

4 Bioaerosole

4.1 Einführung

Bioaerosole bestehen aus

- Mikroorganismen
 - Viren
 - Bakterien
 - Pilze
 - Protozoen
 - Algen
- aus Bruchstücken dieser Organismen
 - Zellbestandteile mit allergener oder toxischer Wirkung
- aus von Lebewesen gebildeten Stoffen
 - Flüchtige organische Verbindungen (VOC's)
 - Enzyme
 - Toxine

Bioaerosole kommen in den unteren Schichten unserer Atmosphäre natürlicherweise vor: Gewässer, Erdboden, Pflanzenblätter, Tiere, auch Menschen sind z.T. massiv mit Mikroorganismen bewachsen; die Mikroorganismen und deren Bestandteile und Produkte werden so an die Luft abgegeben .

Unsere Luft ist also nicht keimfrei.

Bioaerosole entstehen auch durch menschliche Grundaktivitäten (Atmung, Sprechen, Fäkalien) und Arbeiten (Erdbewegungen, Landwirtschaft)

Bioaerosole finden sich auch in Innenräumen;

- eingetragen durch die Aussenluft,
- verändert (oder generiert) in den Raumluftechnischen Anlagen,
- bedingt durch die im Raum befindlichen Menschen und deren Aktivitäten,
- ausgehend von Baumaterialien oder im Raum befindlichen Gegenständen (Zimmerpflanzen)

Die Auswirkungen der Bioaerosole hängen von deren Zusammensetzung und der Konzentration der einzelnen Komponenten ab und können sowohl die Gesundheit betreffen (wie weiter unten beschrieben) als auch andere Folgen haben (Materialverschlechterung, Ernteschäden, Produktionsausfälle)

4.2 Viren

Viren sind sehr kleine Organismen an der Grenze zur Definition „Lebewesen“:

Wesentliche Züge dessen, was man als „Leben“ bezeichnet, fehlen:

- In der Regel können sie sich nicht aktiv bewegen,
- sie haben kaum Stoffwechsel,
- sie wachsen nicht (entstehen in ihrer Endgröße) und
- sie können sich nicht aktiv vermehren (sondern werden in ihren Zielzellen vermehrt)

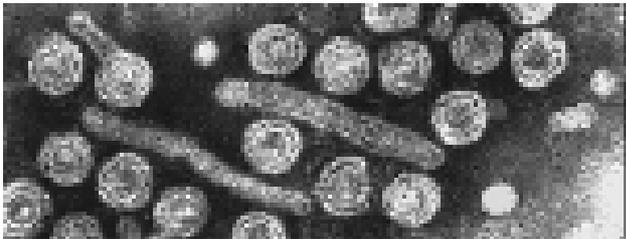
Viren sind zwischen 30nm und 300nm groß und bestehen im Prinzip

- aus einer Nukleinsäure (RNA oder DNS) ,
- einer rudimentären Eiweissaustattung und
- einer Hülle aus relativ einfach strukturierten Proteinen.

Humanpathogene Viren können sich in Raumluftechnischen Anlagen nicht vermehren
Bei Hygieneinspektionen Raumluftechnischer Anlagen können Viren deshalb vernachlässigt werden

Virusnachweis:

- Elektronenmikroskopie (zu klein für das Lichtmikroskop)
- Kultur (schwierig , in Zellkulturen)
- Antigennachweis
- Molekularbiologisch (PCR)



elektronenmikroskopische Aufnahme von Viren



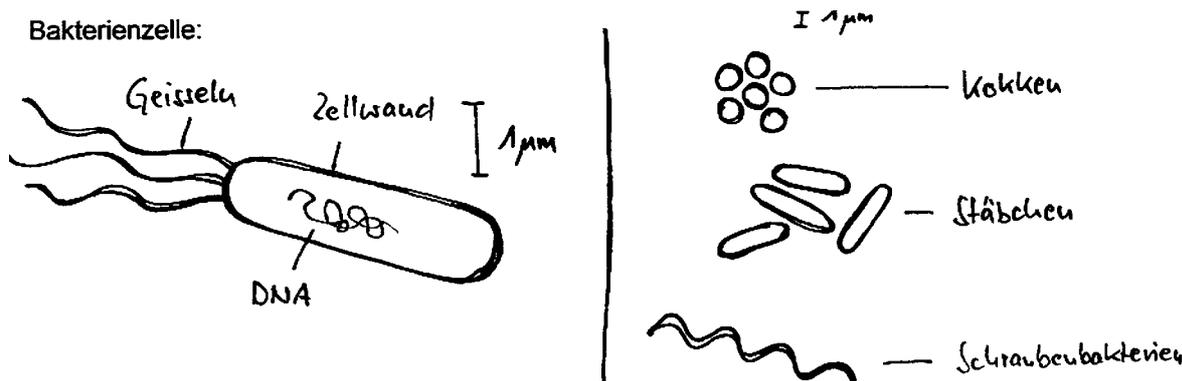
Gramnegative Stäbchenbakterien, lichtmikroskopische Aufnahme

4.3 Bakterien

Bakterien sind einzellige Organismen ohne Zellkern; das Bakteriengenom (= Nukleinsäure) liegt frei im Bakterieninneren. Bakterien haben auch noch keine Mitochondrien. Derartige Lebewesen nennt man Procaryonten (im Gegensatz zu den Eucaryonten = Pflanzen oder Tiere)

Bakterien sind 0,5 – 10 µm groß, die Formen sind

- Kugelig (Kokken)
- Länglich (Stäbchen)
- Gekrümmt oder schraubenförmig (Spirillen)



Die Bakterienzellwand kann sein

- Grampositiv
- Gramnegativ (enthält LPS / Endotoxin)
- Mycolsäurehaltig

Wachstumsbedingungen

Bakterien sind in der Umwelt weit verbreitet und haben die unterschiedlichsten Wachstumsansprüche, viele leben unter ganz anderen Bedingungen als wir (hoher Druck, hohe Temperatur, Sauerstoffmangel, H₂S-Milieu), z.B. die Archebakterien; mit anderen Bakterienarten teilen wir den Lebensraum (Eubakterien).

Umweltbakterien sind sehr anspruchslos, sie brauchen Wasser und anorganische oder organische Substrate zum Stoffwechseln. Bei komplettem Austrocknen sterben die meisten Bakterien ab. Sporenbildung: einige Bakterienarten können unter widrigen Lebensbedingungen ihr Genom mit einer dicken, widerstandsfähigen Kapsel versehen. Die so entstandene Spore kann lange Zeit unter schlechten Bedingungen überdauern (u.U. Jahrzehnte von Trockenheit) und unter günstigeren Umständen wieder Auskeimen. Sporen können gebildet werden von
Aeroben Sporenbildnern (z.B. *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, auch: *Bacillus anthracis*)
Anaeroben Sporenbildnern (z.B. *Clostridium tetani*)

Bakterien vermehren sich asexuell durch Zweiteilung (= Verdoppelung), die Verdoppelungszeit beträgt unter günstigen Umständen 20-30 Minuten. Dadurch kommt es unter geeigneten Temperaturen zur exponentiellem Wachstum.

Auf Festnährböden entstehen aus einzelnen Organismen (oder aus Konglomeraten mehrerer Organismen) sichtbare Kolonien (von 0,5 – 10 mm Durchmesser), die Ursprungszellen dieser Kolonien werden Kolonie Bildende Einheiten (KBE bzw CFU) genannt und beschreiben die ursprüngliche Keimzahl der untersuchten Probe.

Auswirkungen von Bakterien auf die menschliche Gesundheit

- Infektion

Die meisten der in der Umwelt vorkommenden Bakterien sind für den Menschen nicht infektiös, sie können in Milieu unseres Körpers nicht existieren (Druck, pH, Sauerstoff, Immunsystem). Opportunistisch pathogene Keime können Infektionen auslösen, wenn unser Immunsystem geschwächt ist, pathogene Keime können auch bei Immungesunden Infektionen auslösen. Diese Bakterien können aber wiederum in der Umwelt meistens nicht überleben (z.B. Meningokokken, Pneumokokken); Ausnahme: *Mycobacterium tuberculosis*

Umweltbakterien mit Infektionsrisiko für Menschen sind z.B.:

- *Legionella pneumophila* und andere Legionellenarten
- *Pseudomonas aeruginosa*

- Allergie

Es kommen Allergien gegen Bakterienbestandteile (bekannt hierfür sind die sog. thermophilen Aktinomyceten) und Bakterienprodukte (z.B. Enzyme von *Bacillus subtilis*) vor.

- Endotoxin

Endotoxin ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und hat deutliche biologische Wirkungen, die weiter unten ausführliche beschrieben sind (Alveolitis)

- Exotoxine

toxische Wirkungen von bakteriellen Enzymen z.B. *Bacillus cereus*)

- VOC`s

Bakterien produzieren eine ganze Reihe von zumindest olfaktorisch belästigenden flüchtigen organischen Substanzen (sie stinken erbärmlich)

Typische Bakterien in der Luft

- Aerobe Sporenbildner
- Mikrokokken (oft in hoher Dichte in schlecht ventilerten Innenräumen)
- Nonfermenter (typische Nasskeime, z. B. *Pseudomonas aeruginosa* und verwandte Arten)
- Aerobe Aktinomyceten

Nachweis von Bakterien

Üblicherweise werden Bakterien durch Anzuchtung (Kultur) nachgewiesen, erforderlich sind geeignete Nährböden, die richtige Temperatur und Atmosphäre. Die Erlaubnis zur Anzucht von Bakterien regelt das Infektionsschutzgesetz, essentiell sind ausreichende Vorkehrungen zum Selbstschutz und eine sichere Entsorgung des entstandenen infektiösen Mülls.

Weitere Nachweismöglichkeiten sind

- Immunfluoreszenz
- Antigennachweise (ELISA)
- Molekularbiologische Nachweise (PCR)

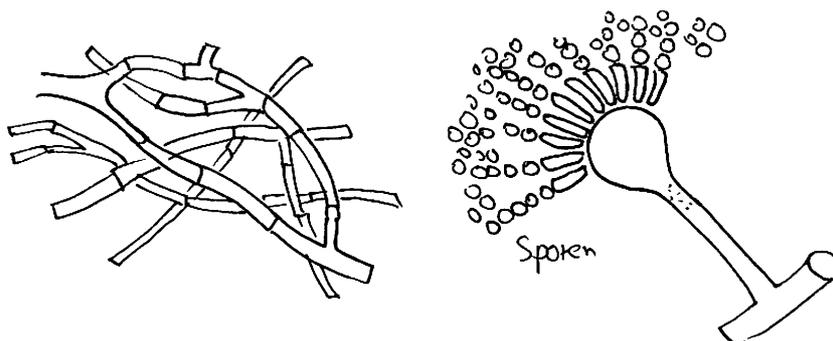
4.4 Pilze (fungi)

Pilze sind den Pflanzen nahestehende, im Vergleich zu den Bakterien höher entwickelte Organismen. Sie haben bereits einen Zellkern (Eucaryonten). Luftgetragene Pilze sind entweder Sprosspilze oder Schimmelpilze:

- Sprosspilze (Hefen, „yeast“)
sind einzellige Organismen, 4-15 µm groß, von runder oder ovaler Gestalt, vermehren sich durch Sprosszellen



- Schimmelpilze („mold“)
wachsen als Mycel (= vielzelliges Geflecht) aus Hyphen (=Pilzfäden) von einigen µm Durchmesser. Das Mycel kann insgesamt sehr groß werden. Schimmelpilze vermehren sich im wesentlichen durch Sporen: in dem Geflecht entstehen Konidien (Fruchtkörper), die in grossen Mengen Sporen abgeben. Die Sporen sind meist rundlich und klein (3-6 µm Durchmesser) und werden mit der Luft weit verbreitet. Die Sporen könne auch widrige Umweltumstände lange Zeit tolerieren; unter geeigneten Bedingungen kann sich (über Vorstufen) aus den Sporen ein neues Pilzgeflecht entwickeln.



Pilze sind relativ anspruchslos; sie benötigen zum Wachstum organisches Substrat und - wie alle Lebewesen – Wasser. Da Pilzsporen ubiquitär sind (d.h. überall in der Umwelt vorkommen), werden sich überall da, wo dauerhafte Feuchte und organisches Substrat als Nährboden vorkommen, nach einiger Zeit auch Pilze ansiedeln können. Im Wasserbedarf unterscheiden sich die Pilzarten; einige können auch in ziemlich trockenen Medien wachsen (xerophile Pilze; z.B. *Wallemia sebi*), während andere eine sehr hohe Wasseraktivität (Aw-Wert) im Substrat brauchen (z.B. *Stachybotrys*)

Aw-Wert	Pilz
0,70	<i>Wallemia sebi</i>
0,75	<i>Aspergillus candidus</i>
0,75	<i>Aspergillus restrictus</i>
0,77	<i>Aspergillus niger</i>
0,78	<i>Aspergillus versicolor</i>
0,78	<i>Aspergillus flavus</i>
0,79	<i>Penicillium chrysogenum</i>
0,80	<i>Penicillium citrinum</i>
0,81	<i>Penicillium brevicompactum</i>
0,82	<i>Aspergillus fumigatus</i>
0,83	<i>Penicillium expansum</i>
0,84	<i>Paecilomyces variotii</i>
0,84	<i>Rhizopus stolonifer</i>
0,85	<i>Alternaria</i>
0,88	<i>Absidia</i>
0,90	<i>Mucor circinelloides</i>
0,94	<i>Stachybotrys chartarum</i>

Gesundheitliche Auswirkungen luftgetragener Pilze:

- Infektion

In Mitteleuropa sind Infektionen durch luftgetragene Pilze insgesamt selten und betreffen ganz überwiegend nur stark abwehrgeschwächte Personen (= opportunistische Infektionen): wesentliche Erreger derartiger Infektionen sind: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Mucor mucedo*, *Cryptococcus neoformans* (häufiger Erreger von Hirnhautentzündungen bei AIDS Patienten, kommt im Taubenkot vor) . In anderen Weltregionen dagegen gibt es Pilze in der Umwelt (im Erdboden) die auch für Immungesunde hochinfektiös sind (z. B. Histoplasmose).
- Allergie

Ein deutlicher Teil der Bevölkerung ist sensibilisiert gegen Schimmelpilzallergene (Literaturangaben: 2-18%), bei den Asthmatikern reagieren 80% allergisch auf Schimmelpilze. Generell können Allergien gegen jeden Schimmelpilz vorkommen; besonders häufig ist die Allergie gegen *Alternaria alternata*.
- Organic Dust Toxic Syndrome (Alveolitis)

1-3- β -Glucan ist ein Bestandteil von Schimmelpilzen und ruft bei Inhalation Symptome wie Endotoxin hervor.
- Mycotoxine

Eine Reihe von Schimmelpilzen kann potente Giftstoffe produzieren, die bei Inhalation Gesundheitsschäden bis hin zu Lungenblutungen und Carcinomen hervorrufen können
- Flüchtige Organische Substanzen (VOC´s)

Schimmelpilze geben Stoffwechselprodukte an die Luft ab, die eine erhebliche olfaktorische Belästigung (= Geruchsbelästigung) bewirken können.

Nachweisverfahren für Pilze:

Standard für Pilznachweise ist die Kultur (Anzucht)

Vorsicht: bei der Kultur von Schimmelpilzen entstehen Sporen in ungeheuren Mengen. Wegen der u.U. erheblichen gesundheitlichen Risiken dürfen Pilzkulturen nur unter Sicherheitswerkbänken gehandhabt werden. **Nie an Pilzkulturen riechen !**

Die Voraussetzungen zur Erlaubnis, Mikroorganismen anzüchten zu dürfen, ist im Infektionsschutzgesetz geregelt.

Nährböden:

Pilze wachsen leicht auf der Mehrzahl der handelsüblichen Nährböden, gut geeignet sind z.B.:

- Malzextraktagar / ME (unterstützt das Wachstum der meisten Pilzarten, typisches Erscheinungsbild der Kulturen)
- DG-18 (lässt auch xerophile Organismen wachsen (z.B. *Wallemia*), behindert das Überschwärmen durch rasch wachsende Pilzarten (z.B. *Mucor*); DG 18 Agar sollte der Standardagar bei Luftkeimuntersuchungen auf Schimmelpilze sein.
- Bengalrot-Agar
- Tryptic-Soy-Agar (auch Casein-Soja)

Bebrütungszeit:

Pilze brauchen länger zum erkennbaren Wachstum als Bakterien: zu kurze Bebrütungszeiten (< 1 Woche) führen zu falsch negativen Ergebnissen, bei langen Bebrütungszeiten (> 3 Wochen) kommt es zur Überwucherung , Sekundären Kontaminationen und degenerativen Veränderungen der Kulturen. Geläufig ist eine Bebrütungszeit von etwa 2 Wochen.

Interpretation:

Die eigentliche Schwierigkeit bei Pilzkulturen aus der Umwelt besteht in der Interpretation der Ergebnisse; Grund dafür ist, dass nahezu alle natürlich vorkommenden Oberflächen mit Pilzen besiedelt sind; es gilt hier, die „normale“ Schimmelkontamination von hygienisch problematischen Zuständen zu unterscheiden.

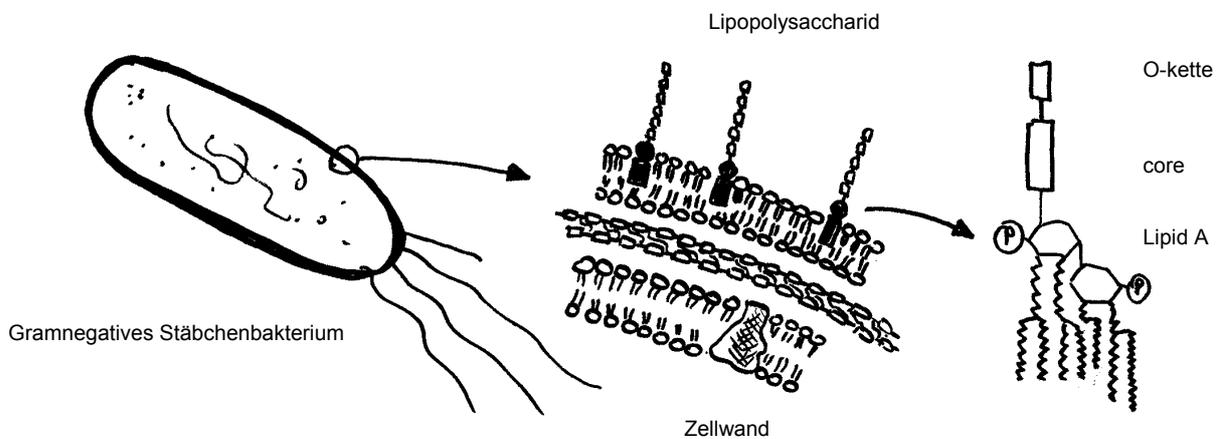
4.5 Endotoxin

4.5.1 Definition und Vorkommen

Die Wand gramnegativer Bakterien (z.B. Enterobacteriaceae, Pseudomonaden) enthält als integralen Bestandteil Lipopolysaccharide (LPS), die aufgrund ihrer biologischen Wirkung auch Endotoxine genannt werden.

LPS Moleküle bestehen aus drei Abschnitten:

- *O-spezifisches Polysaccharid-Antigen*
(kennzeichnet die jeweilige Bakterien-Serogruppe)
- *core-Polysaccharid*
(charakteristisch für die Bakterienart oder auch artübergreifend)
- *Lipid A*
(verantwortlich für die spezifische Toxizität; biologische Wirkung variiert je nach Anzahl, Art und Anordnung der Fettsäuren)



Endotoxin wird aus Bakterien freigesetzt, wenn diese wachsen, sich teilen oder absterben. In eine Flüssigkultur von z.B. *Pseudomonas aeruginosa* werden folglich Endotoxine in das Nährmedium abgegeben und sind nach Abzentrifugieren der Bakterien in der flüssigen Phase nachweisbar. Ebenso reichert sich das Wasser eines bakteriell kontaminierten Umlaufsprühbefeuchters mit Endotoxin an. Dies ist einer der inhaltlichen Gründe für die in der VDI 6022 geforderte regelmäßige bakteriologisch Kontrolle des Wassers von Umlaufsprühbefeuchtern.

Da gramnegative Bakterien ubiquitär sind, d.h. überall in der Umwelt vorkommen (z.B. auf Pflanzenblättern, in Gewässern) sind wir konstant einem (niedrigen) Endotoxinpegel in der Luft ausgesetzt (im übrigen haben wir über unsere Darmschleimhaut ständigen Endotoxinkontakt, ausgehend von den gramnegativen Bakterien unserer Darmflora).

Endotoxine sind an der Umwelt ziemlich stabil (z.B. gegen Erhitzen und Austrocknen) und sind Bestandteil organischer Stäube.

Besonders endotoxinreich ist die Luft naturgemäß während landwirtschaftlicher Aktivitäten (Erntearbeiten, Stallarbeiten), in Gewächshäusern oder in Industriehallen, wo Naturprodukte weiterverarbeitet werden (z.B. Schlachthäuser, Baumwollspinnereien). Endotoxinexposition kommt jedoch auch unter anderen Bedingungen vor, z.B. in Büroräumen mit Luftbefeuchtungsanlagen oder im Bereich der zerspanenden Industrie (über kontaminierte Kühlschmierstoffe).

4.5.2 Biologische Wirkung von Endotoxinen

Lipopolysaccharide sind biologisch hochaktive Moleküle und zeigen Wechselwirkungen mit vielen Komponenten des menschlichen Immunsystems : Makrophagen, B-Zellen, T-Lymphozyten, Granulozyten. Komplementsystem.

Von besonderer Bedeutung ist die Aktivierung von Makrophagen zur Produktion und Ausschüttung von Cytokinen: $\text{TNF-}\alpha$, IL (Interleukin) 1, IL6, IL8 und IL12. Interleukin 1 ist u.a. ein ausgeprägtes Pyrogen, d.h. es erzeugt Fieber. $\text{TNF}\alpha$ (= tumor necrosis factor) ist ein weiteres zentrales Cytokin. LPS stimuliert so sowohl die zellulären als auch die humoralen Abwehrmechanismen.

Geringe Mengen an LPS haben somit durchaus positive Wirkungen auf das Immunsystem, bei größeren Endotoxinmengen stehen dann die „negativen Begleiterscheinungen“ wie Fieber und Entzündung im Vordergrund;

im Extremfall führt dies zum septisch-toxischen Schock mit peripherem Kreislaufversagen und intravasaler Gerinnung.

Ein charakteristisches Phänomen ist die Endotoxintoleranz: Etwa 24h nach Exposition lässt die Endotoxinwirkung nach (vermutlich ist die Fähigkeit von CD14 tragenden Zellen , auf LPS mit Cytokinausschüttung zu antworten, nach dieser Zeit erschöpft). Das Phänomen der LPS-Toleranz dauert etwa 72 h an.

Endotoxin ist eine der Ursachen für das ODTS (organic dust toxic syndrome) mit einer reversiblen, „grippeähnlichen“ Symptomatik bei kurzzeitiger Exposition und chronischen Lungenschäden bei anhaltender Exposition (siehe 1.3.3 und 5.3 Exogen allergische Alveolitis), hat aber auch eine ganze Reihe anderer Folgen; so führt Endotoxininhalation z.B. zum Einströmen von Granulozyten in die Nasenschleimhaut mit der Folge Schwellung und Sekretion.

4.5.3 Quantitative Messung von Endotoxin in Luft

Endotoxin beladene Partikel werden aus der Luft gefiltert (Polycarbonat- oder Teflonfilter 0,45µm) oder über Impinger Verfahren aus der Luft separiert.

Von den Filtern wird das LPS mit pyrogenfreiem Wasser mit 0,05% TWEEN 20 extrahiert ; die nun zu testende Flüssigkeit kann bei 4-7°C problemlos über Wochen bis zur Messung aufbewahrt werden. Unterschiedliche Filtrations- und Extraktionsprozesse können das Ergebnis bis zu einem Faktor 17 beeinflussen.

Die Messung selbst geschieht in der Regel über einen Limulus basierten Ansatz und ist relativ aufwendig; Stand der Technik sind hierbei kinetisch chromogen modifizierte Limulus Assays (z.B. Kinetic Chromogenic QCL Assay der Firma BioWhittaker). Limuluszellen stammen aus dem Blut des Pfeilschwanzkrebse, die hochempfindlich auf Endotoxin reagieren.

Das Ergebnis wird als ng/m³ oder als EU/m³ berechnet, wobei die Umrechnung von der Aktivität des für die Standardreihe verwendeten Endotoxins abhängt, gängige Umrechnungsfaktoren sind Werte von 7-10 EU/ng.

„Normal“ finden sich < 10 EU/m³, akute Lungenfunktionsänderungen wurden beobachtet ab 90 – 300 EU/m³, chronische Lungenschäden bei jahrelanger berufsbedingter Exposition wurden gefunden bei 10-200 EU/m³ in der baumwollverarbeitenden Industrie, sowie bei 200 – 4700 EU und bei 11000 EU in Schweinezuchtanlagen. Aus der Literatur noch folgende Messwerte: Geflügelschlachtereien 6000 EU/m³, Geflügelfarm 21000 EU/m³, Baumwollspinnerei 16000 EU/m³, Futtersilo während Silageentnahme 88000 EU/m³.

Da die Messung von Endotoxin relativ aufwendig ist, kann in Flüssigkeiten oder Oberflächen als Ersatzparameter die Messung von Gramnegativen Bakterien verwendet werden; aus Luft ist die Korrelation schwierig herzustellen, da gramnegative Bakterien - im Gegensatz zu Endotoxin - ziemlich empfindlich gegenüber Austrocknen sind und es daher leicht zu einer Unterschätzung der Belastung kommen kann.

Literatur (Endotoxin):

- S.A.Olenchock: Airborne Endotoxin; in: Manual of Environmental Microbiology, ed. Hurst, Knudsen e.a.; p 661-665; ASM Press Washington DC 1997
- D.K.Milton: Bacterial Endotoxins, a Review of Health Effects and Potential Impact in the Indoor Environment; in: Indoor Air and Human Health, ed. Gammage, Berven; p 179 – 190; Lewis Publishers Boca Raton 1996
- J.Douwes e.a.: Influence of Various Dust Sampling and Extraction Methods on the Measurement of Airborne Endotoxin; Appl. Environ. Microbiol; Vol 61, No 5, May 1995, p 1763 – 1769
- S.Laitinen e.a.: Relationship between bacterial counts and endotoxin concentration in the air of wastewater treatment plants; Appl. Environ. Microbiol; Vol 58, No 11, Nov 1992 p 3774 - 3776