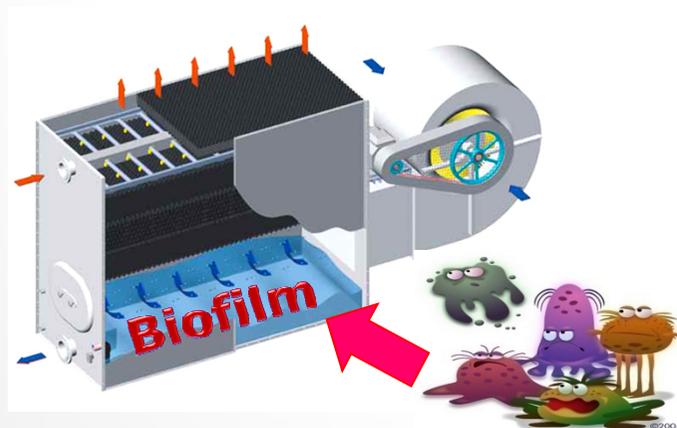


Hygieneschulung VDI 2047

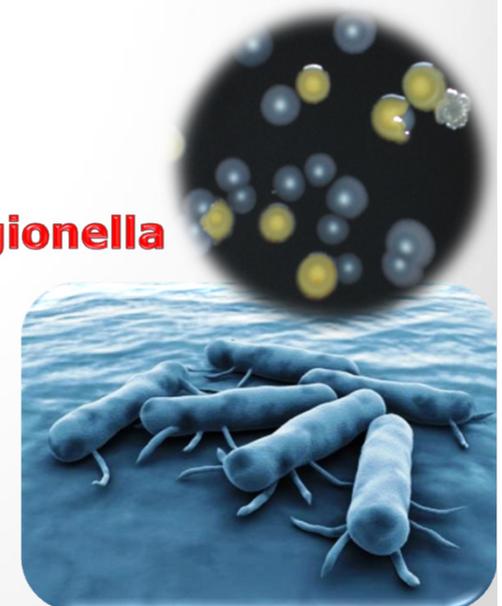


Mikrobiologie im Kühlwasser: Relevante Grundlagen, Risiken, medizinische Aspekte

Dr. habil. Anna Salek



Legionella



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.

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.**

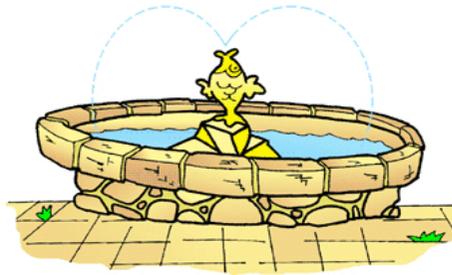
Der natürliche Lebensraum von Mikroorganismen ist der Biofilm

- Biofilme bestehen überwiegend aus:
 - ✓ Wasser (bis zu 95% der gesamten Biofilm-Masse),
 - ✓ EPS (bis zu 95% der Trockenmasse),
 - ✓ Mikroorganismen, ggf. vielzellige Organismen,
auch Krankheitserreger,
 - ✓ Eingebettete Partikel (anorganisch, organisch).
- Allgemeine Bezeichnung des makroskopischen
Erscheinungsbildes von Biofilmen: **Schleim und Belag.**



Mögliche Infektionsquellen Kontamination: Erwärmtes Wasser und Aerosol

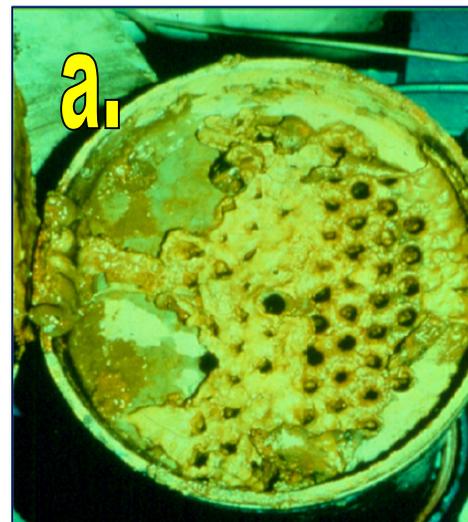
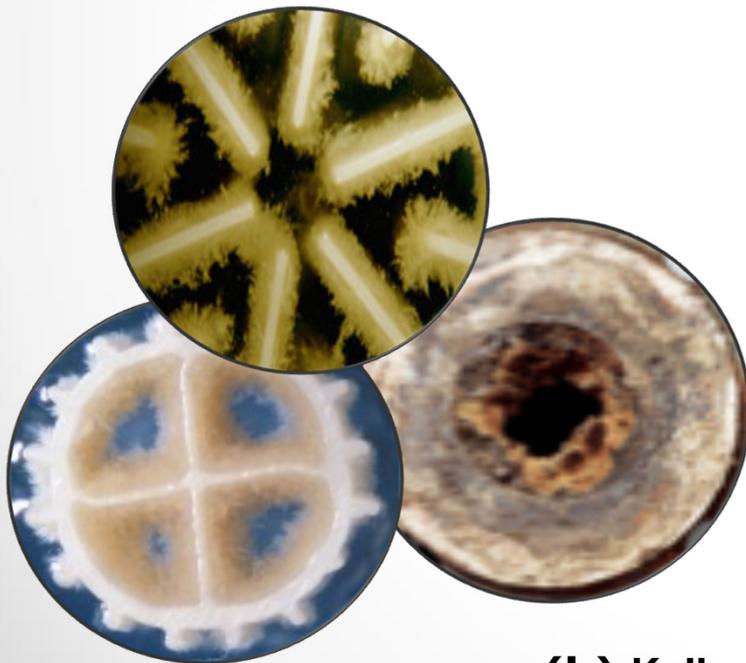
- Whirlpools
- Duschen
- Waschbecken
- Spielmaschinen
- Nebelmaschinen in Supermärkten
- Feuchte Böden, Blumenerde, Spring



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

Biofilme in technischen Anlagen, wie:

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



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

Inhalt:

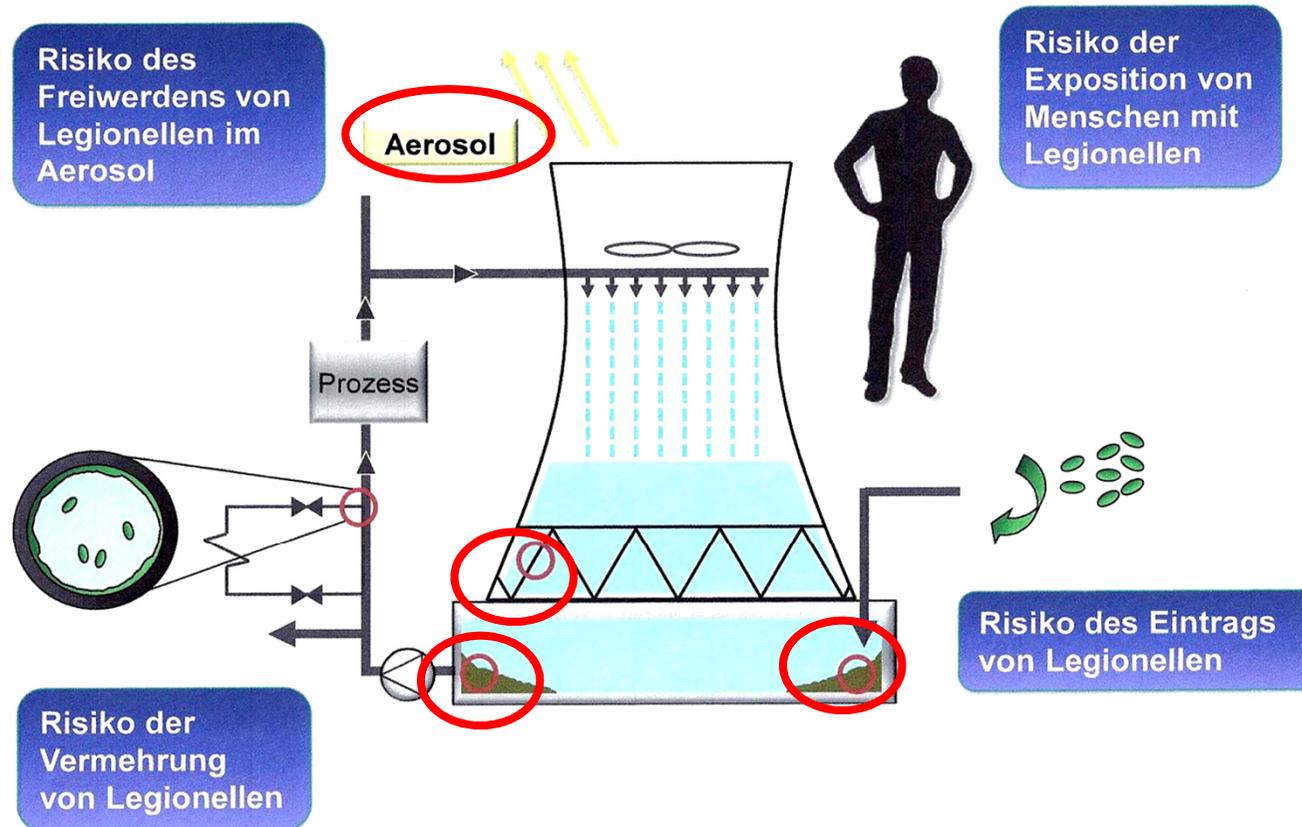
1. **Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).**
2. **Entstehung von Biofilmen & Biofouling.**
3. **Mikroorganismen im Biofilm: Bakterien und deren Ökosystem.**
4. **„Quorum sensing“, Inhibition und Interaktion zwischen Wassermikroorganismen.**
5. **Analytische Methoden – Nachweis von Bakterien im Kühlturmwasser.**



Kühlturm Anlagen



Risikobetrachtung Rückkühlwerke



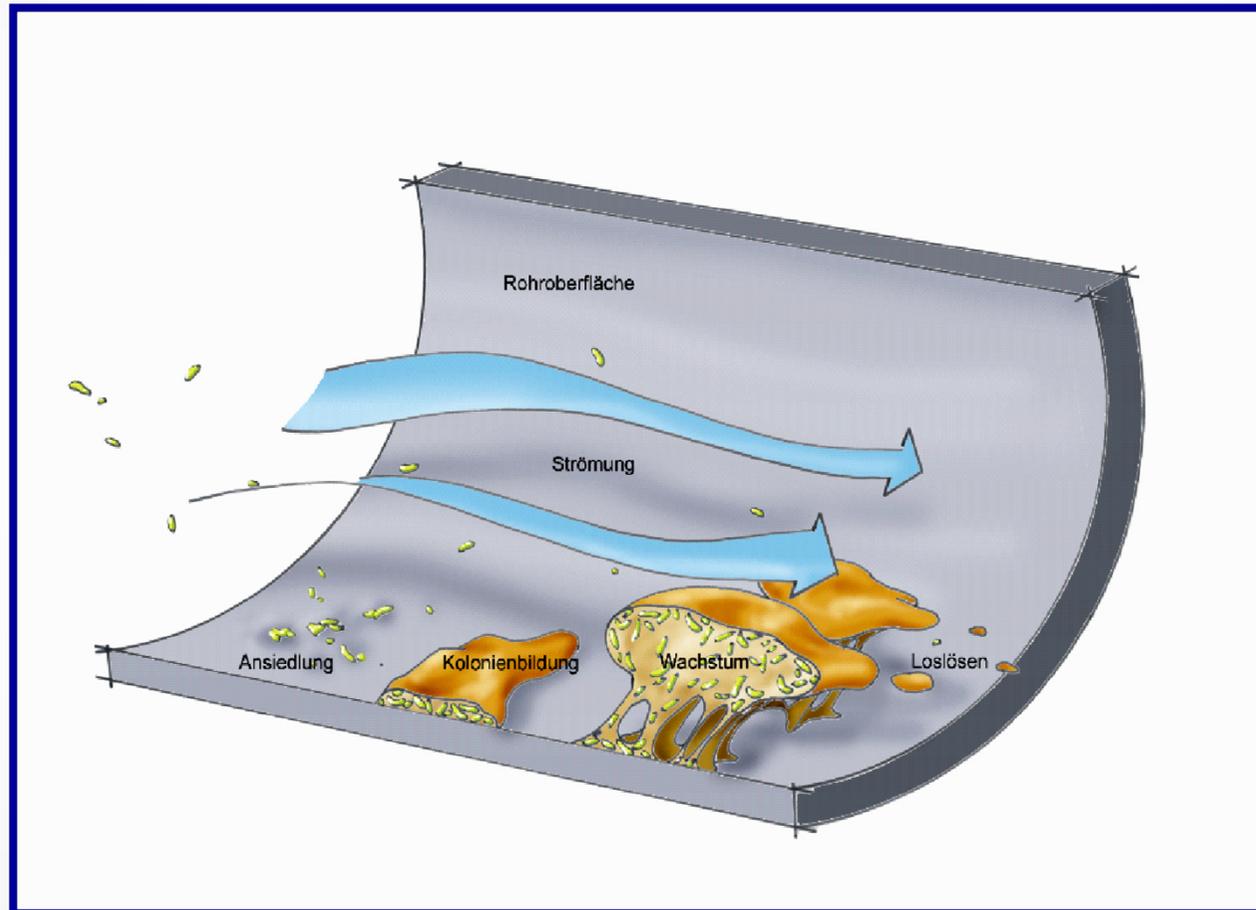
Nach Dr. S. Schult, IWW-Kolloquium Mülheim

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,**
- **Mikrobiologisch beeinflusste/induzierte Korrosion,**
- **Qualitätsverlust bei direkt gekühlten Produkten,**
- **Hygienerisiko durch Freisetzung pathogener Organismen**



Extrazelluläres Polysaccharide Matrix - Biofilm in Kühlswassersystemen

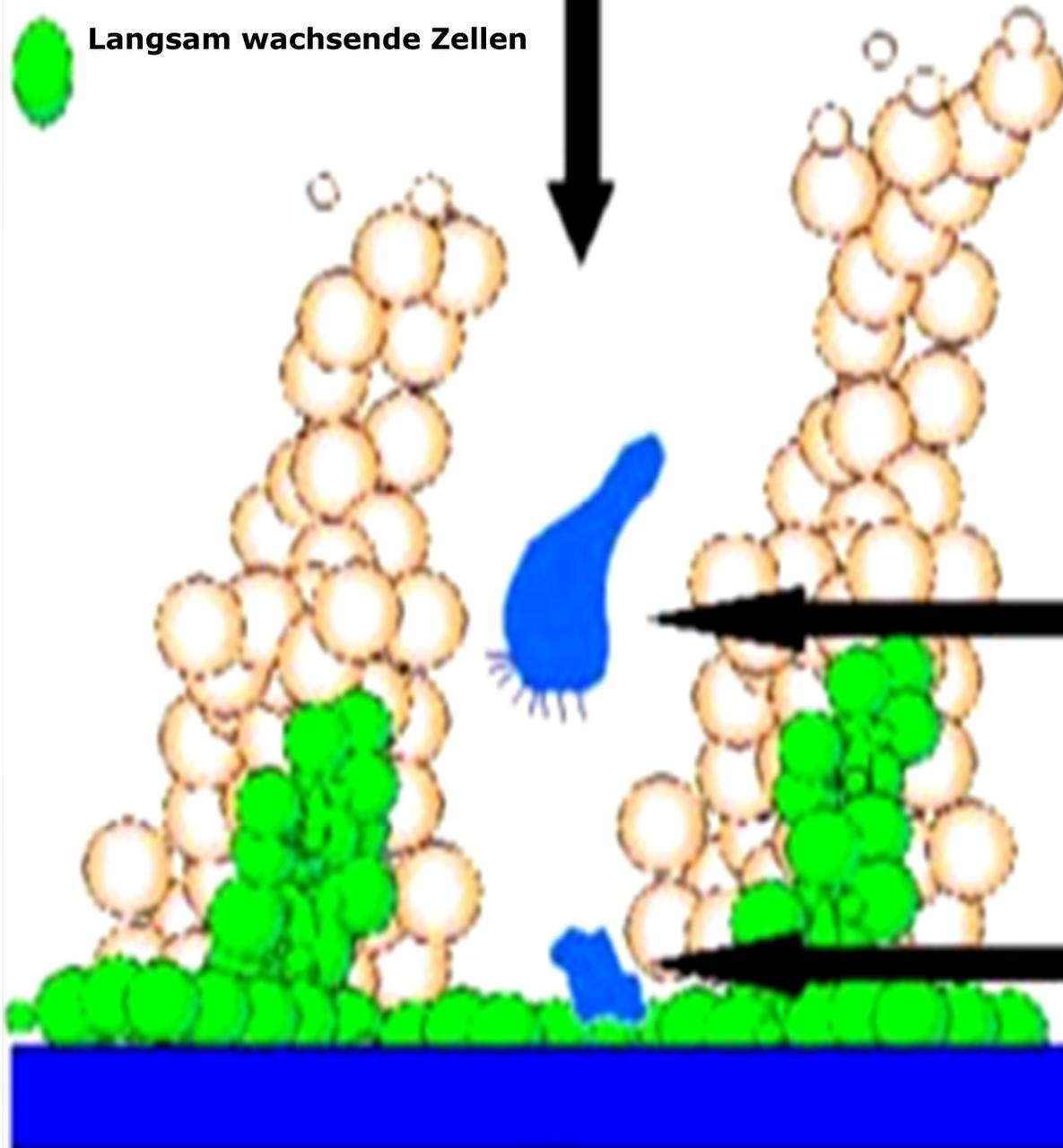




Schnell wachsende Zellen



Langsam wachsende Zellen

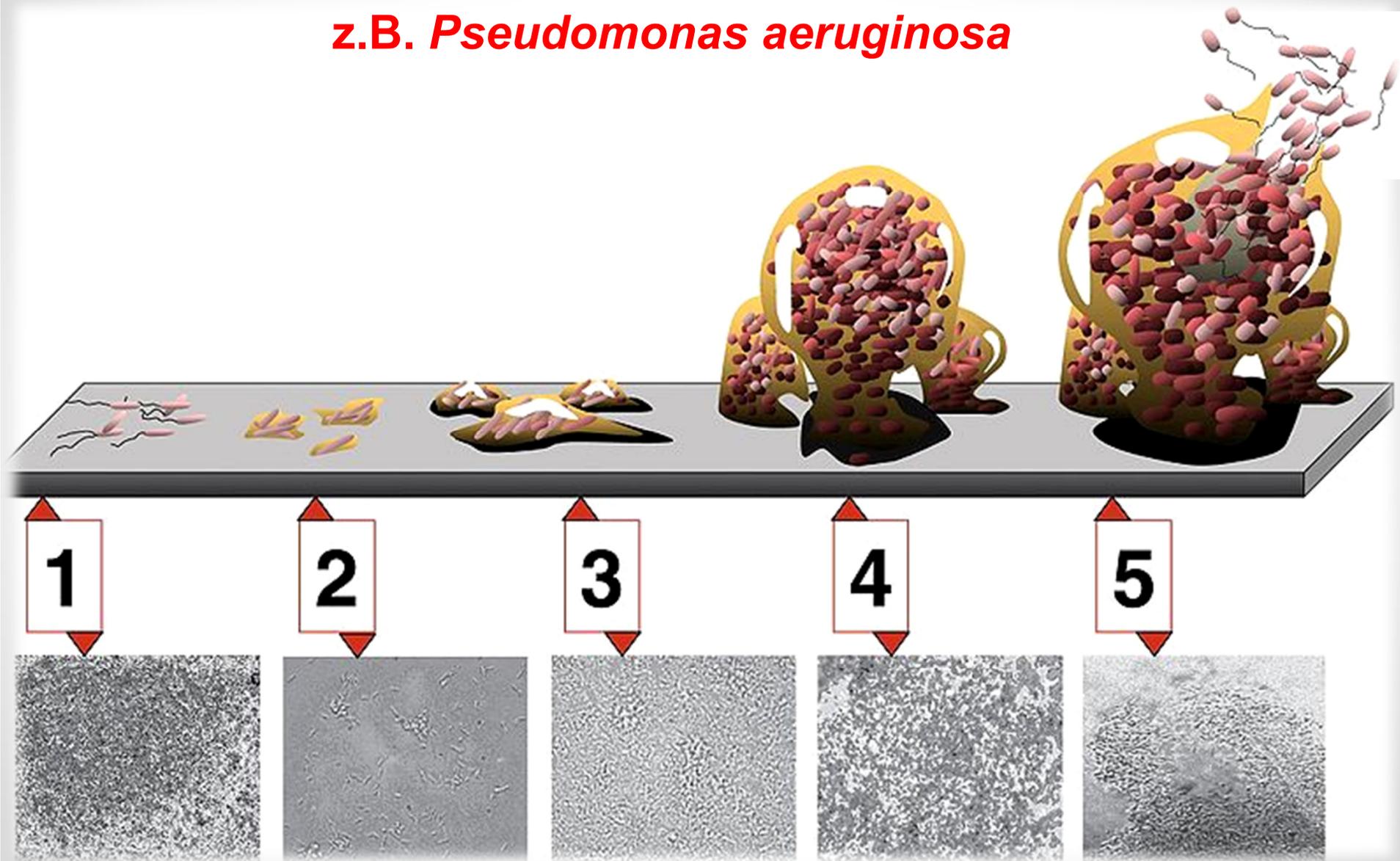


Mikrokolonie

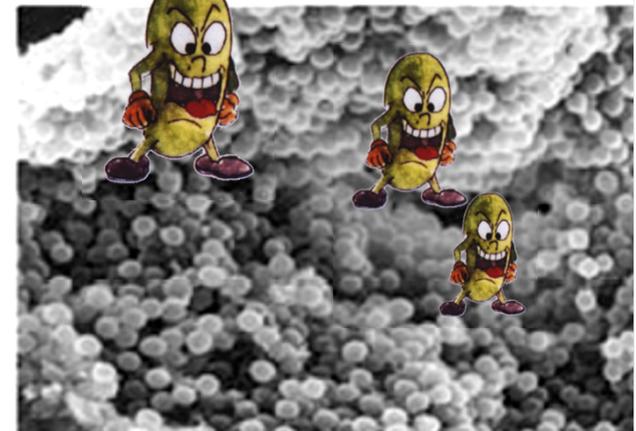
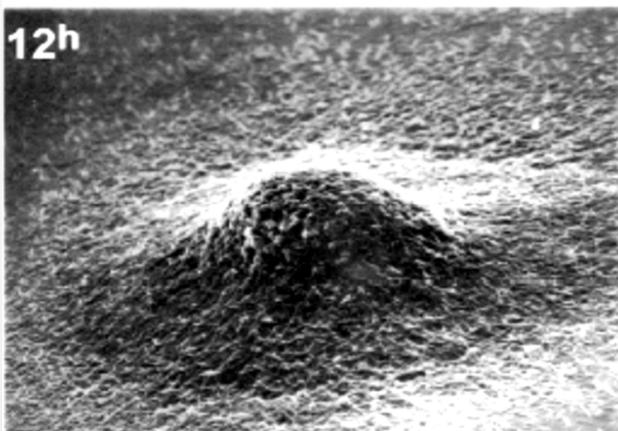
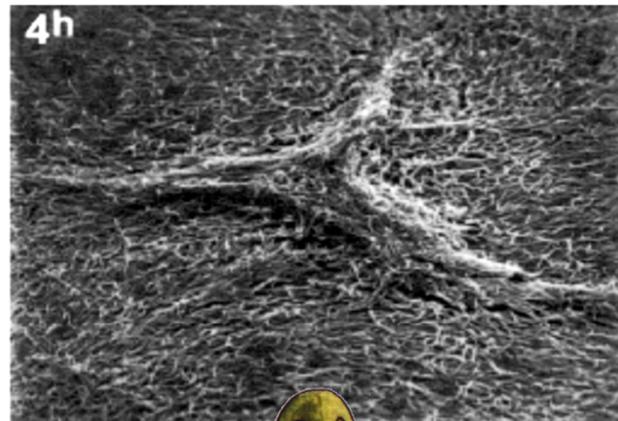
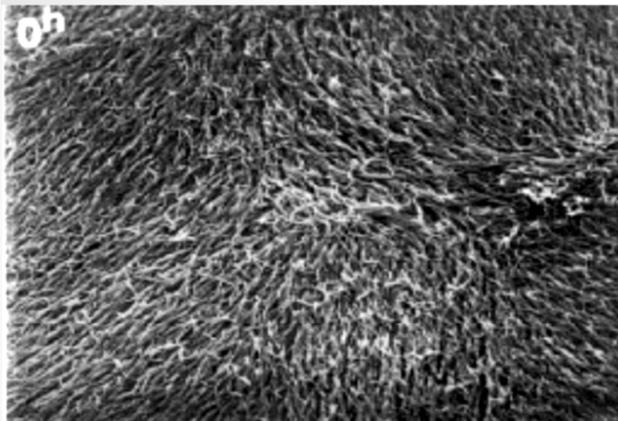
Protozoa

Amöben

Biofilm Wachstum, z.B. *Pseudomonas aeruginosa*



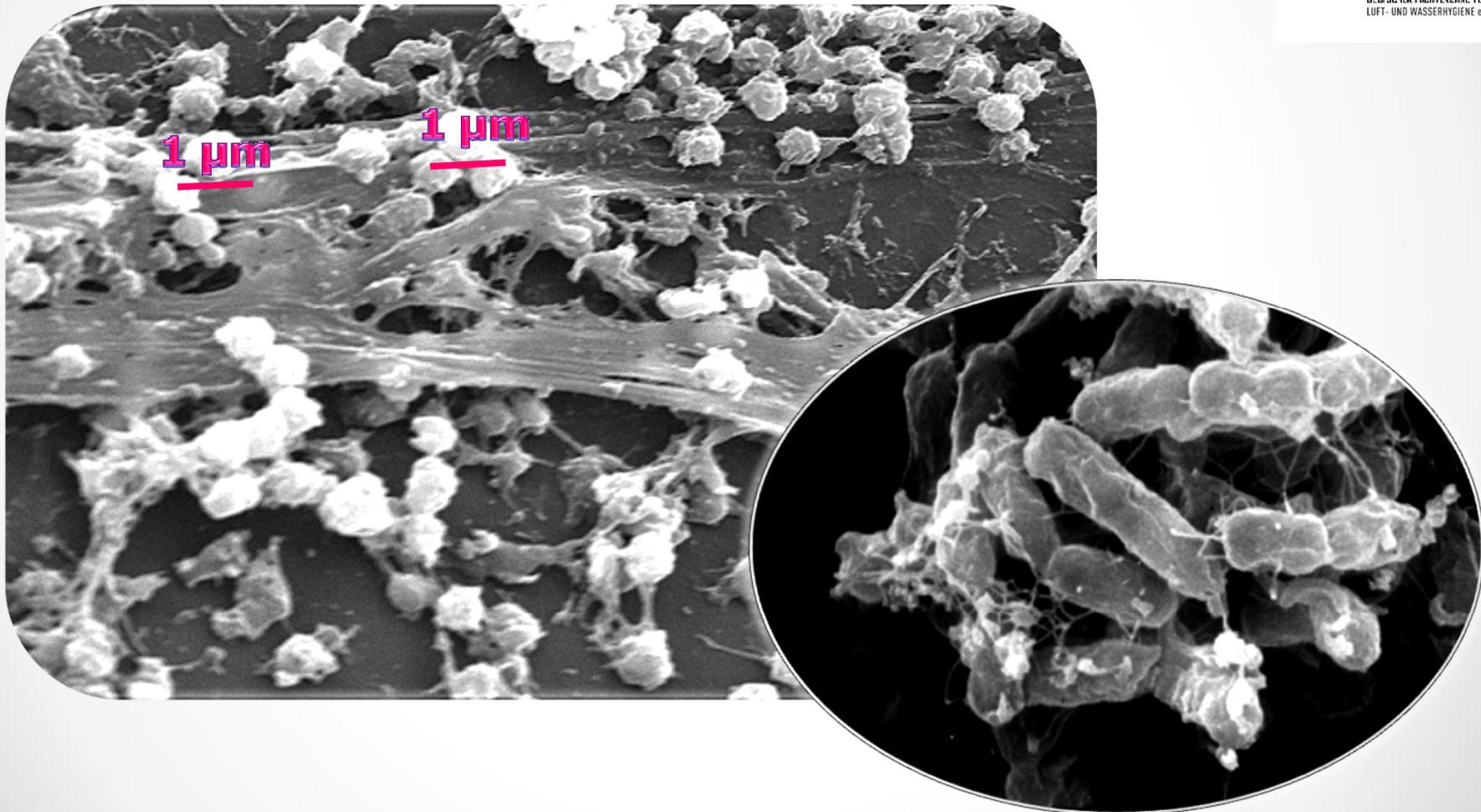
Biofilmwachstum - Matrix EPS, z.B. *Pseudomonas* spp.



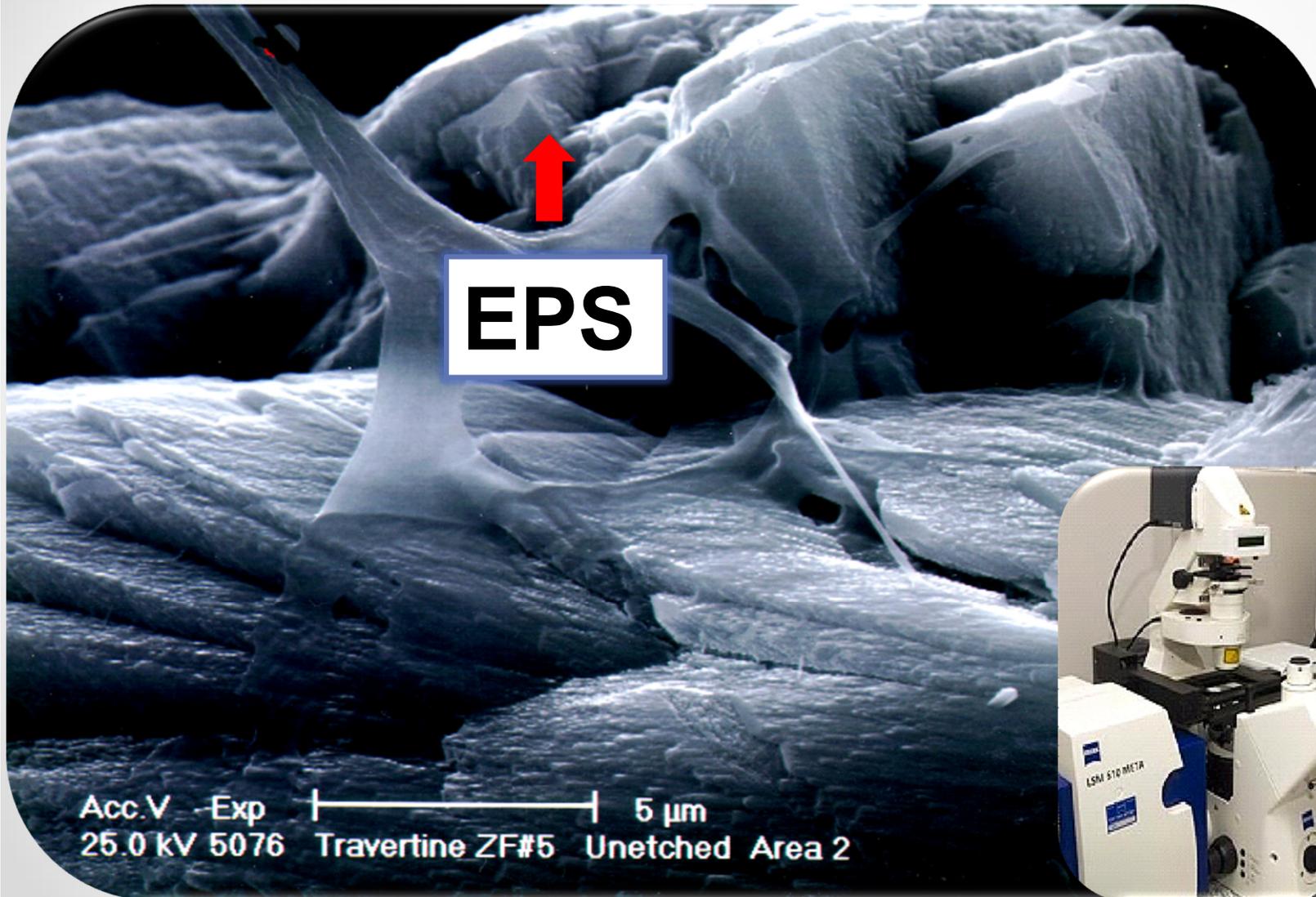
10µm

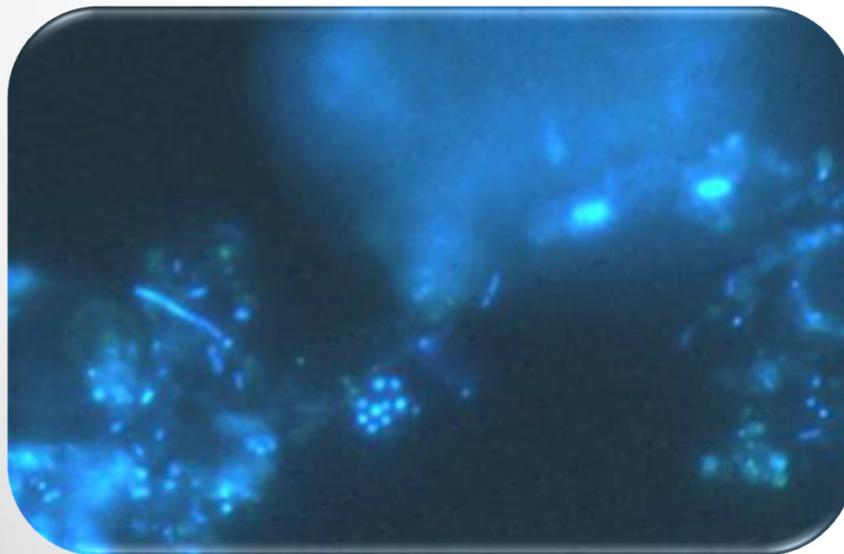
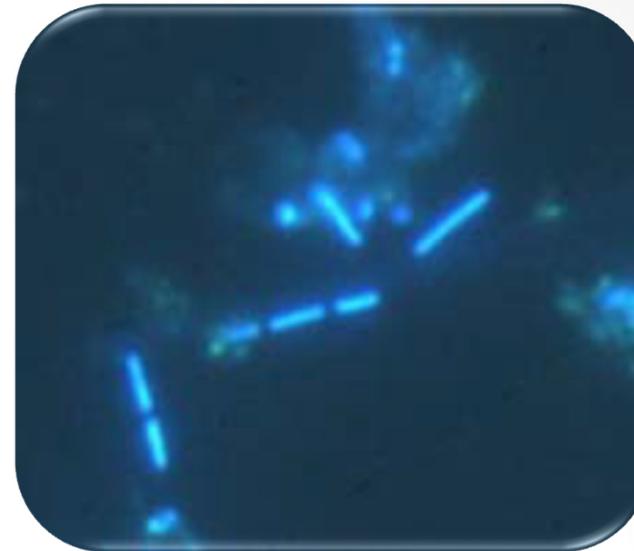
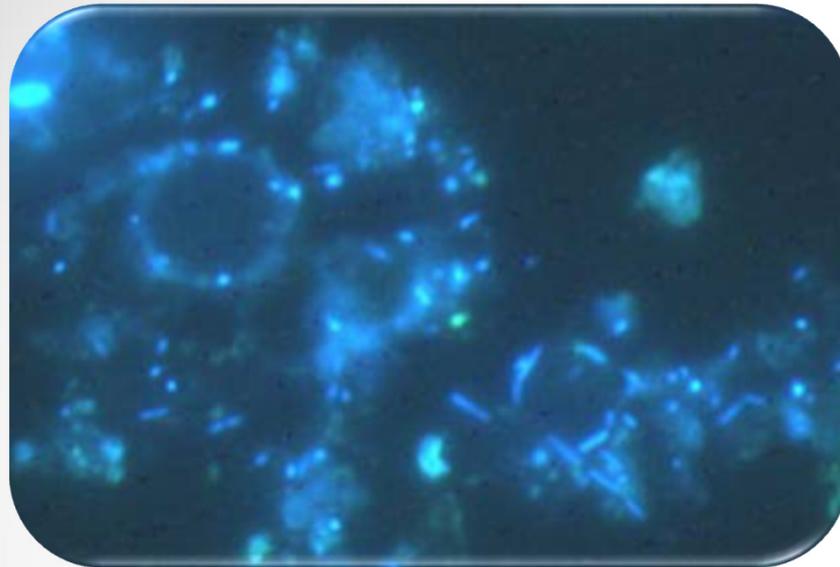
5µm

Aerobe Bakterien *Pseudomonas* spp. (chemoorganotroph) produzieren EPS für Biofilm



Extrazelluläres Polysaccharide Matrix - Biofilm





**Microscopische Bold,
Schmutzdecke, gefärbt mit DAPI,
1000x magnification;
Epifluorescence Mikroskop,
Stäbchen und Spiralle**

EPS, Mukoid von *Pseudomonas aeruginosa*



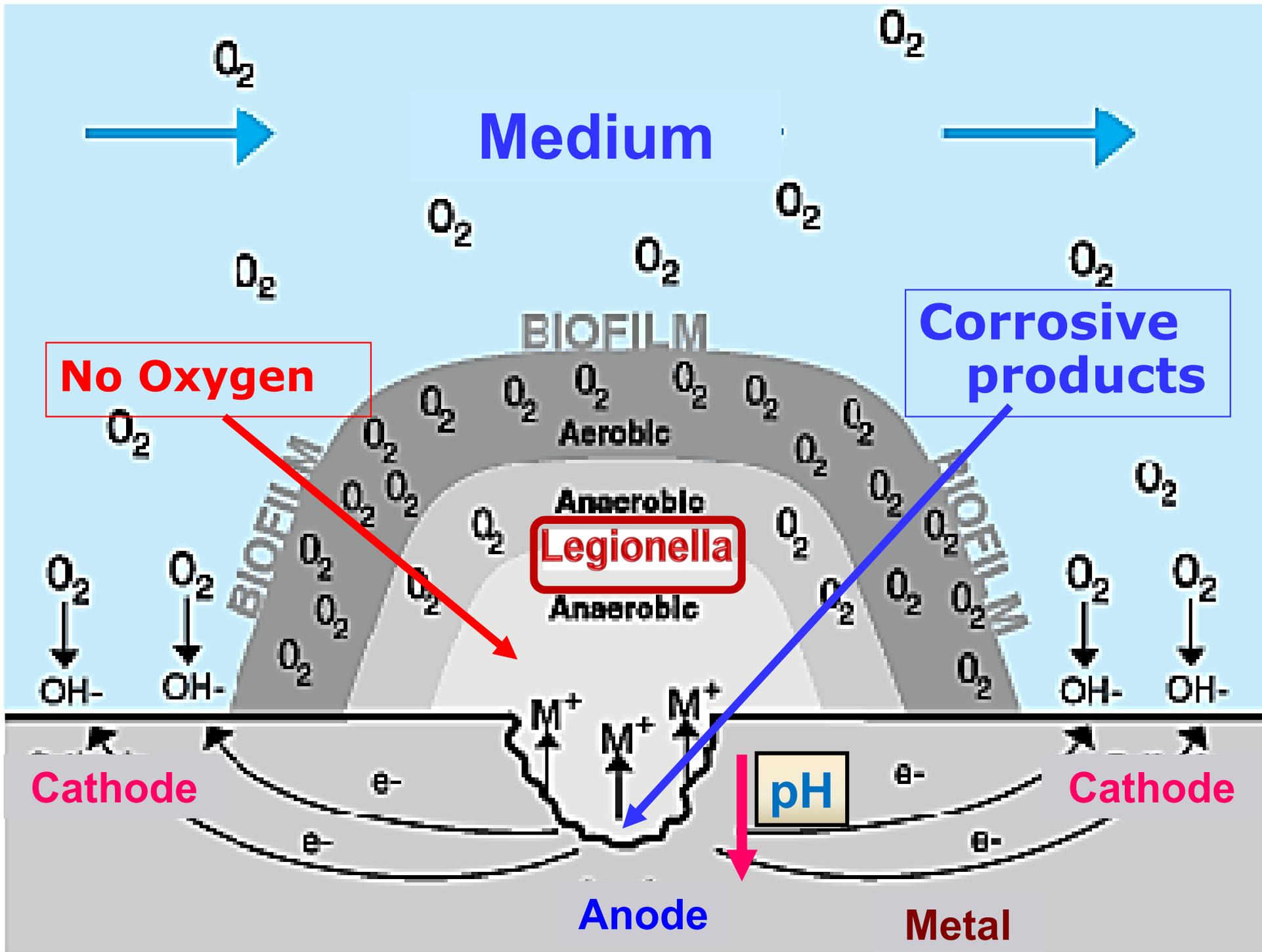
Distribution	in cells	in EPS
Polysaccharides	19,8 %	79,2 %
Uronic acids	15,0 %	85,0 %
Proteins	58,4 %	41,6 %

EPS-components

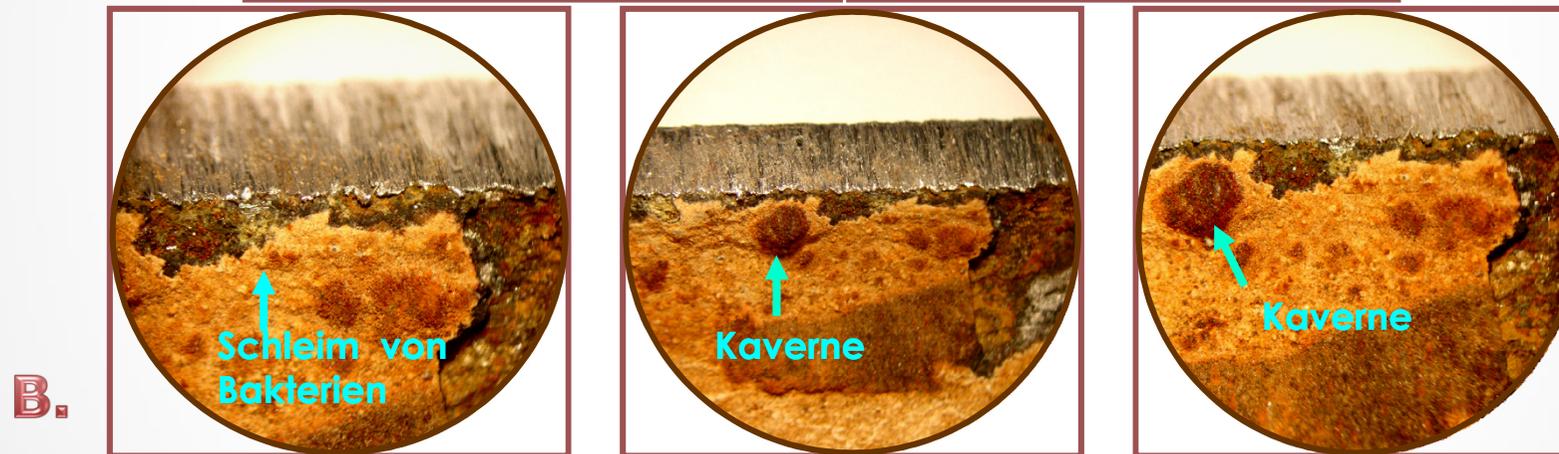
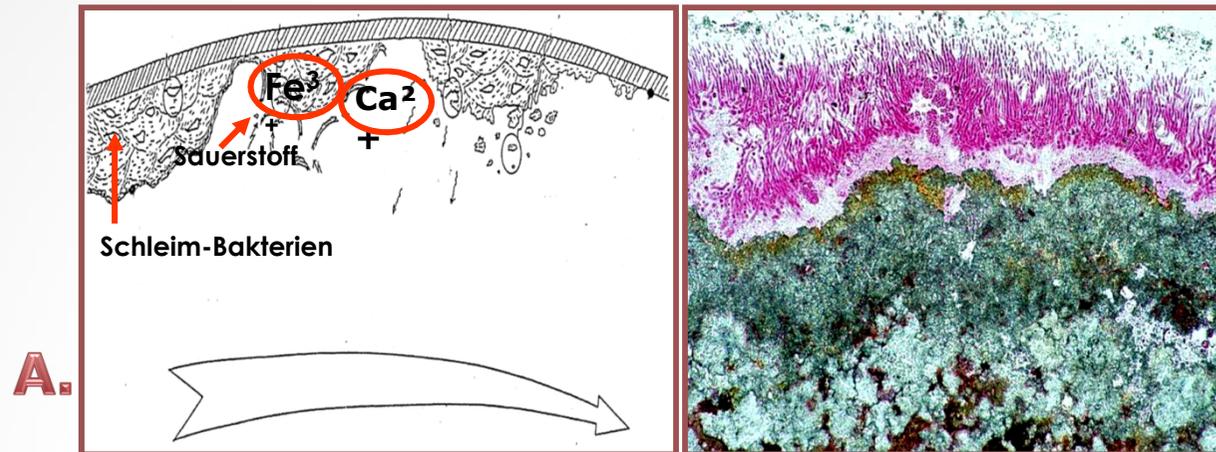
Polysaccharides	69,0 %
Lipopolysaccharides	0,5 %
Proteins	25,0 %
other components	5,5 %
[no nucleic acids detected]	

Polysaccharides

Alginate	81,8 %
Neutral polysaccharides	18,2 %



Ablagerung in Warmwassersystemen



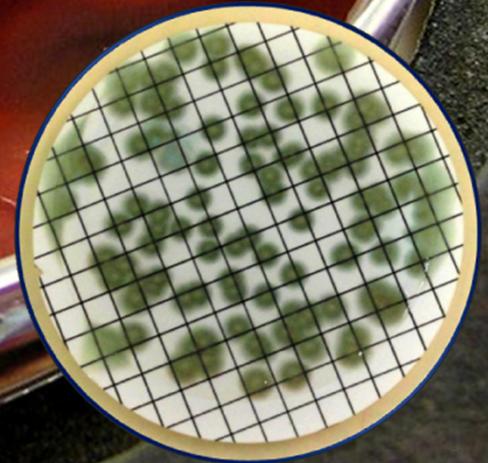
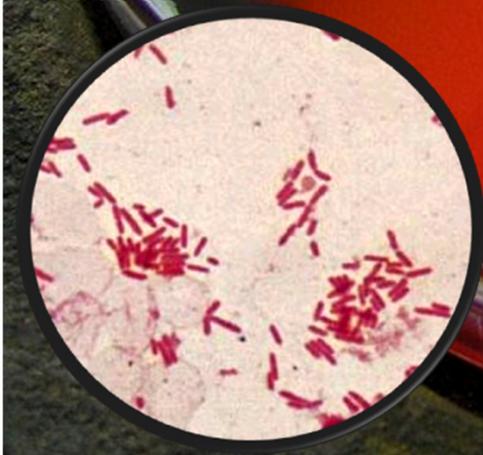
**Bild von Innerleitung für Warmwasser:
(A.) Biofilm (Schleim) und Mineralien,
(B.) Röhren mit Kalkstein und Biofilm zusammen (Photo: A. Salek)**



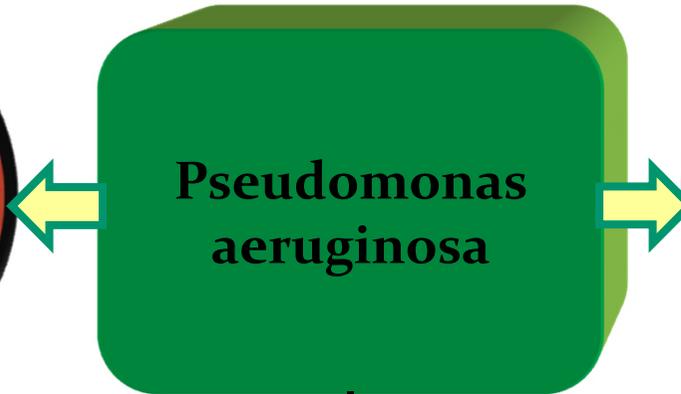
Inhalt:

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

Pseudomonas aeruginosa



Pigmente von *Pseudomonas aeruginosa*



Fluorescein oder
Pyoverdin (gelb)

Fluoreszenz

Farbumschlag

Pyocyanin
(blau-grün)

Pyorubin
(rot-braun)

Toxine !!!

Pseudomonas aeruginosa

Hygienische und technische Relevanz



Allgemeines

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

Pseudomonas aeruginosa

Hygienische und technische Relevanz



Bedeutung

- **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)**

P. aeruginosa - Infektionen



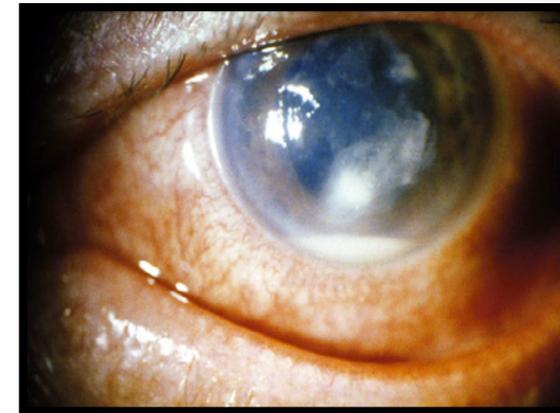
Nosocomial pneumonia



Ear piercing infections



Contact lens associated corneal ulcer



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



Hot tub dermatitis



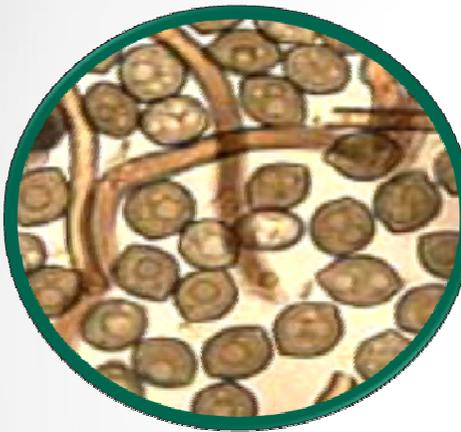
Folliculitis



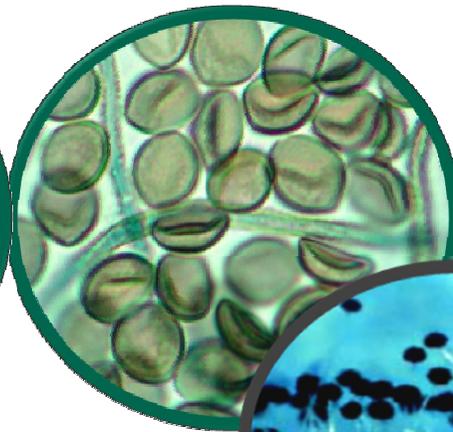
Schimmelpilze in Biofilmen technischer Wassersysteme



Eurotium



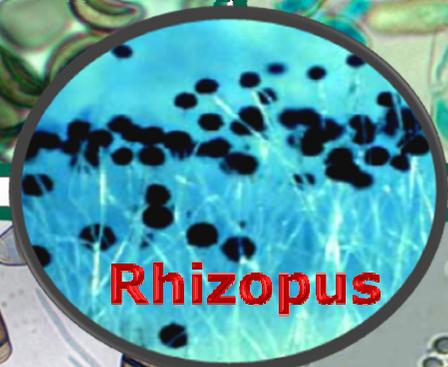
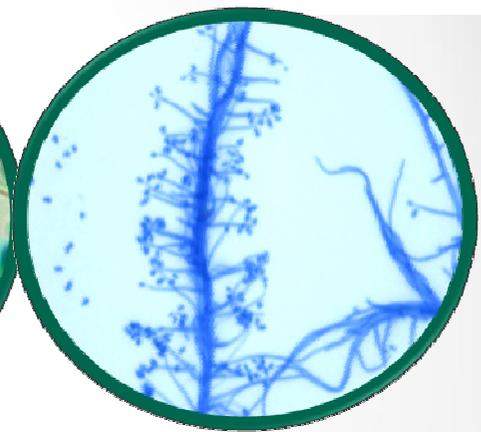
Chaetomium



Cladosporium



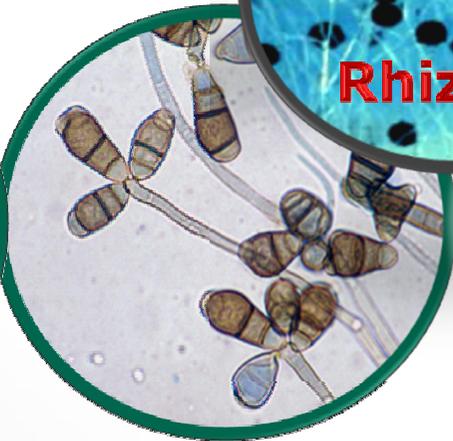
Acremonium



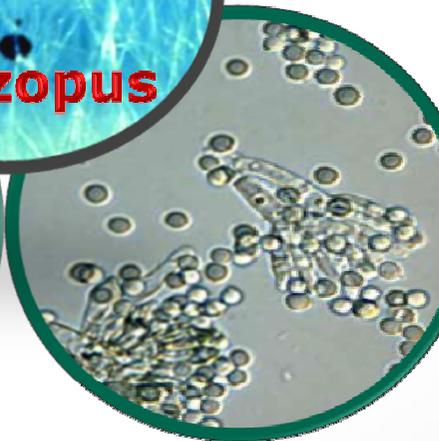
Rhizopus



Fusarium



Curvularia

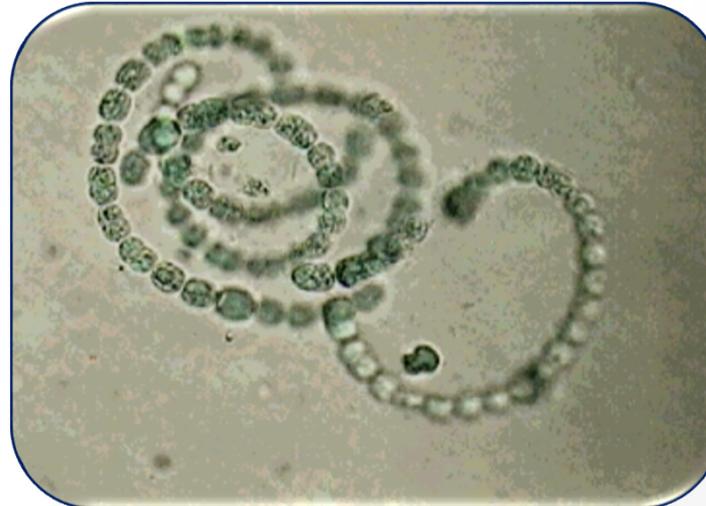


Penicillium



Alternaria

Algen und Amöben in Biofilmen



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

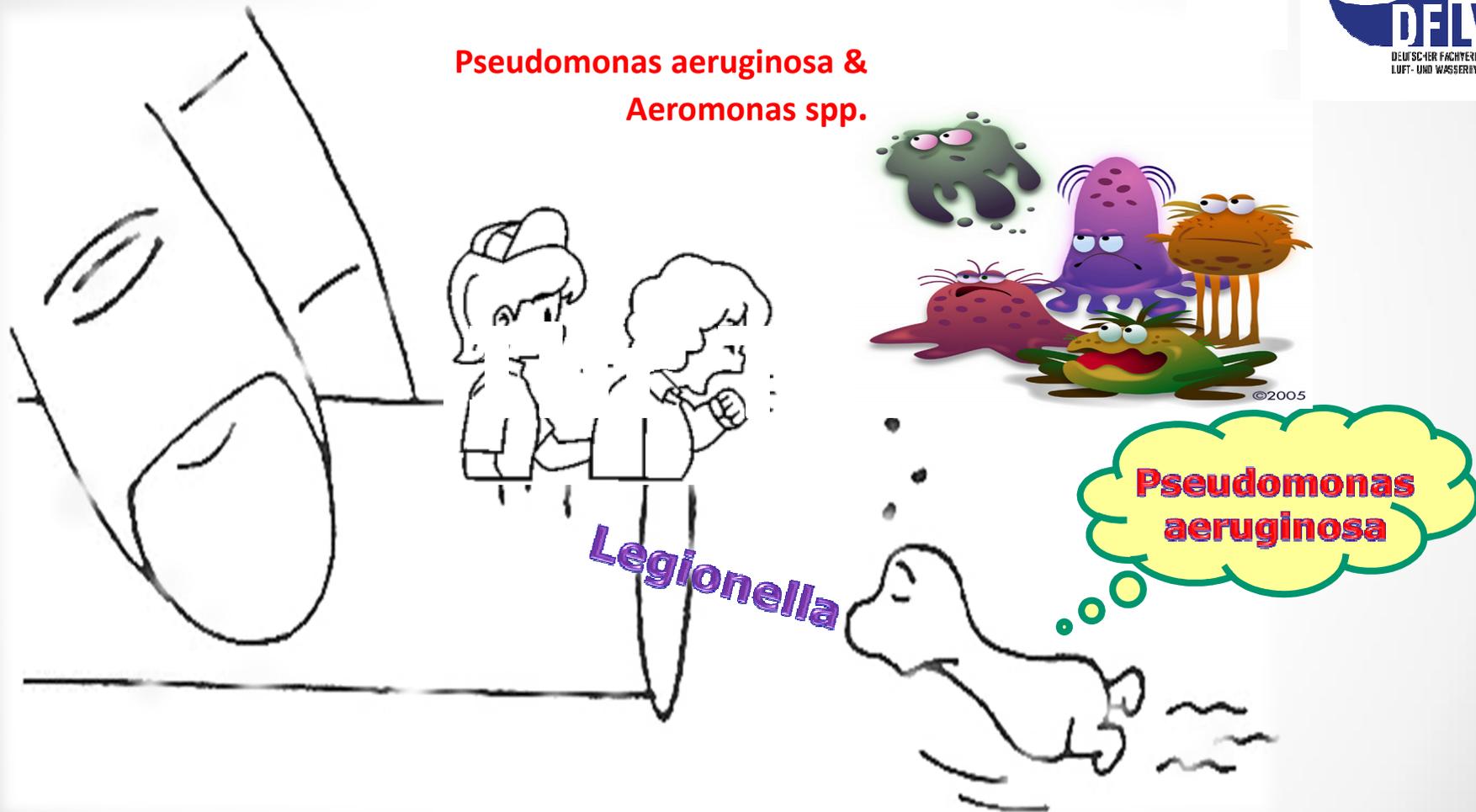
???



Regelmäßige Kontrollen sind unverzichtbar

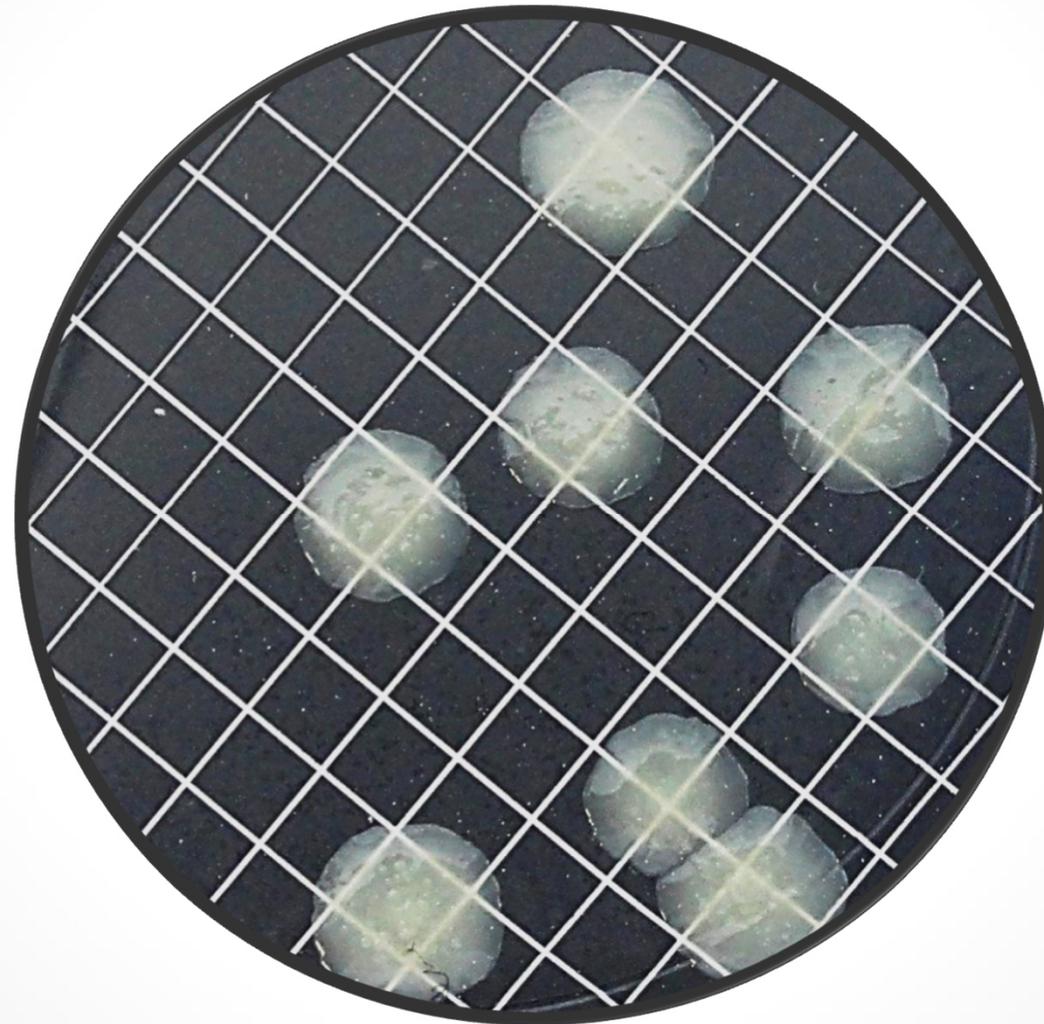


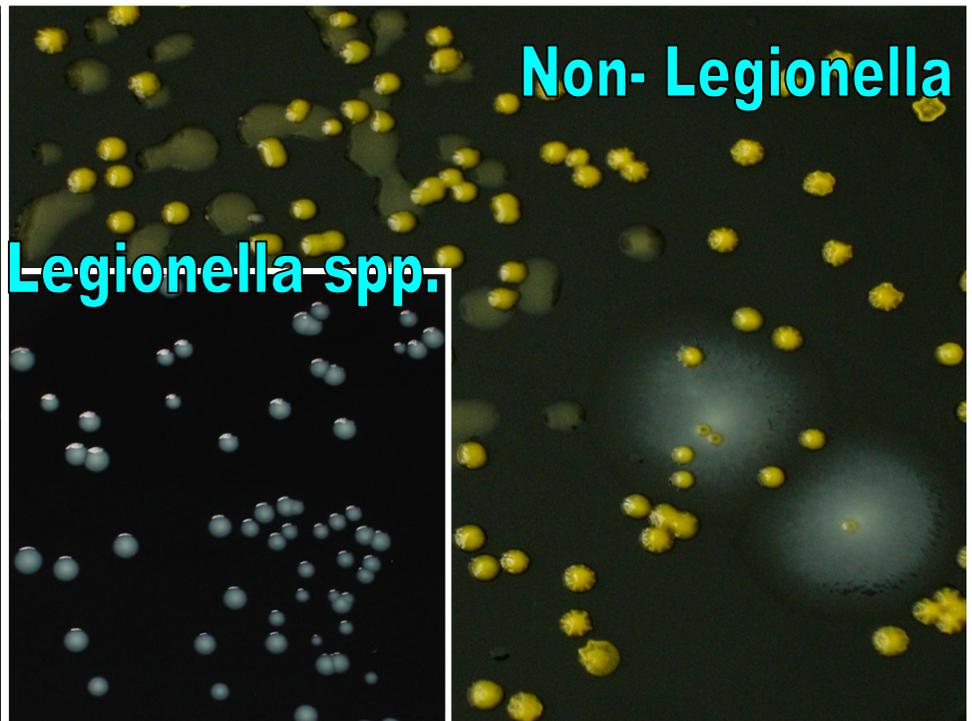
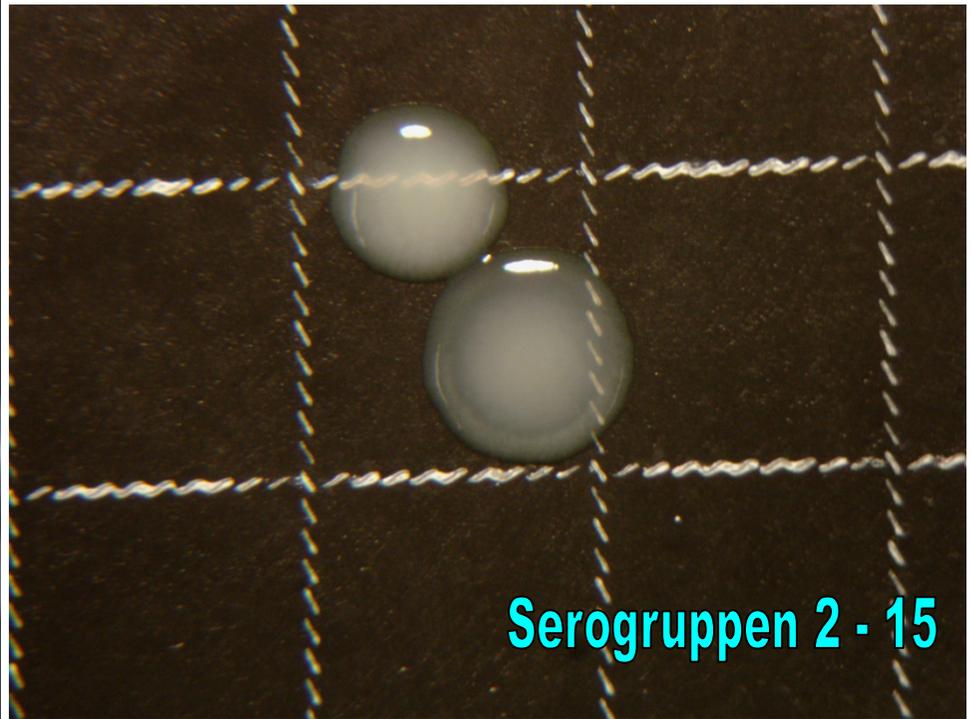
**Pseudomonas aeruginosa &
Aeromonas spp.**



Was produzieren *Pseudomonas aeruginosa* gegen Legionellen?

Legionella pneumophila Sg 1



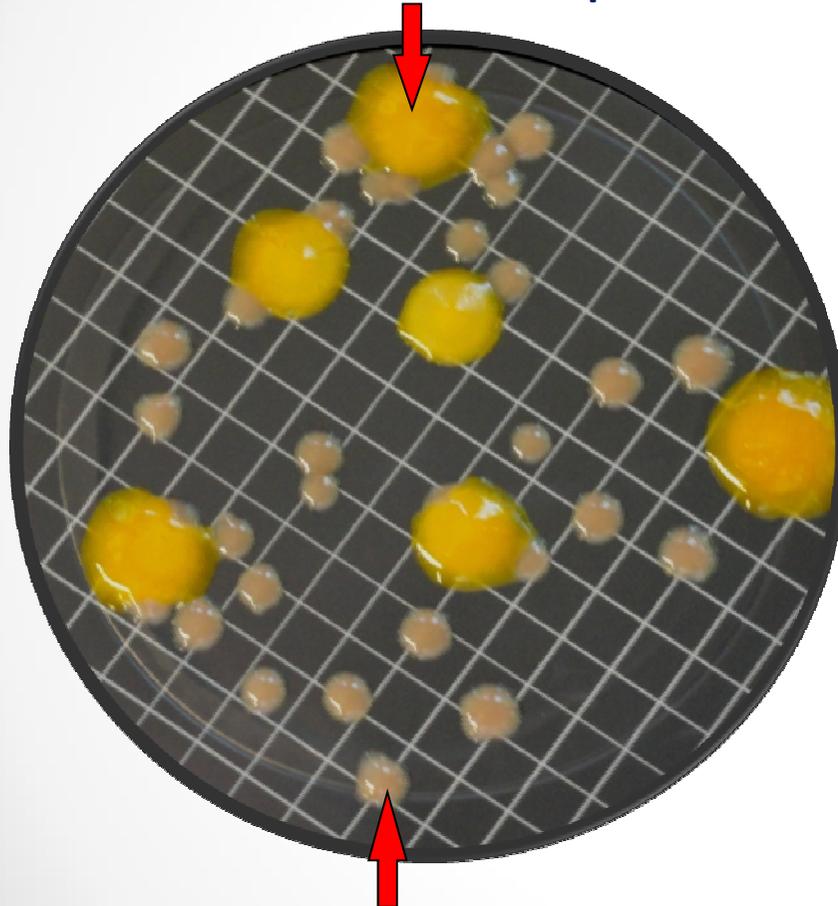


Legionella spp.: Nachweismethoden

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

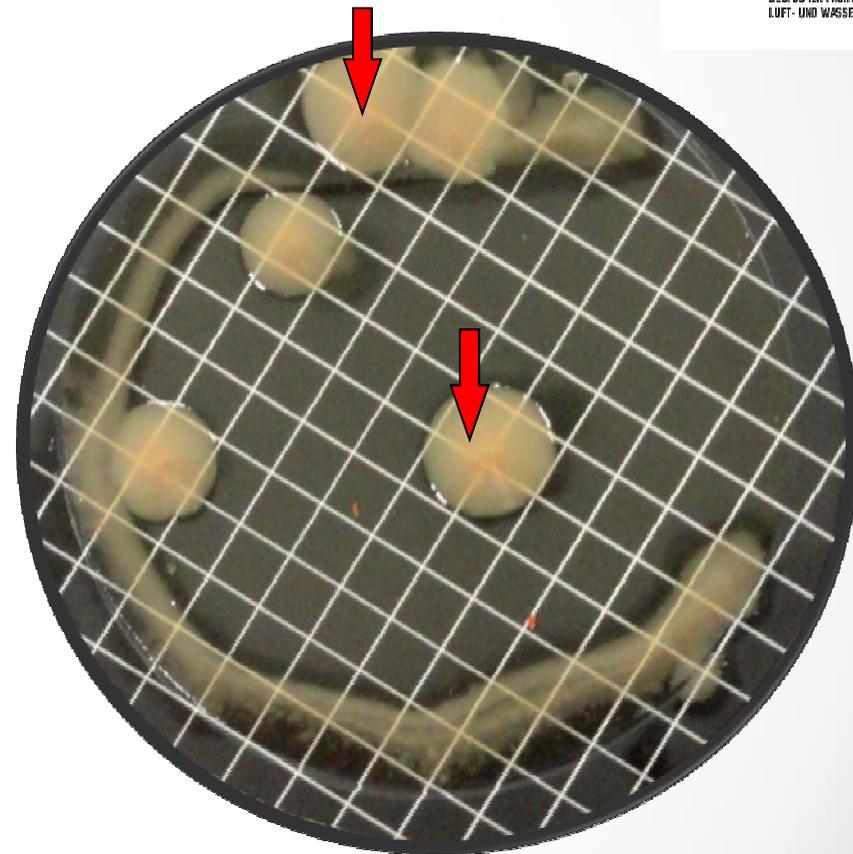
Begleitflora in Kühlturmwässern

Flavobacterium sp.



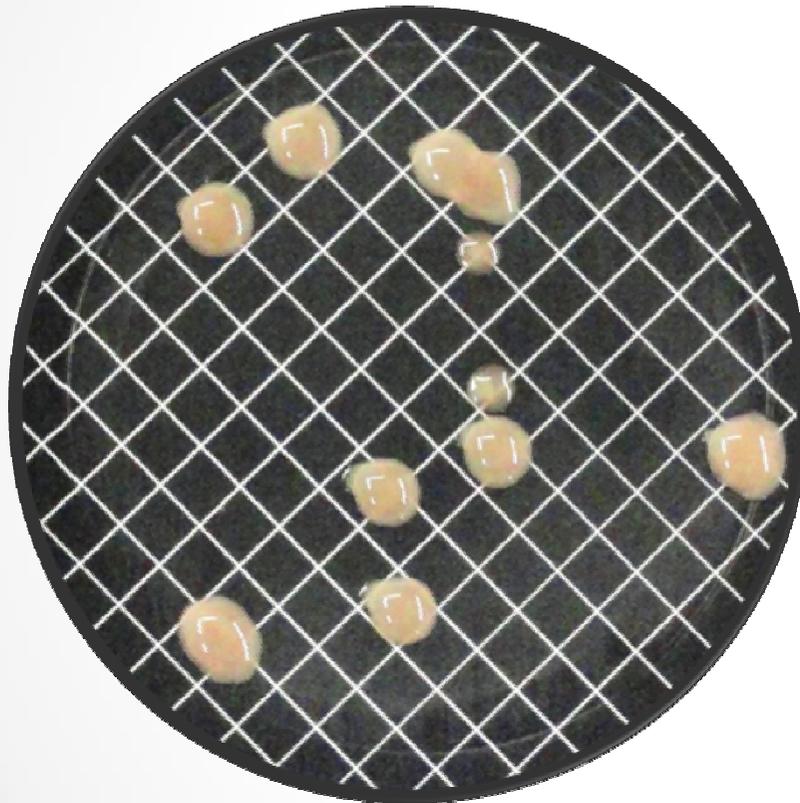
Aeromonas sp.

Stenotrophomonas sp.

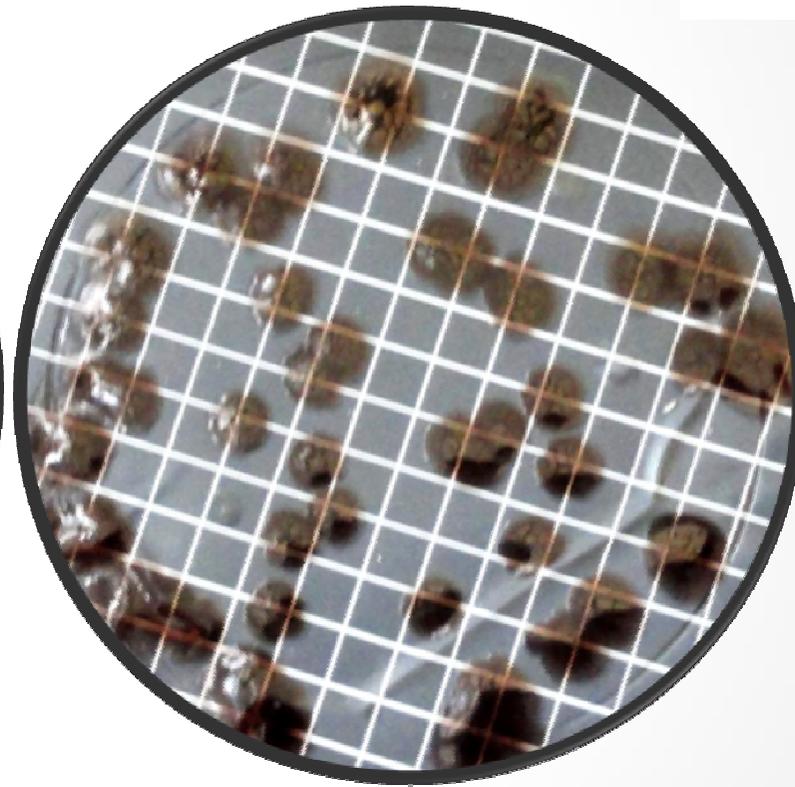


Aeromonas* sp. und *Pseudomonas aeruginosa* hemmen *Legionellen

***Aeromonas* sp.**



Pseudomonas aeruginosa



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

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.

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.

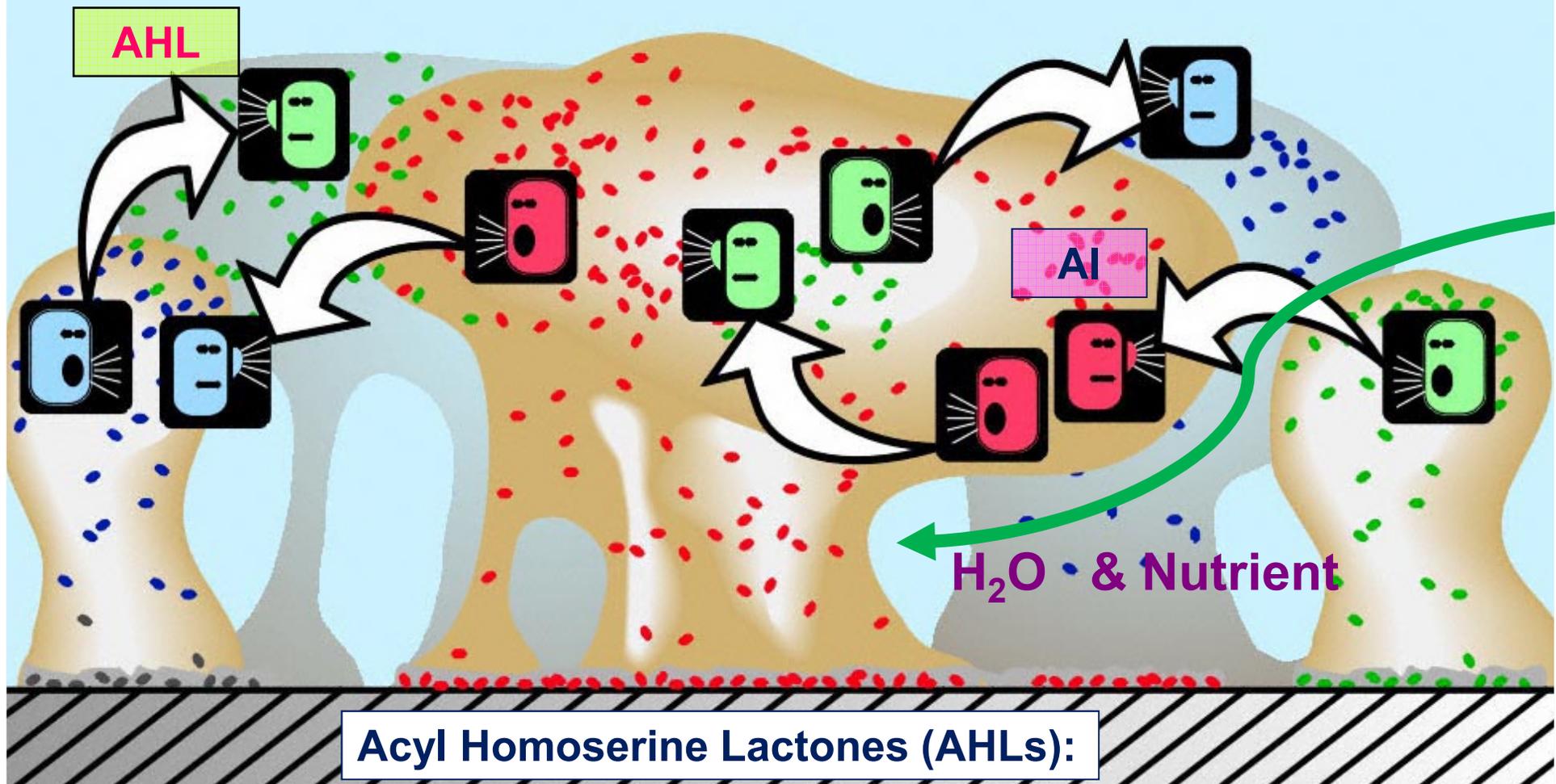
Gram-negative Bakterien, wie zum Beispiel *P. aeruginosa*, produzieren N-Acyl-Homoserin-Lactone (AHL) als Signalmoleküle (Autoinducer) für QS-Systeme.

“Quorum sensing” in the biofilm

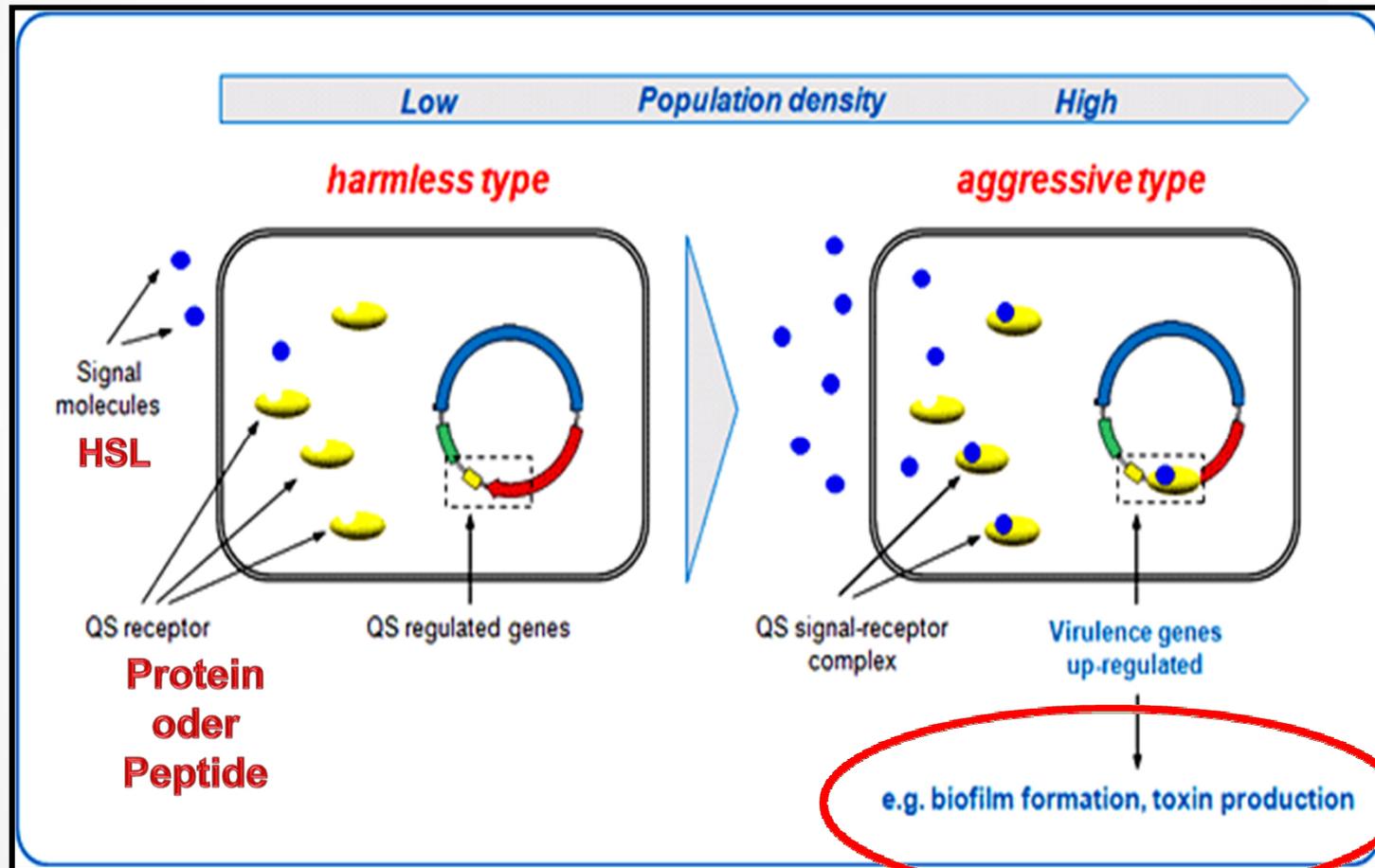
- Keeps channels open for flow of water & nutrients

- Signals for growth, attachment or detachment of bacteria

- Some signal molecules:
 - Acyl Homoserine Lactones (AHL)
 - Auto Inducers (AI)



„Quorum sensing“ : Biofilm und Toxin Produktion

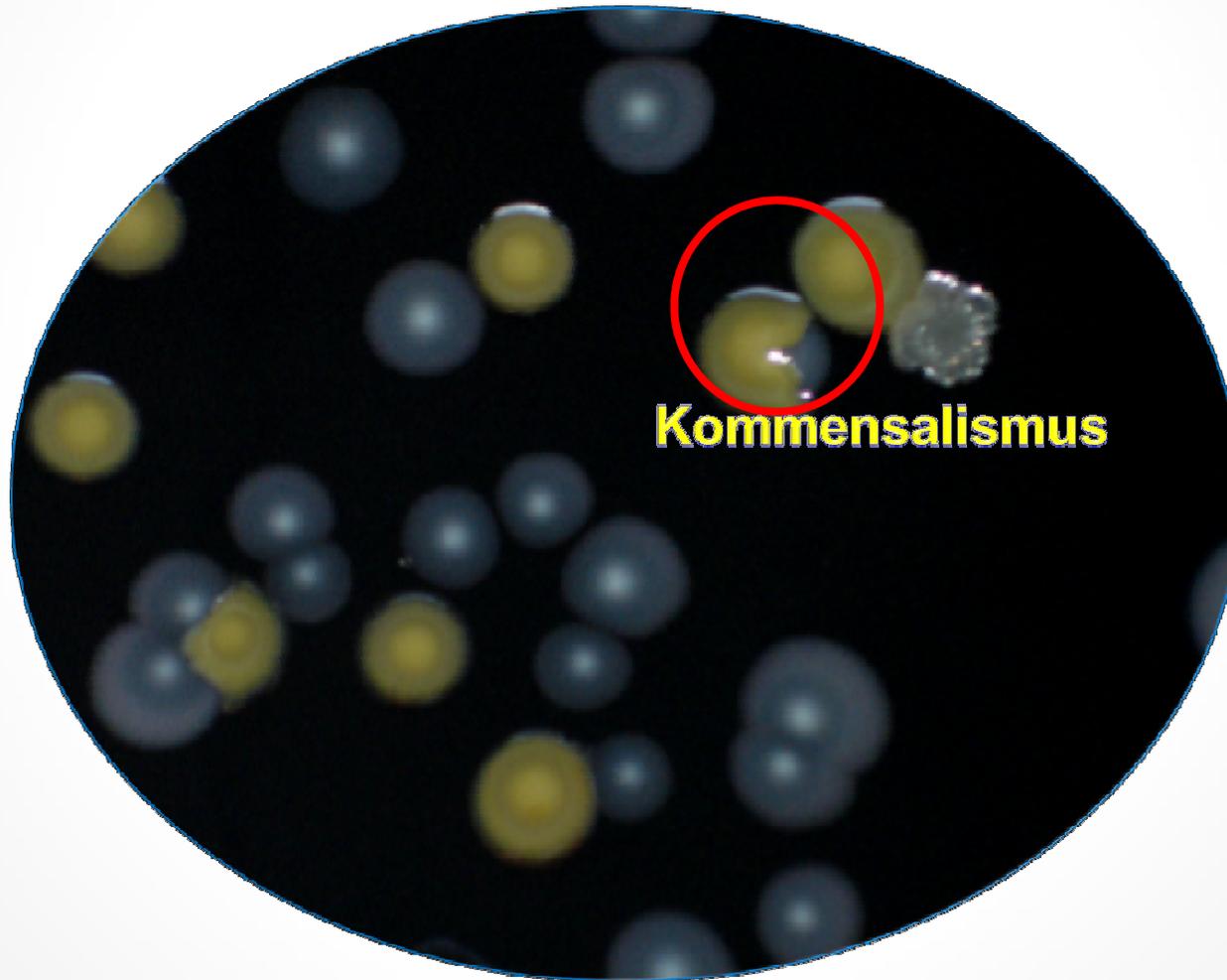


„Quorum sensing“

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

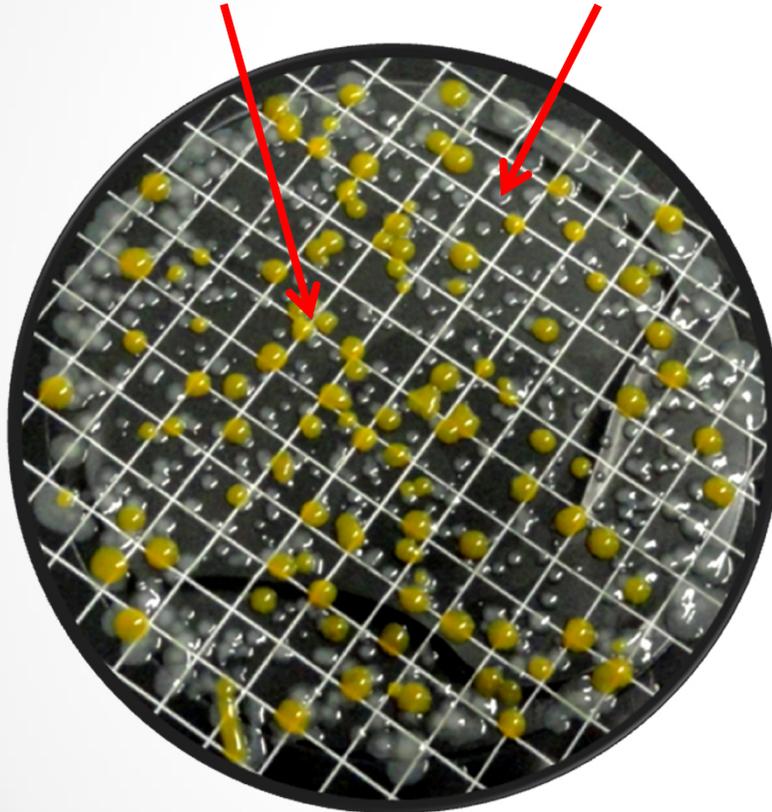
Diese spezifische Biofilmmatrix fördert das Wachstum und die Anwesenheit von *Legionella pneumophila*.

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



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

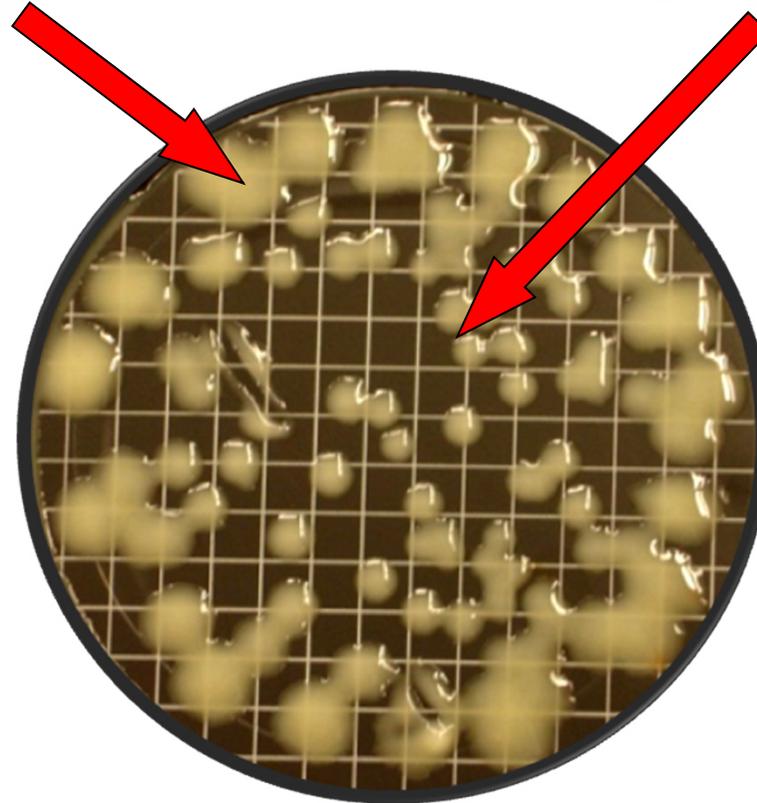
Flavobacterium spp. & Legionella sp.



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)**

„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.

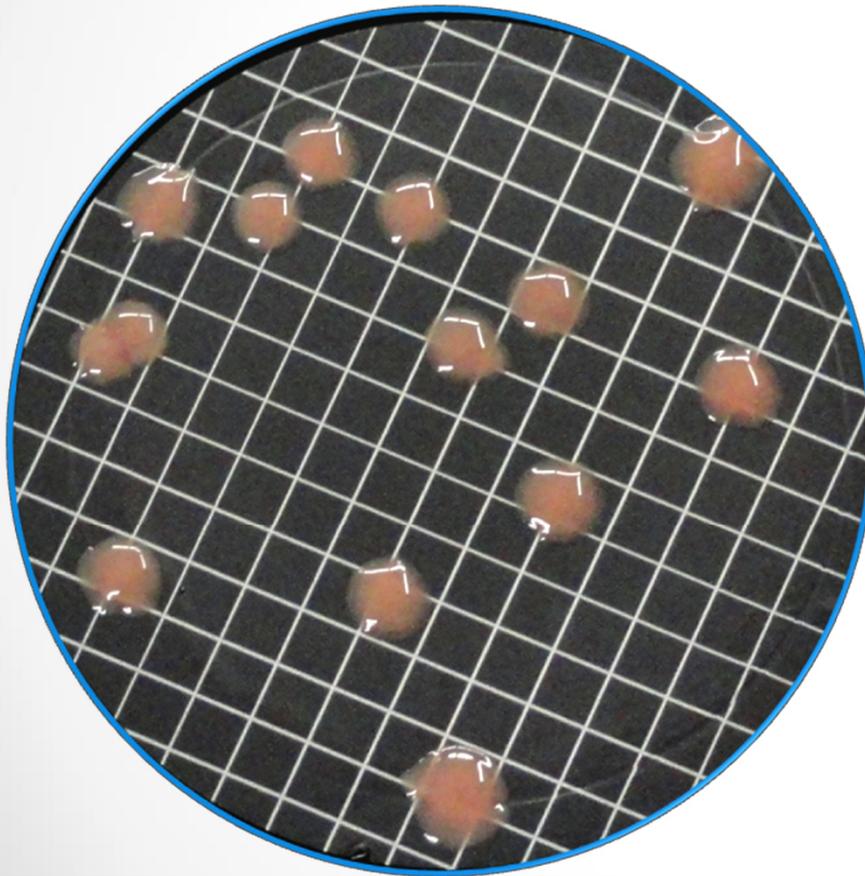
„Quorum sensing“

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.

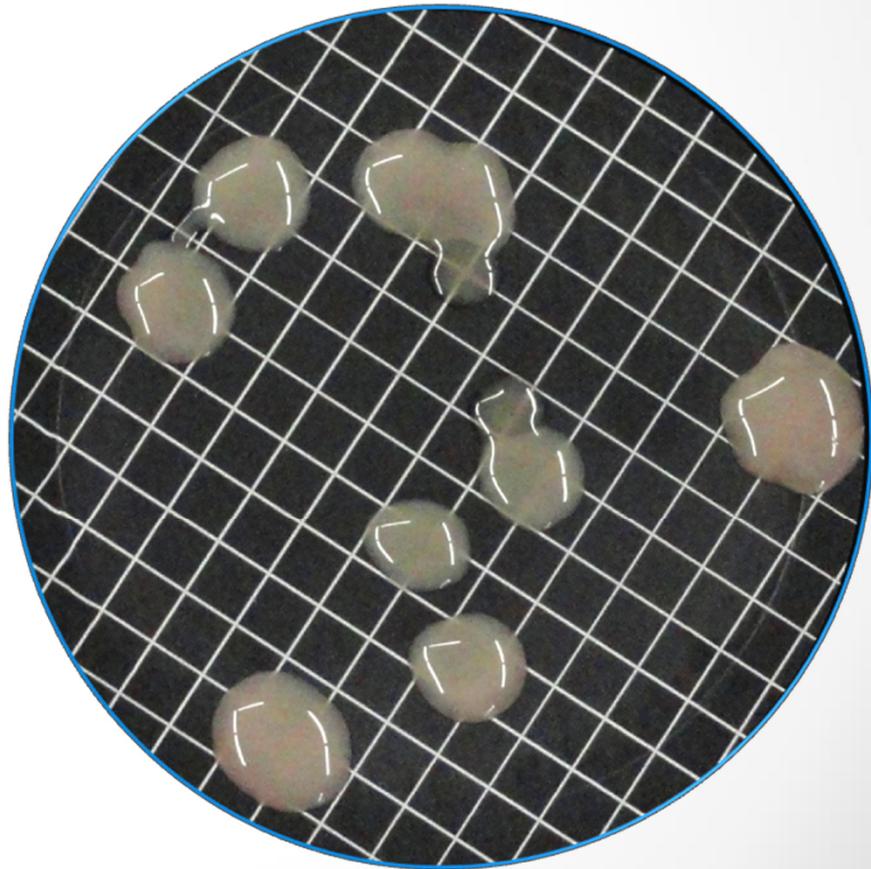
Dies bestätigt, dass einige Bakterien die Kolonisierung mit Legionellen unterstützen, während andere hemmend wirken, wie z.B. *Aeromonas* spp. oder *Stenotrophomonas* spp. (speziell *Legionella pneumophila* Sg. 1)

Begleitflora in Kühlturmwässern

Aeromonas sp.

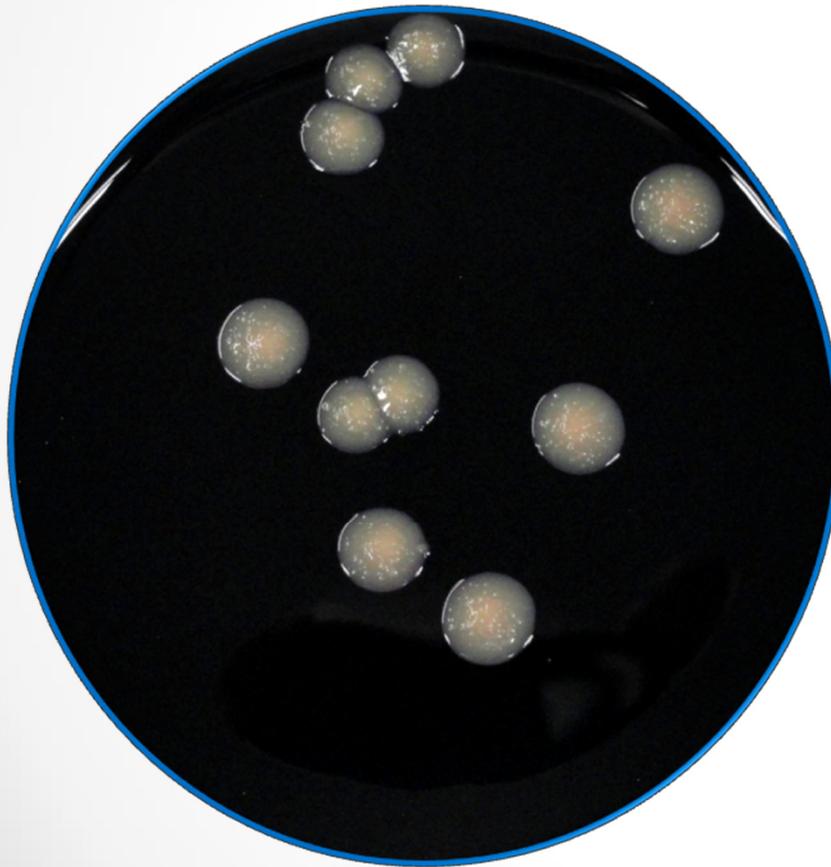


Stenotrophomonas sp.

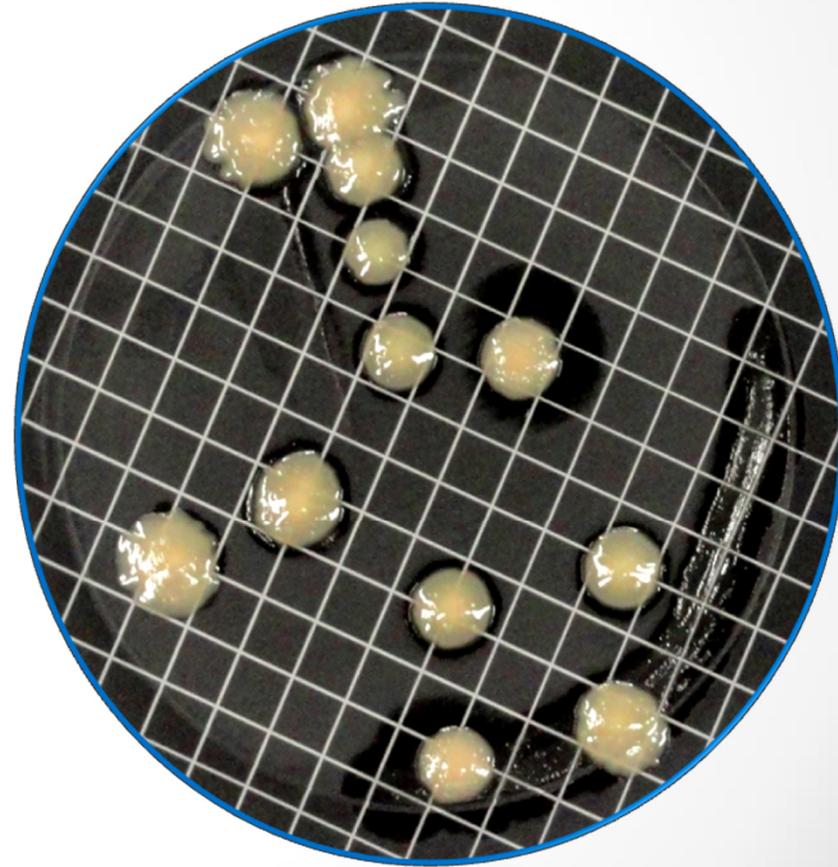


Begleitflora in Kühlturmwässern

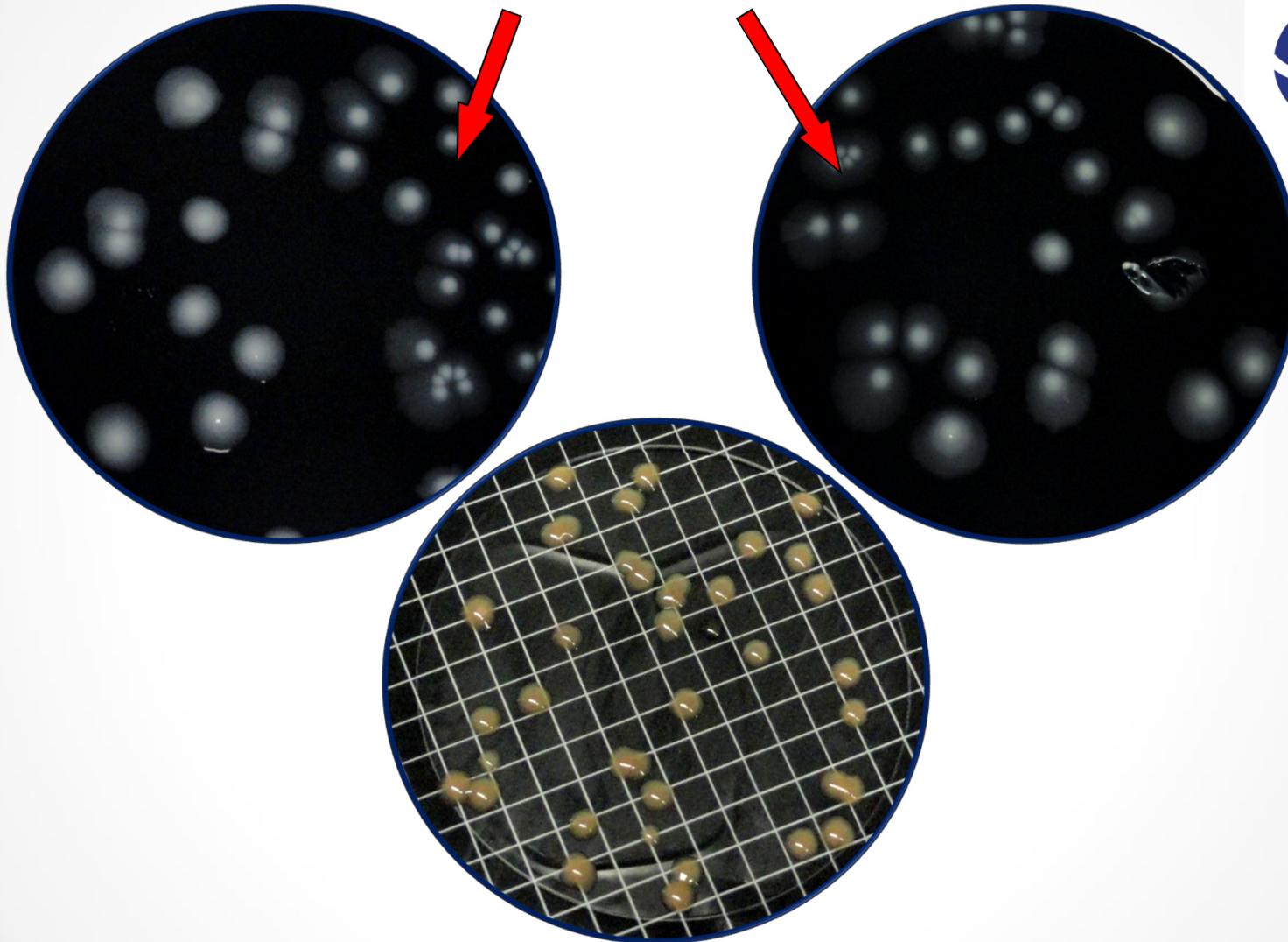
Aeromonas sp.



Stenotrophomonas sp.



***Legionella pneumophila* Sg. 2 - 15**



***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**



- **Die vorgeschriebenen Nachweismethoden (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 Erkrankungen**

Untersuchung nur *Legionella*-Spezies



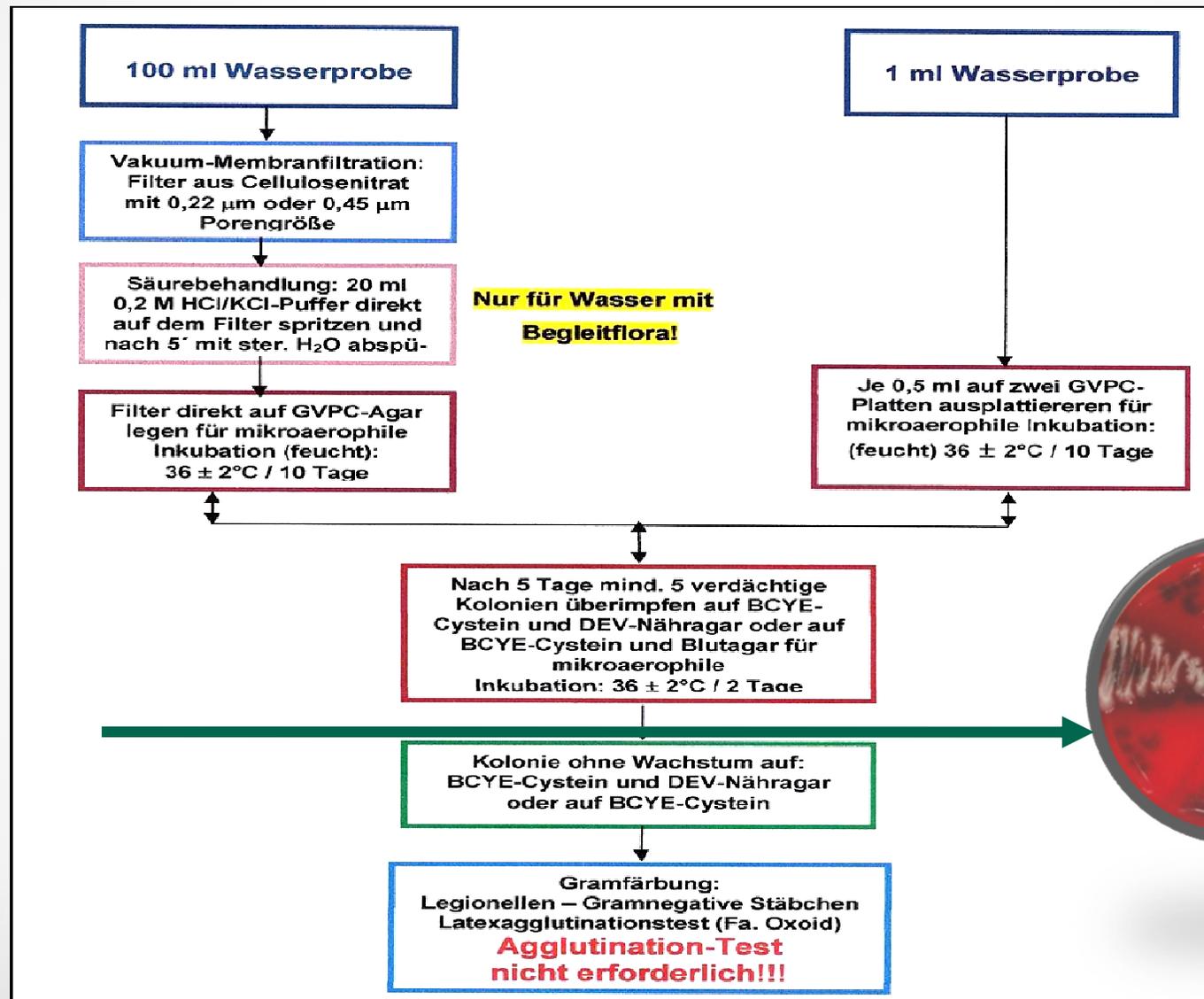
Nach UBA

Legionella-Spezies
(ca. 60 Spezies)

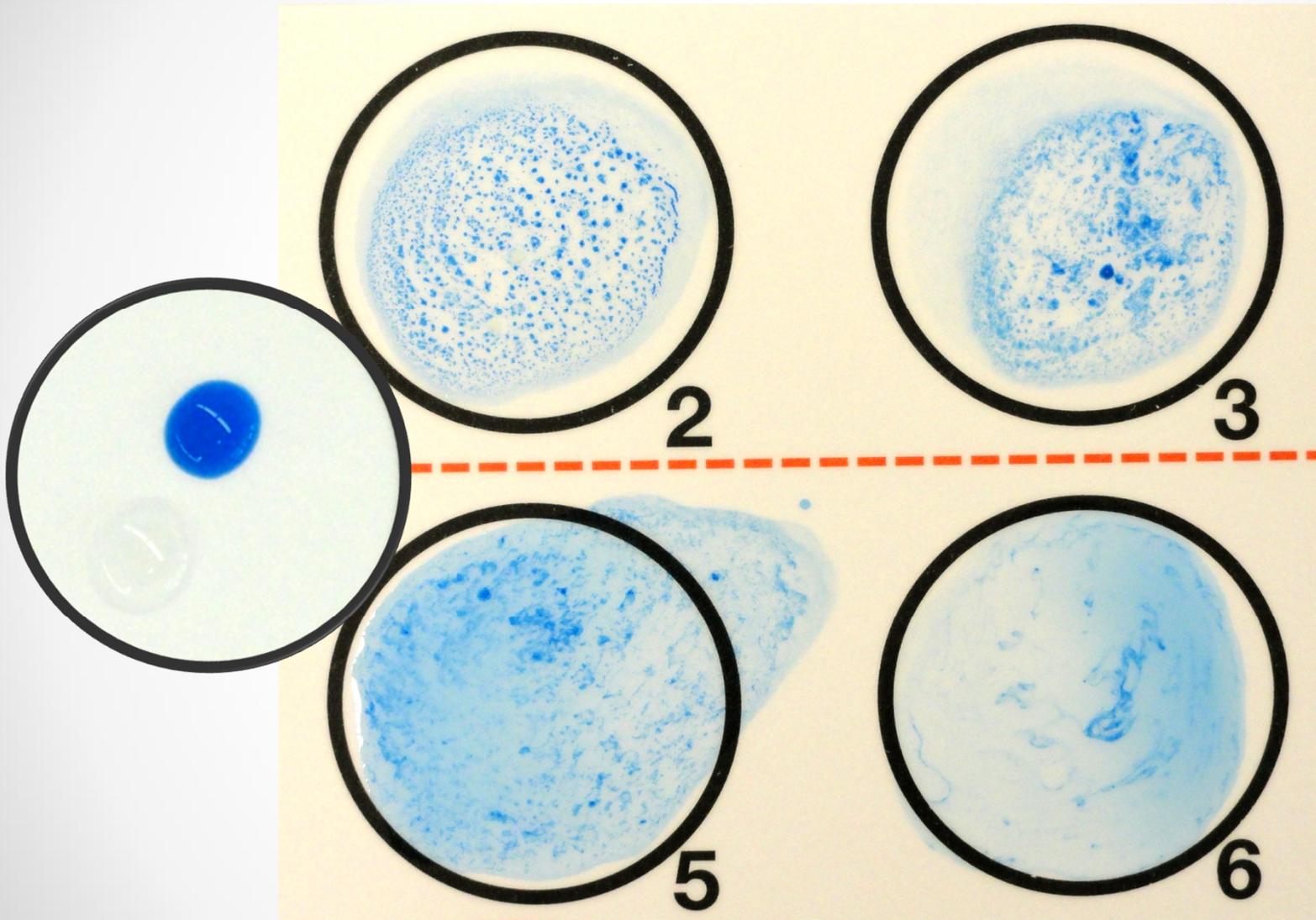
Legionella Spezies
(mit 25 Krankheitserreger)

Legionella pneumophila
Serogruppe: 1 und 2-15 und
2 Serogruppe von 9 Leg. spp.

Untersuchung nur *Legionella*-Spezies



Agglutinations-Test-Legionella: Beispiele

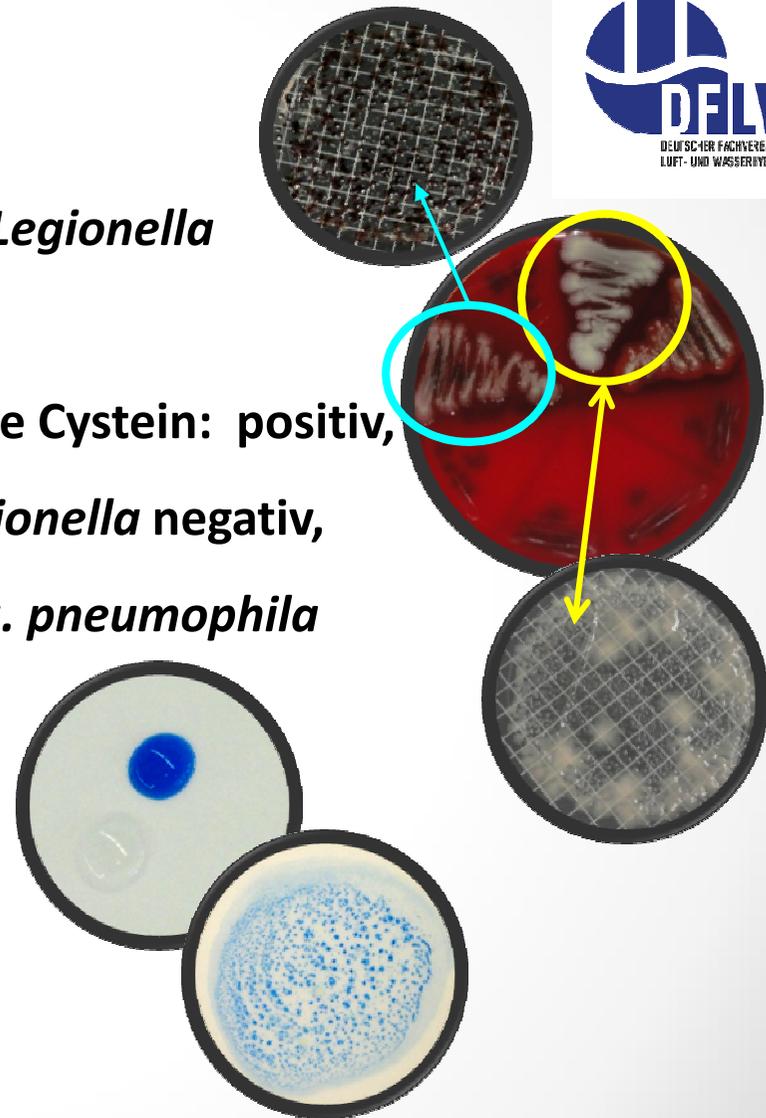


Befund falsch negativ

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!

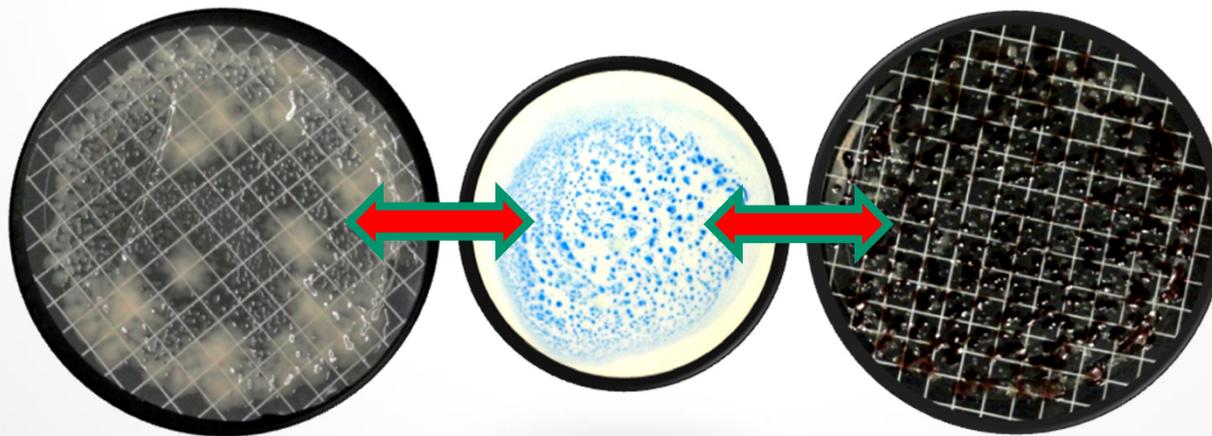


Befund falsch negativ

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!



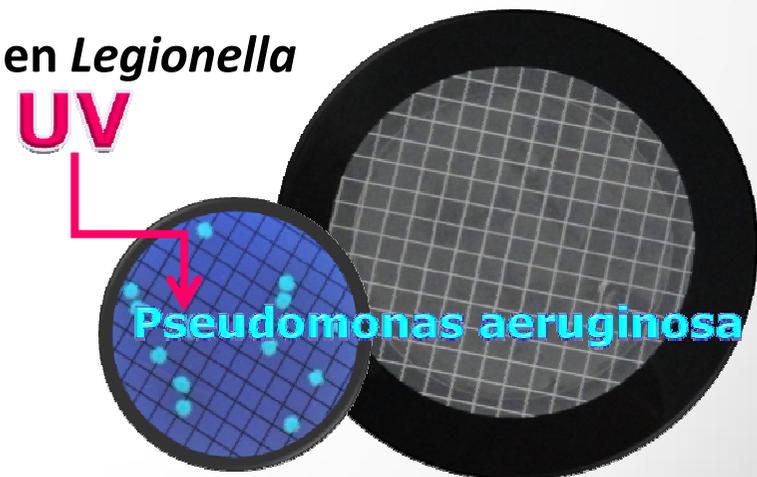
Befund falsch negativ

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* oder *Aeromonas*, hemmen *Legionella pneumophila* Wachstum.



Befund in diesem Fall ist falsch negativ!

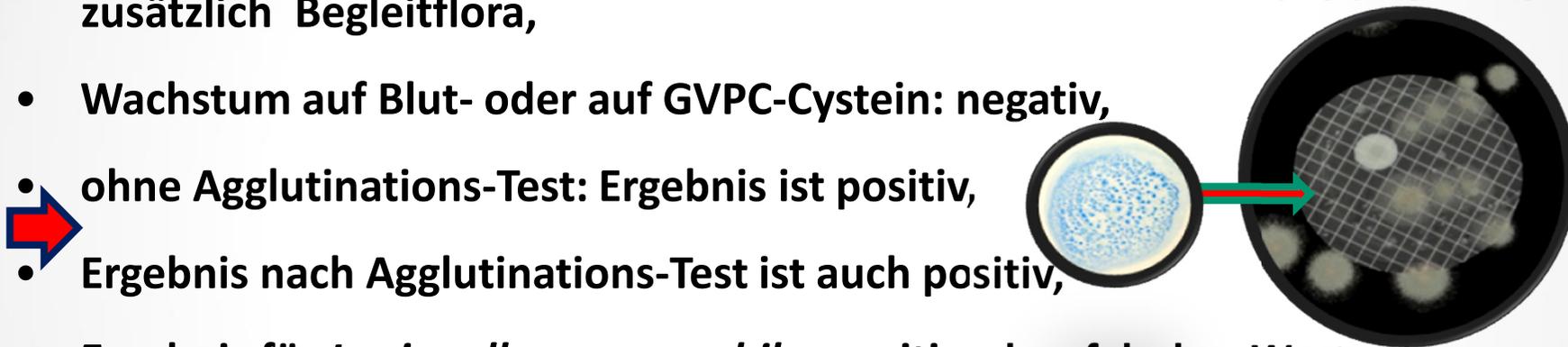


Befund falsch negativ

Beispiel:

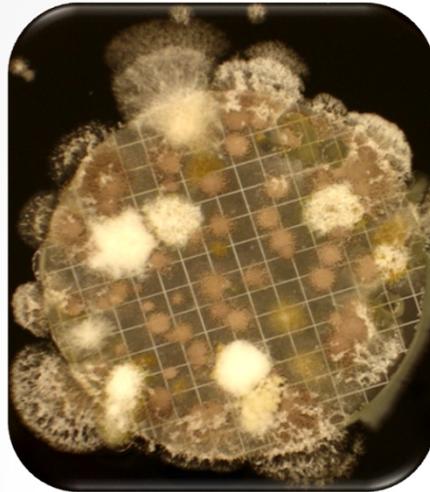
- Niedriges Wachstum von *Legionella pneumophila* auf GVPC, zusätzlich Begleitflora,
- Wachstum auf Blut- oder auf GVPC-Cystein: negativ,
- ohne Agglutinations-Test: Ergebnis ist positiv,
- Ergebnis nach Agglutinations-Test ist auch positiv,
- Ergebnis für *Legionella pneumophila*: positiv, aber falscher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

Falscher Wert



Befund ist: falsch negativ oder zu niedriger Wert!

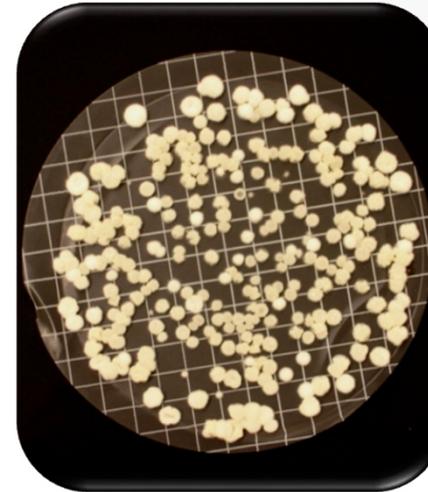
Befund falsch negativ o. nicht richtig



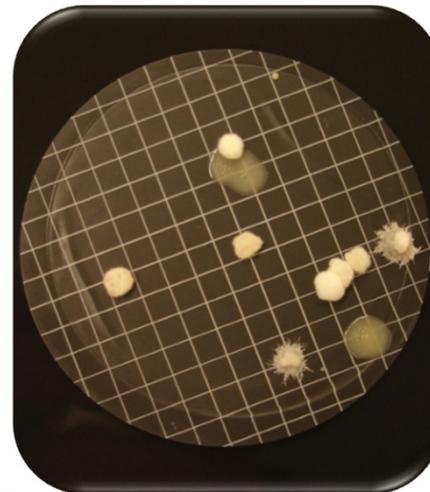
Ohne Säure-
behandlung



Nach Säure-
behandlung



Ohne Säure-
behandlung



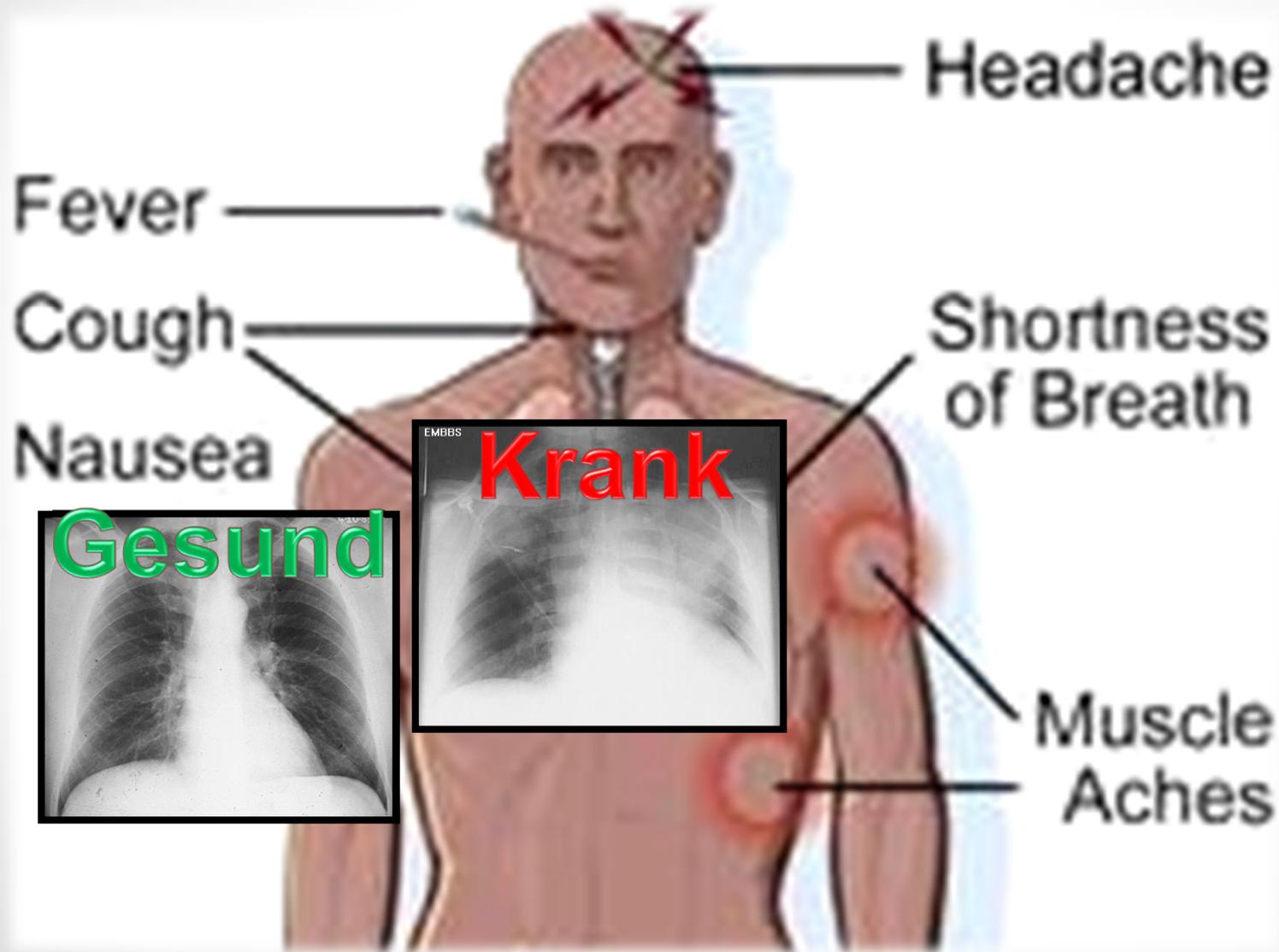
Health hazards by biofilms:

Legionellosis

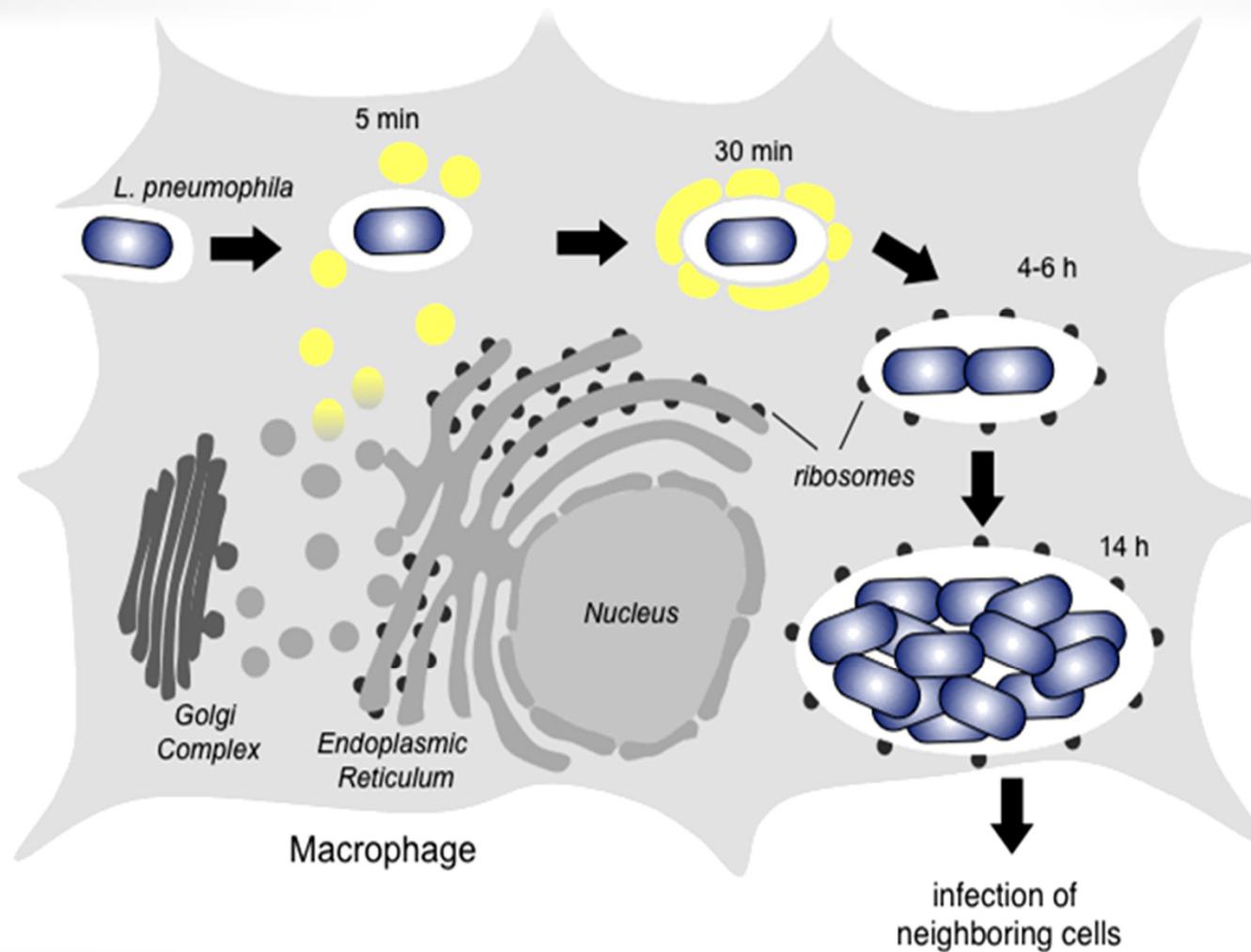
- Every case is proof of contact with an improperly managed water system
- Every case could have been prevented by applying practical scientific management principles
- Legionella are typical biofilm-related pathogens as they survive in protozoa which graze on biofilms



Legionellose Krankheit



Zyklus *Legionella pneumophila* Infektion



Hygiene Kontrolle

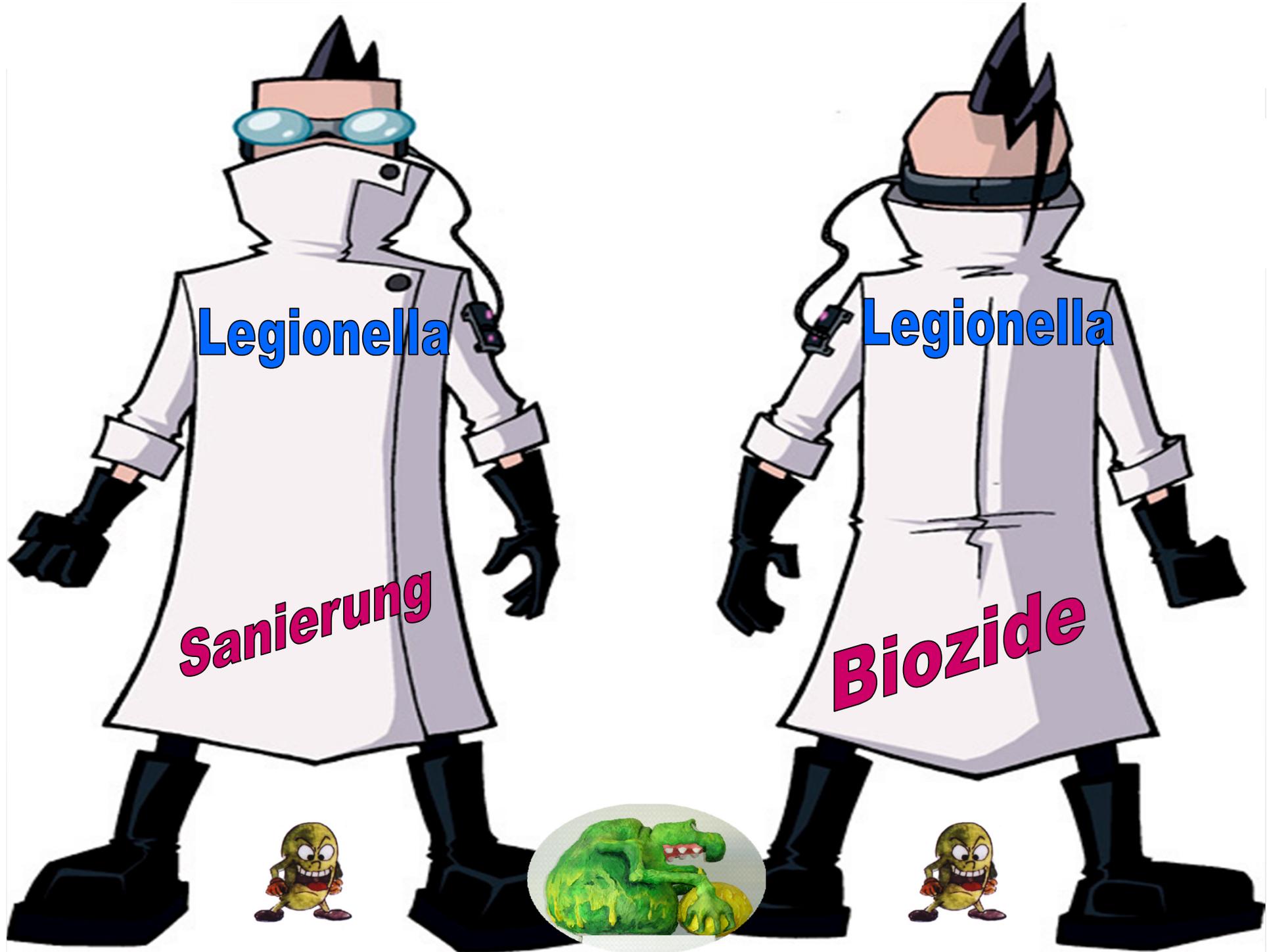
Angesichts der steigenden Zahl von bestätigten und des potentiellen Risikos einer Infektion über diskontinuierlich freigegebene Legionella-haltigen Aerosolen aus Kühltürmen, stellt sich die Frage:

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

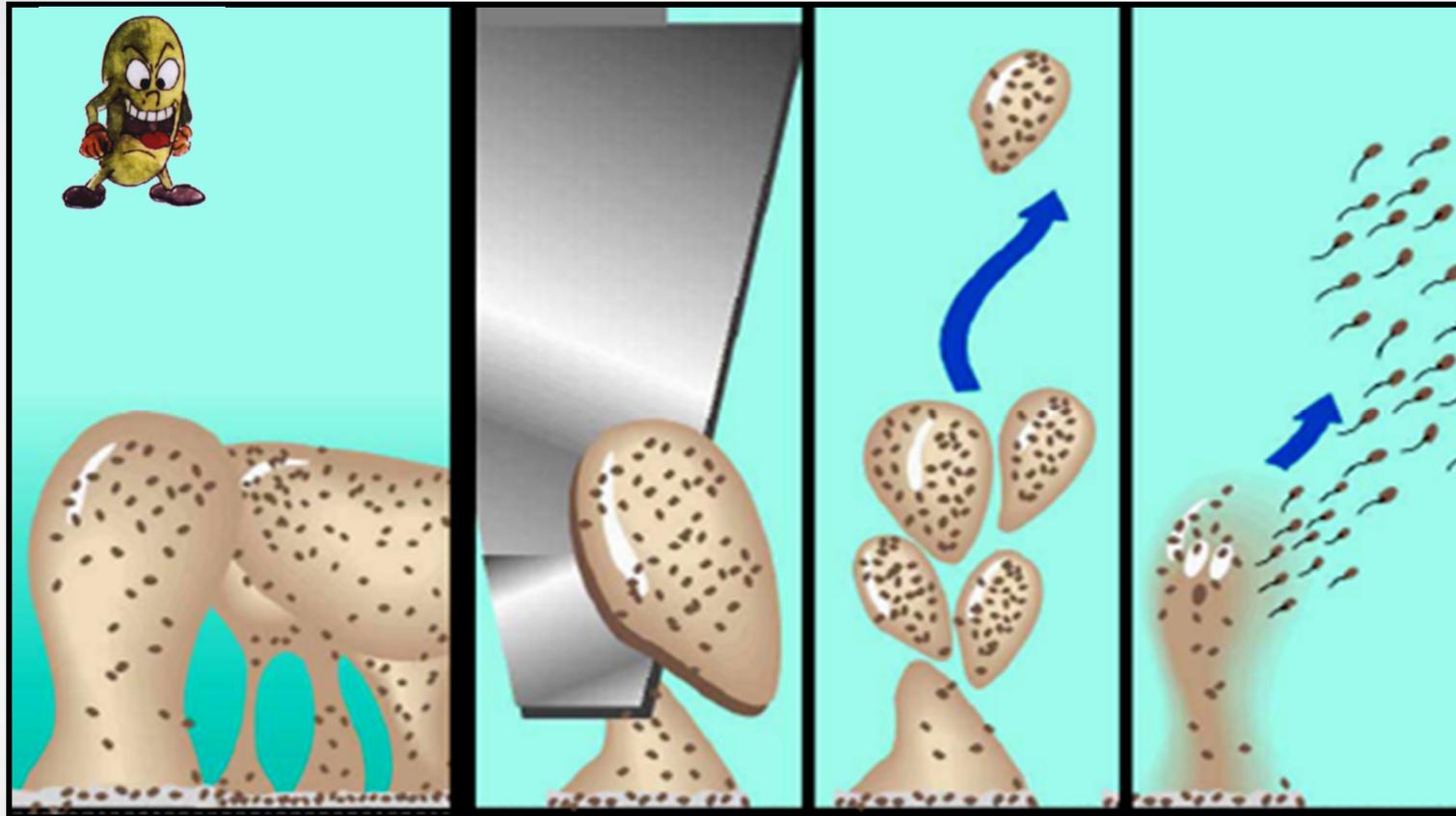
bzw. sinnvoll ist (nach VDI 6022 Blatt 1):

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



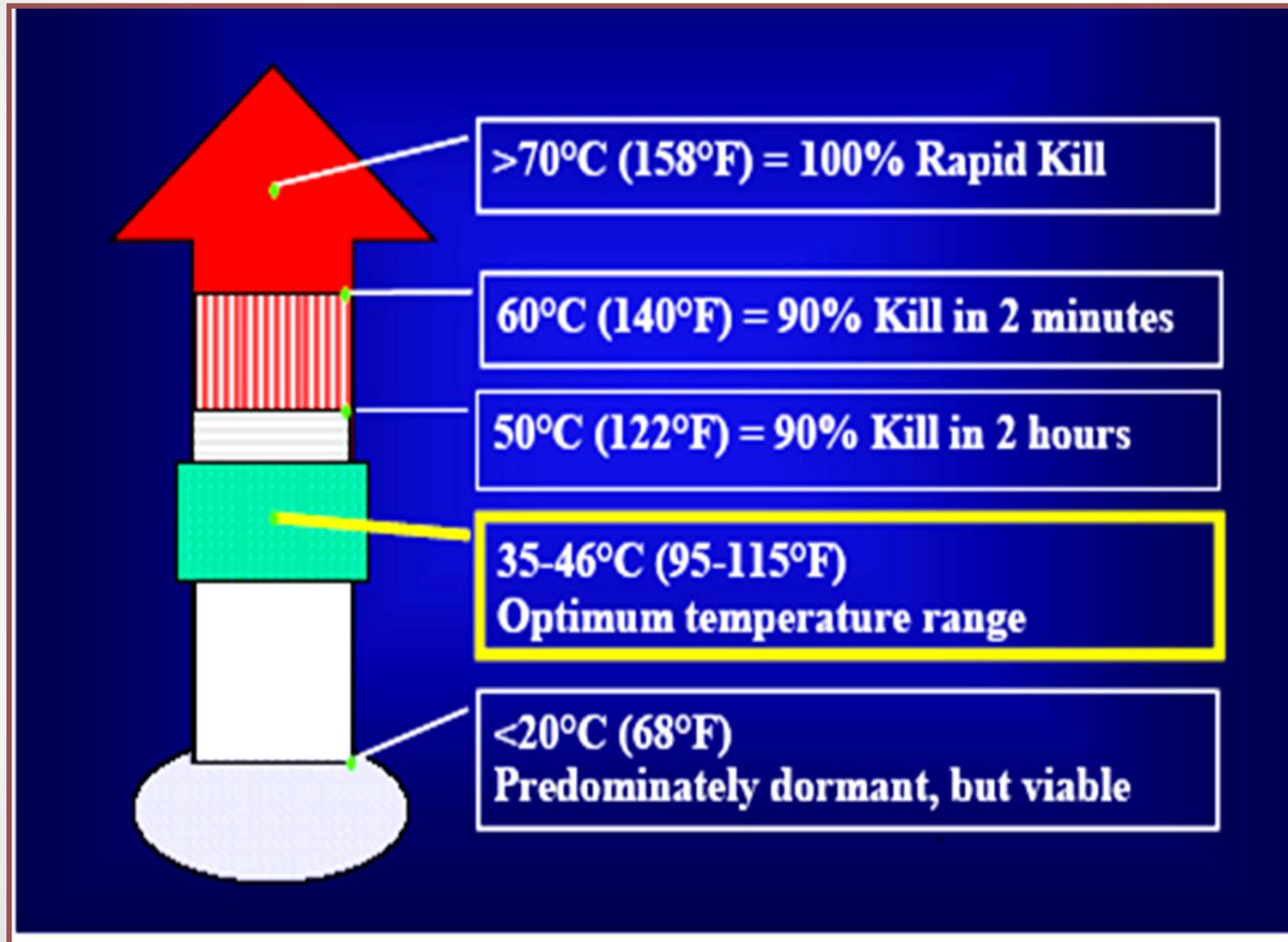


Mechanische Destruktion von Biofilm

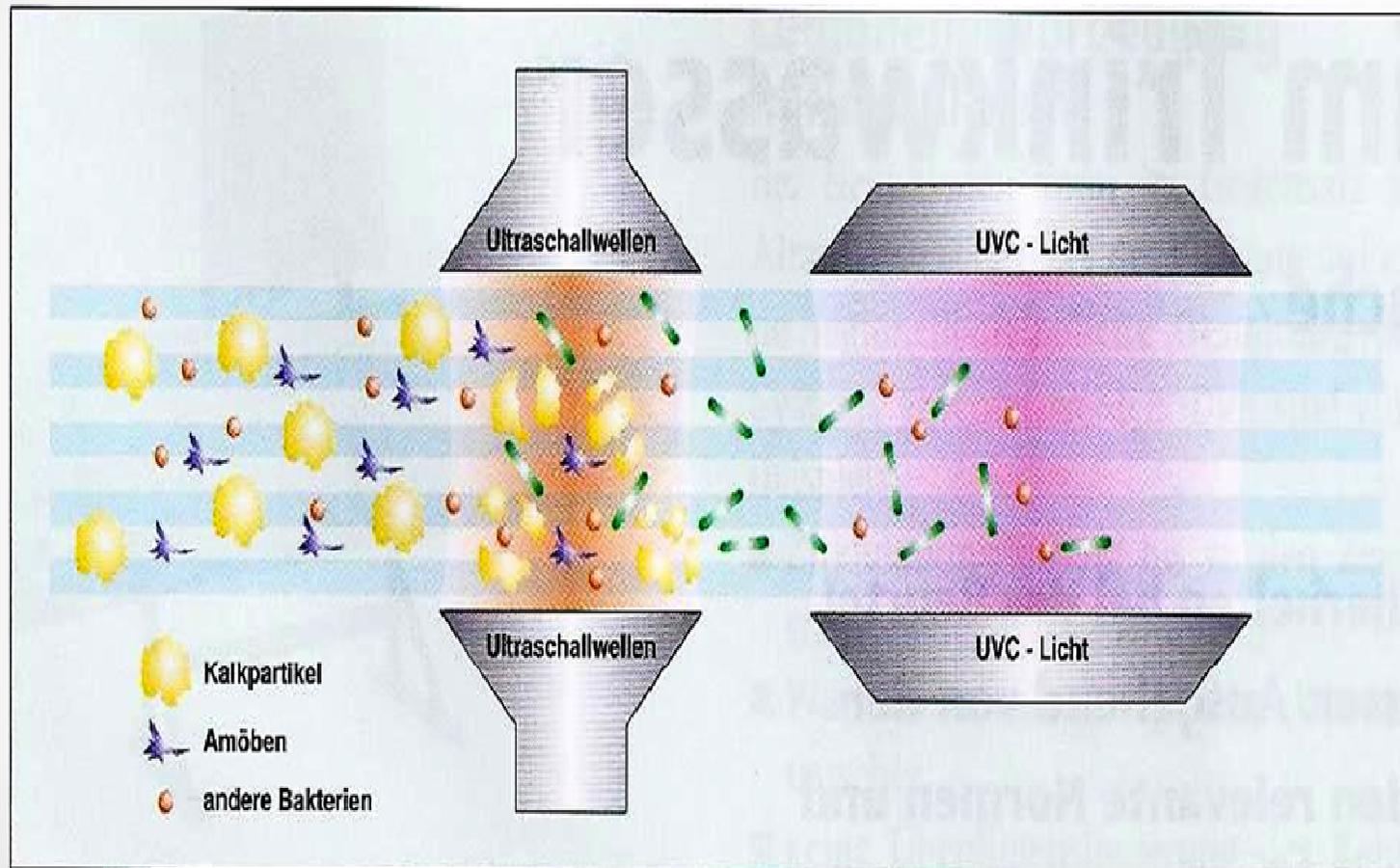


Dyspersion der Biofilm und Entwicklung Einzel Bakterien

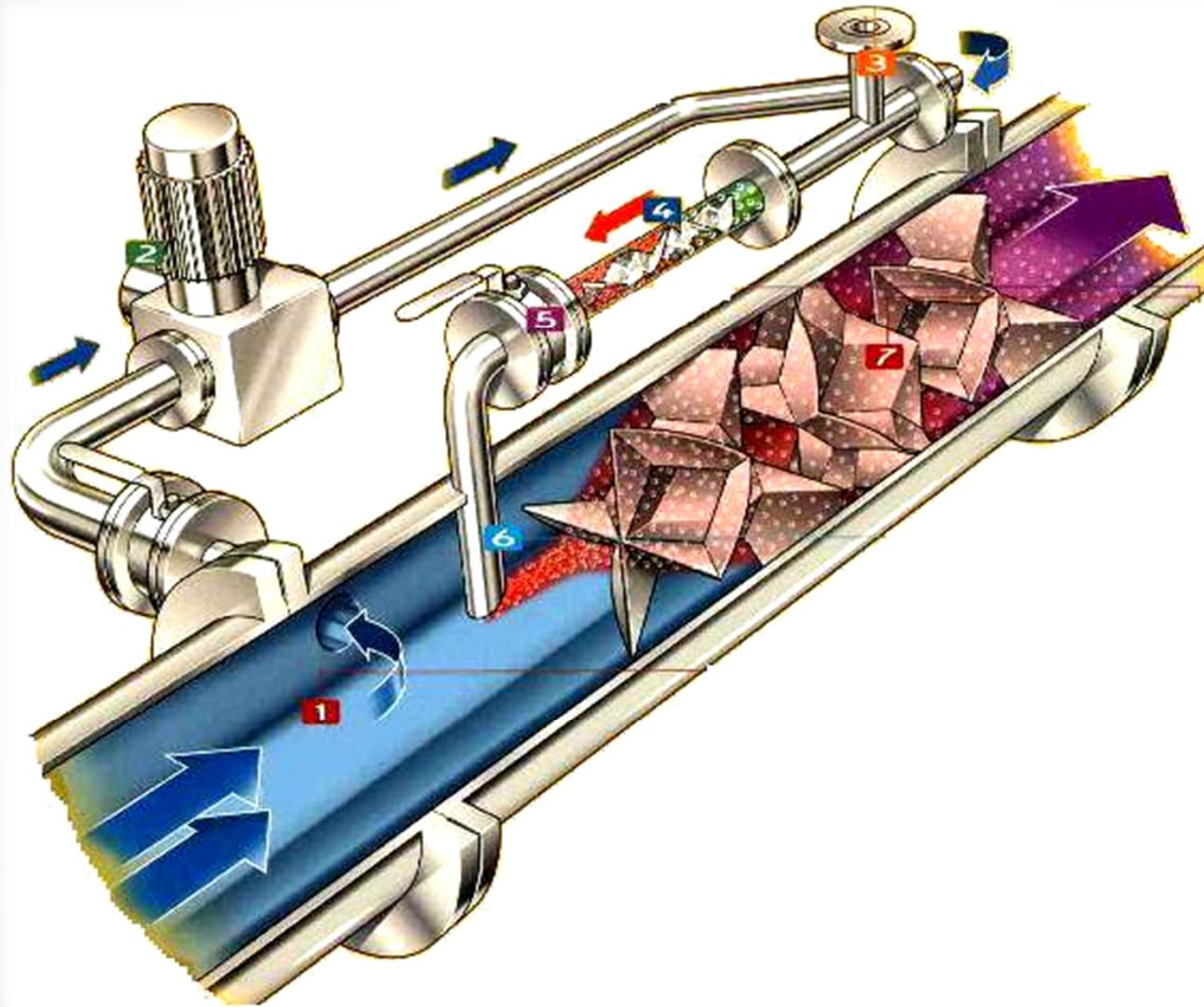
Thermische Behandlung Wasser mit Legionellen



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



Side-Stream 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?

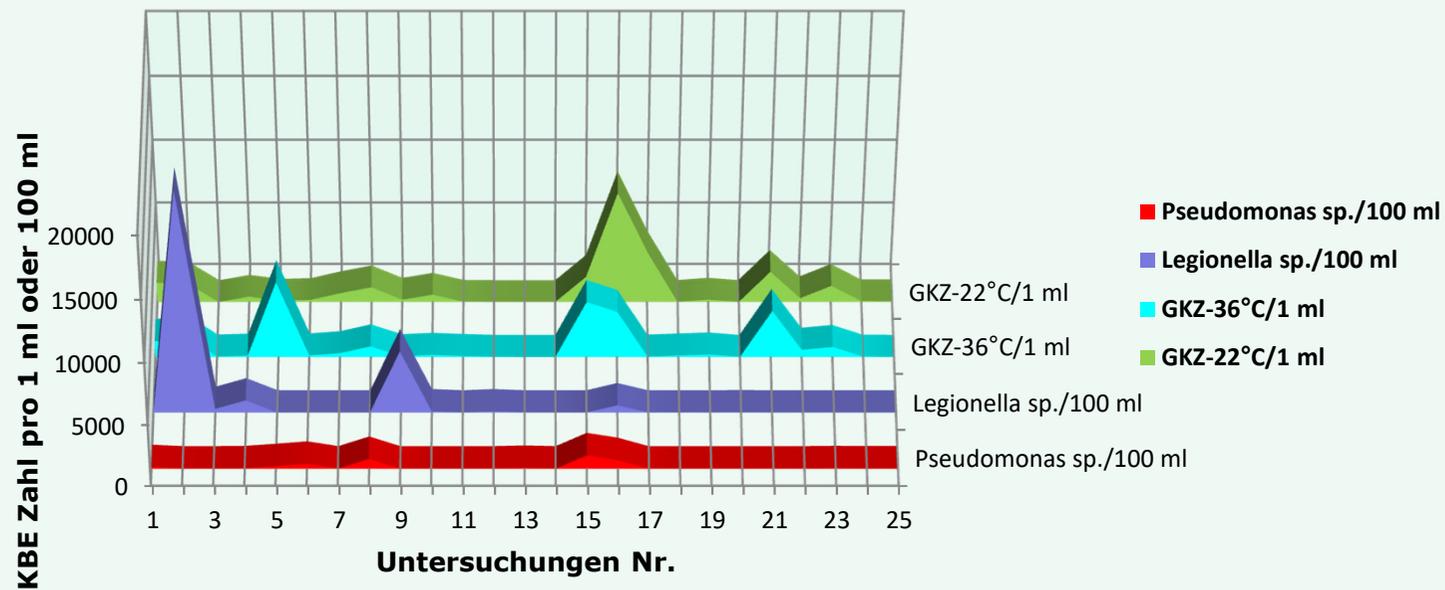
Die Untersuchung der Gesamtkeimzahl ist für die Bestimmung einer Legionellen-Kontamination des Kühlsystems nicht geeignet, da die GKZ und der optisch beurteilte Grad der Verschmutzung (z.B. Biofilm) nicht mit der Legionellen-Konzentration im Kühlwasser korreliert.

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

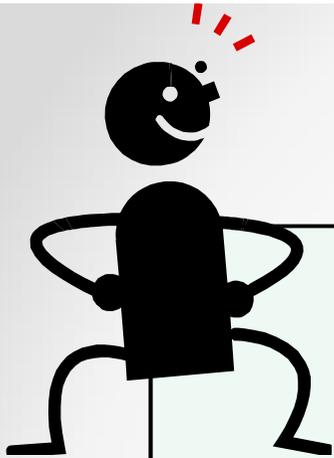
(Bentham, 2000; Salek, 2013)



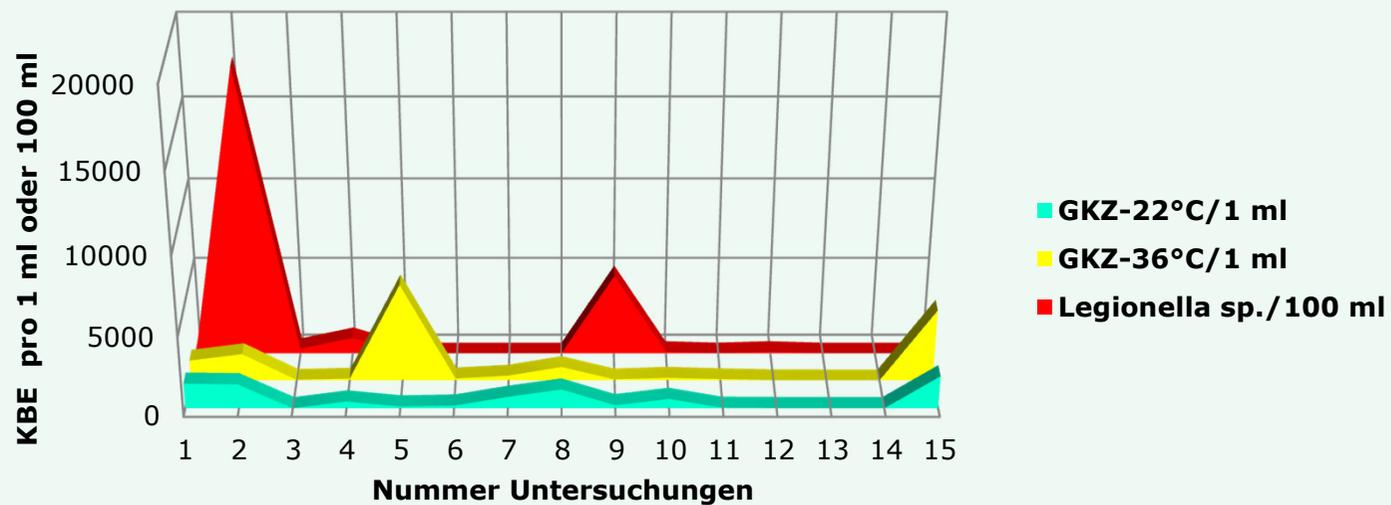
Korrelation zwischen Mikroorganismen in Kühlturmwasser



Salek, 2013



Korrelation zwischen GKZ und Legionellen in Kühlturmwater



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.

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>

