



**Holger Ohme, Dirk Heinecke,**  
INWATEC



**Pascal Jahn, Jennifer Becker**  
INWATEC

## Legionellen im Kühlwasser kontinuierlich ermitteln

In-Line Messgerät zur vollautomatisierten Überwachung der hygienischen Wasserqualität in einer Wasserprobe innerhalb weniger Stunden

Ein neu entwickeltes Messgerät kann innerhalb weniger Stunden alle Legionellen Arten in einer Wasserprobe (*Legionella* spp. = species pluralis) bestimmen. Für technische Wassersysteme aus denen Aerosole ausgetragen werden können, bedeutet die Möglichkeit eines zuverlässigen Schnelltests einen entscheidenden Fortschritt.

Die hygienische Notwendigkeit zur Kontrolle der Konzentration an Legionellen, in technischen Wassersystemen aus denen Aerosole ausgetragen werden können, führt zu der Problematik, dass das hierfür anzuwendende Kultivierungsverfahren (ISO 11731-2017) erst mit einer Verzögerung von 7-12 Tagen einen verlässlichen

Befund liefert. Erforderliche Maßnahmen können auf dieser Basis nur stark zeitverzögert erfolgen und kontrolliert werden. Aktuell auf dem Markt verfügbare Schnelltest korrelieren entweder nicht belastbar mit der akkreditierten Kultivierungsmethode oder erfordern (zeit-) aufwendige Aufbereitungsschritte.

Einige Schnelltests liefern hochspezifische Nachweise für einzelne Legionellenarten, jedoch nicht für alle Legionellenarten in einer Wasserprobe (*Legionella* spp. = species pluralis). Das dem neu entwickelten Messgerät INWATROL L.nella+ zu Grunde liegende Verfahren einer Stoffwechselaktivitätsmessung lebender Zellen bestimmt den Parameter *Legionella* spp. zuverlässig innerhalb weniger Stunden aus einer Wasserprobe. Dabei wird das Messgerät direkt an das technische Wassersystem mit automatischem und selbstdesinfizierendem Probeneinzug angeschlossen, einschließlich Selbstdesinfektion des in der Messzelle enthaltenen Wassers nach abgeschlossener Messung. Dies ermöglicht dem Anlagenbetreiber die gefahrlose, kontinuierliche Ermittlung der hygienischen Wasserqualität. Neben der unmittelbaren Erfolgskontrolle durchgeführter Maßnahmen ist auch die bedarfsgerechte Steuerung z.B. von Bioziden möglich.

## 1. Einleitung

Die hygienische Relevanz der Verbreitung pathogener Legionellen über Aerosole aus technischen Wassersystemen wie Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen hat in vielen Ländern zur Erstellung technischer Hygiene-richtlinien geführt. In Deutschland traten 2015 erstmalig mit der VDI 2047 Blatt 2 und 3 allgemein anerkannte Regeln der Technik für die Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen in Kraft. Zusätzlich wird in vielen Ländern die tolerable Konzentration von Legionellen im Kreislaufwasser von betreffenden Anlagen durch den Gesetzgeber

begrenzt. In Deutschland trat hierzu am 19.08.2017 die zwei- und vierzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider – 42. BImSchV) in Kraft, welche zusätzlich Nassabscheider mit einschließt. Grundlage für die Hygienekontrolle bildet bislang in allen Fällen die Bestimmung der Konzentration an Legionellen im Wasser durch Kultivierung gemäß ISO 11731:2017 mit jeweils systemabhängig definierten Schwellenwerten. Bei der Kultivierungsmethode entstehen durch Zellteilung sichtbare und daher auszählbare Kolonien. Im Vergleich zu anderen Bakterienarten teilen sich Legionellen relativ langsam, so dass der Befund der Messung erst nach 7-12 Tagen vorliegt, wobei teilweise weitere Untersuchungen zur Bestätigung verdächtiger Kolonien folgen.

Für den Betreiber einer überwachungs-pflichtigen Anlage bedeutet dies eine stark zeitverzögerte

Kontrolle des Hygienezustands. Die Effektivität ggf. erforderlicher Maßnahmen kann ebenfalls nur mit großer Verzögerung ermittelt werden.

Ergänzende Schnelltests zur Abschätzung der Belastung des Wassers mit Legionellen sind u.a. auf Basis immunologischer Reaktionen (Antikörper), Nachweis genetischen Materials (PCR) oder mittels Farbfluoreszenzmikroskopie verfügbar. Die Grenzen dieser Schnelltests liegen in der lebend/tot Quantifizierung, der Vergleichbarkeit zur Kulturmethode oder in der aufwendigen Probenaufbereitung.

Durch das neu entwickelte und patentierte Automatikmessgerät INWATROL L.nella+ wird die zuverlässige und kontinuierliche Bestimmung des Parameters *Legionella* spp. mit hoher Korrelation zur Kultivierungsmethode gemäß ISO 11731:2017 innerhalb weniger Stunden ohne weitere Aufbereitungsschritte durch den Anwender möglich.



Abb. 1: INWATROL L.nella+ als Wandmontage

## 2. Schnelltest zur vollautomatisierten Bestimmung von *Legionella* spp.

### 2.1 Messprinzip

Der Nachweis stoffwechselaktiver Legionellen erfolgt durch einen unspezifischen enzymatischen Umsatz eines unpolaren Fluoreszeinsäureesters, der ausschließlich über die Zellmembran lebender Zellen in das Zellinnere gelangt und hier zum farbaktiven Fluoreszein umgesetzt wird. Der Anstieg der Fluoreszenz abhängig der Zeit ist direkt proportional zur Lebendzellzahl und wird in koloniebildenden Einheiten pro 100 ml umgerechnet. Durch eine kombinierte Wärme- und pH-Vorbehandlung sowie die im Vergleich zur Kultivierungsmethode hohe Messtemperatur wird die Begleitflora abgetötet. Die Messung erfolgt unverdünnt in einem Probevolumen von ca. 350 ml. Im Vergleich zur Kultivierungsmethode wird die Messung nicht signifikant durch Begleitflora und eine hohe Messgenauigkeit auf Grund einer hohen Verdünnung beeinflusst.

Für kontinuierliche Messungen ist das Messgerät direkt an ein Wassersystem angeschlossen. Eine thermisch selbstdesinfizierende Probeentnahmeleitung stellt sicher, dass in der Zuleitung keine Vermehrung von Legionellen das Messergebnis beeinflusst. Optimalerweise ist der Probeentnahmekahn als Dauerläufer in Betrieb, um Stagnation von Wasser zwischen zwei Messungen ausschließen zu können. Die Messzelle im Gerät wird bei der Befüllung mehrfach gespült. Nach Abschluss des Spülvorgangs beginnt die kombinierte Wärme- und pH-Vorbehandlung. Zusätz-

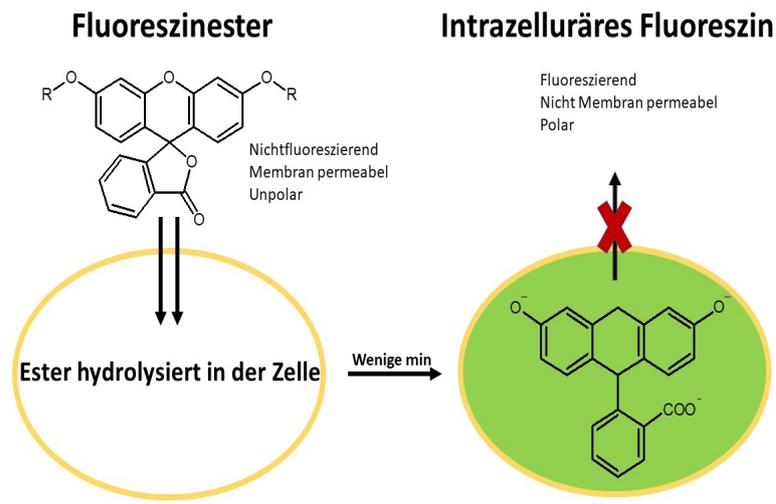


Abb. 2: Messprinzip INWATROL L.nella+

lich erfolgt die automatisierte Dosierung des Inaktivierungsmittels bei Einsatz eines Biozids. Mit Abschluss der Vorbehandlung kühlt die Messzelle auf die Mess-temperatur ab und die Messung beginnt. Vor der erneuten Befüllung des Gerätes für die Folgeuntersuchung wird die Messzelle thermisch desinfiziert. Die Messzelle ist für die nächste Messung bereit. In der Regel ist direkt an der Entnahmestelle vor der Probeentnahmeleitung ein Probeentnahmekahn installiert, über den zum Zeitpunkt des Befüllvorgangs der Messzelle oder zu weiteren beliebigen Zeitpunkten eine mikrobiologische Probenahme z.B. für weitere Validierungsmessungen möglich ist.

### 2.2 Automatisierte Messung manuell aufgebener Proben

Der kontinuierliche Messbetrieb kann für die manuelle Aufgabe weiterer Wasserproben über den Befülltrichter unterbrochen werden. Zur Reinigung, Spülung und Befüllung der Messzelle muss lediglich die Ventilstellung am Gerät geändert werden. Mit abgeschlossener Befüllung wird die Ventilstellung wieder in den Ausgangszustand gebracht und das

Messgerät wechselt mit Abschluss der Messung wieder in den Automatikbetrieb. Das Messverfahren selbst unterscheidet sich nicht vom Automatikbetrieb.

### 2.3 Kultivierung nach ISO 11731:2017/ UBA

Die Kultivierungsmethode verwendet mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Verdünnungs- und Vorbehandlungsstufen (Wärme oder Säure). Ziel ist es dabei sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Legionellen ein auswertbares Ergebnis zu erhalten. Für das Ergebnis wird der Ansatz mit der höchsten Anzahl bestätigter Legionellen Kolonien herangezogen (bei ausreichend hoher Messgenauigkeit/Anzahl an Kolonien). Die Grenzen der Genauigkeit der Kultivierungsmethode liegen v.a. im möglichen Einfluss der Begleitflora, also weiteren Mikroorganismen, welche das Wachstum der Legionellen unterdrücken oder deren Kolonien überwachsen können. Zudem sind Bakterien Partikel in einer Wasserprobe und nicht homogen verteilt. Bei der Entnahme kleiner Volumina aus der Probeflasche kann es daher zu Ungenauigkeiten durch die teilweise hohen Verdünnungs-

faktoren kommen. Bei der Kultivierung werden lebende aber nicht kultivierbare Zellen im sogenannten VBNC Status nicht erfasst. Viele Legionellen aus einem zusammenhängenden Agglomerat, z.B. durch Vermehrung innerhalb einer Amöbe, werden bei der Kultivierung lediglich als eine Kolonie sichtbar und gewertet (vgl. Lindner, Hahn: Mikrobiologische Analysen des Kühlwassers entsprechend der 42. BImSchV, S. 74, VGB PowerTech 9, 2018).

### 3.3 Korrelation des Schnelltests INWATROL L.nella+ mit der Kultivierungsmethode

Die Korrelation des Schnelltests wurde über eine hohe Anzahl an Messungen mit der Kultivierungsprobe gemäß ISO 11731:2017 durchgeführt. Die Durchführung von Probenahme, Probentransport sowie Ansatz und Auswertung der Messergebnisse erfolgten dabei gemäß der geltenden Empfehlung des Bundesumweltamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern (UBA). Validierungsmessungen wurden mit unterschiedlichen akkreditierten Laboren durchgeführt. Um einen belastbaren qualitativen Vergleich zwischen dem Schnelltest und der Kultivierungsmethode zu erhalten, wurden die nachfolgend dargestellten Messung jedoch in nur einem akkreditierten Prüflabor durchgeführt (IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH, D-45476 Mülheim an der Ruhr).

### 4. Diskussion

Die Korrelation zu den im Labor durchgeführten kulturellen Ansät-

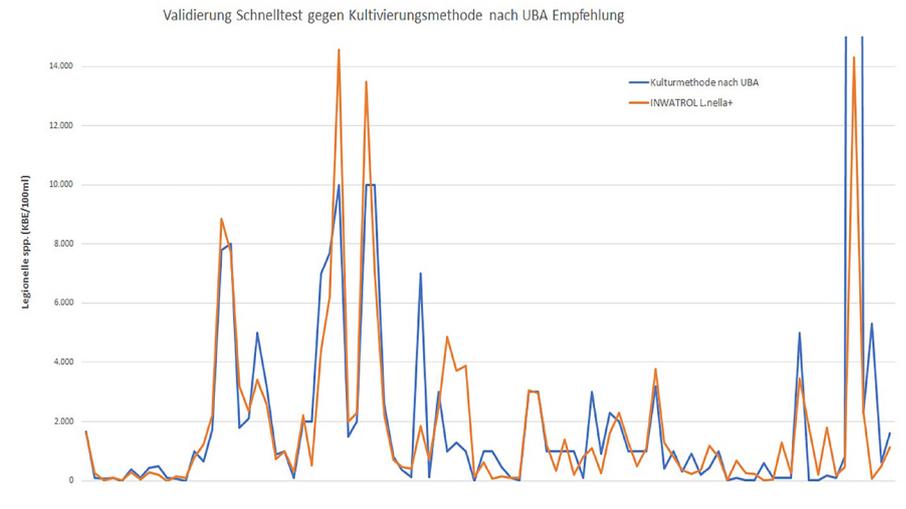


Abb. 6: Validierung Schnelltest gegen Kultivierungsmethode

zen kann insgesamt als sehr hoch gewertet werden. Zwei Geräte zeigten kurzzeitig signifikante Abweichungen zu den Laborergebnissen in Form von Mehrbefunden. Hier wurde der Einfluss von VBNC Zellen auf das Messergebnis des INWATROL L.nella+ Schnelltestes untersucht. Stoffwechselaktivitätsmessungen mittels Fluoreszeindiacetat werden in der Mikrobiologie neben weiteren Methoden (Membran-Integrität, Proteinsynthese (FISH), „intact polar membrane lipid“ Analyse, Zellverlängerung („direct viable count“)) zur Detektion von VBNC Bakterien verwendet. Dies kann für den Betreiber einen zusätzlichen Nutzen darstellen, da es sich bei Rekontaminationen von Wassersystemen mit Legionellen auch um eine „Wiederbelebung“ von VBNC Organismen handeln kann (vgl. Hans-Curt Flemming, Jost Wingender - IWW Zentrum Wasser, Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen). Häufig ist jedoch das Ziel des Betreibers, eine möglichst hohe Korrelation zur gesetzlich verpflichtenden Untersuchung mittels Kultivierung im Labor zu erreichen. Durch die ge-

setzlich verpflichtenden Untersuchung mittels Kultivierung im Labor zu erreichen. Durch die Anpassung der Vorbehandlungsbedingungen (v.a. durch eine Temperaturerhöhung und Verlängerung der Vorbehandlungszeit) kann bei Mehrbefunden durch VBNC Zellen die Korrelation zur Kultivierungsmethode erfolgreich wiederhergestellt werden.

#### Literaturangaben

Zweiundvierzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes- Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider - 42. BImSchV), 12.07.2017

Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern, 06.03.2020

Wasserbeschaffenheit – Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 19458:2006, 12.2006

VDI 2047 Blatt 2 - Rückkühlwerke -Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen (VDI-Kühlturmregeln), 01.2019

Biofilme im Trinkwasser – Schwachpunkt Hausinstallation, Hans-Curt Flemming, Jost Wingender -IWW Zentrum Wasser, Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen