

# Abschlussbericht

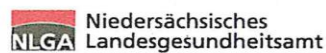
## „Entwicklung von Maßnahmen zur Reduzierung von Legionellen in belebtem Schlamm“

(beauftragt vom Ruhrverband und gefördert vom  
Land Nordrhein-Westfalen)

---

Kennziffer: P 03/13-71 Ar – Zuwendung des Landes NRW

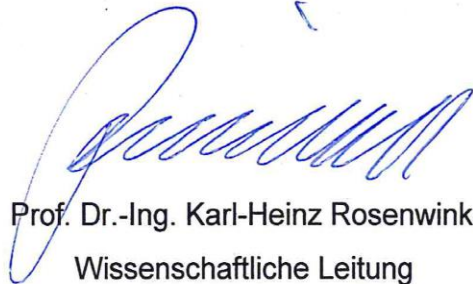
Beteiligte Institutionen:



## Inhaltsangabe und Verantwortliche

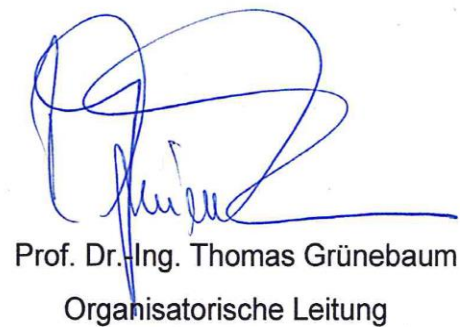
- Kurzzusammenfassung (ISAH, ihph)
- Kommentierung durch das ihph Bonn, Foliensatz
  
- Kapitel 1: Bericht Teilprojekt 1      ISAH
- Kapitel 2: Bericht Teilprojekt 2      Avecom
- Kapitel 3: Bericht Teilprojekt 3      NLGA
  
- Anhang 1: Bericht Teilprojekt 2 Avecom (Original in englischer Sprache)

Hannover, den 30.03.2015



Prof. Dr.-Ing. Karl-Heinz Rosenwinkel  
Wissenschaftliche Leitung

Essen, den 07.04.2015



Prof. Dr.-Ing. Thomas Grünebaum  
Organisatorische Leitung

## Kurzfassung des Projektes „Entwicklung von Maßnahmen zur Reduzierung von Legionellen in belebtem Schlamm“ (beauftragt vom Ruhrverband und gefördert vom Land Nordrhein-Westfalen)

K. Schneider, R. Nogueira, K.-H. Rosenwinkel

Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Leibniz Universität Hannover

Im August 2013 kam es in der Stadt Warstein zu einem Ausbruch der durch Legionellen verursachten Legionärskrankheit, in dessen Folge drei Menschen starben und über 160 Personen erkrankten. Im Zuge der Ursachenforschung wurden neben dem Rückkühlwerk eines Industrieunternehmens im Stadtgebiet auch die Abwasserbehandlungsanlage der Warsteiner Brauerei sowie die kommunale Kläranlage Warstein (Betreiber: Ruhrverband), Kanäle, Kläranlagenablauf und der Vorfluter (Wäster) beprobt. Dabei wurden sowohl im Abwasserbereich der Brauerei als auch im Kanal von der Brauerei zur Kläranlage (KA), in der kommunalen Kläranlage selbst und auch im Vorfluter alarmierend hohe Konzentrationen von Legionellen nachgewiesen ( $> 1 \cdot 10^6$  KBE/100 mL, koloniebildenden Einheiten pro 100 mL). In der Folge wurden sowohl durch den Ruhrverband als Betreiber der kommunalen Kläranlage Warstein als auch durch die Warsteiner Brauerei in Absprache mit den zuständigen Behörden umfangreiche Sofortmaßnahmen eingeleitet (z.B. schrittweise Desinfektion der Abwasserbecken in der Brauerei, Umstellung von Oberflächenbelüftern auf Druckbelüftung mit Sauerstoff, die Abdeckung der Belebungsbecken sowie die zweistufige Desinfektion des Kläranlagenablaufs mittels Wasserstoffperoxid und Ameisensäure plus UV-Bestrahlung). Das Ziel dieses Projektes war es praxistaugliche Strategien für die kurzfristige Legionellenabreicherung zu entwickeln und einen langfristig sicheren Anlagenbetrieb zu formulieren.

Legionellen werden auf kommunalen Kläranlagen in der analytischen Eigenüberwachung üblicherweise nicht erfasst. Ihre Konzentration wird weder im Rahmen der Standardanalytik bestimmt, noch gibt es entsprechende Ablaufgrenzwerte. Für die Entwicklung erfolgreicher Betriebsstrategien zur gezielten Minimierung von Legionellen im belebten Schlamm sowie zur Unterdrückung einer Wiederansiedlung waren daher Grundlagenuntersuchungen erforderlich. In den Versuchen wurden mögliche Betriebsstrategien im Labormaßstab erprobt.

Dabei lauteten die Ziele der einzelnen Projektpartner wie folgt:

- Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik Hannover (ISAH, Teilprojekt 1)

- Abreicherung von Legionellen im Belebtschlamm durch die Anpassung von Betriebsparametern (Temperatur, Schlammalter)
- Reduktion von Nacktamöben durch Teilstrombehandlung mit Ultraschall zur langfristigen Unterbindung der Legionellenvermehrung im Belebtschlamm
- Weiterentwicklung und Anpassung der qPCR-Methode zum Einsatz in Belebtschlamm

- Avecom (Teilprojekt 2)

- Gegenmaßnahmen mit Desinfektion eines Teilstrom → Inaktivierung bzw. Abtötung der Legionellen durch verschiedene chemische Desinfektionsverfahren (Mikrosilber, Ozon, Wasserstoffperoxid, Chlordioxid, Alkalisierung)

- Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (NLGA, Teilprojekt 3)

- Weiterentwicklung und Anpassung des Kulturverfahrens zum Einsatz für Belebtschlammproben (bisheriger kultureller Nachweise für Trinkwasser optimiert)
- Untersuchung der Proben aus den Versuchen des ISAH

- Universität Bonn

- Plausibilitätsprüfung der Ergebnisse, Beratung und Mitwirkung bei der Zusammenfassung

In der Abbildung 1 ist die Art der Zusammenarbeit der einzelnen Gruppen schematisch dargestellt.

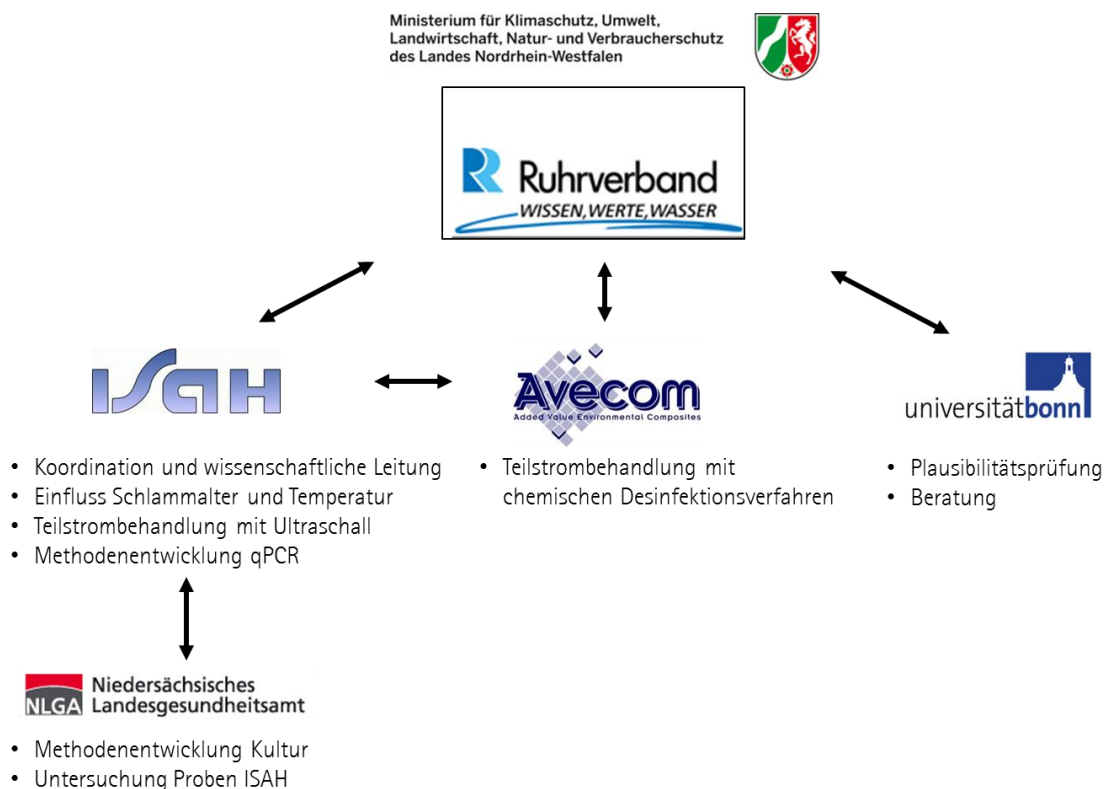


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Zusammenarbeit der Projektpartner

Die detaillierten Auswertungen der Ergebnisse jedes einzelnen Projektpartners sind in den Einzelberichten einsehbar. Die übergreifenden Erkenntnisse aus diesen Berichten lassen sich unter folgenden Gesichtspunkten zusammenfassen:

1. Untersuchungsmethoden für Legionellen im Abwasser,
2. Verhalten von Legionellen im Abwasser,
3. Biologische, chemische und physikalische Eliminationsverfahren
4. Elimination durch Substratveränderung und verfahrenstechnischer Veränderung
5. Vermeidung von Aerosolen und Schutzmaßnahmen

### 1. Untersuchungsmethoden für Legionellen im Abwasser

Die bisherigen Untersuchungen von Abwasserproben auf Legionellen bauen auf den genormten Kulturverfahren für Trinkwasser auf. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Analyse von Feststoffen (hier: Belebtschlamm) als wenig sinnvoll angesehen werden kann. Besonders die Notwendigkeit der Probenvorbehandlung (Ultraturrax, Magnetrührer) und der Unterdrückung der Begleitflora (Säure-/Hitzebehandlung, Antibiotika-Einsatz) haben einen großen Einfluss auf das Ergebnis des Kulturverfahrens. Zusätzlich führt die Notwendigkeit von Verdünnungen dieser Proben zu systematischen Fehlern bei der Hochrechnung auf 100 ml Probenvolumen. Diese Einschränkung gilt für alle Verfahren, bei denen geringe Probenvolumen untersucht und dann auf ein höheres Vergleichsvolumen hochgerechnet werden. Eine Aufkonzentration der Proben mittels Membranfilter ist aufgrund der hohen Zahl an Begleitflora nicht empfehlenswert. Auch die Inkubationszeit der GVPC-Platten bei der Untersuchung von Abwasserproben unterscheidet sich zu den für Trinkwasserproben vorgeschriebenen Zeiten. In der Regel sind bereits nach 3 - 5 Tagen verlässliche Auszählungen möglich. Auch die Angabe in KBE/mL bzw. KBE-<sub>äq</sub>/mL statt wie im Trinkwasserbereich in KBE/100 mL ist in diesem Zusammenhang ebenfalls sinnvoll.

Die PCR-Methodik korreliert nur unter bestimmten Bedingungen (bei Temperaturen zwischen 22-35°C) mit den Kultivierungsverfahren. Die Unterschiede lassen sich hauptsächlich auf folgende Punkte zurückführen: die Art des Nachweises (Erfassung von toten und lebenden Legionellen via qPCR, mit Kultur nur lebende, kultivierbare Legionellen), das Auftreten von Legionellen im VBNC-Stadium und die Effizienz der qPCR-Sonden. Ansätze zur Unterscheidung von toten und lebenden Legionellen wie bei der Viability-PCR sind umsetzbar, bedürfen aber noch der Optimierung.

Zur Untersuchung von Abwasserproben wäre es aufgrund der gesammelten Erfahrungen empfehlenswert sowohl Kulturverfahren als auch qPCR in Kombination einzusetzen. Auf diese Weise könnte eine bessere Einschätzung der tatsächlichen Konzentration an *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* im Belebtschlamm gewährleistet werden.

Mit Hilfe von lichtmikroskopischen Aufnahmen und FISH-Untersuchungen konnten u.a. neue Wirte für Legionellen identifiziert werden (Ciliaten) und bei hohen Temperaturen auch teilweise Korrelationen zwischen Nacktamöben und Legionellen nachgewiesen werden.

Mögliche Indikatorparameter (z.B. CSB/oTS, KN/oTS, Aminosäuren) sollten zur Erkennung von geeigneten Nährsubstraten und zur Früherkennung von Legionellenwachstum untersucht werden.

## 2. Verhalten von Legionellen im Abwasser

Offensichtlich reagieren *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* unterschiedlich auf Temperatur- und Substrateinflüsse. *Legionella pneumophila* hat gegenüber *Legionella* spp. einen deutlichen Wachstumsvorteil bei hohen Temperaturen (35 °C) und guter Substratversorgung (CSB, in Form von proteinhaltigem Substrat wie z.B. Hefekonzentrat). Es stellten sich mitunter sehr hohe Wachstumsraten ein, die aber nach einigen Tagen in einen Rückgang der Legionellenkonzentration übergingen. Der dafür verantwortliche Mechanismus konnte im Rahmen der Versuche noch nicht aufgeklärt werden. Ebenso konnten die genauen Temperaturen, bei denen das spontane Wachstum von *Legionella pneumophila* einsetzt und bei Abkühlung in eine Abreicherung übergeht noch nicht ausreichend genau bestimmt werden. Grundsätzlich war bei niedrigen Temperaturen die Wachstumsrate weniger ausgeprägt bzw. nicht vorhanden. Die Konzentration an *Legionella* spp. hingegen zeigte bei niedrigen Temperaturen und ausreichend Substrat sogar teilweise einen Anstieg auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich im Schlamm kältetolerante Legionellen entwickeln können. Inwiefern diese gesundheitsrelevant sind und welchen Einfluss sie auf das Wachstum von *Legionella pneumophila* haben, bleibt ebenso wie die Bestimmung der kinetischen Parameter für diese Gruppe noch abzuklären.

Bei den Untersuchungen in der KA Warstein konnte regelmäßig im Belebtschlamm der kaum beschriebene Stamm *Legionella londiniensis* nachgewiesen werden. Wenn man die Bedingungen identifizieren könnte, die *L. londiniensis* vor *L. pneumophila* begünstigen, wäre eine Verdrängung des Humanpathogens durch diese vermutlich ungefährliche Legionellenart als weitere Unterdrückungsmaßnahme denkbar. Auch andere Bakterien der natürlichen Biozönose im Belebtschlamm können aber durch Nahrungskonkurrenz und zusätzlich Sekretion von Störsubstanzen einen großen Einfluss auf das Legionellenwachstum haben.

Zur Biozönose gehören aber nicht nur Bakterien sondern auch Eukaryoten. In der Literatur sind bestimmte Arten beschrieben die *Legionella pneumophila* zur Vermehrung bevorzugt (*Acanthamoeba* sp., *Naegleria* sp., *Hartmannella* sp.). Im Belebtschlamm scheinen Legionellen aber auch andere Arten zu infizieren (hier: Ciliaten). Somit scheint ein weites Wirtsspektrum auch eine weitere Strategie der Legionellen zum Überleben im Belebtschlamm zu sein. Hinsichtlich der Nacktamöben ergeben sich aber auch durch ihre verschiedenen physiologischen Stadien der (Zysten, Trophozoite, Flagellaten) Besonderheiten, die offensichtlich unter bestimmten Randbedingungen das Überleben der Legionellen ebenfalls sichern.

## 3. Biologische, chemische und physikalische Eliminationsverfahren

Als biologisches Verfahren zur Elimination von Legionellen wäre die Absenkung des Schlammalters unter die Wachstumsrate der Legionellen denkbar. Unter Beibehaltung einer ordnungsgemäßen Abwasserreinigung ist dies aber aufgrund der sehr hohen Wachstumsraten der Legionellen im warmen Abwasser nicht möglich. Sämtliche untersuchten chemischen Desinfektionsverfahren zur direkten Elimination von Legionellen (Mikrosilber, Ozon, Wasserstoffperoxid, Chlordioxid, Alkalisierung) waren nicht spezifisch genug für Legionellen und hatten meist gleichzeitig eine schädigende Wirkung auf die gesamte Biozönose des Belebtschlammes (insbesondere Nitrifikanten) zur Folge. Ein direkter Einsatz beim Belebungsverfahren ist somit als nicht sinnvoll einzustufen.

Da *Legionella pneumophila* bei Temperaturen  $> 22^{\circ}\text{C}$  Wachstumsvorteile hat, würde eine Abkühlung der Temperatur theoretisch erfolgversprechend sein. In der Praxis wird dies aus energetischen Gründen – wenn nicht mit Wärmerückgewinnung gearbeitet werden kann – kaum umsetzbar sein. Die Versuchsergebnisse zeigen allerdings auch, dass auch bei Temperaturen von  $26^{\circ}\text{C}$  eine Stagnation von *Legionella pneumophila* aufgetreten ist; insofern wäre der genaue Temperaturpunkt, bei dem *Legionella pneumophila* ausgeschwemmt wird, von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung.

Eine Teilstrombehandlung mit Ultraschall zur Abreicherung des Wirtes (Nacktamöben) führte nicht zu einer langfristigen Abreicherung der Legionellen. Durch eine schnelle Wiederbesiedlung des Belebtschlammes durch trophozoite Amöben (insbesondere bei höheren Temperaturen von  $35^{\circ}\text{C}$ ) ist eine Vermehrung in den Wirten trotz Behandlung möglich, sodass Ultraschall keine langfristige Strategie zur Abreicherung von Legionellen darstellt.

#### 4. Elimination durch Substratveränderung und verfahrenstechnischer Veränderung

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass proteinreiches Substrat neben der Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung von *Legionella pneumophila* hat. Ein weitgehender Rückhalt von proteinreichem Substrat bzw. der Vorabbau durch eine anaerobe Vorbehandlung kann hier eventuell Abhilfe schaffen. Als Verfahrenskombination kann daher bei hoher Temperatur und Konzentration eine anaerobe Vorbehandlung hilfreich sein. In dieser Stufe würden die Proteine hydrolysiert, womit eine Abreicherung der spezifischen Substrate für Legionellen erfolgen würde. In einer nachgeschalteten Schwachlaststufe zur Stickstoffelimination wäre dann für Legionellen kein Wachstumsvorteil mehr vorhanden und Nitrifikanten könnten in Abhängigkeit vom Schlammalter gehalten werden. Zur weiteren Aufklärung dieser Möglichkeiten besteht Forschungsbedarf.

#### 5. Vermeidung von Aerosolen und Schutzmaßnahmen

Wesentlicher Bestandteil einer Vermeidungsstrategie für Legionellenbelastungen ist die Verhinderung von Aerosolaustrag aus belasteten Abwasserbehandlungsanlagen und Transportkanälen. Dafür werden folgende präventiven Maßnahmen und Änderungen im Verfahrensprozess empfohlen:

##### 1. auf belasteten Kläranlagen:

- Mechanische Vorreinigungsanlagen – z.B. Sieb- und Rechengebäude – mit Aerosolentwicklung bei Reinigungsarbeiten - müssen entsprechend eingehaust werden und dürfen für Reinigungszwecke nur mit Mundschutz betreten werden.
- Offene Transportkanäle und Förderschnecken auf den Anlagen sollten vermieden werden oder müssen abgedeckt sein.
- Belebungsbecken müssen bei entsprechender Legionellenbelastung grundsätzlich abgedeckt werden, um eine Legionellenemission zu verringern bzw. zu vermeiden.
- Für die Belüftung sollten keine Oberflächenbelüfter gewählt werden, sondern Anlagen mit geringer Aerosolbildung, wie z.B. feinblasige Belüftung oder getauchte Belüfter.
- Kaskaden mit Turbulenzen oder Abstürzen sollten zur Aerosolvermeidung nicht eingesetzt werden.
- Die Luftbelastung oberhalb der Belebungsbecken und am Luftaustritt bei abgedeckten Becken sollte mit geeigneten Luftkeimsammelgeräten für die Bestimmung von Legionellen in Luftproben

untersucht und bei entsprechender Belastung einer Desinfektion unterzogen werden. Hier ist noch Forschungsbedarf für entsprechende Abreicherungsmaßnahmen in der Abluft.

- In anaeroben Abwasserbehandlungsanlagen findet nach bisherigem Kenntnisstand offensichtlich kein Wachstum von Legionellen statt, bereits im Zulauf vorhandene Legionellen werden jedoch nicht eliminiert. Die anaerobe Vorbehandlung von industriellen Abwässern mit gutem Substratpotential für Legionellenwachstum sollte als eine Lösungsmöglichkeit geprüft werden. Geklärt werden muss hier, ob durch den Substratabbau bei dieser Vorbehandlungsmaßnahme ein Wachstum in nachgeschalteten aeroben Anlagen vermieden werden kann.
- Schlammbehandlungsanlagen (Eindickmaschinen, Zentrifugen, Kammerfilterpressen, Bandfilterpressen) müssen mit besonderer Vorsicht bedient werden, wenn dort Schlamm mit Legionellen behandelt wird. Das Bedienungspersonal darf nur mit entsprechender Sicherheitsbelehrung und mit Mundschutz arbeiten, dies gilt besonders bei Reinigungs- und Abspritzarbeiten (z.B. mit Hochdruckspritzgeräten).
- Transporte von Legionellen belastetem Schlamm sind entsprechend abzudecken und vor Aerosolaustrag zu schützen.
- Bei der Verwertung oder Entsorgung von Legionellen belastetem Schlamm müssen Sicherheitsmaßnahmen zum Schutz der Mitarbeiter und zur Vermeidung von Aerosolaustrag berücksichtigt werden.

## 2. in unmittelbarer Umgebung von belasteten Kläranlagen:

- Bei Kanälen, in denen Legionellen belastetes Abwasser transportiert wird, müssen die Schachtdedeckel geschlossen werden, um einen Aerosolaustrag zu vermeiden. Der erforderliche Luftaustausch im Kanal muss über entsprechende Filter geführt werden, vorzugsweise sind in solchen Fällen getrennte Kanalsysteme für Regen- und Schmutzwasser zu empfehlen.
- Eine Überprüfung von in der Nähe befindlichen technischen Systemen mit Aerosolbildung wie Verdunstungskühlanlagen, Luftwäscher etc. muss zeitnah durchgeführt werden. Eine hygienisch-medizinische Bewertung der Risiken sowie ein daraus abgeleiteter Maßnahmenkatalog sind für alle mit Legionellen belasteten Anlagen zu erstellen. Dabei sind erhöhte Sicherheitsmaßnahmen immer dann zu treffen, wenn es sich bei den festgestellten Legionellen um *Legionella pneumophila* handelt.
- Sollte sich der Standort der Kläranlage in der Nähe einer Wohnbebauung und dem Aufenthaltsort von Personen befinden wird empfohlen, Belebungsbecken abzudecken und mit einer angemessenen Abluftbehandlung auszustatten.

## 3. zum Schutz des Kläranlagenpersonals:

- Arbeiten zur Reinigung von Oberflächen oder Ausrüstungsteilen sollten nur mit Trinkwasser durchgeführt werden.
- Reinigungsarbeiten mit Hochdruckgeräten (z.B. "Kärcher") und exponierte Arbeiten sollten nur mit einer Atemschutzmaske (FFP2 oder FFP3-Maske je nach Art der Tätigkeit) verrichtet werden.
- Betriebspersonal darf aerosolbelastete Innenbereiche belasteter Anlagen nur mit entsprechendem Mundschutz betreten.
- Aus Gründen des Arbeitsschutzes müssen in Kläranlagen die Bereiche, in denen hohe Konzentrationen an Aerosolen auftreten, ausgewiesen werden und es ist eine Persönliche Schutzausrüstung



(PSA) vorzuhalten.

Auf der KA Warstein ist zur Vermeidung von Aerosolen über dem Belebungsbecken eine Abdeckung installiert sowie die Oberflächenbelüfter und eine Tropfkörper außer Betrieb genommen worden. Zusätzlich wird im Ablauf der Kläranlage nach wie vor eine UV-Behandlung durchgeführt, sodass zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren Sicherungsmaßnahmen erforderlich sind.

Trotz der bereits durchgeführten umfangreichen Untersuchungen und der erzielten Ergebnisse besteht weiterhin ein hohes Potenzial an Forschungsaufgaben. Die wichtigsten Schwerpunkte sind nachfolgend aufgeführt:

- Einfluss von extrazellulären Substanzen (Inhibitoren) von anderen Bakterien (z.B. *Aeromonas hydrophila*) auf das Wachstum von *Legionella pneumophila*
- Verhinderung einer Wiederbesiedlung nach einer Desinfektion z.B. durch konkurrierende Bakterien
- Identifikation bevorzugter Rahmenbedingungen für *Legionella pneumophila* (z.B. Verfügbarkeit bestimmter Aminosäuren, genauer Temperaturbereich des verstärkten Wachstums über 22 °C sowie die Abreicherung im unteren Temperaturbereich zwischen 15-22 °C)
- Verhalten von Legionellen unter anaeroben Bedingungen
- Identifizierung und Untersuchung des Verhaltens der wichtigsten Wirte im Belebtschlamm (Nacktamöben und/oder Ciliaten), insbesondere der bevorzugten Lebensbedingungen zur Vermehrung, sowie der Einfluss auf die aufgenommenen Legionellen sowie ihre Vermehrung und Veränderung der Virulenz
- Festlegung der Indikatoren (z.B. *Legionella pneumophila* SG1 allein oder zusätzlich SG 2-14) und Grenzwerte für Risikomanagement
- Optimierungen der Nachweismethoden

Derzeit ist die Konzentration an *Legionella pneumophila* im Ablauf der KA Warstein gesundheitlich unbedenklich. Doch um auch in Zukunft in dieser und in eventuell anderen potenziell gefährdeten Anlagen mögliche Probleme frühzeitig zu erkennen, sollten die o.g. Fragen weiter aufgeklärt werden.

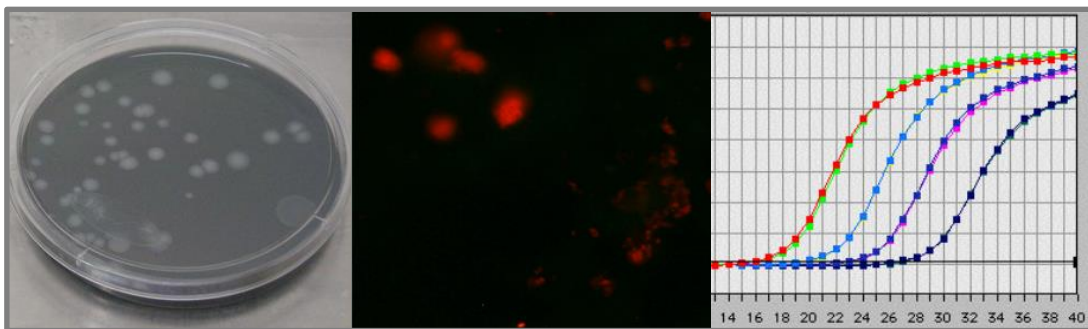
#### Referenzen

- Den Boer, J. W., Yzerman, E. P., Schellekens, J., Lettinga, K. D., Boshuizen, H. C., Van Steenberg, J. E., Bosman, A., Van den Hof, S., Van Vliet, H. A., Peeters, M. F., Van Ketel, R. J., Speelman, P., Kool, J. L. und Conyn-Van Spaendonck, M. A. 2002 A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis*, 8 (1), 37-43
- Diederer, B. M. W. 2008 Legionella spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection*, 56 (1), 1-12
- Garcia-Fulgueiras, A., Navarro, C., Fenoll, D., Garcia, J., Gonzalez-Diego, P., Jimenez-Bunuales, T., Rodriguez, M., Lopez, R., Pacheco, F., Ruiz, J., Segovia, M., Balandron, B. und Pelaz, C. 2003 Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis*, 9 (8), 915-921
- Percival, S. L. und Williams, D. W. 2014 Chapter Eight - Legionella. In: *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*, (ed.), Academic Press, London, pp. 155-175

# *Entwicklung von Maßnahmen zur Reduzierung von Legionellen in belebtem Schlamm*

Abschlussbericht des Teilprojektes 1

ISAH



Hannover, Dezember 2014

## ISAH

Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik

Welfengarten 1,

30167 Hannover

Prof. Dr.-Ing. K.-H. Rosenwinkel,  
Institutsleiter

Prof. Dr. R. Nogueira,  
Professor für Wasser- und Abwasserbiologie

### ***Wissenschaftlicher Mitarbeiter***

Dr.-Ing. M. Beier, Beratung

Dipl.-Biol. K. Schneider; Bearbeitung

### ***Laborteam***

K. Kock (Laborleitung), Dr.-Ing. C. Lorey, B. Schwanda

## Inhalt

1. Einleitung .....	1
2. Material und Methoden .....	6
2.1 Kläranlage und Proben .....	6
2.2 Versuchsaufbau .....	7
2.2.1. Kontinuierlicher Versuch 1 .....	7
2.2.2. Kontinuierlicher Versuch 2 .....	9
2.2.2.1. Vorversuche mit proteinreichem Substrat und Ultraschall .....	9
2.2.2.2. Kontinuierlicher Versuch 2 .....	10
2.2.3. Kontinuierlicher Versuch 3 .....	12
2.3 Untersuchungsmethoden .....	14
2.3.1 Standardmethode, Realtime PCR und Viability PCR .....	14
2.3.2 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) .....	17
2.3.3 Mikroskopische Untersuchung des Schlammes .....	17
2.3.4 Chemische und physikalische Parameter .....	17
2.4 Berechnungen .....	18
3. Ergebnisse und Diskussion .....	20
3.1 Kontinuierlicher Versuch 1 .....	20
3.1.1 Chemische und physikalische Parameter .....	20
3.1.2 Mikrobiologische Auswertung .....	21
3.1.3 Mikroskopische Auswertung .....	27
3.2 Kontinuierlicher Versuch 2 .....	29
3.2.1. Vorversuche mit proteinreichem Substrat und Ultraschall .....	29
3.2.2. Kontinuierlicher Versuch 2 .....	31
3.2.2.1 Chemische und physikalische Parameter .....	31
3.2.2.2 Mikrobiologische Auswertung .....	32
3.2.2.3 Mikroskopische Auswertung .....	37
3.2.3. Fällung mit Polyaluminiumchlorid – Viability PCR .....	39
3.3 Kontinuierlicher Versuch 3 .....	40
3.3.1 Chemische und physikalische Parameter .....	40
3.3.2. Mikrobiologische Auswertung .....	41
3.3.3 Mikroskopische Auswertung .....	44
3.4 Interpretation der Ergebnisse aus der KA Warstein .....	46
4. Zusammenfassung .....	48
5. Referenzen .....	51
6. Appendix .....	54

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Schema der kommunalen Kläranlage Warstein .....	6
Abbildung 2 Sterilbank mit Reaktoren (A) und Reaktorbeispiel (B).....	7
Abbildung 3 Schematische Darstellung für den kontinuierlichen Versuch 1 .....	7
Abbildung 4 Ultraschall-Disruptor.....	9
Abbildung 5 Schematische Darstellung für den kontinuierlichen Versuch 2 .....	10
Abbildung 6 Schematische Darstellung für den kontinuierlichen Versuch 3 .....	12
Abbildung 7 Verlauf der chemisch-physikalischen Parameter im kontinuierlichen Versuch 1; Substrat Abwasser aus KA Warstein bzw. kommunaler KA.....	20
Abbildung 8 Vergleich der Ergebnisse von qPCR und Standardmethode* für <i>Legionella</i> spp. in den Zuläufen für die Reaktoren aus der KA Warstein (A) und der kommunalen Kläranlage (B), die als Substrate in diesem Versuch dienten.....	22
Abbildung 9 Vergleich Nacktamöben und <i>Legionella</i> spp.* im Überstand und Belebtschlamm des Schlammes aus der KA Warstein bei unterschiedlichen Temperaturen (A-C)**, Substrat: Ablauf Vorklärung KA Warstein	25
Abbildung 10 Vergleich Nacktamöben und <i>Legionella</i> spp.* im Überstand und Belebtschlamm des Schlammes aus der kommunalen KA (A) und Warstein (B) mit Zulauf (=Substrat) aus der kommunalen KA bei 22°C ** .....	26
Abbildung 11 Ergebnisse der FISH-Analyse für den kontinuierlichen Versuch 1 .....	28
Abbildung 12 Anstieg von <i>Legionella</i> spp. (A) und <i>Legionella pneumophila</i> (B) in Belebtschlamm bei 35° C mit Zugabe von synthetischem Abwasser und Hefekonzentrat.....	29
Abbildung 13 Anstieg von <i>L. pneumophila</i> , <i>Legionella</i> spp. und Nacktamöben in Belebtschlamm bei 35°C und der Zugabe von Hefekonzentrat:.....	30
Abbildung 14 Verlauf der chemisch-physikalischen Parameter im kontinuierlichen Versuch 2, in dem verdünntes Hefekonzentrat als Substrat diente.....	31
Abbildung 15 Vergleich der Konzentrationsverläufe von <i>Legionella</i> spp. und <i>L. pneumophila</i> mit qPCR (Belebtschlamm) und Standardmethode (Überstand); Substrat: verdünntes Hefekonzentrat .....	33
Abbildung 16 Vergleich der Konzentration an Amöben und <i>Legionella pneumophila</i> im Belebtschlamm des kontinuierlichen Versuches 2; Substrat: verdünntes Hefekonzentrat.....	36
Abbildung 17 Ergebnisse der FISH-Analyse und Mikroskopie für den kontinuierlichen Versuch 2.....	38
Abbildung 18 Viability PCR vor (A+B) und nach (C+D) der Fällung mit PAC im Belebtschlamm (A+C) und im Überstand (B+D) im Reaktor bei 22°C aus dem kontinuierlichen Versuch 2.....	39
Abbildung 19 Prozessparameter kontinuierlicher Versuch 3; Substrat : verdünntes Hefekonzentrat .....	40
Abbildung 20 Vergleich der Methoden zur Bestimmung Legionellenkonzentration im Überstand (A,C, E) und Belebtschlamm (B,D,E) bei 15°C (A,B), 26°C (C,D) und 35°C (E,F)*; Substrat: verdünntes Hefekonzentrat.....	42
Abbildung 21 Ergebnisse der FISH-Analyse für Versuchsbeginn des kontinuierlichen Versuch 3 .....	44
Abbildung 22 Ergebnisse der FISH-Analyse während des kontinuierlichen Versuch 3.....	45
Abbildung 23 FISH-Ergebnisse vom Ende des kontinuierlichen Versuches 2 .....	46
Abbildung 24 Nährstoffabhängiger Vermehrungszyklus von <i>Legionella pneumophila</i> nach Molofsky und Swanson (2004).....	47
Abbildung 25 Vergleich von qPCR und Standardmethode im Überstand im kontinuierlichen Versuch 1.....	54

Tabelle 1 Vorkommen und Quantität von Legionellen in biologischen Behandlungsanlagen der Zellstoff- und Papierindustrie.....	4
Tabelle 2 Vorkommen und Quantität von Legionellen in verschiedenen Kläranlagen.....	5
Tabelle 3 Analyseschema Kontinuierlicher Versuch 1.....	8
Tabelle 4 Parameter der Sequencing-Batch-Reaktoren für den kontinuierlichen Versuch 1.....	8
Tabelle 5 Veränderung des Temperaturprofils der Reaktor im kontinuierlichen Versuch 2.....	10
Tabelle 6 Analyseschema Kontinuierlicher Versuch 2.....	11
Tabelle 7 Parameter der Sequencing-Batch-Reaktoren für den kontinuierlichen Versuch 2.....	11
Tabelle 8 Analyseschema Kontinuierlicher Versuch 3.....	13
Tabelle 9 Analyse des Hefekonzentrates am 17.10.2014 (unverdünnt).....	13
Tabelle 10 Parameter der Sequencing-Batch-Reaktoren für den kontinuierlichen Versuch 3.....	13
Tabelle 11 Methoden zur Bestimmung der Konzentration von Legionellen .....	14
Tabelle 12 Analyseverfahren für die chemischen und physikalischen Parameter.....	17
Tabelle 13 Analyseverfahren für die chemischen und physikalischen Parameter des Hefekonzentrates .....	18
Tabelle 14 CSB-Abbau in den einzelnen Reaktoren im kontinuierlichen Versuch 1 .....	21
Tabelle 15 <i>Legionella</i> -Spezies im Zu- und Ablauf des Kontinuierlichen Versuches 1 .....	24
Tabelle 16 Veränderung des Temperaturprofils der Reaktor im kontinuierlichen Versuch 2 .....	32
Tabelle 17 Veränderung der <i>Legionella</i> -Spezies im Ablauf des Kontinuierlichen Versuches 2 .....	34
Tabelle 18 <i>Legionella</i> -Spezies im Ablauf des kontinuierlichen Versuches 3.....	43
Tabelle 19 Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Legionellen.....	48
Tabelle 20 Kinetische Parameter von <i>Legionella pneumophila</i> .....	48
Tabelle 21 Substrateinflüsse und Indikatoren bei 26°C.....	48
Tabelle 22 Zusammenfassung aller Maßnahmen zur Bekämpfung von Legionellen im Belebtschlamm und ihr Wirksamkeit auf <i>Legionella</i> spp. bzw. <i>L. pneumophila</i> , Amöben und Bakterien ( <i>E. coli</i> , Nitrifikanten).....	49

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BB	Belebung
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EMA	Ethidium Monoazid Bromid
<i>et al.</i>	latein.: <i>et alia</i> ; und andere
EUK	FISH-Sonde für Eukaryoten
EW	Einwohnerwerte
fil	filtriert
FISH	Fluoreszenz-in situ- Hybridisierung
GE	Genomische Einheiten
GSP	FISH-Sonde für <i>Acanthamoeba</i> spp.
HART498	FISH-Sonde für <i>Hartmannella</i> spp.
hom	homogenisiert
KA	Kläranlage
KBE	Kolonie Bildende Einheit
KBEäq	Kolonie Bildende Einheit-Äquivalente
kKA	Kommunale Kläranlage
Konz.	Konzentration
<i>L. pn.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>L. spp.</i>	<i>Legionella spp.</i>
LEG705	FISH-Sonde für <i>Legionella</i> spp.
LEGPNE1	FISH-Sonde für <i>Legionella pneumophila</i>
LLAP	Legionella-like amoebal pathogens (Legionellenartige Amöbenpathogene)
M + A	Misch- und Ausgleichsbecken
NAEG1089	FISH-Sonde für <i>Naegleria</i> spp.
NK	Nachklärung
NLGA	Niedersächsisches Landesgesundheitsamt
oTS	Organische Trockensubstanz
PAC	Polyaluminiumchlorid (Polymer)
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
SBR	Sequencing Batch Reaktor
SG	Serogruppe
sp.	Spezies (eine unbestimmte Art einer Gattung)
spp.	Spezies (mehrere unbestimmte Arten einer Gattung)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TS	Trockensubstanz
US	Ultraschall
UV	Behandlung mit ultravioletter Strahlung
VBNC	Viable-But-Non-Culturable (lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zustand)
VK	Vorklärung
vPCR	Viability-PCR
W-h/L	Wattstunden pro Liter
WHO	World Health Association

## 1. Einleitung

Von den 54 charakterisierten Arten der Gattung *Legionella* werden 25 mit menschlichen Erkrankungen (Diederer 2008) assoziiert. *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 (*L. pneumophila* SG1) ist eine humanpathogene *Legionella*-Spezies, die als Haupterreger der Legionärskrankheit oder auch Legionellose (50 % der Infektionen; Percival und Williams 2014) gilt und durch die Inhalation von Aerosolen erworben wird. Legionellen sind Bewohner von Süßwasserhabitaten (Seen und Flüsse) und werden häufig in künstlichen Trinkwasseranlagen mit erhöhten Temperaturen, z.B. Kühltürmen und Whirlpools, isoliert (Den Boer *et al.* 2002; Garcia-Fulgueiras *et al.* 2003).

Unter Laborbedingungen sind Legionellen sehr anspruchsvoll und eher langsam wachsende Bakterien. In Kultur benötigen sie bestimmte Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle, insbesondere Arginin, Cystein, Methionin, Serin, Threonin und Valin (George *et al.* 1980). Legionellen wachsen bei Temperaturen zwischen 25 °C und 42 °C mit einem Optimum bei 37°C (Fields *et al.* 2002). Neben dem replikativen Zustand können bei Veränderungen in der Umwelt (z.B. Temperaturwechsel, Anwesenheit von Oxidationsmitteln, etc.) auch in einen „lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zustand“ (viable-but-non-culturable, VBNC) übergehen (James *et al.* 1999). Die Wachstumsrate  $1/\mu_{\max}$  für Legionellen ist in der Literatur hauptsächlich für chemisch definierte Medien angegeben und bewegt sich im Bereich zwischen 0,1 d (WHO) bis 0,5 d bei 35 °C (Tison *et al.* 1980).

Mehrere Studien belegen, dass sich *L. pneumophila* in der aquatischen Umwelt intrazellulär in mehrere Arten von Amöben und Wimperntierchen vermehren kann. Als mögliche Wirte wurden unter anderem *Acanthamoeba castellanii* (Declerck *et al.* 2010), *Acanthamoeba polyphaga* (Garcia *et al.* 2007), *Hartmannella vermiformis* [Kuiper *et al.* (2004); Murga *et al.* (2001)] und *Naegleria fowleri* (Newsome *et al.* 1985), aber auch Ciliaten [*Tetrahymena* spp.; Koubar *et al.* (2011); Fields *et al.* (1990)] beschrieben. Die Legionellen dringen in die Amöben ein und entziehen dem Amöbenstoffwechsel die für ihr Wachstum essentiellen Aminosäuren (Price *et al.* 2014). *L. pneumophila* weist nach dem Wachstum in Amöben eine erhöhte Resistenz gegenüber Oxidationsmitteln (Barker und Brown 1995) und Ultraschall (Declerck *et al.* 2010) auf. Die Wirt-Parasit-Beziehungen zwischen *L. pneumophila* und *A. castellanii* ist temperaturabhängig. Bei Temperaturen unter 20°C ist *A. castellanii* in der Lage *L. pneumophila* durch Enzystierung und Verdauung zu eliminieren (Ohno *et al.* 2008).

Auch abwasserassoziierte Legionellenausbrüche sind bereits in der Literatur beschrieben worden [z.B. Medema *et al.* (2004); Allestam *et al.* (2006); Olsen *et al.* (2010); Fykse *et al.* (2013)], was darauf hinweist, dass Orte mit potenzieller Aerosolbildung während der Abwasserbehandlung z.B. Tropfkörper und Belebungsbecken, auch ein Problem bei der Verbreitung von pathogenen Legionellen darstellen können. Es wird empfohlen durch Präventionsmaßnahmen das Risiko von Legionelleninfektionen zu reduzieren. Die Präsenz von Legionellen in biologischen Behandlungsanlagen in Zellstoff- und Papierindustrie, wo Belebtschlammverfahren und belüftete Teichen als Behandlungssysteme (Tab.1). genutzt werden, ist in der Literatur sehr gut dokumentiert. Aus Tab.1 ist ersichtlich, dass der gemeinsame Faktor für alle Kläranlagen mit Legionellenbefund eine Temperatur im Bereich von 35°C bis 38°C ist. In einer umfangreichen Studie von 43 biologischen Behandlungsanlagen von Papierfabriken aus Schweden (Allestam *et al.* 2006) wird berichtet, dass bei Abwassertemperaturen unter 30°C Legionellen nicht nachgewiesen werden konnten. Während der Abschaltung



eines Belüftungsteiches in Norwegen, wurde der Temperaturabfall von 36–38 °C auf 15°C begleitet von einer Reduktion der Legionellenkonzentration um 3–4 log-Stufen [Olsen *et al.* (2010); Fykse *et al.* (2013)].

Die Konzentration von Legionellen im Belebtschlamm bzw. in belüfteten Teichen lag im Bereich zwischen  $10^2$  bis  $10^7$  KBE/mL und *L. pneumophila* wurde in allen untersuchten Systemen nachgewiesen (Tab.1). In der Luft über einem belüfteten Teich, lag die Konzentration von Legionellen bei 3300 KBE/m<sup>3</sup>. Im Kühlturm, der zur Absenkung der Abwassertemperatur genutzt wurde, konnten hingegen keine (Allestam *et al.*, 2006) oder nur geringe Konzentrationen an Legionellen von 1,7 KBE/mL nachgewiesen werden (Kusnezow *et al.*, 2010). Die Konzentration von Legionellen im Schlamm lag im Bereich zwischen  $10^3$  bis  $10^5$  KBE/g.

Neben der Zellstoff- und Papierindustrie, wurde ebenfalls in Kläranlagen aus der Nahrungsmittel- (Gregersen *et al.*, 1999) und petrochemischen Industrie (Nguyen *et al.*, 2006) (Tab.2) über das Auftreten von Legionellen berichtet. Interessanterweise lag die Temperatur des durch diese Industrien anfallenden Abwassers unter 30 °C, was durch Allestam *et al.* (2006) als Schwellenwert für das Auftreten von Legionellen betrachtet wird. Eine Umfrage von Huang *et al.* (2009) in mehreren Kläranlagen in Taiwan berichtete, dass das Auftreten von Legionellen unabhängig von der Art des Abwassers bei Temperaturen zwischen 22°C und 25 °C lag.

Im Belebtschlammverfahren dienen Amöben als wichtige Antagonisten zur Kontrolle der mikrobiellen Gemeinschaften. Die Anwesenheit von *Acanthamoeba*, *Hartmannella* und *Naegleria* in kommunalen Kläranlagen wurde bereits von García *et al.* (2011) beschrieben. Im Abwasser könnten Amöben eine ebenso wichtige Rolle bei der Replikation von Legionellen spielen wie in Süßwasseröko- und Trinkwassersystemen (Fields *et al.*, 2002). Das Verständnis der Faktoren, die zur Persistenz und zum Wachstum von Legionellen in der Kläranlage beitragen, wie Temperatur, Abwasserzusammensetzung, Betriebsparameter, die parasitäre Beziehung zu Protozoen usw., ist nach wie vor begrenzt. Dies erschwert die Entwicklung von Strategien zur Reduzierung bzw. Unterdrückung von Legionellen in biologischen Systemen.

Das vorliegende Forschungsvorhaben sollte unter Berücksichtigung folgender Fragestellungen durchgeführt werden:

- **Betriebsstrategien:**

- Variation des Betriebsparameters „Schlammalter“  $t_{T5}$  in Abhängigkeit der Temperatur des Belebungsverfahrens
- Ziel war die Reduzierung der Legionellen und deren Wirtszellen (Protozoen) mit dem Überschussschlamm

- **Ultraschall:**

- Teildesintegration des belebten Schlammes mittels Ultraschall (Teilstrombehandlung)
- Ziel war die Reduktion der Nacktamöben, wodurch die Entkopplung der Aufenthaltszeit vom Schlammalter erreicht wird und den Bakterien ihr Wirt- und damit die Möglichkeit zur Vermehrung - entzogen werden sollte.

Auf dieser Basis wurden drei kontinuierliche Versuche (Dauer ca. 30–50 d) geplant und durchgeführt. Mit dem ersten kontinuierlichen Versuch sollte die Frage beantwortet werden, ob Legionellen

im Belebtschlamm durch den kontinuierlichen Input aus dem Industrieabwasserstrom bei niedrigen Temperaturen persistieren, oder ob trotz der Umweltbedingungen ein Wachstum möglich ist. Im darauffolgenden Versuch sollten zwei Fragestellungen parallel bearbeitet werden. Zum einen ob Legionellen im Belebtschlamm durch die Zugabe von proteinreichem Substrat (verdünntes Hefekonzentrat) persistieren. Zum anderen sollte die Wirkung der Ultraschallenergie auf die Reduktion der trophozoiten Amöben und freischwimmenden Legionellen im Belebtschlamm untersucht werden. Durch die Verwendung von Ultraschall zur Lyse von Amöben in Belebungsanlagen könnte erreicht werden, dass die Legionellen möglicherweise nicht mehr in der Lage sind, sich zu vermehren und folglich aus dem System eliminiert werden. Im letzten kontinuierlichen Versuch wurde nochmals der Einfluss von Temperatur untersucht, allerdings diente hier ebenfalls verdünntes Hefekonzentrat als Substrat. Dadurch sollte zusätzlich der Einfluss von proteinreichem Substrat im Vergleich zum Abwasser im ersten kontinuierlichen Versuch evaluiert werden.

Darüber hinaus wurden weitere Batchtests durchgeführt, um u.a. das Potential der möglichen Wiederbesiedlung durch trophozoite Amöben aus den Zysten im Belebtschlamm nach der Behandlung mit Ultraschall zu untersuchen. Im ersten Vorversuch wurden dazu zwei Sequencing-Batch-Reaktoren (SBR) mit zwei verschiedenen proteinreichen Substraten als Zulaufalternative für Abwasser aus Warstein getestet. Für den zweiten Vorversuch wurden dann zwei weitere SBRs mit und ohne Ultraschallbehandlung betrieben um das Wachstum von Legionellen ohne potenziellen Wirt (Amöben) beurteilen zu können. Außerdem wurde der Einfluss von Polyaluminiumchlorid auf die Menge der Legionellen im Belebtschlamm unter Zuhilfenahme der Viability PCR (vPCR) untersucht.

Tabelle 1 Vorkommen und Quantität von Legionellen in biologischen Behandlungsanlagen der Zellstoff- und Papierindustrie

Abwassertyp	T [°C]	Herkunft der Probe	% an positiven Legionellenproben	Methode	Konzentration	Art	Quelle
Papierfabriken (43 BBA, 65 % der Proben Legionellen positiv)	-	Kühlturm	3/12 (25 %)	Standardmethode	-	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14 (dominant)	Allestam <i>et al.</i> (2006) Schweden
	-	Schlamm	21/39 (54 %)	Standardmethode	10 <sup>5</sup> KBE/g	<i>L. pneumophila</i> SG 1 (in 5 Kläranlagen)	
	37	Belüfteter Teich	24/43 (56 %)	Standardmethode	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>6</sup> KBE/mL		
Papierfabriken (Kläranlage A)	33	Belebungsbecken	-	Standardmethode	2·10 <sup>4</sup> KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 13	Kusnetsov <i>et al.</i> (2010) Finnland
	36	Belebungsbecken	-	Standardmethode	10 <sup>3</sup> KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 1	
	35	Nachklärung (Abwasser)	-	Standardmethode	23 KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 1 Bellingham	
	36	Nachklärung (Schlamm)	-	Standardmethode	2·10 <sup>3</sup> KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 1 Bellingham, <i>L. pneumophila</i> SG 13	
Papierfabriken (Kläranlage B)	37,7	Belebungsbecken	-	Standardmethode	3·10 <sup>4</sup> KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 5	
	35,2	Belebungsbecken	-	Standardmethode	4,3·10 <sup>4</sup> - 8,0·10 <sup>6</sup> KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 5, <i>L. rubrilucens</i>	
	37,3	Kühlturm (Abwasser)	-	Standardmethode	1,7 KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 2	
Holz- und Papierfabriken	36 - 38	Belüfteter Teich	-	Standardmethode	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>7</sup> KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 1	Blatny <i>et al.</i> (2008) Olsen <i>et al.</i> (2010) Norwegen
	→15	Abschaltung des belüfteten Teiches	-	Standardmethode	10 <sup>7</sup> → 10 <sup>3</sup> KBE/mL		
	-	Luft (über belüftetem Teich)	-	Standardmethode	3300 KBE/m <sup>3</sup>		
Holz- und Papierfabriken	36 - 38	Abschaltung des belüfteten Teiches	-	qPCR (mip gene)	10 <sup>6</sup> → 10 <sup>3</sup> GE/mL (in 1 Monat)	<i>L. pneumophila</i>	Fykse <i>et al.</i> (2013) Norwegen

- kein Angabe

Tabelle 2 Vorkommen und Quantität von Legionellen in verschiedenen Kläranlagen

Abwassertyp	T [°C]	Herkunft der Probe	% an positiven Legionellenproben	Methode	Konzentration	Art	Quelle
Nahrungsmittel-industrie	>20	Schlammdekanter	-	Standard-methode	1,5·10 <sup>7</sup> KBE/g	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. londiniensis</i>	Gregersen <i>et al.</i> (1999) Dänemark
Abwasserreini-gung (7 Kläran-lagen: 100 % der Proben Legionel-len positiv)	-	Abwasser	-	qPCR	10 <sup>5</sup> Kopien/mL	<i>L. spp.</i>	Medema <i>et al.</i> (2004) Niederlande
				Standard-methode	<20 - <200 KBE/mL		
	-	Luft über Tropfkörper, Belebungsbecken  Rechen, Siebbandpresse	3/5 (60 %)	qPCR	0.56 – 56 Kopien/m <sup>3</sup> , max. 100 Kopien/m <sup>3</sup>	<i>L. spp.</i> , <i>L. pneumophila</i>	
				Standard-methode	<0,1 - <1 KBE/m <sup>3</sup>		
Petrochemische Industrie (Lösungsmittel)	-	Biologische Behandlung	-	Standard-methode	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>7</sup> KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> SG 1 Stamm Lens	Nguyen <i>et al.</i> (2006) Frankreich
Integrierte Abwasser-reinigung 10/17	24,4	Zulauf	3/4 (75 %)	PCR	-	<i>L. donaldsonii</i> , <i>L. pneumophila</i> , nicht kultivierte <i>L. spp.</i>	Huang <i>et al.</i> (2009) Taiwan
		Belebungsbecken	7/10 (70 %)	PCR	-	<i>L. donaldsonii</i> , nicht kultivierte <i>L. spp.</i>	
		Ablauf	3/4 (75 %)	PCR	-	<i>L. donaldsonii</i>	
Krankenhaus	24,9	Zulauf	2/3 (67 %)	PCR	-	<i>L. donaldsonii</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>L. lytica</i>	
		Belebungsbecken	5/6 (83 %)	PCR	-	keine	
		Ablauf	0/3 (0 %)	PCR	-	<i>L. donaldsonii</i> , nicht kultivierte <i>L. spp.</i>	
Industrie	22,1	Zulauf, Belebungs-becken und Ablauf	2/7 (29 %)	PCR	-	nicht kultivierte <i>L. spp.</i>	
Kommunal	23,8		3/4 (75 %)	PCR	-	<i>L. lytica</i> , <i>L. anisa</i> , nicht kultivierte <i>L. spp.</i>	

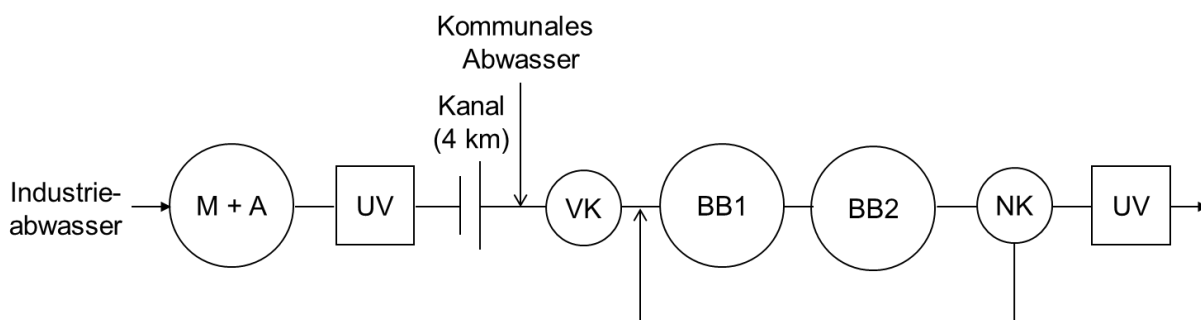
- kein Angabe

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Kläranlage und Proben

Die Proben wurden größtenteils aus der Kläranlage Warstein (KA Warstein) entnommen, deren Ausbaugröße bei 45.200 EW liegt. Der Zulauf der KA Warstein setzt sich aus dem kommunalen Zulauf und einem separaten Zulauf aus der Warsteiner Brauerei (ca. 1/3 des Zulaufes) zusammen. Die mittlere Tagesabwassermenge lag 2013 bei 10.767 m<sup>3</sup>/d. Die Kläranlage umfasst zwei Belebungsbecken mit einem Gesamtvolumen von 3.200 m<sup>3</sup>, die als vorgeschaltete Denitrifikation mit interner Rezirkulation betrieben werden. Dabei wird das erste Becken als Denitrifikations-Nitrifikationsbecken und das zweite Becken als Nitrifikationsbecken betrieben (Abb. 1). Das aerobe Schlammalter liegt bei ca. 10 Tagen.

Die Proben wurden aus dem Ablauf des 2. Belebungsbeckens und dem Ablauf der Vorklärung im März, Juli und September des Jahres 2014 entnommen und zum Labor transportiert. Die Belebtschlammprobe wurde als Inokulum zum Beimpfen der Reaktoren in den Versuchen 1-3 genutzt. Der Ablauf der Vorklärung wurde als Feed für die Reaktoren im ersten kontinuierlichen Versuch verwendet. Die Proben wurden unmittelbar nach der Probenahme durch ein Logistikunternehmen nach Hannover transportiert und während des Transports zum Labor mit Kühllakus gekühlt.



#### Beschreibung der Abkürzungen:

M+A - Misch- und Ausgleichsbecken; VK - Vorklärung; BB - Belebungsbecken (BB1 = Denitrifikation und Nitrifikation, BB2 = Nitrifikation); NK - Nachklärung; UV - UV-Behandlung

Abbildung 1 Schema der kommunalen Kläranlage Warstein

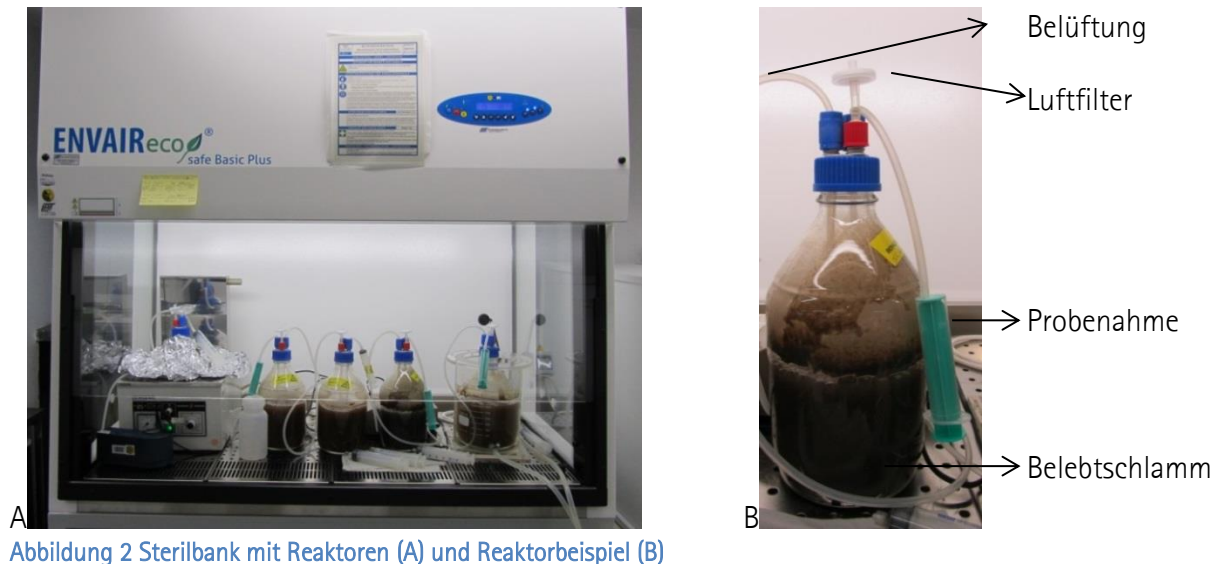
In den kontinuierlichen Versuchen 1 und 2 sowie in den Vorversuchen zum Versuch 2 wurden zusätzlich Schlammproben aus dem Belebungsbecken einer kommunalen KA (kKA) untersucht. Diese Kläranlage ist für 500.000 EW ausgelegt und behandelt vorwiegend kommunales Abwasser (ca. 65.000 m<sup>3</sup>/d).

Die Untersuchungen in diesem Teilprojekt lassen sich in zwei Phasen einteilen. In Phase 1 (kontinuierlicher Versuch 1) wurde der Ablauf der Vorklärung aus der KA Warstein als Substrat eingesetzt um die Bedingungen für die Legionellen in den Kläranlagen nachzubilden (schwankende CSB-Konzentrationen und Legionellen im Zulauf). Für die Phase 2 wurde statt des Abwassers Hefekonzentrat als Substrat verwendet um einen konstanten CSB im Zulauf zu garantieren, der gleichzeitig legionellenfrei ist. Zusätzlich wurden Untersuchungen mit proteinreichem Substrat (Hefekonzentrat und synthetisches Abwasser), Ultraschall und Polyaluminiumchlorid durchgeführt.

Im Folgenden sind die Versuchsaufbau, sowie Ablauf und Analyseverfahren beschrieben.

## 2.2 Versuchsaufbau

Als Reaktoren dienten 2L-Schottflaschen die aus Sicherheitsgründen in einer Sterilbank aufgebaut wurden (Abb.2A). Die Reaktoren wurden als Sequencing-Batch-Reaktor (SBR) betrieben und stets belüftet. Um einen Austrag der Legionellen über Aerosolbildung zusätzlich zu minimieren, wurde die aus den Flaschen austretende Luft durch einen Membranfilter in die Sterilbank entlassen (Abb.2B).



### 2.2.1. Kontinuierlicher Versuch 1

In Abbildung 3 ist der Versuchsaufbau des kontinuierlichen Versuch 1 schematisch dargestellt. Reaktor 1 enthielt Schlamm aus der in Kapitel 2.1 beschriebenen kommunalen Kläranlage und wurde auch mit Abwasser aus dieser Anlage beschickt. Dieser Reaktor sollte als Negativkontrolle dienen, da hier kaum kultivierbare Legionellen nachweisbar waren. In allen anderen Reaktoren (R2-5) wurde der Belebtschlamm aus Warstein eingesetzt. Zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Entwicklung der Legionellen bei gleichzeitigem Input von Legionellen aus dem Zulauf wurden die Reaktoren 2-4 bei 15°C, 22°C und 35°C betrieben und mit Abwasser aus der KA Warstein beschickt. Der Reaktor 5 hingegen wurde mit verdünntem Abwasser aus der kommunalen KA und 22°C Reaktortemperatur betrieben, um zu überprüfen, ob eine Abreicherung über das Schlammalter bei fehlendem Legionelleninput möglich ist.

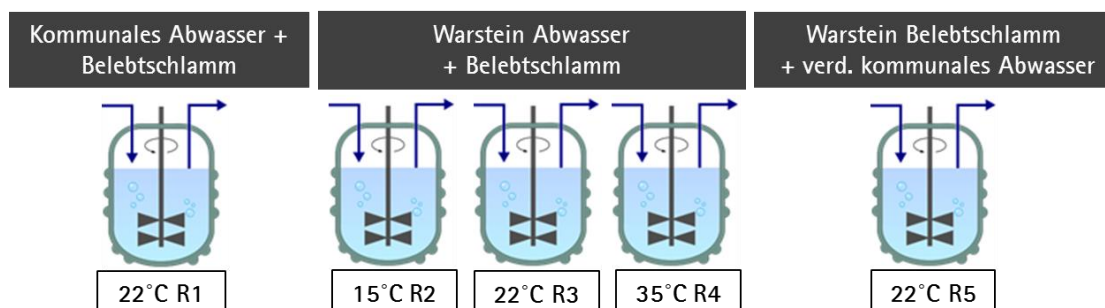


Abbildung 3 Schematische Darstellung für den kontinuierlichen Versuch 1

### Entnahme der Proben und Zugabe der Zuläufe im SBR

Aus dem volldurchmischten Reaktor wurden täglich über den Entnahmeschlauch insgesamt 150 mL Mischprobe entnommen und ggf. für die Analytik aliquotiert. Danach wurde die Belüftung abgeschaltet, damit der Schlamm sich absetzen konnte. Einmal pro Woche wurden dann auch zusätzlich vom Überstand ca. 100 mL für die analytische Zwecke abgenommen (siehe Tab. 3).

Tabelle 3 Analyseschema Kontinuierlicher Versuch 1

Analyse	Probe	Anzahl / Wo
CSB <sub>hom</sub>	Zulauf	1
TS	Mischprobe	2
CSB <sub>fil</sub>	Mischprobe	2
Amöbenzählung	Mischprobe	1
FISH	Mischprobe	1
Standardmethode (NLGA)	Überstand	1
qPCR	Mischprobe Überstand	2

Nach dem Ausschalten der Belüftung wurde entsprechend der Abb.3 der Überstand abgezogen und der Zulauf (Warsteiner oder kommunale KA Ablauf Vorklärung) direkt in die Reaktoren gegeben. Da bei 35°C ein Teil des Wassers zusätzlich verdampft sein kann, wurde eventuell fehlendes Volumen mit Leitungswasser wieder auf 1,5 L gebracht und die Belüftung wieder eingeschaltet. Zur Einstellung der Schlammbelastung von 0,16 bzw. 0,13 kg/(kg·d) lag das auszutauschende Volumen pro Tag bei 1270 mL/d bzw. 760 mL/d bei einem Gesamtvolumen von 1500 mL. Aufgrund des hohen Austauschvolumens wurde das Abwasser dann in zwei Teilschritten täglich ausgetauscht (siehe Tab.4). Alle weiteren Kennwerte des kontinuierlichen Versuch 1 sind ebenfalls in Tab.4 aufgeführt.

Tabelle 4 Parameter der Sequencing-Batch-Reaktoren für den kontinuierlichen Versuch 1

Parameter	Werte	Einheit
Reaktorvolumen	1500	mL
Schlammalter (aerob)	10	d
täglicher Überschussschlammabzug	50 + 100	mL/d
Überstandabzug Reaktor 1	254 + 506 = 760	mL/d
Überstandabzug Reaktor 2-5	423 + 846 = 1270	mL/d
Volumen an Zulauf/d für Reaktor 2-4	1270	mL/d
Volumen an Zulauf/d für Reaktor 1+5	760	mL/d
Ausgangskonzentration an TS für Reaktor 1	4,07	g/L
Ausgangskonzentration an TS für Reaktor 2-5	4,74	g/L
Anfängliche organische Belastungsrate R1	0,16	kg/(kg·d)
Anfängliche organische Belastungsrate R2-5	0,13	kg/(kg·d)
pH	7,8-8,0	-

## 2.2.2. Kontinuierlicher Versuch 2

Für den kontinuierlichen Versuch 2 wurde im Vorfeld zum einen der Einfluss von proteinreichem Substrat und zum anderen der Einfluss von Amöben auf das Wachstum der Legionellen in Belebtschlamm untersucht.

### 2.2.2.1. Vorversuche mit proteinreichem Substrat und Ultraschall

Für diesen Versuch wurden die Sequencing-Batch-Reaktoren für mehrere Tage mit einem aeroben Schlammalter von 10 d bei einer Schlammbelastung von 0,13 kgCSB/(kg oTS·d) und einer Temperatur von 35°C betrieben. Als Substrate wurden synthetisches Abwasser (DIN 38412 Teil 26 (L 26), 1994) und ein Hefekonzentrat getestet. Das eingesetzte Konzentrat hatte folgende abwassertechnischen Kennwerte:  $CSB_{\text{hom}} = 259 \text{ g/L}$ ,  $NH_4\text{-N} = 45,6 \text{ mg/L}$  und  $P_{\text{ges}} = 445 \text{ mg/L}$ . Das synthetische Abwasser enthält sowohl Pepton als auch Fleischextrakt, die beide reich an Proteinen sind. Der Belebtschlamm für diesen Versuch stammte dabei nicht aus Warstein, sondern aus der kommunalen Kläranlage.

Im zweiten Vorversuch wurde das gesamte Volumen an Belebtschlamm (Ursprung hier: Warstein) in den Reaktoren (0,75 L) mit einer Ultraschallenergie von 2 W·h/L behandelt zur Zerstörung der trophozoitischen Amöben. Anschließend wurde der geschallte Schlamm in einem SBR mit dem Hefekonzentrat inkubiert. In einem Parallelansatz wurde ein Kontrollreaktor mit unbehandeltem Belebtschlamm wie oben beschrieben betrieben. Die Bestimmung der Konzentrationen an *Legionella* spp., *L. pneumophila* und Amöben im SBR erfolgte zu Beginn des Versuches und nach 7 Tage Inkubation.

Die Betriebsweise des Ultraschall-Disruptor Sonifier II-Modell W-250 (Branson, Deutschland) (Abb.4) wird im Kapitel 2.2.2.2 detaillierter ausgeführt.



Abbildung 4 Ultraschall-Disruptor  
Sonifier II-Modell W-250



### 2.2.2.2. Kontinuierlicher Versuch 2

In Abb.5 ist der Versuchsaufbau für den kontinuierlichen Versuch 2 schematisch dargestellt. Reaktor 1 enthielt Belebtschlamm aus der kommunalen Kläranlage und allen anderen Reaktoren (R2-5) aus der KA Warstein. Als Zulauf diente das im Vorversuch untersuchte Hefekonzentrat, da es nicht nur legionellenfrei und proteinreich ist, sondern wie der Zulauf der KA Warstein ebenfalls Hefezellen enthält. Das Hefekonzentrat ist fester Brauereiabfall, welcher Hefezellen enthält, die durch Sedimentation am Ende des Fermentationsprozesses gewonnen werden. Die chemische Zusammensetzung wurde am ISAH untersucht und ist in Tab. 9 wiedergegeben. Die eingesetzte CSB Endkonzentrationen in den Reaktoren sind in den Tabellen 7 und 10 dargestellt.

In Reaktor 1 und 2 sollte die Vermehrung von Legionellen bei optimaler Temperatur und proteinreicher Ernährung in unterschiedlichen Schlämmen verglichen werden. In Reaktor 3 wurde wie in Reaktor 2 das Wachstum von Legionellen im Warsteiner Schlamm bei proteinreichem Substrat untersucht werden, allerdings bei niedrigeren Temperaturen (22°C).

Die beiden letzten Reaktoren sind als Duplikatansatz betrieben worden, um den Einfluss einer Teilstrombehandlung mit Ultraschall (10% des Reaktorvolumens) auf das Legionellenwachstum unter optimalen Bedingungen (Temperatur und Substrat) zu untersuchen.

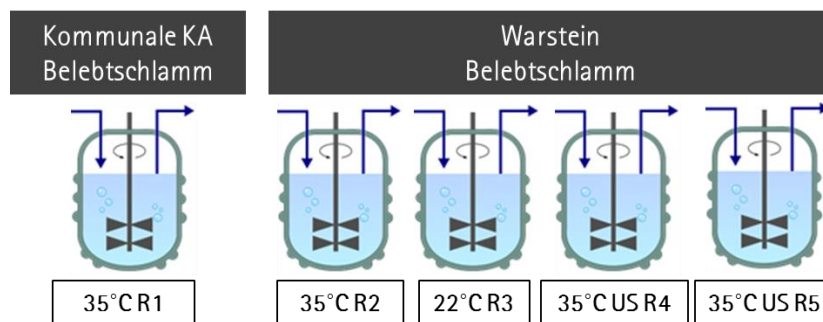


Abbildung 5 Schematische Darstellung für den kontinuierlichen Versuch 2

Aufgrund von technischen Schwierigkeiten kam es während des Versuches zu mehreren Temperaturumstellungen zu verschiedenen Zeitpunkten. Für die einzelnen Reaktoren veränderte sich das Temperaturprofil wie in Tab.5 beschrieben. Nach der ersten Temperaturveränderung ist die Interpretation der Ergebnisse durch Überlagerung mehrerer Effekte eingeschränkt.

Tabelle 5 Veränderung des Temperaturprofils der Reaktor im kontinuierlichen Versuch 2

Belebtschlamm	Warstein				Kommunale KA
Substrat	Hefekonzentrat				Hefekonzentrat
Ausgangstemperatur	22°C	35°C	35°C, 10% US	35°C, 10% US	35°C
Temperaturveränderung 1 (9 d)	-	22°C	22°C 10% US	22°C 10% US	22°C
Temperaturveränderung 2 (19 bzw. 27 d)	35°C (27d)	-	27°C (19d)	15°C (19d)	22°C

### Entnahme der Proben und Zugabe des Hefekonzentrates im SBR

Aus dem volldurchmischten Reaktor wurden täglich 150 mL Mischprobe über den Entnahmeschlauch entnommen und ggf. für die Analytik aliquotiert (Tab.6). Danach wurde die Belüftung abgeschaltet, damit der Schlamm sich absetzen konnte. Einmal pro Woche wurden dann auch vom Überstand ca. 60 mL für analytische Zwecke abgenommen (siehe Tab.6).

**Tabelle 6 Analyseschema Kontinuierlicher Versuch 2**

Analyse	Probe	Anzahl / Wo
TS	Mischprobe	2
CSB <sub>fil</sub>	Mischprobe	2
Nitrat <sub>fil</sub>	Mischprobe	2
Ammonium <sub>fil</sub>	Mischprobe	2
Amöbenzählung	Mischprobe	1
FISH	Mischprobe	1
Standardmethode (NLGA)	Überstand	1
qPCR	Mischprobe	2
	Überstand	1

Nach dem Ausschalten der Belüftung wurde vom Hefekonzentrat (Kennwerte siehe 2.2.2.1, 1:10 verdünnt) 18 mL in die Reaktoren mit Warsteiner Belebtschlamm und 23 mL in dem Reaktor mit kommunalem Belebtschlamm gegeben. Anschließend wurde mit Leitungswasser das Schlammvolumen auf 1,5 L gebracht und die Belüftung wieder eingeschaltet. Die Kennwerte der Sequencing-Batch-Reaktoren zu Beginn des kontinuierlichen Versuches 2 sind in Tab.7 aufgelistet.

**Tabelle 7 Parameter der Sequencing-Batch-Reaktoren für den kontinuierlichen Versuch 2**

Parameter	Werte	Einheit
Reaktorvolumen	1500	mL
Schlammalter (aerob)	10	d
täglicher Überschussschlammabzug	150	mL/d
Volumen an verd. Hefekonzentrat/d für R 1	23	mL/d
Volumen an verd. Hefekonzentrat/d für R 2-5	18	mL/d
Ausgangskonzentration an TS für R 1	3,048	g/L
Ausgangskonzentration an TS für R 2-5	3,005	g/L
CSB <sub>hom</sub> im verd. Hefekonzentrat	32	g/L
CSB <sub>hom</sub> in R 1 nach Zugabe des verd. Hefekonzentrates	485,76	mg/L
CSB <sub>hom</sub> in R 2-5 nach Zugabe des verd. Hefekonzentrates	380,16	mg/L
Anfängliche organische Belastungsrate R1	0,16	kg/(kg·d)
Anfängliche organische Belastungsrate R2-5	0,13	kg/(kg·d)
pH	7,8-8,0	-

## Ultraschallbehandlung

Alle Ultraschallbehandlungen erfolgten in einer geschlossenen Doppelglasrosettenzelle (100 mL). Die Ultraschallenergie wurde mit einer Amplitude von 59,5 - 247  $\mu\text{m}$  auf die Proben übertragen. Die Durchmischung der Probe wurde durch die Zirkulation der Flüssigkeit durch die 3 Arme in der Rosettenzelle und der Hauptkammer gewährleistet, angetrieben durch den Druck der Ultraschallenergie. Das zirkulierende Kühlwasser im Wassermantel hielt die Temperatur der Proben während aller Behandlungen unter 20°C. Die behandelten Proben wurden anschließend wieder in die entsprechenden Reaktoren zurückgeführt.

Für die Ultraschallbehandlung von Reaktor 4 und 5 wurden montags, mittwochs und freitags zusätzlich zum täglichen Überschussschlammabzug weitere 150 mL (10 % des Reaktorvolumens) entnommen und mit Ultraschall behandelt. Dies erfolgte bei 2 W·h/L mit dem Ultraschall-Disruptor Sonifier II-Modell W-250 (Branson, Deutschland). Da das Volumen in der Doppelglasrosettenzelle auf 100 ml begrenzt ist, wurden die beiden Teilströme in 2 Schritten (2 x 75 ml) mit Ultraschall behandelt. Die Expositionszeit für 75 mL betrug 30 s. Anschließend wurde der behandelte Teilstrom wieder in die jeweiligen Reaktoren gegeben.

### 2.2.3. Kontinuierlicher Versuch 3

Für den dritten kontinuierlichen Versuch wurde ausschließlich Belebtschlamm aus Warstein und Hefekonzentrat als Substrat eingesetzt. Wie aus Abb.6 hervorgeht, wurde bei diesem Versuch vorrangig der Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung der Legionellen im Belebtschlamm bei ausreichender Versorgung mit proteinreichem Substrat untersucht.

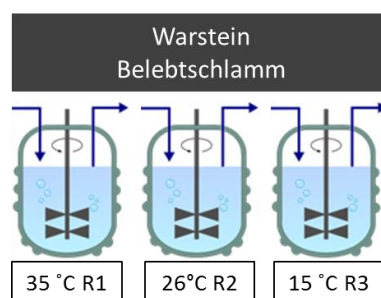


Abbildung 6 Schematische Darstellung für den kontinuierlichen Versuch 3

### Entnahme der Proben und Zugabe des Hefekonzentrates im SBR

Aus dem volldurchmischten Reaktor wurden täglich 150 mL Mischprobe über den Entnahmeschlauch entnommen und ggf. für die Analytik aliquotiert (Tab.8). Danach wurde die Belüftung abgeschaltet, damit der Schlamm sich absetzen konnte. Einmal pro Woche (bzw. für Reaktor 1 zweimal in der Woche) wurden dann auch vom Überstand ca. 60 mL für die analytische Zwecke abgenommen (siehe Tab.8).

Tabelle 8 Analyseschema Kontinuierlicher Versuch 3

Analyse	Probe	Anzahl / Wo
TS	Mischprobe	2
CSB <sub>fil</sub>	Mischprobe	2
Nitrat <sub>fil</sub>	Mischprobe	2
Ammonium <sub>fil</sub>	Mischprobe	2
Amöbenzählung	Mischprobe	1
FISH	Mischprobe	1
Standardmethode (NLGA)	Überstand	1-2
qPCR	Mischprobe Überstand	2-3 1-2

Nach dem Ausschalten der Belüftung wurden dann vom Hefekonzentrat (Kennwerte Tab.9, 1:10 verdünnt) 18 mL in die Reaktoren gegeben. Anschließend wurde mit Leitungswasser das Schlammvolumen wieder auf 1,5 L gebracht und die Belüftung wieder eingeschaltet.

Tabelle 9 Analyse des Hefekonzentrates am 17.10.2014 (unverdünnt)

Parameter	Werte	Einheit
CSB <sub>hom</sub>	327,13	g/L
P <sub>ges, hom</sub>	1,91	g P/L
TKN <sub>hom</sub>	13,78	g N/L
NO <sub>2</sub> -N <sub>fil</sub>	0,29	mg/L
NO <sub>3</sub> -N <sub>fil</sub>	401	mg/L
NH <sub>4</sub> -N <sub>fil</sub>	414	mg/L

In Tab.10 sind die Kennwerte für den Schlamm in den SBR-Reaktoren zu Beginn des Versuches aufgelistet.

Tabelle 10 Parameter der Sequencing-Batch-Reaktoren für den kontinuierlichen Versuch 3

Parameter	Werte	Einheit
Reaktorvolumen	1500	mL
Schlammalter (aerob)	10	d
täglicher Überschussschlammabzug	150	mL/d
Volumen an Hefekonzentrat/d (1:10 verdünnt)	18	mL/d
Volumen an Wasser/d	132	mL/d
Ausgangskonzentration an TS für alle Reaktoren	4,84	g/L
CSB <sub>hom</sub> im verd. Hefekonzentrat zu Beginn am 16.09.14 (bzw. am 17.10.14, s. Tab.9)	53,87 (bzw. 32,71)	g/L
CSB <sub>hom</sub> in Reaktor nach Zugabe des Hefekonzentrates	646	mg/L
anfängliche volumetrische Belastungsrate	0,65	kg/(m <sup>3</sup> ·d)
Anfängliche organische Belastungsrate	0,13	kg/(kg·d)
pH	7,8-8,0	-

## 2.3 Untersuchungsmethoden

### 2.3.1 Standardmethode, Realtime PCR und Viability PCR

Die Legionellenkonzentration in den Proben wurde mit den folgenden Methoden bestimmt (Tab.11):

Tabelle 11 Methoden zur Bestimmung der Konzentration von Legionellen

Parameter	Methode	Quelle
<i>Legionella</i> spp.	Kulturverfahren <sup>a)</sup>	ISO 11731:1998 - Water quality - Detection and enumeration of <i>Legionella</i>
	qPCR	Qiagen mericon Quant <i>Legionella</i> spp. Kit
<i>Legionella pneumophila</i>	qPCR	Qiagen mericon Quant <i>Legionella pneumophila</i> Kit

<sup>a)</sup> Analysen sind vom Niedersächsischen Landesgesundheitsamt (NLGA) durchgeführt worden

#### Standardmethode

Die Standardmethode nach ISO 11731 wurde um eine Vorbehandlung der Probe erweitert, um das Wachstum der heterotrophen Hintergrundmikroflora zu minimieren. Die Vorbehandlung bestand aus einer Hitzebehandlung für 30 min bei 50°C oder einer zweifachen Verdünnung in Säurepuffer pH 2,2 für 5 min. Entsprechende Verdünnungsreihen wurden auf GVPC -Agar ausplattiert. Die Ergebnisse des Kulturverfahrens werden in dieser Studie als Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL ausgedrückt. Eine teilweise Typisierung wurde mit Hilfe des Agglutinationstest durchgeführt (siehe dazu Bericht des NLGAs). Die Angabe der Legionellen-Spezies gibt nur einen ungefähren Einblick in die Vielfalt der Legionellen, da die Bestimmung nicht mit allen vorhandenen Kolonien erfolgen kann. Nach ISO 11731 wird bei Wachstum von Legionellen auf dem GVPC-Agar von mindestens drei charakteristischen Kolonien eine Subkultur auf BYCE-Agar angelegt, um nach erfolgtem Wachstum, dort eine Artbestimmung/Serotypisierung vornehmen zu können. Im NLGA wurden abweichend hiervon nach Ermittlung der Koloniezahl von unterschiedlich aussehenden Spezies jeweils bis zu fünf Kolonien zur Typisierung auf BYCE und zur Kontrolle auch auf Blutagar (kein Wachstum) abgeimpft. Sofern *L. pneumophila* nachgewiesen war, wurde im NLGA stets serologisch überprüft, ob es sich um den hochpathogenen Typ 1 handelte. Bei Verdacht auf den Knoxville-Stamm wurden Proben zu Dr. Lück nach Dresden (Konsiliarlaboratorium für *Legionellen*) geschickt. Bei anderen Legionellen wird kein Latex-Test (Agglutinationstest) durchgeführt. Diese Aussage gilt für alle vorgenommenen Typisierungen in dieser Studie.

#### Realtime PCR (qPCR)

Die Realtime PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, qualitativ) beruht, aber zusätzlich eine Quantifizierung der DNA ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt durch die Messungen von Fluoreszenzsignalen, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von den erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung vorgenommen. Somit können mit den entspre-

chenden Sonden sehr spezifisch Organismen (z.B. *L. pneumophila*) oder Organismengruppen (*Legionella* spp.) in einer Probe quantitativ nachgewiesen werden. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen nicht möglich ist. Es wird immer die Gesamtzahl des gesuchten Organismus angegeben.

Neben der Spezifität der Sonde ist auch die Beschaffenheit der Probe entscheidend für die Genauigkeit der Ergebnisse. Schon bei der Aufreinigung der DNS (Desoxyribonukleinsäure) aus komplexen Proben (wie z.B. in Abwasser) mit potenziell vielen PCR-Inhibitoren (u.a. Huminsäuren) muss ein geeignetes Protokoll gewählt werden, um in der qPCR ein optimales Ergebnis zu erhalten.

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

Die so erhaltene DNA wurde anschließend für die Messung mit dem Realtime PCR Messgerät (Rotor-Gene Q 2plex Platform; Qiagen) ebenfalls mit einem Kit vorbereitet. Das Protokoll wurde in Anpassung an die Probenmatrix modifiziert, unter anderem wurde zu Beginn ein Zentrifugationsschritt zur Aufkonzentration und in der Lysisphase eine Hitzebehandlung bei 90°C durchgeführt, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Die Quantifizierung erfolgte für *Legionella* spp. mit dem „Qiagen mericon Quant *Legionella* spp. Assay“ und für *L. pneumophila* mit dem „Qiagen mericon Quant *Legionella pneumophila* Assay“. Die Quantifizierungsgrenze der qPCR-Methode wird aus der Konzentration des kleinsten mitgeführten Kontrollstandards errechnet. Das Detektionslimit wird dann auf die Hälfte dieses Wertes festgesetzt.

Der „Qiagen mericon Quant *Legionella* spp. Assay“ detektiert eine Multikopiesequenz im Legionellengenom. Basierend auf der Information aus der Sequenzdatenbank ist nach Herstellerangabe das Zielgen 3- bis 4-mal im Genom enthalten (z.B. in *L. pneumophila* 1 KBE = 3 Kopien, *L. longbeachae*: 1 KBE = 4 Kopien). Um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Ergebnissen aus qPCR und Kultivierung, z.B. in Verlaufsgrafiken, herstellen zu können, war es notwendig, die Genomic Units, die mit der qPCR ermittelt wurden, in KBE-Äquivalente zu konvertieren. Um die genauen KBE-Äquivalente bestimmen zu können, müssten zuerst alle detektierten Legionellen-Spezies identifiziert und quantifiziert werden. Um eine ungefähre Konvertierung machen zu können, wurde für diese Untersuchung folgende Annahme getroffen: Für den „Qiagen mericon Quant *Legionella* spp. Assay“ entspricht 1 KBE = 3 GU. Für den „Qiagen mericon Quant *Legionella pneumophila* Assay“ entspricht 1 KBE = 1 GU. Allerdings ist auch die Vergleichbarkeit zwischen den konvertierten qPCR-Ergebnissen und den Ergebnissen der Standardmethode nur eingeschränkt gegeben, da einerseits mit der PCR neben den koloniebildenden Legionellen auch solche im VBNC-Stadium sowie schon tote Legionellen erfasst werden. Andererseits erfolgt die Berechnung der Ergebnisse der qPCR nach dem Mittelwert-Verfahren, während bei der Auswertung der Standardmethode nach DIN unter dem Aspekt einer Risikoabschätzung stets die höchste jemals gefundene Konzentration als Ergebnis angegeben wird (Pessimismusansatz). Da wir in dieser Studie nur eine begrenzte Anzahl von Analysen vorliegen haben, sollte ein direkter Vergleich der Zahlenwerte nicht vorgenommen werden. Vielmehr wird über die grafische Darstellung die Tendenz der aus beiden Methoden gewonnen Kurven miteinander verglichen.

## Viability PCR (vPCR)

Im Gegensatz zur qPCR kann bei der Viability-PCR zwischen lebenden und toten Bakterien unterschieden werden (Mansi *et al.* 2014). Die Membran-Integrität wird hierbei als Kriterium zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen verwendet. Andere, gut erprobte Anwendungsbeispiele, die auf dem gleichen Prinzip beruhen, sind das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit für die Mikroskopie von ThermoFisher Scientific oder die Live-or-Dye™ Fixable Viability Staining Kits für die Durchflusszytometrie von Biotium. Legionellen im VBNC-Stadium werden zusammen mit den lebenden Zellen (in der multiplikativen Phase) mittels vPCR quantifiziert. Dafür wird eine Teilprobe mit Ethidium Monoazid Bromid (EMA) behandelt. Da eine intakte Zellwand für EMA impermeabel ist, dringt es nur in Zellen mit beeinträchtigter Membranintegrität ein. Anschließend wird die Probe in einer Photolyseeinheit unter Kühlung mit LED-Licht bestrahlt. Dabei bildet der Farbstoff Nitren-Radikale, die an den Kohlenstoff-Bindungsstellen mit der DNA stabile kovalente Stickstoff-Kohlenstoff-Bindungen eingehen. Dies bewirkt eine permanente DNA-Modifikation. Bei der anschließenden qPCR-Analyse ist die DNA nicht amplifizierbar. Dadurch werden tote Bakterien maskiert (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009). Anschließend wird die Legionellenzahl in der behandelten und einer nicht mit EMA behandelten Teilprobe mittels qPCR bestimmt. Die unbehandelte Probe zeigt die Gesamtzahl an Legionellen, die mit EMA behandelte die Anzahl an lebenden Legionellen. Die Anzahl der toten Legionellen kann über die Differenz errechnet werden. Weiterführende Versuche im Nachgang zu den im Bericht dargestellten Versuchen haben eine weitere Verbesserung der Spezifität durch Wechsel auf Propidium Monoazid (PMA) anstelle von EMA ergeben.

Die viability qPCR-Methode detektiert in kurzer Zeit (2-3 Stunden inklusive DNA-Extraktion) das Vorhandsein von *Legionella* mit einer intakten Zellmembran, was auf lebensfähige oder VBNC<sup>1</sup> Legionellen hinweisen kann. Die Bestätigung der viability qPCR-Ergebnisse kann dann mit der Kultivierungsmethode erfolgen, welche als goldener Standard für den Nachweis von Legionellen durchgeführt wird. Diese Methode hat jedoch zwei große Nachteile: Sie erfordert lange Inkubationszeit (7-10 d) und sie detektiert keine Zellen im VBNC-Stadium. Außerdem erwies sich die Kultivierungsmethode aufgrund von extremer Begleitflora auf den Legionellen-Platten als ungeeignet für direkte Messungen in gemischten Belebtschlammproben. Mit der viability qPCR-Methode lassen sich hingegen gute Ergebnisse erzielen, wenn beachtet wird, dass durch Wahl eines geeigneten Probevolumens und wiederholtes Mischen der Probe während der Photolyse eine ausreichende Belichtung aller Zellen erfolgt und dass als Kontrolle ein weiteres Aliquot mitgeführt wird, in dem zuvor alle Zellen durch eine Wärmebehandlung abgetötet wurden. Diese darf in der anschließenden qPCR kein Signal ergeben. Dadurch wird auch sichergestellt, dass die zugesetzte Menge an EMA/PMA ausreichend war.

Die viability qPCR-Methode war nicht als Überwachungsparameter in diesem Projekt enthalten. Wir entschieden uns dennoch diese neue Methode anzuwenden, da sie Zellen mit einer beschädigten Membran von der Quantifizierung ausschließt und so realistischere Ergebnisse als die traditionelle PCR liefert.

---

<sup>1</sup> VBNC-viable but not cultivable

### 2.3.2 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

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

Für den Nachweis von Legionellen im Belebtschlamm wurde die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) mit den rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden LEG705 für *Legionella* spp. bzw. LEGPNE1 für *Legionella pneumophila* [Manz *et al.* (1995); Grimm (2000)] durchgeführt. Zur Detektion von Eukaryoten und Amöben wurden die Sonden EUK516 (Eukaryoten), HART498 (*Hartmannella* spp.), NAEG1088 (*Naegleria* spp.) und GSP (*Acanthamoeba* spp.) eingesetzt (Grimm 2000). Die Sonden wurden als Derivate mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3, Tamra und Fluos (biomers.net) eingesetzt. Die FISH-Analyse wurde mit den Hybridisierungs- und Waschpuffern nach Manz *et al.* (1995) durchgeführt. Zur Dokumentation wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Deutschland) mit integrierter Digitalkamera (AxioCam ICc1, Zeiss Deutschland) genutzt.

### 2.3.3 Mikroskopische Untersuchung des Schlammes

Die mikroskopischen Untersuchungen des Belebtschlammes wurden mit einem besonderen Schwerpunkt auf Flokkenstruktur und Zusammensetzung der Protozoen und Metazoengemeinschaft durchgeführt. Die Bestimmung der Amöbenzahl erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Sehr kleine Nacktamöben mit einer Länge zwischen 5 µm und 15 µm wurden nur dann mit erfasst, wenn sie neben einer amöboiden Struktur auch einen amöboiden Bewegungsmodus aufwiesen. Sehr kleine Nacktamöben <15 µm konnten aufgrund der Größe (grundsätzlich) nicht auf Artniveau bestimmt werden.

### 2.3.4 Chemische und physikalische Parameter

Die Analysen der Parameter TS, CSB, Nitrat und Ammonium zur Kontrolle der Aktivität der Biomasse in den Reaktoren wurde, wie in Tab.12 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 12 Analyseverfahren für die chemischen und physikalischen Parameter

CSB (homogenisiert und filtriert)	LCK 314 CSB Küvetten-Test 15-150 mg/L O <sub>2</sub> (Hach-Lange)	ISO 6060-1989
Nitrat (filtriert)	LCK 339 Nitrat Küvetten-Test 0,23-13,5 mg/L NO <sub>3</sub> -N (Hach-Lange)	ISO 7890-1-2-1986
Ammonium (filtriert)	LCK 304 Ammonium Küvetten-Test 0,015-2,0 mg/L NH <sub>4</sub> -N (Hach-Lange)	ISO 7150-1
TS-Gehalt	-	DIN 38414-2
pH-Wert	Universal-Indikatorstäbchen pH-Fix (pH 0-14, Roth) pH-Meter (für Analysen)	-



Zur Charakterisierung des Hefekonzentrats wurden folgende Parameter bestimmt (Tab.13):

Tabelle 13 Analyseverfahren für die chemischen und physikalischen Parameter des Hefekonzentrates

CSB (homogenisiert)	LCK914 CSB Küvetten-Test 5 - 60 mg/L O <sub>2</sub> (Hach-Lange)	ISO 6060-1989, DIN 38409-H41-H44
P (gesamt)	LCK350 Phosphat-Küvetten-Test 2 - 20 mg/L PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P (Hach-Lange)	ISO 6878-1-1986, DIN 38405 D11-4
Nitrat	LCK 340 Nitrat Küvetten-Test 5 - 35 mg/L NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (Hach-Lange)	ISO 7890-1-2-1986, DIN 38405 D9-2
Nitrit	LCK341 Nitrit Küvetten-Test 0,015-0,6 mg/L NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (Hach-Lange)	EN ISO 26777, DIN 38405 D10
Ammonium	LCK 303 Ammonium Küvetten-Test 2 - 47 mg/L NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (Hach-Lange)	ISO 7150-1
Kjeldahl-Stickstoff	-	EN25663:1993

Für die Bestimmung des Kjeldahl-Stickstoffs wurde die Methode dahingehend angepasst, dass statt des angegebenen Selen-Katalysators eine Mischung aus K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und CuSO<sub>4</sub> im Verhältnis 1:10 verwendet wurde.

## 2.4 Berechnungen

Der theoretische Trockensubstanzgehalt bei Überschussschlammabzug und fehlender Vermehrung der Biomasse im SBR wurde wie folgt berechnet:

$$TS_n = TS_0 \cdot (1 - Q/V)^n$$

Dabei steht TS<sub>n</sub> für den Trockensubstanzgehalt nach n Tagen und TS<sub>0</sub> für den TS-Gehalt zum Zeitpunkt T=0 (Ausgangskonzentration) und Q/V für das reziproke Schlammalter bzw. die Auswaschrate.

Der von der Stromversorgung des Sonifiers generierte Energieeintrag (E) kann als

$$E = (P \cdot t) / V$$

berechnet werden. Dabei wird die Leistung P in W, die Dauer der Ultraschallbehandlung t in s und das Volumen der Probe V in L angegeben.

Die Berechnung der Wachstumsrat basiert auf folgender Gleichung:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad (\text{Differentialgleichung})$$

$$\mu = \frac{1}{X_1} \cdot \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{numerische Lösung})$$

Dabei steht  $\mu$  für die spezifische Wachstums,  $t$  für die Zeit ( $t_x =$  bestimmter Zeitpunkt) und  $X$  für die Anzahl der Bakterien (hier: *Legionella pneumophila* oder *Legionella* spp.) in KBE/mL bzw. KBE<sub>äq</sub>/mL.

Die Berechnung der Zerfallsrate basiert auf folgender Gleichung:

$$\frac{dX}{dt} = -k \cdot X \quad (\text{Differentialgleichung})$$

$$k = -\frac{1}{X_1} \cdot \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{numerische Lösung})$$

Dabei steht  $k$  für die spezifische Zerfallsrate

Die Berechnung des CSB-Abbaus basiert auf folgender Gleichung:

$$\text{CSB}_{\text{Abbau}} (\%) = [(\text{CSB}_{\text{Zulauf}} - \text{CSB}_{\text{Ablauf}}) / \text{CSB}_{\text{Zulauf}}] \cdot 100$$

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Kontinuierlicher Versuch 1

##### 3.1.1 Chemische und physikalische Parameter

In Abb.7 ist die CSB-Konzentration im Zulauf (homogenisiert, Abb.7A) und Ablauf der Reaktoren (filtriert, Abb.7B) dargestellt, sowie der TS-Gehalt in den Reaktoren (Abb.7C) während des gesamten Versuches.

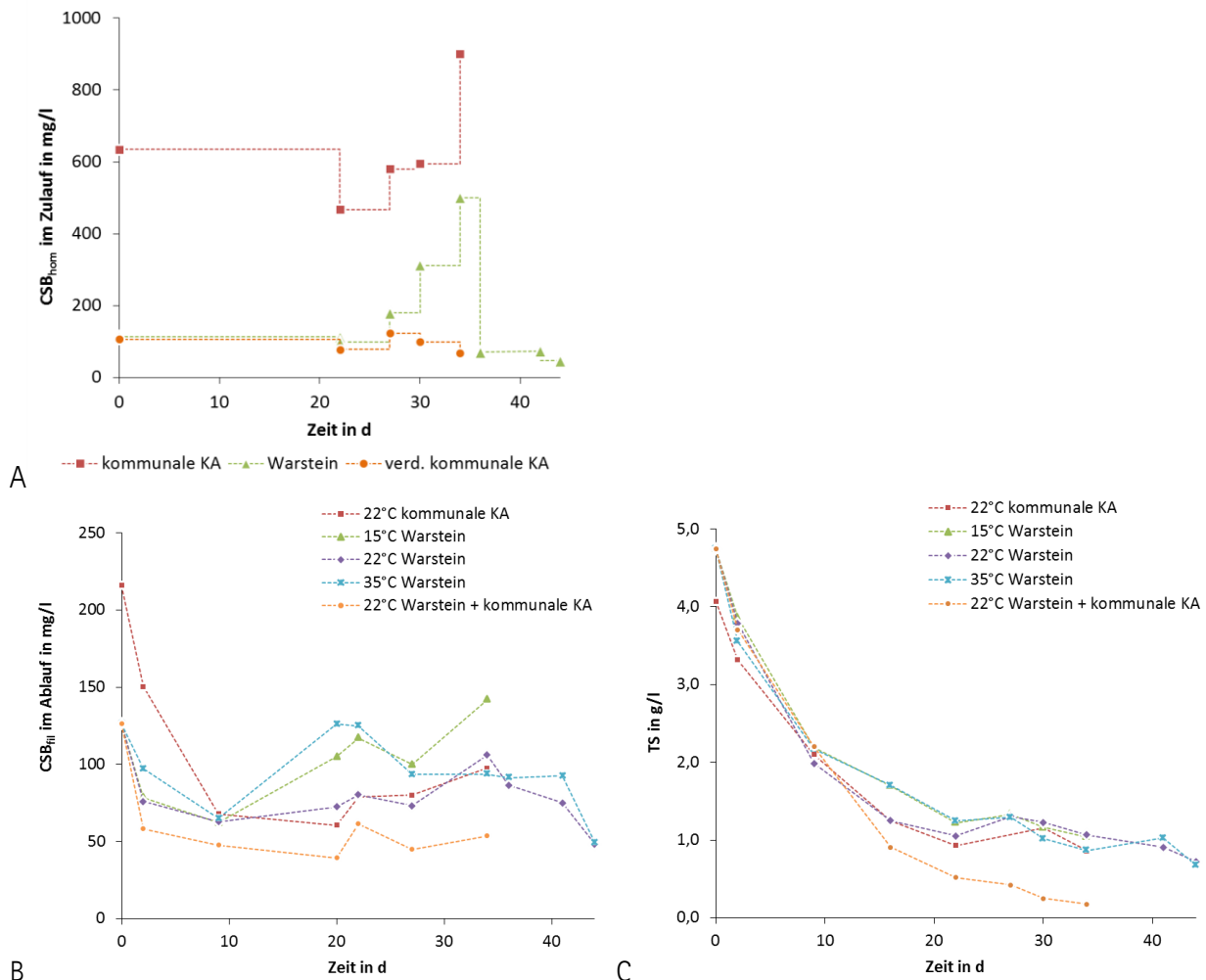


Abbildung 7 Verlauf der chemisch-physikalischen Parameter im kontinuierlichen Versuch 1; Substrat Abwasser aus KA Warstein bzw. kommunaler KA

A) CSB<sub>hom</sub> im Zulauf, B) CSB<sub>fil</sub> und C) TS im Ablauf der Reaktoren

Es ist deutlich zu erkennen, dass der CSB-Gehalt im Zulauf des Reaktors mit Abwasser aus der kommunalen Kläranlage während des gesamten Experimentes deutlich höher war (Ø 600 mg/L) als der Zulauf aus der KA Warstein (Ø 148 mg/L im Jahr 2013). Im Reaktor mit dem verdünnten kommunalen Abwasser als Zulauf blieb die Konzentration über den gesamten Zeitraum des Experimentes konstant bei ca. 148 mg/L. Dahingegen konnte am 34 d ein Anstieg der CSB-Konzentration im kommunalen Abwasser bis auf über 900 mg/L beobachtet werden. Auch im Abwasser aus Warstein wurde am 27 d bei der Anlieferung des neuen Zulaufs eine deutliche Trübung des ansonsten klaren Abwassers festgestellt. Auch der CSB-Wert stieg im Vergleich zu den vorherigen Messungen deut-

lich an (bis auf max. 500 mg/L). Ab dem 36 d ging die Konzentration dann wieder auf ca. 70 mg/L zurück und sank sogar noch bis auf 44 mg/L ab, woraufhin der Versuch abgebrochen wurde. Bei dem Zulauf aus Warstein könnte es sein, dass zum Zeitpunkt der Probenahme eventuell die Wirksamkeit des eingesetzten Flockungsmittel (PAC) kurzzeitig herabgesetzt war aufgrund von einer plötzlichen Stoßbelastung mit CSB aus der Brauerei, die über die Konzentration hinausging für die das Polymer ausgelegt war. Die Schwankungen in der kommunalen KA sind im Toleranzbereich.

Der im Ablauf gemessene CSB (Abb.7B) zeigt für alle Reaktoren ein Absinken der CSB-Konzentration in den ersten 9 Tagen ist danach im Durchschnitt stabil. Berechnet man den CSB-Abbau für die einzelnen Reaktoren (Tab.14) fällt auf, dass im Warsteiner Schlamm unabhängig von Temperatur und Substrat der Abbau im Durchschnitt unter 50% lag. Der Schlamm aus der kommunalen KA hingegen konnte eine CSB-Abbaueffizienz von  $72 \pm 10 \%$  erreichen (siehe Kapitel 2.4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei dem Schlamm aus der KA Warstein durch den vorherrschenden Nährstoffmangel die Biozönose bereits gestresst war und somit im Vergleich zu dem Schlamm aus der kommunalen KA eine geringere Abbaueffizienz aufweist.

**Tabelle 14 CSB-Abbau in den einzelnen Reaktoren im kontinuierlichen Versuch 1**

Belebtschlamm	Warstein			Warstein	Kommunale KA
Substrat	Warstein			verd. kKA	Kommunale KA
Abbau von CSB	15°C	22°C	35°C	22°C	22°C
	$38 \pm 18 \%$	$35 \pm 23 \%$	$49 \pm 20 \%$	$35 \pm 21 \%$	$72 \pm 10 \%$

Die Entwicklung des TS-Gehaltes (Abb.7C) entsprach in allen Reaktoren bis zum 20. Tag dem errechneten Trockensubstanzverlust durch Überschussschlammabzug bei unzureichender Vermehrung der Biomasse (Berechnung: siehe Kapitel 2.4). Ab diesem Zeitpunkt lag der TS-Gehalt konstant bei ca. 1 g/L. Nur in dem Reaktor mit Warsteiner Schlamm und verdünntem Abwasser aus der kommunalen KA entwickelte sich der TS-Gehalt entsprechend dem theoretisch errechneten Verlauf weiter und näherte sich dem Wert 0 g/L an.

Wahrscheinlich konnte sich die Biomasse u.a. durch den Anstieg der CSB-Konzentration in allen Reaktoren - mit Ausnahme des Reaktor mit verdünntem kommunalem Abwasser und Warstein Schlamm - soweit vermehren, um die täglich abgezogene Biomasse ausgleichen zu können. Bei einem kontinuierlichen Input von ca. 100 mg/L CSB hingegen war dies aufgrund des konstanten Nährstoffmangels nicht möglich.

### 3.1.2 Mikrobiologische Auswertung

In Abb.8 werden die mit unterschiedlichen Methoden (qPCR und Standardmethode) ermittelten Ergebnisse für die Konzentrationen an *Legionella* spp. in den Zuläufen der unterschiedlichen Kläranlagen (A – Warstein, B – kommunale KA) gegenübergestellt.

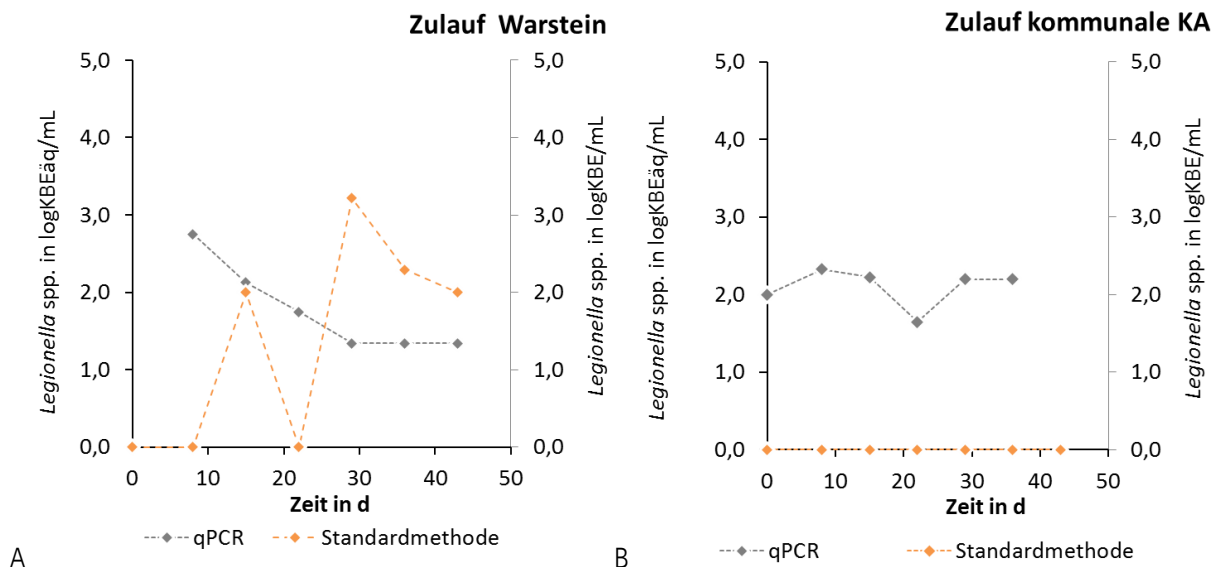


Abbildung 8 Vergleich der Ergebnisse von qPCR und Standardmethode\* für *Legionella* spp. in den Zuläufen für die Reaktoren aus der KA Warstein (A) und der kommunalen Kläranlage (B), die als Substrate in diesem Versuch dienten  
Anmerkung: Für den Reaktor mit verdünntem kommunalem Abwasser als Zulauf konnte mit beiden Methoden keine Legionellen nachgewiesen werden.

\* Ergebnisse der Standardmethode < 10 bzw. 100 KBE/mL sind aus Übersichtsgründen 0 KBE/mL gleichgesetzt worden

Man kann deutlich erkennen, dass mit Hilfe der qPCR immer *Legionella* spp. in beiden Zuläufen nachgewiesen werden können. Im Zulauf Warstein sank die Konzentration kontinuierlich von 2,8 logKBE<sub>äq</sub>/mL auf 1,3 logKBE<sub>äq</sub>/mL ab und blieb ab dem 29 d konstant bis zum Ende des Versuches. Die qPCR-Ergebnisse für den Zulauf aus der kommunalen KA blieben über den gesamten Versuchszeitraum konstant bei ca.  $2,1 \pm 0,2$  logKBE<sub>äq</sub>/mL Mit der Standardmethode hingegen konnten im Zulauf aus Warstein (Abb.8A) in den ersten 20 Tagen keine Legionellen nachgewiesen werden und im Zulauf aus der kommunalen KA (Abb.8B) für den gesamten Versuchszeitraum ebenfalls nicht. Im Zulauf Warstein konnten im Gegensatz zur kommunalen KA nach ca. 20 d nicht nur kultivierbare Legionellen nachgewiesen werden, sondern die Konzentration an kultivierbaren Legionellen lag sogar über den mit qPCR ermittelten Konzentrationen an *Legionella* spp. (größte Differenz am 34 d von 3 logKBE/mL gegenüber 1,3 logKBE<sub>äq</sub>/mL, Abb.8A).

Eigentlich müssten die qPCR-Ergebnisse immer höher ausfallen als die der Standardmethode, da mit dieser Methode zusätzlich zu den kultivierbaren auch die toten Bakterien und solche im VBNC-Stadium erfasst werden können. Theoretisch könnte die hier aufgetretene Differenz durch eine Inhibition der qPCR z.B. durch Störstoffe wie z.B. Huminstoffe hervorgerufen worden sein, sodass es zu einer Minderbewertung der Legionellen kam (Catalan *et al.* 1997). Um eine Inhibition der Reaktion auszuschließen, wurden die eingesetzten Qiagen mericon Quant Legionella Kits und die darin enthaltene interne Kontrolle, als Duplex-PCR parallel auf einem anderen Farbspektrum gemessen. Außerdem enthält das eingesetzte Kit zur Aufarbeitung der Proben spezielle Chemikalien zur Entfernung von solchen Inhibitoren, die in mehreren Versuchen auf ihre Wirksamkeit getestet wurden. Zusätzlich wurden die Proben in drei verschiedenen Verdünnungsstufen analysiert, um Inhibitionseffekte erkennen zu können. Bei Abweichungen im Ergebnis erfolgten weitere Messungen und eine Wiederholung der Aufarbeitung. Der wahrscheinlichere Grund für die Diskrepanz ist das Auftreten von *Legionella* spp. die nicht mit der Sonde aus dem qPCR-Kit erfasst werden können.

Die Typisierungsergebnisse des NLGA (dargestellt in Tab.15) zeigen, dass zumindest zu Beginn des Versuches vermehrt *Legionella londiniensis* auftrat. Diese Legionellenart unterscheidet sich auch morphologisch stark von anderen Legionellen und könnte bei genetischen Abweichungen eventuell auch nicht mit der Sonde detektiert werden. Eine Nachfrage beim Hersteller ergab, dass die Gensequenzen für *Legionella londiniensis* nicht in der Datenbank vorlagen. Somit war eine Überprüfung, ob die Sonde diese *Legionella*-Spezies erfassen kann, nicht möglich. Auch die Gensequenz des in Warstein nachgewiesenen Ausbruchsstammes *Legionella pneumophila* Knoxville ist in der Datenbank des qPCR-Kit Herstellers nicht hinterlegt. Somit kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass dieser *L. pneumophila* Stamm mit einer hohen Effizienz vom Kit erfasst wird. Eventuell handelt es sich aber auch um sogenannte „*Legionella*-like amoebal pathogens“ [LLAP, Legionellenartige Amöbenpathogene; Rowbotham (1993)] wie z.B. *Sarcobium lyticum* [auch *Legionella lytica* genannt; Springer *et al.* (1992)]. *Legionella lytica* stellt innerhalb der *Legionella* spp. einen eigenen Art dar, der nur 14% DNA-Homologien mit allen anderen Arten aufweist [Giles (1995) zitiert in Adeleke *et al.* (2001)]. Diese genetischen Abweichungen könnten genau in dem Genabschnitt auftreten, für die die Sonde designet worden ist, so dass sie sich gegebenenfalls mit einer niedrigeren Effizienz an die DNS bindet.

Für den Zulauf der kommunalen KA hingegen konnte dieses Phänomen nicht nachgewiesen werden. Der plötzliche Anstieg der Legionellen im Zulauf Warstein ist vermutlich auf die Zusammensetzung des Abwassers und die Vorbehandlung in der Vorklärung (siehe dazu auch Kapitel 2.1) zurückzuführen. Der Ablauf Vorklärung in Warstein könnte trotz der Zugabe von Fällungsmittel (PAC), gelegentlich höhere Konzentrationen an CSB und auch an Legionellen aus dem Industrieabwasserstrom enthalten. Dieser Effekt ist zu erwarten, wenn das Polymer nicht ausreichend gefällt hat, weil die PAC-Dosierung aufgrund einer Stoßbelastung durch Entleerung des Misch- und Ausgleichbeckens zu gering war. In der Folge kommt es dann zu einem Anstieg der CSB-Konzentration im Zulauf der Belebung (oder hier der Reaktoren) wie aus Abb.7A ersichtlich, sowie zu einem Anstieg der Legionellen (Abb. 8A, 34 d).

Betrachtet man Tab.15 kann man erkennen, dass sich im Verlauf des Experimentes die Zusammensetzungen der Legionellenarten in den verschiedenen Reaktoren verändert haben. Zu Beginn des Versuches kann man in allen Reaktoren, außer im Reaktor mit Schlamm und Abwasser aus der kommunalen KA, überwiegend *Legionella londiniensis* finden. Ab dem 20 d sind auch andere Legionellen nachweisbar (selbst im kKA-Reaktor). Allerdings sind diese Legionellen nicht typisierbar gewesen. Ab Tag 27 wurde in den 4 Reaktoren mit Schlamm aus Warstein auch im Ablauf vermehrt *Legionella pneumophila* SG1 nachgewiesen, im Zulauf allerdings nur im Abwasser aus Warstein.

Tabelle 15 *Legionella*-Spezies im Zu- und Ablauf des Kontinuierlichen Versuches 1

Belebtschlamm				Warstein				kommunale KA
Zulauf				Warstein			verdünnt kommunale KA	kommunale KA
Datum	Tag	Zulauf	Ablauf	15°C	22°C	35	22°C	22°C
26.03.2014	0	x		n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
			x	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. londiniensis</i>	
02.04.2014	7	x		n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
			x	<i>L. londiniensis</i> , <i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. londiniensis</i> , <i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. londiniensis</i>	n.n.
08.04.2014	13	x		n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
			x	n.n.	n.n.	<i>L. londiniensis</i> *	n.n.	n.n.
15.04.2014	20	x		<i>L. nicht typisierbar</i> *	<i>L. nicht typisierbar</i> *	<i>L. nicht typisierbar</i> *	<i>L. nicht typisierbar</i>	
			x	<i>L. nicht typisierbar</i> *	n.n.	n.n.	n.n.	<i>L. nicht typisierbar</i> *
22.04.2014	27	x		n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
			x	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1	n.n.	n.n.
29.04.2014	34	x		<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. nicht typisierbar</i> *	<i>L. nicht typisierbar</i> *
			x	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1	n.n.	n.n.
06.05.2014	41	x		-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	-	-
			x	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	-	-
09.05.2014	44	x		-	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1	-	-
			x	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	-	-

\*Typisierung erfolgte bei Proben mit Säurevorbehandlung statt mit Hitze; - keine Probenahme; n.n. – nicht nachweisbar

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der kommunalen KA und der KA Warstein ist der unterschiedliche Zulauf (industrieeinflusster kommunaler Zulauf in Warstein und der kommunales Abwasser). Im Zulauf der kommunalen KA befinden sich wahrscheinlich keine bzw. kaum Hefezellen und zu meist keine kultivierbaren Legionellen (Tab.15). Der Ablauf Vorklä rung in Warstein hin gegen enthält gelegentlich hohe Konzentrationen an Hefen aus dem Industrieabwasserstrom und zwar wahrscheinlich immer dann, wenn das Misch- und Ausgleichsbecken des angeschlossenen Industriebetriebes geleert wird. Aufgrund der Ergebnisse aus den im Folgenden beschriebenen Ver suchen mit Hefekonzentrat (siehe ab Kapitel 3.2.1.) ist anzunehmen, dass Hefe *Legionella pneumo phila* einen Wachstumsvorteil verschafft. Bei niedrigen CSB-Konzentrationen wurden im Schlamm aus Warstein hauptsächlich nicht typisierbare *Legionella*-Spezies nachgewiesen (siehe Tab.15 und Abb.7A). Als aber der CSB – und damit wahrscheinlich auch der Anteil an Hefezellen- im Zulauf anstieg, nahm auch der Anteil an *L. pneumophila* an den *Legionella* spp. zu (mit Ausnahme von Tag 34 bei 22°C).

Die Abb.9A-C zeigt die Ergebnisse für *Legionella* spp. im Belebtschlamm (qPCR) bzw. im Überstand (Standardmethode), sowie die Zahl der Nacktamöben im Belebtschlamm.

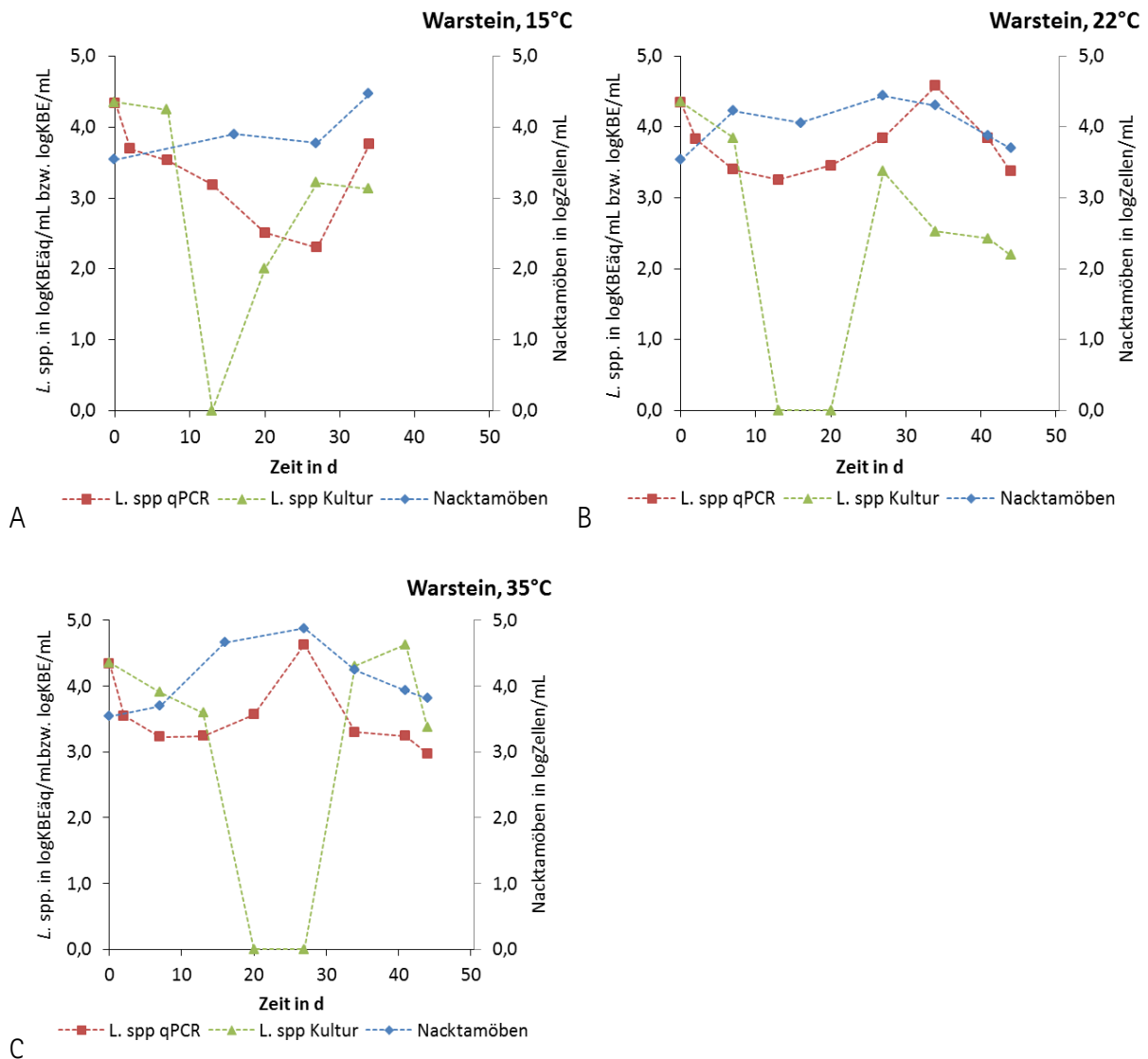


Abbildung 9 Vergleich Nacktamöben und *Legionella* spp.\* im Überstand und Belebtschlamm des Schlammes aus der KA Warstein bei unterschiedlichen Temperaturen (A-C)\*\*, Substrat: Ablauf Vorklärung KA Warstein

Zulauf Warstein, Reaktoren mit Schlamm aus der KA Warstein bei A) 15°C, B) 22 °C und C) 35 °C Reaktortemperatur  
 \* Ergebnisse der Standardmethode < 10 bzw. 100 KBE/mL sind aus Übersichtsgründen 0 KBE/mL gleichgesetzt worden  
 \*\* L. spp. qPCR und Nacktamöben: im Belebtschlamm; L. spp Kultur: im Überstand

Bei 15 °C (Abb.9A) nehmen die *Legionella* spp. in den ersten 20 d (Kultur) bzw. 30 d (qPCR) ab, bevor sie dann sehr stark ansteigen (ca. 1-2 log-Stufen). Beide Methoden korrelieren bei dieser Temperatur, auch wenn die Proben aus unterschiedlichen Bereichen des Reaktors entnommen wurden (Überstand und Mischprobe, siehe Kapitel 2.2.1). Die Nacktamöbenzahl hingegen bleibt bis zum 30 d konstant bevor sie dann ebenfalls ansteigt. Im Reaktor mit einer Temperatur von 22°C (Abb.9B) hingegen ist eine Korrelation zwischen qPCR und Standardmethode nicht gegeben. Hier sieht man eine eindeutig abnehmende Tendenz in der Kultur über den gesamten Versuchszeitraum, während in der qPCR zwischen dem 13 d und dem 34 d ein deutlicher Anstieg um ca. 1,3 log nachgewiesen werden konnte. Danach sank die Konzentration aber wieder innerhalb kürzester Zeit um 1,4 logKBE<sub>äq</sub>/mL auf ca. 3 logKBE<sub>äq</sub>/mL ab. Die Zahl der Nacktamöben blieb über den gesamten Versuchs-



zeitraum relativ konstant. Für den 35 °C-Reaktor (Abb.9C) ist die Entwicklung der *Legionella* spp. (ermittelt mit qPCR) ähnlich dem 22 °C-Reaktor, nur dass der höchste Wert nicht am 34 d sondern am 27 d auftrat. Die Ergebnisse der Standardmethode liegen tendenziell immer über denen der qPCR (Ausnahme 27 d: hier konnten die Platten nicht ausgewertet werden, siehe auch Tab.15), besonders im Zeitraum zwischen dem 34 d und 44 d. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die im NLGA angewandte Methode bei mehreren Ansätzen/Verdünnungsstufen nicht mit Mittelwerten rechnet, sondern unter dem Aspekt einer Risikoabschätzung stets die höchste jemals gefundene Konzentration als Ergebnis angibt (Pessimallansatz, siehe hierzu auch Kap. 2.3.1). Außerdem zeigt der Kurvenverlauf bei 35°C eine Korrelation der Legionellen mit der Zahl der Amöben auf.

Da die absoluten Zahlen der Legionellen in diesem Versuch sehr stark schwanken, dürfen diese Ergebnisse nicht überinterpretiert werden. Vergleicht man die Ergebnisse aller drei Reaktoren mit der Verfügbarkeit von CSB (Abb.7A), so fällt auf, dass bei 15 °C ohne ausreichend CSB im Zulauf (hier: meist um die 100 mg/L) eine Abreicherung der Legionellen über ca. 20 d erfolgt. Wenn aber der CSB deutlich ansteigt (hier nach 27 d, von ca. 113 mg/l auf 500 mg/l), dann ist selbst bei diesen Temperaturen ein Anstieg der Legionellen zu verzeichnen. Wahrscheinlich wurden zusätzlich kultivierbare *Legionella pneumophila* mit dem Zulauf (erkenntlich aus Abb.8A und Tab.15) in den Reaktor eingetragen, womit sich der plötzliche Anstieg zulaufbedingt erklären lässt. Im Gegensatz dazu scheinen Legionellen bei Temperaturen von 22 °C und 35 °C generell aufgrund der höheren Temperatur persistieren zu können. Bei 35 °C ist ein Wachstum denkbar.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch für die Reaktoren mit kommunalem Abwasser und Schlamm aus Warstein bzw. von der kommunalen KA durchgeführt und in Abb.10 dargestellt.

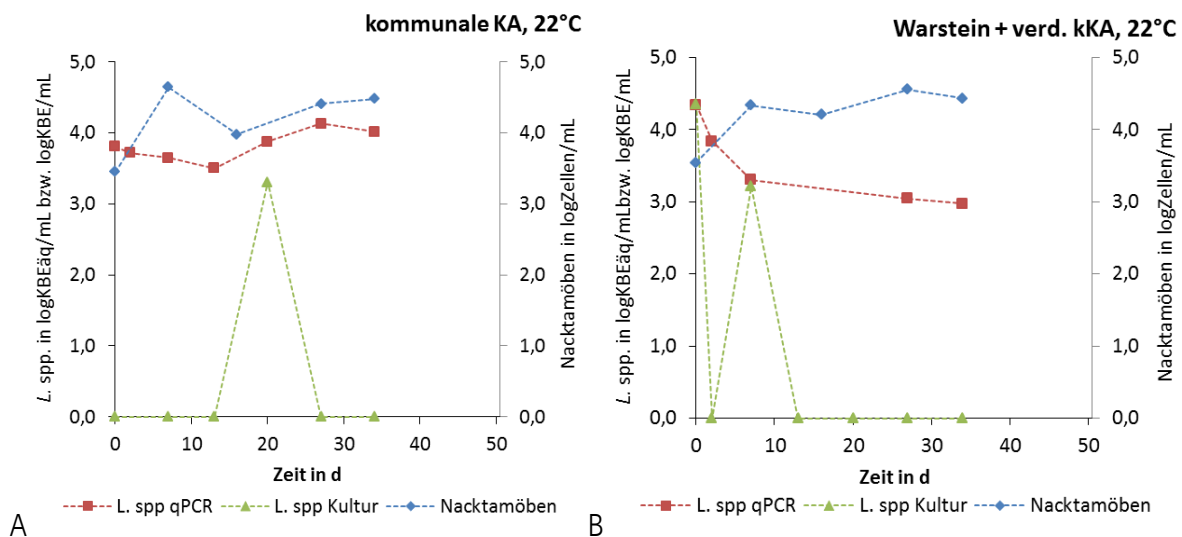


Abbildung 10 Vergleich Nacktamöben und *Legionella* spp.\* im Überstand und Belebtschlamm des Schlammes aus der kommunalen KA (A) und Warstein (B) mit Zulauf (=Substrat) aus der kommunalen KA bei 22°C \*\*

A) Schlamm und Abwasser aus der kommunalen KA, B) Belebtschlamm aus der KA Warstein mit verd. kommunalem Abwasser als Zulauf (Anmerkung: enthält keine Legionellen)

\* Ergebnisse der Standardmethode < 10 bzw. 100 KBE/mL sind aus Übersichtsgründen 0 KBE/mL gleichgesetzt worden

\*\*L. spp. qPCR und Nacktamöben: im Belebtschlamm; L. spp Kultur: im Überstand

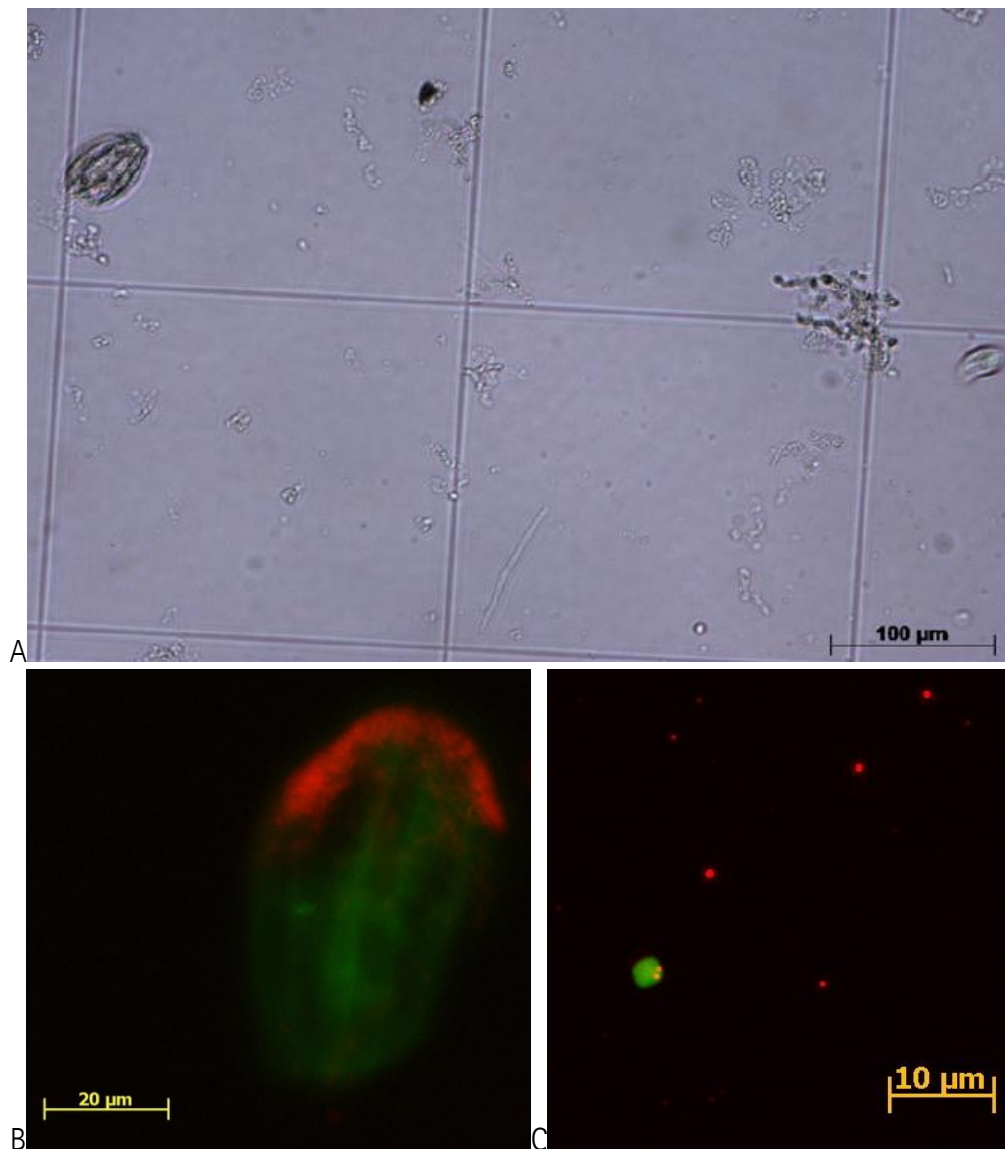
In beiden Reaktoren konnten mit der Standardmethode nur zu wenigen Zeitpunkten kultivierbare Legionellen nachgewiesen werden. Im Nachweis mit qPCR erkennt man aber, dass im Reaktor mit kommunalem Schlamm und Abwasser (Abb.10A) die Konzentration an *Legionella* spp. über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant bleibt. Beim Reaktor mit Warsteiner Schlamm und verdünntem kommunalem Abwasser als Zulauf (Abb.10B) hingegen nimmt die Konzentration über den gesamten Zeitraum stetig ab (insgesamt um 1,4 logKBE<sub>aq</sub>/mL). Die Nacktamöbenzahl steigt in beiden Reaktoren insgesamt stetig an (ca. 1log). Aber eine direkte Korrelation zwischen Amöben und Legionellen konnte bei 22°C nicht nachgewiesen werden.

Im Reaktor mit Warstein Schlamm und verdünntem kommunalem Abwasser sinkt der Anteil an kultivierbaren Legionellen nach wenigen Tagen bei 22°C, während mit der qPCR nach wie vor Legionellen nachgewiesen werden können. Somit ist eine Abreicherung bei niedrigem CSB (siehe Abb.7 Anmerkung) und geringen Legionellenkonzentrationen im Zulauf möglich. Wenn der CSB aber wie im Reaktor mit dem unverdünnten kommunalen Zulauf (Abb.7B) höher ist, können eventuell auch nicht typisierbare Legionellen, die ihr Wachstumsoptimum bei Temperaturen unterhalb von 37°C haben und die entweder im Reaktor selbst gewachsen sind oder mit dem Zulauf (siehe Tab.15) eingetragen wurden, eine Abreicherung verhindern oder zumindest verringern.

### 3.1.3 Mikroskopische Auswertung

Das Vorkommen der Gattungen *Acanthamoeba*, *Hartmannella* und *Naegleria* ist bereits für verschiedene Kläranlagen beschrieben worden (Garcia *et al.* 2011) worden und konnte auch für die beiden Schlämme aus diesem Versuch bestätigt werden. Die Konzentration der Nacktamöben im Belebtschlamm lag zu Beginn des Versuches bei 2813 Amöben/mL (Herrenhausen) bzw. 3469 Amöben/mL (Warstein). Zhou *et al.* (2008) berichteten über Nacktamöbenzahlen im Belebtschlamm 20 – 1620 Individuen/mL, so dass die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Individuenzahlen als erhöht angesehen werden können. Es wurden allerdings auch sehr kleine Amöben (<15 µm) bei der Zählung berücksichtigt, so dass die Unterschiede auch methodisch bedingt sein können. Im Verlauf des Versuches sank die Zahl bei keinem der Ansätze deutlich unter das bei Versuchsbeginn ermittelte Niveau. Die Konzentration stieg in den meisten Ansätzen eher an oder blieb mindestens gleich, abhängig von Nahrungsangebot (CSB-Verlauf siehe Abb.7) und Temperatur (siehe Abb.9 und 10). Eine hohe Zahl von Amöben lässt den Rückschluss auf hohe CSB-Konzentrationen bei geringeren Sauerstoffgehalten zu. Diese Organismengruppe wird in der Literatur als Indikator für hohe Schlammbelastungen bzw. Stoßbelastungen und als Indikator für eine instabile Biozönose genannt [vgl. u.a. Patterson und Hedley (1992); Eikelboom (2001)]. Wenn also das Nahrungsangebot wie in diesem Fall sehr hoch ist, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass Amöben sich gut vermehren können. Dies zeigt sich in einem signifikanten Unterschied zwischen den mit verdünnten und unverdünnten Abwasser gefütterten Reaktoren: Bei verdünntem Abwasser verringert sich die Amöben-Konzentration kontinuierlich, während beim unverdünnten Abwasser die Amöben-Konzentration zwischen Tag 12 und Tag 30 ansteigt.

In Abb.11 sind die Aufnahmen der mit FISH aufgearbeiteten Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt.



**Abbildung 11 Ergebnisse der FISH-Analyse für den kontinuierlichen Versuch 1**

A) lichtmikroskopische Aufnahme (Warstein, 27 d, 35°C) von *Euplotes* sp. (Größe: 60 µm), Ciliat; B) FISH: Reaktor mit 35 °C (Warstein, 27 d): grün EUK, rot *Legionella* spp. Infektion des Ciliaten (cf. *Euplotes* sp.) mit *Legionella* spp.; C) FISH: Reaktor mit 35 °C (Warstein, 27 d): in grün *Acanthamoeba* sp. und in rot *Legionella* spp.

Durch fluoreszenzmikroskopische FISH-Untersuchungen konnte nur in seltenen Ausnahmefällen (vgl. Abb. 11C) ein Nachweis für die Infektion von Amöben mit Legionellen erbracht werden. Bereits Rowbotham (1980) stellte fest, dass bei Raumtemperatur (ca. 22°C) der Nachweis von mit Legionellen infizierten Amöben schwierig ist. Nach Rowbotham (1986) werden Legionellen von Amöben bei diesen Temperaturen eher verdaut als dass sie sich im Zellinneren vermehren könnten. Dies würde den fehlenden Nachweis zumindest für die Reaktoren mit Temperaturen unter 22°C erklären. Allerdings konnte auch im Reaktor mit 35°C kaum ein Beweis für die Vermehrung von Legionellen in Amöben gefunden werden, dafür aber viele positive Belege für Infektionen von Ciliaten mit Legionellen, wobei es sich hier wahrscheinlich um *Euplotes* sp. handelt (Abb.11A, lichtmikroskopische Aufnahme). FISH-Untersuchungen zur genauen Differenzierung der Eukaryoten wurden nur punktuell durchgeführt. In der Literatur wird hauptsächlich *Tetrahymena* spp. als Ciliaten-Wirt beschrieben. Da die meisten Untersuchungen zu diesem Thema eher in Frischwasserhabitaten als in

Abwasser vorgenommen wurden, könnte es sein, dass im Abwasser eine andere Ciliatenart von den Legionellen zur Vermehrung bevorzugt wird.

### 3.2 Kontinuierlicher Versuch 2

#### 3.2.1. Vorversuche mit proteinreichem Substrat und Ultraschall

Zur Beurteilung, ob Legionellen im ultraschallbehandelten Belebtschlamm grundsätzlich wachsen können, wurde zuvor ein Wachstumstest durchgeführt, um ein geeignetes Substrat als Alternative zum Zulauf aus Warstein zu finden, dargestellt in Abb. 12.

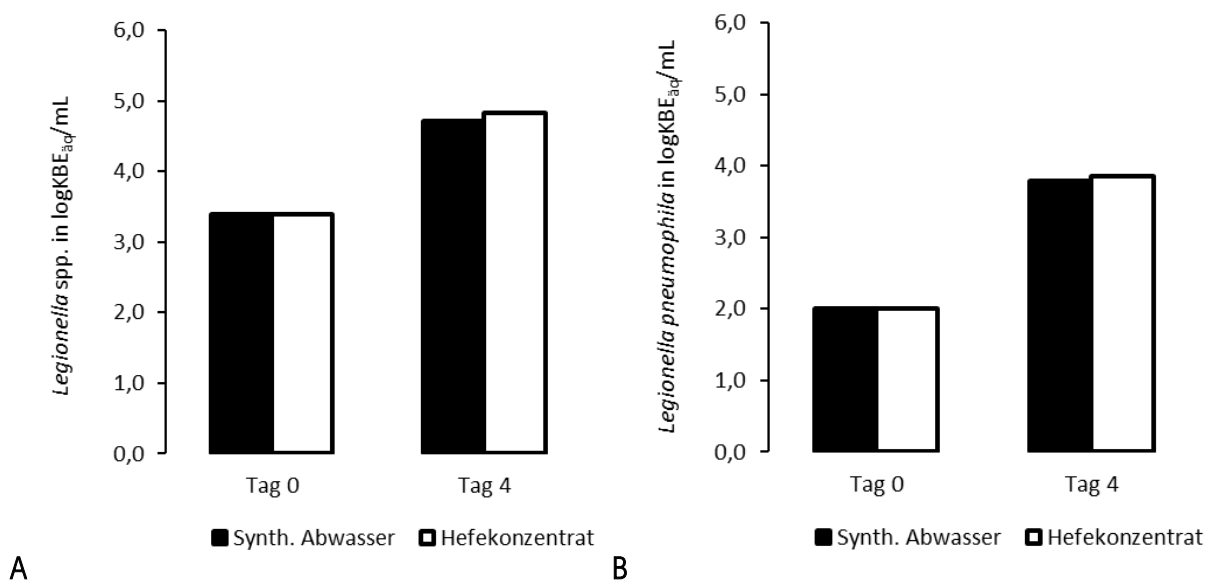


Abbildung 12 Anstieg von *Legionella* spp. (A) und *Legionella pneumophila* (B) in Belebtschlamm einer kommunalen KA bei 35° C mit Zugabe von synthetischem Abwasser und Hefekonzentrat

In Abb.12 ist zu erkennen, dass durch die Zugabe von proteinreichem Substrat innerhalb von 5 Tagen eine Zunahme von *Legionella* spp. um etwa 1,32 (synthetisches Abwasser) bzw. 1,44 log-Stufen (Hefekonzentrat) möglich ist. Für *L. pneumophila* konnte sogar ein Anstieg um 1,8 log-Stufen für synthetisches Abwasser und 1,9 log-Stufen für Hefekonzentrat beobachtet werden.

Die Konzentration an *Legionella pneumophila* zu Beginn dieses Batchtests liegt fast am Detektionslimit der qPCR-Methode (1,78 logKBE<sub>äq</sub>/mL oder 60 KBE<sub>äq</sub>/mL) und macht in beiden Ansätzen nur 4% der Gesamtlegionellenzahl aus. Durch die proteinreichen Substrate steigt der Anteil an *Legionella pneumophila* auf 12% (synthetisches Abwasser) bzw. 11% (Hefekonzentrat) an. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Legionellenart durch proteinreiches Substrat einen Wachstumsvorteil erhält. Für alle weiteren Versuche wurde das Hefekonzentrat als Substrat ausgewählt.

Um die Wirkung von Ultraschall auf das Wachstum von Legionellen und Amöben beurteilen zu können, wurde im Vorfeld des kontinuierlichen Versuches 2 einer weiterer Batchtest durchgeführt, mit Hefekonzentrat als Substrat.

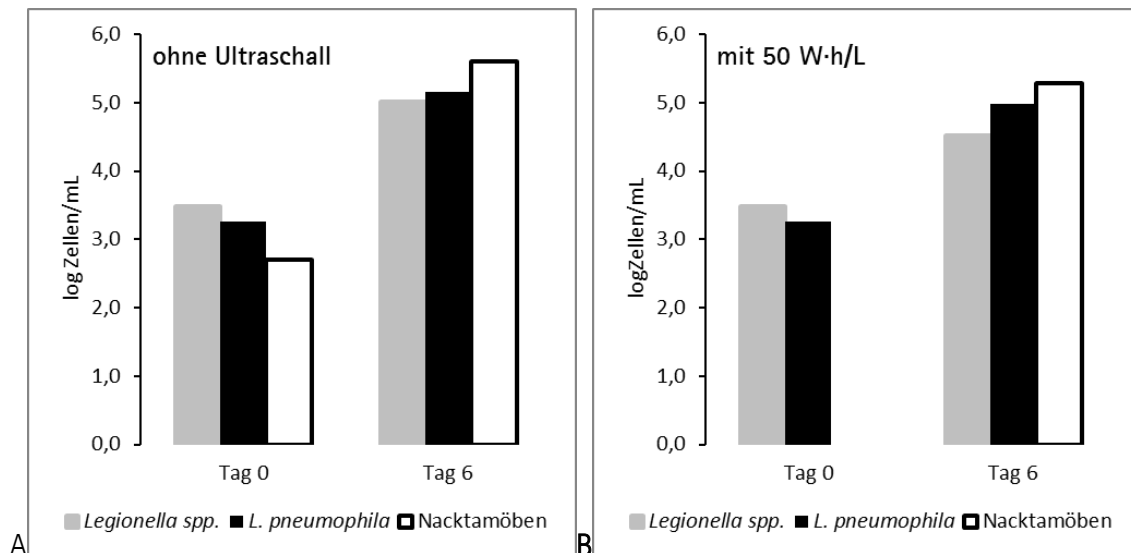


Abbildung 13 Anstieg von *L. pneumophila* (qPCR), *Legionella* spp. (qPCR) und Nacktamöben (Mikroskopie) in Belebtschlamm bei 35°C und der Zugabe von Hefekonzentrat: A) ohne Ultraschall B) mit Ultraschall.

In Abb.13 erkennt man, dass der Konzentrationsanstieg von *L. pneumophila* in Belebtschlamm mit und ohne Ultraschall innerhalb von 7 Tagen parallel zueinander war, 1,88 und 1,72 log-Stufen. Vergleichbare Ergebnisse wurden für *Legionella* spp. beobachtet. Hinsichtlich der Amöben konnte festgestellt werden, dass nach 7 Tagen sich die Konzentration an Nacktamöben nicht wesentlich durch die Ultraschallbehandlung beeinflusst wurde (5,60 log-Stufen ohne und 5,29 log-Stufen mit Ultraschall). Die Zunahme der Amöbenkonzentration mit Ultraschall liegt insgesamt viel höher (5,29 log-Stufen) als die ohne Ultraschallbehandlung (2,90 log-Stufen bei 35°C).

Davon ausgehend, dass die trophoziten Amöben am Anfang des Batchtests mit Ultraschall zerstört wurden, könnte die Wiederbesiedlung des Belebtschlammes mit neuen trophoziten Amöben aus den bereits vorhandenen Zysten im Belebtschlamm erfolgt sein. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine einmalige Ultraschallbehandlung bei 2 W-h/L nicht ausreichend war um die Amöbenzysten zu zerstören, wie es bereits in der Literatur durch Declerck *et al.* (2010) beschrieben wurde. Der zeitgleiche Anstieg der Legionellenkonzentration im Reaktor mit und ohne Ultraschallbehandlung, lässt vermuten, dass unter den gewählten Bedingungen (35°C und Hefekonzentrat) ein Wachstum von Legionellen auch außerhalb von Amöben möglich ist. Möglicherweise infizieren sie aber zunächst aufgrund der fehlenden trophoziten Amöben verstärkt Ciliaten. Ciliaten sind gegen Ultraschall resistenter als Amöben (Daten aus Ultraschalluntersuchungen für Ruhrverband) und könnten daher als Wirt zur Verfügung stehen. Außerdem können die Legionellen sobald die Regeneration der Amöben aus den Zysten abgeschlossen ist wieder beide Gattungen infizieren. Wie lange ein Regenerationszyklus im Abwasser dauert, wurde in diesem Experiment nicht untersucht.

### 3.2.2. Kontinuierlicher Versuch 2

#### 3.2.2.1 Chemische und physikalische Parameter

In Abb.14 sind folgende untersuchte chemische Parameter in den Reaktoren dargestellt worden: Nitrat (A), Ammonium (B), CSB (C) und TS (D).

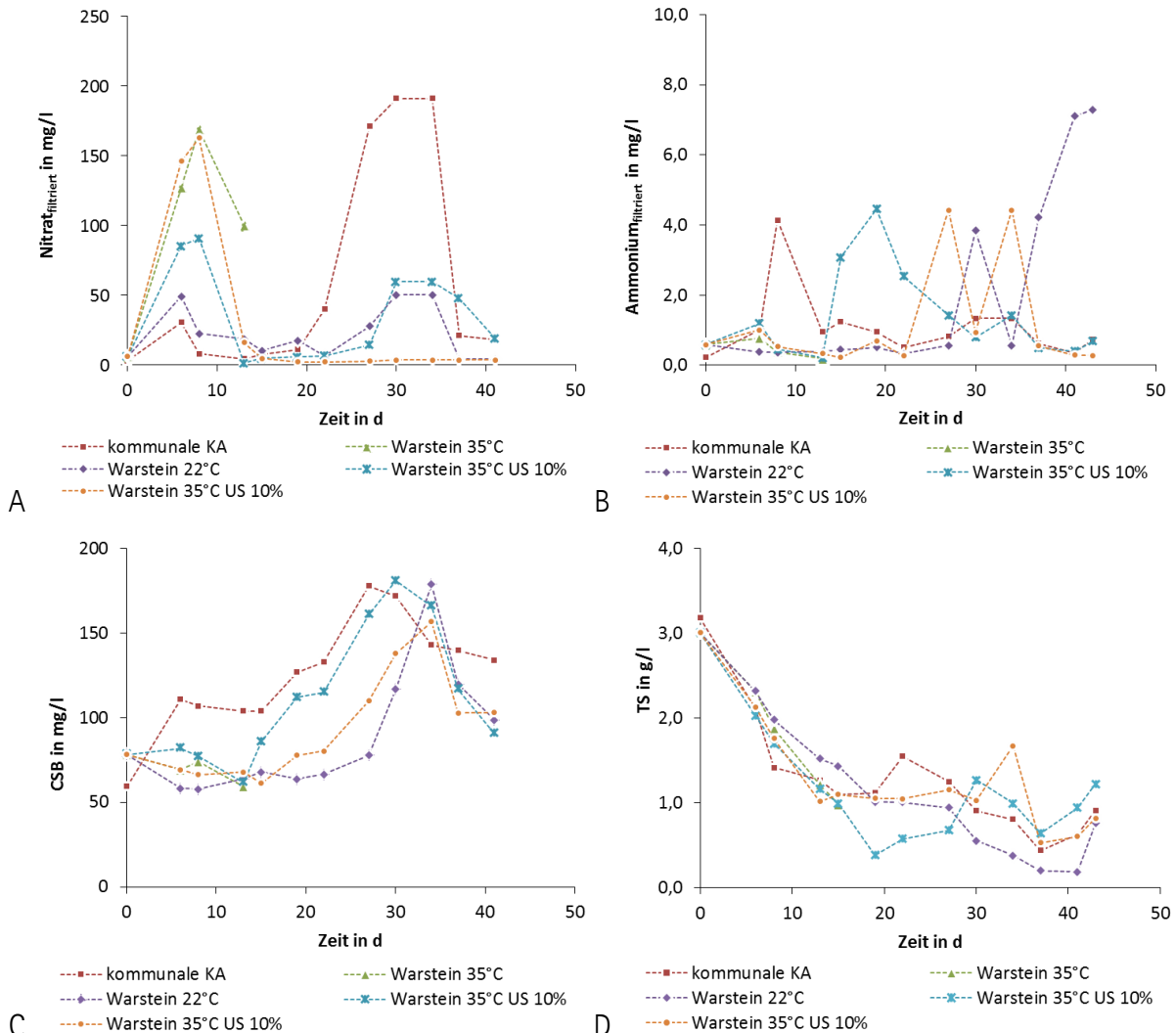


Abbildung 14 Verlauf der chemisch-physikalischen Parameter im kontinuierlichen Versuch 2, in dem verdünntes Hefekonzentrat als Substrat diente

A) Nitrat<sub>fil</sub>, B) Ammonium<sub>fil</sub>, C) CSB<sub>fil</sub> und D) TS

\*Temperaturveränderungen der einzelnen Reaktoren: kommunale KA 35 °C → 22 °C, B) Warstein 35 °C → 22 °C, C)

Warstein 22 °C → 35 °C, D) Warstein 35 °C US → 27 °C und E) Warstein 35 °C US → 15 °C

Anmerkung: die Temperatur in den Reaktoren wurde im Laufe des Versuches mehrfach verändert

Zu Beginn des Versuches stieg in allen Reaktoren die Nitratkonzentration (Abb.14A) unterschiedlich stark an und sank dann aber bis auf den Reaktor mit 35°C und Schlamm aus Warstein auf einen Wert unter 10 mg/L wieder ab. Danach blieb die Konzentration in fast allen Reaktoren unter 50 mg/L. Nur im Reaktor mit Schlamm aus der kommunalen KA kam es zwischen dem 27 d und 34 d zu einem plötzlichen Anstieg auf max. 190 mg/L, ohne dass die Temperatur in diesem Zeitraum verändert wurde. Im Vergleich dazu schwanken die Ammoniumwerte (Abb.14B) in den einzelnen Reaktoren wesentlich stärker, dies lässt sich aber kaum mit dem Temperaturprofil korrelieren.

Die CSB-Werte (Abb.14C) stiegen in allen Reaktoren nach 22 d bis auf ca. 180 mg/L. Aber ab dem 34 d sanken die Werte wieder ab. Für den TS-Gehalt hingegen ist ein ähnliches Verhalten in allen Reaktoren zu beobachten. Nach ca. 15 d stabilisiert sich die Biomasse zwischen 0,5 und 1,5 g/L.

Die Schwankungen in den Nitrat- und Ammoniumwerten lassen sich wahrscheinlich auf eine Adaption der Biozönose an die Bedingungen (neues Substrat – statt Abwasser Hefekonzentrat – und höhere bzw. wechselnde Temperaturen) erklären. Gleiches gilt wahrscheinlich für den CSB, wobei hier im Durchschnitt in allen Reaktoren eine Abbaueffizienz von  $75 \pm 8 \%$  erreicht wurde. Die Ergebnisse in Abb. 14 A-D zeigen, dass die Reaktoren aufgrund der vielen Temperaturänderungen während der Versuche keinen *steady-state*-Zustand in Bezug auf die Stickstoff- und CSB-Elimination erreicht haben.

### 3.2.2.2 Mikrobiologische Auswertung

Im Folgenden sind die Geschehnisse in den Reaktoren entsprechend der in Kapitel 2.2.2.2 erläuterten Temperaturabschnitte beschrieben, da sich die meisten Veränderungen darauf zurückführen lassen.

Zur besseren Orientierung ist in Tab.16 das sich verändernde Temperaturprofil nochmals abgebildet.

Tabelle 16 Veränderung des Temperaturprofils der Reaktor im kontinuierlichen Versuch 2

Belebtschlamm	Warstein				Kommunale KA
Substrat	Hefekonzentrat				Hefekonzentrat
Ausgangstemperatur	22 °C	35 °C	35 °C, 10% US	35 °C, 10% US	35 °C
Temperaturveränderung 1 (9 d)	-	22 °C	22°C 10% US	22°C 10% US	22 °C
Temperaturveränderung 2 (19 d bzw. 27 d)	35 °C (27d)	-	27 °C (19d)	15 °C (19d)	22 °C

In Abb.15 sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Konzentrationsbestimmungsmethoden für Legionellen gegenübergestellt. Aufgrund der Temperaturumstellungen sind die jeweiligen Zeitabschnitte mit der entsprechenden vorherrschenden Temperatur im Reaktor in der Graphik mit angegeben.

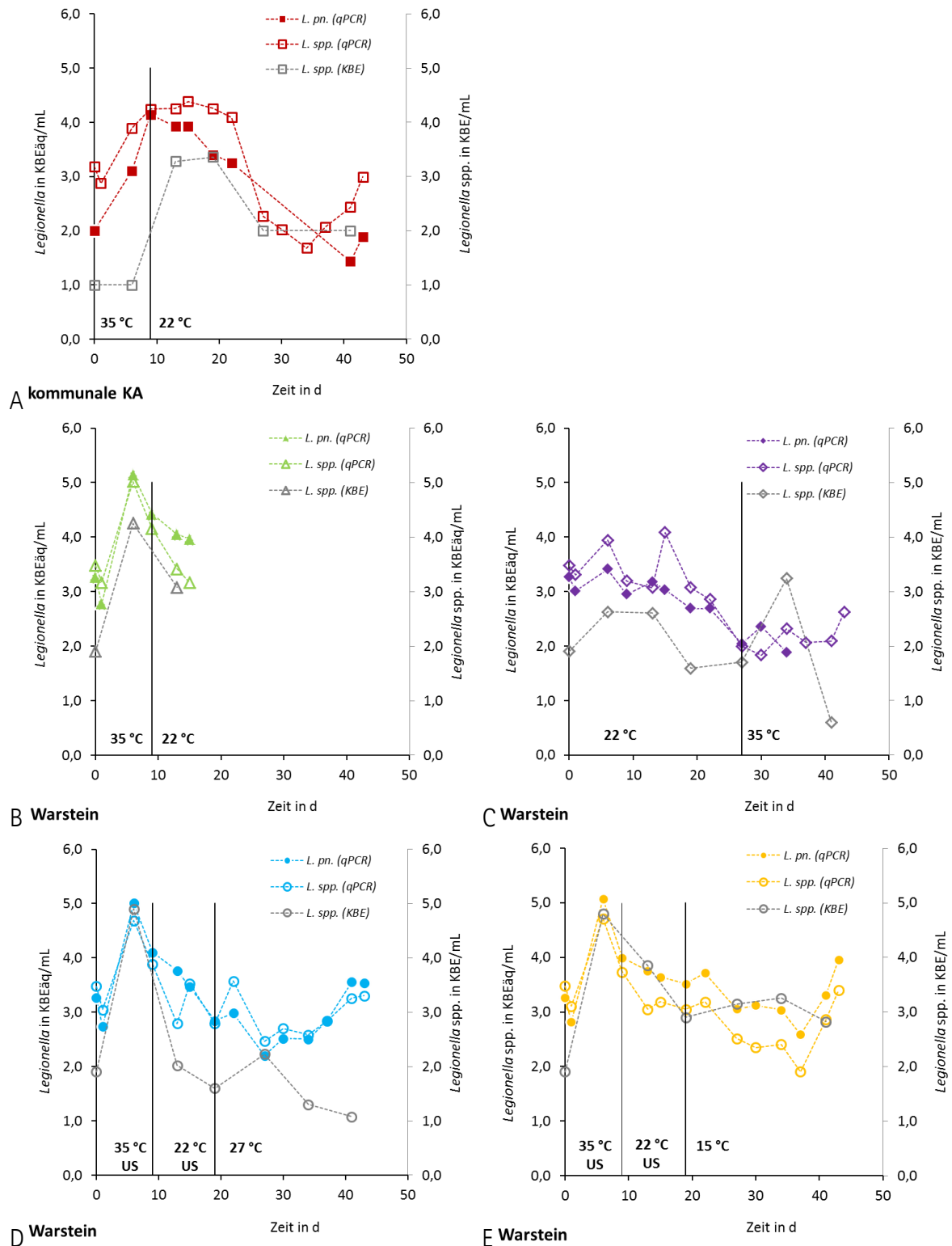


Abbildung 15 Vergleich der Konzentrationsverläufe von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* mit qPCR (Belebtschlamm) und Standardmethode (Überstand); Substrat: verdünntes Hefekonzentrat

A) kommunale KA 35 °C, B) Warstein 35 °C → 22 °C, C) Warstein 22 °C → 35 °C, D) Warstein 35 °C US → 27 °C und E) Warstein 35 °C US → 15 °C

Allgemein ist den Kurvenverläufen in Abb.15 zu entnehmen, dass die KBE-Werte im Gegensatz zu einigen Ergebnissen aus dem ersten kontinuierlichen Versuch entweder unter oder maximal gleich



den qPCR-Ergebnisse waren. Außerdem ist zu erkennen, dass die qPCR-Werte für *Legionella* spp und *Legionella pneumophila* ebenfalls nahezu identisch waren.

Diese Beobachtungen lassen sich durch die Zugabe des Hefekonzentrates (1:10 verdünnt) als Substrat erklären, da dieses stets einen nahezu konstanten CSB-Gehalt aufweist. Der durch das Hefekonzentrat hervorgerufene Wachstumsvorteil für *Legionella pneumophila* in Kombination mit der optimalen Wachstumstemperatur führt zu Beginn dieses Versuches zu einer Dominanz dieser Legionellenart in den Reaktoren. Dies geht auch aus den Typisierungsergebnissen des NLGA hervor (Tab.17).

**Tabelle 17 Veränderung der *Legionella*-Spezies im Ablauf des Kontinuierlichen Versuches 2**

Belebtschlamm		Warstein				kommunale KA
Zulauf		Hefekonzentrat				
Datum	Tag	35 °C	22 °C	35 °C, US	35 °C, US	35 °C
23.07.2014	0	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	-
29.07.2014	6	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar*</i>	-
02.08.2014	9	22 °C	22 °C	22 °C, US	22 °C, US	22 °C
05.08.2014	13	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1*, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14
11.08.2014	19	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14*	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14
11.08.2014	19-27	-	35 °C	27 °C	15 °C	22 °C
19.08.2014	27	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1
26.08.2014	34	-	<i>L. pneumophila</i> SG 2	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	-
02.09.2014	41	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14

\* Typisierung erfolgte bei Proben mit Säurevorbehandlung statt mit Hitze, US = 10% des Schlammes mit Ultraschall Behandelt; - keine Probenahme

Der Schlüssel für das bevorzugte Wachstum auf Hefekonzentrat ist wahrscheinlich ein Protein, das ein Teil des Infektionsapparates von Legionellen ist und als sogenannter „yeast lethal factor“ (wörtlich übersetzt: „Hefe-letal-Faktor“) beschrieben worden ist (Brüggemann *et al.* 2006). Welche Funktion er im Vermehrungszyklus genau hat, ist bisher weitestgehend unerforscht, aber man weiß, dass dieses Protein auch in Hefen nachgewiesen worden ist (Campodonico *et al.* 2005). Das könnte also bedeuten, dass sich die Legionellen durch ein Schlüssel-Schlossprinzip an die Hefezellen binden und dadurch eine Apoptose (Absterben) der Zellen verursachen, die eine Freisetzung vermehrungsrelevanter Aminosäuren zur Folge hat. Dies fördert dann die Vermehrung der Legionellen direkt, da sie sofort von dieser Nährstoffquelle profitieren können, während andere Bakterien sich erst an dieses neue Substrat adaptieren müssen. Im ersten Teilabschnitt entspricht das Temperaturprofil der einzelnen Reaktoren dem im Kapitel 2.2.2.2 angegebenen Schema (Abb.5).

Bei allen Reaktoren mit 35°C Betriebstemperatur (Abb.15 A, B, D und E) konnte unabhängig vom verwendeten Schlamm ein starker Anstieg der Konzentration an *Legionella pneumophila* in den ersten 7-9 d mit beiden Methoden (siehe auch Typisierung Tab.17) festgestellt werden. Danach

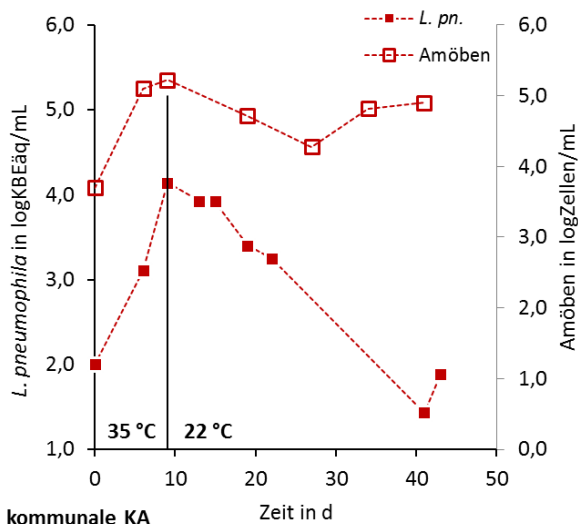
sank die Konzentration wieder ab, allerdings bereits bevor die erste Temperaturveränderung durch einen technischen Defekt eintrat.

Auch hier wird durch das Substrat und die Temperatur unabhängig von der Herkunft des Schlammes *Legionella pneumophila* bei der Vermehrung bevorteilt. Wenn die anderen Bakterien sich aber an die Bedingungen adaptiert haben, steigt wahrscheinlich u.a. der Konkurrenzdruck um die Nahrung und führt so zu einem Absinken der Legionellenkonzentration.

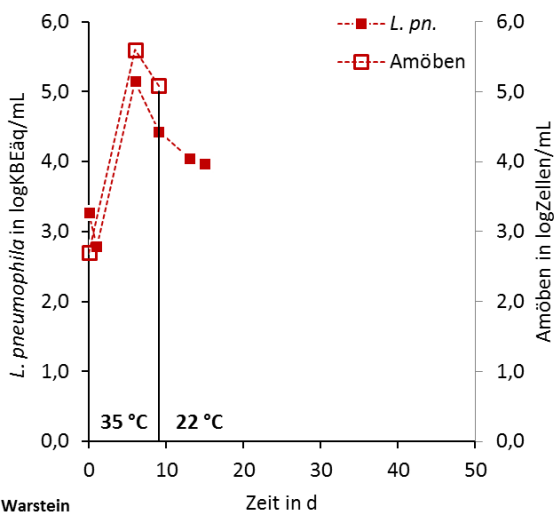
Durch einen technischen Defekt am 9 d, der aber erst nach den Probenahmen auftrat, erfolgte für alle Reaktoren eine Umstellung der Temperatur auf 22°C. Dies führte hauptsächlich zu einer Stabilisierung der Legionellenkonzentration auf dem bis dahin erreichten Konzentrationsniveau und hatte keine weiteren Auswirkungen. Die einzige Behandlung, die weiterhin planmäßig durchgeführt wurde, war die Behandlung des Teilstroms von zwei Reaktoren mit Ultraschall (10% des Reaktorvolumens, Abb.15D und E). Wie man im Vergleich zu dem Reaktor mit 35°C aber ohne Ultraschallbehandlung erkennen kann (Abb.15B), ergibt sich durch die Behandlung kein signifikanter Unterschied im Legionellenwachstum. Da nur ein kleiner Teil des Schlammes (10%) mit Ultraschall behandelt und auch nur die trophozoiten Amöben zerstört wurden, verbleiben noch ausreichend Amöben im Reaktor für eine erfolgreiche Infektion durch Legionellen. Außerdem können aus den vorhandenen Amöbenzysten sofort wieder trophozoite Amöben regeneriert werden (aktiviert siehe Vorversuch, Kapitel 3.2.1), so dass eine Abreicherung durch Ultraschall als Gegenmaßnahme in Kläranlagen als ineffektiv eingestuft werden kann.

Um die bisherigen Erkenntnisse bezüglich des Temperatureinflusses auf die Legionellen zu vertiefen, erfolgte die letzte Veränderung der Temperatur (siehe Tab.16). Parallel wurde aber der Reaktor mit Schlamm aus Warstein und dem Temperaturprofil 35°C → 22°C einem anderen Test unterzogen und anschließend stillgelegt. Dieser Reaktor wurde mit dem in der KA Warstein verwendeten Fällungsmittel Polyaluminiumchlorid versetzt, um die Auswirkung auf die Legionellen im Belebtschlamm zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind im Kapitel 3.2.3 beschrieben und ausgewertet.

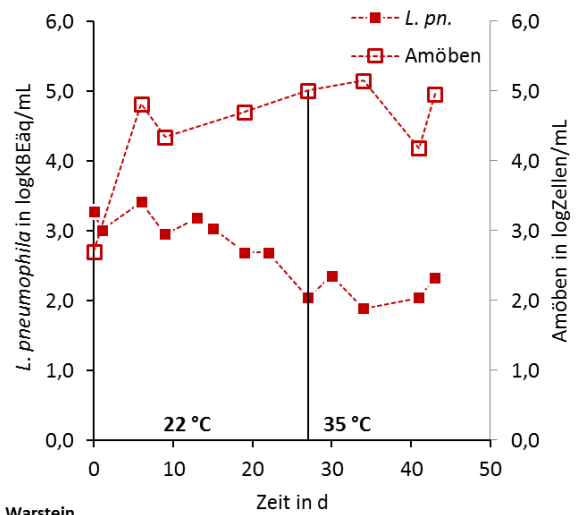
Diese letzte Veränderung der Temperaturen führte zu einem parallelen Verlauf der qPCR-Daten für *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* bei Temperaturen unter 35°C (Abb.15D und E). Etwa 10 d nach dieser Umstellung stieg die Konzentration aber wieder an. Die KBE-Werte bei diesen Reaktoren hingegen blieben entweder konstant (Abb.15E) oder sanken stetig ab (Abb.15D). Im Reaktor, der zuvor bei 22°C betrieben wurde und jetzt bei 35°C lief, blieb die Konzentration in den qPCR-Werten konstant. Die KBE-Zahl hingegen nahm erst sprunghaft zu (über das Niveau der qPCR) und dann wieder sehr stark ab (deutlich unter den qPCR-Wert). Diese Beobachtungen sind wahrscheinlich auf die Anpassung der Biomasse an die neuen Bedingungen zurückzuführen und sollten nicht überbewertet werden.



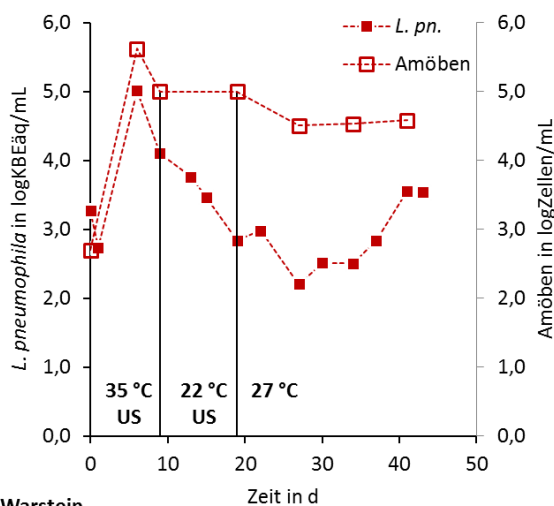
A kommunale KA



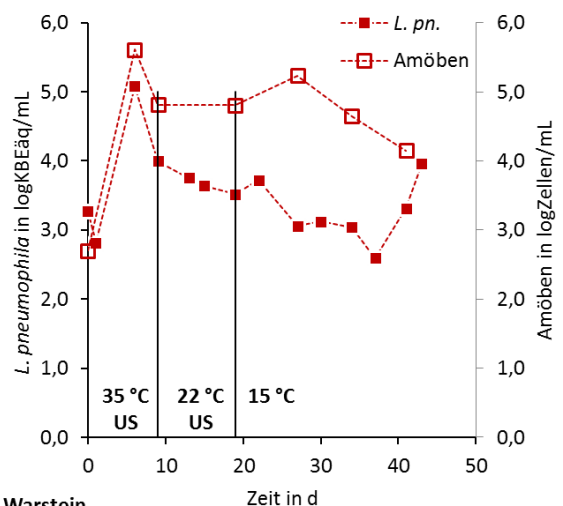
B Warstein



C Warstein



D Warstein



E Warstein

Abbildung 16 Vergleich der Konzentration an Amöben und *Legionella pneumophila* im Belebtschlamm des kontinuierlichen Versuchs 2; Substrat: verdünntes Hefekonzentrat

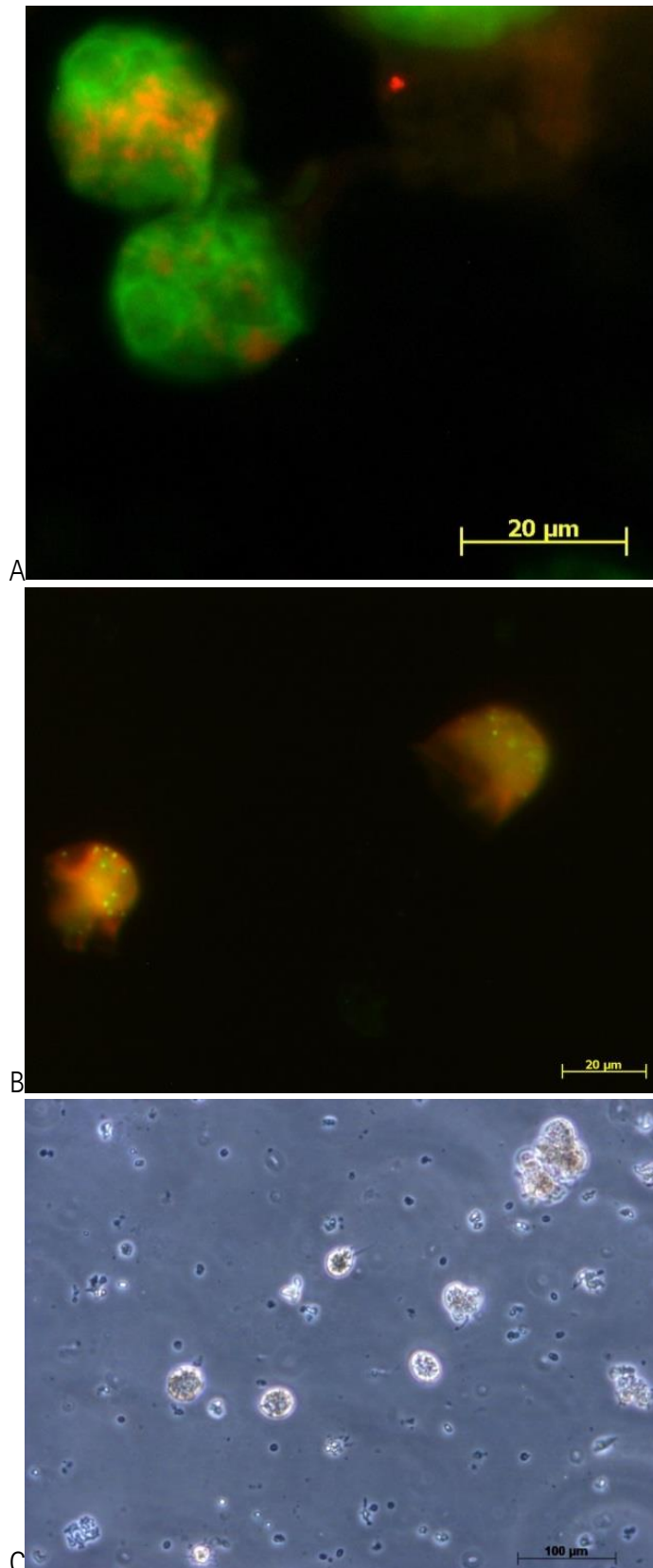
A) kommunale KA 35 °C, B) Warstein 35 °C → 22 °C, C) Warstein 22 °C → 35 °C, D) Warstein 35 °C US → 27 °C und E) Warstein 35 °C US → 15 °C

In Abb.16 sind die Konzentrationen der Amöben im Belebtschlamm den qPCR-Ergebnissen für *Legionella pneumophila* gegenübergestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur in Abb.16A und B eine Korrelation der Amöben und Legionellen nachweisbar ist, wohingegen alle andern Reaktoren (Abb.16C-E) eher eine gegenläufige Tendenz aufweisen. Nur zu Beginn (die ersten 9 d), wenn die meisten Reaktoren eine Temperatur von 35°C aufweisen (Abb.16A, B, D und E), entwickeln sich beide Organismen absolut parallel. Interessanterweise steigt bei den beiden ursprünglich ultraschallbehandelten Reaktoren nach der letzten Temperaturumstellung nach 27 d (Abb.16E) bzw. 34 d (Abb.16D), die Amöbenkonzentration wieder an.

Diese Beobachtungen sind wahrscheinlich auf die gute Nahrungssituation für beide Organismen (ein hoher Anteil an Hefezellen im verwendeten Konzentrat) und die hohe Temperatur zurückzuführen, die für beide ein sehr gutes Wachstum sicherstellt. Der Rückgang der Amöben vor der Temperaturumstellung könnte ebenfalls auf einen Konkurrenzdruck unter den Prokaryoten zurückzuführen sein. Die Ultraschallbehandlung (Abb.16D und E) hat dabei kaum Einfluss auf dieses Verhalten, da auch ohne Ultraschall (Abb.16A-C) eine abnehmende Tendenz erkennbar ist. Der beschriebene Anstieg nach der letzten Temperaturumstellung für diese beiden Reaktoren könnte darauf hinweisen, dass sich die Amöben an die Temperatur adaptiert haben und wieder in ihre trophozoite Form wechseln, oder dass andere Organismen (z.B. Ciliaten) ihre Abundanz verminderten und im System als Konkurrenten ausfielen. Der Grund dafür, dass es bei dem Reaktor mit letztendlich 27°C schneller geschieht als bei 15°C, hat mit der geringen Differenz zu der vorherigen Temperatur zu tun und der Tatsache, dass der Schlamm erwärmt und nicht weiterabgekühlt wird. Eine Abkühlung geht immer auch mit einer Verlangsamung des Metabolismus einher, so dass eine Reaktion auf die Umwelt tendenziell länger dauert als unter wärmeren Bedingungen (RGT-Regel).

### 3.2.2.3 Mikroskopische Auswertung

In Abb.17 sind die Bilder der Probenauswertung mit FISH im kontinuierlichen Versuch 2 dargestellt. In diesem Versuch konnten auch *Legionella* spp. nachgewiesen werden, die innerhalb von Amöben (Abb.17A) leben, statt wie im ersten kontinuierlichen Versuch in Ciliaten. Interessanterweise konnten auch Naeglerien im Inneren von großen Amöben detektiert werden, die Ursache dieses erstmalig beobachteten Phänomens ist noch unklar (Abb.17B). Es wurden insgesamt sehr viele – auch sehr kleine – verschiedene Nacktamöben in diesem Versuch nachgewiesen (Abb.17C).



**Abbildung 17 Ergebnisse der FISH-Analyse und Mikroskopie für den kontinuierlichen Versuch 2**

A) FISH: Reaktor mit 22 °C am 27 d (wurde anschließend auf 35 °C erhöht), in grün Eukaryoten und in rot *L. spp.* → in Amöben liegende Legionellen; B) FISH: Reaktor mit 22 °C (danach 35 °C) am 27 d, in grün Naeglerien und in rot Eukaryoten → innen liegende Naeglerien; C) Phasenkontrastaufnahme mit sehr vielen unterschiedlichen Amöben im Reaktor mit 22 °C (danach 35 °C) am 27 d

### 3.2.3. Fällung mit Polyaluminiumchlorid – Viability PCR

Mit der Viability PCR sollte die Auswirkung von Polyaluminiumchlorid im Belebtschlamm überprüft werden. Der Vorteil an dieser Methode gegenüber der Kultivierung ist die schnellere Auswertbarkeit der Viabilität von Organismen (hier Legionellen) in einem komplexen Medium wie Belebtschlamm. Die Standardmethode benötigt im Vergleich zur Viability PCR 10 d Inkubationszeit, während mit der vPCR das Ergebnis innerhalb von 1-2 d vorliegt (siehe auch Kap. 2.3.1).

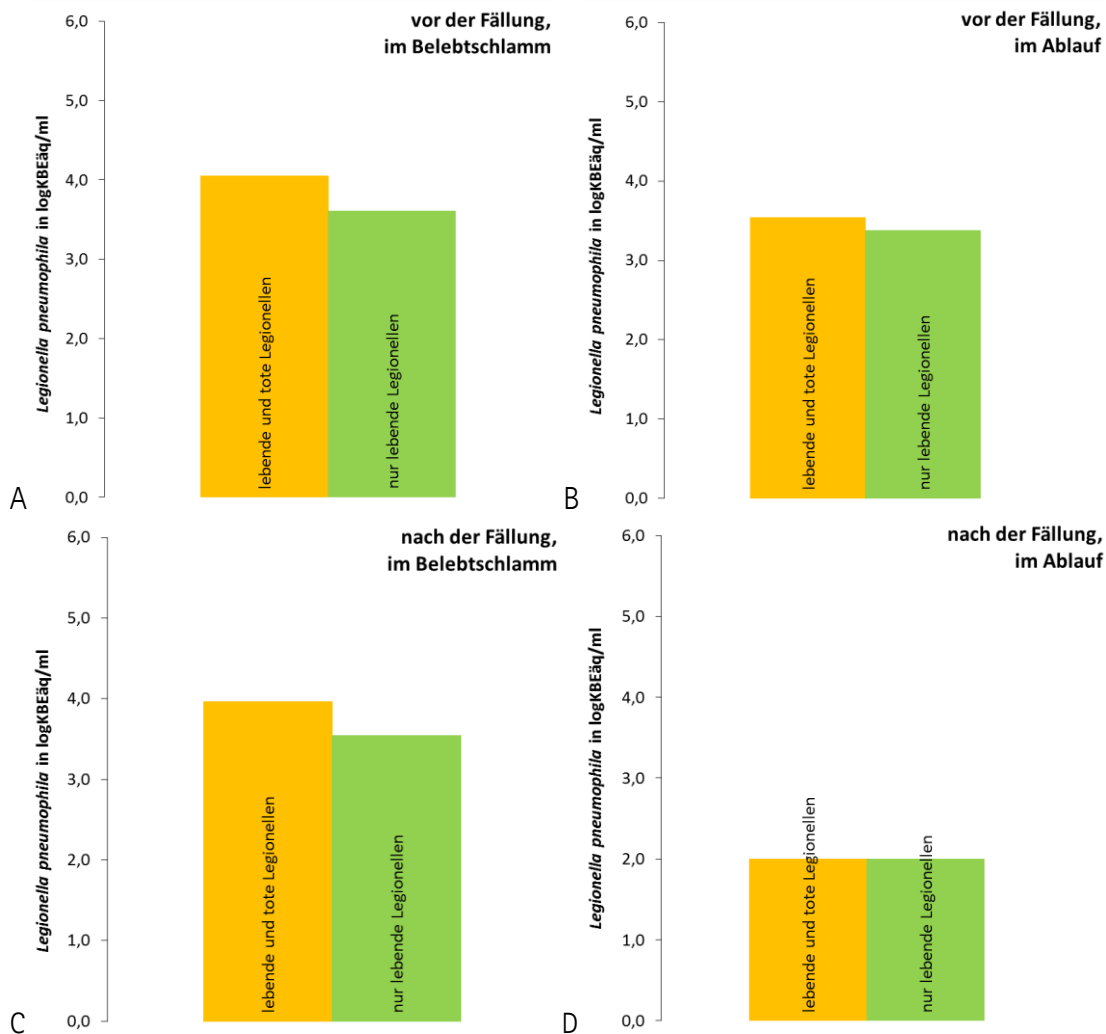


Abbildung 18 Viability PCR vor (A+B) und nach (C+D) der Fällung mit PAC im Belebtschlamm (A+C) und im Überstand (B+D) im Reaktor bei 22°C aus dem kontinuierlichen Versuch 2

In Abb.18 sind die vPCR Ergebnisse vor und nach der Fällung mit PAC im Belebtschlamm (Abb.18A + C) und im Ablauf (Abb.18B und D) dargestellt. Durch die Zugabe von PAC in den Reaktor konnten im Belebtschlamm (Abb.18A + C) nachweislich keine Legionellen abgetötet werden, allerdings wurde ein Großteil aus dem Überstand in den Schlamm überführt (Abb.18B + D). Somit wird durch die PAC-Dosierung im Ablauf eine Abnahme der Legionellenkonzentration durch die Bildung von Floccen herbeigeführt.

### 3.3 Kontinuierlicher Versuch 3

#### 3.3.1 Chemische und physikalische Parameter

Folgende chemisch-physikalischen Parameter im Ablauf der Reaktoren sind in diesem Versuch untersucht und in Abb.19 dargestellt worden: Nitrat (A), Ammonium (B), CSB (C) und TS (D).

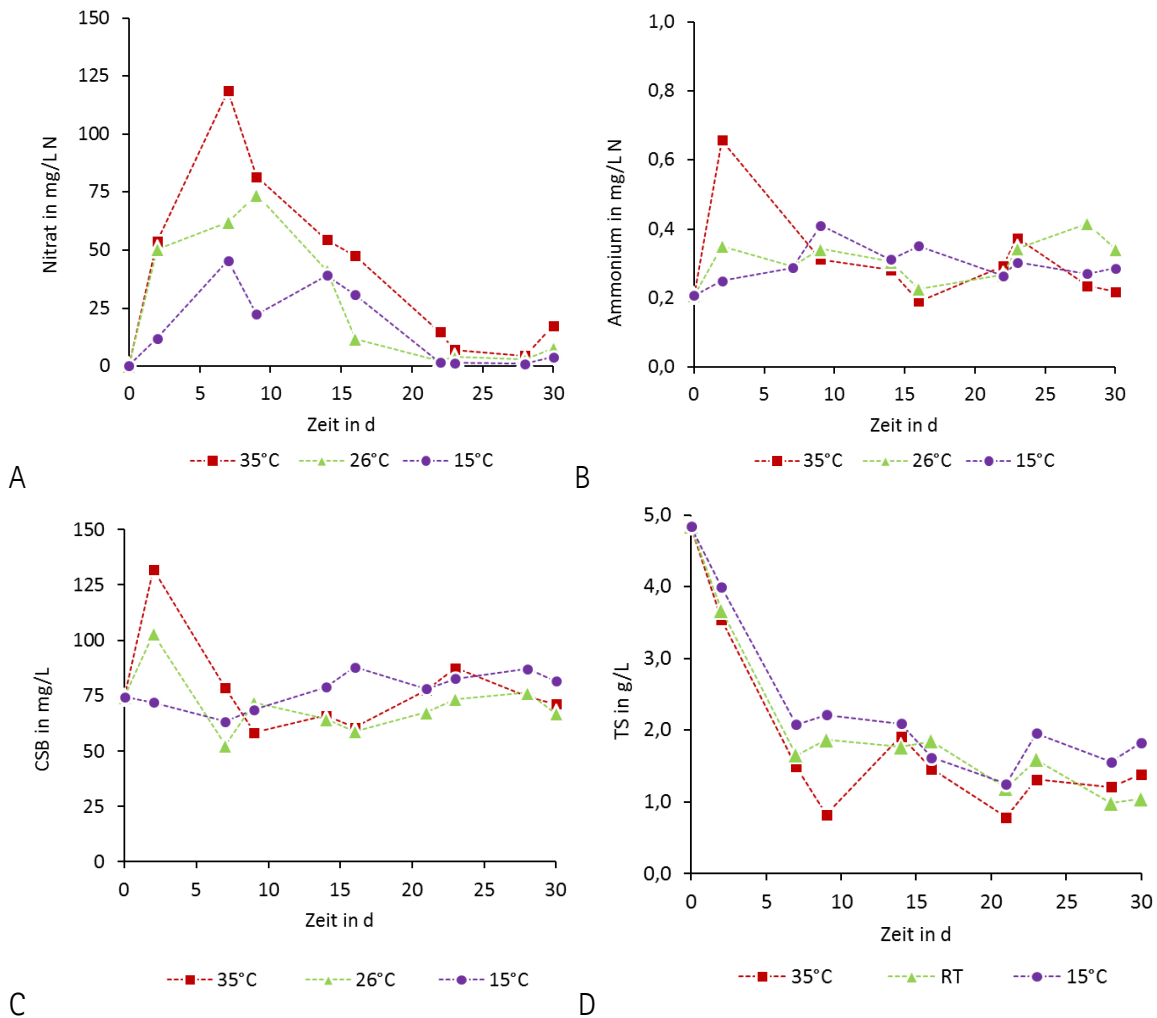


Abbildung 19 Prozessparameter kontinuierlicher Versuch 3; Substrat : verdünntes Hefekonzentrat

A) Nitrat, B) Ammonium, C) CSB und D) TS

Unabhängig von der Temperatur, erreichen die Biomassekonzentration (Abb. 19D) und die CSB-Konzentration im Ablauf (Abb. 19C) den steady-state-Zustand nach 5- 10 Tagen. Eine gute Nitrifikation wurde hierbei erreicht, wie an der geringen Ammoniumkonzentration erkennbar ist (Abb. 19B). Nach 20 Tagen wurde trotz der kontinuierlichen Belüftung eine erhebliche Nitrateliminierung in allen Reaktoren erreicht.

Die Ablaufkonzentrationen an Nitrat stiegen in allen Reaktoren in den ersten 5-10 d stark an. Nach ca. 20 d Versuchszeit lag die  $\text{NO}_3\text{-N}$  Konzentration dann wieder auf dem Niveau der Ausgangswerte zu Versuchsbeginn (Abb.19A). Die Ammoniumwerte hingegen blieben stabil bei Konzentration < 0,8 mg/L. Diese Ergebnisse sprechen für eine durchgängig sehr gute Nitrifikation. Die Denitrifikation verbesserte sich erst im Verlauf des Versuches. Die Effizienz des Gesamtstickstoffabbaus für die einzelnen Reaktoren wurde mit abnehmender Temperatur besser. Für 35 °C lag sie nur bei  $64 \pm 8$

%, für 26 °C schon bei  $72 \pm 13$  % und für 15°C sogar bei  $86 \pm 7$  %. Dabei handelt es sich um Durchschnittswerte unter Berücksichtigung der gesamten Betriebsdauer (30 d). Nach 22 Tagen, ist der Gesamtstickstoffabbau in drei Reaktoren ähnlich, wobei der Einfluss der Temperatur nicht wesentlich ist. Der im Ablauf gemessene CSB (Abb.19C) zeigt im Durchschnitt für alle Reaktoren eine konstante Konzentration von ca. 75 mg/L. Nur in den Reaktoren mit 26°C bzw. 35°C kam es in den ersten Tagen zu erhöhten CSB-Werten. Allgemein lag der berechnete CSB-Abbau bei ca. 88 %. Der TS-Gehalt (Abb.19D) entwickelte sich in allen Reaktoren ebenfalls parallel und stabilisierte sich zwischen 1-2 g/L.

### 3.3.2. Mikrobiologische Auswertung

In der Abb.20 ist das Ergebnis der Quantifizierung von *Legionella pneumophila* und *Legionella* spp. im Überstand und im Belebtschlamm der Reaktoren bei 15°C, 26 °C und 35 °C dargestellt.

Wie man an den qPCR Ergebnissen für den Überstand und den Belebtschlamm in Abb.20 deutlich erkennen kann, nimmt die Konzentration an *Legionella pneumophila* in allen Reaktoren kontinuierlich ab. Nur im Reaktor mit 35°C ist zuvor ein Wachstumsschub in den ersten 7 d zu erkennen, bevor sich dann die Konzentrationsabnahme der der anderen Reaktoren angleicht. Im Gegensatz dazu nimmt die Konzentration an *Legionella* spp. in den Reaktoren mit 15°C (Abb.20 A, B und C) mit einigen Schwankungen zu. Im 15°C Reaktor wurden zur Absicherung der divergierenden Ergebnisse für *Legionella* spp. zwischen qPCR und Standardmethode im Überstand zusätzlich die *Legionella* spp. im Belebtschlamm bestimmt.

Berechnet man den Zerfall (siehe Kapitel 2.4) im Belebtschlamm, liegt dieser für alle Temperaturen bei  $0,149 \text{ d}^{-1}$  bzw. 14,99 %. Das ist ein Hinweis darauf, dass es sich hierbei vorwiegend um einen Auswaschungsprozess handelt, da Sterberaten temperaturabhängig unterschiedlich sind. Das berechnete Wachstum (siehe Kapitel 2.4) hingegen ist temperaturabhängig und bei 35°C zumindest zu Beginn des Versuches wie erwartet mit einem Wert von  $3,85 \text{ d}^{-1}$  am höchsten. Das heißt die Verdopplungszeit betrug 0,26 d. Im späteren Verlauf des Versuches verringert sich aber auch bei 35°C das Wachstum, sodass die Verluste durch Auswaschung nicht ausgeglichen werden können. Der Grund dafür könnte eine Hemmung durch andere Bakterien sein, die ebenfalls durch die erhöhte Temperatur einen erhöhten Stoffwechsel haben. Dieser erhöhte Stoffwechsel hat verschiedene Auswirkungen zur Folge. Zum einen erhöhen sich auch für andere Bakterien die Wachstumsraten und damit der Bedarf an Substrat, was zu einer Nahrungskonkurrenz mit den Legionellen führt. Aufgrund des verhältnismäßig kleinen Anteils der Legionellen an der Gesamtbakterienmasse können sie sich langfristig nicht durchsetzen. Zum anderen ist durch die höhere Temperatur die Sekretion von Stoffen bei Bakterien im Allgemeinen ebenfalls erhöht und eventuell sogar die Wirksamkeit der Substanzen. *Aeromonas hydrophila* beispielsweise könnten das Wachstum von einigen *Legionella* spp. inhibieren durch Sekretion von Störstoffen, so wie es für künstliche Medien durch Toze *et al.* (1994) beobachtet wurde. Aus diesem Grund wird u.a. bei der Kultivierung auf Agarplatten Pulveraktivkohle eingesetzt, um eben solche Hemmstoffe zu absorbieren.



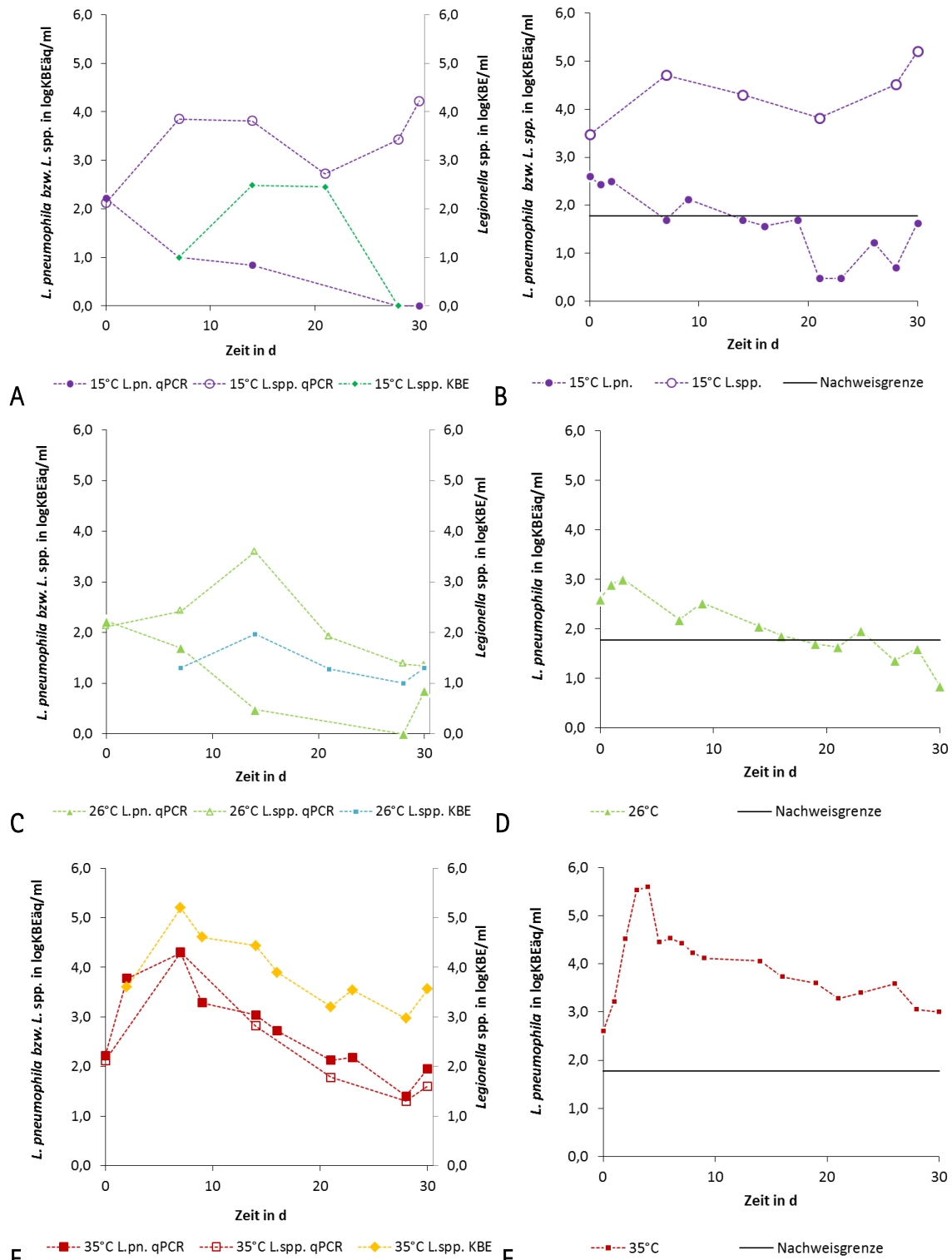


Abbildung 20 Vergleich der Methoden zur Bestimmung Legionellenkonzentration im Überstand (A,C,E) und Belebtschlamm (B,D,F) bei 15 °C (A,B), 26 °C (C,D) und 35 °C (E,F)\*; Substrat: verdünntes Hefekonzentrat

\*Auf der Primärachse sind die Ergebnisse der qPCR-Methode für *Legionella pneumophila* und *Legionella* spp. abgebildet und auf der Sekundärachse die Ergebnisse für *Legionella* spp. der Standardmethode

\*\*Die eingezeichnete Nachweisgrenze gilt ausschließlich für die Ergebnisse der qPCR-Methode

Die mit der Standardmethode ermittelten KBE-Werte im Überstand lagen bis auf den Reaktor mit 35 °C wie erwartet unter den Werten der qPCR für *Legionella* spp. (Abb.20 A,C und E). Das hat zum

einen damit zu tun, dass mit der Standardmethode nur die lebenden Bakterien erfasst werden, und zum anderen könnte es gleichzeitig mit anderen temperaturinduzierten Phänomenen z.B. dem Wechsel der Bakterien in den VBNC-Zustand (Steinert *et al.* 1997) zu tun haben. Denkbar wäre auch, dass Legionellen, die ihr Wachstumsoptimum bei Temperaturen unterhalb von 37°C haben, aufgrund der für *Legionella pneumophila* optimierten Inkubationstemperatur von 35°C bei der Standardmethode nicht wachsen können. Aufgrund der Messungen mit der qPCR-Methode konnte auch in diesem Versuch nachgewiesen werden, dass es *Legionella* spp. gibt, die bei niedrigen Temperaturen (also unter dem Optimum für *Legionella pneumophila*) wachsen können, aber nicht mit der Kultur erfassbar sind. Dieses Phänomen ist bereits durch Wullings und van der Kooij (2006) für andere Kaltwasserhabitats beschrieben worden und ist daher eine plausible Erklärung für diesen Versuch.

In Tab.18 sind die Typisierungsergebnisse der *Legionella*-Spezies im Ablauf der Reaktoren des kontinuierlichen Versuches 3 dargestellt. Sofern zu Versuchsbeginn überhaupt Legionellen nachgewiesen werden konnten, sind diese vorwiegend als *L. pneumophila* SG 1 und SG 2-14 identifiziert worden.

Tabelle 18 *Legionella*-Spezies im Ablauf des kontinuierlichen Versuches 3

Belebtschlamm		Warstein		
Zulauf		Hefekonzentrat (Legionellenfrei)		
Datum	Tag	15°C	26°C	35°C
16.09.2014	0	n.n.	n.n.	n.n.
18.09.2014	2	-	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14
23.09.2014	7	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i> *	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14*	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14
25.09.2014	9	-	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14
30.09.2014	14	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14, <i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i> ,	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14*
02.10.2014	16	-	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14
07.10.2014	21	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. nicht typisierbar</i> , <i>L. pneumophila</i> SG 2-14*	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14, <i>L. nicht typisierbar</i> *	<i>L. pneumophila</i> SG 1
09.10.2014	23	-	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14
14.10.2014	28	<i>L. nicht typisierbar</i>	<i>L. pneumophila</i> SG 1	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14
16.10.2014	30	-	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14	<i>L. pneumophila</i> SG 1, <i>L. pneumophila</i> SG 2-14, <i>L. nicht typisierbar</i>

\*Typisierung erfolgte bei Säurebehandlung der Proben; n.n. – nicht nachweisbar; - keine Probenahme

Im Laufe des Versuches konnten sich in den Reaktoren mit niedrigerer Temperatur später auch mit dem verwendeten Latex-Test nicht typisierbare *Legionella* spp. durchsetzen (siehe Abschlussbericht NLGA). Die Dominanz der *Legionella pneumophila* ist wahrscheinlich auf den vom Hefekonzentrat verursachten Wachstumsvorteil zurückzuführen, wie bereits an anderer Stelle beschrieben (z.B.

Kapitel 3.1.2 und 3.2.1). Der temperaturinduzierte Shift von *L. pneumophila* zu nicht typisierbaren *Legionella* spp. deutet ebenfalls darauf hin, dass bei niedrigen Temperaturen vorwiegend *Legionella non-pneumophila* wachsen können. Diese Annahme wird von den qPCR-Analysen für *Legionella* spp. und *L. pneumophila* gestützt. Bei 15 °C fällt die Konzentration für *L. pneumophila* kontinuierlich während sie für *Legionella* spp. steigt.

### 3.3.3 Mikroskopische Auswertung

Um die Ausgangssituation des Schlammes aus der KA Warstein zu charakterisieren, wurden Proben vom Versuchsbeginn (0 d) mit FISH-Sonden untersucht. Die Aufnahmen des Belebtschlammes sind in Abb. 21 dargestellt. Es konnten unterschiedliche Eukaryoten, u.a. Naeglerien in größerer Zahl, sowie *Legionella pneumophila* und *Legionella* spp. (in geringer Zahl) nachgewiesen werden. Naeglerien kommen laut Fields (1996) oft in Kaltwasserhabitaten vor, wohingegen *Hartmannella* sp. oft in warmem Wasser vorzufinden ist. Diese Erkenntnisse lassen sich auf den Schlamm in Warstein zum Zeitpunkt der Probenahme (Herbst, kalte Außen- und Wassertemperatur unter 20 °C) gut übertragen.

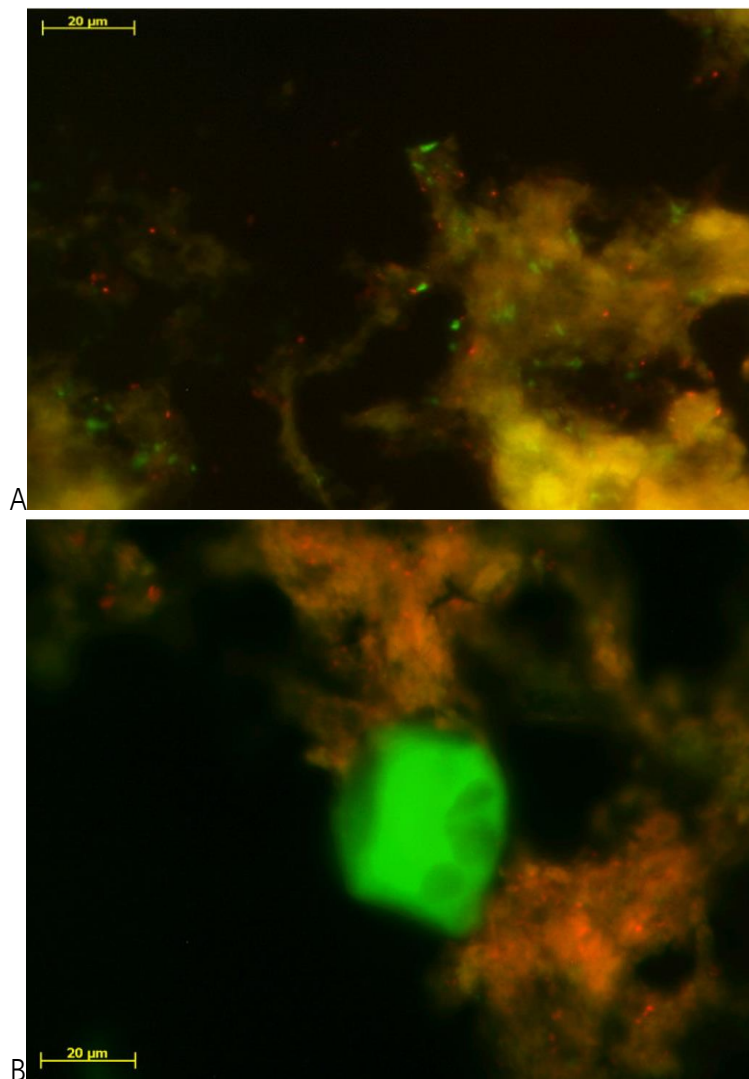
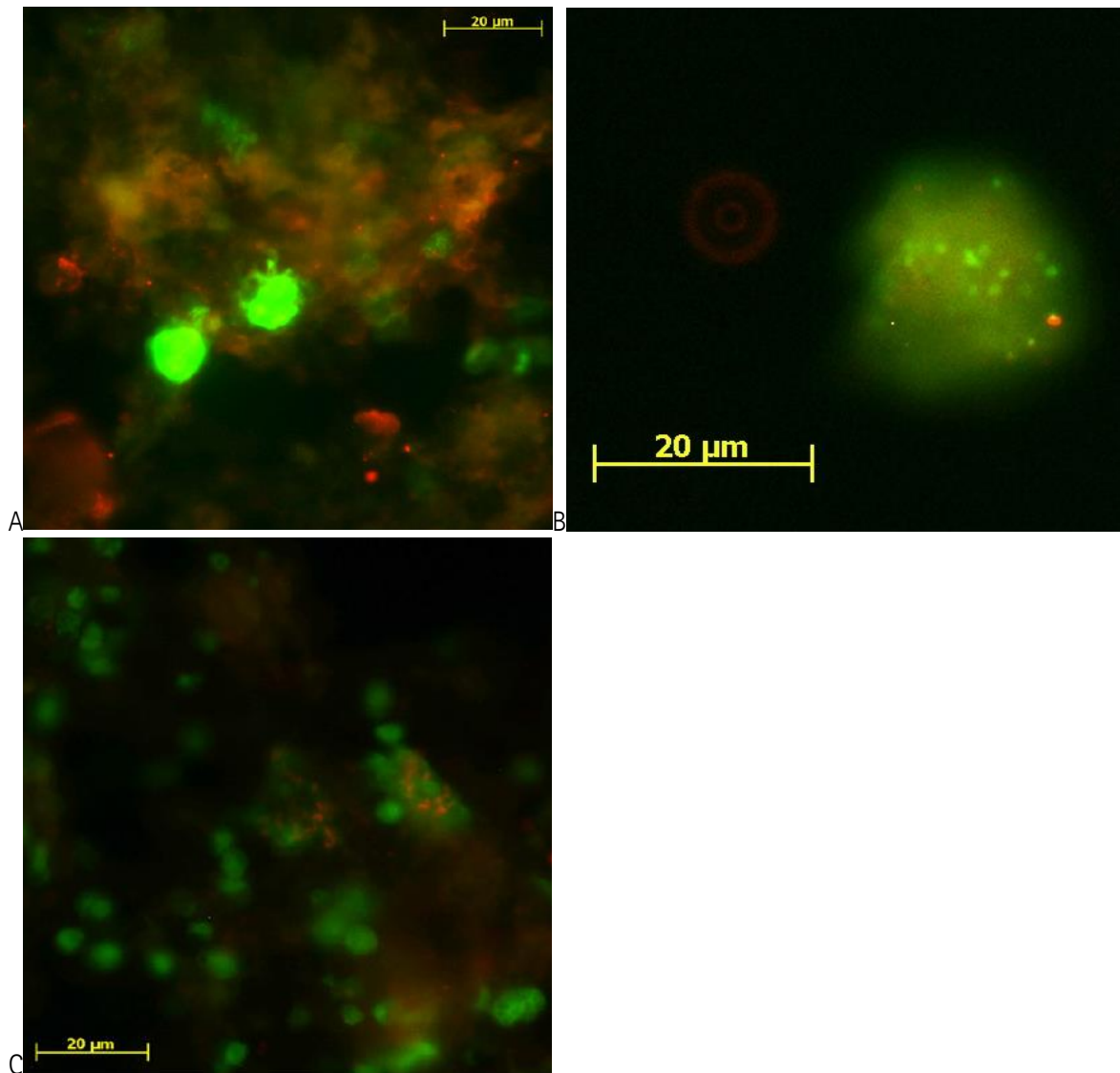


Abbildung 21 Ergebnisse der FISH-Analyse für Versuchsbeginn des kontinuierlichen Versuch 3

A) Belebtschlamm aus KA Warstein, grün: *Naegleria* sp., rot: *Legionella pneumophila*; B) Belebtschlamm aus KA Warstein; grün: Eukaryoten, rot: *Legionella* spp. außerhalb



**Abbildung 22 Ergebnisse der FISH-Analyse während des kontinuierlichen Versuch 3**

A) Reaktor mit 15°C 14 d; grün: *Naegleria* sp., rot: *Legionella pneumophila*; außerhalb *Naegleria* sp.; B) Reaktor mit 27 °C 14 d; grün: *Naegleria* sp., rot: *Legionella* spp.; C) Reaktor mit 15 °C 21 d; grün: Eukaryoten, rot: *Legionella* spp.; innerhalb von Eukaryoten

Während des Versuches konnten Legionellen sowohl außerhalb als auch innerhalb von Eukaryoten (vor allem im Reaktor mit 15 °C) regelmäßig gefunden werden (siehe dazu Abb.22). Am Ende des dritten kontinuierlichen Versuches (Abb.23) konnte hingegen in allen Reaktoren Hartmannellen, Acanthamöben und Naeglerien nachgewiesen werden, allerdings waren diese bis auf eine Ausnahme nicht mit Legionellen infiziert (Ausnahme: Abb.23C infizierte Acanthamöbe). Außerdem konnten wie im ersten kontinuierlichen Versuch (siehe Kapitel 3.1.3) wieder Legionellen in Ciliaten detektiert werden (15 °C Reaktor, Abb.23A + B).

Die in Abb.23 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Legionellen im Abwasser verstärkt auch Ciliaten zur Vermehrung benutzen. Ob dies auch temperaturabhängig ist, und welchen Wirt sie bevorzugen, lässt sich anhand dieser Daten noch nicht nachweisen.

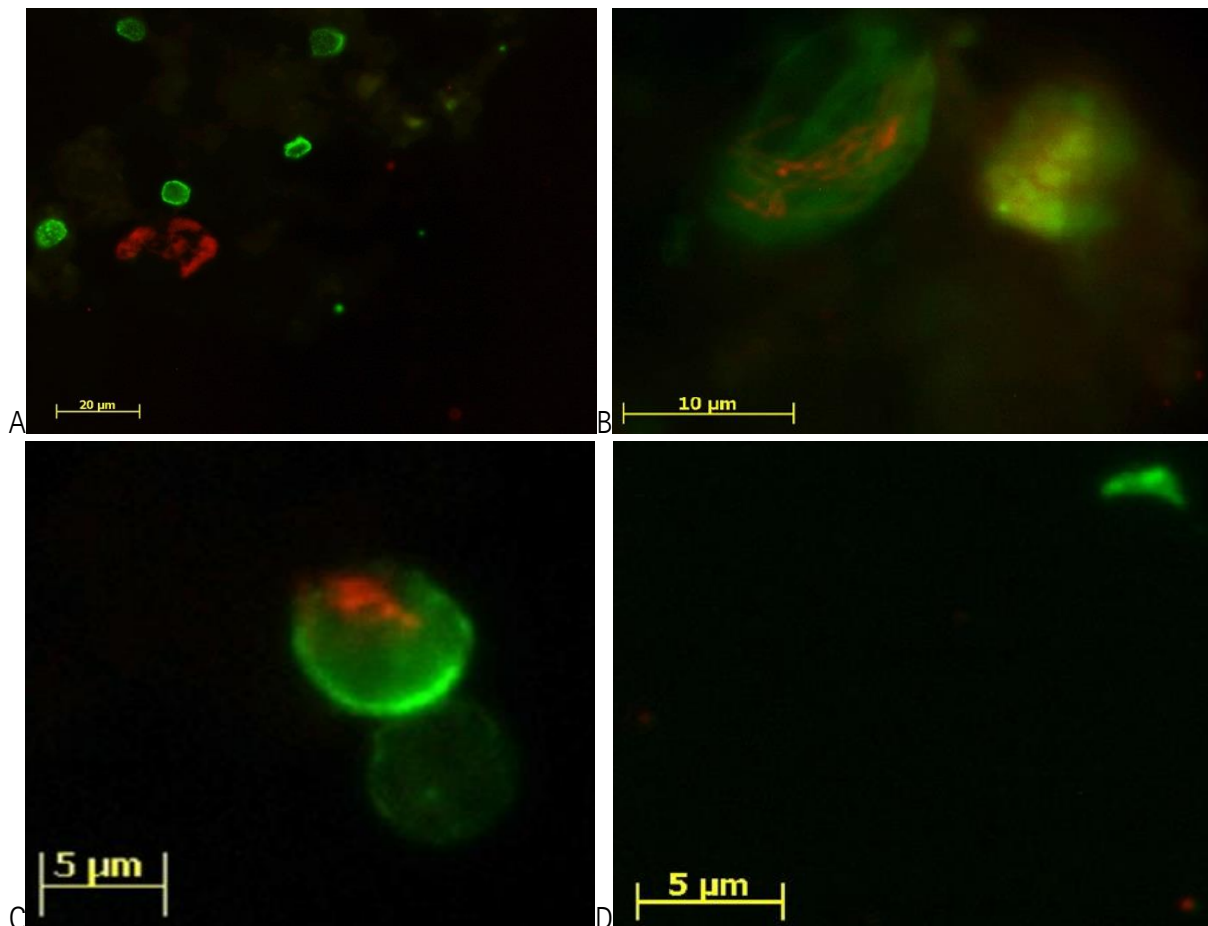


Abbildung 23 FISH-Ergebnisse vom Ende des kontinuierlichen Versuches 2

A) Reaktor mit 15 °C; grün: *Hartmannella* sp., rot: *Legionella* spp., Legionellen innerhalb eines nicht mit FISH hervorgehobenen Eukaryoten; B) Reaktor mit 15 °C; grün: Eukaryoten, rot: *Legionella* spp.; vermutlich Ciliat; C) Reaktor mit 15 °C; grün: *Acanthamoeba* sp., rot: *Legionella* spp.; D) Reaktor mit 35 °C; grün: *Hartmannella* sp., rot: *Legionella* spp.

### 3.4 Interpretation der Ergebnisse aus der KA Warstein

Neben der Temperatur stellte sich im Laufe des Projektes auch die CSB-Konzentration im Zulauf als entscheidender Faktor für das Vorkommen von Legionellen im Belebtschlamm der KA Warstein heraus. Eigentlich befinden sich im Rohabwasser durch den Industrieeinleiter hohe CSB-Konzentration im Zulauf der Anlage, aber da dieser zu Schwierigkeiten am Ablauf der Kläranlage führen würde (Trübung, Grenzwertüberschreitungen), wird in der KA Warstein schon in der Vorklä- rung das Abwasser mit Fällungsmitteln (bis November 2013 ein Eisenpräparat, danach Aluminium) vorbehandelt. Diese starke Reduktion des Gesamt-CSB in der Vorklä- rung führt zu einer Unterversorgung der Bakterien mit Substrat in der Belebung. Als Überlebensstrategie reagieren Bakterien auf Veränderungen in der Umwelt, z.B. Temperatur und Substratverfügbarkeit, u.a. mit einer Anpassung ihrer Morphologie und Viabilität (Roszak und Colwell 1987). Laut Molofsky und Swanson (2004) tritt *Legionella pneumophila* bei Nahrungsmangel in den Vakuolen der Amöben, in denen sie sich vermehren, in die sogenannte transmissive Phase ein (siehe Abb.24) und verlassen ihren Wirt. Außerdem wird *Legionella pneumophila* durch die Freisetzung resistenter gegenüber Umweltein- flüssen auch infektiöser. Dadurch sind sie in der Lage, sogar in solch nährstoffarmen Habitaten wie Trinkwasser bis zu 2,4 Jahre im VBNC-Stadium (Paszko-Kolva et al. 1992) frei im Medium oder in Biofilmen zu überdauern (Molofsky und Swanson 2004), bevor sie wieder einen Wirt infizieren. Wenn sich dann die Nährstoffsituation wieder verbessert, tritt *Legionella pneumophila* wieder in

ihre replikative Phase (Vermehrung in der Wirtszelle) ein und der Zyklus beginnt von vorne (Abb.24). Überträgt man diesen Vermehrungszyklus auf die Kläranlage Warstein würde dies bedeuten, dass *Legionella pneumophila* im Industrieablauf aufgrund von Nahrungsüberschuss und Temperaturen um die 30°C sich im replikativen Stadium innerhalb der Amöben befindet. In der Vorklä- rung kommt es dann aufgrund des Polymereinsatzes abrupt zu einer Nährstoffmangelsituation, die sich auf alle Organismen auswirkt. Dies könnte zu einem Wechsel von *L. pneumophila* in die trans- missive Phase führen, um einer möglichen Verdauung durch den Wirt zu entgehen. Zwar sind die Bedingungen außerhalb ebenfalls nicht optimal für *L. pneumophila*, aber durch die erhöhte Um- weltresistenz sind sie in der Lage zu überleben. Dieser Vermehrungszyklus würde aber auch ohne den Einsatz des Fällungsmittels stattfinden. Allerdings erzwingt der sprunghafte Wechsel von sehr hohen CSB-Konzentrationen (bis zu 1000 mg/L) zu Konzentrationen um die 100 mg/L wahr- scheinlich den Eintritt in die transmissive Phase bei allen *Legionella pneumophila*, die sich innerhalb von Amöben aufhalten. Da diese freien *Legionella pneumophila* zusätzlich zu ihrer Umweltresistenz auch eine höhere Infektiosität aufweisen, ist es empfehlenswert, im Bereich der Beleb- ung eine Aerosolbildung zu vermeiden. Als Vorsichtsmaßnahme wurde auf der Kläranlage Warstein bereits zur Vermeidung von Aerosolen der Tropfkörper außer Betrieb genommen und das Belebungsbecken abgedeckt, so dass hier kein weiterer Handlungsbedarf besteht.

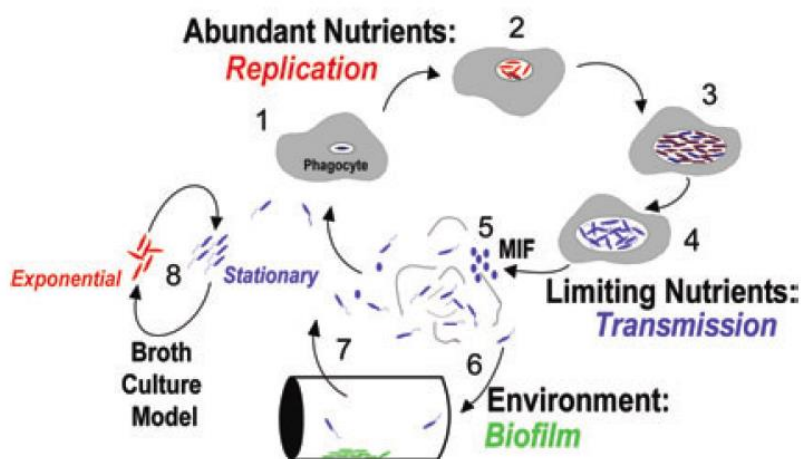


Abbildung 24 Nährstoffabhängiger Vermehrungszyklus von *Legionella pneumophila* nach Molofsky und Swanson (2004)  
 Übersetzung: abundant nutrients – Nährstoffe im Überschuss; replication – Vermehrung; limiting nutrients – Nährstoff-  
 mangel; transmission – Übertragung (z.B. zu neuem Wirt); environment – Umwelt; broth culture model – (künstliches)  
 Flüssigmediummodell (beinhaltet exponentielle und stationäre Phase); phagocyte – Phagozyt (kann humaner Makropha-  
 ge sein oder Amöbe); MIF mature intracellular form – reife (infektiöse) intrazelluläre Form von *Legionella pneumophila*

Auch wenn sich in der Beleb- ung aufgrund der aufgestellten Vermehrungstheorie sehr viele freie *Legionella pneumophila* befinden, zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie aber auch, dass eine Abreicherung bei niedrigen Temperaturen (unter 26°C, siehe Kapitel 3.3.2) im Belebtschlamm möglich ist. Andere *Legionella* spp. hingegen bevorzugen gemäß den vorliegenden Ergebnissen offenbar kältere Temperaturen und persistieren in der Beleb- ung. Inwiefern diese ein Infektionsrisiko darstellen, kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden.

Für die KA Warstein ist der Einbau einer Anaerobstufe geplant. Bisher wurde für Legionellen kein Wachstum unter anaeroben Bedingungen beschrieben [Rowbotham (1980) und Blatny *et al.* (2008)]. Allerdings besteht immer die Möglichkeit, dass sich Legionellen bei der Passage einer anaer-

roben Stufe mittels VBNC im Abwasser halten könnten. In der aeroben Stufe würden sie dann eventuell wieder reaktiviert werden können (Fliermans 1996); hier besteht Forschungsbedarf.

#### 4. Zusammenfassung

Die wichtigsten Erkenntnisse aus der vorliegenden Studie sind in den Tabellen 19-22 zusammengefasst. Tab.19 zeigt, dass die Temperatur einen sehr großen Einfluss auf Legionellen hat. Vor allem der Bereich zwischen 22 °C und 30 °C sollte zukünftig genauer betrachtet werden, da hier der Übergang zwischen Vermehrung oder Abreicherung über das Schlammalter liegt. In den Versuchen konnte eine Abreicherung von *Legionella pneumophila* SG1 bei Temperaturen unter 26 °C nachgewiesen werden, aber andere Legionellenarten scheinen diese Temperaturen wiederum zu bevorzugen.

Tabelle 19 Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Legionellen

Temperatur Legionellen	15°C	26°C	35°C
<i>Legionella</i> spp.	+ (FE)	+/-	-
<i>L. pneumophila</i>	-	+/- (FE)	++ (FE)

+ Wirkung, - keine dauerhafte Wirkung, FE - Forschungsbedarf

Für *Legionella pneumophila* konnte in dieser Studie außerdem die Temperaturabhängigkeit der kinetischen Parameter bestimmt werden (siehe Tab.20).

Tabelle 20 Kinetische Parameter von *Legionella pneumophila*

Temperatur	Wachstum $\mu$ (d <sup>-1</sup> )	Zerfall (nach Abzug Ausschwemmen in %/d)
22°C	- (FE)	0 – 6,8 (FE)
35°C	1,57 – 3,6 (FE)	30 (FE)

FE - Forschungsbedarf

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass diese kinetischen Parameter neben der Temperatur auch stark vom Substrat abhängig sind. In der Tab.21 sind die Substrateinflüsse bei 26°C dargestellt, sowie die gewählten Substratindikatoren (Stickstoffgehalt, CSB-Gehalt, Aminosäuregehalt) aufgeführt. Vor allem proteinreiches Substrat – wie z.B. Hefekonzentrat – und eine Temperatur um 35°C begünstigen das Wachstum von *Legionella pneumophila* deutlich.

Tabelle 21 Substrateinflüsse und Indikatoren bei 26°C

Substrat Legionellen	kommunales Abwasser	proteinreiches Substrat	Substratindikatoren		
			> KN/oTS	> CSB/oTS	Aminosäure
<i>Legionella</i> spp.	- (FE)	(+)	+ (FE)	+ (FE)	+ (FE)
<i>L. pneumophila</i>	+/- (FE)	++ (FE)	+ (FE)	+ (FE)	+ (FE)

+ Wirkung, - keine dauerhafte Wirkung, FE - Forschungsbedarf

Als Maßnahme zur Abreicherung von Amöben und damit langfristig auch von Legionellen wurde in diesem Teilprojekt die Wirksamkeit von Ultraschall untersucht. Zwar konnte schon bei einem geringem Energieeinsatz von 2 W·h/L eine Zerstörung der trophozoiten Amöben erreicht werden, aber ein dauerhafter Abreicherungseffekt war weder für die Amöben noch für die Legionellen nachweisbar. Nach der Ultraschallbehandlung erfolgt eine schnelle Wiederbesiedlung des Belebtschlammes durch trophozoite Amöben (insbesondere bei höheren Temperaturen von 35°C), so dass Ultraschall keine geeignete Strategie zu Abreicherung von Legionellen darstellt.

Basierend auf den Erkenntnissen aus allen Teilprojekten sind die Wirksamkeiten der untersuchten Sofortmaßnahmen in der Tab.22 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 22 Zusammenfassung aller Maßnahmen zur Bekämpfung von Legionellen im Belebtschlamm und ihr Wirksamkeit auf *Legionella* spp. bzw. *L. pneumophila*, Amöben und Bakterien (*E. coli*, Nitrifikanten)**

Maßnahme		Wirkung auf		
		<i>Legionella</i> spp. bzw. <i>L. pneumophila</i>	Amöben	Bakterien ( <i>E. coli</i> , Nitrifikanten)
1	pH > 10	-	?	+
2	pH < 5	-	? (FE)	+
3	ClO <sub>2</sub>	-	? (FE)	+
4	Mikrosilber	-	-	-
5	Ultraschall	-	-	-
6	Temperatur zw. 22°C-30°C	+ (FE)	- (FE)	-
7	Substratzug	+ (FE)	- (FE)	-

+ Wirkung, - keine dauerhafte Wirkung, ? nicht untersucht, FE Forschungsbedarf

Wie aus den Tabellen 19-22 ersichtlich ist, besteht trotz der vielen gewonnenen Erkenntnisse nach wie vor ein Forschungsbedarf hinsichtlich des Verhaltens von Legionellen im Belebtschlamm. Die wichtigsten zu untersuchenden Faktoren für das Überleben von *Legionella pneumophila* im Belebtschlamm sind dabei die Temperatur im Bereich zwischen 22°C und 30°C und die Substratabhängigkeit. Weiterhin ist der Einfluss von extrazellulären Substanzen (Inhibitoren) von anderen Bakterien (z.B. *Aeromonas hydrophila*) auf das Wachstum von *Legionella pneumophila* und der substratabhängige Konkurrenzdruck unter den Bakterien von großem wissenschaftlichem Interesse.

Als geeignete Gegenmaßnahmen innerhalb biologischer Anlagen können offensichtlich nur Veränderungen von Substrat und/oder der Temperatur zu einer Abreicherung führen, wobei eine Substratveränderung z.B. durch eine anaerobe Vorbehandlung ebenfalls erfolgsversprechend zu sein scheint. Die genauen Einflüsse der Temperatur zwischen 22°C und 30°C sowie die Einflüsse einer anaeroben Vorbehandlung sollten weiter untersucht werden. Gleiches gilt für mögliche Indikatorparameter wie die Relationen von CSB/oTS, N/oTS oder auch die Zusammensetzung der Aminosäuren.



Hannover, den 18.12.2014

Prof. Dr.-Ing. Karl-Heinz Rosenwinkel

#### Danksagungen

Wir danken dem Ruhrverband für die gute Zusammenarbeit und dem Land NRW für die Förderung dieses Forschungsvorhabens. Darüber hinaus danken wir allen Labormitarbeitern und studentischen Hilfskräften für ihre Arbeit, sowie Frau Dipl.-Ing. Nina Manig für die Berechnungen der Schlammbelastung und des Schlammalters der KA Warstein.

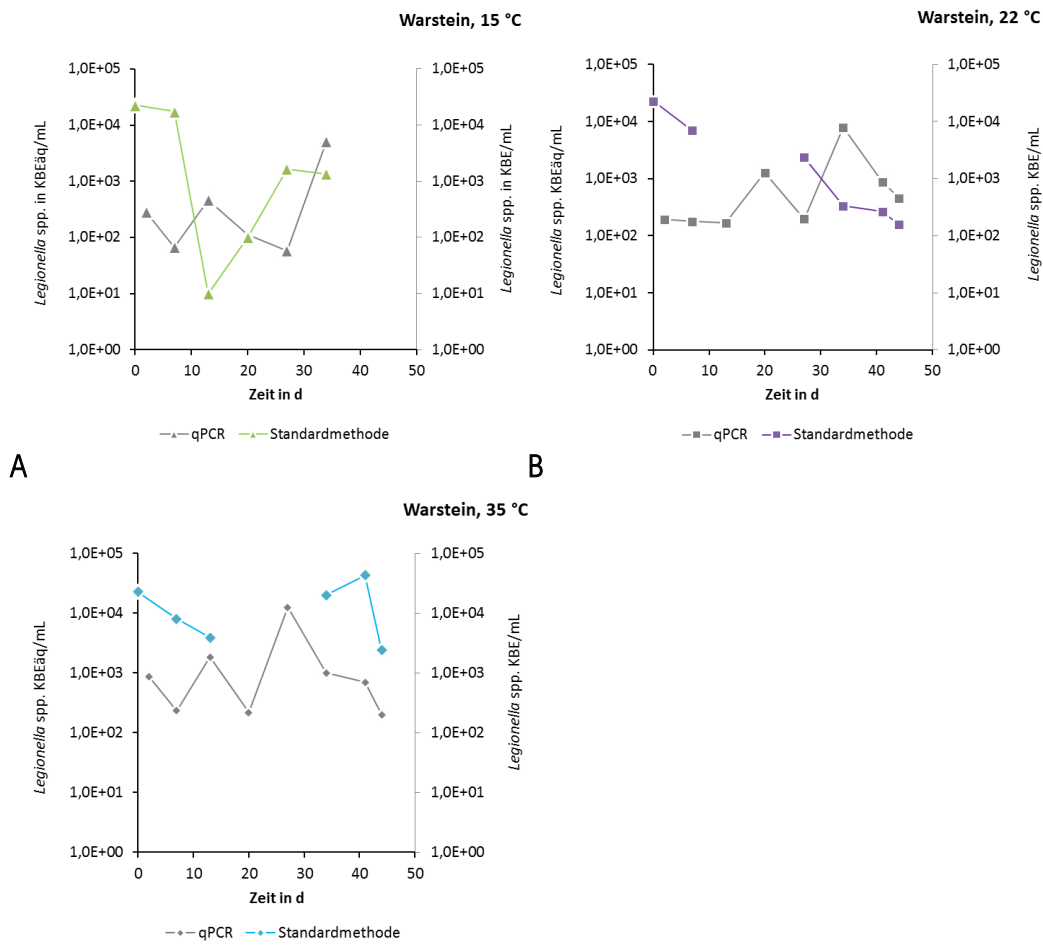
## 5. Referenzen

- 1994 DIN 38412: German standards methods for the examination of water, waste water and sludge - Bio-assays (group L) - Surfactant biodegradation and elimination test simulating municipal waste water treatment (L 26).
- Adeleke, A. A., Fields, B. S., Benson, R. F., Daneshvar, M. I., Pruckler, J. M., Ratcliff, R. M., Harrison, T. G., Weyant, R. S., Birtles, R. J., Raoult, D. und Halablab, M. A. 2001 *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (3), 1151-1160
- Allestam, G., de Jong, B. und Långmark, J. 2006 Biological Treatment of Industrial Wastewater: a Possible Source of *Legionella* Infection. In: *Legionella*, (ed.), American Society of Microbiology, pp.
- Barker, J., Scaife, H. und Brown, M. R. 1995 Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39 (12), 2684-2688
- Blatny, J. M., Reif, B. A., Skogan, G., Andreassen, O., Hoiby, E. A., Ask, E., Waagen, V., Aanonsen, D., Aaberge, I. S. und Caugant, D. A. 2008 Tracking airborne *Legionella* and *Legionella pneumophila* at a biological treatment plant. *Environ Sci Technol*, 42 (19), 7360-7367
- Brüggemann, H., Cazalet, C. und Buchrieser, C. 2006 Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 9 (1), 86-94
- Campodonico, E. M., Chesnel, L. und Roy, C. R. 2005 A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol Microbiol*, 56 (4), 918-933
- Catalan, V., Garcia, F., Moreno, C., Vila, M. J. und Apraiz, D. 1997 Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater by nested polymerase chain reaction. *Research in Microbiology*, 148 (1), 71-78
- Declerck, P., Vanysacker, L., Hulsmans, A., Lambert, N., Liers, S. und Ollevier, F. 2010 Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*. *Water Research*, 44 (3), 703-710
- Delgado-Viscogliosi, P., Salignac, L. und Delattre, J.-M. 2009 Viability PCR, a Culture-Independent Method for Rapid and Selective Quantification of Viable *Legionella pneumophila* Cells in Environmental Water Samples. *Appl Environ Microbiol*, 75 (11), 3502-3512
- Den Boer, J. W., Yzerman, E. P., Schellekens, J., Lettinga, K. D., Boshuizen, H. C., Van Steenberghe, J. E., Bosman, A., Van den Hof, S., Van Vliet, H. A., Peeters, M. F., Van Ketel, R. J., Speelman, P., Kool, J. L. und Conyn-Van Spaendonck, M. A. 2002 A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis*, 8 (1), 37-43
- Diederer, B. M. W. 2008 *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection*, 56 (1), 1-12
- Eikelboom, D. H. 2001 Prozessüberwachung von Belebungsanlagen durch mikroskopische Schlammuntersuchung. ATV-DVWK, Hennef
- Fields, B. S. 1996 The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol*, 4 (7), 286-290
- Fields, B. S., Barbaree, J. M., Sanden, G. N. und Morrill, W. E. 1990 Virulence of a *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. *Infect Immun*, 58 (9), 3139-3142
- Fields, B. S., Benson, R. F. und Besser, R. E. 2002 *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (3), 506-526
- Fliermans, C. B. 1996 Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microb Ecol*, 32 (2), 203-228
- Fykse, E. M., Aarskaug, T., Thrane, I. und Blatny, J. M. 2013 *Legionella* and non-*Legionella* bacteria in a biological treatment plant. *Can J Microbiol*, 59 (2), 102-109
- Garcia-Fulgueiras, A., Navarro, C., Fenoll, D., Garcia, J., Gonzalez-Diego, P., Jimenez-Bunuales, T., Rodriguez, M., Lopez, R., Pacheco, F., Ruiz, J., Segovia, M., Balandron, B. und Pelaz, C. 2003 Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis*, 9 (8), 915-921

- Garcia, A., Goni, P., Clavel, A., Lobez, S., Fernandez, M. T. und Ormad, M. P. 2011 Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environ Microbiol Rep*, 3 (5), 622-626
- Garcia, M. T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R. D. und Abu Kwaik, Y. 2007 Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection. *Environ Microbiol*, 9 (5), 1267-1277
- George, J. R., Pine, L., Reeves, M. W. und Harrell, W. K. 1980 Amino acid requirements of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol*, 11 (3), 286-291
- Giles, D. L. 1995 Characterization and Cultivation of Sarcobium Lyticum on Artificial Medium.
- Gregersen, P., Grunnet, K., Uldum, S. A., Andersen, B. H. und Madsen, H. 1999 Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry. *Scand J Work Environ Health*, 25 (3), 291-295
- Grimm, D. 2000 Entwicklung von neuen Nachweismethoden für Legionellen und Amöben und ihre Anwendung in ökologischen Studien.
- Huang, S. W., Hsu, B. M., Ma, P. H. und Chien, K. T. 2009 Legionella prevalence in wastewater treatment plants of Taiwan. *Water Sci Technol*, 60 (5), 1303-1310
- James, B. W., Mauchline, W. S., Dennis, P. J., Keevil, C. W. und Wait, R. 1999 Poly-3-hydroxybutyrate in Legionella pneumophila, an energy source for survival in low-nutrient environments. *Appl Environ Microbiol*, 65 (2), 822-827
- Koubar, M., Rodier, M. H., Garduno, R. A. und Frere, J. 2011 Passage through Tetrahymena tropicalis enhances the resistance to stress and the infectivity of Legionella pneumophila. *FEMS Microbiol Lett*, 325 (1), 10-15
- Kuiper, M. W., Wullings, B. A., Akkermans, A. D., Beumer, R. R. und van der Kooij, D. 2004 Intracellular proliferation of Legionella pneumophila in Hartmannella vermiformis in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol*, 70 (11), 6826-6833
- Kusnetsov, J., Neuvonen, L. K., Korpio, T., Uldum, S. A., Mentula, S., Putus, T., Tran Minh, N. N. und Martimo, K. P. 2010 Two Legionnaires' disease cases associated with industrial waste water treatment plants: a case report. *BMC Infect Dis*, 10 343
- Mansi, A., Amori, I., Marchesi, I., Marcelloni, A. M., Proietto, A. R., Ferranti, G., Magini, V., Valeriani, F. und Borella, P. 2014 Legionella spp. survival after different disinfection procedures: Comparison between conventional culture, qPCR and EMA-qPCR. *Microchemical Journal*, 112 (0), 65-69
- Manz, W., Amann, R., Szewzyk, R., Szewzyk, U., Stenstrom, T. A., Hutzler, P. und Schleifer, K. H. 1995 In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology*, 141 ( Pt 1) 29-39
- Medema, G., Wullings, B., Roeleveld, P. und van der Kooij, D. 2004 Risk assessment of Legionella and enteric pathogens in sewage treatment works. *Waterborne Pathogens*, 4 (2), 125-132
- Molofsky, A. B. und Swanson, M. S. 2004 Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Molecular Microbiology*, 53 (1), 29-40
- Murga, R., Forster, T. S., Brown, E., Pruckler, J. M., Fields, B. S. und Donlan, R. M. 2001 Role of biofilms in the survival of Legionella pneumophila in a model potable-water system. *Microbiology*, 147 (Pt 11), 3121-3126
- Newsome, A. L., Baker, R. L., Miller, R. D. und Arnold, R. R. 1985 Interactions between Naegleria fowleri and Legionella pneumophila. *Infect Immun*, 50 (2), 449-452
- Nguyen, T. M., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J. und Desenclos, J. C. 2006 A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis*, 193 (1), 102-111
- Ohno, A., Kato, N., Sakamoto, R., Kimura, S. und Yamaguchi, K. 2008 Temperature-dependent parasitic relationship between Legionella pneumophila and a free-living amoeba (Acanthamoeba castellanii). *Appl Environ Microbiol*, 74 (14), 4585-4588

- Olsen, J. S., Aarskaug, T., Thrane, I., Pourcel, C., Ask, E., Johansen, G., Waagen, V. und Blatny, J. M. 2010 Alternative routes for dissemination of *Legionella pneumophila* causing three outbreaks in Norway. *Environ Sci Technol*, 44 (22), 8712-8717
- Paszko-Kolva, C., Shahamat, M. und Colwell, R. R. 1992 Long-term survival of *Legionella pneumophila* serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. *FEMS Microbiology Letters*, 102 (1), 45-55
- Patterson, D. J. und Hedley, S. 1992 Free-living freshwater protozoa: a colour guide.
- Percival, S. L. und Williams, D. W. 2014 Chapter Eight - Legionella. In: *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*, (ed.), Academic Press, London, pp. 155-175
- Price, C. T., Richards, A. M., Von Dwingelo, J. E., Samara, H. A. und Abu Kwaik, Y. 2014 Amoeba host-Legionella synchronization of amino acid auxotrophy and its role in bacterial adaptation and pathogenic evolution. *Environ Microbiol*, 16 (2), 350-358
- Roszak, D. B. und Colwell, R. R. 1987 Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews*, 51 (3), 365-379
- Rowbotham, T. J. 1980 Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*, 33 (12), 1179-1183
- Rowbotham, T. J. 1986 Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci*, 22 (9), 678-689
- Rowbotham, T. J. 1993 Legionella-like amoebal pathogens. In *Legionella: current status and emerging perspectives*. In: Barbaree, J. M., Breiman, R.F. & Dufour, A.P. (ed.), American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 137-140
- Springer, N., Ludwig, W., Drozanski, W., Amann, R. und Schleifer, K. H. 1992 The phylogenetic status of *Sarcobium lyticum*, an obligate intracellular bacterial parasite of small amoebae. *FEMS Microbiol Lett*, 75 (2-3), 199-202
- Steinert, M., Emody, L., Amann, R. und Hacker, J. 1997 Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*, 63 (5), 2047-2053
- Tison, D. L., Pope, D. H., Cherry, W. B. und Fliermans, C. B. 1980 Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Appl Environ Microbiol*, 39 (2), 456-459
- Toze, S., Cahill, M., Sly, L. I. und Fuerst, J. A. 1994 The effect of *Aeromonas* strains on the growth of *Legionella*. *Journal of Applied Bacteriology*, 77 (2), 169-174
- Wullings, B. A. und van der Kooij, D. 2006 Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15 degrees C. *Appl Environ Microbiol*, 72 (1), 157-166
- Zhou, K., Xu, M., Liu, B. und Cao, H. 2008 Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. *Journal of Environmental Sciences*, 20 (4), 482-486

## 6. Appendix



**C** **Abbildung 25 Vergleich von qPCR und Standardmethode im Überstand im kontinuierlichen Versuch 1 bei Reaktortemperaturen von A) 15 °C, B) 22 °C und C) 35 °**



**RUHRVERBAND**  
**Laborversuche zur**  
**Verringerung der**  
**Legionellenzahl**

Datum: 30/09/2014  
Referentie: PJ-13-PP-054-1  
Seite: 1

An Thomas Grünebaum  
Kai Uwe Utecht  
Christian Högel  
  
Ruhrverband

---

Laborversuche zur Verringerung der Konzentration an *Legionella pneumophila* im Ablauf eines Belebtschlammsystems

---

**Bericht**

**30. September, 2014**

ir. Lutgart Stragier  
[lutgart.stragier@avecom.be](mailto:lutgart.stragier@avecom.be)  
Tel.: +32 9 375 17 14  
Mobil: +32 471 79 16 73

ing. Mariane Van Wambeke  
[Mariane.vanwambeke@avecom.be](mailto:Mariane.vanwambeke@avecom.be)  
Mobil: +32 476 41 58 62

ir. Silvio Matassa  
[Silvio.matassa@avecom.be](mailto:Silvio.matassa@avecom.be)  
+32 468 16 59 73

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	2
1. Einleitung .....	4
2. Prozessparameter der Kläranlage Warstein.....	4
2.1 Eigenschaften von Zulauf und Ablauf (01.12.2013 – 04.04.2014) .....	5
2.2 Prozessparameter der Kläranlage Warstein.....	6
2.3 Eigenschaften des Belebtschlammes der Kläranlage Warstein.....	8
3. Reaktoraufbau .....	9
3.1 Beschreibung des Aufbaus .....	9
3.2 Betrieb der SBRs .....	10
3.3 Betriebliche Ähnlichkeit der KA Warstein .....	11
3.4 Monitoring der Reaktoren.....	12
4. Beschreibung der Behandlung zur Reduktion von Legionellen.....	13
5. Testphase 1, Versuchsbeginn (Start – Tag 21) .....	14
5.1 Phase 1 - Prozessparameter .....	14
5.2 Phase 1 - Zusammensetzung des Ablaufs .....	16
5.3 Phase 1 – Einfluss auf Legionellen .....	18
6. Testphase 2: Tag 22 - 48 .....	19
6.1 Phase 2 - Prozessparameter .....	19
6.2 Phase 2 – Zusammensetzung des Ablaufs .....	21
6.3 Phase 2 - Einfluss auf Legionellen .....	22
7. Testphase 3: Tag 49 – 63 (Verdopplung der Dosierung).....	25
7.1 Phase 3 - Prozessparameter .....	25
7.2 Phase 3 – Zusammensetzung des Ablaufs .....	27
7.3 Phase 3 – Einfluss auf Legionellen .....	28
8. Testphase 4: Tag 64 - 84 .....	30
8.1 Phase 4 - Prozessparameter .....	30
8.2 Phase 4 – Zusammensetzung des Ablaufs .....	33
8.3 Phase 4 – Einfluss auf Legionellen .....	34
Behandlung des Ablaufs mit freier salpetriger Säure (FSS) .....	36
9.1 Ziel der Versuche mit FSS .....	36
9.2 Beschreibung und Ergebnisse des FSS Tests im Ablauf.....	36
9. Zusammenfassung .....	38
10. Literatur .....	40

#### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

B <sub>R</sub>	Raumbelastung
BS	Belebtschlamm
BSB <sub>5</sub>	biologischer Sauerstoffbedarf (nach 5 Tagen)
B <sub>TS</sub>	Schlammbelastung
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
CSB <sub>hom</sub>	Gesamt-CSB
CSB <sub>fil</sub>	gelöster CSB
DO	Sauerstoffkonzentration
EL	elektrische Leitfähigkeit
FSS	freie salpetrige Säure
HRT	hydraulische Verweilzeit
L <sub>r</sub>	Einheitsreaktorvolumen (Arbeitsvolumen)
MP	Mischprobe
oTS	organische Trockensubstanz
SBR	Sequential Batch Reaktor
SVI	Schlammvolumenindex
TAN	Gesamt Ammonium-N
TS	Trockensubstanz
t <sub>TS</sub>	Schlammalter





## **RUHRVERBAND Laborversuche zur Verringerung der Legionellenzahl**

Datum: 30/09/2014  
Referentie: PJ-13-PP-054-1  
Seite: 4

### **1. Einleitung**

Im September 2013 kam es zu einem Ausbruch von Legionellose in Warstein. Verschiedene *Legionella* spp. sind der Grund für das Auftreten der Legionärskrankheit beim Menschen. Die Ansteckung erfolgt durch kontaminierte Aerosole, welche über die Atemwege in den Körper gelangen können.

In Warstein wurden die Bakterien höchstwahrscheinlich über industrielle Rückkühlwerke freigesetzt. Ausführliche Untersuchungen auf *Legionella* spp. an verschiedenen örtlichen Einrichtungen zeigten eine große Zahl an *Legionella* spp. im Belebtschlamm und im Ablauf der Kläranlage Warstein (Betreiber ist der Ruhrverband), die eine Mischung aus kommunalem und Brauereiabwasser behandelt. Es wurden Sofortmaßnahmen getroffen, die eine weitere Verbreitung von *Legionella* spp. über den Belebtschlamm und den Ablauf verhindern sollten. Jedoch sind mittelfristige Strategien zur gezielten Verringerung der Legionellenzahl im Belebtschlamm, sowie langfristige Strategien zur Vermeidung einer erneuten Besiedlung durch *Legionella* spp. notwendig. Hierfür wurden Laborversuche durchgeführt, um die Wirksamkeit der verschiedenen Behandlungsmethoden auf das Legionellenwachstum im Belebtschlamm einschätzen zu können.

Avecom wurde mit der Untersuchung beauftragt Möglichkeiten zur Verringerung der Legionellenzahl im Belebtschlamm der Kläranlage Warstein zu finden, unter Beibehaltung des derzeit herrschenden CSB- und Stickstoffabbaus.

### **2. Prozessparameter der Kläranlage Warstein**

Vor dem Start der kontinuierlichen Laborversuche, wurden die Hauptprozessparameter der Kläranlage Warstein analysiert, um den Effekt der verschiedenen Behandlungsmethoden im Laborversuch abschätzen zu können.

Am 28. April erhielt Avecom zwei Dateien mit Betriebsdaten der KA Warstein: diese beinhalteten die Zulauftrate aus dem Brauereiablauf und die Gesamtzulauftrate der Kläranlage, sowie eine Datei mit Messparametern von vier verschiedenen Punkten der Abwasserbehandlung innerhalb der Kläranlage:

- das Brauereiabwasser,
- gemischtes Abwasser (Brauerei- und kommunales Abwasser),
- Abwasser nach Vorklärung,
- und Ablauf UV-Behandlung.

Basierend auf diesen Daten, konnten die Betriebsparameter der Kläranlage Warstein abgeleitet werden.

## 2.1 Eigenschaften von Zulauf und Ablauf (01.12.2013 – 04.04.2014)

Die Eigenschaften des Zulaufs für den Zeitraum (01.12.2013 bis 04.04.2014) sind in Tabelle 2-1. zusammengefasst. Eine Übersicht der täglichen Fracht der Kläranlage ist in Tabelle 2-2. wiedergegeben.

**Tabelle 2-1:** Zusammensetzung von Zulauf und Ablauf der KA Warstein

Parameter	Einheit	Brauerei	Gesamt-zulauf*	Ablauf Vorklärung = Zulauf Belebung <sup>2</sup>	Ablauf <sup>3</sup>	Abbau-leistung Biologie
Q	m <sup>3</sup> /d	2324 ± 470	8888 ± 1921	8877 ± 1906	8887 ± 1906	
pH	-	9,0 ± 0,3	8,7 ± 0,2	8,4 ± 0,3	8,3 ± 0,3	
EL	mS/cm	5,77 ± 1,05	2,48 ± 0,50	2,47 ± 0,80	2,51 ± 0,78	
TS	mg/L	802 ± 211	304 ± 76	44 ± 23	6 ± 5	86%
oTS	mg/L	562 ± 125	226 ± 57	31 ± 16	4 ± 3	87%
CSB <sub>hom</sub>	mg/L	915 ± 198	402 ± 73	94 ± 31	33 ± 10	65%
CSB <sub>fil</sub>	mg/L	275 ± 140	110 ± 44	66 ± 21	/	
org. N	mg/L	/	/	/	1 - 2 <sup>4</sup>	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	mg/L	/	/	/	0 - 1 <sup>4</sup>	
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	mg/L	/	/	/	0	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	mg/L	/	/	/	8 ± 1	
Gesamt N	mg/L	59 ± 43	35 ± 21	21 ± 8	10 ± 1	52%
Gesamt P	mg/L	16 ± 3	7 ± 2	1 ± 1	0-1 <sup>4</sup>	
BSB <sub>5</sub>	mg/L	252 ± 120	118 ± 39	21 ± 11	/	~100%
<b>Verhältnisse</b>						
CSB <sub>fil</sub> /CSB <sub>hom</sub>	%	30%	27%	70%		
BSB/CSB	%	28%	29%	22%		
CSB/N		100/6	100/9	100/22		
CSB/P		100/2	100/2	100/1		
VSS/TSS	%	70%	74%	70%	67%	

\* Abwasser der Brauerei + kommunales Abwasser

<sup>2</sup> Ablauf Vorklärung ist Zulauf Belebung

<sup>3</sup> Ablauf UV-Behandlung

<sup>4</sup> Minimum – Maximum Wert

/ keine Daten verfügbar

Das Belebtschlammssystem wurde mit dem Ablauf der Vorklärung betrieben. Da es sich beim Ablauf der Vorklärung um den Zulauf der Belebungsstufe handelt, ist dieser im weiteren Bericht als „Zulauf“ definiert.

Aus Tabelle 2-1 geht hervor, dass der Zulauf der Belebung einen pH-Wert von ca. 8,4 aufweist. Die Leitfähigkeit liegt bei etwa 2,5 mS/cm. Der Zulauf wies mit durchschnittlich nur 94 mg/L einen sehr geringen CSB-Gehalt auf. Etwa 70% des Gesamt-CSB lag in gelöster Form vor, es wurden jedoch nur 22% (21 mg/L) als BSB<sub>5</sub> identifiziert. Der Ablauf der Kläranlage beinhaltete durchschnittlich 33 mg CSB/L. Folglich wurden 65% des Zulauf-CSB entfernt.

Der Zulauf wurde mit einem CSB/N/P-Verhältnis von 100/22/1 charakterisiert. Dieses Verhältnis zeigt an, dass der Zulauf genug Stickstoff für eine funktionierende Biozönose enthält. Das CSB/P-Verhältnis von 100/1 sollte ein ausreichendes Bakterienwachstum ermöglichen. Der restliche Phosphor im Ablauf variiert zwischen 0 und 1 mg/L. Dies zeigt, dass die Versorgung mit Phosphor durch den Zulauf für ein Bakterienwachstum zeitweise gerade ausreichend war, jedoch auch gelegentlich eine Unterversorgung an Phosphor auftrat. Der Zulauf enthielt 21 mg Gesamt-N/L. Durch Nitrifizierung und Denitrifizierung wurden 52% des Stickstoffs entfernt (der Ablauf enthielt durchschnittlich 10 mg N/L). Der Rest des Stickstoffs wurde fast vollständig zu Nitrat umgesetzt.

**Tabelle 2-2:** Übersicht der täglichen Fracht der Kläranlage Warstein

Parameter	Einheit	Brauerei	Gesamtzulauf*	Ablauf Vorklärung <sup>2</sup>	Ablauf <sup>3</sup>
TS	kg/d	1891 ± 671	2685 ± 830	394 ± 221	54 ± 32
oTS	kg/d	1320 ± 414	1987 ± 601	278 ± 155	37 ± 19
CSB <sub>hom</sub>	kg/d	2114 ± 528	3503 ± 684	812 ± 253	283 ± 79
CSB <sub>fil</sub>	kg/d	616 ± 258	930 ± 276	562 ± 144	/
Gesamt-N	kg/d	136 ± 97	302 ± 133	176 ± 52	81 ± 22
Phosphor	kg/d	38 ± 10	61 ± 13	12 ± 6	4 ± 1
BSB <sub>5</sub>	kg/d	568 ± 225	1028 ± 314	182 ± 93	/

\* Brauerei- und kommunales Abwasser

<sup>2</sup> Ablauf Vorklärung ist Zulauf Belebung

<sup>3</sup> Ablauf nach UV-Behandlung

/ keine Daten verfügbar

## 2.2 Prozessparameter der Kläranlage Warstein

Tabelle 2-3 gibt einen Überblick über die Hauptprozessparameter der Belebungsstufe in Warstein.

Die Kläranlage Warstein behandelt eine Mischung aus Brauerei- und kommunalem Abwasser. Der Gesamtzulauf betrug durchschnittlich 8888 m<sup>3</sup>/d für den Zeitraum vom 01.12.2013 – 04.04.2014. Der Anteil an Brauereiabwasser betrug durchschnittlich 26%. Der Gesamtzulauf der biologischen Abwasserbehandlung betrug nach der Vorklärung im Mittel 8877 m<sup>3</sup>/d. Bei einem Gesamtvolumen der Belebtschlammbehandlung von 3200 m<sup>3</sup> beträgt die mittlere hydraulische Verweilzeit 0,36 Tage oder 8,7 h.

**Tabelle 2-3:** Prozessparameters der biologischen Abwasserbehandlung (Nitrifikation + Denitrifikation)

Parameter	Einheit	Wert
Denitrifikation	m <sup>3</sup>	1760
Nitrifikation	m <sup>3</sup>	1440
Nachklärung	m <sup>3</sup>	6700
Gesamtvolumen Belebung	m <sup>3</sup>	3200
Q Brauerei	m <sup>3</sup> /d	2324 ± 470
Q Gesamtzulauf	m <sup>3</sup> /d	8888 ± 1921
Q Ablauf Vorklärung = Zulauf Belebung	m <sup>3</sup> /d	8877 ± 1906
Q Brauerei/ Q Gesamt	%	26
B <sub>R</sub>	kg CSB/m <sup>3</sup> ·d	0.25
Hydraulische Verweilzeit	d	0.36
	h	8.7
Gesamtschlammalter	d	15 – 30 d*
Trockensubstanzgehalt	g TS/L	3.28 <sup>2</sup>
	g oTS/L	2.06 <sup>2</sup>
B <sub>TS</sub>	g CSB/g oTS·d	0.12

\* Daten per Email erhalten am 28 April 2014

<sup>2</sup> Parameter der ersten Belebtschlammprobe, die zum Animpfen der Versuchsreaktoren an Avecom versandt wurde

### 2.3 Eigenschaften des Belebtschlammes der Kläranlage Warstein

Die Laborreaktoren wurden mit Belebtschlamm der Kläranlage Warstein angeimpft. Nach drei Wochen Betrieb, wurde entschieden, die Reaktoren nochmals mit Belebtschlamm zu beschicken. Beide Proben wurden von Avecom hinsichtlich der Schlammkonzentration untersucht (TS und oTS).

In den Schlammproben wurde die Anzahl an *Legionella pneumophila* mittels qPCR bestimmt. Die Eigenschaften beider Belebtschlammproben sind in Tabelle 2-4 zusammengefasst.

**Tabelle 2-4:** Hauptmerkmale des Belebtschlammes der KA Warstein für die Laborreaktoren

Parameter	Einheit	Probe 1 (Start)	Probe 2 (zusätzliche Zugabe)
TS	g/L	3,28	3,16
oTS	g/L	2,06	2,01
Schlammvolumen 30min	mL/L	630	650
Schlammvolumen 60 min	mL/L	560	500
SVI	mL/g TS	192	203
TS/oTS	%	63	64
<i>Legionella</i> spp. (Plattierung)*	KBE/mL	1,0 E+05	
<i>Legionella pneumophila</i> (qPCR)**	Zellen/mL	1,4 E+06	2,9 E+05

\* Auszählung durch Avecom

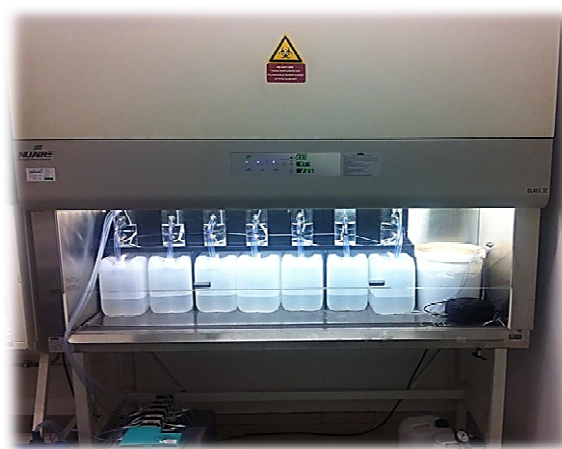
\*\* qPCR-Analysen von externem Labor durchgeführt

Die Ergebnisse aus Tabelle 2-4 zeigen, dass beide Schlammproben, in Bezug auf Schlammkonzentration und –absetzverhalten, sehr ähnlich waren. Beide Proben hatten einen TS-Gehalt von ca. 3,2 g/L. Etwa 63% der Biomasse war organisch (2,0 g oTS/L). Die Schlammprobe hatte einen hohen SVI-Wert, was auf schlechte Absetzeigenschaften hinweist. Die Konzentration an *Legionella pneumophila* variierte zwischen  $10^5$  und  $10^6$  Zellen/mL.

### 3. Reaktoraufbau

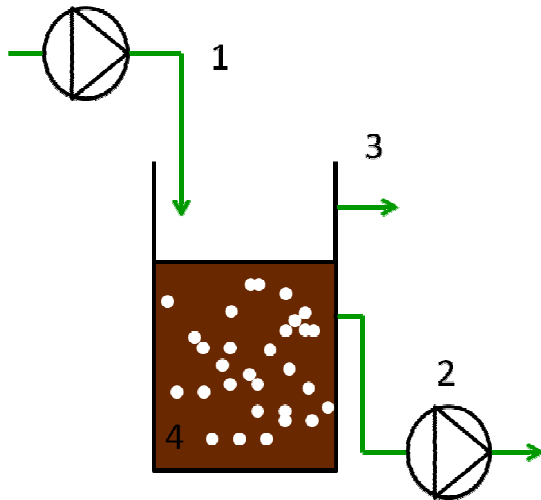
#### 3.1 Beschreibung des Aufbaus

Es wurden sieben kontinuierlich betriebene Reaktoren parallel aufgebaut um die Durchführbarkeit einer Abreicherung der Legionellen im Belebtschlamm der KA Warstein zu bestimmen. Da die Untersuchungen im Zusammenhang mit Legionellen stehen (S2 Bakterium), mussten spezielle Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Eine dieser Vorsichtsmaßnahmen war die Unterbringung der sieben Reaktoren in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank, die über eine spezielle Absaugung mit HEPA-Filtern verfügt. Infolgedessen waren sehr kompakte Reaktoren erforderlich und so wurden für die Vorversuche SBR-Einheiten (Sequential-Batch Reaktoren) ausgewählt. In einem SBR-Reaktor finden die Versorgung des Schlamms mit Zulauf, die Belüftung und das Absetzen zeitlich voneinander getrennt aber im selben Reaktor statt, sodass ein zusätzlicher Absetzbehälter überflüssig war.



**Foto 3-1 und 3-2:** Foto der sieben parallelen SBRs in einer Sicherheitswerkbank mit HEPA-Filter Absaugung zur Untersuchung der Effekte verschiedener Schlammbehandlungen auf die Legionellenzahl. Zulauf und Ablauf wurden mittels einer Pumpe mit sieben Pumpenköpfen zugegeben.

Jeder SBR war ein zylindrischer Reaktor mit einem Arbeitsvolumen von 0,8L. Abbildung 3-1 zeigt eine schematische Darstellung eines Reaktors.



**Abbildung 3-1:** Schematische Darstellung eines Belebtschlammreaktors (SBR-Typ; ID = 9 cm; Ablauf in 12 cm Höhe; Notüberlauf in 15 cm Höhe) mit (1): einem zeitgesteuerten Zulauf; (2): einem zeitgesteuerten Ablauf; (3) einem Notüberlauf; sowie (4) einer belüfteten und durchmischten Flüssigkeit.

Alle SBRs wurden mit Zulauf aus einem Vorratsgefäß versorgt, welches bei Umgebungstemperatur gelagert wurde. Somit erhielten alle Reaktoren denselben Zulauf. Zweimal pro Woche wurde der restliche Zulauf verworfen und durch frischen Zulauf ersetzt. Der Ablauf jedes Reaktors wurde in separaten Gefäßen gesammelt.

### 3.2 Betrieb der SBRs

Die SBR-Einheiten wurden mit zeitlich getrennten Phasen der Befüllung, der Belüftung, des Absetzens und der Ablaufentnahme betrieben. Tabelle 3-1 fasst den zyklischen Betrieb der Reaktoren in den ersten drei Wochen und von Woche 4-12 zusammen.

**Tabelle 3-1:** Übersicht des zyklischen Betriebs der sieben SBR-Einheiten zur Beurteilung unterschiedlicher Behandlungsmethoden zur Verringerung der Legionellenzahl.

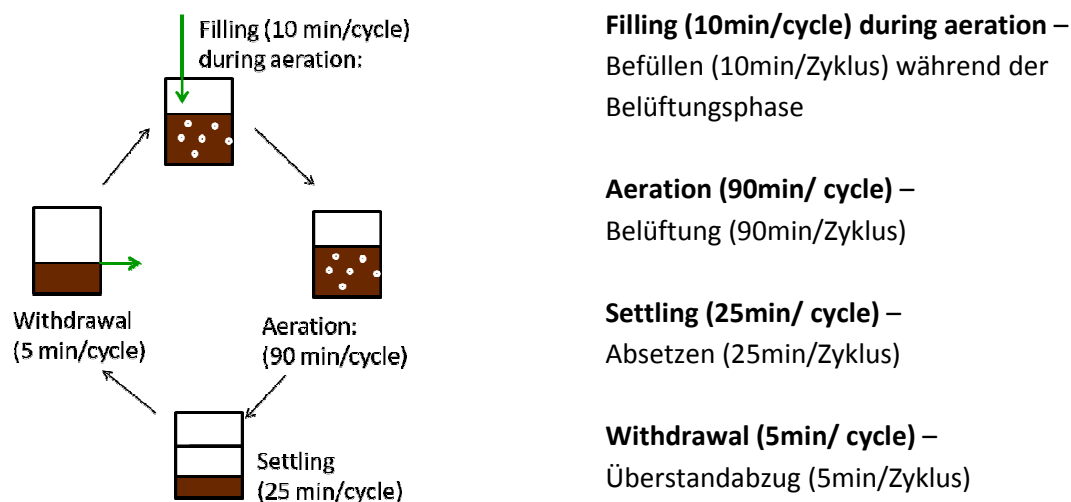
Parameter		Woche 1 - 3	Woche 4 - 12
Zyklen pro Tag		24	12
Befüllen während Belüftung	min	3	10
Belüftung	min	45	90
Schlamm absetzen	min	10	25
Ablaufentnahme	min	5	5

In den ersten drei Wochen der Laborversuche, wurden die Reaktoren mit einer sehr kurzen Absetz- und Entnahmephase im 1h-Zyklus betrieben (24 Zyklen pro Tag). Während dieser drei

Wochen konnte eine ausreichende Schlammkonzentrationen in den Reaktoren nicht aufrechterhalten werden (ebenso im Kontrollreaktor), was auf ein Down-Scaling-Problem hinweist. Der Schlammaustrag hat seinen Ursprung in der kurzen Absetzphase in Verbindung mit dem schlechten Absetzverhalten des Schlammes, wie aus Tabelle 2-4 entnommen werden kann.

Ab der vierten Woche wurden die Reaktoren im 2h Zyklus betrieben (12 Zyklen/Tag). Jeder Zyklus begann mit einer intensiven Belüftung von 90 min mit komprimierter Luft. Die Belüftung sorgte zusätzlich für eine ausreichende Durchmischung des Reaktors. Der Zulauf wurde während der ersten 10 min der Belüftungsphase hinzugefügt. Anschließend folgte eine Absetzphase von 25 min, der ein Abzug des Ablaufs innerhalb von 5 min folgte.

Abbildung 3-2 zeigt eine schematische Darstellung der zeitlich getrennten Phasen für die Testwochen 4 bis 12.



**Abbildung 3-2:** Schematische Darstellung des zyklischen Betriebs der SBRs um die Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungen auf die Anwesenheit von Legionellen im Belebtschlamm zu untersuchen (Wochen 4 - 12).

### 3.3 Betriebliche Ähnlichkeit der KA Warstein

Während des Meetings zwischen dem ISAH - Ruhrverband - Avecom, am 7. Juli bei Avecom, wurde vereinbart, die KA Warstein durch Nachahmen des Zulauf-CSB mit Fokussierung auf eine vergleichbare hydraulische Verweilzeit in den Reaktoren zu simulieren.

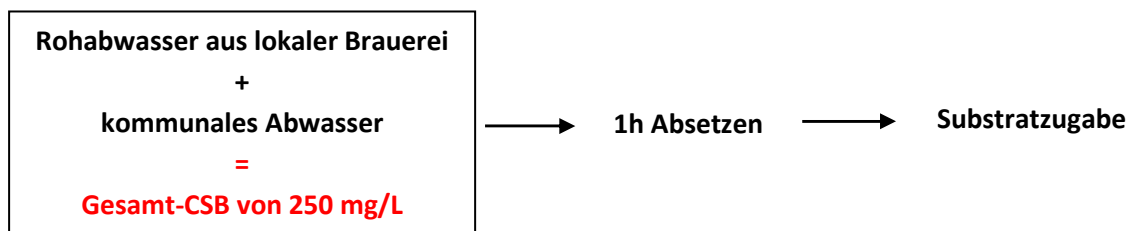
Die Zulauftrate wurde so gewählt, dass die hydraulische Verweilzeit ca. 10h betrug.

Aus Tabelle 2-1 wird ersichtlich, dass die CSB-Konzentration im Gesamtzulauf bei ca. 400 mg/L lag. Nach der Vorklärung betrug die CSB-Konzentration durchschnittlich 94 mg/L.

Es wurde beschlossen, diesen Zulauf bei Avecom zu simulieren, indem Abwasser aus einer lokalen Brauerei mit kommunalem Abwasser (Abbildung 3-3) gemischt wurde, um etwa 250 mg CSB/L in der Mischung zu erhalten. Nach einem zusätzlichen Absetzen von 1h (Simulation des



Absetzens in der Vorklä rung) wurde der abgesetzte Schlamm (= Primärschlamm) vom Überstand getrennt. Für den Zulauf der sieben Reaktoren wurde schließlich nur der Überstand genutzt. Ab der vierten Testwoche wurden zusätzlich Ammonium (15 mg N/L) und Phosphat (5 mg P/L) als  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zu dosiert. Diese Verbindungen wurden zugegeben um sicherzustellen, dass der Zulauf immer genug Ammonium und Phosphat für eine gute Nitrifikation enthält.



**Abbildung 3-3:** Vorbereitung des Zulaufs (2mal pro Woche), der zum Füttern der SBRs während der Vorversuche genutzt wurde

### 3.4 Monitoring der Reaktoren

Die 7 SBRs wurden täglich beobachtet. Es gab eine tägliche Kontrolle der Zulauf rate, des pHs und der Sauerstoffkonzentration. Die Qualität des Zulaufs wurde wöchentlich in Bezug auf die chemische Zusammensetzung überwacht (Gesamt-CSB, gelöster CSB, TS,  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_3^-$ ). Mittels Kulturverfahren wurde *Legionella spp.* wöchentlich im Zulauf oder im Überstand der Reaktoren bestimmt. Die Zahl der kultivierbaren Legionellen wurde immer in einer Doppelbestimmung mittels GVPC-Methode von Oxoid (Plattierung auf GVPC-Platten mit anschließender Inkubation bei 37°C; die Auszählung der KBE erfolgte nach 2, 6 und 10 Tagen) durch Avecom erfasst. Alle 2 - 3 Wochen wurden qPCR-Analysen auf *Legionella pneumophila* im Ablauf durch ein externes Labor durchgeführt (Bioclear, Niederlande).

Das Protokoll zur DNA-Extraktion der Firma Bioclear ist von dem durch Stephen et al., (1999) beschriebenen Verfahren abgeleitet worden. Das DNA-Extraktionsprotokoll umfasste dabei die folgenden Schritte:

- Für Bodenproben 0,5 g oder Wasserproben 1 ml einsetzen.
- 425  $\mu\text{l}$  0,12 M Natriumphosphatpuffer (pH 8,0), 175  $\mu\text{l}$  chaotrope Reagenz (CRSR; Bio-101, Vista, Kalifornien) und 0,5 g Glas-Beads (0,17 mm) hinzufügen.
- Beads 3 mal 1 min lang mit einem High-Speed-Bead-Beater schütteln.
- Zentrifugieren (13.000 g, 5 min).
- Überstand abnehmen.
- 300  $\mu\text{l}$  Chloroform auf das Pellets geben, sorgfältig mischen und zentrifugieren (13.000 g, 5 min).
- Überstand abnehmen und mit der ersten Überstandfraktion vereinigen.
- DNA mit dem gleichen Volumen an Isopropanol fällen (30 min, 0°C).
- Zentrifugieren (13.000 g, 5 min, 4°C).

- Zweimal mit 80% Ethanol Waschen und an der Luft trocknen.
- Pellet in 200 µl Tris-EDTA-Puffer (TE, pH 8,0) wieder auflösen.
- Aufreinigen des DNA-Extrakts durch zweimalige Extraktion mit dem gleichen Volumen an Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25: 24: 1, v / v / v).
- Lagerung bei -20°C.
- Für eine optimale DNA-Extraktion zusätzliche Reinigungsschritte durchführen.

Die qPCR-Primer wurden von Bioclear mit einer hausintern entwickelten „Primer Design Tool Software“ (PDT) entworfen. Die Primer für spezifische Ziele wurden mit Hilfe der genomischen Datenbank von NCBI erstellt. Die Spezifität der Primer wurde in silico unter Verwendung der PDT Software überprüft. Zusätzlich wurde die Spezifität durch Sequenzierung der PCR-Produkte validiert. Das Design der Primer ist entscheidend für ein zuverlässiges quantitatives Ergebnis. Die hier verwendeten Primer wurden nach einem optimierten Bioclear Protokoll erstellt, welches vertraulich bleibt.

#### **4. Beschreibung der Behandlung zur Reduktion von Legionellen**

Das Ziel der Untersuchungen bei Avecom war es zu ermitteln, ob verschiedene Behandlungsmethoden die Zahl an *Legionella spp.*, vor allem an *Legionella pneumophila*, im Belebtschlamm verringern können und wenn dem so ist, ob die Behandlungen die Legionellenzahl im Ablauf der KA Warstein reduzieren können.

Es wurde beschlossen den Einfluss folgender Behandlungen zu untersuchen:

1. Zugabe von Microsil bei Raumtemperatur;
2. Zugabe von Peroxiden bei Raumtemperatur;
3. Zugabe von Chlordioxid bei Raumtemperatur;
4. Zugabe von Ozon bei Raumtemperatur;
5. pH-Stresstest bis pH 12 bei Raumtemperatur;

Der Einfluss der fünf Behandlungsmethoden auf die betrieblichen Aspekte der SBRs und die Anzahl an *Legionella spp.* wurde mit dem Kontrollreaktor verglichen (6. Reaktor), welcher parallel ohne weitere Behandlung betrieben wurde.

Neben diesen sechs Reaktoren wurde ein siebenter Reaktor bei 35°C betrieben. Dieser arbeitete parallel zu den anderen, um die Laborversuche am ISAH (Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik Hannover) zu simulieren.

Die Behandlung der fünf Reaktoren erfolgte dreimal pro Woche (Montag, Mittwoch und Freitag) jeweils mit 10% des homogenisierten Ansatzvolumens. In den letzten Wochen (Testphase 4) erfolgte die Behandlung dreimal pro Woche mit 25% des Ansatzvolumens.

Hierfür wurden 10% (25% in Testphase 4) des Ansatzvolumens aus jedem Reaktor entnommen. Eine der fünf Chemikalien wurde nun zu dosiert. Die Microsilzugabe erfolgte mit einer 50fach verdünnten Lösung der Ausgangssubstanz (Ausgangssubstanz enthält 10 g Ag/L). Das Peroxid wurde als 50%-ige Lösung zugegeben. Chlordioxid wurde als Lösung mit einer Konzentration von 7,5 g ClO<sub>2</sub>/L zu dosiert. Die Behandlung mit Ozon erfolgte mit in-situ erzeugtem Ozon. Die Ozonkonzentration im Gasstrom wurde mit einem in-line Detektor erfasst. Der Gasstrom wurde anschließend durch das abgetrennte Abwasser geleitet. Hierfür wurde ein Belüfterstein benutzt, um eine möglichst große Oberfläche zu erzeugen und einen optimalen Kontakt zwischen Ozon und Bakterium zu erreichen. Die zugegebene Ozonmenge berechnet sich aus der Belüftungszeit (1 bzw. 2h) dem Gasfluss (25 L/h) und der Ozonkonzentration.

Im pH-Stresstest-Reaktor wurde das abgetrennte Abwasser dreimal pro Woche mittels NaOH auf pH 12 eingestellt. In den ersten Wochen wurde der pH-Wert des abgetrennten Volumens mit HCl wieder auf pH 7 neutralisiert, bevor es wieder zum nicht behandelten Abwasser zugegeben wurde. Von Tag 55 bis 74 jedoch wurde die Neutralisierung des pH-Wertes nicht länger vorgenommen, um den Einsatz von Chemikalien zu verringern. Nachdem sich herausstellte, dass dies zu einer Verschlechterung der Leistung des SBRs in Bezug auf CSB-Abbau und Nitrifikation führte (siehe weiter; Ergebnisse Testphase 4), wurde die pH-Neutralisierung vor dem Mischen mit dem unbehandeltem Abwasser wieder aufgenommen.

Im Bericht wurde die Dosierung für jede Chemikalie auf zwei Arten berechnet:


- durchschnittliche Dosierungsrate (durchschnittliche Dosierung pro Tag)
- Eintrittsdosierungsrate oder die Menge, die während der Behandlung dem separierten Volumen zugegeben wurde.

Sowohl die durchschnittliche Dosierung pro Tag als auch die Eintrittsdosierung wurden pro Liter Reaktorvolumen und pro Gramm TS angegeben.

## **5. Testphase 1, Versuchsbeginn (Start – Tag 21)**

### **5.1 Phase 1 - Prozessparameter**

Die sieben SBRs wurden im Juni 2014 in Betrieb genommen. In den ersten drei Wochen wurden die SBRs mit sehr kurzen Zyklen von 1h und kurzen Absetzphasen (Tabelle 3-1) betrieben. Die Prozessparameter für die Reaktoren sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

	<b>RUHRVERBAND</b> <b>Laborversuche zur</b> <b>Verringerung der</b> <b>Legionellenzahl</b>	Datum: 30/09/2014 Referentie: PJ-13-PP-054-1 Seite: 15
---	---	--

**Tabelle 5-1:** Übersicht über die sieben Reaktoren (Start - Tag 21)

Parameter	Einheit	Kontrolle	Microsil	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ClO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	pH Effekt	Temp. 35°C
Arbeitsvolumen	L	0,8						
Durchflussrate	L/L·d	1,8 ± 0,1						
HRT	h	10,6 ± 0,6						
Zulaufkonzentration	g CSB/L	251 ± 105						
Raumbelastung	g CSB/L·d	0,57 ± 0,24						
Temperatur	°C	8,5 ± 0,1						
pH		6,3 ± 0,9						4,6 ± 0,3
Sauerstoffkonzentration	mg O <sub>2</sub> /L	24,4 ± 0,4						35,0
Schlammkonzentration*	g TS/L	0,53	1,06	0,95	0,95	0,88	0,65	2,33
	g oTS/L	0,29	0,55	0,44	0,45	0,53	0,35	1,25
B <sub>TS</sub>	g CSB/g oTS·d	1,97	1,04	1,30	1,27	1,08	1,63	0,47

\*Alle Reaktoren wurden mit Belebtschlamm (nach Verdickung durch Absetzen) der KA Warstein betrieben. Die Startkonzentration der Reaktoren lag bei 12,11 g TS/L und 8,43 g VSS/L.

Aus Tabelle 5-1 geht hervor, dass es während der ersten drei Wochen nicht möglich war, eine ausreichende Schlammkonzentration in den Reaktoren aufrecht zu erhalten. Die geringe Schlammkonzentration stand in keiner Beziehung zur Behandlung, wie der Kontrollreaktor mit der geringsten Schlammkonzentration zeigt (nur 0,29 g VSS/L nach 3 Wochen). Die starke Schlammauswaschung hat ihren Ursprung im Down-Scaling, bezogen auf die kurze Absetzphase in Kombination mit dem schlechten Absetzverhalten des Inokulums (Tabelle 2-4).

Tabelle 5-2 und 5-3 fassen die Eintrittsdosierung und die durchschnittliche Dosierung pro Tag für die unterschiedlichen Behandlungen zusammen. Am ersten Tag wurden hohe Konzentrationen für Peroxid und Chlordioxid gewählt. Die hohe Dosierung führte augenscheinlich zu einer Ausflockung des behandelten Schlammes. Daraufhin wurde entschieden, die Dosierung zu verringern.

Auch die Dosierung des Ozons wurde nach der ersten Behandlung minimiert, da eine große Menge an Ozon nicht verbraucht wurde (Ozon konnte eindeutig im Austrittsgas festgestellt werden).

**Tabelle 5-2:** Übersicht der angewendeten Behandlungen auf die Biomasse der sieben Reaktoren (Start – Tag 21); Dosierung pro Volumeneinheit angegeben

Parameter	behandeltes Vol. (%)	Eintrittsdosierung, zu 0,08L Reaktorvolumen zugegeben	Dosierung täglich	Kontaktzeit (h)
Microsil	10	12 µg Ag	6,4 µg Ag/Lr·d	0,5
Peroxid	10	215 mg*	115 mg/Lr·d*	0,5
ClO <sub>2</sub>	10	375 µg*	201 µg/Lr·d*	0,5
Ozon	10	16 mg**	8,6 mg/Lr·d**	0,5
pH - NaOH	10	2,1 meq	1,1 meq/Lr·d	0,5

\* Die Dosierung war an Tag 1 und Tag 3 10mal höher

\*\* Die Dosierung war an Tag 1 10mal höher

**Tabelle 5-3:** Übersicht der angewendeten Behandlungen auf die Biomasse der sieben Reaktoren (Start - Tag 21); Dosierung pro Einheit Biomasse (g TS) angegeben

Parameter	behandeltes Vol. (%)	Dosierung pro g TS	Dosierung täglich	Kontaktzeit (h)
Microsil	10	142 µg Ag/g TS	6,1 µg Ag/g TS·d	0,5
Peroxid	10	2829 mg/g TS*	122 mg/g TS·d*	0,5
ClO <sub>2</sub>	10	4934 µg/g TS*	212 µg/g TS·d*	0,5
Ozon	10	228 mg/g TS**	9,8 mg/g TS·d**	0,5
pH - NaOH	10	39 meq/g TS	1,7 meq/g TS·d	0,5

\* Die Dosierung war an Tag 1 und Tag 3 10mal höher

\*\* Die Dosierung war an Tag 1 10mal höher

## 5.2 Phase 1 - Zusammensetzung des Ablaufs

Tabelle 5-4 zeigt eine Übersicht der Zusammensetzung von Zu- und Ablauf der sieben SBRs während der ersten Testphase.

**Tabelle 5-4:** Charakteristika der Zu- und Abläufe der 7 Belebtschlammssysteme (mg/L; Ablauf Tag 7 und Tag 21)

	Zulauf	Kontrolle	Microsil	Peroxid	ClO <sub>2</sub>	Ozon	pH	35°C
<b>Ablauf Tag 7</b>								
CSB <sub>hom</sub>	329	268	190	141	212	229	165	122
CSB <sub>fil</sub>	316	36	32	35	36	40	42	59
TS	10 - 20	130	205	90	120	160	85	10
NH <sub>4</sub> -N	18	3	1	14	13	2	8	10
NO <sub>2</sub> -N	< 1	4	< 1	< 1	< 1	3	3	< 1
NO <sub>3</sub> -N	< 1	8	11	< 1	1	9	3	< 1
Gesamt-N	36		36	38	32	30	25	26

	Zulauf	Kontrolle	Microsil	Peroxid	ClO <sub>2</sub>	Ozon	pH	35°C
<b>Ablauf Tag 21</b>								
CSB <sub>hom</sub>	129	35	106	103	98	28	29	39
TS	10	12	12	5	5	6	12	2
NH <sub>4</sub> -N	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Gesamt-N	7	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

### **CSB Abbau**

Nach einer Woche konnten keine signifikant negativen Auswirkungen der verwendeten Dosierungen auf den Abbau von gelöstem CSB im Vergleich zum Kontrollreaktor festgestellt werden. Dies ist in Tabelle 5-4 durch einen grünen Hintergrund kenntlich gemacht worden. Jedoch enthielten an Tag 21 die Abläufe der Reaktoren mit Microsil, Peroxid und Chlordioxid eine höhere Konzentration an Gesamt-CSB (in Tabelle 5-4 durch roten Hintergrund kenntlich gemacht).

### **Nitrifikation**

Die Charakteristika der Abläufe von Tag 7 zeigten, dass die Nitrifikanten zunächst durch die hohe Dosierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ClO<sub>2</sub> gestört waren. Zusätzlich hatten der pH-Effekt sowie die Temperatur einen störenden Einfluss. Dies konnte aus der Konzentration von Ammonium und Nitrat im Ablauf geschlossen werden. Im Ablauf des Kontrollreaktors wurde nahezu das gesamte Ammonium zu Nitrat umgesetzt (= gute Nitrifikation). Im Ablauf der Reaktoren die mit Peroxid, Chlordioxid, pH- Stress und hoher Temperatur behandelt wurden, konnte noch eine erhebliche Menge an Ammonium festgestellt werden. Dies ist in Tabelle 5-4 zu erkennen (orange- brauner Hintergrund).

In der zweiten Testwoche gab es Anzeichen für eine Verbesserung der Nitrifikation in allen Reaktoren (tägliche Messung von Ammonium / Nitrate / Nitrit mit Indikatorstäbchen, nicht angegeben). Jedoch konnte die Nitrifikation in der dritten Woche nicht aufgenommen werden, da der Zulauf kein Ammonium enthielt. Diese Erholung der Nitrifikanten könnte auf eine Anpassung der Nitrifikanten an die unterschiedlichen Behandlungen hindeuten. Ab der vierten Testwoche wurde dem Zulauf Ammonium zugesetzt (Kapitel 3.3).

### 5.3 Phase 1 – Einfluss auf Legionellen

**Tabelle 5-5:** kultivierbare *Legionella spp.* (in KBE/mL) auf GVPC-Platten und qPCR-Ergebnisse (Zellen/mL) für *Legionella pneumophila* von den verschiedenen Ablaufproben der sieben Reaktoren. Die angegebene Zahl an kultivierbaren *Legionella spp.* ist immer der Mittelwert aus zwei Plattierungen.

Datum	kultivierbare <i>Legionella spp.</i> GVPC -Platte(KBE/mL)			<i>Legionella pn.</i> qPCR (Zellen/mL)
	11. Juni	16. Juni	30. Juni	11. Juni
Tage nach Start	2	7	21	2
<b>2 Tage Inkubationszeit</b>				
Zulauf	3,95 E+05	4,70E+05	8,05E+05	3,1 E+02
Kontrolle	-	7,17E+05	8,50E+05	3,9 E+05
Microsil	-	4,23E+05	> 1,00 E06	
Peroxid	-	5,44E+05	4,35E+05	
ClO <sub>2</sub>	-	4,56E+05	1,28E+06	
Ozon	-	7,05E+05	> 1,00 E06	
pH - NaOH	-	4,00E+05	4,05E+03	
Temperatur von 35°C	-	1,79E+06	1,81E+05	
<b>10 Tage Inkubationszeit</b>				
Zulauf	-	Nicht gezählt	8,05E+05	3,1 E+02
Kontrolle	-	Nicht gezählt	9,20E+05	3,9 E+05
Microsil	-	Nicht gezählt	> 1,00 E06	
Peroxid	-	Nicht gezählt	5,15E+05	
ClO <sub>2</sub>	-	Nicht gezählt	1,28E+06	
Ozon	-	Nicht gezählt	> 1,00 E06	
pH - NaOH	-	Nicht gezählt	7,15E+03	
Temperatur	-	Nicht gezählt	1,97E+05	

- keine Plattierung

Die Zahl der kultivierbaren *Legionella spp.* (Plattierung) und *Legionella pneumophila* (qPCR) sind in Tabelle 5-5 wiedergegeben. Die Konzentration der kultivierbaren *Legionella spp.* wurde auf Platten mit GVPC-Medium bestimmt. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde nach 2, 6 und 10 d Inkubation bei 37°C erfasst. Nach 10 Tagen konnten zwar mehr kultivierbare Zellen gezählt werden, die Größenordnung (Zahl im Exponenten) blieb aber gleich.

Der Zulauf enthielt kultivierbare *Legionella spp.* (10<sup>5</sup>). Die Anzahl an *Legionella pneumophila* im Zulauf betrug nur 100 (10<sup>2</sup>) oder lag ca. 1000mal (=10<sup>3</sup>) niedriger.

Basierend auf den Plattenauszahlungen vom 30. Juni gab es erste Anzeichen für eine Verringerung der Legionellenzahl durch die Behandlung mit NaOH (siehe Tabelle 5-5, grüner Hintergrund). Der Ablauf des Reaktors enthielt etwa  $10^3$  KBE/mL an *Legionella spp.*, während der Ablauf des Kontrollreaktors  $10^5$  KBE/mL an *Legionella spp.* enthielt. Folglich enthielt der Ablauf des Reaktors mit dem pH-Stresstest ca. 100mal ( $=10^2$ ) weniger *Legionella spp.* als der Kontrollreaktor.

## 6. Testphase 2: Tag 22 - 48

### 6.1 Phase 2 - Prozessparameter

Zu Beginn der zweiten Testphase wurde zu allen Reaktoren Belebtschlamm der KA Warstein gegeben. In allen Reaktoren wurde die Schlammkonzentration auf 3,16 g TS/L und 2,01 g oTS/L erhöht. Die SBRs wurden in einem 2h Zyklus betrieben, um mit der längeren Absetzphase eine annehmbare Schlammkonzentration in den Reaktoren zu erhalten. Tabelle 6-1 zeigt eine Übersicht der Prozessparameter in Testphase 2. In den Tabellen 6-2 und 6-3 ist die jeweilige Dosierung bzw. Dosierungsrate für jeden Reaktor wiedergegeben.

In Tabelle 6-1 ist zu sehen, dass die längeren Zyklen von 2h mit der damit einhergehenden längeren Absetzphase in der Tat zu einer höheren Schlammkonzentration im Kontrollreaktor führte. Die Konzentration im Reaktor stabilisierte sich bei 1,1 g TS/L. Im Reaktor, der mit Microsil behandelt wurde, konnte eine vergleichbare Konzentration von 1,4 g TS/L festgestellt werden. In den Reaktoren mit Peroxid, Chlordioxid, Ozon und pH-Stresstest wurde hingegen eine geringere Schlammkonzentration gemessen.



**Tabelle 6-1:** Übersicht der Prozessparameter der sieben Belebtschlammssysteme (Tag 22 - 48)

Parameter	Einheit	Kontrolle	Microsil	Peroxid	ClO <sub>2</sub>
Arbeitsvolumen	L	0,8			
Durchflussrate	L/L·d	2,5			
HRT	h	9,7 ± 0,3			
Zulaufkonzentration	g CSB/L	225 ± 53			
Raumbelastung	g CSB/L·d	0,52 ± 0,10			
Temperatur	°C	24,4 ± 0,6	24,4 ± 0,3	24,6 ± 0,2	24,4 ± 0,3
pH		8,1 ± 0,1	8,2 ± 0,2	8,2 ± 0,1	8,2 ± 0,2
Sauerstoffkonzentration	mg O <sub>2</sub> /L	7,0 – 8,0	7,0 – 8,0	7,2 – 8,0	7,3 – 8,0
Schlammkonzentration <sup>2</sup>	g TS/L	1,46 ± 0,50 <sup>3</sup>	1,42 ± 0,32 <sup>3</sup>	1,16 ± 0,58 <sup>3</sup>	1,23 ± 0,45 <sup>3</sup>
	g oTS/L	0,91 ± 0,30 <sup>3</sup>	0,91 ± 0,17 <sup>3</sup>	0,71 ± 0,39 <sup>3</sup>	0,78 ± 0,29 <sup>3</sup>
B <sub>TS</sub>	g CSB/g oTS·d	0,59 ± 0,20	0,56 ± 0,12	0,90 ± 0,58	0,72 ± 0,36

<sup>2</sup> Zu Beginn von Phase 2, zu allen Reaktoren Belebtschlamm mit 3,16 g TS/L und 2,01 g oTS/L gegeben


<sup>3</sup> Durchschnitt von drei Messungen für drei Werte zwischen Tag 33 und 48.

**Tabelle 6-1:** Fortsetzung:

Parameter	Einheit	Kontrolle	Ozon	pH-Effekt	Temperatur
Arbeitsvolumen	L	0,8			
Durchflussrate	L/L·d	2,5			
HRT	h	9,7 ± 0,3			
Zulaufkonz.	g CSB/L	225 ± 53			
Raumbelastung	g CSB/L·d	0,52 ± 0,10			
Temperatur	°C	24,4 ± 0,6	24,5 ± 0,3	24,4 ± 0,3	34,1 ± 0,5
pH		8,1 ± 0,1	8,1 ± 0,2	8,1 ± 0,1	8,2 ± 0,2
Sauerstoffkonzentration	mg O <sub>2</sub> /L	7,0 – 8,0	6,8 – 8,0	7,1 – 8,0	6,5 – 6,7
Schlammkonzentration <sup>2</sup>	g TS/L	1,46 ± 0,50 <sup>3</sup>	1,07 ± 0,43 <sup>3</sup>	0,77 ± 0,42 <sup>3</sup>	1,07 ± 0,48 <sup>3</sup>
	g oTS/L	0,91 ± 0,30 <sup>3</sup>	0,71 ± 0,27 <sup>3</sup>	0,51 ± 0,25 <sup>3</sup>	0,59 ± 0,28 <sup>3</sup>
B <sub>TS</sub>	g CSB/g oTS·d	0,59 ± 0,20	0,79 ± 0,35	1,14 ± 0,50	1,13 ± 0,87

<sup>2</sup> Zu Beginn von Phase 2 wurde zu allen Reaktoren Belebtschlamm mit 3,16 g TS/L und 2,01 g oTS/L dazugegeben

<sup>3</sup> Durchschnitt von drei Messungen für drei Werte zwischen Tag 33 und 48.

	<b>RUHRVERBAND</b> <b>Laborversuche zur</b> <b>Verringerung der</b> <b>Legionellenzahl</b>	Datum: 30/09/2014 Referentie: PJ-13-PP-054-1  Seite: 21
---	---	--

**Tabelle 6-2:** Übersicht der angewendeten Behandlungen auf die Biomasse der sieben Reaktoren (Tag 22 - 48); Dosierung pro Volumeneinheit angegeben

Parameter	behandeltes Vol. (%)	Eintrittsdosierung, zu 0,08L Reaktorvol. zugegeben	Dosierung täglich	Kontaktzeit (h)
Microsil	10	12 µg Ag	6,4 µg Ag/Lr·d	1
Peroxide	10	215 mg	115 mg/Lr·d	1
ClO <sub>2</sub>	10	375 µg	201 µg/Lr·d	1
Ozon	10	47 mg	25 mg/Lr·d	1
pH - NaOH	10	2,5 meq	1,3 meq/Lr·d	1

**Tabelle 6-3:** Übersicht der angewendeten Behandlungen auf die Biomasse der sieben Reaktoren (Tag 22 - 48); Dosierung pro Einheit Biomasse (g TS) angegeben

Parameter	behandeltes Vol. (%)	Dosierung pro g TS	Dosierung täglich	Kontaktzeit (h)
Microsil	10	106 µg Ag/g TS	4,5 µg Ag/g TS·d	1
Peroxid	10	2317 mg/g TS	99 mg/g TS·d	1
ClO <sub>2</sub>	10	3811 µg/g TS	163 µg/g TS·d	1
Ozon	10	552 mg/g TS	24 mg/g TS·d	1
pH - NaOH	10	41 meq/g TS	1,7 meq/g TS·d	1

## 6.2 Phase 2 – Zusammensetzung des Ablaufs

Tabelle 6-4 zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung von Zu- und Ablauf der sieben SBRs, während der zweiten Testphase.

**Tabelle 6-4:** Eigenschaften von Zu- und Ablauf (mg/L) der Reaktoren (Tag 22 - 48); die Werte für den Ablauf sind Mittelwert und Standardabweichung von drei Messungen

	Zulauf	Kontrolle	Microsil	Peroxid	ClO <sub>2</sub>	Ozon	pH	35°C
CSB <sub>hom</sub>	225 ± 53	33 ± 6	31 ± 5	40 ± 6	28 ± 4	31 ± 3	31 ± 6	36 ± 9
CSB <sub>fil</sub>	145 – 238	33 ± 12	29 ± 4	36 ± 11	28 ± 3	28 ± 3	34 ± 11	30 ± 4
TS	14 – 52	19 ± 8	24 ± 22	21 ± 8	18 ± 3	15 ± 10	14 ± 6	21 ± 14
NH <sub>4</sub> -N	13 – 21	< 1	< 1	4 ± 2	< 1	< 1	< 1	< 1
NO <sub>2</sub> -N	< 1	< 1	< 1	0 – 1	< 1	< 1	< 1	< 1
NO <sub>3</sub> -N	0 – 3	9 ± 2	9 ± 2	7 ± 2	9 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	1 – 5

### **CSB Abbau**

Aus Tabelle 6-4 geht hervor, dass im Vergleich zum Kontrollreaktor (vgl. grüner Hintergrund in Tabelle 6-4) keine Dosierung einen signifikant negativen Effekt auf den Abbau des gelösten CSB hatte. Es gab auch keine großen Unterschiede beim Gesamt-CSB im Ablauf der sieben SBRs.

### **Nitrifikation**

Im Kontrollreaktor wurde das gesamte Ammonium zu Nitrat nitrifiziert. Der Kontrollreaktor beinhaltete ca. 9 mg Nitrat-N/L, kein Ammonium und kein Nitrit.

Die Nitrifikation wurde in den Reaktoren mit Microsil, Peroxid, Chlordioxid, Ozon und pH 12 nicht behindert. Nur die Behandlung mit Peroxid resultierte in einer unvollständigen Nitrifikation, wodurch im Ablauf etwa 4 mg Ammonium-N/L nachgewiesen werden konnten (orange-brauner Hintergrund in Tabelle 6-4).

Der Ablauf des Reaktors, welcher bei höherer Temperatur betrieben wurde, enthielt kein Ammonium-N oder Nitrit-N, aber 1 - 5 mg Nitrat-N/L, was nur 50% der Ablaufkonzentration des Kontrollreaktors entspricht. Dieser N-Verlust kann möglicherweise auf zwei Prozesse zurückzuführen sein: Strippung von Ammonium und/oder simultane Nitrifikation-Denitrifikation. Eine simultane Nitrifikation-Denitrifikation könnte durch den diskontinuierlichen Betrieb des SBRs auftreten, was in einer kurzzeitig hohen CSB-Konzentration während der Befüllung resultiert, in Verbindung mit einer kurzzeitig niedrigen DO-Konzentration (hoher Sauerstoffverbrauch). Die Strippung von Ammonium ist ebenfalls möglich durch die Kombination aus hoher Temperatur (35°C), hohem pH (~ 8,2) und konstantem Luftstrom für die Belüftung des Reaktors. Diese drei Faktoren sprechen für eine Strippung des Ammoniums.

## **6.3 Phase 2 - Einfluss auf Legionellen**

Die Zahl der kultivierbaren *Legionella spp.* (Plattenausählung nach zwei bzw. zehn Tagen Inkubationszeit) und *Legionella pneumophila* (qPCR) sind in Tabelle 6-5 wiedergegeben. Nach zehn Tagen konnten mehr kultivierbare Zellen gezählt werden als nach zwei Tagen. In den meisten Plattierungen hat sich die Größenordnung (Zahl im Exponenten) nicht verändert. Aber bei einigen Ablaufproben gab es eine Erhöhung der Größenordnung. Obwohl es einen Unterschied in der Auszählung nach zwei und zehn Tagen gab, ist die Schlussfolgerung dieselbe. (Keine Veränderung nach zwei bzw. zehn Tagen).

Am 6. August, wurde die Zahl der kultivierbaren *Legionella spp.* im Überstand der behandelten Proben gemessen, bevor diese wieder mit dem unbehandelten Schlamm im Reaktor vereinigt wurden. Dies wurde durchgeführt um die Auswirkung unmittelbar nach der Behandlung zu untersuchen.

**Tabelle 6-5:** Zahl der kultivierbaren *Legionella spp.* auf GVPC-Platten und qPCR-Ergebnisse für *Legionella pneumophila* für die sieben SBR (Ablaufproben oder Überstand des behandelten Abwassers). Die angegebene Zahl an kultivierbaren *Legionella spp.* ist immer der Mittelwert aus zwei Plattierungen.

Datum	kultivierbare <i>Legionella spp.</i> GVPC-Platte (KBE/mL)			<i>Legionella pn.</i> qPCR (Zellen/mL)
	22. Juli	30. Juli	06. August	30. Juli
Zeit nach Start	Tag 33	Tag 41	Tag 58	Tag 41
	<b>2 Tage Inkubationszeit</b>			
Zulauf	2,90E+04	3,75E+04	1,94E+05	
Kontrolle	4,20E+02	2,05E+02	3,30E+03	
Microsil	2,90E+04	1,65E+02	3,90E+03*	
Peroxid	1,25E+03	2,00E+02	1,90E+02*	
ClO <sub>2</sub>	3,10E+04	3,20E+02	3,75E+03*	
Ozon	2,35E+04	3,80E+04	5,70E+02*	
pH - NaOH	4,10E+02	3,65E+02	< 1,0 E+01*	
Temperatur	8,35E+02	5,75E+04	4,40E+03	
	<b>10 Tage Inkubationszeit</b>			
Zulauf	5,70E+04	6,45E+04	2,82E+05	< 6,20E+01
Kontrolle	2,85E+03	4,35E+02	3,40E+03	3,70E+03
Microsil	4,75E+03	2,55E+02	4,90E+03*	3,80E+03
Peroxid	1,43E+04	4,10E+02	3,70E+02*	1,00E+04
ClO <sub>2</sub>	3,40E+04	6,60E+02	7,10E+03*	2,90E+03
Ozon	2,50E+04	4,85E+04	4,00E+03*	6,10E+03
pH - NaOH	1,40E+03	6,05E+02	2,5 E+01*	5,60E+03
Temperatur	2,00E+03	6,10E+04	7,50E+03	5,50E+04

\* Konzentration im Überstand des behandelten Abwasser; nach angegebener Reaktionszeit; vor Rückgabe in den Reaktor

Am 22. und 30. Juli wurde beobachtet, dass keine der in Tabelle 6-2 angegebenen Behandlungen die Zahl an *Legionella spp.* im Ablauf im Vergleich zur Kontrolle verringert. In einigen Reaktoren wurde sogar eine Erhöhung der Anzahl an *Legionella spp.* festgestellt.

Am 6. August (Tag 58) wurde der unmittelbare Einfluss jeder einzelnen Behandlung (Tabellen 6-2 und 6-3) untersucht. Jede Behandlung wurde mit 10% des homogenisierten Reaktorvolumens durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 1h ließ man den Schlamm absetzen und plattierte den Überstand des behandelten Volumens auf GVPC-Medium aus (im Falle des pH-Stresstest wurde der pH-Wert vorher neutralisiert). Basierend auf den Plattenausählungen kann man schlussfolgern, dass die Behandlungen mit Microsil, Peroxid, Chlordioxid und Ozon keine Reduktion der *Legionella spp.* im Vergleich zum Kontrollreaktor zur

Folge hatten. Die Behandlung mit NaOH bis pH 12 jedoch hatte einen signifikanten Effekt. Nach zwei bzw. zehn Tagen Inkubationszeit konnte eine signifikante Abnahme an kultivierbaren *Legionella spp.* beobachtet werden.

Trotz des positiven Soforteffekts von pH 12 konnte zu keinem Zeitpunkt in Phase 2 eine verringerte Zahl an *Legionella spp.* im Ablauf des Reaktors mit der pH-Behandlung festgestellt werden.

**Vergleich qPCR von *Legionella pneumophila* und Plattenausählung von *Legionella spp.***

Die Ergebnisse der Plattierung können aus zwei Gründen nicht direkt mit der qPCR-Methode verglichen werden.

1. Mit der qPCR-Methode werden sowohl lebende wie auch tote Zellen erfasst. Plattierungen berücksichtigen nur kultivierbare Zellen, jedoch keine toten Zellen oder solche, die zwar leben aber nicht kultivierbar sind.
2. Die angewandte qPCR-Methode war speziell auf *Legionella pneumophila* ausgerichtet. Die Plattierungen jedoch geben die Zahl an *Legionella spp.* wieder und waren nicht spezifisch für *Legionella pneumophila*.

Am 30. Juli wurde der Ablauf jedes Reaktors auf kultivierbare *Legionella spp.* und mit der qPCR spezifisch für *Legionella pneumophila* untersucht. Im Ablauf des Reaktors mit 35°C war die Zahl an kultivierbaren *Legionella spp.* vergleichbar mit der Zahl an *Legionella pneumophila*. Der Ablauf des mit Ozon behandelten Reaktors enthielt dagegen sowohl *Legionella spp.* als auch *Legionella pneumophila*. Alle anderen Reaktoren enthielten mehr *Legionella pneumophila* (lebend und tot) als kultivierbare *Legionella spp.*.

Der Zulauf enthielt eine große Menge an kultivierbaren *Legionella species*, *Legionella pneumophila* konnte mittels qPCR jedoch nicht erfasst werden. Die Menge an *Legionella pneumophila* im Ablauf aller Reaktoren war immer höher als im Zulauf, was auf ein Wachstum von *Legionella pneumophila* in allen sieben Reaktoren hindeutet.

## 7. Testphase 3: Tag 49 – 63 (Verdopplung der Dosierung)

### 7.1 Phase 3 - Prozessparameter

In der dritten Testphase wurde die Dosierung für alle Behandlungen verdoppelt. Die Menge an zugegebenen Microsil, Peroxid und Chlordioxid wurde verdoppelt.

Die Verdopplung des Ozons wurde durch eine Verlängerung der Kontaktzeit auf 2h erreicht, bevor das behandelte Volumen wieder in den Reaktor zurückgegeben wurde.

Die pH-Behandlung konnte nicht verdoppelt werden (der pH von 10% des Reaktorvolumens war immer auf pH 12 eingestellt), aber die Reaktionszeit wurde auf 2h verdoppelt.

Die Hauptprozessparameter sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst.

Bezüglich der Schlammkonzentration ist in Tabelle 7-1 zu erkennen, dass die Konzentration der mit Peroxid, Chlordioxid, Ozon, pH-Stresstest und Temperatur behandelten Reaktoren geringer war als die Schlammkonzentration des Kontrollreaktors. In dem mit Microsil behandelten Reaktor war die Schlammkonzentration mit der des Kontrollreaktors vergleichbar. Dieser Effekt war auch in Testphase 2 zu beobachten und könnte darauf hindeuten, dass Microsil keinen Einfluss auf die Schlammkonzentration hat.

**Tabelle 7-1:** Übersicht über die Prozessparameter der sieben SBRs (Tag 49 – 63)

Parameter	Einheit	Kontrolle	Microsil	Peroxid	ClO <sub>2</sub>
Arbeitsvolumen	L	0,8			
Durchflussrate	L/L·d	1,9 ± 0,1			
HRT	h	10,2 ± 0,6			
Zulaufkonz.	g CSB/L	232 ± 10			
Raumbelastung	g CSB/L·d	0,55 ± 0,03			
Temperatur	°C	23,7 ± 0,5			
pH		8,0 ± 0,3	8,1 ± 0,2	8,1 ± 0,2	8,1 ± 0,2
Sauerstoffkonzentration	mg O <sub>2</sub> /L	7,5 ± 0,5	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,3	7,9 ± 0,3
Schlammkonzentration <sup>2</sup>	g TS/L	1,07 ± 0,20 <sup>2</sup>	1,17 ± 0,01 <sup>2</sup>	0,62 ± 0,31 <sup>2</sup>	0,59 ± 0,12 <sup>2</sup>
	g oTS/L	0,73 ± 0,18 <sup>2</sup>	0,85 ± 0,06 <sup>2</sup>	0,56 ± 0,28 <sup>2</sup>	0,47 ± 0,10 <sup>2</sup>
B <sub>TS</sub>	g CSB/g oTS·d	0,81 ± 0,10	0,68 ± 0,05	1,17 ± 0,57	1,26 ± 0,26

<sup>2</sup>Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Messungen

**Tabelle 7-1:** Fortsetzung:


Parameter	Einheit	Kontrolle	Ozon	pH-Effekt	Temperatur
Arbeitsvolumen	L	0,8			
Durchflussrate	L/L·d	1,9 ± 0,1			
HRT	h	10,2 ± 0,6			
Zulaufkonz.	g CSB/L	232 ± 10			
Raumbelastung	g CSB/L·d	0,55 ± 0,03			
Temperatur	°C	23,7 ± 0,5			34,1 ± 0,3
pH		8,0 ± 0,3	8,0 ± 0,2	8,1 ± 0,3	8,1 ± 0,3
Sauerstoffkonzentration	mg O <sub>2</sub> /L	7,5 ± 0,5	7,6 ± 0,6	7,6 ± 0,4	6,4 ± 0,9
Schlammkonzentration <sup>2</sup>	g TS/L	1,07 ± 0,20 <sup>2</sup>	0,64 ± 0,33 <sup>2</sup>	0,56 ± 0,13 <sup>2</sup>	0,56 ± 0,07 <sup>2</sup>
	g oTS/L	0,73 ± 0,18 <sup>2</sup>	0,48 ± 0,22 <sup>2</sup>	0,39 ± 0,04 <sup>2</sup>	0,35 ± 0,05 <sup>2</sup>
B <sub>TS</sub>	g CSB/g oTS·d	0,81 ± 0,10	1,35 ± 0,60	1,49 ± 0,15	1,65 ± 0,25

<sup>2</sup> Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Messungen

**Tabelle 7-2:** Übersicht der angewendeten Behandlungen auf die Biomasse der sieben Reaktoren (Tag 49 - 63); Dosierung pro Volumeneinheit angegeben

Parameter	behandeltes Vol. (%)	Eintrittsdosierung, zu 0,08L Reaktorvol. zugegeben	Dosierung täglich	Kontaktzeit (h)
Microsil	10	24 µg Ag	12,9 µg Ag/Lr·d	1
Peroxid	10	430 mg	230 mg/Lr·d	1
ClO <sub>2</sub>	10	0,75 mg	0,40 mg/Lr·d	1
Ozon	10	133 mg	71 mg/Lr·d	2
pH - NaOH *	10	3,3 meq	1,8 meq/Lr·d	2

\* von Tag 47 – 56: keine pH-Anpassung nach Vereinigung mit dem unbehandelten Volumen

	<b>RUHRVERBAND</b> <b>Laborversuche zur</b> <b>Verringerung der</b> <b>Legionellenzahl</b>	Datum: 30/09/2014 Referentie: PJ-13-PP-054-1 Seite: 27
---	---	--

**Tabelle 7-3:** Übersicht der angewendeten Behandlungen auf die Biomasse der sieben Reaktoren (Tag 49 - 63); Dosierung pro Einheit Biomasse (g TS) angegeben

Parameter	behandeltes Vol. (%)	Dosierung pro g TS	Dosierung täglich	Kontaktzeit (h)
Microsil	10	256 µg Ag/g TS	11 µg Ag/g TS·d	1
Peroxid	10	8669 mg/g TS	372 mg/ g TS·d	1
ClO <sub>2</sub>	10	16 mg/g TS	0,68 mg/ g TS·d	1
Ozon	10	2588 mg/g TS	111 mg/ g TS·d	2
pH - NaOH*	10	74 meq/g TS	3,2 meq/ g TS·d	2

\* von Tag 47 – 56: keine pH-Anpassung nach Vereinigung mit dem unbehandelten Volumen

## 7.2 Phase 3 – Zusammensetzung des Ablaufs

**Tabelle 7-4:** Eigenschaften von Zu- und Ablauf (mg/L) der sieben SBRs (Tag 49 – 63); die Werte für den Ablauf sind der Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Messungen

	Zulauf	Kontrolle	Microsil	Peroxid	ClO <sub>2</sub>	Ozon	pH	35°C
CSB <sub>hom</sub>	232 ± 10	28 ± 0	28 ± 1	40 ± 4	25 ± 1	29 ± 6	32 ± 4	32 ± 4
CSB <sub>fil</sub>	174 - 192	25 ± 4	23 ± 1	33 ± 8	23 ± 1	27 ± 5	28 ± 6	27 ± 1
TS	14 – 52	10 ± 8	10 ± 1	23 ± 1	20 ± 18	12 ± 4	6 ± 4	13 ± 12
NH <sub>4</sub> -N	13 – 21	< 1	< 1	2 ± 0	< 1	< 1	< 1	< 1
NO <sub>2</sub> -N	< 1	< 1	< 1	5 ± 1	< 1	< 1	< 1	< 1
NO <sub>3</sub> -N	0 - 3	11 ± 5	19 ± 2	9 ± 0	11 ± 3	12 ± 2	16 ± 4	7

Die eingesetzten Dosierungen von Microsil, Chlordioxid, Ozon und für einen pH von 12 hatten keinen negativen Effekt auf die Qualität des Ablaufs oder auf die Nitrifikation in den Reaktoren (vollständige Nitrifikation). Der Ablauf dieser vier Reaktoren und der Ablauf des Reaktors bei 35°C waren vergleichbar in Bezug auf CSB, Ammonium, Nitrat und Nitrit.

Die Dosierung von Peroxid resultierte in einem Ablauf mit einer etwas erhöhten Konzentration an Gesamt-CSB und gelöstem CSB. Die Nitrifikation im Reaktor mit Peroxid war unvollständig, da im Ablauf noch ca. 2 mg Ammonium-N/L und 5 mg Nitrit-N/L enthalten waren.



### 7.3 Phase 3 – Einfluss auf Legionellen

**Tabelle 7-5:** Zahl der kultivierbare *Legionella spp.* auf GVPC-Platten und qPCR-Ergebnisse für *Legionella pneumophila* der sieben SBR (Ablaufproben oder Überstand des behandelten Abwassers; Tag 49 - 63). Die angegebene Zahl an kultivierbaren *Legionella spp.* ist immer der Mittelwert aus zwei Plattierungen.

Datum	kultivierbare <i>Legionella spp.</i> GVPC-Platten(KBE/mL)			<i>Legionella pneumophila</i> qPCR (Zellen/mL)
	12. Aug. Tag 54	14. Aug. Tag 56	20. Aug. Tag 62	12. Aug. Tag 54
	<b>2 Tage Inkubationszeit</b>			
Zulauf	3,65E+05		480E+04	
Kontrolle	3,95E+03		7,10E+02	
Microsil	3,80E+02	4,50E+03*	1,30E+02	
Peroxid	2,10E+04	3,95E+03*	4,45E+03	
ClO <sub>2</sub>	2,95E+02	< 1,0 E+01*	8,35E+02	
Ozon	6,20E+02	1,80E+04**	4,00E+02	
pH – NaOH	1,05E+03	< 1,0 E+01*	1,75E+02	
Temperatur	4,60E+02		3,00E+03	
	<b>10 Tage Inkubationszeit</b>			
Zulauf	4,35E+05		7,00E+04	< 9,40E+01
Kontrolle	4,40E+03		7,40E+02	1,20E+02
Microsil	4,30E+03	4,50E+03*	4,60E+03	9,00E+01
Peroxid	2,85E+04	3,95E+03*	3,50E+04	2,70E+02
ClO <sub>2</sub>	4,05E+02	2,0 E+01*	4,05E+03	7,20E+01
Ozon	3,15E+03	1,80E+04**	4,80E+02	8,50E+01
pH - NaOH	2,15E+03	< 1,0 E+01*	2,35E+03	5,20E+01
Temperatur	3,70E+03		3,35E+03	6,30E+02

\* Konzentration im Überstand des behandelten Abwasser; nach angegebener Reaktionszeit; vor Rückgabe in den Reaktor

Während der dritten Phase wurden die kultivierbaren *Legionella spp.* durch Ausplattierung nach zwei und zehn Tagen erfasst. Wie bereits in Phase 1 und 2 beobachtet, wurden nach zehn Tagen zwar mehr kultivierbare Zellen gefunden, bei den meisten Plattierungen blieb die Größenordnung aber unverändert. Obwohl es einen Unterschied in der Auszählung nach zwei und zehn Tagen gab, ist die Schlussfolgerung dieselbe (keine Veränderung nach zwei bzw. zehn Tagen).

Am 12. und 20. August wurde beobachtet (bezogen auf die Plattenzählungen), dass keine der in Tabelle 7-2 angegebenen Behandlungen die Anzahl an *Legionella spp.* im Ablauf verringern konnte.

Am 13. August (Tag 47), wurde der Überstand des behandelten Abwasser anstatt des Ablaufs ausplattiert. Dies wurde durchgeführt, um die Auswirkung der Eintrittsdosierung zu untersuchen. Jede Behandlung erfolgte mit 10% des homogenisierten Reaktorvolumens. Nach einer Reaktionszeit von 1h bzw. 2h (siehe Tabelle 7-3) wurde der Schlamm abgesetzt und der Überstand der behandelten Probe auf GVPC-Medium ausplattiert. Basierend auf diesen Plattenauszahlungen kann davon ausgegangen werden, dass die Eintrittsdosierung von Microsil, Peroxid und Ozon keine Reduktion der *Legionella spp.* im Vergleich zum Kontrollreaktor zur Folge hatten. Die Behandlungen mit NaOH bzw. Chlordioxid hatten jedoch einen signifikanten Einfluss. Nach zwei und zehn Tagen Inkubationszeit wurde beobachtet, dass die Behandlungen die Zahl an kultivierbaren *Legionella spp.* signifikant verringert haben.

Obwohl das Peroxid einen negativen Einfluss auf die Nitrifikation und den CSB-Abbau hatte, konnte kein Effekt auf *Legionella spp.* festgestellt werden. Diese Behandlung ist offenbar nicht geeignet um die Anzahl an *Legionella spp.* zu verringern. Dennoch wurde der Test mit Peroxid auch in der nächsten Testphase ausgewertet, um dieses Zwischenergebnis zu bestätigen oder zu widerlegen.

Die Dosierung von 16 mg ClO<sub>2</sub>/g TS während 1h, und die pH 12 Behandlung innerhalb von 2h, resultierten nach zwei Tagen Inkubationszeit in nicht nachweisbaren Konzentrationen an kultivierbaren *Legionella spp.*, bzw. in 2 und 0 KBE/mL nach zehn Tagen Inkubationszeit. Trotz der positiven sofortigen Wirkung von pH 12 und Chlordioxid wurde in diesen beiden Reaktoren keine verminderte Zahl an *Legionella spp.* im Ablauf festgestellt (Tag 54; 20. August).

Am 12. August wurde der Ablauf jedes Reaktors auf kultivierbare *Legionella spp.* und mittels qPCR spezifisch auf *Legionella pneumophila* untersucht. Die Abläufe der Reaktoren enthielten mehr kultivierbare *Legionella spp.* als *Legionella pneumophila*. Das ist das Gegenteil von dem, was in Phase 2 gefunden wurde.

Es sollte darauf hingewiesen werden, dass die Anzahl von *Legionella pneumophila* sich in allen Abläufen über die Zeit verringert hat, so auch im Kontrollreaktor. Die Zahl an *Legionella pneumophila* im Ablauf des Kontrollreaktors betrug für die Phasen 1, 2 und 3 jeweils  $3,9 \cdot 10^5$ ;  $3,7 \cdot 10^3$  und  $1,2 \cdot 10^2$ . Dies könnte darauf hindeuten, dass die Zulaufzusammensetzung und die Verfahrensbedingungen in den Laborversuchen für ein Wachstum von *Legionella pneumophila* ungünstiger waren als die Bedingungen in der KA Warstein. Trotzdem gab es immer ein Wachstum an *Legionella pneumophila* in den Reaktoren, denn obwohl der Zulauf eine große

Menge an kultivierbaren *Legionella* spp. ( $10^4 - 10^5$ ) enthielt, konnten dort keine *Legionella pneumophila* mit der qPCR-Methode nachgewiesen werden. Dennoch war die Anzahl an *Legionella pneumophila* in den Abläufen der Reaktoren immer höher als im Zulauf, was auf ein Wachstum von *Legionella pneumophila* hindeutet. Ein Wachstum von *Legionella pneumophila* ist auch in der zweiten Testphase beobachtet worden.

## 8. Testphase 4: Tag 64 - 84

### 8.1 Phase 4 - Prozessparameter

In der letzten Testphase, wurde die Dosierung (in mg/L) von Microsil und Peroxid verdoppelt, da sie keinen sofortigen Effekt auf die Legionellenzahl in früheren Testphasen gezeigt hatten. Nicht nur die Dosierung wurde verdoppelt, auch der prozentuale Anteil des behandelten Schlammes wurde von 10% auf 25% erhöht. Die Veränderung dieser beiden Parameter resultierte in einem signifikanten Anstieg der täglichen Dosierung pro Liter Reaktorvolumen, verglichen zur Dosierung in Testphase 3 (**ca. 5mal höher**).

Obwohl die zugegebene Menge an Ozon keinen sofortigen Effekt in Testphase 3 zeigte, wurde die Dosierung in Testphase 4 nicht erhöht. Die Dosierung wurde nicht erhöht, da die vorhergehenden Testphasen gezeigt haben, dass während der Behandlung nicht alles Ozon verbraucht wurde. Statt dem Schlamm mehr Ozon zur Verfügung zu stellen, wurde davon ausgegangen das **25% des Reaktorvolumens** (anstatt 10%) zu einem höheren Ozonverbrauch führt.

Die Dosierung von Chlordioxid (mg/L) wurde nicht verändert, da Testphase 3 gezeigt hat, dass die Dosierung von (0,94 mg/0,1L) eine sehr gute Sofortwirkung erzielt hat. Die Behandlung mit Chlordioxid wurde in Phase 4 auf 25% des Schlammvolumens angewandt. Diese Änderung erhöht die tägliche Dosierung von Chlordioxid auf das **2,5fache** im Vergleich zur dritten Testphase.

In Testphase 4 wurde ebenfalls **25% des Schlammvolumens** dem pH-Stress ausgesetzt (**Steigerung um Faktor 2,5 im Vergleich zu Phase 3**). Dies wurde durchgeführt, da die Dosierung, wie sie in Phase 2 und 3 vorgenommen wurde, unzureichend war um die Anzahl an *Legionella* spp. im Ablauf des Reaktors zu verringern. Von Tag 64 – 75 wurde keine Säure zum behandelten Volumen zugegeben (pH 12) nachdem es mit dem unbehandeltem Schlamm wieder vereinigt wurde. Da das System jedoch vom zeitweise hohen pH-Wert gestört wurde (siehe Punkt 8.2), wurde der pH-Wert wieder auf 7 – 8 eingestellt.

Die Kontaktzeit für alle Behandlungen in Phase 4 lag bei 2 Stunden.

Tabelle 8-1 gibt einen Überblick über die Prozessparameter in den sieben SBRs. Es ist zu erkennen, dass der hauptsächliche Unterschied zwischen den Reaktoren die Schlammkonzentration (und in der Folge die Schlammbelastung) ist. In den Reaktoren mit Peroxid-, Chlordioxid- und Ozonbehandlung, in denen dreimal wöchentlich 25% der gemischten Flüssigkeit behandelt wurden, war eine Beeinträchtigung der Flockenstruktur des Belebtschlammes zu erkennen und die Schlammkonzentration nahm ab (=> höhere Schlammbelastung).

**Tabelle 8-1:** Übersicht über die Prozessparameter der 7 Reaktoren (Tag 65 - 84)

Parameter	Einheit	Kontrolle	Microsil	Peroxid	ClO <sub>2</sub>
Arbeitsvolumen	L	0,8			
Durchflussrate	L/L·d	1,8			
HRT	h	10,7			
Zulaufkonzentration	g CSB/L	226 ± 21			
Raumbelastung	g CSB/L·d	0,51 ± 0,05			
Temperatur	°C	23,2 ± 0,8			
pH		7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1	47,8 ± 0,1
Sauerstoffkonzentration	mg O <sub>2</sub> /L	7,7 ± 0,2	7,7 ± 0,2	7,8 ± 0,1	7,7 ± 0,3
Schlammkonzentration <sup>2</sup>	g TS/L	1,01 ± 0,26	0,88 ± 0,38	0,46 ± 0,04	0,42 ± 0,02
	g oTS/L	0,82 ± 0,16	0,71 ± 0,24	0,38 ± 0,04	0,38 ± 0,02
B <sub>TS</sub>	g CSB/g oTS·d	0,61 ± 0,18	0,75 ± 0,32	1,30 ± 0,27	1,28 ± 0,05

<sup>2</sup>Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Messungen

**Tabelle 8-1:** Fortsetzung:

Parameter	Einheit	Kontrolle	Ozon	pH-Effekt	Temperatur
Arbeitsvolumen	L	0,8			
Durchflussrate	L/L-d	1,8			
HRT	h	10,7			
Zulauf- konzentration	g CSB/L	226 ± 21			
Raumbelastung	g CSB/L-d	0,51 ± 0,05			
Temperatur	°C	23,2 ± 0,8			32,8 ± 0,4
pH		7,8 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,1 ± 0,1**	7,7 ± 0,1
Sauerstoff- konzentration	mg O <sub>2</sub> /L	7,7 ± 0,2	7,6 ± 0,3	7,7 ± 0,3	6,6 ± 0,1
Schlamm- konzentration <sup>2</sup>	g TS/L g oTS/L	1,01 ± 0,26 0,82 ± 0,16	0,31 ± 0,06 0,30 ± 0,09	0,92 ± 0,19 0,60 ± 0,10	0,43 ± 0,31 0,31 ± 0,16
B <sub>TS</sub>	g CSB/g oTS-d	0,61 ± 0,18	1,94 ± 0,73	0,81 ± 0,05	1,87 ± 1,13


\* Tag 64 – 75: Keine Korrektur des pH nach Rückführung des behandelten Aliquots. Der pH lag bei 10,5 – 11 nach der Rückführung. Tag 76 – 84: Der pH der gemischten Flüssigkeit wurde nach der Rückführung wieder mit HCl auf den Ausgangs-pH eingestellt.

<sup>2</sup> Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Messungen

**Tabelle 8-2:** Übersicht über die angewandten Behandlungen auf die Biomasse in den 7 Reaktoren (Tag 65 - 84); Dosierungen sind angegeben pro Volumeneinheit

Parameter	behandeltes Vol. (%)	Eintrittsdosierung, zugegeben pro 0,2 L Reaktor	Dosierung tägliche Rate	Kontaktzeit (h)
Microsil	25	120 µg Ag	64 µg Ag/Lr-d	2
Peroxide	25	2150 mg	1152 mg/Lr-d	2
ClO <sub>2</sub>	25	1.9 mg	1,0 mg/Lr-d	2
Ozon	25	137 mg	73 mg/Lr-d	2
pH - NaOH *	25	12 meq	6,2 meq/Lr-d	2

\* Tag 64 – 75: Keine Korrektur des pH nach Rückführung des behandelten Aliquots. Der pH lag bei 10,5 – 11 nach der Rückführung. Tag 76 – 84: Der pH der gemischten Flüssigkeit wurde nach der Rückführung wieder mit HCl auf den Ausgangs-pH eingestellt.

	<b>RUHRVERBAND</b> <b>Laborversuche zur</b> <b>Verringerung der</b> <b>Legionellenzahl</b>	Datum: 30/09/2014 Referentie: PJ-13-PP-054-1 Seite: 33
---	---	--

**Tabelle 8-3:** Überblick über die angewandten Behandlungen auf die Biomasse in den 7 Reaktoren (Tag 65 - 84); Dosierungen sind angegeben pro Einheit Biomasse.

Parameter	behandeltes Vol. (%)	Eintrittsdosierung, zugegeben pro g TS	Dosierung Tägliche Rate	Kontaktzeit (h)
Microsil	25	682 µg Ag/g TS	73 µg Ag/g TS·d	2
Peroxid	25	23370 mg/g TS	2504 mg/g TS·d	2
ClO <sub>2</sub>	25	22 mg/g TS	2,4 mg/g TS·d	2
Ozon	25	2210 mg/g TS	237 mg/g TS·d	2
pH - NaOH *	25	63 meq/g TS	6,8 meq/g TS·d	2

\* Tag 64 – 75: Keine Korrektur des pH nach Rückführung des behandelten Aliquots. Der pH lag bei 10,5 – 11 nach der Rückführung. Tag 76 – 84: Der pH der gemischten Flüssigkeit wurde nach der Rückführung wieder mit HCl auf den Ausgangs-pH eingestellt.

## 8.2 Phase 4 – Zusammensetzung des Ablaufs

**Tabelle 8-4:** Eigenschaften von Zu- und Ablauf (mg/L) der sieben SBRs (Tag 65 - 84); die Werte für den Ablauf sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei Messungen

	Zulauf	Kontrolle	Microsil	Peroxid	ClO <sub>2</sub>	Ozon	pH	35°C
CSB <sub>hom</sub>	226 ± 21	30 ± 4	36 ± 4	45 ± 7	29 ± 2	36 ± 4	76 -> 40**	30 ± 2
CSB <sub>fil</sub>	80 – 174	23 ± 2	27 ± 4	40 ± 8	26 ± 2	28 ± 3	60 -> 25**	27 ± 2
TS	19 – 52	9 ± 6	18 ± 12	17 ± 3	8 ± 9	17 ± 4	30 ± 11	13 ± 10
NH <sub>4</sub> -N	17 – 25	< 1	< 1	0 – 3*	< 1	< 1	14-> 0**	< 1
NO <sub>2</sub> -N	< 1	< 1	< 1	5 ± 1	< 1	< 1	2 -> 0**	< 1
NO <sub>3</sub> -N	< 1	15 ± 2	19 ± 3	10 ± 3	9 ± 2	10 ± 2	0 -> 10**	7 ± 1
Total N	21	18 ± 1	22 ± 1	20 ± 0	12 ± 1	11 ± 0	17 ± 1	16 ± 9

\* Konzentrationen waren im angegebenen Bereich

\*\* Erster Wert wurde erreicht zwischen Tag 64 – 75 als keine Korrektur des pH nach der Rückführung erfolgte; der zweite Wert wurde erreicht zwischen Tag 76 – 84, als der pH der gemischten Flüssigkeit nach der Rückführung wieder mit HCl auf den Ausgangs-pH eingestellt wurde.

Der Einfluss der Peroxidbehandlung auf den Ablauf in der vierten Testphase bestätigt die in den vorherigen Versuchsphasen gezogenen Schlussfolgerungen: die applizierte Dosis an Peroxid führt im Ablauf zu einer leicht erhöhten Konzentration an homogenisiertem und gelöstem CSB. Der Nitrifikationsprozess im mit Peroxid behandelten Reaktor war unvollständig, was im Ablauf zu Werten von bis zu 3 mg Ammonium-N/L und 5 mg Nitrit-N/L führte.

Zu Beginn der vierten Testphase wurde die Ablaufqualität des Reaktors mit dem pH-Stresstest signifikant schlechter, was in einem hohen Rest-CSB und einer vollständigen Hemmung der Nitrifikation resultierte. Diese Verschlechterung des Ablaufs hing vermutlich mit dem zeitweilig erhöhten pH (10,5 bis 11) im Reaktor nach der Rückführung des behandelten Aliquots (25% in Phase 4 statt 10% in vorherigen Phasen) zusammen.

Ab Tag 76 wurde der pH nach der Rückführung und Durchmischung mit HCl sofort auf einen normalen Wert zwischen pH 7,0 und 8,0 eingestellt. Das führte zu einer vollständigen Wiederherstellung des Nitrifikationsprozesses und einer verbesserten Ablaufqualität gegen Ende der Versuche. Die Zusammensetzung des Ablaufs des Reaktors mit dem pH-Stresstest war in den letzten Tagen des Versuches vergleichbar mit dem Ablauf des Kontrollreaktors in Bezug auf homogenisierten und gelösten CSB, Ammonium, Nitrit und Nitrat.

Die Behandlung des Belebtschlammes erlaubte immer noch eine gute betriebsfähige Aktivität des Belebtschlammes, aber Säure musste zur Wiederherstellung eines geeigneten pH-Wertes zugegeben werden.

Die zugegebenen Dosierungen an Microsil, Chlordioxid und Ozon hatten keine Beeinträchtigung der Abflussqualität oder des Nitrifikationsprozesses zur Folge. Der Ablauf dieser drei Reaktoren und des Reaktors, der bei 35°C betrieben wurde, war vergleichbar in Bezug auf den CSB, und es fand durchgehend eine vollständige Nitrifikation statt.

Trotzdem kann – basierend auf der sehr geringen Schlammkonzentration und der beobachteten Schädigung der Flockenstruktur – vermutet werden, dass die zugegebenen hohen Dosierungen von Ozon, Chlordioxid und auch Peroxid eine instabile Reaktorleistung (niedrige Schlammkonzentration, hohe Schlammbelastung) zur Folge haben. Bei einem längeren Testzeitraum könnte sich die Ablaufqualität in diesen Reaktoren vermutlich noch weiter verschlechtern.

### **8.3 Phase 4 – Einfluss auf Legionellen**

Die Zahl der kultivierbaren *Legionella species* (Auszählung der Platten nach 2 und 10 Tagen Inkubation) und von *Legionella pneumophila* (mittels q-PCR) sind in Tabelle 8-5 dargestellt. Nach 10 Tagen wurden mehr kultivierbare Zellen gezählt als nach 2 Tagen. Die Größenordnung stieg für einige Proben, änderte sich bei einigen aber nicht. Obwohl ein Unterschied in der gezählten Anzahl zwischen dem zweiten und dem zehnten Tag festgestellt wurde, änderte sich nichts an den Schlussfolgerungen. (Keine erkennbaren Effekte bei Zählung am zweiten Tag = keine erkennbaren Effekte bei Zählung am zehnten Tag).

Der Zulauf enthielt einen beachtlichen Gehalt an kultivierbaren *Legionella species*, aber *Legionella pneumophila* konnte mit der q-PCR-Methode nicht nachgewiesen werden. Wie bereits in den Testphasen 2 und 3 beobachtet, war die Anzahl an *Legionella pneumophila* in den Abläufen aller Reaktoren immer höher als im Zulauf, was auf ein Wachstum von *Legionella*

*pneumophila* im Belebtschlamm hindeutet. Allerdings war dieses Wachstum erheblich niedriger als in den ersten beiden Testphasen und ungefähr im gleichen Bereich wie in Phase 3.


**Tabelle 8-5:** Zahl der kultivierbaren *Legionella spp.* auf GVPC-Platten und qPCR-Ergebnisse für *Legionella pneumophila*, im Ablauf der sieben SBR in Phase 4 (Tag 65 – 78). Die angegebene Zahl an kultivierbaren *Legionella spp.* ist immer der Mittelwert aus zwei Plattierungen.

Datum	Kultivierbare <i>Legionella spp.</i> GVPC-Platten (KBE/mL)			<i>Legionella pneumophila</i> mittels qPCR (Zellen/mL)
	26. Aug.	02. Sep.	10. Sep.	
Zeit nach Start	Tag 68	Tag 75	Tag 83	
Zeit nach Biomasse-Erhöhung	Tag 55	Tag 62	Tag 62	
	<b>2 Tage Inkubationszeit</b>			
Zulauf	5,80E+03	1,09E+04	1,26E+04	
Kontrolle	6,25E+02	3,00E+02	6,70E+02	
Microsil	7,05E+02	5,50E+03	2,25E+02	
Peroxid	5,80E+03	1,26E+04	3,50E+03	
ClO <sub>2</sub>	4,40E+02	1,27E+03	7,15E+02	
Ozon	4,75E+02	8,00E+02	7,50E+02	
pH - NaOH	6,20E+04	1,78E+04	4,05E+03	
Temperatur	7,05E+02	8,35E+02	3,90E+02	
	<b>10 Tage Inkubationszeit</b>			
Zulauf	9,2E +03	2,87E+04	5,05E+04	< 1,5 +02
Kontrolle	6,60E+02	6,25E+02	1,15E+03	3,50E+02
Microsil	3,95E+04	1,24E+03	7,40E+02	3,30E+02
Peroxid	7,55E+03	1,83E+04	5,20E+03	2,30E+02
ClO <sub>2</sub>	5,90E+02	1,92E+03	1,27E+03	6,20E+02
Ozon	4,15E+03	1,66E+03	1,53E+03	1,40E+02
pH - NaOH	7,25E+04	2,73E+04	5,35E+03	5,20E+02
Temperatur	5,80E+03	1,64E+03	5,90E+02	1,10E+03

In Testphase 4 wurden alle Behandlungen für 2 Stunden und mit 25% des Reaktorvolumens durchgeführt, um zu versuchen, einen Soforteffekt auf Legionellen in der behandelten Menge in einen Effekt auf den Abfluss des Systems zu übertragen.

Die durchschnittliche tägliche Dosierung von Microsil und Peroxid wurde um einen Faktor von etwa 5 gesteigert. Die Behandlung mit Ozon wurde auf 25% des Reaktorvolumens angewendet, in der Hoffnung, die Aufnahme des zugefügten Ozons zu steigern. Die effektiv eingesetzte Dosierung von Chlordioxid und den pH-Stresstest wurden beide mit 25% des Reaktorvolumens durchgeführt, in der Hoffnung, den Soforteffekt in einen Effekt auf den Abfluss des Systems zu übertragen. Trotzdem zeigen die Ergebnisse der Plattierung und der qPCR in Tabelle 8-5, dass keine der Behandlungen die Anzahl an *Legionella species* / *Legionella pneumophila* im Ablauf



	<b>RUHRVERBAND</b> <b>Laborversuche zur</b> <b>Verringerung der</b> <b>Legionellenzahl</b>	Datum: 30/09/2014 Referentie: PJ-13-PP-054-1  Seite: 36
---	---	--

des Systems verglichen zum Kontrollreaktor signifikant abzusenken. Vielmehr war die Zahl der kultivierbaren *Legionella species* im Ablauf oft höher als im Ablauf des Kontrollreaktors.

## Behandlung des Ablaufs mit freier salpetriger Säure (FSS)

### 9.1 Ziel der Versuche mit FSS

Der Auftrag von AVECOM war es im Laborversuch Möglichkeiten zur Senkung der Anzahl an Legionellen im Belebtschlamm der KA Warstein zu untersuchen, ohne den CSB- und N-Abbau zu beeinträchtigen.

7 parallele Belebtschlammssysteme wurden in einem Laborversuch angesetzt und der Einfluss von fünf unterschiedlichen Behandlungsmethoden untersucht. Im Laufe der Laborversuche (12 Wochen) stellte sich heraus, dass einige Behandlungen kurzfristig die Anzahl an Legionellen senken konnten, aber dieser kurzfristige Effekt konnte nie in einen langfristigen Effekt übertragen werden: eine reduzierte Zahl an Legionellen im Ablauf der Reaktoren.

Daher hat AVECOM sich entschieden einen weiteren Test durchzuführen. Dieser Test wurde nicht mit der gemischten Probe durchgeführt, sondern mit dem Ablauf des bei höherer Temperatur betriebenen Reaktors. Da der Ruhrverband bereits Effekte im Ablauf durch die Dosierung von Chemikalien (wie Chlordioxid) evaluiert hatte und auch eine UV-Behandlung für den Ablauf installiert war, sollte das Ziel dieser zusätzlichen Tests sein, den Einfluss eines anderen Produkts zu testen: freie salpetrige Säure (FSS) oder undissoziierte  $\text{HNO}_2$ . In der Literatur wird beschrieben, dass FSS anti-bakterielle Eigenschaften hat (Jiang et al, 2011). Der Vorteil von FSS ist, dass sie biologisch hergestellt werden kann und dass nach der Behandlung nur Nitrat im Wasser zurück bleibt. Für den Fall, dass die Behandlung mit FSS effektiv wäre, müsste FSS sorgfältig dosiert werden, um keine überhöhten Nitratwerte zu erzeugen.

### 9.2 Beschreibung und Ergebnisse des FSS Tests im Ablauf

In diesem zusätzlich von AVECOM durchgeführten Test mit dem Ablauf des Reaktors bei 35°C nutzte AVECOM die Gleichgewichtseigenschaften von Nitrit bei niedrigem pH um FSS zu dosieren: FSS wird in wässrigem Medium gebildet, wenn bei niedrigem pH Nitrit vorliegt.

Der Ablauf des Reaktors bei 35°C wurde in 6 Aliquots geteilt (5 Tests und 1 Kontrolle):

1 Kontrolle (a); 2 Tests zur Überprüfung des Effektes allein durch den niedrigen pH (b und c); 1 Test zur Evaluation des Effektes durch eine Nitritdosierung ohne pH-Korrektur (d); und 2 Tests (e und f) zur Evaluation der antibakteriellen Wirkung der Kombination von beidem (Nitrit und niedriger pH).

- a) Kontrolle: der Ablauf wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt; kein Nitrit wurde zu dosiert
- b) Der Ablauf wurde mit HCl auf pH 5,5 eingestellt; kein Nitrit

- c) Der Ablauf wurde mit HCl auf pH 4,0 eingestellt; kein Nitrit
- d) Der Ablauf wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt; + 20 ppm NaNO<sub>2</sub>-N
- e) Der Ablauf wurde mit HCl auf pH 5,5 eingestellt; + 20 ppm NaNO<sub>2</sub>-N
- f) Der Ablauf wurde mit HCl auf pH 4,0 eingestellt; + 20 ppm NaNO<sub>2</sub>-N

Nach einer Reaktionszeit von 5 Stunden wurde der Ablauf aus den 6 Tests (a-f) als Doppelansatz auf GVPC plattiert (Oxid). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9-1 zusammengefasst.

**Tabelle 9-1:** Kultivierbare *Legionella species* (in KBE/mL) auf GVPC Platten im Ablauf (a-f) nach extra pH-Behandlung mit oder ohne Zugabe von Nitrit. (Reaktionszeit 5 h)

Behandlung	2 Tage Zählung	10 Tage Zählung
<b>Ablauf bei pH 7,5 = Kontrolle</b>	1,06E+03	4,60E+03
<b>Ablauf bei pH 5,5</b>	1,24E+03	4,90E+03
<b>Ablauf bei pH 4,0</b>	1,60E+02	3,30E+02
<b>Ablauf bei pH 7,5 + 20 ppm NaNO<sub>2</sub>-N</b>	6,90E+02	4,45E+03
<b>Ablauf bei pH 5,5 + 20 ppm NaNO<sub>2</sub>-N</b>	7,00E+02	3,55E+03
<b>Ablauf bei pH 4,0 + 20 ppm NaNO<sub>2</sub>-N</b>	6,85E+02	3,00E+03

Basierend auf den Ergebnissen aus Tabelle 9-1 musste festgestellt werden, dass die Zahl der kultivierbaren *Legionella spp.* durch die Dosierung von 20ppm NaNO<sub>2</sub>-N in Kombination mit dem niedrigem pH-Wert im Laborversuch nicht gesenkt werden konnte.

## 9. Zusammenfassung

Im September 2013 kam es zu einem Legionellose-Ausbruch in Warstein. Ausführliche Untersuchungen auf *Legionella spp.* an verschiedenen lokalen Einrichtungen zeigten eine große Zahl an *Legionella spp.* im Belebtschlamm und Ablauf der Kläranlage Warstein, welche eine Mischung aus kommunalem- und Brauereiabwasser behandelt. Es wurden Sofortmaßnahmen getroffen, die eine weitere Verbreitung von Legionellen verhindern sollten. Jedoch sind mittelfristige Strategien zur gezielten Verringerung der Legionellenzahl im Belebtschlamm, sowie langfristige Strategien zur Vermeidung einer erneuten Besiedlung durch *Legionella spp.* notwendig. Hierfür wurden Laborversuche durchgeführt, um die Wirksamkeit verschiedener Behandlungsmethoden auf das Legionellenwachstum im Belebtschlamm einschätzen zu können.

Avecom wurde mit der Untersuchung beauftragt, Möglichkeiten zur Verringerung der Legionellenzahl im Belebtschlamm und im Ablauf der Kläranlage Warstein zu finden, unter Beibehaltung des derzeit herrschenden CSB- und Stickstoffabbaus.

Es wurden sieben parallel geschaltete Belebtschlammreaktoren konstruiert. Da es sich hierbei um Untersuchungen mit *Legionella pneumophila* handelte, wurden alle Reaktoren unter einer mit HEPA-Filtern ausgestattete Sicherheitswerkbank aufgebaut. Es wurde ferner beschlossen, die Kläranlage von Warstein in kompakten SBR-Systemen zu simulieren. Die sieben Reaktoren wurden mit Belebtschlamm der KA Warstein angeimpft. Sie wurden mit einer hydraulischen Verweilzeit von etwa 10h betrieben (ähnlich der KA Warstein). Für den Zulauf der Reaktoren wurde ein Substrat aus einer Mischung von häuslichem Abwasser und dem Abwasser einer Brauerei aus der Nähe von Gent genutzt.

Es gab: einen Kontrollreaktor (keine Schlammbehandlung), einen Reaktor der bei 35°C betrieben wurde (zur Simulation der am ISAH durchgeführten Versuche) und fünf Reaktoren mit einer unterschiedlichen Behandlung des Belebtschlammes. Der Effekt der folgenden Behandlungen wurde untersucht: Dosierung von Microsil (Nano-Silber), Peroxid, Chlordioxid, Ozon und ein pH-Stresstest (temporärer pH 12). Die fünf Behandlungen wurden dreimal die Woche mit einem gewissen Prozentsatz des Belebtschlammes durchgeführt.

Die Gesamtdauer der Untersuchungen belief sich auf 12 Wochen. In vier Testphasen konnten verschiedene Dosierungen für jede Behandlung angewandt werden (unterschiedliche Dosierung, Reaktionszeiten, Behandlung von 10% bzw. 25% des Schlammvolumens).

Die kleinste Dosierung (geringste Dosierung und kürzeste Reaktionszeit) wurde während der ersten Testphase angewandt. Die höchsten Dosierungen dagegen in Testphase 4.

Es muss angeführt werden, dass sich im Verlauf der gesamten Versuchsdauer die Anzahl an *Legionella pneumophila* allmählich verringert hat, so auch im Kontrollreaktor. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Bedingungen im Labormaßstab, im Vergleich zur Kläranlage, ungünstig für ein Wachstum von *Legionella pneumophila* waren. Dennoch wurde ein Wachstum von *Legionella pneumophila* immer im Kontrollreaktor beobachtet (diese waren mittels qPCR im Zulauf nicht detektierbar, aber stets im Ablauf nachweisbar). Infolgedessen wurden die Tests so angepasst, dass der Effekt der verschiedenen Behandlungsmethoden auf *Legionella pneumophila* untersucht werden konnte.


Die unterschiedlichen Behandlungen wurden hinsichtlich ihres Effekts auf kultivierbare *Legionella species* und die Zahl an *Legionella pneumophila* bewertet. *Legionella spp.* wurde mittels Plattierung erfasst, *Legionella pneumophila* mit Hilfe der qPCR-Methode. Die Ergebnisse beider Messung korrelieren nicht, da jeweils andere Bakterien erfasst werden. Die qPCR-Methode gibt die Gesamtzahl an Zellen wieder, sowohl tote Zellen wie auch lebende. Bei der Plattierung werden nur lebende kultivierbare Zellen erfasst. Die qPCR-Methode ist speziell auf *Legionella pneumophila* ausgerichtet, wohingegen die Kultivierung die Gesamtanzahl der kultivierbaren *Legionellaceae* angibt.

In den Testphasen 2 und 3 zeigte sich, dass die Dosierungen von Microsil, Chlordioxid, Ozon und die Behandlung mit NaOH die Nitrifikation nicht inhibierten und die Qualität der Abläufe von der Behandlung nicht beeinflusst wurden.

Die Behandlung mit Peroxid (230 mg/L\*Tag) hatte einen negativen Einfluss auf die Nitrifizierer, da die Nitrifikation unvollständig ablief (Ammonium und Nitrit wurden nachgewiesen). Die Restkonzentration für den Gesamt-CSB und gelösten CSB war im Ablauf des mit Peroxid behandelten Reaktors leicht erhöht.

In den Testphasen 2 und 3 wurde der Effekt der Behandlungen auf zwei Arten bewertet: einerseits der Effekt auf den Ablauf der Reaktoren, andererseits der sofortige Effekt. Der sofortige Effekt der Behandlungen wurde auf Grundlage der Plattenausählung der kultivierbaren *Legionella spp.* aus dem Überstand der Reaktoren bewertet.

Ein signifikanter Effekt auf die kultivierbaren *Legionella spp.* konnte durch die Behandlung mit NaOH festgestellt werden (auf pH 12 für 1 h; Testphase 2), sowie für Chlordioxid bei 16 mg /g TS (Testphase 3). Auf den GVPC-Platten konnten nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen bei 37°C nur 25 KBE/mL im Überstand des mit NaOH behandelten Volumens (Phase 2) gezählt werden, wohingegen der Kontrollreaktor mehr als  $10^3$  KBE/mL enthielt. In Testphase 3 resultierte der sofortige Effekt der Chlordioxid-Behandlung (mit 16 mg ClO<sub>2</sub>/g TS) in lediglich 20 KBE/mL nach 10 Tagen Inkubationszeit bei 37°C.

	<b>RUHRVERBAND</b> <b>Laborversuche zur</b> <b>Verringerung der</b> <b>Legionellenzahl</b>	Datum: 30/09/2014 Referentie: PJ-13-PP-054-1  Seite: 40
---	---	--

Jedoch führte dieser signifikante Effekt der zwei Behandlungen auf den Belebtschlamm nicht zu einer Verringerung der Legionellenzahl im Ablauf der Reaktoren.

Für die letzte Testphase (Phase 4) wurde daher entschieden, die durchschnittliche Dosierung und die Behandlung des Schlammes auf 25% des Reaktorvolumens zu erhöhen (statt 10% wie in Testphase 1-3). Letzteres wurde so entschieden, um den guten Soforteffekt in einen langfristigen Effekt auf die Legionellen im Ablauf umzuwandeln. Jedoch konnte, im Vergleich zum Kontrollreaktor, keine signifikante Abnahme der Legionellenzahl im Ablauf der Reaktoren erreicht werden. Zudem stellte sich heraus, dass eine höhere Dosierung von Ozon, Chlordioxid und Peroxid für einen längeren Einsatz in der KA Warstein zu hoch war. Die führte zu einer Ausflockung des Schlammes, was in einer geringeren Schlammkonzentration mündete.

Nach 12 Wochen wurde festgestellt, dass die Dosierungsraten von Microsil, Chlordioxid, Ozon, Peroxid und pH-Belastung nicht in der Lage waren, die Zahl an Legionellen im Ablauf zu verringern, obwohl einige Behandlungen einen signifikanten sofortigen Effekt auf die Zahl an kultivierbaren *Legionella spp.* zeigten.

Da keine signifikante Verringerung der Legionellenzahl im Ablauf der Reaktoren festgestellt werden konnte, entschied sich Avecom den Einfluss von freier salpetriger Säure (FSS) auf den Ablauf zu untersuchen. FSS wurde als eine Kombination von Nitrit bei niedrigen pH zu dosiert. Obwohl FSS als antibakterielles Mittel wirken kann, war es nicht geeignet die Legionellenzahl im Ablauf der Reaktoren zu verringern.

## 10. Literatur

Jiang, GM; Gutierrez, O; Sharma, KR; Keller, J and Yuan ZG. Optimization of intermittent, simultaneous dosage of nitrite and hydrochloric acid to control sulfide and methane productions in sewers. Research Vol 45 pp 6163 – 6172.

Stephen, J.R., Y.J. Chang, S.J. Macaughton, G.A. Kowalchuk, K.T. Leung, C.A. Flemming, and D.C. White, 1999. Effect of toxic metals on indigenous soil  $\beta$ -subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. Applied and Environmental Microbiology 65: 95-101.

TP-3

**Entwicklung Standardmethode Legionellen  
in der Abwasseranalytik  
und  
Analytik für die ISAH-Batchversuche**

Suchenwirth, R., Dr. med.

Lass, J., Dipl. Ing.(FH)

Günther, P., Biologielaborantin

im ISAH-Projekt



Entwicklung von Maßnahmen zur Reduzierung  
von Legionellen in belebtem Schlamm

Auftraggeber:

Ruhrverband / MKULNV

Thomas Grünebaum, Kai Uwe Utecht, Christian Högel

**Teil A****Methodenentwicklung bzw. Anpassung**

1.) Einführung	3
2.) Vorüberlegungen zur Probe und zur Matrix	4
3.) Probenvorbereitung	4
4.) Selektions-Verfahren der ISO-Methoden	5
5.) Alternative Selektionsverfahren	5
6.) Untersuchung größerer Volumina (z.B. 10 oder 100 ml)	5
7.) Verdünnungsstufen	6
8.) Optimierte NLGA-Verfahren der Probenverarbeitung	6
9.) Subkulturen zur Bestätigung	6
10.) Latex-Test	7
11.) Nationales Referenzlabor für Legionellen der TU Dresden	7
12.) Fazit	7

Anlage 1: Ablaufschema der optimierten NLGA-Probenvorbereitung

Anlage 2: Vortragsfolien von der Abschlussveranstaltung am 28.11.2014 in Hannover

Anlage 3: NLGA Akkreditierungsurkunde

**Teil B****Untersuchungsergebnisse**

Anlage 4: Untersuchungsbefunde Serien 1-33

## 1. Einführung

Als ursächliches Agens im Ausbruchsfall Warstein wurde vom nationalen Referenzlabor für Legionellen in Dresden das Bakterium *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1, ST345 festgestellt, welches sowohl in Patientenproben als auch in zahlreichen Umweltproben nachgewiesen wurde.

*Legionella pneumophila* SG 1 wurden bisher als Ursache für etwa 70% der Legionellenerkrankungen in Europa und den USA nachgewiesen. In weit geringerem Umfang wurden bei Ausbrüchen auch vorrangig *Leg. micdadei*, *Leg. longbeachae*, *Leg. dumoffii* und *Leg. bozemanii* als ursächlich für Erkrankungen beschrieben (Bartram et. al, 2007). Die durch die verschiedenen Bakterienspezies hervorgerufenen Krankheitsbilder sind aber klinisch nicht von einander unterscheidbar.

Die Methoden zur Untersuchung von wässrigen Proben auf die enthaltene Konzentration von Legionellen befinden sich seit der Erstbeschreibung 1976 in einem kontinuierlichen Optimierungsprozess. Die eine, ideale Methode zum Nachweis der bisher bekannten 50 verschiedenen Legionellenspezies mit bisher 70 verschiedenen Serogruppen wurde bisher nicht gefunden.

Mit den Standardmethoden können verschiedene Legionellenspezies z.T. auch gleichzeitig in einer Probe bzw. auf einem Nährboden nachgewiesen werden. Es ist üblich bei der Ergebnis-Angabe im Wesentlichen zwischen *Leg. pneumophila* SG 1, SG 2-14 und *Leg. species* zu unterscheiden. In Abhängigkeit von der Fragestellung sind weitergehende Unterscheidungen zwar möglich, jedoch mit zusätzlichem Untersuchungsaufwand (Serotypisierung) oder gänzlich anderen Untersuchungsmethoden (z.B. Sequenztypisierung oder Speziesbestimmung durch MALDI-TOF) verbunden.

Dieser Aufwand wird bei Routineuntersuchungen meistens nicht betrieben, da bereits das Auftreten einer nachweisbaren größeren Legionellenzahl als Indikator auf hygienische bzw. technische Mängel hinweist. Es gilt dann, hygienisch-technische Bedingungen zu schaffen, die eine mengenmäßige Vermehrung von Legionellen nicht zulassen.

Für die Bereiche der Trinkwasser- und auch der Badebeckenwasserhygiene wurden bereits vor über 20 Jahren Konzentrationen benannt, deren Einhaltung mittels einfacher technischer Voraussetzungen und entsprechender Regeln möglich ist. In die Trinkwasserverordnung wurde 2011 ein als „technischer Maßnahmewert“ bezeichneter „Grenzwert“ aufgenommen und entsprechende Untersuchungen von bestimmten Trinkwasserinstallationen im Warmwasserbereich rechtlich vorgeschrieben. Eine der Voraussetzungen dafür war es, dass standardisierte genormte Untersuchungsverfahren verlässliche Ergebnisse erbringen und die Ergebnisse verschiedener Labore bei gleichen Proben miteinander vergleichbar sind.

Da es für die vorliegende Fragestellung im Zusammenhang mit der Untersuchung von Abwasserproben jedoch bisher keine vergleichbare Methodenentwicklung gab, war es naheliegend auf die bewährten Methoden zurückzugreifen. Diese sind jedoch für Störstoff-arme Wasserproben entwickelt worden, um entsprechend niedrige Bakterienkonzentrationen sicher nachweisen zu können.

Da die Verhältnisse in Abwasser gänzlich andere sind, waren in der Folge die Untersuchungsmethoden an diese andere Matrix anzupassen, worüber im Folgenden berichtet wird.



## **2.) Vorüberlegungen zur Probe und zur Matrix**

In einer „idealen Situation“ wären die Zielorganismen freischwimmend, singular vorkommend und homogen gleichverteilt in z.B. einem Becken. Dann wäre es möglich, mit einem geringen Stichprobenfehler eine repräsentative (Stich-)Probe zu gewinnen und eine Aussage über den „wahren Wert“ der Anzahl der Legionellen in dem beprobten Volumen zu machen – und durch Hochrechnung die wahre Konzentration in dem gesamten Wasservolumen des Beckens anzugeben.

Wenn aber die Zielorganismen nicht homogen gleichverteilt vorkommen, ist der Rückschluss von der Anzahl in der (Stich-)Probe auf die Anzahl in dem untersuchten Ausgangsvolumen limitiert. Bei wechselnder Zusammensetzung z.B. von Abwasser und unterschiedlicher Ausbildung von Flocken oder Vorkommen von Bakterien in Amöben gilt dies umso mehr.

Die realen Proben, die dem Labor nach Absprache überbracht wurden waren überwiegend klare Proben mit einem makroskopisch mäßigen bis geringen Partikelgehalt. Es ist bei Legionellen davon auszugehen, dass sich die Bakterien im Biofilm (hier z.B. Flocken) befinden, in Amöben oder als kleine Aggregate vorkommen. Somit sind sie i.d.R. nicht gleichverteilt, was zur Konsequenz hat, dass die Ergebnisse im tatsächlichen Untersuchungsvolumen angegeben werden sollten – und nicht auf z.B. 100 ml oder 1 L hochgerechnet werden sollten. Ein in der Chemie (bei idealen Lösungen) mögliches Hochrechnen von Proben-Verdünnungen bis zu 1:1000 bei 1 ml auf andere Bezugsvolumina führt in der Mikrobiologie dann zu erheblichen Über- oder Unterschätzungen des „Wahren Wertes“.

Nach unserer Auffassung sollte das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchungen nur in dem tatsächlich untersuchten Volumen (hier also KBE/ml) angegeben werden. Da die Bedingungen im Abwasser gänzlich andere sind, sollte auch nicht der Anschein einer Vergleichbarkeit zum Trinkwasser erweckt werden, wo die Untersuchung bzw. Angaben in KBE/100 ml erfolgen.

## **3.) Probenvorbereitung**

Aus den Vorüberlegungen ergeben sich gewisse Anforderungen an die Probenvorbereitung.

In den ISO-Normen ist als Homogenisierungsschritt der Probe ein –nicht näher definiertes– Schütteln angegeben. Um sich bei der Bestimmung der Bakterienkonzentration dem „wahren Wert“ in der Probe anzunähern, haben Vorversuche mit einem Legionellen-Teststamm aus unserem Arbeitsbereich Ringversuche ergeben, dass ein Rühren über 30 Minuten mittels Magnetrührer (glasummantelt, sterilisierbar) zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geführt hat.

Alternative aggressivere Vorbereitungsarten wie eine Ultraschallbehandlung (z.B. Labor Bonn) oder eine Ultra-Turrax-Behandlung (z.B. Labor Mühlheim) würden nach unserer Auffassung auch im Kläranlagenbetrieb bzw. der Natur eigentlich stabile Konglomerate oder umschlossen Einheiten zerschlagen. Insofern würde man ggf. künstlich falsch-hohe Keimzahlen erzielen. Zugleich entstehen aus den Flocken etc. zerkleinerte Störstoffe, die sich ebenfalls negativ auf die nachfolgenden diagnostischen Schritte auswirken können.

Diese fachliche Einschätzung wäre durch geeignete Ringversuche zu untermauern, in denen die systematische „Übererfassung“ bei entsprechend anderen Probenvorbehandlungen aufzuzeigen wären. Präparationen mit homogen verteilten freischwimmenden Legionellen, die im Trinkwasserbereich verwendet werden, sind dafür jedoch nicht geeignet. Daher gibt es zur Zeit keine Möglichkeit, einen Nachweis auf diese Art zu führen.

Der im September 2014 vom LANUV durchgeführte Ringversuch mit der Matrix Abwasser war aufgrund der ausgewählten Proben mit relativ sehr geringen Gehalten an Legionellen für weitergehende Aussagen wegen des eigentlich „falschen Arbeitsbereiches“ leider weniger geeignet. Die Ergebnisse des Ringversuches liegen bisher leider auch noch nicht vor.

#### **4.) Selektions-Verfahren der ISO-Methoden**

Da Legionellen leicht von der möglichen Begleitflora am idealen Wachstum gehindert werden können, wurden in den Norm-Methoden verschiedene Selektions-Faktoren beschrieben. So sind neben einer Reihe hochwirksamer Antibiotika im sog. GVPC-Agar (Vancomycin, Polymyxin und Cycloheximid) eine Vorbehandlung mit Hitze und/oder Säure beschrieben. Beide Verfahren supprimieren etwaige Begleitflora jeweils wirksam, die Kombination beider führte zu sehr deutlichen Minderbefunden gegenüber den jeweiligen Einzelbehandlungen. Da die Verfahren aber möglicherweise jeweils unterschiedliche Anteile der Störf flora hemmen, werden die Verfahren in der optimierten Methode parallel angewendet.

#### **5.) Alternative Selektionsverfahren**

Da initial nicht absehbar war, wie wirksam die klassischen Supprimierungsverfahren auch für die Matrix Abwasser sein werden, wurde nach weiteren potentiell Selektions-Faktoren gesucht. Für die Versuche wurden geeignete sterile Antibiotika-Präparationen beschafft und mittels Plattentest auf ihre Hemmwirkung auf den bereits erwähnten eigenen Ringversuchstamm sowie native Abwasserproben-Kulturen getestet.

Während das Antibiotikum Nalidixin zu großen Hemmhöfen auch auf den Legionellen-Platten geführt hat, blieb das Antimykotikum Natamycin ohne Wirkung, sowohl auf die Begleitflora als auf Legionellen.

Da jeder zusätzliche Schritt in der Regel mit einer geringeren Ausbeute an den Zielorganismen einhergeht, die Optimierung der klassischen Ansätze für dieses Projekt aber auch erfreulich gute Ergebnisse zeigte, wurden diese Ansätze nicht weiterverfolgt.

#### **6.) Untersuchung größerer Volumina (z.B. 10 oder 100 ml)**

Vorversuche mit der Membranfiltrationsmethode verliefen frustrierend, da zum einen die zusätzlichen Inhaltsstoffe der Probe die Membran zu unterschiedlichen Zeitpunkten, jedoch i.d.R. zu früh verblockten und das jeweilige Zielvolumen nicht filtriert werden konnte. Zum anderen wird sowohl der Zielorganismus, als auch die Begleitflora auf einer relativ kleinen Fläche konzentriert. Die Ergebnisse der dadurch zusätzlich erforderlichen Arbeitsschritte (Zerschneiden, Resuspendieren etc.) waren unterschiedlich gut reproduzierbar und lieferten

letztlich eine schlechtere Ausbeute im Vergleich zur klassischen Ausplattierung. Dieser Aufkonzentrierungsschritt, der eher für Matrizes mit geringen Belastungen und größere Volumina nützlich ist, wurde daher aufgegeben.

## **7.) Verdünnungsstufen**

Da die Anzahl der vermehrungsfähigen Legionellen sowie der möglichen Begleitflora in der jeweiligen Probe nicht bekannt ist, muss die Untersuchung einer Probe einen Bereich über mehrere Verdünnungsstufen, z.B. bis zu 1:1000 mit guter Ausbeute an Legionellen bei minimierter Anzahl an Begleitflora abdecken.

Es zeigte sich im Verlauf des Projektes, dass unverdünnte Proben bei Säurevorbehandlung i.d.R. aufgrund zu hoher Keimzahlen nicht auswertbar waren, so dass auf diese Platte bzw. diesen Schritt ohne Informationsverlust verzichtet werden konnte.

## **8.) Das optimierte NLGA-Verfahren der Probenverarbeitung**

Da in dieser Studie der Zielorganismus mit dem Ausbruchstamm *Leg. pneumophila* SG 1 ST 345 feststand, war die Anwendung der klassischen Methode günstig, da durch dieser Methode bevorzugt wärmeliebende Legionellen der SG 1 nachgewiesen werden. Durch jede Veränderung oder Optimierung der Nachweismethode werden bestimmte Spezies begünstigt und andere tendenziell unterdrückt.

Aufgrund der oben genannten Erfahrungen wurden die beiden Selektions-Verfahren (Hitze & Säure) sowie eine native Probe parallel in verschiedenen Verdünnungsstufen durchgeführt, was zu einer entsprechenden Anzahl von Kulturplatten je Probe führt. Alle Platten werden als Doppelansatz von je 0,5 ml ausgeführt und Befunde aufaddiert in 1 ml angegeben. Als Optimum an Material- und Arbeitseinsatz hat sich das nachstehend aufgeführte Ablaufschema erwiesen, bei dem nun pro Probe resultierend 2x3 Platten mit Säure- und 2x4 Platten Hitze-Behandlung, in der Summe also 14 Platten pro Probe für die Auswertung herangezogen werden können.

Die Auswertung jeder einzelnen Probe wurde auch durch eine Fotodokumentation unterstützt, die auch noch nachträgliche vertiefte Diskussionen der Ergebnisse ermöglichen.

Das optimierte Ablaufschema findet sich im [Anhang 1](#).

Beispiele für die Fotodokumentation finden sich im Vortrag von der Abschlussveranstaltung am 28.11.2014 in Hannover, siehe [Anhang 2](#)

## **9.) Subkulturen zur Bestätigung**

Da Legionellen für ihr Wachstum auf Cystein angewiesen sind, konnte bei Wachstum auf GVPC-Agar, BCYE-Agar und fehlendem Wachstum der isolierten Kolonien auf dem Blutagar (cysteinfrei) die Kolonie als *Legionella* bestätigt werden. In einem geringen Umfang können hier jedoch auch einige Bakterien wachsen, die nicht zur Spezies *Legionella* gehören, daher ist der zusätzliche Latex-Test hilfreich.

## 10.) Latex-Test

Der kommerziell erhältliche Latex-Test ist hoch spezifisch, er basiert auf der Agglutination von mit Antikörpern beladenen Latexpartikeln bei Anwesenheit spezifischer Legionellen-Zellwand- Antigene. Es konnte hierbei zwischen *Legionella pneumophila* SG 1, *Legionella pneumophila* Serogruppe 2-14 und *Legionella spp.* (*L. longbeachae* 1+2, *L. bozemani* 1+2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*) differenziert werden. Bei jeder Testdurchführung wurden eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt.

## 11.) Nationales Referenzlabor für Legionellen der TU Dresden

Im Verlauf der Untersuchung wurden –in Ausdehnung der ursprünglichen Planung– zusätzlich ausgewählte Platten subkultivierter verdächtiger Kolonien auch an das nationale Referenzlabor (Dr. C. Lück) zur weiteren Charakterisierung übersandt.

So konnte gezeigt werden, dass auch in den aktuellen für die Versuche verwendeten Proben aus Warstein in einigen Fällen der Ausbruchsstamm *Leg. pneumophila* SG 1 ST 345, aber auch der ebenfalls bereits beschriebene Stamm *Leg. pneumophila* SG 1 ST 600 sowie der Stamm *Leg. londiniensis* vorhanden waren.

Der Einsatz der weitergehenden Charakterisierungsmethoden ist aufgrund von Arbeitskapazitäten und Kosten limitiert. Umso mehr Bedeutung kommt dem geschulten Auge und dem Erfahrungsschatz bei der Bearbeitung und Vorauswahl im Labor zu.

## 12.) Fazit

Das nach DIN EN ISO 17025 auch für den Parameter Legionellen in Trink- und Badebckenwässern akkreditierte Labor des NLGA in Hannover verfügt über hinreichende Routine in der Durchführung von jährlich etwa 10-15.000 Legionellen-Untersuchungen in diesen Matrices. Es wurde die Aufgabe übernommen, die bestehenden Norm-Methoden auch für die ungleich schwierigere Matrix Abwasser zu erproben und ggf. zu optimieren. Die Untersuchungen erfolgten als Service-Analytik für die Reaktor-Versuchsansätze des ISAH mit Klärschlamm aus Warstein, der mit jeweils frischem Abwasser aus Warstein beschickt wurde.

Durch Schritte von Hitze- bzw. Säurebehandlung im Parallelansatz in Kombination mit Verdünnungsschritten wurde eine praktikable und aussagekräftige optimierte NLGA-Vorbereitungsmethode erarbeitet. Die anschließende kulturelle Vermehrung sowie die klassischen Nachweisschritte erfolgten nach den ISO-Standardmethoden im akkreditierten Laborbereich. In Zusammenarbeit mit dem nationalen Referenzlabor konnten neben dem Legionellen-Ausbruchsstamm *Leg. pneumophila* SG 1 ST 345, auch der ebenfalls bereits beschriebene Stamm *Leg. pneumophila* SG 1 ST 600 sowie der Stamm *Leg. londiniensis* nachgewiesen werden.

Die Proben des ISAH-Projektes erwiesen sich in der Regel bei Untersuchung mit diesem optimierten NLGA-Verfahren der Probenverarbeitung als gut auswertbar. Dies bedeutet, dass mindestens eine oder meistens auch zwei oder mehr Verdünnungsstufen gut ablesbar und interpretierbar waren.

Das optimierte Verfahren mit entsprechenden Vorbereitungsschritten und den Parallel-Ansätzen kann zur Anwendung für Abwasseruntersuchungen bei gleichgelagerten Fragestellungen empfohlen werden. Ein Vergleich mit entsprechenden spezifischen Verfahren anderer Labore ist prinzipiell im Rahmen des Ringversuches des LANUV erfolgt, dessen Ergebnis bzw. Auswertung jedoch bisher nicht bekannt ist.

Die Untersuchungen und alle Arbeitsschritte erfolgten nach den Grundsätzen unserer Laborkkreditierung nach DIN EN ISO 17025, die Ergebnisse wurden im Laborinformationssystem hinterlegt und alle zugehörigen Unterlagen werden für 5 Jahre archiviert.

Hannover, den 15.12.2015

Dr. R. Suchenwirth