

# Mikrobiologische Bewertung technischer Wassersysteme in Abluftreinigungsanlagen von Schweinemastbetrieben

TEXT: G. Schwaiger, M. Clauß, M. Elsner, M. Seidel

**ZUSAMMENFASSUNG** Abluftreinigungsanlagen von Schweinemastbetrieben bieten durch moderate Temperaturen, hohe Nährstoffverfügbarkeit und Wasserstagnation günstige Bedingungen für das Wachstum potenziell pathogener Mikroorganismen wie *Legionella pneumophila*. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass Prozesswasser und das emittierte Reingas ein gesundheitliches Risiko darstellen können. Als mögliche Quelle für den Legionellenbefall wurde das eingespeiste Trinkwasser vermutet, jedoch fehlten bislang weiterführende Untersuchungen. Diese Lücke adressiert die vorliegende Arbeit, wobei ein besonderer Fokus auf Notduschen lag, die aus derselben Wasserquelle gespeist wurden. Werden Notduschen nicht regelmäßig gespült, können sie nicht nur zur Einschleppung von Legionellen in die Abluftreinigungsanlagen beitragen, sondern stellen auch ein direktes arbeitsmedizinisches Risiko dar: Bei Nutzung können legionellenhaltige Aerosole freigesetzt werden. In zwei Schweinemastbetrieben wurden Frischwasser- und Duschproben mithilfe immunomagnetischer Separation kombiniert mit Durchflusszytometrie (IMS-FCM) sowie mit einer sogenannten Standard-Additions-qPCR (SA-qPCR) untersucht. Legionellen – einschließlich intakter *Legionella pneumophila* – wurden in sämtlichen Proben nachgewiesen, mit zum Teil deutlich höheren Konzentrationen in den Notduschen im Vergleich zum Frischwasser. Die Ergebnisse deuten auf eine bislang unterschätzte Gefahr für die Gesundheit der Beschäftigten hin und liefern Hinweise auf mögliche Ursachen für Legionellenbefunde im Reingas der Abluftreinigungsanlagen. Als arbeitsschutzrelevante Maßnahme wird empfohlen, Notduschen regelmäßig zu spülen und die Maßnahmen zu dokumentieren, um die Exposition gegenüber Legionellen im Betriebsalltag wirksam zu minimieren. Vor-Ort-Messungen mittels IMS-FCM zur raschen mikrobiologischen Analyse erwiesen sich dabei als effektives Instrument, um Quellen von Gesundheitsrisiken in hoher Schnelligkeit zu identifizieren.

## Microbiological assessment of technical water systems in exhaust air purification systems at pig farms

**ABSTRACT** Air purification systems in pig-fattening farms provide favorable conditions for the growth of potentially pathogenic microorganisms such as *Legionella pneumophila*, due to moderate temperatures, high nutrient availability, and water stagnation. Previous studies have already shown that both the process water and the emitted clean air can pose a health risk. The drinking water used to supply these systems has been suspected as a potential source of Legionella contamination; however, comprehensive investigations have so far been lacking. This study addresses this gap, with a particular focus on emergency showers that would be fed from the same water source. If not flushed regularly, the emergency showers may contribute not only to the introduction of Legionella into the air purification systems but also pose a direct occupational health risk: the release of Legionella-containing aerosols during use. In two pig-fattening farms, freshwater and shower samples were analyzed using immunomagnetic separation combined with flow cytometry (IMS-FCM) and a so-called standard addition quantitative PCR (SA-qPCR). Legionella – including viable *L. pneumophila* – was detected in all samples, with partly significantly higher concentrations found in emergency showers compared to the corresponding freshwater. These results point to a previously underestimated health hazard for farm personnel and provide indications of possible sources for the presence of Legionella in the clean air of the air purification systems. As a relevant occupational safety measure, it is recommended documented in order to effectively minimize Legionella exposure during daily operations. On-site analysis using IMS-FCM proved to be an effective tool for rapid microbiological assessment to identify sources of health hazards in unparalleled response time.

## 1 Einleitung

Abluftreinigungsanlagen (Adsorptiv-katalytische Abluftreinigung, APS) gehören mittlerweile in der industriellen Mastschweinehaltung zum Stand der Technik und können bei ordnungsgemäßen Betrieb Feinstaub, Gerüche und Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) zu über 90 % aus der Abluft von Tierhaltungsanlagen entfernen [1]. So gab es im Jahr 2020 in Deutschland allein in der Schweinehaltung insgesamt 3 240 zertifizierte Anlagen [2]. Zum Einsatz kommen Biofilter, Biowäscher, Rieselbettfilter, chemische Wäscher oder auch Kombinationen der verschiedenen Verfahren. Am

häufigsten werden jedoch einstufige Rieselbettfilter, einstufige Biofilter und dezentrale Chemowäscher eingesetzt [3].

Die Wäscher enthalten poröse Füllkörper, die mit ihrer großen Oberfläche die Luftschadstoffe adsorbieren und gleichzeitig als Besiedlungsfläche für Mikroorganismen dienen, die die Stoffe anschließend umsetzen sollen. Die Füllkörper dürfen nicht austrocknen und werden deshalb regelmäßig berieselt. Mit diesem Kreislaufwasser gelangen Bakterien, Staub, Ammoniak und Geruchsstoffe in den Waschwasserbehälter, wo ebenfalls ein biologischer Abbau der genannten Stoffe erfolgt. Um eine Versalzung zu vermeiden, wird das Waschwasser in regelmäßigen Abständen abge-

schlämmt und durch Frischwasser ersetzt. Die meisten biologischen Abluftwäscher arbeiten bei bestimmungsgemäßem Betrieb in einem pH-Bereich des Waschwassers von 6,0 bis 7,5. In diesem Bereich ist eine optimale Ammoniakaufnahme des Waschwassers gewährleistet. Bei pH-Werten <6,0 steigt die Gefahr zusätzlicher NO<sub>x</sub>-Emissionen aus der Anlage und bei pH-Werten >7,5 wird NH<sub>3</sub> nicht mehr richtig abgeschieden. Eine Ausnahme bilden reine chemische Wäscher, die bei pH-Werten <4 betrieben werden und primär der Ammoniakabscheidung dienen. Reine Biofilter bestehen dagegen meist aus einer groben Schicht biologischen Materials, vorzugsweise aus gerissenem Wurzelholz, und dienen in erster Linie dem Abbau von Geruchsstoffen durch Mikroorganismen, die auf dem Filtermaterial siedeln. Häufig werden auch Kombinationen der genannten Verfahren in 2- oder 3-stufigen Anlagen zusammengefasst, um gleichzeitig Ammoniak, Staub und Gerüche zu reduzieren [1].

Um den pH-Wert des Waschwassers im Bereich von 6,0 bis 7,5 zu halten, wird dieser geregelt. Steigt der pH-Wert des Waschwassers zum Beispiel durch Ammoniakaufnahme an, wird zur Absenkung konzentrierte Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zudosiert. Sinkt der pH-Wert des Waschwassers jedoch zum Beispiel durch mikrobiologische Prozesse zu stark ab, wird der pH-Wert mit Natronlauge (NaOH) wieder erhöht. Dies bedeutet aber auch, dass in landwirtschaftlichen Betrieben mit pH-geregelten Abluftreinigungsanlagen mit größeren Mengen dieser Gefahrstoffe umgegangen wird. In allen Bereichen, in denen die Gefahr von Verbrennungen, Verbrühungen oder Verätzungen besteht, fordert die Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV) die Installation von Notduschen [4]. Sie dienen dem Schutz der Beschäftigten und sind ein wesentlicher Bestandteil der Sicherheitseinrichtungen. Sie ermöglichen bei Unfällen, wie Chemikalienkontaminationen oder Spritzern, eine sofortige Spülung der betroffenen Körperstellen, um das Risiko von Verletzungen oder schweren Hautschäden zu minimieren.

Konkrete Anforderungen an Notduschen sind in der Technischen Regel für Gefahrstoffe (TRGS 526) [5] sowie in der Betriebssicherheitsverordnung (BetrSichV) [6] festgelegt. Danach müssen Notduschen in der Nähe von Arbeitsplätzen mit Gefahrstoffen vorhanden sein und regelmäßig gewartet und auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft werden. Wichtig ist auch, dass das Personal im Umgang mit den Notduschen geschult ist, um im Notfall richtig reagieren zu können. Normative Vorgaben hierzu finden sich in der DIN EN 15154-5:2018-05 „Sicherheitsnotduschen – Teil 5: Körperduschen mit Überkopfbrause und Wasseranschluss für andere Standorte als Laboratorien“ [7]. Darüber hinaus empfiehlt die DGUV, Notduschen in regelmäßigen Abständen (in der Regel einmal monatlich) zu prüfen. Dabei geht es nicht nur um die technische Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Notdusche. Durch einen häufigen Wasserwechsel können auch Verschmutzungen und Verkeimungen der Wasserleitung vermieden werden, was das Risiko einer Legionellenverkeimung in der Wasserleitung der Notdusche und im Duschkopf verringert.

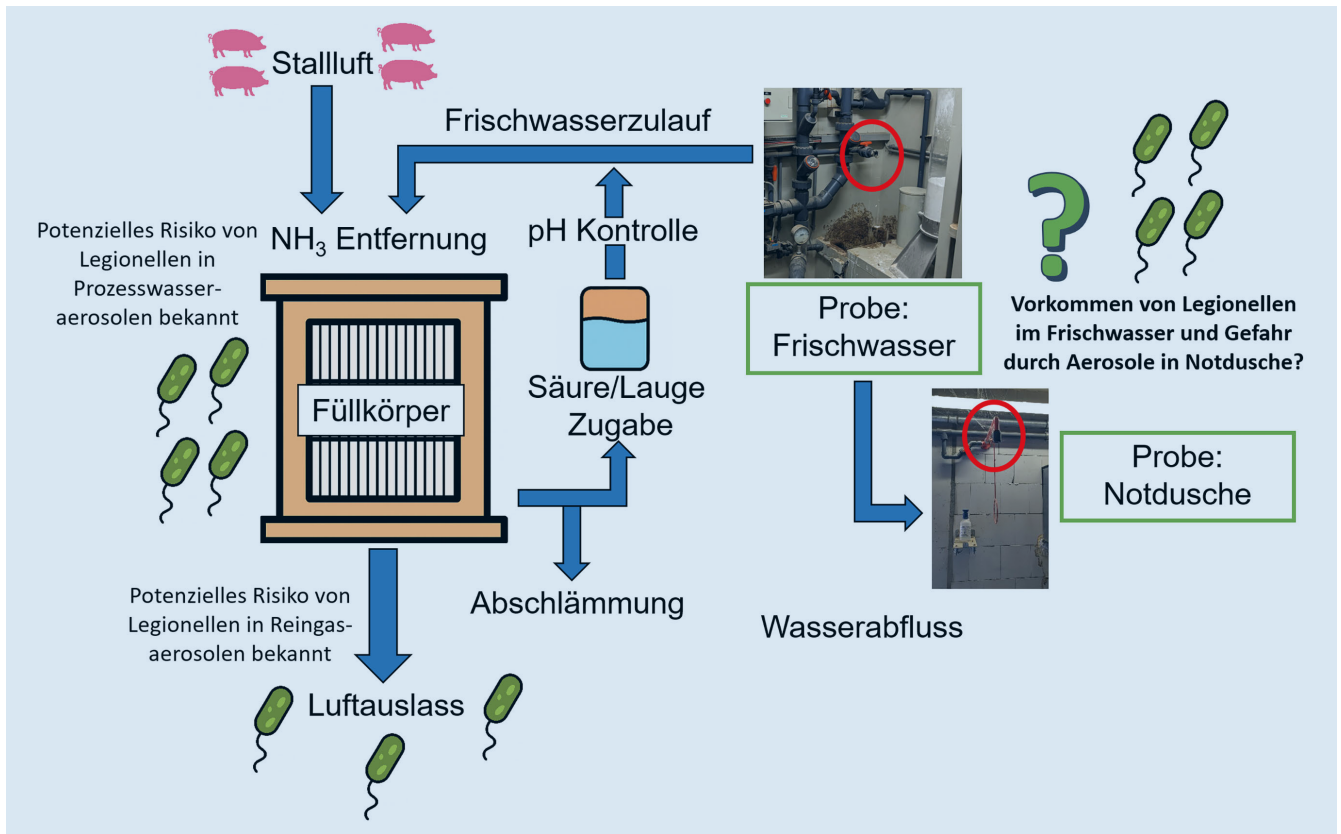
Vergangene Studien haben gezeigt, dass die Bedingungen in Abluftreinigungsanlagen von Schweinemastbetrieben auch zur Besiedlung mit unerwünschten Bakterien führen können [8; 9]. Ein prominentes Beispiel stellen humanpathogene Legionellen (*Legionella* spp.) dar, insbesondere *Legionella pneumophila*

(*L. pneumophila*), die aufgrund ihrer hohen Pathogenität aus Sicht des umweltbezogenen Gesundheitsschutzes als besonders relevant gelten [9; 10]. Legionellen sind ubiquitäre Umweltbakterien, die sowohl im Trinkwasser als auch in anderen Wasserinstallationen wie Duschen, Kühltürmen [11; 12; 13] und Verdunstungsrückkühlanlagen [14] vorkommen. Unter günstigen Bedingungen wie Temperaturen zwischen 25 und 45 °C, Stagnation und Nährstoffverfügbarkeit können sie sich stark vermehren [9]. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Notduschen als kritisch anzusehen.

Das Vorhandensein von Legionellen in den Filteranlagen hat Walser et al. [8] bereits im Jahr 2017 in einer Pilotstudie dargestellt. 2024 wurden die Befunde einer umfassenden Analyse veröffentlicht, bei denen drei verschiedene Filteranlagen von Schweinemastbetrieben in einem Zeitraum von über einem Jahr regelmäßig beprobt wurden [9]. Da sich die Kulturmethode nach EN ISO 11731 [15] durch die hohe Begleitflora als unbrauchbar herausstellte, wurde die Konzentration an *Legionella* spp. und *L. pneumophila* in dem vom BLE finanzierten Forschungsprojekt „Legionellen in landwirtschaftlichen Abluftreinigungsanlagen (LiLA)“ mit zwei orthogonalen kulturunabhängigen quantitativen Methoden bestimmt. Dabei wurden in allen drei Anlagen, sowohl im Sommer, Winter und den Zwischensaisons, *Legionella* spp. und *L. pneumophila* nachgewiesen, ebenso intakte *L. pneumophila*. In der untersuchten Wasserphase (Prozesswasser) wurde dabei die höchste Konzentration festgestellt, mit bis zu  $2,9 \times 10^5$  *Legionella* spp. Zellen/mL. Zusätzlich wurden die Abluft aus den Ställen (Rohgas) und die gereinigte Abluft (Reingas) nach der letzten Filterstufe beprobt. Im Reingas wurden dabei bis zu 9 500 *Legionella* spp. Zellen/m<sup>3</sup> nachgewiesen, während die Rohgasproben fast immer negativ waren. Dies führte zu der Vermutung, dass die Legionellen aus dem Prozesswasser in das Reingas gelangen [9]. Die Tierställe selbst wurden als Quelle der Legionellen eher ausgeschlossen. Wahrscheinlicher war, dass die Legionellen über das eingespeiste Trinkwasser in die Anlagen gelangen.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, erstens potenzielle Eintragspfade von Legionellen in Abluftreinigungsanlagen aufzudecken und zweitens weitere potenzielle Infektionsquellen zu identifizieren. Hierzu wurden in zwei Schweinemastbetrieben gezielt Wasserproben aus den Frischwasserzuflüssen entnommen, die sowohl für Notduschen als auch für die Filtersysteme (Prozesswasser) genutzt werden. Darüber hinaus erfolgte eine Untersuchung von Wasserproben aus vorhandenen Notduschen. Eine Übersicht der Probennahmestellen ist in **Bild 1** dargestellt.

Um mögliche Veränderungen der Proben während des Transports zu vermeiden, wurden ergänzend zur Laboranalyse auch Vor-Ort-Messungen durchgeführt. Hierfür kam ein mobiles Analysesystem zum Einsatz, das die Durchflussszytometrie mit einer IMS-FCM-Methode und die Quantifizierung lebensfähiger *L. pneumophila* der Serogruppen (Sg) 1 bis 15 ermöglicht. Ergänzend wurden die Proben im Labor mittels SA-qPCR [16] auf Gesamtzellzahlen von *Legionella* spp. sowie *L. pneumophila* Sg 1 untersucht. Darüber hinaus erfolgte vor Ort die Bestimmung der allgemeinen bakteriellen Belastung durch Bestimmung der intakten Gesamtkeimzahl mittels FCM, um den mikrobiologischen Gesamtstatus zu erfassen.



**Bild 1** Schematische Übersicht der Probennahme-Orte in Abluftreinigungsanlagen in Schweinemastbetrieben zur Untersuchung der Frischwasserquellen und Notduschen. Während frühere Studien bereits ein potenzielles Gesundheitsrisiko durch Legionellen im Reingas und Prozesswasser identifizierten, ist die Untersuchung des Frischwassers noch ausstehend. Dieses könnte sowohl den Eintrag von Legionellen in die Abluftreinigungsanlagen verursachen als auch durch Notduschen ein weiteres direktes Gesundheitsrisiko darstellen. Grafik: Autoren, [9]

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Messmethoden

Zur Bewertung potenzieller mikrobiologischer Belastungen in technischen Wassersystemen von Abluftreinigungsanlagen wurden in zwei Schweinemastbetrieben systematisch Wasserproben aus Frischwasserzuflüssen und Notduschen entnommen. Die Proben wurden zum einen direkt vor Ort mittels IMS-FCM untersucht, um lebensfähige *Legionella pneumophila* (Sg 1 bis 15) und die Gesamtzellzahl intakter Mikroorganismen zu quantifizieren. Für die IMS-FCM wurde die Probe zuerst mit *Legionellen pneumophila* spezifischen Antikörpern inkubiert, um diese dann durch immunomagnetische Separation von der Begleitflora abzutrennen. Die Quantifizierung erfolgte durch Durchflusszytometrie. Zusätzlich konnten durch Zugabe eines DNA-bindenden Farbstoff jene Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden, die keine intakte Zellmembran aufweisen und bei denen der Farbstoff in die Zelle eindringen konnte. Diese Zellen wurden dann als nicht intakt und nicht mehr infektiös eingestuft. Ergänzend erfolgte im Labor eine molekularbiologische Analyse mittels SA-qPCR, mit der die Gesamtzellzahlen von *Legionella spp.* sowie *L. pneumophila* Sg 1 bestimmt wurden. Dieses Verfahren kombiniert klassische qPCR, bei der DNA spezifisch von Legionellen detektiert wird, mit einem Standardadditionsverfahrens, bei dem bekannte Konzentrationen an Legionellen in die Probe gegeben werden, damit eine

Konzentrationsbestimmung in sehr komplexen Matrices möglich wird. Durch die Kombination beider kulturunabhängiger Methoden konnte sowohl die Legionellen-Belastung quantifiziert als auch die Vitalität bestimmt werden.

### 2.2 Kryokonservierte Bakterienstandards für die SA-qPCR

Die Kryokonservierung von lebensfähigen *L. pneumophila* Sg 1 Subtyp Bellingham wurde mithilfe einer standardisierten, an anderer Stelle bereits ausführlich beschriebenen Methode durchgeführt [17]. Dadurch wurde sichergestellt, dass reproduzierbare und genau definierte Zellkonzentrationen für die Versuchsansätze zur Verfügung standen. Die Qualitätskontrolle wurde zweimal mithilfe von Durchflusszytometrie durchgeführt: nach der Kultivierung im Nährmedium und erneut nach der Adaptation in Mineralwasser. In beiden Fällen kam das Gerät qmicro.COUNT (Fa. qmicro) zum Einsatz, um die Gesamtzellzahl (TCC), die Gesamtanzahl an *L. pneumophila* Sg 1 bis 15 (TLC) sowie die Anzahl intakter *L. pneumophila* Sg 1 bis 15 (ILC) zu bestimmen. Die Kryokonservierungslösung bestand aus 2 x PBS (5,4 mM KCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,27 M NaCl, pH 7,0), ergänzt mit 10 g/L BSA (Fa. Sigma Aldrich) und 120 g/L Dextran 40 (Fa. Sigma Aldrich). Die kryokonservierten Standards wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert und direkt nach dem Auftauen bei Raumtemperatur für die Experimente verwendet.

### 2.3 SA-qPCR

Das genaue Verfahren der SA-qPCR ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben [16]. Anstelle der Verwendung von DNA-Kalibrierstandards wird bei der SA-qPCR ein lebensfähiger, kryokonservierter Bakterienstandards verwendet, um Konzentrationen in der Einheit Zellen pro Milliliter statt genomischer Einheiten pro Milliliter zu quantifizieren. Definierte Zellkonzentrationen (vier bis fünf verschiedene Konzentrationen, sogenannte Dosierpunkte) von *L. pneumophila* Sg 1 Subtyp Bellingham wurden direkt in jede Probe hinzugefügt (sogenanntes Spiking). Die Zellkonzentration in einer Probe wurde mithilfe eines Standard-Addition-Algorithmus berechnet, der in Pang et al. [18] beschrieben und für logarithmische Systeme geeignet ist. Dieser Algorithmus wurde für die Auswertung der SA-qPCR angepasst. Das Prinzip besteht darin, die unbekannte Zellkonzentration des Zielorganismus ( $U$ ) in einer Probe zu schätzen, da nur die zugesetzte Menge bekannt ist, nicht aber die bereits in der Probe vorhandene Legionellen-Konzentration. Die Legionellen-Konzentration  $U$  in der Probe wird dann so lange variiert, bis der Datenpunkt der Probe und die Datenpunkte der hinzugefügten Proben ein lineares Verhalten zeigen. Da die hinzugefügten Konzentrationen so gewählt wurden, dass sie im linearen Bereich des verwendeten qPCR-Systems liegen, wird der wahre Wert von  $U$  ermittelt, wenn die Linearität ( $R^2$ ) am höchsten ist [16; 18].

Alle Experimente wurden mit dem qPCR-Kit „microproof Legionella Quantification LyoKit“ (Fa. Hygiene Diagnostics) durchgeführt. Die Experimente wurden auf dem Gerät „qTower<sup>3</sup>G“ (Analytik Jena) durchgeführt.

Für jedes Experiment wurden 25 µl DNA-Extrakt gemäß der Anleitung der Fa. Hygiene Diagnostics in die qPCR-Ansatzmischung eingebracht. Eine Negativkontrolle (PCR- $H_2O$ ) wurde in jeden Lauf eingebunden. Die thermischen Zyklusbedingungen erfolgten laut Handbuch und begannen mit einer Vorinkubation bei 37 °C für vier Minuten und 95 °C für fünf Minuten. Anschließend folgten 50 Amplifikationszyklen mit drei Schritten: Schritt 1 bei 95 °C für fünf Sekunden, Schritt 2 bei 60 °C für 60 Sekunden und Schritt 3 bei 72 °C für 60 Sekunden. Die Fluoreszenzmessung erfolgte während Schritt 2 und umfasste drei Fluoreszenzkanäle: Cy5 (interne Kontrolle), HEX (*Legionella* spp.) und ROX (*L. pneumophila* Sg 1). Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung gemessen.

### 2.4 Probenvorbereitung für die SA-qPCR

Zur DNA-Extraktion wurde zunächst eine 1-ml-Probe bei 8 000 xg für fünf Minuten zentrifugiert, um die Zellen in einem Pellet zu konzentrieren. Dieses Pellet wurde anschließend mit dem „foodproof StarPrep Two Kit“ (Verfahren B) der Fa. Hygiene Diagnostics weiterverarbeitet. Die Methode kombiniert mechanische- und Hitzebehandlung zur effektiven Zellyse. Nach der Lyse wurde eine zweite Zentrifugation durchgeführt, und 100 µl des resultierenden Überstands wurden für die weitere Analyse entnommen. Die extrahierte DNA wurde bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag weiterverwendet.

### 2.5 Messung mit der IMS-FCM

Die Quantifizierung von lebensfähigen *L. pneumophila* Sg 1 bis 15 erfolgte mithilfe der IMS-FCM auf dem „rqmicro.Count-Sys-

tem“ (Fa. rqmicro). Die Anzahl intakter *L. pneumophila* Sg 1 bis 15 wurde unter Verwendung des Kits „rqmicro Legionella Kit L.p. SG1-15 Detect Kit“ (31102) ermittelt, basierend auf einer leicht modifizierten Version des Herstellerprotokolls. Anstelle der Anreicherung durch Filtration von 100 ml wurden 50 ml Probe durch einen Vorfilter mit 5 µm Porengröße (39002, Fa. rqmicro) gefiltert und anschließend auf einem sterilen Filter mit 0,22 µm Porengröße (39001, Fa. rqmicro) gesammelt.

Die Anzahl intakter Gesamtbakterienzellen wurde mithilfe des „rqmicro Intact Cell Count Kits“ (30020) gemäß der Anleitung im Kit-Handbuch gemessen. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Probe nach der Filtration im Verhältnis 1:100 verdünnt.

### 2.6 Probennahme

Für die Frischwasserproben wurden 500 ml Wasser aus dem Frischwasserauslass, der zur Speisung des APS verwendet wird, in eine sterile 500-ml-PE-Flasche gefüllt. Vor der Probenahme wurde das System 30 Sekunden lang gespült. Für die Notduschenproben wurden 500 ml Wasser direkt ohne vorheriges Spülen in eine sterile 500-ml-PE-Flasche abgefüllt, damit direkt die Bakterienlast nach Betätigung der Notdusche erfasst wird.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Beurteilung der Frischwasserzuläufe und Notduschen auf Gesamtkeimzahl

In zwei Schweinemastbetrieben wurden Vor-Ort-Messungen durchgeführt, bei denen eine bekannte Kontamination der APS mit Legionellen vorlag [9]. Gegenstand der Untersuchung waren sowohl das Frischwasser, das als Prozesswasser in den Filteranlagen eingesetzt wurde, als auch stagnierendes Wasser aus Notduschen, die aus derselben Wasserquelle gespeist wurden.

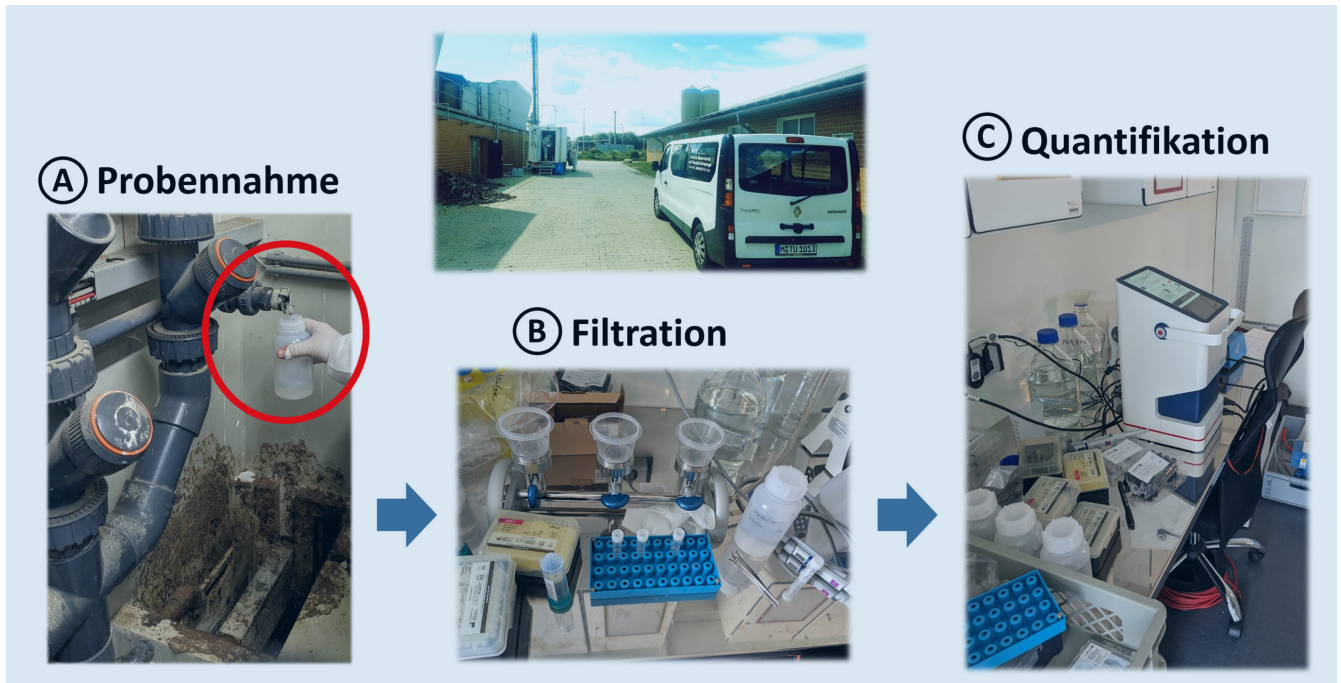
Im ersten Betrieb wurde die Abluftreinigungsanlage über einen regulären Trinkwasseranschluss versorgt, während im zweiten Betrieb eine betriebseigene Quellwasserleitung zum Einsatz kam.

Zur Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden jeweils 50 ml der Wasserproben entnommen. Diese wurden zunächst über einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 5 µm vorfiltriert und anschließend über einen weiteren Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert. Eine speziell angefertigte Filterapparatur ermöglichte die Kombination beider Filtrationschritte in einem Prozess, sowie die parallele Bearbeitung von bis zu drei Proben. Der schematische Ablauf der Vor-Ort-Analyse im mobilen Labor ist in **Bild 2** dargestellt.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Gesamtanzahl lebensfähiger Mikroorganismen im Frischwasser, um eine Bewertung des allgemeinen hygienischen Zustands der Wasserzufuhr vorzunehmen (**Tabelle 1**).

Die mittels IMS-FCM ermittelten Zellzahlen lagen in den Frischwasserproben bei bis zu  $5,3 \times 10^6$  Zellen/50 ml. Die Ergebnisse der beiden Betriebe zeigten dabei vergleichbare Konzentrationen.

Gemäß der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) darf Trinkwasser eine Gesamtkeimzahl von 100 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Milliliter nicht überschreiten [19]. Dies entspricht 5 000 KBE/50 ml. Die mittels FCM ermittelten Zellzahlen über-



**Bild 2** Vor-Ort-Messungen mit der Durchflusszytometrie in einem mobilen Labor auf einem Schweinemastbetrieb. A: Probennahme von Frischwasser, das für die Notduschen und die Abluftreinigungsanlage verwendet wird (APS). B: Filtration von 50 ml mit einem Vorfilter ( $\varnothing 5 \mu\text{m}$ ), und Sterilfilter ( $\varnothing 0,22 \mu\text{m}$ ). C: Quantifikation mittels IMS-FCM (Legionellenmessung) oder FCM (Gesamtzellzahlmessung) mit dem „rqmicro.count“-Messgerät. Grafik: Autoren

stiegen diesen Grenzwert um den Faktor 1 000. Dabei ist zu berücksichtigen, dass KBE und Zellzahlen nicht direkt vergleichbar sind, da bestimmte Bakterien auf Agarplatten nicht kultivierbar sind, jedoch weiterhin lebensfähig sein können (sogenannter VBNC-Zustand – viable but non-culturable). Da die FCM-Methode ausschließlich lebensfähige Zellen erfasst, kann dennoch festgehalten werden, dass das Frischwasser eine erhebliche mikrobiologische Belastung aufweist und als hygienisch bedenklich einzustufen ist.

In Betrieb 1 ist diese Belastung vermutlich auf alterungsbedingte Prozesse im Leitungssystem wie Biofilmbildung zurückzuführen. In Betrieb 2 ist zu berücksichtigen, dass kein Trinkwasser, sondern unbehandeltes Quellwasser verwendet wird, das typischerweise eine höhere natürliche Keimbelastung aufweist.

Die Gesamtzellzahlen in den Notduschen wurde mit  $6,3 \times 10^6$  Zellen/50 ml in Betrieb 1 sowie  $7,6 \times 10^7$  Zellen/50 ml in Betrieb 2 bestimmt und lagen mit einem Faktor von 10 beziehungsweise 100 deutlich über den Werten der Frischwasserzufuhr. In beiden Betrieben wurden die Notduschen seit mindestens mehreren Monaten nicht mehr gespült. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das in den nicht-gespülten Leitungen der Notduschen stagnierende Wasser ein begünstigendes Milieu für das Wachstum von Mikroorganismen darstellt.

### 3.2 Beurteilung der Frischwasserzuläufe und Notduschen auf die Legionellenbelastung

Die Proben, die im vorherigen Kapitel auf die Gesamtanzahl lebensfähiger Mikroorganismen untersucht wurden, wurden anschließend auch auf das Vorkommen von *L. pneumophila* der Sg 1 bis 15 mittels IMS-FCM analysiert. Die Erstanalytik für das Frischwasser erfolgte unmittelbar vor Ort im mobilen Labor. Die

Proben der Notdusche wurden am Folgetag im Forschungslabor vermessen.

Zur ergänzenden molekularbiologischen Diagnostik wurden die Proben auch mittels der SA-qPCR im Labor analysiert. Mit dieser Methode wurden sowohl die Gesamtzellzahlen von *Legionella* spp. als auch spezifisch von *L. pneumophila* Sg 1 bestimmt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse beider Nachweismethoden ist in **Tabelle 2** dargestellt.

Für die Bewertung der Ergebnisse ist es wesentlich, die methodischen Unterschiede zwischen IMS-FCM und SA-qPCR zu berücksichtigen. Während die SA-qPCR entweder die Gesamtzellzahl von *Legionella* spp. oder die spezifische Konzentration von *L. pneumophila* Sg 1 quantifiziert, erfasst das IMS-FCM ausschließlich lebensfähige *L. pneumophila* der Sg 1 bis 15. Daraus ergeben sich zwei zentrale Erwartungen: Erstens sollten die mit SA-qPCR bestimmten Konzentrationen von *Legionella* spp. grundsätzlich höher sein als die mit IMS-FCM erfassten Zellzahlen, da *L. pneumophila* nur eine Teilmenge der Gattung *Legionella* darstellt. Zweitens ist bei intakten Zellen zu erwarten, dass IMS-FCM höhere Zellzahlen liefert als die SA-qPCR für *L. pneumophila* Sg 1, da hier zusätzlich die Sg 2 bis 15 erfasst werden.

In mehreren Fällen entsprachen die Messergebnisse diesen Erwartungen. So wurde in der Duschwasserprobe von Betrieb 1 gemäß SA-qPCR eine Konzentration von *L. pneumophila* Sg 1 von  $1,6 \times 10^4$  Zellen/50 ml bestimmt, während mittels IMS-FCM lediglich 1 270 lebensfähige Zellen/50 ml gemessen wurden. Die Differenz lässt sich durch die Beschränkung der IMS-FCM auf intakte Zellen erklären, da abgestorbene Mikroorganismen nicht detektiert werden. Die hohe Gesamtzellzahl von *Legionella* spp. ( $3,5 \times 10^4$  Zellen/50 ml) wies darüber hinaus auf eine erhebliche Anzahl nicht-intakter Zellen hin, die ausschließlich durch die SA-qPCR erfasst wurde.

**Tabelle 1** Gesamtlebendkeimzahl gemessen mit auf dem „rqmicro.count“-Durchflusstyotmeter in Frischwasser und Notduschen auf zwei Schweinemastbetrieben. Alle Proben wurden direkt vor Ort im mobilen Labor analysiert.

| Betrieb 1            |                              |                              |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Probentyp            | Frishwasser                  | Notdusche                    |
| Gesamtlebendkeimzahl | 5,3 x 10 <sup>6</sup> /50 ml | 6,3 x 10 <sup>6</sup> /50 ml |
| FCM-Rohdaten         |                              |                              |
|                      |                              |                              |
| Betrieb 2            |                              |                              |
| Probentyp            | Frishwasser                  | Notdusche                    |
| Gesamtlebendkeimzahl | 5,1 x 10 <sup>6</sup> /50 ml | 7,6 x 10 <sup>7</sup> /50 ml |
| FCM-Rohdaten         |                              |                              |
|                      |                              |                              |

Auch die Ergebnisse der Notduschprobe aus Betrieb 2 entsprachen den Erwartungen: Die mit IMS-FCM ermittelte Konzentration an lebensfähigen *L. pneumophila* (2 580 Zellen/50 ml) liegt unterhalb der mit SA-qPCR gemessenen Gesamtzellzahl von *Legionella* spp. (4 691 Zellen/50 ml), was auf eine Mischung aus intakten und nicht-intakten Zellen hinweist.

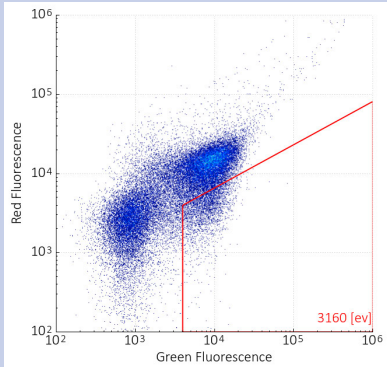
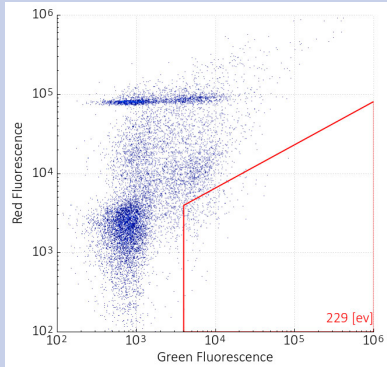
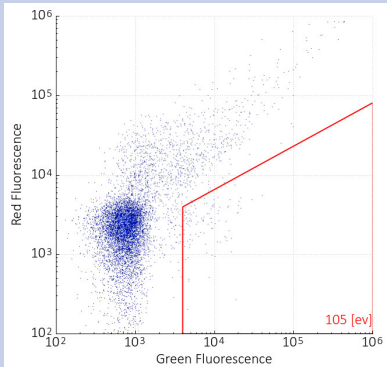
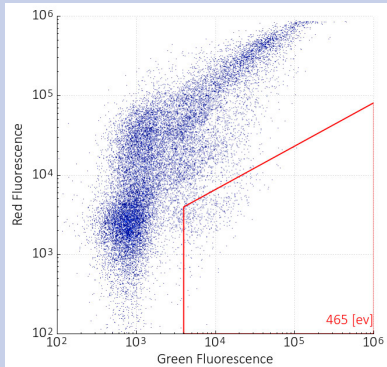
In der Frishwasserprobe von Betrieb 2 zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Abweichungen. Die nahezu identischen Zellzahlen von 582 Zellen/50 ml (IMS-FCM) und 682 Zellen/50 ml (SA-qPCR für *Legionella* spp.) deuten auf eine Population überwiegend intakter *L. pneumophila*-Zellen hin. Es konnte jedoch keine *L. pneumophila* Sg 1 nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass überwiegend andere Serogruppen vorlagen.

Eine Abweichung von den erwarteten Relationen zeigte sich in der Frishwasserprobe von Betrieb 1. Hier überstieg die mittels IMS-FCM ermittelte Konzentration lebensfähiger *L. pneumophila* (1,8 × 10<sup>4</sup> Zellen/50 ml) sowohl die SA-qPCR-Ergebnisse für *L. pneumophila* Sg 1 (1 030 Zellen/50 ml) als auch die Gesamt-

zellzahl von *Legionella* spp. (7 827 Zellen/50 ml). Dieses Ergebnis widerspricht der Erwartung, dass *L. pneumophila* eine Teilmenge der Gattung *Legionella* darstellt. Eine plausible Erklärung hierfür könnte im Probentransport begründet liegen: Während des Transports können Zellen absterben, wobei die freigesetzte DNA in Lösung übergeht. Bei der DNA-Extraktion im Rahmen der SA-qPCR wurde jedoch der Überstand verworfen und lediglich das Zellpellet verarbeitet. Freie DNA aus lysierten Zellen wurde somit nicht berücksichtigt. Nicht mehr lebensfähige, jedoch noch intakte Zellen wurden durch SA-qPCR zwar erfasst, freie DNA hingegen nicht.

Mit beiden Nachweismethoden konnten Legionellen sowohl im Frishwasserzulauf als auch in den Notduschenproben nachgewiesen werden. Neben *Legionella* spp. wurden insbesondere auch für die menschliche Gesundheit relevante, lebensfähige *L. pneumophila*-Zellen detektiert. Die Zellzahlen in den Notduschen lagen – erwartungsgemäß – über denen der Frishwasserproben.

**Tabelle 2** Zusammenfassung von intakten *L. pneumophila* Sg 1 bis 15 quantifiziert mit der IMS-FCM als auch Gesamtzahl von *Legionella* spp. und Gesamtzahl von *L. pneumophila* Sg 1 mit der SA-qPCR im Frischwasserzulauf und den Notduschen aus zwei Schweinemastbetrieben. Die zwei Betriebe wiesen in vergangenen Untersuchungen bereits Legionellen in den Abluftreinigungsanlagen auf. Die mit der IMS-FCM gemessenen Frischwasserproben wurden direkt vor Ort vermessen, während die Notduschen-Proben als auch die SA-qPCR Analyse am Folgetag im Labor durchgeführt wurden.

| Betrieb 1                                                              |                                                                                      |                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Probentyp                                                              | Frischwasser                                                                         | Notdusche                                                                             |
| IMS-FCM – Konzentration von intakten <i>L. pneumophila</i> Sg 1 bis 15 | 1,8 x 10 <sup>4</sup> /50 ml (vor Ort)                                               | 1 270/50 ml                                                                           |
| IMS-FCM-Rohdaten                                                       |    |    |
|                                                                        | SA-qPCR – Gesamtzahl von <i>Legionella</i> spp.                                      | 7 827/50 ml                                                                           |
|                                                                        | SA-qPCR – Gesamtzahl von <i>L. pneumophila</i> Sg 1                                  | 1 030/50 ml                                                                           |
| Betrieb 2                                                              |                                                                                      |                                                                                       |
| Probentyp                                                              | Frischwasser                                                                         | Notdusche                                                                             |
| IMS-FCM – Konzentration von intakten <i>L. pneumophila</i> Sg 1 bis 15 | 582/50 ml (vor Ort)                                                                  | 2 580/50 ml                                                                           |
| IMS-FCM-Rohdaten                                                       |  |  |
|                                                                        | SA-qPCR – Gesamtzahl von <i>Legionella</i> spp.                                      | 682/50 ml                                                                             |
|                                                                        | SA-qPCR – Gesamtzahl von <i>L. pneumophila</i> Sg 1                                  | Nicht detektiert                                                                      |

4 Schlussfolgerung und Empfehlung

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass sowohl die Frischwasserzulaufe als auch die Notduschen mikrobiologisch belastet waren. Dabei waren nicht nur die Gesamtkeimzahlen erhöht, sondern es wurden auch humanpathogene Legionellen in allen untersuchten Proben nachgewiesen. Es konnten auch intakte *L. pneumophila* nachgewiesen werden, die besondere Relevanz für die Gesundheit haben, weil sie potenziell vermehrungsfähig sind. Das Frischwasser wurde als potenzielle Quelle für die Legionellen

in den Abluftreinigungsanlagen identifiziert, wobei besonders die Notduschen auf den landwirtschaftlichen Betrieben ein arbeitsschutzrechtliches Risiko für das Betriebspersonal darstellen, wenn sie nicht regelmäßig gespült werden.

Die Anwendung der IMS-FCM-Methode im mobilen Labor hat sich als effiziente und praxisnahe Strategie zur Vor-Ort-Erkennung hygienischer Schwachstellen erwiesen. In Kombination mit laborbasierten Standardadditions-qPCR-Verfahren konnte ein belastbares Gesamtbild der mikrobiologischen Wasserqualität gewonnen werden.

Das Risiko einer Legionellen-Kontamination könnte durch einfache Maßnahmen zukünftig deutlich reduziert werden. Die Betreiber von Abluftreinigungsanlagen sollten folgende Maßnahmen ergreifen:

- Notduschen regelmäßig spülen: mindestens einmal pro Monat, besser häufiger, um Stagnation des Wassers zu vermeiden. (Vor allem für die erste Spülung einer länger nicht benutzten Notdusche ist ein nach DIN EN ISO 17025 akkreditiertes und zugelassenes Labor zu beauftragen. Diese verfügen über speziell geschultes Personal, das sowohl die Erstspülung der Notdusche übernehmen, als auch zur Sicherheit eine Wasseruntersuchung auf Legionellen durchführen kann).
- Bei Inbetriebnahme die Wasserqualität prüfen: Bei der Inbetriebnahme der Anlage ist darauf zu achten, dass kein legionellenhaltiges Wasser in die Notduschen gelangt. Dies kann durch die Verwendung von aufbereitetem oder frischem Wasser sichergestellt werden. Viele landwirtschaftliche Betriebe verfügen über eigene Brunnen. Hier sollte die Wasserqualität regelmäßig überprüft werden.
- Wartungsprotokolle führen: Ein Protokoll über die regelmäßige Wartung und Spülung der Notduschen sollte geführt werden. Dies dient nicht nur der Hygiene, sondern auch als Nachweis bei Kontrollen.
- Schulung des Personals: Aufklärung des Personals über die Risiken von Legionellen und die Bedeutung einer regelmäßigen Wartung der Notduschen. Gut informiertes Personal kann dazu beitragen, die Sicherheitsstandards im Betrieb zu erhöhen. Die Effektivität der Maßnahmen sollte in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden. Bei Bedarf können auch weitere Maßnahmen wie eine Vorbehandlung des Frischwassers durchgeführt werden, um eine Kontamination der zu verhindern.

## LITERATUR

- [1] Strohmaier, J.C.L.: Exhaust Air Treatment Systems for the Mitigation of Dust, Ammonia and Odour from Poultry Housing. Doctoral dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelm-University, Bonn, 2020.
- [2] Hahne, J.: Die Situation in Der Schweinehaltung. Institut für Agrartechnologie. <https://www.thuenen.de/de/themenfelder/klima-und-luft/abluftreinigung-in-tierstaellen/die-situation-in-der-schweinehaltung> (Zugriff am 11. Juni 2025)
- [3] DLG – Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, Merkblatt 483. Hinweise Zum Betrieb von Abluftreinigungsanlagen Für Die Schweinehaltung, 2023.
- [4] DGUV – Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung, Information 204-022 „Erste Hilfe im Betrieb“, 2017.
- [5] Technische Regel für Gefahrstoffe: Laboratorien (TRGS 526). Ausg. 2/2008. GMBI. (2008) Nr. 15, S. 294
- [6] Bundesamt für Justiz. Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Verwendung von Arbeitsmitteln (Betriebssicherheitsverordnung – BetrSichV), 2025.

- [7] DIN – Deutsches Institut für Normung e. V. Sicherheitsnotduschen – Teil 5: Körperduschen über Kopf mit Wasser Für andere Standorte als Laboratorien; Deutsche Fassung EN 15154-5:2019, 2019.
- [8] Walser, S.M.; Brenner, B.; Wunderlich, A.; Tuschak, C.; Huber, S.J.; Kolb, S.; Niessner, R.; Seidel, M.; Höller, C.; Herr, C.: Detection of legionella-contaminated aerosols in the vicinity of a bio-trickling filter of a breeding sow facility – a pilot study. *Sci. Total Environ.* 575, 1 197-1 202, 2017.
- [9] Schwaiger, G.; Matt, M.; Bromann, S.; Clauß, M.; Elsner, M.; Seidel, M. Rapid: Quantification of Legionella in Agricultural Air Purification Systems from Fattening Pig Houses with Culture-Independent Methods. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 266, 114547, 2025.
- [10] VDI – Verein Deutscher Ingenieure, Richtlinie VDI 4250 Blatt 2 Bioaerosole und Biologische Agenzien – Beurteilung der Gefährdung durch Legionellenhaltige Aerosole aus Sicht des Umweltbezogenen Gesundheitsschutzes und der Prävention; VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) – Normenausschuss. <https://www.beuth.de/de/-/298483564> (Zugriff 11 Juni 2025).
- [11] Kiwull, B.; Wunderlich, A.; Herr, C. E. W.; Nießner, R.; Seidel, M. Bioaerosolkammer für Legionellenhaltige Duschaerosole. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft*, 76 (9-September), 344-350, 2016.
- [12] Mouchtouri, V. A.; Goutziana, G.; Kremastinou J.; Hadjichristodoulou, C.: Legionella species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures, *Am. J. Infect. Control*, 38(1), 50-55, 2010.
- [13] Paranjape, K.; Bédard, É.; Whyte, L. G.; Ronholm, J.; Prévost, M.; Faucher, S. P.: Presence of Legionella spp. in cooling towers: The role of microbial diversity, Pseudomonas, and continuous chlorine application, *Water Res.*, 169, 115252, 2020.
- [14] Crook, B.; Willerton, L.; Smith, D.; Wilson, L.; Poran, V.; Helps, J.; McDermott, P.: Legionella risk in evaporative cooling systems and underlying causes of associated breaches in health and safety compliance, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 224, 113425, 2020.
- [15] DIN – Deutsches Institut für Normung. Wasserbeschaffenheit – Zählung von Legionellen, DIN EN ISO 11731:2019-03, 2019.
- [16] Schwaiger, G.; Matt, M.; Streich, P.; Bromann, S.; Clauß, M.; Elsner, M.; Seidel, M.: Standard Addition Method for Rapid, Cultivation-Independent Quantification of Legionella pneumophila Cells by qPCR in Bio-trickling Filters. *Analyst*, 149 (10), 2978-2987, 2024.
- [17] Heining L.; Welp, L.; Hugo A.; Elsner M.; Seidel, M.: Immunomagnetic separation coupled with flow cytometry for the analysis of Legionella pneumophila in aerosols, *Anal. Bioanal. Chem.*, 415, 5 139-5 149, 2023.
- [18] Pang S.; Cowen, S.: A generic standard additions based method to determine endogenous analyte concentrations by immunoassays to overcome complex biological matrix interference, *Sci. Rep.*, 7(1), 17542, 2017.
- [19] Bundesamt für Justiz. Trinkwasserverordnung (TrinkwV). BGBl. I Nr. 159, S. 2. 2023. [https://www.gesetze-im-internet.de/trinkwv\\_2023/TrinkwV.pdf](https://www.gesetze-im-internet.de/trinkwv_2023/TrinkwV.pdf) (Zugriff am 15 Juni 2025).

**Dr. rer. nat. Marcus Clauß**

Thünen-Institut für Agrartechnologie, Braunschweig.

**PD Dr. rer. nat. habil Michael Seidel,**

**M.Sc. Gerhard Schwaiger,**

**Prof. Dr. Martin Elsner**

Institute of Water Chemistry, Technische Universität, München.