

Bericht der Expertenkommission Legionellen

**Im Auftrag des
Ministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Na-
tur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-
Westfalen**

April 2014 bis April 2015

Stand 22.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Vorbemerkung	5
2	Allgemeines	7
2.1	Legionellen – was sind Legionellen und wo kommen sie natürlich vor	7
2.2	Welche Erkrankungen werden durch Legionellen verursacht	8
2.3	Behandlung und Diagnosesicherung	9
2.4	Infektionsmöglichkeiten mit Legionellen	10
2.5	Legionellenepidemien, Entwicklung von Legionellenerkrankungen auch in Zusammenhang mit Abwasser	10
2.6	Regulierung und Kontrolle relevanter Quellen und Expositionspfade	13
3	Probenahme zur Untersuchung von Legionellen in Umweltproben	14
3.1	Kriterien für qualifizierte Probenahmetechniken und Analytik von Legionellen	14
3.1.1	Anforderungen an Messinstitute	14
3.1.2	Allgemeine Empfehlungen zur Probenahmeplanung/ Durchführung der Probenahme	15
3.2	Luftkeimsammlung	15
4	Laboruntersuchungen auf Legionellen und ergänzende Analysen	16
4.1	Verwendete Verfahren zum kulturellen Nachweis von Legionellen	16
4.2	Alternative Verfahren zum Nachweis von Legionellen	16
4.2.1	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) in Anlehnung an AFNOR T90-471 und T90-431 bzw. ISO/TS 12869	17
4.2.2	Viability PCR (vPCR)	17
4.2.3	FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) als Direktnachweis auf Filtern	18
4.3	Mikroskopische und chemische Analysen	19
4.4	Feintypisierung (Sero- bzw. Genotypisierung) von Legionellen	19
4.5	Ergebnisse Ringversuch LANUV	20
4.6	Ergebnisse Sondermessprogramme Kläranlagen	23
5	Bewertung von Legionellen-Befunden in Gewässern	26
5.1	Allgemeine Überlegungen	26
5.2	Empfehlungen zu technischen Maßnahmenwerten für Gewässer	27
5.2.1	Badegewässer mit aerosolbildenden Attraktionen oder Gewässer mit Aerosolbildung	28

5.2.2	Gewässer mit Entnahmen.....	28
5.2.3	Systeme mit Aerosolbildung aus einem Gewässer mit nachgewiesenem Epidemiestamm im Kontext zu einem Ausbruch	29
5.2.4	Aufhebung von Entnahmeverboten.....	30
6	Risikopotentiale, Bewertung und Kontrolle von Legionellen bei Abwasserbehandlungsanlagen.....	31
6.1	Epidemiologie.....	31
6.2	Qualitative Risikobewertung/ Risikopotentiale.....	31
6.3	Kontrolle	33
6.3.1	Abreicherung von Legionellen in bestehenden Abwasserbehandlungsanlagen	34
6.3.2	Behandlung von Abläufen bestehender Anlagen zur Verminderung von Legionellen.....	35
6.3.3	Vermeidung von Aerosolbelastungen im direkten Umfeld der Abwasserbehandlungsanlagen	35
6.4	Methoden einer weitergehenden quantitativen Risikobewertung	37
7	Zur Reinigung und Desinfektion von Verdunstungskühlanlagen	38
7.1	Einleitung	38
7.2	Rechtliche Grundlagen in Deutschland	40
7.3	Behandlung des Kreislaufwassers und Auswahl von Desinfektionsverfahren	40
7.3.1	Oxidierend wirkende Biozide.....	41
7.3.2	Nicht oxidierend wirkende Biozide	43
7.4	Anwendung	43
7.5	Wasseraufbereitung und Desinfektion bei Probetrieb, Stillstand oder Betriebsunterbrechung	45
7.6	Probenahme von Biozidbehandeltem Wasser	45
7.7	Alternative Behandlungstechniken	46
7.8	Erfahrungen mit Naturzugkühltürmen.....	46
8	Zusammenfassung und Empfehlungen.....	48
9	Literatur.....	53
Anhang I: Details zu Probenahmen basierend auf einem Konzeptpapier des LANUV (SELENT 2015).....		
AI.I.	Probenahmeplanung	55

AI.II.	Anforderungen an Messinstitute und Sachkunde des Probenahme- personals	55
AI.III.	Probenahmestellen	56
AI.IV.	Probenahmegeräte und Probenbehälter	57
	Verwendete Materialien	57
	Sterilisation der Probenahmegeräte	58
	Probenbehälter	59
	Inaktivierung von Desinfektionsmitteln	59
AI.V.	Probenahmen	59
	Allgemein	59
	Automatische Probenahmegeräte	60
	Probenahme aus Oberflächengewässern	60
	Probenahme von Abwasser	61
	Probenahme aus Abwasserleitungen, Kanälen und Kanalschächten	62
	Probenahme aus Kühlsystemen	62
	Probenahme aus Entnahmearmaturen	64
	Probenahme von Belebtschlamm	64
	Probenahme von Biofilmen	65
	Probenahme von Sedimenten	65
AI.VI.	Vor-Ort-Untersuchungen	66
AI.VII.	Probenbeschriftung und Probenahmeprotokoll	66
AI.VIII.	Probenkonservierung, Transport und Lagerung	67
AI.IX.	Arbeitsschutz- und Arbeitssicherheit	67
AI.X.	Literatur zu Anhang I	67
Anhang II: Details zum kulturellen Nachweis von Legionellen basierend auf einem Konzeptpapier des LANUV (SELKE 2015)		69
AI.I.	Ankunft der Probe im Labor	69
AI.II.	Kulturverfahren zum Nachweis von Legionellen in verschiedenen Matrices	69
AI.III.	Angabe Endergebnis Legionellenbestimmung	74
AI.IV.	Serotypisierung	75
AI.V.	Mindestanforderung an die Dokumentation der kulturellen Untersuchung auf Legionellen	75

Anhang III – Details zu Kapitel 3.2 Luftkeimsammlung	76
AIII.I. Luftkeimsammlung nach UFOPLAN-Projekt	76
Anhang IV – Details zu Kapitel 4.2.1 Quantitative Polymerase-Ketten-reaktion (qPCR) und zu Kapitel 4.2.2 Viability PCR (vPCR)	77
AIV.I. Details zur quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	77
AIV.II. DNA-Extraktion mittels des Bio-Rad Aquadien™-Kit für Kühlwasser- und Aerosolproben	78
AIV.III. DNA-Aufreinigung aus Belebtschlamm- und Abwasserproben mit dem QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit	79
AIV.IV. Details zur Viability PCR (vPCR)	81
Anhang V: Abbildungen zu Kapitel 7 Zur Reinigung und Desinfektion von Verdunstungskühlanlagen	83

1 Vorbemerkung

Der Legionellose-Ausbruch in Warstein, mit 159 schwer verlaufenden Legionellose-Erkrankungen und zwei Todesfällen, war der bislang größte Legionellose-Ausbruch in Deutschland. Die in der Folge durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass Kläranlagen eine potentielle Vermehrungsquelle von Legionellen darstellen können.

In den Fluss Wäster (im Unterlauf Wester genannt) waren über die kommunale Kläranlage mit Legionellen hochbelastete Abwässer, einschließlich des Epidemiestammes, eingeleitet worden. Das so belastete Flusswasser der Wäster war ohne Aufbereitung für den Betrieb eines Rückkühlwerkes (Verdunstungskühlanlage) verwendet worden.

Durch eine sehr aufwändige Behandlung des Abwassers vor Einleitung in die Wäster ist es gelungen, die Legionellen Belastung der Wäster wieder vollständig unter Kontrolle zu bringen. Neben der Regulierung des Betriebs von Verdunstungskühlanlagen war die Kontrolle der Abwasserbelastung und der Abwasserkanalisation einer der entscheidenden Gründe, dass das Risiko eines erneuten Legionellose-Ausbruchs vollständig unter Kontrolle gebracht werden konnte. Trotz intensiver Überwachung der Gewässer und der während des Ausbruchsgeschehens kontaminierten Anlagen, konnte in der Folgezeit keine erhöhte Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen pro betrachteter Zeitspanne pro Anzahl betrachteter Individuen) von Legionellenerkrankungen in Warstein und Umgebung, insbesondere mit dem Epidemiestamm, mehr festgestellt werden. Dies spricht für die Effizienz der getroffenen Maßnahmen.

Die Relevanz Legionellen belasteter Abwässer war für die Fachwelt neu und hat daher bisher keinen Eingang in die internationale Risikoregulierung der Behandlung von Abwässern gefunden.

In der Folge mussten fachliche Bewertungen zur Sicherung der öffentlichen Gesundheit vorgenommen und zahlreiche Fragestellungen erstmalig beantwortet werden. Zu diesem Zweck wurde eine vom Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MKULNV) einberufene Experten-Kommission eingerichtet.

Zu den Aufgaben der Kommission gehörten im Wesentlichen:

- Die Erarbeitung von Empfehlungen für eine einheitliche Probenahme und Analytik von Legionellen im Abwasser, in Gewässern und im Umfeld von Kläranlagen (ggf. Luftmessungen).
- Die Bewertung von Legionellenbefunden in Gewässern.
- Die Bewertung von Legionellenbefunden in kommunalen und industriellen Kläranlagen.
- Die Erarbeitung von Empfehlungen zur Selbstüberwachung für kommunale und industrielle Kläranlagen.

- Die Analyse der vorliegenden Untersuchungsergebnisse.

Weitere Fragen sollten beantwortet werden:

- Gibt es eine für Legionellen besonders wachstumsfördernde Abwasserzusammensetzung?
- Sind in diesen Fällen besondere Vorsorgemaßnahmen und konstruktive Vorgaben erforderlich?
- Sind Desinfektionsmaßnahmen notwendig und wenn ja, welche?
- Sind persönliche Schutzmaßnahmen für die Beschäftigten zu fordern?
- Müssen Legionellenuntersuchungen (Selbstüberwachung) in Fließgewässern vorgenommen werden?
- Zu welchem Zeitpunkt können ausgesprochene Wasserentnahmeverbote wieder aufgehoben werden?
- Wie können Legionellen aus einem biologischen System (biologische Kläranlage) wieder entfernt werden?

Die Expertenkommission setzt sich wie folgt in alphabetischer Reihenfolge zusammen:

Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Exner (Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universität Bonn)

Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Hartemann (Universität Nancy, Frankreich; Vorsitzender)

Frau Prof. Dr. med. Herr (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit)

Herr Dr. med. Lück (Konsiliarlaboratorium für Legionellen TU Dresden)

Herr Prof. Dr.-Ing. Rosenwinkel (Leibniz Universität Hannover)

Frau Selke (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, LANUV)

Herr Dr. rer. nat. Strathmann (IWW Zentrum Wasser)

Frau Dr. rer. nat. Szewzyk (Umweltbundesamt)

Die Geschäftsführung der Expertenkommission erfolgte durch Mitarbeiter des LANUV, Frau Dericks und Herrn Oesterbeck.

Seitens des Umweltministeriums NRW waren Herr Dr. Mertsch, Frau Uebelgünn und Frau Wiedenhöft in der Expertenkommission vertreten.

2 Allgemeines

2.1 Legionellen – was sind Legionellen und wo kommen sie natürlich vor

Legionellen (*Legionella*) sind eine Gattung gramnegativer, stäbchenförmiger Bakterien. Sie kommen natürlicherweise in geringen Konzentrationen in Oberflächenwässern, in Grundwasser und auch im Boden vor. Legionellen treten bevorzugt im Süßwasser auf, wurden aber auch in Meerwasser nachgewiesen.

Bisher wurden über 50 Legionellenarten mit mehr als 80 Serogruppen beschrieben, von denen mindestens 17 Arten mit ca. 30 Serogruppen bei Erkrankungen (siehe Kapitel 2.2) nachgewiesen wurden. Die Mehrzahl der Erkrankungen wird in unseren Breiten durch *Legionella pneumophila* Serogruppe (Sg) 1 verursacht.

Innerhalb dieser Serogruppe lassen sich 10 monoklonale Subtypen unterscheiden. Stämme, die mit dem monoklonalen Antikörper (MAb) 3–1 reagieren, werden signifikant häufiger bei erkrankten Personen gefunden. Diese Stämme besitzen offensichtlich ein hohes Virulenzpotenzial; die molekularen Grundlagen dazu sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Legionellen wachsen bevorzugt in einem Temperaturbereich von 25-45 °C. Bis zu Temperaturen von etwa 20 °C vermehren sich Legionellen nur sehr langsam. Erst über 20 °C steigt die Vermehrungsrate allmählich an und ist etwa zwischen 30 °C und 43 °C optimal. Ab etwa 50 °C erfolgt kaum noch Vermehrung und bei etwa 55 °C ist diese nicht mehr möglich und es kommt langsam zum Absterben. Eine raschere Abtötung findet erst oberhalb von 60 °C statt.

Vermehrungsorte für Legionellen sind Wuchsbeläge oder Biofilme an Oberflächen, die bevorzugt gebildet werden, wenn große Oberflächen vorhanden sind, wie z. B. in Filtern oder in zusätzlichen Ablagerungen durch Kalkausfällung, Schlämme oder Korrosionsprodukte. Diese Biofilme stellen ein "Ökosystem" dar, in dem auch Einzeller wie Amöben vorkommen, die sich wiederum von den dort vorhandenen Mikroorganismen ernähren. Auch Legionellen werden von Amöben gefressen, im Innern der Amöbe jedoch nicht verdaut, sondern können sich dort sogar vermehren und damit anreichern. Insbesondere in Amöbencysten (den Dauerformen der Amöben), sind Legionellen vor allen gängigen Desinfektionsmaßnahmen mit Ausnahme von Erhitzen geschützt.

Legionellen werden als natürlich vorkommende Wasserbakterien in geringen Konzentrationen in technische Systeme eingetragen und können sich dort unter günstigen Bedingungen vermehren. Zu Erkrankungen kommt es, wenn legionellenhaltige Aerosole von empfänglichen Personen eingeatmet werden. Diese Voraussetzungen sind beispielsweise in Warmwasserverteilungsanlagen (Duschen, Warmwasserhähne u. a.), Whirlpools, Schwimmbädern, Luftwäschern in Klimaanlage und Verdunstungskühlanlagen gegeben (siehe Kapitel 2.4).

Der kulturelle Nachweis von Legionellen in einer Wasserprobe ist Voraussetzung um den Ursprung einer Infektion aufzudecken. Durch die Serotypisierung und weitergehende molekulare Feintypisierung können die verschiedenen Legionellentypen aus der Umwelt identifiziert, charakterisiert und mit denjenigen verglichen werden, die aus Probenmaterial von Patienten isoliert wurden.

Die Typisierung dient dazu einen klonalen Zusammenhang zwischen verschiedenen Isolaten festzustellen oder auszuschließen. Sie erlaubt, die Verteilung der Bakterienstämme von der lokalen bis zur internationalen Ebene zu analysieren und über die Zeit zu verfolgen. Zwei Arten von Typisierungen von kultivierten Isolaten werden unterschieden: Die phänotypischen Methoden wie z. B. die Serotypisierung (Einsatz von spezifischen Antikörpern) verwenden immunologische Charakteristiken der Isolate. Die genotypischen Methoden der molekularen Typisierung basieren auf den unterschiedlichen Mustern der Nukleinsäuren des Genoms der Bakterien.

Da Legionellen bei der kulturellen Anzucht auch unter Optimalbedingungen vergleichsweise langsam wachsen, kann die detaillierte Analyse 6-14 Tage in Anspruch nehmen. Eine gute Reproduzierbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen Laboratorien ist nur möglich, wenn die Bedingungen für die Probenahme und Analyse standardisiert und strikt eingehalten werden (siehe Kapitel 3 und 4 bzw. Anhang I und II), sowie Referenzstämme für die Standardisierung verwendet werden.

2.2 Welche Erkrankungen werden durch Legionellen verursacht

Legionellen können zwei unterschiedliche Erkrankungen (Legionellosen) hervorrufen.

Zum einen eine leicht verlaufende grippeähnliche Erkrankung, das sog. Pontiac-Fieber. Hierbei kommt es ein bis zwei Tage nach der Ansteckung zu Muskelschmerzen und Fieber, aber ohne Lungenentzündung. Die Erkrankung heilt in der Regel ohne Behandlung aus.

Zum anderen die Legionärskrankheit, die grippeähnlich beginnt und innerhalb weniger Stunden zu schweren Lungenentzündungen führt, gelegentlich mit Bauchschmerzen, Durchfällen und Benommenheit. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis zehn Tage. Die Letalität (Verhältnis der Todesfälle zur Anzahl der Erkrankten) wird auf 5-10 % geschätzt.

Die Legionärskrankheit wird in unseren Breiten meist von *Legionella pneumophila* verursacht. Von dieser Legionellen-Spezies gibt es 16 verschiedene Serogruppen. Die Serogruppe 1 ist dabei die für die Infektion des Menschen bedeutsamste; sie verursacht etwa 80 % aller Fälle von Legionärskrankheit.

Circa 20 % der Fälle werden jedoch von anderen Serogruppen oder von anderen Legionellen-Spezies hervorgerufen. Das ist deswegen von Bedeutung, weil viele La-

bortests nur Serogruppe 1 erkennen können. Legionellosen von anderen Sero-
gruppen werden daher von diesen Tests nicht erkannt und bleiben unentdeckt.

Erstmalig identifiziert wurde das Bakterium 1976 als es in Philadelphia in den USA zu einer Epidemie kam. Dabei erkrankten 182 von mehr als 4.000 Teilnehmern der American Legion akut an einer schweren Pneumonie (Lungenentzündung), die daher den Namen Legionärskrankheit erhielt. Dieser Vorfall führte zu einer intensiven Suche nach der damals noch unbekannten Ursache. Schließlich konnte als Erreger ein Bakterium, *Legionella pneumophila* genannt, identifiziert werden.

Zu durch Legionellen verursachten Erkrankungen war es allerdings bereits früher gekommen, die jedoch damals nicht diagnostiziert wurden, da geeignete Selektivnährmedien bzw. andere Untersuchungsmethoden noch nicht zur Verfügung standen. Bestätigt wurde dies durch die Untersuchung älterer, eingefrorener Lungenbiopsie-Proben von Patienten mit Lungenentzündung.

2.3 Behandlung und Diagnosesicherung

Zur Diagnose einer Legionelleninfektion beim Menschen stehen drei Methoden zur Verfügung.

Zum einen kann eine Anzucht von Legionellen auf Spezial-Medien erfolgen. Zur Anzucht geeignet sind Proben aus den Atemwegen, wie z. B. bronchoalveoläre Lavage, Trachealsekret, Sputum oder Lungengewebe. Diese Methode hat den Vorteil, dass Patientenisolat gewonnen werden, die im Ausbruchsfall, zur Ermittlung der Infektionsquelle, mit Umweltisolaten verglichen werden können.

Eine Infektion kann auch durch Untersuchung des Patientenurins auf Legionellenbestandteile festgestellt werden (Legionella-Antigen-ELISA-Test). Allerdings wird damit nur *Legionella pneumophila* Sg 1 mit ausreichender Empfindlichkeit erfasst.

Die dritte wichtige diagnostische Methode basiert auf dem Nachweis der *Legionella*-DNA in klinischen Proben. Da Menschen nicht mit Legionellen kolonisiert sind, ist bei gesunden Menschen kein *Legionella*-DNA-Nachweis möglich. Daher besitzt die Methode eine sehr hohe Spezifität.

Die Bestimmung von Antikörpern aus dem Serum der Patienten ist möglich. Hierzu sind zwei Serumsproben (aus der akuten Krankheitsphase und 3-6 Wochen später entnommen) zu untersuchen. Zeigt sich ein signifikanter Unterschied in beiden Proben, ist die Diagnose gesichert. Ebenso kann ein zeitlicher Zusammenhang mit einer Exposition hergestellt werden. Der einmalige Nachweis von Antikörpern in Patientenserum, lässt nur den Schluss zu, dass eine Exposition gegenüber Legionellen vorlag. Der Zeitpunkt ist jedoch nicht bestimmbar. Ebenso kann keine Aussage erfolgen, ob die Antikörper infolge einer schweren, leichten oder subklinischen Infektion ohne Symptome gebildet wurden.

Zur Therapie einer *Legionella*-Infektion kommen nur Antibiotika infrage, die eine hohe intrazelluläre Aktivität besitzen. Dies sind Antibiotika aus der Gruppe der Makrolide (Erythromycine) und Gyrasehemmer (Levofloxacin, Ciprofloxacin). Der schnelle Einsatz dieser wirksamen Mittel hilft bei Epidemien die Letalität signifikant zu senken.

2.4 Infektionsmöglichkeiten mit Legionellen

Als Hauptinfektionsweg ist das Einatmen erregerrhaltiger, lungengängiger Aerosole aus dem Warmwasserbereich anzusehen. Somit stellen insbesondere Duschen, aber auch Aerosole am Wasserhahn Gefahrenquellen dar. Weiterhin gewinnen Legionellen als Krankheitserreger auch im direkten Schwimmbeckenbereich zunehmend an Bedeutung. Ebenso ist eine Legionellenübertragung über Aerosole von Verdunstungskühlanlagen und Klimaanlage möglich.

Risikogruppen sind ältere Menschen, Raucher sowie Menschen mit geschwächtem Immunsystem wie beispielsweise Diabetiker. Männer erkranken im allgemeinen mehr als doppelt so häufig wie Frauen. Als Ursache trägt sicher bei, dass Männer im höheren Alter häufig gleichzeitig auch Raucher sind. Viele Faktoren sind aber noch unverstanden. Kinder sind nur sehr selten betroffen.

Eine Übertragung von Mensch zu Mensch findet nicht statt. Wundinfektionen sind äußerst selten und normales Essen und Trinken spielt als Infektionsweg keine Rolle. Lediglich wenn dabei erregerrhaltiges Wasser aus Versehen in die Luftröhre gelangt (Aspiration), können Infektionen entstehen.

Eine Aussage zur Korrelation zwischen der Anzahl an Legionellen in der Luft und dem Infektionsrisiko kann derzeit nicht gegeben werden. Aus Tierexperimenten weiß man, dass die Infektiosität (Ansteckungsfähigkeit eines Krankheitserregers) einzelner Stämme um den Faktor 1.000 schwanken kann. Die individuelle Gefährlichkeit einzelner *Legionella*-Isolate lässt sich derzeit nicht bestimmen. Es ist davon auszugehen, dass mit zunehmender Konzentration an Legionellen im Wasser das Risiko einer Infektion steigt, wenn Legionellen über Aerosole verbreitet werden. Es gibt außerdem Hinweise, dass bereits wenige inhalierte legionellenhaltige Amöbenvesikel eine Infektion hervorrufen können (VDI 4250 Blatt 2).

2.5 Legionellenepidemien, Entwicklung von Legionellenerkrankungen auch in Zusammenhang mit Abwasser

Die epidemiologische Überwachung der Legionellose hat sich in den letzten Jahren verbessert, vor allem dank der vermehrten Sensibilisierung der behandelnden Ärzteschaft und der Möglichkeit die Legionellose mit einem einfachen und nicht-invasiven Test (Nachweis des löslichen Antigens im Urin) nachzuweisen. Jährlich werden dem Robert Koch-Institut (RKI) 600-900 Fälle gemeldet. Seit Beginn der Meldepflicht im

Jahr 2001 lässt sich ein steigender Trend bei der Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen pro betrachteter Zeitspanne und Anzahl betrachteter Individuen) der Legionärskrankheit beobachten (s. Abb. 1).

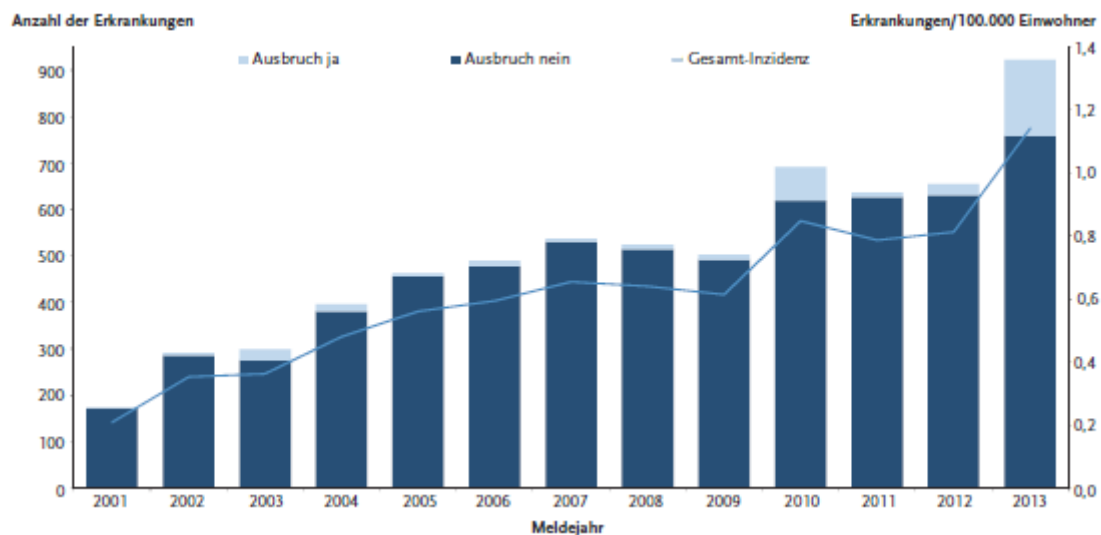


Abb.1: Inzidenz und Anzahl der an das RKI übermittelten Fälle von Legionärskrankheit nach Meldejahr, Deutschland, 2001 bis 2013. Die Zahl der mit Ausbrüchen assoziierten Fälle, wie Ulm/Neu-Ulm und Warstein, sind gesondert ausgewiesen (hellblaue Säulenbereiche). (Quelle: RKI Epidemiologisches Bulletins 2015/Nr. 13).

Das europäische Netzwerk (ELDSNet, Stockholm) erfasst die Erkrankungen in 35 europäischen Ländern mit einer Bevölkerung von 563 Millionen. Die gesamte Inzidenz lag 2013 bei 1,1 offiziell gemeldeten Fällen pro 100.000 Einwohner mit einer Letalität von 4-66 %. Damit wurden etwa 6.000 Infektionen erfasst.

Trotzdem bleibt die Legionellose eine zu selten diagnostizierte und unvollständig gemeldete Krankheit. Darum ist es in den meisten Ländern schwierig, die Morbidität (Krankheitshäufigkeit bezogen auf eine bestimmte Bevölkerungsgruppe) und Mortalität (Anzahl der Todesfälle an einer Krankheit, bezogen auf die Gesamtzahl der Bevölkerung in einem bestimmten Zeitraum) genau zu beziffern. Das klinische Bild allein lässt keine Rückschlüsse auf den ursächlichen Erreger zu, daher kann die Legionellen-Pneumonie nur durch eine spezifische mikrobiologische Erregerdiagnostik festgestellt werden. Jedoch wird zu selten eine Labordiagnostik auf Legionellen durch den behandelnden Arzt veranlasst, so dass nur wenige Pneumonien als Legionärskrankheit identifiziert und gemeldet werden. Aus diesem Grund ist es trotz Meldepflicht schwierig, verlässliche Zahlen zur tatsächlichen Erkrankungshäufigkeit zu erhalten. Nach Schätzungen des Kompetenznetzwerkes für ambulant erworbene Pneumonien (CAPNETZ) in Deutschland geht man von etwa 15.000 bis 30.000 Fäl-

len von Legionärskrankheit pro Jahr für Deutschland aus. Internationale Studien haben gezeigt, dass die Situation in anderen entwickelten Industrieländern ähnlich ist.

Weltweit konnten zahlreiche kleinere Ausbrüche mit schweren Lungenentzündungen und Todesfällen als "Legionärskrankheit" bestätigt werden. Drei größere Vorfälle ereigneten sich 1999 in Bovenkarspel in Holland, wo es anlässlich einer Blumenschau durch zwei Whirlpools zu 233 Erkrankungen mit 22 Todesfällen kam, sowie 2001 in Murcia in Spanien mit 805 Erkrankungen und 3 Todesfällen und 2014 in Portugal mit 334 Fällen und 10 Todesfällen über Verdunstungskühlanlagen.

In Deutschland wurden bisher drei größere Ausbrüche bekannt. Im Jahr 2010 gab es in Ulm/Neu-Ulm, mit 64 Infizierten und fünf Todesfällen, den ersten größeren Legionellose-Ausbruch in Deutschland. Die Behörden ermittelten als Verursachungsquelle die Verdunstungskühlanlage auf einem Bürogebäude. Der zweite Ausbruch ereignete sich im August/September 2013 in Warstein mit 159 Erkrankungen und zwei Todesfällen. Ausbruchsquelle war auch hier eine (oder mehrere) Verdunstungskühlanlage(n). Die Besonderheit beim Ausbruch in Warstein war, dass bereits das Rohwasser der Anlage (Wasser des Flusses Wester; im Oberlauf Wäster genannt) hohe Konzentrationen an Legionellen enthielt. Der Fluss war durch die Einleitung von Abwasser mit hohen Konzentrationen an Legionellen kontaminiert worden.

Auch bei einem Ausbruch in Pas-de-Calais 2003/2004 war ein Abwasserteich beteiligt. Nach Schließung, Reinigung und Desinfektion einer für den Ausbruch ursächlichen Verdunstungskühlanlage, kam es dort nach Wiederinbetriebnahme der Anlage zu einer erneuten Erkrankungswelle. Grund für das Wiederauftreten von Erkrankungen war vermutlich der auf dem Firmengelände befindliche Abwasserteich, welcher eine hohe Legionellen-Kontamination mit demselben Epidemiestamm aufwies. Die Verdunstungskühlanlage wurde wahrscheinlich durch eine Verdriftung der Legionellen in Aerosolen aus dem Abwasserteich rekontaminiert.

Legionellen-Pneumonien durch Aerosole aus Kläranlagen direkt (d. h. nicht über das „Animpfen“ von Verdunstungskühlanlagen) sind bisher nur bei Arbeiten im nahen Umfeld von Belebungsbecken mit hohen Legionellenkonzentrationen beschrieben worden (zwei Fälle in Finnland und ein Fall in Schweden bei papierverarbeitenden Industrien).

Der dritte größere Ausbruch in Deutschland ereignete sich 2014 in Jülich mit 39 Erkrankten. Trotz intensiver Suche konnte die Infektionsquelle nicht eindeutig identifiziert werden. In einem als Infektionsquelle verdächtigten Naturzugkühlturm wurden zwar erhöhte Legionellenkonzentrationen gemessen. Der Epidemiestamm, ein seltener *Legionella pneumophila* Serogruppe 5 Stamm, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

2.6 Regulierung und Kontrolle relevanter Quellen und Expositionspfade

Einzelne Fälle von Legionellosen in Krankenhäusern, Hotels, Altenheimen und ähnlichen Gebäuden treten in Deutschland regelmäßig auf. Es wird vermutet, dass die Übertragung durch Aerosole beim Duschen oder an Waschbecken erfolgt. Daher wurden bereits frühzeitig Empfehlungen erarbeitet, um beim Bau und Betrieb von Trinkwasserverteilungsanlagen das Wachstum von Legionellen zu minimieren (z. B. DVGW Merkblatt W 551). Außerdem wurde in die Trinkwasserverordnung die Pflicht zur regelmäßigen Untersuchung auf Legionellen aufgenommen. Als technischer Maßnahmenwert wurde eine Konzentration von 100 KBE/100 ml (KBE: koloniebildende Einheit) festgelegt. Wird diese Konzentration überschritten, gibt es Empfehlungen für abgestufte Maßnahmen.

Auch in Schwimm- und Badebecken mit warmem Wasser und Aerosolbildung (z. B. Whirlpools) kann es zur Übertragung von Legionellen kommen. In der DIN 19643-1 mit allgemeinen Anforderungen zur Aufbereitung von Schwimm- und Badebecken wird daher für Becken mit Temperaturen von $\geq 23\text{ °C}$ und Aerosolbildung ein technischer Maßnahmenwert für Legionellen von 1 KBE/100 ml festgelegt. Bei Überschreitung werden gestaffelte Maßnahmen empfohlen.

Für die Probenahme und die Nachweisverfahren zur Untersuchung von Trinkwasser sowie Schwimm- und Badebeckenwasser gibt es detaillierte Empfehlungen u. a. des Umweltbundesamtes, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Für den Betrieb von Verdunstungskühlanlagen existieren bisher nur technische Empfehlungen, die für die Betreiber nicht gesetzlich bindend sind. Bereits vor dem Ausbruch in Ulm/Neu-Ulm wurde z. B. die VDI-Richtlinie 6022 für raumluftechnische Anlagen und ein Merkblatt des Verbandes Deutscher Maschinen- und Anlagenbau e.V. (VDMA 2004) zum Betrieb und zur Wartung von Verdunstungskühlanlagen erarbeitet. Seit Januar 2015 liegt die neue VDI-Richtlinie 2047 Blatt 2 zum hygienischen Betrieb von Verdunstungskühlanlagen vor, mit deren Erarbeitung nach der Legionellenepidemie 2010 in Ulm/Neu-Ulm begonnen wurde. Darin werden Empfehlungen zu Errichtung und Betrieb von Verdunstungskühlanlagen gegeben und Untersuchungen des Kreislaufwassers zumindest vierteljährlich empfohlen. Als technischer Maßnahmenwert für die Konzentration von Legionellen im Kühlwasser wird eine Konzentration von 100 KBE/100 ml festgelegt. Für Konzentrationen ≥ 100 KBE/100 ml werden gestaffelte Maßnahmen beschrieben. Die Richtlinie beschäftigt sich nicht mit Naturzugkühltürmen ab 200 MW thermischer Leistung. Für diese soll eine weitere VDI Richtlinie erarbeitet werden.

Während einige andere Länder nach Epidemien gesetzliche Regelungen zur Vermeidung der Verbreitung von Legionellen über Verdunstungskühlanlagen geschaffen haben, ist dies in Deutschland nach dem Ausbruch in Ulm/Neu-Ulm 2010 nicht geschehen. Nach der Epidemie 2013 in Warstein hat sich die Landesregierung NRW deshalb mit einer Initiative im Bundesrat für eine gesetzliche Regelung eingesetzt (vgl. BRat Drs. 795/13 Beschluss vom 14.02.14). Eine entsprechende Verordnung

nach dem Bundes-Immissionsschutzgesetz (BImSchG) wird derzeit vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit (BMUB) unter Beteiligung der Bundesländer und der Verbände erarbeitet. Darin sollen u. a. konkrete Wartungs- und Messverpflichtungen für die Betreiber von Verdunstungskühlanlagen inkl. Naturzugkühltürmen festgelegt werden. Außerdem soll die Einrichtung eines Anlagenkatasters gefordert werden, das im Epidemiefall die Quellensuche vereinfachen und beschleunigen soll. Die Anforderungen sollen sich an den Vorgaben der VDI 2047 Blatt 2 orientieren.

Für Abwasser und Oberflächenwasser existieren bisher weder technischen Regeln noch rechtliche Vorgaben zur Minimierung des Risikos einer Legionelleninfektion. Der Bericht stellt dazu erste Empfehlungen vor (siehe Kapitel 5 und 6).

Eine wichtige Grundlage für die Bewertung von Untersuchungsergebnissen ist auch im Bereich Abwasser- und Kühlwasseruntersuchung eine einheitliche Probenahmestrategie und ein standardisiertes Nachweisverfahren (siehe Kapitel 3 und 4 bzw. Anhang I und II).

3 Probenahme zur Untersuchung von Legionellen in Umweltproben

Im nachfolgenden Kapitel wird zwischen den Probenahmetechniken für in wässrigen Matrices vorliegenden Legionellen und solchen zur Sammlung von luftgetragenen Mikroorganismen unterschieden.

Im Rahmen der amtlich durchgeführten Beprobungen während der Untersuchung der Legionellose-Ausbrüche in Warstein 2013 und Jülich 2014 lag der Focus der Probenahmen auf Oberflächenwasserproben, Abwasser, Kühlwasser, sowie vereinzelt in Biofilmen, Sedimenten und Belebtschlammproben.

3.1 Kriterien für qualifizierte Probenahmetechniken und Analytik von Legionellen

Im Folgenden sind die allgemeinen Kriterien zur Orientierung bei der Auswahl von Probenahme-Instituten und Untersuchungsstellen genannt, die dazu beitragen können Kommunikationswege und Arbeitsschritte zwischen den einzelnen Projektpartnern zu harmonisieren.

3.1.1 Anforderungen an Messinstitute

Um eine vergleichbare Güte der Probenahmen zu gewährleisten, sollte bei Probenahmen ein Sachkundenachweis der eingesetzten Probenehmer, durch Vorlage eines Zertifikates mit Angaben der Schulungsinhalte bzgl. Kenntnis bakteriologischer Probenahmen (basierend auf DIN EN ISO 19458) und Probenahmetechniken für die

zu beprobenden Matrices, gefordert werden (ausführliche Kommentierung siehe Abschnitt AI.II).

Die zu beauftragenden Labore sollten mindestens Erfahrungen mit der Untersuchung von Trinkwässern auf Legionellen vorweisen. Dies kann beispielsweise durch Zertifizierung nach § 15.4 TrinkwV inkl. Untersuchung auf *Legionella* spp. als akkreditierter Parameter und erfolgreicher Teilnahme an zukünftig durchzuführenden Legionellen-Ringversuchen des LANUV NRW für die Matrices Abwasser/ Oberflächenwasser/ Kühlwasser gewährleistet werden. Nachweisbare Erfahrungen mit (Ab-)Wasseruntersuchungen auf Legionellen sind wünschenswert.

3.1.2 Allgemeine Empfehlungen zur Probenahmeplanung/ Durchführung der Probenahme

Lage und Anzahl der zu beprobenden Messstellen, Details der geforderten Dokumentation, sowie die für die jeweilige Messstelle zu verwendende Probenahmeart, Beprobungsfrequenz und die Anzahl der zu nehmenden Proben, obliegen dem jeweiligen Auftraggeber. Weitere Details sind mit ihm abzusprechen.

Ausführliche Erläuterungen zur Planung eines Probenahmeprogramms, zur Vorgehensweise bei Probenahmen für mikrobiologische Analysen und für den Transport, die Handhabung und die Lagerung von Proben bis zum Beginn der Untersuchung sind im Anhang in Abschnitt AI.I bis AI.VIII aufgeführt.

3.2 Luftkeimsammlung

Für die hygienisch-mikrobiologische Überwachung von z. B. Rückkühlwerken werden bisher nur Anforderungen an Legionellen im Wasser gestellt, da es bislang kein standardisiertes Nachweisverfahren für Legionellen in der Luft gibt. Dies ist unbefriedigend, da die Situation im Wasser nicht notwendigerweise die Situation im Biofilm und in der Abluft der Anlagen widerspiegelt. Insbesondere in einer Ausbruchssituation ist ein geeignetes und sensitives Nachweisverfahren für Legionellen in der Luft notwendig, um die Ausbreitung legionellenhaltiger Aerosole zu untersuchen und ggf. Quellen zu lokalisieren.

In einem UFOPLAN-Forschungsvorhaben sollte daher ein sensitives Nachweisverfahren erarbeitet werden, mit dem man Legionellen in der Umgebungsluft (Immissionsmessungen) von Rückkühlwerken nachweisen kann. Die bislang verwendeten Verfahren sind dazu nicht geeignet bzw. nicht hinreichend validiert und standardisiert. Im Ausbruchsfall soll mit dem zu entwickelnden Verfahren schnell das Ausmaß der Gefährdung festgestellt werden. Außerdem sollte untersucht werden, wie Legionellen aus Biofilmen in Rückkühlwerken in die Luft gelangen und wie lange die Legi-

onellen dort unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit) überleben können.

Eine Darstellung des Projektergebnisses finden Sie im Anhang in Abschnitt AIII.I.

4 Laboruntersuchungen auf Legionellen und ergänzende Analysen

4.1 Verwendete Verfahren zum kulturellen Nachweis von Legionellen

Entgegen vielfacher Auffassung gestattet die Legionellenbestimmung mittels Kulturverfahren nach ISO 11731:1998 nicht nur die Untersuchung von Trinkwasserproben, sondern ist gemäß „Scope“ (Anwendungsbereich) ebenfalls auf die Untersuchung von Umweltproben, wie beispielsweise Oberflächenwasserproben, Abwasser, Kühlwasser-Proben, Sedimenten, Biofilmen etc. anzuwenden. Die

- ISO 11731:1998 Water quality – Determination of *Legionella*

und die aus ihr entstandenen weiteren Normen:

- ISO 11731-2: 2004 Water quality – Determination and enumeration of *Legionella* Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts
- DIN EN ISO 11731-2: 2008-06 Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Legionellen –Teil 2: Direktes Membranfiltrationsverfahren mit niedriger Bakterienzahl, (ISO 11731-2:2004); Deutsche Fassung EN ISO 11731-2:2008, Beuth-Verlag, Berlin

beinhalten verschiedene Variationsmöglichkeiten bei der Vorbehandlung und Untersuchung von Proben. Mittlerweile liegen Erfahrungen aus Analysen von mehr als 3.500 amtlich gezogenen Umweltproben seit dem Ausbruch der Legionellen-Epidemien in Warstein 2013 und Jülich 2014 vor. Aufbauend hierauf wurden im Rahmen von Untersuchungen und Diskussionsrunden mit Teilnehmern des Hygiene-Instituts der Universität Bonn, des Hygiene-Instituts Gelsenkirchen, der Abteilung für Hygiene, Sozial- und Umwelt-medizin der Ruhr-Universität Bochum, des IWW Mülheim und des LANUV NRW Konventionen in Anlehnung an die o. g. Normen zur Untersuchung verschiedener Umweltmatrices getroffen, anhand derer eine sehr gute Vergleichbarkeit auch der durch unterschiedliche Labore erhobenen Untersuchungsdaten ermöglicht wird. Details zu den einzelnen Vorgehensweisen nebst Erläuterungen werden im Anhang im Abschnitt AII.II dargestellt.

4.2 Alternative Verfahren zum Nachweis von Legionellen

Vor dem Hintergrund einer zeitnahen Aussage zu möglichen Legionellen-Belastungen zur Ergreifung geeigneter Sanierungs- und Vorsichtsmaßnahmen werden weitere Untersuchungsmethoden empfohlen. Diese beinhalten Kühlwässer, Abwasser und Klärschlämme allgemein und Sonder(ab-)wässer sowie den Vergleich von Verfahren.

4.2.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) in Anlehnung an AFNOR T90-471 und T90-431 bzw. ISO/TS 12869

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, qualitativ) beruht, aber zusätzlich eine Quantifizierung der ursprünglichen DNA-Menge ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt durch die Messungen von Fluoreszenzsignalen, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von den erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung vorgenommen. Mit entsprechenden Sonden können sehr spezifisch Organismen (z. B. *L. pneumophila*) oder Organismengruppen (*Legionella* spp.) in einer Probe quantitativ nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen ist dabei nicht möglich, es wird immer die Gesamtzahl der Ziel-DNA-Kopien des gesuchten Organismus ermittelt.

Neben der Spezifität der Sonde sind auch die Beschaffenheit der Probe sowie die Probenvorbereitung entscheidend für die Genauigkeit der Ergebnisse. Schon bei der Extraktion und Aufreinigung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) aus komplexen Proben (wie z. B. Abwasser) mit potenziell vielen PCR-Inhibitoren (u. a. Huminsäuren) muss ein geeignetes Protokoll gewählt werden, um in der qPCR ein optimales Ergebnis zu erhalten. Hier müssen ggf. im Vorfeld verschiedene DNA-Extraktionsverfahren durch Aufstockungs- und Wiederfindungsversuche für die jeweilige Probenmatrix verglichen und validiert werden. In Vorversuchen hat sich dabei z. B. das „Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit“ für Abwasserproben als geeignet erwiesen.

Der Nachweis von Legionellen mittels qPCR-Methoden bietet den Vorteil, dass Ergebnisse innerhalb von 24 bis 48 Stunden vorliegen. Außerdem ist eine Unterscheidung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* möglich. Nachteilig ist jedoch, dass die Ergebnisse aus hygienischer Sicht schwer zu bewerten sind, da sowohl lebensfähige wie auch tote oder geschädigte Legionellen-Zellen anhand ihrer DNA nachgewiesen werden. Zudem steht mit dieser Methode letztendlich keine Legionellen-Kultur für weitergehende Serotypisierungen bzw. Genotypisierungen zur Verfügung.

Details zur Methodik sind im Anhang im Abschnitt AIV.I bis AIV.III aufgeführt.

4.2.2 Viability PCR (vPCR)

Im Gegensatz zur qPCR kann bei der Viability-PCR zwischen lebenden und toten Bakterien unterschieden werden (MANSI et al. 2014). Diese Unterscheidung erfolgt anhand der Membranintegrität der Bakterien. Dafür wird eine Teilprobe mit Ethidium Monoazid Bromid (EMA) oder Propidium Monoazid (PMA) behandelt, das bei abgetöteten oder geschädigten Zellen durch die Zellwand eindringt und sich an die DNA anlagert, so dass diese im weiteren Verlauf nicht mehr amplifiziert werden kann. Dadurch werden tote/geschädigte Bakterien maskiert (DELGADO-VISCOGLIOSI et

al. 2009). Anschließend wird in der behandelten und einer unbehandelten Teilprobe die Legionellenzahl mittels qPCR bestimmt. Die unbehandelte Probe zeigt die Gesamtzahl an Legionellen, die mit EMA bzw. PMA behandelte die Anzahl an lebenden (bzw. nicht membrangeschädigten) Legionellen. Die Anzahl der toten (bzw. membrangeschädigten) Legionellen kann über die Differenz errechnet werden. Auch hier gilt, dass die Zahl der bisher vorliegenden Untersuchungen für Abwässer und Schlämme noch keine statistische Absicherung der Genauigkeit der Methode erlaubt. Darüber hinaus ist eine absolute Quantifizierung der geschädigten und toten Zellen nicht möglich, sondern es wird das Verhältnis zwischen den gesamten und den lebenden (bzw. nicht membrangeschädigten) Zellen ermittelt.

Details zu PMA-qPCR finden Sie im Anhang in Abschnitt AIV.IV.

Die viability-qPCR-Methoden haben gegenüber der „normalen“ qPCR den Vorteil, dass hiermit auch eine Bewertung des Vitalitätszustandes möglich ist. Die Ergebnisse liegen dabei ebenso innerhalb von 24 bis 48 Stunden vor. Nachteilig ist jedoch auch hier, dass mit dieser Methode letztendlich keine Legionellen-Kultur für weitergehende Feintypisierungen zur Verfügung steht. Außerdem befinden sich die verschiedenen in der Literatur beschriebenen PMA-/EMA-qPCR-Methoden noch im Forschungsstadium und müssen für die verschiedenen Anwendungsfälle noch validiert werden.

4.2.3 FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) als Direktnachweis auf Filtern

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine molekularbiologische Methode zum qualitativen Nachweis von Nukleinsäuren (RNA oder DNA). Man verwendet fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden, die spezifisch an bestimmte DNA-Stellen binden können. Diese Verbindung bezeichnet man als Hybridisierung. Bindet eine solche gefärbte Sonde an die DNA, kann man mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes die Lokalisation in der Probe bestimmt werden.

Für den Nachweis von Legionellen im Belebtschlamm kann die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit den rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden LEG705 für *Legionella* spp. bzw. LEGPNE1 für *Legionella pneumophila* (MANZ et al. 1995, GRIMM et al. 1998) durchgeführt werden. Zur Detektion von Eukaryoten und Amöben können die Sonden EUK516 (Eukaryoten), HART498 (*Hartmannella* spp.), NAEG1088 (*Naegleria* spp.) und GSP (*Acanthamoeba* spp.) eingesetzt werden (GRIMM et al. 2001). Die Sonden werden als Derivate mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3, Tamra und Fluos (biomers.net) eingesetzt. Die FISH-Analyse wird mit den Hybridisierungs- und Waschpuffern nach MANZ et al. (1995) durchgeführt.

Diese Methode erlaubt neben der Quantifizierung von Legionellen auch eine Aussage über die räumliche Verteilung der Zellen z. B. in Belebtschlämmen oder Flo-

cken. Allerdings werden, wie bei der qpCR, sowohl lebende, wie auch geschädigte oder tote Zellen nachgewiesen. Ebenso stehen mit dieser Methode letztendlich keine Reinkulturen für weitergehende Feintypisierungen zur Verfügung. Die Methode erfordert zudem einen erheblichen Arbeitsaufwand sowie erfahrenes Personal. Sie kann derzeit nicht für Routineuntersuchungen empfohlen werden.

4.3 Mikroskopische und chemische Analysen

Um den Zusammenhang zwischen Substratqualität und Legionellenwachstum weiter aufzuklären, sollten bei Legionellenbefunden im Abwasser weitere Untersuchungen auf Indikatororganismen und Indikatorparameter durchgeführt werden. Dazu sind mikroskopische Beurteilungen der Biozönose sowie die Bestimmung von chemischen Parametern, wie z. B. chemischer Sauerstoffbedarf, Kjeldahl-Stickstoff, Ammonium, Phosphor, Eisen, organische Trockenmasse und Aminosäuren zu empfehlen. Die mikroskopischen Untersuchungen des Belebtschlammes sollten mit einem besonderen Schwerpunkt auf Flockenstruktur und Zusammensetzung der Protozoen- und Metazoengemeinschaft durchgeführt werden. Sehr kleine Amöben können zwar erfasst, aber bei Abmessungen von ca. < 15 µm nicht auf Artenniveau bestimmt werden.

4.4 Feintypisierung (Sero- bzw. Genotypisierung) von Legionellen

Im Fall des Legionellose-Ausbruchs in Warstein 2013 wurde ein Legionellenstamm als Epidemiestamm identifiziert, der zum monoklonalen Subtyp Knoxville (reagiert mit dem monoklonalen Antikörper 3-1) gehört. Stämme, die einen Oberflächenmarker tragen, der von dem monoklonalen Antikörper 3-1 erkannt wird, gelten als besonders gefährlich. Dies ist durch die spezielle Oberflächenstruktur dieser Stämme bedingt. Auch die schon aus der Epidemie in Ulm/Neu-Ulm im Jahr 2010 und zahlreichen sporadischen Infektionen bekannten Stämme tragen diesen Marker. Eine Typisierung aller Legionellenisolate ist in der Praxis nicht möglich. Daher wurde zu Beginn der Untersuchungsreihen die Konvention geschlossen, alle Legionellen-Proben bei positivem Befund auf Legionellen hinsichtlich der nachfolgend aufgelisteten Tests zu überprüfen. Hierbei gilt die Regel von jedem koloniemorphologischen Typ mindestens zwei bzw. bei nur einem koloniemorphologischen Typ aus jeder Probe mindestens drei Kolonien zu testen.

- *Legionella pneumophila* Serogruppe (Sg) 1; ggf. Weitertypisierung, ob MAb 3-1 positiv (Befund: Sg 1)
- *Legionella pneumophila* Serogruppen 2-14 (es werden Antikörper benutzt die alle nicht zur Serogruppe 1 gehörenden Stämme erfassen; Befund: Sg 2-14)

- *Legionella* spp. (Das Kürzel "spp" (species pluralis) ist eine Bezeichnung für mehrere, nicht im Einzelnen zu nennende Spezies einer Gattung als Zusatz hinter deren wissenschaftlichem Namen, also z. B mehrere Arten der Gattung *Legionella*; Befund: L. spp)

Daneben findet auch die Bezeichnung *Legionella* spec. Verwendung. Das Kürzel „spec.“ bedeutet dabei, dass es sich um eine einzelne Art/Spezies aus der genannten Gattung handelt, welche aber nicht konkret genannt wird (Befund: L. spec)

- Für den expliziten Ausschluss der Spezies *Legionella pneumophila* in einem Befund oder Bericht ist die Bezeichnung *Legionella* „non-(nicht) pneumophila“ üblich (bedeutet, dass andere *Legionella* Spezies vorhanden sind als *Legionella pneumophila*; Befund: L. non-pneumophila).

Beim Auftreten der Serogruppe 1 ist zwischen dem Auftraggeber und dem Labor abzuklären, ob eine genauere Untersuchung auf den monoklonalen Subtyp z. B. durch Übersendung an das Konsiliarlaboratorium für Legionellen in Dresden zu erfolgen hat. Damit kann geprüft werden, ob die Isolate mit dem monoklonalen Antikörper MAb 3-1 reagieren. Da bisher alle mit Rückkühlwerken assoziierten Ausbrüche und sehr viele sporadische Einzelinfektionen durch solche Stämme verursacht worden sind, hat dies eine hohe hygienisch-medizinische Relevanz.

Im Epidemiefall sollten alle, mindestens jedoch 30 Kolonien, serotypisiert werden.

Zudem ist vom Labor die Art der Vorgehensweise zur Serotypisierung einmalig anzugeben und eine Erläuterung der Ergebnis-Angabe erforderlich. Stämme von Patienten und aus verdächtigen Umweltproben, die in der Serotypisierung nicht unterscheidbar sind, werden in weiteren Untersuchungen genotypisiert.

4.5 Ergebnisse Ringversuch LANUV

Auf Veranlassung des Ministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz (MKULNV) des Landes NRW wurde vom LANUV NRW im September 2014 ein Ringversuch zur Bestimmung von Legionellen in Abwässern und Oberflächenwässern unter Berücksichtigung des „Konzeptvorschlages zur Harmonisierung der Legionellenuntersuchung – Stand März 2014“ durchgeführt.

Zu den Teilnehmern gehörten die vier Referenzlabore, die seinerzeit an der Erstellung des Konzeptpapiers (Stand März 2014) beteiligt waren: Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universität Bonn; IWW, Mülheim; Hygiene-Institut des Ruhrgebiets, Gelsenkirchen; Ruhr-Universität Bonn.

An dem Ringversuch nahmen insgesamt 37 interessierte Untersuchungsstellen auf freiwilliger Basis teil. Der oben genannte Konzeptvorschlag wurde den Laboren, nebst einem Excel-Formular für die Auswertungen vor der Versendung der Proben zur Verfügung gestellt. Den Laboren wurde eine zweiwöchige Frist gewährt, die Unterlagen zu prüfen und ggf. auftretende Fragen einzureichen. Alle eingegangenen Fragen wurden in einem Frage/Antwortkatalog den Teilnehmern vor Versendung der Proben zugesandt.

Proben

Die Teilnehmer erhielten pro Probe zwei 250 ml-Flaschen (Inhalt ca. 200 ml). Insgesamt wurden jeweils zwei native, d. h. undotierte Oberflächenwasserproben und zwei native, undotierte Kläranlagen-Ablauf Proben am 04.09.2014 versandt. Trotz unterschiedlicher Codierung handelte es sich sowohl bei den beiden Abwasserproben als auch bei den beiden Oberflächenwasserproben jeweils um ein und dieselbe Probe.

Zur Gewährleistung, dass alle Labore tatsächlich identische Proben der jeweiligen Wasserart erhalten haben, wurden während der Abfüllung Proben für Homogenitätstests gezogen und für die Bestimmung der enthaltenen Legionellen an das Konsiliarlaboratorium für Legionellen TU Dresden und für die chemischen Parameter an das Labor des LANUV gesandt.

Untersuchungsmethoden

Die Untersuchungsstellen hatten die Möglichkeit, die versendeten Proben neben den Konventions-Vorschlägen des Konzeptpapieres (Stand März 2014) zur Verwendung der ISO 11731 (1998) und der DIN EN ISO 11731-2 (2008) mit weiteren Methoden auf ihren Legionellen-Gehalt zu untersuchen. Zusätzlich waren alle Labore aufgefordert, bei positivem Legionellenbefund eine weitergehende Serotypisierung gemäß der Anforderungen der ISO CD 11731 (1998) durchzuführen und in den Ergebnissen als „*L. non pneumophila*“, „*L. pneumophila* SG 1“ und/ oder „*L. pneumophila* SG 2-14“ zu vermerken.

Einteilung der Proben

Die Labore sollten, bei Untersuchung der Proben gemäß des Konzeptpapieres (Stand März 2014) eine Einteilung der Proben entsprechend den Vorgaben des Papieres erstellen. Das Konzeptpapier (Stand März 2014) sieht im Gegensatz zu der im Anhang I in Abschnitt AII.11 dieses Berichtes stehenden **Version vom Februar 2015** noch eine größere Auswahl für Abwasser- und Oberflächenwasser-Proben folgender Beschreibungen vor:

- „klares (Ab-)Wasser ohne sichtbare Partikel, geringe bis mäßige Begleitflora zu erwarten“

- „klares (Ab-)Wasser mit Partikeln, gefärbtes Ab/Wasser, kein KA Ablauf/ Zulauf, geringe bis mäßige Begleitflora zu erwarten“
- „KA Zulauf oder andere (Ab-)Wässer mit hoher zu erwartender Begleitflora“
- „KA Ablauf oder andere (Ab-)Wässer mit mäßiger bis hoher zu erwartender Begleitflora (noch auswertbar)“

Fazit

35 Labore gaben teils unvollständige Ergebnisse ab. Nach Auswertung der Daten können folgende Resultate festgehalten werden:

- Die Homogenität der Proben bei der Abfüllung war gewährleistet.
- Die Ergebnisse der 4 Referenzlabore waren vergleichbar.
- Viele Labore verfügen nicht über ausreichende Kenntnisse im Bereich von Umweltproben (Stichwort: Begleitflora).
- Eine Akkreditierung bzw. andere Nachweise über Erfahrungen bei der Trinkwasseruntersuchung (z. B. erfolgreiche Teilnahme an Trinkwasserringversuchen etc.) genügen nicht als Voraussetzung für die Untersuchung von Oberflächenwasser, Abwasser, Kühlwasser o.a.
- Das LANUV NRW schlägt hierzu die Durchführung von Ringversuchen zur Untersuchung von Abwasser, Oberflächenwasser und Kühlwasser auf Legionellen und ggf. Gesamtkeimzahlen vor. Diese sollen auf Basis der Laborkonventionen zur Untersuchung auf Legionellen, Stand Februar 2015, durchgeführt werden. Teilnehmer, die diese Ringversuche zukünftig erfolgreich absolvieren, sollen in einer vom Land geführten Liste aufgenommen werden, mit der sie ihre Erfahrungen im Umgang mit Umweltproben – bei der Untersuchung auf Legionellen – potentiellen Auftraggebern vorlegen können. Eine wenngleich erfolgreiche Teilnahme an diesen Ringversuchen bedingt aber keinen Nachweis bzw. keine Listung hinsichtlich der Eignung zur Untersuchung von Trinkwasserproben (nach § 15(4) TrinkwV). Diese müssen gesondert erworben werden.
- Das Konzeptpapier, Stand März 2014, anhand dessen die vier genannten Referenzlabore weit über 3.000 Proben im Jahr 2014 erfolgreich und vergleichbar untersucht haben, wurde hinsichtlich der Einteilung der Proben zur weitergehenden Probenvorbereitung und Untersuchung vereinfacht. Statt der eingangs genannten vier Klassifizierungen wässriger Ab-/Wasserproben wird es künftig nur zwei Unterscheidungen geben (Stand Februar 2015):
 - Abwasser oder Oberflächenwasser: klar, ungefärbt, ohne sichtbare Partikel
 - Abwasser oder Oberflächenwasser: getrübt und /oder sichtbare Partikel
- Zum Zeitpunkt der Erstellung des Konzeptpapiers, Stand März 2014, lagen dem LANUV NRW ausschließlich Erfahrungen mit Abwasser und Oberflächenwasserproben als wässrige Umweltproben vor. Das Labor-Konzeptpapier, **Stand Februar 2015**, wird um eine weitere Klassifizierung ergänzt, da

im Laufe des Jahres 2014 ausreichend amtlich gezogene Proben dieser Einteilung untersucht werden konnten, um Konventionsvorschläge hierzu abzustimmen:

- Kühlwasser und andere Prozesswässer
- Im Konzeptpapier zu den Laboruntersuchungen auf Legionellen, Stand Februar 2015, werden die vereinbarten Probenvorbereitungs- und Untersuchungsschritte unter Berücksichtigung der ISO CD 11731, für jeden verständlich und konkreter formuliert, um Missverständnissen aufgrund mangelnder Erfahrung vorzubeugen. Hierbei erheben die Formulierungen jedoch nicht den Anspruch einer Standardarbeitsanweisung (Details sind den Ausführungen im Anhang I Abschnitt AII.II zu entnehmen).

Nähere Informationen zum Ringversuch können direkt beim LANUV angefordert werden.

4.6 Ergebnisse Sondermessprogramme Kläranlagen

Zu den offenen Fragen im Zusammenhang mit dem Legionelloseausbruch 2013 in Warstein gehörte auch die Frage, ob bei weiteren Kläranlagen ein besonderes Risiko für die Vermehrung von Legionellen besteht. Das Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MKULNV) hatte deshalb zeitnah eine **erste landesweite Sonderüberprüfung** bautechnisch gleicher oder ähnlicher Kläranlagen wie in Warstein veranlasst. Das LANUV hat hierzu 30 Kläranlagen in NRW in den Monaten September bis November 2013 amtlich beprobt.

Als Ergebnis dieser Sonderprüfung kann festgehalten werden, dass in 186 amtlich entnommenen Kläranlagenproben 27 positive Legionellenbefunde festgestellt worden sind. Betroffen waren dabei 13 der 30 untersuchten Kläranlagen.

Acht dieser Befunde bezogen sich auf Proben aus dem Ablauf der Kläranlage. Hierbei waren die nachgewiesenen Legionellen-Konzentrationen in fünf Proben < 1.000 KBE/100 ml; die anderen Befunde lagen bei 1.700, 2.000 und 59.000 KBE/100 ml. Bei einer Nachuntersuchung der letztgenannten Anlage wurde für die Ablaufprobe ein Befund von < 200 KBE/100 ml erhoben. Die Proben aus dem Gewässer unterhalb der letztgenannten Kläranlage ergaben bei der ersten Untersuchung eine Legionellen-Konzentration von 15.000 KBE/100 ml und bei der Nachuntersuchung von 200 KBE/100 ml.

Die restlichen positiven Befunde der Kläranlagenproben waren für Proben aus den verschiedenen Behandlungsstufen nachgewiesen worden. Die höchsten Befunde, von 10.000 – 2.650.000 KBE/100 ml, hatten dabei die Untersuchung der Proben aus den Belebungsbecken ergeben. Allerdings sind diese Ergebnisse, aufgrund der Problematik der in den Proben umfangreich enthaltenen Begleitflora und der daher

erforderlichen Verdünnung der Proben mit anschließender Hochrechnung der Legionellennachweise, mit großer Unsicherheit behaftet. Aus diesem Grund und da für eine Risikobeurteilung zunächst einmal die Legionellen-Konzentration am Ablauf der Anlagen relevant ist, wurden im Rahmen der zweiten landesweiten Sonderprüfung hauptsächlich Kläranlagenabläufe beprobt.

Ergänzend zu den Kläranlagen wurden auch die jeweiligen Vorfluter beprobt. In den 83 amtlich entnommenen Gewässerproben waren 11 positive Legionellenbefunde festgestellt worden. Diese lagen, bis auf die bereits oben genannte Ausnahme von 15.000 KBE/100 ml, im Bereich von 100 – 400 KBE/100 ml.

Neben der amtlichen Beprobung von September bis November 2013 hatte teilweise eine freiwillige Selbstüberwachung durch die Kläranlagenbetreiber stattgefunden. An diese wurde die Bitte ausgesprochen, die gewonnenen Daten zur Verfügung zu stellen. 94 Kläranlagenbetreiber hatten die Daten zur Verfügung gestellt. Bei 69 Kläranlagen konnten keine Legionellen nachgewiesen werden. Bei 25 Anlagen wurden Legionellen-Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze erhalten.

Auf Basis der neuen Erkenntnisse aus den o. g. Untersuchungen wurde eine **zweite landesweite Sonderprüfung** kommunaler Kläranlagen und Anlagen industrieller Direkt- und Indirekteinleiter mit einem mutmaßlichen Potential für eine starke Vermehrung von Legionellen durch das MKULNV im August 2014 veranlasst.

Als Risikoanlagen wurden solche angesehen, die Legionellen wachstumsbegünstigende Bedingungen aufgrund erhöhter Temperaturen von $\geq 23\text{ °C}$ in Kombination mit nährstoffreichen Substraten mit hohen Proteingehalten bieten. Es wurden daher für das genannte Messprogramm insbesondere Anlagen ausgewählt, welche Abwässer aus den in den folgenden Anhängen der Abwasserverordnung bestimmten Herkunftsbereichen behandeln:

- Anhang 3 Milchverarbeitung
- Anhang 4 Ölsaataufbereitung, Speisefett- und Speiseölraffination
- Anhang 10 Fleischwirtschaft
- Anhang 11 Brauereien
- Anhang 12 Herstellung von Alkohol und alkoholischen Getränken
- Anhang 15 Herstellung von Hautleim, Gelatine und Knochenleim
- Anhang 18 Zuckerherstellung
- Anhang 22 Chemische Industrie
- Anhang 28 Herstellung von Papier und Pappe

Kommunale Kläranlagen

In Proben von fünf der siebzehn kommunalen Kläranlagen (ca. 30 % der Anlagen), die für diese zweite Sonderprüfung untersucht wurden, wurden Legionellen nachgewiesen. Die maximalen Legionellen-Konzentrationen in koloniebildenden Einheiten

pro 100 Milliliter (KBE/100 ml) in den Proben der Kläranlagenabläufe waren dabei wie folgt: 100 (L. spec), 2.000 (L. spec), 7.000 (Sg 2-14), 9.200 (L. spec) und 14.000 (Sg 2-14).

Nachuntersuchungen wurden für die beiden letztgenannten Kläranlagenabläufe vorgenommen. Diese ergaben geringere Konzentrationen von 2.800 (L. non-pneumophila) und 100 (Sg 2-14) KBE/100 ml bzw. einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze (< 100 KBE/100 ml).

Relevante industrielle Direkteinleiter

Bei den industriellen Direkteinleitern wurde in vier Proben der zehn beprobten Anlagen (40 % der Anlagen) Legionellen nachgewiesen. Es handelte sich hierbei um Proben der Kläranlagenabläufe jeweils eines Betriebes

- der Fleischwirtschaft,
- eines Papierherstellers,
- eines Chemiebetriebes und
- einer Brauerei.

Die maximalen Legionellen-Konzentrationen in KBE/100 ml in den Proben lagen bei 2.500 (L. spec), 33.000 (L. non-pneumophila), 52.200 (Sg 2-14 und L. non-pneumophila) und 290.000 (L. spec). Nachuntersuchungen der drei letztgenannten Kläranlagenabläufe ergaben 800 (L. spec) bzw. < 100 KBE/100 ml.

Relevante industrielle Indirekteinleiter

Die Untersuchung der Proben der industriellen Indirekteinleiter erbrachte für zwei der neun untersuchten Anlagen (ca. 22 % der Anlagen) einen Legionellen-Nachweis mit maximalen Konzentrationen von 30.000 (Sg 1) bzw. 180.000 KBE/100 ml. Es handelte sich hierbei um

- den Ablauf eines Bioreaktors eines Betriebs der Milchverarbeitung und um
- den Ablauf einer Abwasserbehandlung einer Brauerei.

In Nachuntersuchungen wurde für den Ablauf der Brauerei ein Wert von 10.000 (L. spec) KBE/100 ml und zwei Befunde unter der Nachweisgrenze (< 100.000 bzw. < 1.000 KBE/100 ml) ermittelt. Die Nachuntersuchung beim genannten milchverarbeitenden Betrieb ergab den Befund < 10.000 KBE/100 ml. Bei Befunden mit solch hohen Nachweisgrenzen sollten die Anlagen weiter überprüft werden, da ein Vorhandensein von Legionellen in entsprechend hohen Konzentrationen in diesen Proben nicht auszuschließen ist.

Insgesamt wurden in der zweiten Sonderprüfung in 15 der 57 untersuchten Proben (= 26 % der Proben) Legionellen nachgewiesen. Wenngleich die Befunde in Nachuntersuchungen meist nicht bestätigt wurden, so zeigt sich dennoch, dass die ökolo-

gische Voraussetzung für eine Vermehrung von Legionellen in den Anlagen mit Positiv-Befunden gegeben ist. Eine weitere Beobachtung dieser Anlagen scheint geboten.

Die Einschätzung, dass Anlagen, welche Abwässer aus der Milchverarbeitung, der Fleischwirtschaft, aus Brauereien, aus bestimmten Bereichen der chemischen Industrie bzw. aus der Papierherstellung behandeln, Risikoanlagen hinsichtlich einer starken Legionellen-Vermehrung darstellen, scheint demnach gerechtfertigt.

5 Bewertung von Legionellen-Befunden in Gewässern

5.1 Allgemeine Überlegungen

Legionellen sind ubiquitär in Gewässern üblicherweise in geringen, hygienisch nicht relevanten Konzentrationen kulturell nachweisbar. Unter besonderen Bedingungen (z.B. warme Quellen, bestimmte Abwasser- und Kühlwassereinleitungen) können hygienisch relevante Konzentrationen auftreten.

Der Gewässerbelastung kommt aber nur dann Bedeutung zu, wenn hieraus direkt bzw. indirekt durch Entnahme für technische Systeme eine Aerosolbildung resultieren kann.

Die Bewertung von Legionellenkonzentrationen im Gewässer kann in Analogie zur Bewertung von Legionellen im Trinkwasser vorgenommen werden. Für Trinkwasser ist im Kontext mit Legionellen ein sog. „*technischer Maßnahmenwert*“ eingeführt worden, der eine Synthese aus Charakterisierung des Zustandes eines technischen Systems (z. B. Trinkwasserinstallation) und Gesundheitsrisiko darstellt. Da es sich bei Legionellen nicht um obligat pathogene Erreger handelt, die bei jedem Menschen bei fehlender Immunität eine Erkrankung auslösen, sondern um fakultativ pathogene Erreger, die eine Disposition voraussetzen, welche nur bedingt zu regulieren ist, wurde nicht der Begriff „Grenzwert“, sondern „**technischer Maßnahmenwert**“ gewählt.

In Deutschland gilt gemäß Trinkwasserverordnung als technischer Maßnahmenwert eine Konzentration von 100 KBE/100 ml. Wird diese Konzentration überschritten, gibt es Empfehlungen für abgestufte Maßnahmen.

Während für Kühlwässer in Verdunstungskühlanlagen Empfehlungen für Legionellenkonzentrationen existieren (VDI 6022, bzw. VDI 2047 Blatt 2), gibt es derzeit keine weitergehenden Empfehlungen für Gewässer. Überlegungen zur Etablierung von Gewässerrichtwerten (technische Maßnahmenwerte) für Legionellen sind international neu und bislang auch in einschlägigen Regelwerken einschließlich der WHO-Monografie „Prevention of Legionellosis“ nicht diskutiert.

Die Überlegungen hierzu ergaben sich aufgrund der neuen Erkenntnisse im Kontext mit dem Ausbruchsgeschehen in Warstein. Hier wurde deutlich, dass durch Verwen-

dung von Flusswasser mit hohen Legionellenkonzentrationen zum Betrieb von Verdunstungskühlanlagen ohne Desinfektion eine Mitverursachung des Legionellose-Ausbruches von Warstein anzunehmen war.

International gibt es unterschiedliche Auffassungen über die zu regulierenden Legionellen Spezies. In Deutschland wird im Gegensatz zu einer Reihe anderer Länder, wie z. B. Frankreich und Großbritannien, die Konzentration von Legionellen ohne Differenzierung von Art und Serogruppe angegeben. Durchaus kann mit dem Parameter Legionellen das Legionellenwachstumspotential in technischen Systemen und auch die Wirksamkeit von Kontrollmaßnahmen allgemein bestimmt werden.

Im Kontext mit Verdunstungskühlanlagen assoziierten Legionellose-Ausbrüchen sind bislang nur *Legionella pneumophila* und hier insbesondere *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 (Mab 3-1 positiv) beschrieben worden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Legionellenarten und Serovarietäten von Bedeutung sind.

Für die weitergehende Beurteilung eines Gesundheitsrisikos eignet sich jedoch in erster Linie die Bestimmung von *Legionella pneumophila* (insbesondere Serogruppe 1). Die Bedeutung anderer Serogruppen von *Legionella pneumophila* muss nach dem Ausbruch von Jülich neu diskutiert werden.

5.2 Empfehlungen zu technischen Maßnahmenwerten für Gewässer

Im Folgenden werden drei Fallkonstellationen zur Entnahme / Verwendung aus Gewässern unterschieden, näher erläutert und bewertet:

- Badegewässer mit aerosolbildenden Attraktionen oder Gewässer mit Aerosolbildung
- Gewässer mit Entnahmen für Verdunstungskühlanlagen oder andere Zwecke mit Aerosolbildung
- Gewässer mit Nachweis eines Legionellen-Epidemiestammes im Kontext mit einem Legionellose-Ausbruch und Nutzungen mit Aerosolbildung

Allgemein gilt, dass Gewässer - anders als technische Systeme wie Trinkwasserinstallationssysteme oder Verdunstungskühlanlagen - nicht technisch mittels Desinfektion behandelt werden sollen und müssen.

Wenn erhöhte Legionellenkonzentrationen auftreten, müssen die Ursachen identifiziert und Maßnahmen ergriffen werden.

5.2.1 Badegewässer mit aerosolbildenden Attraktionen oder Gewässer mit Aerosolbildung

Badegewässer mit aerosolbildenden Attraktionen müssen durch den Betreiber auf Legionellen untersucht werden. Bei Gewässern mit natürlicher sehr starker Aerosolbildung und Publikumsverkehr sollten Untersuchungen auf Legionellen mit entsprechender Risikoabschätzung durch den Betreiber erfolgen. Im Allgemeinen unterliegen diese Arten von Anlagen nicht den behördlichen Kontrollen auf Legionellen.

Für diese Art von Gewässern werden nachfolgende Maßnahmenwerte empfohlen:

< 100 KBE Legionellen/100 ml: Kein Handlungsbedarf

100 bis < 1.000 KBE Legionellen/100 ml: weitere Untersuchungen

1.000 bis < 10.000 KBE Legionellen/100 ml: Maßnahmen zur Legionellenminimierung prüfen und weitergehende Untersuchungen

≥ 10.000 KBE Legionellen/100 ml: Maßnahmen zur Gefahrenabwehr, Nutzungsverbote prüfen z.B. Abstellen von aerosolbildenden Systemen oder Maßnahmen zur Expositionsvermeidung

5.2.2 Gewässer mit Entnahmen

Betreiber von Verdunstungskühlanlagen müssen ihr Füllwasser und ihr Rückkühlwasser nunmehr u. a. entsprechend VDI 2047 Blatt 2 auf Legionellen untersuchen lassen.

Das Gleiche gilt ebenfalls für die Verwendung von anderen technischen Systemen mit Aerosolbildung (z. B. für Kühlzwecke bei Schleifmaschinen oder für Feldbewässerung).

Folgende Empfehlungen werden gegeben:

Die Leitungen vom Gewässer zur Verdunstungskühlanlage bzw. anderen Anlagen mit Aerosolbildung müssen so ausgeführt werden, dass sie gereinigt werden können und vollständig desinfizierbar sind.

Es sollte eine Untersuchung auf *Legionella* Spezies ohne weitere Differenzierung erfolgen. Folgende Maßnahmenwerte für Entnahmen aus dem Gewässer werden für Verdunstungskühlanlagen – und entsprechend für andere aerosolbildende technische Systeme (z. B. Feldbewässerung) – empfohlen:

< 100 KBE Legionellen/100 ml: Keine weitergehenden Maßnahmen. Das Wasser kann z. B. für Verdunstungskühlanlagen verwendet werden.

100 bis < 1.000 KBE Legionellen/100 ml: Wiederholung der Untersuchung und bei Bestätigung des Ergebnisses Aufbereitung des Rohwassers ggf. unter Zugabe eines chemischen Desinfektionsmittels oder UV-Desinfektion

1.000 bis < 10.000 KBE Legionellen/100 ml:

- zwingende Desinfektion vor Befüllung
- Prüfung, inwieweit eine alternative Quelle verwendet werden kann
- Wiederholung der Untersuchung mit Bestimmung der Serogruppe
- Meldung an die zuständige Behörde
- Weitergehende Abklärung seitens der Behörde, ob Gewässer in anderen Bereichen kontaminiert sind (z. B. Badegewässer siehe Kapitel 5.2.1)
- Einholung einer hygienisch-medizinischen Bewertung.
- Ursachenabklärung für erhöhte Konzentrationen

≥ 10.000 KBE Legionellen/100 ml: Entnahmeverbot

5.2.3 Systeme mit Aerosolbildung aus einem Gewässer mit nachgewiesenem Epidemiestamm im Kontext zu einem Ausbruch

In einem derartigen Fall liegt der Beweis vor, dass ein Gewässersystem mit einem Legionellen-Epidemiestamm im Kontext mit einem Legionellose-Ausbruch mit bewiesener erhöhter Virulenz kontaminiert ist. Daher werden in diesem Fall strengere Maßnahmenwerte empfohlen. Das Bewertungssystem für eine Entnahme beginnt mit < 10 KBE Legionellen des Epidemiestamms/100 ml.

Die zuständige Behörde führt eine Gefährdungsbeurteilung durch und legt die hierauf basierenden Maßnahmen und Messstellen fest.

Das Gewässersystem soll monatlich an ausgewählten Entnahmepunkten auf die Legionellenkontamination mit Bestimmung / Ausschluss des Epidemiestamms untersucht werden. In jedem Fall muss oberhalb der festgestellten Gewässerbelastung nach Punktquellen für den Eintrag des Epidemiestammes in das Gewässer gefahndet werden. Punktquellen müssen unter Kontrolle gebracht werden.

Für die Verwendung / Entnahme für technische Systeme mit Aerosolbildung aus einem Gewässer mit nachgewiesenem Epidemiestamm werden folgende Maßnahmen empfohlen:

< 10 KBE Legionellen des Epidemiestamms/100 ml: Keine weiteren Maßnahmen

10 bis < 100 KBE Legionellen des Epidemiestamms/100 ml: Verwendung grundsätzlich nur mit Zusatz von Desinfektionsmitteln, die für Verdunstungskühlanlagen zugelassen sind; monatliche Kontrolle durch den Betreiber der jeweiligen Anlage

100 bis < 1.000 KBE Legionellen des Epidemiestamms/100 ml: Verwendung nur nach Desinfektion und geprüfter Biozidbehandlung plus monatlicher Kontrolle; Keine Verwendung als Beregnungswasser

≥ 1.000 KBE Legionellen des Epidemiestamms/100 ml: Entnahmeverbot

5.2.4 Aufhebung von Entnahmeverboten

Gewässer ohne Nachweis eines Epidemiestammes

Zur Aufhebung des Entnahmeverbotes sind bei drei aufeinander folgenden Messungen im Mindestabstand von einer Woche über einen Zeitraum von einem Monat Konzentrationen von **< 10.000 KBE Legionellen/100 ml** nachzuweisen. Es müssen die Kriterien nach Kapitel 5.2.2 beachtet werden.

Ziel sollte sein, die Konzentrationen auf < 100 KBE Legionellen/100 ml abzusenken. Zusätzlich sollte sichergestellt sein, dass im Oberlauf des Gewässers Punktquellen für eine Gewässerbelastung mit Legionellen unter Kontrolle gebracht sind.

Gewässer mit früherem Nachweis eines Epidemiestammes im Kontext zu einem Ausbruch

Zur Aufhebung des Entnahmeverbotes ist bei Entnahme für Wasser mit potentieller Aerosolbildung nachzuweisen, dass bei drei aufeinander folgenden Messungen im Mindestabstand von einer Woche über einen Zeitraum von einem Monat Konzentrationen von **< 100 KBE Legionellen des Epidemiestammes/100 ml** bzw. **< 1.000 KBE Legionellen des Epidemiestammes/100 ml** (je nach Verwendungszweck) eingehalten werden. Es müssen die Kriterien nach Kapitel 5.2.3 beachtet werden.

Ziel sollte sein, die Konzentrationen auf < 10 KBE Legionellen des Epidemiestammes/100 ml abzusenken. Zusätzlich sollte sichergestellt sein, dass im Oberlauf des Gewässers Punktquellen für eine Gewässerbelastung mit Legionellen unter Kontrolle gebracht sind.

6 Risikopotentiale, Bewertung und Kontrolle von Legionellen bei Abwasserbehandlungsanlagen

6.1 Epidemiologie

Das Risiko einer Legionelleninfektion durch Aerosole in der Umgebungsluft von mit Legionellen belasteten Abwasserbehandlungsanlagen (Kläranlagen) wurde nur in wenigen Publikationen beschrieben und dokumentiert:

- Fälle von sporadischen Legionellosen oder kleineren Ausbrüchen bei dem Kläranlagenpersonal,
- Ausbrüche von Pontiac-Fieber in der Bevölkerung, die im Umfeld einer Kläranlage leben.

Zusätzlich gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass Verdunstungskühlanlagen durch legionellenhaltige Aerosole aus abwassertechnischen Anlagen über den Luftpfad oder durch legionellenhaltiges Abwasser über den Wasserpfad kontaminiert werden können:

- Ein Legionellose-Ausbruch in Pas-de-Calais 2003/2004 bei der Bevölkerung in der Umgebung eines belüfteten Abwasserteiches im Zusammenhang mit unmittelbar benachbarten Verdunstungskühlanlagen.
- Bei dem Legionellose-Ausbruch in Warstein konnten in Vorreinigungsbecken einer Brauerei Legionellen des Epidemiestammes in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Vorreinigungsbecken befanden sich in einer Entfernung von 250-300 m zu einer Verdunstungskühlanlage der Brauerei, in welcher der Epidemiestamm ebenfalls nachgewiesen wurde. Es wird für wahrscheinlich gehalten, dass die Legionellen des Epidemiestammes aus den Vorreinigungsbecken durch Verdriftung und Ansaugen in die Verdunstungskühlanlage gelangt sind. Des Weiteren war das Flusswasser der Wester (im Oberlauf Wäster genannt) durch die Einleitung von Abwasser mit hohen Konzentrationen an Legionellen kontaminiert worden, welches wiederum als Rohwasser für Verdunstungskühlanlagen diente.

6.2 Qualitative Risikobewertung/ Risikopotentiale

Abwasseruntersuchungen

Die infektionshygienischen Anforderungen an Abwasser sind im § 41 des Infektionsschutzgesetzes geregelt. Hierin heißt es:

§ 41 Abwasser

(1) Die Abwasserbeseitigungspflichtigen haben darauf hinzuwirken, dass Abwasser so beseitigt wird, dass Gefahren für die menschliche Gesundheit durch Krankheitserreger nicht entstehen. Einrichtungen zur Beseitigung des in Satz 1 genannten Abwassers unterliegen der infektionshygienischen Überwachung durch die zuständige Behörde.

Die Betreiber von Einrichtungen nach Satz 2 sind verpflichtet, den Beauftragten der zuständigen Behörde Grundstücke, Räume, Anlagen und Einrichtungen zugänglich zu machen und auf Verlangen Auskunft zu erteilen, soweit dies zur Überwachung erforderlich ist.

Das Grundrecht der Unverletzlichkeit der Wohnung (Artikel 13 Abs. 1 Grundgesetz) wird insoweit eingeschränkt. § 16 Abs. 1 bis 3 findet Anwendung.

(2) Die Landesregierungen werden ermächtigt, bezüglich des Abwassers durch Rechtsverordnung entsprechende Gebote und Verbote zur Verhütung übertragbarer Krankheiten zu erlassen. Die Landesregierungen können die Ermächtigung durch Rechtsverordnung auf andere Stellen übertragen. Das Grundrecht der Unverletzlichkeit der Wohnung (Artikel 13 Abs. 1 Grundgesetz) kann insoweit eingeschränkt werden.

Nach derzeitigem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass nur bestimmte Kläranlagen ein relevantes Legionellenpotential aufweisen. Hierzu zählen solche Kläranlagen, die Abwassertemperaturen von $\geq 23\text{ °C}$ und im Zulauf Substrate für eine Begünstigung des Legionellenwachstums, u. a. hohe Proteingehalte, aufweisen. Derzeit können Abwässer und Abwasserinhaltsstoffe aus Brauereien, zellulose-, holz- oder papierverarbeitenden Betrieben, der Milchverarbeitung aber auch Abwässer aus der chemischen Industrie und der Ölverarbeitung mit einem Wachstum von Legionellen in Verbindung gebracht werden.

Für die Abwasserverordnung können vorläufig folgende Anhänge benannt werden, bei denen positive Bedingungen für ein Legionellenwachstum auftreten können und erhöhte Legionellenkonzentrationen bereits gefunden wurden:

- Anhang 3: Milchverarbeitung
- Anhang 10: Fleischverarbeitung;
- Anhang 11: Brauereien;
- Anhang 18: Zuckerherstellung;
- Anhang 19: Zellstoffindustrie
- Anhang 22: Chemie
- Anhang 28: Herstellung von Papier und Pappe.

Von der seit Januar 2012 in Kraft getretenen Industrieemissionsrichtlinie (Directive on Industrial Emissions, IED, 2010/75/EU), können nach Einschätzung der Expertenkommission Anlagen entsprechend folgenden BVT-Merkblätter (englisches Kürzel: BREF), als relevant für das Vorkommen von Legionellen eingestuft werden:

- i) Food, Drink and Milk;
- ii) Pulp and Paper;
- iii) Slaughterhouses and Animal Byproducts;
- iv) Wood and Wood Products.

Kläranlagen (Betriebskläranlagen und kommunale Anlagen), die derartige Abwässer verarbeiten, sollten das geklärte Abwasser (Kläranlagenablauf) auf Legionellen untersuchen bzw. untersuchen lassen.

Erstmals wird eine quartalsweise Probennahme und Untersuchung empfohlen (als Selbstüberwachungsparameter). Sofern keine Befunde vorliegen, sollte im Weiteren mindestens 1 x jährlich eine Analyse durchgeführt werden.

Dabei soll zunächst die Konzentration an *Legionella* spp. und bei hohen Konzentrationen auch die Konzentration von *Legionella pneumophila* und die Serogruppen bestimmt werden.

Die nachfolgenden Empfehlungen für Maßnahmenwerte im Ablauf der Anlagen gelten als Vorsorgemaßnahme für den Fall, dass das Flusswasser nach der Einleitung für Rückkühlzwecke oder Bewässerungszwecke mit Aerosolbildung verwendet werden könnte.

Empfehlungen für technische Maßnahmenwerte im Ablauf:

< 1.000 KBE Legionellen/100 ml: Kein Handlungsbedarf

≥ 1.000 bis < 10.000 KBE Legionellen/100 ml: Information der Betreiber und Nutzer sowie Bestimmung der Spezies und Serogruppe; es muss eine weitergehende Untersuchung der einzelnen Aufbereitungsstufen innerhalb der Kläranlage sowie der Zuflüsse zur Kläranlage durchgeführt werden

≥ 10.000 KBE Legionellen/100 ml: Maßnahmen zur Minderung und Überprüfung der Konzentration im Gewässer, ggf. Entnahmeverbot siehe Kapitel 5.2

6.3 Kontrolle

Bei Anlagen, bei denen im Ablauf hohe Legionellenkonzentrationen ≥ 10.000 KBE/100 ml festgestellt werden, müssen Maßnahmen getroffen werden. Diese Maßnahmen betreffen sowohl den Ablauf der Anlage (Kapitel 6.3.2) als auch aerosol-emittierende Teile der Anlage (Kapitel 6.3.3). Zusätzlich sollten die Zuläufe zur Klär-

anlage einzeln überprüft werden, um die Quelle für potentielle Einträge zu ermitteln. Eine Abreicherung (Reduktion) der Legionellen in der Anlage selbst ist ohne Änderung der Betriebsparameter unter Beibehaltung der Reinigungsleistung nicht möglich (6.3.1).

6.3.1 Abreicherung von Legionellen in bestehenden Abwasserbehandlungsanlagen

Die Abreicherung von Legionellen in bestehenden Abwasserbehandlungsanlagen haben sich nur als bedingt durchführbar und in den meisten Fällen als unwirksam erwiesen. Der Grund für diese Probleme liegt einerseits in den Wachstumsbedingungen von Legionellen und andererseits in der von biologischen Anlagen erwarteten Reinigungsleistung durch Bakterien zur Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorelimination begründet.

- Die Wachstumsbedingungen von Legionellen unterscheiden sich zwischen den Arten. *Legionella pneumophila* zeigt ein starkes Wachstum bei Temperaturen oberhalb von 22 °C während für andere Legionellen-Spezies auch ein Wachstum in kälteren Temperaturbereichen beobachtet wurde. Unter optimalen Laborbedingungen mit Temperaturen von 35 °C und proteinreichem Substrat konnten Wachstumsraten für *L. pneumophila* von ca. 1,6 bis zu 3,85 pro Tag gemessen (Rosenwinkel, K-H; Nogueira, R. et. al. 2015) werden. Neben der Temperatur ist das Substrat entscheidend für das Wachstum von Legionellen; hier haben sich proteinreiche Substrate – wie z. B. Hefekonzentrat – als sehr fördernd für das Wachstum von Legionellen erwiesen. Eine weitere Verifizierung der substratspezifischen Einflüsse muss noch erfolgen.
- Eine Abreicherung im bestehenden System einer biologischen Kläranlage unter Einhaltung der Reinigungsleistung – insbesondere für die Stickstoffelimination - ist ohne gravierende Veränderungen kaum möglich.
 - o Die Absenkung der Temperatur auf Werte < 20 °C ist insbesondere bei Industrieanlagen häufig unter Berücksichtigung energetischer und ökologischer Bewertung nicht durchführbar.
 - o Eine Verringerung der Zufuhr proteinreicher Substrate sollte geprüft werden. Hier kann auch die eventuelle Vorschaltung einer anaeroben Vorbehandlungsstufe bei Industriebetrieben Vorteile bieten. Dieser Punkt muss in Bezug auf die verbleibende Substratzusammensetzung und deren Wirkung auf das Legionellenwachstum näher überprüft werden.
 - o Eine Absenkung des Schlammalters bis auf den Auswaschpunkt der Legionellen gelingt nicht, da die Wachstumsrate der Legionellen unter optimalen Randbedingungen wesentlich höher ist als die der Nitrifikanten, die zur Aufrechterhaltung einer Stickstoffelimination benötigt werden.
 - o Der Einsatz von Ultraschall im Rücklaufschlamm zur Bekämpfung von Amöben und damit der „Wirtsorganismen“ für Legionellen führt nicht zum Erfolg, da Legionellen davon nicht beeinträchtigt werden und trophozoite

Amöben nach der Behandlung eine schnelle Wiederbesiedlung aufzeigen.

- Chemische Desinfektionsverfahren stellen keine Option zur Verminderung der Legionellen in bestehenden biologischen Abwasserbehandlungsanlagen dar, wenn die Reinigungsleistung der Anlagen beibehalten werden soll. Der Einsatz von Mikrosilber, Chlordioxid, Ozon, Peroxid sowie pH-Wert-Änderungen waren nicht in der Lage die Legionellenkonzentration in den Reaktoren dauerhaft zu verringern, ohne die biologische Stufe nachhaltig zu schädigen.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass alle Versuche zur Abreicherung der Legionellenkonzentration in Belebungsbecken im Betrieb sich als nicht durchführbar erwiesen haben, wenn entsprechende Risikofaktoren, wie die Abwasserzusammensetzung mit hohem Industrieanteil, eine hohe Temperatur ($\geq 23\text{ °C}$, teilweise $37\text{--}43\text{ °C}$) und hohe Konzentrationen von verwertbaren organischen Substanzen - vorzugsweise Proteinen - vorhanden sind.

6.3.2 Behandlung von Abläufen bestehender Anlagen zur Verminderung von Legionellen

Für die Behandlung von Abläufen bestehender Kläranlagen mit erhöhten Legionellenkonzentrationen hat sich der Einsatz von ultraviolettem Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm als wirksam erwiesen. Voraussetzung für die Effizienz einer solchen Anlage ist die weitgehende Feststoffabtrennung vor dieser Behandlungsstufe. Alternativ kann der Einsatz von Mikrofiltrationsanlagen zur Behandlung der Abläufe oder auch als Ersatz für die Nachklärung in Erwägung gezogen werden. Der Einsatz von Mikrofiltrationsanlagen in Verbindung mit biologischen Vorbehandlungsanlagen gestaltet sich aufgrund der geringeren Permeabilität jedoch als schwierig. Die Verwendung von Chemikalien zur Behandlung von Abläufen ist nur unter Berücksichtigung der Einleitbedingungen in das nachfolgende Gewässer mit entsprechender Neutralisation und Kontrolle möglich, sollte jedoch aus Gründen der Aufsalzung und ggf. AOX-Bildung auf Ausnahmen beschränkt werden.

6.3.3 Vermeidung von Aerosolbelastungen im direkten Umfeld der Abwasserbehandlungsanlagen

Wesentlicher Bestandteil einer Vermeidungsstrategie für Legionellenbelastungen ist die Verhinderung von Aerosolaustrag aus mit Legionellen belasteten Abwasserbehandlungsanlagen und auch aus Transportkanälen.

Wenn im **Ablauf der Anlagen** - vor einer Desinfektion - Konzentrationen von > 1.000 KBE Legionellen/100 ml festgestellt werden, muss eine Stufenkontrolle und eine Be-

stimmung der Legionellen-Spezies erfolgen; nach einer Risikoabschätzung müssen ggf. Maßnahmen zur Vermeidung von Aerosolaustrag getroffen werden.

Für **Transportkanäle** mit Konzentrationen von > 1.000 KBE Legionellen/100 ml im Abwasser gelten die gleichen Vorsichtsmaßnahmen.

Bei Konzentrationen im Ablauf von > 10.000 KBE Legionellen/100 ml müssen Maßnahmen getroffen werden. Die im Einzelfall zu ergreifenden Maßnahmen müssen in Zusammenarbeit mit ausgewiesenen Experten festgelegt werden. Folgende präventiven Maßnahmen und Änderungen im Verfahrensprozess sind möglich – zur Effektivität der Maßnahmen besteht noch Forschungsbedarf:

- Mechanische Vorreinigungsanlagen – z. B. Sieb- und Rechengebäude – mit Aerosolentwicklung bei Reinigungsarbeiten - müssen entsprechend eingehaust werden und dürfen für Reinigungszwecke nur mit Mundschutz betreten werden.
- Offene Transportkanäle und Förderschnecken auf den Anlagen sollten vermieden werden oder müssen abgedeckt werden.
- Belebungsbecken sollten bei der o. g. Legionellenbelastung im Ablauf der Anlage abgedeckt werden.
- Für die Belüftung sollten keine Oberflächenbelüfter gewählt werden, sondern Anlagen mit geringer Aerosolbildung, wie z. B. feinblasige Belüftung oder getauchte Belüfter.
- Der zeitweise Einsatz von Reinsauerstoff zur Begasung kann den Aerosolaustrag ebenfalls deutlich vermindern.
- Kaskaden mit Turbulenzen oder Abstürzen sollten zur Aerosolvermeidung nicht eingesetzt werden.
- Offene Tropfkörper sollten nicht betrieben werden, bei geschlossenen Tropfkörpern mit Umluftführung ist eine Abluftdesinfektion notwendig. Da sich Biofilmverfahren jedoch grundsätzlich für die Anreicherung von Legionellen gut eignen, wäre hier zu prüfen, ob diese Technologie bei Gefährdung durch Legionellen verantwortlich werden kann.
- In anaeroben Abwasserbehandlungsanlagen findet nach bisherigem Kenntnisstand offensichtlich kein Wachstum von Legionellen statt, bereits im Zulauf vorhandene Legionellen werden jedoch nicht eliminiert. Die anaerobe Vorbehandlung von industriellen Abwässern mit gutem Substratpotential für Legionellenwachstum sollte als eine Lösungsmöglichkeit geprüft werden. Geklärt werden muss hier, ob durch den Substratabbau bei dieser Vorbehandlungsmaßnahme ein Wachstum in nachgeschalteten aeroben Anlagen vermieden werden kann.
- Schlammbehandlungsanlagen (Eindickmaschinen, Zentrifugen, Kammerfilterpressen, Bandfilterpressen) müssen mit besonderer Vorsicht bedient werden, wenn dort Schlamm mit Legionellen behandelt wird. Das Bedienungspersonal darf nur mit entsprechender Sicherheitsbelehrung und mit Mundschutz arbeiten, dies gilt besonders bei Reinigungs- und Abspritzarbeiten (z. B. mit Hochdruckspritzgeräten). Eine Behandlung von Schlamm mit Branntkalk hat sich als nicht wirksam erwiesen.
- Aerosolbelastete Innenbereiche belasteter Anlagen dürfen nur mit entsprechendem Mundschutz (FFP 2) betreten werden.

- Transporte von legionellenbelastetem Schlamm sind entsprechend abzudecken und vor Aerosolaustrag zu schützen.
- Bei der Verwertung oder Entsorgung von legionellenbelastetem Schlamm müssen Sicherheitsmaßnahmen zum Schutz der Mitarbeiter und zur Vermeidung von Aerosolaustrag berücksichtigt werden.
- Bei Kanälen, in denen legionellenbelastetes Abwasser transportiert wird, müssen die Schachtdeckel geschlossen werden, um Aerosolaustrag zu vermeiden. Vorzugsweise sind in solchen Fällen getrennte Kanalsysteme für Regen- und Schmutzwasser sowie ggf. die Trennung von betrieblichem und sonstigem Schmutzwasser zu empfehlen.
- Die Abluft von Anlagenteilen, die im Zusammenhang mit Maßnahmen zur Vermeidung von Aerosolaustrag abgedeckt wurden, muss einer Behandlungsstufe – z. B. Desinfektion - zugeführt werden. Die Wirkung von Biofiltern ist in diesem Zusammenhang noch nicht hinreichend geklärt. Es besteht noch Forschungsbedarf. Orientierende Luftmessungen gaben bislang keinen Hinweis auf einen Austrag; diese sind jedoch zu gering in der Anzahl.

Für den Schutz des Kläranlagenpersonals wird weiterhin empfohlen:

- Arbeiten zur Reinigung von Oberflächen oder Ausrüstungsteilen sollten nur mit Trinkwasser durchgeführt werden.
- Reinigungsarbeiten mit Hochdruckgeräten und exponierte Arbeiten sollten nur mit einer Atemschutzmaske verrichtet werden (FFP 2 oder FFP 3-Maske je nach Art der Tätigkeit z. B. bei Reinigung mit Wasser/ Luftstrahlsystemen zur Entfernung von Biofilm und Ablagerungen in Kläranlagenbecken und Abwasserkanälen: FFP 3).
- Aus Gründen des Arbeitsschutzes müssen in Kläranlagen die Bereiche, in denen hohe Konzentrationen an Aerosolen auftreten, ausgewiesen werden und es ist
- Persönliche Schutzausrüstung (PSA) ist vorzuhalten.

Zur Früherkennung sollten bei Anlagen mit Legionellenverdacht bestimmte Leitparameter, wie z. B. CSB der organischen Trockensubstanz, Kjeldahl-Stickstoff der organischen Trockensubstanz, Aminosäurespektrum, mit in die Routineuntersuchungen einbezogen werden. Hier besteht im Hinblick auf die Zusammenhänge jedoch noch Forschungsbedarf.

6.4 Methoden einer weitergehenden quantitativen Risikobewertung

Zur Risikobewertung werden zwei Ansätze zur Prognose eines Risikos im Rahmen von Forschungsprojekten durchgeführt:

- Verwendung eines mathematischen Modells zur Berechnung des Risikos,

- Verwendung einer qualitativen Abschätzung des Risikos.

Der Ansatz unter Verwendung eines mathematischen Modells arbeitet mit einem quantitativ-mikrobiologischen Risikobewertungs-Modell (QMRA = Quantitative Microbiological Risk Assessment). Die Konzentrationen von Legionellen wurden in verschiedenen Abwässern gemessen. Konzentrationen in der Luft werden aus einem Koeffizienten berechnet, der aus Messungen an verschiedenen Stellen auf der Kläranlage ermittelt wurde.

Bei der Verwendung von analytischen Ergebnissen von Legionellen mittels qPCR, scheint das Risiko sehr hoch und inkohärent mit den epidemiologischen Daten. Dies ist auf die Diskrepanz zwischen dem quantitativ-mikrobiologischen Risikobewertungs-Modell zurückzuführen, welches auf Kulturverfahren basiert, und der Übertragung dieser Daten auf mittels PCR gewonnenen Daten.

Wenn das quantitativ-mikrobiologische Risikobewertungs-Modell als Grundlage Ergebnisse mittels Kulturverfahren zu Grunde legt, die z. B. aus Luftproben in einem Umkreis von 300 m um Harnes (Legionellose-Ausbruchsgeschehen in Pas-de-Calais 2003/2004) gewonnen wurden, kann das Risiko als schwach, aber nicht als vernachlässigbar bezeichnet werden.

Eine Konsentierung ist international noch nicht erfolgt. Diese Ansätze bedürfen noch weitergehender Forschungsarbeiten, bevor sie in der Routine Eingang finden. (Siehe auch VDI 4250 Blatt 2).

7 Zur Reinigung und Desinfektion von Verdunstungskühlanlagen

7.1 Einleitung

Der Reinigung, dem Reinigungszustand, der Biofilmkontrolle und ggf. der Desinfektion von Verdunstungskühlanlagen kommt hinsichtlich der Prävention und Kontrolle von Legionellen entscheidende Bedeutung zu. Dabei gilt grundsätzlich, dass ohne einen guten Reinigungszustand eine Desinfektion des Systems nicht möglich ist. Insofern ist ein guter Reinigungszustand eine zwingende Voraussetzung für eine wirksame Desinfektion und bietet Schutz vor einer Selektion biozidtoleranter Legionellen. Das Wasserbehandlungsprogramm in der Anlage sollte daher in der Lage sein, nicht nur Legionellen und andere mikrobielle Prozesse zu kontrollieren, sondern auch Korrosion, Ablagerungen und Biofilmbildung zu vermeiden, um das Gesamtsystem in einem guten Reinigungszustand zu halten. Dies muss regelmäßig überprüft werden, um sicherzustellen, dass diese Maßnahmen zum gewünschten Erfolg führen. Die Neigung einer Anlage, Verunreinigungen aufzuweisen - entweder durch wasserbedingte Verunreinigungen oder luftgetragene Kontaminanten - entscheidet, wie häufig eine Reinigung durchgeführt werden muss. Systeme sollten immer dann gereinigt werden, wenn eine Inspektion die Notwendigkeit zeigt oder wenn entsprechende au-

ßergewöhnliche Gegebenheiten wie lokale Baumaßnahmen oder ein Anstieg in der Trübung des Füllwassers sich zeigen. In den Abbildungen im Anhang IV sind unterschiedliche Zustände von Ablagerungen und Biofilmen dargestellt, die als gut (grün), akzeptabel (gelb), Vorsicht (braun-gelb) sowie hohes Risiko (rot) dargestellt sind.

Auch die Qualität des Füllwassers hat einen großen Einfluss auf den hygienischen Zustand der Anlage und die Wirkung von Desinfektionsverfahren. Beim Füllwasser handelt es sich bei kleineren Anlagen häufig um Trinkwasser. Das Füllwasser kann aber auch aus anderen Wasserressourcen wie Flüssen, Seen oder Quellen sowie von Prozesswasser stammen. Diese Wässer benötigen eine Vorbehandlung, um Kontaminationen zu reduzieren und sie der Qualität von Trinkwasser anzugleichen. Sofern keine Vorbehandlung zur Angleichung an Trinkwasserqualität durchgeführt wird, muss mit erheblichen Variationen hinsichtlich suspendierter Trübstoffe und der mikrobiellen Zusammensetzung gerechnet werden. Dies sollte bei einer Gefährdungsbeurteilung des Kühlwassersystems und bei der Managementstrategie berücksichtigt werden.

Bei verdunstungskühlanlagenassoziierten Legionellose-Ausbrüchen konnten unzureichende Reinigung und Desinfektion als Teilursache des Ausbruchsgeschehens wie z. B. in Barrow-in Furness (England), Ulm und Warstein identifiziert werden. Daher müssen die Grundlagen der Reinigung und Desinfektion sowie die Kriterien für die Auswahl von Desinfektionsverfahren beim qualitätsgesicherten Betrieb von Verdunstungsrückkühlanlagen bekannt sein.

Derzeit gibt es neben den Empfehlungen aus der ehemaligen EWGLI Guideline und der WHO Monographie (Bartram et al. 2007) nationale Richtlinien, in denen Fragen der Reinigung und Desinfektion geregelt werden.

Diese sind zum Beispiel:

1. VDI Richtlinie 2047, Teil 2: "Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen" 01/2015

Diese Richtlinie gilt für Verdunstungskühlanlagen mit Ausnahme von Naturzugkühltürmen mit einer thermischen Rückkühlleistung von > 200 MW und gibt Empfehlungen zum hygienegerechten Bau und Betrieb.

2. Legionnaires' disease: Technical guidance, Part 1: The control of legionella bacteria in evaporative cooling systems des Health and Safety Executive der "Health protection " von England and Wales 2013

Die entsprechende Leitlinie gibt Hinweise über Arten und Betriebsweise, Anforderungen an die Kühlwasserbehandlungsprogramme, Inspektion, Reinigung und Desinfektionsverfahren, Überprüfung der Wasserqualität und Maßnahmen im Fall eines Legionellen-Ausbruches.

Diese werden nachfolgend hinsichtlich ihrer Anforderungen insbesondere an die Desinfektion erläutert.

7.2 Rechtliche Grundlagen in Deutschland

Die Verwendung von Bioziden unterliegt der Biozidproduktrichtlinie (BPR) EU 528/2012 und der Biozidverordnung. Zusätzlich muss bei Bioziden mit gefährlichen Eigenschaften (z. B. gesundheitsschädlich, reizend, ätzend) die Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) beachtet werden. Es dürfen nach BPR nur zugelassene Biozidprodukte der Produktart PT 11 für Kühlwasser verwendet werden. Bei der Verwendung von Bioziden ist ordnungsgemäß und nach guter fachlicher Praxis zu verfahren (GefStoffV, § 16 Absatz 3 in Verbindung mit TRGS 500, Punkt 5.1 (10)). Das setzt voraus, dass die Mitarbeiter im Umgang mit dem jeweiligen Biozid geschult und unterwiesen worden sind. Biozide dürfen nicht verwendet werden, soweit damit zu rechnen ist, dass ihre Anwendung im Einzelfall schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit von Menschen, andere als die Zielorganismen oder auf die Umwelt hat.

Im Hinblick auf den Gewässerschutz sind die Anforderungen der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) zu beachten, die in Deutschland durch das Wasserhaushaltsgesetz (WHG) und die Oberflächengewässerverordnung (OGewV) umgesetzt sind. Insbesondere können Einleitungen von Kraftwerken ohne biologische Reinigungsanlagen in abflussschwache Gewässer nachteilige Auswirkungen auf die Gewässerökologie haben. Der Einsatz von Bioziden ist durch eine sachgerechte Berücksichtigung physikalischer, biologischer, chemischer und sonstiger Alternativen auf ein Minimum zu begrenzen (VDI 2047 Blatt 2).

Weiterhin sind die rechtlichen Vorgaben aus den Anhängen der Abwasserverordnung (22, 31, 45 usw.) zu beachten.

Priorität muss aber die Kontrolle des Legionellenwachstums haben. Andere Aspekte dürfen nicht dazu führen, dass bei hohen Legionellenkonzentrationen auf eine Desinfektion verzichtet wird oder diese in unzureichenden Konzentrationen angewendet wird, da ein Verzicht oder die nicht adäquate Anwendung von Desinfektionsverfahren zu Gefahren für die öffentliche Gesundheit werden kann.

7.3 Behandlung des Kreislaufwassers und Auswahl von Desinfektionsverfahren

Im Kreislaufwasser muss sichergestellt werden, dass es nicht zu erhöhten Konzentrationen von Legionellen kommt. Dazu können Biozide - teilweise in Kombination mit anderen Verfahren (z.B. UV-Behandlung, Einsatz oberflächenaktiver Substanzen) - eingesetzt werden. Aus diesen Gründen müssen Dosierstationen für Biozide vorsorglich in Neuanlagen vorgesehen werden. Die Wirksamkeit des eingesetzten Biozid-

produkts gegen Legionellen muss durch eine Prüfung nach DIN EN 13623 nachgewiesen sein, wobei nach Auffassung der Expertenkommission die Gutachten über die erfolgreiche Prüfung nach DIN EN 13623 seitens des Anwenders vom Hersteller anzufordern sind. Zukünftig sollten nach Auffassung der Expertenkommission – wie auch bei der Listung von Desinfektionsverfahren in medizinischen Bereichen in der VAH Liste - nur noch Desinfektionsverfahren angewendet werden, die in einer Liste von geprüften und für wirksam befundenen Desinfektionsverfahren für Verdunstungsrückkühlwerke aufgeführt sind.

Hinsichtlich ihrer Wirkungsweise und der Auswirkungen auf Betrieb und Überwachung muss man grundsätzlich unterscheiden zwischen:

oxidierend wirkenden Bioziden und

nicht oxidierend wirkenden Bioziden.

7.3.1 Oxidierend wirkende Biozide

Beispiele für oxidierend wirkende Biozide sind:

- anorganische Chlor- und Bromverbindungen (Chlor/Hypochlorige Säure/Hypochlorit, Brom/Hypobromige Säure/Hypobromit), die Halogene abspalten
- Chlordioxid (nicht chlorbildend)
- Wasserstoffperoxid
- Peressigsäure
- Ozon
- organische Chlor- und Bromverbindungen (Halogenabspalter, Tri- und Dichlorisocyanursäure)

Die am häufigsten angewandten oxidierenden Biozide im Kühlwasser sind solche, die auf Chlor und Brom-Verbindungen basieren und welche als aktives Agens die jeweiligen hypohalogenigen Säuren bzw. deren Anionen freisetzen. Bei der Anwendung dieser Biozide besteht durch Abreaktion des jeweiligen „freien“ Halogens mit organischen Wasserinhaltsstoffen die Gefahr der AOX-Bildung (Trihalogenmethane, halogenierte Säuren, Halogenamine).

Kommt es zum Anstieg des pH-Wertes im Rückkühlwasser, sind **Chlorverbindungen** in der Regel weniger Biozid-aktiv und langsamer wirkend als **Bromverbindungen**. Aus diesem Grunde ist die Anwendung von chlorbasierten Biozid-Programmen auf solche Systeme beschränkt, die über eine pH-Kontrolle verfügen. Brombasierte Biozid-Programme sind in der Regel eher geeignet für Systeme, in denen der Kühlwasser-pH dazu neigt, den pH 8 zu überschreiten.

Bei dem Einsatz von halogenbasierten Bioziden sollten in der Regel messbare Konzentrationen im Bereich zwischen 0,5 – 1 mg/l als Cl_2 oder 1 – 2 mg/l Br_2 erreicht werden. Unter solchen Bedingungen kann in der Regel eine gute mikrobiologische Kontrolle sichergestellt werden. Bei höheren pH-Werten kann es notwendig sein, die Halogenreserve zu erhöhen, um die Reduktion der bioziden Aktivität zu kompensieren.

Aufgrund ihrer Wirkungsweise neigen oxidierende Biozide nicht dazu, eine mikrobielle Toleranz oder Selektion zu fördern, sodass es normalerweise nicht notwendig ist, ein zweites alternatives Biozid zu dosieren, solange das oxidierende Biozid nicht zu selten dosiert wird. Häufig werden biodispersierende Chemikalien zudosiert, wobei es sich um spezielle oberflächenaktive Substanzen handelt, um die Penetration und die Dispersion des oxidierenden Biozids in den Biofilm zu verbessern. Während es normalerweise nicht notwendig ist, ein zweites Biozid zu zudosieren, wenn ein oxidierendes Biozid kontinuierlich zudosiert wird, kann es notwendig sein, ein spezifisch mikrobielles Problem, wie z. B. Algenwachstum an den Stellen anzugehen, wo das Rückkühlsystem gegenüber dem Sonnenlicht exponiert ist.

Bei korrekter Anwendung sind sowohl Chlor- als auch Brom-Biozidprogramme sehr wirksam, um das gesamte mikrobielle Wachstum unter Kontrolle zu halten und der Proliferation von Legionellen vorzubeugen, selbst wenn entsprechende Nährstoffgehalte vorhanden sind. Ihre Wirksamkeit kann jedoch durch bestimmte prozessbedingte Kontaminationen, wie z. B. Ammonium oder eine sehr hohe organische Last, eingeschränkt werden. Unter solchen Umständen kann ein alternatives oxidierendes Biozid, wie z. B. Chlordioxid (das kein Chlorgas bildet) oder ein adäquates nicht oxidierendes Biozid-Programm eingesetzt werden.

Chlordioxid wird nicht durch den Wasser-pH beeinflusst und reagiert nicht mit Ammoniak-Verbindungen. Chlordioxid ist wirksam hinsichtlich der Penetration und Verteilung im Biofilm. Dennoch ist die Zudosierung von Chlordioxid komplexer und seine Flüchtigkeit bedeutet, dass messbare Restkonzentrationen von Chlordioxid im zirkulierenden Wasser schwieriger aufrecht zu erhalten sind. Chlordioxid wird in der Regel als ein Biozid für die Anwendung für solche Fälle in Reserve gehalten, in denen die Art und Umstände der Kontamination die Anwendung von Chlor und Brom ausschließen.

Ozon kann als ein schnell wirkendes Biozid mit breitem antimikrobiellen Wirkungsspektrum eingesetzt werden. Innerhalb von Verdunstungskühlanlagen kann wegen der kurzen Halbwertszeit aufgrund einer raschen Zersetzung eine Beaufschlagung von Bereichen des Rückkühlsystems mit unzureichenden Konzentrationen von Ozon nicht ausgeschlossen werden (nur geringe Depotwirkung). Dies ist insbesondere in großen Rückkühlsystemen mit langen Haltezeiten zu berücksichtigen. Dabei muss auch die Reaktivität des Ozons mit anderen Behandlungsprodukten wie Korrosionsinhibitoren berücksichtigt werden.

Wasserstoffperoxid und **Peressigsäure** haben den Vorteil, dass ausschließlich umweltfreundliche Abbauprodukte entstehen. Es besteht aber die Gefahr der Inaktivierung dieser Wirkstoffe durch Enzyme im Kühlwasser oder in den Biofilmen der Anlage.

7.3.2 Nicht oxidierend wirkende Biozide

Nicht oxidierende Biozide sind organische Verbindungen, die in der Regel komplexer als oxidierende Biozide sind. Sie sind meist stabiler und persistenter im Rückkühlwasser als oxidierende Biozide, aber ihre Konzentration nimmt mit der Zeit ab, da der Wasserverlust und Abbau und Verbrauch der aktiven Komponenten der nicht oxidierenden Biozide mit der Zeit zunehmen.

Beispiele für nicht oxidierend wirkende Biozide sind:

- Quaternäre Ammoniumverbindungen
- Glutardialdehyd
- organische Schwefelverbindungen
- (Isothiazolinone, Tetrakis(hydroxymethyl)phosphoniumsulfat (THPS))
- Organobromverbindungen(z. B. Dibromnitrilopropionamid (DBNPA), 2-Brom-2-nitro-propan-1,3-diol)
- Organochlorverbindungen

Ein nicht oxidierendes Biozid-Programm sollte zwei Biozide mit unterschiedlichen Abtötungsmechanismen auf einer alternierenden Basis beinhalten, um das Risiko zu minimieren, dass eine mikrobielle Flora selektiert wird, die gegenüber einem einzigen Biozidtypus tolerant ist. Die Wirksamkeit nicht oxidierender Biozide kann durch den pH-Wert und die Temperatur des Wassers im System beeinflusst werden. Dies sollte berücksichtigt werden um sicherzustellen, dass das Biozid-Programm effektiv ist.

7.4 Anwendung

Für eine erfolgreiche Biozidbehandlung ist es wichtig, dass das Biozid in ausreichender Konzentration und mit der notwendigen Einwirkzeit eingesetzt wird und dass von der Biozidbehandlung alle Stellen des Wasserkreislaufes erreicht werden. Bei zu geringen Biozidkonzentrationen oder zu geringer Einwirkzeit kann es zur Ausbildung von Resistenzen oder Adaptation kommen. Beim Einsatz nicht oxidierender Biozide muss der Wirkstoff in regelmäßigen Abständen (z. B. quartalsweise) gewechselt werden, um Resistenzen vorzubeugen.

Die Dosierung und Kontrolle des Biozids sollte automatisch erfolgen, um sicherzustellen, dass die notwendige Konzentration des Biozids mit der entsprechenden Häufigkeit angewendet wird. Die Dosierung eines oxidierenden Biozids wie Brom oder Chlor kann durch Redoxpotential oder durch amperometrische Kontrollsysteme überprüft werden, die wiederum die Dosierung in Abhängigkeit vom Bedarf des oxidierenden Biozids so steuert, dass die notwendige Biozidkonzentration sichergestellt wird.

Für die Bestimmung der notwendigen Zugabemenge an Bioziden müssen viele Faktoren berücksichtigt werden, wie das Gesamtvolumen des Kreislaufwassers, die Zielkonzentration, die Verweilzeit, die Wasserbeschaffenheit u.a. die Art und das Ausmaß der mikrobiellen Belastung, die Konzentration organischer Substanzen, pH-Wert und Temperatur. Die Tabellen B1 und B2 in der VDI 2047 Blatt 2 geben dazu wertvolle Hinweise.

Die Biozid-Behandlung sollte in der Lage sein, mikrobielles Wachstum im Kühlwasser konsistent derart unter Kontrolle zu halten, dass die Konzentration der Gesamtkoloniezahl der aeroben Bakterien im Normalzustand bzw. nicht höher als 10.000 KBE/ml ist und andere relevante Mikroorganismen wie insbesondere Legionellen unter Kontrolle gehalten werden.

Die Wirksamkeit des Biozid-Regimes sollte wöchentlich überprüft werden, wobei einfache mikrobielle Dip Slides oder alternative Kulturtechniken angewendet werden können. Legionellen sollten mindestens auf einer vierteljährlichen Basis überprüft werden. Eine Anpassung der Kontrollmaßnahmen muss bei jedem Anstieg der Koloniezahlen überprüft werden.

Oxidierende Biozide sollten möglichst kontinuierlich oder in Abhängigkeit vom Redox oder der amperometrischen Kontrollsysteme zudosiert werden. Sofern Halogenbiozide in Intervallen zudosiert werden, sollten sie ausreichend häufig zudosiert werden und in ausreichenden Konzentrationen, um eine Kontrolle des mikrobiellen Wachstums zu allen Zeitpunkten sicherzustellen.

Um die richtige Konzentration der **nicht oxidierenden Biozide** zur Abtötung von Mikroorganismen zu erreichen, werden die Biozide in der Regel intermittierend zudosiert. Die Frequenz und das Volumen der Applikation sind abhängig vom Systemvolumen, von der Halbwertszeit, der Rekontaminationsrate und der notwendigen Biozid-Kontaktzeit - in der Regel mindestens 4 Stunden. Diese Aspekte müssen berücksichtigt werden um sicherzustellen, dass die notwendige Biozid-Konzentration zur Abtötung von Mikroorganismen erreicht wird. In Systemen mit kleineren Wasservolumina und höherer Evaporationsrate ist es insbesondere notwendig, dass die oben angegebenen Parameter exakt bestimmt werden. Im Fall von Systemen, die lange Retentionszeiten haben, ist die Halbwertszeit des Biozids der kontrollierende Faktor. Das gesamte Systemvolumen sollte hierbei berücksichtigt werden um sicherzustellen,

len, dass die gewünschten Konzentrationen des nichtoxidierenden Biozides richtig angewendet werden.

Ein Vorteil der oxidierenden Biozide ist, dass durch einfache Messtechnik leicht zu überprüfen ist, ob eine ausreichende Biozidkonzentration im Kühlwasser vorhanden ist. Bei nicht oxidativen Bioziden ist dagegen eine analytische Konzentrationsbestimmung nur in Ausnahmefällen möglich. Daher ist beim erstmaligen Einsatz von nicht oxidativen Bioziden und bei Biozidwechsel innerhalb nicht oxidativer Biozide eine engmaschige mikrobiologische Überwachung notwendig. Es ist auch sinnvoll, vor Einsatz eines nicht oxidativen Biozids die Wirkung auf die mikrobielle Flora der jeweiligen Verdunstungskühlanlage im Labor zu untersuchen.

7.5 Wasseraufbereitung und Desinfektion bei Probebetrieb, Stillstand oder Betriebsunterbrechung

Die mikrobiologische Beschaffenheit (*Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, Koloniezahl) des Füllwassers beim Probebetrieb muss vor Befüllung bekannt sein. Die Befüllung darf nur stattfinden, wenn die Wasserbeschaffenheit des Füllwassers keine negativen Auswirkungen auf den hygienegerechten Betrieb der Anlage erwarten lässt. Die Wasseraufbereitung/Wasserbehandlung und ggf. die Desinfektionseinrichtung müssen direkt mit Befüllung der Anlage kontrolliert in Betrieb gehen (VDI 2047 Blatt 2). Werden im Rohwasser erhöhte Konzentrationen an Legionellen oder *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen, muss vor Einschalten des Ventilators das Kühlwasser nachweislich wirksam desinfiziert sein und die Legionellenkonzentration darf die in der VDI 2047 Blatt 2 genannten Maßnahmenwerte nicht überschreiten.

Bei Betriebsunterbrechungen oder Stillstandzeiten ist sinngemäß zu verfahren wie bei Probebetrieb.

Beim Abschalten einzelner Zellen im Betrieb von länger als sieben Tage müssen ebenfalls Maßnahmen ergriffen werden, um ein Wachstum von Legionellen zu vermeiden. Die betreffenden Zellen müssen hinreichend vom Kreislaufwasser mit geeigneter Biozidbehandlung durchströmt werden.

7.6 Probenahme von Biozidbehandeltem Wasser

Bei den Probenahmen ist die Art der Biozidbehandlung zu beachten. Die eingesetzten Biozide müssen soweit wie möglich bei der Probenahme inaktiviert werden. Damit dies möglich ist, muss der Probennehmer über die eingesetzten Biozide informiert sein.

Für die Beprobung von Wasser, das mit oxidativen Bioziden behandelt wurde, müssen Probenbehälter mit z. B. Natriumthiosulfat verwendet werden. Für Wasserstoff-

peroxid und Peressigsäure ist Katalase als Inaktivierungsmittel geeignet. „Neutralisationsmedien“ für nicht oxidative Biozide sind in der DIN EN 13623, Anhang B bzw. der VDI 2047 Blatt 2, Anhang B2 aufgeführt. Da nicht alle in der Praxis verwendeten nicht oxidativen Biozide inaktiviert werden können, muss bei der Probenahmen generell beachtet werden, dass die Probenahme vor einer Stoßdosierung des Biozids erfolgt.

Es ist entscheidend, dass die Proben das Labor gemäß der Anforderungen der ISO 19458:2006, erreichen und dass das Laborpersonal informiert ist, ob Neutralisationsmittel zugegeben wurde oder ob noch aktive Biozide in der Probe vorhanden sein könnten.

7.7 Alternative Behandlungstechniken

Es gibt eine Reihe von alternativen Techniken zur Wasserbehandlung, die zum Teil als alleinige Technologie oder in Kombination mit chemischen Biozid-Programmen gefahren werden. Der Eigentümer oder Betreiber von Verdunstungskühlsystemen sollte sicherstellen, dass die entsprechende Technologie für die spezifischen Anwendungszwecke seines Verdunstungsrückkühlwerkes geeignet ist, da die Effektivität dieser Techniken erheblich variieren kann. Dabei sind die spezifischen Wassercharakteristika, die Betriebsbedingungen und das gewünschte Ergebnis zu berücksichtigen. Bei Einführung alternativer Behandlungstechniken muss eine häufigere mikrobielle Kontrolle solange durchgeführt werden, bis sichergestellt ist, dass eine sichere Betriebsweise gewährleistet werden kann.

UV-Bestrahlung ist seit vielen Jahren in der Anwendung um Wassersysteme zu behandeln, insbesondere dann, wenn das Wasser eine sehr geringe Trübung oder Wasserhärte aufweist. Der spektrale Schwächungskoeffizient bei der Wellenlänge 254 nm (SSK 254) soll im Normalbetrieb nicht mehr als 20 m^{-1} betragen. In Verdunstungskühlsystemen wird die UV-Behandlung in der Regel in Verbindung mit einem Biozid-Programm angewandt, da die Desinfektion nur im Bestrahlungsbereich erfolgt. Die Qualität des zu desinfizierenden Betriebswassers bedarf einer Bewertung, da ein hoher Härtegrad oder Eisen zu Ablagerungen und Trübungen der Lampenoberfläche führen kann. Eine wirksame Messeinrichtung für die UV-Bestrahlung nach DVGW W 294-3 muss vorhanden sein. Die Bestrahlungsleistung sollte dabei mindestens 400 J/m^2 betragen, um eine ausreichende Desinfektion zu gewährleisten.

7.8 Erfahrungen mit Naturzugkühltürmen

Bei Naturzugkühltürmen, die mit offenen Wasserkreisläufen (Nasskühlung) arbeiten, besteht die Gefahr der Verkeimung und einer Verbreitung der Mikroorganismen durch Aerosole. Besonders in den Sommermonaten kann es in diesen Naturzugkühltürmen zur Vermehrung auch von Legionellen kommen.

Die Anwesenheit von Legionellen im Kühlwasser bedeutet noch keine Gefahr, solange keine Aerosole von Mitarbeitern oder Anwohnern eingeatmet werden. Kühltürme von Kraftwerken wurden bisher weltweit in keinem Fall als Ursache eines Ausbruches von Legionellose beschrieben.

Zur Desinfektion bei Naturzugkühltürmen gibt es in Europa unterschiedliche Erfahrungen. Beispiele für Legionellenkontaminationen in Naturzugkühltürmen sind:

- Das Atomkraftwerk Leibstadt (Schweiz) hatte im Dezember 2010, nachdem im Wasser des Kühlturms ein unzulässig hoher Legionellenbefund festgestellt wurde, noch vergeblich chemische Mittel gegen die Bakterien eingesetzt. Damals konnte die Legionellenkonzentration nicht nachhaltig gesenkt werden. Seit 2012 setzt der Betreiber 14-tägig Chemikalien zur Bekämpfung der Bakterien ein. Bisher wurde dazu die auch in Schwimmbädern gebräuchliche Substanz Natriumhypochlorit verwendet. In 2013 fand ein Testlauf mit Chlordioxid statt, um die Desinfektion zu optimieren. Das behandelte Kühlwasser wird nach der Desinfektion mitsamt den dabei entstandenen Abbauprodukten stark verdünnt in den Rhein geleitet. Die zulässigen Abgabewerte werden eingehalten. Aufgrund der Emissionen aus dem Atomkraftwerk Leibstadt befasste sich eine IKSAR-Arbeitsgruppe (Internationale Kommission zum Schutz des Rheins) mit dem Biozideinsatz bei der Legionellenbekämpfung in Kraftwerken.
- Im Rahmen der Ursachensuche beim Legionellenausbruch in Jülich wurden unter anderem die Kühltürme des Braunkohlekraftwerks Weisweiler untersucht. Dabei wurden im Kühlturm des Block F erhöhte Konzentrationen an Legionellen (61.000 KBE/100 ml) festgestellt. Der Epidemiestamm mit dem Sequenztyp 1327 konnte jedoch in keiner Probe nachgewiesen werden. Der Block F des Kohlekraftwerkes musste mehrmals ausgeschaltet werden. Zur Reduzierung der Legionellenbelastung wurde der Kühlturm gereinigt und neu befüllt. Nachdem die Werte anschließend dennoch wiederanstiegen, wurden zwei Biozid-Stoßbehandlungen durchgeführt. Das weitere Konzept zur dauerhaften Senkung der Belastung sah einen Austausch des Kühlwassers und eine regelmäßige Stoßdesinfektion mit dem bereits vorher verwendeten Biozid im Abstand von jeweils vier Tagen vor, sowie mittelfristig die Umstellung auf eine kontinuierliche Behandlung mit Monochloramin.

In der Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, die derzeit vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit (BMUB) erarbeitet wird, sollen (anders als in der VDI 2047 Blatt 2) aus Vorsorgegründen auch Anforderungen an Naturzugkühltürme festgelegt werden. Die technischen Maßnahmenwerte und die damit verbundenen Maßnahmen befinden sich noch in der Diskussion. Aufgrund der Bauart, die sich stark von den deutlich kleineren Rückkühlwerken unterscheidet, sowie in Anbetracht des andersartigen Ausbreitungsverhaltens, sind nach derzeitigem Diskussionsstand eventuell höhere Maßnahmenwerte tolerabel, als für Rückkühlwerke vorgesehen sind.

8 Zusammenfassung und Empfehlungen

Der Legionellose-Ausbruch 2013 in Warstein hat gezeigt, dass es bisher wenige Erkenntnisse über Legionellen-Konzentrationen in Industrie- und Gewerbeabwässern (z. B. Brauereien, Papierindustrie) bzw. in den entsprechenden Abwasservorbehandlungsanlagen gibt. Auch der Zusammenhang mit einer nachgeschalteten kommunalen Kläranlage als potentielle Verbreitungsquelle für Legionellen war für die Fachwelt neu.

Um die verschiedenen Fragestellungen zu beantworten, wurde eine internationale Expertenkommission vom Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes NRW (MKULNV) einberufen, um Vorschläge zu formulieren für

- Probenahme und Laboruntersuchung von Legionellen,
- Bewertungen von Legionellenbefunden im Abwasser und Gewässern,
- Vorsorgemaßnahmen,
- mögliche Anforderungen an die Überwachung und
- technische Nachrüstungen von Rückkühlwerken und von Wasser- und Abwasseranlagen.

Mögliche Risikofaktoren sollten identifiziert werden. Die Kommission hat die Arbeit im April 2014 aufgenommen und mit einem Abschlussbericht im April 2015 beendet. Noch während der Berufszeit wurden durch den Legionellose-Ausbruch 2014 in Jülich weitere Fragestellungen zur Reinigung und Desinfektion von Verdunstungskühlanlagen und Naturzugkühltürmen an die Kommission herangetragen.

Folgende Fragestellungen wurden von der Kommission behandelt und als Empfehlungen beantwortet:

- **Erarbeitung von Empfehlungen für eine einheitliche Probenahme und Laboruntersuchung von Legionellen im Abwasser, in Gewässern und im Umfeld von Kläranlagen, ggf. Luftmessungen**

Aufgrund sehr unterschiedlicher Untersuchungsergebnisse der involvierten Labore von parallel oder zeitnah entnommenen Proben war zu Beginn der Untersuchungen nach dem Epidemiefall in Warstein Ende 2013 nicht auszuschließen, dass – trotz Anlehnung an die gleichen Normen – u. a. unterschiedliche Vorgehensweisen im Labor für abweichende Daten verantwortlich waren. Es wurde festgestellt, dass die Norm Spielräume offen lässt, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

Anhand der vorliegenden Untersuchungsdaten wurden Empfehlungen für das Vorgehen bei Probenahmen und Legionellenuntersuchungen im Kulturverfahren in dem vorliegenden Bericht (Kapitel 3 und 4.1) erarbeitet und in einem

Ringversuch auf Verständlichkeit getestet. Neben dem Kulturverfahren nach ISO 11731 und DIN EN ISO 11731-2, welches als das sog. „Goldstandard“-Verfahren bezeichnet werden kann, wurden auch die alternativen Verfahren (qPCR, vPCR, FISH) mit ihren Vor- und Nachteilen beschrieben (Kapitel 4.2).

Für Emissionsmessungen zur Bestimmung von Legionellen in der Abluft von Anlagen kann zusammenfassend festgehalten werden, dass ein standardisiertes Probenahmeverfahren für Bioaerosol-Emissionen grundsätzlich zur Verfügung steht. Praktische Erfahrungen zur Abscheidung von Legionellen, aus gasförmigen oder diffusen Quellen, liegen jedoch nur begrenzt vor. Daher ist eine Quantifizierung von Legionellen-Emissionen mit einer höheren und nicht näher zu beziffernden Messunsicherheit verbunden.

- **Bewertung von Legionellenbefunden im Abwasser und Gewässer**

Nachdem in vereinzelten Gewässern erhöhte Konzentrationen von Legionellen nachgewiesen worden waren, musste international erstmalig eine Bewertung von Legionellen in Gewässern und in Abwässern vorgenommen werden. Dazu wurde ein Art Ampelsystem für technische Maßnahmenwerte von mit Kulturmethoden nachgewiesenen Legionellen in Gewässern und Abwasser entwickelt.

Bei Legionellen im Gewässer werden folgende Fallkonstellationen unterschieden und bewertet:

Badegewässer mit aerosolbildenden Attraktionen oder Gewässer mit Aerosolbildung (Kapitel 5.2.1)

Gewässer mit Entnahmen (Kapitel 5.2.2) und

Systeme mit Aerosolbildung aus einem Gewässer mit nachgewiesenem Epidemiestamm im Kontext zu einem Ausbruch (Kapitel 5.2.3)

Zusätzlich wurden Maßnahmenwerte für Legionellen im Ablauf von Kläranlagen definiert (Kapitel 6.2).

Eine Übersicht gibt die nachfolgende Bewertungstabelle.

Legionellen-Konzentration [KBE/100 mL]	< 10	10 bis < 100	100 bis < 1.000	1.000 bis < 10.000	> 10.000
Nutzung					
Badegewässer	grün	grün	gelb	orange	rot
Gewässer mit Entnahme	grün	grün	gelb	orange	rot
Gewässer mit Epidemiestamm	grün	gelb	orange	rot	rot
Ablauf Kläranlage	grün	grün	grün	gelb	rot
Ablauf KA mit Epidemiestamm	grün	grün	gelb	orange	rot

grün: keine Maßnahmen

gelb: erste Maßnahmen zur Ursachenklärung und Minimierung der Legionellen-Konzentration müssen getroffen werden (z. B. Desinfektion)

orange: weitergehende Maßnahmen zur Kontrolle und Minimierung der Legionellen-Konzentration

rot: generelles Entnahme- oder Nutzungsverbot, Sofortmaßnahmen, Gefahrenabwehr

- **Risikobewertung Abwasserbeschaffenheit und örtliche Situation**

Das Risiko einer Verbreitung von Legionellen über Aerosole aus mit Legionellen belasteten Abwasserbehandlungsanlagen (Kläranlagen, industrielle (Vor-) Kläranlagen) ist aus einigen Fällen bekannt. Neu ist die Erkenntnis der Verbreitung von Legionellen über den Ablauf der Kläranlage in ein Gewässer.

Derzeit weisen nur bestimmte Kläranlagen mit folgenden Kriterien ein relevantes Risiko für Legionellenwachstum und -verbreitung auf:

relativ hohe Abwassertemperaturen $\geq 23^{\circ}\text{C}$ im Reaktor oder im Zulauf

Substrate im Abwasser mit hohen Proteingehalten und organischer Substanz (z. B. aus Brauereien, Holz- und Papierverarbeitung, Fleischverarbeitung, Milchverarbeitung, chemischer Industrie, Zuckerherstellung, Ölverarbeitung)

Aerobe biologische industrielle Abwasserbehandlungsanlagen mit Belüftung und anderen Mikroorganismen, z. B. Amöben

Aerosolbildung auf der Kläranlage (z. B. offene Förderschnecken und Belebungsbecken, Oberflächenbelüfter, Kaskaden, Reinigungsarbeiten)

Vorflutverhältnisse, nachgeschaltet im Gewässer z. B. eine Kühlwasserentnahme mit Relevanz einer Aerosolbildung (z. B. Warstein: 2 km)

Für Kläranlagen und industrielle (Vor-)Kläranlagen, die unter die o. g. Risikobewertung fallen, wird seitens der Expertenkommission eine Selbstüberwachung durch die Betreiber empfohlen.

Für Anlagen, die bereits mit Legionellen belastet sind, wurde als Ergebnis eines Forschungsvorhabens festgestellt, dass alle Versuche zur Abreicherung von Legionellenkonzentrationen durch mechanische oder chemisch/ physikalische Verfahren in Belebungsanlagen im Betrieb erfolglos geblieben sind, wenn entsprechende Risikofaktoren wie die Abwasserzusammensetzung mit hohem Industrieanteil, einer hohen Temperatur ($\geq 23^{\circ}\text{C}$, teilweise $37\text{-}43^{\circ}\text{C}$) und hohe verwertbare organische Substanzen - vorzugsweise Proteine - vorhanden sind. Der Einsatz einer anaeroben biologischen Vorbehandlung erscheint hilfreich, wenn dabei die für das Legionellenwachstum relevanten Substrate umgewandelt werden.

Nach Prüfung von Maßnahmen zur Verringerung der Temperatur, einer Veränderung der Substratzusammensetzung und einer Vermeidung von externem Eintrag von Legionellen - z. B. aus Vorbehandlungsanlagen - müssen Maßnahmen zur Vermeidung von Aerosolaustrag aus den Anlagen, Transportkanälen und auch von Schlammtransporten erfolgen. Zu den Maßnahmen gehören der Einsatz von verfahrenstechnischen Ausrüstungen mit geringer Aerosolerzeugung - wie z. B. Sauerstoffbegasung, feinblasige Belüftung - oder auch die Abdeckung von Anlagen und Anlagenteilen mit einer entsprechenden Abluftbehandlung. Arbeiten in Bereichen dieser Kläranlagen mit starker Aerosolbildung dürfen nur mit geeignetem Mundschutz ausgeführt werden.

Für die Reduzierung von Legionellen aus den Abläufen von Kläranlagen hat sich eine UV-Desinfektion als geeignet erwiesen, wobei hier eine weitgehende Feststoffelimination im Vorlauf Voraussetzung für die Funktion ist; der Einsatz einer Mikrofiltration erscheint hierfür ebenfalls als geeignet.

- **Desinfektion von Verdunstungskühlanlagen**

Die Expertenkommission hat aufgrund der Ereignisse in Jülich Empfehlungen zur Reinigung und Desinfektion von Verdunstungskühlanlagen (Kapitel 7) erarbeitet. Sie empfiehlt hierzu die zwingende Beachtung der geltenden technischen Regel VDI 2047 Blatt 2. Darüber hinaus wird die Notwendigkeit für gesetzgeberische Vorgaben für die Erfassung und den Betrieb von Verdunstungskühlanlagen (Bundesratsinitiative NRW) gesehen.

Forschungsbedarf Legionellen in Abwasser- und Rückkühlanlagen:

Der Kenntnisstand im Zusammenhang mit Legionellenwachstum, Vermeidung und Bekämpfung bei Abwasseranlagen und Rückkühlwerken muss verbessert werden. Für folgende Punkte besteht Forschungsbedarf:

- genauere Substratspezifikation
- Ermittlung von Identifikationsparametern für Abwässer (z. B. Aminosäuren, CSB und Kjeldahl-Stickstoff der organischen Trockensubstanz)
- Einfluss einer anaeroben Vorbehandlung auf die Substratveränderung und auf das Legionellenwachstum
- Verhalten der Legionellen in der Schlammfäulung
- Temperatureinfluss für Wachstum von *L. pneumophila*
- Grund für das Absterben von *L. pneumophila* nach ca. 3 Tagen extremen Wachstums / Übergang in den VBNC (viable but non-culturable) Zustand
- Zusammenhang von *L. pneumophila* Wachstum mit Ciliatenwachstum
- Einfluss von Biofilm und absterbender Biomasse auf das Wachstum von Legionellen
- Substrataufnahme und Wachstum von *L. pneumophila* im Biofilm unter verschiedenen Randbedingungen
- Umweltfaktoren, die zu VBNC Stadien führen
- Hygienische Relevanz von VBNC Stadien
- Überleben von Legionellen in Aerosolen
- Untersuchung zur Wechselwirkung von Legionellen und Amöben
- Maßnahmen zur Abluftdesinfektion (z. B. Biofilter, Entkeimungsfilter)
- Austrag und Verdriftung von Aerosolen mit Legionellenbelastung
- Austrag und Bekämpfung von Legionellen aus der Kanalisation

9 Literatur

BARTRAM J., CHARTIER, Y., LEE, J.V., POND, K., SURMAN-LEE, S. (2007): Legionella and the prevention of legionellosis. World Health Organization.

DELGADO-VISCOGLIOSI, P., SOLIGNAC, L., DELATTRE, J.-M. (2009): Viability PCR, a Culture-Independent Method for Rapid and Selective Quantification of Viable *Legionella pneumophila* Cells in Environmental Water Samples. *Appl Environ Microbiol*, 75 (11), 3502-3512.

EXNER, M., BROCKMANN, A., LÜCK, C., RÖSING, C., PLEISCHEL, S., KOCH, C., WALGER, P. (2014): Bericht - Ausbruchmanagement des Legionellenausbruchs in Warstein 2013 – Charakterisierung, Lehren und Konsequenzen aus hygienische-medizinischer Sicht.

GRIMM, D., LUDWIG, W. F., BRANDT, B. C., MICHEL, R., SCHLEIFER, K. H., HACKER, J., STEINERT, M. (2001): Development of 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes for specific detection of *Hartmannella* and *Naegleria* in *Legionella*-positive environmental samples. *Syst Appl Microbiol*, 24 (1), 76-82.

GRIMM, D., MERKERT, H., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H., HACKER, J., BRAND, B. C. (1998): Specific Detection of *Legionella pneumophila*: Construction of a New 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (7), 2686-2690.

MANSI, A., AMORI, I., MARCHESI, I., MARCELLONI, A. M., PROIETTO, A. R., FERRANTI, G., MAGINI, V., VALERIANI, F., BORELLA, P. (2014): *Legionella* spp. survival after different disinfection procedures: Comparison between conventional culture, qPCR and EMA–qPCR. *Microchemical Journal*, 112 (0), 65-69.

MANZ, W., AMANN, R., SZEWZYK, R., SZEWZYK, U., STENSTROM, T. A., HUTZLER, P., SCHLEIFER, K. H. (1995): In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology*, 141 (Pt 1) 29-39.

MKULNV NRW (2013): Bericht an die Landesregierung - Bericht über die Legionellen Infektionen in Warstein - Vorlagen16/1105 vom 10.09.2013, <http://www.landtag.nrw.de/portal/WWW/dokumentenarchiv/Dokument/MMV16-1105.pdf?von=1&bis=0>

MINISTERPRÄSIDENTIN DES LANDES NRW (2013): Entschließung des Bundesrates zur Notwendigkeit immissionsschutzrechtlicher Regelungen der Anforderungen an Errichtung und Betrieb von Verdunstungskühlanlagen – vom 03.12.2013, Vorlage 16/1473, <http://www.landtag.nrw.de/portal/WWW/dokumentenarchiv/Dokument/MMV16-1473.pdf?von=1&bis=0>

MKULNV NRW (2014): - Aktueller Sachstand Legionellen - Vorlage 16/1665 vom 17.02.2014 mit Daten zum Stand 06.02.14, <http://www.landtag.nrw.de/portal/WWW/dokumentenarchiv/Dokument/MMV16-1665.pdf?von=1&bis=0>

MKULNV NRW (2014): Bericht an die Landesregierung - Legionellenausbruch in Jülich Vorlage 16/ 2575 vom 09.01.2015, <http://www.landtag.nrw.de/portal/WWW/dokumentenarchiv/Dokument/MMV16-2575.pdf?von=1&bis=0>

ROSENWINKEL, K.-H., NOGUEIRA, R. ET. AL. (2015): Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben „Entwicklung von Maßnahmen zur Reduzierung von Legionellen in belebtem Schlamm am Beispiel der Kläranlage des Ruhrverbandes in Warstein“

SELENT, K., SELKE, D. M. (2014): LANUV NRW Konzeptvorschlag zur Harmonisierung der Legionellenuntersuchung

WALSER, S.M., BRENNER, B., TUSCHAK, C., GERBER, L., HÖRMANSDORFER, S., HERR, C.E.W. (2013): Vergleichende Innenraumluftmessungen von Bakterien und Schimmelpilzen, *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 73(9), 381–386.

Anhang I: Details zu Probenahmen basierend auf einem Konzeptpapier des LANUV (SELENT 2015)

Die nachfolgende Anleitung (Abschnitt AI.I bis AI.VIII) dient der Sicherstellung einer vergleichbaren Qualität von Probenahmen, die durch amtliche Probenahme oder andere Untersuchungsstellen zur nachfolgenden Untersuchung auf Legionellen entnommen werden. Es werden Hinweise zur Planung eines Probenahmeprogramms, zur Vorgehensweise bei Probenahmen für mikrobiologische Analysen und für den Transport, die Handhabung und die Lagerung von Proben bis zum Beginn der Untersuchung auf der Grundlage der aufgeführten Normen gegeben.

AI.I. Probenahmeplanung

Allgemeine Grundlagen zur Aufstellung von Probenahmeprogrammen und -techniken für alle Aspekte der Probenahme von Wasser (einschließlich Abwasser, Schlämme, Einleitungen und Sedimenten) siehe DIN EN ISO 5667-1.

Die Veränderlichkeit in Zeit und Raum ist wahrscheinlich der wesentlichste Aspekt, der bei der Erstellung von Probenahmeplänen zu beachten ist. Die Veränderlichkeit bestimmt die Anzahl der Probenahmestellen, die Anzahl der Wiederholungsproben und die Häufigkeit der Probenahme. Eine hohe Veränderlichkeit der Umgebung oder Einleitung in Verbindung mit einer mangelhaften Probenahmeplanung oder zu wenig Proben kann zu Daten führen, die eine zu hohe Streuung aufweisen, um eine Wirkung, Störung oder Tendenz aufzuzeigen (DIN EN ISO 5667-13;2011-08).

Die Probenahmeplanung muss die zeitlichen Veränderungen (tägliche, wöchentliche, jahreszeitliche und ereignisbedingte Schwankungen), örtlichen Veränderungen (im Fließverlauf, aber auch vertikal und horizontal an den einzelnen Probenahmestellen) sowie Veränderungen von Betriebsbedingungen bzw. Witterungsverhältnisse berücksichtigen.

Wegen der hohen Abhängigkeit der Legionellenkonzentrationen von verschiedenen Randbedingungen zielt die Probenahmeplanung in der Regel nicht darauf ab, Mittelwerte über Raum oder Zeit zu erhalten, sondern sie zielt darauf ab, tagesaktuelle und punktgenaue Daten zur jeweiligen Belastung zu erhalten.

AI.II. Anforderungen an Messinstitute und Sachkunde des Probenahme-personals

Die Stellen, die die Probenahmen durchführen, sollten für die Probenahme der jeweiligen Matrix (Wasser, Abwasser, Abluft, Außenluft, etc.) akkreditiert sein und einen Sachkundenachweis des eingesetzten Probenahme-personals bzgl. Kenntnis bakteri-

ologischer Probenahmen (basierend auf DIN EN ISO 19458) und Probenahmetechniken für die zu beprobenden Matrices, mindestens unter Vorlage der Schulungsinhalte bzw. Schulungsunterlagen vorlegen können.

Externe Probenehmer müssen in das Qualitätssicherungssystem der mit den Probenahmen beauftragten Stelle eingebunden sein (siehe ISO 17025 und Erläuterungen dazu in DAkkS 71 SD 4 011).

Eine Zertifizierung des Probenehmers allein genügt nicht. Die Verantwortung für die Durchführung der Probenahme und den Probentransport verbleibt ausschließlich bei der Leitung der mit den Probenahmen beauftragten (akkreditierten) Stelle. Diese hat dafür Sorge zu tragen, dass hinsichtlich der Unabhängigkeit der Durchführung der Probenahme im Sinne der DIN EN ISO/IEC 17025 keine Zweifel bestehen (Empfehlungen des Umweltbundesamtes „Systematische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung“ vom 23.08.2012).

Eine geregelte Schulung, Schulungsnachweise und Prüfung der Kompetenz des für die Probenahme verantwortlichen Personals ist notwendig und muss dokumentiert sein (DIN EN ISO 19458:2006-12).

Wenn im Rahmen der Selbstüberwachung von Abwasserbehandlungsanlagen Probenahmen zur Untersuchung auf Legionellen durch Stellen (z. B. den Anlagenbetreiber selbst) erfolgen, welche nicht akkreditiert sind, muss mindestens der oben beschriebene Sachkundenachweis des eingesetzten Probenahmepersonals bzgl. Kenntnis bakteriologischer Probenahmen und Probenahmetechniken für die zu beprobenden Matrices, mindestens unter Vorlage der (ggf. auch hausinternen) Schulungsinhalte bzw. Schulungsunterlagen vorhanden sein.

AI.III. Probenahmestellen

Die Probenahmestellen sind für den zu untersuchenden Gewässerabschnitt, Abwasserstrom etc. vor Ort festzulegen. Nur vor Ort lässt sich beurteilen, ob diese Stelle repräsentativ und gut zugänglich ist und mit den geeigneten Probenahmegeräten beprobt werden kann. Es sind möglichst Probenahmestellen zu wählen, bei denen eine vollständige Durchmischung eines oberhalb gelegenen Zuflusses oder einer Einleitung sichergestellt ist. Hinweise zur Auswahl der Probenahmestellen finden sich in den entsprechenden Normen (DIN EN ISO 5667-1:2005-08, DIN EN ISO 5667-13:2011-08, DIN 38402-11:2009-02, DIN 38402-15:2010-04).

Die Probenahmestellen müssen zur Wiederauffindung und zur exakten Probenidentifizierung eindeutig beschrieben und ggfs. vor Ort gekennzeichnet sein. Die Dokumentation erfolgt nach Lagekoordinaten (Ost-/Nordwert oder Rechts-/Hochwert) in Übersichts- und Detailkarten und mittels Foto.

Grundsätzlich sollten Probenahmestellen an denen die Bedingungen instabil sind, vermieden und etwaige Heterogenitäten der Inhaltsstoffe berücksichtigt werden. Mikroorganismen sind lebende Organismen, die keine ideale Lösung in Wasser bilden, sondern als Suspension mit einer gewissen Heterogenität vorliegen. Für Legionellen gilt dies in besonderem Maße, da sie zudem nicht ausschließlich in der freien Wasserphase existieren, sondern ebenfalls in Protozoen (z. B. in Amöben, wie *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella* oder Ciliaten, wie *Vorticella*) vorkommen.

Deshalb sind bei der Untersuchung von wässrigen Proben Probenahmen von Oberflächenschichten oder Mitnahme von Oberflächenfilmen zu vermeiden. Die Proben sind wie im Abschnitt AI.V nachfolgend dargestellt aus den entsprechenden Tiefen zu nehmen.

Beispiele für vorkommende Heterogenitäten:

- *Es ist nicht gleichwertig, eine unter der Oberfläche liegende oder eine Oberflächenprobe oder eine während der Entnahme durch den Oberflächenfilm „kontaminierte“ Probe zu nehmen. In einigen Fällen (z. B. stehendes Wasser) kann die Konzentration im Oberflächenfilm 1.000-mal höher sein als unter der Oberfläche.*
- *Es können unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden, wenn einerseits Proben aus Bereichen mit stagnierendem Wasser, verringertem Durchfluss oder andererseits stark durchströmten Bereichen entnommen werden.*
- *Die Beschaffenheit am Abfluss eines durchmischten Behälters ist im Allgemeinen dieselbe wie die im Wasserkörper, kann sich aber von der am Einlass deutlich unterscheiden.*
- *In Absetzbecken, die zur Sedimentation oder Eindickung von Abwasser oder Klärschlamm dienen, werden an Zuleitungs- und Abflussrohren andere Ergebnisse erzielt als aus dem Becken selbst.*

AI.IV. Probenahmegeräte und Probenbehälter

Verwendete Materialien

Grundsätzlich müssen alle zur Probenahme benötigten Arbeitsgeräte steril und chemisch inert sein. Das bedeutet, dass alle Arbeitsmaterialien so gewählt werden müssen, dass sie einer vorherigen Hitzesterilisation standhalten.

Probenahmegeräte (möglichst aus Glas, Edelstahl oder Aluminium):

- Schöpfeimer aus Edelstahl
- Schöpfbecher aus Edelstahl, evtl. mit Teleskopstange
- Teleskopstange mit Flaschengreifer
- Glas- oder Edelstahltrichter (falls keine Gießtüllen vorhanden)
- Spatel oder Schaufel aus Edelstahl (für Sichelhaut und Sedimente aus flachen Gewässern)

Sterilisation der Probenahmegeräte

Bei Verwendung von Teleskopstangen mit Edelstahl-Probenschöpfer oder Flaschenhalter ist darauf zu achten, dass insbesondere bei Verwendung eines Schöpfers bzw. Halters für mehrere Probenahmen, ausschliesslich **saubere** Gerätschaften ohne sichtbare Anhaftungen verwendet werden. Entsprechende Materialien zum Reinigen der Gerätschaften nach erfolgter Probenahme sind mitzuführen. Im optimalen Fall sollten für jede Probenahme „frische, im Labor gereinigte Schöpfer/ Halter“ verwendet werden.

Bei der Verwendung von Schöpfgefäßen ist nach mehrmaligem Gebrauch darauf zu achten, ob Veränderungen der Oberflächen der eingesetzten Materialien (z.B. Salzkorrosion an der Innenwandung von Edelstahlbechern, Porosität bzw. Aufrauung der Innenwandung eines Kunststoffbechers) erfolgt sind. Derartige Becher sind auszutauschen bzw. derart zu behandeln, dass die Oberflächen korrosionsfrei sind, um das Kontaminationsrisiko zu verringern.

Teleskopstangen/ Schöpfer/ Halter werden unmittelbar vor der Probenahme auf die erforderliche Länge eingestellt und der Probenschöpfer innen und außen und das untere Ende der Teleskopstange (mindestens bis zur Eintauchtiefe) sterilisiert.

Hierfür gibt es mehrere Varianten:

- Vorzugsweise können mehrere sterile Probenschöpfer verwendet werden.
- Abflammen: Vorzugsweise unter Verwendung eines Propan/Butan-Kartuschenbrenners möglichst mit Piezozündung. Hier ist darauf zu achten, dass das Abflammen mit der heißesten Stelle der Flamme d. h. direkt oberhalb des inneren Flammenkegels im Schmelzraum der Flamme für einen ausreichenden Zeitraum (mind. 1 Min) erfolgt.
- Desinfektion mit 70 %-igem Ethanol oder iso-Propanol. Ethanol bzw. Propanol aufsprühen und vollständig verdunsten lassen. Diese Variante ist zeitaufwendiger als das Abflammen. Insbesondere in Ex-geschützten Bereichen stellt es jedoch eine Alternative zu dem hier untersagten Abflammen dar.

Probenbehälter

Die Sterilität der Probenbehälter muss sichergestellt sein, unabhängig davon, ob sie intern sterilisiert oder ob sie bereits sterilisiert bezogen wurden. Dies gilt für Glas- und Kunststoffflaschen gleichermaßen. Nähere Hinweise zur Sterilisation der Probenbehälter siehe DIN EN ISO 11731-2:2008-06.

Das Probevolumen sollte für die Analyse aller zu untersuchenden Parameter ausreichend sein. In der Probenflasche ist ein Luftraum zu belassen, um vor der Analyse ein ausreichendes Schütteln zu ermöglichen.

Im LANUV NRW werden für die Untersuchung auf Legionellen i.d.R. handelsübliche, γ -sterilisierte, halbtransparente 250 ml-Kunststoff-Weithals-Einwegflaschen verwendet. Die Flaschen sind etwa mit 200 ml zu befüllen.

Inaktivierung von Desinfektionsmitteln

Bei einigen Untersuchungsgütern, insbesondere Kühlwässern werden im Kreislaufwasser zur Minimierung der mikrobiellen Vermehrung und Verminderung der Biofilmbildung durch Hemmung, Inaktivierung oder Abtötung der Mikroorganismen Biozide teils allein, teils in Kombination mit anderen Desinfektionsverfahren eingesetzt. Eine Übersicht gebräuchlicher Biozide sowie Desinfektionsverfahren enthält VDI 2047 Blatt 2.

Vor der Probenahme ist zu klären, ob und welche Desinfektionsmaßnahmen vorgenommen wurden (siehe Kapitel 7.6). Für etwaig vorhandene Desinfektionsmittel müssen entsprechende Inaktivierungsmaßnahmen durch Zugabe eines geeigneten inaktivierenden Agens im Überschuss zur Probe ergriffen werden, um Minderbefunde zu vermeiden. Oxidationsmittel (z. B. Chlor, Chloramin, Brom oder Ozon) können durch Zugabe von Kaliumthiosulfat oder Natriumthiosulfat in das Probengefäß inaktiviert werden (DIN EN ISO 19458:2006-12). Alternativ können in diesem Fall sterile Einweg-Gefäße mit werksseitig vorgelegtem Natriumthiosulfat verwendet werden

AI.V. Probenahmen

Allgemein

Bei der Probenahme dürfen weder die Probenahmegeräte noch die Probenflaschen (Flaschenhals, der Rand und die Verschlusinnenseite) direkt mit der Hand oder mit anderen unsterilen Stellen in Berührung kommen. Bekanntermaßen stark belastete Probenahmestellen müssen während eines Probenahmeeeinsatzes zuletzt beprobt werden, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Bei mehreren Probenahmen aus Oberflächengewässern und Abwasser am selben Tag sollten zunächst die Ge-

wässerproben und anschließend die Abwasserproben entnommen werden. Die Probenflaschen sind unmittelbar nach dem Befüllen zu verschließen und in einer Kühleinrichtung zu transportieren (siehe Abschnitt AI.VIII). Diese Wasserprobe zur Untersuchung auf Legionellen darf keinesfalls zur Bestimmung der Temperatur oder irgendeines anderen vor Ort zu prüfenden Parameters benutzt werden.

Automatische Probenahmegeräte

In bestimmten Fällen ist der Einsatz von automatischen Probenahmegeräten zur kontinuierlichen Überwachung erforderlich. Für die bakteriologische Probenahme können peristatische Pumpen mit sterilen Schläuchen eingesetzt werden (DIN EN ISO 19458:2006-12).

Die Probenahmegeräte müssen mit Kühlung und Heizung ausgestattet sein, die einen frostfreien Betrieb und eine Temperierung der Proben während des Entnahmezeitraumes von $(3 \pm 2) ^\circ\text{C}$ gewährleisten. Außerdem müssen zur Sicherstellung der Sterilität alle wasserführenden Teile (Schläuche, Verteiler...) nach erfolgter Probenahme wartungsfreundlich innerhalb kurzer Zeit vor Ort komplett ausgewechselt werden können. Idealerweise erfolgt eine Direktverteilung in die Probenbehälter. Bei Verwendung eines Probenteilers im Probenahmegerät muss dieser austauschbar sein. Das Pumpenschlauchsystem wird direkt (ohne weitere Kupplungen) an einen Probenahmehahn angeschlossen oder im Ablaufgerinne /-schacht so fixiert, dass keine Ablagerungen vom Gerinneboden mit angesaugt werden können.

Das LANUV NRW betreibt beispielsweise ein Dauerprobenahmegerät am Ablauf einer Abwasserbehandlungsanlage und wechselt dabei täglich die Schläuche, den Verteiler und die Probenbehälter. Alle wasserführenden Teile sind mehrfach vorhanden und werden stets im Labor vor dem erneuten Einsatz gereinigt und sterilisiert; die Probenbehälter (1 Liter Glasflaschen) werden z. B. bei $170 ^\circ\text{C}$ im Trockenschrank behandelt, der Verteiler wird mit iso-Propanol eingesprüht und getrocknet, Schläuche werden stets neu verwendet. Um etwaige Kontaminationen erkennen zu können, wird vor jeder Probenserie eine Blindwertprobe unter Verwendung der neu eingesetzten Teile entnommen. Die Ergebnisse der Blindwertproben lagen i.d.R. $< 100 \text{ KBE} / 100 \text{ ml}$. Die Mischproben werden jeden Tag morgens entnommen und unmittelbar dem Untersuchungslabor überbracht.

Probenahme aus Oberflächengewässern

Je nach örtlichen Gegebenheiten ist eine Probenahme direkt im Gewässer, vom Ufer, von Brücken oder vom Schiff erforderlich. In allen Fällen ist darauf zu achten, dass kein Sediment aufgewirbelt wird und in die Probenflasche gelangt. Durch die an

Ton und organischem Schluff absorbierten Bakterien kann das Ergebnis verfälscht werden.

Es wird empfohlen, aus Oberflächengewässern ausschließlich Einzelproben zu entnehmen. Eine Einzelprobe ist definitionsgemäß „eine zufällig (in Bezug auf Zeit und/oder Ort) durch einmalige Entnahme (meist durch Schöpfen) aus einem Wasserkörper gewonnene Probe“ (DIN 38402-11:2009-02, DIN 38402-15:2010-04).

Bei Fließgewässern mit mehr als 1 m Wassertiefe sollen Schöpfproben etwa 30 cm unter der Wasseroberfläche entnommen werden. Wenn aus einem Gewässer mit geringerer Tiefe genommen werden muss, ist dieses im Probenahmeprotokoll zu vermerken, weil dann ggfs. etwaige Resuspensionseffekte von Bakterien bei der Beurteilung berücksichtigt werden müssen.

Wenn eine Probenahme im Gewässer sicher und gefahrlos möglich ist, kann die innen sterile Probenflasche direkt im Gewässer gefüllt werden. Hierbei ist insbesondere darauf zu achten, dass etwaige Aufwirbelungen des Untergrundes wieder abgesetzt oder mit der Strömung abgetrieben worden sind, bevor die Flasche gefüllt wird. Dazu die Flasche umgekehrt nach unten ins Wasser bis zu einer Tiefe von etwa 30 cm untertauchen. Anschließend die Flasche durch Drehen seitwärts und aufwärts füllen, um Verschmutzungen zu vermeiden. Wenn Strömung vorhanden ist, die Flasche der Strömung zugewandt halten.

Probenahme von Abwasser

Üblicherweise werden im Rahmen der Abwasserüberwachung Mischproben (z. B. Qualifizierte Stichproben, 2h-Mischproben) entnommen. Für die Probenahme von Legionellen ist die Entnahme von Mischproben nicht empfehlenswert, da erfahrungsgemäß bei der anschließend erforderlichen Homogenisierung von Mischproben auch mit Kontaminationen zu rechnen ist, weil die Homogenisiergefäße (inkl. Entnahmehahn und Magnetrührfisch) i.d.R. nicht hinreichend sterilisiert werden.

Deshalb wird auch für die Probenahme von Abwasser ausschließlich die Entnahme von Einzelproben empfohlen.

Vor der Probenahme sollte die ausgewählte Probenahmestelle gereinigt werden, um Ablagerungen, Schlamm, Bakterienfilm usw. von der Wandung zu entfernen um sicherzustellen, dass bei der manuellen Probenahme nicht doch etwas von der Wandung abgelöst wird und in die Wasserprobe gelangt.

Im Rahmen einer routinemäßigen Prüfung auf Legionellen sollten Proben auf Kläranlagen an folgenden Stellen entnommen werden:

- Zulauf zur Kläranlage (hinter dem Rechen und Sandfang)

- Gesamtablauf (amtliche Probenahmestelle gem. § 120 LWG)

Die Probenahmestellen sollten möglichst unterhalb von Abflussmeseinrichtungen oder Wehren gewählt werden.

Probenahme aus Abwasserleitungen, Kanälen und Kanalschächten

In Kanälen, Ablaufinnen oder offenen Abflussleitungen sollte im Allgemeinen die Probenahmestelle innerhalb des Wasserkörpers liegen, z. B. ein Drittel unterhalb der Wasseroberfläche des Abwasserstromes, um zu gewährleisten, dass weder aufschwimmende noch sedimentierte Stoffe miterfasst werden. Hierzu muss eine ausreichende Breite und Tiefe von baulicher Seite und ausreichende Wassertiefe gegeben sein, die den Einsatz eines Schöpfbechers erlauben.

Sind Abflussmeseinrichtungen oder Wehre in den Kanälen vorhanden, ist die Probenahmestelle immer stromabwärts festzulegen. Der Abstand sollte hierbei mindestens das 3-fache des Rohr-/Gerinnedurchmessers betragen.

Bei flachen Gerinnen oder Kanälen können Staubleche mit V-förmigem Einschnitt eingebracht werden. Die Probe wird am Überlauf entnommen, aus dem das Abwasser in freiem Fall austritt.

Besitzen Abwasserrinnen mit flacher Führung einen Absturz, kann die Probe am Überlauf entnommen werden. Bei geringer Wasserführung können Bleche an der Überlaufkante einen besseren freien Absturz zur Entnahme der Proben gewährleisten.

Bei Probenahmeschächten handelt es sich in der Regel um Kontrollschächte, runder oder rechteckiger Bauart. Sie sollten über einen ausreichenden Querschnitt verfügen, damit manuelle Schöpfproben entnommen werden können. Geeignete Probenahmestellen im Kontrollschacht sind z.B. einmündende Abflussrohre, die etwas in den Schacht hineinragen und soweit über der Kanalsohle liegen, dass ein Schöpfgerät problemlos unter dem Rohr platziert werden kann.

Wird der Kontrollschacht vom Abwasserstrom durchflossen, muss eine ausreichende Wasserführung und Wassertiefe vorhanden sein, um Proben unter der Wasseroberfläche entnehmen zu können. Gegebenenfalls muss bei geringer Wasserführung ein Staublech mit V-Nut eingebracht werden. Die Probe ist dann an dem freien Überlauf zu entnehmen. Probenahmeschächte, in denen sich das Abwasser über dem Auslaufrohr anstauen kann, sind ungeeignet.

Probenahme aus Kühlsystemen

Die Auswahl der Probenahmestellen bei industriellen Kühlverfahren mit Wasser als Kühlmittel ist unter anderem abhängig vom jeweiligen Kühlsystem (Durchlaufkühlung, offene / geschlossene Kühlkreisläufe...).

Bei Durchlaufkühlsystemen wird Frischwasser (Grundwasser, Uferfiltrat, Oberflächenwasser) in einem Durchlauf verwendet. Die Probenahmestellen befinden sich sowohl vor als auch hinter den zu kühlenden Aggregaten.

Bei der Kühlung über Primär- und/oder Sekundärkreisläufen werden zwei Kühlkreisläufe miteinander gekoppelt, wobei ein geschlossener Sekundärkreislauf mit einem Primärkreislauf rückgekühlt wird. Der Primärkreislauf kann aus einem Durchlaufkühlsystem, aus einem offenen oder geschlossenen Rückkühlwerk oder einer Kälteanlage (z. B. Solekühlung) bestehen. Die Probenahmestelle sollte auf der Rücklaufseite und an einer gut durchströmten Stelle des Kreislaufsystems installiert sein.

Vielfach wird das erwärmte Kühlwasser in einem offenen System durch Verdunstungskälte vorgekühlt, wobei Wasserverluste infolge Verdunstung, Versprühen und Abschlammung (Absatzung) durch Frischwasser ersetzt werden. Bei geschlossenen Rückkühlverfahren fließt das Kühlwasser durch Rohre, die von außen durch Luft oder Wasser gekühlt werden. Die Verfahren der offenen und geschlossenen Rückkühlung können kombiniert werden. Hinsichtlich der Probenahmestelle wird auf die VDI 2047 Blatt 2 verwiesen.

Sonderkühlverfahren werden meist eingesetzt, wenn das zu kühlende Medium sehr heiß ist (z. B. Abhitzeverfahren, Wärmepumpen) oder wenn sehr tiefe Vorlauftemperaturen erforderlich sind (z. B. Solekühlung). Für Sonderkühlverfahren im hohen Temperaturbereich ($t > 100\text{ °C}$) wird auf ISO 5667-7 verwiesen.

Bei der Probenahme ist darauf zu achten, dass keine Ablagerungen, Schleim etc. mit in die Wasserprobe gelangen. Für die mikrobiologische Probenahme sollten an geeigneter Stelle desinfizierbare Probenahmearmaturen vorgesehen werden (siehe auch nächster Abschnitt). Vorzugsweise sollten diese in Strömungsrichtung des Kreislaufwassers z.B. vor der Bioziddosierstelle liegen. Ist bei vorhandenen Anlagen eine Probenahme an dieser Stelle nicht möglich, so kann die Probe entweder direkt unter der Versprüheinrichtung oder als Schöpfprobe aus der Kreislaufwanne entnommen werden.

Anmerkung: Um zufällige Schwankungen der Wasserbeschaffenheit und zur Vermeidung der Erfassung einzelner „Verschmutzungsschübe“ durch z.B. abreißende Biofilme wurden und werden vom LANUV NRW bei Naturzugkühltürmen mit großen Umlaufwassermengen jeweils Probenreihen von 5 Proben in einer bestimmten Tiefe an verschiedenen Stellen der Kreislaufwanne entnommen und vor Ort zu einer Mischprobe vereinigt, homogenisiert und eine Teilprobe abgefüllt.

Enthält die Probe sicher oder möglicherweise oxidierende Desinfektionsmittel, so müssen diese inaktiviert werden (siehe Abschnitt "Vorlagen im Probehälter").

Probenahme aus Entnahmearmaturen

Probenahmen an einer Entnahmearmatur können unterschiedlichen Zwecken dienen. Je nach Untersuchungsziel ist es entweder notwendig oder falsch die angebrachten Vorrichtungen oder Einsätze zu entfernen, die Entnahmearmatur zu desinfizieren oder zu spülen (siehe hierzu DIN EN ISO 19458).

Im Rahmen der Abwasser- und Kühlwasserprobenahmen sind i.d.R. spezielle Entnahmearmaturen an den hierfür eingerichteten Probenahmestellen vorhanden. Diese müssen für die mikrobiologischen Untersuchungen durch Abflammen sterilisierbar sein, in einem sauberen Zustand gehalten, deutlich beschriftet und ausschließlich zur Probenahme verwendet werden.

Eine Desinfektion der Öffnung einer Entnahmearmatur ist sichergestellt, wenn die Temperatur dort durch intensives Abflammen mit einem Kartuschenbrenner mindestens 80 °C erreicht. Dieses ist nicht der Fall, wenn Wasser im erhitzten Teil verbleibt. Abflammen mit einem Feuerzeug ist nur oberflächlich und nicht ausreichend.

In explosionsgefährdeten Bereichen muss alternativ mittels Desinfektionsmittel desinfiziert werden.

Vor dem Abflammen sicherstellen, dass keine Verschmutzungen (Kalkablagerungen, Schleim etc.) in die Probe gelangen können und keine Entnahmehähne mit Gummidichtungen ausgewählt werden. Schmutz vor dem Abflammen und der eigentlichen Probenahme abkratzen, und die Entnahmearmatur mehrmals voll aufdrehen und schließen, um Schmutz auszuspülen. Das in der Leitung befindliche Standwasser ist vor der Probenahme ausreichend lange ablaufen zu lassen. Nach dem Abflammen und erneutem Öffnen der Entnahmearmatur sollte ein zischendes Geräusch hörbar sein. Anschließend die Entnahmearmatur soweit öffnen und das Wasser in einem etwa bleistiftstarkem Strahl abfließen lassen, bis die Temperatur konstant ist. Dann die offene Probenflasche in den Wasserstrahl halten und unter aseptischen Bedingungen füllen.

Probenahme von Belebtschlamm

In Belebungsbecken werden die Mikroorganismen, die sich an fein verteilten Schweb- und Feststoffen ansiedeln und als Flocken den Belebtschlamm bilden, aufgrund der Sedimentation und Eindickung sehr heterogen verteilt vorliegen. Mit einer Einzelprobe ist somit keine repräsentative Probenahme möglich und es werden mit

den gewonnenen Untersuchungsergebnissen nur Orientierungswerte erhalten. Eine annähernd repräsentative Erfassung würde die Probenahme von Belebtschlamm aus verschiedenen Abschnitten und Tiefen mit relativ großen Probenvolumina und anschließender Homogenisierung und Probenteilung vor Ort erfordern.

Für dieses Untersuchungsprogramm wird empfohlen, die Belebtschlammproben entweder am Ablauf des Belebungsbeckens oder direkt aus dem Becken stets an derselben Probenahmestelle aus stets der gleichen Entnahmetiefe als Einzelprobe z. B. mit einem Probenschöpfer unterhalb der Wasseroberfläche zu nehmen. Der Probenahmeort sollte exakt im Probenahmeprotokoll beschrieben werden.

Probenahme von Biofilmen

Biofilmproben (Sielhaut) durch mechanisches Abkratzen der Oberfläche mit einem sterilen Spatel nehmen und in den Probenbehälter abstreifen. Als Probenmenge sollten ca. 5 g – 10 g entnommen werden und in ein ausreichend großes Weithalsgefäß überführt werden, so dass die Probe im Labor daraus auch wieder entnommen werden kann. Für eine Bestimmung wird anschließend im Labor der Biofilm in einer entsprechenden Wassermenge (min. 1:10) suspendiert und homogenisiert.

Probenahme von Sedimenten

Ziel der Sedimentprobenahme ist es, möglichst feinkörniges und oberflächennahes Sediment aus dem Gewässer zu entnehmen – aber keinen Sand!

Sedimente findet man in Fließgewässern bevorzugt in strömungsberuhigten Zonen, z. B. oberhalb von Wehren und in Buhnen bzw. unterhalb von Buhnen und Brückens Pfeilern. Eine Entnahme aus dem Uferbereich ist dann zu vermeiden, wenn es in diesem Bereich augenscheinlich zu Ablagerungen von eingeschwemmten Uferboden kommen kann (LAWA AQS-Merkblatt P-8/4; Probenahme von Schwebstoffen und Sedimenten, Mai 2002)

Die Probenahme aus bewatbaren Fließgewässern erfolgt mittels einem sterilen Spatel oder Edelstahlschöpfer durch mechanisches Abkratzen der oberflächennahen Schicht von ca. 5 – 10 mm, weil der relevante Biofilm mit den Amöben obenauf sitzt. Bei tieferen Gewässern werden die Sedimentproben mittels Probenschöpfer, Eimer oder Sedimentgreifer (z. B. Bodengreifer nach Ekman-Birge) gewonnen. Nach erfolgter Probenahme ist evtl. mitgewonnenes, überstehendes Wasser abzutrennen und die obere Schicht von dem gewonnenen Sediment als Probe abzukratzen.

Als Probenmenge sollten ca. 50 g – 100 g entnommen werden und in ein ausreichend großes Weithalsgefäß (z. B. 250 ml) überführt werden, so dass die Probe im Labor daraus auch wieder entnommen werden kann. Für eine Bestimmung werden anschließend im Labor 10 g mit 100 ml Wasser suspendiert.

AI.VI. Vor-Ort-Untersuchungen

Für die Beurteilung der Legionellenbefunde ist die Wassertemperatur zum Zeitpunkt der Probenahme unbedingt erforderlich.

Darüber hinaus sollten auch noch pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit bestimmt werden, um bei auffälligen Befunden eine Plausibilitätsprüfung hinsichtlich der Veränderung der Abwasserzusammensetzung und der Probenmatrix vornehmen zu können.

AI.VII. Probenbeschriftung und Probenahmeprotokoll

Die Behälterbeschriftung muss eindeutig und lesbar sein; das Etikett sollte wasserfest sein und sich nicht einfach ablösen.

Auf dem Probenbehälter sind mindestens folgende Angaben zu vermerken (DIN EN ISO 5667-3:2013-03):

- Datum und Uhrzeit der Probenahme
- Probenahmestelle¹
- Probennummer
- etwaiger Einsatz von Desinfektionsmitteln in der Anlage zum Zeitpunkt der Probenahme
- etwaiger Zusatz von z. B. Natriumthiosulfat oder anderer Hilfsmittel zur Inaktivierung von Desinfektionsmittel

Alle anderen Angaben sind ergänzend und sollten im Probenahmeprotokoll beschrieben werden. Das Probenahmeprotokoll muss mindestens den Namen und die Adresse des Auftraggebers, die Liste der zu untersuchenden Parameter, Datum, Zeit und Probenahmestelle, Name der probenehmenden Person sowie die Probenart (Wasser, Schlamm, etc.) und die Vor-Ort-Messungen enthalten. Hinweise, die für die Interpretation der Ergebnisse wichtig sind (z. B. eingesetzte Biozide, Veränderungen der Messstelle, verfahrenstechnische Änderungen an der Anlage...) sind ebenfalls zu protokollieren.

¹ sofern nicht aus Gründen der Qualitätssicherung oder fehlender Unabhängigkeit das Untersuchungslabor herkunftsunabhängig untersuchen soll. In diesem Falle muss der Auftraggeber sicherstellen, dass die Daten richtig zusammengeführt werden.

AI.VIII. Probenkonservierung, Transport und Lagerung

Die Zeit zwischen der Probenahme und der Analyse im Labor ist so kurz wie möglich zu halten. Die Proben sollten vorzugsweise innerhalb eines Tages dem Labor übergeben und angesetzt werden, jedoch nicht später als zwei Tage (DIN EN ISO 11731-2:2008-06; Nachweis und Zählung von Legionellen).

Die Proben sind in Kühleinrichtungen (z. B. Kühlboxen mit Kühlakkus) lichtgeschützt bei einer Temperatur zwischen $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ zu transportieren. Die Proben dürfen nicht tiefgefroren werden (DIN EN ISO 19458:2006-12, DIN EN ISO 11731-2:2008-06).

Um mögliche Kontaminationen während des Transportes auszuschließen, sollten Oberflächenwasser-Proben und Abwasser-Proben bzw. stark und weniger stark belastete Proben in getrennten Kühlboxen gelagert werden.

AI.IX. Arbeitsschutz- und Arbeitssicherheit

Atemschutz ist zu tragen, wenn die inhalative Aufnahme biologischer Arbeitsstoffe in Form von Spritzern und Aerosolen durch technische und organisatorische Maßnahmen nicht verhindert werden kann. Geeignet sind z. B. partikelfiltrierende Halbmasken (FFP 3) mit Ausatemventil als Mindestanforderung. Bei Benutzung der Masken ist darauf zu achten, dass diese dicht abschließen. Partikelfiltrierende Halbmasken FFP 3 sind nach der Benutzung zu verwerfen (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe TRBA 220, Dezember 2010).

Grundsätzlich sind die im Abwasserbereich ohnehin bekannten und erforderlichen hygienischen Maßnahmen zu beachten und Schutzausrüstung wie Einmalhandschuhe und Atemschutz zu tragen, um das Infektionsrisiko für das Probenahmepersonal zu minimieren.

AI.X. Literatur zu Anhang I

DIN EN ISO 5667-1;2005-08; Anleitung zur Erstellung von Probenahmeprogrammen und -techniken

DIN EN ISO 5667-13;2011-08; Anleitung zur Probenahme von Schlämmen

Empfehlungen des Umweltbundesamtes „Systematische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung“ vom 23.08.2012

DIN EN ISO 19458:2006-12 Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen

DIN 38402-11:2009-02; Probenahme von Abwasser

Bericht der Expertenkommission Legionellen

Anhang I: Details zu Probenahmen basierend auf einem Konzeptpapier des LANUV (SELENT 2015)

DIN 38402-15:2010-04; Probenahme aus Fließgewässern

DIN EN ISO 11731-2:2008-06; Nachweis und Zählung von Legionellen

LAWA AQS-Merkblatt P-8/4; Probenahme von Schwebstoffen und Sedimenten (Mai 2002)

DIN EN ISO 5667-3:2013-03; Konservierung und Handhabung von Wasserproben

Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe TRBA 220 „Sicherheit und Gesundheit bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in abwassertechnischen Anlagen“ (Dezember 2010)

Anhang II: Details zum kulturellen Nachweis von Legionellen basierend auf einem Konzeptpapier des LANUV (SELKE 2015)

AII.I. Ankunft der Probe im Labor

Für die Ankunft der Probe im Labor wurde folgende Konvention geschlossen:

- Bei der Probenübergabe an das Labor ist sicherzustellen, dass die Kühlkette nicht unterbrochen wird.
- Datum und Uhrzeit der Probenansatzes sind zu protokollieren
- Eine eindeutige Deklaration der Probe (Minimum eindeutige Probennummer) ist zu kontrollieren.
- Die Probenbezeichnung auf der Flasche ist im Labor zu dokumentieren; dies kann optional als Fotodokumentation des Etiketts erfolgen
- Die Einteilung der Probe erfolgt nach nachstehend deklarierten visuellen Kategorien, sowie ergänzenden Erklärungen aus der Probendeclaration wie, z. B. „Zulauf“ bzw. „Ablauf“ einer Kläranlage:
 - A: Abwasser oder Oberflächenwasser: klar, ungefärbt, ohne sichtbare Partikel
 - B: Abwasser oder Oberflächenwasser: getrübt und /oder gefärbt und/oder sichtbare Partikel
 - C: Kühlwasser und andere Prozesswässer
 - D: Proben aus dem Belebungsbecken
 - E: Klärschlamm
 - F: Feststoffe Sonstiges: z. B. Sediment, Sielhaut

AII.II. Kulturverfahren zum Nachweis von Legionellen in verschiedenen Matrices

Die im nachfolgenden Textteil dargestellten Konventionen zur Bestimmung von Legionellen nach dem Kulturverfahren basieren auf den folgenden Normen:

- ISO 11731: 1998 Water quality – Determination of *Legionella*
- DIN EN ISO 11731-2: 2008 Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Legionellen – Teil 2: Direktes Membranfiltrationsverfahren mit niedriger Bakterienzahl, (ISO 11731-2:2004); Deutsche Fassung EN ISO 11731-2:2008, Beuth-Verlag, Berlin

Hintergrund: Die im Vorfeld genannten Normen: ISO 11731, ISO 11731-2 und damit auch die deutsche Fassung DIN EN ISO 11731-2 befinden sich derzeit in Revision (Stand: CD-Fassung). Geplant ist eine Erweiterung der Geltungsbereiche der o.g. Kulturverfahren auch auf Matrices, wie „water with extreme high background“ und „waste water“ (Annex J).

Untersuchung von Proben gemäß der laborseitig getroffenen Einteilung:

A: Abwasser oder Oberflächenwasser: klar, ungefärbt, ohne sichtbare Partikel

- Die Homogenisierung der Probe erfolgt mittels manuellem **Aufschütteln**
- Es erfolgt **keine** Legionellenbestimmung mittels **Membranfiltration (*)**
- Eine Hitze- und/ oder Säurebehandlung zur Minimierung der Begleitflora ist nach ISO 11731:1998 durchzuführen. Das genaue Vorgehen ist zu dokumentieren.
- Der kulturelle Legionellen-Nachweis erfolgt **ausschließlich mittels des Oberflächenverfahrens** nach ISO 11731:1998. Hierbei werden folgende Ansätze untersucht: 2 x 0,5 ml aus der Originalprobe (10^0), 2 x 0,5 ml aus der 10^{-1} -Verdünnung, 2 x 0,5 ml aus der 10^{-2} -Verdünnung. Die Zwischenergebnisse sind zu dokumentieren. (Anmerkung: Zur Herstellung der Verdünnungsreihen muss ein Vortex-Mixer benutzt werden.)
- **Falls alle Ansätze aufgrund hoher Begleitflora nicht auswertbar sind (das Ergebnis der Analyse wird mit „nicht auswertbar“ angegeben), muss eine zeitnah entnommene Folgeprobe mit höheren Verdünnungsstufen untersucht werden.**

(*) Für Nachweise zur Abwesenheit des Epidemiestammes (< 10 KBE Legionellen des Epidemiestammes/100 ml) sind ggf. mehrere parallele Ansätze mit geringem Untersuchungsvolumen und ggf. zusätzliche Behandlungen oder Medien notwendig.

Untersuchung von Proben gemäß der laborseitig getroffenen Einteilung:

B: Abwasser oder Oberflächenwasser: getrübt und /oder gefärbt und/oder sichtbare Partikel

- Eine Homogenisierung der Probe mittels manuellen Aufschüttelns wird als nicht ausreichend erachtet. Daher wird eine **intensivere Form der Homogenisierung** der kompletten Probe auf dem Vortex für 1 min unter maximaler rpm-Einstellung vorgenommen.

- Es erfolgt **keine** Legionellenbestimmung mittels **Membranfiltration (*)**
- Eine Hitze- und/ oder Säurebehandlung zur Minimierung der Begleitflora ist nach ISO 11731:1998 durchzuführen. Das genaue Vorgehen ist zu dokumentieren.
- Der kulturelle Legionellen-Nachweis erfolgt **ausschließlich mittels des Oberflächenverfahrens nach ISO 11731:1998**. Hierbei werden folgende Ansätze untersucht: 2 x 0,5 ml aus der Originalprobe (10^0), 2 x 0,5 ml aus der 10^{-1} -Verdünnung, 2 x 0,5 ml aus der 10^{-2} -Verdünnung, 2 x 0,5 ml aus der 10^{-3} -Verdünnung. Die Zwischenergebnisse sind zu dokumentieren. *(Anmerkung: Zur Herstellung der Verdünnungsreihen muss ein Vortex-Mixer benutzt werden.)*
- Falls alle Ansätze aufgrund hoher Begleitflora nicht auswertbar sind (das Ergebnis der Analyse wird mit „nicht auswertbar“ angegeben), muss eine zeitnah entnommene Folgeprobe mit höheren Verdünnungsstufen untersucht werden.

(*) Für Nachweise zur Abwesenheit des Epidemiestammes (< 10 KBE Legionellen des Epidemiestammes/100 ml) sind ggf. mehrere parallele Ansätze mit geringem Untersuchungsvolumen und ggf. zusätzliche Behandlungen oder Medien notwendig.

Untersuchung von Proben gemäß der laborseitig getroffenen Einteilung:

C: Kühlwasser und andere Prozesswässer

- Die Homogenisierung der Probe erfolgt mittels **Aufschütteln**
- Der kulturelle Nachweis erfolgt i.d.R. mittels **Membranverfahren und Oberflächenverfahren**. *Ausnahme: Falls nachgewiesen in 5 Proben in Folge (Abstand 1 Monat) mittels Membranverfahren aufgrund hoher Begleitflora keine auswertbaren Ergebnisse erzielt wurden, kann bei nachfolgenden Untersuchungen auf Bestimmungen mittels des Membranverfahrens verzichtet werden.*
- **Membranfiltrationen** erfolgen von 10 ml **und** 100 ml Probe mit anschließender Säurebehandlung des Membranfilters vor Auflegen auf das Nährmedium nach **DIN EN ISO 11731-2:2008**. Die Einzelergebnisse sind zu dokumentieren.
- **Zusätzlich** erfolgen Legionellenbestimmungen mittels des **Oberflächenverfahrens nach ISO 11731:1998**. Hierbei werden folgende Ansätze untersucht:

2 x 0,5 ml aus der Originalprobe (10^0), 2 x 0,5 ml aus 10^{-1} -Verdünnung, 2 x 0,5 ml aus 10^{-2} -Verdünnung. Die Zwischenergebnisse sind zu dokumentieren. (Anmerkung: Zur Herstellung der Verdünnungsreihen sollte ein Vortex-Mixer benutzt werden.)

- **Anmerkung: Falls alle Ansätze aufgrund hoher Begleitflora nicht auswertbar sind, muss eine zeitnah gezogene Folgeprobe mit höheren Verdünnungsstufen angesetzt werden.**

Untersuchung von Proben gemäß der laborseitig getroffenen Einteilung:

D: „Proben aus dem Belebungsbecken“

Auf die nicht erreichbare Repräsentativität von Proben aus dem Belebungsbecken wurde bereits weiter oben hingewiesen (siehe „Probenahme von Belebtschlamm“ im Abschnitt AI.V). Sollen gleichwohl solche Proben untersucht werden, würde man in Analogie zu den unter Punkt B beschriebenen Vorgehen für „Abwasser oder Oberflächenwasser: getrübt und /oder gefärbt und/oder sichtbare Partikel“ verfahren. Für die Auswertungen wird auf folgendes hingewiesen:

- Auswertung von Platten nach 10 Tagen: in der Regel führt dies zum Ergebnis „nicht auswertbar“.
- Auswertung von Platten zu einem früheren Zeitpunkt als von der Norm vorgegeben. Dies führt dazu, dass die noch kleinen Legionellen-Kolonien nicht oder nur unzureichend entdeckt werden, insbesondere, wenn sie dicht bei oder unter Kolonien schneller wachsender Begleitbakterien liegen. Ein anderer Störfaktor sind Bakterien in der Belegung, die Substanzen abgeben, welche das Wachstum von Legionellen hemmen; das müssen nicht unbedingt Antibiotika sein, die bekanntesten in dieser Art wirkenden Stoffe sind Siderophore, art-spezifische Stoffe, die das lebensnotwendige Eisen aus dem Medium binden. Minderbefunde sind somit wahrscheinlich. Die Aussagekraft eines Ergebnisses wäre günstigstenfalls qualitativ (J/N). Dies meint: Ein positives Ergebnis zeigt die Anwesenheit von Legionellen an, sollte aber durch Rekultivierung bestätigt werden. Ein negatives Ergebnis kann bei starker Begleitflora nicht als Abwesenheit von Legionellen interpretiert werden; der Legionellenstatus bleibt unbestimmt. Bei der Angabe des Ergebnisses ist auf diesen Umstand hinzuweisen und der tatsächliche Zeitpunkt der Auswertung anzugeben.

Untersuchung von Proben gemäß der laborseitig getroffenen Einteilung:

E: „Klärschlamm“

Für die Untersuchung von Klärschlämmen gelten die oben bereits für Belebtschlamm beschriebenen statistischen Unsicherheiten der erhaltenen Ergebnisse im Besonderen. Zwar kann man sich hinsichtlich der Arbeitsweisen im Labor auf einheitliche Vorgehensweisen verständigen, doch führt dies, wie man anhand der vorliegenden Datenreihen erkennen kann, derzeit nicht zu einer Harmonisierung hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der ermittelten Anzahl von Legionellen.

Dies liegt in der Besonderheit der untersuchten Matrix begründet. Die biologische Zusammensetzung von Klärschlamm variiert je nach Alter und Lagerungsbedingungen des Schlamms. Sollten trotz beschränkter Aussagekraft der Ergebnisse dennoch im Einzelfall Klärschlammproben untersucht werden sollen, ist mit dem jeweiligen Auftraggeber zunächst zu vereinbaren, in welcher Form das Ergebnis angegeben werden soll: z.B. KBE/ x g Trockengewicht, KBE/ x g Feuchtgewicht, KBE/ x ml.

Ausgangsvoraussetzung ist eine repräsentative Probe des zu untersuchenden Klärschlamms. Je nach Absprache mit dem Auftraggeber wäre folgende Vorgehensweise im Labor denkbar:

Die Untersuchungen haben in Anlehnung an die o.g. Normen zu erfolgen; die Einzelschritte sind zu dokumentieren.

- Suspension von z. B. ca. 10 g Probe in 100 ml sterilem, entionisierten Wasser (die exakte Einwaage ist zu vermerken), Homogenisierung (Methode und Parameter sind zu dokumentieren)

Sollten keine anders lautenden Vereinbarungen mit dem Auftraggeber getroffen werden, kann die Suspension gemäß der Arbeitsanweisungen Punkt B für „Abwasser oder Oberflächenwasser: getrübt und /oder gefärbt und/oder sichtbare Partikel“ untersucht werden.

Untersuchung von Proben gemäß der laborseitig getroffenen Einteilung:

F: „Feststoffe Sonstiges: z. B. Sediment, Sichelhaut“

Für die Untersuchung von Feststoffen der oben genannten Kategorien, kann anhand der zur Beurteilung vorliegenden Datenreihen keine empirisch abgesicherte Empfehlung gegeben werden. Für die Untersuchung repräsentativer Sichelhaut-Proben gilt aber dieselbe Problematik, wie bei der Bestimmung aus Belebt- oder Klärschlamm.

Sollen Untersuchungen an diesen Matrices mittels o. g. Verfahren durchgeführt werden, ist mit dem Auftraggeber zu vereinbaren, welche Probenmengen suspendiert und in welcher Art das Ergebnis angegeben werden soll.

Für die Durchführung wären folgende Arbeitsschritte denkbar:

- Suspension von z. B. ca. 10 g Probe (mit Auftraggeber abzustimmen) in 100 ml sterilem, entionisierten Wasser (die exakte Einwaage ist zu vermerken), Homogenisierung (Methode und Parameter sind zu dokumentieren)
- Sollten keine anders lautenden Vereinbarungen mit dem Auftraggeber getroffen werden, kann die Suspension gemäß der Arbeitsanweisungen Punkt B für „Abwasser oder Oberflächenwasser: getrübt und /oder gefärbt und/oder sichtbare Partikel“ untersucht werden.

AII.III. Angabe Endergebnis Legionellenbestimmung

Für alle wässrigen Probeneinteilungen gilt:

- Die Angabe des Endergebnisses erfolgt als **gewichtetes Mittel** aus den Daten aller auswertbaren Ansätze (in Anlehnung an DIN EN ISO 8199); bei Anwendung sowohl des Membranfiltrationsverfahrens als auch des Oberflächenverfahrens nach Probeneinteilung C wird der höhere Messwert angegeben
- Falls das Vorhandensein von Legionellen in den Ansätzen der Originalprobe ausgeschlossen werden kann, erfolgt die Ergebnisangabe als „< 1KBE /ml. Falls nur in einer Verdünnung die Anwesenheit von Legionellen sicher ausgeschlossen werden kann, erfolgt die Ergebnisangabe als „< NG/ml“ unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe.

*Bsp.: Originalprobe (2 x 0,5 ml): nicht auswertbar,
Verdünnung 10^{-1} (2 x 0,5 ml) nicht auswertbar,
Verdünnung 10^{-2} (2 x 0,5 ml): keine Legionellen
Ergebnis: < 100 KBE/ml (entspricht < 10.000 KBE/100 ml)*

Bei der Angabe der Ergebnisse für (überwiegend) feste Proben ist mit dem Auftraggeber abzustimmen, ob die Ergebnisangabe in KBE/ x ml oder KBE/x g erfolgen soll. Bei dem Bezug Masse ist die Angabe analog der oben genannten Vorgabe für wässrige Probeneinteilungen entsprechend anzupassen.

AII.IV. Serotypisierung

Wenn eine Serotypisierung durchgeführt werden soll, erfolgt diese analog zu Kapitel 4.4.

Beim Auftreten der Serogruppe 1 ist mit dem Auftraggeber abzuklären, ob eine genauere Untersuchung durch Übersendung an das Referenzlabor in Dresden zu erfolgen hat.

Zudem ist vom Labor die Art der Vorgehensweise zur Serotypisierung einmalig anzugeben und eine Erläuterung der Ergebnis-Angabe erforderlich.

AII.V. Mindestanforderung an die Dokumentation der kulturellen Untersuchung auf Legionellen

- Eindeutige Deklaration der Probe, optional Foto des Etiketts
- Zusätzliche Bemerkung über Besonderheiten (z.B. Anhaftungen an Flaschenwandung etc.)
- Vom Labor getroffene Einteilung der Probe zur Untersuchung (klares, partikel-freies (Ab)Wasser usw.)
- Dokumentation der einzelnen Verdünnungsstufen (optional Foto) und Bewertungen der einzelnen Verdünnungsstufen, Bemerkungen zur Ausprägung möglicher Begleitflora und Vorhandensein von Schwärmern oder Auffälligkeiten
- Gesamtergebnis zuzgl. Ermittlungsweg
- Ergebnisangabe entsprechend Abschnitt AII.III
- Angaben zur Methodik
- Bei einer Epidemie sollte der Stamm weiter typisiert werden.

Anhang III – Details zu Kapitel 3.2 Luftkeimsammlung

AIII.I. Luftkeimsammlung nach UFOPLAN-Projekt

Als Projektergebnis wurde eine Luftsammlung mittels eines Wet-Zyklon-Verfahrens (z. B. Coriolis® μ) als geeignet bestätigt. In Zyklonsammlern wird die eintretende Luft beschleunigt und beim Durchströmen des Gerätes in eine immer enger werdende Spiralbahn gezwungen, wobei enthaltene Partikel und Mikroorganismen auf der Innenwand des Zyklons abgeschieden werden. Die Abscheidung kann auf einer feuchten Oberfläche erfolgen (Wet-Zyklon). Dieses Verfahren wird als schonender angesehen im Vergleich zum Impinger AGI30, der für Immissionsmessungen standardisiert ist, siehe VDI 4252 Blatt 3 und wird daher in die Untersuchungen einbezogen. Das Wet-Zyklon-Verfahren wurde während der Projektlaufzeit auch anderweitig für den Nachweis von luftgetragenen Bakterien und Schimmelpilzen getestet und als geeignet befunden (WALSER et al. 2013).

Zusammenfassend, wurde der Coriolis® μ -Sammler als geeignetes Gerät für die vor-Ort Sammlung von Aerosol-/Luftproben, trotz geringerer Abscheiderate im Vergleich zum Impinger, ausgewählt, da durch das wesentlich höhere Probenahmenvolumen letztlich eine geringere Nachweisgrenze erreicht werden kann. Um eine möglichst niedrige Nachweisgrenze bei der nachfolgenden Legionellen-Analytik zu erreichen, wurden die maximal möglichen Geräteeinstellungen von 300 l/min für 10 min für die Luftprobensammlung gewählt.

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

Gerät:	Coriolis® μ Luftpartikelsammler, Fa. Bertin Technologies (Frankreich), Bezug über PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Sammelgefäße:	Wet-Cyclone-Sammelgefäße, steril, Fa. Bertin Technologies (Frankreich), Bezug über PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Sammelflüssigkeit:	sterile, physiologische Kochsalzlösung (0,9 %) in Legionellen-DNA-freiem Wasser (Water HPLC Optigrade®, LGC Promochem GmbH) mit 0,01 % Tween® 80
Füllvolumen:	15 ml Sammelflüssigkeit
Luftstrom:	300 l/min
Sammeldauer:	10 min

Die nachfolgende Analytik der gesammelten Proben kann kulturell oder mittels qPCR erfolgen.

Anhang IV – Details zu Kapitel 4.2.1 Quantitative Polymerase-Ketten-reaktion (qPCR) und zu Kapitel 4.2.2 Viability PCR (vPCR)

AIV.I. Details zur quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Für die Ermittlung der Legionellenkonzentration in den vorliegenden Proben (Schlamm und/oder Überstand) werden zunächst die Bakterien-DNA mit einem kommerziellen Kit von Qiagen isoliert. Dieses Kit ist ursprünglich für die Isolation von genomischer DNA aus Stuhlproben entwickelt worden (Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit) und entfernt einen Großteil der Inhibitoren, die die qPCR stören könnten. Die Aufreinigung der Nucleinsäuren erfolgt über Silicamembransäulen.

Die so erhaltene DNA wird anschließend für die Messung mit dem Realtime PCR Messgerät (Rotor-Gene Q 2plex Platform; Qiagen) ebenfalls mit einem Kit vorbereitet. Das Protokoll wird dabei in Anpassung an die Probenmatrix modifiziert, unter anderem wird zu Beginn ein Zentrifugationsschritt zur Aufkonzentrierung und in der Lysisphase eine Hitzebehandlung bei 90°C durchgeführt, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Der „Qiagen mericon Quant Legionella spp. Assay“ detektiert eine Multikopiesequenz im Legionellengenom. Basierend auf der Information aus der Sequenzdatenbank ist das Zielgen 3 bis 4 mal im Genom enthalten (z. B. in *L. pneumophila* 1 KBE = 3 Kopien, *L. longbeachea*: 1 KBE = 4 Kopien). Um die genauen KBE-Äquivalente bestimmen zu können, müssten zuerst alle detektierten Legionellestämme identifiziert und quantifiziert werden. Für eine ungefähre Konvertierung müssen Annahmen getroffen werden, z. B.: 1 KBE = 3 Kopien. Für den „Qiagen mericon Quant Legionella pneumophila Assay“ entspricht der Wert der genomischen Einheiten dem der koloniebildenden Einheiten, da der Genabschnitt nur einmal vorkommt. Die Quantifizierungsgrenze der qPCR-Methode wird aus der Konzentration des kleinsten mitgeführten Kontrollstandards errechnet. Das Detektionslimit wird dann auf die Hälfte dieses Wertes festgesetzt. Im Unterschied zum Kulturverfahren erfasst die qPCR auch tote Legionellen und solche im VBNC-Stadium (viable-but-not-culturable). Generell muss darauf hingewiesen werden, dass die erreichbare Nachweisgrenze der qPCR methodenbedingt in der Regel deutlich höher liegt im Vergleich zur kulturellen Bestimmung.

Bei der Verwendung verschiedener DNA-Extraktionskits wurden bei verschiedenen Probenmatrices unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Im Abwasser und im Belebtschlamm lieferte das o. a. Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit gute Ergebnisse. Für Kühlwasser- und Aerosolproben wurden in einem Forschungsvorhaben des UBA mit dem Qiagen-Kit weniger gute Ergebnisse erzielt. Hier erwies sich das Aquadien™-Kit von BioRad als besser geeignet. Zudem ist das BioRad-Kit im Rahmen der AFNOR-qPCR-Methode mit validiert. Allerdings ist zu bemerken, dass es sich um eine andere Probenmatrix und nicht um Abwässer oder Schlämme handelte. Für die statistische Absicherung der Ergebnisse im Bereich der Abwasser- und

Schlammuntersuchungen liegen noch nicht genügend Erfahrungen vor. Generell ist darauf hinzuweisen, dass die DNA-Extraktionsmethode und der qPCR-Nachweis für die jeweilige Probenmatrix anzupassen und zu validieren ist. Beispielprotokolle für die hier genannten Methoden sind in den nächsten zwei Abschnitten aufgeführt.

AIV.II. DNA-Extraktion mittels des Bio-Rad Aquadien™-Kit für Kühlwasser- und Aerosolproben

Die einzelnen Arbeitsschritte sind nachfolgend dargestellt:

Arbeitsschritte der DNA-Isolierung mittels Aquadien™-Kit
10 ml bis 1L der Probe über einen weißen Polycarbonatfilter (Durchmesser 47 mm, Porengröße 0,4 µm, Millipore, Best.-Nr. GTTP 04700) filtrieren
2 ml der R1-Lösung in ein Cryotube pipettieren
Vorsichtig die Polycarbonatmembran dreimal falten
Mittels einer Pinzette die Membran in das Cryotube mit den 2 ml R1 Lösung geben
20 s vortexen
Für 15 min bei 95 °C +/- 5 °C in einem Wasserbad inkubieren
20 s vortexen
Vorsichtig die Membran mit einer Pinzette aus dem Cryotube entnehmen und dabei die Flüssigkeit durch andrücken an der Wand aus dem Filter lösen
20 min bei Raumtemperatur stehen lassen; es bildet sich ein Pellet am Boden des Cryotubes und in dem Überstand (1,6 ml) befindet sich die DNA
Die „Purification column“ in das „collector vial“ stellen
Auf die „Purification column“ 500 µl der Lösung aus dem Cryotube geben
10 min bei 8500 rpm (Biofuge fresco, Thermo Scientific™ Heraeus™) zentrifugieren
Das „collector vial“ leeren und den letzten Schritt mit weiteren 500 µl der Lösung aus dem Cryotube nochmal wiederholen
Zugabe von 100 µl R2-Lösung in die „Purification column“, das „collector vial“ ent-

Arbeitsschritte der DNA-Isolierung mittels Aquadien™-Kit
sorgen
Über die „Purification column“ ein neues „collector vial“ geben und alles um 180°C drehen
3 min bei 1000 rpm (Biofuge fresco, Thermo Scientific™ Heraeus™) zentrifugieren, die Purification column entsorgen
In dem „collector vial“ befindet sich nun 100 µl Probe mit der isolierten DNA

Die aufgearbeiteten DNA-Extrakte wurden bis zur Untersuchung mittels qPCR bei – 20 °C gelagert.

Der Nachweis von *Legionella* spp. erfolgte laut Herstellerangaben mit dem IQ-Check Screen *Legionella* spp. (Bestellnr. 357-8104) von Bio-Rad.

Der Nachweis von *L. pneumophila* erfolgte laut Herstellerangaben mit dem IQ-Check Screen *Legionella pneumophila* (Bestellnr. 357-8105) von Bio-Rad.

AIV.III. DNA-Aufreinigung aus Belebtschlamm- und Abwasserproben mit dem QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit

Die DNA-Isolation für die qPCR erfolgt mit einem kommerziellen Kit von Qiagen, das für die Isolation von DNA aus Stuhlproben entwickelt wurde (QIAamp Fast Stool Kit, Art. 51604). Das Protokoll wurde in Anpassung an die Probenmatrix modifiziert und mit ASL-Puffer (Qiagen Art.19082, Stool Lysis Buffer) ergänzt.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind nachfolgend dargestellt:

DNA-Isolierung aus Belebtschlamm mittels Qiagen QIAamp Fast Stool Kit Kombination von Inhibitex-Puffer und ASL-Puffer
200 µL Probe in ein 2ml-Zentrifugierröhrchen pipettieren.
In alle Röhrchen 500µL ASL-Puffer geben und 1 min vortexen.
5 min im Wasserbad bei 90°C inkubieren.
In alle Röhrchen 500µL Inhibitex-Puffer geben und kurz vortexen.
5 min im Wasserbad bei 90°C inkubieren.

15 s vortexen, 3 min bei 10.000 x g zentrifugieren
In ein 1,5ml-Eppi 30 µL Proteinase K, 300 µL Überstand und 300 µL AL-Puffer pipettieren (Reihenfolge einhalten!).
15 s vortexen
10 min im Wasserbad bei 70°C inkubieren.
300 µL Ethanol zugeben.
Kurz vortexen, dann kurz zentrifugieren.
Spin-Columns beschriften, in Sammelröhrchen einsetzen, das gesamte Lysat in 2 Schritten in das Röhrchen pipettieren und jeweils 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren, Filtrat jeweils verwerfen, Spin-Columns in neues Sammelröhrchen einsetzen.
500 µL AW1-Puffer in das Spin-Column geben, 1 min bei 10.000 x g zentrifugieren, Filtrat verwerfen, Spin-Columns in neues Sammelröhrchen einsetzen.
500 µL AW2-Puffer in das Spin-Column geben, 1 min bei 10.000 x g zentrifugieren, Filtrat verwerfen.
Spin-Columns in neues Sammelröhrchen einsetzen und 3 min bei 10.000 x g zentrifugieren. Spin-Columns in neues Sammelröhrchen einsetzen.
50 µL ATE-Puffer direkt auf die Membran pipettieren. 1 min bei Raumtemp. inkubieren. 3 min bei 10.000 x g zentrifugieren.
Eluat für die PCR unverdünnt und mit Qiagen Nucleic Acid Dilution Buffer 1:2 und 1:5 verdünnen. Falls die PCR nicht zeitnah erfolgt, Eluat als Original einfrieren, auf Eis auftauen und erst direkt vor der Messung verdünnen.

Bei geringen Gehalten (z.B. Ablauf Nachklärung) kann vor der Aufarbeitung eine Anreicherung durch Zentrifugation erfolgen.

2.000 µL Probe in ein 2ml-Zentrifugierröhrchen pipettieren.
Bei 13.000 rpm 5 min zentrifugieren.
1.800 µL Überstand abnehmen und verwerfen, die restlichen 200 µL wie üblich weiter verarbeiten (s.o.)

Bei Verwendung der angegebenen Mengen ergibt sich ein Faktor von Probe zu Eluat von $f=1$. Bei vorheriger Anreicherung durch Zentrifugation ergibt sich ein Faktor von $f=0,1$.

Die aufgearbeiteten DNA-Extrakte wurden bis zur Untersuchung mittels qPCR bei -20 °C gelagert.

Der Nachweis von *Legionella spp.* erfolgte laut Herstellerangaben mit dem Qiagen mericon Quant *Legionella species* Kit (Art. 290085).

Der Nachweis von *L. pneumophila* erfolgte laut Herstellerangaben mit dem Qiagen mericon Quant *L. pneumophila* Kit (Art. 290095).

AIV.IV. Details zur Viability PCR (vPCR)

Aufkonzentrierung:

Das Probenvolumen wird über einen Polycarbonatfilter (Isopore Membran Filters, $0,4\text{ }\mu\text{m}$ HTTP, Fa. Millipore) filtriert und dieser in 10 ml sterile 0,9 %iger Kochsalzlösung gegeben. Danach werden die aufkonzentrierten Bakterien von dem Filter mittels Vortex für 3 min abgelöst. Von dieser Bakteriensuspension werden in zwei 2 ml-Reaktionsgefäße (DNA-frei, Sarstedt REF 72.695.400) jeweils 2 ml überführt.

PMA-Behandlung:

Von den 2 Reaktionsgefäßen mit jeweils 2 ml Probe wird ein Gefäß mit PMA behandelt und das zweite Gefäß nicht mit PMA behandelt. Für die PMA-Behandlung werden zu den 2 ml Probe 5 μl einer 20 mM PMA-Lösung gegeben (Endkonzentration 50 μM), auf dem Vortex kurz gemischt und 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Probe 5 min im PhastBlue™-System bestrahlt (Wellenlänge 464 bis 476 nm, GenIUL, Best.-Nr. 9000700).

Sobald die Bestrahlung beendet ist, kann die DNA der Probe wie im Abschnitt 4.2.1 beschrieben isoliert werden. Danach werden die DNA-Extrakte mittels der qPCR wie unter 4.2.1 beschrieben analysiert.

Kontrollen:

Zur Überprüfung einer erfolgreichen PMA-Behandlung werden verschiedenen Kontrollen mitgeführt.

Dazu wird eine *L. pneumophila*-Suspension hergestellt. Verwendet wird der Stamm *L. pneumophila* DSM 7513, der auf BCYE-Agar für 4 d bei 36 °C angezüchtet wird. Von dieser Kultur wird eine Suspension in steriler 0.9 %iger Kochsalzlösung mit einer

Endkonzentration von 10⁶ Zellen/ml hergestellt. Die Zellzahl wird mittels DAPI-Färbung (Abschnitt 4.7.5) bestimmt.

Diese Suspension wird dann

- (i) unbehandelt für die DNA-Extraktion verwendet,
- (ii) mit Hitze behandelt (20 min bei 90 °C) und dann für die DNA-Extraktion verwendet,
- (iii) wie oben beschrieben mit PMA behandelt (Endkonzentration 50 µM PMA, 5 min Inkubation im Dunkeln, 5 min Bestrahlung) und dann für die DNA-Extraktion verwendet, und
- (iv) mit Hitze behandelt (20 min bei 90 °C) und anschließend wie oben beschrieben mit PMA behandelt und dann für die DNA-Extraktion verwendet.

Bei den Hitzebehandlungen wird ein Referenzgefäß zur Temperaturüberprüfung mitgeführt.

Anhang V: Abbildungen zu Kapitel 7 Zur Reinigung und Desinfektion von Verdunstungskühlanlagen

Photographien aus Verdunstungsrückkühlwerken und deren Risikobeurteilung nach „gut“, „akzeptabel“, „Vorsicht“ und „erhöhtes Risiko“ (Quelle: Health and Safety Executive, Legionnaires' disease: Technical guidance HSG274 Part 1, 2013)

