

Zwischenbericht

Projekttitle: **Bioaerosolbelastung und AGR-Anlagen: Quantifizierung luftgetragene Endotoxine**

Auftraggeber: **Bayerisches Landesamt für Umwelt
z. Hd. Frau G. Winkler
Ref. 21 - Luftreinhaltung bei Anlagen,
Ausbreitungsrechnungen
Bürgermeister-Ulrich-Str. 160
86179 Augsburg**

Projekt-Nr.: **610526**

Bearbeiter: **S. Nischwitz, Dr. K. Hoppenheidt**

INHALTSVERZEICHNIS

1	Aufgabenstellung	1
2	Projektbearbeitung	2
2.1	Ersteinweisung der Probenehmer des LfU	2
2.2	Vorbereitung und Befüllung der Impinger	2
2.3	Endotoxin-Nachweis.....	2
2.3.1	Untersuchungsproben.....	2
2.3.2	Endotoxin-Extraktion bei Feinstaubfilterproben	3
2.3.3	Quantifizierung der Konzentrationen luftgetragener Endotoxine	4
2.3.3.1	Grundprinzip der Nachweismethodik	4
2.3.3.2	Arbeitsgang	6
2.4	Zwischenergebnisse.....	8
2.4.1	Auswahl der Nachweismethodik	8
2.4.2	Konzentrationen luftgetragener Endotoxine bei der Haltung von Masthähnchen	10
2.4.2.1	Kenndaten der Untersuchungsproben	10
2.4.2.2	Erfasste Endotoxin-Emissionen	12
2.4.2.3	Erfasste Endotoxin-Immissionen	15
3	Literatur.....	16

1 Aufgabenstellung

Das Bayerische Landesamt für Umwelt führt im Rahmen eines F&E-Vorhabens Messungen umweltrelevanter Emissionen und Immissionen an Intensivtierhaltungsanlagen durch. Dabei wurden an einer Masthähnchenanlage umfangreiche Emissions- und Immissionsmessungen zu vier verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt¹. Ein Untersuchungsparameter war die Erfassung luftgetragener Endotoxine in Feinstaubfilterproben und in Impingerproben.

Der Nachweis von luftgetragenen Endotoxinen in Umweltproben ist bislang keine Routine-diagnostik. Das bifa Umweltinstitut hat im Auftrag des BStMLU die Nachweismethodik von luftgetragenen Endotoxinen und beta-1,3-D-Glucanen etabliert und erfolgreich auf Luftproben von biologischen Abfallbehandlungsanlagen (Kompostierung, Vergärung, MBA) angewendet (Gerbl-Rieger et al., 1999). Mit dem Nachweisverfahren hat das bifa das LfU bereits in einem vorangegangenen FuE-Vorhaben unterstützt und luftgetragene Endotoxine in der Abluft von Tierstallungen quantitativ untersucht (Lehmann u. Hoppenheidt, 2010). Im Rahmen des aktuellen Vorhabens des LfU wurde das bifa mit dem quantitativen Nachweis von Endotoxinen in 44 Impingerflüssigkeiten und 40 Feinstaubfiltern aus dem Umfeld von Tierstallungen sowie ergänzenden Aufgaben beauftragt:

- Ersteinweisung der Probenehmer des LfU in die Probenahme (Impingement, Filterprobenahme) für den Endotoxin-Nachweis
- Vorbereitung der vom LfU kostenfrei bereitgestellten Impinger: Endotoxin-Elimination durch Ausheizen bei 250°C und aseptisches Befüllen mit endotoxin-freier Saline
- Extraktion von 40 beaufschlagten Feinstaubfiltern mit endotoxin-freiem Wasser gemäß BIA-9450
- Endotoxin-Nachweis in insgesamt 84 Proben
- Aus- und Bewertung der Untersuchungsergebnisse:
 - Dokumentation und wissenschaftliche Auswertung der verwendeten Literatur
 - Zusammenstellung der Gesamtproblematik und bis zur Berichtserstellung publizierte relevante Ergebnisse auf dem Gebiet der Aufgabenstellung
 - Beschreibung der angewandten wissenschaftlichen und technischen Methoden
 - Darstellung und Bewertung der erzielten Ergebnisse und ihrer praktischen Anwendbarkeit sowie eine aus sich heraus verständliche ausführliche Zusammenfassung.

¹ Projektbeschreibung des Landesamtes für Umwelt

2 Projektbearbeitung

2.1 Ersteinweisung der Probenehmer des LfU

Die Einweisung des Projektpersonals hinsichtlich der Schutzmaßnahmen beim Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen sowie der bei der Probenahme von Bioaerosolen zu beachtenden Arbeitstechniken erfolgte beim Projektbeginn (07.02.2013). Die für aseptische Feinstaubfilterprobenahmen und Aerosolprobenahmen mittels Impingern und Feinstaubfiltern zu beachtenden Maßnahmen (Vorbereitung des Probenahmematerials, Probenahme, Probenlagerung) wurden abgestimmt, um eine Einschleppung von Mikroorganismen und Endotoxinen bei der Probenahme sicher vermeiden zu können.

2.2 Vorbereitung und Befüllung der Impinger

Die für die Feinstaubprobenahmen verwendeten Probenahmegeräte und die Filter wurden vom Projektpersonal des Auftraggebers jeweils vorbereitet.

Für die Probenahme von Bioaerosolbestandteilen mussten Impinger mit steriler, Endotoxin-freier Saline gefüllt werden. Die Herstellung der Saline und die aseptische Befüllung der Impinger wurden vom bifa durchgeführt. Um eine Einschleppung von Bioaerosolbestandteilen sicher ausschließen zu können, wurden die depyrogenisierten Impinger unter der Sicherheitswerkbank mit 30 mL 0,9 %ige NaCl-Lösung befüllt. Für die Herstellung der NaCl-Lösung wurde Natriumchlorid > 60 Minuten bei 250 °C depyrogenisiert und anschließend in Endotoxin-freies Reinstwasser (Lonza, LAL Reagent Water, W50-500) eingewogen. Das exakte Füllvolumen wurde durch Wägung der Impinger vor und nach der Befüllung sowie nach der Probenahme (durch LGL-Personal) bestimmt. Bis Mitte Dezember 2014 wurden 280 Immis-sions- und 74 Emissionsimpinger (insgesamt: 354) für die Probenahmen vorbereitet.

2.3 Endotoxin-Nachweis

2.3.1 Untersuchungsproben

Das LfU hat Feinstaubproben aus der Abluft abgeschieden. Aus den beprobten Luftvolumina wurden bei der Probenahme je eine Fraktion mit Partikeln < 2,5 µm (PM_{2,5}) und eine Fraktion mit Partikeln mit 2,5 - 10 µm (PM_{2,5-10}) auf Filtern abgeschieden. Die PM_{2,5}- und die PM_{2,5-10}-Filterproben wurden unabhängig voneinander auf Endotoxine untersucht. Aus den PM_{2,5}- und PM_{2,5-10}-Filterdaten wurden Werte für die PM₁₀-Feinstaubfraktion berechnet.

Mit Feinstaub beaufschlagte Filter wurden nach der Probenahme in Endotoxin-freie Schliff-deckelgefäße gelegt (s. Abbildung 1) und gekühlt ins Labor transportiert. Unmittelbar nach Probeneingang wurden die Filterproben tiefgefroren (-20 °C) zwischengelagert.

Die Filter wurden mit der unter 2.3.2 beschriebenen Methodik extrahiert und die dabei gewonnenen Filtereluat wurden unmittelbar für den Endotoxin-Nachweis verwendet.

Im Untersuchungszeitraum wurden bisher 32 Filterproben angeliefert.

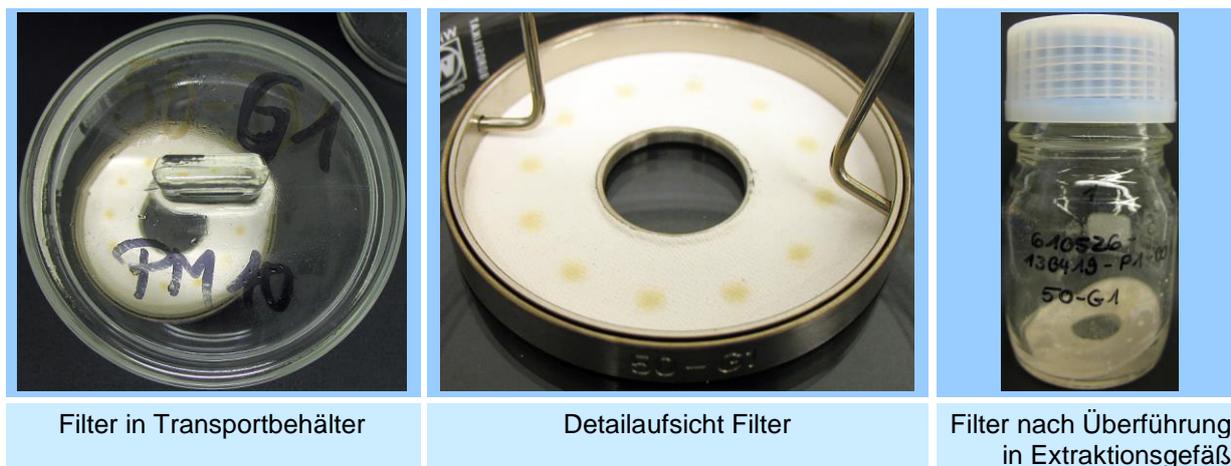


Abbildung 1: Fotodokumentation der Filterextraktion einer $PM_{2,5-10}$ -Filterprobe

Mit Impingern wurden die Abluft (Emission) sowie die Luft in der Abwindfahne der Ställe (Immission) beprobt. Zusätzlich wurden Luftproben im Hintergrund (HG) gewonnen und Impingerflüssigkeiten wurden untersucht, ohne dass diese mit Luft beaufschlagt worden sind (Feldblindwert). Die Probenahmen mit Impingern wurden vom LfU und LGL durchgeführt. Nach der Probenahme wurden die Impinger im Messwagen des LfU gewogen, damit das nach der Probenahme im Impinger verbliebene Füllvolumen ermittelt werden konnte. Danach wurden Aliquote der Impingerflüssigkeit aseptisch in Endotoxin-freie Kunststoff-Schraubdeckelgefäße (Falcon tube) abgefüllt und tiefgefroren dem bifa Labor angeliefert. Dort wurden die Proben bis zur Analyse tiefgefroren (-70 °C) zwischengelagert. Die Impingerproben wurden ohne weitere Aufbereitung für den Endotoxin-Nachweis verwendet.

2.3.2 Endotoxin-Extraktion bei Feinstaubfilterproben

Der Arbeitsgang erfolgte in Anlehnung an die BIA-Methode 9450. Mit Feinstaub beaufschlagte Filter wurden in einem Endotoxin-freien Glasgefäß (pyrogenfreies Schottglas) in Endotoxin-freiem Wasser (Lonza, LAL Reagent Water, W50-500) extrahiert. Dazu wurden die einzelnen Filter mit einer Pinzette aseptisch aus dem Transportbehältnis entnommen und in 10 mL pyrogenfreies Wasser gelegt und bei Raumtemperatur 60 min auf einem Horizontal-schüttler mit 150 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Anschließend wurde der Extrakt bei $1000 \times g$ 10 min in Endotoxin-freien Röhrchen zentrifugiert, um nicht gelöste Feststoffe und Filterfasern abzutrennen.

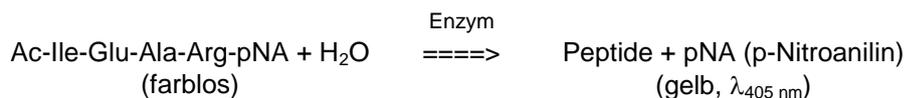
Die Filterextrakte wurden am Tag der Extraktion analysiert. Für eventuell erforderliche Wiederholungsmessungen wurden Aliquote für maximal 24 h bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurden Aliquote der Filterextrakte als Rückstellproben bei -20 °C gelagert.

Die pH-Werte der Filterextrakte im gepufferten Reaktionsansatz des Endotoxin-Assays wurden jeweils nach Abschluss des Assays überprüft und diese lagen immer im Sollbereich. Deshalb wurden die pH-Werte der Filterextrakte im Vorfeld nicht überprüft, da bei einem derartigen Arbeitsschritt unerwünschte Endotoxineinschleppungen auftreten können.

2.3.3 Quantifizierung der Konzentrationen luftgetragener Endotoxine

2.3.3.1 Grundprinzip der Nachweismethodik

Die Endotoxinbestimmung erfolgte mit dem chromogen-kinetischen Limulus-Test der Fa. Charles River (Testkit Endosafe® Endochrome™-K, R1708K; LAL Reagenzwasser W130; 96-well Polystyrol-Platten M9005). Bei diesem Test wird Amöbozyten-Lysat aus dem Blut des Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* eingesetzt, das in Gegenwart von bakteriellem Endotoxin ein Enzym aktiviert, das folgende Reaktion katalysiert:



Die pro Zeiteinheit gebildete Farbstoffmenge ist abhängig von der Menge an aktivem Enzym: Hohe Endotoxinkonzentrationen haben eine hohe Konzentration an aktivem Enzym zur Folge, sodass sich hohe Umsatzgeschwindigkeiten ergeben und umgekehrt. Wichtige Folgerung aus diesem Prinzip ist, dass die Methode durch alle bekannten Einflussfaktoren auf die Enzymkinetik beeinflusst wird (Temperatur, pH-Wert, Inhibitoren, Aktivatoren, ...). Deshalb müssen bei den Untersuchungen Kontrollproben mitgeführt werden, denen eine bekannte Menge an Endotoxin zugesetzt wurde. Diese als „spike“- bzw. Positiv-Produktproben bezeichneten Ansätze lassen erkennen, ob das Enzymsystem durch Probenbestandteile aktiviert oder inhibiert wurde. Für den gewählten Konzentrationsbereich der Kalibrierstandards von 0,005 – 50 EU/mL empfiehlt der Hersteller die Anwendung von „spikes“, die die Endotoxinkonzentration der Probe um 5 EU/mL erhöhen. Falls die Wiederfindung der Endotoxin-spikes im Bereich von 50 - 200 % des theoretischen Wertes liegt², kann angenommen werden, dass das für den Endotoxinnachweis genutzte Enzymsystem nicht unzulässig durch Probenbestandteile gehemmt bzw. aktiviert wurde. In der Praxis ist es meist möglich, durch eine Probenverdünnung entsprechende Störungen auszuschalten, sodass für die Auswertungen die Ergebnisse von Probenverdünnungen mit möglichst geringen Matrixeinflüssen herangezogen werden. Wenn Ergebnisse von mehreren Probenverdünnungen vorlagen, wurde jene Probenverdünnung für die Auswertungen herangezogen, bei der die Wiederfindung des Endotoxin-spikes am dichtesten am 100 %-Wert lag.

Aus messtechnischen Gründen wird nicht die absolute Menge des gebildeten Farbstoffs bestimmt, sondern die Enzymaktivität untersucht: Es wird die Zeit gemessen, die der jeweilige Testansatz benötigt, um bei 405 nm eine Änderung der Absorption um z. B. 0,25 Extinktionseinheiten zu erreichen; dieses Zeitintervall wird als onset time bezeichnet.

Der Quotient ($\Delta E_{\lambda_{405 \text{ nm}}} / \Delta \text{Zeit}$) entspricht einer Enzymaktivität; die Enzymaktivität korreliert mit der Endotoxinkonzentration. Der Hersteller empfiehlt für Auswertungen, bei denen die Standards den gesamten zur Verfügung stehenden Konzentrationsbereich (0,005 – 50 EU/mL) abdecken, die Nutzung einer polynomialen Regression³. Für die Auswertungen wurde deshalb eine 5-parametrische Näherungsfunktion genutzt, die mithilfe der Mikrotiter-

² Angabe aus dem Beipackzettel zum Endosafe Kit, in dem auf die Vorgaben der *U.S. Pharmacopeia, 25th revision* verwiesen wird

³ Eine lineare Korrelation (log/log-Darstellung) der Endotoxinkonzentration gegen die onset time sollte Kalibriergeraden mit Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,980$ liefern.

Plattenreader-Software SoftMaxPro 5.4.5 ermittelt wurde. Die Näherungsfunktion ergab im betrachteten Konzentrationsbereich eine sehr gute Übereinstimmung mit den Daten der Kalibrierstandards.

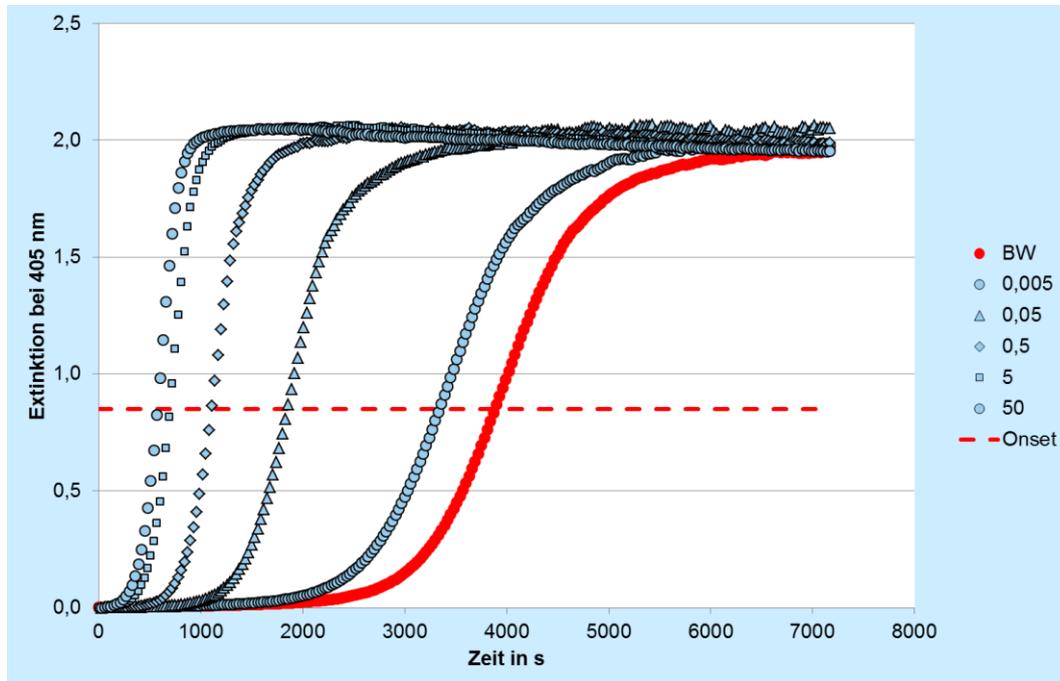


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der $OD_{405\text{ nm}}$ von Kalibrierstandards (Mittelwert aus 3 Parallelen) beim chromogen-kinetischen Endotoxin-Nachweis

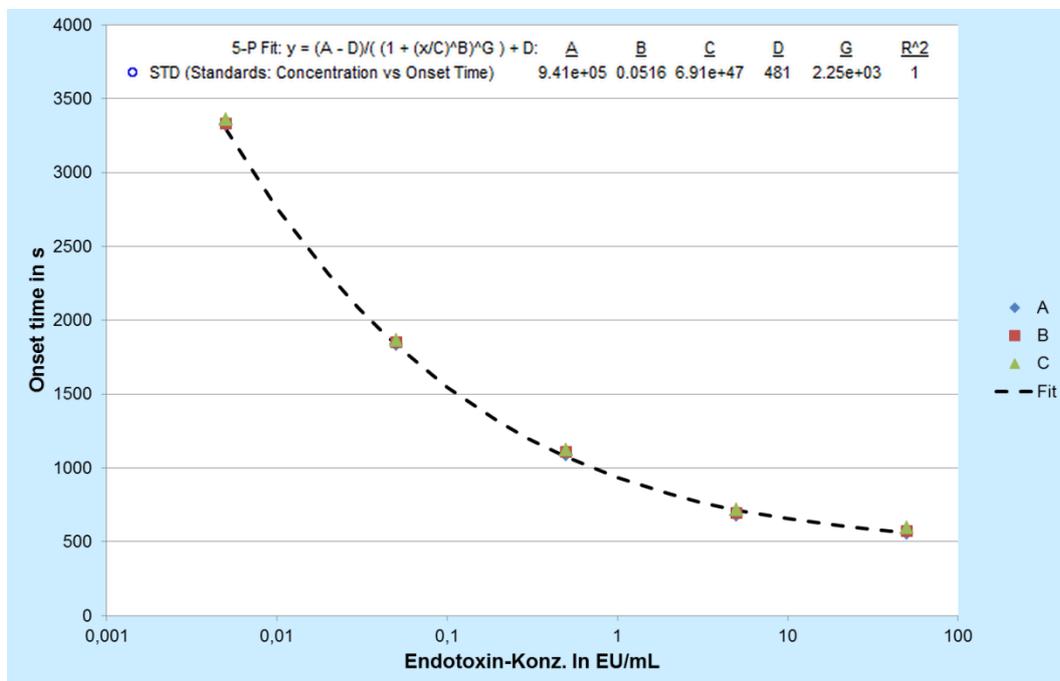


Abbildung 3: Daten aus Abbildung 2, Darstellung der onset time für ein ΔOD von 0,85 für die Kalibrierstandards mit 0,005 bis 50 EU/mL und zugehörige 5-parametrische Näherungsfunktion

Als Impingerflüssigkeit diente Saline; deshalb wurden für die Quantifizierung der Endotoxine in Impingerlösungen auch die Kalibrierstandards in Saline angesetzt. Filtereluate wurden dagegen mit Reinstwasser hergestellt und es wurden deshalb in Reinstwasser gelöste Kalibrierstandards verwendet.

Gemäß Herstellerangaben können mit dem Limulus-Test Endotoxine im Bereich zwischen 0,001 bis 100 EU/mL erfasst werden. EU steht für Endotoxin units (Endotoxin Einheiten). Da Endotoxine keine Reinsubstanzen sind, die fest definierte Eigenschaften haben, wurde im Rahmen der internationalen Methodenstandardisierung ein **Referenz-Standard-Endotoxin (RSE)** festgelegt. Die für den Endotoxin-Nachweis angebotenen Testkits enthalten u. a. ein **Control Standard Endotoxin (CSE)**, dessen Endotoxingehalt in Relation zum RSE angegeben wird. Die RSE/CSE-Relation ist für CSE's verschiedener Herkunft und Herstellungchargen unterschiedlich. Im Falle des Endosafe[®]-Tests wird ein Endotoxin aus E. coli 055:B5 mitgeliefert, das mit einer definierten Menge Wasser versetzt einen Standard mit genau 50 EU/mL ergibt.

Beispiel: Eine CSE-Ampulle enthielt 10 ng des E. coli 055:B5-Endotoxins, das eine RSE-CSE-Relation von 14 EU/ng aufwies. Dementsprechend enthielt die CSE-Ampulle 140 EU. Wenn der Inhalt einer Ampulle mit 2,8 mL Wasser versetzt wurde, hatte die Lösung eine Endotoxinkonzentration von 50 EU/mL. Diese Lösung wurde für die Herstellung der Kalibrierstandards mit 0,005 – 50 EU/mL verwendet und sie wurde zum Spiken der Proben eingesetzt.

Da die in der Luft erfassten Endotoxine Bestandteile von gramnegativen Bakterien sind, lässt sich aus den Endotoxinwerten näherungsweise abschätzen, wie hoch die Anzahl gramnegativer Bakterien in der Luft gewesen sein muss: Rietschel et al. (1994) haben den Endotoxingehalt von Bakterien auf $3,6 \times 10^6$ Lipopolysaccharid-Moleküle pro Bakterienzelle abgeschätzt. Loferer-Krossbacher et al. (1998) geben die Trockenmasse von E. coli-Zellen mit 80 -1.200 fg pro Zelle an. Nimmt man einen mittleren Wert von 640 fg und geht man von der oben genannten Anzahl an LPS-Molekülen aus, würden die Endotoxine knapp 9 % zur Bakterienmasse beitragen. Nimmt man eine spezifische Endotoxinaktivität von 14 EU/ng an (siehe oben), kann man abschätzen, dass die in einer Abluftprobe vorhandenen 1.000 EU/Nm³ einer Endotoxinmenge von 71,4 ng entsprechen, die mit einer Trockenmasse von 793 ng E. coli korrespondieren würden. Dies entspräche einer Anzahl von rd. $1,2 \times 10^6$ E. coli-Zellen pro m³ Abluft. Näherungsweise kann damit angenommen werden, dass 1 EU etwa dem Endotoxin von 1.000 E. coli-Zellen entspricht.

2.3.3.2 Arbeitsgang

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 3 Wiederholungen 100 µL pyrogenfreies Wasser als Negativkontrollen („Blindproben“), 100 µL der Endotoxinstandards, der Untersuchungsproben und der positiven Produktkontrollen (PPC = 100 µL Probe + 10 µL Standard mit 50 EU/mL) dosiert. Freie, nicht benötigte Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit 200 µL dest. Wasser befüllt, damit bei der nachfolgenden Temperierung der Platte eine gleichmäßige Erwärmung gewährleistet war.

Das LAL-Reagenz (LAL steht für Limulus-Amöbocyten-Lysat) wurde mit pyrogenfreiem, auf Raumtemperatur temperierten Wasser rehydratisiert und in eine Pipettierwanne gefüllt. Mit einer 8-Kanalpipette wurden zügig je 100 µL der LAL-Reagenzlösung in alle belegten Vertiefungen dosiert. Die komplett befüllte Platte wurde danach 90 Sekunden auf einem auf 80 °C vorgeheizten Thermostatblock vorinkubiert, damit alle Lösungen in der Mikrotiterplatte zeitgleich die Reaktionstemperatur von 37 °C erreichten. Danach wurde die Platte in den Mikrotiterplattenreader eingebracht und der Messvorgang gestartet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O											
B	H ₂ O	ST4	ST2	BW	P1 1:1	P2a 1:1	P2b 1:10	P2c 1:100	P3a 1:1	P3b 1:10	P4 1:1	H ₂ O
C	H ₂ O	ST4	ST2	BW	P1 1:1	P2a 1:1	P2b 1:10	P2c 1:100	P3a 1:1	P3b 1:10	P4 1:1	H ₂ O
D	H ₂ O	ST4	ST2	BW	P1 1:1	P2a 1:1	P2b 1:10	P2c 1:100	P3a 1:1	P3b 1:10	P4 1:1	H ₂ O
E	H ₂ O	ST5	ST3	ST1	P1 1:1ppc	P2a 1:1ppc	P2b 1:10ppc	P2c 1:100ppc	P3a 1:1ppc	P3b 1:10ppc	P4 1:1ppc	H ₂ O
F	H ₂ O	ST5	ST3	ST1	P1 1:1ppc	P2a 1:1ppc	P2b 1:10ppc	P2c 1:100ppc	P3a 1:1ppc	P3b 1:10ppc	P4 1:1ppc	H ₂ O
G	H ₂ O	ST5	ST3	ST1	P1 1:1ppc	P2a 1:1ppc	P2b 1:10ppc	P2c 1:100ppc	P3a 1:1ppc	P3b 1:10ppc	P4 1:1ppc	H ₂ O
H	H ₂ O											

Abbildung 4: Beispiel einer Belegung der Mikrotiterplatte für den Endotoxin-Nachweis

Für die Messung wurde ein Mikrotiterplattenreader (Molecular Devices) mit dem Softwareprogramm SoftMaxPro 5.4.5 genutzt. Die von der Software bereitgestellte Methode für den chromogen-kinetischen Endotoxin-Nachweis wurde so eingestellt, dass alle 30 Sekunden die Extinktion der Vertiefungen bei 405 nm vermessen wurde. Während der bis zu 120 Minuten dauernden Messung wurde der Reader auf 37 °C temperiert. Aus dem zeitlichen Verlauf der Extinktion ermittelte das Auswerteprogramm die onset time, die der jeweilige Reaktionsansatz für die Zunahme der Extinktion um 0,85 Extinktionseinheiten benötigte. Die Software ermöglichte die abschließende Auswertung der Messdaten, die in eine Excel-Datei übernommen wurden.

2.4 Zwischenergebnisse

2.4.1 Auswahl der Nachweismethodik

Lipopolysaccharide (LPS) bilden zu großen Anteilen die Oberfläche der äußeren Membran von nahezu allen gramnegativen Bakterien. Meist besteht das LPS aus 3 Strukturbestandteilen: dem Lipid A, einem kurzen Oligosaccharid (core region) und dem O-Antigen-Polysaccharid. Das auch Endotoxin bezeichnete Lipid A verankert das LPS in der äußeren Membran der Bakterien und es ist die vom menschlichen Immunsystem erkannte Struktur (Trent et al. 2006). Gramnegative Bakterien sind in der Umwelt weit verbreitet und sie kommen im Darm vieler Tiere und des Menschen in sehr hohen Anzahlen vor.

Endotoxine können mittels Tierversuch, aufwendigen chemisch-analytischen Verfahren und dem als Limulus-Amöbocyten-Lysat (LAL) bezeichneten Biotest quantitativ erfasst werden, wobei der LAL-Test das am häufigsten verwendete Nachweisverfahren im Pharmabereich ist. Der LAL-Test wird wegen seiner hohen Nachweisempfindlichkeit zudem sehr häufig für die Untersuchung luftgetragener Endotoxine verwendet.

Das Ergebnis von Bestimmungen luftgetragener Endotoxine wird – wie der Nachweis anderer Bioaerosolkomponenten – durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Beispielhaft genannt sind die Art der Probenahme (Duchaine et al., 2001; Zucker et al., 2000), die Probenlagerung und die Probenextraktion (Laitinen et al., 1999; Spaan et al., 2007, 2008), die Anwesenheit höherer Proteingehalte (Petsch et al., 1998) und die Nachweismethodik (Reynolds et al., 2005).

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Untersuchungen luftgetragener Endotoxine im Bereich von Arbeitsplätzen zu gewährleisten, wurde von der BIA die Arbeitsmethode 9450 erstellt, die in Deutschland häufig auch für die Untersuchung von luftgetragenen Endotoxinen in der Umwelt herangezogen wird. Aber auch bei der Anwendung von standardisierten Arbeitsmethoden gibt es vergleichsweise große Schwankungen zwischen den Ergebnissen, die von unterschiedlichen Laboratorien ermittelt werden (Linsel et al., 2002; Reynolds et al., 2005). So enthält die BIA 9450 beispielsweise keine Vorgabe hinsichtlich des anzuwendenden Amöbocytenlysates. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das für den Nachweis verwendete Enzymsystem sowohl durch bakterielles Endotoxin als auch durch verschiedene β -1,3-D-Glucane aktiviert wird (Hodes et al., 1987). Untersuchungen von Roslansky u. Novitsky (1991) zeigten jedoch, dass Amöbocytenlysate verschiedener Endotoxin-Assays um mehr als Faktor 1.000 empfindlicher für Endotoxine als Glucane waren. Zhang et al. (1994) konnten nachweisen, dass Endotoxine und Glucane an unterschiedliche Rezeptoren des Amöbocytenlysates gebunden werden, die sich durch verschiedene Inhibitoren selektiv blockieren lassen. Auf diese Beobachtung aufbauend haben die Hersteller von Endotoxin-Assays unterschiedliche Maßnahmen zur Einschränkung der Querempfindlichkeit ihrer Amöbocytenlysate ergriffen. Deshalb sind beim Einsatz von Amöbocytenlysaten unterschiedlicher Hersteller systematische Abweichungen der Ergebnisse bei der Untersuchung von Umweltprouben mit komplexer Zusammensetzung zu erwarten.

Für die hier durchgeführte Untersuchung wurde das Amöbocytenlysate des Herstellers Charles River ausgewählt, da bei Untersuchungen von Stark (2001) mit diesem Lysat keine problematischen Matrixeinflüsse bei der Untersuchung von Stäuben aus Tierställen beobachtet worden sind. Außerdem lagen eigene Erfahrungen mit diesem Amöbocytenlysate vor:

Im Rahmen eines Ringversuches sind Staubproben aus einer Hühner-Bodenhaltung mit diesem Lysat von 10 Ringversuchsteilnehmern auf Endotoxine untersucht worden (Linsel et al., 2002), ohne dass dabei stark störende Matrixeffekte beobachtet wurden. Bei einem früheren Projekt des LfU sind mit diesem Lysat auch keine Störungen der Nachweismethodik beobachtet worden (Lehmann u. Hoppenheidt, 2010).

Stark (2001) hat die Stäube aus verschiedenen Tierställen sowohl mit dem konventionellen Lysat als auch mit einem Lysat untersucht, das mit einem Glucan-inhibierenden Puffer rehydratisiert worden ist. Die in Abbildung 5 zusammengestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass der Einsatz des Glucan-inhibierenden Puffers bei einigen Proben zu reduzierten und bei anderen Proben zu erhöhten Endotoxinbefunden geführt hat. Im Mittel lagen die Endotoxinbefunde bei Einsatz des Glucan-inhibierenden Puffers bei den Proben aus den Broiler- und Legehennenställen nur 2 bzw. 6 % höher als die Werte, die ohne Einsatz des Puffers ermittelt worden sind. Die Verwendung des Glucan-inhibierenden Puffers lieferte bei den Proben aus den Abferkel- und Ferkelaufzuchtställen Befunde, die im Mittel 15 bzw. 2 % über den Werten lagen, die ohne Einsatz des Puffers ermittelt worden sind. Insgesamt waren die durch den Einsatz des Glucan-inhibierenden Puffers erzielbaren Effekte sehr gering.

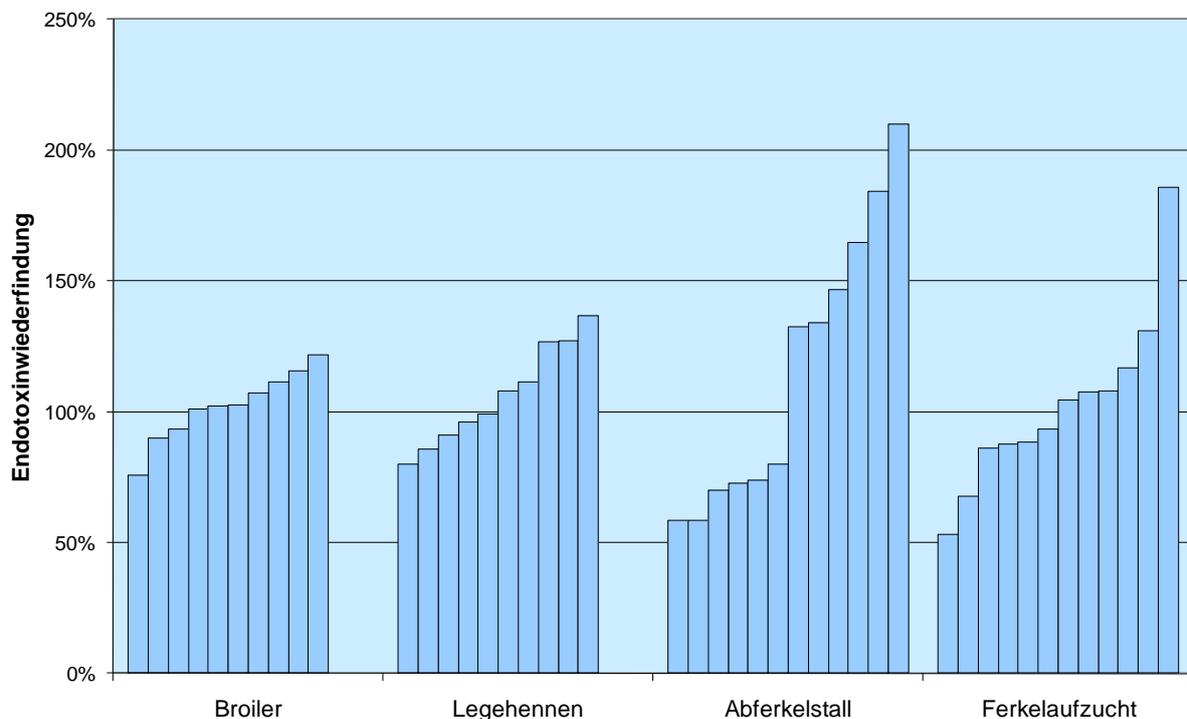


Abbildung 5: Endotoxinwiederfindung bei Einsatz eines Glucan-inhibierenden Puffers in Relation zu Befunden mit einem konventionell mit Reinstwasser rehydratisierten Lysat (Daten von Stark, 2001)

Eine mögliche Erklärung für den geringen Einfluss des Glucan-inhibierenden Puffers auf die Endotoxin-Befunde liefert eine Untersuchung von luftgetragenen Endotoxinen und Glucanen im Bereich von Kompostierungs- und Vergärungsanlagen (Kottmair et al., 2005): Hierbei zeigte sich, dass die erfassten Glucankonzentrationen im Mittel nur um etwa Faktor 10 höher waren als die Endotoxinkonzentrationen (Abbildung 6). Wegen der rund 1000fach höheren Spezifität des Amöbocytenlysates für Endotoxine wirken sich die in vielen Luftstaubproben enthaltenen Glucangehalte dann nicht maßgeblich auf das Resultat von Endotoxinbestimmungen aus. Zudem sind auch zahlreiche Glucane immunologisch wirksam, sodass ihre

Inhibierung dazu führen würde, dass das Gesamtpotenzial an immunologisch wirksamen Probeninhaltsstoffen unterschätzt würde. Dementsprechend wurde das Amöbocytenlysate bei der aktuellen Untersuchung - in Übereinstimmung mit der BIA 9450-Methodik - konventionell mit pyrogenfreiem Reinstwasser rehydratisiert.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse dieser Untersuchung mit Literaturbefunden sollte geprüft werden, ob die Befunde jeweils mit identischen Arbeitsmethoden (Art der Probenahme, Probenlagerung und Probenextraktion, Endotoxinnachweis) ermittelt worden sind.

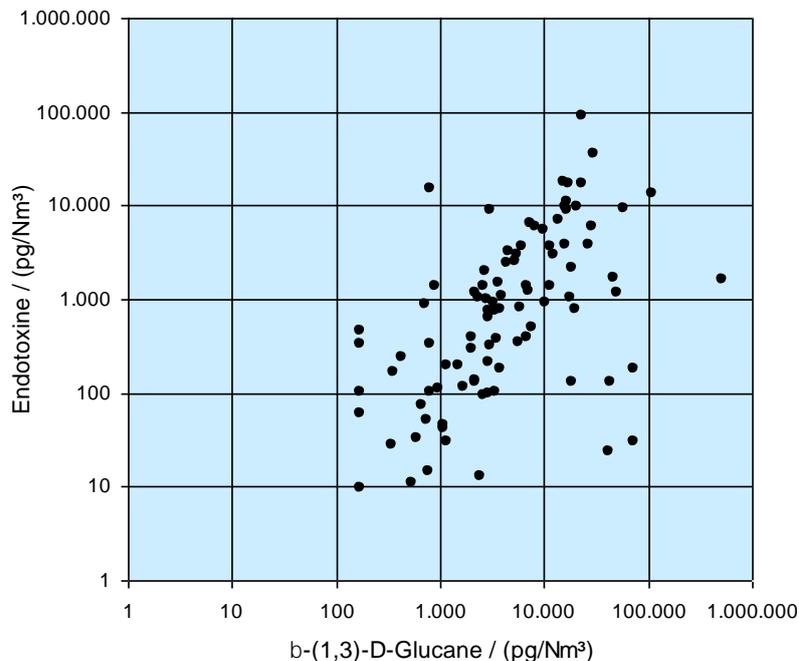


Abbildung 6: Vergleich der Konzentrationen luftgetragener Endotoxine und Glucane im Bereich von Kompostierungs- und Vergärungsanlagen (Kottmair et al., 2005)

2.4.2 Konzentrationen luftgetragener Endotoxine bei der Haltung von Masthähnchen

Die Untersuchungsproben wurden bei vier Probenahmekampagnen des Landesamtes für Umwelt gewonnen. Hierbei wurden die von einer Masthähnchenanlage ausgehenden Bioaerosol-Emissionen mithilfe von Emissionsimpingern⁴ und Feinstaubfilterproben erfasst. Außerdem wurden die resultierenden Immissionen mithilfe von Immissionsimpingern⁵ erfasst.

2.4.2.1 Kenndaten der Untersuchungsproben

Bei den Probenahmen wirkten die Inhaltstoffe von 13,4 - 24,2 Litern Luft auf einen Milliliter der Impingerflüssigkeit ein (Tabelle 1 und Tabelle 2). Die niedrige Nachweisgrenze des LAL-Tests von 0,005 EU/mL ermöglicht den Nachweis von Endotoxinkonzentrationen von > 0,21 bis > 0,37 EU/m³ Luft; Werte typischer Außenluft liegen im Bereich von von 0,75 - 1,99 EU/m³ (Kolk et al., 2009).

⁴ Emissionsimpinger gemäß VDI 4257 Blatt 2, Ausgabe September 2011

⁵ Immissionsimpinger AGI 30 gemäß VDI 4252 Blatt 3, Ausgabe August 2008

Tabelle 1: Kenndaten der Emissionsimpingerproben – Masthähnchen (MH)

Kampagne	Probenart	Kürzel	Impinger-Beladung. [L Luft/mL]	
1	16.04.13	Emission Kamin	MH-PN1-16/13-E	20,314
2	16.07.13	Emission Kamin	MH-PN2-29/13-Em2	24,200
2	16.07.13	Emiss. Giebellüfter	MH-PN2-29/13-Em1	21,409
3	22.10.13	Emission Kamin	MH-PN3-43/13-E	16,332
4	29.01.14	Emission	MH-PN5-05/14-E	15,971

Tabelle 2: Kenndaten der Immissionsimpingerproben – Masthähnchen (MH)

Kampagne	Probenart	Kürzel	Impinger-Beladung [L Luft/mL]	
1	16.04.13	Immissionsprobe 1	MH-PN1-16/13-I1	15,696
1	16.04.13	Immissionsprobe 2	MH-PN1-16/13-I2	16,546
1	16.04.13	Immissionsprobe 3	MH-PN1-16/13-I3	19,375
1	16.04.13	Immissionsprobe 4	MH-PN1-16/13-I4	15,304
1	16.04.13	Immissionsprobe 5	MH-PN1-16/13-I5	14,828
2	16.07.13	Hintergrund	MH-PN2-29/13-HG	18,216
2	16.07.13	Immissionsprobe 1	MH-PN2-29/13-I1	19,108
2	16.07.13	Immissionsprobe 2	MH-PN2-29/13-I2	16,864
2	16.07.13	Immissionsprobe 3	MH-PN2-29/13-I3	22,522
2	16.07.13	Immissionsprobe 4	MH-PN2-29/13-I4	16,755
2	16.07.13	Immissionsprobe 5	MH-PN2-29/13-I5	17,468
3	22.10.13	Hintergrund	MH-PN3-43/13-HG	15,959
3	22.10.13	Immissionsprobe 1	MH-PN3-43/13-I1	13,384
3	22.10.13	Immissionsprobe 2	MH-PN3-43/13-I2	14,302
3	22.10.13	Immissionsprobe 3	MH-PN3-43/13-I3	13,486
3	22.10.13	Immissionsprobe 4	MH-PN3-43/13-I4	15,434
3	22.10.13	Immissionsprobe 5	MH-PN3-43/13-I5	16,831
4	29.01.14	Hintergrund	MH-PN5-05/14-HG	15,246
4	29.01.14	Immissionsprobe 1	MH-PN5-05/14-I1	19,105
4	29.01.14	Immissionsprobe 2	MH-PN5-05/14-I2	14,900
4	29.01.14	Immissionsprobe 3	MH-PN5-05/14-I3	17,743
4	29.01.14	Immissionsprobe 4	MH-PN5-05/14-I4	18,605
4	29.01.14	Immissionsprobe 5	MH-PN5-05/14-I5	14,990

Tabelle 3: Kenndaten der Feinstaubfilter-Proben

Kamp.	Kürzel	Volumen [Nm ³]	PM _{2,5} [mg/Filter]	PM _{2,5-10} [mg/Filter]	PM ₁₀ * [mg/Filter]	PM _{2,5} [mg/Nm ³]	PM _{2,5-10} [mg/Nm ³]	PM ₁₀ * [mg/Nm ³]	
1	16.04.13	MH-PN1-16/13	1,2075	0,543	0,990	1,534	0,45	0,82	1,27
2	16.07.13	MH-PN2-29/13	1,1983	1,234	1,470	2,704	1,03	1,23	2,26
3	22.10.13	MH-PN3-43/13	1,2977	1,129	1,414	2,543	0,87	1,09	1,96
4	29.01.14	MH-PN5-05/14	1,3029	1,199	2,918	4,117	0,92	2,24	3,16

Auf die Feinstaubfilter wirkten Luftmengen von ~ 1,2 bis 1,3 Nm³ ein. Die Filter wurden mit 10 mL Reinstwasser extrahiert, sodass auf einen Milliliter Filterluat rechnerisch die PM_{2,5}- bzw. PM_{2,5-10}-Partikelfractionen von ~ 120 bis 130 Litern Luft einwirkten. Die niedrige Nachweisgrenze des LAL-Tests von 0,005 EU/mL ermöglichte den Nachweis von Endotoxinkonzentrationen in den Partikelfractionen von > 0,038 bis > 0,042 EU/Nm³ Luft. Diese Werte liegen im Bereich der in der Umwelt vorhandenen Hintergrundwerte (Heinrich et al. (2003).

2.4.2.2 Erfasste Endotoxin-Emissionen

Mit Emissionsimpingern wurden die in der Abluft insgesamt vorhandenen Endotoxine gewonnen. Bei den 4 Probenahmen im Masthähnchenstall wurden die in Tabelle 4 und Abbildung 7 zusammengefassten Konzentrationen luftgetragener Endotoxine erfasst.

Die Endotoxingehalte der Abluft waren gegenüber den Gehalten typischer Außenluft (0,75 - 1,99 EU/m³ nach Kolk et al., 2009) deutlich erhöht. Bei früheren Untersuchungen waren an Legehennenställen Endotoxinemissionen im Bereich von 128 bzw. 2.788 EU/m³ erfasst worden (Lehmann u. Hoppenheidt, 2010).

Tabelle 4: Endotoxin-Gehalt der Abluft (Impingement)

Kamp.	Kürzel	A [EU/mL]	B [EU/mL]	C [EU/mL]	MW [EU/mL]	PPC [%]	EU/m ³
1	MH-PN1-16/13-E	2,782	2,566	2,509	2,619	103	128,93
2	MH-PN2-29/13-Em2	4,124	4,210	4,525	4,286	99	177,12
2	MH-PN2-29/13-Em1	1,176	1,237	1,302	1,238	103	57,84
3	MH-PN3-43/13-E	5,250	5,035	5,079	5,145	166	315,04
4	MH-PN5-05/14-E	14,654	14,436	14,796	14,629	184	915,96

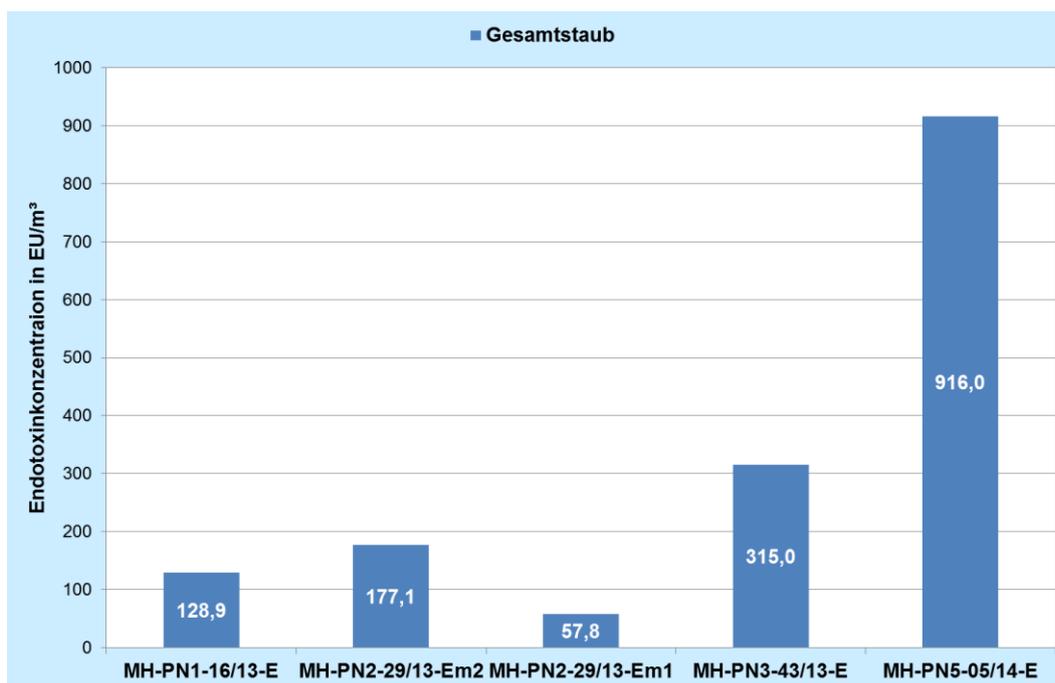


Abbildung 7: Konzentrationen luftgetragener Endotoxine in der Abluft der Masthähnchenställe

Mit den Feinstaubprobenehmern wurden die in den $PM_{2,5}$ - und $PM_{2,5-10}$ -Fraktionen der Abluft enthaltenen Endotoxine erfasst. Die Daten sind in Tabelle 5 - Tabelle 7 und Abbildung 8 zusammengefasst. Im Vergleich zu früheren Untersuchungen der Abluft von an Lege- und Junghennenställen (Lehmann u. Hoppenheidt, 2010) wurden vergleichsweise niedrige Endotoxinkonzentrationen in der Luft ermittelt: Die damaligen Werte lagen bei der $PM_{2,5}$ -Fraktion bei 106,9 (Median; Min.-Max.: 23,1 - 262,0) EU/Nm^3 und bei der $PM_{2,5-10}$ -Fraktion bei 503,0 (Median; Min.-Max.: 240,4 - 1610,3) EU/Nm^3 .

Tabelle 5: Endotoxin-Gehalt in $PM_{2,5}$ -Feinstaubfilter-Proben

Kamp.	Kürzel	A [EU/mL]	B [EU/mL]	C [EU/mL]	MW [EU/mL]	PPC [%]	$PM_{2,5}$ [EU/Filter]	$PM_{2,5}$ [EU/mg]	$PM_{2,5}$ [EU/Nm³]
1	MH-PN1-16/13	5,133	5,169	5,151	5,151	156	51,51	94,80	42,66
2	MH-PN2-29/13	5,598	5,784	5,515	5,632	188	56,32	45,63	47,00
3	MH-PN3-43/13	3,006	2,913	2,999	2,973	167	29,73	26,33	22,91
4	MH-PN5-05/14	6,374	6,091	5,693	6,053	105	60,53	50,49	46,46

Tabelle 6: Endotoxin-Gehalt in $PM_{2,5-10}$ -Feinstaubfilter-Proben

Kamp.	Kürzel	A [EU/mL]	B [EU/mL]	C [EU/mL]	MW [EU/mL]	PPC [%]	$PM_{2,5-10}$ [EU/Filter]	$PM_{2,5-10}$ [EU/mg]	$PM_{2,5-10}$ [EU/Nm³]
1	MH-PN1-16/13	12,991	13,407	12,909	13,102	156	131,02	132,33	108,51
2	MH-PN2-29/13	10,246	10,429	10,026	10,234	130	102,07	69,43	85,40
3	MH-PN3-43/13	7,938	7,810	7,621	7,790	174	77,90	55,07	60,03
4	MH-PN5-05/14	27,804	25,761	24,017	25,861	112	258,61	88,61	198,49

Tabelle 7: Endotoxin-Gehalt in PM_{10} -Feinstaubfilter-Proben

Kamp.	Kürzel	A [EU/mL]	B [EU/mL]	C [EU/mL]	MW [EU/mL]	PM_{10} [EU/Filter]	PM_{10} [EU/mg]	PM_{10} [EU/Nm ³]
1	MH-PN1-16/13	18,124	18,576	18,060	18,253	182,53	227,12	151,17
2	MH-PN2-29/13	15,844	16,213	15,541	15,866	158,39	115,07	132,40
3	MH-PN3-43/13	10,944	10,723	10,620	10,762	107,62	81,40	82,93
4	MH-PN5-05/14	34,178	31,852	29,710	31,913	319,13	139,10	244,94

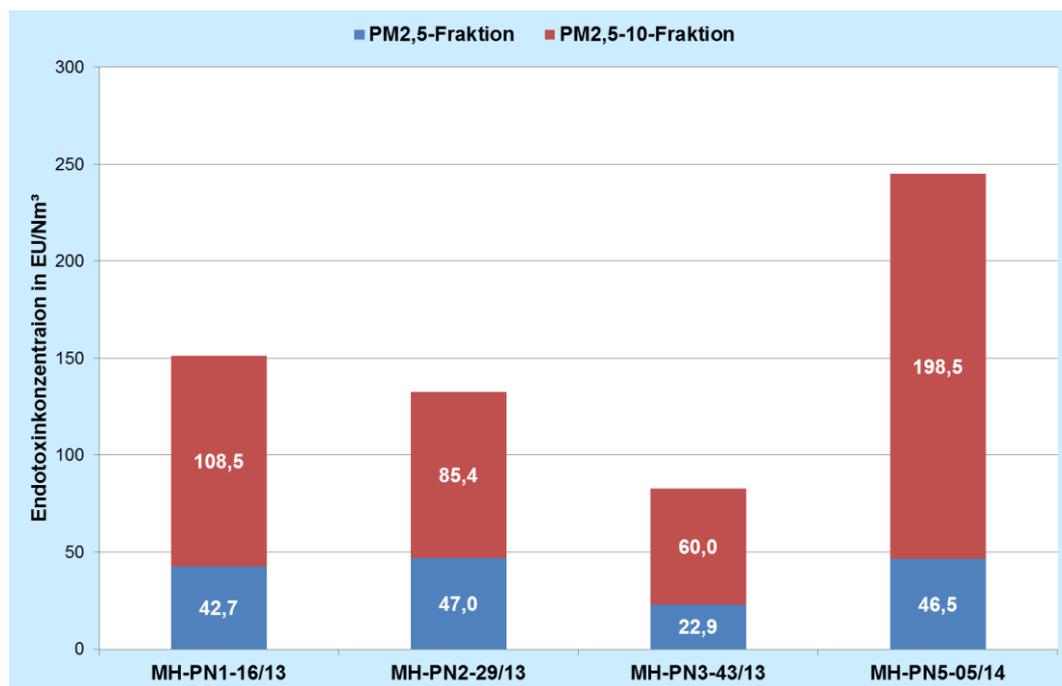


Abbildung 8: Konzentrationen luftgetragener Endotoxine in den $PM_{2,5}$ - und $PM_{2,5-10}$ -Fraktionen der Abluft der Masthähnchenställe

Aufschlussreich ist zudem die auf die Staubmenge bezogene Endotoxinbelastung. Der Feinstaub der aktuellen Untersuchung an Masthähnchen hatte eine geringere spezifische Endotoxinbelastung als der Feinstaub der früheren Untersuchung an Lege- und Junghennen:

- $PM_{2,5}$ -Fraktion:
 - aktuell an Masthähnchen: 50,5-94,8 EU/mg
 - Lege- und Junghennen 253,4 (Median; Min.-Max.: 44,0- 633,5) EU/mg
- $PM_{2,5-10}$ -Fraktion:
 - aktuell an Masthähnchen: 55,1-132,3 EU/mg
 - Lege- und Junghennen: 369,9 (Median; Min.-Max.: 147,3 – 957,8) EU/mg

2.4.2.3 Erfasste Endotoxin-Immissionen

Mit Immissionsimpingern sind bei 4 Messkampagnen Luftproben im Umfeld der Masthähnchenanlage gewonnen worden. Die Resultate der Endotoxinbestimmungen sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: Endotoxin-Gehalt der Luft an Immissionsprobenahmepunkten (Impingement)

Kamp.	Kürzel	A [EU/mL]	B [EU/mL]	C [EU/mL]	MW [EU/mL]	PPC [%]	EU/m ³
1	MH-PN1-16/13-I1	0,006	< 0,005	0,005	< 0,005	72	(< 0,319)
1	MH-PN1-16/13-I2	0,005	0,005	0,009	0,006	76	0,383
1	MH-PN1-16/13-I3	0,008	0,007	0,007	0,007	76	0,379
1	MH-PN1-16/13-I4	0,006	< 0,005	< 0,005	< 0,005	71	(< 0,327)
1	MH-PN1-16/13-I5	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	80	(< 0,337)
2	MH-PN2-29/13-HG	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	107	(< 0,274)
2	MH-PN2-29/13-I1	0,014	0,015	0,013	0,014	152	0,733
2	MH-PN2-29/13-I2	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	147	(< 0,296)
2	MH-PN2-29/13-I3	< 0,005	0,015	< 0,005	< 0,008	107	(< 0,370)
2	MH-PN2-29/13-I4	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	117	(< 0,298)
2	MH-PN2-29/13-I5	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	137	(< 0,286)
3	MH-PN3-43/13-HG	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	151	(< 0,313)
3	MH-PN3-43/13-I1	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	123	(< 0,374)
3	MH-PN3-43/13-I2	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	136	(< 0,350)
3	MH-PN3-43/13-I3	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	180	(< 0,371)
3	MH-PN3-43/13-I4	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	207*	(< 0,324)
3	MH-PN3-43/13-I5	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	263*	(< 0,297)
4	MH-PN5-05/14-HG	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	88	(< 0,328)
4	MH-PN5-05/14-I1	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	131	(< 0,262)
4	MH-PN5-05/14-I2	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	174	(< 0,336)
4	MH-PN5-05/14-I3	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	120	(< 0,282)
4	MH-PN5-05/14-I4	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	152	(< 0,269)
4	MH-PN5-05/14-I5	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	104	(< 0,334)

* PPC deutet auf Aktivierung des LAL-Reagenz hin; bei Messwerten unterhalb der Nachweisgrenze (< XYZ EU/m³) wurde keine Wiederholungsmessung durchgeführt, da kein Messwert oberhalb der Nachweisgrenze zu erwarten war

Lediglich bei 3 von 23 Immissionsproben wurden Endotoxingehalte oberhalb der niedrig gewählten Nachweisgrenze erhalten. Offenbar hat weder das Handling im Feld („Feldblindwert“) noch die Beaufschlagung mit der Probenluft bei 20 Proben zu einem messbaren Ein-

trag an Endotoxinen geführt. Aber auch der höchste ermittelte Messwert (0,733 EU/m³) erreichte nur ein Niveau der Endotoxingehalte typischer Außenluft (0,75 - 1,99 EU/m³; Kolk et al., 2009). Da bereits der Gehalt an Endotoxinen in der Abluft vergleichsweise niedrig war, sind die niedrigen Endotoxingehalte in der Umgebungsluft plausibel. Frühere Untersuchungen von Proben aus dem Umfeld von Lege- und Junghennen hatten ebenfalls nur Werte im Bereich der Nachweisgrenze ergeben. Die Nachweisgrenze lag jedoch bereits deutlich unterhalb des Konzentrationsniveaus von Endotoxinen in unbelasteter Außenluft.

Für eine Erfassung noch niedrigerer Immissionskonzentrationen an Endotoxinen wäre eine Anpassung der Probenahme notwendig. Bei der Nutzung von Impingern wären deutlich längere Probenahmezeiten erforderlich (Steigerung um Faktor 5 – 10); eine Alternative könnte die Nutzung von Feinstaubfiltersammlern sein, da diese eine etwa um Faktor 10 gesteigerte Nachweisempfindlichkeit bieten. Allerdings sollten dann alle Partikelfractionen erfasst und auf Endotoxine untersucht werden.

3 Literatur

- BIA (2002): Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz. BIA-Arbeitsmappe, 28. Lfg. IV/02
- Duchaine, C.; Thorne, P.S.; Meriaux, A.; Grimard, Y.; Whitten, P.; Cormier, Y. (2001): Comparison of Endotoxin Exposure Assessment by Bioaerosol Impinger and Filter-Sampling Methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 6, 2775 - 2780
- Gerbl-Rieger, S.; Hoppenheidt, K.; Mücke, W.; Wallnöfer, P. (1999): Keimemissionen aus Kompostierungs- und Vergärungsanlagen. Schriftenreihe des Instituts für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München, ISBN 3-932108-06-X
- Heinrich, J.; Pitz, M.; Bischof, W.; Krug, N.; Borm, P. J. A. (2003): Endotoxin in fine (PM_{2.5}) and coarse (PM_{2.5-10}) particle mass of ambient aerosols. A temporospatial analysis. *Atmospheric Environment*, 37, 26, 3659 - 3667
- Hodes, D.S.; Heon, D.; Hass., A.; Hyatt, A.; Hodes, H.I. (1987): Reaction of Fungal Products with Amebocyte Lysates of the Japanese Horseshoe Crab, *Tachypleus tridentatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 9, 1701-1704
- Kolk, A.; Van Gelder, R.; Schneider, G.; Gabriel, S. (2009): Mikrobiologische Hintergrundwerte in der Außenluft – Auswertungen der BGIA-Expositionsdatenbank MEGA. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft*, 69, 4, 130-136
- Kottmair, A.; Hoppenheidt, K.; Mücke, W. (2005): Luftbelastung mit β -(1,3)-D-Glucanen in und um Kompostierungs- und Vergärungsanlagen. Herbert Utz Verlag, ISBN 3-8316-0550-5
- Lehmann, S.; Hoppenheidt, K. (2010): Analytik von 24 Filterproben und 8 Impingerproben auf Endotoxine - Az: 33-8721-12941/2008. bifa-Bericht 610584
- Linsel, G.; Doering, C.; Duggal, S.; Hartung, J.; Koch, A.; Kottmair, A.; Lohmeyer, M.; Schriel, R.; Weist, K.; Zucker, B.A. (2002): Ergebnisse eines Ringversuches zur Messung luftgetragener Endotoxine. *VDI-Berichte*, 1656, 329-339
- Loferer-Krossbacher, M.; Klima, J.; Psenner, R. (1998): Determination of Bacterial Cell Dry Mass by Transmission Electron Microscopy and Densitometric Image Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2, 688-694
- Petsch, D.; Deckwer, W.-D.; Anspach, F. B. (1998): Proteinase K Digestion of Proteins Improves Detection of Bacterial Endotoxins by the Limulus Amebocyte Lysate Assay: Application for Endotoxin Removal from Cationic Proteins. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 259, 42-47
- Reynolds, S.J.; Milton, D.K.; Heederik, D.; Thorne, P.S.; Donham, K.J.; Croteau, E.A.; Kelly, K.M.; Douwes, J.; Lewis, D.; Whitmer, M.; Connaughton, I.; Koch, S.; Malmberg, P.; Larsson, B.M.; Deddens, J.; Saraf, A.; Larsson, L. (2005): Interlaboratory evaluation of endotoxin analyses in

- agricultural dusts - comparison of LAL assay and mass spectrometry. *J Environ Monit.*, 7, 12, 13711377
- Rietschel, E. T.; Kirikae, T.; Schade, F. U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A. J.; Zahringer, U.; Seydel, U.; Di Padova, F. (1994): Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.*, 8, 2, 217-225
- Roslansky, P.F.; Novitsky, T.J. (1991): Sensitivity of Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) to LAL-Reactive Glucans, *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 11, 2477-2483
- Schierl, R.; Heise, A.; Egger, U.; Schneider, F.; Eichelser, R.; Naser, S.; Nowak, D. (2007): Endotoxin Concentration in Modern Animal Houses in Southern Bavaria. *Ann Agric Environ Med*, 14, 129-136
- Spaan, S.; Heederik, D.J.J.; Thorne, P.S.; Wouters, I.W. (2007): Optimization of Airborne Endotoxin Exposure Assessment: Effects of Filter Type, Transport Conditions, Extraction Solutions, and Storage of Samples and Extracts. *Appl. Environ, Microbiol.*, 6134-6143
- Spaan, S.; Doekes, G.; Heederik, D.; Thorne, P.S.; Wouters, I.W. (2008): Effect of Extraction and Assay Media on Analysis of Airborne Endotoxin. *Appl. Environ, Microbiol.*, 74, 12, 3804-3811
- Stark, M. (2001): Untersuchungen zur Eignung des Limulus Amöbocyten-Lysat-Tests (LAL) und eines zellkulturbasierten Zytokin-Immunoassays zur Messung luftgetragener Endotoxine. Dissertation, Institut für Tier- und Umwelthygiene der FU Berlin
- Trent, M. S.; Stead, C. M.; Tran, A. X.; Hankins, J. V. (2006): Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis *Journal of Endotoxin Research*, Vol. 12, No. 4, 205-223
- VDI 4252 (2008): Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Aktive Probenahme von Bioaerosolen - Abscheidung von luftgetragenen Bakterien mit Impingern nach dem Prinzip der kritischen Düse. VDI-Richtlinie 4252, Blatt 3, August 2008
- VDI 4257 (2011): Bioaerosolen und biologische Agenzien - Emissionsmessung - Probenahme von Bioaerosolen und Abscheidung in Flüssigkeiten. Entwurf der VDI Richtlinie 4257, Blatt 2, September 2011
- VDI 4255 (2009): Bioaerosole und biologische Agenzien – Emissionsquellen und -minderungsmaßnahmen in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung. VDI-Richtlinie 4255, Blatt 2, Dezember 2009
- Zhang, G.H.; Baek, L.; Buchardt, O.; Kochi, C. (1994): Differential Blocking of Coagulation-Activating Pathways of Limulus Amebocyte Lysate. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 6, 1537-1541
- Zucker, B.-A.; Draz, A.M.; Müller, W. (2000): Comparison of Filtration and Impingement for Sampling Airborne Endotoxin. *J. Aerosol Sci.*, 31, 6, 751-755

Augsburg, 24.03.2015

Prof. Dr.-Ing. W. Rommel
Geschäftsführer

i.V. Dr. K. Hoppenheidt
Projektmanager
Biologische Verfahrenstechnik
und Analytik