



FH Aachen | Postfach 10 05 60 | 52005 Aachen

Max-Buchner-Forschungsstiftung
z. H.: Herrn Dr. Andreas Förster,
Herrn Dr. Christoph Steinbach
Postfach 15 01 04
60061 Frankfurt am Main

Forschungsarbeit MBFSt-Kennziffer 2910

Stipendiatin: Dipl.-Ing. Katharina Druckenmüller

Thema: Entwicklung von Analyseverfahren auf Grundlage der NIR-Spektroskopie und der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Charakterisierung von Bioaerosol-Emissionsproben aus relevanten Anlagen

FH Aachen Campus Jülich
Heinrich Mußmann Str. 1
52428 Jülich
www.fh-aachen.de

Prof. Dr. Gereon Elbers

Fachbereich
Chemie und Biotechnologie

Lehrgebiet
Ökologische Chemie

Kontakt
T +49. 241. 6009 53714
F +49. 241. 6009 53199

elbers@fh-aachen.de

Datum: 14.10.2013

Aktenzeichen

Sehr geehrter Herr Dr. Förster, sehr geehrter Herr Dr. Steinbach,

anliegend übersende ich Ihnen den Abschlussbericht sowie eine Kurzfassung über das o.g. Forschungsprojekt. Ich weise daraufhin, dass in dem Bericht bewusst konkretere Angaben zu den erarbeiteten Probenaufarbeitungs- und Messverfahren sowie Spektren fortgelassen wurden, da diese Resultate noch nicht publiziert sind. Auf Wunsch werden wir Ihnen als Förderer des Projektes natürlich detailliertere Angaben zukommen lassen. Weiterhin haben wir den Titel auf Veranlassung unserer Kooperationspartner leicht abgeändert, da sonst rechtliche Probleme auftreten könnten. Wir bitten Sie daher ausschließlich das o.g. Thema als Titel zu verwenden.

Für die verspätete Abgabe des Berichtes bitte ich um Nachsicht, dies war im Juni mit Frau Frömel abgesprochen worden.

Ich bedanke mich nochmals ganz herzlich bei der Max-Buchner-Forschungsstiftung für die Unterstützung des Vorhabens, ohne die die Durchführung nicht möglich gewesen wäre

Mit freundlichen Grüßen

(Gereon Elbers)

Anlagen: Abschlussbericht, Kurzfassung

Abschlussbericht zum Max-Buchner-Forschungsstipendium, Kennziffer: 2910

Entwicklung von Analyseverfahren auf Grundlage der NIR-Spektroskopie und der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Charakterisierung von Bioaerosol- Emissionsproben aus relevanten Anlagen

Stipendiatin:

Dipl.-Ing. Katharina Druckenmüller

Antragsteller:

Prof. Dr. Gereon Elbers

FH Aachen

Campus Jülich

FB Chemie und Biotechnologie

Heinrich Mußmann Straße 1

52428 Jülich

Tel.: 0241/6009-53714

Email: elbers@fh-aachen.de

Oktober 2013

1 Aufgabe und Ziel des Projektes

Die Aufgabe dieses Projektes besteht in der Prüfung der spektroskopischen Messverfahren NIRS¹ und MALDI-TOF MS² auf ihre Tauglichkeit zur Charakterisierung und Bewertung von Bioaerosol-Emissionen aus relevanten Anlagen.

Bioaerosole, dazu gehören Bakterien, Schimmelpilze oder deren Zellwandbestandteile, werden vorwiegend von Anlagen im Bereich der Abfallverwertung und -beseitigung sowie Betrieben zur Tierhaltung emittiert. Ein Teil dieser freigesetzten Bioaerosole kann zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Die Thematik ist ein sehr aktuelles Problemfeld in der Luftreinhaltung. Für eine Charakterisierung von Bioaerosol-Emissionen ist es erforderlich, nicht nur Summenparameter zu ermitteln, sondern die Zusammensetzung z.B. der emittierten Organismen/ Zellbestandteile möglichst genau zu bestimmen, beispielsweise um aus diesen Kenntnissen Leitparameter für bestimmte Anlagentypen abzuleiten.

Ziel des Projektes ist es, Grundlagen für neue Verfahren zur Charakterisierung der Zusammensetzung von Bioaerosol-Emissionen aus relevanten Anlagen mit Hilfe der NIRS und der MALDI-TOF MS für den Einsatz im praktischen Immissionsschutz zu erarbeiten.

Folgende Proben aus verschiedenen Messkampagnen wurden untersucht:

- I. Emissions-Filterproben gezogen an einer Hähnchenmastanlage (Quarzfaserfilter, Probenahme: nach VDI - Richtlinien 2066 Blatt 1 und Blatt 10)
 - Gesamtstaub (TSP)
 - Feinstaub (PM) 2,5-10 µm
 - Feinstaub (PM) ≤ 2,5 µm

- II. Sterile Emissions-Impingerproben gezogen an verschiedenen Hähnchenmastanlagen (Probenahme: nach VDI - Richtlinie 4257 Blatt 2)

Zu I:

Alle Emissions-Filterproben wurden nach den VDI - Richtlinien 2066 Blatt 1 und Blatt 10 gezogen. Nach Bestimmung der Massenbelegung, wurden diese der FH Aachen zur Verfügung gestellt. Weitere Untersuchungen sind vom Kooperationspartner nicht durchgeführt worden.

ZU II:

Alle Impinger-Proben wurden nach der VDI-Richtlinie 4257 Blatt 2 gezogen. Die Impingerproben wurden nach der Probenahme geteilt. Ein Teil der Proben wurde im Auftrag des Kooperationspartners für klassische mikrobiologische Untersuchungen an ein externes Labor weitergegeben, während der andere Teil nach Sterilisation dem Labor der FH Aachen Campus Jülich zur Verfügung stand.

¹ Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIRS)

² Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time of Flight (MALDI-TOF MS)

2 Ergebnisse

2.1 NIR-Spektroskopie

Die NIR-Spektroskopie ist eine unkomplizierte und schnelle Methode zur Messung der optischen Absorption bzw. Reflexion einer Probe im nahinfraroten Spektralbereich.

2.1.1 Messung der Filterproben

Für die Messung der Filterproben ist ein Nahinfrarot-Spektrometer (Vector 22/N) der Firma Bruker verwendet worden. Die Proben wurden direkt, ohne jegliche Aufarbeitung in diffuser Reflexion gemessen. Eine Messung dauert weniger als eine Minute. Dieser Vorgang wurde für das gesamte erhaltene Probenmaterial, TSP, PM 2,5-10 µm und PM ≤ 2,5 µm, durchgeführt.

Die NIR-Spektren der gemessenen Filterproben weisen drei charakteristische Bereiche auf. In Tab. 1 werden die funktionellen Gruppen aufgelistet, die in diesen Bereichen gewöhnlich absorbieren. Diese funktionellen Gruppen stammen z.B. aus Substanzen wie Lignin, Cellulose, Fette, Lipide, Peptide. Besonders Lipide sind interessant, da diese in Zellwänden von Mikroorganismen vorkommen und oft spezifisch für einzelne Spezies sind.

Tab. 1 Charakteristische NIR-Absorptionsbereiche gemessener Emissions-Filterproben gezogen an einer Lähnenmastanlage und die für diese Absorptionsbereiche entscheidenden funktionellen Gruppen

Bereich 7500 – 6600 cm ⁻¹	Bereich 6000 – 5700 cm ⁻¹	Bereich 5500 – 4200 cm ⁻¹
<ul style="list-style-type: none"> • -CH₃ Methylgruppe; – Kombinationsschwingung • -CH₂ Methylengruppe; – Kombinationsschwingung • CH (Aromat); – Kombinationsschwingung • -OH Alkohol (free); – Kombinationsschwingung • -OH Alkohol (bound); – erste Obertonschwingung • -NH₂ Aminic (ArNH₂); – erste Obertonschwingung • -CONH-; – erste Obertonschwingung 	<ul style="list-style-type: none"> • -CH₃ Methylgruppen – erste Obertonschwingung • -CH₂ Methylengruppe – erste Obertonschwingung • C–C Alkenc – erste Obertonschwingung • CH (Aromat) – erste Obertonschwingung • -CONH-; – erste Obertonschwingung • -SH (Thiole); – erste Obertonschwingung 	<ul style="list-style-type: none"> • -CH₃ Methylgruppe; – Kombinationsschwingung • -CH₂ Methylengruppe – Kombinationsschwingung • C–C Alkenc; – Kombinationsschwingung • -OH Alkohol (free); – Kombinationsschwingung • COOH (Carbonsäuren), COOR - Ester; – zweite Obertonschwingung • C–O Ketone; – zweite Obertonschwingung • CHO Aldehyde; – Kombinationsschwingung • -NH₂ Amine; – Kombinationsschwingung • -CONH₂; – Kombinationsschwingung • -CONH; – Kombinationsschwingung • P-OH; – erste Obertonschwingung • PH (Phosphanc, Phosphorsäureester); – erste Obertonschwingung

Falls diese Unterschiede - der Aufbau der Zellwand/-membran ist von Organismus zu Organismus meist unterschiedlich - mit der NIRS zu detektieren sind, wäre dies eine sehr gute Ausgangsbasis für die Entwicklung von chemometrischen Auswertungsmethoden, die Mikroorganismen identifizieren oder sogar quantifizieren könnten.

2.1.2 Chemometrische Analyse der Filterproben

Die Analyse von NIR-Spektren findet mit Hilfe von chemometrischen Auswertungsverfahren statt. Generell wird für eine quantitative Bestimmung von Konzentrationen oder Summenparametern eine multivariate Kalibration (PLS-Regression) eingesetzt, während für die qualitative Analyse häufig die Hauptkomponentenanalyse (PCA) zur Substanzidentifizierung genutzt wird.

Multivariate-Kalibration (PLS-Regression):

Multivariate Kalibrationsmodelle werden normalerweise mit Daten aus Referenzmethoden aufgebaut. Da für die Emissions-Filterproben keine Referenzdaten (z.B. Konzentrationen von Organismen) vorlagen, wurde stattdessen diese Methode eingesetzt, um zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und den im NIR-Spektrum gezeigten spezifischen Absorptionssignalen vorliegt. Für die Modellbildung wurde die Mastdauer als Referenzwert genommen. Die PLS-Regression zeigt sehr deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen Probenzusammensetzung und Masttag herrscht und dieser mit der NIRS erfasst werden kann. Das lässt den Schluss zu, dass sich die stoffliche Zusammensetzung während der Mast systematisch, mit der Zeit, ändert. Der Korrelationskoeffizient des ermittelten Modells R^2 von 0,998 und die geringe Streuung der Messpunkte der Validation unterstreichen diese Aussage. Des Weiteren stellte sich im Verlauf der Modellentwicklung heraus, dass bei Betrachtung des Messbereiches von $5454 - 5022 \text{ cm}^{-1}$ die besten Modellparameter (z.B. R^2 und RMSECV) erzielt wurden. Vor allem P-OH, PH und -CONH- Schwingungen sind in diesem Bereich signifikant und von einem hohem Wert, da sie, mit Bezug auf Mikroorganismen Identifizierung oder Quantifizierung, z.B. in Substanzen wie Aminosäuren, Adenosintriphosphat (ATP) und DNA-/RNA-Molekülen vorkommen. Welche Substanzen/funktionellen Gruppen hier genau von entscheidender Bedeutung sind, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Hauptkomponentenanalyse (PCA):

Mit Hilfe der PCA lassen sich charakteristische Musterunterschiede mathematisch ermitteln und anhand von Clustern darstellen. Das Ergebnis, die ermittelten spektralen Unterschiede zwischen den NIR-Spektren der Emissionen verschiedener Masttage sind so ausgeprägt, dass sich diese mit Hilfe der PCA sehr gut trennen lassen. Die PCA bestätigt die Ergebnisse aus der multivariaten Kalibration, dass das NIR-Spektrum des emittierten Bioaerosols jedes Masttages ein charakteristisches Absorptionsspektrum besitzt.

2.1.3 Fazit

- Eine direkte NIRS-Messung der emittierten Bioaerosole auf Quarzfaserfilter ist möglich. Die spezifischen Absorptionen im Spektrum erlauben Rückschlüsse auf die stoffliche

Zusammensetzung der Emissionsfilterproben und ermöglichen die Entwicklung von rechnergestützten Auswertungsmethoden mittels PLS-Regression und PCA.

- Die PLS-Regression zeigt eine über die Mastdauer systematisch variierende stoffliche Zusammensetzung der Bioaerosole.
- Die PCA bestätigt die gewonnenen Ergebnisse aus dem erstellten PLS Modell.
 - Masttage besitzen einen spezifischen NIRS Fingerabdruck der zugehörigen Emissionen.

Die zusammengetragenen NIR-Spektren können also genutzt werden, um künftige Mastperioden über die jeweils aktuellen Spektren der Bioaerosolemissionen zu beschreiben. D.h. ein Spektrum zeigt an, ob der Prozess zu dem Zeitpunkt wie üblich verläuft oder Abweichungen in der Anlage, die z. B. durch ungewöhnliche Umstände wie Krankheit der Tiere hervorgerufen werden, zu verzeichnen sind. Über die Spektren-Muster ist weiterhin der Einfluss einer Abluftreinigungsanlage erkennbar.

2.1.4 Ausblick

Als nächster Schritt sollen mit geeigneten Daten aus Referenzanalysen NIRS-Kalibrationsmodelle erstellt werden, die eine Quantifizierung/Identifizierung von einzelnen Bioaerosol-Komponenten wie z.B. Organismen, Endotoxinen usw. ermöglichen.

2.1.5 Analyse der Impingerproben

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Impingerproben sind im Zwischenbericht dargelegt.

2.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

2.2.1 Messung von Filterproben

Zur Messung der Filterproben mussten Aufarbeitungsmethoden und Präparationstechniken erarbeitet werden. Die Herstellung einer für die Analyse tauglichen Suspension erfolgt über Extraktion und Anreicherung. Für die darauffolgenden Messungen wurden, basierend auf Literaturdaten und Erfahrungen aus eigenen Experimenten, ausgewählte Matrixsubstanzen und Lösungsmittel verwendet. Die MALDI-TOF Messungen fanden alle im linearen positiven Ionenmodus statt, wobei das Verhältnis von Masse zur Ladung (m/z) von 1.000–20.000 erfasst wurde. Bisher wurde jeweils das gesamte erhaltene TSP-Probenmaterial des betreffenden Filters aufgearbeitet und gemessen.

2.2.3 Signalzuordnung im MALDI-TOF Spektrum anhand von Biomarkern

Es ist gelungen, in Realproben Biomarker-Ionen von Mikroorganismen zu detektieren, und zwar ohne vorherige Kultivierungsschritte und trotz niedriger Probenmasse, was ein ganz wesentliches Ziel des gesamten Projektes darstellt. Die Signalzuordnung erfolgt bisher über Literaturdaten, da Messungen an den entsprechenden Reinorganismen noch nicht möglich waren. Bisher konnten verschiedenste Organismen-Marker passenden, im MALDI-TOF Massenspektrum gemessenen Ionen zugeordnet werden. Dazu gehört *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Trichoderma*, *Lactobacillus* und *Klebsiella/Citrobacter*. Besonders die Detektion von Biomarkern für *Escherichia*, *Staphylococcus* und *Lactobacillus* sind bemerkenswert, da diese Ergebnisse sich mit den bisher in Emissionsproben aus Hähnchenmastanlagen gefundenen Organismen decken. [E. Martin et al., Molekularbiologische

Charakterisierung luftgetragener Bakterien in Emissionsproben aus Hähnchenmastanlagen, Gefahrstoffe, Reinhaltung der Luft, 03/2012].

2.2.4 Fazit

- Es ist möglich, mit der MALDI-TOF MS auf Filtern abgeschiedene Bioaerosolemissionen aus Tierhaltungsanlagen mit den hier entwickelten Aufarbeitungsmethoden und spektroskopischen Parametern, trotz sehr niedrigen Probenkonzentrationen, zu messen.
- Diese Messung ist ohne vorherige Kultivierung möglich und kann daher in sehr kurzer Zeit nach der Probenahme erfolgen. Dies ist, im Hinblick auf eine mögliche Veränderung der Probe über die Zeit und die meist damit einhergehende Verfälschung des Ergebnisses, von besonderer Bedeutung.
- Eine Charakterisierung/Identifizierung von Mikroorganismen in Bioaerosolemissionen über die in den MALDI-TOF Massenspektren erfassten Biomoleküle ist möglich.

Die MALDI-TOF MS ist geeignet zur Untersuchung von Bioaerosol-Emissionen und liefert in vergleichsweise kurzer Zeit eine Fülle von Informationen, die bei der Bewertung des Emissionsverhaltens betreffender Anlagen von großem Nutzen sein können.

2.2.5 Ausblick

Basierend auf den hier geschilderten Erfahrungen und Erkenntnissen sollen nun auch verstärkt Proben, die in Impingern gezogen wurden, aufgearbeitet und untersucht werden, da diese Probenahmetechnik inzwischen für den Anwendungsbereich standardisiert ist.

3 Schlusswort

Wir danken der Max-Buchner Stiftung der DECHEMA ganz ausdrücklich für die Unterstützung des Projektes im Rahmen dieses Stipendiums. Ohne diese Förderung wäre die Durchführung der Untersuchungen, die einen wesentlichen Bestandteil der in der Anfertigung stehenden Dissertation der Stipendiatin Katharina Druckenmüller darstellt, nicht möglich gewesen.

Entwicklung von Analyseverfahren auf Grundlage der NIR-Spektroskopie und der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Charakterisierung von Bioaerosol-Emissionsproben aus relevanten Anlagen

Prof. Dr. Gereon Elbers, *FH-Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, FB Chemie und Biotechnologie*

Bioaerosole, dazu gehören z.B. luftgetragene Bakterien, Schimmelpilze, Zellwandbestandteile/ Endotoxine werden vorwiegend von Anlagen zur Tierhaltung und Abfallverwertung emittiert. Die Thematik ist aufgrund der gesundheitlichen Bedeutung ein sehr aktuelles Problemfeld in der Luftreinhaltung, und die hier verfügbaren Verfahren zur Charakterisierung von Bioaerosolen zeigen Schwächen. Im Rahmen dieses Projektes wurden Grundlagen für neue Verfahren zur Charakterisierung von Bioaerosol-Emissionen mit Hilfe der NIRS und der MALDI-TOF MS für den Einsatz im praktischen Immissionsschutz erarbeitet. Es zeigte sich, dass sich sowohl die NIRS als auch die MALDI-TOF MS zur Analyse von Bioaerosol-Emissionen eignen, und diese bei der Bewertung des Emissionsverhaltens betreffender Anlagen von großem Nutzen sein können.
