

# Beurteilung der Wirkung von Enzymfiltern auf Bakterien und Schimmelpilze

## Ein Vorschlag zur Prüfung von Maßnahmen gegen Schimmelpilze

Tatsuaki Tanaka, Lee Hun-jun und Keiko Imai

### 1. Einleitung

Für Luftfilter werden je nach Anwendungsgebiet unterschiedliche Materialien benutzt. Es gibt Filtermaterialien für grobe bis hin zu feinsten Staubpartikeln sowie für geringe, mittlere, hohe und sehr hohe Filterleistungen. Die Filter werden vor allem im industriellen Bereich eingesetzt, wie in Reinräumen der Halbleiter-, Flüssig-Kristall-, Pharma- oder Lebensmittelindustrie, in Krankenhäusern, Büro- oder Geschäftsgebäuden aber auch im Wohnbereich.

Luftfilter werden leicht von Schimmelpilzen befallen und bilden damit biologische Verschmutzungsquellen im Raum, die eine sekundäre Verschmutzung verursachen können. Die Pilze vermehren sich in den Filterfasern und werden mit der Luft in die Räume geblasen.

Einige Untersuchungen zu Luftfiltern und Mikroorganismen gibt es bereits:

*Hamada et al.* [1; 2] haben darauf hingewiesen, dass der Schimmelpilzbefall in Luftfiltern von RLT-Anlagen abhängig ist vom Verwendungszeitraum oder der Häufigkeit der Reinigung.

Es gibt auch Untersuchungen zu typischen Arten und zur Anzahl der am Luftfilter anhaftenden Schimmelpilze [3].

*Isomae und Gokano et al.* berichten über ausführliche Untersuchungen von Luftfiltern, die in Reinräumen der Getränke-, Lebensmittel- und Pharmaindustrie sowie in Krankenhäusern oder Hotels eingesetzt werden [4 bis 8]. Für diesen Anwendungsbereich wurden mit Silber oder organischen Chemikalien behandelte Luftfilter entwickelt. Diese Luftfilter sind zwar wirksam, mit der Zeit geht der Effekt aber verloren, weil sich die Chemikalien verbrauchen. Darüber hinaus lösen sich die in die Filterfasern gekneteten oder auf diese aufgetragenen Chemikalien mit der Zeit ab, so dass sie im Raum verteilt werden und Menschen bzw. Produkte, die sich in unmittelbarer Nähe der Luftfilter befinden, verunreinigen können. Der Einsatzbereich dieser vorbehandelten Luftfilter ist somit begrenzt.

1999 erschienen auf dem japanischen Markt Luftfilter mit Bakterien auflösenden Enzymen. Diese Enzymfilter sollen die konventionellen Filter ersetzen. Sie werden jetzt zunehmend in Reinräumen der Lebensmittel-, Getränke- oder Pharmaindustrie, in Krankenhäusern, Büro- oder Geschäftsgebäuden als umweltfreundliche hybride „Enzymfilter für Desinfektionszwecke“ eingesetzt und hoch geschätzt.

Im Gegensatz zu Silber oder organischen Chemikalien sind die die Bakterien abbauenden Enzyme ohne Toxizität. Sie besitzen einen hohen Desinfektionseffekt, der auf einem natürlichen Mechanismus beruht. Ferner werden diese Enzyme nicht auf die Oberfläche der Filtermaterialien gesprüht, sondern auf molekularer Ebene in den Filterfasern chemisch gebunden, so dass sie nicht aufgebraucht werden und eine anhaltende Desinfektion möglich ist. Das sind die bedeutendsten Merkmale dieser Enzymfilter.

Gegenwärtig gibt es keine Untersuchung zu Prüfverfahren, die Aussagen über die vorbeugende Wirkung der Luftfilter gegen Schimmelpilzbefall zulassen. In dieser Arbeit werden vor Ort gemessene Daten über die vorbeugende Wirkung marktüblicher „Enzymfilter für Desinfektionszwecke“ gegen Schimmelpilze und Bakterien vorgelegt und ein Prüfverfahren zur Beurteilung der vorbeugenden und bekämpfenden Wirkung der Luftfilter gegen Schimmelpilzbefall vorgeschlagen.

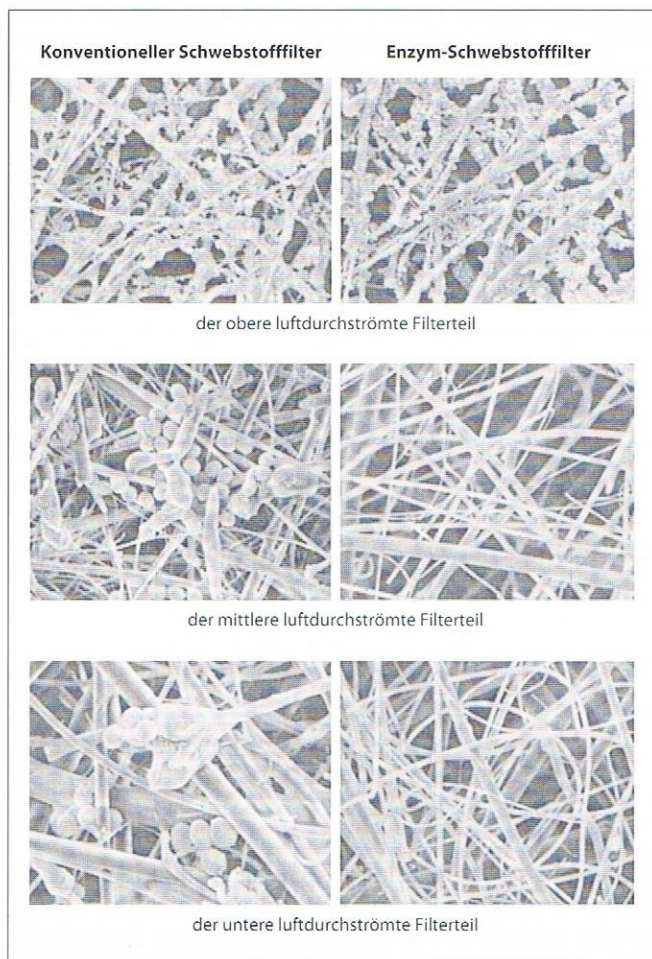
### 2. Vergleichende Untersuchungen zur vorbeugenden Wirkung von Filtern gegen sekundäre Verschmutzungen durch Schimmelpilze

#### 2.1 In einer Lebensmittelfabrik

Ein konventioneller Schwebstoff-Filter und ein Enzym-Schwebstoff-Filter wurden unter gleichen Bedingungen im Reinraum einer Lebensmittelfabrik ein Jahr lang durchgehend bei gleich hoher Feuchte betrieben. Aus beiden Filtermaterialien wurden Proben des oberen, mittleren und unteren luftdurchströmten Teils entnommen und unter einem Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

In *Bild 1* sind die Ergebnisse vergleichend dargestellt.

Prof. Dr. Tatsuaki Tanaka, Ochanomizu Universität, 2-1-1 Otsuka, Bunkyo, Tokio, Japan (112-8610), Dr. Lee Hun-jun (Hygiene & Microbiology Research Center, Tokio), Keiko Imai (Ochanomizu Univ.).



**Bild 1.** Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen in einer Lebensmittel-fabrik.

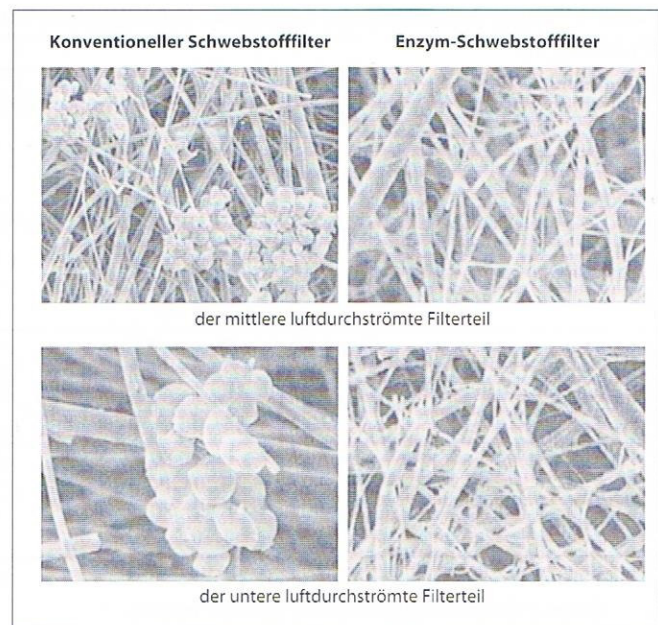
Beim konventionellen Schwebstoff-Filter wurden im mittleren und unteren luftdurchströmten Teil Mikroben, meist Schimmelpilze, nachgewiesen. Dagegen wurden beim Enzym-Schwebstoff-Filter sowohl bei der optischen Untersuchung als auch bei der mit einem Rasterelektronenmikroskop keine Mikroben festgestellt.

### 2.2 In einem Krankenhaus

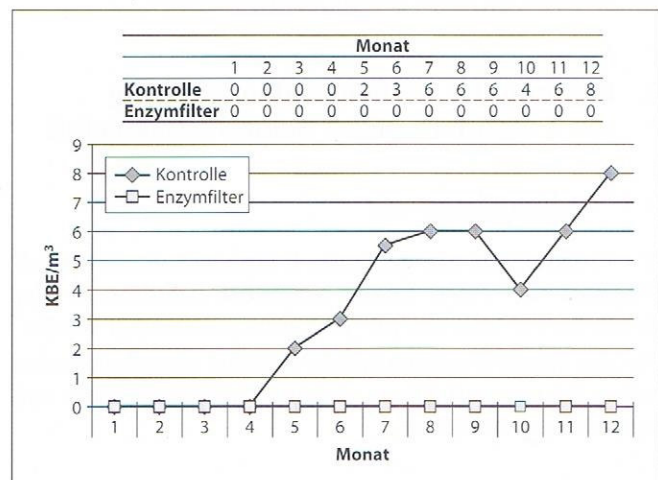
Ein konventioneller Schwebstoff-Filter und ein Enzym-Schwebstoff-Filter wurden im Reinraum einer Universitätsklinik unter gleichen Bedingungen ein Jahr lang durchgehend im Abluftsystem eines Bakterien-Testraums verwendet. Probennahme und Auswertung erfolgten wie unter 2.1.

In *Bild 2* sind die Ergebnisse vergleichend dargestellt.

Im Bakterien-Testraum, in dem die Luftfeuchtigkeit ebenfalls geregelt wird, gibt es weniger Probleme durch Schimmelpilze als in der Lebensmittel-fabrik. Trotzdem wurden beim konventionellen Schwebstoff-Filter im mittleren und unteren luftdurchströmten Filterteil überall Bakterien gefunden, wie aus den beiden linken Bildern zu entnehmen ist. Im Gegensatz dazu wurde beim Enzym-Schwebstoff-Filter (Bilder rechts) keine Verschmutzung durch Mikroorganismen festgestellt.



**Bild 2.** Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen in einer Universitätsklinik.



**Bild 3.** Luftsammler-Ergebnisse in einem Reinraum.

### 2.3 Messung frei schwebender Mikroorganismen mit einem Luftsammler

Beide Filterarten wurden in je einem fortwährend betriebenen, gleichartigen Reinraum eingesetzt. Unmittelbar nach dem Einsetzen der fabrikneuen Filter und anschließend ein Jahr lang monatlich wurden die frei schwebenden Mikroorganismen in den Räumen mit einem RCS Air Sampler (Biotest) gesammelt und untersucht.

Das Ergebnis ist in *Bild 3* dargestellt.

Direkt nach dem Filtertausch ließ sich keine Verschmutzung der Räume nachweisen, erst ab dem 3. Monat nach Austausch der Filter wurden im Raum mit konventionellem Schwebstoff-Filter Mikroorganismen beobachtet. Aufgrund des Verlaufs der Kurve ist davon auszugehen, dass diese aus dem Filter ausgeblasen wurden.

**Tabelle 1.** Prüfung der vorbeugenden Wirkung des Luftfilters gegen Schimmelpilzbefall (Methode A).

Bezeichnung des Schimmelpilzes	Probe	Substrat	Wachstumszustand					
			3. Tag	5. Tag	7. Tag	14. Tag	21. Tag	28. Tag
<i>Aspergillus niger</i>	Kontrolle	Tween 80 *1	+	+	+	+	++	++
		1/10 GP *2	+	+	+	++	++	++
	Enzymfilter	Tween 80 *1	-	-	-	-	-	-
		1/10 GP *2	-	-	-	±	±	±
<i>Aureobasidium sp.</i>	Kontrolle	Tween 80 *1	+	+	++	++	++	++
		1/10 GP *2	+	+	++	++	++	++
	Enzymfilter	Tween 80 *1	-	-	-	-	-	-
		1/10 GP *2	-	±	±	±	±	±
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Kontrolle	Tween 80 *1	+	+	+	++	++	++
		1/10 GP *2	+	+	+	++	++	++
	Enzymfilter	Tween 80 *1	-	-	-	-	-	-
		1/10 GP *2	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	Kontrolle	Tween 80 *1	+	+	+	+	++	++
		1/10 GP *2	+	+	+	++	++	++
	Enzymfilter	Tween 80 *1	-	-	-	-	-	-
		1/10 GP *2	-	-	-	±	±	±

\*1 polysorbate 80, Difco

\*2 Glukose-Pepton-Füssigagar, auf das 10 fache verdünnt

- kein Wachstum

± Wachstum war sichtbar auf unter 1/3 der Probefläche

+ Wachstum war sichtbar auf 1/3 der Probefläche

++ Wachstum war sichtbar auf 2/3 der Probefläche

+++ Wachstum war auf der ganzen Probefläche sichtbar

### 3. Prüfung der vorbeugenden Wirkung von Luftfiltern gegen Schimmelpilzbefall

#### 3.1 Prüfungsmaterial

Als Probe diente ein quadratisch ausgeschnittenes Stück Filtermaterial eines Enzym-Schwebstoff-Filters in der Größe 5cm × 5cm, das mit  $\gamma$ -Strahlung behandelt wurde.

Für den Kontrollversuch wurde Material eines konventionellen Schwebstoff-Filters gleicher Größe verwendet und entsprechend behandelt.

#### 3.2 Schimmelpilze

Als Schimmelpilze wurden *Aureobasidium sp.* (HMC2048), *Cladosporium cladosporioides* (HMC2045), *Aspergillus niger* (HMC2037) und *Penicillium sp.* (HMC2054) gewählt, die in japanischen Wohnungen gewonnen und identifiziert wurden.

#### 3.3 Abstimmung der Sporenlösung

Auf einem mit etwas Chloramphenikol (Antibiotikum) versetzten Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA-CP von Nissui) wurden die oben genannten Schimmelpilzarten eine Woche lang vorgezchtet. Den gewachsenen Kolonien wurde eine autoklavierte 0.05 %-ige Tween80-Lösung (ein oberflächenaktiver Stoff) zugesetzt und die Lösung dann pipettiert. Die gesammelten Sporen wurden anschließend mit einer physiologischen Kochsalzlösung auf die Sporenzahl  $1.0 \sim 4.0 \times 10^6$  cfu/ml abgestimmt.

Die Zubereitung einer zweiten Sporenlösung basierte auf einem Glukose-Pepton-Flüssigagar (GP von Nissui). Zur

Sporengewinnung wurde dieser mit destilliertem Wasser auf 10% verdünnt (1/10 GP), die gesammelten Sporen wurden schließlich mit einer physiologischen Kochsalzlösung auf die Konzentration  $1.0 \sim 4.0 \times 10^6$  KBE/ml abgestimmt.

#### 3.4 Prüfmethode

Die Prüfung erfolgte mit zwei Verfahren: einem Standardverfahren der japanischen Industrie (Methode B), das in verschiedensten Bereichen eingesetzt wird und mit einem speziell für Filter entwickelten Verfahren (Methode A), das stärker die Anwendungsumgebung berücksichtigt.

##### 3.4.1 JIS Z2911 (Japanischer Industrie-Standard) (Methode B)

Die Filterproben wurden je auf ein PDA-CP und ein anorganisches Substrat gelegt und anschließend mit ca. 0,2ml der vorbereiteten Sporenflüssigkeiten gleichmäßig benetzt. Bei 25 °C wurden die Kulturen 28 Tage lang gezüchtet, wobei alle 7 Tage eine Einschätzung des Schimmelpilzbefalls erfolgte.

##### 3.4.2 Prüfung unter Berücksichtigung der Anwendungsumgebung (Methode A)

In einem verschließbaren,  $2\frac{1}{4}$  l fassenden Behälter mit etwas autoklaviertem Wasser befand sich ein 2 cm hoher Ständer mit Tisch, auf den das zu prüfende Material gelegt wurde. Wie bei Methode B wurden die Proben mit ca. 0,2ml der vorbereiteten Sporenflüssigkeiten gleichmäßig benetzt. Der Behälter wurde in einem Wärmeschrank auf der Temperatur 25 °C gehalten, die Aufrecht-

**Tabelle 2.** Prüfung der vorbeugenden Wirkung des Luftfilters gegen Schimmelpilzbefall (Methode B).

Bezeichnung des Schimmelpilzes	Probe	Substrat	Wachstumszustand			
			1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
<i>Aspergillus niger</i>	Kontrolle	anorganisches Salz	–	–	±	±
	Enzymfilter		–	–	±	±
	Kontrolle	PDA-CP *1	+	+	+	+
	Enzymfilter		+	+	+	+
<i>Aureobasidium sp.</i>	Kontrolle	anorganisches Salz	–	–	±	±
	Enzymfilter		–	–	±	±
	Kontrolle	PDA-CP *1	+	+	+	+
	Enzymfilter		+	+	+	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Kontrolle	anorganisches Salz	–	–	±	±
	Enzymfilter		–	–	±	±
	Kontrolle	PDA-CP *1	+	+	+	+
	Enzymfilter		+	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	Kontrolle	anorganisches Salz	–	–	±	±
	Enzymfilter		–	–	±	±
	Kontrolle	PDA-CP *1	+	+	+	+
	Enzymfilter		+	+	+	+

\*1 Kartoffel-Dextrose-Ager mit beigefügtem Chloramphenikol

erhaltung der relativen Feuchte von 98% im Behälter erfolgte mit einem Datenlogger. Unter dieser konstanten hygrothermischen Bedingung wurde das Filtermaterial täglich beobachtet.

Um den Grad der Luftfilterverschmutzung zu bestimmen, wurden bei dieser Untersuchung alle oben genannten Schimmelpilzarten verwendet. Als Index galt der Flächenanteil des Schimmelpilzbefalls auf dem Filtermaterial.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Prüfung unter Berücksichtigung der Anwendungsumgebung (Methode A)

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 1* aufgelistet.

Beim Enzymfilter wurde fünf Tage nach Zugabe von 1/10 GP Wachstum von *Aureobasidium*, 14 Tage danach Wachstum von *Penicillium* und 28 Tage danach Wachstum von *A.niger* und *C.cladosporioides* auf weniger als 1/3 der Probefläche beobachtet.

Lediglich bei Verwendung von Tween80 wurde bei *A.niger*, *C.cladosporioides* und *Penicillium* kein Wachstum beobachtet. Bei *Aureobasidium* war nach 21 Tagen Wachstum auf weniger als 1/3 der Probefläche des Enzymfilters festzustellen.

Beim Kontrollversuch mit konventionellem Filtermaterial wurde in beiden Anwendungsumgebungen bei allen vier Schimmelpilzarten bereits nach 3 Tagen Wachstum beobachtet.

### 4.2 JIS Z2911 (Japanischer Industrie-Standard) (Methode B)

Die Ergebnisse sind der *Tabelle 2* zu entnehmen.

Beim Enzymfilter konnte auf PDA-CP bei allen vier Schimmelpilzarten am 7. Tag der Züchtung Wachstum auf der Oberfläche beobachtet werden.

Auf dem Substrat aus anorganischem Salz wurde bei allen 4 Schimmelpilzarten am 21. Tag der Züchtung Wachstum nachgewiesen.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der auf beiden Nährböden gewachsenen Schimmelpilze war bei PDA-CP eine Sporenbildung deutlich erkennbar, auf dem Substrat aus anorganischem Salz waren Sporen nur vereinzelt zu beobachten.

Die Kontrolluntersuchungen mit dem konventionellen Filtermaterial ergaben die gleichen Messergebnisse wie beim Enzymfilter, bis auf einen Unterschied: sowohl auf PDA-CP als auch auf Substrat aus anorganischem Salz war Sporenbildung deutlich sichtbar.

## 5. Zusammenfassung

Die Untersuchung hat gezeigt, dass die Ergebnisse von der Prüfmethode abhängen: Je besser die Anwendungsumgebung realisiert wird, desto sicherer kann die vorbeugende Wirkung gegen Schimmelpilze beurteilt werden.

Beim Enzymfilter ist im Gegensatz zum konventionellen Filter, bei dem die Chemikalien aufgetragen sind, das Enzym in den Filterfasern chemisch fest gebunden, es löst sich nicht von der Probe ab. In diesem Fall ist es mit der

konventionellen Methode B, die verwendet wird, wenn der herausgelöste Stoff mit dem Schimmelpilz reagiert, schwierig, eine richtige Beurteilung zu treffen. Dadurch, dass bei Methode A die Sporenflüssigkeit unterschiedlich verdünnt wurde, konnte zwischen Enzymfilter und konventionellem Filter ein Unterschied aufgezeigt werden.

Methode A scheint für die Beurteilung von Luftfiltern, bei dem sich die antibakterielle Substanz nicht von den Fasern löst, ein optimales Verfahren zu sein.

Immer mehr Luftfilter werden mit Mitteln gegen Schimmelpilze oder Bakterien vorbehandelt bzw. besitzen einen Desinfektionseffekt. Für die Prüfung der Filter in einer praxisnahen Anwendungsumgebung ist es sinnvoll, mehrere Prüfungsmethoden zur Auswahl zu haben. Es werden weiterhin praxisnahe Prüfmethode untersucht, die Merkmale oder Spezifikationen der Luftfilter berücksichtigen und optimale Prüfmethode vorschlagen.

#### Danksagung

Vor Veröffentlichung dieser Arbeit war oft Gelegenheit zur Diskussion mit Herrn K. Isomae und Frau M. Gokano der Fa. Nikki-Universal. Ihr Beitrag zu dieser Arbeit ist erheblich. Beiden sei herzlich gedankt für ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft.

#### Literatur

- [1] *Aihara, M., Tanaka, T. and Takatori, K.*: Monthly Changes of fungi detected from the indoor environments of a house structure (in Japanese). *J. Antibact. Antifung. Agents* 28 (2000), S. 3–8.
- [2] *Ohta, T.*: *J. Antibact. Antifung. Agents* 26 (1999), S. 521–525.
- [3] *Yoshizawa, S. and Sugawara, F.*: Microbiological contamination of Air-conditioned buildings (in Japanese). *kuuki seijou* 23 (1986), S. 17–26.
- [4] *Isomae, Gokano et al.*: Vortragesammlung für das Symposium für Luftreinhaltung und Kontaminationskontrolle, 194–197. Japanischer Verband für Luftreinigung (2000).
- [5] *Isomae, Gokano et al.*: Vortragesammlung für das Symposium für Luftreinhaltung und Kontaminationskontrolle. 303–306, Japanischer Verband für Luftreinhaltung (2001).
- [6] *Gokano, Isomae et al.*: Vortragesammlung für das Symposium für Luftreinhaltung und Kontaminationskontrolle. 89–92, Japanischer Verband für Luftreinhaltung (2002).
- [7] *Kazuo Isomae et al.*: The ICCCS 14th International Symposium on Contamination Control Proceedings. 233–236, Phoenix, Arizona (USA, 1998).
- [8] *Kazuo Isomae*: *Chemietechnik. Verband der Chemietechnik* 66 (2002), S. 522–525.