

# Luftbefeuchteranlagen - Schnelltest zur Ermittlung der mikrobiellen Belastung

## Bestimmung von Adenosintriphosphat (ATP) in Proben aus Luftbefeuchtungsanlagen

Verena Liebers, Monika Raulf

An vielen Arbeitsplätzen existieren Raumluftechnische Anlagen, um ein konstantes Raumklima zu gewährleisten. Luftbefeuchtung ist dabei für viele industrielle Prozesse vorteilhaft, birgt allerdings auch das Risiko, dass sich mikrobiell belastete Bioaerosole bilden. Diese können zu Atemwegserkrankungen bei den Beschäftigten führen. Mikrobielle Verunreinigungen müssen deshalb zeitnah erkannt und beseitigt werden. Zu diesem Zweck wurde auf Initiative der Berufsgenossenschaft Energie Textil Elektro und Medienerzeugnisse (BGEM) ein Schnelltest zur Untersuchung von Befeuchterwasser auf Basis der ATP-Messung im IPA evaluiert. Die bereits international veröffentlichten Ergebnisse werden hier zusammengefasst [1].

Luftbefeuchtung ist eine wichtige Maßnahme für verschiedene industrielle Prozesse zum Beispiel in der Druck- und Textilindustrie, teilweise auch zur Verbesserung der Raumluft allgemein. Allerdings bietet Wasser, vor allem stehendes Wasser bei Raumtemperatur, ein gutes Mikroklima für das Wachstum von Bakterien und Pilze, das nur durch entsprechende Reinigungsmaßnahmen eingedämmt werden kann. Durch die Bildung von Bioaerosolen können sich die Keime im Raum verteilen, über die Atemwege aufgenommen werden und unter anderem zu Atemwegssymptomen wie Husten, Atemnot und/oder auch Fieber führen. Eine fortlaufende Kontrolle und frühzeitige Beseitigung von verstärktem mikrobiellem Wachstum in den Befeuchteranlagen ist deshalb unabdingbar.

### VDI 6022 „Raumluftechnik, Raumlufqualität“

In der VDI 6022 „Raumluftechnik, Raumlufqualität“ wird zur Prüfung der Wasserqualität die Keimzahlbestimmung mittels Kultivierungsmethode empfohlen [3]: Dabei wird die jeweilige Probe auf

Nährböden und bei Temperaturen von 22 °C und 36 °C inkubiert und anschließend die Kolonien der keimfähigen Mikroorganismen gezählt, die auf den Nährböden anwachsen. Diese Methode ist auch das Standardverfahren zur Überprüfung der Trinkwasserqualität. Die sachgemäße Ausführung erfordert eine entsprechende Laborausstattung, die Inkubationszeiten betragen zwei bis drei Tage. Aus diesem Laborverfahren wurde bereits ein verkürztes Verfahren der Keimzahlbestimmung, die sogenannten „Dip Slides“ entwickelt. Dabei handelt es sich um eine semiquantitative Bestimmung keimfähiger Organismen in einem mit Nährboden vorbeschichteten Röhrchen, das zumeist nur bei einer Temperatur für mindestens 24 Stunden bebrütet wird. Dennoch bleibt auch mit dieser verkürzten Methode ein Zeitfenster zwischen Messung und Aussage über die Keimbelastung. Je nach Nährboden und Inkubationszeit, werden nur bestimmte Organismen in diesem Test sichtbar, nicht keimfähiges mikrobielles Material entzieht sich dem Nachweis. Dabei ist bekannt, dass gesundheitliche Gefahren nicht nur

von vermehrungsfähigen Mikroben ausgehen. Zum Beispiel kann das Einatmen von Zellwandbestandteile Gram-negativer Bakterien (Endotoxin) zu Atemwegserkrankungen führen.

### Schnelltest für die Bestimmung der Keimbelastung

Auf Initiative der BGETEM wurde deshalb im IPA die Evaluation eines Schnelltests durchgeführt, der einen anderen Parameter als die keimfähigen Organismen abgreift. Da Adenosintriphosphat (ATP) in den Zellen lebender Organismen die wichtigste Speicherform chemischer Energie darstellt, ist dessen Nachweis ein erfolgversprechendes Verfahren. Weitere Kriterien für die Auswahl des Tests waren außerdem Schnelligkeit und der mögliche Einsatz im Betrieb ohne Laborausstattung [1,2].

### Testprinzip

Das Prinzip der Biolumineszenz findet sich in der Natur auch beim Glühwürmchen, chemische Energie wird in Lichtenergie umgesetzt. Im verwendeten Test kann die freigesetzte Energie mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion in Form von Licht sichtbar gemacht werden. Dabei setzt das Enzym Luciferase das Substrat D-Luciferin unter Verbrauch von Sauerstoff um. Für diesen Vorgang wird ATP benötigt, das zu AMP (Adenosinmonophosphat) umgewandelt wird. Das ausgestrahlte Licht kann mittels Luminometer gemessen werden, das Ergebnis wird in RLU (= relative light units) angegeben. Die Lichteinheiten sind direkt proportional zum intra- und extrazellulären ATP und liefern entsprechend eine Aussage über den Anteil lebenden Materials in einer Probe. Messgeräte für diese Reaktion gibt es von verschiedenen Firmen, in der IPA-Studie kam das HY-LiTE 2-Verfahren von Merck zum Einsatz.

Ursprünglich wurde die ATP-Messung vor allem im Lebensmittelbereich verwendet. Dort geht es darum, bereits minimale Verunreinigungen zu erkennen. Auf Tischen und anderen Bereichen der Lebensmittelindustrie werden Wischproben angefertigt, die mittels HY-LiTE analysiert werden. Im Hinblick auf Befeuchterwasser stehen andere Anforderungen an die Messtechnik im Vordergrund. ATP wird hier in wässrigen Materialien bestimmt, zudem ist eine absolute Keimfreiheit für Befeuchterwasser nicht notwendig. Ein gewisser mikrobieller Gehalt in Befeuchterwasser ist durchaus zu tolerieren. Bisher gibt es keine gesundheitsbasierten Erkenntnisse, welcher mikrobielle Gehalt im Wasser notwendig ist, um Krankheiten auszulösen. Generell gilt aus präventiven Gründen das Minimierungsgebot. In der VDI 6022 wurden anhand der Keimzahlbestimmung 1000 KBE/ml als Grenze definiert, die eine Reinigung des Wassers implementiert. 100 KBE/ml (Trinkwasserqualität) gelten als adäquat für das Wasser, das zur Befüllung Raumluftechnischer Anlagen verwendet wird.

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung können allerdings nicht als 'Goldstandard' angesehen werden, da diese Methode neben dem hohen Zeitaufwand verschiedene Fallstricke enthält.

Das Ziel der Untersuchungen im IPA bestand deshalb zunächst darin, die Anwendung der Biolumineszenzmessung im Hinblick auf



Abb. 1: Der Messstift wird direkt in das zu untersuchende Wasser getaucht und das Messergebnis liegt innerhalb von fünf Minuten vor.

zwei Fragestellungen zu prüfen: Einerseits sollte die Aussagekraft der Ergebnisse durch den Vergleich mit anderen Tests untersucht werden; andererseits galt es, die Tauglichkeit des Schnelltests in der Praxis zu überprüfen.

In dem Projekt wurden 186 wässrige Proben aus Befeuchteranlagen und anderen Quellen daher zusätzlich zur ATP-Messung unter anderem mit folgenden Verfahren charakterisiert:

1. Mit Hilfe des LAL-Tests (Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test) wurde die Endotoxinaktivität erfasst.
2. Durch Stimulation von kryokonserviertem Vollblut mit dem Probenmaterial und nachfolgender Messung des freigesetzten Zytokins IL-1 $\beta$  wurde die pyrogene Aktivität ermittelt.
3. Anhand der Kultivierung auf Hefeagar bei 22 und 36 °C wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) der Proben bestimmt.

Die Korrelation der Ergebnisse aus den drei genannten Tests war signifikant und lag zwischen  $r_s = 0,5$  und  $r_s = 0,79$ . Dies ist ein Hinweis, dass die ATP-Messung ein relevanter Parameter ist, um die mikrobielle Belastung von wässrigen Proben abzubilden.

### Einsatz in der Praxis

Für den Praxistest der Biolumineszenzmessung waren verschiedene Fragestellungen elementar. Einerseits musste die Methode vor Ort und mit geringem Zeitaufwand durchführbar sein, andererseits galt es, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu prüfen.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass es für die Messung mit HY-LiTE 2 nicht notwendig ist, die Proben zu verdünnen oder anderweitig aufzuarbeiten. Der Messstift wird direkt in das zu untersuchende Wasser getaucht (Abb.1). Das Messergebnis liegt innerhalb von fünf Minuten vor.

Anhand von 67 Wasserproben, die doppelt untersucht wurden (im Betrieb vor Ort und im Labor), ließ sich bestätigen, dass auch die Resultate, die direkt im Betrieb erhoben wurden, vertrauenswürdig sind.

Da die mikrobiellen Bestandteile nicht unbedingt homogen in den Wasserproben verteilt sind, hängt die Reproduzierbarkeit der ATP-Ergebnisse allerdings auch von der Art des Probenmaterials ab. In der vorliegenden Studie wurde eine signifikante Korrelation von  $r_s = 0,93$  zwischen zwei unabhängigen Proben aus einem Wasserbecken gefunden. Dennoch kann es im Einzelfall zu Abweichungen zwischen zwei Messergebnissen kommen. Ähnlich wie es unter anderem auch für die Keimzahlbestimmung üblich ist, ist es deshalb empfehlenswert, nur den Mittelwert von drei Messungen für die Beurteilung einer Probe einzusetzen. Die Reproduzierbarkeit von Messwerten aus biologischen Proben ist nur bedingt gegeben, da das biologische Material selbst nicht homogen verteilt ist. Ein Mittelwert aus mehreren Messungen wird die reale Situation am besten widerspiegeln.

### Bewertung der Testergebnisse

Der Einsatz der ATP-Messung zur Analyse von Befeuchterwasserproben wirft allerdings auch die Frage nach einem Bewertungsschema auf. Da es keine gesundheitsbasierten Grenzwerte gibt, ist eine Regelung [1] anhand der technischen Möglichkeiten und im Vergleich mit anderen Testergebnissen sinnvoll. Der Messbereich des HY-LiTE beträgt laut Hersteller 0-99000 RLU. Im Verlauf der Untersuchungen ließ sich als Hintergrundwert für nicht kontaminierte Proben von 50 RLU festlegen. Der Wert „Null“ konnte auch in Reinstwasser nicht dokumentiert werden. Zur weiteren Beurteilung der Proben sind RLU-Bereiche heranzuziehen, analog zur bisherigen Praxis aufgrund der Keimzahlbestimmung. Eine sinnvolle Einteilung wäre etwa das Aufstellen von drei Biolumineszenz-Kategorien:

- bis 1500 RLU (Kategorie 1, akzeptierter mikrobiologischer Hintergrund),
- 1500-15000 RLU (Kategorie 2; Reinigung empfohlen) und
- >15000 RLU (Kategorie 3; Reinigung erforderlich).

Im Übrigen kann der Verlauf der Messergebnisse im Rahmen von Hygienekontrollen, unabhängig von konkreten Kategorien zur Einschätzung des mikrobiellen Eintrags verwendet werden: Sollte sich über mehrere Wochen ein Anstieg der Messwerte dokumentieren lassen, könnten bereits frühzeitig Gegenmaßnahmen gegen den mikrobiellen Bewuchs getroffen werden.

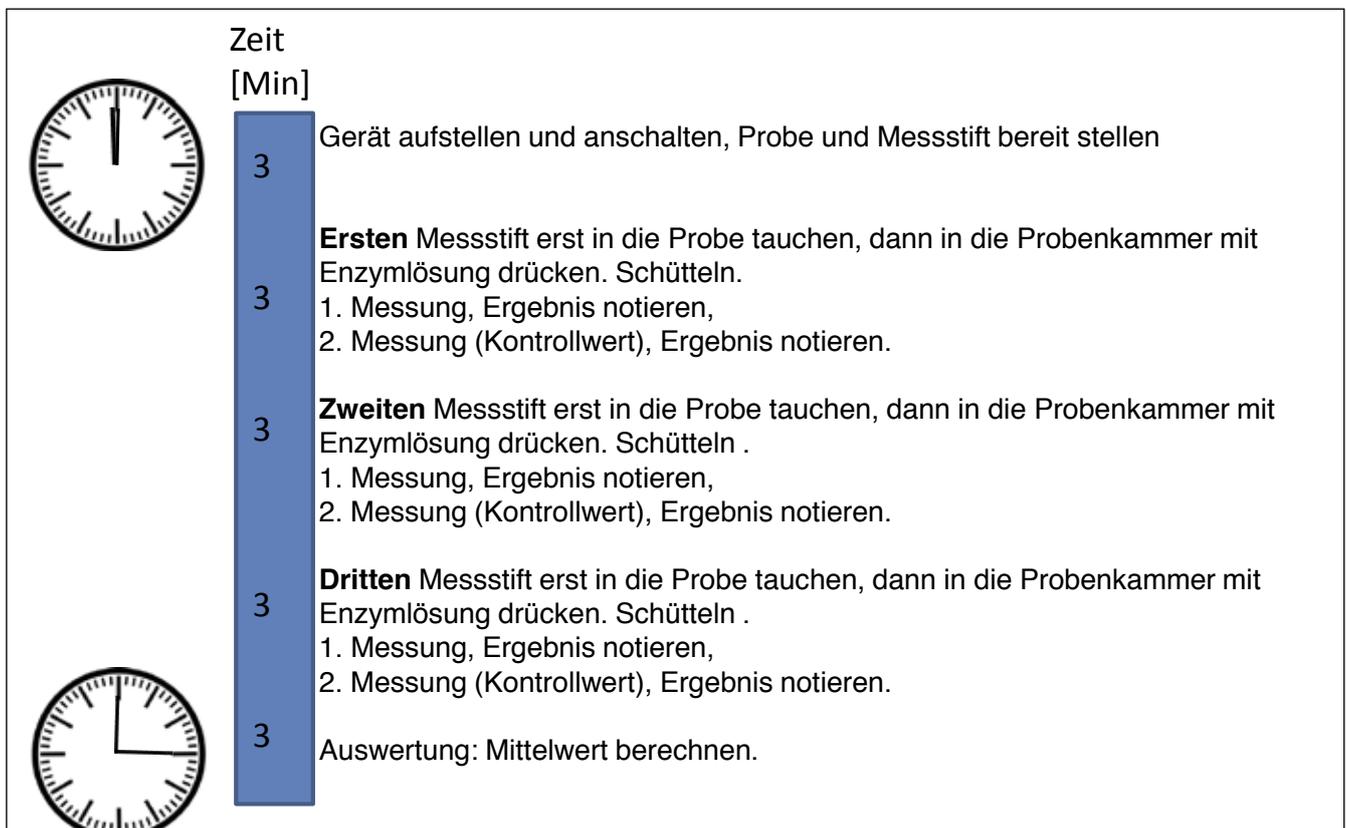


Abb. 2: Ablauf einer ATP-Messung mit der im IPA evaluierten Messmethode.

### Fazit

Mit den Untersuchungen im IPA konnte gezeigt werden, dass die ATP-Messung mittels Biolumineszenz ein schnelles und robustes Verfahren ist, das einen summarischen Überblick über die mikrobielle Belastung des Wassers in Raumluftechnische Anlagen erlaubt. Damit liefert der Test eine unkomplizierte Möglichkeit, Risiken zu erkennen, zu bewerten und gegebenenfalls weitere Maßnahmen zu ergreifen. Es ist vorgesehen, die Ergebnisse dieses Projekts im B2-Seminar Biologische Arbeitsstoffe vorzustellen und den Praxiseinsatz des Tests dort und in weiteren Arbeitskreisen der DGUV zu diskutieren

Die Autorinnen  
**Dr. Verena Liebers, Prof. Dr. Monika Raulf**  
 IPA

Beitrag als PDF



### Literatur

1. Liebers V, Bachmann D, Franke G, Freundt S, Stubel H, Düser M., Kendzia B, Böckler M, Brüning T, Raulf M: Determination of ATP-activity as a useful tool for monitoring microbial load in aqueous humidifier samples. Int. J. Hyg. Environ. Health 2015; 218: 246-53
2. Liebers V, Bachmann D, Causemann S, Franke G, Freundt S, Stubel H, Düser M, Kendzia B, Sander I, Brüning T, Böckler M, Raulf M: ATP als Marker für die mikrobielle Verunreinigung von Luftbefeuchtungsanlagen. Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft, in press
3. VDI 6022: Raumluftechnik, Raumlufqualität – Hygieneanforderungen an Raumluftechnische Anlagen und Geräte (Ventilation and indoor-air quality – Hygiene requirements for ventilation and air-conditioning systems and units (VDI Ventilation Code of practice) Issue German/English Beuth-Verlag GmbH, Berlin, Blatt 1, 2011

Für die Zusammenarbeit bedanken wir uns insbesondere bei folgenden Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der BG ETEM: Dieter Bachmann, Margret Böckler, Dr. Susanne Causemann, Gabriele Franke