

# Abschlussbericht

## Klimawandelanpassung durch Trinkwassersubstitution für Rückkühlwerke

Abschlussbericht über ein Förderprojekt,  
gefördert unter dem AZ: 38007/01-42 von der  
Deutschen Bundesstiftung Umwelt

Projektbeginn: 09.06.2023, Laufzeit: 24 Monate

Verlängerung bis 31.12.2025

Erstellt von:

Nicole van Leuven, Thomas Johann Tewes

Projektleitung:

Prof. Dr. Matthias Kleinke, Prof. Dr. Dirk Bockmühl

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Zusammenfassung .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Theoretischer Hintergrund .....	1
1.2 Motivation und Projektskizze .....	2
1.3 Angegliederte Projekte und Abschlussarbeiten .....	3
2 Methodik und Vorgehensweise .....	4
2.1 (Physiko-)Chemische Charakterisierung von Regenwasser .....	4
2.2 Biofilm-Anzucht in statischen Modellen .....	4
2.3 Praktische Felduntersuchungen in Verdunstungskühlanlagen .....	5
2.4 Biofilm-Anzucht <i>ex-situ</i> durch Nutzung des CDC-Reaktors .....	8
2.5 Zusammenarbeit mit externen Partnern .....	9
3 Ergebnisse und Diskussion .....	10
3.1 (Physiko-)Chemische Eigenschaften von Regenwasser .....	11
3.2 Vergleich des Potenzials zur Biofilmbildung von Regen- und Leitungswasser in statischen Biofilm-Modellen .....	11
3.2.1 Entwicklung und Nutzung eines statischen Biofilm-Modells anhand zweier Wasserproben .....	11
3.2.2 Evaluation der potenziellen Nutzung von Regenwasser für VKAs anhand des Wachstums und der Biofilmbildung .....	12
3.3 Feldversuche in Verdunstungskühlanlagen .....	17
3.3.1 Keimzahlbestimmung auf Probenträgern .....	17
3.3.2 DNA-Analyse der Biofilme auf den Probenträgern .....	20
3.4 Anzucht von Biofilmen aus VKAs <i>ex-situ</i> im CDC-Biofilmreaktor .....	21
4 Öffentlichkeitsarbeit/Vorträge/Veröffentlichungen .....	24
4.1 Austausch und Kommunikation .....	24

4.2	Vorträge .....	24
4.3	Wissenschaftliche Publikationen .....	25
5	Fazit und weiteres Vorgehen .....	26
6	Referenzen.....	27

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regenwassertanks genutzt zur Sammlung von Regenwasser. (A) private Tonnen (beispielhaft), (B) 1000 L-Wassertank an der Hochschule Rhein-Waal.....	4
Abbildung 2: Übersicht beprobter Verdunstungskühlanlagen mit unterschiedlichen Strategien zur mikrobiologischen Sicherheit. A) Hochschule Rhein Waal, Kleve: Biozid; B) Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Sankt Augustin: UV-Durchfluss; C) Bergische Universität , Wuppertal: UV-Becken; D) Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen: Biozid; E) Hochschule Niederrhein, Mönchengladbach: Biozid. ....	7
Abbildung 3: Grundkörper der Probenträger und exemplarisch Membran und Filter nach dem Beprobungszeitraum, welche individuell mikrobiologisch betrachtet werden. ....	8
Abbildung 4: Schematischer Aufbau für die praxisnahen Versuche im CDC-Reaktor. KbE = Koloniebildende Einheiten. ....	9
Abbildung 5: Eigenschaften von Regenwasser verschiedener Herkunft und deren Vergleich mit Vorgaben oder Literaturwerten. A = große geschlossene Anlage (1.000 L Fassungsvermögen), B = offene Anlage von einem Flachdach, C-G = offene private Kleinanlagen. ....	10
Abbildung 6: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen angewachsen in (A) Leitungswasser und (B) Regenwasser. Grün = vitale Zellen, rot = tote Zellen. ....	12
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen angewachsen in Leitungswasser und Regenwasser mit verschiedenen Biozidkonzentrationen am Beispiel von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Grün = vitale Zellen, rot = tote Zellen.....	14
Abbildung 8: OD-Werte von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in verschiedenen Wassertypen mit unterschiedlichem pH-Wert sowie Biozidkonzentrationen über einen Zeitraum von 72 h.....	16
Abbildung 9: Exemplarische Gegenüberstellung von angefärbten Biofilmen die in verschiedenen Wässern bei gleichem pH-Wert gezüchtet wurden. ....	16
Abbildung 10: Logarithmische KbE/Probenträger [ $\log_{10}$ ] in verschiedenen Verdunstungskühlanlagen (A) inkubiert bei 22 °C für 72 h und (B) bei 37 °C für 48 h auf Trypton-Soja-Agar (TSA) und Hefeextrakt-Agar. ....	19

Abbildung 11: Sequenziererergebnisse der Biofilme aus Verdunstungskühlanlagen auf phylogenetischer Ebene der Familie. Others = Andere Familien <1%. Unidentified = auf dieser phylogenetischen Ebene nicht zuzuordnen.....20

Abbildung 12: Aerobe Gesamtkeimzahl in KbE/Biofilmträger [log<sub>10</sub>] der Biofilme M1, M2, M4 und M7 und der Gesamtheit der getesteten Biofilme bei der Anzucht mit Medium in Trinkwasser (TW) und Regenwasser (RW) mit (+) und ohne zweimalige Zugabe von Biozid. Inkubation (A) auf Hefeextrakt-Agar bei 22 °C für 72 h, (B) auf TSA bei 22 °C für 72 h, (C) auf Hefeextrakt-Agar bei 37 °C für 48 h, (D) auf TSA bei 37 °C für 48 h. \* = p ≤ 0.05, \*\* = p ≤ 0.01, \*\*\* = p ≤ 0.001, \*\*\*\* = p <0,0001 basierend auf Tukey's Multiple Comparisons Test zum Vergleich der Wasser- und Behandlungsarten.....22

Abbildung 13: Absorption der extrahierten Biofilme nach Kristallviolett-Färbung bei 550 und 590 nm und der Gesamtheit der getesteten Biofilme (Mittelwert, MW) nach der Anzucht mit Medium in Trinkwasser (TW) und Regenwasser (RW). .....23

Abbildung 14: Graphical abstract zur geplanten Veröffentlichung zur mikrobiellen Zusammensetzung von Biofilmen in VKAs und dem Wachstum von ex-situ Biofilmen in Trink- bzw. Regenwasser. ....25

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Im Rahmen des Projektes angegliederte Projekte und Abschlussarbeiten von Studierenden..... 3

Tabelle 2: Übersicht über beprobte Verdunstungskühlanlagen lokalisiert in verschiedenen Hochschulen/Universitäten und die Dauer des Einsatzes der Probenträger ..... 6

Tabelle 3: Übersicht der Proben aus Verdunstungskühlanlagen (F = Filter, M = Membran)..18

Tabelle 4: pH-Werte genutzter Wässer & Medien.....23

Tabelle 5: Mailadressen der Personen die vor Ort oder in der Kommunikation unterstützt haben mit fett hervorgehobenen Kontakten für Vorgesetzte .....24

## Zusammenfassung

Die im Rahmen des Projektes „Klimawandelanpassung durch Trinkwassersubstitution für Rückkühlwerke“ durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Nutzung von Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen ein vielversprechender Ansatz für nachhaltige Klimaanpassung und Ressourcenschonung sein kann. Regenwasser könnte eine ökologisch sinnvolle Alternative zu Trinkwasser bieten, insbesondere bei gezielter Wasseraufbereitung wie UV-Sterilisation. Dies reduziert nicht nur den Biozidbedarf, sondern trägt auch zur Kontrolle der Biofilmbildung bei. Praktische Feldversuche und Untersuchungen im Labormaßstab lieferten wertvolle Erkenntnisse zur mikrobiellen Zusammensetzung und den Einflussfaktoren auf Biofilmbildung. Statische Wachstumsversuche zeigten, dass die nötige Biozidmenge zur Reduktion von Keimen in Regenwasser tendenziell geringer war. Daten aus dem CDC (Centers for Disease Control)-Reaktor-Versuchen bestätigen dieses Potenzial von Regenwasser, da die Nutzung von Regenwasser bei der Anzucht von Biofilmen aus Verdunstungskühlanlagen (VKAs) zu keiner Erhöhung der Zellzahl führte. Dabei wurde deutlich, dass Regenwasser eine andere mikrobielle Flora fördern kann, was spezifische Anforderungen an Wartung und Überwachung mit sich bringen könnte. Jedoch geben unsere Versuche keine Hinweise darauf, dass ein erhöhtes gesundheitliches Risiko durch angereicherte Pathogene in den mikrobiellen Gemeinschaften von Trinkwasser und Regenwasser besteht. Die Zugabe von Biozid in den *ex-situ* Versuchen erzielte keine Reduktion der Zellzahl. Vielmehr wurde eine Tendenz zu leicht erhöhten Zellzahlen nach Biozidzugabe gefunden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die (Teil-)Substitution von Trink- mit Regenwasser denkbar und basierend auf unseren limitierten Ergebnissen als mikrobiologisch unkritisch anzusehen ist und keine Nachteile entstehen.

Ein wesentlicher Erfolg des Projekts war der umfangreiche Austausch mit Hochschulen, Universitäten und Partnern. Dies ermöglichte wertvollen fachlichen Austausch und sogar die Identifikation einer Verdunstungskühlanlage, die zukünftig auf Basis von Regenwassernutzung in Betrieb gehen soll. Diese Anlage könnte eine einzigartige Gelegenheit bieten, die gewonnenen Erkenntnisse in der Praxis zu testen und nach erfolgreichem Abschluss des Projekts weiterzuentwickeln.

Aufgrund eines personellen Wechsels mit zwischenzeitlichem Leerlauf wurde eine kostenneutrale Verlängerung des Projektes nötig, um die geplanten Projektziele zu erreichen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Theoretischer Hintergrund

Wasserknappheit durch Überpopulation, Kontamination, schlechtes Management und dem Klimawandel stellt ein wachsendes Problem dar [1]. Sinkende Grundwasserspiegel von Brunnen bestätigen die vorliegende Problematik [2] und erfordern innovative Lösungen zur Anpassung urbaner Infrastrukturen sowie das Erwägen der Nutzung von Regenwasser in bisher eher unbekanntem Bereichen. Regenwasser wird in einigen Ländern, unter anderem Deutschland, vor allem in privater Eigennutzung bereits verwendet, z.B. für die Gartenwässerung, Hydranten, Waschmaschinen oder der Spülung von Toiletten [1,3–5]. Auch wenn es hauptsächlich als Brauchwasser verwendet wird, stellt es in einigen Regionen eine bessere Alternative zu kontaminiertem Grundwasser da. Trotzdem entspricht das Regenwasser nicht immer den von der WHO empfohlenen Qualitätsstandards für humanes Trinkwasser [1].

Doch auch die Nutzung von Regenwasser im industriellen Kontext sollte in Betracht gezogen werden, um die Herausforderungen durch die zunehmende Häufung von Hitzewellen und die urbanen Wärmeinseln mit Hilfe von Klimaanpassungen zu entgegnen. Verdunstungskühlanlagen (VKA) könnten eine vielversprechende Möglichkeit zur Minderung dieser Effekte bieten, insbesondere durch die Nutzung von Regenwasser als Ersatz für Trink-/Leitungswasser. Die Nutzung von Regenwasser in Kühltürmen erlaubt das Einsparen von sowohl Wasser, als auch Energie [6]. Da Verdunstungskühlanlagen sowohl in privaten, als auch industriellen Settings verwendet werden [7], bergen sie ein großes Potenzial für Klimaanpassungen durch Wassersubstitution.

Da Kühltürme vorteilhafte Bedingungen für das Wachstum von Mikroorganismen bieten (25 - 35 °C, O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit, pH-neutral) [8,9], ist eine Biofilmbildung im System möglich. Diese wiederum kann zu Korrosion, verstopften Rohren und Wärmeaustauschern mit eingehenden Energieverlusten und Gesundheitsrisiken führen [8,10]. Verschiedene bakterielle Phyla wurden bereits in VKAs nachgewiesen [8,11,12], von Bedeutung ist jedoch vor allem das Vorkommen von *Legionella pneumophila*, ein Bakterium das durch Aerosole verbreitet wird und schwere Lungenentzündungen hervorrufen kann [8]. Da in VKAs Wasser in einen Luftstrom gegeben wird, ist das Risiko einer Aerosolbildung gegeben und es sind bestätigte Fälle von *Legionella*-Ausbrüchen, die auf VKAs zurückzuführen sind, bekannt [10]. In Deutschland unterliegt die Nutzung von VKAs der Zweiundvierzigsten Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (42. BImSchV, Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider) [13], ergänzt durch den Leitfaden VDI 2047 Teil 2 [10].

Neben *Legionella pneumophila* liegt der Fokus für Pathogene auch auf *Pseudomonas aeruginosa*, der einen bekannten Biofilmbildner mit potenziell erhöhten Resistenzen gegen Biozide darstellt [10]. Für die Kontrolle von Mikroorganismen in VKAs sind verschiedene Desinfektionsstrategien (z.B. chemische Behandlung mit Bioziden oder UV-Desinfektion) bekannt [8,14], obwohl es keine spezifischen Grenzen für Gesamtkeimzahlen gibt [10]. Auch wenn chemische Desinfektionen basierend auf Quartären Ammoniumverbindungen, Isothiazolinonen, Brom und vor allem Chlor verbreitet sind [8,15,16], soll falls möglich von einer Biozidnutzung abgesehen werden [10].

Da der Leitfaden VDI 2047 Teil 2 keine definierten Vorgaben zum Wassertyp vorgibt, sondern auf der Aufbereitung und Behandlung des Rohwassers zu Nutzwasser fokussiert [10], ist die Nutzung von Regenwasser unter Einhaltung der hygienischen Vorgaben theoretisch möglich.

## **1.2 Motivation und Projektskizze**

Die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) förderte im Rahmen des Projekts „Klimawandelanpassung durch Trinkwassersubstitution für Rückkühlwerke“ die weitere Erforschung des Potentials der Regenwassernutzung in VKAs. Obwohl bereits Literatur zur Einsparung von Wasser und Energie durch die (Teil-)Substitution mit Regenwasser vorliegt [3,6,17], wurde die mikrobiologische Beschaffenheit und Sicherheit im Rahmen dessen vernachlässigt. Ein zentrales Ziel des Projekts ist es daher, die Einsatzmöglichkeiten von Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen mit dem Fokus auf der Mikrobiota und der möglichen Minimierung von Biozidzusätzen herauszustellen und diese Forschungslücke zu schließen.

Dazu wurde zu Beginn eine umfassende Analyse von Regenwasserproben durchgeführt, bei der die chemische und mikrobiologische Charakterisierung im Vordergrund stand. Darauf aufbauend wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Wasserqualitäten auf die Biofilmbildung untersucht. Erste Laborversuche, bei denen Regenwasser als Medium verwendet wurde, zeigten, dass es eine potenzielle Alternative zu Trinkwasser darstellt, ohne dass signifikante Nachteile hinsichtlich der Biofilmbildung auftreten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine zweite Versuchsreihe entwickelt, bei denen reale VKAs einbezogen wurden. Nach der Identifikation von VKAs an Universitäten und Hochschulen in Nordrhein-Westfalen, wurden Proben-träger über einen Zeitraum von ein bis drei Monaten in deren Anlagen angebracht. Dadurch wurde es ermöglicht, die Bildung und Zusammensetzung von Biofilmen unter realen Betriebsbedingungen zu untersuchen. Die Biofilmbildung in Kühlkreisläufen hat nicht nur Auswirkungen auf die Effizienz der Anlagen, sondern auch auf die Notwendigkeit und die Dosierung von Bioziden. Die Notwendigkeit von Bioziden wurde daher in weiteren Experimenten im Labormaßstab geprüft.

Die aus den Probenträgern extrahierten Mikroorganismen wurden als Basis für die Anzucht realitätsnaher *ex-situ* Biofilme genutzt. Somit konnte neben der Charakterisierung der Mikrobiota in den Anlagen auch eine fundierte Bewertung des Potentials von Regenwasser in der Praxis ermöglicht werden. Dabei halfen detaillierte mikrobiologische Untersuchungen, einschließlich der DNA-Sequenzierung von Biofilmen, die Zusammenhänge zwischen Wasserqualität, Biofilmwachstum und Biozidbedarf zu verstehen.

Ziel des Projektes war es, unsere gewonnenen Erkenntnisse mit den Anforderungen der Praxis in Einklang zu bringen, mit dem aktuellen Stand der Literatur zu vergleichen und möglicherweise sogar konkrete Empfehlungen für die Nutzung von Regenwasser in Kombination mit Bioziden in Verdunstungskühlanlagen zu formulieren. Durch den Austausch mit Anlagenbetreibern konnte eine VKA identifiziert werden, die 2026 unter der Verwendung von Regenwasser in Betrieb genommen werden soll. Diverse Studierende wurden im Rahmen von Abschlussarbeiten oder Projektmodulen einbezogen. Ein weiterer Fokus liegt in der Öffentlichkeitsarbeit und dem Wissenstransfer, weshalb nach dem Abschluss des Projektes die wichtigsten Ergebnisse zusammengetragen und in einem geeigneten Fachjournal veröffentlicht werden.

### 1.3 Angegliederte Projekte und Abschlussarbeiten

Das Projekt wurde durch Studierenden-Projekte, sowie Abschlussarbeiten zum Erlangen des Bachelors/Masters of Science an der Hochschule Rhein-Waal (Tabelle 1).

Tabelle 1: Im Rahmen des Projektes angegliederte Projekte und Abschlussarbeiten von Studierenden

Arbeitstitel	Typ
<i>Entwicklung eines in-situ Modells zur Untersuchung des Biofilmwachstums anhand zweier Wasserproben</i>	Studierenden-Projekt
<i>Biofilm formation in rainwater and its control using biocides for cooling water systems applications</i>	Bachelorarbeit
<i>Vergleichende mikrobiologische Untersuchungen zur Verwendung von Trink- und Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen</i>	Bachelorarbeit
<i>Investigation of the potential use of rainwater for evaporative cooling systems by assessing the growth and biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa</i>	Masterarbeit

## 2 Methodik und Vorgehensweise

Im Rahmen des Projekts wurden verschiedene methodische Ansätze kombiniert, um die Einsatzmöglichkeiten von Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen zu untersuchen und die Auswirkungen auf die Biofilmbildung sowie den Biozidbedarf zu bewerten. Die Methodik umfasst eine Kombination aus Laborversuchen, mikrobiologischen Untersuchungen, Feldstudien sowie Kooperationen mit externen Partnern und Experten.

### 2.1 (Physiko-)Chemische Charakterisierung von Regenwasser

Die chemische Charakterisierung des Regenwassers bildete den Ausgangspunkt für die Untersuchungen. Es wurden Parameter wie der pH- und Leitwert, die Wasserhärte sowie der Gehalt an Nitrat, Phosphat und organischen Verbindungen in Regenwasserproben untersucht. Analysen fanden mit Hilfe entsprechender Messgeräte, Spektroskopie und photometrischer Bestimmungskits statt. Zu untersuchende Wasserproben wurden aus privaten Regentonnen und Wassertanks der Hochschule Rhein-Waal entnommen (Abbildung 1).

A



B



Abbildung 1: Regenwassertanks genutzt zur Sammlung von Regenwasser. (A) private Tonnen (beispielhaft), (B) 1000 L-Wassertank an der Hochschule Rhein-Waal.

Erhaltene Daten wurden mit Angaben bestehender Literatur verglichen. Die Daten wurden zusätzlich durch das Studierenden-Projekt „Entwicklung eines *ex-situ* Modells zur Untersuchung des Biofilmwachstums anhand zweier Wasserproben“ unterstützt, in dem unter anderem die chemischen Eigenschaften von Regenwasser im Vergleich zu Trinkwasser analysiert wurden.

### 2.2 Biofilm-Anzucht in statischen Modellen

Nach der Charakterisierung vom Regenwasser, war ein zentraler Bestandteil der Methodik die Untersuchung der Biofilmbildung unter Verwendung von Regenwasser. Ein Studierenden-

Projekt, sowie zwei Abschlussarbeiten trugen wesentlich zur Entwicklung der Versuchsaufbauten bei.

Im Rahmen des Projektes handelte es sich um ein erstes Screening, weshalb diese Versuche statisch in 6-Well-Zellkulturschalen durchgeführt wurden. Hierzu wurden speziell zugeschnittene Medien verwendet, die in unterschiedlichen Konzentrationen mit Regenwasser/Trinkwasser kombiniert wurden, um die Auswirkungen auf die Biofilmproduktion zu vergleichen. Bewertet wurde das Biofilmwachstum zum Beispiel anhand von molekularbiologischen Parametern (16S-Gen Quantifizierung) und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Lebend/Tot-Färbung).

Die Laboruntersuchungen der Abschlussarbeiten wurden ebenfalls mithilfe von statischen Biofilmwachstumsmodellen durchgeführt. Genutzte Biozidkonzentrationen sowie die Art und die Eigenschaften des verwendeten Wassers wurden variiert. So wurde die Biofilmbildung unter verschiedenen physikalischen Bedingungen wie pH-Wert und Wasserhärte getestet. Als Biozid wurde das an der Hochschule Rhein-Waal genutzte Produkt verwendet. Der Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen wurde am Beispiel des typischen Biofilmbildners *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und weiteren Bakterien analysiert. Diese Versuchsreihe umfasste eine Vielzahl an Methoden: Es wurden verschieden Regen- und Leitungswasserproben gesammelt und mit definierten Tryptic Soy Broth-Konzentrationen angereichert. Die Biofilmbildung wurde in Zellkultur-Schalen unter kontrollierten Bedingungen für definierte Zeiträume kultiviert. Bewertet wurde das Biofilmwachstum zum Beispiel anhand von Wachstumskurven basierend auf der optischen Dichte, Färben und Quantifizierung der Biofilmmasse mittels Kristallviolett und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Zusätzlich wurde extrahierte DNA verwendet, um eine DNA-Sequenzierung zur Identifikation mikrobieller Spezies bei einem externen Dienstleister durchzuführen. Weiterhin erfolgten Keimzahlbestimmungen (KbE) durch serielle Verdünnungen und Plattierung auf Agar.

### **2.3 Praktische Felduntersuchungen in Verdunstungskühlanlagen**

Die Laborergebnisse wurden durch Feldversuche ergänzt, bei denen zuvor entwickelte Probenträger in realen Verdunstungskühlanlagen eingesetzt wurden. 4 verschiedene Anlagen in NRW wurden für die Probenahme identifiziert und die Biofilmträger für 1 bis 3 Monate im Kühlwasser platziert (Tabelle 2).

Da den Hochschulpartnern Anonymität zugesichert wurde, werden diese hier nur mit Buchstaben bezeichnet.

*Tabelle 2: Übersicht über beprobte Verdunstungskühlanlagen lokalisiert in verschiedenen Hochschulen/Universitäten und die Dauer des Einsatzes der Probenträger*

<b>Hochschule/Universität</b>	<b>Ort</b>	<b>Einsatz Probenträger</b>	<b>Entnahme Probenträger</b>
Hochschule Rhein-Waal	Kleve	20.06.2024	20.09.2024
Hochschule A	A	02.09.2024	01.10.2024
Universität B	B	29.08.2024	30.09.2024
Hochschule C	C	12.09.2024	14.10.2024
Hochschule D	D	05.09.2024	07.10.2024

Diese Versuche ermöglichten es, an die Umgebung angepasste Biofilme aus VKAs zu gewinnen und deren Zusammensetzung durch DNA-Sequenzierung zu bestimmen. Die Probenträger wurden in verschiedenen Anlagen aufgehängt, die Trinkwasser verwendeten, aber unterschiedliche Strategien zur mikrobiologischen Sicherheit nutzen (Abbildung 2).

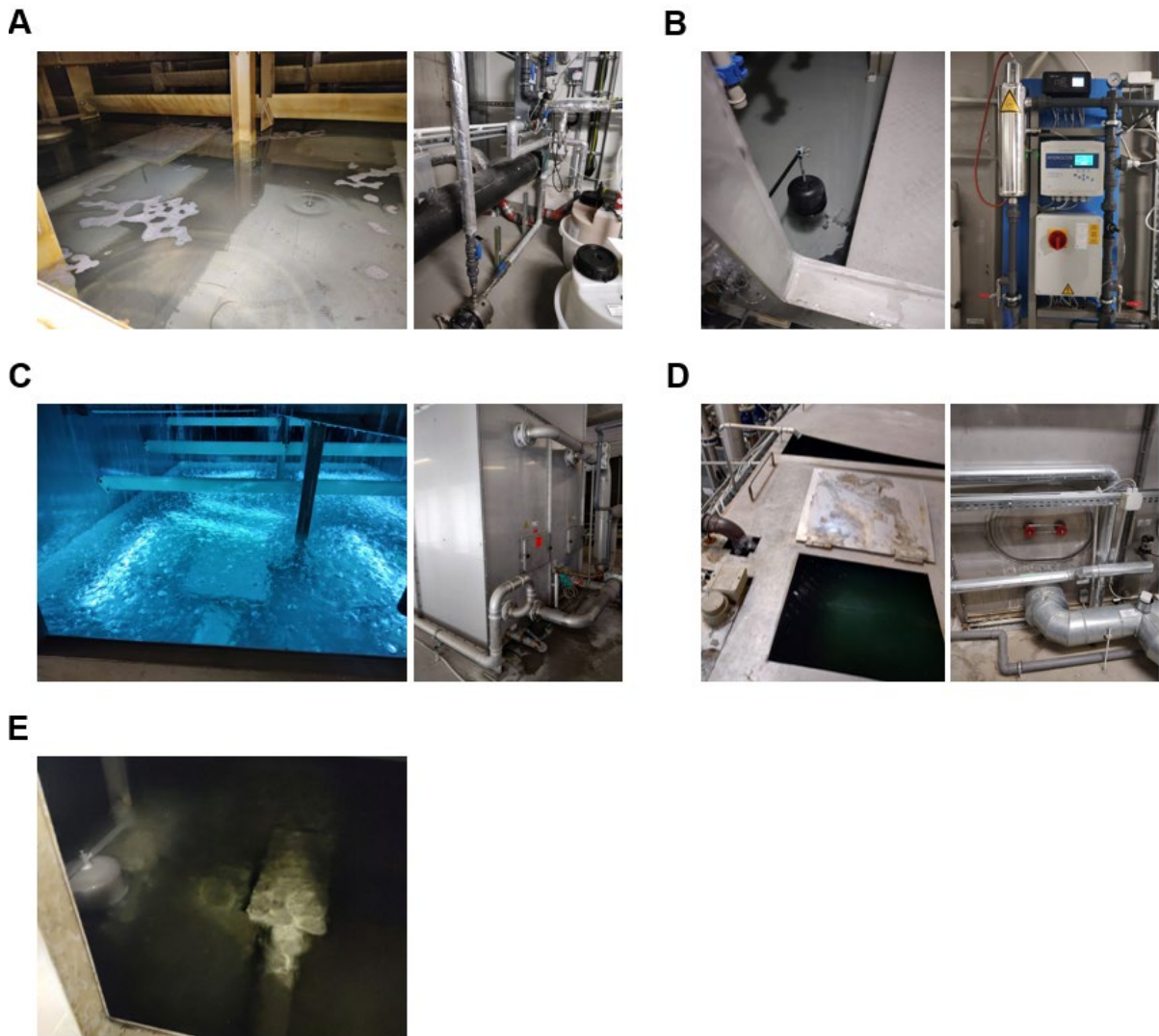


Abbildung 2: Übersicht beprobter Verdunstungskühlanlagen mit unterschiedlichen Strategien zur mikrobiologischen Sicherheit. A) Hochschule Rhein Waal, Kleve: Biozid; B) Hochschule A: UV-Durchfluss; C) Universität B: UV-Becken; D) Hochschule, C: Biozid; E) Hochschule D: Biozid.

Nach dem Testzeitraum bzw. dem Herausnehmen der Probenträger aus den Anlagen wurden Zellen extrahiert. Der Filter (F) und die Membran (M) wurden separat verarbeitet (Abbildung 3), in isotonischer Lösung ausgeschüttelt und für eine dauerhafte Lagerung mit Glycerin versetzt. Diese Stocks der extrahierten Biofilme dienen als Ausgangslösung zur Bestimmung der Keimzahlen verschiedener bakterieller Gruppen und zur Beimpfung der *ex-situ* Experimente.

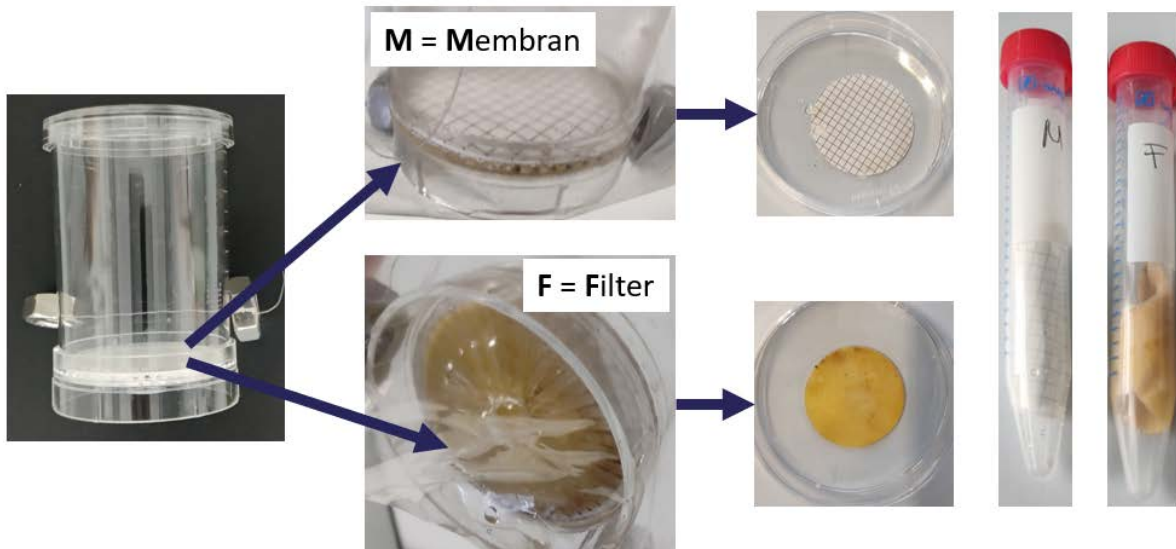


Abbildung 3: Grundkörper der Probenträger und exemplarisch Membran und Filter nach dem Beprobungszeitraum, welche individuell mikrobiologisch betrachtet werden.

Die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl pro Träger wurde bestimmt und die DNA isoliert. Zur Ergänzung wurden weitere mikrobiologische Parameter (Coliforme, intestinale Enterokokken, *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila*) basierend auf der VDI 2047 Teil 2, der BImSchV und der deutschen Trinkwasserverordnung untersucht [10,13,18].

Die Sequenzierung der 16S rDNA des gesamten Biofilms erfolgte bei einem externen Dienstleister. Ziel war es die in VKAs vorliegende Bakterien zu definieren und festzustellen, ob und in welchem Maße die Biofilmbildung durch den Einsatz verschiedener Sterilisationsstrategien (UV im Durchfluss, UV-Systeme im Kühlwasserbecken, Biozidsysteme) beeinflusst wird.

## 2.4 Biofilm-Anzucht *ex-situ* durch Nutzung des CDC-Reaktors

Um die potenzielle Entwicklung von Biofilmen in Verdunstungskühlanlagen zu simulieren, wurden die in 2.3 erhaltenen Biofilme genutzt, um den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Biofilm-Reaktor zu beimpfen. Dies soll praxisnah die dynamische Biofilmbildung in Verdunstungskühlanlagen im kleinen Maßstab simulieren. Die Methodik erlaubt das Wachstum von Biofilmen auf Coins als Trägern und wird durch seine Nutzung von Scherkräften mittels Magnetrührer charakterisiert. Als Wasser wurde Leitungswasser und Regenwasser aus einem 1.000 L Tank der Hochschule Rhein-Waal entnommen.

Im Rahmen dieses Projektes kamen Edelstahl-Coins als Träger für Biofilme zum Einsatz, die nach definierten Adhäsions- und Wachstumsphasen mit kontrollierten Scherkräften beprobt wurden. Der Reaktor wurde mit den Biofilmstocks beimpft und der Biofilm für insgesamt 8 d mit Regenwasser- oder Trinkwasser wachsen gelassen (Abbildung 4).

Dabei wurde für eine zweite Versuchsreihe auch 2x/Woche Biozid hinzugegeben werden. Erneut wurde das an der Hochschule Rhein-Waal verwendete Biozid genutzt. Täglich wurde für 1 h frisches Medium (10% Tryptic Soy Broth, TSB) hinzugepumpt, während parallel das Umwälzen des Wassers in VKAs mit Hilfe des Magnetrührers simuliert wurde. Das tägliche Wälzen, das Biozidprodukt und die Häufigkeit der Biozidzugabe wurden vom Betrieb der VKA an der Hochschule Rhein-Waal übernommen. Nach der Biofilmanzucht wurden die Zellen von den Coins extrahiert wie im Standard ASTM E-2871 beschrieben [19] und die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl, sowie die Zellzahl weiterer relevanter mikrobiellen Gruppen bestimmt (siehe Kapitel 2.3). Zusätzlich wurde die gesamte Biofilmmasse mittels Kristallviolett-Färbung zwischen den genutzten Wassern verglichen. Ebenfalls wurde die DNA von den Coins extrahiert, um eine spätere Sequenzierung zu ermöglichen.

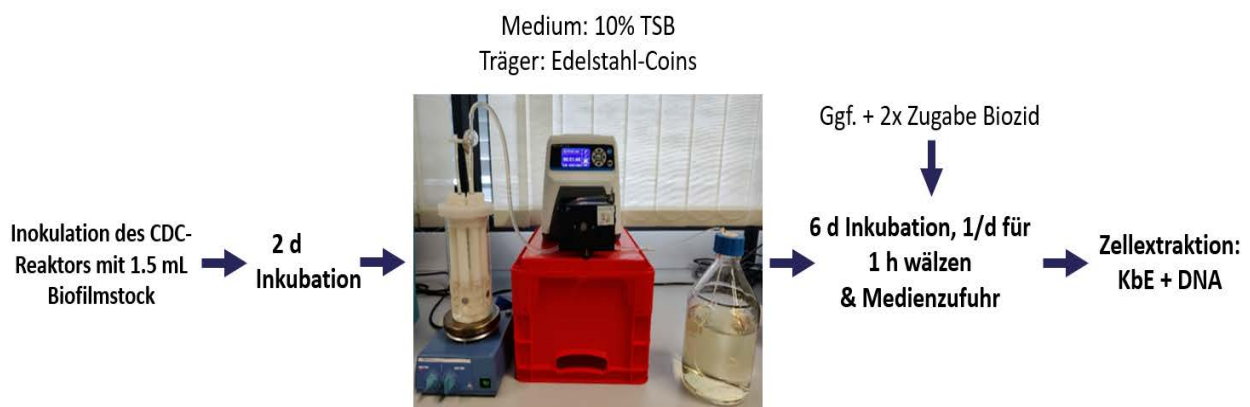


Abbildung 4: Schematischer Aufbau für die praxisnahen Versuche im CDC-Reaktor. KbE = Koloniebildende Einheiten.

## 2.5 Zusammenarbeit mit externen Partnern

Die Methodik umfasste auch eine Zusammenarbeit mit externen Partnern, wie etwa der TROX GmbH (Hersteller von Verdunstungskühlanlagen) und die durch die Beprobung realer Anlagen identifizierte Kontakte genannten Hochschulen. Der Austausch mit den Experten aus der Praxis wurde genutzt, um das Potential der Regenwassernutzung in Verdunstungskühlanlagen besser zu verstehen. Diese Zusammenarbeit half, die praktischen Anforderungen und Herausforderungen in Bezug auf die Implementierung von Regenwasser in Rückkühlwerken zu diskutieren. Durch den Kontakt zum Bundesverband für Betriebs- und Regenwasser e.V. (fbr), wurde die Teilnahme am Hygiene-Treffen des Vereins ermöglicht.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen des Projekts „Klimawandelanpassung durch Trinkwassersubstitution für Rückkühlwerke“ wurden zahlreiche Experimente durchgeführt, um die Effektivität der Regenwassernutzung in Verdunstungskühlanlagen zu bewerten. Diese umfassen sowohl Laboruntersuchungen zur allgemeinen Biofilmbildung spezifischer Spezies, als auch die Untersuchung von Biofilmen aus realen Verdunstungskühlanlagen, die über einen längeren Zeitraum betrieben wurden. Ausgewählte Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

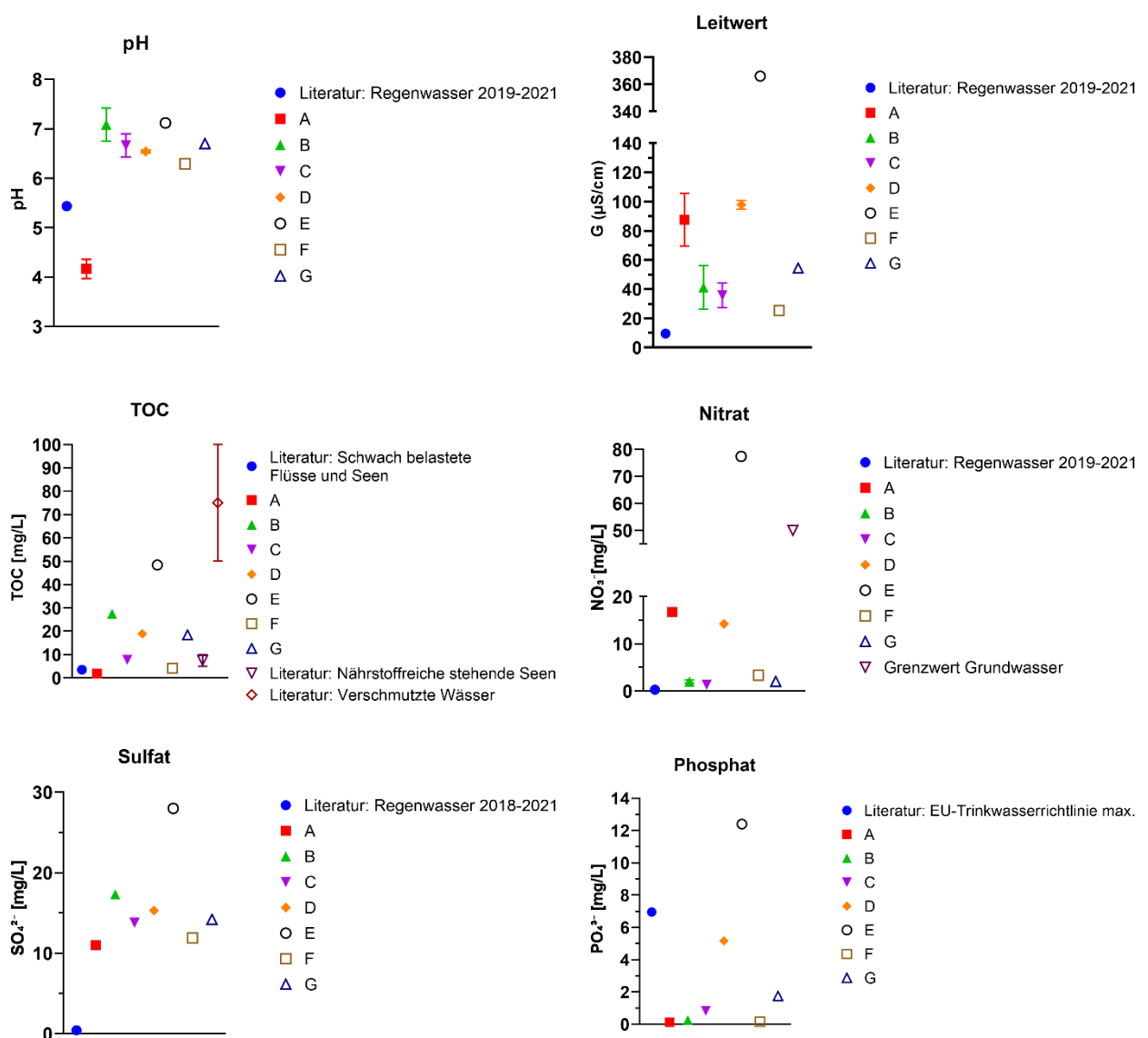


Abbildung 5: Eigenschaften von Regenwasser verschiedener Herkunft und deren Vergleich mit Vorgaben oder Literaturwerten. A = große geschlossene Anlage (1.000 L Fassungsvermögen), B = offene Anlage von einem Flachdach, C-G = offene private Kleinanlagen.

### **3.1 (Physiko-)Chemische Eigenschaften von Regenwasser**

Die Beprobung verschiedener Regenwassersammelanlagen zeigt, dass physikalische und chemische Eigenschaften teilweise stark variieren und auch von Literaturwerten stark abweichen können (Abbildung 5). Obwohl Anlagen C-G alle privaten, offenen Wassertanks entsprechen, stechen vor Allem erhöhte Werte für Anlage E hervor. Während Leitungswasser von Städten regelmäßig auf die Konformität mit der Trinkwasserverordnung geprüft wird und geringere Schwankungen zu erwarten sind, sind Variationen bei Regenwasser wahrscheinlicher. Regenwasser unterliegt saisonale und temperaturabhängige Unterschieden in den mikrobiellen Gemeinschaften [16,20], weshalb durch potenziell verschiedene Stoffwechsel dieser Mikroorganismen wiederholte Messungen zu verschiedenen Jahreszeiten als sinnvoll anzusehen sind. Zudem kann die Mikrobiota auch abhängig von der Beschaffenheit des Auffangbeckens für Regenwasser variieren [11,20]. So ist der Eintrag von organischem Material und somit der aufgezeigten Elemente bei offen Wassertanks ggf. erhöht. Dies deckt sich mit den Angaben zu Anlage E, die von starkem Pflanzenwachstum umgeben war und externe Einflüsse wahrscheinlicher sind. Ebenso können Anlagen mit Vorfiltersystemen ausgestattet sein (Anlage A), die den Eintrag größere Mengen organischen Materials limitieren.

### **3.2 Vergleich des Potenzials zur Biofilmbildung von Regen- und Leitungswasser in statischen Biofilm-Modellen**

#### **3.2.1 Entwicklung und Nutzung eines statischen Biofilm-Modells anhand zweier Wasserproben**

Im Studierenden-Projekt „Entwicklung eines *ex-situ* Modells zur Untersuchung des Biofilmwachstums anhand zweier Wasserproben“ wurde ein statisches Biofilm-Modell zum Vergleich von Leitungs- und Regenwasser genutzt. Die Wachstumsrate der Biofilme hing signifikant von der Wasserquelle ab. Besonders das Regenwasser, das einen niedrigeren pH-Wert und unterschiedliche Mineralstoffgehalte aufwies, führte zu einer schlechteren und verlangsamten Biofilmbildung im Vergleich zum Leitungswasser. Gestützt wurde dies durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 6), wobei verschiedene Keime unterschiedlich ausgeprägtes Wachstum in den verschiedenen Wassertypen zeigten.

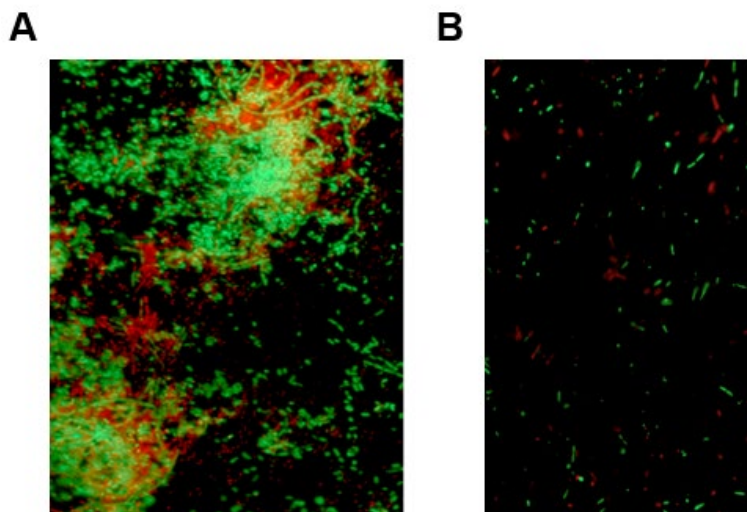


Abbildung 6: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen angewachsen in (A) Leitungswasser und (B) Regenwasser. Grün = vitale Zellen, rot = tote Zellen.

Es zeigte sich auch, dass das Bakterium *Pseudomonas fluorescens* abhängig von der Medienzusammensetzung unterschiedlich gut wuchs. So wurden für Biofilme gezogen im Medium basierend auf Fleischextrakt höhere Zellkopien (16S Gen) erhalten als im Medium basierend auf Stärke. Im Stärkemedium wurde das Biofilmwachstum in Regenwasser im Vergleich zu Leitungswasser stark gehemmt. Die Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit physikalischer und chemischer Eigenschaften des Wassers auf das Biofilmwachstum.

Das Teilprojekt lieferte erste spezifische Daten zur mikrobiologischen Sicherheit und technischen Eignung von Regenwasser. Diese ersten Versuche dienten als Grundlage für weitere Experimente zu Erreichbarkeit der Hauptprojektziele. Die Arbeit konnte einige wichtige Fragestellungen beantworten und trägt zur besseren Einschätzung der Umweltbedingungen bei, die das Wachstum von Biofilmen begünstigen können. Dies kann zur Entwicklung von Strategien zur Bekämpfung von Biofilmen in technischen Systemen beitragen.

### 3.2.2 Evaluation der potenziellen Nutzung von Regenwasser für VKAs anhand des Wachstums und der Biofilmbildung

Diese Versuchsreihe beantwortete wichtige Fragen zur Biofilmbildung in Regenwasser verglichen mit Leitungswasser. Verschiedene Biozidkonzentrationen, pH-Werte und Wasserhärten wurden verglichen, da die ausgewerteten Ergebnisse darauf hinwiesen, dass pH-Wert und Wasserhärte die wichtigsten Einflussfaktoren darstellen. Viele Parameter wie beispielsweise Nitrat, Ammonium und Phosphat wurden ebenfalls näher untersucht. Der Einfluss anderer Parameter ist basierend auf unserer Datenlage jedoch unwesentlich.

Mehrere Mikroorganismen wurden getestet, wobei der Fokus auf *Pseudomonas aeruginosa* lag. Quantifiziert wurde anhand der OD und der Biofilmfärbung mit Kristallviolett.

Es zeigte sich, bei welchen Parameterkombinationen *P. aeruginosa* am schnellsten wächst und die pH-Abhängigkeit der Biofilmbildung konnte genauer beschrieben werden. Höhere Wasserhärten korrelierten mit verstärkter Biofilmbildung, und Regenwasser zeigte eine höhere Effizienz bei der Biozidwirkung im Vergleich zu Leitungswasser. Allerdings blieb unklar, ob Regenwasser in allen Szenarien Leitungswasser ersetzen kann, da die Effekte unterschiedlicher Biozidkonzentrationen auf die Biofilmbildung uneinheitlich waren. Biozide und pH-Werte beeinflussten die Biofilmbildung unterschiedlich stark, und Regenwasser zeigte unter bestimmten Bedingungen vergleichbare oder mikrobiologisch betrachtet „bessere“ Ergebnisse wie Trinkwasser. Die Arbeit konnte jedoch keine umfassenden Standards zur Nutzung von Regenwasser in Kühlanlagen etablieren, da Variabilität in der Wasserqualität sowie in den mikrobiologischen Prozessen bestehen bleiben.

Insgesamt legten die Ergebnisse allerdings nahe, dass Regenwasser in Kombination mit optimierten Biozidstrategien eine nachhaltigere Option darstellen könnten. Um die Forschungsfragen weiter zu untersuchen, sind jedoch Langzeitstudien zur Biofilmbildung unter realistischen Betriebsbedingungen sowie detaillierte Analysen der chemischen Zusammensetzung erforderlich. Diese Versuchsreihe setzte mitunter den Grundstein zur Beprobung realer Verdunstungskühlsystemen, um Praxis und Laborresultate gegenüberzustellen.

#### Einfluss von Bioziden auf die Biofilmbildung

Untersuchungen zur Biofilmbildung in Reaktoren und Labormodellen, ergaben, dass die Zugabe von Bioziden in Regenwasserproben die Biofilmbildung signifikant hemmen kann (Abbildung 7). Besonders in Systemen mit hohen Biozidkonzentrationen wurde eine deutliche Reduktion der Biofilmbildung erzielt, was die Annahme stützt, dass Regenwasser unter solchen Bedingungen keine signifikanten Nachteile gegenüber Trinkwasser aufweist.

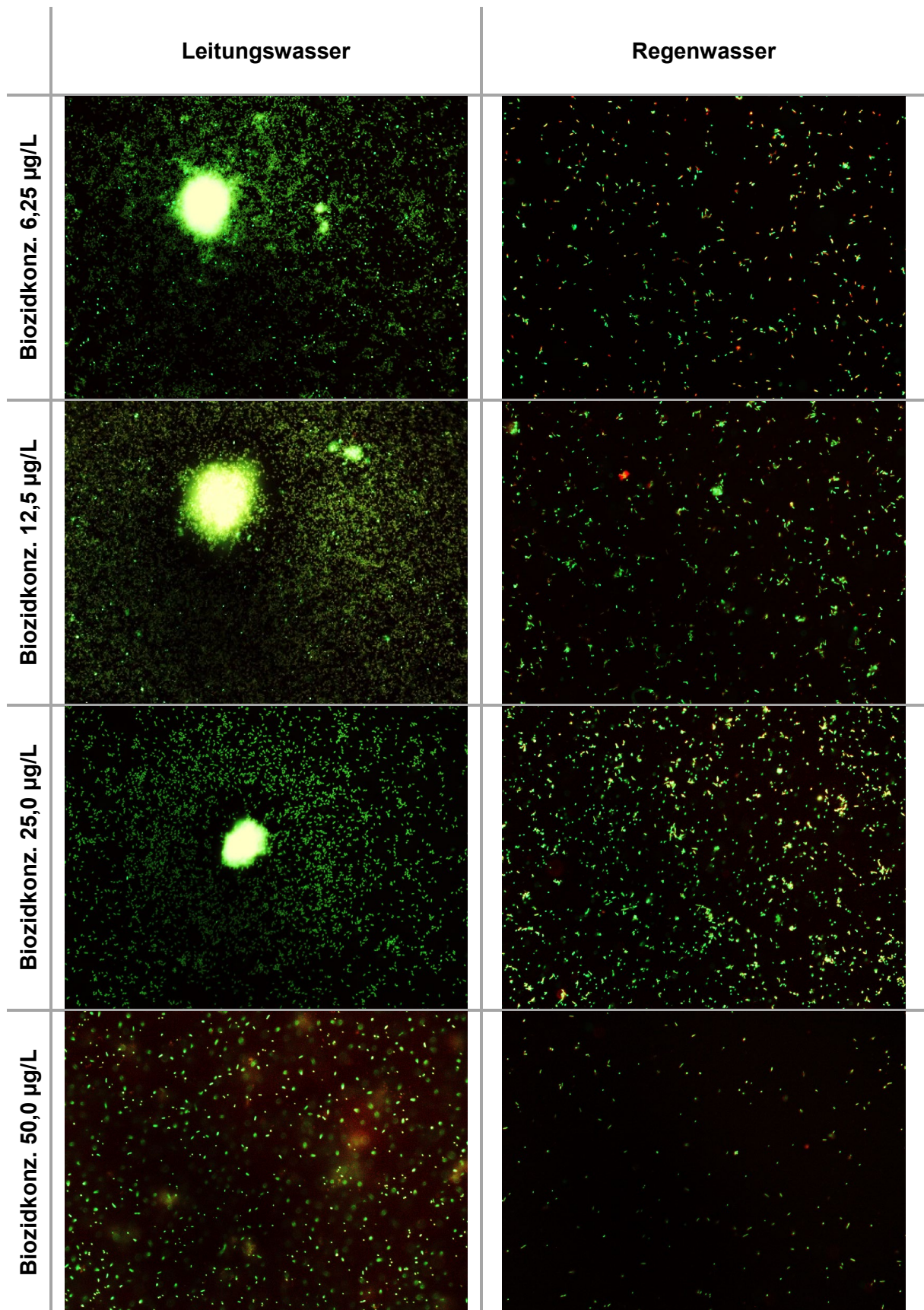


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen angewachsen in Leitungswasser und Regenwasser mit verschiedenen Biozidkonzentrationen am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa*. Grün = vitale Zellen, rot = tote Zellen.

Allerdings wurde auch festgestellt, dass die Biozidbehandlungen in den meisten Fällen nicht vollständig effektiv waren und das Risiko einer Biofilmbildung mit der Zeit anstieg, insbesondere in Systemen mit variierenden pH-Werten und Wasserhärten. Die Einstellung der Wasserhärte, wie sie in den bekannten Anlagen stattfindet (Experten-Austausch), könnte bei weichem Regenwasser möglicherweise entfallen. Da Biofilme im Regenwasser eine geringere Biofilmbildung und eine höhere Sensitivität dieser Biofilme gegenüber dem Biozid aufwiesen, ist ein Potenzial zur Reduktion von Chemikalieneinsatz gegeben.

#### Einfluss vom pH-Wert auf die Biofilmbildung

Bei der Untersuchung des Einflusses vom pH-Wert in Kombination mit unterschiedlichen Biozidkonzentrationen fiel auf, dass leicht saure pH-Werte von 5 und 6 mit erhöhtem Biozidzusatz ein sehr geringes oder stark verspätetes Biofilmwachstum aufwiesen (Abbildung 8). Die Wachstumskurven von sterilem Wasser unterscheiden sich kaum zwischen Leitungs-/Trinkwasser und Regenwasser, wobei in einigen Fällen geringerer Biozidzusatz in Regenwasser zu verringertem oder verzögertem Biofilmwachstum führt. Größere Differenzen sind bei den unsterilen Wassertypen zu sehen. In vielen Fällen ist die maximal erreichte OD bei Regenwasser zu finden. Die Etablierung des Biofilms dauert dort jedoch länger, sodass im unsterilen Regenwasser die Latenzphase mehrfach am größten ist.

In Bezug auf den pH-Wert muss beachtet werden, dass das genutzte Tensid erst bei höheren pH-Werten wirksam ist bzw. aktiver wird. Dieser Umstand ist besonders wichtig, wenn es um die Beurteilung der Nutzung von Regenwasser in der Praxis geht, da dies sehr wahrscheinlich mit einer Anpassung des pH-Werts erfolgen müsste.

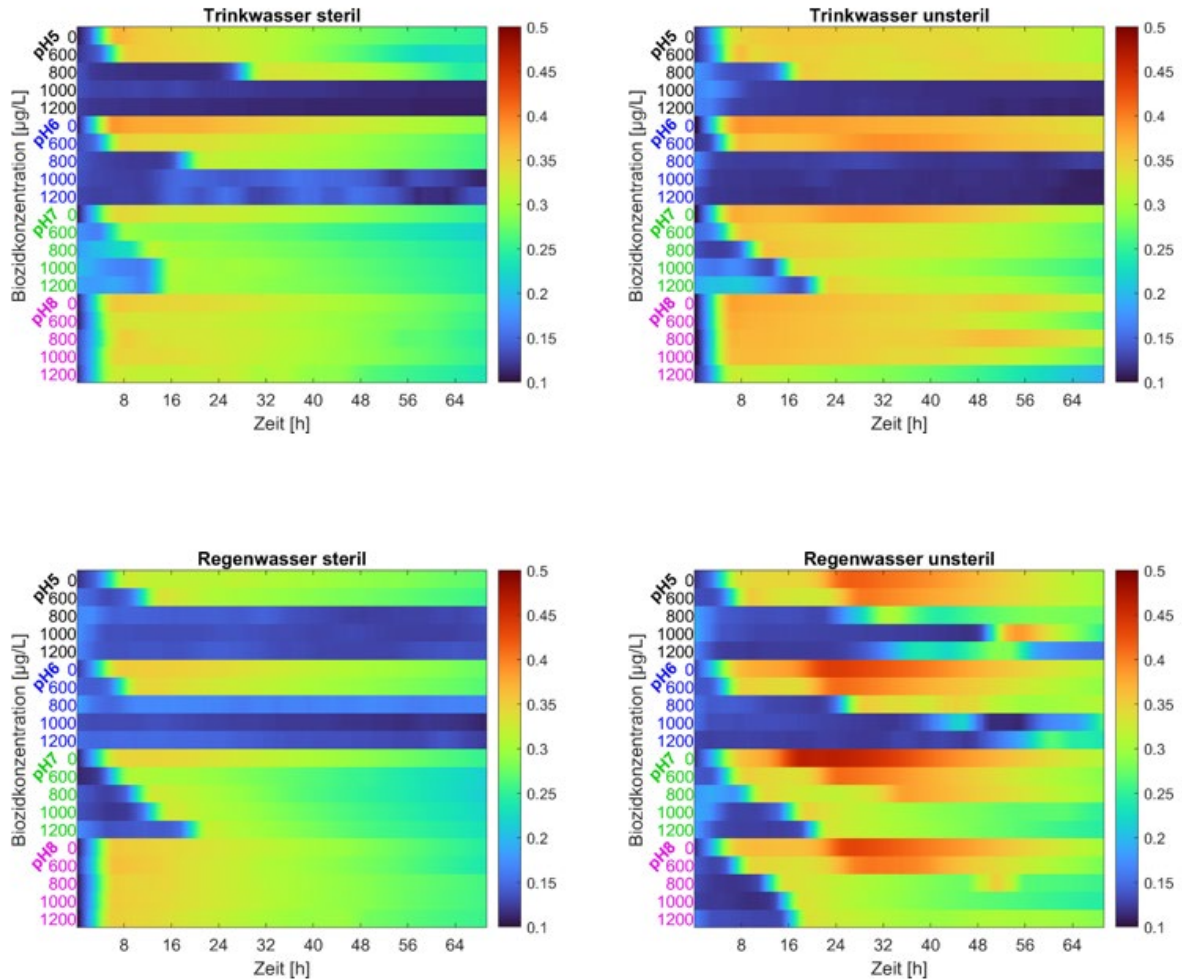


Abbildung 8: OD-Werte von *Pseudomonas aeruginosa* in verschiedenen Wassertypen mit unterschiedlichem pH-Wert sowie Biozidkonzentrationen über einen Zeitraum von 72 h.

### Einfluss der Wasserhärte auf die Biofilmbildung

Bei der Betrachtung verschiedener Wassertypen mit unterschiedlicher Wasserhärte konnte ein Zusammenhang von steigender Wasserhärte mit einer Zunahme der Biofilmbildung erkannt werden (Abbildung 9).

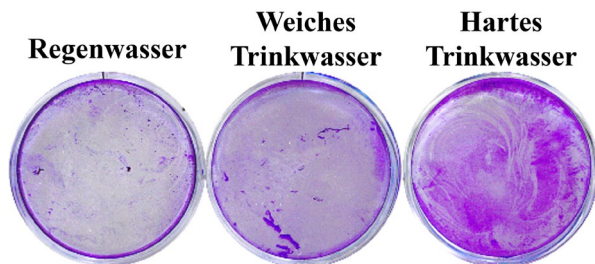


Abbildung 9: Exemplarische Gegenüberstellung von angefärbten Biofilmen die in verschiedenen Wässern bei gleichem pH-Wert gezüchtet wurden.

Dies konnte sowohl für den Gram-negativen Keim *Pseudomonas aeruginosa*, als auch den Gram-positiven *Staphylococcus aureus* bestätigt werden.

Bei einigen Bakterienarten war die Biofilmbildung in Regenwasser geringer als in weichem Trinkwasser. Trotz großer (bio-)chemischer Unterschiede verschiedener getesteter Regenwässer, unterscheiden sie sich kaum in der resultierenden Biofilmbildung.

#### Mikrobielle Zusammensetzung der Biofilme

DNA-Analysen gewonnener Biofilme ergaben, dass in den Biofilmen von Regenwasserproben eine größere Diversität an mikrobiellen Gemeinschaften vorherrschten als in den Biofilmen aus Trinkwasser. Dies deutet darauf hin, dass Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen eine andere mikrobielle Flora fördert, was sowohl positive, als auch negative Auswirkungen auf die Biofilmbildung haben könnte. Dies wurde in den *ex-situ* Versuchen weiter untersucht. Die vielfältige mikrobielle Zusammensetzung könnte unter bestimmten Bedingungen zu einer erhöhten Biofilmbildung führen, was die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Überwachung und angepasster Biozidstrategien unterstreicht. Die DNA-Sequenzierung zeigte ebenfalls, dass keine primär pathogenen Bakterien, jedoch opportunistische Keime vorhanden sind. Dies sollte bei langfristiger Nutzung berücksichtigt werden. Die Forschungsfragen zur Biofilmdynamik und den Langzeitwirkungen der Regenwassernutzung wurden nur teilweise geklärt. Aus diesem Grunde wurde die Versuchsreihe mit *ex-situ* Biofilmen aus VKAs im CDC-Reaktor durchgeführt.

### **3.3 Feldversuche in Verdunstungskühlanlagen**

#### **3.3.1 Keimzahlbestimmung auf Probenträgern**

Die entwickelten Probenträger konnten durch das starke Umwälzen und Pumpen in Anlagen nicht alle erfolgreich entnommen werden, da einige zerstört wurden oder sich Teile gelöst haben. Durch die Versuche konnten die Probenträger aber weiterentwickelt werden und es liegen genügend erfolgreich gesammelte Daten vor, um wichtige Aussagen zu treffen und tiefere quantitative Analysen noch umzusetzen. Insgesamt konnten 11 Proben extrahiert und analysiert werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der Proben aus Verdunstungskühlanlagen (F = Filter, M = Membran).

Probe	Behandlung
M1	Biozid
F1	Biozid
M2	UV (Durchfluss)
F2	UV (Durchfluss)
M3	UV (Durchfluss)
F3	UV (Durchfluss)
M4	UV (Becken)
M7	Biozid
F7	Biozid
M8	Biozid
F8	Biozid

Die Beprobung realer Verdunstungskühlanlagen zeigte, dass Systeme, die auf UV-Sterilisation im gesamten Becken basieren, besonders effektiv bei der Kontrolle der Biofilmbildung sind (siehe Abbildung 10). Systeme mit UV-Durchfluss oder Kontrolle über Biozide wiesen verschieden hohe Keimbelastungen auf. Eine Inkubation bei 22 °C zeigte eine Tendenz zu höheren Keimzahlen im Vergleich zur Inkubation bei 37 °C. Auffallend waren diese Unterschiede besonders bei den Proben aus UV-betriebenen Anlagen (Proben 2-4), was für eine angepasste und von Biozid-behandelten Anlagen abweichende Mikrobiota spricht. In einigen Fällen sind auch Unterschiede zwischen den verwendeten Medien zu sehen, wobei die Nutzung des Hefeextrakt-Agars der Durchführung nach EN ISO 6222:1999 entspricht [21], auf die in der Trinkwasserverordnung verwiesen wird [18].

Es wurden Keimzahlen von  $10^7$  bis  $10^8$  auf den Proben gefunden. Aufgrund der neuen Methode der Probensammlung sind in der Literatur keine direkt vergleichbaren Werte zu finden, in Kühlwassern wurden jedoch bereits ähnlich hohe Gesamtkeimzahlen identifiziert [22]. Es gibt keine definierten Grenzwerte zur Gesamtkeimzahl in VKAs, weshalb keine Einordnung der erhaltenen Zellzahlen stattfinden kann. Jedoch müssen Gegenmaßnahmen eingeleitet werden, sobald der Anlagenspezifische und -typische Wert der Gesamtkeimzahl um das 100-fache überschritten wird [10].

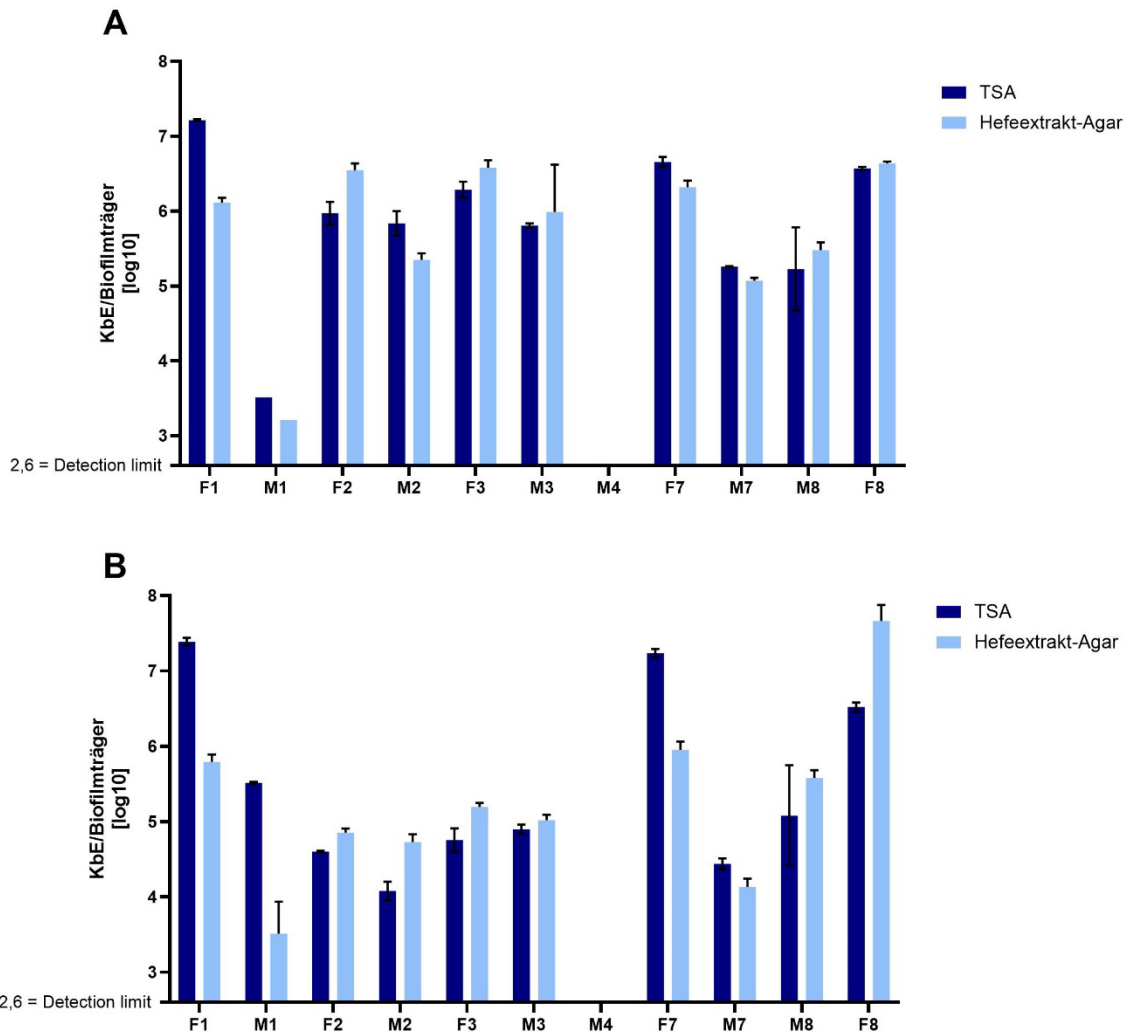


Abbildung 10: Logarithmische KbE/Probenträger [log10] in verschiedenen Verdunstungskühlanlagen (A) inkubiert bei 22 °C für 72 h und (B) bei 37 °C für 48 h auf Trypton-Soja-Agar (TSA) und Hefeextrakt-Agar.

Der Vorteil von UV-Technologien bei der Minimierung von Biofilmen konnte bereits klar bestätigt werden. Im Vergleich dazu waren Systeme, die ausschließlich auf Biozide setzten, deutlich anfälliger für die Bildung von Biofilmen, was zu einem erhöhten Wartungsaufwand und höheren Biozidkosten führen kann.

Diese Befunde decken sich mit wissenschaftlicher Literatur, die auf die zunehmende Resistenzbildung von Mikroorganismen gegenüber herkömmlichen Bioziden hinweist.

Weitere mikrobielle Gruppen, die z.B. im Rahmen der Trinkwasser-Verordnung getestet werden (*Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*, *Escherichia coli*, Coliforme, intestinale Enterokokken), konnten nicht isoliert werden und liegen somit unterhalb der Nachweisgrenze der Versuche.

### 3.3.2 DNA-Analyse der Biofilme auf den Probenträgern

Von allen Proben, die aus realen Anlagen gewonnen wurden eine externe Sequenzierung der 16S rDNA durchgeführt, um mehr über die Zusammensetzung der Biofilme in Erfahrung zu bringen. Es konnten sehr diverse Zusammensetzungen herausgestellt werden, bei denen einige phylogenetische Gruppen vermehrt und wiederholt gefunden wurden (Abbildung 11). Als Beispiel für wiederholt auftauchende Familien sind *Cellvibrionaceae*, *Comamonadaceae* und *Flavobacteriaceae* zu nennen. Die Familien *Comamonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae* und *Sphingomonadaceae* konnten bereits aus Kühlwässern isoliert werden [11]. Auch wenn kulturell keine *Legionella* nachgewiesen werden konnten, zeigen die Sequenzierdaten einiger Proben, dass *Legionella* in einer Menge unterhalb der Nachweisgrenze vorliegt oder noch DNA von einem vorigen Vorkommen im Biofilm vorhanden ist. Da *Legionella* bereits des Öfteren in VKAs nachgewiesen wurde [10,22,23], stellen beide Optionen eine realistische Möglichkeit dar.

Aufgrund dessen, dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft saisonalen Unterschieden unterliegt und auch die Art des Wassertanks der Anlage einen Einfluss hat [11,16,20], könnten erneute und fortlaufende Probensammlungen einen Mehrwert bieten.

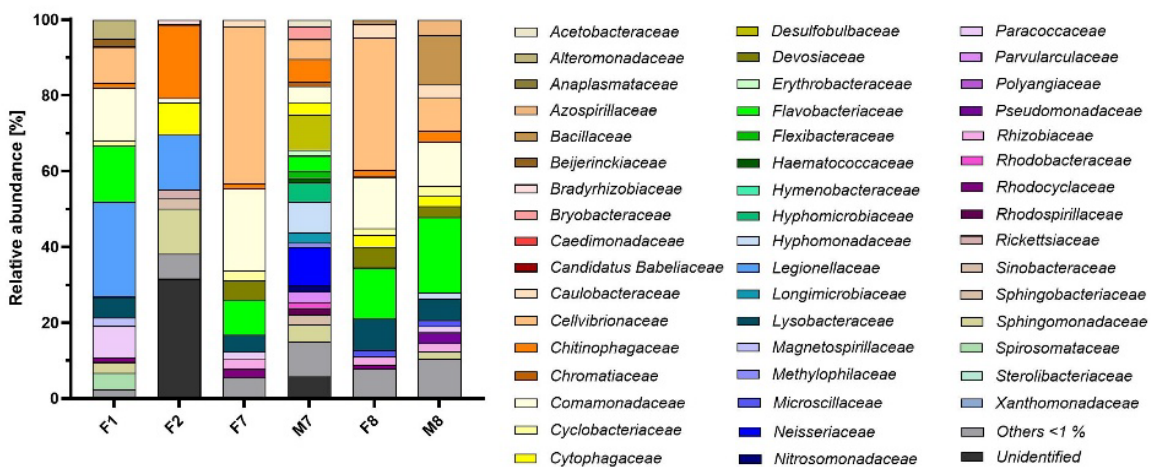


Abbildung 11: Sequenziererergebnisse der Biofilme aus Verdunstungskühlanlagen auf phylogenetischer Ebene der Familie. Others = Andere Familien <1%. Unidentified = auf dieser phylogenetischen Ebene nicht zuzuordnen.

Angesichts zu geringer DNA-Konzentrationen konnten nur 6 der 11 Originalproben erfolgreich sequenziert werden. Trotz erneuter Aufkonzentration und einer zweiten Sequenzierung der DNA-Extrakte konnten aufgrund mangelnder Qualität und Quantität der DNA einige Probe nicht sequenziert werden. Mögliche Gründe dafür sind inhibierende Substanzen durch Reste von Biziden, Korrosionsinhibitoren oder Entschäumer aus den Anlagen, die eine Optimierung der DNA-Extraktion für weiterführende Versuche nötig machen.

### **3.4 Anzucht von Biofilmen aus VKAs *ex-situ* im CDC-Biofilmreaktor**

Vom isolierten Material auf den Probenträgern wurden Versuche in einem CDC-Reaktor durchgeführt. Ziel war es, Unterschiede zwischen den beiden Medien in der Zusammensetzung und den Wachstumsraten der Biofilme zu ermitteln. Abbildung 12 zeigt, dass weder ein statistischer Vor-, noch Nachteil durch die Substitution von Trinkwasser mit Regenwasser erzielt wurde. Die Differenzen variierten je nach Inkubationsparametern und Biofilm, jedoch wurden generell ähnlich hohe Gesamtkeimzahlen erzielt. Da keine über 100-fache Erhöhung durch Regenwasser stattfand, wären keine akuten Maßnahmen zur Verringerung der Zellzahlen bei Nutzung von Regenwasser nötig [10].

Auch in diesen Versuchen konnten keine relevanten Pathogene nachgewiesen werden und eine Anreicherung dieser somit weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Zugabe von Biozid führte tendenziell zu leicht erhöhten Zellzahlen, was die Notwendigkeit der Zugabe basierend auf diesen Ergebnissen in Frage stellt. Da von der Nutzung von Bioziden abgesehen werden soll [10], stellt das Weglassen von Bioziden bei gleichbleibend hohen Keimzahlen eine Option dar. Alternativ müsste die Biozidkonzentration, falls möglich, angepasst und erhöht werden. Hinsichtlich der Versuche sollte jedoch beachtet werden, dass ein Worst-Case Szenario mit hoher mikrobieller Belastung suggeriert wurde und sich das Biozid möglicherweise schon an den im Medium vorhandenen Zell aufbraucht. Die Zusammensetzung der Biofilme basierend auf der Sequenzierung zeigte Unterschiede zwischen einigen Proben auf, die Zugabe von Biozid veränderte sie jedoch nicht maßgeblich. Im Vergleich zu den ursprünglichen Proben nahm die Diversität der Proben ab und wenige phylogenetischen Familien reicherten sich an. *Legionella* wurde nach der Anreicherung im CDC-Reaktor nicht mehr nachgewiesen.

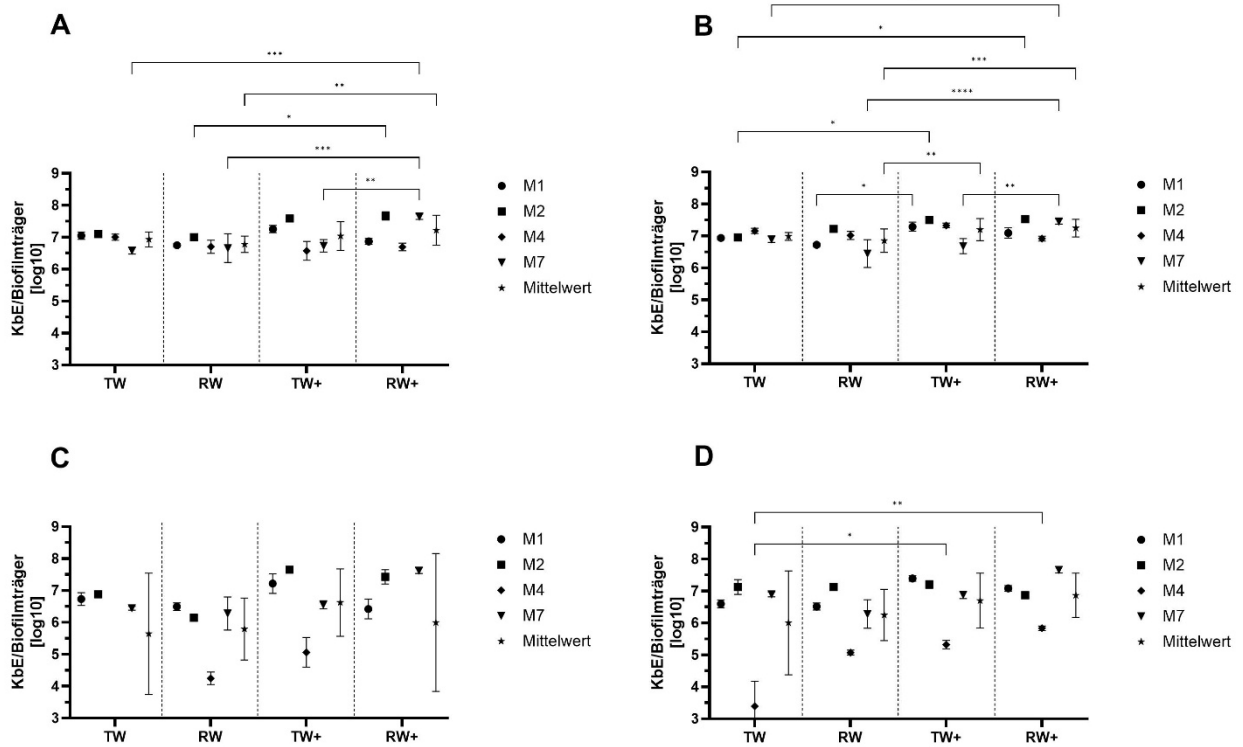


Abbildung 12: Aerobe Gesamtkeimzahl in KbE/Biofilmträger [log<sub>10</sub>] der Biofilme M1, M2, M4 und M7 und der Gesamtheit der getesteten Biofilme bei der Anzucht mit Medium in Trinkwasser (TW) und Regenwasser (RW) mit (+) und ohne zweimalige Zugabe von Biozid. Inkubation (A) auf Hefeextrakt-Agar bei 22 °C für 72 h, (B) auf TSA bei 22 °C für 72 h, (C) auf Hefeextrakt-Agar bei 37 °C für 48 h, (D) auf TSA bei 37 °C für 48 h. \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  basierend auf Tukey's Multiple Comparisons Test zum Vergleich der Wasser- und Behandlungsarten.

Bei der Betrachtung der gesamten Biofilmmasse mit Hilfe einer Kristallviolett-Färbung konnte im Mittel ein geringerer Wert bei der Nutzung von Regenwasser erfasst werden (siehe Abbildung 13). Die Unterschiede erwiesen sich jedoch als nicht signifikant verschieden und unterstützen somit die Ergebnisse der Gesamtkeimzahlen. Auch in Bezug auf diese Ergebnisse wäre eine Substitution von Trink- mit Regenwasser mit keinem Nachteil verbunden.

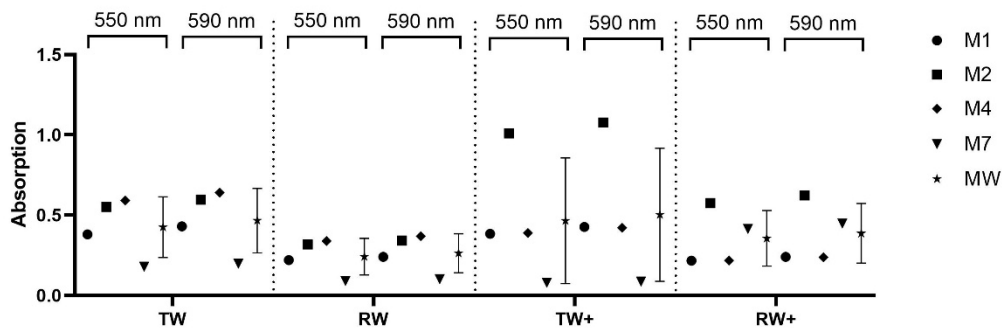


Abbildung 13: Absorption der extrahierten Biofilme nach Kristallviolett-Färbung bei 550 und 590 nm und der Gesamtheit der getesteten Biofilme (Mittelwert, MW) nach der Anzucht mit Medium in Trinkwasser (TW) und Regenwasser (RW).

Da durch die Zugabe vom Medium die pH-Werte der Wasser abgepuffert werden, konnte ein rein pH-basierter Einfluss des Regenwassers ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: pH-Werte genutzter Wässer & Medien

Experiment	10% TSB in Trinkwasser	10% TSB in Regenwasser
M1 TW vs. RW	7.37	7.33
M2 TW vs. RW	7.60	7.40
M4 TW vs. RW	7.52	7.40
M7 TW vs. RW	7.57	7.45
M1 TW+ vs. RW+	7.62	7.43
M2 TW+ vs. RW+	7.55	7.44
M4 TW+ vs. RW+	7.48	7.31
M7 TW+ vs. RW+	7.52	7.40

Dies sollte beim Transfer des erlangten Wissens in die reale Anwendung beachtet werden. So wie in einigen Anlagen die Wasserhärte eingestellt wird, ist auch eine Einstellung des pH-Wertes denkbar. Trotzdem kann auch ein niedriger pH-Wert einen mikrobiellen Vorteil bieten, wie in den Versuchen im statischen Modell zuvor gezeigt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse sollen helfen, Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft und potenzielle Hygienrisiken durch die Nutzung von Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen zu bewerten.

Darüber hinaus bieten sie praxisrelevante Erkenntnisse zur Optimierung von Biozidstrategien und zur Einordnung von Regenwasser als alternative Ressource in technischen Systemen. Insgesamt konnte diese Versuchsreihe keine Nachteile für die mikrobielle Sicherheit bei der Nutzung von Regenwasser in VKAs identifizieren und bestärkt dessen Nutzung. Schlussfolgernd könnten Ressourcen gespart werden und somit auch finanzielle Vorteile entstehen.

## 4 Öffentlichkeitsarbeit/Vorträge/Veröffentlichungen

### 4.1 Austausch und Kommunikation

Besonders durch die Anlagenbeprobung konnten viele wichtige Kontakte geknüpft werden (Tabelle 5) und das Interesse am von der DBU geförderten Projekt war sehr hoch bei anderen Hochschulen und Universitäten. Eine für die Anlagen verantwortliche Person aus der Hochschule A erklärte, dass im Rahmen des Wiederaufbaus am Campus Rheinbach, im Jahr 2026 eine regenwasserbetriebene Verdunstungskühlanlage umgesetzt werden soll. Ein weiterer Austausch ist geplant und zukünftige Projekte sind denkbar.

*Tabelle 5: Mailadressen der Personen die vor Ort oder in der Kommunikation unterstützt haben mit fett hervorgehobenen Kontakten für Vorgesetzte (für öffentlichen Bericht anonymisiert)*

Ort	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Institution</b>	A	B	C	D
<b>Kontakt</b>	*@*.de	*@*.de	*@*.de	*@*.de

### 4.2 Vorträge

Am 27.03.2025 fand ein Treffen der Hygiene-Fachgruppe des fbr im Kreisgesundheitsamt Mettmann statt, zudem die Projektverantwortlichen der HSRW eingeladen wurden. Das Projekt und die zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Ergebnisse wurden präsentiert. Ergebnisse und weitere Vorgehensweisen wurden diskutiert, da das Treffen einen weiteren Austausch mit Personen mit verschiedenen Expertisen im Bereich Regenwasser und Umweltmikrobiologie ermöglichte. Zusätzlich wurden weitere Möglichkeiten zur Einsparung von aufgearbeitetem Wasser durch Substitution mit Regenwasser in anderen Bereichen (z.B. der Bewässerung von Parkanlagen) präsentiert.

Zusätzlich wurde das Projekt in Hamburg auf der „Conference of Applied Hygiene and Microbiology“ (CAHMV, 26. – 28.11.2025) als Teil der Session „Hygiene in Households“ unter dem Titel „Biofilm development in Ventilation and Air Conditioning Systems – Comparison drinking vs. rain water“ vorgestellt.

### 4.3 Wissenschaftliche Publikationen

Als Outcome dieses Projektes sollen ausgewählte Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen in wissenschaftlichen Journals publiziert werden. Im aktuellen Fokus steht eine Veröffentlichung, die die Daten zur mikrobiellen Zusammensetzung von Biofilmen in VKAs und den anschließenden *ex-situ* Versuchen im CDC-Reaktor umfassen soll. Das Manuskript ist inhaltlich vollständig und liegt zurzeit den HSRW-internen Projektleitungen sowie weiteren Co-Autoren zur Korrektur vor. Das geplante Graphical abstract ist in Abbildung 14 zu sehen.

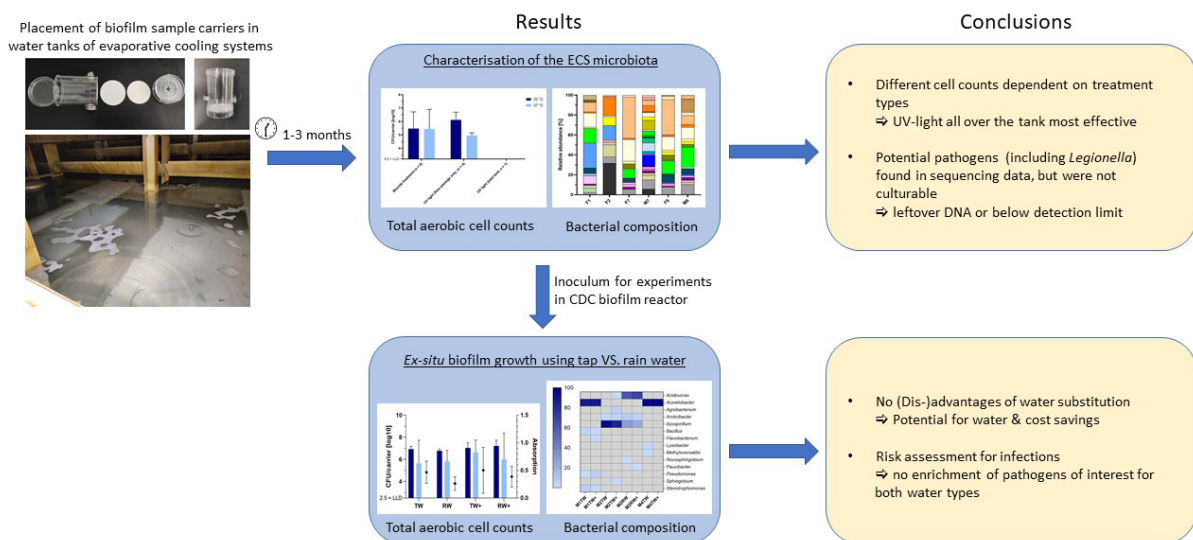


Abbildung 14: Graphical abstract zur geplanten Veröffentlichung zur mikrobiellen Zusammensetzung von Biofilmen in VKAs und dem Wachstum von *ex-situ* Biofilmen in Trink- bzw. Regenwasser.

Eine weitere Veröffentlichung basierend auf den Wachstumskurven ausgewählter Bakterien in verschiedenen Wassertypen ist denkbar, jedoch noch nicht in Bearbeitung. Potenzielle Journals zur Veröffentlichung diese Daten stellen z.B. „Water Environment Research“ oder „Water & Environment“ dar.

## 5 Fazit und weiteres Vorgehen

Die Nutzung von Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen hat großes Potenzial, sowohl für die Klimawandelanpassung als auch für die Ressourcenschonung. Allerdings bedarf es einer systematischen Herangehensweise, um technische, hygienische (und rechtliche) Hürden anzugehen. Die bisherigen Untersuchungen zur Nutzung von Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen haben gezeigt, dass Regenwasser eine nachhaltige Alternative zu Trinkwasser darstellen könnte, wenn es richtig behandelt wird. Insbesondere die Kombination von Regenwasser mit UV-Sterilisationstechnologien könnte sich als effektiv erweisen, um die Biofilmbildung zu kontrollieren und die Notwendigkeit von Biozidzusätzen generell zu reduzieren. Die mikrobiologischen Untersuchungen, einschließlich der DNA-Analyse der Biofilme, zeigten zwar, dass Regenwasser in Verdunstungskühlanlagen eine andere mikrobielle Flora fördert, die spezifische Anforderungen an die Wartung und Überwachung der Systeme stellen könnten. Es konnte jedoch keine spezifische Anreicherung relevanter Pathogene nachgewiesen werden, was für eine Nutzung von Regenwasser spricht.

Die in den Feldversuchen gewonnenen Daten geben bereits einen ersten guten Überblick zum allgemeinen Potenzial verschiedener Anlagen zur Biofilmbildung. Die Nutzung des CDC-Reaktors als dynamisches Wachstumsmodell in Kombination mit der Inokulation mit komplexen *ex-situ* Biofilmen aus VKAs ermöglichen realitätsnähere Untersuchungen zum Vergleich von Trink- und Regenwasser als Wasserquelle für diese. Eine Modifikation des CDC-Biofilmmodells ist denkbar (z.B. UV-Bestrahlung des Reaktors, Zugabe von Entschäumer, ...), um die Bedingungen der Realität noch akkurater darstellen zu können.

Nachdem alle Versuchsreihen abgeschlossen sind, steht zurzeit das Verfassen von wissenschaftlichen Publikationen und deren Veröffentlichung an. In Bezug auf weitere Erforschung des Potenzials von Regenwasser in VKAs sind Langzeitversuche denkbar, bei denen über mehrere Monate oder Jahre sukzessiv Probenträger entnommen werden. Falls wie geplant die Hochschule A eine Regenwasserbetriebene VKA einrichtet, können parallel beide Wassertypen in VKAs getestet und deren Mikrobiota untersucht werden.

## 6 Referenzen

1. García-Avila F, Guanoquiza-Suarez M, Guzman-Galarza J, Cabello-Torres R, Valdiviezo-Gonzales L. Rainwater harvesting and storage systems for domestic supply: An overview of research for water scarcity management in rural areas. *Results Eng.* 2023;18.
2. Jasechko S, Seybold H, Perrone D, Fan Y, Shamsudduha M, Taylor RG, et al. Rapid groundwater decline and some cases of recovery in aquifers globally. *Nature* [Internet]. *Nature Research*; 2024 [cited 2025 Jul 17];625:715–21. <https://doi.org/10.1038/S41586-023-06879-8>,
3. Rapp VLT, Wallin J, Knutsson J. Energy and water saving potential with rainwater-based evaporative cooling and toilet flushing. *Dev Built Environ.* 2025;23. <https://doi.org/10.1016/j.dibe.2025.100702>
4. Vargas-Parra MV, Rovira-Val MR, Gabarrell X, Villalba G. Rainwater harvesting systems reduce detergent use. *Int J Life Cycle Assess* [Internet]. 2019;24:809–23. <https://doi.org/10.1007/s11367-018-1535-8>
5. Zhao Z, Xu H. Study on the Supplying System of Cooling Water of Air Conditioner based on the Urban Street Rainwater. *Energy Procedia* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2025 Jul 21];16:8–13. <https://doi.org/10.1016/J.EGYPRO.2012.01.003>
6. Thomé ACB, Santos PG, Fisch AG. Using rainwater in cooling towers: Design and performance analysis for a petrochemical company. *J Clean Prod* [Internet]. 2019;224:275–83. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.249>
7. Kapilan N, Isloor AM, Karinka S. A comprehensive review on evaporative cooling systems. *Results Eng* [Internet]. 2023;18:101059. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101059>
8. Di Pippo F, Di Gregorio L, Congestri R, Tandoi V, Rossetti S. Biofilm growth and control in cooling water industrial systems. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2018;94:fiy044. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy044>
9. Liu Y, Zhang W, Sileika T, Warta R, Cianciotto NP, Packman A. Role of bacterial adhesion in the microbial ecology of biofilms in cooling tower systems. *Biofouling* [Internet]. 2009 [cited 2025 Nov 13];25:241. <https://doi.org/10.1080/08927010802713414>
10. Verein deutscher Ingenieure. VDI 2047 Part 2: Open recoler systems Securing hygienically sound operation of evaporative cooling systems (VDI Cooling Tower Code of

Practice). 2019.

11. Di Gregorio L, Tandoi V, Congestri R, Rossetti S, Di Pippo F. Unravelling the core microbiome of biofilms in cooling tower systems. *Biofouling* [Internet]. Taylor and Francis Ltd.; 2017 [cited 2025 Jul 18];33:793–806.

<https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1367386>;JOURNAL:JOURNAL:GBIF20;WGROU:STRING:PUBLICATION

12. Wang J, Liu M, Xiao H, Wu W, Xie M, Sun M, et al. Bacterial community structure in cooling water and biofilm in an industrial recirculating cooling water system. *Water Sci Technol* [Internet]. Water Sci Technol; 2013 [cited 2025 Jul 18];68:940–7.

<https://doi.org/10.2166/WST.2013.334>,

13. Zweiundvierzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider - 42. BImSchV). 2017.

14. Sörensen M, Gurrath C. UV-Disinfection of cooling towers [Internet]. 2017. [https://belmar-technologies.com/wp-content/uploads/2022/02/Disinfection\\_of\\_Cooling\\_Towers\\_eng.pdf](https://belmar-technologies.com/wp-content/uploads/2022/02/Disinfection_of_Cooling_Towers_eng.pdf)

15. Mouchtouri VA, Goutziana G, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. Legionella species colonization in cooling towers: Risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control*. 2010;38:50–5. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ajic.2009.04.285>

16. Rajagopal S, Jenner HA, Venugopalan VP. Operational and environmental consequences of large industrial cooling water systems. *Oper. Environ. Consequences Large Ind. Cool. Water Syst*. Springer US; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1698-2/COVER>

17. Morales-Pinzón T, Rieradevall J, Gasol CM, Gabarrell X. Modelling for economic cost and environmental analysis of rainwater harvesting systems. *J Clean Prod* [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2025 Jul 21];87:613–26.

<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2014.10.021>

18. Bundesministerium für Gesundheit. Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV). 2023.

19. ASTM International. ASTM E2871-25: Standard Test Method for Determining Disinfectant Efficacy Against Biofilm Grown in the CDC Biofilm Reactor Using the Single Tube Method. 2025 p. 1–9. <https://doi.org/10.1520/E2871-21>

20. Hauer T, Čapek P, Böhmová P. Main photoautotrophic components of biofilms in natural draft cooling towers. *Folia Microbiol (Praha)* [Internet]. Springer; 2015 [cited 2025 Nov 13];61:255–60. <https://doi.org/10.1007/S12223-015-0429-4>
21. DIN German Institute for Standardization. DIN EN ISO 6222:1999: Water quality - Enumeration of culturable micro-organisms - Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium (ISO 6222:1999); German version EN ISO 6222:1999. 1999.
22. Nocker A, Schulte-illingheim L, Frösler J, Welp L, Sperber O, Hugo A. Microbiological examination of water and aerosols from four industrial evaporative cooling systems in regard to risk of Legionella emissions and methodological suggestions for surveillance. *Int J Hyg Environ Health*. 2020;229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113591>
23. Fitzhenry R, Weiss D, Cimini D, Boyd SBC, Alleyne L, McIntosh RSN, et al. Legionnaires' Disease Outbreaks and Cooling Towers, New York City, New York, USA. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017;23:1769–76. <https://doi.org/10.3201/eid2311.161584>