

## **Entwicklung und Erprobung eines Impinger-Messverfahrens zur Emissionsmessung von Mikroorganismen**

**Dr. Andrea Gärtner und Andreas Gessner**

Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen, Essen

**Dr. Rudolf Rabe und Michael Mehring**

Labor Dr. Rabe HygieneConsult, Essen

### **Kurzfassung**

Das Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen hat in Zusammenarbeit mit dem Labor Dr. Rabe HygieneConsult ein Messprogramm an einem Bioaerosolprüf-Kanal initiiert. Ziel war es, auf Basis der Impingement-Methode eine Datengrundlage zur Beschreibung und späteren Standardisierung eines Emissionsmessverfahrens für Mikroorganismen zu erarbeiten. Als Vertreter unterschiedlicher Bakterien und Pilze wurden die Testorganismen *Bacillus subtilis*, *Penicillium brevicompactum* und *Staphylococcus epidermidis* eingesetzt. Die Sammlung der Mikroorganismen erfolgte mit einem modifizierten AGI 30-Impinger.

Als geeignete Absaugrate wurde bei einem Düsendurchmesser des Impingers von 1,23 mm ein Volumenstrom von 0,6 m<sup>3</sup>/h ermittelt. Eine Füllmenge von 32 ml erwies sich im Hinblick auf Flüssigkeitsverluste bei der Probenahme als besonders günstig. Die Probenahmedauer hatte im Bereich von 10 bis 60 Minuten keinen Einfluss auf die Sammeleffizienz. Ein Zusatz von Tween 80® erhöhte die Abscheideleistung des Impingers um das Fünf- bis Sechsfache, ohne toxisch auf die abgeschiedenen Bakterien zu wirken oder sie zum Wachstum anzuregen. Als Standardabweichung unter Wiederholbedingungen wurden für alle Testorganismen Werte unter 20 % ermittelt. Die Wiederfindungsrate war für die einzelnen Mikroorganismen uneinheitlich, sie betrug für *Bacillus subtilis* 100 %. Erste Versuche zeigen die Eignung des Impingement-Verfahrens zur Emissionsmessung von Mikroorganismen an emittierenden Anlagen.

### **Abstract**

In cooperation with the Institute "Labor Dr. Rabe HygieneConsult" the North Rhine-Westphalia State Environment Agency has started developing a measurement method for the determination of microorganism emissions on the basis of liquid impingement. Different concentrations of the test organisms *Bacillus subtilis*,

*Penicillium brevicompactum* and *Staphylococcus epidermidis* were dosed at constant flow rates into a test tunnel. For the collection of the microorganisms a slightly modified AGI 30- impinger was used. Different measurement parameters as flow rate, fill and sampling time were tested as well as the composition of the sampling liquid. The most important result was that an addition of 0,01 % Tween 80® to the sampling liquid increases the collection efficiency by a factor of at least five. This Tween 80®-concentration was proved not to be toxic or growth-stimulating for the microorganisms. In addition, performance characteristics as standard deviations from parallel measurements and detection limits were determined.

## **1. Einleitung**

Mikroorganismen werden größtenteils von Tierhaltungs-, Abfallbehandlungs- und Entsorgungsanlagen emittiert. Obwohl aus dem Bereich der Arbeitsmedizin bekannt ist, dass luftgetragene Mikroorganismen beim Menschen Atemwegserkrankungen und allergische Reaktionen auslösen können, gibt es bisher noch kein Messverfahren, mit dem Emissionen dieser Stoffe aus Anlagen verlässlich ermittelt werden können. Ein wichtiger Grund hierfür ist, dass Mikroorganismen hauptsächlich im Bereich des Arbeitsschutzes gemessen werden und die dort verwendeten Messmethoden nicht ohne weiteres für Emissionsmessungen eingesetzt werden können. Für die Beurteilung von Anlagenemissionen und Emissionsminderungsmaßnahmen ist jedoch die Anwendung standardisierter Verfahren eine grundlegende Voraussetzung, da nur so eine Vergleichbarkeit von Messergebnissen gewährleistet ist.

Messverfahren zur Emissionsmessung von Mikroorganismen müssen einige grundsätzliche Anforderungen erfüllen. Da die erfassten Mikroorganismen durch Kultivierung nachgewiesen werden, sollte ihre biologische Sammeleffizienz möglichst hoch sein. Die Probenahmesysteme müssen in warmer und wasserdampfgesättigter Abluft eingesetzt werden können und, da Mikroorganismen auch partikelgebunden auftreten, für eine isokinetische Probenahme geeignet sein. Des Weiteren sollten im Hinblick auf die Vorgaben der TA Luft [1] Einzelmessungen über einen Zeitraum von 30 Minuten zur Berechnung von Halbstundenmittelwerten möglich sein. Sind außerdem noch gesundheitliche Wirkungen von Mikroorganismen zu berücksichtigen, ist die Erfassung der einatembaren Fraktion erforderlich. Von den gebräuchlichen Sammelmethoden zur Ermittlung der Konzentration luftgetragener Mikroorganismen bietet sich an, die Abscheidung durch Impingement als Basis eines Emissionsmessverfahrens zu nehmen, da diese Methode alle oben genannten Anforderungen erfüllen kann. Ein Impingement-Verfahren wird darüber hinaus zur Zeit auch zur Erfassung luftgetragener Bakterien in der Außenluft im Rahmen der

VDI-Richtlinie 4252 Blatt 3 [2] standardisiert, so dass eine Vergleichbarkeit von Emissions- und Immissionsdaten möglich wäre.

Das Landesumweltamt NRW hat zur Entwicklung eines Emissionsmessverfahrens in Zusammenarbeit mit dem Labor Dr. Rabe HygieneConsult ein Messprogramm am dort zur Verfügung stehenden Bioaerosol-Prüfkanal initiiert. Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen war es, eine Datengrundlage zur Beschreibung und anschließenden Standardisierung eines Emissionsmessverfahrens für Mikroorganismen zu erarbeiten. Anhand verschiedener Testorganismen wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Probenahmebedingungen wie z.B. Probenahmedauer und Zusammensetzung der Sammelflüssigkeit auf die Abscheidung der Mikroorganismen auswirken. Aus parallelen Probenahmen mit zwei Messeinrichtungen wurden einige Verfahrenskenngrößen für die untersuchten Mikroorganismen bestimmt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Eingesetzte Testorganismen**

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden als Vertreter unterschiedlicher Bakterien und Pilze folgende Mikroorganismen verwendet: Sporen des grampositiven Bakteriums *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), Conidiosporen des Schimmelpilzes *Penicillium brevicompactum* (CBS Kultur) und vegetative Zellen des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus epidermidis* (DSMZ 20044).

### **2.2 Beschreibung des Bioaerosolkanals und Dosierung der Mikroorganismen**

Der Bioaerosol-Prüfkanal hat eine Gesamtlänge von 13,1 m und einen quadratischen Querschnitt von 0,372 m<sup>2</sup> mit einer Kantenlänge von 610 mm. Der Luftstrom wird mittels eines Radiallüfters durch den Kanal gesaugt erzeugt. Die befeuchtete Zuluft wird nach Eintritt in den Kanal mit Hilfe eines Schwebstofffilters (Filterklasse HEPA 13) gereinigt. Hiermit werden alle Partikel in der Größenklasse der verwendeten Mikroorganismen zu mehr als 99,99 % zurück gehalten. Hinter dem Schwebstofffilter erfolgt die Eindüsung der Mikroorganismensuspension in den Luftstrom. Einbauten im Kanalquerschnitt sorgen für eine turbulente Strömung und Ausbildung einer homogenen Aerosolverteilung.

Zur Dosierung der Mikroorganismen wurden die oben beschriebenen Testorganismen in Reinkultur vermehrt und aus diesen Kulturen jeweils Suspensionen hergestellt. Die Zerstäubung der Mikroorganismen-Suspensionen erfolgte mit einem hydropneumatischen Zweistoff-Düsenzerstäuber (Düsendurchmesser: 0,5 mm). Durch Einstellung des Zerstäubungsluftdruckes und

des Flüssigkeitsdurchsatzes wurde Tröpfchenzahl und Keimdichte in der Suspension so auf einander eingestellt, dass in einem Tröpfchen höchstens ein Mikroorganismus enthalten ist. Die Durchflussrate der Keimsuspension wurde während der Messungen online registriert und gegebenenfalls reguliert.

### **2.3 Probenahme der Mikroorganismen**

Die Probenahmen wurden mit einer Absaugeinrichtung der Fa. Breitfuss, Typ MPN-E durchgeführt, deren Saugleistung zwischen 0,5 m<sup>3</sup>/h und 5 m<sup>3</sup>/h (Norm, trocken) einstellbar ist. Zur Probenahme wurde mit einer 50 cm langen Probenahmesonde (90° Winkel) ein Teilvolumenstrom unter leicht überisokinetischen Bedingungen aus der Mitte des Strömungskanals entnommen. Die Abscheidung der Mikroorganismen erfolgte in mit Flüssigkeit gefüllten Impinger-Flaschen. Hierfür wurden Flaschen und Einlassrohre angefertigt, die gegenüber dem AGI-30 Impinger [3] um jeweils 40 mm verlängert sind, um den Überlauf von Reagenzflüssigkeit zu verringern. Der Abstand zwischen Düse und Flaschenboden beträgt wie beim Original AGI 30-Impinger 30 mm. Der mittlere Innendurchmesser der Düsen wurde zu  $1,23 \pm 0,01$  mm bestimmt (n = 35). Als Schutzeinrichtung für das Absaugsystem wurden ein Kondensatabscheider sowie ein Trockenturm zwischengeschaltet. Abhängig vom durchzuführenden Versuch wurde ein Impinger eingesetzt oder es wurden zwei Impinger hintereinander geschaltet. Alle luftführenden Teile und Verbindungsstücke einschließlich Kondensatabscheider bestehen aus Geräteglas, sind mit Kugel- und Pfannenschliff KS 19 ausgestattet und werden durch Schliffklammern miteinander verbunden. Die Verbindung mit dem Trockenturm und der Absaugeinrichtung erfolgt über einen Gewebes Schlauch.

Zur Untersuchung der Bedingungen im Prüfkanal und zur Bestimmung des Volumenstroms im Kanal wurden Temperatur, Strömungsgeschwindigkeit, Feuchte und statischer Druck im Kanal mit entsprechenden Messgeräten sowie Temperatur, Feuchte, Luftdruck am Bioaerosolkanal erfasst.

An jedem Versuchstag wurden auch Blindwerte ermittelt. Hierfür wurden die Impinger wie oben beschrieben vorbereitet, zur Messung mitgenommen, aber keine Mikroorganismen durchgesaugt. Die Sammelflüssigkeit wurde anschließend wie die anderen Proben aufbereitet. Bei keiner Versuchsreihe konnten Blindwerte nachgewiesen werden.

#### **2.4.1 Analyse der Proben und Auswertung der Ergebnisse**

Nach Beendigung der Probenahmen wurden die Impinger mit Alufolie verschlossen und sofort auf ca. 4°C gekühlt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte innerhalb von

24 h nach Ende der Probenahme. Aus den Proben wurden Verdünnungsreihen mit drei dekadischen Verdünnungsstufen hergestellt und aus jeder Verdünnungsstufe je 100 µl Suspension in dreifacher Wiederholung auf Nährbodenplatten ausgestrichen. Bei niedrigen Bioaerosolkonzentrationen wurden unmittelbar aus der Probenflüssigkeit 100 µl Suspension ausgestrichen bzw. 1 ml bis 10 ml Suspension membranfiltriert und die Filter auf Nährböden aufgelegt. Die Bakterien wurden auf CASO-Nährböden bei 36°C zwei Tage lang und die Pilzkulturen auf DG 18-Nährböden bei 25°C fünf Tage lang bebrütet. Die Zählung und Auswertung der gewachsenen Kolonien erfolgte wie in VDI 4253 Blatt 2 und Blatt 3 [4,5] beschrieben. Unter Berücksichtigung des Endvolumens in der Impingerflasche und des Luft-Probenvolumens wurden die KBE/Impingerflasche bzw. KBE/m<sup>3</sup> (KBE = Kolonie bildende Einheiten) berechnet.

### **3. Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1 Laborversuche zur Ermittlung der Probenahmebedingungen**

Bei der Probenahme durch Impingement wird ein definiertes Luftvolumen beim Durchströmen einer Düse auf eine hohe Geschwindigkeit beschleunigt und die im Luftvolumen befindlichen Mikroorganismen in einer Sammelflüssigkeit abgeschieden und dort angereichert. Die Geschwindigkeit der angesaugten Luft kann im engsten Querschnitt der Düse maximal Schallgeschwindigkeit annehmen. In diesem Zustand ist der Massenfluss durch die Düse konstant und kann nicht mehr weiter erhöht werden.

Zur Ermittlung geeigneter Probenahmebedingungen für Emissionsmessungen wurden zunächst in Laborversuchen fünf der vorhandenen Impingerflaschen mit jeweils 30 ml H<sub>2</sub>O dest. befüllt und Luft durch die Flaschen gesaugt. Dabei wurde die Absaugrate stufenweise erhöht und gleichzeitig der statische Druck im Probenahmesystem zwischen Gasausgang des Impingers und Gaseingang der Pumpe gemessen. Mit zunehmendem Volumenstrom sinkt der Druck im Mess-System bis eine weitere Erhöhung des Volumenstroms nicht mehr möglich ist. Dies ist bei den im LUA verwendeten Impinger-Flaschen bei einer Absaugrate von 0,68 m<sup>3</sup>/h erreicht. Die Messpunkte der einzelnen Flaschen zeigen dabei eine gute Übereinstimmung.

Mit sinkendem Druck im Mess-System erhöht sich auch der Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung der Sammelflüssigkeit. Tabelle 1 zeigt die Zunahme der relativen Flüssigkeitsverluste in Abhängigkeit der Absaugrate bei einer Füllmenge von 30 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung mit 0,01%igem Tween 80® -Zusatz und einer Probenahmezeit von 30 min. Ein weiterer Nachteil bei Messungen mit niedrigem Druck ist, dass aufgrund der entstehenden Verdunstungskälte und der Abkühlung

der Probenluft durch die Expansion nach der Düse die Gefahr des Einfrierens der Sammelflüssigkeit besteht. Zusätzlich erhöht sich bei zu großem Unterdruck die Möglichkeit von Leckagen im Messsystem. Aus diesen Gründen ist es empfehlenswert, bei der Probenahme mit den hier verwendeten Impingern eine Absaugrate von 0,6 m<sup>3</sup>/h nicht zu überschreiten.

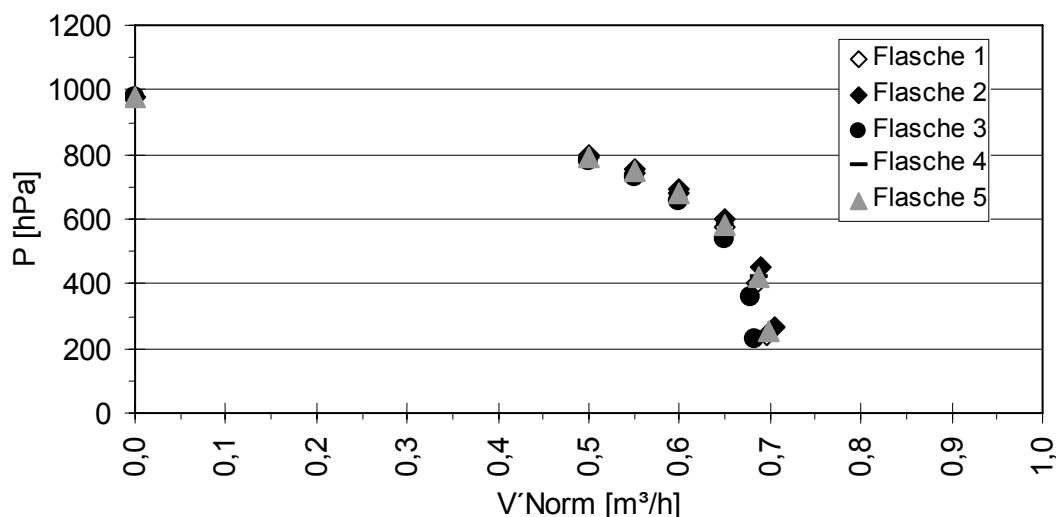


Bild 1: Statischer Druck im Impinger in Abhängigkeit vom Volumenstrom

Tabelle 1: Flüssigkeitsverluste in Abhängigkeit vom Druck

Gesamtzahl der Proben	Absaugrate [m <sup>3</sup> /h]	Druck [hPa]	Rel. Verlust [%]
24	0,5	782	13,2 ± 2,5
51	0,6	690	16,1 ± 3,7
10	0,65	574	19,7 ± 1,5
20	0,67	326	21,5 ± 3,2

Für den AGI 30-Impinger wird für den Betrieb als kritische Düse ein Trenndurchmesser (cut-off) von 0,3 µm angegeben [6]. Das bedeutet, dass unter diesen Probenahmebedingungen 50 % der Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von 0,3 µm impaktiert werden. Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von 1 µm und mehr werden nahezu vollständig impaktiert. Geht man

davon aus, dass sich die Abscheidung im Impinger im Wesentlichen durch Impaktion beschreiben lässt, kann der aerodynamische Trenndurchmesser der Partikel nach Gleichung 1 [6] berechnet werden. Zur Abschätzung des Impaktionswirkungsgrades des von uns verwendeten Impingers errechnet sich nach Gleichung 1 für eine Absaugrate von 0,6 m<sup>3</sup>/h und einem Düsendurchmesser von 1,23 mm ein Trenndurchmesser von 0,58 µm. Damit ist sichergestellt, dass beim Impingement auch kleine Bakterien bzw. Bakteriensporen weitgehend vollständig impaktiert werden.

Gleichung 1:

$$d_{(ae)_{50}} = \sqrt{\frac{9\pi Stk_{50}\eta d^3 N}{4C\rho_p\dot{V}}}$$

$d_{(ae)_{50}}$	Trenndurchmesser	$St_{50}$	Stokeszahl
$\eta$	dynamische Viskosität des Trägergases	N	Anzahl der Düsen
d	Durchmesser der Düse	$\rho_p$	Partikeleinheitsdichte
C	Cunningham-Faktor	$\dot{V}$	Volumenstrom

### 3.2 Messungen am Bioaerosol-Prüfkanal

#### 3.2.1 Füllmenge

Zur Ermittlung einer geeigneten Füllmenge wurde der relative Verlust von Sammelflüssigkeit, der bei der Autoklavierung der befüllten Impinger-Flaschen und der Probenahme entstehen, ermittelt. Flüssigkeitsverluste können sowohl durch Verdunstung als auch durch Flüssigkeitsaustrag auftreten. Als Sammelflüssigkeiten wurden 0,9%ige NaCl-Lösung und 0,9%ige NaCl-Lösung mit einem Zusatz von 0,01% Tween 80® verwendet. Bei einer Probenahmedauer von 30 min wurden jeweils Füllmengen von 20 ml, 30 ml und 50 ml getestet. Zur Berechnung der Flüssigkeitsverluste wurden die Impingerflaschen inkl. Flüssigkeit vor und nach den Probenahmen gewogen.

Die bei den Probenahmen gemessenen relativen Flüssigkeitsverluste (Tabelle 2) sinken erwartungsgemäß mit zunehmender Füllmenge der Sammelflüssigkeit, weil die Verdunstung unabhängig von der Füllmenge konstant ist. Bei Tween 80®-Zusatz tritt durch das Schäumen der Sammelflüssigkeit bei einer Füllmenge von 30 ml ein geringer und bei einer Füllmenge von 50 ml ein hoher Flüssigkeitsaustritt auf.

Der Flüssigkeitsverlust durch das Autoklavieren der Flaschen beträgt ca. 5 % bei 30 ml Füllmenge. Somit ist bei einer Probenahmezeit von 30 min und bei Verwendung von 0,9%iger NaCl-Lösung mit Tween 80® als Sammelflüssigkeit eine Füllmenge von 32 ml empfehlenswert, um Flüssigkeitsverluste durch das Autoklavieren zu kompensieren und nach der Probenahme genügend Probenmaterial für die Kultivierung der Mikroorganismen zur Verfügung zu haben.

Tabelle 2: Verluste von Sammelflüssigkeit bei der Probenahme mit Impingern (Absaugrate: 0,6 m<sup>3</sup>/h; Probenahmedauer: 30 min)

Gesamtzahl der Proben	Sammel- flüssigkeit	Füllmenge vor Probenahme [ml]	Rel. Flüssigkeits- verlust [%]
12	ohne Tween 80®	20	20,7 ± 3,1
33	ohne Tween 80®	30	13,3 ± 4,9
6	ohne Tween 80®	50	8,4 ± 1,7
12	mit Tween 80®	20	21,5 ± 3,0
51	mit Tween 80®	30	16,1 ± 3,7
5	mit Tween 80®	50	34,6 ± 2,2

### 3.2.2 Probenahmedauer

Zur Untersuchung, ob mit zunehmender Probennahmedauer mit dem Impingement-Verfahren eine Schädigung der Mikroorganismen auftritt, wurden für *Bacillus subtilis* und *Penicillium brevicompactum* unterschiedliche Probenahmezeiten von 10 min, 30 min und 60 min getestet. Die Auswertung der Versuchsergebnisse hat, im Rahmen der Messgenauigkeit, keine Hinweise ergeben, dass eine längere Probenahmedauer zu Minderbefunden bei den gemessenen Mikroorganismen-Konzentrationen führt.

#### 3.2.3.1 Erfassungsgrad der im Sammelsystem aufgenommenen Mikroorganismen

Minderbefunde bei der Sammlung von Mikroorganismen können sowohl durch unvollständige Abscheidung in der Sammelflüssigkeit als auch durch einen Übergang der in der Flüssigkeit abgeschiedenen Mikroorganismen in den Luftstrom auftreten.

Um diese Effekte in ihrer kombinierten Wirkung zu untersuchen, wurden *Bacillus subtilis* und *Penicillium brevicompactum* im Bioaerosol-Kanal im Konzentrationsbereich von  $10^3$  bis  $10^6$  KBE/ $m^3$  dosiert und die Konzentrationen der Mikroorganismen in zwei hintereinander geschalteten Impinger-Flaschen gemessen. Als Sammelflüssigkeit wurde in allen Fällen NaCl-Lösung 0,9 % mit Tween 80® 0,01 % verwendet. Die Auswertung der Ergebnisse von 12 Messungen ergab, dass im Mittel in der ersten Flasche 89 % und in der 2. Flasche 11 % der erfassten Mikroorganismen gesammelt wurden. Maximal befanden sich in der 1. Flasche 95 % und minimal 81 % der erfassten Mikroorganismen.

Bedingt durch die Versuchsanordnung mit den zwei hintereinander geschalteten Flaschen betrug die Durchflussrate bei diesen Messungen nur 0,5  $m^3/h$  (Norm, trocken). Das bedeutet, dass trotz der niedrigeren Durchflussrate und damit einer geringeren Impaktionsgeschwindigkeit eine gute Abscheidung der Mikroorganismen in der Sammelflüssigkeit erfolgte.

### 3.2.4 Sammelflüssigkeit (ohne Tween 80® und mit Tween 80®)

Als Sammelflüssigkeit zur Abscheidung der Mikroorganismen durch Impingement wird in der Regel 0,9 %ige NaCl-Lösung verwendet. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde getestet, wie sich in Parallelproben ein Zusatz von 0,01 % Tween 80® auf die Abscheideeffizienz der drei Testorganismen auswirkt.

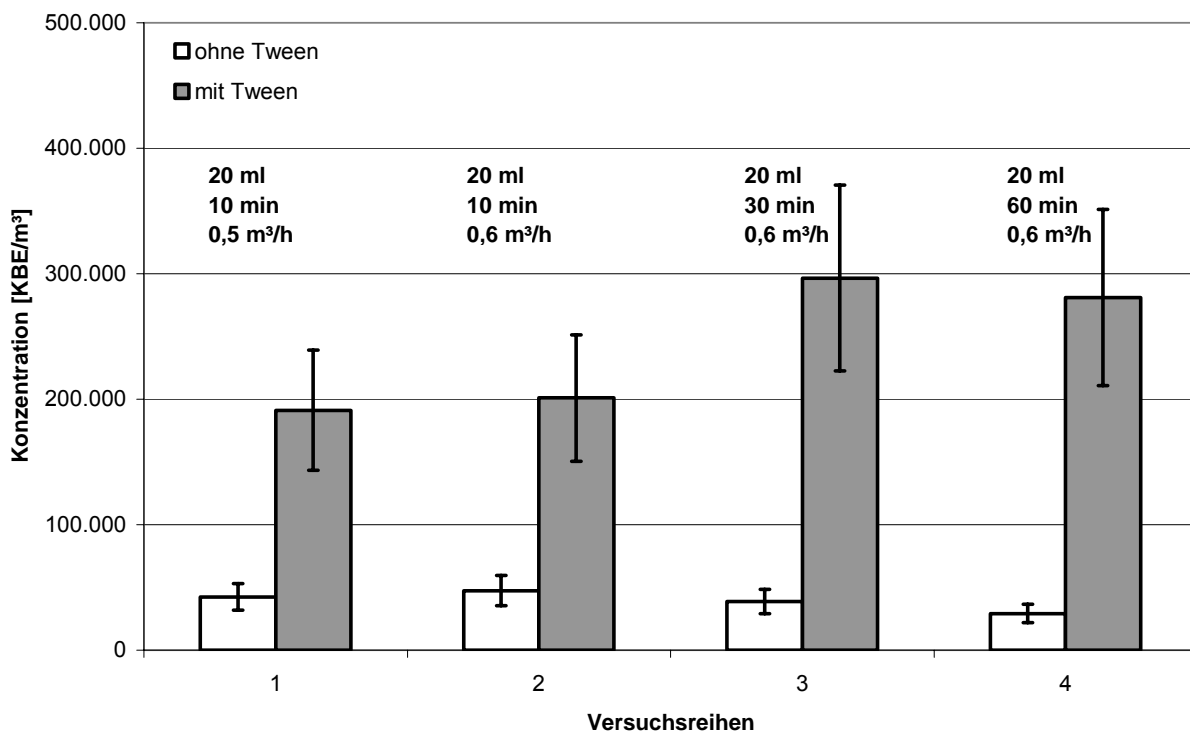


Bild 2: *Bacillus subtilis*: Abscheideverhalten ohne und mit Tween 80®

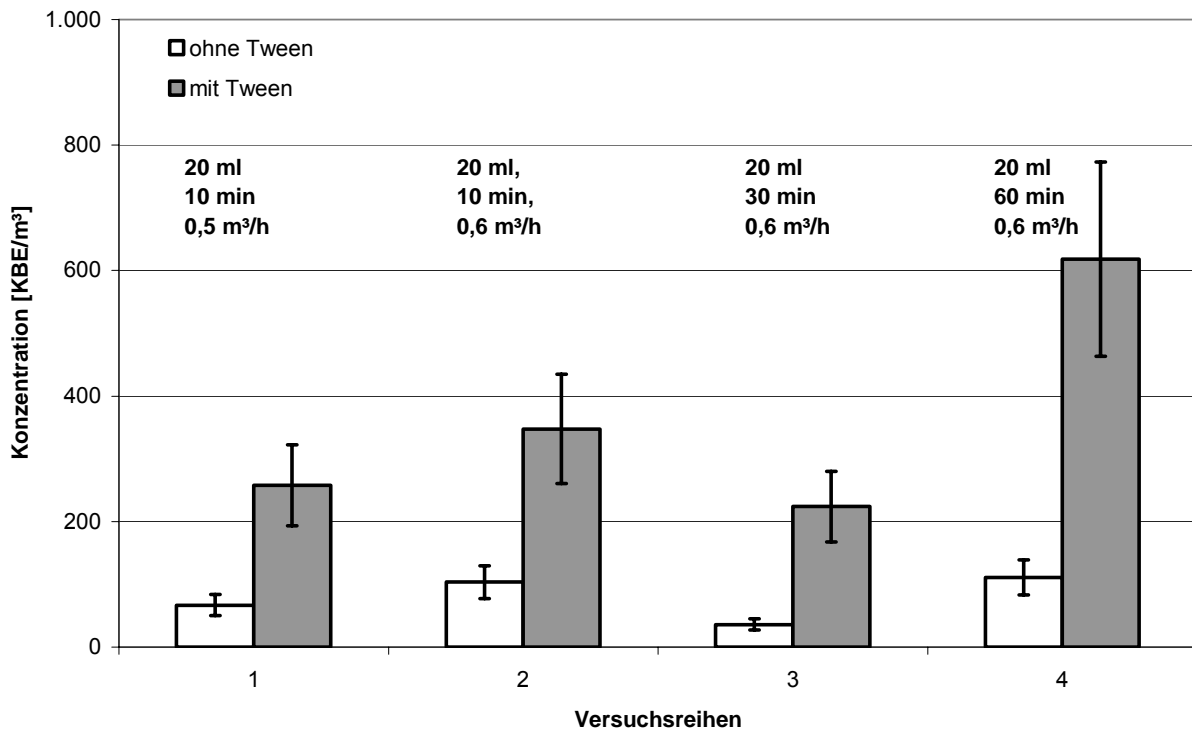


Bild 3: *Penicillium brevicompactum*: Abscheideverhalten ohne und mit Tween 80®

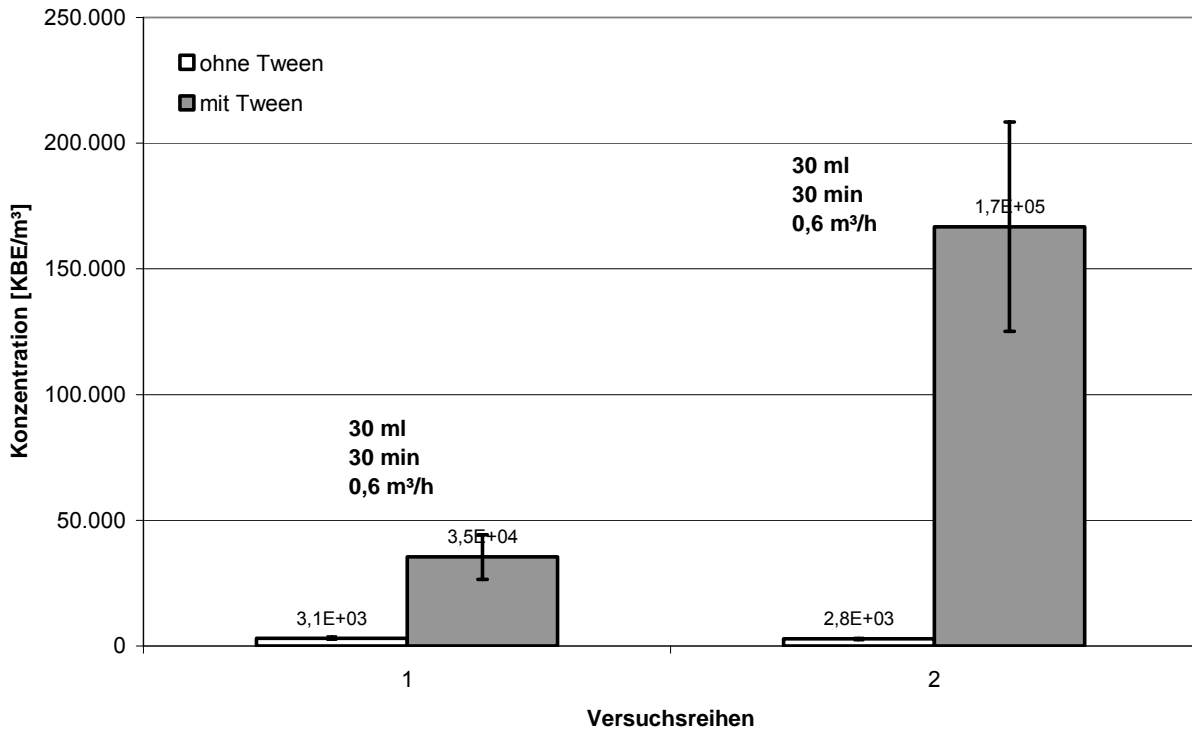


Bild 4: *Staphylococcus epidermidis*: Abscheideverhalten ohne und mit Tween 80®

Die Bilder 2 bis 4 zeigen, dass die Verwendung von 0,01 % Tween 80® in der Sammelflüssigkeit den Abscheidegrad von *Bacillus subtilis* und *Penicillium brevicompactum* um das ca. Fünf- bis Sechsfache erhöht. Für *Staphylococcus epidermidis* beträgt dieser Faktor bis 60. Die verbesserte Abscheidung der untersuchten Mikroorganismen in Anwesenheit von Tween 80® lässt sich vermutlich mit der Herabsetzung der Oberflächenspannung der Sammelflüssigkeit durch das Detergens erklären.

Dass Tween 80® auf grampositive und gramnegative Bakterien in der hier verwendeten Konzentration weder toxisch noch wachstumsfördernd wirkt, wurde mit Suspensionen von vier verschiedenen Bakterienarten (*Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas spec.* (Wildstamm)) getestet. Aus Reinkulturen wurden gewaschene und resuspendierte Bakterien in Impingersammelflüssigkeit mit bzw. ohne Tween 80® in jeweils 10 Parallelansätzen übertragen und bei 4 °C für 24 Stunden, der maximal zulässigen Transport- und Lagerzeit von Impingerproben, gelagert. Unmittelbar nach dem Ansatz und nach 0,5, 6 und 24 Stunden Standzeit wurden Proben entnommen und die Bakteriengehalte bestimmt. Im Rahmen der Messgenauigkeit war kein Einfluss von Tween 80® gegenüber den Versuchsgliedern ohne Tween 80® festzustellen.

### **3.2.5 Verfahrenskenngrößen**

Die Leistungsfähigkeit von Messverfahren wird anhand von Verfahrenskenngrößen charakterisiert. Für das hier eingesetzte Impinger-Verfahren wurden die Wiederholstandardabweichung, die Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze sowie die Wiederfindungsrate ermittelt.

#### **3.2.5.1 Standardabweichung unter Wiederholbedingungen**

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens wurde für die drei verschiedenen Testorganismen die Standardabweichung unter Wiederholbedingungen mit Hilfe von zeitgleichen Doppelbestimmungen mit zwei Impingerflaschen ermittelt (Tabellen 3 bis 6). Bei allen Messungen diente 0,9 %ige NaCl-Lösung mit Tween 80®-Zusatz als Sammelflüssigkeit; die Probenahmebedingungen variierten hinsichtlich der dosierten Konzentrationen, der Probenahmedauer und der Füllmenge der Sammelflüssigkeit.

Tabelle 3: Wiederholstandardabweichungen für *Bacillus subtilis*

N = Anzahl der Doppelbestimmungen; c = dosierter Konzentrationsbereich;

F = Füllmenge ; Absaugrate = 0,6 m<sup>3</sup>/h

C	N	F	Probenahme-dauer	Mittelwert aller Proben	Median aller Proben	Standard-abw. (Doppelbest.)	rel. Standard-abw. (Doppelbest.)
[KBE/m <sup>3</sup> ]		[ml]	[min]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[%]
10 <sup>3</sup>	3	20	10	2.200	2.100	340	16
10 <sup>3</sup>	3	20	30	750	760	170	22
10 <sup>3</sup>	3	20	60	680	610	53	8
10 <sup>5</sup>	3	20	10	200.000	200.000	25.000	12
10 <sup>5</sup>	3	20	30	300.000	280.000	75.000	25
10 <sup>5</sup>	3	20	60	280.000	270.000	54.000	19
10 <sup>5</sup>	10	30	30	130.000	140.000	21.000	16
10 <sup>5</sup>	3	50	30	36.000	36.000	5.000	14
Mittelwert							<b>17</b>

Tabelle 4: Wiederholstandardabweichung für *Staphylococcus epidermidis*

C	N	F	Probenahme-dauer	Mittelwert aller Proben	Median aller Proben	Standard-abw. (Doppelbest.)	rel. Standard-abw. (Doppelbest.)
[KBE/m <sup>3</sup> ]		[ml]	[min]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[%]
10 <sup>5</sup>	9	30	30	103.000	105.000	8.800	9
10 <sup>4</sup>	2	30	30	37.000	38.000	3.000	8

Tabelle 5: Wiederholstandardabweichung für *Penicillium brevicompactum*

C	N	F	Probenahmedauer	Mittelwert aller Proben	Median aller Proben	Standard-abw. (Doppelbest.)	rel. Standard-abw. (Doppelbest.)
[KBE/m <sup>3</sup> ]		[ml]	[min]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[KBE/m <sup>3</sup> ]	[%]
10 <sup>3</sup>	3	30	10	350	350	82	24
10 <sup>3</sup>	3	30	30	220	230	33	15
10 <sup>3</sup>	2	30	60	610	610	91	15
5x10 <sup>4</sup>	2	30	10	8.600	8.800	510	6
5x10 <sup>4</sup>	3	30	30	18.000	17.000	5.500	30
5x10 <sup>4</sup>	3	30	60	62.000	52.000	13.000	22
5x10 <sup>4</sup>	5	30	30	95.000	98.000	7.000	7
5x10 <sup>4</sup>	5	30	30	140.000	130.000	25.000	18
10 <sup>7</sup>	5	30	30	3.400.000	3.700.000	420.000	12
10 <sup>7</sup>	5	30	30	4.200.000	4.000.000	1.200.000	28
Mittelwert							<b>18</b>

Sowohl für *Bacillus subtilis* als auch für *Penicillium brevicompactum* wurden im Mittel relative Standardabweichungen von unter 20 % berechnet. Bei *Staphylococcus epidermidis* ist nur eine geringere Datengrundlage aus zwei Versuchsreihen vorhanden, die einen Mittelwert von 9 % ergab.

### 3.2.5.2 Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze

Bei einem Volumenstrom von 0,6 m<sup>3</sup>/h, einer Probenahmedauer von 30 Minuten und einem Endvolumen der Sammelflüssigkeit von 30 ml ergibt sich bei minimaler Belegung einer der drei parallelen Nährbodenplatten mit einer Kolonie folgende Nachweisgrenze:

- Bei einer Ausstrichmenge von 0,1 ml Sammelflüssigkeit: 330 KBE/m<sup>3</sup>
- Bei Membranfiltration von 3 x 1,0 ml Sammelflüssigkeit und Auflegen der Filter auf 3 Nährböden: 33 KBE/m<sup>3</sup>
- Bei Membranfiltration von 1 x 10 ml Sammelflüssigkeit und Auflegen des Filters auf einen Nährboden: 10 KBE/m<sup>3</sup>

Die Nachweisgrenze hängt von den tatsächlich ausplattierten bzw. membranfiltrierten Volumina ab.

Die Bestimmungsgrenze liegt um den Faktor 10 bzw. 30 höher, da für eine sinnvolle Auswertung der kultivierten Nährböden im Mittel mindestens 10 Kolonien auf jeder Platte vorhanden sein sollten.

### **3.2.5.3 Wiederfindung**

Die Wiederfindung der untersuchten Mikroorganismen wurde ermittelt, indem die mit dem Impinger-Verfahren im Bioaerosol-Prüfkanal gemessenen Konzentrationen mit den dosierten Konzentrationen verglichen wurden. Hierfür wurde bei jeder Versuchsreihe unmittelbar am Aerosolerzeuger das Tropfenaerosol aufgefangen, die Keimzahl als KBE/ml bestimmt und daraus die Konzentration der Mikroorganismen als KBE/m<sup>3</sup> berechnet.

Gemittelt über alle Versuche ergab sich für *Bacillus subtilis* eine nahezu 100%ige Wiederfindung, während bei *Staphylococcus epidermidis* nur etwa 30 % der dosierten Konzentration wieder gefunden wurde. Bei *Penicillium brevicompactum* waren die Ergebnisse uneinheitlich und erfordern noch weitere Untersuchungen.

## **4. Erprobung des Messverfahrens an einer Tierhaltungsanlage**

Das hier beschriebene Impingement-Verfahren wurde zur Emissionsmessung von Mikroorganismen in der Abluft einer Schweinemastanlage getestet. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen eines ebenfalls in diesem Tagungsband beschriebenen Untersuchungsprogramms des Landesumweltamtes NRW [8]. Hierfür wurden jeweils acht Doppelbestimmungen mit Impingern durchgeführt und die Standardabweichung aus diesen Doppelbestimmungen für verschiedene Mikroorganismen bestimmt. Die Probenahmen erfolgten unter leicht überisokinetischen Bedingungen über einen Zeitraum von 15 Minuten. Exemplarisch sind in Bild 5 die ermittelten Konzentrationen der Gesamt-Bakterien 37°C dargestellt. Aus den Doppelbestimmungen wurde eine mittlere relative Standardabweichung von 8 % berechnet. Somit ist die gute Reproduzierbarkeit des Messverfahrens auch an einer realen Anlage dokumentiert.

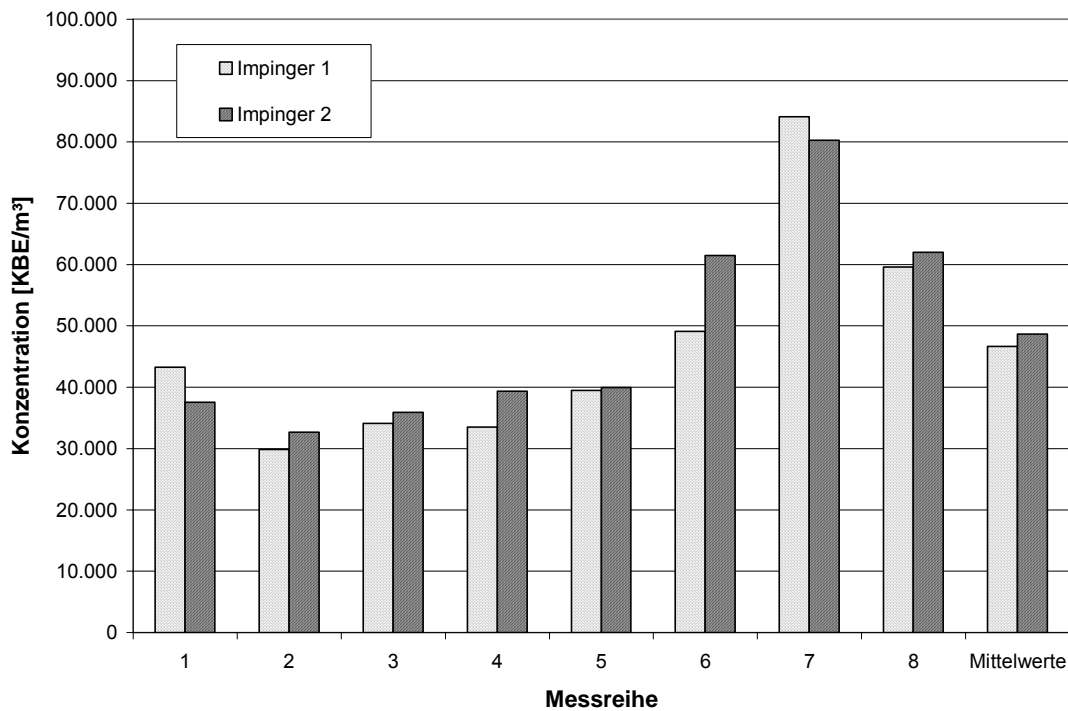


Bild 5: Doppelbestimmungen für Bakterien 37° C in der Abluft eines Schweinestalls

## 5. Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

Die bisher durchgeführten Versuche am Bioaerosolkanal zeigen eine grundsätzliche Eignung des Impingement-Verfahrens für Emissionsmessungen von Mikroorganismen. Für die Untersuchungen wurden als Vertreter unterschiedlicher Bakterien und Pilze *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* und *Penicillium brevicompactum* eingesetzt. Zur Abscheidung der Mikroorganismen in der Sammelflüssigkeit erwies sich eine Absaugrate von 0,6 m<sup>3</sup>/h als geeignet, da keine verringerte Abscheideeffizienz gegenüber dem Betrieb des Impingers als kritische Düse festgestellt werden konnte. Gleichzeitig waren bei dem zugehörigen Druck von ca. 690 hPa die Verdunstungsverluste sowie die Abkühlung der Probenluft vergleichsweise gering. Somit ist auch die Gefahr des Einfrierens der Sammelflüssigkeit reduziert.

Die Messergebnisse zeigen, dass mit dem Impingement-Verfahren Mikroorganismen über einen weiten Konzentrationsbereich von 10<sup>3</sup> bis 10<sup>7</sup> KBE/m<sup>3</sup> gemessen werden können. Dadurch kann das Messverfahren auch bei Vorliegen unbekannter und stark schwankender Mikroorganismen-Konzentrationen angewendet werden.

Als Sammelflüssigkeit wurde physiologische Kochsalzlösung ohne und mit Tween 80® geprüft. Die Abscheidung von Mikroorganismen war bei der Verwendung von

Tween 80® für *Bacillus subtilis* und *Penicillium brevicompactum* um das Fünf- bis Sechsfache, für *Staphylococcus epidermidis* um bis zu das Sechzigfache erhöht. Dementsprechend verbessern sich auch die Nachweisgrenzen der Mikroorganismen im Vergleich zur Verwendung von Sammelflüssigkeit ohne Tween 80®. Ergänzende Laborversuche zeigten außerdem während einer 24-stündigen Lagerung keinen hemmenden oder fördernden Einfluss von Tween 80® auf die in der Sammelflüssigkeit abgeschiedenen Mikroorganismen.

Für alle drei untersuchten Modellorganismen wurden Standardabweichungen unter Wiederholbedingungen von unter 20 % beim Vorliegen von Einzelzellen im Aerosol ermittelt.

Im Rahmen erster Tests konnte die Einsetzbarkeit des Impingement-Verfahrens an einer Tierhaltungsanlage gezeigt werden. Für künftige Versuche werden Impinger mit größeren Düsendurchmessern eingesetzt werden. Ein höheres Absaugvolumen könnte die Nachweisgrenzen erheblich senken, wodurch auch eine Quantifizierung einzelner, in geringeren Konzentrationen vorkommender Bakterienarten ermöglicht würde. Des Weiteren soll untersucht werden, wie sich unterschiedliche Absaugraten auf das Abscheideverhalten der Mikroorganismen in der Sammelflüssigkeit der Impinger auswirken.

## 5. Literatur

- [1] Erste Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Bundes-Immissionsschutzgesetz (Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft – TA Luft), vom 24.7.2002 (GMBI. S. 511).
- [2] VDI 4252 Blatt 3, Vorentwurf: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft. Aktive Probenahme von Bioaerosolen. Abscheidung von luftgetragenen Bakterien in Flüssigkeiten.
- [3] Tyler, M. Shipe, E.L.: Development and Evaluation of the All-Glass-Impinger. Appl. Mikrobiol. 7, 337 -349 (1959).
- [4] VDI 4253 Blatt 2 (06/2004): Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft. Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilz-Konzentrationen in der Luft. Indirektes Verfahren nach Probenahme auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern.
- [5] VDI 4253 Blatt 3, Vorentwurf: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft. Verfahren zum kulturellen Nachweis der Bakterienkonzentrationen in der Luft. Verfahren nach Abscheidung in Flüssigkeiten.

- [6] Grinshpuhn, S.A.; Chang, A.; Nevalainen, Willeke, K.: Inlet characteristics of bioaerosol samplers. J. Aerosol Sci. 25, No. 8, 1503 -1522 (1994).
- [7] Marple, V.A. and Liu B.Y.K.: Characteristics of laminar jet impactors. Env. Sci. and Technology 8, 648 (1974).
- [8] Köllner, B, Heller, D. und Gärtner, A.: Wirkungen von Bioaerosolen aus der Landwirtschaft – Erste Ergebnisse der LUA Studie „Bioaerosole aus Tierställen“, vorliegender Tagungsband