

# Sachbericht zum Verwendungsnachweis

entsprechend Anlage 2 (zu 4.1 NABF 2017)

Thema: KMU-innovativ Verbundprojekt LeMoSe2: KI-basiertes Legionellen-Monitoring-System für Verdunstungskühlanlagen, Teilprojekt 3.

Akronym: LEMOSE2

Förderkennzeichen: 02WQ1597C

Laufzeit des Vorhabens: 01.08.2021 – 31.07.2023 und zum 31.7.2022 teilwiderrufen

## **Ausführende Stelle:**

Technische Universität München

Fakultät für Chemie

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie

Lichtenbergstraße 4

85748 Garching

## **Projektleiter:**

PD Dr. Michael Seidel

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WQ1597 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin /dem Autor.

# 1. Kurzbericht

## 1.1. Ursprüngliche Aufgabenstellung

Das Ziel von LeMoSe2 war es, ein KI-basiertes Legionellen-Monitoringsystem für Verdunstungskühlanlagen, die nach der 42. BImSchV betrieben werden, zu entwickeln. Dieses System sollte kostengünstiges, einfach zu handhaben sein und automatisch kontinuierlich über chemische und physikalische Sensoren indirekt über ein Softsensorysystem das Wachstum von Legionellen kontrollieren. Zum Abgleich der Sensor-Messdaten sollten durch kulturunabhängige Methoden die Konzentration von Legionellen im Kühlwasser einer Verdunstungskühlanlage täglich bestimmt werden. Anhand eines Design-of-Experiment-Plans sollten Abhängigkeiten zwischen Sensor-Messdaten, Wasserchemie (Biozide, Korrosionsschutzmittel, Enthärter, etc.) und Wachstum von Legionellen analysiert werden. Für das Anlernen war eine kulturunabhängige Methode von Nöten, welche *Legionella pneumophila* innerhalb eines Arbeitstages bestimmen kann. Das KI-basiertes Legionellen-Monitoringsystem sollte so optimiert werden, dass eine Verdunstungskühlanlage unterhalb des Prüfwertes von 100 Legionellen pro 100 mL betrieben werden kann. Um das KI-basiertes Legionellen-Monitoringsystem zu realisieren, war es notwendig ein Modell einer Verdunstungskühlanlage zu etablieren, welche in einem Bio2-Labor mit *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 betrieben werden kann, damit täglich die Konzentration von *Legionella pneumophila* kulturunabhängig bestimmt werden kann. Der Prozess „detektieren – analysieren – optimieren“ sollte immer wieder durchlaufen werden, damit ein lernender Regelkreis entsteht.

## 1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die 42. BImSchV beschreibt, welche Maßnahmen ergriffen werden sollen, damit die Bildung von Legionellen im Nutzwasser von Kühltürmen vermieden werden. Bei der Kontrolle der Anlagen verlässt man sich auf kulturbasierte Verfahren, bei denen erst nach 7–10 Tagen aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Die aktuellen Detektionsmethoden für die Legionellen-Konzentration basieren rein auf der Kulturmethode (ISO 11731, 2017), die für Wasseruntersuchungen etabliert ist. Vom Umweltbundesamt wurde in einer Empfehlung eine angepasste Kulturmethode für die 42. BImSchV veröffentlicht. Aber auch diese verbesserte Methode erweist sich als problematisch für die Analyse von stark belasteten Anlagenwässern, wie Kühlturmwässer. Limitierend ist besonders die Überwucherung von Agarplatten während der Kultivierung über den langen Zeitraum und die Verblockung der Sterilfilter, so dass nur sehr geringe Volumina filtriert werden können. Ein weiterer Punkt ist, dass die Kulturmethode ruhende Zellen (VBNC = viable but non culturable) nicht miterfassen. All diese Limitierungen führen dazu, dass die Legionellen-Belastung in Kühltürmen oftmals unterschätzt werden und eine Prozessüberwachung nicht möglich ist. Als Alternative wird an kulturunabhängigen Messmethoden geforscht, welche aber noch nicht in der Routine eingesetzt werden können, weil nicht vergleichbare Ergebnisse in der Einheit kolonienbildende Einheiten pro 100 mL bestimmt werden. Die kulturunabhängigen Messmethoden beruhen entweder auf molekularbiologische Methoden oder auf Immunoassays und können in Abhängigkeit vom Test innerhalb von 2 – 4 Stunden *Legionella* spp. oder *Legionella pneumophila* bestimmen. Eine quantitative Information kann man erhalten, wenn wie bei der Kulturmethode 100 mL Probe filtriert. Standardisierte Protokolle zur kulturunabhängigen Quantifizierung wurden im Rahmen des WIPANO-Projektes LegioRapid erarbeitet, welche in eine Neufassung der VDI 4250 Blatt 2 mündete. Die Ergebnisse aus LegioRapid sollten in LEMOSE2 genutzt werden.

## **Bisherige Arbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. Seidel**

PD Dr. Michael Seidel und dessen Arbeitsgruppe hat Erfahrung in der Umsetzung von Mikroarray-basierten Immunoassays (Seidel und Nießner, 2014), der Durchflusszytometrie (Ott et al., 2011) und molekularbiologischen Methoden (Göpfert et al., 2020 und Hjelmsø et al., 2017). Im Oberflächenwasser konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus monolithischer Adsorptionsfiltration und Sandwich-Mikroarray-Immunoassay Nachweisgrenze von 1 Zelle pro mL erreichen kann (Wunderlich et al., 2016). Im LegioTyper-Projekt wurden Protokolle zur Herstellung von Antikörper-Mikroarrays und der automatisierten Serotypisierung von *Legionella pneumophila* Sg1 etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass bei höheren Konzentrationen eine direkte Messungen aus diversen Matrices wie Prozesswasser, Luft oder Urin möglich ist. Im WIPANO-Projekt LegioRapid wurden Protokolle für die Standardisierung von kulturunabhängigen Methoden etabliert und die Nachweisgrenzen von qPCR, immunomagnetische Separation gekoppelte Durchflusszytometrie und der Sandwich-Mikroarray-Immunoassays bestimmt.

### **1.3. Ablauf des Vorhabens**

Das Projekt wurde von arteos GmbH geleitet und sie waren für die Cloud-Plattform, die KI und der Softsensorentwicklung verantwortlich. Als zweiter Industriepartner war KEBO GmbH im Projekt, welche die wasserchemische Expertise bei Verdunstungskühlanlagen aufwies. Bei der TUM sollte die Versuchsanlage stehen und das KI-basierte Legionellen-Monitoringsystem etabliert werden. Die TUM war für den Betrieb der Versuchsanlage und Messungen von wasserchemischen Parametern und die kulturunabhängige Bestimmung von *Legionella pneumophila* verantwortlich. Das Projekt war auf zwei Jahre angelegt. Der geplante Unterauftragnehmer sprang zu Anfang des Projektes ab. Nach einer beantragten Projektumwidmung wurde am 24.1.2022 die Firma siasys beauftragt, den Sonderbau eines Labormodells eines Legionellen-Inkubators zu bauen. Das notwendige Pflichtenheft für den Sonderbau wurde zu Anfang im Projekt ausgearbeitet. Die Anlage wurde am 22.6.2022 bei der TUM betriebsbereit aufgestellt. Nach Bekanntwerden, dass die KEBO GmbH sich von dem Projekt zurückzieht, hatte der Projektträger das Projekt zum 31.7.22 teilwiderrufen.

### **1.4. Wesentlichen Ergebnisse**

Im Projekt LEMOSE2 wurde ein Sonderbau eines Labormodells eines Legionellen-Inkubators realisiert, welches die notwendige Multisensormesstechnik und Datenübertragungstechnologie bereitstellte, damit ein KI-basiertes Legionellen-Monitoringsystem aufgebaut werden kann. In der kurzen Projektlaufzeit wurde das Pflichtenheft für den Sonderbau erarbeitet, der Bau des Labormodells aus fachlicher Sicht (PD Dr. Seidel) betreut und der Sonderbau eines Legionellen-Inkubators an der TUM in einem Bio2-Labor aufgebaut und in Betrieb genommen. Für das Trainieren der KI wurde ein Design-of-Experiments-Plan ausgearbeitet. In der Projektphase wurde festgestellt, dass eine Konzentrationsmessung unterhalb des Maßnahmenwertes kulturunabhängig am sichersten mit der immunomagnetischen Separation gekoppelten Durchflusszytometrie (rqmicro-Methode) möglich ist. Das entsprechende Messgerät von rqmicro wurde diesbezüglich im Projekt mit realen Kühlturmprozesswässern getestet. Abschließend wurden an der TUM in Garching Verdunstungskühlanlagen identifiziert, welche nach der 42. BImSchV betrieben werden und ein Erstkontakt hergestellt, damit im Projekt die Ergebnisse aus der Laboranlage auf reale Verdunstungskühlanlagen übertragen werden können.

## **1.5. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen**

Im Rahmen des LegioRapid-Projektes zur Standardisierung kulturunabhängiger Detektionsmethoden zur Quantifizierung von *Legionella pneumophila* bestand eine Kooperation mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL, Prof. Herr) und der Technischen Universität Dresden (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Konsiliarlabor Legionellen, Dr. Lück).

## **2. Eingehende Darstellung**

### **2.1. Durchführung und erzielttes Ergebnis**

#### **2.1.1 TP-Nr. 1: Legionellen-Inkubator**

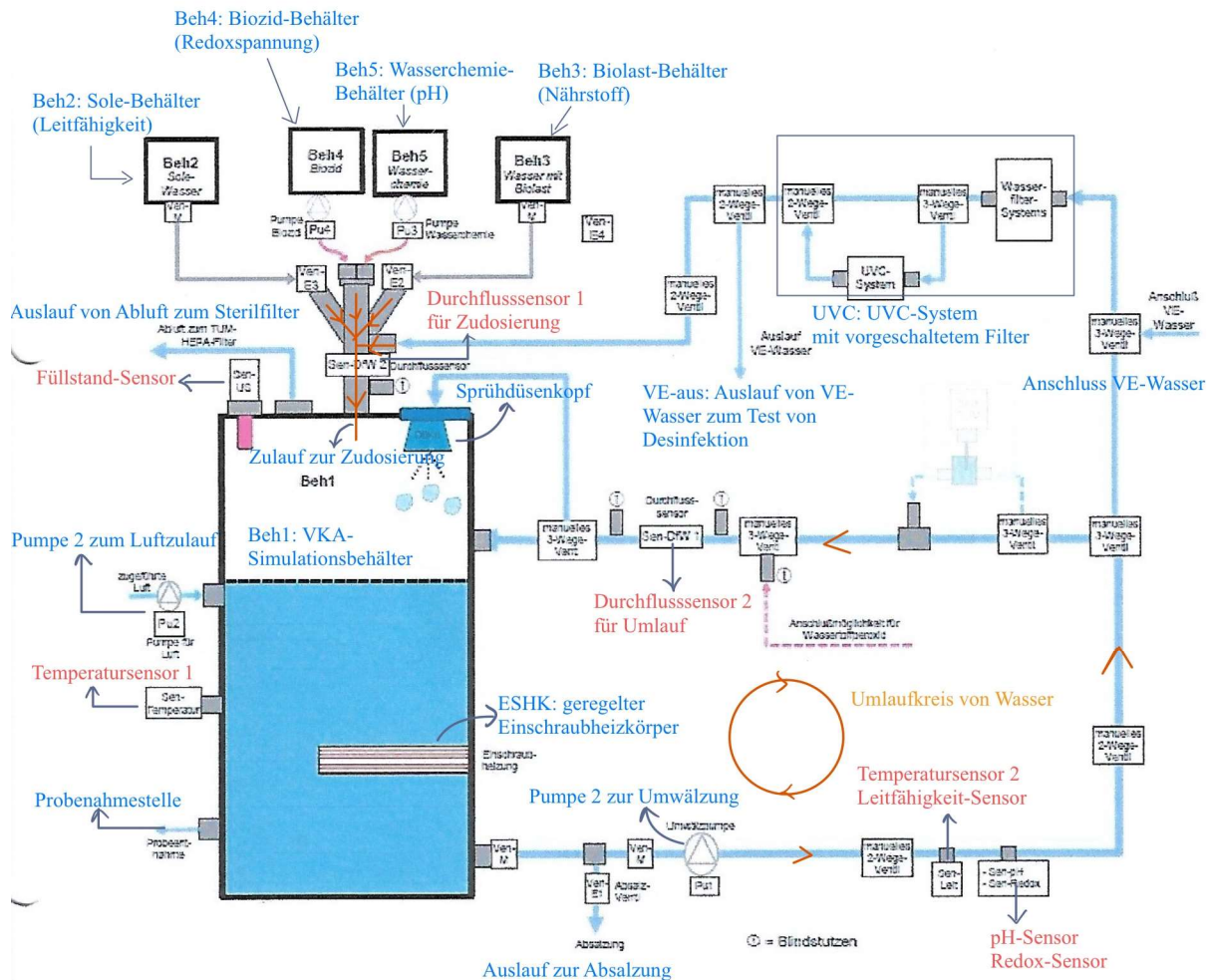
Am Anfang des Projektes war eine kurze Planungsphase für den Legionellen-Inkubator mit der Einholung eines Angebot für den Bau der Sonderanlage geplant. Die Firma Jawatech konnte leider nicht sicherstellen, dass für die geplanten Kosten eine Kleinverdunstungsanlage mit nachgeschalteten Nassabscheider als Legionellen-Inkubator betriebsbereit an der TUM aufgestellt werden kann und hat den erteilten Auftrag kurzfristig storniert. Aus diesem Grund musste das Konsortium schnell handeln und hat ein alternatives Konzept für Legionellen-Inkubator erarbeitet, was folgende Vorteile hatte:

1. Sonderanlage kann im Bio2-Labor aufgestellt werden und ist nicht genehmigungspflichtig.
2. In den Legionellen-Inkubator können *Legionella pneumophila* SG 1 in relevanten Konzentrationen zwischen 100 –10.000 Zellen / 100 mL quantitativ mit der rqmicro-Methode bestimmt werden. Damit bekommt die KI aussagekräftigere Messdaten im relevanten Konzentrationsbereich. Zudem ist eine quantitative Unterscheidung von intakten und nicht-intakten Legionellen möglich, wodurch ein direkter Einfluss der wasserchemischen Parametern auf das Legionellenwachstum messtechnisch erfasst werden kann.

Mit realen Verdunstungskühlanlagenwasser wurden Messungen mit der rqmicro-Methode durchgeführt.

3. Die Sensorik, welche arteos GmbH in den Legionellen-Inkubator einbaut, kann genau mit den gewünschten Prozessen abgestimmt werden und das Gesamtsystem (Sensorik, Elektronik, Auswertesoftware, Legionellen-Inkubator) steht der TUM nach dem Projekt für weitere Forschung zur Verfügung.

Im Folgenden ist der Legionelleninkubator mit allen Funktionalitäten dargestellt:



**Abbildung 1:** Aufbau des Legionelleninkubators

Nach einer Planungs- und Realisierungsphase wurde zum Ende des Projektes an der TUM in dem Bio2-Laboren des Lehrstuhls für Analytische Chemie und Wasserchemie aufgebaut.

Der Legionellen-Inkubator enthält folgende Komponenten, die für den Aufbau eines KI-basierten Legionellen-Monitoringsystem essentiell ist:

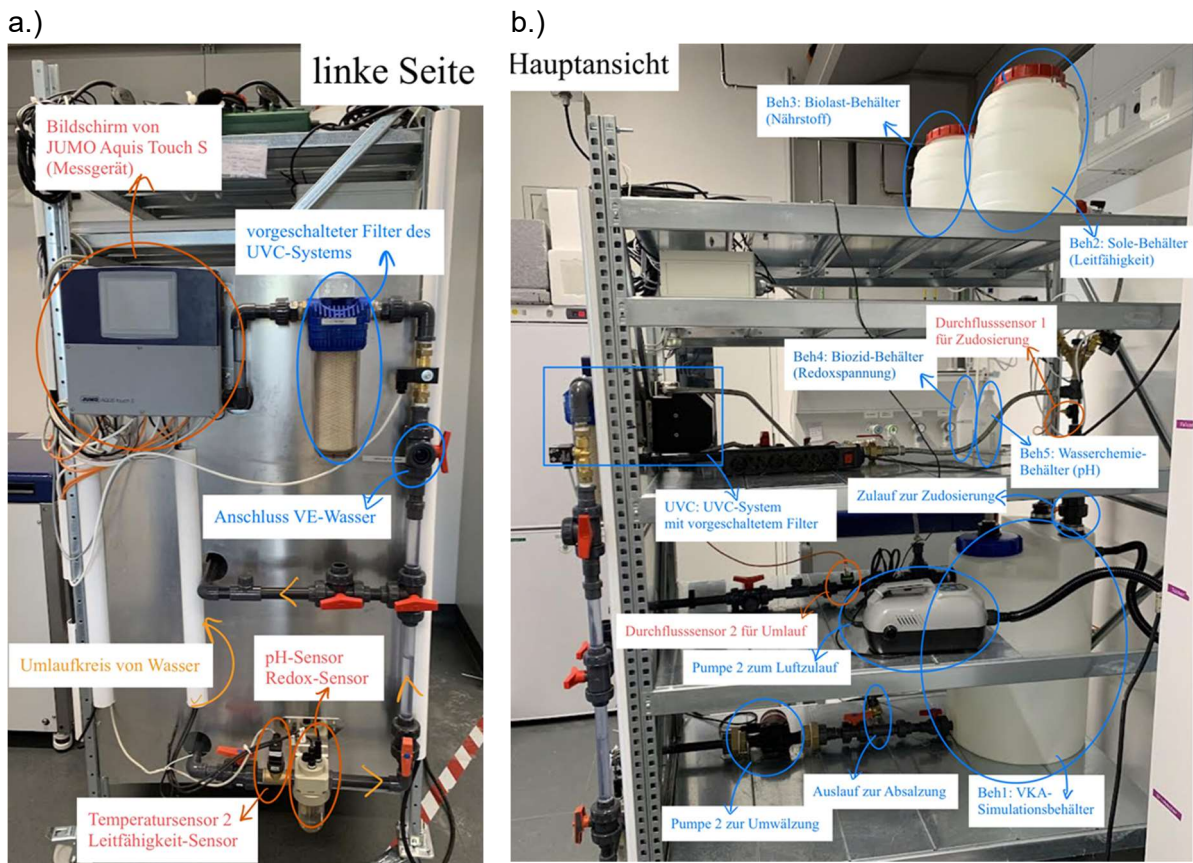
- eine Umwälzung
- 5 Möglichkeiten von Zudosierung
- 4 Zustandssensoren (pH-Wert, Leitfähigkeit, Redox und Temperatur)
- 2 Durchflusssensoren
- Temperaturregelung

Damit können folgende Versuchsreihen systematisch durchgeführt und messtechnisch erfasst werden:

- Simulation von Legionellen-Wachstum in wässriger Phase der VKA
- Bestimmung des gelösten Sauerstoffs in der wässrige Phase unter aerober Bedingungen
- Wasserzulauf (Mikroorganismen und Nährstoff), Wasserablauf, Wasserumlauf
- Simulation der Parameter (Temperatur, pH, Leitfähigkeit, Redox...), Biofilmbildung, Eindickung (Zugabe von Salz), und Absatzung

- Verdunstung von Wasser (nur passiv)
- Rieselfilmreinbau, Tropfenabscheider (nur über Versprühung gelöst)

In Abbildung 2 ist gezeigt, wie der realisierte Aufbau des Legionellen-Inkubators aussieht. Im Projekt konnte die Betriebsbereitschaft des Sonderbaus gezeigt werden, so dass zum Projektende alles soweit geplant und vorbereitet war, dass Versuchsreihen nach DOE-Plänen für das Anlernen der KI durchgeführt werden können.

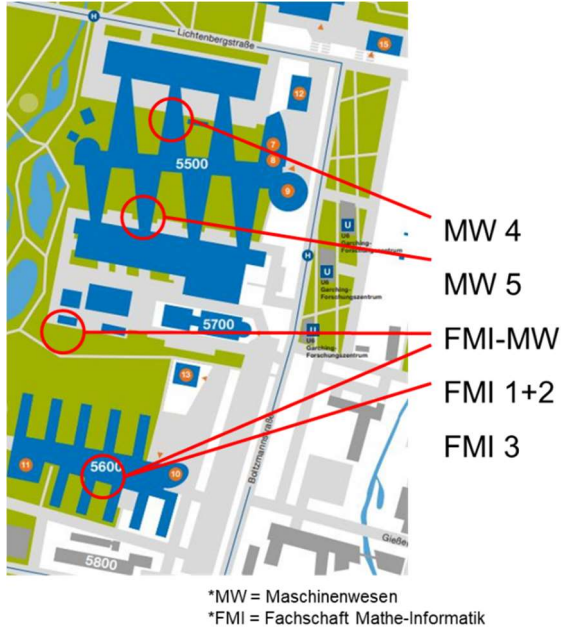


**Abbildung 2:** Aufbau der Multiparameter-Sensormesstechnik (a.) und Gesamtsystem des Legionellen-Inkubators (b.)

### 2.1.2 TP-Nr. 2: Industrie-Kühlturm

An der TUM wurden auf dem Forschungscampus Garching 5 Verdunstungskühlanlagen gefunden, welche nach 42. BlmschV betrieben werden und bei denen es möglich gewesen wäre, das KI-basierte Legionellenmonitoring im realen Betrieb anzuwenden. Weitere Aufgaben waren seitens TUM in TP2 nicht vorgesehen.

a.)



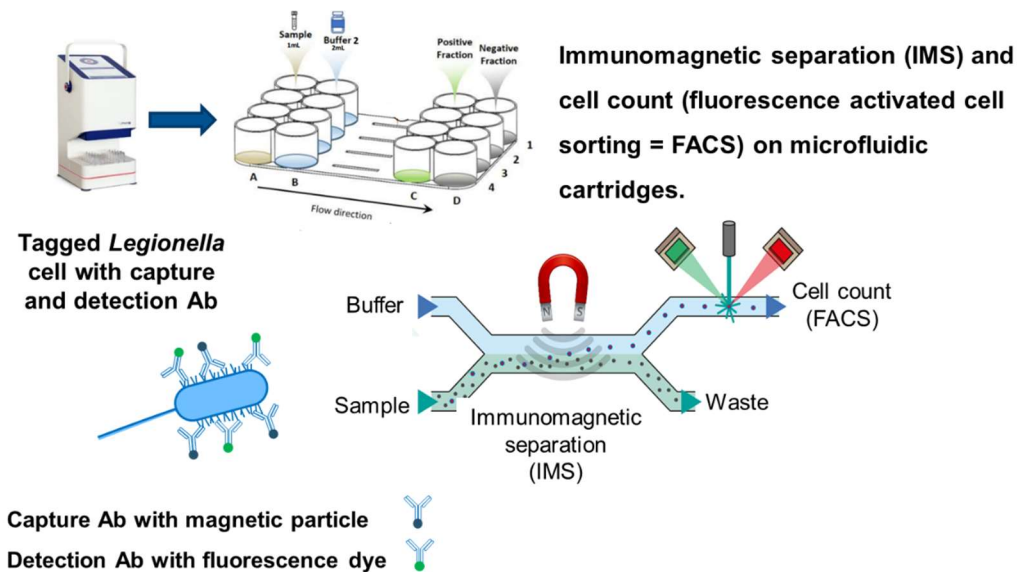
b.)



**Abbildung 3:** Lageplan der Verdunstungskühlanlagen an der TUM (a). Fotos des Verdunstungskühlturms und Probenahmestelle für die Untersuchung des Kühlwassers (b).

### 2.1.3 TP-Nr. 3: Labor-Analysen

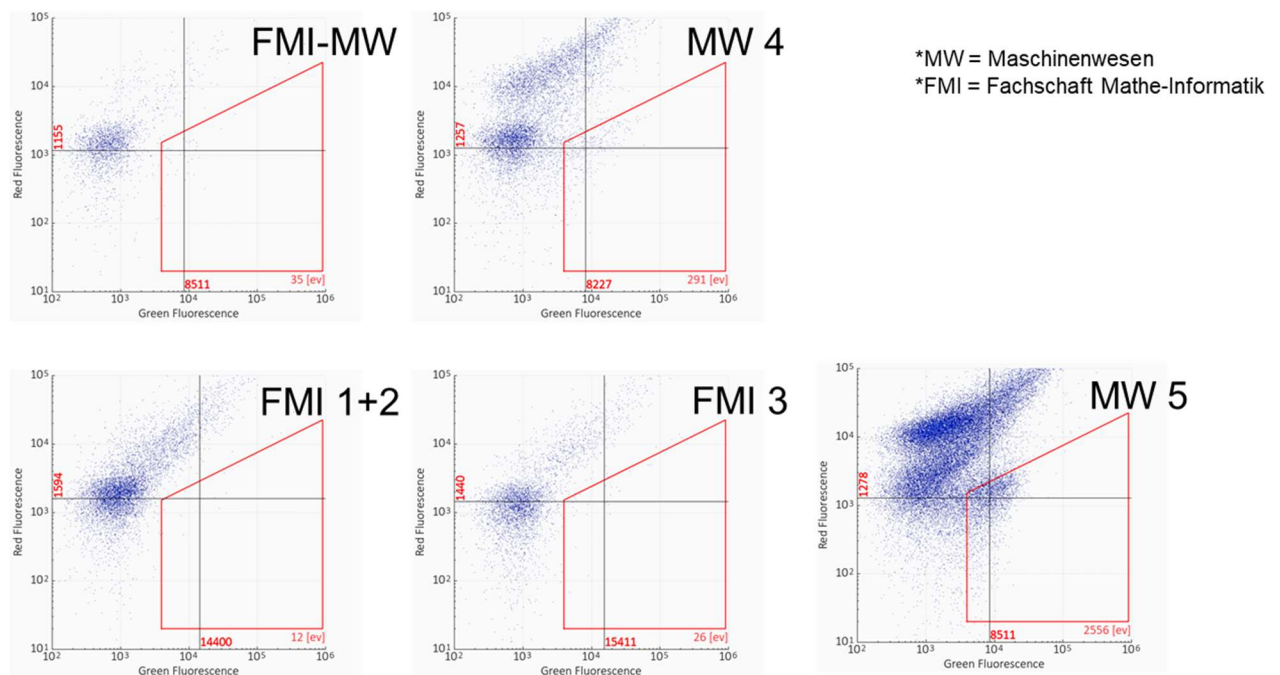
Im Projekt wurde die Immunomagnetische Separation gekoppelte Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 4) als eine kulturunabhängige Methode qualifiziert, welche es ermöglicht, *L. pneumophila* Serogruppe 1-14 im Arbeitsbereich von 100 bis 100.000 intakte Zellen pro 100 mL in dem Kühlwasser von Verdunstungskühlanlagen nach 100 mL Filtration zu bestimmen.



**Abbildung 4:** Analyseprinzip der immunomagnetischen Separation gekoppelten Durchflusszytometrie

Das Labor von PD Dr. Seidel hat diese Methode angelehnt an die VDI 4250 Blatt 2 als für das Projekt LEMOSE2 geeignete kulturunabhängige Methode qualifiziert und im eigenen Legionellenlabor etabliert. Die LegioTyper-Methode, welche zuerst im LEMOSE2-Projekt geplant war, konnte kulturunabhängig *L. pneumophila* Sg 1 ab  $10^5$  CFU/100 mL bestimmen. Da die KI aber so trainiert werden sollte, dass eine Legionellenkonzentration immer unter 10.000 KBE / 100 ml und besser sogar unter 100 KBE / 100 mL bleibt, machte es Sinn, auf die rqmicro-Methode umzusteigen.

Die einzelnen Verdunstungskühlanlagen in Garching wurden mit der rqmicro-Methode untersucht. Die Ergebnisse der Punktwolken, welche man bei der Durchflusszytometrie erhält, sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Ergebnisse der rqmicro-Methode, nachdem die Verdunstungskühlanlagen an der TUM jeweils mit 100 mL Kühlwasser beprobt wurde.

Anlage	Intakte Zellen/100 mL
FMI-MW	194
FMI 1+2	67
FMI 3	144
MW 4	1615
MW 5	14186



#### 2.1.4 TP-Nr. 4: Mittel-Optimierung

Dieses Arbeitspaket konnte nach dem Teilwiderruf nicht bearbeitet werden.

#### 2.1.5 TP-Nr. 5: Monitoring-System

Dieses Arbeitspaket konnte nach dem Teilwiderruf nicht bearbeitet werden.

#### 2.1.6 Fazit

Nach dem Projekt ist nun alles bereit, das KI-basierte Legionellen-Monitoring-System anzutrainieren und danach unter realen Bedingungen zu testen.

### 2.2. Zahlenmäßiger Nachweis

Der Verwendungsnachweis für Zuwendungen auf Ausgabenbasis (VZNA) wurde dem Projektträger zusätzlich zur digitalen Version auch in Papierform mit rechtsverbindlicher Unterschrift des Zuwendungsempfängers zugestellt. In Tabelle 2 sind die einzelnen Positionen für die entstandenen Ausgaben gegenüber dem Gesamtfinanzierungsplan dargestellt.

**Tabelle 2:** Zahlenmäßiger Nachweis der TUM, alle Beträge in Euro (€)

Position		Entstandene Ausgaben	Gesamtfinanzierungsplan
0812	Personalkosten	44.597,86	96.272,00
0843	Materialkosten	43.287,95	73.600,00
0846	Dienstreisen	229,90	900,00
0850	Investitionen	72.473,38	72.473,00
<b>Summe</b>		<b>160.589,09</b>	<b>243.245,00</b>

### 2.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das anspruchsvolle und hoch-innovative Thema eines KI-basierten Legionellen-Monitoring-Systems für Verdunstungsanlagen birgt für die Industrie hohe Risiken, welche nur durch öffentliche Fördermittel, wie es das KMU-innovativ Projekt LEMOSE2 darstellte, abgedeckt werden können. Es werden kompetente Partner aus Industrie und Forschung benötigt, damit im Zusammenspiel verwertbare Ergebnisse erzielt werden. Arteos hatte die Kompetenz in der Erarbeitung eines KI-basierten Softsensors für das Legionellen-Monitoring-System, KEBO GmbH hatte die Kompetenz in der Herstellung und dem Einsatz von Chemikalien in Verdunstungskühlanlagen und die TUM hatte die Kompetenz in der kulturunabhängigen Bestimmung von Legionellen, in der Analyse von wasserchemischen Parametern und dem mikrobiologischen Arbeiten unter Bio2-Bedingungen. Nur zusammen als Projektpartner konnte das Projekt gelingen. In diesem Sinne war die Förderung des KMU-innovativ-Projektes LEMOSE2 aus öffentlichen Mitteln essentiell.

### 2.4. Voraussichtliche Nutzen

Nach der Veröffentlichung der 42. BImSchV sind die Betreiber von Verdunstungskühlanlagen verpflichtet, in regelmäßigen Abständen das Kühlwasser auf Legionellen per Kultur zu untersuchen. Bei Maßnahmenwertüberschreitung müssen Maßnahmen getroffen werden, damit so schnell als möglich die Konzentration an Legionellen gesenkt wird. Da die Kulturmethode sehr lange dauert und es für den Betreiber zwischen dem Ergreifen der ersten Maßnahmen und Bestätigung des Erfolgs einer Maßnahme eine lange ungewisse Zeitspanne besteht, wären die Betreiber von Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern sehr interessiert, ein einfaches Legionellen-Monitorings-System zu

installieren, das über KI und Softsensorik es ermöglicht, die Legionellen-Konzentration möglichst immer unterhalb des Maßnahmenwertes zu halten. Aus Sicht der Betreiber könnten Ressourcen gespart werden, weil die Zugabe von Bioziden optimiert werden könnte und mittlerweile ist auch klar, dass gleichzeitig diese Anlagen energieeffizienter laufen könnten. Die Schlussfolgerung ist, dass das Konzept eines KI-basierten Legionellen-Monitoring-System für Verdunstungskühlanlagen auf alle Fälle für den Betreiber Sinn macht, aber auch hilfreich für eine ressourcen- und energieschonende Industriegesellschaft ist.

## **2.5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Bei Beantragung des Projektes war die rqmicro-Methode für Verdunstungskühlanlagenwasser noch nicht getestet worden. Erst nach Bewilligung von LEMOSE2 zeichnete sich ab, dass die rqmicro-Methode für die Anwendung in LEMOSE2 die geeignete Methode ist. Um das Risiko von nicht nutzbaren Messergebnissen in LEMOSE2 zu minimieren, entschied sich die TUM bei der Projektumwidmung die rqmicro-Methode im Projekt anzuwenden. Ansonsten gab es auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen keinen Fortschritt.

## **2.6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse**

### **Publikation der VDI-Richtlinie**

VDI-Richtlinie 4250 Blatt 2, beschlossene Endfassung des Ausschusses am 24.10.2022, geplanter Gründruck Januar 2023.

### **Vorträge und Poster-Präsentationen TUM**

Seidel, M., Molekularbiologische Methoden zum schnellen Nachweis von Pathogenen im Wasserkreislauf. 5. Mühlheimer Wasseranalytisches Seminar, 14.-15.9.2022

Seidel, M., Kulturunabhängige Nachweisverfahren als Strategie für eine verbesserte Risikoanalyse von Legionellen in Verdunstungsrückkühlanlagen. Wasserchemie in Industriekraftwerken - TÜV Süd, 4.-5.10.2021, München.

Seidel M., Kulturunabhängige Nachweisverfahren als Strategie für eine verbesserte Gefährdungsanalyse von Legionellen in Verdunstungsrückkühlanlagen. VDI Wissensforum, 2.3.-3.3.2021, online.

Streich P., Seidel M., *Characterization and validation of screening methods for culture-independent detection of L. pneumophila in artificial water systems*, 3<sup>rd</sup> European BioSensor Symposium, 09. – 12.03.2021, Online-Tagung.

## Literatur:

Göpfert, L.; Klüpfel, J.; Heinritz, C.; Elsner, M.; Seidel, M. Macroporous epoxy-based monoliths for rapid quantification of *Pseudomonas aeruginosa* by adsorption elution method optimized for qPCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2020**, 412, 8185–8195.

Hjelmsø, M.H.; Hellmér, M.; Fernandez-Cassi, X.; Timoneda, N; Lukjancenکو, O.; Seidel, M.; Elsässer, D.; Aarestrup, F.M.; Löfström, C.; Bofill-Mas, S.; Abril, J.A.; Girones, R.; Schultz, A.C. Evaluation of methods for the concentration and extraction of viruses from sewage in the context of metagenomic sequencing. *PLOS ONE*, **2017**, 1, e0170199.

Ott, S.; Niessner, R.; Seidel, M., Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the efficient immunofiltration of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Separation Science*, **2011**, 34, 2181-2192.

Seidel, M. and Niessner, R., Chemiluminescence microarrays: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406, 5589–5612.

Wunderlich, A.; Torggler, C.; Elsaesser, D.; Lück, C.; Niessner, R.; Seidel, M., Rapid quantification method for *Legionella pneumophila* in surface water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2016**, 408(9), 2203-2213.