

Bestimmung der Konzentration Biologischer Arbeitsstoffe in der Luft am Arbeitsplatz

Erster Ringversuch „Schimmelpilze“

B. Averdiek, Ch. Deininger, S. Engelhart, Th. Missel, W. Philipp, F.G. Riege, B. Schicht, R. Simon

Zusammenfassung Biologische Arbeitsstoffe (Schimmelpilze, Bakterien u.a.) kommen an einer Vielzahl von Arbeitsplätzen vor, z.B. in der Abfallwirtschaft oder beim Einsatz von Kühlschmierstoffen. Um zu einer einheitlichen meßtechnischen Beurteilung von Arbeitsplätzen hinsichtlich ihrer mikrobiellen Belastung zu kommen, sind standardisierte Meßverfahren für Biologische Arbeitsstoffe Voraussetzung.

Der vorliegende erste Ringversuch sollte weitergehende Informationen zu den Leistungskennwerten des „Verfahrens zur Bestimmung der Schimmelpilz/Hefenkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz“ erbringen, das unter Federführung des Berufsgenossenschaftlichen Instituts für Arbeitssicherheit – BIA in der Projektgruppe 4 „Arbeitsplatzbewertung“ (vormals AK „Meßverfahren, Meßstrategie“) des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe entwickelt wurde. Das Verfahren beruht auf einer Probenahme mit Abscheidung auf einem Membranfilter und anschließender Bestimmung durch Anzucht auf Nährböden.

Am Ringversuch beteiligten sich insgesamt acht Einrichtungen. Die Probenahme erfolgte auf dem Gelände einer Kompostieranlage: zum einen an der Außenluft im Eingangsbereich des Verwaltungsgebäudes (Einsatz der Direkten Methode), zum andern in der Sortierkabine des Aufarbeitungsbereiches (Indirekte Methode).

Das Meßverfahren bewährte sich nachdrücklich unter den gegebenen Probenahmebedingungen. Schließt man die Ausreißer (höchster und niedrigster Einzelwert) der ermittelten Schimmelpilzkonzentration pro Filterserie aus, ergibt sich zwischen den Teilnehmern eine Abweichung um den Faktor ~ 2 bei der Indirekten Methode. Die relative Standardabweichung

zwischen allen acht Teilnehmern beträgt für DG-18-Agar 30 bis 41%, für MEA 45 bis 48%. Die Streuungen der Einzelwerte sind nicht allein laborbedingt, sondern liegen auch in der inhomogenen Sporenverteilung am Probenahmeort begründet. Die Bestimmung der einatembaren Fraktion, das personentragbare Probenahmesystem, die quantitative Erfassung sehr großer Schimmelpilzkonzentrationen mit möglichen langen Probenahmezeiten sowie die variable Aufarbeitung der beaufschlagten Filter (direkt; indirekt) stellen Vorteile gegenüber anderen Probenahmeverfahren (z.B. Impaktionsverfahren) dar.

Aufgrund der Erkenntnisse aus umfangreichen Meßkampagnen und dem hier beschriebenen Ringversuch wurde eine überarbeitete Version der Meßverfahrensvorschrift erstellt. Zukünftige Ringversuche (Schimmelpilze, Bakterien) sind geplant.

Determination of atmospheric workplace concentrations of biological agents. First interlaboratory trial "Moulds"

Abstract Biological agents (moulds, bacteria etc.) can be found at many workplaces, e.g. in the waste industry or where cooling lubricants are used. Standardised measuring methods are indispensable for ensuring a harmonised evaluation of microbiological workplace exposure.

The first interlaboratory trial was intended to gather information on the efficiency of the "Method for determining mould/yeast concentrations in workplace air". Coordinated by the Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit – BIA, the trial was carried out by the project group 4 "Workplace assessment" (former task force "Measuring methods, measuring strategy") of the Committee for Biological Agents at Work. The method includes sampling with separation on a membrane filter and determination after culturing on nutrient media.

A total of eight institutions participated in the interlaboratory trial. Samples were taken in a composting plant, both outdoors near the entrance of the administration building (Direct method) and indoors in the sorting cabin, where organic waste is prepared for composting (Indirect method).

The sampling method made its proof under the given sampling conditions. If outliers (highest and lowest individual value) are excluded, mould concentration values determined in one filter series vary by the factor ~ 2 as far as the Indirect method is concerned. The relative standard deviation comes to 30 to 41% for DG-18-Agar and 45 to 48% for MEA. Variance of values is not only due to laboratory conditions, but also to heterogeneous spore distribution at the sampling place. Compared to other approaches (e.g. impaction), the investigated sampling system offers several advantages: determination of the inhalable fraction, personal sampling, quantitative determination of high mould concentrations with long sampling times and variable preparation of loaded filters (direct, indirect).

Frau Dr. rer. nat. B. Averdiek
GUVV Westfalen-Lippe, Münster

Dr. rer. nat. Chr. Deininger
Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit – BIA,
Sankt Augustin

Dr. med. S. Engelhart
Institut für Hygiene der Universität Bonn, Bonn

Dipl.-Biol. Th. Missel
Tierärztliche Hochschule, Institut für Tierhygiene und Tierschutz,
Hannover

Dr. med. W. Philipp
Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim,
Stuttgart

Dr. rer. nat. F.G. Riege
Amt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin Thüringen, Suhl

Dr. rer. nat. B. Schicht
Landesamt für Arbeitsschutz Sachsen-Anhalt, Dessau

Dr. rer. nat. R. Simon
TÜV-ET, Abt. Biologische Sicherheit, Freiburg

On account of the results obtained in exhaustive measuring series and in the described interlaboratory trial, a revised version of the measuring protocol was elaborated. Further interlaboratory trials (moulds, bacteria) are planned.

1

Einleitung

Pilze sind eukaryotische Organismen, die zu den Mikroorganismen gezählt werden und verschiedene Wuchsformen (Hyphen, Sproßbildung) aufweisen. Sie werden u.a. unterteilt in Basidiomyceten (Ständerpilze), Sproßpilze (Hefen), Schimmelpilze (Aspergillus, Mucor, Penicillium), Dermatophyten (Hautpilze) und dimorphe Pilze. Schimmelpilze kommen in allen Lebensräumen des Menschen vor; sie sind im Boden, im Wasser und in der Luft enthalten. Der Mensch kommt durch Luft, Stoffe, Zubereitungen und Erzeugnisse, die aus diesen Mikroorganismen bestehen, diese enthalten oder diesen anhaften, bzw. durch andere Menschen und Tiere mit ihnen in Kontakt. Dies gilt auch für verschiedene Arbeitsbereiche, wo zum Teil sehr hohe Konzentrationen an Schimmelpilzen in der Luft angetroffen werden, die weit über den Referenzaußenluftwerten liegen können. Solche Arbeitsbereiche finden sich z.B. in der Landwirtschaft, bei der Holzverarbeitung und in der Abfallwirtschaft. Schimmelpilze kommen aber auch im Innenraumbereich von Gebäuden regelmäßig vor [1 bis 4]. In allen diesen Fällen spricht man von einem nicht gezielten („unbeabsichtigten“) Umgang mit Biologischen Arbeitsstoffen.

Schimmelpilze spielen eine wichtige Rolle im Stoffhaushalt der Natur, indem sie an der Mineralisierung organischer Stoffe beteiligt sind und so anderen Lebewesen die Besiedelung eines Lebensraumes ermöglichen bzw. Nährstoffe verfügbar machen. Auf der anderen Seite können einige Arten für den Menschen auch ein Risiko darstellen. Sie sind in der Lage, Lebensläufe zu besiedeln, in denen sie unerwünscht sind oder natürlich nicht vorkommen. Durch ihr massives Auftreten können sie beim Menschen zu lokalen oder allgemeinen Störungen des Makroorganismus führen (Mykoallergose, -toxikose, Mykose). Von besonderem Interesse ist die Exposition über die Luft, bei der die Schimmelpilze als Luftsporen, Aggregate von Luftsporen, Hyphenbruchstücke und Einzelzellen, frei oder an Staubpartikeln oder Flüssigkeitstropfen gebunden, vorkommen (Bioaerosol). Insbesondere im o.g. Bereich des unbeabsichtigten Umgangs mit Mikroorganismen sind die Kenntnisse über Art und Ausmaß der Belastungen gering und Schutzmaßnahmen oftmals unzureichend. Somit stellen die Belastungen in diesem Bereich für den Arbeitsschutz ein besonderes Problem dar.

Gemäß der EG RL 90/679/EWG zählen Schimmelpilze zu den Biologischen Arbeitsstoffen. Ziel dieser Richtlinie ist der Schutz der Arbeitnehmer vor der Gefährdung ihrer Sicherheit und Gesundheit, der sie auf Grund der Exposition gegenüber Biologischen Arbeitsstoffen bei der Arbeit ausgesetzt sind oder sein können, einschließlich der Vorbeugung gegen solche Gefährdung [5]. Die nationale Umsetzung erfolgt in Form einer Verordnung auf der Basis des neuen Arbeitsschutzgesetzes.

Danach müssen künftig für jede Tätigkeit, bei der eine Exposition gegenüber Biologischen Arbeitsstoffen auftritt, die Art, das Ausmaß und die Dauer der Exposition der Arbeitnehmer ermittelt werden, damit alle Risiken für die Sicherheit und Gesundheit abgeschätzt und Schutzmaßnahmen festgelegt werden können. Voraussetzung hierfür ist die qualitative und quantitative Bestimmung Biologischer Arbeitsstoffe auf der Grundlage einer einheitlichen Meßmethodik und Meßstrategie.

Dies stellt für den Arbeitsschutz die Grundvoraussetzung dar, um in Zukunft eine einheitliche Beurteilung von Arbeitsplätzen hinsichtlich des Vorkommens von Mikroorganismen zu gewährleisten und ggf. Richtwerte einführen zu können.

Im Rahmen der Tätigkeit des Arbeitskreises „Meßverfahren, Meßstrategie“ des BMA-Beratergremiums „Biologische Arbeitsstoffe“ (jetzt Projektgruppe 4 „Arbeitsplatzbewertung“ des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe – ABAS) wurde ein standardisiertes Meßverfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration erstellt und in der BIA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen, Kennziffer 9420, veröffentlicht [6]. In der Zwischenzeit wurde dieses Verfahren auch als Technische Regel Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 430) vom Bundesministerium für Arbeit und Sozialordnung bekanntgegeben [7].

Der 1. Ringversuch wurde mit der Zielsetzung geplant, die Durchführbarkeit und die Leistungsdaten des Verfahrens unter Praxisbedingungen zu ermitteln und die Verfahrensvorschrift entsprechend anzupassen.

Mangels verfügbarer Bioaerosol-Beaufschlagungstechniken konnten im Ringversuch keine einheitlich im Labor belegten Filter zur Verfügung gestellt werden, so daß die Probenahme durch die beteiligten Einrichtungen unter realen, nicht-experimentell kontrollierten Expositionsbedingungen (Außenluft, Sortierkabine) erfolgte.

2

Durchführung

2.1

Meßprinzip

Dem Meßverfahren liegt die Probenahme über Filtration zugrunde. Hierbei wird mit Hilfe einer im Sammelgerät integrierten oder an den Probenahmekopf angeschlossenen Pumpe ein volumendefinierter Luftstrom durch ein Membranfilter angesaugt und das Bioaerosol auf dem Filter abgeschieden. Die Auswertung der beaufschlagten Filter erfolgt durch Kultivierung der Pilze gemäß der Direkten oder Indirekten Methode. Bei der Direkten Methode werden die belegten Filter direkt auf den Nährboden gelegt, bebrütet, die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die Konzentration pro m^3 Luft berechnet.

Zur Indirekten Konzentrationsbestimmung wird das auf dem Filter abgeschiedene Bioaerosol in einer Lösung suspendiert und nach Anlegen einer Verdünnungsreihe auf Nährböden ausgespatelt. Diese werden anschließend bebrütet und die Schimmelpilzkonzentration pro m^3 Luft ermittelt.

2.2

Material, Geräte

Filter, Nährmedien

Als Filtermaterialien kamen Cellulose-Nitrat-Membranfilter (CN-Filter, 0,8 μm Porengröße, Sartorius) und Polycarbonat-Membranfilter (Pk-Filter, 0,8 μm Porengröße, Costar) zum Einsatz. Zur Kultivierung von Schimmelpilzen wurde Malzextrakt-Agar (MEA, Merck) als gängiges Nährmedium zum Nachweis, zur Isolierung und zur Koloniezahlbestimmung von Pilzen sowie Dichloran-Glyzerin-Agar (DG 18, Oxoid) als Nährmedium zum selektiven Nachweis xerophiler Schimmelpilze verwendet.

Probenahmesystem

Zur Probenahme wurde das personengetragene Gefahrstoffprobenahmesystem PGP mit Gesamtstaubsammelkopf GSP

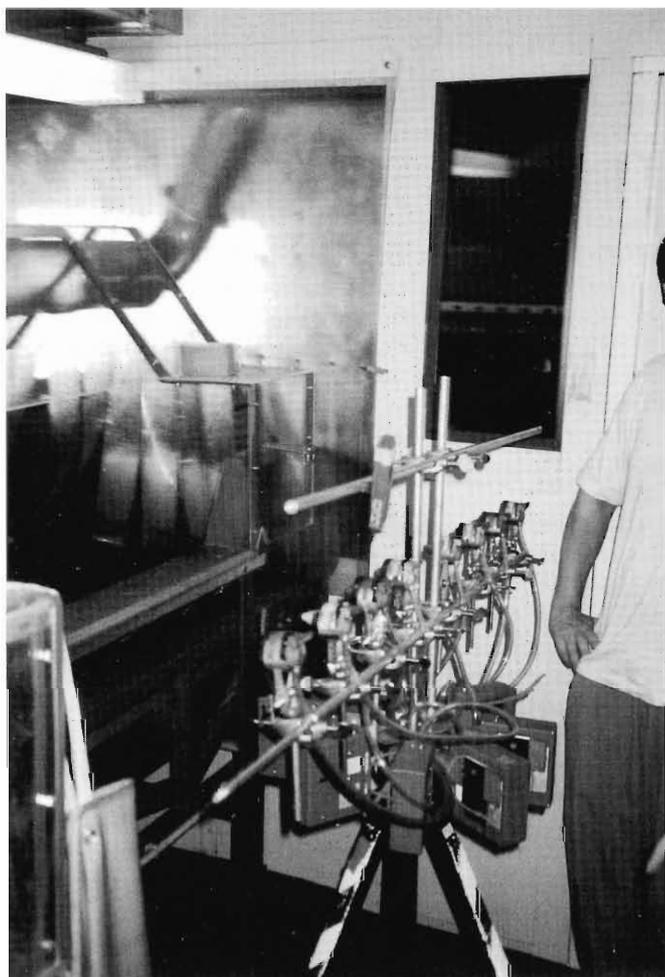


Bild 1. Aufbau der Probenahmegeräte in der Sortierkabine der Kompostieranlage

und Pumpe PP5EX eingesetzt. Durch die Verwendung des GSP-Kopfes werden die einatembaren Schimmelpilzsporen erfaßt.

Die Probenahmeköpfe waren in ca. 15 cm Abstand voneinander horizontal an einem Stativ befestigt (Bild 1).

2.3 Probenahme

Probenahmeort

Die Probenahme erfolgte auf dem Gelände einer Kompostieranlage im Eingangsbereich (Außenluftwert) des Verwaltungsgebäudes sowie in der Sortierkabine des Aufbereitungsbereiches (Bild 1). Die Kompostieranlage stellt im Annahmehbereich und in der Aufbereitung ein geschlossenes eingehautes System dar. Die Hallenluft wird abgesaugt und über ein Biofilter abgeleitet. Intensiv-Vorrotte und -Nachrotte finden unter Luftabsaugung und Desodorierung der Abluft auf einer Fläche im Freien statt (Tafelmiere). Nachrotte und Lagerung des Kompostes erfolgen in einer Halle. Am Tag des Ringversuches sind 53,5 t Biomüll und Strauchschnitt angenommen worden. Der Biomüll wurde am Anlieferungstag verarbeitet.

In der Sortierkabine befinden sich zwei gegenüberliegende Arbeitsplätze, und die aussortierten Störstoffe werden über zwei Abwurfschächte in darunterstehende Container abgeworfen. Die Sortierkabine wird mit Frischluft versorgt, die oberhalb des Sortierbandes eintritt. Am Probenahmetag wurde das Stativ mit den Probenahmeköpfen am unbesetzten Sortierplatz aufgestellt. Während der Probenahme wurde

die Frischluftzufuhr abgeschaltet, um eine gleichmäßigere Verteilung des Bioaerosols zu erreichen.

Der Probenahmeort für den Außenluftwert lag im Eingangsbereich (Eingang Büro-, Sozialgebäude) zur Kompostieranlage, ca. 200 m von Annahme, Aufbereitungs- und Rottebereich entfernt. Der Standort war so gewählt, daß von der Kompostieranlage weitgehend unbelastete Umgebungsluft angesaugt wurde. Während der Probenahme herrschte auf dem Gelände bei wolkenlosem Himmel und Sonnenschein ein Luftdruck von ca. 1012 mbar, eine relative Luftfeuchte von 48% bis 31%, eine Lufttemperatur von 21 bis 25 °C. Der Wind wehte aus östlichen Richtungen mit 4 m/s.

Durchführung

Am Ringversuch beteiligten sich insgesamt acht Einrichtungen. Die acht Probenahmeköpfe wurden vor Ort mit den Filterkapseln bestückt (Außenluft CN-Filter, Sortierkabine Pk-Filter) und die acht kalibrierten Pumpen (3,5 l/min) unmittelbar hintereinander gestartet, in der gleichen Reihenfolge abgeschaltet und die Durchflußrate kontrolliert.

Die Probenahmezeiten zur Bestimmung des Außenluftwertes betragen zwei und vier Minuten (insgesamt sechs Filter je Teilnehmer) und zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Sortierkabine 15 Minuten (drei Filter je Teilnehmer). Die beaufschlagten Filter wurden trocken in der Filterkassette bei Umgebungstemperatur transportiert und am folgenden Tag zeitgleich entsprechend der Vorschrift des Ringversuchs aufgearbeitet. Die beaufschlagten Filter eines der acht Teilnehmer wurden per Expresskurier in das entsprechende Labor geschickt.

Die CN-Filter (Außenluftwert) wurden entsprechend der Direkten Methode und die Pk-Filter nach der Indirekten Methode ausgewertet. Zur Kultivierung sind Malzextrakt-(MEA)- und Dichloran-Glyzerin (DG 18)-Agarplatten verwendet worden. Die Pk-Filter wurden in jeweils 10 ml physiologische NaCl-Lösung (0,9%ige Saline)+0,01% Tween 80 überführt und für vier Minuten bei stärkster Stufe auf einem Vortexer gemischt. Diese Originallösung wurde über eine dezimale Verdünnungsreihe (physiologische NaCl-Lösung+0,01% Tween 80) verdünnt. Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten und vor dem Ausplattieren wurden die Reagenzgläser nochmals zehn Sekunden gemixt (Vortexer). Ausplattiert wurden 0,1 ml der Originallösung und die 1. und 2. Verdünnungsstufe auf je drei Parallelagarplatten. Die Nähragarplatten der Direkten und Indirekten Methode wurden maximal sieben Tage bei 25 °C inkubiert und die Kolonien täglich ausgezählt.

Die Berechnung der Schimmelpilzkonzentration erfolgte unter Berücksichtigung der Originallösung gemäß der Berechnungsformel des BIA-Meßverfahrens Kennziffer 9420 [6].

Die für den Ringversuch erforderlichen Materialien (Probenahmesysteme, Filter, Nährmedien, Verdünnungslösungen) wurden vom BIA bereitgestellt. Die Aufarbeitung der beaufschlagten Filter und die Auszählung erfolgte in den Labors der acht beteiligten Einrichtungen. Die Ergebnisse wurden dann im BIA gesammelt und anonymisiert zusammengestellt. Auswertung und Diskussion der Ergebnisse erfolgten gemeinsam mit den Vertretern der beteiligten Einrichtungen.

3 Ergebnisse

3.1

Direkte Methode

In Tabelle 1 und Bild 2 sind die mit Hilfe der Direkten Methode erzielten Ergebnisse in Abhängigkeit zur Probenahmezeit und dem verwendeten Nährboden dargestellt.

Die ermittelten Konzentrationen an Schimmelpilzen in der Außenluft entsprechen unter Berücksichtigung der vorliegenden Randbedingungen und der Untersuchungsmethodik den zu erwartenden Werten von 10^1 – 10^3 KbE pro m^3 Luft [8, 9]. Eine Korrelation zwischen Probenahmezeit und bestimmter Koloniezahl pro Filter wurde im Mittel unter den natürlichen Expositionsbedingungen nicht gefunden. Als Ursache werden die zu kurze Probenahmezeit (zwei Minuten) und damit verbunden die starke Abhängigkeit der Ergebnisse von den augenblicklichen Expositionsbedingungen sowie der hohe Umrechnungsfaktor ($\times 142,9$ KbE/ m^3 Luft) angenommen. Der Versuch belegt, daß sich bei Koloniezahlen von weniger als 10 KbE/Platte der Zufallsfaktor stark auswirkt.

Die Anzahl der nachweisbaren Schimmelpilze in der Außenluft ist vom Nährmedium abhängig. Unter den gewählten Untersuchungsbedingungen zeigte sich, daß im Mittel mit MEA mehr Schimmelpilze bei einer größeren Standardabweichung der Einzelergebnisse kultivierbar waren als mit

Tabelle 1. Durchschnittliche Koloniezahl pro Filter in der Außenluft, Standardabweichung der Ergebnisse in Abhängigkeit zur Probenahmezeit und zum Nährboden (Direkte Methode)

t [min]	Filter	Nähragar	n	\bar{X} [KbE/ Filter]	S [KbE/ Filter]	Konz. [KbE/ m^3 Luft]
2	CN-1	DG 18	8	5,12	2,29	732
	CN-2	DG 18	8	5,00	1,93	714
	CN-4	MEA	8	5,75	2,96	821
	CN-5	MEA	8	7,50	3,16	1071
4	CN-3	DG 18	8	6,87	2,03	491
	CN-6	MEA	8	7,62	2,67	544

- n = Anzahl der Ergebnisse
 \bar{X} = Mittelwert der Koloniezahl pro Filter
 S = Standardabweichung der Ergebnisse
 KbE = Koloniebildende Einheiten
 MEA = Malzextrakt-Agar
 DG 18 = Dichloran-Glycerin-Agar
 Konz. = Schimmelpilzkonzentration pro m^3 Luft, bezogen auf \bar{X}
 t = Probenahmezeit
 CN = Cellulose-Nitrat-Membranfilter

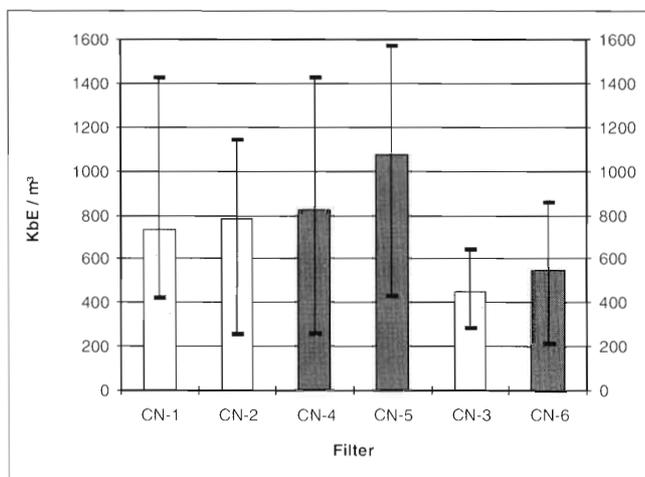


Bild 2. Graphische Darstellung der mit der Direkten Methode ermittelten Schimmelpilzkonzentration in der Außenluft, Mittelwert aus acht Einzelergebnissen

- MEA, CN-1, -2, -4, -5, Probenahmezeit 2 min
 ■ DG-18-Agar, CN-3, -6, Probenahmezeit 4 min
 ⊥ Minimal-, Maximalwert

DG 18. Auf MEA erfolgt im Gegensatz zum DG-18-Agar keine Inhibition von Bakterien oder Größenbegrenzung von Schimmelpilzkolonien. Dadurch wird die Auswertung erschwert, und es kann zu einer Über- bzw. Unterbewertung der Koloniezahlen kommen.

3.2 Indirekte Methode

Tabelle 2 beinhaltet die Ergebnisse der Indirekten Methode. Zusammengestellt wurden die bestimmten Koloniezahlen je zur Auswertung herangezogene Verdünnungsstufe und Filter (Mittelwert aus drei Parallelplatten) und die Standardabweichung zwischen den Teilnehmern sowie zwischen den Parallelplatten. Angegeben sind außerdem die errechneten mittleren Konzentrationen an Schimmelpilzsporen. Eine ausführliche Zusammenstellung der Einzelergebnisse enthält Tabelle 3.

Die Ergebnisse unterstützen die mit der Direkten Methode gemachten Erfahrungen. Beide Nährböden sind zum Nachweis von Schimmelpilzen in der Luft geeignet. DG-18-Agar hat auf Grund seiner Zusammensetzung bei der Auswertung gegenüber dem MEA Vorteile.

Um die optischen Unterschiede beider Pilznährmedien zu objektivieren, wurde eine statistische Auswertung in Form „Gekerbter Box-Whisker-Diagramme“ durchgeführt, die der Untersuchung der Symmetrie, der Verteilungsannahmen sowie der Entdeckung von Ausreißern dienen und somit einen optischen Vergleich verschiedener Meßorte und Meßreihen erlauben.

Das Diagramm unterteilt die Daten in vier Bereiche gleicher Häufigkeit. Die Box selbst schließt die mittleren 50% ein, der innerhalb der Box gezogene Querstrich bezeichnet den Median. Die vertikalen Linien (Whiskers) verlaufen unterhalb der Box vom ersten Quartil (25. Perzentil) zum kleinsten Datenpunkt innerhalb 1,5 Quartilabständen vom ersten Quartil und oberhalb der Box vom dritten Quartil (75. Perzentil) zum größten Datenpunkt innerhalb 1,5 Quartilabständen vom dritten Quartil. Datenpunkte jenseits der Whiskers werden einzeln gezeichnet. Ausreißer, die mehr als drei Quartilabstände unter dem ersten bzw. über dem dritten Quartil liegen, werden mit speziellen Zeichen dargestellt.

Die Länge der vom Median ausgehenden Kerben entspricht einem ca. 95%-Konfidenzintervall für den Median. Ragt eine Kerbe über ein Quartil hinaus, falten sich die Enden der Box ein. Die Breite der Box ist proportional zur Wurzel der Anzahl von Beobachtungen innerhalb der Meßreihe. Überschneiden sich die Kerben zweier Boxen, so sind die jeweiligen Mittelwerte der Meßreihen nicht signifikant voneinander verschieden. Überschneiden sich die Kerben jedoch nicht, so sind die Mittelwerte als signifikant unterschiedlich zu bewerten.

Zur Auswertung der in Bild 3 dargestellten Boxen kamen sämtliche von den acht beteiligten Meßteilnehmern errechneten Mittelwerte für die Konzentration an Schimmelpilzen, bezogen auf die Filter Pk-1 bis Pk-3 und die zwei Pilzmedien. Die auf $1 m^3$ Luft berechneten Mittelwerte ergaben sich aus der Anzahl gewachsener Pilzkolonien auf den pro Filter und Verdünnungsstufe in jeweils drei Parallelen beimpften Agarplatten. Das heißt, daß jede Box die Streuung von acht Mittelwerten um ihren Median unter Angabe des 95%igen Vertrauensbereiches erfaßt.

Im Vergleich zu dem oben dargestellten äußeren Erscheinungsbild sind in der statistischen Bewertung die Unterschiede zwischen den beiden Medien fast vollständig nivelliert. Aus den beinahe deckungsgleichen Ausmaßen der Boxen im jeweiligen Direktvergleich der Filter auf MEA- bzw.

Tabelle 2. Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse der Indirekten Methode

	DG 18					MEA				
	Min.	\bar{X}	Max.	S	rel. S	Min.	\bar{X}	Max.	S	rel. S
Pk-1										
K/10 ⁻²	38,67	74,00	117,00	28,74	38,83	42,00	76,78	149,33	37,15	48,38
S _{PI}	3,78	7,99	16,82			4,04	7,52	14,18		
rel. S _{PI}	6,68	11,05	19,5			3,04	12,33	24,87		
Konz. X 10 ⁶	7,36	14,09	22,29	5,44	38,47	8,00	15,45	28,44	7,08	45,68
Pk-2										
K/10 ⁻¹	27,67	46,67	70,67	14,11	30,21	29,67	53,58	104,00	24,30	45,39
S _{PI}	3,51	7,15	12,00			1,00	8,49	17,62		
rel. S _{PI}	9,32	14,99	21,16			2,32	16,5	23,59		
Konz. X 10 ⁶	0,52	0,89	1,35	0,27	30,62	0,57	1,02	1,98	0,46	45,29
Pk-2										
K/10 ⁻¹	23,00	53,92	86,33	22,35	41,45	21,67	53,79	97,67	24,19	44,97
S _{PI}	2,65	5,24	9,87			2,65	6,85	17,0		
rel. S _{PI}	4,99	11,17	26,44			5,08	12,83	23,28		
Konz. X 10 ⁶	0,44	1,03	1,64	0,43	41,28	0,41	1,03	1,86	0,51	49,12

Min. = Minimalwert
 \bar{X} = Mittelwert
 Max. = Maximalwert
 S = Standardabweichung in KbE (Koloniebildende Einheit)
 rel. S = relative Standardabweichung in Prozent
 K/10⁻¹, K/10⁻² = Koloniezahl je Verdünnung (Mittelwert aus drei Parallelplatten)

S_{PI} = Standardabweichung in KbE (Bezug drei Parallelplatten aller Teilnehmer)
 rel. S_{PI} = relative Standardabweichung in Prozent
 Konz. = Schimmelpilzkonzentration (KbE/m³ Luft)
 Pk-1, -2, -3 = Polykarbonat-Membranfilter 1, 2, 3
 DG 18 = Dichloran-Glyzerin-Agar
 MEA = Malzextrakt Agar

DG-18-Agar ist zu entnehmen, daß beide Pilznährmedien unter den gewählten Versuchsbedingungen als gleichwertig anzusehen sind.

Die Abstufung zwischen den Verdünnungsstufen ist gegeben. Im Mittel sind die relativen Standardabweichungen bei weniger als zehn Kolonien pro Platte größer als bei Koloniezahlen kleiner gleich 100. Diese Tendenz ist unabhängig vom Kultivierungsmedium (siehe hierzu Bild 4). Sind pro Platte deutlich mehr als 100 Kolonien gewachsen, ist eine Abstufung zwischen den Verdünnungsstufen nicht mehr gegeben (z.B. unverdünnt: 162, 146, 188; 10⁻¹: 40, 32, 38). Wegen der Überbelegung kommt es zu einer gegenseitigen Hemmung des Wachstums und damit zur Bestimmung falsch niedriger Schimmelpilzkonzentrationen.

Läßt man die Ausreißer (höchster und niedrigster Einzelwert) der ermittelten Schimmelpilzkonzentration pro Filter weg, ergibt sich zwischen den Teilnehmern eine Abweichung um den Faktor ~2 (vgl. Tabelle 4). Die relative Standardabweichung zwischen allen acht Teilnehmern beträgt für DG-18-Agar 30 bis 41%, für MEA 45 bis 48%. Die Streuungen der Einzelwerte sind nicht allein laborbedingt, sondern haben ihre Ursache auch in nicht einheitlich beaufschlagten Filtern. Als Grund hierfür können die nicht homogene Verteilung des Bioaerosols in der Luft und die horizontale Anordnung der Probenahmeköpfe (I. und VIII. GSP-Kopf sind etwa 1,20 m voneinander entfernt) angesehen werden. Bild 5 zeigt einen Konzentrationsgipfel bei den in der Mitte (dem Sortierer gegenüberliegend) angeordneten Probenahmeköpfen. Bandenritt und der Abwurfsschacht befinden sich neben den Probenahmeköpfen I und VIII.

Zusätzlich zur Bestimmung der Konzentration an „Gesamt“schimmelpilzen wurde auch eine Differenzierung der

anteilmäßig häufigsten Pilzkolonien vorgenommen. In der Innenluft der Sortierkabine wurden als dominante Schimmelpilzspezies *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* und *Penicillium aurantiogriseum*-Komplex nachgewiesen.

4 Schlußfolgerungen

Das Meßverfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz auf der Basis der Filtrationsmethode Kennzahl 9420 [6] hat sich für Arbeitsplatzmessungen bewährt. Die Bestimmung der einatembaren Fraktion, das personentragbare Probenahmesystem, die quantitative Erfassung sehr großer Schimmelpilzkonzentrationen und die variable Aufarbeitung der beaufschlagten Filter (direkt, indirekt) stellen Vorteile gegenüber anderen Probenahmeverfahren (z.B. Impaktionsmethode) dar. Aus diesen Gründen und wegen der Möglichkeit langer Probenahmezeiten, bedingt durch die hohe Austrocknungstoleranz der Schimmelpilzsporen, ist die Sammlung über Filtration besonders geeignet zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft und als Standardmethode zu empfehlen.

Auf eine weitergehende statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse wird verzichtet, da die Anzahl der Einzelergebnisse für eine repräsentative Stichprobe insgesamt zu gering ist.

Die Untersuchungsergebnisse unterstreichen, wie inhomogen die Sporenverteilung am Arbeitsplatz sowohl in räumlicher (Konzentrationsgipfel bei den in der Mitte angeordneten GSP-Köpfen) als auch in zeitlicher Hinsicht (Pk-1 bei allen Teilnehmern über eine Zehnerpotenz höher als Pk-2, -3) ist. Die Systematik der Abweichungen spricht eindeutig gegen ausschließlich laborbedingte Schwankungen.

Tabelle 3. Einzelergebnisse aller acht Teilnehmer (Indirekte Methode)

Filter/ Verd.	GSP- Kopf	DG 18						MEA				
		K	\bar{X}	S_{PI}	rel S_{PI}	Konz. [X 10 ⁶]	K	\bar{X}	S_{PI}	rel. S_{PI}	Konz. [X 10 ⁶]	
Pk-1 10 ⁻²	I	76, 64, 69	69,67	6,03	8,65	13,27	80, 79, 71	76,67	4,93	6,43	14,60	
	II	56, 65, 51	57,33	7,09	12,37	10,92	58, 61, 42	53,67	10,21	19,03	10,22	
	III	38, 43, 35	38,67	4,04	10,45	7,36	36, 36, 54	42,00	10,39	24,74	8,00	
	IV	106, 88, 94	96,00	9,17	9,54	18,29	108, 114, 116	112,67	4,16	3,68	21,46	
	V	104, 136, 111	117,00	16,82	14,37	22,29	144, 153, 151	149,33	4,73	3,16	28,44	
	VI	110, 111, 98	106,33	7,23	6,8	20,25	105, 105, 98	102,67	4,04	3,04	19,55	
	VII	56, 56, 39	50,33	9,82	19,50	9,59	73, 46, 52	57,00	14,18	24,87	10,86	
	VIII	61, 55, 54	56,67	3,78	6,68	10,79	54, 63, 48	55,00	7,55	13,72	10,48	
Mittel			74,00	7,99	11,05	14,09		76,78	7,52	12,33	15,45	
S			28,74			5,44		37,15			7,08	
rel. S			38,83			38,47		48,38			45,68	
Pk-2 10 ⁻¹	I	40, 32, 38	36,67	4,16	11,35	0,69	42, 44, 43	43,00	1,00	2,32	0,82	
	II	41, 50, 50	47,00	5,19	11,05	0,89	40, 36, 31	35,67	4,51	12,64	0,68	
	III	32, 24, 27	27,67	4,04	14,60	0,52	22, 33, 34	29,67	6,66	22,44	0,57	
	IV	51, 36, 55	47,33	10,02	21,16	0,90	37, 54, 62	51,00	12,77	25,0	0,97	
	V	51, 75, 63	63,00	12,00	19,04	1,20	64, 95, 65	74,67	17,62	23,59	1,42	
	VI	34, 38, 41	37,67	3,51	9,32	0,72	52, 42, 39	44,33	6,81	15,35	0,84	
	VII	61, 71, 80	70,67	9,50	13,44	1,35	95, 109, 108	104,00	7,81	7,51	11,98	
	VIII	34, 51, 46	43,67	8,74	20,00	0,83	54, 34, 51	46,33	10,79	23,28	0,88	
Mittel			46,67	7,15	14,99	0,89		53,58	8,49	16,5	1,02	
S			14,11			0,27		24,30			0,46	
rel. S			30,21			30,62		45,39			45,29	
Pk-3 10 ⁻¹	I	27, 16, 26	23,00	6,08	26,44	0,44	18, 22, 25	21,67	3,51	16,2	0,41	
	II	51, 56, 52	53,00	2,65	4,99	1,01	50, 34, 35	39,67	8,96	22,59	0,76	
	III	36, 32, 27	31,67	4,51	14,32	0,60	36, 32, 31	33,00	2,65	8,01	0,63	
	IV	72, 71, 65	69,33	3,79	5,46	1,32	62, 67, 61	63,33	3,21	5,08	1,21	
	V	89, 71, 73	77,67	9,87	12,70	1,48	56, 90, 73	73,00	17,0	23,28	1,39	
	VI	78, 92, 89	86,33	7,37	8,53	1,64	88, 95, 110	97,67	11,24	11,51	1,86	
	VII	43, 37, 42	40,67	3,12	7,90	0,77	51, 44, 46	47,00	3,61	7,67	0,89	
	VIII	45, 50, 54	49,67	4,51	9,07	0,95	56, 59, 50	55,00	4,58	8,33	1,05	
Mittel			53,92	5,24	11,17	1,03		53,79	6,85	12,83	1,03	
S			22,35			0,43		24,19			0,51	
rel. S			41,45			41,28		44,97			49,12	

Verd. = Verdünnung

 \bar{X} = Mittelwert aus drei Parallelplatten (KbE) S_{PI} = Standardabweichung in KbE
(Bezug drei Parallelplatten)rel. S_{PI} = relative Standardabweichung in ProzentS = Standardabweichung der einzelnen Mittelwerte bzw.
Schimmelpilzkonzentration in KbE

□ = Minimal-/Maximalwert

K = Koloniezahl pro Platte in KbE

Konz. = Schimmelpilzkonzentration in KbE pro m³

KbE = Koloniebildende Einheit

DG 18 = Dichloran-Glyzerin-Agar

MEA = Malzextrakt-Agar

rel. S = relative Standardabweichung in Prozent

Das auf dem Förderband befindliche Sortiergut wies in seiner Zusammensetzung während der drei Probenahmezeiten (Pk-1, Pk-2, Pk-3) erhebliche Schwankungen auf (Biomüll, Grünschnitt u.a.), die die zeitliche Varianz erklären könnten.

Die häufig diskutierte Schwankungsbreite der Meßergebnisse bei Einsatz eines mikrobiologischen Luftkeimmeßverfahrens im Bereich mehrerer Größenordnungen konnte unter Einsatz des standardisierten Meßverfahrens im 1. Ringversuch nicht bestätigt werden. Aufgrund der Erkenntnisse

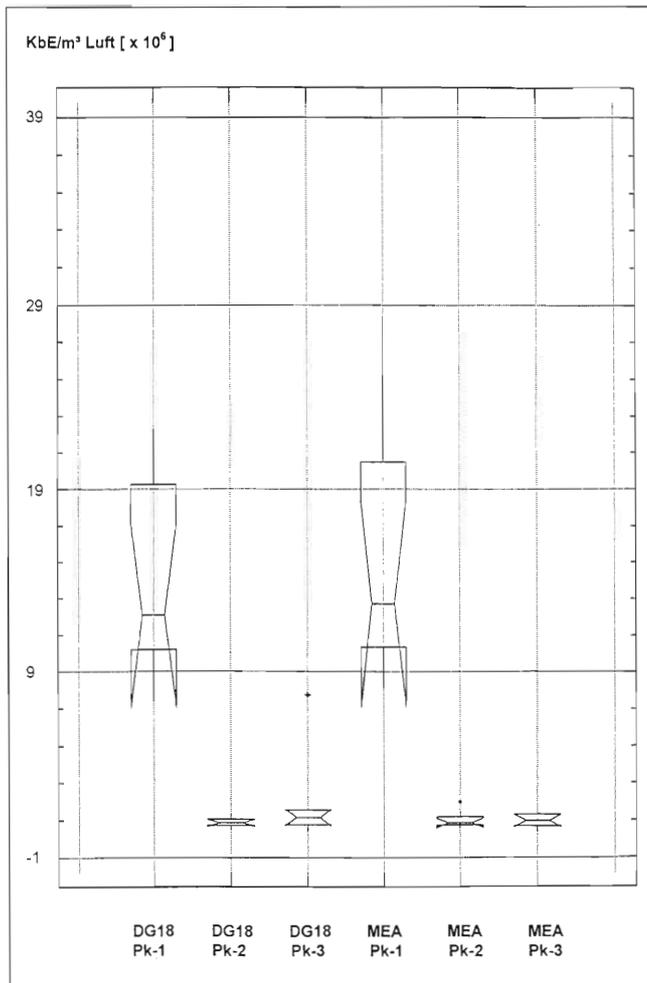


Bild 3. Vergleich der Streuung sämtlicher von den acht beteiligten Teilnehmern pro Filter und Nährmedium errechneten Mittelwerte, dargestellt als gekerbte Box- und Whisker Plots (Indirekte Methode)

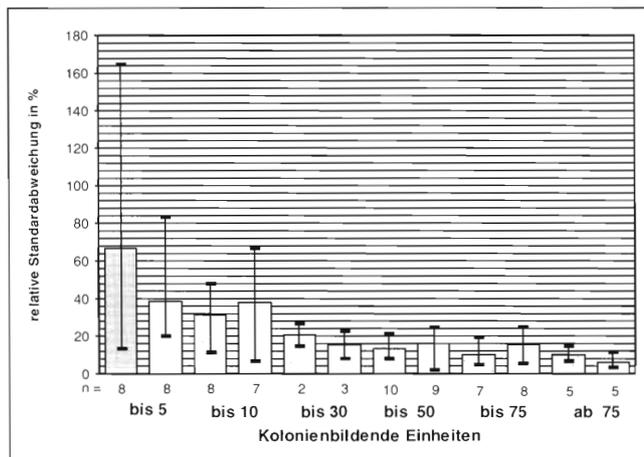


Bild 4. Abhängigkeit der mittleren relativen Standardabweichung von der Koloniezahl pro Platte
 □ Dichloran-Glycerin-Agar
 ■ Malzextrakt-Agar
 ⊢ Minimale und maximale relative Standardabweichung

aus umfangreichen Meßkampagnen und dem hier vorliegenden Ringversuch wurde eine überarbeitete Version des Meßverfahrens erstellt, die vor allem in einer Vereinfachung und Konkretisierung desselben besteht.

Als Filtermaterialien sind Gelatine-, Polycarbonat- und Cellulosenitrat-Membranfilter verwendbar. Für die Direkte Methode werden Cellulosenitrat-Membranfilter (grau mit

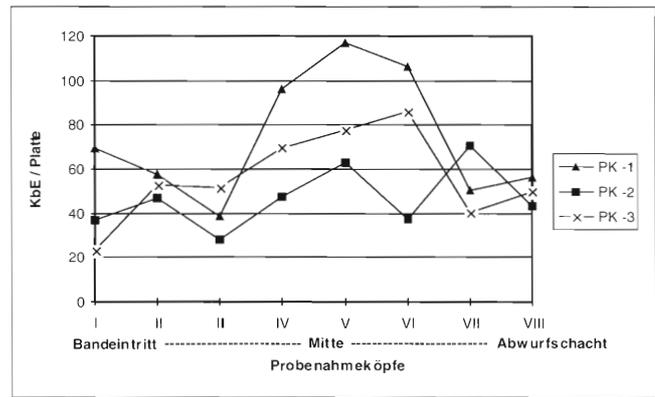


Bild 5. Räumliche Schimmelpilzsporenverteilung am Arbeitsplatz am Beispiel der horizontalen Anordnung der Probenahmeköpfe (Indirekte Methode)

Tabelle 4. Maximale Abweichung der ermittelten Schimmelpilzkonzentration zwischen den Teilnehmern um den Faktor

Filter	DG 18 Ausreißer		MEA Ausreißer	
	mit	ohne	mit	ohne
Pk-1	3,03	2,11	3,56	2,09
Pk-2	2,56	1,72	3,50	2,09
Pk-3	3,74	2,45	4,50	2,21

DG 18 = Dichloran-Glycerin-Agar

MEA = Malzextrakt-Agar

Pk-1, -2, -3 = Polycarbonat-Membranfilter 1, 2, 3

Gitternetz) empfohlen. Cellulosefilter sind für die Indirekte Methode ungeeignet, da die Sporen stark auf der Oberfläche anhaften und somit eine quantitative Ablösung sehr erschwert wird. Zu empfehlen sind Polycarbonat- und Gelatine-Membranfilter, letzterer löst sich in Flüssigkeit bei 35 bis 40 °C vollständig auf.

Für den Transport und die Lagerung der beaufschlagten Filter wird nunmehr empfohlen, diese trocken bei Umgebungstemperatur (nicht höher als die Bebrütungstemperatur) vorzunehmen. Nachdem die Filter in physiologische NaCl-Lösung mit 0,01% Tween überführt, aufgelöst bzw. die Sporen in der Lösung resuspendiert wurden, sollte die weitere Aufbereitung innerhalb von zwei Stunden erfolgen. Unabhängig von der Art der eingesetzten Filter sind diese zum Ablösen der Sporen bzw. zum Auflösen des Filters 15 Minuten bei 35 bis 40 °C zu schütteln und vier Minuten zu vortexen. Anschließend muß sofort pipettiert werden, da sich erneut Aggregate bilden.

Die zwei getesteten Pilznährböden haben sich im Sinne des Untersuchungsgegenstandes bewährt. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem DG-18- und dem MEA-Agar konnte nicht festgestellt werden. Als Standardnährboden (Schiedsmedium) wird jedoch der DG-18-Agar empfohlen, weil die Inhibition der Vermehrung von Bakterien und Hefen sowie die Größenbegrenzung des Wachstums von Zygomyceten-Kolonien eine deutlich verbesserte Auswertbarkeit der Platten bei geringeren Schwankungsbreiten der Ergebnisse bedingt. Diese dem DG-18-Agar inhärenten Eigenschaften wirken sich insbesondere bei längeren Bebrütungszeiträumen vorteilhaft aus.

Die Bebrütungstemperatur für die Bestimmung mesophiler Schimmelpilze wird auf 25 °C festgeschrieben. Die bisher gewählten Temperaturen 22 °C und 30 °C besitzen keinen zusätzlichen Aussagewert für dieses Spektrum. Für den Nach-

weis spezieller (humanpathogener thermotoleranter) Schimmelpilzarten werden in der überarbeiteten Verfahrensvorschrift Hinweise gegeben.

Um Hemmeffekte von Kolonien durch eine Überbelegung von Platten zu vermeiden bzw. den hohen Zufallsfaktor bei geringen Kolonienzahlen pro Platte zu reduzieren, wird vorgeschlagen, als Optimumsbereich nur Platten mit einer Spanne von 10 bis 100 KbE/Platte (\varnothing 85 mm) bei der Indirekten Methode bzw. 3 bis 30 KbE/Platte (\varnothing 37 mm) bei der Direkten Methode in die Auszählung einzubeziehen. Je nach Abstufung der Kolonienzahlen pro Verdünnungsstufe ist bei Priorität der niedrigeren Verdünnungsstufe als Toleranzbereich eine Spanne von 5 bis 150 KbE/Platte bei der Indirekten Methode zulässig. Voraussetzung ist die Hemmung schnellwachsender Schimmelpilzarten durch entsprechende Zusätze.

Unter den Probenahmebedingungen des 1. Ringversuches war eine homogene Keimverteilung in der Luft nicht zu erwarten und gegeben, so daß die festgestellten Konzentrationsabweichungen nicht nur laborbedingt sind. Somit kommt für zukünftige Ringversuche der Wahl des Meßplatzes im Rahmen der Meßstrategie eine besondere Bedeutung zu. Um die laborabhängige Abweichung des Verfahrens zu ermitteln, wäre vor allem die Bereitstellung einheitlich beaufschlagter Filterproben erforderlich.

Die überarbeitete Version des Meßverfahrens wurde unter der Kennziffer 9420 als „Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz“ in der BIA-Arbeitsmappe veröffentlicht [6]. Die aktuelle Version des Verfahrens wird dem ABAS als Beschlußvorlage zur Änderung der TRBA 430 im März 1997 vorgelegt.

Kontaktnahme:

Dr. Christoph Deininger

Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit – BIA

Referat Mikrobiologie

D-53754 Sankt Augustin

Tel. (02241) 231-663, Fax -234

Dr. Bernhard Schicht

Landesamt für Arbeitsschutz Sachsen-Anhalt

Postfach 1802

D-06815 Dessau

Tel. (0340) 6501-226, Fax -294

Literatur

1. **Deininger, Ch.:** Pathogene Bakterien, Pilze und Viren am Arbeitsplatz. Staub – Reinhalt. Luft 53 (1993) Nr. 7/8, S. 293–299
2. **Krug, M.; Schicht, B.:** Gefährdungspotentiale durch biologische Agenzien am Arbeitsplatz und in der Umwelt. Teil 1: TÜ 36 (1995) Nr. 5, S. 197–203; Teil 2: TÜ 36 (1995) Nr. 10, S. 377–382
3. **Hüsing, B.; Knorr, Chr.; Menrad, K.; Strauß, E.:** Erhebung des Standes der Technik beim nicht beabsichtigten Umgang mit bestimmten biologischen Arbeitsstoffen aus der Sicht des Arbeitsschutzes. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz FB 725. Dortmund 1995
4. **Otto, J.; Peter, L.; Riege, F.G.:** Thüringer Wertstoffsortieranlagen unter der „Lupe“. s.i.s. (Z. f. Arbeitsschutz) 3 (1996), S. 118–122
5. **RL 90/679/EWG** des Rates vom 26. Nov. 1990 über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit. Geändert durch RL 93/88/EWG des Rates vom 12. Oktober 1993 und angepaßt durch die RL 95/30/EG des Rates vom 30. Juni 1995
6. **BIA-Arbeitsmappe** Messung von Gefahrstoffen. Hrsg.: Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit – BIA, Sankt Augustin. Berlin, Bielefeld: Erich Schmidt Verlag 1989 – Losebl.-Ausg.
7. **Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe:** Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilz-/Hefenkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz. TRBA 430 B ArbBl. (1997) Nr. 1, S. 47–53
8. **Grüner, C.:** Arbeitsschutz in Biomüll Kompostieranlagen. In: Böhm, R. (Hrsg.), Bericht des 5. Hohenheimer Seminars (1994), S. 148–158
9. **Daschner, F.:** Bewertung der hygienischen Situation von Abfallwirtschaftsanlagen im Hinblick auf luftgetragene Keime. Entsorgung Schriften 15 (1995)