

*CBS-Anfängerkurs Schimmelpilze
26. - 28.05.2011, Stuttgart*

Schimmelpilze in Innenräumen - Messverfahren, Aufarbeitung, Messplanung

Dr. rer. nat. Guido Fischer

LGA, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg,
Labor „Analytische Qualitätssicherung und Biomonitoring“,
Ref. 96 Arbeitsmedizin und umweltbezogener Gesundheitsschutz,
Nordbahnhofstr. 135, 70191 Stuttgart



Baden-Württemberg

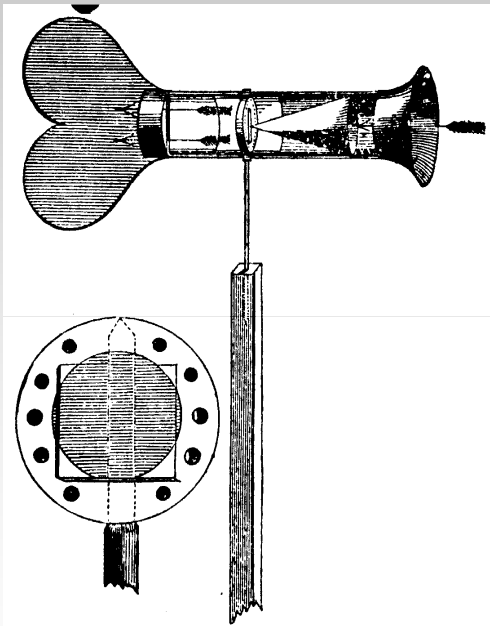
LANDESGESUNDHEITSAMT BADEN-WÜRTTEMBERG
IM REGIERUNGSPRÄSIDIUM STUTTGART

- 1. Einleitung
 - Historie der Luftkeimsammlung
- 2. Messtechnik
 - Messverfahren und Probenahme
 - Aufarbeitung
 - Messplanung
- 3. Zusammenfassung



1. Einleitung - Historie der Luftkeimsammlung

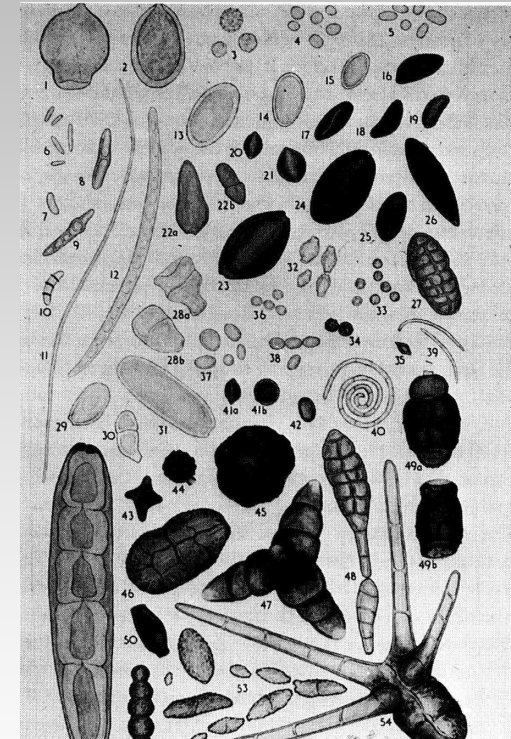
- Cunningham:
- Hirst:
- Lacey:



•Cunningham's Aeroconoscope



•Hirst spore trap



•Zeichnungen von M.E. Lacey

2.1 Messverfahren und Probenahme

Sammlung von luftgetragenen
Mikroorganismen

Übersicht: Prinzipien der Luftkeimsammlung

- Filtration
 - Medium Volume Sampler MVS 6.1 („KleinfILTERgerät“)
 - Sartorius MD 8
 - Sartorius AirPort MD 8
 - PGP-System (**P**ersonen-**g**etragenes **P**robenahmesystem)
 - Planfilterkopfgerät (**Isokinetik**)
 - Gravikon VC 25 (Ströhlein, *high volume sampler*)
- Impingement
 - AGI-30 (Bakterien)
- Impaktion
 - Merck MAS 100
 - Andersen Sampler (1-, 2-, 6-, 8-stufig)
 - RCS-Sammler (Reuter Centrifugal Sampler)

Übersicht: Meßprinzipien und Vorschriften

- Filtration

- Medium Volume Sampler MVS 6.1 („KleinfILTERgerät“) (VDI/DIN 4252Bl. 2)
- Sartorius MD 8
- Sartorius AirPort MD 8
- PGP-System (**P**ersonen-**g**etragenes **P**robenahmesystem)
- Planfilterkopfgerät (**Isokinetik**) (VDI DIN 2066)
- Gravikon VC 25 (Ströhlein, *high volume sampler*) (nach BIA)

- Impingement

- AGI-30 (Bakterien) (VDI/DIN 4252 Bl. 3)

- Impaktion

- Merck MAS 100 (VDI/DIN 4300 Bl. 10)
- LKS 100 bzw. LKS 30 (Hollbach)
- Andersen Sampler (1-, 2-, 6-, 8-stufig)
- RCS-Sammler (Reuter Centrifugal Sampler)

Meßprinzipien - primärer Einsatzbereich

• Legende: Außenluft, Arbeitsplatz, Innenraum

- Filtration

- Medium Volume Sampler MVS 6.1 („KleinfILTERgerät“) (VDI/DIN 4252)

- Sartorius MD 8

- Sartorius AirPort MD 8

- PGP-System (**P**ersonen-**g**etragenes **P**robenahmesystem)

- Planfilterkopfgerät (**I**sokinetik) (VDI DIN 2066)

- Gravikon VC 25 (Ströhlein, *high volume sampler*) (nach BIA)

- Impingement

- AGI-30 (Bakterien) (VDI/DIN 4300 Bl. 10)

- Impaktion

- Merck MAS 100 (VDI/DIN 4300 Bl. 10)

- Andersen Sampler (1-, 2-, 6-, 8-stufig)

- RCS-Sammler (Reuter Centrifugal Sampler)

Filtration

- MVS6.1;



- Sartorius MD 8;

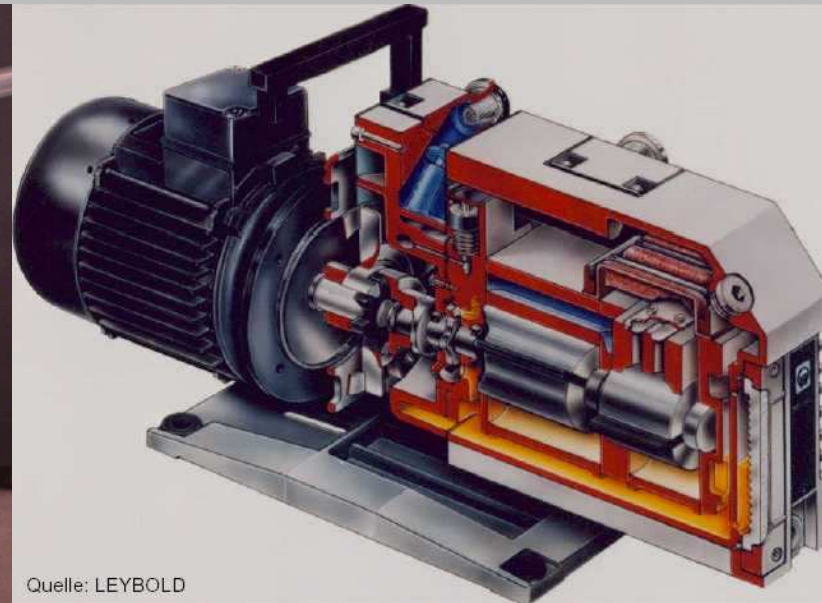


- PGP-System mit Vakuumpumpe



Impingement

- AGI 30: **All Glass Impinger** mit angeschlossener Vakuumpumpe



Quelle: LEYBOLD

• Öffnung des Glasrohres **30 mm** über dem Boden des Gefäßes

Impaktion

- MAS 100, Andersen-Sammler (8-stufig); RCS Sammler



- „Holbach“ Sammler



Luftkeimsammler LKS 100 auf MBASS30V2

2.2 Aufarbeitung

Verarbeitung der Proben im Labor

Aufarbeitung

• *Sammlung* • *Impaktion* • *Filtration* • *Impingement*
:

• *Direkte
Nachweisverfahren*

• *Indirekte
Nachweisverfahren*

• *Mikroskopie*

• *Kultivierung*

• *Direktes
Ausplattieren*

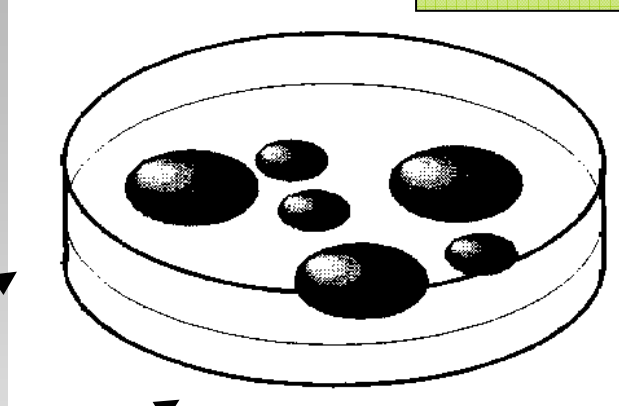
• *über Verdünnungsreihe*

• *„Gesamtkeimzahl“
(Partikelsammlung)*

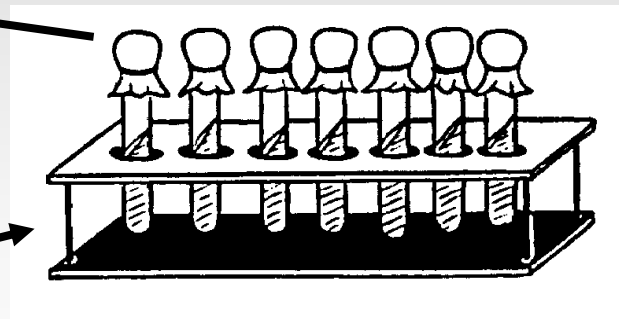
• *Lebensfähige bzw. kultivierbare Mikroorganismen*

Aufarbeitung: direktes und indirektes Nachweisverfahren

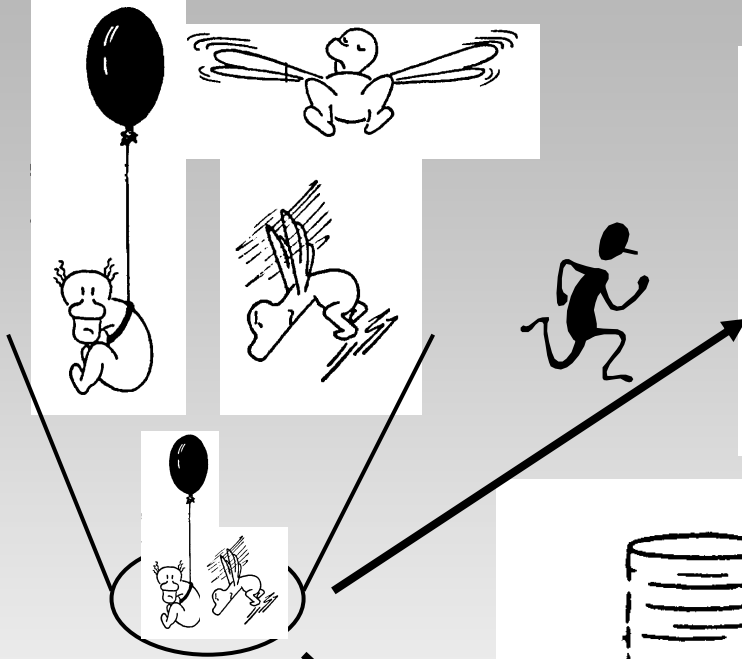
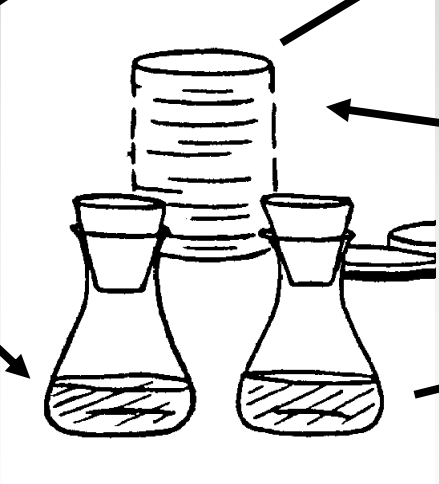
• *direktes Verfahren*



• *indirektes Verfahren*



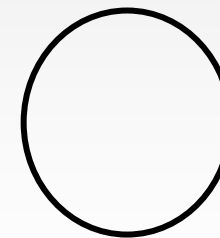
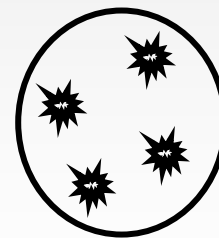
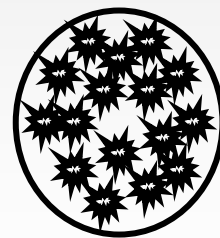
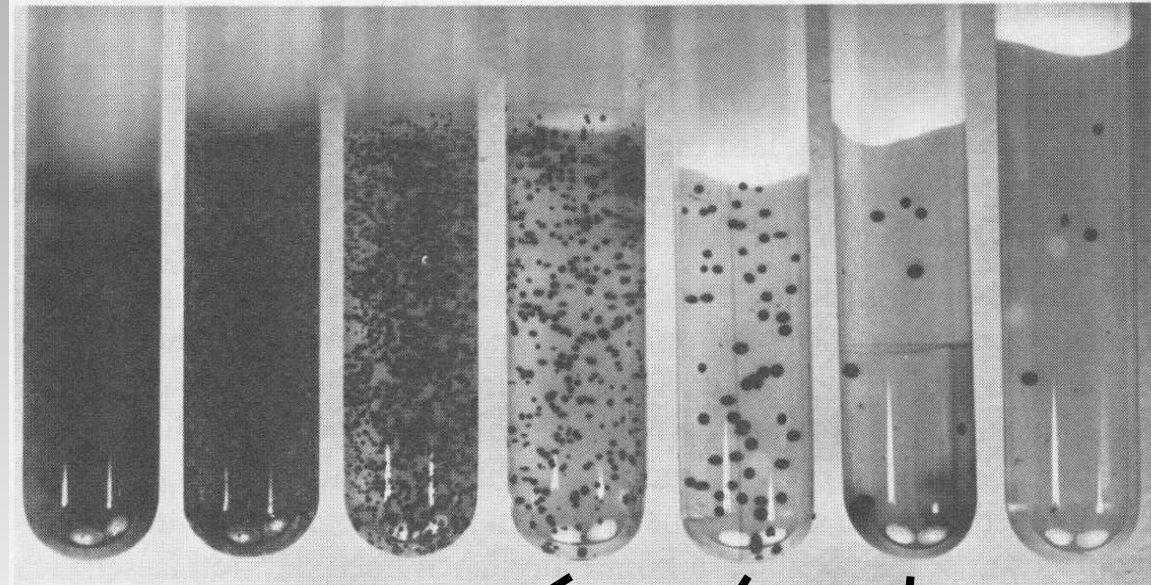
• *Filtration*



Aufarbeitung: indirektes Nachweisverfahren

• *Der Anschaulichkeit halber hier: Verdünnungs-Schüttelkultur-Methode aus Schlegel, 1985*

- 1. *Verdünnungsreihe anlegen*
- 2. *Ausplattieren* von Aliquots aus den Verdünnungsstufen
- 3. *Anzucht* von Mikroorganismen auf Nährmedien (*KBE = Koloniebildende Einheiten*)



Aufarbeitung - Richtlinien

- Filtration:
 - direkt: Auslegen der Filter (Problem: Auswertebereich erreicht?)
 - indirekt: Anlegen einer Verdünnungsreihe (VDI-DIN 4253 BI.2)
- Impingement:
 - indirekt: Anlegen einer Verdünnungsreihe (VDI-DIN 4253 BI.3)
- Impaktion: (VDI/DIN 4300 BI. 10)
 - Inkubation einer Probe bei nur einer Temperatur möglich
 - keine Kombination verschiedener Nährmedien bei einer Probe möglich

Direkte Nachweisverfahren - Vor- und Nachteile

- *Mikroskopie*

- *Lichtmikroskopie*



- Vor-/Nachteile:

- *Gesamtkeimzahlen, nur bei Fadenpilzen!, schlechte Speziesdifferenzierung*

- *Fluoreszenzmikroskopie*



- *Verwendung von spezifischen Farbstoffen und Markern (Verfügbarkeit !?)*

- *Direkte Kultivierung*

- *Impaktion*

- *Filtration*



- *Begrenzung des Messbereichs meist bis 10^4 KBE, nur lebensfähige Mikroorganismen erfaßt*

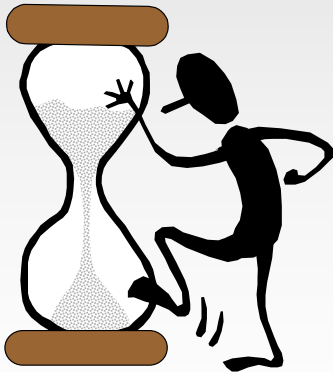


- *Verdünnungsreihe*

- *Suspendieren von Membranfiltern bei Filtration*



- *Impingement*



- Vor-/Nachteile:

- 1. *Messbereich größer*
 - 2. *Überlebensfähigkeit (Fadenpilze > Bakterien)*
 - 3. *„Verluste“ bei Aufarbeitung durch ‚handling‘*
- 1. *unbeabsichtigte Vermehrung der Mikroorganismen bei unsachgemäßer Lagerung*
- 2. *Auflösung von Mikroorganismen-Aggregaten (höhere KBE-Zahlen!)*

Quantitative Auswertung nach VDI 4300 – Blatt 10 – 1. Schritt

- Kultivierung auf DG18- und Malzagar.
- Für die Auswertung werden zunächst nur die DG18-Agarplatten herangezogen.
- Auf den Malzextraktagarplatten werden nur diejenigen Schimmelpilzgattungen ausgewertet, die auf DG18-Agar nicht oder nur sporadisch wachsen (z. B. *Chaetomium*, *Stachybotrys*).

- Differenzierung soweit ohne großen Aufwand möglich
- Koloniemorphologietypen mit ≥ 4 Kolonien:
Artzuordnung, soweit ohne Subkultivierung – unter Einbeziehung mikroskopischer Merkmale – möglich;
ggf. Einteilung in Koloniemorphologietypen.
- Koloniemorphologietypen mit < 4 Kolonien:
Gattungszuordnung oder „andere Spezies“

- Bei bestimmten Fragestellungen (häufig im Zusammenhang mit gesundheitlichen Beschwerden) kann es erforderlich sein, auch in diesen Gattungen einzelne Arten zu identifizieren.
- Durch qualifizierte Laboratorien anhand üblicher Bestimmungsschlüssel.
- Die dabei verwendeten Schlüssel sind zu dokumentieren.

Quantitative Auswertung nach VDI 4300 – Blatt 10 – 4. Schritt

- Optimale Auswertebereich:
20 – 40 Kolonien pro Platte
- Maximal: 100 Kolonien pro Platte (ggf. < 100)
- Minimal : 10 Kolonien pro Platte
- Bei 4 – 9 Kolonien pro Platte
nur semiquantitativ; große Unsicherheit
- < 4 Kolonien pro Platte: „Zufallsereignisse“
Konzentrationsberechnung nicht sinnvoll

Quantitative Auswertung nach VDI 4300 – Blatt 10 – 4. Schritt

- Bei Verdünnungsreihen 1:10 liegt meist nur 1 Verdünnungsstufe im auswertbaren Bereich (sonst gewichtete Mittelwert)
- Bei Kultivierung nach Impaktion mit zwei Volumina (50 l, 100 l) sind eher alle Platten auswertbar: gewichtete Mittelwert

2.3 Messplanung

Richtlinie für den Innenraum

Messplanung

- Innenraum:
 - Angaben zur Meßstrategie werden in der **VDI 3400 BI.10** (Entwurf) aufgeführt
- Außenluft:
 - „Planung von anlagenbezogenen Messungen“ (**VDI 4251 BI.1**, Entwurf)
 - u.a. Messaufgabe
 - Bestimmung der Hintergrundkonzentration
 - Messstrategie bei Fahrenmessungen
 - Übersicht über Anlagen, anlagen- und schutzbezogene Parameter

Messplanung - Allgemeine Messstrategie, Innenraum

•Vor Durchführung der Entnahme einer Luftprobe sollte man sich über den Zweck der Untersuchung im Klaren sein!!!

- Allgemeine Messstrategie nach VDI 3400 Bl.10:
- Ziel der Messungen
 - Identifizierung von Quellen
 - Ermittlung von Konzentrationen in verschiedenen Medien
- Zu untersuchende Medien:
 - Baumaterialien (und deren Oberflächen)
 - Innenraumlufte (Vergleich Außenluft)
 - Hausstaub
- Anlass für mikrobiologische Untersuchungen (aus baulicher Sicht):
 - Sichtbare Schäden
 - Materialfeuchte ohne sichtbaren Befall
 - Bauphysikalische Auffälligkeiten ohne Befall
 - Gesundheitliche Beschwerden
 - Geruchsbelästigung
 - Kontrolluntersuchungen während und nach Sanierung

Messplanung - Einflußfaktoren, Innenraum

- Bei Planung und Durchführung der Untersuchung sind folgende Einflußfaktoren zu berücksichtigen:
 - Probenahmeverfahren
 - Nachweis und Bestimmungsmethode
 - Raumklimatische Randbedingungen
 - Zeitpunkt der Messung
 - Ort der Messung
 - Dauer der Messung
 - Raumnutzung, Aktivität

Messplanung - Aufgabenstellung und Probennahmeverfahren

- **Sichtbare Schimmelschäden:**
 - Abklatsch (nicht quantifizierbar)
 - Klebefilm-Abriß Präparat - (begrenzte Möglichkeit der Differenzierung)
 - Materialproben (nicht bei Bagatellschäden: Kategorie I, UBA-Leitfaden)
 - **Vermutete Schimmelschäden - Materialfeuchte:**
 - Abklatsch (nicht quantifizierbar)
 - Klebefilm-Abriß Präparat - (begrenzte Möglichkeit der Differenzierung)
 - Materialproben (nicht bei Bagatellschäden: Kategorie I, UBA-Leitfaden)
 - **Vermutete Schimmelschäden - Bauphysikalische Auffälligkeiten**
 - Luftuntersuchung (primär)
 - Staub (ggf.)
 - **Gesundheitliche Beschwerden:**
 - Abstimmung mit Umweltmediziner
 - Luftuntersuchung (ggf. Staub) [bei Zusammenhang gesundheitliche Beschwerden - Schimmelschaden]
 - **Geruchsbelästigungen:**
 - keinen Hinweis auf Quelle: Luftuntersuchung (ggf. Staub)
 - ggf. VOC Untersuchung nach VDI 4300 Bl. 6
 - **Sanierungsbegleitung:**
 - Materialprobe: Suspensionsverfahren
 - Direktmikroskopie vom Material
- nach VDI 4300 Bl. 10

Messplanung - Entscheidungshilfe nach VDI 4300 Blatt 10

	Befund und Aufgabenstellung	Material- proben	Innenraum- luft	Staub	Weitere Vorgehensweise
1	Sichtbare Schimmelschäden	I	II	II (bei Verdacht auf Sekundär- kontamination)	Ursache der Feuchtigkeit abklären und ggf. beseitigen
2	Vermutete Schimmelschäden aufgrund von:				Ursache der Feuchtigkeit abklären und ggf. beseitigen
	1. Materialfeuchte	I	II	II	
3	2. Bauphysikalischen Auffälligkeiten	-	I	II	Auffälligkeiten überprüfen, ggf. Quellenidentifizierung und Mängelbeseitigung
4	Gesundheitliche Beschwerden	-	I	I	Konsultation eines Umweltmediziners und ggf. Quellenidentifizierung und - beseitigung
5	Geruchsbelästigung	-	I	II	Identifizierung der Geruchsquelle
6	Sanierungsbegleitung	I (Planung)	I (Erfolgs- kontrolle)	II (Sek.-Kontamination)	

- I = Geeignete Untersuchung zur Beantwortung der Aufgabenstellung
- II = Ergänzende Untersuchung zur Beantwortung der Fragestellung (optional)

3. Zusammenfassung – Messtechnik

- Für die Messungen und Aufarbeitung von Immissionsproben (Außenluft) existieren Richtlinien, die auf dem Filtrationsprinzip basieren:
 - Probenahme Schimmelpilze (MVS 6.1) - **VDI 4251Bl. 2**
 - Aufarbeitung Schimmelpilze (indirekte Mehtode) - **VDI 4252Bl. 2**
- sowie zur Bestimmung von Bakterienkonzentrationen:
 - Probenahme/Aufarbeitung Bakterien (AGI-30) - VDI 4251/ 52 Bl. 3
- Für die Messungen von Proben im Innenraum :
 - verschiedene Probenahmegeräte berücksichtigt - **VDI 4300 Bl. 10**
- Für isokinetische Messungen in strömenden Gasen (Emissionsquellen) kann eine Messmethode zur Sammlung von Stäuben genutzt werden:
 - Planfilterkopfgerät - **VDI 2066**
- ISO 16000-16 Filtration
- ISO 16000-17 Kultivierung
- ISO 16000-18 Impaktion
- ISO 16000-19 Strategie