UMWELT & GESUNDHEIT
05/2020

Inaktivierung von Bioziden bei der Probenahme zur Legionellenanalytik in Kühlwässern von Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen

Abschlussbericht

Für Mensch & Umwelt

Umwelt Bundesamt

UMWELT & GESUNDHEIT 05/2020

Ressortforschungsplan des Bundesministerium für
Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit

Forschungskennzahl 3717 62 280 0
FB000288

Inaktivierung von Bioziden bei der Probenahme zur Legionellenanalytik in Kühlwässern von Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen

Abschlussbericht

von

Andreas Nocker, Gabriela Schaule, Martin Strathmann,
Kathrin Wiede
IWW Zentrum Wasser, Mülheim an der Ruhr

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber
Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
info@umweltbundesamt.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

/umweltbundesamt.de
/umweltbundesamt

Durchführung der Studie:
IWW Zentrum Wasser
Moritzstraße 46
45476 Mülheim an der Ruhr

Abschlussdatum:
März 2019

Redaktion:
Fachgebiet II 1.4 Mikrobiologische Risiken
Dr. Regine Szewzyk

Publikationen als pdf:
http://www.umweltbundesamt.de/publikationen

ISSN 1868-4340

Dessau-Roßlau, Oktober 2020

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung: Inaktivierung von Bioziden bei der Probenahme zur Legionellenanalytik in Kühlwässern von Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen

Zur Überwachung des von Verdunstungskühlanlagen ausgehenden mikrobiologisch-hygienischen Risikos müssen nach der 42. Bundesimmissionsschutzverordnung regelmäßig Wasserproben zur Bestimmung der darin enthaltenen Legionellen entnommen werden. Ziel ist die Abbildung der Legionellenkonzentrationen zum Zeitpunkt der Probenahme. Die Voraussetzung dafür ist, dass die im Kühlwasser enthaltenen Biozide bei der Probenahme effizient inaktiviert werden, damit sie nicht während des Transportes und der Lagerung der Proben weiterhin ihre Wirkung entfalten und zu einem Minderbefund der Legionellenkonzentration führen. Im Moment wird nur eine Inaktivierung von oxidativen Bioziden durch das in den Probenahmeflaschen vorgelegte Natriumthiosulfat erzielt.

Ziel des Projektes war es, für im Markt übliche, nicht-oxidierende Biozide geeignete Neutralisierungssubstanzen zu identifizieren, die keine Schädigung der Legionellen und der Begleitflora zur Folge haben. Es wurde eine Mischung von Substanzen identifiziert, die die biozide Wirkung von Isothiazolinonen, DBNPA, quaternären Ammoniumstrukturen sowie von Bronopol effizient neutralisieren konnte. Die Neutralisierungssubstanzen hatten keine oder eine nur geringfügige nachteilige Wirkung auf die Kultivierbarkeit von *Legionella pneumophila* Serogruppe 2-14, *Legionella anisa* sowie eines aus Kühlwasser isolierten *Legionella* spp. Stammes. Die Wirkung aller genannten Biozide in den üblichen Konzentrationsbereichen konnten in diesen Fällen effizient neutralisiert werden. *Legionella pneumophila* DSM 7513 (als Vertreter der Serogruppe 1 und einziges Nicht-Umweltisolat) auf der anderen Seite war empfindlich gegenüber der Neutralisierungsmischung, vor allem die Inaktivierung von DBNPA und Isothiazolinonen war in diesem Fall unbefriedigend. Da es sich hier um ein Lungenisolat handelt, das sich schon lange in der Stammsammlung befindet, bedarf es der Untersuchung weiterer Vertreter der Serogruppe 1 und gegebenenfalls einer weiteren Optimierung der Neutralisierungsmischung.

Abstract: Inactivation of biocides during sampling for quantification of Legionella in cooling waters from evaporative cooling systems and cooling towers

The microbiological hygienic surveillance of cooling systems is accomplished by sampling water in regular intervals to determine the concentration of *Legionella*. Prerequisite is the efficient neutralization of biocides at the time point of samples to avoid prolonged biocidal action against *Legionella* during transport and storage. Currently only oxidative biocides are inactivated by the presence of sodium thiosulfate in sampling bottles.

Aim of this project was to identify substances capable of neutralizing commonly applied non-oxidizing biocides. A mixture of chemicals was assembled that successfully inhibited the biocidal effects of isothiazolinones, DBNPA, quaternary ammonium compounds and bronopol. The neutralizing compounds had no or only minimal impact on the viability of *Legionella pneumophila* serogroup 2-14, *Legionella anisa* and a *Legionella* spp. cooling tower isolate. For all three, efficient neutralization of all tested biocides was achieved. *Legionella pneumophila* DSM 7513 (as representative of serogroup 1 and the only non-environmental isolate) on the other hand proved susceptible to the neutralization mixture, no satisfactory neutralization, mainly of DNPA and isothiazolinones, could be accomplished in case of this species. As this species is an isolate from human lung tissue and has been in the culture collection for many years, further research will be required to test whether the susceptibility also holds true for other representatives of serogroup 1. If necessary, further optimization of neutralization mixture would be required.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ... 8
Tabellenverzeichnis ... 8
Abkürzungsverzeichnis ... 9
Zusammenfassung ... 10
Summary ... 14
1 Einleitung und Problemstellung ... 18
2 Problem- und Aufgabenstellung ... 19
3 Material und Methoden ... 20
3.1 Bakterienstämme ... 20
3.2 Nährmedien ... 20
3.3 Chemikalien ... 21
3.4 Geräte ... 21
3.5 Mikrobiologische Verfahren ... 21
3.5.1 Stammhaltung der Bakterien ... 21
3.5.2 Herstellung von Flüssigkulturen ... 21
3.5.3 Wiederfindungsversuche ... 22
4 Auswahl der Biozide ... 24
4.1 Isothiazolinone ... 24
4.2 Dibromnitrilopropionamid (DBNPA) ... 24
4.3 2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol (Bronopol) ... 24
4.4 Quaternäre Ammoniumsalze ... 25
5 Biozidkonzentrationen ... 26
6 Auswahl der Neutralisierungssubstanzen ... 27
7 Prüfung des Einflusses der Biozide und der Neutralisierungssubstanzen auf *Escherichia coli* ... 28
8 Prüfung des Einflusses der Biozide und der Neutralisierungssubstanzen auf Legionellen ... 29
8.1 Versuche mit *Legionella pneumophila* Serogruppe 2-14 ... 29
8.1.2 Neutralisierung von CMIT/MIT ... 30
8.1.3 Neutralisierung von DBNPA ... 31
8.1.4 Neutralisierung von quaternären Ammoniumsalzen ... 31
8.1.5 Neutralisierung von Bronopol ... 33
8.2 Versuche mit anderen Legionellen ... 36
8.2.1 Überprüfung der Neutralisationseffizienz mit *Legionella anisa* ... 36
8.2.2 Überprüfung der Neutralisationseffizienz mit *Legionella pneumophila SG 1* ... 37

8.2.3 Überprüfung der Neutralisationseffizienz mit *Legionella* spp. 39

9 Aktueller Kenntnisstand und Empfehlungen für weitere Untersuchungen 40

10 Referenzen 42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wiederfindung am Beispiel von *Legionella anisa*. 13
Abbildung 2: Neutralisierung von CMIT/MIT (10 mg/L).....30
Abbildung 3: Neutralisierung von DBNPA (4 mg/L).....31
Abbildung 4: Neutralisierung von quaternären Ammoniumsalzen (10 mg/L).....32
Abbildung 5: Neutralisierung von Bronopol (50 mg/L) durch NM 5-9.....34
Abbildung 6: Neutralisierung von Bronopol (50 mg/L) durch NM 10-14.....35
Abbildung 7: Wiederfindung von *Legionella anisa*. 37
Abbildung 8: Wiederfindung von *Legionella pneumophila* SG 1 (DSM 7513).....38
Abbildung 9: Wiederfindung von *Legionella* spp. 39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Finale Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung. 12
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.....20
Tabelle 3: Verwendete Nährmedien 20
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien 21
Tabelle 5: Eingesetzte Biozide mit zugehörigen Konzentrationen.....26
Tabelle 6: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung NM 1.....28
Tabelle 7: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung 2 (NM 2). 30
Tabelle 8: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischungen NM 2-6. 32
Tabelle 9: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischungen NM 5-9. 33
Tabelle 10: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischungen NM 10-14. 35
Tabelle 11: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung NM 15.....36

Abkürzungsverzeichnis

BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
CMIT	Chlormethylisothiazolinon
CFU	Colony forming units
Cu	Kupfer
DBNPA	2,2-Dibrom-2-cyanacetamid
KBE	Koloniebildende Einheiten
MIT	Methylisothiazolinon
NM	Neutralisierungsmischung
NH4 salts	Quaternary ammonium salts
NH4 Salze	Quaternäre Ammoniumsalze
SG	Serogruppe
TSA	Tryptic Soy Agar
TW	Trinkwasser
YEB	Yeast Extract Beef

Zusammenfassung

Verdunstungskühlanlagen unterliegen einer Überwachungspflicht hinsichtlich des Legionellenrisikos. Die wichtigsten Anforderungen der technischen Richtlinie VDI 2047 Blatt 2 wurden durch die 42. Bundesimmissionsschutzverordnung (42. BImSchV) zu gesetzlich verbindlichen Anforderungen. Ziel der Überwachung ist eine Einschätzung des von der jeweiligen Verdunstungskühlanlage ausgehenden mikrobiologisch-hygienischen Risikos. Voraussetzung dafür ist, dass beim Einsatz von Bioziden im Kühlwasser diese bei der Probenahme inaktiviert werden, damit die Biozide nicht auf dem Transport und bei der Lagerung der Proben weiterhin ihre Wirkung entfalten und so zu einem Minderbefund bei der Legionellenkonzentration und somit zu einer Unterschätzung des Gesundheitsrisikos führen. Die Untersuchungsergebnisse sollten den mikrobiologischen Status zum Zeitpunkt der Probenahme reflektieren. Ein Minderbefund sollte nicht nur bei den Legionellen, sondern auch hinsichtlich der Gesamtkoloniezahl vermieden werden.

Oxidative Biozide werden bei der Probenahme durch das in den Probenahmegefäßen befindliche Natriumthiosulfat inaktiviert, während von nicht-oxidativen Bioziden nicht genau bekannt ist, wie diese inaktiviert werden können. Ziel dieses Projektes war es, für im Markt häufig eingesetzte nicht-oxidierende Biozide geeignete Inaktivierungsverfahren zu identifizieren, die keine Schädigung der Legionellen und der Begleitflora zur Folge haben bzw. die mikrobiologische Analytik nicht nachteilig beeinflussen. Andererseits sollte auch keine Aufkeimung durch die Neutralisierungssubstanzen erfolgen. Das zu entwickelnde Verfahren sollte möglichst einheitlich für die gängigen nicht-oxidierenden Biozide einsetzbar sein.

In Abstimmungsgesprächen mit fachkundigen Kühlwasserkonditionierern und Industriepartnern wurden als häufig eingesetzte, am Markt übliche Biozide Isothiazolinone, Dibromnitrilopropionamid (DBNPA, 2,2-Dibrom-2-cyanacetamid) 2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol (Bronopol) sowie quaternäre Ammoniumsalze identifiziert. Bei den Isothiazolinonen wurde ein Gemisch aus dem in der Praxis üblichen Methylisothiazolinon (MIT) und Chlormethylisothiazolinon (CMIT) eingesetzt. Glutaraldehyd, obwohl momentan noch häufig eingesetzt, ist nur als „Altwirkstoff“ zugelassen. Da seine Verwendung bis 2026 befristet ist, wurde Glutaraldehyd in dieser Studie nicht berücksichtigt. Die Biozide wurden, falls nicht anders angegeben, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 10 mg/L MIT/CMIT, 4 mg/L DBNPA, 50 mg/L Bronopol und 10 mg/L quaternäre Ammoniumsalze.

In einem ersten Schritt wurden mögliche Rezepturen von Neutralisierungssubstanzen auf Basis von Literaturangaben und aus Normen zur Desinfektionsmittelprüfung ermittelt (z.B. DIN EN 13623, 2010; DIN EN 1040, 2006; DIN EN 1275, 2006; DIN EN 1276, 2010; Kramer & Assadian, 2008). Als gemeinsamer Nenner vieler Rezepturen und Normen in verschiedenen Anwendungsbereichen wurden Lecithin, Saponin und Polysorbat 80 (Tween 80) identifiziert. Diese drei Komponenten wurden zusammen mit Natriumthiosulfat in eine Neutralisierungsmischung eingebracht, die die Basis für die ersten Experimente darstellte und hinsichtlich der Inaktivierungsleistung in Bezug auf die ausgewählten Biozidwirkstoffe geprüft wurde.

Die mikrobiologischen Untersuchungen erfolgten in einer ersten Orientierungsphase zunächst nicht an Legionellen, sondern mit einer schnell wachsenden Reinkultur von *Escherichia coli* (*E. coli*). Gründe hierfür waren die langen Kultivierungszeiten von Legionellen und die Tatsache, dass das finale Inaktivierungsverfahren nicht nur für Legionellen, sondern auch für die Bestimmung der allgemeinen Koloniezahlen einsetzbar sein soll. Die Experimente wurden in Form von Wiederfindungsversuchen durchgeführt. Dafür wurden Wirkstofflösungen der verschiedenen Biozide hergestellt und mit den potentiellen Neutralisierungssubstanzen

versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer definierten Bakterienmenge (Richtwert 10^3 KBE/mL). Nach zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten (7 h und 24 h) wurden die Proben kulturell untersucht. Parallelansätze ohne Zugabe von Biozid und ohne Neutralisierungs-substanzen dienten als Kontrollen, um die Verträglichkeit der Neutralisierungssubstanzen mit der Kultivierbarkeit der Bakterien sowie die Wirksamkeit der Biozide einzuschätzen. Anhand der Wiederfindungsraten der anfänglich in das jeweilige Experiment eingesetzten kultivierbaren Bakterien wurden die Neutralisationsleistung der Wirkstoffe bzw. die Inaktivierungsleistung der Biozide bewertet. Die Endkonzentrationen der Neutralisierungssubstanzen nach Mischung mit der Bakteriensuspension waren 3 mg/L Lecithin, 30 mg/L Saponin, 30 mg/L Polysorbat 80 sowie 18 mg/L Natriumthiosulfat (Neutralisierungsmischung 1, NM 1).

Die Experimente mit *E. coli* erbrachten folgende Ergebnisse:

- Hohe Konzentrationen (ca. 200 mg/L Endkonzentration) von CMIT/MIT waren nötig, um eine effiziente Abtötung von *E. coli* zu erhalten, obwohl in der Praxis im Kühlwasserbereich nur ca. 10 mg/L üblich sind. Solch hohe Konzentrationen von Isothiazolinonen konnten durch die Neutralisierungsmischung 1 nicht inaktiviert werden.
- DBNPA (40 mg/L oder 4 mg/L) konnte durch die Neutralisierungsmischung 1 nicht inaktiviert werden. Die Erweiterung der Neutralisierungsmischung 1 mit Thioglykolat (0,5 - 500 mg/L) führte zu einer guten Inaktivierung der bioziden Wirkung von DBNPA in einer Konzentration von 40 mg/L.
- Der verwendete *E. coli* Stamm wurde durch 50 mg/L Bronopol bei Raumtemperatur nicht abgetötet. Für eine substantielle Desinfektionswirkung sind Bronopol-Konzentrationen von mind. 200 mg/L nötig. Die biozide Wirkung von Bronopol (200 mg/L) auf *E. coli* kann durch die Neutralisierungsmischung 1 neutralisiert werden.
- Quaternäre Ammoniumverbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 10 mg/L durch die Neutralisierungsmischung 1 gut neutralisiert.
- Natriumhypochlorit, das als gängiges oxidierendes Biozid miteinbezogen wurde, konnte in einer Endkonzentration von 2 mg/L problemlos durch die Neutralisierungsmischung 1 inaktiviert werden.
- Die Neutralisierungsmischung 1 konnte bei Raumtemperatur zu einer moderaten Aufkeimung von *E. coli* führen. Mit Unterschieden zwischen verschiedenen Ansätzen wurde eine Zunahme der Konzentration maximal um den Faktor 2-3 beobachtet.

In einem zweiten Schritt wurden Versuche mit Legionellen durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten an vier Legionellenstämmen:

(1) *L. pneumophila* DSM 7513 (WDCM 00107) (Serogruppe 1),
(2) *L. pneumophila* (Serogruppe 2-14, SG 2-14) aus einer realen Kühlwasserprobe,
(3) *L. anisa* ATTC 35292 (WDCM 00106, Isolat aus Trinkwasser) und
(4) *Legionella* spp. (non *pneumophila*) aus einer realen Kühlwasserprobe.

Erste Experimente zeigten, dass sich die Empfindlichkeit der Legionellen gegenüber verschiedenen Substanzen zum Teil von der Empfindlichkeit von *E. coli* unterschied. Zum Beispiel hatten 50 mg/L Bronopol keinen Einfluss auf die Wiederfindung von *E. coli* nach 24 h,

während die Kultivierbarkeit von Legionellen im gleichen Zeitraum stark abnahm bzw. verloren ging. Für eine substantielle Desinfektion von *E. coli* waren Bronopolkonzentrationen von mind. 200 mg/L nötig. Die biozide Wirkung von 200 mg/L Bronopol konnte durch Neutralisierungsmischung NM 1 inaktiviert werden, während dies für die Neutralisierung des Effektes von 50 mg/L Bronopol auf Legionellen ohne Erweiterung der Neutralisierungsmischung nicht gelang.

Auch in der Empfindlichkeit gegenüber den Neutralisierungssubstanzen gab es Unterschiede. Zum Beispiel wurde die Kultivierbarkeit von *E. coli* durch 500 mg/L Thioglykolat innerhalb von 24 h bei Raumtemperatur nicht oder kaum beeinträchtigt, während bei einigen der untersuchten Legionellen eine Konzentration von 50 mg/L schon nach 7 Stunden eine Beeinträchtigung der Kultivierbarkeit zur Folge hatte. Die Thioglykolat-Konzentration wurde deshalb auf eine Endkonzentration von 20 mg/L angepasst.

Die Mehrzahl der Untersuchungen erfolgte mit *Legionella pneumophila* SG2-14. Mit der um Thioglykolat erweiterten Neutralisierungsmischung wurde die Inaktivierung der bioziden Wirkung von 10 mg/L CMIT/MIT sowie von 4 mg/DBNPA erzielt. Nach Erhöhung der Lecithin-Konzentration wurde auch die Wirkung von 10 mg/L quaternärer Ammoniumsalze effizient und reproduzierbar neutralisiert. Die Erweiterung die Neutralisierungsmischung um Cystein (100 mg/L) stellte schließlich auch die vollständige Inaktivierung von 50 mg/L Bronopol sicher.

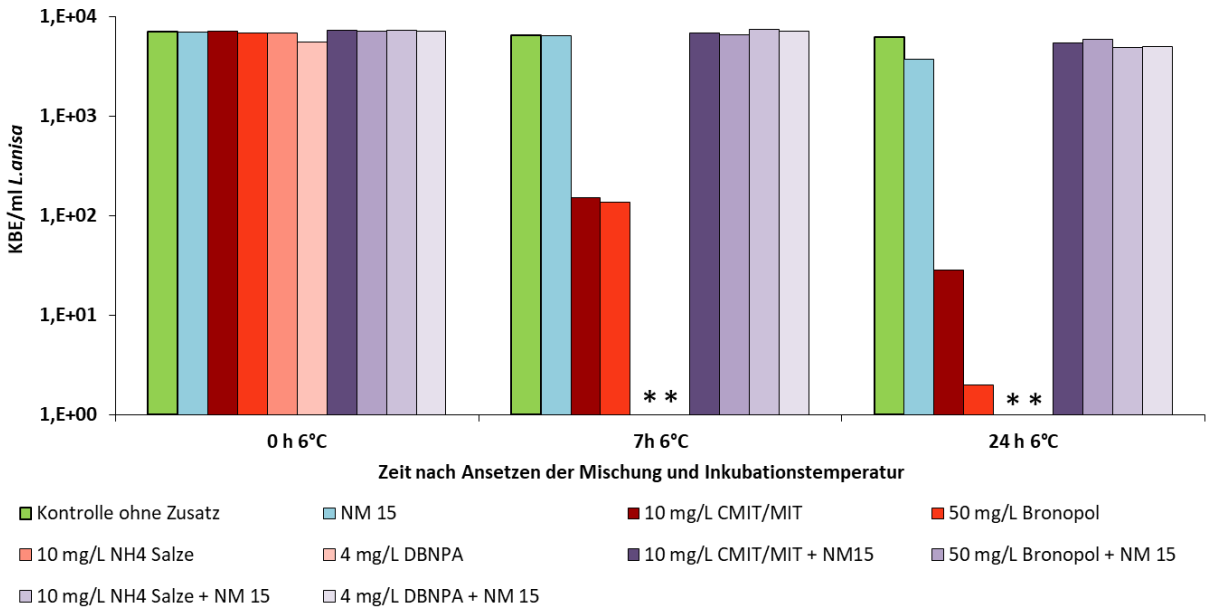
Die nach weiterer Erhöhung der Lecithinkonzentration (100 mg/L) bei Projektende vorliegende Neutralisierungsmischung hatte die folgende Zusammensetzung:

Tabelle 1: Finale Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung.

Neutralisierungssubstanzen	Endkonzentration (mg/L oder ppm) im Ansatz mit Bakterien
Lecithin	100
Saponin	30
Polysorbat 80 (Tween 80)	30
Thioglykolat	20
Natriumthiosulfat	18
L-Cystein	100

Die Neutralisierungsmischung erzielte eine vollständige Wiederfindung von *Legionella anisa* und einem *Legionella* spp. Kühlwasserisolat in Kombination mit allen in dieser Studie getesteten Bioziden. Das mit *Legionella anisa* erhaltene Ergebnis ist exemplarisch in Abbildung 1 gezeigt.

Abbildung 1: Wiederfindung am Beispiel von *Legionella anisa*.



Wirkung der im Projekt entwickelten Neutralisierungsmischung NM15, verschiedener nicht-oxidativer Biozide sowie der Mischung aus Biozid und Neutralisierungsmischung auf die Kultivierbarkeit von *Legionella anisa* im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen. Die Bakterien waren suspendiert in Kupfer-freiem Trinkwasser. Die Sternchen stehen für Legionellenkonzentrationen < 1 KBE/mL.

Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Im Unterschied zu den anderen getesteten Legionellenstämmen zeigte sich *Legionella pneumophila* DSM 7513 als einziges Nicht-Wasserisolat empfindlich gegenüber der Neutralisierungsmischung, was eine verminderte Inaktivierungseffizienz der getesteten Biozide zur Folge hatte. In diesem Fall wurde für DBNPA keine und für CMIT/MIT eine schlechte Inaktivierung erreicht.

Das Ergebnis zeigt, dass prinzipiell eine Inaktivierung der bioziden Wirkung der getesteten nicht-oxidativen Biozide erreicht werden kann, jedoch verschiedene Legionellen unterschiedlich empfindlich gegenüber der Neutralisierungsmischung sind.

Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Untersuchung weiterer Vertreter von *Legionella pneumophila* SG 1, ob sich die hohe Empfindlichkeit des getesteten Typstammes, der ein Lungenisolat darstellt und sich schon seit 1993 in der Stammsammlung befindet, auch bei anderen Stämmen der Serogruppe 1 findet. Gegebenenfalls müssen die Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung bzw. die Konzentrationen der darin enthaltenen Neutralisierungssubstanzen neu überprüft werden. Auch die Wirkung auf die Kultivierbarkeit der in Kühlwasser enthaltenen komplexen bakteriellen Begleitflora bedarf weiterer Untersuchungen.

Summary

Cooling plants are subject to hygienic surveillance to minimize risks originating from *Legionella* bacteria. The requirements of the VDI 2047 were implemented in Germany by the Federal Immission Control Act on 19.08.2017. They aim at an objective evaluation of the microbiological hygienic risk originating from each cooling plant or cooling system. The prerequisite hereof is the efficient inactivation of all biocides that are used to minimize the microbiological burden of cooling waters. Inactivation should take place at the time point of water sampling so that these biocides do not continue to unfold their action during sample transport and storage. Prolonged action would entail an underestimation of *Legionella* concentrations contained in the water and consequently an underestimation of the associated health risk of exposed people. Analytical results should however reflect the 'true state' of microbiology at the time point of water sampling. An underestimation should also be prevented for the total colony counts in the water to be analysed.

Oxidative biocides are inactivated by addition of sodium thiosulfate to water sampling bottles. For non-oxidizing biocides, on the other hand, precise formulations of neutralizing agents to achieve efficient inactivation are currently unknown. This project aimed at identifying procedures that allow inactivation of biocides that are commonly used for cooling water disinfection. Neutralizing agents should not impair the culturability of the legionellae themselves or of the accompanying bacterial flora nor should they lead to bacterial growth. Ideally the inactivation procedure should be applicable to all commonly used non-oxidizing biocides.

In dialogue with knowledgeable cooling water plant operators and industrial partners the following, commonly used cooling water biocides were identified: isothiazolinones, dibromnitrilpropionamide (DBNPA; 2,2-dibromo-2-cyanacetamide), 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol) and quaternary ammonium compounds. In case of the isothiazolinones, methylisothiazolinone (MIT) and chloromethylisothiazolinone (CMIT) were used due to their widespread use in the cooling water treatment market. Glutaraldehyde, which also currently finds widespread use, was not considered in this study due to the fact that its use is limited until 2026. These biocides were applied in the study in the following concentrations: 10 mg/L MIT/CMIT, 4 mg/L DBNPA, 50 mg/L bronopol and 10 mg/L quaternary ammonium compounds.

In a first step possible formulations of inactivation agents were identified by screening different standards regulating disinfection (e.g. DIN EN 13623, 2010; DIN EN 1040, 2006; DIN EN 1275, 2006; DIN EN 1276, 2010) and other literature (e.g. Kramer & Assadian, 2008). The compounds lecithine, saponine and polysorbate 80 (Tween 80) were identified as a common denominator for many of the formulations described. These three compounds in combination with sodium thiosulfate were used to compile an initial 'neutralisation mixture' that formed the basis for the first experiments in order to evaluate their ability to neutralize biocidal action.

Microbiological examinations in a first orientation phase were not performed with *Legionella*, but with fast growing cultures of *Escherichia coli* (*E. coli*). The reasons lie in (i) the long growth times of legionellae and (ii) the fact that biocide inactivation procedures must not only work for *Legionella*, but also for the quantification of the accompanying bacterial flora. All microbiological studies were performed in form of recovery experiments, meaning that the same bacterial concentrations should be obtained after neutralization of biocidal action as were initially supplemented prior to biocide addition and as obtained in untreated controls. Solutions of different biocides were supplemented with potential neutralizing agents followed by addition of defined concentrations of bacteria (aiming at 10^3 CFU/mL). Bacterial concentrations were determined after different incubation times (7 h and 24 h) by cultivation in order to see how

bacterial numbers compared with untreated controls (without addition of biocides or neutralizing agents). The experiments aimed at judging the susceptibility of the bacteria towards the neutralizing agents and the efficacies of the biocides. Comparing recovery rates allowed evaluating the inactivation potential of the different neutralizing agents. The final concentrations of the neutralizing agents after mixing with bacterial suspensions were as follows: 3 mg/L lecithine, 30 mg/L saponine, 30 mg/L polysorbate 80 and 18 mg/L sodium thiosulfate. This mix was referred to as mixture 1 that formed the basis for the first experiments.

Experiments with *E. coli* led to the following conclusions:

- High concentrations of CMIT/MIT (approx. 200 mg/L final concentration) were required to ensure efficient killing of *E. coli* although this biocide is commonly applied in concentrations around 10 mg/L for cooling water disinfection. The biocidal action of such high concentrations of isothiazolinones could not be successfully neutralized by mixture 1.
- DBNPA (40 mg/L or 4 mg/L) could not be neutralized by mixture 1. The addition of thioglycolate was necessary to achieve this. Supplementing mixture 1 with thioglycolate (0.5-500 mg/L) led to successful inactivation of the biocidal action of 40 mg/L DBNPA.
- The *E. coli* strain used in this study was not inactivated by 50 mg/L bronopol at room temperature. Bronopol concentrations of at least 200 mg/L were necessary to achieve substantial disinfection. The biocidal action of bronopol (200 mg/L) on *E. coli* could be neutralized by mixture 1.
- The biocidal action of quaternary ammonium compounds (10 mg/L) was efficiently neutralized by mixture 1.
- Sodium hypochlorite (2 mg/L), which was included in the study as commonly used oxidative biocide, could be efficiently neutralized by mixture 1.
- The presence of neutralization mixture led to moderate growth of *E. coli* at room temperature. Although different between different experiments, regrowth did not exceed a factor of 2-3.

The same experimental procedure was applied in a second step to *Legionella*. The study was performed with the following four *Legionella* strains:

(1) *L. pneumophila* DSM 7513 (WDCM 00107) (serogroup 1),
(2) *L. pneumophila* (serogroup 2-14, SG 2-14; strain from a cooling water sample),
(3) *L. anisa* ATTC 35292 (WDCM 00106, drinking water isolate), and
(4) *Legionella* spp. (*non pneumophila*; strain from a cooling water sample).

The results of initial experiments showed that the susceptibilities of legionellae to different substances can substantially differ from the susceptibilities found for *E. coli*. Whereas for example the recovery rate of *E. coli* was not affected by 50 mg/L bronopol after an exposure time of 24 h, the culturability of legionellae was strongly reduced or abolished after the same time period. The biocidal action of 200 mg/L bronopol could be neutralized by neutralization mixture 1 with *E. coli*, whereas this mixture was not successful to achieve the effect of 50 mg/L bronopol for legionellae and had to be supplemented with other substances. There were also differences in the susceptibilities towards the neutralizing agents. The viability of *E. coli* was for example not or only marginally affected by 500 mg/L thioglycolate after 24 h at room

temperature, whereas the culturability of some of the studied *Legionella* strains was already affected by 50 mg/L thioglycolate after 7 hours. The concentration of thioglycolate in the neutralization mixture was thus adjusted to a final concentration of 20 mg/L.

The majority of recovery experiments was performed with *Legionella pneumophila* SG 2-14. After being supplemented with thioglycolate, neutralization mixture 1 successfully inactivated the biocidal effects of 10 mg/L CMIT/MIT and 4 mg/L DBNPA in combination with this *Legionella* strain. After increasing the concentration of lecithine, also the biocidal action of 10 mg/L quaternary ammonium compounds was reproducibly neutralized. Addition of cysteine (100 mg/L final concentration) eventually also ensured complete inactivation of 50 mg/L bronopol.

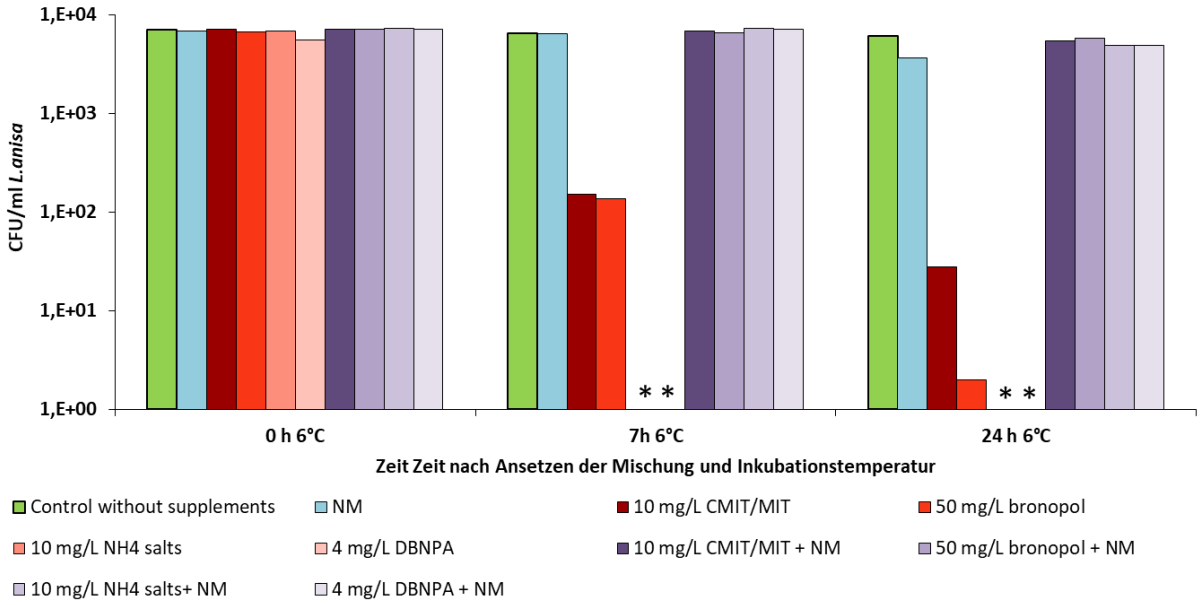
After additional increase of the concentration of lecithine (100 mg/L) the neutralization mixture at the end of the project had the following composition (Table 1).

Table 1: Final composition of the neutralization mixture optimized in this project.

Neutralizing agents	Final concentration (mg/L or ppm) in mixture with bacteria
Lecithine	100
Saponine	30
Polysorbate 80 (Tween 80)	30
Thioglykolate	20
Sodium thiosulfate	18
L-Cysteine	100

This neutralization mixture achieved complete recovery of *Legionella anisa* and *Legionella* spp. (cooling water isolate) after challenge with all non-oxidizing biocides tested in this study. Results with *Legionella anisa* are shown in diagram 1 as an example.

Diagram 1: Recovery of Legionella *anisa*.



Effect of the neutralization mixture NM, different non-oxidizing biocides and a mixture of biocides and neutralization mixture on the culturability of *Legionella anisa* in comparison with a control (green) with supplements (without biocide and without neutralization mixture). Suspensions were incubated at 6 °C. Samples were taken directly after setting up mixtures, after 7 h and after 24 h. Bacteria were suspended in copper-free drinking water. Asterisks indicate *Legionella* concentrations < 1 CFU/mL.

Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

The viability of *Legionella pneumophila* DSM 7513 as the only non-environmental isolate on the other hand proved sensitive towards the mixture, which entailed reduced inactivation efficiencies of biocidal action. No inactivation in this case was obtained for DBNPA and only substantially reduced inactivation of CMIT/MIT. Complete neutralization of all biocides by the neutralization mixture was again given for the cooling water isolate *Legionella* spp.

The results show that in principle the neutralization of the biocidal action of all tested non-oxidizing biocides can be achieved, however different legionellae show different susceptibilities towards the neutralization mixture. Further investigations will be necessary with additional representatives of *Legionella pneumophila* SG 1 to test whether other serogroup 1 strains share the great susceptibility of the type strain DSM 7513, which is a lung isolate and has been in the culture collection since 1993. If necessary, the composition of the neutralization mixture or the concentrations of the substances contained herein would need further adjustments. Also the effect on the accompanying complex bacterial flora in cooling waters needs further investigation.

1 Einleitung und Problemstellung

Verdunstungskühlanlagen werden seit Jahrzehnten in vielen Bereichen (Industrie, Kraftwerke, Raumlufttechnische Anlagen, etc.) eingesetzt, um Wärmelasten abzuführen. Die Kühlwirkung beruht auf dem Prinzip der Verdunstung von verrieseltem oder versprühtem Wasser, wobei es auch zur Bildung von Wassertröpfchen (Aerosolen) kommt, die in die Fortluft bzw. Umgebungsluft abgegeben werden. Aufgrund günstiger Lebensbedingungen (Feuchte, Nährstoffangebot, Wärme) für Mikroorganismen im Wasser und insbesondere in Biofilmen auf den Kühlsystem- und Verdunstungsoberflächen können die Wassertröpfchen auch Bakterien und darunter auch Legionellen enthalten.

Die Überwachung von Verdunstungskühlanlagen hinsichtlich des Legionellenrisikos erfolgt zurzeit routinemäßig durch Messung der Legionellenkonzentration im Kühl-/Nutzwasser. Die technischen Anforderungen hierfür ergeben sich aus der VDI 2047 Blatt 2 und Blatt 3 sowie den geltenden Normen für die mikrobiologische Probenahme (DIN EN ISO 19458)und Analytik (DIN EN ISO 11731). Zusätzlich trat am 19.08.2017 die 42. Bundesimmissionsschutzverordnung (42. BImSchV) in Kraft, mit der die Überwachung von Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen hinsichtlich einer Legionellenkontamination anhand von Kühlwasserproben gesetzlich verankert wurde.

Um sicherzustellen, dass die im Labor gemessenen Legionellenbefunde die Konzentrationen wiedergeben, die vor Ort in der Verdunstungskühlanlage zum Zeitpunkt der Probenahme vorlagen, müssen beim Einsatz von Bioziden im Kühlwasser diese bei der Probenahme inaktiviert werden. Dies stellt sicher, dass die Biozide nicht auf dem Transport und bei der Lagerung der Proben weiterhin ihre Wirkung entfalten und damit zu Minderbefunden bei der Legionellenanalytik und zu einer Unterschätzung des Gesundheitsrisikos führen.

In vielen Kühlwässern werden oxidative Biozide (z.B. Hypochlorit, Chlordioxid etc.) eingesetzt, die mit bekannten Neutralisierungssubstanzen (i.d.R. Natriumthiosulfat) inaktiviert werden können. Die Vorgehensweise hierfür ist der DIN EN ISO 19458 entnommen. In einigen Kühlwässern werden jedoch andere Biozide (nicht-oxidierende Biozide) eingesetzt, von denen bisher nicht genau bekannt ist, wie sie sich in der Praxis inaktivieren lassen und ob die dazu benötigten Neutralisierungssubstanzen möglicherweise einen schädigenden Einfluss auf die Zielorganismen Legionellen haben oder anderweitig die Legionellenanalytik beeinflussen.

Zur Inaktivierung solcher Biozide sollte das VDI-Gremium zur Überarbeitung der technischen Richtlinie 2047 Blatt 2 (Hygienischer Betrieb von Verdunstungskühlanlagen) Vorschläge erarbeiten. Diese Empfehlungen sollten dann auch in die „Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen aus Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nasswäschern“ (UBA, 2017) übernommen werden. Auf der betreffenden VDI Sitzung wurde aber festgestellt, dass es dafür noch keine ausreichenden Daten gibt und daher keine Empfehlungen erarbeitet werden können.

2 Problem- und Aufgabenstellung

Für die Umsetzung der 42. Bundesimmissionsschutzverordnung ist es sehr wichtig, dass auch für nicht-oxidierende Biozide Vorgaben zur Inaktivierung bei der Probenahme gemacht werden. Ziel des Vorhabens war es, für gängige, am Markt häufig eingesetzte nicht-oxidierende Biozide geeignete Inaktivierungsverfahren zu entwickeln, die keine Schädigung der Legionellen bewirken bzw. den Legionellennachweis nicht nachteilig beeinflussen. Gleichzeitig sollte auch die mikrobiologische Begleitflora, die durch den Parameter der Koloniezahl bei 22 °C und 36 °C quantifiziert wird, nicht beeinflusst werden. Es sollten sowohl ein Verlust an bakterieller Vitalität als auch eine mikrobiologische Aufkeimung durch die zugesetzten Neutralisierungssubstanzen vermieden werden. Das zu entwickelnde Verfahren sollte weiterhin möglichst einheitlich für die gängigen nicht-oxidierenden Biozide einsetzbar sein, um zu vermeiden, dass Proben von Kühlwässern, denen unterschiedliche Biozide beigesetzt werden, unterschiedlich behandelt werden müssen.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

Die im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens verwendeten Bakterienstämme sind nachfolgend in Tabelle 2 zusammengestellt.

Legionella pneumophila ATCC 33152 (Typstamm Philadelphia-1) ist ein Isolat aus menschlichem Lungengewebe, *Legionella anisa* ATCC 35292 ist ein Isolat aus Trinkwasser (Los Angeles, USA). Zwei Stämme wurden im Rahmen des Projektes aus realen Kühlwasserproben von Kunden des IWW gewonnen und als Reinkulturen isoliert. Die Typisierung dieser Legionellenstämme erfolgte mittels Latex-Agglutinationstest (Oxoid Deutschland GmbH).

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Typisierung	Herkunft
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* ATCC 33152, WDCM 00107 (Philadelphia-1)	Serogruppe 1	DSMZ, DSM 7513
Legionella anisa ATCC 35292, WDCM 00106	-	DSMZ, DSM 17627
Legionella pneumophila	Serogruppe 2-14	Eigenes Isolat aus IWW Kühlwasserprobe 17-005329-01
Legionella spp.	*Legionella* species	Eigenes Isolat aus IWW Kühlwasserprobe 17-005627-01
Escherichia coli WDCM 00012		DSMZ, DSM 1576

3.2 Nährmedien

Die im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens verwendeten Nährmedien sind nachfolgend in Tabelle 3 zusammengestellt. Alle genannten Nährmedien wurden als Fertigplatten bezogen und einer chargenweisen Qualitätssicherung entsprechend der Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025 unterzogen.

Tabelle 3: Verwendete Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Zusammensetzung
BCYE-Agar	Xebios	40-1603	Fertigplatten, siehe Herstellerangaben
TSA-Agar	Xebios	40-1033	Fertigplatten, siehe Herstellerangaben
CASO-Bouillon	Carl Roth	X938.2	Fertigpulver, siehe Herstellerangaben
YEB-Bouillon	Eigene Herstellung	-	1,0g/L Hefeextrakt, 0,4 g/L L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat, 0,25 g/L Eisen (III)-pyrophosphat

3.3 Chemikalien

Die im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens verwendeten Chemikalien sind nachfolgend in Tabelle 4 zusammengestellt. Chemikalien wurden in deionisiertem Reinstwasser gelöst und anschließend durch Autoklavieren bzw. im Fall von Natriumthiosulfat mittels Filtration durch einen 0,1 µm Filter sterilisiert.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	CAS-Nr.	Hersteller	Bestellnummer
Eisen (III)-pyrophosphat	10058-44-3	Sigma Aldrich	P6526-100g
Hefeextrakt	8013-01-2	Carl Roth	2363.1
L-Cysteinhydrochlorid monohydrat	7048-04-6	Merck	1.02839.0025
Lecithin	8030-76-0	Merck	298632A
Natriumthioglykolat	367-51-1	Sigma Aldrich	T0623-100g
Natriumthiosulfat Pentahydrat	10102-17-7	Merck	1.06516.1000
Saponin	8047-15-2	VWR Chemicals	27534.187
Tween 80	9005-65-6	Merck	8.22187.0500

3.4 Geräte

Geräte, die lediglich für einzelne Analysenparameter oder Verfahren Verwendung finden, sind bei den jeweiligen Verfahren genannt.

3.5 Mikrobiologische Verfahren

3.5.1 Stammhaltung der Bakterien

Die Kultivierung der Gebrauchskulturen der Legionellenstämme erfolgte auf BCYE-Agar und von *E. coli* auf TSA-Agar. Eine Überimpfung auf frische Nährmedien erfolgte typischerweise wöchentlich für Legionellen und spätestens nach vier Wochen für *E. coli*. Dazu wurden Einzelkolonieausstriche für 3-4 Tage bei 36°C (Legionellen) bzw. 24 Stunden bei 36°C (*E. coli*) bebrütet.

Für die Stammkulturhaltung wurden Dauerkulturen in Cryobank-Röhrchen (Mast Group Ltd.) angelegt und bei -80°C gelagert. Die Handhabung der Cryobank™-Kryogefäße erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Neue Gebrauchskulturen wurden aus diesen Dauerkulturen angelegt, indem ein Kügelchen entnommen und auf dem jeweils oben genannten Agarmedium ausgerollt wurde.

3.5.2 Herstellung von Flüssigkulturen

Für die Herstellung von Flüssigkulturen wurden in einen 100 mL Erlenmeyerkolben 20 mL mit sterilem Reinstwasser im Verhältnis 1:5 verdünntes YEB-Medium (für Legionellen) oder

unverdünntes TSB-Medium (für *E. coli*) pipettiert. Die Flüssigmedien wurden anschließend jeweils mit 2 - 3 Kolonien einer frischen Einzelkolonieausstrichplatte mit einer Impföse angeimpft. Die Bebrütung der Flüssigkultur für Legionellen erfolgt bei 30°C für 24 h sowie für *E. coli* bei 36°C für 16 h jeweils bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 280 rpm. Das gesamte Volumen der Flüssigkulturen wurden anschließend zentrifugiert (8.000 rpm, 5 min) und die in den Pellets befindlichen Bakterien mittels Auf- und Abpipettieren in 0,9%iger steriler NaCl-Lösung (für *E. coli*) bzw. sterilem kupferfreiem Trinkwasser (für Legionellen) resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt und das Pellet schließlich in 20 mL steriler NaCl-Lösung (für *E. coli*) bzw. sterilem kupferfreiem Trinkwasser (für Legionellen) aufgenommen.

Von dieser bakteriellen Suspension wurde die Zellzahl mittels einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Basierend auf der so ermittelten Bakterienkonzentration wurde durch Verdünnung mit steriler 0,9%ige NaCl-Lösung (für *E. coli*) bzw. sterilem kupferfreiem Wasser (für Legionellen) eine Suspension mit einer Zellzahl von ca. 1×10^5 Bakterien/mL hergestellt. Von dieser Suspension wurde in den Wiederfindungsexperimenten jeweils 1 mL eingesetzt, um schlussendlich eine Bakterienkonzentration von ca. 1×10^3 Bakterien/mL zu erhalten.

3.5.3 Wiederfindungsversuche

Alle Versuche werden in Form von Wiederfindungsversuchen durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Erwartung, dass ohne hemmende Effekte der zugesetzten Substanzen die Konzentrationen an kultivierbaren Legionellen am Anfang und am Ende des Experiments nach 24 h identisch sein sollten. Für den Fall, dass die Substanzen eine Schädigung der Bakterien zur Folge haben, spiegelt sich dies in einer verminderten Wiederfindung wider.

Folgende Ansätze wurden untersucht:

- Unbehandelte Parallelansätze (ohne Zugabe von Bioziden und ohne Neutralisierungssubstanzen). Diese Kontrollen dienten als Referenz.
- Ansätze ohne Biozidzugabe, jedoch mit Zugabe der Neutralisierungssubstanzen. Diese Ansätze dienten der Bestimmung der Verträglichkeit der Bakterien gegenüber den Neutralisierungssubstanzen bzw. des Effektes der Neutralisierungssubstanzen auf die Kultivierbarkeit der Bakterien.
- Ansätze mit Biozid, jedoch ohne Neutralisierungssubstanzen. Diese Ansätze dienten der Bestimmung der Wirksamkeit der Biozide.
- Ansätze mit Biozid und mit Neutralisierungssubstanzen. Diese Ansätze dienten zur Überprüfung der Inaktivierung der bioziden Wirkung durch die Neutralisierungssubstanzen.

Für die Versuche wurden Wirkstofflösungen der zu untersuchenden Biozide und der Neutralisierungssubstanzen hergestellt. Das Ansetzen der Mischungen erfolgte auf dem Vorlegen von 0,9%ige NaCl-Lösung (für *E. coli*) bzw. sterilem kupferfreiem Trinkwasser (für Legionellen) in sterilen 250 mL Erlenmeyer Gefäßen. Bei den Kontrollen ohne Biozid und ohne Neutralisierungssubstanzen betrug das Volumen je 99 mL NaCl-Lösung oder kupferfreies Trinkwasser. Bei den anderen Ansätzen reduzierte sich dieses Volumen um die Volumina der zugegebenen gelösten chemischen Substanzen (z.B. um 2,1 mL im Fall der Neutralisierungsmischung, die aus fünf Substanzen bestand).

Die Experimente wurden durch Zugabe von jeweils 1 mL der Bakteriensuspension (ca. 1 x 10^5 Bakterien/mL) gestartet, so dass die Endkonzentration der Bakterien im Endvolumen von 100 mL bei ca. 1 x 10^3 Bakterien/mL lag. Für die Ansätze, in denen Biozide und potentielle Neutralisierungssubstanzen gemischt wurden, erfolgte die Zugabe der Bakterien erst 1 min nach Mischung der Biozide und der Neutralisierungssubstanzen, um eine anfängliche Schädigung der Bakterien durch nicht neutralisierte Biozide zu verhindern.

Die ersten Proben wurden direkt nach Mischung der Ansätze sowie nach verschiedenen Inkubationszeiten (nach 7 h oder nach 24 h, wie in den Abbildungen angegeben) entnommen. Aliquote der Proben wurden auf den jeweiligen Nährmedienplatten (TSA im Fall von *E. coli* bzw. BCYE-Agar im Fall der Legionellen) im Spatelverfahren ausplattiert. Bei den Ansätzen, die nur Biozide (und keine Neutralisationsmittel) enthielten und Abtötung erwartet wurde, wurden jeweils 0,5 ausplattiert. Bei allen anderen Ansätzen und in Biozidansätzen, wo die Abtötung der Bakterien nicht effizient war, wurden jeweils 0,1 mL ausgebracht. Alle kulturellen Untersuchungen wurden mindestens als Duplikat durchgeführt. Die Diagramme enthalten in der Regel Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen.

Die Inkubation der Nähragarplatten erfolgte bei 36 °C für 24 h für *E. coli* bzw. für ca. 72 h für Legionellen, gefolgt von der visuellen Quantifizierung der sich darauf bildenden Kolonien. Die Ergebnisse wurden in Microsoft Excel zusammengestellt.

4 Auswahl der Biozide

Repräsentativ für die oxidativen Biozide wurde Na-Hypochlorit verwendet. Als häufig eingesetzte nicht-oxidative Biozide wurden die folgenden Wirkstoffe identifiziert:

1. Isothiazolinone
2. Dibromnitrilopropionamid (DBNPA, 2,2-Dibrom-2-cyanacetamid)
3. 2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol (Bronopol)
4. Quaternäre Ammoniumsalze (NH_4 Salze)

Die Verwendung letzterer ist im Umfang vergleichbar mit der Verwendung von Glutaraldehyd, jedoch werden sie im Kühlwasserbereich weniger häufig als die Wirkstoffe 1 bis 3 eingesetzt. Der Einsatz von Glutaraldehyd ist nur als „Altwirkstoff“ zugelassen und bis 2026 befristet. Glutaraldehyd war aus diesem Grund nicht Bestandteil dieses Projektes.

4.1 Isothiazolinone

Bei den Isothiazolinonen handelt es sich um eine Gruppe von heterocyclischen organischen Wirkstoffen auf Basis von substituierten Isothiazolinonderivaten. In der Praxis werden bei Kühlwässern insbesondere Methylisothiazolinon (MIT) und Chlormethylisothiazolinon (CMIT), häufig als Gemisch, eingesetzt. Im hier durchgeführten Projekt wurde daher ein Gemisch mit gleichen Anteilen von CMIT und MIT berücksichtigt. Die biozide Wirkung der Isothiazolinone beruht zum einen auf einer schnellen Inhibition des bakteriellen Wachstumes und Stoffwechsels (innerhalb von Minuten) und zum anderen auf der irreversiblen Schädigung der Zellen (innerhalb von Stunden, Williams 2006). Stoffwechselinhibition beruht unter anderem auf der Schädigung der wichtigen Klasse von Enzymen der Dehydrogenasen sowie der Synthese von ATP. Der Zelltod beruht unter anderem auf der Zerstörung von Thiolgruppen von Proteinen sowie der Bildung von freien Radikalen.

4.2 Dibromnitrilopropionamid (DBNPA)

Der Einsatz von 2,2-Dibrom-3-nitrilopropionamid (DBNPA) in der Kühlwasserbehandlung ist weit verbreitet. Der biozide Effekt von DBNPA beruht auf der schnellen Reaktion zwischen DBNPA und organischen Molekülen mit Thiolen wie z.B. mit Glutathion und Cystein (Siddiqui et al. 2017; Ullah 2011; Paulus 2005). Die Reaktionen schädigen zelluläre Strukturen an den Zelloberflächen und beeinflussen damit unter anderem Transmembrantransportsysteme (Ullah 2011). Die Wirkung von DBNPA wurde auch in Zusammenhang gebracht mit Veränderungen der Zellmembranfluidität (Ishikawa et al. 2016). Die Autoren berichteten, dass der letale cytotoxische Effekt von DBNPA bei niedrigen Temperaturen bei eukaryotischen Zellen aufgehoben wurde. DBNPA hydrolysiert rasch, besonders bei alkalischem pH, zu den teilweise noch biozid wirkenden Verbindungen Dibromacetonitril, Dibromacetamide, Monobromnitrilopropionamid und Cyanoacetamid (EPA 1994).

4.3 2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol (Bronopol)

2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol (Bronopol) ist wie das Beta-brom-beta-nitrostyrol eine organische Bromverbindung, wobei 2-Brom-2-nitropropan-1,3-diol relativ häufig in Kühlwasserkreisläufen eingesetzt wird. Neben der langsamen Freisetzung von Formaldehyd basiert die biozide Wirkung von Bronopol auf der Inaktivierung von Thiolen, wie sie in den aktiven Zentren verschiedener Enzyme vorliegen, die dadurch inaktiviert werden (Shepherd et al. 1988). Zudem reagiert Bronopol mit freien Sulfhydrylgruppen von z.B. Cystein oder Glutathion. Unter aeroben Bedingungen entstehen durch die Oxidation von Thiolen als

Nebenprodukte reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxide und Peroxide, die ihrerseits bakterizid wirken (Shepherd et al. 1988). Die biozide Wirkung nimmt bei steigendem pH und höherer Temperatur zu, obwohl auch die Zerfallsrate steigt (Bryce et al. 1978; Shepherd et al. 1988; Moore und Stretton 1981).

4.4 Quaternäre Ammoniumsalze

Quaternäre Ammoniumsalze stellen eine komplexe Gruppe von oberflächenwirksamen Tensiden dar. Da die Substituenten verschieden sein können, weisen die Wirkstoffe zum Teil unterschiedliche Eigenschaften und leicht verschiedene Wirkmechanismen auf. Wichtigster Vertreter im Kühlwasserbereich ist das Alkyldimethylbenzylammoniumchlorid, das für die beschriebenen Experimente exemplarisch eingesetzt wurde. Die Wirkung wird der ionischen und hydrophoben Wechselwirkung mit den Lipiden der äußeren Zellmembran zugeschrieben (Ahlström et al. 1999). Die Störung der Molekülanordnung führt zur Schädigung und Permeabilisierung der Zellhülle und zum Verlust intrazellulärer Substanzen (Ferreira et al. 2011). Die biozide Wirkung von quaternären Ammoniumsalzen nimmt bei steigendem pH und Temperatur zu (Paulus 2005).

5 Biozidkonzentrationen

Die gängigen Einsatzkonzentrationen der Biozide wurden bei mehreren Wasserbehandlern (CG-Chemikalien GmbH & Co. KG; INWATEC GmbH & Co. KG) angefragt. Die daraus abgeleiteten gängigen Konzentrationen für eine Stoßdosierung von Kühl-/Nutzwässern sowie die in den Versuchen eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen sind in nachfolgender Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Eingesetzte Biozide mit zugehörigen Konzentrationen.

Biozid	Wirkstoffkonzentrations-bereich (mg/L) in Praxis	Wirkstoffkonzentration (mg/L) in Experimenten
CMIT/MIT	1 -10	10
DBNPA	4 - 8	4
Bronopol	5 - 50	50
Quaternäre Ammoniumsalze	1 - 10	10
Natriumhypochlorit	0,5 - 5	2

Gezeigt sind die in der Praxis üblichen Wirkstoffkonzentrationsbereiche und die in den hier durchgeführten Experimenten eingesetzten Konzentrationen.

Die Produkte wurden von der Firma INWATEC GmbH & Co. KG (Bergheim, Nordrhein-Westfalen) zur Verfügung gestellt. Die in den Versuchen eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen wurden in den meisten Fällen im oberen Bereich des in der Praxis üblichen Wirkstoffkonzentrationsbereichs gewählt, damit die Ergebnisse eine Neutralisierung im hohen Dosisbereich wiedergeben.

6 Auswahl der Neutralisierungssubstanzen

In einem ersten Schritt wurden mögliche Rezepturen von Neutralisierungssubstanzen auf Basis von Literaturangaben und aus Normen zur Desinfektionsmittelprüfung ermittelt (z.B. DIN EN 13623, 2010; DIN EN 1040, 2006; DIN EN 1275, 2006; DIN EN 1276, 2010; Kramer & Assadian, 2008). Basierend auf dieser Literaturauswertung wurden drei Substanzen identifiziert, die in vielen Neutralisierungsmischungen in unterschiedlichen Anwendungsgebieten Verwendung finden und sich in vielen Normen wiederfinden: Lecithin, Saponin und Polysorbat 80 (Tween 80). Diese Substanzen bildeten zusammen mit Natriumthiosulfat zur Neutralisation von oxidativen Bioziden das Grundgerüst für die erste in dieser Studie getestete Neutralisierungsmischung (NM). Zur Inaktivierung der bioziden Wirkung von DBNPA auf Legionellen wurde diese Mischung im Verlauf der Studie um Thioglykolat und später zur Verbesserung der Neutralisierung von Bronopol um Cystein erweitert. Alle Bestandteile wurden in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen getestet.

Diese Neutralisierungssubstanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich der potentiellen Beeinträchtigung der Kultivierbarkeit von *E. coli* und von Legionellen und der Inaktivierungsleistung in Bezug auf die gewählten Biozide überprüft. Diese Untersuchungen erfolgten zunächst nicht an Legionellen, sondern an einer schnell wachsenden Reinkultur von *E. coli*. Gründe hierfür lagen in den langen Kultivierungszeiten von Legionellen und der Tatsache, dass das finale Inaktivierungsverfahren nicht nur für Legionellen, sondern auch für die Bestimmung der allgemeinen Koloniezahlen einsetzbar sein soll. Diese Vorgehensweise ermöglichte ein effizientes Screening von möglichen Neutralisierungssubstanzen/-mischungen.

7 Prüfung des Einflusses der Biozide und der Neutralisierungssubstanzen auf *Escherichia coli*

Ziel der Experimente war es, den Effekt der gewählten Neutralisierungssubstanzen zu testen; sowohl auf die Wiederfindung der eingesetzten *E. coli* DSM 1576 bei Zugabe von Biozid wie auch ohne Zugabe von Biozid. Die Grundlage für die ersten Experimente mit *E. coli* bildete die folgende Neutralisierungsmischung 1 (Tab. 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung NM 1.

Neutralisierungssubstanzen	Endkonzentration im Ansatz (mg/L oder ppm)
Lecithin	3
Saponin	30
Polysorbat 80 (Tween 80)	30
Natriumthiosulfat	18

Wiederfindungsexperimente mit *E. coli* erlaubten folgende Schlussfolgerungen:

- Hohe Konzentrationen (ca. 200 mg/L Endkonzentration) von CMIT und MIT waren nötig, um eine effiziente Abtötung von *E. coli* zu erhalten. Dies steht im Kontrast zu der Tatsache, dass im Kühlwasserbereich in der Praxis nur ca. 10 mg/L von diesem Biozid üblich sind. Die Neutralisierungsmischung NM 1 ist nicht geeignet zur Neutralisierung von CMIT/MIT in einer Konzentration von 200 mg/L.
- DBNPA (40 mg/L oder 4 mg/L) wurde durch die Neutralisierungsmischung NM 1 nicht inaktiviert. Die Erweiterung der Neutralisierungsmischung um Thioglykolat (0,5-500 mg/L) führte zu einer guten Inaktivierung von DBNPA in diesem Konzentrationsbereich.
- Der verwendete *E. coli* Stamm wurde durch 50 mg/L Bronopol nicht effizient abgetötet. Für eine substantielle Desinfektionswirkung sind Bronopol-Konzentrationen von mind. 200 mg/L nötig. Die biozide Wirkung von Bronopol (200 mg/L) auf *E. coli* wurde durch die oben genannte Neutralisierungsmischung NM 1 aufgehoben.
- Die Wirkung quaternärer Ammoniumverbindungen (10 mg/L) auf *E. coli* wurde durch die Neutralisierungsmischung NM 1 ebenfalls aufgehoben.
- Die Neutralisierungsmischung NM 1 führte bei Raumtemperatur zu einer moderaten Vermehrung von *E. coli.* Mit Unterschieden zwischen verschiedenen Ansätzen erhöhte sich die Konzentration innerhalb von 24 h maximal um den Faktor 2-3.

8 Prüfung des Einflusses der Biozide und der Neutralisierungssubstanzen auf Legionellen

Die um Thioglykolat erweiterte Neutralisierungsmischung aus den Vorversuchen mit *E. coli* wurde im nächsten Schritt hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit Legionellen bzw. der Beeinflussung des kulturellen Nachweises untersucht.

Diese Untersuchungen erfolgten an 4 Legionellenstämmen:

(1) *L.* pneumophila DSM 7513 (ATCC 33152, WDCM 00107) (Serogruppe 1),

(2) *L. pneumophila* Serogruppe 2-14 aus einer realen Kühlwasserprobe,

(3) *L. anisa* DSM 17627 (ATTC 35292, WDCM 00106) und

(4) *Legionella* spp. (non- *pneumophila*) aus einer realen Kühlwasserprobe.

Alle Experimente wurden in Form von Wiederfindungsversuchen durchgeführt. Dabei wurden Suspensionen der o. a. Legionellen hergestellt und mit den potentiellen Bioziden und/oder den Neutralisierungsmischungen versetzt. Nach verschiedenen Kontaktzeiten bis zu 24 Stunden wurden die Proben kulturell untersucht. Der kulturelle Nachweis der Legionellen erfolgte dabei nach ISO 11731:2017. Parallelansätze ohne Zugabe von Neutralisierungssubstanzen und Bioziden dienten als Kontrollen.

Die Versuchsansätze enthielten (i) nur Biozid, um dessen Effekt auf die Kultivierbarkeit zu erfassen, (ii) nur Neutralisierungssubstanzen, um eine potentielle Schädigung der Bakterien durch die Neutralisierungssubstanzen selbst zu erfassen oder (iii) sowohl Biozid als auch Neutralisierungssubstanzen zur Bewertung der Effizienz der Inaktivierung der Biozide. Durch Vergleich der erhaltenen Konzentrationen an kultivierbaren Legionellen in den Kontroll-versuchen mit den Konzentrationen in den Versuchsansätzen mit Neutralisierungssubstanzen und/oder Bioziden kann die Wirkung dieser Substanzen auf die Legionellen nachgewiesen werden. Haben Substanzen eine Schädigung der Legionellen zur Folge, so spiegelt sich dies in einer Reduktion der Konzentration an kultivierbaren Legionellen wider. Im Falle einer vollständigen Inaktivierung der bioziden Wirkung sollte die Anzahl der kultivierbaren Bakterien vergleichbar sein mit dem Referenzansatz ohne Behandlung, d.h. es sollte eine vollständige Wiederfindung gegeben sein.

Die Versuche wurden anfangs bei zwei Temperaturen (6 °C und 20 °C) durchgeführt. Die Versuche bei 20 °C simulierten einen ungekühlten Transport der Wasserproben, während die Versuche bei 6 °C einen gekühlten Transport mit evtl. folgender Lagerung im Kühlschrank simulierten. Spätere Versuche mit mehr Ansätzen erfolgten nur bei 6 °C, um die Anzahl der Proben handhabbar zu halten.

8.1 Versuche mit *Legionella pneumophila* Serogruppe 2-14

Die Versuche wurden zunächst mit *L. pneumophila* Serogruppe 2-14 aus einer realen Kühlwasserprobe durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sollten für eine optimierte Versuchsplanung mit anderen Legionellenstämmen, insbesondere mit dem humanpathogenen Stamm DSMZ 7513, genutzt werden.

Die ersten Versuche erfolgten ohne Zugabe eines Biozides, um den Einfluss der Neutralisierungsmischung in den geplanten Zugabekonzentrationen auf Legionellen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass Legionellen gegenüber den eingesetzten Substanzen zum Teil empfindlicher waren als *E. coli*. Während *E. coli* unempfindlich war gegenüber hohen

Konzentrationen an Thioglykolat (bis 500 mg/L), führten 50 mg/L Thioglykolat bei Legionellen bereits zu einem Verlust an Kultivierbarkeit. Die Endkonzentration von Natriumthioglykolat wurde daher auf 20 mg/L begrenzt, (Neutralisierungsmischung NM 2, Tabelle 7), um die Kultivierbarkeit der Legionellen nicht zu beeinträchtigen.

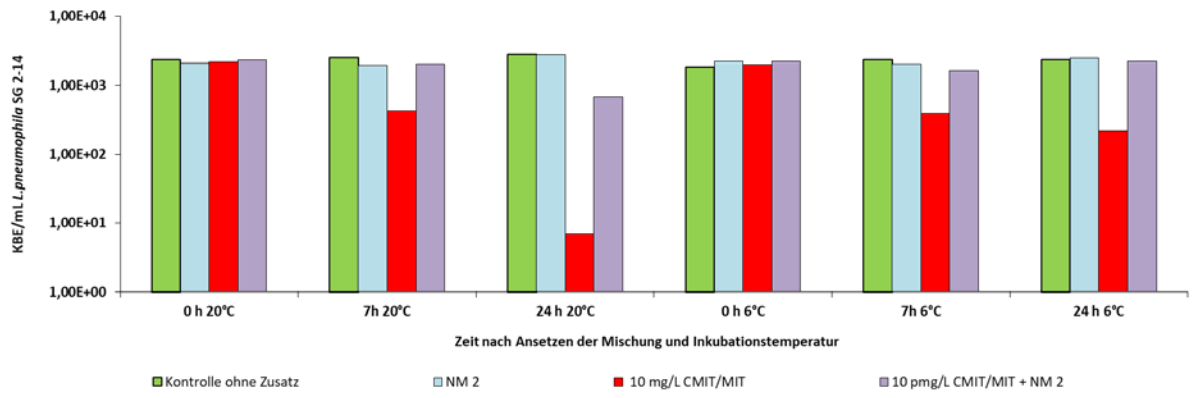
Tabelle 7: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung 2 (NM 2).

Neutralisierungssubstanzen	Endkonzentration im Ansatz (mg/L oder ppm)
Lecithin	3
Saponin	30
Polysorbat 80 (Tween 80)	30
Natriumthiosulfat	18
Thioglykolat	20

8.1.2 Neutralisierung von CMIT/MIT

Im ersten Versuch wurde die Neutralisierung von 10 mg/L CMIT/MIT mit der Neutralisierungsmischung NM 2 geprüft (Abb. 2).

Abbildung 2: Neutralisierung von CMIT/MIT (10 mg/L).



Wirkung der Neutralisierungsmischung 2 (NM 2), des Biozides CMIT/MIT (10 mg/L) sowie der Mischung aus Biozid und Neutralisierungsmischung auf die Kultivierbarkeit von *Legionella pneumophila* SG2-14 im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden entweder bei 20 °C oder bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen.
Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Die Wirkung des Biozids CMIT/MIT setzte erwartungsgemäß erst nach einer längeren Inkubationszeit und verstärkt bei der Inkubationstemperatur von 20 °C ein (Abb. 2), da nicht-oxidierende Biozide im Vergleich zu oxidierenden Bioziden meist eine langsamere, dafür aber anhaltendere Wirkung besitzen.

Die Kultivierbarkeit der Legionellen wurden durch die Neutralisierungsmischung NM 2 nicht beeinflusst.

Die Wiederfindung von *Legionella pneumophila* SG2-14 im Ansatz mit Biozid und Neutralisierungsmischung war vergleichbar mit der Kontrolle ohne Zusätze (Abb. 2). Nur bei

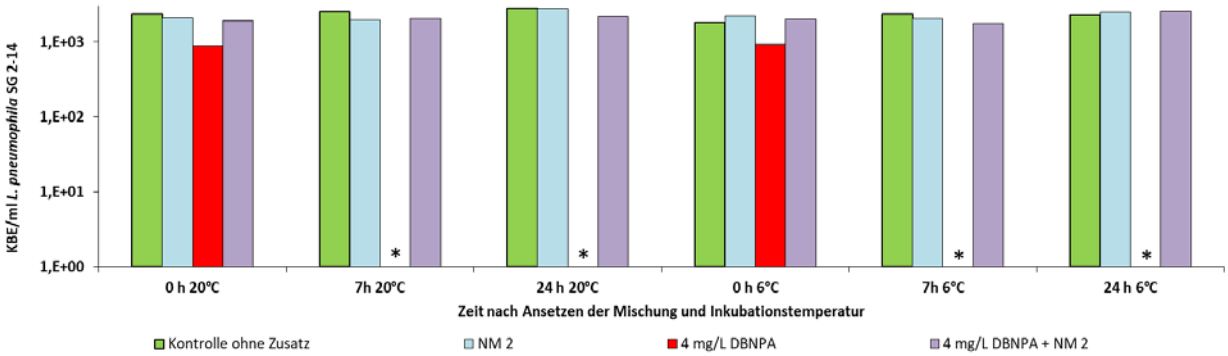
20 °C war die Wiederfindung nach 24 h etwas geringer. Da eine Probenlagerung für 24 h bei 20 °C aber nicht normgerecht ist, kann die verwendete Neutralisierungsmischung insgesamt als geeignet angesehen werden, um die Inaktivierung des Biozides CMIT/MIT in einer Konzentration von 10 mg/L zu gewährleisten.

Fazit: Die Mischung beeinflusst die Kultivierbarkeit der Legionellen nicht und neutralisiert bei normgerechter Probenlagerung effizient die biozide Wirkung von 10 mg/L CMIT/MIT.

8.1.3 Neutralisierung von DBNPA

Im zweiten Versuch wurde die Neutralisierungsmischung NM 2 auf ihre Eignung zur Inaktivierung der bioziden Wirkung von 4 mg/L DBNPA getestet.

Abbildung 3: Neutralisierung von DBNPA (4 mg/L).



Wirkung der verwendeten Neutralisierungsmischung NM 2, des Biozides DBNPA (4 mg/L) sowie des Gemisches aus Biozid und Neutralisierungsmischung auf die Kultivierbarkeit von *Legionella pneumophila* SG2-14 im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden entweder bei 20 °C oder bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen. Die Sternchen stehen für Legionellenkonzentrationen < 1 KBE/mL.
Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Das Biozid DBNPA hatte eine starke Wirkung auf den eingesetzten Legionellenstamm. Bereits nach 7 h wurden keine kultivierbaren Legionellen mehr nachgewiesen (Abb. 3).

Die Legionellen wurden auch in diesem Versuch durch die Neutralisierungsmischung 2 nicht beeinflusst.

Die Wiederfindung von *Legionella pneumophila* SG2-14 in den Ansätzen mit Biozid und Neutralisierungsmischung war in allen Ansätzen vergleichbar mit der Kontrolle ohne Zusätze.

Fazit: Die Mischung beeinflusst die Kultivierbarkeit nicht und neutralisiert effizient die biozide Wirkung von 4 mg/L DBNPA.

8.1.4 Neutralisierung von quaternären Ammoniumsalzen

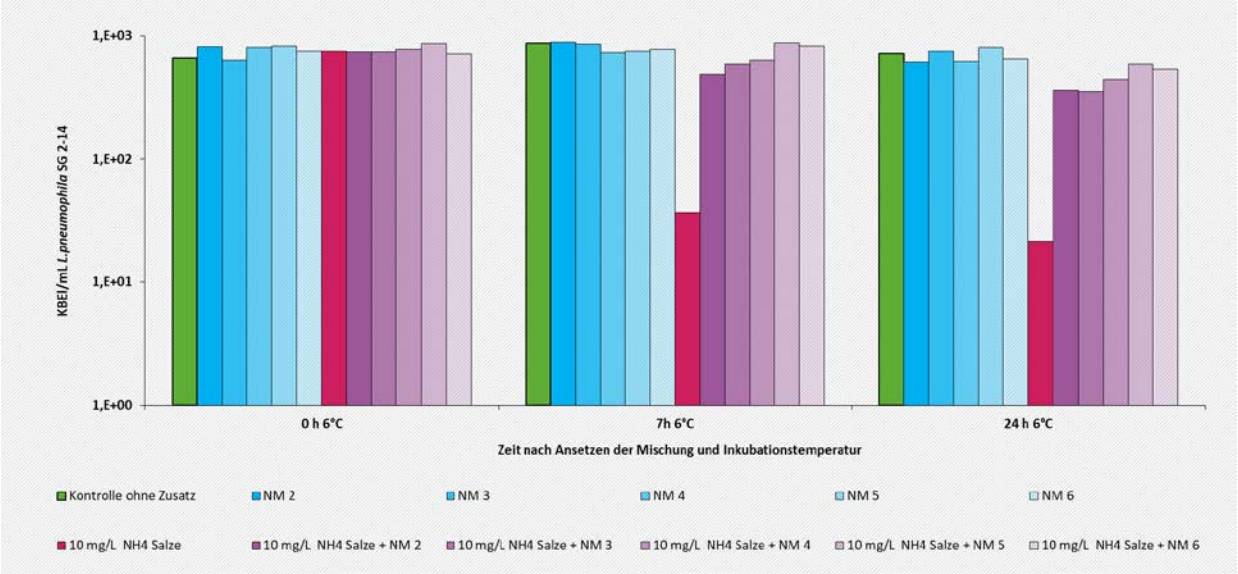
Die Neutralisierungsmischung NM 2 führte nicht reproduzierbar zu einem zufriedenstellenden Ergebnis in Kombination mit 10 mg/L quaternären Ammoniumsalzen. Die Neutralisierungsmischung wurde aus diesem Grund durch graduelle Erhöhung der Konzentration an Lecithin angepasst. Auch die Wirkung einer Verdoppelung der Konzentrationen von Saponin und Tween 80 wurde getestet (Tab. 8).

Tabelle 8: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischungen NM 2-6.

Neutralisierungssubstanzen	NM 2	NM 3	NM 4	NM 5	NM 6
	Endkonzentration (mg/L) oder ppm)				
Lecithin	3	6	12	30	30
Saponin	30	30	30	30	60
Polysorbat 80 (Tween 80)	30	30	30	30	60
Natriumthiosulfat	18	18	18	18	18
Thioglykolat	20	20	20	20	20

Der Versuch mit quaternären Ammoniumsalzen wurde im Unterschied zu den vorherigen Versuchen nur bei 6 °C durchgeführt, um die Anzahl der Versuchsansätze handhabbar zu gestalten. Dies ist vertretbar, da ein ungekühlter Transport der Wasserproben nach den neuen Normen nicht mehr zulässig ist.

Abbildung 4: Neutralisierung von quaternären Ammoniumsalzen (10 mg/L).



Wirkung der Neutralisierungsmischungen NM 2-6, des Biozides ‚quaternäre Ammoniumsalze' (NH4 Salze) sowie der Mischungen aus Biozid und Neutralisierungsmischungen NM 2 – NM 6 auf die Kultivierbarkeit von *Legionella pneumophila* SG2-14 im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen.

Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Das Biozid quaternäre Ammoniumsalze zeigte in der eingesetzten Konzentration eine ähnliche Wirkung auf den eingesetzten Legionellenstamm wie das Biozid CMIT/MIT. Nach 7 h wurde eine Reduktion der Konzentration an kultivierbaren Legionellen um gut 1 log-Stufe erreicht. Nach 24 h wurde eine weitere geringe Reduktion nachgewiesen; die Konzentration an kultivierbaren Legionellen lag aber immer noch bei ca. 20 KBE/ mL (Abb. 4).

Die Legionellen wurden durch die Neutralisierungsmischungen 2-6 nicht beeinflusst.

Die Wiederfindung von *Legionella pneumophila* SG2-14 im Ansatz mit Biozid und Neutralisierungsmischung wies nur kleine Unterschiede zwischen den verwendeten Neutralisationsansätzen 2 bis 6 auf. In den Ansätzen mit den Neutralisierungsmischungen NM 5 und NM 6 zeigten sich die besten Wiederfindungsraten.

Fazit: Durch eine Erhöhung der Lecithinkonzentration auf 30 mg/L in der Neutralisierungsmischung wurde eine reproduzierbar verbesserte Neutralisierung von quaternären Ammoniumverbindungen (Wirkstoffkonzentration: 10 mg/L) erreicht.

8.1.5 Neutralisierung von Bronopol

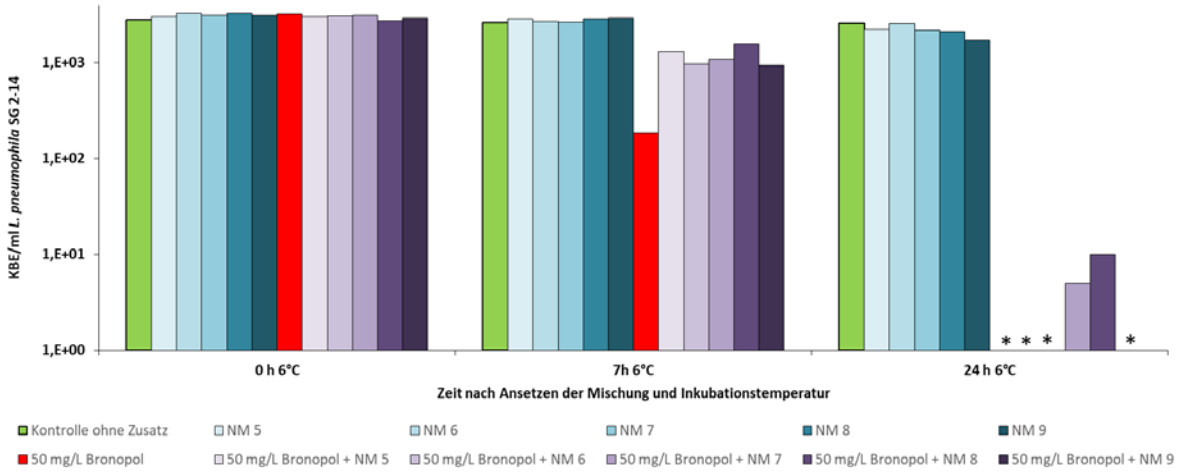
Die Aufhebung der bioziden Wirkung von 50 mg/L Bronopol wurde mit den Neutralisierungsmischungen NM 5 und NM 6 mit erhöhten Konzentrationen an Lecithin (Tab.8) sowie den den Neutralisierungsmischungen NM 7-NM 9, die Histidin enthielten (Tab. 9) getestet. Histidin ist ebenfalls häufig ein Bestandteil von Neutralisierungsmischungen und wurde, in Kombination mit anderen Neutralisierungssubstanzen u.a. empfohlen für die Inaktivierung von Bronopol (Wallhäußer 1995) und von Aldehyden (DIN EN 13623).

Tabelle 9: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischungen NM 5-9.

Neutralisierungssubstanzen	NM 5	NM 6	NM 7	NM 8	NM 9
	Endkonzentration (mg/L) oder ppm)				
Lecithin	30	30	30	30	30
Saponin	30	60	30	30	60
Polysorbat 80 (Tween 80)	30	60	30	30	60
Natriumthiosulfat	18	18	18	18	18
Thioglykolat	20	20	20	20	20
Histidin	-	-	10	100	10

Wie beim Versuch mit quaternären Ammoniumsalzen wurden die Wiederfindungsexperimente mit Bronopol nur bei 6 °C durchgeführt.

Abbildung 5: Neutralisierung von Bronopol (50 mg/L) durch NM 5-9.



Zeitliche Änderung der Kultivierbarkeit von *Legionella pneumophila* SG 2-14 in kupferfreiem Wasser in Anwesenheit die Neutralisierungsmischungen NM 5 – NM 9 ohne und mit 50 mg/L Bronopol im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen.
Die Sternchen stehen für Legionellenkonzentrationen < 1 KBE/mL.

Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Das Biozid Bronopol zeigte eine Wirkung auf den eingesetzten Legionellenstamm. Nach 7 h wurde eine Reduktion der Konzentration an kultivierbaren Legionellen um ca. 1 log-Stufe erreicht. Nach 24 h wurden keine kultivierbaren Legionellen mehr nachgewiesen (Abb. 5).

Die Legionellen wurden durch die Neutralisierungsmischungen 5-9 nicht beeinflusst.

Eine Aufhebung der bioziden Wirkung von 50 mg/L Bronopol wurde durch die Neutralisierungsmischungen NM 5 - NM 9 aber nicht erreicht. Nach 24 Stunden wurden nur noch in den Versuchen mit den Neutralisierungsmischungen NM 7 und NM 8 sehr geringe Legionellenkonzentrationen (5 KBE/mL bzw. 10 KBE/mL) nachgewiesen. Die neutralisierende Wirkung von Histidin war damit nur schwach. Die Erhöhung der Konzentrationen von Saponin und Tween 80 wie in der Neutralisierungsmischung NM 6 und NM 9 wurde nicht weiter in Betracht gezogen. Letzteres wurde unterstützt durch weitere, hier nicht gezeigte Versuche, die auch eine inhibitorische Wirkung dieser Substanzen auf die Kultivierbarkeit anderer Legionellenstämme zeigten.

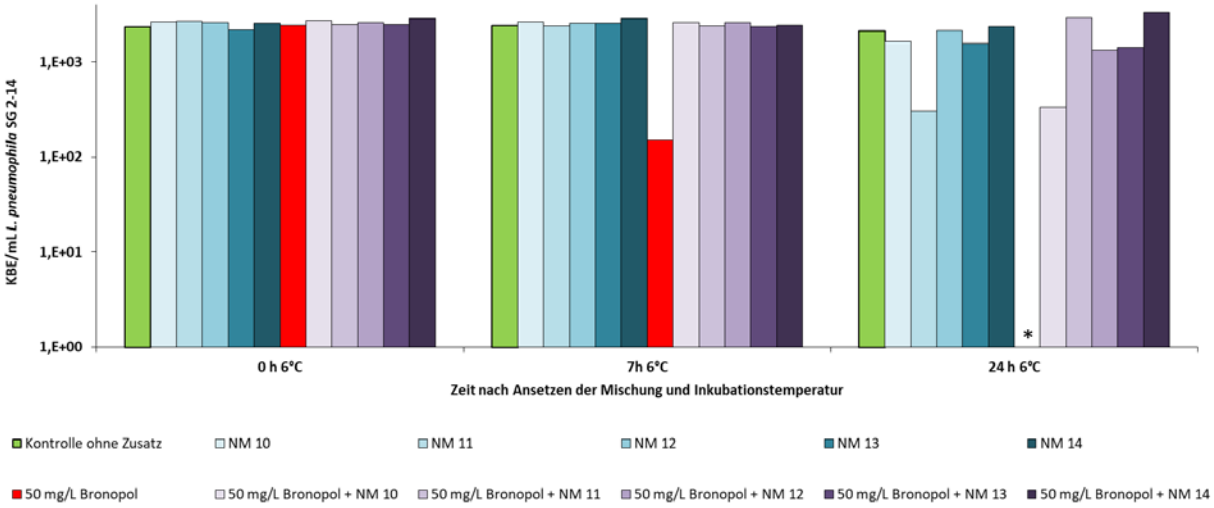
Fazit: Auch die erweiterten Neutralisierungsmischungen erwiesen sich als nicht geeignet für die Neutralisierung der bioziden Wirkung von 50 mg/L Bronopol.

Die Neutralisierungsmischung wurde daher im den folgenden Versuchen nochmals erweitert. Getestet wurde die Wirkung von Cystein, Dithiothreitol (DTT) und Natriumbisulfit. DTT besitzt die Eigenschaft, Disulfidbrücken zu reduzieren und bereits oxidierte Sulfhydrylgruppen im reduzierten Zustand zu halten. Bisulfit findet Anwendung als generelles Antioxidans und verhindert u.a. die Bildung von toxischem Formaldehyd, das durch die Zersetzung von Bronopol entstehen kann. Da die biozide Wirkung von Bronopol zum Teil auf der Oxidation von freien Sulfhydrylgruppen beruht, wurde die Zugabe von Cystein als Ersatzsubstrat für Bronopol getestet. Insgesamt wurden fünf weitere Neutralisierungsmischungen (NM 10 - NM14) getestet (Tab. 10).

Tabelle 10: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischungen NM 10-14.

Neutralisierungssubstanzen	NM 10	NM 11	NM 12	NM 13	NM 14
	Endkonzentration (mg/L) oder ppm)				
Lecithin	30	30	100	100	100
Saponin	30	30	30	30	30
Polysorbat 80 (Tween 80)	30	30	30	30	30
Natriumthiosulfat	18	18	18	18	18
Thioglykolat	20	20	20	20	20
Histidin	-	-	-	100	100
L-Cystein	100	100	100	100	100
Dithiothreitol (DTT)	100	100	100	100	-
Natriumbisulfit	-	100	-	-	-

Abbildung 6: Neutralisierung von Bronopol (50 mg/L) durch NM 10-14.



Zeitliche Änderung der Kultivierbarkeit von *Legionella pneumophila* SG 2-14 in kupferfreiem Wasser in Anwesenheit die Neutralisierungsmischungen NM 7-11 ohne und mit 50 mg/L Bronopol im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen.
Das Sternchen steht für eine Legionellenkonzentration < 1 KBE/mL.

Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Das Biozid Bronopol zeigte eine Wirkung auf den eingesetzten Legionellenstamm. Nach 7 h wurde eine Reduktion der Konzentration an kultivierbaren Legionellen um ca. 1 log-Stufe erreicht. Nach 24 h wurden keine kultivierbaren Legionellen mehr nachgewiesen (Abb. 6).

Die Legionellen wurden durch die Neutralisierungsmischungen 10 sowie 12-14 nicht beeinflusst (Abb. 6). Die Neutralisierungsmischung 11 mit Natriumbisulfit andererseits führte nach 24 h zu einer Reduktion der Konzentration an kultivierbaren Legionellen, obwohl dieser Effekt durch die Anwesenheit von 50 mg/L Bronopol wieder aufgehoben wurde. Die Neutralisierungsmischung NM 13 mit Histidin und die Ansätze mit DTT zeigten keine bessere Wiederfindung als die Ansätze ohne Histidin und ohne DTT. Vermutlich beruht die Neutralisation von Bronopol auf dessen Zehrung durch überschüssiges Cystein.

Fazit: Durch die Zugabe von 100 mg/L Cystein zur Neutralisierungsmischung wurde eine effiziente Neutralisierung von Bronopol (Wirkstoffkonzentration: 50 mg/L) erreicht. Da die Anwesenheit von Histidin und DTT ohne zusätzliche Wirkung war und die Legionellen durch Natriumbisulfit (in Abwesenheit von Bronopol) gehemmt wurden, wurde für die folgenden Experimente die Neutralisierungsmischung NM 15 gewählt (Tab. 11).

Tabelle 11: Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung NM 15.

Neutralisierungssubstanzen	Endkonzentration im Ansatz (mg/L oder ppm)
Lecithin	100
Saponin	30
Polysorbat 80 (Tween 80)	30
Thioglykolat	20
Natriumthiosulfat	18
L-Cystein	100

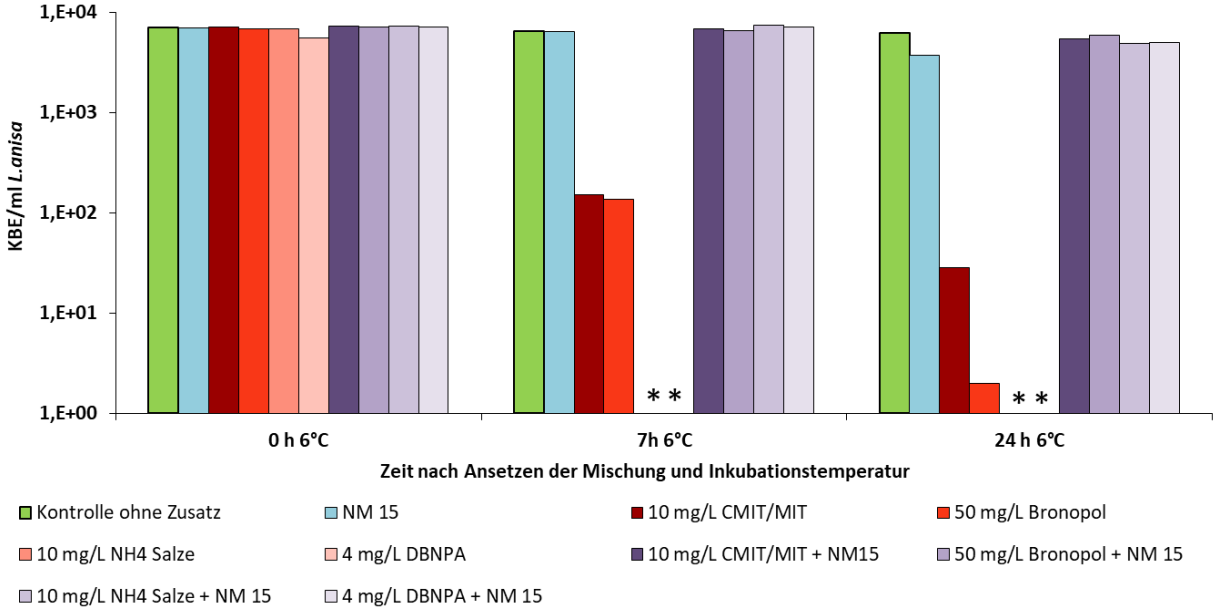
8.2 Versuche mit anderen Legionellen

Die mit *Legionella pneumophila* SG2-14 optimierte Neutralisierungsmischung NM 15 (Tab. 11) wurde für die weiteren Versuche mit anderen Legionellen verwendet.

8.2.1 Überprüfung der Neutralisationseffizienz mit *Legionella anisa*

In einem ersten Experiment wurde die Wirkung der vier untersuchten nicht-oxidativen Biozide auf *Legionella anisa* ohne oder mit Zusatz der Neutralisierungsmischung 15 untersucht (Abb. 7).

Abbildung 7: Wiederfindung von *Legionella anisa*.



Wirkung des Neutralisierungsmischung NM 15, verschiedener nicht-oxidativer Biozide sowie der Mischung aus Biozid und Neutralisierungsmischung NM 15 auf die Kultivierbarkeit von *Legionella anisa* im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen. Die Bakterien waren suspendiert in Kupfer-freiem Trinkwasser. Die Sternchen stehen für Legionellenkonzentrationen < 1 KBE/mL.

Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Mit *Legionella anisa* wurden vergleichbare Ergebnisse wie mit dem zuvor eingesetzten *L. pneumophila* SG 2-14 Stamm erhalten. Die biozide Wirkung der eingesetzten quaternären Ammoniumverbindung war aber bei *L. anisa* stärker als bei dem *L. pneumophila* SG 2-14 Stamm.

Die Neutralisierungsmischung NM 15 hatte innerhalb der getesteten 24 h bei 6 °C keine negative Wirkung auf die Kultivierbarkeit von *Legionella anisa*.

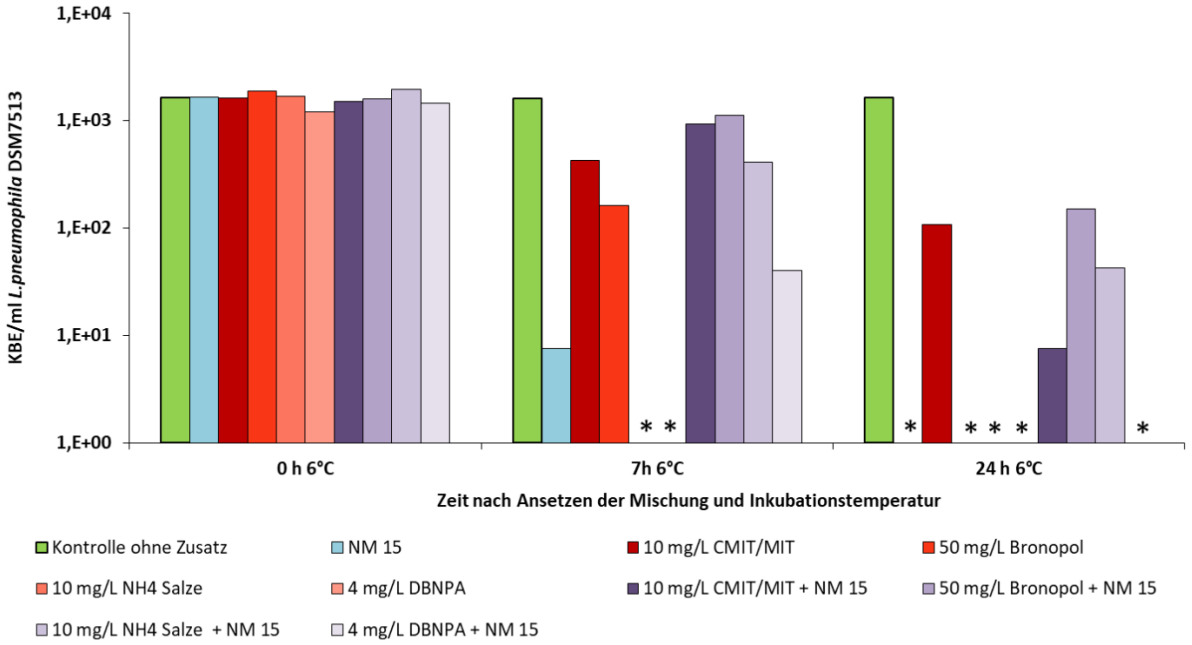
Die Wiederfindung von *L. anisa* in den Ansätzen mit Biozid und Neutralisierungsmischung war in allen Ansätzen vergleichbar mit der Kontrolle ohne Zusätze.

Fazit: Die Neutralisierungsmischung 15 erzielte eine vollständige Wiederfindung der im Experiment eingesetzten *Legionella anisa*. Dies kann als Beweis gesehen werden, dass die darin enthaltenen Komponenten das Potential haben, die getesteten nicht-oxidativen Biozide in den angegebenen Konzentrationen vollständig zu neutralisieren, ohne *L. anisa* zu schädigen.

8.2.2 Überprüfung der Neutralisationseffizienz mit *Legionella pneumophila SG 1*

In einem zweiten Experiment wurde die Wirkung der vier untersuchten nicht-oxidativen Biozide auf *Legionella pneumophila* SG 1 (DSM 7513) ohne oder mit Zusatz der Neutralisierungsmischung NM 15 untersucht (Abb. 8).

Abbildung 8: Wiederfindung von *Legionella pneumophila* SG 1 (DSM 7513).



Wirkung der Neutralisierungsmischung NM 15, verschiedener nicht-oxidativer Biozide sowie der Mischung aus Biozid und Neutralisierungsmischung auf die Kultivierbarkeit von *Legionella pneumophila* SG1 (DSM 7513) im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen. Die Bakterien waren suspendiert in Kupfer-freiem Trinkwasser. Die Sternchen stehen für Legionellenkonzentrationen < 1 KBE/mL.

Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Die Wirkung der Biozide auf *Legionella pneumophila* DSM 7513 war nach 7 h vergleichbar mit der Wirkung auf *L. anisa*. Während bei den Ansätzen, die mit CMIT/MIT oder Bronopol behandelt wurden, die Legionellenkonzentration sank, wurden für die mit quaternären Ammoniumsalzen oder mit DNBPA behandelten Ansätze keine Kolonien gefunden. Mit Ausnahme von CMIT/MIT, das weder *L. pneumophila* DSM 7513 noch *L. anisa* gut abtötete, waren die Legionellenkonzentrationen nach 24 h für alle mit Biozid behandelten Ansätze unter der Nachweisgrenze.

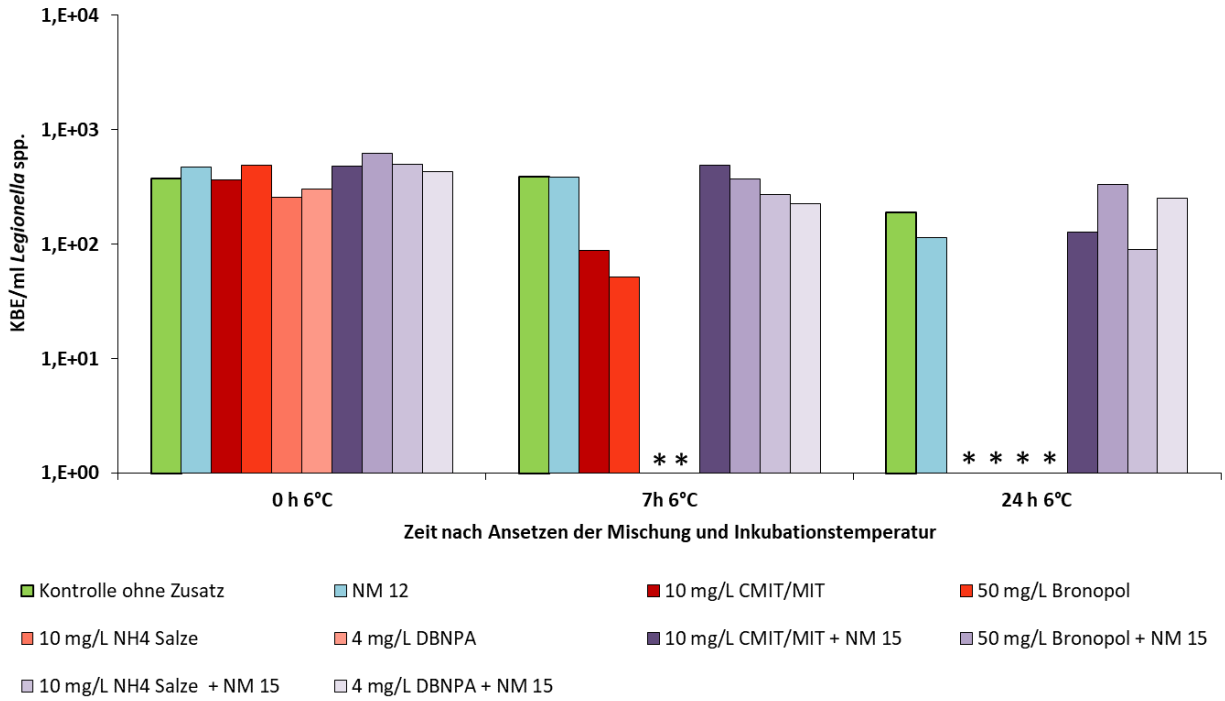
Im Gegensatz zu den Experimenten mit *L. pneumophila* SG 2-14 und mit *L. anisa*, wurde aber mit *Legionella pneumophila* DSM 7513 keine vollständige Wiederfindung in den nur mit Neutralisierungsmischung versetzten Ansätzen erreicht. In diesen Ansätzen kam es bereits nach 7 h bei 6 °C zu einer starken Reduktion der Kultivierbarkeit. Nach einer Inkubation von 24 h wurden keine kultivierbaren Legionellen nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass *L. pneumophila* DSM 7513 durch die Neutralisierungsmischung in der Kultivierbarkeit beeinträchtigt wird. Interessanterweise war nach 24 h die Wiederfindung in Anwesenheit von Biozid zum Teil erhöht. Dies bedeutet, dass die Neutralisierungsmischung eine größere Schädigung von *Legionella pneumophila* DSM 7513 zur Folge hatte als das Biozid selbst.

Fazit: Die Neutralisierungsmischung NM 15 hat eine schädigende Wirkung auf *Legionella pneumophila* DSM 7513. Komponenten der Mischung müssen mit diesem Legionellen Typ-Stamm unverträglich sein.

8.2.3 Überprüfung der Neutralisationseffizienz mit *Legionella* spp.

In einem dritten Experiment wurde die Wirkung der vier untersuchten nicht-oxidativen Biozide auf das Kühlwasserisolat *Legionella* spp. ohne oder mit Zusatz der Neutralisierungsmischung 15 untersucht (Abb. 9).

Abbildung 9: Wiederfindung von *Legionella* spp.



Wirkung der Neutralisierungsmischung NM 15, verschiedener nicht-oxidativer Biozide sowie der Mischung aus Biozid und Neutralisierungsmischung auf die Kultivierbarkeit von *Legionella* spp. im Vergleich zu einer Kontrolle (grün) ohne Zusätze (ohne Biozid und ohne Neutralisierungsmischung). Die Suspensionen wurden bei 6 °C inkubiert. Proben wurden direkt nach dem Ansetzen, nach 7 h und nach 24 h entnommen. Die Bakterien waren suspendiert in Kupfer-freiem Trinkwasser. Die Sternchen stehen für Legionellenkonzentrationen < 1 KBE/mL.

Quelle: Eigene Darstellung, IWW Zentrum Wasser

Nach einer Einwirkzeit von 7 h bei 6 °C war die Wirkung der Biozide auf *Legionella* spp. aus dem Kühlwasser vergleichbar mit der Wirkung auf *L. anisa* und *L. pneumophila DSM 7513*. Nach einer Einwirkzeit von 24 h hatten CMIT/MIT und Bronopol im Vergleich eine stärkere Wirkung auf dieses Legionellenisolat, es wurden in diesen Ansätzen keine kultivierbaren Legionellen mehr nachgewiesen.

Die Neutralisierungsmischung NM 15 hatte innerhalb der getesteten 7 h bei 6 °C keine negative Wirkung auf die Kultivierbarkeit von *Legionella* spp.; nach 24 h wurde nur eine geringfügige Reduktion der Konzentration an kultivierbaren Legionellen beobachtet. Dies deutet auf eine gute Verträglichkeit der Neutralisierungsmischung mit dem verwendeten *Legionella* spp. Stamm hin.

Fazit: Die Neutralisierungsmischung NM 15 beeinträchtigte die Kultivierbarkeit des ausgewählten *Legionella spp.* Stammes nicht. Es wurde eine effiziente Neutralisierung aller getesteten nicht-oxidativen Biozide erzielt.

9 Aktueller Kenntnisstand und Empfehlungen für weitere Untersuchungen

Das Ziel des Vorhabens war die Entwicklung eines geeigneten Inaktivierungsverfahrens für am Markt häufig eingesetzte nicht-oxidierende Biozide. Die Neutralisierungssubstanzen sollten keine Schädigung der Legionellen hervorrufen und möglichst auch nicht die im Kühlwasser vorliegende Begleitflora beeinflussen.

Die Ergebnisse zeigen, dass prinzipiell eine Inaktivierung der bioziden Wirkung der gängigen nicht-oxidativen Biozide erreicht werden kann. In dem Projekt konnte eine Kombination von Substanzen identifiziert werden, die als Neutralisierungsmischung erfolgreich die bioziden Wirkungen von 10 mg/L CMIT/MIT, 4 mg/L DBNPA, 50 mg/L Bronopol sowie 10 mg/L quaternäre Ammoniumsalze neutralisierten. Die Neutralisierungssubstanzen sind kompatibel mit der Anwesenheit von Natriumthiosulfat zur Neutralisierung von oxidativen Bioziden.

Sehr gute Resultate wurden in den Experimenten mit *Legionella pneumophila* SG2-14, *Legionella anisa* und einem *Legionella* spp. Stamm aus dem Kühlwasser erzielt. Die Neutralisierungsmischung hatte bei diesen Teststämmen keinen negativen Effekt auf die Wiederfindung und alle Biozide wurden erfolgreich neutralisiert.

Nicht zufriedenstellend war das Ergebnis mit dem Typ-Stamm *Legionella pneumophila* DSM 7513 als Vertreter der Serogruppe 1, der sich als anfällig gegenüber der verwendeten Neutralisierungsmischung erwies. Dies ist insofern kritisch, als *L. pneumophila* SG 1 hinsichtlich gesundheitlicher Auswirkungen die wichtigste Legionellenart und Serogruppe ist. In weiteren Experimenten muss unbedingt geklärt werden, ob diese hohe Empfindlichkeit gegenüber der Neutralisierungsmischung 15 eine generelle Eigenschaft von *L. pneumophila* SG 1 Stämmen ist oder ob nur der geprüfte DSMZ-Stamm, der sich schon lange in der Stammsammlung befindet, diese Empfindlichkeit zeigt. Sollten auch andere *L. pneumophila* SG 1 Stämme diese Empfindlichkeit zeigen, müssen weitere Experimente folgen, in denen die dafür verantwortlichen Substanzen identifiziert werden und die Zusammensetzung der Neutralisierungsmischung entsprechend angepasst wird.

Natriumthioglykolat wurde als wichtigste Komponente für die Neutralisation von DBNPA bestätigt. Die Anwesenheit von 20 mg/L Endkonzentration dieser Substanz hatte keinen negativen Einfluss auf die Konzentration kultivierbarer Legionellen. Die Anwesenheit von ausreichenden Konzentrationen von Lecithin ist für die effiziente Neutralisierung von quaternären Ammoniumsalzen wichtig. Die Notwendigkeit von Saponin in der Neutralisierungsmischung muss kritisch überdacht werden. Obwohl die Substanz in einer Vielzahl von Neutralisierungsmischungen enthalten ist (z.B. VDI 2047 Anhang A, DIN EN 1276 Anhang B oder DIN EN 13623 Anhang B), kann diese Gruppe von amphiphatischen Glykosiden per se eine gewisse antimikrobielle Wirkung aufweisen (Maatalah et al. 2012). Jedoch wurde auch eine positive Wirkung von Saponin auf bakterielles Wachstum berichtet (Arabski et al. 2012). Auch die Konzentration von Polysorbat 80, das ebenfalls in einer Vielzahl von Neutralisierungsmischungen enthalten ist, sollte ggf. mit *Legionella* Stämmen, die eine hohe Empfindlichkeit gegenüber der Neutralisierungsmischung 15 aufweisen, überprüft werden. Da die Wirkungsweise vieler der hier untersuchten nicht-oxidativen Biozide zumindest teilweise auf der Reaktion mit Sulfhydrylgruppen beruht, war die positive Wirkung der Anwesenheit von Cystein nicht verwunderlich. Die Verfügbarkeit eines Überschusses von Cystein schwächt vermutlich die Reaktion mit Sulfhydrylgruppen bakterieller Zellbestandteile ab. Die Anwesenheit von DTT zur Reduktion bereits gebildeter Disulfide beeinträchtigte im Test mit *Legionella pneumophila* SG2-14 die Kultivierbarkeit der Legionellen nicht; sein Nutzen könnte ggf. mit empfindlichen *Legionella pneumophila* SG 1 Stämmen nochmals überprüft werden. Die Berücksichtigung von Natriumbisulfit als Antioxidans wurde nicht weiterverfolgt.

Natriumbisulfit wird in Festmedien (z.B. Dey-Engley neutralizing broth/agar) neben Lecithin, Thioglykolat und Polysorbat 80 zur Neutralisierung von Desinfektionsmitteln berücksichtigt, zeigte aber im Projekt hemmende Effekte gegenüber Legionellen und *E. coli*.

Der Großteil der hier beschriebenen Versuche wurde bei einer Temperatur von 6 °C durchgeführt. Bei einer Versuchsdurchführung mit Neutralisierungsmischung NM 1 bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) wurde im Fall von *E. coli* eine moderate Aufkeimung um den Faktor von maximal 2-3 erhalten. Dies ist erklärbar durch die Anwesenheit von organischen Substanzen wie Lecithin in der Neutralisierungsmischung, das als Nährstoffquelle dienen können. Das Aufkeimungspotential von realem Kühlwasser wurde in einem Nebenexperiment exemplarisch an einer ausgewählten, gekühlt beim IWW angelieferten Kühlwasserprobe überprüft. Mittels durchflusszytometrischer Messung der Intaktzellzahl (nach Nocker et al. 2017) ergab sich nach Zugabe der Neutralisierungsmischung NM 15 innerhalb von 24 h eine Zunahme der Intaktzellzahl um den Faktor 3,9 für eine Probenlagerung bei 6 °C und um den Faktor 4,7 bei 20 °C. Ohne Zugabe der Neutralisierungsmischung kam es zu keiner Aufkeimung bei 6 °C bzw. zu einer Zunahme der Intaktzellzahl um einen Faktor von 1,3 bei 20 °C. Diese Befunde bedürfen einer detaillierteren Betrachtung mit mehr Proben und der Bestimmung der Gesamtkoloniezahl nach DIN ISO EN 6222. Die allgemeine Erfahrung ist, dass Aufkeimung von koloniebildenden Einheiten durch Kühlung der Proben während Transport und Lagerung auf 6 °C verhindert bzw. minimiert wird. Eine entsprechende Kühlung wird in der neuen Norm zum Nachweis von Legionellen auch gefordert. Auch hinsichtlich der Aktivität der Biozide bei behandelten Kühlwasserproben kann eine Probenaufbewahrung unter Kühlung als förderlich angesehen werden, da die biozide Wirkung der meisten antimikrobiellen Wirkstoffe temperaturabhängig ist. Dies trifft erwiesenermaßen zu auf Bronopol (Shepherd et al. 1988), quaternäre Ammoniumsalze (Paulus 1993) und DBNPA (Ishikawa et al. 2016).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass trotz der erfolgreichen Identifizierung einer Neutralisierungsmischung, die alle hier getesteten nicht-oxidativen Biozide in den eingesetzten Konzentrationen prinzipiell neutralisieren kann und die mit der Anwesenheit von Natriumthiosulfat kompatibel ist, die Verträglichkeit der darin enthaltenen Substanzen unbedingt mit weiteren Legionellenstämmen, insbesondere *L. pneumophila* SG 1 Stämme, überprüft und ggf. angepasst werden muss.

10 Referenzen

Ahlström, B., R. Thompson, et al. (1999). "The effect of hydrocarbon chain length, pH, and temperature on the binding and bactericidal effect of amphiphilic betaine esters on *Salmonella tvphimurium*." Apmis **107**(1-6): 318-324.

Arabski, M., A. Węgierek-Ciuk, et al. (2012). "Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line." BioMed Research International **2012**.

Bryce, D., B. Croshaw, et al. (1978). "The activity and safety of the antimicrobial agent bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1, 3-diol)." J. Soc. Cosmet. Chem 29: 3-24.

Decision, E. R. E. (1994). "2, 2-dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA)." Environmental Protection Agency Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (September 1994) EPA-738 R-94-026.

DIN EN 1040: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung (Basistest) chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1); Deutsche Fassung EN 1040:2005

DIN EN ISO 11731: Wasserbeschaffenheit - Zählung von Legionellen (ISO 11731:2017); Deutsche Fassung EN ISO 11731:2017 Ausgabe 2019-03

DIN EN 1275: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung (Basistest) chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1); Deutsche Fassung EN 1275:2005

DIN EN 1276 Anhang B: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1); Deutsche Fassung EN 1276:2009, Berichtigung zu DIN EN 1276:2010-01; Deutsche Fassung EN 1276:2009/AC:2010

DIN EN 13623 Anhang B: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung gegen Legionella von chemischen Desinfektionsmitteln für wasserführende Systeme - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1); Deutsche Fassung EN 13623:2010

DIN EN ISO/IEC 17025: Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf-und Kalibrierlaboratorien. *Berlin: Beuth* (2005).

DIN EN ISO 19458: Wasserbeschaffenheit - Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 19458:2006); Deutsche Fassung EN ISO 19458:2006

Ferreira, C., A. Pereira, et al. (2011). "Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyldimethyldodecylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **66**(5): 1036-1043.

Ishikawa, M., R. Muraguchi, et al. (2016). "Cytotoxic actions of 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide, a biocide in hydraulic fracturing fluids, on rat thymocytes." Toxicology research **5**(5): 1329-1334.

Kramer, A., K. H. Wallhäusser, et al. (2008). Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung: Qualitätssicherung der Hygiene in Industrie, Pharmazie und Medizin ; 208 Tabellen, Thieme.

Maatalah, M. B., N. K. Bouzidi, et al. (2012). "Antimicrobial activity of the alkaloids and saponin extracts of Anabasis articulate." J. Biotechnol. Pharm. Res **3**(3): 54-57.

Moore, K. E. and R. J. Stretton (1981). "The effect of pH, temperature and certain media constituents on the stability and activity of the preservative, Bronopol." Journal of Applied Bacteriology **51**(3): 483-494.

Nocker, A., Cheswick, R., et al. (2017). "When are bacteria dead? A step towards interpreting flow cytometry profiles after chlorine disinfection and membrane integrity staining." Environmental Technology **38**(7): 891-900.

Paulus, W. (2005). Directory of microbicides for the protection of materials: a handbook, Springer Science & Business Media.

Shepherd, J. A., R. D. Waigh, et al. (1988). "Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol)." Antimicrobial agents and chemotherapy **32**(11): 1693-1698.

Siddiqui, A., I. Pinel, et al. (2017). "Application of DBNPA dosage for biofouling control in spiral wound membrane systems." Desalination and Water Treatment.

UBA 2017: Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen aus Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nasswäschern.

Ullah, S. (2011). Biocides in papermaking chemistry.

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

VDI-Richtlinie: VDI 2047 Blatt 3 Rückkühlwerke - Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen - Kühltürme über 200 MW Kühlleistung (VDI-Kühlturmregeln).

Wallhäußer, K. H. (1995). Praxis der Sterilisation, Desinfektion – Konservierung. Thieme Stuttgart **43**: 391-394.

Williams, T. M. (2006). The mechanism of action of isothiazolone biocide. CORROSION 2006. San Diego, California, NACE International**:** 17.

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