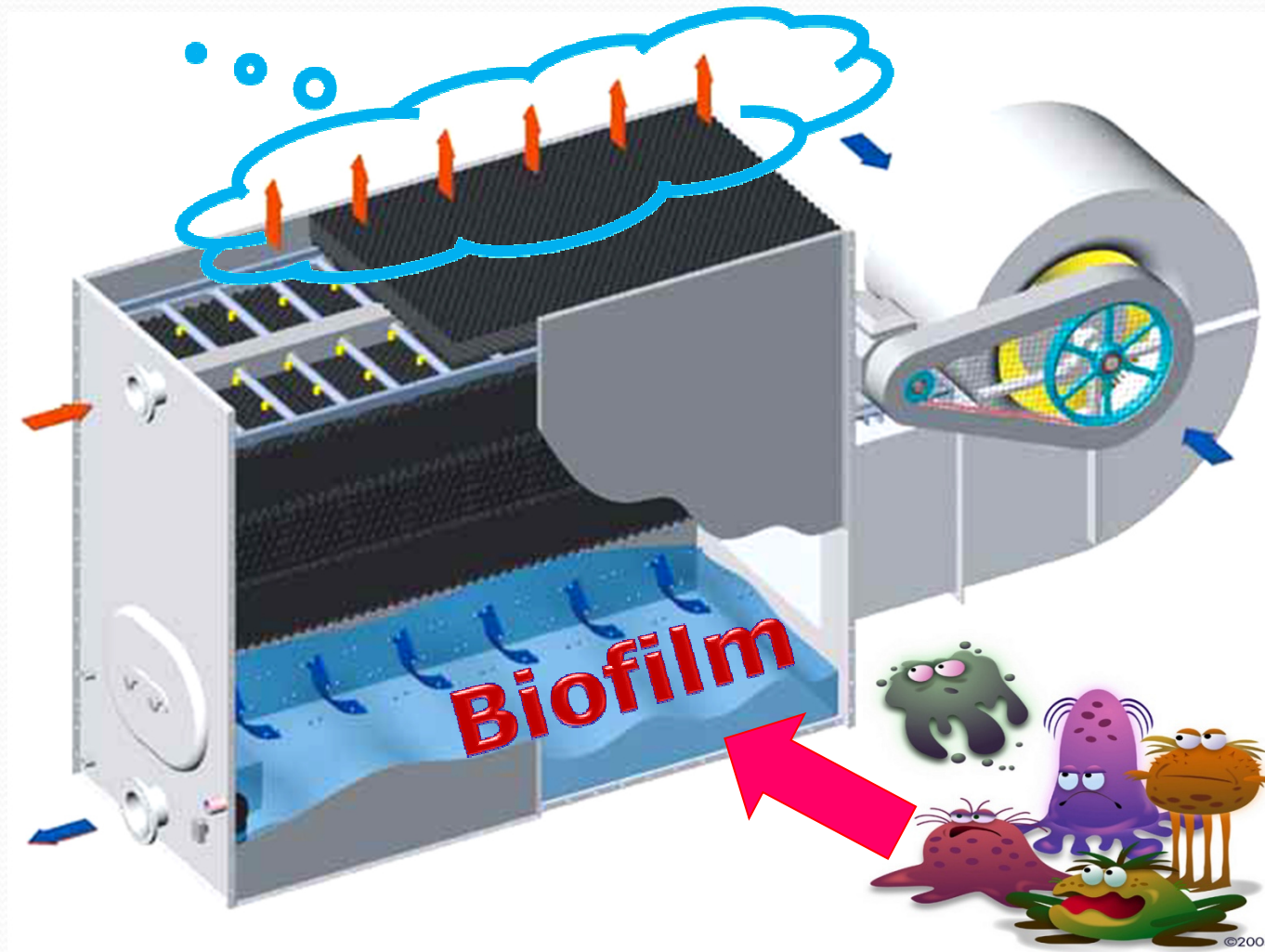
Risikobetrachtung Rückkühlwerke



Nach Dr. S. Schult, IWW-Kolloquium Mülheim

Potsdam, 17.09.2015

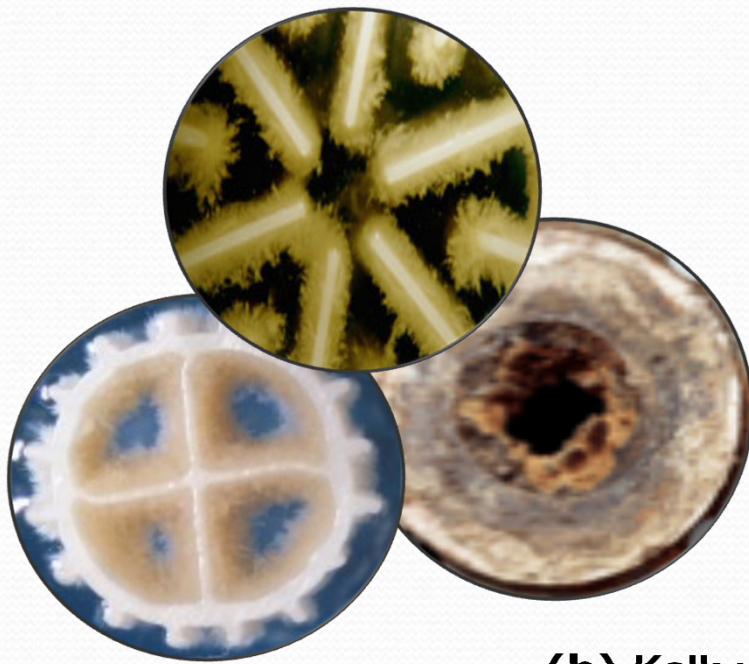
Direkte Kühlung mit offenem Wasserkreislauf



Mögliche Infektionsquellen Kontamination: Erwärmtes Wasser und Aerosol Biofilme in technischen Apparaten

Biofilme getroffen in technischen Anlagen:

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



(a) Bündelwärmetauscher,
(b) Kalk und Biofilm mit unterschiedlichen Mikroorganismen.

Nachteilige Effekte von Biofilmen in Kühlwassersystemen

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

Inhalt:

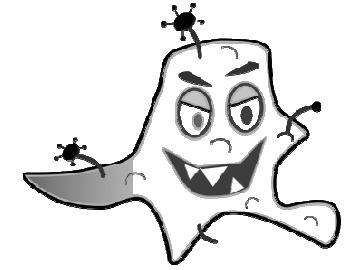
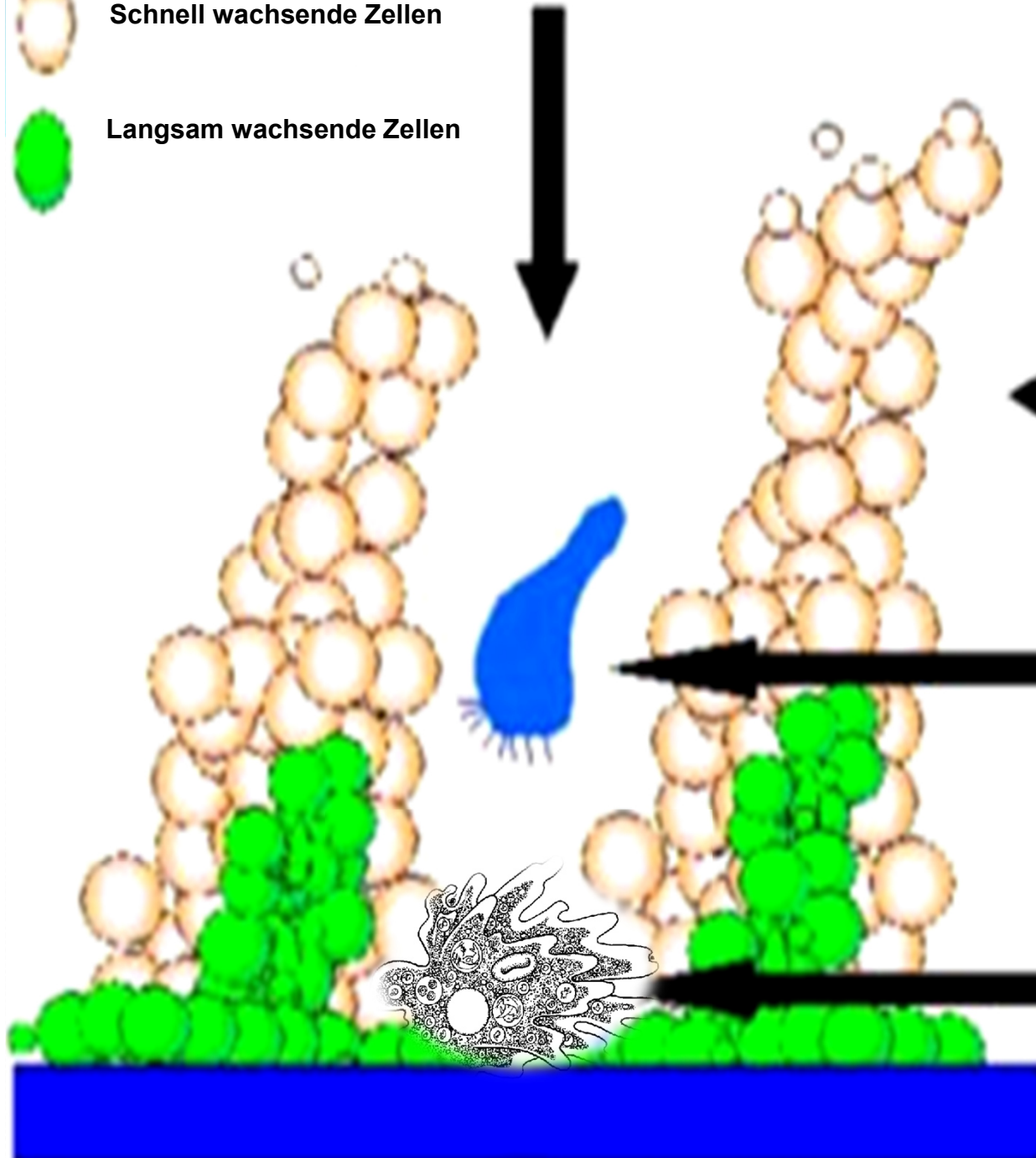
1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).
2. Entstehung von Biofilmen & Biofouling - Genese.
3. Mikroorganismen im Biofilm: Bakterien und deren Ökosystem.
4. „Quorum sensing“, Inhibition und Interaktion zwischen Wassermikroorganismen.
5. Analytische Methoden – Nachweis von Bakterien im Kühlturmwasser.



Schnell wachsende Zellen

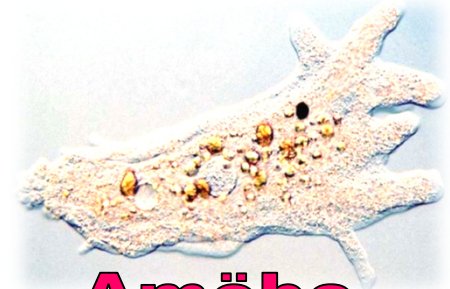


Langsam wachsende Zellen



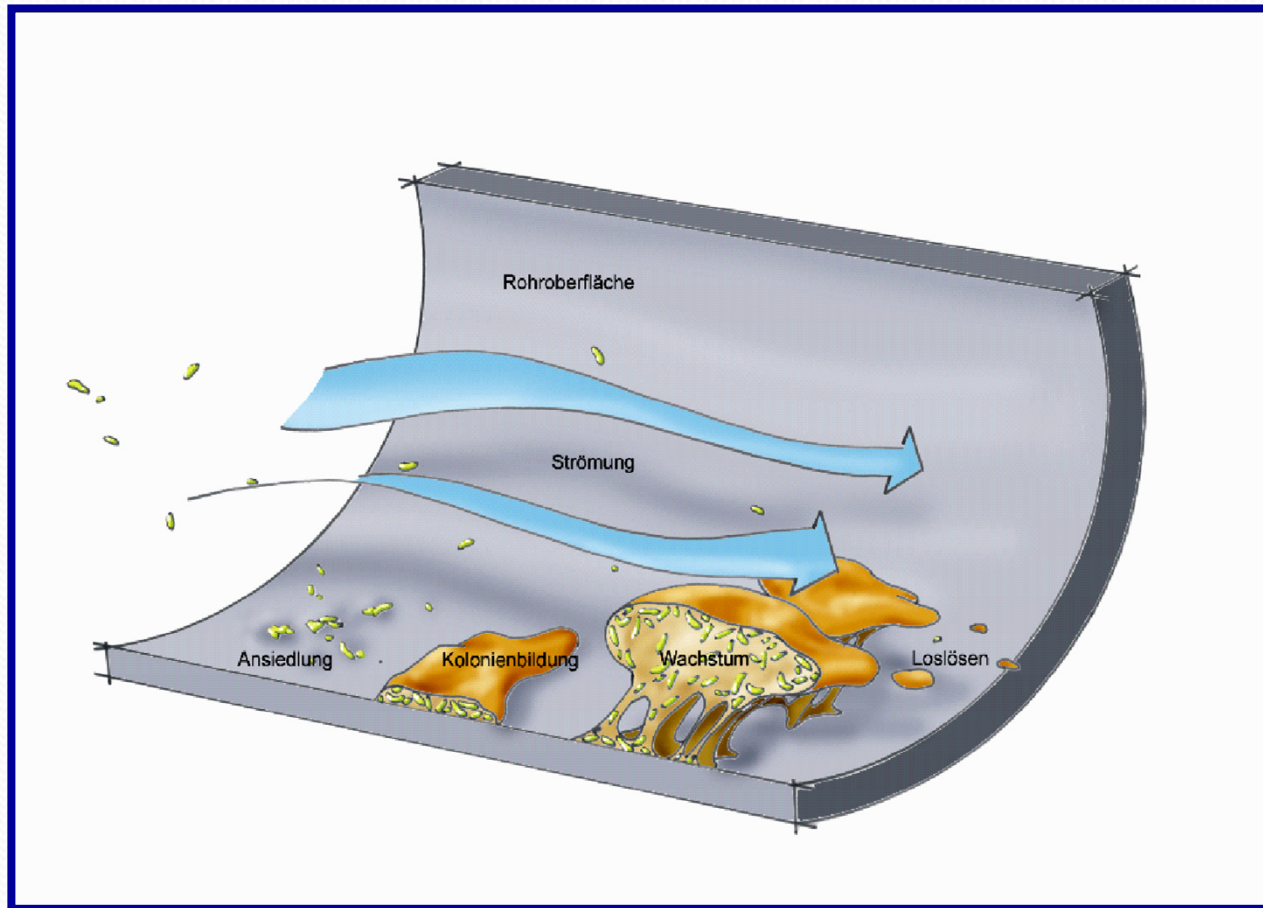
Mikrokolonie

Protozoa



Amöbe

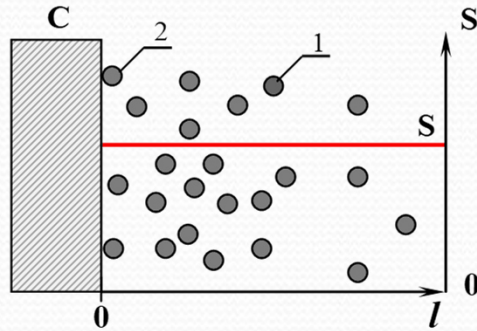
Extrazelluläres Polysaccharide Matrix - Biofilm in Kühlswassersystemen



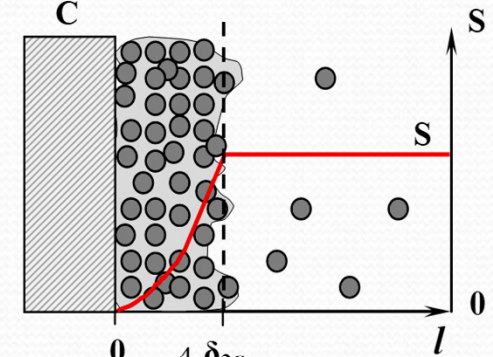
Potsdam, 17.09.2015

Stadium der Biofilm Wachstum

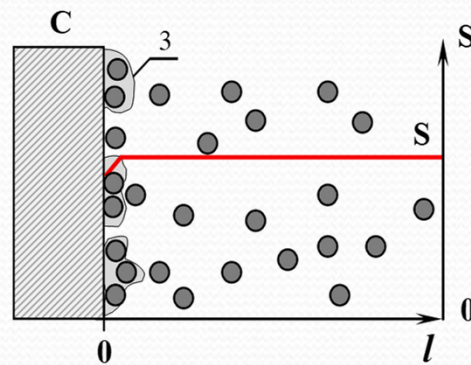
Stadium 1



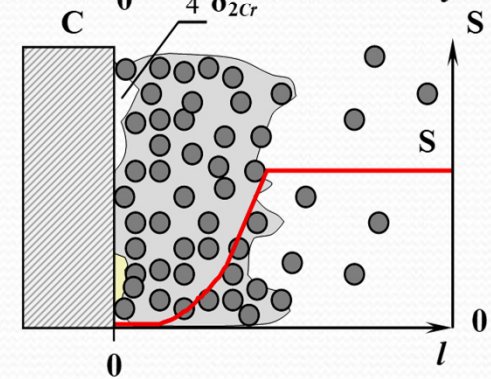
Stadium 4



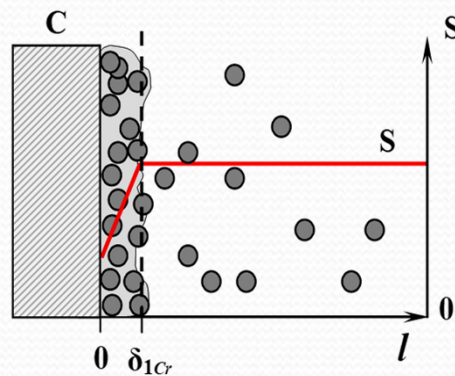
Stadium 2



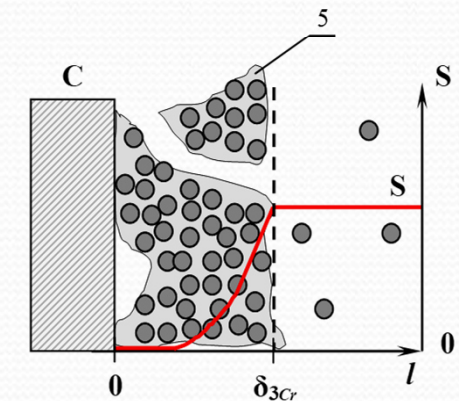
Stadium 5



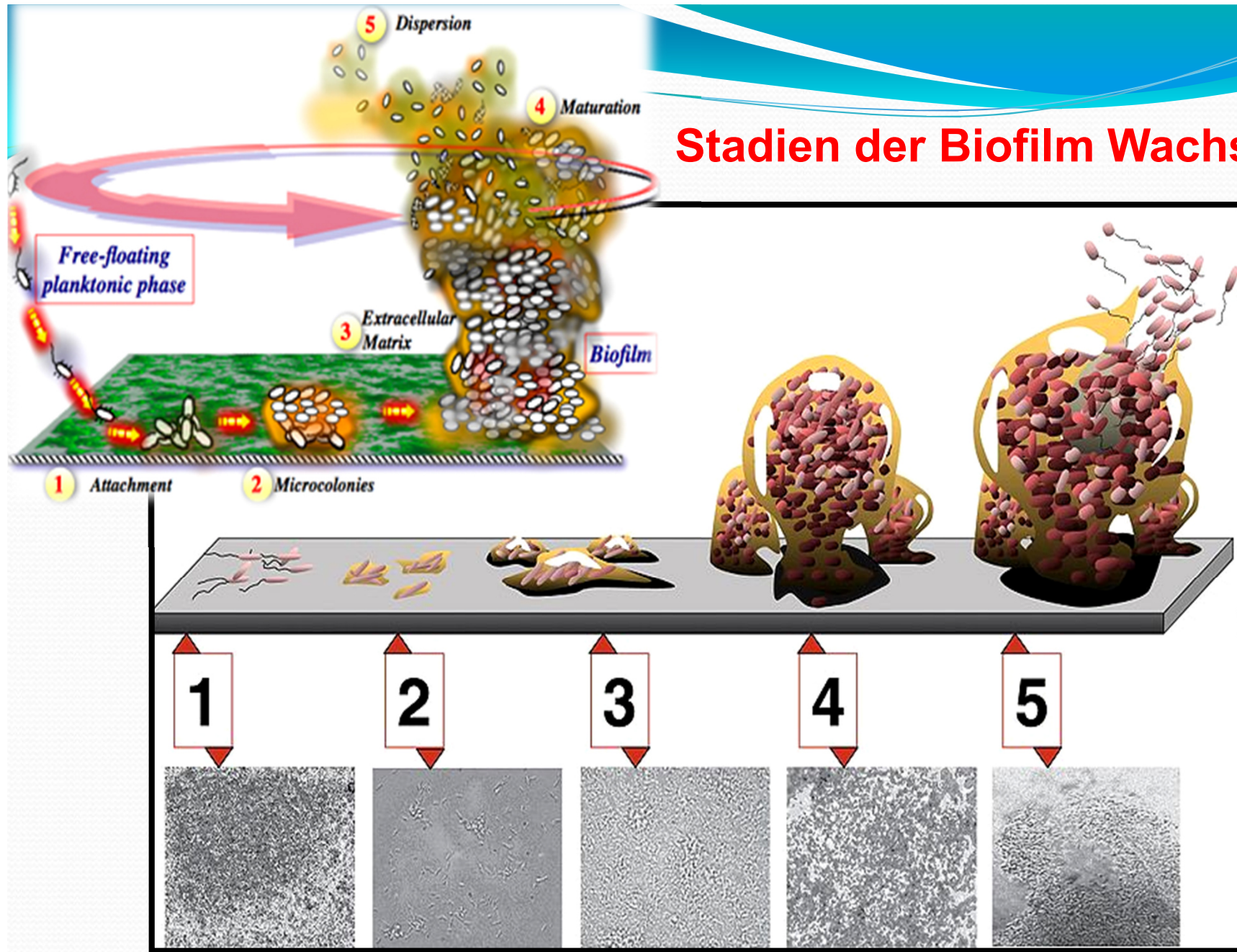
Stadium 3



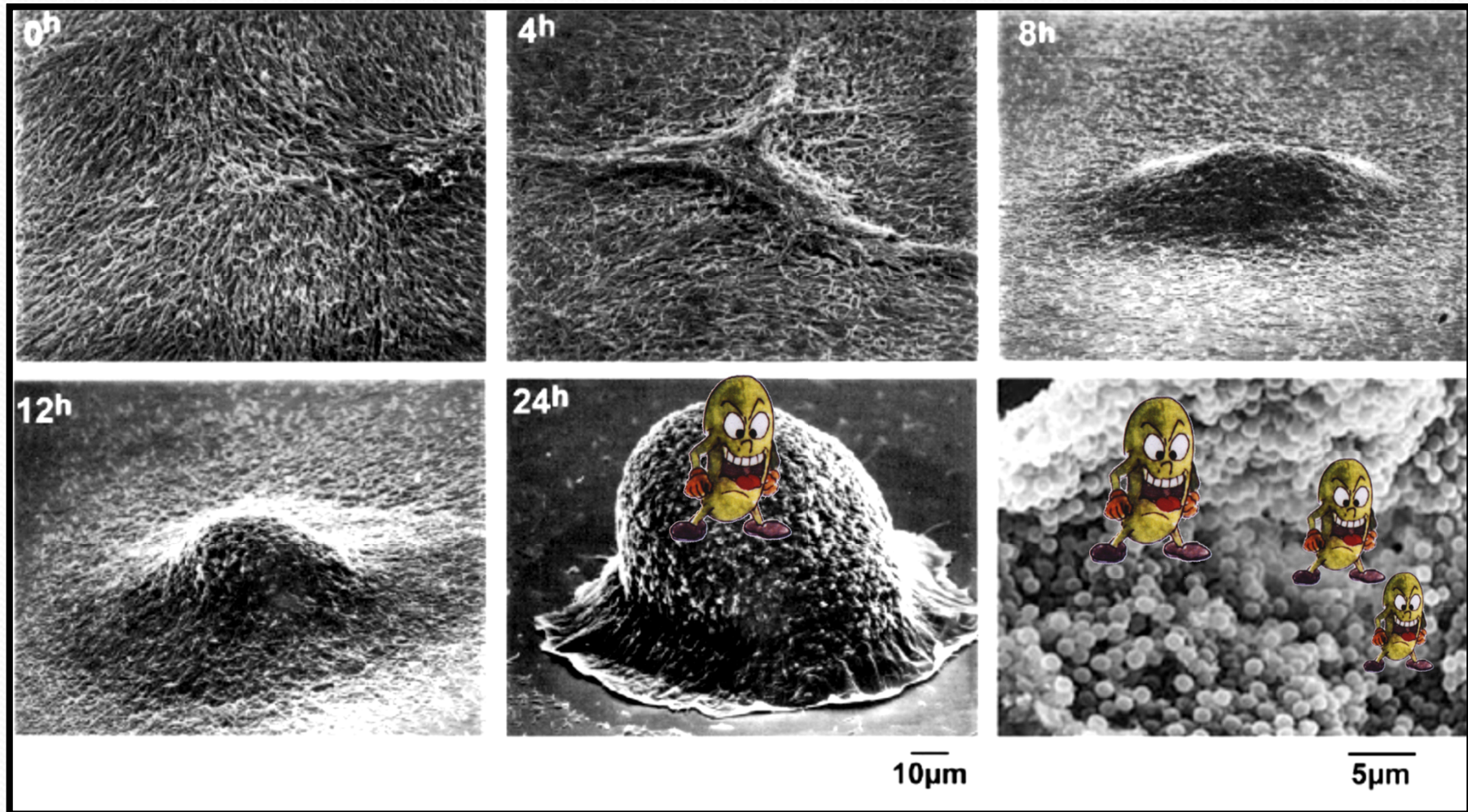
Stadium 6



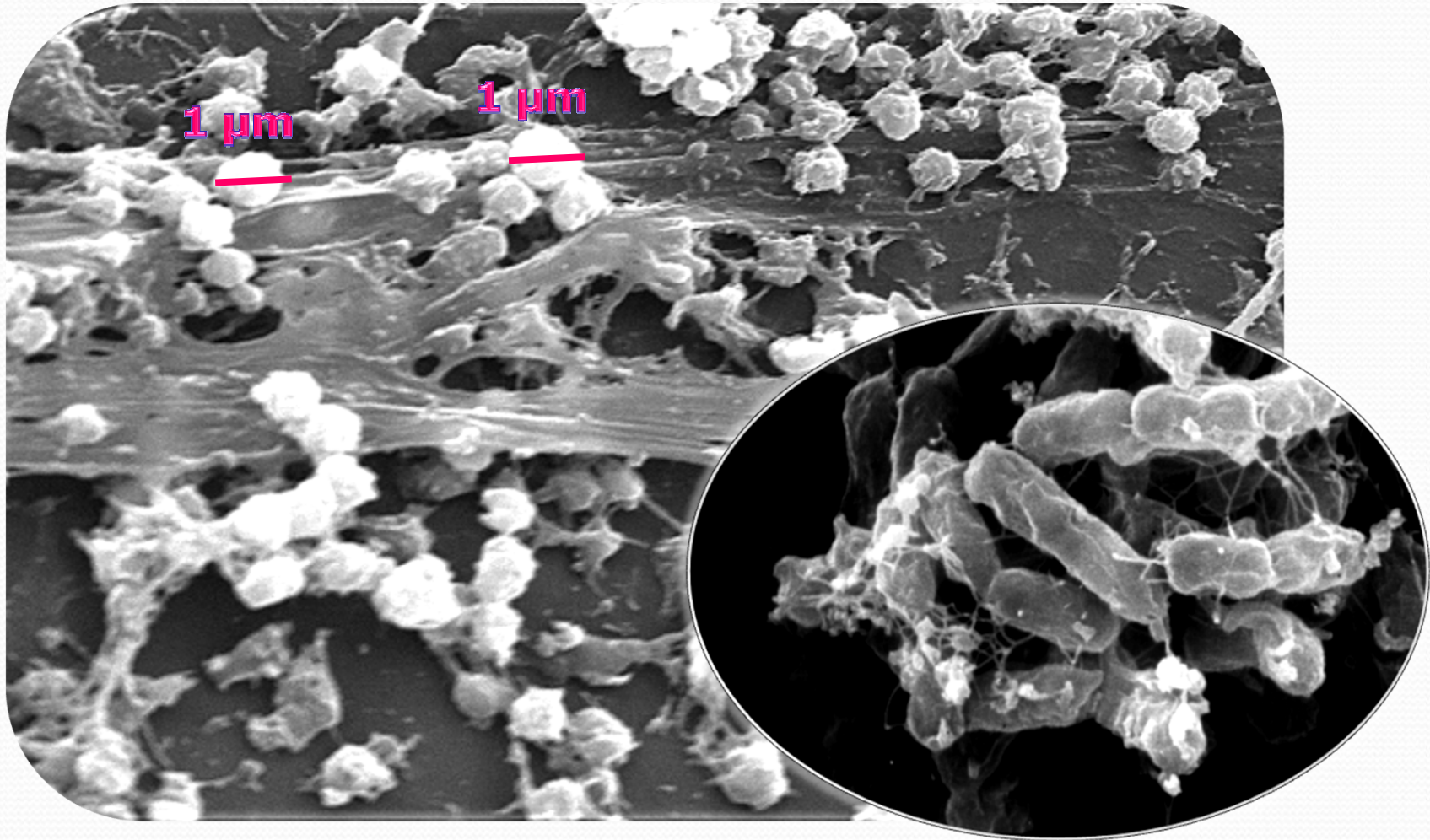
Stadien der Biofilm Wachstum



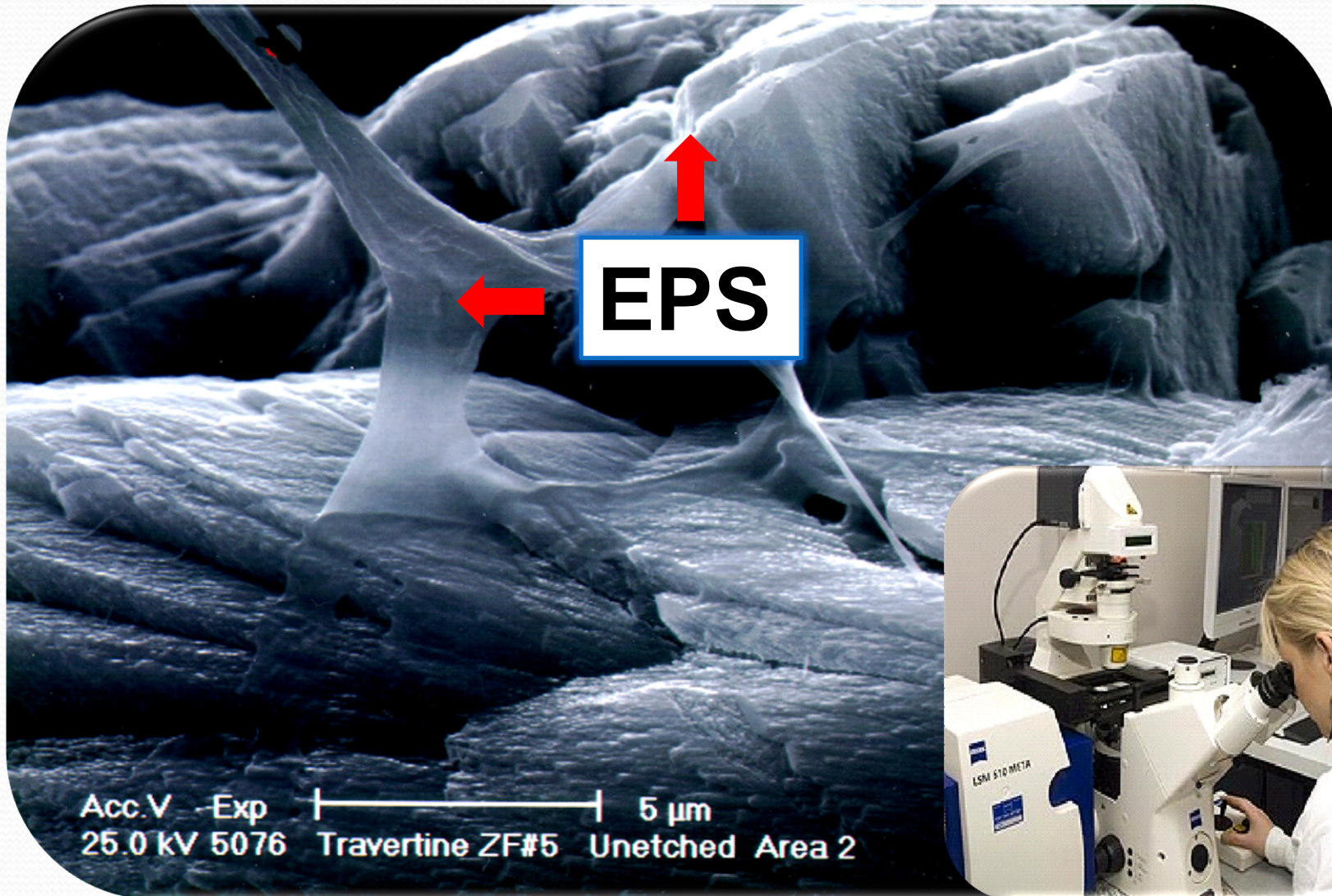
Biofilmwachstum - Matrix EPS, z.B. *Pseudomonas* spp.



Aerobe Bakterien *Pseudomonas* spp. produzierende EPS für Biofilm



Extrazelluläres Polysaccharide Matrix - Biofilm



Potsdam, 17.09.2015

EPS, Mukoid von *Pseudomonas aeruginosa*

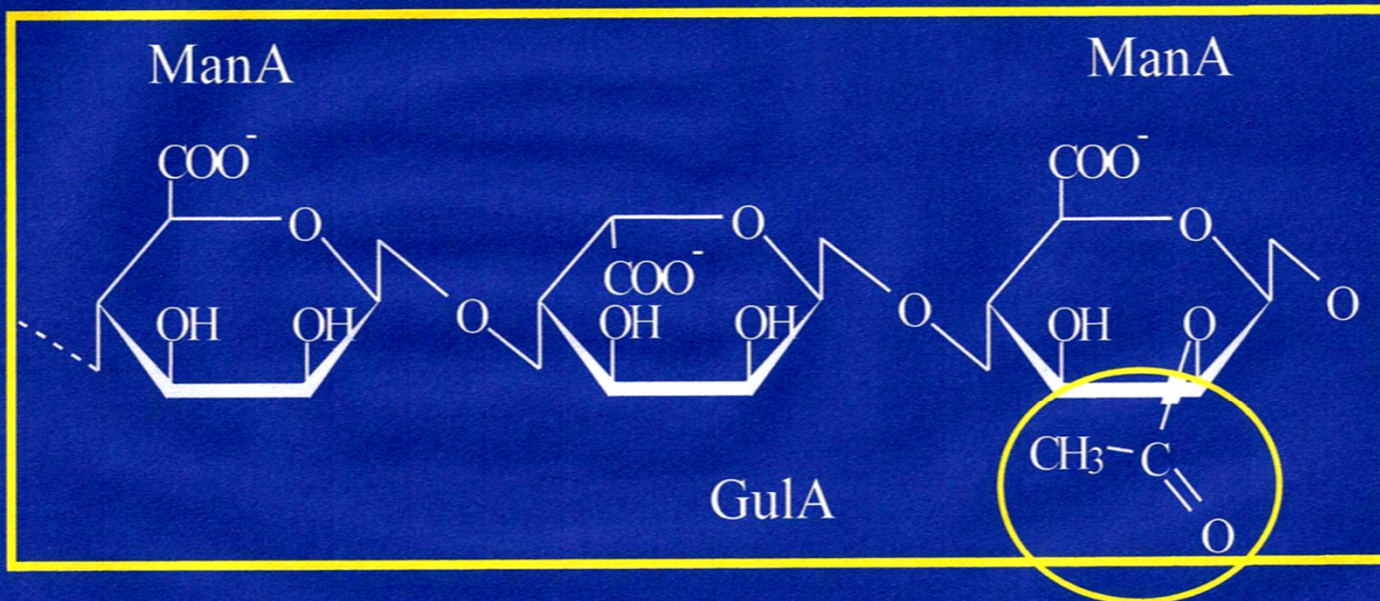
Distribution	in cells	in EPS
Polysaccharides	19,8 %	79,2 %
Uronic acids	15,0 %	85,0 %
Proteins	58,4 %	41,6 %

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 %

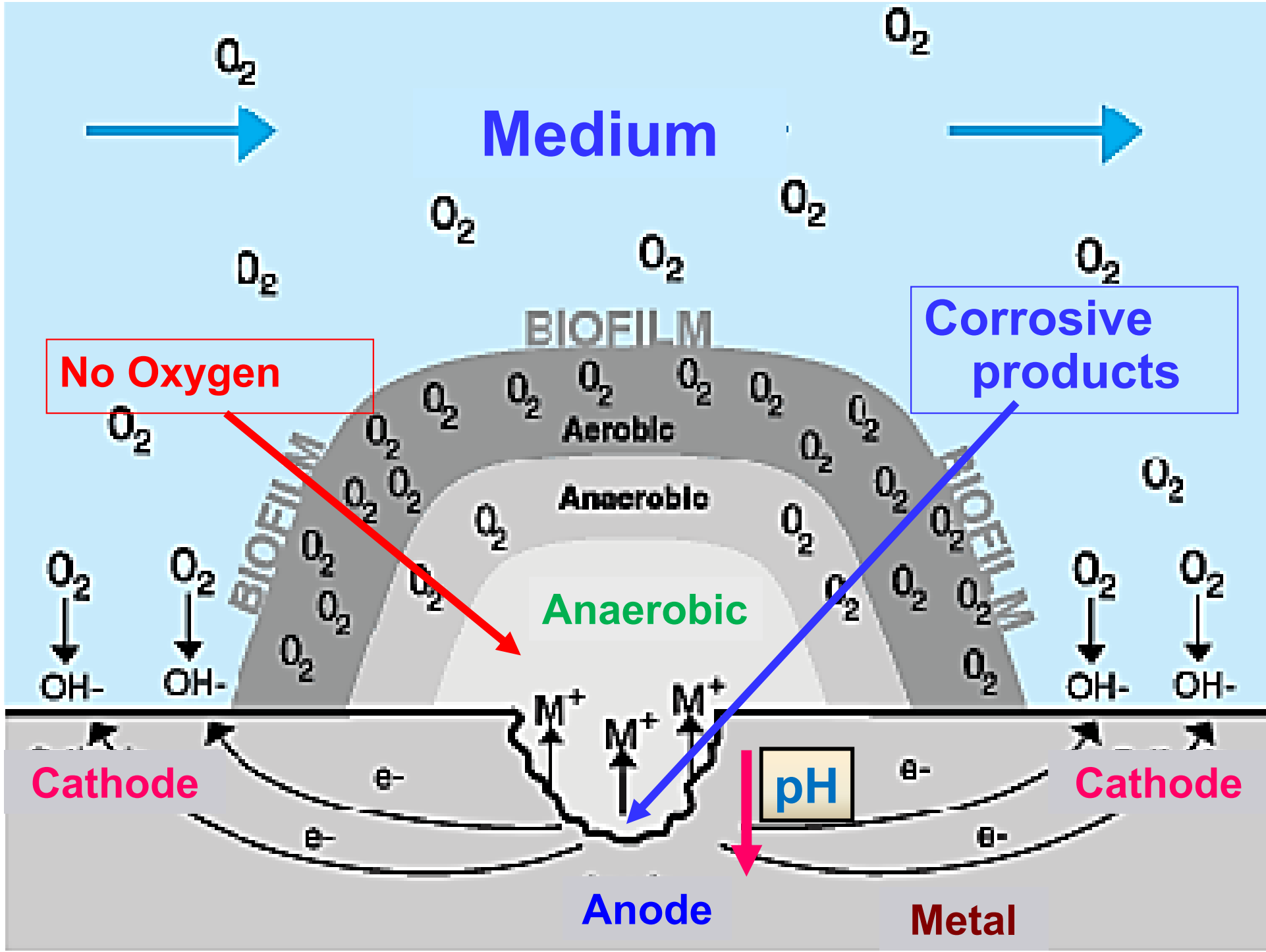
Alginate von *Pseudomonas aeruginosa*

(different from algal alginate!)



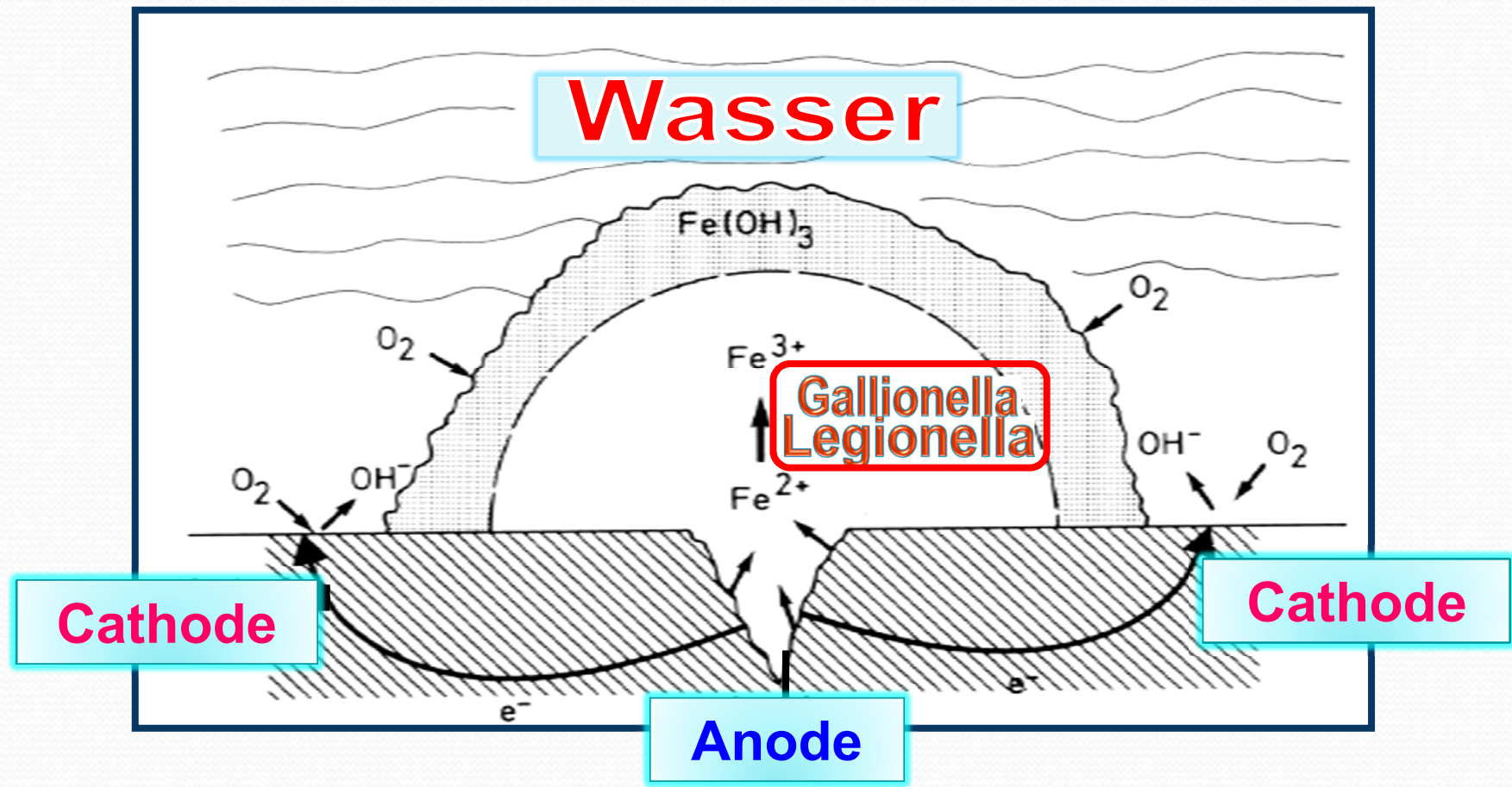
ManA, β -D-mannuronate; GulA, α -L-guluronate

Yellow circle: acetyl groups in alginate, bound to ManA



Biokorrosion von Metalle

Aerobische Bakterien wirken auf Korrosion



Ablagerung in Warmwassersystemen

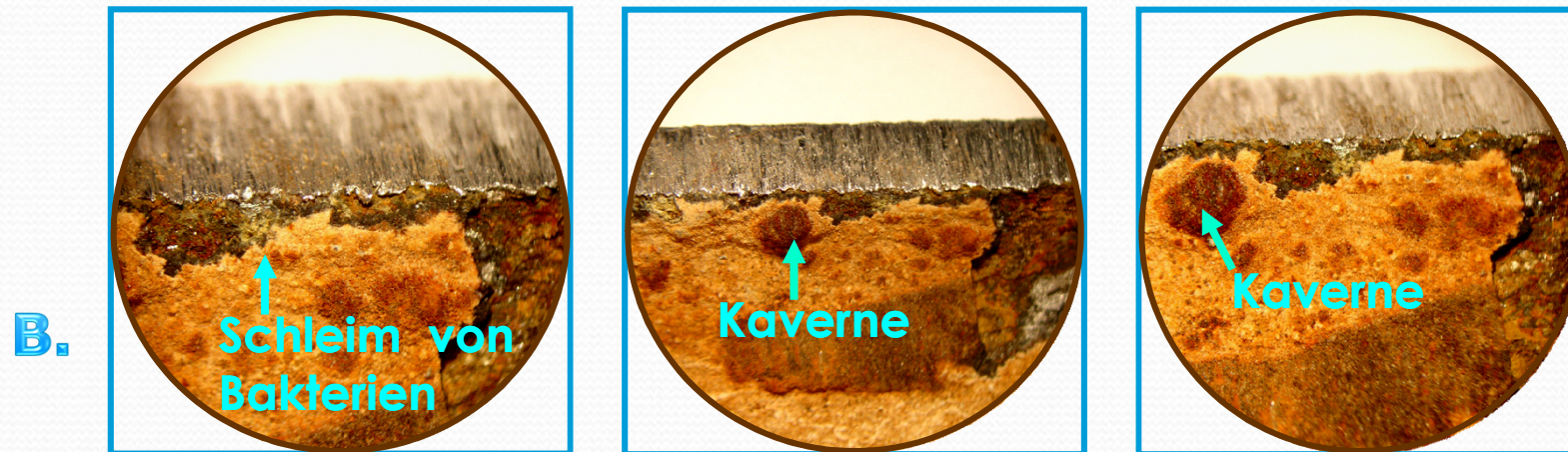


Bild von Innerleitung für Warmwasser:

(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.



Manche Bakterien produzieren einen Biofilm, sobald genügend Akteure zusammen sind.

Pseudomonas aeruginosa



Potsdam, 17.09.2015

Pigmente von *Pseudomonas aeruginosa*



*Pseudomonas
aeruginosa*



Fluorescein oder
Pyoverdin (gelb)

Fluorescenz

Farbumschlag

Pyocyanin
(blau-grün)

Pyorubin
(rot-braun)

Toxine !!!

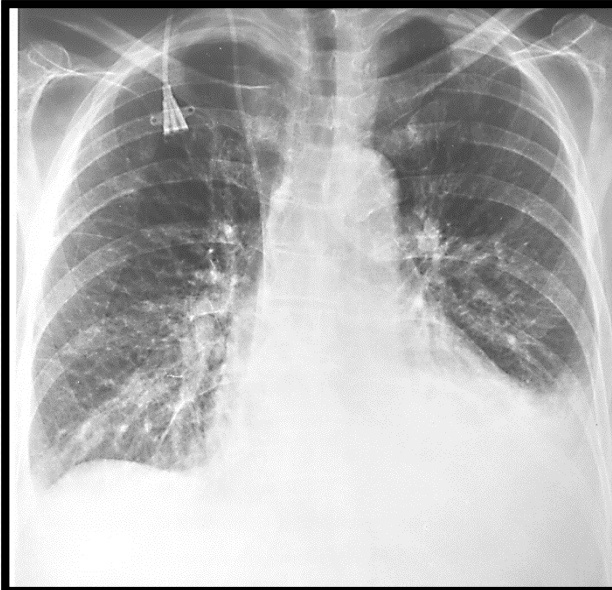


Pseudomonas aeruginosa **Hygienische und technische Relevanz**

- **Übiquitär vorkommendes, feuchtigkeitsliebendes Bakterium, guter Schleimbildner, Biofilmbildner,**
 - **Primärbesidler Boden, Pflanzen, Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser;**
 - **Geringe Nährstoffansprüche Vermehrung im Temperaturbereich von 10°C – 42°C;**
- **Opportunistischer Krankheitserreger (Infektion des Ohres und der Haut, Bindehautentzündungen, Magen-Darm-Erkrankungen, Lungenentzündung, Harnwegs- und Wundinfektionen).**

***Pseudomonas aeruginosa* - Infektionen**

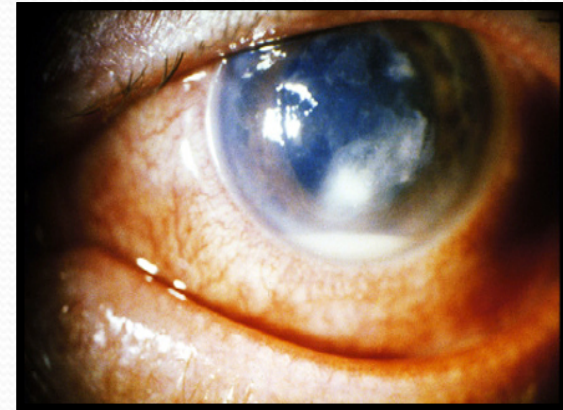
Nosocomial pneumonia



Ear piercing infections



Contact lens associated corneal ulcer



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



Hot tub dermatitis

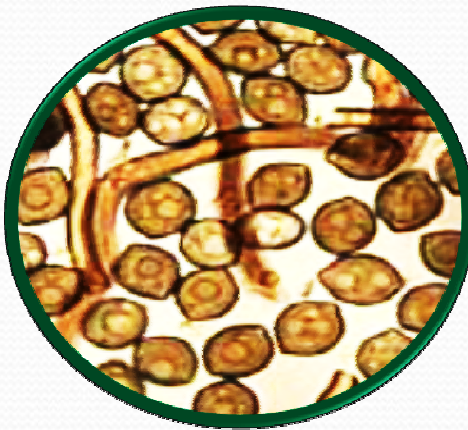


Folliculitis

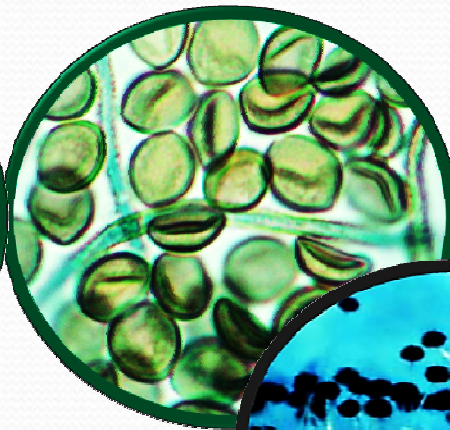


Schimmelpilze in Biofilmen technischer Wassersysteme

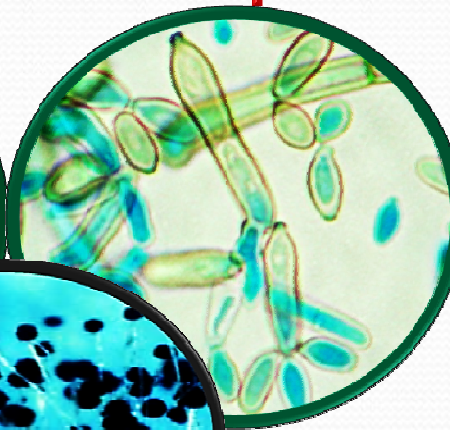
Eurotium



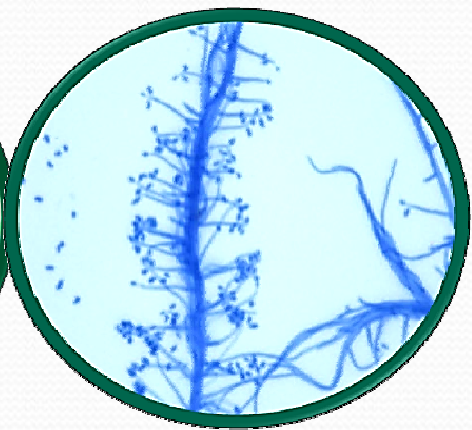
Chaetomium



Cladosporium



Acremonium



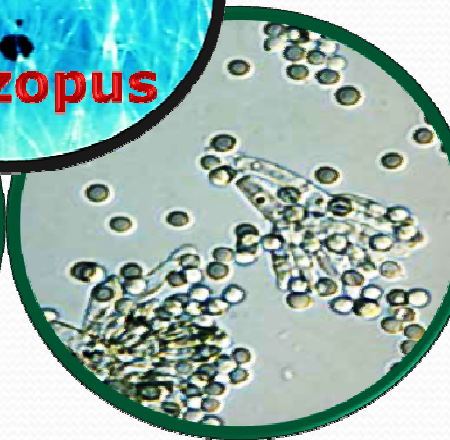
Rhizopus



Fusarium



Curvularia

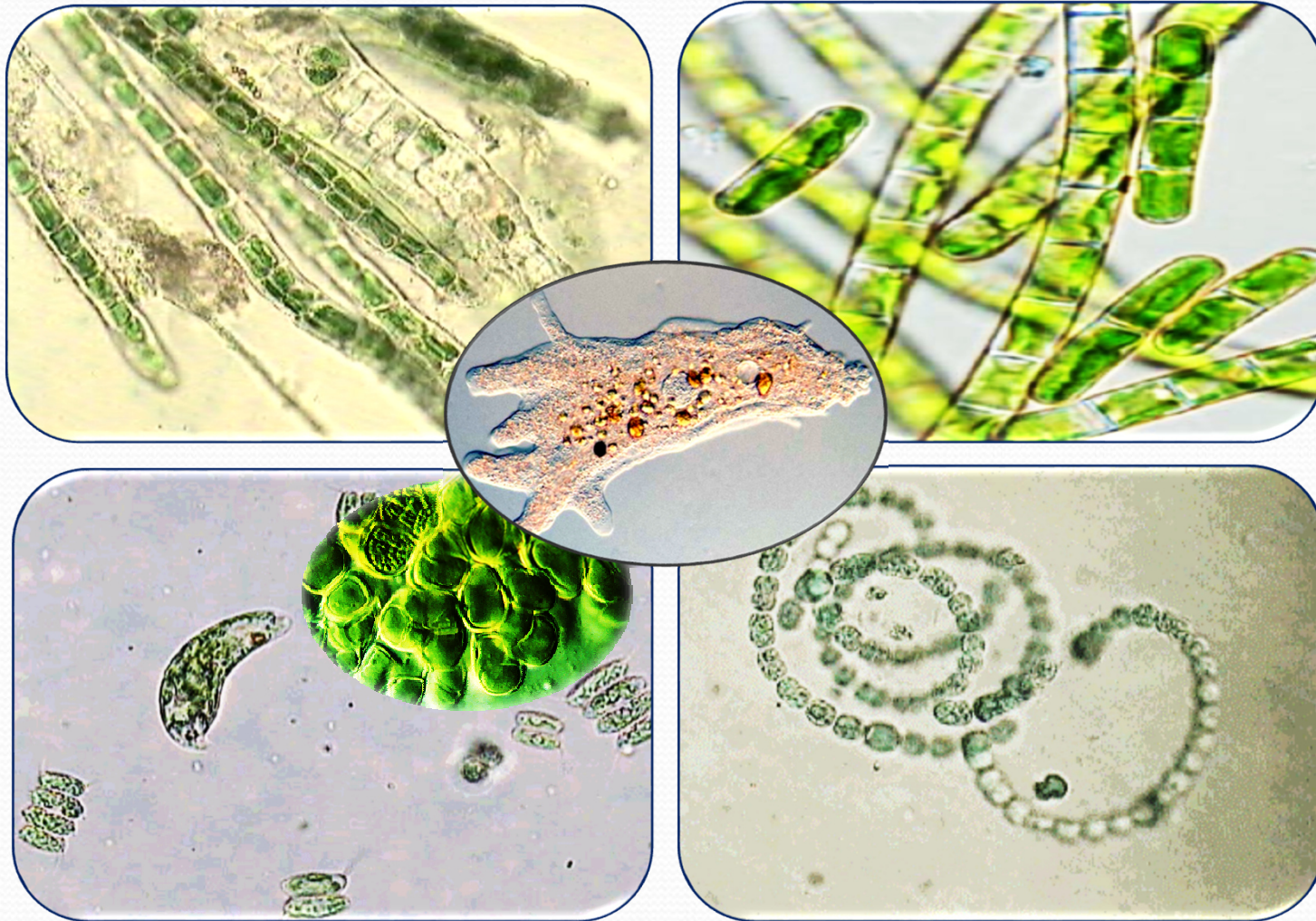


Penicillium



Alternaria

Algen und Amöben in Biofilmen

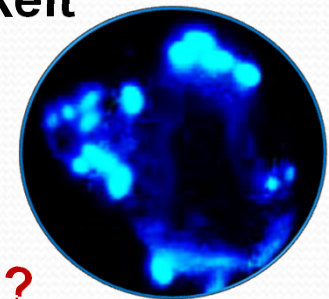


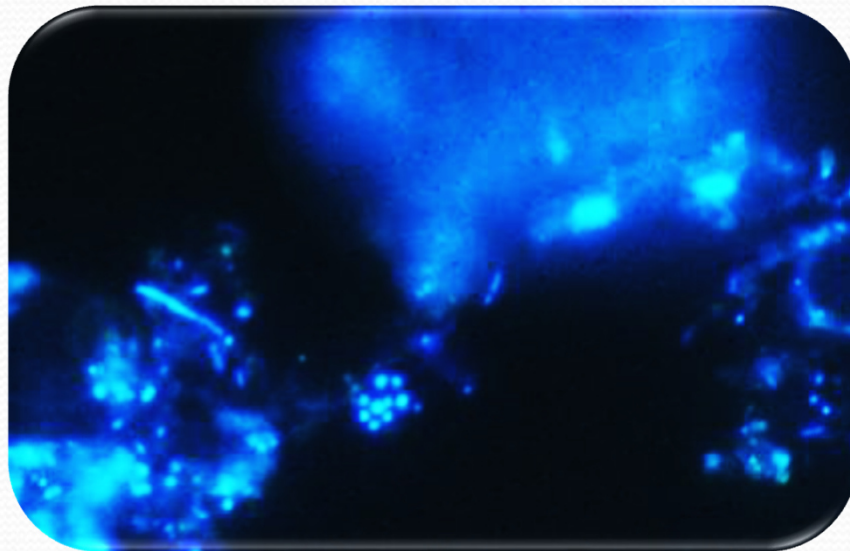
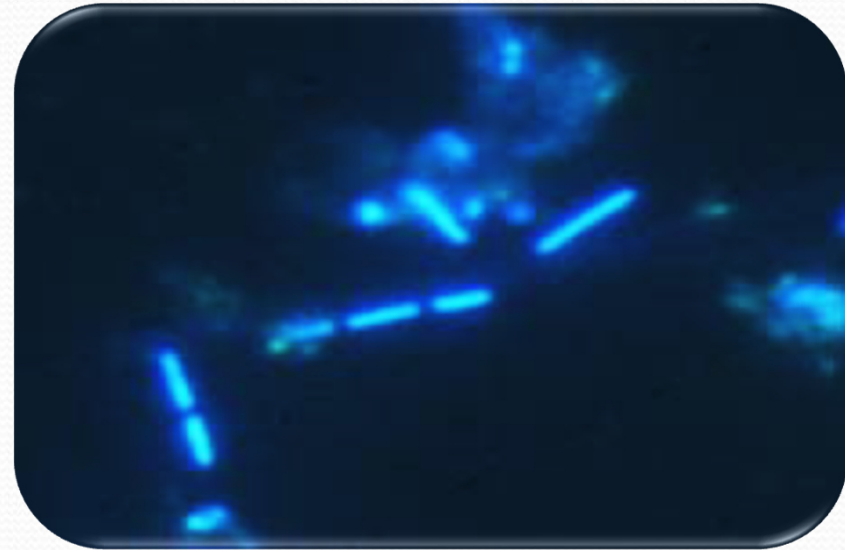
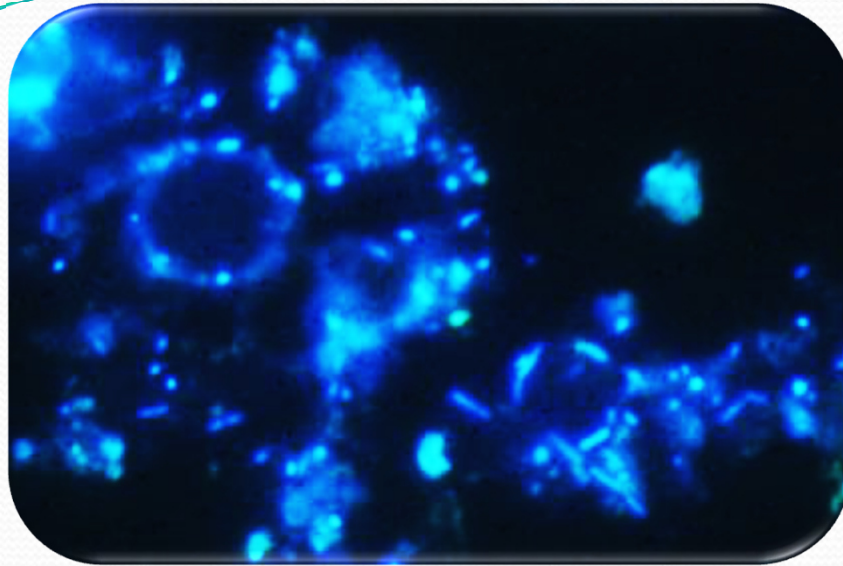
Potsdam, 17.09.2015

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 mit andere Bakterien-Spezies in Biofilm?

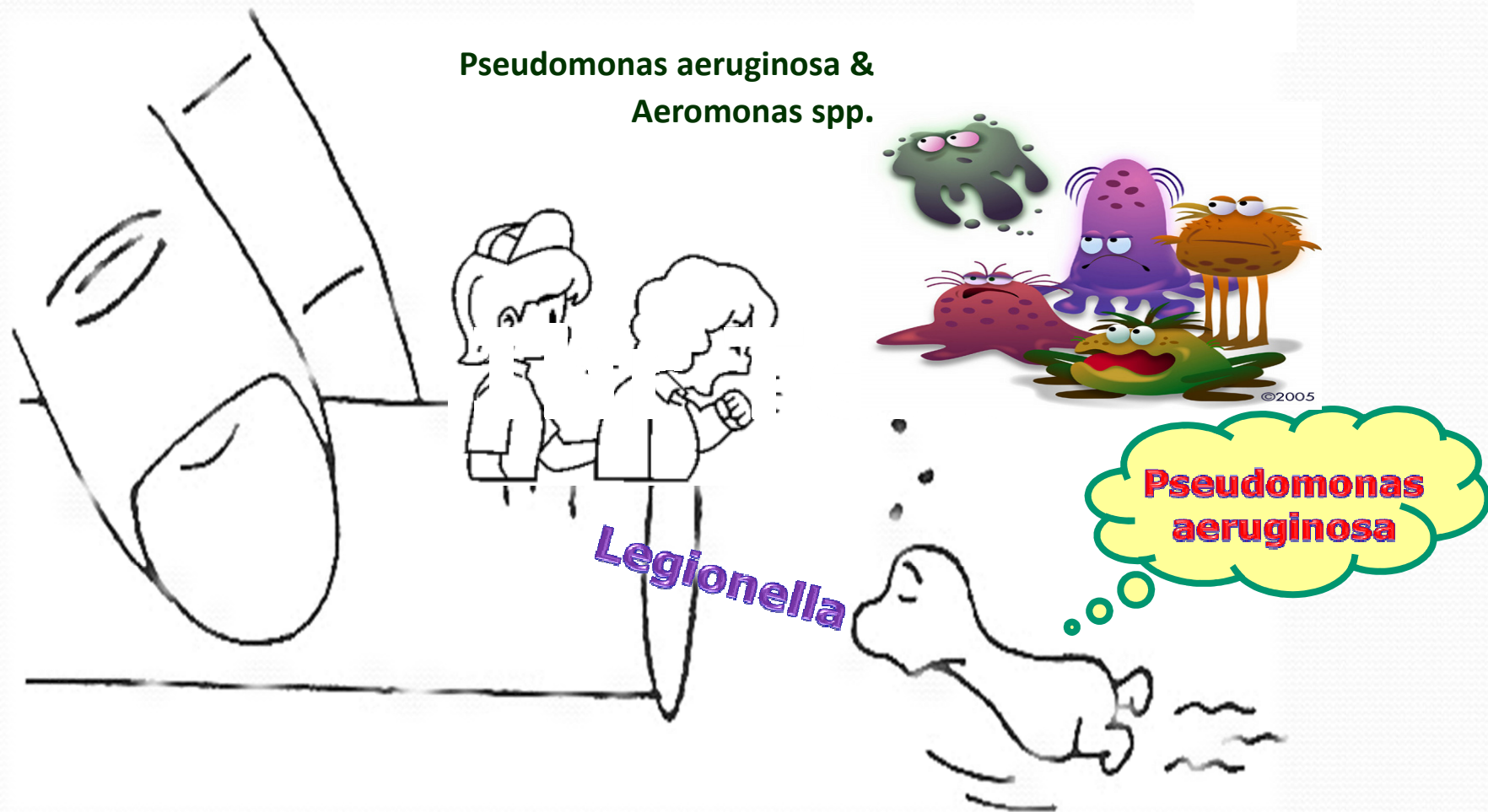




**Mikroskopische Bild:
Bakterien in Biofilm, gefärbt mit DAPI,
1000x magnification**

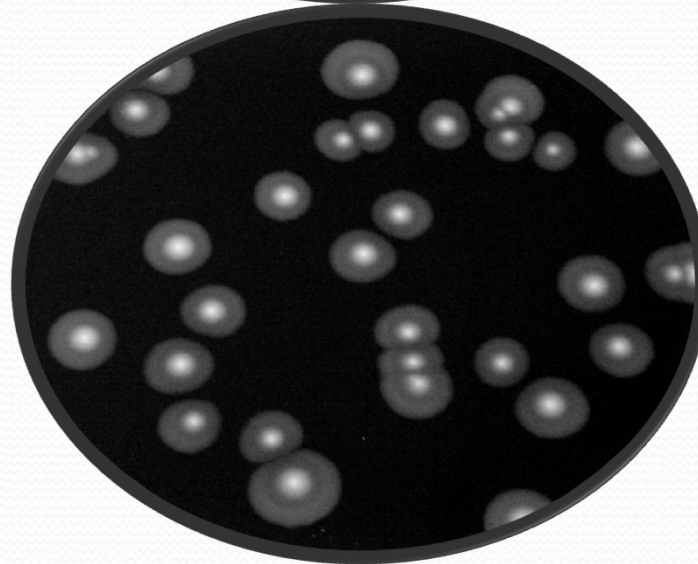
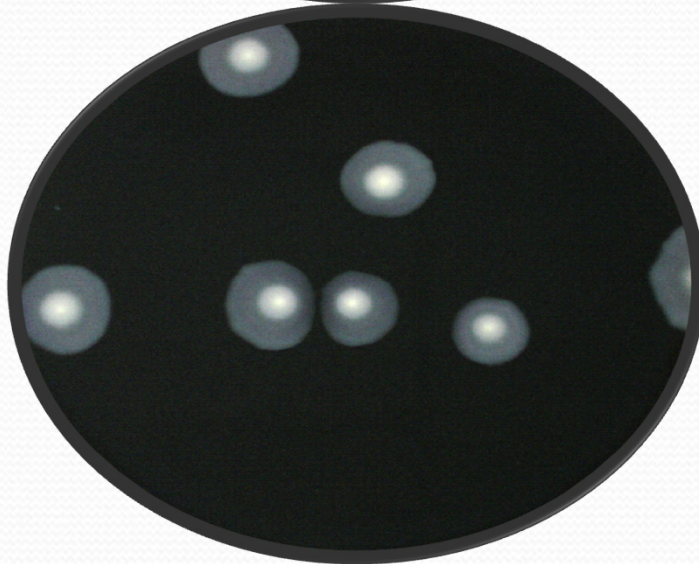
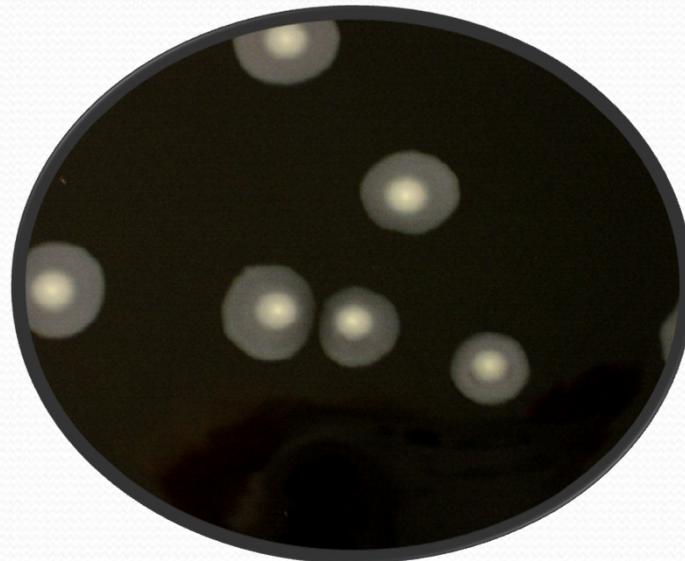
**Epifluorescence Mikroskop:
Stäbchen und Spirale**

Regelmäßige Kontrollen sind unverzichtbar



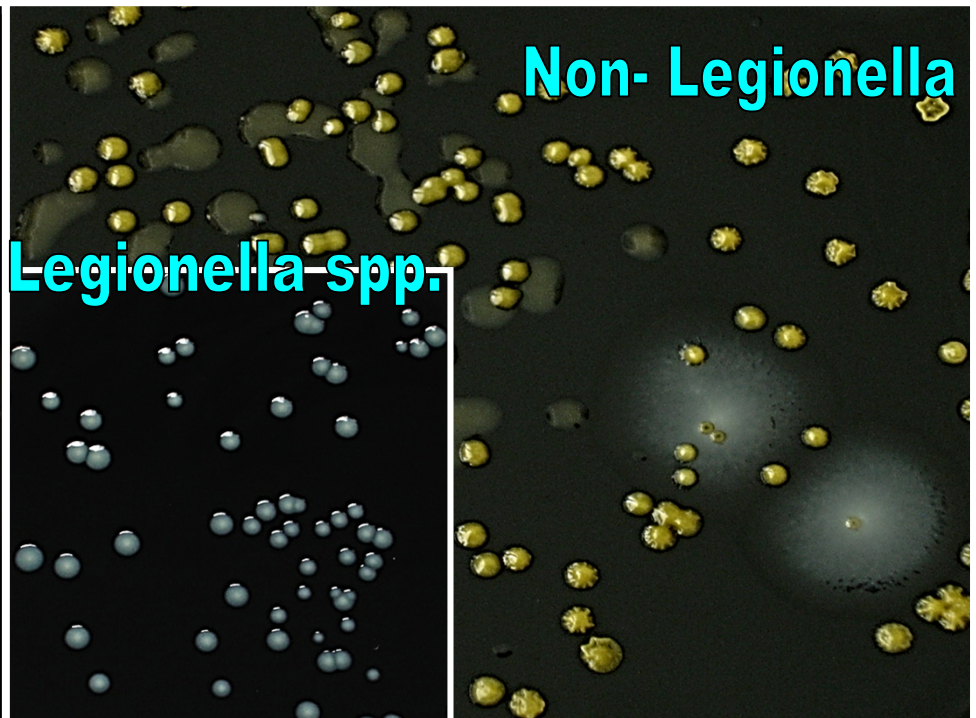
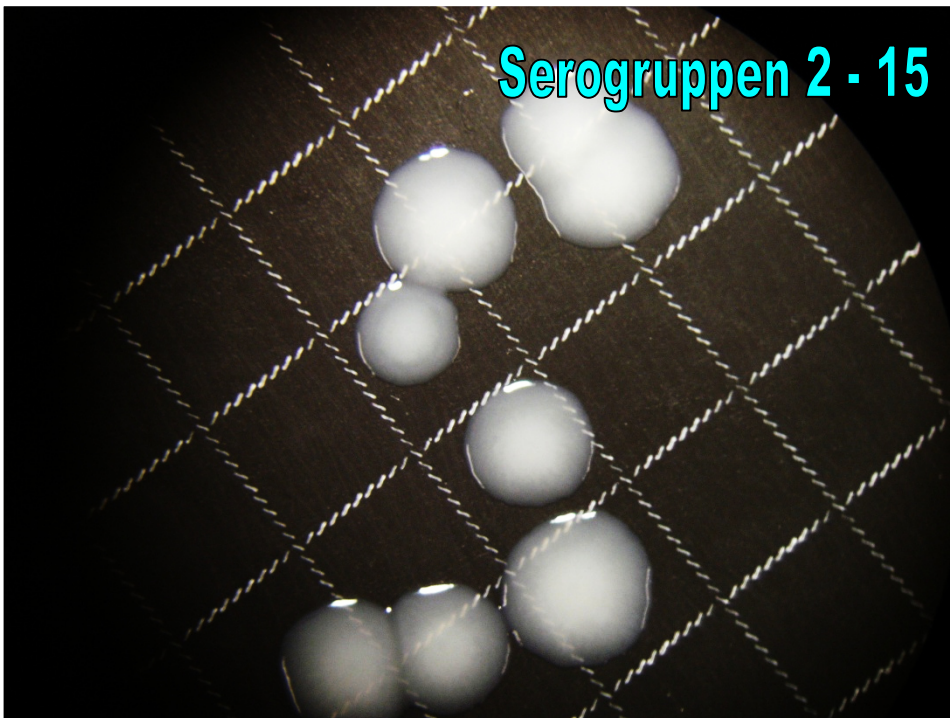
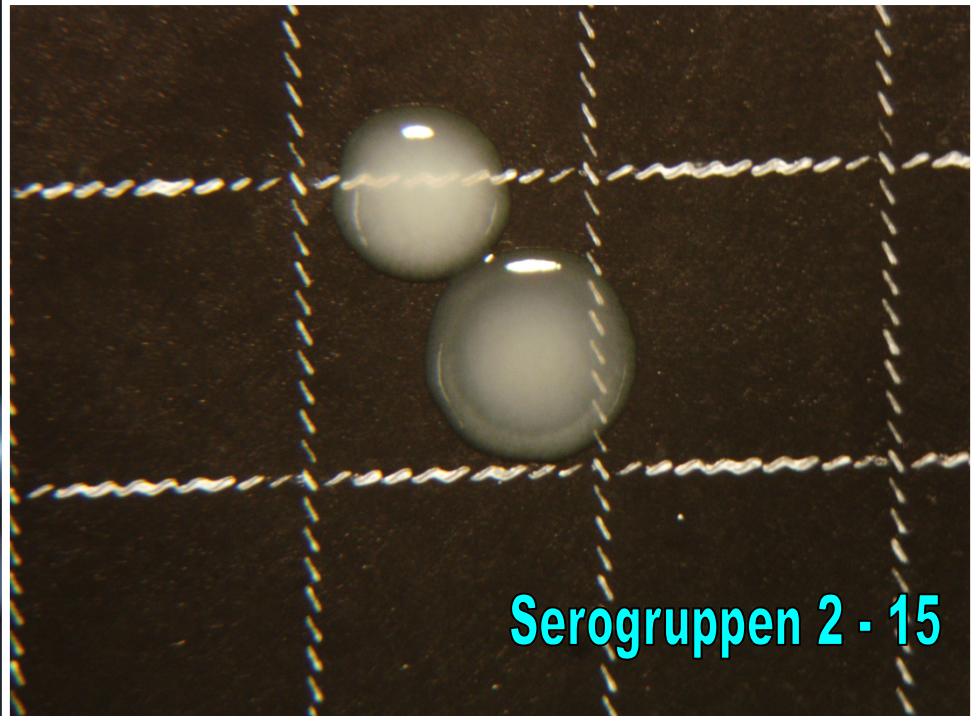
Was produzieren *Pseudomonas aeruginosa* gegen Legionellen?

Serogruppe 1

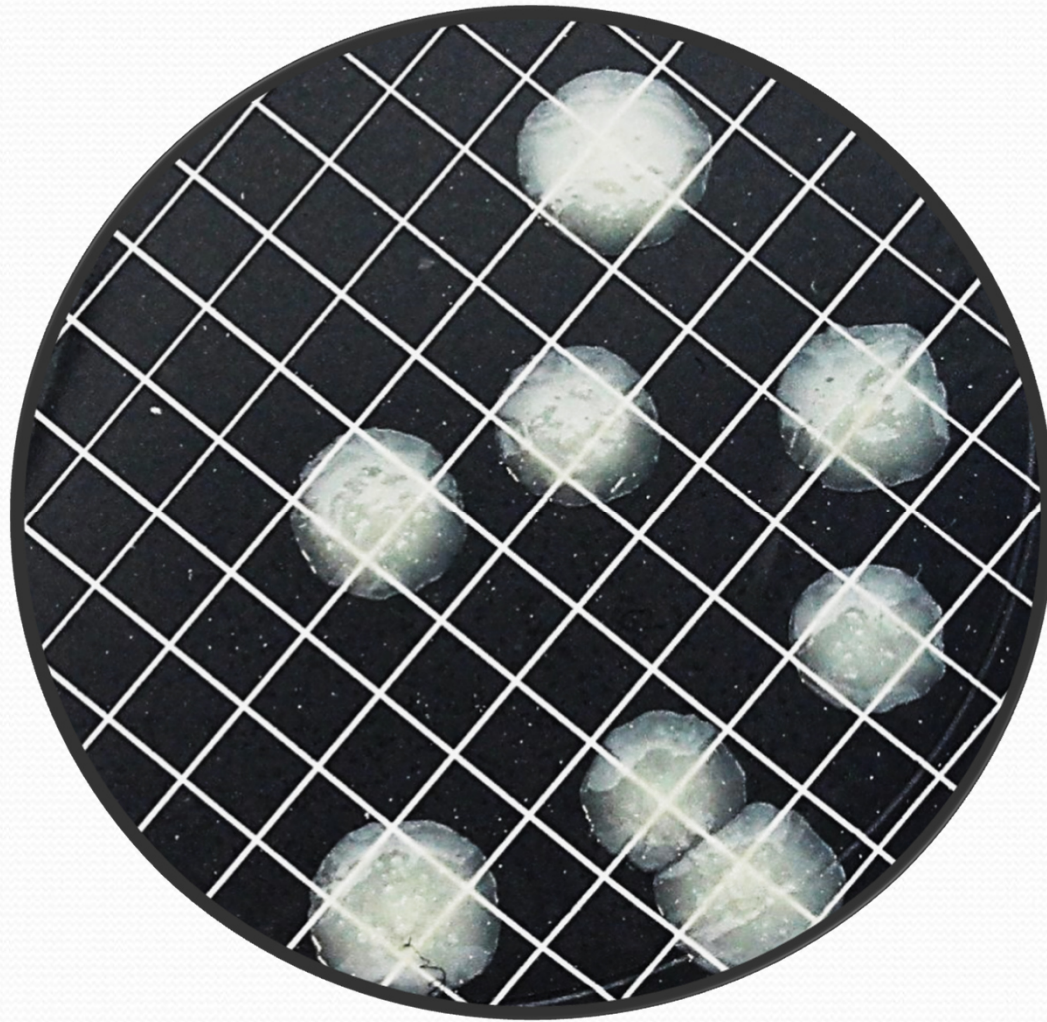


Legionella spp.: Nachweismethoden

- **Zusätzlich sehen wir in der Praxis Wachstum von Begleitflora auf GVPC-Agar, z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, *Xantomonas* sp., *Stenotrophomonas* und *Aeromonas* sp.). Dies kann das Zählergebnis verfälschen, z.B. durch Verdrängung von *Legionella* Kolonien oder sogar vollständiger Inhibition von *Legionella*-Wachstum.**



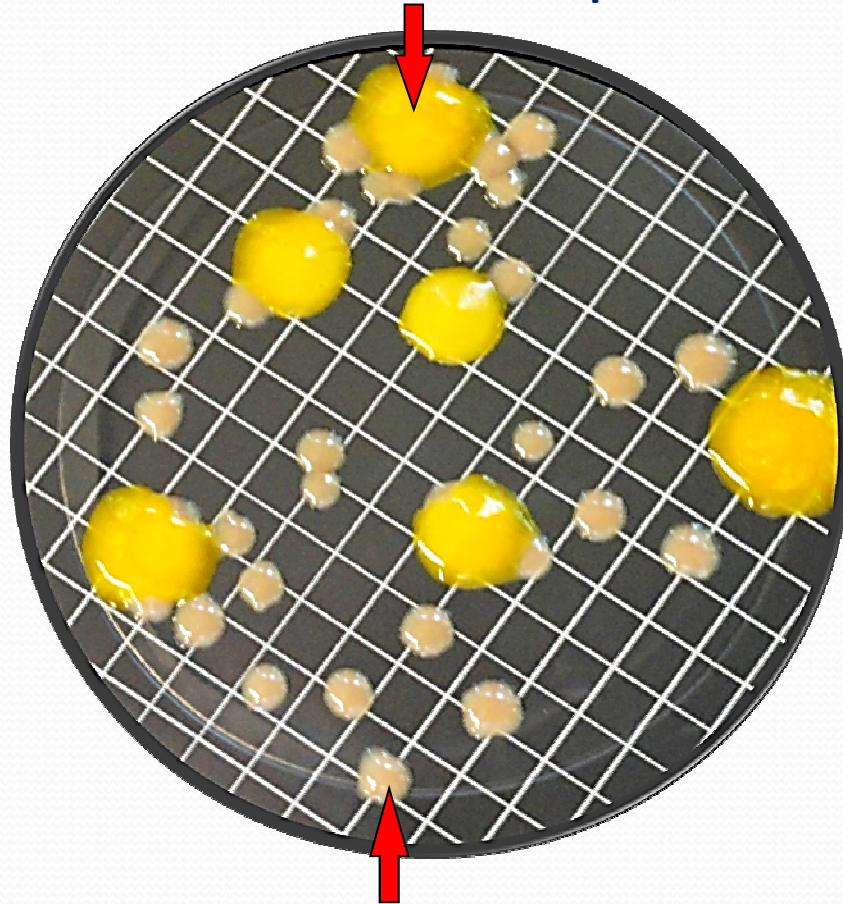
***Legionella pneumophila* Serogruppe 1**



Potsdam, 17.09.2015

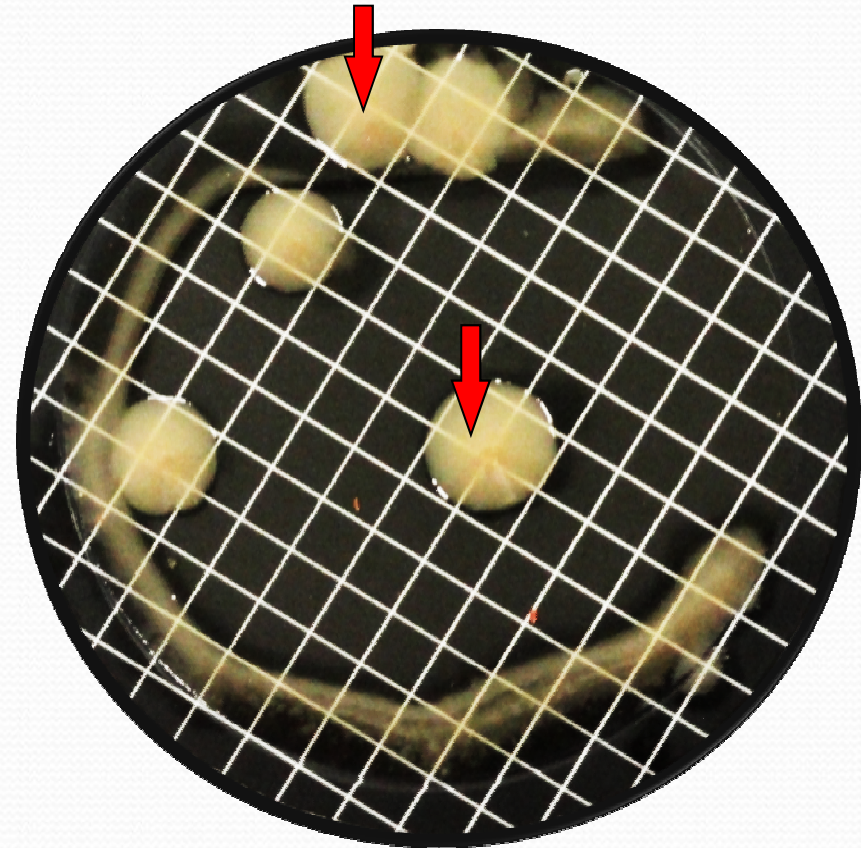
Begleitflora in Kühlturmwässern

Flavobacterium sp.

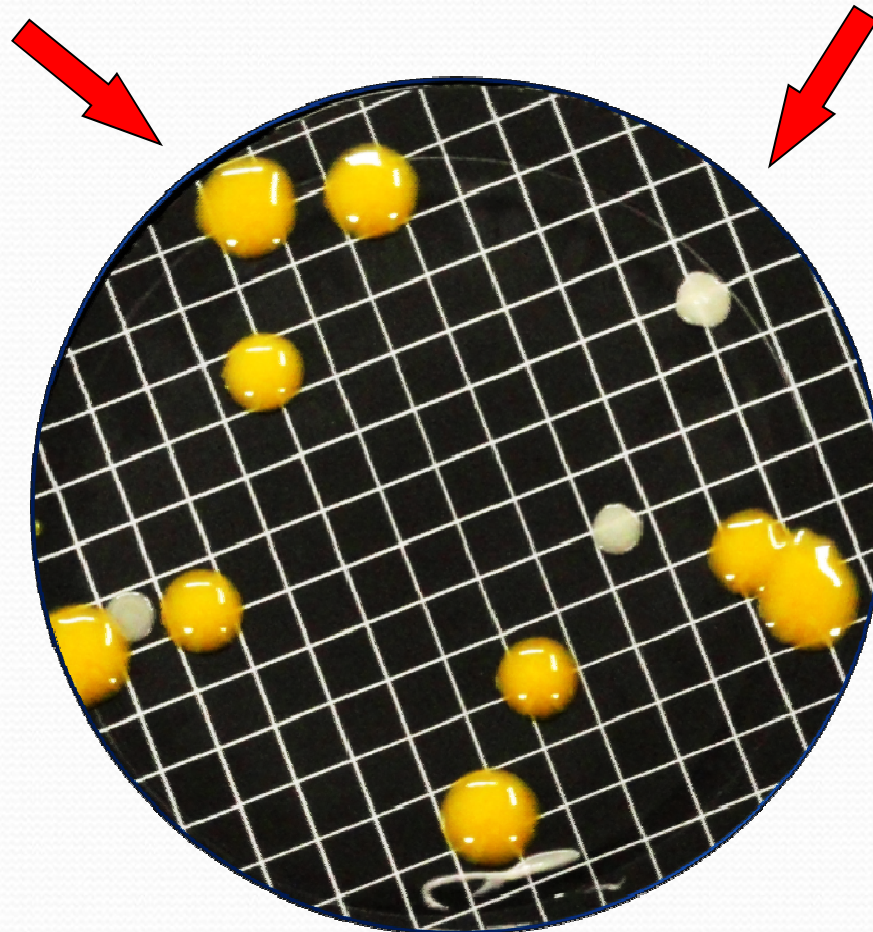


Aeromonas sp.

Stenotrophomonas sp.

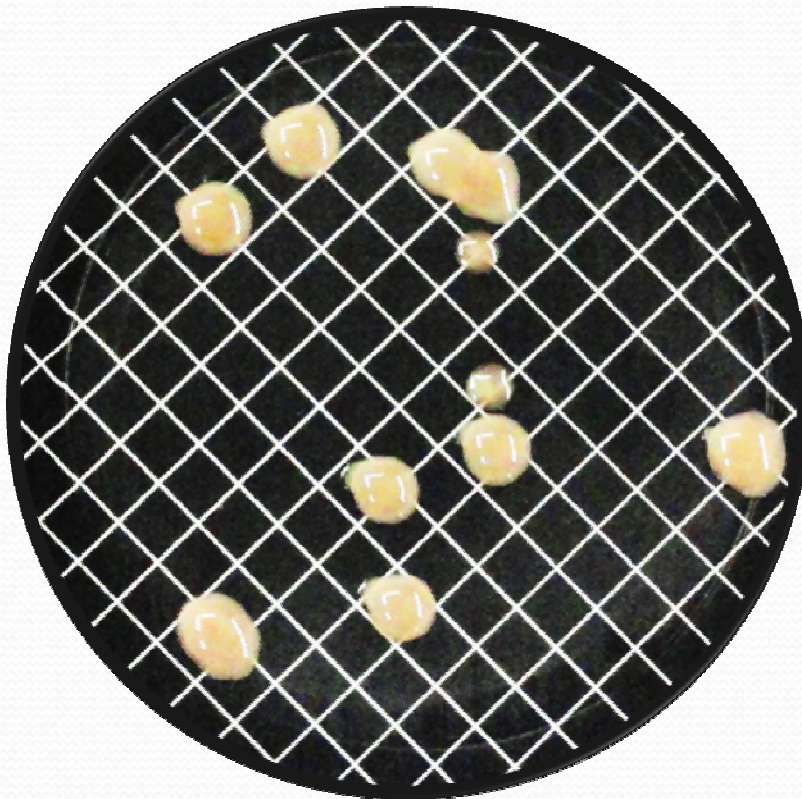


***Flavobacterium* spp. zusammen mit *Legionella* spp.**

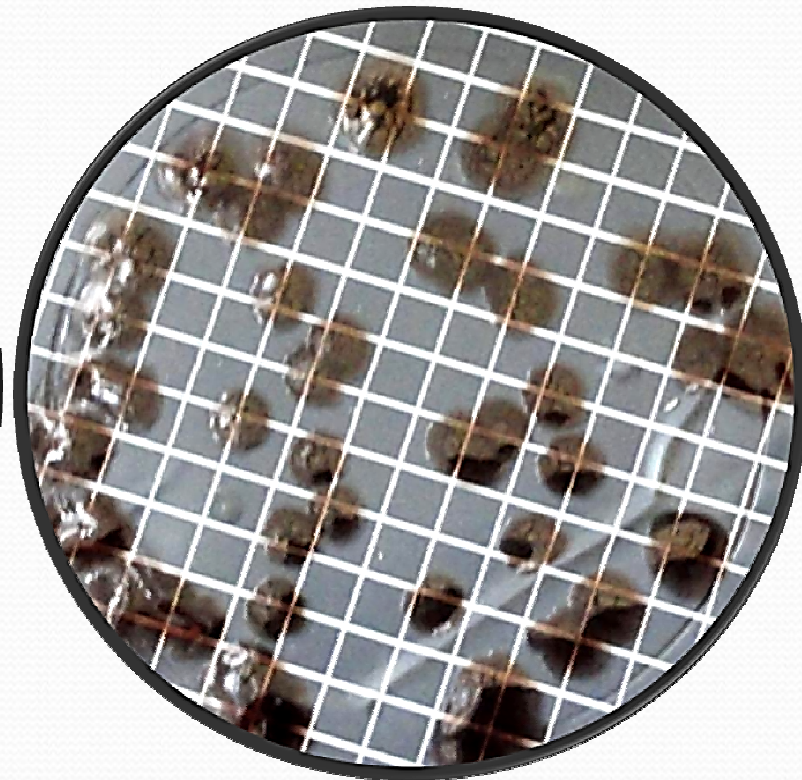


Aeromonas* sp. und *Pseudomonas aeruginosa* hemmen *Legionellen

Aeromonas sp.

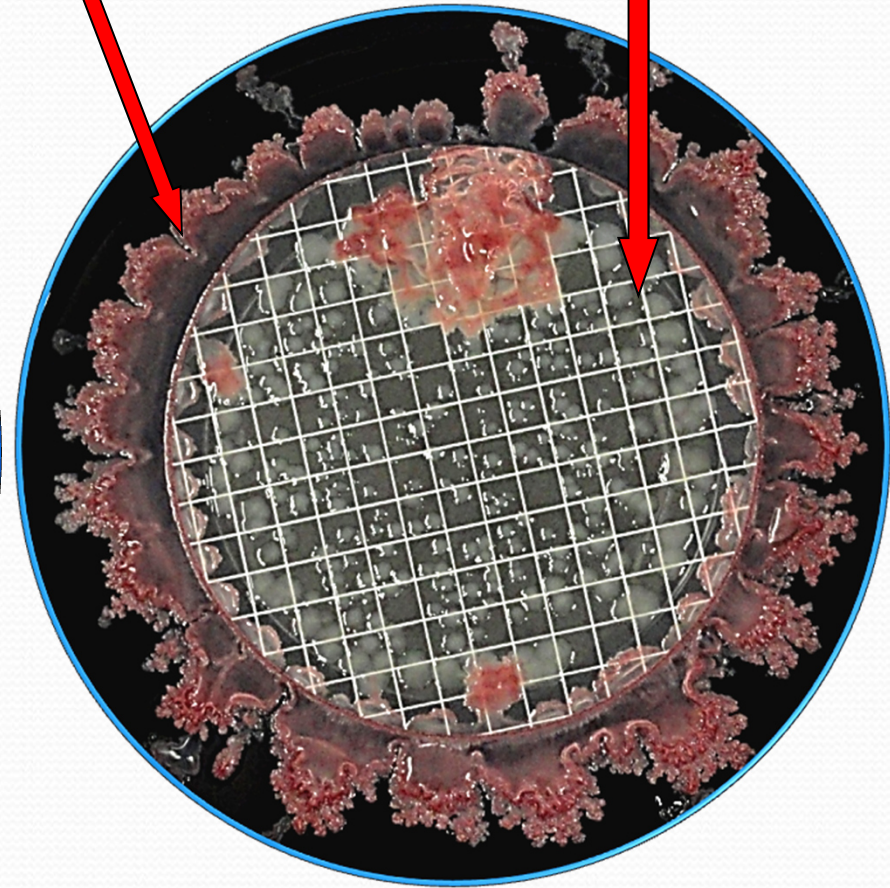
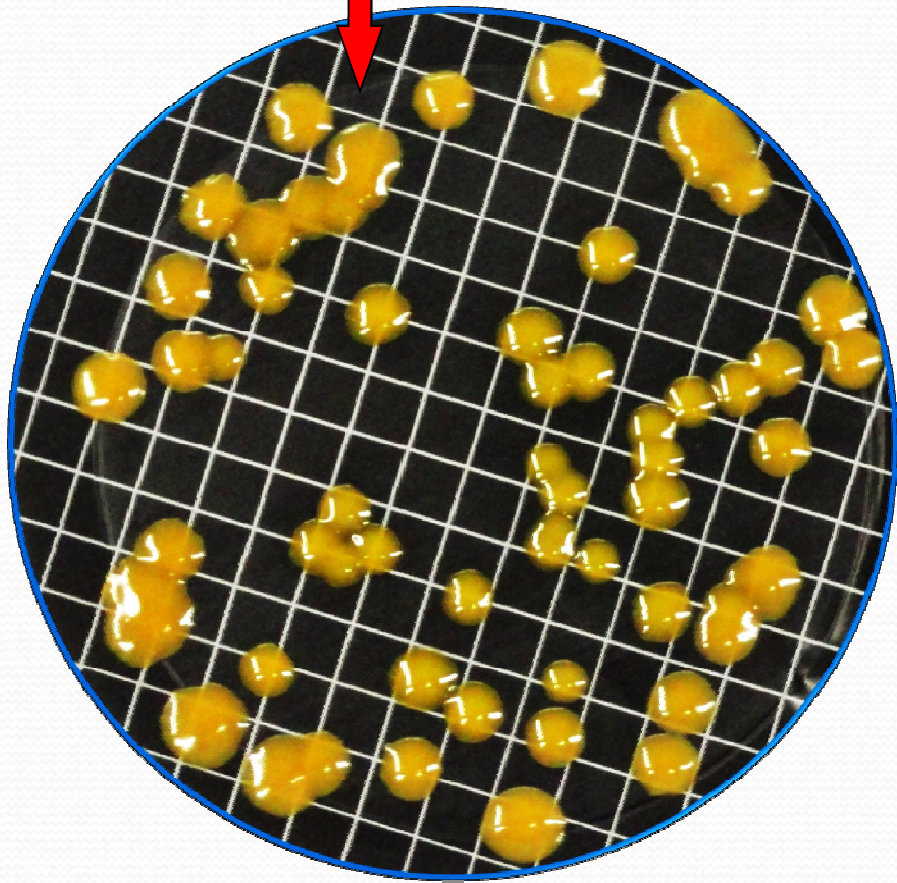


Pseudomonas aeruginosa



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

***Microbacterium* spp., *Aeromonas* und *Stenotrophomonas* spp.
hemmen Legionellen**



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.

Was ist in Kühltürmen?

Legionella pneumophila

Quorum sensing

???

Kommensalismus

???



Quorum sensing (QS)

Quorum sensing ist ein Mechanismus, durch den Bakterien miteinander kommunizieren, um die Bakterienpopulation Dichte zu messen.

Gram-negative Bakterien, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa*

Verlassen sich auf N-Acyl-Homoserin-Lactone (AHL) als Signalmoleküle in QS-Systemen.

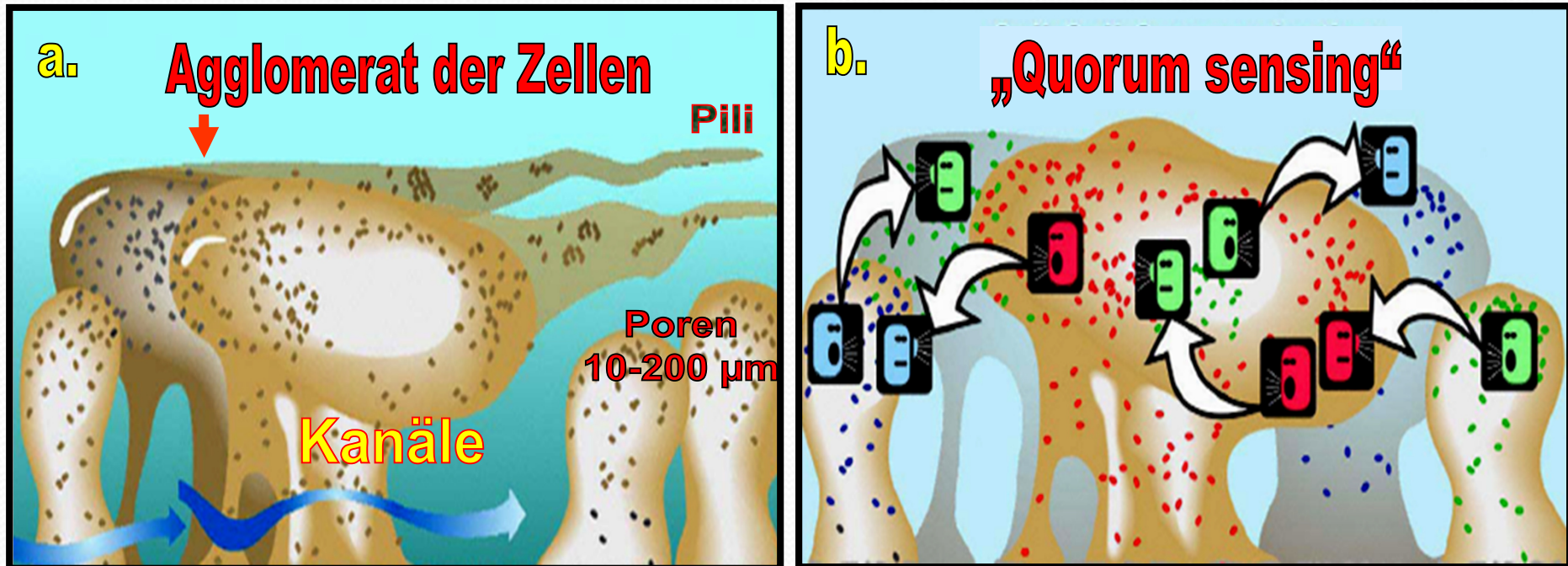
AHLs werden konstitutiv bei niedrigen Zelldichten produziert und werden dann in der Umwelt angereichert, im Verhältnis zu der Zunahme der Bakterienpopulation. Bei einer bestimmten Grenzkonzentration von AHL (50 nmol/l), werden die Moleküle in der Lage sein, die QS-Systeme zu aktivieren.

Quorum sensing (QS)

Dieses System der Regulierung sorgt dafür, dass Bakterien in der Lage, organisierten Gemeinschaften zu bilden und Informationen mit anderen Mitgliedern austauschen, um zelluläre Aktivitäten zu koordinieren sind.

Unter den Verfahren von *Quorum Sensing-Steuerung* sind die Synthese von sekundären Metaboliten, Enzyme und Virulenzfaktoren der Bakterien auf verschiedene ökologische Nischen kolonisieren können.

Kommunikation, Induktion und Interaktion zwischen Bakterien in „Quorum sensing“ Systemen

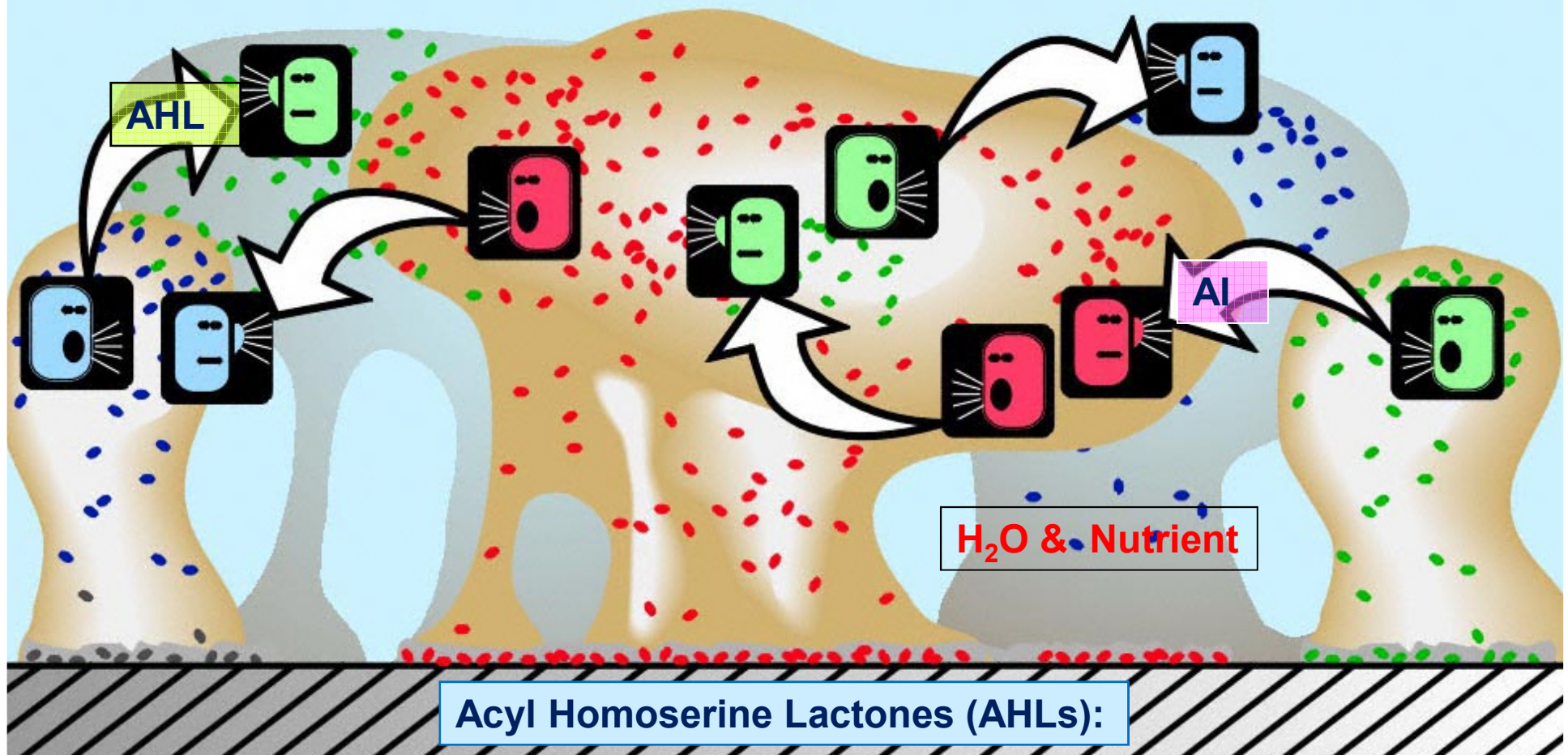


Kommunikation über Signale Bakterien (Zell-Zell) im Biofilm.

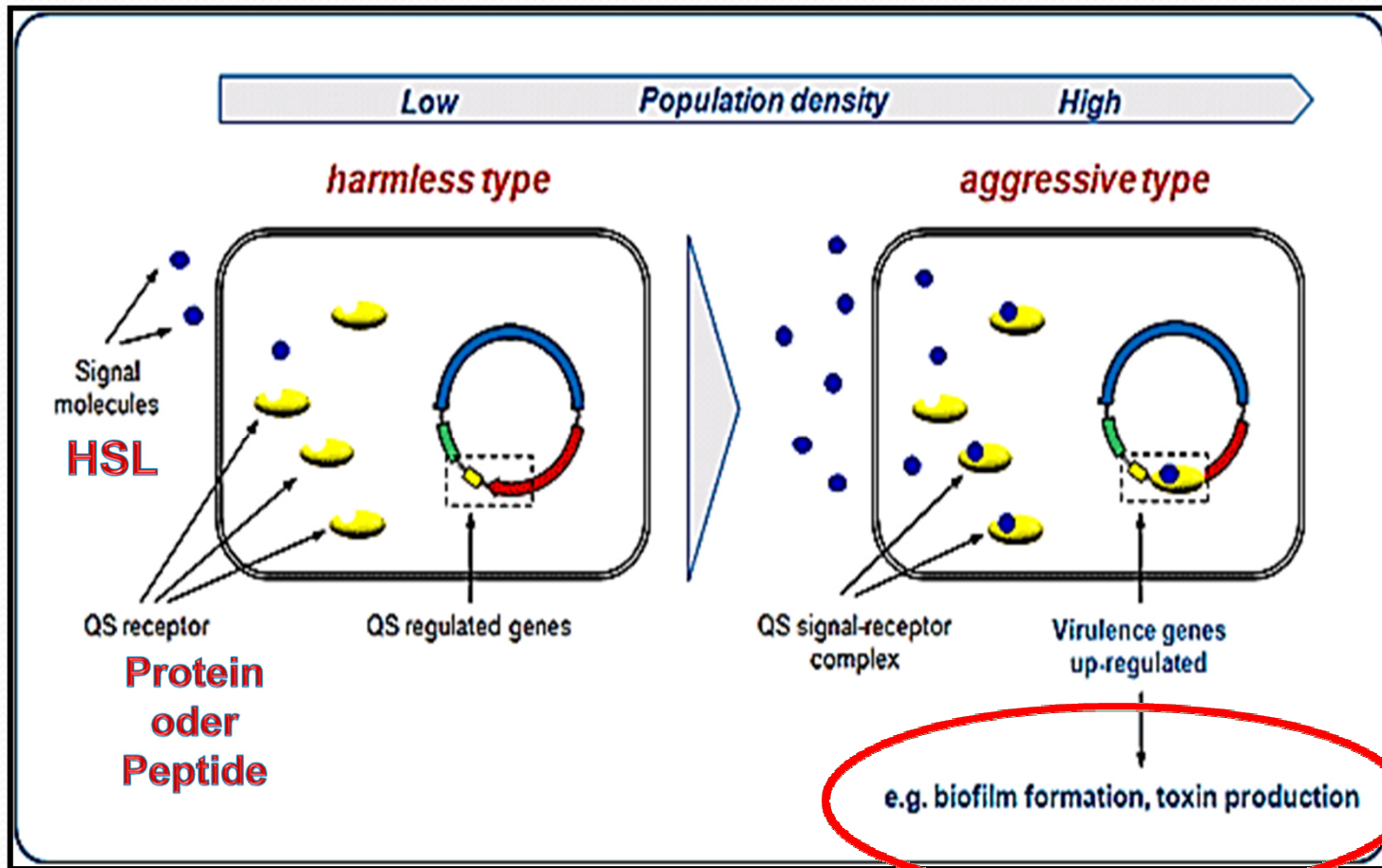
We are looking who is „talking“ ???

Nach Courtesy, MSU-CBE

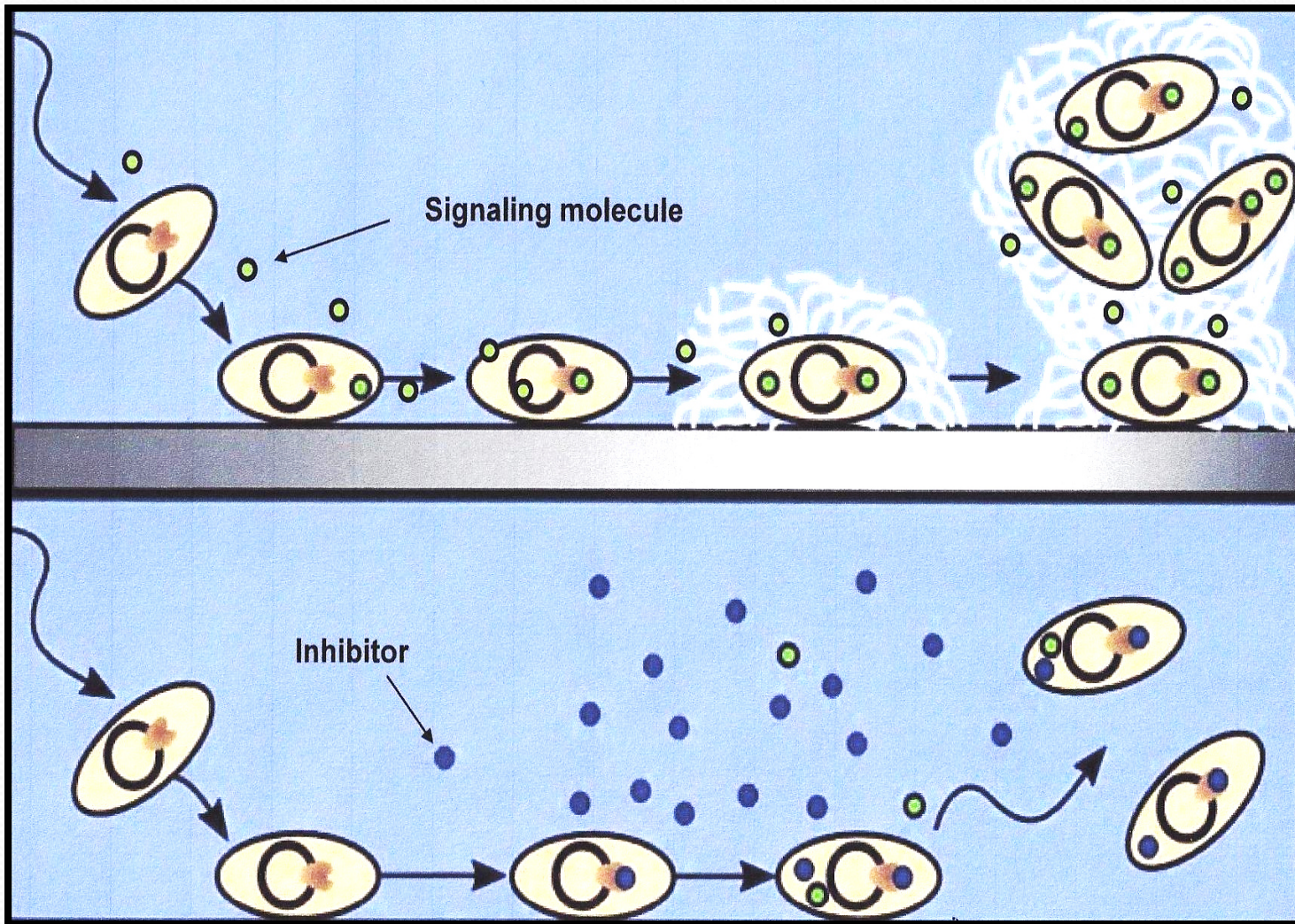
Quorum sensing in the biofilm



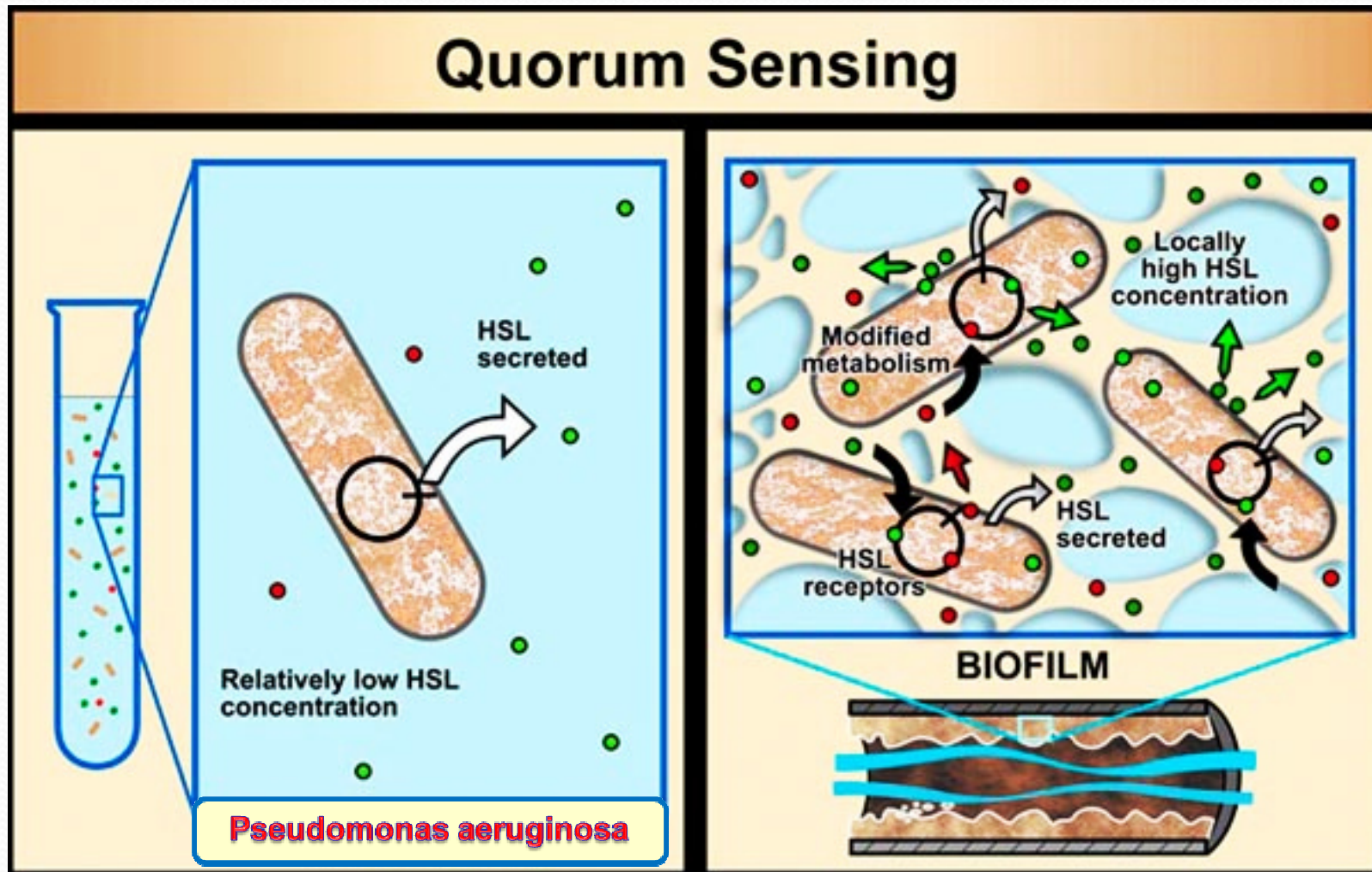
„Quorum sensing“ : Biofilm und Toxin Produktion



“Quorum sensing” in the biofilm



Die Sekretion der „Signal“ Molekülen (Autoinducer)



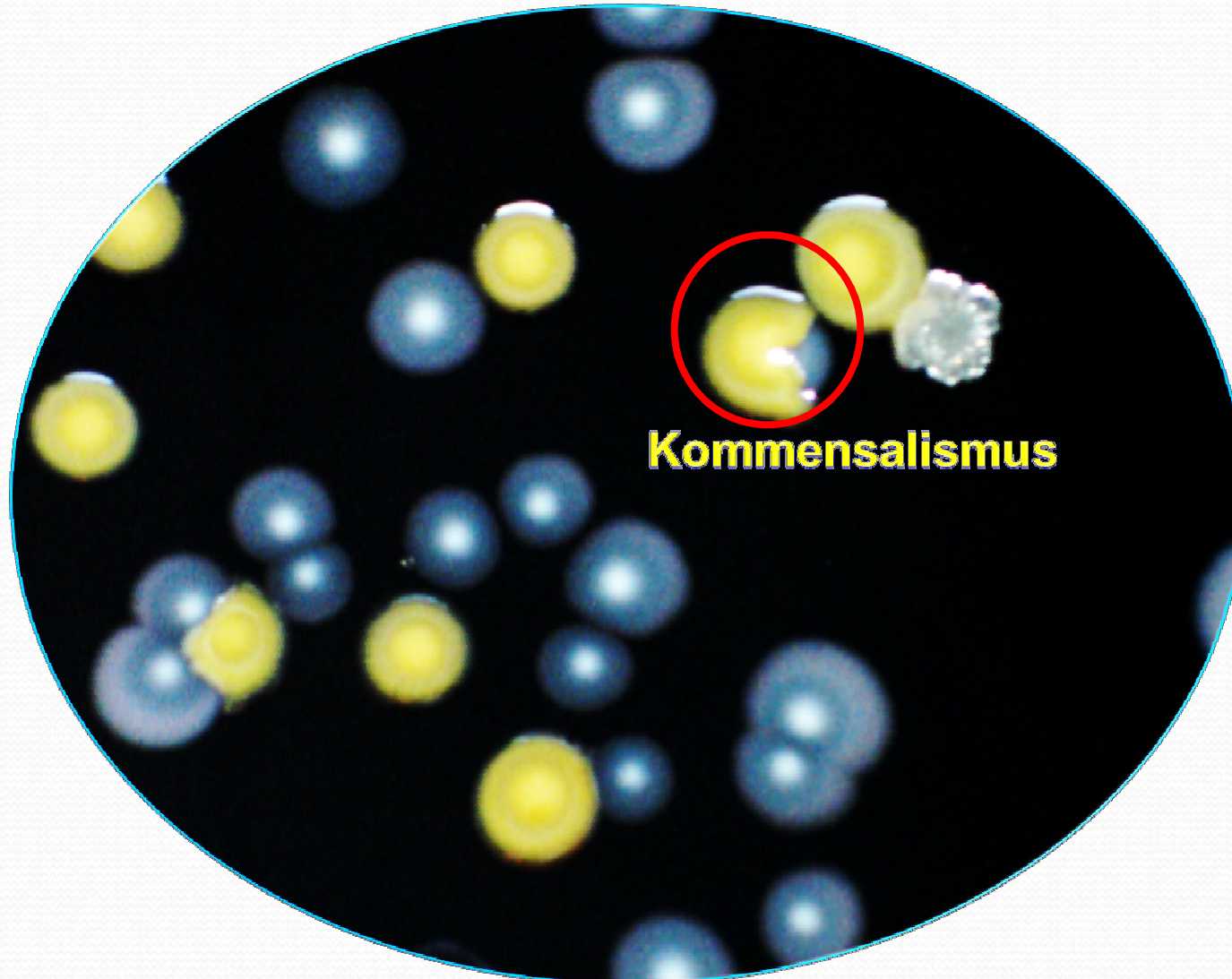
Nach Courtesy, MSU-CBE

„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*.

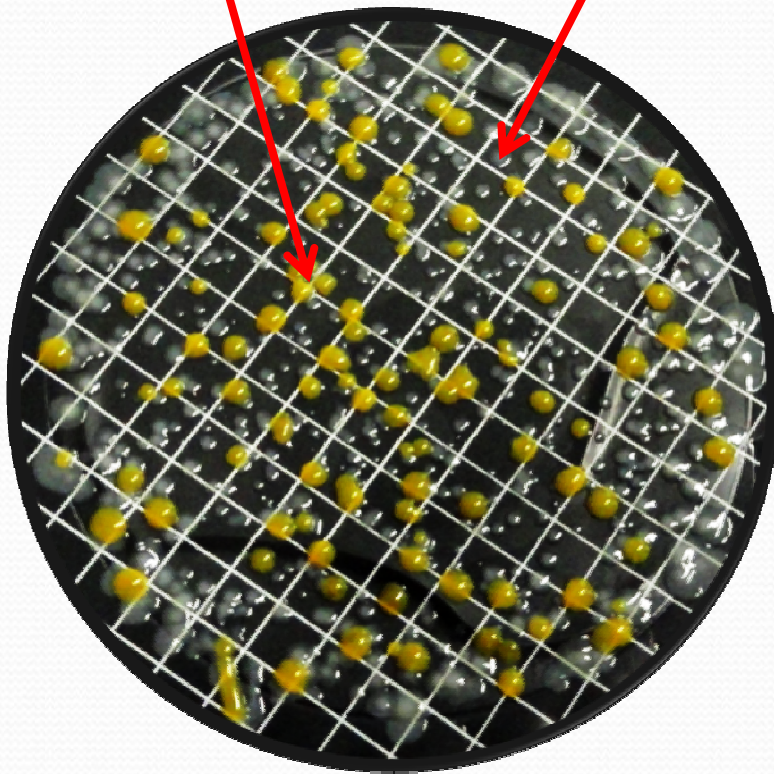
***Legionella pneumophila* Sg. 1 und *Flavobacterium* sp.**



Kommensalismus

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

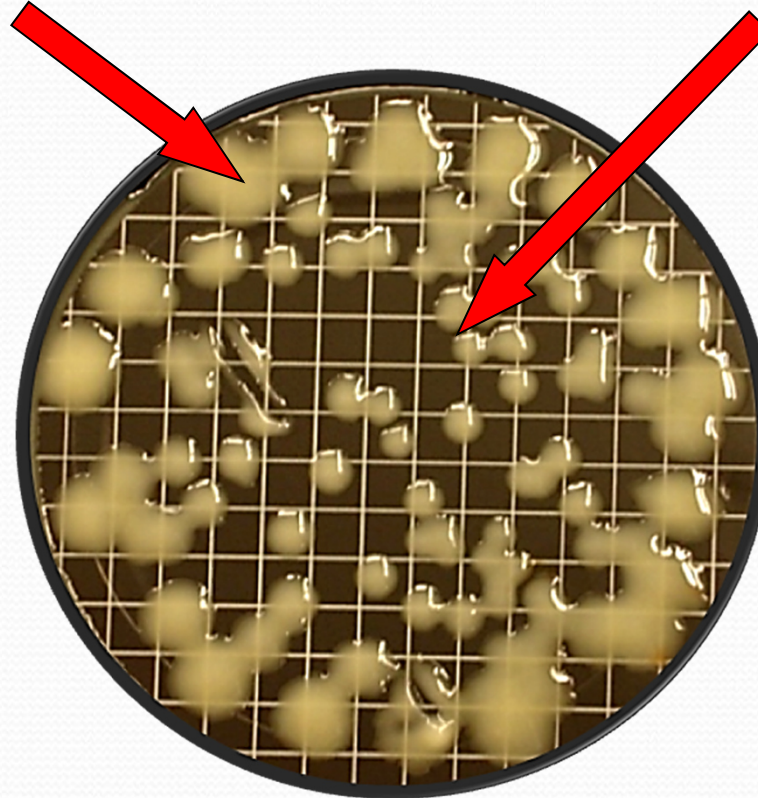
Flavobacterium spp. & *Legionella* sp.



Pseudomonas fluorescens & *Legionella* 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 / cm^2 Stahl)

Potsdam, 17.09.2015

„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.

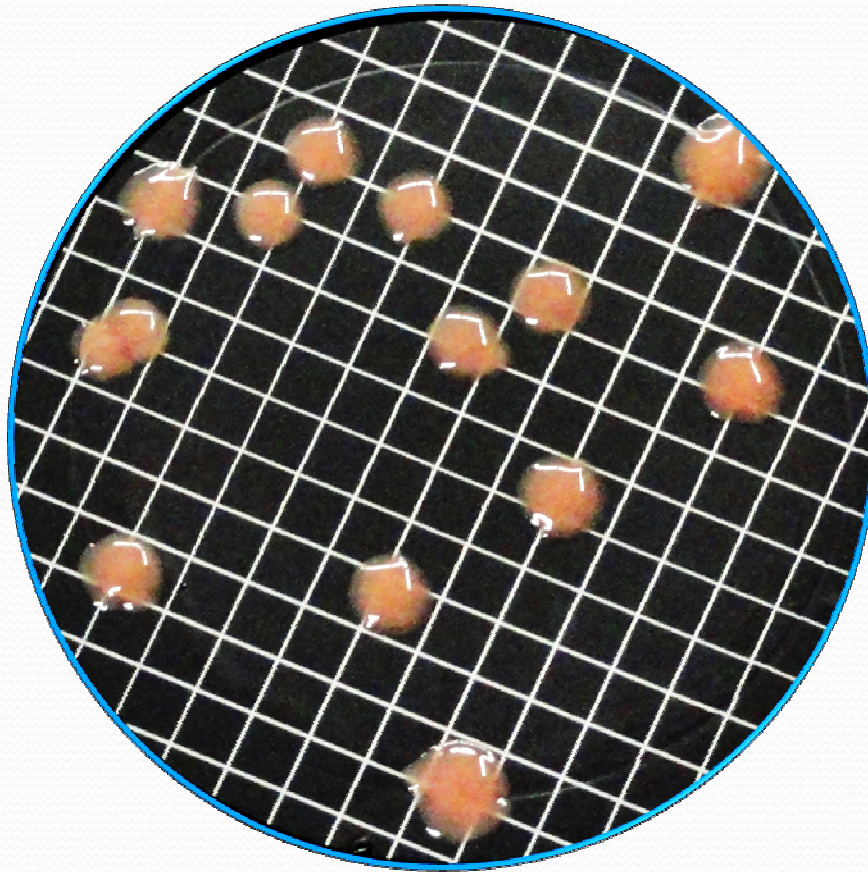
„Quorum sensing“

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.

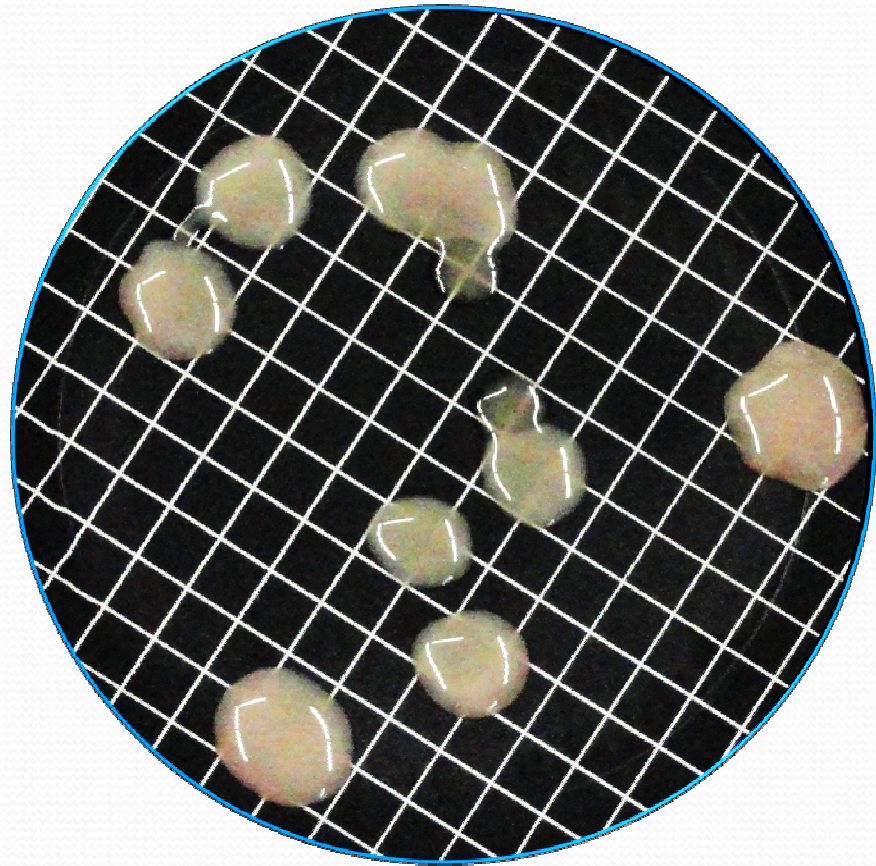
Dies bestätigt, dass einige Bakterien die Kolonisierung mit Legionellen unterstützen, während andere hemmend wirken, wie z.B. *Bacillus licheniformis*, *Aeromonas* spp. oder *Stenotrophomonas* spp. (speziell *Legionella pneumophila* Sg. 1)

Begleitflora in Kühlturmwässern

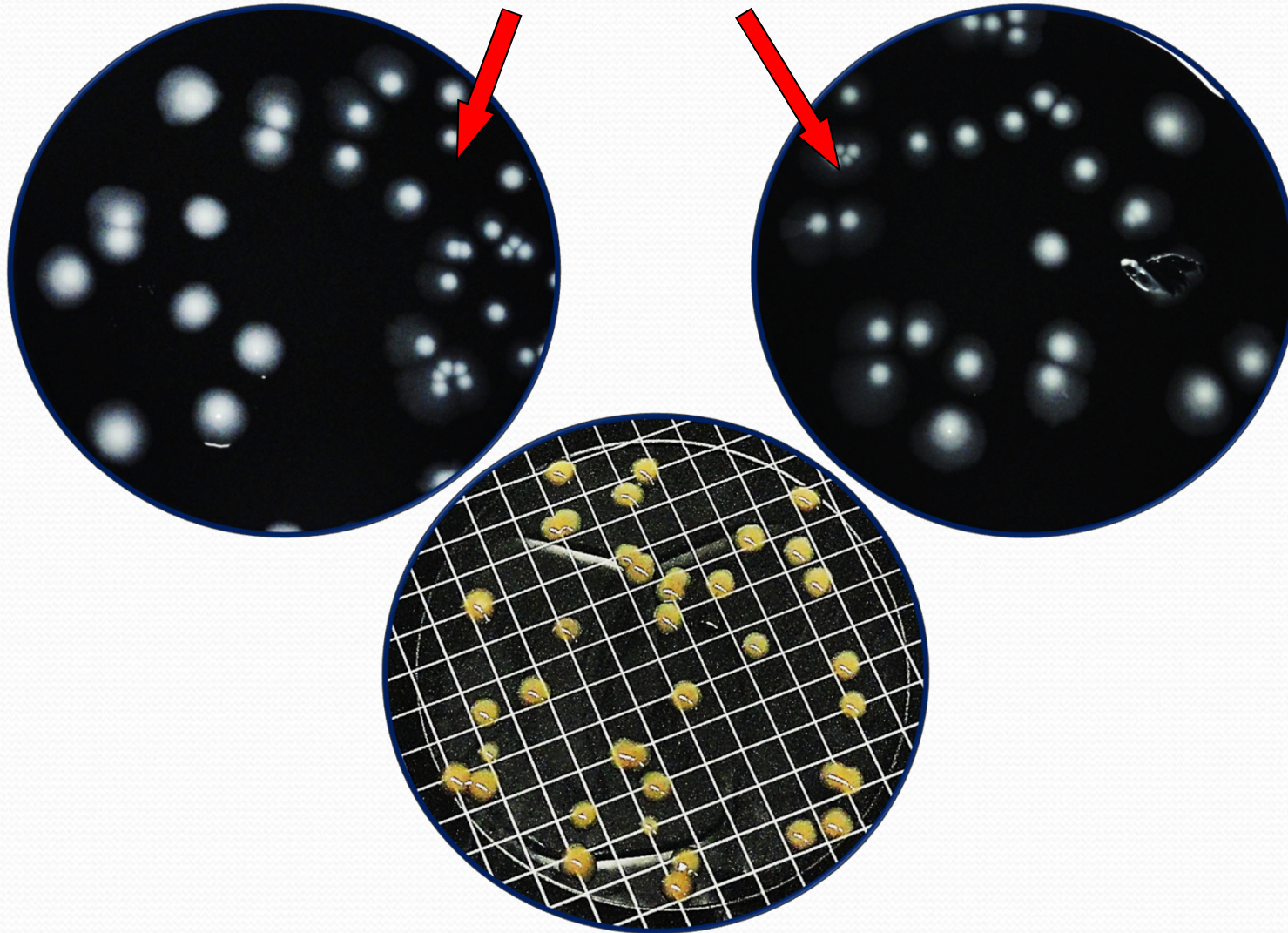
Aeromonas sp.



Stenotrophomonas sp.



Legionella pneumophila Sg. 2 - 15

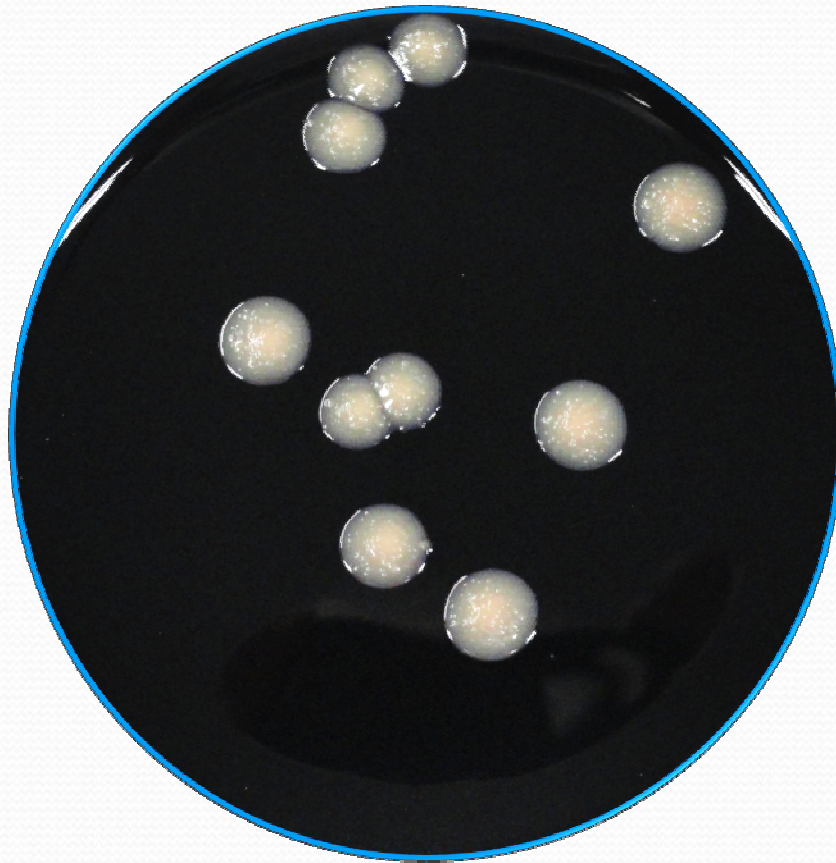


Stenotrophomonas sp.

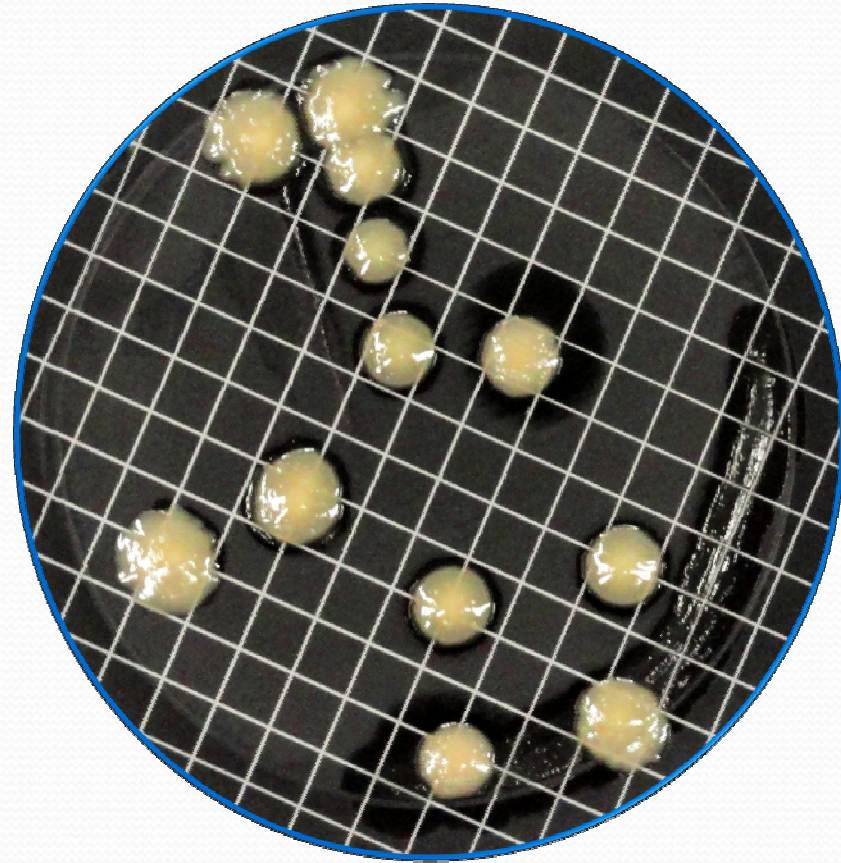
Potsdam, 17.09.2015

Begleitflora in Kühlturmwässern

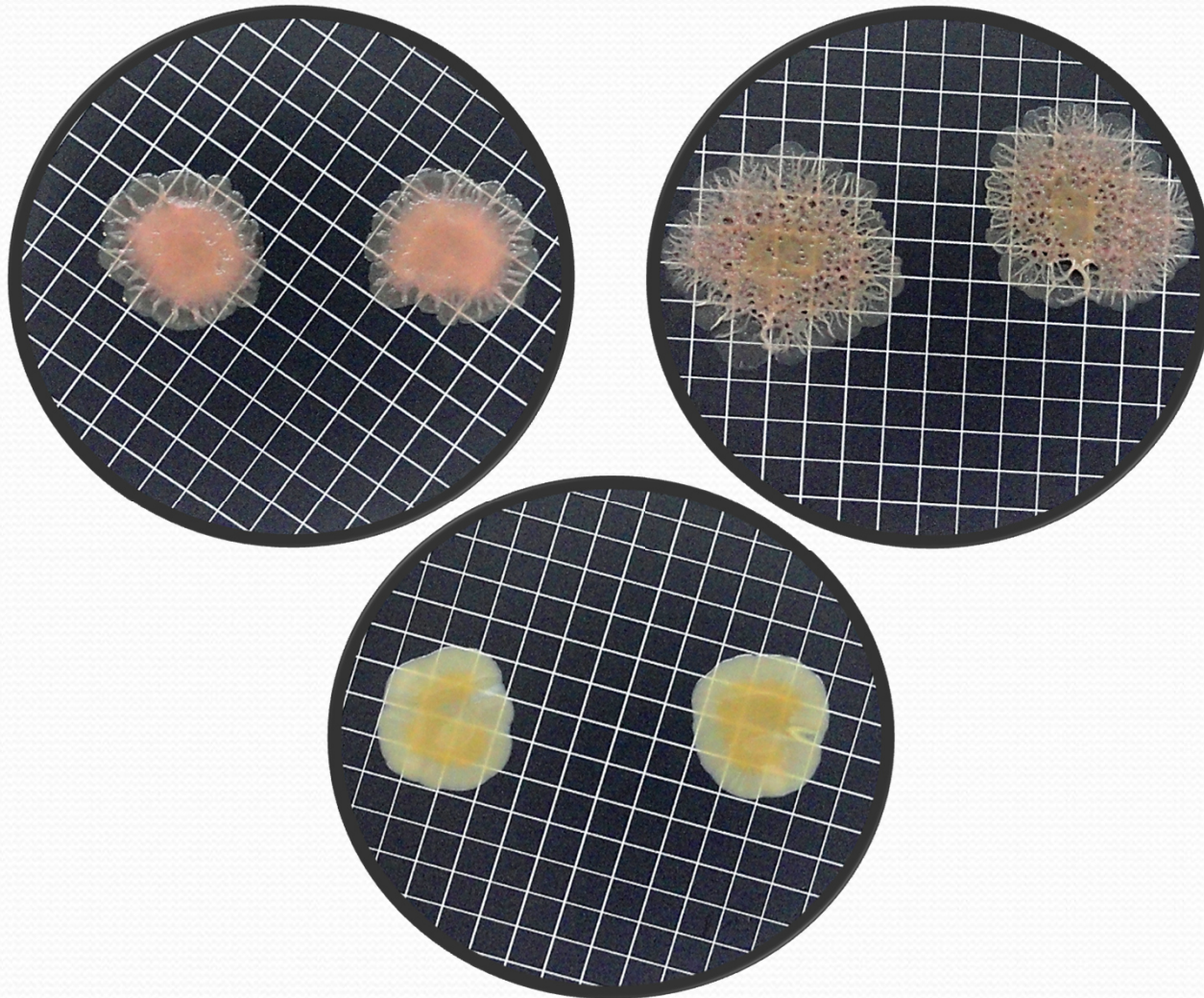
Aeromonas sp.



Stenotrophomonas sp.



Inhibition der Begleitflora welche hemmen *Legionella pneumophila* SG. 1



Hemmung (Inhibition) der Begleitflora auf *Legionella pneumophila* SG. 1



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**

- **Die vorgeschriebenen Nachweismethoden (nach BGBl. 11-2000, s. 911ff oder ISO 11731-2 vom 6-2008) besagen, dass alle Kolonien, die auf GVPC-Agar wachsen, aber auf cysteinfreiem Medium kein Wachstum zeigen, als *Legionellen spp.* betrachtet werden.**

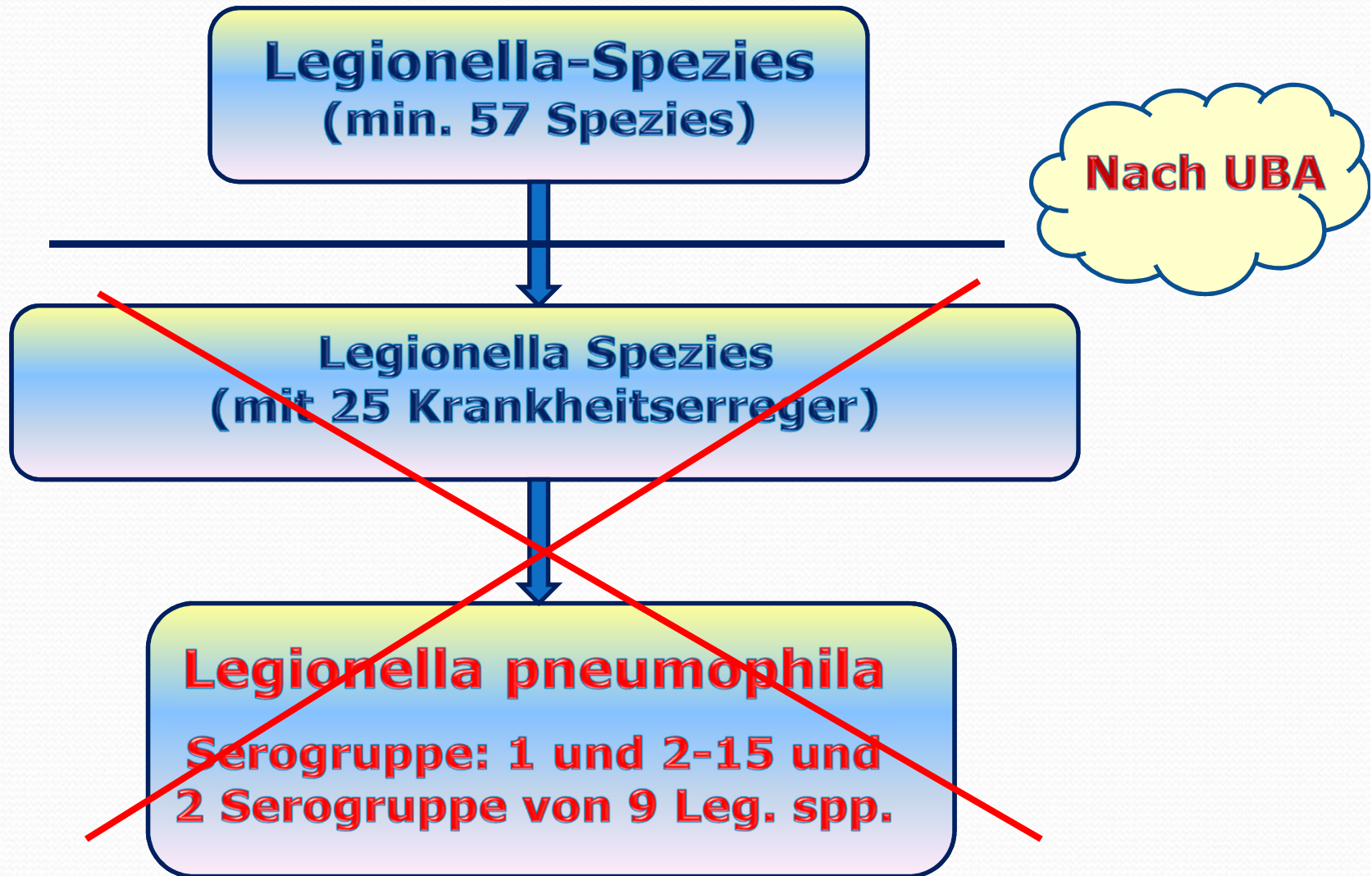
Untersuchung nur *Legionella*-Spezies

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

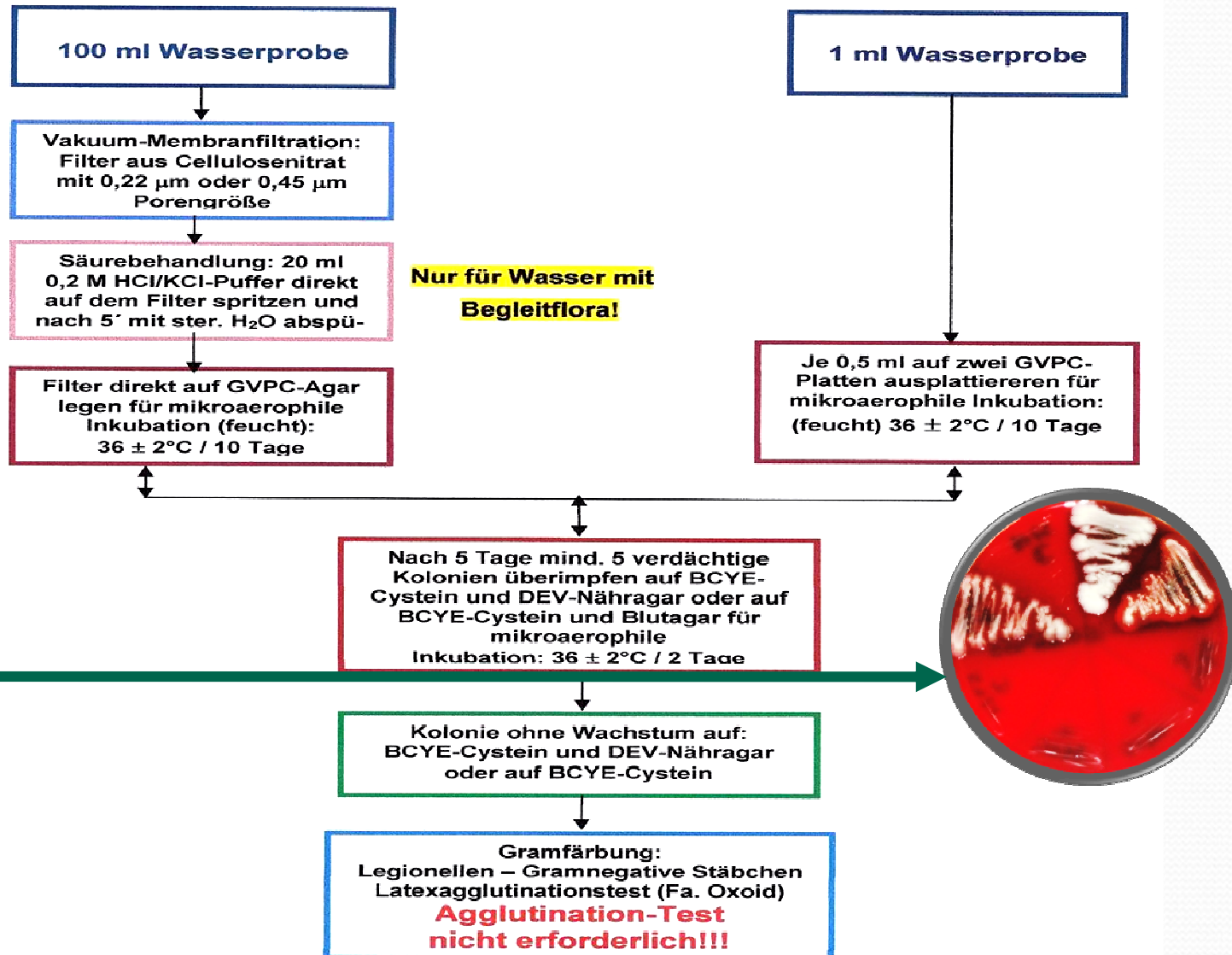
**Legionella Spezies
Bis zu 79 Serogruppen**

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

Untersuchung nur *Legionella*-Spezies



Untersuchung nur *Legionella*-Spezies



100 ml Wasserprobe

Vakuump-Membranfiltration:
Filter aus Cellulosenitrat
mit 0,22 µm oder 0,45 µm
Porengröße

Säurebehandlung: 20 ml
0,2 M HCl/KCl-Puffer direkt
auf dem Filter spritzen und
nach 5' mit ster. H₂O abspü-

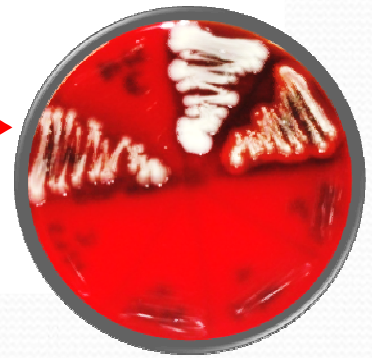
Filter direkt auf GVPC-Agar
legen für mikroaerophile
Inkubation (feucht):
36 ± 2°C / 10 Tage

1 ml Wasserprobe

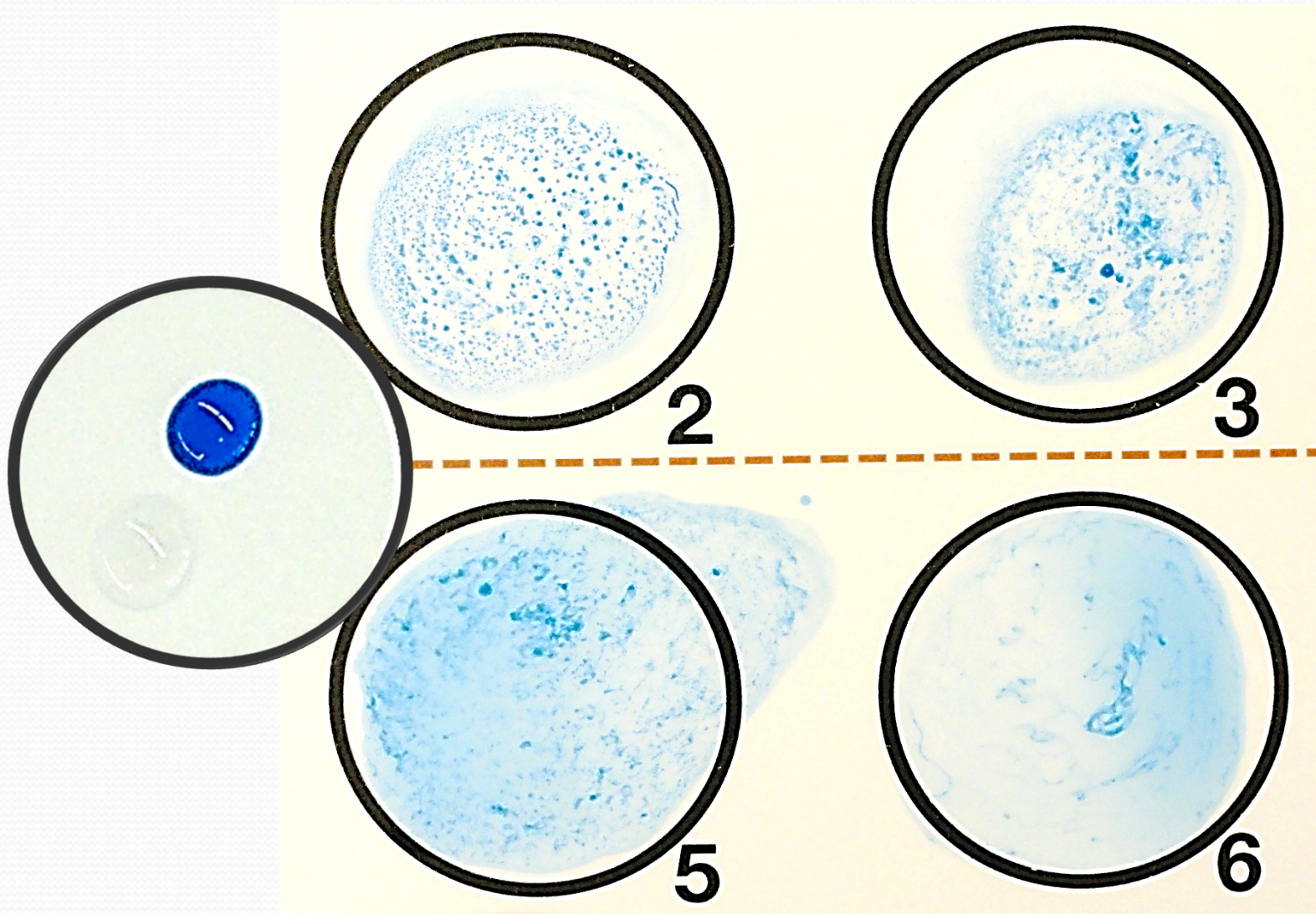
Je 0,5 ml auf zwei GVPC-
Platten ausplattieren für
mikroaerophile Inkubation:
(feucht) 36 ± 2°C / 10 Tage

Nur für Wasser mit
Begleitflora!

Nach 5 Tage mind. 5 verdächtige
Kolonien überimpfen auf BCYE-
Cystein und DEV-Nähragar oder auf
BCYE-Cystein und Blutagar für
mikroaerophile
Inkubation: 36 ± 2°C / 2 Tage




Agglutinations-Test-*Legionella*: Beispiele

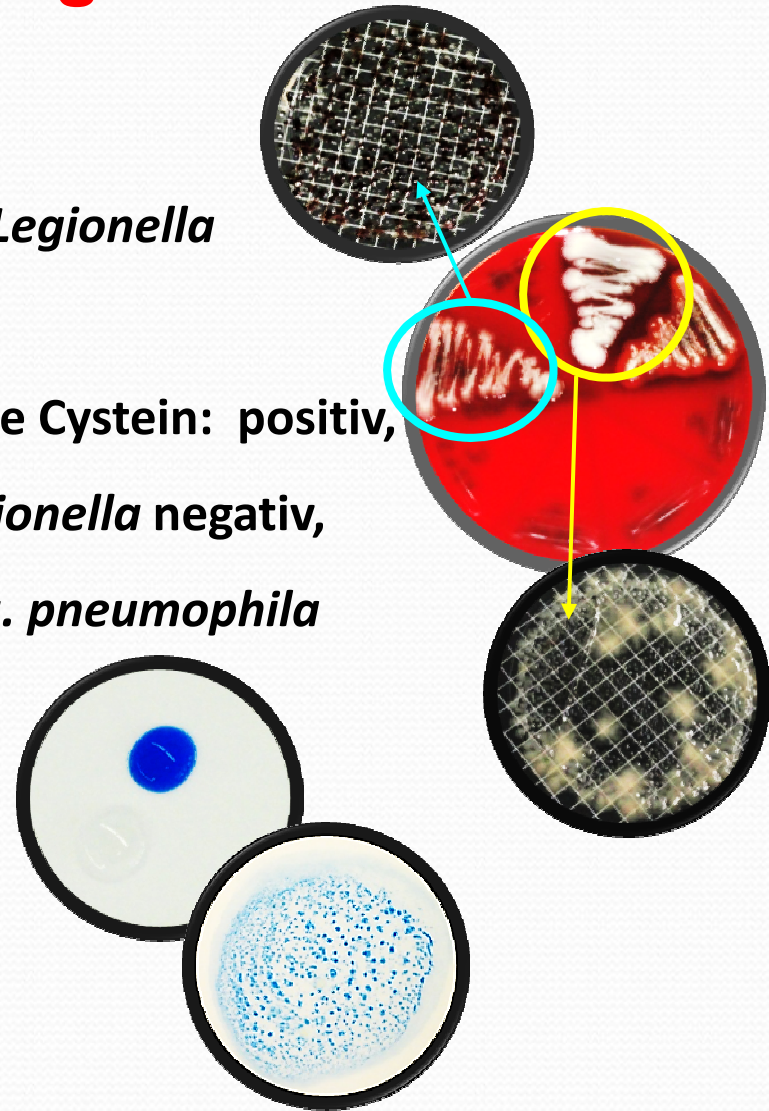


Befund falsch negativ

Beispiel:

- Wachstum auf GVPC Platten: optisch wie *Legionella pneumophila*, zusätzlich viel Begleitflora,
- Wachstum auf Blut und GVPC-Platten ohne Cystein: positiv,
- 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!

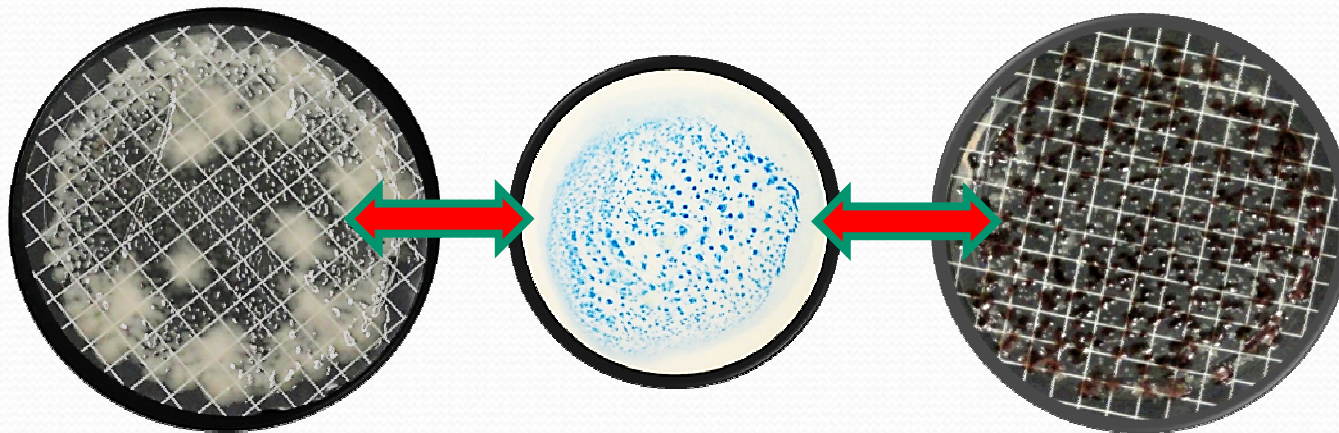


Befund falsch negativ

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.

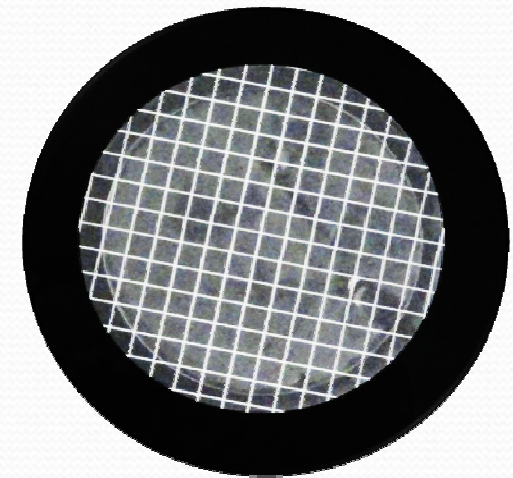
Das führt ohne Agglutinations-Test zu einem falsch negativen Ergebnis!



Befund falsch negativ

Beispiel:

- Kein sichtbares Wachstum von *Legionella* auf GVPC-Platten, nur viel Begleitflora,
- Kontrolle auf Blut- oder auf GVPC-Platten ohne Cystein ist nicht nötig.
- Ergebnis: *Legionella* negativ, aber Begleitflora, z.B. einige Arten von *Pseudomonas*, *Bacillus* oder *Aeromonas*, hemmen *Legionella pneumophila* Wachstum.



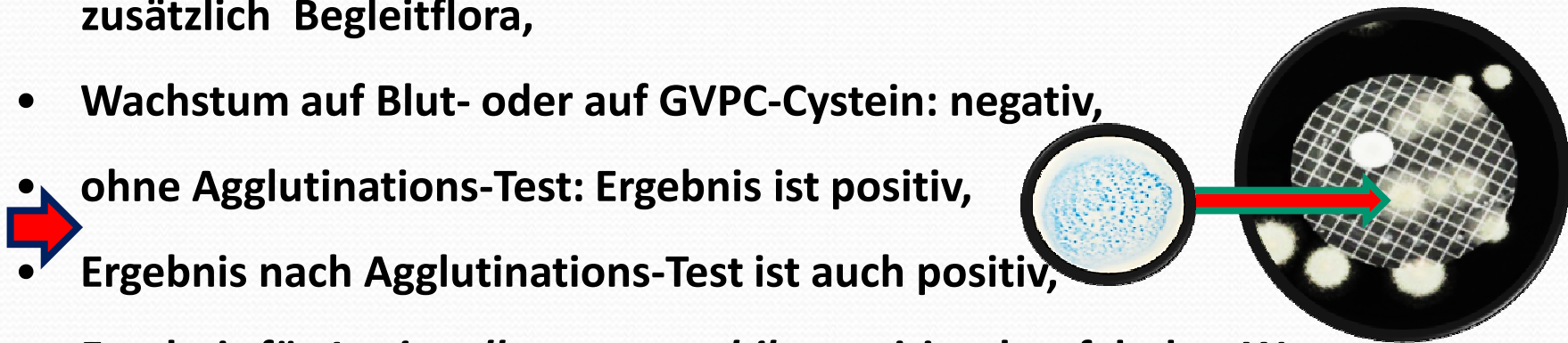
Befund in diesem Fall ist falsch negativ!

Befund falsch negativ

Beispiel:

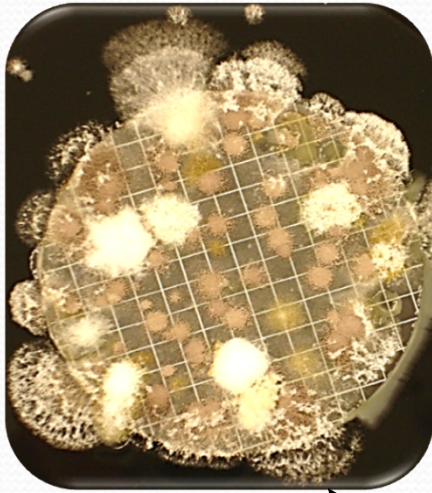
- Niedriges Wachstum von *Legionella pneumophila* auf GVPC, zusätzlich Begleitflora,
- Wachstum auf Blut- oder auf GVPC-Cystein: negativ,
- ohne Agglutinations-Test: Ergebnis ist positiv,
- Ergebnis nach Agglutinations-Test ist auch positiv,
- Ergebnis für *Legionella pneumophila*: positiv, aber falscher Wert, weil Begleitflora, z.B. große Kontamination von *Pseudomonas Aeruginosa*, *Bacillus licheniformis* oder *Aeromonas*, hemmt *Legionella pneumophila* Wachstum.

Falscher Wert

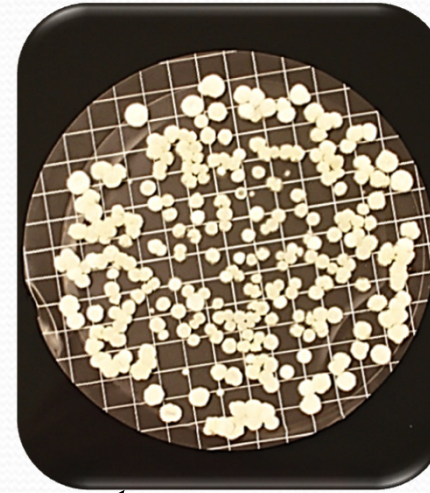


Befund ist: falsch negativ oder zu niedriger Wert!

Befund falsch negativ oder nicht richtig

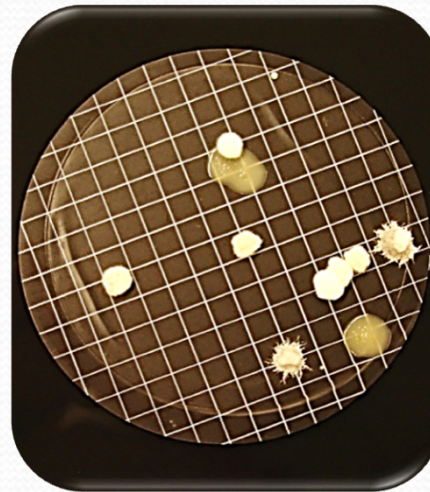


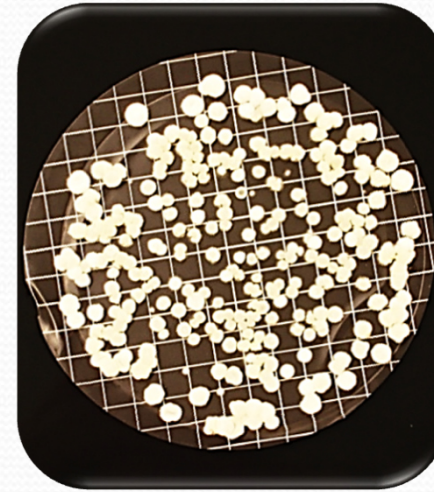
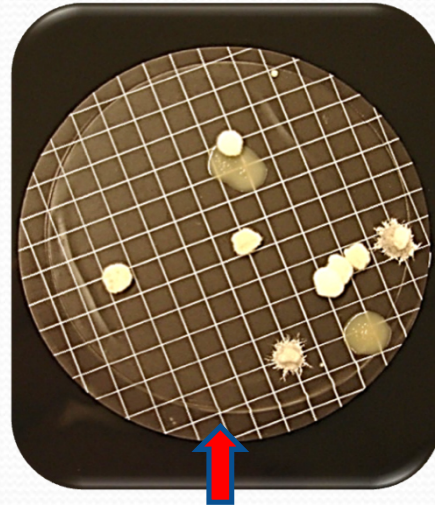
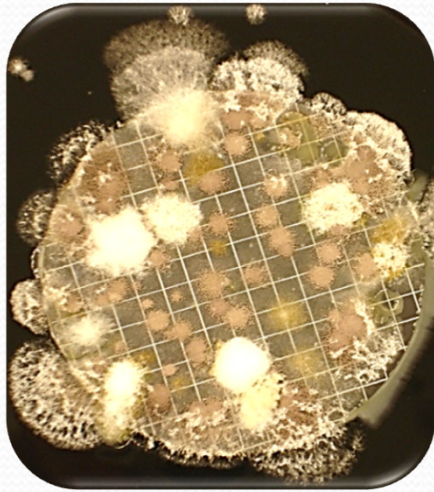
**Ohne Säure-
behandlung**



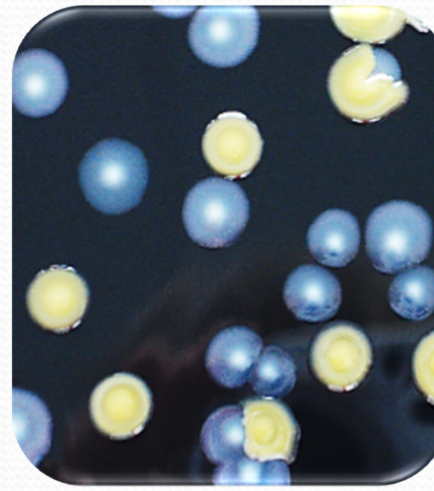
**Ohne Säure-
behandlung**

**Nach Säure-
behandlung**





Filter nach Säurebehandlung



Direktansatz auf Platte, ohne Säurebehandlung

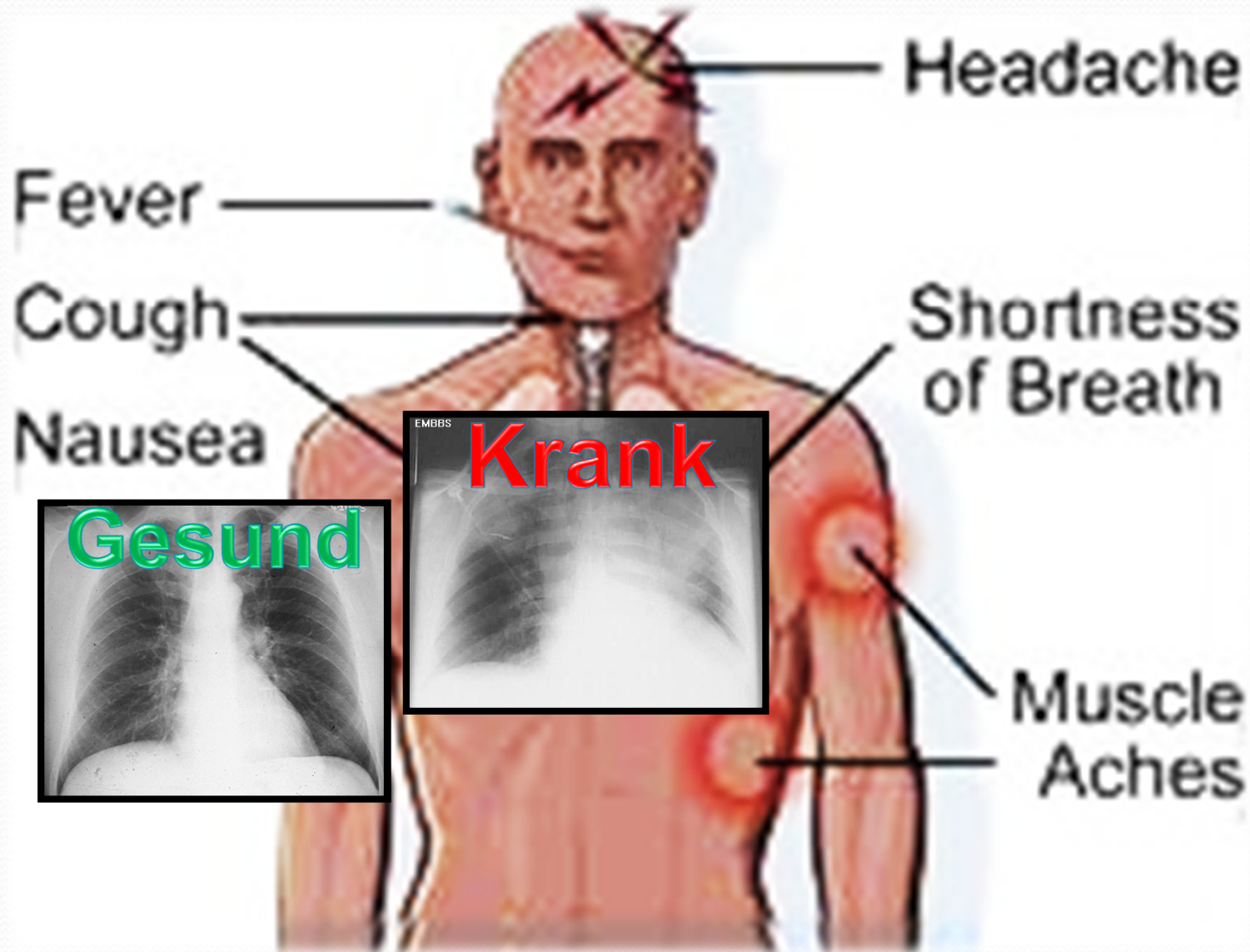
Health hazards by biofilms:

Legionellosis

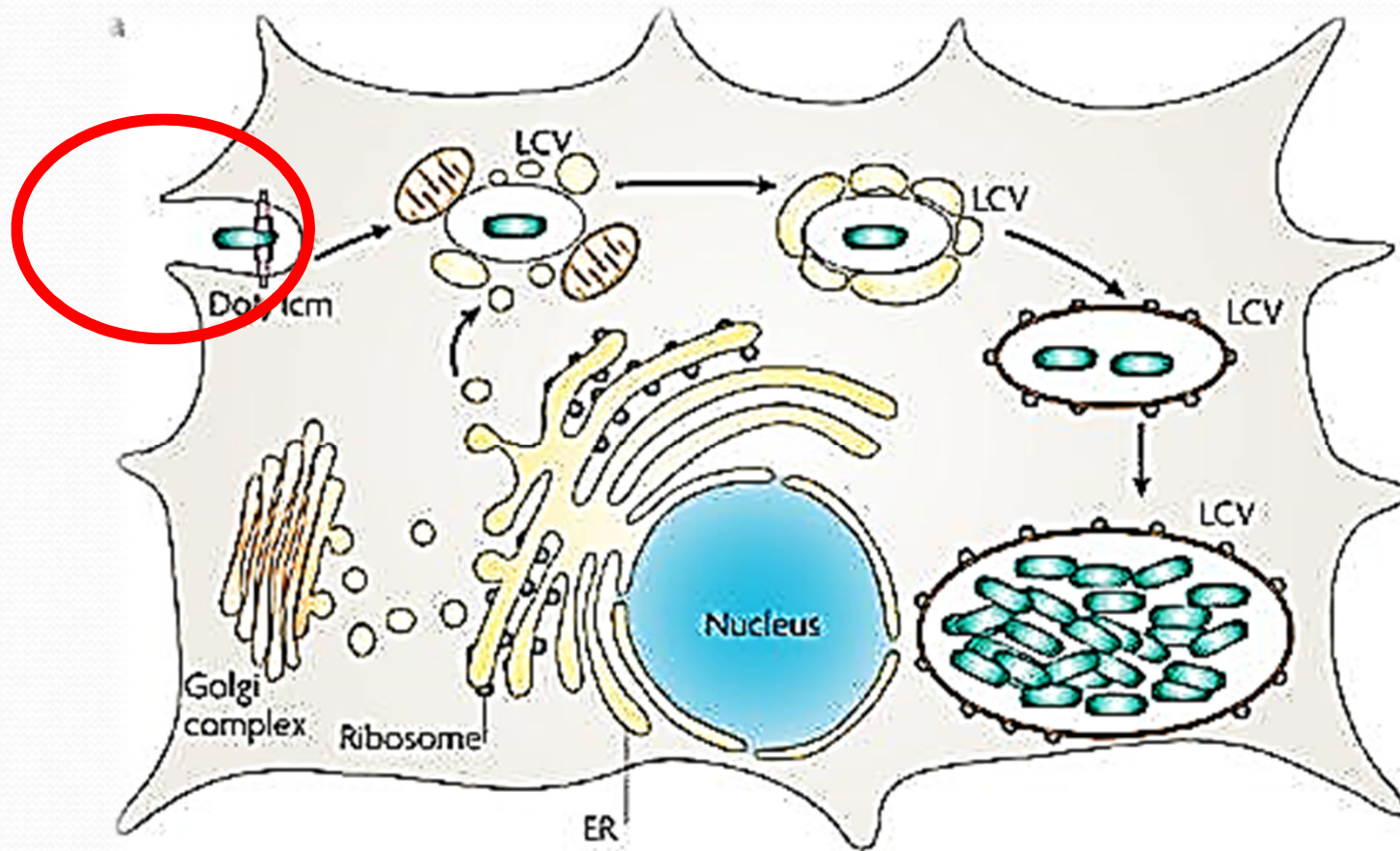
- Every case is proof of contact with an improperly managed water system
- Every case could have been prevented by applying practical scientific management principles
- Legionella are typical biofilm-related pathogens as they survive in protozoa which graze on biofilms



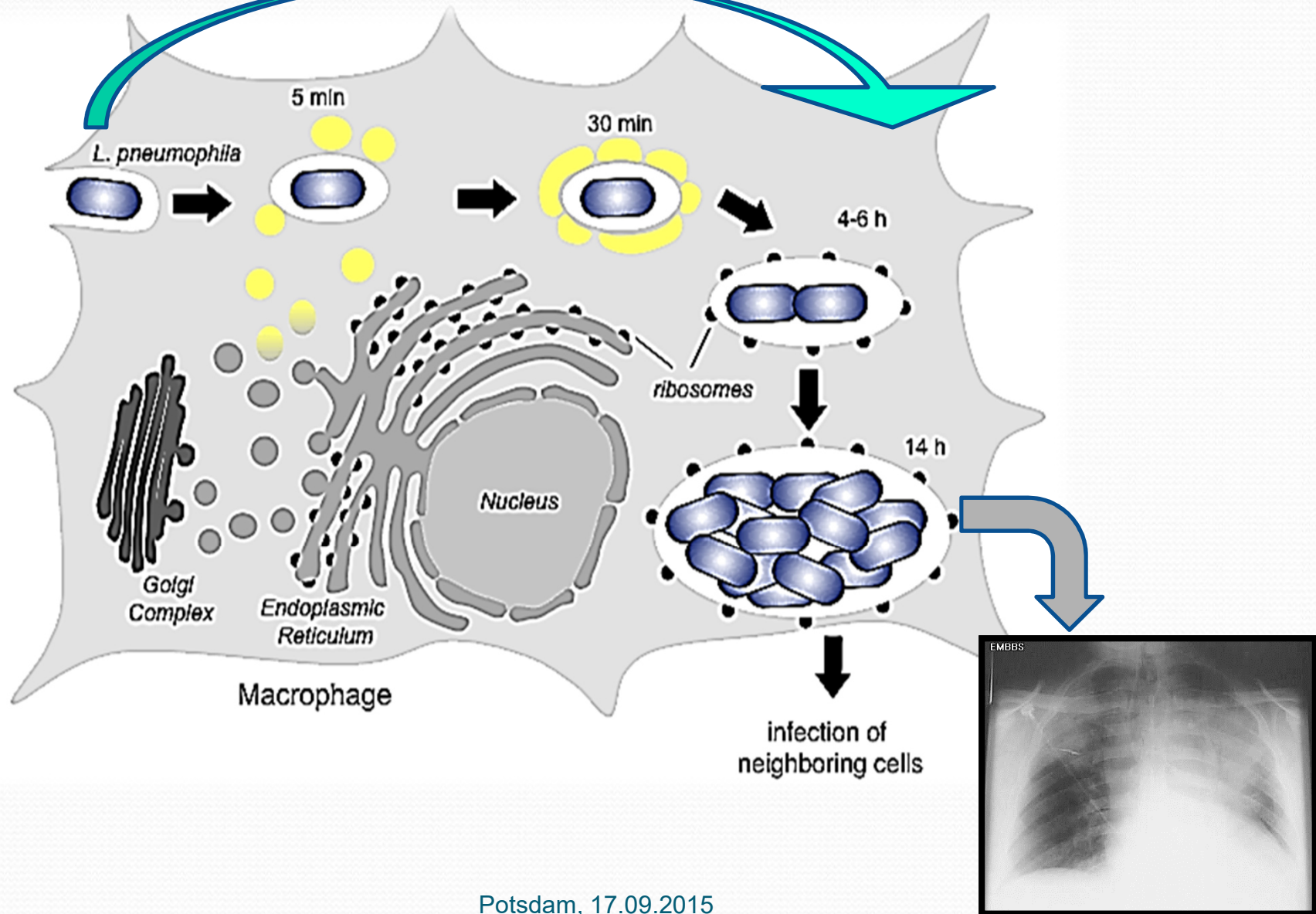
Legionellose Krankheit



Zyklus *Legionella pneumophila* Infektion



Zyklus *Legionella pneumophila* Infektion



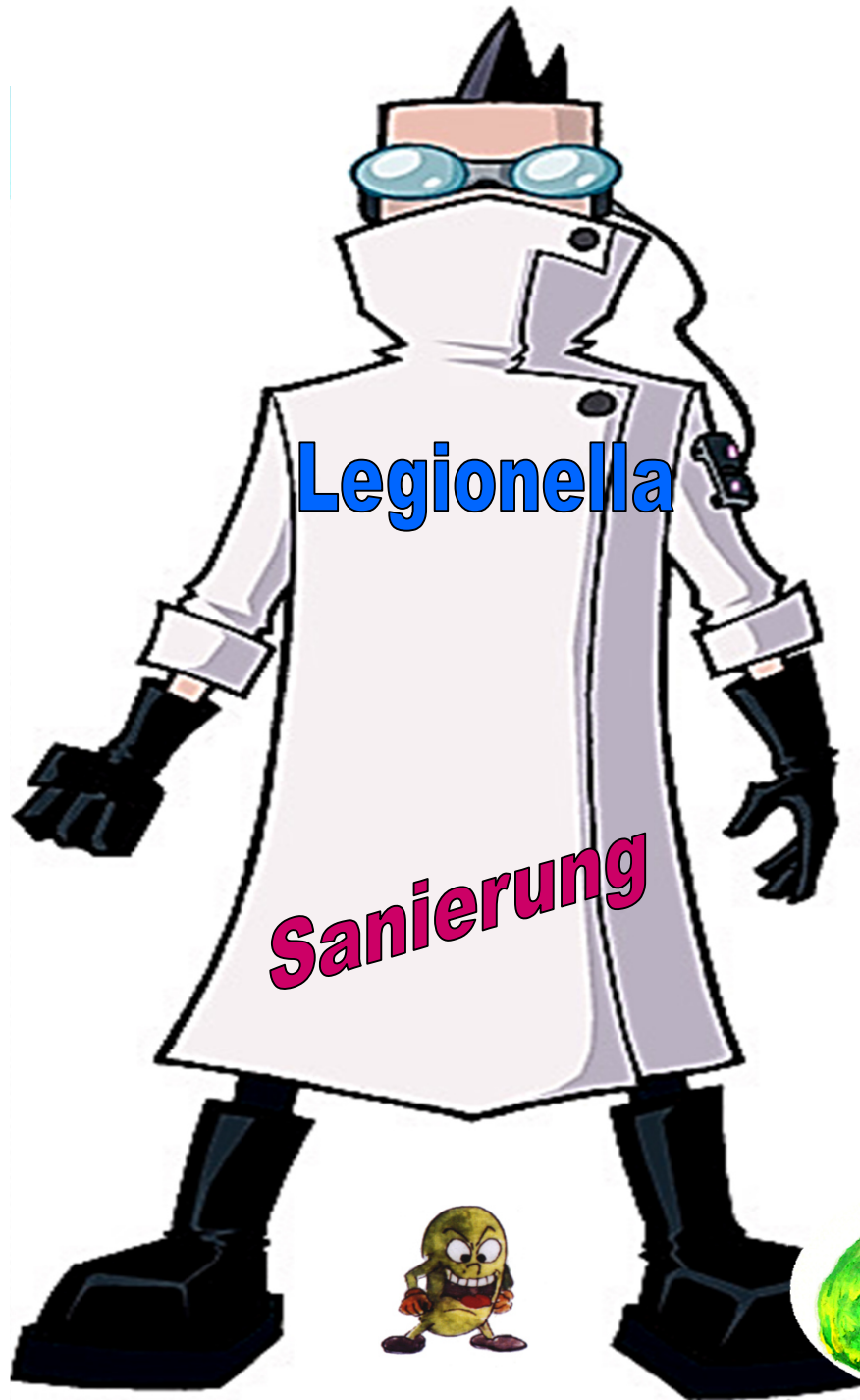
Hygiene Kontrolle

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

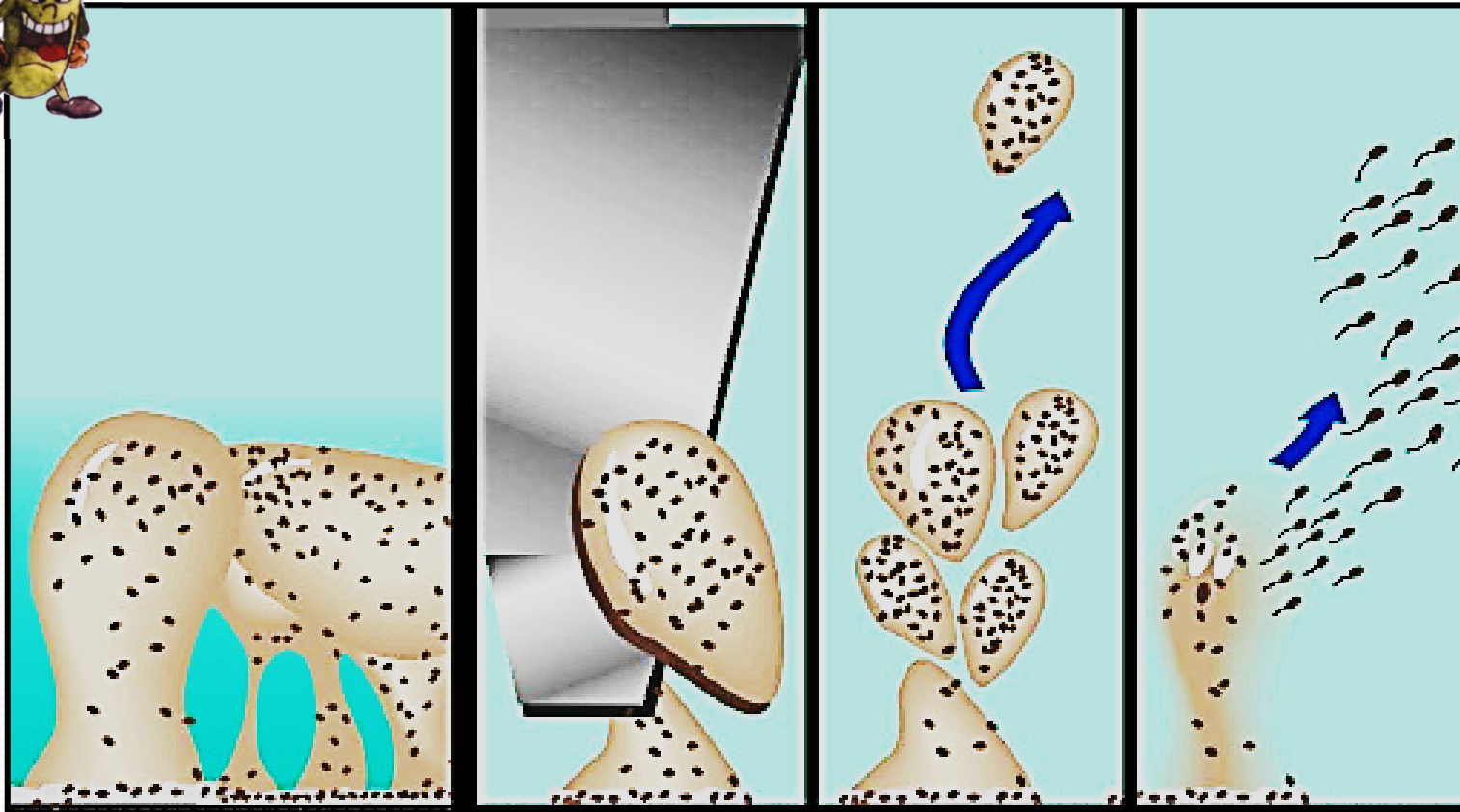
ob die routinemäßige Bestimmung der Gesamtkeimzahl im Kühlwasser, z.B. einmal pro Woche, wie von der deutschen Leitlinie VDMA 24649 vorgeschlagen, ist ausreichend?

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

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

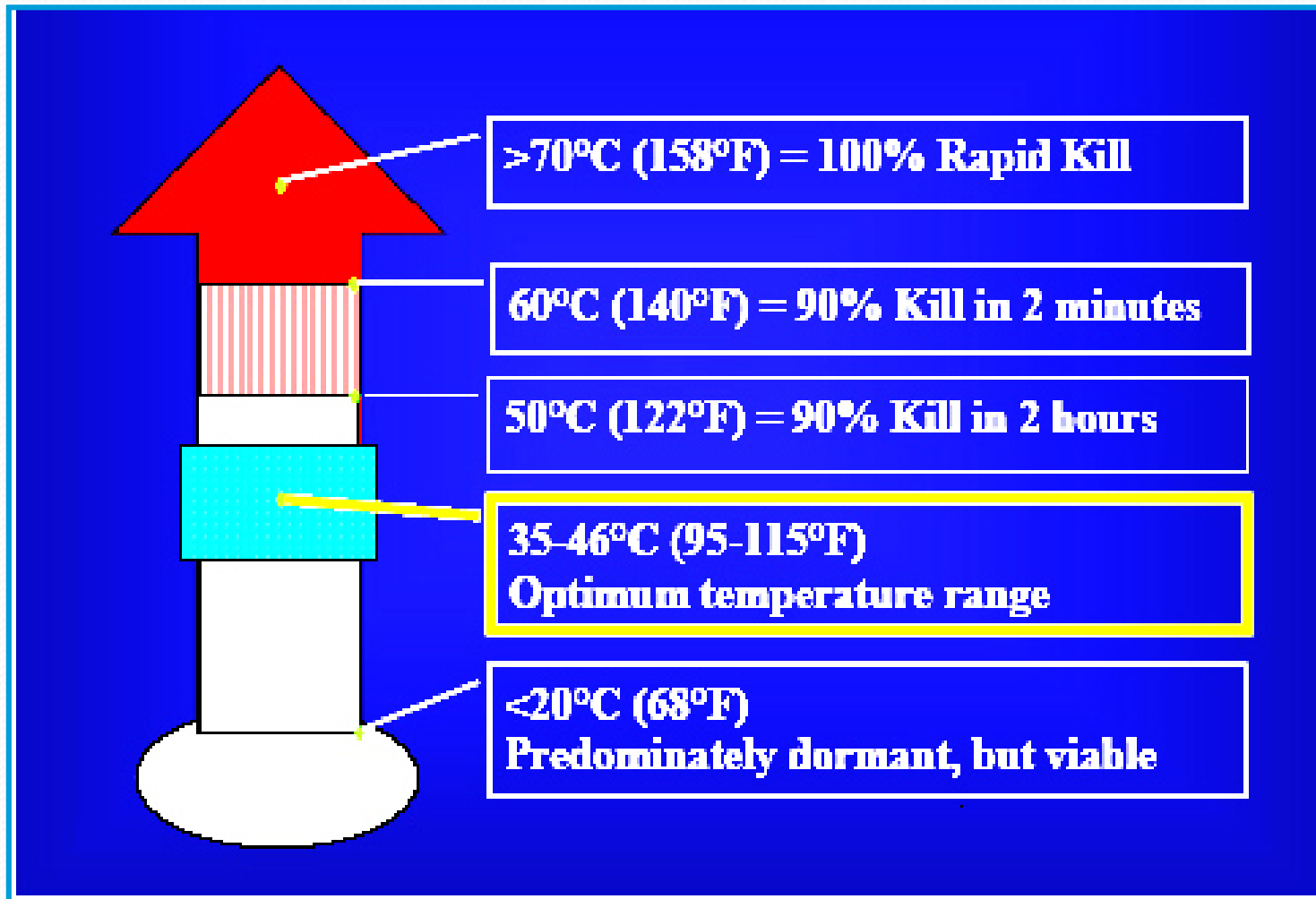


Mechanische Destruktion von Biofilm

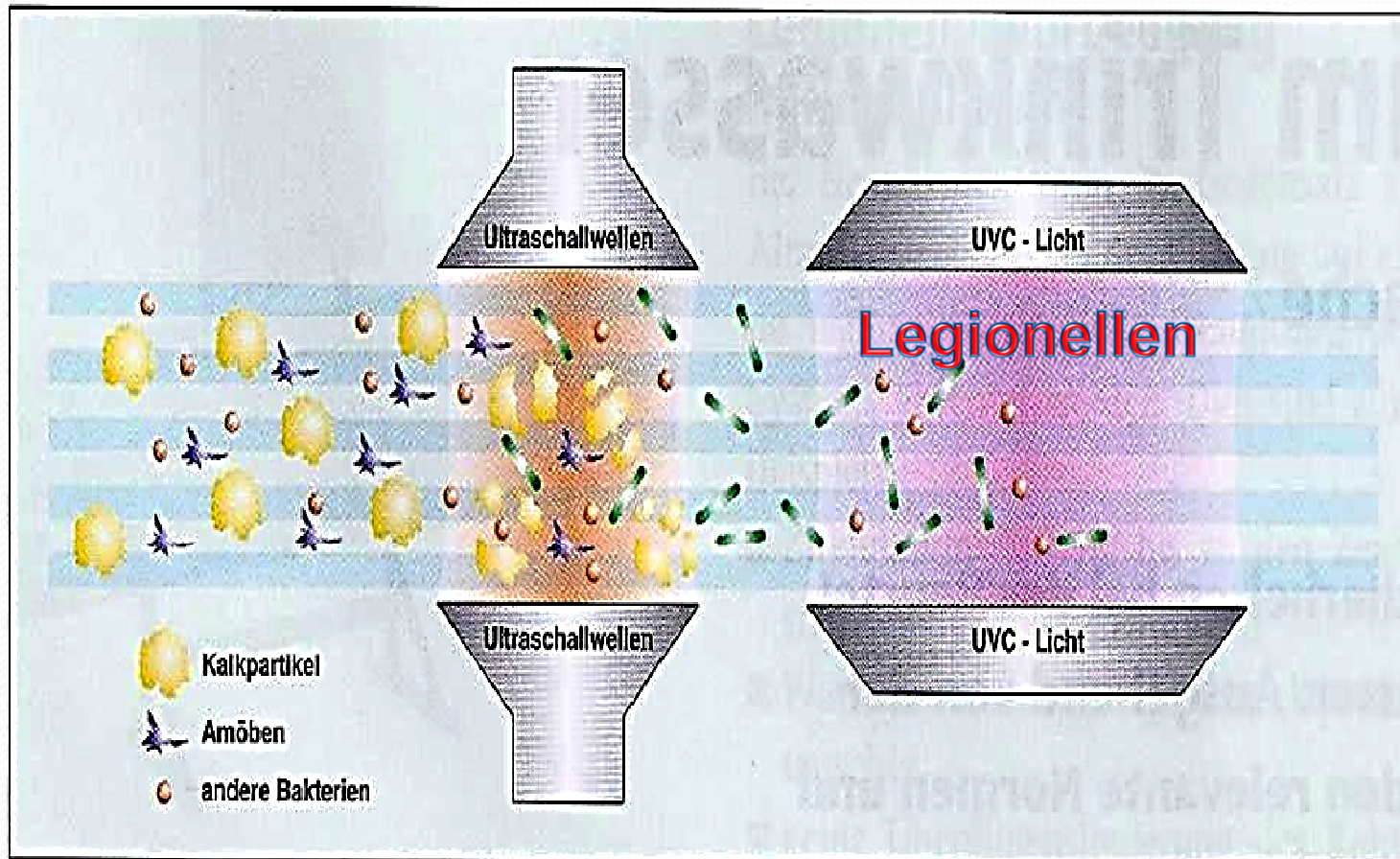


Dyspersion der Biofilm und Entwicklung Einzel Bakterien

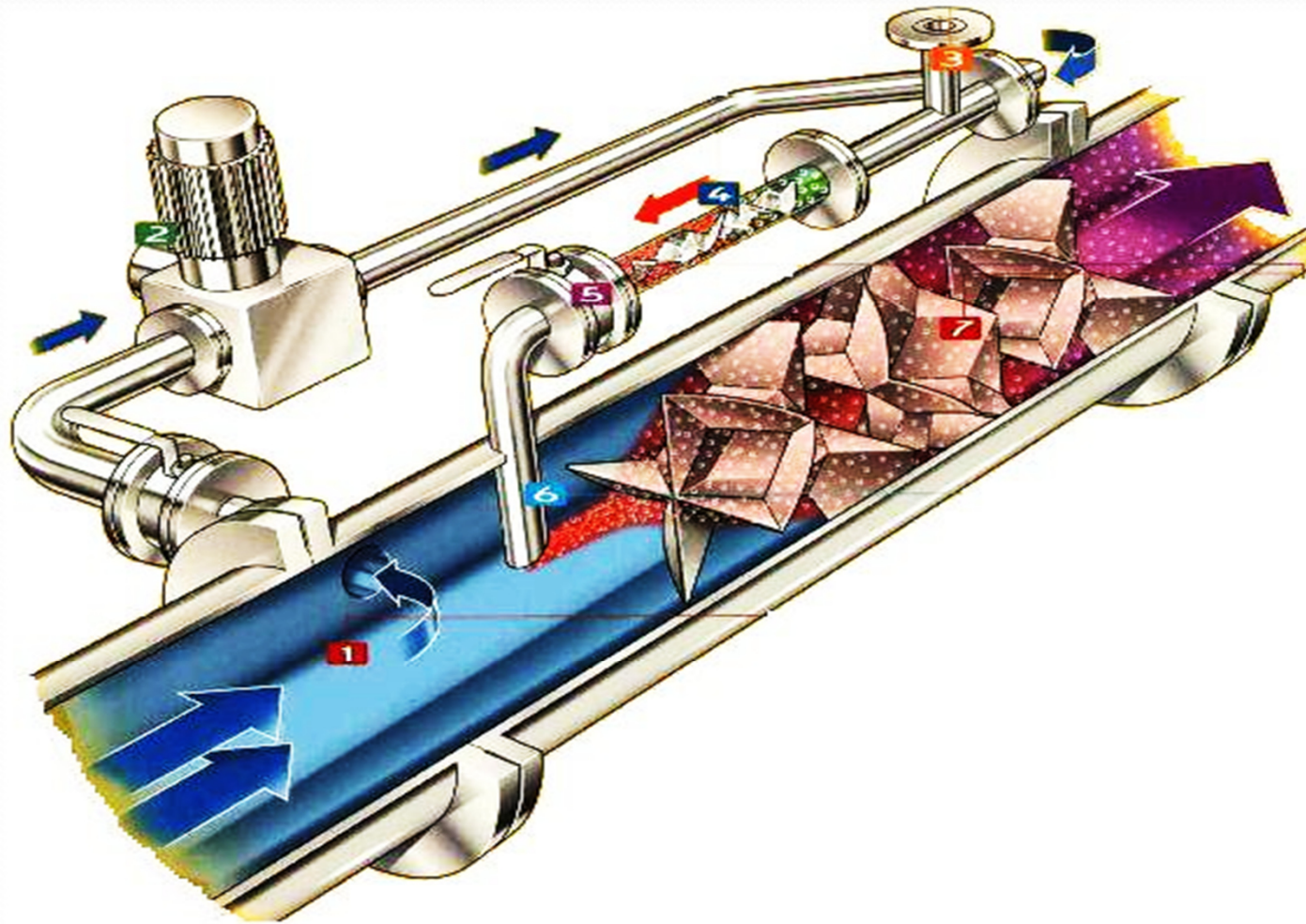
Thermische Behandlung Wasser mit Legionellen



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



Side-Stream Ozon Injektion



Korrelation?

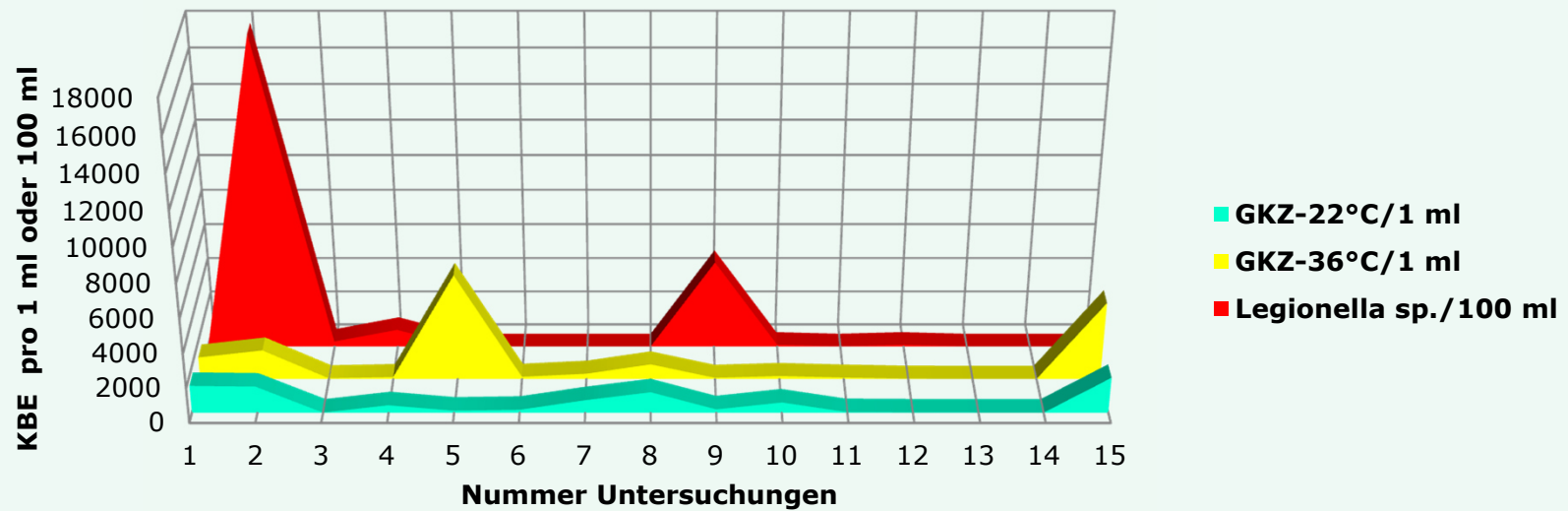
Die Untersuchung der Gesamtkeimzahl ist für die Bestimmung einer Legionellen-Kontamination des Kühlsystems nicht geeignet, da die GKZ und der optisch beurteilte Grad der Verschmutzung (z.B. Biofilm) nicht mit der Legionellen-Konzentration im Kühlwasser korreliert.

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)



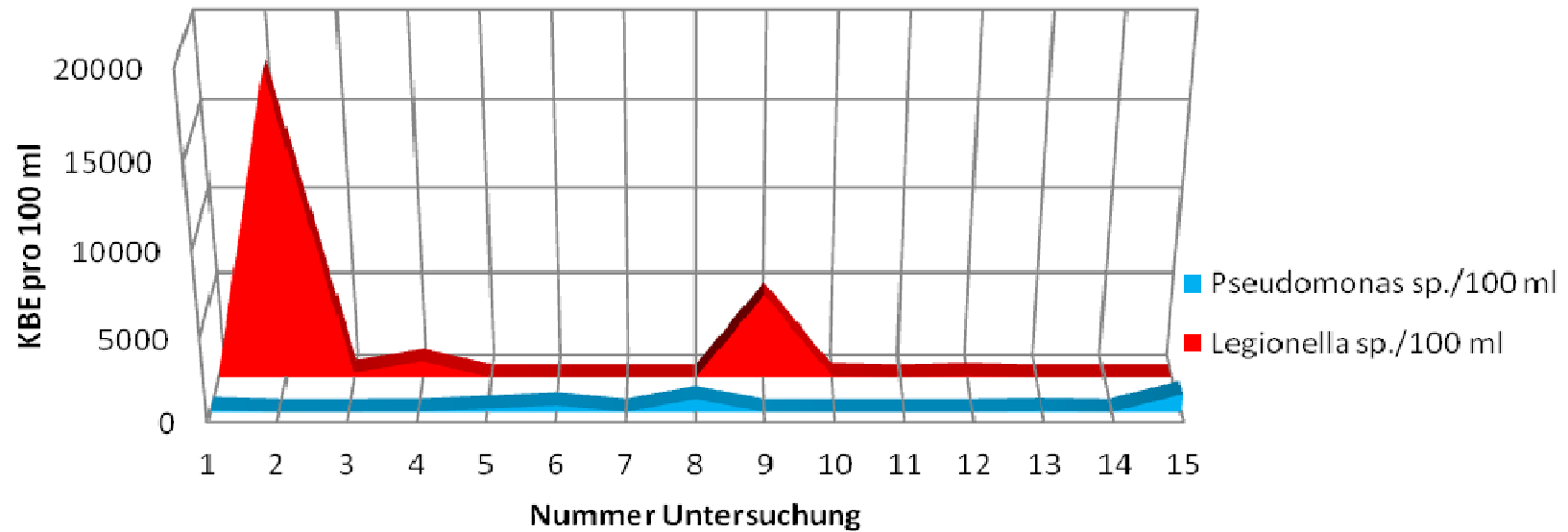
Korrelation zwischen GKZ und Legionellen in Kühlturmwasser



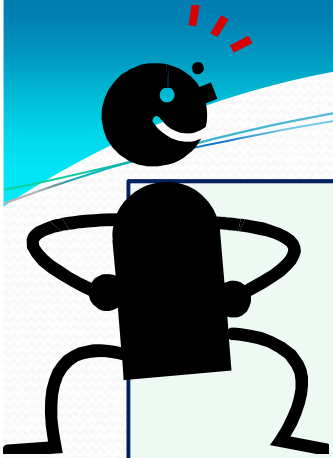
Salek, 2013



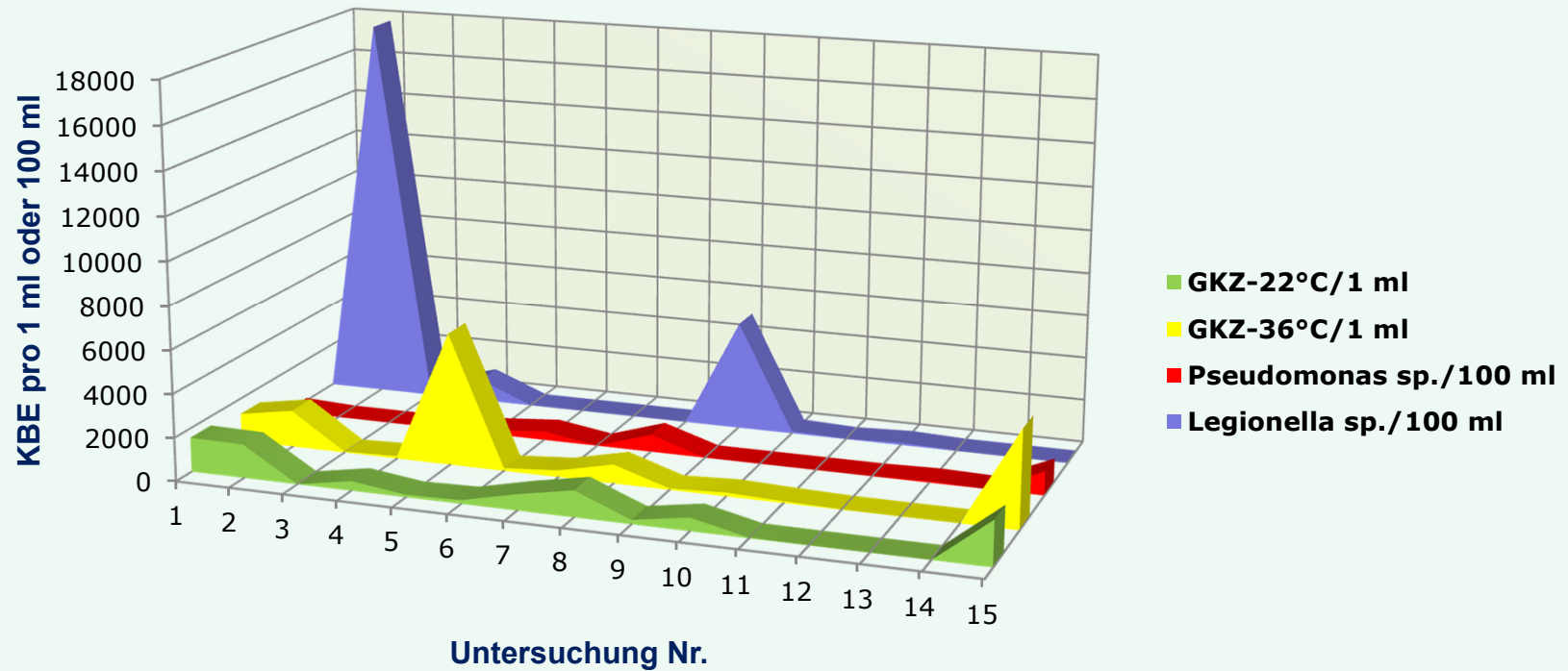
Korrelation zwischen Pseudomonas sp. und Legionelle sp.



Salek, 2013



Korrelation zwischen Mikroorganismen in Kühlturmwasser



Salek, 2013

Koloniezahlen als 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.

Amöba



Legionella

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
<http://www.domatec.info>



Biofilm (EPS) in industriellen Kühlwasser

