

UMWELT & GESUNDHEIT 00/2018

Ressortforschungsplan des Bundesministerium für
Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit

Forschungskennzahl 3716 62 209 0

Entwicklung eines sensitiven Verfahrens zum routinemäßigen Nachweis von Legionellen in Aerosolen von Verdunstungskühlanlagen

Abschlussbericht

von

Andreas Nocker, Lorenz Schulte-Illingheim, Dietmar Pütz,
Kathrin Wiede

IWW Zentrum Wasser, Mülheim an der Ruhr


Achim Hugo, Laura Welp, Oliver Sperber
Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V., Duisburg


Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
info@umweltbundesamt.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

 [/umweltbundesamt.de](https://www.facebook.com/umweltbundesamt.de)

 [/umweltbundesamt](https://twitter.com/umweltbundesamt)

Durchführung der Studie:

Institut
Straße und Hausnummer
Postleitzahl Ort
Land (Bitte nur angeben, wenn nicht Deutschland)

Abschlussdatum:

September 2018

Redaktion:

Fachgebiet XX Name des Fachgebietes
Vorname Name der Fachbegleitung

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1868-4340

Dessau-Roßlau, August 2019

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung: Entwicklung eines sensitiven Verfahrens zum routinemäßigen Nachweis von Legionellen in Aerosolen von Verdunstungskühlanlagen

Die messtechnische Erfassung von Legionellen in freigesetzten Aerosolen von Verdunstungskühlanlagen erfolgt derzeit nicht routinemäßig. Gründe dafür sind insbesondere der mit einer repräsentativen Probenahme verbundene Aufwand sowie offene Fragen bzgl. des Vorgehens bei der Probenahme und der Bewertung der so gewonnenen Daten. Dieses Projekt hatte die Zielsetzung, eine Vorgehensweise für die Beprobung von Aerosolen an Rückkühlanlagen und Vorschläge für die Eignung von diagnostischen Methoden zum möglichst sensitiven Nachweis von Legionellen in Aerosolen zu entwickeln. Die abgeleitete Probenahmestrategie basiert auf Richtlinien und Normen zur (Bio-)Aerosolprobenahme unter Verwendung eines handelsüblichen Nass-Zyklonsammlers für Immissionsmessungen. Dieser wurde zur Emissionsprobenahme technisch modifiziert und die physikalische Sammeleffizienz im Labor ermittelt. An vier industriell betriebenen Verdunstungskühlanlagen erfolgten Validierungsmessungen zur Aerosolsammlung und zum analytischen Nachweis von Legionellen. Bei mehreren Anlagen erfolgten zusätzlich die Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung der Tropfenaerosole und nachfolgend die Berechnung des Flüssigwassergehaltes im Schwaden. Die Auswertung parallel durchgeführter Emissionsmessungen mit unterschiedlichen technischen Sammlerkonfigurationen zeigte nur geringe Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Konfigurationen auf. Die Verdunstungskühlanlagen erwiesen sich als sehr unterschiedlich mit Legionellen belastet; im Tropfenaerosol dreier Anlagen wurden Legionellen nachgewiesen. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Legionellen in den Aerosolen war nur zum Teil mit der Konzentration an Legionellen im Kühlwasser erklärbar. Zur Einschätzung der Effizienz der Tropfenabscheidung wurde ein mikrobiologischer Luftbelastungsfaktor (MLBF) eingeführt, der unabhängig von der Legionellenkonzentration die mikrobiologische Belastung der Fortluft im Vergleich zu einer unbelasteten Luftreferenzprobe quantifiziert. Zudem wurde der relative Anteil von *Legionella pneumophila* an der Gesamtkonzentration an Legionellen in die Risikoklassifizierung aufgenommen.

Abstract: Development of a sensitive procedure for routine quantification of *Legionella* in aerosols of evaporative cooling systems

Legionella surveillance in aerosols released from evaporative cooling systems is currently not performed on a routine basis. The reasons lie most importantly in the challenge of taking representative samples and unanswered questions regarding the technical sampling procedure and the interpretation of obtained data. This project aimed at developing a technical approach suitable for routine aerosol sampling and at evaluating the suitability of different diagnostic methods for the sensitive detection of *Legionella* in aerosols. Aerosol sampling was performed using a commercial wet-cyclon system for immission measurements. For measuring emissions, the system was technically modified. Collection efficiency was determined in the laboratory. The sampling approach was applied to four industrial evaporative cooling systems for validation. Measurements included the assessment of particle number and size distributions and water content in mists. Results showed little difference between different sampler configurations in parallel emission measurements. The four industrial systems showed very different pathogen loads with *Legionella* being found in aerosols in three out of four systems to different degrees. The probability of finding *Legionella* in aerosols could be explained only in part with the pathogen concentration in the cooling water. A microbial air bioburden factor (MABF) was defined to assess the retention efficiency of mist eliminators to quantify the microbial concentrations in emitted air in comparison with a clean reference sample of unaffected air. Also the relative proportion of *Legionella pneumophila* of the total pool of *Legionella* was considered in the risk assessment procedure.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis.....	13
Zusammenfassung.....	15
Summary	25
1 Einleitung und Problemstellung	34
2 Stand der Wissenschaft und Technik	35
2.1 Charakterisierung von Bioaerosolen, insbes. Legionellen im Aerosol.....	35
2.2 Rückkühlanlagen und Verdunstungskühlanlagen.....	37
Bautypen von Verdunstungskühlanlagen	38
Verdunstungskühlanlagen gemäß 42. BImSchV.....	39
Funktionseinheiten und mögliche Probenahmeorte bei Verdunstungskühlanlagen	39
Tropfenaerosole und Kühlturmschwaden.....	41
2.3 Legionellen – Eigenschaften und Vorkommen	43
Luftgetragene Legionellen.....	43
Grenzwerte nach 42. BImSchV	44
2.4 Probenahme von Bioaerosolen an Rückkühlanlagen	45
Normen und Richtlinien	45
Allgemeine Anforderungen an eine Bioaerosolprobenahme gem. Richtlinienreihe VDI 4257	47
Repräsentativität der Probenahme und des ausgewählten Messquerschnittes	48
Isokinetik und Isoaxialität.....	49
Erfassung der Gasgeschwindigkeit sowie weiterer Abluftrandbedingungen	51
Bioaerosolprobenahme.....	51
Bestimmung von Konzentration und Fracht der Mikroorganismen	52
2.5 Bioaerosolsammler	52
Impaktor	53
Impinger	53
Zyklonabscheider bzw. Wet-Zyklon-Abscheider	54
3 Zielsetzung und Aufgabenstellung	55
4 Material und Methoden.....	57
4.1 Coriolis μ Bioaerosolsammler	57
Allgemeine Beschreibung.....	57
Modifikationen des Sammlers zur isokinetischen und isoaxialen Messung	58

4.2	Aerosolherzeugung im Labor	60
	Aerosolherstellung mittels Rotations-Bürsten-Generator	60
	Erzeugung von Tropfenaerosolen	60
	Aerosolherstellung mittels Zweistoffdüse (Atomizer)	61
	Aerosolcharakterisierung	61
	Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung mittels Aerosolspektrometer	62
	Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung mittels Flugzeitspektrometer	62
4.3	Charakterisierung der Sammeleffizienz des Aerosolsammlers.....	62
	Aerosolkammer zur Charakterisierung des Immissionszyklons (Probenahme aus ruhendem Gas)	63
	Aerosolkanal zur Charakterisierung des Emissionszyklons (Probenahme aus strömenden Gasen)	64
	Aerosolkanal zur Charakterisierung des Krümmers	65
	Untersuchungen zum Druckverlust und Absaugvolumenstrom	66
4.4	Modellverdunstungskühlanlage MTKKL2	67
	Aufbau der Modellanlage.....	67
	Probenahme und Versuchsablauf	68
4.5	Vor-Ort-Messungen an Anlagen in der Praxis.....	69
	Messgeräte zur Erfassung der Umgebungs- und Abluftrandbedingungen.....	69
	Wasser-und Biofilmprobeahme	69
	Aerosol-Probenahme	69
	Bestimmung des Strömungsprofils	69
	Bestimmung der Hauptströmungsrichtung.....	69
	Bestimmung der Tropfenbeladung mittels Impaktoren	70
	Gastemperatur, Gasfeuchte, Druckmessung	71
4.6	Mikrobiologische Analytik.....	72
	Messung der Gesamt- und Intaktzellzahl mittels Durchflusszytometrie	72
	Quantifizierung von <i>Legionella</i> spp. und <i>L. pneumophila</i> mittels qPCR.....	72
	Quantifizierung von <i>Legionella</i> spp. mittels Kulturverfahren	73
5	Entwicklung eines Probenahmeverfahrens für Emissions- und Immissionsmessungen	74
5.1	Bewertung des Probenahmeverfahrens für Emissions- und Immissionsmessungen	74
6	Entwicklung von Probenahmestrategien zur Aerosolmessung an Verdunstungskühlanlagen.....	80
6.1	Ableitung einer Probenahmestrategie für Emissionsmessungen.....	80
	Wahl der Probenahmeebene (Lage des Messquerschnittes)	81

Besonderheiten bei der Strömungscharakterisierung – Lokale und mittlere Geschwindigkeit sowie Strömungsrichtung	83
Besonderheiten bei der Strömungscharakterisierung – isoaxiale, isokinetische Absaugung	86
Praxisgerechtes Sammelverfahren für Bioaerosole	87
Vorgehensweise zur Emissionsmessung	87
6.2 Probenahmestrategie für Immissionsmessungen	89
Emissions-Immissionsbeziehungen	89
Modellierung der Immissionskonzentrationsverteilung im Anlagenumfeld	89
Auswahl der Anlagenparameter und Ausbreitungsbedingungen	89
Berechnungsergebnisse	91
Immissionsseitige Probenahme zum Nachweis einer anlagenbezogenen Zusatzbelastung	93
7 Entwicklung und Validierung eines Nachweisverfahrens zur Quantifizierung und lebend/tot-Unterscheidung von Legionellen	96
7.1 Entwicklung und Validierung eines Nachweisverfahrens zur Quantifizierung und lebend/tot-Unterscheidung von <i>L. pneumophila</i>	96
Literaturrecherche	96
Auswahl von Oligonukleotiden	97
Validierung der Oligonukleotid-Kombinationen	99
Optimierung von Vitalitäts-qPCR Bedingungen	101
Einfluss von Inkubationstemperatur und –dauer	102
Einfluss von Deoxycholat auf die PMA-Behandlungseffizienz	103
Einfluss von EDTA auf die PMA-Behandlungseffizienz	104
Vergleichende Beurteilung der PMA-Behandlungseffizienz	106
Vergleich von PMA mit anderen Lebendfarbstoffen	108
7.2 Validierung eines Nachweisverfahrens zur Quantifizierung von <i>Legionella</i> spp.	109
8 Erprobung der Probenahmestrategie, des Probenahmeverfahrens und des Nachweisverfahrens in der Praxis	112
8.1 Anlage A (Zellenkühlturm, Axialventilator, saugend)	112
8.2 Anlage B (Zellenkühlturm, Axialventilator, drückend)	114
8.3 Anlage C (Verdunstungskühlanlage, Naturzug bzw. optional Axialventilator, saugend)....	116
8.4 Anlage D (Zellenkühlturm, Axialventilator, saugend)	118
8.5 Anlage E – Kleinkühlturm (Axialrotor, saugend)	121
9 Mikrobiologische Erkenntnisse aus den Messungen an den Realobjekten A - D	126
9.1 Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser	126
9.2 Bakterienkonzentrationen in Kühlwasser	128

9.3	Relativer Anteil von <i>L. pneumophila</i> an der Gesamtlegionellenpopulation	129
9.4	Messung der mikrobiologischen Fracht in der Fortluft mittels Durchflusszytometrie.....	130
9.5	Legionellenkonzentrationen in den Luftproben	132
9.6	Legionellenkonzentrationen in Biofilmproben	133
10	Zusammenfassung und Ausblick	134
10.1	Status quo und Projektanforderungen	134
10.2	Probenahme von Bioaerosolen, speziell Legionellen im Aerosol aus Verdunstungskühlanlagen	134
10.3	Kultivierung und qPCR – Erkenntnisse und Anwendbarkeit für die Praxis	135
10.4	Vorschlag für eine qPCR basierte Risikomatrix	137
10.5	Vorschlag für einen mikrobiologischen Belastungsfaktor in der Fortluft	138
10.6	Ausblick und Forschungsbedarf	139
	Forschungsbedarf	140
11	Quellenverzeichnis	143
A	Anhang	148
A.1	Aerosolprobenahme	148
A.1.1	Veröffentlichungen zu Messkampagnen an Verdunstungskühlanlagen bzw. unter Verwendung des Coriolis-Sammlers	148
A.1.2	Messpunkte und Probenahmecharakteristik, Anlagenstandorte A bis D.....	149
A.1.3	Schema: Beprobung der Aerosolphase am Anlagenstandort.....	150
B	Anhang	151
B.1	Zum Anhang B gehörig.....	151
B.1.1	Zum Anhang B gehörig.....	151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Rundkühlturm: Naturzug-Nasskühlturm (links) und Kühlturm mit drückend angeordnetem Ventilator (rechts).....	42
Abbildung 2:	Serienkühlturm in Zellenbauweise mit saugend angeordnetem Ventilator.....	42
Abbildung 3:	Kompakte Verdunstungskühlanlage.....	42
Abbildung 4:	Auswirkung einer anisokinetischen Probenahme auf Partikel großer Trägheit.....	50
Abbildung 5:	Standard Biostage Impaktor (links), Impaktorprinzip (rechts) .	53
Abbildung 6:	Impinger BioSampler	54
Abbildung 7:	Coriolis μ Bioaerosolsammler.....	57
Abbildung 8:	Funktionsweise des Coriolis μ Bioaerosolsammlers der Firma Bertin Instruments.....	58
Abbildung 9:	Coriolis μ Sammler: Krümmer und Düsensatz.....	59
Abbildung 10:	Aerosolgenerator nach dem Sinclair-La-Mer Prinzip	61
Abbildung 11:	Anzahlgrößenverteilung des mittels Inhalator erzeugten Tropfenaerosols.....	61
Abbildung 12:	Aerosolkammer	63
Abbildung 13:	Versuchsaufbau zur Fraktionsabscheidegradmessung mit Feststoffaerosol aus strömenden Gasen.....	64
Abbildung 14:	Fraktionsabscheidegrad des Krümmers	66
Abbildung 15:	Druckverlust Zyklonabscheider	67
Abbildung 16:	Modellkühlturm MTKKL 2.....	68
Abbildung 17:	Strömungscharakterisierung mittels Fähnchenmessung	70
Abbildung 18:	Tropfenmesssonde	70
Abbildung 19:	Fraktionsabscheidegradmessung Zyklonsammler, ruhendes Gas	76
Abbildung 20:	Fraktionsabscheidegradmessungen, strömendes Gas	77
Abbildung 21:	Fraktionsabscheidegradmessungen, Ansaugkrümmer, Beaufschlagung mit DEHS.....	77
Abbildung 22:	Zugänglichkeit, Kühlturmkrone und Rieselebene Naturzug-Kühlturm	82
Abbildung 23:	Zugänglichkeit, Zellenkühlturm	83
Abbildung 24:	Typisches Geschwindigkeitsprofil, Zellenkühlturm mit saugend angeordnetem Rotor im Diffusor	85
Abbildung 25:	Ausbreitungscharakteristik, Naturzug-Kühlturm.....	92
Abbildung 26:	Ausbreitungscharakteristik, Zellenkühlturm	92
Abbildung 27:	Berechnete quellbezogene Verdünnungsfaktoren	93
Abbildung 28:	Lage der Forward Primer	98
Abbildung 29:	Schematische Vorgehensweise bei der PCR-Etablierung.....	99
Abbildung 30:	Spezifitätstest von Oligonukleotidkombination F2/R1.....	100

Abbildung 31:	qPCR Amplifikation verschiedener <i>L. pneumophila</i> mit der F2/R1 Primer Kombination	101
Abbildung 32:	qPCR Signalunterdrückung von hitzebehandelten <i>L. pneumophila</i>	102
Abbildung 33:	Effekt der PMA Inkubationstemperatur und Inkubationszeit	103
Abbildung 34:	Effekt von Deoxycholat auf die qPCR Signalunterdrückung...	104
Abbildung 35:	Effekt von EDTA auf die qPCR Signalunterdrückung.	105
Abbildung 36:	Effekt von EDTA auf durchflusszytometrische Signale	106
Abbildung 37:	Vergleich des neu entwickelten Verfahrens mit dem AFNOR-zertifizierten	107
Abbildung 38:	Vergleich verschiedener Lebendfarbstoffe	108
Abbildung 39:	Vergleich BioRad iQ-Check® vs. PrimerDesign™ Ltd. Legionella_spp.....	110
Abbildung 40:	Vergleich ISO 11731-2017 vs. PrimerDesign™ Ltd Legionella_spp.....	111
Abbildung 41:	Aerosolprobenahme, Anlage A.....	113
Abbildung 42:	Aerosolprobenahme Anlage B.....	114
Abbildung 43:	Tropfenmessung mittels Impaktionssonde, Anlage B	116
Abbildung 44:	Strömungsprofil und Probenahme, Anlage C, Messebene oberhalb der Verrieselungsrinnen.....	118
Abbildung 45:	Aerosolprobenahme, Anlage D	120
Abbildung 46:	Tropfenmessung mittels Impaktionssonde, Anlage D.....	121
Abbildung 47:	Grafische Darstellung der Strömungsgeschwindigkeit für die Messebenen 0 und 1 des Kleinkühlturms	121
Abbildung 48:	Darstellung der Rotationsströmung am Auslass des Kleinkühlturms.....	122
Abbildung 49:	Umlaufwasser und Rieselwasser der mobilen Kühlanlage nach Zugabe von Fluorescein in einer Konzentration von 0,05 g/L	122
Abbildung 50:	Aerosolprobenahme am Kleinkühlturm.....	123
Abbildung 51:	Ergebnisse der Keimzahlbestimmung im Umlaufwasser und in Aerosolproben des Modellkühlturms mittels Durchflusszytometrie	125
Abbildung 52:	Legionellenkonzentrationen mittels kultureller Bestimmung und qPCR	127
Abbildung 53:	Relativer Anteil von <i>L. pneumophila</i> in Kühlwasser	129
Abbildung 54:	Bakterien im Fortluftbereich von Anlage A	130
Abbildung 55:	Beispiel einer neuen qPCR-basierten Risikomatrix für Kühlwasser.....	137
Abbildung 56:	Beispiel einer Risikoklassifizierung anhand des mikrobiologischen Luftbelastungsfaktors (MLBF)	139
Abbildung 57:	Mögliches Vorgehen bei Gefährdungsbeurteilung von Verdunstungskühlanlagen.....	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Prüf- und Maßnahmewerte für die Legionellenkonzentration gem. 42. BImSchV [BUN17]	45
Tabelle 2:	VDI-Richtlinienfamilien im Zusammenhang mit der Erfassung und Bewertung von luftgetragenen Mikroorganismen und Bioaerosolen an Verdunstungskühlanlagen	46
Tabelle 3:	Düsendurchmesser und resultierende Gasgeschwindigkeit	59
Tabelle 4:	Gemessene Geschwindigkeiten zur Ermittlung des realen Volumenstroms	65
Tabelle 5:	Eingesetzte Messgeräte zur Erfassung der Umgebungs- und Abluftrandbedingungen	71
Tabelle 6:	Volumenstrommessung Zyklonsammler	75
Tabelle 7:	Absaugleistung des Absauggebläses für den modifizierten Aerosolsammler incl. Krümmer	75
Tabelle 8:	Absaugleistung des Absauggebläses für den modifizierten Aerosolsammler incl. Krümmer	75
Tabelle 9:	Anforderungen an eine (Bio-)Aerosolprobenahme bei Rückkühlanlagen	81
Tabelle 10:	Schichtungsstabilitäten und Windgeschwindigkeiten	90
Tabelle 11:	Quellparameter der Emissionsquellen der Modellierungsrechnung	91
Tabelle 12:	Legionellenkonzentration in der Sammelflüssigkeit bei emissions- und immissionsseitiger Aerosolprobenahme	95
Tabelle 13:	Oligonukleotide zum Nachweis von <i>L. pneumophila</i>	97
Tabelle 14:	Kombinationen aus Primern und Sonde zur Detektion von <i>L. pneumophila</i>	98
Tabelle 15:	Absorptionswerte für Aerosol- sowie Umlaufwasserproben als Maß der Fluorescein-Konzentration	123
Tabelle 16:	Mikrobiologische Parameter für Kühlwasser	128
Tabelle 17:	Mikrobiologische Parameter für Luftproben	131
Tabelle 18:	Durchschnittliche Konzentrationen von Legionellen in Luftproben	132
Tabelle 19:	Legionellenkonzentrationen in Biofilmproben	133

Abkürzungsverzeichnis

A2	Teststaub, Arizona Fine Dust 2
AK	Ausbreitungsklasse
APV	LAGA-Ausschuss für Produktverantwortung; FV
BGBI	Bundesgesetzblatt
BImSchG	Bundes-Immissionsschutzgesetz
BImSchV	Verordnung zum Bundes-Immissionsschutzgesetz
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
BMUB	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit
BV Glas	Bundesverband Glasindustrie e.V., Düsseldorf
DEHS	Di-Ethyl-Hexyl-Sebacat
Destatis	Statistisches Bundesamt, Wiesbaden
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLMB	Deutsches Lebensmittelbuch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN	Europäische Norm, verabschiedet vom Europäischen Normungsgremium
FAG	Fraktionsabscheidegrad
GDB	Genossenschaft Deutscher Brunnen e.G., Bonn
GfK	GfK SE, Nürnberg
ggü.	gegenüber
GU	Genomeinheiten
GVM	GVM Gesellschaft für Verpackungsmarktforschung mbH, Mainz
GZZ	Gesamtzellzahl
ISO	International Standardisation Organisation, Internationales Normungsgremium
KBE	Koloniebildende Einheiten
KT	Kühlturm
kW	Kilowatt, Leistungseinheit (10^3 W)
LAGA	Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Abfall
Min	Minuten
MLBF	Mikrobiologischer Belastungsfaktor
mm	Millimeter (10^{-3} m)
Möve	Mehrweg- und ökologisch vorteilhafte Einweggetränke
MW	Megawatt, Leistungseinheit (10^6 W)
N, n	Anzahl
NK	Naturzug-Kühlturm
Nm	Nanometer (10^{-9} m)
NZ	Naturzug-Kühlturm

A2	Teststaub, Arizona Fine Dust 2
övE	ökologisch vorteilhafte Einweggetränke
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PMA	Propidium Monoazid
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
UBA	Umweltbundesamt
UFOPLAN	Umweltforschungsplan des UBA
v. H.	Von Hundert
VdF	Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V., Bonn
VDI	Verein Deutscher Ingenieure e.V., Düsseldorf
VerpackV	Verpackungsverordnung
VKA	Verdunstungskühlanlage
Vol.Strom	Volumenstrom
v-qPCR	Viability-qPCR
WGS	Windgeschwindigkeit
ZK	Zellenkühlturm, Serienkühlturm
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)

Zusammenfassung

Verdunstungskühlanlagen dienen der Abführung von Wärmelasten in einer Vielzahl von technisch-industriellen Systemen. Die Kühlwirkung beruht auf der Verdunstung von versprühtem oder verrieseltem Wasser. Eine damit verbundene hygienische Konsequenz kann die Freisetzung von Legionellen mit dem Aerosolaustrag sein, falls diese Bakterien im Kühlwasser aufgrund günstiger Lebensbedingungen (Wärme, Feuchtigkeit und Nährstoffe) hohe Konzentrationen erreichen und die Freisetzung von Aerosolen nicht ausreichend unterbunden wird. Nach wiederholten Legionellenepidemien wurde in verschiedenen Fällen ein Zusammenhang zwischen Infektionsereignissen und Rückkühlanlagen hergestellt [1]. Daher unterliegen seit 2017 Kühltürme, Verdunstungskühlanlagen und Nassabscheider den Überwachungserfordernissen der 42. Bundesimmissionsschutzverordnung (42. BImSchV). Die hier gestellten Überwachungs- und Hygieneanforderungen differenzieren je nach Anlagenarten und -größe. An Naturzugkühltürme als Verdunstungskühlanlagen mit einer typischen Leistung > 200 MW werden andere Anforderungen gestellt als an kleinere Verdunstungskühlanlagen. Grundlage der Beurteilung des hygienischen Zustandes einer Anlage ist nach 42. BImSchV die Legionellenkonzentration im Umlaufwasser, da bisher kein geeignetes Sammel- und Nachweisverfahren für Legionellen in Luftproben aus Verdunstungskühlanlagen standardisiert vorliegt. Die Legionellenkonzentration des Kühlwassers erlaubt jedoch nur eine indirekte Risikoabschätzung und nicht zwangsläufig Aussagen über die Legionellenkonzentration in der Fortluft. Dem Aerosolpfad kommt bei diesen Anlagen aber im Hinblick auf eine potentielle Legionellenfreisetzung und -gefährdung eine besondere Bedeutung zu.

Ziel dieses Projektes war daher die Erarbeitung einer systematischen und standardisierten Vorgehensweise sowie der dazugehörigen Methodik, die eine routinemäßige Überwachung von Luftproben von Verdunstungskühlanlagen ermöglicht. Die Arbeit beinhaltete folgende konkrete Teilziele:

- (1) die Bewertung des Probenahmeverfahrens und Erarbeitung von Vorschlägen für ein praxisingerechtes Probenahmeverfahren
- (2) die Optimierung des Probenahmeverfahrens für Emissions- und Immissionsmessungen inkl. Entwicklung eines Prototyps für die Aerosolsammlung
- (3) die Entwicklung von Probenahmestrategien für Emissions- und Immissionsmessungen an Verdunstungskühlanlagen
- (4) die Entwicklung und Validierung eines schnellen Nachweisverfahrens zur Quantifizierung und Lebend/Tot-Unterscheidung von Legionellen. Damit sollten auch die lebenden, aber nicht-kultivierbaren (VBNC) Legionellen nachgewiesen werden.

Messobjekt Verdunstungskühlanlage und Aerosolfreisetzung

Rückkühlanlagen können anhand technisch-konstruktiver Kriterien unterschieden werden. Ein zentrales technisches Unterscheidungsmerkmal stellt die Betriebsweise als Trocken- oder Nasskühlturm dar. Bei Nasskühltürmen oder Verdunstungskühlanlagen hat das zu kühlende Umlaufwasser direkten Kontakt zur Umgebungsluft und die Wärmeabfuhr erfolgt größtenteils durch Verdunstungseffekte. In Bezug auf die Freisetzung legionellenhaltiger Aerosole kommt diesen Anlagen eine besondere Bedeutung zu, sie stehen daher im Fokus der Arbeiten dieses Forschungsvorhabens. Die in der 42. BImSchV verwendete begriffliche Unterscheidung von Kühltürmen und Verdunstungskühlanlagen wird im vorliegenden Bericht nicht weiter vorgenommen, hier wird übergreifend der Begriff Verdunstungskühlanlagen verwendet.

Treibende Kraft der erforderlichen Luftkonvektion innerhalb der Verdunstungskühlanlage kann entweder ein Naturzug innerhalb des Kühlturbauwerks oder ein drückend oder saugend angeordneter Ventilator sein. Weitere zentrale Einbauten mit Bedeutung für das Emissionsverhalten der Anlagen sind Sprühdüsen, Rieselkörper und Tropfenabscheider. In der Düsenebene wird das warme Kühlwasser über den Querschnitt des Kühlturms verteilt. Ein sehr fein verteiltes Tropfenaerosol verbessert dabei den Wärmeübergang, kann aber auch bei Mitriß der Tropfen mit der ausströmenden Luft zu hohen Wasserverlusten führen. Bei großen Anlagen kann eine Flüssigkeitsverteilung auf die Rieselkörper auch mittels überlaufender Rinnensysteme erfolgen. Verrieselungseinbauten unterhalb der Düsenebene dienen der Erzeugung einer möglichst großen Wärmeaustauschfläche. Sie sind typischerweise als strukturierte Körper aus parallelen Kunststofflamellen ausgeführt. Oberhalb der Düsenebene kann ein Tropfenabscheider, meist ebenfalls bestehend aus Kunststoff-Lamellenpaketen, angeordnet sein. In diesem Wabenkörper findet eine mehrfache Umlenkung der wassertropfenhaltigen Aerosolströmung statt. In Abhängigkeit von ihrer Größe können diese Tropfen aufgrund von Trägheitseffekten an den Lamellenwandungen abgeschieden werden und in Richtung der Rieselkörper ablaufen. Saugend angeordnete Ventilatoren sind meist als Axialrotoren mit vertikaler Achse in einem Diffusor knapp unterhalb der Kühlturmmündung angeordnet. Bei größeren Anlagen kann sich der Diffusor über zehn oder mehr Meter Bauhöhe erstrecken, bei kleineren Anlagen oder in Serie aufgestellten Zellenkühltürmen besitzt er eine Bauhöhe von etwa einem bis drei Metern.

Bei größeren Kühltürmen bzw. Verdunstungskühlanlagen ist die zuoberst angeordnete Ebene der Sprühdüsen, Rieselkörper und ggf. Tropfenabscheider für Wartungszwecke zugänglich und i.d.R. in Teilen begehbar. Diese Ebene steht damit grundsätzlich für eine Probenahme zur Verfügung. Die Kühlturmkrone ist ggf. per Lichtgitter-Treppe und umlaufenden Doppelbrüstungs-Steg direkt zugänglich. Zellenkühltürme sind oftmals als Betonbaukörper ausgeführt, auf den die Diffusoren aufgesetzt werden. Das Dach dieser Baukörper ist oftmals ganz oder in Teilen begehbar und bietet damit den Zugang zur Diffusorkrone als eigentliche Messebene.

Die Durchführung von Emissionsmessungen von mikrobiellen Luftverunreinigungen wird in der Richtlinienreihe VDI 4257 beschrieben. Formulierten Anforderungen an eine Bioaerosolprobenahme orientieren sich an den Vorgaben an eine Partikelprobenahme aus geführten Strömungen, wie sie beispielsweise in der Richtlinie VDI 2066 Blatt 1 bzw. der Norm DIN EN 15259 beschrieben sind. Anforderungen an eine Probenahme aus geführten Quellen wie Abgaskanälen unterscheiden sich von denjenigen für großvolumige, meist langsam ausströmende Quellen, sogenannte Flächenquellen bzw. diffuse Quellen.

Bei den aus dem Kühlturm austretenden Kühlturmschwaden handelt sich um ein Gemisch von Luft, Wasserdampf und Flüssigwasser-Tropfen. Die austretenden Tropfen werden je nach Herkunft als Primär-, Sekundär- oder Rekondensationstropfen bezeichnet (Wurz et al. 2016). Aufgrund typischer Wechselwirkungsmechanismen mit Kühlturmeinbauten können diese Tropfenarten spezifische Konzentrationen an Mikroorganismen aufweisen. Während die Konzentration in den bei der Wasserverteilung erzeugten Primärtropfen derjenigen des Kühlwassers entspricht, können durch Wechselwirkung mit Einbauten und Wandungen erzeugte Sekundärtropfen davon abweichende Konzentrationen an Mikroorganismen enthalten. Aufgrund ihres Entstehungsprozesses als rekondensierende Wasserdampfanteile tragen Rekondensationstropfen keine Legionellen, ggf. lediglich die als Kondensationskerne zugrundeliegenden Primär- bzw. Sekundärtropfen. Für den Primär- und Sekundärtropfengehalt wird als typischer Wert ca. $0,2 \text{ g/m}^3$ Schwaden angegeben. Legionellen sind in der Tropfenfraktion mit Durchmessern größer ca. $1 \text{ }\mu\text{m}$ zu erwarten.

Probengewinnung und erwartete Legionellenkonzentration in der Probe

Bei einer Probennahme mit einem angenommenen Volumenstrom von 300 l/min über 10 min werden 3 m³ Schwaden erfasst, was theoretisch 0,6 g Flüssigwasser entspricht. Bei Erreichen des Maßnahmenwertes von 10.000 KBE/100 ml *Legionella* spp. im Nutzwasser entspricht dies rein rechnerisch einer Anzahl von 60 KBE *Legionella* spp. in der Sammelprobe, hier angenommen als 15 ml. Unter der Annahme, dass für den kulturellen Nachweis mittels Direktansatz ein Volumen von 1 ml (aufgeteilt auf 2 Nährmedienplatten mit jeweils 0,5 ml Probe) ausplattiert würde, ergibt sich kumulativ auf den beiden Nährmedienplatten eine Gesamtzahl von 4 KBE. Damit ließen sich gemäß UBA-Empfehlung:2017-06 zumindest semiquantitative Ergebnisse erzielen. Bei niedrigeren Legionellenkonzentrationen im Nutzwasser oder einer biologischen Sammeleffizienz ergeben sich entsprechend niedrigere Werte mit qualitativem Aussagecharakter. Eine Erhöhung der Anzahl KBE kann beispielsweise durch eine Verlängerung der Sammelzeit oder Aufkonzentration der Probe erreicht werden. Ein dadurch verursachter Sammelstress sollte in der Auswertung berücksichtigt werden.

Probenahmeverfahren

Basierend auf den Ergebnissen eines früheren UFOPLAN-Vorhabens kam im Vorhaben als Sammelgerät ein für Immissionsmessungen vorgesehener Nass-Zyklonsammler (Coriolis μ) zum Einsatz. Zur isokinetischen, isoaxialen Emissionsprobenahme z. B. aus vertikalen Strömungen wurde dieser technisch modifiziert und die physikalische Sammeleffizienz des modifizierten Sammlers im Labor durch Beaufschlagung mit Teststaub sowie Tropfenaerosol ermittelt. In Bezug auf eine emissionsseitige Probenahme können ausgehend von den durchgeführten Laboruntersuchungen und den vorangehend dargestellten konzeptionellen Betrachtungen an Verdunstungskühlanlagen folgende Aussagen zur Eignung des Nass-Zyklonsammlers getroffen werden:

- (1) Aerosolprobenahme und Sammelverluste: Der im Lieferzustand zur Immissionsmessung aus einem ruhenden Gas vorgesehene Sammler wurde zur gerichteten Probenahme aus einem strömenden Gas um entsprechende Probenahmeelemente ergänzt und diese auf Anwendungseignung und Funktionsfähigkeit erfolgreich geprüft. Bei Verwendung des angefertigten Ansaugdüsenatzes und evtl. des Krümmers lassen sich vertikale sowie horizontale Strömungen unter normgerechten Bedingungen isoaxial und isokinetisch beproben. Die bei der Konstruktion verwendeten Klemm-Dichtverbindungen unter Verwendung gummiartiger Kunststoffringe ohne direkten Kontakt zum Aerosolstrom ermöglichen eine im Praxisbetrieb sowohl mechanisch ausreichend feste als auch gasdichte Verbindung der Bauteile Ansaugdüse, Krümmer und Sammler-Einlass.
- (2) Volumenstrom: Der im Vergleich zu anderen Sammlern hohe Absaugvolumenstrom von bis zu 300 l/min ermöglicht eine Probenahme einschließlich Doppelbestimmung in einer praktikablen Zeitdauer (Probenahmedauer < 30 min).
- (3) Physikalische Sammeleffizienz / Fraktionsabscheidegrad: Der Sammler weist in der Immissionsausführung mit schlitzförmigem Einlass einen für Feststoffe in Laboruntersuchungen bestimmten partikeldurchmesserabhängigen Fraktionsabscheidegrad von über 60 % bei Durchmesserklassen > 2 μ m und > 50 % bei Durchmesserklassen > 1 μ m auf (Absaugvolumenstrom 200 l/min und größer). In der Ausführung mit Absaugdüse und Krümmer weist der Abscheider eine gute Abscheideeffizienz von über 80 % für Partikel mit Durchmessern von 1 μ m und über 95 % für Partikel mit Durchmessern > 2 μ m auf. Es kann damit angenommen werden, dass bei einem Absaugvolumenstrom von 300

l/min mit allen Konfigurationen des Sammlers eine zur quantitativen Aerosolsammlung ausreichend hohe Sammeleffizienz für Legionellenaerosole mit einem erwarteten aerodynamischen Durchmesser $> 1 \mu\text{m}$ erreicht wird. Der mittlere Abscheidegrad des zur Probenahme aus vertikaler Strömung angesetzten Krümmers liegt dabei um eine Dekade höher als die des Zyklons ($d_{50} = 15 \mu\text{m}$ anstelle 1 bis $2 \mu\text{m}$)

- (4) **Biologische Sammeleffizienz**
Bei der Bioaerosolsammlung mit einem Nass-Zyklonsammler kann von einer im Vergleich zu anderen Sammelverfahren geringen Schädigung bzw. „Sammelstress“ für die Bakterien ausgegangen werden (UFOPLAN-Projekt „Nachweis von Legionellen in Luftproben aus Rückkühlwerken“). Gemäß der Ergebnisse von Vergleichsmessungen ist die biologische Sammeleffizienz höher als bei einem Impaktor, allerdings etwas geringer als beim Impinger.
- (5) **Flüssigkeitsmanagement:** Verdunstungsverluste der Sammelflüssigkeit im Verlaufe der Sammlung lassen sich mithilfe einer Schlauchpumpe aus einem verbundenen Vorratsgefäß ausgleichen, so dass die Fluidmenge im Sammelgefäß konstant gehalten und die Zellaustrocknung vermieden werden kann.
- (6) Eine Absaugung kann mit dem zugehörigen Absauggebläse oder einem externen regelbaren Sauggebläse erfolgen. Letzteres ermöglicht die Entkoppelung von Sammler und Absaugaggregat über eine entsprechende Schlauch- oder Rohrverbindung. In den Schwaden an der Kühlturmmündung kann der Einsatz eines externen Absaugaggregates ggf. technisch sinnvoll sein. Die Entkopplung ermöglicht es weiter, den relativ leichten Zyklonsammler an einem Galgen befestigt räumlich variabel über der Strömung zu platzieren und das relativ schwere Absaugaggregat neben der eigentlichen Mündungsfläche zu betreiben.

Der verwendete Nass-Zyklonsammler kann in der modifizierten Form vom Grundsatz her als geeignetes Gerät zur Erfassung von legionellenhaltigen Bioaerosolen am Auslass von Rückkühlanlagen angesehen werden.

Anlagenbezogene Immissionskonzentration

Emissionen aus Verdunstungskühlanlagen können aufgrund ihres thermischen Auftriebs und oftmals hohen Volumenstroms große Reichweiten erreichen. So traten Erkrankungsfälle von Legionellose auf, die mit Emissionen ausgehend von Verdunstungskühlanlagen in bis zu zehn Kilometer Entfernung in Verbindung gebracht werden (Exner 2015, S. 75). Neben quellbezogenen Größen beeinflussen meteorologische und geographische Randbedingungen die Transportweite und -richtung und damit die Verdünnungsrate bis zum betrachteten Aufpunkt. Für Bioaerosole sind gegenüber staubförmigen Aerosolen weitere Randbedingungen zu beachten, beispielsweise Tropfenverdunstung oder Luftfeuchtigkeit (VDI 4251 Blatt 3) sowie die Veränderung der Lebensfähigkeit von Mikroorganismen u. a. aufgrund der UV-Strahlungsintensität (Janicke, 2015). Für die quellbezogene Auswertung von Immissionsmessungen sind daher Kenntnisse der Emissions-Immissionsbeziehungen bedeutsam. Mittels Ausbreitungsrechnungen lässt sich ausgehend von Quellparametern einer Anlage sowie Ausbreitungsparametern der Transport in der Atmosphäre und die resultierende Zusatzbelastung zur Immissionskonzentration für Aufpunkte im Umfeld der Anlage rechnerisch abschätzen und ggf. eine erforderliche Probenahmedauer einer Immissionsmessung abschätzen.

Wird ein Aerosol ausgehend von einer Anlage beispielsweise entsprechend obigem Beispiel freigesetzt, stehen für eine Immissionsmessung nach atmosphärischer Ausbreitung und

Verdünnung um ca. den Faktor 10^3 unter gleichen Probenahmebedingungen rechnerisch nur ca. 0,004 KBE Legionellen/mL Probenflüssigkeit für die Laboranalyse zur Verfügung. Auch eine Erhöhung des gesammelten Aerosolsammelvolumens in gewissen Grenzen führt zu keiner signifikanten Konzentrationserhöhung in der Probe. Damit ist auch der Nachweis eines eindeutigen Anlagenbezuges durch die Immissionsmessung unter den angenommenen Bedingungen erschwert. Weitere Faktoren, wie die Beeinflussung der Aktivität durch solare Einstrahlung oder Austrocknung können die Konzentration weiter verändern. Dies steht im Widerspruch zu den nachgewiesenen Legionelloseerkrankungen im Umfeld von Verdunstungskühlanlagen, bei denen sich wahrscheinlich höhere Konzentrationen an Legionellen in den Umgebungsaerosolen befunden haben müssen. Lokal ungünstige Ausbreitungsbedingungen durch z. B. niedrige Mischungsschichthöhen oder Downwasheffekte sowie deutlich höhere Emissionskonzentrationen können hier mögliche Ursachen darstellen. Eine detaillierte Ausbreitungsrechnung unter Abbildung lokaler Ausbreitungsverhältnisse und der atmosphärischen Ausbreitungsbedingungen zum betrachteten Zeitpunkt können eine wertvolle Hilfe bei der Quellzuordnung darstellen.

Analytisches Nachweisverfahren

Das Projekt beinhaltete die Entwicklung eines geeigneten, auf quantitativer PCR (qPCR) basierenden Nachweisverfahrens, das die Quantifizierung und eine möglichst gute Unterscheidung zwischen membranintakten und geschädigten Legionellen ermöglicht. Trotz der Vielzahl von qPCR Reaktionen, die für den spezifischen Nachweis von *Legionella pneumophila* und *Legionella* spp. beschrieben sind, fehlen Detektionssysteme, die eine gute Lebend-Tot-Unterscheidung ermöglichen würden z. B. durch Kombination mit einem Lebendfarbstoff (hier gewählt: Propidium Monoazid, PMA). Eine wichtige Voraussetzung für die gute Unterdrückung der Signale von toten Bakterien ist die Vervielfältigung von längeren Gensequenzen, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Amplifikation von Tot-Signalen unterbunden wird. Die große Mehrheit der existierenden Nachweise basiert jedoch auf der Amplifikation von Sequenzen im Bereich bis 100 – 200 bp. Aus diesem Grund bestand die Herausforderung in der Entwicklung bzw. Identifikation von qPCR Reaktionen, die längere Gensequenzen vervielfältigen. Daneben galt es, geeignete Inkubationsbedingungen zu identifizieren, um die Behandlung mit dem Lebendfarbstoff möglichst effizient zu gestalten.

Dazu erfolgte (A) die Entwicklung eines neuen qPCR Nachweises für *L. pneumophila* sowie (B) der Einsatz eines in der Literatur beschriebenen, kommerziell angebotenen Nachweises für *Legionella* spp.:

- (A) *L. pneumophila*: Geeignete Oligonukleotide wurden auf der Basis einer Literaturrecherche ausgewählt bzw. neu entworfen. Unter vier möglichen Oligonukleotid-Kombinationen mit Amplikonlängen von ca. 600 bp wurde eine ausgewählt, die als am meisten spezifisch eingestuft wurde. Mit dieser Primer-Proben-Kombination wurden in einem Inklusivitätstest erfolgreich sieben verschiedene *L. pneumophila* Stämme nachgewiesen. Gleichzeitig wurden in einem Exklusivitätstest keine Amplifikationsprodukte von 17 Nicht-*L. pneumophila* Stämmen erhalten. Nach Optimierung verschiedener Behandlungsparameter wurden für die PMA-Behandlung folgende Inkubationsbedingungen definiert: Inkubation der Probe mit 20 – 50 μM PMA (Endkonzentration, abhängig von der Farbstoffzehrung durch die Probe) bei 45 °C für 10 min in Anwesenheit von 2 mM EDTA. Die anschließende Lichtexposition erfolgte mit einem LED-basierten Gerät von einem kommerziellen Anbieter. Im Vergleich mit dem iQ-Check® Real-Time PCR Kit für *L. pneumophila* war das Resultat eine doppelt so starke Unterdrückung von Totsignalen auf einer logarithmischen Skala.

- (B) *Legionella* spp.: in einer Literaturstudie wurde eine Studie identifiziert, die ein kommerzielles *Legionella*_spp (all species) genesig® Advanced Kit der Firma PrimerDesign™ Ltd. (basierend auf der Amplifikation einer Gensequenz von fast 400 bp) in Kombination mit PMA testete. Die Unterdrückung von Signalen toter Legionellen wurde als deutlich effizienter beurteilt als die mit dem iQ-Check® Real-Time PCR Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH) für *Legionella* spp. Bei Anwendung des Kits auf verschiedene Kühlwasserproben in Kombination mit kultureller Analytik nach DIN EN ISO 11731 wurde jedoch befunden, dass die Inklusivität des Kits der Firma PrimerDesign™ Ltd. nicht ausreichend ist, da bei einer substantiellen Anzahl von Proben Legionellen mit dem iQ-Check® Real-Time PCR Kit und auch kulturell in hohen Konzentrationen gefunden wurden, obwohl mit dem genesig® Advanced Kit negative Resultate vorlagen. Die Herausforderung für die Entwicklung eines mit Lebendfarbstoffen kompatiblen qPCR-basierten Nachweises für *Legionella* spp. ist damit weiterhin gegeben.

Vorgehensweise zur Emissionsmessung

Um für den typischen Anlagenbetrieb repräsentative Ergebnisse zu erhalten, sollen bei einer klassischen Emissionsmessung Betriebszustände zugrunde gelegt werden, die zu charakteristischen bzw. höchsten Emissionen führen können. Bei einer Bioaerosolmessung ist diesbezüglich insbesondere der zeitliche Abstand zur letzten Bioziddosierung zu berücksichtigen. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, sollten laut Richtlinien VDI 4257 Blatt 1 bzw. VDI 2066 Blatt 1 u. a. folgende Randbedingungen an den Messpunkten erfüllt sein:

- (A) Isoaxialität: Winkel zwischen der Richtung des Probenahmestroms und der Mittelachse des Abgaskanals kleiner als 15 %
- (B) Keine negative Strömung im Messquerschnitt festgestellt werden
- (C) Verhältnis von höchster zu niedrigster Gasgeschwindigkeit im Messquerschnitt kleiner als 3:1

Die letzten drei Punkte sind laut Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 dann gewährleistet, wenn es sich um gerade Kanalabschnitte mit einer Einlaufstrecke von fünf hydraulischen Durchmessern vor und zwei hydraulischen Durchmessern hinter dem Messquerschnitt befindet. Der Abstand bis zum Auslass sollte gleichfalls mindestens fünf hydraulische Durchmesser betragen. Aufgrund der technischen Gegebenheiten muss bei der Probenahme an Verdunstungskühlanlagen oftmals von diesen Bedingungen abgewichen werden.

Als Vorgehensweise zur Emissionsmessung im Projekt werden gemäß der im Vorhaben entwickelten Vorgehensweise folgende Arbeitsschritte empfohlen (u. a. Richtlinie VDI 4257 Blatt 1, S. 13):

- (A) Festlegung der Messpunkte
Aufgrund des bei den typischen Flächengrößen der Verdunstungskühlanlagen hohen technischen und wirtschaftlichen Aufwandes erfolgt die Probenahme nach dem in Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 dargestellten vereinfachten Verfahren. Demnach wird ein geeigneter Messpunkt je Achse beprobt. Ausgewählt wird jeweils ein Punkt, an dem die gemessene Strömungsgeschwindigkeit der mittleren Geschwindigkeit am nächsten kommt. Weitere Anforderungen, welche an die Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit gestellt werden, sind zu beachten. Soll die Bioaerosolprobenahme in größerem Abstand von der Arbeitsebene erfolgen, sind ausreichend lange Messsonden erforderlich. Geeignet sind in gewissen Grenzen

Teleskopstangen bzw. Seilzug-Vorrichtungen, um eine Probenahmesonde an den gewünschten Punkt innerhalb des zu vermessenden Querschnittes zu bringen.

- (B) Messung der Strömungsgeschwindigkeit im Messquerschnitt
Orientierende Charakterisierung der lokalen Strömungsrichtung mittels Fähnchenmethode. Die Messung der Strömungsgeschwindigkeit sowie weiterer Abluftrandbedingungen, insbesondere bei saugend betriebenen Zellenkühltürmen, erfolgt raumrichtungsabhängig mit 3-facher Messpunktzahl als Netzmessung (Vorgaben des vereinfachten Verfahrens der Aerosolprobenahme in Anlehnung an RL VDI 4257 Blatt 1). Das Messgerät muss für höhere Wassertropfengehalte im Gas geeignet sein.
Ziel: Bestimmung des Strömungsprofils, Bestimmung der mittleren Strömungsgeschwindigkeit, Bestimmung der Richtungscharakteristik der Strömung
- (C) Messung des Tropfenaerosols mittels Impaktionssonde
Begleitend zur Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit und Bioaerosolsammlung wird eine Messung der Tropfengrößenverteilung bzw. Tropfenkonzentration im Aerosol als zielführend erachtet, um den Flüssigwassergehalt ermitteln zu können. Dies kann beispielsweise mit Impaktionssonden erfolgen (VDI 3679, Blatt 3).
Ziel: Bestimmung der Tropfenwasser-Fracht im Austrittsquerschnitt nach Menge und Tropfen-Anzahlgrößenverteilung
- (D) Bestimmung der Randbedingungen und Messpunkte der eigentlichen Bioaerosolprobenahme
- (E) Durchführung der Bioaerosolprobenahme: Ansaugung nach Möglichkeit in isokinetischer isoaxialer Richtung, ansonsten nach Möglichkeit in Strömungsrichtung (Vereinfachtes Verfahren in Anlehnung an RL VDI 4257 Blatt 1). Alternativ Verwendung der horizontal ansaugenden Sammlerkonfiguration.
Begleitend Gewinnung von Proben des Umlaufwassers sowie des Biofilms
- (F) Messung der Bioaerosol-Hintergrundkonzentration im Luv der Anlage (Coriolis-Immissionsaufsatz, anströmseitig der Anlage)
- (G) Bestimmung sonstiger Umgebungs- Abluft- sowie Anlagenparameter

Immissionsseitige Probenahme an realen Verdunstungskühlanlagen

Validierungsmessungen zur Aerosolsammlung und zum analytischen Nachweis konnten an vier industriell betriebenen Verdunstungskühlanlagen vorgenommen werden. Die Untersuchungen umfassten die Messung von Legionellen in Wasser-, Aerosol- und Biofilmproben der Anlagen unter Anwendung von Durchflusszytometrie, Kultivierung und qPCR. Bei verschiedenen Anlagen erfolgten zusätzlich die Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung der Tropfenaerosole und nachfolgend die Berechnung des Flüssigwassergehaltes im Schwaden. Folgende Anlagen wurden entsprechend der abgeleiteten Vorgehensweise untersucht:

Anlage A: Zellenkühlturm, Axialventilator in saugender Anordnung

Anlage B: Zellenkühlturm, Axialventilator, drückende Anordnung

Anlage C: Verdunstungskühlanlage, Naturzug bzw. optional Axialventilator, saugend angeordnet

Anlage D: Zellenkühlturm, Axialventilator in saugender Anordnung

Aerosol-Probenahme: An den untersuchten Anlagen (vgl. die Darstellung in Abschnitt 8.2) lagen der Gewinnung von Aerosolproben unterschiedliche strömungstechnische Bedingungen zugrunde, auch um die Notwendigkeit der isoaxialen bzw. isokinetischen Probenahme

abschätzen zu können. Bei Anlage D wurde der visuell und messtechnisch nachgewiesenen, durch den saugenden Rotorbetrieb hervorgerufenen Rotationsströmung dahingehend Rechnung getragen, dass die Emissionssonde um 15 Grad aus der Vertikalen gekippt gegen die Strömung gerichtet wurde. An den Anlagen B und D erfolgte zusätzlich eine Probenahme bei horizontaler Ansaugrichtung mit dem Immissionsimpinger.

Mikrobiologie, Kühlwasser: Die Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser der vier Anlagen wiesen substantielle Unterschiede auf. Die höchsten Konzentrationen wurden in der Anlage A, die geringsten in der Anlage D nachgewiesen. Die Legionellenkonzentrationen der Anlagen B und C waren vergleichbar. Beim Vergleich der kulturellen Analytik nach DIN EN ISO 11731 mit der qPCR-Analytik zeigte sich, dass bei konsekutiven Wasserproben der jeweils gleichen Anlage die qPCR Ergebnisse für *Legionella* spp. sehr reproduzierbar waren, während die kulturellen Ergebnisse zum Teil stark voneinander abwichen. Der Grund wurde vorwiegend in der im Kühlwasser vorliegenden Begleitflora gesehen, die das Wachstum von Legionellen auf den Nährmedien stark beeinflussen kann. Bei Vorliegen von Begleitflora müssen oft Ansätze mit hoher Verdünnung, d. h. kleinen Probenvolumina herangezogen werden, die mit einer hohen statischen Unsicherheit behaftet sind. Die Resultate der qPCR Diagnostik basieren dagegen auf größeren Wasservolumina (typischerweise 50 ml – 100 ml); der Einfluss der Begleitflora ist infolge der Spezifität der PCR-Amplifikation zu vernachlässigen. Die Herausforderung für die *Legionella* spp. qPCR Diagnostik liegt jedoch, wie erwähnt, in der effizienteren Unterdrückung von Signalen toter Legionellen.

Mikrobiologie, Biofilme: Biofilme wurden in den Anlagen A, C und D untersucht und waren sehr unterschiedlich mit Legionellen belastet. Die höchsten Konzentrationen mit $9,2 \times 10^6$ KBE pro 100 g Feuchtgewicht und $5,6 \times 10^{10}$ Genomeinheiten pro 100 g Feuchtgewicht wurden bei Anlage C gefunden, wo Proben innerhalb des Kühlturmes an einem Metallgeländer genommen wurden, das permanent Feuchtigkeit ausgesetzt ist.

Mikrobiologie, Aerosole: Legionellen wurden in Aerosolen der Anlagen A, B und C gefunden. Die Legionellenkonzentration war mit 25 KBE/m³ Luft am höchsten in der Fortluft bei Anlage A. In der Anlage A wurden auch die höchsten Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser nachgewiesen. In Aerosolen von Anlagen B und C, wo die Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser vergleichbar waren, wurden Legionellen in signifikanten Konzentrationen nur bei Anlage B mit durchschnittlich 6,5 KBE/m³ Luft detektiert. Bei Anlage C wies nur eine von insgesamt sechs Luftproben einen geringen Befund von einer Kolonie auf. Proben von Anlage D waren frei von kultivierbaren Legionellen. Die qPCR Resultate stimmten tendenziell mit den kulturellen Befunden überein, allerdings lagen die qPCR Ergebnisse mit einer Ausnahme unter der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der jeweiligen qPCR Reaktionen.

Aufgrund der großen Flüssigwasserbeladung und damit verbundenen hohen Anzahl zu erfassender, eher träger Aerosolpartikel mit Durchmessern bis 100 µm sollten alle im gesamten Probenahmezug abgeschiedenen Fraktionen erfasst und im Rahmen der Auswertung der jeweiligen Probe zugeschlagen werden. Dies betrifft insbesondere Emissionsmessungen mit dem Zyklonsammler und Krümmer, bei denen nicht unerhebliche Mengen Ablaufwassers anfallen können. Die Berücksichtigung von Spülproben ermöglicht es, weitere Wandanhaftungen zu erfassen. Bei Auswertung durchgeführter Wiederholungsmessungen in Bezug auf die verwendete Sammlerkonfiguration zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Messdaten. Der Vergleich der Ergebnisse einer Probenahme mit dem Immissionsaufsatz mit den oben dargestellten Ergebnissen des Emissionsaufsatzes zeigt sehr geringfügige Unterschiede der beiden Konfigurationen untereinander. Eine Veränderung der Ansaug-Orientierung um 15 Grad lieferte kein signifikant anderes Ergebnis. Tendenziell liefert der Immissionsaufsatz im direkten Vergleich etwas geringere Konzentrationen. Alle an dieser Stelle diskutierten Konzentrationen

lagen jedoch in etwa in derselben Größenordnung bzw. Log-Stufe. Eine Probenahme unter isoaxialen, isokinetischen Bedingungen in Bezug auf die vertikale Hauptströmung entspricht somit eher worst case Randbedingungen und damit tendenziell höheren Konzentrationen der Gesamtzellzahl, der Anzahl intakter Zellen als auch der kultivierbaren Legionellen. An Standort C erfolgte eine Probenahme sowohl direkt oberhalb der Tropfenabscheider als auch in deutlich größerer Höhe an der Kühlturmkrone. Es zeigte sich sowohl für die Gesamtzellzahl als auch für die Anzahl intakter Zellen eine geringe Abnahme der Zellzahlen zwischen den beiden Messorten. Ursächlich kann ein Abscheideeffekt des laufenden Rotors zwischen den beiden Messebenen sein.

Durchflusszytometrie zur Messung der mikrobiologischen Fracht in der Fortluft

Die Methodik der Durchflusszytometrie wurde als geeignet angesehen, um die mikrobiologische Fracht in der Fortluft von Verdunstungskühlanlagen zu quantifizieren. Der Einsatz dieser Technologie erlaubte die Bestimmung eines Faktors, wieweit die Bakterienkonzentration in der Fortluft der Verdunstungskühlanlage über der Bakterienkonzentration der unbeeinflussten Umgebungsluft liegt. Dieser Faktor wurde in diesem Projekt als Kenngröße eingeführt und wurde als ‚**Mikrobiologischer Luftbelastungsfaktor**‘ (**MLBF**) bezeichnet (engl. Microbial Air Bioburden Factor). Obwohl nicht spezifisch für Legionellen, gibt der Faktor an, wie viele Mikroorganismen von der entsprechenden Verdunstungskühlanlage ausgetragen werden. Der MLBF erlaubt damit Aussagen über die Effizienz des mikrobiologischen Rückhaltes und der Tropfenabscheidung. Je größer der Faktor ist, desto größer kann das davon ausgehende hygienische Risiko angesehen werden für den Fall, dass das Kühlwasser oder die Biofilme mit Legionellen belastet sind.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse des Projektes zeigen, dass bei Wasserproben die qPCR für die Quantifizierung von Legionellen eine höhere Reproduzierbarkeit aufweist als die Kultivierung. Der qPCR Nachweis ist besonders geeignet bei höheren Legionellenkonzentrationen, wie sie im Kühlwasser vorliegen. Bei den Aerosolproben mit zum Teil sehr geringen Legionellenkonzentrationen auf der anderen Seite ist die qPCR nur bedingt tauglich, da die Konzentrationen, sofern sie gemessen werden, oft unter der Nachweis- und Bestimmungsgrenze liegen. Bei Vorliegen kultivierbarer Legionellen in niedrigen Konzentrationen (wie bei den hier gemessenen Aerosolproben) weist das Kultivierungsverfahren Vorteile auf infolge seiner hohen Sensitivität. Das in diesem Projekt eingesetzte Zyklonverfahren verhindert die Austrocknung von Proben und minimiert damit den Verlust der Kultivierbarkeit. Die kulturelle Analytik sollte jedoch auf Hitze- oder Säurebehandlung der Proben verzichten, um die Kultivierbarkeit der Legionellen nicht zu beeinträchtigen. Die Unterdrückung von Begleitflora ist bei den Aerosolproben nicht nötig. Das Sammelverfahren und die abgeleitete Vorgehensweise können als geeignet zur Erfassung von legionellenhaltigen Bioaerosolen am Auslass von Rückkühlanlagen angesehen werden. Dabei ist insbesondere die differenzierte Strömungscharakterisierung in der Auslassebene sowie die quantitative Überführung von im Sammelzug abgeschiedenen Aerosoltröpfchen in die jeweilige Probe zu gewährleisten.

Ein Hauptgrund für die geringe Anwendung der qPCR Diagnostik im Kühlwasserbereich besteht – neben der fehlenden Lebend-Tot Diagnostik für *Legionella* spp. – am Fehlen einer Bewertung der daraus resultierenden Ergebnisse im Hinblick auf Grenz- und Maßnahmewerte. Es wird daher im Rahmen dieses Projektes eine auf dem Ampelsystem basierende Risikoklassifizierung vorgeschlagen. Die auf dem Ampelsystem basierende Risikoklassifizierung beruht auf bisher in Forschungs- und Beratungsprojekten gesammelten Erfahrungswerten, ist jedoch durch weitere Messungen zu validieren und zu verfeinern. Neben der absoluten Konzentration an *Legionella*

spp. im Kühlwasser wird der relative Anteil von *L. pneumophila* an der Legionellenkonzentration zur Einschätzung des hygienischen Risikos herangezogen. Die tolerierbare Konzentration von *Legionella* spp. im Kühlwasser nimmt dabei mit zunehmendem Anteil von *L. pneumophila* ab. Der Anteil von *L. pneumophila* liegt nach den bisherigen Erfahrungen typischerweise zwischen 0 % und 20 %, die Konzentrationen von *Legionella* spp. bei der Mehrheit der Kühlwasserproben im Bereich zwischen 10^5 GU/100 ml und 10^6 GU/100 ml.

Neben der Legionellenkonzentration im Kühlwasser bestimmen noch andere Faktoren die Menge der aus einer Verdunstungskühlanlage freigesetzten Legionellen. Ein wichtiger Faktor ist die Integrität und Effizienz der Tropfenabscheidung. Zur Abschätzung der Tropfenabscheidung wird der im Projekt neu entwickelte „mikrobiologische Luftbelastungsfaktor“ (MLBF) herangezogen. Auch hier wird innerhalb des Projektes eine auf dem Ampelsystem basierende Risikoklassifizierung vorgeschlagen, die es in Folgemessungen zu verfeinern gilt. Der MLBF sollte in Kombination mit der Legionellenkonzentration im Kühlwasser betrachtet werden. Je höher die Legionellenkonzentration im Kühlwasser, desto effizientere Rückhaltung ist erforderlich zur Minimierung der mikrobiologischen Aerosolbelastung.

Die hier vorgeschlagene Diagnostik bzw. Risikoeinschätzung könnte integriert werden in Anlageninspektionen von Verdunstungskühlanlagen nach § 14 BImSchV, wie sie in Fünf-Jahres-Intervallen von vereidigten Sachverständigen vorgenommen werden. Dabei könnte in folgenden Schritten vorgegangen werden:

Am Anfang der Beurteilung des vom Rückkühlwerk ausgehenden hygienischen Risikos stünde die visuelle Überprüfung der Tropfenabscheider. Sind hier keine sichtbaren Mängel gegeben, erfolgt bei sonstiger Nichtbeanstandung eine weitere Überprüfung im Routinemodus im Rahmen der 42. BImSchV. Weist der Tropfenabscheider sichtbare Mängel auf, so sind diese zu beheben. Gleichzeitig erfolgt eine Risikoklassifizierung des Kühlwassers unter Anwendung der qPCR Diagnostik und die Einschätzung nach dem Ampelsystem. Das Vorliegen hoher Konzentrationen von *Legionella* spp. bei einem entsprechenden Anteil von *L. pneumophila* hätte eine Aerosolbeprobung mit Bestimmung des MLBF sowie der kultivierbaren Legionellen in der Fortluft zur Folge.

Summary

Evaporative cooling systems serve the eduction of warmth from industrial processes into the atmosphere. For that purpose a variety of technical-industrial systems were developed. The cooling effect is based on evaporation of sprayed or irrigated water. A hygienic consequence of this process can be the release of *Legionella* with emitted aerosols if these bacteria find beneficial conditions (warm temperatures, humidity and nutrients) in the cooling water systems and if their release into the air is not sufficiently suppressed. After repeated outbreaks of legionellosis a correlation was established between infection events and cooling water systems [1]. For that reason cooling towers, evaporative cooling water systems and wet separators are subject to surveillance requirements since 2017 based on the 42th Federal Emission Control Act (42. BImSchV). The requirements herein in regard to surveillance and hygiene depend on the type of system and its size. Different requirements apply to natural draft cooling towers with a typical output of > 200 MW than to smaller evaporative cooling systems. As there are currently no standardized appropriate procedures for sampling air and for detecting legionella in those samples, the assessment of the hygienic status of evaporative cooling systems according to 42. BImSchV is based solely on the *Legionella* concentration in the cooling water. This however only allows an indirect risk assessment and not necessarily a conclusion on the *Legionella* concentration in the emitted air. Determining the concentration of *Legionella* in aerosol emissions gains special relevance for risk assessment.

This project therefore aimed at developing a systematic and standardized procedure together with the accompanying methodology that would enable the surveillance of air emissions of evaporative cooling systems on a routine basis. The work included the following specific sub-goals:

- (1) the evaluation of the sampling procedure and the development of suggestions for a procedure that can be applied in practice
- (2) the optimization of the sampling procedure for measurement of emissions and immissions including the development of an aerosol sampler prototype
- (3) the development of a sampling strategy for emission and immission measurements from evaporative cooling systems
- (4) the development and validation of a rapid detection system for quantification and live/dead-differentiation of *Legionella*. The system should include the detection of viable but non-culturable (VBNC) *Legionella*.

Evaporative cooling water systems and aerosol emissions

Evaporative cooling water systems can be distinguished based on technical criteria regarding their design. A central technical distinction criteria is the mode of operation as dry or wet cooling tower. For wet cooling towers or evaporative cooling systems the circulating water has direct contact with the surrounding air and the eduction of warmth is primarily based on evaporation effects. As these systems play a special role in regard to the release of *Legionella*-containing aerosols, they are the focal point of this research. The notional distinction between cooling towers and evaporative cooling systems is not further used in this report, the comprehensive term 'evaporative cooling system' is being used.

The driving force for the required air convection within evaporative cooling systems is either a natural draught within the construction or forced draught by a ventilator which can be positioned in either an intake (sucking) or forced draught (blowing) configuration. Other principal mountings with importance for the emission behaviour of the system include spray

nozzles, trickling materials and mist eliminators. On the nozzle level the warm water is distributed over the transverse section of the cooling system. A very finely dispersed droplet aerosol improves the transition of the warmth, but can also entail substantial water loss if water droplets are carried away by emitted air. In systems of great dimension the dispersion of the water onto the trickling filters can also take place via an overflow gutter system. Sprinkler installations below the level of the nozzles serve to maximize the warmth exchange surface. They are typically structured bodies made out of parallel plastic laminations. Above the nozzle level there can be a mist eliminator, which is typically also made of plastic laminations. This comb structure causes multiple deflections of the water droplets contained in the aerosols. Dependent on their size these droplets are deposited on the surfaces of the mist eliminators due to inertness effects and the resulting water flows in direction of the trickling material. Intake ventilators are typically positioned as axial rotors in vertical position with a diffuser slightly lower than the mouth of the cooling tower. In case of systems with greater dimension the diffuser can extend over ten or more meters in height. In smaller systems or cooling systems that are positioned in series, the diffuser reaches a height between one and three meters.

In case of bigger cooling towers or evaporative systems, the top level of spray nozzles, trickling materials and, where applicable, mist eliminators are accessible for maintenance and generally walkable. This level therefore qualifies in principle for sampling. The cooling tower top, where applicable, is directly accessible via a grid ladder with double railing. Cell cooling towers are typically concrete structures with diffusers on top. The roof of these structures can often be walked either entirely or in part and offers access to the diffuser top as actual measurement level.

Guideline VDI 4257 describes how to perform emission measurements of microbial air contaminants. Requirements for sampling bio-aerosols follow the instructions for sampling particles in guided airstreams, as they are for example described in guideline VDI 2066-1 or in the norm DIN EN 15259. Requirements for sampling from guided sources and from exhaust channels differ from those for diffuse sources that enable emission of bigger volumes at slow pace over a greater surface area.

The plumes emitted from cooling towers consist of a mixture of air, vapour and liquid droplets. Depending on their origin, the emitted droplets are referred to as primary, secondary or recondensation droplets (Wurz et al. 2016). Due to typical exchange mechanisms with cooling tower structures these different types of droplets can contain different specific concentrations of microorganisms. In primary droplets which are generated by dispersal, the concentration of microorganisms contained herein corresponds to the one in the cooling water, whereas concentrations in secondary droplets can differ as they are formed by interaction with system structures and surfaces. Recondensation droplets that are formed by recondensing water vapour on the other hand do not contain *Legionella*, or only in cases where they serve as condensation nuclei for primary and secondary droplets. Plumes typically have a content of primary and secondary droplets of 0.2 g/m^3 . *Legionella* can be expected in droplets with diameters exceeding a size of approx. $1 \mu\text{m}$.

Obtaining samples and expected *Legionella* concentrations in the sample

Sampling with a volume flow of 300 L/min over 10 min captures 3 m^3 of air, which corresponds theoretically to 0.6 g of liquid. When reaching the action value of 10,000 CFU/100 ml *Legionella* spp. this reaches in purely mathematical terms a number of 60 CFU *Legionella* spp. in the sample given a sample volume of 15 ml. Assuming that a volume of 1 ml (split in two agar plates with 0.5 ml sample) is plated for cultural assessment of *Legionella*, a total cumulative number of 4 CFU would be obtained on the two agar plates. In accordance with the recommendation by the

German Federal Environment Office (UBA; UBA-Empfehlung:2017-06) this would enable at least a semi-quantitative enumeration. Lower Legionella concentrations or lower sampling efficiencies would result in accordingly lower values allowing only a qualitative interpretation. Greater numbers of culturable bacteria might be obtained by extending the sampling time or by concentrating the samples. Stress caused by the sampling procedure however has to be considered.

Sampling procedure

On the basis of results from a previous UFOPLAN-project a wet cyclon sampler (Coriolis μ) designed for immission measurements was used. This device was technically modified for isokinetic, isoaxial emission sampling e.g. from vertical airflows. The physical sampling efficiency of the modified sampler was assessed in the laboratory by exposure to test dust particles and aerosol droplets. Based on laboratory results and previously mentioned conceptual considerations, the following statements can be made in regard to emission samples:

- (1) Sampling of aerosols and sample losses: The sampler that was originally designed for immission measurements of a quiescent gas volume was supplemented with elements enabling the directed sampling of air flowing from a given direction. This application was successfully tested. Use of a specially designed intake nozzle and possibly of a bend allow sampling of both vertical and horizontal air flows under isoaxial and iso-kinetic conditions conforming to standards. The clip seals using rubber-like rings provide mechanically sufficiently stable and air-tight connections of different sampler components in practical applications.
- (2) Volume flow: Der aspiration volume flow that is high in comparison with other samplers with up to 200 l/min enables sampling in duplicate format in a reasonable time period (sampling times < 30 min).
- (3) Physical sampling efficiency/degree of separation: the immission format of the sampler with a slit-like intake opening reaches a particle size-dependent degree of separation of more than 60 % for cross-section dimensions > 2 μm and > 50 % for cross-section dimensions > 1 μm auf (aspiration volume flow \geq 200 l/min). In its format with aspiration nozzle and bend the separation efficiency exceeds 80 % for particles with a diameter of 1 μm and more than 95 % for particles with diameters > 2 μm . It can be assumed that with an aspiration volume flow of 300 l/min all configurations of the sampler achieve a sampling efficiency that is adequately high for quantitative aerosol sampling for aerosols containing Legionella and with an expected aerodynamic diameter > 1 μm . The average separation angle of the bend that is used for sampling vertical flows is one decade higher than the one of the cyclon ($d_{50} = 15 \mu\text{m}$ instead of 1 to 2 μm).
- (4) Biological sampling efficiency: According to the results of comparative measurements, the biological sampling efficiency is higher than with an impactor but slightly lower than with an impinger.
- (5) Fluid management: Loss of sampling fluid due to evaporation can be compensated by connecting a storage vessel via a hose pump, thereby keeping a constant amount of fluid in the sampling vessel and preventing the cells from drying.
- (6) Bioaerosol sampling with a wet cyclon sampler is thought to cause less damage, or rather “sampling stress” to the bacteria compared to other sampling procedures (UFOPLAN-project “Detection of Legionella in air samples from open recooler systems”)

- (7) Suction can be performed either by a suction blower or with an external, controllable aspirator. The latter enables decoupling of sampler and aspirator device via a corresponding hose fitting or a pipe joint. Inside the plume effusing the cooling-tower mouth, an external aspirator device may be installable. The decoupling may further allow positioning of the relatively light cyclon sampler with a loop over the air current and placing the relatively heavy aspirator device next to the actual surface of the cooling tower mouth.

In principle, the modified version of the utilized wet cyclon sampler can be regarded as an appropriate device for sampling of Legionella containing bioaerosols released from cooling tower outlets.

Re-cooling system-based immission concentration

Due to their thermal buoyancy and oftentimes high volume flow, immissions from open recooler plants may disperse over long distances. Consequently, some legionellosis outbreaks were found to be associated with emissions from evaporative cooling systems located up to ten kilometers away (Exner 2015, p. 75). In addition to source-related properties, meteorological and geographical conditions also critically influence the travelling distance and direction of aerosols and thus the dilution rate towards the reaching point. For bioaerosols, other boundary conditions have to be taken into account compared to dust aerosols, such as droplet evaporation or air humidity (VDI 4251 part 3) as well as the change in the viability of microorganisms; among others due to UV-radiation intensity (Janicke, 2015). Therefore, knowledge on emission-immission relationships is momentous for the source-related evaluation of immission measurements. Under consideration of source-related properties, dispersion calculations can be performed that mathematically evaluate the transport within the atmosphere and the resulting additional load to the immission concentration at reaching points in the vicinity of the plant, additionally estimating a required sampling period of an immission measurement, if necessary. If an aerosol is released from a plant according to the example above, after atmospheric dispersion and dilution by approx. the factor 10^3 under the same sampling conditions, only approx. 0.004 CFU Legionella/ml sample liquid are viable for laboratory analysis in frame of an immission measurement. Also increasing the sampling volume of the aerosol within certain limits may not lead to a significant increase of concentration in the sample. This also makes it more difficult to prove that the immission measurement is clearly related to the installation under the assumed conditions. Other factors, such as the influence on activity by solar radiation or dehydration can further change the concentration. This is in contradiction to the observed cases of legionellosis in the closer environment of evaporative cooling systems, where the concentration of Legionella probably must have been higher in the ambient aerosols. Local, unfavorable conditions for dispersal, such as e.g. low mixing layer heights or downwash effects as well as respectably higher emission concentrations may be possible causes here. A detailed calculation of dispersion under consideration of local and atmospheric dispersion relations at a certain time may be a valuable help to retrace the source.

Analytical detection method

The project included the development of a suitable detection method based on quantitative PCR (qPCR), which enables quantification and the best possible differentiation between Legionella with intact and damaged membranes. Despite the large number of qPCR reactions described for the specific detection of *L. pneumophila* and *Legionella spp.* there are no detection systems which would allow a satisfactory live/dead differentiation, e.g. by combination with a viability dye (used here: propidium monoazide, PMA). A major pre-requisite for analysis is the adequate suppression of signals exerted by dead bacteria. In order to do so, a longer gene sequence is

amplified, consequently increasing the probability that the amplification of dead signals is prevented. However, the vast majority of existing evidence is based on the amplification of sequences in the range of 100 - 200 bp.

For this reason, major challenge was the development or identification of qPCR reactions that amplify longer gene sequences. In addition, suitable incubation conditions had to be identified in order to make the treatment with the viability dye as efficient as possible.

For this purpose, (A) a new qPCR detection method for *L. pneumophila* was developed and (B) a commercially available detection kit for *Legionella spp.* as described in the literature was used:

(A) *L. pneumophila*: Suitable oligonucleotides were either selected from a literature search or newly designed. From four possible oligonucleotide combinations with amplicon lengths of approx. 600 bp, one was selected that was appointed as most specific. With this primer-sample combination, seven different *L. pneumophila* strains were successfully detected in frame of inclusivity testing. At the same time, in an exclusivity testing, no amplification products were generated from 17 non-*L. pneumophila* strains. After optimizing various treatment parameters, the following incubation conditions were defined for the PMA treatment: Sample incubation with 20 - 50 µM PMA (final concentration, depending on dye consumption by the sample) at 45 °C for 10 min in the presence of 2 mM EDTA. The subsequent light-exposure was performed with a commercially available LED-based device. Compared to the iQ-Check® Real-Time PCR Kit for *L. pneumophila*, dead signal suppression was twice as high on a logarithmic scale.

(B) *Legionella spp.*: a literature search pointed out a study that tested a commercially available *Legionella spp.* (all species) genesig® Advanced Kit by PrimerDesign™ Ltd. (based on the amplification of a gene sequence of nearly 400 bp) in combination with PMA. The suppression of dead *Legionella* signals was found to be significantly more efficient than with the iQ-Check® Real-Time PCR Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH) for *Legionella spp.* However, when the kit was applied to various cooling water samples in combination with cultural analysis according to DIN EN ISO 11731, it was found that the inclusivity of the kit by PrimerDesign™ Ltd. is insufficient, since *Legionella* was found in a substantial number of samples with the iQ-Check® Real-Time PCR Kit and also culturally in high concentrations, although negative results were produced with the genesig® Advanced Kit. Concluding, the development of a qPCR-based detection system for *Legionella spp.* that is compatible with viability dyes remains a challenge to be faced.

Emission measurement practice

In order to obtain representative results for typical plant operation, a classical emission measurement should be based on operating conditions that can lead to characteristic or high emissions. In the case of a bioaerosol measurement, the date of the last biocide dosage must be taken into consideration. In order to obtain representative results, the guidelines VDI 4257 part 1 and VDI 2066 part 1 stipulate that the following boundary conditions, among others, should be fulfilled at the measuring points:

(A) Isoaxiality: angle between the direction of sampled partial flow and the central axis of the exhaust duct less than 15%.

(B) No negative flow is detected in the measured cross-section

(C) Ratio of maximum to minimum gas velocity in the measured cross-section less than 3:1

According to VDI Guideline 4257 part 1 the last three points (A-C) are ensured if the channel sections are straight with an inlet path of five hydraulic diameters in the front of and two hydraulic diameters behind the measured cross-section. The distance to the outlet should also be at least five hydraulic diameters. Due to technical constraints, deviation from these conditions

is oftentimes necessary when sampling evaporative cooling systems. In accordance with the procedure developed in the project, the following workflow is recommended for measuring emissions in the project (including guideline VDI 4257 part 1, p. 13):

(A) Determining measuring points

Due to the high technical and economic efforts required for the most typical sizes of evaporative cooling systems, sampling is carried out according to the simplified procedure described in guideline VDI 4257 part 1. Hence, a suitable measuring point per axis is sampled. A point is selected at which the measured flow velocity comes closest to the mean velocity.

Further demands on the determination of the flow velocity, are to be considered. If bioaerosol sampling is to take place at a greater distance from the working plane, sufficiently long measuring sensors are required. Within certain limits telescope bars and wire rope hoists are suitable to bring a sampling probe to the desired point within the cross-section to be measured.

(B) Determining flow velocity in the measured cross-section

Characterization of the local flow direction applying the “flag method”. Measurement of the flow velocity as well as further outlet-air boundary conditions, in particular for induced-draught multiple-cells cooling towers, is carried out depending on the room orientation with 3 times the number of measuring points as network measurement (specifications of the simplified method of aerosol sampling based on RL VDI 4257 part 1). The measuring instrument must be suitable for gases containing higher water droplet concentrations.

Aim: Determining the flow profile, average flow velocity and direction of flow

(C) Measuring aerosol droplets through an impaction sensor

In addition to the determination of flow velocity and bioaerosol sampling, a measurement of the droplet size distribution or droplet concentration in the aerosol may be useful for determining the water content. This, for instance, may be performed with impaction sensors (guideline VDI 3679, part 3).

Aim: Determining water droplet load in the outlet cross-section according to quantity and droplet amount-size distribution

(D) Determination of the boundary conditions and measuring points for the actual bioaerosol sampling

(E) Bioaerosol sampling: suction in isokinetic isoaxial direction (if possible), otherwise in flow direction (simplified procedure according to RL guideline VDI 4257 part 1). Alternatively, the sampling can be performed in a “horizontal suction configuration”. Alongside extraction of circulating water samples and biofilm.

(F) Measurement of the bioaerosol background concentration “upwind” of the plant (Coriolis-immission attachment, incident flow of the plant)

(G) Determination of other ambient air, exhaust air and plant parameters

Immission-side sampling of real evaporative cooling systems

Validation measurements for aerosol sampling and analytical verification were carried out on four industrial evaporative cooling systems. Examinations included measuring of *Legionella* in water, aerosol and biofilm samples implementing flow cytometry, cultivation and qPCR.

For various plants, the amount-size distribution of aerosol droplets was additionally determined, followed by the calculation of water content in the vapour. The following plants were examined according to the procedure described above:

Plant A: Multi-cell cooling tower, axial-flow fan using induced-draught

Plant B: Multi-cell cooling tower, axial-flow fan using forced-draught

Plant C: Evaporative cooling system, natural-draught or optional axial fan with induced-draught

Plant D: Multi-cell cooling tower, axial fan with induced-draught

Aerosol sampling: At the investigated plants (cf. description in section 8.2), the collection of aerosol samples was based on different current-associated conditions, also in order to estimate the necessity of isoaxial or isokinetic sampling. For plant D, the visually-accessed and measured current produced by the rotor was considered in such a way that the emission sensor was placed slightly tilted by 15 degrees relative to the vertical, facing against the current. Plants B and D, were additionally sampled in a horizontal fashion within the suction direction with the immission impinger.

Microbiology, cooling water: The concentration of *Legionella* in the cooling water of the four plants varied substantially. The highest concentrations were found in plant A, the lowest in plant D. *Legionella* concentrations in plants B and C were comparable.

Comparison of the cultural analysis according to DIN EN ISO 11731 with the qPCR showed that the qPCR results for *Legionella spp.* were very reproducible for consecutive water samples from the same plant, whereas the cultural results differed rather strongly.

This observation was mainly attributed to the accompanying flora present in the cooling water, which may strongly influence the growth of *Legionella* on culture media. In the presence of accompanying flora, higher dilution steps must be performed, i.e. usage of smaller sample volumes with rather high statistical uncertainty. qPCR results are based on larger water volumes (typically 50 ml - 100 ml); rendering the influence of the accompanying flora negligible due to high specificity of the PCR-amplification. However, the challenge for *Legionella spp.* qPCR lies, as mentioned above, in the more efficient suppression of dead *Legionella* signals.

Microbiology, biofilms: Biofilms were examined in plants A, C and D and exposed different amounts of *Legionella*. Highest concentrations were found in plant C, with 9.2×10^6 CFU per 100 g wet weight and 5.6×10^{10} genome units per 100 g wet weight. These samples were taken inside the cooling tower from a metal railing that is constantly exposed to moisture.

Microbiology, aerosols: Aerosols of plants A, B and C revealed *Legionella*. The concentration of *Legionella* was highest in the exhaust air from plant A with 25 cfu/m³ air. Also, plant A exposed the highest concentrations of *Legionella* inside the cooling water. Cooling water of plants B and C contained comparable concentrations of *Legionella*, whereas only plant B showed significant concentrations of *Legionella* in aerosol samples with an average of 6.5 cfu/m³ air. In plant C, only one from a total of six air samples came out positive for *Legionella* with just one CFU. Samples retrieved from plant D were free of culturable *Legionella*. qPCR results tended to coincide with cultural findings, however with one exception the qPCR results were below detection limit of the respective qPCR reactions.

Due to the rather high load of large (diameters of up to 100 µm), inert aerosol particles captured, all sampled fractions should be determined and added to the respective sample for evaluation. This particularly concerns emission measurements with the cyclone sampler and bend, for which significant quantities of discharged water may accumulate. Inclusion of flush samples, allows detection of further wall adherences. Evaluation of repeated measurements for the respective sampling configuration revealed good reproducibility of data. Comparing the results of one sampling event (with immission attachment) with the results of the emission attachment presented above, very little differences between the two configurations were observable.

Performing the suction with a tilt of 15 degrees did not produce a significantly different result. In a direct comparison, the immission attachment tends to yield slightly lower concentrations. However, all concentrations discussed at this point were in approximately the same order of magnitude or logarithmic scale level. Sampling under isoaxial, isokinetic conditions in respect to the vertical main current thus corresponds rather to “worst case” boundary conditions and therefore tends to higher total cell numbers, amount of intact cells as well as culturable *Legionella*. At site C, sampling was performed both directly above the mist eliminator and at a notably higher height at the top of the cooling tower. Both for the total cell count as well as for the number of intact cells, there was a slight decrease in the cell count among the two measuring sites. This may be attributed to a separation effect elicited by the rotor running between the two measuring planes.

Flow cytometry for measuring the microbial load in exhaust air

Flow cytometry was considered suitable to quantify the microbial load in the exhaust air of evaporative cooling systems. Usage of this technology enabled the generation of a factor that determines to which extent the bacterial concentration in the exhaust air of the evaporative cooling system exceeds the bacterial concentration in the unaffected ambient air. In the frame of this project this latter factor was introduced as a parameter and named the “Microbial Air Bioburden Factor (MLBF)”. Although not specific for *Legionella*, the factor indicates how many microorganisms are discharged from the respective evaporative cooling system. Still, the MLBF is an appropriate tool to issue statements on the efficiency of microbial retention and mist elimination. The higher the MLBF, the greater the risk of the cooling water or the biofilms being contaminated with *Legionella*.

Summary and Outlook

The project results show that qPCR offers a higher reproducibility for the quantification of *Legionella* in water samples than cultivation techniques. The qPCR is particularly suitable for higher concentrations of *Legionella*, such as typically occurring in cooling water. For aerosol samples, on the other hand, *Legionella* concentration can be very low, thus resulting in below detection and determination limit outputs in the qPCR. In the presence of culturable *Legionella* in low concentrations however (as in the aerosol samples measured in the project), the cultivation method is advantageous due to its high sensitivity. The cyclone sampler utilized in this project prevents samples from drying-up, thus minimizing the loss of culturability. Cultural analysis however, should refrain from heat or acid treatment in order not to impair the cultivability of *Legionella*. Suppressing growth of accompanying flora is not necessary in aerosol samples. Both the sampling method and the derived procedure can be regarded as suitable for the detection of *Legionella*-containing bioaerosols released from cooling towers. In particular, a differentiated current characterization in the outlet plane and the quantitative transfer of aerosol droplets separated in the collection into the respective sample must be ensured.

One major reason for the generally low employment of qPCR for cooling water probing – apart from the lack of live/dead differentiation for *Legionella spp.* – is the lack of thresholds and consequently critical values that would require immediate action. Therefore, creating a hazard system based on a traffic light rating system is proposed within the scope of this project. This classification system is underpinned by current empirical values gathered in research and consulting projects, but it must still be validated and refined by further measurements. Furthermore, the hygienic risk may be expressed as ratio, being the relative proportion of *L. pneumophila* in the total *Legionella spp.* concentration inside the cooling water. The tolerable concentration of *Legionella spp.* inside the cooling water decreases with increasing proportion of *L. pneumophila*. In accordance with previous experience, the proportion of *L. pneumophila* is

typically situated between 0 % and 20 %, the concentrations of *Legionella spp.* in the majority of cooling water samples is in the range of 10^5 GU/100 ml and 10^6 GU/100 ml.

In addition to the *Legionella* concentration in the cooling water, other factors also determine the amount of *Legionella* released from an evaporative cooling system. An important factor is the integrity and efficiency of mist elimination. The newly developed "Microbial Air Bioburden Factor" (MLBF) is used to estimate the mist eliminator. A risk classification system based on a traffic light rating system is proposed within the project, which is to be refined in subsequent measurements. The MLBF should be considered in combination with the *Legionella* concentration in the cooling water. The higher the concentration of *Legionella* in the cooling water, the more efficient should the retention be to minimize the microbial load in aerosols.

The diagnostics and risk assessment proposed here could be integrated into hazard assessments of evaporative cooling systems, as they are carried out at five-year intervals by sworn experts. The following steps could prospectively be taken:

At the beginning of an evaluation in respect to the hygienic hazard emanating from the open cooler system stands a visual examination of the mist eliminator. If there are no visible objections, a further inspection is carried out according to the routine examination protocol stated in the 42nd BImSchV. In case the mist eliminator displays visible defects, these must be addressed. At the same time, the cooling water must be classified by carrying out a qPCR and assigning it according to the traffic light rating system. The presence of high *Legionella spp.* concentrations with a certain share of *L. pneumophila* would demand aerosol sampling with determination of MLBF and culturable *Legionella* in the exhaust air.

1 Einleitung und Problemstellung

Verdunstungskühlanlagen werden seit Jahrzehnten in vielen technischen Systemen zur Abfuhr von dort anfallenden Wärmelasten eingesetzt, beispielsweise bei Produktionsanlagen der Industrie, bei Kraftwerken oder in raumluftechnischen Anlagen. Die Kühlwirkung beruht auf der Verdunstung von versprühtem oder verrieseltem Wasser. Eine damit verbundene hygienische Konsequenz kann die Freisetzung von Legionellen durch Aerosole sein, falls diese Bakterien im Kühlwasser aufgrund günstiger Lebensbedingungen (Wärme, Feuchtigkeit und Nährstoffe) hohe Konzentrationen erreichen und die Freisetzung von Aerosolen nicht ausreichend unterbunden wird.

Bereits 1979 wiesen Adams und Lewis (1979) in einem Technical Report darauf hin, dass die Abluftschwaden von Kühltürmen mikrobiell belastet sind, und zwar trotz aller Chlorungs-Programme. Speziell wiesen sie darauf hin, dass Legionellen in Kühltürmen optimale Lebensbedingungen vorfinden und als Aerosole freigesetzt werden können. „Bakterielle Schleime“ sahen sie als besonders günstigen Lebensraum für diese Organismen an. Legionellenkontaminierte Aerosole von Kühltürmen können noch im Umkreis von mindestens 6 km zu Erkrankungen führen, was durch eine sorgfältige Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese nachgewiesen wurde (Tran Minh et al., 2006). Da sich die Legionellen mit den Aerosolen daher nachweislich über mehrere Kilometer ausbreiten können, kann es im Umkreis einer Anlage zu hunderten von erkrankten Personen kommen. Auch in Deutschland wurden bei einigen Legionellenausbrüchen Verdunstungskühlanlagen als Infektionsquelle identifiziert, z.B. in Ulm und Warstein.

Ein typischer Weg, auf dem hygienisch relevante Organismen in die Luft übergehen können, besteht darin, dass sie von Biofilmen wasserführender Systeme, in denen sie sich einnisten und vermehren konnten, an das Wasser abgegeben werden und sich dann in feinen Aerosolen verbreiten. Solche Aerosole können auf verschiedenste Weise entstehen, z. B. beim Verrieseln und Lufttransport in Kühltürmen. Der häufigste Übertragungsweg für Pathogene in Aerosolen ist die Inhalation, bei der sie dann in den oberen Atemwegen abgelagert werden (Wathes et al., 1988)

Die Überwachung von Verdunstungskühlanlagen hinsichtlich des Legionellenrisikos erfolgt zurzeit durch Messung der Legionellenkonzentration im Wasserkreislauf, da es kein für die routinemäßige Überwachung geeignetes Nachweisverfahren für Legionellen in Luftproben gibt. Dadurch kann aber nur eine indirekte Risikoabschätzung erfolgen, da die Legionellenkonzentration in den Aerosolen nicht bekannt ist.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

Dem Aerosolpfad kommt im Hinblick auf eine potentielle Legionellenfreisetzung ausgehend von Verdunstungskühlanlagen eine besondere Bedeutung zu. Bestandteil dieser Aerosole können auch Mikroorganismen – insbesondere Legionellen – aus dem Kühlwasser und/oder aus Biofilmen sein. Die Aerosole entstehen „technik- und naturgemäß“ während des Nassbetriebs von Verdunstungskühlanlagen. Bedingt durch den Luftzug im Anlagenbereich und in Abhängigkeit vom Durchmesser der Tropfen sowie bautechnischer Bedingungen, können diese Bioaerosole in die Umgebung des Kühlturms getragen werden. Während die Aerosolfreisetzung z. B. von Legionellen primär durch technische Kenngrößen des Anlagenbetriebs beeinflusst wird, ist die Aktivität bzw. Lebensdauer von Mikroorganismen in einem atmosphärischen Aerosol von Faktoren wie Tropfengröße, Luftfeuchte, Temperatur, Luftgeschwindigkeit sowie solarer Einstrahlung beeinflusst.

2.1 Charakterisierung von Bioaerosolen, insbes. Legionellen im Aerosol

Bioaerosole im Allgemeinen sind seit langem Gegenstand hygienischer Betrachtungen. Nach der DIN EN 13098 (2000) sind Bioaerosole definiert als luftgetragene Teilchen biologischer Herkunft. Darunter fallen alle im Luftraum befindlichen Ansammlungen von Partikeln, denen Pilze (Sporen, Konidien, Hyphenbruchstücke), Bakterien, Viren und/oder Pollen sowie deren Zellbestandteile und Stoffwechselprodukte (z. B. Endotoxine, Mykotoxine) anhaften bzw. diese beinhalten oder bilden (VDI 4252 Blatt 2; VDI 4253 Blatt 2).

Der Nachweis von Mikroorganismen in Bioaerosolen wird als sogenannte „Luftkeimmessungen“ bereits seit Jahrzehnten durchgeführt. Dies gilt insbesondere für Reinraumbereiche der pharmazeutischen Industrie oder der Medizin, für die lebensmittelverarbeitende Industrie, für mikrobiologische Laboratorien sowie mit Bioaerosolen stark belastete Arbeitsplätze, beispielsweise der Abfallwirtschaft oder Landwirtschaft. Seitens der Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI und DIN wird die Thematik der Bioaerosole bereits langjährig behandelt (z. B. Richtlinienreihe VDI 4250 bis VDI 4258). Sowohl für die messtechnische Bestimmung der Emissionen aus industriellen Anlagen als auch die Immissionsmessung zur Charakterisierung des Bioaerosolgehaltes in der Umgebungsluft wurden entsprechende technische Regelwerke erarbeitet. Darüber hinaus sind analytische Fragestellungen im Zusammenhang mit der Probenbehandlung und Analytik sowie ihre umweltmedizinische Bewertung Inhalt der technischen Richtlinienarbeit.

Der Einsatz des neben Filtersammlern und Impaktoren häufig zur Bioaerosolerfassung eingesetzten Impingerverfahrens ist in mehreren Richtlinien sowohl für Emissions- als auch Immissionsmessungen beschrieben. Die Ergebnisse des UFOPLAN-Vorhabens „Nachweis von Legionellen in Luftproben aus Verdunstungskühlanlagen“, welches ebenfalls durch das IWW bearbeitet wurde, hat aber gezeigt, dass eine Aerosolbeprobung mittels des Nass-Zyklon-Verfahrens (Coriolis μ) im Falle der Untersuchung von Legionellen in Aerosolen aus Verdunstungskühlanlagen geeigneter ist, da ein wesentlich größeres Luftvolumen beprobt werden kann ohne die Legionellen zu schädigen und dadurch die Nachweisgrenze niedriger ist.

Spezifische Richtlinien zur Emissions- oder Immissionsmessung von Legionellen insbesondere an Verdunstungskühlanlagen liegen derzeit nicht vor. In der Praxis werden Aerosole bei Verdunstungskühlanlagen bislang nur selten beprobt. Die Probenahme ist im Gegensatz zur Beprobung der Wasserphase kaum in der Praxis etabliert. Ähnlich verhält es sich mit Biofilmprouben; hier ist kein Standard der Beprobung vorgegeben, obwohl dies aufgrund langjähriger Erfahrung möglich wäre. Dadurch wird selten ein Zusammenhang zwischen Belastung (Bioaerosol) und Ursache (Biofilm, Wasser) hergestellt. In präventiver Weise wird

deshalb meist auf chemischem Weg (z. B. Biozide) der Gehalt an Mikroorganismen im Wasser eingeschränkt, um das potentielle Risiko zu senken.

In der VDI-Richtlinie 4255 Blatt 1 (2005) heißt es: „Während gesetzliche Vorgaben zur Begrenzung mikrobieller Emissionen zurzeit nur allgemein formuliert sind, hat der Arbeitsschutz bereits erste Normierungsaktivitäten vorgenommen“. Bislang konzentrieren sich die Aktivitäten auf Abfallentsorgungs- und Abwasserbehandlungsanlagen, weil hier die Bildung von Bioaerosolen am stärksten auftritt. Darüber hinaus werden aber auch u. a. Wertstoffsortieranlagen, Tierhaltung, Schlachtbetriebe, Gerbereien, Nahrungsmittelherstellung, Gärtnereien, Biologische Abluftreinigungsanlagen, Kühltürme, Textilverarbeitungsbetriebe, Papierfabriken und Holzverarbeitende Betriebe genannt. Im Wesentlichen werden Bereiche betrachtet, von denen eine kontinuierliche Belastung ausgeht. Andere Fälle, z. B. Abspritzen bei Reinigungsarbeiten oder Abkühlen von Werkstücken, werden nicht explizit einbezogen.

Die Quantifizierung von Mikroorganismen wird nach VDI 4253 Blatt 3 und Blatt 4 durch die Bestimmung koloniebildender Einheiten oder durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Fluoreszenzanalyse nach Anfärbung mit DAPI vorgenommen. Auf einzelne potentielle Krankheitserreger wird in den VDI-Richtlinien nicht oder nur begrenzt eingegangen. Bei den mikrobiologischen Methoden, die darin festgelegt sind, handelt es sich ausschließlich um konventionelle Kultivierungsverfahren. Obwohl molekularbiologische Techniken nicht angegeben sind, eignen sich einige gut für den sensitiven Nachweis von spezifischen Krankheitserregern. Eine herausragende Stellung nimmt die Polymerasekettenreaktion (PCR) ein. Sie beruht auf der Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen, die für diagnostische Zwecke so spezifisch gewählt werden, dass sie Aussagen über die Anwesenheit des Zielorganismus auf Spezies- oder Stammebene erlauben. Bei der quantitativen PCR (qPCR) ermöglicht der Gebrauch von fluoreszenzmarkierten Proben und Standardkurven dabei eine Quantifizierung mit einer Nachweisgrenze von wenigen Zielorganismen pro Probe. Der Zeitaufwand von Probeneingang bis zum Ergebnis liegt dabei typischerweise zwischen 3-4 Stunden. AFNOR-zertifizierte qPCR Methoden werden im Moment angeboten für *Legionella spp.* und *L. pneumophila* von den Firmen Bio-Rad und Pall GeneDiscTechnologies. Bei positivem Befund kann die gleiche Probe (bestehend aus extrahierten genomischen Desoxyribonukleinsäuren, DNS) zur Verifizierung bis auf Serotyp-Ebene weiter untersucht werden, wobei eine nochmalige Probenahme hierbei nicht nötig ist. Dies ist einer der größten Vorteile im Vergleich zu aufkommenden Durchflusszytometrie-basierten Verfahren, die bei positivem Befund keine weitere Typisierung oder Ausweitung der Untersuchung (evtl. auf andere Krankheitserreger) an der gleichen Probe ermöglichen.

Neben der reinen Quantifizierung der Zielorganismen (Legionellen) ist auch eine Aussage zu deren Vitalität wichtig, um das Risiko für mögliche Infektionen bewerten zu können. Eine Schädigung oder ein Absterben der Mikroorganismen ist eine der Folgen von Einwirkungen chemischer oder physikalischer Art wie Biozideinsatz oder Austrocknung. Eine weitere Folge solchen Stresses ist der Übergang von Bakterien in einen nicht-kultivierbaren Zustand (viable but not culturable, VBNC). Dann sind sie nicht mehr mit den gängigen Kulturverfahren nachweisbar. Ein Beispiel für VBNC bei Legionellen wurde von Hussong et al., 1987 und Steinert et al., 1997 beschrieben. In dieser VBNC-Form, aber auch nach Reaktivierung zurück in den kultivierbaren Zustand, können Legionellen infektiöse Eigenschaften haben. Daher bestehen Bestrebungen zur Etablierung von praxisrelevanten Methoden, welche einen deutlich schnelleren und auch kulturunabhängigen Nachweis von Legionellen in Wassersystemen erlauben. Einige Verfahren für diesen Einsatzzweck werden bereits kommerziell angeboten, während andere sich in der Entwicklung bzw. im Forschungsstadium befinden.

Für eine Risikoabschätzung ist das Fehlen der Vitalitätsinformation bei der traditionellen PCR Diagnostik ein großer Nachteil. Dies trifft auch auf die AFNOR-zertifizierten Nachweisverfahren zu. Eine Lösung des Problems besteht in der Vorbehandlung der mikrobiologischen Proben im Rahmen der sogenannten Viability PCR (vPCR), die den selektiven Nachweis von lebenden, membranintakten Zellen ermöglicht, während die Signale toter membrangeschädigter Zellen unterdrückt werden (Review: Fittipaldi et al. 2012). Das Prinzip beruht auf der Zugabe eines sogenannten Vitalitätsfarbstoffes zur mikrobiologischen Probe. Der Farbstoff dringt nur in membrangeschädigte Zellen ein, während eine intakte Zellmembran (wie sie lebende Zellen aufweisen) eine effiziente Diffusionsbarriere darstellt. Der in geschädigte Zellen eingedrungene Farbstoff interkaliert daraufhin in die DNS dieser Bakterien. Die Proben werden nach der Behandlung mit Licht bestrahlt, was zu einer Aktivierung der Azidgruppe des lichtreaktiven Farbstoffes führt. Dies wiederum führt zu einer Schädigung der DNS, die sich in unmittelbarer Nähe des Farbstoffes befindet. In Kombination mit PCR Diagnostik ist das Endresultat der Behandlung eine Unterdrückung der Detektion von membrangeschädigten Bakterien. Der Nachweis von DNS von lebenden intakten Zellen, die nicht mit aktivem Farbstoff in Kontakt kam, ist auf der anderen Seite nicht beeinträchtigt. Unter den beiden Lebendfarbstoffen trifft dies vorwiegend auf den Lebendfarbstoff ‚Propidium Monoazid‘ (PMA) zu, der sehr selektiv für membrangeschädigte Zellen ist. Neben lebenden intakten Zellen werden auch Bakterien im VBNC Zustand erfasst, da deren Zellmembran ebenfalls keine Schäden aufweist.

Die PMA-Methode wurde seit ihrer Entwicklung im Jahr 2007 mit einer Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen erfolgreich getestet. Die Effizienz der Signalunterdrückung ist jedoch abhängig von einer Reihe von Faktoren, die oft nur wenig berücksichtigt werden. Darunter befinden sich die Länge der vervielfältigten DNS Sequenzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Amplifikation langer Zielsequenzen die Lebend-tot-Unterscheidung stark verbessert (Contreras et al. 2011). Der Grund wird in der höheren Wahrscheinlichkeit vermutet, dass zumindest ein Farbstoffmolekül in der längeren Sequenz gebunden hat und damit die PCR Amplifikation unterdrücken kann. Die im Projekt entwickelte PCR zielt ab auf die Vervielfältigung von DNS Abschnitten, die deutlich länger sind als die kurzen Sequenzen, die in den kommerziellen Kits vervielfältigt werden. Weitere Optimierungsschritte bestehen in der Probeninkubation mit Farbstoff bei Temperaturen über Raumtemperatur sowie der Zugabe von EDTA. Sowohl die Vervielfältigung längerer DNS Sequenzen als auch die Probeninkubation bei erhöhten Temperaturen hatten auch beim Nachweis anderer Bakterienspezies zu einer substantiell stärkeren Signalreduktion von membrangeschädigten Zellen und damit zu einer Unterdrückung von falsch-positiven Signalen geführt (Nkuipou-Kenfack et al. 2013).

Abgesehen von der wesentlich höheren Erfahrung mit der Methode, ist PCR hier anderen Amplifikationsverfahren (z. B. isothermale Methoden wie LAMP etc.) vorzuziehen, da deren Amplikonlänge stark eingeschränkt ist.

2.2 Rückkühlanlagen und Verdunstungskühlanlagen

Die Übertragung von Prozesswärme erfolgt in vielfältigen industriellen und gewerblichen Prozessen, beispielsweise Kraftwerken, verfahrenstechnischen Prozessen wie der metallurgischen, chemischen und lebensmittelverarbeitenden Industrie sowie zur Klimatisierung. Anfallende Wärme wird hier oftmals mit Hilfe von Kühlwasser abtransportiert. Rückkühlanlagen dienen der Abkühlung dieser Prozess- bzw. Kühlwässer durch Wärmeabgabe an die Umgebungsluft. Das abgekühlte Wasser kann dann als Umlaufwasser erneut im Prozess eingesetzt werden.

In den Richtlinien VDI 2047 Blatt 2 und 3 sind Rückkühlanlagen anhand technisch-konstruktiver Kriterien unterschieden. Ein zentrales Unterscheidungsmerkmal stellt die Betriebsweise als

Trocken- oder Nasskühlturm dar. Bei Trockenkühltürmen wird das zu kühlende Wasser (Nutzwasser) in einem geschlossenen System durch Rohrbündel- oder Plattenwärmetauscher geleitet und Wärme hier über die Oberfläche konvektiv abgeführt. Das Nutzwasser hat keinen direkten Kontakt zur Umgebungsluft, dementsprechend treten auch keine Bestandteile des Kühlwassers in die Atmosphäre über. Diese Kühltürme kommen vor allem in Regionen zum Einsatz, wo Kühlwasser nicht oder nur eingeschränkt zur Verfügung steht, beispielsweise aufgrund von Wassermangel. Im Hinblick auf potentielle Legionellengefahren sind diese Anlagen von untergeordneter Bedeutung.

Bei Verdunstungskühlanlagen wird durch Versprühen und Verdunstung von Wasser Wärme an die strömende Umgebungsluft abgegeben. Nicht verdunstetes Wasser läuft größtenteils nach unten ab und sammelt sich in der Kühlturmtasse. Zentrale Bauelemente der Anlagen zur Wärmeübertragung sind Verrieselungs- oder Verregnungseinrichtungen für Nutzwasser sowie ein Wärmeübertrager innerhalb eines Kühlturmkörpers. Kältere Umgebungsluft tritt in der Regel an der Unterseite dieses Kühlturmkörpers ein und verlässt die Anlage wasserdampfangereichert und erwärmt, meist an der Oberseite, als Kühlturmschwaden. Weitere konstruktive Unterscheidungsmerkmale betreffen die treibende Kraft des Luftzuges, die in größeren Baukörpern als Naturzug oder per drückend oder saugend angeordnetem Ventilator aufgeprägt werden kann.

Daneben existieren verschiedene Anlagentypen, bei denen in verschiedenen Formen Nass- und Trockenverfahren kombiniert werden, beispielsweise durch einen geschlossenen Primärkreislauf, der innerhalb des Kühlturms durch Wärmetauscher geführt wird, welche von einem im offenen Sekundärkreislauf laufenden Kühlmedium besprüht werden. Dieses steht damit in direktem Kontakt zur durchströmenden Kühlluft und zur Atmosphäre. Daher fallen solche Anlagen auch unter die Regelungen der 42. BImSchV. Diese Kombination wird beispielsweise temporär bzw. saisonal eingesetzt, soweit die Leistung eines direkten Wärmeaustausches vom Primärkreislauf zur Kühlluft nicht ausreicht.

Richtlinie VDI 2047 Blatt 2 beschreibt detailliert die in der Praxis gängigen technischen Systeme.

Bautypen von Verdunstungskühlanlagen

Größere Kühlturmbauwerke kommen oftmals ohne einen Ventilator aus. Der Dichteunterschied der warmen austretenden Luft im Vergleich zur kalten, eintretenden Luft ist bei diesen Anlagen ausreichend groß, um eine ausreichende, stetige Luftströmung zu gewährleisten. Die äußere Form dieser als Naturzugkühltürme bezeichneten Bauwerke ist in der Regel hyperbolisch. Naturzugkühltürme sind typischerweise zwischen 100 m und 200 m hoch. Der kleinste Naturzugkühlturm in Deutschland ist ein Kühlturm in dem Modellkraftwerk Fenne, mit einer Höhe von 100 m und einer Austragsrate von 330 m³/h (STEAG GmbH 2012). Typische Austrittsgeschwindigkeiten von Naturzugkühltürmen liegen zwischen 3 m/s und 5 m/s (Bahmann 2006). Die Strömungsgeschwindigkeit ist hauptsächlich von der Umgebungstemperatur, der Kühlzonenbreite (Temperaturdifferenz des eintretenden zum austretenden Kühlwasser) und dem Mündungsdurchmesser abhängig. Naturzugkühltürme werden in der Regel bei sehr hohen Kühlleistungen von >200 MW eingesetzt.

Bei Beschränkungen der Bauhöhe oder geringen möglichen Temperaturunterschieden zwischen ein- und austretender Luft und damit ggf. nicht ausreichender Kühlleistung werden Ventilatorkühltürme eingesetzt. Bei diesen ist im Innern ein Ventilator angebracht, der bei Bedarf zugeschaltet werden kann. Bei niedriger Last können insbesondere größere Modelle dieser Kühltürme allein im Naturzug betrieben werden. Der Rotor kann saugend unterhalb der Auslassöffnung angebracht sein oder in drückend angeordneter Konfiguration Kühlluft in den

Kühlturmkörper hinein befördern. Bei saugender Anordnung ist meist ein Axialgebläse in einer als parabolisch runder Diffusor ausgebildeten Auslassöffnung am Ort des geringsten Querschnitts angeordnet.

Von einem Zellenkühlturm spricht man, wenn mehrere Ventilatorkühltürme gleicher Bauart kombiniert werden. Für diese Anlagen wird auch der Begriff Serienkühlturm verwendet, da zwei oder bis zu mehrere Duzend Luftaustrittsöffnungen seriell nebeneinander angeordnet sind. Ca. 80 % aller Verdunstungskühlanlagen werden saugend betrieben (Köhl 2017). Zellenkühltürme können auf Gebäuden oder als separates Bauwerk errichtet werden. Typische Bauhöhen separat errichteter Bauwerke betragen 10 m bis 20 m. Durchmesser der Zellenkühltürme an Kraftwerksstandorten liegen in der Größenordnung 15 m, bei Industriekühltürmen eher bei 7 m bis 8 m und für kleinere Anlagen bei 3 m bis 4 m. Die Anlagen sind oftmals als Betonbauwerke ausgeführt. Die Austrittsgeschwindigkeit kann bis zu zehn Meter pro Sekunde betragen. Zellenkühltürme werden auch als relativ kleine Einheiten eingesetzt, bei denen der Durchmesser der Auslassöffnungen deutlich weniger als ein Meter betragen kann. Einzelne kleinere Apparate werden als „kompakte Verdunstungskühlanlagen“ bezeichnet.

Im Wesentlichen können damit hinsichtlich der Strömung folgende Typen an Rückkühlanlagen nach dem Verdunstungsprinzip unterschieden werden, vgl. auch Richtlinie VDI 2047 Blatt 3:

1. Naturzug-Nasskühlturm (Gegenstromprinzip)
2. Ventilator-Nasskühlturm, im Kreuz- oder Gegenstromprinzip
3. Mischform aus 1 und 2
4. Serien- oder Zellenkühlturm mit saugend oder drückend angeordnetem Axialventilator (zwei bis mehrere Dutzend Auslassöffnungen, mehrere Kühlturmtassen)
5. Kompakte Rückkühlwerke

Verdunstungskühlanlagen gemäß 42. BImSchV

Die 42. BImSchV unterscheidet zwischen Kühltürmen und Verdunstungsanlagen. Zu den Kühltürmen werden demnach Anlagen mit einer Kühlleistung von mehr als 200 Megawatt (thermisch) je Luftauslass gezählt, die in der Regel nach dem Naturzug-Prinzip arbeiten und meist ohne Ventilator zum Lufttransport auskommen. Als Verdunstungskühlanlagen gelten alle übrigen Rückkühlanlagen, bei denen ebenfalls eine Wärmeabfuhr nach dem Verdunstungsprinzip erfolgt und der Luftzug in der Regel durch den Betrieb drückend oder saugend angeordneter Ventilatoren erzeugt wird.

Der Begriff Verdunstungskühlanlagen schließt in diesem Bericht beide genannten Bauarten ein.

In diesem Projekt werden nur Verdunstungskühlanlagen betrachtet, in denen die Kühlleistung hauptsächlich durch Verdunstung abgeführt wird und die Konvektion nur einen kleinen Anteil beiträgt. Nur in solchen Anlagen kommt das Nutzwasser direkt mit der Umgebungsluft in Kontakt und tritt als Kühlturmschwaden in die Atmosphäre ein. Dadurch ist auch ein Übertritt von Legionellen mit dem Nutzwasser bzw. Umlaufwasser in die Atmosphäre grundsätzlich nicht auszuschließen.

Funktionseinheiten und mögliche Probenahmeorte bei Verdunstungskühlanlagen

Bei Verdunstungskühlanlagen können folgende Funktionseinheiten zwischen Kühlturmauslass (Kühlturmkrone) und Kühlturmtasse unterschieden werden:

- Kühlturmkrone Luftauslass

- | | |
|---|--------------------------------------|
| ▶ Diffusor (saugend angeordnetes Gebläse) | Lufttransport |
| ▶ Tropfenabscheider | Vermeidung von KW-Verlusten |
| ▶ Düsenebene | KW-Einbringung |
| ▶ Verrieselungsebene | KW-Verteilung, Wärmeaustausch |
| ▶ Lufteinlass (drückend angeordnetes Gebläse) | Luftzutritt, Lufttransport |
| ▶ Kühlturmtasse | KW-Sammlung, Rückführung zum Prozess |

In der Düsenebene wird das warme Kühlwasser per Vollkegel- oder Hohlkegel-Sprühdüsen über den Querschnitt des Kühlturms verteilt. Ein sehr feinverteiltes Tropfenaerosol verbessert dabei den Wärmeübergang, kann aber auch bei Mitriss der Tropfen mit der ausströmenden Luft zu hohen Wasserverlusten führen. Bei großen Anlagen kann eine Flüssigkeitsverteilung auf die Rieselkörper auch mittels überlaufender Rinnensysteme erfolgen.

Oberhalb der Düsenebene kann ein Tropfenabscheider bestehend aus Kunststoff-Lamellenpaketen angeordnet sein. In diesem Wabenkörper findet eine mehrfache Umlenkung der Tropfenaerosolströmung statt. In Abhängigkeit von ihrer Größe können diese Tropfen aufgrund von Trägheitseffekten an den Lamellenwandungen abgeschieden werden und in Richtung der Düsenebene zurücklaufen.

Verrieselungseinbauten unterhalb der Düsenebene dienen der Erzeugung einer möglichst großen Wärmeaustauschfläche. Sie sind typischerweise 1,5 m bis 1,8 m hoch und ebenfalls als Kunststofffolien-Einbauten analog der Tropfenabscheider ausgeführt.

Saugend angeordnete Ventilatoren sind meist als Axialrotoren mit vertikaler Achse unterhalb der Kühlturmmündung angeordnet. Rotor und Antriebsmotor sind mittels Querstreben im Diffusor ca. ein bis mehrere Meter unterhalb der Mündung verbaut. Bei größeren Anlagen, bei denen sich der Diffusor über zehn oder mehr Meter Bauhöhe erstrecken kann, verläuft oftmals zentral ein gemauerter Wellenschacht bis zur Rotorebene.

Bei größeren Kühltürmen bzw. Verdunstungskühlanlagen ist die zuoberst angeordnete Ebene der Sprühdüsen, Rieselkörper und ggf. Tropfenabscheider für Wartungszwecke begehbar, meist auf definiert verlegten Gitterstegen. Ein Zugang ist i. d. R. durch eine Tür in der Außenwand des Kühlturms und eine Steigleiter oder Treppe gewährleistet. Diese Ebene steht damit grundsätzlich für eine Probenahme zur Verfügung. Wellenschächte größerer saugend betriebener Kühltürme sind ggf. begehbar, besitzen allerdings oft nur eine Öffnung wellennah am Rotorzentrum. Ihre Nutzung für Messaufgaben ist daher wenig zielführend. Die Kühlturmkrone ist nur in seltenen Fällen per Steigleiter bzw. umlaufenden Steg direkt zugänglich.

Zellenkühltürme sind oftmals als Betonbaukörper ausgeführt, auf den die Diffusoren aufgesetzt werden. Zur Wartung der Rotoren ist das Baukörperdach über eine Gitterrosttreppe zugänglich und teilweise oder oftmals sogar vollständig begehbar. Diese Ebene kann für Messaufgaben genutzt werden. Falls erforderlich, ist die Diffusorkrone selbst oftmals per mobilem Kleingerüst oder Treppenleiter erreichbar. In Einzelfällen können Krananlagen zum Transport auf diese Ebene vorhanden sein.

Tropfenaerosole und Kühlturmschwaden

Das aus dem Kühlturm austretende Fluid wird als Kühlturmschwaden bezeichnet. Es handelt sich dabei um ein Gemisch von Luft, Wasserdampf und Flüssigwasser-Tropfen (VDI-Richtlinie 2047). Bei den austretenden Tropfen lassen sich je nach Herkunft Primärtropfen, Sekundärtropfen und Rekondensationstropfen unterscheiden (Wurz et al. 2016). Aufgrund verschiedener Wechselwirkungen mit Kühlturmeinbauten können die Tropfenarten spezifische Konzentrationen an Mikroorganismen aufweisen. Laut VDI-Richtlinie 3867 Blatt 1 werden ca. $0,1 \text{ g/m}^3$ Umlaufwassertropfen ausgetragen und gelangen in die Atmosphäre.

Primärtropfen

Primärtropfen sind Tropfen, die beim Einbringen des Kühlwassers in den Kühlturm entstehen (Versprühen oder Verdüsen). Diese können den Tropfenabscheider ohne Wandkontakt passieren. Laut den Untersuchungsergebnissen von Wurz et al. (2016) liegt der Größenbereich dieser Tropfen zwischen $10 \text{ }\mu\text{m}$ und $500 \text{ }\mu\text{m}$. Die Konzentration an Mikroorganismen in diesen Tropfen entspricht derjenigen des Kühlwassers.

Sekundärtropfen

Zwischen den Einbauten der Rieselkörper kann bei hoher Gasgeschwindigkeit ein Tropfenmitriss ausgehend von Filmströmungen an den Lamellenwandungen resultieren. Die für Tropfenabscheider angestrebten Zielparamester geringer Druckverlust und hohe Abscheideeffizienz durch Trägheitsabscheidung sind im praktischen Betrieb nur bedingt gleichermaßen effektiv umzusetzen. Bei hohen Geschwindigkeiten im Tropfenabscheider kann zusätzlich ein Tropfenabriss ausgehend von Flüssigkeitsfilmen resultieren. Im Kühlturm herrscht eine hohe relative Luftfeuchtigkeit von bis zu $100 \text{ }\%$ sowie ggf. Temperaturgradienten zwischen der Aerosolphase und Oberflächen. Kühlturmwandung oder Bauteiloberflächen von Rieselkörpern, Tropfenabscheidern sowie Rotoren sind daher im Betrieb von einem Flüssigkeitsfilm benetzt. Dort bildet sich ein Biofilm mit ggf. lokal spezifischer Flora aus, die von derjenigen des Umlaufwassers verschieden sein kann. Regeneintrag sowie Vogelkot, welche durch die Auslassöffnung in den Kühlturm gelangen können, stellen neben dem Umlaufwasser weitere mögliche Quellen für Mikroorganismen dar. Der sich ausbildende Biofilm stellt den Lebensraum für Bakterien, Pilze sowie Amöben (Einzeller) dar. Er enthält anorganische und organische Substanzen (VDI 4250 Blatt 2), welche die Nährstoffbasis der Bakterien darstellen. Primärtropfen, welche den Tropfenabscheider passieren, sowie mitgerissene Fraktionen dieser Flüssigkeitsfilme, werden als *Sekundärtropfen* bezeichnet. Bei einem Kontakt beispielsweise mit Einbauten können die Tropfen mit dortig vorhandenen hochviskosen Flüssigkeitsfilmen mit ggf. hoher Keimbelastung in Kontakt kommen. Sekundärtropfen können somit eine vom Umlaufwasser abweichende Konzentration an Mikroorganismen aufweisen. Durchmesser der Sekundärtropfen liegen im Größenbereich von $10 \text{ }\mu\text{m}$ bis $1.500 \text{ }\mu\text{m}$, für ihre Konzentrationen im Schwaden wird die Größenordnung 10 mg/m^3 - 200 mg/m^3 angegeben (Wurz et al. 2016).

Rekondensationstropfen

Rekondensationstropfen entstehen bei Übersättigung eines wasserdampfhaltigen Gasstroms durch Kondensation auf Primärkeimen wie Staub, Mikroorganismen oder kleinen Tropfen. Sie weisen typischerweise Durchmesser von unter $5 \text{ }\mu\text{m}$ auf bei einer Beladung des Schwadens mit dieser Tropfenart auf unter 1000 mg/m^3 (Wurz et al. 2016). Aufgrund ihres Entstehungsprozesses tragen Rekondensationstropfen keine Legionellen, ggf. lediglich die als Kondensationskerne zugrundeliegenden Primär- bzw. Sekundärtropfen.

Abbildung 1: Rundkühlturm: Naturzug-Nasskühlturm (links) und Kühlturm mit drückend angeordnetem Ventilator (rechts)



Links: Naturzugkühlturm für 2 x 1.100 MW, Neurath. <https://www.enexio.com/de/produkte/nasskuehltuerme/naturzugkuehltuerme/>, abgerufen 31.07.2019. Rechts: steag Heizkraftwerk Herne (Schi 2013)

Abbildung 2: Serienkühlturm in Zellenbauweise mit saugend angeordnetem Ventilator



<https://www.enexio.com/de/produkte/nasskuehltuerme/zellenkuehltuerme/>, abgerufen 31.07.2019

Abbildung 3: Kompakte Verdunstungskühlanlage



Quelle: Zimmermann 2013

2.3 Legionellen – Eigenschaften und Vorkommen

Legionellen sind im Wasser lebende, aerobe, stäbchenförmige, gramnegative Bakterien mit Durchmessern von ca. 0,5 µm - 0,7 µm und Längen von 2 µm -20 µm (Ryan et al. 2004). Sie sind nicht sporenbildend. Es gibt mehr als 50 Legionellenarten, die in mehr als 80 Serogruppen unterteilt sind. Die epidemiologisch bedeutsamste Art ist *L. pneumophila*, insbesondere *L. pneumophila* Serogruppe 1(LP1). LP1 wird nach Fields et al. 2002 als Auslöser von 90 % aller durch Legionellen initiierten Erkrankungen (Legionellosen) angesehen. Das Einatmen von legionellenhaltigen Aerosolen kann schwere Lungenentzündungen (Legionellen-Pneumonie) oder das Pontiac-Fieber hervorrufen (Ryan et al. 2004). Als Auslöser von mit Verdunstungskühlanlagen in Verbindung stehenden epidemiologischen Ereignissen wurden überwiegend solche Stämme der Serogruppe 1 identifiziert, welche positive Reaktionen auf den monoklonalen Antikörper MAb-3-1 zeigten (VDI 4250 Blatt 2, S. 9).

Legionellen kommen natürlicherweise in geringer Anzahl in allen Oberflächengewässern und im Grundwasser vor (Behling 2004). Aufgrund ihrer geringen Ansprüche an die Umwelt sind sie sowohl im Salz- als auch im Süßwasser lebensfähig (Heller et al. 1998). *L. pneumophila* ist thermotolerant, die Bakterien können einige Stunden bei 50 °C überdauern, ohne zerstört zu werden. Bei einer Temperatur von 60 °C sterben die Bakterien nach wenigen Minuten (Wadowsky und Yee 1983; Schulze-Röbbcke et al. 1987). Der für die Vermehrung von Legionellen optimale Temperaturbereich liegt zwischen 37 °C und 43 ° (VDI 4250 Blatt 2, S. 7). Bei Temperaturen unter 20 °C ist keine bzw. kaum eine Vermehrung zu beobachten (Wadowsky und Yee 1983; Schulze-Röbbcke et al. 1987).

Im industriellen Einsatz ist besonders das Vorkommen der Legionellen im Grund- und Oberflächengewässern relevant. Durch ihre Verwendung zum Beispiel als Kühlwasser gelangen Legionellen in technische Systeme, wo sie sich in Abhängigkeit von den vorherrschenden Bedingungen wie erhöhte Temperaturen vermehren können.

Für die Vermehrung von Legionellen ist ebenfalls ein ausreichendes Nährstoffangebot notwendig. Biofilme bieten ideale Vermehrungsbedingungen für Legionellen, da hier zahlreiche Nährstoffe sowie andere Bakterien vorhanden sind. Legionellen vermehren sich insbesondere intrazellulär in Amöben, welche oftmals Bestandteil des Biofilms sind. Diese intrazellulären Legionellen sind vermehrungsfähig, hochgradig virulent und bis zur Freisetzung durch die Amöbenzelle vor bioziden Desinfektionsmaßnahmen geschützt (Expertenkommission Legionellen 2015). Die Kombination von erhöhten Temperaturen und die Verfügbarkeit von Nährstoffen führten zu der Aussage, dass Legionellen in Verdunstungskühlanlagen optimale Lebensbedingungen vorfinden (Adams und Lewis, 1979).

Luftgetragene Legionellen

Legionellenhaltiges Wasser kann als Tropfenaerosol aus industriellen Prozessen freigesetzt werden und in Kontakt mit der Umgebungsluft treten. Dieses Bioaerosol kann sich in den unteren Luftschichten ausbreiten und ggf. über die Atemwege aufgenommen werden. In Verdunstungskühlanlagen versprühtes Umlaufwasser kann mit dem Tropfenaustrag in Form der Kühlturmschwaden auf diesem Wege verbreitet werden. Erkrankungen durch Legionellenhaltige Aerosole wurden in einem Umkreis von mindestens 10 km nachgewiesen (Exner et al., 2010; Nguyen et al., 2006).

Eine Problematik zur besseren Überprüfung des von Verdunstungskühlanlagen ausgehenden hygienischen Risikos ist das fehlende Wissen zu den direkten Zusammenhängen der Legionellenkonzentration im Umlaufwasser und der Konzentration in Bioaerosolen (Langer 2012) sowie der Tatsache, dass es bisher wenige Untersuchungen zum Überleben von

Legionellen in Aerosolen gibt. Eine UFOPLAN Studie (FKZ 3715 61 202, UBA 2014) kam zu dem Befund, dass bereits eine kurze Verweilzeit in der Luft einer Bioaerosolprüfkammer die Kultivierbarkeit von Legionellen substantiell verringert, während Variationen in der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit keinen erkennbaren Einfluss hatten.

Der Grund für den schnellen Verlust der Kultivierbarkeit der Legionellen in Luftproben wurde darin gesehen, dass Legionellen ohne Hydrathülle schnell ihre Vermehrungsfähigkeit einbüßen (UBA 2014). Die Kultivierbarkeit von vernebelten Legionellen sank bei einer 1-minütigen Verweildauer in einer Bioaerosol-Prüfkammer auf wenige Prozent der Gesamtlegionellenzahl ab. Dies stand im Kontrast zu Versuchen in einer Sterilbank, wo deutlich höhere Kultivierungswerte erhalten wurden. Der Unterschied wurde darin gesehen, dass in den Prüfkammerversuchen das Wasser, die die Legionellen als Tröpfchen umgab, bereits nach wenigen Sekunden Verweilzeit in der Luft verdunstet war und somit die Legionellen ohne schützende Hydrathülle frei in der Luft schwebten, während in der Sterilbank auch noch nicht verdunstete Aerosoltröpfchen gesammelt wurden.

Die Austrocknung beim Transport der Aerosole in der Atmosphäre beruht auf Wechselwirkungen zwischen Tropfen und Umgebungsluft, wodurch das Wasser ganz oder teilweise verdunsten kann. Weiter sind die Tropfen der UV-Strahlung der Sonne ausgesetzt, welche in Abhängigkeit von ihrer Intensität die Aktivität der Zellen beeinflussen kann. Bei sehr hoher Luftfeuchtigkeit oder Niederschlagsereignissen kann es aber auch zu einem Anwachsen der Tropfen kommen. Als kleinster Tropfendurchmesser, innerhalb dessen ein nicht-sporenbildendes Bakterium transportiert werden kann, wird ein Durchmesser von ein bis zwei Mikrometer angenommen [TH008].

Die hygienische Risikobeurteilung wird erschwert durch die inhomogene Verteilung der Legionellen der Legionellen sowohl in der Wasser- als auch Luftphase (UBA 2014). Die Mehrheit der Legionellen sind in Amöben lokalisiert, wo sie lokal hohe Konzentrationen erreichen. Die kulturelle Quantifizierung erlaubt keine Differenzierung zwischen einer einzelnen Legionelle und einer Legionellen-beladenen Amöbe, da nach Plattierung oder Filtration beide jeweils eine Kolonie ergeben. Die inhomogene Verteilung erklärt die relative niedrige Manifestation bei Legionellenepidemien, bei denen in der Regel nur ein kleiner Anteil (ca. 1 %) der exponierten Personen erkrankte (UBA 2014).

Grenzwerte nach 42. BImSchV

In der 42. Bundesimmissionsschutz-Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider (42. BImSchV) vom 12.07.2017 werden Grenzwerte für die zulässigen Konzentrationen an Legionellen im Umlaufwasser von Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern festgelegt [BUN17]. Betreiber von solchen Anlagen sind verpflichtet, zweiwöchentlich betriebsintern Nutzwasseruntersuchungen durchzuführen. In Abständen von drei Monaten müssen akkreditierte Labore Probe entnehmen und diese auf allgemeine Koloniezahl und Legionellen prüfen [BUN17]. In Tabelle 1 sind die Prüf- und Maßnahmewerte nach der 42. BImSchV dargestellt. Die Werte unterscheiden sich für Kühltürme und Verdunstungskühlanlagen, u. a. da ein unterschiedliches Freisetzungsverhalten der Anlagentypen vorliegt. Ein Überschreiten der Prüfwerte führt zu der Verpflichtung, die Überprüfungen durch ein Labor so lange monatlich durchzuführen, bis diese wieder unterschritten werden. Zudem müssen Ursachen gesucht und Maßnahmen zur Behebung der Ursachen durchgeführt werden. Bei Überschreitung von Prüfwert 2 wird zusätzlich die Umsetzung von Sofortmaßnahme zur Verminderung der mikrobiellen Belastung gefordert. Werden die Maßnahmewerte überschritten, hat eine differenzierte Charakterisierung der Legionellenarten durch ein Labor zu erfolgen. Bei einer Bestätigung der Konzentrationen in

einer nachfolgenden Analyse sind Gefahrenabwehrmaßnahmen zu ergreifen. Insbesondere sind Gefahrenabwehrmaßnahmen zur Vermeidung der Freisetzung mikroorganismenhaltiger Aerosole umzusetzen.

Tabelle 1: Prüf- und Maßnahmewerte für die Legionellenkonzentration gem. 42. BImSchV [BUN17]

im Umlaufwasser von Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen (KBE/100 mL)

Anlagentyp	Prüfwert 1	Prüfwert 2	Maßnahmewert
Verdunstungskühlanlagen und Nassabscheider	100	1.000	10.000
Kühltürme	500	5.000	50.000

Der Überwachung nach 42. BImSchV hinsichtlich der Einhaltung der Prüf- und Maßnahmewerte liegt die kulturelle Bestimmung der Legionellenkonzentration zugrunde. Mit dieser Methode wird die Konzentration vermehrungsfähiger Legionellen in Wasser bestimmt, angegeben in der Konzentrationseinheit Koloniebildende Einheiten je 100 ml (KBE/ 100 ml, engl.: CFU/ 100ml).

Dabei müssen die Vorgaben in der Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen [UBA17], sowie in der Norm DIN EN ISO 19458 (Wasserbeschaffenheit – Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen) berücksichtigt werden [DIN06].

2.4 Probenahme von Bioaerosolen an Rückkühlanlagen

Normen und Richtlinien

Verschiedene VDI-Richtlinien sowie nationale und internationale Normen beschreiben das Emissionsverhalten von Verdunstungskühlanlagen bezüglich der Bioaerosolfreisetzung sowie die Erfassung und den Nachweis von Bioaerosolen (Abbildung 2). Die Richtlinienreihen VDI 4250 bis VDI 4258 beschreiben standardisierte Verfahren zu Erfassung und zum Nachweis von Bioaerosolen und biologischen Agenzien in der Außenluft (Immissionsmessung) als auch von Emissionskonzentration an Anlagen. Die hier dargestellten Verfahren sind allerdings bislang nicht zur Ermittlung einer Legionellenkonzentration eingesetzt worden (VDI-Richtlinie 4250 Blatt 2). Da die im Anhang A der Richtlinie VDI 4250 Blatt 2 dargestellten Messungen von Legionellen in der Luft durch Anwendung verschiedener Verfahren erarbeitet wurden, sind sie untereinander nur eingeschränkt vergleichbar.

In der Richtlinienreihe VDI 4257 wird speziell die Durchführung von Emissionsmessung von mikrobiellen Luftverunreinigungen beschrieben und Anforderungen an eine Bioaerosolprobenahme formuliert. Die Richtlinienreihe besitzt damit eine zentrale Rolle in der Durchführung einer Emissionsmessung. Die Anforderungen orientieren sich an den Anforderungen an eine Partikelprobenahme aus geführten Strömungen, wie sie beispielsweise in der diesbezüglich zentralen Richtlinie VDI 2066 Blatt 1 bzw. der Norm DIN EN 15259 beschrieben sind.

Anforderungen an eine Probenahme aus geführten Quellen wie Abgaskanälen unterscheiden sich von denjenigen für großvolumige, meist langsam ausströmende Quellen, sogenannte Flächenquellen bzw. diffuse Quellen.

Tabelle 2: VDI-Richtlinienfamilien im Zusammenhang mit der Erfassung und Bewertung von luftgetragenen Mikroorganismen und Bioaerosolen an Verdunstungskühlanlagen

Richtliniengruppe	Inhalt	Zentrales Dokument
VDI 4250 *	Wirkung von Mikroorganismen auf den Menschen	
VDI 4251 *	Planung und Durchführung von Immissionsmessungen von Bioaerosolen (Hintergrund- sowie Fahnenmessungen), Ausbreitungsmodellierung	Blatt 1 und Blatt 3
VDI 4252 *	Verfahren zur Probenahme von Bioaerosolen (Immissionsmessung)	
VDI 4253	Anzucht und Detektion von Bakterien sowie Analyse von Viren	
VDI 4254	Messung von Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen	
VDI 4255	Darstellung der Quellen mikrobieller Luftverunreinigungen sowie von Minderungsverfahren; Emissionsfaktoren ausgewählter Mikroorganismen	
VDI 4256	Statistische Kenngrößen für die Beschreibung und Vergleichbarkeit von Verfahren	
VDI 4257	Planung und Durchführung von Emissionsmessungen von Bioaerosolen	Blatt 1 und Blatt 2
VDI 4258	Herstellung von Prüfbioaerosolen zur Verfahrensvalidierung	
VDI 2066 Blatt 1	Staubmessung in strömenden Gasen, Gravimetrische Bestimmung der Staubeladung	Grundlage für VDI 4257 Blatt 1
DIN EN 15259	Messung von Emissionen aus stationären Quellen, Anforderungen an Messstrecke, Messplätze sowie Messaufgabe, Messplan und -bericht	
DIN EN ISO 16911-1	Emissionen aus stationären Quellen – Manuelle und automatische Bestimmung der Geschwindigkeit und des Volumenstroms in Abgaskanälen – Teil 1: Manuelles Referenzverfahren	
VDI 3880	Vorgaben zur Messung an aktiven Flächenquellen	
VDI 2047 Blatt 2	Hygienegerechter Betrieb von Verdunstungskühlanlagen (VDI-Kühlturmregeln)	*
VDI 2047 Blatt 3	Hygienegerechter Betrieb von Verdunstungskühlanlagen (VDI-Kühlturmregeln, Kühltürme über 200 MW Kühlleistung)	*
VDI 3784 Blatt 1	Ausbreitung von Emissionen aus Naturzug-Nasskühltürmen, Beurteilung der Kühlturmauswirkungen	*

*: Richtlinien bzw. Richtlinienreihen, welche das Emissionsverhalten von Verdunstungskühlanlagen bezüglich der Bioaerosolfreisetzung beschreiben. Zentrales Dokument: Im Rahmen der hier dargestellten Methodenentwicklung zur Bioaerosolprobenahme von besonderer praktischer Bedeutung (Stand Oktober 2019).

Aktive Flächenquellen sind nach VDI-Richtlinie 4257 Blatt 1 Quellen größerer Dimension (mehrere Quadratmeter), bei denen die Austrittsfläche der emissionsmindernden Anlage gleich der Austrittsfläche der Emissionsquelle ist (z. B. Biofilter).

Die Unterscheidung zwischen passiver und aktiver Flächenquelle wird anhand des Volumenstroms getroffen: Aktive Flächenquellen besitzen einen definierten Volumenstrom, während passive Flächenquellen einen eher undefinierten Volumenstrom aufweisen. Ab einer mittleren Geschwindigkeit von 30 m/h entsprechend ca. 1 cm/s wird von einer aktiven Flächenquelle gesprochen. Gemäß Richtlinie VDI-Richtlinie 4257 Blatt 1 soll in diesem Fall eine Messhaube zur Messung herangezogen werden und damit die Flächenquelle in eine geführte Quelle überführt werden (VDI-Richtlinie 4257 Blatt 2. Die Vorgaben zur Gestaltung einer Messung an aktiven Flächenquellen sind in Richtlinie VDI 3880 beschrieben (VDI-Richtlinie 3880).

Hinsichtlich der Ausdehnung und Austrittsgeschwindigkeit kann die Austrittsfläche des Kühlturms auch als aktive Flächenquelle aufgefasst werden. Aufgrund der deutlich höheren Strömungsgeschwindigkeit als bei typischen Flächenquellen und der bis zum Auslass kanalartigen Führung des Gasstroms werden im Rahmen dieses Projektes alle Verdunstungskühlanlagen analog zu den geführten Quellen behandelt.

Allgemeine Anforderungen an eine Bioaerosolprobenahme gem. Richtlinienreihe VDI 4257

Zentrale Forderung an eine Emissionsmessung ist, dass „die Ergebnisse die Emissionen der Anlage repräsentativ beschreiben...“ (VDI 4257 Blatt 1, S. 12). Entsprechend sollten biologische Kenngrößen des Ausgangsaerosols durch die eigentliche Probenahme möglichst unverändert erhalten bleiben. Zu diesem Zweck erfolgt die Sammlung des Aerosols in einer Flüssigkeit (2.5).

Zur grundsätzlichen Planung und Durchführung einer emissionsseitigen Bioaerosolmessung kann Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 herangezogen werden. Hinsichtlich der Anforderungen an eine Probenahme wird in dieser auf das Blatt 2 der Richtlinienreihe verwiesen. Diese beiden Dokumente sowie die darin per Verweis hergestellten Bezüge zu weiteren Richtlinien und Normen können als zentrale Dokumente zur emissionsseitigen Bioaerosolprobenahme angesehen werden. Zentrale technische und organisatorische Aspekte werden nachfolgend dargestellt, wobei bezüglich der allgemeinen Messplanung an dieser Stelle auf die Richtlinie verwiesen wird. Soweit zur Anwendung bei der Probenahme von Legionellen am Luftauslass von Rückkühlanlagen Modifikationen erforderlich waren, sind diese im Zusammenhang mit der Methodenentwicklung nachfolgend dargestellt.

Zentrale Messparameter sind biologische Kenngrößen sowie Abluftrandbedingungen wie Geschwindigkeitsverteilung im Querschnitt, mittlere Geschwindigkeit, Abgastemperatur und Feuchte sowie Umgebungsbedingungen für Luftdruck, -Temperatur und relative Feuchte. Aufgrund des hohen Wassergehaltes im Abgas kann bei Verdunstungskühlanlagen auch die Erfassung von Tropfenmenge und Anzahl-Größenverteilung von Bedeutung sein.

Die biologischen Kenngrößen werden nicht direkt vor Ort erfasst, sondern im Labor ausgehend von einer Sammelprobe ermittelt. Hierfür ist im Rahmen der Messplanung eine ausreichende Probenmenge bzw. ausreichende Konzentration in der Probe vorzusehen. In der Regel erfolgt die Angabe als Konzentration bezogen auf das Abluftvolumen (KBE/m^3). Parameter der Auswertung sind typischerweise Angaben zur Konzentration an *L. pneumophila*, *Legionella* spp. sowie zur allgemeine Koloniezahl. Darüber hinaus können weitere Größen relevant sein. Bei der Bioaerosolmessung wird oftmals eine Reduktion der Anzahl der Messpunkte gegenüber einer Staub-(Aerosol-)Messung gemäß VDI 2066 Blatt 1 vorgenommen. Im Rahmen der Messplanung ist vorab die erforderliche Probenahmedauer abzuschätzen, um je Probe ausreichend Biomasse zu sammeln. Dies kann orientierend anhand Umlaufwasserkonzentrationen sowie typischer Anlagenparameter (Sammelvolumenstrom, Wirkungsgrad Tropfenabscheider, Tropfenmenge am Auslass) erfolgen.

Vor der eigentlichen Bioaerosolmessung sind typischerweise die Abluftrandbedingungen zu ermitteln und die Strömung zu charakterisieren. Sollen die biologischen Kenngrößen auch als Fracht angegeben werden, sind insbesondere Angaben zur über den Querschnitt mittleren Strömungsgeschwindigkeit erforderlich. Diese wird durch Mittelung der an repräsentativen Punkten in einer Messebene ermittelten Strömungsgeschwindigkeit berechnet. Die Richtlinien und Normen beschreiben die Auswahl dieser repräsentativen Messpunkte im Rahme einer durchzuführenden Netzmessung über den Querschnitt der Messebene sowie das Rechenverfahren zur Ermittlung der mittleren Geschwindigkeit. Wird eine Reduktion der Anzahl der eigentlichen Probenahmepunkte begründet vorgenommen, sollte gleichzeitig die Anzahl der Geschwindigkeits-Messpunkte erhöht werden. Empfohlen wird eine Verdreifachung der Anzahl.

Blatt 2 der Richtlinienreihe VDI 4257 bezieht sich auf die grundsätzliche Probenahme von Bioaerosolen mittels eines Emissionsimpingers. Dabei erfolgt eine Abscheidung der Aerosolpartikel in Flüssigkeit aufgrund von Trägheitseffekten bzw. Diffusion. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kommt zur Probenahme ein handelsüblicher Nass-Zyklon-Bioaerosolsammler zum Einsatz (Coriolis® μ), siehe Richtlinie VDI 4250 Blatt 2. Dieser Bauform kam bereits bei verschiedenen Anwendungen zur Erfassung von Bioaerosolen und z. T. auch Legionellenaerosolen zum Einsatz (Clauß 2016, Langer 2002, Strathmann 2014, Walser 2013, UFOPLAN-Vorhaben). Im Rahmen dieses Vorhabens wurde der Zyklonsammler entsprechend der Darstellung in Richtlinie VDI 4750 Blatt 2 für die Durchführung einer Emissionsmessung modifiziert (4.1).

Die Vorgehensweise zur Emissionsmessung umfasst im Allgemeinen folgende Arbeitsschritte (siehe u. a. Richtlinie VDI 4257 Blatt 1, S. 13):

- ▶ Festlegung der Messebene und der einzelnen Messpunkte in der Messebene
- ▶ Messung der Strömungsgeschwindigkeit (Netzmessung) sowie weiterer Abluftrandbedingungen
- ▶ Bestimmung der Randbedingungen und Messpunkte der Bioaerosolprobenahme
- ▶ Durchführung der Bioaerosolprobenahme
- ▶ Messung der allgemeinen Hintergrundkonzentration

Nachfolgend sollen zentrale, technische Anforderungen an die Messung erläutert werden.

Repräsentativität der Probenahme und des ausgewählten Messquerschnittes

Um für den typischen Anlagenbetrieb repräsentative Ergebnisse zu erhalten, sollen bei einer klassischen Emissionsmessung Betriebszustände zugrunde gelegt werden, die zu charakteristischen bzw. höchsten Emissionen führen können. Bei einer Bioaerosolmessung ist diesbezüglich insbesondere der zeitliche Abstand zur letzten Bioziddosierung zu berücksichtigen.

Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, sollten laut Richtlinien VDI 4257 Blatt 1 bzw. VDI 2066 Blatt 1 folgende Bedingungen an den Messpunkten erfüllt sein:

- ▶ Isoaxialität: Der Winkel zwischen der Richtung des Probenahmeteilstroms und der Mittelachse des Abgaskanals muss kleiner als 15 % sein
- ▶ Es darf keine negative Strömung im Messquerschnitt festgestellt werden

- ▶ Mindestgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom verwendeten Messverfahren zur Volumenstrommessung muss im Messquerschnitt gegeben sein (oberhalb der unteren Messgrenze des verwendeten Gerätes)
- ▶ Das Verhältnis von höchster zu niedrigster Gasgeschwindigkeit im Messquerschnitt muss kleiner sein als 3:1

Die letzten drei Punkte sind laut Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 dann gewährleistet, wenn es sich um gerade Kanalabschnitte mit einer Einlaufstrecke von fünf hydraulischen Durchmessern vor und zwei hydraulischen Durchmessern hinter dem Messquerschnitt befindet. Der Abstand bis zum Auslass sollte gleichfalls mindestens fünf hydraulische Durchmesser betragen.

Aufgrund der technischen Gegebenheiten muss bei der Probenahme an Verdunstungskühlanlagen oftmals von diesen Bedingungen abgewichen werden.

Isokinetik und Isoaxialität

Um bei einer Bioaerosolprobenahme an Verdunstungskühlanlagen eine Probe zu erhalten, die in Konzentration und Größenverteilung der Aerosolpartikel derjenigen des zu vermessenden Abgasstroms entspricht, bedarf es nach Möglichkeit einer isokinetischen, isoaxialen Probenahme (Hinds 1999). Bei einer isokinetischen Probenahme sollte die Absauggeschwindigkeit der Probenahme gleich der Geschwindigkeit des zu beprobenden Gasstroms sein. Bei einer isoaxialen Probenahme sind Hauptachsen von Gasströmung und Probenahmestrom gleich sein.

Anisokinetische Bedingungen können zu einem Überschuss oder Minderbefund von Partikeln in Abhängigkeit von deren Stokeszahl (STK) führen. Die Stokeszahl stellt ein Maß für die Fähigkeit der Partikel dar, einer Strömungsumlenkung zu folgen. Aerosolpartikel mit Stokeszahlen $\ll 1$ den Stromlinien einer Gasströmung auch in eine andere Raumrichtung, während Partikel mit Stokes-Zahlen $\gg 1$ auf ihrer ursprünglichen Transportrichtung beharren. Die Stokeszahl ist eine Funktion der Relaxationszeit τ , der Ursprungsgeschwindigkeit der Partikel u_0 und einer charakteristischen Größe des Strömungshindernisses R . Im Falle einer Probenahmesonde mit rundem Querschnitt entspricht R dem Radius der Sondenöffnung.

$$STK = \tau * \frac{u_0}{R} = \frac{1}{18} * \frac{d_p^2}{\mu} * \rho_p * C_c * \frac{u_0}{R}$$

d_p	Partikeldurchmesser	[m]
μ	dynamische Viskosität	[Pa*s]
ρ_p	Dichte des Partikelmaterials	[kg/m ³ V]
C_c	Cunningham Korrekturfaktor	[-]
R	Radius der Ansaugöffnung einer Probenahmesonde	[m]

Die Auswirkungen isokinetischer und anisokinetischer Absaugbedingungen sind in Abbildung 4 graphisch erläutert.

Bei einer isokinetischen Probenahme entspricht die Absauggeschwindigkeit der Strömungsgeschwindigkeit einer Hauptströmung u_0 , bei isoaxialer Strömung treten alle die Sonde anströmenden Stromlinien mit ihrer Partikelfracht in die Messsonde ein. Die Aerosolverteilung des zu beprobenden Gasstroms entspricht exakt derjenigen des Absaugstroms.

Ist die Absauggeschwindigkeit geringer als die des Hauptstroms (sub- oder unterkinetische Absaugung), wird die auf die Sonde zuströmende Luftmenge nicht komplett von der Sonde aufgenommen, sondern teilweise um die Sonde herum abgelenkt. In dieser Luftmasse enthaltene

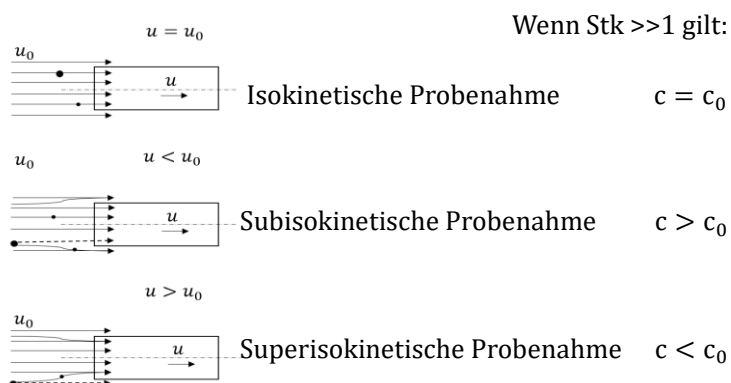
Partikel mit niedriger Stokeszahl entsprechend niedriger Trägheit können dieser Umlenkung folgen, Fraktionen mit Partikeln von großer Trägheit vermögen dies nicht und gelangen in die Probenahmesonde. Für diese Partikel, in der Regel solche mit größerem Durchmesser, ergibt sich damit ein Mehrbefund in der abgesaugten Probe in Bezug auf den abgesaugten Volumenstrom.

Bei einer überisokinetischen Absaugung wird mit größerer Geschwindigkeit abgesaugt als die Hauptströmung axial auf die Sonde zuströmt. Dementsprechend werden umliegend um die Sondenmündung herum anströmende Stromlinien in die Sonden hinein umgelenkt. Dieser Umlenkung können Partikel mit geringer Trägheit folgen. Partikel mit großer Trägheit beharren entsprechend ihrer Stokes-Zahl auf ihrer ursprünglichen Strömungsrichtung, an der Sonde vorbei, und werden nicht mit dem Probenahmestrom erfasst. Für diese Fraktion ergibt sich damit in Bezug auf den angesaugten Volumenstrom ein Minderbefund in der Probe. Im ersten Fall entspricht die Partikelkonzentration der Hautströmung derjenigen des Probenahmestroms, im zweiten Fall weist die abgesaugte Strömung eine höhere Partikelkonzentration auf, während im dritten Fall eine geringere resultiert.

In Abhängigkeit von der Partikelträgheit bzw. der Partikeldurchmesser ergeben sich damit spezifische Raten des Minder- bzw. Mehrbefundes, insbesondere der Partikel mit größerer Trägheit. Im Falle einer Abweichung von der Isokinetik kann die tatsächliche Ausgangskonzentration nur dann aus der gemessenen Konzentration ermittelt werden, wenn die Anzahlgrößenverteilung des Aerosols in der Probe oder im Hauptstrom bekannt ist. Dies ist in der Regel nicht der Fall.

Die Geschwindigkeit des zu vermessenden Abgasstroms ist durch die Betriebsbedingungen i. d. R. fest vorgegeben. Die Realisierung dieser Geschwindigkeit als Absauggeschwindigkeit der Probenahme ergibt sich damit aus der Wahl des Absaugvolumenstroms und der Querschnittsfläche der Absaugsonde.

Abbildung 4: Auswirkung einer anisokinetischen Probenahme auf Partikel großer Trägheit



u : Geschwindigkeit im Probegasstrom

u_0 : Geschwindigkeit der Hauptströmung, u : Geschwindigkeit des Probegasstroms

c : Konzentration für Partikel mit großer Trägheit bzw. großen Stokes-Zahlen im Probegasstrom

c_0 : Konzentration der Partikel mit großen Stokes-Zahlen in der Hauptströmung

Analog ergeben sich Abweichungen der bei der Probenahme erfassten Aerosolkonzentration von der tatsächlichen Konzentration, wenn die Achse der Hauptströmung von derjenigen der Probenahmestromung abweicht. Auch hier kann in Abhängigkeit vom Winkel zwischen den beiden Richtungen ein Minder- bzw. Mehrbefund als Funktion der Stokeszahl ermittelt werden (Hinds 1999).

In der Regel werden die isoaxiale, isokinetische Bedingungen dadurch erreicht, dass die Probenahme mittels eines Krümmers und eines Satzes wechselbarer Ansaugdüsen mit verschiedenen Einlassdurchmessern nach eingehender Charakterisierung der Strömungsgeschwindigkeit der Hauptströmung erfolgt.

Erfassung der Gasgeschwindigkeit sowie weiterer Abluftrandbedingungen

Da ein Tropfenaerosol in einer Verdunstungskühlanlage einer großen Dynamik unterliegt, sollte eine Probenahme nach Möglichkeit in der Auslassebene vorgenommen werden. Erfolgt die Probenahme beispielsweise unmittelbar oberhalb der Tropfenabscheider, werden bis zur Auslassöffnung möglicherweise auftretende Veränderungen des Aerosolspektrums aufgrund von Wechselwirkungen mit oberhalb befindlichen Einbauten und Wandungen nicht berücksichtigt.

Die Abgasgeschwindigkeit wird in der Messebene als Netzmessung ermittelt. Das bedeutet, dass die Messung an einem festgelegten Raster von Messpunkten im Messquerschnitt durchgeführt wird. Die einzelnen Messpunkte sollten dabei flächengleiche Teilflächen repräsentieren, ihre Lage wird nach dem Tangentialverfahren festgelegt (VDI-Richtlinie 4257 Blatt1, VDI-Richtlinie 2066 Blatt 1). Zusätzlich kann über die Netzmessung sichergestellt werden, dass vorhandene Inhomogenitäten der Strömung erkannt werden. Die mindestens erforderliche Anzahl und Lage der Messpunkte ist für runde und rechteckige Querschnitte verschieden und in Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 beschrieben. Allgemein gilt, dass mit zunehmender Größe der Messebene die Anzahl der Messpunkte zunimmt. Messpunkte sollten zur Innenwand des Abgaskanals mindestens 3 % des Durchmessers oder mehr als 50 mm Abstand aufweisen, um eine starke Beeinflussung der Messwerte durch Randeffekte auszuschließen (VDI-Richtlinie 2066 Blatt 1).

Ausgehend von den Einzelwerten der Netzmessung werden die mittlere Strömungsgeschwindigkeit über den Querschnitt berechnet und Kenngrößen der Geschwindigkeitsverteilung ermittelt, beispielsweise Minimal- und Maximalwert.

Eine anschließende Aerosol-Probenahme sollte mindestens an einem Punkt der mittleren Geschwindigkeit je Messachse erfolgen.

Nach Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 sind als weitere Kenngrößen zu erfassen:

- ▶ Ablufttemperatur
- ▶ Abluftfeuchte
- ▶ Ggf. statischer Druck der Abluft
- ▶ Umgebungstemperatur
- ▶ Umgebungsdruck

Bioaerosolprobenahme

Die Bioaerosolprobenahme sollte ebenfalls als Netzmessung durchgeführt werden. In begründeten Einzelfällen ist es nach VDI 4257 Blatt 1 allerdings zulässig, nicht alle Messpunkte zu beproben. Um in diesem Fall dennoch eine repräsentative Probenahme zu gewährleisten, soll pro Messachse ein geeigneter Messpunkt zur Bioaerosolprobenahme ausgewählt werden. Dazu bedarf es einer ausführlicheren Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit. Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 empfiehlt, die Anzahl der Geschwindigkeits-Messpunkte zu verdreifachen. Aus diesen Messungen soll dann die mittlere Geschwindigkeit berechnet werden. Die Bioaerosolprobenahme ist dann auf jeder Achse jeweils an den Messpunkten durchzuführen, an

denen die Differenz der lokalen Strömungsgeschwindigkeit zur berechneten mittleren Geschwindigkeit am geringsten ist.

Für eine repräsentative Probenahme wird gefordert, das Probenahmesystem vor dem eigentlichen Einsatz auf Dichtigkeit zu prüfen. Die Probenahmedauer der Bioaerosol-Probenahme ist vor allem dadurch limitiert, dass eine ausreichende Feuchte des gesammelten Probenmaterials gewährleistet sein muss, damit erfasste empfindliche Mikroorganismen im Verlaufe der Bioaerosolsammlung nicht in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden bzw. absterben. Im Falle des Impingers werden maximal 30 min empfohlen, bei Einsatz des Wet-Zyklons ist herstellerseitig eine Probenahmedauer von max. 10 min vorgesehen. Werden mehrere Punkte je Achse als Sammelprobe beprobt, sollte die gesamte Probenahmedauer gleichmäßig auf die einzelnen Messpunkte verteilt werden bzw. für jeden Messpunkt notiert werden. Bei einer isokinetischen und isoaxialen Probenahme wird die Entnahmesonde so ausgerichtet, dass die Sonde $\pm 10^\circ$ stromaufwärts ausgerichtet ist (Ansaugöffnung entgegen der Anströmrichtung. Der absaugende Volumenstrom ist derart einzustellen, dass die Anforderung an die Isokinetik erfüllt ist. Idealerweise wird der Teilvolumenstrom durch eine automatisierte Regelungseinheit oder ein Bypassventil geregelt oder eine Ansaugdüse mit angepasstem Durchmesser bzw. Mündungsfläche ausgewählt. Der Volumenstrom ist mindestens zu Beginn und Ende der Probenahme zu kontrollieren und zu notieren. Im Falle einer Sammelprobe über mehrere Messpunkte darf die Probenahme entlang der Messachse nicht unterbrochen werden, während der nächste Messpunkt angefahren wird. Nach Beprobung des gesamten Querschnitts muss die Entnahmesonde und das Absaugrohr aus dem Kanal entnommen und mit physiologischer Kochsalzlösung gespült werden. Die Kochsalzlösung wird nach dem Spülen gesammelt und ebenfalls auf mikrobielle Inhalte untersucht. Das gesamte System muss vor einem erneuten Einsatz ggf. desinfiziert werden.

Nach VDI-Richtlinie 2066 Blatt 1 wird zusätzlich zur tatsächlichen Probenahme eine Gesamtleerprobe gefordert. Eine Gesamtleerprobe ist eine „Leerprobe, die am Ort der Probenahme wie normale Proben der Messreihe behandelt wird, jedoch ohne Gasprobenahme und ohne Einführen der Probenahmeeinrichtung in den Abgaskanal während der Dauer des Versuches“ (VDI 2066 Blatt 1, Seite 7, Abschnitt 2.14). Mit Hilfe dieser Probe kann abgeschätzt werden, ob es zu einer Verunreinigung der Proben bei der Probenahme kommen kann.

Bestimmung von Konzentration und Fracht der Mikroorganismen

Die Fracht wird angegeben als Anzahl der Mikroorganismen \dot{Z}_{MO} in KBE/h oder als Anzahl der Mikroorganismenzellen \dot{Z}_{GZZ} in GZZ/h pro Zeiteinheit. Gemäß Richtlinie VDI 4257 Blatt 2 Abschnitt 9 ergibt sich die Fracht aus dem Produkt Konzentration und dem Hauptvolumenstrom der Abluft bezogen auf Normbedingungen (siehe Formel (3.8)):

$$\dot{Z}_{MO} = c_{MO} * \dot{V}_{0,N} = \frac{z_{MO}}{v_{N,tr}} * \dot{V}_{0,N} \text{ bzw. } \dot{Z}_{GZZ} = c_{GZZ} * \dot{V}_{0,N} = \frac{z_{GZZ}}{v_{N,tr}} * \dot{V}_{0,N}$$

c_{MO}	Mikroorganismenkonzentration [KBE/h]
c_{GZZ}	Gesamtzellkonzentration [GZZ/h]
z_{MO}	Anzahl der Mikroorganismen in der Probe [KBE]
z_{GZZ}	Anzahl der Gesamtzellen in der Probe [GZZ]
$v_{N,tr}$	Teilgasvolumen bezogen auf Normbedingungen ($T_N = 273 \text{ K}$; $p_N = 101,3 \text{ kPa}$; trockenes Gasvolumen) [m^3]
$\dot{V}_{0,N}$	Abluftvolumenstrom bezogen auf Normbedingungen [m^3/h]

2.5 Bioaerosolssammler

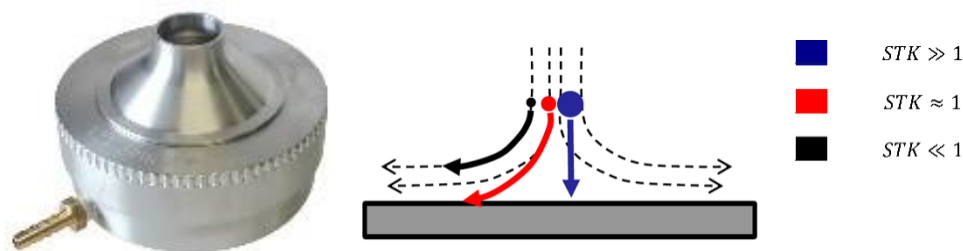
Es sind verschiedene Bioaerosolabscheider im Einsatz, die jeweils nach unterschiedlichen physikalischen Prinzipien arbeiten. Die zwei wesentlichen Anforderungen an einen

Bioaerosolabscheider sind eine hohe physikalische Sammeleffizienz und eine hohe mikrobiologische Wiederfindung. In Hinblick auf eine Probenahme von Bioaerosolen, in denen möglichst geringe Konzentrationen von Mikroorganismen erfasst werden sollen, ist es sinnvoll ein großes Luftvolumen zu beproben, aus dem der eigentliche analytische Nachweis erfolgt. Die nachfolgend vorgestellten Bioaerosolabscheider arbeiten diesbezüglich bei sehr unterschiedlichen Volumenströmen.

Impaktor

Impaktoren sind Partikelabscheider, die auf dem Prinzip der Trägheitsabscheidung (Impaktion) beruhen. In Abbildung 5 (links) ist als Beispiel der für die Luftprobenahme entwickelte Standard BioStage Impaktor (SKC) abgebildet. Ein Volumenstrom von 28,3 l/min tritt durch die runde Einlassöffnung in den Impaktor ein und wird dort in insgesamt 400 parallelen Düsen auf eine senkrecht zur Strömungsrichtung angeordnete Prallplatte beschleunigt. Partikel mit einer hohen Massenträgheit werden auf der Platte abgeschieden. Durch einen radial angeordneten Auslass erfolgt die Absaugung mittels Gebläse mit vorgeschaltetem Filter. Im Falle von Bioaerosolmessungen kommt anstelle der Prallplatte eine Nähragarplatte zum Einsatz, die im Anschluss im Labor zum kulturellen Nachweis herangezogen wird.

Abbildung 5: Standard Biostage Impaktor (links), Impaktorprinzip (rechts)



Quelle: links: SKC Incorporated 2013; rechts: Asbach 2016

Der Partikeldurchmesser, bei dem 50 % der Partikel abgeschieden werden, wird als CutOff oder auch d_{p50} bezeichnet. Im Falle von Impaktoren ist der CutOff unter anderem abhängig von der Düsengeometrie und der damit zusammenhängenden Strömungsgeschwindigkeit. Impaktionsverfahren haben sich für die Erfassung von Mikroorganismen grundsätzlich bewährt. Für Legionellen erscheint das Verfahren nach bisherigen Erkenntnissen allerdings als wenig geeignet (VDI Richtlinie 4250 Blatt 23). Die Probenahmedauer bei Impaktoren mit Nähragarplatten ist begrenzt, da die Platten bei Beaufschlagung mit nicht wasserdampfgesättigten Gasströmen rasch austrocknen können, was ggf. die Aktivität empfindlicher Mikroorganismen beeinträchtigen kann (Langer 2012). Diese begrenzte Probenahmedauer in Verbindung mit dem geringen Volumenstrom von etwa 30 l/min führt zu einem insgesamt kleinen Probenahmenvolumen. Dies wird angesichts der erwarteten eher geringen als eher ungünstig angesehen. Als weiterer Nachteil ist die eingeschränkte Analysemöglichkeit für Agarplatten anzusehen (Langer 2012).

Impinger

Impingement ist laut VDI Richtlinie 4252 Blatt 3 die „Abscheidung von luftgetragenen Partikeln in Flüssigkeiten durch mehrere zugrunde liegende Mechanismen wie Impaktion, Diffusion, Interzeption und Sedimentation“. Der Probenahmestrom wird bei einem definierten Volumenstrom durch eine Sammellösung gesaugt, in der die enthaltenen Partikel abgeschieden werden. Der in Richtlinie VDI 4257 Blatt 2 beschriebene, für einen Probenahmenvolumenstrom von 30 l/min ausgelegte Impinger AGI-30 muss bei der Probenahme wegen des horizontalen

Flüssigkeitsspiegels der Sammellösung zwingend senkrecht betrieben werden (Abb. 6). Für die isoaxiale Probenahme aus horizontalen Strömungen erfolgt die Absaugung und Zuführung über einen vorgeschalteten 90°-Krümmer (Abb. 9). Eine isoaxiale Beprobung vertikal aufwärts strömender Gase erfordert einen weiteren Krümmer. Im Impinger werden Partikel mit Durchmessern kleiner 30 µm abgeschieden, der Krümmer fungiert als Vorabscheider für Partikel größer 10 µm (VDI Richtlinie 4252 Blatt 3). Ein Vorteil gegenüber dem Impaktor ist im Hinblick auf eine Bioaerosolprobenahme die Möglichkeit, nahezu jegliche Sammelflüssigkeiten einsetzen zu können. Nach Vergleichsuntersuchungen ist die biologische Sammeleffizienz höher als bei einem Impaktor sowie einem Wet-Zyklon-Sammler (Expertenkommission Legionellen 2015). Als nachteilig für die Messaufgabe der Legionellenaerosol-Erfassung an Rückkühlanlagen kann das Sammelvolumen angesehen werden, dass bei einem Volumenstrom von 30 l/min über die maximale Probenahmedauer von 30 min maximal 900 l beträgt. Durch zeitgleichen Einsatz mehrerer Probenahmesysteme kann dieser Nachteil ausgeglichen werden. Die zwischen den Probenahmen vorzunehmende Reinigung wird aufgrund der Konstruktion als aufwändig eingeschätzt (Langer 2012). Der Abscheidegrad für Partikel unter 1 µm ist eher gering (Langer 2012). was aber für die Probenahme von Legionellenaerosolen mit überwiegend größeren Durchmessern als akzeptabel angesehen werden.

Abbildung 6: Impinger BioSampler



Quelle: SKC Inc. 2018

Zyklonabscheider bzw. Wet-Zyklon-Abscheider

Zyklonabscheider sind Trägheitsabscheider, bei denen die eintretende Luft beschleunigt und in eine Kreisbahn gezwungen wird. Dadurch bildet sich eine Rotations- oder Zyklonströmung aus, welche über ein Tauchrohr den Zyklon verlässt. Durch die Zentrifugalkräfte werden Partikel mit einer hohen Trägheit nach außen gedrängt und gesammelt, kleinere folgen der Luftströmung und verlassen den Abscheider mit dem austretenden Gasstrom.

Abscheider dieser Art werden in vielen Prozessen zur Staubminderung eingesetzt. Zur Sammlung von Bioaerosolproben wird der Sammelkonus des Zyklons analog zum Impinger mit einer Flüssigkeit gefüllt, in der die Bioaerosole weiterhin lebensfähig bleiben (Wet-Zyklon). Ein Beispiel eines solchen Zyklonsammlers stellt der Coriolis µ-Sammler dar, der im Kapitel 4.1 beschrieben wird. Wie auch beim Impinger ist eine freie Wahl der Sammelflüssigkeit möglich. Gemäß der Ergebnisse von Vergleichsmessungen ist die biologische Sammeleffizienz höher als bei einem Impaktor, allerdings etwas geringer als beim Impinger (VDI-Richtlinie 4250 Blatt 2).

Die Eignung eines Wet-Zyklonsammlers wird im Hinblick auf die Probenahme von Legionellen als sehr gut eingeschätzt, da die Probenahme mit einem höheren Volumenstrom von 300 l/min über 10 Minuten erfolgt (Expertenkommission Legionellen 2015). Dadurch kann bei gleicher Probenahmedauer das höchste Volumen aller handelsüblichen Aerosolsammler erfasst werden.

3 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Um Legionellenepidemien in Zukunft zu vermeiden, ist 2017 die 42. Bundesimmissionschutzverordnung (BImSchV) über die Hygiene in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern in Kraft getreten. In dieser sind Überwachungsstrategien der Legionellenkonzentration im Nutzwasser der betreffenden Anlagen sowie Prüf- und Maßnahmenwerte festgelegt. Für die Routineüberwachung der aus Verdunstungskühlanlagen freigesetzten und epidemiologisch relevanten Legionellenaerosole liegt bislang kein sensitives Nachweisverfahren für an Verdunstungskühlanlagen vor.

Seit einigen Jahren sind Untersuchungen zur Thematik der quantitativen Erfassung von Legionellen in Aerosolen (Deloge-Abarkan et al., 2007; Westrell et al., 2004; Bordenave et al., 2002) publiziert. Basierend auf den wenigen Untersuchungen aus dem Bereich Verdunstungskühlanlagen ist bislang kein Zusammenhang zwischen der Konzentration an Legionellen in Kühlwasserproben (aus den unterschiedlichsten Bereichen) und Aerosolen zu erkennen. Insofern erscheint es wichtig im Bedarfsfall oder auch routinemäßig auf eine standardisierte Probenahme für luftgetragene Legionellen zurückgreifen zu können. Wie aus anderen Bereichen bekannt ist, spielen neben der Auswahl eines geeigneten Sammelverfahrens auch die Details der Probenahme (Probenahmestrategie), der Probentransport und die Probenaufbereitung sowie die Wahl aussagekräftiger und sensitiver Analyseverfahren eine wichtige Rolle.

Im Rahmen des UFOPLAN-Vorhabens „Nachweis von Legionellen in Luftproben aus Verdunstungskühlanlagen“ ist bereits ein Sammel- und Nachweisverfahren unter Verwendung eines Zyklonsammlers erarbeitet worden (UBA 2014). Kann dieses Verfahren zur laufende Überwachung der Legionellenemission bzw. der anlagenbezogenen Immission genutzt werden, lassen sich kritische Anlagenzustände frühzeitig erfassen und in Folge geeignete Maßnahmen zur Reduzierung und Vermeidung der Legionellenfreisetzung ergreifen. Mit diesem Wissen könnten auch grundsätzliche Strategien zur Risikominimierung erarbeitet werden.

Im Vorhaben soll untersucht werden, wie Legionellen in den Aerosolen in der Abluft von Verdunstungskühlanlagen beprobt und mit modernen molekularbiologischen Verfahren nachgewiesen werden können. Dabei sollen Probenahme- und Nachweisverfahren erarbeitet werden, die eine möglichst zeitnahe Erfassung der Emission bzw. der anlagenbezogenen Immission erlauben und auch für die Routineüberwachung geeignet sind. Aufgrund seines hohen Sammelvolumenstroms soll dabei der Coriolis μ -Sammler zum Einsatz kommen. Berücksichtigt werden sollen Anlagen unterschiedlicher Konstruktion (Größe und Bauart).

Das zu entwickelnde Verfahren sollte eine möglichst niedrige Nachweisgrenze erreichen, damit auch geringe Konzentrationen an Legionellen in der Luft nachgewiesen und so kritische Situationen zeitnah erfasst werden können. Außerdem muss das Nachweisverfahren in der Lage sein, lebende von toten Legionellen zu unterscheiden.

Angestrebt wird, eine systematische und standardisierte Vorgehensweise und Methodik zur routinemäßigen Messung von Legionellen in Luftproben von Verdunstungskühlanlagen (Emission und Immission) zu erarbeiten. Die geplanten molekularbiologischen Nachweismethoden wie z. B. quantitative real-time-PCR mit PMA-Behandlung erlauben zudem den differenzierten Nachweis von nicht-kultivierbaren (VBNC) und abgetöteten Legionellen in den Aerosolproben sowie die gewünschte Differenzierung zum Vitalitätszustand der Bakterien.

Wesentliche Elemente der Untersuchungen sind wie folgt:

- ▶ Bewertung des Probenahmeverfahrens mit dem Coriolis μ -Sammler
- ▶ Optimierung des Probenahmeverfahrens für Emissions- und Immissionsmessungen inkl. Entwicklung eines Prototyps
- ▶ Entwicklung einer Probenahmestrategie für Emissionsmessungen
- ▶ Entwicklung einer Probenahmestrategie für Immissionsmessungen
- ▶ Entwicklung und Validierung eines Nachweisverfahrens zur Quantifizierung und Lebend/Tot-Unterscheidung von Legionellen
- ▶ Erprobung der Probenahmestrategien, des Probenahmeverfahrens und des Nachweisverfahrens in der Praxis

Dokumentiert werden die Ergebnisse in Form von standardisierten Protokollen zur Vorbereitung und Durchführung von Emissions- und Immissionsmessungen sowie einem Protokoll für den molekularbiologischen Nachweis der Legionellen.

4 Material und Methoden

4.1 Coriolis μ Bioaerosolsammler

Allgemeine Beschreibung

Der Coriolis® μ -Aerosolsammler (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich, Vertrieb in Deutschland durch VWR International GmbH, Darmstadt) arbeitet nach dem oben beschriebenen Nass-Zyklonprinzip (2.5.3). Die Ansaugung in den Zyklon erfolgt über einen rechteckigen Ansaugschlitz mittels eines Sauggebläses, welches in der Steuereinheit verbaut ist. Der Zyklon wird über ein U-förmig gebogenes Rohr mit der Steuereinheit verbunden (Abbildung 7 links). Der unten an den Zyklon gasdicht angeschraubte, flüssigkeitsgefüllte Sammelkelch stellt den Konus des Zyklons dar (Abbildung 7, Mitte). An der zugehörigen Absaugeinheit kann der Sammelvolumenstrom zwischen 100 l/min und 300 l/min in fest voreingestellten Stufen von 50 l/min gewählt werden (bezogen auf Normalbedingungen $p_n = 1013$ mbar und $T_n = 288$ K, Vautier und Fa. Bertin Technology 2018). Der Coriolis μ Abscheider besitzt in der Standard-Bauform einen rechteckigen Ansaugschlitz mit einer Höhe von 20 mm und einer Breite von 9 mm.

Alternativ wird das Gerät als Coriolis® RECON Sammler angeboten. Dieses Gerät weist mit 600 l/min einen gegenüber dem Standardgerät doppelt so hohen Absaugvolumenstrom auf. Der Einlass des Gerätes saugt nicht gerichtet, sondern umlaufend ein und ist aus diesen Gründen bevorzugt für die Sammlung von Umgebungsluftproben geeignet.

Abbildung 7: Coriolis μ Bioaerosolsammler



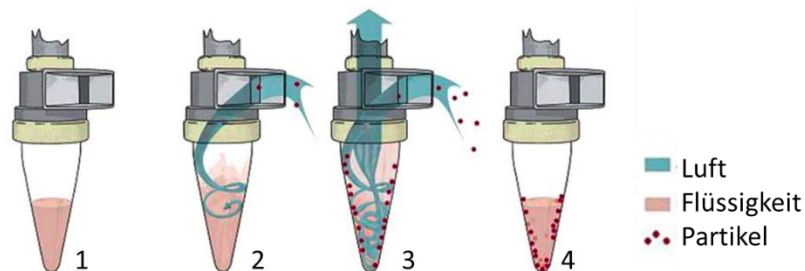
Links: Coriolis-Sammler mit programmierbarer Absaugeinheit. Mitte: Standard-Zyklon zur Immissionsmessung mit rechteckigem Ansaugschlitz und Sammelkelch. Rechts: Alternative Ansaugvariante mit zylindrischem Ansaugstutzen und konisch zulaufendem Übergangsstück

Quelle: links: Bertin Instruments 2018, Mitte und rechts: eigene Aufnahme

In Abbildung 8 ist die Funktionsweise des Abscheiders dargestellt. Der per Sauggebläse angesaugte Probenahmestrom tritt tangential in den zylindrischen Gasraum des Zyklons ein. Hier bildet sich eine Drallströmung aus (2). Im Gasstrom enthaltene Partikel können aufgrund von Massenträgheitseffekten bei der gewählten Umlenkungsgeschwindigkeit an den Zylinderwandungen abgeschieden werden. Aufgrund der auf die Flüssigkeit ausgeübten Zentrifugalkräfte wird auch diese in Rotation versetzt und steigt dabei an der Konus- und

Zylinderwand aufwärts. Auftreffende Partikel werden in einem Flüssigkeitsfilm aufgenommen. Dadurch werden die Partikel in diesem wandbenetzenden Flüssigkeitsfilm abgeschieden, gesammelte Mikroorganismen trocknen so nicht aus. Der abgereinigte Probenahmestrom verlässt den Zyklon über ein Tauchrohr (3). Nach Beendigung der Probenahme bleibt die Flüssigkeit mit den darin befindlichen Partikeln im Sammelgefäß zurück (4) und kann zur weiteren Analyse entnommen werden. Aufgrund des waagerechten Flüssigkeitsspiegels saugt das Gerät horizontal an.

Abbildung 8: Funktionsweise des Coriolis μ Bioaerosolsammlers der Firma Bertin Instruments



Quelle: Carvalho et al. 2008

Bei der Ansaugung von nicht gesättigter Luft können Flüssigkeitsverluste resultieren, welche die Probenahmedauer begrenzen. Bei der herstellereitig vorgesehenen Sammelzeit von zehn Minuten je Probe und dem maximalen Volumenstrom können 3 m^3 Luft beprobt werden. Eine Verlängerung der Sammeldauer ist durch Nachdosieren des Fluids mit Hilfe einer ergänzenden Schlauchpumpe möglich.

Modifikationen des Sammlers zur isokinetischen und isoaxialen Messung

Um Minderbefunde bei einer Probenahme zu vermeiden, wird eine isoaxiale und isokinetische Probenahme angestrebt (2.3.4). Insbesondere bei anlagenseitig aufwärts strömenden Gasauslassöffnungen ist die Standardausführung des Sammlers dafür nicht geeignet, da der Zyklon zwingend aufrechtstehend betrieben werden muss und eine Ansaugung damit horizontal erfolgt.

Im Rahmen des Vorhabens wurde daher eine weitere, für Laborzwecke angebotene Bauform des Sammlers genutzt, bei der ausgehend von einer 25 mm durchmessenden zylindrischen Ansaugöffnung der Gasstrom über einen ca. 14 cm langen, konisch zulaufenden Ansaugkanal zum Ansaugschlitz des Zyklons geführt wird. Der zylindrische Absaugstutzen (Abbildung 7, rechts) ermöglicht es, einen Krümmer aufzustecken (Abbildung 9, oben links) und über diesen verschiedene Absaugdüsen zu verwenden. Bei einer 90-Grad-Krümmung können somit vertikale Strömungen isoaxial beprobt werden. Düsen mit unterschiedlichen Durchmessern ermöglichen die Anpassung der Absauggeschwindigkeit an die Geschwindigkeit des zu beprobenden Gases (Tabelle 3 und Abbildung 9). Ein elastischer Dichtring ermöglicht eine ausreichend hohe Klemmkraft und Gasdichtigkeit zwischen den per Steckverbindung verbundenen Bauteilen.

Die Prototypen-Anfertigung von Düsensatz und Krümmer erfolgte durch ein Unternehmen des Prototypen- und Kunststoffbaus (GIA – Gesellschaft für Ingenieur- und Apparatebau m.B.H., Buchholz-Mendt). Die Auslegung orientierte sich an typischerweise bei Anlagen zu erwartenden Abgas-Strömungsgeschwindigkeiten. Bei Zellenkühltürmen können im Bereich der Tropfenabscheider typischerweise ca. 3,5 m/s, im Bereich der Freisetzungsebene oberhalb der Ventilatoren wegen des dort reduzierten Querschnitts bis zu 10 m/s angenommen werden. Es wurden zwei Krümmer mit unterschiedlichen Krümmungsradien angefertigt.

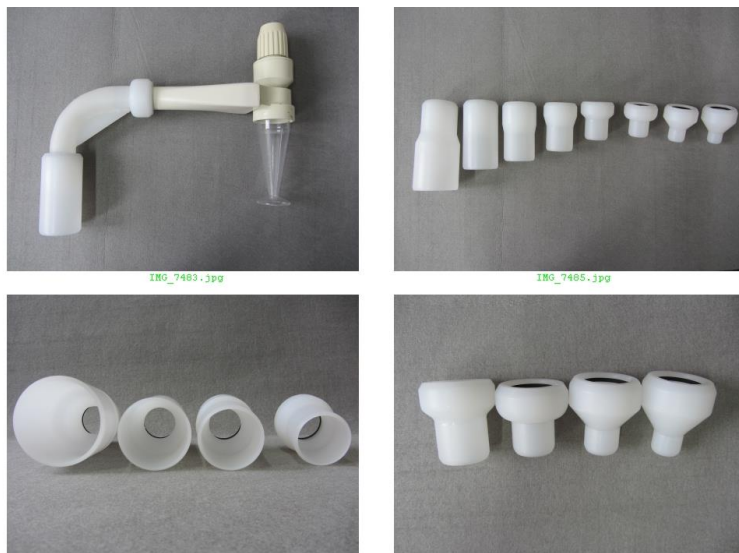
Es ist grundsätzlich möglich, die Zykloneinheit mit einem externen Gasförderaggregat zu betreiben, um beispielsweise den Volumenstrom an spezielle Anforderungen anpassen zu können, beispielsweise erhöhter Strömungswiderstand durch verlängerte Absaugleitungen zwischen Sammler und Gasförderaggregat bzw. erhöhter Druckverlust bei der Ansaugung.

Tabelle 3: Düsendurchmesser und resultierende Gasgeschwindigkeit

Nr.	Düsen-Innen- durchmesser [mm]	Geschwindigkeit (m/s) bei:		
		100 l/min	200 l/min	300 l/min
1	15	9,4	18,9	28,3
2	16,5	7,8	15,6	23,4
3	20	5,3	10,6	15,9
4	25	3,4	6,8	10,2
(0)*	27,2	2,9	5,7	8,6
5	30	2,4	4,7	7,1
6	35	1,7	3,5	5,2
7	40	1,3	2,7	4,0
8	45	1,1	2,1	3,1

* ohne Düse

Abbildung 9: Coriolis μ Sammler: Krümmer und Düsensatz



Oben links: vollständiger Sammelzug, zusammengesetzt aus Absaugdüse (hier 45 mm Durchmesser), Krümmer und Nass-Zyklon-Sammler. Oben rechts: Absaugdüsensatz, Durchmesser der zylindrischen Düsen zwischen 15 und 45 mm. Unten links: zylindrische Düsen, Durchmesser 45 bis 30 mm. Unten rechts: zylindrische Düsen, Durchmesser 25 bis 15 mm.

4.2 Aerosolerzeugung im Labor

Die Bestimmung der physikalischen Abscheidecharakteristik des modifizierten Coriolis μ -Sammlers erfolgte durch Beaufschlagung mit Prüfaerosol und Messung des Fraktionsabscheidegrades. Als Prüfpartikel kamen sowohl Feststoffpartikel (Prüfstaub) als auch ein Tropfenaerosol zum Einsatz.

Aerosolherstellung mittels Rotations-Bürsten-Generator

Bei dem Rotations-Bürsten-Generator (RBG 1000, Fa. Palas GmbH, Karlsruhe) rotiert eine Bürste in einem sogenannten Dosierkopf, welcher von Druckluft durchströmt wird. Unterhalb wird ein mit Partikelmaterial gefüllter Metallzylinder gasdicht befestigt. Per Schrittmotor wird ein dicht schließender Kolben von unten in den Zylinder geschoben, welcher die Staubsäule mit definierter Vorschubgeschwindigkeit aufwärtsbewegt. Die rotierende Bürste nimmt den Staub ab, der dann mit dem strömenden Druckluftstrom abtransportiert wird. Zur Messung wurde ein standardisierter Teststaub verwendet (Arizona Road Dust A2 fine). Das Material besitzt eine (Korn- oder Substanz-)Dichte von 2650 kg/m^3 .

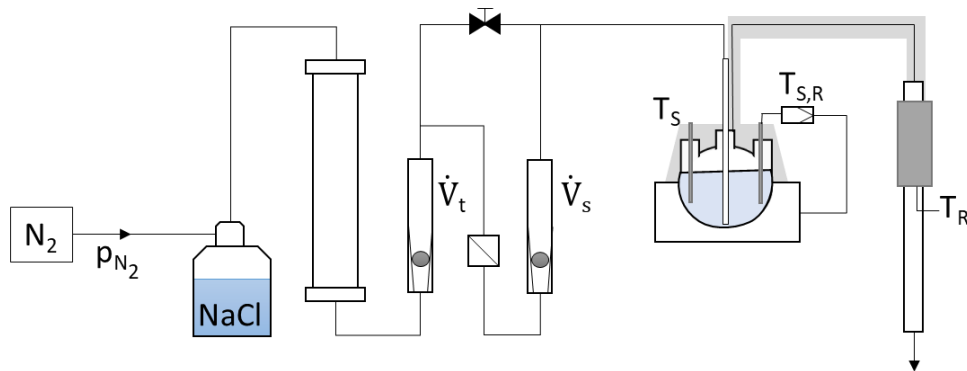
Erzeugung von Tropfenaerosolen

Tropfenaerosol wird im Zusammenhang mit der Partikelmesstechnik durch heterogene Kondensation erzeugt. Um die Messungen unabhängig von Wasserdampfeffekten durchführen zu können, wird als Fluid DEHS (Di-Ethyl-Hexyl-Sebacat) verwendet. Dieses weist aufgrund des geringen Dampfpartialdrucks ein deutlich stabileres Betriebsverhalten als Tropfenaerosol auf als Wasser. Mit einer Dichte von 914 kg/m^3 (bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$) und aufgrund der Bildung von sphärischen Partikeln besitzt es insgesamt vergleichbare Mobilitätseigenschaften zu Wasser und wird daher als Testaerosol eingesetzt. Als Nukleationskeime für die DEHS-Tropfen dienen Kochsalzpartikel mit sehr kleinem Durchmesser. Deren Generierung erfolgt durch Zerstäubung einer Salzlösung mittels Zweistoffdüse. Das Aerosol wird anschließend über einen Trockner geleitet, so dass aus den Lösungstropfen trockene Salzkerne kristallisieren.

Dieses Verfahren wird bei nach dem Sinclair-LaMer Prinzip arbeitenden Tropfenaerosol-Generatoren umgesetzt (Abbildung 10). Das Funktionsprinzip ist in Richtlinie VDI 3491 Blatt 1 beschrieben. Es lassen sich monodisperse Flüssigkeitsaerosole erzeugen, d. h. die Größenverteilung zeichnet sich durch eine geringe Standardabweichung aus. Dieses Prinzip ist von verschiedenen Herstellern in Form entsprechender Geräte umgesetzt, beispielsweise das Gerät TSI 3475 der Firma TSI Inc., welches Partikel mit Durchmessern zwischen $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ und $8 \text{ }\mu\text{m}$ bei einer Konzentration $>10^6 \text{ Partikel/cm}^3$ erzeugen kann (TSI 2004).

Ein nach diesem Prinzip arbeitender Tropfenaerosol-Generator wurde aufgebaut und in Betrieb genommen. Damit steht das erforderliche DEHS-Testaerosol mit reproduzierbaren Eigenschaften für die Charakterisierung des modifizierten Zyklonsammlers zur Verfügung. Die Größe der entstehenden Partikel ist abhängig von der Menge an Flüssigkeit im Trägergas pro Kondensationskern. Über die Temperatur des Dampferzeugers kann das dampfdruckabhängige Angebot an kondensierbarer DEHS-Dampfmenge im Gasvolumen gezielt eingestellt werden.

Abbildung 10: Aerosolgenerator nach dem Sinclair-La-Mer Prinzip



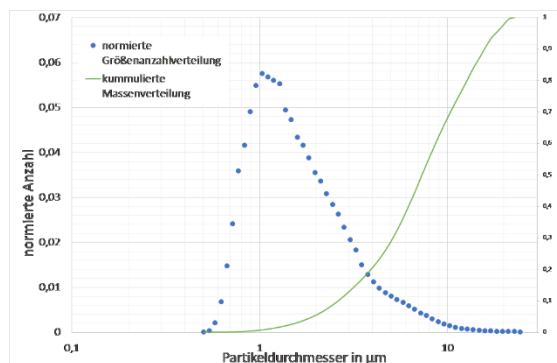
Wässrige Kochsalzlösung wird mittels Zweistoffdüse mit Stickstoff beaufschlagt und vernebelt, wodurch kochsalzhaltige Tropfen freigesetzt werden (Atomizer-Prinzip). Nach einer Trocknung des Aerosolstroms (\dot{V}_t) im Diffusionstrockner dienen verbleibende NaCl-Partikel als Kondensationskeime. Der Strom wird geteilt; in einem Teilstrom (\dot{V}_s) enthaltene Salzkerne können in einem Filter abgeschieden werden. Die Aerosolströme werden vereint und mit gesamt verringerter Salzkern-Konzentration durch ein temperiertes Ölbad geleitet (T_S). Die Atmosphäre oberhalb des Bads sowie der austretende Aerosolstrom ist mit Öl gesättigt und wird in einen Kondensationsturm geleitet und dort abgekühlt (T_R). In Folge der Abkühlung kondensiert das Öl auf den Salzkernen. Es entsteht ein monodisperses (Öltröpfchen-)Aerosol von definiertem Durchmesser.

Aerosolherstellung mittels Zweistoffdüse (Atomizer)

Zur Erzeugung eines Aerosols zur Charakterisierung des Krümmers wurde ein Inhalationsgerät der Firma PARI GmbH eingesetzt. Dieser Aerosolgenerator erzeugt ein polydisperses Tropfenaerosol und wurde ebenfalls mit DEHS betrieben. Nachfolgende Abbildung 11 gibt die gemessene Anzahlgrößenverteilung des erzeugten Aerosols wieder.

Abbildung 11: Anzahlgrößenverteilung des mittels Inhalator erzeugten Tropfenaerosols

Normierte Größenanzahlverteilung (blaue Kurve, primäre Y-Achse) und kumulierte Massenverteilung (grüne Kurve, sekundäre Y-Achse) des mit dem Pari XLent verdünnten DEHS-Aerosols



Auftragung der Partikelanzahl einer Größenfraktion bezogen auf die gemessene Gesamtanzahl an Partikeln (Y-Achsen, normierte Anzahl) über dem Partikeldurchmesser (x-Achse). Quelle: IUTA

Aerosolcharakterisierung

Die Grundlagen zur Bestimmung der Partikelanzahlkonzentration und Anzahlgrößenverteilung von Aerosolen sind in Richtlinie VDI 3867 Blatt 1 beschrieben. Weiterhin wird dort eine Übersicht über verschiedene Partikelmessgeräte gegeben. Im Vorhaben wurden zwei verschiedene Partikelmessgeräte zur Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung eingesetzt. Zum einen wurde das optische Aerosolspektrometer welas® digital 3000 (der Fa. Palas GmbH) und

zum anderen das Flugzeitspektrometer APS™-Spektrometer 3321 (Aerodynamic Particle Sizer® der Fa. TSI GmbH) eingesetzt. Sowohl beim welas® als auch beim APS™ betrug der Probenahmevolumenstrom 5 l/min.

Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung mittels Aerosolspektrometer

Optische Aerosolspektrometer bestimmen die Anzahlgrößenverteilung über die Messung der Streulichtintensität der Partikel. Das hier verwendete Gerät welas® sowie weitere optische Aerosolspektrometer sind ausführlich in Richtlinie VDI 3867 Blatt 4 beschrieben (VDI-Richtlinie 3867 Blatt 4, 2011). Die maximal detektierbare Partikelkonzentration beträgt beim verwendeten Gerät 2×10^5 Partikel je Kubikzentimeter Gas, erfasst werden Partikel im Größenbereich zwischen $0,18 \mu\text{m}$ und $40 \mu\text{m}$ (streulichtäquivalenter Durchmesser). Für A2-Staub ist der streulichtäquivalente Durchmesser mit dem des verwendeten Kalibrierstaubs (monosphere 1000) vergleichbar. Daher können die ermittelten Werte als geometrische Durchmesser angesehen werden. Das Messgerät gibt die Verteilung über den streulichtäquivalenten Durchmesser aus, mithilfe nachfolgend dargestellter Formel (6.3) lässt sich unter Berücksichtigung der Materialdichten der aerodynamische Durchmesser d_p aus dem geometrischen Durchmesser $d_{p,g}$ berechnen. Der Messgasvolumenstrom beträgt i. d. R. 5 l/min und wird von der geräteinternen Pumpe abgesaugt.

$d_p = d_{p,g} * (\rho_{A2} / \rho_{\text{Latex}})^{1/2}$	<u>1</u>
---	----------

ρ_{A2} : Korndichte, A2-Staub (g/m³)

ρ_{Latex} : Korndichte, Latex-Partikel (g/m³)

d_p : aerodynamische Durchmesser

$d_{p,g}$: geometrischen Durchmesser

Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung mittels Flugzeitspektrometer

Bei Flugzeitspektrometern, zu denen das APS™ (Aerodynamic Particle Sizer) zählt, wird aus der Flugzeit der Partikel zwischen zwei Lichtstrahlen der aerodynamische Partikeldurchmesser berechnet. Die Funktionsweise von Flugzeitspektrometer allgemein und das APS™ speziell sind in der Richtlinie VDI 3867 Blatt 5 ausführlich erläutert. Mit dem Messgerät APS™ lassen sich Partikel mit Durchmessern im Bereich von $0,5 \mu\text{m}$ bis $20 \mu\text{m}$ detektieren. Da im submikronen Tropfenbereich keine Bakterien erwartet werden, ist der Messbereich des APS ausreichend zur Fraktionsabscheidegradbestimmung im Rahmen der Aufgabenstellung. Die Ergebnisse sind repräsentativ bis zu Konzentrationen von 1000 \#/cm^3 . Bei einer höheren Konzentration ist mit einem Fehler durch Koinzidenz, zeitgleiches Eintreten mehrerer Partikel in die Messzelle, zu rechnen.

4.3 Charakterisierung der Sammeleffizienz des Aerosolsammlers

Zur Bestimmung der physikalischen Sammeleffizienz wurde der Fraktionsabscheidegrad des Zyklonsammlers bestimmt. Der Abscheidegrad ist der Prozentanteil einer aufgegebenen Partikelkonzentration, der in dem Aerosolabscheider zurückbleibt. Der Fraktionsabscheidegrad (FAG) stellt einen partikeldurchmesserspezifischen Abscheidegrad dar.

Es gilt:

$FAG = \frac{c_{ro} - c_{re}}{c_{ro}} = 1 - \frac{c_{re}}{c_{ro}}$	<u>2</u>
--	----------

c_{ro} Partikelkonzentration einer Durchmesserklasse im Rohgas [1/cm³]

c_{re} Partikelkonzentration einer Durchmesserklasse im Reingas [1/cm³]

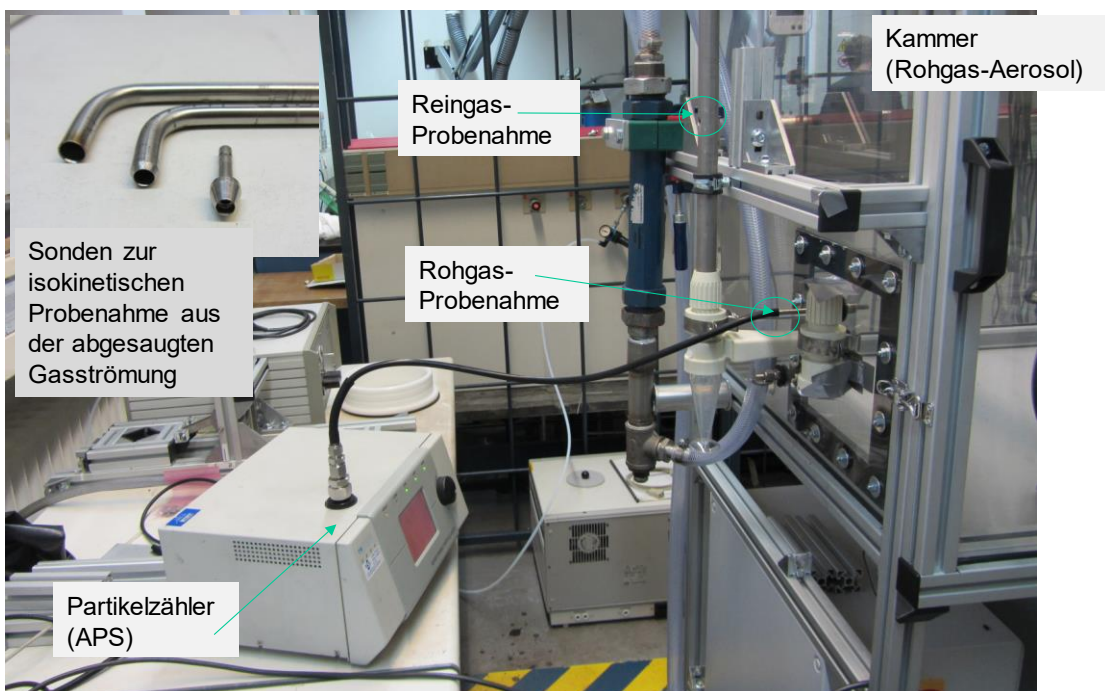
Wenn der FAG logarithmisch über der Partikelgröße aufgetragen wird, ergibt sich die Abscheidekurve (Trennkurve). Der FAG ist im Falle eines Zyklons u. a. von der radialen Geschwindigkeit sowie der Dichte der Partikel abhängig. Die radiale Geschwindigkeit wiederum ist von der Geometrie des Zyklons sowie dem Volumenstrom abhängig.

Das Messgerät wird mit einem Messkopf betrieben, der wiederholt wechselseitig zur Roh- und Reingasmessung verwendet wird. Der Fraktionsabscheidegrad kann gemäß obiger Formel aus diesen Messwerten berechnet werden, wobei die Rohgaskonzentration als Mittelwert der beiden Messungen vor und nach der jeweiligen Reingasmessung bestimmt wird. Mit dieser Vorgehensweise kann ein gerätebedingter zeitlicher Drift der Messwerte im Rahmen der Auswertung berücksichtigt werden. Die Abscheidegradmessung wird jeweils mit flüssigkeitsgefülltem Messkonus am Sammler durchgeführt.

Aerosolkammer zur Charakterisierung des Immissionszyklons (Probenahme aus ruhendem Gas)

Der Fraktionsabscheidegrad des Immissionszyklons wurde durch Absaugung aus einer Kammer mit annähernd ruhendem Aerosol ermittelt (Abb. 12, Kantenlänge der würfelförmigen Kammer jeweils ca. einem Meter). Per Bürstengenerator wurde mit Prüfstaub beaufschlagte Druckluft in die Kammer eingespeist. Die Ansaugung in den Aerosolsammler erfolgte mittels Saugzuggebläse durch eine Wandöffnung in Größe der rechteckigen Ansaugöffnung des Aerosolsammlers. Die Konzentration in der Kammer (Rohgas) wurde mittels APS bestimmt, die Reingas-Konzentration nach Aerosolsammler wurde in einem Abgasrohr vor dem Saugzug gemessen. Aus der Differenz zwischen Roh- und Reingas lässt sich der Abscheidegrad wie oben dargestellt bestimmen. Die Abscheidecharakteristik wird für diskrete Absaugvolumenströme des Sammlers zwischen 100 L/min und 300 L/min bestimmt. Der FAG des Zyklons wurde ebenfalls für die kreisförmig runde Ansaugkonfiguration bestimmt (Konfiguration zum Aufstecken eines Krümmers, Emissionskonfiguration).

Abbildung 12: Aerosolkammer



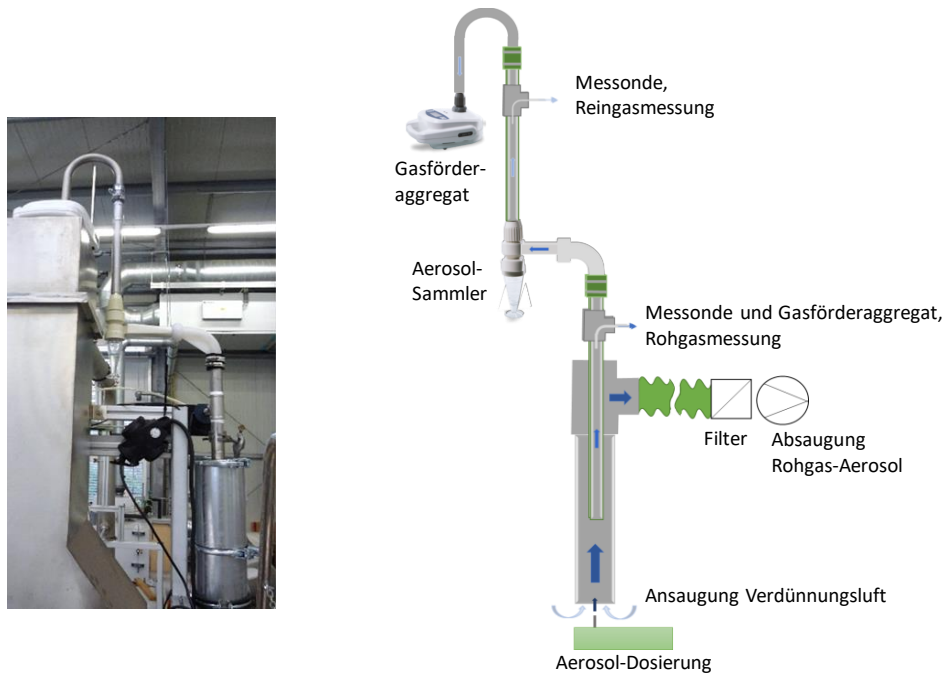
Versuchsaufbau zur Bestimmung des Fraktionsabscheidegrads des Coriolis μ Sammlers (aus ruhender Luft)

Aerosolkanal zur Charakterisierung des Emissionszyklons (Probenahme aus strömenden Gasen)

Zur Fraktionsabscheidegradmessung des Emissionszyklons erfolgte entsprechend der charakteristischen Einsatzbedingungen durch Absaugung aus einem strömenden Gas. Es wurden entsprechende Versuchsstände zur Gewährleistung der Messbedingungen nach den Vorgaben der VDI 2066 für die Beaufschlagung mit Feststoff- und Tropfenaerosol errichtet. Zentrales Element ist jeweils ein Strömungsrohr, aus dem der Emissionssammler einen Aerosol-Teilstrom ansaugt (Rohgas). Ein weiteres Strömungsrohr ist zwischen Sammlerauslass und Absaugpumpe verbaut, in welchem die Reingaskonzentration erfasst werden kann. Aus der Differenz zwischen Roh- und Reingas lässt sich der Abscheidegrad wie vorangehend dargestellt bestimmen. Als Aerosol wird sowohl Arizona Prüfstaub A2 als auch DEHS verwendet. Um eine homogene Strömung und damit eine homogene Verteilung der Partikel im Abgasstrom zu gewährleisten, ist eine Vorlaufstrecke von fünf hydraulischen Durchmessern sowie eine Nachlaufstrecke von mindestens zwei hydraulischen Durchmessern in Bezug auf die Roh- und Reingasmesspunkte vorhanden (VDI-Richtlinie 2066 Blatt 1).

Die Abscheidecharakteristik wird für diskrete Absaugvolumenströme des Sammlers zwischen 100 L/min und 300 L/min bestimmt. Damit auch bei der Fraktionsabscheidegradermittlung die Anforderung an die Isokinetik erfüllt ist, müssen die jeweiligen Messsondendurchmesser in Abhängigkeit von der am Messort vorherrschenden Geschwindigkeit ausgewählt werden.

Abbildung 13: Versuchsaufbau zur Fraktionsabscheidegradmessung mit Feststoffaerosol aus strömenden Gasen



In Abbildung 13 ist der Aufbau zur Fraktionsabscheidegradmessung mit A2-Staub abgebildet. Am Fuß des Prüfstandes ist der Rotationsbürstengenerator RBG 1000 angeordnet, aus dem ein Aerosolstrom in einen 120 mm durchmessenden Strömungskanal dosiert wird. Mittels Saugzug wird das Aerosol aufwärts durch den Strömungskanal gezogen. Zusätzlich wird Umgebungsluft angesaugt, um die Aerosolkonzentration auf eine von den Messgeräten detektierbare Konzentration zu reduzieren. Mittels eines weiteren Sauggebläses wird über ein zentriert im Strömungskanal angebrachtes Innenrohr der Gasstrom durch den Coriolis-Sammler angesaugt. Diese Absaugung erfolgt unter Berücksichtigung der geforderten Längen für die Ein- und Auslaufstrecke nach VDI 2066 Blatt 1.

Die Absauggeschwindigkeit ergibt sich als Verhältnis von gewähltem Absaugvolumenstrom und Sondendurchmesser. Der Probengasvolumenstrom der eingesetzten Partikelmessgeräte ist in beiden Fällen 5 l/min.

Bei der Bestimmung des Fraktionsabscheidegrads mit A2-Staub wird eine Erdung des aerosolführenden Edelstahl-Kanals vorgenommen, um eine Partikelabscheidung durch elektrostatische Aufladung der Partikel zu verhindern. Um im Falle der Versuche mit Öltröpfen eine Kondensation an den Rohrwänden zu verhindern, wird eine Wärmeisolierung des Rohres vorgenommen.

Zur roh- und reingasseitigen Probenahme dient eine gerade Probenahmesonde mit einem Durchmesser von 5 mm. Rohgasseitig erfolgt die Absaugung aus dem Absaugrohr im Strömungskanal und reingasseitig aus dem verlängerten Tauchrohr des Zyklons (Abbildung 13). Die Probenahmestellen entsprechen hinsichtlich der Einlauf- und Auslaufstrecke den Vorgaben der Richtlinie VDI 2066.

Die Fraktionsabscheidegradmessung erfolgt durch wiederholte wechselseitige Messung der Staubkonzentration mittels Aerosolspektrometer vor und nach Zyklon und Berechnung des Fraktionsabscheidegrades. Dazu wird der Messkopf des Messgerätes zwischen den beiden Einbaupositionen wiederholt versetzt. Eine Messreihe besteht aus drei Rohgas- und zwei Reingasmessungen, aus denen jeweils zwei Fraktionsabscheidegrade berechnet werden. Die Dauer der jeweiligen Einzelprobenahme beträgt 2 min. Nach jeweils 10 min stoppt die Absaugeinrichtung des Zyklonabscheiders. Das Probenahmegefäß wird erneut befüllt und die Messreihe wird zweimal wiederholt. Damit ergeben sich insgesamt sechs Fraktionsabscheidegrade pro zu vermessendem Volumenstrom.

Zu Beginn der jeweiligen Untersuchung erfolgt zusätzlich die Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit im Aerosolkanal mit Hilfe eines Hitzdrahtanemometers (Typ FVA935-TH5 der Fa. Ahlborn) am Ort der Rohgasprobenahme. Daraus lässt sich der tatsächliche Volumenstrom berechnen. Nachfolgende Tabelle 4 gibt die Ergebnisse in Bezug zum Sollvolumenstrom des Zyklonabscheiders wieder. Die Abweichungen betragen bis zu 10 % und sind entsprechend bei der Ergebnisdiskussion zu beachten.

Tabelle 4: Gemessene Geschwindigkeiten zur Ermittlung des realen Volumenstroms

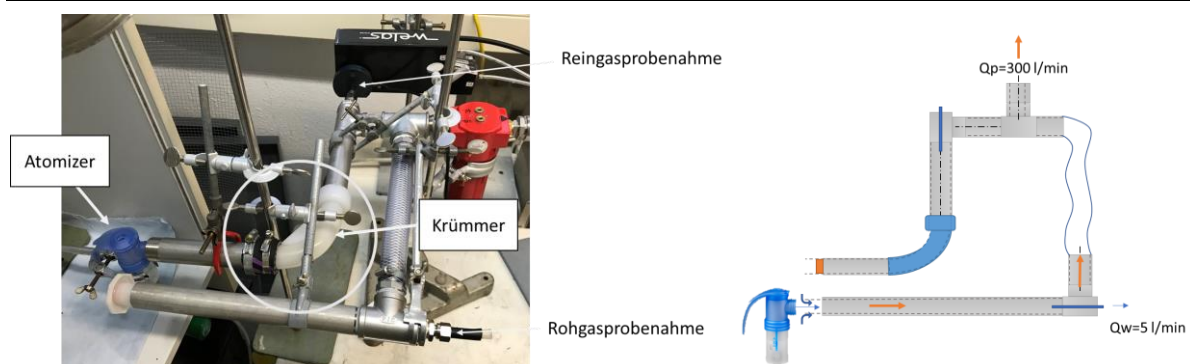
Durchmesser Kanal D_i (mm)	Volumenstrom Sammler, Soll V (l/min)	Volumenstrom Sammler, Messung Hitzdrahtanemometer (l/min)	Abweichung in %
27,2	100,0	98,7	1
27,2	200,0	271,2	10

Aerosolkanal zur Charakterisierung des Krümmers

Zur Charakterisierung des Krümmers wurde ein entsprechender Versuchsaufbau errichtet (Abbildung 14). Dabei handelt es sich um zwei für die Rohgasprobenahme und Probenahme nach Krümmer getrennte, parallel aufgebaute gleichartige Rohrstücke, durch die jeweils ein Aerosolstrom mit der gewünschten Strömungsgeschwindigkeit gesaugt wird. Für die Rohgasprobenahme erfolgt eine Absaugung per schlanker axialer Probenahmesonde unter Berücksichtigung der Isokinetik und Ein- sowie Auslaufstrecken aus einem der beiden Rohre. Zur Probenahme nach Krümmer wird die gleiche Rohrlänge auf zwei Abschnitte vor und nach dem Krümmer aufgeteilt und die Probenahme ebenfalls axial per 5m-Probenahmesonde

durchgeführt. Somit ist in beiden Fällen eine gleichartige Strömungsführung gegeben, ohne die Partikelgrößenverteilung durch Trägheitsabscheidung in Umlenkungen potentiell zu verändern. Die einzige Umlenkung ist die des zu vermessenden Krümmers. Die Probenahme erfolgt durch Wechsel der Probenahme und der Aerosolaufgabe zwischen den beiden gleichartigen Aufbauten und Berechnung des Fraktionsabscheidegrades aus den erhaltenen Messwerten analog zum voran dargestellten Verfahren. Die jeweilig nicht benötigte Aufgabeöffnung wurde verschlossen. Zur Aerosolherstellung wurde der Atomizer (PariBoy) verwendet, der für einen gleichen Vordruck und Luftvolumenstrom eine reproduzierbare Aerosolgrößenverteilung vorgibt (4.2.3). Die Aerosolcharakterisierung wurde mit Hilfe des optischen Partikelspektrometers *welas* (4.2.4.1) durchgeführt. Zur Gewährleistung maximaler Abscheideverluste wurde die Messung bei einem Absaugvolumenstrom von 300 l/min durchgeführt. Ausgehend von den Messergebnissen errechnet sich der Fraktionsabscheidegrad mit Hilfe der Formel 2 (4.3).

Abbildung 14: Fraktionsabscheidegrad des Krümmers



Versuchsaufbau zur Bestimmung des Fraktionsabscheidegrades des Coriolis μ Sammlers mit einem Tropfenaerosol
Quelle: IUTA

Untersuchungen zum Druckverlust und Absaugvolumenstrom

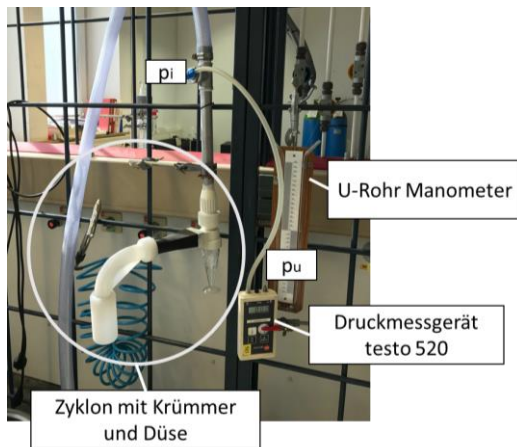
Es erfolgten Untersuchungen zur Beeinflussung des Druckverlustes des Probenahmesystems durch die Anbauteile bei unveränderter Absaugleistung. Nachträglich verwendete Anbauteile können bei Verwendung einer fixen Absaugleistung den Absaugvolumenstrom verringern.

Die Absaugleistung der Pumpe wurde für den Zyklonsammler mit runder Ansaugöffnung bei Verwendung des Krümmers und kleinster Düse bestimmt. Ansaugseitig wird ein gerades Rohrstück aufgesetzt und mittels Hitzdrahtanemometer die Gasgeschwindigkeit bestimmt und unter Bezugnahme zur Anströmfläche der Volumenstrom rechnerisch ermittelt. Mit einem externen Saugzug ist ein Dichtigkeitsstest durchgeführt worden. Sinkt bei verschlossener Ansaugöffnung der per Rotameter gemessene Absaugvolumenstrom auf Null, kann von einer ausreichenden Dichtigkeit des Systems ausgegangen werden. Undichte Verbindungsstellen des Sammel-systems sind entsprechend mit gasdichtem Klebeband verklebt worden, um die gewünschte Dichtigkeit zu erzielen.

Zur Ermittlung des Druckverlustes über den Zyklon und die verschiedenen Ansaugkonfigurationen wurde ein geänderter Aufbau verwendet. Nach Zyklon bzw. der jeweiligen Ansaugkonfiguration folgt ein in einem angesetzten Rohrstück befindliche Druckmessung und anschließend ein per aufgesetztem Schwebekörper und Ventil regelbares Saugzuggebläse (Abbildung 15). Am Auslass befindet sich eine Temperaturmesstelle. Für verschiedene Ansaugkonfigurationen wurde bei Variation des Absaugvolumenstroms der Druckverlust über die Ansaugung und den Zyklonabscheider gemessen. Die Untersuchungen wurden für das abgedichtete System durchgeführt.

Abbildung 15: Druckverlust Zyklonabscheider

Versuchsaufbau zur Bestimmung des Druckverlusts durch den Zyklonabscheider und verschiedene Ansaug-Konfigurationen



Quelle: IUTA

4.4 Modellverdunstungskühlanlage MTKKL2

Eine Modellanlage bietet gegenüber Praxisanlagen den Vorteil, dass Anlagenparameter gezielt eingestellt sowie Tracersubstanzen kontrolliert zugegeben werden können, um systematische Untersuchungen durchführen zu können. Im Rahmen einer Forschungs Kooperation mit der Fa. Kurita Europe GmbH, Düsseldorf wurde ein mobiler Kleinkühlturm „MTKKL 2“ für gezielte Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser und in den Aerosolen genutzt. Die Anlage ist für den mobilen Einsatz bei Kunden vorgesehen und wurde am Standort der Forschungsstelle IUTA temporär betrieben.

Aufbau der Modellanlage

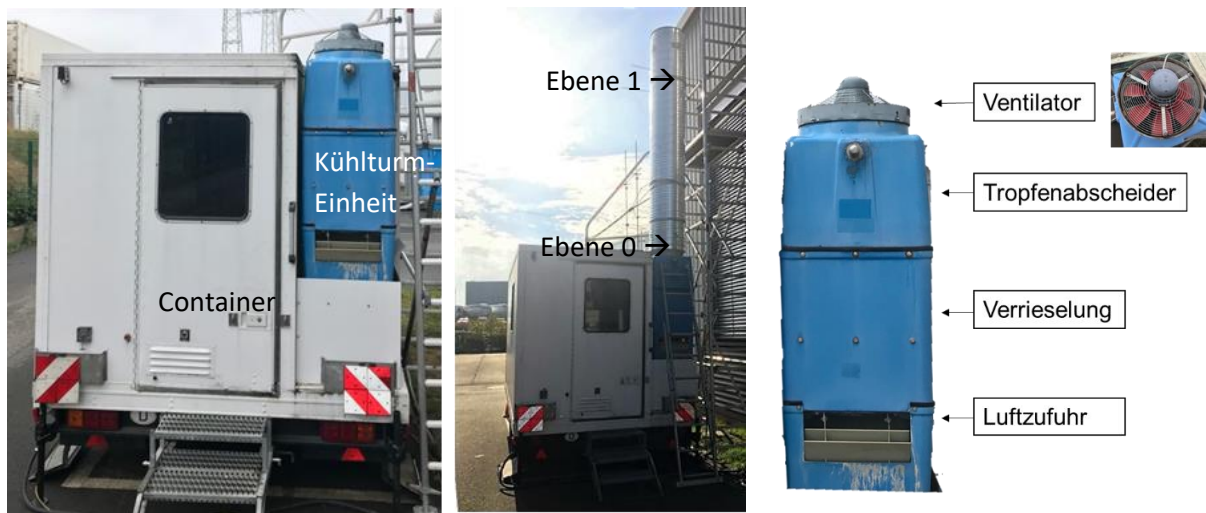
Beim Modell MTKKL 2 handelt es sich um eine Verdunstungskühlanlage, die samt Anlagenperipherie in einem Container auf einen Anhänger aufgebaut ist (Abbildung 16, links). Der Kühlturm selbst weist eine Bauhöhe von ca. 2 m auf (Boden Kühlturmtasse bis Mündung) bei einem quadratischen Grundriss von ca. 0,6 m. Die Anlage besitzt einen unmittelbar unterhalb des Auslassquerschnittes saugend angeordneten Ventilator mit einer Leistung von 21 kW.

Im angeschlossenen Container befindet sich eine aufwändige Wasserkonditionierung, u. a. zur definierten Erwärmung des Wassers. Diese „künstliche“ Erwärmung ist erforderlich, da für den Versuchsbetrieb das System mit Stadtwasser gespeist wird und kein thermischer Prozess angeschlossen ist. Das konditionierte Warmwasser wird in der Verdüsungsebene in etwa 1,5 m Höhe per Vollkegeldüse in den Kühlturm eingespeist und läuft über Rieselkörper aus Kunststoff in die Kühlturmtasse. Durch das Saugzuggebläse (Abbildung 16, rechts) wird dazu im Gegenstrom unmittelbar oberhalb der Kühlturmtasse Luft zur Kühlung angesaugt. Das Kaltwasser wird zurück in den Container geführt und erneut aufbereitet. Verdunstungsverluste werden automatisiert durch Zulaufwasser ergänzt. Oberhalb der Verdüsungsebene sind als Tropfenabscheider Lamellenkörper aus Kunststoff verbaut.

Die Steuerung der Gebläseleistung erfolgt in zwei Stufen in Abhängigkeit von der erzielten Rückkühlleistung des Umlaufwassers. Eine Regelung der Flüssigkeitsumlaufmenge ist per Bypass möglich. Die Anlage verfügt über eine automatisch gesteuerte Additiv- und Bioziddosierung.

Zur Verbesserung der Messbedingungen am Anlagenauslass entsprechend der Empfehlungen der VDI 2066 Blatt 1 wurde zur definierten Strömungsführung des Abgases ein drei Meter langes Rohrstück am Luftauslass angebracht (Abbildung 16, Mitte). Zur Probenahme wurden direkt oberhalb des Rotors (Ebene 0) und im Abstand von ca. 2,5 m oberhalb des Rotors (Ebene 1) jeweils verschließbare Messöffnungen in der Kanalwandung geschaffen (Abbildung 16). Die Zugangsöffnungen in Ebene 0 waren über das Containerdach und in Ebene 1 über ein errichtetes begehbares Gerüst zugänglich.

Abbildung 16: Modellkühlturm MTKKL 2



Links: Kühlturmeinheit und Container mit Steuerungseinheit, Mitte: Aufgesetztes Abgasführungsrohr mit Messöffnungen auf zwei unterschiedlichen Ebenen sowie Zugangsmöglichkeit per Gerüst. Rechts: Funktionseinheiten des Kühlturms

Probenahme und Versuchsablauf

Das Messprogramm umfasste die Charakterisierung der Strömungsgeschwindigkeit über den Messquerschnitt sowie Tropfen- und Aerosolmessungen. Die Untersuchungs- und Probenahmetechniken sind im nachfolgenden Kapitel 4.5 beschrieben.

Die Geschwindigkeitsmessung fand vergleichend mit verschiedenen Messgeräten (Hitzdrahtanemometer, Flügelrad, Vortexsonde sowie S-Pitot-Sonde) statt. Die Messung erfolgte als Netzmessung und in verschiedenen Raumrichtungen orientiert (vertikal und tangential). Zur qualitativen Charakterisierung der Strömungsrichtung kam die Fähnchenmethode zum Einsatz.

Die Probenahme wurde jeweils mit dem Zyklonabscheider in beiden Konfigurationen für Immissions- sowie Emissionsmessungen durchgeführt. Zur Absaugung des Probengasstroms wurde das zugehörige Originalgebläse des Probensammlers eingesetzt.

Zur Bestimmung der Tropfenfracht im Aerosolstrom kamen beschichtete Impaktorplatten zum Einsatz, vgl. nachfolgendes Kapitel zur eingesetzten Feldmesstechnik. Die Impaktorplatten wurden in der Strömung verschieden orientiert ausgerichtet (vertikal (Kennung 0°), horizontal tangential (Kennung 90°) und als Zwischenposition dieser beiden Positionen um 60° gedreht).

4.5 Vor-Ort-Messungen an Anlagen in der Praxis

Messgeräte zur Erfassung der Umgebungs- und Abluftrandbedingungen

Bei Untersuchungen an den realen Verdunstungskühlanlagen A bis D wurden folgende physikalische Parameter in der Luft erfasst: Umgebungstemperatur, Umgebungsdruck, Abgastemperatur, statischer Druck im Messquerschnitt und Geschwindigkeit im Messquerschnitt (Geräte siehe Tabelle 5).

Wasser-und Biofilmprobenahme

Umlaufwasser der untersuchten Anlagen wurden mittels Schöpfproben aus den Kühlturmtassen entnommen. Die Probenahmen erfolgten in 10 – 30 cm Tiefe. Teilweise wurde auch Rieselwasser beprobt. Das Wasser wurde in sterile PE-Einwegflaschen mit vorgelegtem Natriumthiosulfat überführt.

Biofilm- und Belagsproben wurden mittels steriler Schaber (z.B. Metallspatel) von z.B. von den Wandungen der Kühlturmtassen oder von Kühlturmeinbauten direkt abgeschabt und sterilen 50 ml Plastikgefäßen feucht ins Labor transportiert.

Alle Proben wurden gekühlt ($4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) zum Labor transportiert und spätestens innerhalb von 24 Stunden analysiert.

Aerosol-Probenahme

Die Aerosolprobenahme erfolgte jeweils mit dem Zyklonsammler (4.1.2) entsprechend der Herstellerangaben. Als Absaugeinheit kam entweder die im Lieferumfang enthaltene Absaugeinheit oder (vor allem bei Messungen mit dem Emissionsaufsatz) ein separates Sauggebläse zum Einsatz (Drehschieberpumpe bei den Objekten A und C sowie Seitenkanalverdichter bei den Objekten B und D). Die biologischen Parameter beinhalteten Gesamt- und Intaktzellzahl sowie die Legionellenkonzentration.

Bestimmung des Strömungsprofils

Das Strömungsprofil wurde mit Hilfe einer Staudrucksonde (S-Pitot- und Prantl-Sonde) aufgenommen. Vereinzelt kamen auch Messgeräte nach dem Flügelrad-Prinzip zum Einsatz. Beide Verfahren werden in der DIN EN ISO 16911-1 beschrieben. Beim Einsatz von Staudrucksonden wird jeweils der Differenzdruck ermittelt.

Bestimmung der Hauptströmungsrichtung

An Auslässen von Verdunstungskühlanlagen mit saugenden Ventilatoren kommt es häufig zu Drallströmungen bzw. inversen Strömungsrichtungen. Die Hauptströmungsrichtung ist dann über den gesamten Querschnitt nicht vertikal aufwärts, wie es bei Naturzugkühltürmen oftmals der Fall ist. Die Strömungsrichtung kann mit Hilfe eines S-Pitot-Sonde und einer Methode zur Winkelmessung quantifiziert werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, jeweils eine horizontale und vertikale Komponente zu messen, aus der dann trigonometrisch Betrag und Richtung der resultierenden Geschwindigkeit berechnet werden kann.

Als weitere, einfach anzuwendende Methode zur orientierenden qualitativen Sichtbarmachung der Strömungsrichtung kam ein einfaches Fähnchen zum Einsatz (Abb. 17). Es besteht aus einer Halterung (Holzspieß) und der eigentlichen Fahne, bestehend aus in Lamellen geschnittenen leichten Seidenpapier. Für den Einsatz in einem Schwaden kamen Lamellen aus einem leichten, wasserresistenten Kunststoffmaterial an einem Edelstahlrohr befestigt zum Einsatz. Mittels der

Fähnchenmethode können Turbulenzen, die lokale Richtung der Strömung sowie zeitlich zyklische Schwankungen (zum Beispiel induziert durch die Rotorblätter) erkannt werden.

Abbildung 17: Strömungscharakterisierung mittels Fähnchenmessung

Sichtbarmachung der Strömungsrichtung mit Hilfe eines Fähnchens aus Seidenpapier



Visualisierung der Strömung mittels Fähnchenmessung an dem Auslass des Modellkühlturms. Die Strömungsrichtung ist im abgebildeten Beispiel in Nähe der Zentralachse horizontal, zum Rand hin nimmt die Wirkung der tangentialen Komponente im Verhältnis zur vertikalen Komponente zu (sichtbar durch stärkeres Anheben der Lamellen des Fähnchens).

Bestimmung der Tropfenbeladung mittels Impaktoren

Zur Bestimmung der Tropfenfracht im Aerosolstrom kam eine Tropfensonde nach VDI 3679, Blatt 3 mit beschichteten Impaktorplatten zum Einsatz (Paul Gothe GmbH, Bochum, Abbildung 18). Die dünn mit Magnesium-Oxid-Pulver beschichtete Platten werden für einige Sekunden frei vom Aerosolstrom angeströmt. Auftreffende Tropfen erzeugen in Abhängigkeit ihrer Größe und ihrer Geschwindigkeit unterschiedlich große Krater, welche sich mikroskopisch und statistisch auswerten lassen.

Anhand der Größenverteilung kann auf die Gesamtbeladung bzw. Konzentration im Aerosol geschlossen werden. Ausgehend vom Tropfenbild kann zudem qualitativ eine Abweichung der Hauptströmungsrichtung von der Kanalachse erkannt werden. In Hauptströmungsrichtung auftreffende Tropfen erzeugen annähernd kreisrunde Krater, während schräg auftreffende Tropfen eher bahnförmige Linien auf einer Impaktorplatte hervorrufen.

Abbildung 18: Tropfenmesssonde



Die Impaktorplatte ist auf einer innerhalb eines zylindrischen Rohrs der Tropfensonde verschiebbaren Zentralstange fixiert. Die Tropfensonde wird im geschlossenen Zustand in die Strömung geschoben, die pulverbeschichtete Oberfläche der Impaktorplatte ist dabei entgegen der Strömung orientiert. Durch Herausschieben der Zentralstange aus dem Rohr wird die Platte frei in die Strömung geschoben, auftreffende Tropfen erzeugen Krater in der Pulverschicht. Nach Ablauf der Probenahmedauer von z. B. 10 Sekunden wird die Platte zurück in das schützende Rohr geschoben und die Sonde aus dem Aerosolstrom entnommen. Die Platte kann aus der Sonde entnommen und zur Auswertung gebracht werden. Die Plattenoberfläche sollte möglichst entgegen der Strömungsrichtung ausgerichtet werden, um annähernd runde, auswertbare Einschlagkrater auf der Oberfläche zu erhalten.

Bildquelle: <https://www.paulgothe.com/VDI-Tropfensonde> (um Legendentexte ergänzt), zuletzt abgerufen 2019-08-22

Gastemperatur, Gasfeuchte, Druckmessung

Die weiteren zur Bestimmung der physikalischen Messgrößen Gastemperatur und –feuchte, sowie statischer Druck eingesetzten Geräte sind gemeinsam mit den oben genannten Geräten in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Eingesetzte Messgeräte zur Erfassung der Umgebungs- und Abluftrandbedingungen

Messgröße	IUTA-NR	Messgerät	Prinzip	Fehler laut Hersteller
Umgebungstemperatur	1049	Thermoelement Almemo Thermo E4	Thermoelement	-40...1200 °C +/- 2,5°C od. 0,0075*T
Umgebungsdruck	804	Digitaler Luftdruckfühler FDAD 12 SA im ALMEMO D6- Fühler	Druckmessung	300 - 1100 mbar +/- 2,5 mbar
Abgastemperatur	1049	Thermoelement Almemo Thermo E4	Thermoelement	-40...1200 °C +/- 2,5°C od. 0,0075*T
Statischer Druck im Messquerschnitt	997	Druckmessmodul ALMEMO FDA 612 S1K	Druckmessung	Max. 250 mbar +/- 0,5 % vom Endwert
Differenzdruck im Messquerschnitt	997	Druckmessmodul	Druckmessung	Max. 250 mbar +/- 0,5 % vom Endwert
Geschwindigkeitsmessung	572	S-Pitot-Sonde (in Kombination mit Druckmessmodul)	Differenzdruck- Messung	Korrekturfaktor: 0,84
Geschwindigkeit im Messquerschnitt	101	Prantl-Sonde (in Kombination mit Druckmessmodul)	Differenzdruck- Messung	Korrekturfaktor: 1
Handgerät (Steuergerät)	573	Almemo 2590-4S	Elektronisch	/
Geschwindigkeit	keine	Lambrecht Flügelrad	Drehzahl	0,1 (0,5)...20 m/s
Geschwindigkeit	479	Almemo FVA 335- TH5	Thermoanemometer	Temp. 0...+50°C Ström. 0..20m/s ±(0,2 m/s +2% v MW)

4.6 Mikrobiologische Analytik

Messung der Gesamt- und Intaktzellzahl mittels Durchflusszytometrie

Gesamt- und Intaktzellzahlen wurden mithilfe von Durchflusszytometrie bestimmt. Die Quantifizierung von Mikroorganismen und Bakterien mittels Durchflusszytometrie beruht auf der Anfärbung von genetischem Material mit Fluoreszenzfarbstoffen. Somit können Mikroorganismen von anderen Partikeln (organischer und anorganischer Natur) unterschieden werden. Für die Messung wurden Probevolumina von 200 µl verwendet.

Folgende Farbstofflösungen wurden eingesetzt:

- SYBR Green I (100 x): SYBR Green I (10.000 x, Kat.nr. S7567, Life Technologies) wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) 100-mal verdünnt durch Zugabe von 10 µl Stock-Lösung zu 990 µl DMSO. So wurde eine „100 x SYBR Green I Lösung“ erhalten.
- Propidiumiodid (1 mg/ml, Kat.nr. 3566, Life Technologies) wurde mit 100 x SYBR Green I im Verhältnis von 5 Volumina SYBR Green I und 1 Volumen Propidiumiodid gemischt.

Zur Messung der Gesamtzellzahl wurden 2 µl 100 x SYBR Green I und zur Messung der Intaktzellzahl 2,4 µl der Farbstoffmischung aus SYBR Green I und Propidiumiodid in die Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Jeweils 200 µl der mikrobiologischen Probe (unverdünnt oder verdünnt mit 0,1 µm filtriertem Evian Wasser) wurden mit Hilfe einer Multikanalpipette zugegeben und sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Mischungen wurden für 13 min bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Die Endkonzentration der Farbstoffe waren wie folgt: 1 x SYBR Green I und 3 µM Propidiumiodid. Kühlwasserproben wurden dann mit filtriertem Evian Wasser verdünnt, wenn die Gesamtsignalzahl den Wert von 1.000 Signalen pro µl oder pro sec überstieg.

Die Proben wurden analysiert auf einem NovoCyte Durchflusszytometer (ACEA Biosciences, Inc.) unter Verwendung von folgenden Geräteparametern: Durchflussrate: 66 µl/min, Analysevolumen: 50 µl, FL-1 Threshold: 2000, Trigger auf FL-1. Grünfluoreszenz wurde auf dem FL-1 Kanal (533 nm) gemessen, Rotfluoreszenz auf dem FL-3 Kanal (670 nm). Das zur Analyse verwendete Fenster (engl. Gate) orientierte sich an dem von Gatza et al. (2013).

Quantifizierung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* mittels qPCR

Quantitative PCR (qPCR) wurde zur Quantifizierung von *Legionella* spp. und von *L. pneumophila* verwendet. Die Analyse liefert Genomeinheiten (GU) pro 100 mL und beinhaltet die Filtration der Wasserprobe (typischerweise 40 ml – 100 ml), die Extraktion genomischer Nukleinsäuren aus dem Probenmaterial, die Prüfung auf potentielle Anwesenheit von PCR-inhibierenden Substanzen und die eigentliche qPCR Quantifizierung von Legionellen. Das extrahierte genomische Material wurde untersucht mit den AFNOR-ISO validierten iQ-Check® Real-Time PCR Kits der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (Düsseldorf) für die Parameter *Legionella* spp. bzw. *L. pneumophila* unter Verwendung eines C1000™ Thermocyclers der gleichen Firma. Die technischen Vorgehensweisen erfolgten nach Angaben der entsprechenden iQ-Check® *Legionella* Real-Time PCR Kits.

Zur Unterdrückung von Signalen toter, membrangeschädigter Bakterien wurden die Proben mit dem Lebendfarbstoff Propidiummonoazid (PMA) behandelt. Der Farbstoff dringt nur in Bakterien mit Membranschäden ein, jedoch nicht in intakte lebende Bakterien. Nach Bindung an die Nukleinsäuren von geschädigten Bakterien erfolgt deren Zerstörung nach Inaktivierung des Farbstoffes durch Lichtbestrahlung. Die Behandlung führt damit zu einer Unterdrückung von Signalen von membrangeschädigten Bakterien.

Obwohl die Bio-Rad Kits eine hohe qPCR Effizienz und damit eine hohe Sensitivität aufweisen, ist die Signalunterdrückung von membrangeschädigten Bakterien nicht zufriedenstellend infolge der Amplifikation von relativ kurzen Genabschnitten (ca. 100 bp). Die Signalunterdrückung ist umso stärker, je länger die amplifizierten Gensequenzen sind. Deshalb wurde die genomische DNA mit zusätzlichen qPCR Methoden untersucht, die zwar eine etwas schlechtere Nachweisgrenze haben, jedoch infolge einer größeren Amplikonlänge eine bessere Unterscheidung von membranintakten und membrangeschädigten Bakterien erlauben. Für den spezifischen Nachweis von *L. pneumophila* wurde eine Methode in diesem Projekt entwickelt (Kontchou & Nocker, 2018). Für die Quantifizierung von *Legionella* spp. wurde eine Methode von Ditommaso et al. (2015) verwendet. Letztere beruht auf dem kommerziell verfügbaren Kit (Path-*Legionella* spp genesig Real-time PCR detection kit for all *Legionella* species) der Firma Primerdesign Ltd., Chandlers Ford, UK, www.primerdesign.co.uk). Auch hier erfolgte das technische Vorgehen entsprechend den Herstellerangaben des Kits.

Quantifizierung von *Legionella* spp. mittels Kulturverfahren

Die kulturelle Bestimmung von *Legionella* spp. im Kühlwasser erfolgte nach ISO 11731:2017-05 gemäß Anforderungen der 42. BImSchV bzw. UBA-Empfehlung:2017-06. Die kulturelle Bestimmung von *Legionella* spp. in Aerosolproben erfolgte mittels direkter Plattierung von jeweils zwei 0,1 ml und zwei 0,5 ml Ansätzen auf BCYA-Agar. Auf Säure-oder Hitzebehandlung der Aerosolproben wurde im Unterschied zu UFOPLAN Projekt FKZ 3712 61 202 verzichtet, da exzessive Begleitflora bei diesen Proben nicht vorlag und damit auch nicht unterdrückt werden musste (siehe Begründung in Kapitel 10). Abgewogene Mengen an Biofilmproben wurden in einem geeigneten Volumen einer steriler 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und mittels mehrmaligem Auf- und Abpipettieren und kurzem Vortexen homogenisiert. Volumina von 0,1 ml und Verdünnungen davon wurden auf BCYA-Agar plattiert. Die Überprüfung von verdächtigen Kolonien erfolgte in Übereinstimmung mit der UBA-Empfehlung:2017-06.

5 Entwicklung eines Probenahmeverfahrens für Emissions- und Immissionsmessungen

5.1 Bewertung des Probenahmeverfahrens für Emissions- und Immissionsmessungen

Die grundsätzliche technische Eignung des Nass-Zyklon-Sammlers zur Erfassung von Legionellen-aerosolen konnte im UFOPLAN-Vorhaben „Nachweis von Legionellen in Luftproben aus Rückkühlwerken“ nachgewiesen werden (UBA 2014). Nachfolgend sollen die Untersuchungsergebnisse des zur adäquaten Emissionsmessung an Verdunstungskühlanlagen modifizierten Bioaerosol-Sammlers dargestellt werden.

Druckverlust und Absaugvolumenstrom bei Verwendung der Emissions-Konfiguration

Die Untersuchungsergebnisse zum mit dem mitgelieferten Absauggebläse erzielten Absaugvolumenstrom für drei diskrete Absaug-Leistungstufen sind in Tabelle 6 dargestellt.

In der Ansaugung wird der Nennvolumenstrom vom Absauggebläse mit Fehlertoleranzen bis maximal 5 % erreicht. Allerdings konnte festgestellt werden, dass dabei ebenfalls Fremdluft durch Verbindungselemente zwischen Sammlerauslass und Absauggebläse angesaugt wird. Diese Konfiguration unter Beteiligung von Fremdluft ist für die Verwendung einer regelbaren externen Absaugpumpe ungünstig. Das System wurde daher abgedichtet und der tatsächliche Absaugvolumenstrom erneut bestimmt. Das abgedichtete System liefert oberhalb 100 l/min eine 9 % bis 14 % höhere Absaugleistung, (Tabelle 6). Bei 100 l/min ist der gemessene Volumenstrom nach Abdichtung um ca. 20 % erhöht. Bei Verwendung eines externen Saugzugs und entsprechend abgedichteten Sammlers kann der Sollvolumenstrom direkt, z. B. mittels Bypass, am Förderaggregat eingestellt werden.

Es wurde der Druckverlust verschiedener Konfigurationen im Vergleich zur Standardkonfiguration bei fest vorgegebener Absaugleistung bestimmt. Eine Abweichung stellt ein Maß für die Druckverlusterhöhung der jeweiligen Konfiguration dar. Die Messwerte lagen mit einer Ausnahme unter 1 mbar. Die Größenordnung der Werte entspricht den mit einem theoretischen Ansatz berechneten Erwartungswerten für den Druckverlust von Rohrabschnitten. Insgesamt kann von einer sehr geringen Beeinflussung des Absaugvolumenstroms durch die unterschiedlichen zur Emissionsmessung vorgesehenen Konfigurationen ausgegangen werden.

Die nachfolgende Tabelle 7 gibt gemessene Werte des Absaugvolumenstroms gegenüber dem Sollvolumenstrom des Emissionssammlers wieder. Messergebnisse wurden mit Krümmer und Absaugdüse unter Verwendung des im Lieferumfang befindlichen Absauggebläses für die Absaugleistungen 100 l/min und 300 l/min durchgeführt. Soll- und Ist-Wert stimmen für die niedrige Absaugleistung sehr gut überein. Bei maximaler Absaugleistung wurde eine geringere Absaugleistung mit einer Abweichung von 10% gegenüber dem Sollwert bestimmt.

Die Verwendung der unterschiedlichen Düsen führt zu geringen messbaren Unterschieden des gemessenen Druckverlustes (Tab. 8). Der Anbau eines Krümmers liefert einen geringfügig höheren Druckverlust des Absaugsystems.

Insgesamt erzeugt der modifizierte Probenahmezug keine gravierenden Druckverluste und ermöglicht die weitere Verwendung des Absauggebläses. Durch ein regelbares externes Förderaggregat kann die Absaugleistung differenziert angepasst werden.

Tabelle 6: Volumenstrommessung Zyklonsammler

Konfiguration	Nenn-Absaugvolumenstrom (l/min)	Absaugvolumenstrom, Messwert (Mittel) (l/min)	Abweichung vom Nennwert (%)
nicht abgedichtet	300,00	309,39	3
	250,00	262,02	5
	200,00	208,11	4
abgedichtet	300,00	340,46	12
	250,00	281,00	11
	200,00	218,86	9
	150,00	174,18	14
	100,00	129,84	23

Messung mit dem Zyklonsammler mit runder Ansaugöffnung und kleinster Absaugdüse (15 mm)

Tabelle 7: Absaugleistung des Absauggebläses für den modifizierten Aerosolsammler incl. Krümmer

Durchmesser Ansaugdüse (mm)	Vol.Strom (Soll) l/min	Gasgeschw. m/s	Vol.Strom (Ist) l/min	Abweichung Soll – Ist (%)
27,2	100	2,8	98,7	1
27,2	300	7,8	271,2	10

Tabelle 8: Absaugleistung des Absauggebläses für den modifizierten Aerosolsammler incl. Krümmer

Druckverlust-Erhöpfung gegenüber dem Immissionszyklon

Bauelement	Vol.Strom (Soll) l/min	Druckverlust (rechnerisch) mbar	Druckverlust (gemessen) mbar
Emissionsausführung	300	--	
Krümmer, 90°	300	0,08	98,7
Düse, 15 mm	300	3,6	271,2
Düse, 35 mm	300	0,01	
Düse, 45 mm	300	0,01	

Randbedingungen der Modellrechnung: Medium Luft, Gastemperatur 25 °C, rel. Feuchte 40 %. Gemessen wurde der Druckverlust des Gesamtsystems incl. Zyklon und Auslaufstrecke. In der Tabelle ist die Änderung der jeweiligen Emissionsvariante gegenüber der Immissionsvariante angegeben.

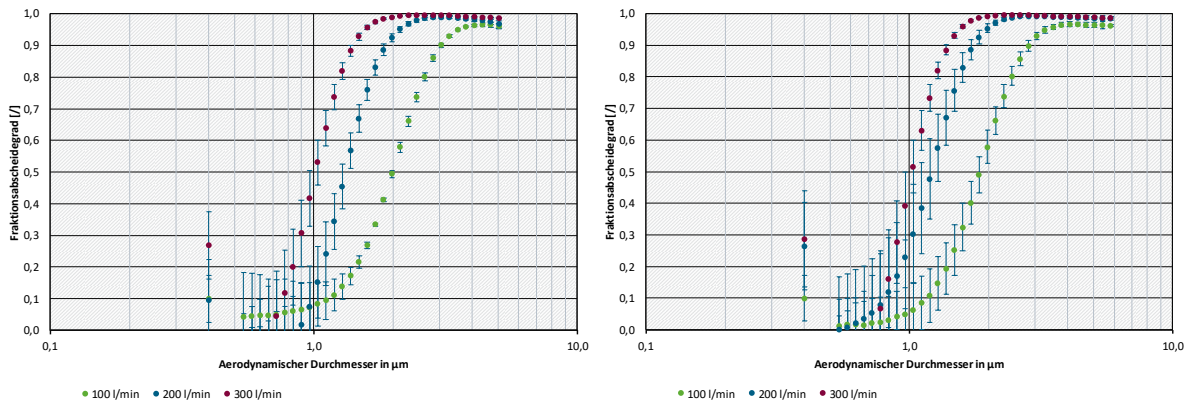
Fraktionsabscheidegrad des Zyklonsammlers für eine Probenahme aus ruhendem Gas

Nachfolgende Abbildung 19 gibt die Ergebnisse der Fraktionsabscheidegradmessungen der Emissions- und Immissionskonfiguration des Zyklonsammlers an ruhendem Gas wieder. Als

mittlerer Abscheidegrad d_{50} kann ein Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ für den Absaugvolumenstrom 300 l/min und $2 \mu\text{m}$ für den Absaugstrom 100 l/min angegeben werden. Der einer Abscheidung von 90% entsprechende Durchmesserwert (d_{90}) liegt bei ca. $1,3 \mu\text{m}$ für 300 l/min und $3 \mu\text{m}$ für 100 l/min . Alle jeweils größeren Partikel werden mit höheren Abscheideraten vom Sammelsystem erfasst.

Abbildung 19: Fraktionsabscheidegradmessung Zyklonsammler, ruhendes Gas

Links: Schlitzeinlass, rechts: 25mm-Rundeinlass. Teststaub A2 fine



Fraktionsabscheidegrad des Zyklonsammlers für eine Probenahme aus strömendem Gas

In nachfolgender Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Fraktionsabscheidegradmessungen an der Emissionsausführung des Zyklonsammlers bei einer Probenahme aus strömendem Gas dargestellt. Untersucht wurde jeweils der Zyklonsammler in Kombination mit dem zur Emissionsmessung vorgesehenen Krümmer mit Teststaub sowie mit einem Tropfenaerosol. Als mittlerer Abscheidegrad d_{50} kann ein Durchmesser von kleiner $1 \mu\text{m}$ für den Absaugvolumenstrom 300 l/min und kleiner $2 \mu\text{m}$ für den Absaugstrom 100 l/min angegeben werden. Der einer Abscheidung von 90% entsprechende Durchmesserwert (d_{90}) liegt bei kleiner ca. $2 \mu\text{m}$ für 300 l/min und kleiner $3 \mu\text{m}$ für 100 l/min . Damit wird eine hohe physikalische Sammeleffizienz für Tropfenaerosole erreicht. Die Trennkurve entspricht dem erwartungsgemäßen Verlauf eines Zyklon-Abscheiders. Aufgrund des untypisch sehr flachen Verlaufs der Kurve bei 100 l/min kann angenommen werden, dass dieser Volumenstrom nicht ausreicht, um eine effektive Rotationsströmung und effektive Abscheidung im Sammler zu erreichen. Die bei Gasdurchströmung des Sammlers ebenfalls in Rotation versetzte Sammelflüssigkeit bildet im Falle dieser Messung im Gegensatz zur Messung bei 200 l/min und 300 l/min keinen zyklonförmigen Konus aus und benetzt die Wandung unvollständig. Bei höheren Geschwindigkeiten wird die Wandung des Konus durch die rotierende und dadurch emporsteigende Flüssigkeit vollständig benetzt. Die höheren Wirbelströme sind zugleich ein Indikator für höhere Zentrifugalkräfte, die auf die Partikel wirken, mit entsprechendem positiven Einfluss auf die Abscheidecharakteristik des Sammlers. Die Abscheidekurven für A2 und DEHS haben jeweils einen sehr ähnlichen d_{50} -Wert, im Bereich hin zu den größeren Partikeln (bei 300 l/min ab $1 \mu\text{m}$) zeigt die A2-Kurve allerdings einen flacheren Verlauf. Es kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Neben dem Abprallen aufgrund schwächerer Haftkräfte können partikelmaterialspezifische Effekte als Ursache herangezogen werden. Der mittlere Trenngrad wird mit guter Übereinstimmung angegeben.

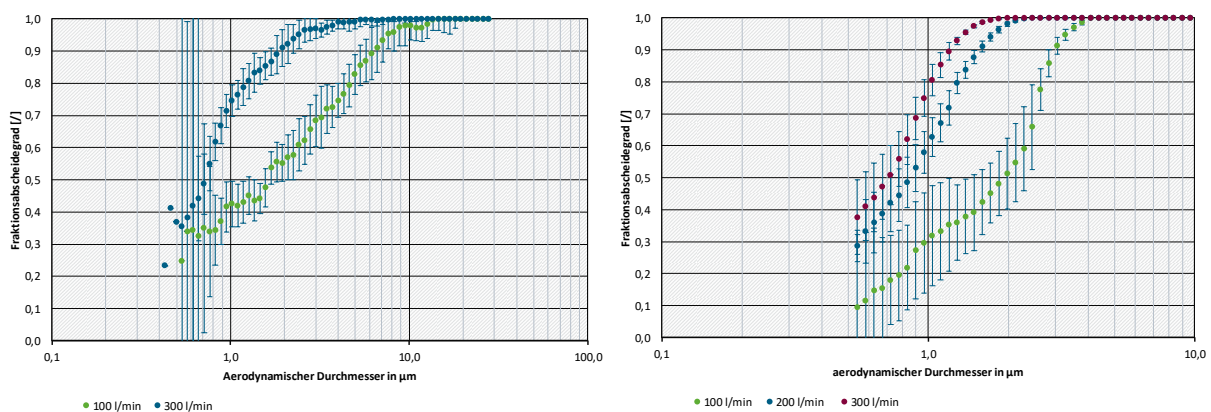
In Abbildung 21 ist der Fraktionsabscheidegrad des verwendeten Krümmers bei Beaufschlagung mit DEHS dargestellt. Der d_{50} liegt oberhalb ca. $12 \mu\text{m}$, der d_{90} -Wert oberhalb von ca. $25 \mu\text{m}$. Damit kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der luftgetragenen Tropfen bis in den

Zyklonsammler gelangen. Die Messwerte weisen eine gute Korrelation zu den nach einem empirischen Modellansatz nach von der Weiden (2009) ermittelten rechnerischen Werten auf.

Düsendurchmesser sind in der Praxis nicht beliebig variierbar, sondern auf die jeweiligen Durchmesser der einzelnen Düsen des Düsenatzes begrenzt. Weicht die tatsächliche Gasgeschwindigkeit vom bei der Düsenauslegung zugrunde gelegten Geschwindigkeit ab und wird die Absauggeschwindigkeit nicht entsprechend am Förderaggregat korrigiert, erfolgt die Absaugung nicht isokinetisch. Dann liegt bei der Probenahme ein Fehler hinsichtlich der Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung vor. Dies ist z. B. der Fall, wenn das mitgelieferte Absauggebläse mit fest eingestellten Absaugvolumenströmen verwendet wird.

Abbildung 20: Fraktionsabscheidegradmessungen, strömendes Gas

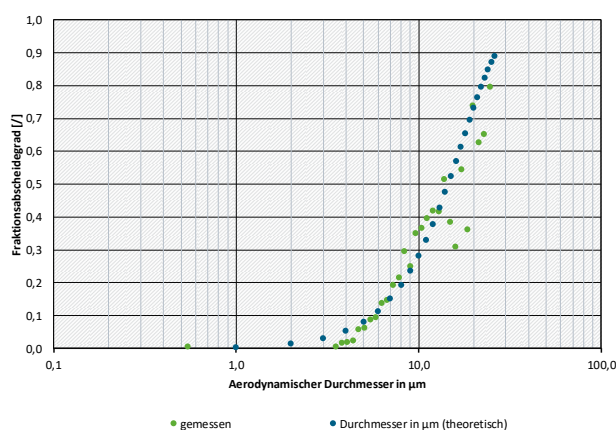
Links: Beaufschlagung mit A2-Teststaub, rechts: Beaufschlagung mit DEHS-Tropfenaerosol. Abscheidegradmessung für Sammler plus Krümmer.



Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Partikelkonzentration an.

Abbildung 21: Fraktionsabscheidegradmessungen, Ansaugkrümmer, Beaufschlagung mit DEHS

Volumenstrom 300 l/min. Vergleich von Messergebnissen mit dem Modellansatz nach von der Weiden (2009)



Zusammenfassende Aussagen zur Eignung des Zyklonsammlers zur Erfassung von Legionellen aus Verdunstungskühlanlagen (Emissions- und Immissionsmessung)

Der Nass-Zyklonsammler ist in der herstellerseitig angebotenen Ausführung zur Probenahme der Umgebungsluft vorgesehen. Bei einem Sammelvolumenstrom von bis zu 600 l/min kann beispielsweise innerhalb von 10 Minuten ein Probenvolumenstrom von 6 m³ erfasst und als Probe zur Analyse gebracht werden. Bei entsprechender Verlängerung der Sammelzeit kann die

erwartete Anzahl der Nutzsignale in der Probe weiter erhöht und bei der Verwendung ausreichend empfindlicher Nachweisverfahren auch eine Detektion auch niedrig konzentrierter Signale grundsätzlich möglich sein.

In Bezug auf eine emissionsseitige Probenahme können ausgehend von den durchgeführten Laboruntersuchungen und den vorangehend dargestellten konzeptionellen Betrachtungen an Rückkühlanlagen folgende Aussagen zur Eignung des Nass-Zyklonsammlers getroffen werden:

- (1) Volumenstrom: Der im Vergleich zu anderen Sammlern hohe Absaugvolumenstrom von bis zu 300 l/min ermöglicht eine Probenahme von großen Luftvolumina einschließlich Doppelbestimmung in einer praktikablen Zeitdauer (Probenahmedauer < 30 min).
- (2) Volumenstrom: Mit dem zugehörigen Absauggebläse wird der Soll-Absaugvolumenstrom zwischen 100 bis 300 l/min durch den Zyklon erreicht. Bei Verwendung regelbarer externer Sauggebläse kann die präzise Einstellung des gewünschten Absaugvolumenstroms gewährleistet werden, beispielsweise über ein Regelventil und externes Rotameter, bei erfolgter Abdichtung der Saugleitung bis zum eigentlichen Zyklon. Insgesamt kann von einer sehr geringen Beeinflussung des Absaugvolumenstroms durch die unterschiedlichen Ansaug-Konfigurationen ausgegangen werden.
- (3) Aerosolprobenahme und Sammelverluste: Der im Lieferzustand zur Immissionsmessung aus einem ruhenden Gas vorgesehene Sammler wurde zur gerichteten Probenahme aus einem strömenden Gas um entsprechende Probenahmeelemente ergänzt und diese auf Anwendungseignung und Funktionsfähigkeit erfolgreich geprüft. Bei Verwendung des angefertigten Ansaugdüsensatz und evtl. des Krümmers lassen sich vertikale sowie horizontale Strömungen unter normgerechten Bedingungen isoaxial und isokinetisch beproben. Die bei der Konstruktion verwendeten Klemm-Dichtverbindungen unter Verwendung gummiartiger Kunststoffringe ohne direkten Kontakt zum Aerosolstrom ermöglichen eine im Praxisbetrieb sowohl mechanisch ausreichend feste als auch gasdichte Verbindung der Bauteile Ansaugdüse, Krümmer und Sammler-Einlass.
- (4) Physikalische Sammeleffizienz / Fraktionsabscheidegrad:
Der Sammler weist in der Immissionsausführung mit schlitzförmigem Einlass einen für Feststoffe in Laboruntersuchungen bestimmten partikeldurchmesserabhängigen Fraktionsabscheidegrad von über 60 % bei Durchmesserklassen > 2 µm und > 50 % bei Durchmesserklassen > 1 µm auf (Absaugvolumenstrom 200 l/min und größer). Diese Aussagen gelten sowohl für die herstellerseitig angebotenen Varianten mit rechteckigem Ansaugschlitz als auch mit angesetztem Konus mit rohrförmiger Mündungsöffnung (Durchmesser 25 mm).
In der Ausführung mit Ansaugdüse und Krümmer weist der Abscheider eine gute Abscheideeffizienz von über 80 % für Partikel mit Durchmessern von 1 µm und über 95 % für Partikel mit Durchmessern > 2 µm auf. Diese Aussagen gelten sowohl für die Beaufschlagung mit Feststoff- als auch mit Tropfenaerosol.
Es kann damit angenommen werden, dass mit allen Konfigurationen des Sammlers eine ausreichend hohe Sammeleffizienz für Legionellenaerosole mit einem erwarteten aerodynamischen Durchmesser > 1 µm bei einem Absaugvolumenstrom von 300 l/min erreicht wird.

- (5) **Biologische Sammeleffizienz**
Gemäß der Ergebnisse von Vergleichsmessungen ist die biologische Sammeleffizienz höher als bei einem Impaktor, allerdings etwas geringer als beim Impinger (VDI-Richtlinie 4250 Blatt 2). Bei Verlängerung der Sammelzeit können eventuell auftretende Flüssigkeitsverluste im Sammelgefäß durch Zudosierung von Sammelflüssigkeit mittels Schlauchpumpe ausgeglichen werden, um eine potentielle Austrocknung von gesammeltem Probenmaterial zu verhindern. Alternativ lassen sich mehrere Sammler mit jeweils geringerem Volumenstrom in räumlicher Nähe zueinander parallel betreiben, wenn ein noch höheres Sammelvolumen erforderlich ist.
- (6) Ein hoher Sammelvolumenstrom ermöglicht die Überführung einer möglichst großen Aerosol-Tropfenmenge in die Sammelflüssigkeit und damit eine hohe Signalkonzentration in der Sammelflüssigkeit. Dies kann helfen, um den Aufwand einer für die nachfolgende mikrobiologische Analytik möglicherweise erforderlichen Aufkonzentrierung zu reduzieren.
- (7) **Flüssigkeitsmanagement:** Verdunstungsverluste der Sammelflüssigkeit im Verlaufe der Sammlung lassen sich mithilfe einer Schlauchpumpe aus einem verbundenen Vorratsgefäß ausgleichen, so dass die Fluidmenge im Sammelgefäß konstant gehalten werden kann.
- (8) Bei der Bioaerosolsammlung mit einem Nass-Zyklonsammler kann von einer im Vergleich zu anderen Sammelverfahren geringen Schädigung der bzw. „Sammelstress“ für die Bakterien ausgegangen werden (UFOPLAN-Projekt „Nachweis von Legionellen in Luftproben aus Rückkühlwerken“)
- (9) **Absauggebläse:** Der Sammler kann sowohl mit dem im Lieferumfang befindlichen programmierten Absauggebläse als auch einem externen Saugzug und Volumenstromregelung zur Probenahme eingesetzt werden. Letzter ermöglicht die Entkopplung von Sammler und Absaugaggregat über eine entsprechende Schlauch- oder Rohrverbindung. In den Schwaden an der Kühlturmmündung kann eine relative Feuchte oberhalb 95 % vorliegen bzw. ggf. auch Wasserdampfsättigung. Es wurde im Rahmen des Vorhabens nicht überprüft, inwieweit das im Lieferumfang befindliche programmierbare Förderaggregat unter diesen Bedingungen dauerhaft funktionsfähig bleibt. In diesen Fällen wurde bevorzugt mit einem externen leistungsfähigen Absaugaggregat gearbeitet.
- (10) **Variabilität hinsichtlich Lage des Probennahmepunktes in der Messebene in Bezug zur Arbeitsbühne (Einsatzmöglichkeiten zur Netzmessung):** Es wird als technisch aufwändig eingeschätzt, Sammler und Absaugpumpe zur isokinetischen Probenahme an beliebige Orte der Messebene zu bringen. Die Entkopplung von Sammeleinrichtung und Förderaggregat über eine entsprechende Rohr- bzw. Schlauchverbindung ermöglicht es, den relativ leichten Zyklonsammler an einem Galgen befestigt über der Strömung zu platzieren und das Absaugaggregat neben der eigentlichen Mündungsfläche zu betreiben.

Der verwendete nass-Zyklonsammler kann in der modifizierten Form vom Grundsatz her als geeignetes Gerät zur Erfassung von legionellenhaltigen Bioaerosolen am Auslass von Rückkühlanlagen angesehen werden.

6 Entwicklung von Probenahmestrategien zur Aerosolmessung an Verdunstungskühlanlagen

Ziel des Projektes war es, eine praxisnahe Probenahmestrategie sowohl für legionellenhaltige Aerosole aus Verdunstungskühlanlagen (Emissionsmessungen) als auch für Immissionsmessungen zu entwickeln.

6.1 Ableitung einer Probenahmestrategie für Emissionsmessungen

Eine Partikelprobenahme am Auslass von Rückkühlanlagen stellt aktuell keine Standardaufgabe der messtechnischen Überwachung des Anlagenbetriebs dar. Die Durchführung einer Bioaerosolprobenahme zur Ermittlung der Legionellenkonzentration an Verdunstungskühlanlagen ist in Normen oder Richtlinien aktuell nicht explizit standardisiert beschrieben. Eine an dieser Stelle vorgeschlagene Vorgehensweise kann sich daher nur an anderen technischen Normen und Richtlinien zur Bioaerosolprobenahme an Anlagen orientieren.

Die Richtlinienreihen VDI 4250 bis VDI 4258 beschreiben standardisierte Verfahren zu Erfassung der Bakterienkonzentrationen in der Außenluft (Immissionsmessung) sowie zur Emissionsmessung an technischen Anlagen und können hier herangezogen werden. Diese Dokumente nehmen Bezug zur standardisierten Vorgehensweise bei einer Staubprobenahme an geführten Quellen gemäß Richtlinie 2066 Blatt 1 bzw. DIN EN 15259 und DIN EN 13284-1. Sie sind aber weder speziell für die Ermittlung von Legionellenkonzentrationen noch hinsichtlich einer Anwendung an Verdunstungskühlanlagen abgeleitet worden.

In Anhang A sind Rechercheergebnisse zu dokumentierten messtechnischen Untersuchungen mit Bezug zu Legionellen-Aerosolmessungen an industriellen Quellen zusammengefasst. Demnach sind sechs Untersuchungen an Verdunstungskühlanlagen sowie eine Untersuchung nach Befeuchtungsstufe einer raumlufttechnischen Anlage dokumentiert. Die Probenahme an Verdunstungskühlanlagen erfolgte i. d. R. im austretenden Schwaden in Nähe der Mündung mit unterschiedlichen Sammelvorrichtungen (in einem Fall ein Zyklonsammler, ansonsten Sammler nach dem Impinger-Prinzip oder Sammlung durch Impaktion). In zwei Untersuchungen haben die Freisetzung eines Legionellenaerosols und die Aerosolmessung an Laboranlagen bzw. Gaskanälen stattgefunden. Technische Randbedingungen der Probenahme sind nicht dokumentiert. In den Dokumenten ist für keine der hier angeführten Untersuchungen detailliert beschrieben, inwieweit bei der Probenahme Vorgaben der oben genannten einschlägigen technischen Normen und Richtlinien umgesetzt worden sind. Damit kann nicht abschließend beurteilt werden, inwieweit die jeweilige Probenahme als repräsentativ für den Austrittsquerschnitt anzusehen ist. Darüber hinaus ist ein direkter Vergleich der jeweilig im Labor ermittelten biologischen Kenngrößen nicht möglich, da unterschiedliche Sammelverfahren und Analyseverfahren zum Einsatz kamen und somit spezifische physikalische und biologische Wiederfindungsraten das jeweilige Untersuchungsergebnis beeinflussen.

Eine an einer Emissionsmessung für Partikel orientierte Probenahme umfasst gemäß der Darstellung in Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 grundsätzlich folgende Schritte: Messstellenbesichtigung, Messvorbereitung, Messdurchführung sowie Nachbereitung (Reinigung/Entsorgung) und Dokumentation.

An dieser Stelle wird auf die Darstellung allgemeiner Grundsätze, die bereits in den technischen Normen und Richtlinien dargestellt sind, verzichtet und nur auf Besonderheiten bei der

Probenahme an Verdunstungskühlanlagen eingegangen. Nachfolgende Tabelle 9 fasst die im Anschluss erläuterten Anforderungen zusammen.

Tabelle 9: Anforderungen an eine (Bio-)Aerosolprobenahme bei Rückkühlanlagen

Anforderungen (Bio-) Aerosol-probenahme	Besonderheiten bei Umsetzung an Verdunstungs-/Rückkühlanlagen
Freisetzungsebene = Auslassebene	Zugänglichkeitsproblem (KT sowie große VKA)
Geschwindigkeitsmessung als Netzmessung	Große Anzahl und Lage einzelner Messpunkte, Dauer der Messung, Hantierbarkeit der Messgeräte, Messfehler durch Kondensation am/im Strömungsmessgerät
Probenahme ungestört, isokinetisch und isoaxial	Ein- u. Auslaufstrecke, Möglichkeiten des Einbringens von Probenahmesonden/-gerät
Keine Rückströmung im Querschnitt	Rückströmung im Ansaugbereich des Ventilators (VKA, saugend)
keine Drallströmung im Querschnitt	eine durch den Ventilator induzierte tangentielle Strömungskomponente (VKA, saugend)
Verhältnis max. zu min. Geschwindigkeit im Querschnitt < 1:3	Im Randbereich häufig deutlich höher als im Zentrum (VKA, saugend)
Minimierung von Sammelverlusten	Ablagerungen, Abtropfverluste
Ermittlung der ausgestoßenen Aerosolfracht	Mittlere Geschwindigkeit x Auslassfläche x mittlere Konzentration

Grundlage: Anforderungen der Richtlinien VDI 4257 Blatt 1 und Blatt 2.

KT: Kühlturm. VKA: Verdunstungskühlanlagen

Wahl der Probenahmeebene (Lage des Messquerschnittes)

Bei Verdunstungskühlanlagen mit einer Leistung größer 200 MW sowie kleineren, nach dem Naturzugprinzip oder optional mit Gebläseunterstützung arbeitenden Anlagen besteht aufgrund der Bauhöhe oftmals eine eingeschränkte Zugänglichkeit der Auslassebene. Einige Anlagen besitzen an der äußeren Wandung Steigleitern bzw. Treppen bis zu einer als Arbeitsebene ausgearbeitete Kühlturmkrone, wie beispielsweise das Kraftwerk Westfalen in Hamm (Abbildung 22, oben). Besteht keine Möglichkeit eines direkten Zutritts einer Arbeitsebene am Auslass, ist bei Zugänglichkeit grundsätzlich eine Messung durch Nutzung von vorab installierten Kühlturmbefahranlagen denkbar (Abbildung 22, unten links). Die Messung mit einem Hubsteiger ist weiterhin möglich, allerdings können damit i. d. R. nur Messpunkte im äußeren Randbereich des Kühlturms beprobt werden.

Alternativ können auch Drohnen, Fesselballons oder Helikopter eingesetzt werden, um die Auslassebene zu erreichen und zu beproben. Helikopter und Drohne erzeugen zur Stabilisierung der Flugposition eine abwärts gerichtete Luftströmung, welche bei zu geringem Abstand die Strömung in der Auslassebene beeinflussen und damit die eine Messung stören können. Ein Problem in Hinblick auf die Probenahme mit Drohne ist deren Stabilisierung. Drohnen sind dafür ausgelegt, in Umgebungsluft zu fliegen und sind auch bei erhöhten Windgeschwindigkeit

noch flugfähig. Eine Strömung von unten könnte allerdings ein unruhiges Flugverhalten, eine Auftriebsbewegung oder schlimmstenfalls ein Abstürzen in den Kühlturm zur Folge haben. Maximale Nutzlasten sind bei diesen Fluggeräten begrenzt und können den Einsatz von Probenahmeausrüstung limitieren. Der Einsatz eines Helikopters oder eines Fesselballons ist zeit- und kostenintensiv. Bei Einsatz eines Fesselballons muss dieser an Kühlturm oder Boden an mindestens drei Punkten fixiert sein, da nur so die Position gehalten werden kann. In Kombination mit einer Haubenmessung kann der Einsatz eines Fesselballons zielführend sein. Für Quellen mit hohen Volumenströmen bei großem Quelldurchmesser stellt die Errichtung einer Haube mit einem oder mehreren Auslassöffnungen eine technisch aufwändige Lösung dar, bei der insbesondere die dann hohe Strömungsgeschwindigkeit im resultierenden Auslassquerschnitt zu beachten ist. Inwieweit sich diese technisch aufwändigen Verfahren für wiederkehrende Messungen eignen bzw. mit welcher Vorlaufzeit ihre Einrichtung möglich ist, ist im Rahmen dieses Vorhabens nicht geprüft worden.

Abbildung 22: Zugänglichkeit, Kühlturmkrone und Rieselebene Naturzug-Kühlturm

Links oben: Naturzugkühlturm, Zugänglichkeit der Kühlturmkrone über eine Lichtgitter-Treppe (Kraftwerk Westfalen, Hamm, Höhe 122 m). Rechts oben: Kühlturmkrone mit umlaufender Arbeitsebene. Unten links: Kühlturmkrone mit angesetzter Befahranlage, ohne umlaufende Arbeitsbühne. Unten Mitte/rechts: Zugangsmöglichkeit zur Rieselebene eines Naturzugkühlturms. Unten rechts: Rieselebene/Tropfenabscheider eines Naturzugkühlturms.



Quelle: Oben links: https://hammwiki.info/wiki/Kraftwerk_Westfalen, abgerufen 20.08.2019. Oben rechts: http://www.geso-brueggen.de/media/img/projekte/Kuehlturbefahranlage2_big.jpg, abgerufen 21.10.2019. Unten links: https://www.geruestbau.com/fileadmin/user_upload/Presse_und_Publikationen/GESTA_Kuehlturbefahranlagen_D-2016.pdf, zuletzt abgerufen 20.08.2019. Unten Mitte und rechts: eigene Aufnahmen

Für größere Naturzugkühltürme wird ausgehend von durchgeführten Untersuchungen die Aussage formuliert, dass die Konzentration von Keimen im Schwaden zwischen Tropfenfängerzone unmittelbar an der Verrieselungsebene und Kühlturmkrone unverändert bleibt (Pietsch 2019). Bei diesem Anlagentyp finden sich i. d. R. keine weiteren Einbauten in diesem Bereich. Unter dieser Voraussetzung und bei gleichbleibendem Schwadengehalt im Abluftstrom reicht bei derartigen Anlagen eine Beprobung oberhalb der Tropfenabscheiderzone unmittelbar nach Verrieselungsebene aus. Eine Probenahme an der Kühlturmkrone sollte dann zu keinen abweichenden Ergebnissen führen. Voraussetzung sind entsprechende Zugänge zur Verrieselungsebene, beispielsweise über eine Leiter bzw. Treppe an das Außenwand und Zugangsöffnungen zur Ebene oberhalb der Tropfenabscheider im Kühlturminnern (Abbildung 232, unten Mitte und rechts).

Abbildung 23: Zugänglichkeit, Zellenkühlturm

Oben links: Zugang zum Dach und Diffusorauslässen eines Zellenkühlturms per Steigleiter. Oben rechts: Zugang zu Tropfenabscheidern in der Auslassebene eines Serienkühlturms mit drückendem Betrieb. Unten links: Krone auf dem Gebäude eines Zellenkühlturms. Das Gebäudedach ist per Gitterrosttreppe zugänglich. Unten rechts: Zugang zur Diffusormündung eines Serienkühlturms



Quelle: eigene Aufnahmen

Bei kleineren Anlagen wie Serien- oder Zellenkühltürmen können sich vielfältige Einbauten oberhalb der Rieselebene befinden, beispielsweise Tropfenabscheider oder saugend angeordnete Ventilatoren. Aufgrund möglicher Wechselwirkungen des Aerosols mit Bauteilen und Wandungen und potentiell resultierenden Auswirkungen auf die Keimkonzentration wird eine Beprobung der Auslassebene bevorzugt. Oftmals ist bei diesem Anlagentyp eine

Arbeitsebene in unmittelbarer Nähe der Auslassebene in der Regel über Gitterrosttreppe oder Steigleitern zugänglich. Die eigentliche Auslassebene ist von hier aus mittels Leiter oder Podest/Kleingerüst direkt zugänglich (Abbildung 23 rechts).

Die Anforderungen an den Arbeitsschutz sowie die Gerätefunktionsfähigkeit in der hochgradig flüssigwasserhaltigen, wasserdampfgesättigten Auslassebene sind bei der Probenahme sicherzustellen. Sind Arbeiten innerhalb des Kühlturms erforderlich, ist die Kommunikation der beteiligten Personen auch unter eingeschränkten Sichtbedingungen und der vorliegenden Wasserdampfatmosphäre durch geeignete technische Maßnahmen sicherzustellen. Dies gilt insbesondere bei Arbeiten innerhalb des Kühlturms oberhalb der Tropfenabscheider bzw. der Verrieselungsebene. Bei großen Naturzugkühltürmen werden die Kraftwerksabgase nach Abgasreinigung oberhalb der Rieselebene in den Kühlturm eingeleitet und mit den Schwaden und der Fortluft des Kühlturms in die Atmosphäre eingeleitet (z. B. KW Lünen, KW Westfalen, Hamm). Sich aus diesem Sachverhalt eventuell ergebende Randbedingungen sind ebenfalls beim Arbeitsschutz zu berücksichtigen.

Besonderheiten bei der Strömungscharakterisierung – Lokale und mittlere Geschwindigkeit sowie Strömungsrichtung

Aufgrund der hohen Auslassgeschwindigkeiten und des kanalartigen Auslasses kann die Messung an Verdunstungskühlanlagen als Messung an einer geführten Quelle angesehen werden. Verschiedene, in der Praxis anzutreffende technische Randbedingungen dieser Anlagen können führen dazu, dass Voraussetzungen für eine Messung an geführten Quellen nur eingeschränkt gegeben sind. Zur detaillierten Ermittlung des Strömungsprofils in Anlehnung an Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 wird für geführte Quellen eine Messung der Abgasgeschwindigkeit als Netzmessung an mehreren Punkten über den Querschnitt angestrebt. Die eigentliche Probenahme ist gemäß Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 ebenfalls als Netzmessung auszuführen. In begründeten Fällen kann demnach eine Probenahme nach einem vereinfachten Verfahren erfolgen. In diesem Fall ist das Strömungsfeld entsprechend intensiv zu charakterisieren, indem eine Verdreifachung der Mindestanzahl von Messpunkten vorgenommen wird. Ziel der Vorgehensweise ist eine möglichst realitätsnahe Ermittlung der mittleren Geschwindigkeit zur ebenfalls realitätsnahen Abschätzung der Emissionsfracht bei nur einer Aerosolprobenahme je Achse sowie die Bestimmung eines repräsentativen Probenahmepunkts. Bei großen Abluftkanälen wird als Mindestanzahl ein Wert von 20 Messpunkten als ausreichend erachtet, der dann entsprechend zu verdreifachen ist.

Eine Netzmessung ist bei Verdunstungskühlanlagen insbesondere auch aufgrund der oftmals großen Abmessungen der Messebene deutlich aufwändiger als bei einem typischen Abluftkanal, für den die Vorgaben abgeleitet worden sind, und daher nur mit großem technischen und wirtschaftlichen Aufwand durchzuführen. Es finden sich keine konkreten Hinweise darauf, ob eine Kühlturmkrone bzw. ein Diffusorauslass einer Verdunstungskühlanlage in diesem Sinne als großer Abluftkanal angesehen werden kann. Bei den im Rahmen dieses Vorhabens durchgeführten Messungen wurde für die orientierenden Untersuchungen auf die Verdreifachung der Messpunktzahl verzichtet.

Bei großer Auslassfläche kann eine Quelle auch als Flächenquelle angesehen werden. Gemäß Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 sollte an Flächenquellen eine Probenahme mittels Haube vorgenommen werden. Durch eine aufgesetzte Haube wird der flächig austretende Gasstrom in eine rohrförmige Konstruktion umgelenkt und somit die Flächenquelle in eine geführte Quelle überführt und entsprechend messtechnisch zugänglich gemacht. Gleichzeitig wird die Beeinflussung der Strömung durch vorherrschenden Witterungsbedingungen wie Windgeschwindigkeit und -richtung minimiert. Die Umsetzung dieser Strategie ist bei

Verdunstungskühlanlagen ebenfalls oftmals aufgrund der Quellabmessungen und hohen Tropfenbeladung schwierig umzusetzen und eher für Quellen mit weniger hohen Strömungsgeschwindigkeiten bzw. niedrigere Volumenströme geeignet. Die Haube würde zusätzlich den Probenahmeort in vertikaler Richtung weiter nach oben und horizontal in Richtung des Auslasszentrums verschieben.

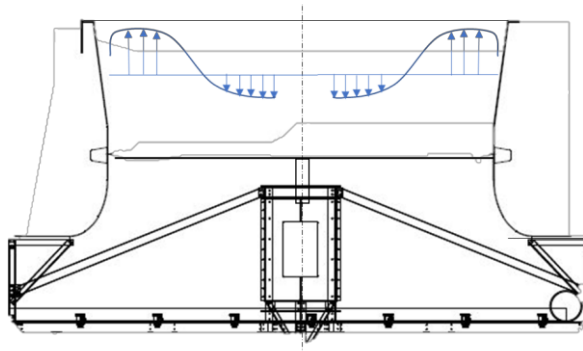
Bei größeren Verdunstungskühlanlagen stellt oftmals die Ebene der Tropfenabscheider den in Strömungsrichtung letzten zugänglichen und in Teilen begehbaren Messquerschnitt dar. Da ein Großteil insbesondere der Hybridkühlanlagen saugend betrieben wird, befindet sich dann oberhalb dieser Ebene ein Rotor als Einbaut im Strömungskanal. Dieser besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Strömungsführung und damit die Aerosolabscheidung bzw. den Aerosolgehalt am Auslass im Vergleich zur darunter befindlichen Messebene. Die vertikal gerichtete Strömung wird hier von einer Rotationsströmung überlagert. Durch die Zentrifugalkräfte können Tropfen nach außen getragen und gegen die Wandung geschleudert werden. Die im Auslass freigesetzte Partikelanzahlverteilung kann dann gegenüber derjenigen in der Messebene abweichen. Es wird geschätzt, dass mit ca. 80 % der überwiegende Teil der Verdunstungskühlanlagen saugend betrieben wird (Köhl 2017). Die Problematik der adäquaten Aerosolmessung in einer Rotationsströmung kann damit als praxisrelevante Fragestellung angesehen werden.

Auch Zellen- oder Serienkühltürme werden überwiegend mit saugend angeordnetem Rotor betrieben. Bei diesen Anlagen zeigt sich die oben genannte Drallströmung sowie ein deutlich ausgeprägtes Profil der Geschwindigkeit im Auslass über den Radius bzw. Durchmesser. In der Praxis erfolgt im Kernbereich der Austrittsfläche eine Ansaugung in den Kühlturm hinein, während nur im äußeren Bereich der Querschnittsfläche eine Strömung ringförmig austritt. Praxiserfahrungen gehen davon aus, bei größeren Anlagen 80 % bis 90 % der Abluft auf dem/den äußeren Metern(n) die Anlage verlassen (Köhl 2017). Abbildung 24 zeigt einen typischen gemessenen Verlauf eines solchen Profils der vertikalen Strömungskomponente. Im Verlauf der Messung zeigte sich zusätzlich eine Geschwindigkeitsfluktuation, die mit jedem Rotorblattdurchgang am Messort auftrat.

Ein recht gutes, qualitatives Bild der lokal vorherrschenden Strömungsverhältnisse liefert die Anwendung der Föhnchenmethode. Soll die Probenahme zur Vermeidung von Verlusten in isoaxialer Richtung und isokinetisch erfolgen, ist die Strömung entsprechend in alle Raumrichtungen zu charakterisieren.

Abbildung 24: Typisches Geschwindigkeitsprofil, Zellenkühlturm mit saugend angeordnetem Rotor im Diffusor

Typische Angaben für die vertikale Geschwindigkeitskomponente in Nähe der Rotorebene am Auslass einer Serien-Verdunstungskühlanlage (Diffusorebene). Die Pfeilrichtung zeigt die Austrittsrichtung an. Die Länge des Pfeils stellt ein Maß für den Betrag der Geschwindigkeit dar.



Bei Messungen in der Auslassebene einer Verdunstungskühlanlage sind die Anforderungen an eine ungestörte Ein- und Auslaufstrecke i. d. R. nicht gegeben. Überlegungen des Einsatzes eines extern aufgesetzten, ggf. mit isokinetischer Geschwindigkeit zwangsdurchströmten Rohres zur Probenahme wurden angestellt. Ausgehend von den nachfolgend dargestellten Untersuchungsergebnissen an der Modellanlage sowie aus Gründen der Statik bzw. Handhabbarkeit einer solchen Einrichtung oberhalb des laufenden Rotors der Verdunstungskühlanlage wurde von der technischen Umsetzung im Rahmen des Vorhabens Abstand genommen.

Die zu vermessende Gasströmung an Verdunstungskühlanlagen weist einen hohen Flüssigwassergehalt sowie eine hohe relative Feuchte auf. Verwendete Gasgeschwindigkeitsmessgeräte müssen unter diesen Bedingungen einsetzbar sein. S-Pitot-Sonden und Prandtl-Staurohre lassen sich unter entsprechenden Randbedingungen bei ausreichend großem Durchmesser der Druckmessöffnung für diese Aufgabe erfolgreich betreiben. Von Flügelradanemometern gelieferte Daten sind aufgrund der Beeinflussung des Rotationsverhaltens durch niedergeschlagene Tropfen als nur bedingt präzise einzuschätzen.

Typische Durchmesser der Quellöffnungen betragen zwischen 3 m und mehr als 40 m. Soll die Quellöffnung vollständig vermessen werden, sind ausreichend lange Messsonden vorzuhalten.

Besonderheiten bei der Strömungscharakterisierung – isoaxiale, isokinetische Absaugung

Wie bereits dargestellt (4.1.2), sollte eine repräsentative Probenahme unter isoaxialen, isokinetischen Probenahmebedingungen durchgeführt werden. Diese Anforderungen basieren auf Grundlagen der Aerosolphysik und sollen an dieser Stelle kurz im Zusammenhang mit den Ergebnissen der im Vorhaben vorgenommenen Beprobungen von Anlagenstandorten diskutiert werden. Dabei werden primär die Ergebnisse der Gesamtzellzahl sowie der Anzahl intakter Zellen berücksichtigt (Daten Anlage 2).

An den untersuchten Anlagen (vgl. die Darstellung in Abschnitt 8.2) lagen der Gewinnung von Aerosolproben unterschiedliche strömungstechnische Bedingungen zugrunde, auch um die Notwendigkeit der isoaxialen bzw. isokinetischen Probenahme abschätzen zu können. An allen Anlagen erfolgte eine Probenahme aus der vertikalen Hauptströmung mittels Emissionsaufsatz des Coriolis- μ -Sammlers. Durch geeignete Auswahl der Ansaugdüse konnte die am Probenahmeort gemessene vertikale Strömungskomponente isoaxial und isokinetisch erfasst werden. Bei Anlage D wurde der visuell und messtechnisch nachgewiesenen, durch den saugenden Rotorbetrieb hervorgerufenen Rotationsströmung dahingehend Rechnung getragen, dass die Emissionssonde um 15 Grad aus der Vertikalen gekippt gegen die Strömung gerichtet wurde. An den Anlagen B und D erfolgte zusätzlich eine Probenahme bei horizontaler Ansaugrichtung mit dem Immissionsimpinger. Für vertikale Strömungen ergab sich hier eine große Abweichung von der Isoaxialität.

Betrachtet man die jeweils unter gleichen Bedingungen durchgeführten Wiederholungsmessungen, so zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Messdaten, insbesondere bei den Messungen an den Standorten A, C und D. Bei Standort B und D wurden mit einer Ausnahme die höchsten Konzentrationen bei Probenahme mit dem Emissionsaufsatz und in Bezug auf die vertikale Hauptströmung erzielt. Die an einem saugend betriebenen Zellenkühlturm gewonnenen Ergebnisse wichen nicht wesentlich von denjenigen eines drückend betriebenen Zellenkühlturms ab. Eine Veränderung der Ansaug-Orientierung um 15 Grad lieferte kein signifikant anderes Ergebnis.

Vergleicht man die Ergebnisse einer Probenahme mit dem Immissionsaufsatz mit den oben dargestellten Ergebnissen des Emissionsaufsatzes, so ergeben sich nur sehr geringfügige Unterschiede. Tendenziell liefert der Immissionsaufsatz im direkten Vergleich etwas geringere Konzentrationen. Alle an dieser Stelle diskutierten Konzentrationen lagen jedoch in etwa in derselben Größenordnung bzw. Log-Stufe.

Eine Probenahme unter isoaxialen, isokinetischen Bedingungen in Bezug auf die vertikale Hauptströmung entspricht somit eher worst case Randbedingungen und damit tendenziell höheren Konzentrationen der Gesamtzellzahl, der Anzahl intakter Zellen als auch der kultivierbaren Legionellen.

An Standort C erfolgte eine Probenahme sowohl direkt oberhalb der Tropfenabscheider als auch an der Kühlturmkrone. Es zeigte sich sowohl für die Gesamtzellzahl als auch für die Anzahl intakter Zellen eine geringe Abnahme der Zellzahlen. Ursächlich kann ein Abscheideeffekt des Rotors zwischen den beiden Messebenen sein.

Praxisgerechtes Sammelverfahren für Bioaerosole

Für die Bioaerosolsammlung wurde zusammenfassend folgendes Protokoll festgelegt und für die weiteren Arbeiten im Rahmen des Forschungsvorhabens verwendet:

- Gerät: Coriolis® μ Luftpartikelsammler, Fa. Bertin Technologies (Frankreich, Bezug in Deutschland über vwr GmbH, Deutschland), Immissionsaufsatz (horizontale Ansaugung) insbesondere für die Erfassung der Umgebungsluft-Konzentration sowie Emissionsaufsatz (Aufsatz mit Ansaugkonus, Ansaugkrümmer und ggf. Ansaugdüse) zur isoaxialen, isokinetischen Ansaugung z. B. aus vertikal aufwärts gerichteter Strömung.
- Sammelgefäße: Wet-Cyclone-Sammelgefäße, steril, Fa. Bertin Technologies (Frankreich), Bezug über vwr GmbH, Deutschland
- Sammelflüssigkeit: sterile physiologische Kochsalzlösung (0,9 %) in Legionellen-DNA-freiem Wasser (Water HPLC Optigrade®, LGC Pro-mochem GmbH) mit 0,01 % Tween® 80
- Füllvolumen: 15 ml Sammelflüssigkeit
- Luftstrom: 300 l/min, bei Bedarf angepasst zur Einstellung der Isokinetik
- Sammeldauer: 10 min, bei Bedarf verlängern, ggf. mit Zufuhr von Sammelflüssigkeit

Vorgehensweise zur Emissionsmessung

Als Vorgehensweise zur Emissionsmessung im Projekt wurde gemäß der empfohlenen Arbeitsschritte (u. a. Richtlinie VDI 4257 Blatt 1, S. 13) Folgendes festgelegt:

- Festlegung der Messpunkte
Aufgrund des bei den typischen Flächengrößen der Verdunstungskühlanlagen hohen technischen und wirtschaftlichen Aufwandes erfolgt die Probenahme nach dem in Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 dargestellten vereinfachten Verfahren. Demnach wird ein geeigneter Messpunkt je Achse beprobt. Ausgewählt wird jeweils ein Punkt, an dem die gemessene Strömungsgeschwindigkeit der mittleren Geschwindigkeit am nächsten kommt. Die höheren Anforderungen, welche an die Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit gestellt werden, sind zu beachten.
Soll die Bioaerosolprobenahme nicht unmittelbar wandnah sondern in größerem Abstand von der Arbeitsebene erfolgen, sind ausreichend lange Messsonden erforderlich. Geeignet sind in gewissen Grenzen Teleskopstangen bzw. Seilzug-

Vorrichtungen, um eine Probenahmesonde an den gewünschten Punkt innerhalb des zu vermessenden Querschnittes zu bringen.

- Messung der Strömungsgeschwindigkeit (Netzmessung)
Die Messung der Strömungsgeschwindigkeit sowie weiterer Abluftrandbedingungen, insbesondere bei saugend betriebenen Zellenkühltürmen, erfolgt raumrichtungsabhängig mit 3-facher Messpunktzahl (gemäß Vorgaben des vereinfachten Verfahrens der Aerosolprobenahme in Anlehnung an RL VDI 4257 Blatt 1). Das Messgerät muss für höhere Wassertropfengehalte im Gas geeignet sein (z. B. S-Pitot-Sonde mit ausreichendem Lochdurchmesser)
- Messung des Tropfenaerosols mittels Impaktionssonde
Begleitend zur Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit und Bioaerosolsammlung wird eine Messung der Tropfengrößenverteilung bzw. Tropfenkonzentration im Aerosol als zielführend erachtet, um den Flüssigwassergehalt ermitteln zu können. Dies kann beispielsweise mit Impaktionssonden erfolgen (VDI 3679, Blatt 3).
- Bestimmung der Randbedingungen und Messpunkte der Bioaerosolprobenahme
- Durchführung der Bioaerosolprobenahme, nach Möglichkeit in isokinetischer isoaxialer Richtung mit dem Coriolis-Emissionsaufsatz, ansonsten Coriolis-Immissionsaufsatz nach Möglichkeit in Strömungsrichtung am Punkt der mittleren Geschwindigkeit je Achse (Vereinfachtes Verfahren in Anlehnung an RL VDI 4257 Blatt 1)
- Messung der Bioaerosol-Hintergrundkonzentration im Luv der Anlage (Coriolis-Immissionsaufsatz, anströmseitig der Anlage), dabei Ausrichtung der Öffnung gegen Windrichtung

6.2 Probenahmestrategie für Immissionsmessungen

Emissionen aus Rückkühlanlagen können aufgrund ihres thermischen Auftriebs und oftmals hohen Volumenstroms große Reichweiten erreichen. So traten Erkrankungsfälle bei Legionelloseausbrüchen auf, die mit Emissionen ausgehend von Verdunstungskühlanlagen in bis zu zehn Kilometer Entfernung in Verbindung gebracht werden (Exner 2015, S. 75). Für die quellbezogene Auswertung von Immissionsmessungen sind daher Kenntnisse der Emissions-Immissionsbeziehungen bedeutsam (6.2.1)

Emissions-Immissionsbeziehungen

Ebenso wie quellbezogene Parameter beeinflussen meteorologische und geographische Randbedingungen die Transportweite und –richtung und damit die Verdünnungsrate bis zum betrachteten Aufpunkt. Für Bioaerosole sind gegenüber staubförmigen Aerosolen weitere Randbedingungen zu beachten, beispielsweise Tropfenverdunstung oder Luftfeuchtigkeit (VDI 4251 Blatt 3) sowie die Veränderung der Lebensfähigkeit von Mikroorganismen u. a. aufgrund der UV-Strahlungsintensität (Janicke, 2015).

Mittels Ausbreitungsrechnungen lässt sich ausgehend von Quellparametern einer Anlage der Transport in der Atmosphäre und die resultierende Zusatzbelastung zur Immissionskonzentration für Aufpunkte im Umfeld der Anlage rechnerisch abschätzen. Auf Basis der so errechneten Verdünnungsfaktoren kann in Folge eine erforderliche Probenahmedauer einer Immissionsmessung abgeleitet werden. Für eine realitätsnahe Modellierung wird als wichtig erachtet, die Auswirkungen von Emissionsaktivitäten bei verschiedenen Emissionssituationen und für unterschiedliche meteorologische Rahmenbedingungen abzubilden. Im Sinne einer worst case Abschätzung erfolgt eine Betrachtung insbesondere auf den Aufpunkt mit maximaler Zusatzbelastung. Derartige Kenntnisse können bereits im Verlaufe der konkreten Messplanung genutzt werden, um geeignete Aufpunkte für die Immissionsmessung auszuwählen.

Zusätzlich sind Angaben zur lokalen Hintergrundkonzentration erforderlich. Welche das allgemeine Konzentrationsniveau im Anlagenumfeld beschreibt. Die Hintergrundkonzentration sollte als Vergleichswert an einem Ort ohne Anlageneinfluss bestimmt werden. Durch Differenzenbildung des anlagen- und nicht-anlagenbeeinflussten Wertes kann die anlagenbezogene Zusatzbelastung ermittelt werden. Die Messung des Hintergrundwertes erfolgt i. d. R. im Luv der Anlage.

Modellierung der Immissionskonzentrationsverteilung im Anlagenumfeld

Die Modellierung orientiert sich an den Vorgaben der TA Luft, hier Anhang 3, Ausbreitungsrechnungen für den anlagenbezogenen Immissionsschutz. Die Durchführung von Ausbreitungsrechnungen erfolgt gemäß Richtlinie VDI 4251 Blatt 3. Dabei kommt das EDV-Programm Austal 2000 zum Einsatz (<https://www.umweltbundesamt.de/themen/luft/regelungen-strategien/ausbreitungsmodelle-fuer-anlagenbezogene/uebersicht-kontakt>).

Auswahl der Anlagenparameter und Ausbreitungsbedingungen

Das Ausbreitungsverhalten wird insbesondere durch die Parameter Quellhöhe und -durchmesser, Austrittsgeschwindigkeit, Abgas- bzw. Schwadentemperatur sowie Anzahl und Durchmesser freigesetzter Partikel und Tropfen als Träger der Legionellen bestimmt.

Für die im Rahmen des Vorhabens zu betrachtenden Quellgruppen > 200 MW und < 200 MW wurden typische Quelldaten zusammengestellt (Quellhöhen und –durchmesser,

Abgasgeschwindigkeit und -temperatur, Tabelle 11). Mittels erzeugter synthetischer Zeitreihen für meteorologische Ausbreitungsparameter (Windgeschwindigkeit und -richtung, Stabilität der atmosphärischen Schichtung bzw. Mischungsschichthöhe) lassen sich anschließend für eine Einheitsquellstärke (z. B. 1 g/s oder 100 KBE/s) die resultierende bodennahe Immissionskonzentrationsverteilung im Anlagenumfeld berechnen. Die somit erhaltenen Ergebnisse sind skalierbar, d. h. eine doppelt so hohe Emissionsquellstärke liefert eine doppelt so hohe Immissionskonzentration.

Naturzug-Kühltürme wurden mit einer Höhe von 95 m bei einem Durchmesser von 34,5 m in den Berechnungen berücksichtigt. Für kleinere Verdunstungskühlanlagen (Zellenkühltürme) lag eine deutlich niedrigere Bauhöhe von 15 m und ein Durchmesser von 6 m zugrunde. Als Austrittsgeschwindigkeiten wurden 3 bzw. 4 m/s angenommen.

Tropfen können nach Freisetzung in die Atmosphäre, je nach deren Temperatur und Wasserdampfgehalt, durch Verdunstung deutlich im Durchmesser schrumpfen, ggf. bis zum Durchmesser der festen Primärkeime. Für Legionellen wurde eine Ausbreitung in der Größenklasse oberhalb ca. 0,5 µm betrachtet, was ihrem unteren typischen Zelldurchmesser entspricht.

Für unterschiedliche meteorologische Ausbreitungsbedingungen wurden synthetische Zeitreihen bestehend aus Stundenmittelwerten für Windgeschwindigkeit, Windrichtung und atmosphärische Stabilitätsklasse erzeugt und damit die resultierenden Immissionskonzentrationen im Umfeld der Quellen berechnet. Im Sinne einer worst case Abschätzung wurde dabei je Zeitreihe eine konstante Windrichtung und -geschwindigkeit zugrunde gelegt. Das berücksichtigte Rechengebiet erstreckte sich 10 km in Windrichtung bei einer Breite von 6 km, davon jeweils 3 km seitlich in beide Richtungen des Quellpunktes. Der Einfluss von Bebauung wurde in erster Näherung nicht berücksichtigt und sollte individuell abgeschätzt werden. Die Bedingungen orientierten sich an den in vergleichbaren Untersuchungen verwendeten Modellparametern (Sievert 2016).

Die zugrunde gelegten Ausbreitungsbedingungen beziehen sich auf neutrale und labile Schichtungsstabilitäten wie sie tagsüber typischerweise anzutreffen sind. Dabei wurden mittlere Windgeschwindigkeiten zwischen 3 und 4 m/s zugrunde gelegt. Tabelle 10 fasst die meteorologischen Randbedingungen zusammen.

Tabelle 10: Schichtungsstabilitäten und Windgeschwindigkeiten

	Stabilität der Atmosphäre	Windgeschwindigkeit
Jahresmittel:	Neutrale Grenzschicht (AK III/1)	WGS 3 m/s, 4,5 m/s (10 m)
Sommer:	Neutrale Grenzschicht (AK III/1)	WGS 3 m/s, 4,5 m/s (10 m)
	Labile Grenzschicht (AK IV)	WGS 3 m/s (10m)
	Sehr labile Grenzschicht (AK V)	WGS 3 m/s (10m)

Aufgrund der gegenüber der Atmosphäre höheren Temperatur und niedrigeren Dichte der Abgase ergibt sich ein thermischer Auftrieb, der zu einer sogenannten Überhöhung der Kühlturmflamme gegenüber dem rein kinetischen Impuls durch die vertikale Ausströmgeschwindigkeit führt. Diese Überhöhung wurde für den Naturzugkühlturm gemäß VDI 3784-B2 1990-03. Für den Zellenkühlturm kann angenommen werden, dass die Einmischung von Umgebungsluft und die Abkühlung der Abgase aufgrund der geringeren

Quellabmessungen deutlich schneller erfolgt, so dass eine Überhöhung im Rechenlauf nicht einbezogen wurde.

In Tabelle 111 sind die gewählten Ausbreitungsbedingungen zusammengestellt. Insgesamt wurden 60 Rechenläufe mit unterschiedlichen Eingangsdaten ausgewertet.

Tabelle 11: Quellparameter der Emissionsquellen der Modellierungsrechnung

	Zellenkühlturm ZKT	Naturzugkühlturm NZ
	VDI 2047 Bl.2	VDI 2047 Bl.3
	VDI 2047 Bl.2	VDI 2047 Bl.3
Bauhöhe (m)	15	95
Innendurchmesser (Mündung, m)	6,3, rund	34,5, rund
Schwadentemperatur Mündung (°C)	35 (JM) 25 (Sommer)	35 (JM) 25 (Sommer)
Flüssigwassergehalt (Tropfen) kg/kg	--	0,0003 (0,3g/kg)
Rel. Feuchte Abgas	--	100 %
Fahnenüberhöhung	keine	gem. VDI 3784 Bl.2
Absolute Quellstärke (g/s)	10	10
Partikeldurchmesser (µm)	2,5 < dp < 10 (Klasse 2)	2,5 < dp < 10 (Klasse 2)

Berechnungsergebnisse

In Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz der Quelltemperatur zur Umgebungstemperatur sowie der atmosphärischen Stabilität kann die Schwadenüberhöhung zu einer deutlichen Vergrößerung der Fahnenachse führen. Mit zunehmender Windgeschwindigkeit nimmt bei gleicher Stabilitätsklasse die Überhöhung ab. Mit zunehmender Labilität der Atmosphäre nimmt die Überhöhung zu. Ein höherer Austrittsimpuls aufgrund erhöhter Austrittsgeschwindigkeit überlagert und vergrößert die effektive Quellhöhe weiter. Eine Änderung um eine Stabilitätsklasse liefert dabei einen größeren Beitrag als eine Änderung der Windgeschwindigkeit um 1 m/s.

Die vergleichende Auswertung der berechneten Immissionskonzentrationen erfolgte in Bezug zum Punkt der höchsten Immissionsbelastung. Erwartungsgemäß liegt dieser für den Zellenkühlturm quellenah in einem Abstand bis ca. 1 km, während der Abstand für den Naturzugkühlturm mehrere Kilometer beträgt (Abbildung 25 und Abbildung 26). Im Maximumaufpunkt zeigt sich eine Verdünnung um etwa den Faktor 10.000. Für den Randbereich der Abgasfahne ergeben sich entsprechend höhere Verdünnungsfaktoren.

Mit zunehmendem Abstand tritt eine weitergehende Verdünnung des Emissionsmassenstroms auf, so dass die maximale Konzentration bei gleichem Emissionsmassenstrom für den Naturzugkühlturm etwa eine Zehnerpotenz niedriger ausfällt als für den Zellenkühlturm. Für eine Abgastemperatur an der Mündung von 35 °C verschiebt sich dieser aufgrund einer größeren thermischen Überhöhung gegenüber einer Temperatur von 25 °C hin zu größeren

Entfernungen (Abbildung 27). Die Konzentration des Maximumaufpunktes ist wesentlich stärker durch die Stabilität der Atmosphäre als durch die übrigen Ausbreitungsbedingungen wie Rauigkeitslänge oder Partikeldurchmesser beeinflusst.

Abbildung 25: Ausbreitungscharakteristik, Naturzug-Kühlturm

Ausbreitungsklasse III.1, Windgeschwindigkeit 3 m/s

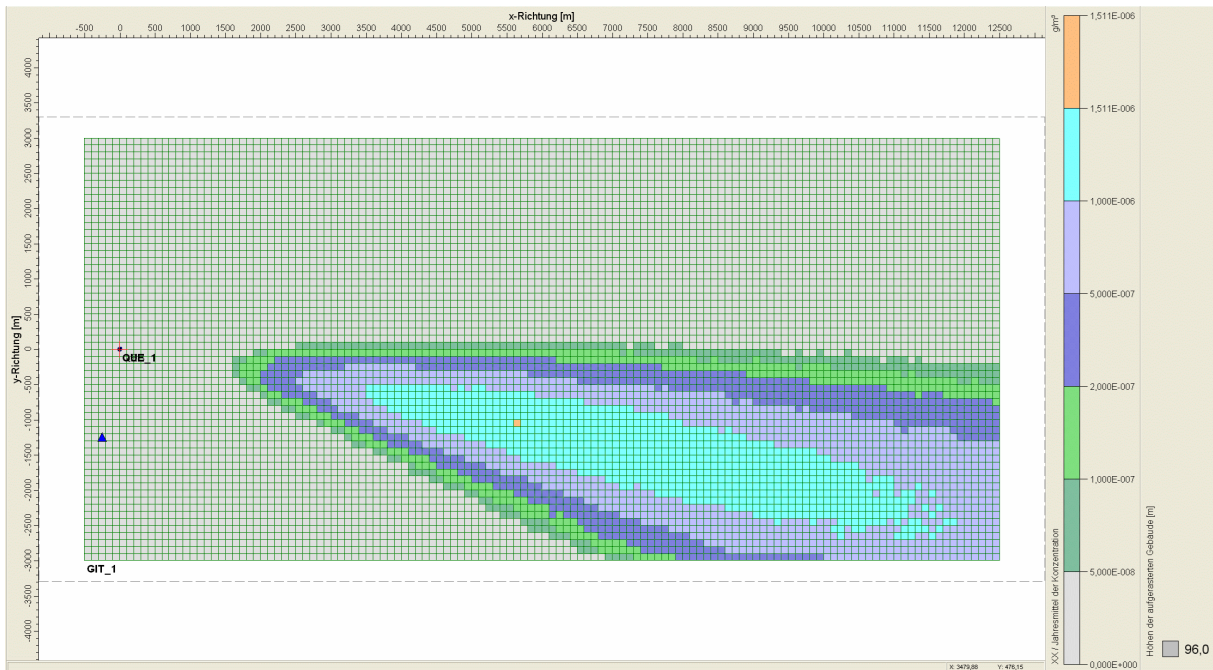


Abbildung 26: Ausbreitungscharakteristik, Zellenkühlturm

Ausbreitungsklasse III.1, Windgeschwindigkeit 3 m/s

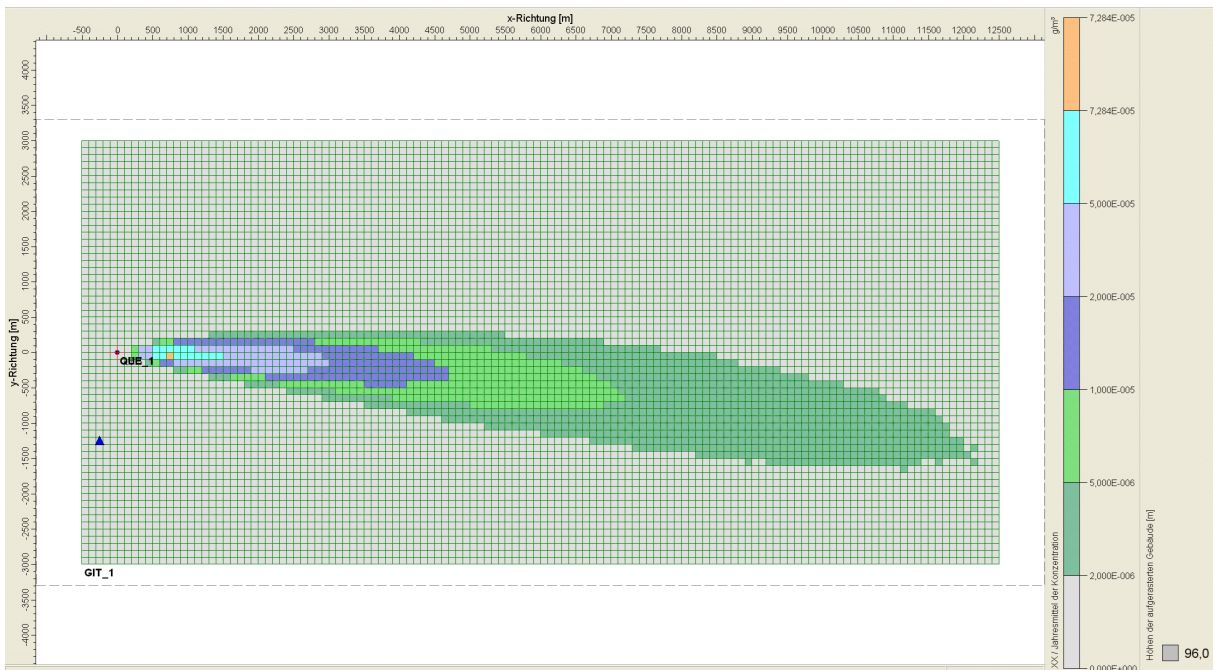
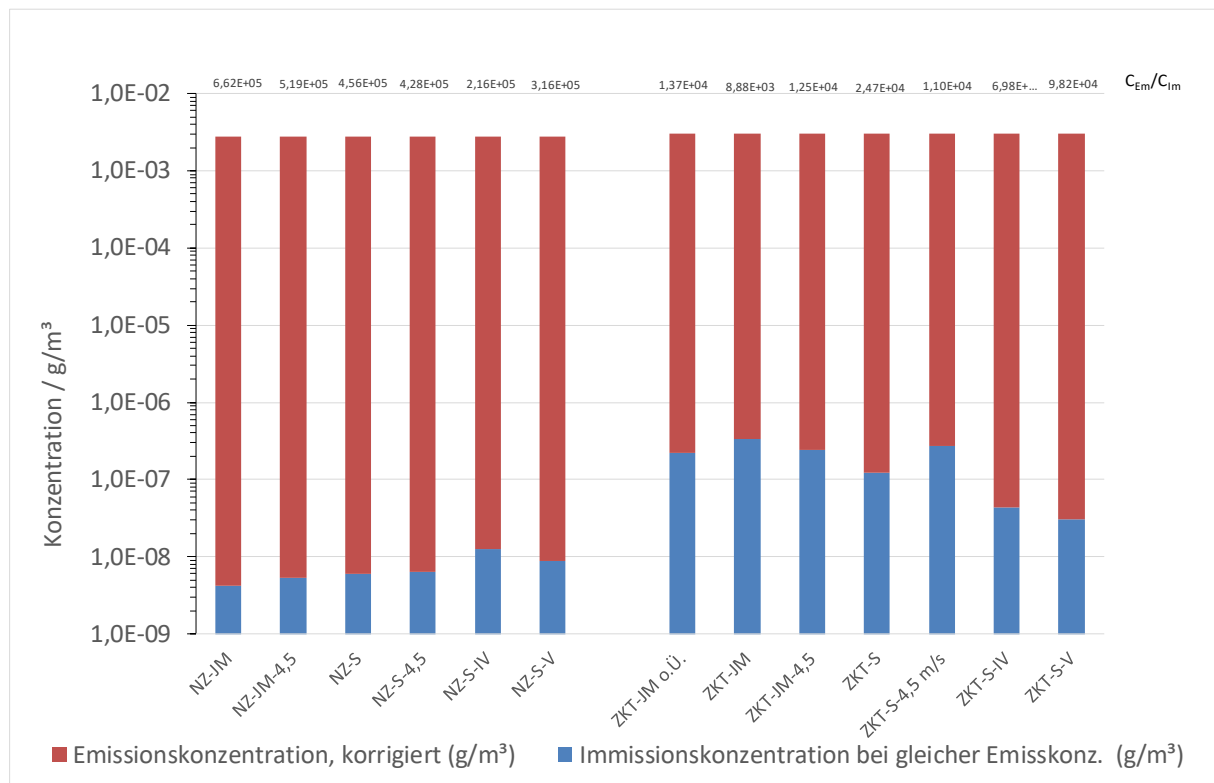


Abbildung 27: Berechnete quellbezogene Verdünnungsfaktoren



Quellbezogene Verdünnungsfaktoren für die exemplarisch zugrunde gelegten Ausbreitungsrechnungen. Darstellung von Emissionskonzentration am Quellort (rote Säule) und berechneter Immissionskonzentration (blaue Säule). Angabe des quellstärkenbezogenen Verdünnungsfaktors als Verhältnis von Emissions- zu Immissionskonzentration (Zahlenwerte oberhalb der Balken).

Immissionsseitige Probenahme zum Nachweis einer anlagenbezogenen Zusatzbelastung

Gegenüber der Emissionskonzentration kann gemäß Modellrechnungen für den Maximumaufpunkt eine um den Faktor 10.000 niedrigere Immissionskonzentration abgeschätzt werden. Geht man von Emissionskonzentrationen knapp oberhalb einer Nachweisgrenze aus, ist der sichere analytische Nachweis der anlagenbezogenen Immissionskonzentration als anspruchsvolle Aufgabe anzusehen. Auch unter Heranziehung von Unsicherheitsfaktoren bei der Modellierungsrechnung kann im optimalen Fall nicht sicher davon ausgegangen werden, dass ein eindeutiger Quellbezug ausgehend von der Probenauswertung am Maximumaufpunkt angetroffen werden kann.

Betrachtet man für beide Quelltypen bei gleichen Ausbreitungsbedingungen den Immissionswert am Maximumaufpunkt, so werden für den Zellenkühlturm aufgrund der deutlich höheren Fracht um einen Faktor ca. 100 höhere Werte als für den Naturzugkühlturm berechnet. Geht man davon aus, dass mehrere gleichartige Zellenkühltürme gleichartig emittieren, resultiert eine noch höhere Immissionskonzentration.

Diese theoretischen Betrachtungen zielen auf den jeweiligen Maximumaufpunkt ab. In der Praxis treten aber Windfluktuationen in Bezug auf Windstärke und -richtung auf, so dass ein Probenahmestandort am Maximumaufpunkt nur eingeschränkt geplant werden kann. Die Probenahme wird in der Realität eher an einem Ort mit geringerer anlagenbezogener Zusatzbelastung stattfindet. Gebäudebestand und daraus resultierende Veränderungen des Windfeldes können ebenfalls die Immissionskonzentration am Messpunkt beeinflussen.

Eine erwartete niedrigere Konzentration kann in gewissem Maße durch eine Verlängerung der Sammelzeit bzw. Probenaufkonzentrierung ausgeglichen werden. Eine deutlich längere Probenahmedauer als 10 Minuten erhöht die Zahl auswertbarer Signale in der Probe. Allerdings erhöht sich zum einen der Sammelstress für die im System befindlichen Mikroorganismen mit zunehmender Probenahmedauer, zum anderen steigt der Aufwand für die dann erforderliche Zufuhr von Probenahmeflüssigkeit zum Ausgleich von Verdunstungsverlusten. Auch eine Aufkonzentration einer Sammelprobe mittels Membranfiltration vor der kulturellen Analyse kann einen erhöhten Sammelstress und möglicherweise abnehmende biologische Aktivität zur Folge haben.

Zur Veränderung der Aktivität von Mikroorganismen im Verlaufe des atmosphärischen Transportes gibt die VDI 4251 Blatt 3 folgenden Hinweis: „Nach derzeitigem Wissensstand können keine belastbaren oder standardisierbaren Aussagen über die Überlebens- und Vermehrungsfähigkeit von Bioaerosolen beim Transport in der Außenluft getroffen werden. Hier besteht noch erheblicher Forschungsbedarf“ (S. 25 VDI 4251-3, 2015). Grundsätzlich kann allerdings davon ausgegangen werden, dass nicht sporenbildende Bakterien zum Überleben eine Hydrathülle benötigen. Herrscht in der Atmosphäre am Ort der Ausbreitung eine geringe relative Feuchte vor, kann dies die Aktivität der Mikroorganismen erheblich beeinflussen. Allerdings traten Infektionsereignisse, bei denen ein Anlagenbezug angenommen wird, auch bei hohen Minusgraden auf.

Aussagekräftige Angaben zum anlagenbezogenen Zusatzbeitrag der Legionellen-Immissionskonzentration können insbesondere im Ausbruchfall eine Maßnahmenplanung sinnvoll unterstützen. Aufgrund der atmosphärischen Verdünnungsraten und relativ niedrigen Ausgangskonzentration an Legionellen im Aerosol ist ein Quellbezug durch eine Aerosolsammlung an einem Immissionsaufpunkt bei vertretbarer Sammelzeit grundsätzlich aber erschwert.

Für eine orientierende Abschätzung der Verhältnisse wurde eine Legionellenkonzentration im Umlaufwasser und in den freigesetzten Aerosolen von 10.000 KBE/100 mL angenommen (Tab. 12), Der Tropfengehalt im emittierten Aerosol wurde entsprechend Literaturangaben mit $0,2 \text{ g/m}^3$ Schwaden angenommen. Damit kann eine Legionellenkonzentration im Probenvolumen abgeschätzt werden. Wird beispielsweise mit dem Coriolis-Sammler ein Sammelvolumen von 3 m^3 Aerosol je Probe erfasst und die darin enthaltenen Legionellen komplett in 15 mL Sammelflüssigkeit überführt, finden sich rechnerisch ca. 4 KBE Legionellen je mL Sammelflüssigkeit bei der emissionsseitigen Probenahme. Wird dieses Aerosol nach atmosphärischer Ausbreitung und Verdünnung um den Faktor 10^3 als Immissionsmessung bei gleichem Volumenstrom und in gleicher Sammelzeit beprobt, stehen rechnerisch nur ca. 0,004 KBE Legionellen/mL Probenflüssigkeit für die Laboranalyse zur Verfügung. Eine Verdopplung des Aerosolsammelvolumens führt zu keiner signifikanten Konzentrationserhöhung in der Probe. Damit ist auch der Nachweis eines eindeutigen Anlagenbezuges durch eine Immissionsmessung unter den angenommenen Bedingungen (6.2.2) erschwert. Weitere Faktoren, welche in der Praxis eine mikrobielle Aktivität beeinträchtigen, sind in dieser Betrachtung nicht berücksichtigt worden, beispielsweise die Beeinflussung der Aktivität durch solare Einstrahlung oder Austrocknung. Damit würde sich die Immissionskonzentration noch weiter reduzieren.

Dies steht im Widerspruch zu den nachgewiesenen Legionelloseerkrankungen im Umfeld von Verdunstungskühlanlagen, bei denen sich höhere Konzentrationen an Legionellen in den Aerosolen befunden haben müssen.

Eine mögliche Erklärung ist das Vorliegen anderer Verhältnisse in der Anlage oder bei der Aerosolausbreitung als im Rechenbeispiel angenommen. Befinden sich z. B. im Emissionsstrom höhere Konzentrationen als angenommen oder liegen sehr ungünstige Ausbreitungsbedingungen, z. B. Inversionswetterlagen oder Schwachwindverhältnisse und deutlich kleinere Verdünnungsfaktoren vor, können entsprechend höhere Immissionskonzentrationen an einem Aufpunkt resultieren.

Außerdem wird diskutiert, dass Legionellen in Aerosolen über Amöbenvakuolen, in denen sie sich vermehren haben verbreitet werden. Damit würden sich zum einen aufgrund der anderen Größe der Partikel die Ausbreitungsverhältnisse verändern und zum anderen die Immissionskonzentrationen erhöhen, da in einer Vakuole eine Vielzahl an Legionellen enthalten sein können.

Tabelle 12: Legionellenkonzentration in der Sammelflüssigkeit bei emissions- und immissionsseitiger Aerosolprobenahme

Randbedingungen der Abschätzung: Umlaufwasserkonzentration der Quelle entspricht Maßnahmenwert der 42. BImSchV sowie der Konzentration im emittierten Aerosol, typische Tropfenaustrittsraten gemäß Literaturangaben 0,2 g/m³ (z. B. Wurz 2016), Verdünnung des emittierten Aerosols um den Faktor 1.000 durch den atmosphärischen Transport zum Immissionsaufpunkt.

		Emissions-Probenahme	Immissions-Probenahme
Umlaufwasser-konzentration	KBE/100 mL	10.000	Verdünnung der Emission um den Faktor 1000
Tropfenmitriss als Aerosol	g/m ³ bzw. mL/m ³ Schwaden	0,2	
	KBE/m ³ Schwaden	20	2,E-02
Probenahme: Sammelvolumen Gas	m ³ Gasstrom bzw. Aerosol je 10 min	3	3
	ml Schwaden/Probe	0,6	
	KBE/Probe	60	6 E-02
Sammelflüssigkeit: 15 mL je Gasprobenahme	KBE/mL der Sammelflüssigkeit	4	4 E-3
Teilfraktion je Auswertung	mL Sammelflüssigkeit je Teilfraktion	0,5	0,5
ohne Anreicherung:	KBE in Teilfraktion (rechnerisch)	2	2 E-03

7 Entwicklung und Validierung eines Nachweisverfahrens zur Quantifizierung und lebend/tot-Unterscheidung von Legionellen

Zum kultivierungsunabhängigen Nachweis von Legionellen wurde quantitative PCR (qPCR), zum Teil in Kombination mit einer Vitalitäts-qPCR (v-qPCR) zur präferentiellen Detektion von membranintakten Bakterien verwendet. Die v-qPCR beruht auf der Behandlung von Proben mit einem Lebendfarbstoff, der selektiv in membrangeschädigte Bakterien eindringt. Einmal in der Zelle, bindet er an Nukleinsäuren und führt zu deren irreversiblen Schädigung nach Photoaktivierung des lichtempfindlichen Farbstoffes. Gleichzeitig wird der Anteil an Farbstoff, der nicht in die Zellen eindringt, durch die Lichtbestrahlung inaktiviert. Die Amplifikation der so geschädigten Nukleinsäuren nach ihrer Extraktion von membrangeschädigten Bakterien wird dadurch inhibiert, während Signale von membranintakten Bakterien, deren DNS nicht mit dem Lebendfarbstoff in Kontakt kam, nicht unterdrückt werden. Die Konsequenz der Behandlung mit dem Lebendfarbstoff vor dem Zellaufschluss ist damit eine selektive Unterdrückung der Signale membrangeschädigter, toter Legionellen. Als sogenannter Lebendfarbstoff wurde in dieser Studie die Substanz Propidium Monoazid (PMA) verwendet.

Für einige Experimente kamen kommerzielle, AFNOR-zertifizierte Kits der Firma BioRad zur Quantifizierung von *L. pneumophila* und *Legionella spp.* zum Einsatz. Diese Kits sind zuverlässig und weisen hohe Sensitivitäten für die betreffenden Zielorganismen mit reproduzierbaren Ergebnissen auf. Zu den hohen Sensitivitäten tragen die relativ kurzen Amplikonlängen bei, die jedoch für die Vitalitäts-qPCR einen Nachteil darstellen, da die Effizienz der Lebend-Tot-Unterscheidung infolge der Kürze des amplifizierten Sequenzabschnittes gering ist. Die Amplifikation längerer Sequenzen erlaubt dagegen eine substantiell bessere Aussage über die Vitalität (Contreras et al. 2011). Aus diesem Grund beinhaltete dieses Projekt die Entwicklung eines qPCR Nachweises für *L. pneumophila* mit verbesserter lebend/tot-Unterscheidung sowie die Identifizierung eines Nachweissystems für *Legionella spp.* mit der gleichen Zielsetzung.

7.1 Entwicklung und Validierung eines Nachweisverfahrens zur Quantifizierung und lebend/tot-Unterscheidung von *L. pneumophila*

Literaturrecherche

Eine Literaturrecherche lieferte einen Überblick über publizierte qPCR Reaktionen für den Nachweis von *L. pneumophila*. Bereits benutzte Oligonukleotide (Primer und Sonden) wurden in einer Liste zusammengefasst mit Angaben zu ihrer Spezifität für *L. pneumophila*. Es wurde deutlich, dass das *mip*-Gen, das für den „macrophage infectivity potentiator“ Virulenzfaktor kodiert, die beste genetische Basis für den neu zu entwickelnden qPCR Nachweis darstellt. Die Suche nach Primern/Sonden konzentrierte sich daher vorwiegend auf dieses Gen.

Zur weiteren Überprüfung ihrer Spezifität wurde mit den Einzelsequenzen der aus der Literaturrecherche identifizierten Oligonukleotide eine Nukleotid BLAST Suche (blastn; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) durchgeführt. Aus den ersten 100 Treffern („Matches“) wurde der darin befindliche Prozentsatz der *L. pneumophila* Stämme errechnet. Dabei deuten 100 % an, dass alle 100 Treffer von *L. pneumophila* stammten. Ein niedriger Wert bedeutet, dass sich entsprechend viele nicht-*L. pneumophila* Stämme unter den ersten 100 Treffern befanden.

Tabelle 13: Oligonukleotide zum Nachweis von *L. pneumophila*

Oligonukleotidname	Amplikongröße (bp)	Prozent (%) <i>L. pneumophila</i> aus BLAST Suche	Referenz	Kommentar aus Literatur bzgl. Spezifität
Lpmip (F) Lpmip (R)	159	47 80	Wilson et al. 2003	Nicht spezifisch, kurze Amplikons
mip3 mip4	339	100 90	Fiume et al. 2005	Spezifisch, kurze Amplikons
mip7 mip8	114	95 96	Fiume et al. 2005	Spezifisch, kurze Amplikons
LmipL920 LmipR1548	650	99 68	Mahbubani et al. 1990	Nicht spezifisch, lange Amplikons
PT69 PT70	168	97 93	Lucia M.A.	Spezifisch, kurze Amplikons
Lpm1 Lpm2	630	61 93	Pinar et al. 2004, Jaulhac et al. 1992	Nicht spezifisch, lange Amplikons
LpmipAf LpmipAr	124	97 100	Hayden et al. 2001	Spezifisch, kurze Amplikons
Forward Reverse	160	98 100	Khanna et al. 2005	Spezifisch, kurze Amplikons
Gil306 Gil307	267	100	Gilmour et al. 2007	100% spezifisch, kurze Amplikons
WielandF WielandR	628	89 90	Wieland et al. 2002	Spezifisch, jedoch noch nicht in qPCR benutzt, lange Amplikons

Aus der Literatur identifizierte Oligonukleotide zum Nachweis von *L. pneumophila* auf Basis des *mip* Gens mit Angaben der in den jeweiligen Publikation beschriebenen Amplikongrößen und dem Prozentsatz der Treffer für *L. pneumophila* (errechnet aus den ersten 100 Treffern eines BLAST Search).

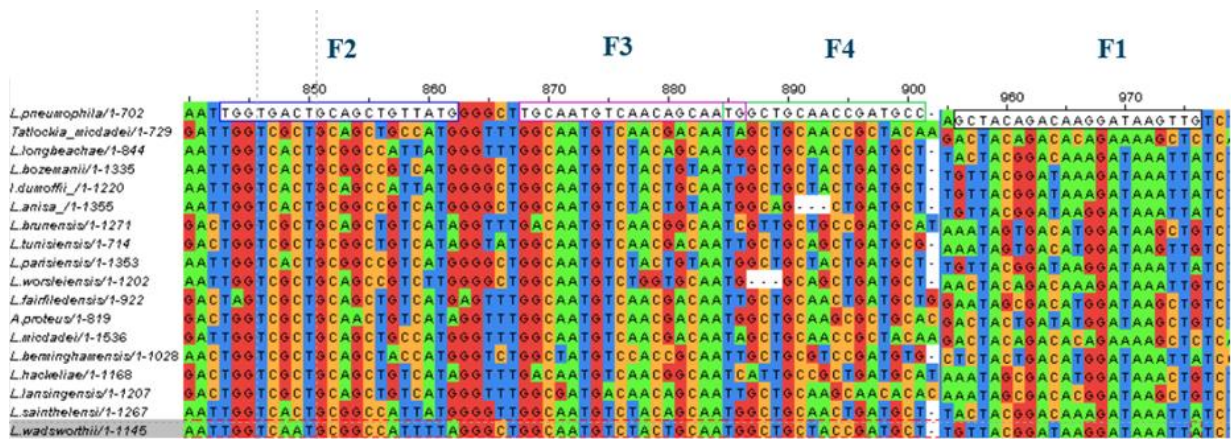
Die aus der Literatur entnommenen PCR Reaktionen amplifizierten vorwiegend recht kurze Sequenzen (ca. 100-300 bp). Reaktionen, die längere Sequenzen amplifizierten, waren entweder ‚traditionelle‘ PCR Reaktionen (d. h. nicht qPCR) oder ihre Spezifität für *L. pneumophila* war gering. Für die zu entwickelnde Viability-qPCR ist jedoch die Amplifikation von langen Sequenzen vorteilhaft, um eine möglichst hohe Unterscheidungseffizienz zwischen membranintakten und membrangeschädigten Bakterien zu erzielen.

Auswahl von Oligonukleotiden

Ziel war es, bereits in der Literatur beschriebene Oligonukleotide mit hoher Spezifität neu zu kombinieren, um die Länge der amplifizierten Sequenzen zu maximieren. Oligonukleotide mit einer hohen Spezifität (mind. 90% auf der Basis der BLAST Suche) und einem zufriedenstellenden Amplifikationsbefund aus der Literatur wurden daher in eine Vorauswahl aufgenommen und auf dem *mip*-Gen kartiert. Für eine weitere Primerauswahl wurden Oligonukleotide ausgewählt, die möglichst nahe am Anfang und Ende des *mip* Genes (Größe ca. 700 bp) lokalisiert waren. Die *mip*-Sequenz von *L. pneumophila* wurde ergänzt mit den *mip*-Sequenzen von 17 Nicht-*L. pneumophila*-Stämmen. Alle Sequenzen wurden verglichen unter

Anwendung eines MafftWS Alignment auf der Jalview Plattform (Desktop Version: <http://www.jalview.org/Desktop/Desktop-news/Jalview-2101-Released>). Das Alignment erlaubte eine Bestimmung der Sequenzbereiche, die möglichst hohe Heterogenität zw. *L. pneumophila* und Nicht-*L. pneumophila*-Stämmen aufwiesen. Insgesamt wurden Sequenzbereiche für 4 Forward Primer, 2 Reverse Primer und eine TaqMan™-Sonde ausgewählt, die theoretisch aussichtsreich waren (Tab. 13). Die in der Literatur identifizierten Oligonukleotidsequenzen wurden z. T. modifiziert, um eine höhere Spezifität zu erreichen; die Probe wurde auf den komplementären DNA Gegenstrang gelegt. Ein beispielhafter Ausschnitt des Sequenz-Alignments im Bereich der Forward Primer ist in Abbildung 28 dargestellt.

Abbildung 28: Lage der Forward Primer



Ausschnitt des *mip* Sequenz-Alignments in der Region von 4 potentiellen Forward-Primern (F1, F2, F3, F4). Unterschiedliche Nukleotide sind mit unterschiedlichen Farben markiert. Bei der Positionierung der Primer wurde auf möglichst hohe Heterogenität am 3'-Ende der Primer geachtet.

Die in dieser Studie getesteten Kombinationen auf Primer und Proben sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Kombinationen aus Primern und Sonde zur Detektion von *L. pneumophila*

Oligonukleotid	Sequenz 5' – 3'	Amplikongröße (bp) mit Primer Reverse R	Referenz
Forward F1	GCTACAGACAAGGATAAGTTG	565	Miguel AC
Forward F2	TGGTGACTIONCAGCTGTTATG	633	Wieland et al. 2002
Forward F3	TGCAATGTCAACAGCAATG	608	Diese Studie
Forward F4	TGGCTGCAACCGATGCC	591	Diese Studie
Reverse R	GGCCAATAGGTCCGCCAACG		Jaulhac et al. 1992
Sonde	CTCATAGCGTCTTGATGCCT		Diese Studie

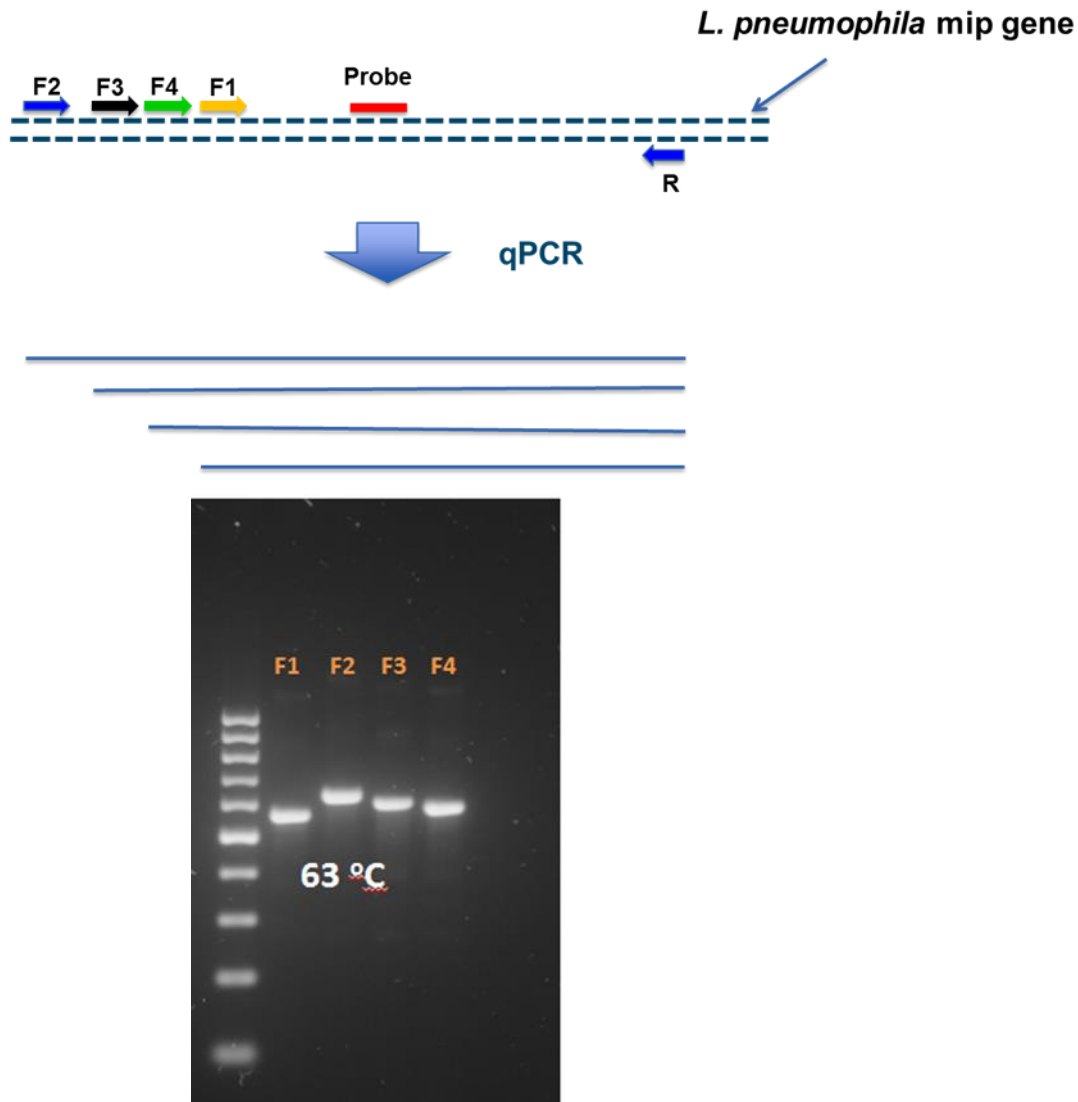
Kombinationen von Primern und Probe, die auf ihre Spezifität für *L. pneumophila* getestet wurden zusammen mit den betreffenden Amplikongrößen bei Kombinationen verschiedener Forward Primer (F1 – F4) mit dem Reverse Primer R.

Ergebnis: Auf Basis der Literaturrecherche, der Ergebnisse des BLAST Searches, eines Sequenzalignments und eigener Sequenz-Anpassungen wurden 4 Forward Primer, 1 Reverse Primer und eine qPCR Sonde identifiziert oder entworfen.

Validierung der Oligonukleotid-Kombinationen

Im Weiteren wurden verschiedene Oligonukleotid-Kombinationen in der Praxis in PCR und qPCR Tests validiert hinsichtlich folgender Parameter: Klare Produkt-Banden auf Agarosegel, eventuelle Hintergrundsignale, Höhe des qPCR Signals, Amplifikationseffizienz (möglichst niedriger Cq Wert) und Spezifität für *L. pneumophila*. Im ersten Schritt wurden die 4 Forward Primer mit einer festgelegten Sonde und einem festgelegten Reverse Primer, wie schematisch in Abbildung 29 dargestellt, kombiniert.

Abbildung 29: Schematische Vorgehensweise bei der PCR-Etablierung



PCR Banden von vier verschiedenen Oligonukleotid-Kombinationen (F1-F4) bei einer Annealing-Temperatur von 63 °C. Die PCR Produkte haben eine Größe um die 600 bp.

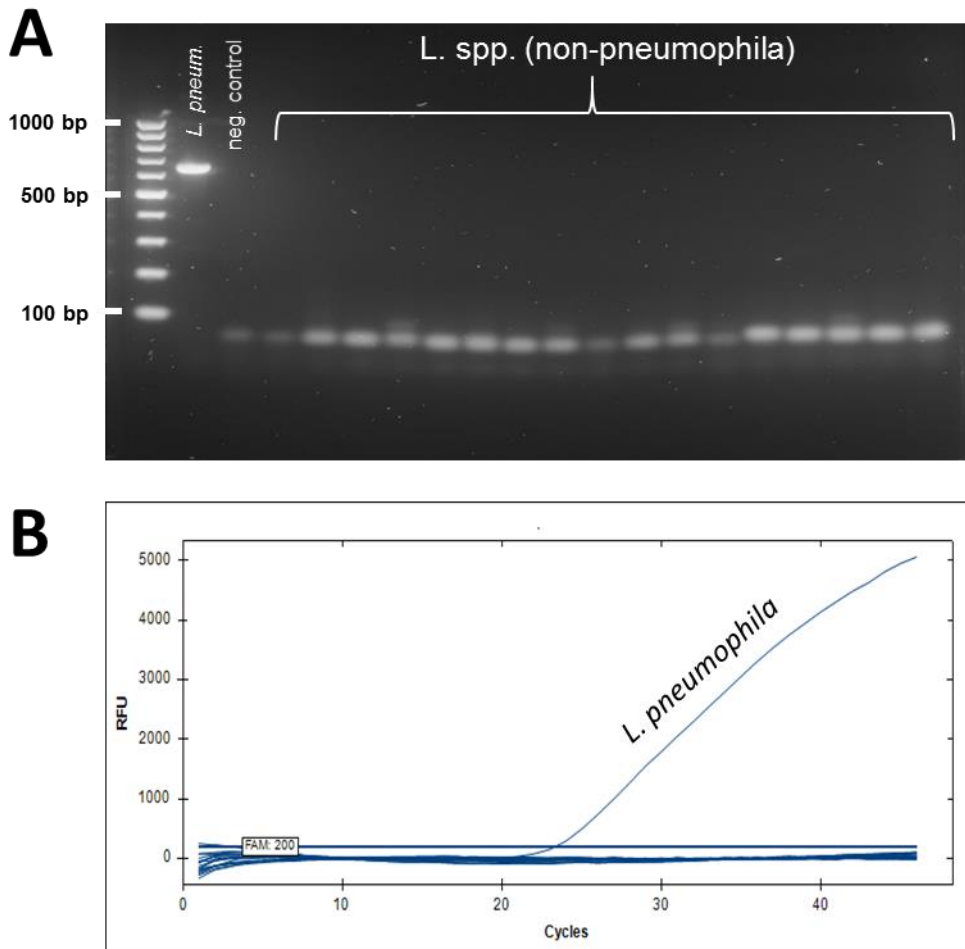
Nach Optimierung der PCR Bedingungen (Annealing-Temperatur, Elongationszeit, etc.) wurden mit allen 4 Oligonukleotidkombinationen nach Amplifikation von genomischer DNA von *L. pneumophila* klare Banden auf Agarosegelen erhalten (Abb. 29).

Zur Überprüfung der Spezifität für *L. pneumophila* wurden alle Oligonukleotidkombinationen mittels klassischer Endpoint PCR und qPCR auf 17 Nicht-*L. pneumophila* -Stämmen getestet. Spezifische Amplifikation wurde mit den Kombinationen F1/R1 und F2/R1 (Abb. 30 A für F2/R1) erzielt. Es wurde in der Endpoint PCR spezifisch nur ein Signal/eine Bande bei

L. pneumophila und bei keinem der anderen Nicht-*L. pneumophila*-Arten erhalten. Auch in der qPCR wurde nur für *L. pneumophila* ein Signal erhalten (Abb. 30 B für F2/R1). Die Ergebnisse wurden mit 7 *L. pneumophila* Stämmen verifiziert (Abb. 31).

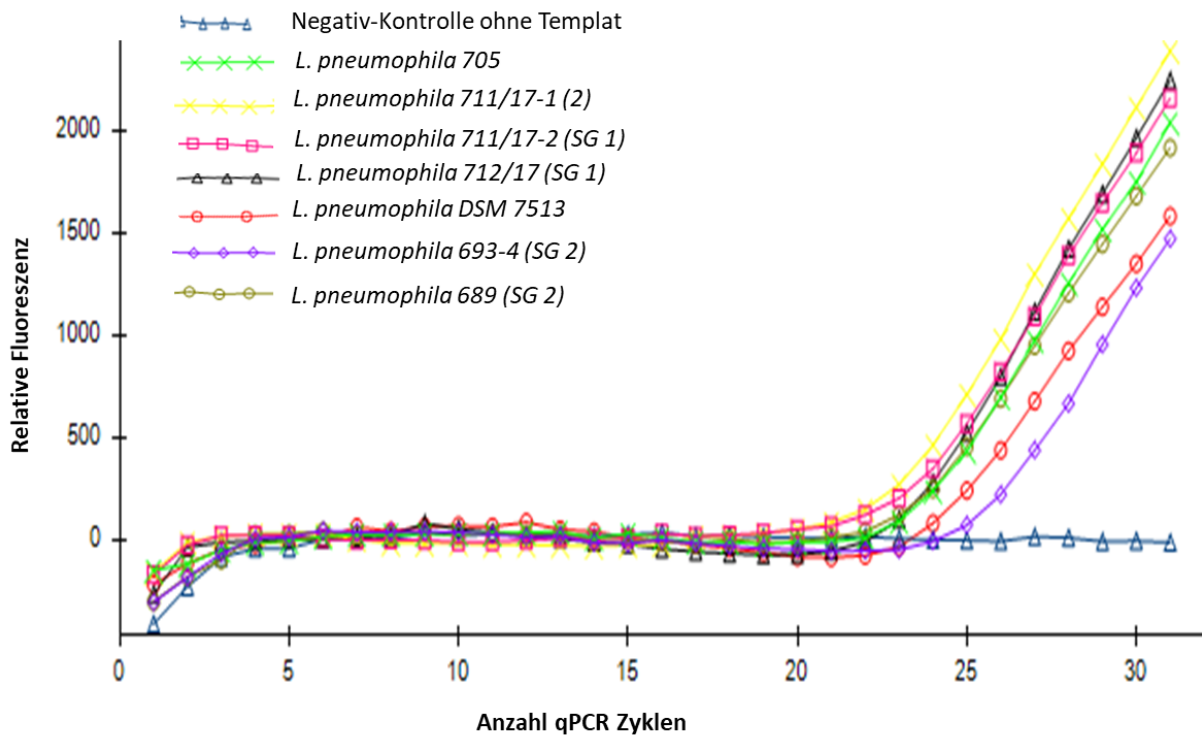
Die Primerkombination F3/R1 ergab ein ca. 600 bp Produkt mit DNS von *L. feelei* und die Primerkombination mit F4 ergab unspezifische Signale (ca. 300 bp) mit DNS von *L. brunensis*, *L. tucsonensis* und *L. micdadei*.

Abbildung 30: Spezifitätstest von Oligonukleotidkombination F2/R1.



Spezifitätstest von Oligonukleotidkombination F2/R1 für *L. pneumophila*. (A) Agarosegel mit Endpunkt-PCR-Reaktionen von genomischer DNA von *L. pneumophila* und 17 anderen *Legionella*-Arten. (B) Ergebnis einer qPCR-Reaktion mit genomischer DNA von *L. pneumophila* und 17 anderen *Legionella*-Arten. Signale werden jeweils nur erhalten mit DNA von *L. pneumophila*.

Abbildung 31: qPCR Amplifikation verschiedener *L. pneumophila* mit der F2/R1 Primer Kombination



Ergebnisse der qPCR Amplifikation von 1 ng genomischer DNS verschiedener *L. pneumophila* Stämme mit der F2/R1 Primerkombination.

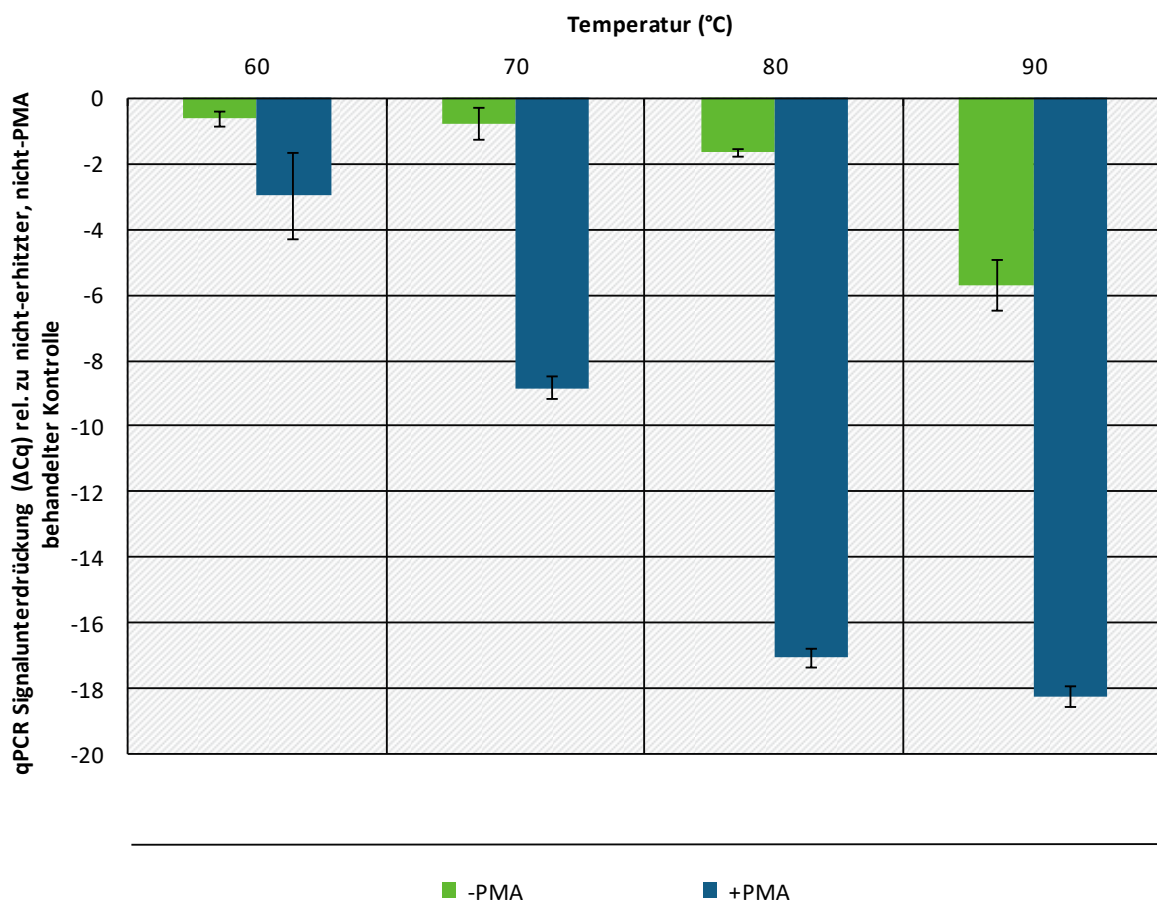
Ergebnis: Basierend auf allen Validierungstests wurde die Oligonukleotidkombination F2/R1 für alle weiteren Experimente ausgewählt. Diese Kombination wies unter den gewählten Amplifikationsbedingungen sehr hohe Spezifität für *L. pneumophila* auf. Amplifikationsprodukte der gleichen Länge wurden mit 7 verschiedenen *L. pneumophila* Stämmen erhalten.

Optimierung von Vitalitäts-qPCR Bedingungen

Die Vorversuche zur Bestimmung der optimalen Konzentration des Vitalitätsfarbstoffes Propidium Monoazid (PMA) wurden mit einer Suspension von *L. pneumophila* Isolat 711/17-2 (Serogruppe 1) mit einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,3 durchgeführt. Eine PMA Endkonzentration von 10 µM war in den Laborversuchen ausreichend für eine Differenzierung von intakten und membrangeschädigten Bakterien und wurde bewusst niedrig gewählt, um andere Parameter Optimierungsspielraum zu belassen.

Diese PMA Konzentration wurde zur Untersuchung der qPCR Signalunterdrückung bei verschiedenen Hitzestress-Temperaturen verwendet. Dazu wurden Suspensionen von *L. pneumophila* für jeweils 30 min bei 60 °C, 70 °C, 80 °C oder 90 °C inkubiert und anschließend mit PMA behandelt. Die resultierende qPCR Signalunterdrückung von hitzebehandelten Legionellen (mit und ohne PMA Behandlung) im Vergleich zu einer Kontrolle (ohne Hitzebehandlung und ohne PMA-Behandlung) zeigte eine zunehmende Signalunterdrückung durch PMA mit steigender Temperatur (Abb. 32). Der Signalverlust ohne PMA-Behandlung fiel weniger stark aus und ist mit der thermischen Schädigung der bakteriellen DNS erklärbar.

Abbildung 32: qPCR Signalunterdrückung von hitzebehandelten *L. pneumophila*



*Fußnote

Quelle: Quellenangabe

qPCR Signalunterdrückung einer hitzebehandelten *L. pneumophila* Suspension (mit und ohne PMA Behandlung) im Vergleich zu einer Kontrolle (ohne Hitzebehandlung und ohne PMA-Behandlung).

Der gewählte qPCR Ansatz wurde dann weiter optimiert hinsichtlich der Anforderung, Signale von membrangeschädigten Bakterien möglichst stark zu unterdrücken, ohne gleichzeitig die Signale von membranintakten Legionellen zu beeinträchtigen (7.1.4.1-7.1.4.3). Für die weiteren Optimierungsexperimente wurden eine Hitzestress-Temperatur von 70 °C und eine PMA-Konzentration von 10 µM gewählt, um Spielraum für Optimierung zu haben.

Einfluss von Inkubationstemperatur und -dauer

L. pneumophila (unbehandelt d.h. lebend oder hitzeabgetötet bei 70 °C für 30 min) wurde bei unterschiedlichen Temperaturen und für unterschiedliche Inkubationszeiten mit PMA behandelt. Das Spektrum an verschiedenen Temperaturen reichte von 20 °C bis 50 °C und die Einwirkzeit erfolgte für 10, 20 oder 30 min (Abb. 33).

Abbildung 33: Effekt der PMA Inkubationstemperatur und Inkubationszeit

A	nicht-erhitzt ("lebend")					erhitzt ("tot")				
	PMA Inkubationstemperatur					PMA Inkubationstemperatur				
Inkubationszeit	20 °C	30 °C	37 °C	45 °C	50 °C	20 °C	30 °C	37 °C	45 °C	50 °C
10 min	-0.05	-0.15	-0.46	-0.67	-1.40	-8.50	-9.33	-11.48	-13.61	-14.67
20 min	0.01	-0.11	-0.66	-0.74	-2.31	-10.68	-11.06	-12.06	-15.82	-17.44
30 min	-0.28	0.17	-0.38	-0.88	-2.84	-10.70	-12.11	-12.66	-15.90	-17.71

B	20 °C	30 °C	37 °C	45 °C	50 °C	20 °C	30 °C	37 °C	45 °C	50 °C
	10 min	±0.68	±0.22	±0.23	±0.41	±0.8	±1.03	±1.23	±2.83	±1.07
20 min	±0.39	±0.34	±0.62	±0.28	±0.8	±2.58	±1.01	±1.12	±1.49	±1.91
30 min	±0.53	±0.43	±0.29	±0.2	±0.85	±1.87	±1.96	±2.84	±1.68	±1.28

Effekt der PMA Inkubationstemperatur und Inkubationszeit auf die qPCR Signalunterdrückung von nicht-behandelten (lebenden) und hitze-behandelten (70 °C, 30 min), toten *L. pneumophila* 711/17-2. Die Bakteriensuspensionen wurden mit 10 µM PMA behandelt für 10, 20, oder 30 min bei 20, 30, 37, 45, oder 50 °C, gefolgt von Lichtexposition. (A) Signalunterdrückung (ΔC_q) wurde berechnet durch Subtrahieren des C_q -Wertes nach PMA-Behandlung von dem C_q -Wert einer nicht-hitzebehandelten Kontrolle ohne PMA-Behandlung. Der Farbgradient wurde unterlegt zur besseren Visualisierung des jeweiligen Effektes: grün signalisiert geringe Unterdrückung der qPCR Signale, rot steht für starke Unterdrückung der qPCR Signale. (B) Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

Man erkennt mit zunehmender Inkubationstemperatur und/oder Inkubationszeit eine stärker werdende Signalunterdrückung hitzebehandelter *L. pneumophila* (in Abb. 33 visualisiert durch zunehmend rote Färbung). Die stärkste Signalunterdrückung toter Bakterien erhält man bei einer PMA Inkubation bei 50 °C über 30 min. Andererseits ist hier auch ein deutlicher Effekt auf lebende Bakterien ersichtlich.

Ergebnis: Zur Erzielung eines möglichst starken Effektes auf tote Bakterien und eines möglichst geringen Effektes auf lebende Bakterien wurde die PMA-Behandlung in allen folgenden Experimenten bei 45 °C für 10 min durchgeführt. Abweichend davon erwiesen sich bei PMA-Behandlung von gefilterten Proben bei Raumtemperatur PMA-Inkubationszeiten von 20-30 min als effizienter.

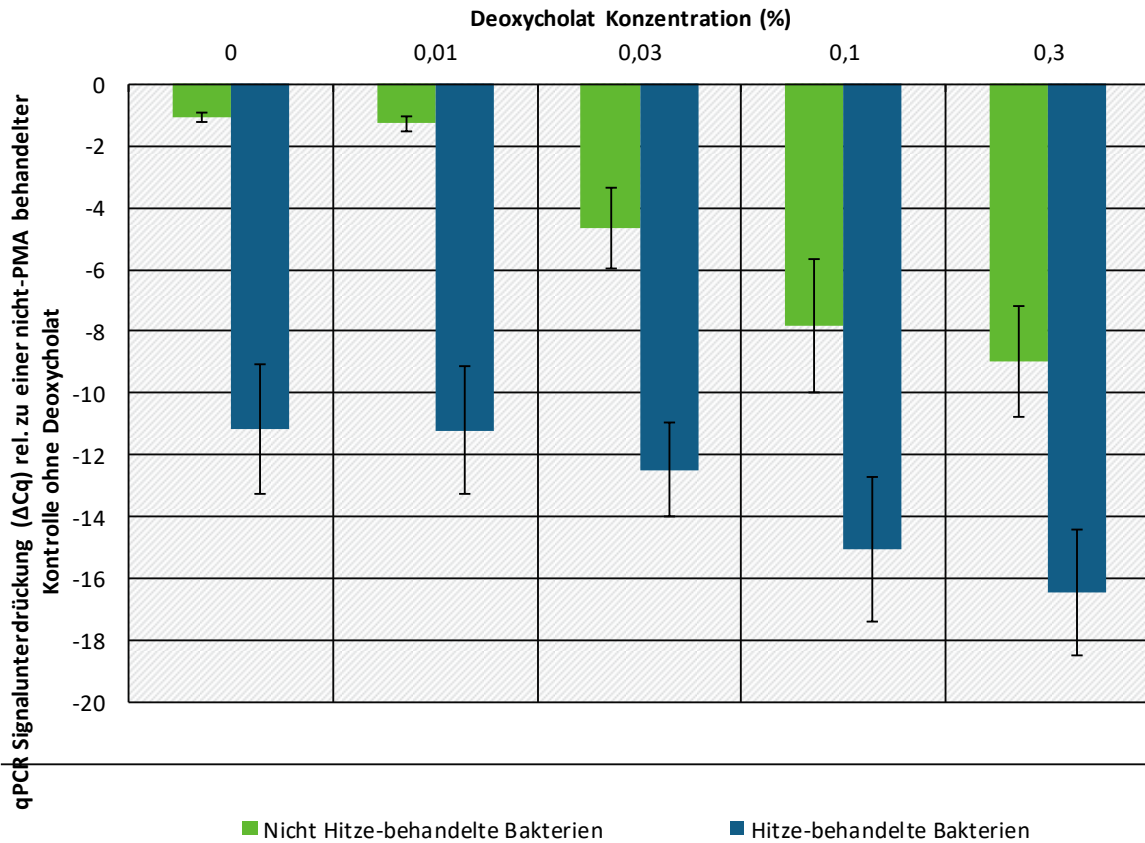
Einfluss von Deoxycholat auf die PMA-Behandlungseffizienz

Mehrere Forschungsarbeiten hatten gezeigt, dass die Inkubation von Lebendfarbstoffen (PMA und Ethidiummonoazid) in Anwesenheit des Gallensalzes Deoxycholat im Falle gram-negativer Bakterien zu einer stärkeren Signalunterdrückung toter Bakterien führte, ohne die Signale lebender Bakterien zu beeinträchtigen (Yang et al. 2011; Lee & Levin 2009).

Um zu überprüfen, ob dies auch für *L. pneumophila* zutrifft, wurden unbehandelt-lebende und hitzeabgetötete Bakteriensuspensionen mit PMA in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen von Deoxycholat inkubiert (Abb. 34). Obwohl zunehmende Konzentrationen von Deoxycholat zu einer stärker werdenden Signalunterdrückung von toten Bakterien führte, zeigten sich im Unterschied zu anderen gram-negativen Bakterien auch lebende *L. pneumophila* empfindlich gegenüber dem Gallensalz. Es zeigte sich eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung hinsichtlich der Membranintegrität lebender Zellen.

Ergebnis: die Anwesenheit von Deoxycholat bei der PMA-Behandlung ist nicht zielführend, da das Gallensalz auch die Signale lebender Legionellen beeinflusst und falsch-negative Ergebnisse bewirkt.

Abbildung 34: Effekt von Deoxycholat auf die qPCR Signalunterdrückung



*Fußnote

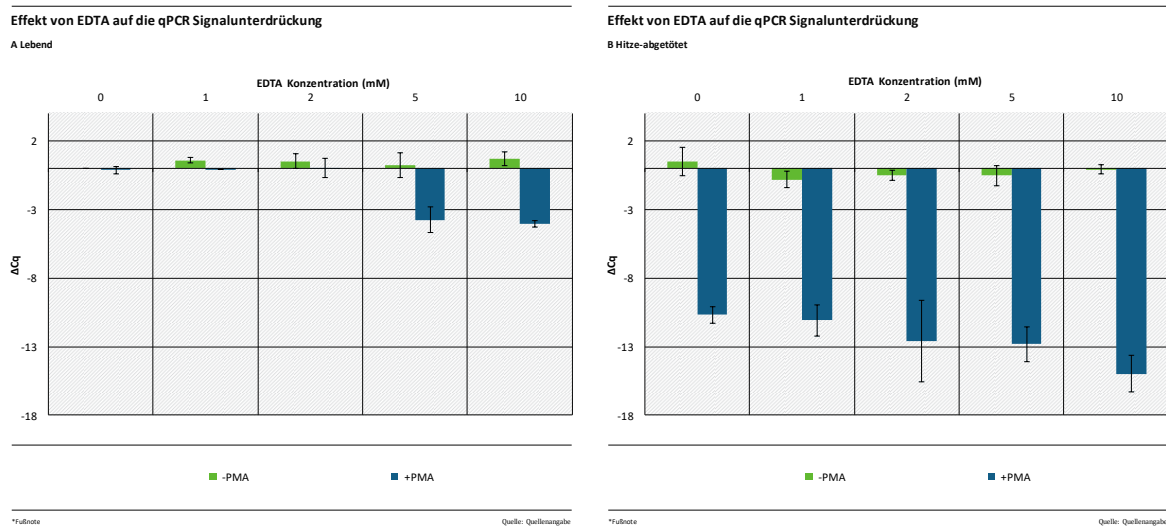
Quelle: Quellenangabe

Effekt von zunehmenden Konzentrationen des Gallensalzes Deoxycholat (in Prozent, w/v) auf die qPCR Signalunterdrückung von nicht-behandelten (lebenden) und hitze-behandelten (70 °C, 30 min), toten *L. pneumophila* 711/17-2. Eine PMA-behandelte Bakteriensuspension ohne Deoxycholat diente als Kontrolle. Die PMA-Behandlung (10 μM) erfolgte für 10 min bei 45 °C. Signalunterdrückung (ΔCq) wurde berechnet durch Subtrahieren der jeweiligen Cq-Werte nach PMA-Behandlung von dem Cq-Wert eines nicht-hitzebehandelten Aliquots ohne PMA-Behandlung. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für drei unabhängige Versuche.

Einfluss von EDTA auf die PMA-Behandlungseffizienz

Chelatierende Substanzen wie EDTA können die Membranpermeabilität für Fluoreszenzfarbstoffe modulieren. Bei durchflusszytometrischen Analysen von Wasserproben werden aus diesem Grund teilweise Protokolle verwendet, wo die Inkubation von Proben mit Lebendfarbstoffen (typischerweise Propidium Iodid) in Anwesenheit von EDTA (typischerweise 5 mM bei Raumtemperatur) durchgeführt wird. Wir untersuchten daher den Einfluss von verschiedenen EDTA-Konzentrationen auf die PMA-qPCR Signale (Abb. 35). Die PMA-Behandlung erfolgte bei 45 °C (10 min).

Abbildung 35: Effekt von EDTA auf die qPCR Signalunterdrückung.



Effekt von zunehmenden EDTA Konzentrationen (Endkonz. in mM) auf die qPCR Signale von (A) nicht-behandelten (lebenden) und (B) hitze-behandelten (70 °C, 30 min), toten *L. pneumophila* 711/17-2. Die Ansätze wurden entweder PMA-behandelt (rot) oder nicht (blau). Bei den Ansätzen mit PMA wurde der Lebendfarbstoff 5 min nach Zugabe von EDTA zugefügt. Eine Bakteriensuspension ohne EDTA diente als Kontrolle. Die PMA-Behandlung (10 µM) erfolgte für 10 min bei 45 °C. Die Signalunterdrückung (ΔC_q) wurde berechnet durch Subtrahieren der jeweiligen C_q -Werte nach PMA-Behandlung von dem C_q -Wert eines nicht-hitzebehandelten Aliquots ohne PMA-Behandlung. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für drei unabhängige Versuche.

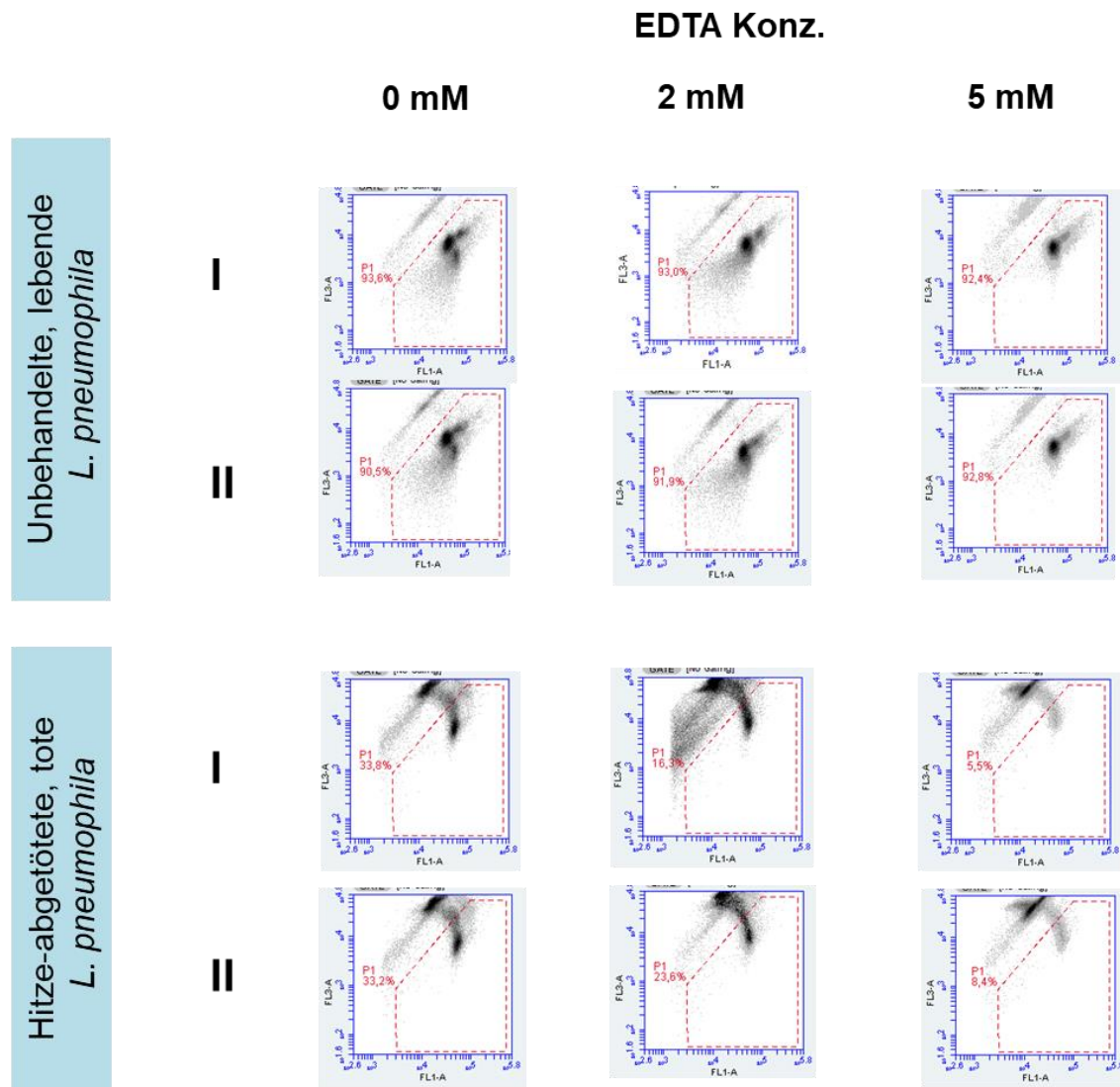
Für lebende Bakterien war bei 1 mM oder 2 mM EDTA kein Effekt und bei 5 mM oder 10 mM EDTA ein moderater Effekt ($\Delta C_q > 3$ Zyklen) auf die Signalunterdrückung sichtbar (Abb. 35 A). Für hitzeabgetötete Bakterien ergab sich dagegen eine stärkere Signalunterdrückung mit zunehmender EDTA-Konzentration (Abb. 35 B). Der Effekt auf lebende Bakterien bei 5 mM oder 10 mM EDTA wurde der PMA-Inkubationstemperatur von 45 ° zugeschrieben.

Um den Effekt von EDTA bei Temperaturen < 45 °C zu untersuchen, wurden Suspensionen von lebenden oder hitzeabgetöteten *L. pneumophila* mit SYBR Green I und Propidium Iodid bei 37 °C für 13 min in An- oder Abwesenheit von EDTA angefärbt. Die Membranpermeabilität von Propidium Iodid ist vergleichbar mit der von Propidium Monoazid. Die angefärbten Bakterien wurden anschließend durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 36). Für lebende Bakterien war kein Effekt von EDTA (2 mM oder 5 mM) auf das Färbeverhalten sichtbar (Abb. 36 oben). Für hitzeabgetötete Bakterien ergab sich eine Verringerung des Anteils von intakten Bakterien mit zunehmender EDTA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ohne EDTA (Abb. 36 unten).

Ergebnis: die Wirkung von EDTA auf die Membranpermeabilität von PMA oder PI ist temperaturabhängig. Die Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 5 mM fördert die Permeabilität von hitzeabgetöteten *L. pneumophila* für Propidium Iodid bei 37 °C, ohne die Signale lebender Bakterien zu beeinflussen. Bei einer Inkubation von 45 °C (10 min) kann EDTA bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben werden, ohne die Signale lebender Bakterien zu beeinflussen.

Bei weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Probenbehandlung mit PMA bei 45 °C für 10 min in Anwesenheit von 2 mM EDTA die Signale hitzeabgetöteter *L. pneumophila* (80 °C, 30 min) bis zu einer Konzentration von 10^6 Bakterien pro mL unterbinden kann.

Abbildung 36: Effekt von EDTA auf durchflusszytometrische Signale

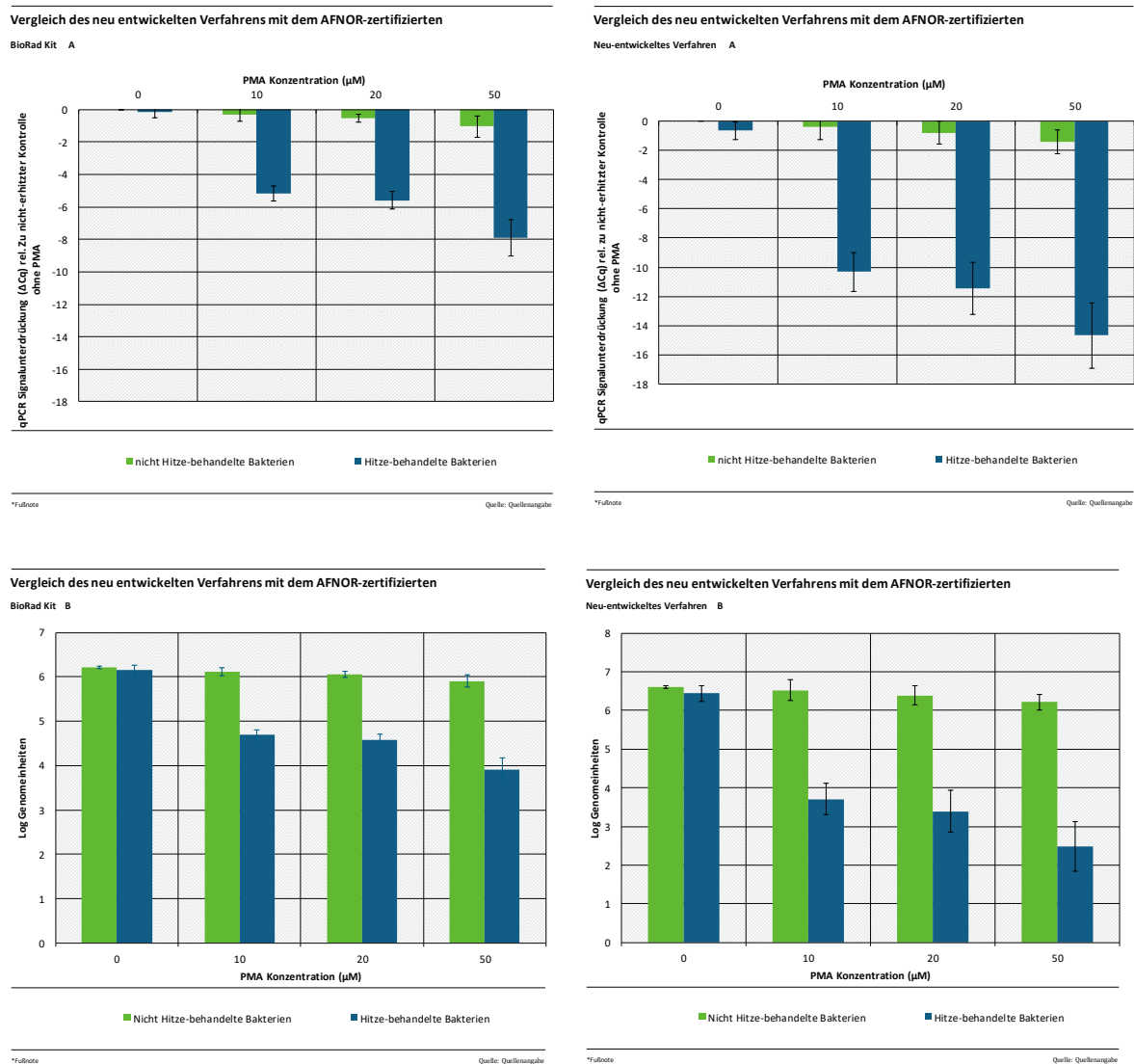


Effekt von EDTA auf durchflusszytometrische Signale von lebenden und hitzeabgetöteten (70 °C, 30 min) *L. pneumophila* nach Färbung mit SYBR Green I und Propidium Iodid bei 37 °C für 13 min. Die Färbung wurde durchgeführt in Abwesenheit von EDTA (Kontrolle) oder in Anwesenheit von 2 mM oder 5 mM EDTA (Endkonzentration). Signale membranintakter Bakterien sind im rot-gestrichelten Fenster lokalisiert. Abgebildet sind exemplarisch die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchswiederholungen.

Vergleichende Beurteilung der PMA-Behandlungseffizienz

Zur Beurteilung des hier neu entwickelten qPCR Verfahrens hinsichtlich seiner Effizienz, Signale toter *L. pneumophila* zu unterdrücken, wurden identische Aliquote PMA-behandelter lebender und toter Bakterien vergleichend mit dem AFNOR-validierten iQ-Check® *Legionella* Real-Time PCR Kit (BioRad) und dem hier entwickelten Protokoll untersucht. Die Suspensionen von *L. pneumophila* wurden mit PMA-Konzentrationen von 10 µM, 20 µM oder 50 µM behandelt und die qPCR Signale mit denen einer unbehandelten Kontrolle verglichen (Abb. 37). Die PMA-Behandlungseffizienz wurde ausgedrückt in erzielten ΔC_q -Werten (Abb. 37 A) oder der quantifizierten Genomeinheiten (Abb. 37 B).

Abbildung 37: Vergleich des neu entwickelten Verfahrens mit dem AFNOR-zertifizierten



Vergleich der mit dem kommerziellen BioRad Kit und dem neu entwickelten Verfahren erzielbaren PMA-Behandlungseffizienzen. Identische Aliquots von lebenden oder hitzeabgetöteten ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) *L. pneumophila* 711/17-2 wurden mit verschiedenen PMA-Konzentrationen behandelt ($42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min). Die extrahierte genomische DNS wurde quantifiziert mit dem kommerziell erhältlichen AFNOR-validierten iQ-Check® Legionella Real-Time PCR Kit (BioRad) oder dem hier neuentwickelten qPCR Verfahren. Die PMA-Behandlungseffizienz wurde ausgedrückt als (A) Signalunterdrückung (ΔCq) oder (B) als detektierte Genomeinheiten (basierend auf Standardkurven). Die ΔCq Signalunterdrückung wurde berechnet durch Subtrahieren der jeweiligen Cq -Werte nach PMA-Behandlung von dem Cq -Wert eines nicht-hitzebehandelten Aliquots ohne PMA-Behandlung. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in drei unabhängigen Versuchen. GU = Genomic Units/Genomeinheiten.

Es zeigte sich, dass das neu entwickelte qPCR Verfahren im Vergleich mit dem kommerziellen Kit bezüglich ΔCq eine ungefähr doppelt so starke Unterdrückung von Tot-Signalen erzielte.

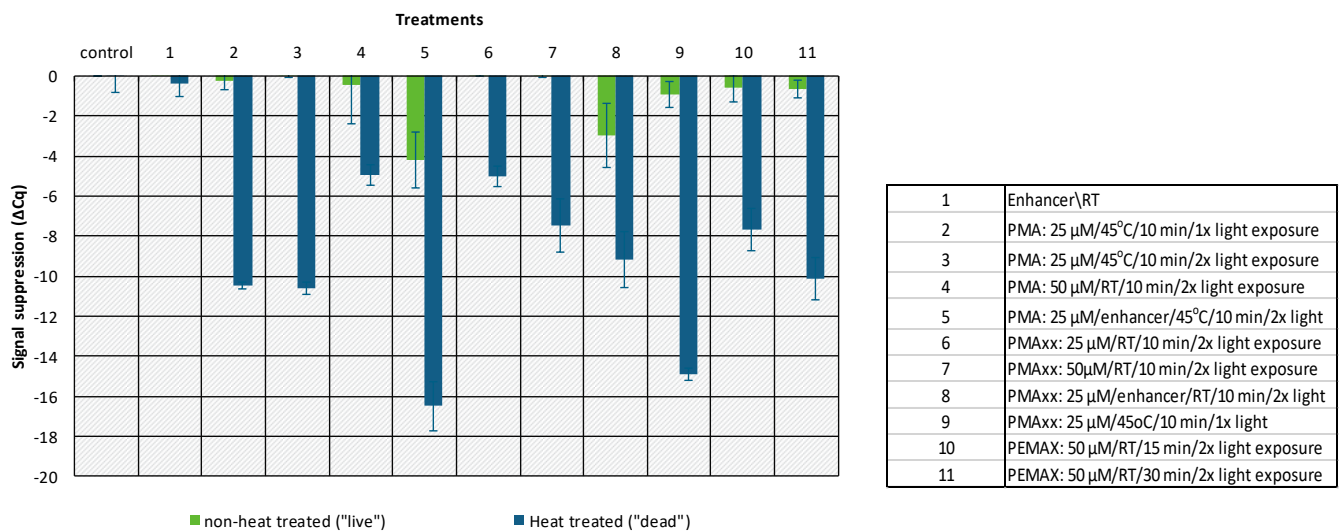
Die starke Unterdrückung toter *L. pneumophila* durch die Behandlung mit PMA in Kombination mit der Amplifikation langer Gensequenzen geht aber auf Kosten der unteren Bestimmungsgrenze des qPCR Ansatzes, der mit 10 Genomkopien pro qPCR Ansatz ermittelt wurde (d.h. mind. 95 % aller Ansätze mit 10 Genomkopien pro qPCR Ansatz geben ein Signal). Es wird geschätzt, dass die Bestimmungsgrenze des kommerziellen iQ-Check Kits von BioRad

aufgrund der kürzeren Amplikongrößen und der daraus resultierenden höheren Amplifikationseffizienz um den Faktor 2 bis 5 niedriger ist.

Vergleich von PMA mit anderen Lebendfarbstoffen

Die Auswirkung von PMA auf lebende und hitzeabgetötete (70 °C, 30 min) *L. pneumophila* wurde verglichen mit der Wirkung der alternativen Vitalitätsfarbstoffe PMAxx (Biotium Inc., Fremont, USA) und PEMAX (GenIUL, Barcelona, Spanien). Die vergleichenden Untersuchungen wurden mit unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (Konzentration, Temperatur, Inkubationszeit, Anzahl von Lichtexpositionsintervallen von jeweils 15 min) durchgeführt (Abb. 38). Die Konzentration an Lebendfarbstoff wurde mit 25 µM oder 50 µM dem für Realproben erforderlichen Konzentrationsbereich angepasst, da die Kühlwassermatrix eine höhere Farbstoffzehrung aufweist als Bakteriensuspensionen im Labor. Die extrahierte DNS wurde mit dem neu entwickelten qPCR Verfahren analysiert.

Abbildung 38: Vergleich verschiedener Lebendfarbstoffe



*Fußnote

Quelle: Quellenangabe

Vergleich von PMA, PMAxx und PEMAX, auf die qPCR Signalreduktion relative zu einer unbehandelten *L. pneumophila* Suspension (Kontrolle). Enhancer: Von Biotium Inc. kommerziell erhältliche Enhancer-Lösung für Anwendung zusammen mit PMAxx. RT = Raumtemperatur.

Das Behandlungsverfahren mit PMA in Kombination mit den beschriebenen Bedingungen schnitt in diesem Vergleich gut ab. Die Inkubation mit 25 µM Vitalitätsfarbstoff bei erhöhter Temperatur (45 °C) erwies sich als wesentlich effizienter als die Inkubation mit 50 µM PMA bei Raumtemperatur (Abb. 38). Unter diesen Inkubationsbedingungen wurde mit PMA eine höhere Signalunterdrückung erreicht als mit PMAxx bei Raumtemperatur. Die Signalunterdrückung toter Bakterien mit PMAxx (25 µM, 45 °C) war zwar höher, dafür wurden auch lebende Zellen beeinflusst. Die kommerzielle Enhancer-Lösung hatte einen negativen Effekt auf lebende Legionellen (Abb. 38).

7.2 Validierung eines Nachweisverfahrens zur Quantifizierung von *Legionella* spp.

Eine Eigenentwicklung eines diagnostischen Verfahrens für *Legionella* spp. konnte infolge von Kostenlimitationen nicht innerhalb dieses Projektes durchgeführt werden. Eine Literaturrecherche zu veröffentlichten qPCR Tests für *Legionella* spp. in Kombination mit Vitalitätsfarbstoffen führte zu einer vielversprechenden Studie von Ditommaso et al. (2015). Die Veröffentlichung beschreibt die Validierung eines kommerziellen qPCR Kits (*Legionella*_spp., Firma Primerdesign™ Ltd.; <http://www.genesig.com/assets/files/Legionella.pdf>) für *Legionella* spp. in Kombination mit der Probenbehandlung mit PMA. Die Amplifikation einer 367 bp-langen Gensequenz führte in Kombination mit PMA-Behandlung zu einer wesentlich besseren Unterdrückung von membrangeschädigten toten *Legionella* spp. als das von Bio-Rad angebotene iQ-Check® Quanti *Legionella* spp. Kit mit einer Amplikonlänge von rund 100 bp.

Das betreffende Kit für die Detektion von *Legionella* spp. wurde bei der Firma Primerdesign™ Ltd. (www.primerdesign.co.uk) im Rahmen dieses Projektes bestellt und im IWW etabliert. Das Kit wurde nachfolgend auf eine Anzahl von realen Kühlwasserproben angewandt und die daraus resultierenden Legionellenkonzentrationen verglichen mit denen des auf die gleichen Proben angewandten iQ-Check® *Legionella* spp. Kits (Bio-Rad) sowie des kulturellen Nachweisverfahrens nach ISO 11731-2017 (Abb. 39 und Abb. 40).

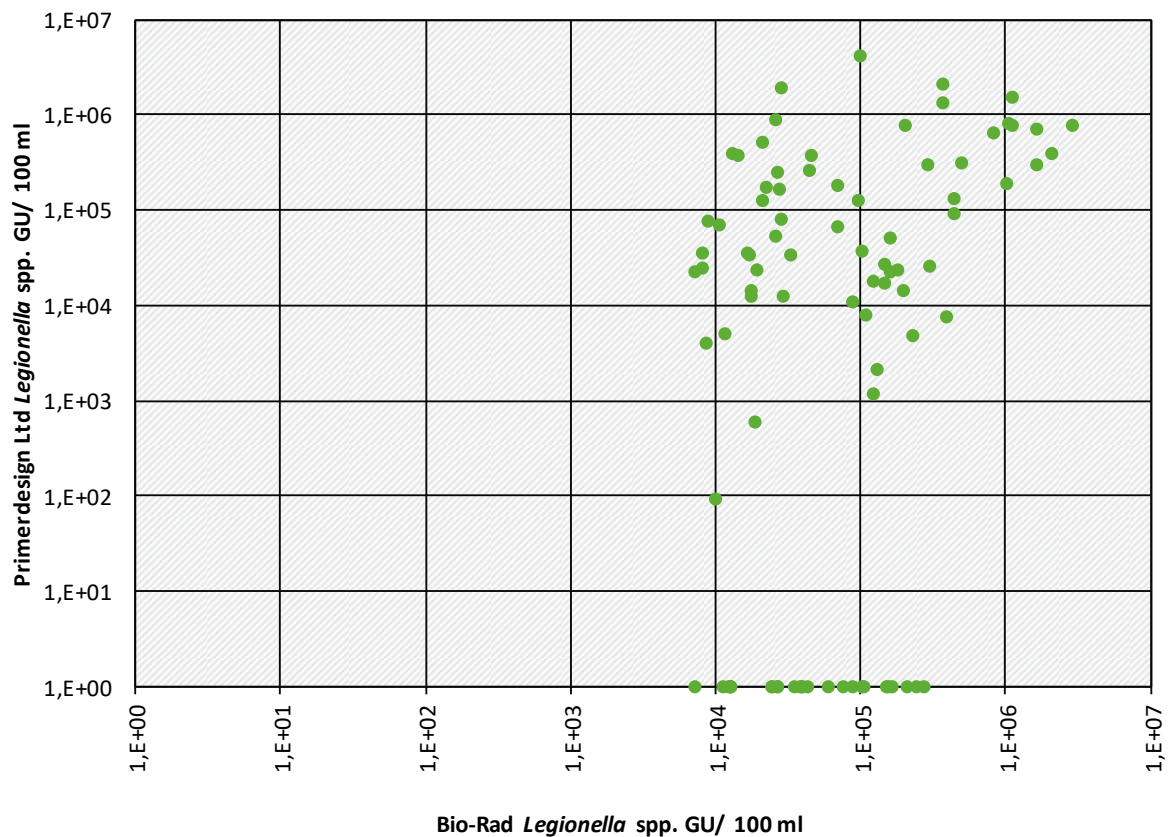
Alle Kühlwasserproben wurden für die qPCR Diagnostik nach Membranfiltration mit dem Lebendfarbstoff PMA behandelt durch Überschichtung der Filter mit 50 µM PMA und einer Inkubation von 10 min, gefolgt von Lichtexposition in einem Photo Activation Universal Light (PAUL) Gerät (GenIUL, Barcelona, Spanien).

Auffallend beim Vergleich der beiden qPCR Kits sind eine signifikante Anzahl (26 von 90) von Negativbefunden mit dem PrimerDesign™ Ltd. *Legionella*_spp Kit, während diese Proben positive Legionellenbefunde mit dem iQ-Check® Quanti *Legionella* spp. Kit aufwiesen. Eine mögliche Erklärung könnte im Vorliegen toter, membrangeschädigter Legionellen liegen, deren Signale durch die größere Amplikonlänge des Kits von PrimerDesign Ltd. effizient unterdrückt würden. Diese Hypothese wurde allerdings widerlegt durch die Korrelation der PrimerDesign qPCR Daten mit den durch Kultivierung erhaltenen Konzentrationen (Abb. 40).

Wie im Vergleich mit dem Bio-Rad Kit zeigt das Diagramm eine signifikante Anzahl von Proben (24 von 90), die zum Teil mit dem kulturellen Nachweisverfahren hohe Legionellenkonzentrationen aufweisen, jedoch nach dem PrimerDesign qPCR Kit negative Befunde oder geringe Konzentrationen aufwiesen. Dieses Ergebnis deutet auf mangelnde Inklusivität des qPCR Nachweises hin, d.h. es werden nicht alle Legionellen, die kulturell und mit anderen qPCR Reaktionen erfasst werden, mit dem betreffenden qPCR Nachweis detektiert. Das *Legionella*_spp qPCR-Kit der Firma PrimerDesign™ Ltd wurde aus diesem Grund als nicht geeignet für den Legionellennachweis in Kühlwasser angesehen.

Abbildung 39: Vergleich BioRad iQ-Check® vs. PrimerDesign™ Ltd. Legionella_spp.

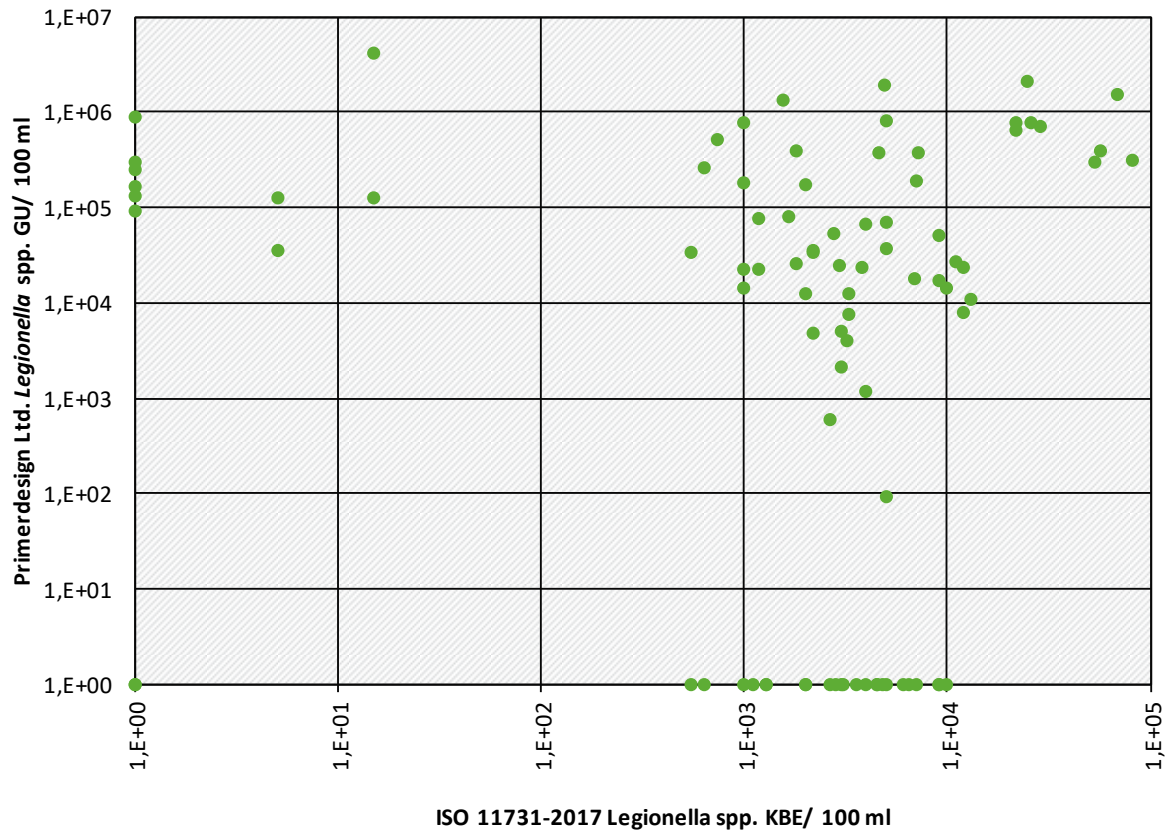
Konzentrationen von *Legionella* spp. (in GU pro 100 ml) von 90 Kühlwasserproben



GU = Genomische Einheiten. Gezeigt sind die in verschiedenen realen Kühlwasserproben bestimmten Konzentrationen von GU *Legionella* spp. in 100 ml unter Verwendung des BioRad iQ-Check® Kits und des PrimerDesign™ Ltd. Kits für *Legionella*_spp. Alle Proben wurden vor der Extraktion von genomischer DNS mit dem Lebendfarbstoff PMA behandelt.
Quelle: IWW.

Abbildung 40: Vergleich ISO 11731-2017 vs. PrimerDesign™ Ltd *Legionella_spp*

Konzentrationen von *Legionella_spp.* in Kühlwasserproben, gemessen mittels Kultivierung oder qPCR.



GU = Genomische Einheiten. Gezeigt sind die in verschiedenen realen Kühlwasserproben bestimmten Konzentrationen von *Legionella_spp.* in 100 ml unter Verwendung des Kulturverfahrens ISO 11731-2017 und des PrimerDesign™ Ltd. Kits für *Legionella_spp.* Quelle: IWW.

8 Erprobung der Probenahmestrategie, des Probenahmeverfahrens und des Nachweisverfahrens in der Praxis

Die entwickelten Verfahren wurden an vier industriellen Verdunstungskühlanlagen (Anlagen A – D) und an einem mobilen Kleinkühlturm (Anlage E) erprobt.

Zu den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen wird auf die Ausführungen in Kapitel 9 verwiesen.

8.1 Anlage A (Zellenkühlturm, Axialventilator, saugend)

Bei der Anlage A handelte es sich um einen saugend betriebenen Zellenkühlturm mit zwei bautechnisch gleichen Zellen gekoppelt in einem gemeinsamen Stahlbetonbauwerk einer Beschichtungsanlage.

Der Kühlwasserzulauf erfolgt über eine gemeinsame Zuleitung und separaten Zuführungsleitungen zur Wasserverteilung der beiden Zellen. Das von den Einbauten abtropfende Wasser sammelt sich in einer gemeinsamen Kühlturmtasse und wird mittels Kaltwasserpumpen in den Prozess zurückgeführt. Die Wasserverteilung erfolgt per Drall-Vollkegeldüsen über die Kühlturmeinbauten mit einer Höhe von knapp 2,5 m. Die Förderung der Luftmenge erfolgt je Zelle per Axialventilator mit ca. 3,5 m Ventilator Durchmesser, welcher oberhalb der Einbauten in einem ca. zwei Meter hohen Diffusorgehäuse verbaut ist. Der Luftzutritt erfolgt direkt oberhalb der Kühlturmtasse, Ansaugöffnungen sind durch Lamellenvorhänge gegen Windangriff und Flüssigkeitsaustritt geschützt. Die Bauhöhe der Anlage beträgt ca. 10 m, Zellenhöhe und -breite messen jeweils ca. 5 m. Der Nenndurchsatz der Anlage beträgt 400 m³ Wasser/h. Die Warmwassertemperatur beträgt ca. 37 °C bei einer Kühlzonenbreite von ca. 10 °C. Für den aus profilierten Kunststofflamellen bestehenden Tropfenabscheider wird ein Abscheidegrad von 0,002 % angegeben (Anteil der Durchriss-Wassermenge am umlaufenden Wasser). Die Anlage wurde im Jahr 2016 errichtet.

Über eine Steigleiter ist die Oberseite des Bauwerks zu erreichen, auf dieser Arbeitsebene ist der Bereich zwischen den beiden Diffusorgehäusen etwa jeweils zur Hälfte begehbar. Aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit des Diffusorauslasses wurden in einer Auslassöffnung nur zwei Halbachsen beprobt. Messsonden bzw. deren Galgen konnten auf der waagrecht ebenen, ca. 15 cm breiten Oberseite des Diffusorgehäuses aufgelegt werden.

Folgende Messungen wurden durchgeführt:

Bestimmung der Abluftparameter:

- ▶ Erfassung von dynamischem und statischen Druck mittels S-Pitot-Sonde auf den vorgesehenen Messpunkten der zwei Achsen im Messquerschnitt zur Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit
- ▶ Berechnung des Strömungsprofils und der mittleren Strömungsgeschwindigkeit, Berechnung des Abluftvolumenstroms
- ▶ Erfassung von dynamischem und statischen Druck mittels S-Pitot-Rohr auf zwei Achsen im Messquerschnitt nach Beendigung der Aerosolmessungen
- ▶ Erfassung der Umgebungsbedingungen (Luftdruck, -temperatur)

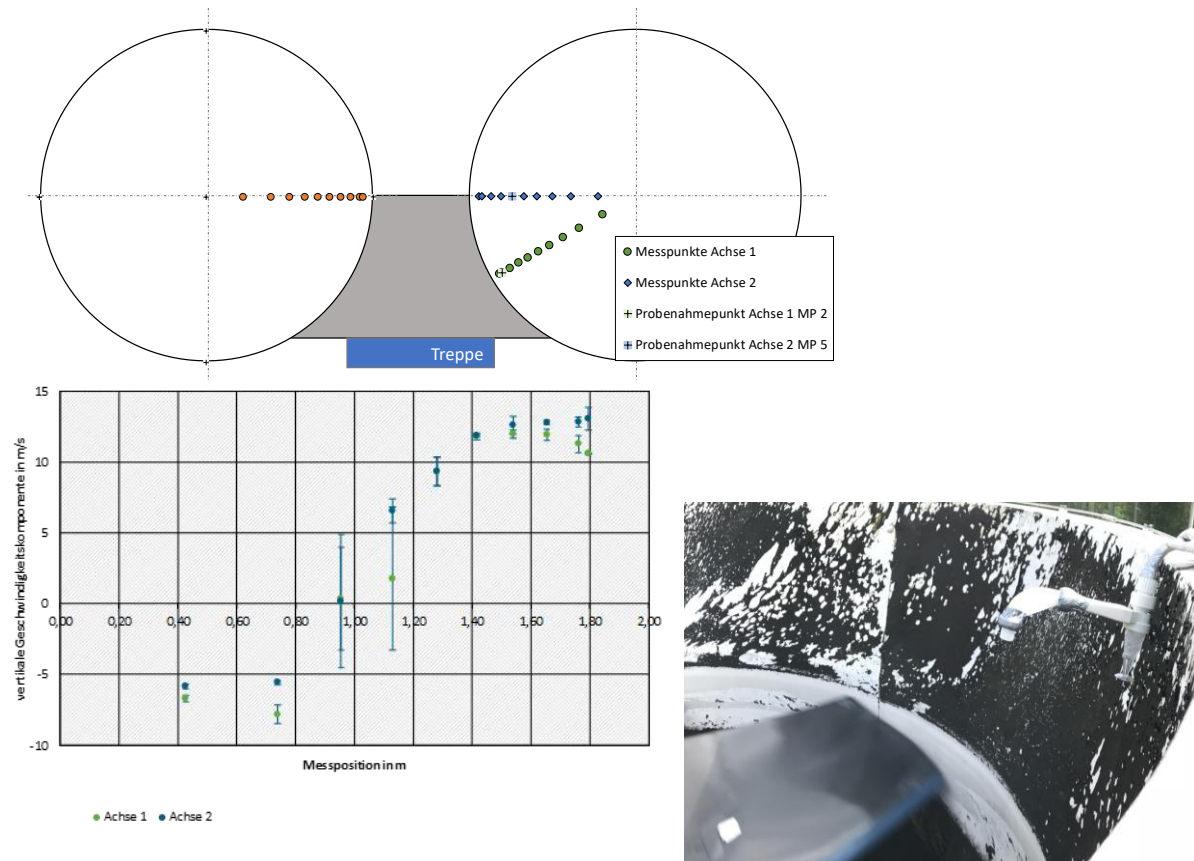
Erfassung biologischer Parameter:

- ▶ Erfassung der Aerosolkonzentration auf beiden Achsen am Ort der mittleren Strömungsgeschwindigkeit
- ▶ Erfassung der Umgebungs-Aerosolkonzentration im Luv der Anlagen
- ▶ Beprobung des Umlaufwassers

Durch Auswertung der durchgeführten Messung des statischen und dynamischen Drucks über die Halbachsen der Diffusormündung mittels S-Pitot-Sonde konnte das Strömungsprofil der Halbachsen bestimmt werden (Abb. 41, unten links). Demnach zeigte sich für eine Ringsströmung zwischen dem maximalen Radius bis zu einem Radius von ca. 1 m eine aufwärts gerichtete Strömung. Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit beträgt ca. 10 m/s. In Nähe der Rotorachse bis zu einem Radius von 1 m konnte eine inverse Strömung aus der Umgebung in den Kühlturm hinein festgestellt werden. Der auswärts gerichteten Kreisringströmung entspricht demnach ein Volumenstrom von 314.000 m³/h.

Abbildung 41: Aerosolprobenahme, Anlage A

Lage der Messpunkte (oben); Profil der Strömungsgeschwindigkeit am Auslass der Kühlturmzelle (unten links), Probenahme am Diffusorauslass mittels modifiziertem Coriolis-Sammler (unten rechts)



Oben: Lage der ausgehend von der Arbeitsbühne (grau) Messbühne zugänglichen Messachsen mit ihren Messpunkten. Unten links: Verlauf der gemessenen Strömungsgeschwindigkeit über zwei Messachsen einer der vermessenen Kühlturmzellen. Vertikale Achse: Gemessene Gasgeschwindigkeit in m/s, Horizontale Achse: Position auf der jeweiligen Halbachse ausgehend vom der Zentralachse der Austrittsfläche. Die reproduzierbar gemessenen Werte zeigen den Gasaustritt für Radien größer ca. 900 mm und die Rückströmung in den Kühlturm für Radien kleiner 900 mm (negative Strömungsgeschwindigkeit, inverse Strömung). Unten rechts: Position des Nass-Zyklon-Sammlers bei der Aerosolmessung.

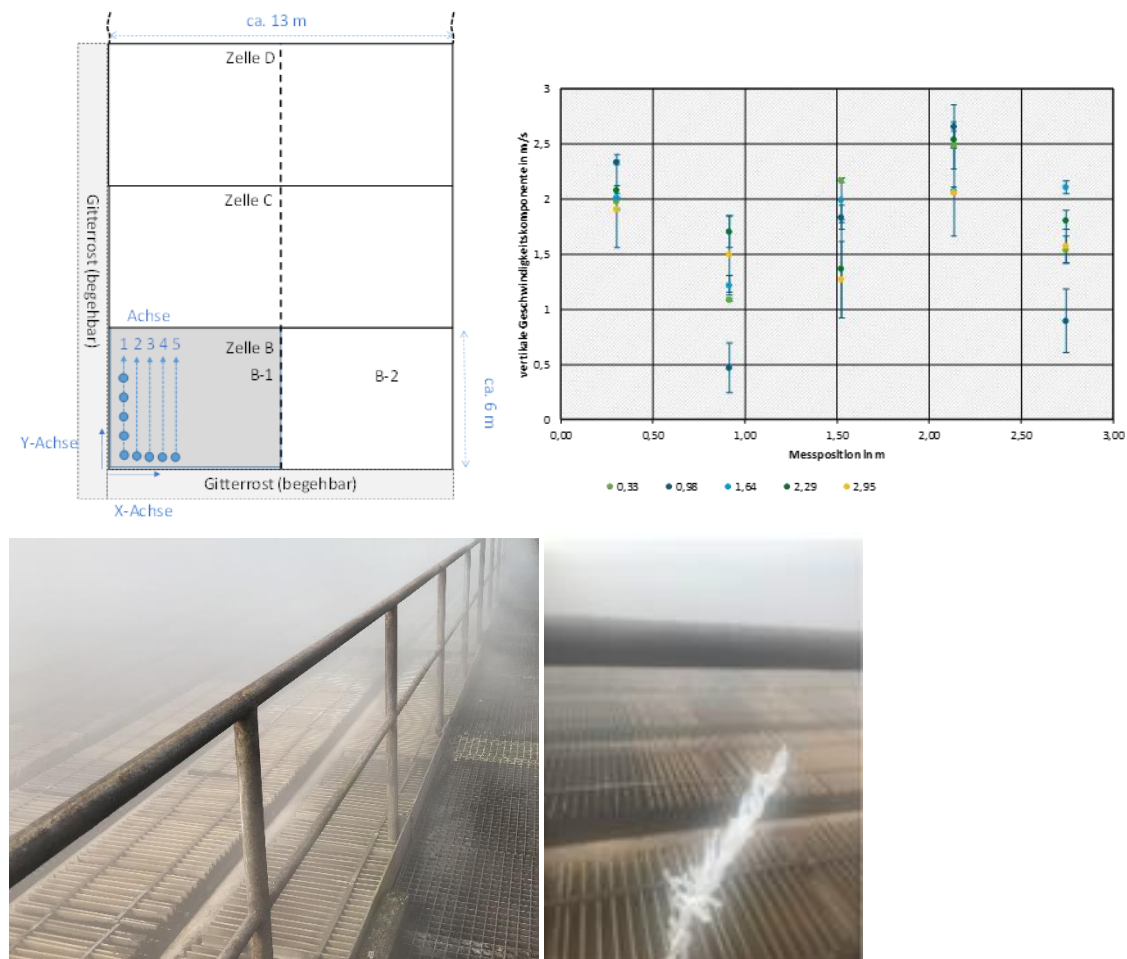
Die Aerosolprobenahme erfolgte vertikal mittels Emissionssammler an jeweils einem Messpunkt je Achse. Es wurden zwei bzw. drei Wiederholungsmessungen durchgeführt. Die Absaugung zur Probenahme erfolgte mittels einer externen Pumpe, die über einen druckfesten Schlauch mit dem Sammler verbunden war. Der Sammelvolumenstrom wurde entsprechend dem verwendeten Düsendurchmesser 25 mm und der Absauggeschwindigkeit entsprechend der Gasgeschwindigkeit am Messpunkt gewählt. Die Probenahmedauer betrug jeweils 10 Minuten.

8.2 Anlage B (Zellenkühlturm, Axialventilator, drückend)

Bei der Anlage B handelte es sich um einen Zellenkühlturm mit drückend betriebenen Ventilatoren.

Abbildung 42: Aerosolprobenahme Anlage B

Lage der Messpunkte (oben links); Profil der Strömungsgeschwindigkeit am Auslass der Kühlturmzelle (oben rechts), Auslassebene (unten links), Ermittlung der Richtungscharakteristik der Strömung (unten rechts)



oben links: Lage der Messpunkte bei rasterförmiger Beprobung eines Teils der Kühlturmzelle.

Oben rechts: Messwerte Strömungsgeschwindigkeit, keine negativen Messwerte (inverse Strömung) bei drückend betriebenen Zellenkühlturm.

Unten: Tropfenabscheider in der Auslassebene sowie begehbare Gitterrost als Arbeitsebene. Unten rechts: Anwendung der Föhnchenmethode zeigt durchweg positive Geschwindigkeiten über die Austrittsfläche an.

Die mehr als zehn rechteckigen Zellen sind jeweils bautechnisch in zwei gleichgroße Einheiten mit einer Grundfläche von ca. 6 x 6 m mit jeweils separater Kühlturmzelle unterteilt. Oberhalb der Verrieselungsebene befinden sich Lamellenabscheider zur Rückhaltung von mitgerissenen Wassertropfen. Die Austrittsseite der Tropfenabscheider in ca. 16 m Höhe stellt die Auslassebene des Kühlturms dar. Die Anlage verfügt über einen umlaufenden Gitterrost in Höhe der Auslassebene, der über eine Gitterrost-Treppe zugänglich ist. Unterhalb der umlaufenden Gitterroste befinden sich ebenfalls Rieselkörperflächen. Die Axialgebläse sind in zwei Leistungsstufen betreibbar. Das Umlaufwasser benachbarter Zellen ist durch Überlaufeinrichtungen verbunden. Die Warmwassertemperatur beträgt ca. 45 °C bei einer Kühlzonenbreite von ca. 20 °C.

Aufgrund der Zugänglichkeit von zwei Seiten wurde eine Halbzelle der ersten Kühlturmzelle als Messobjekt ausgewählt. Eine Ermittlung der Geschwindigkeit erfolgt mittels S-Pitot-Sonde auf 5 Achsen (Abb. 42). Der Bereich war durch die handhabbare Länge der Messlanzen zur Bestimmung des Strömungsdrucks begrenzt.

Die Aerosolprobenahme erfolgte am Ort der mittleren Geschwindigkeit an drei Punkten oberhalb der Rieselkörper, bei jeweils ca. 1,5 bis 2 m Abstand zum Gittersteg.

Folgende Messungen wurden durchgeführt:

Bestimmung der Abluftparameter:

- ▶ Erfassung von dynamischem und statischen Druck mittels Pitot-Sonde auf den vorgesehenen Messpunkten der fünf Achsen im Messquerschnitt zur Bestimmung der mittleren Strömungsgeschwindigkeit, Bestimmung der Richtungscharakteristik der Strömung
- ▶ Berechnung des Strömungsprofils und der mittleren Strömungsgeschwindigkeit, Berechnung des Abluftvolumenstroms
- ▶ Erfassung von Tropfenmitriss mittels Impaktionssonde
- ▶ Erfassung von dynamischem und statischen Druck mittels Pitot-Sonde auf zwei Achsen im Messquerschnitt nach Beendigung der Aerosolmessungen
- ▶ Erfassung der Umgebungsbedingungen (Luftdruck, -temperatur)

Bestimmung biologischer Parameter:

- ▶ Erfassung der Aerosolkonzentration an drei Messpunkten
- ▶ Erfassung der Umgebungs-Aerosolkonzentration im Luv der Anlagen
- ▶ Beprobung des Umlaufwassers

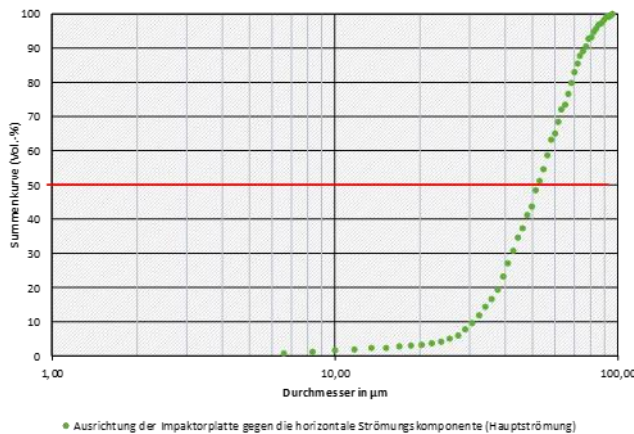
Die lokal ermittelte Gasgeschwindigkeit schwankte zwischen ca. 1 m/s und 2,6 m/s. Die austretende Strömung wies eine nahezu eindeutig vertikale Richtung auf (Abb.42, rechts). Es zeigte sich keine Drallströmung wie bei den Zellenkühltürmen mit saugend positioniertem Gebläse. Eine seitliche Verdriftung ergab sich durch die Möglichkeit des unmittelbaren Windzugriffs in der Auslassebene. Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit wurde zu 2 m/s berechnet. Die Ablufttemperatur betrug ca. 31 °C.

Die Aerosolprobenahme erfolgte mittels Emissionssammler sowohl vertikal axial zur Hauptströmung als auch mittels Immissionsammler, horizontal entgegen einer sichtbaren seitlichen Verdriftung der Schwaden durch den anströmenden Wind. Nach jeder Aerosolprobenahme wurde die Probenahmeeinrichtung gespült. Die Spülflüssigkeit wurde zur Analyse im Labor gesammelt. Sterilisierte Probenahmekelche wurden jeweils unmittelbar vor der Probenahme mit ebenfalls steriler Sammelflüssigkeit befüllt.

Tropfenmessungen wurden an zwei verschiedenen Punkten im Querschnitt durchgeführt. Es wurden jeweils mehrere exemplarische Bildteile summarisch ausgewertet. Der Untersuchung lagen 4110 auswertbare Signale $>10\ \mu\text{m}$ zugrunde. Der massebezogenen mittlere Tropfendurchmesser betrug demnach ca. $70\ \mu\text{m}$ (Abb. 43). Aus der Verteilung wurde als mittlere Tropfenmasse ein Wert zwischen $20\ \text{mg}/\text{m}^3$ und $40\ \text{mg}/\text{m}^3$ bestimmt.

Abbildung 43: Tropfenmessung mittels Impaktionssonde, Anlage B

Bildarstellung der Tropfenverteilung: Original und Umwandlung für automatisierte Bildauswertung (links), Volumenbezogene Verteilung der ausgewerteten Signale zur Bestimmung des mittleren Durchmessers (rechts)



N = 4110

8.3 Anlage C (Verdunstungskühlanlage, Naturzug bzw. optional Axialventilator, saugend)

Bei der Anlage C handelte es sich um einen ca. 35 m hohen Kühlturm eines industriellen Kraftwerks.

Der Kühlturmdurchmesser des unteren, einschließlich Kühlturmtasse ca. 14 m hohen zylindrischen Mantels beträgt etwa 33 m. Daran schließt sich ein auf einen Durchmesser von 17 m konisch zulaufender Abschnitt von ca. 9 m Höhe an, der sich dann über ca. 10 m bis zum Mündungsdurchmesser von 20 m konisch aufweitet. Der Axialrotor befindet auf Höhe des Übergangsbereichs der beiden konischen Abschnitte in ca. 22 m Höhe am Kopf eines zentralen

Wellenschachtes. Die Wasserverteilung erfolgt mittels Verrieselungsrinnen in 13,5 m Höhe. Das Umlaufwasser läuft über die Rieselkörper zurück in die Kühlturmtasse. Der Kühlturm kann je nach erforderlicher Kühlleistung als Naturzugkühlturm betrieben werden oder mit zusätzlichem Rotorbetrieb.

Über eine Treppe mit Gitterrost-Stufen zu einer Tür in der Außenwand des Kühlturms ist die 13,5 m-Ebene von außen zugänglich. Von der Tür verläuft ein Gitterrost-Steg radial bis zum zentralen Wellenschacht. Ausgehend von einem dort ringförmig umlaufenden Steg verlaufen weitere sieben Stege in gleichmäßigen Abständen strahlenförmig jeweils zur Außenwand des Kühlturms. Über diese Stege sind weite Teile der Rieselkörper sowie Verrieselungsrinnen für Wartungszwecke zugänglich. Die Stege besitzen seitlich hüfthohe Geländer. Weitere radial verlaufende Stege sind nicht vorhanden. Der Wellenschacht ist am Boden über einen Tunnel unterhalb der Kühlturmtasse zugänglich. Über eine Steigleiter im Schacht ist der Rotorkopf zugänglich. Ein Zugang zur Kühlturmkrone bzw. dem Bereich oberhalb der Verrieselungsebene per Leiter o. ä. ist nicht gegeben.

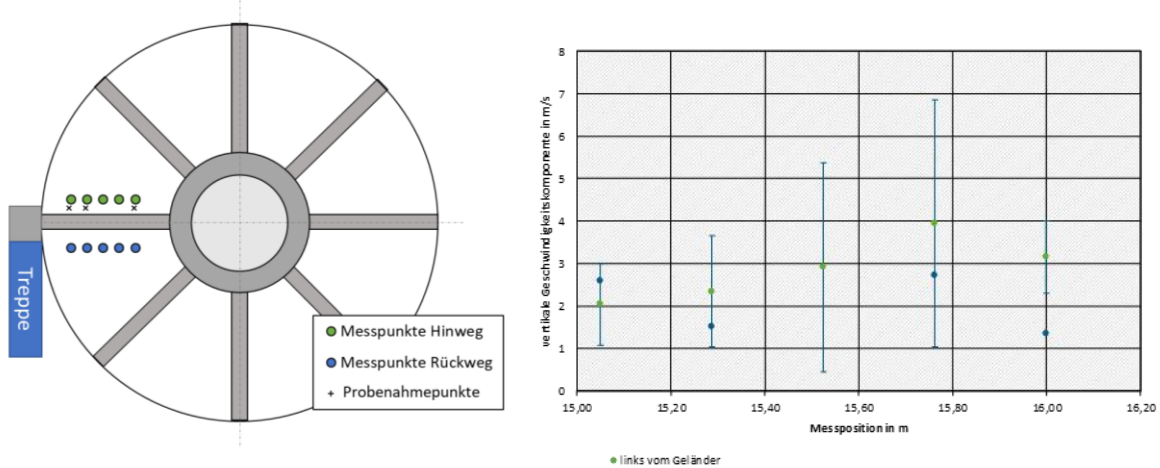
Als Messebene kam damit primär die 13,5-m-Ebene in Betracht. Messgeräte konnten auf den waagerechten Metallstreben der seitlichen Geländer aufgelegt werden bzw. daran geeignete Halter befestigt werden (Abb. 44).

Zum Messzeitpunkt wurde die Anlage mit eingeschaltetem Rotor betrieben. Innerhalb des Kühlturms zeigte sich eine sehr hohe Flüssigwasserbeladung in Form dichter Schwaden, welche die Sichtweite auf maximal ca. 6 bis 8 m einschränkte. Aus Gründen der Arbeitssicherheit wurde auf Sichtweite auf dem radialen Gitterroststeg zwischen Zugangstür zum Wellenschacht gearbeitet und keine komplette Achse einschließlich des Bereichs rückseitig des Wellenschachtes vermessen. Staudruckmessungen wurden zu beiden Seiten des Lichtgittersteges im Abstand von ca. 1,5 m an mehreren Radienlängen erfasst und Geschwindigkeitswerte flächengewichtet gemittelt. Wellenschachtnah ließen sich keine Messungen durchführen. Die anhand Staudruckmessungen ermittelte Strömungsgeschwindigkeit betrug im Mittel ca. 2,4 m/s bei Maximalwerten von bis zu 3,3 m. Die Aerosolprobenahme oberhalb der Rieselkörper erfolgte am Ort der mittleren Geschwindigkeit. Der Sammelvolumenstrom wurde entsprechend den gewählten Düsendurchmesser 27 mm und der Abgasgeschwindigkeit für eine isokinetische Absauggeschwindigkeit gewählt.

Zusätzlich bestand die Möglichkeit, mittels einer Hubvorrichtung eine Probenahme direkt oberhalb der Kühlturmkrone im Schwaden vorzunehmen, ca. 2 m einwärts von der Kühlturmwandung. Es ist zu beachten, dass aufgrund der Querschnittsverjüngung bis zum Auslass die Austrittsgeschwindigkeit dort entsprechend höher ist. Rechnerisch strömt das Gas im Mittel mit 6,5 m/s aus dem Kühlturm aus. An der Kühlturmkrone konnten keine Geschwindigkeitsmessungen durchgeführt werden. Die Probenahmedauer je Messpunkt betrug 10 Minuten.

Abbildung 44: Strömungsprofil und Probenahme, Anlage C, Messebene oberhalb der Verrieselungsrinnen

Probenahmepunkte (oben links); Profil der Strömungsgeschwindigkeit oberhalb der Verrieselungsrinnen (oben rechts), Messungen zur Ermittlung der Gasgeschwindigkeit (unten links) sowie Aerosol-Probenahme (unten rechts)



8.4 Anlage D (Zellenkühlturm, Axialventilator, saugend)

Bei der Anlage D handelte es sich um einen weiteren Zellenkühlturm mit zwei bautechnisch gleichen Zellen, gekoppelt in einem gemeinsamen Stahlbetonkörper.

Der Kühlwasserzulauf erfolgt über eine gemeinsame Zuleitung und separaten Zuführungsleitungen zur Wasserverteilung der beiden Zellen. Das von den Einbauten abtropfende Wasser sammelt sich in einer gemeinsamen Kühlturmtasse und wird mittels Kaltwasserpumpen in den Prozess zurückgeführt. Die Wasserverteilung erfolgt per Drall-Vollkegeldüsen über die Kühlturmeinbauten. Die Förderung der Luftmenge erfolgt je Zelle per Axialventilator mit ca. 7 m Ventilator Durchmesser, welcher oberhalb der Einbauten in einem ca. zwei Meter hohem Diffusorgehäuse verbaut ist. Der Rotor befindet sich ca. 1 m unterhalb der Kühlturmmündung. Der Luftzutritt erfolgt direkt oberhalb der Kühlturmtasse, Ansaugöffnungen sind durch Lamellenvorhänge gegen Windabgriff und Flüssigkeitsaustritt geschützt. Die Bauhöhe der Anlage beträgt einschl. Diffusoren ca. 15 m. Der Nenndurchsatz der Anlage beträgt

3.600 l Wasser/h. Die Warmwassertemperatur beträgt ca. 40 °C bei einer Kühlzonenbreite von ca. 15 °C.

Über eine Steigleiter war die Oberseite des Bauwerks zu erreichen und komplett als Arbeitsebene nutzbar. Die beiden Diffusorauslässe waren von allen Seiten gut zugänglich. Messsonden bzw. deren Galgen konnten auf der waagrecht ebenen, ca. 15 cm breiten Oberseite des Diffusorgehäuses aufgelegt werden. Die Anlage wurde zum Zeitpunkt der Geschwindigkeitsmessung mit reduzierter Wasserumlaufmenge unter Ventilatoreinsatz betrieben.

Folgende Messungen wurden durchgeführt:

Bestimmung der Abluftparameter:

- ▶ Erfassung von dynamischem und statischem Druck mittels S-Pitot-Sonde sowie Prandtl-Rohr auf den vier Achsen im Messquerschnitt zur Bestimmung der mittleren Strömungsgeschwindigkeit, Bestimmung der Richtungscharakteristik der Strömung
- ▶ Berechnung des Strömungsprofils und der mittleren Strömungsgeschwindigkeit, Berechnung des Abluftvolumenstroms
- ▶ Erfassung von Tropfenmitriss mittels Impaktionssonde
- ▶ Erfassung von dynamischem und statischen Druck mittels S-Pitot-Sonde auf zwei Achsen im Messquerschnitt nach Beendigung der Aerosolmessungen
- ▶ Erfassung der Umgebungsbedingungen (Luftdruck, -temperatur)

Bestimmung biologischer Parameter:

- ▶ Erfassung der Aerosolkonzentration am Ort der mittleren Strömungsgeschwindigkeit
- ▶ Erfassung der Umgebungs-Aerosolkonzentration im Luv der Anlagen
- ▶ Beprobung des Umlaufwassers

Eine eingehende Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit fand am ersten Messtag statt. Durch Auswertung der durchgeführten Messung des statischen und dynamischen Drucks über die 8 Halbachsen der Diffusormündung mittels S-Pitot-Sonde konnte das Strömungsprofil der Halbachsen bestimmt werden (Abb. 45, unten rechts). Demnach zeigte sich für eine Ringsströmung zwischen dem maximalen Radius bis zu einem Radius von ca. 2,8 m eine aufwärts gerichtete Strömung. Der mittlere flächenbezogene Wert der Strömungsgeschwindigkeit betrug ca. 3,7 m/s, das Maximum lag bei ca. 4,5 m/s. Ausgehend von der Rotorachse bis zu Radius von ca. 0,7 m konnte eine inverse Strömung aus der Umgebung in den Kühlturm hinein festgestellt werden. Die verschiedenen Messsysteme zeigten übereinstimmende Ergebnisse. Mittels einer aus einer Reihe schmaler Streifen bestehender Fahne, die auf mehreren Achsen vom Rand radial zum Achsmittelpunkt geschoben wurde, konnte die Raumrichtung der Strömung qualitativ ermittelt werden.

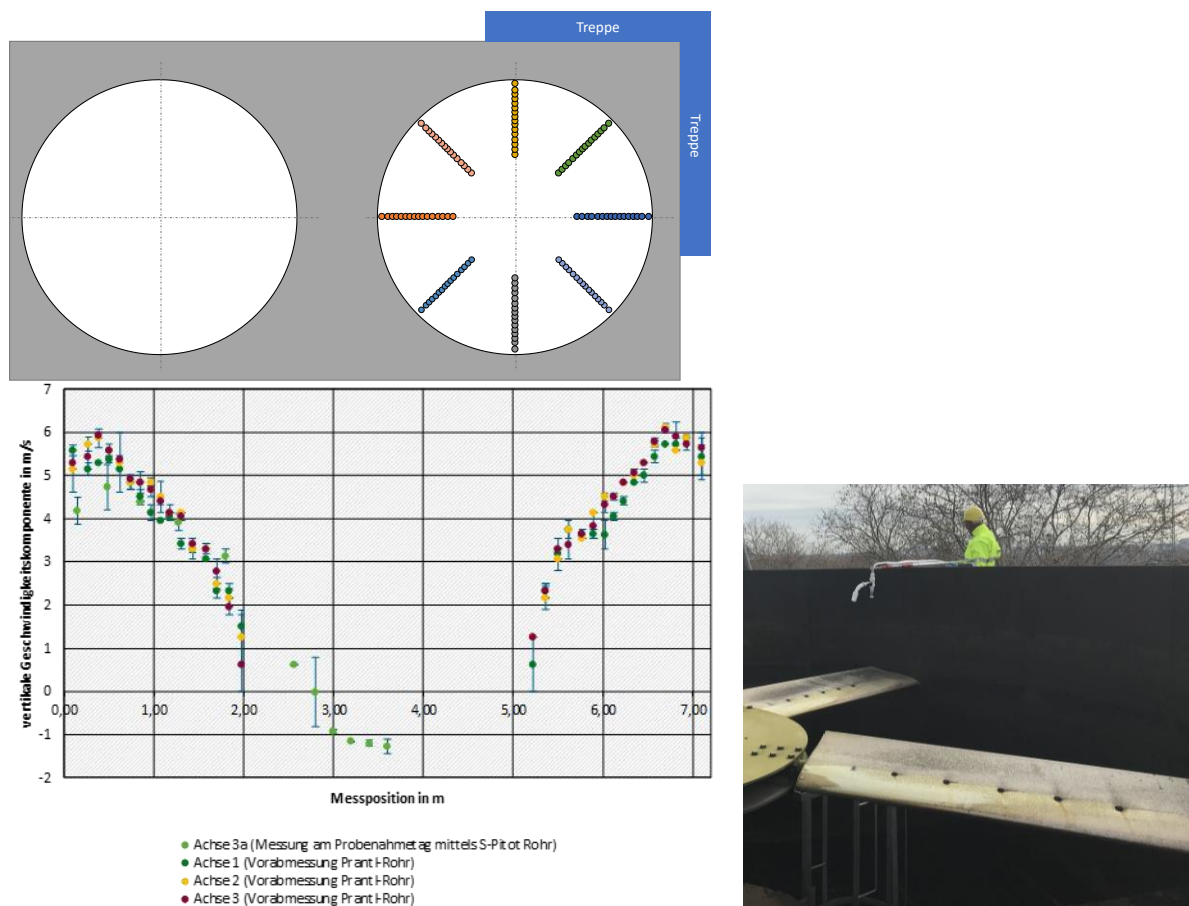
Messungen zur Bestimmung der Tropfengröße wurden mittels Impaktionssonde vorgenommen. Die Probenahmedauer betrug zwischen zwei Sekunden und 20 Sekunden. Wurde die mit MgO bedampfte Platte horizontal ausgerichtet, zeigten sich unter dem Mikroskop weniger runde Krater von aus vertikaler Richtung aufgetroffener Tropfen, sondern häufig Streifen, welche durch in flachem Winkel auftreffende Tropfen verursacht wurden. Daher wurde in

anschließenden Messreihen die Sonde um ca. 15 Grad gekippt exponiert. Bei diesen Proben zeigten sich nahezu ausschließlich runde Krater auf der Platte, deren Durchmesser entsprechend ausgewertet werden konnten. Die Auswertung lieferte einen mittleren volumetrischen Tropfendurchmesser von ca. 50 µm (Abb. 46). Die aus der Verteilung bestimmte mittlere Tropfenmasse war mit ca. 6 mg/m³ deutlich niedriger als die an der Anlage B bestimmte Tropfenmenge. Dies deckt sich mit der visuellen Wahrnehmung der geringeren Konzentration an Schwaden bzw. Tropfen in der Abluft der Anlage.

Am zweiten Messtag wurde vor der eigentlichen Bioaerosol-Probenahme erneut eine Ermittlung der Strömungsgeschwindigkeit vorgenommen. Dabei konnten die am ersten Messtag ermittelten Geschwindigkeitsangaben bestätigt werden. Die Aerosolprobenahme erfolgt vertikal mittels Emissionssammler. Die Absaugung zur Probenahme erfolgte mittels einer externen Pumpe, die über einen druckfesten Schlauch mit dem Sammler verbunden war. Der Sammelvolumenstrom wurde entsprechend den gewählten Düsendurchmesser 40 mm und der Abgasgeschwindigkeit für eine isokinetische Absauggeschwindigkeit gewählt. Die Probenahmedauer je Messpunkt betrug 10 Minuten.

Abbildung 45: Aerosolprobenahme, Anlage D

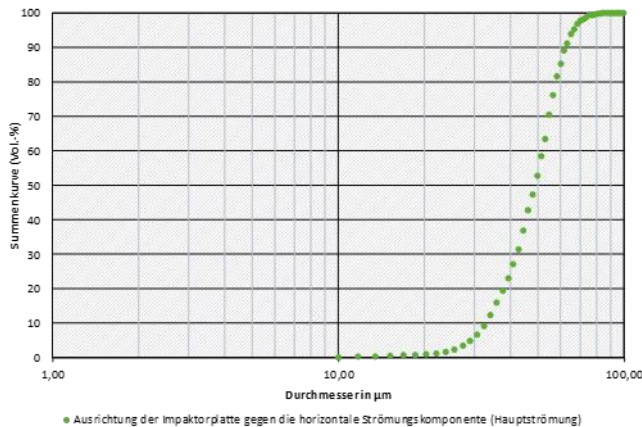
Lage der Messpunkte für die Geschwindigkeitsmessung (oben); Rotor des Axialsaugzuggebläses (unten links), Geschwindigkeitsprofil, am Auslass gemessen (unten rechts), um 15 ° gegen die Hauptströmungsrichtung gekippt



Grafik unten links, Angabe der Messposition in mm als Abstand ausgehend von der Kühlturmwand in Richtung der gegenüberliegenden Wand für einen Messquerschnitt. Im Radius von bis zu ca. 1,5 m um die Zentralachse der Austrittsfläche inverse Strömung, auf der äußeren Kreisfläche mit einem Durchmesser von ca. 2 m auswärts gerichtete Strömung.

Abbildung 46: Tropfenmessung mittels Impaktionssonde, Anlage D

Volumenbezogene Summenkurve des Tropfenaerosols zur Bestimmung des mittleren Durchmessers



N = 2196

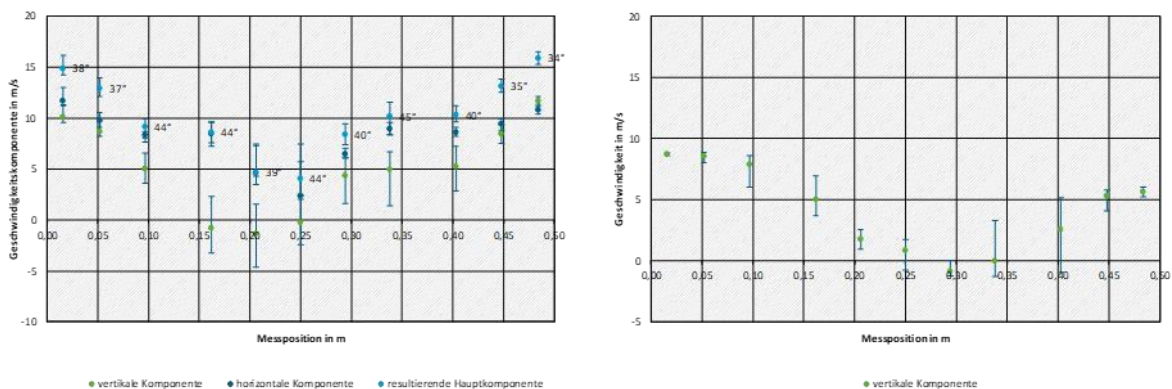
8.5 Anlage E – Kleinkühlturm (Axialrotor, saugend)

Messergebnisse der auf den Messebenen 0 und 1 des Abgasrohres durchgeführten Gasgeschwindigkeitsmessungen sind in nachfolgender Abbildung 47 dargestellt.

Wiederholungsmessungen auf verschiedenen Achsen desselben Querschnitts liefern jeweilig vergleichbare Werte. Die strömungsrichtungsabhängige Messung der Gasgeschwindigkeit sowie die Messungen nach der Föhnchenmethode zeigen auf, dass die Strömung eine ausgeprägte tangentielle horizontale Geschwindigkeitskomponente aufweist, die in der Größenordnung der mittleren vertikalen Strömungsgeschwindigkeit liegt. Diese horizontale Strömung ist in Drehrichtung des Ventilators ausgebildet (Abb. 48). Der Drall baut sich bis zum Auslass des aufgesetzten Strömungsrohres in Ebene 1 nicht ab.

Abbildung 47: Grafische Darstellung der Strömungsgeschwindigkeit für die Messebenen 0 und 1 des Kleinkühlturms

Links: Ebene 0, Gebläsestufe 2, rechts Ebene 1, Gebläsestufe 2



X-Achse: Position ab Kanalwandung (mm), Y-Achse: gemessene Geschwindigkeit in m/s. Messungen mittels S-Pitot-Sonde. Die resultierende Geschwindigkeit wird durch vektorielle Addition der vertikalen Hauptströmung und horizontalen Tangentialgeschwindigkeit berechnet.

Abbildung 48: Darstellung der Rotationsströmung am Auslass des Kleinkühlturms

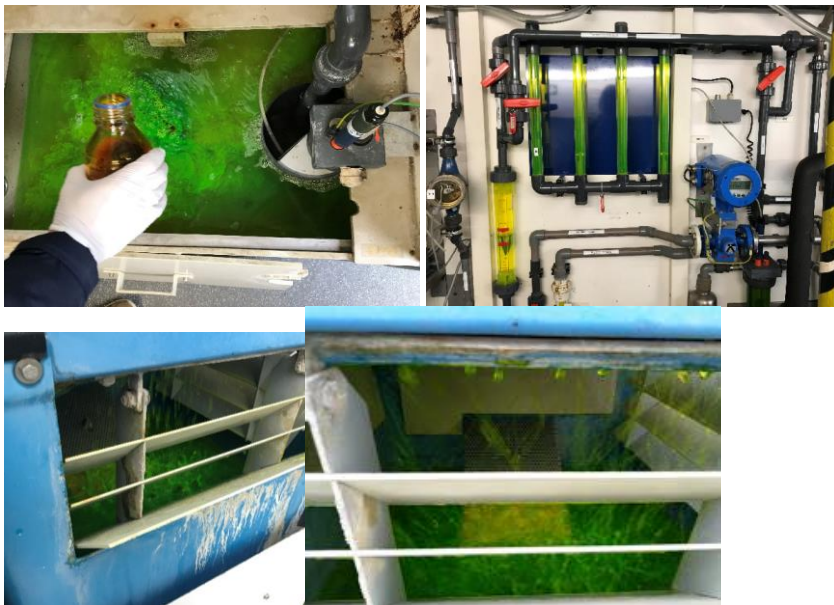
Visualisierung mittels Fähnchenmethode



Fluorescein wurde als geeigneter Tracer angesehen, um die Effizienz der Aerosolfreisetzung aus dem Umlaufwasser zu quantifizieren. Aus diesem Grund wurde das Umlaufwasser der Anlage (Gesamtvolumen von ca. 140 L) mit 7 g wasserlöslichem Natriumfluorescein (Konzentration 0,05 g/L) versetzt. Die Messung von Fluorescein erfolgte bei pH 9 (erzielt durch Zugabe von Phosphatpuffer, Endkonzentration 10 mM), da die Absorption und Emission von Fluorescein bei diesem pH ihr Maximum besitzt.

Die mit Fluorescein versetzte Modellkühlanlage (Abbildung 49) wurde am 23.10.2018 beprobt. Neben Rieselwasser und Wasser vom Vorratsbehälter wurden emissionsseitig Aerosolproben in der Messebene 1 genommen (Abbildung 50). Die Probenahme erfolgte vergleichend sowohl mit der Emissionsausführung (Zyklon mit Krümmer) als auch der in den Kanal eingebrachten Immissionsausführung (Schlitzansaugung) des Zyklons.

Abbildung 49: Umlaufwasser und Rieselwasser der mobilen Kühlanlage nach Zugabe von Fluorescein in einer Konzentration von 0,05 g/L



Oben links: Vorratsbecken des Wasserumlaufs. Oben rechts: Volumenstrommessstrecken. Unten links: Kühlturmaste. Unten rechts: Rücklauf von den Rieselkörpern in die Kühlturmaste. Sichtbar ist die Einschnürung des Wasserablaufs durch den Eintritt der angesaugten Umgebungsluft

Abbildung 50: Aerosolprobenahme am Kleinkühlturm

Von links nach rechts: Probenahme mit Zyklonsammler in der Emissionsausführung, Messebene 0. Blick in das Abgasrohr über den Sammelkopf auf den Absaugventilator. Probenahme mit dem Zyklonsammler in der Immissionsausführung, Messebene 1; Probenahme Umgebungsluft (Referenzprobe)



Zusätzlich erfolgte eine Aerosolprobenahme der Umgebungsluft in einem Abstand von ca. 5 m von der Kühlanlage entgegen der Windrichtung (Referenzprobe, Abbildung 50 rechts). Die Fluorescein-Konzentration in den Proben wurden nach Alkalisierung mittels UV/VIS-Spektrometer als Absorptionswert anhand einer Kalibrierkurve bestimmt (Tabelle 15). Trotz dieser deutlichen Anfärbung des Umlaufwassers konnte in den Emissionsproben keine gegenüber der Referenzprobe erhöhte Fluorescein-Konzentration nachgewiesen werden. Es wurde geschlussfolgert, dass nicht genügend Fluorescein in die Abluft gelangt, um in einen messbaren Bereich zu kommen. Zudem wurde festgestellt, dass die Anwesenheit von Fluorescein stark mit den durchflusszytometrischen Messungen der Mikrobiologie interferiert durch die Erzeugung von dominanten Hintergrundsignalen. Es wurde aus diesen Gründen entschieden, den Einsatz von Fluorescein nicht weiter zu verfolgen.

Die nächsten Beprobungen fokussierten sich daher auf die Messung von Bakterien mittels Durchflusszytometrie, nach Austausch des Umlaufwassers und intensivem Spülen der Anlage.

Tabelle 15: Absorptionswerte für Aerosol- sowie Umlaufwasserproben als Maß der Fluorescein-Konzentration

Probe	Absorption bei 485 nm
Aerosol-Referenzprobe – Umgebungsluft gegen Windrichtung	0,030
Aerosol: Coriolis ohne Ansaugstutzen (Immissionsausführung)	0,067
Aerosol: Coriolis mit Ansaugstutzen (Emissionsausführung)	0,005
Umlaufwasser: Wasser-Vorratsbehälter	14,75
Umlaufwasser: Rieselwasser	14,55

Absorptionswerte verschiedener am Anlagenauslass gesammelter Aerosolproben sowie des Umlaufwassers bei 485 nm nach Alkalisierung der Proben auf pH 9 zur Verstärkung der Absorption.

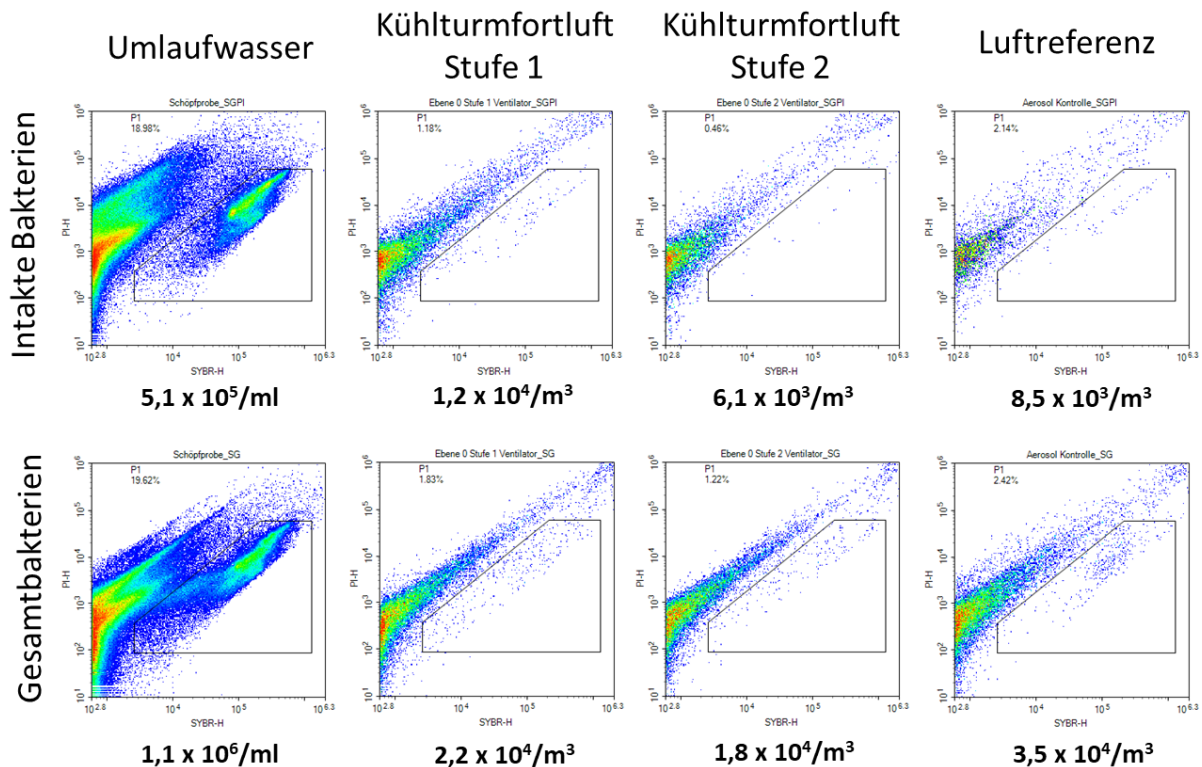
Nach Ausschleppen des Fluoresceins aus dem Umlaufwasser durch wiederholten Wasseraustausch und Spülen der Anlage konnte eine durchflusszytometrische Bestimmung des Bakteriengehaltes im Wasser- und Aerosolproben vorgenommen werden. Beprobt wurde das Umlaufwasser, Rieselwasser, die NaCl-Lösung, welche für Coriolis Aerosolproben als Sammelflüssigkeit vorgelegt wird sowie die Abluft (Aerosolsammler in der Emissions- und Immissionsausführung) sowie eine Referenzprobenahme der Umgebungsluft. Bakterien wurden im Umlauf- und Rieselwasser (letzteres nicht gezeigt, da identisch mit Umlaufwasser) sowie in der Luftreferenzprobe, jedoch nur in sehr geringer Konzentration in der auf den Ebenen 0 und 1 erfassten Kühlturmabluft nachgewiesen. Abhängig von den Windbedingungen am Probetag wiesen die Abluftproben dabei zum Teil weniger Bakterien auf als die Umgebungsluft und waren nur knapp über einer Negativkontrolle (nur Sammelflüssigkeit). Der mikrobiologische Austrag in der Abluft war damit eine ungenügende Arbeitsgrundlage für weitere Messungen. Um den Aerosolaustrag aus der Anlage möglichst ungehindert zu ermöglichen, wurde daher der anlagenseitig vorhandene Tropfenabscheider vor dem Gebläse ausgebaut und in das Fortluftrohr knapp unterhalb der Auslassöffnung versetzt.

Messungen der Strömungsgeschwindigkeit in Ebene 0 oberhalb des Rotors zeigten keine wesentliche Veränderung des Strömungsbildes. Nach dem Umbau des Tropfenabscheiders fand eine Bestimmung des Tropfengehaltes im Abluftstrom mittels Impaktorplatten statt. Dabei wurden die Impaktorplatten in verschiedene Richtungen (vertikal (0°), horizontal (90°) und 60° gedreht) in der Strömung ausgerichtet. Die Platten zeigten bis auf eine Ausnahme keine auswertbare Tropfenimpaktion. Es erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Sammlung von Aerosolproben mit dem Nass-Zyklonsammler. In den Aerosolproben konnten wieder nur sehr geringe Konzentrationen an Mikroorganismen nachgewiesen werden (Abbildung 51). Die Bakterienkonzentrationen in der Fortluft der Anlage waren vergleichbar oder geringer als die Bakterienkonzentration in einer unbeeinflussten Luftreferenzprobe, die in ca. 10 m Entfernung von der Anlage in Gegenwindrichtungen genommen wurde. Dieser Befund war unabhängig von der gewählten Gebläsestufe, die mikrobiologische Fracht war bei Gebläsestufe tendenziell geringer als bei Stufe 1. Dabei war die Konzentration von Bakterien im Umlaufwasser mit einer Gesamtzellzahl von ca. $1,1 \times 10^6$ Bakterien pro ml nicht limitierend, diese konnte nicht als Ursache für den fehlenden Austrag an Mikroorganismen angesehen werden.

Die geringe nachgewiesene Tropfenfracht und niedrigen Konzentrationen an Mikroorganismen im emittierten Bioaerosol deuten auf eine stark reduzierte Tropfenfracht hin, welche die Anlage verlässt. Ursächlich scheint nicht allein die Effektivität des Tropfenabscheiders zu sein, welcher für die zweite Phase der Untersuchungen hinter die Aerosol-Probenahmestelle versetzt wurde. Als weitere mögliche Ursachen kommen eine möglicherweise geringe freigesetzte Tropfenmasse bei der Wasserverdüsung sowie eine Tropfenimpaktion am Rotor grundsätzlich in Betracht, welcher weite Teile der Austrittsfläche abdeckt. Zusätzlich ist die Tropfenimpaktion unterhalb der Auslassebene durch die Rotationsbewegung nicht auszuschließen. Auf umfangreiche Parameterstudien wurde daher im Rahmen dieses Vorhabens verzichtet.

Abbildung 51: Ergebnisse der Bestimmung der Mikroorganismenkonzentration im Umlaufwasser und in Aerosolproben des Modellkühlturms mittels Durchflusszytometrie

Situation nach Versetzen des Tropfenabscheiders



Durchflusszytometrische Dichtediagramme von Umlaufwasser sowie von Luftproben des Modellkühlturms (Anlage E) bei zwei Ventilatorgeschwindigkeiten (Gebläsestufen 1 und 2) im Vergleich mit einer unbeeinflussten Luftreferenzprobe. Gezeigt sind repräsentative Profile, wobei jeder Punkt ein Signal darstellt.

Es wurden jeweils 50 µl Probe analysiert vom Umlaufwasser bzw. von Aerosolsammelflüssigkeit (insgesamt 15 ml). Die Proben wurden gefärbt mit SYBR Green I zur Visualisierung der Gesamtbakterien im umrandeten Feld bzw. mit einem Gemisch aus SYBR Green I und Propidium Iodid zur Visualisierung von Bakterien mit intakten Zellmembranen (ebenfalls im umrandeten Feld). Die daraus errechneten Bakterienkonzentrationen pro ml Umlaufwasser bzw. pro m³ Aerosol sind unter den entsprechenden Dichtediagrammen angegeben. Die Luftreferenzprobe wurde entgegen der Windrichtung in ca. 10 m Entfernung vom Kühlturm genommen. Die Probenahme erfolgte am 26.11.2018, vergleichbare Ergebnisse wurden bei einer Wiederholung am 14.12.2018 erhalten.

9 Mikrobiologische Erkenntnisse aus den Messungen an den Realobjekten A - D

Wasser-, Aerosol- und Biofilmproben der beschriebenen realen Verdunstungskühlanlagen (8.2) wurden mit verschiedenen analytischen Methoden untersucht: Durchflusssytometrie, Kultivierung und qPCR.

Die Ergebnisse und die daraus abgeleiteten Erkenntnisse sind im Folgenden beschrieben.

9.1 Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser

Kühlwasser (Schöpfproben und Rieselwasser) der Anlagen A, B, C und D wurden sowohl mittels Kultivierung (DIN EN ISO 11731) als auch mittels qPCR (iQ-Check® Real-Time PCR Kits (Bio-Rad) für *L. pneumophila* und *Legionella* spp.) untersucht (Abb. 52). Im Unterschied zu den Aerosolproben wurden die Kühlwasserproben vor der qPCR Analyse nicht mit PMA behandelt.

Die Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser der vier Anlagen wiesen substantielle Unterschiede auf. Die höchste Konzentration lag in der Anlage A vor, die geringste in der Anlage D. Die Legionellenkonzentrationen der Anlagen C und D waren vergleichbar.

Auffällig beim Vergleich der beiden diagnostischen Methoden ist, dass die mit qPCR ermittelten Konzentrationen der verschiedenen Wasserproben der jeweils gleichen Anlage vergleichbar sind, während die mit dem Kulturverfahren ermittelten Konzentrationen mit Ausnahme der beiden Proben von Anlage B größere Abweichungen zeigten. Gründe und mögliche Erklärungen werden im Folgenden erläutert:

Anlage A: die ersten drei von insgesamt fünf Wasserproben waren kulturell positiv, die letzten zwei jedoch kulturell negativ (mit < 1.000 KBE/100 ml und stark erhöhter Meßunsicherheit infolge der Begleitflora und des kleinen auswertbaren Untersuchungsvolumens). Eine zwischenzeitliche Dosierung von Biozid ins Kühlwasser kann nicht ausgeschlossen werden.

Anlage B: Beide untersuchte Wasserproben waren kulturell positiv.

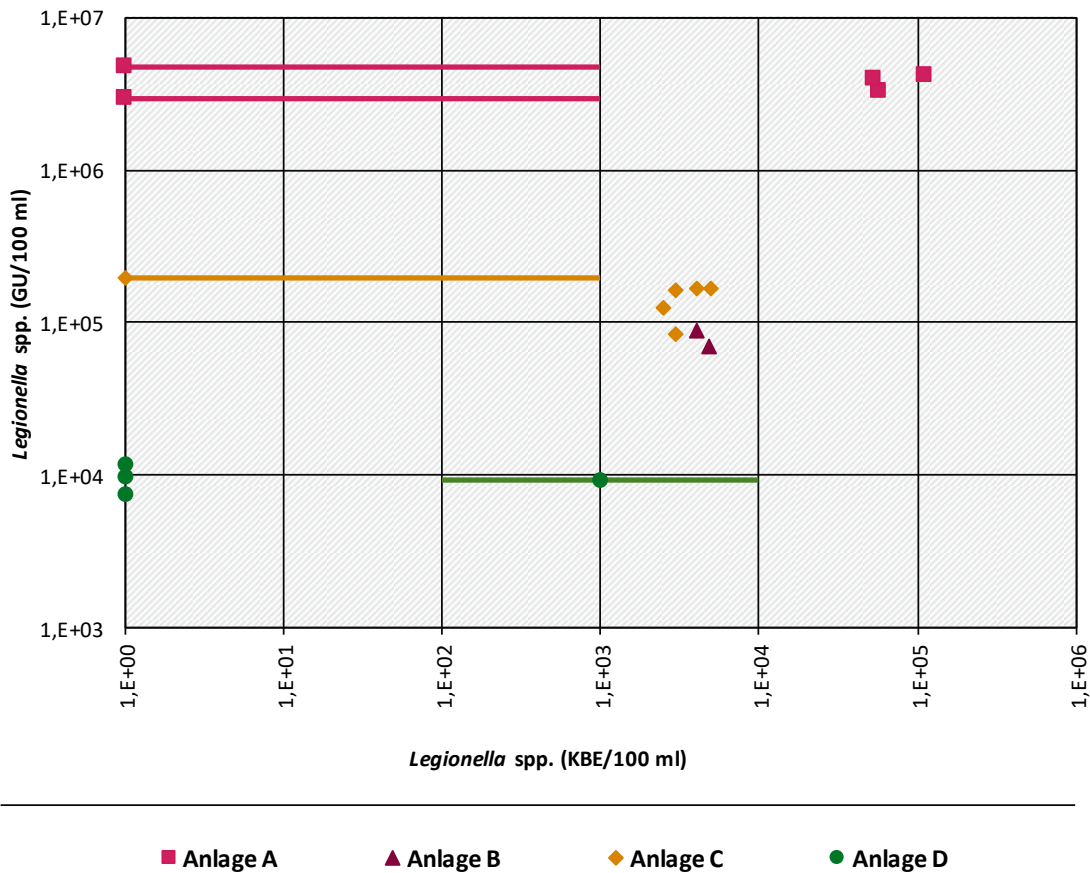
Anlage C: Während 5 von insgesamt 6 Proben kulturell positiv waren, konnten in einer Probe keine Legionellen in keinem der auswertbaren Ansätze nachgewiesen werden. Bei dieser Probe musste wegen starker Begleitflora auf Ansätze mit kleinen Volumina zurückgegriffen werden, die keine Legionellenkolonien aufwiesen. Als Gesamtergebnis konnte damit nur < 1.000 KBE/100 ml mit stark erhöhter Meßunsicherheit infolge der Begleitflora und des kleinen auswertbaren Untersuchungsvolumens angegeben werden.

Anlage D: Während drei Proben kulturell negativ waren mit Legionellenkonzentrationen < 5 KBE/100 ml (keine Legionellenkolonie in den 20 ml Ansätzen), wies eine Probe in einem 0,1 ml Ansatz eine Legionellenkolonie auf (die 20 ml Ansätze waren hier nicht auswertbar infolge von Schimmelpilzen). Rein rechnerisch würde dies eine Legionellenkonzentration von 1.000 KBE/100 ml ergeben. Dieses Ergebnis ist aber mit einer hohen statistischen Unsicherheit behaftet. Eine exakte Ergebnisangabe ist daher nicht möglich sondern nur die Angabe, dass das Ergebnis im Bereich von 10^3 KBE/100 ml liegt (UBA Empfehlung). Für die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse im Projekt wurden trotzdem die hochgerechneten Konzentrationen verwendet.

Abbildung 52: Legionellenkonzentrationen mittels kultureller Bestimmung und qPCR

Vergleich der Legionellenkonzentrationen mittels kultureller Bestimmung und qPCR

Konzentrationen von *Legionella* spp. an vier untersuchten Anlagen in KBE bzw. GU pro 100 ml



KBE = Koloniebildende Einheiten, GU = Genomeinheiten.

Fehlerbalken bei einzelnen Werten von Anlagen A und C bei den kulturellen Werten zeigen Bereiche, in denen die Legionellenkonzentrationen der jeweiligen Proben liegen können und sind bedingt durch die untersuchten Volumina auswertbarer Ansätze. Der Fehlerbalken bei den kulturellen Werten von Anlage D ist bedingt durch die hohe statistische Unsicherheit einer einzelnen Legionellenkolonie in dem kleinen Untersuchungsvolumen von 0,1 ml. Nach UBA Empfehlung wird das Ergebnis hier im Bereich von 10³ KBE/100 ml angegeben. Die Proben für qPCR-Analyse wurden nicht mit PMA behandelt.

Die Resultate der qPCR Analyse wiesen im Vergleich eine bessere Reproduzierbarkeit auf. Dies liegt daran, dass die qPCR Analyse auf größeren Wasservolumina (typischerweise 50 – 100 ml) basiert und der Einfluss der Begleitflora infolge der Spezifität der PCR-Amplifikation zu vernachlässigen ist.

Die Herausforderungen der qPCR Analytik liegen im Erkennen potentiell vorliegender, PCR-Inhibitoren. Aussage über das Vorliegen solcher inhibitorischer Stoffe können Verdünnungsserien im Vorfeld der eigentlichen Analyse geben. Falls Verdünnungen der genomischen DNS, die als Template für die PCR eingesetzt wird, zu höheren Konzentrationen führt, deutet dies auf inhibitorische Substanzen hin. In diesen Fällen muss die optimale Verdünnungsstufe identifiziert werden. Alternativ sind in kommerziellen qPCR Kits oft sogenannte ‚Internal Amplifikation Controls‘ (IAC) enthalten, die ebenfalls Inhibition anzeigen können.

Eine weitere Herausforderung für den Nachweis von *Legionella* spp. mit qPCR besteht in der Limitierung der Signalerfassung auf lebende Bakterien. Probenbehandlung mit einem Lebendfarbstoff ist eine der Möglichkeiten, die Signale auf membranintakte und damit potentiell lebende Legionellen zu limitieren. Dies wurde in diesem Projekt nur mit den Aerosolproben durchgeführt, da die Behandlung von filtrierten Kühlwasserproben eine andere Herangehensweise erfordert. Das Problem für die PCR-basierte Quantifizierung von *Legionella* spp. besteht darin, dass die meisten kommerziellen Kits (inklusive des hier verwendeten iQ-Check® Kits) auf der Vermehrung von sehr kurzen Gensequenzen basieren, was keine effiziente Unterdrückung der Signale toter Bakterien ermöglicht. Eine Anpassung der Länge der amplifizierten Gensequenz sowie der Inkubationsbedingungen erfolgte bereits im Rahmen dieses Projektes für *L. pneumophila* (Kontchou und Nocker 2018) mit einer deutlichen Verbesserung der Totsignalunterdrückung im Vergleich zu iQ-Check®. Da die größere Amplikonlänge auf der anderen Seite die Sensitivität des Nachweises leicht verschlechtert, wird dadurch die Wahrscheinlichkeit eines positiven Legionellennachweises im Aerosol trotz der verbesserten Lebend-Tot-Unterscheidung weiter gemindert. Für Kühlwasser mit seinen in der Regel hohen Legionellenkonzentrationen auf der anderen Seite stellt dies keine Limitierung dar. Eine Optimierung der Effizienz der Lebend-Tot-Unterscheidung fehlt momentan noch für die Detektion von *Legionella* spp. Erst durch Limitierung der Detektion auf lebende Legionellen können auch beim Einsatz von Bioziden belastbare Ergebnisse erhalten werden.

9.2 Bakterienkonzentrationen in Kühlwasser

Die Gesamt- und Intaktbakterienkonzentrationen der Kühlwasserproben der vier beprobten Anlagen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht (Tab. 16).

Tabelle 16: Mikrobiologische Parameter für Kühlwasser

	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
Gesamtzellzahl pro ml	2,4 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶
Intaktzellzahl pro ml	1,7 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶
% intakte Zellen	71	87	66	88
<i>Legionella</i> spp. (KBE/100 ml)	74000*	4.400	3491**	250

Die Gesamt- und Intaktzellzahl wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt, die Legionellenkonzentrationen mit dem Kultivierungsverfahren.

Die Gesamt- und Intaktzellzahlen der Kühlwässer der Anlagen B, C und D waren vergleichbar während die Anzahl an Bakterien in Wasser der Anlage A um ca. 1 Log-Einheit höher war (Tab. 16). In der Anlage A wurden auch die höchsten Legionellenkonzentrationen nachgewiesen (Tab. 16). Dies muss jedoch nicht zwangsläufig ursächlich in Bezug stehen, da in anderen Anlagen mit geringer Gesamtzahl an Mikroorganismen hohe Legionellenkonzentrationen nachgewiesen wurden. D.h. es gibt keinen Zusammenhang zwischen der Gesamtzellzahl und der Legionellenkonzentration.

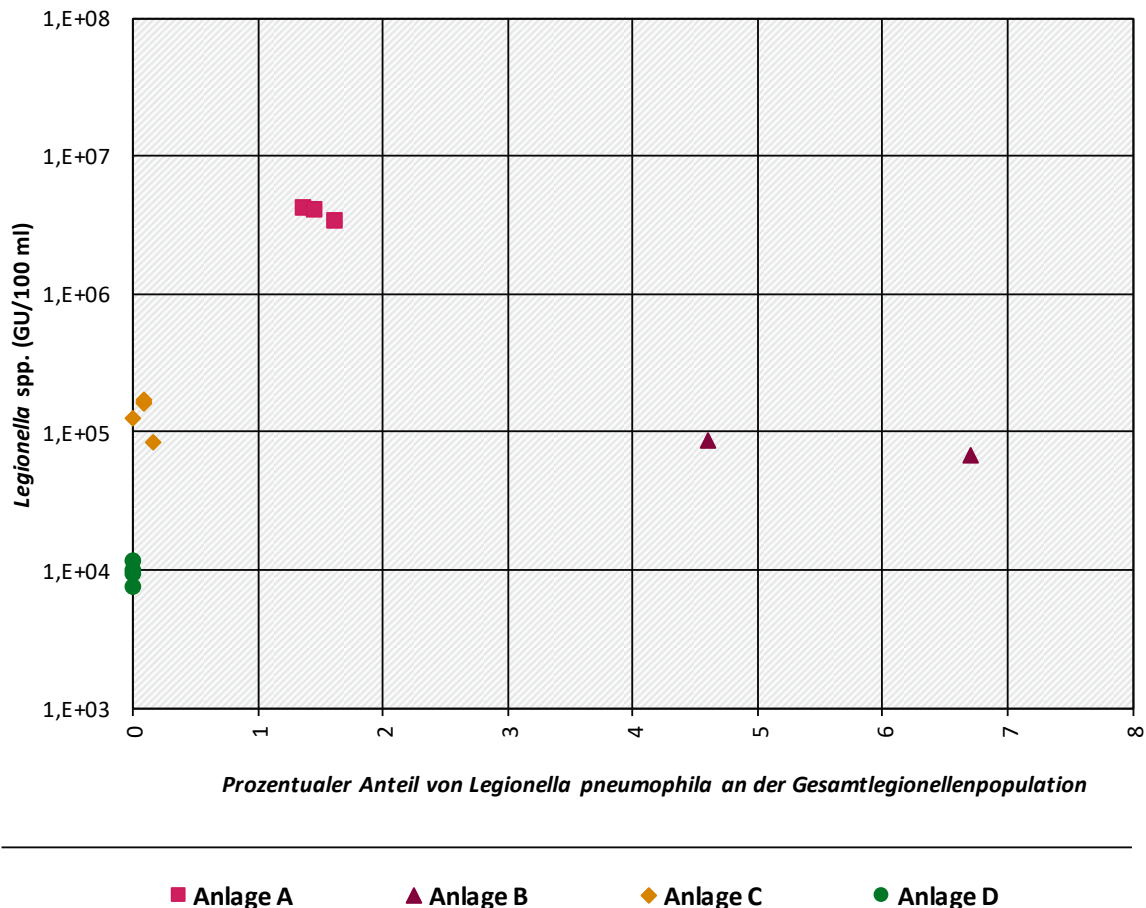
Der Anteil an intakten Bakterien in den verschiedenen Kühlwässern schwankte zwischen 66 % und 88 %.

9.3 Relativer Anteil von *L. pneumophila* an der Gesamtlegionellenpopulation

Nach bisherigen Erkenntnissen wird der überwiegende Anteil der Krankheitsfälle von *L. pneumophila* verursacht (Doleans et al. 2004). Aus diesem Grund ist der Anteil dieser Spezies von besonderem hygienischem Interesse (Yzerman et al. 2010). Zurzeit werden nach der DIN EN ISO 11731 alle im Wasser befindlichen Legionellen erfasst. Nach der 42. BImSchV wird eine Differenzierung der Legionellen nur bei Überschreitung der Maßnahmewerte gefordert. Die Unterscheidung zwischen *L. pneumophila* und anderen Vertretern der Gruppe *Legionella* spp. ist prinzipiell via Serotypisierung möglich. Die Bestimmung mittels Agglutinationstest-Streifen liefert die Information, ob *L. pneumophila* Serogruppe 1, *L. pneumophila* 2-14 oder andere *Legionella* spp. in der Probe vorliegen. Die Serotypisierung erlaubt jedoch keine Quantifizierung der jeweiligen Anteile an der Gesamtlegionellenpopulation, da dafür entweder nicht genügend Kolonien in der jeweiligen Probe verfügbar sind bzw. weil das Testen einer ausreichenden Anzahl von Kolonien sehr teuer wäre.

Abbildung 53: Relativer Anteil von *L. pneumophila* in Kühlwasser

Konzentrationen von *Legionella* spp. an vier untersuchten Anlagen und relativer Anteil von *L. pneumophila* an der Gesamtlegionellenpopulation.



GU = Genomeinheiten.

Quelle: IWW. Gezeigt werden die mittels qPCR bestimmten Konzentrationen an *Legionella* spp. (in GU/100 ml) im Vergleich mit den relativen Anteilen an *L. pneumophila*, die in der Gesamtlegionellenpopulation enthalten sind.

Die in diesem Projekt angewandte qPCR Methode erlaubt dagegen eine quantitative Aussage zum relativen Anteil von *L. pneumophila* an der Gesamtlegionellenpopulation (Abb. 53). Dafür wurden die Werte der iQ-Check® Real-Time PCR Kits (Bio-Rad) für *L. pneumophila* und *Legionella* spp. zugrunde gelegt. Beide Kits sind bzgl. PCR Chemie, Amplikonlänge, Amplifikationseffizienz und Amplifikationsprogramm vergleichbar.

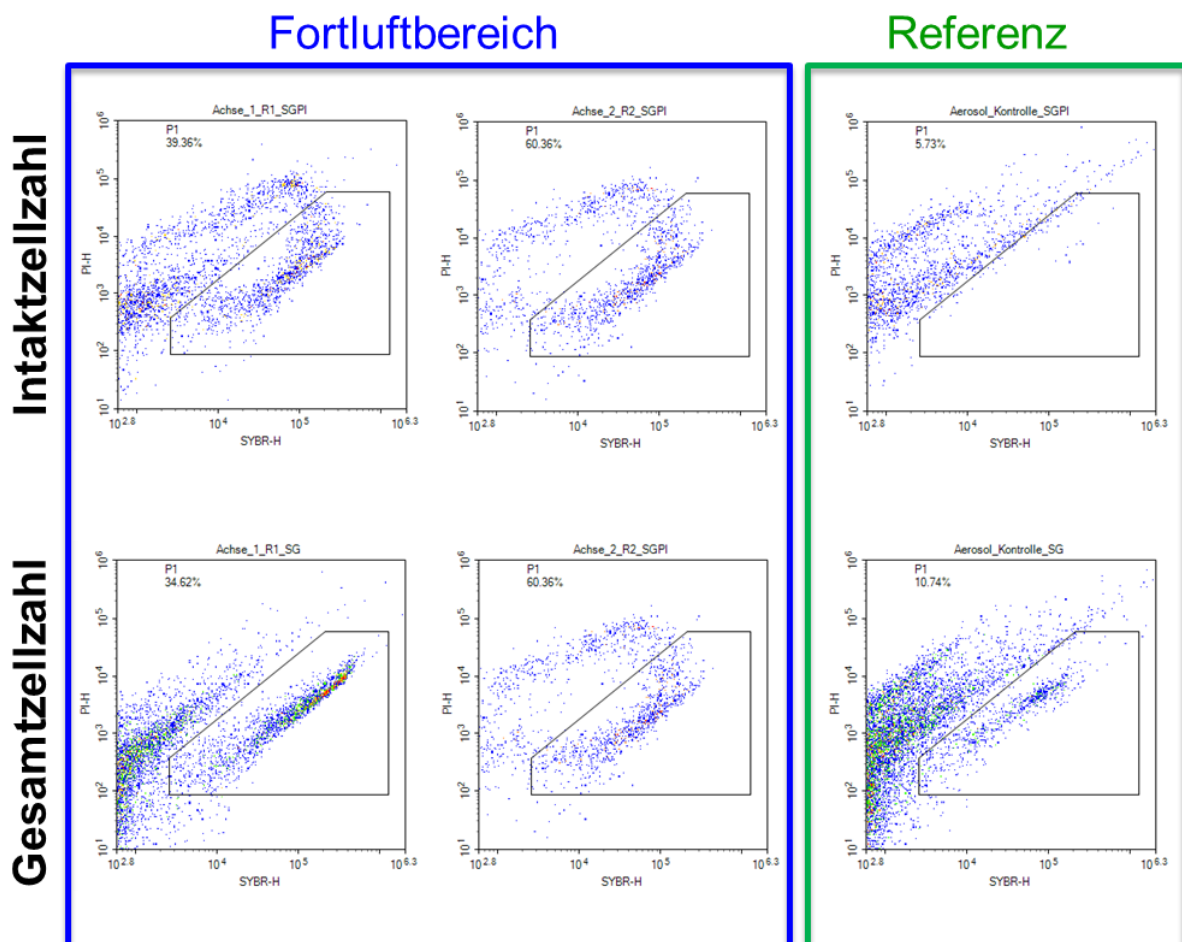
Die relativen Anteile von *L. pneumophila* lagen bei den untersuchten Anlagen im Bereich von 0 % (Legionellenpopulation ohne *L. pneumophila*) bis knapp 7 % (Abb. 53). Andere, am IWW im Laufe der Jahre 2018 und 2019 auf diesen Parameter untersuchte Kühlwasserproben wiesen relative Anteile von *L. pneumophila* von 0 % bis ca. 20 % auf.

9.4 Messung der mikrobiologischen Fracht in der Fortluft mittels Durchflusssytometrie

Um die mikrobiologische Fracht der Fortluft von Verdunstungskühlanlagen zu visualisieren und zu quantifizieren, kam die Durchflusssytometrie (4.6.1) zum Einsatz.

Abbildung 54: Bakterien im Fortluftbereich von Anlage A

Bestimmung von mikrobiologischen Profilen (Intakt- und Gesamtzellzahl) mittels Durchflusssytometrie.



Mikroorganismen im Fortluftbereich der Anlage A im Vergleich mit einer unbeeinflussten Referenzprobe. Bakterien sind im schwarzumrandeten Fenster (engl. Gate) visualisiert. Die Punkte in diesen Fenstern zeigen Bakterien mit intakter Zellmembran im Fall der oberen Diagramme, Punkte in den unteren Diagrammen beinhalten Signale von intakten und membrangeschädigten Bakterien. Die Luftreferenzprobe in Gegenwindrichtung dient als Vergleich.

Quelle: IWW

Diese Methode erlaubt mittels Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen gegen Nukleinsäuren, Bakterien von nicht-biologischen Partikeln zu unterscheiden.

Abbildung 54 zeigt ein Beispiel der mikrobiologischen Fracht in der Fortluft der Verdunstungskühlanlage A im Vergleich mit einer Luftreferenzprobe in Gegenwindrichtung, die nicht von der Fortluft beeinflusst wurde. An diesem Beispiel ist deutlich zu erkennen, dass der Fortluftbereich im Vergleich zur Referenzprobe eine sichtbar höhere Fracht an intakten Bakterien (im schwarzumrandeten Feld) aufweist. Hinsichtlich der Gesamtzellzahl ist der Unterschied weit weniger stark, da hier auch die Referenzprobe eine deutlich sichtbare Anzahl an Signalen hat. Die meisten Bakterien der Referenzprobe weisen jedoch geschädigte Zellmembranen auf, eventuell da sie einer längeren Phase der Austrocknung unterlagen.

Der Faktor, um den die Bakterienkonzentration in der Fortluft im Vergleich zu einer unbeeinflussten Referenzprobe erhöht ist, wurde in diesem Projekt als Kenngröße eingeführt und wird im Folgenden als ‚**Mikrobiologischer Luftbelastungsfaktor**‘ (**MLBF**) bezeichnet (engl. Microbial Air Bioburden Factor, MABF). Der Faktor der erhöhten Bakterienfracht kann sowohl auf die Gesamtzellzahl (GZZ) als auch die Intaktzellzahl (IZZ) bezogen werden. Je höher der Faktor, desto mehr Mikroorganismen werden von der entsprechenden Verdunstungskühlanlage ausgetragen und desto größer kann das davon ausgehende hygienische Risiko angesehen werden.

Die Anlagen A und B wiesen auffällig erhöhte MLBF Werte hinsichtlich der IZZ auf, d.h. in der Fortluft waren wesentlich mehr intakte Bakterien zu finden als in der Referenzprobe (Tab. 17).

Tabelle 17: Mikrobiologische Parameter für Luftproben

	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
Gesamtzellzahl pro m³	2,6 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	5,1 x 10 ⁴
Intaktzellzahl pro m³	1,7 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁴	6,3 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴
% intakte Zellen	65	33	35	24
Faktor 'erhöhte Bakterien-konzentration' im Vgl. zu Referenz bzgl. GZZ	4	16	3	3
Faktor 'erhöhte Bakterien-konzentration' im Vgl. zu Referenz bzgl. IZZ	18	20	2	2

Mikrobiologische Parameter für Luftproben von realen Verdunstungskühlanlagen an den Anlagen A, B, C und D. Angegeben sind die Gesamt- und Intaktzellzahlen pro m³ Luft, der relative Anteil intakter Zellen sowie die jeweiligen mikrobiologischen Luftbelastungsfaktoren, bezogen auf die Gesamt- oder Intaktzellzahl.

Bei Anlage A war ein Teil der Erhöhung darauf zurückzuführen, dass ein hoher Anteil der Bakterien in der Fortluft intakt war (evtl. zu erklären durch starke Hydratisierung der Aerosole). Der Faktor relativiert sich hinsichtlich der GZZ, wo bei Anlage A nur eine Erhöhung um den Faktor 4 vorliegt. In der Luftreferenz gab es zwar relativ viele Bakterien, jedoch wiesen die meisten Membranschädigung auf und gehen damit nicht in den IZZ Wert ein. Die Bakterien in der Referenzprobe hatten möglicherweise schon längere Aufenthaltszeiten in der Luft und hatten dadurch einen höheren Schädigungsgrad. Da der Vergleich der IZZ Werte damit wenig Aussagekraft hinsichtlich der generellen bakteriellen Mehrbelastung der Fortluft im Vergleich

zur Referenzprobe hat, ist der auf die GZZ bezogene MLBF aussagekräftiger. Der Anteil der Bakterien mit intakten Bakterien in der Fortluft ist jedoch ebenfalls von Interesse für die Risikobeurteilung.

Die Bakterienfracht hinsichtlich GZZ in der Fortluft von Anlage B weist eine 16-fache Erhöhung im Vergleich zur GZZ der Umgebungsluft auf. Das heißt, dass die Fortluft von Anlage B 16-mal mehr Bakterien aufweist als die unbeeinflusste Umgebungsluft. 33 % der Bakterien in der Fortluft waren intakt und damit potentiell lebend. Die Bakterienfracht hinsichtlich IZZ war in der Fortluft von Anlage B um den Faktor 20 erhöht. Die Tatsache, dass die mikrobiologische Belastung der Fortluft bei dieser Anlage hinsichtlich beider Faktoren (GZZ und IZZ) stark erhöht ist, weist auf einen vermehrten Austrag an Bakterien hin. Die Überprüfung der Tropfenabscheidung bei dieser Anlage wäre nach diesen Daten empfehlenswert.

Die Anlagen C und D wiesen sowohl hinsichtlich der GZZ als auch hinsichtlich der IZZ nur eine moderate Erhöhung um den Faktor 3 bzw. 2 auf.

9.5 Legionellenkonzentrationen in den Luftproben

Legionellen wurden in insgesamt drei der vier untersuchten Anlagen in den Fortluftproben mit dem Kulturverfahren gefunden (Tab. 18). Anlage A wies dabei die höchsten Konzentrationen mit durchschnittlich 25 KBE/m³ Luft auf, gefolgt von Anlage B mit durchschnittlich 6 KBE/m³ Luft. Bei Anlage C wies nur eine von sechs Luftproben eine geringe Konzentration auf, während in den Luftproben von Anlage D keine kultivierbaren Legionellen nachweisbar waren.

Tabelle 18: Durchschnittliche Konzentrationen von Legionellen in Luftproben

Legionellenkonzentrationen in Luftproben der Anlagen A bis D, bestimmt mittels Kultivierung oder qPCR.

	Legionella spp. (KBE/m ³)	Legionella spp. (GU/m ³)*	Intakte Legionella spp. (GU/m ³)*	L. pneumophila (GU/m ³)*	Intakte L. pneumophila (GU/m ³)*
Anlage A	25 (± 15)	606 (± 387)	126 (± 76)	11 (± 13)	15 (± 30)
Anlage B	6 (± 5)	51 (± 18)	10 (± 6)	n.d.	n.d.
Anlage C	1 (± 2)	4 (± 6)	nicht bestimmt	n.d.	nicht bestimmt
Anlage D	n.d.	16 (± 21)	5 (± 11)	n.d.	n.d.

* alle qPCR Werte liegen unter der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der jeweiligen qPCR Reaktionen mit den folgenden Ausnahmen bei Anlage A: Wert für *Legionella* spp. liegt über Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Wert für intakte *Legionella* spp. liegt über der Nachweis-, aber unter der Bestimmungsgrenze. Die qPCR Werte für intakte Legionellen beruhen auf Proben, die mit dem Lebendfarbstoff PMA behandelt wurden.

Die Konzentrationen für intakte Legionellen beziehen sich auf Proben, die mit dem Lebendfarbstoff Propidium Monoazid behandelt wurden. Die Konzentrationen für *Legionella* spp. und *L. pneumophila* wurden mit den jeweiligen AFNOR-validierten iQ-Check® *Legionella* Kits ermittelt.

Bei Anwendung der qPCR Analytik mit dem iQ-Check® Testverfahren ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der kulturellen Analytik mit den höchsten Konzentrationen für *Legionella* spp. bei Anlage A, gefolgt von Anlage B (Tab. 18). Luftproben der Anlagen C und D wiesen auch mittels qPCR nur sehr geringe Legionellenkonzentrationen auf.

L. pneumophila wurde nur in Proben von Anlage A in geringen Konzentrationen detektiert.

Auch für die positiven qPCR Nachweise für *Legionella* spp. und *L. pneumophila* muss darauf hingewiesen werden, dass alle Konzentrationen mit der Ausnahme der *Legionella* spp. Werte bei

Anlage A unter den Nachweis- oder Bestimmungsgrenzen der jeweiligen qPCR Reaktionen lagen. Bei Anlage A lag der für *Legionella* spp. über Nachweis- und Bestimmungsgrenze, der Wert für intakte *Legionella* spp. über der Nachweis-, aber unter der Bestimmungsgrenze.

Bei Anwendung des in diesem Projekt entwickelten qPCR Test-Verfahrens für *L. pneumophila* wurden in den Luftproben keine Legionellen nachgewiesen. Dies ist in Übereinstimmung mit den nur sporadischen Nachweisen mit dem hocheffizienten iQ-Check® *L. pneumophila* Kit.

Insgesamt sehen wir aus diesen Gründen für den Legionellennachweis in Luftproben Vorteile in der kulturellen Methode aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit. Liegt eine kultivierbare Legionelle im untersuchten Probenvolumen vor, so kann diese erfasst werden. Bei der qPCR Methodik auf der anderen Seite ist ein positiver Befund bei Vorliegen von einer oder wenigen Legionellen infolge von Verlust an Probenmaterial bei der Extraktion der genomischen Nukleinsäuren und der Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der extrahierten Nukleinsäuren als Template für den PCR-Nachweis eingesetzt wird ungewiss.

9.6 Legionellenkonzentrationen in Biofilmproben

Biofilmproben wurden von den Anlagen A, C und D analysiert. Kulturell waren Legionellen nur in Biofilmen der Anlagen A und C nachweisbar (Tab. 19). Mittels qPCR waren hohe Legionellenkonzentrationen v.a. in der Anlage C nachweisbar. Diese Proben wurden von einem Metallgelenk innerhalb des Kühlturmes über dem Ventilator entnommen. Das Gelenk ist durchgängig hoher Feuchtigkeit und Nebel ausgesetzt und ist nicht lichtexponiert.

Tabelle 19: Legionellenkonzentrationen in Biofilmproben

	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
Legionellen (KBE/100 g)	6,9 x 10 ⁶	nicht beprobt	9,2 x 10 ⁶	n.d.
<i>Legionella</i> spp. (GU/100 g)*	3,4 x 10 ⁸	nicht beprobt	5,9 x 10 ¹⁰	4,4 x 10 ⁷
<i>Legionella pneumophila</i> (GU/100 g)*	3,4 x 10 ⁶	nicht beprobt	3,6 x 10 ⁷	n.d.

*bestimmt mittels des jeweiligen iQ-Check® Legionella Real-Time PCR Kits von Bio-Rad.

Die Konzentrationen beziehen sich auf das Biofilmfeuchtgewicht. Die Biofilme wurden im Feuchtbereich (typischerweise in der Kühltasse) beprobt. Die Proben für die qPCR Analyse wurden nicht mit PMA behandelt.

Die Legionellenkonzentration bei Anlage D bezieht sich auf eine Biofilmprobe von einer Metalloberfläche in der Kühlturmtasse, vergleichbar mit den Proben von Anlage A und C. Die Legionellenkonzentration einer Probe einer benachbarten Betonwandung lag um ca. 1 Log-Einheit niedriger. Beide Probenahmestellen waren naturlichtexponiert, genauso wie die vergleichbare Probenahmestelle bei Anlage A, die ebenfalls von einer Metalloberfläche in der Kühlturmtasse stammt.

Die Befund sehr unterschiedlicher Legionellenkonzentrationen in den untersuchten Biofilmen ist in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen des UFOPLAN Projektes FKZ 3712 61 202, wo darauf hingewiesen wurde, dass selbst Biofilme desselben Kühlsystems sehr unterschiedliche Legionellenkonzentrationen aufweisen können. Der Ort der Biofilmprobenahme hat eine starke Auswirkung auf den Legionellenbefund und es bestand keine Korrelation zwischen den kulturellen Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser und in den Belagsproben. Diese Heterogenität lässt die Untersuchung von Biofilmen als wenig aussichtsreich erscheinen im Hinblick auf die hygienische Beurteilung von Verdunstungskühlanlagen.

10 Zusammenfassung und Ausblick

10.1 Status quo und Projektanforderungen

Das von Verdunstungskühlanlagen ausgehende gesundheitliche Risiko hinsichtlich Legionellenfreisetzung wird von mindestens vier Faktoren bestimmt: (1) Der Legionellenkonzentration im Kühlwasser, (2) dem Anteil an pathogenen Stämmen, (3) ihrer Vitalität und (4) der eigentlichen Legionellenfracht, die in die Luft abgegeben wird. Momentan beruht die hygienische Kontrolle von Verdunstungskühlanlagen auf der Bestimmung der Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser, jedoch ließ sich bislang kein eindeutiger Zusammenhang zwischen ihrer Konzentration im Umlaufwasser und in der Abluft herstellen. Die Legionellenfracht in der Abluft von Verdunstungskühlanlagen wird in der Praxis nur in Ausnahmefällen ermittelt, da der technische Aufwand sehr hoch ist und eine Vorgehensweise zur Messdurchführung derzeit nicht standardisiert ist. Die ausgestoßene Aerosolfracht stellt jedoch die entscheidende anlagenbezogene Größe zur Beurteilung eines gesundheitlichen Risikos im Anlagenumfeld dar. Diese Tatsache war der Beweggrund für das vorliegende Projekt, das die Bewertung und Optimierung eines Probenahmesystems für Bioaerosole, die Entwicklung einer Probenahmestrategie für Emissions- und Immissionsmessungen sowie der weiteren Ausarbeitung des diagnostischen Vorgehens für Legionellenaerosole aus Rückkühlanlagen zum Ziel hatte.

Das Projekt konnte aufbauen auf den Erfahrungen des vorhergehenden UFOPLAN-Vorhabens „Nachweis von Legionellen in Luftproben aus Verdunstungskühlanlagen“, in dem bereits ein Sammel- und Nachweisverfahren unter Verwendung eines Nass-Zyklonsammlers (Coriolis μ -Sammler) erarbeitet wurde (UBA 2014).

Ein standardisiertes Verfahrens zur Aerosolsammlung und zur Bestimmung der im Aerosol enthaltenen Legionellen ermöglicht eine systematische Überwachung der direkten Legionellenemission bzw. der anlagenbezogenen Immission und erlaubt somit eine frühzeitige Erfassung kritischer Anlagenzustände. Die sich daraus ableitenden Maßnahmen zur Reduzierung und Vermeidung der Freisetzung von Legionellen kann einen wichtigen Beitrag zur Minimierung anlagenbezogener hygienischer Risiken leisten.

10.2 Probenahme von Bioaerosolen, speziell Legionellen im Aerosol aus Verdunstungskühlanlagen

Die vorgeschlagene Vorgehensweise zur Probenahme in Aerosolen aus Rückkühlanlagen zur Legionellen-Keimzahlbestimmung orientiert sich an der Bioaerosol-Probenahme an geführten Quellen (Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 und 2). Verwendet wird dabei ein Nass-Zyklonsammler mit hohem Sammelvolumenstrom. Dieser horizontal ansaugende Sammler wurde zur Aerosol-Probenahme aus vertikalen Strömungen modifiziert. Die Methodenanwendung und Datenauswertung ist insbesondere vor dem Hintergrund der in der Anlagenpraxis oftmals anzutreffenden inhomogenen Strömungsprofile und hohen Flüssigwassergehalte im Aerosol vorzunehmen.

Bei der Festlegung der Messebene sollten mögliche Wechselwirkungen des Aerosols mit Einbauten und Wandungen des Baukörpers einbezogen werden. Soll die Probenahme im Routinebetrieb stattfinden, kann nach dem vereinfachten Verfahren eine Probe je Messachse gewonnen werden. Vorgeschlagen wird eine Aerosolmessung je Messachse am Punkt der mittleren Geschwindigkeit, nach Möglichkeit isoaxial, bevorzugt isokinetisch. Alternativ kann eine Probenahme aus Richtung der vertikalen Hauptströmung mit dem um Krümmer und Düse

modifizierten Nass-Zyklonsammler bzw. horizontal mittels dessen Standard-Immissionsausführung. Aktuell lässt sich keine Aussage zur Gleichverteilung der Aerosolkonzentration über den Messquerschnitt ableiten.

Laufende Rotoren zur Gasförderung in Nähe des Auslasses prägen dem austretenden Aerosolstrom eine mehr oder weniger ausgeprägte Drallströmung auf. Die nach dem vereinfachten Verfahren vorgesehene intensive Charakterisierung des Strömungsprofils kann um die Anwendung einer Föhnchenmethode zur orientierenden Strömungscharakterisierung sowie um Tropfenmessungen mit einer Impaktionssonde ergänzt werden.

10.3 Kultivierung und qPCR – Erkenntnisse und Anwendbarkeit für die Praxis

Die Überwachung von Verdunstungskühlanlagen beruht momentan auf der Bestimmung der kultivierbaren Legionellen im Kühlwasser der Verdunstungskühlanlagen. Legionellen, die zwar leben, jedoch ihre Kultivierbarkeit verloren haben, werden beim kulturellen Vorgehen nicht erfasst. Die in diesem Projekt gewonnenen mikrobiologischen Ergebnisse wurden unter Hinzuziehung von Ergebnissen aus Kühlwasserprobenuntersuchungen aus den Beratungsaktivitäten des IWW ausgewertet. Auch bei diesen Proben war die Legionellenkonzentrationen sowohl kulturell als auch mittels qPCR bestimmt worden.

Es zeigte sich, dass die mittels qPCR Analytik ermittelten Legionellenkonzentrationen tendenziell eine größere Reproduzierbarkeit aufwiesen als die kulturell ermittelten Konzentrationen, zudem vermeidet die qPCR die Angabe von Konzentrationsbereichen, wie sie manchmal bei den kulturellen Auswertung resultieren (siehe Abb. 52). Schwankungen in den kulturell bestimmten Konzentrationen können durch eine Vielzahl von Faktoren verursacht werden. Viele Abweichungen sind durch den störenden Einfluss der mikrobiologischen Begleitflora bedingt, die zum Teil die Nichtauswertbarkeit von Ansätzen zur Folge hat. Eine Begleitflora erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass eine Koloniebildung von Legionellen unterdrückt wird. Dadurch muss auf Ansätze mit geringen Volumina und somit reduzierter Begleitflora ausgewichen werden, in denen Legionellen dann konzentrationsbedingt ggf. nicht mehr vorhanden sind. Auch das Auftreten weniger Kolonien in kleinen Volumina kann aufgrund der hohen statistischen Unsicherheit zu großen Abweichungen in den kulturellen Befunden führen.

Bei der qPCR-Analytik spielt die Anwesenheit von Begleitflora infolge der Spezifität des molekularbiologischen Nachweises eine nur untergeordnete Rolle. Eine Probenbehandlung mit Säure oder Hitze zu deren Unterdrückung ist aus diesem Grund nicht nötig. Dies und die Tatsache, dass in der Regel größere Probenvolumina (typischerweise 40 ml – 100 ml) in die Analyse eingehen, werden als die Hauptgründe für die tendenziell höhere Reproduzierbarkeit dieser Nachweismethode angesehen. Das größte Hindernis für eine weitverbreitete Anwendung der qPCR zur Quantifizierung von *Legionella* spp. wird jedoch in der momentan nicht zufriedenstellenden Lebend-Tot-Unterscheidung gesehen. Während im Rahmen dieses Projektes ein Vorschlag für eine verbesserte qPCR Analyse für *L. pneumophila* erarbeitet wurde (basierend auf der Amplifikation längerer Genabschnitte), fehlt eine entsprechende Entwicklung für den Nachweis von *Legionella* spp. Die Validierung eines kommerziellen Kits entsprach nicht den Erwartungen.

Zum Nachweis der Legionellenkonzentration in Luftproben wird andererseits die kulturelle Analytik mit Vorteilen gesehen, da sie – sofern kultivierbare Bakterien in den Proben vorliegen – eine höhere Sensitivität als die qPCR-Analytik besitzt. Durch die generell geringere mikrobielle Belastung von Luftproben bzw. des durch Überführung aus Luftproben in eine Sammelfluid vorliegenden Probenmaterials im Vergleich zu Wasserproben (die Gesamtzellzahl je Kubikmeter Abluft lag in der Größenordnung von derjenigen in einem ml Trinkwasser) ist die mikrobielle

Begleitflora in den mit dem Nass-Zyklonverfahren gesammelten Luftproben nicht exzessiv. Dies ermöglicht den Verzicht auf Säure-/Hitzebehandlung der Proben und somit kulturelle Direktansätze des Sammelfluids, welche bereits nach wenigen Tagen Wachstumszeit auswertbar sind. Weiter stellt die geringere Sensitivität des PCR Verfahrens einen wesentlichen Nachteil einer Anwendung dieses Verfahrens bei der Analytik für Luftproben dar, bedingt durch Verluste bei der DNS Extraktion und die Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der extrahierten DNS als Template verwendet wird. Die Wahrscheinlichkeit der Kultivierbarkeit der in Aerosolen enthaltenen Legionellen wird weiterhin durch den oftmals vorliegenden hohen Wassergehalt im Gas grundsätzlich erhöht. Bei direkter Sammlung im Bereich der Auslassebene oder nach kurzen Flugdistanzen ist eine Austrocknung der Mikroorganismen und eine in Folge eintretende Aktivitätsminderung wenig wahrscheinlich.

Der im UFOPLAN Projekt FKZ 3712 61 202 beschriebene Verlust an Kultivierbarkeit bei vernebelten Legionellensuspensionen kann dem Verlust der schützenden Hydrathülle während der zurückgelegten Wegstrecke in einer Bioaerosol-Testkammer zugeschrieben werden. Innerhalb von einer Minute betrug die Anzahl kultivierbarer Legionellen nur noch wenige Prozent der Gesamtlegionellen-Zellzahl. Dies steht im Unterschied zu in einer Sterilbank durchgeführten Untersuchungen, in deren Verlauf eine deutlich geringere Austrocknung erfolgte und in Folge auch höhere Gehalte an kultivierbaren Legionellen detektiert werden konnten. Folgende Faktoren sind in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen:

- (1) Aerosolherstellung: Die Legionellen im vorhergehenden UFOPLAN-Projekt wurden für die Prüfungen in der Bioaerosol-Testkammer mittels eines MEDISANA®-Gerätes unter Verwendung von Ultraschall vernebelt. Die damit erzeugte Tröpfchengröße liegt zwischen 1 µm und 30 µm und ist damit relativ klein. Die Gefahr der Austrocknung und damit des Verlustes der Kultivierbarkeit nimmt damit zu. Ultraschallbehandlung kann auf der anderen Seite die Vitalität von Bakterien beeinträchtigen. Selbst wenn dieser Effekt an sich nicht groß ist, kann sich der damit verbunden Stress synergistisch mit anderen Stressfaktoren, die auf die Bakterien einwirken, auswirken.
- (2) Legionellendiagnostik: Der kulturelle Nachweis von *Legionella* spp. erfolgte gemäß ISO 11731 nach Hitzebehandlung (30 min bei 50 °C) oder Säurebehandlung (ca. pH 2,2 für 5 min Einwirkzeit) zur Unterdrückung von potentieller Begleitflora. Es ist denkbar, dass der für die Bakterien damit verbundene Stress ebenfalls synergistisch mit anderen Stressfaktoren (z. B. Verlust der Hydrathülle, Ultraschall, etc.) wirkt und damit das Potential hat, die Kultivierbarkeit zu vermindern. Um die Diagnostik für die Bakterien möglichst stressfrei zu gestalten, wurde im vorliegenden Projekt bei der Legionellenanalytik der Aerosolproben im Labor auf Hitze- und Säurebehandlung verzichtet. Dies war im Gegensatz zu Kühlwasser möglich, da die Luftproben wesentlich weniger Begleitflora als Kühlwasser aufweisen. Der Mittelwert der Intaktzellzahl in der pro m³ Fortluft bei den Anlagen A – D betrug 7,9x10⁴ intakte Bakterien pro m³ (im Vergleich zu 1,2x10⁴ intakten Bakterien in den Luftreferenzproben). Damit weist ein Kubikmeter Abluft der untersuchten Anlagen im Durchschnitt ca. 75-mal weniger Bakterien auf als ein ml Kühlwasser. Für den Fall, dass die 15 ml Coriolis-Sammelflüssigkeit Bakterien von drei m³ Luft enthält, ergeben sich bei Direktplattierung von 0,5 ml Sammelflüssigkeit nur durchschnittlich 387 Bakterien je Platte, von denen nur ein kleiner Teil Kolonien bilden wird (nur ein kleiner Teil der Bakterien sind per se kultivierbar). Dies entspricht einem winzigen Bruchteil der in einem ml Kühlwasser befindlichen Bakterien. Eine Säure- oder Hitzebehandlung der Aerosolproben zur Unterdrückung von Koloniebildung durch Begleitflora ist damit nicht notwendig.

Angesichts der beschriebenen Faktoren ist es erklärlich, dass, bedingt durch multiple Stresseinwirkung, die Kultivierbarkeit der Legionellen im vorherigen UFOPLAN Projekt stark eingeschränkt war und die qPCR-Methodik für Aerosolproben bevorzugt wurde. Das jetzige Projekt sieht aus den vorangehend genannten Gründen die kulturelle Legionellendiagnostik ohne eine vorherige Probenbehandlung mit Säure oder Hitze für die Aerosolproben im Vorteil, jedoch das qPCR Verfahren für die Kühlwasseranalytik.

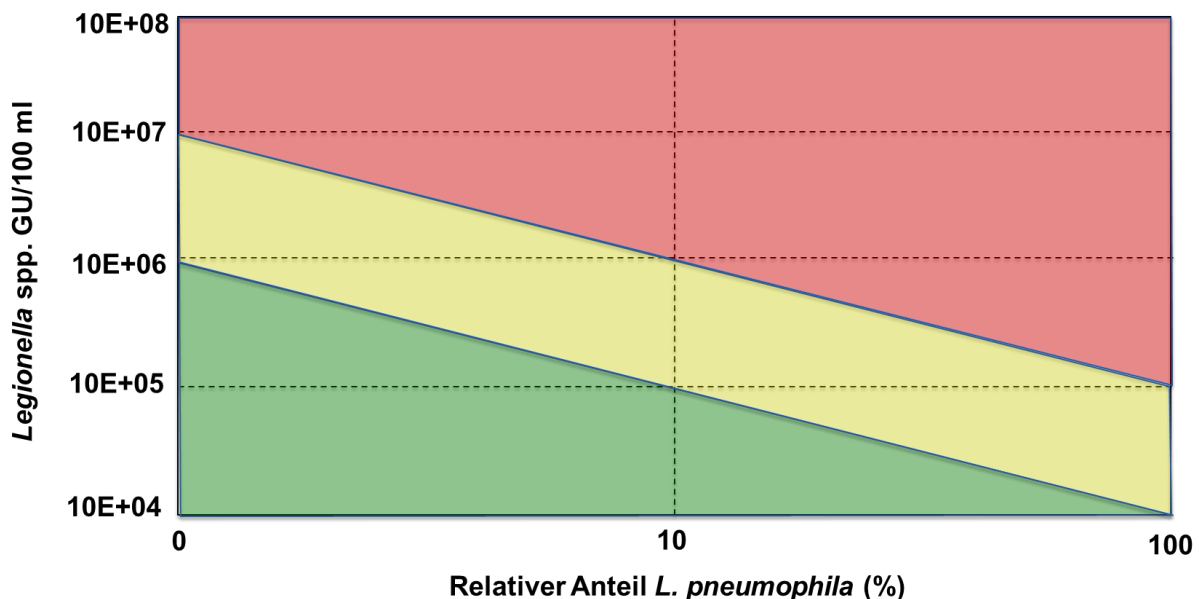
10.4 Vorschlag für eine qPCR basierte Risikomatrix

Das Vorliegen von qPCR-basierten Legionellenkonzentrationen im Kühlwasser bedingt zwangsläufig die Frage, wie diese Ergebnisse einzuordnen und im Hinblick auf die Hygienesituation der Anlagen zu interpretieren sind. Die Vorgaben für Prüf- und Maßnahmewerte der 42. BImSchV beruhen ausschließlich auf den Ergebnissen des kulturellen Nachweises von Legionellen im Umlaufwasser. Eine entsprechende Einordnung von qPCR Ergebnissen ist aktuell nicht einmal in Ansätzen gegeben.

Die qPCR Diagnostik erlaubt neben der Quantifizierung der *Legionella* spp. gleichzeitig die Bestimmung des relativen Anteils der epidemiologisch wichtigen Gruppe der *L. pneumophila*. In einer Risikomatrix analog zum Beispiel in Abbildung 55 können beide Aspekte kombiniert werden. Wird eine solche Arbeitshilfe unter Beteiligung relevanter Fachgremien im Konsens erarbeitet, kann dies eine wertvolle Arbeitshilfe für die Überwachungspraxis darstellen.

Abbildung 55: Beispiel einer neuen qPCR-basierten Risikomatrix für Kühlwasser

Risikoklassifizierung basierend auf der absoluten Konzentration an *Legionella* spp. (bestimmt mittels qPCR) im Kühlwasser und dem relativen Anteil an *L. pneumophila*.



Die Risikoklassifizierung basiert auf dem Ampelsystem. Grün signalisiert den hygienisch tolerierbaren Bereich, gelb einen Bereich, in dem Wiederholungsmessungen vorgenommen werden sollten und evtl. Anpassung der Betriebsbedingungen empfohlen werden. Rot signalisiert den Bereich, in dem Maßnahmebedarf besteht.

Die auf dem Ampelsystem beruhende Risikoklassifizierung beruht auf den in bisherigen Forschungs- und Beratungsprojekten des IWW gesammelten Erfahrungswerten mit dem iQ-Check® *Legionella* spp. Real-Time PCR Kit (BioRad), ist jedoch durch weitere Messungen zu validieren und anzupassen. Obwohl die Proben in der Regel mit PMA behandelt wurden, ist die Effizienz der Signalunterdrückung toter Zellen bei der Amplifikation kurzer Sequenzen (wie bei

beim iQ-Check® Kit der Fall) gering. Bei Amplifikation längerer Sequenzen und damit höherer Spezifität für intakte Legionellen sind die Grenzwerte der *Legionella* spp.-Konzentrationen entsprechend anzupassen, jedoch bleibt das Prinzip das gleiche: Mit zunehmendem Anteil von *L. pneumophila* im Kühlwasser werden zunehmend geringere Konzentrationen von *Legionella* spp. toleriert. Der Anteil von *L. pneumophila* liegt nach den bisherigen Erfahrungen typischerweise zwischen 0 % und 20 %, die Konzentration von *Legionella* spp. bei der Mehrheit der Kühlwasserproben im Bereich zwischen 10^4 GU/100 ml und 10^6 GU/100 ml.

10.5 Vorschlag für einen mikrobiologischen Belastungsfaktor in der Fortluft

Neben der Legionellenbelastung des Kühlwassers ist der anlagenbezogene mikrobiologische Belastungsfaktor (MLBF) als Verhältnis der allgemeinen Bakterienkonzentration in der Fortluft im Verhältnis zu einer durch den Anlagenbetrieb unbeeinflussten Referenzprobe (9.4) relevant. Obwohl nicht spezifisch für Legionellen, erlaubt er Rückschlüsse auf die Effizienz des Rückhaltevermögens mikrobieller Emissionen und der Effizienz der Tropfenabscheidung. Je höher der MLBF ist, desto geringer ist das Rückhaltevermögen von Bakterien durch die Tropfenabscheidung. Damit steigt auch das Risiko, dass in der Anlage befindliche Legionellen mit der Fortluft ausgetragen werden.

Der MLBF stellt eine Bewertung von quellbezogenen Konzentrationswerten dar. Diese basiert auf der Annahme einer Korrelation von Legionellenanzahl und allgemeiner Mikrobiologie im emittierten Aerosol sowie einer durch die Emissionen der Anlage weitgehend unbeeinflussten Hintergrundkonzentration. Ausbreitungsrelevante Größen wie Quellhöhe, Austrittsgeschwindigkeit oder Meteorologie werden aktuell nicht mit einbezogen. Anstelle einer Bezugnahme zu Konzentrationsgrößen ist alternativ auch die Bewertung der Emissionsfracht unter Verwendung des Luftdurchsatzes möglich. Auf einen damit möglichen Bezug zur Anlagengröße wird im ersten Ansatz verzichtet, da epidemiologisch relevante Ereignisse in der Vergangenheit nicht zwingend mit den Emissionen großer Verdunstungskühlanlagen bzw. hohen Emissionsfrachten in Verbindung gebracht werden.

Für eine Risikoabschätzung muss der MLBF in Kombination mit der Legionellenkonzentration im Kühlwasser betrachtet werden. Je höher die Legionellenkonzentration im Kühlwasser ist, desto größer ist das Freisetzungspotential und dementsprechend sind effizientere Maßnahmen zur Rückhaltung bzw. Minimierung der mikrobiologischen Aerosolbelastung zu diskutieren. Daher könnte eine Bestimmung des MLBF ab einem zu definierenden Schwellenwert der Legionellenkonzentration im Kühlwasser gefordert werden.

Die fehlende Spezifität des MLBF hat unter Umständen den Vorteil, dass probenahmebedingte Schwankungen bzgl. der Bakterienkonzentrationen potentiell kleiner werden. Beim spezifischen Nachweis für Legionellen können sich z. B. bei Vorliegen von abgelösten festen Biofilmbestandteilen Unterschiede zwischen konsekutiven Proben ergeben, wenn einige Proben erhöhte Legionellenkonzentrationen infolge des zufälligen Vorliegens solcher Klumpen aufweisen, andere nicht. Die Reproduzierbarkeit des MLBF-Wertes bei konsekutiven Messungen wurde hier jedoch nicht bestimmt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Abbildung 56: Beispiel einer Risikoklassifizierung anhand des mikrobiologischen Luftbelastungsfaktors (MLBF)

Mikrobiologischer Luftbelastungsfaktor (MLBF)*



* bzgl. Gesamtzellzahl in Luft

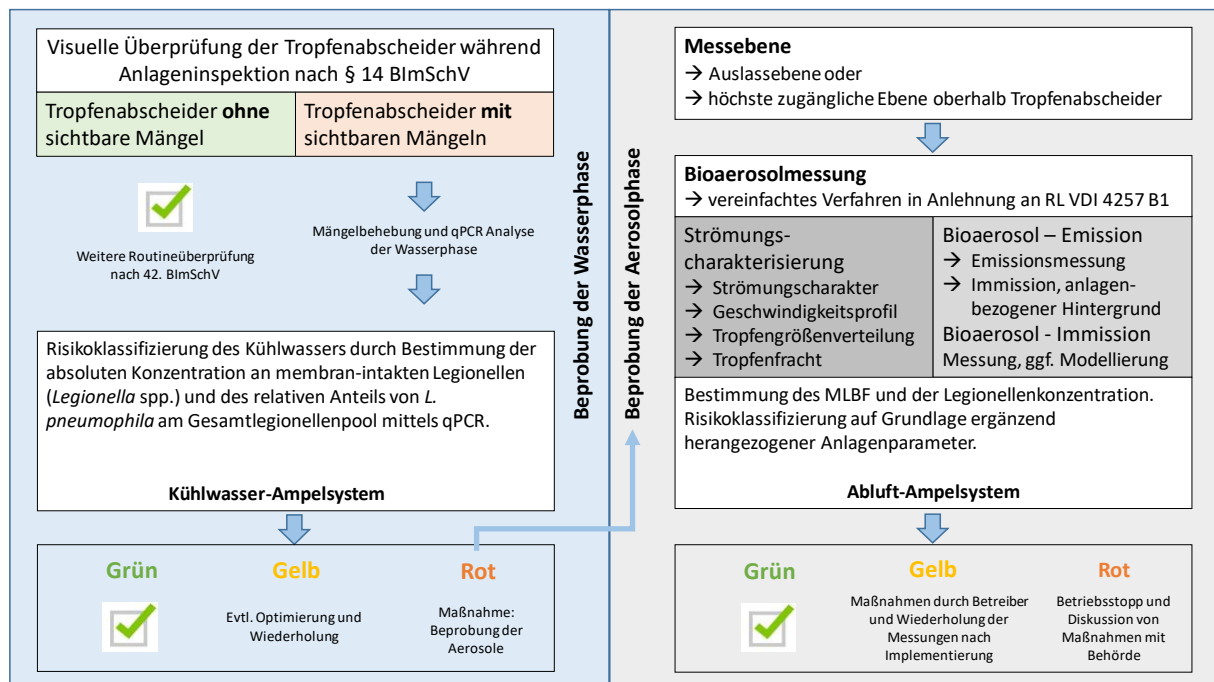
Die Risikoklassifizierung basiert auf dem Ampelsystem. Grün signalisiert den tolerierbaren Bereich, gelb einen Bereich, in dem Wiederholungsmessungen vorgenommen werden sollten und die Integrität des Tropfenabscheiders überprüft werden sollte. Rot signalisiert den Bereich, in dem Maßnahmenbedarf besteht.

Die vorgeschlagene Risikoklassifizierung (Abbildung 56) ist als erster Diskussionsbeitrag zu einer möglichen Klassifizierung der Luftpfademissionen von Legionellen aus Verdunstungskühlanlagen zu sehen und bedarf weiterer Untersuchungen.

10.6 Ausblick und Forschungsbedarf

Die hier vorgeschlagene Diagnostik bzw. Risikoeinschätzung könnte integriert werden in Gefährdungsbeurteilungen von Verdunstungskühlanlagen, wie sie in Fünf-Jahres-Intervallen von vereidigten Sachverständigen vorgenommen werden. Ein mögliches Vorgehen ist in Abbildung 57 dargestellt und wird nachfolgend erläutert.

Abbildung 57: Mögliches Vorgehen bei Gefährdungsbeurteilung von Verdunstungskühlanlagen.



Abgestufte Vorgehensweise und Entscheidungskriterien bei der Beprobung von Umlaufwasser- und Aerosolphase für Zellenkühltürme.

Am Anfang der Beurteilung des von der Verdunstungskühlanlage ausgehenden hygienischen Risikos steht die visuelle Überprüfung der Tropfenabscheider. Die Beurteilung der Integrität des Tropfenabscheiders würde von Sachverständigen vorgenommen.

Sind hier keine sichtbaren Mängel gegeben, erfolgt bei sonstiger Nicht-Bestanndung eine weitere Überprüfung im Routinemodus im Rahmen der 42. BImSchV.

Weist der Tropfenabscheider sichtbare Mängel auf, so sind diese zu beheben. Gleichzeitig erfolgt eine Risikoklassifizierung des Kühlwassers unter Anwendung der qPCR Diagnostik nach dem dargestellten Ampelsystem (Abbildung 55).

Werden hier hohe Konzentrationen von *Legionella* spp. bei entsprechendem Anteil von *L. pneumophila* im roten Bereich des Kühlwasser-Ampelsystems nachgewiesen, stellen eine ergänzende Aerosolbeprobung zur Bestimmung des MLBF und der kultivierbaren Legionellenzahl in der Fortluft nächste Überwachungsschritte dar.

Die Aerosolbeprobung kann in Anlehnung an die Vorgehensweise bei der Emissionsmessung von Bioaerosolen erfolgen. Die Durchführung dieser Aerosolprobenahme umfasst im ersten Schritt eine eingehende Strömungsmessung zur differenzierten Charakterisierung des Geschwindigkeitsprofils sowie des Gehaltes an Flüssigwassertropfen im festgelegten Messquerschnitt vor der eigentlichen Aerosolprobenahme. Zu den detaillierten Arbeitsschritten wird auf das diesbezügliche Schema im Anhang verwiesen. Zur Bestimmung des Referenzwertes findet begleitend eine Probenahme der Umgebungsluft im Luv der Anlage statt. Aus den Untersuchungsergebnissen kann dann der mikrobielle Luftbelastungsfaktor ermittelt werden.

Basierend auf dem Abluft-Ampelsystem des MLBF (Abbildung 56) und zu definierenden Schwellenwerten für Legionellen in der Fortluft können abgestuft differenzierte Maßnahmen zur Effizienzsteigerung der Tropfenabscheidung durch technische Änderungen oder Änderungen der Betriebsweise umzusetzen sein, um bei erneuter Prüfung entsprechend dem Ampelsystem eine Bewertung im grünen Bereich zu erhalten.

Bei einer Bewertung entsprechend dem gelben Bereich des Abluft-Ampelsystems (Abbildung 56) könnten Änderungen durch den Anlagenbetreiber vorgenommen werden, gefolgt von Wiederholungsmessungen der Wasser- und Aerosolphase zur Verifizierung des Maßnahmenerfolges. Eine Bewertung entsprechend dem roten Bereich hätte einen Betriebsstopp zur Folge; umzusetzende Maßnahmen vor Wiederinbetriebnahme müssten in diesem Fall mit der zuständigen Behörde vereinbart werden.

Die vorangehend dargestellten neuen Bewertungsinstrumente stellen in ihrer Verknüpfung somit einen ersten Vorschlag eines exemplarischen Verfahrensschemas zur differenzierten Bewertung anlagenbezogener Legionellenemissionen über den Luftpfad dar.

Forschungsbedarf

Weiterer Forschungsbedarf wird bei folgenden Punkten gesehen:

- Standardisierung der Strömungscharakterisierung in der Austrittsfläche an Rückkühlanlagen für verschiedene Anlagentypen in der Praxis, Bestimmung der mittleren Strömungsgeschwindigkeit und der Messunsicherheiten
- Bedarf einer isoaxialen, isokinetischen Probenahme für verschiedene Anlagentypen / Strömungsfelder zur Berücksichtigung der oftmals anzutreffenden Drallströmungen gegenüber einer rein vertikal aus der Hauptströmung oder horizontal ansaugenden Probenahme

- Emissionsfrachtermittlung: Ermittlung möglicher Konzentrationsvariation für Bioaerosole über den Querschnitt
- Biologische Sammeleffizienz: Beeinflussung durch Verlängerung der Sammelzeit bzw. Erhöhung des Absaug-Volumenstroms des Nass-Zyklonsammlers
- Verbesserung des Flüssigkeitsmanagements des Nass-Zyklonsammlers zur Vermeidung von Sammelverlusten
- Etablierung einer Vitalitäts-qPCR (v-qPCR) Diagnostik für *Legionella* spp. mit optimierter Signalunterdrückung von toten Legionellen und Validierung bezüglich Inklusivität und Exklusivität.
- Weitere Beprobung von Realsystemen zur Verfeinerung der hier vorgeschlagenen Ampelsysteme für Kühlwasser- und Luftproben.

11 Quellenverzeichnis

42. BImSchV: Bundesregierung: Zweiundvierzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider (in Kraft getreten am 12. 6. 2017). In: Bundesgesetzblatt 2017 (2017), Nr. 47. URL www.bundesgesetzblatt.de [BUN17]
- Adams, A.P., Lewis, B.A.G. (1979): Microbial aerosols from cooling towers and cooling sprays. A pilot study. Tech. Rep. NURG/CR-1207; ANL/ES-83, OSTI ID: 5543965.
- Aqua Legion (UK) Ltd. (2017): Cooling Tower Risk Assessment. Independent Specialist. Online verfügbar unter <https://www.aqualegion.com/wp-content/uploads/Cooling-Towers-Legionella-Risk-Aqua-Legion1.jpg>.
- Asbach, Christof (2016): Umweltmesstechnik. Impaktorauslegung. Universität. Duisburg, 2016.
- Bahmann, Wolfram (2006): VGB Forschungsprojekt Nr. 262. Studie zur Anwendbarkeit des Ausbreitungsmodells AUSTAL2000 mit Windfeldmodell TALdia im Hinblick auf die Gebäudeeffekte bei Ableitung von Rauchgasen über Kühltürme und Schornsteine. Unter Mitarbeit von Nicole Schmonsees, zuletzt geprüft am 14.05.2018.
- Bartram, Jamie (Hg.) (2007): Legionella and the prevention of legionellosis. Weltgesundheitsorganisation. Geneva: World Health Organization. Online verfügbar unter http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/Legionella.pdf.
- Behling, Gabriele (2004): Legionellenproblematik im Trinkwasser. Vorkommen, Infektion, Gefahrenpotenzial, Prävention und Sanierung. Unter Mitarbeit von Dr. Bonita Brodhun, RKI Robert-Koch-Institut Berlin, Benedikt Schaefer, UBA Umweltbundesamt Bad Elster, Dr. Peter Schindler, LGL Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit München. Hg. v. FLUGS Fachinformationsdienst. GSF-Forschungszentrum. München, zuletzt geprüft am 04.04.2018.
- Bertin Instruments (2018): Coriolis Micro – Air sampler. Online verfügbar unter <https://www.bertin-instruments.com/product/air-samplers/coriolis-micro-air-sampler/>, zuletzt geprüft am 26.07.2019.
- Carvalho, E.; Sindt, C.; Verdier, A.; Galan, C.; O’Donoghue, L.; Parks, S.; Thibaudon, M. (2008): Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains. In: *Aerobiologia* 24 (4), S. 191–201. DOI: 10.1007/s10453-008-9098-y.
- DIN EN ISO 19458. 2006-12. Wasserbeschaffenheit – Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen [DIN06]
- Ditommaso, S., Giacomuzzi, M., Ricciardi, E., Zotti, C.M. (2015): Viability-qPCR for detecting Legionella: Comparison of two assays based on different amplicon lengths. *Molecular and Cellular Probes* 29:237e243.
- Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J., Jarraud, S. (2004): Clinical and environmental distributions of Legionella strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* 42(1):458-460.
- Exner, M., Suchenwirth, R., Pleischl, S., Kramer, A., Eikmann, T., Nissing, W., Hartemann, P., Koch, C., Teichert-Barthel, U., Heudorf, U., Engelhart, S. (2010): Memorandum zu dem Legionellen-Ausbruch in Ulm 2010 aus Sicht von Hygiene und Öffentlicher Gesundheit. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 15, 43–57.
- Expertenkommission Legionellen (2015): Bericht der Expertenkommission Legionellen. Im Auftrag des Ministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen. Online verfügbar unter https://www.umwelt.nrw.de/fileadmin/redaktion/PDFs/umwelt/legionellen_expertenkommission.pdf, zuletzt geprüft am 05.05.18.

- EYE of Science (2016): Fine Art America. Online verfügbar unter <https://fineartamerica.com/featured/Legionella-pneumophila-tem-eye-of-science.html>, zuletzt aktualisiert am 16.10.2016, zuletzt geprüft am 28.04.18.
- Fields, Barry S.; Benson, Robert F.; Besser, Richard E. (2002): Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. In: Clinical Microbiology Reviews 15 (3), S. 506–526. DOI: 10.1128/CMR.15.3.506-526.2002.
- Fiume, L., Bucca Sabattini, M.A., and Poda, G. (2005): Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays. Letters in Applied Microbiology 41 (6):470-475.
- Gatza, E., Hammes, F., Prest, E. (2013). Assessing water quality with the BD Accuri™C6 flow cytometer. White paper. BD Biosciences.
- Gilmour, M.W., Bernard, K., Tracz, D.M., Olson, A.B., Corbett, C.R., Burdz, T., Ng, B., Wiebe, D., Broukhanski, G., Boleszczuk, P., Tang, P., Jamieson, F., Van Domselaar, G., Plummer, F.A, and Berry, J.D. (2007): Molecular typing of a *Legionella pneumophila* outbreak in Ontario, Canada. Journal of Medical Microbiol. 56 (3):336-341.
- GKN (2015): Der Hybridkühlturm des Blocks II des Kernkraftwerks Neckarwestheim. Online verfügbar unter https://www.nuklearforum.ch/sites/default/files/styles/preset_colorbox_big/public/Medienreise_04.jpg?itok=F486PsMn, zuletzt geprüft am 22.01.2019.
- Gruber, Lou (2008): Kraftwerk Zolling Kühlturm. Online verfügbar unter https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kraftwerk_Zolling_Kühlturm.jpg, zuletzt geprüft am 22.01.2019.
- Hayden, R.T., Uhl, J.R., Qian, X., Hopkins, M.K., Aubry, M.C., Limper, A.H., Lloyd, R.V., Cockerill, F.R. (2001): Direct Detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: Comparison of LightCycler PCR, In situ Hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. Journal of Clinical Microbiology 39 (7):2618-2626.
- Heller, R.; Höller, C.; Süssmuth, R.; Gundermann, K. O. (1998): Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. In: Letters in applied microbiology 26 (1), S. 64–68.
- Hinds, William C. (1999): Aerosol technology. Properties, behavior, and measurement of airborne particles. 2. ed. New York: Wiley (A Wiley-Interscience publication). Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/description/wiley031/98023683.html>.
- ISO 11731:2017. Wasserbeschaffenheit – Zählung von Legionellen (ISO 11731:2017); Deutsche Fassung EN ISO 11731:2017. März 2019, Berlin, Beuth-Verlag.
- Jaulhac, B., Nowicki, M., Bornstein, N., Meunier, O., Prevost, G., Piemont, Y., Fleurette, J., Monteil, H. (1992): Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. Journal of Clinical Microbiology 30:920-924.
- Khanna, M., Fan, J., Pehler-Harrington, K., Waters, C., Douglass, P., Stallock, J., Kehl, S., Henrickson, K.J. (2005): The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organism, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, and *Bordetella pertussis*, and its Real-Time counterpart. Journal of Clinical Microbiology 43 (2): 565-571.
- Köhl, Stephan (2017): Persönliche Auskunft, Hr. Stephan Köhl, Balke-Dürr GmbH, Düsseldorf, 9.2.1017
- Kontchou, J.A., Nocker, A. (2018). Optimization of viability qPCR for selective detection of membrane-intact *Legionella pneumophila*. J. Microbiol. Methods. 156:68-76.
- Langer, Veronika (2012): Nachweis von *Legionella pneumophila* in Luft und Wasser mittels Antikörper-Mikroarrays. Dissertation. Technische Universität, München. Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, zuletzt geprüft am 01.04.2018.

Langer, Veronika: Rapid quantification of bioaerosols containing *L. pneumophila* by Corioliss μ air sampler and chemiluminescence Antibodymicroarrays. Unter Mitarbeit von Georg Hartmann, Reinhard Niessner und Michael Seidel. In: Journal of Aerosol Science, Bd. 48, S. 46–55.

Lee, J.L., Levin, R.E. (2009): Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycalate and real-time PCR. Journal of Microbiological Methods 79:184–188.

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J., and Atlas, R.M. (1990): Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes 4:175-187.

Lucia, M. A.: Application of PCR to the detection of pathogenic bacteria in biofilms from pipes and reservoirs of the EPAL water distribution system. Online verfügbar unter <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/395137426256/Resumo%20alargado.pdf>, zuletzt geprüft am 28.10.2019.

Pinar, A., Bozdemir, N., Kocagöz, T., Alacam, R. (2004): Rapid Detection of bacterial atypical pneumonia agents by multiplex PCR. Cent Eur J Publ Health 12 (1): 3-5.

Pietsch, M. (2019): Hygienische Risikobewertung aus medizinischer Sicht. Vortrag, VGB-Expertenforum „Erfahrungen aus der Umsetzung der 42. BImSchV“. Dortmund, 09.05.2019

Regionalplaner (2013): Kraftwerk Duisburg Walsum. Online verfügbar unter https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kraftwerk_Duisburg_Walsum_08.2013.jpg, zuletzt geprüft am 22.01.2019.

Richtlinie VDI 2047 Blatt 2, 2017-11 (Entwurf): Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen (VDI-Kühlturmregeln).

Richtlinie VDI 2047 Blatt 3, 2018-04: Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen. Kühltürme über 200 MW (VDI-Kühlturmregeln).

Ryan, Kenneth J.; Ray, C. George; Sherris, John C. (2004): Sherris medical microbiology. An introduction to infectious diseases. 4th ed. New York: McGraw-Hill. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/description/mh031/2003054180.html>.

Schi, Julian (2013): STEAG Heizkraftwerk Herne. Herne. Online verfügbar unter <https://de.foursquare.com/v/steag-heizkraftwerk-herne/4ff2ef37e4b08dd52d2a0e8f?openPhotoId=519f0e86498e15f1011a11f2>, zuletzt geprüft am 24.06.19.

Schulze-Röbbecke, R.; Rödder, M.; Exner, M. (1987): Anmerkungen zu den Vermehrungs- und Abtötungstemperaturen von Legionellen. In: Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 72:83–89.

Sheehan, Kathy B.; Henson, Joan M.; Ferris, Michael J. (2005): Legionella species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. In: Applied and Environmental Microbiology 71 (1):507–511.

SKC Incorporated (2013): M-BioStage.jpg (JPEG-Grafik, 500 × 500 Pixel). Online verfügbar unter <http://www.skcinc.com/catalog/images/M-BioStage.jpg>, zuletzt aktualisiert am 06.09.2013, zuletzt geprüft am 07.04.2018.

SKC Incorporated (2018): BioSampler. Online verfügbar unter https://www.skcinc.com/catalog/index.php?cPath=400000000_401000000_401000050, zuletzt geprüft am 07.04.2018.

SSI Incorporated (2004): Model 3475 Condensation Monodisperse Aerosol Generator: Instruction manual. Zuletzt abgerufen am 15.05.2018 [TSI04]

STEAG GmbH (2012): Kraftwerk Fenne. Essen. Online verfügbar unter www.steag.com, zuletzt geprüft am 04.04.2018.

Thomas, Richard J. ; Webber, Daniel ; Sellors, William ; Collinge, Aaron ; Frost, Andrew ; Stagg, Anthony J. ; Bailey, Stephen C. ; Jayasekera, Pramukh N. ; Taylor, Rosa R. ; Eley, Steve ; Titball, Richard W.: Characterization and deposition of respirable large- and small-particle bioaerosols. In: Applied and environmental microbiology 74 (2008), Nr. 20, S. 6437–6443 [TH008]

Nguyen, T. M., Ilf, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D. Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J., Desenclos, J.C. (2006): A Community–Wide Outbreak of Legionnaires Disease Linked to Industrial Cooling Towers How Far Can Contaminated Aerosols Spread? J. Infect. Dis. 193, 102–111.

UBA (2014): Strathmann, Martin, Schaule, Gabriela: Nachweis von Legionellen in Luftproben von Verdunstungskühlanlagen. UFOPlan-Vorhaben des Umweltbundesamtes, Forschungskennzahl 3712 61 202,

UBA-Empfehlung:2017-06. Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern.

https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/355/dokumente/nachweis_legionellen_verordnung_final.dotx.pdf

Vautier, Jaulien; Fa. Bertin Technology (2018): Volumenstrom des Sauggebläses des Coriolis μ Abscheiders, 30.03.2018. schriftlich an Laura Welp. e-mail.

VDI-Richtlinie 2047, 1992-07: Kühltürme Begriffe und Definitionen, zuletzt geprüft am 14.05.2018.

VDI-Richtlinie 2066 Blatt 1, 2006-06: Messen von Partikeln Staubmessung in strömenden Gasen.

VDI-Richtlinie 3867 Blatt 1, 2009-09: Messen von Partikel in der Außenluft Bestimmung der Partikelanzahlkonzentration und Anzahlgrößenverteilung von Aerosolen.

VDI-Richtlinie 3867 Blatt 4, 2011-06: Mesen von Partikeln in der Außenluft. Bestimmung der Partikelanzahlkonzentration und Anzahlgrößenverteilung von Aerosolen [VDI11b]

VDI-Richtlinie 3867 Blatt 5, 2013-11. Messen von Partikeln in der Außenluft. Bestimmung der Partikelanzahlkonzentration und Anzahlgrößenverteilung von Aerosolen [VDI13B]

VDI-Richtlinie 3880, 2011-10: Olfaktometrie – Statische Probenahme.

VDI-Richtlinie 4250 Blatt 2, 2015-11: Bioaerosole und biologische Agenzien Umweltmedizinische Bewertung von Bioaerosol-Immissionen, zuletzt geprüft am 28.03.2018.

VDI-Richtlinie 4252 Blatt 3, 2008-08: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft Aktive Probenahme von Bioaerosolen.

VDI-Richtlinie 4253 Blatt 3 Entwurf. 2017-09. Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft Verfahren zum quantitativen kulturellen Nachweis von Bakterien in der Luft [VDI17]

VDI-Richtlinie 4257 Blatt 1, 2013-05: Bioaerosole und biologische Agenzien Messen von Emissionen, zuletzt geprüft am 14.05.2018.

VDI-Richtlinie 4257 Blatt 2, 2011-09: Bioaerosole und biologische Agenzien – Messen von Emissionen.

von der Weiden (2004): Particle Loss Calculator – a new software tool for the assessment of the performance of aerosol inlet systems. Atmos. Meas. Tech., 2, 479-494

Wadowsky, R. M.; Yee, R. B. (1983): Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. In: Applied and environmental microbiology 46 (6):1447–1449.

Wieland, H., Faigle, M, Lang, F. Northof, H., Neumeister, B. (2002): Regulation of the *Legionella* mip-promoter during infection of human monocytes. FEMS Microbiol. Letters 212:127-132.

Wilson, D. A., Yen-Lieberman, B., Reischl, U., Gordon, S. M., and Procop, G. W. (2003): Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the mip gene. J Clin Microbiol 41: 3327-3330.

Wurz, Dieter; Wachter-Wurz, Christine; Hartig, Stefan (2016): Primär-, Sekundär- und Rekondensationstropfen in Nasskühltürmen. Auswirkungen auf die Emission von Mikroorganismen. Fachabteilung Rückkühltechnik. VDMA. Frankfurt am Main, 16.06.2016.

Yang, X., Badoni, M., Gill, C.O. (2011): Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. *Food Microbiology* 28:1478–1482.

Yee, R. B.; Wadowsky, R. M.; Mezmar, L.; Wing, E. J.; Dowling, J. N. (1982): Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures. In: *Applied and Environmental microbiology* 43 (5), S. 1104–1110.

Yzerman, E., den Boer, J.W., Caspers, M., Almal, A., Worzel, B., van der Meer, W., Montijn, R., Schuren, F. (2010): Comparative genome analysis of a large Dutch *Legionella pneumophila* strain collection identifies five markers highly correlated with clinical strains. *BMC Genomics* 11:433.

Zimmermann, Thomas (2013): Rückkühlwerk. Rückkühlwerk der Esserwerke im Westertal (Warstein). Warstein. Online verfügbar unter https://de.m.wikipedia.org/wiki/Legionellose-Ausbruch_in_Warstein_2013#/media/Datei:3ARueckkuehlwerk_01_THWZ.jpg, zuletzt geprüft am 25.06.19.

A Anhang

A.1 Aerosolprobenahme

A.1.1 Veröffentlichungen zu Messkampagnen an Verdunstungskühlanlagen bzw. unter Verwendung des Coriolis-Sammlers

Author/Jahrzeit	Bibliographie	Messparameter	Anlage	Randbedingung Messung, Sammlerposition	Sammler
Allega 2016	Allega, S. et al.; Characterization of aerosols containing Legionella generated upon nebulisation. DOI: 10.1038/srep35998. www.nature.com/scientificreports	Legionellen	synthetisches Aerosol	Labortbedingungen	DUP1 15-stage, low-pressure-impactor
Bordenave et al. 2001	Bordenave, S; Dubrou, A; Moulesseaux, V; Bex, L; D'Carlier and F; Siquinari: Detection of <i>Legionella pneumophila</i> in environmental aerosols of cooling towers by impact sampling methods. Proceedings: Indoor Air 2002.	Legionellen	Rückkühlanlagen	"air samples were collected in the plume of the towers, close to the air discharge when it was possible (top of the TC and TD) and downwind from TA (3,7 and 5,1 m), TB (2 m), TC (1,2 m), TD (3 and 10m)"	AGI-30 (2 L/min) Andersen Impactor (6-stufig, Überführung in Fluid, 28 L/min) AT(Omega) (einstufiger Impactor, 100l/min, 1 m³/Probe)
Coriucci et al. 2010	Coriucci, A., Verani, M., Battistini, R.: <i>Legionella</i> in Industrial Cooling Towers: Monitoring and Control Strategies. Lett. Appl. Microbiol., 50 (2010), pp. 24-29	Legionellen	Kühlturm (Ballonide, Umlaufsammenge 2.636 m³/d)	Sammlerposition: Abstand zur Quelle 5 m, Höhe 1,5 m, 1 m³-Sammelvolumen	Impactor (Microflow Aquaria Srl., Milan, Italy) with compact agar plates
Chang, Hung 2012	Chang, C.-W., Hung, P.-Y.: Methods for Detection and Quantification of Airborne <i>Legionella</i> Around Cooling Towers. Aerosol Science and Technology 46 (2012) 4, pp. 369-379	Legionellen	Kühlturm	Sammlerposition: "at height 1,2 and 1,1 m downwind from the materials of the CTS"	Bio Sampler, AGI-30; MAS-100L, SAS5 2300. Anderson-5-Stage (Agar-based), MAS-100R (Agar-based), MAS-100 (Filter-based) (Filter-based)
Clauß, Springorum 2016	Clauß, M., Springorum, A.C. (2016): Sammlung/Übertragener Mikroorganismen in Umwelbereichen mit geringer Konzentrationen mit verschiedenen Probenahmeverfahren. Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft 76 (2016) Nr. 3: – März, Seite 85-89	Mikroorganismen	--	Außenluftmessung, Bakterien, Pilze	Coriolis; AGI-30; MAS-100
Ishimatsu et al. 2001	Ishimatsu, S., Miyamoto, H., Hori, H., Tanaka, I., Yoshida, S.: Sampling and detection of <i>Legionella pneumophila</i> aerosols generated from an industrial cooling tower. British Occupational Hygiene Society 45 (2001) 6, pp. 421-427	Legionellen	Kühlturm	Sammlerposition: "30 cm above the fan of the cooling tower"	Andersen Impactor und Impinger
Kunz 2009	Kunz, B.: Kurt Berattungen GmbH: Legionelle (Lebübertragung durch Raumlufttechnische (RLT) Anlagen? Bericht eines Praxisversuches	Legionellen	RLT-Anlage mit Leuchtefeuchter (LB) / horizontaler Ablaufkanal	Geige schwindigkeit 1,2 - 2 m/s, Probenahme im Abstand 0,3, 1,8, 3,3 m vom LB. Zusätzlich Sedimentationsplatten im Kanal (Agar)	MAS-100 (Agarplatte, Luftdurchsatz 6 m³/h)
Langer et al. 2002	Langer, V., Hartmann, G., Niesow, R., Seidel, M. (2002): Rapid quantification of bioaerosols containing <i>L. pneumophila</i> by Coriolis (air sampler and chemiluminescence Antibody microarrays). In: Journal of Aerosol Science, 48, S. 46-55.	Legionellen	synthetisches Aerosol	Labortbedingungen	Coriolis
Mathieu et al. 2006	Mathieu, L., Robins, E., Dejonghe-Akaban, M., Riboux, S., Pauly, D., Hartmann, P., Zmirou-Navier, D.: <i>Legionella</i> bacteria in Aerosols: Sampling and Analytical Approaches Used during the Legionair's Disease Outbreak in Pils-de-Calais. J. Infect. Diseases, 193 (2006), pp. 1333-1335	Legionellen	Kühlturm		
Strahmann et al. 2014	Strahmann, M., Schulte, G., Oldenburg, H.J., Bab, R., Wehde, T. (2014): Nachweis von Legionellen in Luftproben von Verdunstungskühlanlagen: ZK 372.61.202.204	Legionellen	Verdunstungskühlanlage	Emissionsquelle/naher Betrieb des Immissionsaufsatzes des Coriolis-Sammlers, Abstand: Einige Meter	Coriolis i.i. Airport (Gelatinefilter -> Agar) Loreco FH3 (Impaktion (Agar-basiert)
VGB 390	Pietesh, M., Kraft, B., Köhnen, W.: Mikrobielle Emissionen aus Kühltürmen/ Microbial emissions from cooling towers. VGB-Forschungsstiftung, Verfahren VGB Nr. 390. Forschungsbericht unveröffentlicht, einzelne Kurzmittelteilungen publiziert	Legionellen	Kühlturm, Verdunstungskühlanlage	u.a. Impinger AGI-30, horizontale Ansaugung. "In mehreren Kühltürmen werden in praxisnahen Tests verschiedene Methoden der Keimzählung verglichen"	keine Angaben
Walker et al. 2013	Walker, S.M., Renner, B., Tuschak, C., Genes, L., Hörmandorfer, S., Herr, C.E.W. (2013): Vergleichende Innenraumluftmessungen von Bakterien und Schimmelpilzen, Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 73(9), 381-386	Legionellen, Bakterien, Pilze	--	Leg., Duschkabine, 1,5 m Höhe direkt vor Duschkabine sonstige MO: Innenraum (Hörsaal), 1,5 m Höhe	Coriolis i.i. Airport (Gelatinefilter -> Agar) Loreco FH3 (Impaktion (Agar-basiert)
Wurz 1984	Wurz, D., Klar, M., Reske, R., Conrads, M.: Rezirkulation mitgeräuschten Kühlwassers in Zellenkühltürmen mit saugenden Ventilatoren. Essen, VGB Kraftwerkstechnik, Verlag techn.-wiss. Schriften (VGB-TW)105/1984	Tropfen, phys. Parameter	Verdunstungskühlanlage	Glassammler vertikal ansaugend, Düsensichtmesser anpassbar	Zyklonsammler, Tropfenimpactor

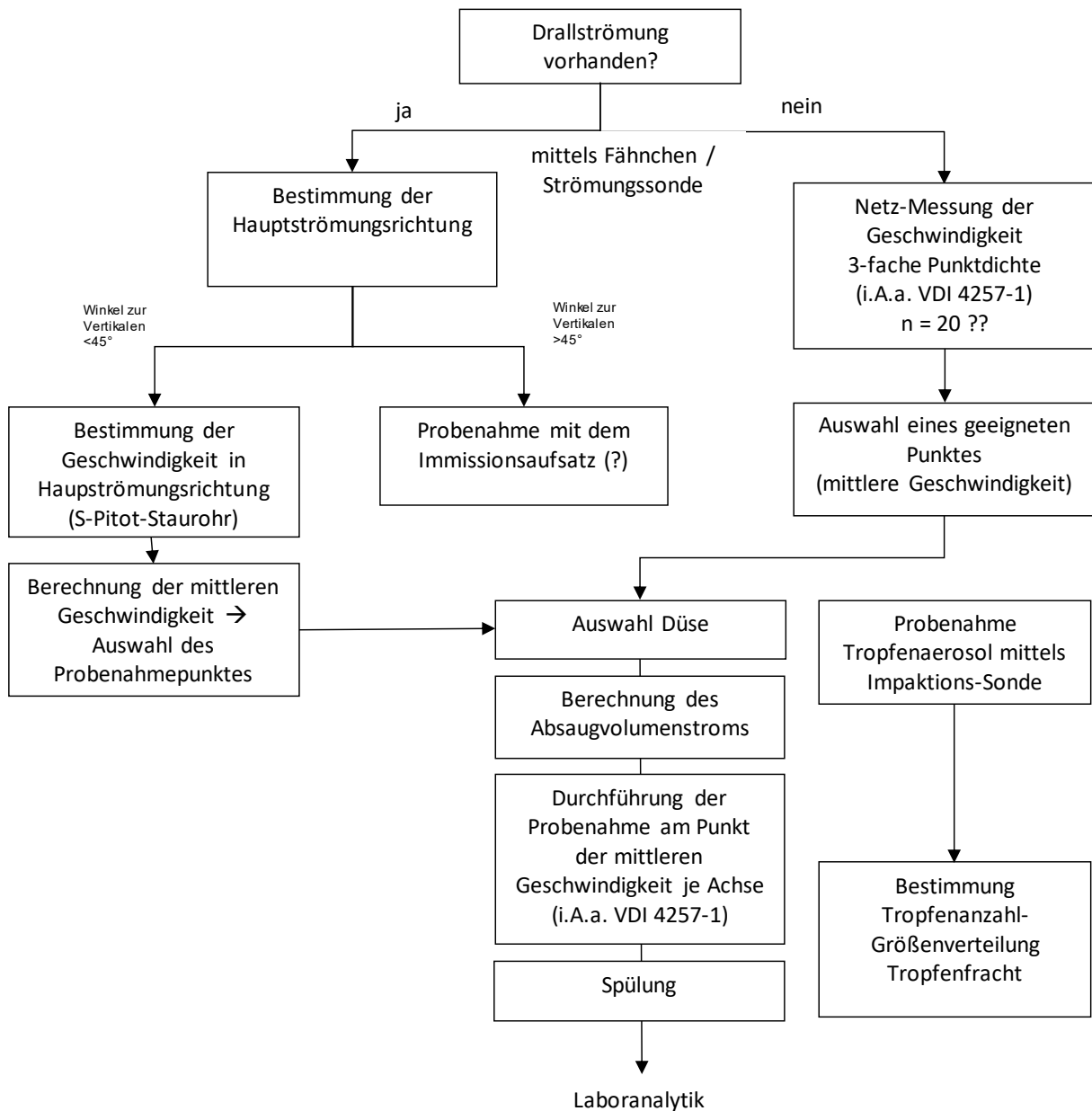
Quelle: K. Ueberholz, 2014

A.1.2 Messpunkte und Probenahmecharakteristik, Anlagenstandorte A bis D

Standort	Messung # lt. Steckbrief / Protokoll	MP #_Achse	Strömungs- Charakter	U / U* (m/s)	Coriolis- Aufsatz	Richtungscharakteristik	Düse Dd (mm)	Absaugung m³/h	KBE Legionellen	je m³ Aerosol	
										GZZ	IZZ
A											
1	6, 7, 8	MP5_A2	Rotation aufwärts	6,2 / 9,4	E	isoax./isokin HS_v	25		45 / 32 / 26	2,6E6 / 4,3E5	2,2E5 / 2,5E5
2	9, 10	MP5_A1	Rotation aufwärts	6,2 / 9,4	E	isoax./isokin HS_v	25		11 / 11	1,9E5 / 1,6E5	1,1E5 / 9,6E4
D											
3	1, 2	MP3_A3a	Rotation aufwärts	3,4 / 3,7	E	isoax./isokin HS_v	40	23,5	0	6,9E4 / 2,9E3	2,2E4 / 8,1E3
4	3, 4	MP3_A3a	Rotation aufwärts	3,4 / 3,7	E	isoax./isokin HS_v+15°	40	23,5	0	2,9E4 / 1,9E4	4,6E3 / 5,3E3
5	5, 6	MP3_A3a	Rotation aufwärts	3,4 / 3,7	I	isoax. N_h	--	23,5	0	4,4E4 / 4,7E4	8,6E3 / 9,0E3
6	7	MP3_A3b	Rotation aufwärts	3,4 / 3,7	E	isoax./isokin HS_v+15°	40	23,5	0	6,5E+04	1,5E+04
7	9	MP3_A3b	Rotation aufwärts	3,4 / 3,7	I	isoax. N_h	--	23,5	0	1,10E+05	2,00E+04
C											
8	1, 2	MP1_13m	Aufwärts	2,2 / 2,2	E	isoax./isokin HS_v	27		5,9 / 0	1,1E5 / 1E5	4,3E4 / 3,8E4
9	3, 4	MP1_13m	Aufwärts	2,2 / 2,2	E	isoax./isokin HS_v	27		0 / 0	2,0E5 / 1,2E5	6,1E4 / 4,2E4
10	5, 6	MP1_13m	Aufwärts	2,2 / 2,2	E	isoax./isokin HS_v	27		0 / 0	2,8E5 / 2,4E5	9,9E4 / 9,4E4
11	7	MP2_33m	Aufwärts*	2,2 / 2,2	E	isoax. unterisokinetisch HS_v	27		0 / 0	1,3E5 / 8,5E4	4,3E4 / 3,0E4
B											
12	7	MP3_A3	Aufwärts	1,9 / 1,9	I	N_h	--		0	3,5E+04	1,0E+04
13	8, 9	MP3_A3	Aufwärts	1,9 / 1,9	E	isoax./isokin HS_v	55		15 / 5	4,9E4 / 4,5E4	1,9E4 / 1,7E4
14	10	MP3_A3	Aufwärts	1,9 / 1,9	E	isoax./isokin HS_v	55		5	2,8E+04	8,4E+03
15	11	MP5_A1	Aufwärts	1,9 / 1,9	I	N_h	--		5	2,3E+04	7,8E+03
16	12	MP3_A5	Aufwärts	1,9 / 1,9	I	N_h	--		10	3,2E+04	1,0E+04

U: Mittlere Strömungsgeschwindigkeit (m/s)
 U*: Mittlere Strömungsgeschwindigkeit, nur positive Werte (Ringsströmung bei saugendem Rotor)
 E: Emissionsaufsatz
 I: Immissionsaufsatz
 HS_v: vertikale Hauptströmung
 HS_vvx*: Aus der Vertikalen um x° gekippt, um die tatsächliche Hauptströmungsrichtung zu erfassen
 N_h: Nebenströmungsrichtung, hier: horizontal

A.1.3 Schema: Beprobung der Aerosolphase am Anlagenstandort



B Anhang

B.1 Zum Anhang B gehörig

B.1.1 Zum Anhang B gehörig