

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

Hamann Wasser-Kommunal
Ingenieurgesellschaft für kommunale
Dienstleistungen mbH
Herrn Hans-Gerd Hamann
Zweibrücker Str. 13
D-76855 Annweiler am Trifels

Sigmund Freud-Str. 25
53127 BONN
Deutschland / Germany

Telefon: ++49 228 287 14022 (Durchwahl)
 ++49 228 287 15520 (Direktion)
Telefax: ++49 228 287 19522
e-mail: juergen.gebel@ukb.uni-bonn.de
Laborleiter: Dr. rer. nat. J. Gebel

25.08.2006



Akkreditiert durch
Zentralstelle der Länder
für Gesundheitsschutz
bei Arzneimitteln
und Medizinprodukten
ZLG-P-470.05.02

Gutachterliche Stellungnahme zur Wirksamkeit des Impuls-Spül- Verfahrens gegen Biofilme in wasserführenden Hausinstallations- systemen

Auftraggeber: Hamann Wasser-Kommunal Ingenieurgesellschaft für kommunale Dienstleistungen mbH

Mündlicher Auftrag vom 10.05.06 nach Angebot vom 13.01.06

Untersuchungszeitraum: 12.06.06 – 19.06.06

Ziel der Untersuchung

Im Rahmen einer hygienisch-mikrobiologischen Untersuchung sollte die Wirksamkeit des Impuls-Spül-Verfahrens zur Entfernung von Biofilmen in wasserführenden Installationssystemen getestet werden.

Einleitung

Durch Biofilme kann es in wasserführenden Systemen zur Abgabe von hohen Konzentrationen von Mikroorganismen in das durchströmende Wasser kommen. Etablierte Biofilme lassen sich wegen der dichten Vernetzung und Haftung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) nur schwer wieder entfernen. Mikroorganismen, die im Biofilm eingebettet sind, werden dadurch vor den lethalen Auswirkungen von Desinfektionsmitteln geschützt.

Im medizinischen Bereich werden Biofilm-assoziierte Mikroorganismen mit einigen schweren Erkrankungen, wie Herzinnenhautentzündung und zystischer Fibrose in Verbindung gebracht, wobei die Mechanismen, die zu den Krankheiten führen, noch weitgehend unbekannt sind. Aus hygienisch-medizinischer Sicht spielen außerdem Erreger, die nosokomiale Infektionen verursachen können, eine bedeutende Rolle.

Inzwischen wird immer häufiger festgestellt, dass Biofilme beteiligt sind, wenn es in Trinkwassersystemen und angeschlossenen Systemen zu mikrobiellen Problemen kommt. Im Verteilungsnetz können sie zur Kontamination des Trinkwassers führen, auch wenn dieses das Wasserwerk in einwandfreier Qualität verlassen hat. Eintragspfade für Biofilm-Organismen ergeben sich bei der Trinkwasser-Gewinnung und -aufbereitung, nach der Aufbereitung im Rohrnetz durch Rohrbrüche, Reparatur, Wartungs- und Reinigungsarbeiten und nicht zuletzt durch das Personal (Nagy und Olsen, 1985; Le Chavallier et al., 1987; Block, 1992).

Bei den problematischen Biofilm-Bakterien handelt es sich vor allem um *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Acinetobacter* spp., atypische Mykobakterien sowie *Serratia* spp. (Rahal und Urban, 2000; Trautmann et al., 2001; Langsrud et al., 2003; Hall-Stoodley und Stoodley, 2005; Exner et al., 2005). Reuter et al. (2002) stellten fest, dass zwischen 30–40% aller im Krankenhaus erworbenen *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen im Zusammenhang mit einer Kontamination des Leitungswassers stehen. In den USA sterben im Durchschnitt jährlich 1400 Menschen an den Folgen einer Lungenentzündung, die durch eine nosokomiale *P. aeruginosa*-Infektion durch kontaminiertes Wasser hervorgerufen wurde (Anaissie et al., 2002).

Legionellen bedingen zwischen 0-14 % nosokomialer Pneumonien, wobei bislang eher von einer Unterschätzung aufgrund unzureichender Diagnostik auszugehen ist. In stehendem Wasser in haustechnischen Installationen (vor allem Klimaanlage und wenig benutzte Wasserleitungen) mit Temperaturen zwischen 30 und 45 °C werden ideale Voraussetzungen für die Vermehrung des Erregers geschaffen. Die Infektion erfolgt durch Einatmen von zerstäubtem Wasser, beispielsweise unter der Dusche oder aus einem Luftbefeuchter (Yu und Stout, 2000). Über Verdunstungsvorgänge können Legionellen aus den Kühlwasserkreisläufen in die Umwelt gelangen und so auch gefährdete Patienten in Kliniken erreichen (Decludt et al. 1999).

Mit der am 1.1.2003 in Kraft getretenen Trinkwasserverordnung wird im Gegensatz zur bis dahin gültigen Trinkwasserverordnung auch die Hausinstallation mit in den Regelungsbe-
reich der Trinkwasserverordnung einbezogen, so dass in diesen Bereichen der Prävention

und Kontrolle aus infektiologischer Sicht die entscheidende Bedeutung zukommt. Darüber hinaus gilt in der neuen Trinkwasserverordnung der Grundsatz, dass auch an der Übergabestelle des Wassers an den Verbraucher – also am Zapfhahn – die Anforderungen an die Trinkwasserqualität erfüllt sein müssen. Diese Anforderung können im Falle des Vorkommens von mikrobiellen Schleimen bzw. Biofilmen nicht sicher erfüllt werden.

Die Bildung von Biofilmen ist eine evolutionäre Überlebensstrategie, die Mikroorganismen seit Millionen von Jahren vor Umwelteinflüssen, antibakteriellen Wirkstoffen (inkl. natürlicher Antibiotika), Bakteriophagen und phagozytierenden Amöben schützt. Mikroorganismen, die in Biofilmen leben, sind bis zu 1000fach resistenter gegen antimikrobielle Wirkstoffe (Gilbert et al., 1997; Costerton et al., 1999).

In Leitungssystemen, Rückkühlwerken, Wärmetauschern und Filtern kann die Bildung von Biofilmen und Schleimen aber auch zu erheblichen technischen Problemen, wie z.B. den Druckabfall aufgrund erhöhter Reibungsverluste oder der Verminderung von Wärmeaustauschkapazitäten führen (Morton und Gaylarde, 2001).

Untersuchungen zum Einfluss des Materials für Rohrleitungen und wasserführende Systeme auf das Biofilmbildungspotentials haben ergeben, dass die Biofilmbildung nur verzögert werden kann; ohne Behandlung des Wassers wird selbst eine Kupferrohrleitung nach Monaten bis Jahren von Biofilmen besiedelt (Exner et al., 1983).

Bei der Entstehung von Biofilmen haben die verschiedensten Faktoren, wie Temperatur, pH, Druck, Scherkräfte, Ladung der Zelloberfläche, Spezies und chemische Zusammensetzung des Substrats, um nur einige zu nennen, einen Einfluss (Stoodley et al., 1999; Donlan, 2002).

Trotzdem geschieht die Entstehung von Biofilmen in aquatischen Systemen prinzipiell in folgenden Schritten (O'Toole et al., 2000; Flemming und Wingender (2001):

1. Adhäsion von Makromolekülen, wie Huminstoffen, Polysacchariden oder Proteinen) und hydrophoben Molekülen aus der wässrigen Phase („conditioning film“) an Oberflächen (Schneider und Leis, 2002).
2. Anhaftung von Mikroorganismen an „conditioning film“ auf der Substratoberfläche mit Hilfe von Fimbrien und Pili (Boonaert et al., 2002), Vermehrung der sessilen Zellen, Bildung von Mikrokolonien und Produktion von EPS (Vandevivere und Kirchman, 1993). Diese Vorgänge sind in Abb. 1 dargestellt.
3. Bildung von Makrokolonien und deren Zusammenwachsen zu differenzierten Biofilmen.
4. Absterben von einigen Zellen, kontinuierliche Replikation anderer Mikroorganismen, Absorption planktonischer Mikroorganismen und Ablösung und Erosion von Teilen des Biofilms (Rittmann, 1989).

Allen Biofilmen ist gemeinsam, dass sie von einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen, kurz EPS, zusammengehalten werden. Die EPS liegen außerhalb der Zellen und bestehen überwiegend aus Polysacchariden und Proteinen, sie können aber auch deutliche Anteile an Nukleinsäuren, Lipiden und anderen Makromolekülen enthalten. Auch Huminstoffe, Ton, Gips und Ionen werden aus der Wasserphase akkumuliert. Gelöste Stoffe werden innerhalb des Biofilms durch Diffusion transportiert. Die biologische Funktionen der EPS sind neben der Strukturbildung und der Schutzbarriere die Adhäsion an Oberflächen, die Aggregation von Zellen, die Bildung von Flocken und Biofilmen, die Rückhaltung von Wasser und die Sorption exogener organischer, anorganischer sowie biotischer und abiotischer Partikel (Flemming und Wingender, 2002).

Trotz der Verfügbarkeit und der Anwendung eines breiten Spektrums von Bioziden werden Biofilme und mikrobielle Schleime meistens nicht vollständig eliminiert und können fortlaufende Probleme im medizinischen, hygienischen und technischen Bereich hervorrufen.

Für die Entfernung etablierter Biofilme stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung.

Verschiedene Chemikalien, wie z.B. Chlor, werden bereits seit Jahrzehnten (in den USA seit ca. 1900) in der Trinkwasserdesinfektion benutzt (Ridgway und Olson, 1982).

Die Chlorungsmittel unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Handhabbarkeit und haben z.T. erhebliche Nachteile aufgrund ihrer Umweltverträglichkeit (auch durch die möglichen Nebenprodukte), aufgrund des benötigten Volumens oder wegen der hohen Kosten

Besondere Berücksichtigung gilt den Stoffen, die als Nebenprodukt bei einer Wasserchlorung entstehen können. Darunter fallen z.B. Chloramine, die durch Reaktion von Chlor mit Harnstoff, Kreatinin, Aminosäuren oder anderen stickstoffhaltigen Verbindungen entstehen und u.a. die Schleimhäute reizen und einen unangenehmen Geruch verursachen (Schwimmbadgeruch). Eine weitere Gruppe von Desinfektionsnebenprodukten sind die Chlor-Kohlenstoffverbindungen, zu denen die Trihalogenmethane (THMs), wie z.B. das Chloroform, gehören. Diese entstehen durch Reaktion des Chlors mit natürlichen Belastungsstoffen im Wasser. Die THMs stehen in begründetem Verdacht, ein krebserzeugendes potential zu besitzen (UBA, 1996).

Das wohl einfachste aber auch wirkungsvollste Verfahren ist die mechanische Entfernung. Exner et al. (1987) konnten belegen, dass durch manuelles Bürsten von kontaminierten Systemen im Vergleich zu chemischen Verfahren (z.B. H_2O_2) eine deutlich höhere Reduktion der Biomasse möglich wird. Ein Nachteil dieser Methode ist die oftmals schlechte Erreichbarkeit entfernter Bereiche im Leitungssystem.

Das von der Firma Hammann entwickelte Impuls-Spül-Verfahren arbeitet mit Luft-Molchen. Diese Druckluftblasen werden in den Wasserstrom eingepresst und führen zu turbulenten Strömungen, die in der Lage sind, Biofilme und andere Verunreinigungen von den Rohrwänden abzureißen. Eine Computersteuerung berücksichtigt dabei die spezifischen Parameter individueller Hausinstallationen, wodurch auch entferntere Bereiche wirkungsvoll und betriebssicher gespült werden sollen. Druckreduzierte Spülabschnitte unterhalb des norma-

len Betriebsdrucks sollen eine zu starke Belastung des Wassersystems verhindern. Durch eine hohe Taktrate der Luftimpulse kann aber dennoch genug Energie an die Rohrwandungen gebracht werden, um eine bestmögliche Reinigungsleistung zu erzielen.

Material und Methoden

Silikonschlauchmodell

Für die Untersuchungen wurden Silikonschläuche verwendet, in denen durch kontinuierlichen Trinkwasserdurchfluss im Silikonschlauchmodell (Exner et al., 1984) Biofilme generiert wurden. Zu Beginn der Untersuchungen waren die Silikonschläuche mit einem 2-3 Jahre alten Biofilm mit bis zu $4,6 \times 10^6$ koloniebildenden Einheiten pro cm^2 bewachsen. Die verwendeten Silikonschläuche mit Biofilm hatten einen Innendurchmesser von 0,4 cm und eine Wandstärke von 1 mm. Für die Untersuchungen wurden die Silikonschläuche in gleich lange Segmente von 50 cm Länge geteilt und in der Versuchsanordnung befestigt (Abb. 1).



Abb. 1: Silikonschläuche mit Biofilm in der Versuchsanordnung zur Untersuchung des Impuls-Spül-Verfahrens

Versuchsanordnung

Für die Versuche wurde von der Fa. Hammann ein maßstabsgetreues Modell zur Anwendung des Impuls-Spül-Verfahrens konzipiert (Abb. 2). Die Geräte-Parameter wurden spezifisch an die Testsituation angepasst. Zum Schutz der flexiblen Silikonschläuche vor Druckdifferenzen wurden diese mit einer Plexiglashülle umgeben.

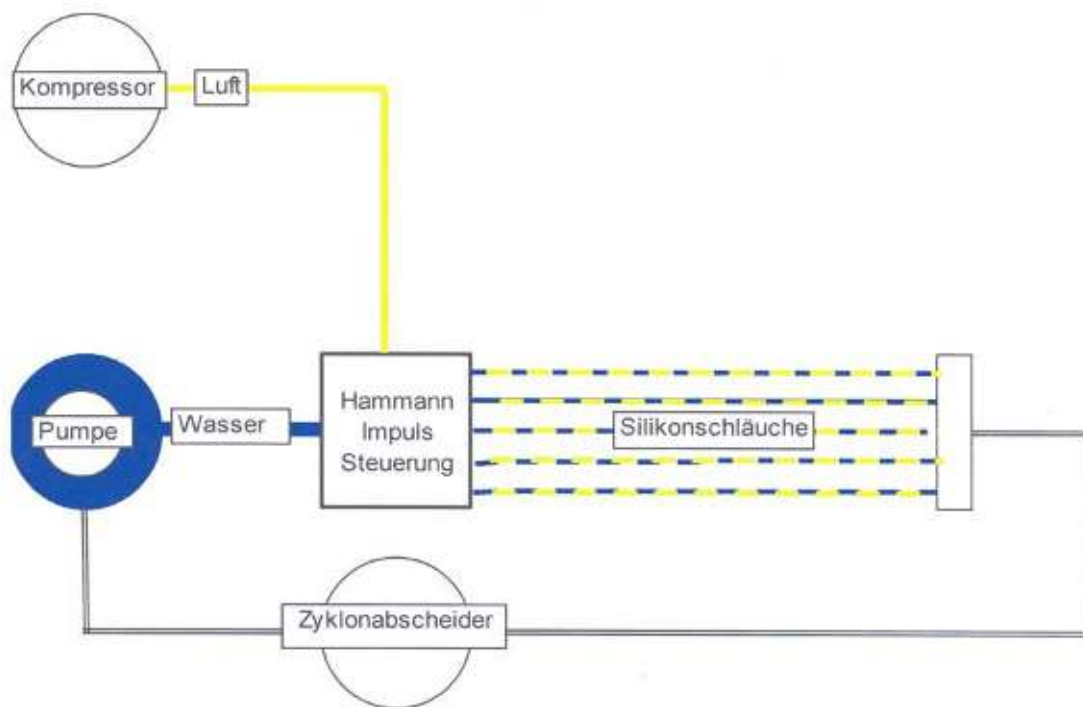


Abb. 2: Schematischer Versuchsaufbau zur Untersuchung der Wirkung des Impuls-Spül-Verfahrens auf Biofilme

Koloniezahlbestimmungen (KBE/cm^2) und Ermittlung des Reduktionsfaktors

Um die Wirkung des Impuls-Spül-Verfahrens auf Bakterien in Biofilmen zu untersuchen, wurden kulturelle Bestimmungen der koloniebildenden Einheiten pro cm^2 Schlauchmaterial (KBE/cm^2) vor und nach der Behandlung mit dem Impuls-Spül-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden die Biofilme aus $2 \times 5 \text{ cm}$ Stücken des Silikonschlauchs ausgeschabt, in 0,9% NaCl-Lösung homogenisiert, in einer dekadischen Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-5} verdünnt, im Doppelansatz auf R2A-Agar ausplattiert und für 7 Tage bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die KBE ausgezählt und daraus die KBE/cm^2 und der Reduktionsfaktor (RF) bestimmt.

Proteinbestimmungen

Um eine Aussage über die Wirkung des Impuls-Spül-Verfahrens auf den Abbau der Biofilm-Matrix treffen zu können, wurden Gesamtprotein-Bestimmungen nach Lowry durchgeführt um daraus die Proteinreduktion in Prozent und in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu errechnen. Hauptbestandteil der Biofilm-Matrix sind die sogenannten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Diese bestehen u.a. aus Proteinen und Kohlenhydraten, die von den Mikroorganismen gebildet wurden. Durch eine Reduktion des Proteinanteils können somit Rückschlüsse auf den Abbau der EPS gezogen werden.

Rasterelektronenmikroskopie

Zur optischen Bestätigung des Matrix-Abbaus wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden 1 cm lange Silikonschlauchstücke nach unterschiedlichen Drucksituationen und Einwirkzeiten für die Betrachtung unter dem Rasterelektronenmikroskop präpariert und anschließend untersucht.

Ergebnisse

Koloniezahlbestimmungen und Ermittlung des Reduktionsfaktors

Es erfolgten insgesamt 3 Durchläufe mit unterschiedlichen Parametern für den Wasser- und Luftdruck.

Aus den erhaltenen Daten wurde der Reduktionsfaktor (RF) ermittelt.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse von 3 Durchläufen mit unterschiedlichen Wasser- und Luftdrücken und Impulsen. Koloniezahl in KBE/cm² und Reduktion als Reduktionsfaktor (RF) und in Prozent (%).

	1. Durchgang Wasserdruck: 0,5 bar Luftdruck: 2,0 bar		2. Durchgang Wasserdruck: 1,0 bar Luftdruck: 3,0 bar		3. Durchgang Wasserdruck: 2,0 bar Luftdruck: 3,0 bar	
Impulse	KBE/cm ²	RF	KBE/cm ²	RF	KBE/cm ²	RF
0	2.155.826	0 (0%)	4.645.604	0 (0%)	1.828.131	0 (0%)
50	1.527.027	0,15 (29,2%)	3.555.894	0,12 (23,5%)	-	-
250	1.316.645	0,21 (38,9%)	1.835.300	0,49 (60,5%)	-	-
400	1.200.896	0,25 (44,3%)	1.454.097	0,50 (68,7%)	-	-
500	-	-	-	-	207.905	0,94 (98,6%)
1000	1.012.804	0,33 (53,0%)	774.072	0,78 (83,4%)	-	-
3000	-	-	-	-	15.199	2,08 (99,2%)
4500	-	-	-	-	14.267	2,11 (99,2%)

- nicht gemessen

Durch das Impuls-Spül-Verfahren wurden die Bakterien auf der Schlauchwand unter den gegebenen Versuchsbedingungen um bis zu 99,2 % (RF 2,11) reduziert.

Proteinbestimmungen

Die Protein-Bestimmungen ergaben bei der günstigsten Wasser- und Luftdruck-Kombination und einer Einwirkzeit von 90 min (= 4500 Impulse) eine Protein-Reduktion um bis zu 91,3%.

Die folgenden Tab. 2 zeigt alle Ergebnisse der Lowry-Proteinmessungen.

Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse von 3 Durchläufen mit unterschiedlichen Wasser- und Luftdrücken und Impulsen. Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und Proteinreduktion in Prozent (%).

	1. Durchgang Wasserdruck: 0,5 bar Luftdruck: 2,0 bar		2. Durchgang Wasserdruck: 1,0 bar Luftdruck: 3,0 bar		3. Durchgang Wasserdruck: 2,0 bar Luftdruck: 3,0 bar	
Impulse	Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Proteinreduktion	Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Proteinreduktion	Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Proteinreduktion
0	15,0	0%	14,3	0%	14,7	0%
50	14,9	1,0%	14,1	1,1%	-	-
250	14,3	4,5%	13,9	2,9%	-	-
400	14,0	6,3%	12,8	10,7%	-	-
500	-	-	-	-	13,7	6,7%
1000	13,9	7,4%	12,3	13,7%	-	-
3000	-	-	-	-	6,1	58,7%
4500	-	-	-	-	1,3	91,3%

- nicht gemessen

Rasterelektronenmikroskopie

Nach einer andauernden Behandlung der Silikonschläuche mit Biofilm durch das Impuls-Spül-Verfahren ist bei einem Wasserdruck von 0,5 bar und einem Luftdruck von 2,0 bar im Vergleich zum unbehandelten Biofilm (Abb. 3A) nach 1000 Impulsen eine Reduktion der Biofilmmatrix zu beobachten, Teile des Biofilms haben sich von der Silikonschlauchoberfläche gelöst (Abb. 3B). Auch bei einem Wasserdruck von 1,0 bar und einem Luftdruck von 3,0 bar lösen sich nach 1000 Impulsen einige Teile der Biofilmmatrix, außerdem nimmt die Schichtdicke des Biofilms ab (Abb. 3C). Bei einem Wasserdruck von 2,0 bar und einem Luftdruck von 3,0 bar sind nach 4500 Impulsen nur noch vereinzelt Biofilmstrukturen zu erkennen. Die Matrix löst sich an einigen Stellen komplett von der Silikonschlauchoberfläche.

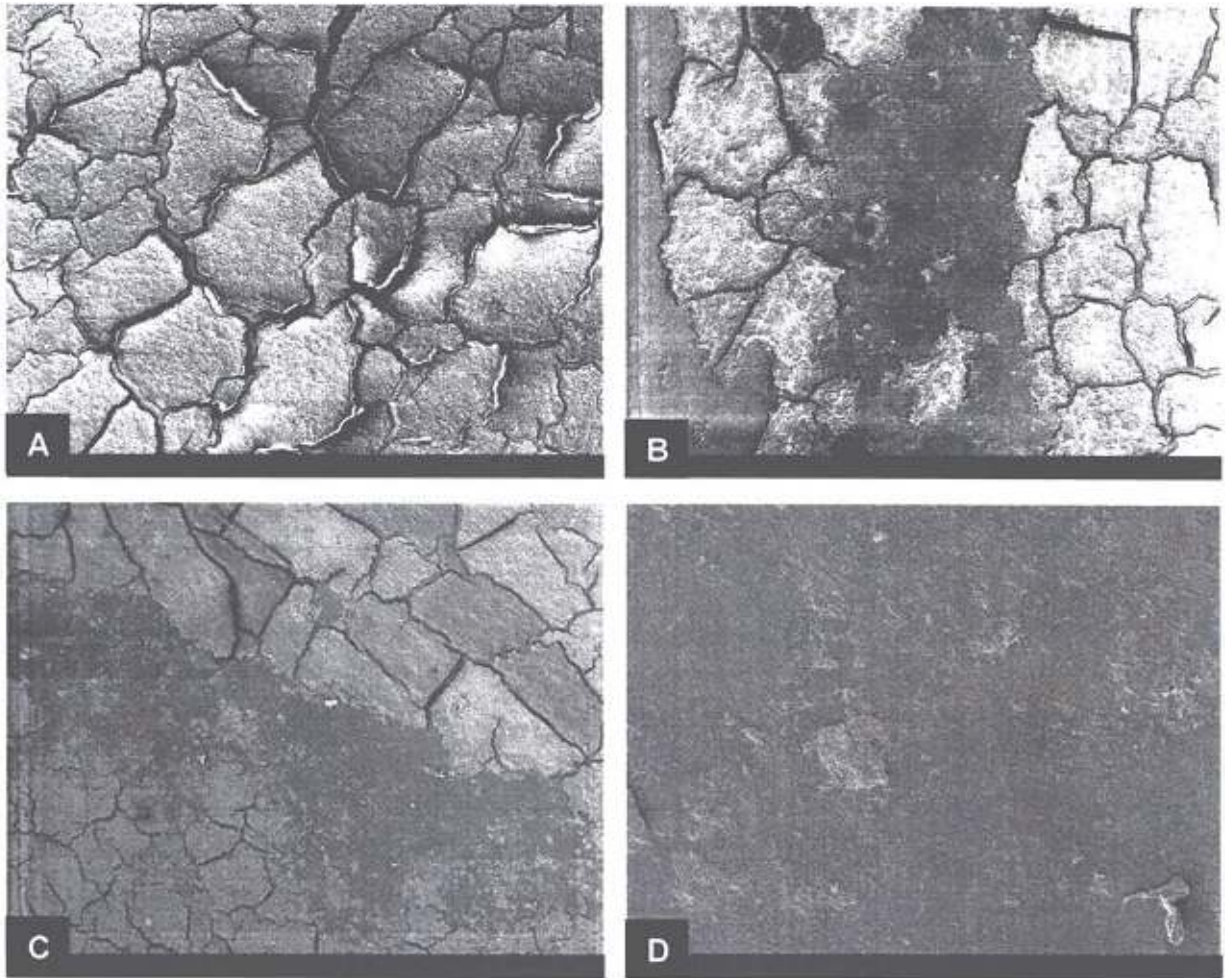


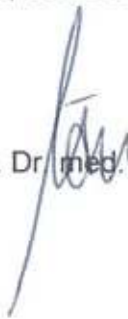
Abb. 3: REM-Aufnahmen der Oberfläche eines Silikonschlauchs mit einem 2 Jahre alten Biofilmbewuchs ohne Behandlung (A), nach 1000 Impulsen bei 0,5 bar Wasser- und 2,0 bar Luftdruck (B), nach 1000 Impulsen bei 1,0 bar Wasser- und 3,0 bar Luftdruck (C) und nach 4500 Impulsen bei 2,0 bar Wasserdruck und 3,0 bar Luftdruck (D). 1000fache Vergrößerung.

Zusammenfassung

Das Impuls-Spül-Verfahren soll laut Hersteller in erster Linie für die regelmäßige Reinigung von wasserführenden Systemen verwendet werden. Doch auch vor einer Desinfektionsmaßnahme, wie z.B. der Zudosierung von Chlor oder Chlordioxid zum Trinkwasser, sollte eine gründliche Reinigung des Systems erfolgen. Dadurch wird die Biofilmmatrix ganz oder teilweise gelöst und ein Desinfektionsmittel kann besser in die noch vorhandenen Schichten des Biofilms mit den Bakterien vordringen. Durch die Anwendung des Impuls-Spül-Verfahrens konnte die vorhandene Biofilmmatrix eines 2 Jahre alten Trinkwasserbiofilms um über 91% reduziert werden. Gleichzeitig wurden die KBE im Biofilm um bis zu 99,2% (RF: $\log_{10} 2,11$) reduziert.

Auf Grundlage der Versuchsergebnisse kann dem Impuls-Spül-Verfahren der Firma Hammann ein sehr gutes Potential zur Reinigung von biofilmkontaminierten, wasserführenden Systemen bescheinigt werden. Für die Wirksamkeit einer anschließenden Desinfektionsmaßnahme werden die Voraussetzungen entscheidend verbessert.

Bonn, den 25.08.2006


Prof. Dr. med. M. Exner


Dr. rer. nat. J. Gebel

Literatur

- Anaissie, E., Penzak, S. and Dignani, C. (2002). The hospital water supply as a source of nosocomial infections. *Arch Intern Med* 162: 1483-1492.
- Block, J.C. (1992). Biofilms in drinking water distribution systems. In: *Biofilms – science and technology*: 469-486. Kluwer Acad. Publ., Doordrecht.
- Boonaert, C.J.P., Dufrene, Y.F. and Rouxhet, P.G. (2002). Adhesion (primary) of microorganisms onto surfaces. In: *Encyclopedia of environmental microbiology* 1: 113-132, John Wiley and Sons, New York.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Decludt, B., Guillotin, L., Van Gastel, B. et al. (2005). Epidemic cluster of legionnaires disease in Paris, June 1998. *Euro Surveill* 4 (11): 115-118.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8 (9): 881-890.
- Exner, M., Kramer, A., Lajoie, L. et al. (2005). Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am J Infect Control* 33 (5 Suppl 1): 26-40.
- Exner, M., Tuschewitzki, G.-J. and Scharnagel, J. (1987). Influence of biofilms by chemical disinfectants and mechanical cleaning. *Zbl Bakt Hyg* 183: 549-563.
- Exner, M., Tuschewitzki, G.J. und Thofern, E. (1983). Untersuchungen zur Wandbesiedlung der Kupferrohrleitung einer zentralen Desinfektionsmitteldosieranlage. *Zbl Bakt Hyg, I. Abt. Orig. B* 177: 170-181.
- Flemming, H.-C. und Wingender, J. (2001). Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit* 31 (3): 169-180.
- Flemming, H.-C. und Wingender, J. (2002). Was Biofilme zusammenhält. *Chemie in unserer Zeit* 36 (1): 30-42.
- Gilbert, P., Das, J. and Foley, I. (1997). Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11 (1): 160-167.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 13 (1): 7-10.
- Langsrud, S., Moretro, T. and Sundheim, G. (2003). Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *J Appl Microbiol* 95 (1): 186-195.
- LeChevallier, M.W., Babcock, T.M. and Lee, R.G. (1987): Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 53: 2714-2724.
- Morton, L.H.G. and Gaylarde, C.C. (2001). The role of microbial slimes in biodeterioration. *Culture* 22: 1-4.
- Nagy, L.A. and Olsen, B.H. (1985). Occurrence and significance of bacteria, fungi and yeasts associated with distribution pipe surfaces. Proc Water Qual Tech Conf Houston, American Water Works Association, Denver.

O'Toole, G.A. et al. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54 : 49-79.

Rahal, J.J. and Urban, C. (2000). Acinetobacter. *Semin Respir Crit Care Med* 21 (4): 341-348.

Reuter, S., Sigge, A., Reuter, U. et al. (2002). Endemische Übertragungswege von *Pseudomonas aeruginosa*. *Hyg Mikrobiol* 6: 6-12.

Ridgway, H.F. and Olsen, B.H. (1982). Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 44 (4): 972-987.

Rittmann, B.E. (1989). Detachment from biofilms. In: *Structure and function of biofilms*: 49-58, John Wiley and Sons, New York, USA.

Schneider, R.P. and Leis, A. (2002). Conditioning films in aquatic environments. In: *Encyclopedia of environmental microbiology* 2: 928-941, John Wiley and Sons, New York, USA.

Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D. and Lappin-Scott, H.M. (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol Sym Suppl* 85: 19S-28S.

Trautmann, M., Michalsky, T., Heidmarie, W. et al. (2001). Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *P. aeruginosa* infections of ICU patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 22 (1): 49-52.

Umweltbundesamt (1996). Trinkwasser – Desinfektion und Bewertung der Desinfektionsnebenprodukte – Merkblatt 181/5a der FKST für Gesundheitsämter. Umweltmed. Informationsdienst 2/96: 17-19.

Vandevivere, P. and Kirchman, D.L. (1993). Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl Environ Microbiol* 59: 3280-3286.

Yu, V.L. and Stout, J.E. (2000). Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 21 (7): 798-805.