

---

Mikroorganismen  
in der Arbeitsplatz-  
atmosphäre   
– Aktinomyceten

---



Das Projekt „Kommission Arbeitsschutz und Normung“ wird finanziell durch das Bundesministerium für Arbeit und Sozialordnung gefördert.

|                   |               |   |
|-------------------|---------------|---|
| Autoren           | Teil 1:       | Dr. Gerhard Danneberg, Prof. Dr. Albert J. Driesel  |
|                   | Teil 2 und 3: | Dr. Gerhard Danneberg, Regine Thelen<br>TÜV Energie und Systemtechnik GmbH<br>Abteilung: Institut für Sicherheit in der Biotechnologie (ISB)<br>Unternehmensgruppe TÜV Süddeutschland<br>Mergenthalerallee 27, 65760 Eschborn |
| Herausgeber       |               | Verein zur Förderung der<br>Arbeitssicherheit in Europa e.V.  |
| Redaktion         |               | Kommission Arbeitsschutz und Normung (KAN)<br>Geschäftsstelle<br>Alte Heerstraße 111, 53754 Sankt Augustin<br>Telefon (0 22 41) 2 31–34 53<br>Telefax (0 22 41) 2 31–34 64<br>– 2., erweiterte Auflage Februar 1999 –         |
| Gesamtherstellung |               | Druckerei Plump OHG   |
| ISBN              |               | 3–88383–517–X   |

Mikroorganismen  
in der Arbeitsplatz-  
atmosphäre  
– Aktinomycceten

---

KAN-Bericht 13



Verein zur  
Förderung der  
Arbeitssicherheit  
in Europa

# Inhaltsübersicht

|   |     |
|---|-----|
| <b>Teil 1 KAN-Bericht:<br/>Mikroorganismen in der Arbeitsplatzatmosphäre –<br/>Aktinomyceten</b> . . . . .  | 3   |
| <b>Teil 2 Ringversuch:<br/>Mikroorganismen in der Arbeitsplatzatmosphäre –<br/>Aktinomyceten</b> . . . . .  | 85  |
| <b>Teil 3 Vorschlag für eine Meßstrategie zur Erfassung<br/>luftgetragener thermophiler Aktinomyceten<br/>in der Arbeitsplatzatmosphäre</b> . . . . . | 103 |

Diese Neuauflage umfaßt im **Teil 1** (Seite 3 – 84) den zuerst im Juni 1997 veröffentlichten **KAN-Bericht** „Mikroorganismen in der Arbeitsplatzatmosphäre – Aktinomyceten“. Er wurde gegenüber der Erstauflage in einigen Punkten aktualisiert.

Erweitert wird dieser Bericht im **Teil 2** (Seite 85 – 102) durch die Ergebnisse von zwei **Ringversuchen** in den Jahren 1997 und 1998, die zur Erprobung des in der Studie entwickelten Meßverfahrens in einer Kompostieranlage durchgeführt wurden.

**Teil 3** (Seite 103 – 106) enthält, basierend auf der Studie und den Ergebnissen des Ringversuchs, den Vorschlag für eine **Meßstrategie** zur Erfassung luftgetragener thermophiler Aktinomyceten in der Arbeitsplatzatmosphäre.

# Teil 1

## Mikroorganismen in der Arbeitsplatzatmosphäre – Aktinomyceten

### Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
|          | Zu diesem Bericht . . . . .  | 5         |
|          | Zusammenfassung der Studie . . . . .   | 7         |
|          | Empfehlungen der KAN . . . . .   | 10        |
|          | <b>This Report</b> . . . . .   | 12        |
|          | Summary . . . . .  | 14        |
|          | KAN's recommendations . . . . .  | 17        |
|          | <b>A ce propos</b> . . . . .   | 19        |
|          | Résumé . . . . .   | 21        |
|          | Recommendations de la KAN . . . . .  | 24        |
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b> . . . . .  | <b>27</b> |
| <b>2</b> | <b>Welche Aktinomyceten sind relevant<br/>unter dem Gesichtspunkt des Arbeitsschutzes?</b> . . . . . | <b>29</b> |
| 2.1      | Arbeitsplätze mit einer möglichen Belastung durch Aktinomyceten . . . . .                            | 34        |
| <b>3</b> | <b>Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft</b> . . . . .                                     | <b>37</b> |
| 3.1      | Einleitende Bemerkungen . . . . .  | 37        |
| 3.2      | Personengebundenes und nicht personengebundenes Sammeln . . . . .                                    | 37        |
| 3.3      | Verfahren zum Sammeln von Luftkeimen . . . . .   | 39        |
| 3.3.1    | Die Sedimentationsplattenmethode . . . . .   | 39        |
| 3.3.2    | Das Impaktionsverfahren . . . . .  | 39        |
| 3.3.3    | Filtrationsverfahren . . . . .   | 42        |
| 3.3.4    | Das Impinger-Verfahren . . . . .   | 44        |
| 3.4      | Auswahl eines geeigneten Probenahmeverfahrens . . . . .  | 44        |

# Teil 1

## Mikroorganismen in der Arbeitsplatzatmosphäre – Aktinomyceten

|                     |  |           |
|---------------------|--|-----------|
| 3.5                 | Strategie der Probenahme . . . . .   | 50        |
| 3.6                 | Transport . . . . .  | 52        |
| 3.7                 | Nachweis und Differenzierung von Aktinomyceten im Labor . . . . .                            | 56        |
| 3.7.1               | Isolierung von Aktinomyceten . . . . .   | 56        |
| 3.7.2               | Differenzierung im Labor . . . . .   | 59        |
| 3.8                 | Alternativen zur Erfassung der kultivierbaren Aktinomyceten . . . . .                        | 60        |
| 3.8.1               | Staubmessungen . . . . .   | 60        |
| 3.8.2               | Alternative Verfahren zur Bestimmung<br>der Belastung der Luft mit Mikroorganismen . . . . . | 62        |
| 4                   | <b>Ansätze für die Normung von Verfahren<br/>zur Erfassung von Aktinomyceten . . . . .</b>   | <b>65</b> |
| 4.1                 | Literaturrecherche . . . . .   | 65        |
| 4.2                 | Recherche in der Datenbank PERINORM . . . . .  | 66        |
| 5                   | Empfehlungen für den Auftraggeber . . . . .  | 67        |
| 6                   | Forschungsbedarf . . . . .   | 69        |
| 7                   | Literatur . . . . .  | 71        |
| <br>                |  |           |
| Anhang/Annex/Annexe |  |           |
| 1                   | Nährmedien/Culture media/Milieux de culture . . . . .  | 77        |
| 2                   | Vorschlag für eine Meßstrategie . . . . .  | 79        |
|                     | Proposal for a measuring strategy . . . . .  | 81        |
|                     | Stratégie de mesure préconisée . . . . .   | 83        |

# Zu diesem Bericht

Die Kommission Arbeitsschutz und Normung (KAN) wurde 1994 eingerichtet, um die Belange des deutschen Arbeitsschutzes vor allem in der Europäischen Normung geltend zu machen. Sie setzt sich zusammen aus Vertretern der Sozialpartner (Arbeitgeber, Arbeitnehmer), des Staates (Bund, Länder), des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG) und des DIN Deutschen Institut für Normung. Die KAN hat u. a. die Aufgabe, die öffentlichen Interessen im Arbeitsschutz zu bündeln und mit Stellungnahmen auf laufende oder geplante Normungsvorhaben Einfluß zu nehmen.

Zur Analyse von arbeitsschutzrelevanten Sachverhalten in der Normung und zur Ermittlung von Defiziten oder Fehlentwicklungen in der Normungsarbeit vergibt die KAN u. a. Studien und Gutachten.

Der vorliegenden Studie lag folgender Auftrag zugrunde:

*Während für eine Vielzahl biologischer Agenzien (z. T. auch als Summen- und Leitparameter) die Erarbeitung einheitlicher Meßverfahren auf der Basis von Vorwissen mit vertretbarem Aufwand gegenwärtig als leistbar angesehen wird, bereitet die Ausarbeitung eines Verfahrens für Aktinomyzeten große Schwierigkeiten.*

*Aktinomyzeten sind grampositive Bakterien, die myzelartig wachsen (sog. „Strahlenpilze“) und ubiquitär in der Umwelt, insbe-*

*sondere im Boden, vorkommen. Einige Arten verschiedener Gattungen besitzen pathogene Eigenschaften (z. B. Actinomyces, Nocardia) und können chronische Infektionssyndrome hervorrufen. Daneben können thermophile Aktinomyzeten (z. B. Thermoactinomyces vulgaris, Saccharopolyspora rectivirgula) beim Menschen eine exogen-allergische Alveolitis (EAA) auslösen. Die EAA wird durch Inhalation großer Mengen von in der Luft dispergierten Konidiosporen hervorgerufen. Hohe Konidienkonzentrationen in der Atemluft finden sich insbesondere bei bestimmten Arbeitsabläufen und im weiteren technischen Umfeld des Menschen. Beispiele hierfür sind landwirtschaftliche Betriebe (Farmerlunge), Kompostieranlagen, Pilzzucht (Pilzarbeiterlunge), aber auch Räume mit technischer Luftbefeuchtung (Befeuchterlunge).*

*Für die Bestimmung der Aktinomyzetenkonzentrationen in der Luft in Arbeitsbereichen stehen bislang keinerlei standardisierte Meßverfahren zur Verfügung. Da sie für den Menschen durch ihre krankheitserzeugenden Eigenschaften eine besondere medizinische Bedeutung besitzen, ist ein standardisiertes Meßverfahren für Aktinomyzeten von hohem Interesse, um in der Zukunft eine einheitliche Beurteilung verschiedener Arbeitsplätze zu gewährleisten. Dabei stellen Aktinomyzeten besondere Anforderungen an die Meßtechnik, da sie schwierig nachzuweisen sind. Neben*

# Zu diesem Bericht

*einer großen systematischen Vielfalt wach-  
sen Aktinomyceten auf den Kulturnähr-  
böden im allgemeinen wesentlich lang-  
samer als begleitende andere Bakterien  
und Pilze und bilden zudem kleinere Kolo-  
nien. Die Identifizierung gestaltet sich  
kompliziert, da neben der Heranziehung  
morphologischer Kriterien auch unterschied-  
liche physiologische Tests, z. B. Abbau  
unterschiedlicher Biopolymere, durch-  
zuführen sind.*

*Ein zu entwickelndes Meßverfahren für Akti-  
nomyceten muß den spezifischen Ansprü-  
chen des Arbeitsschutzes genügen. Da die  
Luftsporen der Aktinomyceten im Vergleich  
zu vegetativen Formen relativ austrock-  
nungsresistent sind, bietet sich ein Probe-  
nahmeverfahren auf der Basis des Filtra-  
tionsprinzips unter Beachtung der EN 481  
an.*

*Ziel einer Projektstudie müßte es daher  
sein, das vorhandene Wissen zur Messung  
von Aktinomyceten aus der Literatur zu-  
sammenzutragen, ggf. Defizite zu be-  
schreiben und damit Ansätze für Aufgaben-  
verteilungen im Vorfeld der als notwendig  
erachteten Normung in einer vom BTS 4  
als wünschenswert erachteten WG 5  
„Probenahmeverfahren biologischer Agen-  
zien“ des CEN/TC 137 zu liefern, um  
die Aussichten und Möglichkeiten für eine  
Normung zu beschreiben.*

Die KAN dankt den Verfassern für die  
Durchführung des Projekts und für die Vor-

lage des Berichts sowie den folgenden  
Experten für die kritische Begleitung und  
die Unterstützung bei der Auswertung der  
Arbeit:

Frau Dr. Arnold-Sundermann  
Verwaltungs-Berufsgenossenschaft, Mainz

Herrn Dr. Dieter Brauer  
Hoechst AG, Frankfurt a.M.

Frau Cornelia Eckrich  
Institut WAR, Technische Hochschule  
Darmstadt

Frau Angela Janowitz  
KAN-Geschäftsstelle, Sankt Augustin

Herrn Dr. Rüdiger Pipke  
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeits-  
medizin, Dortmund

Herrn Dr. Rumler  
Arbeitsmedizinischer Dienst der Tiefbau-  
Berufsgenossenschaft, Höchberg

Herrn Dr. B. Schappler-Scheele  
Niedersächsisches Landesamt für Öko-  
logie, Hannover

Frau Dr. Ursula Schies  
Tiefbau-Berufsgenossenschaft –  
Technischer Aufsichtsdienst –, München

Herrn Dr. D. Tommerdich  
Zentralverband des Deutschen Bau-  
gewerbes, Bonn

Frau Barbara Zeschmar-Lahl  
BZL GmbH, Oytten

Frau Dorit Zimmermann  
KAN-Geschäftsstelle, Sankt Augustin

Die folgende Zusammenfassung der Studie und die Empfehlungen wurden von der KAN am 28. Juni 1996 verabschiedet.

## **Zusammenfassung der Studie**

### **1 Einleitung**

Im Rahmen der Studie wird zur Vorbereitung eines standardisierten Meßverfahrens zur Erfassung luftgetragener Aktinomyceten (gram-positive, überwiegend aerobe, mycelbildende Bakterien) in der Arbeitsplatzatmosphäre das hierzu vorhandene Wissen zusammengestellt und ein erster Ansatz für eine mögliche Normung erarbeitet.

Bedarf an einem solchen Meßverfahren besteht, da luftgetragene Aktinomyceten – insbesondere thermophile, thermotolerante sowie mesophile Arten – ein Risiko für den Arbeitnehmer insbesondere durch die Auslösung einer allergischen Lungenerkrankung, der exogen-allergischen Alveolitis (EAA), darstellen. Die für den Arbeitnehmer gesundheitlich relevanten Aktinomyceten finden sich vor allem in Kompostier-, Wertstoffsortier- und mechanisch-biologischen Restabfallbehandlungsanlagen, in geschlossenen Stallungen, Silos, Getreidemöhlen sowie Klimaanlageanlagen und können bei der Bodensanierung und der Pilzzucht in höheren Konzentrationen in der Atemluft auftreten.

## **2 Entwicklung einer Meßstrategie für die Bestimmung von Aktinomyceten**

### **2.1 Probleme bei der Entwicklung einer standardisierten Meßstrategie**

Ein wesentliches Problem bei der Entwicklung eines standardisierten Meßverfahrens besteht darin, daß alle gängigen Verfahren zur Quantifizierung der aerogenen Keimkonzentration lebens- und vermehrungsfähiger Mikroorganismen auf der Kultivierung der gesammelten Keime beruhen. Auf lange Sicht muß das Probenahmeverfahren aber auch die Möglichkeit bieten, den Gehalt an nicht-kultivierbaren abgestorbenen Zellen oder Zellfragmenten zu bestimmen, da auch diese eine allergische Reaktion hervorrufen können.

### **2.2 Anforderungen an ein Meßverfahren**

Das Meßverfahren sollte folgenden Anforderungen genügen:

- einfache Handhabung (hohe Mobilität der Apparatur, einfaches Wechseln der Medien, einfache Reinigung bzw. Desinfektion, Unempfindlichkeit gegen Außeneinflüsse);
- geringer personeller, zeitlicher und finanzieller Aufwand;
- hohe Leistungsfähigkeit (gute Reproduzierbarkeit, großer Meßbereich, Unterscheidung verschiedener Parameter und Partikelgrößen, Erfassung auch abgestorbener Zellen oder Zellfragmente);

# Zu diesem Bericht

- Ermittlung repräsentativer Meßergebnisse für die Exposition der Beschäftigten (durchschnittliche und maximale [worst case] Belastung).
- Nachweisgrenze, Empfindlichkeit und Präzision des Meßverfahrens sind entsprechend einem (noch zu entwickelnden) vorläufigen, nationalen Orientierungswert für Aktinomyceten bzw. deren allergieauslösende Struktureinheiten in der Luft am Arbeitsplatz auszuwählen. Dabei stellt dieser Orientierungswert den arbeitshygienischen Standard dar, der durch technische Maßnahmen erreicht und möglichst unterschritten werden muß.
- Es sollten mehrere Parallelmessungen durchgeführt werden. Die Zahl der Einzelmessungen hängt von der Probenahmedauer ab und sollte mindestens drei betragen.
- Zur Bestimmung der Hintergrundbelastung sollte eine Kontrollmessung im Außenbereich auf der zum Wind hin gerichteten Seite erfolgen.

## 2.3 Vorschlag für ein Meßverfahren

Es wird das zur Messung von Stäuben bereits praxiserprobte Filtrationsverfahren für die Probenahme von Aktinomyceten aus der Arbeitsplatzatmosphäre empfohlen.

Dieses Verfahren bietet neben der Analyse der lebenden Zellen den Vorteil, daß prinzipiell auch der Gehalt der Probe an nicht mehr lebensfähigen Zellen und Zellbruchstücken (z. B. an spezifischen Allergenen über Immunoassays oder an relevanten Aktinomyceten durch spezifische DNA<sup>1</sup>-Sonden oder PCR<sup>2</sup>-Verfahren) bestimmt werden kann. Allerdings besteht hier weiterer Forschungsbedarf.

## 2.4 Strategie der Probenahme

Der Arbeitsplatz sollte zuerst hinsichtlich der möglicherweise vorkommenden Mikroorganismen sowie des zeitlichen Verlaufs der Exposition der Arbeitnehmer abgeschätzt werden.

Es ist wichtig, daß

- die Probenahme in Atemhöhe und in unmittelbarer Nähe der Beschäftigten erfolgt,
- die Probenahme zum Zeitpunkt der höchsten Belastungen erfolgt, jedoch auch relevante Arbeitsgänge mit erfahrungsgemäß niedrigerer Belastung beprobt werden, sofern eine durchschnittliche Belastung ermittelt werden soll,
- kurze Probenahmezeiten verwendet werden, um eine Schädigung des biologischen Materials möglichst gering zu halten (max. 60 Minuten),

---

1) DNA = Desoxyribonucleinsäure

2) PCR = Polymerase chain reaction

- die verwendeten Filtermaterialien den äußeren Bedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit) entsprechend angepaßt ausgewählt werden.

## 2.5 Transport

Spezielle Anforderungen an das Transportsystem für Aktinomycetenproben sind:

- Zeit zwischen Probenahme und Untersuchung im Labor: < 24 Stunden,
- keine Zufuhr von Feuchtigkeit,
- Transporttemperatur sollte maximal bei Raumtemperatur liegen.

## 2.6 Nachweis und Differenzierung von Aktinomyceten im Labor

Da Aktinomyceten in der Regel langsamer wachsen als andere Bakterien und Pilze, sollte bei der Aufarbeitung im Labor das Kulturmedium so gewählt werden, daß es den Aktinomyceten einen Selektionsvorteil bietet.

- Beim Kulturmedium sollte soweit möglich auf chemisch genau definierte Medienbestandteile zurückgegriffen werden (Vorschlag: Glycerin-Arginin-Agar nach El-Nakeeb und Lechevalier unter Zugabe geeigneter Antibiotika, z.B. Cycloheximid und/oder Nystatin).
- Die Bebrütung sollte bei 50 °C (thermophile und thermotolerante Aktinomyceten) sowie bei 28 °C (mesophile Aktinomyceten) erfolgen.

- Beimpfte Platten sollten maximal 14 Tage bebrütet werden.

## 3 Vorschlag an die KAN

Der vorliegende Vorschlag für ein Meßverfahren sollte in einem Ringversuch evaluiert werden, bevor er an die Normung weitergereicht wird.

Die Forschung im Bereich der Meßverfahren für Aktinomyceten sollte gefördert werden, um

- die Einflüsse von Probenahmestrategie, Anzahl der Proben, Probentransport und Probenaufbereitung auf die erhaltenen Meßwerte sowie die eingesetzten Nährmedien hinsichtlich der Qualität der erhaltenen Meßwerte genau zu evaluieren,
- den Entwurf des Meßverfahrens für luftgetragene Aktinomyceten auf Grundlage der genannten Aspekte weiterzuentwickeln.

Über das Meßverfahren hinaus besteht zu folgenden Punkten Forschungsbedarf:

- Vergleich der derzeit gängigen Verfahren zur Ermittlung lebensfähiger Keime in der Arbeitsplatzatmosphäre mit alternativen Verfahren, die die gesamte Belastung an lebenden und toten Keimen sowie deren Bruchstücke erfassen,

# Zu diesem Bericht

- Weiterentwicklung der Meßstrategie, Förderung epidemiologischer Studien zur Belastung der Arbeitnehmer durch Aktinomyceten sowie die Schaffung der Grundlagen zur Festlegung eines nationalen Orientierungswertes für Aktinomyceten.

## **Empfehlungen der KAN**

### **Gesamteinschätzung**

Die KAN schließt sich den Ergebnissen der Studie an und beschließt, sie als KAN-Bericht zu veröffentlichen.

Der Bericht gibt einen guten Überblick über den zum Zeitpunkt der Studie vorliegenden Stand des Wissens bzgl. der Messung von luftgetragenen Aktinomyceten. Alle für den Bereich relevanten Meßverfahren sind miteinander verglichen und daraus ein erster Entwurf (siehe Anhang) für ein mögliches zu standardisierendes Meßverfahren entwickelt worden.

### **Handlungsbedarf für die KAN und ihre Geschäftsstelle**

Der in der Studie entwickelte Vorschlag für ein Meßverfahren bedarf der Evaluierung und Weiterentwicklung. Besonderen Forschungsbedarf sieht die KAN zu folgenden Punkten:

- Beurteilung des Einflusses der Untersuchung in verschiedenen Laboratorien,
- Einfluß von Probenahmeverfahren, Probenanzahl, -transport, -aufbereitung und der eingesetzten Nährmedien auf die Qualität der Meßergebnisse,
- Vergleichbarkeit der derzeit gängigen Verfahren zur Ermittlung lebensfähiger Keime in der Arbeitsplatzatmosphäre mit alternativen Verfahren, die die gesamte Belastung an lebenden und toten Keimen sowie deren Bruchstücke erfassen,
- Weiterentwicklung dieser Verfahren zur Erfassung von abgestorbenen Zellen und Zellbruchstücken,
- Entwicklung eines nationalen Orientierungswertes.

Die Forschungsförderung (z. B. bei der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin [BAuA] oder beim Berufsgenossenschaftlichen Institut für Arbeitssicherheit [BIA]) soll hierzu angestoßen werden.

Parallel dazu soll das vorgeschlagene Meßverfahren vor der Weiterleitung an die Normungsebene in der Praxis erprobt und eine erste Überarbeitung des Vorschlags erfolgen. Die Mitglieder der Projektbegleitenden Arbeitsgruppe haben sich bereit erklärt, im Rahmen ihrer Möglichkeiten an einem hierzu notwendigen, vom Projektnehmer koordinierten einmaligen Ringversuch teilzunehmen. Die KAN trägt die für die Probenahme vor Ort anfallenden Reisekosten der Arbeitsgruppenmitglieder.

Die KAN wird das anschließend überarbeitete Meßverfahren als Normungsvorschlag beim DIN einreichen.

Die Ergebnisse der Studie, die Empfehlungen der KAN und das Meßverfahren sind an den Ausschuß für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) weiterzuleiten. Dieser soll gebeten werden, die Meßstrategie an schon vorhandene, beim ABAS entwickelte Meßstrategien zur Bestimmung von biologischen Arbeitsstoffen anzupassen.

### **Handlungsbedarf für das DIN**

Das DIN soll über die Ergebnisse der Studie und die Empfehlungen der KAN informiert werden, damit diese in die Arbeit der WG 5 „Probenahmeverfahren biologischer Agenzien“ des CEN/TC 137 „Gefährliche Stoffe am Arbeitsplatz“ einfließen können. Das DIN wird gebeten, für die Meßstrategie die Ergebnisse des ABAS und für den Bereich des Meßverfahrens den Normungsvorschlag der KAN aufzugreifen.

# This Report

The Commission for Occupational Health, Safety and Standardization (KAN) was founded in 1994 to assert German interests in OH & S matters, especially with regard to European standardization. KAN is composed of representatives of the social partners, the federal state and the Laender, the Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG, Federation of the statutory accident insurance institutions of the industrial sector) and the German Standards Institute (DIN). One of KAN's tasks is to focus the public interests in the field of occupational health and safety and to exert influence on current and future standardization projects by delivering opinions on specific subjects.

KAN procures studies and expert opinions in order to analyse occupational health and safety aspects in standardization and to reveal deficiencies or erroneous developments in standardization work.

This study was based on the following task in hand:

*While it is currently considered possible to develop uniform measuring methods for numerous biological agents relatively straightforwardly on the basis of previous knowledge (also as sum and guide parameters in some cases), the development of a method for actinomycetes presents considerable difficulties.*

*Actinomycetes are Gram-positive bacteria which grow mycelially (so-called "ray-fungi") and are to be found in all areas of the environment, especially in the ground. Several types of different species have pathogenic properties (e.g. actinomycetes, nocardia) and can cause chronic infection syndromes. Moreover, thermophile actinomycetes (e.g. Thermoactinomyces vulgaris, Saccharopolyspora rectivirgula) can bring about extrinsic allergic alveolitis (EAA) in people. EAA is caused by inhaling large quantities of conidium spores dispensed in the air. High conidia concentration in the air we breathe is produced during certain work routines and in some of our technical environments. Examples include agricultural facilities (farmer's lung), composting plants, mushroom cultivation (mushroom worker's disease) and also rooms with technical air humidifiers (air-conditioner disease).*

*There are as yet no standardized measuring methods available for determining the actinomycete concentration in the air in work areas. Actinomycetes represent a special medical problem for people because of their allergenic pathogenic properties. Therefore a standardized method for measuring actinomycetes is of considerable interest if the uniform assessment of different workplaces is to be guaranteed in the future. However, since their presence is difficult to prove, actinomycetes represent a special problem for measuring technology. In addition to their wide systematic*

*diversity, actinomycetes in general grow considerably more slowly on culture media than other bacteria and fungi present and also form smaller colonies. Identification is complicated because as well as taking morphological criteria into account, various physiological tests, e. g. tests in biopolymer degradation, have to be carried out.*

*A measuring method for actinomycetes must meet the specific demands of occupational health and safety. Since the air spores of actinomycetes are relatively resistant to drying compared with vegetative microorganisms, a sampling procedure based on the filtration principle taking account of EN 481 would provide a solution.*

*In order to describe the prospects and possibilities for standardization, this study is aimed at collecting existing knowledge on measuring actinomycetes from various sources of literature, describing possible deficits and thus at providing initial ideas for task distribution in the run-up to the necessary standardization in a WG 5 "Sampling procedures for biological agents" of CEN/TC 137 which BTS 4 considers desirable.*

KAN thanks both the authors for carrying out the study and presenting the report and the following experts for their critical assistance and support throughout the evaluation of the study:

Dr. Arnold-Sundermann  
Verwaltungs-Berufsgenossenschaft, Mainz

Dr. Dieter Brauer  
Hoechst AG, Frankfurt a.M.

Cornelia Eckrich  
Institut WAR, Technische Hochschule Darmstadt

Angela Janowitz  
KAN-Geschäftsstelle, Sankt Augustin

Dr. Rüdiger Pipke  
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Dortmund

Dr. Rumler  
Arbeitsmedizinischer Dienst der Tiefbau-Berufsgenossenschaft, Höchberg

Dr. B. Schappler-Scheele  
Niedersächsisches Landesamt für Ökologie, Hannover

Dr. Ursula Schies  
Tiefbau-Berufsgenossenschaft –  
Technischer Aufsichtsdienst–, München

Dr. D. Tommerdich  
Zentralverband des Deutschen  
Baugewerbes, Bonn

Barbara Zeschmar-Lahl  
BZL GmbH, Oyten

Dorit Zimmermann  
KAN-Geschäftsstelle, Sankt Augustin

# This Report

KAN adopted the following summary of the study and recommendations on June 28, 1996.

## **Summary of KAN Study “Microorganisms in the workplace atmosphere – Actinomycetes –”**

### **1 Introduction**

Within the framework of the study, existing information has been compiled and an initial approach for possible standardization drawn up in preparation for a standardized measuring method for the evaluation of airborne actinomycetes (Gram-positive, mainly aerobic, mycel-forming bacteria) in the workplace atmosphere.

This kind of measuring procedure is needed since airborne actinomycetes – particularly thermophilic, thermotolerant and mesophilic types – represent a risk for workers, especially as they can cause an allergic lung disease known as extrinsic allergic alveolitis (EAA). Actinomycetes which can be damaging to workers’ health are found above all in composting, recycling and mechanical/biological residual waste treatment plants, in closed stables, silos, grain mills and air conditioning systems. High actinomycete concentration in the air can also occur during soil purification procedures and mushroom cultivation.

### **2 Development of a measuring strategy for determining actinomycetes**

#### **2.1 Problems involved with developing a standardized measuring strategy**

One of the main problems involved with developing a standardized measuring process is that all conventional processes used to quantify the airborne concentration of living and reproducing microorganisms are based on cultivating the germs collected. In the long term, however, the sampling procedures must also make it possible to determine the proportion of dead cells or cell fragments which cannot be cultivated, since these can also cause an allergic reaction.

#### **2.2 Measuring procedure requirements**

The measuring process must satisfy the following requirements:

- Simple to use (highly mobile apparatus, easily changeable media, simple cleaning and disinfection, insensitivity towards outside influences).
- Minimum staff, time and financial requirements.
- High efficiency (good reproducibility, large measuring range, discrimination between different parameters and particle sizes, dead cells and cell fragments also recorded).

- Establishing representative measurement results for worker exposure (average and maximum [worst case] level).
- Cut-off limit, sensitivity and precision of the measuring procedure must be selected in accordance with a temporary, national reference value (still to be developed) for actinomycetes and their allergy-causing structural units in the workplace atmosphere. This reference value represents the standard for occupational hygiene which must be met and, if possible, bettered with the help of technical measures.
- Several parallel measurements should be carried out. The number of individual measurements depends on the sampling period, but there should be at least three.
- In order to determine background exposure, a check measurement should be taken outdoors on the side located upwind.

### 2.3 Proposal for a measuring procedure

The filtration process already tried and tested for measuring dust is recommended for sampling actinomycetes in the workplace atmosphere. This process has the advantage that in principle, the proportion of

dead cells and cell fragments contained in the sample can also be determined (e.g. of specific allergens by immunoassays or of relevant actinomycetes using specific DNA<sup>1)</sup> probes or PCR<sup>2)</sup> processes) in addition to living cells. Further research in this field is, however, necessary.

### 2.4 Sampling strategy

First of all, the workplace should be assessed with regard to the microorganisms which could possibly occur and the time for which workers are exposed to them.

It is important that

- samples are taken at the level at which air is breathed in and in the worker's direct proximity,
- samples are taken when concentration is at its highest. Relevant operations which are known to subject workers to a lower level of concentration should, however, also be tested if an average level is to be established,
- short sampling times are used in order to minimize damage to the biological material (max. 60 minutes),
- filter materials used are selected according to external conditions (temperature, humidity).

---

1) DNA = deoxyribonucleic acid

2) PCR = polymerase chain reaction

# This Report

## 2.5 Transport

Special requirements concerning the transport system for actinomycete samples are as follows:

- Time between sampling and laboratory examination: < 24 hours.
- The sample has to be protected from moisture.
- Transport temperature should be no higher than room temperature.

## 2.6 Detection and differentiation of actinomycetes in the laboratory

Since actinomycetes generally grow more slowly than other bacteria and fungi, it is important to choose for the treatment in the laboratory a culture medium that gives actinomycetes a selective advantage.

- As far as the culture medium is concerned, media components which are precisely defined in chemical terms should be used as far as possible (proposal: glycerine-arginine-agar according to El-Nakeeb and Lechevalier, with the addition of suitable antibiotics, e. g. cycloheximide and/or nystatine).
- Incubation should take place at 50 °C (thermophilic and thermotolerant actinomycetes) or at 28 °C (mesophilic actinomycetes).
- Inoculated plates should not be incubated for longer than 14 days.

## 3 Proposal to KAN

This proposal for a measuring procedure should be evaluated in an inter-laboratory test before being introduced into standardization.

Research in the field of measuring procedures for actinomycetes should be supported in order to

- evaluate precisely the effects of sampling strategy, number of samples, sample transport, sample treatment and the culture media used on the quality of measuring results,
- develop the draft of the measuring procedure for airborne actinomycetes on the basis of the aspects just mentioned above.

In addition to the measuring procedure itself, there is need for research in the following areas:

- Comparing conventional procedures for establishing living germs in the workplace atmosphere with alternative procedures which record overall exposure to living and dead germs and their fragments.
- Developing the measuring strategy, supporting epidemiological studies on worker exposure to actinomycetes and creating the basis for establishing a national reference value for actinomycetes.

## **KAN's recommendations**

### **Overall evaluation**

KAN endorses the results of the study and has decided to publish them as a KAN report.

The report provides a good overview of the information available at the time of the study concerning the measurement of airborne actinomycetes. All measuring procedures relevant to this field have been compared and an initial draft (see annex; also in English) developed for a possible measuring procedure suitable for standardization.

### **Need for KAN and its Secretariat to take action**

The proposal for a measuring procedure developed in the study must be evaluated and developed further. KAN sees a particular need for research in the following areas:

- Assessing the effect of examinations carried out in different laboratories.
- Effect of sampling procedures, number of samples, sample transport, sample treatment and the culture media used on the quality of measuring results.
- Comparability of conventional procedures used to establish living germs in the workplace atmosphere with alterna-

tive procedures which record overall exposure to living and dead germs and their fragments.

- Developing these procedures with the aim of recording dead cells and cell fragments.
- Developing a national reference value.

In addition, research projects (e.g. at the Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin [BAuA] or at the Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit [BIA]) should be encouraged.

Parallel to this, the proposed measuring procedures should be tested in practice and the proposal revised for the first time before being passed on to the standardization stage. The members of the working group accompanying the project have agreed, within their means, to take part in a necessary one-off inter-laboratory test coordinated by the contractor of the KAN project. KAN is to bear the travel expenses of working group members incurred during on-site sampling.

KAN will then submit the subsequently revised measuring procedure to DIN as a proposal for a standard.

The results of the study, KAN's recommendations and the measuring procedure should be passed on to the „Ausschuß für Biologische Arbeitsstoffe“<sup>1)</sup> (ABAS). The ABAS

---

1) Committee for Biological Work Substances

# This Report

should be requested to adapt the measuring strategy in line with existing measuring strategies which it has developed for determining other biological agents.

## **Need for DIN to take action**

DIN should be informed of the results of the study and KAN's recommendations so that they can be incorporated into the work of WG 5 "Procedures for sampling biological agents" of CEN/TC 137 "Assessment of workplace exposure". DIN is requested to adopt the ABAS' results for the measuring strategy and KAN's proposal for a standard for the measuring procedure.

# A ce propos

La Commission pour la sécurité et la santé au travail et la normalisation (KAN) a été fondée en 1994 pour représenter les intérêts allemands en matière de sécurité et de santé au travail surtout dans la normalisation européenne. Elle est composée des représentants des partenaires sociaux, de l'état fédéral et des Länder, du Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG, Fédération des organismes d'assurance accident de l'industrie) et de l'Institut allemand de normalisation (DIN). La KAN a pour mission de réunir les intérêts publics quant à la sécurité et la santé au travail et d'influer sur les projets de normalisation en cours d'élaboration et de planification en soumettant des avis.

La KAN commissionne des études et expertises pour l'analyse des questions qui touchent à la sécurité et la santé au travail dans la normalisation et pour révéler des déficits ou développements erronés dans le travail de normalisation.

La présente étude a été fondée sur la mission suivante:

*Tandis que l'élaboration de procédures unificables de mesure pour de nombreux agents biologiques (parfois comme paramètre principal ou comme ensemble de paramètres), sur la base de connaissances préalables, est considérée à l'heure actuelle comme faisable et justifiable, la conception d'une procédure pour les actinomycètes pose de gros problèmes.*

*Les actinomycètes sont des bactéries Gram positif qui ont une croissance de type mycélien et que l'on trouve, ubiquitaire, dans l'environnement, dans le sol en particulier. Quelques espèces de la famille possèdent des caractéristiques pathogènes (Actinomyces et Nocardia, par exemple) et peuvent provoquer des syndromes de maladies chroniques. Par ailleurs, les actinomycètes thermophiles (Thermoactinomyces vulgaris, Saccharopolyspora rectivirgula, par exemple) peuvent déclencher chez l'homme une alvéolite allergique extrinsèque. Cette allergie est la conséquence de l'inhalation de grandes quantités de spores conidies réparties dans l'air. On trouve une concentration élevée de conidies dans l'air respiré en particulier dans certaines activités professionnelles et dans l'environnement technique de l'individu. Les exploitations agricoles (poumon du fermier), les installations de compostage industriel et la culture de champignons (poumon des champignonnistes) en sont des exemples, ainsi que les salles équipées d'humidificateur d'air (maladie des climatiseurs).*

*On ne dispose actuellement d'aucune méthode normalisée qui permette de déterminer la concentration d'actinomycètes dans l'air sur les lieux de travail. Etant donné que les actinomycètes jouent un rôle essentiel sur le plan médical en raison de leurs propriétés pathogènes, il serait très intéressant de disposer d'une méthode de mesure normalisée afin de pouvoir, à l'avenir, éva-*

# A ce propos

luer les lieux de travail en fonction de critères identiques. Les actinomycètes constituent une difficulté particulière d'un point de vue technique de mesure car il est difficile d'apporter la preuve de leur présence. Outre le fait qu'elles sont par principe très diverses, les actinomycètes se développent beaucoup moins rapidement en bouillon de culture que les autres bactéries également présentes; elles constituent, par ailleurs, des groupements plus réduits. Cela rend leur identification compliquée étant donné qu'il faut recourir aux critères morphologiques et de surcroît effectuer également divers tests physiologiques, un catabolisme de différents biopolymères par exemple.

La procédure de mesure à développer doit satisfaire aux critères requis en matière de sécurité et santé au travail. Étant donné que les spores des actinomycètes dans l'air sont relativement résistantes à la dessiccation par comparaison aux formes végétatives, une méthode d'échantillonnage reposant sur le principe de filtration conformément à l'EN 481 conviendrait.

Par conséquent, l'objectif de cette étude consiste à rassembler ce qui est publié sur les connaissances concernant la mesure d'actinomycètes, d'identifier le cas échéant les manques en la matière et de fournir ainsi le prélude à la répartition des travaux à réaliser au sein d'un WG 5 „Méthode d'échantillonnage d'agents biologiques“

considéré comme souhaitable par le BTS 4 à la veille de la normalisation jugée nécessaire, cela afin d'en décrire les possibilités et les perspectives.

Les remerciements de la KAN vont aux auteurs de l'étude pour son travail et la présentation du rapport ainsi qu'aux experts suivants pour leurs appréciations critiques et leur apport aux conclusions de l'étude:

Dr. Arnold-Sundermann  
Verwaltungs-Berufsgenossenschaft, Mainz

Dr. Dieter Brauer  
Hoechst AG, Frankfurt a.M.

Mme. Cornelia Eckrich  
Institut WAR, Technische Hochschule Darmstadt

Mme. Angela Janowitz  
KAN-Geschäftsstelle, Sankt Augustin

Dr. Rüdiger Pipke  
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Dortmund

Dr. Rumler  
Arbeitsmedizinischer Dienst der Tiefbau-Berufsgenossenschaft, Höchberg

Dr. B. Schappler-Scheele  
Niedersächsisches Landesamt für Ökologie, Hannover

Dr. Ursula Schies  
Tiefbau-Berufsgenossenschaft –  
Technischer Aufsichtsdienst–, München

Dr. D. Tommerdich  
Zentralverband des Deutschen Bau-  
gewerbes, Bonn

Mme. Barbara Zeschmar-Lahl  
BZL GmbH, Oytten

Mme. Dorit Zimmermann  
KAN-Geschäftsstelle, Sankt Augustin

Le 28 juin 1996, la KAN a adopté le  
résumé et les recommandations suivants.

## **Résumé de l'étude de la KAN «Les micro-organismes dans l'atmosphère au poste de travail des actinomycètes»**

### **1 Introduction**

Cette étude a pour objet d'élaborer une procédure de mesure standardisée permettant de détecter les actinomycètes (bactéries à Gram +, pour la plupart aérobies, provoquant la formation de mycélium) véhiculés par l'air dans l'atmosphère du poste de travail. A cet effet, les auteurs ont compilé les connaissances disponibles sur le sujet et élaboré une première approche pour une normalisation possible.

Une telle procédure de mesure s'avère nécessaire, car les actinomycètes véhiculés par l'air, et en particulier ceux de type thermophile, thermotolérant et mésophile, constituent un risque pour la santé des travailleurs. Ces bactéries déclenchent en particulier une maladie pulmonaire de type allergique, l'EAA (alvéolite allergique extrinsèque). Les actinomycètes, qui ont une incidence sur la santé des travailleurs, se trouvent surtout dans les installations de compostage, de tri de déchets valorisables, de traitement mécanique et biologique de déchets résiduaires, dans les étables fermées, les silos, les moulins à céréales, ainsi que dans les systèmes de climatisation. Ils peuvent également se présenter en concentrations élevées dans le contexte de la dépollution des sols et de la culture de champignons.

### **2 Elaboration d'une stratégie de mesure pour la détermination d'actinomycètes**

#### **2.1 Problèmes rencontrés lors de l'élaboration d'une stratégie de mesure standardisée**

L'un des principaux problèmes rencontrés lors de l'élaboration d'une procédure de mesure standardisée réside dans le fait que toutes les procédures classiques utilisées pour quantifier la concentration en germes véhiculés par l'air dans les micro-organismes viables et capables de se

# A ce propos

reproduire se basent sur la culture des germes recueillis. Or, le procédé de prélèvement d'échantillons doit, à long terme, permettre également de déterminer la quantité de cellules, ou fragments de cellules, mortes et non cultivables, qui sont en effet également susceptibles de provoquer une réaction allergique.

## 2.2 Conditions auxquelles doit satisfaire une procédure de mesure

La procédure de mesure doit satisfaire aux exigences suivantes:

- Etre simple d'exécution (grande mobilité des appareils, facilité de changement des milieux, simplicité de nettoyage et/ou de désinfection, insensibilité aux facteurs d'influence externes).
- Ne pas requérir de moyens importants (personnel, temps, investissements).
- Etre performante (bonne reproductibilité, grande fourchette de mesure, différenciation de divers paramètres et de taille de particule, détection des cellules ou fragments de cellules morts).
- Permettre d'obtenir des mesures représentatives pour l'exposition des travailleurs, en termes de charge moyenne et maximale (worst case).
- La limite de décèlement, la sensibilité et la précision de la procédure de mesure doivent correspondre à une valeur de

référence provisoire (qu'il restera à définir), applicable au niveau national, relative aux actinomycètes et à leurs unités structurales allergènes présentes dans l'atmosphère du poste de travail. En termes d'hygiène industrielle, cette valeur de référence constituera le standard que des mesures techniques devront permettre d'atteindre, mais au-dessous duquel il sera préférable de rester.

- Il conviendra d'effectuer plusieurs mesures parallèles. Le nombre de mesures, qui devra être au minimum de trois, dépendra de la durée du prélèvement des échantillons.
- Pour déterminer la contrainte d'arrière-plan, une mesure de référence devra être effectuée à l'extérieur du bâtiment, du côté du vent.

## 2.3 Procédure de mesure préconisée

Pour mesurer les poussières, il est recommandé d'utiliser le procédé par filtration, largement éprouvée dans la pratique, pour prélever des échantillons d'actinomycètes dans l'atmosphère du poste de travail. Ce procédé permet non seulement d'analyser les cellules vivantes, mais présente en outre l'avantage de déterminer également, dans les échantillons prélevés, la quantité de cellules ou fragments de cellules qui ne sont plus viables (p.ex. d'allergènes spécifiques, par immunoassays, ou d'actinomy-

cètes importants, par sondes ADN<sup>1)</sup> ou procédé PCR<sup>2)</sup>. Il y a toutefois lieu de poursuivre la recherche dans ce domaine.

## 2.4 La stratégie de prélèvement des échantillons

Il convient, en un premier temps, d'évaluer le poste de travail pour ce qui est de la présence éventuelle de micro-organismes, ainsi que, au niveau temporel, de l'exposition du travailleur à ces micro-organismes.

Il est important :

- d'effectuer le prélèvement à proximité immédiate du travailleur et à hauteur de respiration;
- d'effectuer le prélèvement au moment où la charge atteint son niveau maximum. Si l'on souhaite calculer une charge moyenne, des prélèvements peuvent toutefois être effectués lors d'opérations significatives, pour lesquelles on sait par expérience que la charge est moins élevée;
- d'effectuer les prélèvements sur des périodes courtes (maximum 60 minutes), afin de réduire au maximum les risques d'endommagement du matériau biologique;

- de choisir des matériaux filtrants adaptés aux conditions extérieures (température, humidité).

## 2.5 Transport

Le transport des échantillons d'actinomycètes est soumis à des conditions particulières :

- la période écoulée entre le prélèvement et l'analyse en laboratoire doit être inférieure à 24 h,
- l'échantillon doit être parfaitement protégé contre l'humidité,
- la température de transport ne doit pas être supérieure à la température ambiante.

## 2.6 Détection et différenciation des actinomycètes en laboratoire

Les actinomycètes se propagent généralement plus lentement que d'autres bactéries et champignons, on veillera, pour la préparation en laboratoire, à choisir un milieu de culture apte à offrir aux actinomycètes un avantage sélectif.

- Le milieu de culture choisi devra, autant que possible, se composer d'éléments chimiques parfaitement définis (recommandation : glycérine-arginine-agar-

---

1) ADN = Acide désoxyribonucléique

2) PCR = *Polymerase chain reaction*

# A ce propos

agar selon El-Nakeeb et Lechevalier, avec adjonction d'antibiotiques adéquats, p.ex. cycloheximide et/ou nystatine);

- la température d'incubation devra être de 50 °C (actinomycètes thermophiles et thermotolérants) et de 28 °C (actinomycètes mésophiles);
- la durée d'incubation des coupelles inoculées ne devra pas dépasser 14 jours.

### 3 Recommandation à l'adresse de la KAN

Il conviendra, lors d'un essai interlaboratoire, d'évaluer la procédure de mesure préconisée, avant de la transmettre à la normalisation.

Il convient de promouvoir la recherche relative aux procédures de mesure pour actinomycètes, et ce dans les buts suivants:

- être en mesure d'évaluer avec exactitude l'influence des stratégies de prélèvement des échantillons, du nombre, du transport et de la préparation des échantillons, ainsi que des milieux de culture utilisés sur la qualité des mesures obtenues,
- en se basant sur les aspects évoqués plus haut, poursuivre le perfectionnement d'une procédure permettant de mesurer les actinomycètes véhiculés par l'air.

Outre la procédure de mesure, il y a lieu de faire progresser la recherche également dans les domaines suivants:

- Comparaison des procédures couramment utilisées pour déterminer les germes viables dans l'atmosphère d'un poste de travail, avec des procédures alternatives permettant de déterminer la charge totale causée par des germes vivants et morts, ainsi que par des fragments de ces germes,
- Perfectionnement de la stratégie de mesure, promotion des études épidémiologiques portant sur le risque que représentent les actinomycètes pour les travailleurs, et mise en place de règles fondamentales destinées à définir, en matière d'actinomycètes, une valeur de référence applicable au niveau national.

### Recommandations de la KAN

#### Evaluation globale

La KAN se rallie aux conclusions de l'étude et décide de publier celle-ci sous forme de rapport KAN.

Ce rapport donne un vaste aperçu des connaissances disponibles au moment de l'étude au sujet de la détermination des actinomycètes véhiculés par l'air. Toutes les procédures de mesure pertinentes ont été comparées entre elles, et ont servi de base

à un premier projet (cf. annexe, aussi en français) portant sur une procédure de mesure possible, qu'il resterait à standardiser.

### **Interventions souhaitées de la part de la KAN et de son secrétariat**

Il restera à évaluer et à perfectionner la procédure de mesure proposée et élaborée dans l'étude.

La KAN estime qu'il y a lieu d'approfondir particulièrement la recherche dans les domaines suivants :

- Evaluation de l'impact de l'étude dans différents laboratoires,
- Influence des procédures de prélèvement des échantillons, du nombre, du transport et de la préparation des échantillons, ainsi que des milieux de culture utilisés sur la qualité des mesures obtenues,
- Comparabilité des procédures utilisées couramment pour déterminer les germes viables dans l'atmosphère du poste de travail, avec des procédures alternatives capables de déterminer la quantité totale de germes vivants et morts, et de leurs fragments,
- Perfectionnement de ces procédures permettant de déterminer les cellules ou les fragments de cellules mortes,

- Elaboration d'une valeur de référence applicable au niveau national.

Il conviendra de solliciter à cet effet des aides à la recherche (p.ex. auprès de Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin [BAuA] ou Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit [BIA]).

Avant de passer au niveau de la normalisation, la procédure de mesure préconisée devra, parallèlement, être expérimentée dans la pratique, une première révision de la proposition devant alors être effectuée. Les membres des groupes de travail qui accompagnent le projet se sont déjà déclarés disposés à participer, dans la mesure de leurs possibilités, à un essai unique inter-laboratoire. Cet essai nécessaire serait coordonné par le mandataire de l'étude KAN. Les frais de déplacement des membres du groupe de travail occasionnés dans le contexte du prélèvement in situ seront à la charge de la KAN.

La procédure de mesure revue et corrigée sera ensuite transmise au DIN, sous forme de proposition de norme.

Les résultats de l'étude, les recommandations de la KAN et la procédure de mesure devront être transmis à l'*Ausschuß für Biologische Arbeitsstoffe*<sup>1)</sup> (ABAS). Il sera demandé à celui-ci d'adapter la stratégie de mesure aux stratégies de mesure déjà

---

1) Comité pour Substances de travail Biologiques

# A ce propos

existantes élaborées par l'ABAS, utilisées pour déterminer les substances biologiques de travail.

## **Interventions souhaitées de la part du DIN**

Il conviendra d'informer le DIN des conclusions de l'étude et des recommandations de la KAN, pour permettre de les intégrer dans le travail du WG 5 «Procédures de prélèvement d'agents biologiques» du CEN/TC 137 «Substances dangereuses au poste de travail». Il est demandé au DIN de recourir aux conclusions de l'ABAS pour ce qui est de la stratégie de mesure, et à la proposition de normalisation de la KAN pour ce qui relève de la procédure de mesure.

# 1 Einleitung

Für eine Vielzahl chemischer Verbindungen sind zahlreiche Daten über die Toxizität und Kanzerogenität verfügbar. Probenahmeverfahren und Analytik sind für diese Agenzien erprobt und standardisiert. Ebenso sind Richt- und Grenzwerte in einer Fülle von Normen und technischen Regeln festgelegt.

Derzeit wird das Gefährdungspotential biologischer Agenzien diskutiert. Für das Land Niedersachsen (1995) wurde eine erste Richtlinie für die Erfassung von biologischen Agenzien in Wertstoffsortieranlagen vorgelegt. Durch das berufsgenossenschaftliche Institut für Arbeitssicherheit (BIA, 1995) wurde ein Meßverfahren für die Erfassung von luftgetragenen Pilzsporen publiziert.

Für luftgetragene Aktinomyceten steht derzeit noch kein standardisiertes Meßverfahren zur Verfügung. Ziel dieser Studie ist es, das für die Erfassung von luftgetragenen Aktinomyceten vorhandene Wissen zusammenzustellen und erste Ansätze für eine mögliche Normung eines Verfahrens zur Erfassung von Aktinomyceten darzulegen.

Die Studie liefert eine Übersicht zur Frage der Erfassung der für die Sicherheit der Beschäftigten relevanten Aktinomyceten in der Arbeitsplatzatmosphäre. Ein Bedarf für ein Meßverfahren für luftgetragene Aktinomyceten besteht, da insbesondere thermophile, aber auch mesophile Vertreter eine allergische Lungenerkrankung, die exogen-allergische Alveolitis (EAA), auslösen können.

Die Arbeit enthält eine kurze Einführung in die Biologie der Aktinomyceten, wobei der Schwerpunkt auf den Vertretern liegt, die an typischen Arbeitsplätzen (Land- und Forstwirtschaft, Gartenbau, Entsorgungswirtschaft etc.) vorkommen können. Eine Tabelle entsprechender Arbeitsplätze ist in der Studie enthalten.

Die Problematik der Erfassung luftgetragener Keime wird in dieser Studie abgehandelt. Dabei wird sowohl die personenbezogene Probenahme wie auch die nicht-personenbezogene Probenahme diskutiert. Die derzeit gängigen Verfahren zur Erfassung luftgetragener Keime werden abgehandelt unter dem Gesichtspunkt der Erfassung von Aktinomyceten in der Arbeitsplatzatmosphäre. Derzeit etabliert sind nur Verfahren, die lebende Keime nachweisen. Da Allergien auch durch Zellfragmente oder Zellbestandteile ausgelöst werden können, sollte ein Meßverfahren aber auch die Möglichkeit bieten, tote Zellen oder Zellbruchstücke und -komponenten zu erfassen.

Derzeit existieren keine Normen oder Richtlinien für die Erfassung luftgetragener Aktinomyceten. Es ist ein Ziel dieser Studie, einen entsprechenden Norm-Entwurf vorzubereiten.

Als Ergebnis der Studie wird ein Vorschlag für ein Meßverfahren gemacht. Es wird ein Filtrationsverfahren empfohlen, da diese Technik bereits in der Staubmessung praxiserprobt ist. Sie ist weiterhin auch für die Erfassung lebender Zellen aus der Luft eta-

# 1 Einleitung

bliert und bietet prinzipiell die Möglichkeit der Erfassung toter Zellen oder von Fragmenten (z. B. über Immunoassays, PCR etc.). Hier besteht aber noch Forschungsbedarf. Die Studie enthält Angaben zur Probenahme sowie zum Transport der Proben. Der Einfluß einzelner Parameter (Temperatur, Feuchte etc.) auf die Proben

beim Transport muß jedoch noch praktisch untersucht werden. Für die Laboruntersuchung wird zunächst die Lebendkeimzahlbestimmung auf einem mineralischen Agar bei zwei Bebrütungstemperaturen vorgeschlagen. Das vorgeschlagene Meßverfahren sollte erprobt und ggf. modifiziert werden.

## 2 Welche Aktinomyceten sind relevant unter dem Gesichtspunkt des Arbeitsschutzes?

Aktinomyceten sind grampositive, überwiegend aerobe Bakterien, die im Gegensatz zu anderen Bakterien ein Mycel bilden, was in der Bezeichnung *Aktinomyceten* zum Ausdruck kommt. Es handelt sich dabei nicht um Vertreter der eukaryontischen Klasse der Pilze, sondern um prokaryontische Organismen.

Zur Gruppe der Aktinomyceten werden eine Reihe von Bakteriengattungen gezählt. Namengebend ist die Gattung *Actinomyces*, wobei es sich um anaerobe oder fakultativ aerobe Organismen handelt, die Filamente bilden. Diese zerfallen aber leicht in einzelne coryneforme Zellen. Vertreter dieser Gattung können human- oder auch tierpathogen sein.

Nach Brock und Madigan (1991) werden folgende Gruppen zu den Aktinomyceten im weiteren Sinne gerechnet (vgl. Tabelle 1 auf Seite 30).

Für die Betrachtung der Arbeitsplatzatmosphäre sind solche Gruppen besonders relevant, die aufgrund ihrer Biologie in den Biotopen gute Bedingungen vorfinden, die an Arbeitsplätzen vorkommen. Weiterhin besitzen die im Zusammenhang dieser Studie wichtigen Keime die Eigenschaft, daß sie sich gut über die Luft verbreiten und dort eine hohe Toleranz gegenüber Trockenheit und Wärme besitzen.

Dies ist vor allem bei solchen aerob wachsenden Vertretern gegeben, die starke Luftmycelien ausbilden und hier insbesondere dann, wenn Sporen gebildet werden.

Aus der Sicht des Arbeitsschutzes ist die Gruppe der wichtigen Organismen weiter einzugrenzen auf die Arten, die eine nachteilige Wirkung auf den Menschen ausüben können. Derartige Wirkungen auf den Menschen können einerseits Infektionen und andererseits allergische Reaktionen sein.

Infektionen sind charakterisiert durch das Eindringen eines Infektionserregers in den Wirt (hier: Mensch), gefolgt von einer Vermehrung und damit verbunden der Auslösung einer Reaktion im Wirtsorganismus. Die Zeitspanne zwischen dem Eindringen des Erregers und dem Auftreten der Reaktion wird als Inkubationszeit bezeichnet.

Eine Allergie ist hingegen eine überschießende Reaktion des Immunsystems, die durch bestimmte Epitope von Antigenen hervorgerufen werden kann und Krankheitssymptome zur Folge hat (Kayser et al., 1993). Allergieauslösende Antigene können in der Natur häufig vorkommen, wie z. B. Pollen oder Schimmelpilzsporen.

## 2 Welche Aktinomyceten sind relevant unter dem Gesichtspunkt des Arbeitsschutzes?

Tabelle 1: Die wichtigen Vertreter der Aktinomyceten (nach Brock und Madigan, 1991)

| Gruppe                                 | Gattungen   | Ökologie<br>Physiologie   | Anmerkungen   |
|--|---|---|---|
| Aktinomyceten im engeren Sinne         | <i>Actinomyces</i>  | anaerob oder fakultativ aerob, filamentös, Filamente zerbrechen leicht in Einzelzellen  | können pathogen für Mensch und Tier sein  |
| Mycobacterien                          | <i>Mycobacterium</i>  | obligat aerob, Saprophyten, keine Mycelbildung  | <i>M. tuberculosis</i> erregt Tuberkulose, pathogene Vertreter wachsen langsam und haben komplexe Nährstoffansprüche <sup>1</sup> |
| N <sub>2</sub> -bindende Aktinomyceten | <i>Frankia</i>  | microaerophil, symbiontisch mit Pflanzen (z. B. Erlen)  |   |
| Dermatophilus                          | <i>Dermatophilus</i>  |   | gelegentlich treten Hautinfektionen auf, keine Sporen   |
| Nocardia-artige                        | <i>Nocardia</i> ,<br><i>Rhodococcus</i>   | Mycel zerfällt leicht in Einzelzellen, gelegentliche Bildung von Luftsporen, <i>Nocardia</i> obligat aerob, kommt im Boden vor, <i>Rhodococcus</i> im Boden und im Verdauungstrakt von Insekten |   |
| Streptomyceten                         | <i>Streptomyces</i> und andere  | stark entwickeltes, stets intakt bleibendes Mycel, lange Ketten von Luftsporen  |   |
| Micromonospora-artige                  | <i>Micromonospora</i> ,<br><i>Thermoactinomyces</i> ,<br><i>Thermomonospora</i> | Mycel bleibt intakt, Sporen werden einzeln, in Paaren oder in Ketten gebildet, Saprophyten, an verrottendem Pflanzenmaterial, einige thermophil   |   |

<sup>1</sup> Schlegel, 1985

Die aus der medizinischen Sicht wichtigen Gruppen unter den Aktinomyceten sind in der folgenden Tabelle 2 (Seite 32) aufgeführt.

Kutzner et al. (1993) stellen fest, daß Infektionen mit Aktinomyceten vor allem opportunistische Erkrankungen darstellen. Allerdings können durch obligat aerobe Aktinomyceten wie den verschiedenen Mitgliedern der Gattungen *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordona* und *Tsukamurella* sowie durch fakultativ anaerobe Aktinomyceten auch bei abwehrgesunden Personen Infektionen hervorgerufen werden. Am Arbeitsplatz relevant können z.B. *Nocardia*-Arten sein, die bei der Bodensanierung zum Abbau von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen eingesetzt werden. Hier könnte eine speziellere Betrachtung und ggf. eine Anpassung der Strategie von Probenahme und Laboruntersuchung notwendig sein.

Land et al. (1991) geben als Infektionskrankheiten der Actinomycetales für immunkompetente Patienten Mycetome der Haut an. Dabei handelt es sich nach Pschyrembel (1982) um „chronisch-fiestelnde Hautprozesse“, die nach Land et al. (1991) durch das traumatische Eindringen kontaminierter Vegetation oder kontaminierten Bodens verursacht werden. Somit ist der Infektionsweg in diesem Falle nicht die Luft, so daß derartige Erkrankungen bei der Bewertung der mikrobiologischen Qualität der Arbeitsplatzatmosphäre außer Betracht bleiben können.

Für immunkompetente Patienten können nach Land et al. (1991) daneben noch Infektionen mit *Dermatophilus congolensis* auftreten. Als Infektionsweg wurde der Umgang mit erkrankten Tieren (z.B. Ausweiden nach der Jagd) beschrieben. Somit scheint der direkte Kontakt entscheidend zu sein. Für eine luftgetragene Infektion gibt es keine Hinweise. Zusätzlich kommt der Keim nicht in Europa vor (vgl. Tabelle 2), so daß er in dieser Studie für die weiteren Betrachtungen nicht relevant ist.

Das für die Betrachtung der Arbeitsplatzatmosphäre vordringlichste Risiko stellen die Allergien dar. Nach Kutzner et al. (1993) und Kempf und Kutzner (1994) sind hier thermophile Aktinomyceten die Verursacher einer allergischen Lungenerkrankung, der „exogen-allergischen Alveolitis“ (EAA). Als wichtigste Verursacher werden von diesen Autoren *Saccharopolyspora rectivirgula* und *Saccharomonospora viris* und verschiedene Spezies der Gattung *Thermoactinomyces* angesehen.

Diese Angaben decken sich auch mit den Ausführungen anderer Autoren. Die allergische Erkrankung der Atemwege wird dabei als wesentliches Krankheitsbild aerober und hier insbesondere thermophiler Aktinomyceten beschrieben.

Ökologisch ist das Vorkommen von thermophilen Aktinomyceten beschrieben für geschlossene Stallungen, Silos, Getreide-

## 2 Welche Aktinomyceten sind relevant unter dem Gesichtspunkt des Arbeitsschutzes?

Tabelle 2: Liste einiger medizinisch relevanter aerober Aktinomyceten (verändert nach Land et al., 1991)

| Keim                              | Krankheit  | Vorkommen   | Sporenbildung                | Luftmycel                                 | Anmerkungen                                 |
|-----------------------------------|--|---|------------------------------|---|---|
| <i>Nocardia asteroides</i>        | Abszesse in der Lunge, systemische Erkrankung, häufig mit ZNS-Involvierung | ubiquitär in Böden, Tiere, Menschen                 | ja (Ketten von Arthrosporen) | ja  | Wachstum bei 46 °C                          |
| <i>Nocardia brasiliensis</i>      | Mycetom  | Vorkommen vorwiegend in Amerika                     | ja (Ketten von Arthrosporen) | ja  | kein Wachstum bei 46 °C                     |
| <i>Nocardia olti-discaviarum</i>  | Mycetom  | ubiquitär in Böden, vorwiegend in südlichen Ländern | ja (Ketten von Arthrosporen) | ja  | variables Wachstum bei 46 °C                |
| <i>Actinomadura madurae</i>       | Mycetom  | ubiquitär in Böden, zerfallender Vegetation         | ja (in kurzen Ketten)        | spärlich entwickelt                       | Temperatur-optimum 30 °C                    |
| <i>Actinomadura pellitieri</i>    | Mycetom  | Boden und Pflanzen in Afrika und Indien             | ?                            | spärlich entwickelt                       | Temperatur-optimum 30 °C –37 °C             |
| <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> | Mycetom  | ubiquitär in Böden                                  | ja                           | reich entwickelt, lange Ketten von Sporen | Wachstum bei 40 °C, kein Wachstum bei 45 °C |
| <i>Streptomyces somaliensis</i>   | Mycetom  | Böden in Afrika, Arabien, USA                       | ja                           | ja  | Optimum bei 30 °C                           |

| Keim  | Krankheit                                | Vorkommen   | Sporenbildung   | Luftmycel                     | Anmerkungen                              |
|---|--|---|---|-------------------------------|--|
| <i>Streptomyces</i> ssp.  | nicht pathogen                           | ubiquitär in Umweltproben, Mist, Kompost, an Pflanzen und in Klimaanlagen | ja (in langen Ketten)   | ja (Mycel fragmentiert nicht) |  |
| <b>Micropolyspora-Gruppe:</b><br><i>Saccharomonospora viridis</i><br><i>Micropolyspora faeni</i> <sup>1</sup>                   | restriktive allergische Lungenerkrankung | ubiquitär in Luftkanälen, Mist, Kompost                                   | ja (gebildet in Paaren oder kurzen Ketten sowohl an Luft- wie auch Substratmycel) | ja                            |  |
| <b>Thermoactinomyces-Gruppe</b> <sup>2</sup> :<br><i>Thermoactinomyces vulgaris</i><br><i>T. sacchari</i><br><i>T. candidus</i> | allergische Lungenerkrankung             | ubiquitär in Luftkanälen, Mist, Kompost, Befuchterwasser, Heu, Zuckerrohr | ja (Endosporen), einzeln an Luft- oder Substratmycel                              | ja                            |  |
| <i>Dermatophilus congolensis</i>  | epidemisches Ekzem                       | bei Menschen und Tieren in Australien, Afrika, USA                        | ?   | ja (Zoosporen)                | kein Wachstum auf Sabouraud-Glucose-Agar |

<sup>1</sup> = *Saccharopolyspora rectivirgula* = *Faenia rectivirgula*

<sup>2</sup> Die Gattung *Thermoactinomyces* wird heute der Familie der Bacillariaceae zugeordnet, wurde jedoch lange den Actinomyceten zugerechnet, da sie ein mycelartiges Wachstum aufweist. Sie wird auch heute noch z. B. von Kutzner et al. (1993) mit den Actinomyceten zusammen bearbeitet. Dies soll daher auch in dieser Studie geschehen, zumal diese Gattung auch für die Auslösung von EAA wichtig ist.

## 2 Welche Aktinomyceten sind relevant unter dem Gesichtspunkt des Arbeitsschutzes?

mühlen, Bagassen und Klimaanlage (Williams et al., 1984).

Neben den oben erwähnten Arten wird als weniger häufiger Erreger der EAA noch der mesophile *Streptomyces albus* genannt (Kutzner et al., 1993; Sennekamp, 1991; Kagen et al., 1981).

In Kläranlagen wurde das Vorkommen von *Rhodococcus* ssp. und *Nocardia* ssp. beschrieben. Diese sollen die Hauptursache für starke Schaumbildung sein, wobei sie möglicherweise auch als Aerosol in die Luft übergehen können. Dabei gibt es kryophile wie auch mesophile Vertreter (Soddell und Seviour, 1995). Spezies aus beiden Gattungen können pathogen sein. Inwieweit es hier jedoch zu einem gesundheitlichen Risiko für Beschäftigte kommt, ist aus den uns vorliegenden Daten nicht ersichtlich.

Neben aeroben Organismen gehören zu den Aktinomyceten auch anaerob lebende Vertreter. Klinisch bedeutend ist hier vor allem die Gattung *Actinomyces* mit den wichtigsten Vertretern *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. gerencseriae* und *Propionibacterium propionicum*. Neben diesen beiden Arten sind noch *A. viscosus*, *A. odontolyticus*, *A. pyogenes* und *A. meyeri* als humanpathogen beschrieben (Hillier und Moncla, 1991). Das natürliche Habitat dieser Mikroorganismen sind die Schleimhäute und die Mundhöhle. Nach Kayser et al. (1993) handelt es sich bei

Aktinomycosen zu 90 % um Infektionen mit *A. israelii* und zu 7 % um Infektionen mit *A. naeslundii*. Die Ursache derartiger Infektionen sind stets die in der endogenen Flora vorkommenden Keime der Gattung *Actinomyces*. Aus diesem Grunde können die Vertreter dieser Gattung bei einer weiteren Betrachtung der Mikroorganismen in der Arbeitsplatzatmosphäre außer Betracht bleiben.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das wesentliche Risiko in einer Belastung der Arbeitsplatzatmosphäre bei solchen aeroben Aktinomyceten liegt, die EAA hervorrufen. Dies sind im wesentlichen thermophile bzw. thermotolerante Aktinomyceten. Somit focussieren die weiteren Erörterungen in dieser Arbeit auf diese zuletzt genannte Gruppe, wobei aber auch mesophile Vertreter mit betrachtet werden sollen, um z. B. *Streptomyces albus* mit zu erfassen.

### 2.1 Arbeitsplätze mit einer möglichen Belastung durch Aktinomyceten

Im nachfolgenden Abschnitt wurde der Versuch unternommen, eine Auflistung aller Arbeitsplätze zu erstellen, an denen das Auftreten von Aktinomyceten und insbesondere von thermophilen Vertretern dieser Gruppe möglich ist.

Tabelle 3: Arbeitsplätze mit dem Risiko des Auftretens luftgetragener Aktinomyceten in hohen Konzentrationen

| Bereich                      | bearbeitete Materialien   | auf tretende Aktinomyceten | Anmerkungen   |
|------------------------------|---|----------------------------|---|
| Landwirtschaft               | Heu, Stroh, Dreschstaub, Gemüse   | thermophile                |   |
|                              | Tabakblätter  | thermophile                |   |
|                              | Viehhaltung: Kuhställe, Pferdeställe, Schweineställe                                    | thermophile                |   |
|                              | Futtersilos   | thermophile                |   |
| Forstwirtschaft              | Holzstaub, verschimmelte Holzschnitzel  | thermophile                | nachgewiesen:<br><i>Thermoactinomyces vulgaris</i>                        |
| Landwirtschaft und Gartenbau | Champignonanbau auf speziellem Substrat, Umgang mit Speise- und Giftpilzen, Pilzkompost | thermophile und mesophile  | nachgewiesen:<br><i>Thermomonospora</i> ssp.,<br><i>Streptomyces</i> ssp. |
| Gartenbau                    | Umgang mit Rindenmulch  | thermophile                |   |
| Entsorgungswirtschaft        | Kompostierung   | thermophile und mesophile  |   |
|                              | Wertstoffsortieranlagen, mechanisch-biologische Restmüllbehandlung                      | thermophile und mesophile  |   |
|                              | biologische Sanierungsverfahren   | ?                          |   |
| diverse                      | Klimaanlagen  | ?                          |   |

## 2 Welche Aktinomyceten sind relevant unter dem Gesichtspunkt des Arbeitsschutzes?

Wenngleich thermophile Aktinomyceten die EAA auslösen können, sind sie keineswegs die einzige Ursache dieser Erkrankung. So wurden auch Pilze als Erreger nachgewiesen (Kutzner et al., 1993) wie auch Serumproteine von Vögeln, die mit dem Kot ausgeschieden werden (Nolte, 1980).

Unter den Aktinomyceten werden nach Lacey und Crook (1988) bzw. Kutzner et al. (1993) folgende Organismen als Ursache von EAA in der Literatur beschrieben:

- Saccharopolyspora rectivirgula*
- Saccharomonospora viridis*
- Streptomyces albus*
- Streptomyces olivaceus*
- Thermoactinomyces sacchari*

*Thermoactinomyces vulgaris*

*Streptomyces albus*

Hinsichtlich der Biologie thermophiler Aktinomyceten weisen Kutzner et al. (1993) darauf hin, daß sie durch ein Wachstumsoptimum bei Temperaturen zwischen 50 °C und 65 °C gekennzeichnet sind. Dies führt dazu, daß es zu einer Massenvermehrung vor allem bei der Selbsterhitzung organischer Materialien kommt. Dies kann vor allem bei der Lagerung von feuchtem Heu, Getreide sowie bei der Kompostierung von Bioabfall und der mechanisch-biologischen Restmüllbehandlung vorkommen. Eine Massenentwicklung von thermophilen Aktinomyceten kann auch bei einer längeren Lagerung von Müll in den Sommermonaten auftreten.

# 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

## 3.1 Einleitende Bemerkungen

Dieses Kapitel befaßt sich vorwiegend mit der Erfassung von kultivierbaren Mikroorganismen aus der Luft, da dieser Ansatz derzeit der nahezu ausschließlich praktizierte Weg zur Erfassung eines mikrobiologischen Gefährdungspotentials ist. Dies beruht auf der Tatsache, daß die klassischen Verfahren der Differenzierung von Organismen in der Mikrobiologie auf den phänotypischen Eigenschaften des lebenden Organismus beruhen.

Bei der Erfassung der kultivierbaren Mikroorganismen werden jedoch sowohl abgestorbene Zellen wie auch Zellbruchstücke nicht erfaßt; beide können aber sowohl durch gebildete Toxine wie auch durch allergenes Potential ein Risiko bedeuten. Ebenfalls nicht erfaßt werden lebende, aber nicht mehr kultivierbare Keime, sogenannte „viable but not culturable“ Mikroorganismen.

Generell ist die Beschränkung auf lebende Mikroorganismen gerade dann problematisch, wenn diese Mikroorganismen Allergien auslösen können, wie es bei den Aktinomyceten und der EAA der Fall ist. Die Fähigkeit, Allergien hervorzurufen, ist nicht mit der Lebensfähigkeit eines Organismus korreliert, da auch Teile von Organismen wie Eiweiße etc. Allergien verursachen können. Eine Erfassung auch der toten Mikroorganismen wäre von Vorteil, zumal die Relation zwischen der Zahl der le-

benden Mikroorganismen und der Gesamtzahl von lebenden und toten Zellen nicht fest ist, sondern je nach Umweltbedingungen schwanken kann (Nielsen und Breum, 1995).

In der BIA-Verfahrensbeschreibung 9420 „Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilz-/Hefenkonzentration am Arbeitsplatz“ werden zur Analyse derzeit ausschließlich Kulturverfahren beschrieben. Dennoch wird von den Verfassern die Problematik der Erfassung aller (lebenden und toten) Mikroorganismen gesehen; denn es ist ein ausdrücklicher Vorbehalt formuliert dahingehend, daß in Zukunft auch weitere analytische Verfahren eingesetzt werden können, die zur Erfassung aller Organismen geeignet sind wie die direkte Zählung durch Fluoreszenzmikroskopie.

In dieser Studie werden daher ungeachtet ihrer derzeit noch geringen Bedeutung unter 3.8.2 Verfahren diskutiert, die eine Erfassung auch der abgestorbenen Mikroorganismen erlauben.

## 3.2 Personengebundenes und nicht personengebundenes Sammeln

Bei Messungen der Arbeitsplatzatmosphäre z. B. auf Feinstaub oder Gesamtstaub werden häufig personengebundene Probenahmesysteme eingesetzt, die so beschaffen sind, daß der Arbeitnehmer sie

### 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

bei seiner Tätigkeit tragen kann, ohne stark behindert zu werden. Diese Methodik ermöglicht es, die tatsächliche Belastung des Arbeitnehmers z. B. mit Gesamtstaub zu erfassen. Für Fein- oder Gesamtstaubmessungen, die am ehesten mit der in der vorgelegten Studie behandelten Problematik vergleichbar sind, kommen Probenahmesysteme bestehend aus einer Pumpe sowie einem 37-mm-Quarzfilter zum Einsatz. Die Geräte werden mit einem Luftdurchsatz von 2 oder 3,5 l/Minute betrieben. Die Meßdauer beträgt mindestens zwei Stunden, so daß sich ein Luftvolumen von 240 bis 420 Litern erfassen läßt.

Personengebundene Verfahren werden bei der Erfassung von Luftkeimen derzeit kaum eingesetzt. Für vegetative Keime ist eine Probenahmedauer von zwei Stunden viel zu hoch. Diese lange Verweilzeit auf dem Filter kann zu einer Schädigung führen, so daß zumindest eine Erfassung der lebenden Keime mit einem hohen Fehler behaftet ist. Die Halbwertszeit z. B. für *E. coli* beträgt an Luft 70 Minuten bei 50 % Luftfeuchte (Müller, 1987). Insbesondere gramnegative Keime sind vergleichsweise empfindlich gegen Austrocknung, so daß hier bei langer Verweilzeit auf dem Filter in einem Luftstrom eine Inaktivierung zu erwarten ist. *Staphylococcus aureus* ist hingegen vergleichsweise resistent gegen Hitze und Austrocknung (Schmidt, 1994). So werden auch im Rahmen des derzeit im Land Niedersachsen durchgeführten Vor-

habens zur Untersuchung von Arbeitsplätzen und Beschäftigten bei der Abfallentsorgung personengebundene Systeme lediglich bei der Probenahme für Sporen eingesetzt. Dabei kommen Geräte zum Einsatz, die für die Sammlung von Feinstaub verwendet werden (Missel, 1996).

Die veröffentlichten Daten sind in der Regel mit ortsgebundenen Systemen ermittelt worden.

Cohen et al. (1984) berichten von einem Vergleich zwischen personengebundener Probenahme und nicht personengebundenen Systemen bei der Staubbemessung. Sie fanden mit personengebundenen Systemen im Durchschnitt dreifach höhere Meßwerte. Als Hauptursache beschreiben die Autoren den Eintrag von Staub, der sich von der Arbeitskleidung gelöst hat, auf den Filter des personengebundenen Systems. Poulsen et al. (1995) schließen aus den Angaben von Cohen et al. (1984), daß die vorhandenen Expositionsdaten für Luftkeime möglicherweise zu niedrig sind.

Das oben angesprochene Problem des Austrocknens auf der Filtermembran bei langen Probenahmezeiten könnte bei der Erfassung luftgetragener Aktinomyceten eine geringere Rolle spielen, da hier, wie auch die Daten von Kutzner et al. (1993) zeigen, überwiegend Sporen erfaßt werden. Diese wiederum sind nach allgemeiner Lehrmeinung gegen Austrocknung vergleichsweise resistent.

In der BIA-Verfahrensbeschreibung 9420 wird für Schimmelpilze und Hefen der Einsatz personengetragener Probenahme-systeme als „erstrebenswert angesehen“. Die entsprechenden Geräte müßten jedoch ausreichend erprobt und validiert werden.

Zusammenfassend müßte der Einfluß personengetragenen Sammelns sicherlich gründlich überprüft werden, um zu klären, ob es nicht durch die üblicherweise eingesetzte nicht-personengetragene Probenahme in der Nähe des Beschäftigten zu einer Unterbewertung der tatsächlichen Belastung kommt.

### **3.3 Verfahren zum Sammeln von Luftkeimen**

Luftkeime werden derzeit in der Regel nicht durch direkte Beobachtung nachgewiesen (z. B. Filtration mit anschließender Vitalfärbung und mikroskopischer Betrachtung). Alle derzeit gängigen Meßverfahren beruhen darauf, daß die gesammelten Proben einem Kultivierungsschritt mit geeigneten Nährmedien unterzogen werden, wobei auf diese Weise die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) ermittelt wird. Derartige Verfahren sind somit nur in der Lage, die Anzahl der lebensfähigen Mikroorganismen in einer Luftprobe zu ermitteln. Abgestorbene Zellen oder Zellfragmente, die möglicherweise als Allergene wirken

könnten, werden nicht erfaßt. Die Vor- und Nachteile der einzelnen Geräte sind insbesondere bei Wallhäußer (1995) und Daschner (1995) zusammengefaßt. Daneben bestehen am ISB auch eigene Erfahrungen mit unterschiedlichen Geräten zur Erfassung der Luftkeimzahl.

#### **3.3.1 Die Sedimentationsplattenmethode**

Diese Methode stellt das älteste Verfahren zur Ermittlung der Keimbelastung der Luft dar. Dabei wird eine Agarplatte mit abgenommenem Deckel für eine festgelegte Zeit an Raumluft exponiert. Dieses Verfahren liefert keine quantitativen Ergebnisse über den Keimgehalt pro Volumeneinheit Luft, wohl aber gute Vergleichswerte für die Routinekontrolle von Sterilräumen. Da keine quantitativen Aussagen möglich sind, soll dieses Verfahren hier nicht weiter diskutiert werden.

#### **3.3.2 Das Impaktionsverfahren**

Geräte nach dem Impaktionsverfahren werden von einer Reihe von Herstellern angeboten. Die Keime bzw. die mit Keimen kontaminierten Partikel werden dabei direkt oder durch Nutzen der bei einem kreisförmigen Luftstrom auftretenden Zentrifugalkräfte auf einen Agar-Nährboden aufgeschleudert. Nach diesem Prinzip arbeiten unterschiedliche Geräte wie der Schlitzsammler, der Reuter-Zentrifugal-Sammler

### 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

und der Andersen-Sammler. Die Vor- und Nachteile der einzelnen Geräte sollen hier für jedes Gerät einzeln aufgezeigt werden.

Der Andersen-Sammler wurde z. B. auch von Kutzner et al. (1993) bzw. Kempf und Kutzner (1994) eingesetzt. Der größte Vorteil der von diesen Autoren verwendeten sechsstufigen Ausführung liegt darin, daß eine Analyse der luftgetragenen Keime bzw. keimtragenden Partikel nach Größe erfolgt. Es lassen sich gut lungengängige Partikel mit einer Größe von weniger als  $4,7 \mu\text{m}$  von den größeren, nicht-lungengängigen Partikeln unterscheiden.

Für jede Einzelmessung sind jedoch bei diesem Gerät sechs Petrischalen mit Nähragar erforderlich. Die Ansaugleistung beträgt  $28,3 \text{ l}$  pro Minute, so daß bei einer maximalen Probenahmedauer von fünf Minuten, wie von den o. a. Autoren verwendet,  $141,5 \text{ l}$  Luft analysiert werden können. Eine solche Analysezeit wird auch von Wallhäußer (1995) als optimal beschrieben. Die untere Erfassungsgrenze beträgt somit 7 Keime pro Kubikmeter Luft. Diese für die Untersuchung von Sterilräumen recht hohe Erfassungsgrenze bedeutet für Arbeitsplatzuntersuchungen keinen Nachteil und dürfte auch bei Immissionsmessungen nicht kritisch zu bewerten sein.

Bei einer Probenahme an hoch belasteten Stellen hat aber der Andersen-Sammler wie alle Impaktionsgeräte den großen Nachteil, daß die Keimzahlen zu hoch liegen können, um noch einzelne Kolonien unterscheiden zu können. Generell wird in der Mikrobiologie eine Keimzahl von ca. 50 – 150 pro Petrischale (Durchmesser: 9 cm) für optimal erachtet (Süßmuth et al., 1987). Somit würden beim Andersen-Sammler, eine gleichmäßige Verteilung auf die sechs Stufen vorausgesetzt, bis zu ca. 200 – 1000 Keime optimal auszuwerten sein. Dies bedeutet bei einer Keimzahl von  $10^5$  pro Kubikmeter ca.  $100 \text{ l}$  Luft<sup>1)</sup>. Bei höheren Keimzahlen müßte das Luftvolumen entsprechend reduziert werden. Da in der Regel keineswegs genau bekannt ist, welche Keimkonzentration vorherrscht, sind u. U. auch mehrere Parallelmessungen mit unterschiedlichen Probevolumina erforderlich, was den Aufwand erheblich steigert.

Für die Untersuchung unterschiedlicher Parameter müssen jeweils neue Nährböden verwendet werden. Eine Untersuchung unterschiedlicher Parameter aus derselben Luftprobe ist leider nicht möglich. Dieser Nachteil gilt zwar für alle Impaktionsgeräte, jedoch ist der Materialaufwand beim Andersen-Sammler besonders hoch, da hier für jede Einzelmessung jeweils sechs Agarplatten eingesetzt werden

---

1) Diese Annahme ist optimistisch, da in der Praxis nicht von einer gleichmäßigen Verteilung der Keime auf die einzelnen Fraktionen des Andersen-Sammlers auszugehen ist.

müssen. Auch Abdou (1979) und Daschner (1995) sprechen von einem hohen Materialaufwand für den Andersen-Sammler. Zwar ist das Thema dieser Studie nur die Erfassung von luftgetragenen Aktinomyzeten, jedoch wäre eine parallele Erfassungsmöglichkeit anderer mikrobiologischer Parameter aus *einer* Luftprobe, wie sie bei anderen Verfahren möglich ist, auf jeden Fall sinnvoll.

Der größte Vorteil des Andersen-Sammlers scheint in seiner hohen Genauigkeit zu liegen. So beschrieben Jensen et al. (1992) – allerdings bei Arbeiten mit künstlich hergestellten Aerosolen – Fehlerbreiten von 10 % für einen sechsstufigen Andersen-Sammler, wohingegen andere Geräte weit aus ungenauer waren. Auch Buttner und Stetzenbach (1993) und Kang und Frank (1989) fanden mit dem Andersen-Sammler die besten Ergebnisse.

Der **RCS-Sammler** ist sehr einfach zu handhaben. Die Keime werden dabei auf einen spezifischen, vom Hersteller mitgelieferten Agarstreifen aufgeschleudert. Kritisch wird bemerkt, daß hier keine genaue Trennung von ein- und ausströmender Luft aufgrund des Konstruktionsprinzips möglich ist (Daschner, 1995), was möglicherweise zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Die Sammeleffizienz soll mit der Größe der Partikel (Macher und First, 1983) oder deren Masse (Kang und Frank, 1989) korreliert sein. Kanz und Kanz (1986) vertreten die Auffassung, daß

der RCS-Sammler ohnehin keine absoluten Angaben über die Luftkeimzahl ermöglichen.

Ebenso wie beim Andersen-Sammler müssen zur Bestimmung unterschiedlicher Parameter verschiedene Agarstreifen verwendet werden, die Bestimmung mehrerer Parameter aus einer Luftprobe ist nicht möglich. Dabei ist der Aufwand im Vergleich zum Andersen-Sammler deutlich geringer, da hier nur jeweils ein Agarstreifen neu eingelegt werden muß.

Wie auch beim Andersen-Sammler können die Streifen leicht überwachsen werden, wenn die Luftkeimzahlen zu hoch liegen.

Der große Vorteil des RCS-Sammlers liegt in seiner Handlichkeit und geringen Größe, die einen Einsatz an nahezu allen denkbaren Probenahmepunkten möglich machen.

Der **SAS-Luftkeimsammler** (Firma Zinsser) verwendet statt spezifischer Agarstreifen, wie beim RCS-Sammler erforderlich, RODAC-Abklatschplatten, die von zahlreichen Herstellern angeboten werden oder mit einem gewissen Aufwand auch selbst hergestellt werden können. Das Gerät ist wie der RCS-Sammler leicht und kompakt, so daß es bei Außenmessungen gut eingesetzt werden kann. Die Nachteile des Impaktionsverfahrens treffen auch für dieses Gerät zu und wurden oben bereits diskutiert.

## 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

Der **Luftkeimsammler KS 101** der Firma MLE kann ebenfalls mit RODAC-Platten und darüber hinaus mit konventionellen Petrischalen bestückt werden. Derartige Schalen werden zur Herstellung von Nährböden in jedem mikrobiologischen Labor eingesetzt. Auch dieses Gerät besitzt eine gute Handlichkeit als positives Merkmal und die oben beschriebenen, mit dem Impaktionsverfahren generell verbundenen Nachteile.

Der **Schlitzsammler** ist nach Wallhäußer (1995) vor allem durch seine Unhandlichkeit und schlechte Transportierbarkeit gekennzeichnet, so daß er für Arbeitsplatzmessungen in Kompostierwerken oder landwirtschaftlichen Betrieben wenig geeignet erscheint.

### 3.3.3 Filtrationsverfahren

Bei diesem Verfahren wird die Keime bzw. mit Keimen kontaminierte Partikel enthaltende Luft durch ein Membranfilter gesaugt, auf dem die Mikroorganismen bzw. die kontaminierten Partikel zurückgehalten und abgeschieden werden. Nach dem Filtrationsverfahren arbeiten die Luftkeimsammelgeräte der Firma Sartorius (MD 8). Es wird ein spezieller Gelatinefilter eingesetzt, wobei sich der Filter steril verpackt in einer Einweghalterung befindet, die einerseits zum Sammeln der Probe wie auch zum anschließenden Transport eingesetzt werden kann. Im Labor können die Filter direkt auf

geeignete Agarmedien aufgelegt werden, wo sie sich dann auflösen, so daß keinerlei Barriere für die Diffusion von Nährstoffen aus dem Agar besteht. Eine solche Behandlung der Filter ermöglicht den Nachweis von sehr geringen Keimkonzentrationen. Werden höhere Keimkonzentrationen erwartet, kann der Filter in steriler Kochsalzlösung oder anderen geeigneten Solventien gelöst werden. Dabei ist nach den Erfahrungen des ISB ein Mindestvolumen von 20 ml Flüssigkeit erforderlich. Die so hergestellte Suspension kann als Basis für Verdünnungsreihen dienen. Aus der Suspension können dann zahlreiche unterschiedliche Nährböden beschickt werden. Somit ist nach dem Auflösen der Filter die Untersuchung einer Luftprobe auch auf verschiedene mikrobiologische Parameter möglich. Während aber bei einem direkten Auflegen der Filter auf Nährböden noch ein lebensfähiger Keim pro Filter nachgewiesen werden kann, kommt es durch das Auflösen und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß üblicherweise 0,1 ml Bakteriensuspension zur Bestimmung der Keimzahl auf einen Agar aufgespaltet werden, zu einer Senkung der Nachweisgrenze auf 200 Keime pro Filter. Dieser Empfindlichkeitsverlust dürfte jedoch für Arbeitsplatzmessungen unerheblich sein. Selbst für Immissionsmessungen erscheint diese Nachweisgrenze durchaus ausreichend, da in „normaler“ Luft bereits Keimzahlen von mehr als 200 KBE/m<sup>3</sup> vorkommen.

Daneben kann im Falle niedriger Keimzahlen der Filter immer noch direkt auf den Nähragar gelegt werden. Es bleibt aber die Frage offen, ob bei Auflösen der Membranfilter gleiche Ergebnisse erzielt werden wie beim direkten Auflegen auf die Agaroberfläche. Werden die Filter direkt auf die Agaroberfläche aufgelegt, muß allerdings für jeden Parameter ein neuer Filter eingesetzt werden, wie auch beim Impaktionsverfahren für jeden Parameter ein neuer Nähragar eingesetzt werden muß.

Das geringste Volumen des Sartorius MD 8 liegt bei 41,67 l (Sammeldauer 1 Minute). Angesichts der Möglichkeit zur Anlage von Verdünnungsreihen dürfte dies nicht limitierend sein.

Als Nachteil der Filtrationsmethode wird diskutiert, daß die Keime bei zu hohen Probenvolumina durch Austrocknen geschädigt werden könnten. Im Jahre 1988 schrieb Wallhäußer in Bezug auf dieses Problem, daß der Keimdurchsatz bei der Nutzung der Filtrationsmethode auf 250 l/Filter zu begrenzen sei, da sonst die Gefahr der Schädigung bestünde (Wallhäußer, 1988). Diese Behauptung wird in der neuesten Auflage seines Standardwerks zur Sterilisation (Wallhäußer, 1995) aber nicht mehr wiederholt. Jensen et al. (1992) fanden für die Filtrationsmethode mit Zellosefiltern im Vergleich zu anderen Luftkeimsammlern eine schlechtere Ausbeute für vegetative Zellen von *E. coli*, wohingegen die Ausbeuten mit *Bacillus subtilis* vergleich-

bar zum als gut bewerteten sechsstufigen Andersen-Sammler lagen. Die Autoren führen dies auf das Austrocknen von *E. coli* auf der Membran zurück.

Gelatine-Membranfilter sind nach Angaben des Herstellers nur bis zu einer relativen Luftfeuchte von 85 % zu verwenden. Eine solche Luftfeuchte wird nach unseren Erfahrungen aber an manchen Arbeitsplätzen wie z. B. umhausten Kompostierwerken in Einzelfällen durchaus überschritten. Nach Angaben von Jaschhof (1992) verändert sich die Konsistenz des Filters aber auch bei 90 % Luftfeuchte nicht. Nach Angaben des Herstellers kann das Filter für kurzzeitige Messungen auch bei einer Luftfeuchte von über 90 % eingesetzt werden, solange es sich nur um kurzzeitige Messungen handelt und Gewähr dafür getragen wird, daß das Filter nicht naß wird. Da an Arbeitsplätzen hohe Keimkonzentrationen zu erwarten sind, können hier durchaus kurzzeitige Messungen (wenige Minuten) durchgeführt werden. Ebenso berichten Anwender darüber, daß die Filter sich bei Temperaturen deutlich über 30 °C in ihrer Konsistenz verändern.

Es besteht die Möglichkeit, auf wasserunlösliche Filter auszuweichen (z. B. auf Zellosebasis), die in der Mikrobiologie bei der Membranfilteranalytik wäßriger Proben ebenfalls eingesetzt werden. Diese müßten dann in einem wäßrigen Medium (z. B. physiologische Kochsalzlösung) suspendiert werden, wobei die auf dem Filter vorhan-

## 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

denen Keime durch Plattieren von Aliquoten der wäßrigen Phase quantifiziert werden. Dabei geht allerdings der besondere Vorteil der Wasserlöslichkeit der Gelatine verloren, und es besteht die Möglichkeit, daß Teile der Probe nicht vom Filter abgewaschen und somit nicht erfaßt werden.

### 3.3.4 Das Impinger-Verfahren

Bei diesem Verfahren wird die mit Keimen bzw. keimtragenden Partikeln befrachtete Luft in eine Flüssigkeit geleitet. Dabei kann es sich um einen Puffer oder aber auch um eine Nährlösung handeln. Im Prinzip handelt es sich bei einem Impinger um eine Waschflasche, wobei allerdings die Eintrittsöffnung für die Luft in die Flüssigkeit speziell und für verschiedene Typen auch unterschiedlich gestaltet ist.

Wallhäußer (1995) beschreibt den Impinger als recht aufwendig und zeitraubend. Nach seinen Angaben liefert er keine besseren Ergebnisse als die Membranfiltermethode. Hier kamen Jensen et al. (1992) jedoch zu einem anderen Ergebnis. Diese Autoren arbeiteten aber mit Aerosolen von ca. 2  $\mu\text{m}$  Durchmesser und fanden für einen Endosporenbildner vergleichbare Ergebnisse zwischen Membranfilterverfahren und Impinger.

Der von Wallhäußer (1995) kritisierte geringe Luftdurchsatz dürfte zumindest bei

Arbeitsplatzmessungen mit hohen Keimkonzentrationen keinen Nachteil darstellen.

Auch Daschner (1995) hält die Anwendung des Impingers für relativ aufwendig. Kiefer (1992) weist auf die schlechte Desinfizierbarkeit des Impingers unter Freilandbedingungen hin.

Die Handhabung eines Impingers unter Praxisbedingungen erscheint bereits aufgrund der Tatsache, daß hier eine Flüssigkeit im Impinger vorhanden ist, problematisch im Vergleich zu Filtern oder auch Agarstreifen oder -platten.

### 3.4 Auswahl eines geeigneten Probenahmeverfahrens

Generell wird in der Literatur stets darauf hingewiesen, daß nach wie vor ein Forschungsbedarf hinsichtlich des optimalen Verfahrens zur Erfassung von Luftkeimen besteht. Ein Standardverfahren für die Erfassung von Luftkeimen allgemein existiert derzeit nicht. Hinzu kommt, daß die derzeit am Markt befindlichen Verfahren höchst unterschiedliche Resultate liefern, die sowohl nach den Angaben der Literatur wie auch nach unseren eigenen Erfahrungen um bis zu 50 % und mehr voneinander abweichen können, selbst wenn eine größere Zahl von Messungen pro Meßpunkt durchgeführt wird. Alle derzeit eingesetzten Verfahren beruhen auf der Quantifizierung lebender Zellen; tote

Zellen, Zellbruchstücke und -teile werden somit nicht erfaßt. Diese könnten möglicherweise teilweise mit der Nukleinsäureanalytik oder Immunoassays erfaßt werden.

Für die Erfassung von Luftkeimen allgemein im Reinraumbereich werden derzeit unterschiedliche Verfahren empfohlen (Wallhäußer, 1995; DIN prEN 1632–4). Für Arbeitsplatzmessungen existiert derzeit eine Anweisung des Landes Niedersachsen (Niedersächsisches Landesamt für Ökologie, 1995).

Daher gilt es festzustellen:

1. Ein standardisiertes Meßverfahren für Luftkeime allgemein und speziell für Aktinomyzeten fehlt derzeit.
2. Aus der Literatur und aus eigenen praktischen Erfahrungen ergibt sich, daß mit verschiedenen Verfahren für vergleichbare Proben unterschiedliche Meßwerte ermittelt werden.
3. Es läßt sich aus der Literatur kein einheitlicher Trend entnehmen dergestalt, daß die Resultate mit einem Verfahren immer in einem bestimmten, festen Verhältnis zu einem anderen Verfahren liegen. Dies ist sicher auch darin begründet, daß unterschiedliche Verfahren gegenläufige Effekte beinhalten. So können im Impinger Keime durch die plötzliche Hydrierung geschädigt werden, wohingegen sowohl für das Membranfilterverfahren wie auch für verschiedene Impaktionsverfahren eine Schädigung

der Keime durch Austrocknen diskutiert wird. Die Auswirkungen dieser Effekte auf konkrete Meßergebnisse dürften von den erfaßten Spezies abhängig sein.

Somit ist die Vergleichbarkeit von Meßergebnissen, die an unterschiedlichen Arbeitsplätzen und mit unterschiedlichen Geräten gewonnen wurden, nicht gegeben. Auf der anderen Seite ist eine Bewertung des Gefährdungspotentials für die Arbeitsplatzatmosphäre dringend notwendig. Dies beinhaltet die Notwendigkeit, für die Bewertung aller Arbeitsplätze untereinander vergleichbare Meßwerte zu haben.

Aus unserer Sicht sollte daher eine Festlegung auf ein Meßverfahren erfolgen, das für alle Arbeitsplatzmessungen eingesetzt wird. Dies würde zur Vergleichbarkeit der Meßergebnisse führen und aufgrund der größeren Datenbreite in Zukunft auch eine sicherere Beurteilung eventueller Gefahrenpotentiale ermöglichen.

Ein solches Meßverfahren sollte folgende Kriterien erfüllen:

- hohe Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse auch mit unterschiedlichen Geräten des gleichen Typs,
- großer Meßbereich,
- hohe Mobilität (geringes Gerätegewicht, Möglichkeit zu netzunabhängigem Betrieb),

### 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

- einfaches Wechseln der Medien, mit denen die Einzelproben aufgefangen werden (insbesondere auch unter Berücksichtigung der Kontaminationsgefahr in einer stark belasteten Umgebung), oder die Verwendung steriler Einweeinheiten,
- einfache Reinigung bzw. Desinfektion oder Sterilisation zwischen den Einzelmessungen,
- Unempfindlichkeit gegen Außeneinflüsse (hohe Feuchte, extreme Temperaturen),
- geringer zeitlicher und personeller Aufwand, geringe Kosten.

Daneben sind weitere Kriterien wünschenswert wie z. B.

- Diskriminierung zwischen Partikeln unterschiedlicher Größe,
- Möglichkeit zur Untersuchung einer Luftprobe auf unterschiedliche Parameter (verschiedene Keimgruppen, Endotoxine, Staub etc.).

Die DIN prEN 1632–4 (1994) beschreibt zwei Haupttypen von Sammelverfahren für Risikozonen mit normaler (auf niedrigem Niveau liegender) Biokontamination als geeignet: Aufprallsammelgeräte (Impaktionsverfahren) und Filtersammelgeräte. Die BIA-Verfahrensbeschreibung 9420 empfiehlt die Probenahme mit einem Filtersammelgerät für die Beprobung der Arbeitsplatzatmosphäre.

Unter der Berücksichtigung aller oben gemachten Ausführungen sollte aus unserer Sicht derzeit das Filtrationsverfahren für die Probenahme von Aktinomyceten aus der Luft am Arbeitsplatz empfohlen werden. Es handelt sich hier um eine Arbeitstechnik, die bei der Messung von Stäuben verbreitet und erprobt ist und ihre Praxistauglichkeit für Arbeitsplatzmessungen bereits bewiesen hat. Im Gegensatz zum Impaktionsverfahren ist mit dieser Technik die Erfassung eines hinreichend großen Meßbereichs möglich, ohne daß zahlreiche Proben mit unterschiedlichen Luftvolumina genommen werden müssen. Die Filter lassen sich nach der Probenahme leicht und schnell in sterile Beutel verstauen, so daß die Handhabbarkeit unter Praxisbedingungen gut ist.

Der häufig genannte Nachteil beim Filtrationsverfahren, das Austrocknen der Organismen während der Probenahme, erscheint für Aktinomyceten weniger erheblich zu sein, da es sich bei den in der Luft befindlichen, vermehrungsfähigen Aktinomyceten in der Regel um Sporen handelt (Kutzner et al., 1993). Sporen stellen Dauerformen dar, die sich durch eine erhöhte Toleranz gegenüber Streß wie Trockenheit auszeichnen. In Übereinstimmung mit dieser Feststellung spricht auch die BIA-Verfahrensbeschreibung 9410 „Probenahme von Bioaerosolen am Arbeitsplatz“ davon, daß sich robustere Zellen wie Sporen von Bakterien mit dem Filtrationsverfahren sehr

gut erfassen lassen. Ebenso beschreiben Jensen et al. (1992), daß Endosporenbildner mit dem Filtrationsverfahren in vergleichbarer Größenordnung wie mit dem Impinger nachgewiesen werden konnten.

Weiterhin bietet ein Filtrationsverfahren auch die Möglichkeit, auf direktem Wege z. B. den Gehalt der Probe an spezifischen Allergenen über Immunoassays zu ermitteln oder auch durch spezifische DNA-Analysen den Gehalt einer Luftprobe auf die DNA relevanter Aktinomyzeten hin zu untersuchen und auf diesem Wege die nicht mehr lebensfähigen Keime mit zu erfassen. Dies erscheint bei Impaktionsverfahren nur schwer möglich, wohl aber beim Impinger-Verfahren.

Gegen den Einsatz des Andersen-Sammlers spricht der vergleichsweise hohe Materialaufwand bei der Probenahme sowie die Notwendigkeit, u. U. mehrere Parallelmessungen mit unterschiedlichen Luftvolumina durchführen zu müssen.

Der Impinger erscheint wegen der Tatsache, daß die einzelnen Sammelflaschen mit Flüssigkeit gefüllt sind, sowie der Bruchanfälligkeit (Glas) unter Praxisbedingungen weniger geeignet.

Zwar sind die verschiedenen Impaktionsgeräte für eine mobile Probenahme aufgrund ihrer Handlichkeit noch besser geeignet als Filtrationsgeräte wie der Sartorius MD 8, jedoch spricht gegen Impak-

tionsgeräte die Tatsache, daß die Nährböden insbesondere bei hohen Keimkonzentrationen leicht überladen werden. Bei unbekannter Mikroorganismenkonzentration müssen daher zahlreiche Proben mit unterschiedlichen Volumina genommen werden, um auswertbare Ergebnisse zu erreichen. Beim Filtrationsverfahren kann hingegen aus einer Probe ein weiter Konzentrationsbereich untersucht werden, wobei hier noch der Vorteil hinzukommt, daß parallel auch verschiedene Parameter getestet werden können.

Das hier für die Erfassung von Aktinomyzeten empfohlene Filtrationsverfahren deckt sich mit der in der BIA-Verfahrensbeschreibung 9420 gegebenen Empfehlung für die Erfassung von Schimmelpilzen, wo ebenfalls das Filtrationsverfahren empfohlen wird. In beiden Fällen sind die nachzuweisenden Agenzien Sporen, die sich über die Luft verbreiten und gegenüber vegetativen Zellen gegen Austrocknung vergleichsweise resistent sind.

Die Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren sind auf Seite 48 noch einmal tabellarisch zusammengefaßt.

Insgesamt ergibt sich aus dieser Tabelle, daß die Streßbelastung der Mikroorganismen der größte Nachteil des Membranfilterverfahrens ist. Diese Belastung ist jedoch bei sporenbildenden Mikroorganismen als nicht so schwerwiegend zu bewerten.

### 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

Tabelle 4: Tabellarischer Vergleich verschiedener Verfahren zur Luftkeimsammlung

|  | Andersen-Sammler | Impaktionssammler (z. B. SAS, RCS-Sammler, MLE KS 101) | Impinger    | Membranfilterverfahren (stationär oder personengebunden) |
|--|------------------|--|-------------|--|
| Transportierbarkeit  | weniger gut      | sehr gut   | weniger gut | gut  |
| Materialaufwand für die Probenahme                               | hoch             | gering   | gering      | gering   |
| Handhabbarkeit unter Arbeitsplatzbedingungen                     | weniger gut      | gut  | weniger gut | gut  |
| Eignung für die Erfassung hoher Keimkonzentrationen <sup>1</sup> | weniger gut      | weniger gut  | sehr gut    | sehr gut   |
| Streßbelastung für die Mikroorganismen                           | gering           | gering   | sehr gering | hoch   |
| Eignung für großen Probendurchsatz                               | weniger gut      | gut  | weniger gut | gut  |

<sup>1</sup> Keimkonzentrationen  $\geq 10^5$  KBE/m<sup>3</sup> Luft

In Tabelle 5 findet sich eine Abschätzung der Kosten und des notwendigen Zeitaufwands. Die Gerätekosten liegen mit Ausnahme des Andersen-Sammlers in der Größenordnung zwischen 3.500 und 6.000 DM, da für das Impinger-Verfahren auch eine entsprechende Zahl an Impingern angeschafft werden muß (bei zwei Meßpunkten mit jeweils dreifacher Probenahme sind das bereits Kosten von

DM 2.100). Dem bei Impinger- und Membranfiltermethode entstehenden Laboraufwand steht beim Andersen-Sammler und anderen Impaktionsgeräten der u. U. höhere Aufwand bei der Probenahme gegenüber, da bei einer nicht genau bekannten Keimkonzentration aus Sicherheitsgründen mehrfach Proben mit unterschiedlichen Luftvolumina genommen werden sollten.

Tabelle 5: Zeit- und Kostenaufwand für den Einsatz der unterschiedlichen Luftkeimsammler

|   | Andersen-Sammler    | Impaktions-sammler                   | Impinger  | Membranfilter-verfahren (stationär oder personengebunden)             |
|---|---------------------|--------------------------------------|---|---|
| Gerätepreis <sup>1</sup> (DM)                             | ca. 11.000          | 3.500 bis 6.000 DM                   | 350,- pro Impinger, ca. 2.000 DM für Vakuumpumpe                              | 5.400 DM  |
| Verbrauchsmaterial für eine Einzelprobe <sup>2</sup> (DM) | 12 DM               | 2,- (SAS, MLE)<br>4,- (RCS)          | wenige Pfennige   | ca. 10 DM (Filter)  |
| Vorbereitungszeit für eine Probenahme                     | ca. 2 bis 3 Minuten | weniger als 1 Minute                 | ca. 5 Minuten (Beschicken der Impinger im Labor, Anschließen vor der Messung) | weniger als 1 Minute  |
| angesaugtes Luftvolumen in 5 Minuten                      | 141,5 l             | 200 l (RCS)<br>500 l (MLE<br>KS 101) | 62,5 l  | 17,5 l (personengebundene Systeme) bis max. 666 l (Sartorius MD 8)    |
| Aufbereitungszeit der Probe nach der Messung <sup>3</sup> | keine               | keine                                | ca. 10 Minuten für Verdünnungsreihe und Ausplattieren                         | ca. 15 Minuten (Lösen der Filter, Verdünnungsreihe und Ausplattieren) |
| Materialkosten für die Probenaufbereitung <sup>4</sup>    | keine               | keine                                | ca. DM 17,-   | ca. DM 17,-   |
| Auswertungszeit für eine Einzelprobe                      | ca. 5 Minuten       | ca. 1 Minute                         | ca. 5 Minuten   | ca. 5 Minuten   |

<sup>1</sup> Der Impinger muß mit mindestens 508 mm Hg Unterdruck betrieben werden; daher muß eine entsprechende Vakuumpumpe zusätzlich angeschafft werden. Weiterhin müssen die Impinger unter sterilen Bedingungen mit der Impinger-Flüssigkeit (Puffer o. ä.) beschickt werden, so daß für eine Arbeitsplatzmessung eine Zahl an Impingern mitgeführt werden muß, die zumindest der Anzahl der Einzelproben entspricht.

<sup>2</sup> Der Preis einer RODAC-Abklatschplatte bzw. einer mit einem Nähragar beschickten 9-cm-Petrischale wurde mit DM 2,- veranschlagt.

<sup>3</sup> Die Kosten für Glasgefäße, Sterilisation etc. als Vorbereitung für Verdünnungsreihen werden pauschal mit DM 5,- in Rechnung gestellt.

<sup>4</sup> Hier gehen insbesondere die Kosten für die Nähragarplatten ein. Es wird davon ausgegangen, daß drei verschiedene Verdünnungsstufen einer dekadischen Verdünnungsreihe jeweils in einer Doppelbestimmung ausplattiert werden. Die Materialkosten für das Verdünnungsmedium (z.B. physiologische Kochsalz-Lösung) sind zu vernachlässigen. Somit ergeben sich pro Einzelprobe für die Nähragarplatten Kosten von DM 12,-.

# 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

## 3.5 Strategie der Probenahme

Vor Beginn der Probenahme sollten die Verhältnisse am Arbeitsplatz ermittelt werden. Dazu ist es erforderlich, Informationen über den Arbeitsablauf sowie den Aufbau des Arbeitsbereichs zu beschaffen. Aus diesen Informationen können dann die möglicherweise vorkommenden Mikroorganismen, hier Aktinomyceten, abgeleitet werden. Dabei ist vor allem darauf abzuheben, ob überwiegend mesophile oder kryophile Vertreter oder aber thermophile Spezies zu erwarten sind.

Die Arbeitsplätze sollten aus mikrobiologischer Sicht bewertet werden hinsichtlich der unterschiedlichen Expositionsorte und des jeweiligen zeitlichen Verlaufs einer möglichen Exposition (gleichförmige Verteilung der Mikroorganismen über die Zeit oder variierende Betriebszustände mit differierenden Expositionen). Treten unterschiedliche Betriebszustände auf, in denen eine jeweils verschiedene Freisetzung von Mikroorganismen zu erwarten ist, müssen die diversen Betriebszustände einzeln beprobt werden.

Da möglicherweise auch kurzzeitige Expositionsspitzen Auswirkungen auf die Beschäftigten haben, sind diese in geeigneter Weise zu erfassen. Die Probenahmedauer sollte dabei so gewählt sein, daß die kurzzeitigen Spitzen der Keimbelastung wirklich erfaßt werden können. Für die Bewertung der Expositionsspitzen ist ein Referenz-

wert für die durchschnittliche Belastung zu erheben. Dies kann geschehen durch Probenahme während Tätigkeiten, die keine Expositionsspitze der Keimbelastung erwarten lassen.

Bekannte Expositionsquellen sollten in möglichst geringem Abstand beprobt werden, um den Einfluß dieser Quellen möglichst genau ermitteln zu können.

Die BIA-Verfahrensbeschreibung 9420 macht keine weiteren Angaben über Details der Probenahme wie z. B. Höhe der Ansaugung über dem Boden etc. Die „Methodik zur lufthygienischen Untersuchung in Wertstoffsortieranlagen in Niedersachsen“ enthält zu diesem Punkt detailliertere Vorgaben. Weitere Hinweise für die Probenahme lassen sich der TRGS 402 (1986) entnehmen.

Neben einer eindeutigen Festlegung auf ein Filtrationsverfahren für die Erfassung der Keime werden in der „Methodik zur lufthygienischen Untersuchung in Wertstoffsortieranlagen in Niedersachsen“ eindeutige Angaben auch für die Meßorte gemacht. Da sich der o. a. Erlaß aber lediglich auf einen eng umgrenzten Bereich bezieht mit definierten Tätigkeiten, ist eine solche Vorgabe verhältnismäßig leicht möglich.

Die Arbeitsplätze, an denen Aktinomyceten auftreten können, sind sehr vielschichtig (vgl. Tabelle 3). Unter Berücksichtigung der TRGS 402 (1986) können folgende allgemeine Vorgaben für die Probenahme gemacht werden:

1. Die Probenahme sollte bei stationärer Probenahme in Atemhöhe der Beschäftigten erfolgen, wie auch in der „Methodik zur lufthygienischen Untersuchung in Wertstoffsortieranlagen in Niedersachsen“ vorgesehen. Dies steht auch in Übereinstimmung mit der TRGS 402, die eine Probenahme „möglichst in Atemhöhe und in unmittelbarer Nähe der Beschäftigten“ fordert. Bei einer stehenden Tätigkeit dürfte hierfür der in der „Methodik zur lufthygienischen Untersuchung in Wertstoffsortieranlagen in Niedersachsen“ angegebene Wert von 1,5 m Höhe über dem Boden sinnvoll sein. Kutzner et al. (1993) verwendeten bei ihrer Untersuchung auf Aktinomyzeten eine Höhe von 1,6 m.

Nach TRGS 402 sollten möglichst personenbezogene Probenahmegeräte eingesetzt werden, die vom Beschäftigten am Körper getragen werden. Die derzeit kommerziell verfügbaren Luftkeimsammelgeräte sind nicht personenbezogen einsetzbar, so daß eine derartige Probenahme mit diesen Geräten nicht möglich ist. Aus unserer Sicht erscheint es nach derzeitigem Stand der Technik tragbar, wenn die Probenahme durch stationäre Geräte direkt am Arbeitsplatz des Mitarbeiters in Atemhöhe erfolgt. Diese Problemstellung müßte jedoch noch einmal genauer untersucht werden mit der Zielsetzung, die Einsatzmöglichkeit nicht personengebundener Staubsammelgeräte zu prüfen.

2. Die Probenahme sollte unter Bedingungen erfolgen, bei denen die höchsten Emissionen zu erwarten sind. Dies ist in der Regel dann der Fall, wenn das zu behandelnde Material bewegt wird.

3. Die TRGS 402 fordert, daß die Nachweisgrenze sowie „Empfindlichkeit und Präzision des Meßverfahrens dem Grenzwert angepaßt sein müssen.“ Dies gilt nach TRGS 402 dann als gewährleistet, wenn Konzentrationen der zu messenden Komponente zwischen einem Zehntel, mindestens aber einem Fünftel und dem Dreifachen des Grenzwertes gemessen werden können. Für luftgetragene Aktinomyzeten existieren derzeit noch keine verbindlichen Grenzwerte. Aus der Literatur lassen sich lediglich Angaben entnehmen, die als Vergleichswerte dienen können. So gibt Lacey (1981) einen Wert von  $10^6$  bis  $10^{10}$  Sporen thermophiler Aktinomyzeten pro Kubikmeter Luft an, die eine EAA auslösen können. Miller (1992) stellt fest, daß  $10^8$  Sporen pro Kubikmeter Luft akute Symptome auslösen können. Crook (1992) stellte fest, daß Personen, die einer Exposition von  $10^3$  Sporen pro Kubikmeter in Schweineställen ausgesetzt waren, bereits allergische Symptome entwickelten. Bezüglich der Grenzwertproblematik besteht aber noch großer Forschungsbedarf (vgl. Kapitel 6).

4. Die Meßunsicherheit als integraler Fehler aus allen bei einer Messung auftretenden systematischen und zufälligen Feh-

### 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

lern soll nach TRGS 402 30 % nicht überschreiten. Daraus und aus der von Daschner (1995) noch einmal unterstrichenen Erfahrung, daß Einzelmessungen für Keimgehalte der Luft relativ ungenau sind, ergibt sich, daß mehrere Parallelmessungen durchgeführt werden sollten. Lembke et al. (1981) stellten fest, daß für eine Ungenauigkeit von weniger als 10 % 16 Einzelmessungen notwendig sind. Daschner (1995) hält es in diesem Zusammenhang für möglich, daß sich bei Reihenuntersuchungen zwischen verschiedenen Labors Toleranzen um den Faktor 10 ergeben und daher Wertunterschiede in der entsprechenden Größenordnung als irrelevant anzusehen sind. Die Zahl der Einzelmeßwerte für einen Meßpunkt und Betriebszustand sollte jeweils mindestens drei betragen, wobei bei sehr kurzen Probenahmezeiten mehr Einzelmessungen erforderlich sein können (für die Ermittlung der durchschnittlichen Exposition über eine Schichtlänge vgl. Punkt 6).

5. Eine Kontrollmessung im Außenbereich auf der zum Wind hin gerichteten Seite der Anlage (Iuvseite) sollte vorgenommen werden, um die Hintergrundbelastung in der natürlichen, ungestörten Umgebung zu ermitteln.

6. Zur Ermittlung der Exposition über eine ganze Schichtlänge gibt die TRGS 402 (1986) die Zahl der notwendigen Proben in Abhängigkeit von der Probenahmedauer vor. Um die Möglichkeit einer Schädigung des biologischen Materials gering zu halten, sollten Probenahmezeiten von maximal einer Stunde verwendet werden.<sup>1)</sup> (Vermutlich werden Aktinomycetensporen auch durch längere Probenahmezeiten nicht geschädigt, dies müßte jedoch zunächst experimentell verifiziert werden, bevor längere Probenahmezeiten z. B. in personenbezogenen Sammelsystemen eingesetzt werden.) Zur Erfassung der Belastung über eine Schichtlänge hinweg sind ggf. mehrere Einzelmessungen durchzuführen.

#### 3.6 Transport

Der Transport von bakterienhaltigem Untersuchungsgut für medizinisch-mikrobiologische Untersuchungen ist in DIN 58942 Teil 4 geregelt. Ein Transportsystem wird hier definiert als diagnostisches Hilfsmittel, das einen hygienisch sicheren Transport von bakterienhaltigem Untersuchungsgut für den Zeitraum von der Entnahme der Probe

---

1) Aus der Sicht des Arbeitsschutzes erscheinen lange Probenahmezeiten sinnvoll, um eine möglichst wirklichkeitsnahe Aussage über die tatsächliche Belastung zu erhalten. Daher sollte die Frage des Einflusses der Probenahmezeit auf die Meßergebnisse in jedem Falle untersucht werden mit dem Ziel, möglichst lange Probenahmezeiten zu ermöglichen. Eine Probenahmezeit von acht Stunden (Schichtlänge) wurde nach derzeitigem Kenntnisstand auch von der projektbegleitenden Arbeitsgruppe für problematisch gehalten.

bis zur Verarbeitung im Labor gewährleistet. Nach DIN 58942 Teil 4 bestehen die Transportbehältnisse aus flüssigen oder halbflüssigen Medien, dem Behältnis und ggf. der Entnahmevorrichtung.

Die Anforderungen an Transportmedien werden dort zusammenfassend wie folgt definiert:

- Das Transportsystem muß keimdicht sein. (Hintergrund dieser Forderung ist primär der Umgebungsschutz vor pathogenen Keimen, die in medizinischen Proben vorkommen können.)
- Das Transportsystem muß eine derartige Fallfestigkeit besitzen, daß es sich bei einem Aufprall auf eine harte Oberfläche aus 1 m Höhe nicht öffnet oder Risse aufweist, die zu einer Kontamination in der Umwelt führen können.
- Es darf keine chemischen Reaktionen zwischen dem Transportmedium und dem Material des Behältnisses geben, die den bakteriellen Status des Untersuchungsgutes verändern könnten.
- Transportsysteme für den allgemeinen Einsatz müssen bei einer Temperatur von  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem bakteriellen Inokulum von  $\leq 5 \times 10^3$  KBE für *E. coli* bzw. *Staphylococcus aureus* eine Überlebenszeit von 72 h gewährleisten. Für *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* und *Bacteroides fragilis* wird eine Überlebensdauer von 48 h und für *Streptococcus pneumoniae* eine Über-

lebenszeit von 24 h verlangt. Diese Anforderungen gelten als erfüllt, wenn Proben, die aus beimpften Systemen nach den entsprechenden minimalen Überlebenszeiten entnommen wurden, Wachstum des zu testenden Keimes zeigen.

Das Überleben eines Keimes bei einem Inokulum von  $\leq 5 \times 10^3$  KBE zu gewährleisten, bedeutet sicherlich kein hinreichendes Qualitätsmerkmal für ein Transportsystem, das bei der Quantifizierung von Aktinomyceten in der Arbeitsplatzatmosphäre eingesetzt werden soll. Das o. a. Kriterium wäre bereits erfüllt, wenn von einem Inokulum von  $5 \times 10^3$  KBE genau ein Mikroorganismus überleben würde, was effektiv einer Reduktion der Keimzahl um den Faktor  $5 \times 10^3$  während des Transports entspräche.

Für eine quantitative Erfassung ist es vielmehr anzustreben, daß sich die Zahl der lebensfähigen Organismen zwischen dem Zeitpunkt der Probenahme und der Untersuchung im Labor möglichst wenig verändert.

Die bereits angeführte „Methodik zur luft-hygienischen Untersuchung in Wertstoff-sortieranlagen in Niedersachsen“ gibt folgende Parameter vor:

- Zeit zwischen Probenahme und Untersuchung im Labor: < 24 h
- Transporttemperatur: 4 – 7 °C

### 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

Vor allem die Temperatur ist bei einem Versand per Post bzw. Kurierdienst nur schwer und validierbar einzuhalten.

Die BIA-Verfahrensbeschreibung 9420 „Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilz-/Hefenkonzentration“ stellt hier etwas unbestimmtere und allgemeinere Anforderungen: „Beim Transport sollten die beaufschlagten Filter in sicheren Behältnissen ... möglichst rasch ins Laboratorium zur Analyse gebracht werden, das bedeutet in der Regel am Tage der Probenahme. Sollte dies aus bestimmten Gründen nicht möglich sein (Versand per Post, Probenahme am Wochenende), ist die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Pilzeinheiten sowie die Verhinderung des Pilzwachstums auf den beaufschlagten Filtern durch Festlegung der Umgebungsparameter (z. B. Kühlung, Dunkelheit) zu gewährleisten.“

Alle zitierten Empfehlungen sind nicht spezifisch auf die Erfassung von Aktinomyceten ausgerichtet. Für Erfordernisse des Transports von Proben, die auf Aktinomyceten hin untersucht werden sollen, erscheint uns die Festlegung folgender Parameter wichtig:

#### Transporttemperatur

Die niedersächsische Richtlinie empfiehlt generell eine Kühlung auf 4 – 7 °C bei der Sammlung von Luftkeimen. Die DIN prEN 1632–4 macht über die Transporttemperatur keine Angaben. Das oben bereits er-

wähnte Meßverfahren des BIA für die Erfassung von luftgetragenen Pilzsporen legt sich in Bezug auf die Transporttemperatur nicht eindeutig fest. Dies gilt im übrigen auch für die Transportdauer. Hinsichtlich der Temperatur wird davon gesprochen, daß die Proben, sofern sie nicht direkt am Tage der Probenahme in das Untersuchungslabor gebracht werden können, so behandelt werden müssen, daß die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Pilzeinheiten sowie die Verhinderung des Pilzwachstums auf den beaufschlagten Filtern durch Festlegung der Umgebungsparameter (z. B. Kühlung, Dunkelheit) sicherzustellen ist.

Die DIN 58942 Teil 4 hebt auf eine Testtemperatur von  $20 \pm 2$  °C für die Bewertung von Transportmedien im Bereich der medizinischen Mikrobiologie ab. Dies entspricht der Erfahrung, daß derartige Proben auch ohne Kühlung versandt werden. Da der Inhalt von Untersuchungen im medizinisch-mikrobiologischen Sektor jedoch der qualitative Nachweis eines bestimmten Keimes und weniger die exakte Quantifizierung von Keimgehalten ist, läßt sich hier eine eventuelle Vermehrung der Keime während des Transports tolerieren. Im Gegensatz hierzu sind Arbeitsplatzmessungen des Luftkeimgehalts jedoch Messungen zur möglichst genauen Quantifizierung von Keimgehalten, so daß hier eine Vermehrung der Keime während des Transports möglichst zu unterbinden und

ein Fremdeintrag ausgeschlossen werden muß.

Bei der Erfassung thermophiler Aktinomyceten muß jedoch beachtet werden, daß es sich hierbei um Organismen handelt, deren Wachstumstemperatur zwischen 45–65 °C liegt (Greiner-Mai et al., 1986). Als vermehrungsfähige Agenzien in der Luft liegen thermophile Aktinomyceten als Sporen vor (Kutzner und Kempf, 1994) Dies ergibt sich schon allein aufgrund der Biologie der Organismen. Bei Sporen handelt es sich um Ruhestadien, die

- erst unter geeigneten Bedingungen wieder auskeimen und
- eine hohe Toleranz gegen Streß (UV-Strahlung, Austrocknung) besitzen.

Diese beiden Faktoren lassen es aus unserer Sicht ausreichend erscheinen, den Transport auch ohne Kühlung durchzuführen, wenn sich die Proben auf einem Filter befinden und somit keine nennenswerte Zufuhr von Feuchtigkeit durch die Matrix (wie z. B. bei Agar) möglich ist.

Sollen die Proben jedoch nicht nur auf thermophile, sondern auch auf mesophile Aktinomyceten hin untersucht werden, ist eine Kühlung (4 – 8 °C Transporttemperatur) empfehlenswert, jedoch aus heutiger Sicht nicht zwingend erforderlich, sofern keine Feuchtigkeit vorhanden ist. Hier sollten aber experimentelle Untersuchungen endgültige Klarheit schaffen.

## Feuchtigkeit

Die Feuchtigkeit ist ein wichtiger Parameter, der das Auskeimen von Sporen generell beeinflusst. Sporen – die meisten Aktinomyceten bilden Sporen im Sinne von Konidien – keimen bei optimalen Umweltbedingungen aus, wozu auch eine ausreichende Wasserversorgung gehört. Auf der anderen Seite sind sie selbst im Wassergehalt reduziert und besitzen eine deutliche Toleranz gegenüber Trockenheit, um die Verbreitung durch die Luft zu überdauern. Während des Transports von Proben mit Aktinomycetensporen sollte die Feuchtigkeit somit als Schutz vor dem Auskeimen niedrig gehalten werden. Zudem können Aktinomyceten im feuchten Milieu auch ohne Anwesenheit größerer Nährstoffmengen während des Transports rasch von Gram-negativen Bakterien und saprophytären Pilzen überwuchert werden.

Dies ist beim Sammeln der Proben auf Agaroberflächen naturgemäß nicht möglich, wohl aber dann, wenn das Material auf Filtern gesammelt wird. Daher ist schon aus dem Grund der geringeren Feuchtigkeitzufuhr während Lagerung und Transport das Sammeln der keimtragenden Partikel auf Filtern gegenüber einem Impaktionsverfahren zu bevorzugen.

## Transportdauer

Während die DIN prEN 1632–4 keine Angaben über die Transportdauer macht, empfiehlt die Richtlinie für die Erfassung von biologischen Agenzien in Wertstoffsortier-

### 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

anlagen des Landes Niedersachsen einen Zeitraum von maximal 24 h, wobei hier allerdings die aerobe Gesamtkeimzahl in der Luft bestimmt wird. Die BIA-Verfahrensbeschreibung 9420 zur Bestimmung der Schimmelpilz-/Hefenkonzentration empfiehlt eine Laboranalyse der Proben noch am Tag der Probenahme, läßt jedoch auch längere Zeiträume zu, die allerdings nicht genauer spezifiziert sind. In einem solchen Falle soll aber die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Pilzeinheiten sowie die Verhinderung des Pilzwachstums sichergestellt sein.

In der Literatur wird für *Streptomyces albus* eine Halbwertszeit von 771,6 Minuten bei einer relativen Luftfeuchte von 50 % und 22 °C angegeben (Müller, 1987). Dies bedeutet, daß sich die Keimzahl innerhalb von ca. 13 h halbiert. (Zum Vergleich: Für *E. coli* gibt der gleiche Autor eine Halbwertszeit von 70 Minuten bei vergleichbaren Bedingungen an.) Diese Daten zeigen, daß *Streptomyces albus*, der zur Gruppe der Aktinomyceten gehört, vergleichsweise unempfindlich gegen die Inaktivierung an Luft ist. Dennoch würde sich die Keimzahl auch hier innerhalb von 24 h auf ca. ein Viertel reduzieren. Unter Praxisgesichtspunkten ist heute ein Transport in das Prüflabor innerhalb von 24 h möglich. Diese Zeitdauer sollte nicht überschritten werden, bevor nicht weitere Daten vorliegen.

Zusammenfassend sollte das Überleben von Aktinomyceten nach der Auswahl

eines geeigneten Probeverfahrens noch einmal untersucht werden, um den Einfluß von Temperatur, Feuchte und Zeitdauer zwischen Probenahme und Aufarbeitung im Labor für die gewählte Probenahme zu prüfen. Diese Prüfung sollte mit Proben aus typischen Arbeitsplatzmessungen und nicht mit Testaerosolen erfolgen, da Komponenten der Arbeitsplatzatmosphäre einen Einfluß auf das Überleben der Aktinomyceten während des Transports haben können.

#### 3.7 Nachweis und Differenzierung von Aktinomyceten im Labor

##### 3.7.1 Isolierung von Aktinomyceten

Aktinomyceten wachsen in der Regel langsamer als andere Bakterien oder auch Pilze. Weiterhin bilden sie relativ kleine Kolonien (Kutzner und Kempf, 1994). Daher sollten die Kulturmedien bei der Aufarbeitung im Labor so gewählt werden, daß sie den Aktinomyceten einen Selektionsvorteil bieten. Kutzner und Kempf (1994) verwendeten in ihren Untersuchungen Glycerin-Arginin-Agar. Sie beschreiben ihn als ein „generelles Medium für die Anzucht von mesophilen und thermophilen Aktinomyceten“.

Kutzner et al. (1993) nutzten vier verschiedene Nährböden: Glycerin-Arginin-Agar modifiziert nach El-Nakeeb und Leche-

valier (1963), R-8-Agar (Amner et al., 1989), Hippurat-Agar (Mattinson-Rose, 1986) und einen Standard-I-Malzextrakt-Agar, wobei es sich um Standard-I-Agar von Merck handelte (enthält Pepton und Hefeextrakt), der mit Malzextrakt sowie  $\text{CaCO}_3$  ergänzt wurde. Diese Autoren versetzten alle Medien mit einer Kombination aus Nystatin und Cykloheximid zur Unterdrückung des Pilzwachstums. Von den vier hier beschriebenen Nährböden enthalten der R-8-Agar sowie der Standard-I-Malzextrakt-Agar komplexe Bestandteile wie Hefeextrakt oder Pepton, während der Glycerin-Arginin-Agar sowie der Hippurat-Agar Medien mit einer exakten stöchiometrischen Zusammensetzung sind<sup>1)</sup>. Eine Tabelle mit einer genauen Beschreibung der einzelnen Nährböden befindet sich im Anhang.

Auch am ISB wurde Glycerin-Arginin-Agar bereits erfolgreich zur Erfassung luftgetragener Aktinomycceten eingesetzt. Wichtig ist nach unseren Erfahrungen der Zusatz von Antibiotika wie Cykloheximid, die die pilzliche Begleitflora unterdrücken. Viele Pilze wie *Aspergillus fumigatus* oder andere sind durchaus noch in der Lage, bei Temperaturen von 45 oder 50 °C zu wachsen, wie sie für die Kultur thermophiler Aktinomycceten eingesetzt werden. Da die Pilze auch größere Kolonien bilden

können und dabei leicht die Agarplatten überwachsen, könnten sie aufwachsende kleine Aktinomycceten-Kolonien überdecken. Das Pilzwachstum muß daher effizient unterdrückt werden.

Spezielle Selektivmedien setzten die gleichen Autoren für drei im Hinblick auf die EAA besonders interessante Erreger ein: Hippurat-Agar für *Saccharomonospora rectivirgula*, R-8-Agar mit Rifampicin für *Saccharomonospora viridis* und Standard-I-Malzextraktagar mit Novobiocin für *Thermoactinomyces* ssp. Die beiden zuerst genannten Keimarten sollen dabei aber auch gut auf Glycerin-Arginin-Agar wachsen, während zu den Wachstumseigenschaften von *Thermoactinomyces* ssp. auf Glycerin-Arginin-Agar keine Angaben gemacht werden. Von El-Nakeeb und Lechevalier (1963) wird Glycerin-Arginin-Agar ebenfalls als ein universales Nährmedium für aerobe Aktinomycceten beschrieben.

Korn-Wendisch und Weber (1992) haben verschiedene Medien untersucht für die selektive Isolierung verschiedener Aktinomycceten, wobei insbesondere darauf geachtet wurde, daß das Überwachsen der Nährböden durch Pilze oder andere Bakterien unterdrückt wurde. Dabei waren von 18 Medien sieben effektiv für die selektive Isolierung von thermophilen Aktinomycceten, wobei die Selektivität hoch war, so daß

---

1) Hippursäure ist N-Benzoylglycin.

### 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

immer nur eine oder zwei Arten isoliert wurden. Es ist aus unserer Sicht fraglich, ob eine derartig hohe Selektivität im Hinblick auf Arbeitsplatzmessungen notwendig ist oder ob es nicht vielmehr ausreichend ist, generell die thermophilen und evtl. mesophilen Aktinomyceten zu erfassen, ohne eine genauere Differenzierung vorzunehmen. Die meisten von Korn-Wendisch und Weber (1992) verwendeten Medien bauten auf TSA (Tryptic Soy Agar = Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar) auf. Dieses Medium ist ohne weitere Zusätze ein Universalnährboden, der z. B. bei der Prüfung auf Verkeimung nach dem Deutschen Arzneibuch (1991) eingesetzt wird. Aufgrund seiner von Hause aus äußerst geringen Selektivität muß dieser Nährboden durch den Zusatz eines oder mehrerer Antibiotika selektiv gemacht werden.

Dunger und Fiedler (1989) geben eine Übersicht über verschiedene Nährböden für Bodenaktinomyceten. Die verwendeten Medien lassen sich dabei grob in zwei Gruppen unterteilen:

1. Mineralmedien, die als Kohlenstoffquelle Glycerin und als Stickstoffquelle eine Aminosäure enthalten wie Glycin, Arginin oder Asparaginsäure.
2. Komplexe Medien. Diese enthalten entweder eine hochmolekulare C-Quelle wie Stärke mit Casein oder Ammoniumsulfat oder aber auch Casein mit Glucose als C-Quelle.

Greiner-Mai (1988) gibt in ihrer Dissertation eine Reihe von verschiedenen Nährböden für die Kultivierung von Aktinomyceten an. Diese Medien enthalten einen oder mehrere komplexe Bestandteile wie Hefeextrakt, Kartoffel-Karotten-Extrakt, Malzextrakt etc. Leider werden in dieser Arbeit keine allgemeinen Angaben dazu gemacht, welche Nährböden universell geeignet sind und welche eine hohe Selektivität besitzen.

Medien, die in den Handbüchern der klinischen Mikrobiologie angeführt werden, erscheinen weniger hilfreich für Arbeitsplatzmessungen zu sein, da die Angaben auf die pathologisch wichtigsten Aktinomyceten ausgerichtet sind, während die Erreger der EAA, wenn überhaupt, nur am Rande aufgeführt sind. So empfiehlt Land (1992) für die Erfassung von Aktinomyceten Hirn-Herz-Agar oder Columbia-Agar, wobei Chloramphenicol und Cykloheximid bzw. Colistin und Nalidixinsäure als Hemmstoffe zur Unterdrückung der Begleitflora zugesetzt werden. Unter den von diesem Autor als wichtig angeführten Aktinomyceten ist jedoch kein thermophiler Vertreter, sondern lediglich die mesophilen Vertreter *Nocardia* ssp., *Actinomadura* ssp., *Streptomyces* ssp., *Rhodococcus* ssp. und *Dermatophilus congolensis*. Im Manual of Clinical Microbiology empfehlen Land et al. (1991) ebenfalls ähnliche Komplexmedien für die Erfassung von Aktinomyceten.

Zusammenfassend sind zahlreiche Medien zur Erfassung von Aktinomyzeten beschrieben, wobei allerdings keine Daten explizit vorliegen über den Vergleich der Ausbeute verschiedener Medien für die Messungen der Arbeitsplatzatmosphäre. Grundsätzlich erscheint es sinnvoll, so weit wie möglich auf chemisch genau definierte Medienbestandteile zurückzugreifen, da diese die Nährmedien gerade im Sinne einer späteren Normierung eines Verfahrens national und auch international am besten reproduzierbar sind. Dies spricht gegen komplexe Medien, die nicht stöchiometrisch definierte Bestandteile wie Hefeextrakt, Pepton oder andere Komponenten enthalten. Die in der Arbeitsgruppe um Professor Kutzner zusammengetragenen Daten sprechen dafür, daß Glycerin-Arginin-Agar nach El-Nakeeb und Lechevalier (1963) mit einer Bebrütungstemperatur von 50 °C ein geeignetes Medium für die Erfassung von thermophilen Aktinomyzeten darstellt, wobei nach Kempf und Kutzner (1994) das gleiche Medium mit einer Bebrütungstemperatur von 28 °C auch für die Erfassung mesophiler Aktinomyzeten wie *Streptomyces* ssp. geeignet ist.

### 3.7.2 Differenzierung im Labor

Es stellt sich grundsätzlich die Frage, inwieweit über die Klassifizierung als mesophile oder thermophile Aktinomyzeten hinaus eine genauere Identifizierung notwendig

ist, da einige verschiedene Gattungen als Auslöser der EAA in Frage kommen können. Für eine erste Beurteilung der Arbeitsplatzatmosphäre erscheint es zunächst ausreichend, die Konzentration an thermophilen und evtl. mesophilen Aktinomyzeten generell zu bestimmen. Für die Erhebung genauer epidemiologischer Daten wäre eine möglichst weitgehende Differenzierung jedoch wichtig.

Eine einfache Differenzierung ist nach Kempf und Kutzner (1994) sowie Kutzner et al. (1993) bereits anhand der Farbe von Substratmycel und Luftmycel sowie der Anordnung der Sporen und der Sporenoberfläche möglich. Während die beiden zuerst genannten Kriterien sich mit bloßem Auge bzw. mit einer Lupe gut erkennen lassen, wird für die Untersuchung der Sporenanordnung ein Lichtmikroskop und für die Bewertung der Sporenoberfläche ein Elektronenmikroskop benötigt, was die Analyse natürlich aufwendiger macht.

Weitere biochemische Analysen sind das Zuckerspektrum in Ganzzellhydrolysaten sowie der Abbau verschiedener Biopolymere (Kempf und Kutzner, 1989).

Moderne molekularbiologische Verfahren, die auf der selektiven Erkennung bestimmter Gensequenzen beruhen, werden die Identifizierung von Mikroorganismen in Zukunft sicherlich sehr erleichtern. Neben den Verfahren, die mit Sonden für Gene der ribosomalen RNS erarbeitet wurden und

## 3 Erfassung des Aktinomyceten-Gehalts in der Luft

die sogar eine In-situ-Identifizierung ermöglichen können, werden sich auch weitere DNA-Techniken etablieren und durch einen hohen Grad an Automatisierung eine schnelle und präzise Identifizierung von Mikroorganismen ermöglichen (DeBruijn, 1996). Wenn eine solche Methodik für Aktinomyceten verfügbar ist, erscheint nach Isolation einer entsprechenden Anzahl von Kolonien aus der Arbeitsplatzatmosphäre auch die Bestimmung einer großen Anzahl von Einzelisolaten (einige hundert) innerhalb eines Tages durchaus möglich.

Der Laboraufwand zur Erfassung von Mikroorganismen aus der Luft läßt sich durch eine Charakterisierung von Einzelisolaten zur Erfassung einer genauen Speziesverteilung praktisch beliebig steigern. Es bleibt jedoch die Frage zu beantworten, inwieweit eine Identifizierung der Keime bis zur Speziesebene und gar darunter für eine Erfassung des Gefahrenpotentials der Luft an Arbeitsplätzen notwendig ist. Für eine generelle Erfassung der Gefährdung durch Aktinomyceten in der Arbeitsplatzatmosphäre, die ja im wesentlichen in der Möglichkeit einer EAA gegeben ist, erscheint es ausreichend, die thermophilen bzw. mesophilen Aktinomyceten zunächst summarisch zu bestimmen und von einer aufwendigen weiteren Differenzierung abzusehen.

### 3.8 Alternativen zur Erfassung der kultivierbaren Aktinomyceten

#### 3.8.1 Staubmessungen

Kutzner et al. (1993) führten bei ihren Untersuchungen parallel zur Erfassung der kultivierbaren Aktinomyceten auch Staubmessungen durch. Dies liegt begründet in der Tatsache, daß Keime und insbesondere Sporen Teil des in der Luft befindlichen Staubes sind. Es erhebt sich die Frage nach einer Parallelität zwischen dem Keimgehalt und dem Staubgehalt in der Luft. So berichtet Wallhäußer (1995) im Zusammenhang mit der Beschreibung der Problematik bei der Herstellung von Arzneimitteln, daß in entsprechenden Räumlichkeiten ein Verhältnis von Keimzahl zu Partikelzahl zwischen 1 : 1000 und 1 : 5000 vorliegt.

Kutzner et al. (1993) fanden für Aktinomyceten eine Tendenz zu höheren Konzentrationen in der Luft an Stellen hoher Staubbelastung nur dann, wenn sie die Meßwerte innerhalb eines Werkes betrachteten. Wurden hingegen alle acht beprobten Werke (drei Kompostwerke, ein Wertstoff- und Humuswerk, eine Wertstoffsortieranlage, zwei Müllheizkraftwerke sowie eine Mülldeponie) betrachtet, war eine solche Beziehung nicht mehr zu erkennen. Die Autoren führen dies auf eine unterschiedliche Beschaffenheit des Mülls

und der Meßbedingungen zurück. Da Mikroorganismen keineswegs die einzige Quelle für Staub in der Luft darstellen, muß eine solche Korrelation zwischen Staubgehalt und Mikroorganismenkonzentration auch keineswegs zwingend sein, da die Anteile aus mikrobiologischen und nicht-mikrobiologischen Quellen am Gesamtstaubgehalt mit Sicherheit variieren können. Diese Schwankungen sind durch die unterschiedliche biologische Aktivität wie auch durch die variierende Größenverteilung der übrigen eingetragenen Staubpartikel gegeben.

Die Befunde von Kutzner et al. (1993) stehen auch nur in einem scheinbaren Widerspruch zu den Angaben von Dutkiewicz und Molocznik (1970), die eine Korrelation zwischen Staubgehalt und Keimzahl beschrieben. Diese Autoren betrachteten jedoch lediglich Bereiche, wo Getreide verarbeitet wird. In derartigen Bereichen ist aber ein weitaus homogenerer Eintrag als bei Kompostierung und Wertstoffsortierung zu erwarten, die in den Arbeiten von Kutzner et al. (1993) untersucht wurden.

Für die pharmazeutische Produktion und somit für reine Räume wird, wie oben gesagt, in der Literatur ein Verhältnis zwischen Partikelzahl und Mikroorganismenkonzentration in der Luft angegeben, das zwischen 5000:1 und 1000:1 schwanken soll (Wallhäußer, 1995). Die für die Bereiche der pharmazeutischen Produktion

gemachten Angaben lassen sich aber kaum mit der Arbeitsplatzatmosphäre in Wertstoffsortieranlagen oder Kompostierwerken vergleichen.

Aus diesen Ausführungen ergibt sich, daß eine reine Staubmessung als Ersatz für eine Erfassung der Aktinomyceten zur Risikobewertung der Arbeitsplatzatmosphäre wenig geeignet ist. Allenfalls bei Abwesenheit von Staub bzw. bei extrem geringen Staubkonzentrationen wie in der Reinraumtechnik kann geschlossen werden, daß keine oder nur sehr geringe Mikroorganismen- bzw. Aktinomycetenkonzentrationen vorhanden sind. Das Vorkommen hoher Staubkonzentrationen ist jedoch keineswegs zwingend mit einer hohen Luftkonzentration an Aktinomyceten korreliert.

Ein Einsatz der Partikelmessung erscheint allenfalls möglich bei der Beurteilung der Sicherheit von Maschinen gemäß DIN EN 292-1 (1991). In dieser Norm wird unter 4.8 beschrieben, daß Maschinen ein biologisches Gefährdungspotential durch Schimmel, Bakterien und Viren besitzen können. Die Überprüfung eines derartigen Gefährdungspotentials wäre durch Einsatz eines „Modellstaubs“ mit entsprechender Staubmessung oder Partikelzählung denkbar.

Im Sinne eines „worst case“-Szenarios sollte in diesem Falle die Partikelgröße des Modellstaubs durch die kleinstmögliche real vorkommende Partikelgröße festgelegt

### 3 Erfassung des Aktinomycceten-Gehalts in der Luft

werden. Dies wäre im Falle der Aktinomycceten die Größe einer Einzelspore, die nach Kutzner et al. (1993) 0,8 – 2  $\mu\text{m}$  beträgt. Für *Thermoactinomycces* wird an gleicher Stelle eine Größe zwischen 0,5 und 1,5  $\mu\text{m}$  angegeben.

Würde eine Maschine zur Überprüfung mit einem Modellstaub von 0,5  $\mu\text{m}$  Korngröße betrieben und würde keinerlei Emission gemessen, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß auch einzelne Aktinomyccetensporen oder gar Aggregate solcher Sporen emittiert werden können, sofern die sonstigen Rahmenbedingungen wie insbesondere die Feuchte entsprechend eingehalten werden.

Hinsichtlich der Größenverteilung von Partikeln mit Aktinomyccetensporen in der Arbeitsplatzatmosphäre geben Kutzner et al. (1993) an, daß die meisten Kolonien mit einer Partikelgröße zwischen 1,1 und 2,2  $\mu\text{m}$  assoziiert waren, wohingegen die zu den Bacillariaceae gehörende Gattung *Thermoactinomycces* Kolonien überwiegend auf den Agarplatten bildete, wo Partikel mit einer Größe von mehr als 7  $\mu\text{m}$  abgetrennt wurden. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Aktinomycceten überwiegend als Einzelsporen in der Luft vorkommen, während bei der Gattung *Thermoactinomycces* entweder größere Aggregate aus Myzel und Sporen gebildet werden oder die Sporen stärker an Staubpartikel gebunden sind als die Aktinomyccetensporen (Kutzner et al., 1993).

#### 3.8.2 Alternative Verfahren zur Bestimmung der Belastung der Luft mit Mikroorganismen

Alle Mikroorganismen und Viren besitzen Nukleinsäuren. Daher ist die Bestimmung des Nukleinsäure-Gehalts einer Probe ein Ansatz zur Bestimmung der Biomasse, wobei die modernen Verfahren der PCR darüber hinaus auch die Möglichkeit bieten, die zugehörigen Spezies zu ermitteln. Erste Ansätze in dieser Richtung werden bereits in der neueren Literatur beschrieben (Alvarez et al., 1995). Diese Autoren zeigten, daß PCR-Verfahren auch dann noch gute Ergebnisse erbringen, wenn die Empfindlichkeit der konventionellen Lebendkeimzahlbestimmung durch Streßphänomene bereits deutlich reduziert ist. Inwieweit sich PCR-Ansätze auch für exakte Quantifizierung der in der Luft vorkommenden Mikroorganismen eignen, bleibt noch abzuwarten. Einen Überblick über molekulare Techniken und ihre Anwendung bei der Überwachung der Luftqualität liefern Macneil et al. (1995). Solche Verfahren können nach Angaben dieser Autoren sein: Hybridisierung mit Sonden, Restriktionsanalyse, Pulsfeldgelelektrophorese, DNA-Fingerprints, PCR-Techniken. Macneil et al. vertreten die Überzeugung, daß die PCR-Verfahren auch mit gutem Erfolg zur quantitativen Erfassung von Mikroorganismen eingesetzt werden können, sofern die Bedingungen gut kontrolliert sind. Ebenso wie die DNA ist der Proteingehalt einer Probe in der Regel mit der Biomasse

korreliert. Colorimetrische Proteinbestimmungen mit einer Empfindlichkeit bis in den  $\mu\text{g}$ -Bereich (Bradford, 1976) dürften jedoch möglicherweise noch nicht empfindlich genug sein. Weiterhin ergibt eine Aussage über das Gesamtprotein noch keine Aussage über qualitative Eigenschaften wie Toxizität oder Allergenität.

Sowohl quantitative Aussagen über die Konzentration einer Meßgröße wie auch qualitative Aussage erlauben immunologische Methoden wie ELISA („Enzyme-linked immunosorbent assay“). Hiermit lassen sich mit hoher Spezifität unter Verwendung von Antikörpern z. B. allergene Substanzen quantifizieren. Die Antigene, die die EAA hervorrufen können, sind allerdings bislang erst unzureichend charakterisiert. Es handelt sich dabei um Proteine oder Glycoproteine. Ein derartiges Antigen wurde aufgereinigt. Es handelte sich dabei um ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kD, das mit allen Seren von 15 Farmerlunge-Patienten in einer Studie reagierte (Kurup et al., 1984). Kurup (1985) berichtet, daß Seren von 18 Farmerlunge-Patienten mit Antigenen aus Kulturfiltraten von *Saccharopolyspora rectivirgula* reagierten. Keine Reaktion erfolgte jedoch mit zellfreien Zell-extrakten oder Zellwandextrakten. Dies spricht dafür, daß die antigenen Determinanten durch den Mikroorganismus nach außen abgegeben werden und nicht fest mit der Zellwand verbunden sind. Zusammenfassend kann festgestellt werden,

daß zwar prinzipiell die Möglichkeit besteht, die Antigene der Aktinomyceten immunologisch nachzuweisen. Da diese Antigene bislang jedoch noch nicht hinreichend charakterisiert sind und daher auch keine allgemein verfügbaren Antiseren zur Verfügung stehen, scheidet dieser Ansatz derzeit für eine Quantifizierung des Risikopotentials dieser Organismen in der Luft aus.

Theoretisch ist weiterhin noch eine klassische chemische Analytik denkbar, um das Risikopotential für Aktinomyceten in der Arbeitsplatzluft zu erfassen. Einen solchen Ansatz als Ersatz für einen biologischen Test schlagen Walters et al. (1994) für Endotoxine gramnegativer Bakterien vor, die Endotoxine als 3'-Hydroxyfettsäuren über Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie bestimmten. Für Protein-Antigene ist jedoch eine derartige Analytik wenig sinnvoll.

Schließlich sei noch erwähnt, daß einige Autoren auch die Gesamtzahl der lebenden und toten Mikroorganismen durch direktes mikroskopisches Auszählen ermitteln (Nielsen und Breum, 1995). Diese Technik erscheint jedoch aufgrund des Aufwands für Routinemessungen weniger geeignet, zumal sie auch ohne weitere Hilfsmittel kaum Informationen z. B. über die Speziesverteilung liefert. Möglicherweise bringt hier die elektronische Bildanalyse eine Senkung des Zeitaufwands und eine Steigerung der Spezifität, so daß auch dieses Verfahren evtl. später routinemäßig eingesetzt werden kann.

## 4 Ansätze für die Normung von Verfahren zur Erfassung von Aktinomyceten

### 4.1 Literaturrecherche

Im Rahmen der Studie wurde eine Literaturrecherche in den Jahrgängen 1994 und 1995 des Referateorgans „Current Contents, Agriculture, Biology and Environmental Sciences“ vorgenommen. Als Suchbegriffe wurden dabei unter anderem „Actino?“<sup>1)</sup> und „Air“ verwendet, wobei sowohl die Titel und Keywords als auch die Abstracts der Veröffentlichungen abgesucht wurden. Während nach dieser Recherche 1994 keine Arbeit zur Untersuchung von Aktinomyceten in Luft erschienen ist, konnten im Jahrgang 1995 einige Arbeiten ermittelt werden.

So untersuchten Lavoie et al. (1995) unter anderem Aktinomyceten in der Schweinezucht und kommen zu der Schlußfolgerung, daß in den von ihnen untersuchten spezifischen Systemen ideale Bedingungen für die Vermehrung von Aktinomyceten und *Aspergillus fumigatus* herrschen. Die Beschäftigten sollten daher HEPA-Filter tragen, die mindestens 99,7 % der Sporen zurückhalten sollten. Die Untersuchungen wurden mit einem Andersen-Sammler mit extrem kurzen Probenahmezeiten (15 oder 30 Sekunden) durchgeführt, wobei Vollmedien zum Einsatz kamen. Raty et al. (1994) isolierten u. a. Aktinomyceten aus der Innenraumluft, wobei allerdings die biologische

Aktivität der Organismen im Mittelpunkt der Arbeit stand.

Poulsen et al. (1995) geben eine umfangreiche Übersicht über die Gesundheitsprobleme, die mit dem Sortieren und Recyclen von häuslichem Abfall verbunden sind. Generell wird in dieser Arbeit auf die steigende Bedeutung der Problematik hingewiesen, die sich durch den Trend ergeben, weniger Abfall thermisch zu behandeln bzw. in Deponien zu entsorgen. Ein spezielles Risikopotential für thermophile Aktinomyceten sehen diese Autoren in Kompostwerken.

Für die Meßstrategie wird in dieser Arbeit darauf verwiesen, daß ein großer Mangel an standardisierter Methodik in diesem Bereich besteht, wobei es wünschenswert wäre, nicht nur die lebensfähigen und kultivierbaren, sondern auch die Gesamtzahl aller Mikroorganismen in der Luft zu erfassen. Personengebundene Probenahme könnte höhere Meßwerte ergeben als die üblicherweise durchgeführten nicht-personengebundenen Probenahmesysteme. Es wird auf die hohe Bedeutung einer durchdachten Strategie der Probenahme hingewiesen, wobei es nach den Angaben von Poulsen et al. besonders wichtig ist, daß die Ursachen einer Variation in der Exposition bei der Erarbeitung einer derartigen Strategie berücksichtigt werden.

---

1) „?“ ist eine sogenannte Wildcard, die es ermöglicht, beliebige Zeichenfolgen mit dem Präfix Actino zu erkennen.

## 4 Ansätze für die Normung von Verfahren zur Erfassung von Aktinomyceten

Besonders wird unter Verweis auf eine Arbeit von Heedrik (1990) vermerkt, daß für allergische Alveolitis, wie sie durch Aktinomyceten hervorgerufen werden kann, die Expositionsspitzen wichtig sind, während für Bronchitis Durchschnittswerte über längere Zeiträume eine größere Bedeutung haben. Nach Poulsen et al. (1995) besteht derzeit noch ein großer Forschungsbedarf, um die kausalen Verknüpfungen zwischen der Exposition gegenüber Bioaerosolen einerseits und bestimmten gesundheitlichen Auswirkungen andererseits zu klären. In einer Literaturübersicht werden von Poulsen et al. (1995) 17 Literaturzitate aufgeführt, die eine Korrelation zwischen einer mikrobiellen Exposition in der Arbeitsplatzatmosphäre und gesundheitlichen Problemen untersucht haben, wobei sich allerdings keine der Arbeiten mit Aktinomyceten beschäftigt.

### 4.2 Recherche in der Datenbank PERINORM

In der CD-ROM-Datenbank PERINORM wurde im Februar 1996 eine Recherche durchgeführt hinsichtlich bereits bestehender Normen oder Richtlinien für die Sammlung von Luftkeimen und insbesondere von Aktinomyceten.

Für die Erfassung von Aktinomyceten konnte keine Norm oder Richtlinie ermittelt werden. Für die Bestimmung des Luftkeimgehalts allgemein wird derzeit die EN 1632 in nationale Normen umgesetzt, wobei in Deutschland die im Entwurf vorliegende DIN EN 1632-4 speziell die Grundsätze und Analyseverfahren für die Bewertung der Luft in Risikozonen beschreibt. Diese Norm bezieht sich aber explizit auf die Reinraumtechnologie und ist daher auf Arbeitsplatzmessungen nur bedingt zu übertragen. Darüber hinaus existieren lediglich drei ältere Angaben aus den Jahren 1972 bis 1975 über die Bestimmung des Luftkeimgehalts in der Lebensmittel- und Verpackungsindustrie, die vom Fraunhofer Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung in Stuttgart herausgegeben wurden.

## 5 Empfehlungen für den Auftraggeber

Derzeit existiert noch keine verbindliche Norm für die Erfassung luftgetragener Aktinomyzeten in der Arbeitsplatzatmosphäre. Die Erfassungsverfahren für Luftkeime insgesamt bedürfen somit einer Standardisierung, wobei die derzeit verfügbaren Methoden noch nicht hinreichend validiert sind.

Ungeachtet dessen besteht die Notwendigkeit einer möglichst einheitlichen und übertragbaren Erfassung von Aktinomyzeten an Arbeitsplätzen.

Als Meßstrategie wird vorgeschlagen:

1. Die zu untersuchenden Arbeitsplätze werden hinsichtlich der möglicherweise vorkommenden Mikroorganismen bewertet. Besteht die Möglichkeit des Vorkommens solcher Organismen in höheren Konzentrationen, werden die Arbeitsvorgänge dahingehend untersucht, wann die höchsten und wann niedrige Belastungen auftreten können.

2. Zum Zeitpunkt der höchsten Belastungen erfolgt eine Erfassung der Luftkeime mit dem Membranfilterverfahren in einer Dreifachmessung pro Meßpunkt. Daneben sollten auch relevante Arbeitsgänge mit erfah-

rungsgemäß niedrigerer Belastung beprobt werden, sofern eine durchschnittliche Belastung ermittelt werden soll.

3. Die Proben werden möglichst innerhalb der nächsten 24 h in das Labor gebracht und nach Aufarbeitung auf Glycerin-Arginin-Agar plattiert, dem zur Unterdrückung des Pilzwachstums geeignete Antibiotika wie Cycloheximid oder Nystatin beigelegt sind.

4. Die Bebrütung erfolgt bei 50 °C und bei 30 °C, um sowohl thermophile wie auch mesophile Aktinomyzeten zu erfassen.

5. Die beimpften Platten werden maximal 14 Tage bebrütet, wobei sichergestellt werden muß, daß sie während dieser Zeit nicht austrocknen.

6. Parallel erfolgt eine Staubmessung, um die Belastung der Arbeitsplatzatmosphäre mit Staub zu ermitteln und somit noch einen unabhängigen Parameter zur Bewertung der Luft am Arbeitsplatz zur Verfügung zu haben.

7. Zur besseren Bewertung der Ergebnisse kann eine Referenzmessung an Außenluft sinnvoll sein.

## 6 Forschungsbedarf

Der bestehende Forschungsbedarf läßt sich wie folgt darlegen:

1. Die Einflüsse von Probenahmestrategie, Anzahl der Proben, Probentransport und Probenaufarbeitung auf die erhaltenen Meßwerte müssen genau evaluiert werden.
2. Die im Labor eingesetzten Nährmedien müssen hinsichtlich der Qualität der erhaltenen Meßwerte evaluiert werden. Dazu müssen neben dem hier vorgeschlagenen Glycerin-Argin-Nährboden auch andere im Vergleich untersucht werden, um die Frage zu beantworten, welcher Nährboden ggf. die optimale Ausbeute ermöglicht.
3. Die unter 1. und 2. zusammengefaßten Faktoren sollten zunächst in einem Labor praxisnah untersucht und bewertet werden, um daraus einen Entwurf für ein Meßverfahren luftgetragener Aktinomyzeten zu erarbeiten. Dieser Entwurf sollte dann unabhängig in einem Ringversuch getestet werden.
4. Derzeit existieren noch keine Grenzwerte hinsichtlich der Bewertung der Keim-

zahlen. Lediglich Lacey (1981) gibt einen Wert von  $10^6$  bis  $10^{10}$  Sporen thermophiler Aktinomyzeten pro Kubikmeter Luft an, die eine EAA auslösen können. Miller (1992) stellt fest, daß  $10^8$  Sporen pro Kubikmeter Luft akute Symptome auslösen können. Crook (1992) stellte fest, daß Personen, die einer Exposition von  $10^3$  Sporen pro Kubikmeter in Schweineställen ausgesetzt waren, bereits allergische Symptome entwickelten. Da nur wenige Daten vorhanden sind, sollten Grenzwerte durch epidemiologische Studien unter Einsatz eines einheitlichen Meßverfahrens erarbeitet werden.

5. Die derzeit gängigen Verfahren zur Ermittlung der lebensfähigen Keime in der Arbeitsplatzatmosphäre sollten abgeglichen werden mit alternativen, weiter zu entwickelnden Verfahren, die die gesamte Belastung an lebenden und toten Keimen sowie deren Bruchstücken erfassen (DNA-Analytik, Immunologie etc.). Ziel soll es sein, eine allgemeingültige Bezugsgröße zu erhalten.

## 7 Literatur

- Abdou, M.A.F. (1979): Luftkeimsammler RCS. Einsatzmöglichkeiten in medizinischen und nichtmedizinischen Bereichen, *Ärztl. Lab.*, 6, 20–26
- Alvarez, A.J.; Buttner, M.P.; Stetzenbach, L. D. (1995): PCR for bioaerosol monitoring – sensitivity and environmental interference, *Appl. Environm. Microbiol.*, 61, 3639–3644
- Amann, R. (1996): In-situ-Identifizierung von Mikroorganismen mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden, *Biospektrum*, 2, 27–31
- Amner, W.; Edwards, C.; McCarthy, A. J. (1989): Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism *Saccharomonospora viridis*, *Appl. Environm. Microbiol.*, 55, 2669–2674
- BIA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen, Loseblattsammlung, Hg.: Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit (BIA), Erich Schmidt Verlag, Bielefeld
- Verfahrensbeschreibung 9410 (1995): Proebenahme von Bioaerosolen am Arbeitsplatz
  - Verfahrensbeschreibung 9420 (1995): Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilz-/Hefenkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248–254
- Brock, T.D.; Madigan, M. T. (1991): *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ, USA
- Buttner, M.P.; Stetzenbach, L. D. (1993): Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling, *Appl. Environm. Microbiol.*, 59, 219–226
- Cohen, B.S.; Harley, N.H.; Lippmann, M. (1984): Bias in air sampling techniques used to measure inhalation exposure, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 45, 187–192
- Crook, B. (1992): Exposure to airborne microorganisms in the industrial workplace, *J. Aerosol Sci.*, 23 (Suppl. 1), 559–562
- Daschner, F. (1995): Bewertung der hygienischen Situation von Abfallwirtschaftsanlagen im Hinblick auf luftgetragene Keime, Entsorga gGmbH, Köln
- DeBruijn, F. J. (1996): Molecular approaches in microbial ecology to assess diversity and stress-induced gene expression in rhizosphaere bacteria. Hauptvortrag auf der VAAM-Frühjahrstagung, Bayreuth 1996
- Deutsches Arzneibuch, 10. Aufl. (1991), Dtsch. Apotheker Verlag, Stuttgart

## 7 Literatur

- DIN EN 292 (1991): Sicherheit von Maschinen, Teil 1: Grundsätzliche Terminologie, Methodik, Beuth Verlag, Berlin
- DIN prEN 1632-4 (1994): Reinraumtechnik – Kontrolle der Biokontamination, Teil 4: Analyse und Messung der Biokontamination der Luft in Risikozonen, Beuth Verlag, Berlin
- Drews, G. (1983): Mikrobiologisches Praktikum, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Dunger, W.; Fiedler, H. J. (1989): Methoden der Bodenbiologie, Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Dutkiewicz, J.; Moloczniak, A. (1970): Untersuchungen zur Korrelation zwischen der Staubkonzentration und der Mikroorganismenzahl in der Luft von Getreidemöhlen und Getreidesilos, Arch. Hyg., 154, 371–377
- El-Nakeeb, A.M.; Lechevalier, H. A. (1963): Selective isolation of aerobic actinomycetes, Appl. Microbiol., 11, 75–77
- Greiner-Mai, E. (1988): Taxonomie thermophiler Actinomyceten im Hinblick auf ihre Bedeutung für die allergische Erkrankung „Farmerlunge“. Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt
- Greiner-Mai, E.; Kempf, A.; Kutzner, H. J. (1986): Untersuchungen über die drei Actinomyceten-Gattungen Faenia, Saccharomonospora und Thermoactinomyces, die Erreger der Farmer-Lunge. VDLUFA-Schriftenreihe, 20, 899–908
- Heedrik, D. (1990): Epidemiological studies of the relationship between occupational exposures and chronic non-specific lung disease, Museum Historische Landbouwtechniek, Wageningen
- Hillier, S.; Moncla, B. J. (1991): Anaerobic gram-positive nonsporeforming Bacilli and Cocci. In: Handbook of Clinical Microbiology, 5. Aufl. (Eds.: A. Balows; W. J. Hausler; K. L. Herrmann; H. D. Isenberg; H. J. Shadomy), American Society for Microbiology, Washington, USA, 522–537
- Jaschhof, H. (1992): Sammlung von Virusaerosolen mit dem Gelatine-Membranfilter. Abscheidung bei erhöhtem Luftdurchsatz durch das Membranfilter. BioTec Mikrobiologie, Heft 6
- Jensen, P.A.; Todd, W.F.; Davis, G.N.; Scarpiro, P. V. (1992): Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosols of free bacteria, Am. Ind. Hyg. Assc. J., 53, 660–667
- Kagen, S.L.; Fink, J.N.; Schlueter, D.P.; Kurup, V.P.; Fruchtman, R. B. (1981): Streptomyces albus: A new cause of hypersensitivity pneumonitis, J. Allergy. Clin. Immunol., 68, 748–753

- Kang, Y.J.; Frank, J. F. (1989): Evaluation of air samplers for recovery of artificial generated aerosols of pure cultures in a controlled environment, *J. Food Prot.*, 52, 560–563
- Kanz, E.; Kanz, C. (1986): Die Praxis der Krankenhaushygiene – gestern und heute, *Hyg. und Med.*, 11, 25–31
- Kayser, F.H.; Bienz, K.A.; Eckert, J.; Lindenmann, J. (1993): *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Kempf, A.; Kutzner, H. J. (1989): Screening von biopolymerabbauenden Exoenzymen bei thermophilen Actinomyceten, *VDLUFA-Schriftenreihe*, 28, 979–989
- Kempf, A.; Kutzner, H.J. (1994): Untersuchungen zur Emission von Actinomyceten in Kompostwerken. In: *Gesundheitsrisiken bei der Entsorgung kommunaler Abfälle* (Hg. K. Stalder), 67–90
- Kiefer, S. (1992): *Leistungsvergleich verschiedener Keimsammler zum Nachweis luftgetragener Bakterien*. Dissertation, Universität Hohenheim
- Korn-Wendisch, F.; Weber, C. (1992): Selective isolation of thermophilic actinomyce. *DECHEMA Biotechnology Conferences*, 5, 1137–1141
- Kurup, V. P. (1985): Seriological diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. In: *Microbiology* (Ed. L. Leive), *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, USA
- Kurup, V.P.; John, K.V.; Ting, E.Y.; Somasunderam, K.; Resnick, A.; Marx, J. J. (1984): Immunochemical studies of a purified antigen from *Micropolyspora faeni*, *Mol. Immunol.*, 21, 215–221
- Kutzner, H.J.; Kempf, A. (1994): Emission von Actinomyceten-Sporen in Kompostwerken und anderen Müll-verarbeitenden Anlagen. In: *5. Hohenheimer Seminar Nachweis und Bewertung von Keimemissionen bei der Entsorgung von kommunalen Abfällen* (Hg. R. Böhm), *Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft*, Stuttgart, 76–99
- Kutzner, H.J.; Kempf, A.; Jäger, T. (1993): Verbundvorhaben: Abschätzung von Gesundheitsrisiken für Müllwerker durch Keimemissionen und Entwicklung von Arbeitsschutzmaßnahmen. Teilvorhaben B: Actinomyceten. Förderkennzeichen: O1 HK 739, Technische Hochschule Darmstadt, Institut für Mikrobiologie
- Lacey, J. (1981): Airborne actinomycete spores as respiratory allergens. In: *Actinomycetes* (Hg. K. P. Schaal, G. Pulverer), *Zbl. Bakt. Suppl.* 11, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Lacey, J.; Crook, B. (1988): Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational antigens, *Ann. Occup. Hyg.*, 32, 515–533
- Land, G.; McGinnis, M.R.; Staneck, J.; Gatson, A. (1991): Aerobic pathogenic Actinomycetales. In: *Handbook of Clinical*

## 7 Literatur

- Microbiology, 5. Aufl. (Eds. A. Balows; W. J. Hausler; K. L. Herrmann; H. D. Isenberg; H. J. Shadomy), American Society for Microbiology, Washington, USA, 340–359
- Land, G. A. (1992): Aerobic Actinomyces. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1 (Ed. H. D. Isenberg), American Society for Microbiology, Washington, USA
- Lavoie, J.; Marchand, G.; Drolet, J.Y.; Gingras, G. (1995): Biological and chemical contamination of the air in a grower-finisher pig building using deep-litter systems, *Canad. Agricult. Engineer.*, 37, 195–203
- Lembke, L.L.; Kniseley, R.N.; Nostrand, R.C.; Hale, M. D. (1981): Precision of the All-Glass-Impinger and the Andersen microbial impactor for air sampling in solid waste air facilities, *Appl. Environm. Microbiol.*, 42, 222–225
- Macher, J.M.; First, M. W. (1983): Reuter Centrifugal Air Sampler. Measurement of effective air flowrate and collection efficiency, *Appl. Environm. Microbiol.*, 45, 1960–1962
- Macneil, L.; Kauri, T.; Robertson W. (1995): The molecular techniques and their potential application in monitoring the microbial quality of indoor air, *Can. J. Microbiol.*, 41, 657–665
- Mattinson-Rose, A. D. (1986): Classification of amycolate wall chemotype IV actinomyces. PhD Thesis, Newcastle upon Tyne, UK
- Miller, J. D. (1992): Fungi as contaminants in indoor air, *Atmospheric Environment*, 26 A, 2163–2172
- Missel (1996): Persönliche Mitteilung aus dem Institut für Tierhygiene und Tierschutz der medizinischen Hochschule Hannover
- Müller, W. (1987): Emission von Keimen und Partikeln von Deponien, *Stuttgarter Berichte zur Abfallwirtschaft.*, 24, 107–122
- Niedersächsisches Landesamt für Ökologie (1995): Methodik zur lufthygienischen Untersuchung von Wertstoffsortieranlagen in Niedersachsen. Version Januar 1995
- Nielsen, B.H.; Breum, N. O. (1995): Exposure to air contaminants in chicken catching, *Am. Ind. Hyg. Ass. J.*, 56, 804–808
- Nolte, D. (1980): Immunologische und allergische Lungenkrankheiten, *Fortschr. Med.*, 98, 481–486
- Poulsen, O.M.; Breum, N.O.; Ebbehoj, N.; Hansen, A.M.; Ivens, U.I.; Vanlelieveld, D.; Malmros, P.; Matthiasen, L.; Nielsen, B.H.; Nielsen, E.M.; Schibye, B.; Skov, T.; Stenbaek, E.I.; Wilkins, K. C. (1995): Sorting and recycling of domestic waste – review of occupational health problems and their possible causes,

Science of the Total Environment, 168, 33–56

Pschyrembel, W. (1982): Klinisches Wörterbuch, 254. Aufl., de Gruyter Verlag, Berlin

Raty, K.; Raatikainen, O.; Holmalahti, J.; Vonwright, A.; Joki, S.; Pitkanen, A.; Saano, V.; Hyvarinen, A.; Nevalainen, A.; Buti, I. (1994): Biological activities of actinomycetes and fungi isolated from the indoor air of problem houses, Intern. Biodeterioration and Biodegradation, 34, 143–154

Schlegel, H. G. (1985): Allgemeine Mikrobiologie, 6. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart

Schmidt, B. (1994): Die Emission von Bakterien beim Umgang mit Bioabfall. In: Gesundheitsrisiken bei der Entsorgung kommunaler Abfälle (Hg. K. Stalder; C. Verkoyen), Verlag Die Werkstatt, Göttingen, 33–52

Sennekamp, J. (1981): Exogen allergische Alveolitis. In: Konietzko, J.; Dupuis, H. (Hg.): Handbuch der Arbeitsmedizin. 1–20, ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg a.L.

Soddell, J.A.; Seviour, R. J. (1995): Relationship between temperature and growth

of organisms causing Nocardia foams in activated sludge plants, Water Research, 29, 1555–1558

Süßmuth, R.; Eberspächer, J.; Haag, R.; Springer, W. (1987): Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum, Thieme Verlag, Stuttgart

TRGS 402 (1986): Technische Regeln für Gefahrstoffe. Ermittlung und Beurteilung der Konzentrationen gefährlicher Stoffe in der Luft in Arbeitsbereichen

Wallhäußer, K. H. (1988): Praxis der Sterilisation Desinfektion – Konservierung, 4. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart

Wallhäußer, K. H. (1995): Praxis der Sterilisation Desinfektion – Konservierung, 5. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart

Walters, M.; Milton, D.; Larsson, L.; Ford, T. (1994): Airborne environmental endotoxin – a cross-validation of sampling and analysis techniques, Appl. Environm. Microbiol., 60, 996–1005

Williams, S.T.; Lanning, S.; Wellington, E.M.H. (1984): The ecology of actinomycetes. In: Goodwin, M.; Mordarski, M.; Williams, S. T. (eds.): The biology of the actinomycetes, Academic Press, London

# Anhang 1/Annex 1/Annexe 1

## Nährmedien/Culture media/Milieux de culture

Darstellung, leicht verändert, nach Kutzner et al., 1993.

Presentation, slightly modified, according to Kutzner et al., 1993.

Cette description se réfère, sous une forme légèrement modifiée, à Kutzner et al., 1993.

### **Glycerin-Arginin-Agar/Glycerine-arginine-agar/ Glycérine-arginine-agar-agar**

Dieses Nährmedium ist in Anhang 2 (Vorschlag für eine Meßstrategie) genau beschrieben.  
This culture medium is described in detail in annex 2 (proposal for a measuring strategy).  
Ce milieu de culture fait l'objet d'une description détaillée à l'annexe 2 (stratégie de mesure préconisée).

### **R 8-Agar/R8-agar/R 8-agar-agar**

(Amner et al. 1989)

|  |           |
|--|-----------|
| Hefeextrakt/Yeast extract/Extrait de levure  | 10,0 g/l  |
| MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O   | 5,1 g/l   |
| NaOH (1 M)   | 7,0 ml/l  |
| Agar/Agar-agar   | 12,0 g/l  |
| Nach dem Autoklavieren zugeben:<br>Added after autoclaving:<br>Après le passage en autoclave, ajouter: |           |
| L-Prolin/Proline L   | 3,0 g/l   |
| CaCl <sub>2</sub> (5 M)  | 10,0 ml/l |

# Anhang 1 / Annex 1 / Annexe 1

Nährmedien / Culture media / Milieux de culture

## Hippurat-Agar / Hippurate-agar / Hippurate-agar-agar

(Mattinson-Rose, 1986; modifiziert von / modified by / modifié par Kutzner et al., 1993)

|   |          |
|---|----------|
| Natrium-Hippurat / Sodium hippurate / Hippurate de sodium | 3,0 g/l  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$                    | 1,0 g/l  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                  | 1,0 g/l  |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$               | 0,4 g/l  |
| NaCl  | 20,0 g/l |
| Agar / Agar-agar  | 12,0 g/l |

Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt.

The pH value is set at 7.2.

Le pH est amené à 7,2.

## Standard-I-Malzextrakt-Agar / Standard I-malt extract-agar / Agar-agar-extrait de malt-I standard

(Greiner-Mai, 1988)

|   |          |
|---|----------|
| Standard-I-Agar (Merck, Nr. 7881)<br>Standard I-agar (Merck, No. 7881)<br>Agar-agar I standard (Merck, n° 7881) | 37,0 g/l |
| Malzextrakt / Malt extract / Extrait de malt  | 10,0 g/l |
| $\text{CaCO}_3$   | 2,0 g/l  |

Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt.

The pH value is set at 7.2.

Le pH est amené à 7,2.

# Anhang 2

## Vorschlag für eine Meßstrategie

Aerobe Aktinomyzeten und darunter insbesondere thermophile Vertreter können bei einem Vorkommen in der Arbeitsplatzatmosphäre ein gesundheitliches Risiko für die Beschäftigten bedeuten. Daher soll hier eine Kurzanleitung für die Erfassung derartiger Organismen in der Arbeitsplatzatmosphäre gegeben werden.

### Procedere

- Probenahme in Atemhöhe oder im Atembereich der Beschäftigten (ca. 1,50 m Höhe).
- Dreifachproben mit Membranfilterverfahren (bei sehr kurzen Probenahmezeiten wird eine höhere Zahl an Einzelproben empfohlen).
- Empfohlene Dauer der Probenahme 10 oder 15 Minuten. (Eine Zeit von einer Stunde sollte jedoch in keinem Fall überschritten werden!)
- Transport der Proben ins Labor möglichst innerhalb von 24 h. (Für Actinomyzeten sporen sind wahrscheinlich längere Transportzeiten zulässig. Dies sollte jedoch zunächst geprüft werden.)
- Auflösen oder Suspendieren der Filter in 20 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung.
- Plattieren auf Glycerin-Arginin-Agar. (Dieses Medium ist ein Mineralmedium, daher gut standardisierbar und für mesophile wie auch thermophile Aktinomyzeten geeignet.)
- Von jedem aufgelösten bzw. suspendierten Filter ist jeweils eine Doppelbestimmung bei jeder Bebrütungstemperatur durchzuführen.
- Bebrütung bei 50 °C und 28 °C für maximal 14 Tage.
- Wichtig ist der Zusatz von Antibiotika, um das Aufwachsen von Pilzen zu verhindern. Vorgeschlagen werden Cykloheximid und Nystatin, jeweils mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml.
- Wegen der langen Bebrütungsdauer ist das Austrocknen ein Problem. Kutzner et al. (1993) empfehlen, das übliche Agar-Volumen von ca. 25 ml auf 40 ml zu erhöhen, evtl. müssen die Schalen auch mit Parafilm verschlossen werden.
- Für die Bewertung der Meßergebnisse ist eine Referenzmessung der Außenluft im Luv der Anlage empfehlenswert.

# Anhang 2

## Vorschlag für eine Meßstrategie

### Rezept für Glycerin-Arginin-Agar

(El-Nakeeb und Lechevalier, 1963;  
modifiziert nach Kutzner et al., 1993)

|   |          |
|---|----------|
| Glycerin                                    | 12,5 g/l |
| L-Arginin                                   | 1,0 g/l  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                    | 0,3 g/l  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                    | 0,7 g/l  |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g/l  |
| NaCl  | 1,0 g/l  |
| Spurenelemente nach Drews (1983, s. rechts) | 1,0 ml   |
| Agar  | 12,0 g/l |

Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt.

### Spurenelement-Lösung nach Drews (1983)

Die Substanzen werden getrennt in Wasser gelöst und zur EDTA-Lösung gegeben. Danach wird der pH-Wert auf etwa 4 eingestellt und die Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

|  |          |
|--|----------|
| EDTA   | 500 mg/l |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  | 300 mg/l |
| $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  | 3 mg/l   |
| $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 5 mg/l   |
| $\text{CuCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 1 mg/l   |
| $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 2 mg/l   |
| $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 3 mg/l   |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  | 5 mg/l   |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                      | 2 mg/l   |

# Annex 2

## Proposal for a measuring strategy

Aerobic actinomycetes, especially thermophilic types, can constitute a health risk for workers if present in the workplace atmosphere. For this reason, here is a brief introduction to recording organisms of this type in the workplace atmosphere.

### Procedure

- Sampling at workers' breathing level and within their breathing range (at a height of approx. 1.50 m).
- Triple samples using membrane filter process (a higher number of single samples is recommended if sampling times are very short).
- Recommended sampling period: 10 or 15 minutes. (A period of one hour should not be exceeded under any circumstances!)
- Samples should be brought into the laboratory within 24 hours if possible. (A longer transport period is probably permissible for actinomycete spores. This should, however, be checked first.)
- Dissolving or suspending filters in 20 ml of sterile physiological sodium chloride solution.
- Making plates on glycerine-arginine-agar. (This is a mineral medium and is therefore suitable for standardization and for both mesophilic and thermophilic actinomycetes.)
- Two evaluations should be made of each dissolved and suspended filter at each incubation temperature.
- Incubation at 50 °C and 28 °C for a maximum of 14 days.
- It is important to add antibiotics to prevent fungi from growing. Cycloheximide and nystatine are recommended with a final concentration of 50 µg/ml.
- Due to the long incubation period, drying out is a problem. Kutzner et al. (1993) recommend that the usual volume of agar be increased from approx. 25 ml to 40 ml; dishes may also have to be sealed with parafilm.
- A reference measurement of the outside air on the windward side of the laboratory is recommended for assessing measuring results.

# Annex 2

## Proposal for a measuring strategy

### Formula for glycerine-arginine-agar

(El-Nakeeb and Lechevalier, 1963; modified according to Kutzner et al., 1993)

|  |          |
|--|----------|
| Glycerine                                      | 12.5 g/l |
| L-arginine                                     | 1.0 g/l  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                       | 0.3 g/l  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                       | 0.7 g/l  |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$    | 0.5 g/l  |
| NaCl   | 1.0 g/l  |
| Trace elements acc. to Drews (1983, see right) | 1.0 ml   |
| Agar   | 12.0 g/l |

The pH value is set at 7.2.

### Trace element solution according to Drews (1983)

Substances are dissolved separately in water and added to the EDTA solution. The pH value is then set to approx. 4 and the solution is filled up with water to 1000 ml.

|  |          |
|--|----------|
| EDTA   | 500 mg/l |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  | 300 mg/l |
| $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  | 3 mg/l   |
| $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 5 mg/l   |
| $\text{CuCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 1 mg/l   |
| $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 2 mg/l   |
| $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 3 mg/l   |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  | 5 mg/l   |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                      | 2 mg/l   |

# Annexe 2

## Stratégie de mesure préconisée

Les actinomycètes aérobies, et en particulier les espèces thermophiles, peuvent, par leur présence dans l'atmosphère d'un poste de travail, constituer un risque pour la santé des travailleurs. On trouvera donc ci-dessous de brèves instructions sur la manière de détecter ces organismes dans l'atmosphère du poste de travail.

### Procédure à suivre

- Effectuer le prélèvement à la hauteur ou dans la zone de respiration des travailleurs (à environ 1,50 m de hauteur).
  - Effectuer un triple prélèvement en utilisant un filtre à membrane (si les durées de prélèvement sont très courtes, il est conseillé de prélever un nombre plus important d'échantillons).
  - Durée de prélèvement conseillée : 10 à 15 minutes (on ne dépassera en aucun cas une durée d'une heure).
  - Les échantillons devront être transportés au laboratoire si possible dans les 24 heures qui suivent (pour les spores d'actinomycètes, un laps de temps plus long est probablement admissible. Ceci reste toutefois à vérifier).
  - Dissolution ou suspension des filtres dans 20 ml de solution saline physiologique stérile.
- Mise en culture dans un milieu glycérine-arginine-agar-agar (étant de nature minérale, ce milieu est facile à standardiser et convient donc aussi bien pour les actinomycètes mésophiles que thermophiles).
  - Pour chaque filtre dissous ou mis en suspension, on effectuera une double évaluation pour chaque température d'incubation.
  - Incubation à 50 °C et 28 °C. Durée maximum : 14 jours.
  - Il est important d'ajouter des antibiotiques pour éviter l'apparition de champignons. Antibiotiques recommandés : cycloheximide et nystatine, à une concentration finale de 50 g/ml.
  - Du fait de la période d'incubation prolongée, le dessèchement peut poser un problème. Kutzner et al. (1993) recommandent d'augmenter le volume usuel d'agar-agar de 25 ml à 40 ml. Le cas échéant, il conviendra de fermer les coupelles à la paraffine.
  - Pour pouvoir évaluer les résultats des mesures, il est recommandé de procéder à une mesure de référence de l'air, prise à l'extérieur des bâtiments, du côté du vent.

## Annexe 2

### Stratégie de mesure préconisée

#### Formulation du glycérite-arginine-agar-agar

(El-Nakeeb et Lechevalier, 1963; modifié selon Kutzner et al., 1993)

|   |          |
|---|----------|
| Glycérine                                       | 12,5 g/l |
| Arginine L                                      | 1,0 g/l  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                        | 0,3 g/l  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                        | 0,7 g/l  |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$     | 0,5 g/l  |
| NaCl  | 1,0 g/l  |
| Oligo-éléments selon Drews (1983, cf. à droite) | 1,0 ml   |
| Agar-agar                                       | 12,0 g/l |

Le pH est amené à 7,2.

#### Solution d'oligo-éléments selon Drews (1983)

Les substances sont dissoutes séparément dans l'eau et ajoutées à la solution d'EDTA. Le pH est ensuite amené à 4 environ. De l'eau est ajoutée à la solution jusqu'à obtenir 1000 ml.

|  |          |
|--|----------|
| EDTA   | 500 mg/l |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  | 300 mg/l |
| $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  | 3 mg/l   |
| $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 5 mg/l   |
| $\text{CuCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 1 mg/l   |
| $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  | 2 mg/l   |
| $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 3 mg/l   |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  | 5 mg/l   |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                      | 2 mg/l   |

## Teil 2

### Ringversuch:

# Mikroorganismen in der Arbeitsplatzatmosphäre – Aktinomyceten

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 1     | Einleitung . . . . .   | 87  |
| 2     | Experimentelle Durchführung . . . . .                                    | 87  |
| 2.1   | Teil 1: Probenahme mit anschließender Laborauswertung . . . . .          | 87  |
| 2.1.1 | Probenahme . . . . .   | 87  |
| 2.1.2 | Laboruntersuchungen . . . . .  | 88  |
| 2.2   | Teil 2: Zusätzliche Laboraufarbeitung einer geteilten Probe . . . . .    | 90  |
| 3     | Ergebnisse . . . . .   | 91  |
| 3.1   | Teil 1: Probenahme mit anschließender Laborauswertung . . . . .          | 91  |
| 3.2   | Teil 2: Zusätzliche Laboraufbereitung einer geteilten Probe . . . . .    | 91  |
| 4     | Diskussion . . . . .   | 98  |
| 4.1   | Teil 1: Probenahme mit anschließender Laborauswertung . . . . .          | 98  |
| 4.2   | Teil 2: Zusätzliche Laboraufarbeitung einer gesplitteten Probe . . . . . | 100 |
| 5     | Empfehlungen . . . . .   | 101 |
| 6     | Literatur . . . . .  | 102 |

# Teil 2 Ringversuch

## 1 Einleitung

Die KAN hatte in einer Literaturstudie die Möglichkeiten zur Erfassung von luftgetragenen Aktinomycceten in der Arbeitsplatzatmosphäre untersuchen lassen.<sup>1</sup>

Diese Arbeit enthielt eine Empfehlung für ein mögliches Verfahren zur Probenahme und Laborauswertung, wobei dies aber im Rahmen der Studie nicht experimentell abgesichert werden konnte.

Es wurde in dieser Literaturstudie jedoch die Empfehlung ausgesprochen, das vorgestellte Verfahren in einem Ringversuch zu erproben. Dies geschah mit dem Ziel, eine Praxisbewertung zu erhalten. Sofern erforderlich, sollten auf der Basis experimenteller Daten auch Modifikationen vorgenommen werden.

Inhalt dieses Berichtes ist eine Zusammenstellung der Ergebnisse und eine Bewertung.

Die experimentellen Arbeiten wurden 1997 und 1998 durchgeführt. Am Ringversuch haben teilgenommen:

- Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit (BIA), Sankt Augustin
- Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für angewandte Mikrobiologie, Gießen
- Labor Dr. Rabe, Essen

- Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover (konnte am Teil 2 des Ringversuchs nicht teilnehmen)
- TÜV Energie- und Systemtechnik GmbH, Institut für Sicherheit in der Biotechnologie (ISB), Freiburg/Eschborn
- Universität Hohenheim, Institut für Umwelt und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Stuttgart

Allen Teilnehmern, dem Kompostwerk Leonberg bei Stuttgart, in dem die Probenahme durchgeführt wurde, sowie der KAN sei an dieser Stelle gedankt.

## 2 Experimentelle Durchführung

### 2.1 Teil 1: Probenahme mit anschließender Laborauswertung

#### 2.1.1 Probenahme

Die Probenahme erfolgte in der Rottehalle des Kompostwerks Leonberg. In der Rottehalle wurde zum Zeitpunkt der Probenahme eine Intensiv-Kompostierung durchgeführt, wobei das Material während der Probenahme an der Probenahmestelle nicht umgesetzt oder anderweitig stark bewegt wurde. Im hinteren Teil der Halle wurden jedoch zeitweise Umsetzarbeiten durchgeführt.

---

1) KAN-Bericht 13 (1. Auflage, 1997); jetzt Teil 1 in der vorliegenden Broschüre.

# Teil 2 Ringversuch

Tabelle 1: Varianten der Probenahme im Kompostwerk Leonberg

| Probenahmegerät                | Filter                         | Volumen              | Probenahmedauer (Minuten) | Anzahl der Einzelproben |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|
| Luftkeimsammler Sartorius MD 8 | Gelatinemembranfilter, Ø 80 mm | 1 m <sup>3</sup>     | 10                        | 3                       |
| Luftkeimsammler PGP            | Gelatinemembranfilter, Ø 37 mm | 0,105 m <sup>3</sup> | 30                        | 2                       |
| Luftkeimsammler PGP            | Polycarbonatfilter, Ø 37 mm    | 0,105 m <sup>3</sup> | 30                        | 2                       |

Starke Luftbewegungen waren in der Hallenluft nicht wahrnehmbar.

Die Probenahmestelle befand sich seitlich in Wandnähe etwa in der Mitte der Längsachse der Halle. Die Probenahme erfolgte in einer Höhe von ca. 1,5 m, wobei die Probenahmeköpfe der einzelnen Geräte einen seitlichen Abstand von ca. 1 m hatten.

Es wurden insgesamt 7 Einzelproben genommen in den in Tabelle 1 genannten Varianten.

Die beaufschlagten Filter wurden nach Probenahme so gelagert, daß ein Zutritt von Keimen ausgeschlossen war. Die Filter wurden bei Umgebungstemperatur durch die Probenehmer in die einzelnen Labors verbracht.<sup>1</sup>

Die Aufarbeitung der Filter für die Laboruntersuchungen erfolgte nach maximal 24 h.

## 2.1.2 Laboruntersuchungen

Die Filter wurden in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl versetzt mit 0,01 % Tween 80) suspendiert (10 ml Volumen für die großen Filter (Ø 80 mm) und 5 ml Volumen für die kleinen Filter (Ø 37 mm)). Danach wurden die Ansätze für ca. 15 Minuten bei 35 – 40 °C geschüttelt, darauf gevortext und dekadische Verdünnungsreihen angelegt.

Jeweils 0,1 ml aus jeder Verdünnungsstufe wurde auf Agarplatten (Ø 90 mm) in drei Parallelen ausplattiert.

Für Aktinomyceten wurde Glycerin-Arginin-Agar (abgekürzt: GA-Agar) verwendet. Die Zusammensetzung ist nachfolgend beschrieben.

1) Bei der Gruppe Gießen wurden Kühlelemente in der Rottehalle temperiert und anschließend mit den Proben in einer Kühltasche transportiert.

|  |          |
|--|----------|
| Glycerin                               | 12,5 g/l |
| L-Arginin                              | 1,0 g/l  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 0,3 g/l  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 0,7 g/l  |
| MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O | 0,5 g/l  |
| NaCl                                   | 1,0 g/l  |
| Spurenelemente                         | 1,0 ml   |
| Agar                                   | 12 g/l   |

Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt.

Spurenelement-Lösung: Die Substanzen werden getrennt in Wasser gelöst und zur EDTA-Lösung gegeben. Danach wird der pH-Wert auf etwa 4 eingestellt und die Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

|   |          |
|---|----------|
| EDTA                                    | 500 mg/l |
| FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O  | 300 mg/l |
| MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O  | 3 mg/l   |
| CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O  | 5 mg/l   |
| CuCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O  | 1 mg/l   |
| NiCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O  | 2 mg/l   |
| NaMoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O | 3 mg/l   |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O  | 5 mg/l   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>          | 2 mg/l   |

Die Agarplatten enthielten Cycloheximid und Nystatin jeweils mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml.

Die Bebrütung erfolgte bei 50 °C zur Erfassung der thermophilen Aktinomyceten, die bei der Bewertung der Arbeitsplatzatmosphäre aufgrund der Art der Arbeitsplätze die bedeutendste Aktinomyceten-Gruppe darstellen. Zusätzlich wurden parallel GA-Platten bei 30 °C bebrütet, um die mesophilen Aktinomyceten zu erfassen. Die Bebrütungsdauer betrug 14 Tage.

Um eine bessere Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde aus den gleichen Proben heraus weiterhin die Schimmelpilz-Konzentration ermittelt. Hierbei wurde das eingeführte Verfahren nach TRBA 430<sup>1</sup> in der Fassung vom Oktober 1997 verwendet (Bebrütungsdauer: 7 Tage).

Als Nährmedium kam dabei gemäß TRBA 430 Dichloran-Glycerin-(DG 18)-Agar zum Einsatz. Die Zusammensetzung ist:

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| Pepton                          | 5,0 g/l   |
| Glucose                         | 10,0 g/l  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,0 g/l   |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,5 g/l   |
| Dichloran                       | 0,002 g/l |
| Chloramphenicol                 | 0,1 g/l   |
| Glycerin                        | 18 %      |
| Agar                            | 15,0 g/l  |
| pH-Wert                         | 5,6 ± 0,2 |

1) TRBA = Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe.

# Teil 2 Ringversuch

Die Platten wurden wie oben beschrieben in drei Parallelen beschickt und für eine Woche bei 25 °C bebrütet. Die Inkubation der inokulierten Platten erfolgte zum Schutz gegen Austrocknung stapelweise in verschlossenen Kunststoffbeuteln. Eine Gruppe setzte zusätzlich noch oberhalb und unterhalb jedes Plattenstapels eine Petrischale mit feuchter Watte ein.

Alle Platten wurden nach Abschluß der Inkubationszeit ausgewertet in Anlehnung an die Vorgaben der TRBA 430. Die Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und des Probenahmevolumens auf ein Luftvolumen von einem Kubikmeter umgerechnet.

## 2.2 Teil 2: Zusätzliche Laboraufarbeitung einer geteilten Probe

Im Kompostwerk Leonberg wurden durch die Universität Hohenheim vier Proben mit dem Sartorius MD 8 auf Gelatinefiltern genommen. Die vier Gelatinefilter wurden zusammen in 40 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und bis zum Erreichen der Homogenität geschüttelt.

Anschließend wurden Aliquote von ca. 5 ml in sterile Gefäße gegeben und per

Post an die einzelnen Versuchsteilnehmer verschickt. Aus einem Aliquot wurde sofort nach Herstellung der Suspension eine Keimzahlbestimmung durchgeführt.

Die Proben trafen am folgenden Tage in den beteiligten Labors ein. Die weitere Aufarbeitung (Erstellung der Verdünnungsreihen, Plattieren) wurde in allen beteiligten Labors zur gleichen Zeit begonnen.

Es wurden dekadische Verdünnungsreihen wie oben beschrieben hergestellt. Medien und Inkubationsbedingungen sind in zusammengefaßt. Der im Teil 1 nicht verwendete DIFCO-Agar ist ein kommerziell erhältliches Medium zur Isolierung von Aktinomyceten. Es handelt sich dabei um ein Medium, das vom Hersteller unter der Artikelnummer 0957-17 vertrieben wird und folgende Komponenten enthält:

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| Natrium-Caseinat,  | 2 g/l     |
| Asparagin          | 0,1 g/l   |
| Natrium-Propionat  | 4 g/l     |
| Di-Kalium-Phosphat | 0,5 g/l   |
| Magnesium-Sulfat   | 0,1 g/l   |
| Eisen (III)-Sulfat | 0,001 g/l |
| Agar               | 15 g/l    |

Tabelle 2: Medien und Inkubationsbedingungen bei der Laboruntersuchung einer gesplitteten Probe

| Nr. | Medium | Inkubationstemperatur | Inkubationsdauer | Parameter                 |
|-----|--------|-----------------------|------------------|---------------------------|
| 1   | GA     | 50 °C                 | 14 Tage          | thermophile Aktinomyceten |
| 2   | GA     | 55 °C                 | 14 Tage          | thermophile Aktinomyceten |
| 3   | DIFCO  | 50 °C                 | 14 Tage          | thermophile Aktinomyceten |
| 4   | DIFCO  | 55 °C                 | 14 Tage          | thermophile Aktinomyceten |
| 5   | GA     | 30 °C                 | 14 Tage          | mesophile Aktinomyceten   |
| 6   | DG 18  | 25 °C                 | 7 Tage           | mesophile Schimmelpilze   |

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Teil 1: Probenahme mit anschließender Laborauswertung

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 3 und in Tabelle 4 zusammengestellt.

In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind die für eine Bewertung der Schwankung der Meßwerte wichtigen Parameter zusammengefaßt.

#### 3.2 Teil 2: Zusätzliche Laboraufbereitung einer geteilten Probe

Die Ergebnisse lassen sich Tabelle 7 entnehmen.

Tabelle 8 zeigt die für eine Bewertung der Variation der Meßwerte wichtigen Parameter.

## Teil 2 Ringversuch

Tabelle 3: Erfassung der Konzentration an luftgetragenen Mikroorganismen bei Probenahme und Laboraufarbeitung durch verschiedene Gruppen: Aktinomyceten

|     |                   |                   | Eschborn            | Essen               | St. Augustin        | Hannover            | Gießen              | Hohenheim           |
|-----|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Nr. | Gerät/<br>Filter  | Parameter         | KBE/m <sup>3</sup>  |
| 1   | MD8,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 30° | 1,3×10 <sup>5</sup> | 4,5×10 <sup>5</sup> | 4,9×10 <sup>5</sup> | 4,6×10 <sup>5</sup> | 3,9×10 <sup>5</sup> | 4,6×10 <sup>4</sup> |
| 2   | MD8,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 30° | 2,7×10 <sup>5</sup> | 4,5×10 <sup>5</sup> | 1,3×10 <sup>6</sup> | 6,7×10 <sup>5</sup> | 5,8×10 <sup>5</sup> | 1,3×10 <sup>5</sup> |
| 3   | MD8,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 30° | 3,1×10 <sup>5</sup> | 2,9×10 <sup>5</sup> | 1,4×10 <sup>6</sup> | 4,7×10 <sup>5</sup> | 6,0×10 <sup>5</sup> | 7,6×10 <sup>4</sup> |
| 4   | PGP, Polycarbonat | Aktinomyceten 30° | 2,3×10 <sup>5</sup> | 4,7×10 <sup>5</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 3,4×10 <sup>5</sup> | 1,2×10 <sup>5</sup> |
| 5   | PGP, Polycarbonat | Aktinomyceten 30° | 6,5×10 <sup>4</sup> | 5,7×10 <sup>5</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> | 8,7×10 <sup>4</sup> | 3,6×10 <sup>5</sup> | 2,2×10 <sup>5</sup> |
| 6   | PGP,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 30° | 2,9×10 <sup>4</sup> | 7,1×10 <sup>5</sup> | 4,9×10 <sup>5</sup> | 2,7×10 <sup>5</sup> | 9,8×10 <sup>4</sup> | 1,1×10 <sup>5</sup> |
| 7   | PGP,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 30° | 3,8×10 <sup>4</sup> | 3,2×10 <sup>5</sup> | 3,9×10 <sup>5</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 1,3×10 <sup>5</sup> | 8,9×10 <sup>4</sup> |
|     |                   |                   |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
| 1   | MD8,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 50° | 8,0×10 <sup>4</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> | 6,5×10 <sup>5</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> | 1,1×10 <sup>6</sup> | 8,9×10 <sup>4</sup> |
| 2   | MD8,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 50° | 1,7×10 <sup>5</sup> | 3,0×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,1×10 <sup>5</sup> | 2,7×10 <sup>6</sup> | 1,7×10 <sup>5</sup> |
| 3   | MD8,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 50° | 2,0×10 <sup>5</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 1,2×10 <sup>6</sup> | 4,2×10 <sup>4</sup> | 3,4×10 <sup>6</sup> | 1,1×10 <sup>5</sup> |
| 4   | PGP, Polycarbonat | Aktinomyceten 50° | 2,2×10 <sup>5</sup> | 4,4×10 <sup>5</sup> | 5,6×10 <sup>5</sup> | 4,8×10 <sup>4</sup> | 1,4×10 <sup>6</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> |
| 5   | PGP, Polycarbonat | Aktinomyceten 50° | 6,5×10 <sup>4</sup> | 6,3×10 <sup>5</sup> | 3,1×10 <sup>5</sup> | 4,5×10 <sup>4</sup> | 1,4×10 <sup>6</sup> | 1,9×10 <sup>5</sup> |
| 6   | PGP,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 50° | 3,5×10 <sup>4</sup> | 4,4×10 <sup>5</sup> | 8,4×10 <sup>5</sup> | 1,3×10 <sup>4</sup> | 3,8×10 <sup>5</sup> | 1,0×10 <sup>5</sup> |
| 7   | PGP,<br>Gelatine  | Aktinomyceten 50° | 1,8×10 <sup>4</sup> | 2,5×10 <sup>5</sup> | 8,9×10 <sup>5</sup> | 8×10 <sup>3</sup>   | 2,3×10 <sup>5</sup> | 7,8×10 <sup>4</sup> |

Tabelle 4: Erfassung der Konzentration an luftgetragenen Mikroorganismen bei Probenahme und Laboraufarbeitung durch verschiedene Gruppen: Schimmelpilze

|     |                        |                    | Eschborn            | Essen               | St. Augustin        | Hannover            | Gießen              | Hohenheim           |
|-----|------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Nr. | Gerät/<br>Filter       | Parameter          | KBE/m <sup>3</sup>  |
| 1   | MD8,<br>Gelatine       | Schimmel-<br>pilze | 2,8×10 <sup>4</sup> | 8,6×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 3,0×10 <sup>5</sup> | 2,1×10 <sup>5</sup> | 4,5×10 <sup>4</sup> |
| 2   | MD8,<br>Gelatine       | Schimmel-<br>pilze | 8,5×10 <sup>4</sup> | 4,0×10 <sup>5</sup> | 5,4×10 <sup>5</sup> | 5,4×10 <sup>5</sup> | 5,1×10 <sup>5</sup> | 2,1×10 <sup>5</sup> |
| 3   | MD8,<br>Gelatine       | Schimmel-<br>pilze | 5,1×10 <sup>4</sup> | 3,6×10 <sup>5</sup> | 6,0×10 <sup>5</sup> | 6,8×10 <sup>5</sup> | 5,7×10 <sup>5</sup> | 1,0×10 <sup>5</sup> |
| 4   | PGP, Poly-<br>carbonat | Schimmel-<br>pilze | 1,4×10 <sup>5</sup> | 8,9×10 <sup>5</sup> | 3,7×10 <sup>5</sup> | 2,3×10 <sup>5</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 4,0×10 <sup>5</sup> |
| 5   | PGP, Poly-<br>carbonat | Schimmel-<br>pilze | 1,4×10 <sup>4</sup> | 3,8×10 <sup>5</sup> | 1,8×10 <sup>5</sup> | 6,0×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 5,7×10 <sup>5</sup> |
| 6   | PGP,<br>Gelatine       | Schimmel-<br>pilze | 9×10 <sup>3</sup>   | 6,7×10 <sup>5</sup> | 3,5×10 <sup>5</sup> | 4,1×10 <sup>5</sup> | 1,4×10 <sup>5</sup> | 5,1×10 <sup>5</sup> |
| 7   | PGP,<br>Gelatine       | Schimmel-<br>pilze | 9×10 <sup>3</sup>   | 1,3×10 <sup>5</sup> | 3,4×10 <sup>5</sup> | 3,0×10 <sup>5</sup> | 3,5×10 <sup>4</sup> | 9,5×10 <sup>4</sup> |

# Teil 2 Ringversuch

Tabelle 5: Maximum-, Minimum-, Median und Mittelwerte der einzelnen Meßwerte für die Erfassung luftgetragener Aktinomycceten gemäß Tabelle 3

|     |                        |                        | Maximum             | Minimum             | Median              | Max./<br>Min. | Mittel-<br>wert     | Standard-<br>abweichung |                         |
|-----|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| Nr. | Gerät/<br>Filter       | Para-<br>meter         | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>  |               | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>      | % des Mittel-<br>wertes |
| 1   | MD8,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 30° | 4,9×10 <sup>5</sup> | 4,6×10 <sup>4</sup> | 4,2×10 <sup>5</sup> | 10,7          | 3,3×10 <sup>5</sup> | 1,9×10 <sup>5</sup>     | 58                      |
| 2   | MD8,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 30° | 1,3×10 <sup>6</sup> | 1,3×10 <sup>5</sup> | 5,2×10 <sup>5</sup> | 9,8           | 5,6×10 <sup>5</sup> | 4,0×10 <sup>5</sup>     | 71                      |
| 3   | MD8,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 30° | 1,4×10 <sup>6</sup> | 7,6×10 <sup>4</sup> | 3,9×10 <sup>5</sup> | 18,4          | 5,3×10 <sup>5</sup> | 4,6×10 <sup>5</sup>     | 88                      |
| 4   | PGP, Poly-<br>carbonat | Aktinomy-<br>ceten 30° | 4,7×10 <sup>5</sup> | 1,2×10 <sup>5</sup> | 2,2×10 <sup>5</sup> | 3,9           | 2,5×10 <sup>5</sup> | 1,3×10 <sup>5</sup>     | 52                      |
| 5   | PGP, Poly-<br>carbonat | Aktinomy-<br>ceten 30° | 5,7×10 <sup>5</sup> | 6,5×10 <sup>4</sup> | 1,9×10 <sup>5</sup> | 8,7           | 2,4×10 <sup>5</sup> | 1,9×10 <sup>5</sup>     | 78                      |
| 6   | PGP,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 30° | 7,1×10 <sup>5</sup> | 2,9×10 <sup>4</sup> | 1,9×10 <sup>5</sup> | 24,3          | 2,8×10 <sup>5</sup> | 2,7×10 <sup>5</sup>     | 93                      |
| 7   | PGP,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 30° | 3,9×10 <sup>5</sup> | 3,8×10 <sup>4</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> | 10,2          | 1,9×10 <sup>5</sup> | 1,4×10 <sup>5</sup>     | 71                      |
|     |                        |                        |                     |                     |                     |               |                     |                         |                         |
| 1   | MD8,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 50° | 1,1×10 <sup>6</sup> | 8,0×10 <sup>4</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> | 13,8          | 3,7×10 <sup>5</sup> | 4,2×10 <sup>5</sup>     | 112                     |
| 2   | MD8,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 50° | 2,7×10 <sup>6</sup> | 1,1×10 <sup>5</sup> | 2,3×10 <sup>5</sup> | 25,7          | 8,2×10 <sup>5</sup> | 1,1×10 <sup>6</sup>     | 129                     |
| 3   | MD8,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 50° | 3,4×10 <sup>6</sup> | 4,2×10 <sup>4</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 81,0          | 8,5×10 <sup>5</sup> | 1,3×10 <sup>6</sup>     | 154                     |
| 4   | PGP, Poly-<br>carbonat | Aktinomy-<br>ceten 50° | 1,4×10 <sup>6</sup> | 4,8×10 <sup>4</sup> | 3,3×10 <sup>5</sup> | 29,2          | 4,7×10 <sup>5</sup> | 4,9×10 <sup>5</sup>     | 104                     |
| 5   | PGP, Poly-<br>carbonat | Aktinomy-<br>ceten 50° | 1,4×10 <sup>6</sup> | 4,5×10 <sup>4</sup> | 2,5×10 <sup>5</sup> | 31,1          | 4,4×10 <sup>5</sup> | 5,2×10 <sup>5</sup>     | 118                     |
| 6   | PGP,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 50° | 8,4×10 <sup>5</sup> | 1,3×10 <sup>4</sup> | 2,4×10 <sup>5</sup> | 64,2          | 3,0×10 <sup>5</sup> | 3,2×10 <sup>5</sup>     | 106                     |
| 7   | PGP,<br>Gelatine       | Aktinomy-<br>ceten 50° | 8,9×10 <sup>5</sup> | 8×10 <sup>3</sup>   | 1,5×10 <sup>5</sup> | 111,5         | 2,5×10 <sup>5</sup> | 3,3×10 <sup>5</sup>     | 136                     |

Tabelle 6: Maximum-, Minimum-, Median und Mittelwerte der einzelnen Meßwerte für die Erfassung luftgetragener Schimmelpilze gemäß Tabelle 4

|     |                   |               | Maximum             | Minimum             | Median              | Max./Min. | Mittelwert          | Standardabweichung  |                    |
|-----|-------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Nr. | Gerät/Filter      | Parameter     | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>  |           | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>  | % des Mittelwertes |
| 1   | MD8, Gelatine     | Schimmelpilze | 3,0×10 <sup>5</sup> | 2,8×10 <sup>4</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> | 10,8      | 1,4×10 <sup>5</sup> | 1,1×10 <sup>5</sup> | 77                 |
| 2   | MD8, Gelatine     | Schimmelpilze | 5,4×10 <sup>5</sup> | 8,5×10 <sup>4</sup> | 4,5×10 <sup>5</sup> | 6,4       | 3,8×10 <sup>5</sup> | 1,9×10 <sup>5</sup> | 51                 |
| 3   | MD8, Gelatine     | Schimmelpilze | 6,8×10 <sup>5</sup> | 5,1×10 <sup>4</sup> | 4,7×10 <sup>5</sup> | 13,3      | 3,9×10 <sup>5</sup> | 2,7×10 <sup>5</sup> | 68                 |
| 4   | PGP, Polycarbonat | Schimmelpilze | 8,9×10 <sup>5</sup> | 1,4×10 <sup>5</sup> | 3,0×10 <sup>5</sup> | 6,4       | 3,7×10 <sup>5</sup> | 2,7×10 <sup>5</sup> | 74                 |
| 5   | PGP, Polycarbonat | Schimmelpilze | 5,7×10 <sup>5</sup> | 14×10 <sup>4</sup>  | 1,7×10 <sup>5</sup> | 40,7      | 2,3×10 <sup>5</sup> | 2,1×10 <sup>5</sup> | 93                 |
| 6   | PGP, Gelatine     | Schimmelpilze | 6,7×10 <sup>5</sup> | 9×10 <sup>3</sup>   | 3,8×10 <sup>5</sup> | 74,1      | 3,5×10 <sup>5</sup> | 2,4×10 <sup>5</sup> | 69                 |
| 7   | PGP, Gelatine     | Schimmelpilze | 3,4×10 <sup>5</sup> | 9×10 <sup>3</sup>   | 1,1×10 <sup>5</sup> | 38,1      | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,4×10 <sup>5</sup> | 91                 |

## Teil 2 Ringversuch

Tabelle 7: Ergebnisse der Keimzahlbestimmung einer gesplitteten Luftkeimprobe in unterschiedlichen Labors

|     |           |            |                     |                     |                     |                     |                     | Hohenheim           |             |
|-----|-----------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------|
|     |           |            | Eschborn            | Essen               | Sankt Augustin      | Gießen              | Hohenheim           | Tag der Probenahme  | Veränderung |
| Nr. | Nährboden | Temperatur | KBE/m <sup>3</sup>  | (%)         |
| 1   | GA        | 30 °C      | 8,9×10 <sup>5</sup> | 4,9×10 <sup>5</sup> | 2,4×10 <sup>5</sup> | 6,1×10 <sup>5</sup> | 6,4×10 <sup>5</sup> | 8,2×10 <sup>5</sup> | - 22        |
| 2   | GA        | 50 °C      | 7,1×10 <sup>5</sup> | 1,8×10 <sup>5</sup> | 4,4×10 <sup>5</sup> | 3,6×10 <sup>5</sup> | 4,1×10 <sup>5</sup> | 5,7×10 <sup>5</sup> | - 28        |
| 3   | GA        | 55 °C      | kein Wachst.        | 1,0×10 <sup>5</sup> | kein Wachst.        | 5,8×10 <sup>4</sup> | 5,6×10 <sup>4</sup> | 1,7×10 <sup>4</sup> | + 229       |
| 4   | DIFCO     | 50 °C      | 4,7×10 <sup>5</sup> | 4,7×10 <sup>5</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 2,5×10 <sup>5</sup> | 6,9×10 <sup>5</sup> | 7,2×10 <sup>5</sup> | - 4         |
| 5   | DIFCO     | 55 °C      | 5,1×10 <sup>4</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 1,4×10 <sup>4</sup> | 4,7×10 <sup>4</sup> | 5,4×10 <sup>4</sup> | 8,6×10 <sup>4</sup> | - 37        |
| 6   | DG 18     | 25 °C      | 4,8×10 <sup>5</sup> | 3,0×10 <sup>5</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> | 2,9×10 <sup>5</sup> | 3,8×10 <sup>5</sup> | 3,9×10 <sup>5</sup> | - 3         |

### Anmerkung:

Die Probe wurde durch die Gruppe Hohenheim auf Membranfilter genommen. Direkt nach der Probenahme wurden die Filter suspendiert und eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Das Ergebnis ist in der 2. Spalte von rechts dargestellt. Ein Aliquot der Probe wurde dann von der Uni Hohenheim per Post an die eigene Adresse versandt, wo sie am folgenden Tage eintraf, ebenso wie die anderen Aliquote bei den übrigen Labors. Darauf wurde die auf dem Postweg erhaltene Probe in Hohenheim zeitlich parallel mit allen anderen Arbeitsgruppen untersucht.

Die Spalte „Hohenheim Veränderung“ gibt die prozentuale Veränderung der Hohenheimer Werte zwischen dem am Tag der Probenahme erhaltenen Wert und der Keimzahl, die einen Tag später nach Postversand in Hohenheim ermittelt wurde, wieder.

Tabelle 8: Maximum-, Minimum-, Median und Mittelwerte der einzelnen Meßwerte bei der Keimzahlbestimmung einer gesplitteten Luftkeimprobe gemäß Tabelle 7

|     |           |            | Maximum             | Minimum             | Median              | Max./Min. | Mittelwert          | Standardabweichung  |                    |
|-----|-----------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Nr. | Nährboden | Temperatur | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>  |           | KBE/m <sup>3</sup>  | KBE/m <sup>3</sup>  | % des Mittelwertes |
| 1   | GA        | 30 °C      | 8,9×10 <sup>5</sup> | 2,4×10 <sup>5</sup> | 6,1×10 <sup>5</sup> | 3,7       | 5,7×10 <sup>5</sup> | 2,4×10 <sup>5</sup> | 41                 |
| 2   | GA        | 50 °C      | 7,1×10 <sup>5</sup> | 1,8×10 <sup>5</sup> | 4,1×10 <sup>5</sup> | 3,9       | 4,2×10 <sup>5</sup> | 1,9×10 <sup>5</sup> | 45                 |
| 3   | GA        | 55 °C      | 1,0×10 <sup>5</sup> | 0                   | 5,6×10 <sup>4</sup> | ∞         | 4,4×10 <sup>4</sup> | 4,4×10 <sup>4</sup> | 100                |
| 4   | DIFCO     | 50 °C      | 6,9×10 <sup>5</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 4,7×10 <sup>5</sup> | 3,5       | 4,2×10 <sup>5</sup> | 2,0×10 <sup>5</sup> | 47                 |
| 5   | DIFCO     | 55 °C      | 2,0×10 <sup>5</sup> | 1,4×10 <sup>4</sup> | 5,1×10 <sup>4</sup> | 14,3      | 7,3×10 <sup>4</sup> | 7,3×10 <sup>4</sup> | 100                |
| 6   | DG 18     | 25 °C      | 4,8×10 <sup>5</sup> | 1,6×10 <sup>5</sup> | 3,0×10 <sup>5</sup> | 3,0       | 3,2×10 <sup>5</sup> | 1,2×10 <sup>5</sup> | 37                 |

# Teil 2 Ringversuch

## 4 Diskussion

### 4.1 Teil 1: Probenahme mit anschließender Laborauswertung

Der durchgeführte Versuch erfolgte unter praxisnahen Bedingungen, d.h. jeder Versuchsteilnehmer stellte die Medien selbst her und führte die Beprobung mit den eigenen Meßgeräten und Ausrüstungsgegenständen selbst durch, wobei die Probenahme der Einzelproben für alle Gruppen exakt zeitgleich erfolgte. Während die Laborausarbeitung bei Teil 1 nicht synchronisiert erfolgte, wurde dieser Vorgang in Teil 2 (Aufarbeitung einer gesplitteten Probe) genau zeitgleich durchgeführt.

Es wurde hier bewußt darauf verzichtet, in Analogie zum publizierten Ringversuch über Schimmelpilzmessungen (Averdiek et al., 1997) sämtliche erforderlichen Materialien (Probenahmesysteme, Filter, Nährmedien, Verdünnungslösungen) aus einer Hand zur Verfügung zu stellen. Es sollte auf diese Weise die Streuung der Meßergebnisse ermittelt werden, die bei Praxismessungen durch unterschiedliche Meßinstitute zu erwarten ist.

Die Erfassung von Schimmelpilzen wurde parallel durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der hier gewonnenen Aussagen mit dem publizierten Ringversuch „Schimmelpilze“ zu ermöglichen. In jenem Versuch wurden für die Meßwerte von Schimmelpilzen auf DG18-Agar ein Verhältnis Maxi-

um/Minimum von weniger als 4 ermittelt. Die Standardabweichung lag dort um 40 % oder niedriger bezogen auf den Mittelwert.

Im Vergleich dazu streuen die hier für Schimmelpilze gewonnenen Meßergebnisse deutlich stärker (vgl. Tabelle 6). In 4 Fällen (Zeile 1 – 4) lag das Verhältnis Maximum/Minimum in einer Größenordnung von 10, in den drei übrigen Fällen sogar deutlich höher. Dies war unabhängig davon, ob Gelatine- oder Polycarbonatfilter zum Einsatz kamen.

Für Aktinomyceten bei einer Bebrütungstemperatur von 30 °C wurde in einem Einzelfall (vgl. Tabelle 5) ein Maximum/Minimum-Verhältnis von 3,9 erzielt. In 4 weiteren Fällen lag der Maximalwert um das Zehnfache über dem Minimalwert. In den letzten zwei Fällen war aber ein Verhältnis in einer Größenordnung von 20 zu verzeichnen. Die Standardabweichung aller Resultate lag für Aktinomyceten und eine Bebrütungstemperatur von 30 °C zwischen 52 und 93 % des jeweiligen Mittelwertes.

Somit war in diesem Versuch die Streuung der Daten für Aktinomyceten bei einer Bebrütungstemperatur von 30 °C tendenziell eher noch günstiger als die Streuung der unter den gleichen Bedingungen erhaltenen Werte für Schimmelpilze, die nach der etablierten Methode (TRBA 430) ermittelt wurden.

Für thermophile Aktinomyceten (Tabelle 5, Bebrütungstemperatur 50 °C) wurde im

ersten Teil des Ringversuchs eine höhere Streuung der Meßergebnisse verzeichnet. Das Verhältnis Maximum/Minimum lag in einem Falle in einer Größenordnung von 10 (genau 13,8), in drei weiteren Fällen in einer Größenordnung von 30 und in den letzten drei Fällen über 60 (Spitzenwert über 111). Entsprechend wurde hier auch eine Standardabweichung verzeichnet, die stets größer war als der zugehörige Mittelwert.

Somit kann zusammenfassend für den ersten Versuchsteil festgestellt werden, daß die Streuung der Meßergebnisse in dem hier durchgeführten Ringversuch sowohl für Schimmelpilze als auch für Aktinomyzeten höher war als im publizierten Ringversuch „Schimmelpilze“ (Averdiek et al., 1997).

Es stellt sich die Frage nach den Ursachen. Diese können einerseits im Bereich der Probenahme und andererseits im Bereich der Laboraufarbeitung liegen.

#### *Probenahme:*

- Die Verteilung der Mikroorganismen in der Luft ist wahrscheinlich nicht homogen, so daß auftretende Schwankungen in den Meßergebnissen z.T. auf die real existierenden Konzentrationsschwankungen zurückzuführen sind.
- Die Meßgeräte waren nicht speziell kalibriert worden. Im Gegensatz zum PGP-System ist beim Sartorius MD8 keine Kontrolle des Volumenstroms über einen

Durchflußmesser möglich. Ein Teilnehmer berichtete auch von deutlichen Abweichungen vom nominalen Volumenstrom bei seinem MD8-System. Diese Beobachtungen waren jedoch zu einem weiter zurückliegenden Zeitpunkt gemacht worden. Aus den hier erhaltenen Ergebnissen läßt sich jedoch keine höhere Streuung der Daten für das MD 8 im Vergleich zum PGP-System ersehen.

- Die Zeit zwischen Probenahme und Aufarbeitung war nicht standardisiert. Da der Transport aber trocken und bei Umgebungstemperatur (vgl. 2.1.1) erfolgte, sind für Sporen keine deutlichen Konzentrationsabnahmen zu erwarten. Dies wird auch in der Literatur für Schimmelpilze berichtet sowie für thermophile Bakterien (Thorne et al., 1994). Es wurde im Rahmen der Arbeiten nicht weiter untersucht, ob und zu welchem Anteil auch Hyphenfragmente in der Luft enthalten waren, die eine geringere Austrocknungstoleranz haben dürften und für die damit eine Konzentrationsabnahme eher zu erwarten wäre.

#### *Laboraufarbeitung:*

- Der Glycerin-Argin-Agar ist aus vergleichsweise zahlreichen Komponenten zusammengesetzt, so daß hier bei der Herstellung möglicherweise Fehler vorkommen können, die zu unterschiedlichen Eigenschaften des Nährbodens

# Teil 2 Ringversuch

der verschiedenen Labors geführt haben könnten.

- In Art und Geschwindigkeit der Aufarbeitung wie auch den Inkubationsbedingungen (Temperaturschwankungen der Brutschränke, relative Luftfeuchte bei der Bebrütung) kann es Unterschiede zwischen den einzelnen Labors geben, die sich in Ergebnisschwankungen ausdrücken. Vergleichsweise hohe Konzentrationen wurden von der Gruppe Gießen festgestellt, die neben einer relativ schnellen Aufarbeitung nach Probenahme (ca. 5 h) auch versuchte, durch die Inkubation von Petrischalen mit feuchter Watte in den verschlossenen Kunststoffbeutel eine besonders hohe Luftfeuchte zu erzielen.
- Die beteiligten Versuchsteilnehmer besitzen Erfahrungen in der Erfassung von Arbeitsplatzkonzentrationen für biologische Agenzien, sind jedoch keine ausgewiesenen Spezialisten auf dem Gebiet der Aktinomyceten. Daher könnten die Schwankungen der Meßergebnisse auch in einer unterschiedlichen Interpretation der kultivierten Platten begründet sein. Die gewählten Kultivierungsbedingungen für thermophile Aktinomyceten gewährleisten jedoch ein weitgehend ausschließliches Wachstum dieser Keimgruppe (Kutzner, mdl. Mitteilung).

## 4.2 Teil 2: Zusätzliche Laboraufarbeitung einer gesplitteten Probe

Bei der Abschlußbesprechung des 1. Versuchsteils wurde vereinbart, einen weiteren Versuch durchzuführen. Es sollte ermittelt werden, ob die gefundene Streuung der Resultate im Bereich der Probenahme oder der Laboraufarbeitung zu suchen ist.

Daher wurden Gelatinefilter einer Luftprobe gemeinsam suspendiert, in verschiedene Aliquote geteilt und dann nach Postversand getrennt durch unterschiedliche Labors aufgearbeitet und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt, die Daten in Tabelle 8 hinsichtlich ihrer Streuung analysiert.

Die Daten zeigen sowohl für Schimmelpilze wie auch für Aktinomyceten bei den Bebrütungstemperaturen 30 °C und 50 °C ein Verhältnis Maximum/Minimum zwischen 3 und 4. Diese Streuung wurde auch im ersten Ringversuch für die Bestimmung von Schimmelpilzen ermittelt (Averdiek et al., 1997).

Für die hier noch zusätzlich gewählte Inkubationstemperatur von 55 °C wurde aber eine sehr hohe Streuung verzeichnet. So konnte auf GA-Agar in zwei Fällen hier gar kein Wachstum festgestellt werden. Offensichtlich ist diese Temperatur für die in der Luftprobe enthaltenen Aktinomyceten an der oberen Grenze ihrer Wachstumsfähigkeit. Damit können auch geringfügige

Schwankungen der Temperaturen, wie sie in Brutschränken auftreten können, deutliche Auswirkungen haben (die Schwankungsbreite der Temperatur in den Brutschränken wurde hier nicht aufgezeichnet).

Auffällig ist auch, daß fehlendes Wachstum beim GA-Agar verzeichnet wurde, während beim komplexen DIFCO-Agar lediglich große Schwankungen zu verzeichnen waren. Der nährstoffreichere Nährboden fördert offensichtlich die Überlebensfähigkeit in Grenzbereichen.

Beim Vergleich beider Nährböden bei der Bebrütungstemperatur 50 °C wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen festgestellt. Beide Nährböden ergeben vergleichbare Keimzahlen und vergleichbare Schwankungsbreiten der Daten.

Somit kann für die Laboraufarbeitung festgestellt werden, daß das hier durchgeführte Verfahren mit Glycerin-Arginin-Agar bei Durchführung in unterschiedlichen Labors vergleichbare Ergebnisse bringt. Diese haben eine ähnlich Qualität wie die Ergebnisse, die für das etablierte Verfahren für die Ermittlung der Konzentration an luftgetragenen Schimmelpilzen erhalten wurden.

Der DIFCO-Aktinomycceten-Agar ist eine Alternative zum in der KAN-Studie (Teil 1 dieser Broschüre) vorgestellten Glycerin-Arginin-Agar, die hinsichtlich der ermittelten Konzentrationen für thermophile Aktinomycceten vergleichbar ist.

Als Bebrütungstemperatur sollte 50 °C gewählt werden.

## 5 Empfehlungen

Es wird empfohlen, das hier durchgeführte Verfahren zur Ermittlung der Konzentration von Aktinomycceten in der Arbeitsplatzatmosphäre an die zuständigen Gremien weiterzuleiten. Dazu sollte eine detaillierte Verfahrensweisung ausformuliert werden.

Die für die Laborphase in der KAN-Studie gemachten Vorschläge sind grundsätzlich geeignet, sollten ggf. noch ergänzt werden durch die in diesem Ringversuch gewonnenen Erfahrungen (z. B. DIFCO-Medium als alternatives Medium).

Hinsichtlich der Probenahme erscheinen die im Ringversuch festgestellten Schwankungen noch zu hoch und müssen durch geeignete Maßnahmen verringert werden. Mögliche Verbesserungen lassen sich z. B. durch eine zeitnahe Kalibrierung der Sammler erreichen. Entsprechende Anweisungen sollten noch formuliert werden, wobei dies durchaus im Verlauf des Diskussionsprozesses in den zuständigen Gremien erfolgen kann.

Nach mündlicher Auskunft von Prof. Schaal, Bonn, dem kultivierte Petrischalen für eine qualitative Bewertung überlassen wurden, befanden sich unter den gewachsenen Kolonien kaum medizinisch

## Teil 2 Ringversuch

wichtige thermophile Aktinomyceten. Ob dies auf eine entsprechende Selektivität des Mediums oder auf eine entsprechende Zusammensetzung der beprobten Luft hindeutet, kann nicht ausgesagt werden.

Der hier dokumentierte Ringversuch stellt eine Methodenevaluation verschiedener Labors dar, wobei lediglich ein Ort beprobt wurde, was bei generalisierenden Aussagen berücksichtigt werden muß.

## 6 Literatur

Averdiek, B.; Deininger, C.; Engelhart, S.; Missel, T.; Philipp, W.; Riege, F. P.; Schicht, B.; Simon, R. (1997): Bestimmung der Konzentration biologischer Arbeitsstoffe in der Luft am Arbeitsplatz. Erster Ringversuch „Schimmelpilze“. Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft, **57**, 129 – 136

Thorne, P. S.; Lange, J. L.; Bloebaum, P.; Kullmann, G. (1994): Bioaerosol sampling in field studies: Can samples be express mailed?. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., **55**, 1072 – 1079

TRBA 430 (1997): Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe: Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz, BArbBl. Nr. 10, S. 74 – 77

## Teil 3

# Vorschlag für eine Meßstrategie zur Erfassung luftgetragener thermophiler Aktinomycceten in der Arbeitsplatzatmosphäre

Nachfolgend werden Empfehlungen für ein Meßverfahren zur Erfassung von vermehrungsfähigen luftgetragenen thermophilen Aktinomycceten gegeben. Die Erfassung erfolgt durch ein kulturelles Verfahren. Die Keimkonzentration wird angegeben in KBE (koloniebildende Einheiten) pro m<sup>3</sup> Luft.

## 1 Probenahmeverfahren

### 1.1 Probenahmestellen

- Die Probenahme sollte in Atemhöhe der Beschäftigten erfolgen. Dazu ist vor Beginn der Probenahme eine Ermittlung der Verhältnisse vor Ort durchzuführen, um die Stellen zu definieren, an denen eine Exposition der Arbeitnehmer durch luftgetragene thermophile Aktinomycceten insbesondere über die Atemluft stattfinden kann.

### 1.2 Vorbereitung der Probenahme

- Die Situation am Arbeitsplatz sollte wie in der BIA-Verfahrensbeschreibung 9411 beschrieben erhoben werden. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die Frage, ob das Auftreten thermophiler Aktinomycceten in der Arbeitsplatzatmosphäre des betreffenden Arbeitsplatzes überhaupt zu erwarten ist.

- Der Luftdurchfluß der Keimsammler sollte maximal vier Wochen vor der Beprobung kalibriert worden sein. Bevorzugt sollten solche Keimsammler verwendet werden, die mit einem Durchflußmesser ausgestattet sind und so eine Kontrolle des Luftflusses während der Probenahme ermöglichen. Derartige Durchflußmesser sollten entsprechend kalibriert sein (vgl. Teil 2, Kap. 5).

### 1.3 Probenahme

- Die Probenahme sollte mit dem Membranfilterverfahren erfolgen, wobei generell sowohl Polycarbonat- als auch Gelatinefilter eingesetzt werden können.
- Für eine orientierende Messung sollten mindestens drei Proben an einer Probenahmestelle gezogen werden.
- Für Schichtmessungen gelten die in der BIA-Verfahrensbeschreibung 9411 bzw. in der TRBA 405 gemachten Vorgaben.
- Es wird eine Probenahmezeit von mindestens 10 Minuten empfohlen. Eine Probenahmezeit von einer Stunde sollte nicht überschritten werden.
- Als Referenz sollte eine Probenahme in der Umgebung der Anlage (Iuv) durchgeführt werden, wobei auch diese Probenahme jeweils mindestens drei Einzelproben pro Probenahmestelle umfassen sollte.

## Teil 3

# Vorschlag für eine Meßstrategie zur Erfassung luftgetragener thermophiler Aktinomyceten in der Arbeitsplatzatmosphäre

## 2 Transport<sup>1</sup>

- Die Proben können trocken bei Umgebungstemperatur (maximal 25 °C) transportiert werden.
- Während des Transports sollen die Filter in entsprechenden Behältnissen vor Sonnenlicht, übermäßiger Feuchtigkeit oder Trockenheit, Staub und insbesondere dem Zutritt von Keimen geschützt werden.
- Die Transportzeit sollte in der Regel 24 Stunden nicht überschreiten.

## 3 Laboraufarbeitung

- Die Membranfilter sollten in einem angemessenen Volumen physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl versetzt mit 0,01 % Tween 80) suspendiert werden (z. B. 10 ml für 85 mm Gelatinefilter, bei 37 mm Gelatinefilter 5 ml).
- Die Filter sollen in der Stammlösung 15 bis maximal 30 Minuten bei einer Temperatur von 35 – 40 °C geschüttelt werden.

- Es ist ggf. eine dekadische Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,01 % TWEEN 80 anzusetzen.
- Von jeder Verdünnungsstufe sollten mindestens zwei gleiche Aliquote auf einen entsprechenden Nährboden ausgespatelt werden. Sofern notwendig, müssen die Platten vorgetrocknet werden.
- Als Medien lassen sich mit Glycerin-Arginin-Agar (mit jeweils 50 µg/ml Cykloheximid und Nystatin<sup>2</sup>) und mit Aktinomyceten-Agar (Difco, angesetzt nach Herstellervorschrift) vergleichbare Ergebnisse erzielen. Diese werden daher zunächst vorgeschlagen.<sup>3</sup>
- Für thermophile Aktinomyceten wird eine Bebrütungstemperatur von 50 °C vorgeschlagen bei einer Bebrütungszeit von maximal 14 Tagen.
- Wegen der langen Bebrütungsdauer muß das Austrocknen verhindert werden. Dazu sollte pro Petrischale 40 ml Agar verwendet werden, sofern nicht sichergestellt ist, daß ein Austrocknen der inokulierten Nährböden auf andere

---

1) Der genaue Einfluß der Temperatur und anderer Transportbedingungen sollte noch systematisch untersucht werden.

2) Eine konzentrierte Stammlösung von Nystatin läßt sich in DMSO herstellen.

3) Diese Medien ergaben mit Praxisproben bei unterschiedlichen Labors vergleichbare Werte. Es wurde bislang nicht das Kulturverhalten verschiedener Aktinomyceten-Typstämme geprüft. Möglicherweise könnten hier komplexe Medien noch bessere Ergebnisse bringen. Bei der Verwendung derartiger Medien müßte die Vergleichbarkeit von Meßergebnissen unterschiedlicher Labors durch Ringversuche hinreichend belegt werden.

Weise für die Dauer der Bebrütung zuverlässig verhindert wird. Stapel von inokulierten Platten sollten in Kunststoffbeuteln inkubiert werden. Es ist empfehlenswert, auf der Ober- und Unterseite der in den Beuteln befindlichen Plattenstapel leere Petrischalen mit feuchter Watte einzuschließen.

#### 4 Auswertung

- Eine Zwischenablesung sollte nach einer Woche erfolgen, die Endauswertung nach 14 Tagen.
- Für die Auswertung sind die gleichen Kriterien wie für Schimmelpilze anzulegen (vgl. TRBA 430, BIA-Verfahrensbeschreibung 9420).
- Es wird empfohlen, Einzelkolonien von Kultivaren, deren Anteil an der Gesamtzahl der erfaßten Aktinomyzeten (bewertet anhand ihrer Koloniemorphologie) höher als 10 % liegt, zu isolieren, damit sie für eine evtl. notwendige genaue systematische Zuordnung (z. B. über Fingerprints) zugänglich bleiben.

## 5 Medien

### 5.1 Glycerin-Arginin-Agar

Die Zusammensetzung ist nachfolgend beschrieben.

|  |          |
|--|----------|
| Glycerin                               | 12,5 g/l |
| L-Arginin                              | 1,0 g/l  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 0,3 g/l  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 0,7 g/l  |
| MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O | 0,5 g/l  |
| NaCl                                   | 1,0 g/l  |
| Spurenelemente                         | 1,0 ml   |
| Agar                                   | 12 g/l   |

Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt.

Spurenelement-Lösung: Die Substanzen werden getrennt in Wasser gelöst und zur EDTA-Lösung gegeben. Danach wird der pH-Wert auf etwa 4 eingestellt und die Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

|   |          |
|---|----------|
| EDTA                                    | 500 mg/l |
| FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O  | 300 mg/l |
| MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O  | 3 mg/l   |
| CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O  | 5 mg/l   |
| CuCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O  | 1 mg/l   |
| NiCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O  | 2 mg/l   |
| NaMoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O | 3 mg/l   |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O  | 5 mg/l   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>          | 2 mg/l   |

## Teil 3

# Vorschlag für eine Meßstrategie zur Erfassung luftgetragener thermophiler Aktinomyceten in der Arbeitsplatzatmosphäre

Nach dem Autoklavieren werden Nystatin und Cykloheximid in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

### 5.2 Aktinomyceten-Agar (DIFCO)

Hierbei handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Medium, das über den Fachhandel zu beziehen ist und nach Herstellerangaben angesetzt wird.

## 6 Literatur

BIA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen, Loseblattsammlung, Hg.: Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit (BIA), Erich Schmidt Verlag, Bielefeld

- Verfahrensbeschreibung 9411: Anwendung von Meßverfahren für luftgetragene biologische Arbeitsstoffe
- Verfahrensbeschreibung 9420: Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz

TRBA 405 (1997): Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe: Anwendung von Meßverfahren für luftgetragene biologische Arbeitsstoffe, BArbBl., Nr. 1, S. 47 – 50

TRBA 430 (1997): Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe: Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz, BArbBl., Nr. 10, S. 74 – 77