



Biokontrolle von Mikroorganismen in Kühltürmen

Das Ökosystem für Legionellen







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.



Dr. habil. Anna Salek / domatec





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 (VDI 6022 Blatt 1):

GKZ ≤ 10⁴ KBE/ml, *Legionella* sp. ≤ 10³ KBE/100 ml





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)

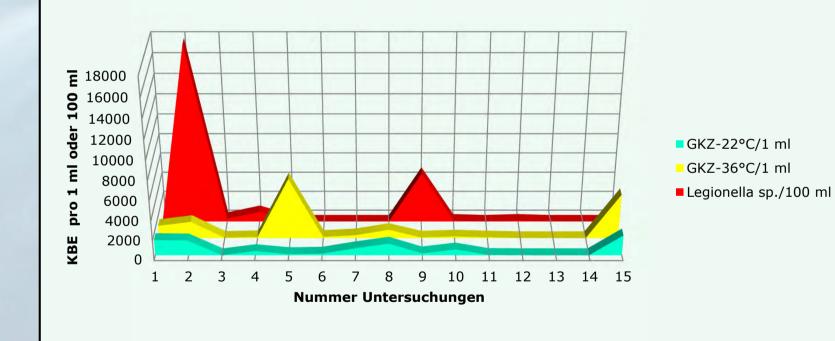








Korrelation zwischen GKZ und Legionellen in Kühlturmwasser



Salek, 2013







Aussagen zur Korrelation zwischen GKZ als Indikator und möglicher Legionellen-Kontamination sind deshalb sehr riskant. Bentham (2000) 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, z.B. nur Routineuntersuchungen für Legionellen alle zwei Jahre in

Das ist nicht ausreichend!

Kombination mit Routine-Hygieneinspektionen oder ...



Inhalt

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

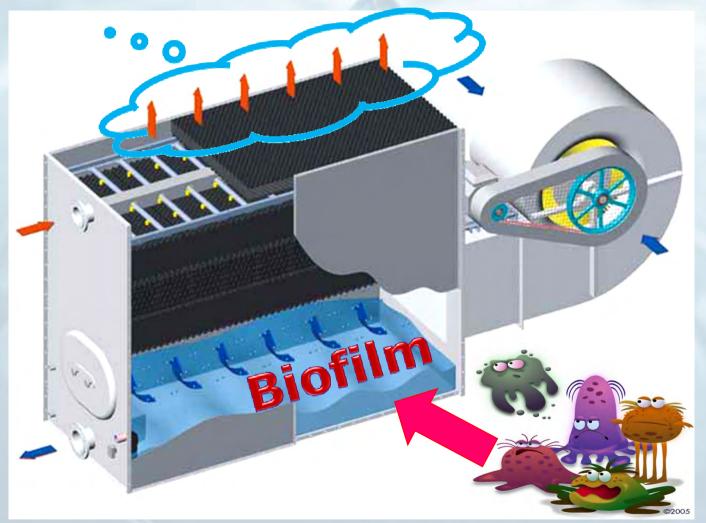








Direkte Kühlung mit offenem Wasserkreislauf, Bauform K (nach KTK Kühlturme GmbH)





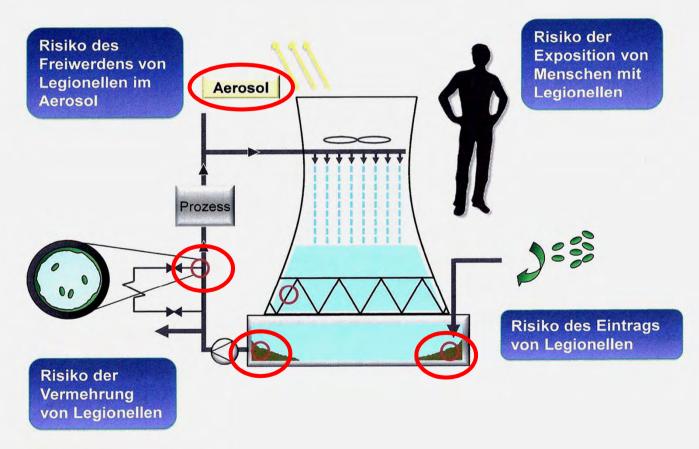








Risikobetrachtung Rückkühlwerke



Nach Dr. S. Schult, IWW-Kolloquium Mülheim



Inhalt

- 1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).
- 2. Entstehung von Biofilmen & Biofauling 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.







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.

N N

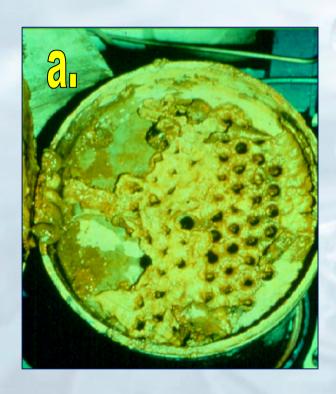
Was ist mit andere Bakterien-Spezies in Biofilm?

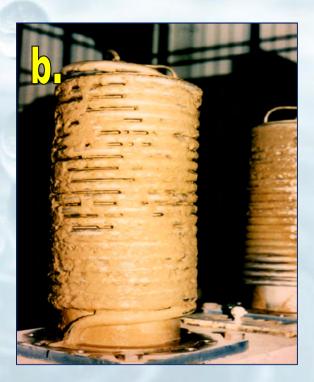






Biofilme in technischen Apparaten





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

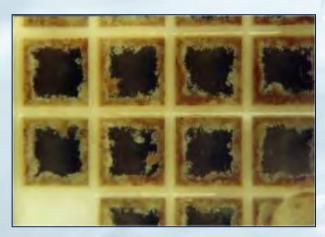






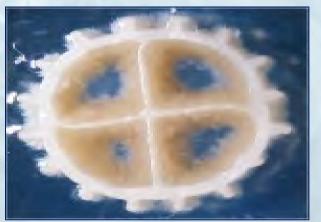


Unterschiedliche Biofilme in Wassersystemen











Inhalt

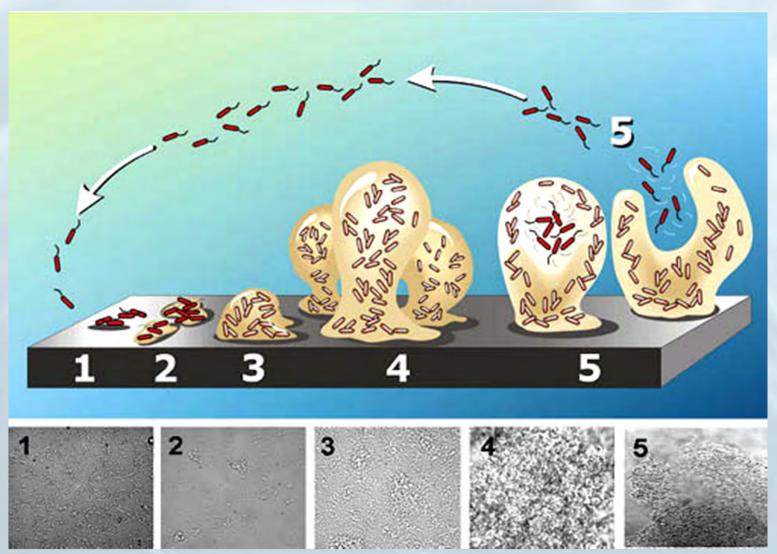
- 1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).
- 2. Entstehung von Biofilmen & Biofauling Genese.
- 3. Mikroorganismen im Biofilm: Bakterien und deren Ökosytem.
- 4. "Quorum sensing", Inhibition und Interaktion zwischen Wassermikroorganismen.
- 5. Analytische Methoden Nachweis von Bakterien im Kühlturmwasser.







Biofilmwachstum, z.B. mit Pseudomonas aeruginosa



Grafik: Peg Dirckx and David Davies.

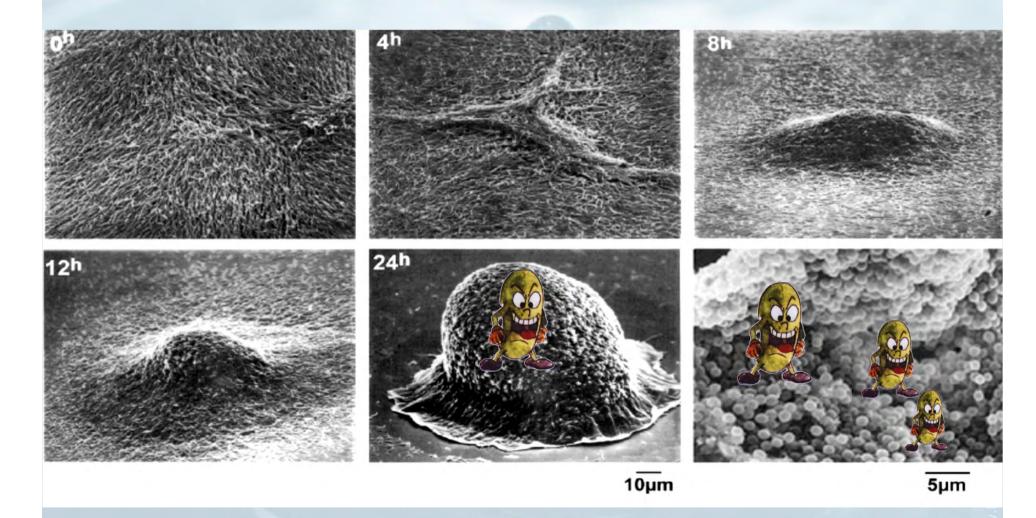








Biofilmwachstum - Matrix EPS, z.B. Pseudomonas spp.

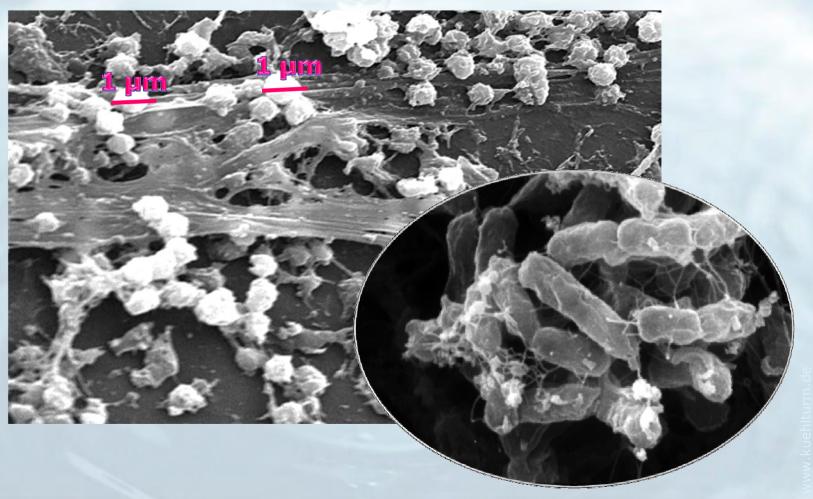








Aerobe Bakterien *Pseudomonas* spp. (chemoorganotroph) produzieren EPS für Biofilm



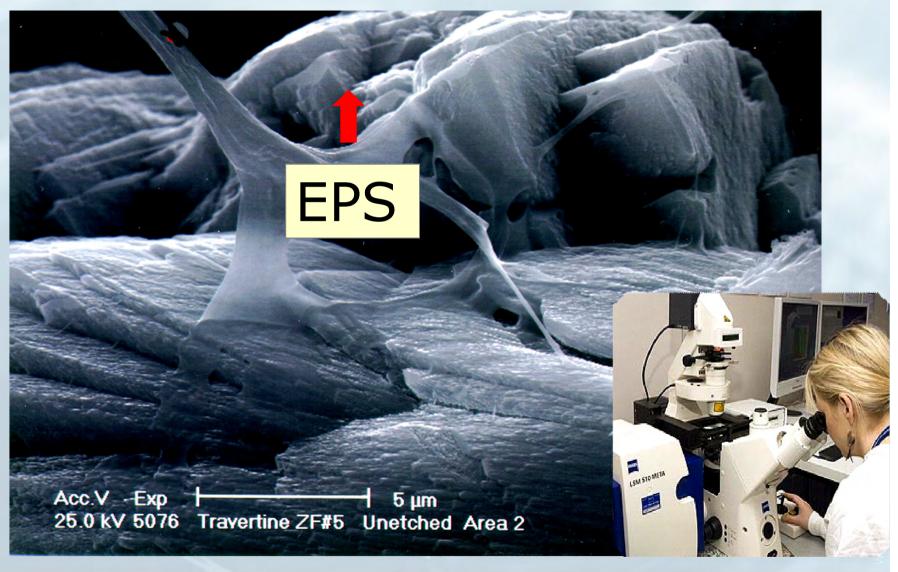








Extrazelluläres Polisaccharid - Matrix Biofilm

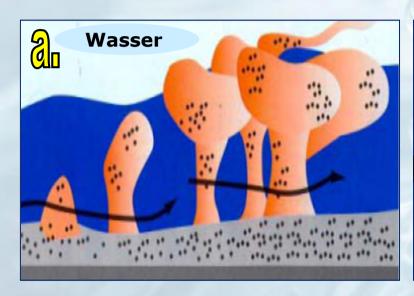


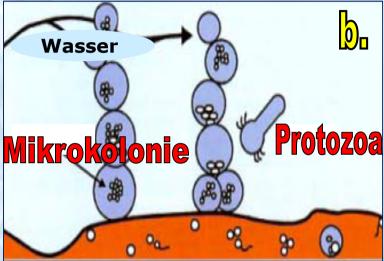






Biofilme sind abhängig von Nährsubstraten





Biofilme sind abhängig von Menge und Qualität der Nährstoffe:

- (a) bei optimalen Menge an Nährstoffen,
- (b) bei geringer Menge an Nährstoffen.

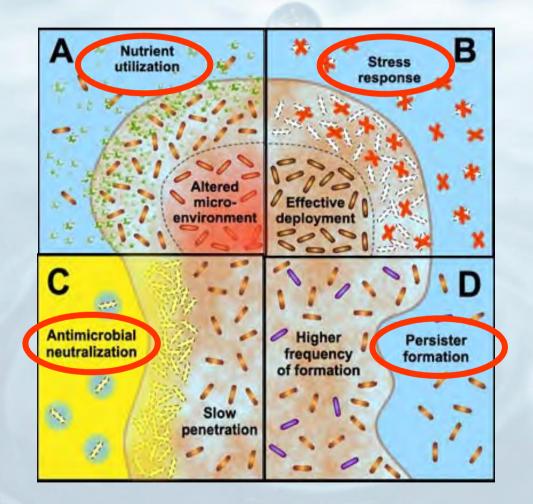








"Quorum sensing"



Nach Courtesy, MSU-CBE









Analyse von Mikroorganismen in Biofilmen



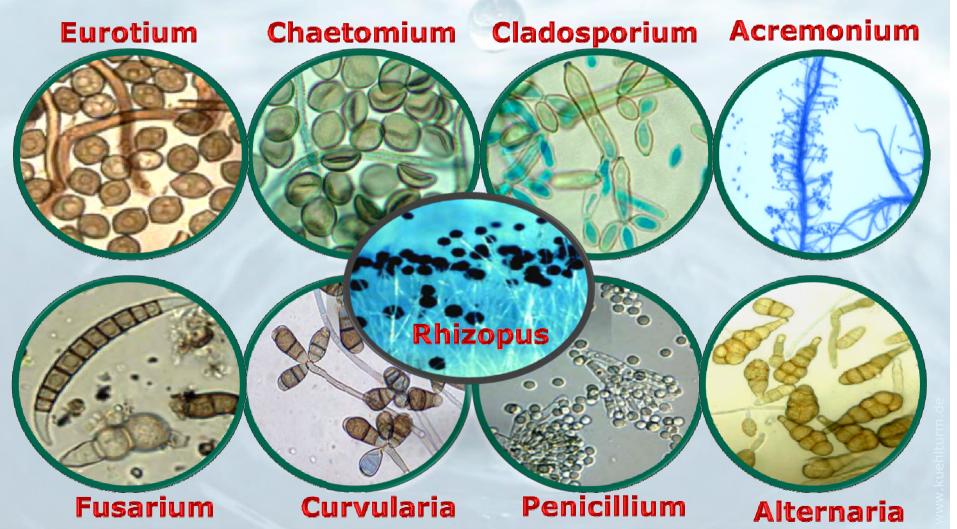
Notwendigkeit von Untersuchungsreihen!







Schimmelpilze in Biofilmen technischer Wassersysteme

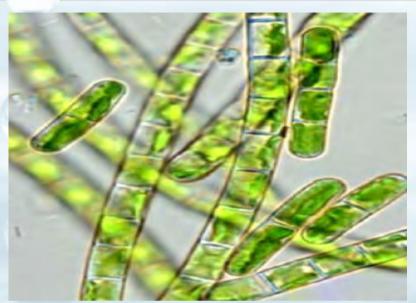






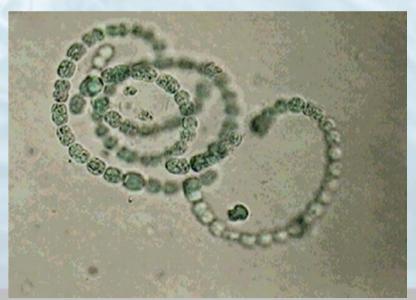






Algen und Amöben in Biofilmen

















Inhalt

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







Quorum sensing (QS)

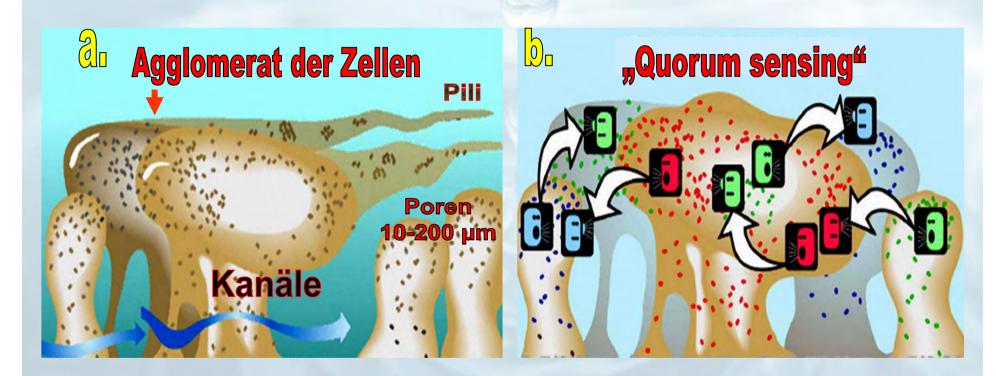
Dabei handelt es sich um einen Mechanismus von
Bakterien miteinander zu kommunizieren. Dieser ist
abhängig vom Typ der Bakterien und deren Dichte.
Gram-negative Bakterien, wie zum Beispiel
P. aeruginosa, produzieren N-Acyl-Homoserin-Lactone
(AHL) als Signalmoleküle (Autoinducer) für
QS-Systeme.







Kommunikation, Induktion und Interaktion zwischen Bakterien in "Quorum sensing" Systemen



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

We are looking for who is "talking"???

Nach Courtesy, MSU-CBE



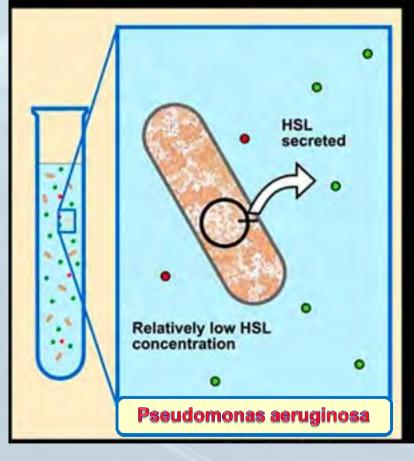


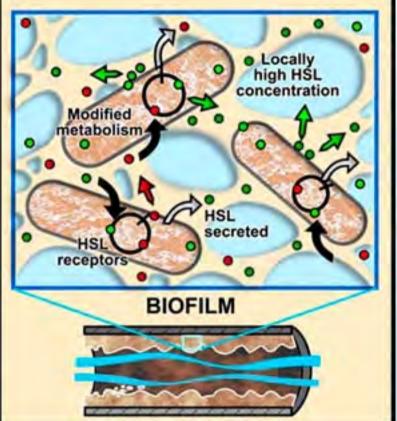




Die Sekretion der "Signal" Molekülen (Autoinducer)

Quorum Sensing





Nach Courtesy, MSU-CBE

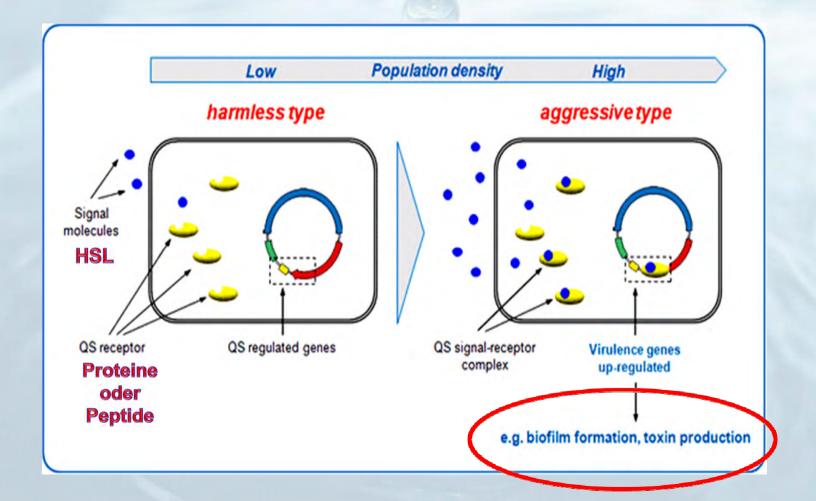








"Quorum sensing": Biofilm und Toxin Produktion









"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.

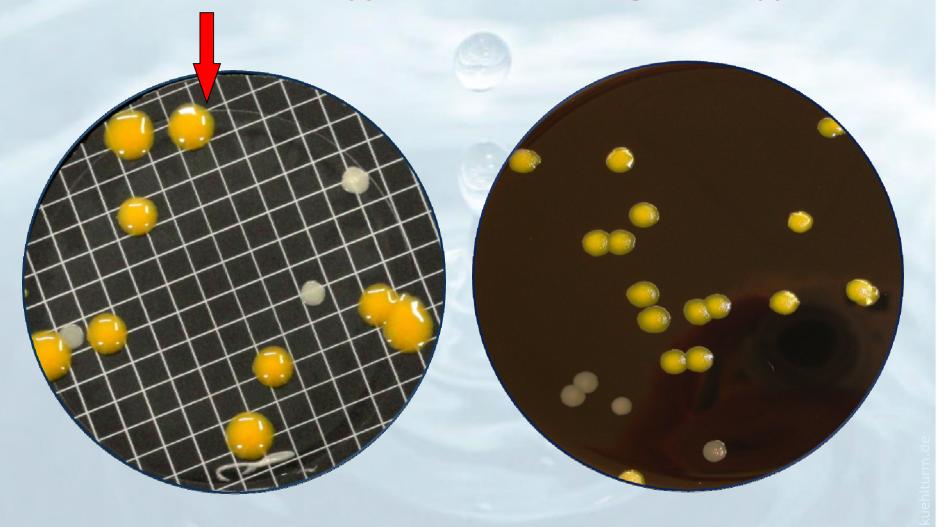
Diese spezifische Biofilmmatrix fördert das Wachstum und die Anwesenheit von Legionella pneumophila.







Flavobacterium spp. zusammen mit Legionella spp.

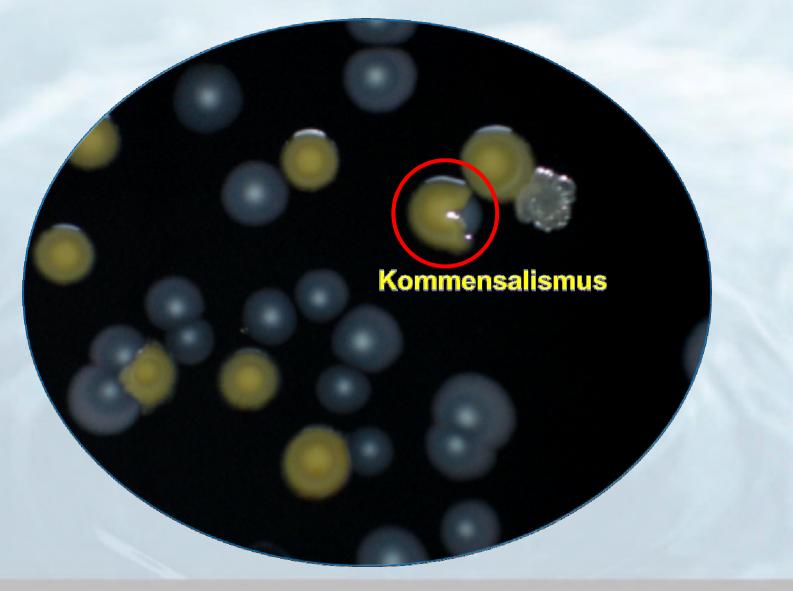








Legionella pneumophila Serogruppe 1 mit Flavobacterium sp.



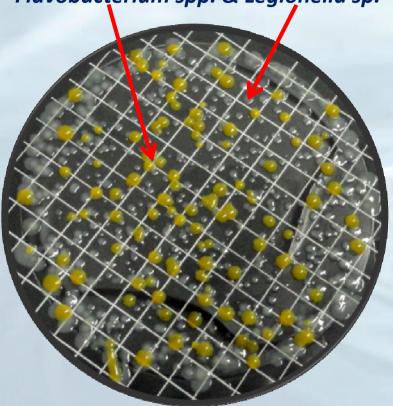




Flavobacterium sp. und Pseudomonas fluorescens zusammen mit Legionella sp.

Flavobacterium spp. & 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"

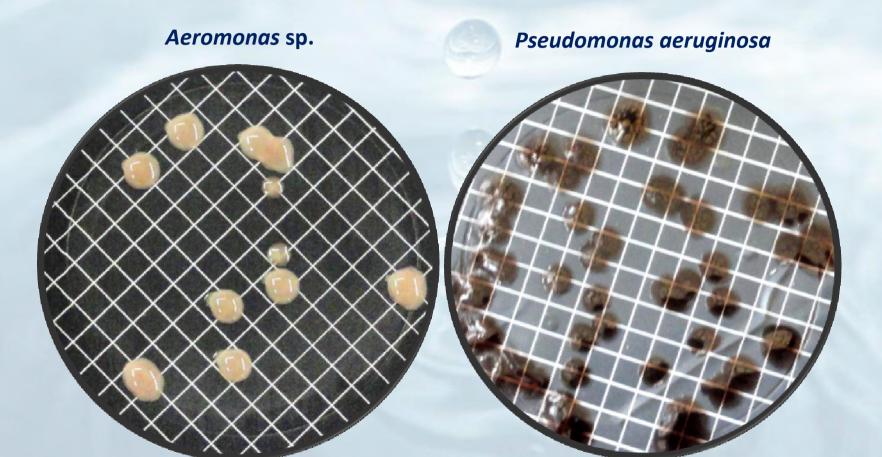
Interessanterweise konnten Legionellen auch einen zwei-Spezies Biofilm aus K. pneumoniae und P. aeruginosa besiedeln - wobei nachgewiesen werden konnte, dass eine Spezies, wie K. pneumoniae, permissiv für Legionellen ist und andere, wie P. aeruginosa (nicht-permissiven) und hemmende Wirkung zeigen kann.







Aeromonas sp. und Pseudomonas aeruginosa hemmen Legionellen



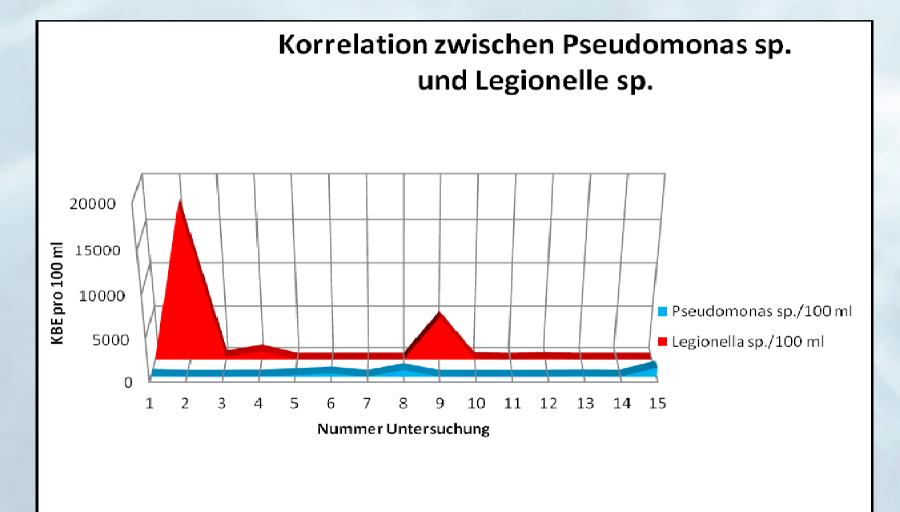
Legionella spp. nicht in einem Biofilm in Anwesenheit von Pseudomonas aeruginosa oder Aeromonas spp. wachsen.











Salek, 2013







"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.

Dr. habil. Anna Salek / domatec

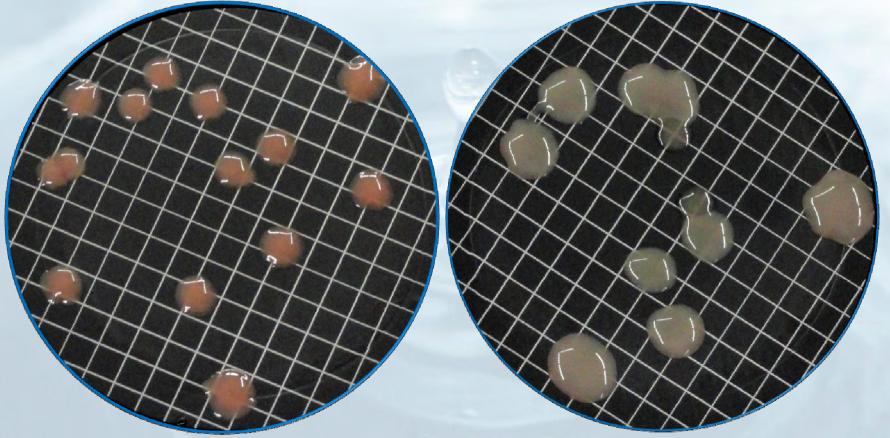
(speziell Legionella pneumophila Sg. 1)





Begleitflora in Kühlturmwässern





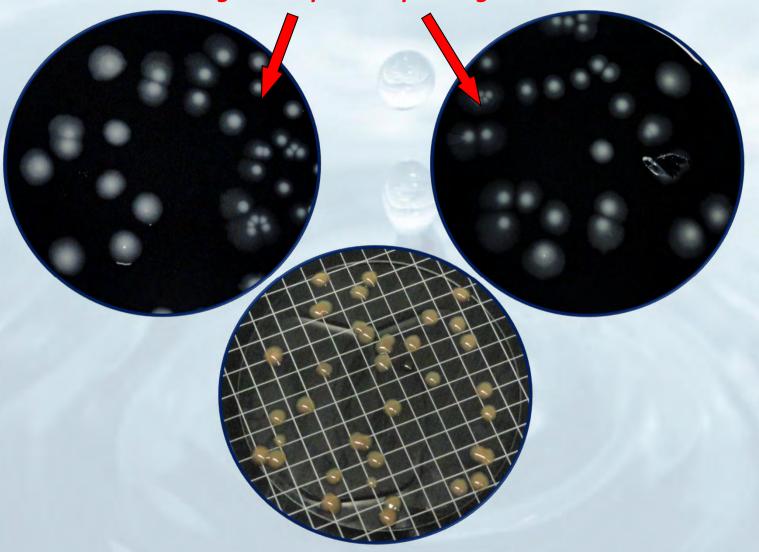


Dr. habil. Anna Salek / domatec





Legionella pneumophila Sg. 2 - 15



Stenotrophomonas sp.





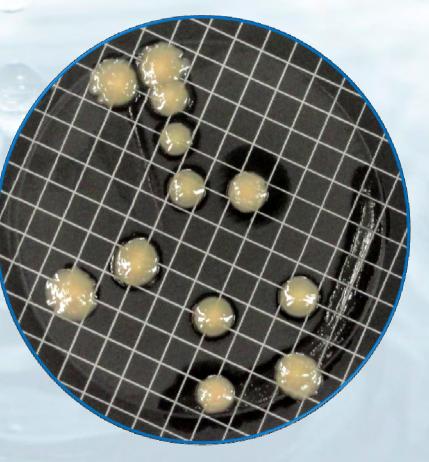


Begleitflora in Kühlturmwässern



Stenotrophomonas sp.

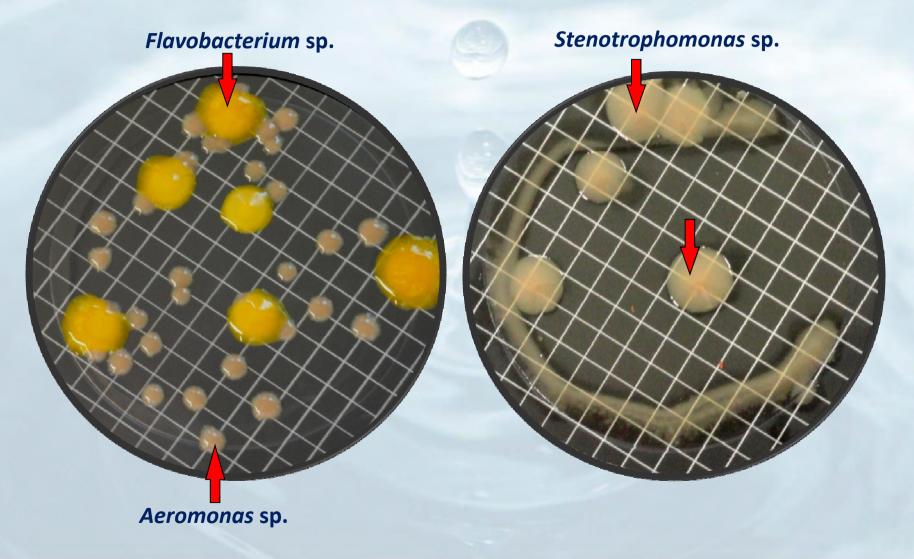








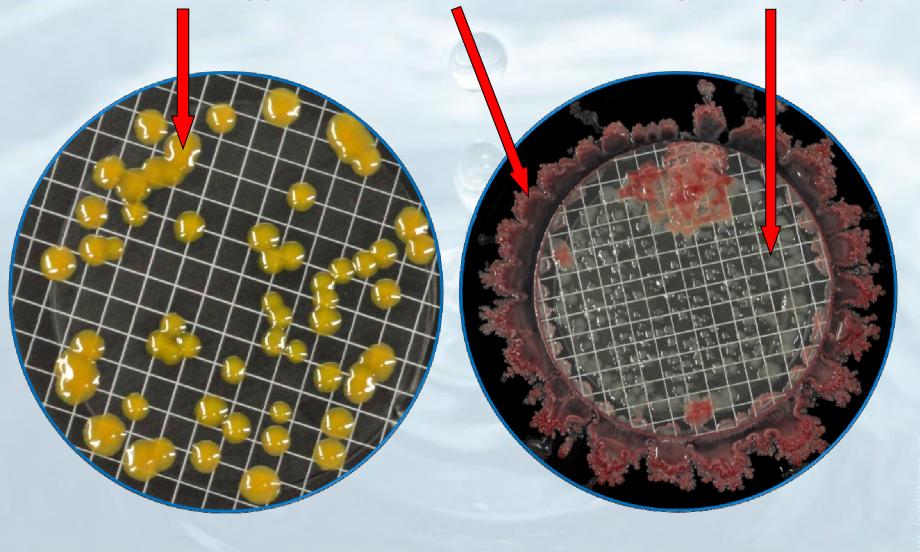
Begleitflora in Kühlturmwässern







Flavobacterium spp. und Aeromonas mit Stenotrophomonas spp.











Regelmäßige Kontrollen sind unverzichtbar

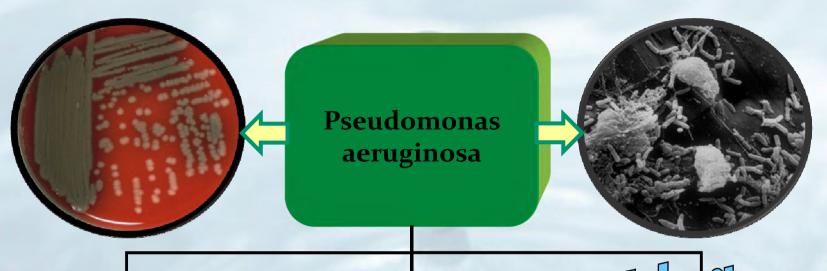








Pigmente von Pseudomonas aeruginosa



Fluorescein oder Pyoverdin (gelb)

In a seale

Farbumschlag

Pyocyanin (blau-grün)

roxine !

Pyorubin (rot-braun)

v.kuehlturm.

Inhalt

- 1. Kühlturmsysteme (Risikobetrachtung).
- 2. Entstehung von Biofilmen & Biofouling Genese.
- 3. Mikroorganismen im Biofilm: Bakterien und deren Ökosytem.
- 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 Krankungen

www.kiiehitiirm







Untersuchung nur Legionella-Spezies

Legionella-Spezies (bis 57, RKI, 2012) Nach UBA

Legionella Spezies
Bis zu 79 Serogruppen

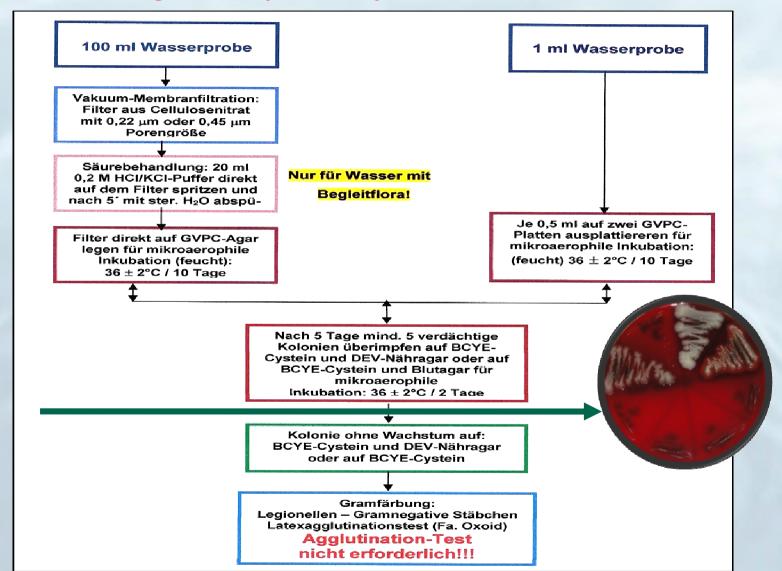
Legionella pneumophila Serogruppe 1 und 2-15;

90% der Krankungen





Legionella pneumophila: Nachweis







Legionella spp.: Nachweismethoden

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



Dr. habil. Anna Salek / domatec





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!



seudomonas aerugin<mark>osa</mark>

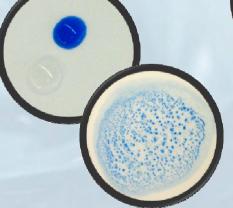




Beispiel:

- 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!





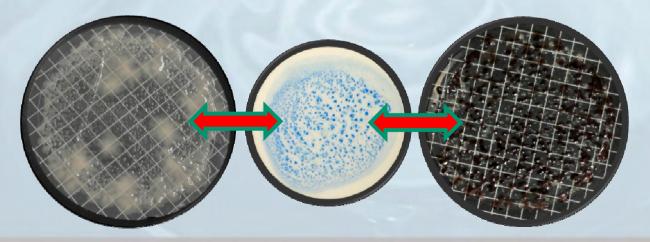




Erklärung:

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!







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 positiv,
 - Ergebnis für *Legionella pneumophila*: positiv, aber falscher Wert, weil Begleitflora, z.B. große Kontamination von *Pseudomonas* aeruginosa oder *Aeromonas*, hemmt *Legionella pneumophila* Wachstum.

Befund ist: falsch negativ oder zu niedriger Wert!



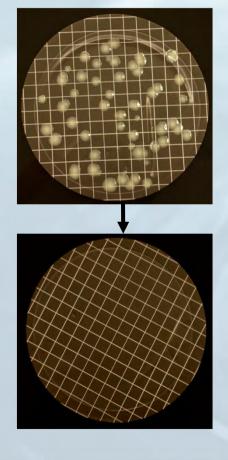




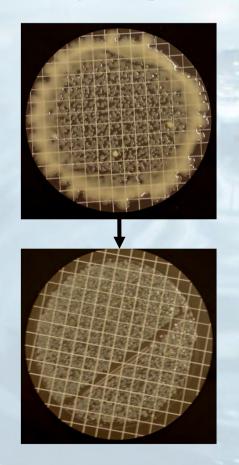


Befund falsch negativ nach Säure

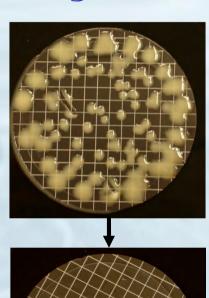
Probe
L. pn. Sgr. 2-15



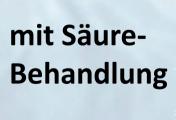
Ref. Stamm L. pn. Sg. 1



Klebsiella + Legionella



ohne Säure-Behandlung









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.

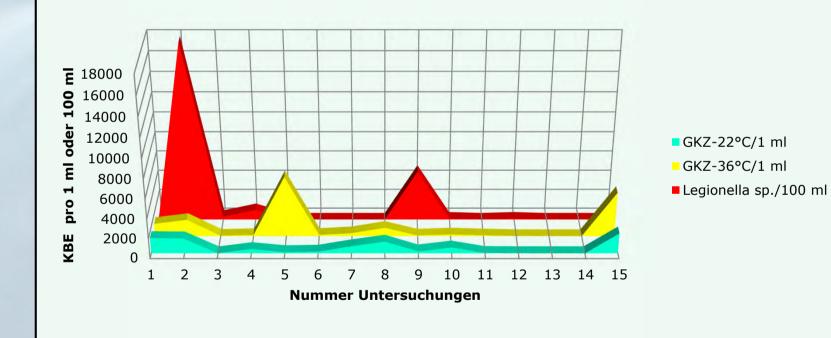








Korrelation zwischen GKZ und Legionellen in Kühlturmwasser



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.



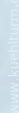






Korrelation zwischen Mikroorganismen in Kühlturmwasser 18000 KBE pro 1 ml oder 100 ml 16000 14000 12000 10000 ■GKZ-22°C/1 ml 8000 GKZ-36°C/1 ml 6000 ■ Pseudomonas sp./100 ml 4000 Legionella sp./100 ml 2000 0 8 9 10 11 12 13 Untersuchung Nr.

Salek, 2013

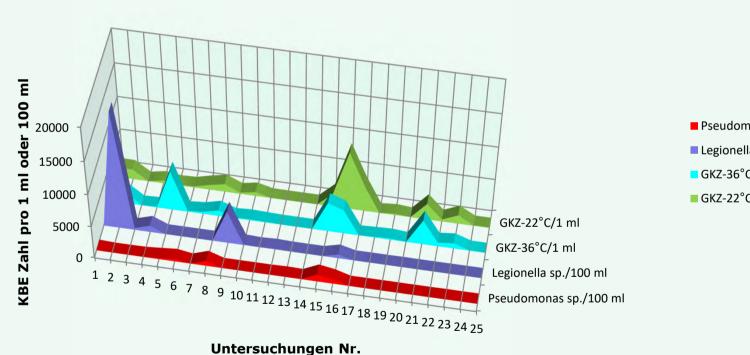








Korrelation zwischen Mikroorganismen in Kühlturmwasser



- Pseudomonas sp./100 ml
- Legionella sp./100 ml
- GKZ-36°C/1 ml
- GKZ-22°C/1 ml

Salek, 2013









Überwachung mit "Dip-Slides" untauglich!

Bei industriell gefertigten Dip-Slides gibt es deutliche Unterschiede.

Die eingesetzten Medien eignen sich zudem nicht für die Bewertung

der Kühlturmwasser-qualität, z.B. große Abweichungen im Hinblick

auf das erfasste Keim-Spektrum und die

Wachstumsgeschwindigkeit der Organismen.

Bei gleicher Bebrütungsdauer sind große Unterschiede möglich.

Es besteht eine erhebliche Unschärfe zur tatsächlich

vorhandenen Population!



Dr. habil. Anna Salek / domatec











Akkreditierungsstelle

Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH

Beliehene gemäß § 8 Absatz 1 AkkStelleG i.V.m. § 1 Absatz 1 AkkStelleGBV Unterzeichnerin der Multilateralen Abkommen von EA, ILAC und IAF zur gegenseitigen Anerkennung

Akkreditierung



Die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH bestätigt hiermit, dass die

domatec GmbH Am Burgfried 20, 84453 Mühldorf am Inn

mit ihren Prüflaboratorien

Menninger Straße, 84570 Polling-Weiding Hermann-von-Helmholtzplatz 10 im Forschungszentrum Karlsruhe, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen Prof. Eichmann-Str. 8, 80999 München

die Kompetenz nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 besitzt, Prüfungen in folgenden Bereichen

mikrobiologische Untersuchungen von Trinkwasser nach Anlage 1, 3 und 4.1.2 der Trinkwasserverordnung: 2001 sowie von Wasser, Oberflächenwasser, Schwimm- und

chemische Untersuchungen von Trinkwasser von ausgewählten Parameter nach Anlage 3 der Trinkwasserverordnung: 2001;

Probenahme von Roh- und Trinkwasser sowie Schwimm- und Badebeckenwasser

Die Akkreditierungsurkunde gilt nur in Verbindung mit dem Bescheid vom 25.01.2011 mit der Akkreditierungsnummer D-PL-14323-01 und ist gültig bis 24.01.2016. Sie besteht aus diesem Deckblatt, der Rückseite des Deckblatts und der folgenden Anlage mit insgesamt 4 Seiten.

Registrierungsnummer der Urkunde: D-PL-14323-01-00

Berlin, 25.01.2011

1. N. Nalburn













Name: Dr. habil. Anna Salek

Firma: domatec GmbH

Straße: Menninger Str. 1

Ort: 84570 Polling

www.domatec.info

E-Mail:

anna.salek@domatec.info

Fon: +49-8631-1676-251

Fax: +49-8631-1676-291

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

