

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Mikrobiologie des Wassers

Dr. C. Sandhu, Prof. T. Grischek & C. Syhre

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Gliederung

- Einleitung
- Generelle Aspekte zu pathogene Mikroorganismen
- Trinkwasserrelevante pathogene Mikroorganismen
- Entfernung von pathogenen Mikroorganismen durch die Uferfiltration
 - Multi-Barrieren-Prinzip / Multi-Barrieren-Risikomanagement
- Nachweis von Mikroorganismen
 - Colilert Verfahren
 - Legiolert Verfahren
 - Andere neuere Verfahren

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Einleitung

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Drinking Water Ladder

Improved drinking water sources

- have the potential to deliver safe water by nature of their design and construction
- piped water, boreholes or tubewells, protected dug wells, protected springs, rainwater and packaged or delivered water

Safely managed	Drinking water from an improved water source which is located on premises, available when needed and free of faecal and priority chemical contamination
Basic	Drinking water from an improved source provided collection time is not more than 30 minutes for a roundtrip including queuing
Limited	Drinking water from an improved source where collection time exceeds over 30 minutes for a roundtrip to collect water, including queuing
Unimproved	Drinking water from an unprotected dug well or unprotected spring
No service	Drinking water collected directly from a river, dam, lake, pond, stream, canal or irrigation channel

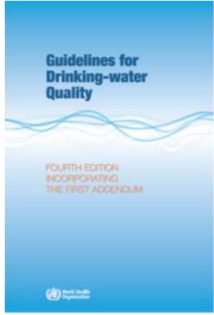
UNICEF & WHO (2017)

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

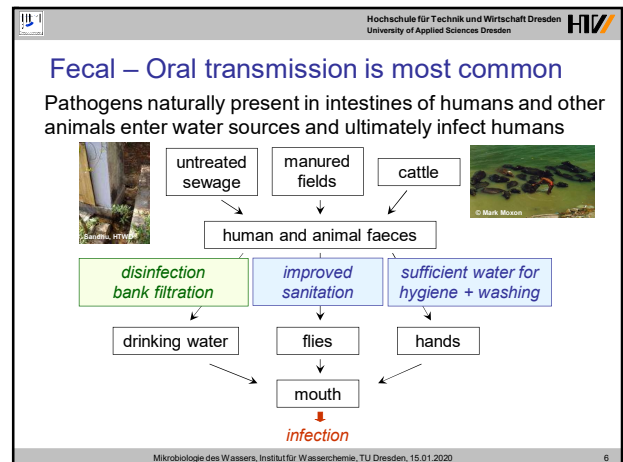
WHO Wasserbeschaffenheitsrichtlinien

- To be considered safe, drinking water must be free from pathogens and elevated levels of harmful substances at all times.



Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva: World Health Organization, 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020



Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

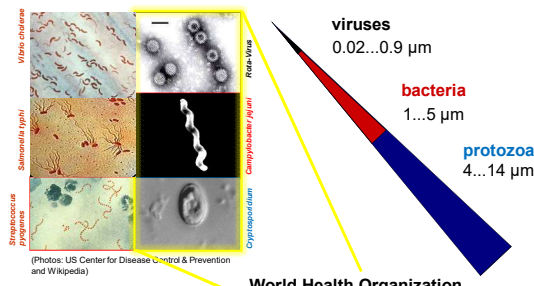
Pathogene Mikroorganismen

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Wasserübertragene pathogene Mikroorganismen

Variety of pathogen types... and organism / cell sizes



viruses: 0.02...0.9 µm

bacteria: 1...5 µm

protozoa: 4...14 µm

World Health Organization → Reference pathogens

(Photos: US Center for Disease Control & Prevention and Wikipedia)

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

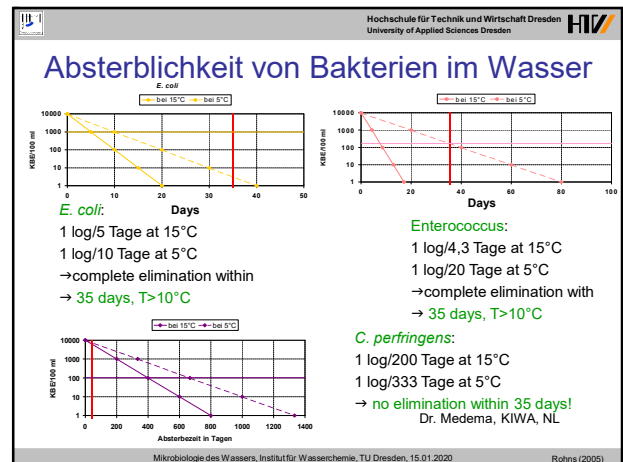
Frühere Krankheiten

Typhus, Cholera, Ruhr

Heutige Krankheiten

Gastroenteritis
Legionellose
Cryptosporidiosis
Giardiasis

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020



Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Übertragungswege durch Wasser

- Trinken (Ingestion)
- Aspiration
- Inhalation (Aerosol)
- Kontakt (z. B. Waschen)

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Trinkwasserrelevante pathogene Mikroorganismen

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Gesetze, Richtlinien, Empfehlungen, Verordnungen

- 1988 Richtlinie für Krankenhaushygiene "Wasserversorgung"
- 1990/91 Vorschläge für Richtwerte (Exner et al.)
- 1993 Richtlinie für Krankenhaushygiene „Untersuchung“
- 1993 DVGW Arbeitsblatt W551
- 2001/2003 TrinkwV 2001
- 2001 Infektionsschutzgesetz: Meldepflicht für Legionellen
- 2004 Guidelines for Drinking Water Quality der WHO
- 2006 Periodische Untersuchung von Legionellen-Empfehlung des Umweltbundesamtes
- 2011 Neufassung der TrinkwV 2011
- 4. Änderung der TrinkwV 2011 (8./9.01.2018)**

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 13

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

4. Änderung der TrinkwV 2011 (01/2018)

- Risikobasierten Anpassung des Probenahmeplans (RAP)
 - Einführung eines Risikomanagementkonzeptes durch den Ww (freiwillig)
 - Minimierung des Analysenaufwands durch RAP
 - Ww muss RAP beim Gesundheitsamt anmelden
- Änderung bei der Verfahrenskenndaten für Analysenmethoden (wichtig für Labore)
- Neue Meldepflicht für Legionellen
 - Jede Überschreitung des Legionellen-Maßnahmewertes muss durch Laboratorien an das Gesundheitsamt gemeldet werden
- Aufnahme von Enterokokken (routine Untersuchungen / A Parameter Gruppe)

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 14

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Anforderungen der TrinkwV 2011

§ 5 Mikrobiologische Anforderungen

(1) Im Trinkwasser dürfen Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nummer 1 des Infektionsschutzgesetzes, die durch Wasser übertragen werden können, nicht in Konzentrationen enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen.

(2) Im Trinkwasser dürfen die in Anlage 1 Teil I festgelegten Grenzwerte für mikrobiologische Parameter nicht überschritten werden.

Coliforme Bakterien	0 in 100 ml
Escherichia coli (E.coli)	0 in 100 ml
Enterokokken	0 in 100 ml
Clostridium perfringens	0 in 100 ml

einschließlich Sporen, nur bei Oberflächengewässer

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 15

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Relevante Krankheitserreger in TWV D

Bakterien

- Pseudomonas aeruginosa
- Campylobacter jejuni, Campylobacter coli
- Enterohämorrhagische Escherichia coli
- Atypische Mykobakterien
- Coliforme Bakterien (Klebsiella sp., Enterobacter sp., Citrobacter sp.)

Viren

- Noroviren
- Adenoviren
- Enteroviren

Protozoen

- Cryptosporidium parvum
- Giardia intestinalis

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 16

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Cryptosporidien

Wasserbedingter Cryptosporidien-Ausbruch, Milwaukee 1993

- 403.000 Erkrankte
- 44.000 Personen in ärztlicher Behandlung
- 4.400 Patienten in Krankenhäusern
- 69 Todesfälle, hauptsächlich bei immunsupprimierten Personen einschl. AIDS
- Gesamtkosten für medizinische Behandlung & Produktivitätsverlust: 96,2 Mill. \$

Corso P. Emerg Inf Dis. 2003; 9:426

Probleme (WHO)

- hohe Infektiosität (ab 10 Oozysten)
- Langlebigkeit (Wochen bis Monate in Frischwasser)
- Resistenz gegenüber konventioneller Desinfektion (Chlor)
- Entfernung durch Filtration bzw. Uferfiltration notwendig

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 17

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Relevante wasserassoziierte Infektionserreger die sich in Hausinstallationssystemen vermehren können

- **Legionella spp.**
- **Pseudomonas aeruginosa**
- Enterobacteriaceen (*E. coli*, *Serratia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.)
- *Acinetobacter* spp.
- *Burkholderia cepacia*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Sphingomonas* spp.
- *Ralstonia pickettii*
- Nicht-tuberkulöse Mykobakterien
- Pilze (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.)
- Amöben-assoziierte Bakterien (*Legionella anisa*, *Bosea massiliensis*)

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 18

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Biofilm

Bestandteile eines Biofilms:

- Mikroorganismen**
- extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)**
 - Proteine**
 - DNA**
 - Lipide**
 - Makromoleküle**

Die EPS ermöglicht den Biofilmen die Haftung an der Oberfläche.

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 19

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Legionellen

Vermehrung von Legionellen

bis 15 °C keine Vermehrung
25 °C bis 45 °C ideale Vermehrung
36 °C optimale Vermehrung
ab 55 °C beginnen Legionellen abzusterben
ab 70 °C sterben Legionellen ganz ab

Aufwuchsträger Biofilm

Warmwasserspeicher
verrostete Rohre
Springbrunnen
Whirlpools
Rohrabschnitte mit Stagnationswasser
von außen erwärmte Kaltwasserleitung

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 20

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Wasserspezifische Aspekte

- Legionellen korrelieren nicht mit klassischem bakteriologischem Indikatorsystem
- Legionellen benötigen spezifische Nährmedien
- Legionellen werden durch Inhalation, nicht durch Trinken (Ingestion) erworben
- Legionellen vermehren sich in Warmwasser (20-55 °C)
- Legionellen sind die wichtigsten ausschließlich aus der Umwelt erworbenen Infektionen

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 21

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Legionellen - Probenahme

Vor der Probenahme dürfen max. 1 l Wasser laufen gelassen werden

Vor der Probennahme sind alle mit dem Trinkwasser in Berührung kommenden Teile durch Abflammen zu desinfizieren, damit keine Verfälschung der Entnahmeprobe stattfindet.

Menzel (2011)

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 22

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Bewertung der Analysenergebnisse

Legionellen (KBE/100 ml)	Bewertung	Maßnahme	Weitergehende Untersuchungen	Nachuntersuchung
≥ 10.000	extrem hohe Kontamination	direkte Gefahrenabwehr erforderlich (Desinfektion und Nutzungseinschränkung, z.B. Duschverbot), Sanierung erforderlich	unverzüglich	1 Woche nach Desinfektion bzw. Sanierung
> 1.000	hohe Kontamination	Sanierungserfordernis ist abhängig vom Ergebnis der weitergehenden Untersuchung	umgehend	-
≥ 100	mittlere Kontamination	keine	innerhalb von 4 Wochen	-
< 100	keine / geringe Kontamination	keine	keine	nach 1 Jahr

Menzel (2011)

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 23

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Maßnahmen gegen Legionellen

Einmal kontaminiert – immer kontaminiert

Thermische Desinfektion
60°C im Speicher und 50°C am Auslauf
Krankenhäuser – superheat and flush (70°C und 30 min auslaufen)
Energie- und Wasserverbrauch

Chlorierung:
Schock-Chlorierung und thermische Desinfektion
Hyperchlorierung – Korrosion!

Andere Maßnahmen:
Ozon
UV-Bestrahlung
Cu-Ag - Ionisation

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 24

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Legionellen - Vermeidung

Planung

- Verweildauer im System minimieren (kurze Rohrleitungen, dezentrale WW-Bereitung)
- Rohrleitungen nicht überdimensionieren (guter Wasseraustausch)
- kein stagnierendes Wasser (Toträume, nicht benutzte Leitungen)
- auf Materialwahl achten (Biofilmbildung vermeiden – bestimmte Kunststoffe, Kautschuk-Dichtungen)

Ausführung

- kein Erwärmen der Kaltwasserleitungen durch WW-Leitung
- keine Partikel, Verkrustungen → Nährstoffe und Schutz gegen Dekontamination → glatte Innenwände

Konstruktion

- keine Toträume in Armaturen
- keine Dichtungen aus Kautschuk

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 25

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Pseudomonas aeruginosa

- Wundinfektion
- Infektion von Atem- und Harnwegen
- Lungenentzündung
- Sepsis
- Herzerkrankung

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 26

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Pseudomonas aeruginosa

Charakterisierung
gramnegatives Bakterium mit hoher Anspruchslosigkeit und hoher natürlicher Antibiotikaresistenz

Reservoir
aquatische Biotope, Wasserhähne, Perlatoren, Reinigungslösungen, Whirl-Pools, Badewasser, neu verlegte Rohrleitungen

Umweltverhalten
hohe Persistenz, über Jahre in wasserführenden Systemen

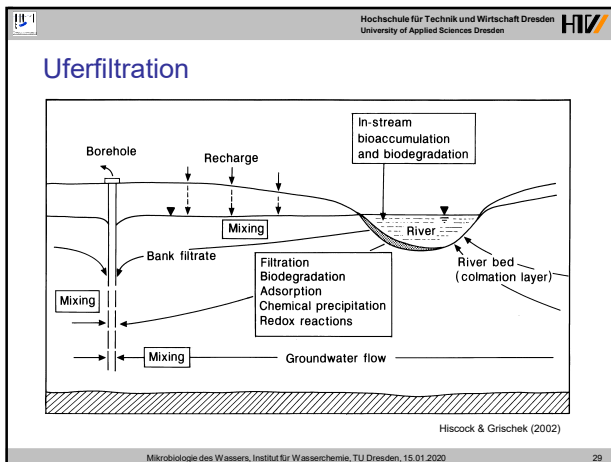
Aufnahme
Kontakt, Haut, Wunden, Gehörgang

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 27

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Entfernung von pathogenen Mikroorganismen durch die Uferfiltration

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 28

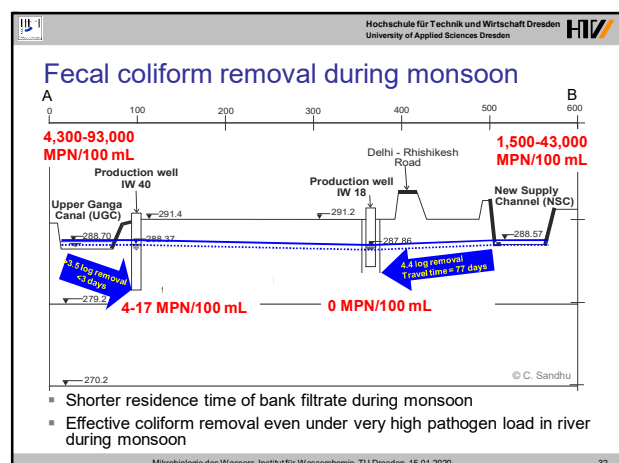
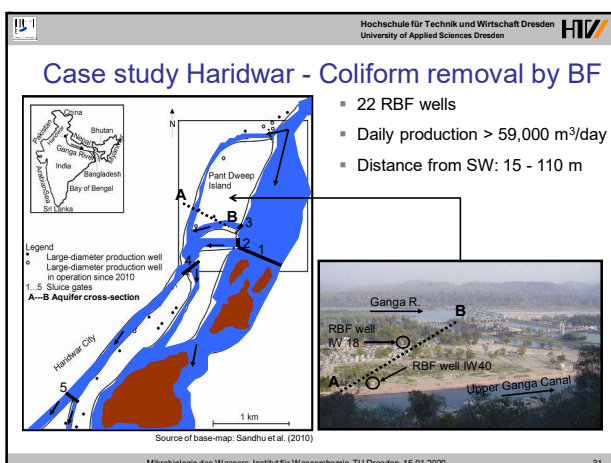


Pathogen removal by BF in Europe & USA

Expressed as "log removal", where a greater-than ">" symbol implies no detection in outflow (1.0 log = 90% removal, 2.0 log = 99%, etc.)

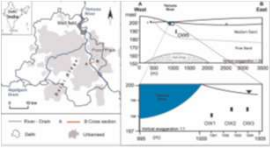
RBF site	Coliform bacteria	<i>E. coli</i>	<i>Clostridium</i> spores	Particles as large as Protozoa	Enteroviruses	Reference
Missouri River (Parkville, USA)	> 4.8	> 3.5	> 4.8			Weiss et al., 2005
Great Miami River (Cincinnati, USA)				3.0 ... 4.0		Gollnitz et al., 2004
North Platte River (Casper, USA)	2.15 ... 2.35	1.9 ... 2.05				Gollnitz et al., 2005
Rhine River (Flehe, Germany)	2 ... 3.5					Rohns et al., 2006
Rhine River (Remmerden, NL)	> 5.0		3.1		> 2.6	Havelaar et al., 1995
Meuse River (Roosteren, NL)			3.3 ... 5.0		1.7	Medema et al., 2000

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 30



Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Removal of enteric virus by RBF in Delhi



- High capacity to remove viruses from extremely polluted surface waters
- Removal of indigenous somatic phages:
 - by factor $> 10^4$ over 4 m flow path
 - by factor $> 10^6$ over 50 m flow path

Sprenger et al. 2014

Organism	Yamuna River ^a	Yamuna River ^b	Average	Standard deviation	QMS
HAV	4.1×10^8 genome copies/100 mL	3.1×10^8 genome copies/100 mL	5.6×10^8 genome copies/100 mL	7.1×10^8 genome copies/100 mL	None in 500 mL ^{a,b}
NoV	5.7×10^3 genome copies/100 mL	1×10^3 genome copies/100 mL	5.4×10^3 genome copies/100 mL	6.9×10^3 genome copies/100 mL	None in 500 mL ^{a,b}
HAV	ND	Positive in 100 mL	–	–	None in 1000 mL ^b
HEV	Positive in 100 mL	ND	–	–	None in 1000 mL ^a

^aUniversity of Jena
^bFederal Environmental Agency of Germany
ND: Not determined

Sprenger et al. 2014

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Multi-Barrieren-Prinzip

- Zuverlässigkeit einer seuchenhygienisch einwandfreien Wasserversorgung basiert auf drei Säulen: Gewässerschutz, Aufbereitung und Desinfektion, die nicht beliebig gegeneinander austauschbar sind
- Bank filtration as single barrier is not sufficient - a careful risk assessment at all stages between catchment and consumer is required (Medema et al., WHO)

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Nachweis von Mikroorganismen

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Detection of pathogens

Method	Detectable Pathogens	Time to Result	Commercial Examples	Advantages & Disadvantages
Membrane Filtration and Cell Culture	Viruses, bacteria, protozoa	Days to weeks	Use of Agar growth agent	Allows quantification, but slow
Polymerase Chain Reaction (PCR)	Viruses, protozoa, bacteria	~ 3 hours	SmartBeads	Very fast, but expensive and not very portable
Optical Detection (color changes or cells themselves)	Bacteria	15 minutes to several hours		Fast and can be portable, but expensive
Multiple Tube Fermentation	Bacteria	~18-24 hours	Colilert (IDEXX)	Affordable and quantifiable, but not very fast
Microscopic Observation	Protozoa, others	Minutes to hours		May be fast, but cannot tell viable from unviable cysts

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Nachweis von Mikroorganismen

Wasserprobe

Vakuum

Filtermembran mit suspendierten Keimen

Filtrat 'steril'

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Colilert

Erprobt
von der US-Umweltschutzbehörde (EPA) zugelassen, 24-Stunden-Test für Trink- und Quellwasser, auch in Deutschland als Standardmethode anerkannt, jährlich werden weltweit Millionen von Tests durchgeführt

Einfach
Einfache Verwendung erleichtert Schulung von Mitarbeitern. Aufgrund der Einzeldosisverpackung sind keine Zubereitungsschritte notwendig. Durchführung von Qualitätskontrollen in 15 Minuten

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Colilert

Wasserprobe mit Puffer und Nährmedium mischen

Tüten füllen

Tüten verschließen
Inkubieren
Aus zählen: gelb Coliforme, fluoreszierend E.coli

total coliform present

E. coli present

www.idexx.com

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Bestimmung von Legionellen - Legiolert

- 100 ml der Probe in ein steriles Gefäß geben.
- Probe auf Raumtemperatur bringen.
- Härtegrad der Wasserprobe ermitteln. Stufen Sie Pads mit 0-2-positiv als
- Ggf. mit entsprechendes Ergänzungsmittel und 0,33 ml bzw. 1,0 ml hinzufügen.
- Die Probe-Reagenz-Mischung in ein Quanti-Tray/Legiolert-Tray geben.
- Die versiegelten Trays bei $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 7 Tage lang inkubieren.

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020




AquaNES
Demonstrating Synergies in Combined Natural and Engineered Processes for Water Treatment Systems

The AquaNES project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement no. 689450

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Other microbiological methods – FCM

Flow cytometry (FCM): BactoSense TCC



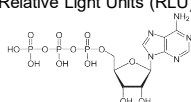

- sampling, adding reagent, mixing and incubation, measurement cleaning – fully automated
- results available after 20 minutes
- on-line operation
- internal database

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 42

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

Adenosin-Tri-Phosphat

- Nukleotid, nämlich das Triphosphat des Nucleosids Adenosin
- Energielieferant: Unmittelbar verfügbare Energie in jeder Zelle
- Ubiquitär. In allen lebenden Organismen und Produkten welche von lebenden Organismen stammen
- reaction between two proteins derived from fireflies, luciferin (substrate) and luciferase (enzyme) occurring in the presence of ATP
- produced light is measured and displayed in Relative Light Units (RLU)

3M ATP-meter

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 43

Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden
University of Applied Sciences Dresden

2. Conclusion/Outlook

ATP correlates well with indicator parameters (Coliforms, E.coli), measurements useful for detection of changes and selection of samples for detailed analysis, but not for groundwater (Fe/Mn)

FCM operational in online mode

FCM indicates (viable?) cells in permeate after UF

Mikrobiologie des Wassers, Institut für Wasserchemie, TU Dresden, 15.01.2020 44