

sofw journal

Home & Personal Care Ingredients & Formulations

country focus **france**

04

2016

deutsch

KOLB Kolloquium – Biofilm verbindet Industrien

11. November 2015, Restaurant „Au Premier“, Zürich Hauptbahnhof

K. Henning

KOLB Kolloquium – Biofilm verbindet Industrien

11. November 2015, Restaurant „Au Premier“, Zürich Hauptbahnhof

K. Henning*

Abstract

Biofilme sind hoch organisierte Ansammlungen von Mikroorganismen auf Grenzflächen. Sie können in verschiedenen Industriebereichen schwerwiegende betriebstechnische und hygienische Probleme verursachen. Im Haushaltsbereich können durch Biofilmbildung in Waschmaschinen und Geschirrspülmaschinen sowohl Hygiene- und Geruchsprobleme als auch Biokorrosion und Biofouling auftreten. Biofilmbildung in der Waschmaschine ist die Geruchsquelle für schlechten Geruch, der auch zum Schlechtgeruch von Textilien beiträgt.

Von Swissatest wurden Testmethoden zur Erfassung der Biofilmentfernung oder der Biofilmabnahme im Screening-Verfahren als Lab-scale-Test sowie nach einer Desinfektionsmaßnahme oder nach einem Maschinenzyklus entwickelt. Nach der Behandlung wird die verbleibende Biofilmmenge durch das Kristallviolett-Assay nach O'Toole (2011) oder alternativ durch eine Lebendkeimzahlbestimmung quantitativ erfasst.

Bei der Bestimmung der Biofilmentfernung in der Waschmaschine werden Plättchen aus Polypropylen eingesetzt, auf deren Oberfläche ein gemischter Biofilm aus drei Bakterienspezies (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*), kultiviert wurde. Durch Erfassung der Keimzahlen auf den Plättchen vor und nach der Wäsche wird die Biofilmentfernung im einzelnen Waschprozess oder im Geräte Reinigungszyklus ermittelt. Desweiteren kann die Wirksamkeit von Waschmitteln, Bleiche und Additiven bei der Biofilmentfernung sowie die Übertragung von Biofilmkeimen auf die gewaschene Wäsche bestimmt werden.

In der Industrie, z.B. in der Papierindustrie oder in Kühlwassersystemen, werden üblicherweise zur Bekämpfung der Biofilme Biozide eingesetzt, die eine Abtötung der Bakterien ergeben, aber nicht zu einer Ablösung führen. Zusätze dispergierend wirkender Mischungen nichtionischer Tenside, die selbst nicht biozid, aber an Grenzflächen physikalisch wirksam sind, stabilisieren die Oberfläche und verzögern dadurch die Biofilmbildung. Durch Ablösen und Austragen wird der Biofilm verringert.

„Biofilm – ein weit verbreitetes Phänomen“ wurde im Eröffnungsvortrag von Prof. Dr. **Hans-Curt Flemming**, Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen, unter Darlegung der relevanten Grundlagen zu Biofilmen und ihrem Vorkommen in unterschiedlichen Industrien und im Haushaltsbereich sowie der daraus sich ergebenden hygienischen Relevanz und wirtschaftlichen Bedeutung behandelt.

„Entwicklung von Dispergatoren mit biofilmlösenden und -verzögernden Eigenschaften“ wurde von **Monika Bunk**, Technology Development Manager, Kolb Distribution Ltd., Hedingen, auf der Grundlage des im Unternehmen Kolb angewendeten Innovationsprozesses dargestellt. Dieser beginnt mit der Ideenfindung und Entwicklung eines Business Case, denen das Screening von nichtionischen Tensiden und Tensidmischungen unter Anpassung an Anforderungen für unterschiedliche Applikationen folgt und mit der Formulierung neuer Kolb Produkte abgeschlossen wird.

Die Anregung zur Entwicklung von Dispergatoren, die die Fähigkeit besitzen, Biofilme in Produktionsprozessen beispielsweise in der Papierindustrie und in Kühltürmen, oder in hygienischen Prozessen wie beispielsweise bei Waschmaschinen und Spülmaschinen oder auch in Kühlschmierstoffen entgegenzuwirken bzw. zu verzögern, basiert auf der Beobach-

tung, dass von natürlichen Mikroorganismen wie Bakterien oberflächenaktive Biotenside dazu produziert werden. Bakterien leben im Biofilm in einer Gemeinschaft, korrespondieren miteinander und organisieren ihr Leben u.a. durch Biotenside. Biotenside von *Pseudomonas aeruginosa* wurden beschrieben, dass sie die Kolonialisierung beeinflussen [1] und wichtig für die Erhaltung der Wasserkanäle im Biofilm sind [2].

Der überwiegende Teil der Mikroorganismen lebt gemeinsam in Aggregaten, wie Flocken, Filme und Schlämme, der allgemein als Biofilm bezeichnet wird. Die Aggregate werden von einer Mischung aus Biopolymeren mikrobiellen Ursprungs, der sogenannten extrazellulären polymeren Substanz (EPS) zusammengehalten. Die Abkürzung EPS wird als genereller Ausdruck benutzt, der verschiedene Klassen von schleimbildenden Makromolekülen, wie Polysaccharide, Proteine, Nucleinsäuren, (Phospho)lipide und andere polymere Stoffe umfasst und die von Mikroorganismen abgegeben werden. Die EPS füllt und formt den Raum zwischen den Zellen. Sie ist verantwortlich für den Zusammenhalt der Zellen, die Morphologie der Matrix und die dreidimensionale Biofilmarchitektur, in welcher die Zellen leben. Der Zusammenhalt wird durch verschiedene Kräfte, z.B. durch elektrostatische und ionische Anziehungskräfte sowie durch van der Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen, gewähr-

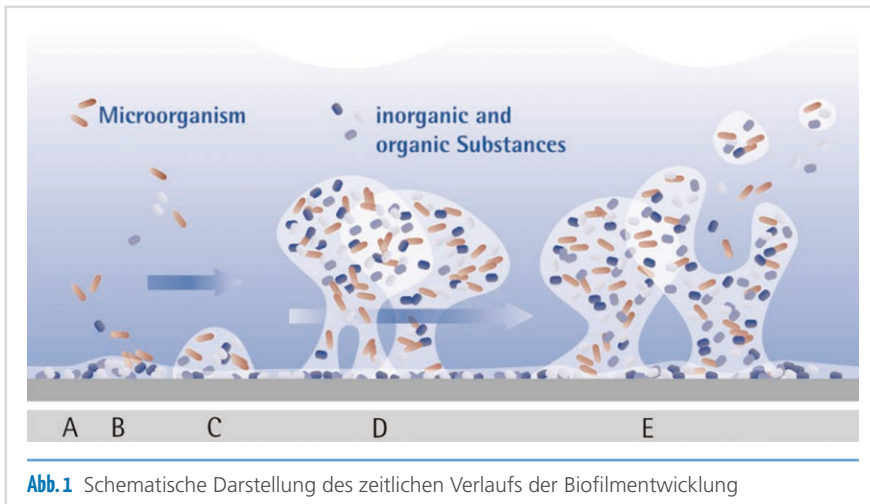


Abb. 1 Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Biofilmentwicklung

leistet. Damit bildet die EPS sozusagen das „Haus“ der Mikroorganismen [3].

Die Biofilmentwicklung erfolgt schrittweise durch Anheftung der Mikroorganismen an die Oberfläche und der Bildung von Mikrokolonien bis zum ausgebildeten „reifen“ Biofilm (Abb. 1). Aus dem reifen Biofilm lösen sich einzelne aktive Zellen, sog. Schwärmerzellen, ab, um neue Bereiche zu besiedeln. In die EPS können auch anorganische Stoffe oder Detritus eingelagert sein.

Vorteile bei der Kontrolle von Biofilmen durch Dispergatoren

Zur Bekämpfung von Biofilmen werden hauptsächlich Biozide bzw. Desinfektionsmittel eingesetzt. Der Bedarf an Bioziden steigt weltweit. Aufgrund des steigenden Bewusstseins von Gesundheitsgefahren durch pathogene Keime aus Biofilmen werden zunehmend Strategien zur Vermeidung von Infektionen entwickelt. Dies zeigt das aktuelle Beispiel der Legionellenrichtlinie des VDI. Zum anderen ist der Trend „Wassereinsparungen in industriellen Prozessen“ anhaltend, was auch einen steigenden Bedarf an Bioziden nach sich zieht. Gleichzeitig unterliegen die einzelnen Industrien einem Handlungsdruck infolge regulatorischer Beschränkungen der Biozide und Desinfektionsmittel durch die Biozidrichtlinie oder durch Anforderungen aus dem Wasserhaushaltsgesetz.

Der Einsatz von Bioziden gegen Bakterien ist gerechtfertigt gegenüber frei schwimmenden (planktonischen) Mikroorganismen und zur Konservierung von Gutstoffen. Dagegen ist die Wirksamkeit von Bioziden gegen Mikroorganismen, die sich innerhalb eines Biofilms organisiert haben, um ein Vielfaches reduziert. Hinzu kommt, dass Biozidmaßnahmen im besten Fall zu einer Abtötung der Bakterien, aber nicht zu einer Ablösung des Biofilms führen.

Tenside und deren Gemische agieren an Grenzflächen. Diejenigen Tensidprodukte, die an der

Grenzfläche „Ablagerung“ und „Oberfläche“ wirksam sind, werden im industriellen Bereich allgemein als Dispergatoren gegen Ablagerungen eingesetzt. Weil Biofilme nicht nur aus mikrobiellen Aggregaten bestehen, sondern immer auch alle Stoffe enthalten, die im umgebenden Medium vorhanden sind, spricht man von Ablagerungen. Diese Ablagerungen können sowohl betriebstechnische als auch hygienische Probleme verursachen.

In der Papierindustrie werden Dispergatoren in Form nichtionischer Mischungen (KOLB Natudisp™) zusammen mit einem oxidativ wirksamen Biozid (Mucosin™) zur Behandlung von Ablagerungen eingesetzt.

Um eine effektive Kontrolle der Ablagerungen zu garantieren, erfolgt eine Onlinemessung der Schichtdicke mit dem von KOLB entwickelten BioDeposit Control (BDC) Messgerät durch die In-situ-Installation von 3 kompakten Sensoren. Die Kombination der drei Elemente Dispergator, oxidatives Biozid und kontinuierliche Messung der Schichtdicke ergibt das SURFOX-Konzept.

Oberflächenhygiene durch neue Tensid-Applikationen

Durch Technologietransfer des für Natudisp™-Dispergatoren in der Papierindustrie bei der Oberflächenhygiene vorhandene Knowhow möchte Kolb Hedicol™-Dispergatoren gegen Ablagerungen in Märkte wie Wasserbehandlung, Home Care, Industrielle & Institutionelle Reinigung (I&I) und Schmierstoffindustrie einführen. In einem ersten Schritt wurden etwa 100 Tenside und Tensidmischungen auf ihre Fähigkeit, den Biofilmaufbau zu beeinflussen, untersucht. Der Ablauf beim Screening-Test ist in Abb. 2 dargestellt.

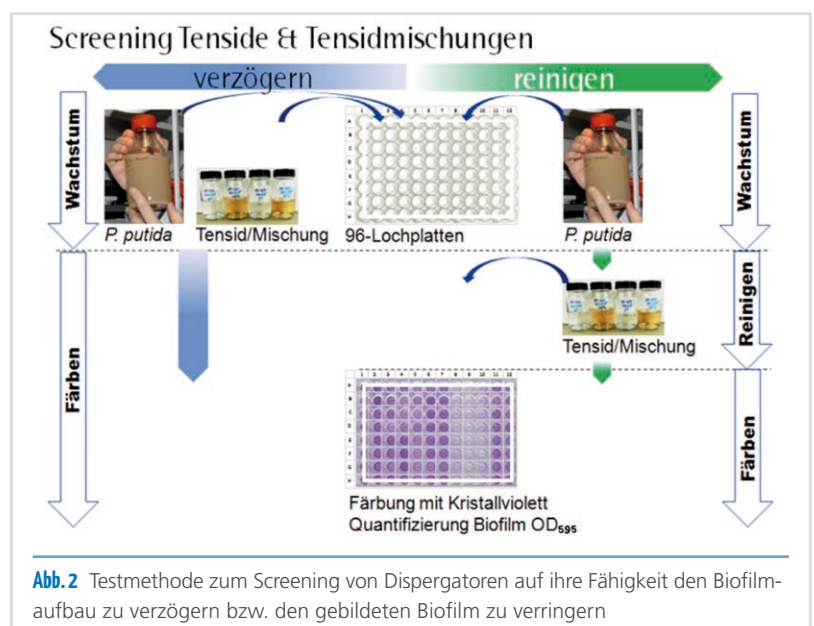


Abb. 2 Testmethode zum Screening von Dispergatoren auf ihre Fähigkeit den Biofilmaufbau zu verzögern bzw. den gebildeten Biofilm zu verringern

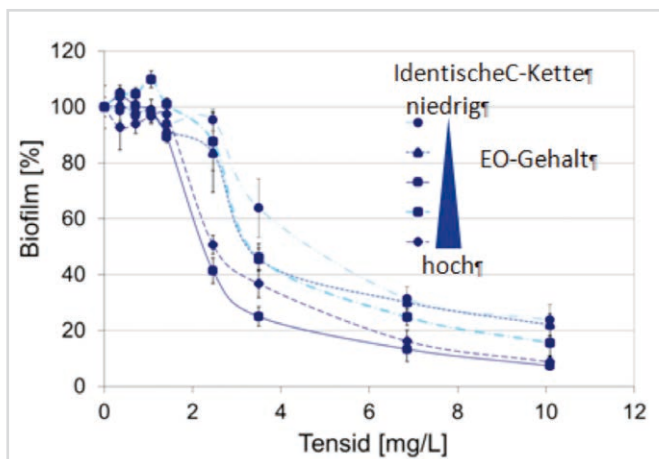


Abb. 3 Der Biofilmaufbau wird durch Tenside identischer Kohlenstoffkettenlänge und einem optimalen Ethoxylierungsgrad schon bei 10 ppm und darunter verzögert

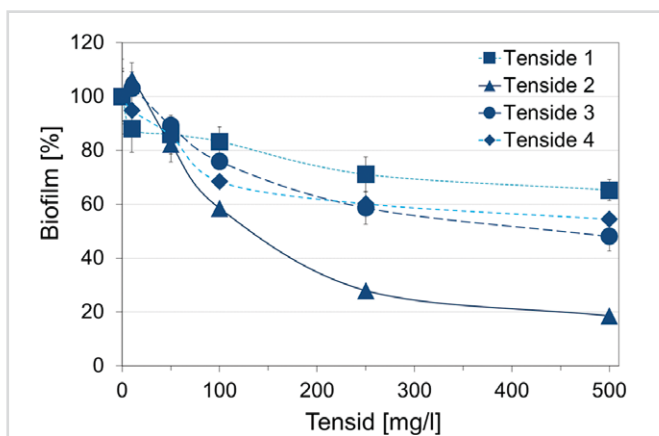


Abb. 4 Effiziente Tensidmischungen können Biofilme bei einer Konzentration von 500 ppm bei 30°C und einer Einwirkzeit von 60 Min. von Oberflächen bis zu 80 % verringern

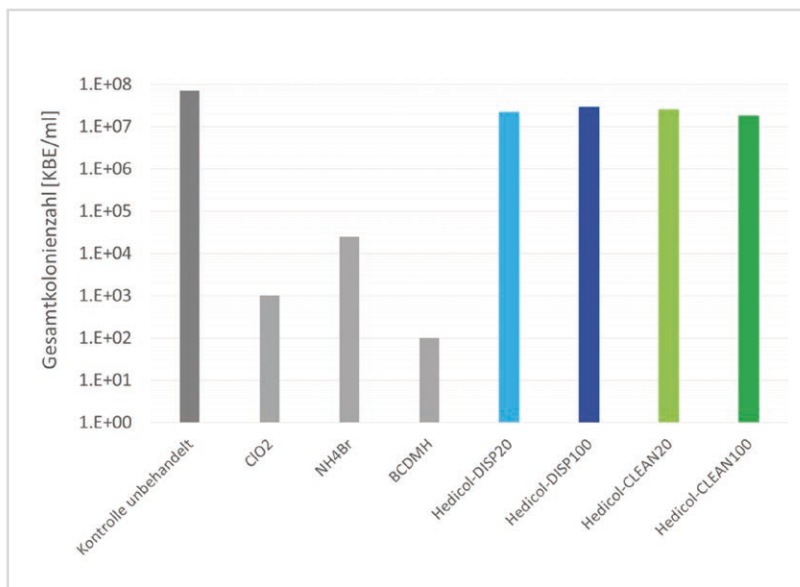


Abb. 5 Killing Test mit Isolaten einer Papiermaschine mit einer standardisierten Matrix. Bestimmung der Keimzahlen nach 60 Min. Einwirkzeit

Hierbei zeigte sich in den Labortests mit *P. putida*, dass bei einer Konzentration von 10 ppm und darunter der Biofilmaufbau innerhalb der Wachstumsphase von 60 Stunden verzögert wird. Bei nichtionischen Tensiden identischer Kohlenstoffkettenlänge und zunehmendem Ethoxylierungsgrad konnte ein optimaler EO-Gehalt gefunden werden (**Abb. 3**). Durch effiziente Tensidmischungen wird die Oberfläche physikalisch stabilisiert, und so das Anhaften, die Motilität und das Schwärmen der Bakterien beeinträchtigt.

In weiteren Laborversuchen wurden im Screening 70 Tenside bzw. Tensidmischungen auf ihre Fähigkeit untersucht, Biofilme zu verringern. Bei 30°C und einer Einwirkzeit von 60 Min. ließen sich mit effizienten Tensidmischungen bei einer Konzentration von 500 ppm bis zu 80 % des Biofilms verringern (**Abb. 4**). Mischungen ergeben eine bessere Leistung als einzelne Tensidsubstanzen. Um einen Biofilm zu verringern bedarf es verschiedener Eigenschaften der Tenside. Die Zugabe eines Netzmittels resultiert in einer Ablösung von Biofilm infolge konkurrierender Adsorption auf der Oberfläche und die kombinierte Gabe eines dispergierenden Tensids hilft dann den Biofilm auszutragen.

Dispergatoren sind keine Biozide, sondern sind an Grenzflächen physikalisch wirksam. Sie wirken stabilisierend auf die Oberfläche und verzögern dadurch die Biofilmbildung. Durch Ablösen und Austragen wird der Biofilm verringert. In **Abb. 5** sind die Ergebnisse aus einem Killing Test mit Isolaten einer Papiermaschine mit einer standardisierten Matrix für Biozide und den neu entwickelten Dispergatoren gegenübergestellt. Die Keimzahlen wurden nach 60 Min. Einwirkzeit ermittelt.

In **Abb. 6** sind die Anwendungen der neu entwickelten Dispergatoren Hedicol™-DISP20 und Hedicol™-DISP100 sowie Hedicol™-CLEAN20 und Hedicol™-CLEAN100 zusammengestellt, die biofilmbildung und Oberflächen stabilisierende Eigenschaften besitzen.

„Biofilm – Industriennahe Testmethoden“ zur methodischen Prüfung der Biofilmbildung in Haushaltsgeräten und zur Relevanz und den Grenzen von Standards und Testmethoden referierte **Caroline Amberg**, Swisstest Testmaterialien AG, St. Gallen, Schweiz.

Durch Biofilmbildung können in Haushaltswaschmaschinen und -geschirrpülmaschinen Geruchsprobleme sowie Biokorrosion und Biofouling auftreten. Dadurch besteht ein potenzielles Infektionsrisiko und es kann eine unsichtbare Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen stattfinden.

Biofilm ist die Geruchsquelle für schlechten Geruch in Haushaltswaschmaschinen, der auch zum Schlechtgeruch von gewaschenen Textilien beitragen kann. Zur Geruchsquelle im Biofilm gehören am häufigsten Dimethyldisulfid, 3-Methyl-1-butanol und Isobuttersäure. Involviert sind Bakterien wie z.B. Pseudomonas-Stämme (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. oleovorans*) Staphylococcus-Stämme (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) und Micro-

Produkt	Ready to use Produkte	zum Einfüllen	stabilisiert Oberflächen	verringert Biofilm	Home Care und I&I	Schmierstoffindustrie	Wasserbehandlung	Papierindustrie
Hedicol-DISP20	✓✓✓		✓✓✓			✓✓✓	✓✓✓	
Hedicol-DISP100		✓✓✓	✓✓✓		✓✓✓			
Hedicol-CLEAN20	✓✓✓		✓	✓✓✓			✓✓✓	✓✓✓
Hedicol-CLEAN100		✓✓✓	✓	✓✓✓	✓✓✓			

✓ = geeignet ✓✓✓ = empfohlen

Abb. 6 Dispergatoren mit biofilmlösenden und Oberflächen stabilisierenden Eigenschaften

coccus-Stämme sowie *Shewanella putrefaciens*, *Brevundimonas sp.*, *Sphingobacterium sp.* und *Microbacterium sp.*

Zu den in Waschmaschinen am häufigsten nachgewiesenen pathogenen Keimen gehören *P. aeruginosa*, *Staphylococcus sp.* (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) und *Micrococcus sp.* sowie die Pilze *Rhodotorula*, *Candida*, *Fusarium* usw. Etwa 30 % der isolierten Keime sind potenziell pathogen (Risikogruppe 2). Grundsätzlich besteht die Gefahr der Keimübertragung vom Gerät auf die Wäsche oder das Geschirr.

Über das in der Geschirrspülmaschine vorhandene Bakterienspektrum sind keine Studien vorhanden, dafür wurde das Vorkommen von Pilzen in Haushaltsgeräten von einer Arbeitsgruppe der Universität Ljubljana um Dr. Polona Zalar näher untersucht. Häufig vorkommende Pilze in der Geschirrspülmaschine sind *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhodotorula sp.* und die schwarze Hefe *Exophiala* (In 60 % der Geschirrspüler konnten Pilze gefunden werden und in der Hälfte der pilzhaltigen Proben konnte *Exophiala* nachgewiesen werden).

Exophiala sp. ist thermo-, pH- und salztolerant und ist ein potentieller Erreger von systemischen Infektionen beispielsweise der Lungen oder des Nervensystems. Das Infektionsrisiko durch *Exophiala sp.* ist aber noch unklar. Das Vorkommen von *Exophiala sp.* in Haushaltsgeräten zeigt aber, dass Haushaltsgeräte Nischen für spezialisierte Mikroorganismen sein können.

Normen zu Biofilmuntersuchungen

Die für die Untersuchung anzuwendende Methode hängt vom Ziel der Untersuchung ab. Biofilme können direkt (Mikroskopie) oder indirekt (Ablösen des Biofilms und Bestimmung bzw. Beurteilung der Zellzahlen, Art der Spezies, Verteilung der Spezies im Biofilm, Biofilmstruktur, Biofilmmenge (Biomasse), EPS-Menge, Viabilität und dem Vorkommen spezifischer Keime) untersucht werden.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass einzelne Parameter alleine oftmals keine ausreichende Aussagefähigkeit besitzen, denn ein natürlicher Biofilm hat eine hochkomplexe Struktur. Deshalb müssen die Wahl der richtigen Analyseverfahren und die Interpretation der Ergebnisse vorher gut durchdacht werden und zum Untersuchungsziel passen.

Normierte Standardprüfmethoden bestehen für Herstellung und Probenahme eines standardisierten *P. aeruginosa*-Biofilms für verschiedene Anwendungen gemäß:

- ASTM E2562_12: Standard test method for quantification of *P. aeruginosa* biofilm grown with high shear and continuous flow using CDC biofilm reactor
- ASTM E2647_13: Standard test method for quantification of *P. aeruginosa* biofilm grown using drip flow biofilm reactor with low shear and continuous flow

- ASTM E2196_12: Standard test method for quantification of *P. aeruginosa* biofilm grown with medium shear and continuous flow using rotating disk reactor.

Normierte Prüfmethoden zur Bestimmung der Desinfektionswirkung gegenüber *P. aeruginosa*-Biofilm durch Keimzahlbestimmung sind beschrieben in:

- ASTM E2871_13: Standard test method for evaluating disinfectant efficacy against *P. aeruginosa* biofilm grown in CDC biofilm reactor using single tube method
- ASTM E2799_12: Standard test method for testing disinfectant efficacy against *P. aeruginosa* biofilm using the MBEC assay (Anwendung nur im Screening-Test durch quantitative Bestimmung der Keimzahl oder qualitativ durch Messung der optischen Dichte).

Swissatest Testmethoden

In wasserführenden Teilen und Bereichen mit hoher Feuchte muss sowohl in Waschmaschinen wie auch in Geschirrspülmaschinen mit Biofilmbildung gerechnet werden. Nährstoffreiche Schmutzrückstände in verschiedenen Maschinenbereichen, wie Schläuchen, Pumpen, Pumpensumpf, Dosierschublade, Bottich, Trommel, Ablauf, Gummidichtungen und Ionenaustauscher können die Biofilmbildung fördern. Durch den Trend zu niedrigen Anwendungstemperaturen und der Verwendung von Flüssigwaschmitteln ohne Bleiche wird die Biofilmbildung begünstigt.

Von Swissatest wurden Testmethoden zur Erfassung der Biofilmentfernung oder der Biofilmmenge im Screening-Verfahren als Lab-scale-Test sowie nach Desinfektion oder im Maschinenzyklus entwickelt. Nach der Behandlung wird die verbleibende Biofilmmenge durch das Kristallviolett-Assay nach O'Toole (2011) oder alternativ durch eine Lebendkeimzahlbestimmung quantitativ erfasst.

Screening-Verfahren

Beim Biofilm Screening Test wird in einer 96-well Mikroplatte die Lebendkeimzahl oder die Menge an organischem Material bestimmt. Zuerst wird ein gemischter Biofilm mit *P. aeruginosa*, *E. coli* und *S. aureus* während 24 Std. bei 30°C angezogen. Danach wird eine Desinfektion oder ein Maschinenreinigungszyklus simuliert. Nach der Behandlung wird die verbleibende Biofilmmenge durch das Kristallviolett-Assay nach O'Toole (2011) oder alternativ durch eine Lebendkeimzahlbestimmung quantitativ erfasst. Der Verfahrensablauf ist in **Abb. 7** dargestellt. Der Screening-Test kann zur Prüfung von Oberflächenbeschichtungen, Gerätereinigungsmitteln (Waschmaschinen-Reiniger), Desinfektionsmitteln, Bestim-

mung der wirksamsten Konzentrationen und der wirksamsten Waschbedingungen sowie zur Bestimmung synergistischer oder antagonistischer Effekte angewendet werden.

Biofilmentfernung und -wachstum in der Waschmaschine

Bei der Bestimmung der Biofilmentfernung in der Waschmaschine werden Plättchen aus Polypropylen eingesetzt, auf deren Oberfläche ein gemischter Biofilm aus drei Bakterienpezies (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, inkubiert mit Nährmedium bei 30°C während 24 Std.) kultiviert wurde. Durch Erfassung der Keimzahlen auf den Plättchen vor und nach der Wäsche wird die Biofilmentfernung in einem einzelnen Waschprozess ermittelt. Mit diesem Prüfverfahren können vergleichende Prüfungen zur Biofilmentfernung z.B. ohne Waschmittelzusatz, mit Zusatz von Flüssigwaschmitteln oder synergistische Effekte von Mechanik, Wasser, Chemie und Temperatur ermittelt werden. Des Weiteren können die Biofilmentfernung in einem Geräte-reinigungszyklus, die Wirksamkeit von Waschmitteln, Bleiche und Additiven sowie die Übertragung von Biofilmkeimen auf die gewaschene Wäsche bestimmt werden. Der Verfahrensablauf ist in **Abb. 8** dargestellt.

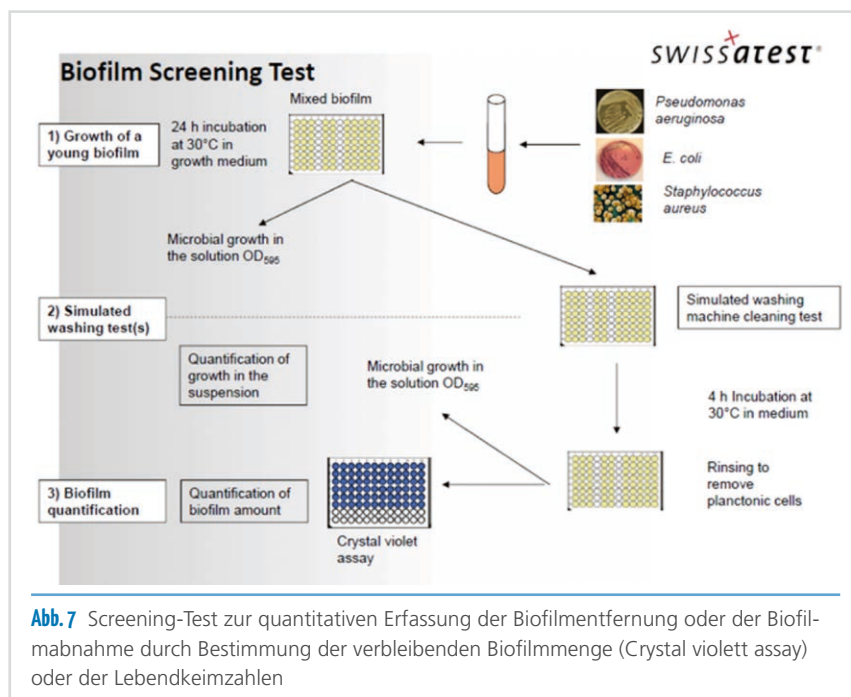


Abb. 7 Screening-Test zur quantitativen Erfassung der Biofilmentfernung oder der Biofilmbildung durch Bestimmung der verbleibenden Biofilmmenge (Crystal violett assay) oder der Lebendkeimzahlen

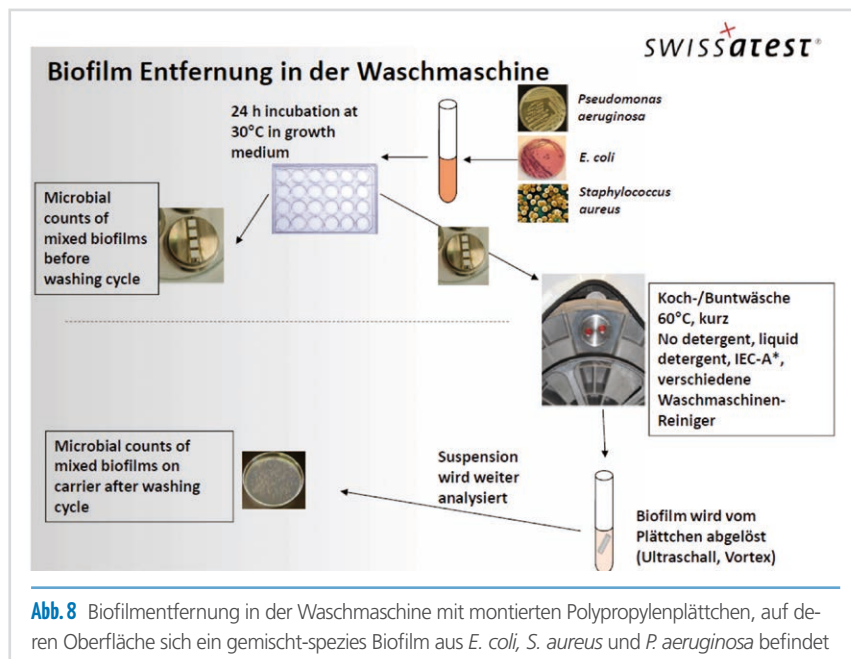


Abb. 8 Biofilmentfernung in der Waschmaschine mit montierten Polypropylenplättchen, auf deren Oberfläche sich ein gemischt-spezies Biofilm aus *E. coli*, *S. aureus* und *P. aeruginosa* befindet

Im Waschmaschinen-Test werden in der Regel geringere Biofilmmengen oder Lebendkeimzahlen ermittelt als im Lab-scale Test, da im Waschmaschinen-Test viele Faktoren (Temperatur, Chemie, Mechanik, Zeit, Wasser) das Ergebnis beeinflussen können. Prüfungen in der Waschmaschine führen zu höheren Standardabweichungen, da nicht alle Parameter standardisiert werden können.

Bleichehaltige Pulverwaschmittel wirken bei 60°C gegenüber Biofilm bereits sehr effektiv. Gewisse Gerätereiniger sind gegenüber Biofilmen weniger effektiv als IEC-A*-Waschmittel, und zwar sowohl im Lab-scale-Test als auch im Waschmaschinen-Test.

Um Waschmaschinen bezüglich Biofilmbildung zu beurteilen, können Waschmaschinen-Biofilme gezielt in Geräten kultiviert werden, indem „schlechte“ Verbraucher-Gewohnheiten simuliert werden. Dabei wird mit Niedrigtemperaturwaschverfahren, tief dosiertem Flüssigwaschmittel und einer hohen Schmutzmenge gewaschen und das Gerät nur kurz für die Entnahme der Wäsche geöffnet. Nach 12 bis 16 Wochen kann eine Verkeimung des Gerätes qualitativ bestimmt werden und es können verschiedene Waschmaschinen

miteinander verglichen werden. Die qualitative Beurteilung des Biofilmwachstums pro Probeort berücksichtigt Gesamtkeimzahl, Schimmelpilze, *P. aeruginosa*, Protein- und Polysaccharidmenge sowie die visuelle Beurteilung. Es konnte gezeigt werden, dass sich in parallel geprüften Waschmaschinen unterschiedliche Keime in den Waschmaschinenbiofilmen etablieren können, obwohl die Geräte mit der gleichen Wasserqualität, Schmutzbelastung und Waschbedingungen betrieben wurden. Gründe dafür könnten Konstruktionsunterschiede oder unterschiedliche Materialien in den Geräten sein.

„Der Einsatz von Dispergatoren in Feldversuchen“ wurde von Dr. **Simone Schulte**, Business and Technology Development Manager, Kolb Distribution Ltd., Hedingen, durch Überwachung des Biofilms von Anlagen mit Online-Monitoring in der Papierherstellung und in offenen Verdunstungskreisläufen und unter Beachtung der Legionellen-Problematik dargestellt. Biofilme verfügen über verschiedene Mechanismen, um gegenüber Bioziden eine bestimmte Toleranz zu entwickeln. Diese bestehen darin, dass durch die Biofilmmatrix die Durchdringung verringert wird und Biofilmzellen sich dadurch auf Stress einstellen können. Die Zellen verändern ihre Aktivität oder induzieren einen Resistenzmechanismus (Katalasebildung). Des Weiteren werden durch Metabolismus inaktive, aber lebensfähige Zellen gebildet, die im Überdauerungszustand weniger empfindlich gegenüber der Wirkung von Bioziden sind. Aufgrund dieser Mechanismen können Biozide den Biofilm nicht quantitativ erreichen, d.h. durch Abtötung gelingt keine vollständige Biofilmlöschung bzw. nicht die vollständige Reinigung der Oberfläche. Deshalb ist für die Oberflächenreinigung die Kombination aus Biozid und Reiniger sehr wichtig, denn die auf der Oberfläche verbleibende tote Biomasse kann als Nahrung für überlebende und neu eingetragene Mikroorganismen dienen. Die mechanische Reinigung ist einfach durchzuführen und dabei effektiv. An Stellen, an denen eine mechanische Reinigung nicht möglich ist, können Tenside die Wirksamkeit von Bioziden unterstützen.

Anwendung in Kühlwassersystemen

Für Kühlwassersysteme spielt die Bekämpfung von Biofilmen eine zentrale Rolle, denn Legionellen nisten sich im Biofilm ein, überdauern und vermehren sich. Aus dem Biofilm freigesetzte Legionellen werden mit dem durchströmenden Wasser über Aerosole in die Umgebung ausgetragen.

Für die Anwendung von Dispergatoren im Kühlwasserbereich ist Voraussetzung, dass diese schaumgedämpft und im Bereich über pH 8 bei 20 bis 30 °C wirksam sind. Sie dürfen keine Interferenz mit Korrosionsinhibitoren (z.B. anorganische und organische Phosphorverbindungen, Metallionen enthaltende Inhibitoren, spezielle synthetische Inhibitoren oder Silikate), mit Härtestabilisatoren (z.B. anorganische und organische Phosphorverbindungen und polymere Carboxylate und deren Derivate) und Bioziden zeigen. Dispergatoren sollen

selbst nicht biozid sein und eine bessere Wirkung als Orangerterpen besitzen.

Die zu verwendenden Härtestabilisatoren haben keinen Einfluss auf die biofilmverzögernde Wirkung, beeinflussen aber die filmablösende Wirkung geringfügig. In **Abb. 9** ist die filmverzögernde Wirkung von Orangerterpen der Wirkung der Dispergatoren Hedicol™-DISP20 und Hedicol™-DISP100 gegenübergestellt, die beide eine deutlich bessere filmverzögernde Wirkung als Orangerterpen besitzen.

Die biofilmlösende Wirkung von Orangerterpen ist in **Abb. 10** im Vergleich zu Hedicol™-CLEAN20 und Hedicol™-CLEAN100 dargestellt, die beide eine vergleichsweise bessere ablösende Wirkung ergeben.

Chlordioxid besitzt neben der bioziden Wirkung auch eine die Biofilmbildung verzögernde Wirkung, die sich bereits bei Zusatz von 0,5 ppm ClO₂ bemerkbar macht und bei Zusatz von 100 ppm ClO₂ zu einer signifikanten Verringerung der Biofilmbildung führt (Screening-Test über 60 Std.). Auf die biofilmverzögernde Wirkung von Hedicol™-DISP20 hat die Anwesenheit von Chlordioxid keinen Einfluss, vielmehr unterstützt Hedicol™-DISP20 die biofilmverzögernde Wirkung von Chlordioxid (**Abb. 11**). Bei einer Konzentration von 25 ppm ClO₂ und 5 ppm Hedicol™-DISP20 wird die Biofilmbildung bis auf 5 % verringert. Mit 5 ppm Orangerterpen,

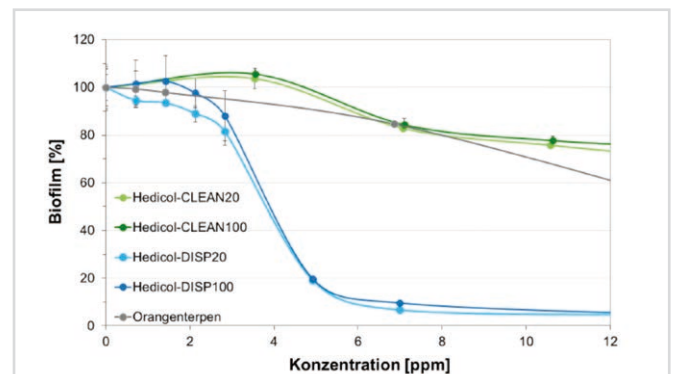


Abb. 9 Vergleich der biofilmverzögernden Wirkung von Orangerterpenen zur Wirkung der Dispergatoren Hedicol™-DISP20 und Hedicol™-DISP100, die eine deutlich bessere filmverzögernde Wirkung als Orangerterpen besitzen

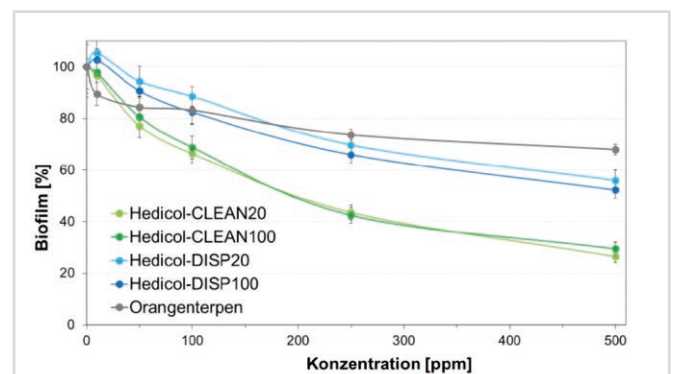


Abb. 10 Vergleich der biofilmlösenden Wirkung von Orangerterpenen zur Wirkung von Hedicol™-CLEAN20 und Hedicol™-CLEAN100, die eine vergleichsweise bessere filmablösende Wirkung als Orangerterpen besitzen

das in diesem Anwendungsbereich als Benchmark gilt, beträgt die Verringerung vergleichsweise nur wenige Prozentpunkte.

Dispergatoren in der Papierindustrie

In der Papierindustrie werden gemäß dem Stand der Technik Dispergatoren in Form nichtionischer Formulierungen (KOLB Natudisp™) zusammen mit einem oxidativ wirksamen Biozid zur Kontrolle von Ablagerungen eingesetzt. Mit dem von KOLB zur Kontrolle der Reinigung entwickelten BioDeposit Control (BDC) erfolgt die Messung der Schichtdicke kontinuierlich durch In-situ-Installation von kompakten Sensoren (Abb. 12). Konventionelle mikrobiologische Verfahren sind vergleichsweise zeitintensiv (2 bis 3 Tage) und liefern keine Aussage über die Biofilmbildung. Die Verwendung dieser Tensidformulierungen ergibt Vorteile in Bezug auf eine verbesserte Hygiene, Vermeidung von Geruchsproblemen, Verringerung der Exposition von Krankheitserregern und Korrosion sowie durch verringerten Biozidverbrauch und durch eine verbesserte Papierqualität. In Abb. 13 ist die Ablagerungsentwicklung in der Papierindustrie über einen Zeitraum von 5 bzw. 6 Wochen unter Verwendung von Biozid mit Dispergator sowie unter Verwendung von Dispergator ohne Biozid der Verfahrensweise ohne Behandlung gegenübergestellt. Durch Zusatz von Biozid und Dispergator erfolgt ein vergleichsweise verringerter Schichtdickenaufbau über den gesamten Produktionszeitraum.

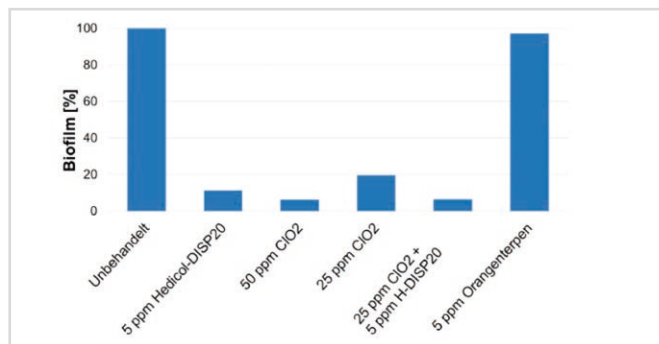


Abb. 11 Die Anwesenheit von Chlordioxid hat keinen Einfluss auf die biofilmverzögernde Wirkung von Hedicol™-DISP20, sondern unterstützt die biofilmverzögernde Wirkung von Chlordioxid (Screening-Test 60 Std.)

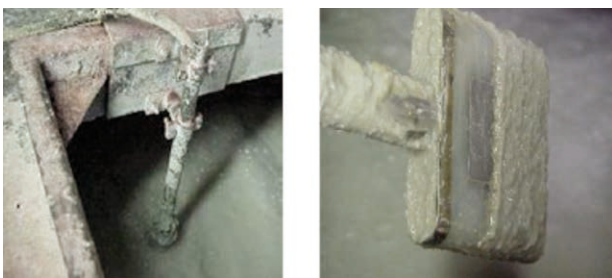


Abb. 12 KOLB BDC Ablagerungs-Monitor für die Online-Schichtdickmessung in der Papierindustrie

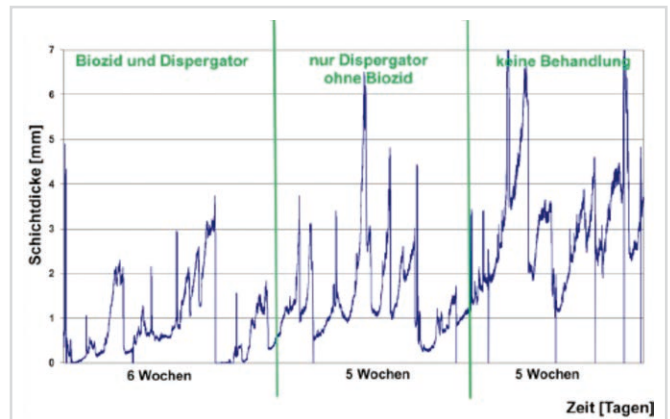


Abb. 13 Ablagerungsentwicklung in der Papierindustrie bei unterschiedlicher Behandlung

Biofilmverhinderung im Kühlwassersystem

Ein Modellkühlkreislauf mit einem Volumen von 130 l, einem Volumenstrom von 17 l/min und einem Eindickungsfaktor von 2,5 wurde über 14 Tage betrieben. Das Kühlwasser wurde mit einem Korrosionsinhibitor und einem Härtestabilisator behandelt, ein Biozid wurde nicht zugegeben. Die Ablagerungsbildung wurde mit dem KOLB BDC Sensor online überwacht. Zusätzlich wurden Aufwuchsoberflächen aus Edelstahl in die Kühlturmtasse eingehängt, auf denen sich ebenfalls Biofilm bilden konnte.

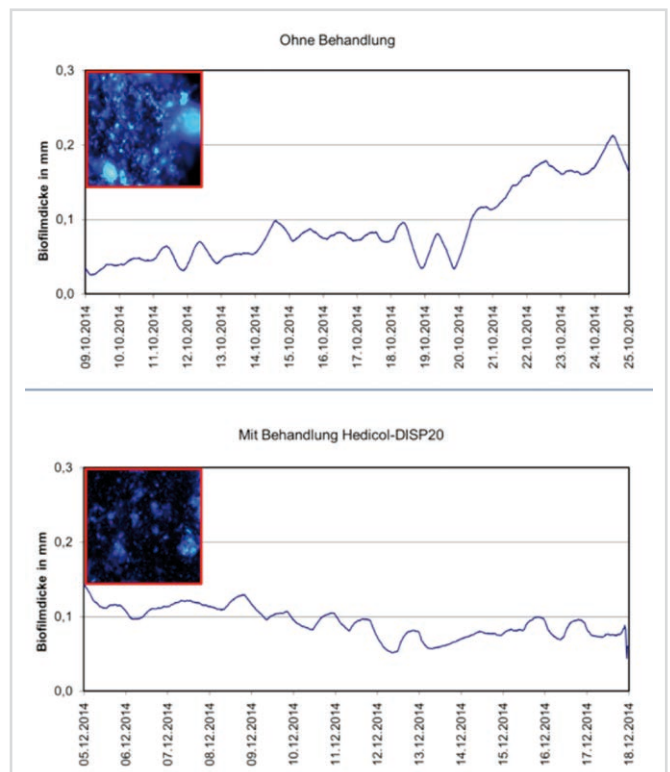


Abb. 14 Detektion des Ablagerungsaufbaus in einem Kühlwassertestsystem mit dem BDC-Sensor und durch fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Aufwuchsoberfläche ohne Zusatz von Hedicol™-DISP20 (oben) und mit Zusatz von Hedicol™-DISP20 (unten). Die Bakterien wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt und bei 1000-facher Vergrößerung direkt auf der Edelstahloberfläche im Mikroskop betrachtet

Dieser wurde am Ende des Versuchs direkt fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Der Ablagerungssensor zeigte in dem Versuchsansatz ohne Behandlung einen kontinuierlichen Anstieg der Belagsdicke auf 0,2 mm. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich ein mehrschichtiger Biofilm gebildet hatte (Abb. 14, oben).

In dem Versuchsansatz mit einer täglichen Zugabe von 10 mg/l des Dispergators Hedicol™-DISP20 im Kühlwasservolumen zeigt sich dagegen kein Biofilmaufbau (Abb. 14, unten). Die Biofilmdicke scheint sogar im Laufe des Versuchs abzunehmen. (Aufgrund von Temperatureffekten startete der Biosensor nicht beim Wert 0.)

Biofilmentfernung im Feldversuch

In einem realen Kühlwassersystem mit einem Kühlwasservolumen von 70 m³ wurde eine Reinigung und Desinfektion im

laufenden Betrieb durchgeführt. Bei geschlossener Absalzung wurde zunächst für 1 Std. das neu entwickelte Produkt Hedicol™-CLEAN20 allein und danach in Kombination mit einem oxidativen Biozid für weitere 8 Std. behandelt. Danach wurde das Biozid inaktiviert und anschließend die Absalzung geöffnet und das Wasservolumen einmal mit Frischwasser ausgetauscht. In den Wasserproben wurde die Gesamtzellzahl, die sowohl lebende als auch tote Bakterien und die Gesamtkoloniezahl der lebensfähigen Bakterien erfasst, bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits durch die alleinige Zugabe des Dispergators zum Kühlwasser eine Ablösung von Biofilmbakterien erfolgt, denn im Kühlwasser wurden bereits nach 1 Std. etwa 10-mal so viele Bakterien nachgewiesen wie vor Behandlungsbeginn. Bei den Bakterien handelt es sich um die abgelösten Biofilmbakterien. Im mikroskopischen Bild ist ebenfalls zu erkennen, dass sich Biofilmetzen im Kühlwasser befinden (Abb. 15).

Im weiteren Verlauf der Reinigung des Kühlsystems wurde ein oxidatives Biozid hinzugefügt. In der Kombination Dispergator und Biozid wurden über einen Zeitraum von weiteren 8 Std. Biofilmbakterien abgelöst, denn die Bakterienzahl im Kühlwasser stieg nochmals um fast den Faktor 10 auf 9×10^7 Bakterien/ml an. Der Anteil kultivierbarer Bakterien blieb nach der alleinigen Behandlung mit dem Dispergator konstant bei ca. 3%. Das bedeutet, dass dieser keine biozide Wirkung besitzt. Erst nach Zugabe des Biozids verringerte sich der Anteil kultivierbarer Bakterien stark auf 0,00005% bzw. 0,0001% (s. Tab. 1).

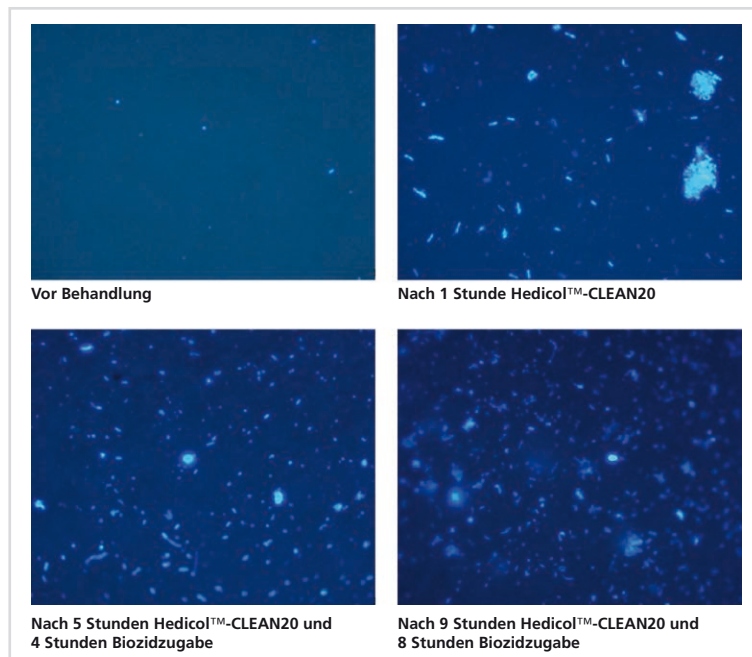


Abb. 15 Hedicol™-CLEAN20 reinigt Oberflächen eines Kühlwassersystems durch Biofilmentfernung. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Wasserproben nach unterschiedlichen Reinigungszeiten des Kühlwassersystems und Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (1000-fache Vergrößerung)

Literatur

- [1] Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T., Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* (2007) 2531-2539
- [2] Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Journal of Bacteriology* (2003) 1027-1036
- [3] H.-C. Flemming, J. Wingender, Extracellular polymeric substances (EPS): Structural, ecological, and technical aspects, in: G. Bitton (Hrsg.), *Encyclopedia of environmental Microbiology*, New York, *John Wiley and Sons* (2002) 1223-1231

Kontakt

*Dr. Klaus Henning
Mörlikeweg 12

71111 Waldenbuch | Germany

Tel.: +49-7157-534556

E-Mail: klaus.henning@onlinehome.de

Zeitpunkt der Probenahme	Gesamtzellzahl (Bakterien/ml)	Gesamtkoloniezahl (KBE/ml)	Kultivierbarkeit (%)
Vor Behandlungsbeginn	$1,16 \times 10^6$	$3,68 \times 10^4$	3,2
Nach 1 Std. Zusatz Hedicol™-CLEAN20	$1,82 \times 10^7$	$6,08 \times 10^5$	3,4
Nach 5 Std. Zusatz Hedicol™-CLEAN20 und nach 4 Std. Biozidzugabe	$3,93 \times 10^7$	$2,00 \times 10^1$	0,00005
Nach 9 Std. Zusatz Hedicol™-CLEAN20 und nach 8 Std. Biozidzugabe	$9,40 \times 10^7$	$1,40 \times 10^2$	0,0001

Tab. 1 Biofilmentfernung im Kühlwassersystem durch Zugabe des nicht bioziden Dispergators Hedicol™-CLEAN20 zum Kühlwasser. (Die Gesamtzellzahl wurde fluoreszenzmikroskopisch mit DAPI und die Gesamtkoloniezahl durch Kultivierung nach DIN EN ISO 6222 bestimmt, nur 36°C aufgeführt.)