

Schlussbericht vom 31.03.2025

zu IGF-Vorhaben Nr. 21747

Thema

LegioAir - Freisetzungsmechanismen legionellenhaltiger Aerosole aus Verdunstungskühlanlagen und aussagekräftige Bewertungsmethoden für das Ausbruchsmanagement

Berichtszeitraum

01.04.2021 - 30.09.2024

Forschungsvereinigung

vgbe Forschungsstiftung

Forschungseinrichtung(en)

FE 1: Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. (IUTA), Duisburg

FE 2: Technische Universität München (Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie), München



DLR Projektträger

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Duisburg, 31.3.2025

Dipl.-Ing. A. Hugo
(FE 2, Institut für Umwelt & Energie, Technik &
Analytik e. V. (IUTA), Duisburg)

München, 31.3.2025

PD Dr. rer. nat. habil. M. Seidel
(FE 1, Technische Universität München (Lehrstuhl
für Analytische Chemie und Wasserchemie,
Gruppe Bioanalytics and Microanalytical Systems)

Ort, Datum

Name aller Projektleiterinnen und Projektleiter der
Forschungseinrichtung(en)

Forschungseinrichtungen

- 1 Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. (IUTA),
Bliersheimer Straße 58 - 60
47229 Duisburg

- 2 Technische Universität München
Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie,
Gruppe Bioanalytics and Microanalytical Systems,
Lichtenbergstraße 4
D-85748 Garching

Inhalt

1	Forschungsthema	6
2	Zusammenfassung	6
3	Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung	10
3.1	Ausgangssituation	10
3.2	Problemstellung	13
3.3	Forschungsziel / Lösungsweg / Ergebnisse	16
3.3.1	Konzeption einer Laborrückkühlanlage zur Untersuchung von Biofilmentstehungsprozessen	17
3.3.2	Konzeption einer Technikumsanlage zur Untersuchung der Tropfenentstehung und Aerosoldynamik sowie der Erprobung von Messtechnik in wasserdampfgesättigter, stark tropfenhaltiger Atmosphäre	20
3.3.3	Beschaffung, Aufbau, Inbetriebnahme der Versuchsanlage, Modifikation der Aerosolsammler	21
3.3.4	Versuchsprogramm zur Eignungsprüfung von Geschwindigkeitsmesssonden sowie eingehender Evaluation der Sammeleffizienz von Aerosol-Sammlern in stark feuchtebeladenen Gasströmungen	33
3.3.5	Versuchsprogramm zur Charakterisierung des Freisetungsverhaltens von Bioaerosolen aus unterschiedlichen Quellbereichen (Tropfenmitriss, Ablösung von Wandungen oder Bauteilen), Untersuchungen zum wallflow	37
3.3.6	Konzeption der Laborrückkühlanlage hinsichtlich Bio2-Sicherheitsbedingungen	49
3.3.7	Bestimmung der biologischen Sammeleffizienz der Bioaerosolsammler mit Testbioaerosolen	50
3.3.8	Evaluation der nicht-kulturellen Analyseverfahren zum differenzierten Legionellen Nachweis (lebend/tot) mittels LegioTyper / Arbeitspaket 8 (TU München)	69
3.3.9	Bestimmung der Verteilungsfunktion aktiver Legionellen zwischen Wasser- und Aerosolphase in der Laborrückkühlanlage	81
3.3.10	Herstellung und Quantifizierung von markierten hitzeinaktivierten Legionellen für Tracerversuche an Versuchsanlage	81
3.3.11	Versuchsprogramm zur Charakterisierung des Freisetungsverhaltens von Bioaerosolen aus unterschiedlichen Quellbereichen an der Laborrückkühlanlage mit aktiven Legionellen	81
3.3.12	Übertragbarkeitsuntersuchungen der angepassten Probenahme und Analyse-Strategien auf reale Rückkühlanlagen	90

4	Fazit	98
5	Verwendung der Zuwendung	103
6	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	104
7	Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU	104
8	Aktualisierter Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	106
8.1	Durchgeführte Transfermaßnahmen	106
8.2	Geplante Transfermaßnahmen	108
9	Einschätzung der Realisierbarkeit dieses Transferkonzepts	109
10	Abbildungsverzeichnis	112
11	Tabellenverzeichnis	115
12	Literatur, Quellen	116

1 Forschungsthema

LegioAir - Freisetzungsmechanismen legionellenhaltiger Aerosole aus Verdunstungskühlanlagen und aussagekräftige Bewertungsmethoden für das Ausbruchsmanagement

2 Zusammenfassung

Bei häufig eingesetzten Bauformen von Verdunstungskühlanlagen (VKA) liegt ein unmittelbarer Kontakt des umlaufenden erwärmten Kühlmediums mit der zur Rückkühlung des Mediums genutzten angesaugten Umgebungsluft vor. Sowohl im erwärmten Kühlmedium als auch an Oberflächen von Anlagenbauteilen mit Kontakt zum Kühlwasser können erhöhte Populationen an Mikroorganismen bzw. ein Biofilmwachstum auftreten. Da bei diesen Anlagen die Freisetzung von Mikroorganismen mit der erwärmten Fortluft nicht ausgeschlossen werden kann, erfolgt nach der 42. BImSchV eine fortlaufende Überwachung der Gehalte an Mikroorganismen im Umlaufwasser, insbesondere relevanter Legionellenpopulationen. Da der Freisetzungspfad der Mikroorganismen als Aerosole mit der Fortluft der VKA als besonders gefährdungsrelevant angesehen werden kann, wurden im Vorhaben *LegioAir* diesbezüglich bestehende Freisetzungsmechanismen untersucht. Im Fokus standen die Erarbeitung aussagekräftiger Probenahme- und Bestimmungsmethoden für das Ausbruchsmanagement an zwangsbelüfteten Anlagen mit weniger als 200 MW Kühlleistung. Dazu sollten Verfahren zur Aerosolprobenahme am Auslass der Verdunstungskühlanlagen in Kombination mit einer gegenüber der Kultivierungsmethode schnellen Analytik abgeleitet und kombiniert werden. Einsatzmöglichkeiten dieser Instrumente zur beschleunigten Identifikation möglicher Emissionsquellen im Ausbruchsfall sollen abgeschätzt werden.

An der TUM wurden kulturunabhängige Methoden zur schnellen Quantifizierung von Legionellen bzw. Gesamtheit der Bakterien in Bioaerosolen etabliert. Die allgemeine und biologische Sammeleffizienz der Bioaerosolsammler Coriolis μ und Next Generation Impactor (NGI) wurde erstmalig mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden DNA-interkalierende Farbstoffe PI und Syto9 mit den Proben inkubiert, um die Gesamtzellzahl bzw. Intaktzellzahl zu bestimmen. Der Coriolis μ erreichte bei einer Flussrate von 300 mL/min eine sehr hohe biologische Sammeleffizienz von $90 \pm$

10 %. Der NGI zeigte bei einer Flussrate eine allgemeine Sammeleffizienz von 95 ± 12 % und eine biologische Sammeleffizienz von 60 ± 17 %. Der NGI weist je Sammelstufe eine spezifische Zahl an Zutrittsdüsen mit jeweils spezifischem Durchmesser auf. Bei Durchflussraten zwischen 30 L/min und 100 L/min ergeben sich somit sieben Trennstufen, was den aerodynamischen Partikeldurchmesserbereich zwischen 11 μm bis 0,24 μm abdeckt. Mit der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die meisten Bioaerosole einen Durchmesser von 2 – 0,7 μm haben. Bei Verwendung der selbstgebauten Dispergiereinheit zeigte sich, dass die meisten Bioaerosole schon in der ersten Stufe gesammelt werden. Dies scheint plausibel, da die feuchten Bioaerosole größer sind als die trockenen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit der Dispergiereinheit im NGI mit 90 ± 7 % eine höhere biologische Sammeleffizienz erreicht werden kann.

Für die kulturunabhängige Quantifizierung von *Legionella pneumophila*-haltigen Bioaerosolen wurde eine qPCR von Hygenia sowie eine Immunomagnetische Separation mit einer Durchflusszytometrie (IMS-FCM) der Firma rqmicro gekoppelt. Die Nachweisgrenze für *L. pneumophila* Sg 1 im Bioaerosol lag für IMS-FCM bei 4.0 ± 10^3 Zellen m^{-3} Sammelvolumen (TLC) und 5.8 ± 10^3 Zellen m^{-3} (ILC) und für qPCR bei 9.5 ± 10^2 Zellen m^{-3} (TLC) und 7.8 ± 10^2 Zellen m^{-3} (ILC). Es zeigte sich dabei, dass die Wiederfindung mit 63 ± 14 % (ILC) bei IMS-FCM höher ist als bei qPCR (42 ± 16 % (ILC)). Die Aerosolbestimmung von *Legionella* spp. über Kultivierung erreichte mit 1.5 ± 10^3 Zellen m^{-3} Probengasvolumen eine ähnliche Nachweisgrenze. Die Wiederfindung der kultivierbaren Zellen lag jedoch bei 31 ± 18 %. Dies zeigt, dass IMS-FCM für die Quantifizierung von *Legionella pneumophila* eine schnelle und nachweisstarke Methode ist, welche die Anwesenheit von lebenden *L. pneumophila* besser widerspiegelt als eine Kulturmethode.

Für die Serotypisierung von *L. pneumophila* Sg1-haltigen Bioaerosolen wurde der LegioTyper angewendet, welcher über einem Sandwich-Microarray-Immunoassay das Dresden Panel abbildet. Es zeigte sich, dass eine Subtypisierung von *L. pneumophila* Sg1 erst ab einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml möglich ist. Dies bedeutet, dass nur bei hohen Kontaminationen in einer Anlage eine direkte Subtypisierung möglich ist. Es erscheint aber sinnvoller, im Ausbruchsfall eine Schnell-Subtypisierung mittels LegioTyper nach Kultur durchzuführen, ohne die Bestätigung der Kulturoisolate auf

Legionella spp. per Kultur abzuwarten. Für eine schnelle kulturunabhängige Quantifizierung von *L. pneumophila* im Bioaerosol, im Prozesswasser oder im Biofilm kann die IMS-FCM von rqmicro als Alternative zur qPCR verwendet werden.

Im Rahmen des Vorhabens wurde eine zweiteilige Laboranlage konzipiert und aufgebaut, in der das Biofilmwachstum unter Bedingungen einer realen Verdunstungskühlanlage in der Zweiphasenatmosphäre sowie im Umlaufwasser auf Testoberflächen sowie die Tropfenaerosolprobenahme untersucht werden kann. Die Anlage ist gezielt temperierbar und bei variablen Umlaufvolumenströmen für Gas und Umlaufwasser betreibbar. Die Anlage wurde zur Etablierung und Erprobung von kulturunabhängigen Nachweisverfahren auf Basis von IMS-FCM zur schnellen Quantifizierung von *Legionella pneumophila* in Bioaerosolen nach Bioaerosolsammlung genutzt. Die Aerosolsammlung erfolgte mittels Zyklonabscheider, Impaktion sowie Impingement. In der Laboranlage konnte die Wirkung von Bioziden, die in Verdunstungsanlagen eingesetzt werden, in Abhängigkeit der Bildung eines Biofilms oder die Anwesenheit von Amöben untersucht werden. Hier zeigte sich, dass mit IMS-FCM nach Biozidbehandlung lebende *L. pneumophila* im Prozesswasser zu finden sind, die aber per Kultur nicht nachweisbar sind. Es zeigte sich, dass ein Biofilm eine wichtige Rolle vor allem bei der Verbreitung von *L. pneumophila* auch in Verdunstungskühlanlagen einnimmt, da in den Untersuchungen gezeigt wurde, dass ein Schutzeffekt für Legionellen auftritt. Auch scheinen Amöben einen positiven Einfluss auf die Überlebensraten von Legionellen zu haben, was bei der Risikoabschätzung in Kühlanlagen beachtet werden sollte. Die chemische Zusammensetzung der beiden untersuchten Biozide zeigte starke Unterschiede in der Wirksamkeit, weswegen zukünftig weitere Untersuchungen, besonders im Hinblick auf nicht-kulturunabhängige Methoden, mit allen eingesetzten Bioziden notwendig sind, um eine Übersicht zu erhalten, welches Regrowth-Potential einzelne Biozide in den Verdunstungsanlagen haben. Nur so kann zukünftig zielgerichtet ein Biozid derart eingesetzt werden, dass optimale Hygienebedingungen bei möglichst geringem Biozideinsatz gewährleistet sind.

Um die Bioaerosolfracht am Luftaustritt von Verdunstungskühlanlagen zu bestimmen, ist mindestens die Austrittsgeschwindigkeit der Fortluft und der darin enthaltene Gehalt an Mikroorganismen zu bestimmen. Sollen diese Größen in Verbindung zur emittierten Tropfenmasse und zum Gehalt an Mikroorganismen im Umlaufwasser gebracht

werden, ist zusätzlich noch die Tropfenmenge im Fortluftstrom zu bestimmen. Aufgrund der Größe der Fortluft-Austrittsfläche bei VKA sind diese Größen im Rahmen einer Netzmessung zu erfassen. Bei den häufig anzutreffenden Anlagen mit saugend angeordnetem Gebläse ist dies ebenfalls erforderlich, da in Abhängigkeit vom radialen Abstand der Rotorachse lokal deutlich verschiedene Austrittsgeschwindigkeiten und damit Austrittsvolumina gegeben sind. Die Durchführung dieser insbesondere bei vertikal-tangential gerichteter Strömung in Summe zeitaufwändigen Messungen konnte durch Geräteentwicklungen zur Mehrrichtungs-Strömungsmessung und Verbesserung der Sammeleffizienz bei der isokinetisch-isoaxialen Tropfen-Probenahme deutlich vereinfacht werden.

Vom Gasstrom durch die Rieselpakete und Tropfenabscheider mitgerissene Primärtropfen weisen in erster Näherung dieselbe Legionellenpopulation auf wie das Umlaufwasser. In Abhängigkeit von der Transportgeschwindigkeit ist aber auch die Freisetzung sogenannter Sekundärtropfen möglich, die sich von Oberflächen und Bauteilen ablösen können und ggf. aufgrund dortiger lokal ausgebildeter Organismengemeinschaften in Konzentration und Zusammensetzung vom Umlaufwasser abweichen können. Daher wurde im Labor- bzw. Technikumsmaßstab die Tropfenfreisetzung ausgehend von verschiedenen Oberflächengeometrien in Abhängigkeit von der Gasgeschwindigkeit untersucht. Die Geometrien wurden von innen heraus mit Wasser benetzt und der abluftseitig auftretende Tropfengehalt mit unterschiedlichen Methoden erfasst. Als Geometrien kamen eine eher spitze Kante (in Analogie zu einem Rotorblatt), ein unstetiger 90-Grad-Winkel (in Analogie zu einem Diffusor oder einem Motorgehäuse) sowie eine nassfeuchte, schwamm- bzw. gelartige Struktur (analog Biofilm-Surrogat) zum Einsatz. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass für die spitze Kante ab Überströmungsgeschwindigkeiten von 12,5 m/s eine Tropfenablösung auftritt. Diese Relativgeschwindigkeiten können sehr wohl an Rotorblättern im Betrieb auftreten. Die Tropfen-Abwurfrichtung ist aufgrund der Rotorausrichtung primär gegen die Diffusorwand gerichtet, so dass die direkte Freisetzung in Richtung des Fortluft-Austritts eher weniger relevant scheint. Für die unstetige 90-Grad-Erweiterung tritt die Ablösung bei Überströmungsgeschwindigkeiten oberhalb ca. 15 m/s auf. Für die nassfeuchte schwammartige Struktur sind nochmals höhere Geschwindigkeiten von ca. 20 m/s erforderlich, um hier Tropfen abzulösen.

Realprobenahmen wurden u. a. an einer Verdunstungskühlanlage auf dem Forschungscampus der TU München in Garching im Januar 2023 durchgeführt, um das Gesamtverfahren aus der Kombination von Probenahmeverfahren und Analytik in der Praxis zu erproben. Nach erfolgreicher Probenahme zeigte sich, dass alle Legionellen-Messungen in Luft- und Wasserproben mittels IMS-FCM und Kultivierung negativ ausfielen. Zum Zeitpunkt der Messkampagne konnte kein Nachweis dahingehend geführt werden, dass Legionellen mit der Fortluft freigesetzt werden. Bei der Probenahme an einer weiteren Anlage kam allein das Kultivierungsverfahren zum Einsatz. Die vorliegenden Messdaten zeigen Möglichkeiten der Zuordnung der Emissionsfracht zu Primär- und Sekundärtropfen auf.

3 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

3.1 Ausgangssituation

Verdunstungskühlanlagen (VKA) sind bei vielfältigen Industrieeinrichtungen im Einsatz, um dort anfallende und nicht nutzbare Prozesswärme über einen flüssigen Wärmeträger an die Umgebungsluft abzuführen. Als Wärmeträger kommt i.d.R. im Kreislauf geführtes Prozesswasser zu Einsatz, das auch als Kreislauf- oder Kühlwasser bezeichnet wird. Dieses Prozesswasser wird innerhalb der Anlage großflächig über Tropf- oder Rieselkörperschichten verteilt und am Fuß der Anlage in einer Kühlturm-tasse aufgefangen. Durch den Kontakt zu meist im Gegenstrom durch die Anlage geführter kälterer Umgebungsluft kühlt das Prozesswasser ab und kann dem jeweiligen wärmeerzeugenden Prozess erneut zu Kühlzwecken zugeführt werden. Neben dem indirekten Wärmeaustausch, bei dem das Prozesswasser in Rohrbündeln geführt wird, ist der direkte Wärmeaustausch mit unmittelbarerem Kontakt zwischen Luft und Prozesswasser konstruktiv häufig anzutreffen, vgl. der untere Bildteil in Abbildung 1.

Bei diesem als Nasskühlturm oder offenem Nasskühler bezeichneten Anlagentyp findet zusätzlich die Verdunstung von Teilen des Prozesswassers und damit eine weitere Abkühlung des Prozesswassers statt, soweit die zugeführte Umgebungsluft

während des Kontaktes nicht wasserdampf-gesättigt vorliegt. Verdunstungskühlanlagen werden oftmals kontinuierlich betreiben.

Auch in kleinen und mittelständischen Unternehmen ist die Abführung von Wärme mittels Verdunstungskühlanlagen Stand der Technik. So werden in der Lebensmittel-industrie (Molkereien, Brauereien), in der Stahlindustrie (Gießereien, Drahtziehereien), in der chemischen Industrie und Kunststoffverarbeitung, in Reinigungsbetrieben sowie in der Gebäudetechnik Rückkühlanlagen benötigt, um nur einige Beispiele zu nennen.

Das Prozesswasser wird mit Temperaturen von einigen zehn Grad Celsius in die VKA eingespeist und beim Durchlaufen des Rückkühlprozesses in der VKA typischerweise um fünf bis acht Grad abgekühlt. Durch die in der Anlage feuchte Atmosphäre bei Temperaturen von oftmals 20 °C oder höher herrschen gute Wachstumsbedingungen für aerobe Mikroorganismen vor. Im umlaufenden Prozesswasser lassen sich daher oftmals erhöhte Konzentrationen an Mikroorganismen nachweisen. Zusätzlich findet unter diesen Bedingungen an den dauer-feuchten Wandungen der Anlagen ein Biofilmaufwuchs statt. Während die Anteile des Prozesswassers, die in die zugeführte Luft verdunsten, keine Mikroorganismen aufweisen, können zusätzlich Prozesswassertröpfchen mitgerissen und mit der Fortluft aus der Anlage in die Atmosphäre ausge-tragen werden. Von den Anlagen werden täglich große Mengen an tropfenhaltigem Aerosol in die Umgebungsluft abgeführt und je nach Ausbreitungsbedingungen über ein großes Gebiet verteilt. Kommt es zu einer Inhalation dieses Tröpfchenaerosols durch den Menschen, bevor die Mikroorganismen inaktiviert werden, können schwere Atemwegserkrankungen die Folge sein.

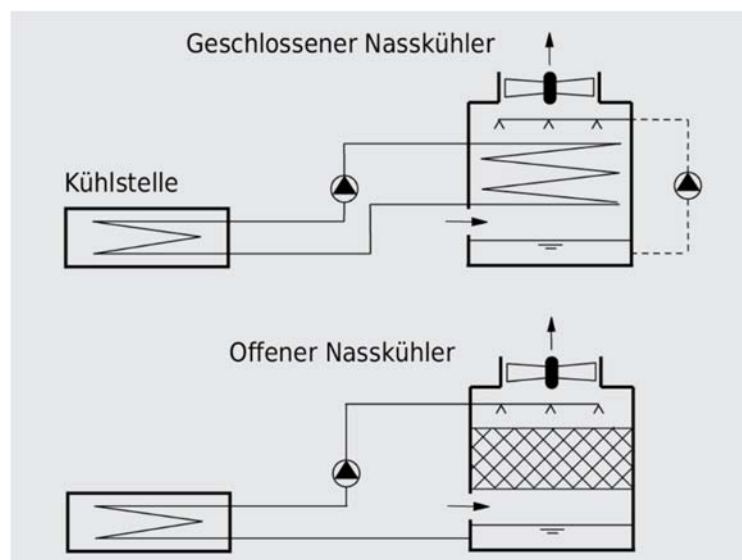


Abbildung 1 Schema von geschlossenem und offenem Nasskühler [1]

Tabelle 1 **Prüf-, Maßnahme- und Zielwerte gemäß 42. BImSchV [3]**

Art der Anlage	Prüfwert 1	Prüfwert 2	Maßnahmenwert
	Legionellenkonzentration (KBE <i>Legionella</i> spp. je 100 mL)		
Verdunstungskühlanlagen	100	1.000	10.000
Nassabscheider	100	1.000	10.000
Kühltürme	500	5.000	50.000

Verdunstungskühlanlagen, von denen in Deutschland mehr als 10.000 Anlagen im Einsatz sind [2], werden diesbezüglich allgemein als potentiell relevante Quelle eingestuft. Bei konservativer Abschätzung kann angenommen werden, dass sich jährlich mindestens 110 Legionelleninfektionen auf ein solches Ausbruchsgeschehen zurückführen lassen [3]. Andere Schätzungen gehen sogar von 30.000 bis 50.000 Anlagen aus [4]. Bspw. trat in Warstein/NRW im Jahr 2013 eine solche Legionellenepidemie auf. In diesem Zusammenhang erkrankten 165 Menschen, zwei Menschen starben [5]. Vorliegende Erfahrungen zeigen, dass insbesondere kleinere Anlagen wie kompakte Verdunstungskühlanlagen bei diesem und vergleichbaren Ereignissen von Bedeutung waren [6 S. 51].

Zur Gewährleistung eines hygienisch einwandfreien Betriebs und Verhinderung nicht ordnungsgemäßer Betriebszustände an Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern ist 2017 die 42. Bundesimmissionsschutzverordnung (BImSchV) in Kraft getreten [3]. Diese soll insbesondere die Umsetzung von technischen und organisatorischen Maßnahmen beim Betrieb von Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern sicherstellen. Die darin vorgesehene Überwachungsstrategie basiert vor allem auf der Untersuchung des Umlaufwassers der betreffenden Anlagen sowie der mehrstufigen Bewertung der Wasserqualität anhand von mehrstufigen Prüf- und Maßnahmenwerten, vgl. Tabelle 1. Als Kühltürme werden dabei solche Verdunstungskühlanlagen bezeichnet, bei denen eine Kühlleistung von mehr als 200 MW je Luftauslass durch einen natürlichen Luftzug erzeugt wird, ohne zusätzliche Unterstützung durch Gebläse oder Ventilatoren.

Die Anlagenzahl, für die aufgrund potentieller Legionellenfreisetzung Überwachungsbedarf besteht, ist dementsprechend sehr hoch. Die Bundesregierung geht von insgesamt ca. 40.000 überwachungsbedürftigen Anlagen aus [2]. Der Großteil der Anlagen

(schätzungsweise 70 bis 80 %) sind dabei Verdunstungskühlanlagen mit einer Leistung von weniger als 200 MW je Luftauslass. Da das Gesundheitsgefährdungspotential dieser „kleineren“ Verdunstungskühlanlagen als deutlich größer als das von Anlagen oberhalb 200 MW eingeschätzt wird, liegen hierin auch die höheren Prüf- und Maßnahmenwerte in der 42. BImSchV für Kühltürme mit ihrer größeren Bauhöhe und dem andersartigen Emissionsverhalten mit erheblich stärkerer Verdünnung bis zum Immissionsaufpunkt begründet (vgl. [7]).

Die stetig wachsenden Anforderungen an die Überwachung der einzelnen Anlagen erfordern neben eingehender Gefährdungsbeurteilung durch öffentlich bestellte und vereidigte Sachverständige alle fünf Jahre eine laufende, wiederkehrende Überwachung der Anlagen durch Probenahme des Umlaufwassers und Laboranalysen der gewonnenen Proben. Die Anlageninspektion durch den Betreiber und die notwendige regelmäßige Behandlung bzw. Aufbereitung des Umlaufwassers sind weitere Faktoren, die für jede Anlage anfallen und einen Kostenaufwand in der Größenordnung von jährlich mehreren Tausend Euro erzeugen können.

3.2 Problemstellung

An den Anlagen ist aufgrund des erheblichen erforderlichen Aufwands keine direkte Überwachung der Konzentration an Mikroorganismen in der Fortluft durch den Betreiber möglich. Diese Größen stellen aber aus Sicht der Antragssteller das zentrale Maß des tatsächlichen Gefährdungspotentials dar. Im Ausbruchsfall müssen daher zusätzliche Möglichkeiten zur schnellen Suche und Identifikation der Emissionsquelle zur Verfügung stehen. Die im Umlaufwasser einer Anlage gemessene Legionellenkonzentration ist nach derzeitigem Stand nicht direkt auf die Konzentration der Legionellen in der Abluft der Anlage übertragbar [8, 9]. Nur hilfsweise kann in erster Näherung angenommen werden, dass die Konzentration der unmittelbar bei der Wasserverteilung freigesetzten Umlaufwasser-Tropfen (Primärtropfen) durch die vorliegenden Messwerte des Umlaufwassers repräsentiert werden. Während für Anlagen > 200 MW über die Passage durch die Anlage von einem weitgehend gleichbleibenden Tropfenspektrum ausgegangen werden kann [10], ist für kleinere Anlagen bekannt, dass auf dem Weg vom Tropfenabscheider zum Auslass Veränderungen auftreten [8]. Wechselwirkungen des Tropfenspektrums mit Einbauten wie Tropfen-

abscheiden, Ventilatoren bzw. Wandungen sowie Einflüsse aufgrund der thermodynamischen sowie Strömungsbedingungen sind bei diesen weit verbreiteten Anlagentypen potentiell stets gegeben. Ausgehend von diesen Flächen ist – neben dem Anhaften auch die Freisetzung von Sekundärtropfen möglich [11]. Aufgrund von sich lokal ausbildenden Biofilmen kann die hier auftretende mikrobiologische Belastung von der der Primärtropfen abweichen. Änderungen des Tropfenspektrums, der Fracht und des Gehaltes an Mikroorganismen sind die Folge. Dieser Sachverhalt soll mit der Darstellung in Abbildung 2 erläutert werden.



Abbildung 2 Tropfenemission aus unterschiedlichen Quellbereichen am Auslass einer Kühlzelle mit saugend angeordnetem Ventilator

Links: Blick durch die Auslassöffnung in einen Diffusor mit saugend angeordnetem Ventilator

Rechts: Schematische Darstellung der Freisetzungsbereiche für Tropfen: Primärtropfen (blau) passieren den Tropfenabscheider und den Diffusor, können aber auch mit Einbauten wie dem Tropfenabscheider, Rotor oder Wandungen wechselwirken (Sekundärtropfen)

Kenntnisse zu technischen Freisetzungsfaktoren können zur kostenoptimierten Gewährleistung der Anlagenhygiene beitragen. Die Lokalisierung der (anlagenspezifischen) Freisetzungsorte der Legionellen (z. B. Mitriss von Tropfen aus den Biofilmen) sowie die Orte der Legionellenvermehrung ist eine wesentliche Voraussetzung, um den Biozideinsatz im Rahmen einer quasi-kontinuierlichen Eigenüberwachung gezielter zu gestalten und die Biozidmenge idealerweise insgesamt zu reduzieren.

Ein Grund für den Bezug der Prüf- und Maßnahmenwerte der 42. BImSchV auf das Umlaufwasser ist neben der relativ einfachen Zugang der Matrix, dass derzeit keine standardisierte Strategie zur Probenahme von Bioaerosolen am Auslass von Verdunstungskühlanlagen vorliegt [12]. Die Anforderungen der einschlägigen Richtlinienreihen VDI 4257 bzw. VDI 2066 an eine (Bio-)Aerosolprobenahme sind unter den besonderen Randbedingungen von Verdunstungskühlanlagen nur bedingt umsetzbar.

Auf internationaler Ebene ist nur die CEN/TS 16115-2 zu nennen, die sich aber auf die Erfassung von Bioaerosolen in der Außenluft fokussiert [13]. Insbesondere die großen Abmessungen der Austrittsfläche der Verdunstungskühlanlagen, die häufig schlechte Zugänglichkeit der Messebene sowie der hohe Wassergehalt des Aerosols bereiten messtechnische Schwierigkeiten. Vorgaben zur Probenahme an diffusen Quellen der Richtlinienreihe VDI 4285 sind aufgrund der speziellen Quellcharakteristik von Verdunstungskühlanlagen (oftmals höhere Ausströmgeschwindigkeit ≥ 2 m/s, Durchmesser von ca. 3 m bis 60 m in größerer Höhe) ebenfalls nur bedingt anwendbar.

Gemäß 42. BImSchV erfolgt eine Bestimmung des Legionellengehaltes mittels Kultivierungsmethoden. Es ist in verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen gezeigt worden (z. B. [14]), dass die Kulturmethode zur Bestimmung von Legionellen im Umlaufwasser nicht nur sehr zeitaufwendig, sondern auch unzureichend zuverlässig ist. Gründe dafür sind, dass Legionellen sehr langsam wachsen (erste Informationen nach 7 – 10 Tagen), Begleitflora die Kultur oftmals überwuchert und damit das Wachstum von Legionellen inhibiert bzw. die Auswertung der Ergebnisse erschwert. Intrazelluläre Legionellen, die in Amöben enthalten sind oder sich in einem lebenden, aber nicht kultivierbaren Zustand befinden (VBNC oder dormant), werden nicht miterfasst [20]. Diese Minderbefunde gegenüber der tatsächlich vorhandenen Legionellen-Gesamtzahl und die langen Wartezeiten sind insbesondere im Falle eines akuten Legionelloseausbruchs nicht hinnehmbar, weswegen die Etablierung kulturunabhängiger Methoden enorm wichtig ist (Immunoassays oder molekularbiologischen Methoden). In der Richtlinie VDI 4259 Blatt 1 werden aus diesem Grund erstmals kulturunabhängige Messmethoden als Screening-Methoden für den Ausbruchsfall zur schnelleren Findung der Ausbruchsquelle beschrieben [14].

Von Institutionen, Behörden und Verbänden wird das Thema der Gefährdungsvermeidung ausgehend von einer anlagenbezogenen Legionellenemission in Arbeitskreisen diskutiert bzw. werden geeignete Maßnahmen abgeleitet. Mitarbeiter bzw. Mitarbeiterinnen beider im Rahmen der Antragstellung kooperierenden Forschungseinrichtungen wirken in solchen Gremien aktiv mit (IUTA (FE 1): VDI-Richtlinienausschuss NA 134-03-07-03 UA: Probenahme von Bioaerosolen und Erzeugung von Biotestaerosolen, TUM (FE 2): VDI Richtlinienausschuss NA 134-03-07-09 UA „Messen und Bewerten von Legionellen“ und NA 134-03-07-04 UA „Bioaerosole und biologische Agenzien – Luftgetragene Mikroorganismen und Viren“). Das vom Umweltbundesamt geförderte

UFO-Plan Vorhaben FZK 3716 62 209 0, mit dem Ziel, ein sensitives Verfahren zum Nachweis von Legionellen in Aerosolen von Verdunstungskühlanlagen zu entwickeln, wurde unter Mitwirkung der FE 1 bearbeitet [15, 16].

3.3 Forschungsziel / Lösungsweg / Ergebnisse

Mit dem vorliegenden Forschungsbericht wird angestrebt, Hintergrundinformationen zu Freisetzungsmechanismen legionellenhaltiger Aerosole aus Verdunstungskühlsystemen (zwangsbelüftete Anlagen, < 200 MW) insbesondere für die besonders relevanten Kleinanlagen zu liefern und aussagekräftige Probenahme- und Bestimmungsmethoden für das Ausbruchsmanagement abzuleiten (LegioAir).

Die Entwicklung eines handhabbaren und validierten Verfahrens zur Aerosolprobenahme am Auslass der Verdunstungskühlanlagen in Kombination mit einer schnellen Analytik ermöglicht im Ausbruchsfall die beschleunigte Identifikation der Emissionsquelle.

Wird gezeigt, dass kulturunabhängige Methoden eine valide Alternative zu den kulturellen Verfahren darstellen, lassen sich zukünftig deutlich kürzere Intervalle zwischen Probenahme und Untersuchungsergebnis (Stunden statt Tage) erzielen. Diese deutlich schnellere Auswertung ist insbesondere zur Überprüfung der Wirksamkeit von Gegenmaßnahmen bei akut erhöhter mikrobiologischer Belastung des Umlaufwassers hilfreich. Für den Erhalt valider Ergebnisse müssen die Betreiber die Untersuchung mittels kulturunabhängiger Verfahren allerdings bei erfahrenen Laboren in Auftrag geben. Durch eine vertiefte und erweiterte Wissensbasis zu Aerosolentstehungs- und -freisetzungsmechanismen kann der Maßnahmenumfang bedarfsgerecht und ursachenbezogen angepasst werden.

Aktuell lässt sich die Freisetzung von Legionellen für einzelne Anlagentypen nur orientierend abhängig von den spezifischen Freisetzungsbedingungen abschätzen. Kenntnisse von systematischen Zusammenhängen sind auch für Anlagenhersteller von großer Bedeutung, da diese somit die technische Ausgestaltung von Kühlanlagen gezielt so planen können, dass eine Gefährdung durch Legionellen im Falle des Anlagenneubaus oder auch bei Nachrüstungsmaßnahmen geringgehalten wird.

Das Vorhaben gliedert sich in drei Schwerpunkte:

- Konzeption, Aufbau und Inbetriebnahme einer Bioaerosol-Testkammer, welche die Bildung von Bioaerosolen, Biofilmen und das Wachstum von *Legionella pneumophila* in Verdunstungskühlsystemen abbildet und unter Anforderungen der Sicherheitsstufe 2 (BioStoffV) betrieben werden kann
- Etablierung und Erprobung von kulturunabhängigen Nachweisverfahren auf Basis des LegioTypers (Antikörper-basiert und molekularbiologisch) zur schnellen Quantifizierung von *Legionella pneumophila* in Bioaerosolen nach Bioaerosolsammlung (Zyklonabscheider, Impaktion, Impingement)
- Konzeption, Aufbau und Inbetriebnahme einer Technikumsanlage zur systematischen Untersuchung von Einflussparametern der Bioaerosolfreisetzung aus Verdunstungskühlanlagen sowie zur Validierung einer adäquaten Probenahme

3.3.1 Konzeption einer Laborrückkühlanlage zur Untersuchung von Biofilmentstehungsprozessen - AP 1 (IUTA)

Durchgeführte Arbeiten

Die Laboranlage soll das Biofilmwachstum sowie die Tropfenaerosolprobenahme unter Bedingungen einer realen Verdunstungskühlanlage ermöglichen. In den späteren Versuchsreihen, die bei FE 2 mit dieser Versuchseinrichtung durchgeführt werden, erfolgt zusätzlich zur Tropfengrößenklassen-fraktionierten Aerosolprobenahme die Beprobung des aufgewachsenen Biofilms sowie des Umlauffluids. Anhand eines umfassenden Anforderungskatalogs wurden in Abstimmung mit FE 2 verschiedene Konzepte für eine Labor-VKA entwickelt, bewertet, und schließlich kriteriengestützt ein geeignetes Anlagenkonzept ausgewählt. Die Anforderungen ergeben sich ausgehend von Erfordernissen der Aerosolprobenahme sowie der ausreichenden Medienversorgung des Biofilms (Belüftung, Befeuchtung, Nährstoffe).

Im Rahmen der Entwicklungsarbeiten wurden verschiedene Anlagenkonzepte auf Basis unterschiedlichen Stromführungen vergleichend geprüft. Die Prüfung umfasste Konzepte mit und ohne Bypassstromführung.

Erzielte Ergebnisse

Es wurde ein zweigeteiltes Anlagenkonzept bestehend aus einer Bioaerosol-Wachstumschamber sowie einer separaten Dispergiereinheit entwickelt. Abbildung 3 zeigt die Funktionseinheiten und Stoffflüsse der Anlage in einer schematischen Darstellung.

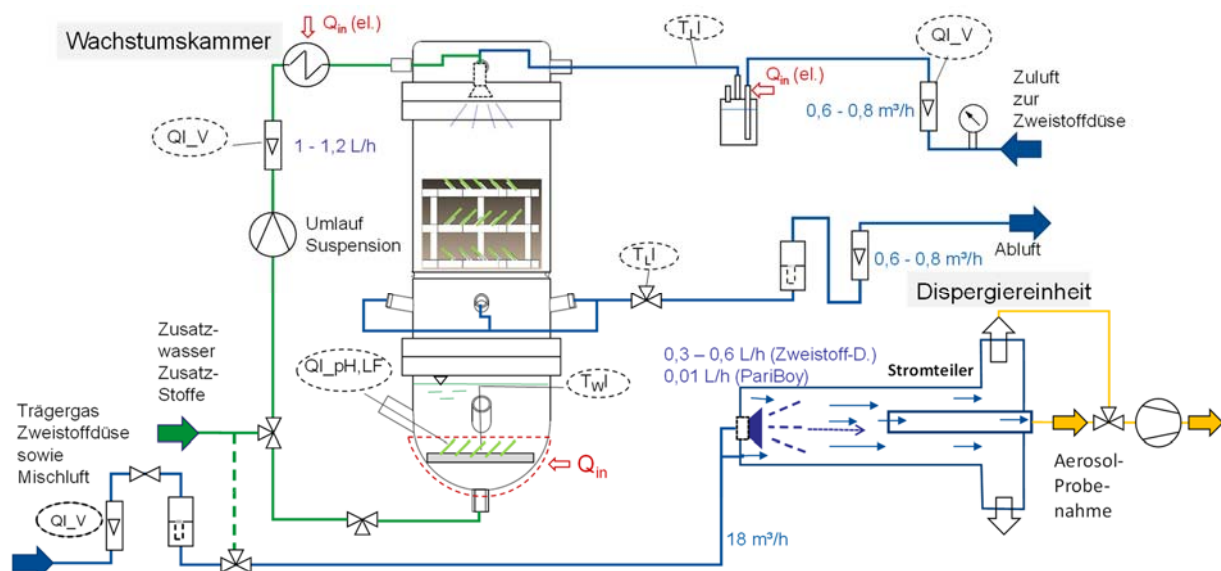


Abbildung 3 Anlagenskizze: Funktionseinheiten der Laboranlage und Stoffflüsse

Für den Betrieb ist eine weitgehende Wasserdampfsättigung der Gasphase erforderlich, damit das erzeugte Tropfenaerosols nicht bei Einmischen in nicht-wasserdampf-gesättigte Gasströmungen bereits vor der Probeahme verdunstet. Es wurden mehrere Varianten der Wasserdampfsättigung untersucht, unter anderem der Einsatz befeuch-teter Rieselkörper, die Impinger-Durchströmung sowie eine Dampfzugabe.

Zur gezielten Erzeugung von Aerosoltropfenspektren mit definiertem mittleren Durchmesser wurde eine Vorauswahl unterschiedlicher Düsen in Bezug auf Tropfenspektrum und Flüssigkeitsverbrauch durchgeführt. Für ausgewählte Systeme wurde das Tropfenspektrum mittel Phasendoppler-System (PDA) aufgenommen (Medizinische Aerosolgeneratoren PariBoy Xlent, PariBoy LCPlus und modular aufgebaute Labor-Zweistoffdüse (Modell 970, Fa. Düsen-Schlick GmbH).

Die Strömungsverhältnisse am Auslass der Laboranlage sollten den Bedingungen von Realanlagen entsprechen, um vergleichbare Probenahmebedingungen zu schaffen. Maßgebliche Kennzahl für den dabei wichtigen Turbulenzzustand einer Strömung stellt die Reynolds-Zahl (Re) dar, die als Verhältnis von charakteristischer Länge, Gasgeschwindigkeit sowie -dichte zur Viskosität des strömenden Mediums berechnet wird (vgl. z. B. Hinds 1999, S. 28 [17]). Dazu wurden Messdaten verschiedener Anlagen herangezogen, vgl. nachfolgende Tabelle. Demnach liegen turbulente Strömungsverhältnisse mit Re-Zahlen im Bereich 2×10^5 bis 2×10^6 für Zellen- und Serienkühltürme sowie ca. 5×10^6 für Hybridanlagen vor.

Tabelle 2 Strömungsverhältnisse am Auslass von Verdunstungskühlanlagen

	Zellenkühlturm 1		Zellenkühlturm 2		Serienkühlturm		Hybridkühlturm
Form Austrittsfläche	Kreis	Ring	Kreis	Ring	Kreis	Ring	
Temperatur (K)	293,15	293,15	293,15	293,15	293,15	293,15	293,15
Luftdruck (kPa)	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3	101,3
Kanaldurchmesser (m)	3,8	2,9	7,2	7,0	0,5	0,49	33
Gasgeschwindigkeit (m/s)	6,2	11,4	4,0	3,7	6,2	6,8	2,4
Dichte Luft (kg/m ³)	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
Viskosität Luft (Pa s)	0,0000181	0,0000181	0,0000181	0,0000181	0,0000181	0,0000181	0,0000181
Reynolds-Zahl (Re)	1,57E+06	2,18E+06	1,92E+06	1,71E+06	2,08E+05	2,23E+05	5,21E+06

3.3.2 Konzeption einer Technikumsanlage zur Untersuchung der Tropfenentstehung und Aerosoldynamik sowie der Erprobung von Messtechnik in wasserdampfgesättigter, stark tropfenhaltiger Atmosphäre - Arbeitspaket 2 (IUTA)

Durchgeführte Arbeiten

Neben der Labor-VKA wurde von FE 1 ein zu errichtender Versuchsstand auf Basis einer vorhandenen Versuchsanlage entwickelt, um die Tropfenablösung an verschiedenen Testmonitoren zu untersuchen. Die Anlage ist mit einer geplanten Durchsatzleistung von ca. 2.500 m³/h deutlich größer dimensioniert als die Laborrückkühlanlage gemäß AP 1. An dieser können die Gegebenheiten realer Anlagen besser angenähert werden, zudem lassen sich die in einschlägigen Normen zur repräsentativen Probenahme geforderten Ein- und Auslaufstrecken (z. B. nach VDI 2066) realisieren.

Die Planungen des Anlagenkonzeptes sahen die Nutzung eines in einer IUTA-Technikumschale vorhandenen vertikalen Strömungsrohres mit angeschlossenem Heizregister vor. Diese Anlage sollte durch einen Mitteldruck-Hochleistungsventilator mit regelbarer Durchsatzleistung zu einer funktionsfähigen Gesamtanlage ergänzt werden, in welche verschiedene Baukörper eingesetzt und mittels integrierter Messtechnik die resultierende Tropfenablösung untersucht werden sollten.

Aufgrund sicherheitstechnischer Anforderungen konnte die ursprünglich vorgesehene Anlage für die experimentellen Untersuchungen leider nicht eingesetzt werden. Daher wurde eine Neuplanung des Anlagenkonzeptes durchgeführt, was auch einen alternativen Anlagenstandort erforderte.

Ausgehend von der jeweiligen typischen Geometrie der zu untersuchenden Kühlanlagenbauteile und den an Praxisbedingungen angelehnten Strömungsbedingungen (Gasgeschwindigkeit, Reynolds-Zahl) erfolgte die technisch-konstruktive Auslegung der Technikumsanlage. Im nachfolgenden Abschnitt „Ergebnisse“ wird das entwickelte Anlagenkonzept beschrieben.

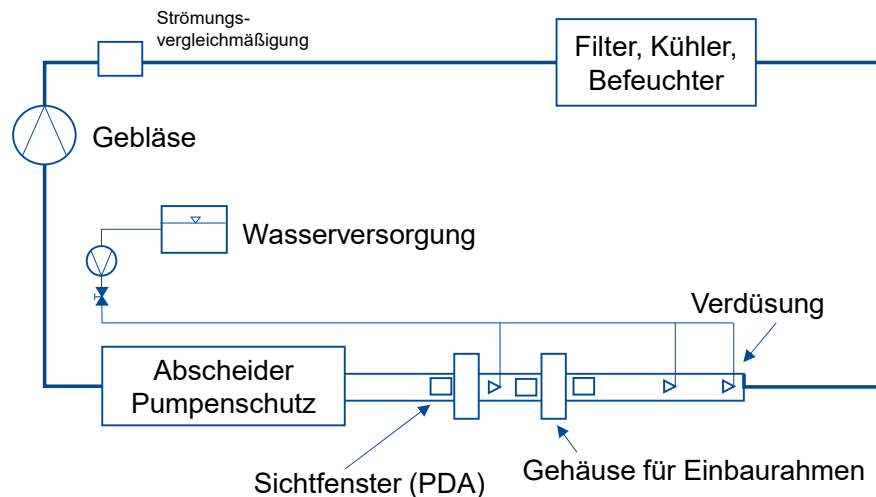


Abbildung 4 Anlagenskizze: Technikumsanlage mit Luftstrom-Konditionierung

Erzielte Ergebnisse

Das ursprüngliche Schema der Technikumsanlage wurde nach eingehender Prüfung auch aus energetischen Gründen dahingehend verändert, dass im aktuellen Anlagenkonzept eine Kreislaufführung des feuchten Gasstroms vorgesehen ist, vgl. Abbildung 5. Die Anlage ist überwiegend als rechteckiger Kanal mit DN 300 ausgeführt. Für den Einbau der Testmonitore sind entsprechende Einschübe vorgesehen. Einrichtungen zur Tropfenerzeugung sowie Messgeräte werden über entsprechende Flanschan-schlüsse bzw. Sichtfenster integriert. Die Messung der Gasgeschwindigkeit erfolgt mittels einer dauerhaft in den Kanal eingebrachten Vortex-Sonde. Der Luftstrom wird vor der Tropfeneindüsung gesättigt zugeführt, um die Verdunstung von zugegebenen Wassertropfen zu minimieren. Entsprechende Isometriezeichnungen zur Anlage wurden erstellt.

3.3.3 Beschaffung, Aufbau, Inbetriebnahme der Versuchsanlage, Modifikation der Aerosolsammler / Arbeitspaket 3 (IUTA)

Durchgeführte Arbeiten - Laboranlage

Die für die in den vorangehenden Kapiteln dargestellten Anlagen erforderlichen Bauteile wurde beschafft und die Anlagen montiert. Die Bauteile der als Glasanlage ausgeführten Biowachstumschammer nebst Halterungen, Verrohrung/Verschlauchung sowie Mess- und Regeltechnik wurden beschafft. Die Fertigung der speziell konstru-

ierten Bauteile erfolgte bei IUTA im 3D-Druck-Verfahren. Die Laboranlage wurde ausgehend von der Zentraleinheit assembliert und erfolgreich verschiedenen Funktionstests unterzogen. Bei Aufbau und Inbetriebnahme war insbesondere zu berücksichtigen, dass die Anlage am Aufstellort bei der TU München innerhalb einer Sicherheitswerkbank betrieben wird und daher ein entsprechendes Bedienkonzept unter Nutzung von Glovebox-Handschuhen gewährleistet sein muss.

Nach Fertigstellung der Wachstumskammer wurde als zweite Baueinheit der Laboranlage die Dispergiereinheit zur Aerosolerzeugung aufgebaut, getestet und optimiert.

Die Ausführungsplanung zeigte auf, dass das ursprünglich vorgesehene Anlagenkonzept, welches je nach Sammler ein nicht unerheblichen Bypass-Luftstrom vorsah, sich aufgrund des Regelungsaufwandes, Vielzahl der erforderlichen Stoffströme und Platzangebot am Aufstellort innerhalb einer Sicherheitswerkbank nicht realisieren ließ. Alternativ wurde eine Variante aufgebaut, bei der der Probenahmestrom dem gesamten Zuluftstrom zum Aerosolsammler entspricht und die zudosierte, überschüssige Flüssigkeit einlassseitig aufgefangen wird, vgl. nachfolgende Abbildung 11.

Diese als Strömungsrohr ausgeführte Baueinheit ermöglicht die gezielte Erzeugung und Probenahme eines Tropfenaerosols aus einer per Zweistoffdüse dispergierten Flüssigkeit oder wässrigen mikroorganismenhaltigen Suspension, bspw. aus der Umlaufflüssigkeit der Bioaerosol-Wachstumskammer. Ziel war, einen Anlagenbetrieb innerhalb der Sicherheitswerkbank beim Forschungspartner zu ermöglichen. Die Dispergiereinheit besteht weitgehend aus standardisierten Bauteilen, bspw. Kunststoff-Rohrelementen verschiedener Hersteller. Um Aerosolsammler mit ihren spezifischen Anschlussmaßen an die Dispergiereinheit anschließen zu können, wurden im 3 D-Druck-Verfahren verschiedene Adapterstücke konstruiert und aus Kunststoff gefertigt, um die ausreichend gasdichte Verbindung zwischen Dispergiereinheit und Aerosolsammlern zu gewährleisten. Stromführung und Konstruktion wurden zusätzlich im Hinblick auf möglichst geringe Sammelverluste optimiert, z. B. durch gleichmäßige Durchmesseränderungen des gasführenden Strömungsrohres sowie Minimierung von Kanten und Umlenkungen.

Die Aerosoldosierung erfolgte bei diesem Aufbau mit einer Zweistoffdüse, die baugleich auch in der Biofilm-Wachstumskammer Verwendung fand. Zu diesem Zweck kam ein kompaktes Gerät zur kontinuierlichen Erzeugung auch kleiner

definierter Mengen an Wasserdampf zum Einsatz (Cellkraft Precision Evaporator E-1000, Cellkraft AB, Stockholm/SE).

Funktionstests wurden insbesondere durchgeführt, um eine weitgehende Wasserdampfsättigung der Zuluft zu gewährleisten. Dazu wurde die Gasphase wasserdampfgesättigt und über die jeweilige Versuchsdauer zudosierte Flüssigwassermenge im Verhältnis zur im Tropfenfang ablaufenden bzw. im Sammler erfassten Wassermenge bilanziert.

Nach Inbetriebnahme-Testläufen bei IUTA erfolgte der abschließende Anlagenaufbau und die Inbetriebnahme bei FE 2 durch IUTA in Abstimmung mit und enger Kooperation mit der TU München. Nachfolgend sollen die als Ergebnis erarbeiteten Anlagenkonzepte beschrieben werden.

Erzielte Ergebnisse - Laboranlage

Biofilm-Wachstumschammer

Die Wachstumschammer umfasst die Komponenten „Glasanlage“ und zusätzlich Biofilmträger, Zweistoffdüse inkl. Zuluft- und Abluftführung sowie einen Wasserkreislauf nebst die für die Funktion erforderliche Mess- und Regeltechnik. Die Anlage verfügt über einen per Schlauchpumpe gewährleisteten Flüssigkeitsumlauf, einen elektrisch temperierbaren flüssigkeitsgefüllten Sumpfteil sowie eine Temperatur- und Feuchteconditionierung der Zuluft. Flüssigkeit und Zuluft werden bei niedrigem Druck gemeinsam über eine Zweistoffdüse zugeführt. Verschiedene Temperatursensoren kommen zur Steuerung der Heizungen zum Einsatz. Weitere Temperatursensoren messen die System- und Stoffstromtemperaturen an verschiedenen Positionen der Anlage. Zusätzlich erfolgt die Erfassung von pH-Wert und Leitfähigkeit jeweils per Messsonde im Flüssigkeitssumpf. Die Verarbeitung der Temperatur-Messdaten erfolgt per Mikrocomputer (Aduino Nano). Diese Daten werden gemeinsam mit den pH- und Leitfähigkeitsdaten auf einem angeschlossenen PC-System abgespeichert. Dazu dient eine in der Programmiersprache Python entworfene Benutzeroberfläche.

Der Hauptteil der Biofilmanlage umfasst drei Glaselemente mit einem Nenndurchmesser DN 150 (Innendurchmesser 150 mm): Kopfelement, zylindrisches Mittelteil und Bodenelement (Sumpf). Die Elemente besitzen ebenfalls aus Glas ausgeführte Gewindestutzen der Maße GL18 (Kopf- und Mittelteil) und GL25 (Sumpfteil). Diese dienen als Anschlüsse für die Versorgung mit Betriebsmedien (Wasser, Luft, Sonstige)

sowie der Positionierung von Messsensoren. Die einzelnen Bauteile werden jeweils mit einer ePTFE Dichtung gegeneinander abgedichtet und mittels Edelstahl-Spannringen gasdicht verbunden.

Der zylindrische Mittelteil besitzt im unteren Bereich einen innen im Glaskörper umlaufenden Steg, auf den sich die Biofilmträger-Einheit aufsetzen lässt. Der unterhalb befindliche Sumpf dient als Reservoir für das umlaufende Fluid. Das Fassungsvermögen liegt bei ca. 1.500 mL. Der Sumpfinhalt kann mittels elektrischer Widerstandsheizungen temperiert werden. Dazu sind an der Außenwandung sechs Heizfolien angebracht. Eine umgelegte, aus zwei Teilen bestehende temperaturbeständige textile Isolierung (Aramid) verringert Wärmeverluste. Zudem ist auf dem Sumpf eine Skala sichtbar, mit der der Füllstand überprüft werden kann. Um einen sicheren Stand zu gewährleisten, ist die Glasanlage in einem Gestell aus Aluminium-Profilen (Rexrodt) mit Hilfe von Rohrschellen fixiert. Über in die Profile eingeklinkte Gleitschuhe mit Gewindestangen bzw. -bohrungen lassen sich einzelne Bauteile am Gestell befestigen, bspw. Klemmhalterungen oder Messeinrichtungen wie Schwebekörper-Durchflussmesser.

Die Zweistoffdüse (Schlick Modulsystem 970, Düsen Schlick GmbH, Untersiemau) im Kopfelement der Anlage dient der gleichmäßigen Befeuchtung des Anlagenquerschnitts mit Aerosoltropfen sowie der Zuführung von Zuluft. Sie besitzt entsprechend Schraubanschlüsse für die umlaufende Flüssigkeit sowie Druckluft. Sprührichtung ist in Richtung der Einbauten nach unten in Richtung des Sumpfes. Der Sprühkegel der Zweistoffdüse kann nach Ausbau der Düse verändert werden. Die Zuluft lässt sich vor Eintritt in die Biosicherheitskammer über eine vorgeschaltete Konditionierungseinheit temperieren und befeuchten. Abbildung 6 zeigt die Einbausituation der Zweistoffdüse im Kopf der Anlage.

Bei den von Flüssigkeit bzw. Glas überströmten Biofilmträger handelt es sich um Glasplatten der Abmessungen 76 x 26 mm (Glas-Objektträger). Von diesen sind jeweils vier Platten in drei Ebenen übereinander in einer Kunststoffhalterung fixiert, vgl. den linken Bildteil von Abbildung 7. Die Platten sind in jeder Ebene im Winkel von ca. 45 Grad parallel aufgestellt. Zusätzlich befindet sich eine weitere Kunststoffhalterung mit einer Ebene eingesetzter Glasplatten im Sumpf und damit in der Regel unterhalb des Flüssigkeitsspiegels. Diese Halterung wurde zusätzlich mit einem im Inneren des Materials eingearbeiteten Edelstahlring beschwert, um dem Auftrieb der Halterung in

der flüssigen Phase entgegenzuwirken. Zusätzlich sind die Platten seitlich vorn über Haltenasen gesichert. Die per CAD designten Halterungen wurden aus PCCF-Material im 3D-Druck-Verfahren spezifisch angefertigt. Nachfolgende Abbildung 7 zeigt rechts beide Halterungen jeweils mit eingesetzten Glasplatten.

Die Abluft verlässt die Glasanlage im Mittelteil über vier als GL-Schraubstutzen ausgeführte, umlaufend angeordnete seitliche Öffnungen in eine Schlauch-Ringleitung, vgl. Abbildung 5. Von dort aus wird die Luft durch eine als Tropfenabscheider fungierende Waschflasche geleitet, die an Aluprofilen fixiert ist, und anschließend durch ein weiteres Rotameter in die Bioaerosolkammer abgeführt (Abbildung 5, rechts). Der Abgleich der Skalenwerte der beiden Rotameter am „Eintritt“ und „Austritt“ der Anlage ermöglicht die Identifikation von eventuellen Gasundichtigkeiten. Die Temperaturregelung ermöglicht die gezielte Temperierung der Umlaufflüssigkeit im für Verdunstungskühlanlagen kritischen Bereich zwischen 20 und 40 Grad Celsius. Zum Biofilmwachstum unter dem Einfluss eines Flüssigkeitsumlaufs und eines Zuluftstroms dienen mehrere Platten aus Glas oder anderen Werkstoffen, die über entsprechende Haltevorrichtungen in der Anlage positioniert werden können.

Das in einer Schlauchleitung umlaufende Fluid wird per Schlauchpumpe aus dem Sumpf zur Zweistoffdüse gefördert. Zu deren Schutz vor Verstopfungen durch grobe Bestandteile des Biofilms wird das Fluid über ein Filter geführt. Der Filter besitzt zur Sichtkontrolle ein in transparentem Kunststoff ausgeführtes Gehäuse. Über manuelle Betätigung zweier Dreiwege-Hähne besteht die Möglichkeit, Fluid aus dem Umlauf und der Anlage abzuführen bzw. Medien von außen in den Flüssigkeitsumlauf einzuspeisen, z. B. zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten, die mit der Abluft ausgetragen werden. Leitfähigkeit- und pH-Wert der Flüssigphase werden per Sensoren im Sumpf erfasst. Zur weiteren Messdatenverarbeitung sind die Sensoren mit einem Mikrocontroller (Arduino Nano) verbunden. Über eine USB-Schnittstelle des Controllers erfolgt die Verbindung zu einem PC/Notebook, auf dem ein Datenaufzeichnungsprogramm gestartet werden kann.

Nach einer gezielten Aufwuchsphase ist die Entnahme von einzelnen Biofilm-Trägerplatten möglich, um die Fouling-Beläge einer mikrobiologischen Analyse zuführen zu können.

Im laufenden Betrieb sind folgende Parameter in gewissen Grenzen einstellbar:

- Volumenstrom der Zuluft,
- Volumenstrom der Umlaufflüssigkeit,
- Temperatur der eintretenden und bevorrateten Flüssigkeit



Abbildung 5 Abluftführung Glasanlage, Tropfenfang und Rotameter zur Kontrolle des Gasvolumenstroms



Abbildung 6 Bioaerosol-Wachstumskammer, Glasanlage

links: Blick von oben durch den Glasdeckel auf die Zweistoffdüse im Kopfelement der Anlage (obere, von rechts zugeführte Rohrleitung: Zuführung Wasser; untere, im 180-Grad-Bogen zugeführte Rohrleitung (vom hinteren Bildteil kommend): Zuführung Luft)
rechts: Einbausituation pH-Sensor (links) und Leitfähigkeitssensor (rechts) im Sumpfelement



Abbildung 7 Halterungen mit eingesetzten Glasplatten

(links: Platzierung innerhalb der Gasphase/2-Phasen-Strömung, rechts: Halterung innerhalb der Flüssigphase)

Verschiedene geeignete Düsensysteme konnten identifiziert werden, mit denen sich ein Tropfenaerosol im geforderten Größenspektrum erzeugen lässt. Nachfolgende Abbildung 8 zeigt exemplarisch zwei Größenverteilungen. Während die Tropfengrößenverteilung der Labor-Zweistoffdüse Partikel mit einer mittleren Größe von ca. 30 μm erzeugt (50 %-Durchgang der Volumen-Summenkurve), liegt diese Kenngröße für den kommerziell erhältlichen Vernebler für medizinische Aerosole bei ca. 16 μm . In

der Versuchsanlage wird die Labor-Zweistoffdüse verwendet, da diese Partikel mit einem größeren mittleren Durchmesser erzeugt, was näherungsweise den Bedingungen in Realanlagen entspricht.

Da mikrobielle Wachstumsraten stark temperaturabhängig sind, ist für die kontrollierte Versuchsdurchführung eine reproduzierbare Temperierung des Systems essentiell. Die gezielte Temperierung des Systems erfolgt durch die Vorwahl der Sumpf-Heiztemperatur. Die sich ausbildende Systemtemperatur in der Anlage ist zusätzlich durch Umgebungstemperatur, Wassermenge und geringfügig auch durch die Vorwahl der Temperatur bzw. die Heizleistung der Konditionierungseinheit beeinflusst, da so die Lufteintrittstemperatur variiert und mehr oder weniger Fluid verdunstet. Ein Diagramm (Abbildung 9) stellt den Zusammenhang zwischen gewählter Temperatur der Sumpfheizung und der Zulauftemperatur vor der Zweistoffdüse für typische Einstellparameter dar und ermöglicht eine gezielte Auswahl bzw. Voreinstellung der Heizungstemperaturen.

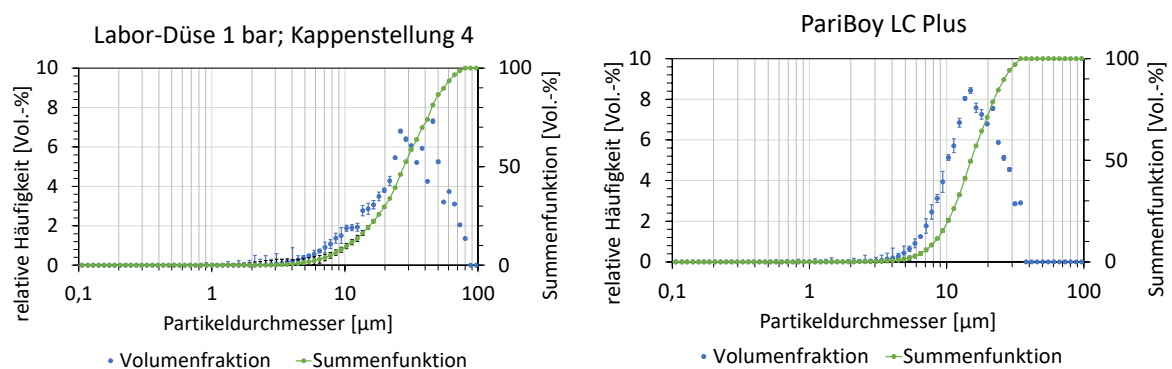


Abbildung 8 Untersuchung der volumenbezogenen Tropfenverteilung für eine Labor-Zweistoffdüse und einen medizinischen Aerosolerzeuger

Links: Labor-Zweistoffdüse Schlick Modulsystem 970, rechts: medizinischer Vernebler. Medium: Ringer Lösung; gemessen mittels PDA-System

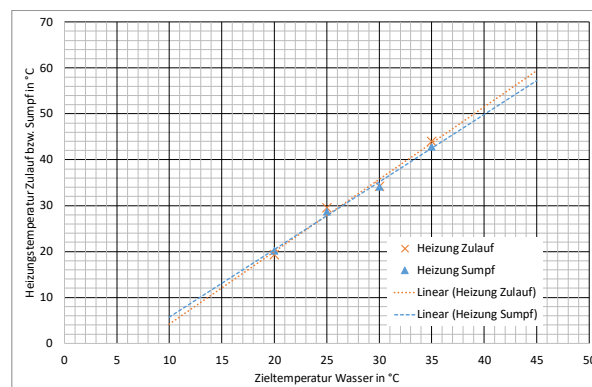


Abbildung 9 Zusammenhang Heizungstemperatur und Zieltemperatur der Laboranlage

Zulauf (Flüssigkeit vor Eintritt in die Zweistoff-Düse) bei $Q_{\text{Luft}} = 5 \text{ NL/min}$ und $Q_{\text{Wasser}} = 0,01 \text{ l/min}$

Der Teil der Biofilm-Wachstumschamber der Laboranlage konnte erfolgreich testweise im IUTA-Labor in Betrieb genommen werden, vgl. Abbildung 10. Dabei wurde insbesondere geprüft, dass das Anlagenkonzept eine Bedienung unter den Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank zulässt. Gemäß Vorversuchen ist ein Betrieb der Anlage bei einer Umlauffluid- bzw. Systemtemperatur zwischen ca. Raumtemperatur und 40 Grad Celsius möglich. Eine Anlagenbeschreibung erläutert das Funktionskonzept sowie die Bedienung der Anlage.

Dieser Anlagenteil wurde anschließend an die TU München überführt und dort für die vorgesehenen Untersuchungen in Betrieb genommen, vgl. Abschnitt 3.3.9.

Dispergiereinheit

Die im Labor durchgeführten Testreihen zur Befeuchtung des zugeführten Gasstroms zeigten beim Einsatz eines Impingers bzw. dem Aufbau eines Rieselkörpers den jeweilig nicht unerheblichen apparativen Aufwand auf, um für einen Dauerbetrieb einen Gas-Gesamtstrom von bis zu 18 m³/h zu konditionieren. Diese Lösung wurden daher unter den erforderlichen Randbedingungen des Betriebs in einer Sicherheitswerkbank nicht weiterverfolgt. In entsprechenden Versuchsreihen konnten die Prozessparameter für unterschiedliche Luftdurchsatzraten charakterisiert werden, um einen definiert stationären Anlagenbetrieb zu ermöglichen. Die Dispergiereinheit wurde daher als separate Strömungskammer aufgebaut, vgl. Abbildung 11.

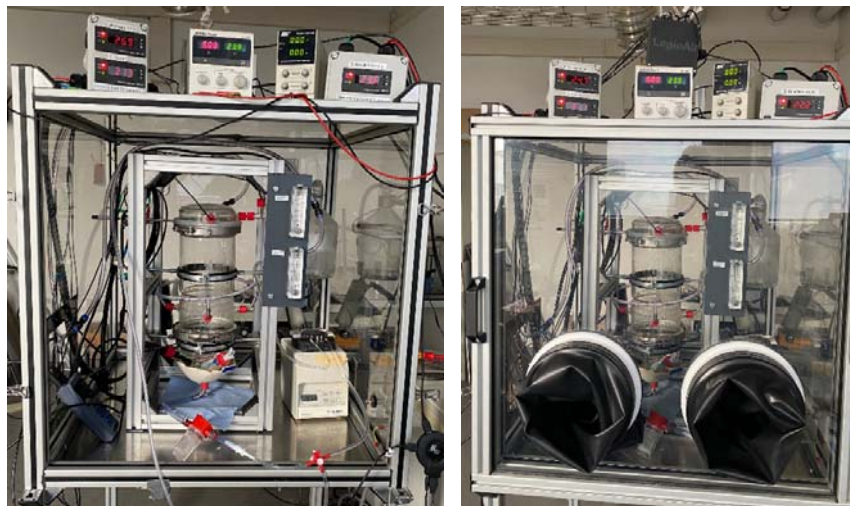


Abbildung 10 Gesamtanlage der Biowachstumschamber

Links: Gesamtanlage

Rechts: Testaufbau zur Prüfung des Bedienkonzeptes unter den Einsatzbedingungen innerhalb einer Sicherheitswerkbank

Die Untersuchungsergebnisse zur Flüssigwasser-Bilanz über die Dispergiereinheit sind in Abbildung 12 wiedergegeben. Dabei wird die Differenz aus zudosierter Wassermenge zur Tropfenerzeugung und zur Luftbefeuchtung zur abluftseitig summarisch im Sammler bzw. Ablauf erfassten Flüssigkeitsmenge bestimmt. Demnach traten Flüssigwasserverluste von $< 5\%$ auf. Dementsprechend steigt mit zunehmender Tropfenbeaufschlagung der Anlage die Menge an im Zyklonsammler Coriolis® μ aufgefangenen Tropfenmenge, ohne dass in erhöhtem Maße unerwünschte Tropfenverluste als Differenz zwischen Aufgabe- und Auffangmenge auftreten.

Die gezielte Zudosierung von Wasserdampf in den Zuluftstrom ermöglicht somit die weitgehende Sättigung der zugeführten trockenen Druckluft zur Zweistoffdüse und der Umgebungsluft. Eine Verkleinerung der Tropfendurchmesser aufgrund von Verdunstung wird weitestgehend vermieden. Ein Betrieb sowohl mit dem Sammler NGI als auch dem Sammler Coriolis® μ mit den konstruierten Adaptionseinheiten ist erfolgreich realisiert.

Auch dieser Anlagenteil wurde beim Projektpartner FE 2 aufgestellt, um dort die Probenahme von dispergierter Umlaufflüssigkeit der Bioaerosol-Wachstumschamber oder einer anderweitig wässrigen, mikroorganismenhaltigen Suspension zu untersuchen, vgl. Abschnitt 3.3.8.



Abbildung 11 Dispergiereinheit

Wesentliche Bauelemente: 1 Strömungsrohr, 2 Zweistoffdüse, 3 Dampfgenerator Cellcraft E-1000 zur Wasserdampfsättigung der Zusatzluft, 5 angesetzter Bioaerosol-sammler, 7: Abluft zum Absauggebläse, 8: Druckluftversorgung Zweistoffdüse, 9: Schlauchpumpe zur Flüssigkeitszufuhr der Zweistoffdüse, 12 Ablauf für überschüssige Flüssigkeit (hier: Coriolis® μ -Sammler)

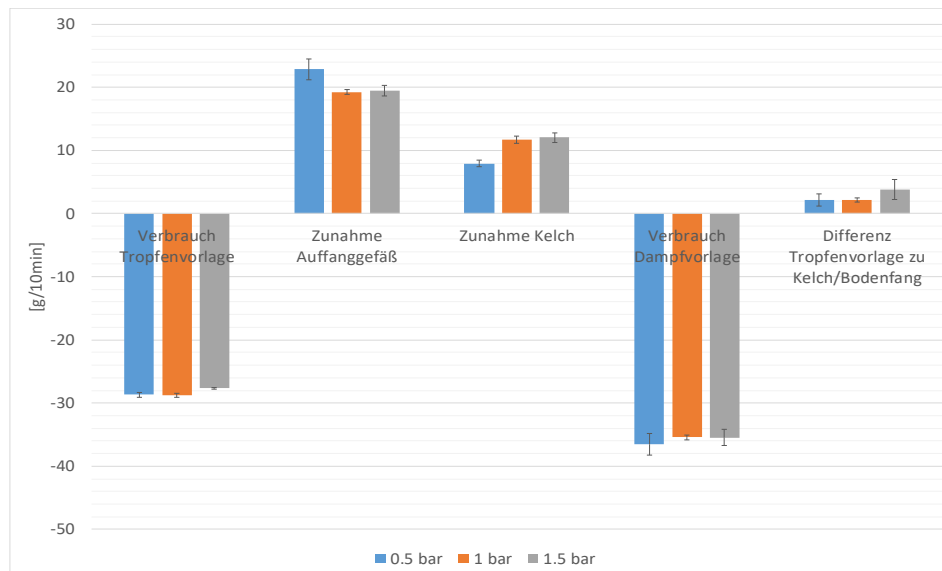


Abbildung 12 Flüssigkeitsbilanz über die Dispergiereinheit bei Variation des Vordrucks an der Zweistoffdüse (Gasdurchsatz)

Bilanzierung der gesammelten Wassermenge in Kelch des Aerosolsammlers sowie in einem Auffanggefäß, welches überschüssiges Wasser aus dem geeigneten Rohr auf-fängt. Einstellung am Dampferzeuger: Flüssigwassermenge 300 ml/h, Einstellung Ab-saugvolumenstrom Zyklon: 300 l/min, Einstellung an der Schlauchpumpe: 10 digits.

Durchgeführte Arbeiten - Technikumsanlage

Ein lt. Antragstellung vorgesehenes Gebläse wurde beschafft und in einen ebenfalls aufgebauten horizontalen Ringkanal integriert. Der Ringkanal umfasst neben dem Ge-bläse eine Befeuchtungseinrichtung zur Zuluftkonditionierung sowie eine Abreini-gungsstufe zur Abtrennung von Partikeln/Tropfen.

Die Anlage ist im ersten Schritt als horizontaler Ringkanal aufgebaut worden und in den Testbetrieb gegangen. Untersucht wurden insbesondere die Möglichkeiten zur Wasserdampfsättigung des umgewälzten Luftvolumens sowie die Eindüsung von Tropfenaerosol in die Anlage. Um die mit der Variantenprüfung einhergehenden zeitli-chen Verzögerungen weitestgehend zu kompensieren, fanden erste Untersuchungen zur Tropfenablösung an einer kleinmaßstäblicheren Anlage statt.

Erzielte Ergebnisse - Technikumsanlage

Im IUTA-Technikum steht mit dem aufgebauten Ringkanal nach ersten erfolgreichen Funktionstests grundsätzlich eine Einrichtung zur Verfügung, an der sich Tropfenablö-sungseffekte untersuchen lassen. Der Umlufttransport im Ringkanal wird durch den im Rahmen des Vorhabens beschafften frequenzgeregelten Mitteldruck-Hochleistungs-ventilator realisiert. Nachfolgende Abbildung 13 zeigt den Einbaubereich für

Tropfenabscheider. Über entsprechende Stutzen mit geeigneter dichter Verschraubung können Messgeräte wie eine Tropfensonde oder ein Aerosolsammler eingebracht werden.

Der zur Bioaerosolsammlung zur Verfügung stehende Zyklonsammler muss aufgrund der vorgelegten Sammelflüssigkeit senkrecht stehend mit horizontal ausgerichteter Ansaugöffnung betrieben werden. Unter diesen Umständen ist sowohl innerhalb der Sicherheitswerkbank als auch an der Technikumsanlage keine isoaxiale-isokinetische Probenahme möglich. Da auch größere Tropfen erfasst werden sollen, bei denen eine Abweichung von der Isoaxialität mit nicht unerheblichen Minderbefunden verbunden sein kann, wird das Probenahmesystem um eine im Ansaugdurchmesser anpassbare und in der Ansaugrichtung variable Ansaugereinheit erweitert (vgl. auch [15]).

Bei dieser Erweiterung kommt ebenfalls eine Strömungsumlenkung des erfassten Aerosols zum Einsatz. In einer solchen Umlenkung können aufgrund der auftretenden Trägheitskräfte Sammelverluste auftreten, insbesondere für größere Partikel. Daher wurde eine Auffangrinnen-Einheit in mehreren Varianten konzipiert, im 3D-Druck-Verfahren hergestellt und anhand von Vorversuchen weiter modifiziert, um eine effektive Tropfensammlung zu ermöglichen. Die konstruktive Optimierung erfolgte insbesondere hinsichtlich gasdichter Verbindungen zu angesetzten Rohrstücken der Probenahmeeinrichtung und des ungestörten Flüssigkeitsablaufs.



Abbildung 13 Technikumsanlage: Einbaumöglichkeit Tropfenabscheider und Einbaukörper (links) sowie Wassereindüsung (rechts)

Durchgeführte Arbeiten – Modifikation Aerosolsammler

Bei FE 2 (TUM) erfolgten im Anschluss Untersuchungen, um eine möglicherweise auftretende negative Beeinflussung der Aktivität von Mikroorganismen bei Kontakt zum verwendeten Kunststoffmaterial zu ermitteln. Weiterhin wurde das Material auf seine chemische Beständigkeit bei Desinfektion mit Ethanol geprüft.

Erzielte Ergebnisse – Modifikation Aerosolsammler

Für den Zyklonsammler steht eine Tropfensammler-Einheit zur Verfügung, die unmittelbar nach der Düse und vor dem Rohrbogen in den Probenahmestrang eingesetzt wird und hier zusammenlaufende Tropfenflüssigkeit erfasst. Nachfolgende Abbildung 14 zeigt den Herstellungsprozess sowie eine schematische sowie fotografische Darstellungen des angefertigten Tropfenfangs.

Im Rahmen der von der TU München vorgenommen Untersuchungen ließen sich keine signifikant negativen Wirkungen des verwendeten Kunststoffs auf die Aktivität von Mikroorganismen bei kurzzeitigem Kontakt zum Kunststoff feststellen.

Nachfolgende Abbildung 15 gibt den erwarteten Abscheidegrad des im Anschluss an den Tropfenfang durchströmten Rohrbogen wieder. Demnach werden Partikel mit einem Durchmesser ca. 15 μm zu 50 % abgeschieden. Entsprechende Partikel werden in diesem Bauelement des Probenahmesystems theoretisch abgeschieden, können an der Wandung in Richtung des Tropfenfangs ablaufen und hier gesammelt werden. In Abhängigkeit von den Druckverhältnissen im System ist auch ein Transport als Schleichströmung bis in den Zyklon möglich.

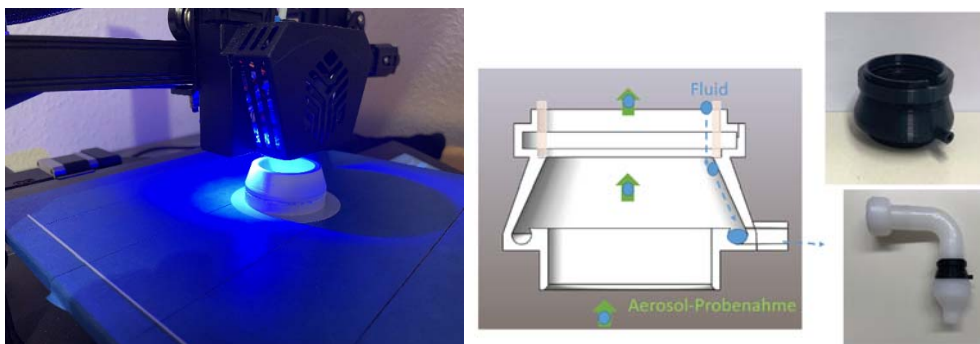


Abbildung 14 Tropfenfang für aus dem Probenahmesystem ablaufendes Fluid

Links: 3-D-Druck. Mitte: Funktionsprinzip, rechts oben: Bauteil Tropfenfang, rechts unten: Tropfenfang, eingesetzt zwischen den Bauteilen Ansaugdüse und Rohrbogen

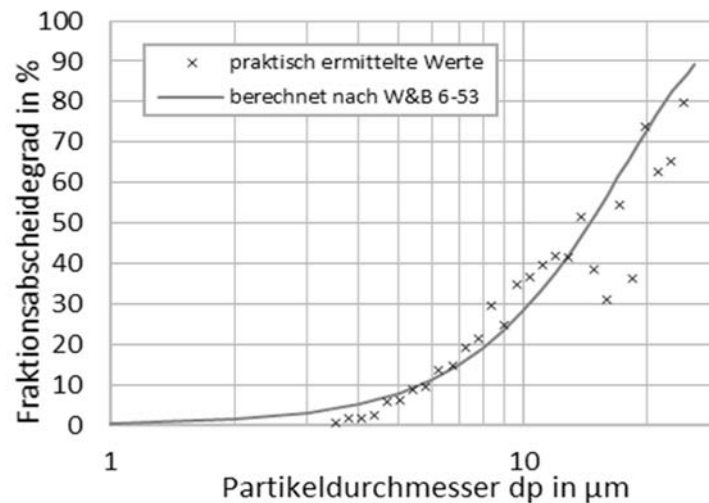


Abbildung 15 Fraktionsabscheidegrad der zur Emissionsprobenahme angefertigten Rohbogens

3.3.4 Versuchsprogramm zur Eignungsprüfung von Geschwindigkeitsmesssonden sowie eingehender Evaluation der Sammeleffizienz von Aerosol-Sammlern in stark feuchtebeladenen Gasströmungen / Arbeitspaket 4 (IUTA)

3.3.4.1 Mehrdimensionale Geschwindigkeitsmessung

Durchgeführte Arbeiten

Die in Richtung der Auslassöffnung von Verdunstungskühlanlagen ausströmende tropfenbeladene Fortluft weist, bedingt durch Einbauten bzw. Anordnung des Sauggebläses, weitere überlagernde Geschwindigkeitskomponenten auf. So tritt insbesondere bei saugend betriebenen Anlagen, bei denen der Saugzugrotor häufig in Auslassnähe im Diffusor eingesetzt ist, eine aufwärts gerichtete Rotationsströmung auf. Um den netto ausströmenden Gasvolumenstrom berechnen zu können, reicht die als Netzmessung ausgeführte lokale Ermittlung des in Richtung des Auslasses strömenden Gasvolumens aus. Gemäß einschlägiger Normen und Richtlinien lässt sich daraus der Gasvolumenstrom ermitteln.

Soll eine isokinetische, isoaxiale Aerosolprobenahme erfolgen, ist die mehrdimensionale Bestimmung von Strömungsrichtung und -geschwindigkeit über den Probenahmequerschnitt erforderlich. Die Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit in einem feuchten tropfenbeladenen Aerosolstrom stellt besondere Anforderungen an das Messgerät. So liefern Flügelradanemometer unter diesen Bedingungen keine zuverlässigen Ergebnisse – Tropfen und Kondensat schlagen sich auf den Flügeln

nieder und beeinflussen so die Messung. Gleiches gilt für Staudrucksonden mit sehr kleinen Öffnungsdurchmessern (Prandtl-Sonden). Phasendoppler-Systeme (PDA) sowie die Particle-Image-Velocimetry (PIV), die gerade für solche Strömungsformen grundsätzlich geeignet wären, können wegen der frei geführten Laserstrahlen an Verdunstungskühlanlagen nicht zur Anwendung kommen.

Bei FE 1 wurde zum Zwecke der Geschwindigkeitsmessung in derartig komplexen Strömungen eine spezielle Staudrucksonde (X-Pitot-Rohr) konstruiert und beim Messgerätehersteller Paul Gothe GmbH, Bochum, für IUTA angefertigt.

Zum Test wurde die Sonde vergleichend bei trockener Luft, bei gesättigter Luft und bei gesättigter, tropfenbeladener Luft über einen Zeitraum von ca. 70 Minuten in ein Strömungsrohr eingebracht und die Druckmesswerte kontinuierlich aufgezeichnet. In einer tropfenbeladenen Strömung wurden Messeinrichtungen zur Gasgeschwindigkeitsmessung unter Praxisbedingungen exponiert und ermittelt, inwieweit repräsentative Messsignale generiert werden. Die Untersuchungen beziehen neben Ein- und Mehr richtungs-Staudrucksonden insbesondere ein Flügelradanemometer ein.

Erzielte Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse der Funktionstests der Staudrucksonden zeigen, dass die beiden vergleichbaren Prandtl-Rohre nicht für den Einsatz in einer tropfenbeladenen, gesättigten Gasströmung geeignet sind. Aufgrund des geringen Querschnitts verstopfen die Messöffnungen durch Tropfendeposition bereits nach kurzer Zeit, was zu verfälschten Messergebnissen führt (vgl. Abbildung 3, links). Im Gegensatz dazu verfügt das speziell für Feldmessungen an Verdunstungskühlanlagen entwickelte X-Pitot-Rohr über größere Messöffnungen im Vergleich zu herkömmlichen Staudruckrohren. Dies ermöglicht die Messung konstanter Geschwindigkeiten selbst nach einer längeren Exposition in einer tropfenbeladenen, gesättigten Umgebung. Für das X-Pitot-Rohr ließ sich über den betrachteten Messzeitraum von 70 Minuten bei hoch tropfenbeladener Strömung keine signifikante Veränderung der Messwerte feststellen. Die gemessenen Druckwerte entsprechen Gasgeschwindigkeiten zwischen 12,6 und 13,2 m/s. Ebenso zeigt das Flügelradanemometer im Durchschnitt auch nach 70 Minuten noch identische Geschwindigkeiten wie zu Beginn der Messung.

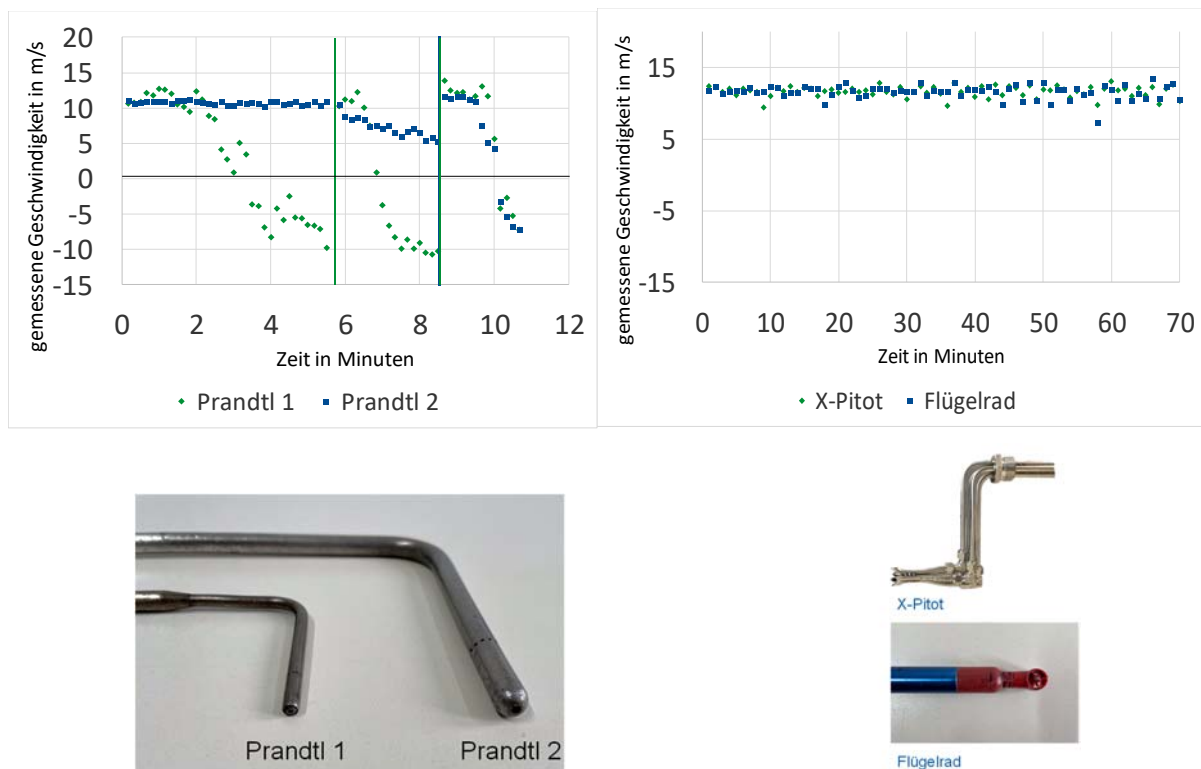


Abbildung 16 Ergebnisse Gasgeschwindigkeitsmessung

Links: Simultane Geschwindigkeitsmessung mit zwei Prandtl-Rohren, wobei die Messöffnungen unterschiedliche Größen aufweisen (Öffnungsdurchmesser: Prandtl 1 ca. 1 mm; Prandtl 2 ca. 3 mm). Rechts: Simultane Geschwindigkeitsmessung mittels Flügelradanemometer und Mehr richtungsstaudruckrohr („X-Pitot“).

Die Ergebnisse zeigen auf, dass mit der entwickelten Messsonde die Strömungsgeschwindigkeit in mehrere Raumrichtungen gleichzeitig bestimmt werden kann. Die Messsonde liefert auch bei erhöhter Tropfenfracht zuverlässige Ergebnisse.

3.3.4.2 Steigerung der Sammeleffizienz bei der Tropfenaerosol-Probenahme

Durchgeführte Arbeiten

Die isokinetische und isoaxiale Probenahme von Tropfenaerosol aus vertikalen Strömungsrichtungen stellt besondere Anforderungen an die Aerosolsammler, wenn damit das für Verdunstungskühlanlagen typische Tropfenaerosol quantitativ erfasst werden soll. Aufgrund der hohen Anteile an Tropfen mit Durchmessern im Bereich $> 10 \mu\text{m}$ kommt der Sammeleffizienz bei der Probenahme eine besondere Beachtung zu. Die Isokinetik und Isoaxialität wurde bereits bei vorangehenden Messungen durch geeignete Maßnahmen berücksichtigt, z. B. durch Anpassung von Absaugvolumenstrom oder Verwendung von Rohrbögen und angepasstem Durchmesser der Ansaugdüse.

Das Zurücklaufen von im Probenahmegerät abgeschiedenem Tropfenaerosol entgegen der Absaugrichtung wird dadurch verhindert, dass mündungsnah bzw. im Eintrittsbereich der Ansaugdüse zusätzlich eine am IUTA entwickelte Auffang- und Sammeleinheit eingesetzt wird.

In Untersuchungen wurde ermittelt, ob die Verwendung der Einrichtung auch unter Praxisbedingungen zuverlässige Ergebnisse liefert. Dabei wurde insbesondere untersucht, inwieweit die zur Emissionsprobenahme eingesetzten Zusatzeinrichtungen am Zyklonsammler Coriolis® μ zu Mehr- oder Minderbefunden führen.

Die Effektivität dieser Einheit wurde in Laborversuchen durch Sammlung eines definierten Tropfenaerosols mit einem handelsüblichen Aerosol-Zyklonsammler mit und ohne Verwendung der Auffangrinne und anschließende vergleichenden Bewertung insgesamt erfassten Flüssigkeitsmenge geprüft. Dazu erfolgte wiederholt abwechselnd eine Probenahme mit und ohne Auffangrinne bei einem Volumenstrom von 300 l/min über einen Zeitraum von fünf Minuten. Die Wasserbilanz wurde gravimetrisch geführt. Dazu wurden die Fraktionen Masse Kelch („Kelchvolumen“) sowie beim Einsatz des Tropfenfangs die ablaufende aufgefangene Wassermenge („Rinnenablauf“) und Restanhaftungen im Tropfenfang („Rinnenrückstand“) berücksichtigt. Nachfolgende Abbildung 17 zeigt den Versuchsaufbau der Untersuchungen.

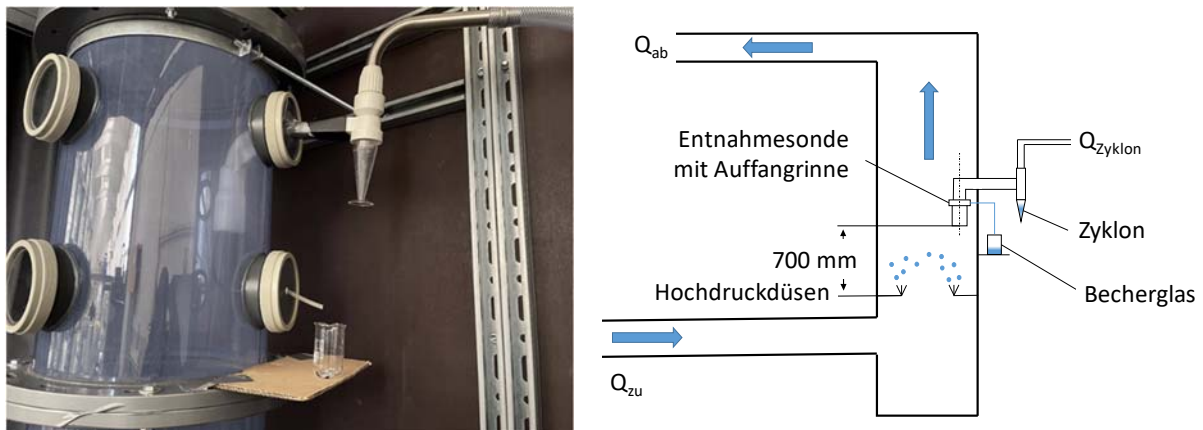


Abbildung 17 Messaufbau zur Untersuchung der im Bioaerosolsammler aufgefangenen Tropfenmenge mit und ohne Tropfenfang – Foto und schematischer Aufbau

Erzielte Ergebnisse

Bei Einsatz der Auffangrinne zeigte sich eine gesteigerte Flüssigkeitsmenge im Sammler gegenüber der alleinigen Sammlung von Probenmaterial im Zyklon, vgl.

nachfolgende Abbildung 18. Demnach werden bei 14 bzw. 15 Wiederholungsmessungen mit Tropfenfang im Mittel 11,4 g Wasser gesammelt gegenüber 8,8 g ohne Tropfenfang. Dies entspricht einem Mehrbefund von ca. 30 %. Unter diesen Bedingungen finden sich im eigentlichen Sammelkelch etwas geringere Fluidmengen als beim alleinigen Einsatz des Zyklonsammlers.

Mit diesen Ergebnissen liegen wichtige Voraussetzungen zur Durchführung der Untersuchungen im Technikum und späteren Validierungsmessungen an Realanlagen vor.

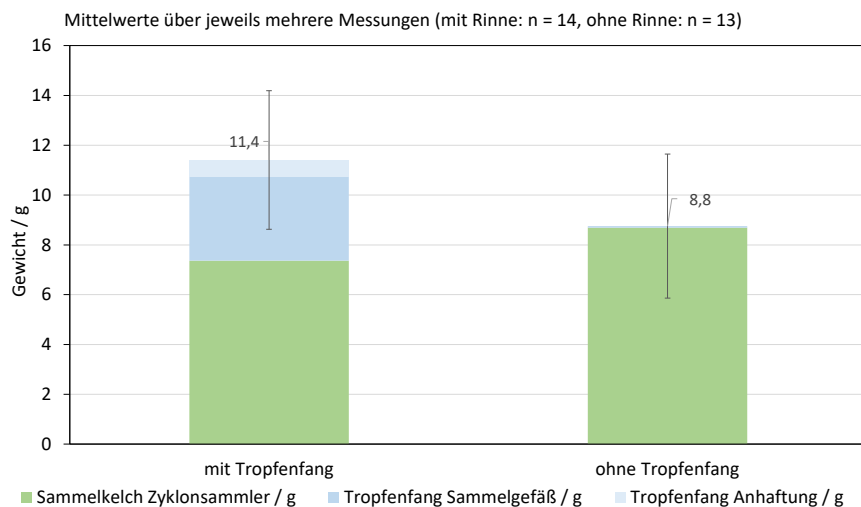


Abbildung 18 Mit Coriolis® µ-Sammler aufgefangene Tropfenmengen mit und ohne Tropfenfang

Grüner Balken: Wassermenge im Kelch des Zyklonsammlers, blauer Balken: Wassermenge im einlassnahen Zusatz-Tropfenfang

3.3.5 Versuchsprogramm zur Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens von Bioaerosolen aus unterschiedlichen Quellbereichen (Tropfenmitriss, Ablösung von Wandungen oder Bauteilen), Untersuchungen zum wallflow / Arbeitspaket 5 (IUTA)

3.3.5.1 Tropfenmessverfahren

Durchgeführte Arbeiten - Tropfenmessverfahren

Zur Vorbereitung der in diesem Arbeitspaket vorgesehenen Tropfenmessungen wurden verschiedene Tropfenmessverfahren auf ihre Eignung hin untersucht. Da das PDA-System am derzeitigen Anlagenaufstellungsort der Technikumsanlage nur mit großem Kostenaufwand eingesetzt werden kann, wurden alternativ die Anwendungsmöglichkeiten einer Impaktionssonde sowie eines Hitzdrahtmessverfahrens (DC-IV,

KLD Labs, Inc., Hauppauge, NY/USA [18]) untersucht. Dazu erfolgt die Probenahme in einer stark tropfenbeladenen Strömung wiederholt mit beiden Sonden. Im Anschluss erfolgte die Ermittlung der Anzahlgrößenverteilung der Tropfen sowie die Aggregation der Daten zu jeweils einem mittleren volumenbezogenen Tropfendurchmesser.

Die Impaktions- oder auch Tropfensonde [19] ist als Edelstahlrohr ausgeführt, in dem eine Stange längsverschiebbar geführt wird, vgl. Abbildung 19. An einem Ende der Stange befindet sich eine dicht abschließende Metallplatte und dahinter eine Aufnahme für Impaktionsplatten, am anderen Ende ragt das Stangenende mit einem Griff aus dem Hüllrohr heraus. Diese aus Glas in den Abmessungen 76 mm × 26 mm bzw. 76 mm × 13 mm gefertigte Platten (Objektträger) sind entweder mit einer dünnen Schicht Magnesiumoxid bedampft oder mit Wasser-sensitivem Papier belegt. Die eigentliche Messung funktioniert ähnlich dem Belichtungsvorgang in der Photographie: Zur Messung wird die Sonde mit eingefahrener Platte in die tropfenbeladene Strömung eingeführt, so dass die im Innern des Rohres geschützt befindliche Platte mit der sensitiven Schicht entgegen der Strömung ausgerichtet ist. Durch rasches Verschieben der Stange wird die Platte aus dem Hüllrohr heraus in die Messposition innerhalb der Aerosolströmung gebracht. Nach Ablauf der vorgesehenen Messdauer von typischerweise einigen Sekunden wird die Stange aus der Strömung in das Hüllrohrinnere zurückgezogen. Für die Expositionsdauer konnten mit der Gasströmung enthaltene Tropfen auf der Platte impaktieren und so entweder auf Magnesiumoxid-beschichteten Platten Einschlagkrater erzeugen oder auf dem sensitiven Papier abweichend vom nicht befeuchteten Hintergrund Farbsignale erzeugen. Die aus der Sonde entnommenen Platten können einer Mikroskop- und PC-gestützten Bildauswertung unterzogen werden. Das Verfahren ist in Richtlinie VDI 3679 Blatt 3 [20] sowie bei May (1950) [21] bzw. in einem Industriestandard beschrieben. Die Umrechnung von sichtbarem Einschlagkrater oder Farbsignal zu Tropfendurchmesser erfolgt für verschiedene Fluide wie Wasser und Öl nach einem standardisierten Verfahren des Anbieters. Die Durchmesser der auszuwertenden zentralen seitenparallelen Kraterlöcher ist weitgehend unabhängig von der Anströmgeschwindigkeit (vgl. [21], S. 130). Als untere Detektionsgrenze des Verfahrens wird ein Tropfendurchmesser von 10 µm angegeben. Die Anpassung der Expositionsdauer in der Gasströmung ermöglicht die Erfassung sowohl hoher als auch niedrigerer Tropfenfracht.

Die Erzeugung der mikroskopischen Aufnahmen und der Bildauswertung ist mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden. Im Vorhaben wurde daher in der Programmiersprache Python eine Methode entwickelt, nach der die Auswertung weitgehend automatisiert, KI-gestützt unter Verwendung des Objekterkennungsalgorithmus MaskRCNN vorgenommen werden kann [22]. Die Software wurde abschließend als Stand-Alone-Version erstellt, so dass keine Python-Umgebung auf dem Auswerte-PC vorhanden sein muss.

Beim DC-IV-System handelt es sich um ein nach dem Hitzdrahtprinzip arbeitenden Verfahren zur Tropfenmessung. Treffen Tropfen auf einen elektrisch beheizten Metalldraht, führen sie hier lokal zu einer Abkühlung. Während die weiterhin anliegende elektrische Spannung durch den Energieeintrag zur Verdunstung des Tropfens führt, wird kontinuierlich ein elektrisches Signal aufgezeichnet, aus dessen Verlauf auf die Größe des Tropfens geschlossen werden kann [23]. Die Signalauswertung und Ausgabe der Rohdaten erfolgt geräteintern. Eine größere Anzahl an Rohdaten, z. B. von Wiederholungsmessungen oder Parameterstudien, kann zur vereinfachten Mittelwertbildung und Visualisierung mittels eines erstellten Python-Skriptes softwaregestützt in eine gemeinsame MS-Excel-Datei überführt werden. Auch diese Software wurde abschließend als Stand-Alone-Version erstellt, so dass sie ohne spezielle Python-Programmumgebung auf dem Auswerte-PC einsetzbar ist.

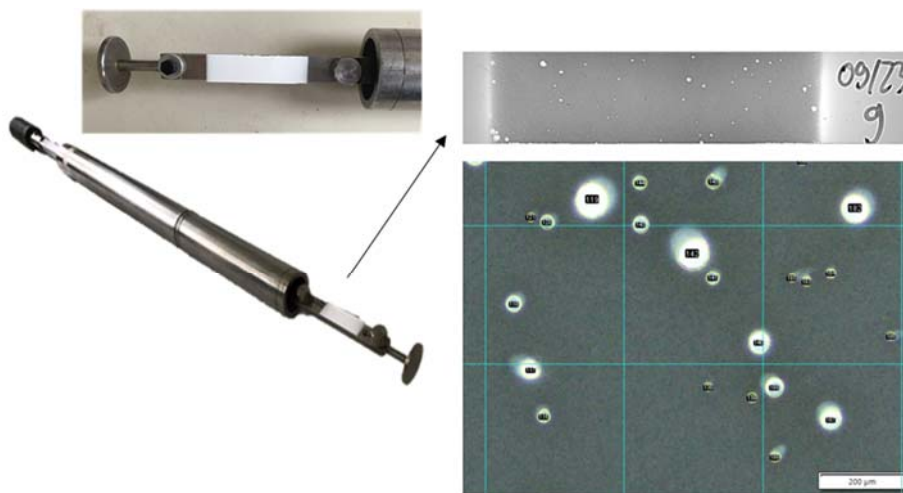


Abbildung 19 Impaktionssonde zur Erfassung der Anzahl-Größenverteilung eines Tropfenkollektivs

Links: Impaktions-Tropfensonde mit eingesetzter Impaktor-Platte. Unten: Impaktor-Platte rechts aus dem Hüllrohr in die Messposition geschoben.

Rechts: beladene Impaktor-Platte (oben) und lichtmikroskopische Aufnahme eines Plattenausschnitts mit software-gestützt gekennzeichneten Tropfenkratern (unten)

Als untere Detektionsgrenze für das Verfahren wird ein Tropfendurchmesser von 1 μm angegeben [24].

Erzielte Ergebnisse - Tropfenmessverfahren

Abbildung 5 zeigt das Tropfenspektrum der in der Dispergiereinheit verbauten Zweistoffdüse, gemessen mit dem Impaktionsverfahren und einem Hitzdrahtverfahren. Für Tropfen mit Durchmessern zwischen 10 und 40 μm liefern beide Verfahren in etwa gleichartige Beladungskennwerte. Tropfen unterhalb etwa 10 μm werden per Impaktionsplatte bei der während der Messungen vorherrschenden Anströmgeschwindigkeit von ca. 1,5 m/s erwartungsgemäß nicht repräsentativ erfasst. Als obere Grenze des Messbereichs wird für das Impaktionsverfahren gemäß Literaturangaben ein Tropfendurchmesser von ca. 200 μm angenommen. Beim Hitzdrahtverfahren werden anders als beim Impaktionsverfahren im Rahmen der Auswertung oberhalb 20 μm fast keine Tropfen detektiert.

Abbildung 6 zeigt ein auf einer Halbachse am Auslass einer saugend betriebenen Verdunstungskühlanlage aufgenommenes Tropfenspektrum. Dazu wurden die Tropfenspektren über alle Messpunkte einer Halbachse gemittelt. Die mittlere Gasgeschwindigkeit lag bei 8,4 m/s. Der Mode der Anzahlverteilung liegt bei ca. 10 μm .

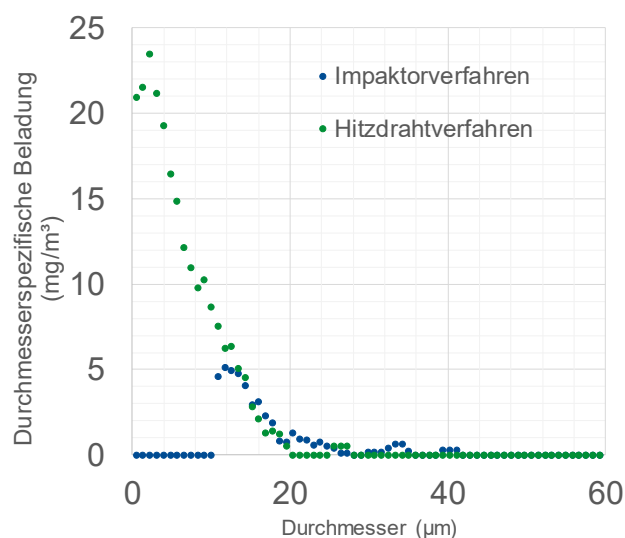


Abbildung 20 Tropfenspektrum eines Tropfenaerosols in der Dispergiereinheit gemessen mit zwei Messverfahren (Impaktionsverfahren und Hitzdrahtverfahren)
Tropfenerzeugung mittels Zweistoffdüse. Anströmgeschwindigkeit: ca. 1,5 m/s

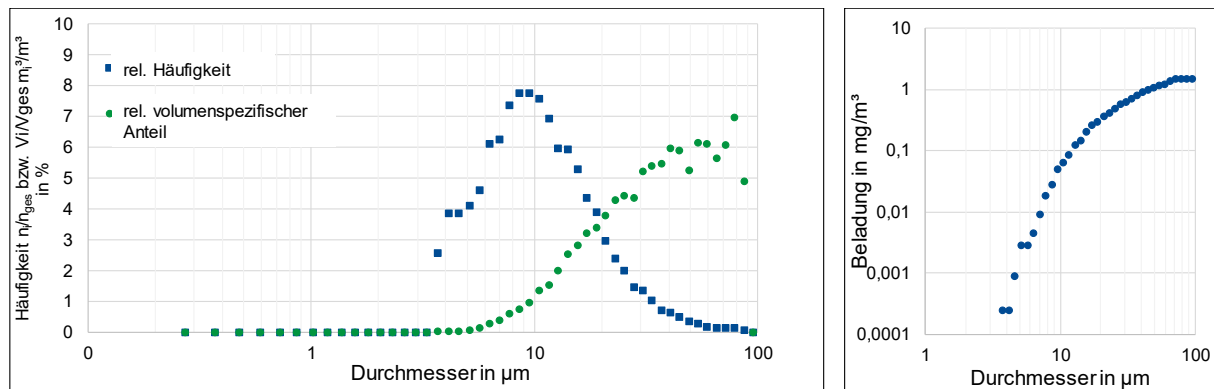


Abbildung 21 Tropfenspektrum, gemessen am Auslass einer Verdunstungskühlanlage
links: Tropfenspektrum, rechts: Tropfenbeladung in mg/m^3 ,

Ein Vergleich der Feldmess-Ergebnisse mit den Untersuchungen im Labor zeigt auf, dass im Feld sehr hohe Austrittsgeschwindigkeiten detektiert werden, bei denen Tropfenmessungen mit der Impaktionssonde gut durchführbar sind.

3.3.5.2 Sekundärtropfenfreisetzung (Ablösung von Wandungen oder Bauteilen)

Durchgeführte Arbeiten – Grenzgeschwindigkeit der Sekundärtropfenfreisetzung

In diesem Teilarbeitspaket wurde die Sekundärtropfenfreisetzung ausgehend von verschiedenen für VKA typischen Bauteilgeometrien untersucht. Dazu sind geometrische und strömungstechnische Kenngrößen zu berücksichtigen, im Wesentlichen:

- Geometrie, Oberflächenenergie,
- Eigenschaften des freigesetzten Fluiden (Viskosität, Oberflächenspannung, ...)
- Strömungsbedingungen (Gasgeschwindigkeit, Turbulenzgrad)

Unterschiedliche Bauteile wie Tropfenabscheider, Ventilatorrotoren, Verjüngungen oder Aufweitungsstücke sowie Wandungen werden im Rahmen dieser Untersuchungen exemplarisch auf folgende Objekte zurückgeführt:

- ebener Biofilm („Schwamm“),
- Bauteilkante oder
- überströmte Fläche

Die Untersuchungen sollen für die Praxis relevante, typische Strömungsverhältnisse an den Einbauten bzw. Wandungen abbilden (z. B. Gasgeschwindigkeit 2 bis > 10 m/s, typische Wandrauigkeiten bzw. Filmdicken). Messtechnisch bestimmt werden soll die Grenzgeschwindigkeit, oberhalb der eine Freisetzung von Tropfen von den jeweiligen

Oberflächen und damit Bioaerosolen aus unterschiedlichen Quellbereichen auftritt. Dazu wurden entsprechende Traceruntersuchungen durchgeführt. Entsprechend flüssigkeitshaltige Flächen werden dazu in ein Strömungsrohr eingesetzt und von einem wasserdampfgesättigten Gasstrom überströmt. Durch entsprechende Einrichtungen wird ein Flüssigkeitsfilm bzw. Tropfen auf der Oberfläche des jeweiligen Objektes erzeugt. Abströmseitig unter den jeweiligen Strömungsbedingungen im Gasstrom detektierte Tropfen können dann als ein Maß für die korrespondierende Freisetzungsrates biologisch aktiver Bestandteile angesehen werden. Die Untersuchungen können mit und ohne Primärtropfenzugabe durchgeführt werden, um den Einfluss der zusätzlichen Tropfenzugabe zu untersuchen.

Durch den gezielten Einsatz von Farbstofftracern (bspw. Fluorescein) und/oder über Leitfähigkeitsmessungen lassen sich ggf. passierenden Primärtropfen von Sekundärtropfenemissionen durch Abriss von Wandungen und Einbauten sowie Rekondensationstropfen unterscheiden. Die Detektion von Tropfen kann bspw. auch über die bereits beschriebenen Tropfenmessverfahren mittels Impaktionssonde und Hitzdrahtsonde erfolgen oder mittels Flüssigaerosol-Sammlung.

Nachfolgende Abbildung 22 zeigt ein Schema der aufgebauten Versuchsanlage. Mittels Gebläse wird eine Luftströmung innerhalb eines Strömungsrohres erzeugt. Durch den regelbaren Luftdurchsatz lässt sich die Anströmgeschwindigkeit der darin eingebrachten Testobjekte variieren.

Die zugeführte Zuluft wird mittels eines Dampferzeugers mit Wasserdampf gesättigt. Zusätzlich kann per Zweistoffdüse ein Tropfenaerosol zudosiert werden. Durch eine Schlauchverbindung und Schlauchpumpe wird an der Oberfläche der Testobjekte gezielt Wasser freigesetzt. Die Probenahme zur Erfassung evtl. freigesetzter Tropfen erfolgt unmittelbar abströmseitig der Testobjekte. Hier kann über eine Flanschverbindung entweder eine Probenahmesonde eingesetzt oder eine Teilstromentnahme zu einem Aerosolsammler erfolgen.

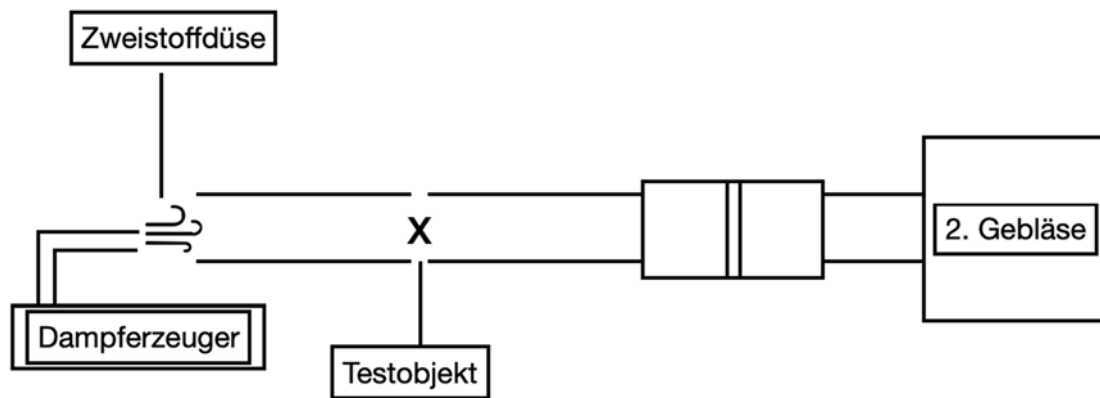


Abbildung 22 Versuchsaufbau zur Untersuchung der Tropfenablösung

links: Tropfenspektrum, rechts: Tropfenbeladung in mg/m^3 ,

Die Testobjekte mit integrierter Wasserzufuhr wurden im 3D-Druck-Verfahren hergestellt. Das die Oberfläche benetzende Wasser wird jeweils aus dem inneren der Körper freigesetzt. In nachfolgender Abbildung 23 sind die Objekte dargestellt.

Die unstetige Verjüngung sowie die Kante sind als Hohlkörper ausgeführt, in die von der Unterseite her Wasser per Schlauchpumpe und schlanker Zuleitung zugeführt wird. Das Wasser tritt durch feine Bohrungen an der Oberseite der Körper aus. In Vorversuchen wurde eine geeignete Zufuhr rate bestimmt, mit der eine Ausbildung von Tropfen an der Körperoberfläche möglich ist.

Als Material für die schwammartige, dauerfeuchte Struktur wurden verschiedene Biopolymere wie Agar-Agar oder Gelatine in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Diese Materialien führten nicht zu einer stabilen, wassertropfen-freisetzenden Struktur. Schlussendlich kam ein in der Medizintechnik (Chirurgie) zur Blutungsstillung verwendetes Gelatineschaum-Pad zum Einsatz [25]. Dieses Biopolymer besitzt mit dem 40-fachen des Eigengewichtes (Herstellerangabe) eine hohe Wasseraufnahmekapazität und eine gelartige Struktur analog zu Biofilmen. Für dieses Material wurde eine Halterung ebenfalls im 3D-Druck-Verfahren hergestellt, vgl. Abbildung 23. Die Halterung besteht aus zwei Halbschalen mit Einkerbungen, die zusammengesteckt werden. Im Inneren der unteren Halbschale befinden sich vier Stege, die zur exakten Positionierung und Stabilisierung des Flachbetts dienen, auf das der Schwamm aufgelegt wird. In der Abbildung ist rechts neben den Halbschalen das Bett für den Schwamm zu sehen. Eine Klammer, die längs über das Flachbett gesteckt werden kann, hindert den Schwamm daran, in das Gebläse zu gesaugt zu werden. Der Schwamm wird mit Wasser bis zur Sättigung getränkt und anschließend mit der Halterung in das Strömungsrohr eingesetzt. In Vorversuchen wurde untersucht, ob und

bei welchen Gasgeschwindigkeiten Tropfen aus dem Schwamm herausgelöst werden können. Messungen mit der Impaktionssonde wurden über eine Messdauer von 60 Sekunden durchgeführt.

Als Tracer wurde Fluorescein-Natriumsalz verwendet (Uranin). Dieses ist als wässrige Lösung bereits in geringer Konzentration ab 0,02 ppm intensiv gelbgrün gefärbt (entsprechend einer Verdünnung von 1 : 50.000.000). Das Absorptionsmaximum der Lösung liegt bei einer Wellenlänge von 477 nm (vgl. nachfolgende Abbildung 24). Für Konzentration unterhalb 2 mg/L liegt ein lineares Konzentrations-Intensitätsverhältnis vor [26]. Die Konzentrationsbestimmung der gemessenen Lösungen erfolgte anhand einer linearen Konzentrations-Intensitäts-Kurve, die vorab durch definierte Verdünnung einer präzise eingewogenen Uranin-Stammlösung aufgenommenen wurde (Uranin-Konzentration 0,1 – 1,4 mg/L), vgl. Abbildung 25.



Abbildung 23 Einbaukörper Biofilm-Surrogat (Schwamm“), Unstetigkeit („Verjüngung“) sowie (Rotorblatt-)Kante

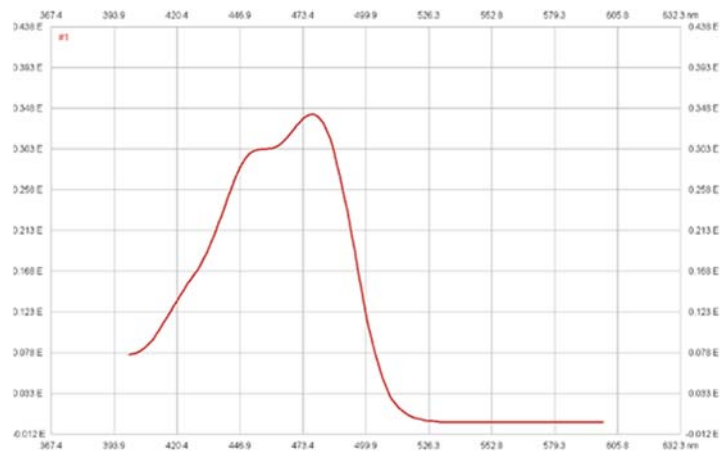


Abbildung 24 Wellenlängenabhängige Absorption vom Uranin
 Absorptions-Maximum: 477 nm. Macherey-Nagel NANOCOLOR® UV/VIS II
 Photometer

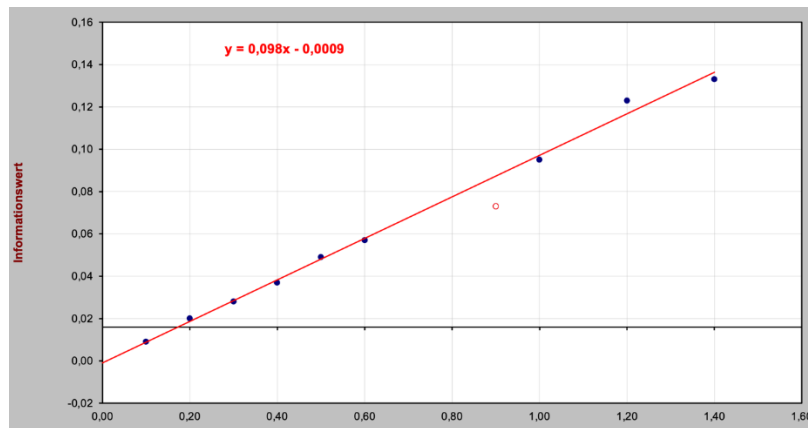


Abbildung 25 Lineare Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion für wässrige Uranin-Lösungen (Absorption bei 477 nm)
 Horizontale Achse: Konzentration in mg/L, vertikale Achse: Extinktion
 (Informationswert)

Die messtechnischen Untersuchungen der Tropfenablösung von Einbauten umfassten drei Versuchsabschnitte:

- Erfassung von Primärtropfen
- Erfassung von Sekundärtropfen ohne Primärtropfen
- Erfassung von Sekundärtropfen mit Primärtropfen

Erzielte Ergebnisse - Vorbereitungsmessungen

Die Wassermenge wurde per Schlauchpumpe dahingehend eingestellt, dass über die Dauer einer Einzelmessung eine ausreichende Wassermenge zur Tropfenbildung zudosiert wird. Nicht vom Gasstrom mitgerissene Tropfen laufen am Boden des Kanals ab.

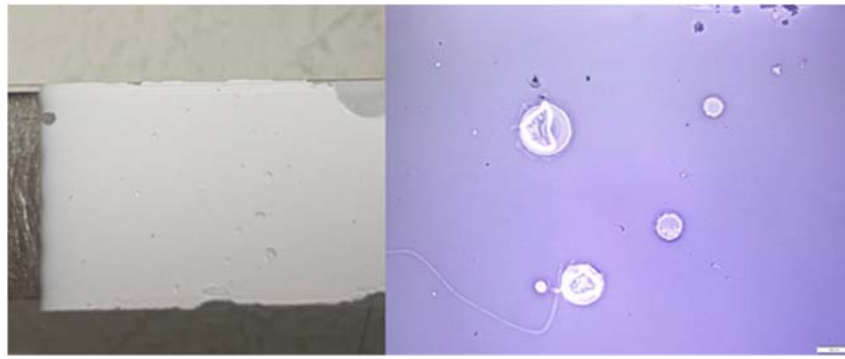


Abbildung 26 Vorversuche: Tropfenfreisetzung aus dem wassergesättigten Schwammkörper ab 18,5 m/s

Links: MgO-beschichtete Impaktorplatte mit Tropfenkratern. Rechts: mikroskopische Aufnahme bei 20-facher Vergrößerung- Länge des Maßstabsbalkens unten rechts: 500 µm

Die Vorversuche zur Tropfenfreisetzung aus dem Schwammkörper haben gezeigt, dass sich mithilfe des Impaktorverfahrens ab einer Gasstromgeschwindigkeit von 18,5 m/s ausgetretene Tropfen detektieren lassen, vgl. nachfolgende Abbildung 26.

Erzielte Ergebnisse - Primärtropfenfreisetzung

Bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 9 m/s wird mit dem DC-IV-System eine Tropfenbeladung von $9,7 \text{ mg/m}^3 \pm 1,35 \text{ mg/m}^3$ gemessen.

Erzielte Ergebnisse – Grenzgeschwindigkeit der Sekundärtropfenfreisetzung und Gesamtfracht

Für die (Ventilator-)kante zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der freigesetzten Wasserfracht von der Luftstromgeschwindigkeit. Für Anströmgeschwindigkeiten von bis zu 10 m/s konnten mit allen eingesetzten Verfahren nur geringe Mengen an emittierter Tropfenflüssigkeit detektiert werden. So wies lediglich eine der fünf untersuchten Impaktorplatten eine Tropfenbeladung auf. Im Zyklonsammler fand sich eine Flüssigkeitsbeladung von $1,7 \text{ µL/m}^3 \pm 1,4 \text{ µL/m}^3$ und zusätzlich im vorgelagerten Probenahmezug $7 \text{ µL/m}^3 \pm 3,9 \text{ µL/m}^3$. Die gegenüber der Menge im Sammelkelch große Menge im vorgelagerten Probenahmezug entspricht der Erwartung von eher großen Tropfen, die sich ablösen.

Daher wurden Untersuchungen bei 12,5 m/s, 15 m/s und 20 m/s durchgeführt. Dies berücksichtigt, dass in der Praxis aufgrund der Rotorbewegung deutlich höhere Relativgeschwindigkeiten vorherrschen können als die reine Leerrohrgeschwindigkeit der Fortluft im Diffusor.

Für die erwarteten großen Tropfen wird anstelle der MgO-bedampften Platten ein feuchtesensitives Papier eingesetzt. Die Mehrzahl der Platten waren größere farblich eingefärbte Flächenareale. Einzelne, auswertbaren kreisrunde Signale waren nicht erkennbar. Als ursächlich können die sehr großen Tropfen angesehen werden, die sich als Sekundärtropfen von den Oberflächen abgelöst haben. Diese besitzen Durchmesser oberhalb des Detektionsbereichs des Verfahrens nach May (1950 [21]), vgl. auch nachfolgende Abbildung 27. Um trotzdem eine Auswertung der Platten orientierend vornehmen zu können, wurde als Maß für die Beladung der jeweiligen Platte der durch Wasserkontakt eingefärbte Flächenanteil ($A_{\text{Eingefärbt}} / A_{\text{Gesamt}}$, angegeben in %) im Verhältnis zum Probenahme-Gasvolumen (m^3) als Maß für die Tropfenfreisetzung ermittelt. Diese Größe besitzt damit die Einheit $\%/ \text{m}^3$. Bei den Untersuchungen mit Zugabe von Primärtropfen zeigt sich eine leichte Grundeinfärbung der Beschichtung, hervorgerufen durch die zusätzlich auftreffende Fracht an sehr kleineren Tropfen.

Anströmgeschwindigkeit 12,5 m/s: Für die Tropfenfreisetzung ausgehend von der Ventilator-kante kann mit wassersensitivem Papier eine Beladung von $46 \%/ \text{m}^3$ ermittelt werden. Mit dem Zyklonabscheider werden hier im Durchschnitt $8,4 \mu\text{L}/\text{m}^3 \pm 0,6 \mu\text{L}/\text{m}^3$ im Sammelkelch und $13,3 \mu\text{g}/\text{m}^3 \pm 0,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ im Rohrbogen nachgewiesen.

Anströmgeschwindigkeit 15 m/s: Für die Tropfenfreisetzung ausgehend von der Ventilator-kante kann mit wassersensitivem Papier eine Beladung von $33 \%/ \text{m}^3$ ermittelt werden. Mit dem Zyklonabscheider werden im Mittel $8,3 \mu\text{L}/\text{m}^3 \pm 0,6 \mu\text{L}/\text{m}^3$ an Sekundärtropfen im Sammelkelch und $33,1 \mu\text{L}/\text{m}^3 \pm 6,3 \mu\text{L}/\text{m}^3$ im Rohrbogen gesammelt.

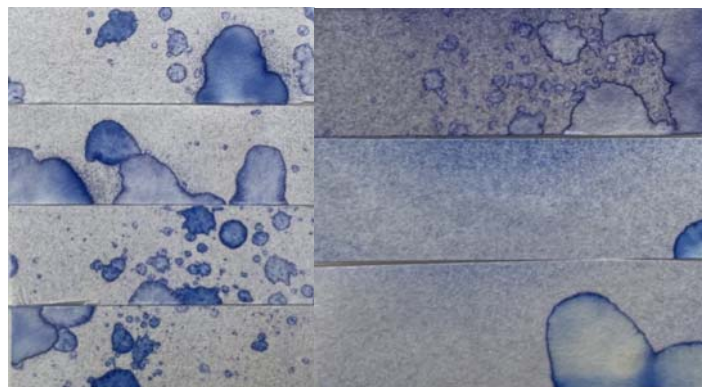


Abbildung 27 Tropfenbeladung der mit wassersensitivem Papier beschichteten Platten der Untersuchungen an der (Ventilator-)Kante

Links: Versuche ohne Primärtropfen, rechts: Versuche mit Primärtropfen

Anströmgeschwindigkeit 20 m/s: Bei dieser Anströmgeschwindigkeit werden Sekundärtropfen in hohem Umfang abgelöst. Die Impaktorplatten sind bei dem Versuch größtenteils überladen und aufgrund der Größe und des Umfangs der Tropfen nicht auswertbar. Mit dem Zyklonabscheider ist im Durchschnitt ein Tropfenvolumen von $45 \mu\text{L}/\text{m}^3 \pm 5,64 \mu\text{L}/\text{m}^3$ an gesammeltem Stammlösungsvolumen nachweisbar.

Die Mittelwerte der einzelnen Messungen sind in nachfolgender Abbildung 28 zusammengestellt aufgetragen. Demnach tritt die Tropfenfreisetzung ausgehend von der Ventilator-kante ab einer Grenzgeschwindigkeit von ca. 12,5 m/s auf. Geringere Anströmgeschwindigkeiten führen nicht zu einer Freisetzung luftgetragener Sekundärtropfen.

Die in gleicher Weise ermittelten Sekundärtropfen-Freisetzungsraten sind als Belastungswerte je Kubikmeter Messgasvolumen in den nachfolgenden Abbildung 29 und Abbildung 30 wiedergegeben.

Für die Verjüngung bzw. Unstetigkeit lässt sich ab einer Grenzgeschwindigkeit von 17,5 m/s mit den angewandten Mess- und Auswertetechniken eine Freisetzung von Tropfen feststellen. Bei niedrigeren Geschwindigkeiten kann keine Tropfenfreisetzung festgestellt werden.

Für den Biofilm lässt sich mittels Zyklonsammler erst ab 20 m/s eine Tropfenfreisetzung detektieren. Mit Impaktorplatten kann bereits oberhalb Gasgeschwindigkeiten von 12,5 m/s die Freisetzung von Tropfen festgestellt werden.

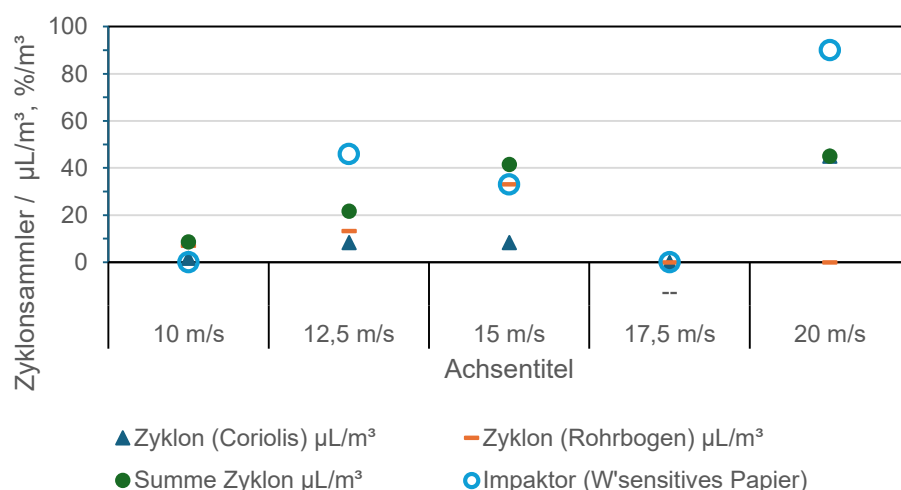


Abbildung 28 Ergebnisse – Freisetzung von Sekundärtropfen von der Kante

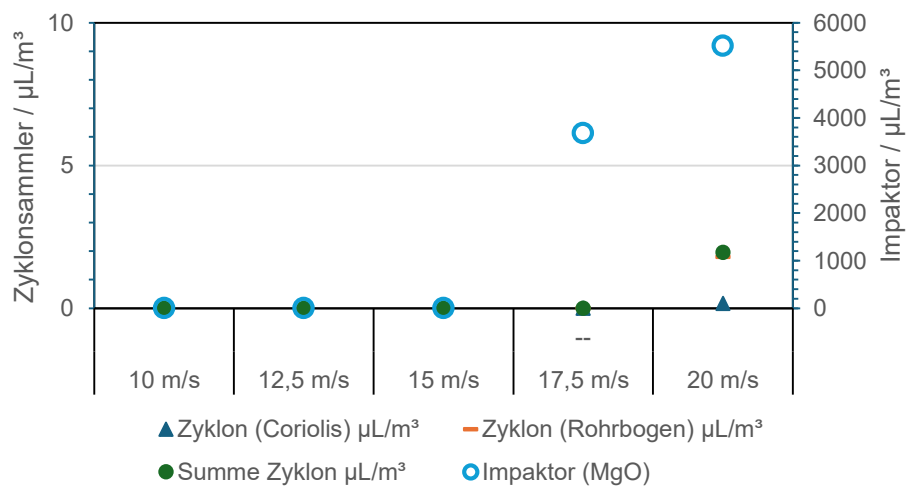


Abbildung 29 Ergebnisse – Freisetzung von Sekundärtropfen ausgehend von einer Verjüngung/Unstetigkeit

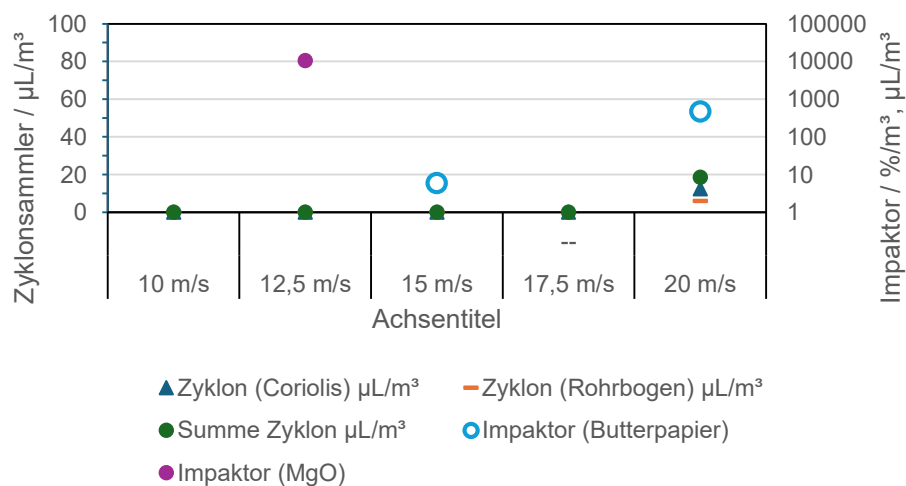


Abbildung 30 Ergebnisse – Freisetzung von Sekundärtropfen aus dem Biofilm (Schwammmaterial)

Erfolgt die Zugabe von Sekundärtropfen bei gleichzeitiger Zugabe von Primärtropfen, steigt erwartungsgemäß abströmseitig die Tropfenfracht. Detektierte Tropfen sind größer und die Beladung höher, vgl. auch Abbildung 27.

3.3.6 Konzeption der Laborrückkühlanlage hinsichtlich Bio2-Sicherheitsbedingungen / Arbeitspaket 6 (TU München)

Zur Gewährung der Sicherheit der im Labor arbeitenden Personen wurde die Bioaerosolkammer (siehe Abbildung 20) zunächst auf Dichtigkeit überprüft. Bei der Bioaerosolkammer handelt es sich um eine umgebaute Glovebox. Diese wird mit Unterdruck betrieben und an den Öffnungen für Zu- und Abluft befinden sich HEPA-Filter. Durch den Unterdruck kann die Luft nur durch den HEPA-Filter aus der Kammer gelangen.

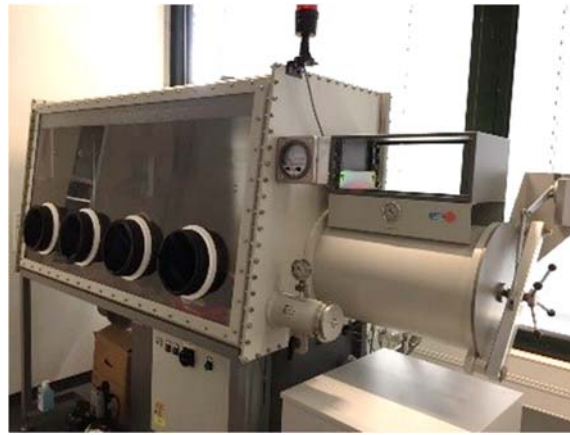


Abbildung 31 Bild der Bioaerosolkammer an der TU München

Zur Dichtigkeitsprüfung und Überprüfung der Funktionsfähigkeit des HEPA-Filters wurden in der Kammer nicht-pathogene *E. coli* Bakterien vernebelt. Durch Wischproben (mit 1x PBS-Puffer angefeuchtetes Cellulose-Tuch) und Aufstellen von Kulturplatten (Agar-NZCYM-Medium) außerhalb der Kammer wurde überprüft, ob kultivierbare Bakterien zu finden sind. Zur Vergleichbarkeit wurden Proben sowohl nach Vernebelung von *E. coli* in 1x PBS-Puffer als auch nach Vernebelung von reinem PBS-Puffer ohne Bakterien genommen, um Bakterienvorkommen aus anderen Quellen auszuschließen.

Erzielte Ergebnisse

Bei allen analysierten Proben konnte kein Wachstum von *E. coli* aus der Bioaerosolkammer festgestellt werden, womit die Dichtigkeit der Kammer bestätigt ist.

Des Weiteren ist ein Dekontaminationsprozess etabliert worden, bei dem H₂O₂ mittels PARI LC PLUS® in der Bioaerosolkammer vernebelt werden kann. Dadurch können alle verwendeten Materialien vor dem Ausschleusen und auch der Innenraum der Kammer selbst desinfiziert werden.

3.3.7 Bestimmung der biologischen Sammeleffizienz der Bioaerosolsammler mit Testbioaerosolen / Arbeitspaket 7 (TU München)

Das Ziel dieses Arbeitspaketes ist es, die biologischen und allgemeinen Sammeleffizienzen der verschiedenen Sammelsysteme zu bestimmen und zu vergleichen. Dies soll Auskunft über die Anwendbarkeit für reale Fragestellungen hinsichtlich der Sammlung von Legionellen in Aerosolen liefern.

Es wurden 3 Sammler (Coriolis® µ, AGI-30 und NGI) mit unterschiedlichen physikalischen Prinzipien hinsichtlich ihrer allgemeinen und biologischen Sammeleffizienz

untersucht. Dazu wurden Bakteriensuspensionen (mit *E. coli* und *L. pneumophila*) in der Bioaerosolkammer mittels PARI LC PLUS® vernebelt, um feuchte legionellenhaltige Tropfen zu erzeugen, und mit dem jeweiligen Aerosolsammler gesammelt. Zur Bestimmung der erzeugten Aerosolmenge wurde das Vernebelungsgefäß vor und nach dem Vernebelungsprozess gewogen. Die Gesamtzellzahl (Total cell count (TCC)) vor und nach dem Sammelvorgang wurde mittels Durchflussszytometrie (durchgeführt am Durchflussszytometer Cube 6 von Sysmex/Partec) bestimmt. Dazu wurde der Farbstoff Syto®9 zum Anfärben der Zellen verwendet. Dieser Farbstoff dringt in alle Zellen ein und bindet dort an die DNA. Für Unterscheidungen zwischen Zellen mit intakter und beschädigter Zellmembran wurde zusätzlich der Farbstoff Propidiumiodid (PI) hinzugefügt. Dieser kann nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringen, was zu einer Verschiebung der Signale Richtung rote Fluoreszenz führt. Dadurch können intakte (Intact cell count (ICC)) von geschädigten Zellen in einem Dot-Plot unterschieden werden.

Die physikalische Sammeleffizienz bezeichnet normalerweise die Sammelfähigkeit aller Partikel und wird mittels Partikelzähler bestimmt. Da wegen Dekontaminationsschwierigkeiten kein Partikelzähler eingesetzt werden konnte, wurde die Sammeleffizienz in Kombination mit Durchflussszytometrie (DFZ) bestimmt. Die Sammeleffizienz beschreibt die Wiederfindung aller vernebelter Zellen. Da dies nicht direkt der Definition der physikalischen Sammeleffizienz entspricht, wird sie in Folgendem als allgemeine Sammeleffizienz bezeichnet.

$$\text{Allgemeine Sammeleffizienz} = \frac{\text{Gesamtzellzahl}_{\text{gesammelt}}}{\text{Gesamtzellzahl}_{\text{vernebelt}}} \times 100\%$$

Die biologische Sammeleffizienz dagegen beschreibt das Überleben der Zellen während des Sammelvorgangs und wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Biologische Sammeleffizienz} = \frac{\text{Intaktzellzahl}_{\text{gesammelt}} / \text{Gesamtzellzahl}_{\text{gesammelt}}}{\text{Intaktzellzahl}_{\text{vernebelt}} / \text{Gesamtzellzahl}_{\text{vernebelt}}} \times 100\%$$

Hierbei wird das Verhältnis von Intakt- zu Gesamtzellzahl verwendet, um Verluste durch den Sammelprozess auszuschließen.

3.3.7.1 Coriolis® μ

Durchgeführte Arbeiten

Die Menge der Sammelflüssigkeit beim Coriolis® μ und AGI-30 wurde gravimetrisch durch Wiegen der Sammelgefäße vor Befüllung und nach dem Sammelvorgang bestimmt.

Der Optimierungsprozess erfolgte zunächst mit einem nicht pathogenen *E. coli* Stamm als Testbakterium. Anschließend wurden die Versuche mit *Legionella pneumophila* Serogruppe (Sg) 1 Subtyp Bellingham wiederholt. Die zu untersuchenden Parameter waren Sammelgeschwindigkeit, Menge an Sammelflüssigkeit und Art der Sammelflüssigkeit. Des Weiteren wurde der Effekt der Reinigung des Sammlers zwischen den Sammelvorgängen und der Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit näher betrachtet.

Erzielte Ergebnisse

Für eine aussagekräftige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist es wichtig zu wissen, ob eine Verschleppung von Bakterien im Coriolis® μ möglich ist. Dazu wurden zunächst Aerosole, die *E. coli* enthielten, gesammelt (300 L/min, 10 min), anschließend eine Leerprobe (Blank) ohne Bakterien. Zu den Ergebnissen vgl. Abbildung 32. Ohne Reinigung (türkis gefärbte Balken) ist zu erkennen, dass noch eine hohe Konzentration an Zellen im Coriolis® μ zurückgeblieben ist, während mit einer Reinigung zwischen den beiden Durchgängen dies nicht mehr festzustellen ist. Es empfiehlt sich also zwischen den einzelnen Sammelvorgängen alle potentiell kontaminierten Oberflächen mit Ethanol und Wasser zu spülen bzw. zu reinigen.

Ein Spülen mit Ringerlösung zwischen den einzelnen Sammelvorgängen ist erst nach zweimaliger Durchführung wirksam. In der ersten Spülflüssigkeit waren noch viele intakte und kultivierbare Zellen auffindbar, in der zweiten Spülflüssigkeit kaum noch.

Da die Ergebnisse mit Legionellen von größerer Bedeutung sind, werden im weiteren Verlauf nur noch diese hier aufgeführt. Die nachfolgenden Ergebnisse zur Untersuchung der besten Parameter zur Sammelflüssigkeit, Sammelflüssigkeitsmenge und Sammelvolumen konnten jedoch ebenfalls mit *E. coli* bestätigt werden.

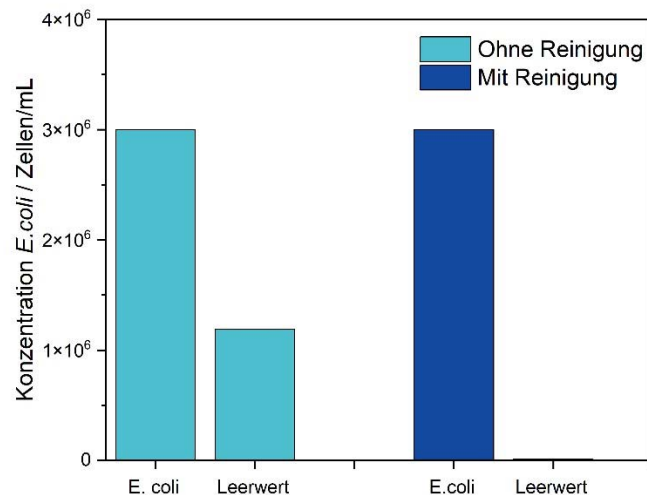


Abbildung 32 Einfluss der Reinigung mit Ethanol und VE-Wasser des Coriolis® μ zwischen einzelnen Sammelvorgängen

Als Menge der Sammel Flüssigkeit wurden Volumina von 15 mL und 10 mL getestet. Die Ergebnisse in Abbildung 6 zeigen keinen signifikanten Unterschied ($p > 0.05$) zwischen den Sammeleffizienzen der beiden Sammel Flüssigkeitsmengen. Somit sind beide Flüssigkeitsmengen geeignet. Bei 10 mL besteht jedoch der Vorteil einer niedrigeren Verdünnung der Zellen, wohingegen mit 15 mL je nach Anwendung mehr Probenvolumen zur Verfügung steht. Die Auswahl sollte also bezüglich des Anwendungszweckes getroffen werden.

Auch die Art der Sammel Flüssigkeit spielt eine Rolle hinsichtlich der Sammeleffizienzen. Getestet wurden 0,9 % NaCl, PBS-Puffer und Ringerlösung. Die höchsten Sammeleffizienzen konnten mit Ringerlösung erzielt werden (vgl. Abbildung 34). Da Ringerlösung standardisiert und steril erworben werden kann, eignet sie sich gut für gleichbleibende Bedingungen.

Der Coriolis® μ erreicht mit 300 L/min eine sehr hohe Sammeleffizienz. Des Weiteren wurden 100 L/min und 200 L/min getestet. Die Ergebnisse (siehe Abbildung 35) zeigen biologische Sammeleffizienzen bei 300 L/min von 90 ± 10 %. Dies ist eher unerwartet, da bei höheren Geschwindigkeiten auch größere Scherkräfte auftreten, was zur Schädigung der Zellen führen kann, was jedoch beim Coriolis® μ nicht der Fall zu sein scheint. Die hohe Geschwindigkeit hat zusätzlich den Vorteil, dass bei geringen Zellkonzentrationen in der Luft trotzdem eine messbare Konzentration in der aufgefangenen Flüssigkeit in kürzerer Probenahmezeit ermittelt werden kann.

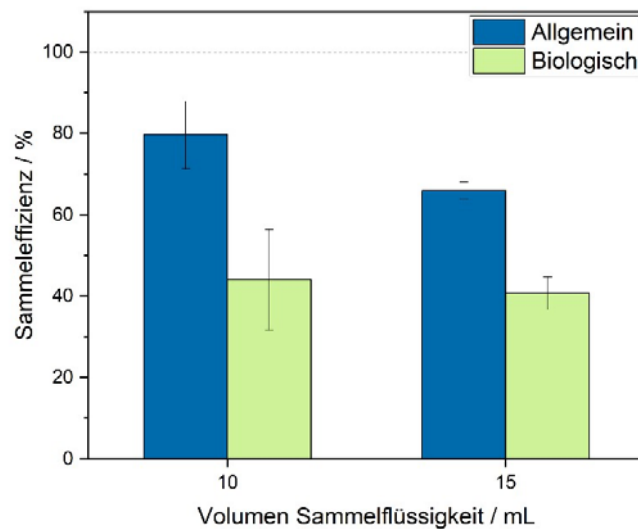


Abbildung 33 Sammeleffizienzen bei unterschiedlichen Sammelflüssigkeitsmengen (Anzahl der Wiederholungen n = 3)

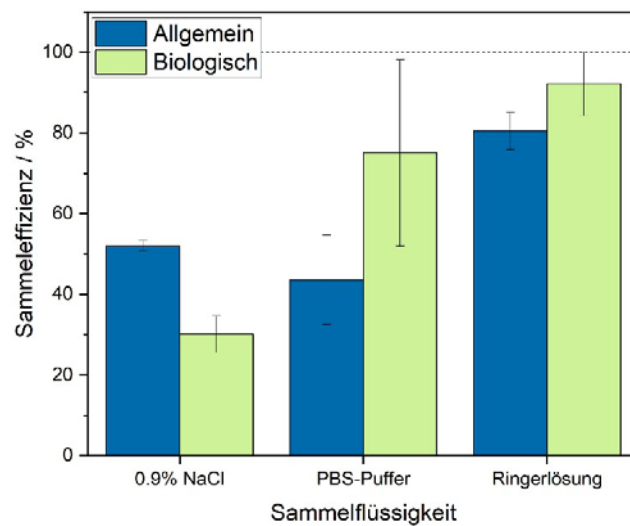


Abbildung 34 Sammeleffizienzen bei Verwendung unterschiedlicher Arten von Sammelflüssigkeiten (n = 3)

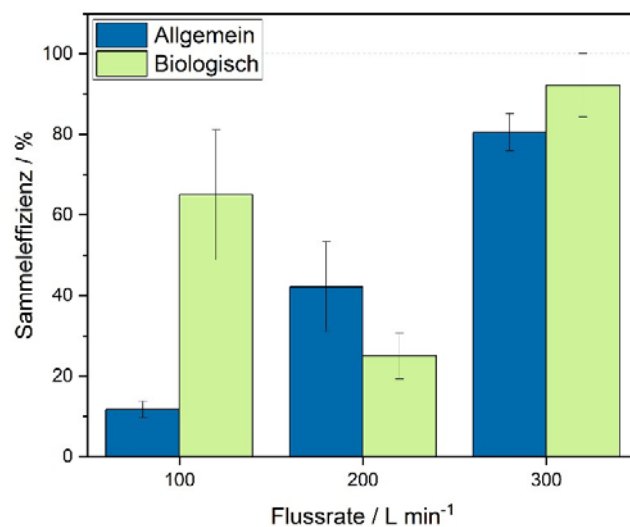


Abbildung 35 Sammeleffizienzen bei Verwendung unterschiedlicher Flussraten (n = 3)

Aufgrund der Ergebnisse wurden für weitere Messungen 10 mL Ringerlösung als Sammelflüssigkeit und 300 L/min als Sammelgeschwindigkeit verwendet.

Dass es beim Coriolis® μ zu Verdunstungseffekten der Sammelflüssigkeit kommen kann, ist schon öfter in der Literatur beschrieben worden. Dabei spielt die relative Luftfeuchtigkeit eine entscheidende Rolle. Ein niedriger Wert führt dabei zu einer höheren prozentualen Verdunstung. Versuche bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchtigkeiten verdeutlichten nochmal deren Einfluss (Abbildung 36).

Um ein konstantes und schließlich reproduzierbares Probenvolumen zu gewährleisten, ist es empfehlenswert, die Sammelflüssigkeit nach der Sammlung wieder auf den Ausgangswert aufzufüllen.

3.3.7.2 Next Generation Impactor (NGI)

Der NGI basiert auf Impaktion der gesammelten Partikel auf einer Oberfläche. Dabei durchläuft der Luftstrom den NGI mit 8 Stufen (siehe Abbildung 37), wobei die Partikel entsprechend ihrem aerodynamischen Durchmesser klassiert gesammelt werden. In folgendem wurde ein Protokoll entwickelt, um bakterielle Zellen in Aerosolen größenabhängig und kulturunabhängig zu quantifizieren.

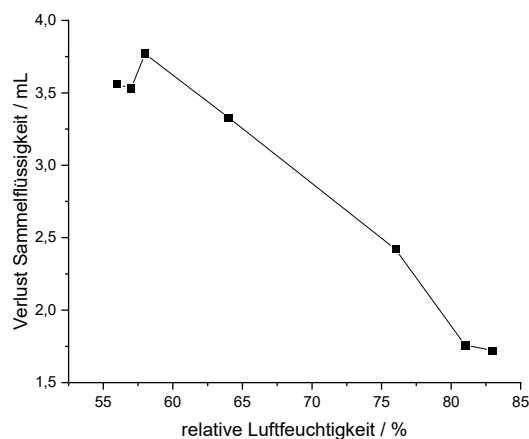


Abbildung 36 Auftragung der relativen Luftfeuchtigkeit (in %) gegen den Verlust an Sammelflüssigkeit (in mL)

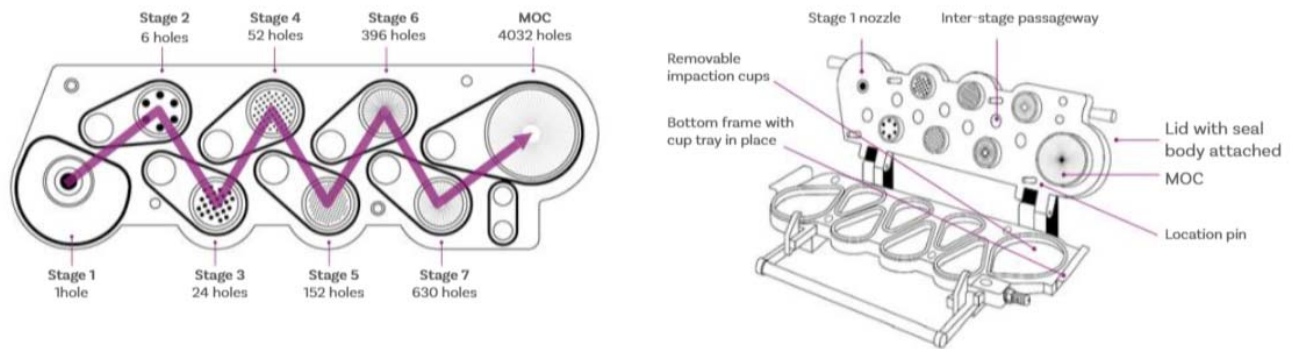


Abbildung 37 Abbildung des Aufbaus des Next-Generation-Impactor (NGI) [27]

Der Luftstrom durch den Sammler ist links eingezeichnet

Durchgeführte Arbeiten

Der NGI wurde in der Aerosolsicherheitskammer betrieben. Da zum Betrieb eine Vakuumpumpe (Becker Drehschieberpumpe VT 4.40) benötigt wird, wurde diese außerhalb der Bioaerosolkammer aufgestellt und ein ULPA-Filter zwischen NGI und Pumpe installiert, um ein Austreten der Legionellen aus der Kammer zu verhindern.

Um die Parameter für einen optimalen Betrieb zu bestimmen, wurden verschiedene Sammelgeschwindigkeiten und -zeiten näher untersucht. Da die Zellen am Ende des Sammelvorgangs auf der Oberfläche der 8 Schalen zu finden sind, ist ein Abwaschen der Zellen nötig. Dafür hat sich bewährt 5 mL sterile Ringerlösung in die Schalen zu geben und leicht zu schwenken. Mit einer Animpföse wird anschließend leicht über die Oberfläche gefahren, um noch festsitzende Zellen zu lösen. Nach einem erneuten Schwenken wird die Flüssigkeit in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Daraus wurden Proben (1 mL) für die DFZ-Messungen entnommen. Es wurden alle acht Stufen einzeln vermessen. Für die Bestimmung der Sammeleffizienzen wurden die Ergebnisse der Stufen addiert und mit der Konzentration an vernebelten Zellen verglichen. Zusätzlich wurden Blindwertmessungen mit vernebelter Ringerlösung durchgeführt, die bei der Bestimmung der Sammeleffizienzen mit einbezogen wurden.

Hierbei ist es wichtig, das Bauteil mit den Düsen nach jedem Sammelvorgang herauszunehmen und mit EtOH und VE-Wasser zu reinigen, da vor allem beim Vernebeln von Salzlösungen, wie z. B. Ringerlösung, Salzkristalle die Düsen verstopfen können und so ein geringerer Volumenstrom erreicht wird. Zusätzlich wird eine Verschleppung von Legionellen zwischen den Sammelvorgängen vermieden.

Erzielte Ergebnisse

In Abbildung 38 ist der Vergleich der allgemeinen und biologischen Sammeleffizienzen bei verschiedenen Absaugvolumenströmen dargestellt. Es wurden vier Flussraten zwischen 30 L/min und 100 L/min näher betrachtet, wobei 30 L/min und 100 L/min das Minimum bzw. Maximum beim NGI darstellen.

Bei den allgemeinen und biologischen Sammeleffizienzen ist kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) erkennbar. Bei 30 L/min ist jedoch eine hohe Abweichung bei der biologischen Sammeleffizienz erkennbar, bei 100 L/min eine niedrigere. Dies lässt darauf schließen, dass die hohe Flussrate zur Sammlung von Legionellen gut geeignet ist, nicht nur wegen der hohen Sammeleffizienzen, sondern auch wegen des höheren Sammelvolumens im Vergleich zu den niedrigeren Geschwindigkeiten.

Mit 100 L/min wurden anschließend drei unterschiedliche Sammelzeiten untersucht. Die Ergebnisse sind Abbildung 39 dargestellt.

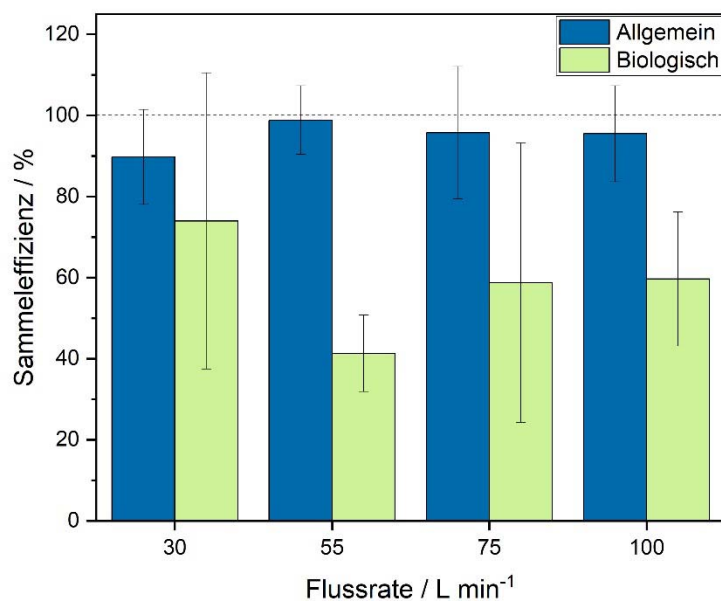


Abbildung 38 Sammeleffizienzen des NGI für verschiedene Flussraten (n = 3)

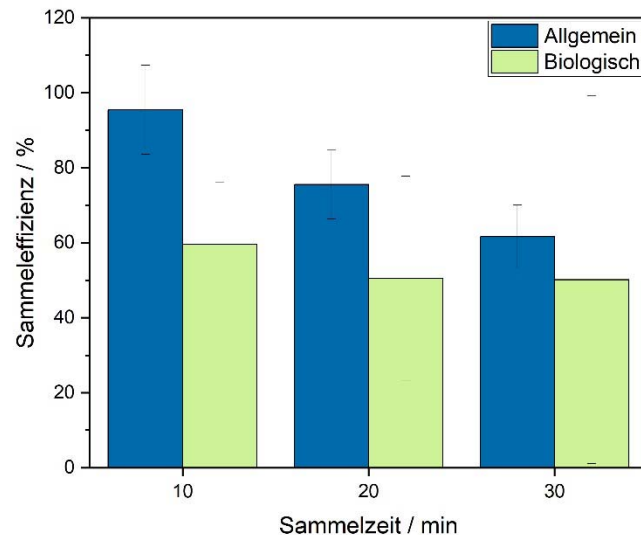


Abbildung 39 Sammeleffizienzen des NGI für verschiedene Sammelzeiten (n = 3)

Bei Betrachtung der Ergebnisse fallen sowohl bei der allgemeinen als auch bei der biologischen Sammeleffizienz Unterschiede zwischen den Sammelzeiten auf. Je länger die Sammelzeit, desto geringer die allgemeine Sammeleffizienz. Das ist dadurch zu begründen, dass Zellen auch wieder von der Oberfläche mit dem Luftstrom mitgerissen werden können, was mit der Zeit wahrscheinlicher wird. Bei der biologischen Sammeleffizienz ist eine leichte Abnahme aber vor allem ein starker Anstieg der Standardabweichung mit steigender Sammelzeit zu erkennen. Die Zellen sind während des Sammelvorgangs einer hohen Stresssituation ausgesetzt, da sie zunächst auf einer trockenen Oberfläche abgeschieden werden. Je länger diese Zeit ohne Flüssigkeit andauert, desto wahrscheinlicher sind Schäden an der Zellmembran. Die Zellen reagieren jedoch auch sehr unterschiedlich auf den Trockenstress, was die hohen Abweichungen erklärt. Anhand dieser Ergebnisse wären 10 Minuten die optimale Sammelzeit. Ist jedoch nur eine geringe Konzentration an Zellen in der Luft vorhanden, kann es auch sinnvoll sein, längere Sammelzeiten anzuwenden, um die gesammelte Konzentration zu erhöhen, auch wenn das zur Abnahme der intakten Zellen führen kann.

Wie schon erwähnt werden beim NGI Partikel entsprechend ihrem aerodynamischen Durchmesser in den einzelnen Stufen klassiert. Der Hersteller hat 7 der 8 Stufen des NGI dementsprechend charakterisiert (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 **Cut-off-diameters (Trenngrenzendurchmesser) der einzelnen Stufen des NGI für drei unterschiedliche Flussraten.**

Die Ergebnisse wurden vom Hersteller ermittelt [28]

Cut-off diameters	30	60	100	L/min
Stufe 1	11.72	8.06	6.12	µm
Stufe 2	6.40	4.46	3.42	µm
Stufe 3	3.99	2.82	2.18	µm
Stufe 4	2.30	1.66	1.31	µm
Stufe 5	1.36	0.94	0.72	µm
Stufe 6	0.83	0.55	0.40	µm
Stufe 7	0.54	0.34	0.24	µm

Es ist zu erkennen, dass der Cut-of-diameter (Trenngrenzendurchmesser) der Zellen mit steigenden Geschwindigkeiten für die einzelnen Stufen sinkt. Das heißt, bei höheren Sammelgeschwindigkeiten werden Partikel schon in früheren Stufen abgeschieden. Um zu sehen ob mit Legionellen auch eine Geschwindigkeitsabhängigkeit erkennbar ist, wurde die Verteilung der Zellen (TCC und ICC) in den Stufen näher betrachtet (siehe Abbildung 40).

Bei der Verteilung der Gesamtzellzahl ist eine leichte Geschwindigkeitsabhängigkeit zu erkennen. Während bei 30 L/min Zellen bevorzugt in Stufen 4,5 und 6 zu finden sind, steigt der prozentuale Anteil bei 100 L/min für Stufe 4 und sinkt für Stufe 6. Vor allem in den späteren Stufen 7 und 8 sind bei allen Geschwindigkeiten kaum Zellen zu finden. Betrachtet man die Partikelgrößen in Tabelle 1, stellt man fest, dass besonders Legionellen im Größenbereich 0,4 - 2,3 µm festgestellt werden. Diese Werte liegen im unteren Größenbereich dieser Bakterien, die typischerweise Größen zwischen 2 – 20 µm aufweisen.

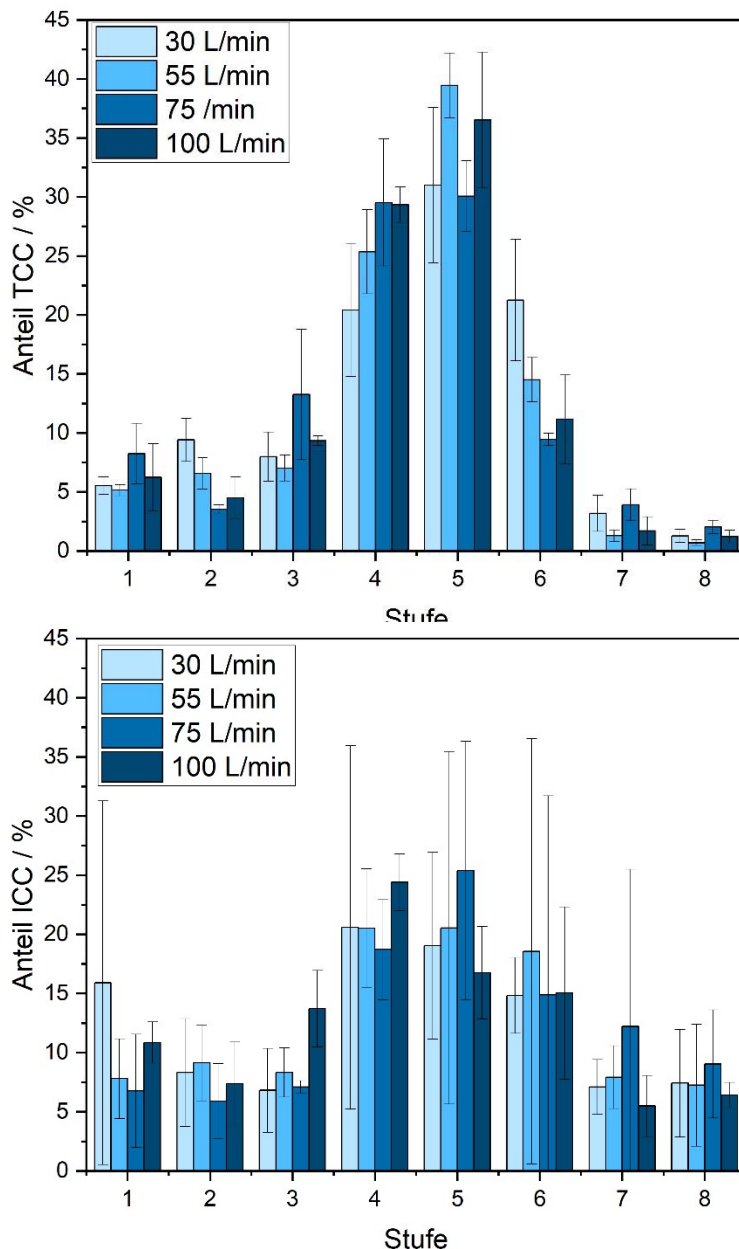


Abbildung 40 Größenverteilung der Gesamtzellzahl (TCC, oben) und Intaktzellzahl (ICC, unten) in den einzelnen Stufen des NGI für vier verschiedene Flussraten (n = 3)

Der Vergleich der Ergebnisse mit der vom Hersteller bereitgestellten Größentabelle gestaltet sich aus mehreren Gründen schwierig für Legionellen. Zum einen muss unterschieden werden, ob die Tropfengröße oder die Zellgröße für die Abscheidung betrachtet wird. Ein Tropfenspektrum des PARI LC PLUS® gibt einen mittleren Durchmesser von 6,2 µm an. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass die Flüssigkeit während des Sammelvorgangs bereits verdunstet ist, wenn die jeweilige Stufe erreicht wird. Dies liegt vor allem an der relativen Luftfeuchtigkeit während der Experimente.

Da diese bei 30 % lag, kam es zu einem starken Verdunstungseffekt der Flüssigkeit, die die Bakterien umhüllt. Deswegen ist es auch wahrscheinlicher, dass die Größenverteilung eher von der Größe der Legionellen abhängig ist. Zum anderen wurde die Charakterisierung des NGI vom Hersteller mit kugelförmigen trockenen Partikeln vorgenommen. Dahingegen sind Legionellen stäbchenförmig, weshalb es möglich ist, dass diese sich im Luftstrom anders verhalten. Auch ist nicht geklärt, ob die Größenunterscheidung aufgrund von Länge oder Breite (0,3 - 0,9 μm) erfolgt.

Aus diesem Grund sind Untersuchungen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % notwendig, um eine Verteilung der Tropfen zu untersuchen. Auch kann eine höhere Luftfeuchtigkeit Auswirkungen auf das Überleben der Zellen haben.

Dispergiereinheit

Durchgeführte Arbeiten

Die schon in einem früheren Arbeitspaket beschriebene Dispergiereinheit wurde verwendet, um Sammlungen bei 100 % Luftfeuchtigkeit zu ermöglichen. Der Luftdruck wurde hierbei auf 0,5 bar eingestellt, die Flussgeschwindigkeit der Probenzufuhr betrug 2,1 mL/min. Alle Sammelvorgänge wurden für 10 min durchgeführt.

Erzielte Ergebnisse

Der Einsatz der Dispergiereinheit zeigte deutliche Unterschiede bezüglich der Größenverteilung des NGIs (siehe Abbildung 41). Mit der Dispergiereinheit konnte eine Luftfeuchtigkeit von 100 % erreicht werden.

Hier ist deutlich erkennbar, dass Zellen vor allem in früheren Stufen (1 - 4) zu finden sind und der Anteil bei höheren Stufen deutlich abnimmt. Da nach dem Sammelvorgang noch Flüssigkeit in den Schalen erkennbar war, ist davon auszugehen, dass hier die Tropfengröße für die Verteilung entscheidend ist und nicht die Partikelgröße. Auch ist eine Geschwindigkeitsabhängigkeit zu erkennen. Bei höheren Sammelgeschwindigkeiten befindet sich ein höherer Anteil der Zellen in Stufe 1, wohingegen bei niedrigeren Geschwindigkeiten mehr Zellen in den Stufen 2 - 4 zu finden sind. Ein Vergleich mit der Größentabelle (Tabelle 1) zeigt hier, dass die meisten Zellen in Tropfengrößen

zwischen 4 - 8 μm zu finden sind. Da die erzeugte mittlere Tropfengröße der Zweistoffdüse ca. 4 μm beträgt, ist davon auszugehen, dass sich in größeren Tropfen mehr als eine Legionellen-Zelle befindet.

Betrachtet man die Sammeleffizienzen für die unterschiedlichen Flussraten (siehe Abbildung 42), fällt auf, dass die allgemeine Sammeleffizienz deutlich verringert ist.

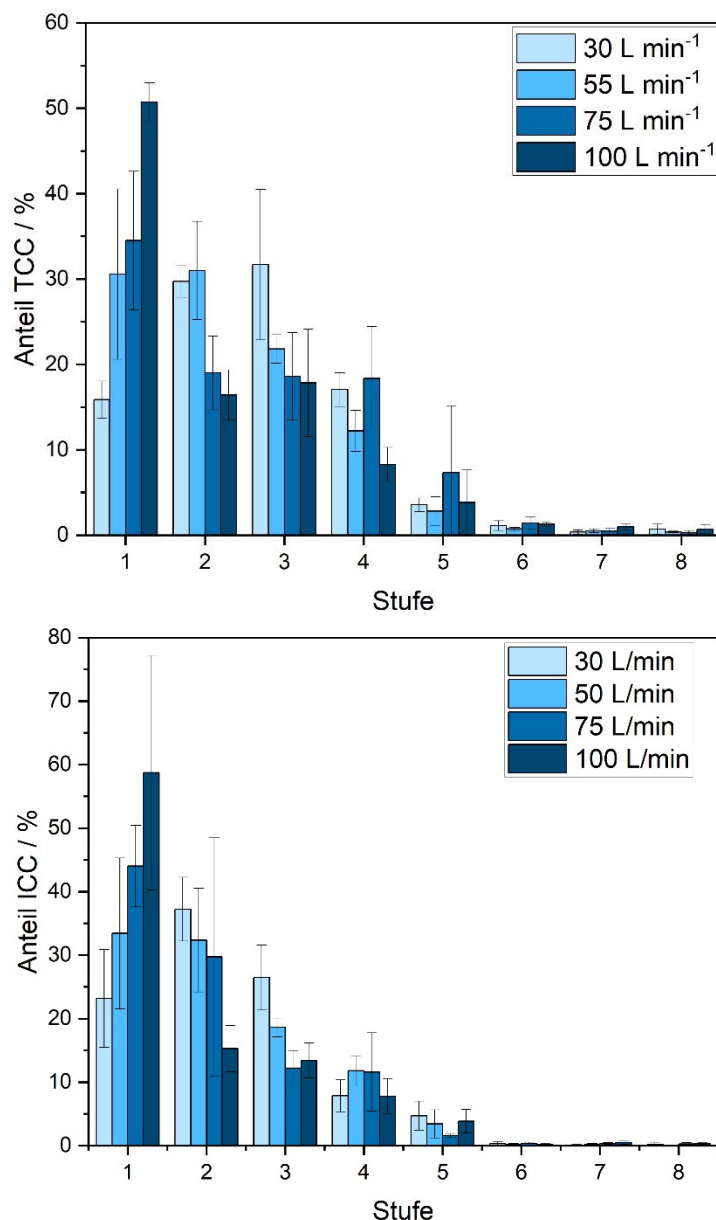


Abbildung 41 Größenverteilung der Gesamtzellzahl (TCC, oben) und Intaktzellzahl (ICC, unten) in den einzelnen Stufen des NGI für vier verschiedene Flussraten unter Verwendung der Dispergiereinheit (n = 3)

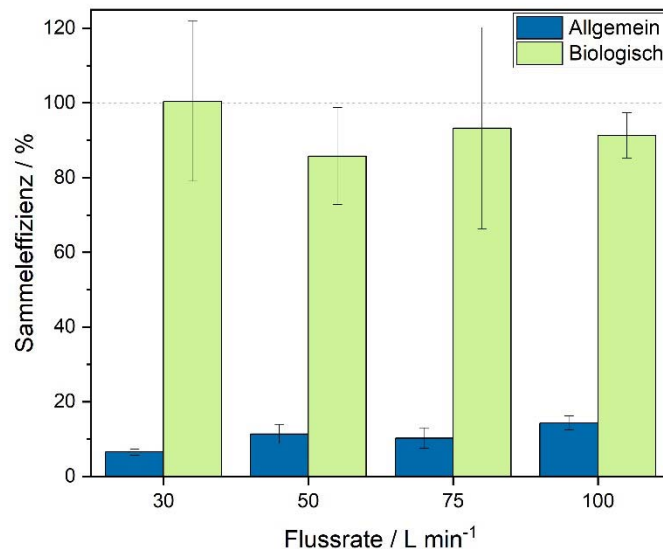


Abbildung 42 Sammeleffizienzen des NGI für verschiedene Sammelzeiten unter Verwendung der Dispergiereinheit (n = 3)

Dies ist auf den Versuchsaufbau zurückzuführen. Mit der Dispergiereinheit muss der Luftstrom einen längeren Weg durch das Rohr zurücklegen als bei den Sammelvorgängen ohne Dispergiereinheit. Dadurch ist es möglich, dass Zellen an den Wänden anhaften und nicht zum Sammler gelangen. Dies zeigt deutlich, dass der Versuchsaufbau eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der allgemeinen Sammeleffizienz spielt. Die biologische Sammeleffizienz wird dagegen immer auf die gesammelten TCC Werte bezogen, weswegen hier der Vergleich zwischen verschiedener Versuchsaufbauten einfacher möglich ist. Hier ist ein Anstieg der biologischen Sammeleffizienz auf teilweise über 90 % für alle Flussraten erkennbar. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine höhere Luftfeuchtigkeit sich positiv auf das Überleben der Zellen auswirkt.

Diese Ergebnisse wurden auch durch den Vergleich mit dem Coriolis® μ bei Verwendung der Dispergiereinheit bestätigt (siehe Abbildung 43), bei dem auch ein Anstieg der biologischen Sammeleffizienz auf über 90 % erkennbar ist.

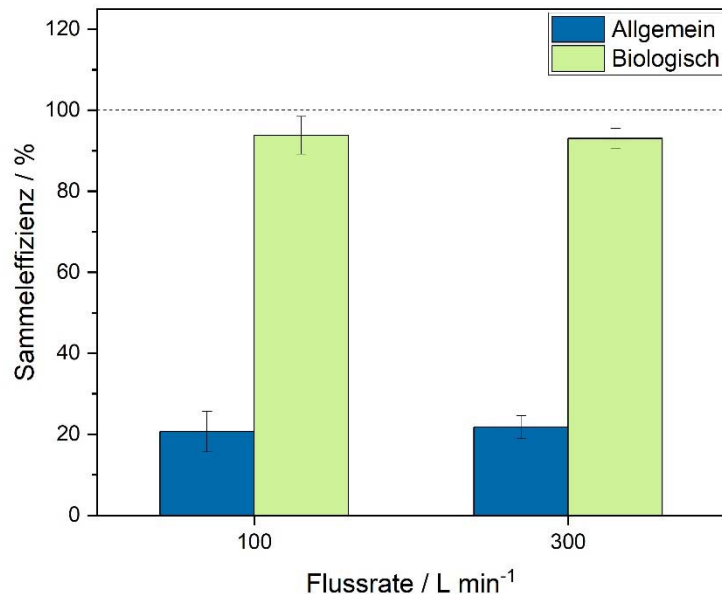


Abbildung 43 Sammeleffizienzen des Coriolis® μ für verschiedene Flussraten unter Verwendung der Dispergiereinheit (n = 3)

3.3.7.3 All-Glass-Impinger (AGI-30)

Der dritte getestete Aerosolsammler war der Impinger AGI-30. Dieser gilt als Goldstandard für die Verwendung mit Bioaerosolen und ist in vielen VDI-Richtlinien erwähnt [29]. Aufgrund der Benutzung seit mehreren Jahrzehnten, gibt es zahlreiche Erfahrungsberichte und Veröffentlichungen darüber. Im Zuge dieses Projektes wurde er als standardisierter Vergleichssammler eingesetzt. Das Prinzip beruht auf Impingement, wobei der Luftstrom bis zu Schallgeschwindigkeit beschleunigt wird. Die Partikel treffen dann auf eine Flüssigkeit, in der sie abgeschieden werden.

Durchgeführte Arbeiten

Da beim AGI-30 schon viele Parameter optimiert wurden oder in Richtlinien festgeschrieben sind, wurden nur Experimente mit verschiedenen Sammelzeiten durchgeführt. So sind 30 mL als maximale Vorlage an Sammelflüssigkeit und 12,5 L/min als Sammelvolumenstrom in Abschnitt 8 der Richtlinie VDI 4252 Blatt 3 empfohlen. Die Sammelgefäße wurden vor (leer) und nach (voll) dem Sammelprozess gewogen, um die verbleibende Menge an Sammelflüssigkeit zu bestimmen. Identisch zu den Messungen mittels NGI wurde auch für den AGI-30 ein ULPA-Filter zwischen Vakuumpumpe und Sammler installiert. Proben für DFZ-Messungen konnten direkt aus dem Sammelgefäß entnommen werden.

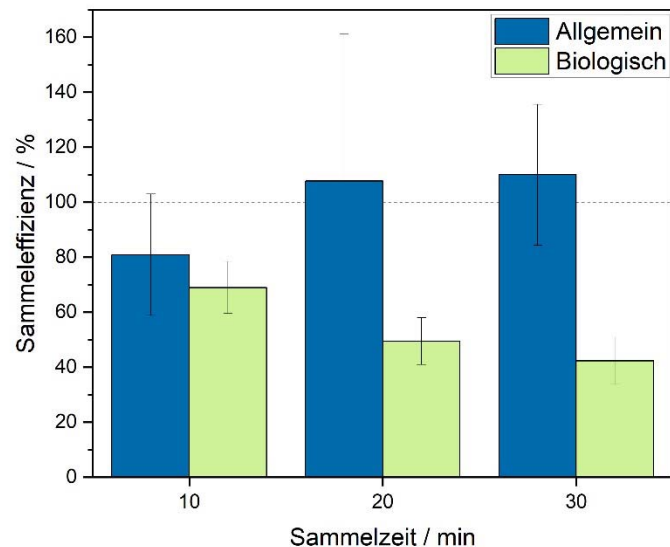


Abbildung 44: Sammeleffizienzen des AGI-30 für verschiedene Sammelzeiten (n = 3)

Erzielte Ergebnisse

Die Ergebnisse bei verschiedenen Sammelzeiten sind in Abbildung 44 dargestellt.

Bei der allgemeinen Sammeleffizienz ist mit längeren Zeiten kein signifikanter Unterschied erkennbar ($p > 0.05$), wohingegen eine Abnahme bei der biologischen Sammeleffizienz auftritt. Mit längerer Sammeldauer stehen die Zellen auch für längere Zeit unter Stress, was zu einer Abnahme der Überlebensfähigkeit führen kann. Da der AGI-30 mit 12,5 L/min das geringste Sammelvolumen im Vergleich zu den anderen beiden Sammlern aufweist, kann es für Messungen mit geringer Bakterienkonzentration sinnvoll sein, längere Sammelzeiten zu wählen. Für die Versuche im Labor mit hoher Bakterienkonzentration stellen 10 Minuten eine bessere Option dar, besonders wegen der höheren Überlebensrate.

3.3.7.4 Vergleich der Sammler

Durchgeführte Arbeiten

Nach Bestimmung der optimalen Betriebsparameter wurden Experimente zur Performance der drei Sammler durchgeführt. Dazu wurden Bioaerosole mittels Pari LC PLUS® erzeugt und die gesammelten Proben mittels DFZ und Kultivierung auf BCYE-Agar-Platten quantifiziert. Dadurch sollen Erkenntnisse über den Anteil an VBNC-

Bakterien, das heißt Bakterien, die noch eine intakte Zellmembran aufweisen, aber nicht mehr kultivierbar sind, gewonnen werden. Die Parameter für die jeweiligen Sammler waren folgende:

- Coriolis® µ: 10 mL Ringerlösung, 300 L/min, 10 min
- AGI-30: 30 mL Ringerlösung, 12,5 L/min, 10 min
- NGI: in 5 mL Ringerlösung resuspendiert, 100 L/min, 10 min

Für die Bestimmung mittels Kultivierung wurden 0,1 mL und 0,5 mL der gesammelten Probe in verschiedenen Verdünnungen sowohl vor als auch nach dem Sammelvorgang auf BCYE-Platten ausgestrichen. Diese wurden anschließend bei 37 °C für 7 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Der Anteil der VBNC-Zellen berechnet sich mit folgender Formel

$$Anteil_{VBNC} = \left(1 - \frac{Kultivierbar_{nachher} / Kultivierbar_{vorher}}{Biologische\ Sammeleffizienz} \right) \times 100 \%$$

Erzielte Ergebnisse

Der Vergleich der Sammeleffizienzen der drei Sammler ist in Abbildung 45 aufgeführt.

Es lassen sich deutliche Unterschiede in den Sammeleffizienzen erkennen. Der NGI erreicht dabei mit 95.5% ± 11.8% die höchste allgemeine Sammeleffizienz, wohingegen das Überleben der Zellen mit 59.7% ± 16.5% niedriger ausfällt. Mit dem Coriolis® µ verhält es sich genau umgekehrt. Hier ist mit 51.4% ± 6.0% eine niedrigere allgemeine dafür mit knapp 83.5% ± 15.3% eine sehr hohe biologische Sammeleffizienz zu sehen. Der AGI-30 liegt genau in der Mitte mit 80.9% ± 22.1% (allgemein) und 69.0% ± 9.5% (biologisch). Die Unterschiede lassen sich durch die verschiedenen physikalischen Prinzipien erklären. Der NGI weist einen hohen Trockenstress für die Legionellen auf, jedoch ist das Mitreißen von Zellen unwahrscheinlicher. Dagegen ist die Sammlung in einer Flüssigkeit schonender, was die höheren Überlebensraten mittels AGI-30 und Coriolis® µ verdeutlichen, dagegen tritt vor allem beim Coriolis® µ ein Wiederaustreten der Zellen aus dem Sammelmedium häufiger auf.

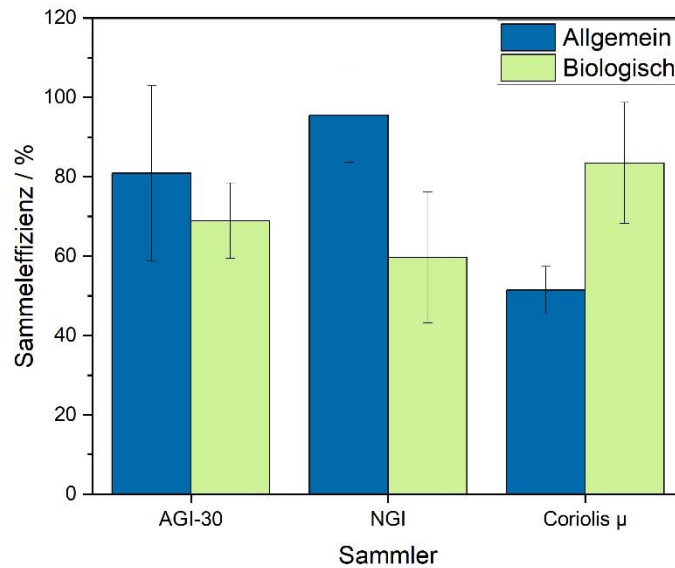


Abbildung 45: Vergleich der Sammelleffizienzen der drei getesteten Sammler (n = 4 - 6)

Der Einfluss des Stresses, dem die Bakterien ausgesetzt sind, wird auch nochmal bei Betrachtung des VBNC-Anteils nach dem Sammelvorgang deutlich (siehe Abbildung 46)

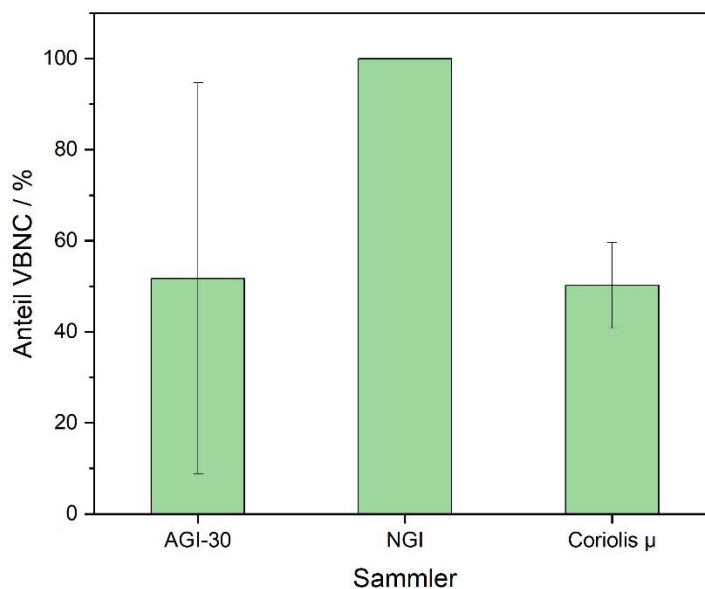


Abbildung 46 Anteil an VBNC-Zellen der drei getesteten Sammler (n = 3)

Hier ist zu erkennen, dass der NGI mit 99,9 %, den höchsten VBNC-Anteil aufweist. Wie schon zuvor erklärt, gehen die Zellen durch Stresssituationen, wie hier die Abwe-

senheit von Flüssigkeit, in den VBNC-Status über. Bei Sammlung direkt in ein wässriges Medium, ist der Anteil mit $51.7 \% \pm 43.0 \%$ (AGI-30) und $50.2 \% \pm 9.5 \%$ (Coriolis® μ) deutlich niedriger. Jedoch ist beim AGI-30 eine sehr hohe Standardabweichung erkennbar, was darauf schließen lässt, dass die Zellen sehr unterschiedlich auf Impingement reagieren.

Bei Verwendung der Dispergiereinheit ergab sich ein VBNC-Anteil von $97.7 \% \pm 1.4 \%$, das bedeutet, die Kultivierbarkeit hat sich um eine Log-Stufe erhöht. Beim Coriolis® μ sind mit $64.2 \% \pm 2.3 \%$ ähnliche Ergebnisse wie zuvor erzielt worden. Der Unterschied kann durch die verschiedenen Sammelprinzipien erklärt werden. Beim NGI ist durch eine höhere Luftfeuchtigkeit Flüssigkeit in den Schalen zu finden. Dies reduziert den Trockenstress für die Zellen, was zu weniger VBNC-Zellen führt. Der Coriolis® μ sammelt die Bakterien von vornherein in einer Flüssigkeit was den Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf den VBNC-Status verringert.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass alle drei Sammelssysteme für die Anwendung bei Legionellen in Bioaerosolen geeignet sind. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die Abscheidung der Zellen in Anwesenheit von einer Flüssigkeit zu höherem Überleben und geringerem VBNC-Anteil der Legionellen führt. Der Coriolis® μ weist hierbei mit 300 L/min das höchste Sammelvolumen auf und ist durch die integrierte Pumpe gut in Feldmessungen einsetzbar. Der AGI-30 benötigt zwar eine externe Vakuumpumpe und wegen geringerer Sammelgeschwindigkeiten sind auch längere Sammelzeiten nötig, jedoch weist er gute Sammeleffizienzen auf und ist am meisten erforscht. Mit dem NGI sind aufgrund seines Gewichtes Feldmessungen, vor allem auf Kühltürmen, eher schwieriger zu gestalten, jedoch sind durch die größenabhängige Unterteilung der Tropfen in 8 Stufen mehr Informationen über die Tropfengröße möglich. Hier spielt die Luftfeuchtigkeit eine entscheidende Rolle. Zur Untersuchung der Tropfengröße sind 100 % RH notwendig, wofür die Dispergiereinheit gut geeignet ist. Für den PARI LC PLUS® müsste die gesamte Bioaerosolkammer auf 100 % RH eingestellt werden, was eine größere Herausforderung darstellen würde. Für Realmessungen sind hohe Luftfeuchtigkeit nicht immer gegeben, weswegen der NGI besonders für Experimente im Labor gut geeignet ist. Im Vergleich zum bisher verwendeten Andersen-Impaktor, sind beim NGI die Schalen nicht mit einem Kulturmedium bedeckt, weswegen auch kultur-unabhängige Methoden, wie Durchflusszytometrie oder qPCR, angewandt werden können.

Dementsprechend sollte ein geeigneter Sammler immer anhand der Gegebenheiten und Fragestellungen ausgewählt werden. Auch wurde die Notwendigkeit von kultur-unabhängigen Methoden aufgezeigt, da alle Sammler den Anteil an VBNC-Zellen erhöhen, die mit Kultivierung so nicht mehr bestimmt werden können. Dieses Thema wird im Folgendem Kapitel näher betrachtet.

3.3.8 Evaluation der nicht-kulturellen Analyseverfahren zum differenzierten Legionellen Nachweis (lebend/tot) mittels LegioTyper / Arbeitspaket 8 (TU München)

Zur Herstellung von legionellenhaltigen Bioaerosolen zur Evaluation der verschiedenen nicht-kulturellen Analyseverfahren, wurden Suspensionen bestehend aus Ringerlösung und Legionellen Cryo Standards hergestellt. Diese wurden anschließend mit dem PARI LC PLUS® Vernebler aerosolisiert und das entstehende Bioaerosol wurde mittels des Zyklonsammlers Coriolis® μ gesammelt (300 L/min für 10 min). Die in der Ringerlösung abgeschiedenen Zellen, konnten daraufhin mit verschiedenen Methoden analysiert werden.

Ziel des Arbeitspaketes ist es, kulturunabhängige Methoden zu evaluieren, besonders im Hinblick auf einen Vergleich zur bisher verwendeten Kultivierung mit der Angabe des Messbereiches, der Wiederfindungen, der Nachweisgrenzen, der Messdauer und der erhaltenen Informationen. IMS-FCM wurde hierbei zum ersten Mal für die Anwendung zur Untersuchung von Legionellen in Aerosolen eingesetzt.

3.3.8.1 Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (CL-SMIA)

Durchgeführte Arbeiten

- Herstellung der Microarray Chips

Auf einer mit modifiziertem Jeffamine ED 2003 beschichteten Polycarbonatplatte wurden zunächst verschiedene Antikörper mittels Kontaktpottings immobilisiert. Als Immobilisierungsreagenzien wurden EDC und s-NHS verwendet. Insgesamt enthält der Chip 11 monoklonale Antikörper (mAb), die unterschiedlich hohe Affinitäten für verschiedene Subtypen von *L. pneumophila* Sg 1 aufweisen. Zusätzlich ist noch ein polyklonaler Antikörper (pAb) aufgebracht, der die Anwesenheit von Sg 1 angibt. Auch wurden immer eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Nach der Immobilisierung

erfolgte die Fertigstellung durch Aufkleben der Flusszelle und einer schwarzen Unterschale (siehe Abbildung 47). Die fertigen Chips sind im Kühlschrank mehrere Monate haltbar.

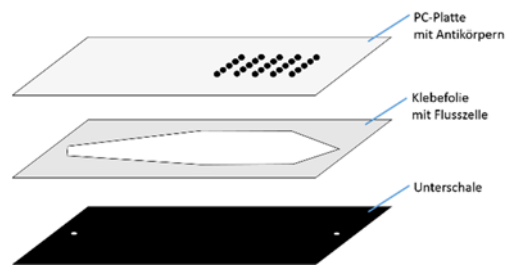


Abbildung 47: Aufbau der Microarray-Chips

- Messprinzip am Microarray-Chip-Reader Research (MCR - R)

1 ml der Probe wird direkt aus dem Sammelgefäß entnommen und in den Microarray Chip Reader (MCR) eingespritzt. Danach erfolgt die automatisierte Zugabe des biotinylierten Detektionsantikörpers und des Poly-Streptavidin-HRP. Zuletzt werden die Reagenzien Luminol und Wasserstoffperoxid zugegeben, die zur Chemilumineszenz-Reaktion führen. Die dabei entstandenen Signale werden mittels einer CCD-Kamera aufgenommen. Der Aufbau des Sandwich-Immunoassays ist in Abbildung 48 schematisch dargestellt.

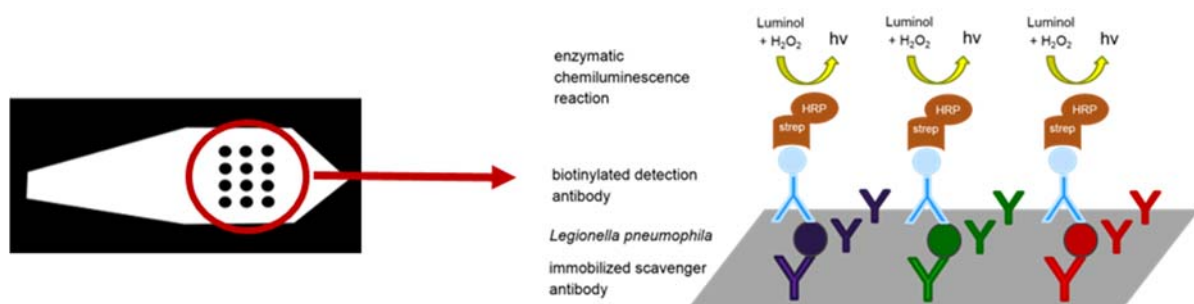


Abbildung 48 Schematische Darstellung des Aufbaus des Chemilumineszenz-Sandwich-Microarray-Immunoassays (CL-SMIA)

- Experimente zu freier LPS

Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Analyse von freien LPS-Strukturen von *L. pneumophila* Sg 1 Subtyp Bellingham vorgenommen. Dies soll Erkenntnisse liefern, ob freie LPS messbar sind und ob es durch das Vernebeln und Sammeln zu einer Freisetzung von freier LPS kommt. Dazu wurde freie LPS hergestellt indem

L. pneumophila Suspensionen für 14 Stunden bei 37 °C geschüttelt wurden. Die freie LPS wurde anschließend mittels Steril-Filtration (0,22 µm) von Bakterienzellen abgetrennt. Zum Vergleich, ob der Anteil an freier LPS durch den Vernebelungs- und Sammelprozess zunimmt, wurde die freie LPS vor und nach dem Sammeln abgetrennt und vermessen.

Erzielte Ergebnisse

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Vernebelung von Ringerlösung zu unspezifischen Bindungen auf dem Chip führt, das heißt, ob in den Blindwertmessungen erhöhte Signale zu erkennen sind. Dazu wurde steril filtrierte Ringerlösung vor und nach der Vernebelung/Sammlung am MCR vermessen, vgl. Tabelle 4

Für die Antikörper 84/2, 30/4 und pAb sind im Vergleich zu den anderen Antikörpern etwas höhere Signalintensitäten zu erkennen. Da dies auf verschiedene Matrices zutrifft, kann es auf unspezifische Bindungen zwischen immobilisiertem Antikörper und Detektionsantikörper zurückgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Vernebelung von Ringerlösung zu keiner Signalerhöhung führt und demnach weiter als Sammelflüssigkeit eingesetzt werden kann.

Zur Bestätigung der Anwendbarkeit der Methode für eine Subtypisierung von *L. pneumophila* Sg 1 in Bioaerosolen wurde der Subtyp Bellingham verwendet.

Tabelle 4 Intensitäten für Blankmessungen am MCR mit Ringerlösung (RL) vor und nach der Vernebelung/Sammlung

	Negativ-kontrolle	mAb 84/2	mAb 30/1	mAb 30/4	mAb 10/6	mAb 3	mAb 20/1	mAb 10/7	mAb 48/3	mAb 81/2	pAb	Positiv-kontrolle
RL vorher	718	6167	1368	4655	886	1730	1127	995	1167	700	5659	63662
RL nach- her	451	4602	908	3240	382	770	743	456	851	450	1962	63660

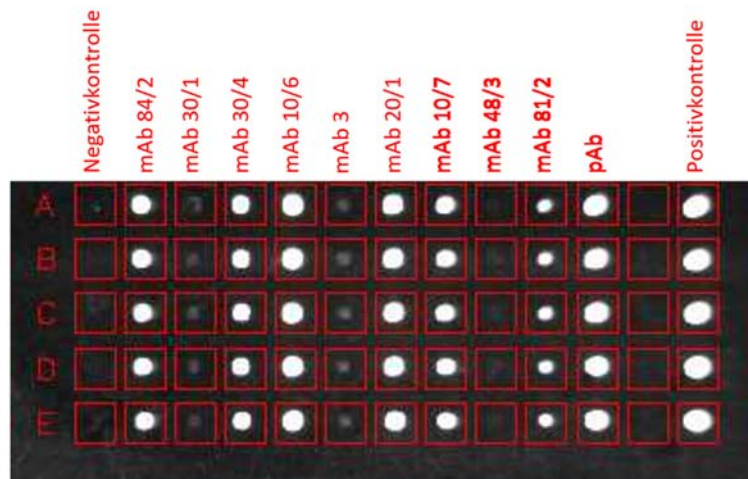


Abbildung 49: Chip-Aufnahme der CCD-Kamera für *L. pneumophila* Sg 1 Bellingham mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/mL

Abbildung 49 zeigt die Aufnahme der CCD-Kamera für die Konzentration 10^6 Zellen/mL.

Für den Subtyp Bellingham sind positive Signale für die Antikörper 10/7, 84/2, 10/6, 20/1 und 30/4 zu erwarten und auch zu erkennen, so dass dieser Subtyp bestätigt werden kann. Somit konnte gezeigt werden, dass mit dieser Analyseplattform eine Subtypisierung für *L. pneumophila* Sg 1 Bellingham auch für Bioaerosole möglich ist. Ob dies auch auf weitere Subtypen zutrifft, müsste in weiteren Messungen bestätigt werden.

Da bisher nur qualitative Aussagen getroffen werden können, erfolgte im weiteren Verlauf auch eine Kalibrierung, um eine Quantifizierung möglich zu machen. Dazu wurden Legionellen-Suspensionen zwischen 10^3 - 10^7 Zellen/mL vernebelt, gesammelt und am MCR-R vermessen. Die Ergebnisse für den Subtyp Bellingham sind in Abbildung 50 dargestellt.

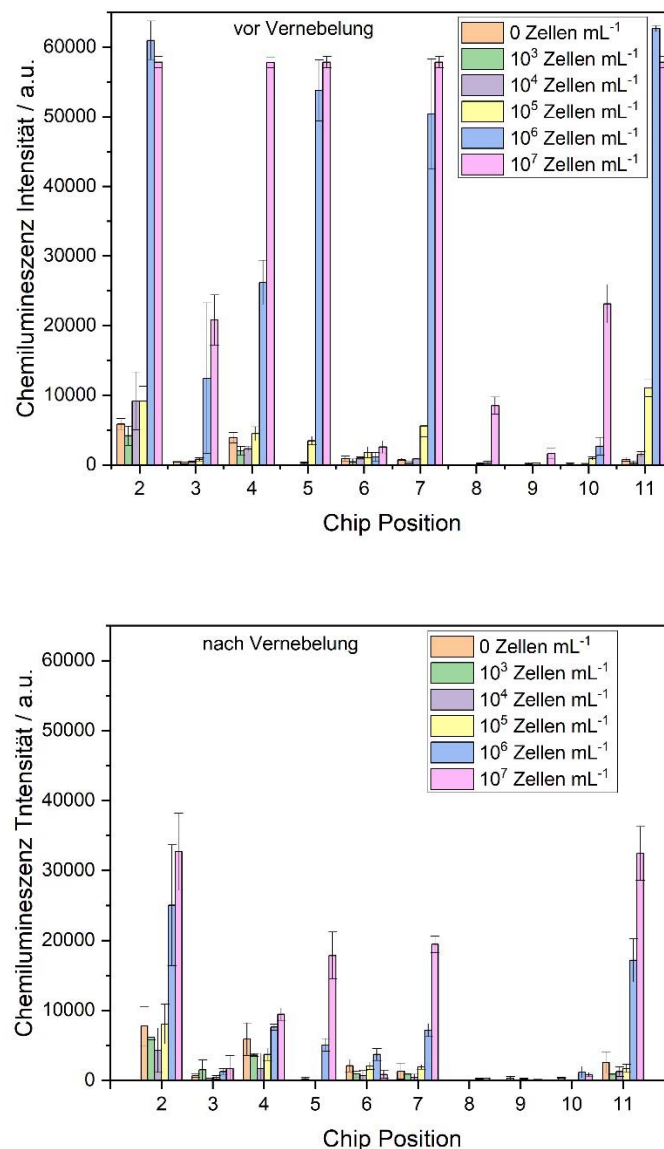


Abbildung 50: Ergebnisse der CL-SMIA Messungen verschiedener Konzentrationen an *L. pneumophila* Bellingham (n = 3)

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Subtypisierung vor der Aerosolbildung erst ab einer Konzentration von 10⁵ Zellen/mL möglich ist. Bei den Aerosolproben ergab sich zudem die Schwierigkeit, dass durch die Sammlung in 10 ml Sammelflüssigkeit eine Verdünnung der Konzentration auftrat, wodurch die Subtypisierung erst ab einer Konzentration von 10⁶ Zellen/mL erfolgen konnte. Eine Quantifizierung war über den angewandten Messbereich nicht möglich. Dies lässt darauf schließen, dass CL-SMIA für Bioaerosole prinzipiell angewandt werden kann, jedoch erst bei sehr hohen Konzentrationen und auch nur für qualitative Aussagen. Eine Möglichkeit besteht darin, eine Kombination aus Kultivierung und CL-SMIA vorzunehmen. Sollte eine Probe Kultur-

positiv sein, werden verdächtige Kolonien resuspendiert und mittels CL-SMIA vermessen, da in Kolonien höhere Zellzahlen zu finden sind.

Die Untersuchungen von freier LPS ergaben, dass diese mit dem CL-SMIA messbar sind und auch eine Subtypisierung stattfinden kann. Durch das Vernebeln und Sammeln von *L. pneumophila* konnte keine Zunahme an freier LPS erkannt werden, das heißt, die im Sammelprozess auftretenden Kräfte führen zu keiner Freisetzung von LPS.

Auch Versuche, bei denen nur freie LPS vernebelt und gesammelt wurde, ergaben keine Veränderung im Aerosol. Dies lässt darauf schließen, dass die Sammeleffizienz von freier LPS der von Bakterienzellen ähnelt.

3.3.8.2 Immunomagnetische Separation gekoppelt mit Durchflusszytometrie (IMS-FCM)

Durchgeführte Arbeiten

Für die Messungen mittels IMS-FCM wurden Antikörper gegen *L. pneumophila* Sg 1 eingesetzt. Diese sind entweder mit magnetischen Partikeln oder einem grünen Fluorochrom gekoppelt. Die Antikörper wurden zur Probe gegeben und anschließend für 1 h auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Da die Antikörper bestimmte Bedingungen für eine optimale Bindung an die Zellen benötigen, war zu Beginn eine Probenvorbereitung nötig. Dazu wurden 900 µL der gesammelten Ringerlösung mit 100 µL einer Phosphatlösung (2 mL Phosphatpuffer (80 mM Na₂HPO₂ und 20 mM KH₂PO₄), 0.2 mg BSA und 10 µL Tween-20 in VE-Wasser) versetzt, was zu einem Verdünnungsfaktor von 1.1 führt (Bei späterem Messergebnis zu berücksichtigen). Anschließend konnte mit der Zugabe der Antikörper begonnen werden. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe in die Mess-Kartusche gegeben. Zusätzlich wurde noch entsprechender Puffer benötigt. Für die Gesamt-Legionellen Konzentration (Total Legionella Count (TLC)) wurde ein Puffer bestehend aus 1x PBS und Tween-20 hinzugegeben, während für die Intakt-Legionellen Konzentration (Intact Legionella Count (ILC)) ein Puffer mit Propidiumiodid (PI) zugegeben wird. Das PI ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringt und so die Messsignale in Richtung roter Fluoreszenz verschiebt. Somit ist eine Unterscheidung zwischen beschädigten (toten) und intakten Zellen möglich. Die immunomagnetische Separation

und Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgen automatisiert am rqmicro.COUNT. Das Messprinzip ist schematisch in Abbildung 51 dargestellt.

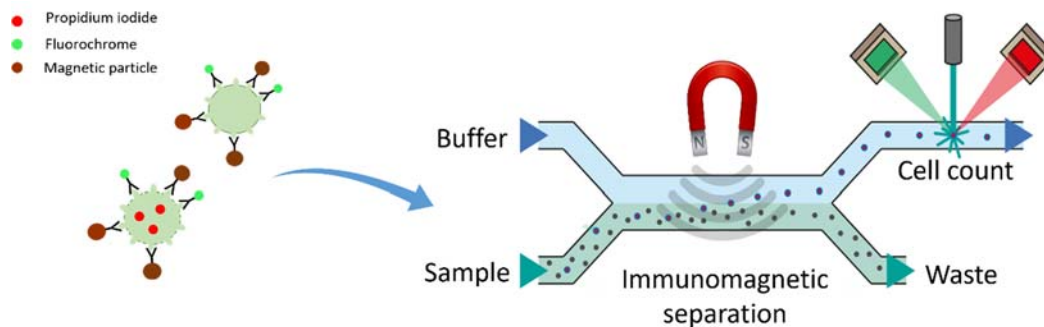


Abbildung 51: Schematische Darstellung des Messprinzips mittels IMS-FCM

Erzielte Ergebnisse

In Abbildung 52 ist exemplarisch ein Dot Plot für ILC-Messungen bei einer Konzentration von 10^5 Zellen/mL zu sehen. Dabei ist grüne gegen rote Fluoreszenz aufgetragen. Das rote Gate ist eine Voreinstellung des Herstellers, lässt sich aber an die jeweilige Messung anpassen und verschieben. Der rote Farbstoff PI führte hier zu einer Verschiebung der beschädigten Zellen nach oben in Richtung rote Fluoreszenz. Demnach blieben im Gate alle intakten Zellen zurück, wodurch die Konzentration bestimmt werden konnte.

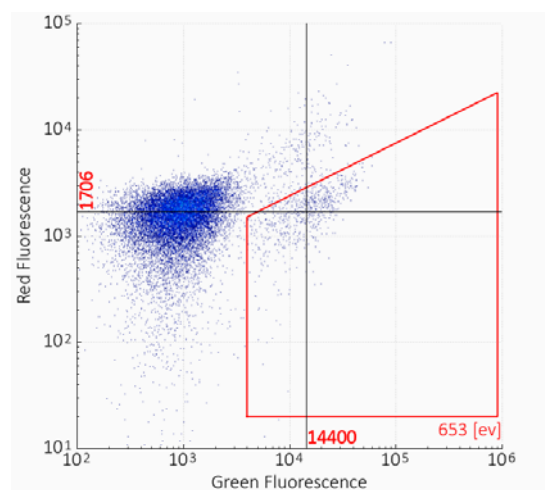


Abbildung 52: Dot-Plot einer IMS-FCM Messung für die Bestimmung von intakten Legionellen

Die Auftragung der Ergebnisse in Abbildung 53 zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter und gemessener Konzentration sowohl vor als auch nach der Aerosolbildung. Des Weiteren sind oben die Ergebnisse der TLC-Messungen und unten die der ILC-Messungen dargestellt. Somit ist ein linearer Messbereich zwischen 10^3 - 10^6 Zellen/mL gegeben.

Die Leerwertmessungen zeigen einen leichten Anstieg der Konzentration im Aerosol. Dies ist auf mögliche verbleibende Zellen im Bioaerosolsammler oder in der Luft der Bioaerosolkammer zurückzuführen. Insgesamt konnte eine alternative quantitative Methode für die Anwendung bei Legionellen in Aerosolen bestätigt werden.

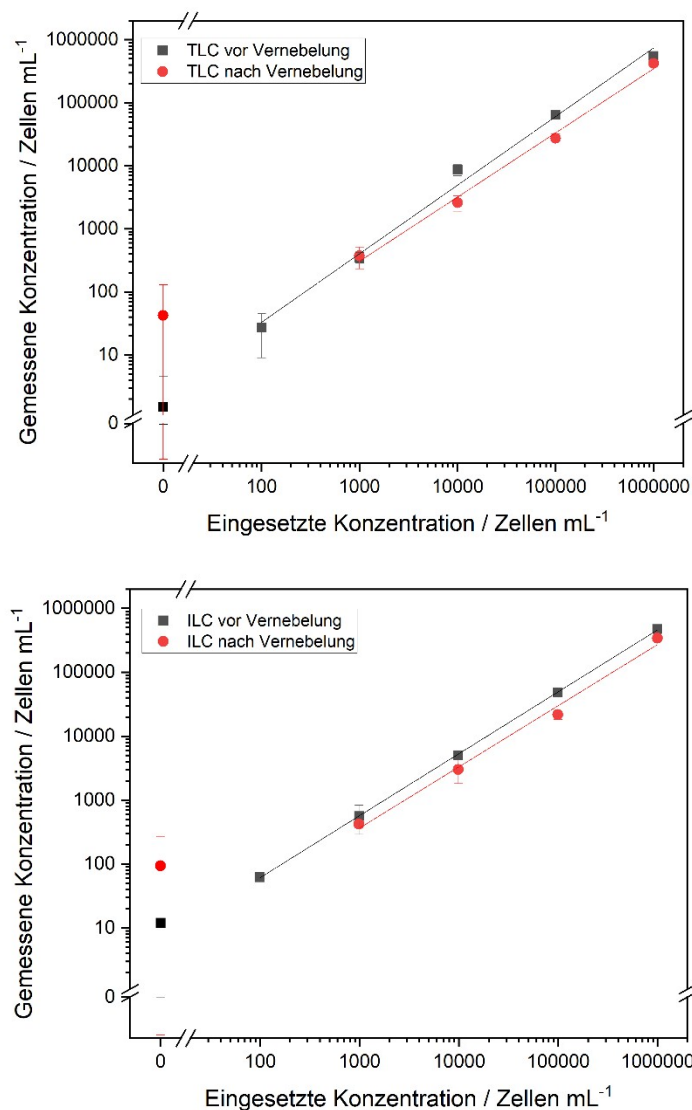


Abbildung 53: Korrelation zwischen eingesetzter und gemessener Konzentration für Proben vor und nach Aerosolbildung gemessen mittels IMS-FCM. oben: TLC; unten: ILC (n = 3)

3.3.8.3 qPCR

Durchgeführte Arbeiten

Da die im Projektantrag geplante molekularbiologische Methode haRPA (heterogene asymmetrische Rekombinase Polymerase Amplifikation) noch nicht weit genug entwickelt ist, um diese für Legionellen in Aerosolen anwenden zu können, wurde eine alternative molekularbiologische Methode herangezogen. Dabei handelt es sich um die quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR). Dafür wurde ein kommerziell erhältliches qPCR-Kit der Firma Bioteccon verwendet. Mit diesem Kit ist es möglich, *Legionella species*, *Legionella pneumophila* und *Legionella pneumophila* Sg 1 simultan zu bestimmen.

Erzielte Ergebnisse

Bei allen drei bestimmten Spezies ist eine lineare Korrelation zwischen eingesetzter Konzentration und Ct-Wert erkennbar (siehe Abbildung 54). Hohe Ct-Werte entsprechen hierbei niedrigen Konzentrationen. Dies trifft sowohl vor als auch nach der Aerosolbildung zu. Hohe Ct-Werte entsprechen hierbei niedrigen Konzentrationen. Durch die Verwendung eines Farbstoffes, der kovalent an DNA beschädigter Zellen bindet und so die Amplifizierung verhindert, konnten zusätzlich auch die intakten Zellen bestimmt werden. Auch hier ist ein linearer Zusammenhang im untersuchten Messbereich sichtbar. Durchgeführte Blindwertmessungen mit Ringerlösung ergaben keinen Ct-Wert, das heißt keine Legionellen konnten nachgewiesen werden.

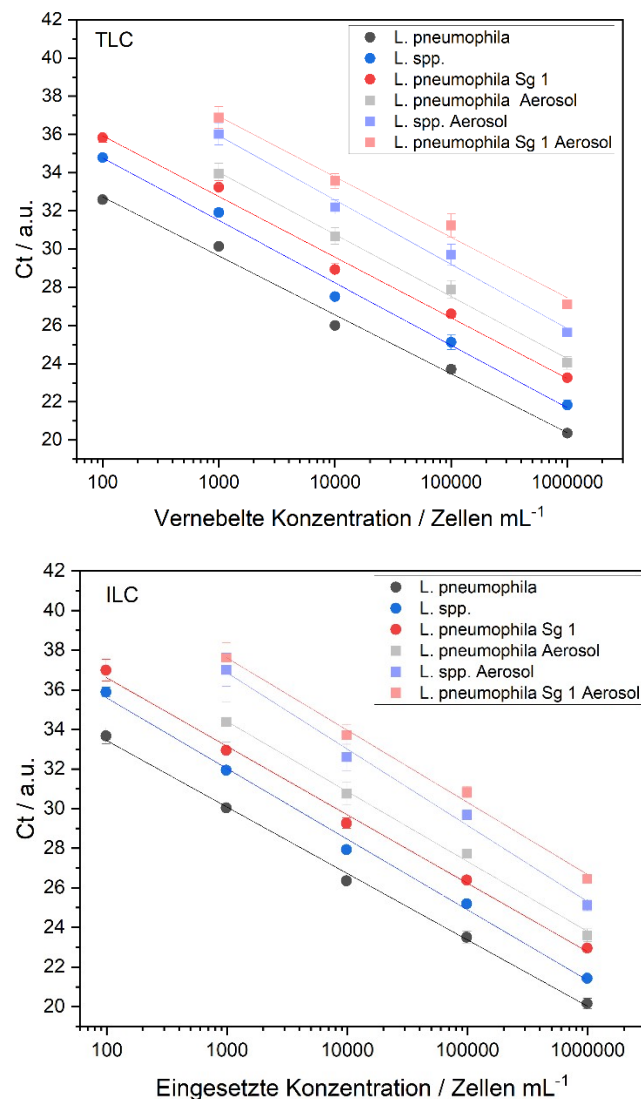


Abbildung 54: Korrelation zwischen eingesetzter und gemessenem Ct-Wert für Proben vor und nach Aerosolbildung gemessen mittels qPCR für alle drei analysierten Spezies; oben: TLC; unten: ILC (n = 3)

3.3.8.4 Kultivierung

Durchgeführte Arbeiten

Für die Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden Zellen in Ringerlösung direkt auf Buffered Carcoal Yeast Extract (BCYE) Agar Platten aufgebracht und ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend in einem Inkubator bei 37 °C für 7-10 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die gewachsenen Kolonien gezählt.

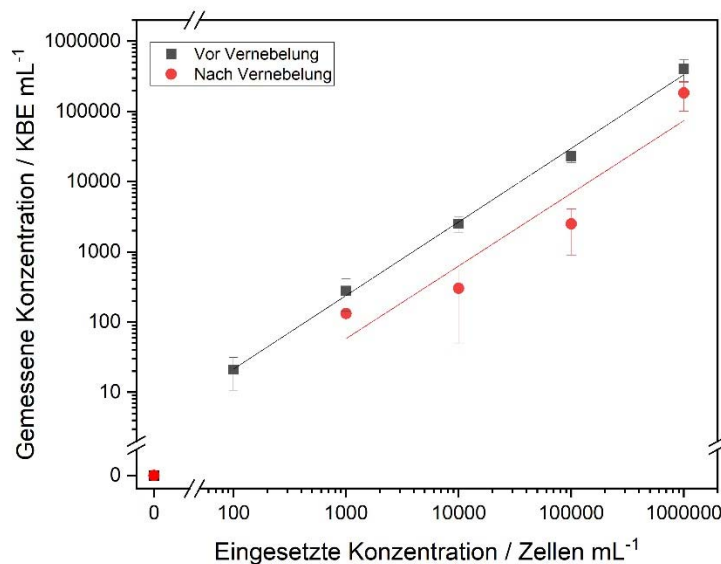


Abbildung 55: Korrelation zwischen eingesetzter und gemessener Konzentration für Proben vor und nach Aerosolbildung gemessen mittels Kultivierung (n = 3)

Erzielte Ergebnisse

Die Ergebnisse (siehe Abbildung 55) zeigen vor der Aerosolbildung eine lineare Korrelation zwischen eingesetzter Konzentration und gebildeten Kolonien. Nichtsdestotrotz lässt sich erkennen, dass nicht jede Zelle eine Kolonie bildet (nur ca. 10 %). Dies wird noch deutlicher bei Betrachtung der Ergebnisse nach der Aerosolsammlung, wo zum einen eine höhere Standardabweichung der Ergebnisse und zum anderen eine deutliche Unterbestimmung auftritt. Dies lässt darauf schließen, dass die Bakterien durch den Sammelvorgang in den VBNC-Status übergehen. Der Anteil der Zellen im VBNC-Status scheint dabei zu variieren, was die höheren Abweichungen erklärt. Durch diese Ergebnisse wird die Notwendigkeit von geeigneten kulturunabhängigen Methoden noch einmal verdeutlicht.

3.3.8.5 Vergleich Nachweisgrenzen und Wiederfindungen der quantitativen Methoden

Durchgeführte Arbeiten

Nachweisgrenzen (LOD) in Zellen/m³ wurden mit folgender Formel berechnet:

$$LOD_{Aerosol} = \frac{LOD_{Methode} \times V_{Ende}}{Q \times t} \frac{1}{\eta}$$

mit $LOD_{\text{Methode}} = LOD$ der jeweiligen analytischen Methode, V_{Ende} = Endvolumen im Sammelgefäß, Q = Flussrate des Sammlers, t = Sammelzeit und η = Sammeleffizienz.

LOD_{Methode} wurde berechnet, indem die dreifache Standardabweichung der Blindwertmessungen zum Mittelwert der Blindwertmessungen addiert wurde. Als Blindwert wurde hierbei sterile Ringerlösung verwendet. Das Endvolumen wurde gravimetrisch bestimmt. Die Sammeleffizienz ist das Verhältnis von gesammelten zu vernebelten Legionellen und entspricht in diesem Fall der Wiederfindung.

Erzielte Ergebnisse

Für einen Vergleich unterschiedlicher Methoden spielen Nachweisgrenzen (Limit of detection (LOD)) und Wiederfindungen eine große Rolle, da sie Auskunft über die Leistung der jeweiligen Methode geben. Für die drei quantitativen Methoden IMS-FCM, qPCR und Kultivierung wurden LOD und Wiederfindung bestimmt und in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 LOD und Wiederfindungen für alle drei angewandten Analysemethoden

	LOD _{Aerosol} / Zellen m ⁻³	Wiederfindung _{Aerosol} TLC / %	Wiederfindung _{Aerosol} ILC / %
IMS-FCM			
<i>L. pneumophila</i> Sg 1	4.0 × 10 ³ (TLC) 5.8 × 10 ³ (ILC)	63.7 ± 34.1	63.0 ± 13.5
qPCR			
<i>L. pneumophila</i>	9.5 × 10 ² (TLC) 7.8 × 10 ² (ILC)	35.8 ± 12.1	44.9 ± 14.7
<i>L. pneumophila</i> Sg 1		35.1 ± 11.3	42.2 ± 16.1
<i>Legionella</i> spp.		35.3 ± 11.9	40.7 ± 15.0
Kultivierung			
<i>Legionella</i> spp.	1.5 × 10 ³	-	30.9 ± 18.0

Die bestimmten Nachweisgrenzen in Zellen/ m^3 zeigen, dass vor allem mit qPCR niedrigere Konzentrationen gemessen werden können. Die Nachweisgrenze von IMS-FCM ist vergleichbar mit Kultivierung.

Bei Betrachtung der Wiederfindungen im Aerosol zeigt IMS-FCM die höchsten Wiederfindungsraten. Dabei lassen sich ähnliche Ergebnisse zwischen TLC- und ILC-Messungen erkennen. Da alle Messungen aus derselben Probe vorgenommen wurden, wären für qPCR ähnliche hohe Wiederfindungsraten zu erwarten. Die niedrigeren Werte lassen sich vermutlich auf Verlust der DNA während der Extraktion zurückführen. Im ersten Schritt wurden die Zellen hierbei zentrifugiert, sodass sich ein

Pellet gebildet hat. Normalerweise werden die Zellen durch die Zentrifugationskräfte nicht beschädigt. Der vorherige Sammelprozess kann jedoch dazu geführt haben, dass die Zellmembran geschwächt wurde und so während der Zentrifugation beschädigt wurde, was zur Freisetzung und damit zum Verlust von DNA führte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die kulturunabhängigen Methoden IMS-FCM und qPCR gut als Alternativen zur klassischen Kultivierung angewandt werden können. Besonders durch die zusätzlichen Informationen, wie Lebend-tot Unterscheidung und Serotypisierung, und eine kurze Analysedauer haben diese Methoden viele Vorteile gegenüber der klassischen Kultur. Für qPCR sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Wiederfindung im Aerosol zu erhöhen.

3.3.9 Bestimmung der Verteilungsfunktion aktiver Legionellen zwischen Wasser- und Aerosolphase in der Laborrückkühlanlage / Arbeitspaket 9 (TU München)

Da die Labor-VKA anders konzipiert werden musste als ursprünglich geplant, waren die in diesem Arbeitspaket vorgesehenen Versuche nicht umsetzbar. Zum Ausgleich der veranschlagten Personenmonate wurde die Methode IMS-FCM in Arbeitspaket 8 ergänzt. Die Labor-VKA wird in Folgendem als Biofilmkammer bezeichnet.

3.3.10 Herstellung und Quantifizierung von markierten hitzeinaktivierten Legionellen für Tracerversuche an Versuchsanlage / Arbeitspaket 10 (TU München)

Dieses Arbeitspaket wurde aufgrund von Änderungen in der Vorgehensweise von IUTA nicht durchgeführt, da keine hitzeinaktivierten Legionellen für Tracerversuche benötigt wurden.

3.3.11 Versuchsprogramm zur Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens von Bioaerosolen aus unterschiedlichen Quellbereichen an der Laborrückkühlanlage mit aktiven Legionellen / Arbeitspaket 11 (TU München)

Die Labor-VKA wird in Folgendem als Biofilmkammer bezeichnet. Ziel des Arbeitspaketes war es, die Biofilmkammer auf das Wachstum eines legionellenhaltigen

Biofilmes in der Verrieselung und im Sumpf zu evaluieren. Zusätzlich sollte der Einfluss von Amöben und der Einsatz von Bioziden mit verschiedenen Wirkungen untersucht werden.

3.3.11.1 Vorversuche

Durchgeführte Arbeiten

Zu Beginn der Arbeiten mit der Biofilmkammer wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit zu testen.

Dazu wurde die Biofilmkammer 6 Wochen mit VE-Wasser betrieben. Während dieser Zeit wurden Wasserproben entnommen und auf Gesamt- und Intaktzellzahl (TCC und ICC) analysiert. Auch wurden Glas-Objektträger als Oberfläche zum Biofilmwachstum eingesetzt. 3 x 4 Objektträger in der Verrieselung und 1 x 4 Objektträger im Sumpf. Am Ende der 6 Wochen wurden alle Glas-Objektträger entnommen und der Biofilm von der Oberfläche extrahiert.

Zur Charakterisierung des Biofilmwachstums und zur Bestätigung der Methode zur Zellextraktion aus dem Biofilm wurden Wiederholungsmessungen durchgeführt. Dazu wurde die Anlage jeweils eine Woche mit VE-Wasser betrieben. Nach dieser Zeit wurden alle 16 Glas-Objektträger aus der Anlage entnommen, die Zellen von der Oberfläche entfernt und mittels Durchflussszytometrie auf ICC und TCC analysiert. Dieses Experiment wurde 5 x wiederholt sodass statistische Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse getroffen werden konnten.

Erzielte Ergebnisse

Die Ergebnisse der ICC- und TCC-Messungen der ersten 6 Wochen sind in Abbildung 56 dargestellt.

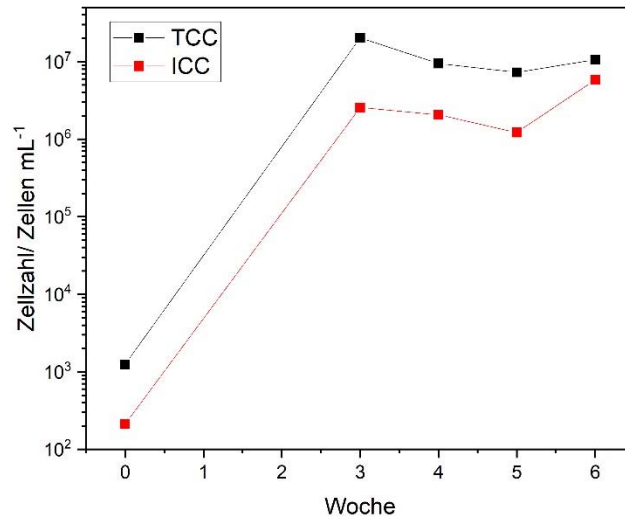


Abbildung 56: Verlauf der gemessenen Werte von ICC und TCC für die ersten 6 Wochen der laufenden Biofilmkammer mit VE-Wasser

Es ist zu erkennen, dass bereits nach 3 Wochen ein Anstieg der Zellen um 4 Log-Stufen erfolgt. TCC-Werte befinden sich dabei bei 10^7 Zellen/mL, während ICC-Werte über 10^6 Zellen/mL liegen. Somit ist bestätigt, dass mit der Biofilmkammer Wachstumsexperimente von Zellen durchführbar sind.

Für die Entfernung des Biofilms von der Oberfläche wurde folgendes Vorgehen erarbeitet und angewandt (siehe Abbildung 57).

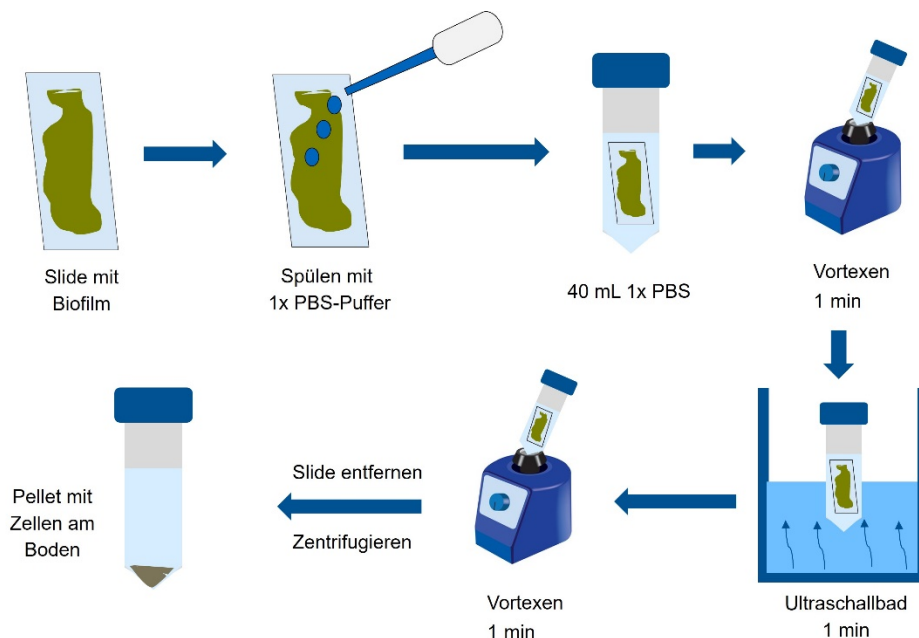


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Extraktion des Biofilms von der Oberfläche eines Glas-Slides

Der Glas-Objektträger mit dem Biofilm wird zunächst mit 1x PBS-Puffer gewaschen, um lose Zellen zu entfernen. Anschließend wird er in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen mit 40 mL 1x PBS-Puffer gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird als erstes 1 min gevortext, dann 1 min in einem Ultraschallbad behandelt und erneut 1 min gevortext. Daraufhin kann der Glas-Objektträger entfernt werden. Nach einer Zentrifugation bei 4500 rpm für 10 min sind die Zellen in einem Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens gesammelt. Je nach Anwendung kann nun die Flüssigkeitsmenge auf das gewünschte Volumen eingestellt werden, was bei diesen Experimenten 10 mL beträgt. Nach 6 Wochen konnten in der Verrieselung Zellzahlen im Bereich 10^6 Zellen/mL und im Sumpf im Bereich von 10^7 Zellen/mL gefunden werden. Der Unterschied zwischen Verrieselung und Sumpf kann demnach durch mehr Kontakt der Oberfläche mit Wasser im Sumpf erklärt werden.

Die Experimente zur Reproduzierbarkeit ergaben keinen signifikanten ($p > 0,05$) Unterschied zwischen den einzelnen Glas-Objektträgern einer Reihe und auch nicht zwischen den 3 Reihen in der Verrieselung. Jedoch konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Verrieselung und dem Sumpf festgestellt werden, was wie schon erwähnt an längeren Kontaktzeiten von Wasser und Oberfläche liegt.

3.3.11.2 Versuche mit Bioziden

Durchgeführte Arbeiten

Um den Einfluss von oxidierenden und nicht-oxidierenden Bioziden, ebenso wie Amöben, auf das Überleben von Legionellen und natürlich vorkommenden Zellen in Prozesswasser zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze durchgeführt. Die einzelnen Ansätze sind in Abbildung 58 zu sehen.

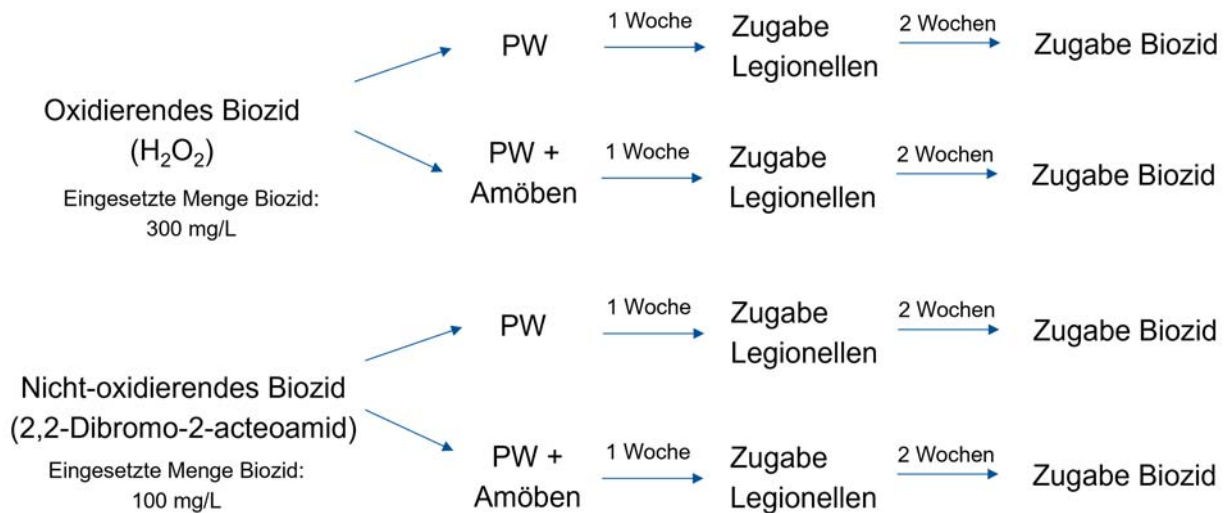


Abbildung 58: Schematische Darstellung der einzelnen Ansätze für die Untersuchungen zur Biozid Effizienz für Biofilme

Dazu wurde die Biofilmkammer mit 1.5 L Prozesswasser aus einer realen Verdunstungskühlanlage gefüllt. Für die Ansätze mit Amöben wurde *Hartmanella vermiformis* hinzugegeben, sodass eine Konzentration von $6,7 \times 10^2$ Zellen/mL erreicht wurde. Der Luftstrom wurde auf 5 L/min, der Wasserstrom auf 10 mL/min eingestellt. Die Wassertemperatur wurde auf 25 °C gesetzt. Halterungen mit Glas-Objektträger wurden eingesetzt, 3 × 4 in der Verrieselung und 1 × 4 im Sumpf. Nach einer Woche Laufzeit, wurden *Legionella pneumophila* Sg 1 Subtyp Bellingham aus einem Cryostandard zugegeben, sodass eine Endkonzentration von $3,2 \times 10^4$ Zellen/mL erzielt wurde. Nach weiteren 2 Wochen wurde jeweils das Biozid zugegeben. Das oxidierende Biozid H_2O_2 , wurde mit einer Konzentration von 300 mg/L zugegeben, das nicht-oxidierende, welches 2,2-Dibromo-2-cyanoacetamid enthält, mit einer Konzentration von 100 mg/L. Die zugegebene Menge bezog sich dabei auf die für Verdunstungskühlanlagen empfohlene Konzentration.

Proben von Prozesswasser und Biofilm wurden vor und nach Biozidzugabe entnommen, und mittels IMS-FCM (Gesamt- und Intakt-Legionellenzahl), Durchflusszytometrie (Gesamt- und Intaktzellzahl) und Kultivierung (kultivierbare Legionellen und Gesamtkeimzahl) vermessen. Zusätzlich wurden Mikroskopie Aufnahmen des Biofilms mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) angefertigt.

Die Überlebensraten wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{Überleben}_{\text{intakte Zellen}} = \frac{ICC_{\text{nachher}}/TCC_{\text{nachher}}}{ICC_{\text{vorher}}/TCC_{\text{vorher}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Überleben}_{\text{intakte Legionellen}} = \frac{ILC_{\text{nachher}}/TLC_{\text{nachher}}}{ILC_{\text{vorher}}/TLC_{\text{vorher}}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Überleben}_{\text{kultivierbare Zellen}} = \frac{\text{Kultivierbare Zellen}_{\text{nachher}}}{\text{Kultivierbare Zellen}_{\text{vorher}}} \times 100\% \quad (3)$$

Erzielte Ergebnisse

REM-Messungen in Abbildung 59 bestätigen das Wachstum von Biofilm auf den Glas-Objektträgern und zusätzlich die Anwesenheit von Legionellen im Sumpf (Abbildung 59 A) und in der Verrieselung (Abbildung 59 B).

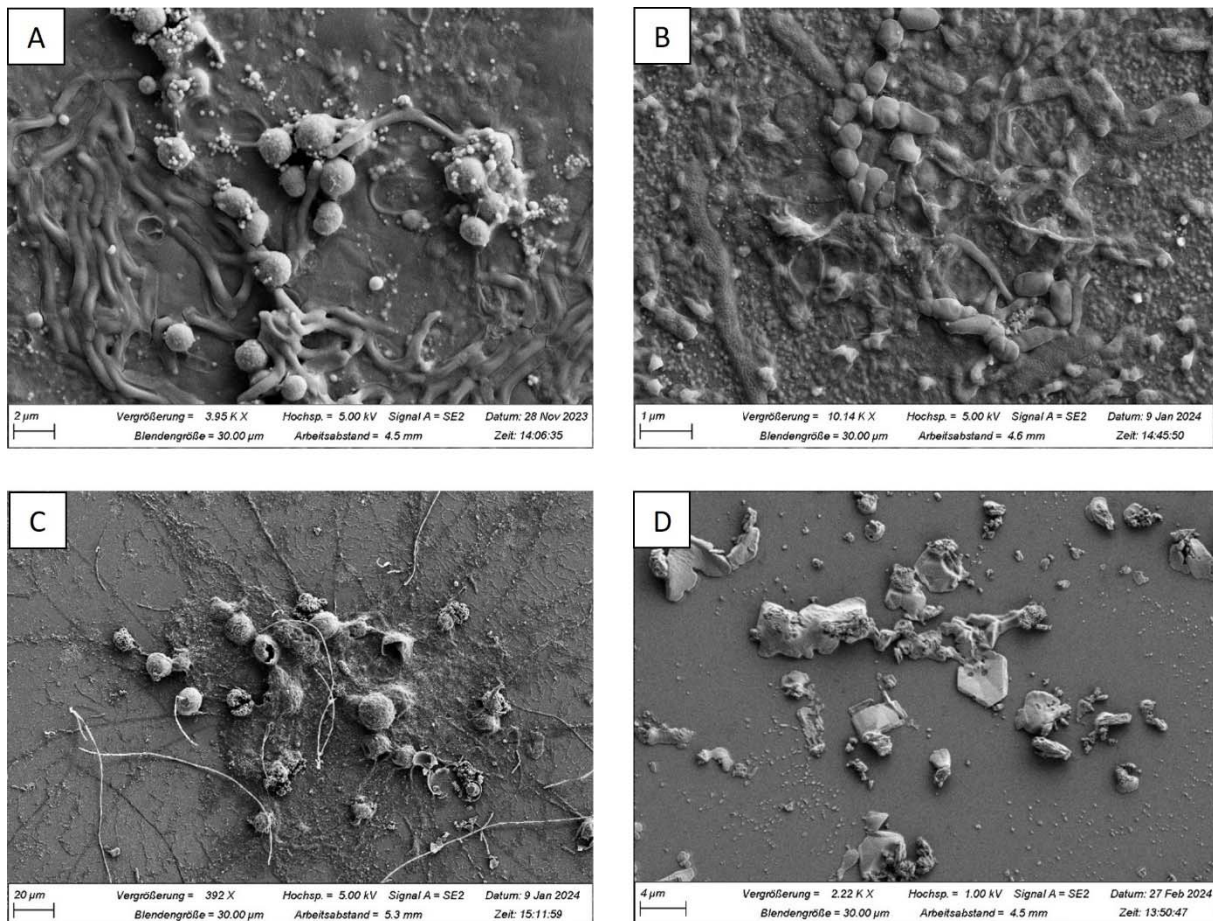


Abbildung 59: REM-Aufnahmen des im Sumpf (A) und in der Verrieselung (B) gewachsenen Biofilms, C: Biofilm nach Biozidzugabe, D: Oberfläche nach Biofilmextraktion

In Aufnahme Abbildung 59 C sind beschädigte Zellen nach der Zugabe von Biozid zu erkennen. Die Oberfläche eines Glas-Objektträgers nach erfolgter Extraktion ist in Abbildung 59 D zu sehen. Es sind noch vereinzelte Partikel auf der Oberfläche zu

erkennen, aufgrund ihrer Form handelt es sich dabei aber vermutlich hauptsächlich um Salzpartikel des PBS-Puffers. Dies bestätigt nochmal die Wirksamkeit der Extraktionsmethode.

Die Ergebnisse der Überlebensraten von Legionellen mittels IMS-FCM (Abbildung 60, links) und Kultivierung (Abbildung 60, rechts) zeigen unterschiedliche Ergebnisse.

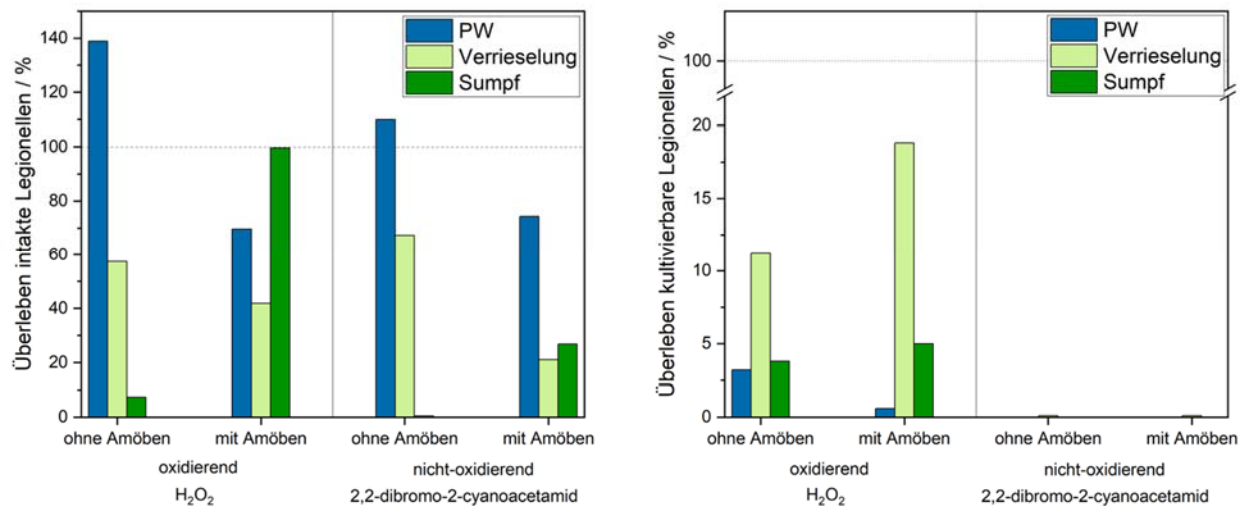


Abbildung 60: Überlebensraten für Legionellen-Messungen mittels IMS-FCM (links) und Kultivierung (rechts) für Legionellen in Prozesswasser (PW), im Biofilm der Verrieselung (Verrieselung) und Biofilm im Sumpf (Sumpf)
Ergebnisse für beide angewandten Biozide und Ansätze mit und ohne Amöben sind gezeigt

Bei den Ansätzen ohne Amöben sind im Prozesswasser (PW) Überlebensraten von über 100 % erkennbar. Dies lässt darauf schließen, dass beide Biozide Zellen aus dem Biofilm herauslösen, die anschließend im PW als intakte Zellen vorliegen. Bei Betrachtung der Ergebnisse mittels Kultivierung fällt jedoch auf, dass für das oxidierende Biozid noch kultivierbare Zellen in PW vorhanden sind, für das nicht-oxidierende jedoch nicht. Das würde bedeuten, dass die aus dem Biofilm gelösten Zellen zwar noch intakt jedoch nicht mehr kultivierbar sind.

Bei den Ergebnissen des Biofilms ist auffällig, dass bei den Ansätzen ohne Amöben das Überleben von Legionellen im Biofilm in der Verrieselung größer ist als im Biofilm im Sumpf. Dies kann auf kürzere Kontaktzeiten zwischen Biozid und Biofilm in der Verrieselung zurückgeführt werden. Bei den Ansätzen mit Amöben ist das Überleben dagegen im Sumpf besser, was auf eine erhöhte Anzahl an legionellenhaltigen Amöben im Sumpf hinweist. Auch im Biofilm sind Unterschiede in der Kultivierbarkeit der Legionellen nach Biozidzugabe erkennbar. Mit dem oxidierenden Biozid sind noch

kultivierbare Zellen, besonders in der Verrieselung, erkennbar, wohingegen nur noch wenige kultivierbare Legionellen-Zellen in der Verrieselung mit dem nicht-oxidierenden Biozid erkennbar sind.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass das nicht-oxidierende Biozid 2,2-Dibromo-2-cyanoacetamid einen größeren Einfluss auf die Legionellen im Prozesswasser und im Biofilm zu haben scheint, was besonders an der Kultivierbarkeit erkennbar ist.

Zusätzlich wurden die einzelnen Proben auch mittels DFZ und Gesamtkeim-Kultivierung untersucht, um einen Einfluss der Biozide auf das Überleben aller vorkommenden Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 61).

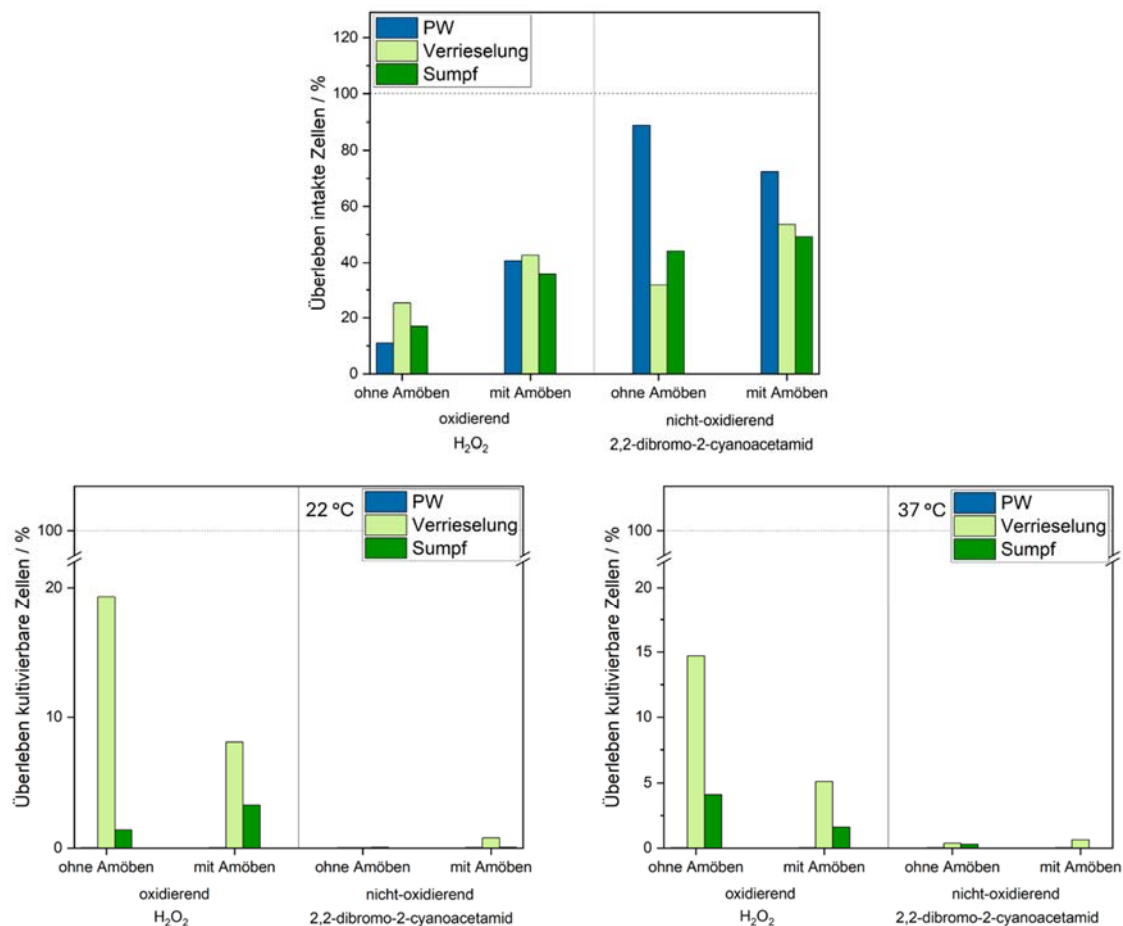


Abbildung 61: Überlebensraten für Gesamtzell-Messungen mittels DFZ (oben) und Kultivierung (unten links: 22 °C; unten rechts: 37 °C) in Prozesswasser (PW), im Biofilm der Verrieselung (Verrieselung) und Biofilm im Sumpf (Sumpf)
Ergebnisse für beide angewandten Biozide und Ansätze mit und ohne Amöben sind gezeigt.

Hierbei sind unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu den Legionellen-Messungen erkennbar. Das oxidierende Biozid scheint besonders im PW eine höhere Wirksamkeit als das nicht-oxidierende zu zeigen. Im Biofilm sind diese Unterschiede nicht so dominant zu sehen. Auch ist der Einfluss von Amöben nicht so stark zu erkennen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass oft Legionellen bevorzugt von Amöben aufgenommen werden.

Mittels Kultivierung lassen sich bei beiden Inkubationstemperaturen keine kultivierbaren Zellen im PW erkennen. Mit dem oxidierenden Biozid sind jedoch noch kultivierbare Zellen im Biofilm zu finden, besonders in der Verrieselung. Unterschiede der Ergebnisse zwischen Kultur und DFZ sind dadurch zu erklären, dass mittels DFZ alle vorkommenden Zellen angefärbt werden, Legionellen eingeschlossen. Bei der Kultivierung jedoch ist kein L-Cystein im Medium enthalten, so dass Legionellen hier nicht kultivierbar sind.

Die Ergebnisse zeigten unterschiedliche Wirkungen der beiden Biozide auf Legionellen und natürlich vorkommende Zellen. Dies liegt an verschiedenen Wirkmechanismen. Das nicht-oxidierende Biozid beruht auf H_2O_2 als Wirkkomponente. H_2O_2 oxidiert dabei Bestandteile der Zellen, wie Lipide, Proteine und Nukleinsäuren durch OH-Radikale. Das nicht oxidierende Biozid, bestehend aus 2,2-Dibromo-2-acetoamid, dagegen greift die Zelle durch Reaktion mit den Thiol-Gruppen der Zellwände an, was durch die Freisetzung von Brom-Ionen verstärkt wird. Auch die mikrobielle Zusammensetzung der Zellarten kann eine Rolle spielen. Bakterien weisen sogenannte Efflux Pumpen auf. Dabei handelt es sich um Proteine, die schädliche Bestandteile aus der Zelle entfernen können. Weitere Untersuchungen zu den vorkommenden Zellarten wäre nötig, um genauere Aufschlüsse über die Wirksamkeit der Biozide zu erhalten.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass der Biofilm eine wichtige Rolle vor allem bei der Verbreitung von *L. pneumophila* in Verdunstungskühlanlagen einzunehmen scheint, da in den Experimenten gezeigt wurde, dass ein Schutzeffekt für Legionellen auftritt. Auch scheinen Amöben einen positiven Einfluss auf die Überlebensraten von Legionellen zu haben, was bei der Risikoabschätzung in Kühlanlagen beachtet werden sollte. Die Art des Biozides zeigte auch Unterschiede in der Wirksamkeit, weswegen weitere Untersuchungen, besonders im Hinblick auf nicht-kulturunabhängige Methoden, mit anderen eingesetzten Bioziden notwendig sind, um eine optimale Hygienevoraussetzung in Anlagen zu gewährleisten.

3.3.12 Übertragbarkeitsuntersuchungen der angepassten Probenahme und Analyse-Strategien auf reale Rückkühlanlagen / Arbeitspaket 12 (IUTA und TU München)

Durchgeführte Arbeiten

In den vorhergehenden APs wurden einzelne Aspekte einer Probenahmestrategie in Kombination mit differenzierten mikrobiologischen Analysemethoden erarbeitet. Ziel sollte es sein, die in der Fortluft von Verdunstungskühlanlagen enthaltene Emissionsfracht an Mikroorganismen und insbesondere Legionellen differenziert zu bestimmen. Diese Emission ist an die Freisetzung von Flüssigwassertropfen bzw. Staubpartikel und seltener fester Bestandteile wie ausgetragene Biofilmbestandteile gekoppelt. Tropfenkollektive und Staubemissionen liegen i. d. R. als durchmesserabhängige Anzahlverteilung vor, die mit einer Standardverteilung um einen Modalwert streut. Aufgrund der Trägheitskräfte ist die Emissionsrate partikulärer Materialien stark abhängig von der vorherrschenden Gasgeschwindigkeit. Da die Geschwindigkeit insbesondere bei saugend betriebenen Zellen- und Serienkühltürmen im Auslass von Verdunstungskühlanlagen lokal stark schwankt, sollte eine repräsentative Emissionsmessung als Netzmessung ausgeführt werden.

Die ist auch erforderlich, da das biologische Wachstum lokal unterschiedlich intensiv über den Querschnitt erfolgen kann und eine Freisetzung aufgrund der Stromlinienverläufe damit auch lokal begrenzt erfolgen kann.

Realprobenahmen wurden u. a. an einer Verdunstungskühlanlage auf dem Forschungscampus der TU München in Garching im Januar 2023 durchgeführt. Bei der Anlage handelt es sich um einen Serienkühlturm mit drei Auslassöffnungen in je einem Diffusor und dort in saugender Position eingebautem Ventilator (Balcke Dürr GmbH, Serienkühlturm Typ SG). Alle drei Anlagen werden über denselben Wasserkreislauf gespeist. Die Wassermenge beträgt je Kühlturmauslass 287 m³/h, Die Warm- und Kaltwassertemperatur betragen ca. 37 °C bzw. ca. 27 °C. Die Rieselkörper sind als Kunststoff-Folienpakete (PP) ausgeführt. Zusätzlich ist ein Tropfenabscheider oberhalb der Wasserverteilerebene aufgelegt. Die Wasserverteilerebene ist als rechteckiger Baukörper von ca. 4.000 x 5.000 mm² ausgeführt. Der Axialventilator befindet sich oberhalb einer Verjüngung. Der Durchmesser der kreisförmigen Auslassöffnung beträgt ca. 2.500 mm und ist als Rohrstück von ca. 1.000 mm Länge ausgeführt. Dieser Bereich

oberhalb des Axialventilators besitzt auf der Innenseite eine Schalldämpferkulissee und ist über eine Revisionsklappe in der Wandung für Messungen zugänglich (Messebene). Serienmäßig sind die Ventilatoren für den Betrieb bei zwei Drehzahlen ausgerüstet.

Im Vorfeld der Bioaerosolmessungen fand gemäß der abgeleiteten Vorgehensweise zur Probenahme die eingehende Charakterisierung der Strömungsverhältnisse sowie die Erfassung des Tropfenspektrums statt. Aerosolmessungen wurden oberhalb des Ventilators im Abluftkanal der Anlage und als Umgebungsmessungen auf einem Dach neben dem Kühlturm durchgeführt. Zum Einsatz kam ein Zyklonsammler (Coriolis® μ). Die Vorgehensweise bei der Probenahme orientierte sich an der ausgearbeiteten Strategie zur Emissionsprobenahme an VKA.

In nachfolgender Abbildung 62 ist die Anlage dargestellt.

Erzielte Ergebnisse

Gasgeschwindigkeitsmessung und kontinuierliche Aufzeichnung

In der Messebene tritt die Fortluft über eine Ringfläche von 4,4 m² um die Rotornabe und den Antriebsmotor herum aus. Im Zentrum der Austrittsfläche ist ein Bereich mit einem Durchmesser von ca. 1,6 m nicht durchströmbar.

Die Mindestanzahl an Messpunkten nach Richtlinie VDI 4257 Blatt 1 beträgt vier Messpunkte je Quadratmeter [30] (verteilt) auf zwei Achsen, in diesem Falle entsprechend 16 Punkte. Im vorliegenden Fall war nur eine Halbachse zugänglich. Die Messpunktanzahl auf dieser verfügbaren Halbachse wurde um 50 % auf 6 Messpunkte erhöht. Die Positionen der Messpunkte, angegeben in Millimeter ab der Innenseite der Schalldämpferkulissee („Eintauchtiefe“), ergeben sich wie in Abbildung 63 dargestellt.



Abbildung 62: Verdunstungskühlanlage Garching

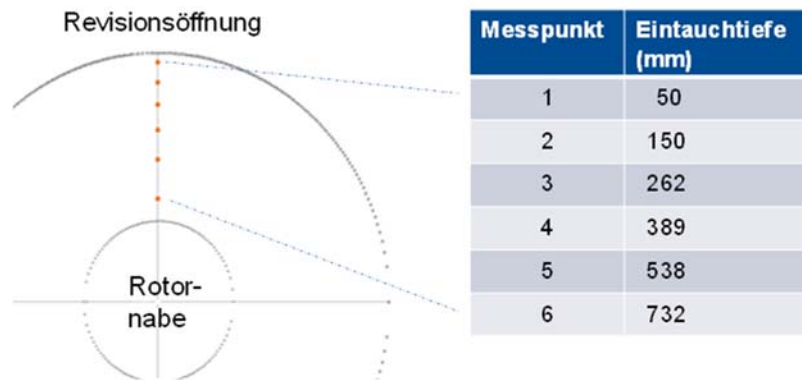


Abbildung 63: Messpunkte auf einer Halbachse im Messquerschnitt, Angabe der Eintauchtiefe relativ zur Innenseite der Schalldämpferkulissee

Da die Messung bei saugend betriebenen Verdunstungskühlanlagen in der Regel in einer drallgeprägten Strömung erfolgt, kommt an den Messpunkten eine Mehrrichtungsmesssonde zur richtungsabhängigen Erfassung der Gasgeschwindigkeitsmessung an den Messpunkten zum Einsatz. Zusätzlich erfolgt messtäglich über die gesamte Dauer des Messeinsatzes stationär an einem Messpunkt eine kontinuierliche Erfassung und Aufzeichnung der Strömungsgeschwindigkeit und Fortlufttemperatur als Zeitreihe von Minutenmittelwerten. Diese Daten liefern wertvolle Hinweise bei der Messdatenauswertung, da betreiberseitig vorgenommene Volumenstrom- oder Prozessänderungen i. d. R. als Änderung der Fortlufttemperatur bzw. der Gasgeschwindigkeit detektiert werden können. Die Darstellung in Abbildung 64 zeigt exemplarisch einen konstanten Verlauf der Messwerte über die Messdauer.

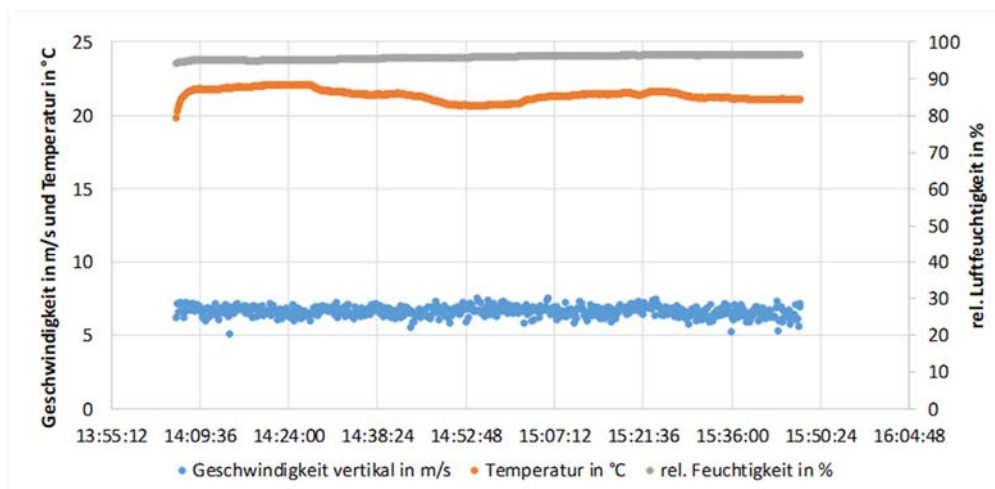


Abbildung 64: Fixpunktmessung – Verlauf von Fortluft-Kenngrößen Temperatur, Gasgeschwindigkeit und relative Feuchte über eine längere Zeitspanne einer Messkampagne.

Gasgeschwindigkeitsmessung an den Messpunkten

Zur Vermeidung des Fremdlufteinflusses wird während der Gasgeschwindigkeitsmessung an den Messpunkten die Revisionsöffnung weitgehend abgedeckt. Die verwendete Staudrucksonde (X-Pitot-Rohr) stellt eine Eigenentwicklung von IUTA dar und ermöglicht die gleichzeitige Staudruckmessung in zwei orthogonal zueinanderstehenden Raumrichtungen, vgl. Abschnitt 3.3.4.1. Mithilfe der Sonde kann in einer Messung gleichzeitig die vertikale und tangentiale Strömungsgeschwindigkeit für jeden Messpunkt bestimmt und daraus durch Vektoraddition bzw. geometrischer Betrachtungen die resultierende Geschwindigkeit und ihre Raumrichtung errechnet werden. Die Sonde wird auf die Unterkante der Revisionsöffnung aufgelegt und der Messkopf ausgehend vom ersten, wandnächsten Messpunkt radial weiter in Richtung Zentrum des Messquerschnittes auf die Position des jeweilig nächsten zu vermessenden Messpunktes verschoben. An den vorab berechneten Positionen (vgl. Tabelle in Abbildung 1) erfolgte die Messwertaufzeichnung je Messpunkt für die Zeitdauer einer Minute. Im Anschluss werden die Messpunkte in umgekehrter Reihenfolge angesteuert, so dass eine Doppelbestimmung vorliegt.

Aufgrund der gekröpften Bauform und der Schenkellänge des X-Pitot-Rohrs liegt die vertikale Position einer Geschwindigkeitsmessung ca. 15 cm unterhalb der Zugangsebene der Sonde (hier die untere Kante der Revisionsöffnung, die als Auflager dient). Handhabungsbedingt und aufgrund der Lage des ersten Messpunktes relativ zur Schalldämpferkulisse ist die Datenerfassung am ersten Messpunkt nicht in dieser Ebene möglich, sie erfolgt direkt auf Höhe der Unterkante der Revisionsöffnung.

In nachfolgender Tabelle 6 sind die Messergebnisse wiedergegeben. Die Angabe der Raumrichtung der resultierenden Geschwindigkeit erfolgt in Grad des Winkels relativ zur Vertikalen. Orientierend lässt sich während der Messung die lokale Strömungsrichtung auch mithilfe eines in die Strömung gehaltenen Streifenfähnchens visualisieren (parallel an einen dünnen Stab angebrachte Streifen einer leichten Kunststofffolie). Das Streifenfähnchen ist in der Praxis hilfreich bei der isoaxialen Ausrichtung der Probenahmesonde am jeweiligen Messpunkt.

Die resultierende Geschwindigkeit liegt je nach Messpunkt zwischen ca. 1 m/s bis ca. 10 m m/s. Die Geschwindigkeitsverteilung zeigt einen typischen Verlauf mit niedrigeren Geschwindigkeiten für randnahe Bereiche sowie im Zentrum der Messebene. Bei der Interpretation der Messwerte ist zu beachten, dass die Messung an MP1 nicht in der Messebene der übrigen Messpunkte, sondern auf Höhe der Unterkante der Revisionsklappe befindet.

Tabelle 6 Ergebnisse, Messung der lokalen Fortluftgeschwindigkeit an den Messpunkten

Messachse 1		Messwerte Geschwindigkeiten und Winkel (Mittelwerte der 2 Messreihen)			
MP	Position [mm]	Geschwindigkeit tangential [m/s]	Geschwindigkeit vertikal [m/s]	resultierende Geschwindigkeit [m/s]	Strömungsrichtung (Winkel zwischen der Vertikalen und der Resultierenden) [Grad]
1	50	2,9	3,9	4,6	44
2	150	0,4	0,0	0,5	2
3	262	6,5	5,0	8,5	34
4	390	7,5	6,6	10,1	39
5	540	6,3	6,0	8,7	41
6	736	-0,7	1,4	0,9	21
Mittelwert gesamt		3,8	3,8	5,5	30

Tropfenmessung

Im Anschluss erfolgte an jedem der sechs Messpunkte der Halbachse eine Tropfenmessung mit einer Impaktionssonde, wobei Punkt 3 dreifach beprobt wurde. Die Impaktionsfläche der Messsonde wurde jeweils gegen Hautströmungsrichtung ausgerichtet und je Messpunkt für jeweils fünf Sekunden mit dem Aerosolstrom beaufschlagt.

In nachfolgender Abbildung 65 sind verschiedene Ergebnisse der Auswertung zusammengefasst. Zur Charakterisierung der gesamten Tropfen-Aerosolströmung im Messquerschnitt werden der mittlere Tropfendurchmesser, die Tropfenbeladung sowie die resultierende Gasgeschwindigkeit jeweils an den sechs Messpunkten herangezogen. Die Anzahlgrößenverteilung der Tropfen besitzt an den Messpunkten 1 sowie 3 bis 6 einen Modalwert von ca. 10 μm . Für Messpunkt 2 wird ein kleinerer mittlerer Durchmesser von ca. 7 μm bzw. kleiner ermittelt. Abbildung 66 und Abbildung 67 geben die ausgezählte Größenverteilung der Tropfen an den sechs Messpunkten wieder. Die Darstellung kann dahingehend interpretiert werden, dass im äußeren Bereich der Aus-

trittsfläche eher kleinere Tropfen auftreten als im inneren Bereich. Ob hier ein Zusammenhang zur lokalen Umlaufgeschwindigkeit des Rotorblattes des Axialventilators vorliegt, konnte nicht untersucht werden. Dies könnte auf Basis von Vergleichsdaten weiterer Anlagen abgeleitet werden.

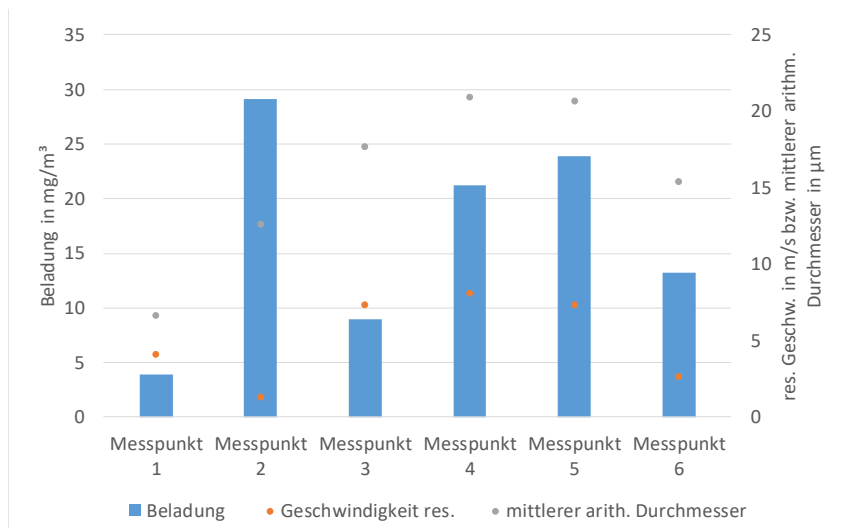


Abbildung 65: Auswertung Tropfenmessung: (Flüssigkeits-)Beladung, mittlerer Durchmesser und Geschwindigkeit

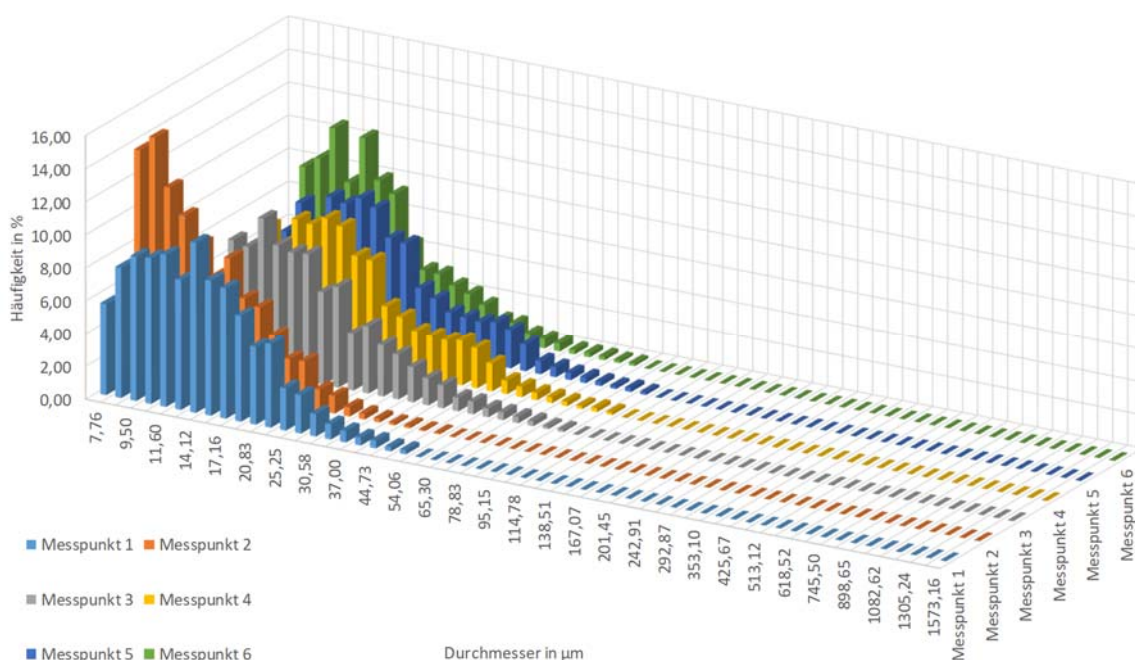


Abbildung 66: Häufigkeitsverteilung Tropfen am jeweiligen Messpunkt, geglättet
Glättung durch Bildung des zentrierten gleitenden Mittelwerts der Breite 3 Werte

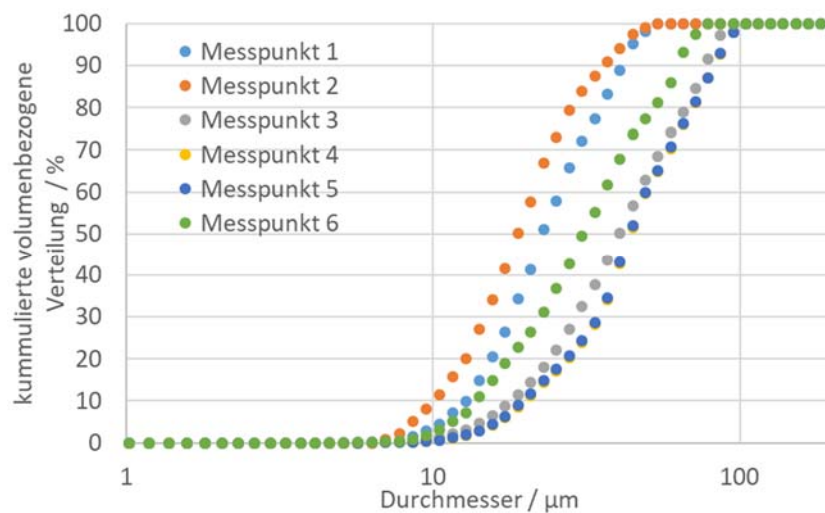


Abbildung 67: Kumulierte volumetrische Tropfenverteilung an den Messpunkten

Wasserprobenahme

Vor und nach der Bioaerosolmessung erfolgt eine Probenahme des Umlaufwassers. Dies erfolgt i. d. R. an der betriebsseitig gemäß 42. BImSchV eingerichteten Probenahmestelle.

Bioanalytik

Die Bioaerosol-Probenahme erfolgte für zehn Minuten bei einem Absaugvolumenstrom von 300 L/min in 10 mL Ringerlösung. Zusätzlich wurden Prozesswasserproben entnommen. Alle Luft- und Wasserproben wurden anschließend mittels IMS-FCM und Kultivierung auf den jeweiligen Legionellen-Gehalt untersucht. Alle Legionellen-Messungen in Luft- und Wasserproben mittels IMS-FCM und Kultivierung fielen negativ aus. Zum Zeitpunkt der Messkampagne konnte kein Nachweis dahingehend geführt werden, dass Legionellen mit der Fortluft freigesetzt werden.

Emissions-Frachtaberschätzung aus Messungen an weiteren Verdunstungskühlanlagen

An einer weiteren Verdunstungskühlanlage konnten wiederholt Messungen der Parameter Gasgeschwindigkeit, Tropfengehalt und Mikrobiologie durchgeführt werden. Auch an dieser Anlage lieferte die kulturelle Analytik der gewonnenen Aerosolproben nur in wenigen Fällen Legionellenkonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze.

Ausgehend der Ergebnisse dieser Messungen wurde versucht eine Abschätzung vorzunehmen, inwieweit sich die Emissionen auf Primär- oder Sekundärtropfen zurückführen lassen.

Die Messung der Gasgeschwindigkeit in der Auslassebene ergab eine mittlere Austrittsgeschwindigkeit an der Auslassebene von ca. 15 m/s. Unter Heranziehung der Flächengröße der Austrittsöffnung lässt sich der Fortluftvolumenstrom berechnen. Dieser liegt je nach Leistungsstufe des Axialventilators in der Größenordnung 300.000 bis 800.000 m³/h.

Die Bioaerosol-Probenahme erfolgte auf einer Halbachse an fünf Messpunkten. Werden die Messwerte der Legionellenkonzentration für das bekannte Messgasvolumen mit dem Fortluftstrom am jeweiligen Messpunkt gewichtet, kann eine mittlere Legionellenkonzentration über die Austrittsfläche berechnet werden. Diese beträgt ca. 12 KBE/m³ für *Legionella* spp. Damit ergibt sich theoretische Freisetzungsrate von ca. 4 bis 10 Mio. KBE/h für *Legionella* spp.

Im Umlaufwasser wird korrespondierend eine Legionellenkonzentration von ca. 255 KBE/100 ml für *Legionella* spp. bestimmt. Mit der Umlaufwassermenge der Anlage und einer angenommenen, für Tropfenabscheider an Verdunstungskühlanlagen typischen Tropfenmitrissrate ergibt sich für den Messzeitraum eine Freisetzungsrate von ca. 12.000 KBE/h für *Legionella* spp. Demnach liegt die anhand der Aerosolmessung bestimmte Freisetzungsrate um den Faktor 1.000 höher als die Freisetzungsrate, die sich rechnerisch ausgehend von Messergebnissen für das Umlaufwasser und Kenndaten gemäß Datenblatt des Tropfenabscheiders ergeben würde. Diese Abschätzung kann in ähnlicher Weise vorgenommen werden, indem die Legionellenkonzentration je mL Wassertropfen im Aerosol derjenigen im Umlaufwasser gegenübergestellt wird. Dazu wird die am Fortluftauslass im Mittel kulturell nachgewiesene Legionellenanzahl je mL Flüssigkeit mit der am selben Messort gemessenen Tropfenfracht je m³ Fortluft multipliziert und durch die im Umlaufwasser je mL nachgewiesenen Legionellenanzahl dividiert. Diese Rechnung liefert Werte in derselben Größenordnung.

Dieses Verhältnis kann theoretisch darauf hindeuten, dass Sekundäraerosole zu einer erhöhten Freisetzungsrate gegenüber der alleinigen Freisetzung des Umlaufwassers führen. Diese Aussage müsste durch mehrere Validierungsmessungen bestätigt werden, was aufgrund der häufig angetroffenen Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze

bislang erschwert war. Weiter ist zu berücksichtigen, dass die Werte zur Tropfenbelastung und Gasgeschwindigkeit zwar auf vier Halbachsen im Messquerschnitt erfasst wurden, die Bioaerosolmessungen aber nur auf einer Halbachse erfolgen konnten und auf die gesamte Austrittsfläche hochgerechnet wurden. Falls der erhöhte Befund auf einen lokal angetroffenen Biofilm-Bewuchs zurückzuführen ist, ist diese Hochrechnung auf die gesamte Fläche nicht zulässig. Andererseits ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass erhöhte Gehalte an Legionellen bei 4 von 5 Messpunkten der Halbachse festgestellt werden konnten, vgl. nachfolgende Abbildung 68.

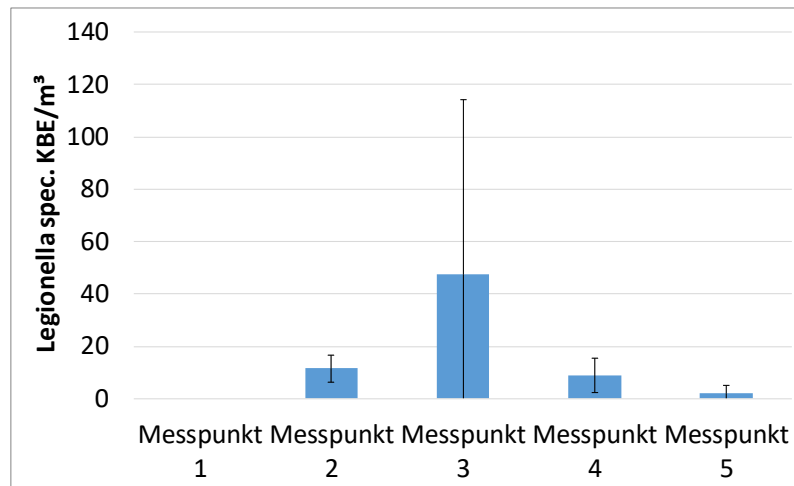


Abbildung 68: Legionellenbefunde oberhalb der Nachweisgrenze gemessen in der Fortluft-Austrittsfläche einer VKA (5 Messpunkte auf einer Halbachse)

4 Fazit

In diesem Vorhaben wurde untersucht, inwieweit der Übertritt von gesundheitsgefährdenden Mikroorganismen in die Fortluft von Verdunstungskühlanlagen (VKA) und damit ihre Freisetzung in die Atmosphäre auf spezifische Freisetzungsbereiche zurückgeführt werden kann. Als Freisetzungsquelle standen dabei insbesondere Sekundärtropfen im Fokus des Interesses. Als Sekundärtropfen werden Tropfen bezeichnet, die oberhalb der Verrieselungsebene des Umlaufwassers freigesetzt werden und in ihrem Gehalt an Mikroorganismen von den Primärtropfen als Mitriss des Umlaufwassers abweichen können.

Bei den häufig eingesetzten Bauformen von Verdunstungskühlanlagen (VKA) liegt ein unmittelbarer Kontakt des umlaufenden erwärmten Kühlmediums mit der zur Kühlung genutzten angesaugten Umgebungsluft vor. Sowohl im erwärmten Kühlmedium als

auch an Oberflächen von Anlagenbauteilen mit Kontakt zum Kühlwasser können erhöhte Populationen an Mikroorganismen bzw. ein Biofilmwachstum auftreten. Da bei diesen Anlagen die Freisetzung von Mikroorganismen mit der erwärmten Fortluft nicht ausgeschlossen werden kann, erfolgt nach 42. BImSchV eine fortlaufende Überwachung der Gehalte an Mikroorganismen, insbesondere relevanter Legionellenpopulationen, im Umlaufwasser. Da der Freisetzungspfad der Mikroorganismen als Aerosol mit der Fortluft der VKA als besonders gefährdungsrelevant angesehen werden kann, wurden im Vorhaben *LegioAir* diesbezügliche Freisetzungsmechanismen untersucht. Im Fokus standen die Erarbeitung aussagekräftige Probenahme- und Bestimmungsmethoden für das Ausbruchmanagement an zwangsbelüfteten Anlagen mit weniger als 200 MW Kühlleistung. Dazu sollten handhabbare Verfahren zur Aerosolprobenahme am Auslass der Verdunstungskühlanlagen in Kombination mit einer schnellen Analytik als der Kultivierungsmethode abgeleitet und kombiniert werden. Versuchsstände im Labor- bzw. Technikumsmaßstab sollten aufgebaut werden, um Analysemethoden zu entwickeln und eine Tropfenfreisetzung ausgehend von Bauteilen untersuchen zu können.

Bei der TUM wurden kulturunabhängige Methoden zur schnellen Quantifizierung von Legionellen bzw. Gesamtheit der Bakterien in Bioaerosolen etabliert. Die allgemeine und biologische Sammeleffizienz der Bioaerosolsammler Coriolis μ als Nasszyklon-sammler und Next Generation Impactor (NGI) als mehrstufiger Impaktionssammler wurde erstmalig mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu werden DNA-interkalierende Farbstoffe PI und Syto9 mit den Proben inkubiert, um die Gesamtzellzahl bzw. Intaktzellzahl zu bestimmen. Der Coriolis μ erreicht bei einer Flussrate von 300 mL/min eine sehr hohe biologische Sammeleffizienz von $90 \pm 10 \%$. Der NGI zeigte bei einer Flussrate eine allgemeine Sammeleffizienz von $95 \pm 12 \%$ und eine biologische Sammeleffizienz von $60 \pm 17 \%$. Der NGI weist je Sammelstufe eine spezifische Zahl an Zutrittsdüsen mit jeweils spezifischem Durchmesser auf. Bei Durchflussraten zwischen 30 L/min und 100 L/min ergeben sich somit sieben Trennstufen entsprechend aerodynamischen Partikeldurchmessern von 11 μm bis 0,24 μm . Mit der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die meisten Bioaerosole einen Durchmesser von 2 – 0,7 μm haben. Bei Verwendung der eigens hierzu entwickelten Dispergierarbeit zeigte sich, dass die meisten Bioaerosole schon in der ersten Stufe abgetrennt bzw. gesammelt werden. Dies scheint plausibel, weil die feuchten

Bioaerosole eher größere Durchmesser aufweisen als die trockenen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit der Dispergiereinheit im NGI mit $90 \pm 7 \%$ eine höhere biologische Sammeleffizienz erreicht werden kann.

Für die kulturunabhängige Quantifizierung von *Legionella pneumophila*-haltigen Bioaerosolen wurde eine qPCR von Hygenia und eine Immunomagnetische Separation gekoppelt mit Durchflusszytometrie (IMS-FCM) der Firma qmicro charakterisiert. Die Nachweisgrenze für *L. pneumophila* Sg 1 im Bioaerosol lag für IMS-FCM bei 4.0 ± 10^3 Zellen m^{-3} Probengasvolumen (TLC) und 5.8 ± 10^3 Zellen m^{-3} (ILC) und für qPCR bei 9.5 ± 10^2 Zellen m^{-3} (TLC) und 7.8 ± 10^2 Zellen m^{-3} (ILC). Es zeigte sich dabei, dass die Wiederfindung mit $63 \pm 14 \%$ (ILC) bei IMS-FCM höher ist als bei qPCR ($42 \pm 16 \%$ (ILC)). Die Aerosolbestimmung von *Legionella* spp. über Kultivierung erreichte mit 1.5 ± 10^3 Zellen m^{-3} eine ähnliche Nachweisgrenze. Die Wiederfindung der kultivierbaren Zellen lag jedoch bei $31 \pm 18 \%$. Dies zeigt, dass IMS-FCM für die Quantifizierung von *Legionella pneumophila* eine schnelle und nachweisstarke Methode ist, welche die Anwesenheit von lebenden *L. pneumophila* besser widerspiegelt als eine Kulturmethode.

Für die Serotypisierung von *L. pneumophila* Sg1-haltigen Bioaerosolen wurde der LegioTyper angewendet, welcher über einem Sandwich-Microarray-Immunoassay das Dresden Panel abbildet. Es zeigte sich, dass eine Subtypisierung von *L. pneumophila* Sg1 erst ab einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml möglich ist. Dies bedeutet, dass nur bei hohen Kontaminationen in einer Anlage eine direkte Subtypisierung möglich wäre. Es ist daher zielführender, im Ausbruchsfall eine Schnell-Subtypisierung mittels LegioTyper nach Kultur durchzuführen, ohne die Bestätigung der Kulturoisolate auf *Legionella* spp. per Kultur abzuwarten. Für eine schnelle kulturunabhängige Quantifizierung von *L. pneumophila* im Bioaerosol, im Prozesswasser oder im Biofilm kann die IMS-FCM von qmicro verwendet werden, alternativ auch eine qPCR.

Im Rahmen des Vorhabens wurde bei FE 1 eine zweiteilige Laboranlage konzipiert und aufgebaut, in der das Biofilmwachstum unter Bedingungen einer realen Verdunstungskühlanlage in der Zweiphasenatmosphäre sowie im Umlaufwasser auf Testoberflächen sowie die Tropfenaerosolprobenahme untersucht werden kann. Die Anlage ist gezielt temperierbar und bei variablen Umlaufvolumenströmen für Gas und Umlaufwasser betreibbar. Die Anlage wurde zur Etablierung und Erprobung von kultur-

unabhängigen Nachweisverfahren auf Basis von IMS-FCM zur schnellen Quantifizierung von *Legionella pneumophila* in Bioaerosolen nach Bioaerosolsammlung genutzt. Die Aerosolsammlung erfolgte mittels Zyklonabscheider, Impaktion sowie Impingement. In der Laboranlage konnte die Wirkung von Bioziden, die in Verdunstungskühlanlagen eingesetzt werden, in Abhängigkeit der Bildung eines Biofilms oder die Anwesenheit von Amöben untersucht werden. Hier zeigte sich, dass mit IMS-FCM nach Biozidbehandlung lebende *L. pneumophila* im Prozesswasser zu finden sind, die aber per Kultur nicht nachweisbar sind. Es zeigte sich, dass ein Biofilm eine wichtige Rolle vor allem bei der Verbreitung von *L. pneumophila* auch in Verdunstungskühlanlagen einnimmt, da in den durchgeführten Untersuchungen gezeigt wurde, dass ein Schutzeffekt für Legionellen auftritt. Auch scheinen Amöben einen positiven Einfluss auf die Überlebensraten von Legionellen zu haben, was bei der Risikoabschätzung in Kühlanlagen beachtet werden sollte. Die chemische Zusammensetzung der beiden untersuchten Biozide zeigte starke Unterschiede in der Wirksamkeit, weswegen zukünftig weitere Untersuchungen, besonders im Hinblick auf nichtkulturunabhängige Methoden, mit allen eingesetzten Bioziden notwendig sind, um eine Übersicht zu erhalten, welches Regrowth-Potential einzelne Biozide in den Verdunstungskühlanlagen haben. Nur so können zukünftig optimale Hygienebedingungen bei möglichst geringem Biozideinsatz gewährleistet werden.

Um die Bioaerosolfracht am Luftaustritt von Verdunstungskühlanlagen zu bestimmen, ist mindestens die Austrittsgeschwindigkeit der Fortluft und der darin enthaltene Gehalt an Mikroorganismen zu bestimmen. Sollen diese Größen in Verbindung zur emittierten Tropfenmasse und zum Gehalt an Mikroorganismen im Umlaufwasser gebracht werden, ist zusätzlich noch der Tropfenmenge im Fortluftstrom zu bestimmen. Aufgrund der Größe der Fortluft-Austrittsfläche bei VKA sind diese Größen im Rahmen einer Netzmessung zu erfassen. Bei den häufig anzutreffenden Anlagen mit saugend angeordnetem Gebläse ist dies ebenfalls erforderlich, da in Abhängigkeit vom radialen Abstand der Rotorachse lokal deutlich verschiedene Austrittsgeschwindigkeiten und damit Austrittsvolumina gegeben sind. Die Durchführung dieser - insbesondere bei vertikal-tangential gerichteter Strömung - in Summe zeitaufwändigen Messungen konnte durch Geräteentwicklungen bei FE 1 zur Mehrrichtungs-Strömungsmessung und Verbesserung der Sammeleffizienz bei der isokinetisch-isoaxialen Tropfen-Probenahme deutlich vereinfacht werden.

Vom Gasstrom durch die Rieselpakete und Tropfenabscheider mitgerissene Primärtropfen weisen in erster Näherung dieselbe Legionellenpopulation auf wie das Umlaufwasser. In Abhängigkeit von der Transportgeschwindigkeit ist aber auch die Freisetzung sogenannter Sekundärtropfen möglich, die sich von Oberflächen und Bauteilen ablösen können und ggf. aufgrund dortiger lokal ausgebildeter Organismengemeinschaften in Konzentration und Zusammensetzung vom Umlaufwasser abweichen können. In einem weiteren Teil des Vorhabens erfolgte daher die Konzeption, der Aufbau und die Inbetriebnahme einer Technikumsanlage zur systematischen Untersuchung von Einflussparametern der Bioaerosolfreisetzung aus Verdunstungskühlanlagen sowie zur Validierung einer adäquaten Probenahme.

Im Labor- bzw. Technikumsmaßstab wurde mittels dieser Anlagen bei FE 1 die Tropfenfreisetzung ausgehend von verschiedenen Oberflächengeometrien in Abhängigkeit von der Gasgeschwindigkeit untersucht. Die Geometrien wurden von innen heraus mit Wasser benetzt und der abluftseitig auftretende Tropfengehalt mit verschiedenen Methoden erfasst. Als Geometrien kamen eine eher spitze Kante (in Analogie zu einem Rotorblatt), eine unstetiger 90-Grad-Winkel (in Analogie zu einem Diffusor oder einem Motorgehäuse) sowie eine nassfeuchte, schwamm- bzw. gelartige Struktur (analog Biofilm-Surrogat) zum Einsatz. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass für die spitze Kante ab Überströmgeschwindigkeiten von 12,5 m/s eine Tropfenablösung auftritt. Diese Relativgeschwindigkeiten können sehr wohl an Rotorblättern im Betrieb auftreten. Die Tropfen-Abwurfrichtung ist aufgrund der Rotorausrichtung primär gegen die Diffusorwand gerichtet, so dass die direkte Freisetzung in Richtung des Fortluft-Austritts eher weniger relevant scheint. Geschwindigkeiten Für die unstetige 90-Grad-Erweiterung tritt die Ablösung Bei Überströmungsgeschwindigkeiten oberhalb ca. 15 m/s auf. Für die nassfeuchte schwammartige Struktur sind nochmals höhere Geschwindigkeiten von ca. 20 m/s erforderlich, um hier Tropfen abzulösen.

Realprobenahmen wurden u. a. an einer Verdunstungskühlanlage auf dem Forschungscampus der TU München in Garching im Januar 2023 durchgeführt, um das Gesamtverfahren aus der Kombination von Probenahmeverfahren und Analytik in der Praxis zu evaluieren. Nach erfolgreicher Probenahme zeigte sich, dass alle Legionellen-Messungen in Luft- und Wasserproben mittels IMS-FCM und Kultivierung

negativ ausfielen. Zum Zeitpunkt der Messkampagne konnte kein Nachweis dahingehend geführt werden, dass Legionellen mit der Fortluft freigesetzt werden. Bei der Probenahme an einer weiteren Anlage kam allein das Kultivierungsverfahren zum Einsatz. Die vorliegenden Messdaten zeigen Möglichkeiten der Zuordnung der Emissionsfracht zu Primär- und Sekundärtropfen auf.

Eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Anlagenarten ist Bestandteil eines geplanten Folgeprojektes.

5 Verwendung der Zuwendung

FE 1:

Die Durchführung der beschriebenen Untersuchungen erfolgte im Berichtszeitraum durch wissenschaftlich-technisches Personal (HPA A) (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplanes) im Umfang von insgesamt 20,4 PM sowie durch Personal mit dem Ansatz HPA B im Umfang von insgesamt 20,4 PM.

Eine kostenneutrale Verlängerung war aufgrund der umfangreichen zeitlichen Verzögerungen bedingt durch die Auflagen der Stabsabteilung für „Arbeitssicherheit“ und durch die langen Versuchszeiten notwendig und ist entsprechend der erfolgten Beantragung seitens des Projektträgers genehmigt worden.

FE 2:

Die Durchführung der beschriebenen Untersuchungen erfolgte im Berichtszeitraum durch wissenschaftlich-technisches Personal (HPA A, Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplanes) im Umfang von insgesamt 18 PM. Eine kostenneutrale Verlängerung war aufgrund der umfangreichen zeitlichen Verzögerungen und durch die langen Versuchszeiten notwendig und ist entsprechend der Beantragung genehmigt worden.

Ein lt. Antragstellung vorgesehener Hochdruckradialventilator wurde beschafft und in einen ebenfalls aufgebauten horizontalen Ringkanal integriert. Um aufgetretene Mehrkosten gegenüber dem bewilligten Betrag abzudecken, wurden bewilligte

Mittel für einen Frequenzumrichter umgewidmet und ein vorhandener älterer Frequenzumrichter zur Verwendung ertüchtigt.

Aufgrund der veränderten Aufbaubedingungen für die Technikumsanlage war die Beschaffung einer Rohrleitung in der beantragten Form DN300 PVC-transparent nicht erforderlich. Aufgrund des erhöhten Aufwandes für die wiederholte Umpflanzung, wurden die Mittel gemäß Änderungsantrag in Personalmittel umgewidmet.

6 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Ausgaben waren für die Durchführung der geleisteten Arbeiten notwendig und angemessen. Die durchgeführten Arbeiten stellen die Umsetzung der im Forschungsantrag vorgesehenen Arbeitsschritte dar und waren für die Erreichung des Forschungsziels wichtig. Die geleisteten Arbeiten waren zur Bearbeitung der genannten Arbeitspakete erforderlich.

7 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU

Wissenschaftlich-technischer Nutzen

- 1 Die bei FE 1 und FE 2 im Rahmen des Projektes konzipierten Versuchsanlagen können im Anschluss des IGF-Vorhabens gemeinsam mit KMUs für weitere Untersuchungen im Rahmen von z. B. ZIM-KF-Projekten genutzt werden. So kann an der Labor-VKA der FE 2 beispielsweise die Wirkung verschiedener oxidativ und nicht oxidativ wirksamer Biozide auf die Legionellenkonzentration im Umlaufwasser sowie im Biofilm in Kombination mit der Freisetzung von Bioaerosolen untersucht werden. Die Technikumsanlage der FE 1 kann zur Auslegung von Tropfenabscheidern, Düsen oder anderen Kühlturmkomponenten eingesetzt werden.
- 2 Bei FE 1 wurden zahlreiche Fragestellungen in Bezug auf die adäquate Probenahme aufgegriffen, die bislang nicht abschließend beantwortet werden konnten. Die in diesem Rahmen vorgenommenen technischen Neuentwicklungen zur

Fortluft-Geschwindigkeitsmessung und emissionsseitiger Aerosolsammlung mittels Nasszyklon sowie Anpassungen an bisher praktizierten ProbenahmeprozEDUREN tragen dazu bei, dass zukünftig die Messaufgabe „Bioaerosolmessung am Auslass von VKA“ effizient durchgeführt werden kann.

- 3 Die vorliegenden Erfahrungen zeigen die Bedeutung der verschiedenen, im Rahmen einer Aerosolmessung per Netzmessung im Messquerschnitt zu erfassenden Größen auf (Gasgeschwindigkeit, Tropfenspektrum, Mikroorganismengehalt je m³ bzw. mL Tropfenaerosol).
- 4 Es konnten Daten zur Beurteilung des Tropfenmittrisses ausgehend von mit einem Wasserfilm benetzten Oberflächengeometrien in einem Luftstrom gewonnen werden, die stellvertretend Bauteilgeometrien im austrittsnahen Fortluftbereich an Verdunstungskühlanlagen repräsentieren. Ausgehend von diesen Erfahrungen sind weitergehende Analysen geplant, z. B. im Hinblick auf speziell bei VKA anzutreffende Oberflächen- oder Fluideigenschaften (Viskosität des flüssigen Mediums, Alterung von Bauteiloberflächen über die Einsatzdauer),

Wirtschaftlicher Nutzen

- 5 Im Projekt wurde eine Bioaerosolkammer für Legionellen-Untersuchungen unter Bio2-Bedingungen etabliert, welche zukünftig generell für Bioaeroluntersuchungen mit Pathogenen eingesetzt werden kann. Weiterführende Experimente können mit Kooperationspartnern aus Wirtschaft und Wissenschaft bei TUM-IWC zukünftig durchgeführt werden.
- 6 Die Bioaerosolsammler Coriolis μ und NGI sind auf allgemeiner und biologischer Sammeleffizienz charakterisiert und können zukünftig für weitere Bioaerosoluntersuchungen eingesetzt werden.
- 7 Kulturunabhängige Antikörper-basierte und molekularbiologische Schnellmessmethoden sind für die Quantifizierung von Legionellen-Bioaerosole etabliert worden und können zukünftig zusammen mit Kooperationspartnern der Wirtschaft und Wissenschaft für weiterführende Projekte genutzt werden. TUM-IWC hat nun eine ausgewiesene Expertise im Bereich der Bioaerosolanalytik von Legionellen.
- 8 Erste kulturunabhängige Wirksamkeitsuntersuchungen von Bioziden im Prozesswasser wurden in Zusammenhang mit Legionellen und Biofilmen mittels Durchflussszytometer durchgeführt. Diese Messmethode hat großes Potential, um Biozide hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in Verdunstungsanlagen besser einschätzen zu

können und ist für die Einhaltung des Minimierungsgebot von Biozide in der Industrie förderlich.

- 9 Es wurde eine neuartige Biofilmkammer konzipiert und getestet, bei denen Biofilme in Rieselkammern in Anwesenheit von Bioziden, Legionellen und oder Amöben untersucht werden können.
- 10 Die gewonnenen Erkenntnisse geben erste Hinweise auf die Freisetzungsmechanismen von Sekundärtropfenaerosolen, die in die Anlagenauslegung einfließen können.
- 11 Kommt es an einer Anlage zu einem Legionellenausbruch und infolge dessen nachweislich zu Erkrankungen im Umfeld der Anlage, kann dies für den Anlagenbetreiber einen nicht unerheblichen Imageschaden darstellen, der nur schwer monetär zu bewerten ist. Die etablierten neuen Methoden und der erweiterte Stand der Wissenschaft und Technik können dazu beitragen, das Potential eines Ausbruches zu reduzieren. Die gewonnenen Erkenntnisse können Anlagenbetreiber dabei unterstützen, die Wirksamkeit von Maßnahmen in Folge einer erhöhten Mikrobiologie zu überprüfen (siehe auch VDI 4250 Blatt 2)..

8 Aktualisierter Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

8.1 Durchgeführte Transfermaßnahmen

Maßnahme	Ziel	Zeitraum
regelmäßige Sitzungen, projektbegleitender Ausschuss	Diskussion und Wissenstransfer zu KMU, Impulse aus der Wirtschaft	Erfolgt am 05.05.2021, 1.4.2022, 18.4.2023 sowie 18.03.2024
Veröffentlichung der aktuellen Aktivitäten und Ergebnisse auf den Webseiten der FE	Wissenstransfer zu interessierten Personen	Erfolgt mit https://www.iuta.de/forschung/aerosole-partikel/aerosole/freisetzung-transport-transformation-von-partikeln-partikelinhaltsstoffen-2
Akademische Lehrveranstaltungen	Fachliche Ausbildung von Studierenden vor ihrem Eintritt ins Berufsleben	Betreuung von Bachelor-/Masterarbeiten bei IUTA, erfolgreich erfolgt 30.05.2023 (M. Mielke) sowie 30.09.2024 (D. Knorsch)
Akademische Lehrveranstaltungen	Promotionsverfahren	Erfolgreich erfolgt an der TU München Institute of Water Chemistry & Chair of

Maßnahme	Ziel	Zeitraum
		Analytical Chemistry and Water Chemistry 2024 (L. Heining)
Vorträge, Poster:	Information interessierter Personen aus Wissenschaft und Forschung, Diskussion der Ergebnisse	SETAC Umwelttagung, 07.-08.09.2021 Medical Biodefense Conference, 29.09.-01.10.2021 Dresdner Sensor Symposium, 06.-08.12.2021 European Aerosol Conference EAC 2021, 30.8.-3.9.2021 IFA-Seminar B2, Forum Biostoffe, 08.12.2021 VDI-Fachtagung „Legionellen aus Rückkühlwerken“, 22. und 23.02.2022, Würzburg (Vortrag) VDI-Fachtagung „Emissionsminderung 2022“, 4.-5. Mai 2022, Nürnberg (Vortrag) Wassertagung, 23.-25.05.2022 (Poster) ANAKON Konferenz, 11.-14.04.2023, Wien (Poster) EAC European Aerosol Conference, 03.-08.09.2023 2023, Spanien (Poster) Jahrestreffen Dechema-Fachgruppe Mehrphasenströmung und Partikelmesstechnik, Paderborn 29.03.2023 VDI Expertenforum „Messen und Bewerten von Bioaerosolen und Legionellen in der Außenluft“, Freising bei München, 20.04.2023 VDI-Fachtagung „Emissionsminderung 2024“, Nürtingen, 03.06.2024
Mitwirkung in VDI-Richtlinienausschüssen, z. B. NA 134-03-07-03 UA: Probenahme von Bioaerosolen, Erzeugung von Biotestaerosolen	Wissenstransfer zu interessierten Personen und beteiligten Gruppen, Forschungsvernetzung	Normenausschuss NA 134-03-07-03 UA Unterausschuss „Probenahme von Bioaerosolen und Erzeugung von Biotestaerosolen“ Normenausschuss NA 134-03-07-12 UA Unterausschuss Ausbruchmanagement Legionellen im Arbeitskreis NA 134-03-07-12-02 AK – Gefährdungsbeurteilung Legionellen (VDI 4250 Blatt 2)
Veröffentlichung in Fachzeitschriften	Wissenstransfer	Forschungsartikel in internationalen peer-reviewed Journalen: Heining et al., 2023 in Analytical and Bioanalytical Chemistry

Maßnahme	Ziel	Zeitraum
		Heining et al., 2025 in Journal of Aerosol Sciences Januar: Einreichung Forschungsartikel bei Analytical Chemistry VDI-Berichte 2397 (2022), S. 53 – S. 66. Düsseldorf 2022) Weitere (Aerosol Science, Analytical Chemistry, Analytical and Bioanalytical Chemistry)
Veröffentlichungen in Hauszeitschrift IUTA aktuell	Wissenstransfer	Erfolgt in IUTA aktuell 2021-01
Internet-Steckbrief zur tropfen- und Bioaerosol-Probenahme	Wissenstransfer, Information interessierter Kreise	Erfolgt, vgl. https://www.iuta.de/dienstleistungen/

8.2 Geplante Transfermaßnahmen

Maßnahme	Ziel	Zeitraum
Veröffentlichung des Abschlussberichtes auf den Webseiten der MV	Wissenstransfer	2. Halbjahr 2025
Veröffentlichung in Fachzeitschriften	Wissenstransfer	Biofouling (eingereicht, im Review-Verfahren befindlich) Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft (geplant)
IUTA-Hauszeitschrift	Information eines breiten Fachpublikums zu Zielen und Ergebnissen des Projektes	2. Halbjahr 2025
Information und Beratung interessierter Unternehmen	Direkter Know-How-Transfer zu Unternehmen, vornehmlich kmU; Information zu Zielen und Ergebnissen des Projektes	Erfolgt fortlaufend
Normenausschuss	Einfließen der Projektergebnisse in die Normungsarbeit	fortlaufend durch den Projektleiter der FE 1 und FE 2

Maßnahme	Ziel	Zeitraum
Information und Beratung interessierter Unternehmen	Direkter Know-How-Transfer zu Unternehmen, vornehmlich kmU; Information zu Zielen und Ergebnissen des Projektes	Gezieltes Ansprechen und Information von interessierten Unternehmen außerhalb und innerhalb des PA; Übersenden von Projektübersichten. fortlaufend
Vorträge und Poster	Direkter Know-How-Transfer zu Unternehmen, vornehmlich kmU; Information zu Zielen und Ergebnissen des Projektes	Gezieltes Ansprechen und Information von interessierten Unternehmen und wissenschaftlichen Fachkreisen außerhalb des PA; Übersenden von Projektübersichten. fortlaufend

9 Einschätzung der Realisierbarkeit dieses Transferkonzepts

Über die durchgeführten und geplanten Transfermaßnahmen, wie PA-Sitzungen, Konferenzbeiträge, Veröffentlichungen usw., wurden die Unternehmen, die im Bereich der Hygienekontrolle von Verdunstungskühlanlagen tätig sind, gezielt angesprochen. Dabei erfolgt insbesondere der Hinweis auf die Durchführungsmöglichkeit von Untersuchungen zu Tropfenmitrisseffekten bei der Bauteilentwicklung sowie zur Testung von Biozidprodukten an den bei den Forschungspartnern vorhandenen Versuchsständen.

Unternehmen, die Produkte sowie Dienstleistungen für den genannten Bereich anbieten, können damit von den Ergebnissen des IGF-Projektes profitieren.

Die im Projekt gewonnen Erkenntnisse werden durch die Projektmitarbeitende der Forschungsstellen 1 und 2 unmittelbar in die entsprechenden Normungsgremien eingebracht. Hier sind insbesondere zu nennen

- Normenausschuss NA 134-03-07-12 UA Unterausschuss Ausbruchsmanagement Legionellen im Arbeitskreis NA 134-03-07-12-02 AK – Gefährdungsbeurteilung Legionellen (VDI 4250 Blatt 2)
- Normenausschuss NA 134-03-07-03 UA Unterausschuss „Probenahme von Bioaerosolen und Erzeugung von Biotestaerosolen“

Die erfolgte Präsentation von Projektergebnissen auf Tagungen sowie als peer-reviewte wissenschaftliche Publikationen oder als anwendernahe, industrieorientierte Publikation trägt zusätzlich zur Sichtbarkeit der erzielten Projektergebnisse bei.

Die Projektergebnisse sind in folgende Tagungsbeiträge und Publikationen eingeflossen:

1) Wissenschaftliche Publikationen

Heining, L., Welp, L., Hugo, A., Seidel, M. A trickling biofilm chamber to assess biocide efficiency in biofilms. Biofouling, Submission ID 245043016, eingereicht, in Review-Verfahren befindlich

Heining, L., Welp, L., Hugo, A., Elsner, M., Seidel, M. Immunomagnetic separation coupled with flow cytometry for the analysis of *Legionella pneumophila* in aerosols. Anal Bioanal Chem 415, 5139–5149 (2023)

Heining, L., Welp, L., Hugo, A., Elsner, M., Seidel, M. Bioaerosol sampling and bioanalysis: Applicability of the next generation impactor for quantifying *Legionella pneumophila* in droplet aerosols by flow cytometry. Journal of Aerosol Science, Volume 183, 2025, 106460, ISSN 0021-8502, <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2024.106460>.

Welp, L., Hugo, A., Neue Bewertungsmethodik der Hygiene von Verdunstungskühlanlagen im Hinblick auf Legionellen Immissionsschutz 26. Jahrgang, Juni 2021, S. 100

Hugo, A., Welp, L., Haep, S., Bioaerosolabscheidung - Probenahme von Legionellen am Auslass von Verdunstungskühlanlagen (VKA). VDI-Berichte 2397 (2022), S. 53 – S. 66. Düsseldorf 2022. ISBN 978-3-18-092397-0

Bewertung der Hygiene von Verdunstungskühlanlagen im Hinblick auf Legionellen. IUTA-aktuell 2021-01

2) Vorträge auf Fachtagungen bzw. Posterpräsentationen:

Welp, L., Hugo, A., Haep, S. Experience with aerosol sampling from evaporative cooling systems - physical aspects. European Aerosol Conference EAC 2021, 30.8.-3.9.2021 (Vortrag)

Heining, L., Welp, L., Hugo, A., Seidel, M. Entwicklung von Sammel- und Analysestrategien für *Legionella pneumophila* in Aerosolen aus Verdunstungskühlanlagen SETAC Umwelttagung, 07.-08.09.2021 (Poster)

Heining, L., Welp, L., Hugo, A., Elsner, M., Seidel, M. Bioaerosol chamber for directed experiments with *Legionella pneumophila*. Medical Biodefense Conference, 29.09.-01.10.2021 (Poster)

Heining, L., Welp, L., Hugo, A., Elsner, M., Seidel, M. Analyse von *Legionella pneumophila* in Aerosolen aus Verdunstungskühlanlagen mittels einer flussbasierten Microarray-Plattform. Dresdner Sensor Symposium, 06.-08.12.2021 (Poster)

Welp, L., Hugo, A., Haep, S., Heining, L., Seidel, M., Bioaerosolprobenahme an Verdunstungskühl-anlagen mittels Zyklonabscheider B2-Seminar, Forum Biostoffe, Institut für Arbeitsschutz (IFA), Sankt Augustin, 08. – 09.12.2021

Welp, L., Hugo, A., Haep, S. Probenahme von Bioaerosolen am Auslass von Verdunstungskühlanlagen (VKA) mittels Nass-Zyklonabscheider. VDI-Fachtagung „Legionellen aus Rückkühlwerken“, 22. und 23.02.2022, Würzburg (Vortrag)

Welp, L., Hugo, A., Haep, S. Bioaerosolabscheidung - Probenahme von Legionellen am Auslass von Verdunstungskühlanlagen. VDI-Fachtagung „Emissionsminderung 2022“, 4.-5. Mai 2022, Nürnberg (Vortrag)

Heining, L., Welp, L., Hugo, A., Elsner, M., Seidel, M. Combination of immunomagnetic separation with flow cytometry for the detection of *Legionella pneumophila* in aerosols ANAKON Konferenz, 11.-14.04.2023, Wien (Poster)

Welp, L., Hugo, A., Haep, S., Neue Methoden zur Probenahme von Bioaerosolen aus Anlagen VDI Expertenforum „Messen und Bewerten von Bioaerosolen und Legionellen in der Außenluft“, Freising bei München, 20.04.2023

Heining, L., Welp, L., Hugo, A., Elsner, M., Seidel, M. Combination of the cyclone sampler Coriolis® µ with different quantitative analytical methods for the detection of *Legionella pneumophila* in aerosols. EAC European Aerosol Conference, 03.-08.09.2023 2023, Spanien (Poster)

Mielke, M., Welp, L., Hugo, A., Haep, S., Datensynthese zum Training eines Mask-RCNN Modells für die automatisierte Analyse von Impaktorplatten Jahrestreffen Dechema-Fachgruppe Mehrphasenströmung und Partikelmessstechnik, Paderborn 29.03.2023 (Poster)

Welp, L., Hugo, A., Haep, S., VKA Control - Bewertung von Legionellenemissionen aus Verdunstungskühlanlagen: Neue Erkenntnisse und Methoden, 7. VDI-Fachtagung Emissionsminderung 2024, Nürtingen, 03.06.2024

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schema von geschlossenem und offenen Nasskühler []	11
Abbildung 2	Tropfenemission aus unterschiedlichen Quellbereichen am Auslass einer Kühlzelle mit saugend angeordnetem Ventilator	14
Abbildung 3	Anlagenskizze: Funktionseinheiten der Laboranlage und Stoffflüsse	18
Abbildung 4	Anlagenskizze: Technikumsanlage mit Luftstrom-Konditionierung	21
Abbildung 5	Abluftführung Glasanlage, Tropfenfang und Rotameter zur Kontrolle des Gasvolumenstroms	26
Abbildung 6	Bioaerosol-Wachstumschamber, Glasanlage	26
Abbildung 7	Halterungen mit eingesetzten Glasplatten	26
Abbildung 8	Untersuchung der volumenbezogenen Tropfenverteilung für eine Labor-Zweistoffdüse und einen medizinischen Aerosolerzeuger	27
Abbildung 9	Zusammenhang Heizungstemperatur und Zieltemperatur der Laboranlage	27
Abbildung 10	Gesamtanlage der Biowachstumschamber	28
Abbildung 11	Dispergiereinheit	29
Abbildung 12	Flüssigkeitsbilanz über die Dispergiereinheit bei Variation des Vordrucks an der Zweistoffdüse (Gasdurchsatz)	30
Abbildung 13	Technikumsanlage: Einbaumöglichkeit Tropfenabscheider und Einbaukörper (links) sowie Wassereindüsung (rechts)	31
Abbildung 14	Tropfenfang für aus dem Probenahmesystem ablaufendes Fluid	32
Abbildung 15	Fraktionsabscheidegrad der zur Emissionsprobenahme angefertigten Rohbogens	33
Abbildung 16	Ergebnisse Gasgeschwindigkeitsmessung	35
Abbildung 17	Messaufbau zur Untersuchung der im Bioaerosolsammler aufgefangenen Tropfenmenge mit und ohne Tropfenfang – Foto und schematischer Aufbau	36
Abbildung 18	Mit Coriolis® μ -Sammler aufgefangene Tropfenmengen mit und ohne Tropfenfang	37
Abbildung 19	Impaktionssonde zur Erfassung der Anzahl-Größenverteilung eines Tropfenkollektivs	39
Abbildung 20	Tropfenspektrum eines Tropfenaerosols in der Dispergiereinheit gemessen mit zwei Messverfahren (Impaktionsverfahren und Hitzdrahtverfahren)	40
Abbildung 21	Tropfenspektrum, gemessen am Auslass einer Verdunstungskühlanlage	41

Abbildung 22	Versuchsaufbau zur Untersuchung der Tropfenablösung	43
Abbildung 23	Einbaukörper Biofilm-Surrogat (Schwamm“), Unstetigkeit („Verjüngung“) sowie (Rotorblatt-)Kante	44
Abbildung 24	Wellenlängenabhängige Absorption vom Uranin	45
Abbildung 25	Lineare Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion für wässrige Uranin-Lösungen (Absorption bei 477 nm)	45
Abbildung 26	Vorversuche: Tropfenfreisetzung aus dem wassergesättigten Schwammkörper ab 18,5 m/s	46
Abbildung 27	Tropfenbeladung der mit wassersensitivem Papier beschichteten Platten der Untersuchungen an der (Ventilator-)Kante	47
Abbildung 28	Ergebnisse – Freisetzung von Sekundärtropfen von der Kante	48
Abbildung 29	Ergebnisse – Freisetzung von Sekundärtropfen ausgehend von einer Verjüngung/Unstetigkeit	49
Abbildung 30	Ergebnisse – Freisetzung von Sekundärtropfen aus dem Biofilm (Schwammmaterial)	49
Abbildung 31	Bild der Bioaerosolkammer an der TU München	50
Abbildung 32	Einfluss der Reinigung mit Ethanol und VE-Wasser des Coriolis® μ zwischen einzelnen Sammelvorgängen	53
Abbildung 33	Sammeleffizienzen bei unterschiedlichen Sammelflüssigkeitsmengen (Anzahl der Wiederholungen $n = 3$)	54
Abbildung 34	Sammeleffizienzen bei Verwendung unterschiedlicher Arten von Sammelflüssigkeiten ($n = 3$)	54
Abbildung 35	Sammeleffizienzen bei Verwendung unterschiedlicher Flussraten ($n = 3$)	54
Abbildung 36	Auftragung der relativen Luftfeuchtigkeit (in %) gegen den Verlust an Sammelflüssigkeit (in mL)	55
Abbildung 37	Abbildung des Aufbaus des Next-Generation-Impactor (NGI) []	56
Abbildung 38	Sammeleffizienzen des NGI für verschiedene Flussraten ($n = 3$)	57
Abbildung 39	Sammeleffizienzen des NGI für verschiedene Sammelzeiten ($n = 3$)	58
Abbildung 40	Größenverteilung der Gesamtzellzahl (TCC, oben) und Intaktzellzahl (ICC, unten) in den einzelnen Stufen des NGI für vier verschiedene Flussraten ($n = 3$)	60
Abbildung 41	Größenverteilung der Gesamtzellzahl (TCC, oben) und Intaktzellzahl (ICC, unten) in den einzelnen Stufen des NGI für vier verschiedene Flussraten unter Verwendung der Dispergiereinheit ($n = 3$)	62

Abbildung 42 Sammeleffizienzen des NGI für verschiedene Sammelzeiten unter Verwendung der Dispergiereinheit (n = 3)	63
Abbildung 43 Sammeleffizienzen des Coriolis® μ für verschiedene Flussraten unter Verwendung der Dispergiereinheit (n = 3)	64
Abbildung 44: Sammeleffizienzen des AGI-30 für verschiedene Sammelzeiten (n = 3)	65
Abbildung 45: Vergleich der Sammeleffizienzen der drei getesteten Sammler (n = 4 - 6)	67
Abbildung 46 Anteil an VBNC-Zellen der drei getesteten Sammler (n = 3)	67
Abbildung 47: Aufbau der Microarray-Chips	70
Abbildung 48 Schematische Darstellung des Aufbaus des Chemilumineszenz-Sandwich-Microarray-Immunoassays (CL-SMIA)	70
Abbildung 49: Chip-Aufnahme der CCD-Kamera für <i>L. pneumophila</i> Sg 1 Bellingham mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/mL	72
Abbildung 50: Ergebnisse der CL-SMIA Messungen verschiedener Konzentrationen an <i>L. pneumophila</i> Bellingham (n = 3)	73
Abbildung 51: Schematische Darstellung des Messprinzips mittels IMS-FCM	75
Abbildung 52: Dot-Plot einer IMS-FCM Messung für die Bestimmung von intakten Legionellen	75
Abbildung 53: Korrelation zwischen eingesetzter und gemessener Konzentration für Proben vor und nach Aerosolbildung gemessen mittels IMS-FCM. oben: TLC; unten: ILC (n = 3)	76
Abbildung 54: Korrelation zwischen eingesetzter und gemessenem Ct-Wert für Proben vor und nach Aerosolbildung gemessen mittels qPCR für alle drei analysierten Spezies; oben: TLC; unten: ILC (n = 3)	78
Abbildung 55: Korrelation zwischen eingesetzter und gemessener Konzentration für Proben vor und nach Aerosolbildung gemessen mittels Kultivierung (n = 3)	79
Abbildung 56: Verlauf der gemessenen Werte von ICC und TCC für die ersten 6 Wochen der laufenden Biofilmkammer mit VE-Wasser	83
Abbildung 57: Schematische Darstellung der Extraktion des Biofilms von der Oberfläche eines Glas-Slides	83
Abbildung 58: Schematische Darstellung der einzelnen Ansätze für die Untersuchungen zur Biozid Effizienz für Biofilme	85
Abbildung 59: REM-Aufnahmen des im Sumpf (A) und in der Verrieselung (B) gewachsenen Biofilms, C: Biofilm nach Biozidzugabe, D: Oberfläche nach Biofilmextraktion	86
Abbildung 60: Überlebensraten für Legionellen-Messungen mittels IMS-FCM (links) und Kultivierung (rechts) für Legionellen in Prozesswasser	

(PW), im Biofilm der Verrieselung (Verrieselung) und Biofilm im Sumpf (Sumpf)	87
Abbildung 61: Überlebensraten für Gesamtzell-Messungen mittels DFZ (oben) und Kultivierung (unten links: 22 °C; unten rechts: 37 °C) in Prozesswasser (PW), im Biofilm der Verrieselung (Verrieselung) und Biofilm im Sumpf (Sumpf)	88
Abbildung 62: Verdunstungskühlanlage Garching	91
Abbildung 63: Messpunkte auf einer Halbachse im Messquerschnitt, Angabe der Eintauchtiefe relativ zur Innenseite der Schalldämpferkulissee	92
Abbildung 64: Fixpunktmessung – Verlauf von Fortluft-Kenngrößen Temperatur, Gasgeschwindigkeit und relative Feuchte über eine längere Zeitspanne einer Messkampagne.	92
Abbildung 65: Auswertung Tropfenmessung: (Flüssigkeits-)Beladung, mittlerer Durchmesser und Geschwindigkeit	95
Abbildung 66: Häufigkeitsverteilung Tropfen am jeweiligen Messpunkt, geglättet	95
Abbildung 67: Kumulierte volumetrische Tropfenverteilung an den Messpunkten	96
Abbildung 68: Legionellenbefunde oberhalb der Nachweisgrenze gemessen in der Fortluft-Austrittsfläche einer VKA (5 Messpunkte auf einer Halbachse)	98

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Prüf-, Maßnahme- und Zielwerte gemäß 42. BImSchV [3]	12
Tabelle 2	Strömungsverhältnisse am Auslass von Verdunstungskühlanlagen	19
Tabelle 3	Cut-off-diameters (Trenngrenzendurchmesser) der einzelnen Stufen des NGI für drei unterschiedliche Flussraten.	59
Tabelle 4	Intensitäten für Blankmessungen am MCR mit Ringerlösung (RL) vor und nach der Vernebelung/Sammlung	71
Tabelle 5	LOD und Wiederfindungen für alle drei angewandten Analysemethoden	80
Tabelle 6	Ergebnisse, Messung der lokalen Fortluftgeschwindigkeit an den Messpunkten	94

12 Literatur, Quellen

- 1 <https://enbau-online.ch/heizung-lueftung-elektrizitaet/6-4-kuehlanlagen/> 2024-12-16
- 2 Hahn, S.: Die Umsetzung der 42. BImSchV aus Sicht eines Betreibers. In: VGB PowerTech - International Journal for Electricity and Heat Generation 2018 (2018), 1/2, S. 50–57
- 3 Bundesrat-Drucksache 242/17, 23.03.17: Verordnung der Bundesregierung: Zweiundvierzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider - 42. BImSchV)
- 4 Sinder, Ch.; Ringel, M.; Hardt, H.; Langbein, H. (2020): Legionellenrisiken in Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen - Ursachen und Vermeidung. Berlin, VDE Verlag 2020
- 5 Expertenkommission Legionellen: Bericht der Expertenkommission Legionellen: Im Auftrag des Ministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen. Mai 2015
- 6 Hahn, S.; Lindner, H.; Piepenbrink, O; Czolkoss, W.: Mikrobiologische Emissionen aus Verdunstungskühl-anlagen. In: vgbe energyjournal 8 (2023), S. 46-55
- 7 Richtlinie 2047 Blatt 3: 2018-04. Rückkühlwerke - Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen. Kühltürme über 200 MW Kühlleistung (VDI-Kühlturmregeln). Beuth-Verlag, Berlin
- 8 Wurz, Dieter; Wachter-Wurz, Christine; Hartig, Stefan: Primär-, Sekundär- und Rekondensationstropfen in Nasskühltürmen: Auswirkungen auf die Emission von Mikroorganismen. Frankfurt am Main, 16.06.2016
- 9 Prussin, Aaron J.; Schwake, David Otto; Marr, Linsey C.: Ten Questions Concerning the Aerosolization and Transmission of Legionella in the Built Environment. In: Building and environment 123 (2017), S. 684–695
- 10 Pietsch, Michael: Hygienische Risikobewertung aus medizinischer Sicht (Erfahrungen aus der Umsetzung der 42. BImSchV). Dortmund, 09.05.2019
- 11 Stanton, D.W., Rutland, C-J.: Multi-dimensional modelling of thin liquid films and spray-wall interactions resulting from impinging sprays. International Journal of heat and Mass Transfer 41 (1998) 3337-3054
- 12 Brandl, Helmut; Mandal, Jyotshna: Bioaerosols in Indoor Environment: A Review with Special Reference to Residential and Occupational Locations. In: The Open Environmental & Biological Monitoring Journal (2011), Nr. 4, S. 83–96
- 13 CEN/TS 16115-2. 2016-03. Außenluft - Messen von Bioaerosolen; Deutsche Fassung CEN/TS :2016
- 14 KIRSCHNER, Alexander K. T.: Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? In: Water research 93 (2016), S. 276–288
- 15 Nocker, Andreas; Schulte-Illingheim, Lorenz; Strathmann, Martin; Hugo, Achim; Welp, Laura; Sperber, Oliver: Entwicklung es sensitiven Verfahrens zum routinemäßigen Nachweis von Legionellen in Aerosolen von Verdunstungskühlanlagen: FZK 3716 62 209 0. 2019

- 16 Hugo, Achim; Welp, Laura; Sperber, Oliver; Schulte-Illingheim, Lorenz; Frösler, Jan; Nocker, Andreas: Erfahrungen der Aerosolbeprobung von Verdunstungsrückkühlanlagen bezüglich Probenahme und Legionellenanalytik. In: Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft 79 (2019), Nr. 9
- 17 Hinds, William C: Aerosol Technology. Properties, behaviour, and measurement of airborne particles. 2. Ed., 1999
- 18 <https://www.kldlabs.com/compliance-testing/aerosol-dispersion/>, zuletzt abgerufen 2025-02-27
- 19 Tropfensonde nach VDI 3679, Blatt 3. <https://www.paulgothe.com/VDI-Tropfensonde>, zuletzt abgerufen 2025-02-25
- 20 Richtlinie VDI 3679 Blatt 3, Nassabscheider – Tropfenabscheider. 2019-08. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- 21 May, K. R. (1950). The measurement of airborne droplets by the magnesium oxide method. *Journal of Scientific Instruments*, 27(5), 128
- 22 Mielke, Max: Entwicklung eines automatisierten Analyseverfahrens zur Auswertung von Tropfenmessungen mittels neuronaler Netze am Beispiel des Mask R-CNN Modells. Bachelorarbeit, Institut Maschinenbau, Hochschule Ruhr-West, 2023
- 23 Mahler, D., & Magnus, D. E. (1984). Hot-wire technique for droplet measurements. In *Liquid Particle Size Measurement Techniques*. ASTM International.
- 24 Datenblatt zum DC IV-System “Droplet measurement Technology”. KLD Labs Inc.,
- 25 GELITA MEDICAL, <https://www.gelitamedical.com/Products/Gelita-Spon>. Letzter Zugriff 2024-06-16
- 26 Kirill M. Gerke, Roy C. Sidle, und Dirk Mallants, „Criteria for selecting fluorescent dye tracers for soil hydrological applications using Uranine as an example“, *Journal of Hydrology and Hydromechanics* 61, Nr. 4 (1. Dezember 2013): 313–25, [hSps://doi.org/10.2478/johh-2013-0040](https://doi.org/10.2478/johh-2013-0040).
- 27 <https://www.calameo.com/copleyscientific/read/006693220f5f2991cffed?page=84>, Copley Scientific Ltd. Nottingham, UK
- 28 NGI Model 170 – next Generation Impactor (NGI), Product Information. MSP Corporation, Shoreview, MN, USA
- 29 Richtlinie VDI 4253 Blatt 3, Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft. Aktive Probenahme von Bioaerosolen: Abscheidung von luftgetragenen Bakterien mit Impingern nach dem Prinzip der kritischen Düse. Beuth-Verlag, Berlin, August 2008
- 30 Richtlinie VDI 4257 Blatt 1, Bioaerosole und biologische Agenzien, Messung von Emissionen: Planung und Durchführung von Emissionsmessungen. Beuth-Verlag, Berlin, Mai 2013