

Rasterelektronenmikroskopische Klassierung und Identifizierung von Schimmelpilzsporen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Michael Blondin
aus Moers

Gießen und Moers 2002

Aus dem Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin

Leiter: Prof. Dr. Hans-Joachim Weitowitz

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Dr. K. Rödelsperger

Prof. Dr. A. Szigoleit

Tag der Disputation: 20.11.2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I - Allgemeiner Teil	VIII
Abkürzungsverzeichnis II - Klassen der Summenparameter Form, Oberfläche und Verbindung (Abb. 3.8 und Tab. 3.1, 4.1, 4.10, 8.3, 8.4, 8.5)	IX
Abkürzungsverzeichnis III - Gattungsgruppen	X
1 Einleitung	1
1.1 Fragestellung	1
1.2 Biostoffverordnung	2
1.3 Biorichtwerte	3
1.4 Bioaerosole	3
1.5 Schimmelpilze	4
1.5.1 Taxonomie und Vorkommen	4
1.5.2 Schimmelpilze in der Industrie	7
1.6 Actinomyceten Taxonomie und Vorkommen	7
1.7 Messverfahren für Bioaerosole in der Luft am Arbeitsplatz	9
1.7.1 Probenahmeverfahren für Schimmelpilze in der Luft am Arbeitsplatz	9
1.7.2 Standardisierte Methode zur Bestimmung der KBE	10
1.8 Erkrankungen durch Schimmelpilze und thermophile Actinomyceten	11
1.8.1 Übersicht	11
1.8.2 Allergische Erkrankungen	13
1.8.3 Allergische Alveolitis	13
1.8.4 Toxische Alveolitis	14
1.8.5 Mycotoxicosen	15
1.8.6 Microbial Volatile Organic Compounds (MVOC's)	16
1.8.7 Enzyme in der Luft am Arbeitsplatz	17
1.8.8 Spezifischer Serumantikörpernachweis gegen Schimmelpilze und Actinomyceten	17
2 Untersuchungsgut	19
2.1 Auswahl der Kulturen für den Referenzkatalog	19
2.2 Nährböden zur Anzucht der DSMZ- bzw. Pleomorphismusversuch-Kulturen	21
3 Anzucht, Probenahme, Präparation und Klassierung	25
3.1 Anzucht der Schimmelpilze und thermophiler Actinomyceten	25

3.2	Probenahme an den angezüchteten Kulturen	25
3.3	Luftprobenahme an der Biotonne	28
3.4	Luftprobenahme beim Einsammeln von Hausmüll	29
3.5	Präparation für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop.....	29
3.6	Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop.....	31
3.6.1	Erstellen des Referenzkataloges, Summenparameter, Klassen.....	31
3.6.2	Auswerten der beim Hausmüllsammeln und an der Biotonne beaufschlagten Filter	34
3.7	Zuordnungsalgorithmus	35
3.8	Fotodokumentation der gewonnenen Arten.....	37
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Rasterelektronenmikroskopische Zuordnung von Schimmelpilzsporen.....	39
4.1.1	Referenzkatalog mit den Summenparametern der 49 Sporenarten (Schritt 1)	39
4.1.2	Zuordnung der Einzelsporen der 49 Sporenarten des Referenzkataloges (Schritt 2)	41
4.1.3	Auswahl der Spore mit der besten Übereinstimmung (Schritt 3)	43
4.2	Sensitivität und Spezifität der Zuordnung	43
4.3	Nachweis von Sporen beim Sammeln von Hausmüll.....	45
4.4	Nachweis von Sporen beim Öffnen der Biotonne	48
4.4.1	Sporenkonzentration	48
4.4.2	Zugewiesene Sporenarten	48
4.5	Charakterisierung der Partikelbelegung bei Kernporenfiltern	50
4.5.1	Sporenähnliche organische und anorganische Partikel.....	50
4.5.2	Sporenaggregate: Sporenketten und Sporenhaufen	51
4.6	Pleomorphismustest bzw. Reproduzierbarkeitsuntersuchung.....	54
5	Diskussion der Ergebnisse	61
5.1	Bewertung der Messergebnisse.....	61
5.1.1	Sensitivität und Spezifität der Zuordnung	61
5.2	Repräsentativität der Katalogsporen für die Verhältnisse am Arbeitsplatz	64
5.3	Untersuchungen zum Pleomorphismus.....	64
5.4	Schlussfolgerungen	67
5.4.1	Charakterisierung der Methode.....	67
5.4.2	Vorschläge zur Weiterentwicklung.....	68
5.4.3	Möglichkeiten des Einsatzes der MSC/REM-Methode	68
6	Zusammenfassung.....	69
7	Literatur.....	71

8	Anhang	75
8.1	Kriterien für die Auswahl der Sporenarten S1 bis S49 des Referenzkataloges	75
8.2	Literaturauswahl zur Katalogerstellung	76
8.3	Pleomorphismusversuch.....	76
8.4	Vertrauensbereiche für den richtig positiven Anteil der zugeordneten Sporenarten des Referenzkataloges	79
8.5	Sporenbeispiele aus dem IPAS-Katalog und Zuweisungen zu den Klassen des Referenzkataloges	80
	8.5.1 Aspergillus flavus.....	80
	8.5.2 Penicillium chrysogenum.....	81
	8.5.3 Trichothecium roseum.....	82
8.6	Sporen unbekannter Sporenart aus der Biotonne	83
8.7	Zuordnung der Abmessungen der Sporen und Pollen zu den Ablagerungsorten im Atmungstrakt.....	83

Abkürzungsverzeichnis I - Allgemeiner Teil

ABAS	Ausschuss für biologische Arbeitsstoffe
ABPA	Allergisch broncho pulmonale Aspergillose
AG	Aggregat
AGS	Ausschuss für Gefahrstoffe
BAT	Biologische Arbeitsplatztoleranzwerte
BG Chemie	Berufsgenossenschaft Chemie
BIA	Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit
BSV	Biostoffverordnung
CAMNEA	Collection of airborne micro-organism on nucleopore filters estimation and analyses
CASO	Casein Sojamehlpepton Agar
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
D _{max}	Durchmesser maximal
D _{min}	Durchmesser minimal
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EAA	Exogen Allergische Alveolitis
EDX	Energie dispersive Röntgen Mikroanalyse
ESEM	Environmental scanning electron microscopy
EU	Europäische Union
FP	Falsch positiv
GF	Gesichtsfeld
Ig	Immunglobulin (Typ E, G oder M)
IPAS	Institut und Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Gießen
KAN	Kommission Arbeitsschutz und Normierung
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KPP	Kohlepadprobe
LM	Lichtmikroskopie
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MMI	Mucous membrane irritation syndrome
MSC/REM	Morphologische Sporencharakterisierung mit dem Rasterelektronenmikroskop
MVOC	Microbial volatile organic compound
NPFP	Nucleoporefilterprobe
ODTS	Organic dust toxic syndrome
PCR	Polymerase Chain Reaction
REM	Rasterelektronenmikroskop
RP	Richtig positiv
S	Sporenart des Referenzkataloges
SBS	Sick building syndrome
SE	Sensitivität
SP	Spezifität
TRBA	Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
TRK	Technische Richtkonzentration
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
VOC	Volatile organic compounds
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abkürzungsverzeichnis II - Klassen der Summenparameter Form, Oberfläche und Verbindung (Abb. 3.8 und Tab. 3.1, 4.1, 4.10, 8.3, 8.4, 8.5)

Form:

ba	Banane
ec	eckig
hi	Himbeere
kb	Kaffeebohne
ke	Keule
ku	Kugel
li	Limone
ni	Niere
ov	oval
pa	Patrone
sc	Schuh
se	Sonstige
so	Schüssel oval
sp	Spindel
sr	Schüssel rund
tr	Tropfen
va	Vase
zy	Zylinder

Oberfläche:

be	Beule
bl	Blase
fa	Falte
gl	glatt
kö	körnig
oh	ornamentiert - Haarriss
ow	ornamentiert - Wurm
pl	polygonale Lochstruktur
ra	rauh
ri	Rille
sg	Sonstige
sn	Schuppen
st	Stachel
wa	Warze

Verbindung:

af	ausgefranst
ag	ausgestanzt
fn	Faden
kf	Knopf
kn	Ansammlung von Körnern
kr	konzentrische Ringstruktur
pu	Punkt
rr	radiär zulaufend
si	Sonstige
sl	Stiel

Abkürzungsverzeichnis III - Gattungsgruppen

a	Aspergillus , Eurotium und Emericella
c	Cladosporium
f	Fusarium
m	Zygomyceten
p	Penicillium
s	Sonstige
t	thermophile Actinomyceten
u	Ustilago esculante

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

Die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin schätzt, dass die Arbeitsplätze von etwa 5 Millionen Arbeitnehmern von der Biostoffverordnung erfasst werden [Smola 1999]. Darin eingeschlossen ist eine Vielzahl von Arbeitsplätzen, an denen eine Exposition gegenüber Sporen von Schimmelpilzen und thermophilen Actinomyceten besteht, so dass im Rahmen der Biostoffverordnung eine Gefährdungsanalyse erforderlich ist. Bisherige Messverfahren sind entweder wie die standardisierte Zählung der *koloniebildenden Einheiten (KBE)* unspezifisch oder identifizieren mit hoher Spezifität einzelne besonders wichtige Arten oder Gruppen von Sporen [Kämpfer et al 1999]. Sie können aber angesichts der großen Vielfalt der Mikroorganismen keinen umfassenden Überblick liefern und werden nur selten nebeneinander eingesetzt. Da oft auch die Züchtung von Kolonien notwendig ist, erfordern die bisherigen Messverfahren einen erheblichen Aufwand. Wenig Beachtung findet in Deutschland die in Skandinavien bereits seit längerem gebräuchliche *morphologische Sporencharakterisierung mit dem Rasterelektronenmikroskop (MSC/REM)*, obwohl diese nach Auffassung von [Heikkilä et al. 1988; Karlsson und Malmberg 1989; Pasanen et al. 1989; Scott et al. 1993, Tossavainen et al. 2000] zur Identifizierung der Sporen vieler wichtiger Schimmelpilzarten geeignet ist.

Die vorliegende Arbeit möchte nunmehr einerseits prüfen, inwieweit die MSC/REM-Methode eine praktikable Klassierung der Sporen von Schimmelpilzen und thermophilen Actinomyceten erlaubt. Andererseits soll untersucht werden, inwieweit die MSC/REM-Methode mit dem von Rödelsperger et al. [2000] entwickelten Algorithmus eine Zuordnung zu bekannten häufig vorkommenden Sporenarten erlaubt.

Die hierzu erforderlichen Untersuchungen lassen sich wie folgt strukturieren:

1. Erstellen eines *Referenzkataloges*: aus der Vielzahl bekannter Schimmelpilze und thermophilen Actinomyceten werden die arbeitsmedizinisch relevanten, häufig anzutreffenden Spezies (Sporenarten) morphologisch erfasst und in einem Katalog zusammengestellt. Der Referenzkatalog definiert die Summenparameter zur Charakterisierung des Eigenschaftsspektrums der in ihm enthaltenen Sporenarten. Die für die Aufnahme einer bestimmten Sporenart in den Referenzkatalog festgelegten Kriterien werden in **Abschnitt 2.1** und **8.1** beschrieben.
2. Evaluation des von Rödelsperger et al. [2000] entwickelten Zuordnungs-Algorithmus durch die Zuordnung der bekannten Sporen des Referenzkataloges (Abschnitt 4.1.2).
3. Zuordnung von unbekanntem Sporen zweier realer Arbeitsplatzsituationen durch den o.g. Algorithmus (**Abschnitt 4.3** und **4.4**) als Beispiel einer praktischen Anwendung des Algorithmus.

Im Folgenden soll näher auf die bisherige Bewertung von Gefahrstoffen in der Luft am Arbeitsplatz eingegangen werden. Eine kurze taxonomische Beschreibung der hier untersuchten Schimmelpilze und thermophilen Actinomyceten sowie deren Erkrankungspotential wird vorgenommen. Desweiteren wird ein Überblick über die bisher verwandten Messverfahren für Bioaerosole in der Luft am Arbeitsplatz zum besseren Verständnis der Problematik gegeben.

1.2 Biostoffverordnung

Seit langem gilt die Gefahrstoffverordnung für den Schutz des Arbeitnehmers vor gefährlichen Stoffen am Arbeitsplatz [GefStoffV 1999]. Darin sind die Einstufung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe und Zubereitungen sowie die Ermittlungspflichten des Arbeitgebers und die erforderlichen Schutzmaßnahmen geregelt, darunter auch Herstellungs-, Verwendungsverbote und Vorsorgeuntersuchungen.

Als ein fortlaufendes und umfangreiches Regelwerk sorgen die *Technischen Regeln für Gefahrstoffe (TRGS)* unter Zuhilfenahme von Grenzwerten in der Luft am Arbeitsplatz für die Umsetzung des Arbeitnehmerschutzes. Für luftgetragene Partikel gelten die *Grenzwerte in der Luft am Arbeitsplatz [TRGS 900]* sowie die *Biologischen Arbeitsstofftoleranzwerte [TRGS 903]*. Auf die *Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK)*, die *Technische Richtkonzentration (TRK)* und die *Biologischen Arbeitsplatztoleranzwerte (BAT)* wird in **Abschnitt 1.3** näher eingegangen.

In der *Biostoffverordnung (BSV)* vom März 1999 [BSV 1999] weitet sich der Schutz des Arbeitnehmers auf den Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen am Arbeitsplatz aus. Ausschlaggebend für die Einführung der Biostoffverordnung war eine von der Europäischen Union erlassene Richtlinie zum Schutz des Arbeitnehmers gegen Gefährdungen durch biologische Arbeitsstoffe am Arbeitsplatz [EU Richtlinie 90/679/EWG]. Die Biostoffverordnung dient dem Schutz der Beschäftigten vor der Gefährdung ihrer Gesundheit durch biologische Arbeitsstoffe am Arbeitsplatz. Hiermit ist ein branchenübergreifender Rahmen für alle Arbeitsplätze mit biologischen Arbeitsstoffen geschaffen worden. Ausnahme ist die Gentechnik, hier greift die Gentechnik Verordnung. Die Biostoffverordnung regelt den Umgang mit biologischen Agenzien, die in vier Risikogruppen eingeteilt werden. Sie definiert die betroffenen Arbeitsbereiche, legt die Durchführung von Gefährdungsbeurteilungen fest und schreibt die notwendigen Vorsorgeuntersuchungen und Schutzmaßnahmen vor.

Die Umsetzung der Richtlinie in nationales Recht erfolgte unter Mitwirkung des *Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS)* des Bundesministeriums für Arbeit und Sozialordnung, der dem Ministerium beratend und koordinierend zur Seite steht. Des weiteren trägt er zur Aufstellung von sicherheitstechnischen, arbeitsmedizinischen und hygienischen Regeln bei. Die Projektgruppe Nr.4 ("Arbeitsplatzbewertung" des Ausschusses) mit Vorsitz am *Berufsgenossenschaftlichen Institut für Arbeitssicherheit (BIA)* zielt hierbei auf die Entwicklung standardisierter Messverfahren zur Erfassung von Schimmelpilzen in der Luft an Arbeitsplätzen ab. So gab es bisher eine Reihe von Probenahmeverfahren, die eine Vergleichbarkeit untereinander erschwerten. Für Pilze wurden von der Projektgruppe das "Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz" [BIA Arbeitsmappe 9420] sowie der "Bestimmung der Konzentration Biologischer Arbeitsstoffe in der Luft am Arbeitsplatz" / Erster Ringversuch "Schimmelpilze" [BIA Arbeitsmappe 9427] veröffentlicht. Diese Verfahren haben inzwischen Eingang in die *Technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA)* [TRBA 430] gefunden.

1.3 Biorichtwerte

In Analogie zu den MAK und TRK Werten für Gefahrstoffe [DFG 1998] wird auch für Biostoffe darüber diskutiert inwieweit Richtwerte für biologische Partikel zu definieren sind. Die Angabe lediglich als KBE/m³ Luft wird jedoch dem spezifischen toxischen und allergenen Potential sowie den Wirkungen von Sporen abgestorbener Mikroorganismen wie etwa den Schimmelpilzen und Actinomyceten nicht gerecht. Eine auf dieser Basis definierte Grenzwertkonzentration ist daher nur als Anhaltswert zu verstehen [Göttlich et al. 1999]. Neben der KBE Zählmethode werden daher auch mikroskopische Zählmethoden bzw. Antigen- und Toxinnachweise angewandt. Im Vergleich zur KBE Methode wird hierbei über einen hohen Anteil der Nichtlebendfraktion berichtet [Griffiths und Cosemo De 1994; Palmgren et al. 1986; Karlsson und Malmberg 1989]. Die Sporenkonzentration ist bei mikroskopischer Auswertung ungefähr 2- bis 10-mal größer als bei der KBE-Zählung [Herr et al. 1999]. Eine Übersicht über die Empfehlung für die Festlegung von Höchstwerten mikrobieller Belastung in der Luft am Arbeitsplatz kann ebenfalls bei [Herr et al. 1999] nachgelesen werden. Für Gesamtpilze gibt es lediglich Biorichtwerte der [LASI LV 13]. Angegeben werden KBE Werte für unspezifische Leitkeime, so im Abfallbereich der Wert für den *Aspergillus fumigatus* (50000 KBE). Es bleibt abzuwarten, inwieweit sich diese Werte durchsetzen werden.

1.4 Bioaerosole

Unter einem Aerosol versteht man das System aus einem Gas und den darin dispers verteilten Partikeln (Feststoffe oder Flüssigkeiten). Am Arbeitsplatz können Stäube, Faserstäube, Rauche oder Nebel als Aerosol vorkommen [DFG 1998]. Abhängig von der Partikelgröße kann das Aerosol am Arbeitsplatz in unterschiedliche Fraktionen eingeteilt werden. Von diesen wurde für Staubmessungen die einatembare, die thorakale und die alveolengängige Fraktion nach der [CEN-Norm EN 481, 1993] definiert. Nach den Vorschlägen des *Ausschusses für Gefahrstoffe (AGS)* werden Bioaerosole als einatembarer Anteil erfasst.

Als Bioaerosole werden luftgetragene biologische Partikel, die aus lebenden Organismen zusammengesetzt sind oder von diesen stammen, bezeichnet. Darunter fallen anzüchtbare und nichtanzüchtbare Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Pilze, Algen, Viren), Pollen sowie Fragmente und Trümmer von lebenden Mikroorganismen [BIA Arbeitsmappe 9410]. Daneben sind auch Zellprodukte (Enzyme), Glucane (Bestandteile der Pilzwand), Endotoxine (Zerfallsprodukte gram negativer Bakterien), mikrobielle flüchtige organische Verbindungen (*Microbial volatile organic compounds*, als MVOC's bezeichnet) sowie Exotoxine (Mycotoxine) von Mikroorganismen, die sich an anderen Staubpartikeln anlagern können, zu berücksichtigen. Eine Übersicht der im Bioaerosol vorkommenden Bestandteile gibt **Tab. 1.1**.

Tab. 1.1: Mögliche Bestandteile von Bioaerosolen (nach Lacey and Duitkiewics 1994).

(Mikro-) Organismen	Allergene / toxische Substanzen	Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen
Schimmelpilze	Pflanzenreste	Enzyme: z.B. Bacillus subtilis
Bakterien	Teestaub	Pepsin, Trypsin
Viren	Sojabohnenstaub	Fragmente und Trümmer:
Protozoen	Mehlstaub	Endo-/Ektotoxine (Mycotoxine)
Parasiten	Zellfragmente	Fragmente und Trümmer:
Milben	Pollen	Hyphen, Glukane
Insekten	Getreideaerosol	
MVOC's von Schimmelpilzen und Bakterien	Proteinaerosol	
Alkohol	Eier, Milch, Fischmehl	
Keton	Staub (Vögel)	
Aldehyd	Exkrete: Urin,	
Aromaten	Stuhl, Sputum	
Alkane	Haare, Epithelien	
Terpene		

1.5 Schimmelpilze

1.5.1 Taxonomie und Vorkommen

Pilze sind Lebewesen, die ubiquitär in der Natur vorkommen und zu den Eukaryonten gehören. Sie betreiben keine Fotosynthese und sind auf fremde Nahrungsquellen angewiesen. Als nützliche Destruenten in der Natur haben sie ihren Platz als Saprophyten beim Abbau toter organischer Materie sowie als Parasiten beim Abbau lebender organischer Substanz. Es existieren weit mehr als 250000 verschiedene Arten, von denen bisher aber nur etwa 100000 Arten taxonomisch erfasst worden sind. Aufgrund eines fast undurchschaubaren Beziehungsgeflechtes bestehen Schwierigkeiten bei der exakten Taxonomie der Pilze [Schata und Jorde 1989]. Im Pilzreich existieren verschiedene Systematiken. Vereinfachend kann nach [Reiß 1997] vorgegangen werden (**Abb. 1.1**). Morphologisch sind makrozytisch wachsende Pilze mit Fruchtkörper (z.B. Speisepilze) von den unizellulären Hefen und den am häufigsten in der Natur vorzufindenden filamentös wachsenden Schimmelpilzen (Mikrozyten) zu unterscheiden. Eumycota gelten als die humanpathogenen Vertreter der Schimmelpilze. Sie unterteilen sich in die Klasse der Zygomycetes (Jochpilze), der Ascomycetes (Schlauchpilze) und der Deuteromycetes (Fungi imperfecti). Nach Reiß fallen in die Klasse der Fungi imperfecti alle Schimmelpilze, bei denen keine geschlechtliche Vermehrung bekannt ist.

Das morphologische Grundelement humanpathogener Schimmelpilze stellt die Hyphe dar. Es wird dabei zwischen Lufthyphen und Substrathyphen unterschieden, die als schlauchartiges Grundelement der Schimmelpilze zu verstehen sind. Ein Geflecht von Hyphen wird als Myzel

bezeichnet. Die Vermehrung filamentöser Pilze (Schimmelpilze) kann sowohl *asexuell über Sporen* als auch durch *Verzweigung von Hyphen (Mitose)* erfolgen. Außerdem können sich Schimmelpilze auch über *Sexualsporen (Meiose)* vermehren [Kayser et al. 1993].

Einige, insbesondere tierpathogene Pilze können sowohl fädig als auch einzellig (d.h. hefeartig) wachsen; diese Erscheinung ist als Dimorphismus bekannt. Durch Veränderung der Umweltbedingungen kann ein Übergang von der fädigen zur einzelligen Form hervorgerufen werden [Webster 1983].

Beispielhaft sei hier auf den Formenwandel des *Aspergillus fumigatus* verwiesen [Reiß 1997]. Im Falle der Gattung *Aspergillus* werden asexuelle Sporen als Konidien und sexuelle Sporen, falls vorhanden, als Ascosporen bezeichnet.

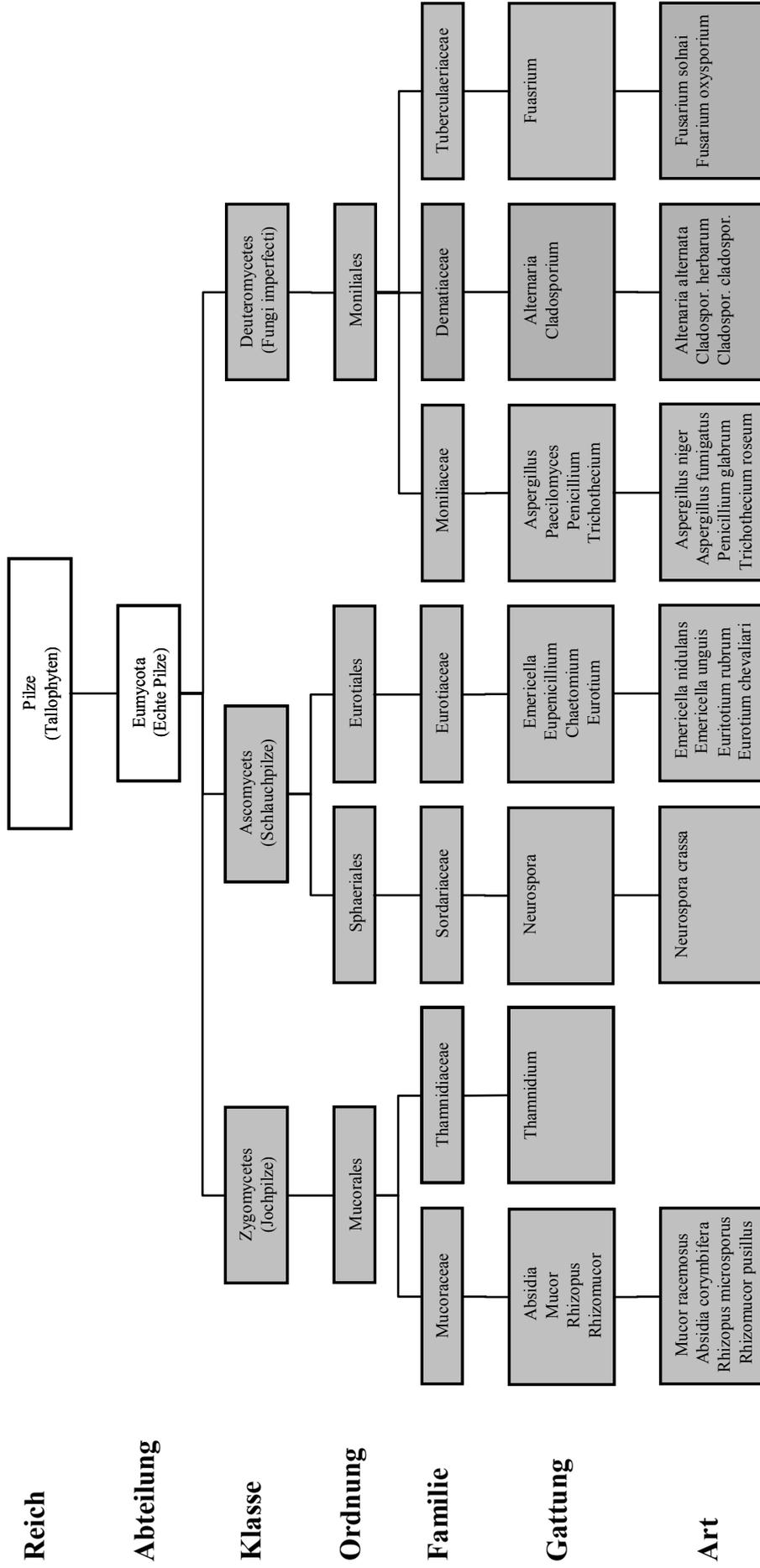


Abb. 1.1: Pilzsystematik für die Eumycota (nach Reiß 1997).

1.5.2 Schimmelpilze in der Industrie

Seit Urzeiten werden Mikroorganismen wie Hefen, Schimmelpilze und Bakterien in der Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt. Als Beispiele seien dafür die alkoholische Gärung, die Herstellung von Brot, die Sauermilch-, Joghurtproduktion und die Schimmelkäseherstellung genannt. Die Lebensmitteltechnologie aber auch die Medizin nutzt heute Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte mehr denn je (**Abb. 1.2**, hier am Beispiel der Schimmelpilze). Aus dem medizinischen Bereich sei die Antibiotika- und Immunsuppressivagewinnung, die Vitaminproduktion sowie die Enzymherstellung erwähnt. Eine Übersicht des Einsatzes von Schimmelpilzen und deren Enzyme ist bei [Reiß 1997] nachzulesen.

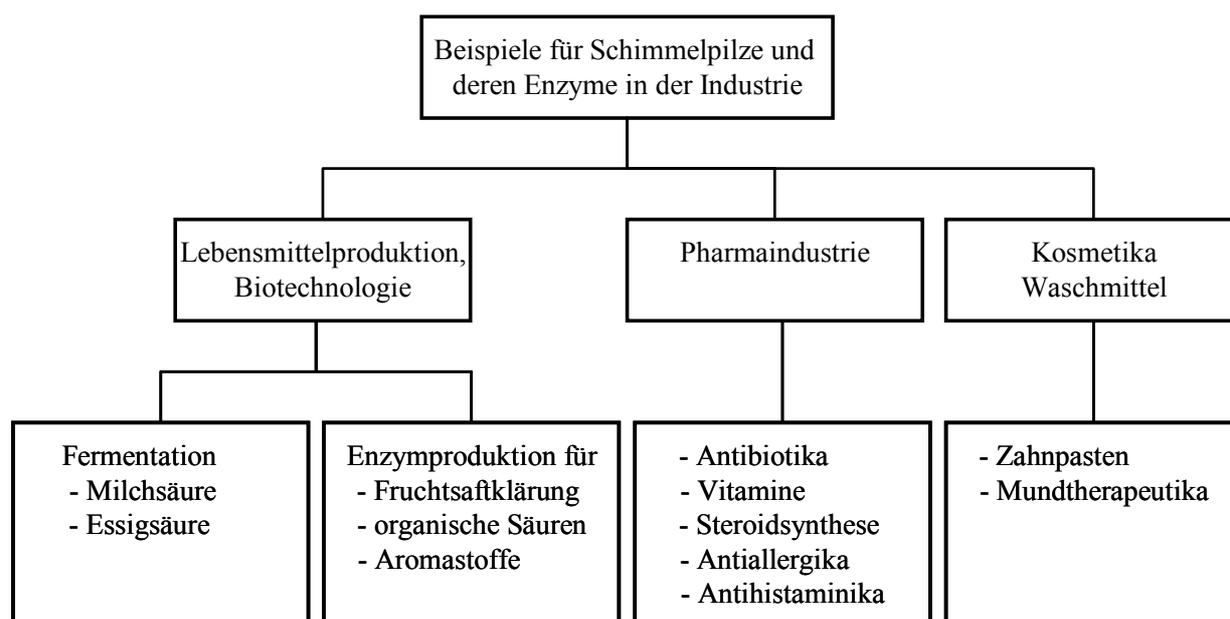


Abb. 1.2: Verwendung von Schimmelpilzen und deren Enzyme in der Industrie [nach Schata und Jorde 1989].

Daneben kommt es in vielen Industriezweigen auch zu erheblichen Schäden durch die natürliche Kontamination des Getreides mit Schimmelpilzen. Dabei unterscheidet [Reiß 1997] Feld- und Lagerpilze. Der *Aspergillus flavus* sei hier als typischer Vertreter der Lagerpilze erwähnt, der z.B. Mais während der Lagerung befällt. Es kann hierbei beim Menschen zu einer Mycotoxicose durch Aflatoxinen kommen (siehe **Abschnitt 1.8.5**).

Der gesamte Arbeitsplatzbereich der Biotechnologie fällt unter die neue Biostoffverordnung. Im einzelnen umfasst die Biotechnologie die Anwendung biologischer Prozesse zur Gewinnung von Biomasse (Hefe), Zellprodukten (Enzyme, organische Säuren, Arzneimittel) oder Produkten, die durch mikrobiologische Prozesse aus einem Vorprodukt entstehen (Nahrungsmittel-Fermentation, Gärung). Die Anzahl der dort gefährdeten Arbeitsplätze ist in den letzten Jahren stetig angestiegen.

1.6 Actinomyceten Taxonomie und Vorkommen

Die Klasse der Actinomyceten-Actinomycetes beinhaltet prokaryontische, ubiquitär besonders im Boden vorkommende grampositive, unregelmäßig geformte Stäbchenbakterien. Ihr überwiegend aerobes Wachstum ist durch filamentöse Strukturen gekennzeichnet, weshalb sie auch lange zu

den Pilzen gezählt wurden (Strahlenpilze). Im weiteren Wachstumsverlauf auftretende stäbchenförmige Bakterien rechtfertigen jedoch eine Zuordnung zu den Bakterien. Wichtige Gattungen der Actinomyceten sind als Kommensalen der Schleimhaut bei Mensch und Tier beschrieben. Die Actinomykose ist eine schon seit längerem bekannte Infektionskrankheit endogenen Ursprungs. Sie kann nach topografischen Gesichtspunkten unterteilt werden [Kayser et al. 1993].

Anhand der Temperatur des Wachstumsbereichs wurde bisher zwischen mesophilen, thermotoleranten und thermophilen Arten unterschieden. Es besteht jedoch kein eindeutiger thermischer Wachstumsbereich. Mesophile Arten können auch unter höheren Temperaturen wachsen und thermophile Arten unter niedrigeren Temperaturen. Nach [Kutzner et al. 1984] ist es nicht immer möglich, exakte Anzuchtsbereiche für die mesophilen und thermophilen Actinomyceten anzugeben. Natürliches Habitat thermophiler Actinomyceten sind organische Substrate in denen eine Selbsterhitzung stattgefunden hat [Kutzner et al. 1984]. Arbeitsmedizinisch relevante Arbeitsplätze sind u.a. in der Landwirtschaft und in der Abfallwirtschaft zu erwarten. Sporen der thermophilen Actinomyceten sind bedingt durch ihre geringe Größe (bis ca. 2 µm) alveolengängig (siehe **Abschnitt 8.6**). Sie sind als ein Verursacher der *exogen allergischen Alveolitis (EAA)* (**Abschnitt 1.8.3**) bekannt [Lacey 1997; KAN 1999].

Neuere biochemische Verfahren und gentechnische Methoden machen eine Neubewertung der Klassifikation von Actinomyceten nötig [Kutzner et al. 1984].

Eine Übersicht unter Berücksichtigung der im Referenzkatalog dieser Arbeit verwendeten thermophilen Actinomyceten und ihre Einteilung in die Systematik der Bakterienklassifikation ist **Abb. 1.3** zu entnehmen.

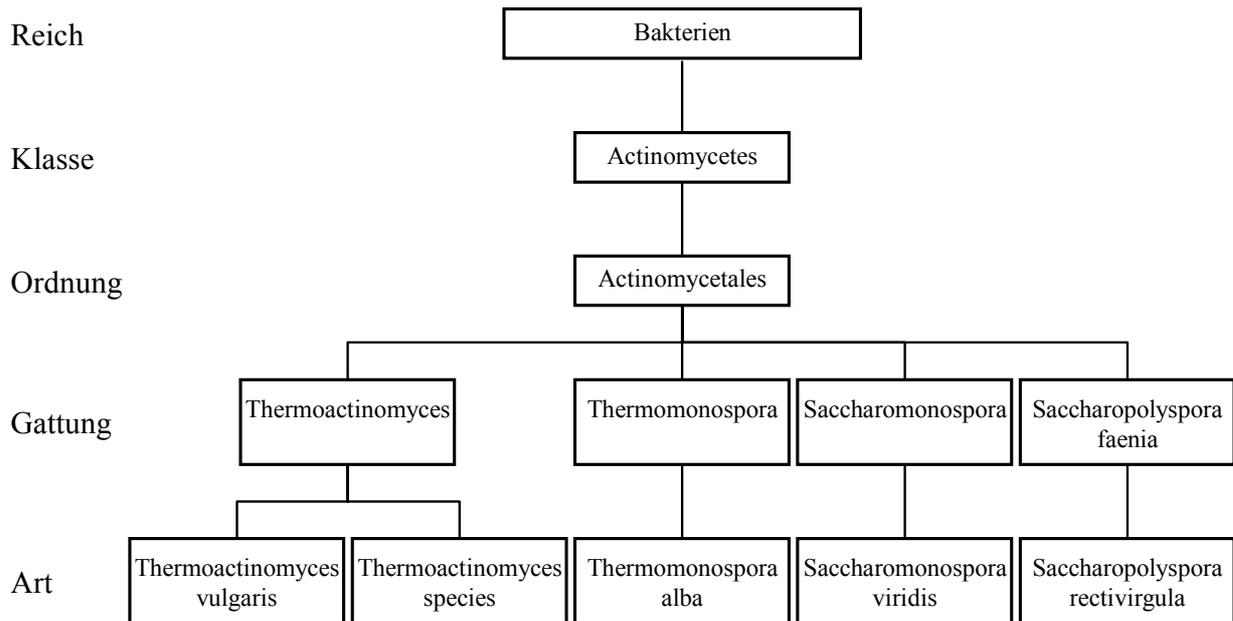


Abb. 1.3: Thermophile Actinomyceten-DSMZ Referenzkatalog.

1.7 Messverfahren für Bioaerosole in der Luft am Arbeitsplatz

1.7.1 Probenahmeverfahren für Schimmelpilze in der Luft am Arbeitsplatz

Für Bioaerosole sind diverse Probenahmeverfahren in Gebrauch. Es werden aktive quantitative von passiven semiquantitativen Verfahren unterschieden [BIA 9410; Kämpfer und Weißenfels 1997].

Aktive Sammelverfahren saugen ein definiertes Luftvolumen durch ein Abscheidemedium. Für Bioaerosole ist die Abscheidung durch Filtration etwa auf Membranfilter sowie durch Impaktion, d.h. Trägheitsabscheidung der Bioaerosole auf feste Sammelphasen (z.B. Andersen six stage Impactor) und durch das Impingement mit Umleitung des Luftstromes durch ein flüssiges Sammelmedium, mit dortiger Anreicherung der Partikel aus dem Aerosol in Gebrauch.

Demgegenüber stehen die passiven Sammelverfahren. Hierzu zählt insbesondere das Sedimentationsverfahren. Unter Ausnützung der Schwerkraft und der vorhandenen Luftströmung lagern sich hierbei die im Bioaerosol vorhandene Partikel direkt auf dem Nährmedium ab. Die Ergebnisse sind hier nur qualitativ oder semiquantitativ zu werten [BIA 9410]. Eine gute Zusammenfassung der verschiedenen Messverfahren mit ihren Vor- und Nachteilen findet sich bei [Kämpfer und Weißenfels 1997]. Zur Messung der Schimmelpilzsporenkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz wird die Probenahme mit Abscheidung auf einem Membranfilter und Bestimmung durch Kultivierung bevorzugt. Dieses Verfahren wurde als Referenzverfahren im Bundesarbeitsblatt veröffentlicht [TRBA 430]. Damit kann auf übliche Gefahrstoffprobenahmesysteme für einatembaren Staub (ehemals Gesamtstaub) zurückgegriffen werden, die im Arbeitsschutz weit verbreitet sind.

1.7.2 Standardisierte Methode zur Bestimmung der KBE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Filterproben untersucht, die bei Messungen nach der indirekten Methode der BIA Richtlinie beim Sammeln von Hausmüll gewonnen wurden. Aus der von diesen Filtern gewonnenen Spülflüssigkeit wurden im mikrobiologischen Labor Dr. J. Balfanz bzw. Dr. M. Lohmeyer GbR in Münster Kernporenfilter zur weiteren REM-Auswertung präpariert.

Die indirekte Methode des BIA (**Abb. 1.4**) gibt die über die Probenahmedauer gemittelte Konzentration an vermehrungsfähigen Kolonien bildenden Schimmelpilzeinheiten im Arbeitsbereich - personengetragen oder bei ortsfester Probenahme - mit der Maßeinheit "koloniebildende Einheiten pro m^3 Luft" (KBE/m^3 Luft) an. Die Beaufschlagung des Filters wird in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Emulgator in Suspension gebracht.

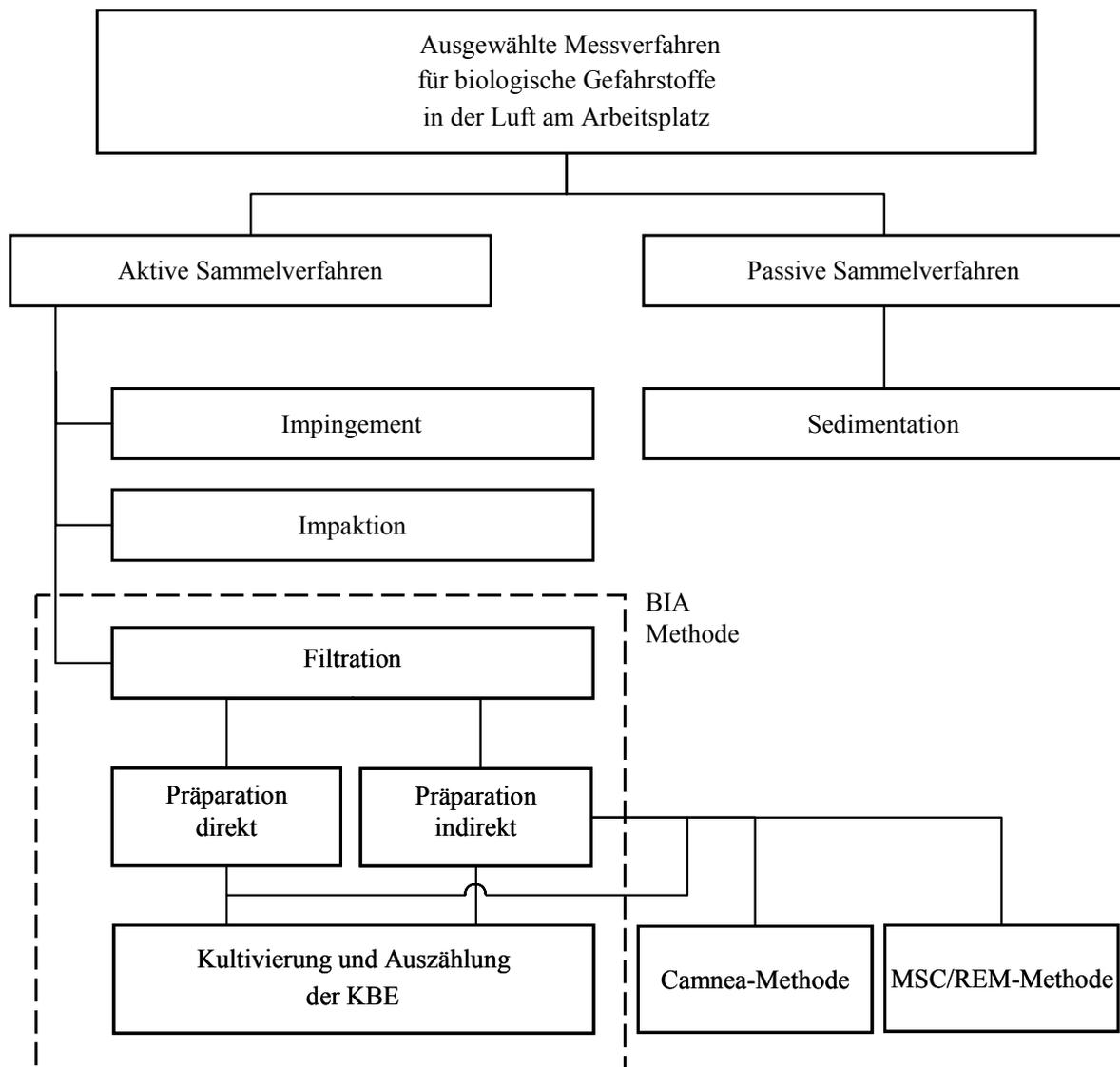


Abb. 1.4: Ausgewählte Messverfahren für biologische Gefahrstoffe.

In einer seriellen Verdünnungsreihe wird ein Aliquot der jeweiligen Verdünnung der Suspension auf ein geeignetes Nährmedium ausplattiert. Zur Auszählung kommen die vermehrungsfähigen Pilzeinheiten. Aus der Verdünnungsreihe wird diejenige Stufe ausgewählt, die eine optimale

Auszählbarkeit der Pilzkulturen gewährleistet. Geeignete Nährmedien sollten möglichst viele Schimmelpilzarten anwachsen lassen [BIA 9420].

Als standardisierte Messmethode für Schimmelpilzsporen wurden bisher lediglich die zuvor geschilderten Luftmessungen für die Anzahlkonzentration der KBE eingeführt [BIA 9400]. Trotz des erheblichen Messaufwandes und des Zeitbedarfs von mindestens sieben Tagen bis zum Vorliegen des Ergebnisses liefert diese Methode demnach noch keine zielgerichtete Unterscheidung zwischen einzelnen Arten von Schimmelpilzen. Ergänzend stehen unspezifische Färbemethoden z.B. zur Ermittlung der Gesamtzahl aller Mikroorganismen sowie eine Vielzahl von mehr oder weniger spezifischen mikrobiologischen Methoden zur Verfügung, darunter solche, die bestimmte DNA-Sequenzen nachweisen u.a. mit Hilfe der *polymerase chain reaction* (PCR) und immunologischen Verfahren, die auf der Antikörper-Antigen-Bindung beruhen [Kämpfer et al. 1999]. Die MSC/REM-Methode wird bisher hauptsächlich in Skandinavien verwendet [Heikkilä et al. 1988; Karlsson und Malmberg 1989; Pasanen et al. 1989; Scott et al. 1993; Tossavainen 2000]. Sie kann als ein zur indirekten BIA Methode ergänzendes morphologisches rasterelektronenmikroskopisches Zähl- und Auswerteverfahren eingesetzt werden (**Abb. 1.4**). Dr. Palmgren beschrieb 1986 die CAMNEA Methode (Collection of airborne microorganism on nucleopore filters estimation and analyses). Nach Abscheidung des Bioaerosols auf einen Membranfilter über übliche Filterpumpensysteme kann mittels Fluoreszenzfarbstoffe eine mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgen. Dieses Zählverfahren kann alternativ zur KBE Bestimmung eingesetzt werden.

1.8 Erkrankungen durch Schimmelpilze und thermophile Actinomyceten

1.8.1 Übersicht

Die Organismenkonzentrationen in der Außenluft liegen nach [Kämpfer und Weißenfels 1997] zwischen 10^1 und 10^3 KBE/m³ Luft. In Innenräumen ist mit Konzentrationen von 10^2 bis 10^3 KBE/m³ Luft zu rechnen.

An zahlreichen Arbeitsplätzen wie z.B. bei der Müllabfuhr, der Wertstoffsartierung, der Kompostierung und in der Tierhaltung werden dagegen hohe Konzentrationen von Sporen in der Luft registriert. Der im Bereich der Wertstoffsartierung und Abfallbehandlung empfohlenen Höchstgrenze ≤ 50000 kolonienbildende Einheiten (KBE) pro m³ [Herr et al. 1999] stehen insbesondere bei der Kompostierung und in der Tierhaltung oft Konzentrationen von 10^6 bis $> 10^8$ KBE/m³ gegenüber. Bei derart hohen Sporenkonzentrationen ist mit inhalativ toxischen (*Toxische Alveolitis*) und allergischen Wirkungen (*Mycoallergosen*) sowie bei geschwächter Immunabwehr auch mit lebensbedrohlichen Infektionen (*Mycosen*) zu rechnen [Herr et al. 1999; Kämpfer und Weißenfels 1997] (**Abb. 1.5**). Im Hinblick auf die Mycosen wird zwischen pathogenen, opportunistisch pathogenen und fakultativ pathogenen Schimmelpilzen unterschieden. Meist treten diese Erkrankungen nur in Verbindung mit ungünstigen Umständen wie einer Abwehrschwäche auf. Die allergischen und toxischen Erkrankungen werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

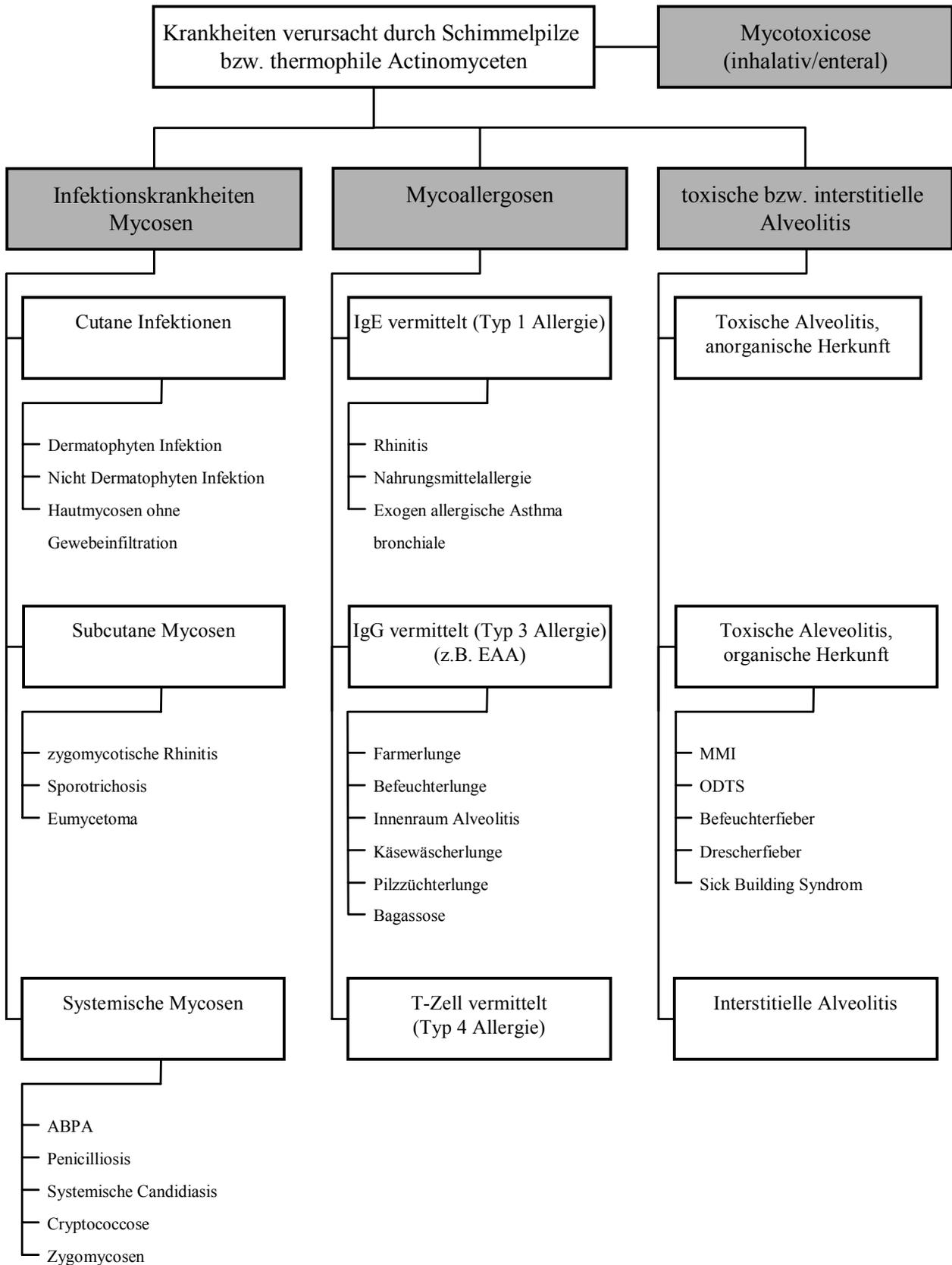


Abb. 1.5: Auswahl an durch Schimmelpilze und thermophile Actinomyceten (nach Sennekamp 1998) verursachte Erkrankungen.

1.8.2 Allergische Erkrankungen

Im Allgemeinen werden vier Typen von Allergien (in Hinblick auf die Schimmelpilze auch Mycoallergosen genannt) unterschieden. Nach Coombs and Gell werden die Allergien in einen Soforttyp, z.B. anaphylaktischer Schock, Urtikaria (Typ 1, IgE vermittelt) und einen verzögerten Allergietyp (Typ 4, T-Zell vermittelt) unterschieden. Unter letzterem werden die Kontaktallergien subsumiert. Typ 2 Reaktionen sind häufig medikamentös bedingt und spielen sich als komplementvermittelte Zytolyse in erster Linie an Blutzellen ab. Als Beispiel für eine Typ 2 Allergie sei hier die allergische hämolytische Anämie und die Agranulozytose erwähnt. Die Typ 3 Allergie ist eine Immunkomplexkrankheit (IgG und IgM vermittelt) (Siehe **Abb. 1.5**, Mitte). Beispiele dafür sind die Allergische Alveolitis und die Serumkrankheit [Duale Reihe Dermatologie 1995].

Dabei kann das Allergen in verschiedenen Formen auftreten. Zum einen kann die Spore des Schimmelpilzes selbst als Allergen wirken, zum anderen können die Stoffwechselprodukte sowie flüchtige Geruchs- und Aromastoffe (*MVOC's*) als Allergene wirken. Von der allergischen Wirkung zu trennen sind die toxischen Wirkungen der Schimmelpilze.

Als Bestandteile der Bioaerosole wurden in dieser Arbeit die Sporen von mesophilen, thermophilen und thermotoleranten Schimmelpilzen sowie thermophilen Actinomyceten untersucht. Je nach Größe können Sporen und Pollen im Atmungstrakt in unterschiedlichen Regionen abgelagert werden und rufen unterschiedliche Erkrankungsbilder wie eine Rhinitis durch Pollen oder eine Exogen allergische Alveolitis durch Sporen von thermophilen Actinomyceten aus. Ausgewählte Sporen- und Pollenbeispiele im REM nach Größen gegliedert sind **Abb. 8.7** zu entnehmen.

1.8.3 Allergische Alveolitis

Aus arbeitsmedizinischer Sicht besitzt die zu den allergischen Alveolitiden zählende *Exogen Allergische Alveolitis (EAA)* als Berufskrankheit Nr. 4201 mit im Mittel etwa 250 angezeigten Verdachtsfällen und 70 neuen Rentenfällen pro Jahr besonderes Gewicht. Sie gehört zu den IgG vermittelten Immunkomplexkrankheiten (*Typ-III Allergie*). Die meisten dieser Erkrankungen werden in der Landwirtschaft sowie bei Vogelhaltern beobachtet. Schon im Mittelalter tauchen Beschreibungen der damals als Heufieber bezeichneten Erkrankung bei Bauern auf. Klinisch zeigt sich bei akuten Verläufen etwa 4 bis 8 Stunden nach inhalativem Allergenkontakt u.a. eine grippeartige Symptomatik mit Dyspnoe, Fieber, Gliederschmerzen, trockenem Husten und einer Leukozytose. Radiologische Veränderungen des Röntgen Thorax Bildes sind zu diagnostizieren. All diese Erscheinungen normalisieren sich bei Allergenmeidung. Chronische Verläufe können sich allerdings zur irreversiblen Lungenfibrose entwickeln [Sennekamp 1998].

Nach [Sennekamp 1998] sind serologisch sicher bewiesene Auslöser der EAA unter anderem in der Gruppe der Mikroorganismen (Schimmelpilze, thermophile Actinomyceten) zu finden. Daneben unterscheidet der Autor tierische und pflanzliche Allergene. Weiterhin kommen Bakterien und Pilze als ätiologische Auslöser in Betracht. Arzneimittel und Chemikalien lösen ebenfalls EAA aus. Einige Schimmelpilze und thermophile Actinomyceten aus der Liste der Allergene Sennekamps seien hier exemplarisch aufgeführt (*Alternaria*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium*, *Cephalosporium*, *Penicillium*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micropolyspora faeni* usw.). Eine Auswahl besonders gefährdeter Berufszweige für die EAA ist **Abb. 1.6** zu entnehmen.

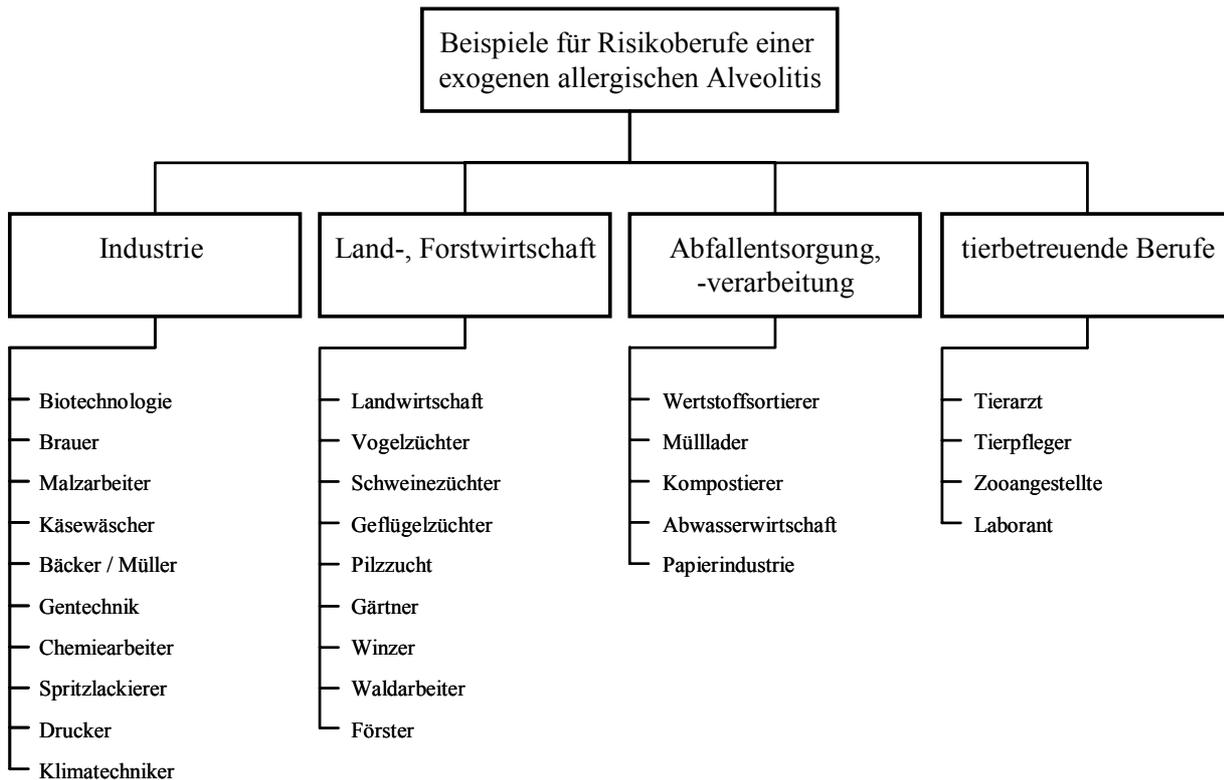


Abb. 1.6: EAA Risikoberufe (nach Sennekamp 1998).

Wesentlich häufiger als diese durch Immunglobulin G vermittelte Typ-III Allergie, tritt die durch Immunglobulin E vermittelte *Typ-I Allergie* (Soforttyp) mit Symptomen einer Rhinitis, Konjunktivitis bis hin zum exogen allergischem Asthma bronchiale auf. Nach [Schata und Jorde 1989] waren bei 15450 Patienten mit inhalativer und Nahrungsmittel-Allergie Schimmelpilze mit 30,8% das am häufigsten gefundene Allergen. Diese Allergie vom Soforttyp kann außer durch Schimmelpilze noch durch diverse andere Mikroorganismen ausgelöst werden. Nach [Schata und Jorde 1989] liegt häufig bei Milbenallergikern gleichzeitig eine Schimmelpilzsensibilität vor. Auch *Typ-IV Allergien* können durch Schimmelpilze verursacht werden [Stalder und Verkoyen 1994].

1.8.4 Toxische Alveolitis

Den in **Abschnitt 1.8.3** beschriebenen allergischen Lungenkrankheiten werden nach [Sennekamp 1998] differentialdiagnostisch die interstitiellen- und toxischen Lungenkrankheiten gegenüber gestellt (**Abb. 1.5**, rechts).

Unter einer toxischen Alveolitis wird ein EAA-ähnliches Krankheitsbild verstanden, das mit Augenbrennen, einer Mukositis (*mucous membrane irritation syndrom, als MMI bezeichnet*) sowie Fieber und Schüttelfrost einhergeht. Letztere Symptome finden sich insbesondere auch beim *organic dust toxic syndrom (ODTS)*. Die Symptomatik tritt erst bei massiven Staub- und Sporenkonzentrationen von 10^6 bis 10^{10} KBE/m³ auf [Karlsson und Malmberg 1989]. Eine vorherige Sensibilisierung findet dabei aber nicht statt. Für die Entstehung dieser Erkrankungen sind nicht nur die vermehrungsfähigen Sporen selbst, sondern auch Stoffwechselprodukte wie Enzyme, Mycotoxine und die flüchtigen *microbial volatile organic compounds (MVOC's)* sowie Bestandteile der Pilzzellwand (Glucane) und schließlich auch die von gramnegativen Bakterien erzeugten Endotoxine in Betracht zu ziehen. Im Einzelfall wird es sicherlich oft schwierig bleiben, klar zwischen toxischen und allergischen Auslösern unterscheiden zu können. Wird jedoch in einer Personengruppe, die gemeinsam einer außergewöhnlich hohen Exposition ausgesetzt war

nachfolgend kurzzeitig eine hohe Prävalenz von Erkrankungen beobachtet, so kann von einer toxischen Wirkung ausgegangen werden.

Beispiele für toxische Alveolitiden sind das nach Bearbeiten von schimmeligem Heu entstehende Drescherfieber und das durch Endotoxinfreisetzung charakterisierte Befeuchterfieber. Zur Gefährdungsanalyse sind daher nicht lediglich die KBE, sondern auch die Gesamtzahl aller Sporen, ihre Identität und die Konzentrationen der toxischen Komponenten zu berücksichtigen [Bünger et al. 1999; Tilkes et al. 1999].

1.8.5 Mycotoxinen

Mycotoxine sind natürliche Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die bevorzugt auf nährstoffreichen Substraten gebildet werden. Sie gelangen in das umliegende Substrat oder werden an Sporen und Mycel des Schimmelpilzes weitergegeben. Sie dienen primär nicht dem Wachstum oder der Vermehrung. Ihre biologische Bedeutung erlangen Mykotoxine dadurch, dass sie es den Schimmelpilzen erlauben, sich gegen andere Mikroorganismen durchzusetzen. Ein Großteil dieser Produkte hat eine antimikrobielle Wirkung (Penicillin, Cephalosporin) [DGE 1996].

Mycotoxine können eine karzinogene, mutagene, immunsuppressive sowie teratogene Wirkung auf den Menschen haben. Bisher gibt es noch keine umfassenden Daten über die Auswirkungen auf den Menschen. Ein lokaler Befall einzelner Organe (Leber, Niere, Herz, Lunge, ZNS) sowie systemische Wirkungen gehören zum Bild der Mycotoxicose. Weiterhin wird eine hormonähnliche Wirkung diskutiert. Etwa 10000 Schimmelpilzarten sind in der Lage Mycotoxine zu bilden. Etwa 300 verschiedene chemische Strukturen wurden für diese bisher beschrieben. Eine gute Übersicht der wichtigen Mycotoxine kann [Reiß 1997] entnommen werden. Außer an die inhalative Aufnahme von allergenem und toxischem Material ist an eine Aufnahme durch Nahrungsmittel von Schimmelpilzgiften zu denken. In der Toxikologie ist das Problem der Mycotoxine schon länger bekannt. Verwiesen sei z.B. auf *Turkey X disease* durch Verschimmelung von Futtermittel (Erdnussmehl) an Truthähnen 1960 [Reiß 1997]. Arbeitsmedizinische- und umweltmedizinische Relevanz hat nach neueren Studien von [Johanning et al. 1998] auch die *Stachybotrys* Mycotoxicose in verschimmelten Gebäuden, die ein nicht zu unterschätzendes Gesundheitsrisiko darstellt. In diesem Zusammenhang sei das "Krankes Gebäude Syndrom" (Sick building Syndrom) erwähnt. Meist kommt es nach zuvorigen Wasserschäden in Bürobauten zu einem versteckten Schimmelpilzbefall mit nachfolgender Mycotoxinbelastung. Dabei stehen bei exponierten Mitarbeitern unspezifische Befindlichkeitsstörungen wie beispielsweise Kopfschmerzen, Symptome einer Rhinitis, gastrointestinale Beschwerden und vermehrte Müdigkeit im Vordergrund.

Bestrebungen, auch bei den Mycotoxinen in der Luft am Arbeitsplatz standardisierte Messverfahren einzuführen, werden ebenfalls von der BIA koordiniert und gefordert. Forschungsvorhaben zu diesem Thema laufen.

Eine Zusammenstellung ausgewählter Mycotoxine gibt **Tab. 1.2**.

Tab. 1.2: Mycotoxine und Mycotoxinbildner (nach Engelhardt 1999).

Mycotoxin	Arten					Schimmelpilz
	B1	B2	G1	G2	M1	
Aflatoxin (> 20 Arten) als Beispiel:						Aspergillus flavus, Asp. parasiticus, Penicillium sp. Paecilomyces variotii, Byssochlamys
Patulin, Mycophen- nolsäure, Butenolid, Monilioformin						Penicillium expansum, Asp. sp., Byssochlamys, Paecilomyces variotii
Ochratoxin	A					Fusarien, Penicillium verrucosum, Aspergillus ochraceus
Fusariumtoxine						
- Fumonisine	FB1-4	FA1	FA2			Fusarien sp.
- Trichothecene	A	B				Fusarium sp., Fusarium solani, Trichothecium roseum, Cladosporium, Stachybotrys atra
- Zearalenon						Fusarien sp.
Sterigmatocytosin Versicolorine						Aspergillus, Penicillium, Chaetomium, Emericella
Citrinin						Penicillium, Aspergillus
Tenuazonensäure						Alternaria Arten
Citreoviridin						Penicillium sp. Aspergillus terreus
Anthracen Derivate						Penicillium, Aspergillus, diverse Schimmelpilze
Cytochalasane						Aspergillus, Penicillium, Chaetomium, Phoma
Mutterkornalkaloide						Claviceps purpurea

1.8.6 Microbial Volatile Organic Compounds (MVOC's)

Schimmelpilze erzeugen eine Reihe von flüchtigen organischen Verbindungen (MVOC's). Sie sollen für den muffigen und moderigen Geruch in Innenräumen verantwortlich sein. Meist tritt der Geruch weit vor Sichtbarwerden des Schimmelbefalls auf. Gesundheitliche Beschwerden reichen von Reizung der Augen und Schleimhäute, Infektanfälligkeiten, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Reizbarkeit, Aggressivität, immunologische Störungen, Gelenksbeschwerden, Übelkeit durch Geruchsbelästigungen, Nahrungsmittelunverträglichkeiten, Nebenhöhlenentzündungen bis hin zu Atemproblemen in Innenräumen. Mitunter wird dieser Symptomenkomplex auch als "Krankes Gebäude Syndrom" (*Sick building syndrom, als SBS bezeichnet*) zusammengefasst. Nach [Ohgke 1999] soll sich das Spektrum der MVOC's der Schimmelpilze und Bakterien signifikant von anderen *flüchtigen organischen Verbindungen (VOC)* unterscheiden. Die wichtigsten Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen sind in **Abb. 1.7** aufgeführt.

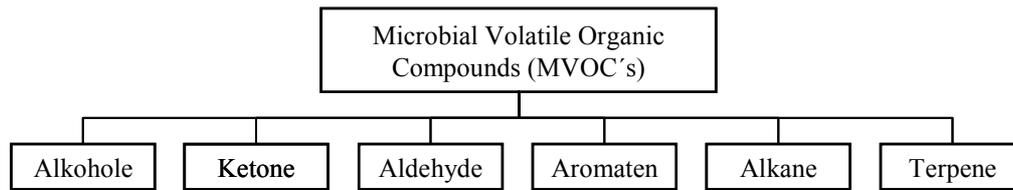


Abb. 1.7: Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen (nach Keller et al. 1997).

Nach [Keller et al. 1997] sollen einige dieser MVOC's geeignet sein, nicht sichtbaren Schimmelbefall in Innenräumen zu entdecken. Im Einzelnen sind dies folgende Verbindungen (**Tab. 1.3**).

Nach [Keller et al. 1997] sind zum Nachweis des nicht sichtbaren Schimmelbefalles in Innenräumen folgende MVOC's geeignet:

- Methylisopentylether, Methylisopentylether
- Dimethylsulfid, Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid, Dimethylsulfoxid
- 2-Methyl-1-Butanol, 3-Methyl-1-Butanol, 2-Methyl-1-Propanol
- 1-Decanol
- Geosmin
- 1-Octen-3-ol
- 2-Pentylfuran
- β -Farnesan

1.8.7 Enzyme in der Luft am Arbeitsplatz

Enzyme stellen nach [Baur 2000] aggressive Inhalationsnoxen dar. Mittels IgE Ak Nachweis, dem Prick Haut Test und der inhalativen Provokation werden Enzyme in der Luft am Arbeitsplatz als Ursachen allergischer Reaktionen gesichert. Meist handelt es sich dabei um Hydrolasen und Proteasen, die auch von Bakterien und Schimmelpilzen freigesetzt werden können.

1.8.8 Spezifischer Serumantikörpernachweis gegen Schimmelpilze und Actinomyceten

Nach [Bünger et al. 2000] stellt der Nachweis von spezifischen IgG Serumantikörpern exponierter Arbeitnehmer gegen Schimmelpilze und Actinomyceten eine Möglichkeit dar, auf eine mikrobiologische Verunreinigung in der Luft am Arbeitsplatz zu schließen. Dabei sind unter anderem folgende Antikörper bestimmbar: *Saccharopolyspora rectivirgula*; *Saccharomonospora viridis*; *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus niger*; *Penicillium crustosum*. Der Autor spricht dabei von Biomarkern. Dabei sollen hohe Antikörpertiter bei exponierten Arbeitnehmern mit einer hohen Exposition dieser Mikroorganismen am Arbeitsplatz korrelieren. Inwieweit ein hoher Antikörpertiter beispielsweise für *Aspergillus fumigatus* auch ein Hinweis für eine Exogen allergische Alveolitis darstellt, muss offen bleiben. [Johanning et al. 1996] fand diesbezüglich keine signifikante Korrelation zwischen hohen Antikörpertitern für *Stachybotrys chartarum* und einer erhöhten Erkrankungshäufigkeit für eine *Stachybotrys Mycotoxicose*. Anzumerken bleibt, dass der Antikörpernachweis ein aufwendiges Verfahren ist, was nur bestimmten Leitkeimen vorbehalten bleibt.

2 Untersuchungsgut

2.1 Auswahl der Kulturen für den Referenzkatalog

50 Kulturen unterschiedlicher Sporenart bestehend aus 45 Schimmelpilzen und 5 thermophilen Actinomyceten der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) wurden auf Nährmedien angezchtet mit dem Ziel, einen die o.g. Sporenarten umfassenden Referenzkatalog zu entwickeln. Bei einer geschätzten Anzahl von über 250000 Pilzarten und zahlreicher Arten thermophiler Actinomyceten (Grampositiver Bakterien) war es nötig, vorab geeignete Kriterien für die Auswahl eines Referenzkatalogs zu definieren.

Humanpathogene Vertreter der Schimmelpilze werden derzeit mit ca. 200 Arten angegeben, wobei ständig neue Arten hinzukommen und die Anzahl somit ständig zunimmt [De Hoog und Guarro 1995, Kayser 1993]. Dabei wird bei der Festlegung der Humanpathogenität bisweilen ausschließlich die Infektiosität als bestimmendes Kriterium herangezogen. Arbeitsmedizinisch relevante Pilze und Bakterien umfassen darüber hinaus aber auch die allergisierende und toxische Wirkung.

Vorab wurde nach folgenden Kriterien versucht einen repräsentativen Überblick über die mikrobielle Belastung der Luft am Arbeitsplatz mit Sporen von Schimmelpilzen und thermophilen Actinomyceten anhand einer Recherche bei Med-Line und Tox-Line zu gewinnen (siehe **Abschnitt 8.1**):

- **Häufigkeit des Vorkommens** der Arten an Arbeitsplätzen in der Landwirtschaft, der Abfallwirtschaft und in Innenräumen
- **Relevanz für die Erzeugung einer EAA**
- **Repräsentativität der Auswahl mit wenigstens einem Vertreter je Gattung** [Reiß 1997]
- **Listen anderer Autoren:** [Sennekamp 1998, BG Chemie 1998, Karlsson und Malmberg 1989]

Die o.g. Kulturen wurden bei der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)* angefordert. Unter Berücksichtigung obiger Auswahlkriterien wurden ausschließlich humanpathogene Schimmelpilzarten der Eumycota (**Abb. 1.1**) verwendet. Die hier verwendete Nomenklatur entspricht exakt derjenigen des online-Bestellkataloges der DSMZ (Stand 6/2000). Die Kulturen können anhand der in **Tab. 2.1** angegebenen Katalog Nummern des DSMZ identifiziert werden.

Tab. 2.1: Bezeichnung und Katalog Nr. der 50 angezüchteten Kulturen entsprechend der DSMZ.

Nr.	Bezeichnung der Kultur nach der DSMZ	Katalog Nr. der DSMZ	Nr.	Bezeichnung der Kultur nach der DSMZ	Katalog Nr. der DSMZ
1	<i>Aspergillus niger</i>	737	26	<i>Fusarium oxysporum</i>	2018
2	<i>Aspergillus flavus</i>	818	27	<i>Stachybotrys chartarum</i>	2144
3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	819	28	<i>Rhizopus microsporus</i>	2196
4	<i>Emericella nidulans</i>	820	29	<i>Aureobasidium pullularia</i>	2404
5	<i>Aspergillus ochraceus</i>	824	30	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	2693
6	<i>Aspergillus terreus</i>	826	31	<i>Acremonium strictum</i>	3567
7	<i>Emericella unguis</i>	827	32	<i>Penicillium brevicompactum</i>	3825
8	<i>Penicillium chrysogenum</i>	844	33	<i>Ustilago esculante</i>	4458
9	<i>Trichothecium roseum</i>	860	34	<i>Wallemia sebi</i>	5329
10	<i>Botrytis cinerea</i>	877	35	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	43016
11	<i>Epicoccum sp.</i>	892	36	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	43114
12	<i>Neurospora crassa</i>	894	37	<i>Saccharomonospora viridis</i>	43115
13	<i>Alternaria alternata</i>	1102	38	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	43370
14	<i>Absidia corymbifera</i>	1144	39	<i>Thermomonospora alba</i>	43795
15	<i>Fusarium solani</i>	1164	40	<i>Eurotium chevalieri</i>	62064
16	<i>Penicillium spinulosum</i>	1180	41	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	62121
17	<i>Penicillium expansum</i>	1282	42	<i>Eurotium amstelodani</i>	62629
18	<i>Aspergillus parasiticus</i>	1300	43	<i>Eurotium rubrum</i>	62631
19	<i>Rhizomucor miehei</i>	1330	44	<i>Mucor racemosus</i>	62760
20	<i>Rhizomucor pusillus</i>	1331	45	<i>Phoma glomerata</i>	62905
21	<i>Penicillium verrucosum</i>	1836	46	<i>Ulocladium chartarum</i>	63070
22	<i>Aspergillus versicolor</i>	1943	47	<i>Humicola fuscoatra</i>	63302
23	<i>Paecilomyces fulva</i>	1961	48	<i>Aspergillus sydowii</i>	63373
24	<i>Chaetomium globosum</i>	1962	49	<i>Cladosporium herbarum</i>	63422
25	<i>Penicillium glabrum</i>	2017	50	<i>Doratomyces microsporus</i>	63549

Die in **Tab. 2.1** vorgestellten Sporenarten werden in 8 Gattungsgruppen geordnet, wobei jeder Gattungsgruppe ein Kennbuchstabe zugewiesen wird (**Abb. 2.1**). Gattungsgruppe t umfasst hierbei die 5 thermophilen Actinomyceten, die 45 Schimmelpilze finden sich in den Gruppen a, c, f, m, p, s und u wieder. Unter den acht Gattungsgruppen sind z.B. Zygomyceten (Gruppe m) mit fünf Arten vertreten: *Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor* mit zwei Arten und *Rhizopus*.

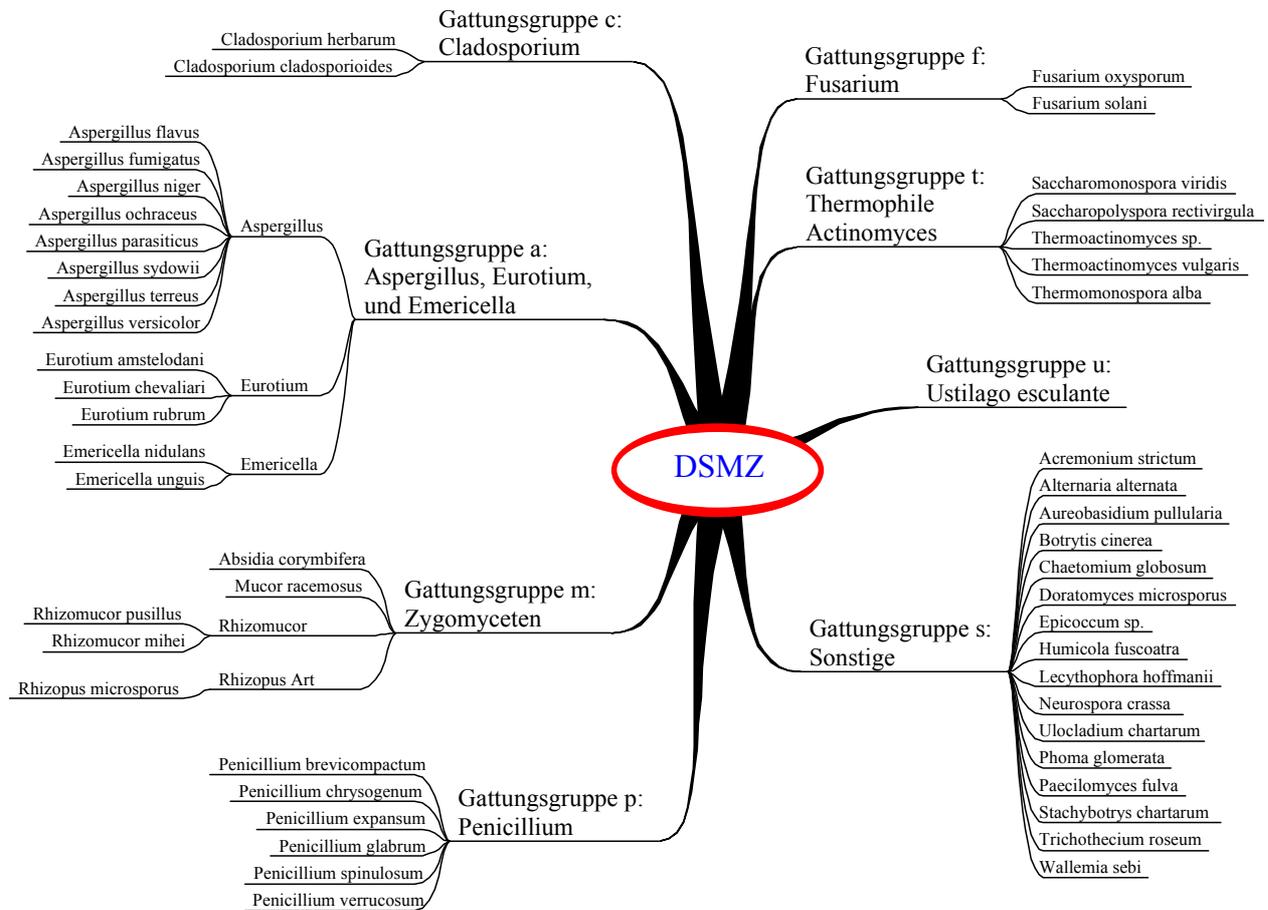


Abb. 2.1: Zusammenfassung der Schimmelpilzarten und der thermophilen Actinomyceten Arten aus **Tab. 2.1** nach 8 Gattungsgruppen geordnet.

Unter den 45 angeführten Schimmelpilzarten ordnet die [BG Chemie 1998; TRBA 460] die 4 Arten *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* und *Fusarium oxysporum* der der Gefahrstoffklasse 2, die verbleibenden 41 Arten der Gefahrstoffklasse 1 zu (es sei an dieser Stelle angemerkt, dass - abweichend dazu - der online-Bestellkatalog der DSMZ (Stand 6/2000) auch die Arten *Trichothecium roseum*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium verrucosum*, *Stachybotrys chartarum* der Gefahrstoffklasse 2 zuordnet).

2.2 Nährböden zur Anzucht der DSMZ- bzw. Pleomorphismusversuch-Kulturen

Die DSMZ Lieferungen bestehen überwiegend aus Schrägagarkulturen sowie gefriergetrockneten Kulturen, die eine vorherige Anreicherung in Nährlösung (Standard Nährbouillon aus der Mikrobiologie JLU Gießen) erfordern, bevor die Kultur angezchtet werden kann (**Abb. 2.2**).



Abb. 2.2: Schimmelpilzkulturen auf Schrägagar (links) und gefriergetrocknete Kulturen von vier thermophilen Actinomyceten (rechts) der DSMZ.

Als Nährböden für die Erstellung der Schimmelpilzkulturen dienen ausschließlich Standardmedien. Zur Verwendung kommt ein vier prozentiger Glucose Sabouraudagar. Für die Anzucht der thermophilen Actinomyceten kommt der CASO Agar (Casein Sojamehlpepton Agar) als Breitspektrumagar für Bakterien der Firma Merck zur Anwendung. Zusätzlich wird ebenfalls mit Reisagar gearbeitet. Ein sorgfältiger Verschluss mit Klebeband soll die Fremdkontamination und die Sporenverbreitung verhindern.

Neben dem Sabouraudagar kommen im Rahmen eines Pleomorphismusversuchs mit *Aspergillus niger* und *Penicillium expansum* 10 weitere Nährmedien zur Anwendung (**Tab. 2.2**). Ziel des Versuches ist es zu überprüfen, ob innerhalb einer Schimmelpilzart die morphologische Oberflächenstruktur der Sporen sich verändert, wenn unterschiedliche Nährmedien verwendet werden. Hierzu werden gängige Medien zur Bakterienkultivierung aus dem Mikrobiologischem Institut der JLU Gießen bezogen. Die Nährmedien stammen von den Firmen Merck, Oxoid und Difco.

Tab. 2.2: Nährböden des Pleomorphismusversuchs.

Nr.	Bezeichnung	Nährboden-Kennung	Firma Bestellnr.	pH Wert	Verwendung
1	Saboraud Agar 4% Glucose	P1	Merck 1.05438	5,6	pathogene Pilze, bevorzugt Dermatophyten, Hefen, Schimmelpilze
2	Brain/Heart-Agar, Hirn/Herz-Extrakt	P2	Merck 1.10493	7,4	Streptokokken, Staphylokokken, Meningokokken, Pneumokokken, pathogene Pilze, Clostridien
3	Brolacin Agar - C.L.E.D.	P3	Merck 1.01638	7,3	Bakterien Agar – E.Coli, Klebsiellen, Proteus, Serratia, Pseudomonas, Streptokokken, Staphylokokken
4	Yersinien Selektiv Agar nach Schieman + Supplement	P4	Merck 1.16434; Merck 1.16466	7,4	Yersinien, besonders Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis
5	Shigellen Agar - XLD	P5	Merck 1.05287	7,4	Nachweis von Shigellen, pathogene Enterobakterien
6	Blut - Columbia Agar + Hammelblut 5%	P6	Oxoid CM 331; Gibco M 10600 + SR 0051 E	7,3	Streptokokken, Staphylokokken, Pneumokokken, Listerien, Clostridien
7	Kochblut Agar - CASO Agar + Hammelblut 8%	P7	Merck 1.05458	7,3	Staphylokokken, Streptokokken, bacillus, Candida, E.Coli
8	Salmonella-Shigella Agar	P8	Oxoid CM 99	7	Shigellen und die meisten Salmonellen, Proteus, E. Coli, Enterobacter aus dem Stuhl
9	BP Brilliant Grün Phenolrot Lactose Saccharose Agar	P9	Oxoid CM329	6,9	Staphylokokken, Salmonellen, E.Coli, Proteus, Enterokokken, Bacillus subtilis
10	Mc Conckey Sorbitol Agar	P10	Difco 0079-17-7	7,1	Koliforme Bakterien, Salmonellen, Shigellen aus Stuhl und Urin
11	Müller Hinton	P11	Oxoid CM 337	7,3	Empfindlichkeitsüberprüfung medizinisch bedeutsamer Erreger gegenüber Antibiotika

3 Anzucht, Probenahme, Präparation und Klassierung

3.1 Anzucht der Schimmelpilze und thermophiler Actinomyceten

Im Gefahrstofflabor Physik des *Institut und Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin (IPAS)* der JLU Gießen wurde ein Laborraum zur Bearbeitung von mikrobiologischem Material eingerichtet, der in Abstimmung mit dem Leiter des mikrobiologischen Instituts der JLU Gießen unter Einhaltung einfacher Schutz- und Hygienemaßnahmen auch zur Bearbeitung von Mikroorganismen der Risikogruppe 2 [BG Chemie 1998] geeignet war. Entsprechend der Biostoffverordnung wurde eine Betriebsanweisung erstellt. Unter anderem wurden die mikrobiologischen Anzuchtkulturen für die ordnungsgemäße Entsorgung in separaten Behältnissen verschlossen gesammelt. Für Problemkeime stand eine Arbeitsbank mit Partikelfiltern zur Verfügung. Regelmäßig der Raumluft ausgesetzte Pilznährmedien sollten eine Kontamination während der Bearbeitung von Schimmelpilzen dokumentieren.

Es war notwendig, die gelieferten Schrägagarkulturen neu auszuplattieren, um genügend Material zur Präparation zu bekommen. Die Schimmelpilzkulturen wurden in mit Klebeband verschlossenen Kulturschalen auf Sabouraud Nährmedien (Glucose 4 %) bei Raumtemperatur angezchtet. Für alle Pilze wurde eine Anzuchtdauer von mindestens 24 Stunden bis zu maximal 14 Tagen eingehalten. Während dieses Zeitraumes gelang es, ausreichend Sporen zur REM Analyse zu gewinnen. Eine Kultur musste wegen Fremdkontamination verworfen werden. Während der Bearbeitung der Kulturen diente eine offene Nährplatte (Sabouraud Agar) zur Kontrolle der Kontamination aus der Atemluft. Die gefriergetrockneten Schimmelpilz- und Actinomyceten Arten mussten zuvor nach Anweisung der DSMZ mit Nährbouillon angereichert werden. Erst danach erfolgte die weitere Ausplattierung auf die Standardkulturmedien (CASO für Actinomyceten, Sabouraud für Schimmelpilze).

Zur Anzucht thermophiler Actinomyceten auf CASO Agar wurden höhere Temperaturen benötigt. Dazu fand ein Brutschrank mit regelbaren Temperaturbereichen zwischen 30 °C und 60 °C Verwendung. Jede dieser Kulturen wurde bei Temperaturen von 60 °C, 50 °C und 40 °C angezchtet. Der Anzuchtvorgang musste auf Grund zu geringem Sporenwachstums mehrmals wiederholt werden. In zwei Fällen kam es erst bei niedriger Temperatur (40 °C) zum Wachstum. Die Anzuchtdauer betrug im Schnitt ein bis zwei Wochen.

Bei dem Pleomorphismusversuch kam es lediglich einmal beim *Penicillium expansum* auf BP Agar zu keinem Wachstum. Die Zeiträume und Temperaturbedingungen zum Wachstum deckten sich auch hier mit den Bedingungen für die Schimmelpilzanzucht des Referenzkataloges.

3.2 Probenahme an den angezchteten Kulturen

Zur Probenahme und Präparation von Sporen wurden mehrere Verfahren getestet. Zum einen wurden mit Hilfe von beidseitig klebenden Kohlenstofffolien (Kohlepads) Kontaktproben der Kulturen gewonnen. Allerdings ist diese Methode störanfällig. So bilden sich bei Saccharopolyspora Kristalle, in denen mit der EDX Natrium und Chlorid nachgewiesen wurde (**Abb. 3.1**). Der restliche zentrale Filterbereich ermöglichte dennoch eine effiziente Sporenauswertung im REM. Hinzu kommt, dass die lösemittelhaltigen Kohlepads nur bedingt haltbar sind, so dass nach

einigen Monaten keine Auswertbarkeit der Sporenfilter mehr besteht. Ein Jahr nach Präparation lassen sich die Sporen des *Penicillium expansum* in **Abb. 3.2**, rechts nur noch schemenhaft erkennen, obwohl die Sporen im REM zunächst gut beschrieben und vermessen werden konnten. Der Versuch, solche Abklatschproben auch auf Kernporenfiltern zu gewinnen scheiterte an der geringen Haftung an deren Oberfläche. Die **Abb. 3.2**, links und Mitte zeigen Kohlepad Abklatschproben unbekannter Sporen mit Konturunregelmäßigkeiten und Helligkeitsartefakten, die dazu führten, dass die Präparate verworfen wurden.

In einem zweiten Verfahren wurde durch Absaugen mit hoher Geschwindigkeit (ca. 170 m/sec) durch eine Öffnung mit einem Durchmesser von einem Millimeter die Abscheidung freigesetzter Sporen auf einen goldbedampften Kernporenfilter mit einem Durchmesser von 25 mm untersucht, (**Abb. 3.3**). Verwendet wurde das Gerät PNA der Firma APC (**Abb. 3.6**) mit einem eingestellten Fluss von acht Litern pro Minute. Es wurde maximal fünf Minuten lang wenige Millimeter oberhalb der Kultur angesaugt. Beide Verfahren kamen bei allen 50 Kulturen zur Anwendung. Anzucht und Probenahme musste bis zu fünf Mal wiederholt werden bis akzeptable Präparate gewonnen werden konnten. Insbesondere bereiteten nass wachsende Schimmelpilze Schwierigkeiten. Beispielsweise kann bei *Phialophora hoffmannii* eine Konturunschärfe festgestellt werden (**Abb. 3.4**, Mitte). Solche Sporenbilder wurden im REM nicht ausgewertet.

Im Nachhinein wurde bei Problemfällen nach einem Vorschlag von [Tossavainen 2000] schließlich auch die Übertragung der Kulturteile mit Hilfe einer Pinzette oder Impföse als Probe auf Kohlepad getestet und zwar dann, wenn durch Ansaugen keine Sporen nachgewiesen werden konnten. Auch hierbei ergaben sich Probleme bei nassen Kulturen. In einem kritischen Fall konnte jedoch ein solches Präparat nach ausreichender Lufttrocknung ausgewertet werden.

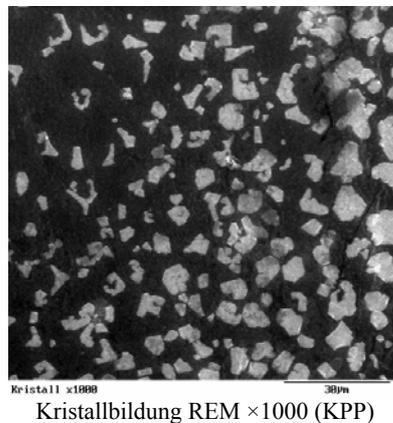


Abb. 3.1: Kristallbildung bei der Präparation von *Saccharomonospora viridis*. Die Auskristallisationen enthalten überwiegend die Elemente Natrium und Chlor.



Abb. 3.2: Abklatschprobe unbekannter Sporen unmittelbar nach der Präparation (links, Mitte) sowie von *Penicillium expansum* Sporen ein Jahr nach der Präparation (rechts).



Abb. 3.3: Geschlossener Filterhalter und Konus.

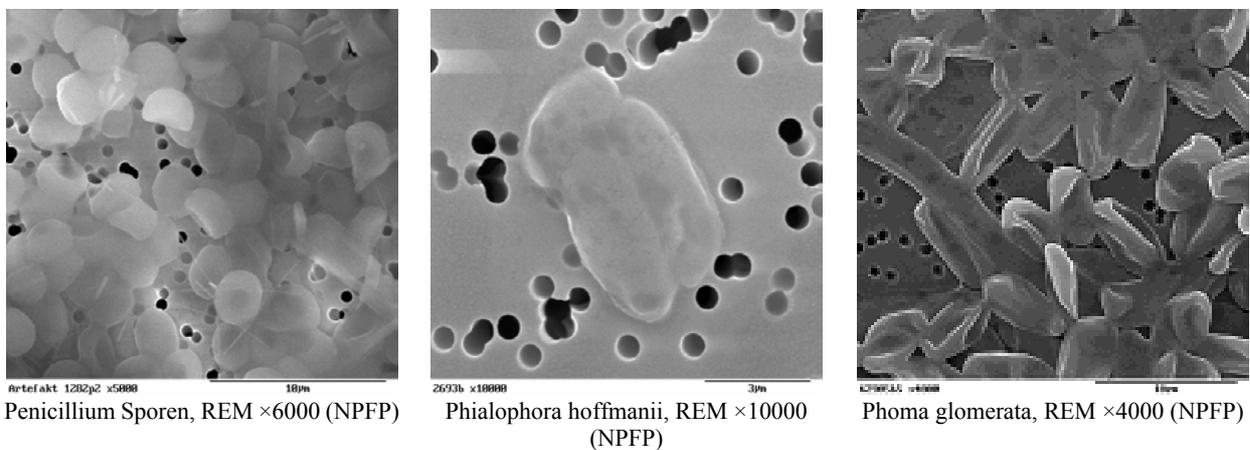


Abb. 3.4: Sporen schleimig wachsender Schimmelpilze. Die Präparation erfolgte durch Absaugen bei hoher Geschwindigkeit.

Ein weiteres generelles Problem ergibt sich für die Auswertung von biologischen Partikeln (z.B. Sporen) durch das Vakuum im REM für die Form der Sporen [siehe **Abb. 3.4**]. So kann es zu massiven Eindellungen kommen. Teilweise verformen sich die Sporen zu einem "luftleeren Schlauch". Bei der Beschreibung der Sporen wurden daher Vakuumdefekte speziell erfasst. Auch das Verhältnis D_{\max} / D_{\min} führt zur Unterscheidung von runden und ovalen länglichen Sporen, die durch Vakuumdefekte geprägt sein können. **Abb. 3.5**, Mitte zeigt eine durch das Vakuum zusammengefallene Spore des *Fusarium solani*.

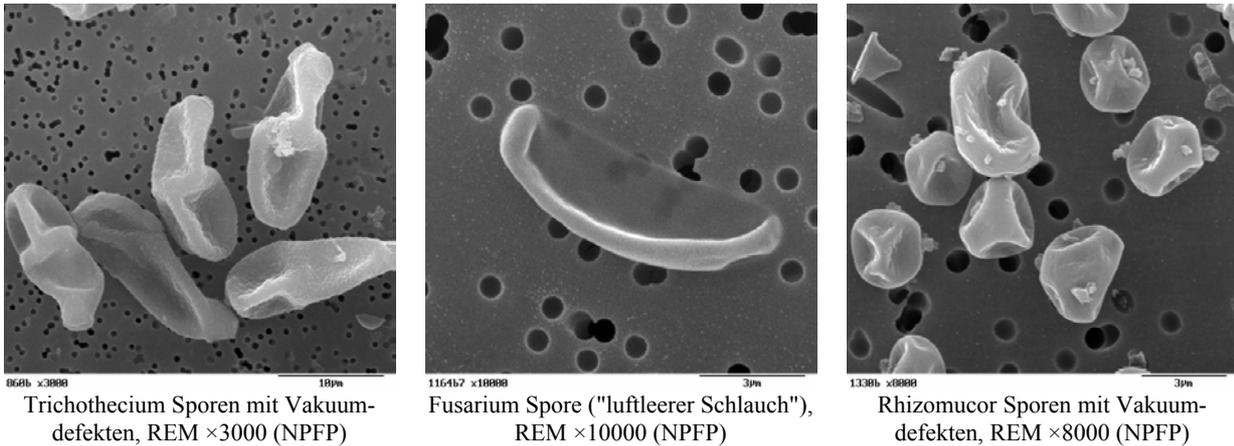


Abb. 3.5: Vakuumdefekte bei Trichothecium-, Fusarium- und Rhizomucorsporen.

3.3 Luftprobenahme an der Biotonne

Eigene Luftprobenahmen mit goldbedampften Kernporenfiltern wurden im Herbst 1998 durchgeführt. Hierbei wurden mit dem Probenahmegerät PNA der Firma APC (**Abb. 3.6**) mit einem Fluss von acht Litern pro Minute die Sporen über mindestens 5 Minuten auf einen Kernporenfilter abgeschieden.

Zwei Messungen erfolgten nach dem einfachen Öffnen der Biotonne. Eine weitere Messung erfolgte nach kräftigem Schütteln der Tonne. Die mit Gold bedampften Kernporenfilter wurden hierbei in Einatemhöhe durch Filterhalter positioniert.



Abb. 3.6: Probenahmepumpe

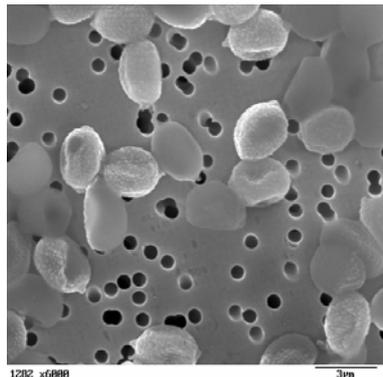
3.4 Luftprobenahme beim Einsammeln von Hausmüll

In Kooperation mit einem von der Gemeindeunfallversicherung Münster (Projektleiter Dr. Neumann) und dem mikrobiologischen Labor Dr. J. Balfanz bzw. Dr. M. Lohmeyer GbR durchgeführten Projekt standen auch Filterproben vom Einsammeln von Hausmüll zur Verfügung. Verwendet wurde die indirekte Referenzmethode des BIA zur Messung von Schimmelpilzsporen am Arbeitsplatz entsprechend der TRBA 430 (siehe **Abschnitt 1.7.2**). Dieses Filtrationsverfahren ist besonders geeignet, um am Arbeitsplatz im mittleren bis hohen Konzentrationsbereich Sporen zu erfassen. Die bei der Luftprobenahme beaufschlagten Kernporenfilter (25 mm; 0,8 μm Porenweite) wurde mit einer Waschflüssigkeit abgespült. Ein Aliquot (1 ml der Lösung) der Waschflüssigkeit der Müllfilter wurde im mikrobiologischen Labor von Dr. Balfanz bzw. Dr. Lohmeyer auf Kernporenfilter übertragen. Diese uns auf dem Postweg zugesandten Filter kamen nach Begoldung zur Auswertung.

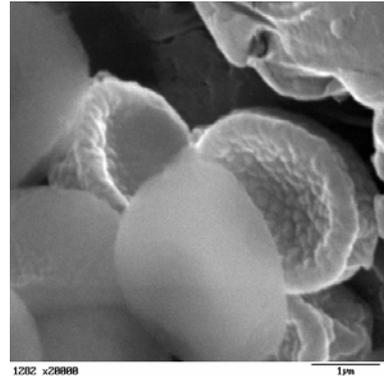
3.5 Präparation für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop

Aus den gewonnenen Kernporenfiltern wurde ein keilförmiges Stück herausgeschnitten und mit Hilfe eines Kohlepad auf einen Aluminiumteller geklebt, der in das REM eingesetzt werden kann. Die auf dem Teller montierte Probe wurde durch Sputtering nachbegoldet, wenn notwendig auch mehrfach. Das Sputter-Gerät arbeitet bei einem Vakuum von $< 0,1$ Torr bei einem Plasmastrom von 35 mA bei 3 bis 7 Minuten Laufzeit mit einem Argonplasma, das Atome aus einer Goldelektrode herausschlägt. Ziel war es eine Goldschicht einer Dicke von ca. 20 nm zu erreichen.

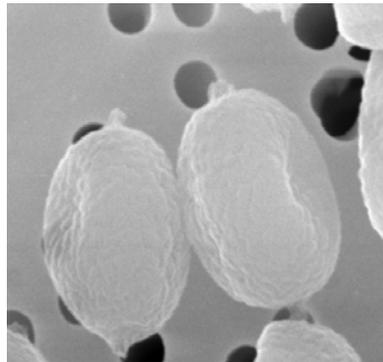
Die Präparation und Auswertung schleimig wachsender Schimmelpilze im REM stellt ein erhebliches Problem dar (**Abb. 3.4**). Es wurde daher experimentell geprüft, inwieweit eine vorsichtige Kaltveraschung der mit Sporen beaufschlagten Nucleoporfilter eine Verbesserung liefert. Aus einer Probe von *Penicillium expansum* Sporen wurden 4 gleiche Anteile präpariert und 3 davon unter verschiedenen Bedingungen verascht (**Abb. 3.7**). Bei 20 Watt und einer Veraschungsdauer von 2 bis 5 Minuten zeigte sich eine zuvor nicht erkennbare Oberflächenstruktur. Zumindest die Veraschung bei 30 Watt richtet aber bereits eindeutige Zerstörungen an den Sporen an. Das Verfahren kam daher bei der Erstellung des Referenzkataloges nicht zum Tragen.



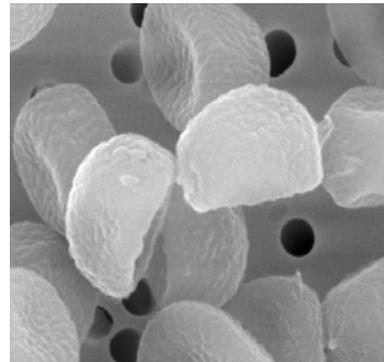
ohne Veraschung, REM $\times 6000$ (NFPF)



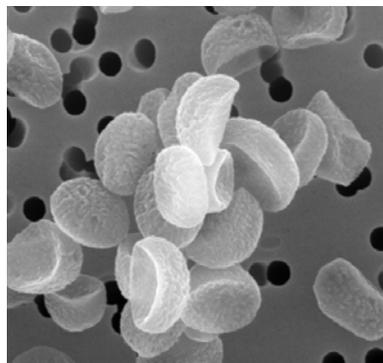
ohne Veraschung, REM $\times 20000$ (NFPF)



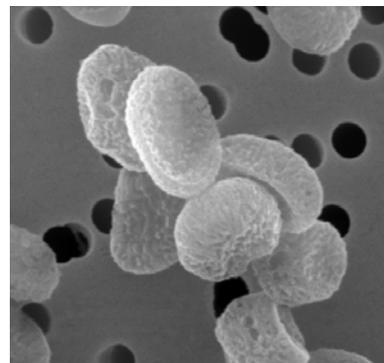
Kaltveraschung, REM $\times 20000$ (NFPF)
20 Watt, 2 Minuten



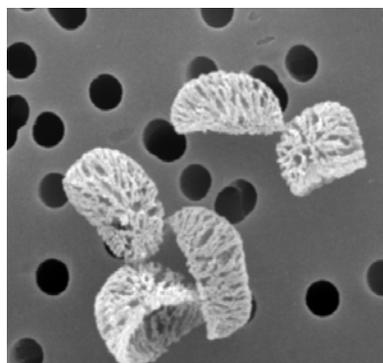
Kaltveraschung, REM $\times 15000$ (NFPF)
20 Watt, 2 Minuten



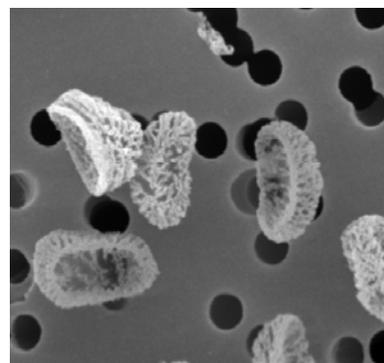
Kaltveraschung, REM $\times 10000$ (NFPF)
20 Watt, 5 Minuten



Kaltveraschung, REM $\times 15000$ (NFPF)
20 Watt, 5 Minuten



Kaltveraschung, REM $\times 15000$ (NFPF)
30 Watt, 10 Minuten



Kaltveraschung, REM $\times 15000$ (NFPF)
30 Watt, 10 Minuten

Abb. 3.7: *Penicillium expansum* Sporen ohne und mit Anätzung der Sporenoberfläche durch eine 10-minütige Kaltveraschung bei 30Watt.

3.6 Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop

3.6.1 Erstellen des Referenzkataloges, Summenparameter, Klassen

Von den in **Abschnitt 2** vorgestellten und nach den in **Abschnitt 2.1** bzw. **8.1.** dargelegten Kriterien zusammengestellten 50 Kulturen verlief die Züchtung von 49 erfolgreich. Eine der angezüchteten Schimmelpilz-Kulturen (*Chaetomium globosum*) musste verworfen werden, da es zur Kontamination des Nährmediums kam. Der Referenzkatalog (**Tab. 3.1**) umfasst die 49 verbleibenden Arten.

Die morphologische Sporenauswertung erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi S 2300 mit angeschlossenen energiedispersiven Röntgenmikroanalyzesystem (EDX) KEVEX 7000 für die Elementanalyse.

Aus der Gesamtheit der REM Untersuchungen von 1470 Einzelsporen (jeweils 30 Sporen der o.g. 49 Kulturen) wurden zunächst geeignete *Parameter* abgeleitet und *Klassen* festgelegt, anhand derer die wesentlichen Charakteristika der untersuchten Sporen beschrieben und somit erfasst werden. Ein Parameter ist eine bestimmte allgemeine Eigenschaft einer Spore wie das "Vorhandensein" von Vakuumdefekten (Dellen). 7 Parameter wurden definiert, die wiederum in Klassen unterteilt sind, welche die Parameter spezifizieren. Im Falle des Parameters "Vakuumdefekte" sind dies 5 Klassen, wobei jede der 5 Klassen eine bestimmte Anzahl an Dellen repräsentiert.

<u>Parameter:</u>	<u>darin enthaltende Klassen:</u>
1. maximaler Durchmesser:	5 Klassen [$\leq 1 \mu\text{m}$, $1 - 2 \mu\text{m}$, $2 - 5 \mu\text{m}$, $5 - 10 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$]
2. Form:	18 Klassen [Banane (ba), eckig (ec), Himbeere (hi), Kaffeebohne (kb), Keule (ke), Kugel (ku), Limone (li), Niere (ni), oval (ov), Patrone (pa), Schuh (sc), Sonstige (se), Schüssel oval (so), Spindel (sp), Schüssel rund (sr), Tropfen (tr), Vase (va), Zylinder (zy)]
3. Vakuumdefekte:	5 Klassen [keine Dellen (0), 1 Delle (1), 2 Dellen (2), 3 Dellen (3), 4 Dellen (4)]
4. Art der Oberflächenstrukturen:	14 Klassen [Beule (be), Blase (bl), Falte (fa), glatt (gl), körnig (kö), ornamentiert - Haarriss (oh), ornamentiert - Wurm (ow), polygonale Lochstruktur (pl), rauh (ra), Rille (ri), Sonstige (sg), Schuppen (sn), Stachel (st), Warze (wa)]
5. Größe der Oberflächenstrukturen:	5 Klassen [$0 \mu\text{m}$, $\leq 0,2 \mu\text{m}$, $0,3 - 0,4 \mu\text{m}$, $0,5 - 0,7 \mu\text{m}$, $\geq 0,8 \mu\text{m}$]
6. Art der Verbindungsstellen:	10 Klassen [ausgefranst (af), ausgestanzt (ag), Faden (fn), Knopf (kf), Ansammlung von Körnern (kn), konzentrische Ringstruktur (kr), Punkt (pu), radiär zulaufend (rr), Sonstige (si), Stiel (sl)]
7. Größe der Verbindungsstellen:	4 Klassen [$0 \mu\text{m}$, $0,1 - 0,4 \mu\text{m}$, $0,5 - 0,9 \mu\text{m}$, $\geq 1 \mu\text{m}$]

Anschließend wurden die 1470 Einzelsporen bekannter Sporenart den o.g. Klassen nach klassiert. Die Auswertung der durchgeführten Zuweisungen der Sporen zu den Klassen bildet die Grundlage des Klassierungsalgorithmus nach [Rödelsperger et al. 2000] (siehe **Abschnitt 3.7**).

Der Algorithmus schreibt eine eindeutige Zuordnung zu einer der Klassen innerhalb eines Parameters zwingend vor (vgl. **Abschnitt 3.7**). Auch für den Fall, dass der visuelle (stets subjektive) Eindruck eine Zwei- oder Mehrfachzuordnung sinnvoll erscheinen ließ, wurde deshalb eine gleichzeitige Zuweisung (wie beispielsweise zu "ba" *und* "ov" innerhalb des Parameters Form) nicht vorgenommen. Die Zuordnung erfolgte stets zu derjenigen Klasse, mit der die "größte" Übereinstimmung der untersuchten Spore zu erkennen war.

Als maximalen Durchmesser einer Spore wird hierbei derjenige Durchmesser des, die Spore umschreibenden, Kreises bezeichnet, dessen Mittelpunkt das geometrische Zentrum der Spore bildet.

Als "Größe der Oberflächenstrukturen" bzw. "Größe der Verbindungsstellen" ist bei Formen, die näherungsweise als kreis- bzw. ellipsenähnlich beschrieben werden können, der maximale Durchmesser der Oberflächenstrukturen bzw. Verbindungsstellen zu verstehen und wird entsprechend dem maximalen Durchmesser der Spore bestimmt (s.o.). Für den Fall, dass die Oberflächenstrukturen bzw. die Verbindungsstellen linienförmigen d.h. eindimensionalen Charakter aufweisen, wird als Größe, die jeweilige Länge der Gebilde verwendet. Dies ist beispielsweise für als Faden charakterisierte Verbindungsstellen der Fall.

Nachfolgend werden die Parameter Art und Größe der Oberflächenstrukturen bzw. Verbindungsstellen auch kurz als Art und Größe der Oberfläche bzw. Verbindung bezeichnet.

Abb. 3.8 zeigt die Bildung der Summenparameter und Klassen am Beispiel des *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* und *Stachybotrys chartarum*.

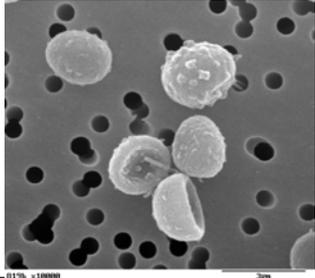
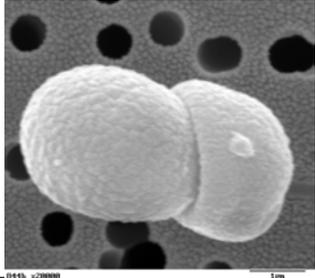
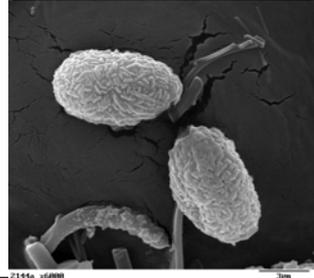
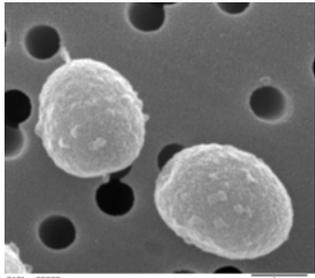
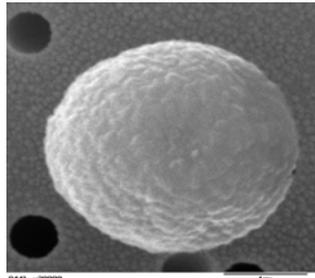
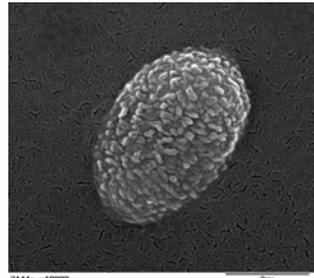
Sporenart		Aspergillus fumigatus		Penicillium chrysogenum		Stachybotrys chartarum	
REM-Aufnahmen							
		REM ×10000 (NPFP)		REM ×20000 (NPFP)		REM ×10000 (KPP)	
							
		REM ×20000 (NPFP)		REM ×30000 (NPFP)		REM ×10000 (KPP)	
Charakterisierung		Parameter	Anzahl	Parameter	Anzahl	Parameter	Anzahl
maximaler Durchmesser (D_{max})		> 1 bis 2 μm	3	> 2 bis 5 μm	30	> 5 bis 10 μm	30
Form		ov	18	ov	26	ov	20
		ec	3	so	4	so	10
		so	9				
Vakuundefekte		keine	12	keine	16	keine	11
		1 Delle	9	1 Delle	11	1 Delle	18
		2 Dellen	6	2 Dellen	3	2 Dellen	1
		3 Dellen	3				
Oberfläche	Art	wa	30	be	24	ow	30
	Größe	$\leq 0,2 \mu\text{m}$	30	ra	6	keine Angabe	30 ^{*)}
Verbindung	Art	keine	18	keine	10	keine	16
		kf	9	kf	20	kf	11
		fn	3 ^{*)}			st	3 ^{*)}
	Größe	keine Angabe	18 ^{*)}	keine Angabe	10 ^{*)}	keine Angabe	19
	0,1 bis < 0,5 μm	12	0,5 bis < 1 μm	20	0,5 bis < 1 μm	11	

Abb. 3.8: Bildung von Summenparametern aus der morphologischen REM-Analyse von jeweils 30 Einzelsporen einer Sporenart am Beispiel des *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* und *Stachybotrys chartarum*.

^{*)} Bei der Größenbeschreibung der Oberfläche bzw. der Verbindung wird lediglich die "wesentliche" Maßangabe herangezogen (mögliche weitere Maßangaben werden nicht verwendet).

3.6.2 Auswerten der beim Hausmüllsammeln und an der Biotonne beaufschlagten Filter

Der Auswertmodus der beim Hausmüllsammeln und an der Biotonne gewonnenen Nucleopore-filter umfasste neben der Beschreibung der Sporenmorphologie auch die quantitative Bestimmung der Sporenanzahl je mm² Filterfläche. Bei gleichmäßiger Filterbenetzung können somit auch Luftkonzentrationen bei bekanntem Durchfluss prinzipiell angegeben werden^{*)}. Im REM wurden hierzu bei einer 2000-fachen Vergrößerung mindestens 100 bis 150 Gesichtsfelder ausgezählt. Bei schwach belegten Filtern wurde stets eine Zählfeldfläche von mindestens einem mm² abgesucht. Bei unklaren Strukturen, die auch anorganischen Partikeln hätten entsprechen können, wurde ein Elementspektrum aufgenommen. Bei der Auswertung von Luftprobenahmen wurden oftmals zusammenhängende Aggregate von gleichartigen Sporen angetroffen. Da diese bei der Zählung von KBE nur als eine Kolonie erkannt werden können (vgl. **Abschnitt 1.7.2**), ist es sinnvoll, diese Aggregate getrennt zu erfassen.

Die morphologische Erfassung ist beispielhaft anhand einer Untersuchung von 11 Sporen in **Tab. 3.1** dargestellt. Hierbei wurden die Größen D_{\max} und D_{\min} , die Form, das Auftreten von Vakuumdefekten (Vakuum), die Nummer des Aggregates (AG Nr.) die Oberfläche (Art und Größe), Verbindungen (Art und Größe) und die Nummer des zugehörigen Gesichtsfeldes (GF Nr.) jeweils dokumentiert. In dem dargestellten Beispiel gehören demnach die Sporen 2 bis 11 dem Aggregat Nr. 1 an. Bei allen 11 Sporen war eine vollkommen glatte Oberfläche zu erkennen, so dass eine Angabe der Größe der Oberfläche nicht möglich ist. Bei der Spore Nr. 1 waren keine Verbindungen erkennbar. Dies erklärt die nicht vorhandenen Angaben zu Art und Größe der Spore.

Tab. 3.1: Erfassung der Morphologie am Beispiel von 11 Sporen und quantitative Auszählung der Sporen auf mit Luftproben beaufschlagten Kernporenfiltern (Biotonne 15.09.1999).

Spore Nr.	Durchmesser		Form	Vakuum	AG Nr.	Oberfläche		Verbindung		GF Nr.
	D_{\max} [μm]	D_{\min} [μm]				Art	Größe [μm]	Art	Größe [μm]	
1	1,6	1,3	ov	0	-	gl	-	-	-	43
2	4,7	2,1	ov	0	1	gl	-	pu	0,5	123
3	6	2,5	ov	1	1	gl	-	pu	0,5	123
4	4	1,8	ov	1	1	gl	-	pu	0,5	123
5	4,5	2,8	ec	1	1	gl	-	pu	1	123
6	4,8	3,3	ec	0	1	gl	-	pu	0,5	123
7	4,5	2,5	ov	0	1	gl	-	pu	0,5	123
8	6	3,3	so	1	1	gl	-	pu	0,5	123
9	7,4	2,5	sp	1	1	gl	-	pu	0,5	123
10	5,2	2,1	ov	0	1	gl	-	pu	0,5	123
11	4	2,5	ov	0	1	gl	-	pu	0,5	123

^{*)} Da sich jedoch Hinweise auf eine ungleichmäßige Belegung der für das Einsammeln von Hausmüll gewonnenen Filter fanden, wurde auf die Angabe von Konzentrationen hierbei verzichtet.

Für eine quantitative Auszählung von Sporen für die Bestimmung der Luftkonzentration sind demnach folgende Parameter zu ermitteln:

1. Die Zahl der bei 2000-fachen ausgezählten Gesichtsfelder (die Fläche eines Gesichtsfeldes entspricht einer Filterfläche von $2,66 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$).
2. Die Zahl der insgesamt auf dieser Fläche angetroffenen Sporen und zwar einschließlich aller in Aggregaten verbundenen Sporen.
3. Die Anzahl aller Aggregate.

Zweckmäßigerweise wird hierbei jedes Aggregat zusammen mit der Zahl der in ihm enthaltenen Einzelsporen ermittelt (vgl. **Tab. 3.1**). Die Sporen eines Aggregates müssen allesamt der selben Art angehören. Ihre Zuordnung als einheitliche Gruppe kann demnach weit zuverlässiger erfolgen als die Zuordnung einer Einzelspore. Insbesondere bei kleineren Sporen ($D < 1,5 \mu\text{m}$) und großen Aggregaten ist es oftmals nicht möglich die Anzahl der darin enthaltenen Sporen exakt zu erfassen. Das Konzept der Datenerfassung und Auswertung in Excel wurde von [Rödelsperger et al. 2000] entwickelt.

3.7 Zuordnungsalgorithmus

Für die Zuordnung der unbekannt Sporen zu den 49 Sporenarten (S1 bis S49) des Referenzkataloges (**Tab 3.2**) kommt der in **Abb. 3.9** dargestellte Algorithmus nach [Rödelsperger et al. 2000] zum Einsatz. Nachfolgend sollen die 3 hierfür erforderlichen Verfahrensschritte näher beschrieben werden.

Tab. 3.2: Die 49 Sporenarten (S1 bis S49) des Referenzkataloges.

Bezeichnung nach der DSMZ	Sporenart	Bezeichnung nach der DSMZ	Sporenart
<i>Aspergillus niger</i>	S1	<i>Stachybotrys chartarum</i>	S26
<i>Aspergillus flavus</i>	S2	<i>Rhizopus microsporus</i>	S27
<i>Aspergillus fumigatus</i>	S3	<i>Aureobasidium pullularia</i>	S28
<i>Emmericella nidulans</i>	S4	<i>Lecytophora hoffmannii</i>	S29
<i>Aspergillus ochraceus</i>	S5	<i>Acremonium strictum</i>	S30
<i>Aspergillus terreus</i>	S6	<i>Penicillium brevicompactum</i>	S31
<i>Emmericella unguis</i>	S7	<i>Ustilago esculante</i>	S32
<i>Penicillium chrysogenum</i>	S8	<i>Wallemia sebi</i>	S33
<i>Trichothecium roseum</i>	S9	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	S34
<i>Botrytis cinerea</i>	S10	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	S35
<i>Epicoccum sp.</i>	S11	<i>Saccharomonospora viridis</i>	S36
<i>Neurospora crassa</i>	S12	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	S37
<i>Alternaria alternata</i>	S13	<i>Thermomonospora alba</i>	S38
<i>Absidia corymbifera</i>	S14	<i>Eurotium chevalieri</i>	S39
<i>Fusarium solani</i>	S15	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	S40
<i>Penicillium spinulosum</i>	S16	<i>Eurotium amstelodani</i>	S41
<i>Penicillium expansum</i>	S17	<i>Eurotium rubrum</i>	S42
<i>Aspergillus parasiticus</i>	S18	<i>Mucor racemosus</i>	S43
<i>Rhizomucor miehei</i>	S19	<i>Phoma glomerata</i>	S44
<i>Rhizomucor pusillus</i>	S20	<i>Ulocladium chartarum</i>	S45
<i>Penicillium verrucosum</i>	S21	<i>Humicola fuscoatra</i>	S46
<i>Aspergillus versicolor</i>	S22	<i>Aspergillus sydowii</i>	S47
<i>Paecilomyces fulva</i>	S23	<i>Cladosporium herbarum</i>	S48
<i>Penicillium glabrum</i>	S24	<i>Doratomyces microsporus</i>	S49
<i>Fusarium oxysporum</i>	S25		

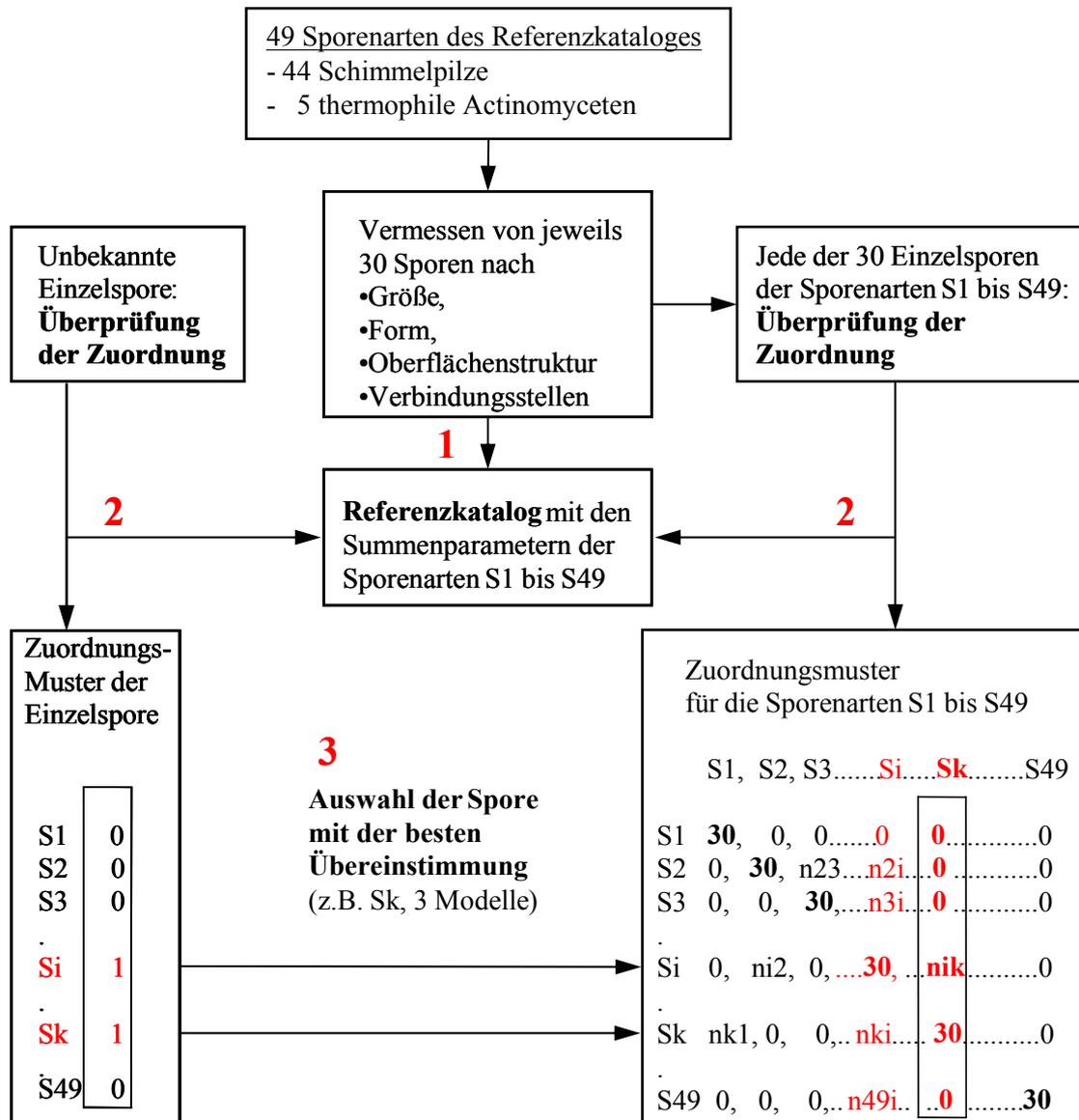


Abb. 3.9: angewandter Algorithmus der rasterelektronischenmikroskopischen Zuordnung von unbekanntem Sporen zu den 49 im Referenzkatalog (Tab. 3.2) definierten Sporenarten mit den 3 benötigten Verfahrensschritten (in roter Farbe 1 bis 3).

Erster Schritt:

Für die je Sporenart des Referenzkataloges erfassten 30 Sporen werden Summenparameter gebildet, die sich aus den Bereichsgrenzen der Größenangaben und der Anzahl der für jede der qualitativen Merkmalsausprägungen angetroffenen Sporen ergeben.

Zweiter Schritt:

Für jede dieser 30 Sporen einer Sporenart wird ein Vergleich mit den nach Schritt 1 gewonnenen Summenparametern aller 49 Arten durchgeführt. Für den Vergleich der einzelnen Sporen mit einer der 49 Sporenarten wird dabei für jedes der Merkmale ein quantitativer Parameter gebildet, der Werte zwischen 0 und 1 (z. T. auch zwischen 0,1 und 1, in Ausnahmen auch > 1) annehmen kann. Dabei bedeutet 0 fehlende und 1 vollständige Übereinstimmung. Beispielsweise würde für eine Größenangabe von D_{\max} außerhalb des Größenbereichs der 30 Sporen einer Art des Referenzkataloges den Wert 0 ergeben. Da die Parameter aller Merkmale miteinander

multipliziert werden, ergibt sich in diesem Fall insgesamt das Fehlen einer Übereinstimmung. Resultiert dagegen ein Wert > 0 , ist eine Übereinstimmung nicht vollständig ausgeschlossen und der Wert kann als quantitatives Maß dieser Übereinstimmung angesehen werden. Die so getroffene Zuordnung wird in eine Matrix eingebunden, in der die Zeilen den Summenparametern einzelner Sporenarten und die Spalten den jeweils 30 an diesen Parametern getesteten Einzelsporen einer Art entsprechen (**Abb. 3.9**, rechts unten). Diese Matrix lässt erkennen, dass viele der Sporenarten neben der identischen Zuordnung zu der Art, der sie tatsächlich angehören (jeweils 30 Zuordnungen in der Diagonalen), auch mehr oder weniger Zuordnungen zu einer oder mehreren anderen Arten möglich sind.

Dritter Schritt:

Wird für eine unbekannte Spore die Zuordnungsprozedur nach Schritt 2 vorgenommen, so muss für sie wie auch für die Katalogsporen selbst mit einer Zuordnung zu mehreren Sporenarten des Referenzkataloges gerechnet werden. Es hat daher eine Auswahl zu der bestmöglichen Zuordnung zu erfolgen, die sich an der Übereinstimmung zwischen dem Muster der unbekanntes Spore und dem Muster der Katalogsporen orientieren kann, sowie an der Größe der in Schritt 2 gewonnenen Übereinstimmungsparameter.

3.8 Fotodokumentation der gewonnenen Arten

Von den 49 Kulturen wurden jeweils makroskopische und mikroskopische Aufnahmen festgehalten. Die Lichtmikroskopie umfasst Bilddokumentationen bei 100-, 500- und 1100-facher Vergrößerung. Dabei wurde mit der Tesafilmabklatschmethode präpariert. Für die makroskopische und mikroskopische Dokumentation der Kulturen des mikrobiologischen Teils der Doktorarbeit wurde eine digitale Mikroskopkamera der Firma Optic Axis verwendet. Die Lichtmikroskopie wurde mit einem Leitz Ortholux 2 durchgeführt. Im REM wurde für jede der 49 Arten eine umfassende Dokumentation durch die Bildbearbeitung durchgeführt. Vergrößerungen wurden je nach Sporenart von 50-facher bis maximal 50000-facher gewählt. Die Dokumentation der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit einem Bildverarbeitungssystem der Firma Point Electronic. Die nachfolgende **Abb. 3.10** gibt am Beispiel des *Alternaria alternata*, *Paecilomyces fulva* sowie des *Ulocladium chartarum* die Vorgehensweise der Dokumentation wieder. Weitere Beispiele können **Abb. 8.3** bis **Abb. 8.5** entnommen werden.

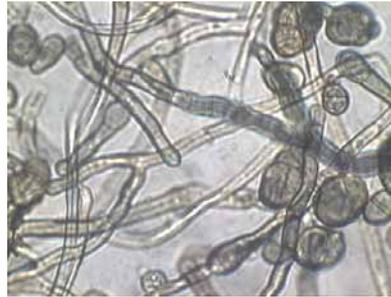
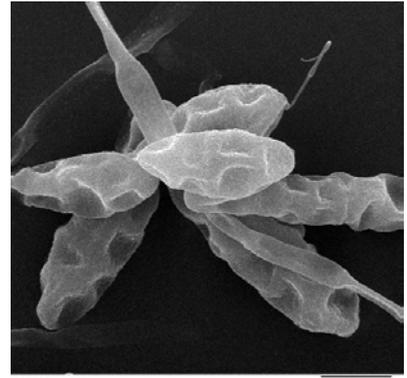
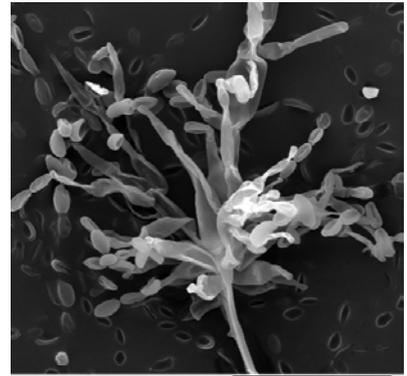
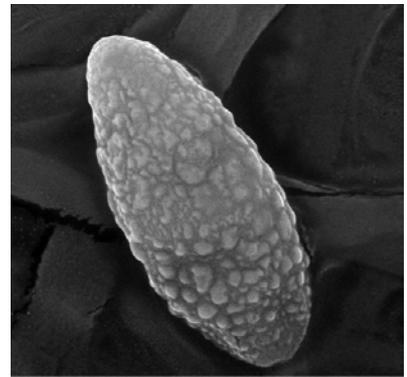
Kultur: *Alternaria alternata**Alternaria alternata*, LM $\times 1100$ *Alternaria alternata*, REM $\times 2000$ (KPP)Kultur: *Paecilomyces fulva**Paecilomyces fulva*, LM $\times 500$ *Paecilomyces fulva*, REM $\times 1500$ (KPP)Kultur: *Ulocladium chartarum**Ulocladium chartarum*, LM $\times 1100$ *Ulocladium chartarum*, REM $\times 6000$ (KPP)

Abb. 3.10: Beispiele der makroskopischen (links), der lichtmikroskopischen (Mitte) und der rasterelektronenmikroskopischen (rechts) als Fotodokumentation der Arten *Alternaria alternata* (oben), *Paecilomyces fulva* (Mitte), *Ulocladium chartarum* (unten).

4 Ergebnisse

4.1 Rasterelektronenmikroskopische Zuordnung von Schimmelpilzsporen

4.1.1 Referenzkatalog mit den Summenparametern der 49 Sporenarten (Schritt 1)

In der Übersicht **Abb. 3.9** ist als Schritt 1 die Gewinnung von Summenparametern für die Sporen des Referenzkataloges angegeben. **Abb. 3.8** zeigt hierzu beispielhaft die morphologische Charakterisierung für drei der im REM untersuchten Sporenarten. In **Tab. 4.1** sind die innerhalb des Referenzkataloges erfolgten Einordnungen der jeweils 30 Sporen jeder der 49 Arten zu den in **Abschnitt 3.6.1** beschriebenen 61 Klassen dargestellt. Nachfolgend sind noch einmal die verwendeten Parameter und die Anzahl der zugehörigen Klassen aufgeführt.

1. maximaler Durchmesser D_{\max}	5 Klassen
2. Form	18 Klassen
3. Vakuumdefekte	5 Klassen
4. Art der Oberflächenstrukturen	14 Klassen
5. Größe der Oberflächenstrukturen	5 Klassen
6. Art der Verbindungsstellen	10 Klassen
7. Größe der Verbindungsstellen	4 Klassen
<hr/>	
Summe:	61 Klassen

Der mit diesen sieben Parametern und ihren klassierten Ausprägungen konstruierte Referenzkatalog würde eine Gesamtzahl von $5 \times 18 \times 5 \times 14 \times 5 \times 10 \times 4 = 1,26$ Millionen unterschiedlichen Kombinationen ermöglichen. Dabei ist das zusätzlich erfasste Verhältnis D_{\max}/D_{\min} , das teilweise auch durch den Form-Parameter beschrieben wird, noch nicht berücksichtigt.

Da bei der Klasseneinteilung der Merkmalsausprägungen unbedingt auf die Eindeutigkeit der Zuordnung zu achten ist und daher Doppelnennungen wie "Ei" und "oval" unbedingt vermieden werden müssen, wurden nicht ausreichend voneinander abgrenzbare Klassen im Nachhinein zusammengelegt. Die Eingruppierung in die Vakuumklassen wurde nach den in **Abschnitt 4.6** beschriebenen Reproduzierbarkeitsuntersuchungen aufgegeben. Die Kombination der für diese Merkmale im Vergleich mit einer unbekanntes Spore ermittelten Übereinstimmungsparameter mit Werten zwischen 0 bei fehlender und 1 bei vollständiger Übereinstimmung erfolgt multiplikativ, d. h. für jedes der Merkmale werden diese mit den entsprechenden Parametern der übrigen Merkmale multipliziert.

4.1.2 Zuordnung der Einzelsporen der 49 Sporenarten des Referenzkataloges (Schritt 2)

Als zweiter Schritt in **Abb. 3.9** ist die Zuordnung von bekannten und unbekanntem Einzelsporen zu den 49 Sporenarten des Referenzkataloges beschrieben. Dabei ergibt der Vergleich der 30 Einzelsporen einer der Sporenarten des Referenzkataloges mit den Summenparametern in der Regel, zumindest für einen Teil der Sporen, mehrere Zuordnungen (**Tab. 4.2**). Wie durch das Zuordnungsmodell beabsichtigt werden dabei in der Diagonalen, d.h. zu den Summenparametern der eigenen Art, stets alle 30 Sporen zugeordnet (grau unterlegt).

Als Beispiel sei hier der Schimmelpilz *Aspergillus niger* (S1) erwähnt, der sich mit allen 30 Sporen selbst erkennt. Darüber hinaus folgen weitere Zuweisungen z.B. zur Sporenart S41 (*Eurotium chevalieri*) mit 3 Sporen und zur Sporenart 11 (*Epicoccum spezies*) mit 2 Sporen.

Es lassen sich lediglich 3 Sporenarten vollständig von den anderen Sporenarten unterscheiden. Im einzelnen sind dies die Sporenart S6 (*Aspergillus terreus*), S9 (*Trichothecium roseum*) und S34 (*Thermoactinomyces vulgaris*).

Ein eindeutiges Häufigkeitsmaximum für die identische Zuordnung besteht bei 20 der 49 Katalogsporenarten. Als eindeutig zuordenbar wird dabei eine Wiedererkennungsrate von 20 der 30 untersuchten Sporen festgelegt. Zur statistischen Grundlage der Unterscheidung der Sporenarten auf Grund der Häufigkeit Ihrer Zuordnungen der Binomialverteilung siehe **Tab. 8.2**.

Für vier Paare von zwei Schimmelpilzarten sowie für eine Dreiergruppe thermophiler Actinomyceten stimmt die Häufigkeitsverteilung der Zuordnungen soweit überein, dass eine Unterscheidung zwischen ihnen nicht möglich ist. Im einzelnen sind dies die Paare S5 (*Aspergillus ochraceus*) und S7 (*Emericella unguis*), S22 (*Aspergillus versicolor*) und S33 (*Wallemia sebi*), S4 (*Emericella nidulans*) und S47 (*Aspergillus sydowii*), S19 (*Rhizomucor miehei*) und S20 (*Rhizomucor pusillus*) und die Dreiergruppe S35 (*Saccharopolyspora rectivirgula*), S37 (*Thermoactinomyces species*) und S38 (*Thermomonospora alba*). Im Vergleich mit den Zuordnungen einer unbekanntem Einzelspore (**Abb. 3.9**, links unten) lassen diese Häufigkeitsverteilungen eine mehr oder weniger gute Übereinstimmung erkennen. Hierbei charakterisieren die Häufigkeiten dieser Zuordnung die Sporenarten besser als die in **Tab. 4.1** dargestellten Summenparameter selbst.

4.1.3 Auswahl der Spore mit der besten Übereinstimmung (Schritt 3)

Als Schritt 3 in **Abb. 3.9** hat für die eindeutige Zuordnung einer Einzelspore die Auswahl der Sporenart mit der besten Übereinstimmung des Zustimmungsmuster zu erfolgen. Eine eindeutige Zuordnung für Einzelsporen zu einer der 49 Sporenarten wird dabei durch eine Kombination der folgenden drei Auswahlkriterien erreicht:

- A** Anzahl der mit der unbekanntes Spore übereinstimmend zugeordneten Sporenarten
- B** Prozentanteil der mit der unbekanntes Spore übereinstimmend zugeordneten Einzelsporen
- C** Quantitative Bewertung des Grades der Übereinstimmung einer jeden Zuordnung.

Diese Kriterien wurden mit unterschiedlicher Priorität in drei Modellen für die Zuordnung der 30 Einzelsporen der 49 Sporenarten des Kataloges getestet (**Tab. 4.3**).

Im einzelnen wurden folgende Prioritäten gewählt:

Modell 1: **A > B > C**

Modell 2: **A > C > B**

Modell 3: **C > A > B**

Das Modell 1 bewertet z.B. Kriterium A am höchsten. Kriterien B und C sind nachrangig.

4.2 Sensitivität und Spezifität der Zuordnung

In **Tab. 4.3** wird für die jeweils 30 Sporen der 49 Arten des Referenzkatalogs die Gesamtzahl aller Zuordnungen sowie der "richtig positiven Zuordnung" (RP) als Maß für die Sensitivität (SE) und die Zahl der "falsch positiven Zuordnung" (FP) Zuordnung als Maß für die Spezifität (SP) bestimmt. Ausgehend von den jeweils 1440 Sporen der 48 übrigen Arten wurden je Art 0 bis 30 richtig positive und 0 bis 86 falsch positive Zuordnungen beobachtet. Zwischen den 3 Modellen bestanden dabei zum Teil erhebliche Unterschiede.

Eine Sensitivität von $SE \geq 80\%$ ($RP \geq 24$) wurde nach Modell 1 für 20, nach Modell 2 und 3 für 18 der 49 Sporenarten erzielt sowie 24 Mal mit wenigstens einem der 3 Modelle. Bezogen auf die große Anzahl von 1470 Prüfungen resultieren stets hohe Spezifitäten zwischen $SP = 94\%$ ($FP = 86$) und $SP = 100\%$ ($FP = 0$).

Tab. 4.3: Zahl der Zuordnungen insgesamt sowie der richtig positiven (RP) und der falsch positiven (FP) Zuordnungen der 30 Sporen einer jeden der 49 Sporenarten des Referenzkataloges zu den Summenparametern.

Sporenart	Bezeichnung nach der DSMZ	Gattungsgruppe	Gesamt Zuordnungen Modell			Zuordnungen RP Modell			Zuordnungen FP Modell		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
S1	<i>Aspergillus niger</i>	a	32	53	83	27	26	26	5	27	57
S2	<i>Aspergillus flavus</i>	a	9	22	24	9	21	21	0	1	3
S3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	a	114	15	15	30	12	12	84	3	3
S4	<i>Emericella nidulans</i>	a	0	63	63	0	22	22	0	41	41
S5	<i>Aspergillus ochraceus</i>	a	115	34	42	29	13	13	86	21	29
S6	<i>Aspergillus terreus</i>	a	30	30	30	30	30	30	0	0	0
S7	<i>Emericella unguis</i>	a	0	26	26	0	9	9	0	17	17
S8	<i>Penicillium chrysogenum</i>	p	79	40	40	29	21	21	50	19	19
S9	<i>Trichothecium roseum</i>	s	30	30	30	30	30	30	0	0	0
S10	<i>Botrytis cinerea</i>	s	30	30	31	30	30	30	0	0	1
S11	<i>Epicoccum sp.</i>	s	2	13	9	1	7	3	1	6	6
S12	<i>Neurospora crassa</i>	s	13	24	27	13	20	20	0	4	7
S13	<i>Alternaria alternata</i>	s	25	32	32	25	28	28	0	4	4
S14	<i>Absidia corymbifera</i>	m	11	19	21	9	13	12	2	6	9
S15	<i>Fusarium solani</i>	f	73	17	15	23	11	9	50	6	6
S16	<i>Penicillium spinulosum</i>	p	30	30	37	30	30	30	0	0	7
S17	<i>Penicillium expansum</i>	p	33	39	39	21	27	27	12	12	12
S18	<i>Aspergillus parasiticus</i>	a	60	19	18	19	11	10	41	8	8
S19	<i>Rhizomucor miehei</i>	m	73	34	35	30	20	20	43	14	15
S20	<i>Rhizomucor pusillus</i>	m	10	29	29	8	22	22	2	7	7
S21	<i>Penicillium verrucosum</i>	p	13	15	6	0	3	1	13	12	5
S22	<i>Aspergillus versicolor</i>	a	0	1	1	0	1	1	0	0	0
S23	<i>Paecilomyces fulva</i>	s	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S24	<i>Penicillium glabrum</i>	p	6	20	14	6	14	10	0	6	4
S25	<i>Fusarium oxysporum</i>	f	14	32	32	13	24	24	1	8	8
S26	<i>Stachybotrys chartarum</i>	s	31	31	31	30	30	30	1	1	1
S27	<i>Rhizopus microsporus</i>	m	56	10	10	29	7	7	27	3	3
S28	<i>Aureobasidium pullularia</i>	s	0	42	42	0	21	21	0	21	21
S29	<i>Lecytophora hoffmannii</i>	s	66	15	15	29	9	9	37	6	6
S30	<i>Acremonium strictum</i>	s	18	73	73	8	30	30	10	43	43
S31	<i>Penicillium brevicompactum</i>	p	15	47	56	3	20	20	12	27	36
S32	<i>Ustilago esculante</i>	u	31	21	19	16	15	14	15	6	5
S33	<i>Wallemia sebi</i>	s	0	90	92	0	27	27	0	63	65
S34	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	t	30	30	30	30	30	30	0	0	0
S35	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	t	3	3	3	1	1	1	2	2	2
S36	<i>Saccharomonospora viridis</i>	t	21	21	21	21	21	21	0	0	0
S37	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	t	92	92	92	30	30	30	62	62	62
S38	<i>Thermomonospora alba</i>	t	4	4	4	3	3	3	1	1	1
S39	<i>Eurotium chevalieri</i>	a	11	23	17	10	17	13	1	6	4
S40	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	c	33	64	61	22	30	30	11	34	31
S41	<i>Eurotium amstelodani</i>	a	2	29	9	1	7	3	1	22	6
S42	<i>Eurotium rubrum</i>	a	49	29	20	30	23	16	19	6	4
S43	<i>Mucor racemosus</i>	m	31	29	32	30	29	29	1	0	3
S44	<i>Phoma glomerata</i>	s	35	7	6	11	1	1	24	6	5
S45	<i>Ulocladium chartarum</i>	s	35	28	28	30	26	26	5	2	2
S46	<i>Humicola fuscoatra</i>	s	5	39	37	4	23	21	1	16	16
S47	<i>Aspergillus sydowii</i>	a	41	17	16	16	9	8	25	8	8
S48	<i>Cladosporium herbarum</i>	c	32	32	31	30	30	30	2	2	1
S49	<i>Doratomyces microsporus</i>	s	27	27	26	26	27	26	1	0	0
Summe			1470	1470	1470	822	911	877	648	559	593

In **Tab. 4.4** ist für die 30 Einzelsporen der 49 Sporenarten des Referenzkataloges die Gesamtheit aller richtig positiven Zuordnungen als Maß für die Sensitivität und die falsch positiven Zuordnungen Zahl als Maß für die Spezifität getrennt nach den 3 in **Abschnitt 4.1.3** vorgestellten Modellen den 8 Gattungsgruppen zugeordnet. Die Einordnung lediglich in 1 der 8 Gruppen von Sporengattungen ergab in Modell 1 eine Sensitivität von SE = 49 % bis 87 %, in Modell 2 von SE = 52 % bis 100 % und in Modell 3 von SE = 47 % bis 100 %. Die Spezifität ergab für alle drei Modelle stets hohe Werte zwischen SP = 76 % bis 100 %. Beispielsweise lassen sich 49 % der Penicillium Sporen einer Spezifität von SP = 93 %, richtig positiv mit Modell 1 zuordnen. Dagegen ordnet Modell 3 sogar 61% der zuordenbaren Penicillium Sporen bei einer Spezifität von SP = 94 %, richtig positiv zu. Erfreulich hohe "richtig positive" Wiedererkennungsraten lagen bei den Cladosporien vor. Modell 1 zeigte eine Sensitivität von SE = 87%, Modell 2 und 3 hatte eine 100%-ige Sensitivität bezüglich der Zuordnung zu den Gattungsklassen.

Tab. 4.4: Sensitivität (SE) und die Zahl der richtig positiven Zuordnungen (RP) sowie Spezifität (SP) und die Zahl der falsch positiven Zuordnungen (FP) von 30 Sporen einer jeden der 49 Kulturen des Referenzkataloges zu einer der acht Gattungsgruppen.

Nr.	Bezeichnung	Gattungsgruppe	Anzahl der Arten	Einzelsporen je Gattungsgruppe	Modell 1		Modell 2		Modell 3	
					RP (SE)	FP (SP)	RP (SE)	FP (SP)	RP (SE)	FP (SP)
1	Aspergillus, Emericella, Eurotium	a	13	390	201 (52%)	262 (76%)	201 (52%)	160 (85%)	184 (47%)	180 (83%)
2	Cladosporium	c	2	60	52 (87%)	13 (99%)	60 (100%)	36 (97%)	60 (100%)	32 (98%)
3	Fusarium	f	2	60	36 (60%)	51 (96%)	35 (58%)	14 (99%)	33 (55%)	14 (99%)
4	Zygomyceten	m	5	150	106 (71%)	75 (94%)	91 (61%)	30 (98%)	90 (60%)	37 (97%)
5	Penicillien	p	6	180	89 (49%)	87 (93%)	115 (64%)	76 (94%)	109 (61%)	83 (94%)
6	Sonstige	s	15	450	237 (53%)	80 (92%)	309 (69%)	172 (83%)	302 (67%)	178 (83%)
7	Thermophile Actinomyceten	t	5	150	85 (57%)	65 (95%)	85 (57%)	65 (95%)	85 (57%)	65 (95%)
8	Ustilago esculante	u	1	30	16 (53%)	15 (99%)	15 (50%)	6 (100%)	14 (47%)	4 (100%)
Summe			49	1470	822	648	911	559	877	593

4.3 Nachweis von Sporen beim Sammeln von Hausmüll

Die Auswertungen von insgesamt 178 Sporen auf Filtern, die beim Sammeln von Hausmüll beaufschlagt und mit dem in **Abschnitt 3.7** vorgestellten Algorithmus dem Referenzkatalogsporenarten zugeordnet wurden zeigt **Tab. 4.5**. 39 der 178 Einzelsporen konnten nicht zugewiesen werden, was einem Anteil an "nicht zuordenbaren Sporen" von 22 % entspricht.

Tab. 4.5: Zuweisung von 178 Einzelsporen aus der Hausmüllsammlung zu den 49 Arten des Referenzkataloges und Vergleich der Unterschiede in den Zuordnungen bei den 3 Modellen mit den entsprechenden Unterschieden bei der Gesamtzuordnung nach **Tab. 4.3**.

Sporenart	Bezeichnung nach der DSMZ	Gattungsgruppe	Hausmüll Modell			Referenzkatalog (siehe Tab. 4.3) Modell		
			1	2	3	1	2	3
S1	<i>Aspergillus niger</i>	a	2	4	5	32	53	83
S2	<i>Aspergillus flavus</i>	a	5	17	20	9	22	24
S3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	a	21	3	3	114	15	15
S4	<i>Emericella nidulans</i>	a	0	0	0	0	63	63
S5	<i>Aspergillus ochraceus</i>	a	1	1	1	115	34	42
S6	<i>Aspergillus terreus</i>	a	0	0	0	30	30	30
S7	<i>Emericella unguis</i>	a	0	0	0	0	26	26
S8	<i>Penicillium chrysogenum</i>	p	10	6	5	79	40	40
S9	<i>Trichothecium roseum</i>	s	0	0	0	30	30	30
S10	<i>Botrytis cinerea</i>	s	0	0	0	30	30	31
S11	<i>Epicoccum</i> sp.	s	0	0	0	2	13	9
S12	<i>Neurospora crassa</i>	s	3	3	5	13	24	27
S13	<i>Alternaria alternata</i>	s	0	0	0	25	32	32
S14	<i>Absidia corymbifera</i>	m	1	4	3	11	19	21
S15	<i>Fusarium solani</i>	f	4	3	2	73	17	15
S16	<i>Penicillium spinulosum</i>	p	0	0	0	30	30	37
S17	<i>Penicillium expansum</i>	p	7	6	6	33	39	39
S18	<i>Aspergillus parasiticus</i>	a	2	1	1	60	19	18
S19	<i>Rhizomucor miehei</i>	m	13	4	4	73	34	35
S20	<i>Rhizomucor pusillus</i>	m	4	6	6	10	29	29
S21	<i>Penicillium verrucosum</i>	p	14	1	0	13	15	6
S22	<i>Aspergillus versicolor</i>	a	0	1	1	0	1	1
S23	<i>Paecilomyces fulva</i>	s	0	0	0	0	0	0
S24	<i>Penicillium glabrum</i>	p	0	0	0	6	20	14
S25	<i>Fusarium oxysporum</i>	f	2	3	3	14	32	32
S26	<i>Stachybotrys chartarum</i>	s	0	0	0	31	31	31
S27	<i>Rhizopus microsporus</i>	m	9	0	0	56	10	10
S28	<i>Aureobasidium pullularia</i>	s	2	9	9	0	42	42
S29	<i>Lecythopora hoffmannii</i>	s	4	3	3	66	15	15
S30	<i>Acremonium strictum</i>	s	0	1	1	18	73	73
S31	<i>Penicillium brevicompactum</i>	p	5	11	12	15	47	56
S32	<i>Ustilago esculante</i>	u	18	16	14	31	21	19
S33	<i>Wallemia sebi</i>	s	0	17	17	0	90	92
S34	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	t	0	0	0	30	30	30
S35	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	t	0	0	0	3	3	3
S36	<i>Saccharomonospora viridis</i>	t	1	1	1	21	21	21
S37	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	t	0	0	0	92	92	92
S38	<i>Thermomonospora alba</i>	t	0	0	0	4	4	4
S39	<i>Eurotium chevalieri</i>	a	2	2	2	11	23	17
S40	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	c	3	3	3	33	64	61
S41	<i>Eurotium amstelodani</i>	a	0	1	0	2	29	9
S42	<i>Eurotium rubrum</i>	a	0	0	0	49	29	20
S43	<i>Mucor racemosus</i>	m	2	2	2	31	29	32
S44	<i>Phoma glomerata</i>	s	1	0	0	35	7	6
S45	<i>Ulocladium chartarum</i>	s	0	0	0	35	28	28
S46	<i>Humicola fuscoatra</i>	s	1	8	9	5	39	37
S47	<i>Aspergillus sydowii</i>	a	0	0	0	41	17	16
S48	<i>Cladosporium herbarum</i>	c	1	1	1	32	32	31
S49	<i>Doratomyces microsporus</i>	s	1	1	0	27	27	26
Summe der zugeordneten Sporen			139	139	139	1470	1470	1470
Summe der nicht zugeordneten Sporen			39	39	39	0	0	0
Gesamtsporen			178	178	178	1470	1470	1470

Bei den insgesamt getroffenen Zuordnungen (RP + FP) der aus den Messungen beim Sammeln von Haus- und Biomüll angetroffenen unbekanntem Einzelsporen nach **Tab. 4.5** zu den 49 Katalogsporenarten zeigen sich erneut wie in **Tab. 4.3** charakteristische Unterschiede zwischen den 3 Modellen. Für insgesamt 11 Sporenarten (**Tab. 4.5**, grau unterlegt), bei denen mit wenigstens einem der Modelle mehr als 8 Sporen beobachtet wurden, erfolgt ein Vergleich mit den Gesamtzuordnungen der **Tab 4.3**. Dabei wird der beim Übergang von Modell 1 zu Modell 2 oder 3 beobachtete Trend eines Anstiegs oder Abfalls 10 Mal übereinstimmend beobachtet. Die für die zufällig zusammengestellten 49 Sporenarten beobachteten Verhältnisse zwischen den 3 Modellen werden demnach auch für reale Arbeitsplatzsituationen beobachtet.

Die nachfolgende **Tab. 4.6** stellt die Zuweisungen (absolut und prozentual) der 178 Einzelsporen aus der Hausmüllsammlung zu den Sporenartenarten des Referenzkataloges, geordnet nach 8 Sporengattungen und dem Anteil an "nicht zuordenbaren Sporen" dar.

Tab. 4.6: Zuweisung von 178 Einzelsporen aus der Hausmüllsammlung zu 1 der 8 Gattungsgruppen und Anteil an "nicht zuordenbaren Sporen".

Nr.	Bezeichnung	Gattungsgruppe	Gesamtanzahl an Zuordnungen		
			Modell		
			1	2	3
1	Aspergillus, Emericella, Eurotium	a	33 (19%)	30 (17%)	33 (19%)
2	Cladosporium	c	4 (2%)	4 (2%)	4 (2%)
3	Fusarium	f	6 (3%)	6 (3%)	5 (3%)
4	Zygomyceten	m	29 (16%)	16 (9%)	15 (8%)
5	Penicillien	p	36 (20%)	24 (14%)	23 (13%)
6	Sonstige	s	12 (7%)	42 (24%)	44 (25%)
7	Thermophile Actinomyceten	t	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)
8	Ustilago esculante	u	18 (10%)	16 (9%)	14 (8%)
9	nicht zuordenbare Sporen		39 (22%)	39 (22%)	39 (22%)
Summe			178	178	178

4.4 Nachweis von Sporen beim Öffnen der Biotonne

4.4.1 Sporenkonzentration

Es wurden drei Einzelmessungen auf Nucleoporefiltern durchgeführt. Dabei wurde beim Öffnen der Biotonne zusammen 104 auswertbare Sporen gefunden. Es ergaben sich Sporenkonzentrationen zwischen $2,6 \times 10^5$ bis $6,6 \times 10^5$ Sporen pro m^3 Luft (**Tab. 4.7**). Damit liegen die Sporenkonzentrationen knapp oberhalb der im Bereich der Wertstoffsartierung und Abfallbehandlung empfohlenen Höchstgrenze von ≤ 50000 KBE/ m^3 . Beim Schütteln der Biotonne in (**Tab. 4.7**, 3. Zeile) war keine gravierende Erhöhung der Sporenkonzentration ersichtlich. Der Vergleich zur Außenluft lässt eine um ca. 3 Zehnerpotenzen höhere Belastung mit Schimmelpilzsporen erkennen. Nach [Kämpfer und Weissenfels 1997] beträgt die Außenluftkonzentration von Pilzsporen zwischen 100 und 1000 KBE/ m^3 Luft.

Tab. 4.7: Drei Messungen der Sporenkonzentration an der Biotonne. Die 3. Messung enthält die gefundenen Sporen nach vorherigem Schütteln der Biotonne (worst case). Die angegebenen Konzentrationen resultieren für eine effektive Filterfläche von 360 mm^2 und eine Zählfeldfläche von $0,00266 \text{ mm}^2$ und das jeweils angesaugte Volumen von 3,9 l.

Messung Nr.	Probenahmeort und -jahr	Zahl der abgesuchten Gesichtsfelder	Gesamtzahl aller Sporen	Zahl der Aggregate	Gesamtsporen in Aggregatform (Sporen je Aggregat)	Sporenkonzentration Anzahl/ m^3
1	Biotonne 1998	250	45	2	6 (3,3)	658000
2	Biotonne 1999	350	25	2	15 (12,3)	261000
3	Biotonne 1999 worst case	350	34	1	17 (17)	355000

4.4.2 Zugewiesene Sporenarten

Es wurden alle 104 Einzelsporen der bei den 3 Messungen beobachteten Sporen gleichzeitig eingelezen. Bei der Zuordnung der Einzelsporen zu den Sporenarten des Referenzkataloges konnten 31 nicht zugeordnet werden. Dies entspricht einem Anteil an "nicht zuordenbaren Sporen" von 30 %.

Anzumerken ist, dass der maßgebliche Einfluss auf das Ergebnis der Zuordnung von den Aggregaten ausgehen kann. Dies gilt insbesondere für Cladosporien und Actinomyceten. So wurde auf Filter 1 und 3 ein einziges Aggregat beobachtet, das alle 16 ausgewiesenen thermophilen Actinomyceten und allen 14 Sporen der Klasse der Cladosporien enthält.

Erneut stimmen die Unterschiede zwischen den 3 Modellen, die auf größeren Sporenzahlen beruhen, mit den in **Tab. 4.3** für die Sporen des Referenzkataloges beobachteten Unterschiede überein (**Tab. 4.8**, grau unterlegte Fläche). Beispiele für die an der Biotonne gesammelten Sporen können dem Anhang entnommen werden (**Abb. 8.6**).

Tab. 4.8: Zuweisung von 104 beim Sammeln der Luft oberhalb der Biotonne gewonnenen Einzelsporen zu den 49 Sporenarten des Referenzkataloges und Vergleich der Unterschiede in den Zuordnungen bei den 3 Modellen mit den entsprechenden Unterschieden bei der Gesamtzuordnung nach **Tab. 4.3**.

Sporenart	Bezeichnung nach der DSMZ	Gattungsgruppe	Biotonne Modell			Referenzkatalog (siehe Tab. 4.3) Modell - Tab. 4.3		
			1	2	3	1	2	3
S1	<i>Aspergillus niger</i>	a	0	1	1	32	53	83
S2	<i>Aspergillus flavus</i>	a	0	0	0	9	22	24
S3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	a	2	0	0	114	15	15
S4	<i>Emericella nidulans</i>	a	0	0	0	0	63	63
S5	<i>Aspergillus ochraceus</i>	a	1	1	1	115	34	42
S6	<i>Aspergillus terreus</i>	a	0	0	0	30	30	30
S7	<i>Emericella unguis</i>	a	0	0	0	0	26	26
S8	<i>Penicillium chrysogenum</i>	p	1	0	0	79	40	40
S9	<i>Trichothecium roseum</i>	s	0	0	0	30	30	30
S10	<i>Botrytis cinerea</i>	s	3	3	3	30	30	31
S11	<i>Epicoccum</i> sp.	s	0	0	0	2	13	9
S12	<i>Neurospora crassa</i>	s	1	1	2	13	24	27
S13	<i>Alternaria alternata</i>	s	0	0	0	25	32	32
S14	<i>Absidia corymbifera</i>	m	0	0	0	11	19	21
S15	<i>Fusarium solani</i>	f	6	2	1	73	17	15
S16	<i>Penicillium spinulosum</i>	p	0	0	0	30	30	37
S17	<i>Penicillium expansum</i>	p	0	0	0	33	39	39
S18	<i>Aspergillus parasiticus</i>	a	2	0	0	60	19	18
S19	<i>Rhizomucor miehei</i>	m	10	3	3	73	34	35
S20	<i>Rhizomucor pusillus</i>	m	1	5	5	10	29	29
S21	<i>Penicillium verrucosum</i>	p	0	3	1	13	15	6
S22	<i>Aspergillus versicolor</i>	a	0	0	0	0	1	1
S23	<i>Paecilomyces fulva</i>	s	0	0	0	0	0	0
S24	<i>Penicillium glabrum</i>	p	0	0	0	6	20	14
S25	<i>Fusarium oxysporum</i>	f	1	2	2	14	32	32
S26	<i>Stachybotrys chartarum</i>	s	0	0	0	31	31	31
S27	<i>Rhizopus microsporus</i>	m	2	0	0	56	10	10
S28	<i>Aureobasidium pullularia</i>	s	0	7	7	0	42	42
S29	<i>Lecythopora hoffmannii</i>	s	10	4	4	66	15	15
S30	<i>Acremonium strictum</i>	s	0	5	5	18	73	73
S31	<i>Penicillium brevicompactum</i>	p	1	0	2	15	47	56
S32	<i>Ustilago esculante</i>	u	0	0	0	31	21	19
S33	<i>Wallemia sebi</i>	s	0	3	3	0	90	92
S34	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	t	16	16	16	30	30	30
S35	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	t	0	0	0	3	3	3
S36	<i>Saccharomonospora viridis</i>	t	0	0	0	21	21	21
S37	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	t	0	0	0	92	92	92
S38	<i>Thermomonospora alba</i>	t	0	0	0	4	4	4
S39	<i>Eurotium chevalieri</i>	a	2	2	2	11	23	17
S40	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	c	9	10	10	33	64	61
S41	<i>Eurotium amstelodani</i>	a	0	1	1	2	29	9
S42	<i>Eurotium rubrum</i>	a	0	0	0	49	29	20
S43	<i>Mucor racemosus</i>	m	0	0	0	31	29	32
S44	<i>Phoma glomerata</i>	s	1	0	0	35	7	6
S45	<i>Ulocladium chartarum</i>	s	0	0	0	35	28	28
S46	<i>Humicola fuscoatra</i>	s	0	0	0	5	39	37
S47	<i>Aspergillus sydowii</i>	a	0	0	0	41	17	16
S48	<i>Cladosporium herbarum</i>	c	4	4	4	32	32	31
S49	<i>Doratomyces microsporus</i>	s	0	0	0	27	27	26
Summe der zugeordneten Sporen			73	73	73	1470	1470	1470
Summe der nicht zugeordneten Sporen			31	31	31	0	0	0
Gesamtsporen			104	104	104	1470	1470	1470

Tab. 4.9: Zuweisung von 104 Einzelsporen aus einer Biotonnensammlung zu 1 der 8 Gattungsgruppen und Anteil an "nicht zuordenbaren Sporen".

Nr.	Bezeichnung	Gattungsgruppe	Gesamt Zuordnungen n		
			Modell		
			1	2	3
1	Aspergillus, Emericella, Eurotium	a	7 (7%)	5 (5%)	5 (5%)
2	Cladosporium	c	13 (13%)	14 (13%)	14 (13%)
3	Fusarium	f	7 (7%)	4 (4%)	3 (3%)
4	Zygomyceten	m	13 (13%)	8 (8%)	8 (8%)
5	Penicillien	p	2 (2%)	3 (3%)	3 (3%)
6	Sonstige	s	15 (14%)	23 (22%)	0 (0%)
7	Thermophile Actinomyceten	t	16 (15%)	16 (15%)	16 (15%)
8	Ustilago esculante	u	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
9	nicht zuordenbare Sporen		31 (30%)	31 (30%)	31 (30%)
Summe			104	104	104

4.5 Charakterisierung der Partikelbelegung bei Kernporenfiltern

4.5.1 Sporenähnliche organische und anorganische Partikel

Die REM-Auswertung der beim Sammeln von Hausmüll beaufschlagten Filter zeigt, dass eine Vielzahl von Partikeln in der Waschflüssigkeit der indirekten BIA-Methode (**Abschnitt 1.7.2**) enthalten sind (**Abb. 4.1**).

Gefunden wurden neben den Sporen insbesondere auch anorganische Materialien, die mit Hilfe der EDX als solche erkannt werden konnten. Identifizierte Partikel (sofern abgrenzbar) waren u.a. morphologisch abgrenzbare Staubpartikel unterschiedlicher Zusammensetzung, Eisenkügelchen, natriumchlorid-, silizium- und magnesiumhaltige Partikel. Als eindeutig anorganisch wurden Elemente bezeichnet, bei denen ein hoher und schnell ansteigender Peak mindestens eines Elementes mit einer Ordnungszahl ≥ 11 (Natrium) zu verzeichnen war. Allerdings konnte die Kontamination einer Spore mit anorganischem Material nicht immer eindeutig von einem anorganischen Partikel unterschieden werden. In solchen Fällen wurde auch das morphologische Bild des Partikels in die Entscheidung mit einbezogen. So könnte **Abb. 4.1**, rechts unten durchaus auch als eine Spore mit Kontamination durch Natriumchlorid angesehen werden. Dabei zeigte sich eine besondere Schwierigkeit Sporen auszuwerten, die am Rande einer größeren Teilchensammlung liegen. Anorganisch kugelige Objekte ließen sich meist durch ihre größere Helligkeit im REM unter Mithilfe der EDX gut unterscheiden. Das Fehlen von Vakuumdefekten erleichtert es ebenfalls die Sporen von anorganischen Partikeln zu unterscheiden.

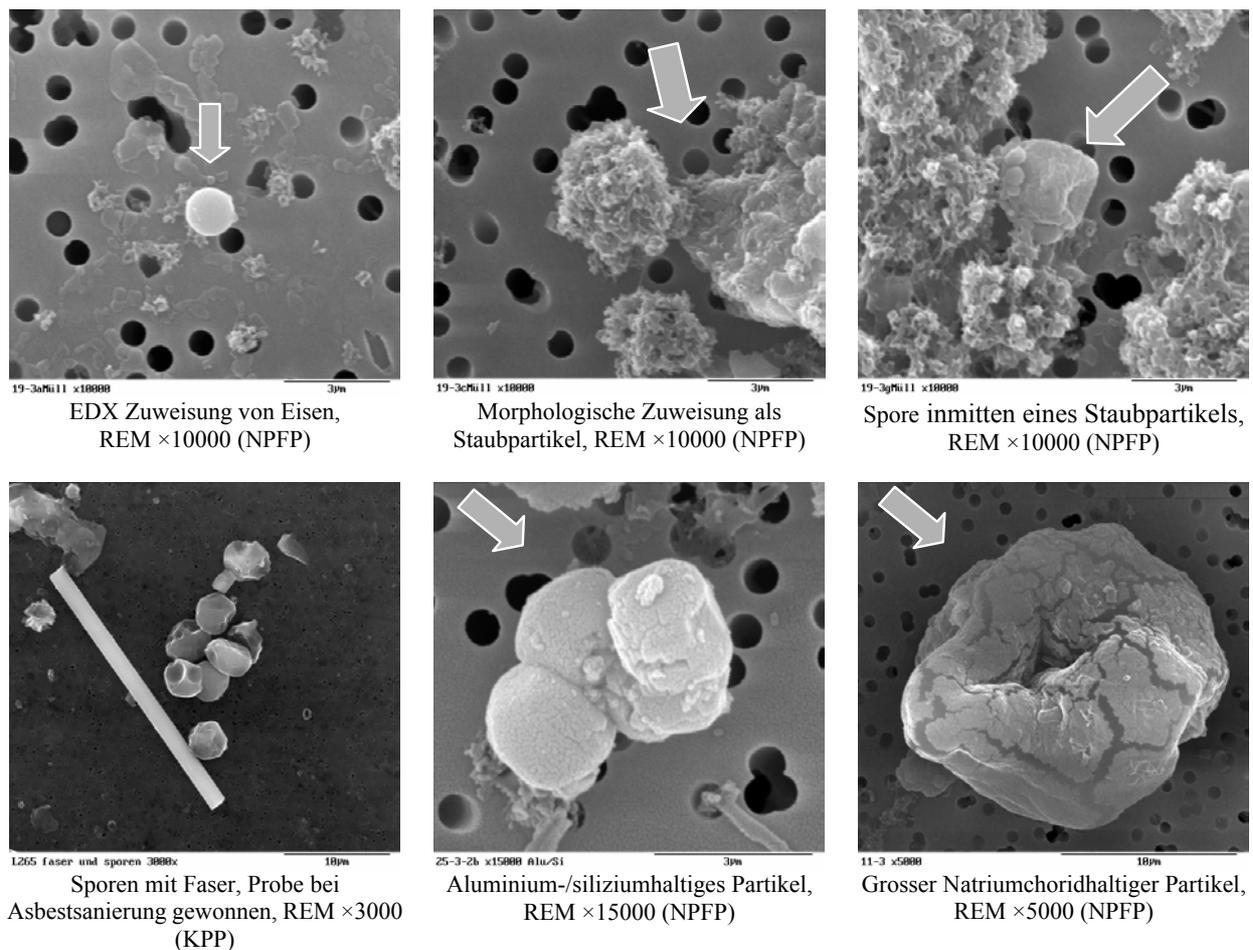


Abb. 4.1: Im Müllversuch gefundene sporenhähnliche und sporenhaltende Partikel.

4.5.2 Sporenaggregate: Sporenketten und Sporenhaufen

Die am Arbeitsplatz beaufschlagten Filter sind nicht nur mit Einzelsporen und anorganischen Teilchen, sondern auch mit Aggregaten von Sporen belegt. Zur Zuweisung kommen Einzelsporen homogener Aggregate von Sporenketten und Sporenhaufen (**Abb. 4.3**, oben links und unten links) sowie heterogene Aggregate (Mischformen von Partikeln anorganischen und organischer Herkunft, z. B. Tierepithelien und Sporen unterschiedlicher Morphologie (**Abb. 4.2**, oben Mitte und unten Mitte rechts). Dabei wurde bereits eine Anzahl von ≥ 2 Sporen als Aggregat definiert.

Für die beim Sammeln von Hausmüll beaufschlagten Filter war die Belegung zunächst durch Abspülen in Suspension gebracht worden. Bei der Auswertung der aus dieser Suspension indirekt beaufschlagten Filter wurden sämtliche Sporen eines Aggregates einzeln ausgezählt und zugeordnet. Die Aggregate sowie die dazugehörigen Gesichtsfelder, in denen die Sporen und Aggregate lagen, wurden dabei nicht separat aufgeführt. Dies lag unter anderem an der ungleichmäßigen Belegung der Filter, die beim Einsammeln von Hausmüll gewonnen wurden.

Im Unterschied dazu war bei der Auswertung der an der Biotonne direkt beaufschlagten Filter das Vorhandensein von Aggregaten jedoch weitaus auffälliger. Das Auswerteverfahren wurde daher insofern modifiziert, als neben den Sporen und den dazugehörigen Gesichtsfeldern auch die Zuordnung der Sporen zu den Aggregaten dokumentiert wurde (vgl. **Tab. 3.1**). Bei der Auswertung der Filter von den Biotonnen konnten demnach auch quantitative Aussagen über das Vorkommen von Aggregaten zusätzlich zur Konzentration aller Einzelsporen je m^3 Luft getroffen werden (**Tab. 4.7**). Bei den 3 Messungen beim Öffnen der Biotonne wurden demnach 38 der

insgesamt 104 zugewiesenen Sporen in 5 Aggregaten angetroffen. Das kleinste der Aggregate enthielt 3, das größte 17 Sporen. Ihre Zusammensetzung erschien als homogen. Beispiele für "heterogene" Sporenhaufen auch bei der Auswertung an der Biotonne zeigen **Abb. 4.2**, Mitte oben mit der Ansammlung von 3 in sich homogenen untereinander aber unterschiedlichen Sporenarten und **Abb. 4.2**, rechts unten mit 3 nebeneinander liegenden morphologisch deutlich unterschiedlichen Sporen.

Die Auswertung der beim Sammeln von Hausmüll beaufschlagten Filter zeigte dagegen häufiger auch heterogene Sporenaggregate, die vermutlich durch die Zusammenlagerung von unterschiedlichen Einzelsporen bei der Filtration aus der Suspension entstanden sind. Dagegen dürften die ursprünglich vorhandenen Aggregate durch den Abwaschvorgang vermehrt auseinander gebrochen sein. Hinzu kommt, dass auch zahlreiche anorganische Partikel vorhanden waren, die bei 2000-facher Vergrößerung nur schwer z. B. von den Sporen thermophiler Actinomyceten mit Abmessungen $< 1,5 \mu\text{m}$ unterschieden werden konnten. Von einigen Autoren werden daher Sporen mit einem Durchmesser $\leq 1,5 \mu\text{m}$ per definitionem der Gruppe der thermophilen Actinomyceten oder anderer Bakterien zugerechnet [Eduard et al. 1990].

Ein weiteres Problem der Auszählung ergab sich darüber hinaus bei größeren oder übereinander gestapelten Aggregaten (**Abb. 4.2**, rechts oben und **Abb. 4.3**). Hierbei war es oftmals unmöglich, die genaue Zahl der Sporen festzustellen. Insgesamt kann die für die Auswertung an der Biotonne beobachtete ausgeprägte Aggregatbildung durch die Ergebnisse von Karlsson und Malmberg für thermophile Actinomyceten bestätigt werden.

Neben eindeutigen Ketten und Anhäufungen homogener Sporen (**Abb. 4.2**, links oben und unten) werden heterogene Sporenhaufen beobachtet. So zeigt **Abb. 4.2**, Mitte oben drei unterschiedliche, in sich aber homogene Sporenarten (durch unterschiedliche Farbpfleile markiert), die möglicherweise von drei Aggregaten herrühren. Es muss offen bleiben, ob diese bereits in der Luft oder aber erst auf dem Filter zusammengetroffen sind. In **Abb. 4.2**, links unten handelt es sich dagegen klar erkennbar um drei nebeneinander liegende unterschiedliche Sporen.

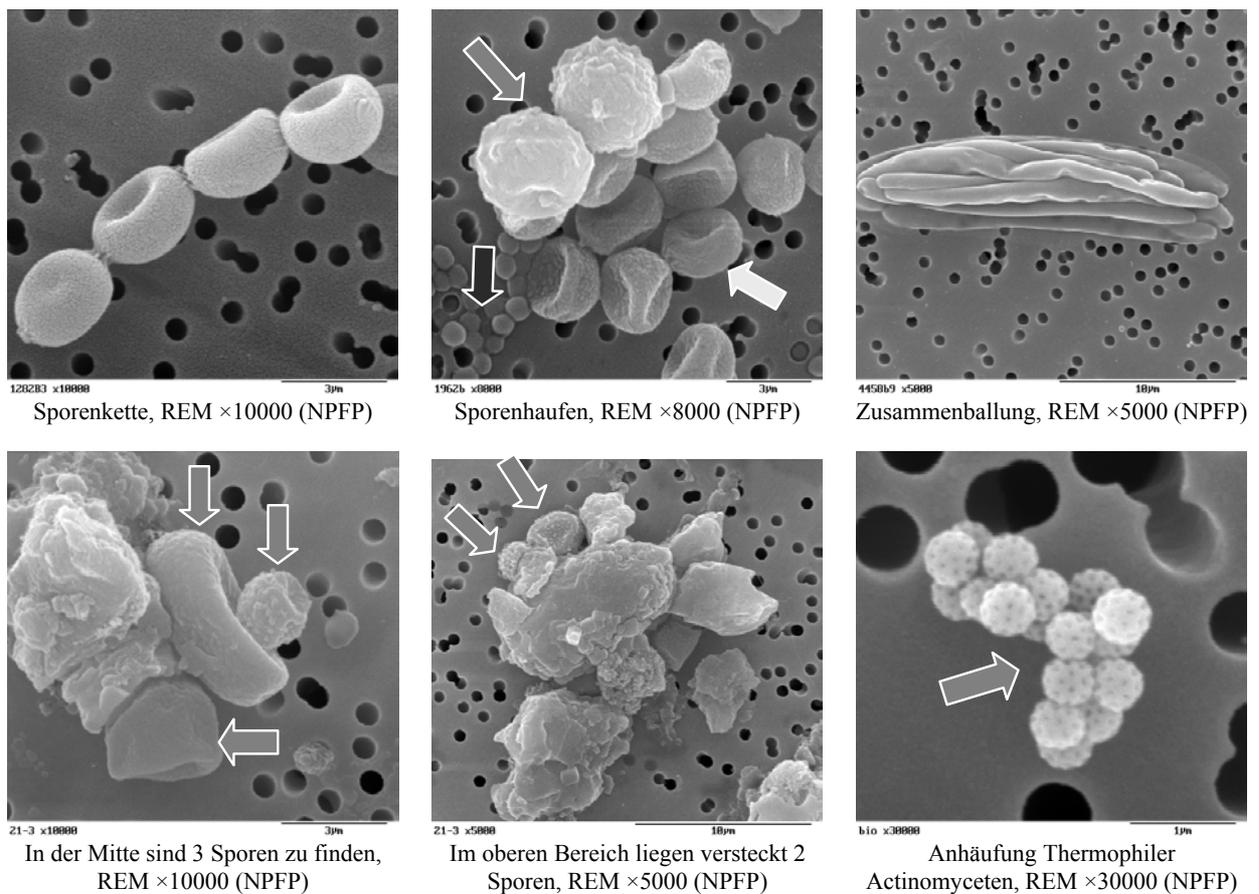


Abb. 4.2: Beispiele der im REM gefundenen Aggregate von Sporen (obere Reihe: dem Referenzkatalog entnommen, links und Mitte unten: Filterproben aus Hausmüllsammung, rechts unten: Filterproben aus Biomüllsammung).

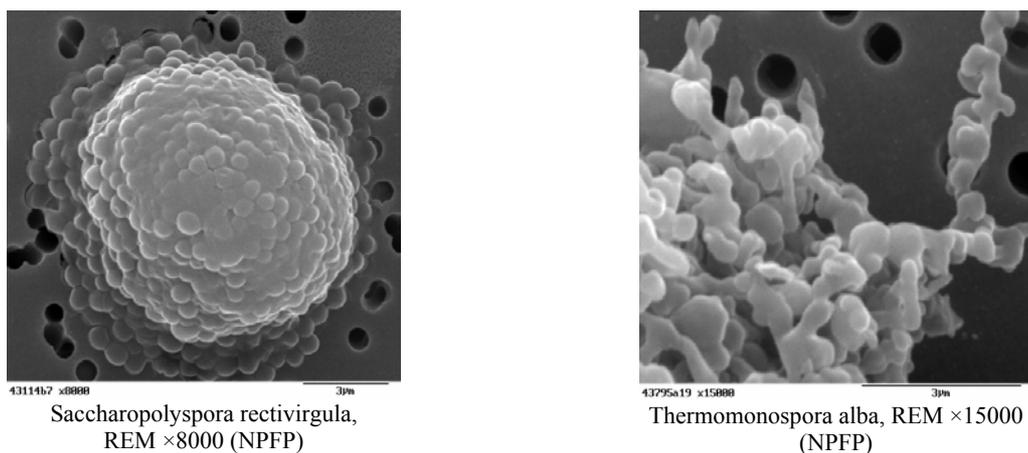


Abb. 4.3: Beispiele der Aggregatbildung bei den thermophilen Actinomyceten im REM. Die Filter wurden bei der Erstellung des Referenzkataloges erstellt.

4.6 Pleomorphismustest bzw. Reproduzierbarkeitsuntersuchung

In einem Pleomorphismustest wurden für 2 der 49 Sporenarten, *Aspergillus niger* und *Penicillium expansum*, zusätzlich zu den für die Erstellung des Kataloges durchgeführten Untersuchungen jeweils 11 weitere Anzüchtungen von Kolonien auf unterschiedlichen Nährböden durchgeführt, darunter erneut auch das für die Erstellung des Kataloges verwendete Standardnährmedium Sabouraud Agar. Wie in **Abschnitt 3.6.1** bereits erwähnt schlug die Anzüchtung des *Penicillium expansum* (P9) fehl. Insgesamt wurden daher zusätzlich 630 Sporen ausgewertet. **Tab. 4.10** für *Aspergillus niger* in Anlehnung an **Tab. 4.1** die Ergebnisse der Zuordnung von den jeweils 30 Einzelsporen für die 11 Nährmedien.

Dargestellt sind die Ergebnisse der morphologischen Auswertung der 330 Sporen des Schimmelpilzes *Aspergillus niger* gemäß Schritt 1 der Methode in Anlehnung an **Tab. 4.1**. Zur Vereinfachung sind solche Klassen weggelassen worden, für die es keine Zuweisung gab. In die Summenberechnung geht der *Aspergillus niger* des Referenzkataloges (S1) nicht mit ein. Er ist zum Vergleich in der obersten Zeile aufgeführt.

Tab. 4.10: Morphologische Auswertung für *Aspergillus niger* und *Penicillium expansum* von je 30 Sporen für die Nährböden P1 bis P11. Zum Vergleich sind die Summenparameter des *Aspergillus niger* und *Penicillium expansum* aus dem Referenzkatalog mit aufgeführt. Die Nährböden P1 bis P11 sind in **Tab. 2.2** aufgeführt.

	D _{max} [µm]	Form					Vakuum					Oberfläche					Verbindung																				
		ec	hi	ku	ov	so	sr	0	1	2	3	be	fa	gl	oh	ow	ra	sn	wa	Größe [µm]	Größe [µm]	Größe [µm]	ag	kf	kr	rr	sl	0	0,1-0,4	0,5-0,9	≥1						
<i>Aspergillus niger</i>	SI	29	1	3	8	8	0	3	24	3	0	3	1	1	0	0	2	0	1	25	5	1	0	0	24	7	10	0	2	3	19	0	2	9			
	P1	29	1	3	0	6	1	5	15	2	25	2	1	0	0	0	0	0	29	1	0	0	0	29	0	0	19	0	0	2	9	7	14	0			
	P2	30	0	2	0	9	1	11	7	9	19	0	2	0	0	0	0	0	28	2	0	0	0	28	0	0	19	0	0	2	9	0	21	0	0		
	P3	30	0	0	0	9	0	6	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	30	0	0	17	0	0	0	13	0	17	0	0		
	P4	30	0	1	0	9	7	12	1	12	17	0	1	0	0	0	0	0	25	5	0	0	0	24	0	0	10	0	0	3	17	0	12	1	1	0	
	P5	29	1	0	0	12	4	9	5	9	21	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	30	0	0	17	0	0	0	13	0	17	0	0	0	
	P6	28	2	2	0	7	4	11	6	4	23	1	2	0	0	0	0	0	28	2	0	0	0	28	0	0	20	0	0	2	8	0	22	0	0		
	P7	30	0	0	0	11	9	4	6	16	12	2	0	0	0	0	0	0	26	4	0	0	0	26	0	0	14	0	0	0	16	0	14	0	0	0	
	P8	30	0	0	0	10	9	10	1	16	13	1	0	0	0	0	0	0	29	1	0	0	0	29	0	0	12	0	0	0	18	0	12	0	0	0	
	P9	30	0	0	0	13	4	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	3	0	0	0	27	0	0	13	0	1	0	17	0	13	0	0	0	
	P10	30	0	0	0	11	2	8	9	13	17	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	30	0	0	11	0	0	0	19	0	11	0	0	0	
P11	29	1	0	0	17	3	4	6	19	11	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	30	0	0	18	0	0	0	12	0	18	0	0	0		
Summe	325	5	8	0	114	44	89	75	100	158	6	6	0	0	3	1	2	12	0	312	18	0	1	311	0	0	170	0	1	9	151	7	171	1	1		
<i>Penicillium expansum</i>	SI	30	0	1	0	2	15	10	2	1	12	16	1	19	0	0	11	0	0	0	30	0	0	0	0	0	24	0	0	0	6	18	6	0	0		
	P1	30	0	1	0	2	15	11	1	1	12	16	1	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	25	0	0	0	5	19	6	0	0		
	P2	30	0	1	0	1	18	8	2	5	15	9	1	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	27	0	0	0	3	26	1	0	0	0	
	P3	30	0	1	0	3	18	6	2	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	23	0	0	0	8	21	1	0	0	0	
	P4	30	0	1	0	0	22	6	1	7	14	8	1	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	24	0	0	0	5	19	6	0	0	0	
	P5	30	0	0	0	1	27	2	0	12	8	10	0	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	25	0	0	0	5	11	14	0	0	0	
	P6	30	0	0	0	0	30	0	0	6	14	10	0	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	28	0	0	0	2	27	1	0	0	0	
	P7	30	0	0	0	1	19	9	1	6	14	10	0	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	27	0	0	0	3	26	1	0	0	0	
	P8	30	0	1	0	0	19	7	3	4	15	9	2	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	27	0	0	0	3	18	9	0	0	0	
	P9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P10	30	0	1	0	1	17	9	2	5	11	11	3	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	23	0	0	0	7	22	1	0	0	0	
P11	30	0	0	0	0	30	0	0	12	11	7	0	30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	24	0	0	0	6	21	3	0	0	0		
Summe	300	0	6	0	9	215	58	12	58	114	90	8	300	0	0	0	0	0	0	300	0	0	0	0	0	253	0	0	0	47	210	43	0	0	0		

Tab 4.10, oben lässt erkennen, dass die im Vergleich zwischen der Katalogspore des *Aspergillus niger* und allen 11 Nährmedien P1 bis P11 des *Aspergillus niger* zwar ein hoher Grad an Übereinstimmung der "warzigen" Oberflächenstruktur auf sämtlichen Nährmedien vorhanden ist, dass aber insbesondere bezüglich der Größe der Oberfläche und Auftreten von Vakuumdefekten wesentliche Abweichungen zu verzeichnen sind. So ließen sich nahezu keinem der Sporen des Referenzkataloges Dellen beobachten (Vakuum "0"). Die meisten Sporen der Pleomorphismus-Auswertungen wiesen jedoch 1 Delle auf (Vakuum "1"). Die Sporengröße D_{\max} liegt bei fast allen *Aspergillus*-Sporen im Bereich zwischen 2 μm und 5 μm . Der Oberflächenstruktur kommt für die Zuordnung zum Referenzkatalog die größte Bedeutung zu.

Tab. 4.10, unten zeigt die morphologische Auswertung des Schimmelpilzes *Penicillium expansum* für 300 Sporen. Zur Vereinfachung wurden auch hier auf die Darstellung derjenigen Klassen verzichtet, bei denen keinerlei Zuweisungen zu verzeichnen waren. Auf dem Nährmedium P9 (BP Brilliant Grün Phenolrot) gab es kein Wachstum.

Alle Sporen wiesen maximale Durchmesser von $D_{\max} = 2 \mu\text{m}$ bis 5 μm auf. Eine prozentuale Häufung von "ovalen" Formen liegt vor. Die meisten Sporen weisen eine Delle auf. Unterschiede sind bei der Oberflächenbeschreibung zu erkennen. Während in der Katalogauswertung eine Reihe von Sporen (ca. 30 %) mit einer "feinen Ornamentierung" beschrieben wurden, wurde im Pleomorphismusversuch fast ausschließlich eine "beulige" Oberfläche zugewiesen. Bei der Größe der Oberfläche sowie der Verbindungen gab es kaum Abweichungen zu den Katalogsporenauswertungen.

In **Tab. 4.11** und **Tab. 4.12** werden für die Untersuchungen P1 bis P11 die richtig positiven Zuweisungen, einerseits zu den beiden Sporenarten (*Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*) und andererseits zu der diese umfassenden Sporenklasse der Aspergillen und Penicillien, bestimmt. Das hier verwendete Zuordnungsprogramm berücksichtigte die Vakuumdefekte nicht mehr.

Tab. 4.11 zeigt bei Zuweisung der 330 Einzelsporen des *Aspergillus niger* zur exakten Sporenart *Aspergillus niger* eine schlechte Wiedererkennungsrates für alle drei Modelle. Es werden lediglich 0 bis 20 richtig positive Zuordnungen getroffen. Statt dessen erfolgten Zuordnungen insbesondere zu einer weiteren *Aspergillus* Art (*Aspergillus parasiticus*), der morphologisch dem *Aspergillus niger* sehr nahe steht. Bei Zusammenfassung beider *Aspergillus*-Arten ergeben sich daher richtig positive Zuweisungen von jeweils 19 bis 29 Sporen. Bei Zuordnung zur Gattungsgruppe a (*Aspergillen*, *Emericella* und *Eurotium*) ergibt sich für alle drei Modelle stets ein hoher Anteil (83 % bzw. 100 %) richtig positiver Zuweisungen.

Entsprechend ergibt die Zuordnung der 300 Sporen der Auswertungen P1 bis P11 des *Penicillium expansum* nach **Tab. 4.12** Wiedererkennungsraten mit den drei Modellen von 2 bis 28 richtig positiv zugeordneten Sporen zum *Penicillium expansum* des Referenzkataloges. Auch hier zeigt sich, dass stattdessen ebenfalls ein morphologisch verwandter Schimmelpilz der Gattung *Penicillium* (*Penicillium chrysogenum*) zugewiesen wird (vgl. **Abschnitt 5.2** und **5.3**). Beide *Penicillien* zusammengefasst ergeben stets eine Zuordnung von 23 bis 30 Sporen. Die Zuordnung zur Gattung der *Penicillien* ergibt 83 % bis 100 % richtig positive Zuordnung.

Die morphologischen Sporenbilder der beiden Schimmelpilzarten des Pleomorphismusversuches sind den Übersichtsabbildungen im Anhang zu entnehmen (**Abb. 8.1** und **8.2**).

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Bewertung der Messergebnisse

5.1.1 Sensitivität und Spezifität der Zuordnung

Die nach **Tab. 4.3** beobachteten Sensitivitäten und Spezifitäten für die Zuordnung der 49×30 Einzelsporen zu den 49 Arten des durch sie gebildeten Referenzkataloges mit den 3 Zuordnungsmodellen nach **Abschnitt 4.1.3** sind nur für einen Teil der Sporenarten des Kataloges zufrieden stellend. Entscheidend für die Güte der Zuordnung ist die Kombination einer hohen Sensitivität, d.h. eines großen Anteils richtig positiver Ergebnisse unter den 30 Sporen einer Art, mit einer kleinen Zahl falsch positiver Ergebnisse als Resultat einer hohen Spezifität. **Tab. 5.1** zeigt hierzu die aus **Tab. 4.3** gebildete Klassierung der 49 Sporenarten nach der Zahl der richtig und falsch positiven Zuordnungen.

Tab. 5.1: Klassierung der 49 Sporenarten nach der Zahl der richtig (RP) und falsch positiven Zuordnungen (FP) für die jeweils 30 Einzelsporen.

Modell 1						
	FP					Summe
	≥24	15-23	10-14	6-9	≤5	
≥24	7	1	0	0	12	20
20-23	1	0	2	0	1	4
RP 15-19	2	1	0	0	0	3
10-14	1	0	0	0	3	4
<10	0	0	3	0	15	18
Summe	11	2	5	0	31	49

Modell 2						
	FP					Summe
	≥24	15-23	10-14	6-9	≤5	
≥24	5	0	1	1	11	18
20-23	2	3	1	2	3	11
RP 15-19	0	0	0	2	0	2
10-14	0	1	0	4	1	6
<10	0	2	1	4	5	12
Summe	7	6	3	13	20	49

Modell 3						
	FP					Summe
	≥24	15-23	10-14	6-9	≤5	
≥24	5	0	1	2	10	18
20-23	2	4	0	2	2	10
RP 15-19	0	0	0	0	1	1
10-14	1	0	0	2	4	7
<10	0	1	0	5	7	13
Summe	8	5	1	11	24	49

So werden in den 3 Mehrfeldertafeln beispielhaft diejenigen Klassen der Sporenarten durch Grenzlinien abgeteilt, bei denen eine Mindestzahl von wenigstens 15 richtig positiven Zuordnungen einer gegenüber dieser Anzahl niedrigeren Zahl von falsch positiven Zuordnungen gegenübersteht. Felder, in denen diese Bedingung nur teilweise erfüllt ist, sind lediglich durch eine gestrichelte Linie abgegrenzt. Für diese Kombinationen ist dann gewährleistet, dass einerseits die Sporen der jeweiligen Art mit einer Wahrscheinlichkeit $\geq 50\%$ auch tatsächlich dieser Art zugeordnet werden und dass andererseits unter den insgesamt dieser Art zugeordneten Sporen wenigstens 50 % richtig zugeordnet wurden. Diese Bedingungen werden durch alle Sporenarten der mit fett gedruckten Strichen abgetrennten Felder erfüllt, und zwar insgesamt - einschließlich der gestrichelten Felder - durch 18 Sporenarten nach Modell 1, 23 Sporenarten nach Modell 2 und 21 Sporenarten nach Modell 3. Im einzelnen handelt es sich hierbei um die in **Tab. 5.2** gekennzeichneten Arten.

Tab. 5.2: Sporenarten für die wenigstens 50 % bzw. wenigstens 80 % (von 30 Sporen) richtig positiv zugeordnet werden und bei denen wenigstens 50 % bzw. 75 % der insgesamt zugeordneten Sporen als richtig positiv anzusehen sind (jeweils dünne bzw. dicke Rahmenlinie und Schraffur).

Sporenart	Bezeichnung der Kultur nach deufr DSMZ	Gattungsgruppe	Gesamt Zuordnungen Modell			Richtig positive Zuordn. Modell			Falsch positive Zuordn. Modell		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
S1	Aspergillus niger	a	32	53	83	27	26	26	5	27	57
S2	Aspergillus flavus	a	9	22	24	9	21	21	0	1	3
S3	Aspergillus fumigatus	a	114	15	15	30	12	12	84	3	3
S4	Emericella nidulans	a	0	63	63	0	22	22	0	41	41
S5	Aspergillus ochraceus	a	115	34	42	29	13	13	86	21	29
S6	Aspergillus terreus	a	30	30	30	30	30	30	0	0	0
S7	Emericella unguis	a	0	26	26	0	9	9	0	17	17
S8	Penicillium chrysogenum	p	79	40	40	29	21	21	50	19	19
S9	Trichothecium roseum	s	30	30	30	30	30	30	0	0	0
S10	Botrytis cinerea	s	30	30	31	30	30	30	0	0	1
S11	Epicoecum sp.	s	2	13	9	1	7	3	1	6	6
S12	Neurospora crassa	s	13	24	27	13	20	20	0	4	7
S13	Alternaria alternata	s	25	32	32	25	28	28	0	4	4
S14	Absidia corymbifera	m	11	19	21	9	13	12	2	6	9
S15	Fusarium solani	f	73	17	15	23	11	9	50	6	6
S16	Penicillium spinulosum	p	30	30	37	30	30	30	0	0	7
S17	Penicillium expansum	p	33	39	39	21	27	27	12	12	12
S18	Aspergillus parasiticus	a	60	19	18	19	11	10	41	8	8
S19	Rhizomucor miehei	m	73	34	35	30	20	20	43	14	15
S20	Rhizomucor pusillus	m	10	29	29	8	22	22	2	7	7
S21	Penicillium verrucosum	p	13	15	6	0	3	1	13	12	5
S22	Aspergillus versicolor	a	0	1	1	0	1	1	0	0	0
S23	Paecilomyces fulva	s	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S24	Penicillium glabrum	p	6	20	14	6	14	10	0	6	4
S25	Fusarium oxysporum	f	14	32	32	13	24	24	1	8	8
S26	Stachybotrys chartarum	s	31	31	31	30	30	30	1	1	1
S27	Rhizopus microsporus	m	56	10	10	29	7	7	27	3	3
S28	Aureobasidium pullularia	s	0	42	42	0	21	21	0	21	21
S29	Lecythopora hoffmannii	s	66	15	15	29	9	9	37	6	6
S30	Acremonium strictum	s	18	73	73	8	30	30	10	43	43
S31	Penicillium brevicompactum	p	15	47	56	3	20	20	12	27	36
S32	Ustilago esculante	u	31	21	19	16	15	14	15	6	5
S33	Wallemia sebi	s	0	90	92	0	27	27	0	63	65
S34	Thermoactinomyces vulgaris	t	30	30	30	30	30	30	0	0	0
S35	Saccharopolyspora rectivirgula	t	3	3	3	1	1	1	2	2	2
S36	Saccharomonospora viridis	t	21	21	21	21	21	21	0	0	0
S37	Thermoactinomyces sp.	t	92	92	92	30	30	30	62	62	62
S38	Thermomonospora alba	t	4	4	4	3	3	3	1	1	1
S39	Eurotium chevalieri	a	11	23	17	10	17	13	1	6	4
S40	Cladosporium cladosporioides	c	33	64	61	22	30	30	11	34	31
S41	Eurotium amstelodani	a	2	29	9	1	7	3	1	22	6
S42	Eurotium rubrum	a	49	29	20	30	23	16	19	6	4
S43	Mucor racemosus	m	31	29	32	30	29	29	1	0	3
S44	Phoma glomerata	s	35	7	6	11	1	1	24	6	5
S45	Ulocladium chartarum	s	35	28	28	30	26	26	5	2	2
S46	Humicola fuscoatra	s	5	39	37	4	23	21	1	16	16
S47	Aspergillus sydowii	a	41	17	16	16	9	8	25	8	8
S48	Cladosporium herbarum	c	32	32	31	30	30	30	2	2	1
S49	Doratomyces microsporus	s	27	27	26	26	27	26	1	0	0
Summe			1470	1470	1470	822	911	877	648	559	593

Erneut werden hierbei die Unterschiede zwischen den drei Modellen sichtbar. Während z. B. für *Aspergillus niger* die Mindestanforderungen an eine Zuordnung nur mit Hilfe von Modell 1 erreicht werden, und zwar mit einer Wahrscheinlichkeit $\geq 80\%$, kann die Zuordnung von *Aspergillus flavus* nur mit Modell 2 und 3 erfolgen, wenn auch nur mit einer Wahrscheinlichkeit $\geq 50\%$. Insgesamt werden mit $RP \geq 50\%$ und $FP \leq 50\%$ 26 Arten durch wenigstens eines der drei Modelle zugeordnet, aber nur 12 Arten mit $RP \geq 80\%$ und $FP \leq 25\%$. Dabei ist zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit eine verbesserte Eingrenzung der Vertrauensbereiche für die Sensitivität und Spezifität der Zuordnung der Schimmelpilz- und Actinomyceten-Sporen gegenüber der vorläufigen Auswertung mit jeweils nur 10 Sporen [Rödelsperger et al. 2000]

erreicht werden konnte. Ein Vergleich zwischen den 95%-Konfidenzintervallen beider Auswertungen ist dem Anhang (**Tab. 8.2**) zu entnehmen. Demnach würde das 95%-Konfidenzintervall für eine Sensitivität von 100 % von ≥ 69 % für 10 Zuordnungen auf ≥ 88 % für 30 Zuordnungen eingegrenzt.

5.2 Repräsentativität der Katalogsporen für die Verhältnisse am Arbeitsplatz

Um die Repräsentativität der Sporenarten des Referenzkataloges für die Verhältnisse am Arbeitsplatz zu gewährleisten, wurde bei seiner Zusammenstellung darauf geachtet, dass die bei Arbeitsplatzmessungen mit der MSC/REM-Methode z.B. in der Landwirtschaft hauptsächlich angetroffenen Sporenarten [Karlsson und Malmberg 1989] auch Berücksichtigung fanden, vgl. **Abschnitt 2.1, 8.1 und 8.2**. Die Autoren identifizierten in erster Linie Sporen der Gattung *Penicillium*, *Aspergillus* und der thermophilen Actinomyceten, wobei letztere nicht weiter untergliedert wurden. 19 der ca. 50 bis zur Art identifizierten Sporen der Schimmelpilze wurden in den Referenzkatalog aufgenommen. Laut [Tossavainen et al 2000] enthält der hier verwendete Referenzkatalog 19 Schimmelpilzarten, die bei Messungen im REM im Finish Institut of Occupational Health in ihrem Institut häufig gesehen werden.

Entsprechend führen die hier durchgeführten Messungen am Arbeitsplatz bei 78 % der beim Sammeln von Hausmüll und bei 70 % der an der Biotonne angetroffenen Sporen zu einer Zuordnung. Hinzu kommt, dass die für die einzelnen Sporenarten beobachteten Unterschiede zwischen den 3 Modellen in der Zahl der insgesamt, d.h. richtig und falsch positiv zugeordneten Sporen auch bei den am Arbeitsplatz angetroffenen Sporen eindrucksvoll sichtbar werden (**Tab. 4.5 und 4.8**). So wird der von den Katalogsporen zwischen den drei Modellen 11- bzw. 6-mal vorgegebene Trend 10-mal bzw. 6-mal bestätigt ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,02$, jeweils mit dem Vorzeichentest von Dixon und Mood). Schließlich befinden sich auch die beim Sammeln von Hausmüll beobachteten Zuweisungen bezüglich des *Aspergillus fumigatus* in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von [Balfanz, J. et al. 2000]. Weitergehende Vergleiche anderer Schimmelpilze aus dem Referenzkatalog mit den Ergebnissen der Schimmelpilzbelastung beim Sammeln von Hausmüll waren nicht möglich, da lediglich der *Aspergillus fumigatus* als Leitkeim exakt bestimmt wurde. Im Gegensatz dazu erscheinen die geringen Anteile der Zuweisungen von *Aspergillen* und *Penicillien* bei den Messungen an der Biotonne nicht als repräsentativ. Dies ist jedoch bereits aufgrund der geringen Zahl von nur drei Probenahmen an einer Biotonne und der geringen Anzahl von nur 104 ausgewerteten Sporen zu erwarten, zumal diese noch in Aggregaten von bis zu 14 Sporen zusammenhängen.

5.3 Untersuchungen zum Pleomorphismus

Die Richtigkeit der bisher gemachten Bewertungen werden durch die Pleomorphismus-Untersuchungen (**Abschnitt 4.6**) teilweise in Frage gestellt. Zwar lässt der für die Schimmelpilzarten *Aspergillus niger* und *Penicillium expansum* durchgeführte Vergleich von insgesamt 11 unterschiedlichen Nährmedien keinen entscheidenden Einfluss der Wachstumsbedingungen der Kolonien auf die Morphologie der Sporen erkennen. Jedoch führen diese 11 für jede der beiden Sporenarten im Nachgang zur Erstellung und Anwendung des Referenzkataloges durchgeführten Wiederholungsmessungen - darunter jeweils auch eine erneute Messung an dem für die Erstellung des Referenzkataloges verwendeten Nährmedium - zu deutlichen Abweichungen von den Ergebnissen der **Tab. 4.3 bzw. 5.2**.

So ergeben sich nach **Tab. 4.11** für *Aspergillus niger* folgende Beobachtungen. Für die Zuweisung zu *Aspergillus niger* liefert

Modell 1: an Stelle von 27 richtig positiven Zuweisungen nach **Tab. 4.3** im Median nur 1 (Bereich zwischen 0 und 2) richtig positive Zuweisung.

Modell 2: an Stelle von 26 richtig positiven Zuweisungen nach **Tab. 4.3** im Median nur 10 (Bereich zwischen 6 und 19) richtig positive Zuweisungen.

Modell 3: an Stelle von 26 richtig positiven Zuweisungen nach **Tab. 4.3** im Median nur 11 (Bereich zwischen 6 und 20) richtig positive Zuweisungen.

Dabei erfolgt die Zuweisung überwiegend zu den morphologisch ähnlichen Sporen des *Aspergillus parasiticus*. Für die Zuweisung zu *Aspergillus parasiticus* ergibt

Modell 1: im Median 27 (Bereich zwischen 20 und 30) richtig positive Zuweisungen.

Modell 2: im Median 27 (Bereich jeweils zwischen 19 und 29) richtig positive Zuweisungen.

Modell 3: im Median 27 (Bereich jeweils zwischen 19 und 29) richtig positive Zuweisungen.

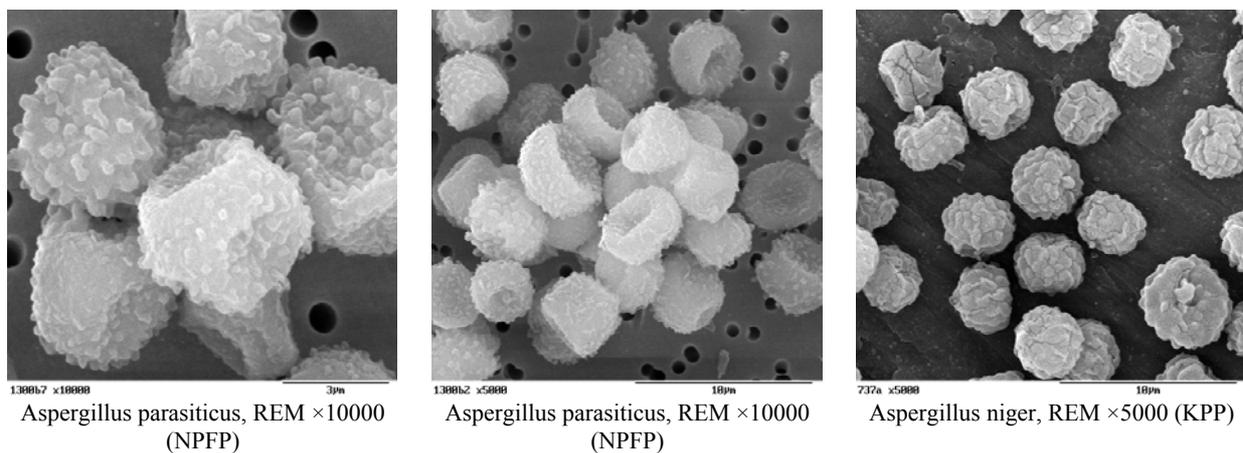


Abb. 5.1: Vergleichende Abbildungen des *Aspergillus parasiticus* (links und Mitte) und des *Aspergillus niger* (rechts)

Als ursächlich erweisen sich scheinbar geringe Unterschiede in der morphologischen Beschreibung der Oberflächenstruktur. Zwar wird diese in ihrer Form übereinstimmend als warzig beschrieben (**Tab. 4.10**), jedoch wurde bei Erstellung des Referenzkataloges 24-mal die als Oberflächengröße $\geq 0,8 \mu\text{m}$ angenommen, dagegen bei den Pleomorphismus-Untersuchungen als Oberflächengröße 24-mal bis 30-mal $0,5$ bis $0,7 \mu\text{m}$.

In **Abb. 8.1** sind Beispiele von *Aspergillus niger* Sporen des Pleomorphisversuches zu sehen. Diese lassen den Schluss zu, dass die Oberfläche auf dem Sabouraud Agar und dem Kochblut Agar eine eher feinere Ornamentierung aufweist als auf den übrigen Nährmedien, bei denen eher warzige Oberflächenstrukturen zum Vorschein kommen. Im konkreten Fall war es im REM nicht immer klar möglich, die Oberflächenstruktur eindeutig als warzig, beulig oder fein ornamentiert zu beschreiben. Je nach Anschnitt der Spore auf dem Filter können Oberflächenstrukturen wie auch Formen durchaus mehreren Klassen zugeordnet werden. Die erforderliche Eindeutigkeit bei der Beschreibung ist somit in vielen Fällen nicht gegeben. Zusammenlegungen verschiedener Einteilungskriterien führten hier zum Teil bereits zu Verbesserungen. Dennoch sind eingehende weiterführende Untersuchungen bezüglich der Beschreibungskriterien erforderlich.

Für *Penicillium expansum* sind nach **Tab. 4.12** folgende Beobachtungen festzuhalten. Für die Zuweisung zu *Penicillium expansum* liefert

Modell 1: an Stelle von jeweils 30 richtig positiven Zuweisungen im Median nur 8 (Bereich zwischen 2 und 15) richtig positive Zuweisungen.

Modell 2: an Stelle von jeweils 30 richtig positiven Zuweisungen im Median je 22 (Bereich zwischen 11 und 28) richtig positive Zuweisungen.

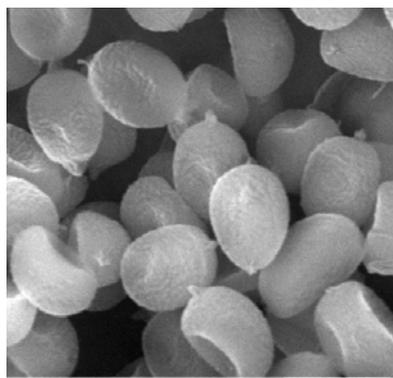
Modell 2: an Stelle von jeweils 30 richtig positiven Zuweisungen im Median je 22 (Bereich zwischen 11 und 28) richtig positive Zuweisungen.

Dabei erfolgt auch hier die Zuweisung ganz überwiegend zu den morphologisch ähnlichen Sporen des *Penicillium chrysogenum*. Für die Zuweisung von *Penicillium chrysogenum* ergibt

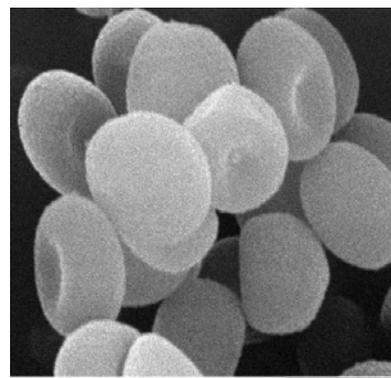
Modell 1: im Median 29 (Bereich zwischen 26 und 30) richtig positive Zuweisungen.

Modell 3: im Median je 27 (Bereich jeweils zwischen 23 und 30) richtig positive Zuweisungen.

Modell 3: im Median je 27 (Bereich jeweils zwischen 23 und 30) richtig positive Zuweisungen.



Penicillium expansum, REM $\times 10000$
(KPP)



Penicillium chrysogenum, REM $\times 10000$
(KPP)

Abb. 5.2: Vergleichende Abbildungen des *Penicillium expansum* und *Penicillium chrysogenum*.

Als ursächlich erweisen sich hier Abweichungen insbesondere in der Bezeichnung der Oberflächenstruktur im Pleomorphismusversuch ausschließlich als beulig bei der Bildung des Referenzkataloges aber ebenfalls als fein ornamentiert (vgl. **Tab. 4.10**).

Abb. 8.2 zeigt entsprechende Beispiele des *Penicillium expansum* aus dem Pleomorphismusversuch. Es sind deutlich die verschiedenen Formvariabilitäten je nach angeschnittener geometrischer Lage und Vakuumdefekt im REM zu erkennen. Lediglich die Oberfläche der *Penicillium* Spore auf dem Shigellen Agar könnte eine feine Ornamentierung vortäuschen. Genau dies ist mehrfach bei der morphologischen Beschreibung der Oberflächenstruktur des Referenzkataloges im REM gefunden worden. Die Oberfläche im Pleomorphismusversuch wurde eindeutig auf allen Nährmedien als beulig beschrieben. Die Form ist überwiegend oval.

Insgesamt stellen diese Untersuchungen die Zuweisung einzelner Sporenarten selbst dann in Frage, wenn für diese Arten nach **Tab. 5.2** günstige Ergebnisse beobachtet werden konnten. Es gilt daher, Gruppen morphologisch ähnlicher Sporen zu definieren, zu denen eine weniger störanfällige Zuordnung getroffen werden kann. So bleibt beispielsweise für die beiden diskutierten Sporenarten die Zuweisung lediglich zur Sporengattung von den Unterschieden in der morphologischen Beschreibung unberührt. Der Pleomorphismusversuch zeigt jedoch, dass für die erfolgreiche Anwendung der Methode noch erhebliche Anstrengungen im Hinblick auf die

Verbesserung der Reproduzierbarkeit und der Qualitätssicherung erforderlich sind. So verdeutlichen die in **Abb. 8.1** bis **8.7** gesammelten Sporenbilder die Möglichkeit, dass unbekannte Sporen "online" am Mikroskop ausgewertet und zugeordnet werden, so dass unmittelbar ein Vergleich mit den entsprechenden Abbildungen des Referenzkataloges möglich ist und so eine Kontrolle und Korrektur der schematischen Zuordnung nur aufgrund der Summenparameter erfolgen kann.

5.4 Schlussfolgerungen

5.4.1 Charakterisierung der Methode

Die morphologische Sporencharakterisierung mit dem REM erfasst anders als die KBE-Zählung sowohl lebende als auch tote Sporen. Vergleichende Untersuchungen zwischen beiden Methoden zeigen, dass die Gesamtzahl aller vorhandenen Sporen offenbar ein Vielfaches der KBE ausmacht [Karlsson und Malmberg, 1989]. Da einerseits jede einzelne Spore als potentiell lebensfähiger Keim anzusehen ist [Heikkila et al. 1988], andererseits aber selbst ein größeres Aggregat von Sporen, insbesondere bei Anwendung der direkten KBE-Methode, nur eine makroskopisch auswertbare Kolonie liefert, ist der Unterscheidung zwischen den einzeln oder in Aggregaten angetroffenen Schimmelpilzsporen besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Dabei lässt der Vergleich zwischen den REM-Auswertungen der bei direkter und indirekter Probenahme beaufschlagten Filter im Hinblick auf die KBE-Methode erwarten, dass die bei direkter Probenahme angetroffenen besonders langen Aggregate bei der im Rahmen der indirekten Probenahme notwendigen Überführung in eine Suspension auseinander brechen können. Eine für die Verhältnisse in der Atemluft charakteristische Beschreibung der Aggregate kann daher nur mit Hilfe der indirekten Methode erfolgen. Die analytischen Vorteile, die in der gemeinsamen Zuordnung mehrerer gleichartiger Sporen zu einer der Sporenarten liegen, können dagegen mit der MSC/REM-Methode im vollen Umfang ausschließlich unter Verwendung der direkten Präparation genutzt werden.

Ein weiterer Vorteil der MSC/REM-Methode besteht darin, dass ein umfassender Überblick über die partikulären Bestandteile in der Luft am Arbeitsplatz gegeben werden kann. So können Kombinationsbelastungen aus organischen und anorganischen Partikeln einschließlich Sporen und Pollen in einem Arbeitsgang untersucht werden. Bei der Erfassung von Sporen kann anders als bei den hochspezifischen Methoden eine Beschränkung vorab auf wenige Arten unterbleiben, da die Zählung und morphologische Klassierung für alle Arten möglich ist. Dabei kann ein Ergebnis innerhalb eines Arbeitstages gewonnen werden, während für eine unspezifische KBE-Zählung mindestens 7 Tage zu veranschlagen sind.

Der wesentliche Nachteil der MSC/REM-Methode liegt in der geringen Sicherheit einer exakten Sporentifizierung mit Hilfe des derzeitigen verwendeten Klassierungs-Algorithmus. Das Verfahren kann daher nur als Screening-Methode verwendet werden. Ebenfalls als problematisch ist der hohe Arbeitsaufwand anzusehen, der sich einschließlich der Notwendigkeit einer sorgfältigen Einarbeitung der Mitarbeiter und der notwendigen Maßnahmen zur Qualitätssicherung ergibt.

5.4.2 Vorschläge zur Weiterentwicklung

Eine Weiterentwicklung und Evaluierung der Methode im Hinblick auf ihre Reproduzierbarkeit ist erforderlich. Nachfolgend sind Vorschläge und die damit voraussichtlich erzielbaren Verbesserungen aufgeführt:

- Verbesserung der Präparation angezüchteter Kolonien für die Fortschreibung des Referenzkataloges. So können Pilzkulturen mit Impföse oder Pinzette unmittelbar auf Nucleoporefilter übertragen und vor der Evakuierung im Elektronenmikroskop ausreichend getrocknet werden [Tossavainen 2000].
- Verwendung des Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM). Eine Minderung eventuell auftretender Vakuumartefakte [Scott et al. 1993] wird erreicht.
- Automatisierung der wechselseitigen Zuordnung aller Sporenarten, die für die Fortschreibung des Referenzkataloges erforderlich ist. Dies führt zu einer Verbesserung des Auswerteprogrammes innerhalb des Fortschreibens des Kataloges.
- Erprobung der Online-Auswertung. Dieser ermöglicht die gezielte morphologische Überprüfung der untersuchten Probe anhand der Bildersammlung des Referenzkataloges.
- Höhere Präzision der zur morphologischen Klassierung verwendeten Charakteristika (Summenparameter). Die Genauigkeit der Zuweisungen zu den Sporenarten des Referenzkataloges kann so erheblich gesteigert werden.
- Exaktere Definition von Sporengruppen. Eine Differenzierung zwischen Sporen, die bisher - aufgrund ihrer Ähnlichkeit - nur schwer voneinander zu unterscheiden sind, kann so vermieden werden.
- Erprobung der Alternative der Bildverarbeitung. Insbesondere die reproduzierbare Beschreibung der Oberflächenstrukturen wird verbessert.
- Erprobung einfacherer Färbemittel. Eine Unterscheidung zwischen organischen und anorganischen Partikeln wird erleichtert.

5.4.3 Möglichkeiten des Einsatzes der MSC/REM-Methode

Die MSC/REM-Methode nimmt eine Mittelstellung ein zwischen den weitgehend unspezifischen Methoden KBE und CAMNEA [Palmgren et al. 1995] und hochspezifischen Verfahren, wie etwa der PCR-Methode und Immun- und Antikörperbestimmungen. Sie kann daher als im Vorfeld solcher hochspezifischen Methoden anwendbare Screening-Methode angesehen werden.

Eine besondere Eignung dürfte die Methode für epidemiologische Fall-Kontroll-Untersuchungen zur Gewinnung von Erkenntnissen über die unterschiedliche Wirksamkeit einzelner Sporenarten besitzen, da sie bereits ohne dass eine genaue Identifizierung erfolgen muss, auffällige Anhäufungen gleichartiger Sporen wahrnimmt. Solche auffälligen Anhäufungen morphologisch gut definierter Sporenarten können neben der Gesamtzahl aller vorhandenen KBE als Risikofaktoren diskutiert werden. Wird für eine oder mehrere solcher Arten eine Assoziation mit der Erkrankung beobachtet, können diese dann gezielt durch eine spezifischere Analyse identifiziert werden. Bisher liegen offenbar nur wenige spezielle Erkenntnisse über die besondere Wirksamkeit einzelner Sporenarten vor. Die Methode könnte bei der Erweiterung dieses Wissens hilfreich sein.

6 Zusammenfassung

Die in Kraft getretene Biostoffverordnung macht an einer Vielzahl von Arbeitsplätzen u. a. mit Schimmelpilz-Sporen eine Gefährdungsanalyse erforderlich. Standardisierte Luftmessungen der Konzentrationen kolonienbildender Einheiten von Schimmelpilzen liefern trotz des erheblichen Messaufwandes keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Schimmelpilzarten und vernachlässigen abgestorbene Mikroorganismen. Eine umfassende Identifizierung ist angesichts der großen Zahl dieser Arten a priori unrealistisch. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde geprüft, inwieweit eine morphologische Sporencharakterisierung im Rasterelektronenmikroskop (MSC/REM) eine sinnvolle Klassierung und Unterscheidung der einzelnen Arten sowie eine Zuordnung zu bekannten Spezies (Sporenarten) erlaubt.

Zur Anlage eines Referenzkatalogs wurden 50 Kulturen von 45 Schimmelpilzen und 5 thermophilen Actinomyceten der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen auf Nährböden angezüchtet. Dem Vergleich mit Sporen in der Atemluft am Arbeitsplatz dienten Filter, die beim Sammeln von Hausmüll beaufschlagt worden waren. Für jeweils 30 Sporen der 50 Kulturen, für 178 Sporen von den Arbeitsplatzfiltern sowie für 104 Sporen beim Öffnen der Biotonne wurden die Größe (maximaler und minimaler Durchmesser), Form, Oberflächenstruktur (Art und Größe), Verbindungsstellen (Art und Größe) und Hinweise auf Vakuumdefekte im REM erfasst. 49 der Kulturen konnten durch diese Summenparameter für die Auswertung von jeweils 30 Sporen beschrieben werden. Der Referenzkatalog wurde aus diesen 49 Kulturen gebildet.

Der Vergleich der 30 Einzelsporen einer der Sporenarten mit diesen Summenparametern ergibt für einen Teil der Sporen mehrere Zuordnungen. Im Vergleich mit dem Zuordnungsmuster einer unbekanntem Einzelspore charakterisieren die Häufigkeiten dieser Zuordnungen die Sporenarten besser als die Summenparameter selbst. Die eindeutige Zuordnung zu einer der 49 Sporenarten wurde in drei Modellen für jeweils 30 Einzelsporen einer jeden der 49 Sporenarten getestet. Je Art wurden 0 bis 30 richtig positive (RP) und 0 bis 86 falsch positive (FP) Zuordnungen beobachtet.

Zwischen den 3 Modellen bestanden erhebliche Unterschiede. So wurde eine Sensitivität $SE \geq 80\%$ ($RP \geq 24$) nach Modell 1 für 20 und nach Modell 2 und 3 für jeweils 18 der 49 Sporenarten erzielt. Die Einordnung lediglich in eine der 8 Gattungsgruppen ergab in allen Modellen eine Sensitivität von $SE = 47\%$ bis 100% . Für 178 Sporen von Arbeitsplatzfiltern ergeben die 3 Modelle zu 17% bis 19% eine der Gattungen *Aspergillus*, *Eurotium*, *Emericella*, zu 13% bis 20% *Penicillium* und jeweils 22% nicht zuordenbare Sporen.

Die Sensitivität und Spezifität der Zuordnung der 49 untersuchten Sporenarten lässt die MSC/REM-Methode für die Klassierung und Identifizierung von Schimmelpilzsporen arbeitsmedizinisch als geeignet erscheinen. Sie kann für den Nachweis einzelner Arten des Referenzkataloges zumindest als Screening-Methode gelten. Sind die Sporen keiner der 49 Arten zuzuordnen, kann eine morphologische Charakterisierung und der Nachweis von Gruppen ähnlicher Sporen erfolgen. Weitere Reproduzierbarkeitsuntersuchungen und Erprobungen an realen Arbeitsplätzen mit hinreichend bekannter Zusammensetzung der Sporenkollektive werden empfohlen.

7 Literatur

- Balfanz, J. (2000): persönliche Mitteilung; Mikrobiologisches Labor Münster.
- Baur, X. (2000): Aerogene Enzyme sind aggressive berufliche Inhalationsallergene, DMW, 125, 30, 912-17.
- Bayas, N. (1998): Diplomarbeit, Schimmelpilze in Innenräumen, Fachhochschule Fulda-Haushalt und Ernährung.
- BG Chemie (1998): "Sichere Biotechnologie", Sichere Biotechnologie 007 Pilze Eingruppierung von Pilzen, Merkblatt B: 001-B: 010, ZH 1/347, Jedermann Verlag Heidelberg.
- BIA Arbeitsmappe (1997): Messung von Gefahrenstoffen, Loseblattsammlung. Herausgegeben vom Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit (BIA), Erich Schmidt Verlag, Bielefeld, 18. Lfg. IV/97. 9400: Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe. "Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilz-/Hefekonzentration in der Luft am Arbeitsplatz" (TRBA 430). 9410: "Probenahme von Aerosolen am Arbeitsplatz". 9420: "Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz". 9427: "Bestimmung der Konzentration Biologischer Arbeitsstoffe / 1. Ringversuch Schimmelpilze".
- Biostoffverordnung (BSV) (1999): Verordnung zur Umsetzung von EG-Richtlinien über den Schutz der Beschäftigten gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit, Bundesarbeitsblatt, 3/1999, 76-82.
- Bünger, J.; Müller, M.; Ruhнау, P.; Schulz, T.; Westphal, G.; Dreeßen, B.; Stalder, K. und Hallier, E. (1999): Erfassung von Exposition und Gesundheitsrisiken durch luftgetragene biologische Arbeitsstoffe in der Abfallwirtschaft, Zbl. Arbeitsmed. 49, 182-190.
- Bünger, J., Ruhнау, P., Grüner, C., Bittighofer, P.M., Antlauf-Lammers, M., Pethran, A., Paduch, S., Hallier, E. (2000): Spezifische IgG Antikörper gegen Actinomyceten und Schimmelpilze als Biomarker einer Exposition durch Bioaerosole, Arbeitsmed.-Sozialmed.-Umweltmed. 35, 270-273.
- CEN Europäisches Komitee für Normung (1993): EN 481 - Festlegung der Teilchengrößenverteilung zur Messung luftgetragener Partikel. Brüssel 1993. Beuth Verlag, Berlin.
- De Hoog, G.S., Guarro, J. (1995): Atlas of Clinical Fungi. Hrsg: Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn and Delft, The Netherlands, Universitat Rovira i Virgili.
- Deininger, Ch. (1997): Bestimmung der Konzentration Biologischer Arbeitsstoffe in der Luft am Arbeitsplatz. Gefahrst.-Reinhalt-Luft.1997; 57:129-136.
- Deininger, Ch. (1998): Untersuchungen zur mikrobiellen Luftbelastung in 32 Wertstoffsortieranlagen. Gefahrst.-Reinhalt-Luft; 58(3): 113-123.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (1998): MAK- und BAT-Werte-Liste, Wiley-VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 152-160.
- DGE Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (1996): Ernährungsbericht 1996, Hrsg. DGE, Frankfurt am Main.
- DSMZ Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (2001): List of genera - filamentous fungi, Internet : <http://www.dsmz.de/species/fungi.htm>.

Eduard, W., Lacey, J., Karlsson, K., Palmgren, U., Strom, G., Blomquist, G. (1990): Evaluation of Methods for Enumerating Microorganisms in Filter Samples from Highly Contaminated Occupational Environments. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 51(8):427-436.

Eduard, W. et al. (1988): Identification and quantification of mould spores by scanning electron microscopy (SEM): analysis of filter samples collected in Norwegian saw mills. *Ann-Occup-Hyg.* 32:447-455

Engelhardt, G. (1999): Mykotoxine - Giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, Hrsg: Bayerische Landesanstalt für Ernährung, Internet: <http://www.lfe.bayern.de/lebensmittel/mykotox.html>.

EU Richtlinie 90/679/EWG: Richtlinie zum Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit.

Fischer, G., Müller, T. et al. (1998): Exposition durch luftgetragene Fadenpilze und deren Stoffwechselmetabolite an Arbeitsplätzen in Kompostierungsanlagen. Vortrag 38. Jahrestagung DGAUM. Belastung durch Schimmelpilze, deren Stoffwechselmetabolite.

Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) (1999): Verordnung zum Schutze von gefährlichen Stoffen, Bundesgesetzblatt (BGBl Teil I, S.2233).

Geigy (1985): Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Statistik, 8.Auflage, Basel, 2.Nachdruck, 1985.

Göttlich, E., Beck, E-M., Böhm, R., Danneberg, G., Gerbl-Rieger, S., Hofmann, R., Koch, A., Kühner, M., Kummer, V., Liebl, K., Martens, W., Missel, Th., Neef, A., Palmgren, U., Rabe, R., Schilling, B., Tilkes, F., Wieser, P. (1999): Erfassung von luftgetragenen kultivierbaren Mikroorganismen aus Kompostieranlagen-Emission und Immission, *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* (59) 6, 209-217.

Göttlich, E., Engesser, K.H. Untersuchungen zur Emission von Pilzsporen zur Bioabfallkompostierung. In: *Gesundheitsrisiken bei der Entsorgung kommunaler Abfälle* Hrsg. Stalder, K., Verkoyen, C. Verlag Die Werkstatt Göttingen 1994.

Griffiths, W.D. and Cosemo De, G.A.L. (1994): The assessment of bioaerosols: A critical review, *J Aerosol Sci* 25, 1425-1458.

Heikkilä, P.; Kotimaa, M.; Tuomi, T.; Salmi, T. and Louchelainen, K. (1988): Identification and counting of fungal spores by scanning electron microscope, *Ann. occup. Hyg.* 32, 241-248.

Herr, C.; Bittinghofer, P.M.; Bünger, J.; Eikmann, T.; Fischer, A.B.; Grüner, C.; Idel, H.; zur Nieden, A.; Palmgren, U.; Seidel, H.-J. und Velcovsky, H.-G. (1999): Wirkung von mikrobiellen Aerosolen auf den Menschen, *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 59, 229-240.

Johanning, E., Biagini, R., Hull, D.L., Morey, P., Jarvis, B., Landsbergis, P. (1996): Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 68, 207-218.

Johanning, E., Gareis, M., Yang Chin, S., Hintikka, E.-L, Nikulin, M., Jarvis, B., Dietrich, R. (1998): Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*), *Mycotoxin Research* 14, 60-73.

Jung, E.G (1995) *Dermatologie* (S. 49 bis 83): Tabellen/hrsg. Unter Mitarbeit von Bahmer, F.A., Bojanowsky, A., Boonen, H., Frosewite, U., Girbig, P., Grimmel, M., Herz, E., Hofmann, H., Miller, X., Moll, I., Rauterberg, A., Voigtländer, V., Weiß, J. - 3. Vollständig überarbeitete Auflage- Stuttgart: Hippokrates Verlag.

- Kämpfer, P., Beyer, W., Dannaberg, G., Grün, L., Martens, W., Neef, A., Palmgren, U., Szewzyk, R. (1999): Neuere Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung luftgetragener Mikroorganismen. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 59 6, 219-227.
- Kämpfer, P. und Weißenfels, W.D. (Hrsg.) (1997): Luftgetragene Mikroorganismen in Abfallbehandlungsanlagen, Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) Fachgruppe Umweltmikrobiologie.
- KAN (Kommission Arbeitsschutz und Normierung) Bericht 13 (1999): Mikroorganismen in der Arbeitsatmosphäre - Actinomyceten, Hrsg. Verein zur Förderung der Arbeitssicherheit in Europa, 2. Auflage.
- Karlsson, K. und Malmberg, P. (1989): Characterization of exposure to molds and actinomycetes in agricultural dusts by scanning electron microscopy, fluorescence microscopy and the culture method, *Scand-J-Work-Environ-Health* 15, 353-359.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Lindemann, J. (1993): *Medizinische Mikrobiologie*, 8., überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart, New York.
- Keller, R., Sönnichsen, R., Ohgke, H. (1997): Untersuchung der flüchtigen organischen Stoffwechselprodukte von ausgewählten Schimmelpilzen (*Penicillium expansum*, *Aspergillus versicolor*) mittels GC-MSD zur Erkennung von nicht sichtbarem Schimmelpilzbefall in Innenräumen, *Ökologisches Bauen und Sanieren*, Hrsg. Diel et al., C.F. Müller.
- Kotimaa, M.H., Oksanen, L., Koskela, P. (1991): Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scand-J-Work-Environ.* 17:117-122.
- Kutzner, H.J.; Kroppenstedt, R.M. und Korn-Wendisch, F. unter Mitarbeit zahlreicher Diplomanden, Doktoranden und technischer Assistenten (1984): Methoden zur Untersuchung von Streptomyceten und einigen anderen Actinomyceten, *Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, DSM*, 3. Auflage.
- Lacey, J. and Duitkiewics, J. (1994): Bioaerosols and occupational lung disease, *Journal of Aerosol Science* 25, 1371-1404.
- Lacey, J., Pepys, J., Cross, T. (1972): Actinomycete and fungus spores in air as respiratory allergenes, In: Shapton D.A., Board, R.G.; *Safety in microbiology*, Academic Press London, New York, 151-184.
- Lacey, J. (1997): Actinomycetes in composts, *Ann Agric Environ Med*, 4, 113-121.
- Länderausschuss für Arbeitsschutz und Sicherheitstechnik (LASI) (1997): LV 13, Leitlinien für den Arbeitsschutz in biologischen Abfallbehandlungsanlagen, Okt. 1997.
- Madelin T.M., Johnson, H.E. (1992): Fungal and actinomycete spore aerosols measured at different humidities with an aerodynamic particle sizer. *J-Appl-Bacteriology* 1992; 72:400-409.
- Neumann, H.-D., Hornig, B., Buxtrup, M., Balfanz, J. (1998): Schimmelpilz- und Gefahrstoffbelastungen bei der Müllsammlung, *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 58 6, 249-255.
- Ohgke, H. (1999): Detektion von "Microbially Volatile Organic Compounds" (MVOC) bei Schimmelpilzen, Internet: http://www.hygiene.mu-luebeck.de/for_p6.htm, 20.04.1999.
- Palmgren, U.; Ström, G.; Blomquist, G. and Malmberg, P. (1986): Collection of airborne microorganisms on Nucleopore filters, estimation and analysis-CAMNEA method, *J-Appl-Bacteriol.* 1986 Nov; 61(5), 401-406.
- Pasanen, A.; Kalliokowski, P.; Pasanen, P.; Salmi, T. and Tossavainen, A. (1989): Fungi carried from farmer`s work into farm house, *Am-Ind-Hyg-Assoc-J.* 50(12), 631-633.

- Reiß, J. (1997): Schimmelpilze, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2. Auflage.
- Rödelsperger, K., Blondin, M., Balfanz, J. (2000): Rasterelektronenmikroskopische Klassierung und Identifizierung von Schimmelpilzsporen, *Arbeitsmed.-Sozialmed.-Umweltmed.* 10.
- Schata, M., Jorde, W. (1989): Allergische Erkrankungen durch Schimmelpilze, Dustri Verlag Dr. Karl Feistle München-Deisenhofen.
- Collins, S.C., Pope, K.R., Scheetz, R.W., Ray, R.I., Wagner, P.A., Little, B.J. (1993): Advantages of Environmental Scanning Electron Microscopy in Studies of Microorganisms, *Microscopy research and technique* 25, 398-405.
- Sennekamp, H. J. (1998): Exogen-allergische Alveolitis, Frank/Schulz-Manuale allergologicum Verfahren 9.
- Smola, A. (1999): Biostoffverordnung - Verbesserter Arbeitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* (5), 157-161.
- Stalder, Verkoyen (1994): Gesundheitsrisiken bei der Entsorgung kommunaler Abfälle, Verlag Die Werkstatt, Göttingen.
- Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 430: Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilz/Hefekonzentration in der Luft am Arbeitsplatz, BarB1 Nr. 1 (1997), 50-53.
- Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 460: Einstufung von Pilzen in Risikogruppen, BarB1 Nr. 12 (1998), 36-40.
- Technische Regeln für Gefahrstoffe (TRGS) 900: Grenzwerte in der Luft am Arbeitsplatz (MAK und TRK).
- Technische Regeln für Gefahrstoffe (TRGS) 903: Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte (BAT-Werte).
- Tilkes, F., Dott, W., Fischer, G., Grün, L., Harpel, S., Hartung, J., Keller, R., Koch, A., Linsel, G., Manns, A., Martens, W., Palmgren, U., Seidel, H.J. (1999): Mikrobielle Luftverunreinigung - Verfahren zur Erfassung und Diagnose von Endotoxinen, Mycotoxinen und MVOC. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft.* (59) 6, 205-208.
- Tossavainen, A., Tuomi, T., Kamppi, R. (2000): persönliche Mitteilung in Gießen.
- Webster, J. (1983): Pilze – Eine Einführung, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

8 Anhang

8.1 Kriterien für die Auswahl der Sporenarten S1 bis S49 des Referenzkataloges

Mit einer Literaturrecherche wurde vorab versucht, einen Überblick über die mikrobielle Belastung der Luft am Arbeitsplatz mit Schimmelpilz- und thermophilen Actinomycetensporen zu bekommen. Anhand eines Med-Line Suchlaufes (Sommer 1998) u.a. mit den Suchbegriffen "mould", "micro fungi", "actinomycetes", "air microbiology", "spores fungi", "microscopy electron scanning", "allergy alveolitis" wurden gefundene Mikroorganismen tabellarisch erfasst und ausgezählt. Die Auswahl der hier untersuchten Sporenarten ergab sich dann nach folgenden Kriterien:

Gesucht wurde nach der **Häufigkeit des Vorkommens** von Schimmelpilz- und thermophiler Actinomycetensporen (Arten) an Arbeitsplätzen in der Landwirtschaft, Abfallwirtschaft und in Innenräumen.

Ein weiteres Kriterium ergibt sich aus der **medizinischen Relevanz** von Schimmelpilzen und thermophilen Actinomyceten in Hinblick auf die EAA. Suchbegriffe mit arbeitsmedizinischer Relevanz waren "farmers lung", "allergy alveolitis", "alveolitis and spores" und "extrinsic allergic etiology" sowie "sick building syndrom".

Außerdem wurde versucht, **möglichst einen Vertreter je Gattung** nach der Pilzsystematik von [Reiß 1997] einzubeziehen. Es sollte damit auch eine möglichst große Anzahl an verschiedenen Sporenarten gewonnen werden.

Ähnliche **von anderer Autoren aufgestellte arbeitsmedizinisch relevanten Listen** wurden ebenfalls berücksichtigt [Sennekamp 1998; BG Chemie 1998; Karlsson und Malmberg 1989]. Nach [Sennekamp 1998] kann eine auf der Serologie basierende Klasseneinteilung der Mikroorganismen nach ihrer Allergenität in Hinblick auf die Allergische Alveolitis erfolgen. Hierbei werden drei Klassen unterschieden: durch inhalative Provokation sicher bewiesene, wahrscheinliche Allergene und verdächtige Allergene. Der Referenzkatalog enthält 20 Schimmelpilzarten sowie 5 thermophile Actinomyceten, die nach Sennekamp als sicherer Auslöser der Allergischen Alveolitis einzustufen sind. Eine weitere Einteilung für biologische Arbeitsstoffe in Risikogruppen ist der Liste der BG Chemie [1998] zu entnehmen. Neben Viren und Bakterien werden auch Schimmelpilze berücksichtigt. Kriterien dieser Liste waren die Wahrscheinlichkeit des Auftretens, das Infektionspotential, die Vorbeugemöglichkeit, die Verbreitungsgefahr sowie die Therapierbarkeit der Mikroorganismen. Im Rahmen der Risikoeinteilung wurden vier Gruppen gebildet. Bisher fallen keine Pilze in die Risikogruppe 4. Für den Katalog wurden nur Schimmelpilzarten der Risikogruppe 1 und 2 bestellt. Eine gute Auswahl von häufig im REM identifizierten Schimmelpilzarten in der Landwirtschaft ist [Karlsson und Malmberg 1989] zu entnehmen.

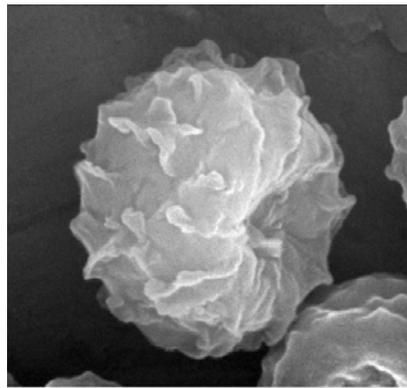
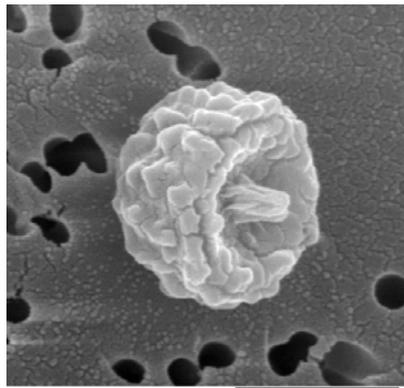
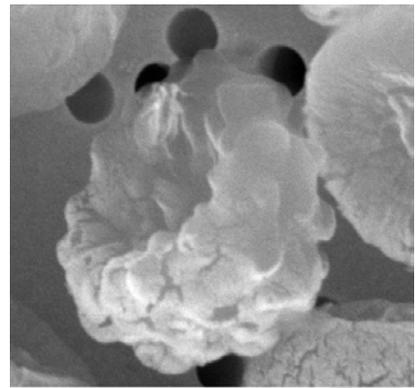
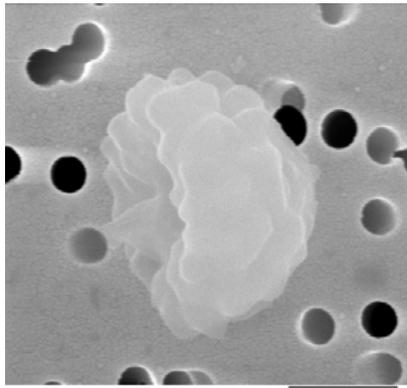
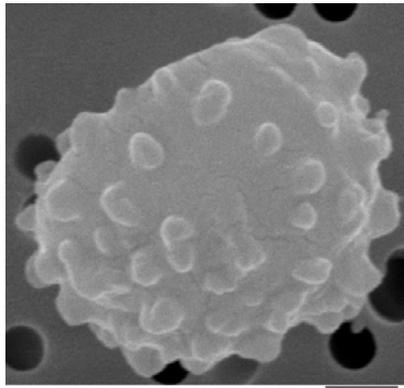
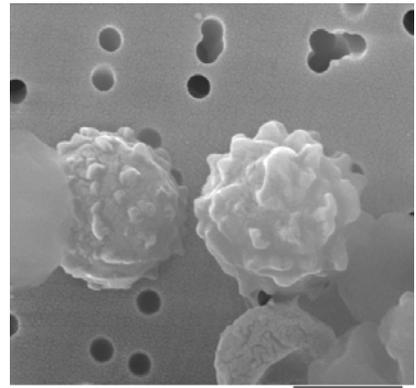
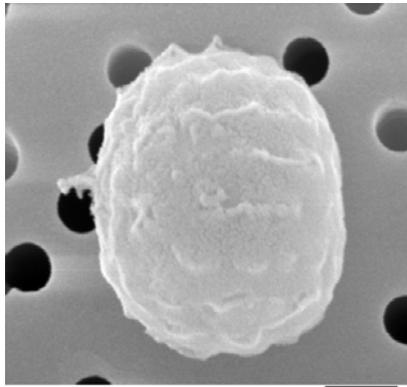
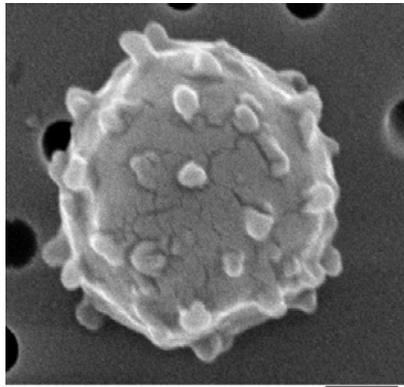
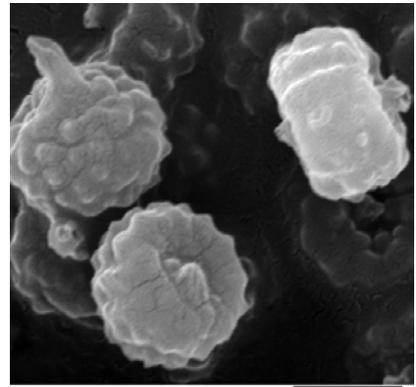
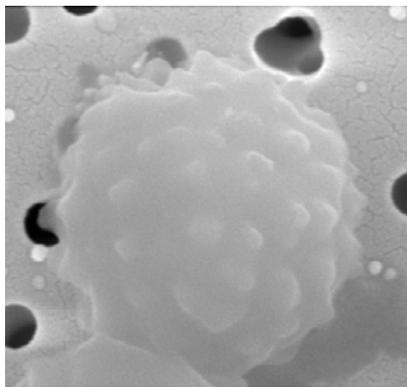
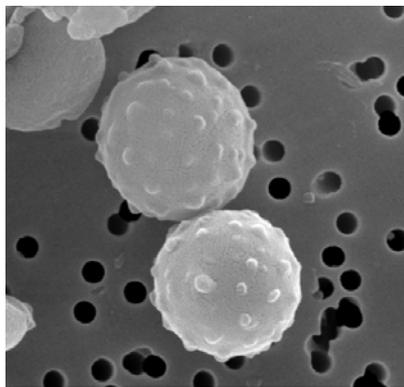
8.2 Literatúrauswahl zur Katalogerstellung

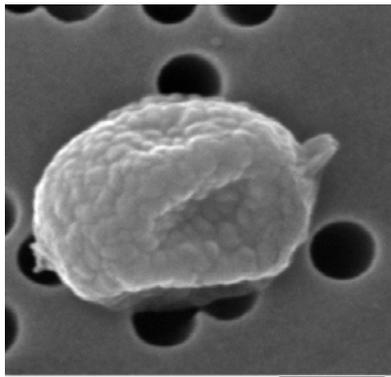
1998 wurde vorab eine Literaturabfrage zur Auswahl von geeigneten Schimmelpilzen zur Erstellung des Referenzkataloges durchgeführt. Als relevante Literatur wurden insgesamt 17 Quellen ausgewählt. Es war dabei nicht immer möglich, klar die einzelnen Schimmelpilze exakt auseinander zu halten. Auch wurden zum Teil veraltete Schimmelpilzbezeichnungen verwendet. Nachfolgend sind die ausgewerteten Veröffentlichungen zusammengestellt. Die hinzugefügten Angaben in eckigen Klammern beschreiben die Anzahl der in der jeweiligen Veröffentlichung beschriebenen (Schimmel-)Pilze, Hefen, Bakterien bzw. Actinomyceten).

- BG Chemie (1/98): Sichere Biotechnologie, Eingruppierung biologischer Agenzien: Pilze, Merkblatt B007 (1/98), ZH 1/347, Jedermann Verlag [Pilze: 153]
- Sennekamp, H.J.: Ätiologische Einteilung der allergischen Alveolitis, persönliche Mitteilung, inhalative, serologische Untersuchungen [37 Schimmelpilze, 4 Hefen, 11 Bakterien]
- Ostrowski, R. et al. (1996): Mikrobielle Luftbelastung in Kompostieranlagen (Poster). RWTH Aachen /Hygiene und Umweltmedizin aus dem Internet. Andersen sampler mit anschließender Anzüchtung [58 Schimmelpilze, 18 Bakterien]
- Bayas, N. (1998): [15 Schimmelpilze]
- Deininger, Ch. (1998): [16 Schimmelpilze, 29 Bakterien]
- Kotimaa, M.H. et al. (1991): [35 Schimmelpilze und Bakterien]
- Heikkilä, P. et al. (1988): [11 Schimmelpilze, 1 Aktinomyceten]
- Karlsson, K. et al (1989): [50 Pilze, div. Actinomyceten]
- Eduard, W. et al. (1990): [ca. 27 fungi, ca. 11 bacteria]
- Pasanen, A.L. et al. (1989): [8 main fungi]
- Palmgren, U. et al. (1986): [3 fungi, 3 bacteria]
- Eduard, W. et al. (1988): [6 fungi]
- Deininger, Ch. (1997): [4 Pilze]
- Fischer, G. et al. (1998): [7 Pilze]
- Madelin T.M., Johnson, H.E. (1992): [10 Fungi, 3 thermophile Actinomyceten]
- Göttlich, E., Engesser, K.H. (1994): [38 Schimmelpilze]
- Reiß, J. (1997): [85 Pilze]

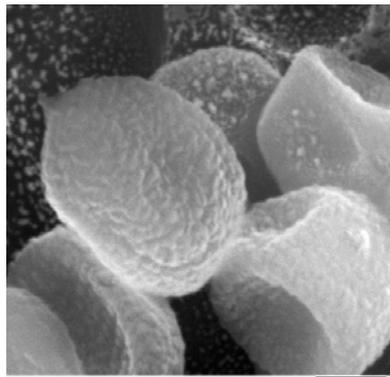
8.3 Pleomorphismusversuch

In **Abb. 8.1** sind *Aspergillus niger* Sporen, in **Abb 8.2** *Penicillium expansum* Sporen, die im Rahmen des Pleomorphismusversuches auf unterschiedlichen Nährböden kultiviert wurden, dargestellt.

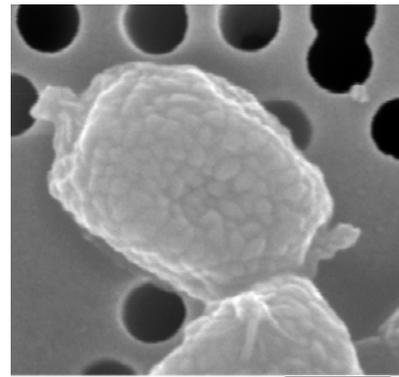
Sabouraud Agar, REM $\times 15000$ (KPP)BHI Agar, REM $\times 15000$ (NFPF)CLED Agar, REM $\times 30000$ (NFPF)Yersinien Agar, REM $\times 20000$ (NFPF)Shigellen Agar, REM $\times 30000$ (NFPF)Blutagar, REM $\times 10000$ (NFPF)Kochblut Agar, REM $\times 20000$ (NFPF)Salmonellen Shigellen Agar,
REM $\times 20000$ (NFPF)BP Agar, REM $\times 10000$ (KPP)Mc Conckey Agar, REM $\times 20000$ (NFPF)Müller Hinton Agar, REM $\times 10000$ (NFPF)Abb. 8.1: *Aspergillus niger* Sporen auf unterschiedlichen Nährböden kultiviert.



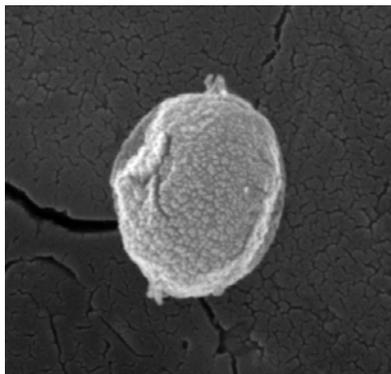
1202p1 x30000
Sabouraud Agar, REM $\times 30000$ (NPFP)



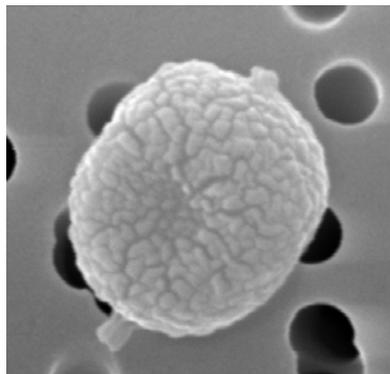
1202p2 x20000
BHI Agar, REM $\times 20000$ (NPFP)



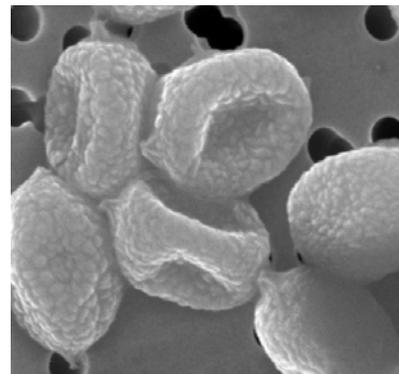
1202p3 x30000
CLED Agar, REM $\times 30000$ (NPFP)



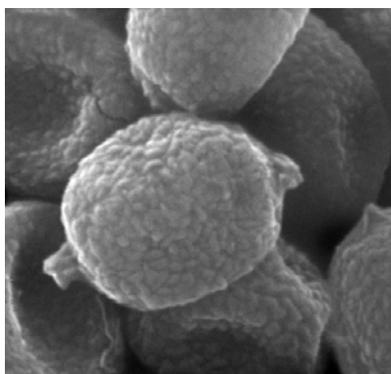
1202p4 x20000
Yersinien Agar, REM $\times 20000$ (KPP)



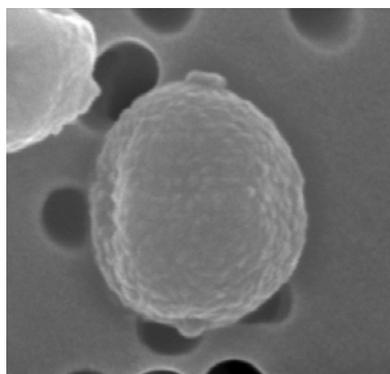
1202p5 x30000
Shigellen Agar, REM $\times 30000$ (NPFP)



1202p6 x15000
Blut Agar, REM $\times 15000$ (NPFP)

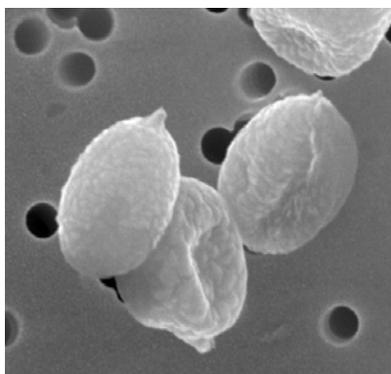


1202p7 x20000
Kochblut Agar, REM $\times 20000$ (NPFP)

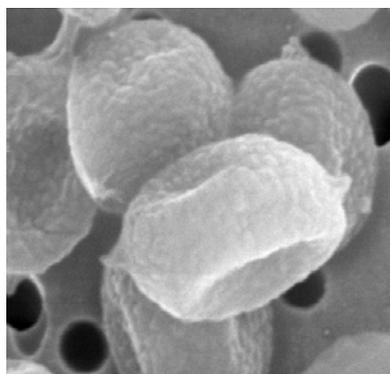


1202p8 x30000
Salmonellen Shigellen, REM $\times 30000$ (NPFP)

Kein Wachstum
auf BP Agar



1202p10 x15000
Mc Conkey Agar, REM $\times 15000$ (NPFP)



1202p11 x20000
Müller Hinten Agar, REM $\times 20000$ (NPFP)

Abb. 8.2: *Penicillium expansum* Sporen auf unterschiedlichen Nährböden kultiviert.

8.4 Vertrauensbereiche für den richtig positiven Anteil der zugeordneten Sporenarten des Referenzkataloges

Der statistische Vertrauensbereich (95 % Grenzen) für den Anteil der als richtig positiv erkannten Sporen nach **Abschnitt 4.3** folgt einer Binomialverteilung. In **Tab. 8.2** sind die Vertrauensbereiche dieser Verteilung aus den wissenschaftlichen Tabellen [Geigy 1985] für einen Stichprobenumfang von jeweils 10 bzw. 30 Sporen angegeben.

Tab. 8.2: Vertrauensbereiche (95 % Grenzen) der Binomialverteilung für den Anteil, der als richtig positiv (RP) erkannten Sporen. Vergleich der aktuellen Auswertung für jeweils 30 Sporen mit den früheren Auswertungen für jeweils 10 Sporen [Geigy 1985].

% RP	Zuordnung von 10 Sporen		Zuordnung von 30 Sporen	
0	0 Sporen	0 - 30,88 %	0 Sporen	0 - 11,57 %
10	1 Sporen	0,25 - 44,50 %	3 Sporen	2,11 - 26,53 %
20	2 Sporen	2,52 - 55,61 %	6 Sporen	7,71 - 38,57 %
30	3 Sporen	6,67 - 66,25 %	9 Sporen	14,37 - 49,40 %
40	4 Sporen	12,16 - 73,76 %	12 Sporen	22,66 - 59,40 %
50	5 Sporen	18,71 - 81,29 %	15 Sporen	31,3 - 68,70 %
60	6 Sporen	26,24 - 87,84 %	18 Sporen	40,6 - 77,34 %
70	7 Sporen	34,75 - 93,33 %	21 Sporen	50,6 - 85,27 %
80	8 Sporen	44,39 - 97,48 %	24 Sporen	61,34 - 92,29 %
90	9 Sporen	55,5 - 99,75 %	27 Sporen	73,47 - 97,89 %
100	10 Sporen	69,15 - 100,00 %	30 Sporen	88,43 - 100 %

8.5 Sporenbeispiele aus dem IPAS-Katalog und Zuweisungen zu den Klassen des Referenzkataloges

8.5.1 *Aspergillus flavus*

Die durchgeführten Zuweisungen der 30 Einzelsporen eines *Aspergillus niger* zu den Klassen des Referenzkataloges können **Tab. 4.1** entnommen werden.

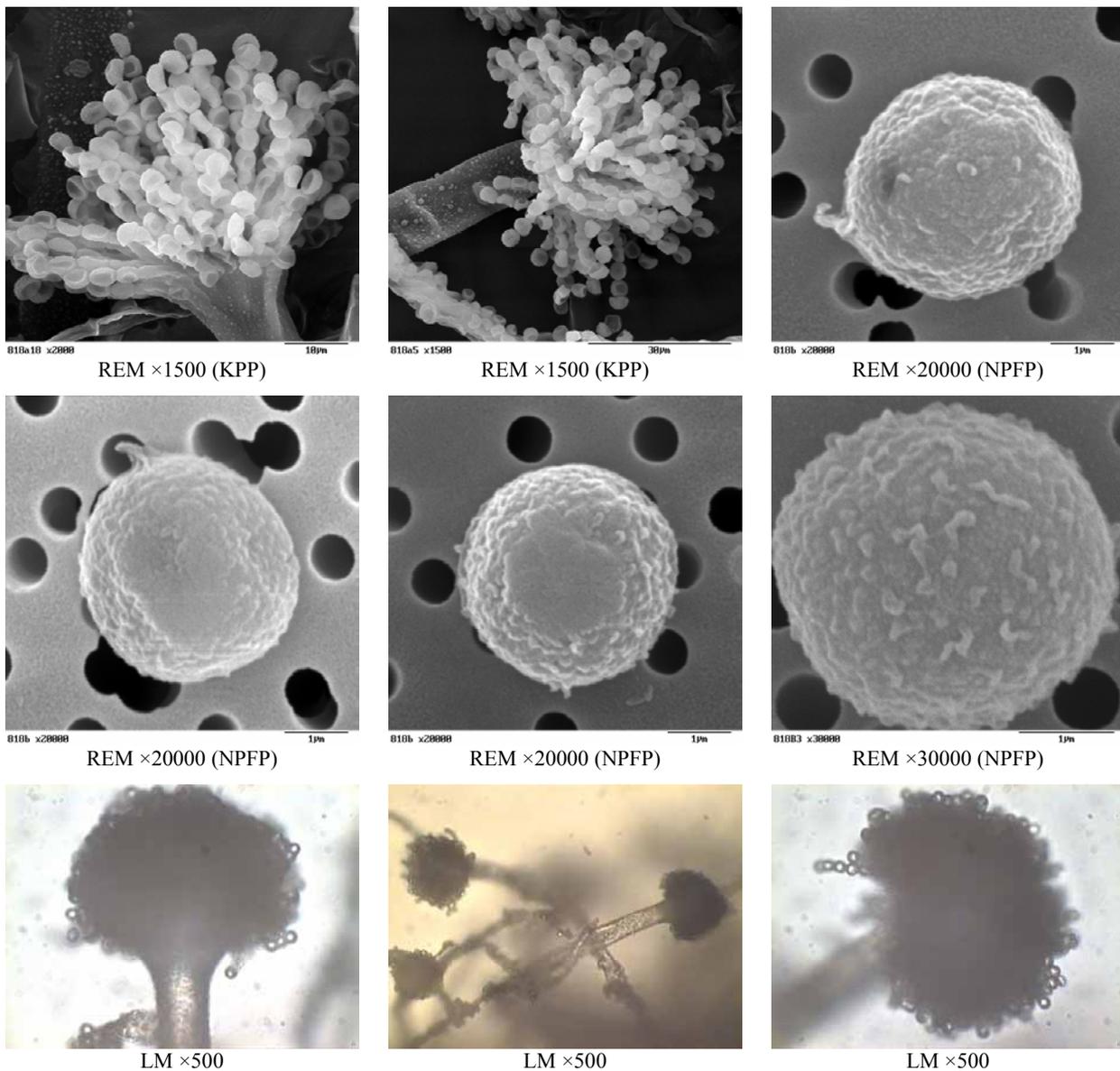


Abb. 8.3: Beispiele für *Aspergillus flavus* Sporen aus dem Sporenkatalog des IPAS

8.5.2 *Penicillium chrysogenum*

Die durchgeführten Zuweisungen der 30 Einzelsporen eines *Penicillium chrysogenum* zu den Klassen des Referenzkataloges können **Tab. 4.1** entnommen werden.

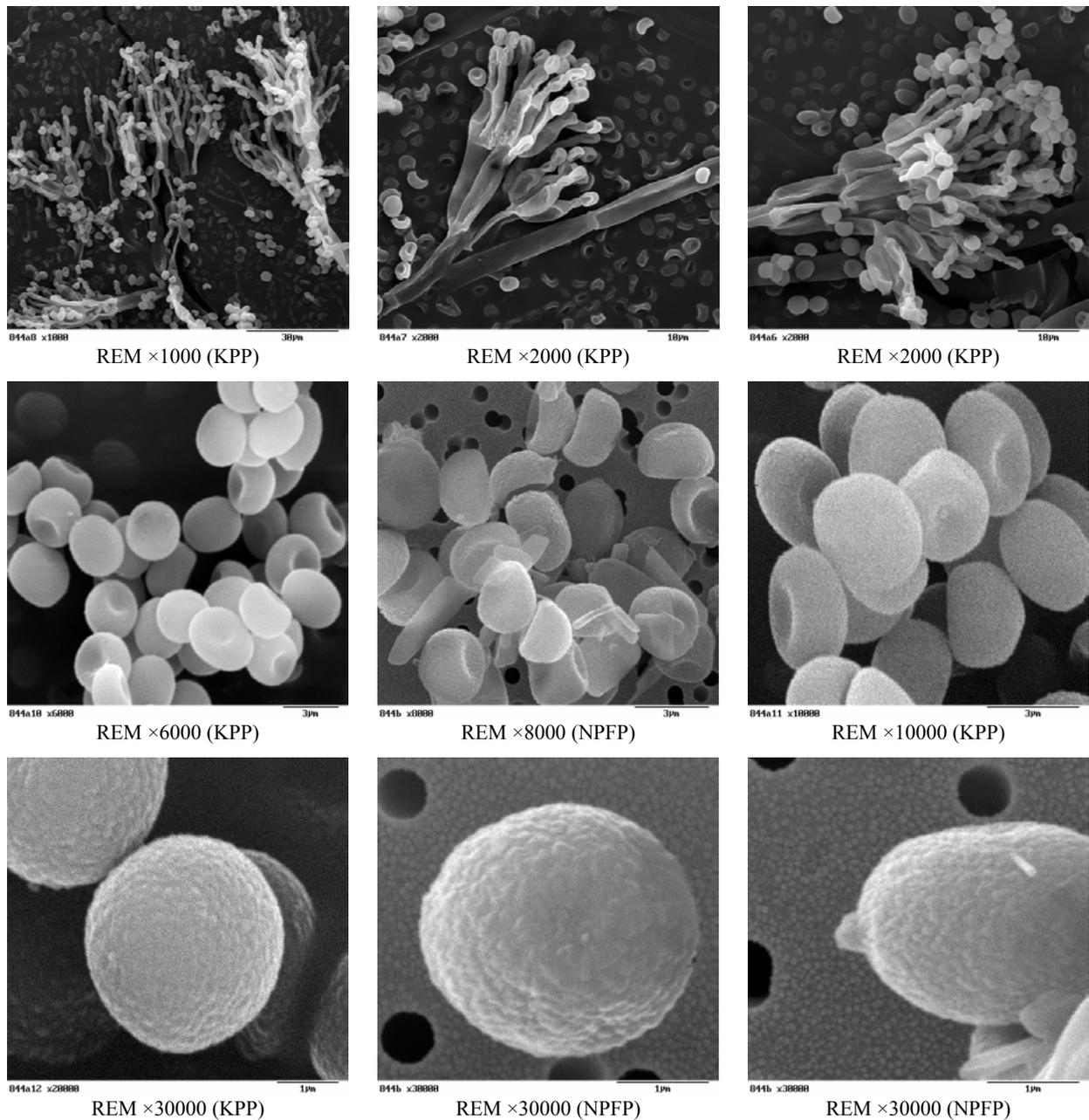


Abb. 8.4: Beispiele für *Penicillium chrysogenum* Sporen aus dem Sporenkatalog des IPAS

8.5.3 *Trichothecium roseum*

Die durchgeführten Zuweisungen der 30 Einzelsporen eines *Trichothecium roseum* zu den Klassen des Referenzkataloges können **Tab. 4.1** entnommen werden.

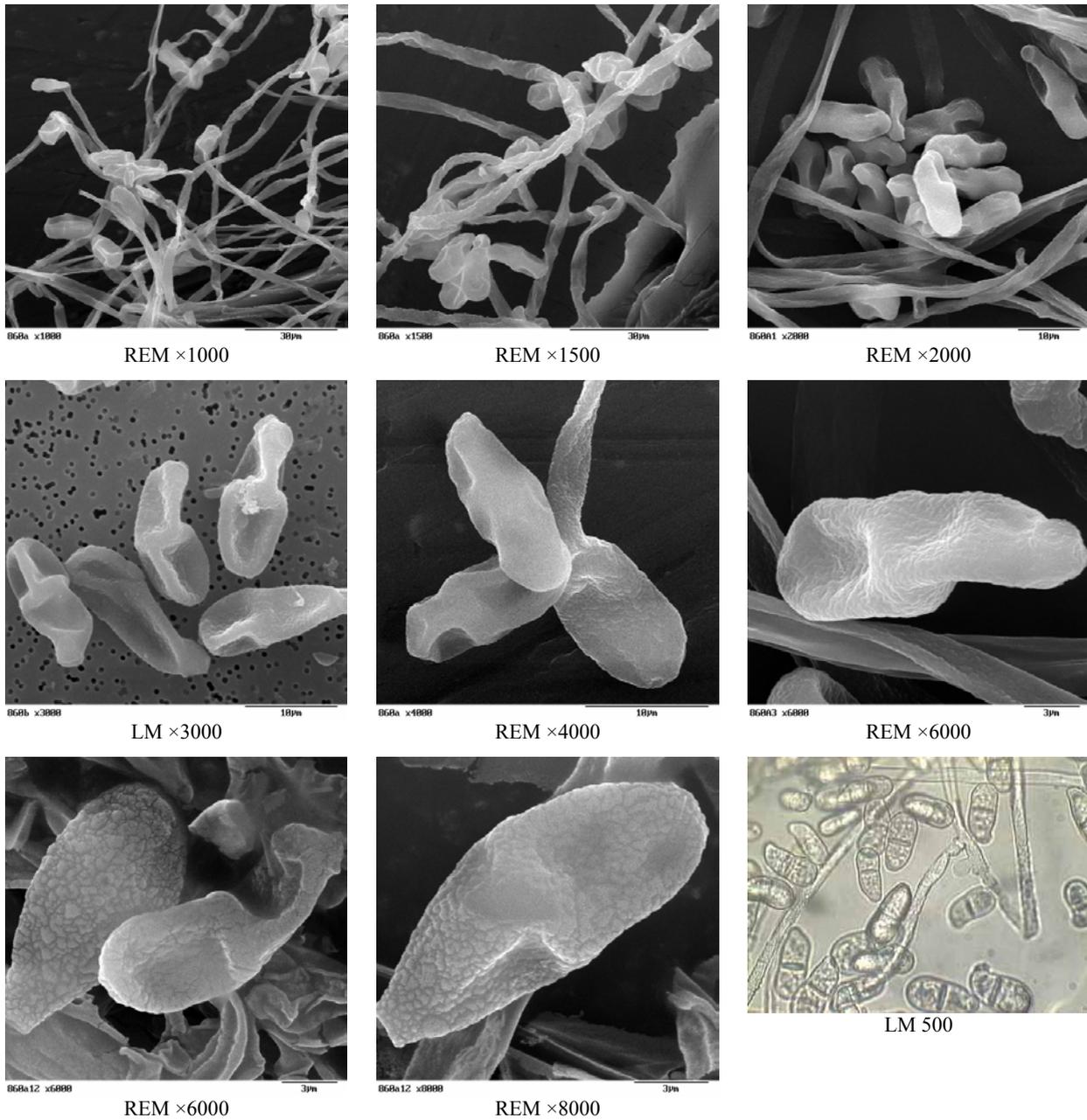


Abb. 8.5: Beispiele für *Trichothecium roseum* Sporen aus dem Sporenkatalog des IPAS

8.6 Sporen unbekannter Sporenart aus der Biotonne

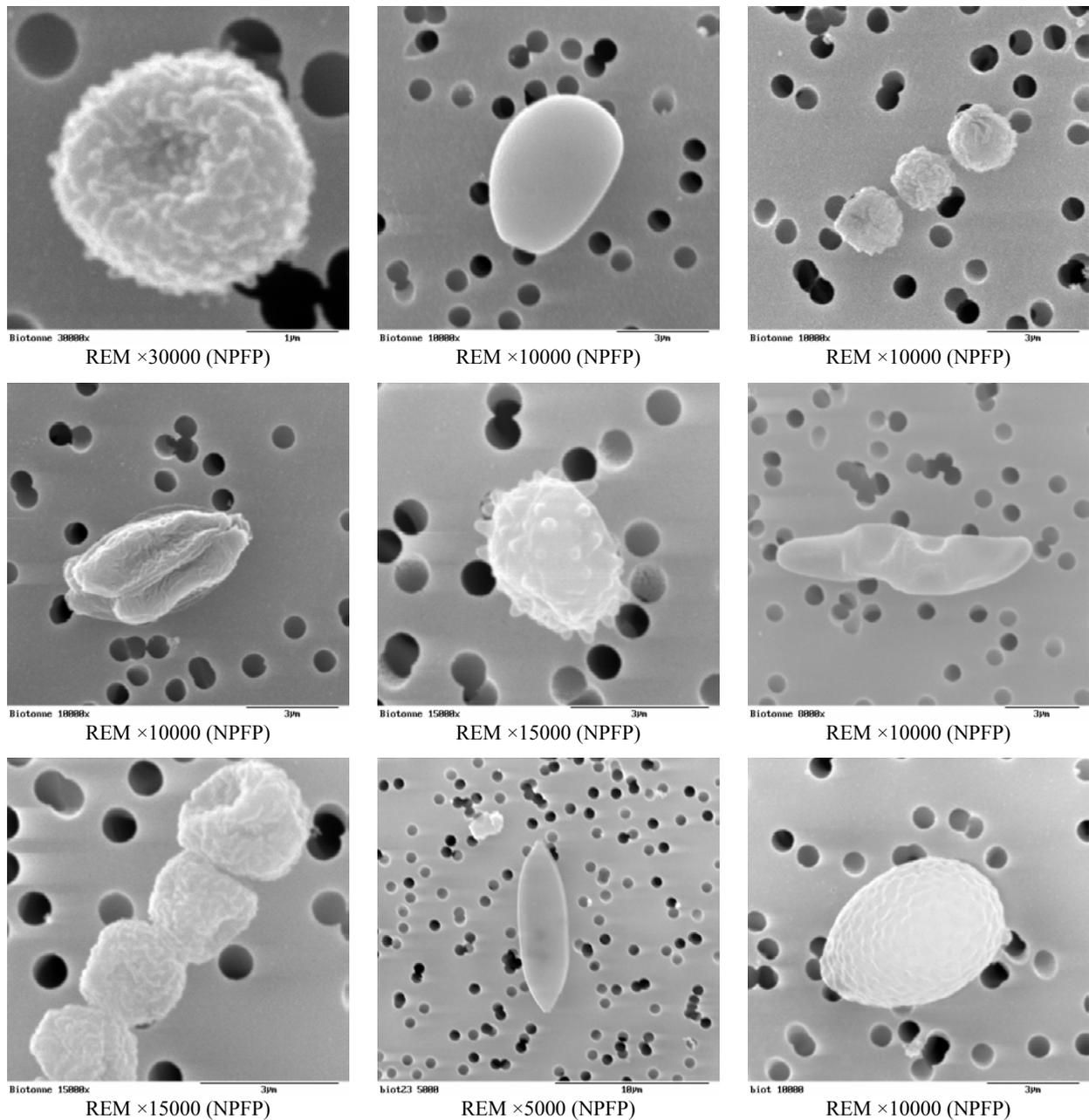
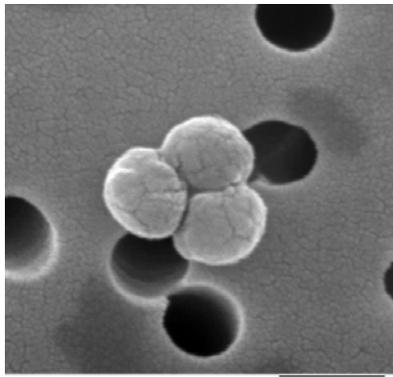


Abb. 8.6: Sporen unbekannter Sporenart aus der Biotonne

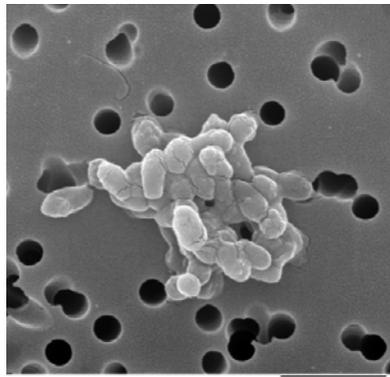
8.7 Zuordnung der Abmessungen der Sporen und Pollen zu den Ablagerungsorten im Atmungstrakt

Nach [Lacey et al. 1972] erreichen verschieden große Sporen, unterschiedliche Orte im Atmungstrakt. Die thermophilen Actinomyceten Sporen (Obere Reihe: Sporengröße $< 4 \mu\text{m}$) gehören zur alveolengängigen Fraktion, sie können somit eine Alveolitis auslösen. Die Schimmelpilzsporen (Mittlere Reihe: Sporengröße 4 bis $10 \mu\text{m}$) können in den Tracheobronchi-

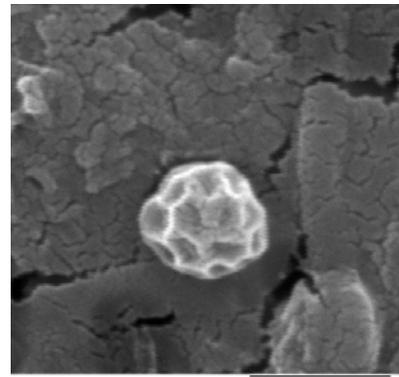
alberreich eindringen und so u.a. ein Asthma verursachen. Die in der unteren Bildreihe zu sehenden Pollen (Pollengröße $> 10 \mu\text{m}$) werden im wesentlichen im Bereich der Nase abgeschieden und können u.a. Rhinitis verursachen.



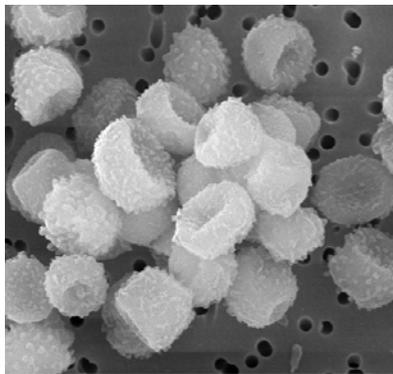
Saccharomonospora viridis, REM $\times 30000$
(NPPF)



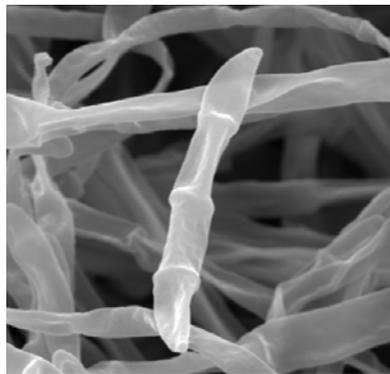
Saccharomonospora viridis,
REM $\times 10000$ (NPPF)



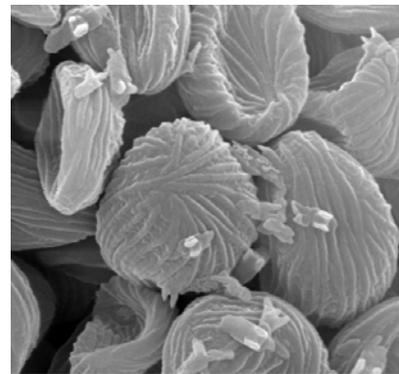
Thermomyces vulgaris,
REM $\times 40000$ (KPP)



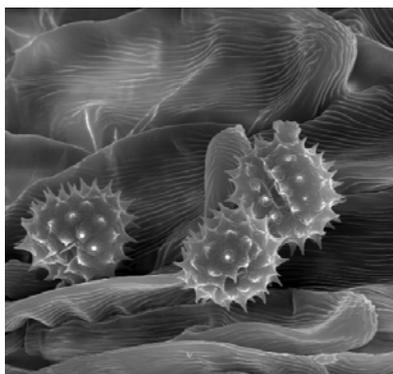
Aspergillus parasiticus, REM $\times 5000$
(NPPF)



Fusarium oxysporium, REM $\times 4000$
(NPP)



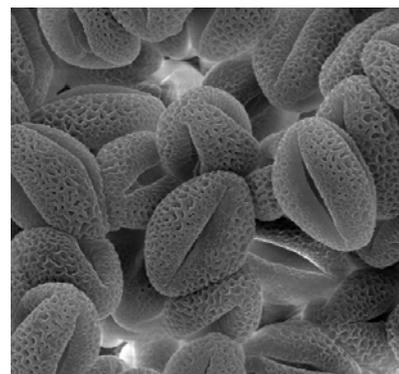
Mucor racemosus, REM $\times 6000$ (NPPF)



Gänselümpchenpollen $\times 1500$ (Pollen3a)
Gänselümpchen Pollen, REM $\times 1500$
(NPP)



Holunderpollen 2000-fach 2.6.97
Holunderblüten Pollen, REM $\times 2000$
(NPP)



Saalweidenpollen $\times 2000$ (Pollen2)
Saalweiden Pollen, REM $\times 2000$ (NPP)

Abb. 8.7: Ausgewählte Beispiele im REM vermessener Sporen für den Referenzkatalog, oben: Thermophile Actinomyceten, Mitte: Schimmelpilze, unten: Pollen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Blondin
Geburtsdatum, -ort	20.06.68, Moers
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Anschrift

Hoffnungsstr. 34
47441 Moers,
Tel.: 02841 - 8870011
E-Mail: michaelblondin@hotmail.com

Schulbildung

1974 – 1978	Grundschule Moers
1978 – 1988	Gymnasium Adolfinum, Moers

Wehrdienst

1988 – 1989	Heer -Transport und Versorgung, Rheine
-------------	--

Akademische Ausbildung

1989 – 1992	Studium der Betriebswirtschaftslehre, Universität zu Köln
1993 – 2000	Studium der Humanmedizin, Justus Liebig Universität, Giessen
1996	Physikum
1997	1. Staatsexamen
1999	2. Staatsexamen
1999 – 2000	PJ im Evangelischen Krankenhaus, Giessen
2000	3. Staatsexamen

Berufserfahrung

1992 – 1993	Pflegepraktika (6 Monate)
1993 – 1994	Heilpraktikerschule, Eschborn bei Frankfurt
1996	Famulatur: Kardiologie Krankenhaus Bethanien, Moers
1996	Famulatur: Institut für medizinische Mikrobiologie, JLU Giessen
1997	Famulatur: Allgemeinmedizin, Haiger
1998	Famulatur: Innere Medizin Evangelisches Krankenhaus, Giessen
1998 – 1999	Praktikum: NEF Einsatzfahrten, Malteser Hilfsdienst, Östrich Winkel
1998	Akupunktur in der Schmerztherapie, JLU Giessen (120h)
1998 – 1999	Grundkurse Akupunktur, Deutsche Ärztegesellschaft für Akupunktur (70h)
1999	Akupunkturschule in Peking, China (120 h)
1998 – 2000	Studienbegleitende Mitarbeit als Telefonist, hausärztlicher Notfallvertretungsdienst, Grünberg
2000	Seit November Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Inneren Abteilung im Marienhospital in Kevelaer
2000	Wechsel in das Krankenhaus Bethanien in Moers als Arzt im Praktikum in der Inneren Abteilung, Assistenzarzt in der Inneren Abteilung

Sprachkenntnisse

Englisch	fließend in Wort und Schrift
Französisch	Grundkenntnisse

EDV-, Mikroskopie- und Laborkenntnisse

MS Office, Rasterelektronenmikroskopie, Licht-/ Dunkelfeldmikroskopie, Laborkenntnisse der Mikrobiologie

Aktivitäten und Interessen

Naturheilkunde, Traditionelle chinesische Medizin Tischtennis, aktiv, langjährige Tätigkeit als Übungsleiter im Jugendtraining, Badminton, Squash, Tennis, Mountain Biking, Ski, Gartenbau, Fotografieren

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Dem Leiter des Instituts, Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Weitowitz, sei an dieser Stelle für die Möglichkeit zur Promotion an seinem Institut gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Dr. Klaus Rödelsperger für seine ständige Betreuung. Bei den Mitarbeitern des Gefahrstofflabores Physik sowie Herrn Arhelger bedanke ich mich für ihre Unterstützung. Den Herren Dr. Jürgen Balfanz und Dr. M. Lohmeyer aus dem Mikrobiologischem Labor Münster GbR möchte ich für die Bereitstellung und Präparation der Filterproben danken.