

# DER FINALE METER



## BIOFILME IN DUSCHSCHLÄUCHEN

**Biofilme in Duschschläuchen sind ein kritischer Punkt in Hausinstallationen und deshalb zunehmend Gegenstand von Forschungsprojekten. Ausmass und Zusammensetzung der Biofilme werden massgeblich von der Wahl des Schlauchmaterials beeinflusst. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, da sich Bakterien aus dem Biofilm in die Wasserphase ablösen (v. a. während der Stagnation). Somit nimmt die Materialwahl direkten Einfluss auf die Wasserqualität und letztendlich auf den Konsumenten.**

*Lisa Neu\*, Eawag*

*Caitlin R. Proctor, Eawag*

*Frederik Hammes, Eawag*

### RÉSUMÉ

#### LE DERNIER MÈTRE – BIOFILMS DANS LES TUYAUX DE DOUCHE

Entre la source et le robinet, l'eau potable suisse passe – si cela est nécessaire – par plusieurs étapes de traitement avant de parvenir finalement dans les installations domestiques via le réseau de distribution. Les conditions exerçant une influence sur la microbiologie changent constamment; en général, cela fait l'objet d'une surveillance et les problèmes qui surviennent sont résolus dans l'urgence. Pour les installations domestiques, cela n'est cependant pas le cas, bien que les conditions ici changent beaucoup plus que dans le réseau de distribution. Les tuyaux de douche représentent le dernier mètre et constituent un exemple particulièrement critique. Des projets de recherche actuels ont révélé que (1) le choix du matériau des tuyaux a une influence sur les concentrations de cellules bactériennes et la composition microbiologique des biofilms, que (2) ces mêmes biofilms présentent un haut niveau d'hétérogénéité même à très petite échelle, que (3), durant la stagnation, des bactéries se détachent du biofilm et que la qualité de l'eau potable se détériore avant son utilisation en raison des concentrations élevées de cellules qui en résultent.

Une recherche continue doit permettre de mieux comprendre le processus d'évolution du biofilm sur les matières plastiques en contact avec l'eau potable et leurs dynamiques en phase

### TRINKWASSERMIKROBIOLOGIE IN HAUSINSTALLATIONEN

Schweizer Trinkwasser weist im Allgemeinen eine sehr gute mikrobiologische Qualität auf. Dies ist nicht nur einer effizienten Aufbereitung des Rohwassers zu verdanken, sondern wird vor allem aufgrund regelmässiger Kontrollen im Verteilnetz durch die Wasserversorgungen gewährleistet. Sobald das Trinkwasser jedoch die Feinverteilung von Gebäudeinstallationen erreicht, endet zum einen deren Zuständigkeit und zum anderen ändern sich einflussnehmende Bedingungen im System [1, 2]. Im Vergleich zum Verteilnetz führen (1) die kleineren Rohrdurchmesser zu einem höheren Oberflächen-Volumen-Verhältnis, (2) Warm- und Kaltwasserleitungen werden parallel betrieben, wobei es (3) zu einer ungenügenden Aufrechterhaltung der hierbei angestrebten Temperaturen kommen kann (d. h. erwärmtes Kalt- und abkühlendes Warmwasser), (4) Wasser stagniert zum Teil lange und unregelmässig in den Leitungen (bis zu 23,5 Stunden/Tag) und (5) bei den Installationen werden verschiedenste und teils unzertifizierte Materialien verwendet.

Vor allem in Kombination begünstigen diese Veränderungen Rahmenbedingungen für unkontrolliertes mikrobielles Wachs-

\* Kontakt: [lisa.neu@eawag.ch](mailto:lisa.neu@eawag.ch)

tum. Hierbei existiert und vermehrt sich der Grossteil der Bakterien (bis zu 99%) in sogenannten Biofilmen – einer Matrix aus Schleim, anorganischem Material und Mikroorganismen, die sich z.B. auf der Innenoberfläche von Rohren ausbildet [3]. Übermässiges Wachstum kann zu einer Verschlechterung der Trinkwasserqualität führen, z.B. aufgrund von Veränderungen in Geschmack, Geruch oder Färbung des Wassers. Im ungünstigsten Fall jedoch können sich opportunistische Krankheitserreger wie *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* oder nicht tuberkulöse Mykobakterien wie *Mycobacterium avium* vermehrt ausbreiten [4]. Beim Übergang von der Gebäude-Feinverteilung zum finalen Meter vor der Wasserentnahme ändern sich die zuvor diskutierten Parameter erneut. Hier stellen Duschschläuche ein Paradebeispiel dar. So sind sie wortwörtlich der letzte Meter der Wasserverteilung unmittelbar vor der Nutzung durch den Konsumenten und somit der letzte Teil des Verteilsystems, in dem sich die Qualität des Trinkwassers verschlechtern kann.

In den vergangenen fünf Jahren wurden sowohl Laborexperimente wie auch Feldversuche mithilfe einer Bandbreite an analytischen Methoden durchgeführt, um der Frage nachzugehen, welche Parameter die Trinkwasserqualität auf dem finalen Meter beeinflussen können. Nachfolgend wird ein kurzer Überblick zu interessanten Ergebnissen und aktuellen Forschungsfragen gegeben.

## FORSCHUNGSPROJEKTE

### WIESO DIE WAHL DES DUSCHSCHLAUCH-MATERIALS KRITISCH IST

Für die Herstellung von Duschschläuchen werden verschiedenste Materialien verwendet, die sich nicht nur in ihrer Zusammensetzung und Verarbeitung unterscheiden, sondern auch in ihrer Qualität. Unmittelbar abhängig davon werden unterschiedlichste Kohlenstoffverbindungen aus dem Plastikmaterial ausgewaschen, sobald sich dieses in Kontakt mit (Trink-)Wasser befindet [5]. In einem kürzlich veröffentlichten Forschungsprojekt [6] wurde der Einfluss verschiedener Duschschlauch-Materialien (z.B. PE-Xc, Silikon, PVC-P) auf die Biofilmentwicklung untersucht. Hierzu wurden die Duschschläuche über einen Zeitraum von acht Monaten täglich mit warmem Wasser gespült, um gewöhnliche Duschevents zu simulieren. Bei der Analyse stand insbesondere die Methode der 16S rDNA-Amplikon-Sequenzierung im Vordergrund. Diese ermöglicht die Identifizierung einzelner Bakterien wie auch den Vergleich zwischen Gemeinschaften unterschiedlicher Biofilme. Materialabhängige Unterschiede konnten bereits in bakteriellen Zellkonzentrationen gezeigt werden (gemessen mittels Durchflusszytometrie, DZ), wobei die ermittelten Werte von  $10^6$  bis  $10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> stets mit der Menge an ausgewaschenem Kohlenstoff korrelierte. Bezüglich der bakteriellen Gemeinschaften wiesen alle Biofilme

Die Umsetzung dieser Projekte wurde durch Finanzierungen der Europäischen Union (*Marie-Sklodowska-Curie Initial Training Network*, Fördernr. 607492), des Schweizerischen Nationalfonds (SNF, Fördernr. 31003A\_163366/1), des Bundesamts für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV) und durch Ermessensausgaben der Eawag ermöglicht.

Vertreter wie *Caulobacter*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Methyloversatilis*, *Legionella* und *Phenylobacterium* auf. Diese Gemeinsamkeit wich jedoch materialabhängigen Unterschieden, sobald die Gesamtzusammensetzungen verglichen wurden (Fig. 1). Interessanterweise zeigten zwei Schläuche, die aus dem gleichen Grundmaterial (PVC) bestanden, starke Variationen in der Anzahl an Bakterientypen (41 vs. 72) und der relativen Häufigkeit dominanter Vertreter (Fig. 1). Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit zeigen, dass eine scheinbar simple, alltägliche Entscheidung wie der Kauf eines neuen Duschschlauches einen beträchtlichen Einfluss auf das Ausmass und die Qualität der bakteriellen Aussetzung im eigenen Haus haben kann. Ein hieran anschließendes Projekt wird sich nun mit der Frage befassen, ob Materialien bewusst dazu genutzt werden können, Biofilme auf Schlauch-/Leitungs-/Rohrmaterialien basierend auf einer materialienspezifischen Selektion aktiv zu manipulieren.

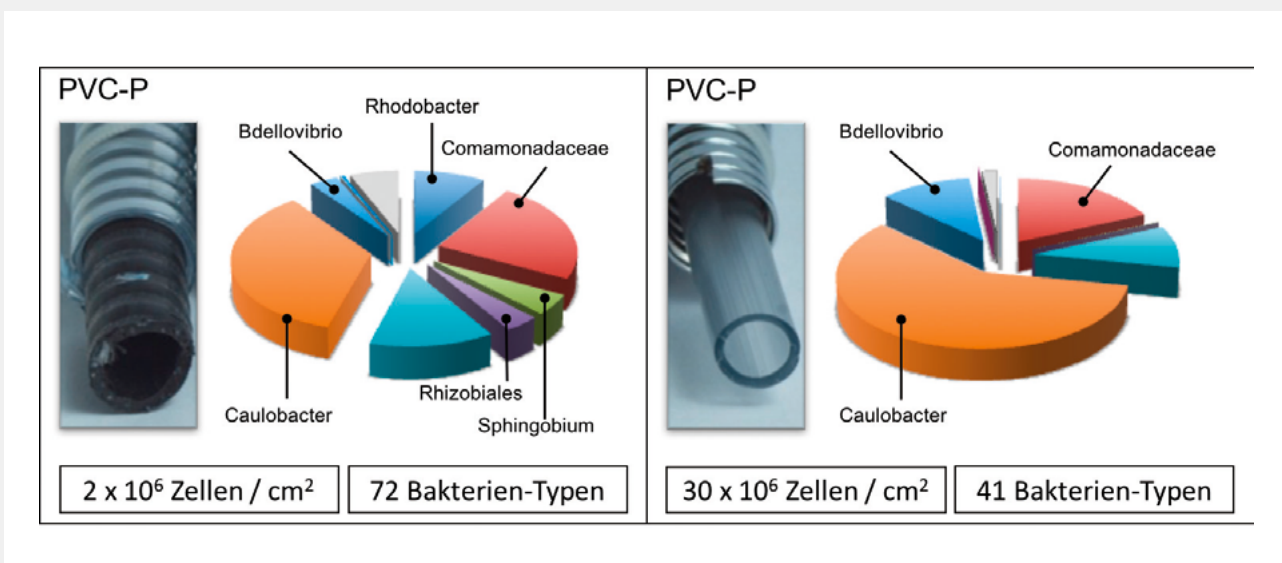


Fig. 1 Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung von Biofilm-Gemeinschaften, die sich in zwei auf Polyvinylchlorid-basierten, weichen (PVC-P) Duschschlauch-Materialien gebildet haben.

Différences dans la composition bactérienne des biocénoses présentes dans le biofilm qui se sont formées dans deux matériaux souples de tuyau de douche à base de chlorure de polyvinyle (PVC-P).

### CHARAKTERISIERUNG VON BIOFILMEN AUF KLEINSTMÖGLICHER SKALA

Die Bildung von Biofilmen erfolgt unter dem Einfluss verschiedenster Faktoren, die sowohl die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Struktur als auch die mikrobielle Ökologie beeinflussen und letztendlich für die Entstehung einer heterogenen Umwelt sorgen. Für die Forschung wie auch verschiedene Industriezweige ist es wertvoll, diese Heterogenität von einer möglichst kleinen Skala bis hin zum grossskaligen Gesamtsystem zu verstehen, z.B. zur besseren Einordnung ökologischer Abläufe bei der initialen Biofilmbildung oder zur Entwicklung effizienter Strategien zur Probenahme. In einem derzeit laufenden Projekt wird die Heterogenität eines Duschschlauch-Biofilms untersucht. Hierzu wurde ein horizontal ausgerichteter Duschschlauch über einen Zeitraum von zwölf Monaten zweimal täglich mit Warmwasser gespült (15 min, ~ 42 °C), um eine Biofilmbildung unter kontrollierten Bedingungen zu gewährleisten. Eine der grundlegenden Methoden bei der Analyse war die Optische Kohärenztomografie (OCT), die nicht nur eine Visualisierung der Struktur, sondern auch die Quantifizierung der Dicke des Biofilms ermöglicht und somit ein detailliertes Bild zur räumlichen Heterogenität

erlaubt. Beachtliche, kleinskalige Heterogenität wurde über die gesamte Länge des Duschschlauches hinweg gefunden, wobei die Dicke des Biofilms von 35,8 bis 890,7 µm reichte und im untenliegenden Teil des Schlauches signifikant höhere Werte aufwies ( $323,0 \pm 91,7 \mu\text{m}$ ) als im oberen Teil ( $244,1 \pm 54,4 \mu\text{m}$ ) (Fig. 2A). Während bereits auf einem 4 mm langen Stück deutliche Schwankungen in der Biofilmdicke nachweisbar waren (z.B. 135,5 bis 550,0 µm; Fig. 2A), wurde die kleinskalige, räumliche Heterogenität insbesondere durch 48% Abweichung innerhalb von nur 300 µm deutlich. Um noch weiter ins Detail gehen zu können, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, die eine Visualisierung der tatsächlichen Komplexität der Biofilmmatrix erlaubte – inklusive Schleim, anorganischem Material und verschiedensten Bakterientypen (Fig. 2B). Auf Zellebene wurden Konzentrationen von  $1,2$  bis  $8,9 \times 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> mittels DZ bestimmt, was bei einem Duschschlauch mit einer Gesamtlänge von 1,20 m ein Total von etwa  $2 \times 10^{11}$  Zellen ausmachen würde. Fügt man die Werte zu Biofilmdicke und Zellkonzentrationen zusammen, zeigt sich interessanterweise, dass Bakterien in diesem Biofilm nur einen sehr geringen Anteil (~0,1%) des Gesamtvolumens ausmachen

und der Grossteil der Matrix aus Schleim und anorganischem Material besteht. Dieses Ergebnis verdeutlicht wiederum, wie wichtig, aber auch herausfordernd eine detaillierte Charakterisierung von Biofilmen generell, insbesondere jedoch innerhalb von Hausinstallationen ist. Aktuelle Analysen konzentrieren sich auf die Fragestellung, inwieweit sich die kleinskalige, räumliche Heterogenität auf die gemeinschaftliche Zusammensetzung im Biofilm überträgt, und welche Faktoren für die Entwicklung dieser verantwortlich sind.

### BIOFILMDYNAMIKEN – WIE STAGNATION DIE TRINKWASSERPHASE BEEINFLUSST

Wasser stagniert in Duschschläuchen täglich bis zu 23,5 Stunden. Während dieser Zeit interagieren die Bakterien des Biofilms mit der Wasserphase [7]. Es ist wichtig, sich dessen bewusst zu sein, da Konsumenten mit ebendiesem Wasser direkt in Kontakt kommen. In einem fortlaufenden Projekt wird eine an der Eawag neu entwickelte Echtzeit-DZ-Methode genutzt [8, 9]. Mit dieser ist es möglich, die Dynamiken der bakteriellen Ablösung vom Biofilm in die Trinkwasserphase *in situ* vor, während und nach einem Duschereignis zu erfassen (Fig. 3A). Unmittelbar vor dem Duschereignis, sprich nach 24 Stunden der Stagnation, wies die bakterielle Zellkonzentration in der Wasserphase bis zu zehn Mal höhere Werte auf, als dies bei fließendem Hahnenwasser der Fall ist ( $1 \times 10^5$  gegenüber  $1 \times 10^6$  Zellen/ml; Fig. 3B). Während des Duschens wurden die abgelösten Bakterien rasch ausgewaschen und erreichten binnen Minuten Konzentrationen, wie sie für gewöhnlich im Verteilnetz vorkommen. Diese Dynamiken zeigen, dass eine erhöhte Zellkonzentration in der ersten Spülung nicht wie bisher vermutet ein Resultat von hydraulischen Scherkräften ist, sondern vielmehr durch die Interaktion von Biofilm und Wasserphase während der Stagnation zustande kommen. Nach Beendigung der Dusche steigen die Werte in der Wasserphase unmittelbar wieder an, mit einer Zunahme von etwa  $1 \times 10^5$  Zellen/ml/ Stunde. Hierbei erfolgt der Anstieg zu schnell, als dass es sich um reines Wachstum und Zellteilung handeln könnte. Es ist wichtig, nicht nur die Dynamiken der Zellablösung vom Biofilm in die Trinkwasserphase zu verstehen, sondern auch die Bedeutung dessen für die direkte Exposition des

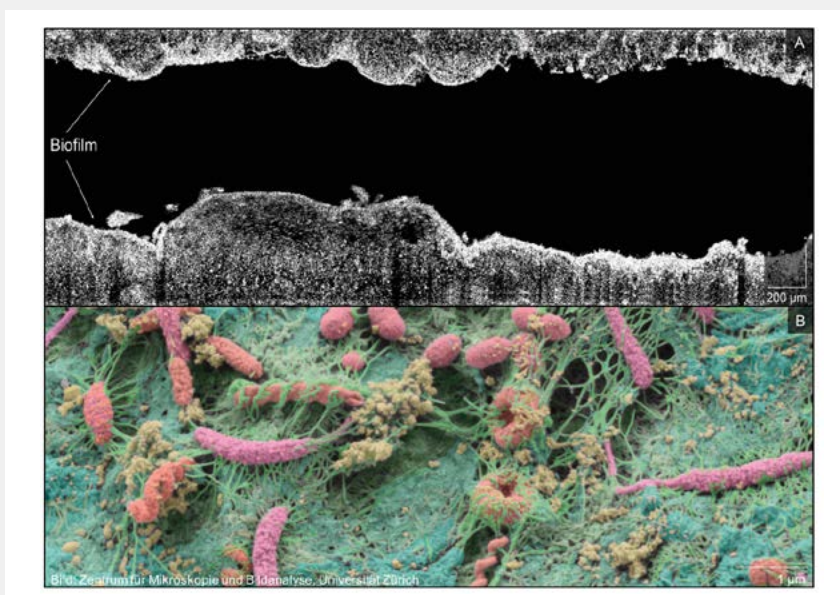


Fig. 2 Heterogenität innerhalb von 4 mm eines Duschschlauch-Biofilms. Optische Kohärenztomografie wurde zur Visualisierung und Quantifizierung der räumlichen Heterogenität genutzt (A), Rasterelektronenmikroskopie zur Betrachtung von Bestandteilen und der Zusammensetzung der Biofilmmatrix in höherer Auflösung (B).

Hétérogénéité à moins de 4 mm d'un biofilm de tube de douche. La tomographie par cohérence optique a été utilisée pour visualiser et quantifier l'hétérogénéité spatiale (A), la microscopie électronique à balayage pour observer les composants et la composition de la matrice du biofilm à plus haute résolution (B).



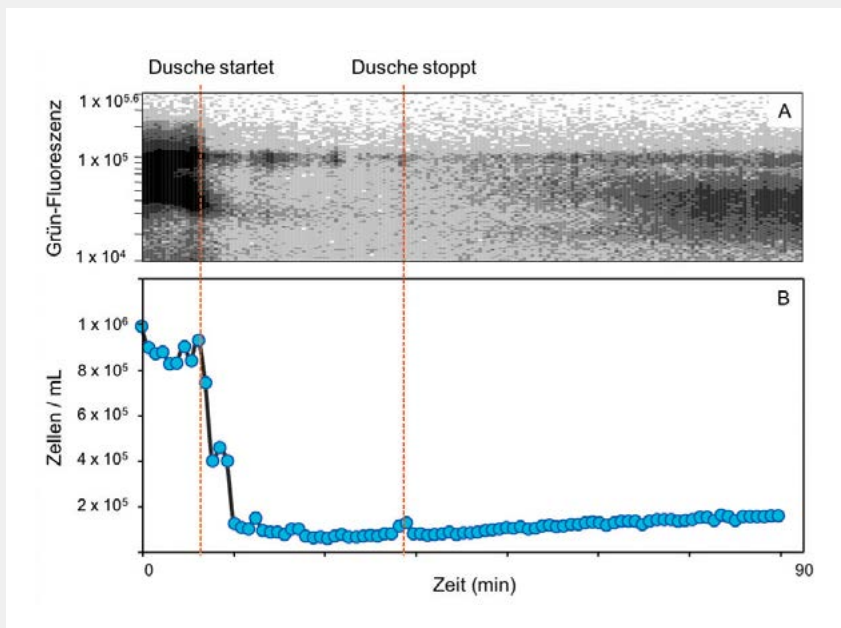


Fig. 3 Dynamiken der mikrobiellen Ablösung vom Biofilm in die Trinkwasserphase nach 24 Stunden Stagnation, während und nach einem Duschereignis, gemessen mittels Echtzeit-Durchflussszytometrie.

In (A) repräsentiert jeder Punkt die Grün-Fluoreszenz eines Partikels, der in Echtzeit gemessen wurde. Dieses Signal wurde in (B) zu bakteriellen Zellzahlen umgewandelt. Die rot gestrichelten Linien markieren Start und Ende des Duschereignisses.

*Dynamique du détachement microbien du biofilm dans la phase de l'eau potable, après 24 heures de stagnation, durant et après une douche, mesurées par cytométrie de flux en temps réel.*

En (A), chaque point représente la fluorescence verte d'une particule mesurée en temps réel. Ce signal a été converti en (B) en numéros de cellules bactériennes. Les lignes en pointillés rouges marquent le début et la fin de la douche.

Konsumenten. Um dieser Fragestellung nachzukommen, werden sich weiterführende Projekte auf die Ablösung hygienisch relevanter Organismen konzentrieren und auf das daraus resultierende Gefährdungspotenzial.

## FAZIT

Die Biofilmbildung ist ein natürlicher Prozess, der in jedem Teil des Trinkwasser-Verteilungssystems abläuft. In Hausinstallationen sind insbesondere Duschschräume ein besonders kritisches Beispiel, da sie den finalen Meter vor der Exposition des Konsumenten darstellen. Durch unsere aktuellen Projekte konnten wir zeigen, dass bereits die Wahl des

Materials oder die Art, wie ein System betrieben wird (z.B. Stagnationszeiten), Einfluss ausüben auf Struktur und Zusammensetzung der Biofilme – von der kleinstmöglichen Skala bis hin zur gesamten Länge des Duschschrums. Diese Erkenntnis ist insbesondere wichtig, da durch das Verständnis kleinskaliger Biofilmentwicklungen wie auch -dynamiken Rückschlüsse auf deren Einflüsse und Bedeutung für Gebäudeinstallationen auf grösserer Skala geschlossen werden können. Des Weiteren können auf Grundlage dieses Wissens Bereiche wie Bauausführung oder auch Verwaltung und Betrieb von Gebäudeinstallationen angepasst und eventuell verbessert werden. Zu guter Letzt wird dieses Wissen

dabei helfen, die Verteilung von qualitativ hochwertigem Trinkwasser bis zur Verbrauchsstelle hin zu gewährleisten.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Köttsch, S. et al. (2013): Kunststoffe in Kontakt mit Trinkwasser: Labortests und Realität. *Aqua & Gas*, 3: 44–52
- [2] Proctor, CR.; Hammes, F. (2016): Drinking water microbiology – from measurement to management. *Current opinion in biotechnology*, 33: 87–94
- [3] Köttsch, S. et al. (2016): Wenn der Start zum Problemfall wird: Hygienische Inbetriebnahme von Trinkwasserinstallationen. *Aqua & Gas*, 6: 74–81
- [4] Falkinham, JO. et al. (2015): Opportunistic premise plumbing pathogens: Increasingly important pathogens in drinking water. *Pathogens*, 4:3 73–86
- [5] Proctor, CR. et al. (2018): Biofilms in shower hoses. *Water Research*, 131: 274–286
- [6] Proctor, CR. et al. (2016): Biofilms in shower hoses – choice of pipe material influences bacterial growth and communities. *Environmental Science: Water Research & Technology*, DOI: 10.1039/c6ew00016a
- [7] Lautenschlager, K. et al. (2010): Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Research*, 44: 4868–4877
- [8] Besmer, MD. et al. (2016): Online-Durchflussszytometrie in der Praxis. *Aqua & Gas*, 7/8: 73–77
- [9] Besmer, MD. et al. (2017): laboratory-scale simulation and real-time tracking of a microbial contamination event and subsequent shock-chlorination in drinking water. *Frontiers in microbiology*, 8: 1900

## > SUITE DU RÉSUMÉ

aqueuse. Les nouvelles connaissances acquises doivent permettre de comprendre la signification de l'hétérogénéité à petite échelle de ces biocénoses pour l'ensemble du système d'une installation domestique et de garantir la préservation de la qualité de l'eau potable jusqu'au robinet par le biais de mesures appropriées.