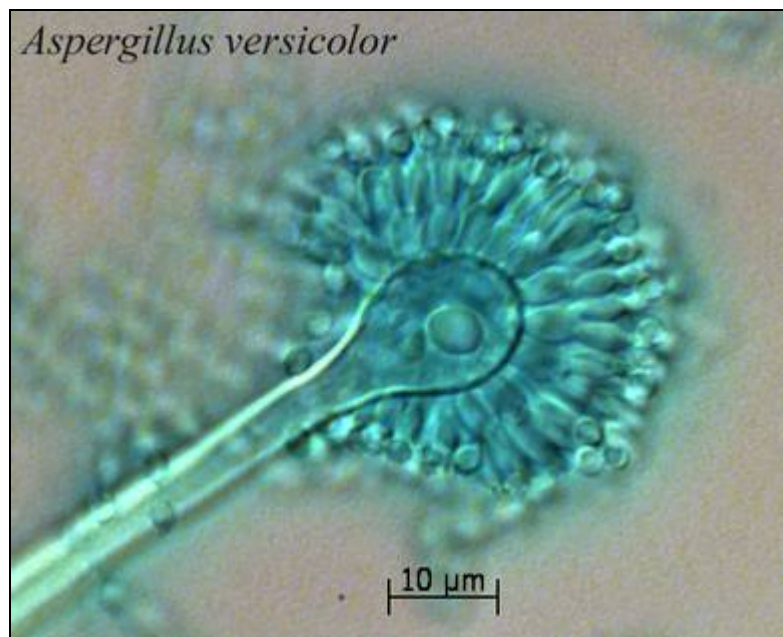


Nachweismethoden für Schimmelpilze und deren Metaboliten in Innenräumen



Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades und Titels einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

angenommene Dissertation

von

Ilka Toepfer

geboren am 16.04.1969 in Berlin

Gutachter:	apl. Prof. Dr. Werner Butte
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Krumbein
Tag der Disputation:	20.09.2010

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGEN.....	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Schimmelpilzbelastungen in Innenräumen.....	1
1.2 Schimmelpilze und ihre Metaboliten im Hausstaub – Vorstellung der Methoden und Ziel der Arbeit.....	4
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Sammlung und Beschreibung des Probenkollektivs.....	12
2.1.1 Herkunft der Proben und Probenahme von Hausstaub	12
2.1.2 Vorbereitung der Hausstaubproben	12
2.1.3 Erstellung der Fragebögen zur Ermittlung von Hintergrundinformationen zu den Haushalten.....	13
2.1.4 Bestimmung des Glühverlustes	14
2.1.5 Nachweis von Pentachlorphenol im Hausstaub.....	15
2.2 Quantifizierung von Schimmelpilzen im Hausstaub	16
2.2.1 Bestimmung der Lebendkeimzahl	16
2.2.2 Nachweis der Gesamtsporenzahl	17
2.3 Chemische Indikatoren für Schimmelpilze im Hausstaub	18
2.3.1 Quantifizierung von Ergosterin	18
2.3.2 Nachweis von 1,3- β -D-Glucan	19
2.3.3 Aktivitätsbestimmung von N-Acetyl- β -D-glucosaminidase	20
2.4 Ochratoxin A im Hausstaub.....	22
2.4.1 Nachweis von Ochratoxin A mittels Enzymimmunoassay	22
2.4.2 Nachweis von Ochratoxin A mittels Hochleistungsflüssigchromatographie	23
2.5 Entwicklung eines ELISA für den Nachweis von Sterigmatocystin im Hausstaub.....	26
2.5.1 Produktion von Sterigmatocystin	26
2.5.2 Herstellung des Hapten-Protein-Konjugats für die Immunisierung	28

2.5.3	Antikörperherstellung	30
2.5.4	Kompetitiver ELISA zum Nachweis von Sterigmatocystin	31
2.5.5	Aufreinigung der Sterigmatocystin-spezifischen Antikörper	32
2.5.6	Extraktion und Aufreinigung von Sterigmatocystin aus Hausstaub	34
2.5.7	Nachweis von Sterigmatocystin mittels Dünnschichtchromatographie	34
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	37
3.1	Quantifizierung von Schimmelpilzen im Hausstaub	37
3.1.1	Bestimmung der Lebendkeimzahl	37
3.1.2	Bestimmung der Gesamtsporenzahl	51
3.1.3	Vergleich der Methoden – Lebendkeimzahl vs. Gesamtsporenzahl	53
3.2	Chemische Indikatoren im Hausstaub	57
3.2.1	Quantifizierung von Ergosterin	57
3.2.2	Nachweis von 1,3- β -D-Glucan	61
3.2.3	Aktivitätsbestimmung von N-Acetyl- β -D-glucosaminidase	64
3.3	Ochratoxin A im Hausstaub	67
3.3.1	Nachweis von Ochratoxin A mittels Enzymimmunoassay	67
3.3.2	Nachweis von Ochratoxin A mittels Hochdruckflüssigchromatographie	70
3.3.3	Vergleich der Methoden	72
3.4	Entwicklung eines ELISA für den Nachweis von Sterigmatocystin	76
3.4.1	Produktion von Sterigmatocystin	76
3.4.2	Herstellung des Hapten-Protein-Konjugats für die Immunisierung	80
3.4.3	Antikörperherstellung	83
3.4.4	Aufreinigung des Antikörpers	84
3.4.5	Aufreinigung der Staubextrakte und dünnenschichtchromatographischer Nachweis von Sterigmatocystin	87
4	VERGLEICH UND AUSSAGEKRAFT DER UNTERSUCHUNGSMETHODEN	91
4.1	Extraanalytische Einflüsse auf den Schimmelpilzgehalt im Hausstaub	91
4.2	Schimmelpilze und chemische Indikatoren (Methodenvergleich)	106
4.3	Mykotoxine und toxigene Schimmelpilze	111
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	SUMMARY	121
7	LITERATUR	124

8	ANHANG	138
8.1	Geräteliste	138
8.2	Chemikalienliste.....	140
8.3	Tabellen.....	142
8.4	Fragebogen.....	146
	ERKLÄRUNG	151
	CURRICULUM VITAE	152

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Strukturformel von Ergosterin	7
Abb. 1-2: Strukturformel von 1,3- β -D-Glucan	8
Abb. 1-3: Spaltung von 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid durch das Enzym N-Acetyl- β -D-glucosaminidase zum fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon.....	9
Abb. 1-4: Strukturformel von Ochratoxin A (OTA).....	10
Abb. 1-5: Strukturformel von Sterigmatocystin (ST)	11
Abb. 2-1: Chromatogramm des Standards mit 15 mg/l Ergosterin und 20 mg/l 7-Dehydrocholesterin.....	19
Abb. 2-2: Kalibriergerade für den Nachweis von Ergosterin.....	19
Abb. 2-3: Kalibriergerade für den Nachweis von 1,3- β -D-Glucan	20
Abb. 2-4: Kalibriergerade für die Aktivitätsbestimmung der N-Acetyl- β -D-glucosaminidase.....	21
Abb. 2-5: Kalibrierkurve für den Nachweis von Ochratoxin A mittels ELISA	22
Abb. 2-6: Chromatogramm des Standards mit 25 μ g/L Ochratoxin A	24
Abb. 2-7: Kalibriergerade für den Nachweis von Ochratoxin A mittels HPLC-UV	25
Abb. 2-8: Schema des Vorversuchs für die Überprüfung der Antikörper-Aufreinigung.....	33
Abb. 3-1: Vergleichspräzision einer Fallprobe mit vergleichsweise hohem Keimgehalt ...	38
Abb. 3-2: Verteilung der Lebendkeimzahl der Kontrollproben auf DG18-Agar nach einer Z- und Logarithmus-Transformation	38
Abb. 3-3: Anzahl der Lebendkeime bestimmt auf Malzextrakt- (ME) und DG18-Agar in den Kontrollproben	39
Abb. 3-4: Ansatz der 10^1 Verdünnung einer Fallprobe auf Malzextrakt- (links) und DG18-Nährboden (rechts).....	40
Abb. 3-5: Ansatz einer Fallprobe auf Malzextrakt- (obere Reihe) und DG18-Agar (untere Reihe) in der 10^0 , 10^1 und 10^2 Verdünnung (von links nach rechts)	40
Abb. 3-6: Relative Häufigkeit (%) der Lebendkeimzahlen ($\cdot 10^6$ KBE/kg) in Kontroll- und Fallproben (bestimmt auf DG18).....	41
Abb. 3-7: Gesamt-Lebendkeimzahl sowie Lebendkeimzahlen von <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Eurotium spp.</i> und <i>Wallemia sebi</i> in Kontroll- (K) und Fallproben (F)	45
Abb. 3-8: Relative Häufigkeit (%) der Lebendkeimzahl ($\cdot 10^6$ KBE/kg) von <i>Aspergillus versicolor</i> in Kontroll- und Fallproben (bestimmt auf DG18)	46

Abb. 3-9: Lebendkeimzahlen (KBE/kg) und die Verteilung der überwiegend vorkommen- den Gattungen in 5 Proben aus Kontrollhaushalt I	46
Abb. 3-10: Aufnahmen der mit einer Staubsuspension ausgestatteten Bürker-Türk-Zähl- kammer bei 100- (links) und 400-facher Vergrößerung (rechts).....	52
Abb. 3-11: Aufnahmen von zwei Fallproben bei 400-facher Vergrößerung.....	52
Abb. 3-12: Vergleich der Lebendkeimzahl (bestimmt auf DG18) mit der Gesamtsporen- zahl in 29 ausgewählten Staubproben	53
Abb. 3-13: Aufnahme einer Fallprobe (Tab. 3-9) bei 400-facher Vergrößerung	56
Abb. 3-14: Wiederholpräzision einer Kontrollprobe mit einer mittleren Ergosterin-Kon- zentration	57
Abb. 3-15: Chromatogramm einer Kontrollprobe mit 11,12 mg/kg Ergosterin.....	58
Abb. 3-16: Relative Häufigkeit (%) der Ergosterin-Konzentration (mg/kg) in Kontroll- und Fallproben	59
Abb. 3-17: Wiederholpräzision einer Kontrollprobe mit einem relativ hohen 1,3-β-D- Glucan-Konzentration	62
Abb. 3-18: Konzentration von 1,3-β-D-Glucan (mg/kg) in 21 Kontroll- und 8 Fallproben	64
Abb. 3-19: Aktivität von N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (μmol/min·kg) in 21 Kontroll- und 8 Fallproben	65
Abb. 3-20: Relative Häufigkeit (%) der Konzentration von Ochratoxin A (μg/kg) in Kontroll- und Fallproben, analysiert mit dem ELISA.....	69
Abb. 3-21: Chromatogramm einer Fallprobe mit 8,44 μg/kg OTA und einer Retentionszeit von 11,49 min	71
Abb. 3-22: Vergleich der Ochratoxin A Konzentrationen (μg/kg), die mit Hilfe des ELISA und der HPLC ermittelt wurden.....	74
Abb. 3-23: Kartoffelpüree-Glucose direkt nach dem Animpfen mit einer Sporensuspension von <i>A. versicolor</i> (links) und nach 7 Tagen Inkubation (rechts)	77
Abb. 3-24: Ansatz auf Kartoffelpüree-Glucose aus Abb. 3-23 nach 14 Tagen Inkubation	77
Abb. 3-25: Säulenchromatographie des Myzelextraktes nach 10, 70, 150, 390 und 525 min 78	
Abb. 3-26: Dünnschichtchromatographie der Fraktionen 18 bis 71 (340 bis 970 ml Dichlormethan) aus der Säulenchromatographie.....	78
Abb. 3-27: Das 500 MHz ¹³ C NMR Spektrum des gereinigten Sterigmatocystins in DCCl ₃ Lösung	79
Abb. 3-28: Strukturformel des Sterigmatocystin-hemisuccinats	80

Abb. 3-29: Syntheseweg für die Herstellung von Sterigmatocystin-hemisuccinat durch Kopplung von ST und Bernsteinsäure-hemitrichlorethylester unter Umsetzung mit Dicyclohexylcarbodiimid	81
Abb. 3-30: Syntheseweg für die Herstellung von Sterigmatocystin-hemisuccinat durch Kopplung von ST und Bernsteinsäurechlorid-trichlorethylester unter Umsetzung mit Pyridin	83
Abb. 3-31: Verdünnungen des Antiserums von Kaninchen 1 nach der ersten Restimulierung im ELISA mit unterschiedlich beschichteten Kavitäten: KLH, BSA, ST, OVA (Ovalbumin)	84
Abb. 3-32: Nitrocellulosestreifen mit und ohne Antiseren bzw. gesättigt und ungesättigt.	85
Abb. 3-33: Kalibriergerade für den Nachweis von Sterigmatocystin nach Derivatisierung mit AlCl_3	88
Abb. 3-34: Dünnschichtchromatographie der Fraktionen nach der C18-SPE-Säule mit aufsteigender Methanol-Konzentration	89
Abb. 3-35: DC (mit Konzentrierungszonen) des C18-SPE-Eluats (70 % Methanol) von 2 dotierten Poolstaubproben (50 µg/kg) sowie das Chromatogramm der linken Bahn im Bereich von 90 bis 120 mm	89
Abb. 4-1: Lebendkeimzahl (KBE/kg, log) sämtlicher Gattungen und von <i>Cladosporium spp.</i> im Winter und Sommer (bestimmt auf DG18)	92
Abb. 4-2: Abhängigkeit der Ergosterin-Konzentration von der Geschossigkeit der beprobten Wohnung	94
Abb. 4-3: Einfluss der Müllsammlung auf die Lebendkeimzahl im Hausstaub (KBE/kg, log) (bestimmt auf DG18)	95
Abb. 4-4: Aufnahmen von ungesiebten Staubproben verschiedener Haushalte, in denen die Variationsbreite der Zusammensetzung deutlich wird	101
Abb. 4-5: Lebendkeimzahl (KBE, DG18-Agar) und Konzentration von Ergosterin (mg/kg) in den Hausstaubproben (n = 354)	107

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3-1: Statistische Kenngrößen der Bestimmung der Lebendkeimzahl in Kontroll- und Fallproben für die beiden verwendeten Nährböden	39
Tab. 3-2: Häufigkeiten (%) und statistische Kenngrößen der Konzentrationen ($\cdot 10^6$ KBE/kg) einzelner Pilzgattungen, bestimmt auf DG18-Agar	43
Tab. 3-3: Häufigkeiten (%) und statistische Kenngrößen der Konzentrationen ($\cdot 10^6$ KBE/kg) einzelner Pilzgattungen, bestimmt auf Malzextrakt-Agar	43
Tab. 3-4: Referenzwerte aus dem gerundeten 95. Perzentil (DG18) der Kontrollproben (n = 201) für ausgewählte Gattungen sowie die Anzahl der richtig erfassten Fallproben aus n = 153	44
Tab. 3-5: Häufigkeiten (%) und statistische Kenngrößen der Konzentrationen ($\cdot 10^6$ KBE/kg) einzelner Pilzarten (bestimmt auf DG18)	45
Tab. 3-6: statistische Angaben zur Variabilität der Lebendkeimzahl in zwei mehrfach beprobten Kontrollhaushalten	47
Tab. 3-7: Vergleich der Lebendkeimzahlen von <i>Cladosporium spp.</i> mit der Gesamt-lebendkeimzahl zwischen der hier vorliegenden Studie und der von Trautmann et al. (2005)	50
Tab. 3-8: Statistische Kenngrößen der Bestimmung der Gesamtsporenzahl in 21 Kontroll- und 8 Fallproben	51
Tab. 3-9: Vergleich der Lebendkeimzahl und Gesamtsporenzahl in einer Fallprobe	55
Tab. 3-10: Statistische Kenngrößen der Ergosterin-Konzentration in Kontroll- und Fallproben	58
Tab. 3-11: Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse der Ergosterin-Konzentration im Hausstaub zur Studie von Dhamarge et al. (1999)	60
Tab. 3-12: Statistische Kenngrößen der Bestimmung der Konzentration von 1,3- β -D-Glucan in 21 Kontroll- und 8 Fallproben	62
Tab. 3-13: Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse der 1,3- β -D-Glucan-Konzentration im Hausstaub zur Studie von Iossifova et al. (2007)	63
Tab. 3-14: Statistische Kenngrößen der Aktivitätsbestimmung von N-Acetyl- β -D-glucosaminidase in 21 Kontroll- und 8 Fallproben	65
Tab. 3-15: statistische Kenngrößen der Varianzanalyse der Präzision für die doppelte Bestimmung und Aufarbeitung beim Nachweis von Ochratoxin A mittels ELISA ..	

Tab. 3-16: Statistische Kenngrößen der Konzentration von Ochratoxin A in Kontroll- und Fallproben (ELISA).....	69
Tab. 3-17: Statistische Kenngrößen der Konzentration von Ochratoxin A in Kontroll- und Fallproben (HPLC-UV).....	71
Tab. 3-18: Vergleich der statistischen Kenngrößen der mittels ELISA und HPLC ermittelten Konzentrationen von Ochratoxin A (n = 93)	73
Tab. 3-19: Vergleich der Produktion von Sterigmatocystin von 9 Stämmen <i>Aspergillus versicolor</i> auf 5 verschiedenen Nährböden nach 14 Tagen Inkubation bei 29 °C im Dunkeln	76
Tab. 3-20: Ergebnisse der Titerbestimmung nach der 5. Blutung (durchgeführt bei der DIANOVA GmbH)	83
Tab. 4-1: Zusammenstellung der von einem Pilzbefall unabhängigen Faktoren, die zu einer erhöhten Konzentration von Ergosterin und Lebendkeimen im Hausstaub führen.....	97
Tab. 4-2: Ergebnisse der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman (r_s)	106
Tab. 4-3: Vergleich der Konzentration von Ochratoxin A, gemessen mit dem ELISA und der HPLC, sowie die Lebendkeimkonzentration potentieller OTA-produzierender Pilze.....	113
Tab. 4-4: Gegenüberstellung der Konzentration von Sterigmatocystin, gemessen mit Hilfe der LC-MS/MS, mit der Lebendkeimkonzentration potentieller ST-produzierender Pilze	114
Tab. 8-1: Statistische Kenngrößen der Lebendkeimzahlen der im Hausstaub nachweisbaren Schimmelpilzarten, sowie deren Häufigkeit.....	142
Tab. 8-2: Ergebnisse der chemischen Indikatoren und der Lebendkeim- sowie Gesamtsporenzahl in einem Unterkollektiv (n = 29)	145

ABKÜRZUNGEN

BSA	bovine serum albumin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DG18	Dichloran-Glycerin-Agar
7-DHC	7-Dehydrocholesterin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektronenspray-Ionisation
HM	Hafermehl-Nährboden
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KG	Kartoffel-Glucose-Nährboden
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LAL	<i>Limulus</i> Amöbocyten Lysat
LC	Flüssigchromatographie
ME	Malzextrakt-Agar
MG	Molekulargewicht (g/mol)
MM	Maismehl-Nährboden
MS oder MS/MS	Massenspektrometrie oder Tandemmassenspektrometrie
4-MU	4-Methylumbelliferon
NAGase	N-Acetyl- β -D-glucosaminidase
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OTA	Ochratoxin A
PCP	Pentachlorphenol
PO	Meerrettichperoxidase
RM	Reismehl-Nährboden
s	Standardabweichung
ST	Sterigmatocystin
ST-BSA	Kopplungsprodukt aus Sterigmatocystin und BSA
ST-KLH	Kopplungsprodukt aus Sterigmatocystin und KLH
$\bar{x}$	Mittelwert

1 EINLEITUNG

1.1 Schimmelpilzbelastungen in Innenräumen

Schimmelpilze sind eukaryotische Organismen, die sich durch filamentöses Wachstum und eine heterotrophe Lebensweise auszeichnen. Das einzelne Filament wird Hyphe genannt und das Netzwerk, das von den Hyphen gebildet wird, als Myzel bezeichnet (Brock et al. 1994). Der Begriff „Schimmelpilz“ ist keine wissenschaftliche Bezeichnung und umreißt eine nicht genau definierte Gruppe von Pilzen (Reiß 1998). Längst hat sich dieser Begriff aber bei den Wissenschaftlern durchgesetzt, die sich beispielsweise mit den von Schimmelpilzen verursachten Problemen im Innenraum und in Lebensmitteln beschäftigen. Selbst eine der bekannten Stammsammlungen trägt die Bezeichnung im Titel: Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Niederlande). Pilze vermehren sich sexuell und asexuell, wobei in beiden Fällen Sporen produziert werden. Die ausschließlich zur asexuellen Vermehrung befähigten Pilze (Anamorphe) bilden die Abteilung der Fungi imperfecti, zu denen viele der als Schimmelpilze bezeichneten Organismen gehören (Müller und Löffler 1992). Pilze leben als Parasiten, Symbionten oder Saprophyten. Gerade die Saprophyten sind für die Natur und die Menschheit von großer Bedeutung. Es gibt wahrscheinlich kein von der Natur produziertes, organisches Material, das von Pilzen nicht wieder zersetzt werden kann (Deacon 1984). Nützliche und wichtige Funktionen der Pilze bestehen im Abbau des organischen Materials im Zuge des Stoffkreislaufes, in der Nutzung zur Herstellung bestimmter Speisen und Getränke, in der Funktion als Antibiotikalieferanten und als Quelle für industriell wichtige Chemikalien wie z. B. Alkohole, Acetone und Enzyme (Bhat 2010). Die saprophytischen Fähigkeiten bereiten allerdings auch großen Schaden, da die Pilze bei Anwesenheit von Feuchtigkeit z. B. Lebensmittel verderben und organische Baumaterialien zerstören können. Neben dem Abbau von organischen Substanzen können Pilze aufgrund mechanischer und physikalischer Prozesse auch anorganische (Bau-)Materialien zerstören. Gesellschaften von Pilzen und anderen Mikroorganismen bilden auf und innerhalb von Gesteinen Biofilme. Diese können dem Stein z. B. durch Säureangriffe, durch die Sprengkraft von Wasser aufnehmenden Polymeren oder durch thermische Sprengung infolge von Pigmentbildung zusetzen (Krumbein 2004, Gorbushina und Krumbein 2006).

Es ist anzunehmen, dass Schimmelpilzbefall in Innenräumen vorkommt, seit der Mensch überhaupt baut. Bereits in der Bibel wird auf den Umgang mit „Aussatz am Haus“ hinge-

wiesen (3. Buch Mose, Kap. 14, Vers 33 – 57). Der römische Architekt und Ingenieur Marcus Vitruvius Pollio (1. Jhd. v. Chr.) hat in seinen „Zehn Büchern über Architektur“ empfohlen, dass Schlafzimmer und Bibliotheken gen Osten gerichtet sein sollten, da die von Süden und Westen kommenden „feuchten Winde“ Schimmel begünstigen. Die Menge des im und am Material zur Verfügung stehenden Wassers – in der Biologie Wasseraktivität (a_w -Wert) und in der Bauphysik Ausgleichsfeuchte genannt (Sedlbauer und Krus 2003) – ist der limitierende Faktor für Pilzwachstum im Innenraum (Nielsen 2003). Die Ursachen für erhöhte Feuchtigkeit im Gebäude sind sehr vielfältig und können in gebäudebedingte (Wärmebrücken, Leckagen, Baumängel) und nutzerbedingte (mangelndes Lüften und Heizen) Ursachen eingeteilt werden. Häufig ist es aber auch eine Kombination beider Ursachen, die einen Schaden größeren Ausmaßes entstehen lässt (Hankammer und Lorenz 2003). Es existieren nur Schätzungen zur Zahl der Wohnungen und Gebäude mit Pilzbefall. Der Anteil der Gebäude mit Feuchteschäden (nicht zwangsläufig verbunden mit Pilzbefall) wird für Europa auf 45 % geschätzt (Szponar und Larsson 2000). In einer repräsentativen Untersuchung in Deutschland wurde in 9,3 % von 5.530 Wohnungen Schimmelpilzbefall festgestellt (Brasche et al. 2003), wobei der Befall nur durch Inaugenscheinnahme erfasst und nicht mikrobiologisch untersucht wurde. Clausnitzer (2006) hat bei der Untersuchung von 920 Mietwohnungen mit einem Baujahr vor 1975 einen Anteil von 25,9 % mit Pilzbefall ermittelt. Ähnlich schwierig ist zu erfassen, ob der Anteil der pilzbelasteten Wohnungen zunimmt. Auf der einen Seite hat sich die Bauweise vor allem in den letzten Jahrzehnten sehr stark verändert: seit der Energiekrise der 1970er Jahre nimmt die Dichtigkeit der Gebäudehülle bei Neubauten und sanierten Gebäuden zu, so dass die innen produzierte Feuchtigkeit nur noch über die aktive Lüftung abgeführt werden kann. Auf der anderen Seite ist ein Pilzbefall – nicht zuletzt durch die Medien – stärker als „Problem“ in das Bewusstsein der Menschen gerückt, so dass bereits bei kleineren Befallssituationen Beratungsstellen oder Untersuchungslabore aufgesucht werden, was sich in den Statistiken niederschlägt.

Neben dem wirtschaftlichen Schaden, der durch einen Pilzbefall am und im Gebäude entstehen kann, sind die möglichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch Schimmelpilze im Innenraum nicht außer Acht zu lassen. Die klassische Einteilung der Erkrankungen gliedert sich in Mykosen (Infektionen), mykogene Allergien und Mykotoxikosen (Vergiftungserscheinungen) (Reiß 1998). Das Risiko einer Mykose ist bei den in Innenräumen überwiegend vorkommenden Schimmelpilzarten relativ gering, da die meisten nach der Klassifizierung der Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 460) zur

Risikogruppe 1 mit dem geringsten Infektionsrisiko gehören (Heinzow 2007). Ferner ist eine Immunsuppression bei den Betroffenen Voraussetzung für eine Infektion. Die mykogenen Allergien hingegen kommen häufig vor und äußern sich in Abhängigkeit von dem entwickelten Allergietyp z. B. als Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale oder exogen allergische Alveolitis (Heinzow 2007). Im Rahmen des Kinder-Umwelt-Surveys wurde festgestellt, dass 8,3 % der Kinder in Deutschland eine Sensibilisierung gegenüber Schimmelpilzen aufweisen (Szewzyk 2009). Bezogen auf die gesamte Bevölkerung sollen ungefähr 5 % der Menschen gegen Schimmelpilze sensibilisiert sein (Gabrio et al. 2003). Mykotoxikosen sind Vergiftungen durch Mykotoxine (toxische Sekundärmetaboliten von Schimmelpilzen), deren Wirkung für den oralen Aufnahmepfad von der Lebensmittelforschung detailliert untersucht wurde. Über die Wirkung und Dosis-Wirkungsbeziehung nach inhalativer Aufnahme von luftgetragenen Mykotoxinen in kontaminierten Innenräumen liegen bisher keine gesicherten Erkenntnisse vor (Heinzow 2007). Es gibt aber erste Hinweise, dass bereits geringe Mykotoxindosen aufgrund von synergistischen Effekten von Mykotoxinen untereinander oder mit strukturellen Verbindungen (z. B. Glucane, Pigmente und Proteine) zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen können (Fischer und Dott 2005). Die strukturellen Verbindungen von Pilzen stehen ebenfalls im Verdacht, auch ohne synergistischen Partner, die Gesundheit zu beeinträchtigen: 1,3- β -D-Glucan wirkt wie die Endotoxine von Bakterien entzündungsfördernd (Rylander et al. 1998, Chew et al. 2001) und Melanine können das Komplementsystem aktivieren (Rosas et al. 2002). Das Auftreten von unspezifischen Symptomen (Augenreizungen, Kopfschmerzen, Müdigkeit, grippeähnlichen Symptomen usw.) im Zusammenhang mit Pilzbefall wird auf die genannten Substanzen zurückgeführt (Douwes 2005, Giovannangelo et al. 2007). Die Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“ vom Robert-Koch-Institut (2007) sieht erhöhten Forschungsbedarf in der Mikrobiologie und Medizin, um die Zusammenhänge zwischen Symptomen der Raumnutzer und einem Pilzbefall im Innenraum stärker aufzuklären. Zuverlässige Nachweismethoden für das Vorkommen von Schimmelpilzen und ihren Metaboliten im Innenraum sind dafür erforderlich. Die bereits gängigen Methoden sowie die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten und erarbeiteten Nachweismethoden werden im folgenden Kapitel erläutert.

1.2 Schimmelpilze und ihre Metaboliten im Hausstaub – Vorstellung der Methoden und Ziel der Arbeit

In der Innenraumanalytik werden zur Erfassung von Schimmelpilzen und ihren Metaboliten überwiegend Luft- und Materialproben untersucht. In der Luft werden routinemäßig die Anzahl der keimfähigen Pilzbestandteile (Sporen und Hyphenfragmente), die Gesamtsporenzahl sowie (seltener) die von Pilzen gebildeten organischen Verbindungen (MVOC = microbial volatile organic compounds) gemessen. Die Untersuchung von Luft erfasst nur die momentane Situation (einige Minuten bis mehrere Stunden) und das Ergebnis wird von dem Ausmaß der Luftverwirbelung während der Messung beeinflusst (Hankammer und Lorenz 2003). Die Untersuchung von Materialproben ist sinnvoll, um die Befallsstärke und die vorkommenden Pilzarten zu bestimmen oder um einen Befall ausschließen zu können. Diese Ergebnisse beschreiben die Situation an der untersuchten Stelle, so dass keine Rückschlüsse auf andere Stellen oder auf eine eventuelle Exposition der Raumnutzer gezogen werden können. Ferner ist ein Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Materialien (z. B. Dämmmaterial, Putz, Tapete) aufgrund der verschiedenen Gewichte und Oberflächen-Volumen-Verhältnisse kaum möglich (Trautmann 2005).

Die Analytik in Hausstaub wird in Hinblick auf Schimmelpilze und ihre Metaboliten bislang selten angewendet. Dabei stellt Hausstaub eine Senke für Chemikalien und Schimmelpilze dar, so dass seine Analyse Langzeitinformationen zu andauernden Kontaminationen des Innenraums liefern kann (Toepfer und Butte 2009). Dies wird für das Erkennen von Innenraumkontaminationen z. B. mit Bioziden genutzt, die sich aufgrund ihrer Schwerflüchtigkeit im Hausstaub anreichern können (Butte et al. 2000). Der Nachweis von keimfähigen Pilzbestandteilen im Hausstaub wurde bereits in einigen Studien durchgeführt und es liegen verschiedene Vorschläge zu Bewertungshilfen vor (Schleibinger et al. 2004 II, Trautmann et al. 2005, Baudisch et al. 2009 I). Die Kultivierung der Schimmelpilze ist insofern von Nachteil, dass die Ergebnisse aufgrund der Wachstumszeit erst nach frühestens 5 bis 7 Tagen vorliegen und nur die keimfähigen Sporen und Hyphenfragmente erfasst werden. Bei einem alten oder bereits fungizid behandelten Befall ist die Keimfähigkeit eingeschränkt oder nicht mehr vorhanden, so dass diese Methode eine solche Befallssituation nicht erfasst. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Nachweis chemischer Indikatoren für Schimmelpilze in der Matrix Hausstaub geführt und die Methoden auf ihre Anwendbarkeit und Aussagekraft getestet. Als chemische Indikatoren wurden (1) Ergosterin aus der Zytoplasmamembran von Pilzen, (2) 1,3- β -D-Glucan aus der Zellwand

und (3) die Aktivität des Enzyms N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) ausgewählt, da sie unabhängig von der Keimfähigkeit der Sporen und Hyphen erfasst werden. Ferner wurde in einem Unterkollektiv die Gesamtsporenzahl ermittelt. Der Nachweis der chemischen Indikatoren und der Gesamtsporen kann jeweils an einem Tag erfolgen, so dass innerhalb kurzer Zeit ein Ergebnis vorliegt, das die Gesamtheit der im Hausstaub vorkommenden Pilze beschreibt. Als vergleichende Größe wurde die Lebendkeimzahl bestimmt und die Pilzarten differenziert, da über deren Vorkommen und Hintergrundkonzentrationen die meisten Informationen in der Literatur vorliegen (Moriske und Szewzyk 2002, LGA Baden-Württemberg 2004, Trautmann et al. 2005).

Die Möglichkeit der Kontamination von Innenräumen mit Mykotoxinen wurde bisher überwiegend im Zusammenhang mit dem toxigenen Pilz *Stachybotrys chartarum* untersucht (Brasel et al. 2004, Bloom et al. 2009), aber Studien zeigen, dass auch andere Mykotoxin-produzierende Pilze und ihre toxischen Metaboliten im Innenraum in erhöhten Konzentrationen nachweisbar sind (Gravesen et al. 1999, Rolle-Kampczyk et al. 2000, Nielsen 2002). Im Hausstaub von Wohnungen mit starkem Pilzbefall konnten die Mykotoxine Sterigmatocystin (Engelhart et al. 2002) und Ochratoxin A (Kasel et al. 1999) bestimmt werden. Es existieren bisher aber keine Erkenntnisse darüber, ob Mykotoxine auch in Haushalten mit weniger auffälligen oder sogar ohne Pilzschäden vorkommen und in welchen Konzentrationen sie vorliegen können. Diesen Fragen wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen und gleichzeitig konnte durch die Artdifferenzierung der Lebendkeime ein Vergleich zwischen nachweisbaren Mykotoxinproduzenten und messbaren Mykotoxinen erfolgen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Methoden zum Nachweis von chemischen Indikatoren für Schimmelpilze und von Mykotoxinen auf ihre Anwendbarkeit im Hausstaub sowie auf ihre Aussagekraft zu überprüfen. Um feststellen zu können, ob erhöhte Konzentrationen von Pilzen und/oder Mykotoxinen im Hausstaub mit einem Pilzbefall im Zusammenhang stehen oder auch auf andere Quellen zurückzuführen sind, wurden Hausstaubproben aus Haushalten mit sichtbarem Pilzbefall (Fälle) und ohne sichtbaren Pilzbefall (Kontrollen) gesammelt. Außerdem wurden detaillierte Informationen zum Gebäude und zur Nutzung der teilnehmenden Haushalte mit Hilfe eines Fragebogens ermittelt. Diese Angaben sollten ermöglichen, von einem Pilzbefall unabhängige Einflüsse wie z. B. der Gebäudestruktur, der Haustierhaltung oder dem Müllsammelverhalten auf den Pilzgehalt im Staub herauszufinden. Mit den Ergebnissen der Kontrollproben sollten vor allem für die chemischen Indikatoren zunächst die Hintergrundkonzentrationen festgestellt werden, da Schimmelpilze im

Hausstaub grundsätzlich vorliegen (Trautmann et al. 2005). Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der Fall- und Kontrollproben sollte Aufschluss geben, ob mit den ausgewählten Methoden ein Pilzbefall im Innenraum nachgewiesen werden kann. Für die Bildung von Referenzwerten auf Basis des 95. Perzentils wurde ein Kollektiv von 150 Fall- und 150 Kontrollproben angestrebt. Das Sammeln des Kollektivs erfolgte im Zeitraum von Februar 2007 bis März 2009 und wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Energie und Umwelttechnik (IUTA e. V.) in Duisburg durchgeführt. Das gesamte Kollektiv stand sowohl für die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation als auch für die Mykotoxin-Analytik im Rahmen des am IUTA durchgeführten Projektes „Aufbau eines Arbeitsschwerpunktes: Bewertungs- und Analytikbereich zur Problematik der Belastung von Innenräumen mit Mykotoxinen“ zur Verfügung (gefördert vom TIT – Technologie- und Innovationsprogramm des Landes Nordrhein-Westfalen, Förderkennzeichen 005-0501-0009).

Bei der aktiven Probenahme wird Hausstaub durch Wischen oder Saugen gewonnen, wobei zwischen Alt- und Frischstaub differenziert wird (VDI 4300 Blatt 8, 2001). Frischstaub ist genau 7 Tage alt und wird durch einen Mitarbeiter des Messinstituts gesammelt. Staub unbekannten Alters wird als Altstaub bezeichnet, kann von den Bewohnern mit einem handelsüblichen Staubsauger selbst gewonnen und mitsamt Staubsaugerbeutel an das Messinstitut gegeben werden (Butte et al. 2000). Für die vorliegende Arbeit wurde Altstaub zur Untersuchung ausgewählt, weil über den längeren Sammelzeitraum eine stärkere Anreicherung erfolgt, was vor allem in Hinblick auf die wahrscheinlich sehr gering konzentrierten Mykotoxine wichtig erschien. Die Untersuchung von Altstaub erfasst außerdem die Kontamination der gesamten Wohnung. Bei der Gewinnung von Frischstaub wird eine definierte und begrenzte Fläche gesaugt, so dass auch nur die Kontamination dieser Fläche bestimmt werden kann (Butte et al. 2000). Die Möglichkeit, den gefüllten Staubsaugerbeutel an ein Messinstitut zu schicken, beschleunigt den Ablauf und ist kostengünstig, da die Probenahme durch einen geschulten Mitarbeiter entfällt. Dies ist in Hinblick auf eine zukünftige Etablierung der Methoden ein wichtiger Aspekt. Für die vorliegende Arbeit wurde durch das Einschicken der Staubsaugerbeutel ein größerer Stichprobenumfang ermöglicht. Die mit dem langen Sammelzeitraum erzielte Staubmenge erlaubte außerdem erst die Anwendung der verschiedenen Methoden in einer Probe.

Im Folgenden werden die untersuchten chemischen Indikatoren sowie Mykotoxine und die angewandten Methoden kurz vorgestellt.

Chemische Indikatoren:

Ergosterin:

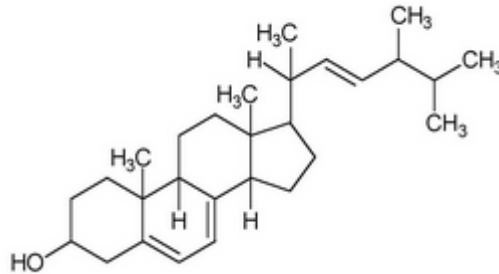


Abb. 1-1: Strukturformel von Ergosterin

Ergosterin (Abb. 1-1) ist das primäre Sterin der Zytoplasmamembran von Pilzen (Weete und Gandhi 1996) und kommt in allen Zelltypen von Pilzen vor. Einige grüne Mikroalgen (Newell et al. 1987) und bestimmte Protozoen (Raederstorff und Rohmer 1987) enthalten ebenfalls Ergosterin. Da diese Organismen im Hausstaub gar nicht oder nur (von außen eingeschleppt) in geringen Mengen vorliegen, erscheint Ergosterin ein besonders gut geeigneter Indikator für Pilze. Der in dieser Arbeit angewandte Nachweis mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie und anschließender UV-Detektion wurde zuerst von Seitz et al. (1977) für die Bestimmung der Pilz-Biomasse in Getreide durchgeführt. Aufgrund des konjugierten Paares an Doppelbindungen an C5-C6 und C7-C8 absorbiert Ergosterin das UV-Licht zwischen 240 und 300 nm mit einem Maximum bei 282 nm (Seitz et al. 1977). Pflanzliche Sterine, die im Hausstaub ebenfalls vorkommen können, verfügen hingegen über nur eine Doppelbindung und werden mit dem untersuchten Wellenlängenbereich nicht erfasst. Bei der Untersuchung sehr verschiedener Matrices, wie z. B. Nahrungsmittel, Baumaterialien und Laub, wurden signifikante Korrelationen zwischen der Ergosterinkonzentration und der Lebendkeimzahl nachgewiesen (Pasanen et al. 1999, de Sio et al. 2000, Volker et al. 2000).

1,3-β-D-Glucan:

1,3-β-D-Glucan (Abb. 1-2) ist ein Polymer der β-D-Glukose in der Zellwand einer großen Zahl von Organismen: Pilze, einige Bakterien, die meisten höheren Pflanzen und einige niedere Pflanzen (Giovannangelo et al. 2007). Die Polymere sind untereinander über 1,6-β-D-Glukose-Seitenketten und zusätzlich mit Proteinen, Lipiden und anderen Kohlenwasserstoffen wie z. B. Chitin verbunden (Klis 1994), so dass ein stabiles Gerüst entsteht, das der

Zelle Festigkeit verleiht. Glucane spielen eine Rolle bei gesundheitlichen Beeinträchtigungen (Kap. 1.1), die unabhängig von der Lebensfähigkeit der Pilzzellen sind, so dass ihre Erfassung besonders geeignet für Expositionsuntersuchungen ist. Der Nachweis von 1,3- β -D-Glucan kann mit dem *Limulus*-Amöbozyten-Lysat Test (LAL-Test) erfolgen, für den ein Lysat aus den Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus* eingesetzt wird. Die Krebse bilden Blutgerinnsel, um sich gegen Blutverlust und den Eintritt von Mikroorganismen zu schützen. Die Gerinnungsbildung wird durch Endotoxine von gram(-) Bakterien und durch 1,3- β -D-Glucan ausgelöst, was für den Nachweis beider Substanzen genutzt wird (Foto et al. 2004). 1,3- β -D-Glucan aktiviert den Gerinnungsfaktor G und Endotoxine den Faktor C, der für den Glucan-Nachweis aus dem Lysat entfernt wurde. Das Gerinnungsenzym ist in der Lage ein künstliches Chromogen-Peptid-Substrat zu spalten. Das farbige Produkt p-Nitroanilin kann photometrisch erfasst werden.

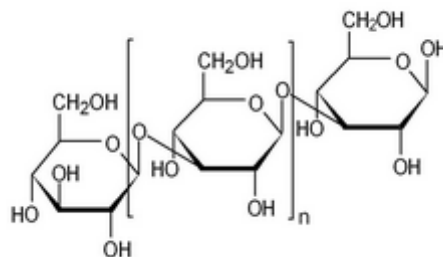


Abb. 1-2: Strukturformel von 1,3- β -D-Glucan

N-Acetyl- β -D-glucosaminidase:

Das Enzym N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) (EC 3.2.1.52) ist eine Glucosaminid-Hydrolase, die N-Acetyl- β -D-glucosaminid durch Spaltung der glykosidischen Bindung von Glykosiden und Polysacchariden (z. B. Chitin) abtrennt (Reyes et al. 1989). Das Enzym liegt im periplasmatischen Raum vor (Gooday et al. 1992), kann aber auch als Exoenzym an das Medium abgegeben werden (Jones und Kosman 1980). NAGase ist an sehr vielfältigen Prozessen beteiligt: Autolyse, Hyphenwachstum, Auflösung von Septen, Sporenfreisetzung, Nahrungserschließung, Mykoparasitismus usw. (Gooday et al. 1992, Brunner et al. 2003). NAGase konnte auch im Körper von Insekten, Ratten, Rindern, Menschen und anderen Tieren sowie in einigen Pflanzen und Bakterien nachgewiesen werden (BRENDA Enzym-Datenbank 2010). Zumindest Insekten, Pflanzen und Bakterien könnten im Staub neben den Pilzen eine Quelle für NAGase darstellen. In Bodenproben konnten

Miller et al. (1998) eine gute Korrelation zwischen der NAGase Aktivität und der Konzentration chemischer Indikatoren wie Ergosterin und pilzspezifischen Fettsäuren feststellen. Darauf basierend wurde ein Test für den Nachweis von Pilzen auf Oberflächen von Baumaterialien etabliert (MycoMeter-Test™), der hier in modifizierter Form eingesetzt wurde. Dabei wird die Enzymaktivität nach Zugabe des Substrats 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid durch das fluoreszierende Produkt 4-Methylumbelliferon (4-MU) messbar (Abb. 1-3).

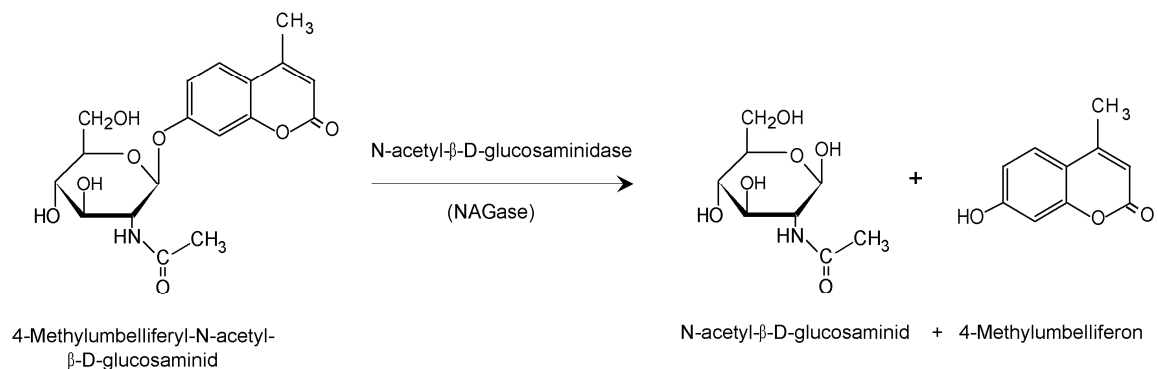


Abb. 1-3: Spaltung von 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid durch das Enzym N-Acetyl-β-D-glucosaminidase zum fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon

Mykotoxine:

Mykotoxine sind nicht scharf definiert, aber werden als sekundäre Metaboliten von filamentösen Pilzen beschrieben, die in geringer Konzentration eine toxische Wirkung auf Wirbeltiere haben (Bennett und Klich 2003). Die meisten dieser Verbindungen sind nicht flüchtig und haben ein Molekulargewicht von weniger als 1500 Da (Nielsen 2003). Diese Stoffgruppe ist in ihrer chemischen Struktur und toxischen Wirkung extrem heterogen. In Abhängigkeit der verwendeten Definition sind bisher ca. 300 bis 400 Mykotoxine als solche erfasst (Bennett und Klich 2003). Nur wenige Mykotoxine kommen nach dem heutigen Kenntnisstand als Innenraumkontaminanten infrage, da ihre Produzenten nicht im Zusammenhang mit Feuchteschäden in Gebäuden vorkommen. Aufgrund des häufigen Nachweises von *Aspergillus versicolor* im Innenraum (Nielsen 2003), wurde für diese Arbeit der Schwerpunkt auf das von diesem Pilz produzierte Sterigmatocystin gelegt. Auch die potentiellen Produzenten von Ochratoxin A, wie z. B. *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* und *Penicillium verrucosum*, sind auf kontaminiertem Baumaterial nachweisbar.

Mykotoxine werden mit verschiedenen chromatographischen Methoden und mit Enzymimmunoassays (ELISA) nachgewiesen. Die Vorteile des ELISA liegen in der schnellen und einfachen Durchführung mit hohem Probendurchsatz und geringem apparativem Aufwand (Krska und Molinelli 2007), was auch in kleinen Laboren für Innenraumanalytik realisierbar ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der immunologische Nachweis für die Anwendbarkeit im Hausstaub getestet und validiert.

Ochratoxin A:

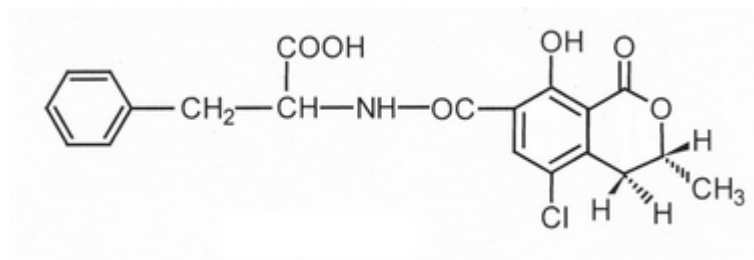


Abb. 1-4: Strukturformel von Ochratoxin A (OTA)

Ochratoxin A (OTA) war der erste Metabolit aus der Gruppe der Ochratoxine, die 1965 aus *Aspergillus ochraceus* isoliert und beschrieben wurden (van der Merwe et al. 1965). Bei den Ochratoxinen handelt es sich um zyklische Pentaketide. Ochratoxin A ist ein Derivat von Dihydroisokoumarin, das über eine α -Amidbindung mit der Aminosäure L-Phenylalanin verbunden ist (Abb. 1-4). Ochratoxin A hat ein Molekulargewicht von 403,81 g/mol und ist aufgrund der phenolischen Hydroxylgruppe im Dihydroisokoumarinring und der Carboxylgruppe des Phenylalanins schwach sauer. OTA wirkt akut schädigend auf die Niere, ist teratogen sowie immunsuppressiv und wurde von der Internationalen Agentur für Krebsforschung als mögliches Karzinogen klassifiziert (Pitt 2000). Da verschiedene Lebensmittel (Wein, Bier, Kaffee, Getreide usw.) mit OTA kontaminiert sein können (Bhat 2010), existieren bereits kommerzielle Testsysteme auf Basis des ELISA, deren Anwendbarkeit in der Matrix Hausstaub in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Zum Vergleich wurde der Nachweis von OTA mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie und anschließender UV-Detektion durchgeführt.

Sterigmatocystin:

Sterigmatocystin (ST) wurde in den 1950er Jahren scheinbar gleichzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen in Großbritannien und Japan isoliert und beschrieben (Birkinshaw und

Hammady 1957). Das Mykotoxin kann als Vorstufe von Aflatoxin B1 gebildet werden, wobei die Biosynthese von Aflatoxin B1 auch ohne ST erfolgen kann (Lou et al. 1994). Andere Pilze, wie z. B. *Aspergillus versicolor*, produzieren ST, aber keine Aflatoxine. ST ist charakterisiert durch einen Xanthon-Rest verbunden mit einem Dihydrodifuran- oder einem Tetrahydrofuran-Rest (Sweeney und Dobson 1998) (Abb. 1-5). ST weist keine starke Zytotoxizität auf, aber nach Aktivierung durch die Cytochrom P450 Monooxidase entfaltet es in der Leber seine karzinogene Wirkung (McConnell und Garner 1994). Außerdem wurde nachgewiesen, dass ST ein starker Inhibitor für die tracheale Ziliarbewegung ist (Piecková und Jesenká 1998), was in der Folge zu gehäuft auftretenden Infektionskrankheiten der Atemwege führen kann.

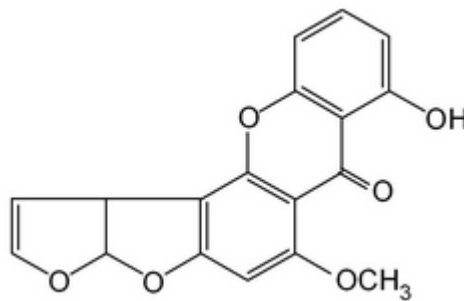


Abb. 1-5: Strukturformel von Sterigmatocystin (ST)

ST kommt nur selten in Lebensmitteln vor und wird nicht routinemäßig untersucht. So wurden für den Nachweis zwar zahlreiche chromatographische Methoden beschrieben (Stack und Rodricks 1971, Abramson und Thorsteinson 1989, Bloom et al. 2007), aber auf dem Markt sind keine Antikörper oder gar fertige ELISA-Testsysteme und Immunoaffinitätssäulen erhältlich. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Antikörper mit dem Ziel der Entwicklung eines ELISA für den Nachweis von ST im Hausstaub produziert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Sammlung und Beschreibung des Probenkollektivs

2.1.1 Herkunft der Proben und Probenahme von Hausstaub

Im Zeitraum von Februar 2007 bis März 2009 wurden an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg und am Institut für Energie und Umwelttechnik (IUTA e. V.) Duisburg insgesamt 354 Hausstaubproben aus 343 Haushalten gesammelt. Der Staub wurde von den Bewohnern der teilnehmenden Haushalte mit Hilfe handelsüblicher Staubsauger gewonnen. Die Probenahme ist in der VDI-Richtlinie 4300, Blatt 8 (VDI 2001) beschrieben. Der mindestens zur Hälfte gefüllte Staubsaugerbeutel wurde in einer Kunststofftüte verpackt eingeschickt. Bei beutellosen Staubsaugern wurden der grobe Staub aus dem Auffangbehälter und der feine Staub aus dem Filter direkt in eine Kunststofftüte umgefüllt. Es handelt sich per Definition um die aktive Probenahme von Altstaub (Butte et al. 2000).

Die Auswahl der Teilnehmer und Proben wurde nicht im Sinne einer repräsentativ epidemiologischen Studie sondern anlassbezogen vorgenommen. Die Einteilung der Proben in Fall- und Kontrollproben erfolgte mit Hilfe der Angabe im begleitenden Fragebogen (Kap. 2.1.3), ob im Zeitraum der Sammlung sichtbarer Pilzbefall im beprobten Bereich vorlag. In 150 Haushalten kam sichtbarer Pilzbefall vor und 193 Haushalte haben das Vorkommen von Pilzbefall verneint. Aufgrund mehrfacher Beprobungen von einem Fall- und zwei Kontrollhaushalten ergab sich ein Stichprobenumfang von 153 Fallproben und 201 Kontrollproben.

20,0 % der Haushalte befinden sich im Großraum Oldenburg (Oldenburg), 45,6 % im Ruhrgebiet (Einzugsgebiet Duisburg) und die übrigen 34,4 % der Proben sind über die Bundesrepublik Deutschland verteilt. Eine Probe stammt aus Belgien.

2.1.2 Vorbereitung der Hausstaubproben

Zur Homogenisierung der Proben und zur Abtrennung der groben Bestandteile wurde der gesamte Inhalt der Staubsaugerbeutel inklusive des Zwischenlagenstaubs durch einen Siebsatz bestehend aus einem 2 mm und einem 63 µm Prüfsieb (20 cm Durchmesser, Fa. RESCH, Deutschland) gegeben. Die Siebung erfolgte per Hand nach den Vorgaben der DIN 66 165 Teil 2 (1987) in einem Digestorium. Die ≤ 63 µm Fraktionen wurden in braunen

Weithalsglasflaschen bei Zimmertemperatur gelagert und der Anteil $> 63 \mu\text{m}$ verworfen. Sämtliche Analysen wurden in den $\leq 63 \mu\text{m}$ Fraktionen durchgeführt. Die Siebung erfolgte innerhalb von 3 Tagen nach Probeneingang und der Ansatz für die Bestimmung der Lebendkeimzahl innerhalb von 10 Tagen nach Erhalt der Proben, um die Keimfähigkeit der Sporen durch Lagerung möglichst wenig zu beeinträchtigen.

Für die Validierung einiger Methoden wurde Poolstaub eingesetzt. Dafür wurden je $3,0 \pm 0,4 \text{ g}$ von 171 Kontrollproben abgewogen, gemischt und 2 Stunden durch Rotation in einem 2000 ml Igelkolben homogenisiert.

2.1.3 Erstellung der Fragebögen zur Ermittlung von Hintergrundinformationen zu den Haushalten

Um Informationen über die örtlichen Gegebenheiten, die Eigenschaften, die Ausstattung und Belegung der Wohnungen/Gebäude, das Nutzerverhalten der Bewohner und das Vorkommen von Pilzbefall zu erhalten, wurde ein Fragebogen (s. Anhang) in Anlehnung an die Protokolle aus der VDI-Richtlinie 4300 Blatt 10 (VDI 2008) und den Schimmelpilzleitfaden (Moriske und Szewzyk 2002) sowie nach Angaben von Keller et al. (2004) erstellt.

Sofern persönlicher Kontakt zu den Teilnehmern der Studie bestand, wurde der Fragebogen von Christoph Portner (IUTA) oder mir gemeinsam mit den Teilnehmern ausgefüllt. Bei Haushalten, die nicht im Großraum Oldenburg oder Duisburg lagen, wurden die ausgefüllten Fragebögen zusammen mit den Staubproben von den Teilnehmern eingeschickt. Bei Unklarheiten der Angaben im Fragebogen wurden die Teilnehmer telefonisch befragt.

Ziel der Befragung war die Ermittlung von möglichen Einflüssen auf den Schimmelpilzgehalt im Hausstaub, die im Folgenden aufgezählt werden:

- die Jahreszeit, in der der Hausstaub gesammelt wurde
- die unmittelbare Umgebung eines Gebäudes: ländlich, städtisch oder eine gemischte Region
- die Charakteristika eines Gebäudes und die Lage der beprobten Wohnung im Gebäude: Alter des Gebäudes, Anzahl der Wohnungen pro Gebäude (Ein- bis Mehrfamilienhäuser), Lage der Wohnung im Gebäude (Geschossigkeit), Beschaffenheit dessen, was ober- und unterhalb der Wohnung liegt (Fundament, Keller, andere Wohnung), Umbaumaßnahmen, Baumängel

- die Belegung und Ausstattung der Wohnung: Personenzahl, Fußbodenbeläge, Wandverkleidungen
- das Nutzerverhalten: Reinigungsgewohnheiten, Müllsammelverhalten, Haustierhaltung, Anzahl der Blumentöpfe, Lüft- und Heizverhalten, Luftbefeuchtung
- die Historie von Pilzschäden: früheres Vorkommen von Pilzbefall, Beseitigungsmaßnahmen eines solchen Befalls, aktuell vorkommender Pilzbefall, Größe des Befalls, Lokalität des Befalls

Die Untersuchungsergebnisse vom Ergosterin- und Lebendkeimgehalt im Staub wurden entsprechend den Antworten aus den Fragebögen sortiert. Für den Vergleich von zwei Variablen wurde der Rangtest nach Mann und Whitney (U-Test) und von mehreren Variablen der nach Kruskal und Wallis (H-Test) durchgeführt (Sachs 2004).

2.1.4 Bestimmung des Glühverlustes

In den Staubproben wurde der Anteil organischer Bestandteile mit Hilfe des Glühverlustes nach DIN 38 409 Teil 1 (1987) bestimmt, um eine Korrelation zum Pilzgehalt zu überprüfen. Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden ca. 100 mg Staub ($\leq 63 \mu\text{m}$ Fraktion) in einen getrockneten (30 min bei $105 \pm 2^\circ\text{C}$) und gewogenen Tiegel gegeben und 1 h bei $105 \pm 2^\circ\text{C}$ in den Trockenschrank gestellt. Nach dem Erkalten im Exsikkator wurde der Tiegel mit Staub auf 1 mg gewogen und ein weiteres Mal 30 min getrocknet. Sofern sich noch keine Gewichtskonstanz einstellte, wurde der Vorgang wiederholt. Die Trockenmasse (m_T) ergibt sich aus der Differenz der Masse (m_b) des getrockneten Staubs mit Tiegel und der Masse (m_a) des leeren Tiegels:

$$m_T = m_b - m_a \quad [\text{mg}]$$

Für die Bestimmung des Glühverlustes wurden die Tiegel mit dem Staub zweimal 60 min auf 550°C im Glühofen erhitzt. Bereits nach dem zweiten Glühen konnte ein konstantes Gewicht erzielt werden. Die Differenz zwischen der Masse des Tiegels vor (m_a) und nach dem Glühen (m_c) ergibt die Glühmasse (m_G):

$$m_G = m_c - m_a \quad [\text{mg}]$$

Der Glührückstand (β_{GG}) ist der prozentuale Anteil der nicht verglühten Bestandteile des Staubs und entspricht dem anorganischen Gehalt des Staubs:

$$\beta_{GG} = \frac{m_G}{m_T} \cdot 100 \quad [\%]$$

Der Glühverlust (β_{GV}) beschreibt den prozentualen organischen Anteil des Staubs:

$$\beta_{GV} = 100 - \beta_{GG} \quad [\%]$$

2.1.5 Nachweis von Pentachlorphenol im Hausstaub

Pentachlorphenol (PCP) ist fungizid wirksam und kommt trotz des Verbotes in einigen Haushalten noch in erhöhten Konzentrationen im Hausstaub vor. Ein Einfluss von PCP im Hausstaub auf den Gehalt der Lebendkeime ist nicht auszuschließen. In 130 Kontroll- und 158 Fallproben wurde die Konzentration von PCP bestimmt. Je ca. 50 mg der Proben wurde an die Firma EUKOS Umweltanalytik Nord GmbH in Plön geschickt. Die Analyse von PCP erfolgte nach pyrolytischer Ethylierung und gaschromatographischer Trennung mit einem Elektroneneinfang-Detektor (Walker et al. 1999).

2.2 Quantifizierung von Schimmelpilzen im Hausstaub

2.2.1 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Die Lebendkeimzahlbestimmung wurde durchgeführt, um eine Vergleichsgröße für die Konzentrationen der chemischen Indikatoren zu erhalten und das Vorkommen von Mykotoxinen und toxischen Pilzen zu vergleichen.

Nährböden und Lösungen:

- Malzextraktagar (ME), pH $5,6 \pm 0,2$:

Trockennährboden (MERCK AG, Deutschland), Herstellung nach Packungsangabe

Malzextrakt	30,0 g/l
Pepton aus Sojamehl	3,0 g/l
Agar	15,0 g/l

- Dichloran-Glycerin-Agar, 18 % (DG18), pH $5,6 \pm 0,2$:

Trockennährboden (OXOID Ltd., Großbritannien), Herstellung nach Packungsangabe

Pepton	5,0 g/l
Glucose	10,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
Dichloran	0,002 g/l
Agar	15,0 g/l

Zusatz von

Chloramphenicol	0,1 g/l
Glycerin	220 g/l

Die Nährböden wurden 10 min bei 121 °C autoklaviert.

- Extraktionslösung:

NaCl	9,0 g/l
Tween 80	0,1 g/l

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl an Schimmelpilzen im Hausstaub erfolgte mit Hilfe des Verdünnungsverfahrens (Baudisch et al. 2001, Trautmann et al. 2005). 50 mg Staub wurden in einem sterilen Reagenzglas mit 5 ml Extraktionslösung suspendiert und 30 min geschüttelt (Rundschüttler, 500 U/min). Aus der Suspension wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt (10^0 , 10^1 , 10^2 und 10^3) und je 100 µl jeder Verdünnung auf je zwei Malzextraktagar- und einem DG18-Nährboden mit Hilfe eines sterilen Glasspatels ausplattiert. Die

Inkubation je eines Nährbodens erfolgte bei 20 ± 2 °C und die der zusätzlichen Malzextraktagar-Platte bei 37 ± 1 °C. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden zwischen dem 2. und 14. Tag gezählt und die Spezies morphologisch bestimmt. Die Angabe erfolgte in KBE pro Kilogramm Hausstaub.

2.2.2 Nachweis der Gesamtsporenzahl

Die Gesamtsporenzahl wurde ebenfalls als Vergleichsgröße für die chemischen Indikatoren bestimmt. Der Nachweis erfolgte in einem Unterkollektiv ($n = 29$), dessen Proben nach aufsteigender Lebendkeimzahl (ermittelt auf DG18) ausgewählt wurden.

50 mg gesiebter Staub wurden in 1 ml 0,9 % NaCl / 0,01 % Tween 80 Lösung suspendiert und nach Bedarf 1:2 oder 1:5 verdünnt. Ein Tropfen dieser Verdünnung wurde in eine Bürker-Türk-Zählkammer (0,1 mm Höhe, 0,0025 mm² pro Kleinquadrat) gegeben. Es wurden 6 Quadrate mit je 16 Kleinquadraten bei 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop ausgezählt. Das Ergebnis wurde über das Volumen auf die Anzahl der Sporen pro Kilogramm Hausstaub hochgerechnet.

2.3 Chemische Indikatoren für Schimmelpilze im Hausstaub

2.3.1 Quantifizierung von Ergosterin

Für den Ergosterinnachweis im Hausstaub wurde ein Verfahren modifiziert (Binnberg 2005), das ursprünglich für den Nachweis von Ergosterin in verrottendem Laub eingesetzt wurde (Volker et al. 2000). Der Nachweis erfolgte im gesamten Kollektiv ($n = 354$).

500 mg der $\leq 63 \mu\text{m}$ Fraktion wurden mit 5,4 ml 10 % KOH in Methanol (w/v) suspendiert und mit 0,6 ml 7-Dehydrocholesterin (50 mg/l in Methanol) als interner Standard dotiert. Die Hydrolyse von Ergosterin erfolgte 2 Stunden bei 80 °C im Wasserbad auf einem Magnetrührer. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension zentrifugiert (5 min, 3.000 U/min) und 4 ml des Überstandes durch eine mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette filtriert. Es wurde mit 2 ml destilliertem Wasser gespült, die zu dem Filtrat gegeben wurden. Anschließend wurde zweimal mit je 2 ml n-Hexan extrahiert. Die vereinten Hexan-Extrakte wurden auf einem Heizblock (ca. 30 °C) unter Luftzufuhr bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen und durch einen 0,45 μm Glasfaserfilter gegeben. Das Filtrat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei + 4 °C bis zur Messung aufbewahrt (maximal 2 Tage). 20 μl des Extraktes wurden mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) aufgetrennt.

Als mobile Phase wurde Methanol/Acetonitril im Verhältnis 75:25 verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einer C18-Säule (4 x 150 mm, Partikelgröße 5 μm , PHARMACIA ODS2) und die UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 282 nm. Die Retentionszeit von Ergosterin betrug bei einer Flussrate von 1 ml/min ca. 16 min und die von 7-Dehydrocholesterin ca. 18 min (Abb. 2-1). Zur Kalibration wurden Ergosterin-Lösungen in Methanol im Konzentrationsbereich von 1 bis 20 mg/l eingesetzt (Abb. 2-2), die jeweils den internen Standard 7-Dehydrocholesterin in einer Konzentration von 20 mg/l enthielten.

Eine Probe wurde für die Bestimmung der Wiederholpräzision am gleichen Tag 16-mal und für die Bestimmung der Vergleichspräzision an 16 unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet und gemessen. Für die Wiederfindungsrate wurde Poolstaub 8-mal aufgearbeitet und mit jeweils 20 mg/kg Ergosterin dotiert. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde anhand von vier Kalibriergeraden in jeweils dreifacher Bestimmung berechnet (DIN 32 654, 1994).

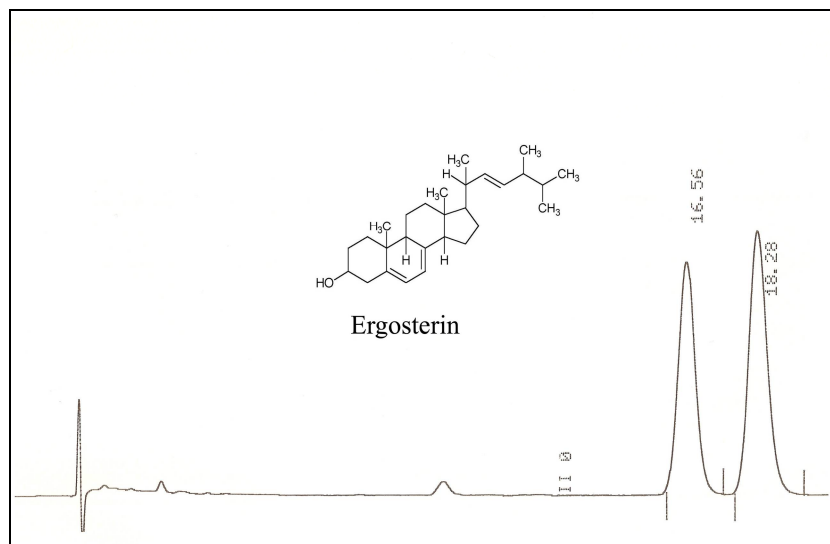


Abb. 2-1: Chromatogramm des Standards mit 15 mg/l Ergosterin und 20 mg/l 7-Dehydrocholesterin
Ergosterin hatte eine Retentionszeit von ca. 16 min und 7-Dehydrocholesterin von ca. 18 min.

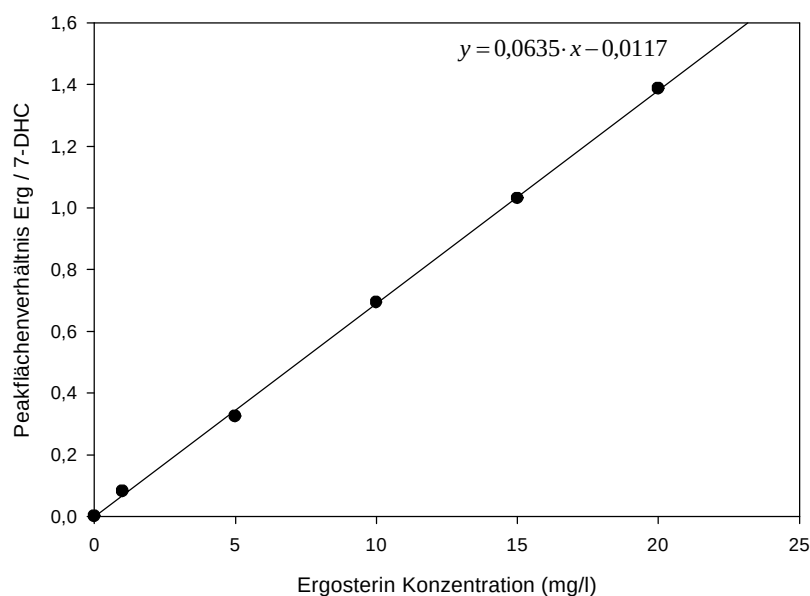


Abb. 2-2: Kalibriergerade für den Nachweis von Ergosterin

Auf der Y-Achse wurde das Verhältnis der Peakflächen von Ergosterin (Erg) zum internen Standard 7-Dehydrocholesterin (7-DHC) aufgetragen.

2.3.2 Nachweis von 1,3-β-D-Glucan

In einem Unterkollektiv von 29 Proben (s. auch Kap. 2.2.2) wurde die Konzentration von 1,3-β-D-Glucan mit Hilfe des *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-(LAL)-Tests (GLUCATELL-Test, PYROQUANT) bestimmt (Fogelmark und Rylander 1997).

Sämtliche eingesetzten Gefäße, Pipettenspitzen, Lösungen usw. mussten glucanfrei sein. Glasgefäße wurden hierzu mit Alufolie abgedeckt und 7 h bei 235 °C erhitzt. Glucanfreies Wasser, Natronlauge und Salzsäure sowie pyrogenfreie Pipettenspitzen wurden von der Fa. PYROQUANT bezogen. Für den Nachweis wurden 50 mg gesiebter Staub mit 2,5 ml 1 N Natronlauge 3 h geschüttelt (Rundschüttler, 250 U/min). Der mit 5 N Salzsäure neutralisierte Extrakt wurde mit dem im Test enthaltenen Reagenzwasser 1:20.000 verdünnt und diese Verdünnung nach Herstellerangaben im Test eingesetzt (Testprinzip Kap. 1.2). Die Farbintensität des bei der Reaktion freigesetzten p-Nitroanilins wurde bei 540 nm photometriert. Die Kalibration erfolgte mit den im Test enthaltenen Standards (Abb. 2-3).

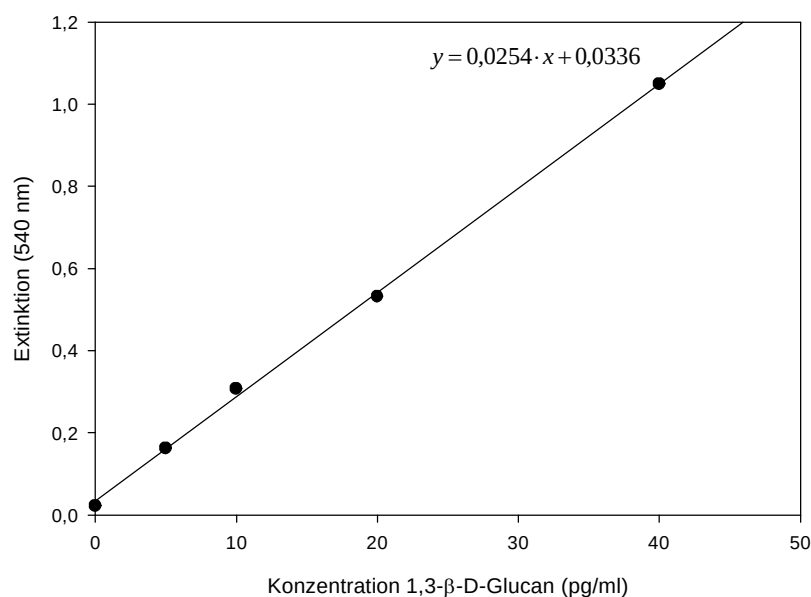


Abb. 2-3: Kalibriergerade für den Nachweis von 1,3-β-D-Glucan

Es wurde die Extinktion bei 540 nm im Verhältnis zur Konzentration des 1,3-β-D-Glucan-Standards aufgetragen.

2.3.3 Aktivitätsbestimmung von N-Acetyl-β-D-glucosaminidase

Für die Bestimmung der Aktivität der N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase) (Miller et al. 1998) wurde der MycoMeter-Test™ der Fa. MycoMeter ApS (Kopenhagen, Dänemark) adaptiert. 50 mg gesiebter Staub (n = 29) wurden in 1 ml der mitgelieferten Extraktionslösung suspendiert und 20 min (Rundschüttler, 250 U/min) gemischt. Der Extrakt wurde zentrifugiert und der Überstand nach den Angaben der Testanleitung zur Bestimmung der Aktivität eingesetzt. Die Detektion des fluoreszierenden Produkts 4-Methylumbelliferon (4-MU) erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 377 nm und einer Emissionswellen-

länge von 446 nm. Der MycoMeter-Test™ sieht vor, dass die Ergebnisse als Mykometer-Wert angegeben werden. Aus der Kalibriergeraden (Abb. 2-4) mit 4-MU konnte ausgelesen werden, dass 1 µmol/l 4-MU 350 Fluoreszenzeinheiten (U) entspricht. Unter Berücksichtigung der Einwaage an Staub, der eingesetzten Volumina der verschiedenen Lösungen, der Inkubationszeit für die Umsetzung sowie der ausgelesenen Fluoreszenzeinheiten pro µmol 4-MU ergab sich ein Umrechnungsfaktor von 0,8381, mit dem der Mykometer-Wert multipliziert wurde, um die entstehende Menge (µmol) von 4-MU pro min Reaktion und kg Hausstaub angeben zu können.

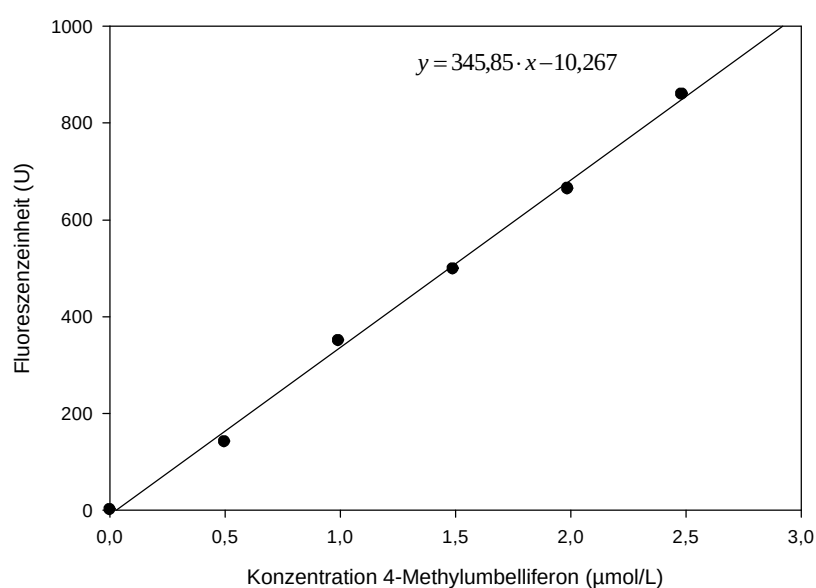


Abb. 2-4: Kalibriergerade für die Aktivitätsbestimmung der N-Acetyl-β-D-glucosaminidase

Es wurde die Fluoreszenz (Anregung: 377 nm; Emission: 446 nm) im Verhältnis zur Konzentration des 4-Methylumbelliferon-Standards aufgetragen.

2.4 Ochratoxin A im Hausstaub

2.4.1 Nachweis von Ochratoxin A mittels Enzymimmunoassay

Der immunologische Nachweis von Ochratoxin A (OTA) wurde mit Hilfe eines für die Lebensmitteluntersuchung entwickelten Testkits (RIDASCREEN® Ochratoxin A, R-BIOPHARM AG, Deutschland) durchgeführt. Die Extraktion erfolgte nach den Herstellervorgaben für die Aufarbeitung von Getreide.

Zu 50 mg Hausstaub wurde 1 ml NaHCO_3 -Puffer (0,13 M, pH 8,1) gegeben, gevortext und 20 min extrahiert (Rundschüttler, 250 U/min). Die Suspension wurde 10 min bei 4.000 U/min zentrifugiert und 50 μl des Überstandes für den Test eingesetzt. Die Proben wurden einfach aufgearbeitet und für eine doppelte Bestimmung randomisiert auf die Antikörper-beschichtete Multititerplatte aufgetragen. Der Test basierte auf dem Prinzip des kompetitiven Enzym-gekoppelten Immunoassays (enzyme linked immuno sorbent assay = ELISA). Für die Quantifizierung wurde das Chromogen TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) eingesetzt, das durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid (katalysiert durch Meerrettichperoxidase) zu einer Blaufärbung führte. Die Reaktion wurde mit 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion des daraus resultierenden gelben Farbstoffs bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch erfasst. Die Kalibration erfolgte mit den mitgelieferten OTA Standardlösungen (Abb. 2-5).

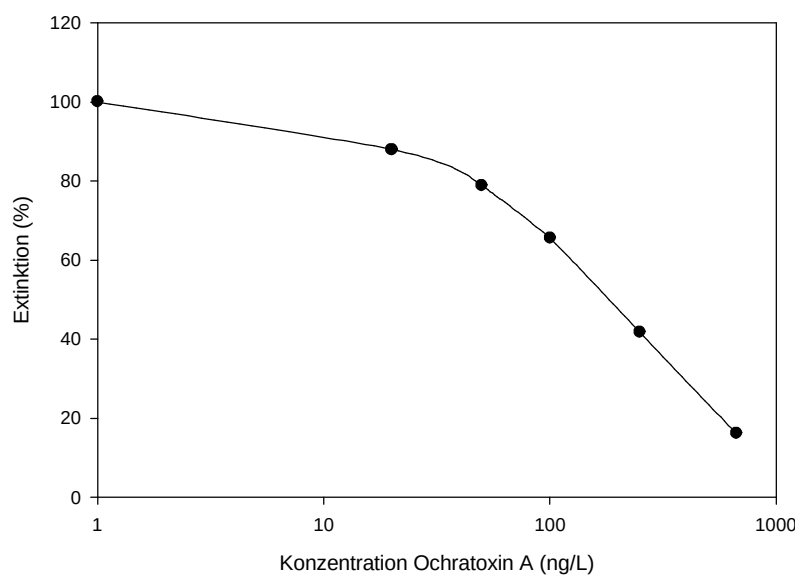


Abb. 2-5: Kalibrierkurve für den Nachweis von Ochratoxin A mittels ELISA

Es wurde die Extinktion (%) bei 450 nm im Verhältnis zur Konzentration der Ochratoxin A-Standards aufgetragen.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden 20 Proben nach dem Lotterieverfahren (Sachs 2004) gezogen und pro Probe 4 Partitionen je 50 mg eingewogen. Je zwei Partitionen wurden mit einem OTA Standard zu einer Endkonzentration von 2,4 µg/kg Staub dotiert. Jede Partition wurde randomisiert und doppelt auf die Multititerplatte aufgetragen. Ferner wurde eine Varianzanalyse für die doppelte Aufarbeitung sowie doppelte Bestimmung durchgeführt.

2.4.2 Nachweis von Ochratoxin A mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Für den HPLC-Nachweis von Ochratoxin A (modifiziert nach Richard et al. 1999) wurde ein Unterkollektiv von 93 Proben zusammengestellt, die mindestens eins der folgenden Kriterien erfüllen mussten:

1. Proben, in denen OTA mit Hilfe der Flüssigchromatographie und anschließender Tandemmassenspektrometrie am IUTA in Duisburg nachgewiesen wurde
2. Proben, in denen mit Hilfe des ELISA mehr als 10 µg/kg OTA bestimmt wurde (Kap. 2.4.1)
3. Proben, in denen *Aspergillus ochraceus* vorkam
4. Proben mit erhöhten Konzentrationen an *Aspergillus niger* ($> 2 \cdot 10^7$ KBE/kg) und *Eurotium herbariorum* ($> 8 \cdot 10^8$ KBE/kg)

Lösungen und Puffer:

- 80 Teile HPLC-geeignetes Methanol + 20 Teile 1 % Na₂CO₃ in bidestilliertem Wasser
- PBS-Puffer (phosphate buffered saline), Stammlösung 10-fach, pH 7,4:

Na ₂ HPO ₄	1,33 g/l
NaH ₂ PO ₄	0,305 g/l
NaCl	8,474 g/l
Tween 20	100 µl/l

Zu 1 g der ≤ 63 µm Fraktion wurden 10 ml der Methanol/Na₂CO₃-Lösung sowie 5 ml n-Hexan gegeben. Die Reagenzgläser wurden verschraubt, die Suspension gevortext und 30 min auf einem Überkopfschüttler gut durchmischt. Nach anschließender Zentrifugation (10 min bei 4.000 U/min) wurden 8 ml der methanolischen Phase mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Der Extrakt wurde mit 32 ml

PBS-Puffer verdünnt und durch einen 0,2 µm Glasfaser-Spritzenfilter gegeben. Pro Probe wurde eine Immunoaffinitätssäule für OTA (OtaCLEAN von LC-TECH GmbH, Deutschland) auf eine Vac-Elut-Einheit gesteckt und der enthaltene Puffer abgelassen. Der Probenextrakt wurde auf die Säule gegeben und bei einem Unterdruck von -0,15 bis -0,2 bar langsam durchgezogen. Nach dem Spülen mit 10 ml bidestilliertem Wasser wurde die Säule mit 2 ml Methanol eluiert, wobei das Methanol bis zu 5 min einwirken konnte. Das Eluat wurde im Blockverdampfer (ca. 30 °C) unter Luftzufuhr bis zur Trockne eingengt. Im trockenen Zustand konnte der Extrakt bei + 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert werden. Der Rückstand wurde in 150 µl der mobilen Phase aufgenommen, gevortext und 5 min im Ultraschallbad gelöst. Der Extrakt wurde durch einen 0,2 µm Spritzenfilter gegeben und 20 µl in die HPLC injiziert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Als mobile Phase wurde Methanol/Wasser/Essigsäure (65:34:1) verwendet. Die Auftrennung des Extraktes erfolgte in einer C18-Säule (4 mm x 250 mm, Partikelgröße 5 µm, MACHEREY-NAGEL Nucleosil 100-5). OTA wurde mit 333 nm angeregt und die Emission bei 460 nm gemessen. Die Retentionszeit betrug bei einer Flussrate von 0,7 ml/min 11 min (Abb. 2-6). Die Kalibration wurde mit Standardlösungen im Bereich von 5 bis 25 µg/L OTA in Methanol durchgeführt (Abb. 2-7).

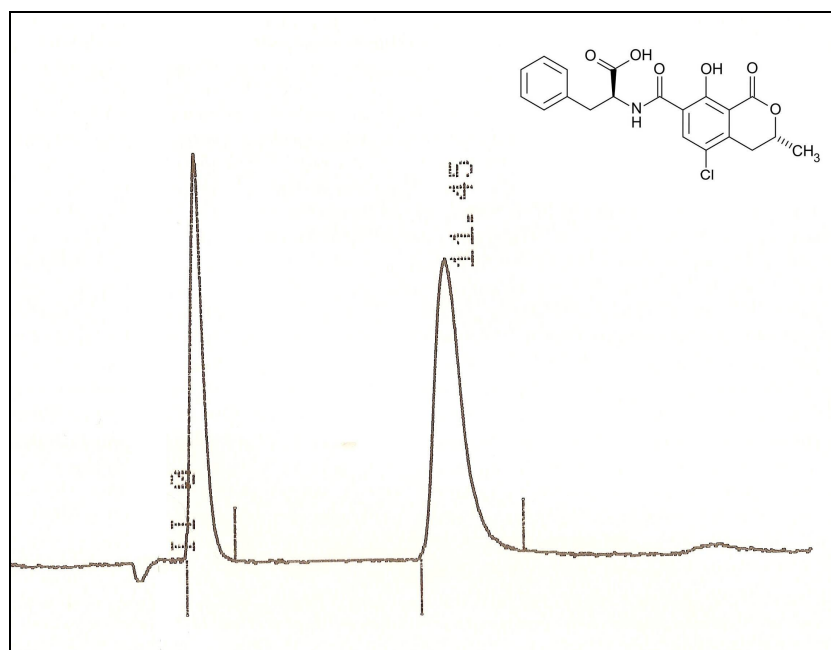


Abb. 2-6: Chromatogramm des Standards mit 25 µg/L Ochratoxin A

Die Retentionszeit von OTA betrug ca. 11 min.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden 8 Aliquots Poolstaub mit je 1 µg/kg OTA dotiert und doppelt bestimmt. Die Wiederholpräzision wurde aus den Ergebnissen der doppelten Bestimmung berechnet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde anhand von vier Kalibriergeraden in jeweils dreifacher Bestimmung berechnet (DIN 32 654, 1994).

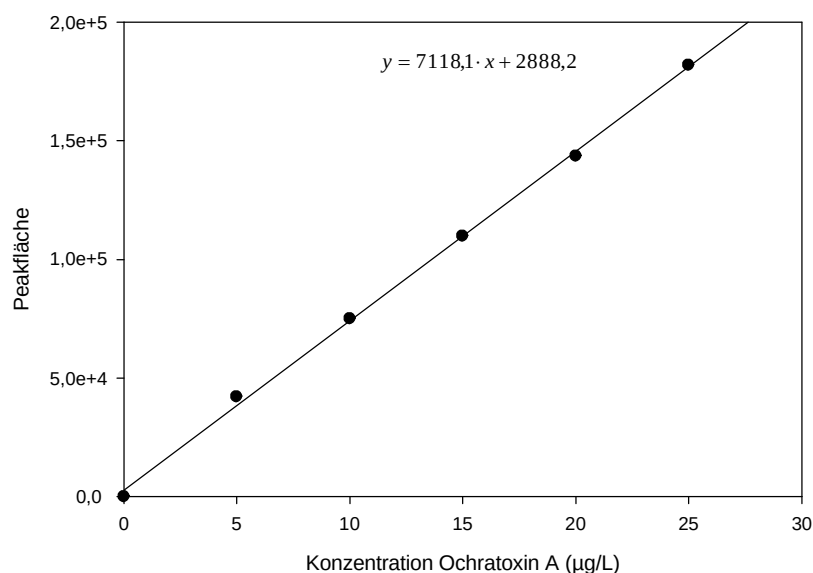


Abb. 2-7: Kalibriergerade für den Nachweis von Ochratoxin A mittels HPLC-UV

Es wurde die Peakfläche gegen die Konzentration von OTA (µg/L) aufgetragen.

2.5 Entwicklung eines ELISA für den Nachweis von Sterigmatocystin im Hausstaub

2.5.1 Produktion von Sterigmatocystin

Die Produktion von Sterigmatocystin (ST) wurde vorgenommen, da für die geplante Antikörperherstellung und die Methodenvvalidierung ca. 1 g der Substanz benötigt wurde. Aufgrund des hohen Preises von ST erschien es den Aufwand der Herstellung wert.

Nährmedien:

- Kartoffel-Glucose-Agar (KG), pH $5,6 \pm 0,2$:

Trockennährboden (MERCK AG, Deutschland), Herstellung nach Packungsangabe

Kartoffelinfus aus 200 g Kartoffeln	4,0 g/L
Glucose	20,0 g/L
Agar	15,0 g/L

- Hafermehlager (HM), pH $6,0 \pm 0,2$:

Trockennährboden (DIFCO, USA), Herstellung nach Packungsangabe

Hafermehl	60,0 g/L
Agar	12,5 g/L

- Maismehlager (MM), pH $6,0 \pm 0,2$ (nach Samson et al. 2004):

Maismehl (THEODOR KATTUS GmbH, Deutschland)	60,0 g/L
Agar	15,0 g/L

- Reisextraktager (RE), pH $5,8 \pm 0,2$:

Trockennährboden (MERCK AG, Deutschland), Herstellung nach Packungsangabe

Reisextraktkonzentrat	0,7 g/L
Agar	14,3 g/L

Die Nährmedien wurden 10 min bei 121 °C autoklaviert und in Petrischalen oder als Schrägagarröhrchen gegossen.

- Kartoffelpüree-Glucose:

Kartoffelpüreepulver „Das Lockere“ (PFANNI, UNILEVER, Deutschland)	70,0 g/l
Glucose	20,0 g/l

Die Glucose wurde in heißem Leitungswasser aufgelöst und das Püreepulver darin angerührt. Das Püree wurde in Bechergläsern 10 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend in hitzesterilisierten und mit Alufolie abgedeckten Kristallisierschalen bzw. Backblechen ca. 1 cm dick ausgestrichen.

- Maiskörner-Pepton (in Abwandlung nach Steyn und Rabie 1975):

Popcorn Mais (SEEGER KG, Deutschland)	45 g/Kolben
Pepton aus Soja	2 g/Kolben
Leitungswasser	65 ml/Kolben

Die Maiskörner wurden in 300-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen und Pepton sowie Leitungswasser zugegeben. Die Kolben wurden mit Wattestopfen verschlossen und autoklaviert (121 °C), wobei die Zeit auf 60 min ausgedehnt wurde, damit die Maiskörner aufweichen.

Vorversuche zur Auswahl des Stammes und der Anzuchtbedingungen:

Neun Stämme von *Aspergillus versicolor*, einem der Hauptproduzenten von ST, wurden aus Ansätzen verschiedener Innenraumproben (Materialien, Hausstaub und Luft) isoliert und morphologisch bestimmt (Klich 2002). Die Stämme wurden flächig auf den Nährböden ME, KG, HM, MM und RE ausgestrichen und 14 Tage bei 29 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden von jedem Stamm Myzelstücke mit einem Korkbohrer ausgestanzt und auf eine Dünnschichtfolie übertragen (Agar-Plug-Methode nach Filtenborg et al. 1983, Kap. 2.5.7), um die Produktion von ST zu überprüfen.

Entsprechend der Ergebnisse (Kap. 3.4.1) wurden der produktivste Stamm und zwei der ertragreichsten Nährböden (KG und MM) ausgewählt. Da Maiskörner im Gegensatz zu einem Nährboden aus Maismehl eine größere Oberfläche bieten, wurde die Produktivität auf Maiskörnern mit Pepton-Zusatz getestet (Steyn und Rabie 1975). Parallel dazu wurde Kartoffelpüree-Pulver mit Glucose-Zusatz als kostengünstige Alternative zum kommerziellen KG-Nährboden angesetzt, das sich als sehr ertragreich und praktikabel herausstellte.

Produktion von Sterigmatocystin:

Aspergillus versicolor wurde auf KG-Schrägaragarröhrchen aufbewahrt und für das Inokulum flächig auf KG-Petrischalen angezüchtet (7 Tage bei 25 °C). Das Myzel wurde mit einer sterilen 0,9 % NaCl / 0,01 % Tween 80 Lösung (Kap. 2.2.1) überschwemmt und die Sporen mit einem Glasspatel abgelöst. Das Inokulum wurde auf die Oberfläche des Kartoffelpüree-Glucose Mediums gegeben und mit dem Glasspatel verteilt. Die Inkubation erfolgte 14 Tage bei 25 °C im Dunkeln. Nach 7 und 14 Tagen wurden jeweils kleine Myzelstücke entnommen und mit Hilfe der Agar-Plug-Methode (Kap. 2.5.5) die Bildung von ST überprüft. Nach 14 Tagen wurde das Myzel vom Substrat abgenommen, auf Alufolie

gelegt und im Trockenschrank bei 40 °C getrocknet. Das Trockengewicht wurde bestimmt und das Myzel anschließend mit einem Küchenmixer fein gemahlen.

Die Extraktion von je 20 g pulverisiertem Myzel erfolgte über ca. 22 Stunden in der Soxhletapparatur mit 750 ml Chloroform. Der im Rotationsverdampfer eingedampfte Extrakt wurde mit etwas Kieselgel verrührt, bis er rieselfähig war, und mit Hilfe der Säulenchromatographie aufgereinigt (modifiziert nach Lou et al. 1994). Hierzu wurde eine Säule (4 x 40 cm) mit 100 g deaktiviertem Kieselgel 60 (10 % A. dest.) unter Dichlormethan gepackt und der Extrakt aufgetragen. Die Säule wurde mit Dichlormethan eluiert und das Eluat in 10 ml Fraktionen aufgefangen. Der ST Gehalt der Fraktionen wurde in der Dünnschichtchromatographie qualitativ überprüft (Kap. 2.5.7). Die ST enthaltenden Fraktionen wurden vereint, eingedampft und mit n-Hexan/Chloroform und Aceton umkristallisiert. Die Identität der Substanz und der Grad der Reinheit wurden mit einem ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum (Kernspinresonanzspektroskopie) bestätigt (Zentrale Analytik der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg).

2.5.2 Herstellung des Hapten-Protein-Konjugats für die Immunisierung

Sterigmatocystin ist mit 324,29 g/mol ein Hapten (Pitt 2000), so dass eine Immunisierung erst nach der Kopplung an ein Protein erfolgen kann. ST wurde für die Immunisierung an das Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin = KLH) der Großen Kalifornischen Schlüssellocknapfschnecke (*Megathura crenulata*) gebunden. Für die Titerbestimmung (Kap. 2.5.3) und den kompetitiven ELISA (Kap. 2.5.4) erfolgte eine Kopplung von ST an Rinderserumalbumin (BSA = bovine serum albumin) und Meerrettichperoxidase (PO). Alle Kopplungen wurden nach der Anleitung von Li und Chu (1984) durchgeführt (Hemiacetalmethode). Das Immunogen wurde über zwei Tage gegen PBS-Puffer dialysiert. Der Puffer wurde 3-mal gewechselt.

Für eine geplante, weitere Immunisierung wurde ST über einen Spacer an das Protein gekoppelt. Es wurden zwei Synthesewege für die Herstellung von Sterigmatocystin-hemisuccinat versucht:

Synthese mit Bernsteinsäurehemitrichlorethylester:

1. Stufe (Abb. 3-29, Kap. 3.4.2):

Zur Herstellung des 2,2,2-Trichlorethylhemisuccinats (2,2,2-Trichlorethylbernsteinsäurehalbester) wurden 15 g (0,1 mol) Trichlorethanol, 12 g (0,12 mol) Bernsteinsäureanhydrid

und 8,7 ml (0,12 mol) Triethylamin in 100 ml Ethylacetat eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 300 ml 5 % NaHCO₃-Lösung und 200 ml Diethylether aufgenommen. Die wässrige Phase wurde noch 2-mal mit je 150 ml Diethylether gewaschen und dann mit Schwefelsäure angesäuert. Die ausgefallenen Kristalle wurden im Vakuum getrocknet und aus Chloroform/n-Hexan umkristallisiert. Zur Bestätigung wurde von den Kristallen ein ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum angefertigt.

2. Stufe (Abb. 3-29, Kap. 3.4.2):

Zur Herstellung des gemischten Esters 2,2,2-Trichlorethylsterigmatocystylsuccinat wurden 670 mg (2,07 mmol) ST (MG 324), 940 mg (3,76 mmol) 2,2,2-Trichlorethylhemisuccinat (MG 249,5) und 10 mg 4-Dimethylaminopyridin in 60 ml Benzol mit 440 mg (2,14 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (MG 206,3) über 2 Tage gerührt. Das Gemisch wurde in 100 ml Wasser gegossen und die wässrige Phase noch 3-mal mit Benzol extrahiert. Die vereinten Benzol-Extrakte wurden eingeeengt und der Rückstand aus Benzol/Methanol umkristallisiert. Dieser Schritt hat auch nach Wiederholung mit 5 Tage rühren nicht das gewünschte Produkt ergeben.

3. Stufe (Abb. 3-29, Kap. 3.4.2):

Ziel dieser Stufe war die Bildung des Sterigmatocystinhemisuccinats durch reduktive Hydrolyse unter Abspaltung des 2,2,2-Trichlorethylester. Da die Synthese des gemischten Esters (Stufe 2) zu keinem Erfolg geführt hat, wurde ein zweiter Syntheseweg versucht.

Synthese mit Bernsteinsäurechloridtrichlorethylester (Abb. 3-30, Kap. 3.4.2):

217,4 mg ST (0,64 mmol) und 7 ml Pyridin wurden unter Rühren in Stickstoffatmosphäre auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 267,7 mg Bernsteinsäurechloridtrichlorethylhalbester (1,0 mmol) und einem Körnchen 4-Dimethylaminopyridin versetzt. Nach 30 min wurde auf 60 °C erhitzt und der Ansatz acht Stunden gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch überprüft (Kieselgel 60, mobile Phase: Petrolether – Ethylacetat = 1:1). Das eingesetzte ST konnte auch nach einer weiteren Verlängerung der Reaktionszeit sowie einem weiteren Zusatz von Bernsteinsäurechloridtrichlorethylhalbester (80 mg) nicht quantitativ umgesetzt werden.

Nach einer Reaktionszeit von 8 Stunden wurde ein Aliquot von 2 ml entnommen und das Pyridin abgezogen. Die Probe wurde dünnschichtchromatographisch untersucht und die

unter der UV-Lampe sichtbaren Flecken wurden von den Dünnschichtplatten mittels einer von Luftmann (2004) entwickelten Apparatur extrahiert und online in das Elektrospray-Ionisation Massenspektrometer (ESI-MS) transferiert.

Im nächsten Schritt wurde der gemischte Ester durch reduktive Hydrolyse zu Sterigmato-cystylhemisuccinat umgesetzt. 430 mg Kopplungsprodukt (Rohprodukt) wurden mit 10 ml Tetrahydrofuran, 4 ml Essigsäure (100 %) und 0,7 ml A. dest. versetzt und auf 0 °C gekühlt. Dann wurden in Abständen von 30 min jeweils 35 mg Zinkpulver (insgesamt 175 mg) zugefügt und nach der letzten Zugabe bei Raumtemperatur stark gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Synthesansatz wurde mit Hilfe der Säulenchromatographie (10 % desaktiviertes Kieselgel 60, mobile Phase: Chloroform) in Fraktionen aufgeteilt. Diese wurden mittels Dünnschichtchromatographie (nach Methode in Kap. 2.5.7) und ESI-Massenspektrometrie untersucht.

2.5.3 Antikörperherstellung

Die Immunisierung zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurde bei der DIANOVA GmbH in Hamburg in zwei Kaninchen (New Zealand White Rabbits) durchgeführt. Pro Injektion und Tier wurden 2 mg ST-KLH in 250 µl PBS-Puffer an die DIANOVA GmbH geschickt. Nach Entnahme des Präimmunserums erfolgte die Grundimmunisierung. Anschließend wurden insgesamt 4 Restimulierungen in 4-wöchigen Abständen durchgeführt. Je zwei Wochen nach einer Antigen-Injektion wurde den Tieren Blut zur Titerkontrolle entnommen. Nach der letzten Blutentnahme erfolgte das Endbluten der Kaninchen zur Gewinnung des gesamten Serums.

Die Titerbestimmung wurde ebenfalls von der DIANOVA GmbH mit Hilfe eines ELISA durchgeführt. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden mit ST-BSA (5 µg/ml in PBS-Puffer) bzw. BSA (1 %) als Kontrolle belegt. Nach dem Waschen der Kavitäten wurde das jeweilige Serum in Verdünnungen bis zu 10^6 aufgetragen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation (45 min, 37 °C) mit einem Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (1:5.000) und anschließendem Waschen der Kavitäten. Im letzten Schritt wurde das Substrat p-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) zugegeben und nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur das gelb gefärbte Produkt p-Nitrophenol bei 405 nm photometrisch erfasst.

2.5.4 Kompetitiver ELISA zum Nachweis von Sterigmatocystin

Das nach der Immunisierung gewonnene Antiserum wurde in einen kompetitiven ELISA eingesetzt, um die Spezifität gegen ungekoppeltes ST zu überprüfen.

Puffer und Lösungen:

- Sterigmatocystin Standard: 50 µg/L
100 µl einer 50 mg/L Standardlösung in Methanol wurden zu 100 ml PBS-Puffer gegeben
- Citratpuffer, pH 5,0:

Zitronensäure	7,29 g/L
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	14,24 g/L
- TMB-Substrat (3,3',5,5'-Trimethylbenzidin):
10 ml Citratpuffer wurden mit 5 µl H₂O₂ (30 %) versetzt und 1 TMB-Tablette (1 mg) darin aufgelöst

Die Kavitäten einer Multititerplatte wurden mit je 150 µl der 1:10.000 mit PBS-Puffer verdünnten Antiseren belegt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend ausgeschüttet. Pro Tier wurden 3 Reihen in 6 Spalten verwendet. Zum Absättigen der Oberflächen wurden 150 µl 2 % BSA in PBS-Puffer eingefüllt, 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und mit je 200 µl PBS-Waschpuffer (+ 0,05 % (v/v) Tween 20) 4-mal gewaschen. In alle verwendeten Kavitäten wurden 50 µl PBS-Puffer vorgelegt. In die erste Spalte wurden 50 µl des 50 µg/L ST-Standards zugegeben, mit dem PBS-Puffer vermischt und 50 µl davon in die zweite Spalte gefüllt. Aus der zweiten Spalte wurden 50 µl in die dritte Spalte gefüllt und gemischt und der Vorgang bis zur fünften Spalte wiederholt. Aus der 5. Spalte wurden 50 µl entnommen und verworfen. Damit ergab sich folgende Konzentrationsreihe:

Spalte:	1	2	3	4	5	6
Konzentration ST (µg/L):	50	25	12,5	6,25	3,125	0

In jede Kavität wurden außerdem 50 µl der 1:1.000 verdünnten ST-PO-Lösung pipettiert und die Platte 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach 4-maligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl TMB-Substrat und eine Inkubation von 30 min im Dunkeln. Die Reaktion wurde mit 25 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und der gelbe Farbstoff bei 450 nm photometrisch erfasst.

2.5.5 Aufreinigung der Sterigmatocystin-spezifischen Antikörper

Puffer und Lösungen:

- TBS-Puffer (tris-buffered saline), pH 7,5:

1 M Tris-HCl Lösung	20 ml
---------------------	-------

5 M NaCl Lösung	30 ml
-----------------	-------

Die beiden Lösungen wurden vor jeder Benutzung gemischt und mit A. dest. auf 1.000 ml aufgefüllt.

- 4-Chlor-1-Naphthol-Lösung, 3,4 mM:

Stammlösung: 3 g 4-Chlor-1-naphthol in 100 ml Ethanol (Aufbewahrung bei -18 °C)

Ansatz: Zu 4,5 ml Ethanol wurden 500 µl Chlornaphthol-Stammlösung gegeben und mit A. dest. bis ca. 20 ml aufgefüllt, damit Tris-HCl nicht ausfällt. 1,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) wurden zugegeben und mit A. dest. auf 25 ml genau aufgefüllt. Kurz vor der Anwendung wurden 25 µl 30 % H₂O₂ zugegeben.

Um die Qualität des Antiserums in Bezug auf die Spezifität für ST zu verbessern, sollte das Antiserum durch Immunadsorption aufgereinigt werden (Rhiel et al. 1989). Ein Vorversuch diente der Überprüfung des Erfolges der Aufreinigung (Schema in Abb. 2-8). Aus einer kleinen Menge Antiserum wurden die gegen KLH gebildeten Antikörper präzipitiert. Mit dem Locher ausgestanzte Plättchen Nitrocellulose wurden von jeder Seite mit je 10 µl KLH (~ 5 mg/ml, in PBS) abgesättigt und an der Luft getrocknet. Das Antiserum beider Tiere wurde mit TBS-Puffer 1:5 verdünnt und in 500 µl jeder Verdünnung zwei der KLH-belegten Nitrocellulose-Plättchen gegeben. Die Immunpräzipitation erfolgte in Mikrozentrifugen-Filtereinheiten (Micro Columns) für 1 h auf Eis. Die Micro Columns wurden in regelmäßigen Abständen geschwenkt und anschließend 2 min bei 2.600 U/min zentrifugiert. Das Eluat wurde 1:20 mit TBS-Puffer verdünnt, so dass die endgültige Verdünnung des derart vorgereinigten Antiserums 1:100 betrug.

ST-BSA (~ 15 mg/ml) wurde auf schmale Streifen Nitrocellulose aufgetragen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden einige Streifen 2 h bei Raumtemperatur mit 2 % Magermilch abgesättigt, andere blieben ungesättigt. Auf die gleiche Weise wurden Streifen ohne ST-BSA behandelt. Anschließend wurden die Streifen in Glaspetrischalen gelegt und mit dem vorgereinigten und 1:100 verdünnten Antiserum bedeckt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

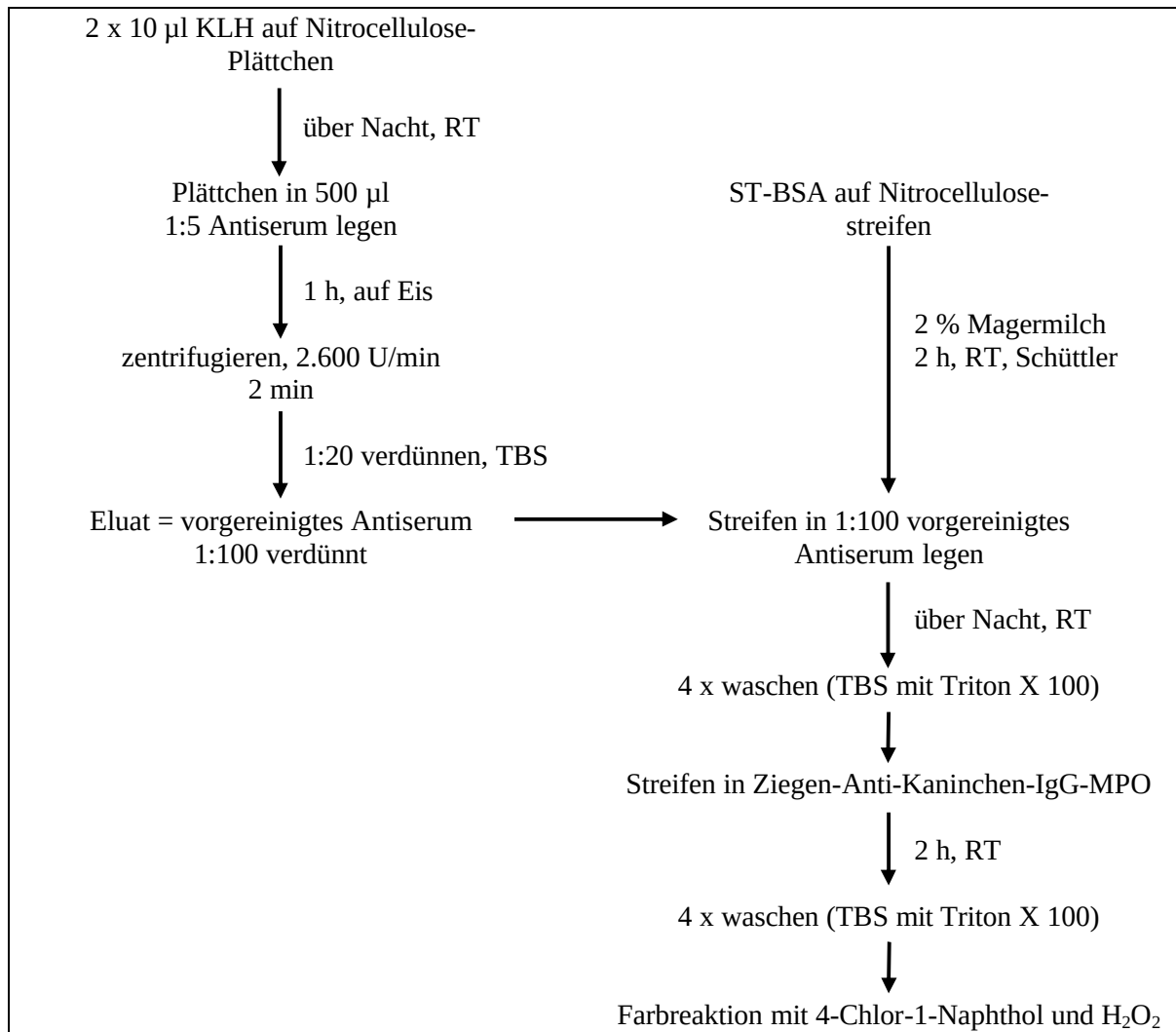


Abb. 2-8: Schema des Vorversuchs für die Überprüfung der Antikörper-Aufreinigung

RT = Raumtemperatur

Die Streifen wurden folgendermaßen belegt:

Ohne Antiserum:

- 0a) ST-BSA, TBS statt Serum, ungesättigt
- 0b) ST-BSA, TBS statt Serum, mit Magermilch gesättigt

Antiserum Kaninchen 1:

- 1a) ST-BSA, Antiserum 1:100, ungesättigt
- 1b) ST-BSA, Antiserum 1:100, mit Magermilch gesättigt

Antiserum Kaninchen 2:

- 2a) ST-BSA, Antiserum 1:100, ungesättigt
- 2b) ST-BSA, Antiserum 1:100, mit Magermilch gesättigt

Am nächsten Morgen wurden die Streifen 4-mal in TBS-Puffer mit 0,1 % Triton X 100 gewaschen und für 2 h mit 1:1.000 verdünntem Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (MPO) überdeckt. Nach vier weiteren Waschschritten wurde die Antikörperbindung mit der frisch angesetzten 4-Chlor-1-Naphthol-Lösung visualisiert. An den Stellen, an denen Meerrettichperoxidase über den zweiten an den ersten Antikörper gebunden werden konnte, erfolgte eine bläuliche Färbung (Abb. 3-33, Kap. 3.4.4).

2.5.6 Extraktion und Aufreinigung von Sterigmatocystin aus Hausstaub

Sowohl für den Nachweis im ELISA als auch mittels Dünnschichtchromatographie ist ein sorgfältiges Aufreinigen der Extrakte (Clean-up) notwendig. Hierfür wurde 1 g der $\leq 63 \mu\text{m}$ Fraktion mit 2 ml A. dest. und 3 g aktiviertem Kieselgel 60 verrührt, bis die Mischung trocken und rieselfähig war. In eine Chromatographiesäule (15 mm Durchmesser, 16 cm Länge) wurden 7,5 g mit 10 % Wasser (w/v) desaktiviertes Kieselgel trocken eingefüllt und darüber die Staubprobe geschichtet. Die Säule wurde zunächst mit 30 ml Dichlormethan und anschließend mit 100 ml Dichlormethan/Ethylacetat (95:5) eluiert. Die ersten 30 ml Eluat wurden verworfen und weitere 80 ml Eluat in einem 200 ml Rundkolben aufgefangen. Das Eluat wurde bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 600 μl Methanol aufgenommen und mit 5,4 ml A. dest. verdünnt. Eine C18-Festphasensäule (Strata C18 E, PHENOMENEX, 500 mg Packung, 6 ml Volumen) wurde mit 6 ml Methanol und anschließend mit 6 ml A. dest. konditioniert. Der Probenextrakt wurde aufgetragen und die Säule mit je 6 ml 10, 20, 30, 40, 50 und 60 % Methanol (in Wasser) gespült. Anschließend wurde mit 6 ml 70 % Methanol eluiert und das Eluat bis zur Trockne eingengt. Das Lösungsmittel und Volumen zur Aufnahme des Rückstandes hing von der Dünnschichtchromatographie-Methode ab (Kap. 2.5.7).

2.5.7 Nachweis von Sterigmatocystin mittels Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde als Methode ausgewählt, um einfach und in kurzer Zeit die Produktion von ST und das Vorkommen von ST in den Fraktionen der Säulenchromatographie qualitativ zu überprüfen (Kap. 2.5.1).

Die Dünnschichtfolien oder -platten (Kieselgel 60, 20 x 20 cm, teils mit Konzentrierungszonen) wurden vor der Verwendung 2 h bei 110 °C aktiviert und gegebenenfalls im Exsik-

kator aufbewahrt. Die Fraktionen oder Extrakte wurden mit einem Volumen von bis zu 100 µl punktförmig mit einer Kapillare auf der Startlinie (2 cm von unten) aufgetragen.

Bei der Anwendung der Agar-Plug-Methode (Filtenborg et al. 1983) wurde das aus der Kolonie ausgestanzte Myzelstück (Kap. 2.5.1) mit einem Tropfen Chloroform/Methanol (2:1) benetzt und die feuchte Myzeloberseite direkt auf die Startlinie gedrückt.

Für die qualitative DC wurden – soweit nicht anders angegeben – 20 µl eines ST Standards mit einer Konzentration von 10 mg/l (in Chloroform) aufgetragen. Einige Platten wurden mit Hilfe eines DC-Scanners (CAMAG II) ausgelesen.

Entwicklung der Dünnschichtfolie und anschließende Derivatisierung mit AlCl₃:

Mobile Phase: Toluol/Ethylacetat/90 % Ameisensäure = 5:4:1

Derivatisierungsmittel: 20 % AlCl₃ (w/v) in 96 % Ethanol

Auswertung: unter UV-Licht, 366 nm ⇒ grüne Fluoreszenz

Der Rückstand des Hausstaubextraktes (Kap. 2.5.6) wurde in 100 µl Dichlormethan aufgenommen und vollständig auf die Dünnschichtfolie aufgetragen. Die Dünnschichtkammer war an zwei Seiten mit Filterpapier ausgeschlagen. Die mobile Phase wurde 2 h vor der Chromatographie ca. 8 mm hoch in die Kammer gefüllt und das Filterpapier mit mobiler Phase benetzt. Nach dem Abtrocknen der Auftragepunkte wurde die Dünnschichtfolie/-platte in die Kammer eingestellt und bis zu einer Laufmittelfront von ca. 18 cm entwickelt. Die Laufmittelfront wurde direkt nach der Entnahme der Folie aus der Kammer markiert. Die Platte wurde unter dem Abzug getrocknet, anschließend aus ca. 20 cm Entfernung gleichmäßig mit der AlCl₃-Lösung eingesprüht und nach erneutem Trocknen 5 min bei 100 °C im Trockenschrank erhitzt. Die grüne Fluoreszenz des ST Derivats ist bei 366 nm (UV-Lampe) gut sichtbar. Der Retentionsfaktor betrug $R_f = 0,58$.

Acetylierung von Sterigmatocystin und Entwicklung der Dünnschichtfolie:

Mobile Phase: Chloroform mit 0,75 % Ethanol (als Stabilisator) und 2 % Methanol

Auswertung: unter UV-Licht, 366 nm ⇒ hellblaue Fluoreszenz

Zu dem Rückstand des Hausstaubextraktes aus Kap. 2.5.6 wurden 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid gegeben und die Lösung sofort in einen auf 110 °C erhitzten Heizblock gestellt (Vorster und Purchase 1968). Unter Luftzufuhr wurde das Lösungsmittel innerhalb

von 20 min verdunstet. Nach dem Abkühlen des Röhrchens wurden 100 µl Chloroform zugegeben. Für die Acetylierung des Standards wurde 1 ml einer 100 mg/l ST Lösung in Chloroform bis zur Trockne eingengt und wie für den Staubextrakt beschrieben behandelt. Der acetylierte Standard wurde mit Chloroform entsprechend der Anwendung verdünnt. Acetyliertes ST ist empfindlich gegenüber Tageslicht und nicht lange stabil. Daher fand die weitere Bearbeitung am gleichen Tag und in einem leicht abgedunkelten Raum statt.

Die Dünnschichtkammer wurde mindestens eine Stunde vor der Nutzung mit der mobilen Phase befüllt (ca. 8 mm Füllhöhe) und das darin befindliche Filterpapier mit mobiler Phase benetzt. Die DC-Folie wurde bis zu einer Höhe von ca. 18 cm entwickelt und das Lösungsmittel anschließend im Abzug verdunstet. Unter UV-Licht fluoresziert acetyliertes ST hellblau. Der Retentionsfaktor betrug $R_f = 0,55$ ($R_f = 0,60$ bei Vorster und Purchase, 1968).

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Quantifizierung von Schimmelpilzen im Hausstaub

3.1.1 Bestimmung der Lebendkeimzahl

In sämtlichen Proben wurde die Lebendkeimzahl auf den Nährböden Malzextrakt- und DG18-Agar bestimmt. Alle Verdünnungsstufen wurden zunächst betrachtet und für die quantitative Bestimmung bevorzugt die Verdünnungsansätze herangezogen, die zwischen 10 und 100 Kolonien pro Nährboden aufwiesen (Trautmann et al. 2005). Die nachweisbaren Schimmelpilze wurden – soweit möglich – bis zur Art differenziert. Mit den Koloniebildenden Einheiten (KBE) werden alle keimfähigen Bestandteile der Pilze erfasst: die verschiedenen Sporentypen wie z. B. Asko-, Sporangio-, Basidio- und Konidiosporen sowie Hyphenfragmente. Die unterschiedlichen Sporentypen werden im Folgenden meistens zusammenfassend als Sporen bezeichnet.

Die Präzisionskontrolle erfolgte in einer Kontrollprobe mit einer mittleren Lebendkeimzahl und 10 nachweisbaren Schimmelpilzarten sowie in einer Fallprobe mit einer hohen Lebendkeimzahl und 7 nachweisbaren Arten. Die beiden Proben wurden jeweils 16-mal aufgearbeitet und angesetzt. Für die Berechnung wurden die auf DG18-Nährboden ermittelten Keimzahlen eingesetzt. Sämtliche Werte lagen innerhalb oder auf den jeweiligen oberen und unteren Warngrenzen ($\bar{x} \pm 2s$) (Abb. 3-1). Bei der Fallprobe ergaben sich Variationskoeffizienten (relative Standardabweichung) von 14,1 % für die Wiederholpräzision ($\bar{x} = 36,8 \cdot 10^9$ KBE/kg = 36,8 KBE/Nährboden) und von 21,5 % für die Vergleichspräzision ($\bar{x} = 36,5 \cdot 10^9$ KBE/kg = 36,5 KBE/Nährboden). Die Kontrollprobe wies hingegen mit 26,6 % für die Wiederholpräzision ($\bar{x} = 1,1 \cdot 10^9$ KBE/kg = 1,1 KBE/Nährboden) und mit 39,9 % für die Vergleichspräzision ($\bar{x} = 0,9 \cdot 10^9$ KBE/kg = 0,9 KBE/Nährboden) höhere Variationskoeffizienten auf. Dieses Ergebnis entspricht der Präzision, die auch bei chemischen Analysen im ppb- bis ppm-Bereich zu erwarten ist (Horwitz 2003). Der zufällige Fehler wird mit steigender Koloniezahl pro Nährboden kleiner. Baudisch et al. (2009 II) haben bei weniger als 4 KBE/Nährboden eine relative Standardabweichung von 60 bis 100 % und bei mehr als 28 KBE/Nährboden von 13 % ermittelt.

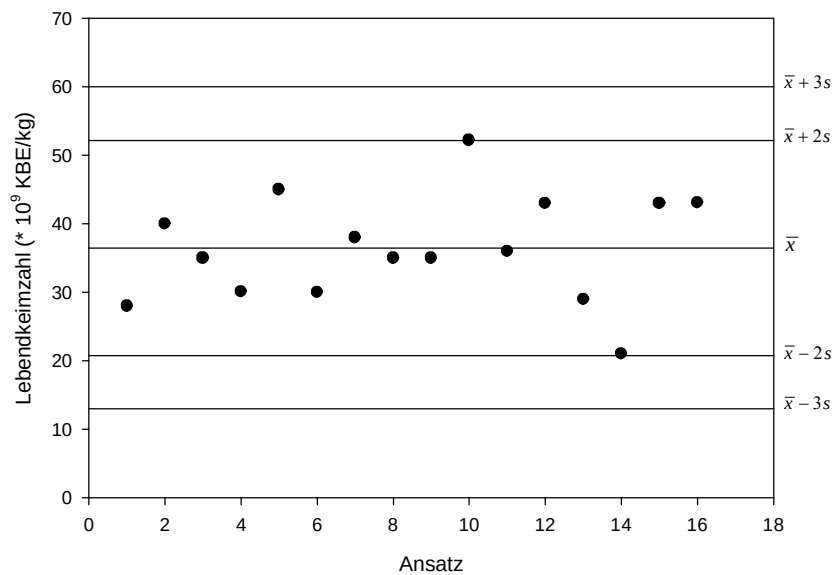


Abb. 3-1: Vergleichspräzision einer Fallprobe mit vergleichsweise hohem Keimgehalt

($\bar{x} = 36,5 \cdot 10^9$ KBE/kg, $s = 7,8 \cdot 10^9$ KBE/kg, $n = 16$). Für diese Werte liegt kein Trend vor (Trend-Test nach Neumann).

Die Nachweisgrenze der Methode lag bei $1 \cdot 10^6$ KBE/kg. Die Lebendkeimzahlen waren nicht „normal-verteilt“ (Kolmogoroff-Smirnoff Test, $P < 0,05$) und wiesen eine rechts-schiefe Verteilung auf, wie es häufig bei Umweltdaten der Fall ist (Stoyan et al. 1997). Daher wurden für die weitere Statistik nicht parametrische Tests angewendet. Erst durch die Logarithmus-Transformation ergab sich eine Normalverteilung (Abb. 3-2).

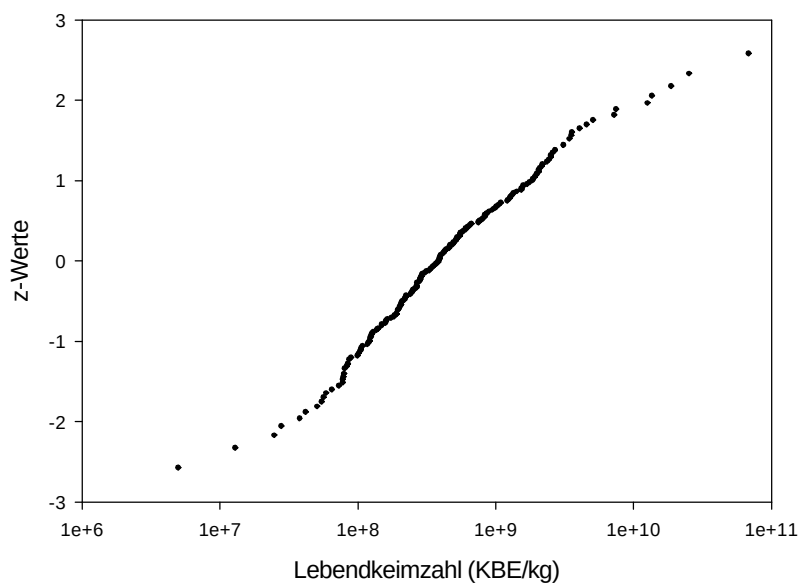


Abb. 3-2: Verteilung der Lebendkeimzahl der Kontrollproben auf DG18-Agar nach einer Z- und Logarithmus-Transformation

Tab. 3-1: Statistische Kenngrößen der Bestimmung der Lebendkeimzahl in Kontroll- und Fallproben für die beiden verwendeten Nährböden

($\cdot 10^6$ KBE/kg)	Kontrollen		Fälle	
	DG18	ME	DG18	ME
Anzahl	201	201	153	153
Mittelwert	1.911,6	2.592,0	5.156,3	2.692,5
Median	390,0	961,0	1.120,0	1.130,0
Minimum	5,0	42,0	16,0	50,0
Maximum	88.000,0	39.000,0	164.000,0	35.010,0
95. Perzentil	68.130,0	9.824,0	100.442,0	11.192,6

Die auf Malzextrakt- und DG18-Agar ermittelten Lebendkeimzahlen korrelierten sowohl bei den Kontroll- (Abb. 3-3) als auch bei den Fallproben signifikant miteinander (Rangkorrelation nach Spearman). Der Ertrag war auf DG18-Agar signifikant höher als auf Malzextrakt-Agar (U-Test nach Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$) (Tab. 3-1). Der Unterschied zeigte sich in den Fallproben deutlicher ($P = 2 \cdot 10^{-5}$) als in den Kontrollproben ($P = 0,027$). Verhoeff et al. (1994 I) und Koch et al. (2000) konnten in ihren Studien ebenfalls höhere Keimzahlen auf DG18 als auf einem Vollmedium (V8 oder ME) nachweisen.

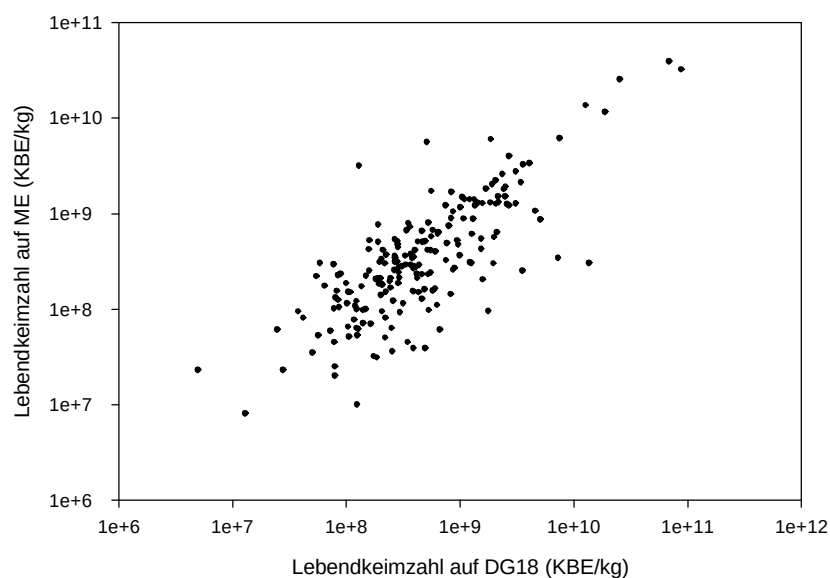


Abb. 3-3: Anzahl der Lebendkeime bestimmt auf Malzextrakt- (ME) und DG18-Agar in den Kontrollproben

Im Gegensatz dazu wurde mit Malzextrakt-Agar eine größere Gattungs- und Artenvielfalt nachgewiesen. Auf Malzextrakt-Agar wurden 29 bzw. 28 (Kontrollen bzw. Fälle) und auf DG18-Agar 22 bzw. 25 Gattungen bestimmt. Innerhalb dieser Gattungen wurden auf Malzextrakt-Agar 74 bzw. 73 und auf DG18-Agar 64 bzw. 66 verschiedene Arten differenziert.



Abb. 3-4: Ansatz der 10^1 Verdünnung einer Fallprobe auf Malzextrakt- (links) und DG18-Nährboden (rechts)

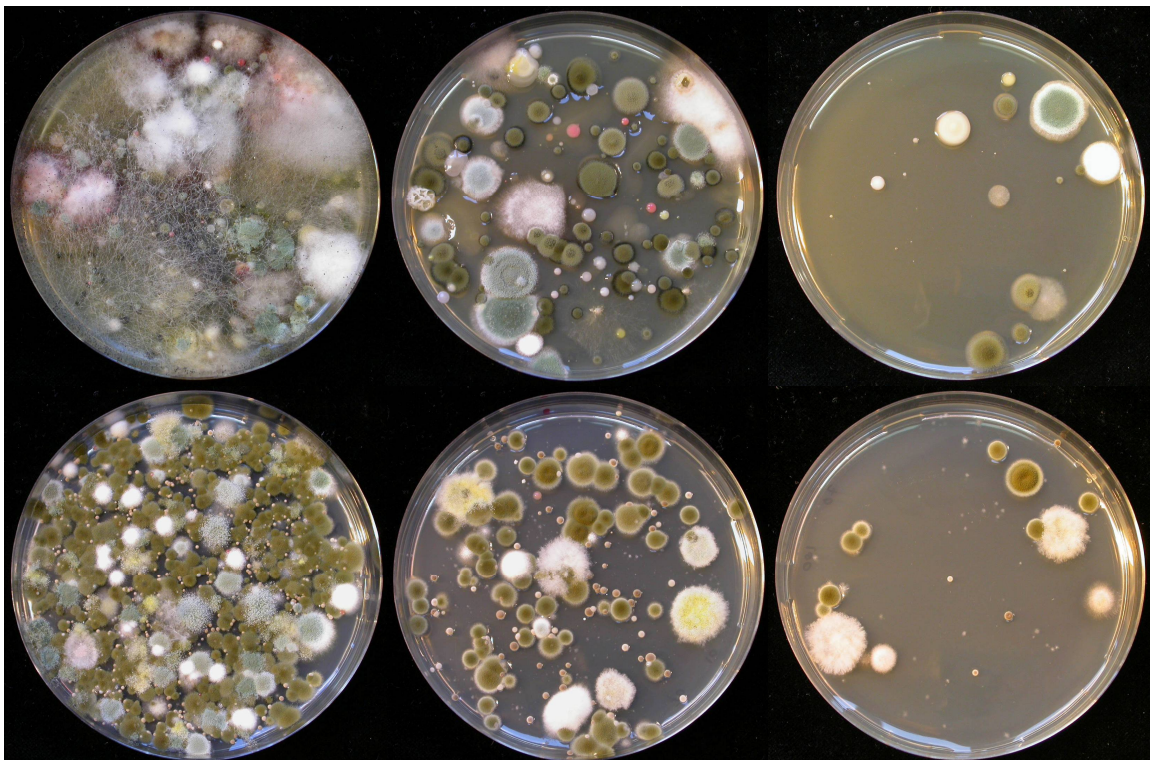


Abb. 3-5: Ansatz einer Fallprobe auf Malzextrakt- (obere Reihe) und DG18-Agar (untere Reihe) in der 10^0 , 10^1 und 10^2 Verdünnung (von links nach rechts)

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich mit dieser Methode die Lebendkeimzahl im Hausstaub relativ präzise nachweisen lässt. Der Einsatz beider Nährböden hat sich bei der mikrobiologischen Bewertung von Innenräumen durchgesetzt (Verhoeff et al. 1990). DG18-Agar enthält Chloramphenicol zur Unterdrückung des Bakterienwachstums sowie Dichloran zur Hemmung des wuchernden Wachstums von Pilzen der Ordnung *Mucorales* und zur Verminderung des Koloniedurchmessers anderer Gattungen (Hocking und Pitt 1980) (Abb. 3-4). Aus diesem Grund war die auf DG18-Agar bestimmte Lebendkeimzahl höher als die auf Malzextrakt-Agar. Der Zusatz von 18 % (w/w) Glycerin führte zu einer reduzierten Wasseraktivität von 0,95 (a_w -Wert) zur Erfassung von xerophilen Pilzarten. Auf Malzextrakt-Agar wurde hingegen eine höhere Artenvielfalt erlangt und es wurden Pilze nachgewiesen, die aufgrund ihrer eher hydrophilen Eigenschaften auf DG18-Agar nicht wachsen (Abb. 3-5). Aus diesen Gründen wurden für quantitative Betrachtungen die Ergebnisse der Auswertung von DG18-Agar bevorzugt (Trautmann et al. 2005, Gabrio et al. 2005) und für qualitative Bewertungen die Ergebnisse beider Nährböden hinzugezogen.

Im Folgenden wird die Methode in Hinblick auf ihre Aussagekraft und Trennfähigkeit zwischen Kontroll- und Fall-Haushalten geprüft.

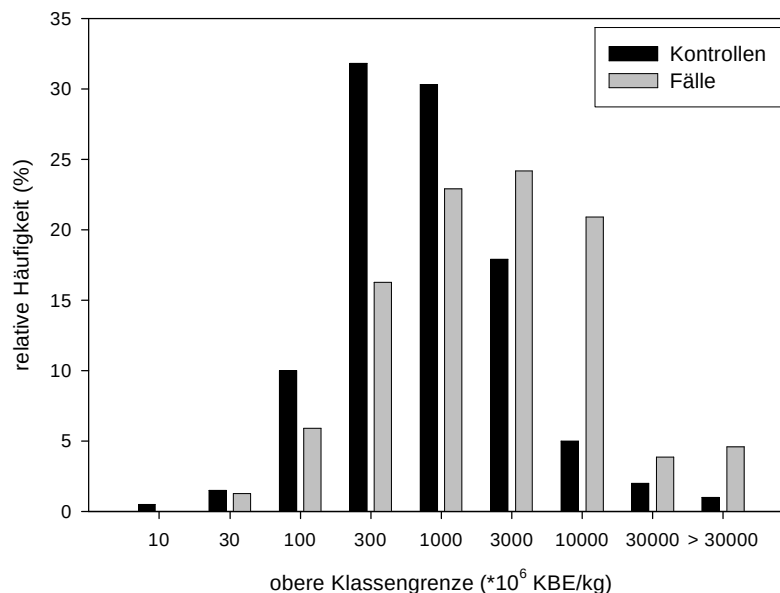


Abb. 3-6: Relative Häufigkeit (%) der Lebendkeimzahlen ($\cdot 10^6$ KBE/kg) in Kontroll- und Fallproben (bestimmt auf DG18)

Die Konzentration der keimfähigen Schimmelpilze ist in den Fallproben signifikant höher als in den Kontrollproben (U-Test nach Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$) (Tab. 3-1). Die Trenneffizienz ist bei den auf DG18-Agar ermittelten Keimzahlen stärker ($P = 0,7 \cdot 10^{-7}$) als bei den auf Malzextrakt-Agar ($P = 0,006$) bestimmten Werten, was sich durch die bessere quantitative Erfassung der Lebendkeimzahl auf DG18 erklärt. Dennoch zeigen die Ergebnisse keine ausreichende Trennfähigkeit zwischen Schimmel- und Nichtschimmel-Haushalten (Abb. 3-6). Bei Umwelt- und Innenraumstudien wird in Anlehnung an das Human-Biomonitoring häufig das 95. Perzentil als statistisch abgeleiteter Referenzwert verwendet (HBM-Kommission 1996). Ein solcher Referenzwert hat keine toxikologische oder epidemiologische Bedeutung, sondern signalisiert, wann eine besonders hohe Belastung mit der entsprechenden Substanz vorliegt (Ewers et al. 1999). Die im Rahmen des Konfidenzintervalls gerundeten 95. Perzentile betragen für die Kontrollproben $4,6 \cdot 10^9$ KBE/kg für DG18-Agar und $3,3 \cdot 10^9$ KBE/kg für Malzextrakt-Agar. Auf der Grundlage dieser Referenzwerte wären nur 30 (DG18) bzw. 17 (ME) von 153 Fallproben richtig erfasst worden. Auch hier zeigt sich zwar wieder die bessere Trennfähigkeit von den auf DG18-Agar ermittelten Ergebnissen, aber die Sensitivität der Lebendkeimzahl ist als Bewertungsmaßstab für den Schimmelstatus eines Haushaltes mit 19,6 % (DG18) und 11,1 % (ME) extrem gering. Immerhin wären 80,4 % (DG18) bzw. 88,9 % (ME) der hier untersuchten Fallproben falsch negativ bewertet und als Hintergrundbelastung eingestuft worden. Eine Bewertung des Innenraums im Hinblick auf das Vorhandensein eines Pilzbefalls ist mit Hilfe der Gesamtzahl an keimfähigen Pilzsporen im Hausstaub mit der hier angewandten Methode (Altstaub, Fraktion $\leq 63 \mu\text{m}$) nicht möglich.

Im Folgenden wird untersucht, ob die Konzentrationen einzelner Gattungen eine höhere Trenneffizienz zwischen Haushalten mit und ohne Pilzbefall haben.

Pilze der Gattung *Penicillium* waren sowohl in den Kontroll- (99,5 %, DG18) als auch in den Fallproben (98,0 %, DG18) am häufigsten vertreten. In mehr als 80 % der Proben kamen außerdem die Gattungen *Aspergillus*, *Cladosporium* und *Eurotium* vor. Die statistischen Kenngrößen der nachweisbaren Konzentrationen und die Häufigkeiten einiger Gattungen sind in Tab. 3-2 für DG18-Agar und in Tab. 3-3 für Malzextrakt-Agar aufgeführt. Eine Tabelle mit den statistischen Kenngrößen sämtlicher nachgewiesenen Pilzarten befindet sich im Anhang (Tab. 8-1).

Tab. 3-2: Häufigkeiten (%) und statistische Kenngrößen der Konzentrationen ($\cdot 10^6$ KBE/kg) einzelner Pilzgattungen, bestimmt auf DG18-Agar

Das Minimum beträgt für alle aufgeführten Gattungen 0 KBE/kg. (K = Kontrollen; F = Fälle)

DG18		($\cdot 10^6$ KBE/kg)				Anteil pos. Proben (%)
		Mittelwert	Median	95. Perzentil	Maximum	
<i>Penicillium</i>	K	882,0	80	1.390	73.000	99,5
	F	1.689,3	116	4.090	128.000	98,0
<i>Aspergillus</i>	K	378,6	38	1.498	18.200	89,6
	F	2.355,5	290	19.000	42.501	90,8
<i>Cladosporium</i>	K	123,2	20	554	2.100	83,6
	F	166,8	30	900	5.000	79,1
<i>Eurotium</i>	K	65,1	10	267	2.300	82,6
	F	141,1	12	745	3.000	85,6
<i>Mycelium sterile</i>	K	22,3	6	98	500	64,2
	F	29,3	4	100	800	56,2
<i>Wallemia</i>	K	349,6	8	1.090	30.000	54,7
	F	709,7	10	3.150	23.000	66,0
<i>Mucor</i>	K	42,8	0	100	4.000	37,3
	F	16,8	0	33	1.200	23,5
<i>Fusarium</i>	K	4,4	0	30	100	24,9
	F	3,0	0	30	60	11,8
<i>Botrytis</i>	K	1,9	0	10	140	10,0
	F	0,6	0	11	30	5,9

Tab. 3-3: Häufigkeiten (%) und statistische Kenngrößen der Konzentrationen ($\cdot 10^6$ KBE/kg) einzelner Pilzgattungen, bestimmt auf Malzextrakt-Agar

Das Minimum beträgt für alle aufgeführten Gattungen 0 KBE/kg. (K = Kontrollen; F = Fälle)

ME		($\cdot 10^6$ KBE/kg)				Anteil pos. Proben (%)
		Mittelwert	Median	95. Perzentil	Maximum	
<i>Penicillium</i>	K	671,3	81	1.490	32.000	95,0
	F	822,9	100	4.090	23.000	93,5
<i>Aspergillus</i>	K	256,8	10	870	13.010	64,7
	F	671,3	20	3.320	20.000	73,9
<i>Cladosporium</i>	K	119,9	8	492	4.000	54,7
	F	173,6	10	600	8.000	55,6
<i>Mycelium sterile</i>	K	30,9	3	200	700	53,2
	F	55,1	10	200	3.000	61,4
<i>Fusarium</i>	K	15,7	2	68	300	53,2
	F	17,9	0	43	1.500	39,2
<i>Mucor</i>	K	35,3	1	95	3.000	51,7
	F	24,6	1	100	2.000	54,9
<i>Botrytis</i>	K	1,9	0	10	100	15,4
	F	3,5	0	20	100	25,5
<i>Geotrichum</i>	K	1,9	0	10	100	11,9
	F	1,2	0	10	100	5,2

Die Gattung *Penicillium* kommt in den Fall- und Kontrollproben ungefähr gleich häufig vor und unterscheidet sich nicht in den nachweisbaren Konzentrationen (U-Test, $P_{DG18} = 0,053$, $P_{ME} = 0,413$). Die Gattung *Aspergillus* tritt in den Fallproben zumindest auf Malzextrakt-Agar häufiger und auf beiden Nährböden in signifikant höheren Konzentrationen auf ($P_{DG18} = 0,4 \cdot 10^{-9}$, $P_{ME} = 0,007$). Des Weiteren weisen die Gattungen *Eurotium* ($P = 0,002$) und *Wallemia* ($P = 0,021$) auf DG18-Nährboden sowie *Botrytis* ($P = 0,018$) und sterile Myzelien ($P = 0,032$) auf Malzextrakt-Agar signifikant höhere Konzentrationen in den Fallproben auf. Im Gegensatz dazu sind die Gattungen *Fusarium* ($P_{DG18} = 0,004$, $P_{ME} = 0,007$), *Geotrichum* ($P_{ME} = 0,032$) und *Mucor* ($P_{ME} = 0,008$) in Kontrollproben in signifikant höheren Konzentrationen als in Fallproben nachweisbar. Alle anderen Gattungen kommen in den Proben beider Haushaltstypen gleichermaßen vor.

Die für die Außenluft untypischen Gattungen *Aspergillus*, *Eurotium* und *Wallemia* (Ackermann et al. 1969) scheinen sich bei dem Vorhandensein eines Pilzbefalls im Hausstaub anzureichern. Im Gegensatz dazu sind die Konzentrationen der außenlufttypischen Gattungen wie *Fusarium*, *Geotrichum* und *Mucor* (Lacey 1962, Ackermann et al. 1969) in den Fallproben geringer als in den Kontrollen. Trotz dieser zunächst vielversprechenden Feststellung sind die Gattungen *Aspergillus*, *Eurotium* und *Wallemia* nicht geeignet als Indikatororganismen für den Nachweis eines Pilzbefalls mit Hilfe der Matrix Hausstaub. Nach Bildung der Referenzwerte aus dem 95. Perzentil der Kontrollproben (DG18) zeigt sich wie bei der Gesamtzahl der Lebendkeime eine schlechte Trennfähigkeit dieser Parameter (Tab. 3-4 und Abb. 3-7). Die Lebendkeimzahl von *Aspergillus spp.* weist mit 22,9 % die höchste Sensitivität der möglichen Indikator-Organismen auf, aber dieser Wert ist für eine zuverlässige Bewertung des Innenraums mit Hilfe von Hausstaubproben (Altstaub, $\leq 63 \mu m$) dennoch nicht ausreichend.

Tab. 3-4: Referenzwerte aus dem gerundeten 95. Perzentil (DG18) der Kontrollproben ($n = 201$) für ausgewählte Gattungen sowie die Anzahl der richtig erfassten Fallproben aus $n = 153$

Gattung	Referenzwert ($\cdot 10^6$ KBE/kg)	richtig erfasste Fallproben	
		Anzahl	Sensitivität (%)
<i>Aspergillus</i>	1.500	35	22,9
<i>Eurotium</i>	270	15	9,8
<i>Wallemia</i>	1.100	14	9,2

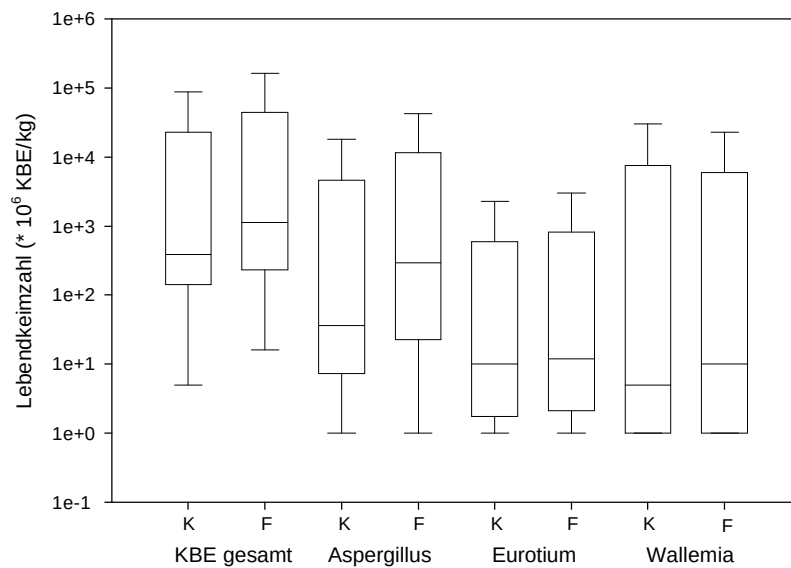


Abb. 3-7: Gesamt-Lebendkeimzahl sowie Lebendkeimzahlen von *Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.* und *Wallemia sebi* in Kontroll- (K) und Fallproben (F)

Die oberen und unteren Balken umfassen die Spannweite und die Boxen den Interquartilsbereich. Der mittlere Strich kennzeichnet den Median.

Die auf DG18-Agar am häufigsten nachweisbaren Pilzarten sind *Aspergillus versicolor*, *Eurotium herbariorum*, *Penicillium chrysogenum* und *Wallemia sebi* (Tab. 3-5 und Tab. 8-1 im Anhang). Da *Wallemia* eine monotypische Gattung ist (Domsch et al. 1980), gelten die für die Gattung *Wallemia* bereits dargestellten Werte auch für *Wallemia sebi*. *A. versicolor* ($P = 0,046$) und *E. herbariorum* ($P = 0,002$) sind in Fallproben in statistisch signifikant höheren Konzentrationen nachweisbar als in Kontrollproben (U-Test, $\alpha = 0,05$). Für *P. chrysogenum* ist kein Unterschied zwischen Kontroll- und Fallproben festzustellen ($P = 0,714$).

Tab. 3-5: Häufigkeiten (%) und statistische Kenngrößen der Konzentrationen ($\cdot 10^6$ KBE/kg) einzelner Pilzarten (bestimmt auf DG18)

Das Minimum beträgt für alle aufgeführten Arten 0 KBE/kg (K = Kontrollen; F = Fälle).

DG18		($\cdot 10^6$ KBE/kg)				Anteil pos. Proben (%)
		Mittelwert	Median	95. Perzentil	Maximum	
<i>Aspergillus versicolor</i>	K	145,1	9	690	8.000	64,2
	F	569,5	10	2.830	26.000	65,4
<i>Eurotium. herbariorum</i>	K	41,7	3	100	2.100	61,7
	F	126,3	10	560	3.000	69,3
<i>Penicillium chrysogenum</i>	K	305,4	20	500	26.000	76,1
	F	622,1	20	800	56.000	69,9

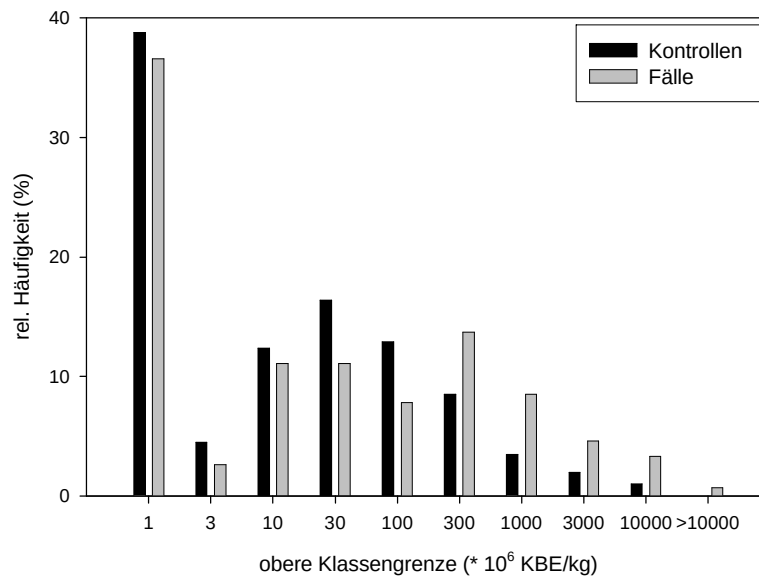


Abb. 3-8: Relative Häufigkeit (%) der Lebendkeimzahl ($\cdot 10^6$ KBE/kg) von *Aspergillus versicolor* in Kontroll- und Fallproben (bestimmt auf DG18)

Zwei Kontrollhaushalte wurden mehrfach beprobt. Die Proben beider Haushalte zeigen eine hohe Variabilität sowohl in der Gesamtzahl der lebensfähigen Pilzsporen als auch in der Verteilung der Gattungen (Abb. 3-9 und Tab. 3-6) und Arten. Beide Haushalte sind gut bekannt und ein Pilzbefall im Innenraum kann nahezu ausgeschlossen werden. Diese Schwankungen zeigen, dass selbst die Proben aus demselben Haushalt kaum zu vergleichen sind und neben dem Vorhandensein eines Pilzbefalls auch andere Einflüsse stark auf den Pilzgehalt des Hausstaubs wirken, die in Kapitel 4.1 aufgezeigt und diskutiert werden.

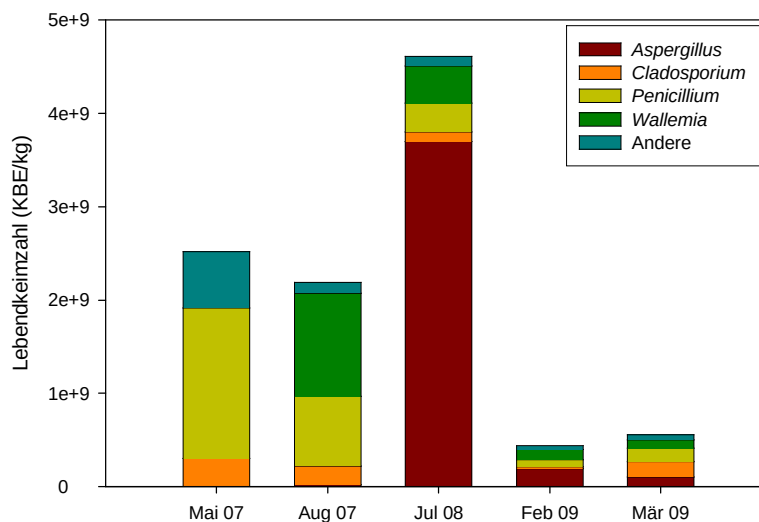


Abb. 3-9: Lebendkeimzahlen (KBE/kg) und die Verteilung der überwiegend vorkommenden Gattungen in 5 Proben aus Kontrollhaushalt I

Tab. 3-6: statistische Angaben zur Variabilität der Lebendkeimzahl in zwei mehrfach beprobten Kontrollhaushalten

	Nährboden	Mittelwert ($\cdot 10^6$ KBE/kg)	Variations- koeffizient (%)	Spannweite ($\cdot 10^6$ KBE/kg)
Kontrolle I (n = 5)	DG18	2.061,8	82,7	4.171
	ME	913,6	59,2	1.213
Kontrolle II (n = 4)	DG18	1.014,8	33,8	728
	ME	527,3	55,3	601

Ein Vergleich mit anderen Studien ist nur eingeschränkt möglich, da sowohl die Probenahmen als auch die Methoden der Aufarbeitung sehr unterschiedlich sind. Die analytischen Ergebnisse sind extrem von der Art der Probenahme und der Fraktion, die für die Analyse eingesetzt wird, abhängig (Butte und Heinzow 2002). In vielen Studien wurde Frischstaub von einer definierten Flächengröße und bevorzugt von Teppichböden auf Planfilter gesammelt (Koch et al. 2000, Baudisch et al. 2001, Schleibinger et al. 2004 II, Trautmann et al. 2005), was zu sehr geringen Staubmengen führt. Schleibinger et al. (2004 II) haben in Abhängigkeit vom Bodenbelag 0,002 bis 2,9 g/m² Staub gewonnen. Je nach beprobter Flächengröße ist diese Probenmenge zu gering, um gesiebt zu werden und mehrere Nachweismethoden darin durchzuführen. Das Sieben führt allerdings zu einer Homogenisierung der Proben (Butte et al. 2000) und fördert somit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Proben. In der Literatur ist eine Vielzahl von Methoden beschrieben. Gravesen (1978) und Wickmann et al. (1992) haben nach dem Entfernen sehr grober Bestandteile Aliquots der ungesiebten Probe direkt auf die Nährböden aufgestreut. Dadurch werden Agglomerate von Pilzsporen nicht voneinander getrennt und es werden niedrigere Konzentrationen erzielt als nach einer Suspendierung unter Zusatz eines Detergenz (CEC 1993). Schleibinger et al. (2004 II) haben ungesiebten Staub suspendiert und in Verdünnungen auf die Nährböden ausplattiert. In weiteren Studien wurden Fraktionen von 2,5 mm (Mølhav et al. 2000), 500 µm (Koch et al. 2000), 425 µm (Chew et al. 2003, Wickens et al. 2004), 250 µm (Franke et al. 1997), 125 µm (LGA Baden-Württemberg 2004) bis zu 63 µm (Baudisch et al. 2001, Trautmann et al. 2005, Baudisch et al. 2009 I) verwendet. Im Allgemeinen steigt die Konzentration eines Analyten im Hausstaub mit sinkender Partikelgröße aufgrund der steigenden spezifischen Oberfläche (Butte und Heinzow 2002). Die Verwendung der ≤ 63 µm Fraktion hat den entscheidenden Vorteil, dass auch Sand entfernt wird, dessen Anteil im Staub je nach Herkunft stark variieren kann (Butte et al.

2000) und der das Verhältnis der Keimzahl zum Gewicht der Probe stark beeinträchtigt. Mit der $\leq 63 \mu\text{m}$ Fraktion wird die überwiegende Zahl der Pilzsporen erfasst, die meistens zwischen 2 und 20 μm groß sind. Auch die mehrzelligen Konidiosporen von *Alternaria spp.* und *Ulocladium spp.* mit bis zu 40 μm und die Makrokonidien von *Fusarium spp.* mit bis zu 90 μm Länge (Samson et al. 2004) sind im Zweifelsfall aufgrund ihres geringen Durchmessers in der Fraktion enthalten. Sogar Hyphenfragmente und abgerissene Konidiophore z. B. von *Penicillium sp.* konnten im gesiebten Staub beobachtet werden (Abb. 3-11, Kap. 3.1.2).

Im Rahmen des Ringversuches zur „Differenzierung von Innenraum- und Lebensmittel-relevanten Schimmelpilzen“, der seit 2001 vom Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg im Regierungspräsidium Stuttgart veranstaltet wird, wurden dreimal Staubproben (Fraktion $\leq 63 \mu\text{m}$) versandt, die von den teilnehmenden Laboren (zwischen 44 und 77 Labore) und den sieben Referenzlaboren angesetzt (Verdünnungsverfahren nach Gabrio et al. 2005) und ausgewertet wurden. Die enormen Diskrepanzen der Ergebnisse sowohl zwischen den Teilnehmern als auch zwischen den Referenzlaboren zeigen, dass auch in der $\leq 63 \mu\text{m}$ Fraktion noch mit Inhomogenitäten zu rechnen ist und die Verwendung von Nährböden unterschiedlicher Hersteller Einfluss auf die Ergebnisse haben kann (Seidl 2009).

In einigen Studien kommen die Autoren zu dem Schluss, dass eine Bewertung des Innenraums anhand der Lebendkeimbestimmung im Hausstaub möglich ist und geben Referenzwerte für die Beurteilung an (Schleibinger et al. 2004 II, Trautmann et al. 2005, Baudisch et al. 2009 I). Schleibinger et al. 2004 II erreichten mit der Untersuchung von Frischstaub einer definierten Fläche, der auf Planfiltern gesammelt und ungesiebt angesetzt wurde, eine Sensitivität von 93 % (DG18) bzw. 95 % (ME). Im Gegensatz dazu weisen die im Altstaub ermittelten Keimzahlen einen hohen Überlappungsgrad der Verteilungen von Kontroll- und Fallproben auf (Abb. 3-6 gesamt und Abb. 3-8 A. *versicolor*). Im Folgenden werden die methodischen Unterschiede zwischen der hier vorliegenden Untersuchung und den zitierten Studien diskutiert, während in Kap. 4.1 die Referenzwerte vorgestellt und ihre Aussagekraft erörtert werden.

Der offensichtliche methodische Unterschied zwischen den Studien mit Bewertungsschema und der vorliegenden Arbeit mit einer ungenügenden Trenneffizienz der Lebendkeimzahl liegt in der Art der Probenahme und der Verwendung von Altstaub. Jede Probe wurde von einem anderen Probenehmer (= Bewohner) genommen und ist somit bereits durch in-

dividuelle Reinigungsgewohnheiten (Häufigkeit, Gründlichkeit) und durch unterschiedliche Staubsaugerfabrikate beeinflusst. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass die Bewohner aufgrund der Teilnahme an der Studie ihr übliches Saugverhalten verändert und z. B. besonders gründlich oder auch in sehr versteckten Ecken gesaugt haben. Ob ausschließlich im Innenraum gesaugt wurde, wurde im Fragebogen abgeklärt und bei der Auswertung der Daten berücksichtigt. In den zitierten Studien erfolgte die Probenahme durch einen geschulten Mitarbeiter und es wurden definierte Flächen mit (meistens) Teppichboden beprobt. Teppichböden liefern größere Staubmengen als wischbare Fußböden (Schleibinger et al. 2004 II) und es wird Staub aus tieferen Schichten aufgenommen. Die Menge dieses sehr alten Staubs hängt von der Saugleistung, der Geschwindigkeit beim Saugen und der Beschaffenheit des Belags ab (Seifert 1998). Die Saugleistung, der Sammelzeitraum pro Flächeneinheit und die Auswahl der beprobten Fläche wurde bei den genannten Studien weitestgehend standardisiert. Bei dem Vorliegen eines Pilzbefalls in der Wohnung wurde die beprobte Fläche in dem betroffenen Raum angelegt. Bei der Sammlung von Altstaub hingegen wurde die gesamte Wohnung gesaugt. Eventuell mit Pilzen angereicherter Staub aus einem Zimmer mit Befall wurde auf diese Weise durch den Staub der anderen Räume verdünnt.

Die Proben wurden in unterschiedlichen Staubsaugerbeutelmarken gesammelt. Der besonders feine Staub, zu dem auch Pilzsporen mit wenigen μm Durchmesser (z. B. *Aspergillus* und *Penicillium*) gehören, fand sich in den Zwischenlagen des Staubsaugerbeutels. Bei Papierbeuteln konnten diese Lagen noch relativ leicht voneinander getrennt und der Staub daraus gewonnen werden. Bei den dreilagigen Vliesbeuteln waren die Verluste dieses feinen Staubs relativ hoch. Zudem variierte der Abscheidegrad der unterschiedlichen Staubsaugerbeutel in Abhängigkeit von Material und Ausführung (Schleibinger et al. 2004 II). Der Minderbefund der Fraktion $< 10 \mu\text{m}$ ist nach VDI 4300 Blatt 8 (2001) allerdings vernachlässigbar, wenn der Staubsaugerbeutel mindestens zu einem Drittel gefüllt ist. Die Bedingung zur Teilnahme an der Studie war ein mindestens zur Hälfte gefüllter Staubsaugerbeutel.

Die Dauer des Staubsammelns reichte in den untersuchten Proben von wenigen Tagen bis zu einem Jahr mit einem Median von 40 Tagen. Die Gesamtzahl der Kolonie-bildenden Einheiten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen unterschiedlich langen Sammelzeiten (H-Test nach Kruskal-Wallis, $P_{\text{DG18}} = 0,685$), wohl aber die Lebendkeimzahl von *Cladosporium spp.* ($P_{\text{DG18}} = 0,007$). Durch den Vergleich verschiedener Zeiträume konnte ein signifikanter Unterschied in der *Cladosporium*-Konzentration für Sammelzeit-

räume bis zu 30 Tagen und mehr als 30 Tagen festgestellt werden (U-Test nach Mann-Whitney, $P_{DG18} = 0,0002$). Koch et al. (2002) haben festgestellt, dass bei der Aufbewahrung von Staubproben bei Raumtemperatur bereits nach 14 Tagen mit einem Rückgang der Keimfähigkeit besonders bei *Cladosporium spp.* zu rechnen ist. Um den Verlust unter 10 % zu halten, empfehlen sie, Staubproben nicht länger als sieben Tage bei Raumtemperatur zu lagern. Ein Grund für das Absterben einiger Sporen ist u. U. im osmotischen Stress zu sehen, der durch die sinkende Wasseraktivität des Staubs im Sauger begründet ist (Morris 1995). Neben dem Zeitfaktor durch die „Lagerung“ der Probe im Staubsaugerbeutel ist der Verlust der Keimfähigkeit auch auf mechanische Beschädigung durch den Schub und den Aufprall auf dem Sammelmedium zurückzuführen (Saldanha et al. 2008). Betrachtet man die Anzahl der nachgewiesenen *Cladosporium*-Sporen im Verhältnis zur Gesamtzahl der keimfähigen Sporen, stellt man bei den hier untersuchten Proben einen deutlich geringeren Anteil von *Cladosporium*-Sporen als bei Trautmann et al. (2005) fest (Tab. 3-7). Gleichzeitig werden im Altstaub höhere Gesamtkonzentrationen nachgewiesen als im Frischstaub, da es über die längere Sammeldauer zu einer stärkeren Anreicherung kommt. Baudisch et al. (2009 II) haben nach dreiwöchiger Aufbewahrung von Staubproben bei Raumtemperatur keinen Rückgang der Lebendkeimzahl von *Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.* und *Penicillium spp.* festgestellt. Durch die Dauer des Sammelns und die Häufigkeit bzw. Dauer der Staubsaugernutzung werden somit vermutlich Arten selektiert, deren Sporen besonders widerstandsfähig sind. Auf diese Weise wird das tatsächlich vorhandene Art-/Gattungsspektrum verzerrt und es kann zu Fehlinterpretationen kommen (Schleibinger et al. 2004 I).

Tab. 3-7: Vergleich der Lebendkeimzahlen von *Cladosporium spp.* mit der Gesamtlebendkeimzahl zwischen der hier vorliegenden Studie und der von Trautmann et al. (2005)

Um die Vergleichbarkeit zu gewähren, wurden die Daten für Winter und Sommer berechnet.

($\cdot 10^6$ KBE/kg)		Winter		Sommer	
		Median	95. Perzentil	Median	95. Perzentil
eigene Studie	<i>Cladosporium</i>	20	64	25,5	545
	gesamt	392	23.919	378	3.110
Trautmann et al. (2005)	<i>Cladosporium</i>	16,5	101	260	1.264,5
	gesamt	67,5	607	1.315	3.120

Die extra- und intramuralen Einflüsse, die neben einem Pilzbefall im Innenraum die Pilzkonzentration im Staub beeinflussen können, werden in Kapitel 4.1 diskutiert.

3.1.2 Bestimmung der Gesamtsporenzahl

In einem Unterkollektiv von 29 Proben wurde die Gesamtsporenzahl mit Hilfe einer Bürker-Türk-Zählkammer bestimmt. Die Werte waren nicht „normal-verteilt“ (Kolmogoroff-Smirnoff Test, $P < 0,05$). Die Nachweisgrenze lag aufgrund der starken Verdünnung bei $1,7 \cdot 10^9$ Sporen pro kg Hausstaub. Es handelt sich also um eine relativ unempfindliche Methode. Die Verdünnung ist aufgrund der im Staub enthaltenen sonstigen Partikel erforderlich. Durch Hautschuppen, größere Fasern und andere Partikel kommt es zu Überlagerungen, die die Auswertung bei einer geringeren Verdünnung nicht mehr möglich machen. Bereits bei der hier gewählten Verdünnung ist nicht auszuschließen, dass große Partikel einige Pilzsporen verdeckt haben, so dass diese nicht erfasst wurden (Abb. 3-10). Die meisten Sporen können bei 400-facher Vergrößerung gut erkannt werden (Abb. 3-11). Um sehr kleine Pilzsporen, wie z. B. von *Acremonium spp.* oder *Verticillium spp.*, von anderen Kleinstpartikeln, wie z. B. mineralischen Bestandteilen, unterscheiden zu können, ist eine Betrachtung bei 1.000-facher Vergrößerung erforderlich. Aber auch dann erfordert die Auswertung viel Erfahrung und Sachverstand. Fehlidentifizierungen und Überlagerungseffekte können zu Minder- oder Falschbefunden führen. Eduard et al. (2001) haben zwei erfahrene Experten dieselben Proben auswerten lassen. Für das Auszählen ergaben sich relative Standardabweichungen von 2 bis 12 %. Für die Zuordnung der gezählten Sporen zu Gattungen oder Sporentypen lag die relative Standardabweichung bei 9 %.

Tab. 3-8: Statistische Kenngrößen der Bestimmung der Gesamtsporenzahl in 21 Kontroll- und 8 Fallproben

	Gesamtsporenzahl ($\cdot 10^9$ Sporen/kg)
Anzahl	29
Mittelwert	48,9
Median	25
Minimum	6,7
Maximum	578,3
95. Perzentil	328,3

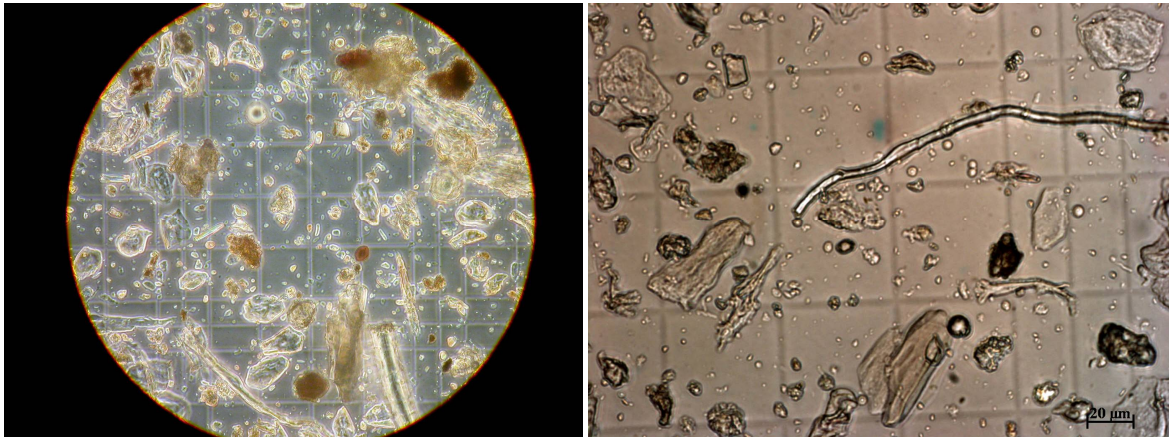


Abb. 3-10: Aufnahmen der mit einer Staubsuspension ausgestatteten Bürker-Türk-Zählkammer bei 100- (links) und 400-facher Vergrößerung (rechts)

Im linken Bild ist das Raster mit den 16 Kleinquadraten im Hintergrund zu sehen. Beide Bilder zeigen deutlich, dass einige große Partikel die Hälfte und mehr der Fläche eines Kleinquadrates verdecken können.



Abb. 3-11: Aufnahmen von zwei Fallproben bei 400-facher Vergrößerung

Die Zusammensetzung der Proben variierte stark. Einige Bestandteile von Pilzen konnten Gattungen zugeordnet werden, wie ein abgerissener Konidiophor von *Penicillium sp.* oder Konidien von *Cladosporium sp.*

Für die Zählung von Bakteriensuspensionen gilt, dass Zählkammern mit der hier verwendeten Größe bei einer Konzentration geringer als $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml ungenau werden (Süßmuth et al. 1987). Dies entspricht einer Gesamtsporenzahl im Staub von $4 \cdot 10^{11}$ Sporen/kg. Die hier ermittelten Gesamtsporenzahlen liegen in einem Bereich von 6,7 bis $578,3 \cdot 10^9$ Sporen/kg (Tab. 3-8) und nur eine Probe befindet sich oberhalb des empfohlenen Wertes. Aufgrund der Probleme mit Überlagerungen durch größere Partikel konnte nicht mehr Staub pro Zählkammervolumen eingesetzt werden. Eine weitere Fraktionierung des Staubs z. B. durch Filtration der Suspension stellt keine sinnvolle Alternative dar. Es würden neben störenden Partikeln auch große Pilzsporen (z. B. von *Alternaria spp.* und *Fusarium spp.*) entfernt werden und weitere Verluste durch Anhaftung von Sporen am Filtermaterial entstehen. Die hier ermittelten Gesamtsporenzahlen müssen als ungenau betrachtet werden

und können nur bedingt in die Vergleiche einfließen. Der Vergleich zur Lebendkeimzahl wird in Kapitel 3.1.3 und der Vergleich zu den chemischen Indikatoren im Kapitel 4.2 diskutiert.

3.1.3 Vergleich der Methoden – Lebendkeimzahl vs. Gesamtsporenzahl

Die Gesamtsporenzahl korrelierte signifikant mit der Lebendkeimzahl auf DG18-Agar (Rangkorrelation nach Spearman, $P = 0,014$), aber nur schwach mit der auf Malzextrakt-Agar nachgewiesenen Lebendkeimzahl ($P = 0,057$). Dies erklärt sich bereits durch die Tatsache, dass auf DG18-Agar tendenziell höhere Lebendkeimzahlen als auf Malzextrakt-Agar nachgewiesen wurden. Während die 29 Proben aufgrund der Auswahl des Kollektivs eine ansteigende Lebendkeimzahl (DG18) aufweisen, zeigt die Gesamtsporenzahl keinen ansteigenden Trend (Abb. 3-12). Der Anteil der Lebendkeime (DG18) an der zugehörigen Gesamtsporenzahl reicht von 0,04 bis 90,0 %. Diese große Spannweite zeigt, dass das Verhältnis von Lebendkeimzahl zu Gesamtsporenzahl sehr stark variieren kann und die Konzentrationen somit scheinbar nicht den gleichen Einflüssen unterliegen.

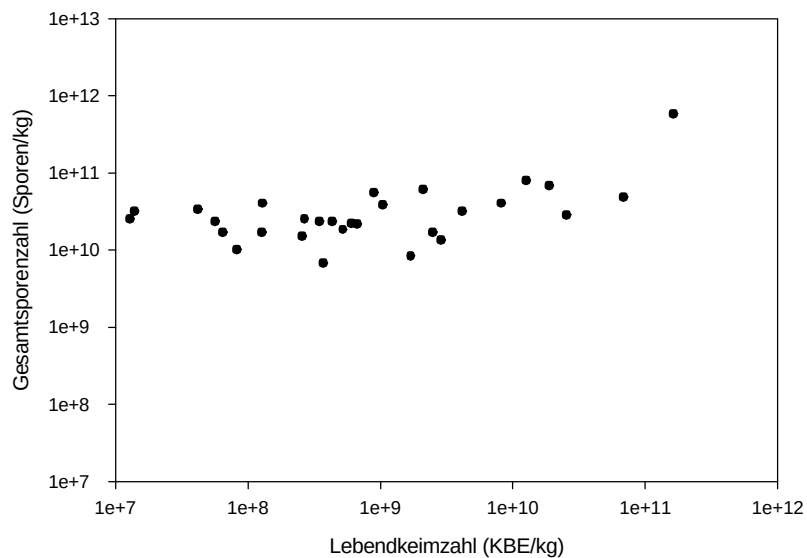


Abb. 3-12: Vergleich der Lebendkeimzahl (bestimmt auf DG18) mit der Gesamtsporenzahl in 29 ausgewählten Staubproben

Die beiden Methoden liefern sehr unterschiedliche Informationen über den Pilzgehalt von Hausstaub. Während mit der Lebendkeimzahl nur die keimfähigen und von den verwendeten Nährböden unterstützten Sporen und Hyphenfragmente nachweisbar sind, erfasst die

Gesamtsporenzahl auch die abgestorbenen oder nicht mehr keimfähigen Sporen. Der Verlust der Keimfähigkeit kann durch Desinfektionsmaßnahmen, den Einsatz von fungiziden Mitteln, durch Alterungsprozesse oder durch hohe UV-Einstrahlung (z. B. bereits in der Außenluft) erfolgen (Trautmann 2006). Die Anfälligkeit gegenüber diesen Einflussfaktoren ist gattungs- oder artspezifisch, so dass beim alleinigen Nachweis der Lebendkeimzahl die widerstandsfähigsten Gattungen/Arten selektiert werden (Näsman et al. 1999). Ein Zusammenhang zwischen einem sehr geringen Anteil an Lebendkeimen von der Gesamtsporenzahl und dem Vorkommen des fungiziden Wirkstoffs Pentachlorphenol (PCP) ist nicht zu erkennen (s. auch Kap. 4.1). In 14 Proben liegt die PCP-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze und in den übrigen Proben ist die Konzentration sehr gering (0,2 - 0,76 mg/kg).

Außer diesen äußeren Einflüssen sind auch analytische Fehler für die Diskrepanzen zwischen Lebendkeimzahl und Gesamtsporenzahl verantwortlich. Beide Bestimmungen wurden mit derselben Suspension (10 mg gesiebter Staub pro ml) durchgeführt. Bei der Lebendkeimzahlbestimmung wird je nach Verdünnung 1 µg bis 1 mg Staub pro Nährboden aufgetragen und ausgewertet. Aufgrund der geringen Größe der Zählkammer und der erforderlichen Verdünnung erfolgt die Zählung der Gesamtsporen in 120 ng Hausstaub. Diese extrem geringe Menge ist trotz guter Homogenisierung der Suspension u. U. nicht mehr repräsentativ für die Gesamtprobe. Hinzu kommen die Unsicherheiten bei der Bestimmung der Gesamtsporenzahl, die bereits unter 3.1.2 geschildert wurden. Zu diesem Schluss kommen auch Durand et al. (2002), die zwar mit Luftproben gearbeitet haben, aber ebenfalls starke Variationen im Verhältnis der beiden Messparameter von Ort zu Ort nachwiesen. Es gibt bisher keine Untersuchungen darüber, in welchem Maße die extranalytischen und analytischen Einflüsse auf die Gesamtsporenzahl und das Verhältnis der Lebendkeim- zur Gesamtsporenzahl wirken. Somit kann mit der Bestimmung eines Parameters keine Vorhersage zur Konzentration des jeweils anderen Parameters erfolgen (Eduard und Heederick 1998).

Für die Untersuchung des Pilzgehaltes in der Innenraumluft hat sich sowohl die Lebendkeimzahl- als auch die Gesamtsporenzahl-Bestimmung durchgesetzt. Welche Methode zum Einsatz kommt oder ob beide Methoden angewendet werden, hängt von der Fragestellung ab. Derjenige, der die Ergebnisse und in der Folge den Innenraum bewertet, muss berücksichtigen, welche Informationen die eingesetzte Methode liefern kann und wo die Grenzen sind. Da auch nicht mehr keimfähige Sporen und Hyphen gesundheitliche Beeinträchtigungen in Form von Allergien usw. verursachen können, ist die Gesamtsporenzahl

besser für Expositionsabschätzungen geeignet (Eduard und Heederik 1998). Sinnvoll ist die Bestimmung der Gesamtsporenzahl auch dann, wenn eine Sanierung mit Desinfektionsmaßnahmen kontrolliert oder ein Altschaden beurteilt werden soll (Trautmann 2006). Der aufgrund seiner potentiellen toxischen Wirkung für die Innenraum-Bewertung wichtige Pilz *Stachybotrys chartarum* ist nur schwer kultivierbar. Daher wird der Pilz bei der Lebendkeimbestimmung in Luft und Hausstaub häufig nicht nachgewiesen. Aufgrund seiner charakteristischen Sporen kann er mikroskopisch gut zugeordnet werden und wird bei der Gesamtsporenbestimmung eher erkannt (Portnoy et al. 2001). Im Gegensatz dazu können viele Sporen aufgrund ihres ähnlichen Aussehens bei der Mikroskopie nur grob ihren Gattungen oder Gruppen zugeordnet werden. So müssen z. B. Sporen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* zusammen erfasst werden (Godish und Godish 2007). Der entscheidende Vorteil der Lebendkeimbestimmung ist die Möglichkeit, die vorkommenden Pilze bis zur Art zu differenzieren. Allerdings liegen die Ergebnisse aufgrund der Wachstumszeit erst nach bis zu 10 Tagen vor, wohingegen die Gesamtsporenzahl am gleichen Tag der Probenahme bestimmt werden kann.

Tab. 3-9: Vergleich der Lebendkeimzahl und Gesamtsporenzahl in einer Fallprobe

	Gesamtsporenzahl ($\cdot 10^6$ Sporen/kg)	Lebendkeimzahl ($\cdot 10^6$ KBE/kg)	
		DG18	ME
Anzahl	578.333	164.000	500
Beobachtungen	reichlich Sporen Typ <i>Aspergillus/Penicillium</i> , zahlreiche Sporen von <i>Scopulariopsis sp.</i> , vereinzelt <i>Chaetomium sp.</i> (Abb. 3-13)	massenhaft <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Eurotium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> und <i>Wallemia sebi</i> , kein <i>Rhizopus stolonifer</i> nachweisbar	alle Verdünnungen vollständig von <i>Rhizopus stolonifer</i> überwuchert

Am Beispiel einer Fallprobe werden die unterschiedlichen Ergebnisse, die mit beiden Methoden erzielt wurden, deutlich (Tab. 3-9). Die mikroskopisch erfassten Sporen von *Scopulariopsis sp.* und *Chaetomium sp.* (Abb. 3-13) wurden mit der Lebendkeimzahlbestimmung nicht nachgewiesen, da die Malzextrakt-Nährböden, auf denen beide Arten bevorzugt bzw. ausschließlich wachsen, in allen Verdünnungen vollständig mit *Rhizopus stolonifer* überwuchert waren. Auf der anderen Seite konnte bei der Mikroskopie nicht unterschieden werden, zu welcher Gattung oder Art die Sporen gehören, die als Typ *Aspergillus/Penicillium* erfasst wurden.

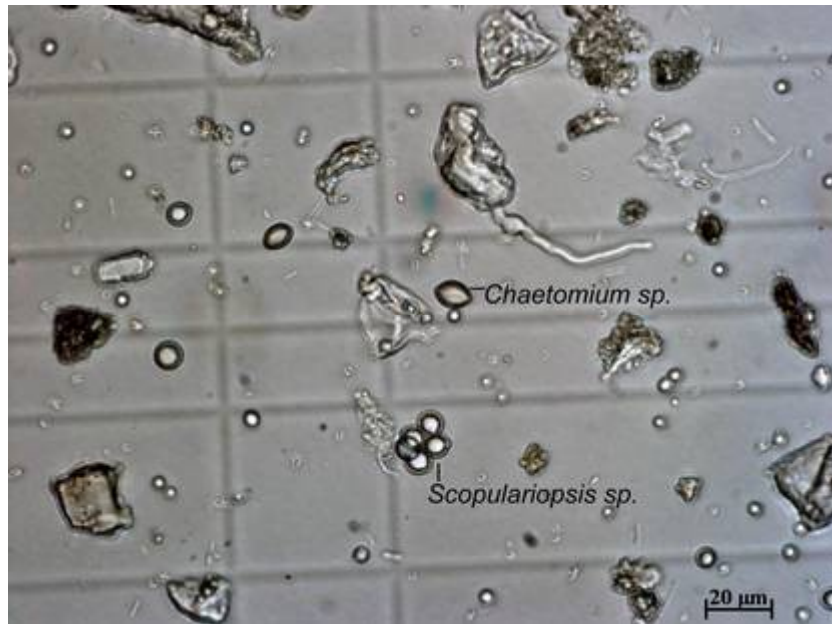


Abb. 3-13: Aufnahme einer Fallprobe (Tab. 3-9) bei 400-facher Vergrößerung

3.2 Chemische Indikatoren im Hausstaub

3.2.1 Quantifizierung von Ergosterin

Die Analyse von Ergosterin wurde im gesamten Probenkollektiv ($n = 354$) durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag bei 1,27 mg/kg und die Bestimmungsgrenze bei 5,04 mg/kg. Alle Werte, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurden als halbe Nachweisgrenze, also 0,6 mg/kg, gerechnet (Becker et al. 2003). Ein typisches Chromatogramm ist in Abb. 3-15 dargestellt.

Die Präzisionskontrolle wurde an einer Kontrollprobe mit einem mittleren Ergosteringehalt durchgeführt. Die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) betrug für die Wiederholpräzision 4,07 % (Abb. 3-14) und für die Vergleichspräzision 7,08 % ($\bar{x} = 6,52$ mg/kg). Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde dotierter Poolstaub 16-mal aufgearbeitet und jeweils doppelt bestimmt. Bei einer Dotierung von 20 mg Ergosterin pro g Staub ergab sich eine Wiederfindungsrate von 63,1 %. Die Methode ist präzise, zeigt aber keine optimale Wiederfindung.

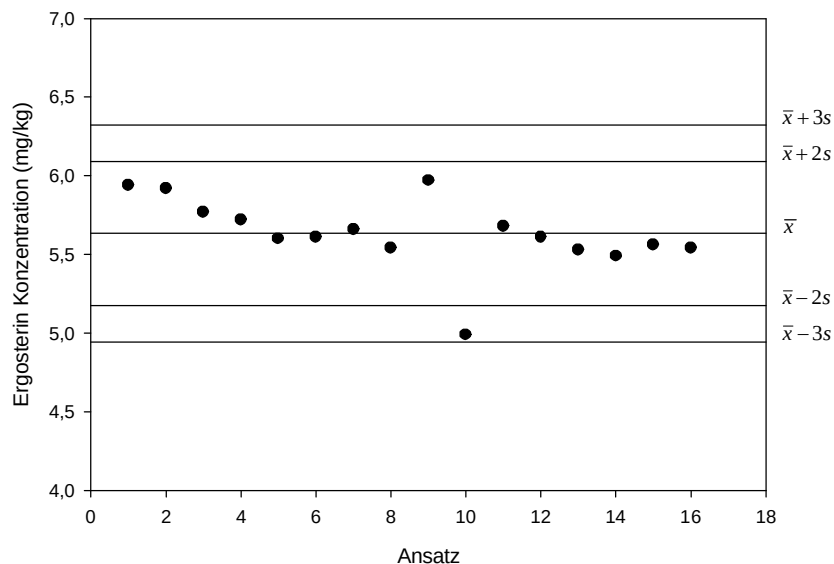


Abb. 3-14: Wiederholpräzision einer Kontrollprobe mit einer mittleren Ergosterin-Konzentration

($\bar{x} = 5,63$ mg/kg, $s = 0,23$ mg/kg, $n = 16$). Für diese Werte liegt kein Trend vor (Trend-Test nach Neumann).

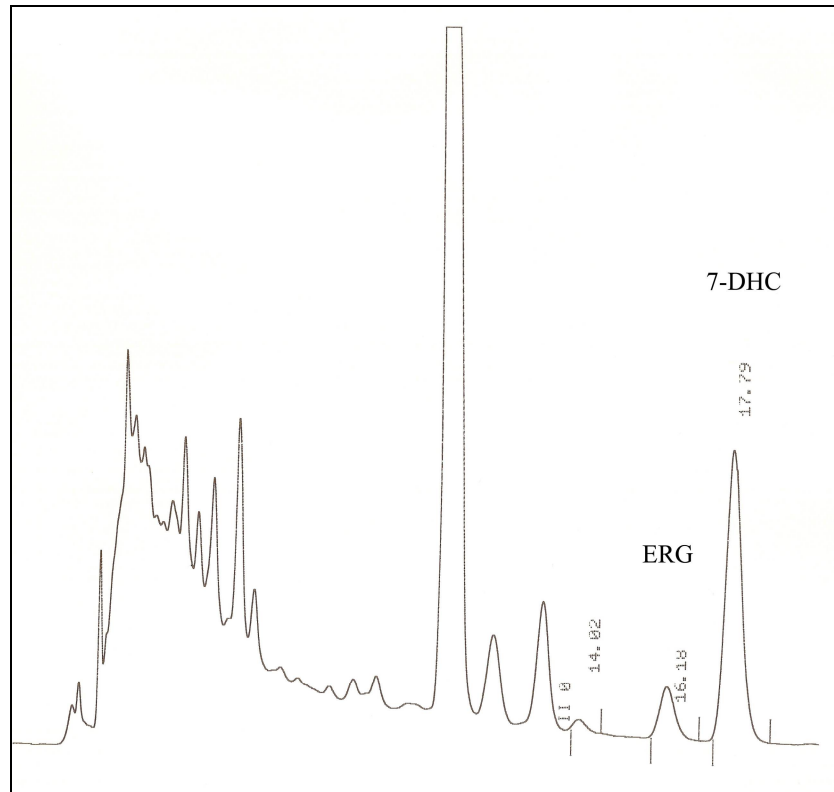


Abb. 3-15: Chromatogramm einer Kontrollprobe mit 11,12 mg/kg Ergosterin

Die Retentionszeit für Ergosterin (ERG) betrug 16,18 min und die für 7-Dihydrocholesterin (7-DHC) 17,79 min.

Die Daten waren nicht „normal-verteilt“ (Kolmogoroff-Smirnoff Test, $P < 0,05$) und wiesen eine rechts-schiefe Verteilung auf. Im Gegensatz zur Lebendkeimzahl hat auch die Logarithmus-Transformation für die Ergosterin-Konzentration im Hausstaub keine Normal-Verteilung ergeben. Aus diesem Grund wurden nicht parametrische Tests für weitere Berechnungen angewendet.

Tab. 3-10: Statistische Kenngrößen der Ergosterin-Konzentration in Kontroll- und Fallproben

(mg/kg)	Kontrollen	Fälle
Anzahl	201	153
Mittelwert	6,07	6,99
Median	4,91	4,69
Minimum	0,60	0,60
Maximum	25,14	63,16
95. Perzentil	16,46	24,65

Die Konzentration von Ergosterin ist in den Fallproben nicht signifikant höher als in den Kontrollproben (U-Test nach Mann-Whitney, $P = 0,368$) (Tab. 3-10). Wie für die Lebendkeimzahl wurde aus dem sinnvoll gerundeten 95. Perzentil der Kontrollproben ein Referenzwert abgeleitet, der bei 16,5 mg/kg lag. Mit diesem Wert wären 12 Fallproben richtig erfasst worden, was einer Sensitivität von 7,8 % entspricht. Bereits die relative Häufigkeitsverteilung zeigt (Abb. 3-16), dass sich die Konzentrationsbereiche der Fall- und Kontrollproben nahezu vollständig überlappen. Mit Hilfe der Bestimmung von Ergosterin im Hausstaub kann somit nicht zwischen Haushalten mit und ohne Pilzbefall unterschieden werden. Die Methode selbst ist relativ präzise und empfindlich, so dass die Gründe für die schlechte Trenneffizienz eher extraanalytischen Einflüssen unterliegen (Kap. 4.1 und 4.2). Ein Abbau von Ergosterin während der Lagerung der Staubproben bis zur Analyse kann ausgeschlossen werden, da die Proben in braunen Glasflaschen in einem Schrank aufbewahrt wurden. Ergosterin wird durch UV-Strahlung photochemisch abgebaut, aber bleibt im Dunkeln lange stabil (Mille-Lindblom et al. 2004).

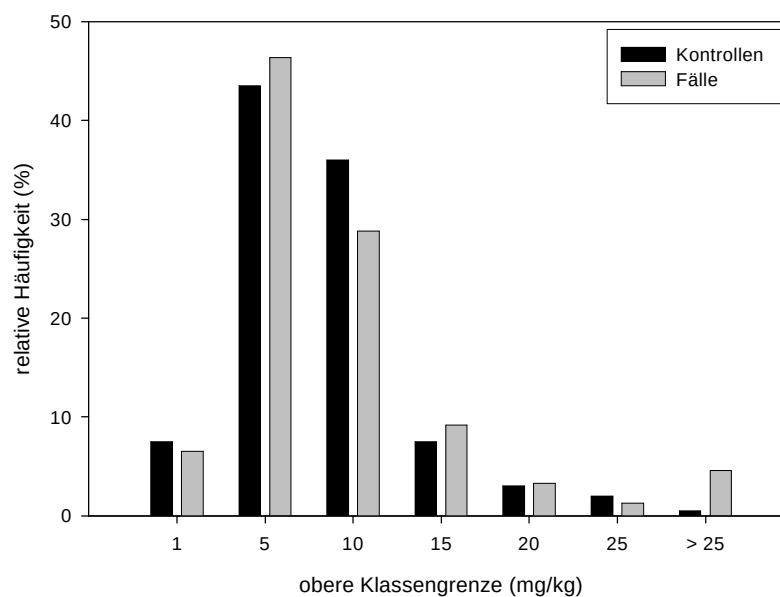


Abb. 3-16: Relative Häufigkeit (%) der Ergosterin-Konzentration (mg/kg) in Kontroll- und Fallproben

Der Ergosterin-Nachweis im Hausstaub mit Hilfe der HPLC und UV-Detektion wurde bisher selten angewendet. Dharmage et al. (1999) haben Hausstaubproben aus 447 Wohnungen auf den Gehalt an Ergosterin untersucht. Dazu wurde Frischstaub mit einem Handstaubsauger gesammelt, der mit einem 25 µm Nylonfilter ausgestattet war. Die Extraktion von Ergosterin erfolgte in der ≤ 25 µm Fraktion mit eiskaltem Ethanol ohne alkalische

Hydrolyse. Auf diese Weise wurde nur das freie Ergosterin aus den Zellen herausgelöst und nicht das mit Fettsäuren veresterte Ergosterin. Letzteres wird erst durch die alkalische Hydrolyse, wie sie hier durchgeführt wurde, mit erfasst. Der Anteil des freien Ergosterins an der Biomasse schwankt zwischen verschiedenen Pilzarten stärker als die Konzentration des gesamten Ergosterins (Newell 1994), was bei Proben mit variierender Artenzusammensetzung zu einer stärkeren Streuung der Ergosterin-Konzentrationen und einer schlechteren Beschreibung der Pilz-Biomasse führt. Trotz der methodischen Unterschiede bei der Probenahme, der Aufarbeitung und der Extraktion stimmen die Ergebnisse beider Studien gut überein (Tab. 3-11). Im Gegensatz zu der hier angewendeten Analyse von Ergosterin im Altstaub konnten Dharmage et al. (1999) mit der Bestimmung von Ergosterin im Frischstaub signifikant ($P < 0,05$) höhere Konzentrationen in Haushalten mit sichtbarem Pilzbefall und Feuchteflecken als in Haushalten ohne diese Auffälligkeiten nachweisen. Wie beim Nachweis der Lebendkeimzahl (Kap. 3.1.1) scheint auch in Bezug auf Ergosterin die Untersuchung von Frischstaub besser geeignet zu sein, um die Anwesenheit eines intramuralen Pilzbefalls zu erkennen. Die weitere Diskussion zu diesem Thema erfolgt in den Kapiteln 4.1 und 4.2.

Tab. 3-11: Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse der Ergosterin-Konzentration im Hausstaub zur Studie von Dharmage et al. (1999)

NWG = Nachweisgrenze

	Probenzahl	Proben < NWG (%)	Median (mg/kg)	Spannweite (mg/kg)
Eigene Studie	354	7,9	4,81	0,6 – 63,1
Dharmage et al. 1999	447	10	3,8	0 – 61,5

In anderen Arbeiten wurde das gesamte Ergosterin – ebenfalls nach alkalischer Hydrolyse – mit Hilfe der Gaschromatographie mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie in Hausstaub nachgewiesen (Saraf et al. 1997 und 1999, Sebastian und Larsson 2003, Park et al. 2008). Die genannten Autoren haben allerdings Frischstaub mit einem Staubsauger auf Filtern gesammelt und die Analyse in der $\leq 400 \mu\text{m}$ Fraktion durchgeführt, was die Vergleichbarkeit zu den vorliegenden Ergebnissen stark einschränkt. Die zitierten Autoren sind sich einig, dass Ergosterin ein geeigneter Indikator zu Beschreibung der Pilzbiomasse im Staub darstellt. Allerdings wurde in keiner dieser Arbeiten die Aussagekraft der Ergosterinkonzentration der Staubproben in bezug auf das Vorliegen eines Pilzbefalls unter-

sucht. Park et al. (2008) haben hingegen eine Assoziation des Ergosteringehalts in Hausstaubproben ($n = 323$) aus einem wassergeschädigten Bürogebäude mit erworbenem Asthma bei den Angestellten nachweisen können.

In den aufgeführten Studien anderer Autoren wurden keine Validierungsversuche für den Nachweis von Ergosterin im Hausstaub beschrieben. Somit ist der Vergleich nur mit der Bestimmung von Ergosterin in anderen Matrices, wie z. B. Lebensmitteln und Bodenproben möglich. Die Extraktionseffizienz wird von Seitz et al. (1977) für Getreide mit 93 % und von Grant und West (1986) für Boden mit 88 – 96 % angegeben. Die hier ermittelte Wiederfindungsrate von 63,1 % erscheint im Vergleich zu diesen Angaben und zur hohen Präzision der Methode relativ gering. Sowohl die zitierten als auch die eigene Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe von Ergosterinstandard zur Matrix ermittelt, was nur die Verlustrate während der Extraktion, aber nicht die Ausbeute des Analyten aus der eigentlichen Matrix prüft (Davis und Lamar 1992). Die hohen Wiederfindungsraten von Seitz et al. (1977) und Grant und West (1986) sprechen dafür, dass die angewendete Extraktionsmethode keine hohen Verlustraten birgt. In den zitierten Studien wurde die Matrix zunächst mit Methanol extrahiert, die Matrix abfiltriert und nur der methanolische Extrakt alkalisch hydrolysiert. Die alkalische Hydrolyse der Hausstaubproben hingegen erfolgte in Anwesenheit der Matrix. Davis und Lamar (1992) haben festgestellt, dass die Wiederfindungsrate von Ergosterin in Bodenproben höher ist, wenn die Pilzzellen während der alkalischen Hydrolyse noch vorhanden sind. Sie haben eine Wiederfindungsrate von 96 % ermittelt, nachdem sie zu den Bodenproben Pilzgewebe mit bekanntem Ergosteringehalt gegeben haben. Bei der Dotierung der Bodenproben mit Ergosterinstandard ergab sich eine Wiederfindungsrate von nur 76 %. Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass die Wiederfindungsrate bei der hier gewählten Extraktionsmethode höher sein müsste. Die relativ niedrige Wiederfindungsrate kann daher nur noch mit Fehlern in der Dotierung und Aufarbeitung erklärt werden.

3.2.2 Nachweis von 1,3- β -D-Glucan

In dem gleichen Unterkollektiv ($n = 29$), in dem die Gesamtsporenzahl bestimmt wurde (Kap. 3.1.2), wurde 1,3- β -D-Glucan mit Hilfe des *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-Tests (LAL-Test) nachgewiesen. Die Daten waren „normal-verteilt“ (Kolmogoroff-Smirnoff Test, $P = 0,724$). Die statistischen Kenngrößen zur Bestimmung von 1,3- β -D-Glucan sowie der Bereich der Messwerte (Minimum, Maximum) sind Tab. 3-12 zu entnehmen. Die

Nachweisgrenze wurde bei 0,1 mg/kg Hausstaub angesetzt. Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde Poolstaub sechsfach aufgearbeitet und doppelt bestimmt. Bei einer Dotierung mit 40 mg Glucan-Standard pro kg gesiebttem Staub wurde eine Wiederfindungsrate von 71,7 % erzielt. Die Wiederholpräzision wurde in einer Kontrollprobe mit einer relativ hohen Konzentration an 1,3- β -D-Glucan ermittelt (Abb. 3-17). Alle Ansätze und Parallelen wurden auf dieselbe Multititerplatte aufgetragen. Der Variationskoeffizient lag bei 8,23 %, so dass die Methode an sich als relativ präzise und empfindlich beschrieben werden kann. Iossifova et al. (2007) geben einen Variationskoeffizienten von 9 % innerhalb einer Mikrotiterplatte und von 27 % zwischen zwei Platten an.

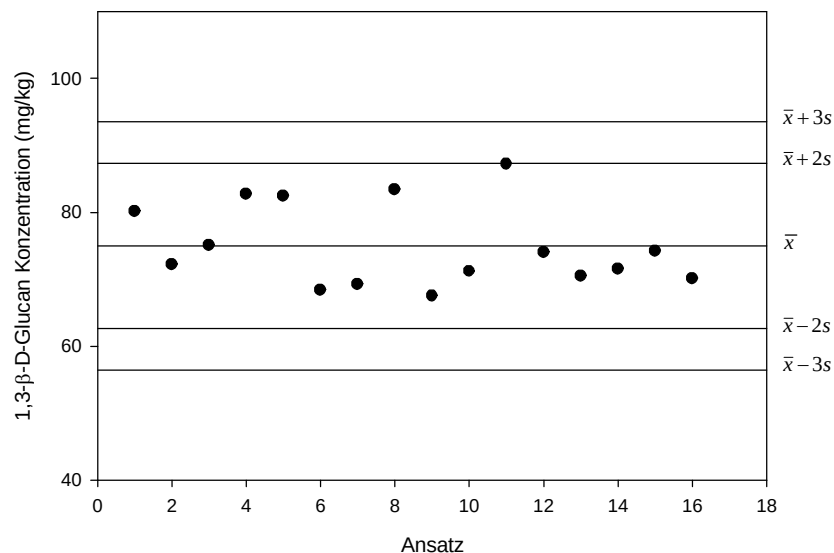


Abb. 3-17: Wiederholpräzision einer Kontrollprobe mit einem relativ hohen 1,3- β -D-Glucan-Konzentration ($\bar{x}$ = 75,0 mg/kg, s = 6,17 mg/kg, n = 16). Für diese Werte liegt kein Trend vor (Trend-Test nach Neumann).

Tab. 3-12: Statistische Kenngrößen der Bestimmung der Konzentration von 1,3- β -D-Glucan in 21 Kontroll- und 8 Fallproben

	1,3- β -D-Glucan (mg/kg)
Anzahl	29
Mittelwert	49,0
Standardabweichung	3,3
Minimum	16,8
Maximum	96,2
95. Perzentil	88,7

Es gibt nur wenige Studien über den Nachweis von 1,3- β -D-Glucan im Hausstaub und meistens erfolgte die Bestimmung mit Hilfe eines Enzymimmunoassays (Douwes et al. 1996, Chew et al. 2001, Gehring et al. 2001, Schram-Bijkerk et al. 2006, Giovannangelo et al. 2007). Zwischen diesen Studien ist ein Vergleich der Ergebnisse kaum möglich, da die Vorgehensweise bei der Probenahme, der Aufarbeitung des Staubs und der Extraktion stark voneinander abweichen. Der Nachweis mit Hilfe des LAL-Tests wurde im Hausstaub sehr selten angewendet, obwohl der Test wesentlich empfindlicher als die Enzymimmunoassays ist (Douwes 2005). Iossifova et al. (2007) haben 1,3- β -D-Glucan in der $\leq 335 \mu\text{m}$ Fraktion von Frischstaub aus Kinderzimmern ($n = 574$) nachgewiesen. Trotz der anderen Fraktion und der Verwendung von Frischstaub sind die Ergebnisse mit den hier vorliegenden Daten vergleichbar (Tab. 3-13). Theoretisch sind im Altstaub (Anreicherung) und in der kleineren Fraktion (Aufkonzentrierung) höhere Konzentrationen zu erwarten. Ein Abbau oder Zerfall von 1,3- β -D-Glucan während der Zeit im Staubsaugerbeutel bzw. während der Lagerung des gesiebten Staubs ist als Grund auszuschließen, da 1,3- β -D-Glucan eine relativ stabile Substanz ist (Fogelmark und Rylander 1997).

Iossifova et al. (2007) konnten keinen Zusammenhang zwischen der Konzentration von 1,3- β -D-Glucan im Hausstaub und dem Vorhandensein von Pilzbefall im beprobten Zimmer nachweisen. Mit den Werten aus der hier vorliegenden Untersuchung war ebenfalls keine Trennung zwischen Kontroll- und Fallproben möglich (Abb. 3-18), was allerdings auch am geringen Probenumfang (8 Fälle, 21 Kontrollen) liegen kann. Eine weitere Diskussion erfolgt im Vergleich mit den anderen Methoden in Kapitel 4.2.

Tab. 3-13: Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse der 1,3- β -D-Glucan-Konzentration im Hausstaub zur Studie von Iossifova et al. (2007)

	Probenzahl	Mittelwert (mg/kg)	Standard- abweichung (mg/kg)	Interquartils- bereich (mg/kg)
Eigene Studie	29	49,0	3,3	34,0 – 56,3
Iossifova et al. 2007	574	55,1	3,7	21,9 – 133,5

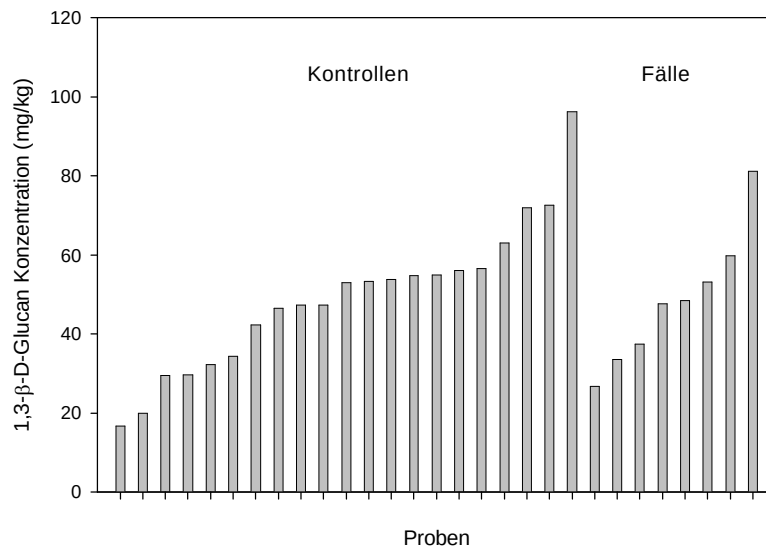


Abb. 3-18: Konzentration von 1,3-β-D-Glucan (mg/kg) in 21 Kontroll- und 8 Fallproben

3.2.3 Aktivitätsbestimmung von N-Acetyl-β-D-glucosaminidase

Die Aktivitätsbestimmung von N-Acetyl-β-D-glucosaminidase wurde in demselben Unterkollektiv (n = 29) durchgeführt wie der Nachweis der Gesamtsporenzahl (Kap. 3.1.2) und von 1,3-β-D-Glucan (Kap. 3.2.2). Die Daten waren „normal-verteilt“ (Kolmogoroff-Smirnoff Test, P = 0,923). Die Nachweisgrenze wurde nicht bestimmt. Im Handbuch des MycoMeter-Tests™ wird angegeben, dass Mykometer-Werte ≤ 25 einer Hintergrundbelastung an Schimmelpilzen entsprechen. Legt man die Nachweisgrenze willkürlich auf einen Mykometer-Wert von 10 fest, ergibt sich nach dem hier ermittelten Umrechnungsfaktor (Kap. 2.3.3) eine Nachweisgrenze von 8,4 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{kg}$. Die im Handbuch angegebenen Bewertungskriterien beziehen sich auf den Abstrich einer Oberfläche von 9 cm² und können daher nicht für die Beurteilung der Hausstaubproben angewendet werden. Die statistischen Kenngrößen der Messwerte befinden sich in Tab. 3-14.

Die graphische Darstellung (Abb. 3-19) lässt bereits erkennen, dass mit der Bestimmung der NAGase-Aktivität nicht zwischen Kontroll- und Fallproben unterschieden werden kann. Aufgrund der geringen Probenzahl ist dies keine allgemeingültige Aussage. Auffällig ist allerdings, dass 5 Fallproben die geringste Enzymaktivität aller Proben aufweisen. Es ist nicht auszuschließen, dass im Hausstaub Substanzen enthalten sind, die hemmend auf die Enzymaktivität wirken oder Quenching-Effekte verursachen. Nach Kenntnis der Autorin

wurden bisher keine Aktivitätsbestimmungen von NAGase in Hausstaub durchgeführt, so dass ein Vergleich mit anderen Studien entfällt.

Tab. 3-14: Statistische Kenngrößen der Aktivitätsbestimmung von N-Acetyl- β -D-glucosaminidase in 21 Kontroll- und 8 Fallproben

Die Aktivität wurde berechnet als Menge (μmol) des entstehenden Produkts 4-Methylumbelliferon (4-MU) pro Minute und kg Hausstaub.

	NAGase-Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{kg}$)
Anzahl	29
Mittelwert	297,1
Standardabweichung	30,1
Minimum	55,1
Maximum	576,9
95. Perzentil	576,2

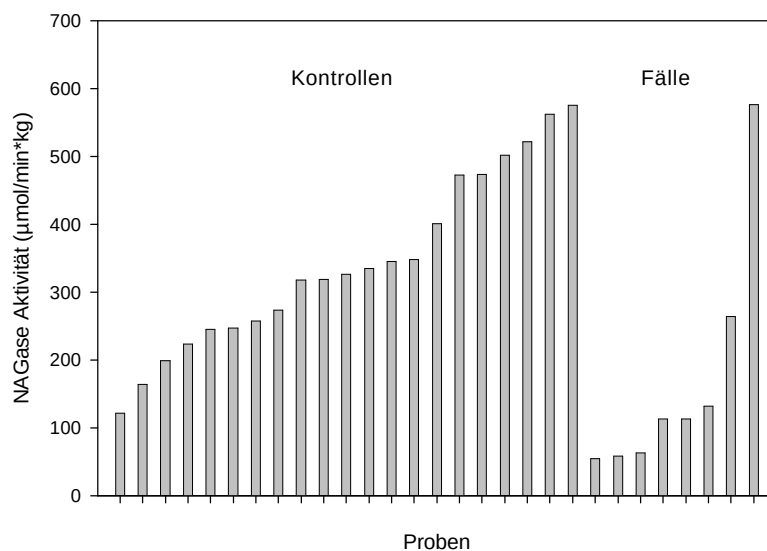


Abb. 3-19: Aktivität von N-Acetyl- β -D-glucosaminidase ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{kg}$) in 21 Kontroll- und 8 Fallproben

Der MycoMeter-TestTM wird überwiegend für den Nachweis von Schimmelpilzwachstum auf Oberflächen von Baumaterialien eingesetzt. Dafür wird ein Abstrich von einer definierten Fläche genommen, so dass kaum störende Substanzen in das Testsystem gelangen. Madsen (2003) hat die NAGase-Aktivität in luftgetragenen Staub untersucht, der bei

staubintensiven Arbeiten z. B. im Anlieferungsbereich von Biogasanlagen entsteht. Eine Lagerung der Proben über einen Zeitraum von 40 Tagen bei Raumtemperatur führte nur zu einem geringen und statistisch nicht signifikanten Rückgang der Enzymaktivität. Allerdings konnte Madsen (2003) nachweisen, dass der Zeitraum, in dem der Staub auf Filter gesammelt wird, einen Einfluss auf die NAGase Aktivität hat. Proben, die über zweimal 4 Stunden gesammelt wurden, enthielten höhere Aktivitäten als Proben, die einmal 8 Stunden gesammelt wurden. Somit hat also weniger die Lagerung des Hausstaubs im Staubsaugerbeutel und im Labor als die Häufigkeit und Länge des Staubsaugerbetriebs einen reduzierenden Einfluss auf die Enzymaktivität.

Der Vergleich mit den anderen Methoden und die Aussagekraft der Methode werden in Kap. 4.2 diskutiert.

3.3 Ochratoxin A im Hausstaub

3.3.1 Nachweis von Ochratoxin A mittels Enzymimmunoassay

In einem Kollektiv von 157 Kontrollen und 123 Fallproben wurde Ochratoxin A (OTA) mit Hilfe eines für die Lebensmitteluntersuchung bestimmten Enzymimmunoassays bestimmt. Die Nachweisgrenze wurde im abknickenden Bereich der Kalibrierkurve auf 20 ng/L festgelegt, was einer Ochratoxin A Konzentration im Hausstaub von 0,4 µg/kg entspricht.

Tab. 3-15: statistische Kenngrößen der Varianzanalyse der Präzision für die doppelte Bestimmung und Aufarbeitung beim Nachweis von Ochratoxin A mittels ELISA

Die Dotierung betrug 2,4 µg/kg.

	doppelte Bestimmung	doppelte Aufarbeitung
nicht dotiert		
Spannweite	0,74 – 5,95	
Mittelwert (µg/kg)	1,86	1,86
Standardabweichung (µg/kg)	0,19	0,26
Variationskoeffizient (%)	10,4	13,9
Anzahl	40	20
dotiert		
Mittelwert (µg/kg)	4,63	4,63
Standardabweichung (µg/kg)	0,53	0,28
Variationskoeffizient (%)	11,3	6,0
Anzahl	39	19

Die Präzisionskontrolle und die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden anhand von 20 Proben durchgeführt. Unter den Werten der dotierten Proben befand sich ein Ausreißer (Test nach Grubbs), der von der weiteren Berechnung ausgeschlossen wurde. Die Variationskoeffizienten lassen einzeln betrachtet auf eine relativ präzise Methode schließen (Tab. 3-15). Eine etwas stärkere Variation bei der doppelten Aufarbeitung im Gegensatz zur doppelten Bestimmung ist zu erwarten und hat sich bei den Proben ohne Dotierung bestätigt. Bei den dotierten Proben ist das Verhältnis der Variationskoeffizienten allerdings umgekehrt, was auf Pipettierfehler bei der Dotierung oder eine unterschiedlich effiziente

Extraktion des dotierten Standards aus der Probe schließen lässt. Die OTA-Standardlösung wurde einmalig einem größeren Volumen des NaHCO_3 -Puffers zugesetzt, mit dem anschließend die entsprechenden Staubpartitionen extrahiert wurden.

Der Mittelwert der Wiederfindungsrate betrug 115,1 % und die Spannweite reichte von 45,8 bis 239,6 %. Im Vergleich dazu haben Giray et al. (2009) in Maisproben unter Verwendung des gleichen Testkits (R-BIOPHARM AG) eine Wiederfindungsrate von $65 \pm 1,5$ % ermittelt. Die extremen Schwankungen mit Wiederfindungsraten weit über 100 % lassen auf Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Staubinhaltsstoffen, auf Matrixeffekte und/oder den Einfluss anderweitiger Störsubstanzen auf die Immunreaktion schließen, so dass falsch-positive Ergebnisse oder Überbefunde entstehen. Diese Störeffekte basieren auf nieder- und mittelaaffinen Bindungen zwischen unterschiedlichen Bestandteilen der Probe, der Reagenzien und der Antikörper (Rauch 2005). Mit einer Aufreinigung der Extrakte hätten zumindest die Einflüsse anderer Staubbestandteile minimiert werden können. Hausstaub weist von Haushalt zu Haushalt extreme Variationen in der Zusammensetzung auf, was wiederum zu starken Variationen in den Störeinflüssen führen kann. Im Vergleich dazu kann man Getreideproben eine gewisse Homogenität unterstellen.

Die OTA-Werte des Kollektivs waren nicht „normal-verteilt“ (Kolmogoroff-Smirnoff Test, $P < 0,05$). Von allen Proben lag nur eine Fallprobe unterhalb der Nachweisgrenze. Weit über 80 % der Proben enthielten zwischen 2 und 7 $\mu\text{g/kg}$ OTA (Abb. 3-20). Es ist nicht davon auszugehen, dass in sämtlichen untersuchten Stäuben OTA vorkommt. Es ist eher wahrscheinlich, dass störende Staubbestandteile zu falsch-positiven Werten führen, wie es bereits bei der Bestimmung der Wiederfindungsrate festgestellt wurde. Im Vergleich dazu lagen bei Giray et al. (2009) 43 % der Getreideproben unterhalb der Nachweisgrenze.

Der Vergleich der statistischen Kenngrößen (Tab. 3-16) sowie der Verteilung (Abb. 3-20) der Konzentrationen zwischen den Fall- und Kontrollproben zeigt nur geringe Unterschiede in den Ergebnissen. Der statistische Test bestätigt dies (U-Test, $P = 0,07$). Auf Basis des 95. Perzentils der Kontrollen kann der Referenzwert für OTA im Hausstaub auf 8,0 $\mu\text{g/kg}$ festgelegt werden. Daraus ergeben sich 7 Kontroll- und 5 Fallproben mit einer erhöhten Konzentration an OTA. Bei dem Nachweis von OTA im Hausstaub geht es nicht wie bei der Lebendkeimzahl oder den chemischen Indikatoren darum, Haushalte mit Pilzbefall von Haushalten ohne Pilzbefall zu unterscheiden. Aus diesem Grund erwartet man von diesem Nachweis keine Trennfähigkeit zwischen Fall- und Kontrollproben. Es geht vielmehr dar-

um, mit OTA belastete Haushalte zu ermitteln. Nach Kenntnis der Autorin wurde OTA bisher nicht mit Hilfe des ELISA im Hausstaub nachgewiesen, so dass hier keine Vergleiche zu anderen Studien gezogen werden können. Die Eignung der Methode wird im Vergleich zum Nachweis mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit anschließender UV-Detektion in Kap. 3.3.3 diskutiert. Eine Gegenüberstellung der gemessenen Mykotoxin-Konzentrationen zu dem Vorkommen der potentiellen Produzenten erfolgt in Kap. 4.3.

Tab. 3-16: Statistische Kenngrößen der Konzentration von Ochratoxin A in Kontroll- und Fallproben (ELISA)

($\mu\text{g/kg}$)	Kontrollen	Fälle
Anzahl	157	123
Mittelwert	4,89	4,51
Median	3,33	3,65
Minimum	1,19	0,40
Maximum	78,0	51,0
95. Perzentil	7,75	7,18

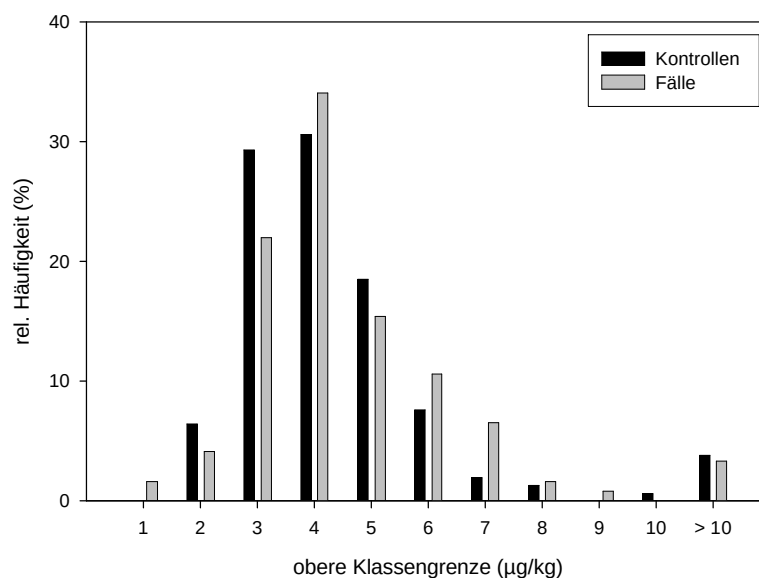


Abb. 3-20: Relative Häufigkeit (%) der Konzentration von Ochratoxin A ($\mu\text{g/kg}$) in Kontroll- und Fallproben, analysiert mit dem ELISA

3.3.2 Nachweis von Ochratoxin A mittels Hochdruckflüssigchromatographie

In einem Unterkollektiv von 93 Proben (Auswahlkriterien in Kap. 2.4.2), bestehend aus 50 Kontrollen und 43 Fällen, wurde Ochratoxin A mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) und anschließender UV-Detektion bestimmt. Ein typisches Chromatogramm ist in Abb. 3-21 dargestellt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,23 µg/kg und die Bestimmungsgrenze bei 0,87 µg/kg. Aufgrund des hohen Preises der Immunoaffinitätsäulen wurde lediglich die Vergleichspräzision aus der doppelten Bestimmung von 16 Proben ermittelt. Der Variationskoeffizient betrug 5,85 % bei einem Mittelwert von 6,70 µg/kg und einer Standardabweichung von 0,39 µg/kg. Außerdem wurde eine Wiederfindungsrate von 78,4 % ermittelt. Die Dotierung betrug 1 µg/kg und der Variationskoeffizient 28,3 % bei einem Mittelwert von 0,78 µg/kg und einer Standardabweichung von 0,28 µg/kg. Die Wiederfindungsrate wurde in 8 verschiedenen Staubproben bestimmt und die Aufreinigung der Extrakte erfolgte in Immunoaffinitätsäulen. Es ist davon auszugehen, dass die Antikörper in den Säulen ähnlich wie beim ELISA den variierenden Störeinflüssen aufgrund der unterschiedlichen Staubzusammensetzung unterliegen (Kap. 3.3.1). Der Variationskoeffizient für die doppelte Bestimmung lässt in erster Linie eine Aussage über die Qualität der Auftrennung in der HPLC und der Detektion zu und ist – wie zu erwarten – relativ gering. Der Variationskoeffizient der Wiederfindungsrate spiegelt auch die Qualität der Extraktion und Aufreinigung von unterschiedlich zusammengesetzten Staubproben wieder. Im Vergleich dazu haben Richard et al. (1999), deren Methode hier adaptiert wurde, eine Wiederfindungsrate von über 90 % ermittelt, die aber auf der Messung von nur zwei dotierten Proben beruht.

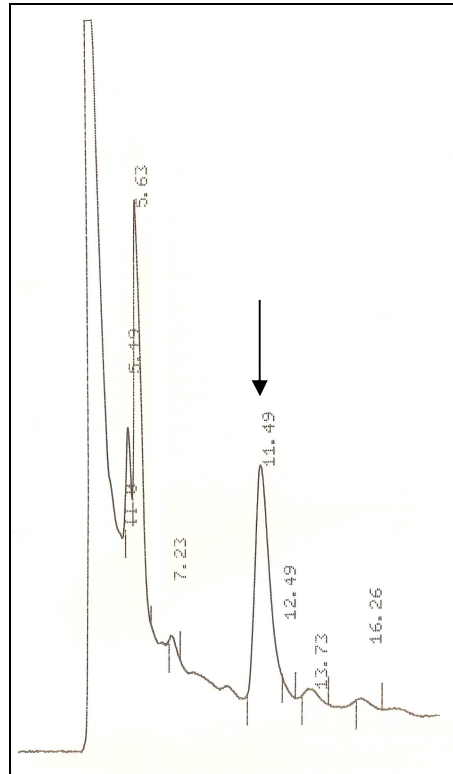


Abb. 3-21: Chromatogramm einer Fallprobe mit 8,44 µg/kg OTA und einer Retentionszeit von 11,49 min

Tab. 3-17: Statistische Kenngrößen der Konzentration von Ochratoxin A in Kontroll- und Fallproben (HPLC-UV)

NWG = Nachweisgrenze

(µg/kg)	Kontrollen	Fälle
Anzahl	50	43
Mittelwert	1,03	1,31
Median = NWG	0,23	0,23
Minimum = NWG	0,23	0,23
Maximum	23,92	14,57
95. Perzentil	7,22	12,13
Anzahl positive Proben	5	8
Spannweite positiver Proben	0,66 – 23,92	0,55 – 14,57

Auch die mit der HPLC und anschließender UV-Detektion ermittelten OTA Werte waren nicht „normal-verteilt“ (Kolmogoroff-Smirnoff Test, $P < 0,05$). Im Gegensatz zum Nachweis mit Hilfe des ELISA, bei dem nur ein Wert unterhalb der Nachweisgrenze lag, war bei der Bestimmung mit der HPLC nur in wenigen Proben OTA messbar (Tab. 3-17). Der vom 95. Perzentil der Kontrollproben abgeleitete Referenzwert lag bei 7,0 µg/kg. Von den

insgesamt 13 positiven Proben lagen 2 Kontroll- und 4 Fallproben oberhalb des Referenzwertes. Kasel et al. (1999) haben ebenfalls Hausstaub auf OTA untersucht. Sie haben 14 Tage alten Staub gesiebt ($\leq 250 \mu\text{m}$), mit Immunoaffinitätssäulen aufgereinigt und die Bestimmung ebenfalls mit der HPLC und UV-Detektion durchgeführt. Der Median lag bei $0,1 \mu\text{g/kg}$ (entsprach der Nachweisgrenze), das 95. Perzentil bei $3,81 \mu\text{g/kg}$ und das Maximum bei $5,1 \mu\text{g/kg}$ ($n = 50$). Die Werte waren insgesamt niedriger als die hier vorgestellten Ergebnisse, da es in dem relativ frischen Staub zu einer geringeren Anreicherung von OTA kam und durch die Verwendung einer gröberen Fraktion OTA weniger aufkonzentriert wurde. Kasel et al. (1999) gehen davon aus, dass die erhöhten Konzentrationen von OTA auf das Wachstum von Schimmelpilzen im Innenraum zurückzuführen sind. Aber sie sehen auch weiteren Forschungsbedarf, um mögliche Sekundärquellen für Mykotoxine im Innenraum nachzuweisen oder auszuschließen. Einige Lebensmittel wie Brot und Gewürze enthalten OTA, aber kommen als Sekundärquelle für OTA im Staub nicht in Frage, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass entsprechend große Mengen solcher Lebensmittel aufgesaugt werden. In einigen stark kontaminierten Gewürzen konnten Maxima von $42 \mu\text{g/kg}$ für Chilipulver und $19 \mu\text{g/kg}$ für Pfeffer nachgewiesen werden (Scheuer und Gareis 2001).

Richard et al. (1999) haben in abgelagertem Staub aus Heizungs-Luftschächten teilweise erhebliche Konzentrationen an OTA nachweisen können. Der Staub wurde mit dem behandschuhten Finger aufgewischt und vollständig zur Analyse eingesetzt. In einem korrodierten Schacht enthielt der Staub $1.581,8 \mu\text{g/kg}$ OTA. Dies zeigt, dass es zu erheblichen Belastungen mit OTA im Innenraum kommen kann.

Ein Vergleich der mit dem ELISA und der HPLC erzielten Ergebnisse erfolgt in Kap. 3.3.3 und die Gegenüberstellung der potentiellen Produzenten in diesen Proben in Kapitel 4.3.

3.3.3 Vergleich der Methoden

Die Ergebnisse aller Proben ($n = 93$), in denen OTA mit beiden Methoden (HPLC und ELISA) bestimmt wurde, korrelieren signifikant miteinander (Rangkorrelation nach Spearman, $r_s = 0,215$, $P = 0,02$). Die mit dem ELISA erzielten Ergebnisse sind deutlich höher als die mit der HPLC gewonnenen (U-Test, $P < 10^{-3}$), wie auch der Vergleich der statistischen Kenngrößen beider Messreihen zeigt (Tab. 3-18). Dieses Phänomen wurde auch in einem Ringversuch des Verbandes deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Fachgruppe Futtermittel, bei der Bestimmung der Mykotoxine Zearalenon und Deoxynivalenol beobachtet (Länderübergreifende Zusammenarbeit 2005).

Dort lagen die ELISA-Ergebnisse bis zu 600 % über denen mit der HPLC gewonnenen. Als Grund für die höheren Werte wurden die Kreuzreaktivität der Antikörper bzw. Matrixeffekte angeführt.

Tab. 3-18: Vergleich der statistischen Kenngrößen der mittels ELISA und HPLC ermittelten Konzentrationen von Ochratoxin A (n = 93)

(µg/kg)	ELISA	HPLC
Mittelwert	7,40	1,16
Median	4,25	0,23
Minimum	1,19	0,23
Maximum	78,0	23,92
95. Perzentil	29,09	10,64
Anzahl positive Proben	92	13
Spannweite positiver Proben	1,19 – 78,0	0,28 – 23,92

Bei der Betrachtung allein der positiven Proben fällt auf, dass die Ergebnisse beider Methoden nicht mehr korrelieren (Rangkorrelation nach Spearman, $r_s = -0,084$, $P = 0,360$, $n = 21$). In acht Proben wurden mittels ELISA Konzentrationen oberhalb des Referenzwertes nachgewiesen, wohingegen die mit der HPLC gewonnenen Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze lagen. In zwei Proben wurden mit der HPLC Konzentrationen oberhalb und mit dem ELISA Konzentrationen unterhalb des jeweiligen Referenzwertes ermittelt. In nur elf Proben zeigten die Ergebnisse beider Methoden den gleichen Trend im Sinne von ober- oder unterhalb des Referenzwertes (Abb. 3-22). Zu ähnlich schlechten Korrelationen zwischen ELISA und chromatographischen Methoden (in dem Fall Gaschromatographie mit Massenspektrometrie oder Elektroneneinfangdetektion) kommen auch Chuang et al. (1998). Sie haben verschiedene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe mit beiden Methoden im Hausstaub nachgewiesen und ebenfalls starke Schwankungen in den Ergebnissen festgestellt. Die Tendenzen dieser Schwankungen unterschieden sich teilweise auch in Abhängigkeit des Analyten. Die Zahl und Menge der strukturverwandten Substanzen, die Kreuzreaktionen mit dem Antikörper verursachen, hängt neben der Zusammensetzung der Matrix auch von der Struktur des Antigens ab. Chuang et al. (1998) bewerten den ELISA als nicht geeignet für den quantitativen Nachweis von Analyten im Hausstaub.

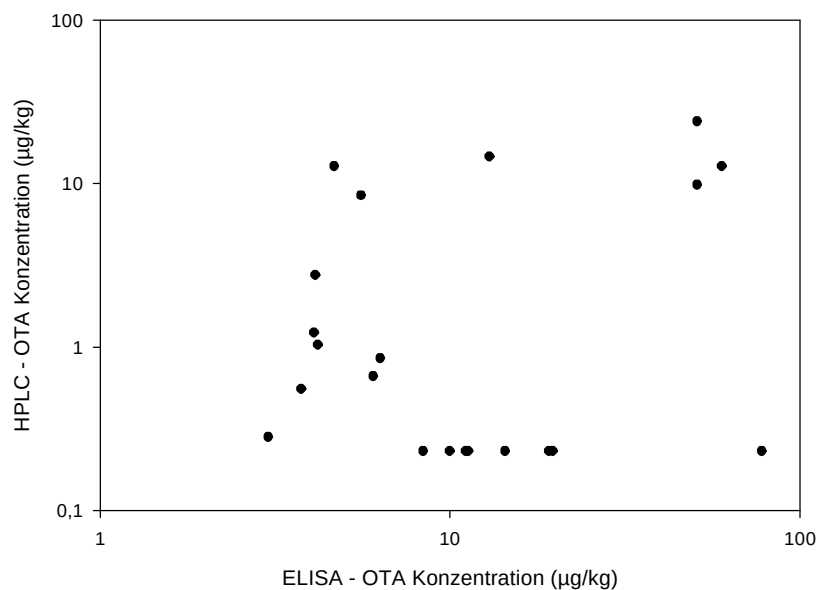


Abb. 3-22: Vergleich der Ochratoxin A Konzentrationen (µg/kg), die mit Hilfe des ELISA und der HPLC ermittelt wurden

Die Darstellung umfasst die Proben, in denen OTA mittels HPLC nachgewiesen werden konnte (n = 13). Zusätzlich wurden die Proben ergänzt, in denen mit dem ELISA Konzentrationen oberhalb des Referenzwertes (> 8,0 µg/kg), aber mit der HPLC Werte < Nachweisgrenze ermittelt wurden (n = 8).

Grundsätzlich liegen die Vorteile von Enzymimmunoassays in der hohen Geschwindigkeit und Einfachheit der Durchführung sowie dem geringen apparativen Aufwand (Krska und Molinelli 2007), so dass diese Methode ein ideales Screening-Verfahren mit hohem Probendurchsatz darstellt. Wie jede andere standardisierte Methode auch, wurden die auf dem Markt erhältlichen ELISA Testkits für bestimmte Matrices entwickelt und können nur mit Abwandlungen für eine andere Matrix eingesetzt werden. Umweltproben weisen im Gegensatz zu Lebensmittelproben häufig einen hohen Grad an Verschmutzungen auf (Jarvis 2003). Für die stark variierende Matrix Staub ist ein ELISA zum Nachweis von Mykotoxinen nur dann denkbar, wenn die Extraktion und die Aufreinigung der Proben optimiert werden. Köller et al. (2003) haben OTA-freien Hausstaub dotiert und den Erfolg verschiedener Extraktionsmittel ausgetestet. Der Nachweis von OTA erfolgte mit Hilfe der Kapillaren-Elektrophorese gekoppelt mit Laser-induzierter Fluoreszenz. Dabei haben sie festgestellt, dass der Anteil störender Matrixkomponenten mit dem Anteil an Wasser im Extraktionsmittel zunahm. Für den hier angewandten ELISA wurden die Staubproben mit einem wässrigen NaHCO₃-Puffer extrahiert. Für den Nachweis mit der HPLC wurde Methanol/1 % Na₂CO₃ (80:20) eingesetzt, so dass im Extrakt vermutlich weniger Störsubstanzen aus der Matrix vorlagen, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion beeinträchtigen können.

ten. An dieser Stelle besteht ein Ansatz zur Optimierung der Extraktion vor einem ELISA. Trotz der weitestgehenden Vermeidung von Störsubstanzen aus der Matrix sollten im ELISA getestete, positive Proben zusätzlich mit einer zuverlässigen chromatographischen Methode überprüft werden. Bei dieser Vorgehensweise ist zu bedenken, dass eine aufwendige Extraktion und Aufreinigung die Vorteile des ELISA (Schnelligkeit, hoher Probandurchsatz) wieder zunichte machen kann.

3.4 Entwicklung eines ELISA für den Nachweis von Sterigmatocystin

3.4.1 Produktion von Sterigmatocystin

Aus verschiedenen Innenraumproben (Luft, Staub und Material) wurden insgesamt neun Stämme von *Aspergillus versicolor* isoliert und auf ihre Fähigkeit, Sterigmatocystin (ST) zu produzieren, überprüft. Die Stämme wurden zunächst auf die Nährböden Malzextrakt- (ME), Kartoffel-Glucose- (KG), Hafermehl- (HM), Maismehl- (MM) und Reismehl-Agar (RM) ausgestrichen und die Produktion von Sterigmatocystin nach 14 Tagen Inkubation bei 29 °C mit Hilfe des Agar-Plug-Tests überprüft. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ durch augenscheinliche Abschätzung der Intensität und Größe der Banden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-19 dargestellt. Aufgrund der starken Produktion von ST wurden der Stamm 9 und die Substrate Mais-Pepton sowie Kartoffel-Glucose für weitere Vorversuche ausgewählt. Der Ansatz von Maiskörnern mit Peptonzusatz im Erlenmeyerkolben erwies sich in Hinblick auf die ST-Produktion als weitaus weniger ertragreich als der Ansatz auf Kartoffelpüree mit Glucosezusatz. Außerdem stellte sich die Ernte des Myzels vom Kartoffelpüree-Glucose-Substrat als sehr praktikabel heraus. Das Pilzmyzel wuchs überwiegend auf der Oberfläche des Kartoffelpürees (Abb. 3-23) und ließ sich nach 14 Tagen Inkubation als Matte von dem Substrat abheben (Abb. 3-24). Dadurch befand sich sehr wenig Substrat in dem zu extrahierenden Material, der Trocknungsprozess war entsprechend kurz und die trockenen Myzelmatten ließen sich gut mahlen. Die Maiskörner hätten hingegen vollständig mit extrahiert werden müssen und wären schlechter zu zerkleinern gewesen.

Tab. 3-19: Vergleich der Produktion von Sterigmatocystin von 9 Stämmen *Aspergillus versicolor* auf 5 verschiedenen Nährböden nach 14 Tagen Inkubation bei 29 °C im Dunkeln

Nährboden	<i>Aspergillus versicolor</i> Stämme								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ME	+++	+	-	(+)	(+)	++	-	-	+++
KG	+++	+++	(+)	+++	+	++	+	-	+++
HM	-	+++	(+)	+	++	+	++	++	++
MM	++	++	-	++	+++	-	++	++	+++
RM	++	+	(+)	+	-	++	-	+	+++

Legende:

- keine Produktion von Sterigmatocystin
- (+) schwache Produktion
- +
- ++ mittlere Produktion
- +++ starke Produktion



Abb. 3-23: Kartoffelpüree-Glucose direkt nach dem Animpfen mit einer Sporensuspension von *A. versicolor* (links) und nach 7 Tagen Inkubation (rechts)



Abb. 3-24: Ansatz auf Kartoffelpüree-Glucose aus Abb. 3-23 nach 14 Tagen Inkubation

Die Myzelmatte wurde für die Ernte in Kunststoffdosen überführt und darin getrocknet (rechte Abb.).

Insgesamt konnten 337 g getrocknetes und ST-haltiges Myzel geerntet werden. Die Aufreinigung mit Hilfe der Säulenchromatographie (Abb. 3-25) führte bereits zu relativ matrixarmen Lösungen (Dichlormethan) mit einem hohen Gehalt an ST (Abb. 3-26). Nach der Umkristallisation mit n-Hexan/Chloroform und Aceton konnten insgesamt 1,25 g ST gewonnen werden. Eine anschließend durchgeführte Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) (^1H , ^{13}C) hat einen Reinheitsgrad der hellgelben Kristallnadeln von mehr als 95 % ergeben (Abb. 3-27).

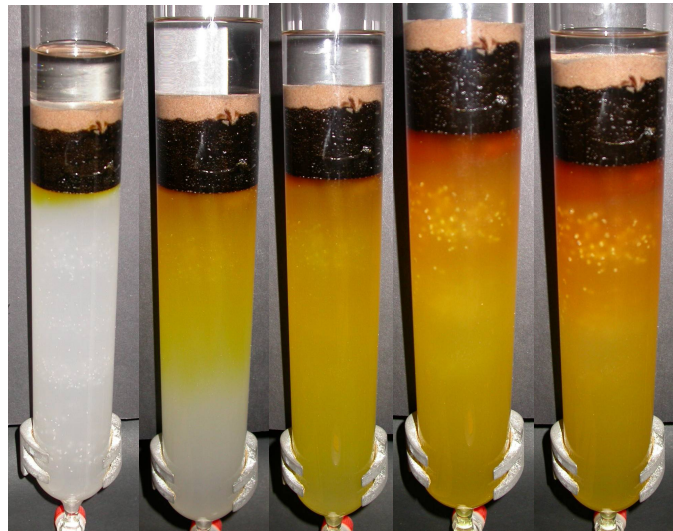


Abb. 3-25: Säulenchromatographie des Myzelextraktes nach 10, 70, 150, 390 und 525 min

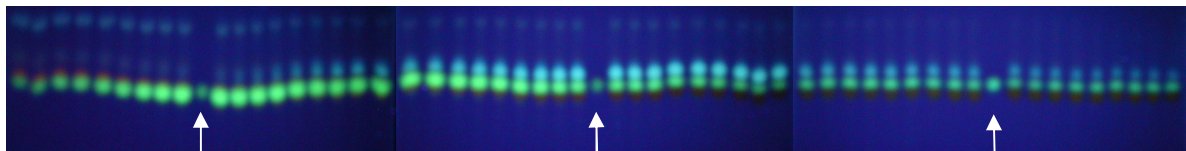


Abb. 3-26: Dünnschichtchromatographie der Fraktionen 18 bis 71 (340 bis 970 ml Dichlormethan) aus der Säulenchromatographie

Die unter UV-Licht grün fluoreszierenden Banden sind auf Sterigmatocystin zurückzuführen. Die Pfeile markieren die Standardlösung mit 0,6 µg ST pro Auftragepunkt.

Der Ertrag von Sterigmatocystin betrug 5,0 g pro kg Kartoffelpüreepulver bzw. 3,7 g pro kg getrocknetem Myzel. Die in anderen Studien erzielten Erträge liegen mit 0,6 g ST pro kg Reis (Rao und George 2000) deutlich darunter und mit 8 g ST pro kg Mais (Rabie et al. 1976) deutlich darüber, was durch unterschiedliche Inkubationsbedingungen und Substratzusammensetzungen erklärt werden kann. Die in der Literatur angegebenen optimalen Bedingungen für einen hohen Ertrag variieren stark: Maiskörner mit Sojapepton, 27 °C, 22 Tage (Rabie et al. 1976), Maiskörner mit Sojaextrakt, 28 °C, 30 Tage (Lou et al. 1994), Reiskörner, 37 °C, 24 Tage (Rao und George 2000), Brotkrümel, 27 °C, 15 Tage (Bennett et al. 1989) u. v. m. Das Temperaturoptimum für die ST-Synthese scheint wie die optimale Wachstumstemperatur von *A. versicolor* im Bereich von 25 bis 30 °C zu liegen (Reiß 1998).

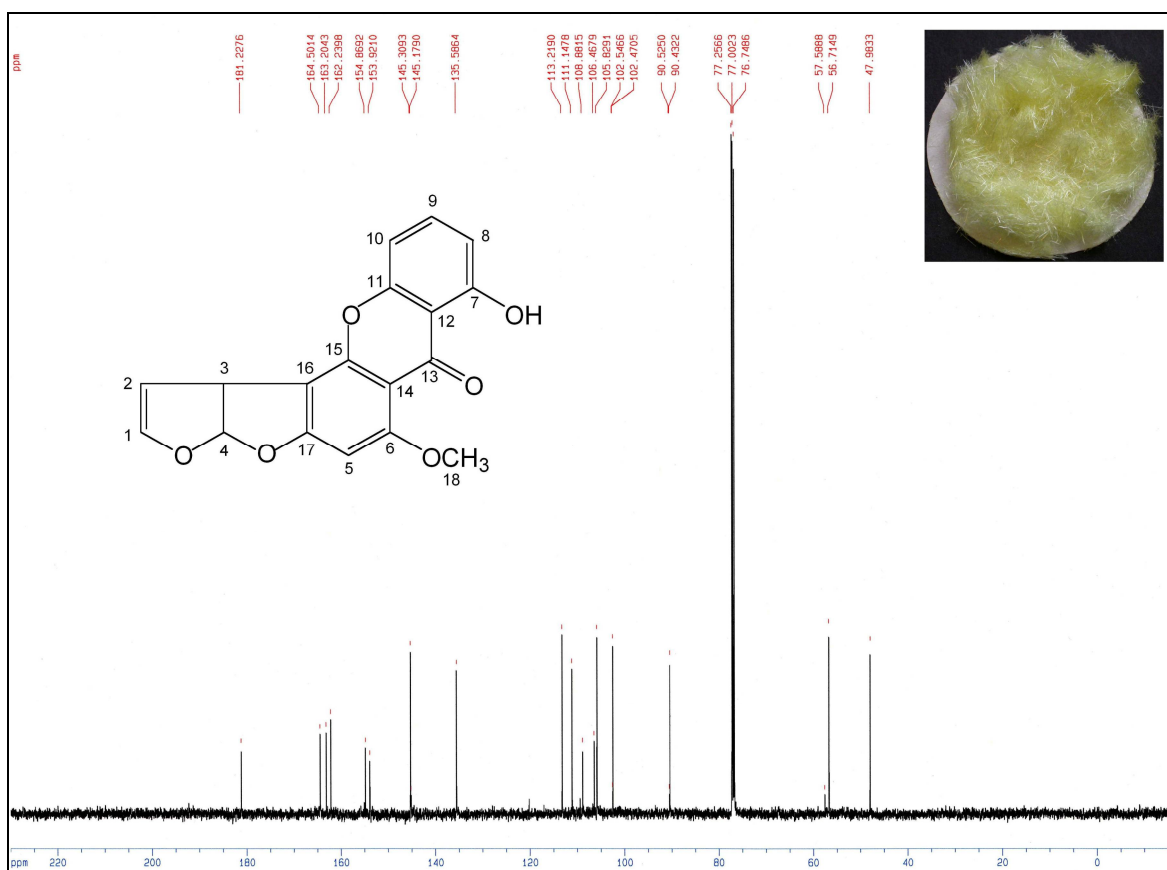


Abb. 3-27: Das 500 MHz ^{13}C NMR Spektrum des gereinigten Sterigmatocystins in DCCl_3 Lösung

Nach der Umkristallisation mit n-Hexan/Chloroform und Aceton bildete ST hellgelbe, dünne Nadeln (oben rechts).

Der Einsatz von Lebensmitteln als Substrat ist kostengünstig und führt zu höheren Erträgen als synthetische Flüssigkulturen (Bennett et al. 1989). Letztere werden z. B. eingesetzt, um durch Zusatz von ^{14}C -Acetat als einzige Kohlenstoffquelle radioaktiv markiertes ST für die Forschung herzustellen. Im Gegensatz zur natürlichen Umgebung steht unter Laborbedingungen ausreichend Wasser in den Nährmedien zur Verfügung, so dass die Toxinproduktion dadurch nicht limitiert wird. *A. versicolor* produziert ST erst bei einem a_w -Wert nahe einem Wert von 1 (Nielsen 2003). Neben den physikalischen und chemischen Faktoren wird die Toxinproduktion durch die genetische Variabilität der Stämme stark beeinflusst (Lepom und Kloss 1988). Lou et al. (1994) haben für 19 ST-produzierende Stämme von *A. versicolor* eine Ertragsspannweite von 4,2 bis 1.160,8 mg/kg Substrat ermittelt. Daher ist es für die Produktion von ST oder auch anderen Mykotoxinen wichtig, eine Vielzahl von Stämmen zur Verfügung zu haben, um den effektivsten Stamm ausfindig zu machen. *A. versicolor* kann bis zu 1 % seiner Biomasse an ST produzieren (Nielsen 2003), was die Herstellung von ST vereinfacht und ökonomisch macht. Außerdem wird dadurch deutlich,

dass auch im Innenraum unter optimalen Bedingungen hohe Konzentrationen von ST an schimmelnden Bauteilen vorliegen können.

3.4.2 Herstellung des Hapten-Protein-Konjugats für die Immunisierung

Mykotoxine sind zu klein, um eine Antikörperbildung im Säugetier zu provozieren, und werden daher für die Immunisierung an ein Protein gekoppelt (Bhat 2010). Damit wird außerdem verhindert, dass das Säugetier beim Injizieren des Mykotoxins Vergiftungserscheinungen erleidet oder sogar stirbt. Die Herstellung eines Hemiacetals wurde bereits 1968 mit dem strukturnahen Aflatoxin B1 von Pohland et al. durchgeführt. Die deutliche Fluoreszenz der Hemiacetale im Vergleich zu den ursprünglichen Aflatoxinen oder Sterigmatocystin wird genutzt, um diese Mykotoxine mit hoher Empfindlichkeit in verschiedenen Matrices nachzuweisen (Orti et al. 1989, Jaimez et al. 2000). Das Hemiacetal von Sterigmatocystin wurde außerdem wie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um es für eine Immunisierung an Proteine zu koppeln (Li und Chu 1984, Morgan et al. 1986).

Da mit dem über die Hemiacetalmethode gekoppelten Immunogen im vorliegenden Fall keine spezifischen Antikörper produziert werden konnten (Kap. 3.4.4), sollte im zweiten Ansatz ein Hapten-Protein-Konjugat mit Hilfe der Hemisuccinatmethode synthetisiert werden (Abb. 3-28). Das an die phenolische OH-Gruppe (C7) von Sterigmatocystin gekoppelte Bersteinsäureanhydrid fungiert als Abstandhalter (Spacer) vom Protein, so dass der Kontakt zwischen dem ST-Molekül und den Rezeptoren der Lymphozyten verbessert wird, und liefert eine Carboxylgruppe, mit der die Synthese an das Protein über eine Peptidbindung leicht zu bewerkstelligen ist.

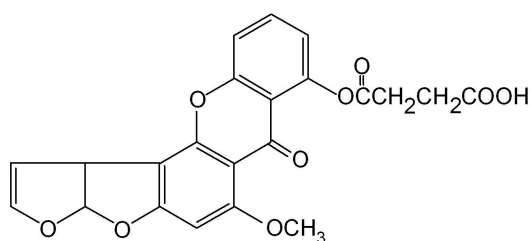


Abb. 3-28: Strukturformel des Sterigmatocystin-hemisuccinats

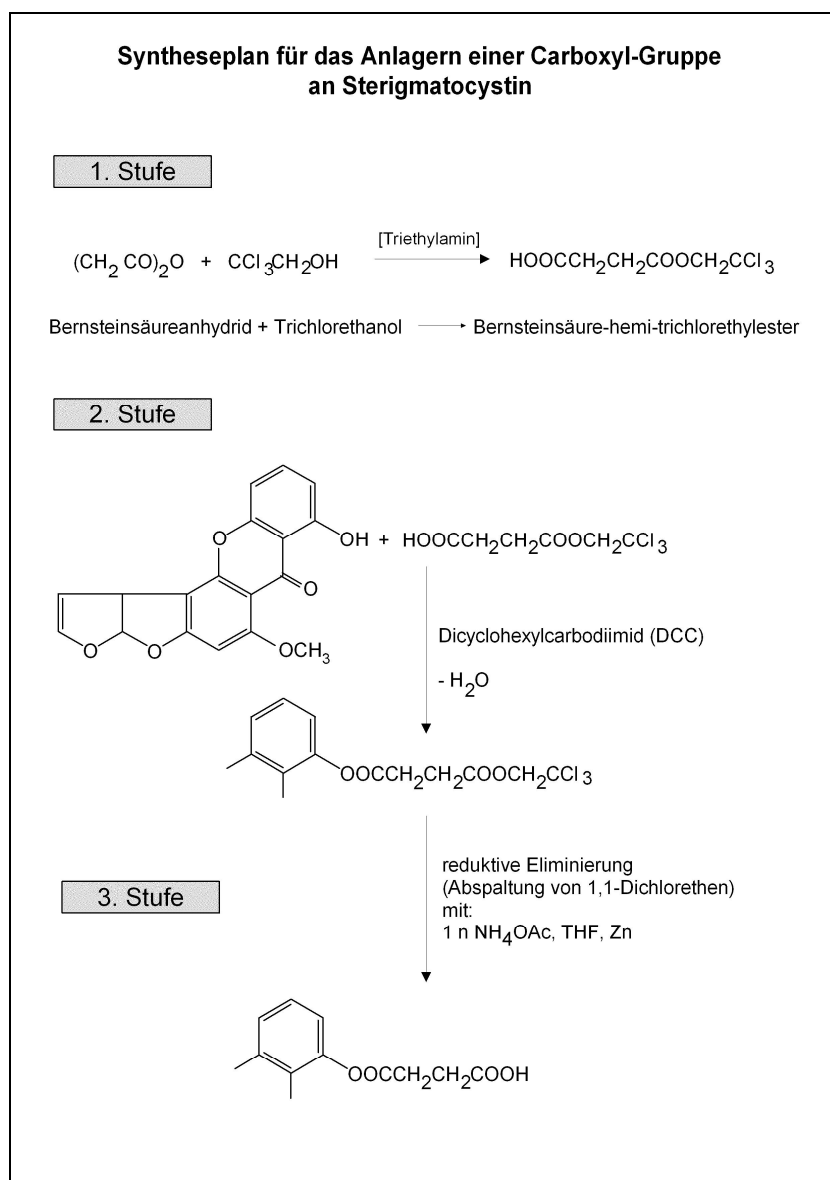


Abb. 3-29: Syntheseweg für die Herstellung von Sterigmatocystin-hemisuccinat durch Kopplung von ST und Bernsteinsäure-hemitrichlorethylester unter Umsetzung mit Dicyclohexylcarbodiimid

Nach der Reaktion der ersten Stufe (Abb. 3-29) wurden 21,0 g 2,2,2-Trichlorethylhemisuccinat gewonnen. Die Substanz lag in Form weißer, glänzender Kristalle vor und hatte einen Schmelzpunkt von 91 °C. Im Vergleich dazu haben Okabayashi et al. (1977) eine Ausbeute von 19,2 g erzielt und einen Schmelzpunkt von 88 bis 89 °C bestimmt. Die Richtigkeit der Substanz konnte außerdem mit einem ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum bestätigt werden. Die Syntheseschritte zur Herstellung des gemischten Esters (2. und 3. Stufe, Abb. 3-29) wurden zu Übungszwecken zunächst mit Cholesterin als „alkoholischen Partner“ erfolgreich durchgeführt. Im doppelten Ansatz wurden 950 mg 2,2,2-Trichlorethylcholesterylsuccinat (Stufe 2) in Form weißer Kristallnadeln mit einem Schmelzpunkt von

132,5 bis 133,5 °C produziert. Somit war die Ausbeute etwas geringer als bei Drasar et al. (1984), die im einfachen Ansatz 532 mg Substanz mit einem Schmelzpunkt von 132,0 bis 133,5 °C gewinnen konnten. Die in der 3. Stufe durchgeführte Abspaltung des 2,2,2-Trichlorethylesters durch reduktive Hydrolyse führte zur Bildung des Cholesterylhemisuccinats (weiße, krümelige Kristalle). Der Schmelzpunkt entsprach mit 174,0 bis 177,0 °C den von Drasar et al. (1984) angegebenen 177,0 °C. Eine zusätzliche Bestätigung der Produkte der 2. und 3. Stufe lieferte je ein ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum.

Während diese Synthese mit Cholesterin erfolgreich reproduziert werden konnte, scheiterte bei Einsatz von ST die Herstellung des gemischten Esters 2,2,2-Trichlorethylsterigmato-cystylsuccinat. Das von Drasar et al. (1984) als günstig angegebene Verhältnis von 2 Mol Säure, 1 Mol Steroid (= Alkohol) und 1,1 Mol Dicyclohexylcarbodiimid wurde auf die Synthese mit ST übertragen. Eine Versuchswiederholung mit einer von 2 auf 5 Tage verlängerten Reaktionszeit führte auch nicht zum Erfolg. Nach der Umkristallisation entstand wieder das Ausgangsprodukt ST in Form von gelben Kristallnadeln. Es ist zu vermuten, dass die alkoholische OH-Gruppe von Cholesterin besser für die Umsetzung mit Dicyclohexylcarbodiimid geeignet ist als die leicht saure, phenolische OH-Gruppe von ST.

Aus diesem Grund wurde ein alternativer Synthesepan erstellt und durchgeführt. Statt der Kopplung mit Bernsteinsäure-hemitrichlorethylester unter Umsetzung mit Dicyclohexylcarbodiimid wurde für die 2. Stufe Bernsteinsäurechlorid-trichlorethylester unter Umsetzung mit Pyridin verwendet (Abb. 3-30) (Davies et al. 1960). Das ESI-Spektrum des Kopplungsprodukts zeigte das mit Natrium kationisierte Molekülion bei m/z 577 $[\text{M}\cdot\text{Na}]^+$ und zusätzlich das Dimer bei m/z 1131 $[2\text{M}\cdot\text{Na}]^+$. Daraufhin wurde der gemischte Ester als Rohprodukt der reduktiven Hydrolyse zugeführt. Das gewünschte Produkt Sterigmato-cystylhemisuccinat konnte weder mit der Dünnschichtchromatographie noch mit der ESI-Massepektrometrie nachgewiesen werden. Weitere Syntheseveruche wurden daher eingestellt.

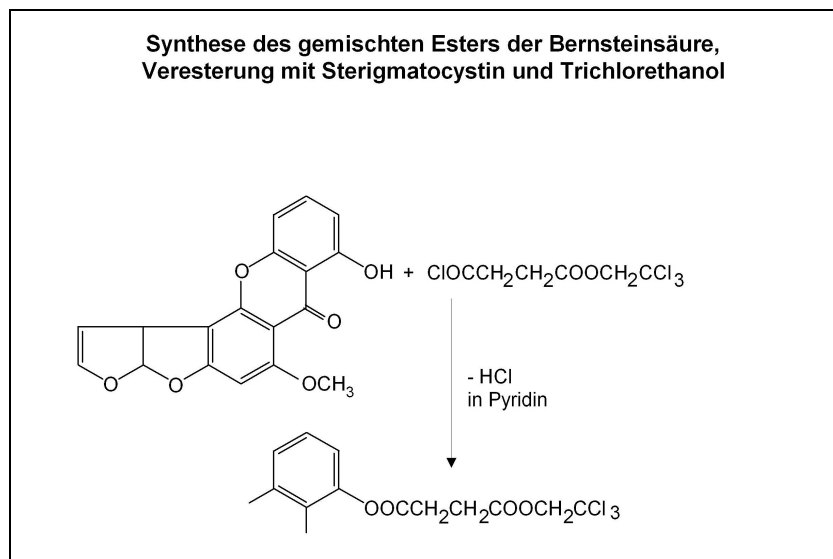


Abb. 3-30: Syntheseweg für die Herstellung von Sterigmatocystin-hemisuccinat durch Kopplung von ST und Bernsteinsäurechlorid-trichlorethylester unter Umsetzung mit Pyridin

3.4.3 Antikörperherstellung

Die ersten Sterigmatocystin-Antikörper konnten nach der 2. Restimulierung nach insgesamt 10 Wochen nach der Grundimmunisierung nachgewiesen werden. In Folge der 4. Restimulierung ergab sich für die Seren beider Kaninchen ein Titer von 1:100.000 (Tab. 3-20).

Tab. 3-20: Ergebnisse der Titerbestimmung nach der 5. Blutung (durchgeführt bei der DIANOVA GmbH)

Es sind die Absorptionswerte der verschiedenen Verdünnungen der Seren beider Kaninchen bei 405 nm angegeben. Die maximal mögliche Verdünnung im Vergleich zur BSA-Kontrolle ist hervorgehoben.

	Kaninchen 1		Kaninchen 2	
Beschichtung der Vertiefung:	Sterigmatocystin (OD _{405 nm})	BSA (OD _{405 nm})	Sterigmatocystin (OD _{405 nm})	BSA (OD _{405 nm})
1:1.000	0,832	0,325	1,051	0,352
1:5.000	0,356	0,259	0,380	0,192
1:10.000	0,326	0,193	0,219	0,175
1:50.000	0,234	0,111	0,126	0,114
1:100.000	0,165	0,117	0,112	0,098
1:500.000	0,092	0,094	0,077	0,070
1:1.000.000	0,079	0,078	0,084	0,060

Der Titer von Kaninchen 1 war mit 1:1.000.000 bereits nach der 3. Restimulierung am höchsten und sank trotz einer weiteren Immunogen-Applikation ab. Daher wurde nach der 4. Restimulierung die Endblutung durchgeführt, um ein weiteres Abfallen der Antikörper-Konzentration zu verhindern. Die von anderen Autoren gegen ST-Hemiacetal-Konjugat erzielten Antikörpertiter lagen ebenfalls bei 1:100.000 (Morgan et al. 1980) und erreichten sogar 1:512.000 (Li und Chu 1984). Die Intensität der Antikörperproduktion hängt stark von dem eingesetzten Konjugat und von der individuellen Disposition des Tiers ab (Crowther 1995).

3.4.4 Aufreinigung des Antikörpers

Der kompetitive ELISA mit Sterigmatocystin-Standard und Peroxidase-gekoppeltem ST hat keinerlei Signal ergeben. Bei der Titerbestimmung durch die DIANOVA GmbH wurde ein ELISA mit unterschiedlichen Beschichtungen der Kavitäten durchgeführt: KLH, BSA, ST und Ovalbumin. Bereits nach der insgesamt zweiten Immunogen-Applikation lag im Serum ein hoher Titer an anti-KLH-Antikörpern vor (Abb. 3-31).

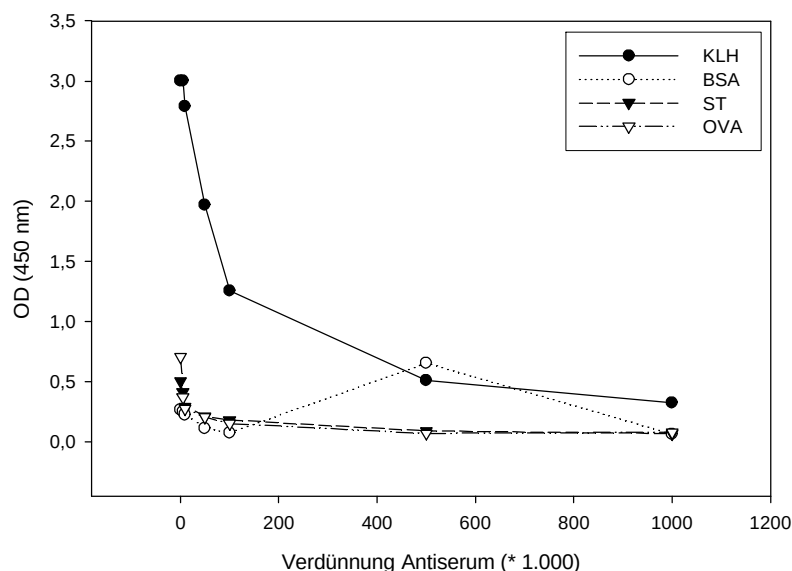
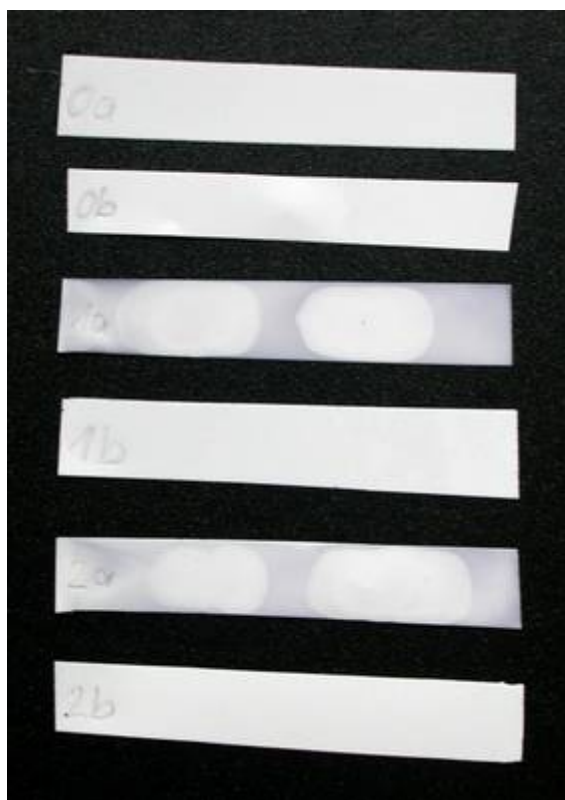


Abb. 3-31: Verdünnungen des Antiserums von Kaninchen 1 nach der ersten Restimulierung im ELISA mit unterschiedlich beschichteten Kavitäten: KLH, BSA, ST, OVA (Ovalbumin)

Die anti-KLH-Antikörper im Antiserum der Endblutung konnten (zumindest qualitativ) auf Nitrocellulosestreifen, die mit ST-KLH beschichtet waren, sichtbar gemacht werden. Daneben können weitere unspezifische Antikörper und andere Serumproteine das Antise-

rum verunreinigen, obwohl das Serum bei der DIANOVA GmbH bereits durch Präzipitation vorgereinigt wurde. Unter Umständen kommt es aufgrund der Vielzahl von Antikörpern und anderer Proteine im Serum zu sterischen Behinderungen bei der Antigen-Antikörper-Bindung. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben von einem Signal im ELISA kann allerdings auch darin liegen, dass keine spezifischen Antikörper gebildet wurden, die ungekoppeltes ST binden.

Aus diesem Grund wurde eine Aufreinigung und Selektion der ST-spezifischen Antikörper durchgeführt. Pro Nitrocellulosestreifen wurden zwei Punkte ST-BSA aufgetragen, die sich bei den ungesättigten Streifen nach dem Färben abzeichnen (Abb. 3-32), da die Antikörper aus dem Kaninchenserum außerhalb dieser Punkte unspezifisch an die Nitrocellulose binden. Dieser Versuchsaufbau war mit ungekoppeltem ST nicht durchführbar, da ST aufgrund der geringen Molekülgröße bei der Absättigung von den Magermilch-Proteinen überlagert wurde. Grundsätzlich konnte beobachtet werden, dass keine spezifischen Antikörper gegen ST-BSA gebunden haben, so dass die mit ST-BSA belegten Bereiche der Nitrocellulose ungefärbt blieben (Abb. 3-32).



Ohne Antiserum:

0a) ST-BSA, ungesättigt

0b) ST-BSA, gesättigt

Antiserum Kaninchen 1, 1:100:

1a) ST-BSA, ungesättigt

1b) ST-BSA, gesättigt

Antiserum Kaninchen 2, 1:100:

2a) ST-BSA, ungesättigt

2b) ST-BSA, gesättigt

Abb. 3-32: Nitrocellulosestreifen mit und ohne Antiserum bzw. gesättigt und ungesättigt

Es ist davon auszugehen, dass die Kaninchen keine ST-spezifischen Antikörper gebildet haben. Bei der hier durchgeführten Kopplung nach der Hemiacetalmethode befanden sich die ST-Moleküle sehr dicht am Protein, so dass unter Umständen nicht nur das angekoppelte ST-Hemiacetal, sondern auch umliegende Strukturen des KLH-Moleküls den Epitopbereich gebildet haben. Damit kann es zur Bildung strukturdiffuser und unspezifischer Antikörper kommen (Willenborg 2001). Durch den Einbau eines Spacers, wie er für den zweiten Immunisierungsansatz geplant war, könnte dieser Effekt minimiert oder ausgeschaltet werden. Neben den unspezifischen Antikörpern, die direkt gegen das ST-Konjugat produziert werden, können auch Antikörper gegen frei in der Immunogen-Lösung vorliegende Verunreinigungen (Reste der Synthese) gebildet werden. Im schlechtesten Fall ist eine solche Verunreinigung immunogener als das Antigen bzw. der Hapten-Protein-Komplex selbst (Luttmann et al. 2004). Diesem Effekt wurde durch eine gründliche Dialyse des Immunogens im Anschluss an die Synthese entgegengewirkt. Über die Gründe für die Tatsache, dass zwar im ELISA für die Titerbestimmung ein deutliches Signal zu messen ist, aber auf den Nitrocellulosestreifen kein Nachweis einer Antigen-Antikörper-Bindung erfolgt, kann nur spekuliert werden. Für beide Testsysteme wurde das mit der gleichen Kopplungsmethode hergestellte ST-BSA eingesetzt, allerdings aus unterschiedlichen Chargen.

Li und Chu (1984) haben in ihrer Studie einen spezifischen Antikörper gegen das ST-Hemiacetal nachweisen können und schlagen den Einsatz des Hemiacetals im ELISA als Standardsubstanz vor, da ST selbst in Wasser unlöslich ist. Allerdings gehen sie nicht mehr darauf ein, wie das nachzuweisende ST aus der Probe in Lösung gebracht werden soll und ob die gewonnenen Antikörper gegen nicht derivatisiertes ST spezifisch sind. Morgan et al. (1986) haben ebenfalls erfolgreich Antikörper gegen ST-Hemiacetal produziert. Um das Problem der Wasserunlöslichkeit von ST zu umgehen, haben sie das in der Probe vorliegende ST zu hydroxyliertem ST derivatisiert, für das die Antikörper ebenfalls spezifisch waren. Chung et al. (1989) haben ihren anti-ST-Hemiacetal-Antikörper auch direkt gegen ST spezifisch einsetzen können. ST wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, zunächst in einem Lösungsmittel aufgenommen und anschließend mit Puffer verdünnt. Grundsätzlich scheint das Prinzip der Antikörper-Produktion mit einem ST-Hemiacetal-Protein-Konjugat zu funktionieren. Daher bleibt die Frage nach der genauen Ursache für das Missglücken in der vorliegenden Arbeit offen. Es stellt sich allerdings auch die Frage, warum keiner der spezifischen Antikörper oder ein ELISA-Fertigtest vermarktet wurde.

3.4.5 Aufreinigung der Staubextrakte und dünnschichtchromatographischer Nachweis von Sterigmatocystin

Wie für die bisher beschriebenen Methoden besteht auch beim Nachweis von Sterigmatocystin im Hausstaub – unabhängig von der Art des Nachweises – das Problem der stark variierenden Staubzusammensetzung und des Vorliegens von Störsubstanzen. Da ST nur am Rande des Interesses der Lebensmitteluntersuchung steht (Dasko et al. 2002), existieren keine Immunoaffinitätssäulen auf dem Markt, die eine spezifische Aufreinigung wie beim Ochratoxin A ermöglichen. Daher wurde für den Nachweis von ST mit Hilfe sowohl der DC als auch der HPLC eine optimiertes Clean-up erarbeitet. Der Erfolg der verschiedenen, getesteten Aufreinigungsmethoden wurde mit Hilfe der DC überprüft.

ST erscheint im langwelligen UV-Licht als ziegelroter Fleck, der ab einer Konzentration von ca. 5 µg pro Auftragung sichtbar ist (Engel 1977). Durch eine Derivatisierung von ST intensiviert sich die Fluoreszenz und die Nachweisgrenze sinkt deutlich ab. Eine gängige Methode ist das Einsprühen der DC-Platten mit 20 % AlCl₃ in Ethanol und anschließendes Erhitzen (100 °C, 5 min), was zu einer deutlichen grünen Fluoreszenz unter UV-Licht führt (Stoloff et al. 1971) (Abb. 3-33). Dabei entsteht ein Aluminiumkomplex mit der Keto- und der Hydroxygruppe von ST (Thurm 1979). Mit dieser Methode konnte eine Nachweisgrenze von 7 ng und eine Bestimmungsgrenze von 25 ng pro Auftragung ermittelt werden ($\alpha = 0,05$). Geht man davon aus, dass der gesamte Extrakt aus 1 g Hausstaub auf die DC-Platte aufgetragen wird, entspricht das einer Nachweisgrenze von 7 µg/kg und einer Bestimmungsgrenze von 25 µg/kg. Eine Alternative stellt die vor der DC durchgeführte Umsetzung von ST mit Essigsäureanhydrid und Pyridin zu ST-Monoacetat dar, das bei 366 nm hellblau fluoresziert (Vorster und Purchase 1968). Die Fluoreszenz des ST-Monoacetats war etwas schwächer als die des ST-Aluminium-Komplexes, so dass die Nachweisgrenze bei 18 ng/Auftragung (= 18 µg/kg) und die Bestimmungsgrenze bei 33 ng/Auftragung (= 33 µg/kg) lag.

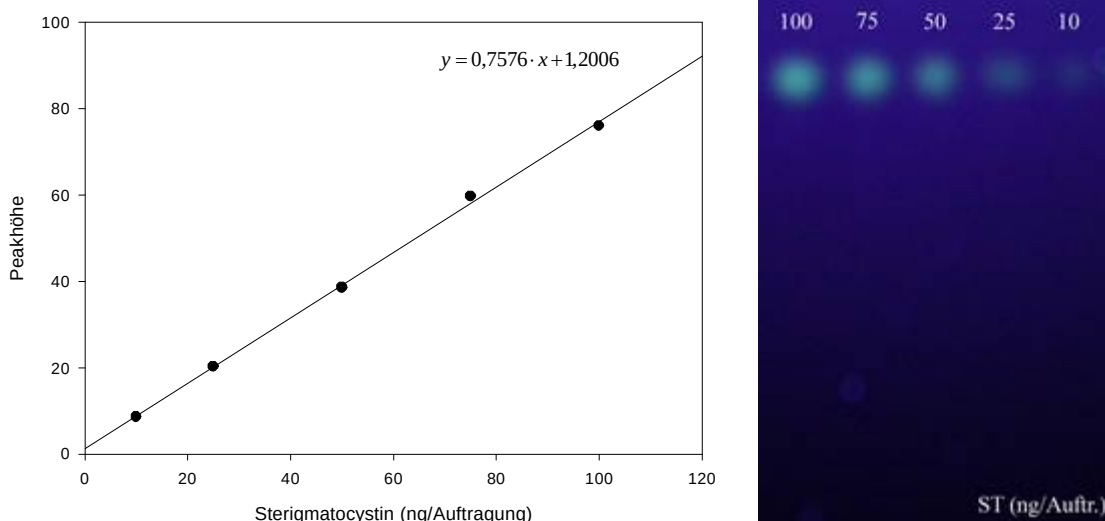


Abb. 3-33: Kalibriergerade für den Nachweis von Sterigmatocystin nach Derivatisierung mit AlCl_3

Die DC-Platte wurde mit einem DC-Scanner ausgewertet (Anregung: 366 nm; Emission: 440 nm). Für die Kalibriergerade wurde die Peakhöhe gegen die Konzentration von ST (ng/Auflragung) aufgetragen. Der ST-Aluminium-Komplex fluoresziert grün (366 nm).

Erste Versuche einer flüssig-flüssig-Extraktion von ST mit n-Hexan und Acetonitril/Wasser führten zu Extrakten mit unzähligen Störsubstanzen. Die Festphasenextraktion lieferte hingegen deutlich bessere Ergebnisse. Die Vorreinigung mit einer Chromatographiesäule unter Elution von Dichlormethan mit 5 % Ethylacetat entfernte zunächst die Partikel und die Inhaltsstoffe, die wesentlich polarer oder unpolarer als ST sind. Allerdings entstand dadurch ein Extrakt mit immer noch zahlreichen Substanzen mit relativ ähnlichen chemischen Eigenschaften. Die beste Auftrennung dieser Substanzen wurde durch das schrittweise Eluieren einer reverse-phase C18 Festphasensäule (C18-SPE) mit einem aufsteigenden Gradienten von Methanol in Wasser erzielt. In Abb. 3-34 ist deutlich erkennbar, dass der Staubextrakt noch starke Verunreinigungen enthält. ST löste sich mit 70 % wässrigem Methanol von der Säule (Abb. 3-35). Allerdings konnte die ST-Bande vom DC-Scanner nur ungenügend erfasst werden. Das Hintergrundrauschen war nach wie vor sehr hoch und führte zu breiten, unklaren Peaks mit einer hohen Basislinie (Abb. 3-35). Bei einigen Proben waren die Banden der unterschiedlichen Substanzen trotz der einheitlichen Aufreinigung weder mit dem unbewaffneten Auge noch für den DC-Scanner getrennt erkennbar. Der Nachweis von ST mit Hilfe der DC ist somit für die Anwendung in Hausstaub nicht geeignet. Dies ist insofern bedauerlich, als dass es sich um eine einfach durchführbare und wenig geräteintensive Methode handelt. Für ein erstes Screening von Hausstaubproben wäre eine solche Methode wünschenswert.

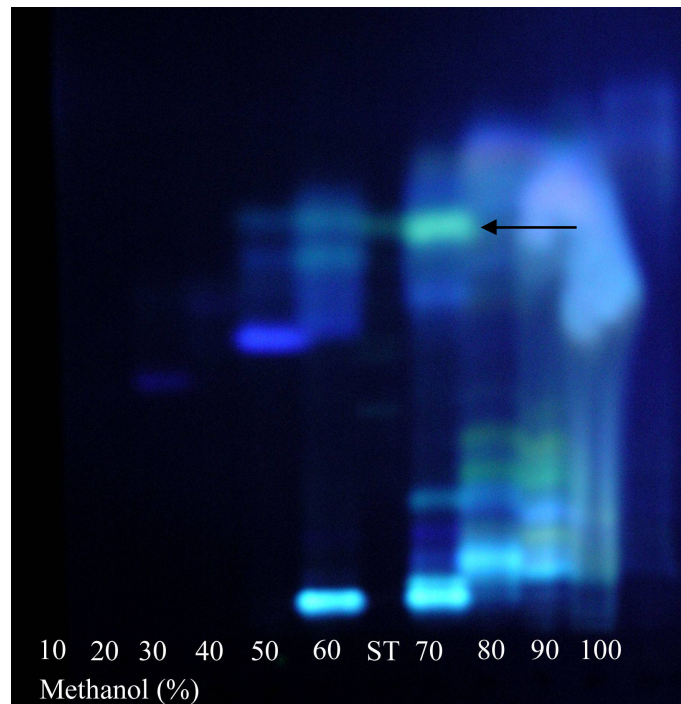


Abb. 3-34: Dünnschichtchromatographie der Fraktionen nach der C18-SPE-Säule mit aufsteigender Methanol-Konzentration

(ST: ST-Standard mit 250 ng; DC-Platte mit Konzentrierungszonen). In der 70 % Methanol-Fraktion ist dotiertes Sterigmatocystin (2 µg) enthalten.

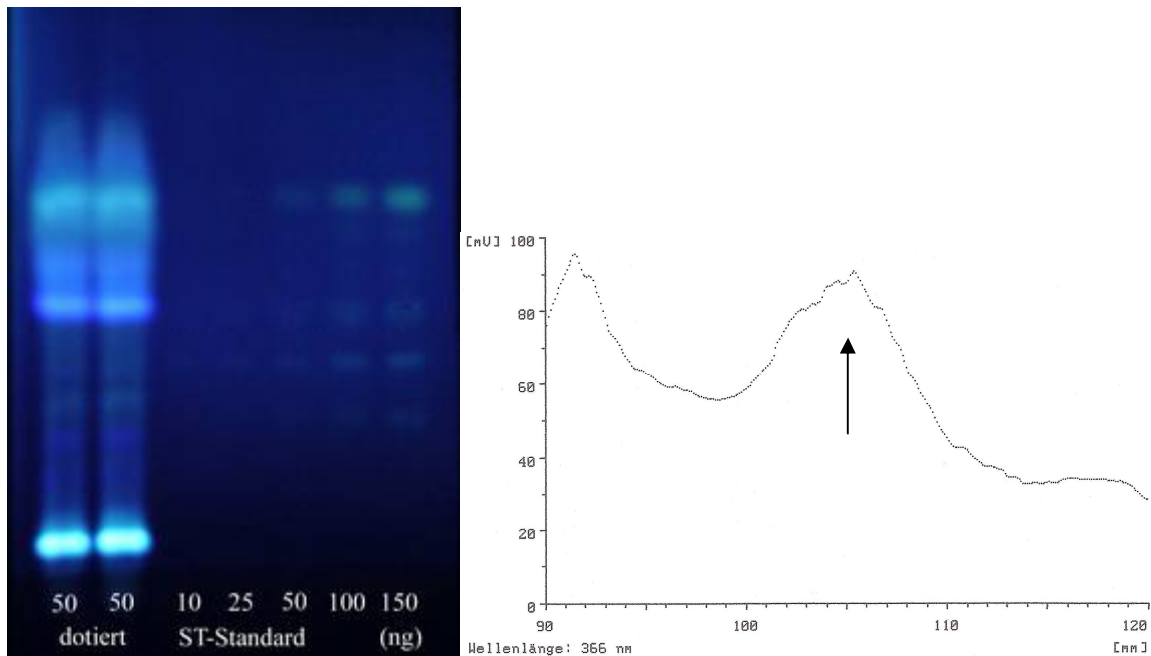


Abb. 3-35: DC (mit Konzentrierungszonen) des C18-SPE-Eluats (70 % Methanol) von 2 dotierten Poolstaubproben (50 µg/kg) sowie das Chromatogramm der linken Bahn im Bereich von 90 bis 120 mm Chromatogramm aufgenommen mit einem DC-Scanner (Anregung: 366 nm; Emission: 440 nm), ST-Peak bei ca. 105 mm.

Der Nachweis von Mykotoxinen mit Hilfe der HPLC ist empfindlicher und weist eine bessere Trennfähigkeit der Substanzen auf als der Nachweis mit der DC (Smoragiewicz et al. 1993). Daher kann man davon ausgehen, dass die beschriebene Aufreinigung als Vorbereitung für den Nachweis mit der HPLC und Fluoreszenzdetektion geeignet ist und den Nachweis von ST in Hausstaub ermöglicht. Leider stand zum Ende der Projektphase kein Fluoreszenzdetektor mehr zur Verfügung, so dass die HPLC-Methode nicht mehr angewendet werden konnte. Geplant war der Nachweis des ST-Monoacetats, wie es für die Anwendung bei der DC beschrieben wurde. Diese Methode erfordert keine Nachsäulen-Derivatisierung wie der Nachweis des mit AlCl_3 erzeugten ST-Komplexes. Engelhart et al. (2002) haben ST im Hausstaub mit der HPLC und Elektrospray-Ionisation und Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS) nachgewiesen. Die Proben wurden lediglich mit Acetonitril extrahiert und filtriert, aber die Extrakte nicht weiter aufgereinigt. Die Erfahrungen mit der DC zeigen, dass die Extrakte bei der Anwendung der Fluoreszenzdetektion möglichst frei von überlagernden Substanzen sein müssen, was ein gutes Clean-up erfordert.

Der Projektpartner am IUTA hat ST in sechs Hausstaubproben des hier untersuchten Kollektivs mit Hilfe der Flüssigchromatographie und anschließender Tandemmassenspektrometrie (Portner et al. 2008) nachweisen können (Kap. 4.3). Das Vorkommen von ST im Hausstaub zusammen mit der Tatsache, dass der Hauptproduzent *Aspergillus versicolor* häufig und in hohen Konzentrationen im Zusammenhang mit Pilzbefall im Innenraum vorkommt (Nielsen 2002), macht deutlich, dass ein zuverlässiges Nachweisverfahren für ST im Hausstaub sinnvoll und erforderlich ist.

4 VERGLEICH UND AUSSAGEKRAFT DER UNTERSUCHUNGSMETHODEN

4.1 Extraanalytische Einflüsse auf den Schimmelpilzgehalt im Hausstaub

Mit Hilfe der Antworten aus dem fünfseitigen Fragebogen wurden Einflüsse auf den Gehalt an Schimmelpilzen im Hausstaub ermittelt. Die möglichen Einflussfaktoren wurden sowohl im Hinblick auf die Lebendkeimzahl (auf ME und DG18) als auch auf die Konzentration von Ergosterin untersucht.

Für die Außenluft und lüftungsbedingt für die Innenraumluft sind starke, von der Jahreszeit abhängige Konzentrationsschwankungen der Lebendkeimzahlen bekannt (Ackermann et al. 1969, Reiß 1998), die sich durch Sedimentationsprozesse scheinbar auch auf den Staub auswirken (Koch et al. 2000, Trautmann et al. 2005). In den hier untersuchten Kontrollproben konnte kein signifikanter Unterschied der Gesamtlebendkeimzahlen zwischen den einzelnen Monaten (H-Test nach Kruskal-Wallis, $P_{DG18} = 0,068$; $P_{ME} = 0,257$) und zwischen Sommer und Winter (U-Test nach Mann-Whitney, $P_{DG18} = 0,383$; $P_{ME} = 0,574$) nachgewiesen werden. In anderen Studien (Koch et al. 2000, Baudisch et al. 2001, Schleibinger et al. 2004 II, Trautmann et al. 2005) wurden deutliche Sommerspitzen für außenlufttypische Gattungen wie z. B. *Cladosporium spp.* und *Alternaria spp.* festgestellt. Die Konzentrationen außenluftuntypischer Gattungen wie z. B. *Aspergillus spp.* und *Penicillium spp.* zeigten hingegen nur eine sehr geringe bis gar keine Abhängigkeit von der Jahreszeit. Im Gegensatz dazu ergaben sich in den hier vorgestellten Ergebnissen für *Cladosporium spp.* und andere außenlufttypische Gattungen weder zwischen den Monaten (H-Test nach Kruskal-Wallis, $P_{DG18} = 0,358$; $P_{ME} = 0,566$) noch zwischen Sommer und Winter (U-Test nach Mann-Whitney, $P_{DG18} = 0,169$; $P_{ME} = 0,763$) signifikante Unterschiede in den Konzentrationen (Abb. 4-1).

Gründe für die von anderen Studien abweichenden Ergebnisse liegen wahrscheinlich im Alter des Staubs und in der Dauer des Staubsammelns, was zu einer Selektion besonders robuster Gattungen und einer Verzerrung des Gattungs-/Artenspektrums gegenüber Untersuchungen in Frischstaub führt (Kap. 3.1). Für den jahreszeitlichen Vergleich wurde das Abgabedatum des Staubsaugerbeutels berücksichtigt. Dabei muss bedacht werden, dass die Sammlung des Staubs bis zu mehreren Monaten vor der Abgabe erfolgte und somit unter Umständen über zwei Jahreszeiten hinweg durchgeführt wurde. In den Studien von Koch et al. (2000) und Trautmann et al. (2005) wurden dieselben Wohnungen einmal im Winter und einmal im Sommer beprobt. Im Gegensatz dazu stammen die hier vorliegenden Som-

mer- und Winterproben aus unterschiedlichen Haushalten, so dass neben der Jahreszeit auch noch mit Einflüssen durch die Umgebung, das Gebäude und die Nutzer zu rechnen ist. Allerdings sind in den beiden mehrfach beprobten Kontrollhaushalten nicht alle Sommerproben höher konzentriert als die entsprechenden Winterproben, so dass der Jahreszeiten-Einfluss auch hier nicht beobachtet werden konnte (Abb. 3-9 in Kap. 3.1.1).

Die Jahreszeiten zeigen außerdem keinen Einfluss auf die Konzentration von Ergosterin im Hausstaub ($P = 0,169$ Sommer vs. Winter).

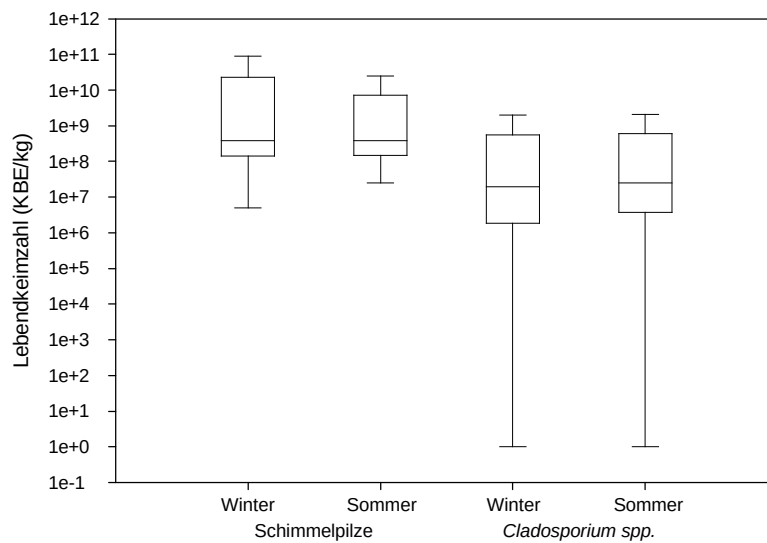


Abb. 4-1: Lebendkeimzahl (KBE/kg, log) sämtlicher Gattungen und von *Cladosporium spp.* im Winter und Sommer (bestimmt auf DG18)

Die oberen und unteren Balken markieren die Spannweite und die Boxen den Interquartilsbereich. Der mittlere Strich beschreibt den Median.

Die Proben wurden nach der Beschaffenheit der unmittelbaren Umgebung der Haushalte in drei Gruppen eingeteilt: geschlossene Bebauung, Mischgebiet und ländliches Gebiet. Mischgebiet konnte z. B. ein städtisches Umfeld mit der Nähe zu einem großen Park oder Friedhof bedeuten. In Bezug auf die Gesamtlebendkeimzahl konnte kein signifikanter Unterschied in der Konzentration nachgewiesen werden ($P > 0,05$). *Wallemia sebi* wies hingegen Unterschiede in der Konzentration auf (H-Test nach Kruskal-Wallis, $P_{DG18} = 0,037$) mit der niedrigsten Konzentration im Bereich geschlossener Bebauung. Zwischen ländlicher Umgebung und Mischgebiet war kein Unterschied erkennbar. *Cladosporium spp.* kommen in ländlicher Umgebung in signifikant höheren Konzentrationen als im Bereich geschlossener Bebauung vor (U-Test nach Mann-Whitney, $P = 0,022$). Ergosterin wurde in Haushalten mit ländlichem Umfeld in signifikant höheren Konzentrationen als in Haus-

halten im Bereich geschlossener Bebauung nachgewiesen (U-Test nach Mann-Whitney, $P = 0,006$).

Neben den Einflüssen von Außen sind gebäudebedingte Auswirkungen auf die Pilzkonzentration im Hausstaub denkbar. Folgendes konnte durch die statistische Analyse festgestellt werden:

- Die Ergosterin-Konzentration ist in Ein- und Zweifamilienhäusern signifikant höher als in Reihenhäusern ($P = 0,011$) und in Mehrfamilienhäusern ($P = 0,0007$). Für die Lebendkeimzahl (gesamt und einzelne Gattungen) konnte keine Abhängigkeit der Konzentration zum Gebäudetyp nachgewiesen werden.
- Das Alter des Gebäudes zeigt keinen Einfluss auf die getesteten Parameter.
- Die Geschossigkeit der beprobten Wohnung beeinflusst die Konzentrationen von Ergosterin ($P = 0,001$) und der Lebendkeimzahl auf DG18 ($P = 0,0005$). Die mit Malzextrakt-Agar ermittelte Lebendkeimzahl zeigt keine Unterschiede über die Geschosse ($P = 0,182$). Souterrain- und Erdgeschosswohnungen weisen im Vergleich zu oberen Geschossen signifikant höhere Konzentrationen an Ergosterin ($P = 3 \cdot 10^{-5}$, Abb. 4-2) und Lebendkeimen ($P_{DG18} = 8 \cdot 10^{-6}$) auf. Die Unterschiede gelten allerdings nicht für alle nachweisbaren Gattungen. Während die Konzentrationen von *Aspergillus spp.* ($P = 0,007$) und *Wallemia sebi* ($P = 1 \cdot 10^{-6}$) wie die Gesamtkeimzahl Abhängigkeiten von der Lage der Wohnung im Gebäude zeigen, ist dieser Einfluss für *Penicillium spp.* und *Eurotium spp.* nicht signifikant nachweisbar.
- Die Beschaffenheit dessen, was sich unterhalb der beprobten Wohnung befindet, beeinflusst ebenfalls signifikant die Konzentration von Ergosterin ($P = 0,0002$) und der auf DG18-Agar bestimmten Lebendkeimzahl ($P = 9 \cdot 10^{-5}$). Sofern sich eine weitere Wohnung darunter befand, war kein Unterschied zwischen bewohnter und unbewohnter Wohnung erkennbar. Wohnungen oberhalb von Souterrain-/Kellergeschossen wiesen höhere Ergosterin- ($P = 0,003$) und Lebendkeimkonzentrationen ($P = 0,005$) als oberhalb von anderen Wohnungen auf. In Erdgeschosswohnungen, unter denen sich direkt ein Fundament oder gestampfte Erde befand, wurden höhere Ergosterinkonzentrationen ($P = 0,048$) als in Wohnungen oberhalb von Kellern und Souterrains nachgewiesen. Für die Gesamtlebendkeimzahl war hier kein Unterschied mehr feststellbar. Bei der Betrachtung einzelner Gattungen ist Folgendes erkennbar: für *Aspergillus spp.* ist wie für Ergosterin die Konzentration in der Folge Fundament/Erde > Souterrain/Keller > Wohnung unterscheidbar. *Eurotium spp.* und *Wallemia sebi* zeigen die gleichen Ab-

hängigkeiten wie die Gesamtlebendkeimzahl. Die Konzentrationen von *Penicillium spp.* werden durch das, was sich unterhalb einer Wohnung befindet, nicht beeinflusst ($P = 0,810$).

- Die Tatsache, ob sich oberhalb der beprobten Wohnung direkt das Dach, ein Dachboden oder eine Wohnung befindet, hat keinen nachweisbaren Einfluss auf die Konzentration von Ergosterin oder der Lebendkeime.

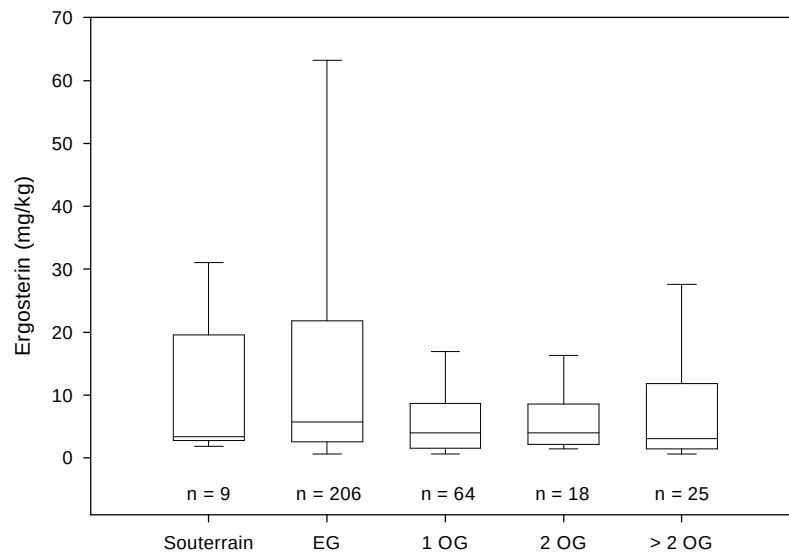


Abb. 4-2: Abhängigkeit der Ergosterin-Konzentration von der Geschossigkeit der beprobten Wohnung

Die oberen und unteren Balken markieren die Spannweite und die Box den Interquartilsbereich. Der mittlere Strich beschreibt den Median.

Die Innenausstattung, wie z. B. Art der Bodenbeläge und der Wandverkleidung, wurden im Fragebogen zwar abgefragt, aber da jeweils die gesamte Wohnung gesaugt wurde, kamen meist viele, verschiedene Oberflächen vor. Es gab nur wenige Wohnungen, die z. B. ganzflächig einen einheitlichen Bodenbelag enthielten. Eine statistische Analyse dieser Angaben war aufgrund der zu geringen Stichprobenumfänge daher nicht sinnvoll.

Im Folgenden werden die nutzungsbedingten Einflussfaktoren aufgezeigt:

- Die Anzahl der Raumnutzer pro Wohnung hat keinen Einfluss auf die Pilzkonzentration im Hausstaub.
- Die Haltung von Haustieren (abgesehen von Fischen) führt zu einer erhöhten Konzentration von Ergosterin ($P = 2 \cdot 10^{-7}$) und der auf DG18 bestimmten Lebendkeimzahl ($P = 0,044$). Für die auf Malzextrakt bestimmte Lebendkeimzahl konnte kein Unter-

schied nachgewiesen werden. Für die Konzentrationsunterschiede der Lebendkeime auf DG18-Agar sind die Gattungen *Cladosporium spp.* ($P = 0,004$), *Fusarium spp.* ($P = 0,022$) und *Mucor spp.* ($P = 0,004$) verantwortlich.

- In Haushalten, in denen Biomüll gesammelt wird, ist die Ergosterinkonzentration ($P = 3 \cdot 10^{-6}$) und die auf beiden Nährböden ermittelte Lebendkeimzahl ($P_{DG18} = 0,002$; $P_{ME} = 0,011$) signifikant höher als in Haushalten, die Biomüll nicht separat sammeln (Abb. 4-3). Durch den Biomüll wird die Konzentration von *Botrytis spp.* ($P = 0,015$), *Cladosporium spp.* ($P = 4 \cdot 10^{-8}$) und *Penicillium spp.* ($P = 0,005$) signifikant beeinflusst.
- Die Sammlung von Restmüll und Wertstoffmüll (gelber Sack) wirkt sich weder auf die Ergosterinkonzentration noch auf die Lebendkeimzahlen aus ($P > 0,05$) (Abb. 4-3).
- Die Anzahl der Topfpflanzen pro Haushalt hat keinen nachweisbaren Einfluss auf den Pilzgehalt im Hausstaub.
- Das Heizverhalten, die Lüftungsgewohnheiten und die aktive oder passive Luftbefeuchtung zeigen keine Auswirkungen auf den Pilzgehalt im Hausstaub. Bezüglich des Heiz- und Lüftungsverhaltens entstand allerdings der Eindruck, dass die Angaben im Fragebogen nicht immer der Realität entsprachen.

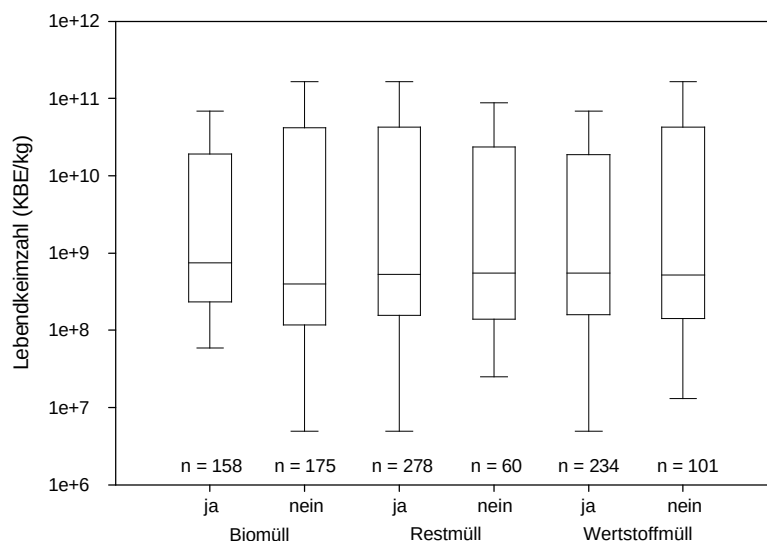


Abb. 4-3: Einfluss der Müllsammlung auf die Lebendkeimzahl im Hausstaub (KBE/kg, log) (bestimmt auf DG18)

Die oberen und unteren Balken markieren die Spannweite und die Box den Interquartilsbereich. Der mittlere Strich beschreibt den Median.

Die Abhängigkeit der Pilzbelastung im Hausstaub von größeren Umbaumaßnahmen des Gebäudes konnte nicht eindeutig geprüft werden. Die Antworten waren zu verschieden und nicht alle angegebenen Umbauten (z. B. erneuerte Elektrik) sind als Einflussfaktoren auf die Schimmelpilzkonzentration im Hausstaub naheliegend. Das Vorhandensein von Baumängeln im Sinne von defekter Regenableitung, Putzrissen oder feuchten Stellen hat nach den hier ermittelten Antworten keinen Einfluss auf den Pilzgehalt im Hausstaub. Allerdings konnte aus den Antworten nicht abgelesen werden, ob sich die Baumängel auch im direkten Einflussbereich der beprobten Wohnung befanden.

Um die Auswirkungen eines zeitlich zurückliegenden und beseitigten Pilzbefalls auf den Schimmelpilzgehalt im Staub zu beurteilen, wurden nur die Kontrollproben herangezogen. Ergosterin kommt in Haushalten mit einem früheren Pilzbefall in höheren Konzentrationen vor als in Haushalten ohne Befallsgeschichte ($P = 0,005$). Die Gesamtlebendkeimzahl zeigt hingegen keine Unterschiede ($P > 0,05$). Sofern der Pilzbefall in diesen Haushalten mit Fungiziden behandelt wurde, sind im Staub niedrigere Konzentrationen an Ergosterin ($P = 0,032$) und auf Malzextrakt-Agar bestimmten Lebendkeimen ($P = 0,025$) nachweisbar als in Haushalten ohne Fungizid-Einsatz. Für die Lebendkeimzahl auf DG18-Agar konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P = 0,091$). Für die Schimmelpilzbekämpfung im Innenraum stehen auf dem Markt zahlreiche Produkte zur Verfügung, die z. B. auf Alkoholen (Ethanol, Isopropanol), Wasserstoffperoxid oder chlorhaltigen Verbindungen basieren und hier zu den Fungiziden gezählt wurden. In vielen deutschen Haushalten sind nach wie vor hohe Konzentrationen von Pentachlorphenol (PCP) nachweisbar, das in den 1970er Jahren als Fungizid im Holzschutz eingesetzt und aufgrund seiner karzinogenen Wirkung 1989 verboten wurde (Walker et al. 1999). Die Konzentration von PCP wurde in 288 Proben bestimmt und mit den Lebendkeimzahlen im Staub verglichen. Es konnte kein Einfluss der PCP-Konzentration auf die Konzentration der Schimmelpilze im Hausstaub nachgewiesen werden (Rangkorrelation nach Spearman).

In Haushalten, in denen ein muffiger Geruch wahrnehmbar ist, ist die Lebendkeimzahl, nachgewiesen auf DG18-Agar, signifikant höher als in Haushalten ohne Geruchsauffälligkeiten ($P = 0,0025$). Es sind folgende Gattungen in erhöhten Konzentrationen nachweisbar: *Aspergillus spp.* ($P = 0,003$), *Fusarium spp.* ($P = 0,033$) und *Wallemia sebi* ($P = 0,032$). Für die Ergosterinkonzentration und die Lebendkeimzahl, bestimmt auf Malzextrakt-Agar, bestätigt sich dieses Ergebnis nicht ($P > 0,05$).

Die Befallsgröße zeigt in den Fallproben keine Auswirkungen auf den Pilzgehalt im Hausstaub. Dagegen ist ein deutlicher Unterschied erkennbar, ob der Befall zum Raum hin offen vorliegt oder hinter Möbeln versteckt ist. Allerdings sind die Konzentrationen nicht – wie man erwarten würde – bei einem Befall an freier Wandfläche höher, sondern dann, wenn der Befall hinter Möbeln vorliegt. Dieser Effekt zeigt sich bei der Ergosterinkonzentration ($P = 0,014$) und der auf DG18 bestimmten Lebendkeimzahl ($P = 0,032$). Vermutlich wird ein hinter Möbeln versteckter Befall nicht so schnell entdeckt, so dass es über einen längeren Zeitraum zu einer Anreicherung von Pilzbestandteilen im Staub kommt. Außerdem wird ein offensichtlicher Missstand wahrscheinlich eher beseitigt als ein verstecktes Problem.

Tab. 4-1: Zusammenstellung der von einem Pilzbefall unabhängigen Faktoren, die zu einer erhöhten Konzentration von Ergosterin und Lebendkeimen im Hausstaub führen

Einflussfaktor	Ergosterin	Lebendkeime (DG18)	Abkürzung
Umgebung	L > M > B	L > B <i>Cladosporium</i> M > B <i>Wallemia</i>	L: ländl. Umgebung B: geschloss. Bebauung M: Mischgebiet
Gebäudetyp	E/ZFH > RH > MFH	-	E/ZFH: Ein-/Zwei-familienhaus RH: Reihenhaushaus MFH: Mehrfamilienhaus
Geschossigkeit	S/EG > OG	S/EG > OG gesamt, <i>Aspergillus</i> , <i>Wallemia</i>	S: Souterrain EG: Erdgeschoss OG: Obergeschoss
Unterhalb der Wohnung	F/E > K/S > W	F/E und K/S > W gesamt, <i>Eurotium</i> , <i>Wallemia</i> F/E > K/S > W <i>Aspergillus</i>	F/E: Fundament/Erde K/S: Keller/Souterrain W: Wohnung
Haustiere	ja > nein	ja > nein gesamt, <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Mucor</i>	
Biomüll	ja > nein	ja > nein gesamt (auch ME), <i>Botrytis</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i>	ME: Malzextrakt-Agar
Muffiger Geruch		ja > nein gesamt, <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Wallemia</i>	

Diese Ausführungen zeigen, dass der Pilzgehalt im Hausstaub von weit mehr Einflussfaktoren als nur dem Vorhandensein eines Pilzbefalls im Innenraum abhängt. Die Faktoren sind in Tab. 4-1 zusammengestellt.

Neben den Jahreszeiten beeinflussen Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Windgeschwindigkeit, die Ökologie einer Umgebung, die Vegetation und Mikroklimata entscheidend die Menge und Zusammensetzung der Lebendkeime in der Außenluft (Flannigan et al. 1991). Lacey (1962) beobachtete an einer geschützten Stelle in Flussnähe das 2,6-fache an keimfähigen Sporen als auf einer offenen Anhöhe, die nur 450 m entfernt war. Der variierende Pilzgehalt der Luft in Abhängigkeit der unmittelbaren Umgebung scheint sich stärker auf den Pilzgehalt im Hausstaub auszuwirken als die jahreszeitlichen Schwankungen, was in erster Linie an der Ergosterinkonzentration abgelesen werden konnte (Tab. 4-1), die die gesamte Menge an Pilzbestandteilen im Staub beschreibt. Dies lässt den Schluss zu, dass im ländlichen Bereich höhere Pilzmassen im Hausstaub vorkommen, die sich über die keimfähigen Bestandteile nicht vollständig beschreiben lassen. Nur an einzelnen Gattungen lässt sich der Einfluss der Umgebung ablesen. Ein Zusammenhang zwischen ländlicher Umgebung und der Konzentration von *Cladosporium spp.* ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass einige Vertreter dieser Gattung pflanzenpathogen sein können und andere saprophytisch leben (Samson et al. 2004) und somit in Umgebungen mit hohem pflanzlichen Anteil verstärkt vorkommen. Die signifikant höhere Konzentration von *Wallemia sebi* in Mischgebieten ist nicht zu erklären, da die hier ausgewiesenen Mischgebiete nicht klar definiert sind und somit keine charakteristischen Eigenschaften aufweisen. *Wallemia sebi* ist ein ubiquitär vorkommender und xerophiler Pilz, der auf relativ trockenen Lebensmitteln, im Boden, in Heu und im Innenraum nachweisbar ist (Samson et al. 2004).

Die unterschiedlichen Konzentrationen von Ergosterin und teils auch der Lebendkeimzahl in Abhängigkeit vom Gebäudetyp, der Geschossigkeit und dem, was sich unterhalb der beprobten Wohnung befindet, sind teilweise auf die gleichen Gründe zurückzuführen. Der Eintrag von Schimmelpilzen über verschmutztes Schuhwerk der Nutzer ist ein nicht zu vernachlässigender Faktor (Trautmann et al. 2005). Freistehende Ein- und Zweifamilienhäuser haben neben der Haustür noch eine Gartentür und vielleicht einen weiteren Nebeneingang zum Autostellplatz, so dass durch den verstärkten Laufverkehr zwischen Innen und Außen auch mehr Eintrag von Schimmelpilzen mit dem Schuhwerk erfolgt. Auch Jovanovic et al. (2001) haben festgestellt, dass der Hausstaub in Ein- und Zweifamilienhäusern mehr Pilze enthält als der anderer Haushalte. Von den hier beprobten Haushalten in Mehrfamilienhäusern liegen zwar 35 % im Souterrain oder Erdgeschoss, aber vermutlich

ohne weiteren Ein-/Ausgang zum Garten. In Mehrfamilienhäusern sind die Wohnungstüren meistens nicht identisch mit der Haustür, so dass die Bewohner und Besucher einige Meter durch den Hausflur gehen und somit ersten Schmutz vom Schuhwerk ablaufen. Dieser Effekt wird stärker, je höher die Wohnung im Gebäude liegt, so dass die oberen Geschosse geringere Konzentrationen von Ergosterin sowie der Gesamtlebendkeimzahl aufweisen. Jovanovic et al. (2001) haben neben der abnehmenden Keimzahl im Hausstaub auch eine geringere Staubmenge pro m² Bodenfläche mit steigender Geschosshöhe nachgewiesen. Die Tatsache, dass dieser Konzentrationsunterschied auch für die Gattungen *Aspergillus* und *Wallemia* nachweisbar ist, legt die Vermutung nahe, dass das Schuhwerk ein wichtiger Eintragungsweg für diese Gattungen ist.

Der Einfluss dessen, was sich unterhalb der beprobten Wohnung befindet, ist auf die gleichen Ursachen zurückzuführen. Wohnungen oberhalb von Souterrains oder Kellern liegen (offensichtlich) im Erdgeschoss und Haushalte oberhalb anderer Wohnungen mindestens im 1. Obergeschoss. Allerdings zeigt die statistische Analyse signifikant höhere Konzentrationen von Ergosterin und Vertretern der Gattung *Aspergillus* in Wohnungen direkt über einem Fundament oder gestampfter Erde als über einem Keller oder Souterrain. Da die meisten Gebäude über eine Fußbodenkonstruktion bestehend aus einer Bodenplatte mit Feuchtigkeitssperre, Dämmschicht und Estrichplatte verfügen, ist das darunter befindliche Erdreich als Quelle unwahrscheinlich. Unter Umständen sind diese Fußbodenkonstruktionen aufgrund mangelnder thermischer und hygrischer Abdichtung anfälliger für Pilzbefall als Konstruktionen oberhalb von Kellern. Solange es nicht zu geruchlichen Auffälligkeiten kommt, wird ein solcher Befall nicht entdeckt. In diesem Lebensraum sind häufig xerophile Arten wie *Wallemia sebi* und sich an xerophile Verhältnisse anpassende Arten wie z. B. *Aspergillus versicolor* anzutreffen (Hankammer und Lorenz 2003, Sedlbauer und Krus 2003).

Unter den nutzerbedingten Einflussfaktoren führen die Sammlung von Biomüll und die Haltung von Haustieren (abgesehen von Fischen) zu den deutlichsten Konzentrationsunterschieden im Pilzgehalt des Hausstaubs. Die Haltung von Haustieren ist mit Hygienemängeln assoziiert und wurde von Brasche et al. (2003) als Risikofaktor für Schimmelpilzschäden eingestuft. Außerdem führen Haustiere zu nachweislich höheren Konzentrationen von Milbenallergenen (Gross et al. 2000) und von Endotoxinen im Hausstaub (Bischof et al. 2002). Jovanovic et al. (2001) haben bei ihren Untersuchungen in Haushalten mit Tieren höhere Staubmengen nachgewiesen. In den hier untersuchten Proben scheint die Haustierhaltung mit erhöhten Ergosterin- und Lebendkeimkonzentrationen verbunden zu

sein. Der Eintrag erfolgt zum einen ähnlich wie beim Schuhwerk durch Pfoten und Fell von z. B. Hunden und Katzen und zum anderen über die verwendete Streu (Heu, Stroh, Sägespäne u. a.) bei Käfighaltung. Gerade für die erhöhte Konzentration von *Fusarium spp.* ist das Streumaterial eine sehr wahrscheinliche Quelle, da viele *Fusarium*-Arten pflanzenpathogen sind und z. B. Getreide besiedeln (Samson et al. 2004). *Mucor spp.* wachsen oft auf Dung, verrottendem Pflanzenmaterial und oberflächlich im Boden (Domsch et al. 1980), so dass – wie bei *Cladosporium spp.* (s. o.) – vor allem der Eintrag über Tiere, die sich auch draußen aufhalten, denkbar ist. Da die Sporangiosporen von *Mucor spp.* die Darmpassage von Kaninchen überleben können (Domsch et al. 1980), können keimfähige Sporen nach dem Verzehr von kontaminiertem Heu im Kot enthalten sein. Die Staubsaugerbeutel aus Haushalten mit Kaninchen und anderen Nagetieren enthielten häufig massenhaft Heu, Stroh und Kot. *Mucor spp.* und *Fusarium spp.* wachsen auf Malzextrakt-Agar sehr schnell und wuchernd, so dass die Kolonien häufig quantitativ nicht zu erfassen sind. Daher ist der Einfluss der Tierhaltung auf diesem Nährboden im Gegensatz zu DG18-Agar nicht nachweisbar, obwohl diese eher hydrophilen Gattungen Malzextrakt-Agar bevorzugen.

Die Sammlung von Biomüll ist der einzige Faktor, der auch die auf Malzextrakt-Agar bestimmte Lebendkeimzahl beeinflusst. Neben einer erhöhten Ergosterin- und Gesamtkeimkonzentration sind die Gattungen *Botrytis*, *Cladosporium* und *Penicillium* in signifikant höheren Konzentrationen im Hausstaub nachweisbar. *Botrytis spp.* sind häufig als Schädling (bekannt als Grauschimmel) auf Beeren- und Kernobst sowie auf zahlreichen Gemüsesorten anzutreffen (Samson et al. 2004). Einige *Penicillium spp.* werden gezielt zur Herstellung von Lebensmitteln wie z. B. Käse eingesetzt, viele bereiten aber auch große Probleme als Verderber von Lebensmitteln (Samson et al. 2004), so dass ihr häufiges Vorkommen in Biomüll naheliegend ist. Die Auswirkung der Häufigkeit der Leerung des Mülls konnte hier nicht untersucht werden, da die Frage nur unzureichend beantwortet wurde. Wouters et al. (2000) haben im Hausstaub von Haushalten mit Biomüllsammlung (mehr als 1 Woche Sammlung) die 3,2-fache Menge an Endotoxinen, die 7,6-fache Konzentration an extrazellulären Polysacchariden (von *Aspergillus spp.* und *Penicillium spp.*) sowie den 4,6-fachen Gehalt an 1,3- β -D-Glucan als in Haushalten ohne Biomüll-Trennung nachgewiesen. In Haushalten, in denen der Biomüll wenigstens einmal pro Woche geleert wurde, wurde dieser Effekt nur noch bei den Endotoxinen (2,6-fach) und extrazellulären Polysacchariden (2,1-fach) beobachtet. Für 1,3- β -D-Glucan ergab sich kein Unterschied mehr. Um auszuschließen, dass diese erhöhten Werte auf andere unhygienische Zustände als die

Biomüll-Sammlung zurückzuführen sind, wurden auch Katzen- und Milben-Allergene in den Staubproben untersucht. Die Werte waren nicht assoziiert mit Haushalten mit Biomüll-Sammlung.

Der Einfluss der Bewohner, ihrer Gewohnheiten und auch der Umgebung auf die Zusammensetzung des Staubs zeigte sich bereits beim ersten Öffnen der Staubsaugerbeutel: im Dezember und Januar waren häufig massenhaft Tannennadeln zu sehen, im Herbst fanden sich viele Blätter. Bei Haltung von Nagetieren enthielten die Staubsaugerbeutel viel Stroh und Kot und in Haushalten mit Kleinkindern oftmals Spielzeugteile (Abb. 4-4). Daher ist es naheliegend, dass sich diese Schwankungen auch auf die Fraktionen $\leq 63 \mu\text{m}$ auswirken.



Abb. 4-4: Aufnahmen von ungesiebten Staubproben verschiedener Haushalte, in denen die Variationsbreite der Zusammensetzung deutlich wird

Ein weiterer Anhaltspunkt für die Variationsbreite der Staubzusammensetzung ist der Gehalt an organischen Bestandteilen, der durch den Glühverlust bestimmt wurde. Der Glühverlust variierte in den Proben von 15,3 bis 95,5 % bei einem Mittelwert von 54,0 %. Zwi-

schen Kontroll- und Fallproben ist kein signifikanter Unterschied im organischen Anteil messbar (U-Test nach Mann-Whitney). Eine Korrelation des organischen Anteils zum Pilzgehalt im Hausstaub konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Nachweis von Schimmelpilzen oder chemischen Indikatoren für Schimmelpilze im Altstaub ($\leq 63 \mu\text{m}$) nicht geeignet ist, um einen Pilzbefall im Innenraum nachzuweisen oder auszuschließen, da sowohl die Konzentration als auch die Artenzusammensetzung multifaktoriell bedingt sind. Diskussionswürdig erscheint vor diesem Hintergrund, ob diese Einflüsse auf 7 Tage alten Staub (= Frischstaub) wirklich so gering sind, dass erhöhte Lebendkeimzahlen im Hausstaub eindeutig auf einen Pilzbefall im Innenraum zurückzuführen sind.

Schleibinger et al. (2004 II) haben einen signifikanten Unterschied in den Häufigkeiten und Konzentrationen zwischen Schimmel- und Nichtschimmel-Wohnungen nur für Vertreter der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* nachweisen können. Sie haben Frischstaub von einer definierten Fläche auf einen Planfilter gesammelt und ungesiebt angesetzt. Für die Summenkonzentration beider Gattungen haben sie cut-off-Werte ermittelt und mit deren Hilfe Schimmel- und Nichtschimmel-Wohnungen mit einer Sensitivität von 93 % (DG18) bzw. 95 % (ME) richtig klassifizieren können. Diese Vorgehensweise konnte mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht nachvollzogen werden, da sich weder die Konzentration noch die Häufigkeit von *Penicillium spp.* zwischen Fällen und Kontrollen signifikant unterscheidet. Die höchste, aber für eine Bewertung unzureichende Sensitivität betrug 22,9 % und wurde mit der Summenkonzentration von *Aspergillus spp.* auf DG18 erzielt (Tab. 3-4, Kap. 3.1.1). Die Beurteilung eines Innenraums anhand von ein oder zwei Gattungen hat den entscheidenden Nachteil, dass Befallssituationen mit anderen Gattungen nicht erfasst und falsch negativ bewertet werden. Neben *Aspergillus spp.* und *Penicillium spp.* sind auch Gattungen wie *Acremonium*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Scopulariopsis*, *Wallemia* u. a. auf befallenem Baumaterial und durchaus großflächig nachweisbar (Hankammer und Lorenz 2003).

Aus diesem Grund haben Trautmann et al. (2005) Bewertungshilfen für häufig im Innenraum vorkommende Pilzarten/-gattungen und Feuchteindikator-Organismen vorgeschlagen. Die zugrundeliegenden Daten wurden in Haushalten ohne sichtbaren Pilzbefall erhoben. Es wurde Frischstaub von einer definierten Teppichfläche auf Planfilter gesaugt und Verdünnungen der $\leq 63 \mu\text{m}$ Fraktion auf Malzextrakt- und DG18-Agar ausplattiert. Um den

starken Schwankungen der Lebendkeimzahlen z. B. aufgrund von Jahreszeiten und anderen Einflüssen gerecht zu werden, wurden zwei Beurteilungswerte ermittelt (im Folgenden Zwei-Stufen-Bewertung genannt). Der erste Wert ist das sinnvoll gerundete 95. Perzentil der für die entsprechende Art/Gattung nachgewiesenen Konzentration ($n = 159$ Kontrollproben) bzw. mindestens $10 \cdot 10^6$ KBE/kg und entspricht der oberen Grenze der Hintergrundkonzentration. Der zweite Beurteilungswert entspricht dem dreifachen ersten Wert. Trautmann et al. (2005) gehen davon aus, dass Konzentrationen oberhalb des zweiten Beurteilungswertes nur von belasteten Proben überschritten werden. Zusätzlich wird eine Gruppierung der Pilze nach ihrer häufigsten Quelle vorgenommen: 1. Feuchteschaden, 2. Feuchteschaden und andere Innenraumquellen (Müllsammlung, verschimmelte Lebensmittel u. a.), 3. Außenluft. Dies zeigt dem Anwender des Beurteilungsschemas, dass er auch nach anderen Quellen außer Feuchteschäden suchen muss. *Aspergillus spp.* und *Penicillium spp.* werden von Trautmann et al. (2005) in Gruppe 2 und *Eurotium spp.* in Gruppe 1 eingestuft – mit dem Hinweis auf Tierhaltung als mögliche Quelle. Im Gegensatz dazu bringen Baudisch et al. (2009 I) erhöhte Konzentrationen der Gattungen *Aspergillus*, *Eurotium* und *Penicillium* ausschließlich mit Feuchteschäden in Verbindung.

Baudisch et al. (2009 I) haben 14 Fallproben mit ihrem eigenen Bewertungsschema und mit dem von Trautmann et al. (2005) beurteilt und verglichen. Die Probenahme und die Aufarbeitung sind in beiden Studien identisch. Im Gegensatz zu der Zwei-Stufen-Bewertung von Trautmann et al. (2005) mit der Berücksichtigung der verschiedenen Pilzgattungen/-arten haben Baudisch et al. (2009 I) die Leitgattungen *Aspergillus/Eurotium* und *Penicillium* herangezogen, die im Verhältnis zur Gesamtzahl bewertet werden. Bei einer Gesamtzahl der Kolonie-bildenden Einheiten von $5 \cdot 10^8$ KBE/kg beträgt der Schwellenwert für *Aspergillus/Eurotium* $2 \cdot 10^8$ KBE/kg und für *Penicillium* $3 \cdot 10^8$ KBE/kg. Bei einer Gesamtzahl zwischen 5 und $20 \cdot 10^8$ KBE/kg liegt die Schwelle der Leitgattungen bei je 20 % der Gesamtzahl und bei mehr als $20 \cdot 10^8$ KBE/kg entsprechen die Schwellenwerte dem jeweils 2. Beurteilungswert von Trautmann et al. (2005), nämlich $4,2 \cdot 10^8$ KBE/kg für *Aspergillus/Eurotium* und $4,5 \cdot 10^8$ KBE/kg für *Penicillium*. Diese Bewertung führt zu einer Spezifität von 98,7 % und die Zwei-Stufen-Bewertung von Trautmann et al. (2005) lediglich zu einer Spezifität von 74 %. Allerdings wird bei der Darstellung der beprobten Haushalte nicht erläutert, ob ein Pilzbefall zusätzlich z. B. durch Materialbeprobung bewiesen wurde. Für einige Haushalte ist zwar ein Feuchteschaden angegeben, aber kein sichtbarer Pilzbefall. Daher stellt sich die Frage, ob die im Hausstaub nachweisbaren er-

höhten Konzentrationen der Leitgattungen tatsächlich auf einen Pilzbefall oder auf andere Quellen zurückzuführen sind.

Die Standardisierung der Probenahme und der Aufarbeitung des Hausstaubs verringert zwar die methodischen Schwankungen, aber es bleibt dennoch die Unsicherheit, welches die Quellen für die in erhöhter Konzentration vorkommenden Pilze sind. Bei der Bewertung von Lebendkeimzahlen im Hausstaub müssten Einflussfaktoren, wie z. B. die Haustierhaltung, die Biomüllsammlung und Geschossigkeit, berücksichtigt werden, was die Bewertung stark verkompliziert. Um diese Einflüsse zumindest annähernd bewerten zu können, ist eine Ortsbegehung unabdingbar. Beim Einschicken der Staubsaugerbeutel ist der Bewertende auf die Angaben der Bewohner angewiesen, die mittels Fragebogen oder telefonisch abgefragt werden können. Dies birgt weitere Unsicherheiten.

Weiterhin müssen für jede Gattung die Flugfähigkeit ihrer Sporen und das Ausmaß der Sporenablösung vom Myzel in die Höhe des Referenzwertes einfließen. Während *Aspergillus spp.* und *Penicillium spp.* Sporen mit guter Flugfähigkeit bilden und die Sporen sich leicht und massenhaft vom Myzel ablösen, werden die Sporen von *Stachybotrys chartarum* von einer Schleimschicht umgeben, die das Ablösen und die Flugfähigkeit negativ beeinträchtigt (Hankammer und Lorenz 2003). Die Ablösebereitschaft der Sporen und das Ausmaß der Sporenproduktion sind auch vom Wassergehalt des Substrats abhängig (Reiß 1998). Dementsprechend kann die Menge der Sporen, die sich aufgrund eines Pilzbefalls im Hausstaub anreichert, stark schwanken.

Trautmann et al. (2005) werden diesen Einflüssen mit ihren Gattungs- oder Pilzgruppenspezifischen Beurteilungswerten und der Zwei-Stufen-Bewertung am stärksten gerecht. Koch et al. (2000) fordern sogar für jahreszeitlich schwankende Gattungen entsprechend an Jahreszeiten angepasste Schwellenwerte.

Bei der Frischstaubprobenahme wird das Ergebnis durch die Lage und Beschaffenheit der Probefläche stark beeinflusst. Das Gewicht und die Zusammensetzung des Staubs sind von der Beschaffenheit des Untergrundes – Teppich oder glatter Belag – (Verhoeff et al. 1994 II) und beim Teppich von dessen Art und Alter abhängig (Trautmann et al. 2005). Auch die Frequenz des Belaufens der beprobten Fläche hat einen starken Einfluss auf die Lebendkeimzahl, wie Gabrio et al. (2005) zeigen konnten. Die Auswahl der Fläche lässt sich nur schwer standardisieren, da der Probenehmer mit den örtlichen Gegebenheiten zurechtkommen muss.

Bei einem sichtbaren Pilzbefall ist die Lebendkeimbestimmung im Staub überflüssig, da das Ergebnis keinen zusätzlichen Informationsgewinn liefert. Für die Einschätzung des Gefährdungspotentials durch die dort wachsenden Pilze ist eine direkte Materialuntersuchung ausreichend, auch wenn damit keine Expositionsabschätzungen möglich sind. In Hinblick auf das Erkennen eines versteckten Pilzbefalls erschien die Methode der Lebendkeim- oder Ergosterinbestimmung im Hausstaub vielversprechend. Ob sich allerdings ein verdeckter Pilzbefall messbar auf den Schimmelpilzgehalt im Staub auswirkt, konnte durch die bisher durchgeführten Studien nicht geklärt werden. Die geschilderten Einflüsse, die unabhängig von einem Pilzbefall zu einer Anreicherung von Pilzbestandteilen im Hausstaub führen, lassen daran Zweifel entstehen – selbst wenn die scheinbar aussagekräftigere Methode der Untersuchung von Frischstaubs gewählt wird.

Die möglichen Gründe für die unterschiedlichen Auswirkungen der geschilderten Einflüsse auf den Lebendkeimgehalt und die Konzentration von Ergosterin werden im folgenden Kapitel 4.2 diskutiert.

4.2 Schimmelpilze und chemische Indikatoren (Methodenvergleich)

Die Gesamtsporenzahl sowie die chemischen Indikatoren 1,3- β -D-Glucan und N-Acetyl- β -D-glucosaminidase wurden in einem Unterkollektiv von 29 Proben bestimmt. Die Ergebnisse sind der Tab. 8-2 im Anhang zu entnehmen. Der Nachweis von Ergosterin erfolgte hingegen im gesamten Kollektiv. Die Ergebnisse der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman sind in Tab. 4-2 dargestellt. Im Anschluss folgt die Diskussion zu den einzelnen Methoden.

Tab. 4-2: Ergebnisse der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman (r_s)

In den 3 Zeilen pro Korrelationspaar sind der Rangkorrelationskoeffizient (r_s), die Anzahl der Proben und die einseitige Signifikanz angegeben (Irrtumswahrscheinlichkeit < 5 %). Bei einer Signifikanz kleiner als die Irrtumswahrscheinlichkeit wird die Nullhypothese abgelehnt und es liegt eine Korrelation vor (Felder grau unterlegt).

		KBE - DG18	KBE - ME	Gesamtsporen	Ergosterin	1,3- β -D-Glucan
KBE - ME	r_s	0,745				
	Anzahl	354				
	eins. Sign.	$5,3 \cdot 10^{-64}$				
Gesamtsporen	r_s	0,410	0,438			
	Anzahl	29	29			
	eins. Sign.	0,014	0,009			
Ergosterin	r_s	0,399	0,371	0,298		
	Anzahl	354	354	29		
	eins. Sign.	$3,0 \cdot 10^{-15}$	$3,1 \cdot 10^{-13}$	0,058		
1,3- β -D-Glucan	r_s	0,215	0,251	-0,041	0,171	
	Anzahl	29	29	29	29	
	eins. Sign.	0,131	0,094	0,417	0,188	
NAGase	r_s	0,242	0,178	0,369	0,311	0,037
	Anzahl	29	29	29	29	29
	eins. Sign.	0,103	0,177	0,025	0,050	0,425

Ergosterin vs. Lebendkeimzahl:

Die Konzentration von Ergosterin korreliert signifikant mit der Lebendkeimzahl auf DG18-Agar ($r_s = 0,399$, einseitige Signifikanz = $3,0 \cdot 10^{-15}$) (Abb. 4-5) und auf Malzextrakt-Agar ($r_s = 0,371$, einseitige Signifikanz = $3,1 \cdot 10^{-13}$). Im Gegensatz zur Lebendkeimzahl erfasst die Bestimmung von Ergosterin auch nicht keimfähige und abgestorbene Pilzbestandteile, so dass davon auszugehen ist, dass die Ergosterinkonzentration die gesamte vorkommende Pilzmasse beschreibt.

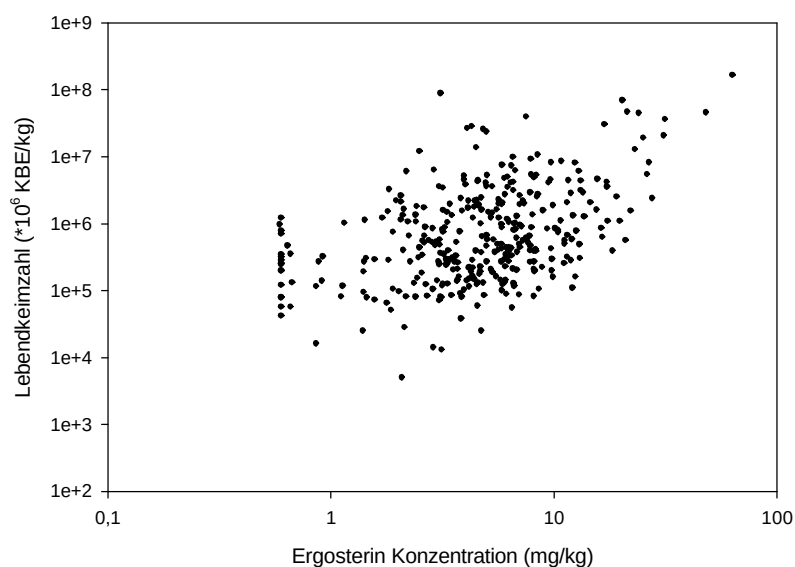


Abb. 4-5: Lebendkeimzahl (KBE, DG18-Agar) und Konzentration von Ergosterin (mg/kg) in den Hausstaubproben (n = 354)

Die Assoziation der koloniebildenden Einheiten zum Ergosteringehalt wurde in der Literatur für verschiedene Matrices wie Hausstaub (Saraf et al. 1997), Luft (Robine et al. 2005), Laborkulturen (Schnürer 1993) und Getreide (Seitz et al. 1977) ermittelt. Pasanen et al. (1999) haben hingegen bei der Untersuchung von kontaminierten Baumaterialien unterschiedlich gute Korrelationen zwischen der Lebendkeimzahl und der Ergosterinkonzentration festgestellt, die auf das Baumaterial (Glaswolle, Gipskarton, Holzspäne), die variierende Pilzflora und die bisherigen Wachstumsbedingungen (Feuchtegehalt usw.) im eingebauten Zustand zurückgeführt wurden. Die chemische Zusammensetzung des Substrats beeinflusst den Ergosteringehalt der Pilze und führt somit zu unterschiedlichen Ergosterinkonzentrationen pro Trockenmasse des Pilzmyzels (Gessner und Chauvet 1993). Newell et al. (1987) haben nachgewiesen, dass Pilzisolat aus einem Salzmarschland auf einem Labormedium (Glukose – Hefeextrakt) viermal weniger Ergosterin als auf einem mit Blattextrakten angereichertem Vollmedium enthielten. Verschiedene Pilzarten scheinen außerdem unterschiedliche Mengen an Ergosterin zu produzieren. Der Ergosteringehalt pro Spore bzw. Zelle von neun untersuchten Pilzarten war bei *Aspergillus versicolor* und *Stachybotrys chartarum* am höchsten und bei *Rhodotorula spp.* am geringsten (Pasanen et al. 1999). Bei der Berechnung von Messparametern pro Spore oder Zelle liegt allerdings eine große Unsicherheit in der richtigen Erfassung der genauen Sporenzahl (Madsen 2003). Ähnliche Zweifel haben Ruzicka et al. (2000), die Ergosterin nur bedingt für einen guten Indikator der Pilzmasse halten, da alle vergleichenden Methoden wie z. B. die Bestimmung

der Lebendkeime, der Biomasse oder der Gesamtsporen ebenfalls stark fehlerbehaftet sind. Somit wird nicht klar, wie gut Ergosterin die tatsächlich vorhandene Pilzmasse beschreibt.

Die Lebendkeimzahl und die Ergosterinkonzentration zeigten unterschiedliche Abhängigkeiten von extraanalytischen Einflüssen (Tab. 4-1, Kap. 4.1). An dieser Stelle kann nicht unterschieden werden, ob die Ursache in der Erfassung der gesamten Pilzmenge durch Ergosterin (im Gegensatz zur Lebendkeimzahl) oder in den variierenden Ergosteringehalten in Abhängigkeit der Pilzart und den Wachstumsbedingungen zu sehen ist. Grundsätzlich zeichnet die signifikante Korrelation zwischen Lebendkeimzahl und Ergosterinkonzentration Ergosterin als einen geeigneten chemischen Indikator für Pilze aus.

Ergosterin vs. Gesamtsporenzahl:

Obwohl Ergosterin auch in nicht keimfähigen Sporen enthalten ist, korrelierte die Gesamtsporenzahl nicht signifikant mit der Ergosterinkonzentration ($r_s = 0,298$, einseitige Signifikanz = 0,058). Dieses Ergebnis ist vermutlich in erster Linie auf die in Kap. 3.1.2 beschriebenen methodischen Probleme bei der Bestimmung der Gesamtsporenzahl zurückzuführen. Weitere Gründe sind in den unterschiedlichen Ergosteringehalten der Sporen zu sehen, wie sie oben beschrieben wurden.

1,3- β -D-Glucan:

Die Konzentration von 1,3- β -D-Glucan korrelierte mit keiner der anderen untersuchten Messgrößen. Iossifova et al. (2007 und 2008) haben beim Vergleich der Konzentrationen von 1,3- β -D-Glucan, bestimmt mit Hilfe des LAL-Tests, und von Pilzen im Hausstaub, nachgewiesen über die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), ebenfalls keine Assoziation festgestellt (maximaler Korrelationskoeffizient $r = 0,14$). Im Gegensatz dazu stehen die Arbeiten, in denen 1,3- β -D-Glucan mit einem Enzymimmunoassay im Hausstaub bestimmt wurde. Chew et al. (2001) konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration von 1,3- β -D-Glucan und der Lebendkeimzahl im Hausstaub nachweisen (Frischstaub auf Planfiltern, $\leq 425 \mu\text{m}$ Fraktion). Mit diesem Verfahren konnten auch Gehring et al. (2001) im Hausstaub eine gute Korrelation zwischen diesen beiden Messgrößen herstellen, obwohl sie 1,3- β -D-Glucan in einer ungesiebten und die Lebendkeimzahl in einer $\leq 500 \mu\text{m}$ Fraktion derselben Probe bestimmt haben. Es ist naheliegend, dass diese unterschiedlichen Ergebnisse auf den Einsatz verschiedener Nachweismethoden (LAL vs.

ELISA) und verschiedener Staubarten (Alt- und Frischstaub) zurückzuführen sind. Chun et al. (2000) zweifeln die Reproduzierbarkeit und Spezifität des LAL-Tests an, da sie in einem Ringversuch zur Bestimmung von Endotoxinen in Baumwollstaub hohe Variationen in den Ergebnissen zwischen den Laboren ermittelt haben. Ein Grund für die stark variierenden Ergebnisse wurde in der Verwendung unterschiedlicher Chargen des LAL-Tests vermutet. Saraf et al. (1997) nehmen aufgrund ihrer Untersuchungen im Hausstaub an, dass das LAL-System anfällig für Kreuzreaktionen und Hemmungen der Enzym-Kaskade durch andere Umwelt-Kontaminanten ist. Daher ist fraglich, ob der Nachweis von 1,3- β -D-Glucan im Hausstaub mit dem LAL-Test geeignet ist, um einen Pilzbefall im Haushalt zu erkennen.

1,3- β -D-Glucan kommt außer in Pilzen auch in einigen Bakterien sowie niederen und höheren Pflanzen vor (Giovannangelo et al. 2007). Bakterien, Pollen und andere pflanzliche Bestandteile sind im Hausstaub teilweise in beträchtlichem Maße enthalten und werden über den Glucan-Nachweis mit erfasst. Dadurch wird die Korrelation zwischen 1,3- β -D-Glucan und Pilzen negativ beeinflusst. 1,3- β -D-Glucan ist somit ein wenig geeigneter Indikator für die Menge an Pilzen im Hausstaub.

N-Acetyl- β -D-glucosaminidase:

Die Aktivität von N-Acetyl- β -D-glucosaminidase korrelierte signifikant mit der Gesamtsporenzahl ($r_s = 0,369$, einseitige Signifikanz = 0,025) und schwach mit der Ergosterinkonzentration ($r_s = 0,311$, einseitige Signifikanz = 0,050), allerdings nicht mit der Lebendkeimzahl. Dieses Ergebnis ist nicht plausibel. Die Korrelation zur Gesamtsporenzahl muss vorsichtig bewertet werden, da die Auszählung der Gesamtsporen aufgrund der methodischen Probleme keine verlässlichen Werte produzierte (Kap. 3.1.2). Madsen (2003) hat die Aktivität von NAGase in luftgetragenen Staub untersucht, der im Anlieferungsbereich von Biogasanlagen und in Holzverarbeitenden Betrieben generiert wurde. In dieser Untersuchung korrelierte die Enzymaktivität signifikant mit der Lebendkeim- und Gesamtsporenzahl. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete MycoMeter-TestTM wurde für die Bestimmung der NAGase-Aktivität von Pilzen auf Bauteiloberflächen entwickelt und optimiert. Im Handbuch wird darauf hingewiesen, dass die Enzymaktivität mit dem Alter eines Schimmelrasens abnimmt und die Sensitivität des Tests bei einem älteren Befall reduziert ist. Daher scheint der Test eher geeignet zu sein, die Zu- oder Abnahme der Aktivität eines Befalls auf einer Oberfläche zu überprüfen, als die eigentliche Pilzmasse zu be-

schreiben. Hausstaub ist meistens und vor allem dann, wenn er bereits aufgesaugt wurde, sehr trocken, so dass darin kein Pilzwachstum stattfinden kann. Die Sporen befinden sich zur Überdauerung schlechter Lebensbedingungen im Ruhezustand und haben einen reduzierten Stoffwechsel (Deacon 1984). Diese Gründe würden zu insgesamt niedrigeren Aktivitätswerten führen. Daher ist die – wenn auch schwache – Korrelation zu Ergosterin, das die gesamte Menge an Pilzen beschreibt, und die nicht vorhandene Korrelation zur Lebendkeimzahl nicht nachvollziehbar. Es ist nicht auszuschließen, dass im Staub Substanzen vorkommen, die die Enzymreaktion negativ beeinflussen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Ergosterin von den untersuchten chemischen Indikatoren die Menge der Pilze im Hausstaub am besten beschreibt. Die mangelnde Trennfähigkeit zwischen Haushalten mit und ohne Pilzbefall ist nicht methodisch bedingt, sondern scheint zum einen an der Verwendung von Altstaub und an den externen Faktoren zu liegen, die neben einem Pilzbefall Einfluss auf den Pilzgehalt im Staub haben (Kap. 4.1). Zum anderen können unterschiedliche Konzentrationen an Ergosterin durch Variationen in der Artenzusammensetzung und substratbedingt entstehen. Im Gegensatz dazu spiegeln die chemischen Indikatoren 1,3- β -D-Glucan und NAGase-Aktivität den Pilzgehalt im Altstaub mit den hier angewandten Methoden nur ungenügend wieder.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nicht möglich ist, eine erhöhte Lebendkeimzahl oder Ergosterinkonzentration im Altstaub eindeutig mit einem Pilzbefall in der Wohnung in Zusammenhang zu bringen. Somit ist die Anwendung der Methoden nur dann geeignet, wenn z. B. im Rahmen von epidemiologischen Studien die Höhe einer Pilzbelastung im Hausstaub im Zusammenhang mit gesundheitlichen Beeinträchtigungen bei den Bewohnern untersucht werden soll. Für diese Erhebungen sind die möglichen Quellen der Pilze im Staub zunächst irrelevant. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist eine Vorher-Nachher-Untersuchung für die Überprüfung von Maßnahmen (Entfernen eines alten Teppichbodens, Änderungen des Reinigungsverhaltens o. ä.) zur Beseitigung von hygienischen Mängeln in Haushalten, in denen die Bewohner unter unspezifischen Symptomen leiden.

4.3 Mykotoxine und toxigene Schimmelpilze

Im Folgenden werden die gemessenen Konzentrationen von Ochratoxin A und Sterigmatocystin mit dem Vorkommen der potentiellen Produzenten in den Staubproben verglichen. Das größte Problem bei der Gegenüberstellung sind die zum Teil widersprüchlichen Angaben in der Literatur, welche Pilze diese Mykotoxine produzieren können. Nielsen et al. (1999) merken an, dass die Literatur voll von falschen Berichten über die Mykotoxinproduktion verschiedener Pilzarten ist. Die Gründe für die vermeintlich falschen Ergebnisse liegen zum einen in der Pilzdiagnostik und zum anderen in der Mykotoxinanalytik. Die Pilze müssen sicher und zuverlässig bis zum Artniveau bestimmt werden, was angesichts der hohen Variabilität der phänotypischen Merkmale bereits innerhalb einer Art häufig sehr schwer ist und hohe Anforderungen an die Fähigkeiten der Beobachtungsgabe und an die Mikroskopie stellen (Samson 2001). Bei den Ringversuchen zur Bestimmung von „Innenraumrelevanten Schimmelpilzen“ schließen in Abhängigkeit des Schwierigkeitsgrades der zu bestimmenden Pilzarten teilweise nur 46 %, aber auch bis zu 98 % der teilnehmenden Laboratorien erfolgreich ab (Seidl et al. 2005). Bei der chemischen Analytik der Mykotoxine kann es aufgrund von Überlagerungen mit chemisch ähnlichen Substanzen zu falsch-positiven Resultaten kommen (Nielsen 2003). Daher ist die Anwendung von mindestens zwei zuverlässigen Methoden empfehlenswert.

Als innenraumrelevante Produzenten von Ochratoxin A kommen relativ sicher *Aspergillus ochraceus* (van der Merwe et al. 1965, Frisvad und Thrane 2004), *A. niger* (Abarca et al. 1994), *A. carbonarius* (Téren et al. 1996) und *Penicillium verrucosum* (Pitt 1987) in Frage. Bei vielen Stämmen, die als *Aspergillus ochraceus* differenziert wurden, handelt es sich eigentlich um die neue Spezies *A. westerdijkiae*, die relativ große Mengen Ochratoxin A produzieren kann. Auch der originale OTA-produzierende Stamm (NRRL 3174) von van der Merwe et al. (1965) wurde inzwischen genetisch als *A. westerdijkiae* identifiziert (Frisvad et al. 2004). Da diese beiden Stämme morphologisch kaum zu unterscheiden sind, besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit als *A. ochraceus* benannten Pilzen eigentlich um *A. westerdijkiae* handelt. Da beide Arten zur Produktion von OTA befähigt sind, ist diese mögliche Fehldifferenzierung zumindest für die Mykotoxindiskussion nicht entscheidend.

Sehr umstritten ist das Potential zur OTA-Produktion bei *Eurotium herbariorum*. Chelkowski et al. (1987) haben für zwei Stämme von *E. herbariorum* die Produktion von Ochratoxin A nachgewiesen. Die Stämme wurden später von Frisvad und Nielsen (2010, per-

sönliche Mitteilung) überprüft. Es konnte kein OTA nachgewiesen werden, aber Anthrachinone (z. B. Asperthecin), die bei der Fluoreszenz-Detektion falsch-positive Resultate für OTA geben können. Weitere Hinweise auf eine OTA-Produktion durch *E. herbariorum* befinden sich hingegen bei El-Kady et al. (1994), O'Callaghan und Dobson (2005) sowie bei Bennett und Klich (2003). Auch bei den Spezies der Gattung *Penicillium* gibt es widersprüchliche Angaben. Während Pitt (1987) *Penicillium verrucosum* für die einzige Spezies der Gattung hält, die OTA produzieren kann, haben Vega et al. (2006) in Isolaten von *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* und *P. oxalicum* OTA nachgewiesen.

Bei den möglichen Produzenten von Sterigmatocystin sieht es ähnlich aus. Der neben *Penicillium chrysogenum* im Innenraum am häufigsten vorkommende Pilz ist *Aspergillus versicolor* (Nielsen 2003), der – wie hier gezeigt wurde – große Mengen ST produzieren kann. Das Potential zur Produktion von ST gilt außerdem als relativ gesichert für *Emericella nidulans* (Holzapfel et al. 1966, Samson und Hoekstra 2004) und einige *Chaetomium* spp. (Nielsen 2002). *Chaetomium globosum*, der häufig auf feuchten Baumaterialien vorkommt und in den untersuchten Staubproben nachgewiesen wurde, ist allerdings nicht in der Lage, ST zu produzieren (Frisvad und Thrane 2004). Widersprüchlich sind die Angaben für *A. ustus*. Reiß (1998) und Davis (1981) listen diese Pilzart als ST-Produzenten, wohingegen Frisvad und Thrane (2004) ihm diese Fähigkeit absprechen. Schröder und Kelton (1975) sowie Karo und Hadlok (1982) berichten von der ST-Produktion durch verschiedene *Eurotium* spp., was aber später nie wiederholt und bestätigt werden konnte (Samson et al. 1996).

Die Liste der möglichen Produzenten von OTA und ST ist länger, aber in dieser Diskussion wurde der Schwerpunkt auf die Pilzarten gelegt, die in den hier untersuchten Hausstaubproben nachgewiesen wurden. In den Tab. 4-3 und 4-4 sind die nachweisbaren Mykotoxinproduzenten vorbehaltlich aufgeführt, für die die Fähigkeit zur Produktion in der Literatur mehrfach beschrieben wurde.

Tab. 4-3: Vergleich der Konzentration von Ochratoxin A, gemessen mit dem ELISA und der HPLC, sowie die Lebendkeimkonzentration potentieller OTA-produzierender Pilze

(ohne Anspruch auf Vollständigkeit und unter Vorbehalt der oben aufgeführten widersprüchlichen Angaben)

Konzentration OTA ELISA (µg/kg)	Konzentration OTA HPLC (µg/kg)	OTA-produzierende Pilze (· 10 ⁶ KBE/kg)
Kontrollproben		
78,00	nicht messbar ¹⁾	2 <i>A. ochraceus</i> 100 <i>E. herbariorum</i>
60,00	12,68	10 <i>A. niger</i> 110 <i>A. ochraceus</i>
51,00	23,92	1 <i>A. niger</i> 260 <i>A. ochraceus</i> 30 <i>E. herbariorum</i>
19,20	< NWG	30 <i>E. herbariorum</i>
14,40	< NWG	100 <i>A. niger</i> 10 <i>A. ochraceus</i>
11,10	< NWG	200 <i>A. niger</i> 10 <i>E. herbariorum</i>
10,00	< NWG	3 <i>E. herbariorum</i>
6,05	0,66	20 <i>A. ochraceus</i> 40 <i>E. herbariorum</i>
4,20	1,03	200 <i>A. niger</i>
4,13	2,75	9 <i>A. ochraceus</i>
Fallproben		
51,00	9,77	1 <i>A. niger</i> 300 <i>E. herbariorum</i>
19,70	< NWG	2.000 <i>E. herbariorum</i>
13,00	14,57	200 <i>A. ochraceus</i> 10 <i>E. herbariorum</i>
11,30	nicht messbar ²⁾	10 <i>E. herbariorum</i>
8,40	< NWG	10 <i>A. niger</i> 1 <i>A. ochraceus</i> 1 <i>E. herbariorum</i>
6,33	0,85	10 <i>A. niger</i> 10 <i>A. ochraceus</i>
5,58	8,44	1 <i>A. niger</i> 200 <i>A. ochraceus</i> 20 <i>E. herbariorum</i>
4,68	12,72	2.000 <i>E. herbariorum</i>
4,10	1,22	1 <i>A. niger</i> 1 <i>A. ochraceus</i> 10 <i>E. herbariorum</i>
3,77	0,55	3 <i>A. niger</i> 1 <i>A. ochraceus</i>
3,03	0,28	1 <i>A. niger</i> 3.000 <i>E. herbariorum</i>

¹⁾ Extrakt rot gefärbt

²⁾ Extrakt braun gefärbt

Tab. 4-4: Gegenüberstellung der Konzentration von Sterigmatocystin, gemessen mit Hilfe der LC-MS/MS, mit der Lebendkeimkonzentration potentieller ST-produzierender Pilze

Mykotoxinanalyse durch Christoph Portner am IUTA in Duisburg (Portner et al. 2008)

Konzentration ST LC-MS/MS ($\mu\text{g/kg}$)	ST-produzierende Pilze ($\cdot 10^6$ KBE/kg)
Kontrollproben	
46,5	100 <i>A. versicolor</i>
34,3	0
13,2	0
Fallproben	
113,0	6.000 <i>A. versicolor</i>
32,2	2.800 <i>A. versicolor</i>
18,2	6.000 <i>A. versicolor</i>

Für die nachgewiesenen Mykotoxine Sterigmatocystin und Ochratoxin A kann festgestellt werden, dass hohe Konzentrationen von potentiellen Produzenten (erfasst als Lebendkeime) nicht zwangsläufig mit nachweisbaren Mykotoxinkonzentrationen und umgekehrt einhergehen. Engelhart et al. (2002) haben den Frischstaub ($\leq 355 \mu\text{m}$) aus acht Haushalten auf den Gehalt an Lebendkeimen und Sterigmatocystin untersucht (HPLC mit Elektrospray-Ionisation und Tandemmassenspektrometrie, HPLC-ESI-MS/MS). In allen Proben wurde *A. versicolor* und in zwei Proben ST nachgewiesen. Die Konzentrationen von ST lagen bei 3,8/2,0 und 3,4/3,8 $\mu\text{g/kg}$ (doppelt aufgearbeitet) und somit deutlich unter den in der vorliegenden Studie ermittelten Werten (Tab. 4-4). In anderen Studien wurden die Mykotoxine und Lebendkeime direkt in kontaminierten Baumaterialien untersucht. Tuomi et al. (2000) haben in 13 von 68 Materialproben ST (HPLC-ESI-MS/MS) und *A. versicolor* nachweisen können. In 14 weiteren Proben wurde *A. versicolor*, aber kein ST gefunden, und in 3 Proben war zwar ST, aber kein ST-Produzent nachweisbar. Ähnlich erging es Nielsen et al. (1999), die das ST in den Proben ohne nachweislichen Produzenten auf die Anwesenheit von *A. versicolor* zurückführten, der sich aufgrund von Überwucherung durch *Penicillium chrysogenum* nicht kultivieren ließ.

Die Schwächen der Bestimmung der Lebendkeimzahl wurden bereits in Kap. 3.1.3 diskutiert. Der mangelnde Nachweis der Produzenten in Proben mit Mykotoxinen kann auf den Verlust der Keimfähigkeit, die erschwerte Kultivierbarkeit aufgrund von Konkurrenzorganismen oder auf suboptimale Kultivierungsbedingungen für den jeweiligen Pilz zurückzuführen sein. Mykotoxine können im Material lange weiter bestehen nachdem der Pilz seine Lebensfähigkeit verloren hat (Pitt et al. 2000).

Die Anwesenheit eines potentiellen Mykotoxinproduzenten bedeutet nicht zwangsläufig das Vorkommen der entsprechenden Mykotoxine. Die Produktion der Sekundärmetaboliten hängt stark von den Lebensbedingungen ab: von der Art und dem Feuchtegehalt des Substrats, dem Nährstoffangebot, der Temperatur, der Feuchtigkeit der unmittelbaren Umgebung, der Reife der Pilzkolonie, der Koexistenz von anderen Pilzen, der physikalischen Beschädigung des Substrats durch Insektenaktivität und von anderen Stressfaktoren (Bhat 2010). Die meisten Mykotoxine werden erst ab einer Wasseraktivität von mehr als 0,95 produziert (Nielsen 2003). Die optimale Temperatur für die Mykotoxinsynthese weicht teilweise sehr stark von der optimalen Wachstumstemperatur ab und kann z. B. bei einigen *Fusarium spp.* nahe dem Gefrierpunkt liegen (Bhat 2010). Valero et al. (2006) haben einen OTA-produzierenden Stamm von *Aspergillus carbonarius* mit verschiedenen anderen Pilzarten paarweise angeimpft und das Ausmaß der OTA-Produktion unter diesen Konkurrenzbedingungen untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass *Eurotium amstelodami* und *Candida albicans* einen stimulierenden Effekt auf die OTA-Synthese von *A. carbonarius* haben. Die Anwesenheit von *Trichoderma harzianum* und *Penicillium decumbens* hingegen führte zu geringeren OTA-Konzentrationen. Sowohl die Stimulation als auch die Hemmung der OTA-Produktion durch die Begleitflora waren abhängig von der Temperatur und der Wasseraktivität. Die Gründe für eine verminderte OTA-Synthese wurden (1) in einer Limitierung des Wachstums von *A. carbonarius*, (2) in der Verwertung von Nährstoffen, die für die OTA-Synthese wichtig sind, durch die antagonistischen Pilze und (3) im Abbau von OTA durch andere Pilze vermutet (Valero et al. 2006). Die Fähigkeit zum Abbau von OTA konnte z. B. für *Alternaria alternata* gezeigt werden (Abrunhosa et al. 2002). Ferner sind nicht alle Stämme einer toxischen Pilzart zur Produktion des Mykotoxins befähigt. OTA wird nur von wenigen Stämmen von *Aspergillus niger* produziert (Abarca et al. 2004), aber von relativ vielen Stämmen von *A. carbonarius* (Samson et al. 2004). Auch die Mykotoxinmenge, zu deren Produktion ein Pilz befähigt ist, schwankt von Art zu Art. Verglichen mit *A. versicolor* produziert *Emmericella nidulans* nur relativ wenig Sterigmatocystin im Verhältnis zur Biomasse (Chung et al. 1989). Diese Ausführungen zeigen, dass es für Expositionsabschätzungen wenig sinnvoll ist, die Fähigkeit zur Mykotoxinproduktion an Isolaten aus Hausstaub oder von Baumaterialien durchzuführen. Die Mykotoxinsynthese unter Laborbedingungen ist noch kein Beweis für die Anwesenheit der Toxine im Innenraum.

Neben diesen biologischen Gründen für die Abwesenheit von Mykotoxinen sind auch falsch-negative Ergebnisse beim Nachweis eine mögliche Erklärung. Einige Mykotoxine

liegen „maskiert“ vor, z. B. als Acetat-Derivate, und werden so in Abhängigkeit der Detektionsmethode u. U. nicht erfasst (Nielsen 2003).

Die Proben mit nachweisbaren Mykotoxinen verteilen sich gleichermaßen auf die Fall- und Kontrollproben. Zwei der Kontrollhaushalte, in denen ST nachweisbar ist, sind gut bekannt, da es sich um Einfamilienhäuser aus dem kollegialen Umfeld handelt. In beiden Häusern lagen zum Zeitpunkt der Untersuchungen und auch in der Vergangenheit keine Feuchtigkeitsschäden vor. Vor dem Hintergrund, dass ST erst bei einer Wasseraktivität nahe 1 produziert wird, stellt sich die Frage, aus welcher Quelle das ST stammt. Ein Eintrag von außen erscheint hier wahrscheinlich. Die meisten Berichte über nachweisbare Mengen von ST in Baumaterialien stehen im Zusammenhang mit sehr auffälligen und großflächigen Befallssituationen (Bloom et al. 2007, Tuomi et al. 2000), so dass nach dem momentanen Kenntnisstand zu vermuten ist, dass ein Pilzschaden mit relativ hoher ST-Konzentration nicht übersehen werden kann. Die Angaben in den Fragebögen zu den toxinhaltigen Staubproben gaben keinen eindeutigen Aufschluss über mögliche Quellen für die Mykotoxine, da die Anzahl der positiven Proben zu gering war.

An dieser Stelle soll nur kurz auf das Expositionspotential durch Mykotoxine im Innenraum eingegangen werden. Dabei wird häufig vor allem der inhalative Aufnahmepfad beachtet (Fischer et al. 2004), bei dem wenig über die Wirkung und die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Mykotoxine bekannt ist. Mykotoxine stehen im Fokus der Lebensmitteluntersuchung und die Forschung betrachtet vornehmlich den digestiven Aufnahmepfad. Hausstaub kann inhalativ, dermal und oral aufgenommen werden, wobei sich die aufgenommene Menge jeweils nur grob abschätzen lässt und vom individuellen Verhalten der Raumnutzer abhängig ist (Butte et al. 2000). Kleinkinder, die auf dem Boden spielen und vieles in den Mund stecken, nehmen täglich ca. 100 mg, im schlechtesten Fall bis zu 500 mg Hausstaub über den Mund auf (Lewis et al. 1994). In den Haushalten mit der jeweils hier gemessenen höchsten Mykotoxinkonzentration würde ein Kleinkind mit 10 kg Körpergewicht demnach täglich 1,13/5,65 ng ST (mit 100/500 mg Hausstaub) bzw. 0,24/1,2 ng OTA pro kg Körpergewicht digestiv aufnehmen. Die von der EU-Kommission für Lebensmittel herausgegebene maximal tolerierbare Aufnahmemenge (TDI = tolerable daily intake) beträgt für OTA 5 ng/kg Körpergewicht (SCF 1996), während für ST kein TDI-Wert existiert. Der TDI-Wert für OTA wird zwar noch deutlich unterschritten, aber die berechnete Aufnahmemenge berücksichtigt nur den digestiven Aufnahmepfad. Zusätzlich werden Staubpartikel eingeatmet und Stoffe aus dem Staub über die Haut absorbiert.

Ferner sind einige Lebensmittel (Getreideprodukte, Gewürze, Kaffee u. a.) mit OTA kontaminiert, so dass eine Innenraumkontamination nicht die einzige Quelle für das Mykotoxin darstellt. Ertl et al. (2007) haben für die drei Expositionspfade inhalative, dermale und digestive Aufnahme die Konzentration von OTA im Hausstaub berechnet, die den TDI-Wert allein über den jeweiligen Pfad vollständig ausschöpft. Die kleinste der drei Konzentrationen wurde als Richtwert definiert. Diese Berechnungen wurden für die drei Expositionsgruppen Kleinkinder bis 2 Jahre, Grundschulkinder mit 6 Jahren und Erwachsene durchgeführt, da sich die Aufnahmemengen pro Expositionspfad mit dem Alter verändern. Daraus ergaben sich für das Vorkommen von OTA im Hausstaub Richtwerte von 10 µg/kg (Kleinkinder) bis 30 µg/kg (Erwachsene) (Ertl et al. 2007). Vier der 13 OTA-haltigen Proben lagen oberhalb des Richtwertes für Kleinkinder. Es handelt sich hier um sehr theoretische Berechnungen, die nicht alle Aspekte berücksichtigen und sich der tatsächlich aufgenommenen Menge nur grob nähern können. Es macht aber deutlich, dass einige Mykotoxine im Innenraum in Konzentrationsbereichen vorkommen können, für die eine gesundheitliche Beeinträchtigung nicht auszuschließen ist. Daher sind zuverlässige Methoden für den Nachweis von innenraumrelevanten Mykotoxinen, wie ST und OTA, im Hausstaub wichtig für Expositionsabschätzungen oder für ein erstes Screening bei dem Verdacht einer Kontamination im Innenraum.

Abschließend kann festgestellt werden, dass Ochratoxin A im Hausstaub mit Hilfe der HPLC im Anschluss an eine spezifische Aufreinigung zuverlässig bestimmt werden kann. Im Gegensatz dazu ist der Einsatz des ELISA zum Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub aufgrund von Kreuzreaktionen nicht zu empfehlen. Die Verwendung von Altstaub als Untersuchungsmatrix erscheint sinnvoll, da sich die Mykotoxine über einen langen Zeitraum im Hausstaub anreichern können und mit den Ergebnissen erste Aussagen zur Exposition der Raumnutzer möglich sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit und Aussagekraft des Nachweises von chemischen Indikatoren für Schimmelpilze im Hausstaub (Altstaub, $\leq 63 \mu\text{m}$ Fraktion) untersucht. Hintergrund dieser Studie war die Suche nach einer Methode, mit der innerhalb von ein bis zwei Tagen und ohne die Notwendigkeit einer Probenahme durch geschultes Personal ein Pilzbefall in einem Haushalt bestätigt oder ausgeschlossen werden kann. Aufgrund des wachsenden Interesses am Vorkommen von Mykotoxinen (toxischen Sekundärmetaboliten von Pilzen) im Innenraum und der damit verbundenen, möglichen Gesundheitsgefährdung, wurden die Hausstaubproben auch auf ausgewählte Mykotoxine untersucht. Es wurde Hausstaub, im besonderen Altstaub, als Matrix ausgewählt, da er eine Senke für schwerflüchtige und partikuläre Kontaminanten des Innenraums darstellt und von den Bewohnern selbst gesammelt werden kann. Als chemische Indikatoren wurden (1) Ergosterin aus der Zytoplasmamembran von Pilzen, (2) 1,3- β -D-Glucan aus der Zellwand und (3) die Aktivität des Enzyms N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) ausgewählt. Als Vergleichsgrößen wurden die Lebendkeim- und Gesamtsporenzahl im Hausstaub bestimmt. Der Nachweis erfolgte in 201 Hausstaubproben aus Haushalten ohne sichtbaren Pilzbefall (Kontrollen) und 153 Proben aus Haushalten mit sichtbarem Pilzbefall (Fälle) bzw. in ausgewählten Unterkollektiven. Ergosterin, das fast ausschließlich in Pilzen vorkommt, beschreibt von den drei untersuchten Indikatoren am besten die Menge der im Staub vorkommenden Pilze. Die Werte korrelierten signifikant mit der Lebendkeimzahl und der Nachweis mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) und UV-Detektion erwies sich als eine präzise Methode. Im Gegensatz dazu korrelierte die Konzentration von 1,3- β -D-Glucan, nachgewiesen mit dem *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-(LAL)-Test, mit keinem der anderen Parameter. Scheinbar kommt es zu Kreuzreaktionen und Hemmungen der dem LAL-Test zugrunde liegenden Enzym-Kaskade durch andere Staubbestandteile. Obwohl die Aktivität der NAGase mit der Ergosterinkonzentration und mit der Gesamtsporenzahl korrelierte, erschien dieses Ergebnis nicht plausibel. Stattdessen wurde eine Korrelation zur Lebendkeimzahl erwartet, da die Enzymaktivität in den lebensfähigen Sporen und Hyphen am höchsten sein sollte.

Für die Lebendkeimzahl und die Ergosterinkonzentration wurden Referenzwerte ermittelt, um die Fähigkeit der Methoden zur Unterscheidung von Fällen und Kontrollen zu überprüfen. Für die Gesamtlebendkeimzahl betrug der Referenzwert $4,6 \cdot 10^9$ KBE/kg (DG18-Agar), mit dem nur 19,6 % der Fallproben richtig erfasst werden konnten. Eine Bewertung

der Schimmelpilzbelastung anhand einzelner Gattungen als Indikatororganismen war ebenfalls nicht geeignet. *Aspergillus spp.* wies mit 22,9 % die höchste, aber nicht ausreichende Sensitivität auf. Die Trennfähigkeit der Ergosterinkonzentration zwischen Fall- und Kontrollproben erwies sich mit einer Sensitivität von 7,8 % als noch schlechter (Referenzwert 16,5 mg/kg).

Mit Hilfe der Angaben aus den Fragebögen, die zu jeder Probe erhoben wurden, konnten abgesehen von einem Pilzbefall im Innenraum weitere Quellen für Pilze und ihre Bestandteile im Hausstaub ermittelt werden. Die Sammlung von Biomüll und Haustierhaltung führten zu signifikant höheren Ergosterin- und Lebendkeimkonzentrationen. Ferner wurden Einflüsse durch die Umgebung (ländlich, städtisch), den Gebäudetyp, die Geschossigkeit und durch die Struktur dessen, was sich unterhalb der beprobten Wohnung befand (Fundament, Keller, weitere Wohnung), auf die Konzentrationen von Ergosterin und den Lebendkeimen im Hausstaub nachgewiesen. In Bezug auf die keimfähigen Pilzbestandteile zeigten sich die Unterschiede nicht immer in der Gesamtlebendkeimzahl, sondern teilweise nur für einzelne Gattungen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit dem Nachweis von Ergosterin oder der Lebendkeimzahl im Hausstaub (Altstaub) nicht eindeutig zwischen Haushalten mit und ohne sichtbaren Pilzbefall unterschieden werden kann.

Während mit der Bestimmung des Pilzgehaltes im Hausstaub Rückschlüsse auf einen eventuellen Pilzbefall gezogen werden sollten, sollte der Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub der Erfassung einer möglichen Exposition der Bewohner mit diesen toxischen Metaboliten dienen. Die beiden Mykotoxine Ochratoxin A (OTA) und Sterigmatocystin (ST) wurden ausgewählt, da ihre potentiellen Produzenten häufig und in großen Konzentrationen in Haushalten mit Pilzbefall vorkommen können. OTA wurde mit Hilfe der HPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion sowie mit einem kommerziellen Enzymimmunoassay (ELISA) bestimmt. Dem ELISA zufolge enthielten 279 von 280 Proben OTA, was unwahrscheinlich erschien. Ferner schwankte die Wiederfindungsrate beim ELISA zwischen 45,8 und 239,6 %. Es ist davon auszugehen, dass Matrixeffekte und Kreuzreaktionen zu falsch-positiven Ergebnissen führten, so dass der ELISA keine zuverlässige Nachweismethode für OTA im Hausstaub darstellt. Im Gegensatz dazu wurde OTA mit der HPLC in nur 13 Proben ($n = 93$) in einem Konzentrationsbereich von 0,28 - 23,92 µg/kg nachgewiesen. Dieses Ergebnis erschien realistischer. Für den Nachweis von Sterigmatocystin (ST) sind keine Antikörper auf dem Markt erhältlich. Daher wurden polyklonale Antikörper in zwei Kaninchen produziert, um darauf aufbauend einen ELISA zu entwickeln. Allerdings erwiesen sich die Antikörper als unspezifisch gegenüber ST. Ein Nachweis von ST in

Hausstaub mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie war trotz sorgfältiger Aufreinigung der Extrakte aufgrund von Überlagerungen der Banden nicht möglich. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Probenkollektiv wurde von dem Kooperationspartner am Institut für Energie- und Umwelttechnik (IUTA e. V.) in Duisburg mit einer dort entwickelten Multitoxinmethode auf Basis der HPLC mit anschließender Tandemmassenspektrometrie analysiert. ST wurde in 6 von 354 Proben in einem Konzentrationsbereich von 13,2 - 113,0 µg/kg nachgewiesen. Die für OTA und ST positiven Proben verteilten sich gleichermaßen auf Kontrollen und Fälle. Der Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub von Kontrollhaushalten lässt den Schluss zu, dass neben einem Pilzbefall auch andere Quellen für Mykotoxine infrage kommen. An dieser Stelle besteht noch Forschungsbedarf. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass OTA und ST im Hausstaub in erhöhter Konzentration vorkommen können. Es empfiehlt sich der Nachweis mittels HPLC im Anschluss an eine spezifische Aufreinigung. Die Anwendung der ELISA-Technik ist aufgrund von Kreuzreaktionen und anderen Störeinflüssen durch die Matrix nicht zuverlässig.

Während die Verwendung von Altstaub für den Nachweis von Mykotoxinen gerade aufgrund der langfristigen Anreicherungsmöglichkeit sehr gut geeignet scheint, ist der Nachweis von Schimmelpilzen oder chemischen Indikatoren für Schimmelpilze im Altstaub nicht empfehlenswert, wenn basierend auf den Ergebnissen ein Pilzbefall im Haushalt bestätigt oder ausgeschlossen werden soll. Es konnte gezeigt werden, dass sich Pilze und ihre Bestandteile aus zahlreichen intra- und extramuralen Quellen im Hausstaub anreichern und ein Rückschluss auf einen möglichen Pilzbefall in der Wohnung nicht möglich ist. Da Ergosterin von den drei ausgewählten chemischen Indikatoren die Menge der Pilze im Hausstaub am besten beschreibt, könnte sein Nachweis allerdings für Expositionsuntersuchungen nützlich sein, bei denen die gesamte Pilzkonzentration im Hausstaub unabhängig von der Quelle erfasst werden soll.

6 SUMMARY

The present dissertation investigates the possibility of using chemical indicators to describe the quantity of fungi in house dust (dust of unknown age, $\leq 63 \mu\text{m}$ particle size). The study was inspired by the search for a method which allows to confirm or to exclude a mould infestation in a household within one or two days, and without the need of trained personnel to take samples on site. Due to the growing interest in the occurrence of mycotoxins (toxic secondary metabolites of fungi) in indoor environments and their potential health hazard the house dust was also analysed for selected mycotoxins. House dust was chosen as matrix for this study, as it is a repository for semivolatile organic compounds as well as particulate matter, and can easily be sampled by the residents themselves. Three compounds were chosen as possible chemical indicators for fungi: (1) ergosterol from the fungal cytoplasmic membrane, (2) 1,3- β -D-glucan, a component of the cell wall, and (3) the activity of the enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase). At the same time, the concentration of viable fungi and total spore count were determined, in order to compare with the chemical indicators. In total, 201 house dust samples from households without mould infestation (controls), and 153 samples from households with visible mould infestation (cases) were used in this study. Of the three potential indicators, ergosterol, which occurs almost exclusively in fungi, describes the amount of fungi in house dust in the most consistent way. The concentration of ergosterol correlated significantly with the amount of culturable fungi and its determination by high pressure liquid chromatography (HPLC) and UV-detection was shown to be a very reliable method. By contrast, the concentration of 1,3- β -D-glucan, determined with the *limulus* amoebocyte lysate (LAL) test, showed no association with any of the other parameters. The LAL-test seems to be hampered by crossreactions and inhibition of the enzyme cascade, on which the test is based, by other components of the dust. Although the activity of NAGase correlated with the concentration of ergosterol and with the total spore count, this result seems counter-intuitive. Instead, an association of NAGase activity with the amount of culturable fungi would have been expected, since enzyme activity should be highest in viable spores and hyphae.

In order to verify the suitability of the methods to differentiate between controls and cases, reference values for viable fungi and ergosterol concentration were determined. For the viable fungi a reference value of $4.6 \cdot 10^9$ cfu/kg was obtained on DG18-agar, which exhibited a sensitivity of only 19.6 % to correctly identify cases. An assessment of the level of mould infestation of a household by means of single genera as indicator organisms was not

possible either. With 22.9 %, *Aspergillus spp.* showed the highest sensitivity, but not sufficient to be a reliable indicator. The sensitivity of ergosterol concentration in house dust was even worse, with only 7.8 % (reference value: 16.5 mg/kg).

Apart from visible mould infestation, other sources for fungi and their constituents in house dust could be identified with the aid of detailed questionnaires, which were filled in by the residents. The indoor collection of organic waste and keeping pets lead to significantly higher concentration of viable fungi and ergosterol. In addition, the surroundings (countryside or city) and the type of building, the structural level, and the structure lying underneath the sampled household (foundation, cellar, another flat) influence both concentrations. However, not all these environmental factors influenced the total count of viable fungi, but rather the concentration of single genera. In summary, neither the concentration of viable fungi nor ergosterol in house dust (of unknown age) was found to be a reliable general indicator to distinguish between households with and without visible mould infestation.

While the determination of the mould concentration in housedust was supposed to allow the conclusion to a possible mould infestation, the analysis of mycotoxins in house dust was supposed to detect a possible exposition of the residents to these toxic metabolites. The two mycotoxins which were analysed were Ochratoxin A (OTA) and Sterigmatocystin (ST), since their potential producers can occur often and in high concentration in mould infested homes. OTA was determined by HPLC with fluorescence detection, and with a commercial enzyme immunoassay (ELISA). According to the ELISA results, 279 out of 280 analysed samples contained OTA, which appeared unlikely. The recovery rate of OTA by the ELISA varied from 45.8 to 239.6 %. These two results were taken as an indication of matrix effects and crossreactivity, and showed that ELISA is not a reliable method to determine OTA concentrations in house dust. By contrast, using HPLC OTA was detected in only 13 out of 93 tested sub-samples, in a range of 0.28 – 23.92 µg/kg. This result appears to be more realistic. For the determination of ST no antibodies are commercially available. Polyclonal antibodies were produced in two rabbits in order to develop an ELISA test. Unfortunately, the antibodies turned out to be unspecific for ST. Despite a careful clean-up of the samples, the detection of ST in house dust by thin layer chromatography was also not possible, due to overlapping of bands. In parallel with this study, all investigated samples were also analysed by a cooperation partner (Institute of Energy and Environmental Technology - IUTA e. V., Duisburg). They developed a multitoxin method based upon HPLC followed by tandem mass spectrometry. By that method, ST was de-

tected in a range of 13.2 – 113.0 µg/kg in 6 out of the 354 samples. The fact that OTA and ST containing samples came both from control as well as case households, suggests that there are other sources for mycotoxins apart from mould infestation. At this stage, further research revealing sources of mycotoxins in house dust is clearly needed. It was shown that mycotoxins like OTA and ST do occur in house dust. Analysis by HPLC after a specific clean-up is recommended, while ELISA techniques should not be used with house dust as a matrix since results turn out to be unreliable because of crossreactivity and other interference by house dust components.

Summarizing the results, this study shows that the use of old house dust seems to be reasonable for the analysis of mycotoxins due to the longterm accumulation, while the determination of viable fungi or chemical indicators for fungi in old house dust is not recommended as a method to confirm or exclude an indoor mould infestation. It could be shown that fungi and their constituents accumulate in house dust from various indoor and outdoor sources, thus detection of high concentrations allows no conclusion to a mould infestation. Since ergosterol describes the biomass of fungi in the most consistent way, its detection in old house dust could be useful for the investigation of total fungi exposure in a household, irrespective of the source and type of the fungi.

7 LITERATUR

- ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CASTELLA, G., CABANES, F. J. (1994): Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2650-2652
- ABARCA, M. L., ACCENSI, F., CANO, J., CABANES, F. J. (2004): Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**: 33-49
- ABRAMSON, D. UND THORSTEINSON, T. (1989): Determination of sterigmatocystin in barley by acetylation and liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**: 342-344
- ABRUNHOSA, L., SERRA, R., VENÂNCIO, A. (2002): Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 7493-7496
- ACKERMANN, H. W., SCHMIDT, B., LENK, V. (1969): Mykologische Untersuchungen von Außen- und Innenluft in Berlin. *Mykosen* **12**: 309-320
- BAUDISCH, C., SADEK, H., STENGLIN, M. (2001): Erste Ergebnisse eines modifizierten Hausstaubmessverfahrens zur quantitativen und qualitativen Bewertung von Schimmelpilzen." *Umweltmed. Forsch. Prax.* **6**: 265-274
- BAUDISCH, C., ASSADIAN, O., KRAMER, A. (2009 I): Concentration of the genera *Aspergillus*, *Eurotium* and *Penicillium* in 63 µm house dust fraction as a method to predict hidden moisture damage in homes. *BMC Public Health* **9**: 247-255
- BAUDISCH, C., ASSADIAN, O., KRAMER, A. (2009 II): Evaluation of errors and limits of the 63-microuse-dust-fraction method, a surrogate to predict hidden moisture damage. *BMC Res. Notes* **2**: 218-222
- BECKER, K., SCHULZ, C., KAUS, S., SEIWERT, M., SEIFERT, B. (2003): German environmental survey 1998 (GerES III): Environmental pollutants in the urine of the German population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **206**: 15-24
- BENNETT, J. W., HENDERBERG, A., GROSSMAN, K. (1989): Sterigmatocystin production on complex and defined substrates. *Mycopathologia* **105**: 35-38
- BENNETT, J. W. UND KLICH, M. (2003): Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 497-516
- BHAT, R., RAI, R., KARIM, A. A. (2010): Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9**: 57-81
- BINNBERG, A. (2005). Qualifizierung und Quantifizierung von Schimmelpilzsporen im Hausstaub. Diplomarbeit, Institut für Reine und Angewandte Chemie, Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg
- BIRKINSHAW, J. H. UND HAMMADY, I. M. (1957): Studies in the biochemistry of microorganisms. 99. Metabolic products of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi. *Biochem. J.* **65**: 162-166
- BISCHOF, W., KOCH, A., GEHRING, U., FAHLBUSCH, B., WICHMANN, H. E., HEINRICH, J. (2002): Predictors of high endotoxin concentrations in the settled dust of German homes. *Indoor Air* **12**: 2-9

- BLOOM, E., BAL, K., NYMAN, E., MUST, A., LARSSON, L. (2007): Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus spp.* in indoor environments. *Appl. Environ. Microbiol* **73**: 4211-4217
- BLOOM, E., GRIMSLEY, L. F., PEHRSON, C., LEWIS, J., LARSSON, L. (2009). Molds and mycotoxins in dust from water-damaged homes in New Orleans after hurricane Katrina. *Indoor Air* **19**: 153-158
- BRASCHE, S., HEINZ, E., HARTMANN, T., RICHTER, W., BISCHOF, W. (2003): Vorkommen, Ursachen und gesundheitliche Aspekte von Feuchteschäden in Wohnungen. *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz*. **46**: 683–693
- BRASEL, T. L., CAMPBELL, A. W., DEMERS, R. E., FERGUSON, B. S., FINK, J., VOJDANI, A., WILSON, S. C., STRAUS, D. C. (2004): Detection of trichothecene mycotoxins in sera from individuals exposed to *Stachybotrys chartarum* in indoor environments. *Arch Environ Health* **59**: 317-323
- BRENDA ENZYM-DATENBANK (2010): <http://www.brenda-enzymes.org>, online
- BROCK, D., MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. (1994): Biology of microorganisms. Prentice Hall International Englewood Cliffs, New Jersey, 7. Aufl.
- BRUNNER, K., PETERBAUER, C. K., MACH, R. L., LORITO, M., ZEILINGER, S., KUBICEK, C. P. (2003): The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* **43**: 289-295
- BUTTE, W., HEINZOW, B., HENSEN, D., PETZHOLD, G. (2000). Belastung der Umweltmedien Teil 2: Innenraumluft-Hausstaub. In: *Praktische Umweltmedizin - Klinik, Methoden, Arbeitshilfen*. D. Beyer, A. Eis and P. Falkenberg (Hrsg.). Springer Verlag Berlin: 1-51
- BUTTE, W. UND HEINZOW, B. (2002): Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **175**: 1-46
- CEC (1993). Biological particles in indoor environments. Research and Development, Directorate General for Science. Luxembourg, Commission of the European Communities. **12**: 1-97
- CHELKOWSKI, J., SAMSON, R. A., WIEWIOROWSKA, M., GOLINSKI, P. (1987): Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* Link ex Grey (= *Eurotium herbariorum* Wiggers Link ex Gray) from cereal grains. *Nahrung* **31**: 267-269
- CHEW, G. L., DOUWES, J., DOEKES, G., HIGGINS, K. M., VAN STRIEN, R., SPITHOVEN, J., BRUNEKREEF, B. (2001): Fungal extracellular polysaccharides, beta (1->3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air* **11**: 171-178
- CHEW, G. L., ROGERS, C., BURGE, H. A., MUILENBERG, M. L., GOLD, D. R. (2003): Dust-borne and airborne fungal propagules represent a different spectrum of fungi with differing relations to home characteristics. *Allergy* **58**: 13-20

- CHUANG, J. C., POLLARD, M. A., CHOU, Y. L., MENTON, R. G., WILSON, N. K. (1998): Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in house dust and residential soil. *Sci. Total Environ.* **224**: 189-199
- CHUN, D. T., CHEW, V., BARTLETT, K., GORDON, T., JACOBS, R. R., LARSSON, B. M., LARSSON, L., LEWIS, D. M., LIESIVUORI, J., MICHEL, O., MILTON, D. K., RYLANDER, R., THORNE, P. S., WHITE, E. M., BROWN, M. E. (2000): Preliminary report on the results of the second phase of a round-robin endotoxin assay study using cotton dust. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **15**: 152-157
- CHUNG, D. H., ABOUZIED, M. M., PESTKA, J. J. (1989): Immunochemical assay applied to mycotoxin biosynthesis: ELISA comparison of sterigmatocystin production by *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus nidulans*. *Mycopathologia* **107**: 93-100
- CLAUSNITZER, K. D. (2006): Schimmelpilze im Mietwohnungsbestand. *Bauphysik* **28**: 388-391
- CROWTHER, J. R. (1995): ELISA Theory and Practise. *Methods in Molecular Biology*. J. M. Walker (Hrsg.), Humana Press Totowa, New Jersey
- DASKO, L., STROKA, J., ANKLAM, E. (2002): Sterigmatocystin derivatization. 24. Mykotoxin Workshop, Berlin, 3. – 5. Juni 2002
- DAVIES, J. E., KIRKALDY, D., ROBERTS, J. C. (1960): Studies in Mycological Chemistry. Part VII. Sterigmatocystin, a Metabolite of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi. *J. Chem. Soc.*: 2169-2178
- DAVIS, N. D. (1981): Sterigmatocystin and Other Myco-Toxins Produced by *Aspergillus* Species. *J. Food Prot.* **44**: 711-714
- DAVIS, M. W. UND LAMAR R. T. (1992): Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. *Soil Biol. Biochem.* **24**: 189-198
- DEACON, J. W. (1984): Introduction to Modern Mycology. In: *Basic Microbiology*, Vol. 7, Wilkinson, J. F. (Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2. Aufl.
- DE SIO, F., LARATTA, B., GIOVANE, A., QUAGLIUOLO, L., CASTALDO, D., SERVILLO, L. (2000): Analysis of free and esterified ergosterol in tomato products. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 780-784
- DHARMAGE, S., BAILEY, M., RAVEN, J., MITAKAKIS, T., THIEN, F., FORBES, A., GUEST, D., ABRAMSON, M., WALTERS, E. H. (1999): Prevalence and residential determinants of fungi within homes in Melbourne, Australia. *Clin. Exp. Allergy* **29**: 1481-1489
- DIN 32 645 (1994). Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN 38 409 Teil 1 (1987). Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen H 1 - Bestimmung des Gesamttrockenrückstandes, des Filtrattrockenrückstandes und des Glührückstandes. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN 66 165 Teil 2 (1987): Siebanalyse Durchführung. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T. H. (1980). Compendium of soil fungi. Academic Press London

- DOUWES, J., DOEKES, G., MONTIJN, R., HEEDERIK, D., BRUNEKREEF, B. (1996): Measurement of beta(1->3)-glucans in occupational and home environments with an inhibition enzyme immunoassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3176-3182
- DOUWES, J. (2005): (1->3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air* **15**: 160-169
- DRASAR, P., CERNY, I., POUZAR, V., HAVEL, M. (1984): Steroids. CCCIII. New preparation of steroidal 3-hemisuccinates. *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.* **49**: 306-312
- DURAND, K. T., MUILENBERG, M. L., BURGE, H. A., SEIXAS, N. S. (2002): Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration. *Ann. Occup. Hyg.* **46**: 113-118
- EDUARD, W. UND HEEDERIK, D. (1998): Methods for quantitative assessment of airborne levels of non-infectious micro-organisms in highly contaminated work environments. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Journal* **59**: 113-127
- EL-KADY, I., EL-MARAGHY, S., ZOHRI, A. N. (1994): Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. *Microbiol. Res.* **149**: 297-307
- ENGEL, G. (1977): Untersuchungen zur Bildung von Mykotoxinen und deren quantitative Analyse. IX. Sterigmatocystin. *J. Chromatogr.* **136**: 182-5
- ENGELHART, S., LOOCK, A., SKUTLAREK, D., SAGUNSKI, H., LOMMEL, A., FARBER, H., EXNER, M. (2002): Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3886-3890
- ERTL, H., PORTNER, C., PLEGGE, V., TEUTENBERG, T., TÜRK, J., BUTTE, W. (2007). Quantifizierung von 7 Mykotoxinen in Hausstaub mittels HPLC-MS/MS und MSⁿ-Screening nach Schimmelpilzmarkern sowie weiteren Toxinen. ANAKON. Jahrestagung des GDCh e. V., Jena, Poster
- EWERS, U., KRAUSE, C., SCHULZ, C., WILHELM, M. (1999): Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **72**: 255-260
- FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., SVENDSEN, J. A. (1983): Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 581-585
- FISCHER, G., THISSEN, R., BRAUN, S., SCHMITZ, C., DOTT, W. (2004): Relevance of mycotoxins for indoor hygiene. 8. Lübecker Fachtagung für Umwelthygiene - Erfassung biogener und chemischer Schadstoffe des Innenraumes und die Bewertung umweltbezogener Gesundheitsrisiken, Lübeck, Deutschland: 47-68
- FISCHER, G. UND DOTT, W. (2005): Die Relevanz von sekundären Stoffwechselprodukten (MVOC, Mykotoxine) von Schimmelpilzen für die Innenraumhygiene. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **10**: 329
- FLANNIGAN, B., MCCABE, E. M., MCGARRY, F. (1991): Allergenic and toxigenic microorganisms in houses. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **20**: 61S-73S

- FOGELMARK, B. UND RYLANDER, R. (1997): (1→3)-beta-D-glucan in some indoor air fungi. *Indoor Built Environ.* **6**: 291-294
- FOTO, M., PLETT, J., BERGHOUT, J., MILLER, J. D. (2004): Modification of the *Limulus* amoebocyte lysate assay for the analysis of glucan in indoor environments. *Anal. Bioanal. Chem.* **379**: 156-162
- FRANKE, D. L., COLE, E. C., LEESE, K. F., FOARDE, K. K., BERRY, M. A. (1997): Cleaning for improved indoor air quality: an initial assessment of effectiveness. *Indoor Air* **7**: 41-54
- FRISVAD, J. C. UND THRANE, U. (2004): Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: *Introduction of food- and airborne fungi*. Samson, R. A., Hoekstra, E. S. und Frisvad, J. C. (Hrsg.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande: 389-399
- FRISVAD, J. C., FRANK, J. M., HOUBRAKEN, J., KUIJPERS, A., SAMSON, R. A. (2004): New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section Circumdati. *Stud. Mycol.* **50**: 23-43
- GABRIO, T., DILL, I., FISCHER, G., GRÜN, L., RABE, R., SAMSON, R., SEIDL, H.-P., SZEWZYK, R., TRAUTMANN, C., WARSCHIED, T., WEIDNER, U. (2003): Ringversuch – Differenzierung von innenraumrelevanten Schimmelpilzen. *Allergologie* **26**: 95-102
- GABRIO, T., DILL, I., TRAUTMANN, C., WEIDNER, U. (2005): Schimmelpilze im Hausstaub. Probenahme und Bestimmung. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* **48**: 21-28
- GEHRING, U., DOUWES, J., DOEKES, G., KOCH, A., BISCHOF, W., FAHLBUSCH, B., RICHTER, K., WICHMANN, H. E., HEINRICH, J. (2001): beta(1→3)-glucan in house dust of German homes: Housing characteristics, occupant behavior, and relations with endotoxins, allergens, and molds. *Environ. Health Perspect.* **109**: 139-144
- GESSNER, M. O. UND CHAUVET, E. (1993): Ergosterol-to-Biomass Conversion Factors for Aquatic Hyphomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 502-507
- GIOVANNANGELO, M. E., GEHRING, U., NORDLING, E., OLDENWENING, M., VAN RIJSWIJK, K., DE WIND, S., HOEK, G., HEINRICH, J., BELLANDER, T., BRUNEKREEF, B. (2007): Levels and determinants of beta(1→3)-glucans and fungal extracellular polysaccharides in house dust of (pre-)school children in three European countries. *Environ. Int.* **33**: 9-16
- GIRAY, B., ATASAYAR, S., SAHIN, G. (2009): Determination of ochratoxin A and total aflatoxin levels in corn samples from Turkey by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycotoxin Research* **25**: 113-116
- GODISH, D. R. UND GODISH, T. J. (2007): Relationship between sampling duration and concentration of culturable airborne mould and bacteria on selected culture media. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 1479-1484
- GOODAY, G. W., ZHU, W., O'DONNELL, R. W. (1992): What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 387-392

- GORBUSHINA, A. A. UND KRUMBEIN, W. E. (2006): BIODAM: Innovative Oberflächen, intelligente Baumaterialien und polyphasische Behandlung von Biofilmschäden an Bauwerksoberflächen. *Schriftenreihe Altbauinstandsetzung* **11**: 215-227
- GRANT, W. D. UND WEST, A. W. (1986): Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of microbial biomass. *J. Microbiol. Methods* **6**: 47-53
- GRAVESEN, S. (1978): Identification and prevalence of culturable mesophilic microfungi in house dust from 100 Danish homes. Comparison between airborne and dust-bound fungi. *Allergy* **33**: 268-272
- GRAVESEN, S., NIELSEN, P. A., IVERSEN, R., NIELSEN, K. F. (1999): Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. *Environ. Health Perspect.* **107**: 505-508
- GROSS, I., HEINRICH, J., FAHLBUSCH, B., JAGER, L., BISCHOF, W., WICHMANN, H. E. (2000): Indoor determinants of Der p 1 and Der f 1 concentrations in house dust are different. *Clin. Exp. Allergy* **30**: 376-382
- HANKAMMER, G. UND LORENZ, W. (2003). Schimmelpilze und Bakterien in Gebäuden. Verlagsgesellschaft Rudolf Müller GmbH, Köln
- HBM-KOMMISSION (1996): Konzept der Referenz- und Human-Biomonitoring-Werte (HBM) in der Umweltmedizin. *Bundesgesundheitsblatt* **39**: 221-224
- HEINZOW, B. (2007): Schimmelpilze in Innenräumen und gesundheitliche Folgen - Mehr Fragen als Antworten? 11. Lübecker Fachtagung für Umwelthygiene - Einfluss von Klimafaktoren auf Mikroorganismen und Baumaterialien, Schmidt Römhild, Lübeck, 195-220
- HOCKING, A. D. UND PITT, J. I. (1980): Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 488-492
- HOLZAPFEL, C. W., PURCHASE, I. F., STEYN, P. S., GOUWS, L. (1966): The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin, a carcinogenic mycotoxin, and its isolation from two new fungal sources. *S. Afr. Med. J.* **40**: 1100-1101
- HORWITZ, W. (2003): The certainty of uncertainty. *JAOAC Int.* **86**: 109-111
- IOSSIFOVA, Y. Y., REPONEN, T., BERNSTEIN, D. I., LEVIN, L., KALRA, H., CAMPO, P., VILLAREAL, M., LOCKEY, J., HERSHEY, G. K., LEMASTERS, G. (2007): House dust (1-3)-beta-D-glucan and wheezing in infants. *Allergy* **62**: 504-513
- IOSSIFOVA, Y., REPONEN, T., SUCHAREW, H., SUCCOP, P., VESPER, S. (2008): Use of (1-3)-beta-D-glucan concentrations in dust as a surrogate method for estimating specific fungal exposures. *Indoor Air* **18**: 225-232
- JAIMEZ, J., FENTE, C. A., VAZQUEZ, B. I., FRANCO, C. M., CEPEDA, A., MAHUZIER, G., PROGNON, P. (2000): Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *J. Chromatogr. A* **882**: 1-10
- JARVIS, B. B. (2003): Analysis for mycotoxins: the chemist's perspective. *Arch. Environ. Health* **58**: 479-483

- JONES, C. S. UND KOSMAN, D. J. (1980): Purification, properties, kinetics, and mechanism of beta-N-acetylglucosamidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **255**: 11861-11869
- JOVANOVIC, S., PIECHOTOWSKI, I., GABRIO, T., WEIDNER, U., ZOLLNER, I., SCHWENK, M. (2001): Abschätzung der Schimmelpilzbelastung in Wohnungen in Südwestdeutschland. *Gesundheitswesen* **63**: 404-411
- KARO, M. UND HADLOK, R. M. (1982): Investigations on sterigmatocystin production by fungi of the genus *Eurotium*. Proceedings of the V. International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, IUPAC, Wien
- KASEL, U., WICHMANN, G., BLECK, M. (1999): Ochratoxin A im Hausstaub. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **4**: 301-303
- KELLER, R., REINHARDT-BENITEZ, S., DÖRINGER, K., EILERS, J., LAUBMANN, D., MERGNER, H.-J., OHGKE, H., SCHMIDT, A., SENKPIEL, K., SOLBACH, W., WALKER, G., WEIß, R., BUTTE, W. (2004): Hintergrundwerte von flüchtigen Schimmelpilzmetaboliten in unbelasteten Wohngebäuden. *Gefahrst. Reinhalt. Luft* **64**: 187-190
- KLICH, M. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande
- KLIS, F. M. (1994): Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-869
- KOCH, A., HEILEMANN, K. J., BISCHOF, W., HEINRICH, J., WICHMANN, H. E. (2000): Indoor viable mold spores--a comparison between two cities, Erfurt (eastern Germany) and Hamburg (western Germany). *Allergy* **55**: 176-180
- KOCH, A., HEILEMANN, K. J., BISCHOF, W. (2002): Storage stability of viable mould spores and endotoxin in house dust samples. *Indoor Air* **1**: 46-51
- KÖLLER, G., ROLLE-KAMPCZYK, U., POPP, P., HERBARTH, O. (2003): A new method for the sensitive analysis of Ochratoxin A in house dust. *Chromatographia* **58**: 763-767
- KOMMISSION „METHODEN UND QUALITÄTSSICHERUNG IN DER UMWELTMEDIZIN“ (2007): Schimmelpilzbelastung in Innenräumen – Befunderhebung, gesundheitliche Bewertung und Maßnahmen. Empfehlung des Robert Koch-Instituts. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* **50**: 1308-1323
- KRSKA, R. UND MOLINELLI, A. (2007): Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**: 145-148
- KRUMBEIN, W. E. (2004): Life on and in stone - an endless story? 10th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Stockholm
- LACEY, M. E. (1962): The summer air-spora of two contrasting adjacent rural sites. *J. Gen. Microbiol.* **29**: 485-501
- LÄNDERÜBERGREIFENDE-ZUSAMMENARBEIT (2005): Schimmelpilze und Mykotoxine in Futtermitteln. Vorkommen, Bewerten, Vermeiden. Landesanstalten für Landwirtschaft, www.lfl.bayern.de/internet/stmlf/lfl/ite/futterkonservierung/12418/linkurl_0-_2.pdf: 47

- LAUSSMANN, D., EIS, D., SCHLEIBINGER, H. (2004): Vergleich mykologischer und chemisch-analytischer Labormethoden zum Nachweis von Schimmelpilzbefällen in Innenräumen. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* **47**: 1078-1094
- LEPOM, P. UND KLOSS, H. (1988): Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* isolated from roughage. *Mycopathologia* **101**: 25-29
- LEWIS, R. G., FORTMANN, R. C., CAMANN, D. E. (1994): Evaluation of methods for monitoring the potential exposure of small children to pesticides in the residential environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **26**: 37-46
- LGA BADEN-WÜRTTEMBERG (2004): Schimmelpilze in Innenräumen - Nachweis, Bewertung, Qualitätsmanagement. Abgestimmtes Arbeitsergebnis des Arbeitskreises „Qualitätssicherung – Schimmelpilze in Innenräumen“ am Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart, 2001, überarbeitet 2004
- LI, Y. G. UND CHU, F. S. (1984): Production and characterization of antibody against sterigmatocystin. *J. Food Saf.* **6**: 119-127
- LOU, J. L., MENG, Z. H., WANG, D. S. (1994): Production and characterization of sterigmatocystin. *Biomed. Environ. Sci.* **7**: 293-301
- LUFTMANN, H. (2004): A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**: 964-968
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M., MYRTEK, D. (2004): Immunologie. Elsevier GmbH, München
- MADSEN, A. M. (2003): NAGase activity in airborne biomass dust and relationship between NAGase concentrations and fungal spores. *Aerobiologia* **19**: 97-105
- MCCONNELL, I. R. UND GARNER, R. C. (1994): DNA adducts of aflatoxins, sterigmatocystins and other mycotoxins. In: DNA adducts: identification and biological significance. Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D. E. G., Kadlubar, F. F., Segerbäck, D., Bartsch, H. (Hrsg.), IARC Scientific publication Nr. 125, IARC, Lyon, 29-55
- MILLE-LINDBLOM, C., VON WACHENFELDT, E., TRANVIK, L. J. (2004): Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *J. Microbiol. Methods* **59**: 253-262
- MILLER, M., PALOJARVI, A., RANGGER, A., REESLEV, M., KJOLLER, A. (1998): The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 613-617
- MØLHAVE, L., SCHNEIDER, T., KJAERGAARD, S. K., LARSEN, L., NORN, S., JORGENSEN, O. (2000): House dust in seven Danish offices. *Atmos. Environ.* **34**: 4767-4779
- MORGAN, M. R., KANG, A. S., CHAN, H. W. (1986): Production of antisera against sterigmatocystin hemiacetal and its potential for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for sterigmatocystin in barley. *J. Sci. Food Agric.* **37**: 873-880
- MORISKE, H.-J. UND SZEWZYK, R. (2002): Leitfaden zur Vorbeugung, Untersuchung, Bewertung und Sanierung von Schimmelpilzwachstum in Innenräumen. Innenraumlufthygiene-Kommission des Umweltbundesamtes, Berlin

- MORRIS, K. J. (1995). Modern microscopic methods of bioaerosol analysis. In: *Bioaerosols Handbook*. Cox, C. und Wathes, C. M. (Hrsg.). Lewis Publication, Boca Raton, FL, USA: 285-316
- MÜLLER, E. UND LÖFFLER, W. (1992): Mykologie. Thieme Verlag Stuttgart, 5. Aufl.
- NÄSMAN, A., BLOMQUIST, G., LEVIN, J. O. (1999): Air sampling of fungal spores on filters. An investigation on passive sampling and viability. *J. Environ. Monit.* **1**: 361-365
- NEWELL, M. S., MILLER, J. D., FALLON, R. D. (1987): Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. *Mycologia* **79**: 688-695
- NEWELL, S. Y. (1994): Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3479-3482
- NIELSEN, K. F., GRAVESEN, S., NIELSEN, P. A., ANDERSEN, B., THRANE, U., FRISVAD, J. C. (1999): Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia* **145**: 43-56
- NIELSEN, K. F. (2002): Mould growth on building materials - Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Dissertation, Biocentrum DTU. Lyngby, Technical University of Denmark
- NIELSEN, K. F. (2003): Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal. Genet. Biol.* **39**: 103-117
- O'CALLAGHAN, J. AND DOBSON, A. D. (2005): Molecular Characterization of Ochratoxin A Biosynthesis and Producing Fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* **58C**: 227-243
- OKABAYASHI, T., MIHARA, S., REPKE, D. B., MOFFATT, J.G. (1977): Radioimmunoassay for 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Research* **37**: 619-624
- ORTI, D. L., GRAINGER, J., ASHLEY, D. L., HILL, R. H. (1989): Chromatographic and spectroscopic properties of hemiacetals of aflatoxin and sterigmatocystin metabolites. *J. Chromatogr.* **462**: 269-279
- PARK, J. H., COX-GANSER, J. M., KREISS, K., WHITE, S. K., RAO, C. Y. (2008): Hydrophilic fungi and ergosterol associated with respiratory illness in a water-damaged building. *Environ. Health Perspect.* **116**: 45-50
- PASANEN, A. L., YLI-PIETILA, K., PASANEN, P., KALLIOKOSKI, P., TARHANEN, J. (1999): Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 138-142
- PIECKOVÁ, E. UND JESENKÁ, Z. (1998): Mold on house walls and the effect of their chloroform-extractable metabolites on the respiratory cilia movement of one-day-old-chicks in vitro. *Folia Microbiol.* **63**: 672-678
- PITT, J. I. (1987): *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 266-269
- PITT, J. I. (2000): Toxigenic fungi: which are important? *Med. Mycol.* **38**: 17-22
- PITT, J. I., BASILICO, J. C., ABARCA, M. L., LOPEZ, C. (2000): Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med. Mycol.* **38**: 41-46

- POHLAND, A. E., CUSHMAC, M. E., ANDRELLOS, P. J. (1968): Aflatoxin B1 hemiacetal. *J. Assoc. Anal. Chem.* **51**: 907-910
- PORTNER, C., PLEGGE, V., TEUTENBERG, T., TOEPFER, I., TÜRK, J., BUTTE, W. (2008): Analysis of mycotoxins in house dust using LC-MS/MS and LC-MSⁿ. Analytica 2008, München, Poster
- PORTNOY, J. M., FLAPPAN, S., BARNES, C. S. (2001): A procedure for evaluation of the indoor environment. *Aerobiologia* **17**: 43-48
- RABIE, C. J., LUBBEN, A., STEYN, M. (1976): Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on semisynthetic liquid and solid media. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 206-208
- RAEDERSTORFF, D. UND ROHMER, M. (1987): Sterol biosynthesis via cycloartenol and other biochemical features related to photosynthetic phyla in the amebas *Naegleria lovaniensis* and *Naegleria gruberi*. *Eur. J. Biochem.* **164**: 427-434
- RAO, G. V. S. UND GEORGE, V. T. (2000): Production of sterigmatocystin on rice grains by *Aspergillus versicolor*. *Indian J. Anim. Sci.* **70**: 759-760
- RAUCH, P., WIESMANN, H.-P., FISCHER, A., SIEWERT, S., SPECHT, C. (2005): Hintergrund bei Immunoassays. *Bioforum* **11**: 22-24
- REIß, J. (1998): Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. Springer Verlag, Berlin, 2. Aufl.
- REYES, F., CALATAYUD, J., VAZQUEZ, C., MARTINEZ, M. J. (1989): Beta-N-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* which degrades chitin oligomers during autolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**: 83-87
- RHIEL, E., KUNZ, J., WEHRMEYER, W. (1989): Immunocytochemical localization of phycoerythrin-545 and of a chlorophyll a/c light harvesting complex in *Cryptomonas maculata* (Cryptophyceae). *Botanica Acta* **102**: 46-53
- RICHARD, J. L., PLATTNER, R. D., MAY, J., LISKA, S. L. (1999): The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia* **146**: 99-103
- ROBINE, E., LACAZE, I., MOULARAT, S., RITOUX, S., BOISSIER, M. (2005): Characterisation of exposure to airborne fungi: measurement of ergosterol. *J. Microbiol. Methods* **63**: 185-192
- ROLLE-KAMPCZYK, U., MÜLLER, A., DIEZ, U., REHWAGEN, M., SCHWENKE, A., METZNER, G., HERBARTH, O. (2000): Mycotoxins in house dust - an underestimated problem. *Mycotoxin Research* **16A**: 100-104
- ROSAS, A. L., MACGILL, R. S., NOSANCHUK, J. D., KOZEL, T. R., CASADEVALL, A. (2002): Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 144-148
- RUZICKA, S., EDGERTON, D., NORMAN, M. D. P., HILL, T. (2000): The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soil. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 989-1005

- RYLANDER, R. (1998): Effects after mould exposure - which are the causative agents? Third international conference on fungi, mycotoxins and bioaerosols - health effects, assessment, prevention and control, Saratoga Springs, New York, USA, Eastern New York Occupational & Environmental Health Center
- SACHS, L. (2004): Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin, 11. Aufl.
- SALDANHA, R., MANNO, M., SALEH, M., EWAZE, J. O., SCOTT, J. A. (2008): The influence of sampling duration on recovery of culturable fungi using the Andersen N6 and RCS bioaerosol samplers. *Indoor Air* **18**: 464-472
- SAMSON, R. (2001): Mycotoxin producing fungi: ecology and significance. 5. Lübecker Fachtagung für Umwelthygiene - Gesundheitliche Aspekte toxinogener Schimmelpilze in Gebäuden, Lübeck
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. (1996): Introduction to foodborne fungi. 5. Aufl., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. (2004): Introduction to food- and airborne fungi. 7. Aufl., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande
- SAMSON, R. A. UND HOEKSTRA, E. S. (2004): Toxic moulds in indoor environments - descriptions of important species. 8. Lübecker Fachtagung für Umwelthygiene - Erfassung biogener und chemischer Schadstoffe des Innenraumes und die Bewertung umweltbezogener Gesundheitsrisiken, Lübeck: 409-435
- SARAF, A., LARSSON, L., BURGE, H., MILTON, D. (1997): Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* amebocyte lysate assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2554-2559
- SARAF, A., LARSSON, L., LARSSON, B. M., LARSSON, K., PALMBERG, L. (1999): House dust induces IL-6 and IL-8 response in A549 epithelial cells. *Indoor Air* **9**: 219-225
- SCF (1996): Opinions of the Scientific Committee for Food. Brüssel, Scientific Committee for Food: 58
- SCHEUER, R. UND GAREIS, M. (2001). Occurrence of ochratoxin A in spices. *Mitteilungsblatt BAFF* **152**: 93-100
- SCHLEIBINGER, H., KELLER, R., RÜDEN, H. (2004 I): Indoor air pollution by microorganisms and their metabolites. In: *Indoor Air Pollution*. Pluschke, P. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin. **4**: 149-177
- SCHLEIBINGER, H., LAUSSMANN, D., EIS, D., SAMWER, H., NICKELMANN, A., RÜDEN, H. (2004 II): Unterscheidung von Schimmel- und Nichtschimmelwohnungen anhand von Sporen aus Hausstaubproben. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **9**: 363-376
- SCHNÜRER, J. (1993): Comparison of methods for estimating the biomass of three foodborne fungi with different growth patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 552-555
- SCHRAM-BIJKERK, D., DOEKES, G., BOEVE, M., DOUWES, J., RIEDLER, J., UBLAGGER, E., VON MUTIUS, E., BENZ, M., PERSHAGEN, G., WICKMAN, M., ALFVEN, T., BRAUNFAHRLANDER, C., WASER, M., BRUNEKREEF, B. (2006): Exposure to microbial components and allergens in population studies: a comparison of two house dust collection methods applied by participants and fieldworkers. *Indoor Air* **16**: 414-425

- SCHROEDER, H. W. UND KELTON, W. H. (1975): Production of sterigmatocystin by some species of the genus *Aspergillus* and its toxicity to chicken embryos. *Appl. Microbiol.* **30**: 589-591
- SEBASTIAN, A. AND LARSSON, L. (2003): Characterization of the microbial community in indoor environments: a chemical-analytical approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3103-3109
- SEDLBAUER, K. UND KRUS, M. (2003): Schimmelpilze in Gebäuden - Biohygrothermische Berechnungen und Gegenmaßnahmen. In: *Bauphysik Kalender 2003*. Cziesielski, E. (Hrsg.), Ernst & Sohn, Berlin: 435-530
- SEIDL, H. P., GABRIO, T., WEIDNER, U., DILL, I., FISCHER, G., GRUN, L., HOEKSTRA, E. S., RABE, R., SAMSON, R. A., TRAUTMANN, C. (2005): Ringversuch "Innenraum-relevante Schimmelpilze". *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* **48**: 36-42
- SEIDL, H. P., GABRIO, T., WEIDNER, G., DILL, I., VAN DOORN, T., FISCHER, G., HOEKSTRA, E. S., ILYASHENKO, I., JANICH-GRÜN, S., RABE, R., SAMSON, R. A., SZEZYK, R., TRAUTMAN, C. (2009): Ringversuch "Innenraum- und Lebensmittel relevante Schimmelpilze" des LGA Baden-Württemberg. 10. Umwelttoxikologisches Kolloquium - Analytische Qualitätssicherung, Stuttgart
- SEIFERT, B. (1998): Die Untersuchung von Hausstaub im Hinblick auf Expositionsabschätzungen. *Bundesgesundheitsblatt* **9**: 383-391
- SEITZ, L. M., MOHR, H. E., BURROUGHS, R., SAUER, D. B. (1977): Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry* **54**: 1207-1217
- SMORAGIEWICZ, W., COSSETTE, B., BOUTARD, A., KRZYSTYNIAK, K. (1993): Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **65**: 113-117
- STACK, M. UND RODRICKS, J. V. (1971): Method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **54**: 86-90
- STEYN, M. UND RABIE, C. J. (1975): Production of sterigmatocystin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**: 622-623
- STOLOFF, L., NESHEIM, S., YIN, L., RODRICKS, J. V., STACK, M., CAMPBELL, A. D. (1971): A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin, and patulin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **54**: 91-97
- STOYAN, D., STOYAN, H., JANSEN, U. (1997): Umweltstatistik – Statistische Verarbeitung und Analyse von Umweltdaten. Teubner-Reihe Umwelt. B. G. Teubner Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- SÜßMUTH, R., EBERSPÄCHER, J., HAAG, R., SPRINGER, W. (1987): Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- SWEENEY, M. J. UND DOBSON, A. D. W. (1998): Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* **43**: 141-158
- SZEZYK, R. (2009): Sensibilisierung von Kindern durch Schimmelpilzallergene – Ergebnisse aus dem Kinder-Umwelt-Survey. Vortrag zur Fortbildung für den öffentlichen Gesundheitsdienst, 26.03.2009, Umweltbundesamt, Berlin

- SZPONAR, B. UND LARSSON, L. (2000): Determination of microbial colonisation in water-damaged buildings using chemical marker analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Indoor Air* **10**: 13-18
- TÉREN, J., VARGA, J., HAMARI, Z., RINYU, E., KEVEI, F. (1996): Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* **134**: 171-176
- THURM, V., PAUL, P., KOCH, C. E. (1979): Zur hygienischen Bedeutung von Sterigmatocystin in pflanzlichen Lebensmitteln. 1. Mitt. Analytischer Nachweis von Sterigmatocystin. *Nahrung* **23**: 111-115
- TOEPFER, I. UND BUTTE, W. (2009): Chemische Indikatoren für Schimmelpilze im Hausstaub. *Gefahrst. Reinhalt. Luft* **69**: 91-95
- TRAUTMAN, C. (2005): Aussagekraft von Schimmelpilzuntersuchungen. 9. Pilztagung des VDB: Schimmel sicher erkennen, bewerten, sanieren. Hamburg: 17-32
- TRAUTMAN, C. (2006): Nachweis und Bewertung von non-viable Sporen im Innenraum. 10. Lübecker Fachtagung für Umwelthygiene - Partikuläre und molekulare Belastungen in Innenraum- und Außenluft, Lübeck: 315-332
- TRAUTMANN, C., GABRIO, T., DILL, I., WEIDNER, U. (2005): Hintergrundkonzentrationen von Schimmelpilzen im Hausstaub. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* **48**: 29-35
- TUOMI, T., REIJULA, K., JOHNSON, T., HEMMINKI, K., HINTIKKA, E. L., LINDROOS, O., KALSO, S., KOUKILA-KAHKOLA, P., MUSSALO-RAUHAMAA, H., HAAHTELA, T. (2000): Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1899-1904
- VALERO, A., FARRE, J. R., SANCHIS, V., RAMOS, A. J., MARIN, S. (2006): Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and a(w). *Int. J. Food Microbiol.* **110**: 160-164
- VAN DER MERWE, K. J., STEYN, P. S., FOURIE, L. (1965): Mycotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc. Perkin.* **1**: 7083-7088
- VDI (2001). VDI 4300 Blatt 8 - Messen von Innenraumlufthverunreinigungen - Probenahme von Hausstaub. VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft. Verband Deutscher Ingenieure. Beuth Verlag, Berlin
- VDI (2008). VDI 4300 Blatt 10 - Messen von Innenraumlufthverunreinigungen - Messstrategien bei der Untersuchung von Schimmelpilzen im Innenraum. VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft. Verband Deutscher Ingenieure. Beuth Verlag, Berlin
- VEGA, F. E., POSADA, F., PETERSON, S. W., GIANFAGNA, T. J., CHAVES, F. (2006): *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia* **98**: 31-42
- VERHOEFF, A. P., VAN WIJNEN, J. H., BOLEIJ, J. S., BRUNEKREEF, B., VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S., SAMSON, R. A. (1990): Enumeration and identification of airborne viable mould propagules in houses. A field comparison of selected techniques. *Allergy* **45**: 275-284

- VERHOEFF, A. P., VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S., SAMSON, R. A., BRUNEKREEF, B., VAN WIJNEN, J. H. (1994 I): Fungal propagules in house dust. I. Comparison of analytic methods and their value as estimators of potential exposure. *Allergy* **49**: 533-539
- VERHOEFF, A. P., VAN WIJNEN, J. H., VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S., SAMSON, R. A., VAN STRIEN, R. T., BRUNEKREEF, B. (1994 II): Fungal propagules in house dust. II. Relation with residential characteristics and respiratory symptoms. *Allergy* **49**: 540-547
- VOLKER, E. J., DILELLA, D., TERNEUS, K., BALDWIN, C., VOLKER, I. (2000): The determination of ergosterol in environmental samples. *J. Chem. Educat.* **77**: 1621-1623
- VORSTER, L. J. UND PURCHASE, I. F. (1968): A Method for determination of sterigmato-cystin in grain and oilseeds. *Analyst* **93**: 694-696
- WALKER, G., HOSTRUP, O., HOFFMANN, W., BUTTE, W. (1999): Biozide im Hausstaub: Ergebnisse eines repräsentativen Monitorings in Innenräumen. *Gefährst. Reinhalt. Luft* **59**: 33-41
- WEETE, J. D. UND GANDHI, S. R. (1996): Biochemistry and molecular biology of fungal sterols. In: *The Mycota III - Biochemistry and Molecular Biology*. Esser, K. und A. Lemke, P. (Hrsg.), Springer Verlag Berlin, Vol 3: 421-438
- WICKENS, K., LANE, J., SIEBERS, R., INGHAM, T., CRANE, J. (2004): Comparison of two dust collection methods for reservoir indoor allergens and endotoxin on carpets and mattresses. *Indoor Air* **14**: 217-222
- WICKMANN, M., GRAVESEN, S., NORDVALL, S. L., PERSHAGEN, G., SUNDELL, J. (1992): Indoor viable dust-bound microfungi in relation to residential characteristics, living habits, and symptoms in atopic and control children. *J Allergy Clin Immunol* **89**: 752-759
- WILLENBORG, R. (2001): Entwicklung eines Enzymimmunoassays zum Nachweis von Permethrinsäure [(1RS)-trans-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbon-säure] in Urin. Dissertation, Institut für Reine und Angewandte Chemie. Oldenburg, Carl von Ossietzky Universität
- WOUTERS, I. M., DOUWES, J., DOEKES, G., THORNE, P. S., BRUNEKREEF, B., HEEDERIK, D. J. (2000): Increased levels of markers of microbial exposure in homes with indoor storage of organic household waste. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 627-631

8 ANHANG

8.1 Geräteliste

Prüfsiebe mit Siebschale und Deckel, 63 µm und 2 mm	Retsch
Binokulares Lichtmikroskop (Durchlicht)	Carl Zeiss
Binokulare Stereolupe	Carl Zeiss
Analysenwaage A 120 S	Sartorius Analytic
Schnellwaage L 310	Sartorius Laboratory
Trockenschrank mit 105 ± 2 °C	Heraeus
Brutschrank mit 37 ± 1 °C	Heraeus
Glühofen mit 550 °C	Nabertherm
Zentrifuge: Minifuge GL	Heraeus Christ
Zentrifuge: Biofuge A	Heraeus Christ
Autoklav	H + P Varioklav
Magnetrührer IKA-Combimag Ret	IKA Janke & Kunkel
Vortex Rüttler	IKA Janke & Kunkel
Rundschüttler Rotamax 120	Heidolph
Überkopfschüttler 3020	GFL
Heizverdampfer Reacti-Therm mit Reacti-Vap	Pierce
Fluorometer LS5	Perkin-Elmer
Quarzküvetten QS Suprasil (B 12,5 mm, H 45 mm)	Roth
Ultraschallbad Sonorex RK 255	Bandelin
Rotationsverdampfer	Jürgens, IKA-Werke
Soxhletapparatur	Glasgeräte
Vac-Elut-Einheit und Membranpumpe	Analytichem international
Küchenmixer MagicMaxx	ds-Produkte
Kolbenhubpipetten, variabel, 100 und 1000 µl	Eppendorf
8- und 12-Kanalpipetten, 100 und 300 µl	Eppendorf
HPLC:	
LC-Gradientenpumpe 2249	LKB
Säulenofen: LKB 2155	Pharmacia
Fluoreszenz-Detektor RF 535	Shimadzu
Absorptions-Detektor: Spectroflow 757	Kratos analytical

Integrator SP 4270	Spectra Physics
Nucleosil 100-5-C18-Säule, 125 mm * 3 mm, 5 µm (OTA)	Macherey-Nagel
ODS2 C18-Säule, 150 mm * 4 mm, 5 µm (Ergosterin)	Pharmacia

DC:

DC-Kammer: 10 x 25 x 25, Glas, geschlossen	Camag
DC-Scanner II, Cats Software	Camag
DC-Sprüngerät	Merck
UV-Handlampe UVGL 58, 366 nm	UVP
<i>DC-Platten 20 x 20 cm:</i>	
Kieselgel 60 auf Alufolie oder Glas	Merck
Kieselgel 60 mit Konzentrierungszonen auf Alufolie	Merck
Exsikkator	Glasgerät

ELISA:

Platten-Photometer Multiskan	Titertek
Multititerplatten (Polystyrol)	Greiner

Verbrauchsmaterialien und Gefäße:

Petrischalen, Durchmesser 90 mm, Kunststoff	Greiner
Spritzenfilter 0,45 µm, Glasfaser	Phenomenex
Spritzenfilter, 0,2 µm Glasfaser	Phenomenex
Strata C18 E, Festphasensäule	Phenomenex
Immunoaffinitätssäulen für Ochratoxin A: OtaCLEAN	LC-Tech
Micro Columns ProbeQuant™ G-50, 0,45 µm	GE Healthcare
Probengefäße mit konischem Boden, 3 ml, mit Verschraubkappe	Pierce
Reaktionsgefäße, PP, 1500 und 2000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen, 100 und 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen, glucanfrei, 100 und 1000 µl	Pyroquant

Testkits:

GLUCATELL-Test	Pyroquant
MycoMeter-Test™	MycoMeter ApS
RIDASCREEN® Ochratoxin A	R-Biopharm

8.2 Chemikalienliste

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p. a. Qualität eingesetzt

Acetonitril	Scharlau
Agar-Agar	Carl Roth
Ameisensäure	Riedel de Haen
Benzol	Fluka
Bernsteinsäureanhydrid	Merck
Bernsteinsäurechloridtrichlorethylhalbester	Merck
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Merck
Zitronensäure	Merck
7-Dehydrocholesterin	Sigma
Dichlormethan	Merck
Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma
Diethylether	Fluka
4-Dimethylaminopyridin	Aldrich
Essigsäure	Riedel de Haen
Essigsäureanhydrid	Merck
Ethylacetat	Promochem
α -D(+)-Glucose	Acros Organics
Glycerin	Carl Roth
n-Hexan	Scharlau
Kaliumhydroxid	Riedel de Haen
Kieselgel 60	Merck
Methanol	Scharlau
Natriumchlorid	VWR
Natriumcarbonat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
Natronlauge (1 mol/l), glucanfrei	Pyroquant
Pepton aus Soja	Merck

Petrolether	Merck
Pyridin	Fluka
Salzsäure (5 mol/l), glucanfrei	Pyroquant
Schwefelsäure	Merck
Tetrahydrofuran	Fluka
TMB-Substrat (3,3,5,5-Trimethylbenzidin), Tabletten	Sigma
Trichlorethanol	Merck
Triethylamin	Fluka
Triton X 100	Merck
Tween 20	Merck
Tween 80	Merck
Wasser, glucanfrei	Pyroquant
Wasserstoffperoxid	Merck

8.3 Tabellen

Tab. 8-1: Statistische Kenngrößen der Lebendkeimzahlen der im Hausstaub nachweisbaren Schimmelpilzarten, sowie deren Häufigkeit

Die Werte wurden mit Hilfe der auf DG18-Agar nachgewiesenen Keimzahlen ermittelt. Die grau unterlegten Werte wurden auf Malzextrakt-Agar ermittelt.

	Kontrollen				Fälle			
	($\cdot 10^6$ KBE/kg)			(%)	($\cdot 10^6$ KBE/kg)			(%)
	Median	95. Perz.	Max.	pos. Proben	Median	95. Perz.	Max.	pos. Proben
<i>Absidia corymbifera</i>	0	0	30	0,5	0	0	1	0,7
<i>Acremonium butyri</i>	0	29	1.000	13,4	0	100	3.000	13,7
<i>Acremonium charticola</i>	0	10	200	6,5	0	51	2.700	10,5
<i>Acremonium murorum</i>	0	0	10	0,5	0	0	100	1,3
<i>Acremonium strictum</i>	0	29	300	10,4	0	43	1.000	8,5
<i>Acremonium</i> Summe	0	100	1.000	28,9	0	230	3.000	30,7
<i>Alternaria alternata</i>	0	19	50	22,9	0	13	100	18,3
<i>Apiospora montagnei</i>	0	0	10	1,0	0	0	70	0,7
<i>Aspergillus candidus</i>	0	30	150	24,9	0	86	12.000	17,6
<i>Aspergillus clavatus</i>	0	0	0	0,0	0	0	10	0,7
<i>Aspergillus flavus</i>	0	1	10	5,5	0	0	80	3,9
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0	0,0	0	0	10	0,7
<i>Aspergillus lentulus</i>	0	0	10	0,5	0	0	2.800	0,7
<i>Aspergillus melleus</i>	0	0	400	0,5	0	0	200	0,7
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	10	1,0	0	0	220	2,0
<i>Aspergillus niger</i>	0	19	200	40,8	0	10	600	35,3
<i>Aspergillus niveus</i>	0	0	20	0,5	0	0	0	0,0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	10	400	15,4	0	79	300	19,6
<i>Aspergillus oryzae</i>	0	0	1	1,0	0	0	10	1,3
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0	408	3.000	13,9	0	2.390	42.000	26,1
<i>Aspergillus restrictus</i>	0	290	16.000	14,4	0	5.320	31.000	25,5
<i>Aspergillus sydowii</i>	0	10	240	6,5	0	2	330	5,9
<i>Aspergillus tamarii</i>	0	0	2	0,5	0	0	1	0,7
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	4	1,0	0	0	70	2,0
<i>Aspergillus unguis</i>	0	0	20	0,5	0	3	3.000	4,6
<i>Aspergillus ustus</i>	0	0	300	1,0	0	0	0	0,0
<i>Aspergillus versicolor</i>	9	690	8.000	64,2	10	2.830	26.000	65,4
<i>Aspergillus</i> Summe	38	1.498	18.200	89,6	290	19.000	42.501	90,8
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	10	80	14,9	0	23	100	15,0
<i>Botryosporium pulchrum</i>	0	0	1	0,5	0	0	10	1,3
<i>Botrytis cinerea</i>	0	10	140	10,0	0	1	30	5,9
<i>Chaetomium globosum</i>	0	0	10	4,5	0	10	200	7,2
<i>Chrysonilia sitophila</i>	0	0	10	4,0	0	0	30	2,0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0	118	600	22,4	0	330	1.900	28,8
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	210	2.100	40,8	0	165	3.000	39,2
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	0	138	1.000	16,4	0	10	500	7,2
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	200	700	17,9	0	300	2.000	17,6
<i>Cladosporium</i> Summe	20	554	2.100	83,6	30	900	5.000	79,1

Fortsetzung Tab. 8-1

	Kontrollen				Fälle			
	($\cdot 10^6$ KBE/kg)			(%)	($\cdot 10^6$ KBE/kg)			(%)
	Median	95. Perz.	Max.	pos. Proben	Median	95. Perz.	Max.	pos. Proben
<i>Curvularia geniculata</i>	0	0	70	3,5	0	0	10	1,3
<i>Engyodontium album</i>	0	0	10	1,0	0	0	300	1,3
<i>Epicoccum nigrum</i>	0	0	10	3,5	0	6	200	13,1
<i>Eurotium amstelodami</i>	0	19	1.200	24,4	0	50	200	17,0
<i>Eurotium chevalieri</i>	0	10	1.000	10,4	0	10	1.100	10,5
<i>Eurotium herbariorum</i>	3	100	2.100	61,7	10	560	3.000	69,3
<i>Eurotium Summe</i>	10	267	2.300	82,6	12	745	3.000	85,6
<i>Fusarium sp.</i>	0	30	100	24,9	0	30	60	11,8
<i>Geomyces pannorum</i>	0	0	2	0,5	0	0	10	2,0
<i>Geotrichum candidum</i>	0	10	100	11,9	0	10	100	5,2
<i>Moniliella acetoabutens</i>	0	0	10	1,0	0	0	0	0,0
<i>Mucor hiemalis</i>	0	20	200	16,9	0	10	1.200	7,8
<i>Mucor plumbeus</i>	0	4	100	9,0	0	10	400	9,2
<i>Mucor racemosus</i>	0	29	4.000	12,9	0	6	230	7,8
<i>Mucor Summe</i>	0	100	4.000	37,3	0	32	1.200	23,5
<i>Mycelium sterile</i>	6	98	500	64,2	4	100	800	56,2
<i>Nectria inventa</i>	0	0	100	1,5	0	0	1	0,7
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0	0	100	1,5	0	0	100	0,7
<i>Paecilomyces variotii</i>	0	0	10	2,0	0	0	200	2,0
<i>Paecilomyces Summe</i>	0	0	100	3,5	0	0	200	2,6
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0	89	2.600	32,3	0	300	9.000	28,8
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0	99	3.000	22,4	0	200	61.000	28,1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	20	500	26.000	76,1	20	800	56.000	69,9
<i>Penicillium citrinum</i>	0	29	23.000	6,5	0	0	60	2,0
<i>Penicillium corylophilum</i>	0	136	15.000	30,8	0	200	2.000	28,8
<i>Penicillium crustosum</i>	0	10	5.000	8,5	0	16	2.000	5,9
<i>Penicillium digitatum</i>	0	19	1.000	8,0	0	23	1.000	9,8
<i>Penicillium echinulatum</i>	0	0	500	1,0	0	0	18.000	3,3
<i>Penicillium expansum</i>	0	59	26.000	18,9	0	113	2.000	20,3
<i>Penicillium funiculosum</i>	0	0	100	4,0	0	10	1.400	6,5
<i>Penicillium glabrum</i>	0	80	3.000	27,9	0	200	800	21,6
<i>Penicillium griseofulvum</i>	0	0	10	0,5	0	0	0	0,0
<i>Penicillium italicum</i>	0	0	10	0,5	0	0	0	0,0
<i>Penicillium nalgiovense</i>	0	8	50	6,0	0	20	600	7,2
<i>Penicillium neoechinulatum</i>	0	0	40	1,5	0	0	600	1,3
<i>Penicillium olsonii</i>	1	109	6.000	56,2	0	100	18.000	45,8
<i>Penicillium roquefortii</i>	0	0	0	0,0	0	0	300	0,7
<i>Penicillium rugulosum</i>	0	0	20	1,0	0	0	0	0,0
<i>Penicillium variable</i>	0	0	60	0,5	0	0	7.000	1,3
<i>Penicillium verrucosum</i>	0	0	20	1,0	0	13	500	5,9
<i>Penicillium Summe</i>	80	1.390	73.000	99,5	116	4.090	128.000	98,0
<i>Phoma glomerata</i>	0	1	60	5,5	0	3	30	5,9
<i>Phoma macrostoma</i>	0	0	20	0,5	0	0	0	0,0
<i>Phoma Summe</i>	0	2	60	6,0	0	3	30	5,9
<i>Pithomyces chartarum</i>	0	0	6	1,0	0	0	100	0,7

Fortsetzung Tab. 8-1

	Kontrollen				Fälle			
	($\cdot 10^6$ KBE/kg)			(%)	($\cdot 10^6$ KBE/kg)			(%)
	Median	95. Perz.	Max.	pos. Proben	Median	95. Perz.	Max.	pos. Proben
<i>Rhizopus oligosporus</i>	0	0	0	0,0	0	0	50	1,3
<i>Rhizopus oryzae</i>	0	2	3.000	5,0	0	0	300	2,6
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0	8	600	7,0	0	0	60	4,6
<i>Rhizopus</i> Summe	0	10	3.000	11,9	0	4	300	8,5
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	0	0	130	2,0	0	0	150	2,0
<i>Scopulariopsis candida</i>	0	0	20	1,0	0	0	2.200	2,0
<i>Scopulariopsis fusca</i>	0	0	40	4,5	0	0	20	0,7
<i>Scopulariopsis</i> Summe	0	10	130	7,0	0	3	2.200	4,6
<i>Stachybotrys chartarum</i>	0	0	10	0,5	0	0	0	0,0
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	10	2.000	27,4	0	10	100	19,6
<i>Trichothecium roseum</i>	0	0	0	0,0	0	0	500	0,7
<i>Ulocladium chartarum</i>	0	30	600	24,4	0	30	60	22,2
<i>Wallemia sebi</i>	8	1.090	30.000	54,7	10	3.150	23.000	66,0
Hefen/Bakterien	380	5.000	28.000	90,0	300	3.660	6.400	81,7
Schimmelpilze	388	4.559	88.000	100,0	1.120	28.896	164.000	100,0

Tab. 8-2: Ergebnisse der chemischen Indikatoren und der Lebendkeim- sowie Gesamtsporenzahl in einem Unterkollektiv (n = 29)

Probe	Lebendkeimzahl ($\cdot 10^6$ KBE/kg)		Ergosterin (mg/kg)	1,3- β -D-Glucan (mg/kg)	NAGase (U/kg)	Gesamtsporen ($\cdot 10^6$ Sporen/kg)
	DG18	ME				
1	13	8	3,1	47,3	562,6	25.000
2	14	9	2,9	37,5	113,6	31.667
3	42	81	0,6	56,6	164,2	33.333
4	57	53	0,6	29,5	401,2	23.333
5	65	174	1,8	46,5	122,0	16.667
6	83	41	3,3	26,7	55,1	10.000
7	128	62	2,4	19,9	473,9	16.667
8	130	3.162	4,6	71,9	472,9	40.000
9	259	122	3,7	16,8	257,3	15.000
10	269	361	5,0	32,2	224,1	25.000
11	350	412	3,5	53,2	58,4	23.333
12	373	77	6,9	59,7	132,7	6.667
13	436	149	2,50	54,8	199,5	23.333
14	524	230	3,6	63,1	326,4	18.333
15	610	400	7,5	42,3	318,2	21.875
16	670	61	11,5	72,5	319,1	21.667
17	901	270	7,2	47,4	575,4	55.000
18	1.050	1.471	6,3	53,0	273,6	38.333
19	1.703	1.800	4,1	96,2	245,8	8.333
20	2.110	635	2,1	56,0	335,2	60.000
21	2.515	1.500	8,4	53,3	522,2	16.667
22	2.900	2.000	13,5	81,2	264,8	13.333
23	4.185	480	6,6	48,5	63,0	31.667
24	8.200	8.370	9,7	33,6	113,6	40.000
25	12.720	13.520	23,1	55,0	348,6	78.333
26	18.910	11.451	25,1	29,7	502,2	68.333
27	25.500	25.320	4,8	34,4	246,9	28.333
28	69.000	39.000	20,3	53,8	345,6	48.333
29	164.000	500	63,2	47,6	576,9	578.333

8.4 Fragebogen

Fragebogen zur Erhebung von Informationen zum Gebäude und zur Nutzung (5 Seiten). Die erste Seite mit den persönlichen Angaben wurde getrennt aufbewahrt. Die übrigen Angaben wurden über eine Probenummer anonymisiert ausgewertet.

Forschungsstudie zu Schimmelpilzgiften im Hausstaub

Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA)

Kontakt:

Universität Oldenburg
Ilka Toepfer
Carl-von-Ossietzky-Str. 9-11
26129 Oldenburg
Tel.: 0441 – 798-5635
ilka.toepfer@mail.uni-oldenburg.de

Datum: _____ Probennehmer: _____ Probe-Nr. _____

1 Allgemeine Angaben

Name: _____

Objektanschrift: _____

Telefon: _____

Email: _____

1.1 Probenahmestelle:

- ☐ Wohnhaus ☐ Mietwohnung ☐ Öffentliches Gebäude/ Firma

Bemerkung: _____

1.2 Welches Stockwerk? ☐ Souterrain, Keller ☐ Erdgeschoss ☐ ____ Obergeschoss**1.3 Befinden sich in unmittelbarer Umgebung des Gebäudes (bis max. 500 m):**

- ☐ Geschlossene Bebauung ☐ Landwirtschaftliche Nutzflächen ☐ Komposthaufen
☐ Mülltonnen ☐ Park ☐ Friedhof ☐ Kompostierwerk oder Mülldeponie

Genaue Beschreibung: _____

1.4 Um was für einen Typ Haus handelt es sich?

- ☐ Ein- oder Zweifamilienhaus, freistehend ☐ Reihenhaushaus
☐ Mehrfamilienhaus bis 5 Etagen ☐ Mehrfamilienhaus mit mehr als 5 Etagen
☐ Öffentliches Gebäude/ Firma
☐ Anderes: Bitte Beschreibung _____

2. Schimmelvorkommen allgemein**2.1 Trat schon einmal Schimmelbefall auf?** ☐ ja ☐ nein

☐ Wenn ja, wann und wo: _____

2.2 Wurde schon einmal Schimmelbefall bekämpft? ☐ ja ☐ nein

☐ Wenn ja, wann, wie und durch wen: _____

2.3 Wurden fungizide Farben, Sprays etc. benutzt? ☐ ja ☐ nein

☐ Wenn ja, wann, wie und durch wen: _____

3 Angaben Räume/ Gebäude**3.1 Gebäude allgemein**

3.1.1 In welchem Jahr wurde das Gebäude erbaut? Jahreszahl (ungefähre Angabe) |_|_|_|

3.1.2 Zeitpunkt des Einzuges in die Wohnung: Monat |_|_| Jahr |_|_|_|

3.1.3 Wurden umfangreiche bauliche Veränderungen vorgenommen (z. B. Innen-/Außen-dämmung)? ☐ Wenn ja, wann und welche: _____

3.2 Weist das Haus eine der folgenden baulichen Besonderheiten auf?

- ☐ Energiesparhaus/ Niedrigenergiehaus ☐ Öko-Haus (z.B. Holzhaus)
☐ Flachdachhaus ☐ Fertighaus
☐ Bauernhaus mit direkt angebautem Stallgebäude, in dem Tiere gehalten werden
☐ Bauernhaus (mit Stallgebäude), mit früherer Tierhaltung
☐ Anderes: Bitte Beschreibung _____

3.3 Lage der Räume im Gebäude**3.3.1 Ist das Haus unterkellert?** ☐ ja ☐ neinWenn ja: ☐ voll unterkellert ☐ teilweise unterkellert

Bemerkungen: _____

3.3.2 Was befindet sich unter der Wohnung?☐ Bewohnte Wohnung ☐ unbewohnte Wohnung ☐ Souterrain, Keller☐ Fundament, Erde Bemerkungen: _____**3.3.3 Was befindet sich oberhalb der Decke der Wohnung?**☐ Bewohnte Wohnung ☐ unbewohnte Wohnung ☐ Dachboden ☐ Flachdach☐ Dachschrägen Bemerkungen: _____**3.4 Bauwerksmängel:**☐ Risse im Putz ☐ mangelhafte Verfugung ☐ Salzausblühungen☐ defekte Regenrinne / -fallrohre bzw. Dachziegel ☐ feuchte Stellen☐ Anderes: Bitte Beschreibung _____**3.5 Art der Fenster:**☐ Einscheibenfenster ☐ Kastendoppel- / 2-Rahmenfenster☐ Isolierverglasung, Thermofenster, Schallschutzfenster

Bemerkungen: _____

3.6 Womit ist der Fußboden in der Wohnung belegt? Bei Pilzbefall im betroffenen Raum:☐ Stein, Fliesen, Estrich☐ Parkett, Kork, Stirnholz, Laminat Fugenbreite: _____mm Versiegelt mit:☐ Linolium, PVC, etc. ☐ kurzfloriger Teppichboden ☐ hochfloriger Teppichboden☐ lose Teppiche (m²) _____☐ Anders: Bitte Beschreibung: _____**3.7 Material der Wände? Bei Pilzbefall im betroffenen Raum?**☐ Raufaser ☐ Vinyl ☐ Putz ☐ Tapete ☐ Holz ☐ Gipskarton☐ Anders: Bitte Beschreibung _____**4 Raumnutzung allgemein****4.1 Wohnungsnutzer und ihre Aktivitäten:****4.1.1 Personenzahl:** _____ davon Raucher, die im Innenraum rauchen: _____**4.1.2 Geruchswahrnehmung (modrig, muffig):** ☐ ja ☐ nein

Bemerkungen: _____

4.2 Boden- und Wandbündigkeit von Möbeln an Außenwänden des betroffenen Raumes**4.2.1 Sind Einbauschränke vorhanden?** ☐ ja ☐ nein**4.2.2 Ist ein Abstand von mindestens 5 cm zwischen Außenwänden und Möbelstück(en)?**☐ ja ☐ nein

4.3 Haustiere

4.3.1 Gibt es Haustiere in der Wohnung? ☐ ja ☐ nein

Wenn ja, welche? _____

4.3.2 Gab es in der Vergangenheit Haustiere in der Wohnung? ☐ ja ☐ nein

Wenn ja, welche? _____

4.4 Wird häufig Obst und Gemüse in der Wohnung gelagert? ☐ ja ☐ nein

Wenn ja, wo und wieviel: _____

4.5 Wird in der Wohnung gekocht? ☐ ja ☐ nein

5. Reinigungsgewohnheiten / Müllentsorgung

5.1 Wird Biomüll in der Wohnung gesammelt? ☐ ja ☐ nein

5.2 Wird Wertstoffmüll z.B. „gelber Sack“-Müll in der Wohnung gesammelt? ☐ ja ☐ nein

5.3 Wird Restmüll in der Wohnung gesammelt? ☐ ja ☐ nein

5.4 Falls ja, wie lange befindet sich der Sammelbehälter gewöhnlich in der Wohnung?

	Biomüll	Wertstoffmüll	Restmüll
5.4.1 weniger als 1 Woche	☐	☐	☐
5.4.2 1 - 2 Wochen	☐	☐	☐
5.4.3 mehr als 2 Wochen	☐	☐	☐

5.4.5 Wie häufig wird gesaugt/ geputzt (pro Woche/ Monat)? _____

Bemerkungen: _____

6. Angaben zu Heizung und Lüftung**6.1 Heizung**

6.1.1 Sind alle Räume beheizbar? ☐ ja ☐ nein

6.1.2 Werden alle Räume beheizt? ☐ ja ☐ nein

Wenn nein, wird der von Schimmelpilzen befallene Raum beheizt? ☐ ja ☐ nein

Wenn nein, Türe gewöhnlich: ☐ offen ☐ zu

6.2.1 Wird ein passiver Luftbefeuchter (mit Wasser gefüllte Gefäße, oder ein Zimmerbrunnen) verwendet? ☐ ja ☐ nein

6.2.2 Wird ein aktiver Luftbefeuchter (Verdunster, Vernebler) verwendet? ☐ ja ☐ nein

Wenn ja, wie häufig wird er benutzt? Anzahl der Stunden pro Tag: |_|_|

Anzahl der Tage pro Woche: |_|

6.3 Wie lüften Sie im Winter?

☐ selten, nie ☐ einmal täglich für kurze Zeit durch öffnen mehrerer Fenster

☐ mehrmals täglich für kurze Zeit durch öffnen mehrerer Fenster

☐ über mehrere Stunden das/ die Fenster ganz öffnen

☐ Das / die Fenster über mehrere Stunden gekippt

☐ Bemerkungen : _____

7. Topfpflanzen**7.1 Wie viele Topfpflanzen befinden sich in der Wohnung?**

Hydrokultur, Anzahl

|_|_|

Erdkultur, Anzahl

|_|_|

8. Schimmelbefall**8.1 Ist aktuell Schimmelbefall sichtbar?**☐ ja☐ nein**8.2 Wenn ja, wie groß ist die befallene Fläche?**☐ ca. Postkartengröße☐ ca. DIN A4-Größe☐ ca. 1 m²☐ größer: ca. ____ m²**8.3 In welchen Räumen ist der Schimmel aufgetreten?**

Möglichst genaue Beschreibung der betroffenen Räume:

8.4 Wo ist der Schimmel aufgetreten?☐ Hinter Möbeln☐ Freie Wandfläche☐ Sonstiges

Möglichst genaue Beschreibung: _____

8.5 Sind Fotos des Schimmelschadens vorhanden?☐ ja☐ nein

Wenn ja, genaue Beschreibung: _____

9. Alter des Hausstaubes :**9.1 Bei Abgabe des eigenen Staubbeutels:** ungefährender Zeitraum der Nutzung des Beutels in Tagen: _____**9.2 Bei Probenahme vom IUTA:** Zeitpunkt der letzten Grundreinigung in Tagen: _____**9.3 Anzahl und Art aller Proben.** Bitte genau beschreiben:

9.4 Art des Staubsauger-Beutels:☐ Papier☐ Vlies☐ Vlies mit hygienischer Ausstattung☐ Vlies mit integriertem HEPA-Filter☐ Bemerkungen : _____

9.5 Wurde der Staubsauger ausschließlich im Innenraum benutzt?☐ ja☐ nein

Wenn nein, wo wurde noch gesaugt (z. B. Auto, Balkon, Terrasse): _____

10. Sonstige Informationen, Bemerkungen

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem anderen Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Oldenburg, den 02.08.2010

CURRICULUM VITAE

Name: Ilka Katrin Toepfer
Geburtsdatum: 16.04.1969
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig

BERUFSTÄTIGKEIT:

- 01/2000 – 10/2002: Wissenschaftliche Hilfskraft in Drittmittelprojekten der AG Geomikrobiologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg:
1. Mikrobiologische Untersuchung des Domschatzes Halberstadt.
2. Mikrobiologische Untersuchung der Dorfkirche Mellenthin auf Usedom
- 08/2001 – 11/2009: Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Teilzeit) bei der INTOX GmbH, Institut für angewandte Toxikologie und Umwelthygiene, Aninstitut der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg: Mikrobiologische Untersuchungen von Innenräumen und Erstellung der Untersuchungsberichte, 01/2004 – 11/2009 Geschäftsführerin der INTOX GmbH
- 11/2002 – 12/2004: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Drittmittelprojekt „Pilzbelastung der Raumluft hochgedämmter Häuser – baubiologische Aspekte“ an der HAWK Hildesheim und Universität Oldenburg
- 06/2005 – 12/2007: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Drittmittelprojekt „Validierung eines Schnelltests zur Bestimmung von β -1,3-D-Glucan und Mykotoxinen im Hausstaub“ an der HAWK Hildesheim und Universität Oldenburg
- 06/2006 – 08/2010: Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Butte über Nachweismethoden für Schimmelpilze und deren Metabolite in Innenräumen

BERUFSAUSBILDUNG/STUDIUM:

- 10/1989 – 08/1991: Ausbildung zur biologisch-technischen Assistentin an der Dr.-Heinmann-Schule in Braunschweig
- 10/1991 – 08/1998: Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Diplomarbeit in der AG Geomikrobiologie: Untersuchungen

- zur Anwendbarkeit ausgewählter Schnelltests zur Beurteilung der mikrobiellen Besiedlung von Kunst- und Kulturgut. (Adenosin-triphosphat (ATP) Bestimmung und Respirationssmessung mit Hilfe der Warburg-Technik)
- 10/1998 – 12/1999: Aufbaustudium Denkmalpflege an der Otto-Friedrich-Universität Bamberg
Abschlußarbeit: Venz auf Rügen – ein Herrenhaus. Verformungs-gerechtes Aufmaß und Raumbuch
- 07/2000 – 07/2003: Fernstudiengang Baubiologie beim Institut für Ökologie und Baubiologie Neubeuern – IBN

SCHULBILDUNG:

- 1975 – 1978: Grundschule Hörsterfeld, Essen
- 1978 – 1979: Grundschule Cranachstraße, Wolfenbüttel
- 1979 – 1981: Orientierungsstufe Wallstraße, Wolfenbüttel
- 1981 – 1988: Gymnasium Große Schule, Wolfenbüttel