

**Überprüfung der antimikrobiellen Wirkung
des „Wellan“-Wasserbehandlungssystems
auf einige ausgewählte Testkeime
mit kontinuierlicher Behandlung
mit dem „Wellan“-System**

Versuchsreihe II

**Auftraggeber:
IAB, Klaus Wagner
Institut für angewandte Bioenergetik
in Bietigheim-Bissingen**

**Auftrag vom:
10.02.2003**

**Gutachten Nr. G03-0102.doc
Lollar, 18.03.2003**

Einleitung

Bei den ersten Versuchen zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung des „Wellan“-Wasserbehandlungssystems, die in dem Gutachten G03-0076.doc vom 12.02.2003 beschrieben sind, wurde im Institut für Hygiene und Umwelt (IHU) in Lollar in der Steinstraße 10 ein „Wellan“-Ring an der Hauptwasserleitung installiert. In das anschließend gezapfte Wasser wurden ausgewählte Testkeime gegeben und deren Konzentration in Abhängigkeit von der Standzeit der jeweiligen Versuchsansätze bestimmt. Als Blindwerte wurden entsprechende Versuchsansätze an einer anderen vom IHU weit entfernten Stelle in Lollar mit dem dort gezapften Wasser hergestellt und ebenfalls die zeitabhängige Änderung der jeweiligen Testkeimkonzentrationen bestimmt.

Bei diesen ersten Untersuchungen über die antimikrobielle Wirkung des „Wellan“-Wasserbehandlungssystems wurde bei den Testkeimen *Escherichia coli* und *Streptokokkus faecalis* eine Abnahme der Konzentration dieser Testkeime in Abhängigkeit von der Zeit gefunden. Bei den Testkeimen *Pseudomonas aeruginosa* und *Legionella pneumophila* war der Effekt des „Wellan“-Wasserbehandlungssystems nicht eindeutig nachzuweisen.

Deshalb wurde eine weitere Versuchsreihe angesetzt, bei der das „Wellan“-Wasserbehandlungssystem durch Umpumpen kontinuierlich auf das mit Keimen kontaminierte Wasser einwirken konnte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind auf den folgenden Seiten dargestellt.

Verwendete Testkeime

Für die Überprüfung der antimikrobiellen Wirkung bei diesen Versuchsreihen wurden die Testkeime

- *Escherichia coli* und
- *Pseudomonas aeruginosa*

verwendet.

Konzentration der Testkeime

Die Testkeime wurden in unterschiedlichen Anfangskeimkonzentrationen für die Versuchsreihen angesetzt. Die Anfangskeimkonzentrationen lagen im Bereich von

- 100 KBE/100 ml bis
- 1.000 KBE/100 ml.

Durchführung der Untersuchungen

Für die Versuchsreihen mit kontinuierlicher Behandlung mit dem „Wellan“-System wurde ein im Institut für Hygiene und Umwelt aufgestellter Kryostat mit 5 Liter Leitungswasser befüllt. Wie in der Abb. 1 gezeigt, wurde der „Wellan“-Ring um ein Stück Wasserrohr installiert und dieses Rohr über 2 PVC-Schläuche mit dem Eingang und dem Ausgang des Kryostaten verbunden. Nach Kontamination des Leitungswassers mit dem entsprechenden Keim wurde das Leitungswasser kontinuierlich über 24 Stunden umgepumpt und in Zeitabständen von

Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa
- 0 Stunden,	- 0 Stunden,
- 1 Stunde,	- 1 Stunde,
- 2 Stunden,	- 2 Stunden,
- 4 Stunden,	- 4 Stunden,
- 7 Stunden,	- 6 Stunden,
- 24 Stunden,	- 24 Stunden,

dem Kryostaten jeweils 100 ml Wasser entnommen und die jeweilige Keimkonzentration bestimmt.

Als Blindwert wurde ein zweiter Kryostat bei einer Firma in Lollar 2 km entfernt vom IHU aufgestellt, der wie der Abb. 2 zu entnehmen ist zwischen dem Eingang und dem Ausgang keinen „Wellan“-Ring enthielt. Dieser Kryostat wurde ebenfalls mit 5 Liter Leitungswasser befüllt, dass auch dort dem Wassernetz entnommen wurde. Anschließend wurde dieses Wasser genauso mit Keimen kontaminiert und kontinuierlich umgepumpt wie bei dem Versuchsaufbau im IHU und in den gleichen Zeitabständen Proben zur Bestimmung der Keimkonzentration entnommen.



Abb. 1: Versuchsaufbau im Institut für Hygiene und Umwelt in Lollar mit installiertem „Wellan“-Ring



Abb. 2: Versuchsaufbau bei der anderen Firma in Lollar 2 km vom IHU ohne „Wellan“-Ring

Zusätzlich wurde bei der anderen Firma im Fall der Versuchsreihen mit *Escherichia coli* ein weiterer Blindwert ohne Umpumpen des kontaminierten Wassers und ebenfalls ohne Einwirkung des „Wellan“-Rings angesetzt. Hierzu wurde eine Glasflasche mit 5 Liter dort gezapftem Leitungswasser gefüllt und nach Kontamination des Wassers mit dem Keim 24 Stunden lang stehen gelassen. Wie bei den Versuchsreihen mit Umpumpen wurden auch hier Proben zur Bestimmung der Keimkonzentration entnommen.

Die Bestimmung der Keimkonzentration in den bei den verschiedenen Versuchsreihen genommenen Proben erfolgte durch Filtration der gesamten Probenmenge von 100 ml über sterile Filter und anschließendes Auflegen dieser Filter auf entsprechende Nährböden. Zur Bestimmung von *Escherichia coli* wurde Endo-Agar und zur Bestimmung von *Pseudomonas aeruginosa* Cetrimid-Agar verwendet. Nach einer Bebrütungszeit von 48 Stunden bei 36°C wurden die auf den Nährböden gewachsenen Kolonien ausgezählt. Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte zusätzlich noch über Malachitgrün-Bouillon. Hierzu wurden jeweils 100 ml Probe in 100 ml doppelkonzentrierte Malachitgrün-Bouillon gegeben und ebenfalls 48 Stunden bei 36 °C bebrütet.

Auf den nachfolgenden Seiten sind die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze dargestellt.

Ergebnisse der Untersuchungen

Tabelle 1: Keimkonzentrationen an *Escherichia coli* in den Versuchsansätzen mit Umpumpen im Kryostaten mit und ohne Wellan-Ring und im Standversuch ohne „Wellan“-Behandlung

Laufzeit des Versuchs	Keimkonzentration an <i>Escherichia coli</i> im Versuchsansatz im Kryostaten mit „Wellan“-Ring (IHU)	Blindwert: Keimkonzentration an <i>Escherichia coli</i> im Versuchsansatz im Kryostaten ohne „Wellan“-Ring (andere Firma)	Blindwert: Keimkonzentration an <i>Escherichia coli</i> im Standversuch ohne „Wellan“-Ring (andere Firma)
[h]	[KBE/100 ml]	[KBE/100 ml]	[KBE/ 100 ml]
0	72	ca. 1000	ca. 1000
1	0	ca. 1000	ca. 1000
2	0	ca. 1000	ca. 1000
4	0	ca. 1000	ca. 1000
7	0	ca. 1000	ca. 1000
24	0	ca. 1000	ca. 1000

Die zeitabhängige Änderung der *Escherichia coli*-Keimkonzentration ist in der Abbildung 3 graphisch dargestellt.

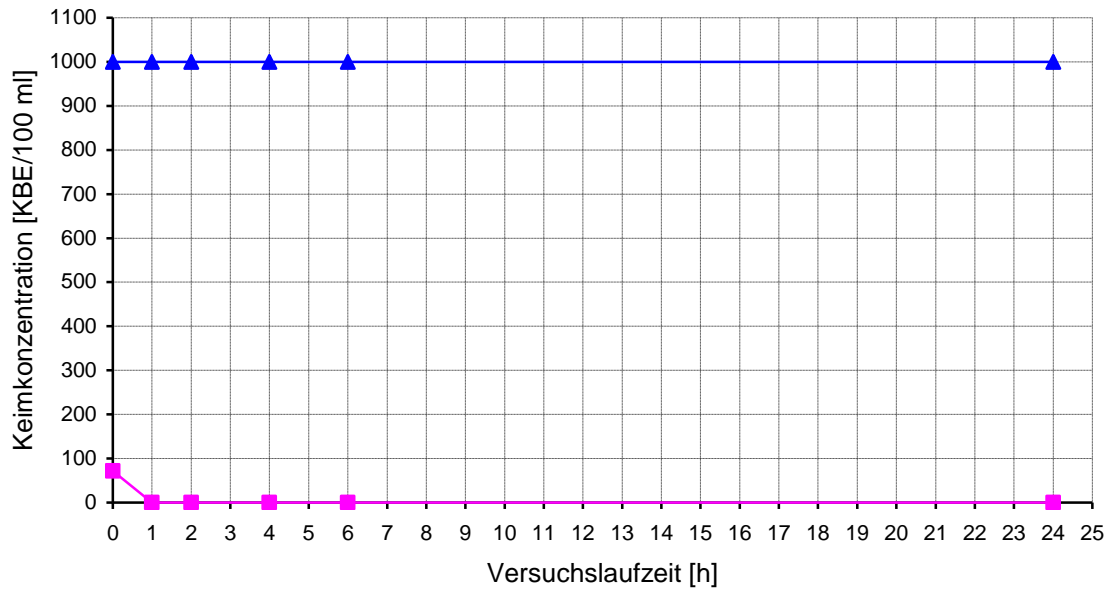


Abb. 3: Graphische Darstellung der zeitabhängigen Änderung der *Escherichia coli*- Konzentration bei den Versuchsansätzen im Kryostaten mit und ohne „Wellan“-Ring
 rot: Versuchsansatz im Kryostat **mit** Wellan-Ring (durchgeführt im IHU)
 blau: Versuchsansatz im Kryostat **ohne** Wellan-Ring (durchgeführt bei der anderen Firma)

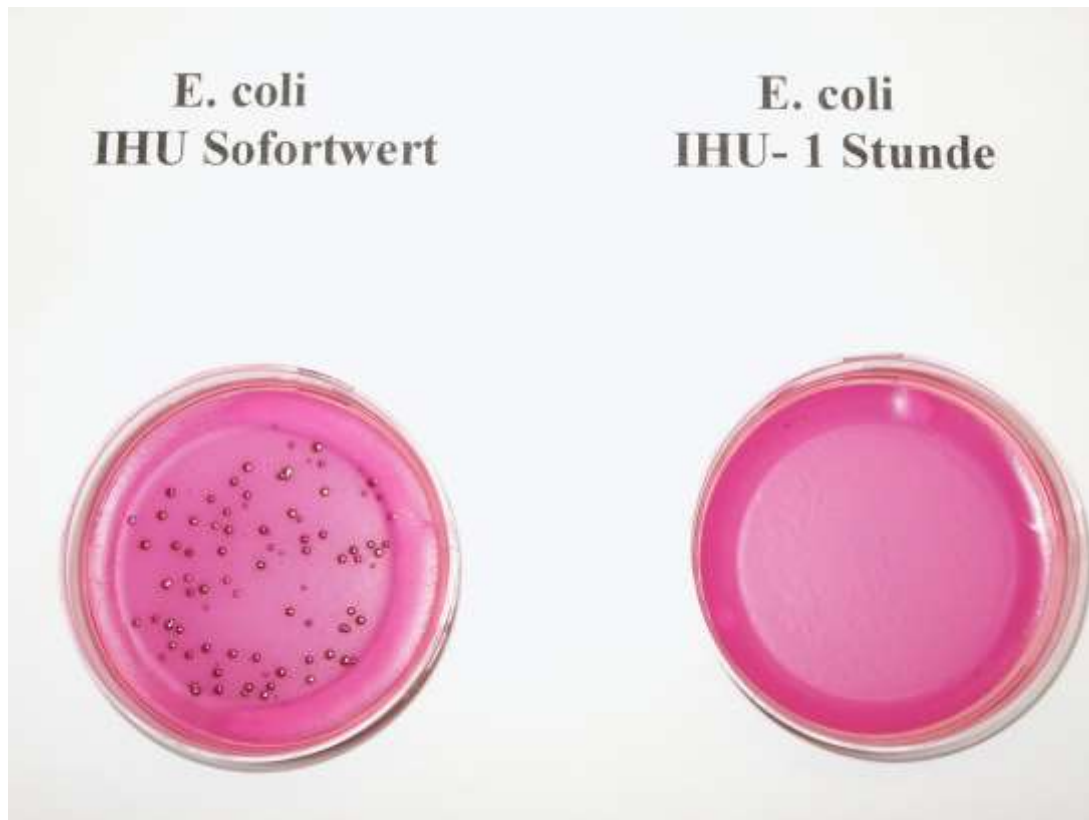


Abb. 4: Bestimmung der Keimkonzentration an *Escherichia coli* bei dem Versuchsansatz im Kryostaten mit „Wellan“-Ring

Jeweils 100 ml Probe wurden membranfiltriert, auf Endo-Agar aufgelegt und 48 Stunden bei 36°C bebrütet

links: Anfangskeimkonzentration vor Versuchsbeginn von 72 KBE/100 ml

rechts: nach 1 Stunde Umpumpen waren keine Keime mehr nachweisbar

Tabelle 2: Keimkonzentrationen an *Pseudomonas aeruginosa* in den Versuchsansätzen mit Umpumpen im Kryostaten mit und ohne Wellan-Ring

Laufzeit des Versuchs	Keimkonzentration an <i>Ps. aeruginosa</i> im Versuchsansatz im Kryostaten mit „Wellan“-Ring (IHU)	Blindwert: Keimkonzentration an <i>Ps. Aeruginosa</i> im Versuchsansatz im Kryostaten ohne „Wellan“-Ring (andere Firma)
[h]	[KBE/100 ml]	[KBE/100 ml]
0	78	97
1	28	95
2	4	87
4	0	88
6	0	110
24	0	95

Die zeitabhängige Änderung der *Pseudomonas aeruginosa*-Keimkonzentration ist in der Abbildung 4 graphisch dargestellt.

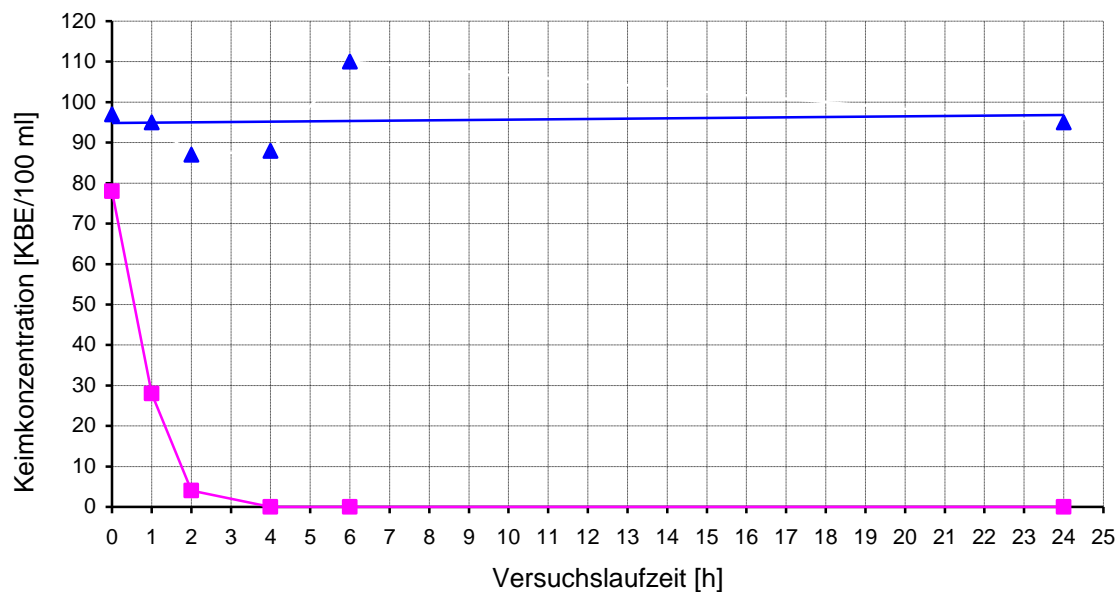


Abb. 5: Graphische Darstellung der zeitabhängigen Änderung der *Ps. aeruginosa*-Konzentration bei den Versuchsansätzen im Kryostat mit und ohne „Wellan“-Ring
 rot: Versuchsansatz im Kryostat **mit** Wellan-Ring (durchgeführt im IHU)
 blau: Versuchsansatz im Kryostat **ohne** Wellan-Ring (durchgeführt bei der anderen Firma)

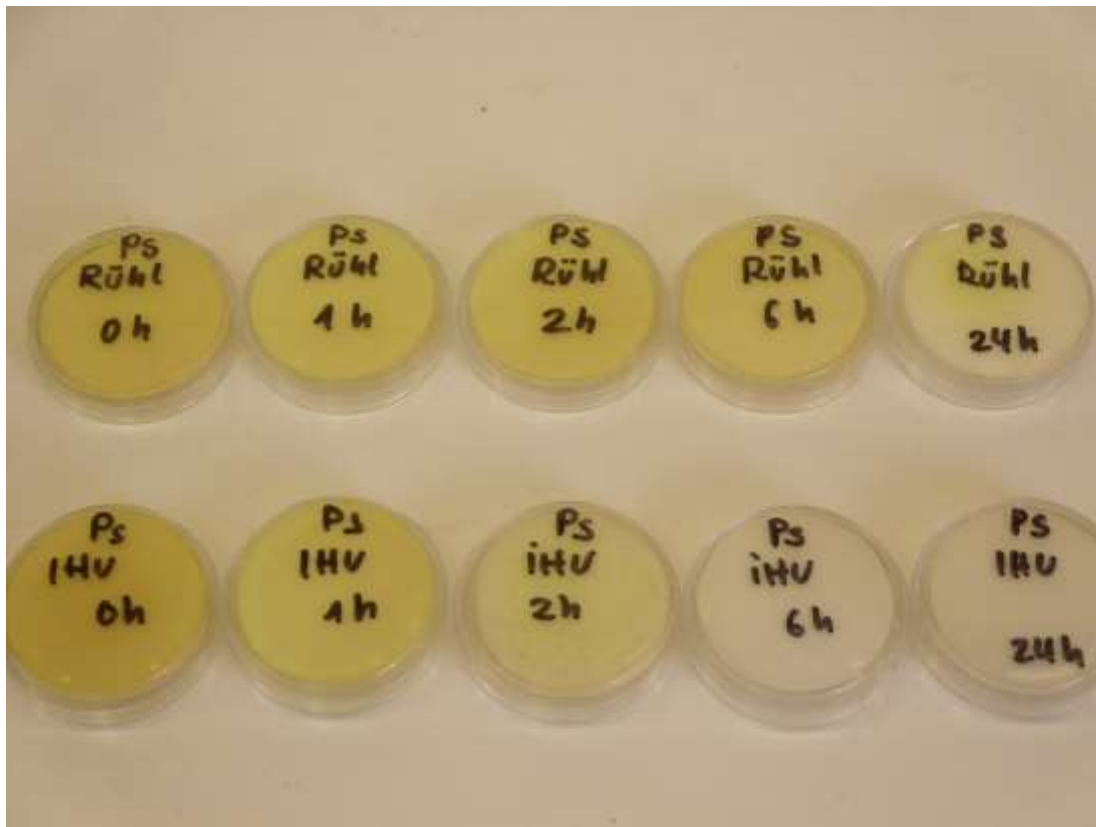


Abb. 4: Bestimmung der Keimkonzentration an *Pseudomonas aeruginosa* bei dem Versuchsansatz im Kryostaten mit und ohne „Wellan“-Ring

Jeweils 100 ml Probe wurden membranfiltriert, auf Cetrimid-Agar aufgelegt und 48 Stunden bei 36°C bebrütet.

Die Gelbfärbung zeigt *Pseudomonas aeruginosa* an.

- oben: Versuchsansatz im Kryostaten **ohne** „Wellan“-Ring bei der anderen Firma in Lollar
- unten: Versuchsansatz im Kryostaten **mit** „Wellan“-Ring im IHU, Lollar



Abb. 5: Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* mittels Malachitgrün-Bouillon bei dem Versuchsansatz im Kryostaten mit und ohne „Wellan“-Ring

Jeweils 100 ml Probe wurden in Malachitgrün-Bouillon gegeben 48 Stunden bei 36°C bebrütet. Trübung zeigt einen Verdacht auf *Pseudomonas aeruginosa* an.

rechts: Versuchsansatz im Kryostaten **ohne** „Wellan“-Ring nach 24 Stunden Versuchsdauer bei der anderen Firma in Lollar

links: Versuchsansatz im Kryostaten **mit** „Wellan“-Ring nach 24 Stunden Versuchsdauer im IHU

Beurteilung

In den oben aufgeführten Untersuchungen wurde die Wirkung von „Wellan“ auf die Testkeime *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* überprüft. Es wurden Testkonzentrationen zwischen 10 und 1000 KBE/100 ml eingestellt. Bei dieser zweiten Versuchsreihe wurde Leitungswasser mit entsprechenden Testkeimen in ein Wasserbad bzw. in einen Kryostat gefüllt. Durch die eingebaute Pumpe wurde das Wasser mit den Keimen umgepumpt. In der Anordnung im Institut wurde in die Umleitung ein Stück verzinktes Rohr eingebaut. Auf dieses Rohr wurde der „Wellan“-Ring Nr. 2 aufgesetzt. Parallel zu dieser Anordnung wurde am anderen Ende von Lollar bei einer anderen Firma (ca. 2 km entfernt) der Blindversuch aufgestellt (gleicher Aufbau, aber ohne „Wellan“-Ring). Das Wasser für den Versuch wurde jeweils am Versuchsort entnommen und die Keime auch dort eingestellt.

Danach wurden nach 1, 2, 4, 7 und 24 Stunden Proben entnommen und mikrobiologisch überprüft. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die *E. coli* – Keime in der Anlage mit dem „Wellan“-Ring nach einer Stunde nicht mehr nachweisbar waren, d. h. abgetötet waren. Im Gegensatz dazu blieb die *E. coli* – Konzentration im Blindwert bei der anderen Firma im Umlauf bzw. einer Standprobe über 24 Stunden unverändert. Die Ergebnisse wurden photographisch festgehalten und die Daten graphisch dargestellt.

Bei dem zweiten Versuch, der mit dem Testkeim *Pseudomonas aeruginosa* wieder an den beiden vorgenannten Orten erfolgte, wurden die Testkeime bei 100 KBE/100ml eingestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Pseudomonaden eine etwas höhere Resistenz aufweisen. Erst nach vier Stunden wurde eine vollständige Abtötung der Keime festgestellt, nach zwei Stunden wurde bereits eine über 90-prozentige Abtötung ermittelt. In der Abbildung 4 sind die Ergebnisse in Form der Membranfiltrate von 100 ml Wasser dokumentiert. Der Ansatz mit „Wellan“-Behandlung zeigt ein Abnehmen der Pseudomonadenkonzentration (im Bild eine Abnahme des typischen gelb-grünlichen fluoreszierenden Farbstoffes), während der Blindwert unverändert hoch bleibt. Die Pseudomonaden konnten nach zwei Stunden noch erfasst werden, nach sechs Stunden waren sie nicht mehr nachweisbar.

Darüber hinaus wurde auch eine Überprüfung mit einer Anreicherungsbouillon für die *Ps. aeruginosa* (Malachitgrün-Bouillon) angesetzt. Untersucht wurden das „Wellan“-behandelte Wasser und die Blindprobe nach jeweils 24 Stunden Versuchsdauer. Das Ergebnis dieser Überprüfung zeigt, dass das „Wellan“-behandelte Wasser 100% frei von *Pseudomonas aeruginosa* war, dagegen zeigte das Wasser aus der Blindprobe Wachstum von Pseudomonaden, die Bouillon war nach der Bebrütung entsprechend verfärbt und auch trüb. Die weitere mikrobiologische Identifizierung zeigte, dass es sich bei den vermehrten Keimen auch um *Ps. aeruginosa* handelte.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser zweiten Versuchsserie wurde der „Wellan“-Ring mit *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* überprüft. Der Kontakt des Wassers mit dem „Wellan“-Ring erfolgte im Umpumpverfahren, d. h. die Wirkung dieses Ringes auf das Wasser bzw. die Keime dauerte 24 Stunden an.

Escherichia coli wurden innerhalb einer Stunde abgetötet. *Pseudomonas aeruginosa* zeigte gegenüber dem „Wellan“-Ring eine höhere Resistenz. Diese Keime konnten nach sechs Stunden vollständig abgetötet werden.



Dr. J. Prucha



Dr. W. Schulz