

PROF. DR. MED. M. EXNER

Direktor des Institutes für Hygiene und Öffentliche Gesundheit
der Universität Bonn



Hygiene-Institut - Sigmund-Freud-Str. 25 - D-53105 Bonn

Wolf Umwelttechnologie
Martinweg 2

83329 Waging am See

Sigmund-Freud-Str. 25
53105 BONN
Deutschland / Germany

Telefon: ++49 228 287 4022 (Durchwahl)
 ++49 228 287 5520 (Direktion)
Telefax: ++49 228 287 9522
e-mail: juergen.gebel@ukb.uni-bonn.de
Sachbearbeiter: Dr. rer. nat. J. Gebel
22.08.2005

Gutachterliche Stellungnahme zur Wirksamkeit von Brauseschläuchen mit FlexClean® -Technologie gegen Biofilme

Laborcode DMT 2005-03

Abschlussbericht

1. Zielsetzung des Projekts

Ziel des Projekts war die Untersuchung der Wirksamkeit der FlexClean® -Technologie in Brauseschläuchen zur Reduzierung des Biofilmbildungspotentials.

2. Einführung

Der Begriff „Biofilm“ ist eine Bezeichnung für Aggregate wie Schleime, Aufwuchs, Flocken und größere Ansammlungen von Biomasse in Form von Schlämmen. Ihnen allen ist gemeinsam, dass die Mikroorganismen in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind, die sie zusammenhält, vor äußeren Einflüssen schützt und gegebenenfalls an Oberflächen bindet. Biofilme können sich nicht nur an Grenzflächen zwischen Wasser und festen Medien entwickeln, sondern auch zwischen Wasser und Luft sowie zwischen Feststoff und Atmosphäre, nämlich auf natürlichem Gestein oder auf Gebäuden. Die Voraussetzungen für die Entstehung von Biofilmen sind denkbar einfach: Es

müssen Grenzflächen vorhanden sein, genügend Wasser, mikrobiell verwertbare Nährstoffe und die Mikroorganismen selbst. Diese sind praktisch ubiquitär, deshalb finden sich Biofilme ebenfalls weit verbreitet in der Natur, im medizinischen Bereich und in technischen Systemen. Aufgrund der Widerstandsfähigkeit von Biofilmen und ihrer schnellen Wiederaufkeimung haben viele Desinfektionsmaßnahmen bzw. eine mechanische Reinigung oft nur einen vorübergehenden Erfolg. Eine chemische Reinigung kann außerdem zu unerwünschten Effekten und Beschädigungen im behandelten System führen.

Die Entstehung von Biofilmen basiert prinzipiell auf der Anheftung (Adhäsion) von Mikroorganismen an eine Aufwuchsoberfläche (Substratum), der Vermehrung zu Mikrokolonien und deren Zusammenwachsen zu differenzierten Biofilmen. Allerdings haften die Zellen in der Regel nicht direkt an der Oberfläche des Substratums, sondern am sogenannten conditioning film, der durch die irreversible Adsorption organischer Makromoleküle (Proteine, Polysaccharide, Huminstoffe, usw.) innerhalb von Sekunden in fast allen Umgebungen an der Oberfläche entsteht. Nach der festen Verankerung der Zellen erfolgt die Phase der mikrobiellen Akkumulation, die vor allem durch die Vermehrung der Bakterien bestimmt wird, aber auch durch aus der Wasserphase neu hinzukommende Mikroorganismen begleitet wird. Hierdurch kommt es zur Bildung von Mikrokolonien, die zusammengewachsen Makrokolonien bzw. Biofilme bilden. Dies geschieht besonders schnell, wenn die betroffenen Materialien, wie z.B. Brauseschläuche, in einem permanent feuchtem Milieu eingesetzt werden. Gerade im Duschbereich ist auch die Gefahr einer Bildung und Verbreitung von Legionellen durch die beim Duschen entstehenden Aerosole besonders groß.

Da die Entfernung vorhandener Biofilme ein großes Problem darstellt, ist eine mögliche Strategie die Inhibition der Biofilmneubildung. Dies kann z.B. durch Behandlung des Wassers mit Chlor, Chlordioxid erreicht werden, wobei hier unerwünschte Nebenprodukte auftreten können. Eine andere Strategie ist, durch geeignete Oberflächenmaterialien mit bakteriziden Substanzen bzw. eine mechanische Behandlung betroffener Oberflächen, die irreversible Anheftung der Mikroorganismen zu verhindern oder ihre Vermehrungsfähigkeit einzuschränken. Die Vorteile einer mechanischen Behandlung durch Abrieb und eine gleichzeitige bakterizide Wirkung durch eine silberhaltige Spirale sind in der FlexClean®-Technologie der Brauseschläuche von Wolf Umwelttechnologie vereint. Eine versilberte Edelstahlfeder, welche die Innenwandung des Brauseschlauchs berührt, wird beim Öffnen der Duscharmatur durch den Wasserdurchfluss in Fließrichtung gezogen und zieht sich beim Schließen selbständig in die Ausgangsposition zurück. Hierbei wird die Schlauchwandung 2x mechanisch behandelt. Die versilberte Feder überträgt zusätzlich eine leichte, antimikrobiell wirksame Silberschicht auf die Schlauchwandung. Dieser Ansatz könnte in Bereichen, in denen Biofilme ein hohes Gesundheitsrisiko darstellen oder in denen eine chemische Behandlung unmöglich oder nicht gewünscht ist, zum Einsatz kommen.

Studienziele und Studiendesign

Das Studiendesign umfasste folgende Ziele:

1. Darstellung der Reduktionskinetik der Bakterien in anfangs neuen Brauseschläuchen mit und ohne FlexClean®-Technologie über 12 Wochen unter Praxisbedingungen. Bestimmung des Keimgehalts im Duschschauch durch kulturellen Nachweis im Abstand von etwa 4 Wochen.
2. Darstellung von Veränderungen des äußeren Erscheinungsbildes der, wie unter 1. beschrieben behandelten Duschschauch-Oberflächen durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM).

3. Material und Methoden

3.1 Brauseschläuche

Die Untersuchungen wurden in 3 Haushalten mit jeweils 2 Duschen durchgeführt, die täglich zum normalen Duschen benutzt wurden. Eine Dusche wurde dabei mit einem FlexClean®-Brauseschlauch und eine Dusche mit einem Brauseschlauch gleicher Ausführung aber ohne FlexClean®-Technologie ausgestattet. Diese Schläuche sind mit einer silberbeschichteten Metallfeder ausgestattet, die durch Bewegung eine Anhaftung von Bakterien an der Brauseschlauchinnenwandung verhindern soll. Etwa alle 4 Wochen wurde ein Paar Brauseschläuche abmontiert und im Labor auf Biofilmbildung untersucht.

3.2 Wasserquelle

Für die Versuche wurde Trinkwasser aus dem jeweiligen Hausinstallationssystem verwendet.

3.3 Bestimmung der Bakterienkonzentration im Biofilm (KBE cm⁻²)

Es wurden 5 cm lange Stücke aus der Mitte der Brauseschläuche abgeschnitten, der Biofilm herausgeschabt, in 10 mL 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert und homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann zur Herstellung von Verdünnungen von 1:10 bis 1:10.000 in 0,9%iger NaCl-Lösung verwendet. Aliquots von 100 µL der Verdünnungsreihen wurden im Doppelansatz auf R2A-Agarplatten ausgespatelt und für 7 Tage bei 20°C inkubiert.

3.4 Probenvorbereitung für das Rasterelektronenmikroskop

Es wurden 1 cm lange Stücke aus der Mitte der Brauseschläuche abgeschnitten, längsseits in 4 gleich große Segmente geschnitten und einer Behandlung mit Glutardialdehyd, Osmium-Tetraoxid und Natrium-Cacodylatpuffer unterzogen. Elektronenmikroskopische Bilder der Biofilme bzw. Brauseschlauch-Oberflächen wurden parallel zu den Bestimmungen des Bakteriengehalts und der ausgewaschenen Bakterien aufgenommen. Sie dokumentieren die strukturelle Erscheinung der Biofilme bzw. Schlauch-Oberflächen zum Zeitpunkt der Probenahmen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bakterienkonzentration in Brauseschläuchen mit und ohne FlexClean®-Technologie

Im unbehandelten Brauseschlauch vermehrten sich die Bakterien innerhalb des Versuchszeitraums von 12 Wochen auf bis zu $1,92 \times 10^7$ KBE/cm² (KBE = koloniebildende Einheiten).

Im Brauseschlauch mit FlexClean®-Technologie waren während des Versuchszeitraums maximal $2,60 \times 10^6$ KBE/cm² nachweisbar.

Die vollständigen Versuchsergebnisse sind in der Abbildung 1 dargestellt.

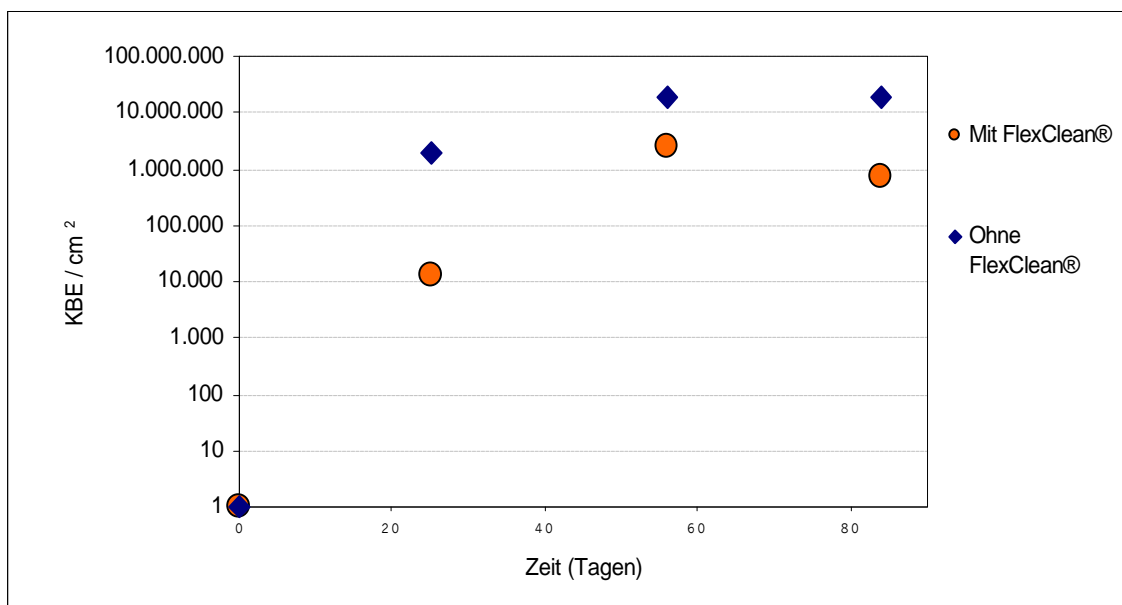


Abbildung 1. Darstellung der Bakterienentwicklungskinetik in Brauseschläuchen mit (rot) und ohne (blau) FlexClean®-Technologie. Die Probenahme erfolgte im Haushalt 1 nach 25 Tagen, im Haushalt 2 nach 56 Tagen und im Haushalt 3 nach 84 Tagen.

4.2 Morphologie der Biofilme bzw. Brauseschlauch-Oberflächen

Die Ergebnisse der REM-Studien sind in der Abb. 2 dargestellt. Bei 1000-facher Vergrößerung ist in Abb. 2A die innere Oberfläche eines neuen Brauseschlauchs zu erkennen. Die Risse können als Folge der Probenvorbereitung für das REM entstehen. Nach 4 Wochen ist auf der Oberfläche des Schlauchs ohne FlexClean®-Technologie deutlich ein dichter werdender Biofilm zu erkennen (Abb. 2B). Details des Biofilms, wie die vernetzte EPS-Struktur und der dichte Aufwuchs der Bakterien sind zu erkennen. Nach 8 Wochen ist die komplette Schlauchoberfläche mit einem dichten Biofilm bewachsen (Abb. 2C). Zum Vergleich sind in den Abb. 2D-F die Veränderungen der inneren Oberfläche eines Brauseschlauchs mit FlexClean®-Technologie dargestellt. Nach 4 Wochen sind vereinzelt Bakterien auf der Schlauchoberfläche zu erkennen (Abb. 2D), nach 8 Wochen scheint sich ein dichter werdender Biofilm zu bilden (Abb. 2E), der allerdings nach 12 Wochen wieder deutlich reduziert wird (Abb. 2F).

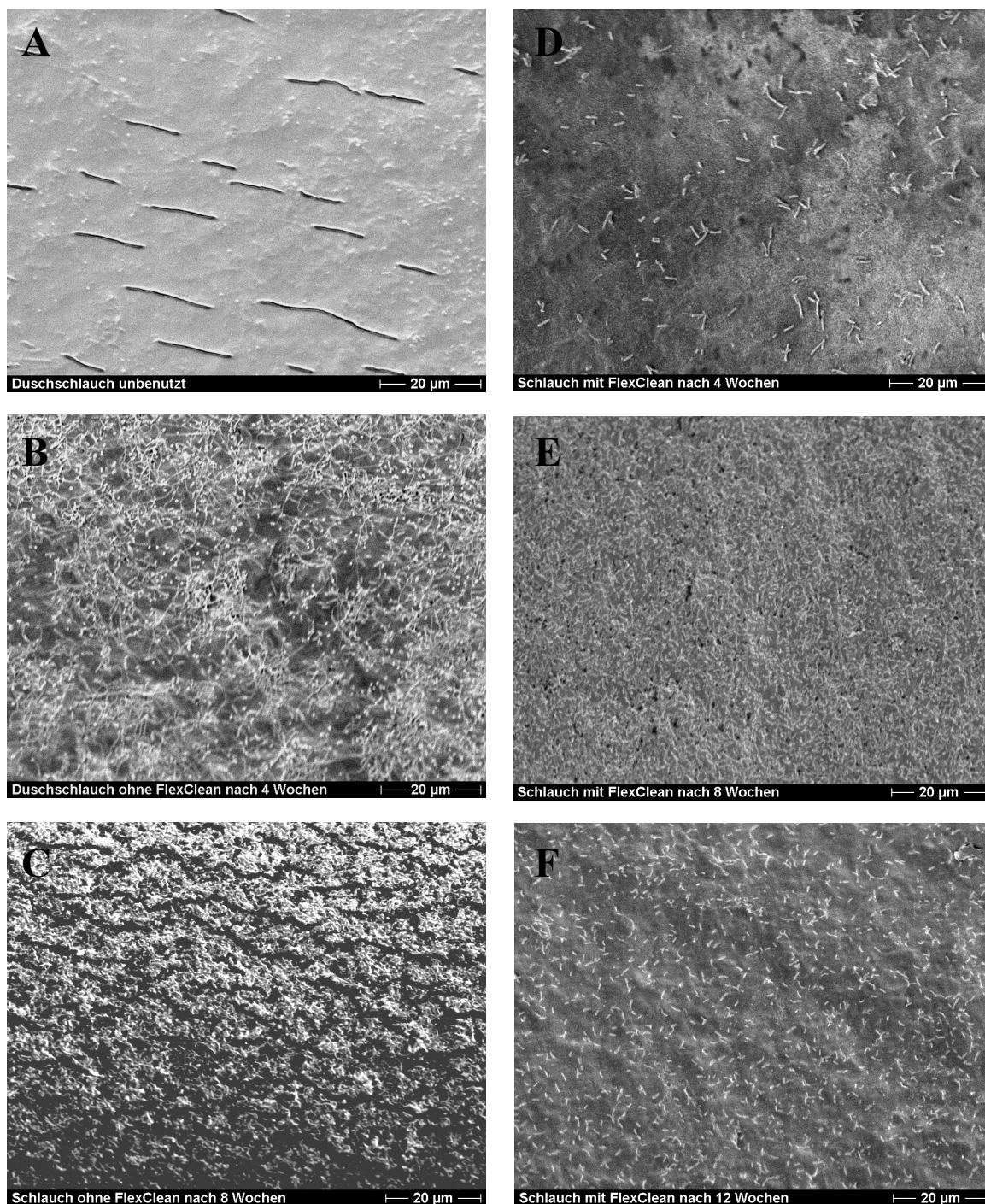


Abbildung 2. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Brauseschlauchoberflächen. A) - neuer Brauseschlauch. B) - Brauseschlauchs ohne FlexClean®-Technologie nach 4 Wochen und C) – nach 8 Wochen (nach 12 Wochen erfolgte keine weitere Änderung des Erscheinungsbildes). D) – Brauseschlauch mit FlexClean®-Technologie nach 4, E) – 8 und F) – 12 Wochen.

5. Zusammenfassung

Zur Untersuchung der hemmenden Wirkung der FlexClean®-Technologie auf die Biofilmbildung in Brauseschläuchen wurden Brauseschläuche mit und ohne FlexClean®-Technologie in verschiedenen Haushalten regelmäßig zum Duschen verwendet und nach 4, 8 und 12 Wochen einer mikrobiologischen Diagnostik, unterstützt durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, unterzogen.

Die Muster wurden entsprechend zwei parallel ausgeführten Methoden untersucht:

1. Bakterienkonzentration im Biofilm

Von der ersten Probenahme an zeigen die mit der FlexClean®-Technologie ausgerüsteten Muster bewuchshemmende Eigenschaften und geringe KBE-Werte gegenüber dem Kontrollmaterial. Die Reduktion der KBE/cm² durch die FlexClean®-Technologie betrug während des Versuchszeitraums im Vergleich zu den nicht ausgestatteten Testkörpern nach 25 Tagen 99,35 %, nach 56 Tagen 86,45 % und nach 84 Tagen 94,32 %.

2. Rasterelektronenmikroskopie

Auf den Oberflächen der mit der FlexClean®-Technologie ausgerüsteten Brauseschläuchen ist eine deutlich verringerte Biofilmbildung sichtbar. Während die unbehandelten Brauseschläuche bereits nach 8 Wochen einen dichten Biofilmbewuchs aufweisen, der konstant bleibt, zeigen die Rasteraufnahmen der behandelten Oberflächen nach Ende des Versuchszeitraums auch Stellen ohne Bewuchsbildung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden:

Der Einsatz von Brauseschläuchen mit FlexClean® -Technologie führt, bewertet über die Untersuchung der KBE und der Rasterelektronenmikroskopie, zu einer Reduktion der Biofilmbildung auf ausgerüsteten neuen Brauseschläuchen. Im Vergleich zu den unausgerüsteten Schlauchmaterialien kann eine geringere Keimdichte/cm² Oberfläche um ca. 90% festgestellt werden. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass nach 8 Wochen ca. 1×10^6 koloniebildende Einheiten/cm² Schlauchoberfläche nachgewiesen werden können. Auch nach 12 Wochen wird dieses Ergebnis bestätigt.

Bonn, den 22.08.2005

Prof. Dr. med. M. Exner

Dr. rer. nat. J. Gebel

Literatur

Costerton B. et al., Bacterial biofilms in nature and disease (1987), *Ann. Rev. Microbiol.*, 41, 435-464.

Exner M., Tuschewitzki G.J. and Scharnagel J. (1987), Influence of biofilms by chemical disinfectants and mechanic cleaning, *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, 183(5-6), 549-563.

O'Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R. (2000), Biofilm formation as microbial development, *Ann. Rev. Microbiol.*, 54, 49-79.

Flemming H.-C. and Wingender J. (2001), Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien, *Biologie in unserer Zeit*, 31(3) 169-180.

Wingender J., Strathmann M., Rode A., Leis A. and Flemming H.-C. (2001), Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *P. aeruginosa*, *Meth. Enzymol.*, 336, 302-314.

Dunne W.M. (2002), Bacterial Adhesion: Seen any good biofilms lately?, *Clinical Microbiology Reviews*, April 2002, 155-166.

Donlan R.M. (2002), Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerging Infectious diseases*, 8(9) 881-890.

Schwartz T., Hoffmann S. and Obst U. (2003), Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system, *Journal of Applied Microbiology*, 95(3) 591-601.

Otte A., Vacata V., Exner M. and Gebel J. (2004), Efficiency of chlorine, chlorine dioxide and UV-C irradiation on biofilm removal and prevention in silicone tubes with running tap water (Presentation at Int. IWA Conference - Biofilms 2004, Las Vegas, USA).

Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S. and Stoodley P. (2005), Survival strategies of infectious biofilms, *Trends in Microbiology*, 13(1) 34-40.

Branda S.S., Vik A., Friedman L. and Kolter R. (2005), Biofilms: the matrix revisited, *Trends in Microbiology*, 13(1) 20-26.