

Charakterisierung ausgewählter Isolate von *Stachybotrys* spp. anhand  
kulturmorphologischer, molekularbiologischer und massenspektrometrischer  
Verfahren

von Sebastian-Uwe Ulrich

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Charakterisierung ausgewählter Isolate von *Stachybotrys* spp. anhand  
kulturmorphologischer, molekularbiologischer und massenspektrometrischer Verfahren

von Sebastian-Uwe Ulrich

aus Soest

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis  
Mitbetreuung durch: Dr. C. Gottschalk

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Ph.D. Reinhard Straubinger

Tag der Promotion: 06.02.2016

*Meinen Eltern zu Ehren, die mir immer zur Seite standen!*

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ATCC	American Type Culture Collection
a <sub>w</sub> -Wert	Wasseraktivität
CE	Collision energy
CHCA	α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
cps	counts per second
CMA	Corn Meal Agar (Maismehl Agar)
CXP	Cell exit potential
DDR	Deutsche Demokratische Republik
DMSO	Dimethylsulfoxid
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleic acid
DHB	2,5-Dihydroxy-Benzoessäure
DP	Declustering potential
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	Entrance potential
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration 50 (Mittlere inhibitorische Konzentration)
IL	Interleukin
ITS	Internal transcribed spacer - Region
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	HPLC-Tandemmassenspektrometrie
LD <sub>50</sub>	Median Lethal Dosis 50 (Mittlere Letale Dosis)
Lnn.	Lymphonodi
MALDI - TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
MEA	Malzextraktagar
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie

---

MSP	Main Spectra Projection
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MVOC's	Microbial volatile organic compounds
m/z	Masse-/Ladungsverhältnis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
RNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
rcf	Relative centrifugal force
RSD	Relative Standardabweichung
<i>S.</i>	<i>Stachybotrys</i>
SBS	Sick-Building Syndrome
SK-Zellen	Swine-Kidney Zellen
S/N	Signal-/Rausch-Verhältnis
sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
THAP	2,4,6-Trihydroxy-Acetophenon
<i>tri</i>	Trichodiensynthase-Gen
UV	Ultraviolett
V	Volt
VOC's	Volatile organic compounds

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Gattung <i>Stachybotrys</i> .....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Taxonomie .....	12
2.1.2	Wachstumsbedingungen .....	17
2.1.3	Vorkommen .....	18
2.1.4	Metabolite des sekundären Stoffwechsels .....	24
<b>2.2</b>	<b>Bedeutung als Krankheitserreger .....</b>	<b>30</b>
2.2.1	Tier .....	30
2.2.2	Mensch .....	34
<b>2.3</b>	<b>Methoden zur Charakterisierung und zum Nachweis von Toxinen von <i>Stachybotrys</i> spp. .....</b>	<b>39</b>
2.3.1	Phänotypisierung .....	39
2.3.2	Genotypisierung .....	42
2.3.3	Massenspektrometrie .....	45
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>56</b>
3.1.1	<i>Stachybotrys</i> -Isolate .....	56
3.1.2	Referenzstämme .....	60
3.1.3	Nährmedien .....	61
3.1.4	Phänotypisierung .....	61
3.1.5	Genotypisierung .....	62
3.1.6	MALDI-TOF MS .....	63
3.1.7	LC-MS/MS .....	64
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>66</b>
3.2.1	Anzucht .....	66
3.2.2	Phänotypische Charakterisierung .....	67
3.2.3	Molekularbiologische Differenzierung .....	68
3.2.4	MALDI-TOF MS .....	72
3.2.5	LC-MS/MS .....	77



---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung .....</b>	<b>80</b>
4.1.1	Referenzstämme .....	80
4.1.2	<i>Stachybotrys</i> -Isolate .....	90
<b>4.2</b>	<b>Molekularbiologische Differenzierung .....</b>	<b>108</b>
4.2.1	PCR .....	108
4.2.2	Sequenzierungsergebnisse des ITS-1/4 Genabschnittes der Referenzstämme.....	108
4.2.3	Sequenzierungsergebnisse der <i>tri5</i> - Region der Referenzstämme .....	109
4.2.4	Sequenzierungsergebnisse der ITS- und <i>tri5</i> -Regionen der <i>Stachybotrys</i> -Isolate .....	111
<b>4.3</b>	<b>Differenzierung mittels MALDI-TOF MS .....</b>	<b>115</b>
4.3.1	Erstellung von Referenzspektren mittels MALDI-Biotyper .....	120
4.3.2	Identifizierung der <i>Stachybotrys</i> -Isolate mittels MALDI-Biotyper .....	124
<b>4.4</b>	<b>Nachweis makrozyklischer Trichothecene mittels LC-MS/MS.....</b>	<b>128</b>
4.4.1	Referenzstämme .....	130
4.4.2	<i>Stachybotrys</i> -Isolate .....	132
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>134</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>140</b>
<b>5.1</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung .....</b>	<b>142</b>
<b>5.2</b>	<b>Molekularbiologische Differenzierung .....</b>	<b>146</b>
<b>5.3</b>	<b>Differenzierung mittels MALDI-TOF MS .....</b>	<b>147</b>
<b>5.4</b>	<b>Nachweis makrozyklischer Trichothecene.....</b>	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>154</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>155</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>156</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>180</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>196</b>



## 1 Einleitung

Der Schwärzepilz *Stachybotrys* (*S.*) gehört im Reich der *Mycota* zur Ordnung der *Hypocreales* (Hibbett et al., 2007). Diese Mikromyketen kommen ubiquitär vor und wachsen aufgrund ihres zellulolytischen Potentials insbesondere auf feuchten oder welkenden, zellulosehaltigen Materialien (Forgacs, 1972; Nielsen et al., 1998b).

*Stachybotrys* spp. haben aufgrund ihrer Fähigkeit hochtoxische Mykotoxine zu bilden eine besondere Bedeutung in der Tier- und Humanmedizin. Bei Tieren, darunter vor allem bei Pferden, gelten die zytotoxischen makrozyklischen Trichothecene als Auslöser der Stachybotryotoxikose (Forgacs, 1972). Beim Menschen ist eine Gesundheitsgefährdung durch ein Vorkommen in Innenräumen insbesondere nach Feuchteschäden möglich. Gleichzeitig kann eine inhalative Belastung mit makrozyklischen Trichothecenen beim Umgang mit verschimmelten Futtermitteln oder während Sanierungsarbeiten auftreten (Johanning, 1994; Hintikka, 1978).

Gegenwärtig ist die Taxonomie der Gattung *Stachybotrys* nicht ausreichend geklärt. Es existieren viele nicht vollständig beschriebene Spezies und eine Vielzahl an Synonymen. Insgesamt sind je nach Quelle bis zu 78 Spezies bekannt, wobei davon bisher nur 22 Spezies in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) anhand ihrer Nukleotidsequenzen erfasst sind (Crous et al., 2004; NCBI, 2014). Eine weiterführende Charakterisierung anhand des Sekundärmetabolitenprofils existiert nur für einige dieser Spezies.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Gattung *Stachybotrys* am Beispiel von verfügbaren Referenzstämmen (n=15) und je 15 ausgewählten Isolaten aus Umweltproben, Futter- und Lebensmitteln aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit umfassend auf phänotypischer und genotypischer Ebene sowie mittels massenspektrometrischer Verfahren zu charakterisieren. Dafür lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Etablierung einer optimierten Proteinextraktionsmethode für die Identifizierung von *Stachybotrys* anhand ihres ribosomalen Proteinprofils mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und auf der Erstellung dafür notwendiger Referenzspektren.

## 2 Literatur

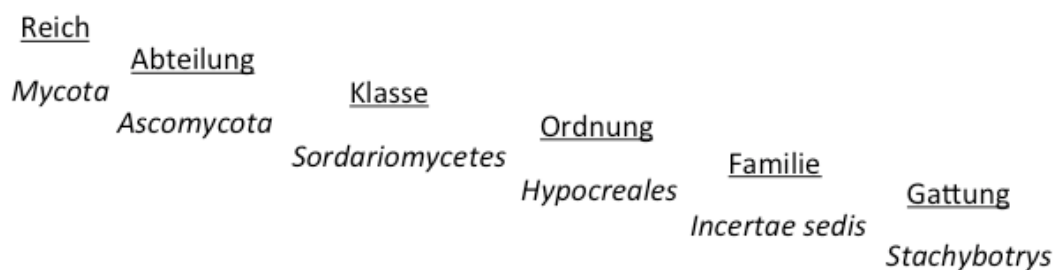
### 2.1 Gattung *Stachybotrys*

#### 2.1.1 Taxonomie

Echte Pilze (*Mycota*) werden nach Samson (2010) in vier Abteilungen, die *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* und *Chytridiomycota* eingeteilt. Hibbett et al. (2007) teilten die *Mycota* hingegen in sieben Abteilungen ein: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporidia* und *Neocallimastigomycota*.

Der formalen Einordnung von Schimmelpilzen nach Gedek (1980) folgend, wurde die Gattung *Stachybotrys* im Reich der *Mycota* der Abteilung *Deuteromycota*, der Klasse *Hyphomycetes*, der Ordnung *Moniliales* und dort der Familie *Dematiaceae* zugeordnet.

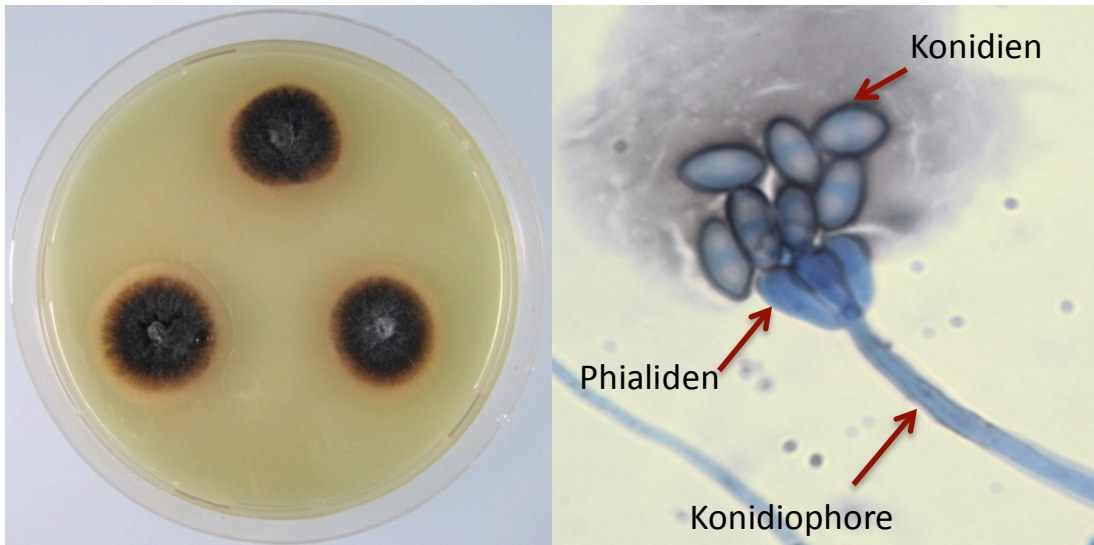
Die gegenwärtig anerkannte Einteilung von Mikromyzeten der Gattung *Stachybotrys* nach Hibbett et al. (2007) ist der Abbildung 1 zu entnehmen.



**Abbildung 1:** Systematik für *Stachybotrys* spp. nach Hibbett et al. (2007)

Auf Gattungsebene führen Seifert et al. (2011) sieben Synonyme für *Stachybotrys* an: *Fuckelina* Sacc. (1875), *Gliobotrys* Höhn. (1902), *Hyalobotrys* Pidopl. (1948), *Hyalostachybotrys* (1958), *Spinomyces* Saito (1939), nom. inval. Art. 36 (nomen invalidum) ( $\cong$  *Memnoniella*) und *Synsporium* Preuss (1849).

*Stachybotrys* ist ein typischer Schwärzepilz, dessen mikroskopisches Erscheinungsbild durch längliche Konidiophoren und keulenförmige Phialiden gekennzeichnet ist (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Typische schwarze Dreipunktkultur von *S. chartarum* auf Malzextraktagar und lichtmikroskopische Aufnahme von *S. chartarum* (Klebestreifenpräparat, Anilinblaufärbung, 400-fache Vergrößerung) (Biermaier, 2013)

Das erste *Stachybotrys*-Isolat (*S.*) wurde von Corda (1837) in einem von Schimmel befallenen Gebäude in Prag von einer Tapete isoliert und als *S. atra* CORDA beschrieben.

Bis 1943 waren 20 Spezies bekannt, die von Bisby (1943) neu geordnet auf zwei Spezies, *S. atra* und *S. subsimplex* reduziert wurden. Er postulierte, dass extrinsische Faktoren, z.B. UV-Licht oder Kälte, zur Entstehung abnormer Isolate („freak isolates“) führen können und dass diese nicht als neue Spezies behandelt werden dürften.

Die Zugehörigkeit eines Isolates zur Gattung *Stachybotrys* wurde nach der Farbe der Kolonien bestimmt (Bisby, 1943). Hughes (1953) hingegen nahm später die taxonomische Einordnung nach der Form und Beschaffenheit der Konidiophoren und Konidien vor.

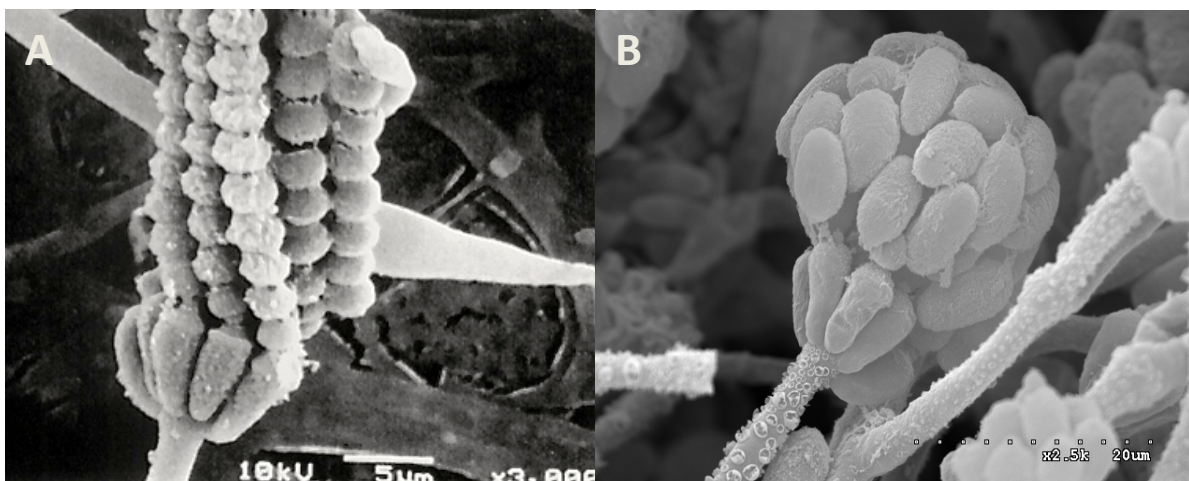
*S. atra* wurde 1976 in *S. chartarum* (EHRENBERG EX LINK) HUGHES (Jong und Davis, 1976) umbenannt. 1976 waren insgesamt elf Spezies aufgrund ihrer unterschiedlichen Kulturmorphologie differenziert (Jong und Davis, 1976). Cruse et al. (2002) nannten ebenso elf, zum Teil abweichend von Jong und Davis (1976), morphologisch anerkannte Spezies von *Stachybotrys*. Aufgrund morphologischer und phylogenetischer Untersuchungen und Analysen des Metabolitenprofils wurde *S. chartarum* sensu lato (im weiten Sinne) in einen Chemotyp A und den hoch zytotoxischen Chemotyp S, sowie eine neue Spezies, *S. chlorohalonata*, unterschieden (Andersen et al., 2003).

Die Zuordnung von Schimmelpilzen zur Gattung *Stachybotrys* ist bislang problematisch. Es tauchen immer wieder kryptische Spezies auf, deren Taxonomie für Verwirrungen sorgen (Cruse et al., 2002). Dies kann sehr gut anhand von Gattungen wie *Memnoniella* dargestellt werden, die erst später aufgrund von DNA-Analysen der Gattung *Stachybotrys* zugeordnet wurden (Haugland et al., 2001).

Diese Gattung wurde ursprünglich aufgrund ihrer Morphologie und der Art der Sporenbildung von der Gattung *Stachybotrys* unabhängig aufgelistet (Jong und Davis, 1976). *Memnoniella echinata* besitzt ähnlich ausgeprägte Konidiophoren, produziert jedoch runde Sporen in Ketten (Abbildung 3) (Jong und Davis, 1976). Wang et al. (2014) bestätigten schließlich die Überführung von *Memnoniella* spp. in *Stachybotrys* spp. auch aufgrund eines vergleichbaren Metabolitenprofils.

Zuck (1946) und Wang et al. (2015) beobachteten, dass *Memnoniella echinata*-Isolate auch Sporenpakete ähnlich derer von *S. chartarum* bilden können.

*Myrothecium* ist eine weitere Gattung, die bislang getrennt von der Gattung *Stachybotrys* aufgeführt wird, obwohl es auf morphologischer und phylogenetischer Ebene Ähnlichkeiten gibt und sie ein vergleichbares Mykotoxinprofil aufweist (Castlebury et al., 2004).



**Abbildung 3:** Rasterelektronenmikroskopaufnahmen: A: *Memnoniella echinata* (ATCC 22697) Vergrößerung: 3.000-fach (Haugland et al., 2001), B: *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) Vergrößerung: 2.500-fach (Gareis, 2014)

Während des Internationalen Botanischen Kongresses (IBC) 2011 legte das dort tagende Nomenklatur-Komitee fest, dass neue Namen für Schimmelpilze in Zeitschriften publiziert werden müssen, die "peer-reviewed" sind. Zusätzlich müssen die Namen in Online-datenbanken wie „Index Fungorum" oder „MycoBank" registriert werden (Norvell, 2011).

In diesen Onlinedatenbanken, aber auch in Fachbüchern wie dem „Dictionary of the Fungi“, werden unterschiedliche *Stachybotrys* spp. gelistet (Crous et al., 2004; Kirk et al., 2008; The Royal Botanic Gardens Kew et al., 2014). Oft werden dort auch verschiedene Synonyme für dieselbe *Stachybotrys* sp. verwendet. Für *S. chartarum* existieren so insgesamt 23 Synonyme (vgl. Tabelle 40 im Anhang).

Bis zum Jahr 2004 waren 51 *Stachybotrys* spp. und vier *Memnoniella* spp., die zur Gattung *Stachybotrys* gezählt wurden, anerkannt (Pinruan et al., 2004). Die gegenwärtige Zahl an Einträgen für *Stachybotrys* spp. - in Abhängigkeit der Quellen - in verschiedenen Onlinedatenbanken und Büchern ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** Einträge von *Stachybotrys* spp. in verschiedenen Datenbanken

Quelle	Anzahl*	Referenz
Dictionary of the Fungi	44	Kirk et al. (2008)
Index Fungorum	78	The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014)
MycoBank	78	Crous et al. (2004)
National Center for Biotechnology Information	22	NCBI (2014)
Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Saccardo Database	33	Farr und Rossmann (2014)

\* Zusammenstellung einzelner Spezies siehe Tabelle 40 im Anhang

In der zehnten Ausgabe des „Dictionary of the Fungi“ wurden 44 Spezies der Gattung *Stachybotrys* zugeordnet (Kirk et al., 2008).

Die Datenbank „Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Saccardo Database“ zählt jedoch nur 33 Einträge, ohne genauer darauf einzugehen, welche als Synonyme zu betrachten sind (Farr und Rossmann, 2014).

In der Onlinedatenbank „Index Fungorum“ sind 78 *Stachybotrys* spp. aufgelistet. Von diesen 78 Spezies sind sechs unter anderen Gattungen (*Melanopsamma*, *Memnoniella*, *Periconiella* und *Sterigmatobotrys*) geführt (Tabelle 40 im Anhang), die als Synonyme für *Stachybotrys* spp. gelten (The Royal Botanic Gardens Kew et al., 2014).

Alle diese 78 Spezies sind publiziert und ebenfalls in der Onlinedatenbank MycoBank erfasst und somit gemäß den Beschlüssen des Internationalen Botanischen Kongresses (IBC) 2011 anerkannt (Crous et al., 2004; Hawksworth et al., 2011; Norvell, 2011; Robert et al., 2005). In der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) sind von diesen 78 *Stachybotrys* spp. nur 22 Spezies mit ihren Nukleotidsequenzen gelistet (NCBI, 2014). Die anderen 56 *Stachybotrys* spp. wurden größtenteils nur anhand ihrer Kulturmorphologie beschrieben. Pan et al. (2014) beschrieben zudem vier weitere Spezies, jedoch nur kulturmorphologisch. Diese vier neuen *Stachybotrys* spp. waren zum Zeitpunkt dieser Dissertation noch nicht in „Index Fungorum“ registriert (The Royal Botanic Gardens Kew et al., 2014).

In Tabelle 40 im Anhang sind die momentan bekannten und durch die Aufnahme in „MycoBank“ und „Index Fungorum“ anerkannten *Stachybotrys* spp. (n=78) und ihre Synonyme zusammengestellt.

Derzeit sind nur zwei teleomorphe Formen von *Stachybotrys* bekannt, *Melanopsamma pomiformis* von *S. albipes* und *Nectriella funicola* von *S. oleronensis* (Booth, 1957; Castlebury et al., 2004; Lechat et al., 2013), wobei „Index Fungorum“ und „MycoBank“ in Hinblick auf *Melanopsamma pomiformis* unterschiedliche Meinungen vertreten (Wang et al., 2015). „MycoBank“ führt *Melanopsamma pomiformis* als geschlechtsneutral, wohingegen „Index Fungorum“ *Melanopsamma pomiformis* als teleomorphe Form von *S. albipes* ansieht (Crous et al., 2004; The Royal Botanic Gardens Kew et al., 2014).

Zudem wird vermutet, dass *Flexuoniesslia* sp. eine teleomorphe Form einer noch nicht identifizierten *Stachybotrys* sp. ist (Whitton et al., 2001) und *Ornatispora* spp. ebenfalls asexuelle *Stachybotrys*-Stadien besitzen (Whitton et al., 2012).



Bislang existiert keine einheitliche Gliederung der Gattung *Stachybotrys*. Wang et al. (2015), die sich der unübersichtlichen Taxonomie der Gattung *Stachybotrys* widmeten, weisen ebenfalls darauf hin, dass aktuell keine einheitliche taxonomische Einordnung von *Stachybotrys* spp. möglich ist.

### 2.1.2 Wachstumsbedingungen

*Stachybotrys* kommt weltweit vor und wächst bevorzugt auf zellulosehaltigen Materialien (Samson, 2010). Abhängig von den Matrices, auf denen *Stachybotrys* spp. wachsen, sind auch die jeweiligen Angaben betreffend Temperaturangaben, die relative Luftfeuchtigkeit und pH-Wert für das Wachstum von *Stachybotrys* spp. in der Literatur oft verschieden.

In älterer Literatur werden je nach Nährmedium Temperaturbereiche von +2 bis +40 °C für das Wachstum und ein minimaler  $a_w$ -Wert von 0,85 bis 0,95 für das Auskeimen der Sporen genannt. Für die Sporulation ist ein  $a_w$ -Wert von 0,91 bis 0,96 optimal (Ayerst, 1969; Domsch und Gams, 1970; Grant et al., 1989).

Für das Wachstum von *Stachybotrys* spp. auf Potato Dextrose Agar (PDA) wird von einem Temperaturoptimum von 25 - 30 °C und einem optimalen  $a_w$ -Wert von 0,980 - 0,995 ausgegangen (Frazer et al., 2011; Magan et al., 2012). PDA erwies sich jedoch als nicht optimal für die Sporulation von *Stachybotrys* spp. (McQuade, 1963).

Biotin und Glucose erwiesen sich als limitierende Faktoren für das Wachstum von *Stachybotrys*-Kulturen auf Nährmedien (Buston und Basu, 1947; McQuade, 1963; Steinberg, 1939).

McQuade (1963) beschrieb eine Abhängigkeit des Erscheinungsbildes des Myzels vom Verhältnis bestimmter Salze sowie von deren Konzentration im Nährmedium. Durch erhöhte Konzentrationen von Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ ) wurde vermehrt filamentöses Myzel ausgebildet. Durch niedrige Konzentrationen von Ammoniumchlorid ( $NH_4Cl$ ) wurde die Sporulation unterdrückt; außerdem kam es zu einem Anschwellen der Zellen.

### 2.1.3 Vorkommen

*Stachybotrys* spp. kommen ubiquitär vor. Sie wachsen bevorzugt als Saprobionten auf feuchtem, zellulosehaltigem und welkendem Material wie Heu und Stroh, aber auch auf zellulosehaltigen Baumaterialien und Innenraummaterialien (Hintikka, 1977; Jarvis et al., 1983; Nikulin et al., 1994).

In Einzelfällen wurde über den Nachweis von *S. atra* in menschlichen Konjunktivalsäcken und die Isolierung von *S. chartarum* aus der Lunge eines an pulmonaler Häm siderose erkrankten Kindes berichtet (Ainley und Smith, 1965; Vesper et al., 2000b).

#### 2.1.3.1 Futtermittel

Im Jahr 1931 kam es in der Ukrainischen Sozialistischen Sowjetrepublik gehäuft zu Todesfällen von Pferden (Forgacs, 1972). Als Ursache wurde Stroh identifiziert, das mit einem schwarzen Schimmelpilz bedeckt war (Drobotko et al., 1946, zit. nach Forgacs, 1972). Sarkisov (1947) isolierte drei Jahre später *S. alternans* aus Stroh eines Betriebes, in dem die Erkrankung Stachybotryotoxikose (vgl. 2.2.1) endemisch war (Forgacs, 1972). Harrach et al. (1983) wiesen die für die Stachybotryotoxikose verantwortlichen Mykotoxine, makrozyklische Trichothecene (vgl. 2.1.4.1), erstmals in Stroh nach.

In Tabelle 2 sind die in der verfügbaren Literatur von 1929 - 1991 beschriebenen Stachybotryotoxikose-Erkrankungen bei Tieren zusammengefasst, die mit dem Vorkommen von *Stachybotrys* auf Heu und Stroh in Zusammenhang gebracht werden. Heu und Stroh, insbesondere Gerstenstroh, gelten als das beste Nährsubstrat für *S. chartarum* (Dankó, 1975; Harrach et al., 1987; Le Bars und Le Bars, 1991).

**Tabelle 2:** Vorkommen von *Stachybotrys* im Zusammenhang mit der Erkrankung Stachybotryotoxikose bei Tieren von 1929 - 1991 (modifiziert nach Kluwe, 2006)

Jahr	Land	Betroffene Tierart	Matrix	Referenz
1929	Ungarn	Pferd	n.b.	Jarmai (1929) <sup>2</sup>
1931-1938	Ukraine	Pferd	verschimmelter Heu/Stroh	Drobotko et al. (1946) <sup>1</sup>
1946	n.b.	Pferd	schwarz verschimmelter Stroh	Drobotko et al. (1946) <sup>1</sup>
1951-1957 außer 1954	Ukraine	Pferd	n.b.	Shulyumov et al. (1960) <sup>1</sup>
1959	n.b.	Pferd/Rind	mit <i>S. alternans</i> befallenes Stroh	Fortuskny et al. (1959) <sup>1</sup>
1960-1962	n.b.	Rind	n.b.	Ismailov und Moroshkin (1962); Kurmanov (1961); Levenberg et al. (1961); Matusevich et al. (1960); Nagornyi et al. (1960) <sup>1</sup>
1965	Ungarn	Pferd	Gerstenstroh	Dankó (1975)
1983	Südafrika	Schaf	Weizen- und Gerstenstroh	Kriek und Marasas (1983) <sup>2</sup>
1983	Ungarn	Pferd	Stroh	Harrach et al. (1987)
1984	Deutschland	Pferd	verschimmelter Heu	Launer et al. (1987) <sup>2</sup>
1991	Frankreich	Pferd	verschimmelter Stroh	Lefebvre et al. (1994) <sup>2</sup>

<sup>1</sup>nach Forgacs (1972)

<sup>2</sup>nach Kluwe (2006)

n.b.: nicht beschrieben

In Ägypten wurden 164 *S. chartarum*-Isolate aus 50 Weizenstrohproben gewonnen (El-Kady und Moubasher, 1982). In Südafrika wurde *S. chartarum* aus Weizen- und Gerstenstroh isoliert (Kriek und Marasas, 1983, zit. nach Kluwe, 2006). Ohff und Weissbach (1984) gewannen elf *S. atra*-Isolate aus 61 Futtermitteln aus der ehemaligen DDR. Bata et al. (1985) beschrieb 17 *S. atra* Stämme aus Stroh in Ungarn und der Tschechoslowakei und wiesen das Bildungsvermögen von makrozyklischen Trichothecenen bei den isolierten *S. atra* Stämmen nach. In Frankreich isolierten Le Bars und Le Bars (1991) von 1974 - 1984 20 *S. atra* Stämme aus Stroh. Tantaoui-Elaraki et al. (1994) isolierten *S. atra* aus zehn Strohproben in Marokko.

Zuletzt beschrieb Kluwe (2006) das Vorkommen von 32 *Stachybotrys*-Isolaten in Heu- und Strohproben aus Deutschland. Zudem wies sie das Bildungsvermögen von makrozyklischen Trichothecenen bei einigen der gewonnenen Isolate nach.

### 2.1.3.2 Lebens- und Genussmittel

In Tabelle 3 sind die verfügbaren Berichte über den Nachweis von *Stachybotrys* spp. in Lebens- und Genussmitteln zusammengefasst. *Stachybotrys* spp. wurden aus verschiedenen, teilweise verarbeiteten Agrarprodukten wie Getreide, Hafermehl, Erbsen und rotem Pfeffer isoliert (Abdel-Hafez und El-Said, 1997; Fung et al., 1998; Korpinen und Uoti, 2009; Nejat und Ershad, 1994).

Zudem wurden *Stachybotrys* spp. in Tabak (*Nicotiana tabacum* L. var. Burley) nachgewiesen (Catania et al., 1998 nach Li und Hartman, 2000) und als mögliche Verursacher des „Soybean root rot“ identifiziert (Li und Hartman, 2000; Li et al., 2002).

Zuletzt wurde *S. chartarum* aus Heilkräutern (Abdel-Hafez SII und Naggar, 2006 nach Ramos et al., 2013) und *S. chartarum* (Chemotypen A und S) sowie *S. chlorohalonata* aus getrockneten Kräutern isoliert (Biermaier et al., 2015).

**Tabelle 3:** Vorkommen von *Stachybotrys* auf Lebens- und Genussmitteln

Jahr	Land	Matrix	Referenz
1972	Finnland	Erbsen	Korpinen und Ylimäki (1972)
1994	Iran	Gerste	Nejat und Ershad (1994)
1997	Ägypten	roter Pfeffer	Abdel-Hafez und El-Said (1997)
1998	n.b.	Getreide	Fung et al. (1998)
1998	n.b.	Tabak	Catania et al. (1998) <sup>1</sup>
2000	USA	Sojabohnenwurzeln	Li und Hartman (2000)
2006	Ägypten	Heilkräuter	Abdel-Hafez SII und Naggar (2006) <sup>2</sup>
2013	Deutschland	Kräuter	Biermaier et al. (2015)

<sup>1</sup>nach Li et al. (2002)

<sup>2</sup>nach Ramos et al. (2013)

n.b.: nicht beschrieben

### 2.1.3.3 Umweltproben

Aufgrund von Wasserschäden kann es in Innenräumen zu einem Wachstum von Mikromyzeten kommen (Nielsen, 2002).

Wie Tabelle 4 zu entnehmen ist, wurden *Stachybotrys* spp. auf verschiedenen Arten von feuchtigkeitsgeschädigten Materialien (Holzleisten, Möbel, Teppiche, Tapeten, Gipskartonplatten, u.a.) aus Innenräumen (Andersson et al., 1997; Gareis, 1995; Gottschalk et al., 2006; Jarvis et al., 1996; Van Reenen-Hoekstra et al., 1991) oder aus Büchern und Abfallpapier isoliert (Nikulin et al., 1994). Zudem konnten *Stachybotrys*-Sporen auch in Staubproben (Bloom et al., 2009; Hunter et al., 1988) und Luftproben aus Innenräumen mit Feuchteschäden nachgewiesen werden (Gravesen et al., 1999; Reponen et al., 1994, Johanning, 1994; Gareis, 1995).

Zum Teil wurden die Proben im Zusammenhang mit Erkrankungen von Menschen gewonnen (Tabelle 4). In der Literatur beschriebene Krankheitsfälle und dabei aufgetretene Symptome sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Zudem konnte bei solchen Proben mittels MTT-Zytotoxizitätstest die hochgradige Zytotoxizität nachgewiesen werden, was mit der Präsenz der makrozyklischen Trichothecene positiv korrelierte (Gareis, 1995; Hanelt et al., 1994).

**Tabelle 4:** Zusammenstellung von *Stachybotrys*-Nachweisen in Innenräumen

<b>Jahr</b>	<b>Land</b>	<b>Matrix</b>	<b>Referenz</b>
1983-1985	England	Luftfilter	Hunter et al. (1988)
1982*	Belgien	Luftfilter Matratzen Möbel Tapete Teppichstaub	Nolard (1999)
1990-1991	Finnland	Luftfilter	Reponen et al. (1994)
n.b.	Holland	Fensterrahmen Fußbodenmaterial Luftfilter Möbel Tapete Teppich Wandmaterial	Van Reenen-Hoekstra et al. (1991)
1992-1996*	Finnland	Staub	Reijula (1999)
1993-1998*	USA	Deckenplatten Gipskartonplatte Holz Isolierungsmaterial Luftfilter Putz Tapete Teppich	Gareis (1995); Johanning (1994)
n.b.*	Deutschland	kompostierbare Blumentöpfe	Dill et al. (1997)
1995*	Finnland	Baumaterial Staub	Andersson et al. (1997)
n.b.	Dänemark	Gipskartonplatten Holz Isoliermaterial	Gravesen et al. (1999)
n.b.*	USA	Bodenmaterial Gipskartonplatte Polster Teppich	Craner (1999)
2005-2006	Deutschland	Gipskartonplatte Tapete Wandmaterial	Gottschalk et al. (2006)
2007	USA	Staub	Bloom et al. (2009)

\*Proben im Zusammenhang mit Erkrankungen von Menschen gewonnen

n.b.: nicht beschrieben

**Tabelle 5:** Vorkommen von *Stachybotrys* in Umweltproben im Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen

<b>Jahr</b>	<b>Matrix</b>	<b>Betroffene</b>	<b>Symptome</b>	<b>Referenz</b>
n.b.	Pilzextrakte/ Stroh	Versuchspersonen	Atemwegsbeschwerden, Irritation der Schleimhäute, dermatologische Beschwerden, Blutungen	Drobotko (1945)*
1978	Staub/ Landwirtschaft	Landarbeiter	Stachybotryotoxikose	Hintikka (1978) <sup>1</sup>
1993- 1994	Luftfilter	Kleinkinder	pulmonale Hämosiderose	Etzel et al. (1998); Montana et al. (1997) <sup>1</sup>
1996	verschimmertes Papier	Büroangestellte	Atemwegsbeschwerden, chronisches Erschöpfungs- Syndrom, Blutbildveränderungen, Irritation der Augenschleimhaut, dermatologische Beschwerden	Johanning et al. (1996)
1997	Baumaterial/ Innenraum	Handwerker	Irritation von Augen- und Nasenschleimhaut	Andersson et al. (1997)
1998	Luftfilter	Büroangestellte	dermatologische Beschwerden, Irritation der Schleimhäute, respiratorische Beschwerden, ZNS- Störungen	Johanning et al. (1998)
1998	Luftfilter	Mitarbeiter des Gerichts	pulmonale Beschwerden	Hodgson et al. (1998) <sup>1</sup>
1996- 2001	Baumaterial/ Innenraum	Anwohner	"Sick-Building"-Syndrom	Engvall et al. (2001)
2000	Baumaterial/ Innenraum	Anwohner	Irritation der Augen- und oberen Atemwegsschleimhäute, Kopfschmerzen	Usleber et al. (2001)
2001	Baumaterial/ Innenraum	Schüler/Lehrer	"Sick-Building"-Syndrom	Scheel et al. (2001)
2010	Luftfilter	Anwohner	Irritation der oberen Atemwege und Augenschleimhäute	Mussalo- Rauhamaa et al. (2010)

<sup>1</sup> nach Johanning (1999) ZNS: Zentralnervensystem n.b.: nicht beschrieben \*Humanexperimente

#### 2.1.4 Metabolite des sekundären Stoffwechsels

Metabolite des sekundären Stoffwechsels werden als Substanzen beschrieben, die scheinbar keine lebenswichtige Funktion im Organismus übernehmen. Oftmals werden sie in der Literatur auch "Abfall- oder Detoxifikationsprodukte" genannt und wiegen selten mehr als 3000 Da (Williams et al., 1989). Zu diesen Metaboliten zählen auch von Pilzen gebildete Mykotoxine (Jarvis et al., 1995).

Metabolite wie Mykotoxine erfüllen jedoch eine ökologische Funktion. Sie werden von dem bildenden Organismus unter anderem gegen Konkurrenten eingesetzt, die sich im selben Habitat befinden, um sich einen Vorteil im Kampf um Nährstoffe zu verschaffen (Gareis und Gottschalk, 2014).

Andere Metabolite besitzen z.B. antibiotische Eigenschaften gegen Pilze oder Bakterien (Fleming, 1929; Xu et al., 1992). Zudem wurde die Wirksamkeit von einigen Metaboliten gegen Insekten und Würmer nachgewiesen (Vesper, 2002).

Eine Übersicht zu den von *Stachybotrys* spp. gebildeten Metaboliten wie Trichothecenen (2.1.4.1), Atranonen (2.1.4.2) und Phenylspirodrimanen (2.1.4.3) liefert Tabelle 6. Von den derzeit 78 beschriebenen *Stachybotrys* spp. wurden 13 näher auf die Produktion von Trichothecenen und Atranonen untersucht. *S. chartarum* Chemotyp S und Chemotyp A, *S. chlorohalonata* und *S. dichroa* erwiesen sich einheitlich als Produzenten von einfachen Trichothecenen (Andersen et al., 2003). Hinsichtlich des Bildungsvermögens von *S. albipes*, *S. kampalensis*, *S. microspora*, *S. nephrospora* und *S. oenantes* sind die Untersuchungsergebnisse uneinheitlich. *S. chartarum* Chemotyp S und *S. dichroa* gelten als Bildner von makrozyklischen Trichothecenen (Andersen et al., 2003; Jarvis et al., 1995). Für *S. albipes*, *S. kampalensis* und *S. microspora* sind die Angaben hingegen widersprüchlich.

Die Bildung von Phenylspirodrimanen wurde bisher nur bei *S. chartarum* beschrieben (Hinkley et al., 1999; Jarvis et al., 1995; Li et al., 2014).



**Tabelle 6:** Metabolitenprofil von *Stachybotrys* spp.

<i>Stachybotrys</i> (S.) spp.	Bildung von		
	makrozyklischen Trichothecenen	einfachen Trichothecenen	Atranonen
<i>S. albipes</i>	Ja <sup>1</sup> /Nein <sup>2</sup>	Ja <sup>1</sup> /Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>
<i>S. chartarum</i> * (Chemotyp A)	Nein <sup>3</sup>	Ja <sup>3</sup>	Ja <sup>3</sup>
<i>S. chartarum</i> * (Chemotyp S)	Ja <sup>3</sup>	Ja <sup>3</sup>	Nein <sup>3</sup>
<i>S. chlorohalonata</i>	Nein <sup>3</sup>	Ja <sup>3</sup>	Ja <sup>3</sup>
<i>S. cylindrospora</i>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>
<i>S. dichroa</i>	Ja <sup>2</sup>	Ja <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>
<i>S. elegans</i> (bisbyi**)	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>
<i>S. kampalensis</i>	Ja <sup>1</sup> /Nein <sup>4</sup>	Ja <sup>1</sup> /Nein <sup>4</sup>	n.b.
<i>S. microspora</i>	Ja <sup>4</sup> /Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup> +/- <sup>1</sup>	Ja <sup>2</sup>
<i>S. nephrospora</i>	Nein <sup>2</sup>	+/- <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>
<i>S. nilagirica</i>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>
<i>S. oenanthes</i>	Nein <sup>2</sup>	+/- <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>
<i>S. parvispora</i>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>
<i>S. theobromae</i>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>	Nein <sup>2</sup>

\*Bildung Phenylspirodrimanen für *S. chartarum* beschrieben (Jarvis et al., 1995) <sup>1</sup> el-Maghraby et al. (1991)

\*\* Synonym zu *S. elegans*

Ja: gebildet

Nein: nicht gebildet

+/-: nicht alle Isolate übereinstimmend

n.b.: nicht beschrieben

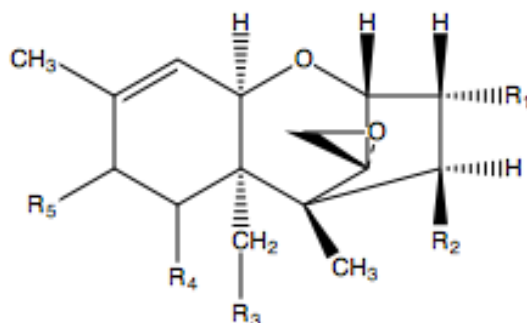
<sup>2</sup> Andersen et al. (2002)

<sup>3</sup> Andersen et al. (2003)

<sup>4</sup> El-Kady und Moubasher (1982)

### 2.1.4.1 Trichothecene

Zu den Trichothecenen zählen ca. 150 Metabolite, die zytotoxisch und immunmodulatorisch wirken können (Bennett und Klich, 2003; Otokawa, 1983). Sie gehören zur Gruppe der zyklischen Sesquiterpene, denen ein trizyklisches Grundgerüst und mindestens eine Epoxygruppe gemein sind (Abbildung 4).



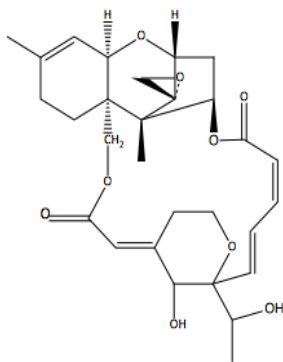
**Abbildung 4:** Grundgerüst von Trichothecenen nach Cole et al. (2003)

Trichothecene unterscheiden sich in Anzahl und Position der Hydroxygruppen und darin, wie diese verestert sind. Aufgrund der verschiedenen chemischen Strukturen wurden die Trichothecene in vier Typen (A-D) unterteilt (Ueno, 1983).

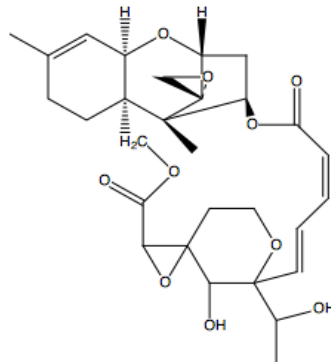
Typ B unterscheidet sich von Typ A durch eine Ketogruppe an Kohlenstoffatom C-8. Beide Typen werden hauptsächlich von Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildet (Ueno, 1983), wobei auch *S. chlorohalonata* und *Myrothecium* spp. Typ A Trichothecene wie z.B. Trichodermol bzw. Trichoverroide bilden können (Jarvis et al., 1996; Andersen et al., 2002; Nielsen et al., 1998a). Die Typ C Trichothecene besitzen zusätzliche Epoxygruppen und können als einfache oder makrozyklische Trichothecene vorliegen, die hauptsächlich von den Gattungen *Cephalosporium* und *Trichothecium* gebildet werden (Cole et al., 2003). Typ D Trichothecene, makrozyklische Trichothecene, sind durch einen unterschiedlich aufgebauten Makrozyklus zwischen Kohlenstoffatom C-4 und C-15 gekennzeichnet (Ueno, 1983).

Abgesehen von *S. chartarum* Chemotyp S und *Myrothecium* spp. können makrozyklische Trichothecene auch von der Pflanzengattung *Baccharis* synthetisiert werden. Diese werden als Baccharinoide bezeichnet. Dabei handelt es sich zum Teil um dieselben makrozyklischen Trichothecene die auch von *Myrothecium* gebildet werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Pflanze die zur Toxinproduktion nötigen Gene von den Mikromyzeten erworben hat (Jarvis et al., 1988).

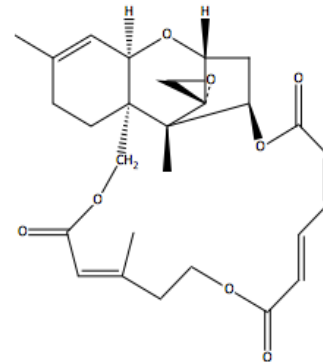
*S. chartarum* Chemotyp S bildet folgende makrozyklische Trichothecene (Abbildung 5): Satratoxin F, G und H, Roridin E und L-2, sowie Verrucarin J bzw. Isoformen davon (Andersen et al., 2002; Jarvis et al., 1988). Die Metabolite Roridin A und Verrucarin A werden hingegen nur von *Myrothecium roridum* bzw. *Myrothecium verrucaria* gebildet (Cole et al., 2003).



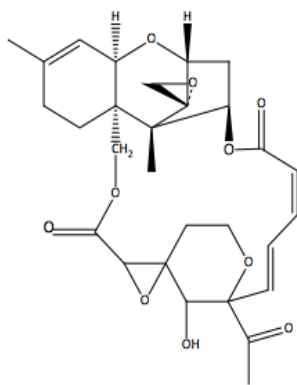
Satratoxin H  
( $C_{29}H_{36}O_9$ )  
MW: 528,24



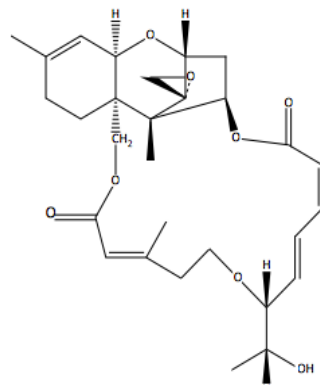
Satratoxin G  
( $C_{29}H_{36}O_{10}$ )  
MW: 544,23



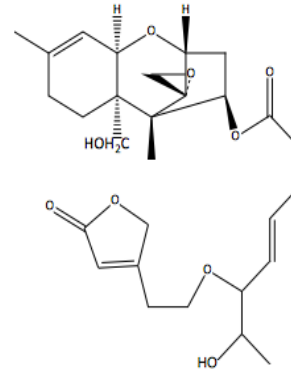
Verrucarin J  
( $C_{27}H_{32}O_9$ )  
MW: 484,21



Satratoxin F  
( $C_{29}H_{34}O_{10}$ )  
MW: 542,22



Roridin E  
( $C_{29}H_{38}O_8$ )  
MW: 514,26



Roridin L-2  
( $C_{29}H_{38}O_9$ )  
MW: 530,25

**Abbildung 5:** Strukturformeln der von *S. chartarum* Chemotyp S gebildeten makrozyklischen Trichothecene nach Cole et al. (2003). Isoformen nicht abgebildet (MW=Molekulargewicht, g/mol)

In Tabelle 7 sind Werte für akute Toxizitäten ausgewählter Trichothecene im Tierexperiment bzw. Zytotoxizitätstest dargestellt.

Die höchste Toxizität besitzen die Typ D Trichothecene, da sie im Vergleich zu den einfachen Trichothecenen irreversibel an die 60S Untereinheit der Ribosomen binden können und so durch die Interaktion mit der Peptidyltransferase die Proteinsynthese in der Initiations-, Elongations- und Terminationsphase hemmen (Feinberg und McLaughlin, 1989; Hernandez und Cannon, 1982; Rocha et al., 2005; Ueno, 1977).

**Tabelle 7:** LD<sub>50</sub>-Werte und IC<sub>50</sub>-Werte für ausgewählte Trichothecene (Typ A-D) nach Ueno (1983), Yoshizawa et al. (1986) und Gareis (2006)

Typ	Trichothecene	LD <sub>50</sub> -Werte (mg/kg)					IC <sub>50</sub> -Werte (µg/ml)
		Mäuse			Neugeborene Mäuse		SK-Zellen
		i.v.	i.p.	s.c.	p.o.	s.c.	
A	T-2 Toxin Trichodermol	-	5,2	-	10,5	0,15	0,02
		-	-	500 - 1000	-	-	-
B	Nivalenol Deoxynivalenol	-	4,1	-	-	-	2,0
		-	70,0	-	46,0	-	17,0
C	Crotocin	800	500	> 1000	-	-	-
D	Verrucarin A Satratoxin G	-	0,5	-	-	-	0,005
		-	1,2	-	-	-	0,007

LD<sub>50</sub>: Median Lethal Dosis 50

IC<sub>50</sub>: Inhibitory Concentration 50

SK: Swine Kidney

i.v.: intravenös

i.p.: intraperitoneal

p.o.: per os

s.c.: subcutan

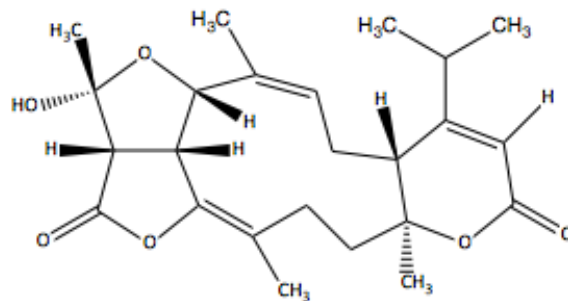
Anhand der IC<sub>50</sub> - Werte konnte festgestellt werden, dass Typ D Trichothecene ca. 20-fach toxischer gegenüber porcinen Nierenzellen (SK-Zellen) sind als Typ A Trichothecene (Gareis, 2006; Hanelt et al., 1994).

Die von *Stachybotrys*-Isolaten gebildeten Metabolite wirken nicht nur zytotoxisch, sondern auch proinflammatorisch, indem sie die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und Zytokinen (TNF-α und IL-6) anregen (vgl. Tabelle 9) (Islam et al., 2006; Leino et al., 2003; Lichtenstein et al., 2010; Pieckova et al., 2009; Ruotsalainen et al., 1998; Yike et al., 2005).

### 2.1.4.2 Atranone

Atranone bestehen aus einem Dolabellan-Diterpen-Ringsystem sowie einem Enol-Lacton-System. Atranone A - K sind in der Literatur beschrieben (Hinkley et al., 1999; Hinkley et al., 2000; Hinkley et al., 2003). Atranone wie z.B. Atranon B (Abbildung 6) werden ausschließlich von *Stachybotrys* spp. gebildet, die keine makrozyklischen Trichothecene produzieren (Tabelle 6) (Andersen et al., 2003; Hinkley et al., 1999; Rand et al., 2006).

Mäuse, denen hohe Konzentrationen von Atranon A und C intratracheal verabreicht wurden, reagierten mit unterschiedlich starkem Anstieg von Entzündungsmediatoren und Makrophagen (Rand et al., 2006). Damit kann von einer proinflammatorischen Wirkung auf Säugetiere ausgegangen werden, wobei gegenwärtig keine weiteren Erkenntnisse oder Fallberichte vorliegen.



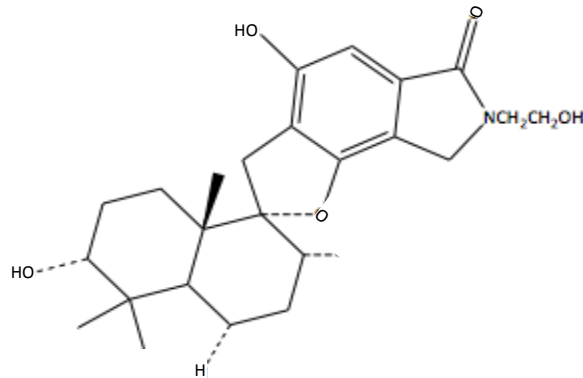
**Abbildung 6:** Chemische Struktur von Atranon B ( $C_{25}H_{34}O_7$ , Molekulargewicht: 446,2 g/mol) nach Cole et al. (2003)

### 2.1.4.3 Phenylspirodrimane

Es sind 24 verschiedene Phenylspirodrimane bekannt, die von verschiedenen *Stachybotrys* spp. gebildet werden können (Jarvis et al., 1995; Li et al., 2014).

Sie werden über zwei Synthesewege produziert, den Terpensyntheseweg und den Polyketidsyntheseweg (Nielsen, 2003). Phenylspirodrimane, wie das Stachybotryamid (Abbildung 7), gelten als immunsupprimierend, da sie das Komplementsystem hemmen, proteolytische Enzyme inhibieren und die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  vermindern (Hinkley et al., 1999). Sie stimulieren die Produktion von Plasminogen, regen die Fibrinolyse und die Thrombolyse an und wirken geringgradig zytotoxisch und neurotoxisch (Nielsen, 2003).

Im Vergleich zu makrozyklischen Trichothecenen ist die Zytotoxizität von Phenylspirodrimanen deutlich geringer (Jarvis et al., 1995).



**Abbildung 7:** Chemische Struktur von Stachybotryamid ( $C_{25}H_{35}NO_5$ , Molekulargewicht: 429,3 g/mol) nach Hinkley et al. (1999)

## 2.2 Bedeutung als Krankheitserreger

### 2.2.1 Tier

Während der Invasion der Mongolen in Russland im 13. Jahrhundert kam es vermutlich aufgrund von mit *S. alternans* kontaminiertem Stroh zu massiven Todesfällen bei Pferden (Dankó, 1975; Forgacs, 1972).

Im Jahr 1930 erkrankten Pferde in der Ukrainischen Sozialistischen Sowjetrepublik an verschimmeltem Stroh. Zu dieser der Zeit war die Krankheit unter dem Namen „NZ“ (neizvestnoe zabolevanie - unbekannte Erkrankung) oder „MZ“ (massovoe zabolevanie - Massenerkrankung) bekannt (Forgacs, 1972). In Ungarn wurde die Erkrankung als Pyoseptikämie beschrieben (Dankó, 1975).

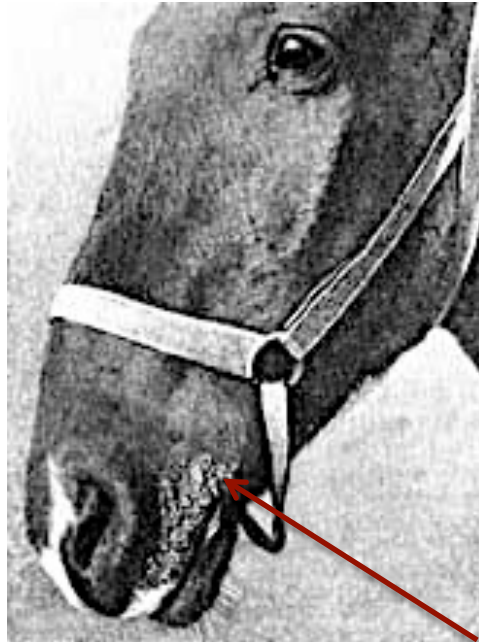
Um die Todesfälle in der Ukrainischen Sozialistischen Sowjetrepublik zu stoppen, arbeiteten mehrere Arbeitsgruppen gleichzeitig an der Klärung der Ätiologie. 1938 wies Sarkisov *S. alternans* in Stroh aus einem von den Todesfällen betroffenen Pferdebeständen nach und brachte so ein Vorkommen von *Stachybotrys* mit der Erkrankung der Pferde in Verbindung (Sarkisov, 1947, zit. nach Forgacs, 1972).

Der Begriff "Stachybotryotoxikose" als Krankheitsbild wird erstmals in einem von der sowjetischen Armee erbeuteten Wehrblatt erwähnt. In diesem wird eine Haltung-/Ernährungsempfehlung beschrieben, die dazu dienen sollte, die Gesundheit der Militärpferde hoch zu halten. Eine deutsche Übersetzung des russischen Wehrblatts zur Information bezüglich der Massenerkrankung („MZ“) wurde in der Zeitschrift für Veterinärkunde (54. Jahrgang, Nr. 8) im Jahr 1942 veröffentlicht (Kluwe, 2006).

In den Jahren 1951 - 1991 kam es in Europa zu weiteren belegten Ausbrüchen bei Pferden und anderen Farmtieren (siehe Tabelle 2) (Launer et al., 1987; Shulyumov et al., 1960, zit. nach Forgacs, 1972).

Bei Pferden werden drei klinisch unterschiedliche Formen der Stachybotryotoxikose, die typische Form, die atypische Form und die Schockform unterschieden. Welche Form zur Ausprägung kommt ist abhängig von der Menge an aufgenommenen Toxinen und der Dauer der Exposition (Forgacs, 1972).

Die typische Form wird bei kontinuierlichen Aufnahmen von geringen, subletalen Dosen beobachtet und gliedert sich in drei Stadien: Stadium 1 beginnt zwei bis zehn Tage nach Kontakt mit den Toxinen und ist geprägt durch Stomatitis und oberflächliche bis tiefe Risse in den Maulwinkeln. Bei weiterer Exposition treten Nekrosen auf (Abbildung 8) (Dankó, 1975; Forgacs, 1972).



**Abbildung 8:** Pferd mit borkigen Veränderungen in den Maulwinkeln (Pfeil) nach Exposition gegenüber mit *S. chartarum* kontaminiertem Stroh (Sarkisov, 1954)

Bei niedriger Exposition treten nur geringgradige Ulcera an den mucocutanösen Übergängen im Nüsternbereich auf. Daher wird dieses Stadium oftmals übersehen.

Weiter kann es zu Ödemen im Kopfbereich (Nilpferdkopf) und zum Anschwellen der lokalen Lymphknoten kommen. Die *Lnn. submaxillares* sind oft besonders stark geschwollen und äußerst druckempfindlich. Je nach Menge des aufgenommenen Toxins dauert dieses erste Stadium acht bis 30 Tage. Sollte das Pferd weiterhin geringe, subletale Mengen an Toxinen aufnehmen, kommt es eventuell trotzdem nach ca. zwei Wochen zu einem Rückgang der äußeren Symptome (Forgacs, 1972).

Nach weiteren fünf Tagen erreicht die Erkrankung Stadium 2 mit typischen systemischen Krankheitserscheinungen. Die Koagulation des Blutes kann deutlich verlangsamt sein oder ganz fehlen. Im Blutbild fällt eine deutlich verringerte Zahl an Thrombozyten und Leukozyten auf. Dieses Stadium hält meist fünf bis 20 Tage an (Forgacs, 1972).

Im dritten Stadium nehmen die Thrombozytopenie und Leukopenie weiter zu und es kommt zu einer Hyperthermie mit bis zu 41,5 °C. Alle Schleimhäute im Maulbereich sind durch frische Nekrosen gekennzeichnet und das Pferd wird zunehmend apathisch. Der Puls ist in dieser Phase der Intoxikation bereits sehr schwach (Forgacs, 1972).

Die letzte Phase ist mit Schnappatmung und starkem Leiden der Pferde verbunden und endet nach ein bis sechs Tagen mit dem Tod des Pferdes (Forgacs, 1972).



Die atypische Form ist selten (Reed et al., 2009). Forgacs et al. (1958) beobachteten, dass die atypische Form erst nach der Aufnahme von ca. 225 g stark mit *S. atra* belastetem Stroh über eine Aufnahmeperiode von zehn Tagen auftrat.

Symptomatisch stehen nervöse Störungen, verminderte Reflexe, Hyperästhesie und Verlust des Visus im Vordergrund. Aufgrund der verminderten Reflexe können diese Pferde nur unter massiver Anstrengung schlucken. Zu Beginn der Intoxikation kommt es zu einer Tachykardie, die sich im weiteren Verlauf zu einer Bradykardie entwickelt. Der Tod tritt meist durch Aussetzen der Atmung ein (Forgacs, 1972).

Die stärkste Form der Intoxikation ist die Schockform. Sie verläuft sehr rasant und endet innerhalb von zehn bis zwölf Stunden immer tödlich. Die Form tritt auf, wenn Pferde in einem sehr kurzen Zeitraum permanent sehr hohe Konzentrationen an makrozyklischen Trichothecen aufnehmen. Die betroffenen Pferde zeigen Symptome eines Schocks mit einer erhöhten Körpertemperatur von 41 °C, verkürzter Atmung, Zyanose, Hämorrhagien an sichtbaren Schleimhäuten und einem sehr schwachen Puls (Forgacs, 1972).

Die Stachybotryotoxikose wurde auch bei Rindern (Fortuskny et al., 1959, zit. nach Forgacs, 1972), Schafen (Harrach et al., 1983; Schneider et al., 1979), Schweinen (Forgacs, 1972) und Hühnern beschrieben (Askalonov, 1949; Sarkisov, 1954; Schumaier et al., 1963). Tkachenko (1960) diagnostizierte zwei Fälle von Stachybotryotoxikose bei einem Bison und einem Nilpferd, die in einem Zoo gehalten wurden. Die klinischen und pathologischen Symptome bei den beschriebenen Tierarten ähnelten denen von Pferden, wobei Rinder resistenter erschienen (Forgacs et al., 1958).

Korneev (1948) erzeugte das Krankheitsbild der Stachybotryotoxikose mittels Tierversuchen an Mäusen, Meerschweinchen, Hasen und Hunden (zit. nach Forgacs, 1972). Palyusik (1970) wies in Tierexperimenten die Stachybotryotoxikose auch bei jungen Hühnern nach.

### 2.2.2 Mensch

Eine Gefährdung für den Menschen stellt prinzipiell der direkte Kontakt mit makrozyklischen Trichothecenen sowie die Inhalation (vgl. 2.1.3.3) von Metaboliten von *Stachybotrys* spp. dar, auch wenn eine orale Exposition nicht ausgeschlossen werden kann (Jarvis, 2003). Gefährdet sind auch Personen, die berufsbedingt mit *Stachybotrys*-verschimmelten Materialien (z.B. Stroh) in Berührung kommen (Hintikka, 1977). Drobotko et al. (1946, zit. nach Forgacs, 1972) wiesen mittels Humanexperimenten mit hoch kontaminiertem Stroh nach, dass eine Intoxikation auch infolge eines direkten Hautkontakts mit den von *Stachybotrys* gebildeten Toxinen entstehen kann.

In Tabelle 8 sind mögliche Symptome aufgelistet, die nach einer Exposition gegenüber Sekundärmetaboliten von *Stachybotrys* auftreten können. Die Angaben basieren auf einer Auswertung von befragten Patienten, die im Zusammenhang mit einer Exposition in mit Mikromyzeten befallenen Innenräumen aufgezeichnet wurden (Johanning und Landsbergis, 1999).

**Tabelle 8:** Symptome und Häufigkeiten des Auftretens (%) bei klinisch erkrankten Patienten und Büroangestellten nach Exposition gegenüber Mikromyzeten (z.B. *Stachybotrys*) in Innenräumen (Fallstudien)

Betroffene Organsysteme	Klinische Fälle <sup>1</sup> (n=151)	Exponierte Büroangestellte <sup>2</sup> (n=53)
Untere Atemwege	81 %	76 %
ZNS	77 %	70 %
Obere Atemwege	76 %	57 %
Haut	57 %	47 %
Augen	62 %	57 %
Chronische Erschöpfung	50 %	24 %
Allergie	23 %	60 %
Schlechte Verfassung	9 %	28 %

<sup>1</sup> nach Johanning und Landsbergis (1999) <sup>2</sup> nach Johanning et al. (1996) ZNS: Zentralnervensystem

Croft et al. (1986) beschrieben einen Fall einer Familie, die über längere Zeit unter anderem *S. atra* ausgesetzt war und eine Trichothecenvergiftung entwickelte, die der Stachybotryotoxikose ähnlich war. Für die Erkrankung wurden *S. atra* und die von ihm gebildeten makrozyklischen Trichothecene verantwortlich gemacht.

Seitdem wurden *Stachybotrys* spp. immer wieder mit Fällen in Verbindung gebracht, in denen Menschen an respiratorischen oder neurologischen Symptomen litten (Dearborn et al., 2002; Dearborn et al., 1999; Johanning et al., 1996; Koskinen et al., 1995; Scheel et al., 2001).

In den 1990er Jahren trat bei Neugeborenen in den USA eine ungewöhnliche Krankheitserscheinung auf. In Cleveland, Ohio starben im Zeitraum zwischen Januar 1993 und Dezember 1994 zehn Kinder an pulmonaler Häm siderose (Etz el et al., 1998). Andere Literaturstellen berichten von zwölf toten und insgesamt 37 erkrankten Neugeborenen im Zeitraum von 1993 bis 1998 (Dearborn et al., 1999). Alle Kinder lebten in Räumen, die nach Wasserschäden mit *S. chartarum* befallen waren (Etz el et al., 1996).

Aufgrund von epidemiologischen Untersuchungen und dem massiven Auftreten von *S. chartarum* in den erwähnten Häusern wurde vermutet, dass dieser Schwärzepilz der Auslöser der Erkrankungen war (Etz el et al., 1998). Ähnliche Symptome wurden bei einem 40 Tage alten Neugeborenen in Florida (USA) beschrieben, das starkem Schimmelbefall der Wohnräume und Tabakrauch ausgesetzt war (Novotny und Dixit, 2000; Tripi et al., 2000).

Inzwischen geht man davon aus, dass nicht allein die makrozyklischen Trichothecene dafür verantwortlich waren, sondern auch andere Metabolite von *Stachybotrys* spp., wie Hämoly sine (Stachylisin) oder Proteasen (Vesper et al., 2000a; Vesper, 2002; Vesper et al., 2001).

In verschiedenen Untersuchungen von Proben aus schimmelbefallenen Innenräumen, z.B. Tapeten, Gipskartonplatten und Luftproben (siehe auch Tabelle 4), wurde gezeigt, dass makrozyklische Trichothecene in diesen Proben in z.T. hohen Mengen vorkommen (Bloom et al., 2007; Gottschalk et al., 2006, 2008; Lanier et al., 2012; Nielsen et al., 1998a; Tuomi et al., 2000). Rohextrakte von *Stachybotrys*-Isolaten, die aus solchen Innenräumen gewonnen wurden, erwiesen sich in Zellkulturtests als hoch zytotoxisch. Diese Ergebnisse korrelierten mit der Präsenz von makrozyklischen Trichothecenen (Gareis, 1995; Johanning, 1994).

Eine inhalative Exposition ist dabei möglicherweise durch die Bildung von toxinhaltigen Guttationströpfchen und einer damit verbundenen aktiven Abgabe makrozyklischer Trichothecene in die Umwelt erklärbar (Gareis und Gottschalk, 2014). Zudem ist eine mögliche Intoxikation aufgrund der Inhalation von *Stachybotrys* Sporen nachgewiesen (Leino et al., 2003; Samsonov und Samsonov, 1960). Brasel et al. (2005) konnten zeigen, dass makrozyklische Trichothecene auch an Partikel gebunden vorkommen, die deutlich kleiner sind als Sporen, und damit in Raumluft übergehen können.

Ein Symptomkomplex, mit dem Metabolite von *Stachybotrys* spp. in Verbindung gebracht werden, ist das „Sick-Building Syndrome“ (SBS) (Dearborn et al., 1999; Johannung et al., 1999; Scheel et al., 2001). Das SBS ist durch vielfältige Symptome wie Schleimhautirritationen, Hautveränderungen, Asthma-ähnliche Beschwerden, gastrointestinale Symptome, Gelenkbeschwerden, urogenitale Beschwerden, neurologische Beschwerden, Verhaltensstörungen und chronische Müdigkeit (vgl. Tabelle 8) gekennzeichnet (Aditama und Andarini, 2002; Johannung und Landsbergis, 1999; Lorenz et al., 2013; Redlich et al., 1997; Sabir et al., 1999).

Diese Symptome treten vermehrt bei Personen auf, die sich in Häusern mit hoher Luftfeuchtigkeit, modriger Luft und Wasserschäden oder in klimatisierten Räumen aufhielten (Engvall et al., 2001).

Die Ursachen gelten als multifaktoriell (Aditama und Andarini, 2002). Man geht davon aus, dass das SBS durch psychischen und physischen Stress (Ooi und Goh, 1997), chemische Noxen wie Mykotoxine (Trout et al., 2001), Pharmaka oder „volatile organic components“ (VOC's) (Engelhart et al., 1999) und Bioaerosole (MVOC's) sowie bakterielle Endotoxine ausgelöst werden kann (Kuhn und Ghannoum, 2003; Li et al., 1997; Trout et al., 2001).

Dabei spielen nicht nur die beschriebenen zytotoxischen Wirkungen, sondern auch proinflammatorische Wirkungen eine wichtige Rolle. In Tabelle 9 sind entsprechende Literaturstellen zusammengefasst. *Stachybotrys*-Sporen, die in Lungen von Ratten und Mäusen appliziert wurden, führten zu einem Anstieg von Chemokinen und Zytokinen, zudem kam es zu einem Anschwellen der Alveolarwände (Lichtenstein et al., 2010).

---

Eine Exposition über Lebensmittel gilt als eher unwahrscheinlich. In verschiedenen Studien mit Lebens- und Futtermitteln (z.B. Getreide und Nüsse) wurden bisher keine makrozyklischen Trichothecene nachgewiesen (Barthel et al., 2012; Gottschalk et al., 2009; Sulyok et al., 2010; Xavier und Scussel, 2008).

Da allerdings toxinbildende *S. chartarum*-Isolate in Kräutern gefunden wurden (Biermaier et al., 2015), kann eine mögliche Kontamination auch mit Toxinen derzeit nicht sicher ausgeschlossen werden.

**Tabelle 9:** Veränderungen von Entzündungsparametern infolge einer Exposition gegenüber Metaboliten von *Stachybotrys* spp.

Zellen/ Modell- Organismus	Organ	Laborveränderungen	Applizierte Materialien	Referenz
Makrophagen	-	<u>Anstieg von:</u> TNF- $\alpha$ reaktive Sauerstoff- Radikale	n.b.	Ruotsalainen et al. (1998)
Maus	Lunge	<u>Anstieg von:</u> Monozyten neutrophilen Zellen Lymphozyten IL-1 $\beta$ , IL-6 TNF- $\alpha$ MIP-1a MIP-1b MCP-1	<i>S. chartarum</i> (Satratoxin- und nicht Satratoxin- Bildner)	Leino et al. (2003)
Ratte	Lunge	<u>Anstieg von:</u> TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$	<i>S. chartarum</i>	Yike et al. (2005)
Maus	Nase und Gehirn	<u>Anstieg von:</u> neutrophilen Zellen TNF- $\alpha$ IL-1, IL-6 MIP-2	Satratoxin G	Islam et al. (2006)
Ratte	Lunge	<u>Verringerung von:</u> roten Blutzellen alveolaren Makrophagen <u>Anstieg von:</u> Zellen im BALF Granulozyten	<i>S. chartarum</i>	Pieckova et al. (2006)
Maus	Lunge	<u>Anstieg von:</u> Entzündungsmediatoren	<i>S. chartarum</i>	Lichtenstein et al. (2010)

MIP: Makrophagen-Entzündungsprotein IL: Interleukin TNF: Tumor nekrose faktor  
BALF: Bronchoalveolare Lavage-Flüssigkeit MCP: Makrophagen-Chemoattraktorprotein  
n.b.: nicht beschrieben

## 2.3 Methoden zur Charakterisierung und zum Nachweis von Toxinen von *Stachybotrys* spp.

### 2.3.1 Phänotypisierung

*Stachybotrys* spp. können auf verschiedenen Nährmedien, z.B. Malzextraktagar (MEA), Potato Dextrose Agar (PDA) oder Corn Meal Agar (CMA) angezüchtet werden (Samson, 2010). Bei diesen Nährmedien handelt es sich um Vollnährmedien, die häufig zur Anzucht von Hefen und Schimmelpilzen aus Lebensmitteln und Futtermitteln eingesetzt werden (Samson, 2010).

Langsam wachsende Pilze wie *Stachybotrys* spp. werden häufig von schneller wachsenden Gattungen überwachsen (Hintikka, 1977). Deshalb wird zur Isolierung dieser zelluloseverwertenden Gattung zusätzlich die Papierfiltermethode mit einem Minimalnährmedium (van Iterson-Medium) angewandt (Bata et al., 1985; Hintikka, 1977).

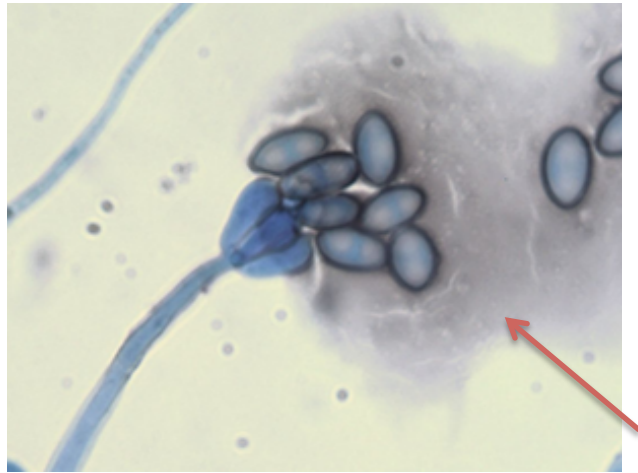
Auf MEA wächst *S. chartarum* gräulich bis schwarz und produziert, wie auch gelegentlich auf PDA, orange-braunes extrazelluläres Pigment. *S. chlorohalonata* bildet ebenfalls auf MEA ein gräuliches Myzel und auf PDA gelegentlich grünes, extrazelluläres Pigment (Andersen et al., 2003; Samson, 2010).

In der Regel ist nach sieben Tagen genügend Pilzmaterial auf einem Malzextraktagar gewachsen, damit ein Mikroskop-Präparat zur Identifikation angefertigt werden kann (Gareis, 2014).

*Stachybotrys* spp. besitzen gerade aufgerichtete Konidiophoren mit ein bis zwei Verzweigungen. Oft sind die Phialiden glatt und werden zur Spitze hin dunkler. In Tabelle 10 sind die verschiedenen Formen und Oberflächenbeschaffenheiten der Phialiden und Konidien für acht ausgewählte *Stachybotrys* spp. aufgeführt. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die meisten *Stachybotrys* spp. Konidien mit einer rauen Oberfläche bilden und deren Form stark variiert (Andersen et al., 2003; Pinruan et al., 2004; Wang et al., 2015).

Die Phialiden variieren ebenfalls stark in ihrer Form und können subclavat, obovoid, zylindrisch bis ellipsoid sein (Andersen et al., 2003; Jong und Davis, 1976).

Die Konidien treten meist in Gruppen von drei bis fünf auf und können von einer dunklen Masse (Schleimkapsel; Abbildung 9) umhüllt sein (Samson, 2010).



**Abbildung 9:** Lichtmikroskopische Aufnahme von *S. chartarum* im Klebestreifenpräparat, Anilinblaufärbung, 400-fache Vergrößerung (Biermaier, 2013); Pfeil: Schleimkapsel

*Memnoniella echinata* bildet eine Ausnahme mit kettenförmigen, runden Konidien (Abbildung 3) (Jong und Davis, 1976).

Die von Corda (1837) beschriebenen zwei Zellkerne in den Konidien (siehe Abbildung 9) wurden von Bisby (1943) als zwei Tropfen beschrieben. Beobachtungen legen nahe, dass junge Konidien von *S. chartarum* zwei tropfenartige Gebilde aufweisen und diese mit zunehmendem Alter verschwinden (Wang et al., 2015). Die Konidien aller anerkannten *Stachybotrys* spp. werden mit nur einem Zellkern beschrieben (Jong und Davis, 1976; Wang et al., 2015).

Wie die Komplexität und die unterschiedlichen Angaben der morphologischen Charakteristika in Tabelle 10 zeigen, ist eine sichere Speziesidentifizierung innerhalb der Gattung *Stachybotrys* anhand der Mikromorphologie kaum möglich.



**Tabelle 10:** Mikromorphologie von ausgewählten *Stachybotrys* spp. auf Corn Meal Agar (CMA) modifiziert nach Andersen et al. (2003) und Jong und Davis (1976)

<i>Stachybotrys</i> (S.) spp.	Phialiden	Konidien		Referenz
	Form	Form	Oberfläche	
<i>S. bisbyi</i>	zylindrisch	fusiform	glatt	Andersen et al. (2003)
	n.b.	limoniform/ fusiform	n.b.	Pinruan et al. (2004)*
<i>S. chartarum</i>	obovoid	ellipsoid	rau	Andersen et al. (2003)
	n.b.	obovoid/ ellipsoid	n.b.	Wang et al. (2015)*
	n.b.	n.b.	rau	Pinruan et al. (2004)*
<i>S. chlorohalonata</i>	obovoid	ellipsoid	glatt	Andersen et al. (2003)
	n.b.	ellipsoid/ obovoid	n.b.	Pinruan et al. (2004)*
<i>S. cylindrospora</i>	subclavat	zylindrisch	rau	Jong und Davis (1976)
	n.b.	zylindrisch	rau	Wang et al. (2015)
	n.b.	zylindrisch	rau	Pinruan et al. (2004)*
<i>S. dichroa</i>	subclavat	ovoid	rau	Jong und Davis (1976)
	n.b.	ovoid	rau	Wang et al. (2015)
	n.b.	ellipsoid/ ovoid	n.b.	Pinruan et al. (2004)*
<i>S. nephrospora</i>	obovoid	reniform	rau	Andersen et al. (2003)
	n.b.	n.b.	glatt	Wang et al. (2015)*
	n.b.	reniform	glatt	Pinruan et al. (2004)*
<i>S. parvispora</i>	ellipsoid	ellipsoid	rau	Andersen et al. (2003)
	n.b.	oval	n.b.	Wang et al. (2015)*
	n.b.	ellipsoid	glatt	Pinruan et al. (2004)*
<i>S. theobromae</i>	zylindrisch	fusiform	rau	Andersen et al. (2003)
	n.b.	ellipsoid	n.b.	Pinruan et al. (2004)*
	n.b.	ellipsoid	glatt	Wang et al. (2015)*

\*Nährmedium nicht bekannt

n.b.: nicht beschrieben

### 2.3.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung von *Stachybotrys* spp. wird mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung verschiedener Genabschnitte durchgeführt. Derzeit sind entsprechende Sequenzen für insgesamt 22 *Stachybotrys* spp. (Tabelle 40 im Anhang) in der NCBI-Datenbank erfasst (NCBI, 2014). Um *Stachybotrys* spp. zu identifizieren, wurden die in Tabelle 11 zusammengefassten Primer und Genabschnitte beschrieben und eingesetzt.

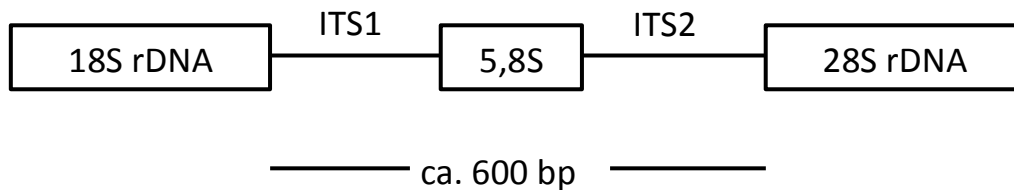
**Tabelle 11:** Übersicht über Primer für die PCR von *Stachybotrys* spp.

Primer	Sequenz	Zielgen	Referenz
ITS-1/4	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS-1/4	White et al. (1990)
StacR-3 StacF-4	5'-TGCCACTCAGAGAATACTGAAA-3' 5'-CGAGGTCAACGTTTCAGAAAGTC-3'	ITS-1/2	Haugland und Heckman (1998)
FR-1 FF-2	5'-CTCTCAATCTGTCAATCCTTATT-3' 5'-GGTTCTATTTTGTGGTTTCTA-3'	18 S rRNA Gen	Zhou et al. (2000)
STAF-1 STAR-1	5'-GTTGCTTCGGCGGGAAC-3' 5'-TTTGCGTTTGCCACTCAGAG-3'	ITS-1	Cruz-Perez et al. (2001)
STAF-2 STAR-2	5'-ACCTATCGTTGCTTCGGCG-3' 5'-GCGTTTGCCACTCAGAGAATACT-3'	ITS-1	Cruz-Perez et al. (2001)
Tri-5	5'-CATCAATCCAACAGTTTCAC-3' 3'-GCAACCTTCAAAGACTATTG-5'	<i>tri5</i>	Cruse et al. (2002)
Tub-2	5'-CTGTCCAACCCCTTACGGCGACCTGAAC-3' 3'-ACCCTCACCAGTATACCAATGCAAGAAAGC-5'	beta-tubulin 2	Cruse et al. (2002)
Chs-1	5'-ATCTCACCACAAGCACC GCCACACA-3' 3'-GGAAGAAGATCGTTGTGTGCGTGGT-5'	Chitin-Synthase	Cruse et al. (2002)
$\beta$ -tubulin	5'-CTCTGAGTGGCAAACGCAA-3' 5'-GGGCGCAATGTGCGTTCAA-3' 5'-CCTCGACAGCAATGGTGTC-3' 5'-GAAATTGTGAGCCGAGAGGT-3'	<i>benA</i>	Black und Foarde (2007)
Sc1F Sc1R	5'-TACAAGCCCTGACTTCGGAA-3' 5'-CATGTTTGGCCACTACCCAA-3'	18S rRNA	Black et al. (2008)
Sc2F Sc2R	5'-GAGTAGTTTGGGAATGCTGC-3' 5'-GCCCAAGTCTGGTCATAAAC-3'	28S rRNA	Black et al. (2008)
Sc3F Sc3R	5'-TCTTTGAACGCACATTGCGC-3' 5'-CTACCTGATCCGAGGTCAA-3'	18S rRNA	Black et al. (2008)
Tri5F Tri5R	5'-GCACACTGGACTGTAAGTCT-3' 5'-CCTGGGAAGCCATGGAAGT-3'	<i>tri5</i>	Black et al. (2008)
$\beta$ -tubulin	5'-AGCAATGGTGTCTACAACGG-3' 5'-TACCGGGCTCGAGATCGA-3'	beta-tubulin 1	Black et al. (2008)
Tef-1	n.b.	translation elongation factor 1 alpha	Jie et al. (2012)
Rpb-2	n.b.	RNA polymerase II subunit b	Jie et al. (2012)

n.b.: nicht beschrieben (r)RNA: (ribosomal) ribonucleic acid ITS: internal transcribed spacer

*tri*: Trichodiensynthase-Gen *benA*:  $\beta$ -Tubulin-Gen

Oft wird für die initiale Identifizierung von *Mycota* die ribosomale internal transcribed spacer (ITS) -Region sequenziert (Hibbett und Taylor, 2013), da alle Schimmelpilze diesen Genabschnitt besitzen (Abbildung 10). Dabei handelt es sich um einen nicht codierenden Abschnitt (Haugland und Heckman, 1998).



**Abbildung 10:** ITS-Region von Schimmelpilzen nach Haugland und Heckman (1998)

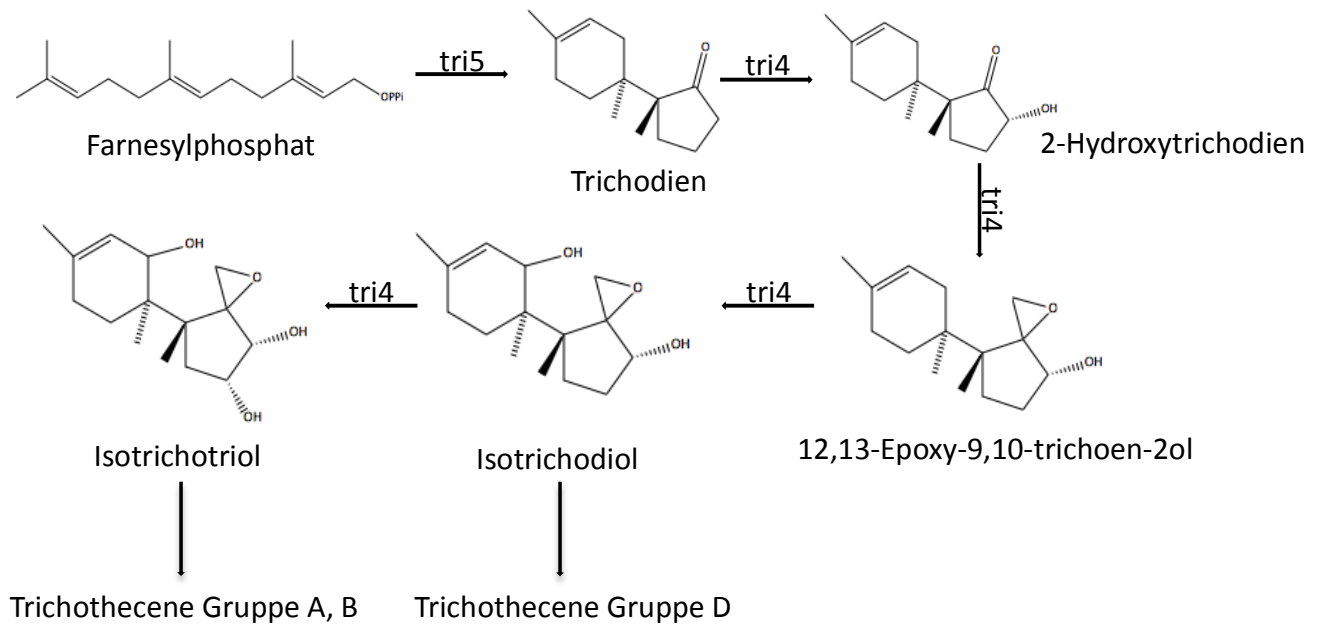
Der hoch zytotoxische *S. chartarum* und der weniger toxische *S. chlorohalonata* unterscheiden sich im ITS-Genabschnitt in nur einem Basenaustausch (ITS (Position 58): G bzw. A / C bzw. T) (Haugland und Heckman, 1998). Die Chemotypen A und S von *S. chartarum* (2.1.4) sind mittels der ITS Sequenz-1/4 nicht zu unterscheiden (Andersen et al., 2003).

Der Genabschnitt *Chs1* kodiert für die Chitin-Synthase (Jollès, 1999). Dieser Genabschnitt kann zur Differenzierung von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* genutzt werden, da sie sich durch neun Basensubstitutionen unterscheiden (Andersen et al., 2003).

Der Genabschnitt *Tub2* codiert für das Protein beta-Tubulin. Das Protein ist ein Bestandteil des Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen (Löffler, 2007). In diesem Genabschnitt unterscheiden sich *S. chlorohalonata* und *S. chartarum* durch 27 Basensubstitutionen (Andersen et al., 2003).

Zur Differenzierung der beiden Chemotypen A und S von *S. chartarum* wird das *tri5*-Gen verwendet (Cruse et al., 2002). Die Trichodiensynthase, die die Bildung von Trichodien aus Farnesylpyrophosphat katalysiert (Abbildung 11), ist im *tri5*-Genabschnitt codiert. In diesem Genabschnitt unterscheiden sich *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* in insgesamt 28 Basensubstitutionen. *S. chartarum* Chemotyp S und A unterscheiden sich in diesem Genabschnitt in einem Basenaustausch (forward: C bzw. T / reverse: G bzw. A) (Andersen et al., 2003; Cruse et al., 2002).

Eine weitere mögliche Differenzierungsmöglichkeit liegt in der Sequenzierung des Satratoxin-Gencluster (SC1-3), für die 21 Primer designed wurden (Semeiks et al., 2014).



**Abbildung 11:** Trichothecensyntheseweg nach McCormick et al. (2011),  
Abbildung aus Biermaier (2013), tri: Trichodien synthase

### 2.3.3 Massenspektrometrie

In der Massenspektrometrie (MS) werden Moleküle in gasförmige Ionen umgewandelt und anhand ihres Masse-/Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) getrennt und detektiert. Dabei wird ein Massenspektrum generiert. In einem Massenspektrum wird auf der x-Achse die Masse ( $m/z = \text{Masse-/Ladungsverhältnis}$ ) und auf der y-Achse die Intensität detektierter Ionen pro Zeiteinheit, z.B. cps = counts per second) angegeben (McLafferty und Turecek, 1995).

Der Massenbereich erstreckt sich von  $< 100$  Dalton (Da) bis hin zu mehr als 100 kDa (z.B. Mykotoxine, Pestizide, Antibiotika, Oligopeptide, Glycopeptide und Proteine). Massenspektrometrische Verfahren können einerseits für die Identifikation einzelner Moleküle in der Spurenanalytik und deren Quantifizierung eingesetzt werden und andererseits zur Generierung von Massenspektren (Fingerprints), anhand derer beispielsweise Mikroorganismen identifiziert werden können (Lottspeich et al., 2012).

#### 2.3.3.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde erstmals 1987 beschrieben (Karas et al., 1987; Tanaka et al., 1988). Dabei handelt es sich um eine Technologie zur Massenanalyse chemischer Verbindungen die ein Matrix-unterstütztes Laser- Desorptions- und Ionisations-Verfahren (MALDI) mit der Flugzeitanalyse der generierten Ionen (time of flight, TOF) kombiniert (Schubert und Wieser, 2011).

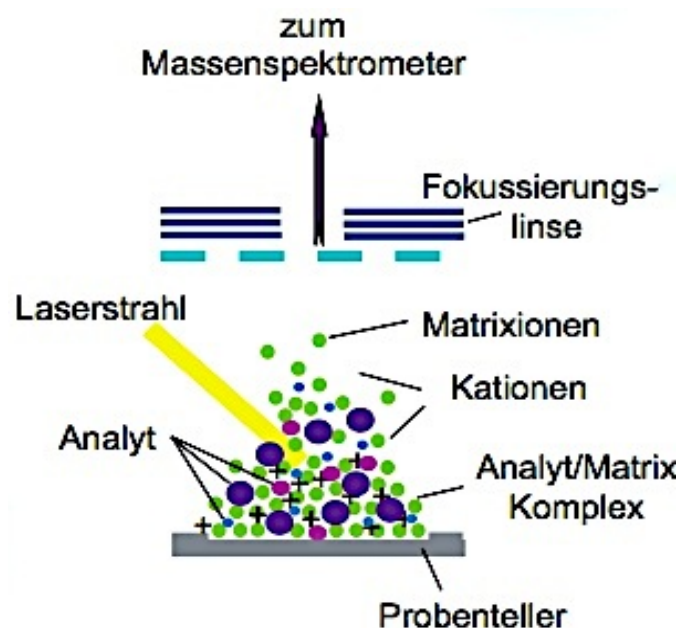
Der Einsatzbereich der MALDI-TOF MS beschränkt sich mittlerweile nicht nur auf die Identifikation von Mikroorganismen, sondern dient auch der Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln anhand von Biomarkern (Wang et al., 2009). Zudem wird die MALDI-TOF MS in der klinischen Chemie angewandt um Antibiotikaresistenzen von Bakterien über deren gebildete Stoffwechselprodukte zu diagnostizieren (Marvin et al., 2003).

Die Methode hat sich insbesondere zur Identifizierung von Mikroorganismen bewährt. Diese können im Massenbereich von 2 - 20 kDa über spezifische, meist ribosomale Proteine bis auf Subspeziesebene differenziert und identifiziert werden (Clarka et al., 2013; Mellmann et al., 2009).

Dafür wurden Datenbanken und Softwaresysteme mit Referenzspektren zur Identifikation von Mikroorganismen oder Biomarkern mittels MALDI-TOF MS erstellt (Ackermann et al., 2006; Clarka et al., 2013; Fenselau und Demirev, 2001; Lay, 2001), die unter den Markennamen Biotyper OC (Bruker Daltoniks, Bremen) und Saramis (Biomerieux, Nürtingen) zur Mikroorganismen-Identifizierung im klinischen Bereich vertrieben werden. Der Ansatz, mittels intakter Zellen eine Datenbank zu erstellen, konnte sich aufgrund von qualitativ minderwertigen Spektren und/oder der erhöhten Biogefahr nicht durchsetzen (Clarka et al., 2013).

Bei der MALDI-TOF MS erfolgt die Ionisation ganzer Peptide und Proteine mittels Laserenergie („soft laser desorption“). Dadurch ist es möglich, Proteine oder Peptide zu ionisieren, ohne dass es zu einer Fragmentierung der Moleküle in der Ionenquelle (ISD, in source decay) kommt (Clarka et al., 2013).

Die Proben auf dem Probenhalter (Target) werden mit einer niedermolekularen, organischen Lösung (Matrix) beschichtet. Während diese trocknet, findet eine Co-Kristallisation statt und der Analyt wird in die Matrixkristalle eingebettet. Die Matrix überträgt dann die durch den Laserstrahl erzeugte Ladung in Form eines Protons auf die Probe (Abbildung 12) (Schubert und Wieser, 2011).



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung des Ionisationsvorganges nach Schubert und Wieser (2011)

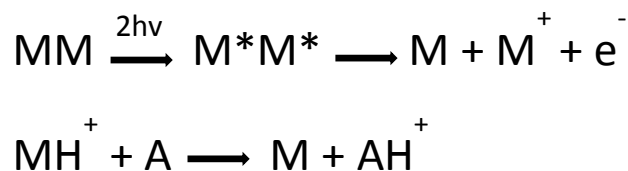
Je nach Probenmaterial werden verschiedene Matrices benötigt, um die Energie zu übertragen und ein optimales Messergebnis zu erhalten (Clarka et al., 2013).

In der Routinediagnostik von Bakterien wird am häufigsten  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA) als Matrix eingesetzt, da sie sich in der Ladungsübertragung als am effizientesten erwiesen hat. Es werden auch Derivate dieser Substanz verwendet, um speziellen Anforderungen gerecht zu werden (Jaskolla et al., 2008).

Die Sinapinsäure (SA) wird oft bei aufgereinigten Proteinen eingesetzt. Sie reduziert die Entstehung photochemischer Addukte und führt so zu einer besseren Auflösung der Peaks (Beavis und Chait, 1989).

2,5-Dihydroxy-Benzoessäure (DHB) wird häufig bei der Messung von Glykopeptiden im linearen negativen Modus, bei Kohlenhydraten, Oligosacchariden und Proteinen oder Peptiden unter 10 kDa eingesetzt (Clarka et al., 2013).

Wie genau die Energieübertragung erfolgt, ist noch nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die „Energy pooling“-Theorie (Abbildung 13) zutrifft (Beavis und Chait, 1989). Dabei wird das Proton, das von einem angeregten Matrixmolekül stammt, auf ein zweites Matrixmolekül übertragen, wobei ein freies Elektron, ein angeregtes Matrixmolekül und ein Matrixmolekül im Ruhezustand entstehen. Es folgt eine Übertragung des Protons von dem angeregten Matrixmolekül auf den Analyten, der dann einfach positiv geladen ist (Clarka et al., 2013).



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der „Energy pooling“-Theorie nach Beavis und Chait (1989); Abbildung nach Clarka et al. (2013), M: Matrixmolekül,  $H^+$ : Proton,  $e^-$ : Elektron, A: Analyt,  $2h\nu$ : Laserenergie, \*angeregtes Matrixmolekül

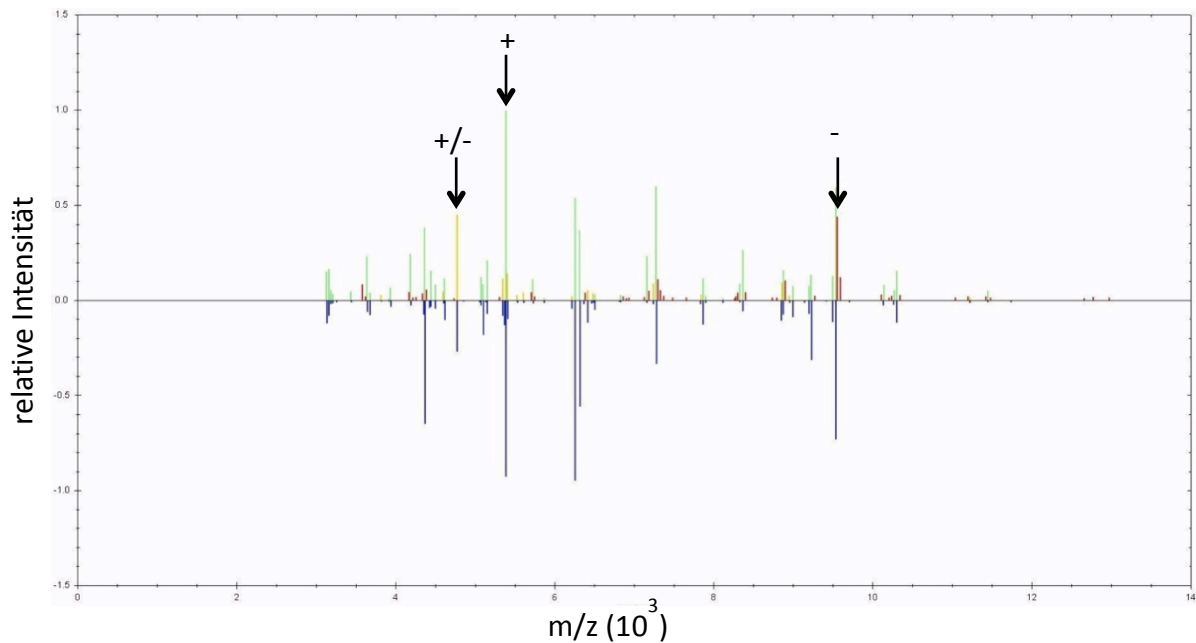
Um diese Energie zu generieren, können verschiedene Lasertypen (z.B. Stickstofflaser oder Feststofflaser) genutzt werden (Clarka et al., 2013).

Der Laser wird auf einen sehr kleinen Teil des Matrixspots fokussiert. Hierbei ist die Laserenergie auf die Desorptionsgrenze der Analyten anzupassen (Clarka et al., 2013). Das Analyten-Matrix-Gemisch wird so direkt in die Gasphase überführt, ohne in die flüssige Phase überzugehen. Die geladenen Analyten werden aufgrund eines Ladungsgefälles in das Flugrohr beschleunigt und driften dort bis zum Detektor. Dabei treffen die Ionen je nach ihrer Masse-/Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) nach unterschiedlichen Flugzeiten („time of flight“ (TOF)) auf dem Detektor auf. Die Flugzeiten sind dabei indirekt proportional zu der Masse der Moleküle (Cotter, 1997).

Die Referenzspektren, die in einer Datenbank hinterlegt sind, wurden je nach Datenbanksystem anhand von mindestens 20 Einzelspektren pro Analyt erstellt, die zu einem Referenzspektrum (MSP, „Main spectra projection“) zusammengefasst werden. Die Biotyper-Datenbank (Bruker Daltoniks, Bremen) arbeitet mit MSPs für jedes einzelne Isolat, das in die Datenbank eingespeist wird. Die Saramis-Datenbank (Biomerieux, Nürtingen) hingegen enthält sogenannte Superspektren, die sich aus mehreren Spektren von mehreren einzelnen Isolaten ergeben (Clarka et al., 2013).

Generierte Spektren können mithilfe entsprechender Software mit Referenzspektren abgeglichen und auf diese Weise z.B. Mikroorganismen identifiziert werden (Abbildung 14) (Clarka et al., 2013). Massenpeaks, die in ihrer Position auf der x-Achse und mit der relativen Intensität (y-Achse) übereinstimmen, werden grün dargestellt. Massenpeaks, die lediglich von der relativen Intensität abweichen werden gelb dargestellt. Massenpeaks einer Probe, die im Referenzspektrum nicht existieren, werden rot dargestellt (vgl. Abbildung 14).





**Abbildung 14:** Spektrenabgleich mittels Biotyper OC - Software (Bruker Daltoniks) (Isolat von *Escherichia coli* (oben) gegen *Escherichia coli* (ATCC 25922) Referenzspektrum (unten)) m/z: Massen-/Ladungsverhältnis. Pfeile (von links nach rechts) markieren Massen, die nicht die gleiche relative Intensität im Vergleich zum Referenzspektrum aufweisen (+/-), mit dem Spektrum exakt übereinstimmen (+) oder nicht übereinstimmen (-).

Das Abgleichen der Spektren mit den Referenzspektren erfolgt mittels eines Algorithmus, der drei Charakteristika der Probe gegenüber denen der Referenzspektren abgleicht.

Zuerst wird die Zahl der Massenpeaks des Referenzspektrums, die dem des Probenspektrums sehr ähnlich sind, ermittelt. Anschließend wird die Zahl der Peaks des Probenspektrums, die dem des Referenzspektrums sehr ähnlich sind, festgestellt. Abschließend wird überprüft, wie ähnlich sich die Peaks sind, die eine hohe Intensität aufweisen, und die, die eine niedrige Intensität aufweisen. Die drei Werte, die sich aus diesen Vergleichen ergeben, werden multipliziert und auf den Zahlenwert 1000 normalisiert. Der zur Beurteilung der Übereinstimmung herangezogene Score Value ist der dekadische Logarithmus des Ergebnisses und kann maximal 3 (=  $\log 1000$ ) erreichen (Anonymous, 2012).

Dabei wurden folgende Score Value Werte festgelegt (Anonymous 2012):

- 2,300 - 3,000: Hochwahrscheinliche Speziesidentifikation
- 2,000 - 2,299: Sichere Gattungsidentifikation, eventuelle Speziesidentifikation
- 1,700 - 1,999: Eventuelle Gattungsidentifikation
- 0,000 - 1,699: Keine verlässliche Identifikation

Um Spektren ribosomaler Proteine zu erhalten, muss zuerst die Zellwand aufgeschlossen werden. Je nach Mikroorganismus wurden verschiedene Protein-Extraktionsprotokolle entwickelt. Für nur wenige Bakterien reicht die Matrixlösung allein aus, um die Zellwände aufzulösen (Anonymous, 2014; McTaggart et al., 2011).

Für die meisten Bakterien wird dazu eine „on target extraction“ angewandt („Extended Direct Transfer“) (Anonymous, 2014). Dabei wird eine kleine Kolonie direkt vom Nährmedium auf einen Probenträger aufgetragen und mit Ameisensäure (70 %) bedeckt. Anschließend wird der Analyt mit Matrix beschichtet (Anonymous, 2012).

Für die Generierung von hochwertigen Spektren oder bei Mikrobiota mit sehr stabilen Zellwänden wird ein erweitertes Extraktionsprotokoll („Formic Acid Extraction“; siehe Abbildung 52 im Anhang) empfohlen (Anonymous, 2012). Dabei wird der Analyt zuerst mittels Reinstwasser und reinem Ethanol gewaschen. Danach folgt die Zellwandlyse mittels Ameisensäure (70 %). Anschließend werden die Proteine in Acetonitril gelöst. Dieses Gemisch wird auf den Probenträger aufgebracht und nach einer kurzen Trockenzeit mit Matrix beschichtet (Anonymous, 2014).

Die Zellwände von *Mycota* bestehen in der Regel aus Glukanen und Chitin. Selten sind sie auch aus Glukanen und Zellulose aufgebaut (Carlile et al., 2001). Somit sind die Zellen der *Mycota* stabiler und größer als Bakterienzellen. Aus diesem Grund müssen die Extraktionsmethoden für filamentöse Schimmelpilze angepasst werden (Clarka et al., 2013).

Hierzu wurde eine Methode entwickelt, mit der die meisten klinisch relevanten, filamentösen Schimmelpilze identifizierbar sein sollen. Diese Methode wird angewandt, wenn alle anderen vorher genannten Proteinextraktionsmethoden versagen. In diesem Fall müssen die Pilze in einem modifizierten Sabouraud - Flüssignährmedium angezüchtet werden und möglichst über einen kurzen Zeitraum wachsen (Anonymous, 2014).

Anschließend werden die Myzeflocken mehrmals gewaschen und analog der Extraktion des erweiterten Extraktionsprotokolls mit Ameisensäure (70 %) und Acetonitril extrahiert (siehe Abbildung 53 im Anhang).

---

Da bei der Identifikation von filamentösen Pilzen immer wieder Probleme auftreten (Del Chierico et al., 2012; Normand et al., 2013), wurden inzwischen mehrere Methoden an einzelne *Mycota* angepasst. Hauptsächlich wurden Methoden für *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. und *Penicillium* spp. entwickelt. Tabelle 12 stellt eine Übersicht über einige Publikationen dar, die Proteinextraktionsprotokolle für einzelne *Mycota* enthalten. In Tabelle 41 im Anhang sind zusätzlich die einzelnen Extraktionsmethoden der genannten Publikationen zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Zusammenfassung von Publikationen zur Identifikation von *Mycota* mittels MALDI-TOF MS (siehe auch Tabelle 41 im Anhang)

<b>MALDI-TOF MS</b>	<b><i>Mycota</i></b>	<b>Referenz</b>
Biflex III (BD)	<i>Penicillium</i> spp.	Chen und Chen (2005)
Voyager DE Pro (AB)	<i>Antrodia</i> spp., <i>Coniophora</i> spp. und <i>Serpula</i> spp.	Schmidt und Kallow (2005)
	<i>Fusarium</i> sp.	Seyfarth et al. (2008)
	<i>Arthroderma</i> sp., <i>Trichophyton</i> spp. und <i>Microsporium</i> sp.	Erhard et al. (2008)
CIPHERGEN PBS - IIc (BR)	<i>Aspergillus</i> spp.	Hettick et al. (2008a)
	<i>Penicillium</i> spp.	Hettick et al. (2008b)
Autoflex I (BD)	<i>Fusarium</i> spp.	Marinach-Patrice et al. (2009)
Microflex (BD)	<i>Verticillium</i> spp.	Tao et al. (2009)
AXIMA TOF AXIMA CFR (S)	<i>Fusarium</i> spp.	Kemptner et al. (2009)
Axima-LNR (S)	<i>Aspergillus</i> sp.	Rodrigues et al. (2010)
AXIMA Confidence (S)	<i>Trichoderma</i> spp.	De Respini et al. (2009)
Microflex (BD)	<i>Aspergillus</i> spp.	Alanio et al. (2011)
Autoflex speed I/II und UltrafleXtreme (BD)	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Beauveria</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp., <i>Fomitopsis</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Geosmithia</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Hamigera</i> sp., <i>Hypocrea</i> sp., <i>Nectria</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Scedosporium</i> sp. und <i>Trichoderma</i> spp.	Cassagne et al. (2011)
Microflex (BD)	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Lichtheimia</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp. und <i>Rhizomucor</i> sp.	De Carolis et al. (2012)
Microflex LT (BD)	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Emericella</i> spp., <i>Fomitopsi</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Geosmithia</i> spp., <i>Neosartorya</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Pseudallescherichia</i> spp., <i>Scedosporium</i> spp. und <i>Talaromyces</i> spp.	Del Chierico et al. (2012)
4700 Proteomics Analyzer (AB)	<i>Monilinia</i> sp.	Horka et al. (2012)
UltrafleXtreme (BD)	<i>Acremonium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Beauveria</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp., <i>Fomitopsis</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Hamigera</i> sp., <i>Hypocrea</i> sp., <i>Microsporium</i> spp., <i>Onychocola</i> sp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Scedosporium</i> sp., <i>Trichoderma</i> spp. und <i>Trichophyton</i> spp.	Normand et al. (2013)
Axima LNR (S)	<i>Sporothrix</i> spp.	Oliveira et al. (2015)
Microflex LT (BD)	<i>Stachybotrys</i> spp.	Gruenwald et al. (2015)

BD: Bruker Daltonics

AB: ABSciex

BR: Bio-Rad

S: Shimadzu

Eine verlässliche Identifikation von *Mycota* beginnt bereits mit der Anzucht (Del Chierico et al., 2012). Die von Bruker Daltoniks GmbH empfohlene Anzucht im Flüssignährmedium hat sich bislang aufgrund des erhöhten Aufwandes nicht durchsetzen können (Anonymous, 2014). In der Regel wurde versucht, direkt von Festnährmedien zu identifizieren. Die Problematik der Generierung von qualitativ hochwertigen und reproduzierbaren Spektren liegt in der oft heterogenen Art der filamentösen Schimmelpilze, die sich schon allein im Alter des Myzels äußern kann (De Carolis et al., 2012; Del Chierico et al., 2012).

Daher wird möglichst junges Myzel zur Identifikation herangezogen, vor allem Randmyzel (Alanio et al., 2011; De Carolis et al., 2012; De Respinis et al., 2009; Marinach-Patrice et al., 2009; Normand et al., 2013). Außerdem müssen die Anzuchtbedingungen im Vorfeld standardisiert sein (Del Chierico et al., 2012).

Die ersten Proteinextraktionsmethoden nutzten lediglich das Matrixgemisch als Extraktionsmittel und arbeiteten nur mit Sporen oder einem Gemisch aus Sporen und Myzel (Erhard et al., 2008; Kemptner et al., 2009; Schmidt und Kallow, 2005; Seyfarth et al., 2008). Verschiedene Arbeiten zeigten, dass das Waschen und anschließende Extrahieren mittels Ameisensäure (70 %) Spektren mit einer besseren Auflösung, einem besseren Signal-/Rauschverhältnis (S/N) und einem größeren Massenreichtum hervorbringt (Anonymous, 2014; Cassagne et al., 2011; Del Chierico et al., 2012; Horka et al., 2012; Marinach-Patrice et al., 2009).

Eine zusätzliche mechanische Bearbeitung des Probenmaterials mittels Glasperlen (Hettick et al., 2008a, b) oder Ultraschall (Oliveira et al., 2015) erwies sich als erfolgsversprechend.

Als Energieüberträger wurden vor allem CHCA und DHB eingesetzt, doch auch hier konnte sich hauptsächlich CHCA durchsetzen (Anonymous, 2014; Clarka et al., 2013; Oliveira et al., 2015). Die Messung erfolgt auch bei filamentösen Schimmelpilzen im linearen positiven Modus in einem Massenbereich von 2 - 20 kDa (Anonymous, 2012; De Carolis et al., 2012; Del Chierico et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

Hettick et al. (2008a) beschrieben bei ihren Untersuchungen mit *Aspergillus niger*, *Epicoccum* und *Stachybotrys*, dass es nicht möglich sei, anhand der Konidien ein zur Identifizierung ausreichendes, qualitativ hochwertiges Spektrum zu generieren. Sie führten dies auf die dunklen Konidien zurück.

Bislang wurde nur eine Studie veröffentlicht, in der erfolgreich Proteinprofile von *Stachybotrys* spp. mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie generiert wurden. In dieser Studie wurden die *S. chartarum* Chemotypen A und S und *S. chlorohalonata* sowie *S. bisby* anhand ihrer Konidienproteinprofile differenziert. Dabei wurde Material von einem Malzextraktagar gewonnen und gemäß der "Formic acid" Extraktionsmethode (vgl. Abbildung 52 im Anhang) extrahiert. Um den Signalsuppressionseffekt des in den Sporen enthaltenen Melanins zu umgehen, wurden anstatt einem Mikroliter Matrix zwei Mikroliter aufgetragen (Gruenwald et al., 2015).

Aktuell umfasst die Datenbank zu filamentösen Schimmelpilzen von Bruker Daltoniks 40 Gattungen und innerhalb dieser Gattungen sind 110 Spezies erfasst (Fungi Library 1.0 – #700281). *Stachybotrys* ist bislang in dieser Datenbank nicht enthalten.

### **2.3.3.2 HPLC - Tandemmassenspektrometrie**

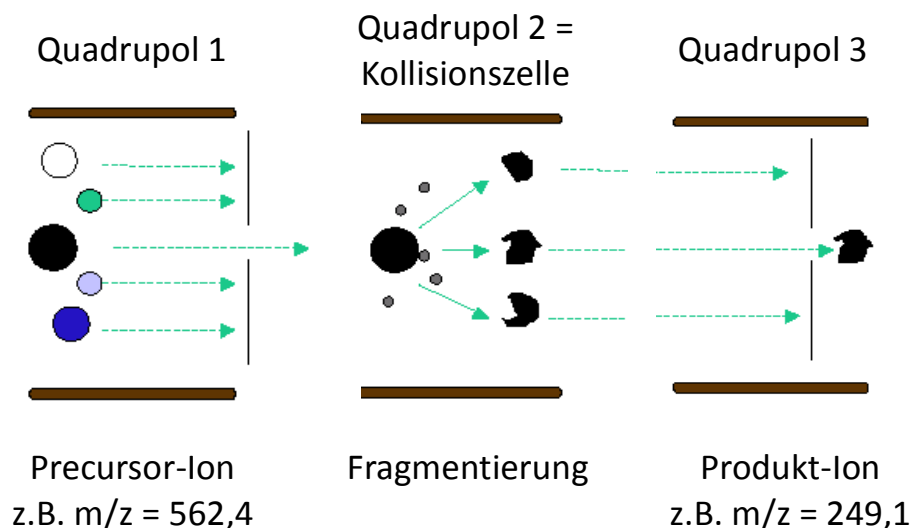
Die Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) ist eine etablierte Methode, um die Konzentration von niedermolekularen Analyten, z.B. von Mykotoxinen, Tierarzneimitteln oder Pflanzenschutzmitteln in einem Extrakt nachzuweisen (Europäische Kommission, 2002; Lottspeich et al., 2012).

Die LC-MS/MS wird sowohl zur Untersuchung von Lebensmitteln als auch Futtermitteln eingesetzt (Sulyok et al., 2010; Gottschalk et al., 2009; Xavier und Scussel, 2008). Auch das Vorkommen makrozyklischer Trichothecene in Umweltproben (z.B. Hausstaub und Luftproben) wurde mittels LC-MS/MS untersucht (Bloom et al., 2007; Gottschalk et al., 2006, 2008; Lanier et al., 2012; Nielsen et al., 1998a; Tuomi et al., 2000).

Es gibt verschiedene Verfahren, die Zielanalyten aus der zu untersuchenden Matrix herauszulösen, wobei ein Extrakt meistens mittels Mischungen verschiedener organischer und anorganischer Lösungsmittel in Abhängigkeit von den chemischen Eigenschaften der Zielanalyten gewonnen wird. Der flüssige Probenextrakt ist demzufolge ein Gemisch aus verschiedenen Matrixbestandteilen und den Zielanalyten, weshalb dieser oft noch weiteren Reinigungsschritten unterzogen wird (Gottschalk, 2009; Lottspeich et al., 2012).

Die Zielanalyten werden mit Hilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Anlage aufgetrennt und in der Ionenquelle des Massenspektrometers meist unter hoher Spannung (Elektrospray-Ionisation, ESI) und Temperatur in die Gasphase überführt und ionisiert. Die so gewonnenen Molekülonen werden entlang des Ionenpfads entsprechend ihres Masse- / Ladungs- Verhältnisses aufgetrennt (McLafferty und Turecek, 1995).

Ein Tandem-MS besteht aus drei Quadrupolen mit vier parallel verlaufenden Stabelektroden (Abbildung 15). Im ersten Quadrupol werden die ionisierten Zielmoleküle (precursor ions) anhand ihres Masse-/Ladungs-Verhältnisses selektiert. Im zweiten Quadrupol, der sogenannten Kollisionszelle, wird das selektierte Mutterion in spezifische Tochterionen (product ions) fragmentiert (Lottspeich et al., 2012). Zum Nachweis einer Substanz werden zwei spezifische Fragmente mit spezifischen Massen (Quantifier und Qualifier) im dritten Quadrupol selektiert, die ein elektronisch messbares Signal (Peak) zu einer charakteristischen Retentionszeit hervorrufen (Europäische-Kommission, 2002). Die ausgewählten Fragmentionen treten immer zur selben Retentionszeit auf und deren Peakflächen im resultierenden Chromatogramm stehen in einem spezifischen Verhältnis zueinander. Aufgrund dieser Kriterien ist eine hoch spezifische Identifizierung der Substanz möglich (Lottspeich et al., 2012; McLafferty und Turecek, 1995).



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der Tandemmassenspektrometrie nach ABSciex (Darmstadt)

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 *Stachybotrys*-Isolate

Es wurden 45 *Stachybotrys*-Isolate aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit ausgewählt (je n=15 aus Umweltproben, Futtermitteln und Lebensmitteln). Die Isolate wurden gemäß ihrer ursprünglichen Habitate kodiert:

- UM: Umwelt- und Innenraumproben
- FM: Futtermittelproben
- LM: Lebensmittelproben

Die Isolate wurden teilweise bereits in vorherigen Studien untersucht (vgl. Tabelle 13, 14 und 15). Nach Biermaier (2013) und Höhne (2008) werden mittels MTT-Zytotoxizitätstest ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte wie folgt beurteilt (bezogen auf Gramm Agar bzw. Quadratmillimeter Agar):

- > 7,5 g/ml bzw. > 100,0 mm<sup>2</sup>/ml nicht toxisch
- 7,5 - 0,74 g/ml bzw. 100,00 - 50,00 mm<sup>2</sup>/ml geringgradig toxisch
- < 0,74 g/ml bzw. < 50,00 mm<sup>2</sup>/ml hochgradig toxisch

Die Isolate wurden bis zu ihrer Analyse als Lyophilisate gelagert. Um ihre Reinheit zu überprüfen, wurden sie auf Malzextraktagar (vgl. 3.1.3) bei 25 °C für sieben Tage bebrütet. Nach Bestätigung der Reinheit wurde von jedem Isolat eine Dreipunktkultur angezüchtet, die ebenfalls sieben Tage bei 25 °C bebrütet wurde.



**Tabelle 13:** *Stachybotrys*-Isolate aus Umwelt- und Innenraumproben (n=15)

Eigene Isolat-Nr.	Stamm-sammlung	Land	Herkunft	MTT-Test <sup>1</sup>		ELISA <sup>2</sup>	Sequenzierung	HPLC/ LC-MS/MS <sup>3</sup>
				IC <sub>50</sub> -Wert g/ml*	mm <sup>2</sup> /ml*			
UM01/14	S1091	USA	Gipskarton-platte	>7,50	1936,26	1,25-9,03	<i>Stachybotrys</i> spp.	-
UM02/14	S1114	USA	Gipskarton-platte	0,23	7,56	335,41-9210,38	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	+
UM03/14	S1166/2	USA	Papier	1,88	-	7200,00	-	-
UM04/14	S1285	USA	Rigips	7,50	-	14,00	-	-
UM05/14	S1455	USA	Luftfilter	7,50	-	20,00	-	-
UM06/14	S1339	Deutschland	Fußboden-material	>7,50	-	11,00	-	-
UM07/14	S1492	USA	Luftfilter	0,06	-	15000	-	-
UM08/14	S1493/1	USA	Luftfilter	7,50	-	12000	-	-
UM09/14	S1494	USA	Luftfilter	7,50	-	< 1,00	-	-
UM10/14	S1589	USA	Filter (Glasfaser)	7,50	-	< 1,00	-	-
UM11/14	S1166/1	USA	Papier	>7,50	-	< 1,00	-	-
UM12/14	S3	Deutschland	Tapete	-	-	-	-	+
UM13/14	S4	Deutschland	Tapete	-	-	-	-	+
UM14/14	S5	Deutschland	Tapete	-	-	-	-	-
UM15/14	S9	Deutschland	Tapete	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> MTT-Zytotoxizitätstest mit Schweinenierenzellen

<sup>2</sup> ELISA für makrozyklische Trichothecene als Roridin A Äquivalent

<sup>3</sup> Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen (+: konnten nachgewiesen werden)

RA: Roridin A

MTT-Test IC<sub>50</sub>-Wert (inhibitory concentration 50: Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt,

Interpretationsgrundlage: > 7,5 g/ml bzw. > 100,0 mm<sup>2</sup>/ml nicht toxisch

7,5 - 0,74 g/ml bzw. 100,00 - 50,00 mm<sup>2</sup>/ml geringgradig toxisch

< 0,74 g/ml bzw. < 50,00 mm<sup>2</sup>/ml hochgradig toxisch

\*bezogen auf Gramm Agar bzw. Quadratmillimeter Agar - : es liegen keine Ergebnisse vor

**Tabelle 14:** *Stachybotrys*-Isolate aus Futtermitteln aus Deutschland (n=15)

Eigene Isolat-Nr.	Stamm-sammlung	Herkunft	MTT-Test <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	Sequenzierung	HPLC/ LC- MS/MS <sup>3</sup>
			IC <sub>50</sub> -Wert (mm <sup>2</sup> /ml)*	Roridin A- Äquivalent (ng/g)	<i>Stachybotrys</i> spp.	
FM16/14	SS01	Stroh	-	-	-	-
FM17/14	S7	Stroh	781,25	0,51	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.
FM18/14	S16St	Stroh	3,05	4185,70	-	+
FM19/14	S5	Stroh	97,66	2,80	-	-
FM20/14	S23St	Stroh	390,62	19,70	-	-
FM21/14	S24St/A	Stroh	0,38	174605,20	-	+
FM22/14	S24It/B	Stroh	3,05	22562,60	-	-
FM23/14	S35It	Stroh	1,52	4124,20	-	+
FM24/14	S44St	Stroh	390,62	2,34	-	+
FM25/14	S48St	Stroh	0,76	22320,90	-	-
FM26/14	H42St	Heu	781,25	1,00	-	+
FM27/14	H47A	Heu	3,05	3525,53	-	-
FM28/14	H47B	Heu	97,66	4,67	-	-
FM29/14	H47C	Heu	390,62	0,76	-	+
FM30/14	H47D	Heu	0,76	3447,10	-	+

<sup>1</sup> MTT-Zytotoxizitätstest mit Schweinenierenzellen

<sup>2</sup> ELISA für makrozyklische Trichothecene als Roridin A Äquivalent (ng/g Agar)

<sup>3</sup> Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen (+: konnten nachgewiesen werden)

RA: Roridin A n.n.: nicht nachweisbar -: es liegen keine Ergebnisse vor

Interpretationsgrundlage MTT-Test IC<sub>50</sub>-Wert > 100,0 mm<sup>2</sup>/ml nicht toxisch, 100 - 50,00 mm<sup>2</sup>/ml geringgradig toxisch,

< 50,00 mm<sup>2</sup>/ml hochgradig toxisch

\*bezogen auf Quadratmillimeter Agar

Tabelle 15: *Stachybotrys*-Isolate aus Lebensmitteln (n=15)

Eigene Isolat-Nr.	Stamm-sammlung	Herkunft	Koloniefarbe und Größe**	MTT-Test <sup>1</sup> IC <sub>50</sub> -Wert (g/ml)*	ELISA <sup>2</sup> Roridin A- Äquivalent (ng/g)	Sequenzierung		LC-MS/MS <sup>3</sup>
						<i>Stachybotrys</i> spp.		
LM31/14	SBM5	Majoran	dunkel k.K.	7,50	15,33	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM32/14	SBM10	Majoran	dunkel g.K.	7,50	0,59	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM33/14	SBM12b	Majoran	hell	7,50	0,47	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM34/14	SBM17b	Majoran	hell	7,50	0,27	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM35/14	SBM29	Majoran	dunkel g.K.	0,47	0,46	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM36/14	SBM30	Majoran	dunkel g.K.	1,88	11,30	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM37/14	SBO1a	Oregano	dunkel g.K.	0,23	1991,22	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S		+
LM38/14	SBO1b	Oregano	dunkel g.K.	0,23	19084,25	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S		+
LM39/14	SBO2	Oregano	dunkel g.K.	0,12	1784,37	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S		+
LM40/14	SBT1a	Thymian	dunkel k.K.	7,50	0,25	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM41/14	SBT2	Thymian	dunkel g.K.	3,75	0,35	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM42/14	SBT3	Thymian	dunkel g.K.	0,03	5840,63	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S		+
LM43/14	SBB2	Bohnen- kraut	dunkel g.K.	0,06	1082,64	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S		+
LM44/14	SBB3	Bohnen- kraut	dunkel g.K.	> 7,50	0,39	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.
LM45/14	SBB5	Bohnen- kraut	dunkel g.K.	7,50	0,36	<i>S. chlorohalonata</i>		n.n.

<sup>1</sup> MTT-Zytotoxizitätstest mit Schweineerizellen

<sup>2</sup> ELISA für makrozyklische Trichothecene als Roridin A Äquivalent (ng/g Agar)

<sup>3</sup> Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen (+: konnten nachgewiesen werden)

RA: Roridin A n.n.: nicht nachweisbar -: es liegen keine Ergebnisse vor

IC<sub>50</sub>-Wert (inhibitory concentration 50: Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt,

MTT-Test Interpretationsgrundlage: > 7,5 g/ml nicht toxisch; 7,55 - 0,74 g/ml geringgradig toxisch;

< 0,74 g/ml hochgradig toxisch)

\*\* dunkel: überwiegend dunkles Erscheinungsbild; hell: überwiegend helles Erscheinungsbild

\*bezogen auf Gramm Agar k.K.: kleine Kolonien g.K.: große Kolonien

### 3.1.2 Referenzstämme

In Tabelle 16 sind die Referenzstämme gelistet, die über ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel) bezogen wurden.

Die Anzucht erfolgte gemäß Anleitung der ATCC. Zudem wurden sie kulturmorphologisch auf ihre Reinheit und Identität überprüft (vgl. 3.2.1). Zudem wurden drei Isolate aus der Stammsammlung des BioCentrum der Technischen Universität Dänemark (DTU, IBT, Lyngby) in die Untersuchung mit einbezogen.

**Tabelle 16:** Verwendete Referenzstämme (n=15) und ihre Herkunft

<i>Stachybotrys (S.) spp.</i>	Land	Herkunft	Bezugsquelle / Referenznummer
<i>Melanopsamma pomiformis</i> <sup>*1</sup>	England	<i>Ulmus</i> sp.	ATCC/18873
<i>Memnoniella echinata</i> <sup>***</sup>	USA	Innenraum	ATCC/MYA-584
<i>Nectriella funicola</i> <sup>*2</sup>	Schweiz	Toter Stamm von <i>Anthriscus</i> sp.	ATCC/96538
<i>S. chartarum</i> (Chemotyp A)	Dänemark	Baumaterial	IBT <sup>**</sup> /40288
<i>S. chartarum</i> (Chemotyp S)	USA	Baumaterial	IBT <sup>**</sup> /40293
<i>S. chartarum</i>	Ungarn	Hafer	ATCC/34916
<i>S. chlorohalonata</i>	USA	Baumaterial	IBT <sup>**</sup> /40285
<i>S. complementi</i>	Japan	Boden	ATCC/20511
<i>S. cylindrospora</i>	Deutschland	Boden	ATCC/16276
<i>S. dichroa</i>	England	<i>Senecio jacobaea</i>	ATCC/18913
<i>S. kampalensis</i>	Neuguinea	Waldboden	ATCC/22705
<i>S. longispora</i>	Japan	Tote Blätter von <i>Ilex latifolia</i>	ATCC/32451
<i>S. oenanthes</i>	Kanalinseln	<i>Oenanthe crocata</i>	ATCC/22844
<i>S. parvispora</i>	Griechenland	Boden	ATCC/18877
<i>S. theobromae</i>	Malaysia	<i>Theobroma cacao</i>	ATCC/18905

\*sexuelle Formen, <sup>1</sup>: anamorphe Form: *S. albipes* <sup>2</sup>: anamorphe Form: *S. oleronensis*

\*\* BioCentrum der Technischen Universität Dänemark (DTU, Lyngby) \*\*\* Synonym zu *S. echinata*

### 3.1.3 Nährmedien

In Tabelle 17 sind die zur Anzucht genutzten Nährmedien und ihre Bezugsquellen aufgeführt. Es wurde Malzextraktagar für die Toxinextraktion und Phänotypisierung verwendet. Für die Proteinextraktion zur MALDI-TOF MS Messung und zur DNA-Extraktion wurde Malzextrakt-Bouillon genutzt.

**Tabelle 17:** Verwendete Nährmedien

Nährmedium	Mischungsverhältnis	Bezugsquelle
Maismehl Agar (CMA)	Fertigmischung 17,0 g Aqua dest. ad 1000 ml	Oxoid (Wesel), Art.Nr. 1501649
Malzextraktagar (MEA)	Fertigmischung 48,0 g Aqua dest. ad 1000 ml	Merck (Darmstadt), Art.Nr. 105398
Malzextrakt Bouillon	Fertigmischung 17,0 g Aqua dest. ad 1000 ml	Merck (Darmstadt), Art.Nr. 105397
Potato Dextrose Agar (PDA)	Fertigmischung 39,0 g Aqua dest. ad 1000 ml	VWR (Darmstadt), Art.-Nr. 84651.0500

### 3.1.4 Phänotypisierung

- Anilinblau wasserlöslich [Merck (Darmstadt), Art.Nr. M 101275]
- Aqua dest.
- Bunsenbrenner Gasprofi [WLD-Tec (Göttingen)]
- Deckgläser 24 x 24 mm [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 613F9415]
- Exsikkatordeckel [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 467-1275]
- Exsikkatorplatte Porzellan [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 467-0104]
- Exsikkatorunterteil ohne Anschluss [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 467-1130]
- Immersionsöl für die Mikroskopie [Merck (Darmstadt), Art.Nr. M 104699]
- Impflanzette [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 631-7121 N]
- Impföse [VWR (Darmstadt), Art.Nr. SCUT3686232]
- Impfösenhalter Aluminium mit PVC 150 mm [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 612-2683]
- Klebeband kristallklar 15 mm [TesaFilm, Tesa (Hamburg), Art.Nr. 57316-00000]
- Lichtmikroskop Leica Aristoplan [Leitz (Stuttgart)]
- Milchsäure 90 % [Merck (Darmstadt), Art.Nr. M100366]
- Nährbodenflaschen 1 l / 2,5 l [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 391-0528/391-0530]
- Objektträger 76 x 26 mm, geputzt/Mattrand [Menzel (Braunschweig), Art.Nr. 021102]
- Petrischalen Greiner Ø 94 mm [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 391-3662]
- Pinzette [Merck (Darmstadt), Art.-Nr. 232G2164]
- Schere [VWR (Darmstadt), Art.-Nr. 2331551]
- Stereomikroskop Discovery. V8 [Zeiss (Jena)]
- Universalpepton [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 107043]
- Horizontalschüttler, Typ 3005 [GFL (Burgwedel), Art.Nr. 10561614E]

### 3.1.5 Genotypisierung

#### 3.1.5.1 System

- Bio-Rad iCycler [Bio-Rad (München)]

#### 3.1.5.2 DNA Extraktion

- Ballotini Vollglasperlen SiLiBeads® 1,0-1,2 mm [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 201-0491]
- Chloroform z.A. [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 102445]
- Ethanol absolut z.A. [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 100983]
- Horizontalschüttler, Typ 3005 [GFL (Burgwedel), Art.Nr. 10561614E]
- LAL-Reagenzwasser steril [Acila® LRW (Weiterstadt), Art.Nr. 1715006]
- NucleoSpin® Plant Kit [Macherey & Nagel (Düren), Art.Nr. 740770.50]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.059]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.083]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 613-3687]
- Proteinase K recombinant PCR grade [Roche (Basel), Art.Nr. 03115828001]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 0030120.094]
- TissueLyser [Qiagen (Hilden), Art.Nr. 85220]
- Thermomixer Comfort [Eppendorf (Hamburg)]
- Zentrifuge mini [Labogene (Lyngø), Scanspeed, Art.Nr. 7.601.314.101]

#### 3.1.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

- Agarose [Bio-Rad (München), Art.Nr. 1613101]
- Ethidiumbromid [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 1.11608.0030]
- Gelelektrophoresekammer, horizontal [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 401515]
- HyperLadder [Bioline (Luckenwalde), Art.Nr. H4-107K]
- EZ Load [Bio-Rad (München), Art.Nr. L9703456]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.059]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.083]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 613-3687]
- Primer tri5 forward und reverse [Eurofins Operon (Ebersberg)]
- Primer ITS-1 [TIB MOLBIOL (Ebersberg)]
- Primer ITS-4 [TIB MOLBIOL (Ebersberg)]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 0030120.094]
- Thermo Prime TAQ DNA Polymerase [Thermo Scientific, Art.Nr. 00185198]
- UV-Kammer [Bio-Rad (München)]
- Vortex [IKA Lab Dancer (Staufen)]

### 3.1.5.4 Sequenzierung

- Ethanol absolut z.A. [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 100983]
- LAL-Reagenzwasser steril [Acila® LRW (Weiterstadt), Art.Nr. 1715006]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.059]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.083]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 613-3687]
- Primer tri5 forward und reverse [Eurofins Operon (Ebersberg)]
- Primer ITS-1 [TIB MOLBIOL (Ebersberg)]
- Primer ITS-4 [TIB MOLBIOL (Ebersberg)]
- QIAquick PCR Purification Kit (250) [Qiagen (Hilden), Art.Nr. 28106]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 0030120.094]
- Zentrifuge mini [Labogene (Lyngø), Scanspeed, Art.Nr. 7.601.314.101]

### 3.1.6 MALDI-TOF MS

#### 3.1.6.1 System

- MALDI-TOF Massenspektrometrie Microflex LT [Bruker Daltoniks (Bremen)]
- Software - Biotyper OC inkl. Taxonomy [Version 3.1.66] [Bruker Daltoniks (Bremen)]
- Software - Flex Analysis [Version 3.4] [Bruker Daltoniks (Bremen)]

#### 3.1.6.2 Anzucht und Proteinextraktion

- Acetonitril für HPLC [ChemSolute (Renningen), Art.Nr. 2637.2500]
- Alu-Laborfolie [Zefa (Grasbrunn), Art.Nr. 60150]
- Ameisensäure 99 – 100 % z.A. [Th. Geyer (Renningen), Art.Nr.607-001-00-0]
- Aqua bidest. / Anlage Typ 2108 [GFL (Burgwedel), Art.Nr. 10280303]
- Collection Swab invasive sterile [Eurotubo (Trujillo), Art.Nr. 300200]
- Dimethylsulfoxid [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 2952]
- Erlenmeyer-Kolben 100 ml, Weithals [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 214-1171]
- Ethanol absolut z.A. [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 100983]
- Glasperlen 0,5 mm Durchmesser [Bio-Spec Products (Karlsruhe), Art.Nr. 11079105]
- Horizontalschüttler, Typ 3005 [GFL (Burgwedel), Art.Nr. 10561614E]
- Malzextrakt-Bouillon [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 105397]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.059]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.083]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 613-3687]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 0030120.094]
- Salzsäure [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 1.09057.1000]

- TissueLyser [Qiagen (Hilden), Art.Nr. 85220]
- Vacuumzentrifuge MiVac [GeneVac (Brigachtal)]
- Vortex [IKA Lab Dancer (Staufen)]
- Zentrifuge mini [Labogene (Lynge), Scanspeed, Art.Nr. 7.601.314.101]

### 3.1.6.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

- Acetonitril [Fluka (Dagebüll), Art.Nr. 34967]
- Bruker IVD Bakterien Test Standard [Bruker Daltoniks (Bremen), Art.Nr. 8290190]
- MSP 96 polished Steel BC Target [Bruker Daltoniks (Bremen), Art.Nr. 8280800]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]
- Software – Flex Control [Version 3.4.127] [Bruker Daltoniks (Bremen)]
- Trifluoressigsäure [Merck (Hamburg), Art.Nr. 1.08178.0050]
- Aqua dest. [Fluka (Dagebüll), Art.Nr. 39253]
- α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure [Fluka (Dagebüll), Art.Nr. 70990]

### 3.1.7 LC-MS/MS

#### 3.1.7.1 System

- Tandemmassenspektrometer „API 4000“ [ABSciex (Darmstadt)]
- Software Analyst [Version 1.6.2] [ABSciex (Darmstadt)]

#### 3.1.7.2 Extraktion

- Aqua bidest./ Anlage Typ 2108 [GFL (Burgwedel), Art.Nr. 10280303]
- Acetonitril für HPLC [ChemSolute (Renningen), Art.Nr. 2637.2500]
- Bag Mixer 400 [Interscience (Bensheim)]
- Becherglas, niedrige Form 80 ml [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 213-1128]
- Bördelkappen N11-L, 13 mm [Zefa (Grasbrunn), Art.Nr. 70288]
- Faltenfilter 18,5 cm [Macherey & Nagel (Düren), Art.Nr. 531018]
- Glastrichter [VWR (Darmstadt), Art.Nr. ROBU47044]
- Messzylinder [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 612-2893]
- Omnifix 2 ml Luer Lock Spritzen [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 612-2893]
- Spritzenfilter (Nylon), 25 mm/0,45 µm [Zefa (Grasbrunn), Art.Nr. E256.1]
- Reagenzglas mit Gewinde [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 216-1166]
- Stomacherbeutel, steril [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 129-9866]
- Ultraschallbad Sonorex RX 510 [Bandelin (Berlin)]
- Vakuumpzentrifuge MiVac [GeneVac (Brigachtal)]
- Verschlusszange für Bördelkappen 13 mm [Zefa (Grasbrunn), Art.Nr. 735113]
- Vials 2 ml 12 x 32 mm Klarglas [Zefa (Grasbrunn), Art.Nr. 8251370]
- Waage [Sartorius (Göttingen)]

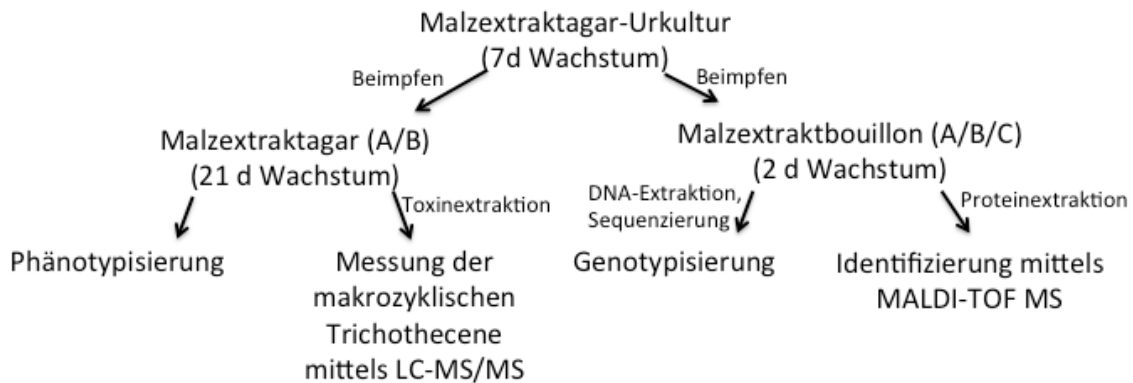


### 3.1.7.3 Messung der Extrakte

- Ameisensäure 99 – 100 % z.A. [Th. Geyer (Braunschweig), Art.Nr.607-001-00-0]
- Ammoniumformiat [Sigma-Aldrich (Steinheim), Art.Nr. F2004]
- Aqua bidest. Anlage Typ 2108 [GFL (Burgwedel), Art.Nr. 10280303]
- HPLC-Anlage: LC-20 AB; CBM-20A; CTO-20AC [Shimadzu (Hamburg)]
- HPLC-Säule Synergi Polar-RP, 150 x 2 mm [Phenomenex, Art.Nr. 00F-4375-B0]
- Methanol [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 1.06009]
- Öffnungszange für Bördelkappen 13 mm [Zefa (Grasbrunn), Art.Nr. 12967]
- *Stachybotrys*-Vergleichsextrakt (S8, *S. chartarum* Chemotyp S, vgl. Gottschalk (2009))
- Spritzenfilter (Nylon), 13 mm/0,45 µm [Zefa (Grasbrunn), Art.Nr. 101214042]
- Tandemmassenspektrometer „API 4000“ [ABSciex (Darmstadt)]
- Verrucarin A [Sigma-Aldrich (Steinheim), Art.Nr. R7502]
- Vorsäulenhalter [Phenomenex (Aschaffenburg), Part.Nr. KJ0-4282]
- Vorsäule Synergi Polar-RP 4 x 20 mm [Phenomenex (Aschaffenburg), Part.Nr. AJ0-6075]

### 3.2 Methoden

In Abbildung 16 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Nach sieben Tagen Inkubation der ersten Kulturplatte aus dem *Stachybotrys*-Lyophilisat (vgl. Kap. 3.1.1) war genügend Pilzmaterial gewachsen, um dieses für die Beimpfung von MEA-Nährmedien und/oder Flüssignährmedien zu gewinnen.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus  
(LC-MS/MS  $\hat{=}$  Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie,  
MALDI-TOF MS  $\hat{=}$  Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight  
Massenspektrometrie, d: Tage) (A, B und C  $\hat{=}$  Mehrfachansätze)

#### 3.2.1 Anzucht

Die als Lyophilisate vorliegenden Isolate wurden in 1000  $\mu$ l Peptonwasser (0,1 %) aufgelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (GFL, Burgwedel) mit einer Geschwindigkeit von 250/min inkubiert. Anschließend wurde die Sporensuspension auf MEA ausgestrichen und für sieben Tage bei +25 °C inkubiert.

Von diesen Platten wurde Pilzmaterial mittels einer Impflanzette entnommen und punktförmig an drei verschiedenen Stellen auf MEA aufgebracht (Dreipunktkultur) (Samson, 2010). Diese Platten (Urkulturen) wurden für sieben Tage bei +25 °C im Brutschrank und anschließend für 14 Tage in einem mit sterilem Aqua bidest. gefüllten Exsikkator bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Referenzstämme wurden gemäß den Vorschriften der ATCC und je nach Referenzstamm zusätzlich auf CMA, MEA und PDA angezüchtet und anschließend wie die Isolate auf MEA als Dreipunktkultur angelegt.

## **3.2.2 Phänotypische Charakterisierung**

### **3.2.2.1 Kulturmorphologie**

Von den Urkulturen aller Isolate und Referenzstämme wurden Dreipunktkulturen (je n=2, A und B) auf Malzextraktagar angefertigt (siehe Kap. 3.2.1). Diese Kulturen wurden bei +25 °C im Brutschrank für sieben Tage und anschließend bei Raumtemperatur in einem mit Aqua bidest. gefüllten Exsikkator für 14 Tage inkubiert.

Nach insgesamt 21 Tagen wurde von allen Isolaten ein makroskopisches Foto angefertigt. Die Fotos der Referenzstämme wurden zum Vergleich mit den Fotos der Isolate herangezogen (Abbildung 19 - 22).

Die Platten wurden anschließend bis zur Toxinextraktion bei -20 °C aufbewahrt für maximal 21 Tage.

### **3.2.2.2 Mikromorphologie**

Das Pilzmaterial für die mikroskopischen Präparate wurde mittels eines kristallklaren Klebestreifens von der Dreipunktkultur abgenommen, auf einem Objektträger mit Anilinblaufärbelösung (Anilinblau + Milchsäure (85 %)) angefärbt und bei 400- und 1000-facher Vergrößerung betrachtet.

Anhand der Form der Konidiophoren, Phialiden und Konidien wurde eine taxonomische Zuordnung vorgenommen (Samson, 2010).

Die Mikroskopaufnahmen (Abbildung 23 - 25) der Referenzstämme wurden zum Vergleich mit den zu untersuchenden Isolaten herangezogen.

### **3.2.3 Molekularbiologische Differenzierung**

#### **3.2.3.1 PCR**

##### **3.2.3.1.1 System**

Die Polymerasekettenreaktion wurde an einem iCycler (Bio-Rad, München) durchgeführt.

##### **3.2.3.1.2 Anzucht und DNA-Extraktion**

Von den Urkulturen (Kap. 3.2.1) wurde Pilzmaterial mittels eines sterilen Tupfers in mit 50 ml Malzextrakt-Bouillon befüllte 100 ml Erlenmeyerkolben (je n=3, A, B und C) überführt und für 24 h bei 25 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Erlenmeyerkolben auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur für weitere 24 h mit einer Geschwindigkeit von 250/min inkubiert.

Aus diesen Flüssigkulturen wurde 200 mg Myzel entnommen und die DNA mittels NucleoSpin Plant Kit nach Anweisungen des Herstellers (Macherey & Nagel, Düren) extrahiert. Um einen besseren Aufschluss der Zellen zu erreichen, wurden zusätzlich Gasperlen (n=10, Durchmesser: 1,0 mm) eingesetzt (Biermaier, 2013).

##### **3.2.3.1.3 Amplifikation der ITS-Region**

Die Amplifikation (330 - 520 bp) des ITS-Genabschnittes (ITS-1/4) wurde mittels folgender Primer durchgeführt (White et al., 1990):

- ITS-1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3` (forward)
- ITS-4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3` (reverse)

In Tabelle 18 ist der Reaktionsansatz für die PCR dargestellt.

Da alle Schimmelpilze diesen Genabschnitt besitzen, dient das PCR-Ergebnis gleichzeitig als interne Amplifikationskontrolle (Biermaier, 2013; Hibbett und Taylor, 2013).

Anhand des ITS-Genabschnittes können verschiedene Pilzgattungen unterschieden werden. Zum Teil gelingt eine Differenzierung auf Speziesebene (White et al., 1990).

**Tabelle 18:** Reaktionsansatz (50 µl) für die PCR

Stammlösung	Endkonzentration	µl/Ansatz
10 x Puffer	-	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5
dNTP	200 nM	1
ITS-1 bzw. tri5 f	10 µM	1
ITS-4 bzw. tri5 r	10 µM	1
Aqua dest.	-	ad 50

dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat    f: forward    r: reverse

Die Amplifikation erfolgte nach dem Temperaturprogramm in Tabelle 19.

Um zu überprüfen, ob die PCR erfolgreich war, wurden jeweils 3 µl der PCR-Produkte auf ein zweiprozentiges Agarose-Elektrophoresegel aufgetragen, für 60 min bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt und anschließend mittels Ethidiumbromidfärbung unter einer UV-Kamera sichtbar gemacht.

**Tabelle 19:** Temperaturprogramm für die ITS - PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
1	95	10 min	1x
2	95	20 s	40x
	52	30 s	
	72	90 s	
3	72	10 min	1x
4	10	unbegrenzt	-

### 3.2.3.1.4 Amplifikation des *tri5*-Gens

Mittels der folgenden Primer (Cruse et al., 2002) wurde der Sequenzabschnitt des *tri5*-Gens amplifiziert:

- 5'-CATCAATCCAACAGTTTCAC-3' (forward)
- 3'-GCAACCTTCAAAGACTATTG-5' (reverse)

Der Reaktionsansatz für diese PCR entspricht dem Ansatz der ITS-PCR (Tabelle 18). In Tabelle 20 ist das Temperaturprogramm für die PCR aufgeführt.

Anhand des *tri5*-Genabschnittes kann zwischen *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* und zwischen den Chemotypen (A und S) von *S. chartarum* unterschieden werden.

**Tabelle 20:** Temperaturprogramm für die *tri5*-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
1	95	10 min	1x
2	95	20 s	40x
	51	30 s	
	72	45 s	
3	72	10 min	1x
4	10	unbegrenzt	

### 3.2.3.2 Sequenzierung und Identifizierung

Die PCR-Produkte wurden mittels des QIAquick<sup>®</sup> Purification Kits (Qiagen, Venlo) nach Herstellerangaben aufgereinigt und auf eine Konzentration von 5 ng/μl eingestellt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

Aufgrund der Unterschiede im ITS-Genabschnitt (ITS-1/4) kann zwischen einzelnen *Stachybotrys* spp. unterschieden werden (Andersen et al., 2003).

Anhand des *tri5*-Genabschnittes ist es möglich, eindeutig zwischen dem hoch toxischen *S. chartarum* Chemotyp S und *S. chartarum* Chemotyp A sowie *S. chlorohalonata* zu unterscheiden (Andersen et al., 2003).

Um die Referenzstämme auf ihre Identität zu überprüfen, wurden die Sequenzierungsergebnisse der ITS- und der *trj5*-Region mit der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und der MycoBank-Datenbank abgeglichen (Crous et al., 2004; NCBI, 2014). Die Sequenzierungsergebnisse der 45 *Stachybotrys*-Isolate wurden mit den Sequenzierungsergebnissen der Referenzstämme verglichen.

Die Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse erfolgte mittels der Software Bionumerics (Gent) und Online-Datenbanken (NCBI und MycoBank) (Crous et al., 2004; NCBI, 2014). Es wurden nur eindeutige Basensequenzen ab einem Software-ermittelten Signalqualitätswert von  $\geq 30$  in Betracht gezogen (Qualitätskriterium Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

Die Qualität der Dendrogramme wurde mittels des kophenetischen Korrelationskoeffizienten beurteilt (Rohlf und Sokal, 1962). Dabei werden die Werte der Distanzmatrix und der kophenetischen Matrix durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson in Bezug zueinander gebracht und der lineare Zusammenhang beurteilt. Dieser Wert sollte möglichst nahe an 1,0 sein. Ab einem kophenetischen Korrelationskoeffizienten von  $< 0,76$  gilt die Aufzweigung als nicht verlässlich. Diese Beurteilung ist in den Dendrogrammen als Prozentwert (1,0=100 %) dargestellt (Goris, 2014).

### 3.2.4 MALDI-TOF MS

#### 3.2.4.1 System

Die Messungen wurden an einem Microflex LT (Bruker Daltoniks, Bremen) MALDI-TOF Massenspektrometer mit einem MSP 96 polished steel BC Target durchgeführt.

#### 3.2.4.2 Proteinextraktion

Alle Referenzstämme und Isolate wurden für die Vorversuche sowohl auf Malzextraktagar als auch in Malzextrakt-Bouillon angezüchtet, wobei für die Hauptversuche nur Malzextrakt-Bouillon verwendet wurde. Dabei bildeten die untersuchten *Stachybotrys* spp. sogenannte Myzel-Pellets (Paul und Thomas, 1998).

Im Rahmen der Vorversuche wurde Randmyzel der Referenzstämme für *S. chartarum* Chemotyp A und S (IBT 40288 und 40293) und *S. chlorohalonata* (IBT 40285) entsprechend den Standardmethoden („Extended Direct Transfer“ und „Formic Acid Extraction“) von Bruker Daltoniks direkt von Malzextraktagarplatten extrahiert (vgl. Abbildung 52 im Anhang). Zudem wurde die Extraktionsmethode von Bruker Daltoniks für filamentöse Schimmelpilze im Vorversuch getestet (vgl. Abbildung 53 im Anhang) und ein zusätzlicher Waschschriff mit DMSO (10 %) oder Glasperlen (0,5 mm) ergänzt, um die Extraktionsmethode zu optimieren (Abbildung 17).

Die Reproduzierbarkeit dieser Methodik wurde an drei unterschiedlichen Tagen im Mehrfachansatz (3 biologische Replikate) getestet.

Das Myzel wurde aus der unter 3.2.3.1.2 beschriebenen Flüssigkultur mittels einer 1000 µl Pipette entnommen und mit so wenig Flüssignährmedium wie möglich in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das Myzel absetzen zu lassen.



Der resultierende Überstand an Malzextrakt-Bouillon wurde verworfen und durch weiteres Myzel ersetzt, bis hin zu einer Menge von ca. 1000  $\mu\text{l}$  Myzel-Bouillon-Gemisch. Nach dem ersten Waschschrift mit Aqua bidest. wurde das Myzel mit 10 %-igem DMSO gewaschen und in Ethanol/Wasser (900  $\mu\text{l}$ /300  $\mu\text{l}$ ) bis zur weiteren Verarbeitung (max. 7 Tage) im Kühlschrank bei + 7 °C aufbewahrt, wobei das Verhältnis zwischen sterilem Aqua bidest. und Ethanol gemäß den Vorgaben von Bruker Daltoniks (Abbildung 53 im Anhang) gewählt wurde (Anonymous, 2014).

Beim Trocknen des Myzels wurde auf eine vollkommene Trocknung des Pellets geachtet, das daraufhin vollständig in Ameisensäure resuspendiert wurde. Nach Zugabe von Acetonitril wurde die Lösung mit dem Myzel ebenfalls sorgfältig gemischt und angeraute Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm, ca. 250  $\mu\text{l}$ ) hinzugegeben. Um eine Reduktion störender Silikate zu erreichen, wurden die Glasperlen zuvor mittels konzentrierter Salzsäure für 24 h behandelt. Dies hat gleichzeitig einen anrauenden Effekt auf die Oberfläche der Glasperlen, wodurch eine zusätzliche mechanische Einwirkung auf die Pilzzellen erreicht wurde.

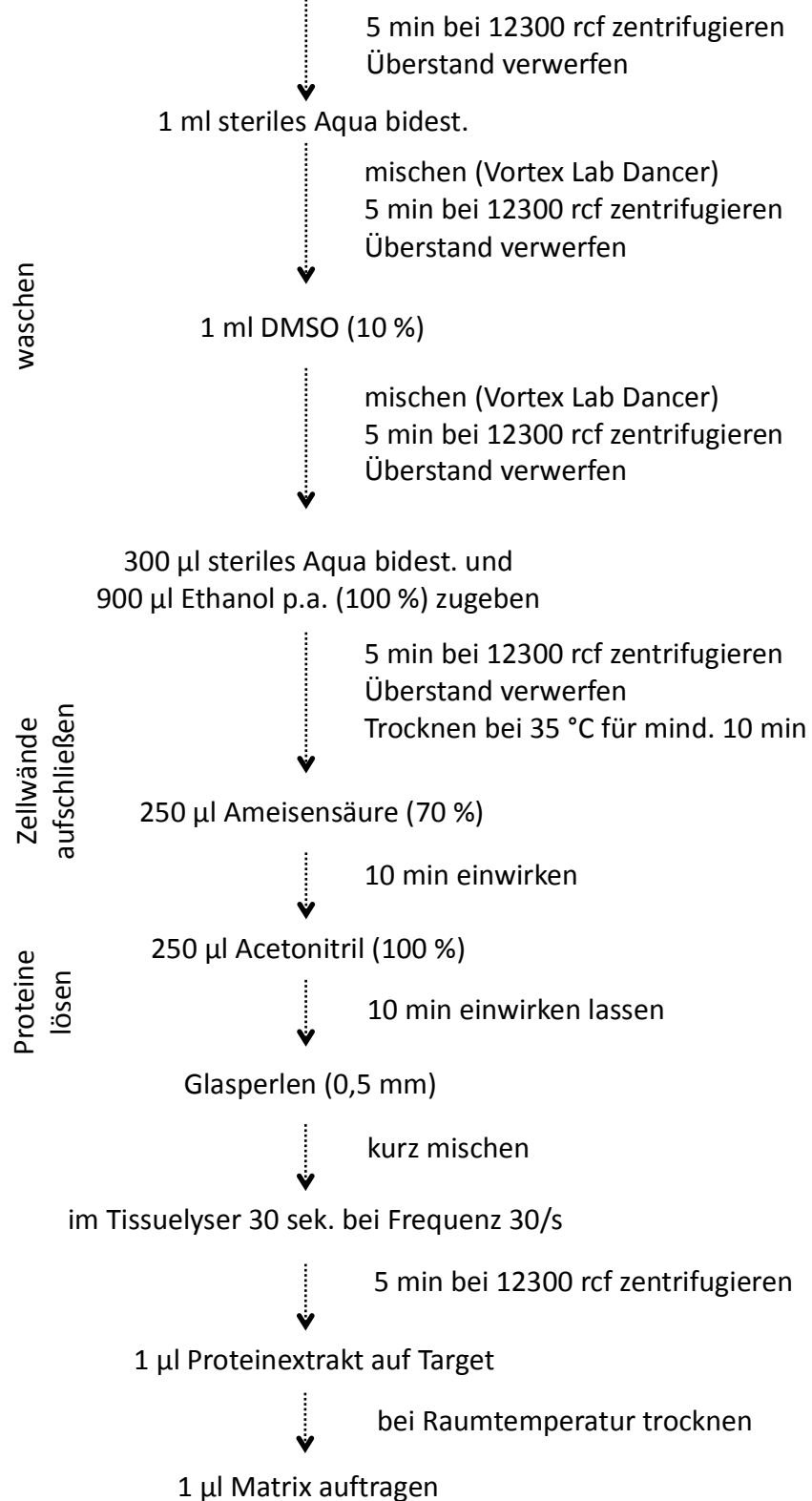
Der Extrakt wurde im Tissuelyser für 30 s bei einer Frequenz von 30/s bearbeitet.

Zuletzt wurde 1  $\mu\text{l}$  des Proteinextrakts auf ein MSP 96 polished steel BC Target aufgebracht, getrocknet und mit 1  $\mu\text{l}$  Matrix (CHCA) beschichtet. Die Matrixlösung (Tabelle 21) wurde selbst hergestellt (Wolf und Straubinger, 2014).

**Tabelle 21:** Herstellung der  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure-Matrixlösung nach Wolf und Straubinger (2014)

Lösungen	Zusammensetzung
Organisches Lösemittel (1 ml)	500 $\mu\text{l}$ Acetonitril 475 $\mu\text{l}$ Aqua dest. 25 $\mu\text{l}$ Trifluoressigsäure
Matrix (1 ml)	14 mg $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure 1000 $\mu\text{l}$ organisches Lösemittel

Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 1000 - 1500 µl Myzel füllen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren



**Abbildung 17:** Schema der optimierten Proteinextraktion zur Untersuchung von *Stachybotrys* spp. mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie, DMSO: Dimethylsulfoxid, p.a.: pro analysi

### 3.2.4.3 MALDI-TOF MS Messung

Die Generierung aller Spektren wurde mit der Software „Real Time Classification“ von Bruker Daltoniks im linearen positiven Modus (2 - 20 kDa, MBT\_FC.par) mittels der MBT\_AutoX Methode mit folgenden Grundeinstellungen durchgeführt:

#### Lasereinstellung:

- MS/Parent Modus: An
- Fuzzy Control, Gewichtung: 2,00
- Laserenergie: 30 - 40 % bei Global Offset von 38 %
- Matrix Blaster: 10 Laserschüsse mit 40 % Laserenergie
- Laserbewegung: spiral-klein
- Max. Laserschüsse an einer Rasterstelle: 120

#### Massenbereich:

- Evaluierungsbereich: m/z 4 - 10 kDa
- größten Peak im gewählten Massenbereich ausblenden
- Bearbeitungsmethode: MBT\_Process
- Smoothing: An
- Baseline Substraction: An
- min. Peak Auflösung:  $x > 400$

#### Spektrengenerierung:

- MS/Parent Kontrolle: An
- 240 Einzelspektren pro 40 Laserschüsse

#### Hochspannung:

- Ionenquelle 1: 20,00 kV
- Ionenquelle 2: 16,70 kV
- Linse: 7,00 kV
- Pulsed Ion Extraction: 150 ns

Da die Messungen reproduzierbar und standardisiert erfolgen sollten, wurden alle Messungen mittels der automatischen Messmethode (MBT\_AutoX) gemessen. Damit wurde indirekt die Proteinextraktionsmethode standardisiert und einer weiteren Qualitätsprüfung unterzogen. Ein Spektrum muss folgende Qualitätskriterien erfüllen, um von der automatischen Messmethode als ausreichend registriert und gespeichert zu werden:

- minimale Peak-Auflösung:  $> 400$
- minimales S/N-Verhältnis: 2
- minimale Intensität: 600

Um vergleichbare Spektren zu generieren, wurden Kalibrationen vor jeder Erstellung eines Referenzspektrums und routinemäßig einmal pro Woche mittels des von Bruker Daltoniks empfohlenen Bakterien-Teststandards (BTS; acht Kalibranten im Massenbereich von 3637,8 Da - 16952,3 Da), bei einem maximalen Peak Error von 300 ppm durchgeführt.

Die Anzucht und Extraktion der Referenzstämme wurde wie in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben durchgeführt.

Die Referenzspektren wurden gemäß dem Handbuch zu Biotyper OC 3.1 erstellt (Anonymous, 2012). Um die erforderlichen mindestens 20 einzelnen Spektren für die Generierung eines Referenzspektrums (MSP) zu erhalten, wurden die drei biologischen Replikate (A, B und C) jeweils 12 mal auf das MSP 96 polished steel BC Target aufgebracht.

Nach Überprüfung der Kalibrationsparameter wurden alle Spektren mit übereinstimmenden Massensignalen ( $\pm 500$  ppm) mit der Biotyper OC Datenbank Version 3.1.66 abgeglichen, um deren Spezifität zu bestätigen. Nur wenn es keine eindeutige Gattungsidentifizierung (Score Value:  $x < 1,7$ ) mittels der bestehenden Biotyper OC Datenbank gab und mindestens 20 Spektren übereinstimmten (Kontrolle der Kalibration, Kontrolle der Spektren auf eventuelle Null-Linien („Flatlines“) oder Peakshifts (max. 500 ppm)), wurde ein MSP erstellt und in die Datenbank aufgenommen.

Um die Qualität der MSPs zu überprüfen, wurden die Spektren, mit denen das MSP erstellt wurde, mit dem generierten MSP abgeglichen. Nur bei einem durchschnittlichen Score Value von  $> 2,5$  wurde das erstellte MSP als gut beurteilt.

Von jeder Probe wurden drei biologische Replikate auf je drei Spots auf dem Target aufgetragen, d.h. von jeder Probe wurden neun Summenspektren, bestehend aus je sechs einzelnen Spektren von je 40 Laserschüssen, erstellt. Die Summenspektren wurden anschließend mit den zuvor erstellten Referenzspektren mittels der Biotyper OC Software abgeglichen.

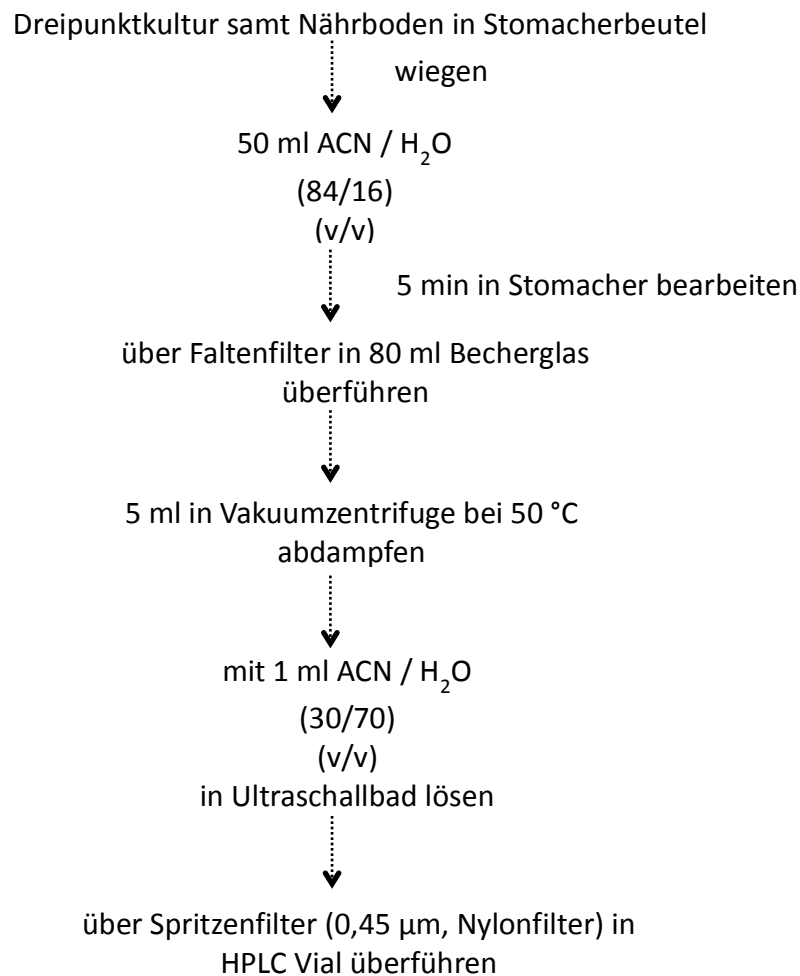
### 3.2.5 LC-MS/MS

#### 3.2.5.1 System

Die Messung wurden an einem Tandemmassenspektrometer „API 4000“ (ABSciex, Darmstadt) durchgeführt und mittels der Software Analyst (Version 1.6.2, ABSciex, Darmstadt) ausgewertet.

#### 3.2.5.2 Toxinextraktion der *Stachybotrys*-Isolate

Für die Bestimmung der Toxinproduktion wurden MEA-Dreipunktkulturen aller Isolate und Referenzstämme (siehe Kap. 3.2.1) (zwei biologische Replikate je n=2) aufgetaut, in Stomacherbeutel überführt und gewogen. Die Extraktion erfolgte wie in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Extraktion von Dreipunktkulturen von *Stachybotrys* spp. zur Toxinbestimmung mittels LC-MS/MS, ACN: Acetonitril  
HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

### 3.2.5.3 Messung der Toxinextrakte

Die Messung des Gehalts an makrozyklischen Trichothecenen (Satratoxin F, G und H, Roridin E und L-2, sowie Verrucarin J) erfolgte mittels HPLC-Tandemmassenspektrometrie.

Die Toxine wurden semiquantitativ mittels Matrixkalibration (5-Punkt Kalibration zwischen 10-200 ng/ml) als Äquivalente von Verrucarin A (Nachweisgrenze 0,1 ng/g Agar) bestimmt, da keine Standards für die anderen oben genannten makrozyklischen Trichothecene kommerziell erhältlich waren. Als Vergleichsstandard für diese von *S. chartarum* gebildeten makrozyklischen Trichothecene wurde ein Matrix-Referenzextrakt (Stammsammlungsbezeichnung: S8, *S. chartarum* Chemotyp S, (Gottschalk (2009)) verwendet.

Zur Herstellung des Matrixextraktes wurden Kulturplatten des Referenzstamms IBT 40288 für *S. chartarum* Chemotyp A analog des Schemas in Abbildung 18 extrahiert und die Standardverdünnung daraus hergestellt, um Matrixeffekte weitgehend zu kompensieren.

In Tabelle 22 und 23 sind die Bedingungen für die Flüssigkeitschromatographie dargestellt. Die Massenspektrometer-spezifischen Einstellungen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

**Tabelle 22:** Grundbedingungen für die HPLC

HPLC-Säule	Synergi Polar-RP 80 A (Phenomenex, Torrance)
Mobile Phase	Reinstwasser + 5 mM Ammoniumformiat + 0,1 % Ameisensäure (Eluent A) Methanol + 5 mM Ammoniumformiat + 0,1 % Ameisensäure (Eluent B)
Flussrate	400 µl/min
Injektionsvolumen	20 µl

**Tabelle 23:** Gradientenprogramm (linear) für die HPLC

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	90	10
15	5	95
20	5	95
20,1	90	10
26	90	10

Eluent A: Reinstwasser + 5 mM Ammoniumformiat + 0,1 % Ameisensäure

Eluent B: Methanol + 5 mM Ammoniumformiat + 0,1 % Ameisensäure

**Tabelle 24:** Quellenparameter des Tandemmassenspektrometers (API 4000, ABSciex, Darmstadt)

<b>Ionisierung</b>	Elektrospray positiv (ESI +)
<b>Ionisierungsspannung (ISV)</b>	5000 V
<b>Temperatur</b>	500 °C
<b>Nebulizergas (GS1)</b>	50 psi
<b>Heizgas (GS2)</b>	50 psi
<b>Curtaingas (CUR)</b>	25 psi
<b>Kollisionsgas (CAD)</b>	Stufe 9

Die substanzspezifischen MS - Parameter für die Bestimmung der einzelnen makrozyklischen Trichothecene im „Multiple reaction monitoring“ (MRM) - Modus können Tabelle 25 entnommen werden. Diese wurden für die nicht als Standardsubstanz erhältlichen makrozyklischen Trichothecene anhand des beschriebenen Vergleichsstandards (Stammsammlungsbezeichnung: S8, *S. chartarum* Chemotyp S, (Gottschalk (2009)) ausgewählt und optimiert.

**Tabelle 25:** Substanzspezifische Parameter der analysierten makrozyklischen Trichothecene (LC-MS/MS im MRM-Modus)

<b>Analyt</b>	<b>Vorläufer-ion (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup></b>	<b>Produkt-ion</b>	<b>DP (V)</b>	<b>EP (V)</b>	<b>CE (eV)</b>	<b>CXP (V)</b>
Verrucarin A (Kontrollstandard)	550,4	457,3	66	10	19	26
		249,1	66	10	25	14
Roridin E	532,4	361,3	81	10	23	20
		113,1	81	10	37	20
Roridin L-2	548,3	283,1	61	10	19	16
		249,2	61	10	23	14
Satratoxin F	560,4	249,1	71	10	23	14
		231,2	71	10	27	14
Satratoxin G	562,3	249,2	66	10	21	14
		231,2	66	10	27	12
Satratoxin H	546,3	511,3	66	10	17	28
		245,1	66	10	29	14
Verrucarin J	502,4	343,2	86	10	25	20
		249,2	86	10	29	14

DP: Declustering potential

CXP: Cell exit potential

V: Volt

EP: Entrance potential

CE: Collision energy

eV: Elektronenvolt

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phänotypische Charakterisierung

#### 4.1.1 Referenzstämme

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung zusammenfassend dargestellt. Es konnte aufgrund der großen makroskopischen Heterogenität und des Mangels an Vergleichsliteratur keine Identifikation erfolgen (vgl. Abbildung 19 - 22). Mikroskopisch war aufgrund der Heterogenität und der mangelnden Übereinstimmung mit Zeichnungen der erstbeschreibenden Literatur (vgl. Abbildung 23 - 25) ebenfalls keine Identifikation möglich.

**Tabelle 26:** Phänotypische Charakteristika der Referenzstämme (n=15)

Angaben ATCC bzw. IBT	Isolat	Kolonie-farbe	Verfärbung des Agar	Bildung von	
				Guttations-tropfen	Sporen
<i>Melanopsamma pomiformis</i>	ATCC/18873	sw	Ja	Nein	+
<i>Memnoniella echinata</i>	MYA-584	gra	Ja	Nein	+++
<i>Nectriella funicola</i>	ATCC/96538	w	Nein	Nein	-
<i>S. chartarum</i> (Chemotyp A)	IBT/40288	s	Ja	Ja	+++
<i>S. chartarum</i> (Chemotyp S)	IBT/40293	sw	Nein	Ja	+++
<i>S. chartarum</i>	ATCC/34916	sw	Nein	Ja	+++
<i>S. chlorohalonata</i>	IBT/40285	s	Nein	Ja	+++
<i>S. complementi</i>	ATCC/20511	sw	Ja	Nein	-
<i>S. cylindrospora</i>	ATCC/16276	gra	Ja	Nein	++
<i>S. dichroa</i>	ATCC/18913	w	Ja	Nein	++
<i>S. kampalensis</i>	ATCC/22705	o	Nein	Nein	++
<i>S. longispora</i>	ATCC/32451	grü	Nein	Nein	-
<i>S. oenantes</i>	ATCC/22844	o	Nein	Ja	+
<i>S. parvispora</i>	ATCC/18877	sw	Nein	Ja	++
<i>S. theobromae</i>	ATCC/18905	gra	Ja	Nein	-

sw: schwarz-weiß    gra: grau    w: weiß    s: schwarz    o: orange    grü: grün  
 -: keine Sporen    +: sehr wenige Sporen    ++: einige Sporen    +++: viele Sporen



Makroskopisch wiesen alle 15 auf MEA kultivierten Referenzstämme (*S. parvispora* (ATCC 18877), *S. cylindrospora* (ATCC 16276), *Memnoniella echinata* (MYA-584), *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873), *Nectriella funicola* (ATCC 96538), *S. complementi* (ATCC 20511), *S. dichroa* (ATCC 18913), *S. kampalensis* (ATCC 22705), *S. longispora* (ATCC 32451), *S. oenanthos* (ATCC 22844), *S. theobromae* (ATCC 18905), *S. chartarum* (ATCC 34916), *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) und Chemotyp A (IBT 40288) sowie *S. chlorohalonata* (IBT 40285)) ein unterschiedliches Erscheinungsbild auf (Abbildung 19 - 22).

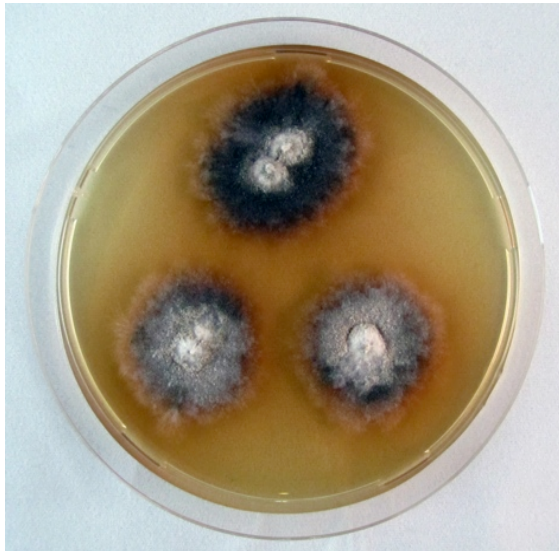
Die größten Ähnlichkeiten im Wachstumsverhalten (Sporenbildung und Größe der Kolonien) zeigten die Referenzstämme für *S. chlorohalonata* (IBT 40285), *S. chartarum* Chemotyp A und S (IBT 40288, IBT 40293 und ATCC 34916) und *Memnoniella echinata* (MYA-584) (Abbildung 19 und 20).

Wie in den Abbildungen 19 - 22 dargestellt, zeigten sich schwarze, weiße, grünliche und rötliche sowie mehrfarbige Kolonien unterschiedlicher Größe, die zum Teil scharf abgegrenzt waren oder zum Kolonierand hin auslaufendes Myzel aufwiesen. Die biologischen Replikate (A und B, je n=2) der Pilzkulturen zeigten jeweils ein homogenes Erscheinungsbild.

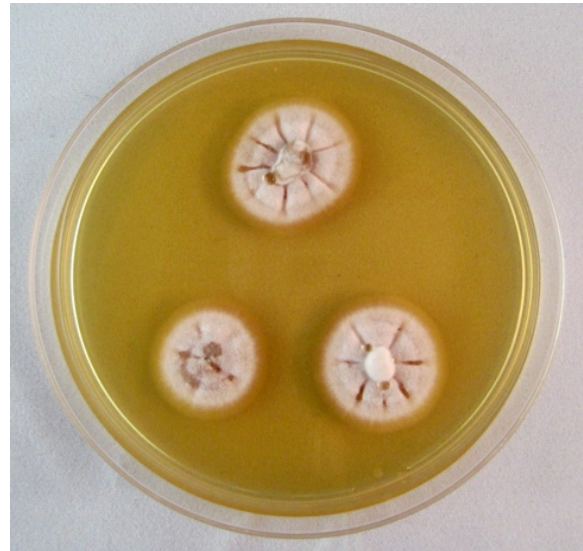
Es liegen für einige Referenzstämme keine Daten zum Auftreten von Farbveränderungen in MEA-Kulturmedium vor, sodass anhand dieses Merkmals für *S. parvispora* (ATCC 18877), *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873), *Nectriella funicola* (ATCC 96538), *S. complementi* (ATCC 20511), *S. dichroa* (ATCC 18913), *S. kampalensis* (ATCC 22705), *S. longispora* (ATCC 32451), *S. oenanthos* (ATCC 22844) und *S. theobromae* (ATCC 18905) keine Identifizierung erfolgen konnte. Der Agar verfärbte sich je nach Spezies rötlich, braun oder gelblich und die Ausdehnung der Kolonien reichte von der Bedeckung von zwei Dritteln bis hin zu einem vollständigen Bewuchs des Nährmediums.

Die Bildung von Guttationstropfen wurde bei *S. oenanthos* (ATCC 22844), *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873), *S. chartarum* (ATCC 34916), *S. parvispora* (ATCC 18877), *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) und Chemotyp A (IBT 40288) sowie *S. chlorohalonata* (IBT 40285) beobachtet. Bisher ist diese Eigenschaft nur für *S. chartarum* Chemotyp S und A sowie *S. chlorohalonata* beschrieben (Gareis und Gottschalk, 2014).

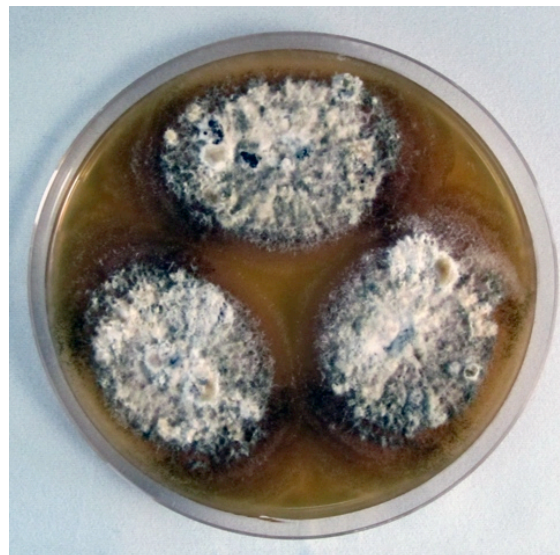
Eine Identifikation der Referenzstämme anhand kulturmorphologischer Merkmale war nicht möglich, da nur wenig Vergleichsliteratur zur Verfügung steht. Die für *S. chartarum*, *S. chlorohalonata* und *Memnoniella echinata* vorliegenden Quellen (Samson, 2010) geben von den hier erhaltenen Ergebnissen abweichende Merkmale an (vgl. 2.3.1).



*Melanopsamma pomiformis\**  
(ATCC 18873)

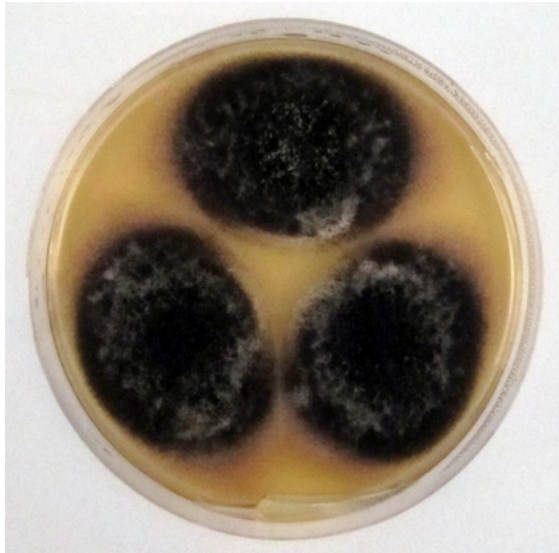


*Nectriella funicola\**  
(ATCC 96538)



*Memnoniella echinata\*\**  
(MYA-584)

**Abbildung 19:** *Stachybotrys*-Referenzstämme, \*teleomorphe Formen, \*\*Synonym zu *S. echinata*



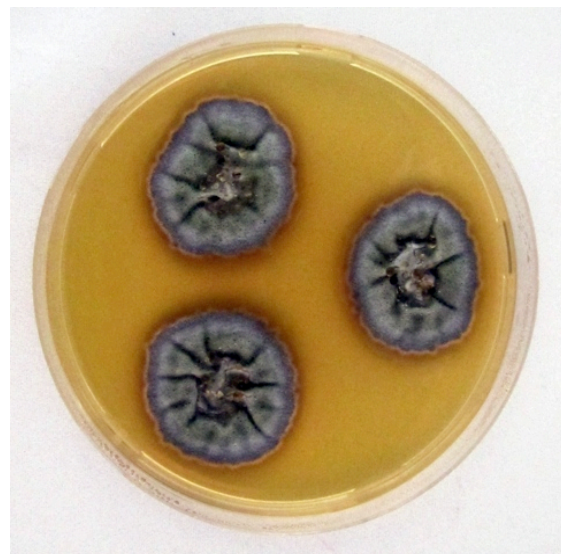
*S. chartarum* Chemotyp A  
(IBT 40288)



*S. chartarum*\*  
(ATCC 34916)



*S. chartarum* Chemotyp S  
(IBT 40293)

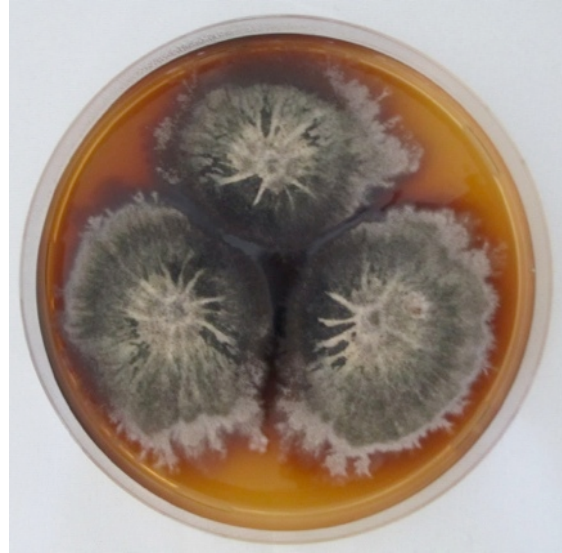


*S. chlorohalonata*  
(IBT 40285)

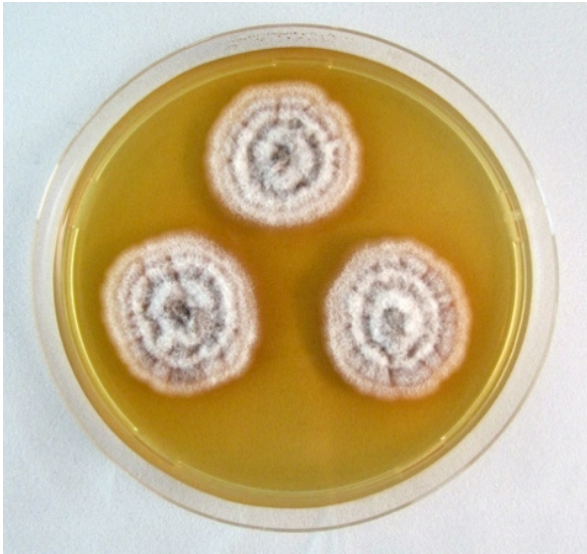
**Abbildung 20:** *Stachybotrys*-Referenzstämme (n=4), \*gemäß Sequenzierung (vgl. 4.2.3) und LC-MS/MS (vgl. 4.4.1) *S. chartarum* Chemotyp S



*S. complementi\**  
(ATCC 20511)



*S. cylindrospora*  
(ATCC 16276)

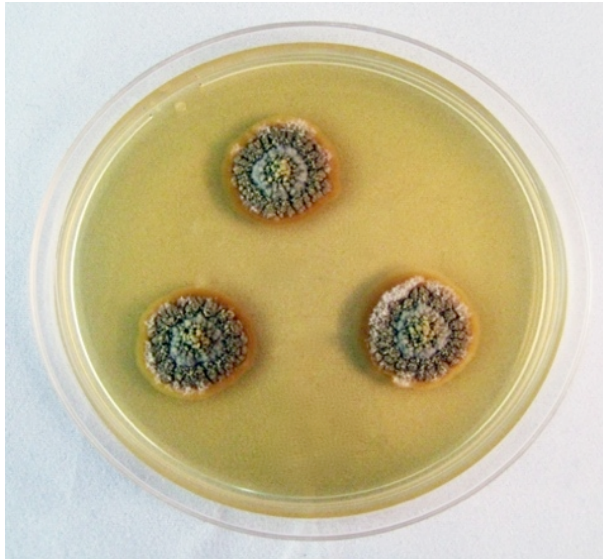


*S. dichroa*  
(ATCC 18913)

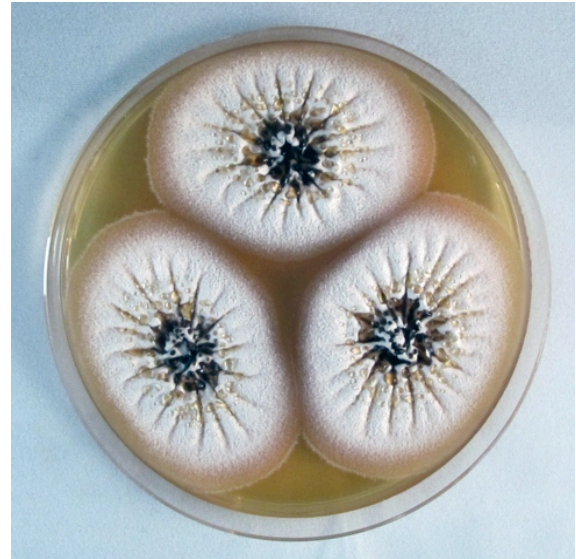


*S. kampalensis*  
(ATCC 22705)

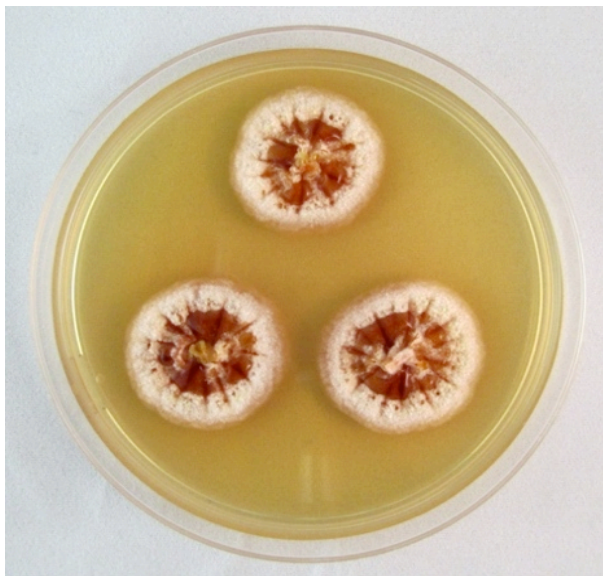
**Abbildung 21:** *Stachybotrys*-Referenzstämme, \*gemäß Sequenzierungen (vgl. Kap. 4.2.2)  
*S. microspora*



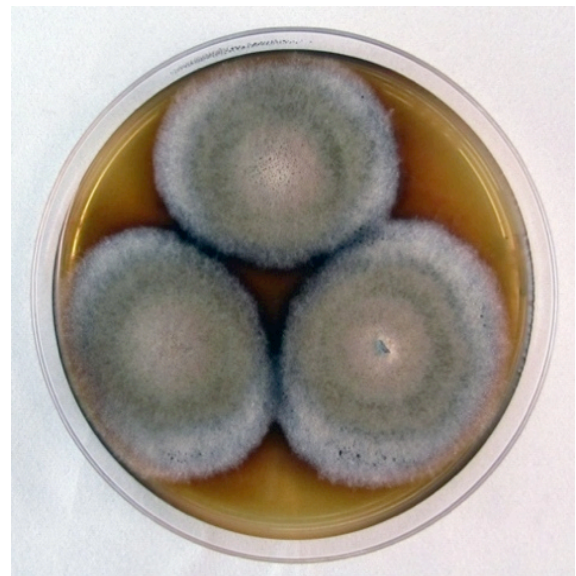
*S. longispora*  
(ATCC 32451)



*S. parvispora*  
(ATCC 18877)



*S. oenanthae*  
(ATCC 22844)



*S. theobromae*  
(ATCC 18905)

**Abbildung 22:** *Stachybotrys*-Referenzstämme

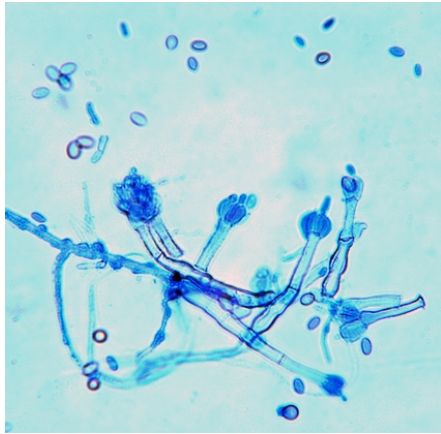
Mikromorphologisch war erkennbar, dass die Referenzstämme schon innerhalb eines einzigen mikroskopischen Präparates Unterschiede in der Beschaffenheit ihrer Konidien und Konidienträger aufwiesen. Es traten sowohl raue als auch glatte Konidien und Konidienträger auf.

Die Referenzstämme *Nectriella funicola* (ATCC 96538), *S. complementi* (ATCC 20511), *S. longispora* (ATCC 32451) und *S. theobromae* (ATCC 18905) bildeten auf Malzextraktagar keine Sporen, während bei *S. oenanthae* (ATCC 22844) und *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873) nur vereinzelt Sporen auftraten. Deutlich mehr Sporulation zeigte *S. dichroa* (ATCC 18913), *S. cylindrospora* (ATCC 16276) und *S. parvispora* (ATCC 18877) und *S. kampalensis* (ATCC 22705). Am meisten Sporen bildeten die Referenzstämme *S. chartarum* Chemotyp A (IBT 40288) und S (IBT 40293), *S. chartarum* (ATCC 34916), *S. chlorohalonata* (IBT 40285) und *Memnoniella echinata* (MYA-584).

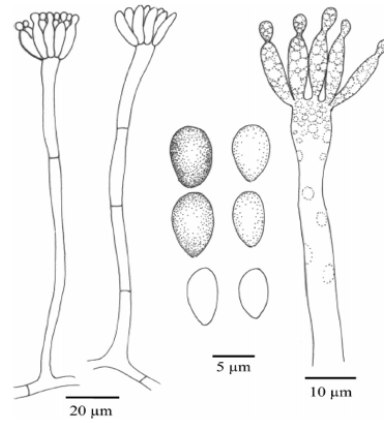
In Abbildung 23 - 25 sind mikroskopische Aufnahmen der Referenzstämme, die auf MEA Sporen bildeten, im Vergleich zu den in der Literatur verfügbaren Zeichnungen dargestellt. Die für die Gattung *Stachybotrys* typischen keulenförmigen Phialiden wurden bei allen abgebildeten Referenzstämmen nachgewiesen.

Die bei *S. oenanthae* (ATCC 22844) im lichtmikroskopischen Präparat zu erkennenden vesikelartigen Strukturen direkt unterhalb der Phialiden wurden bislang nicht beschrieben und sind auf der erstbeschreibenden Zeichnung von Ellis (1971) nicht eingezeichnet (Abbildung 25).

Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den Referenzstämmen und der deutlichen Heterogenität der jeweiligen mikroskopischen Präparate war mikromorphologisch keine sichere Speziesidentifizierung möglich.



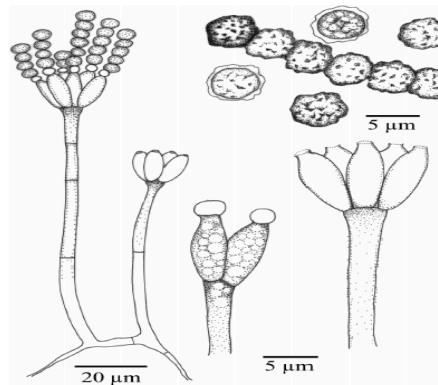
*S. albipes* (ATCC 18873)\*



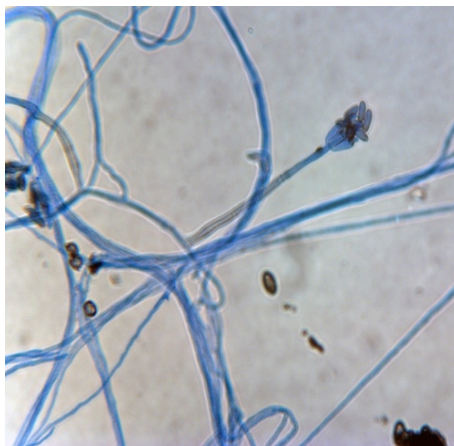
*S. albipes* nach Jong und Davis (1976)



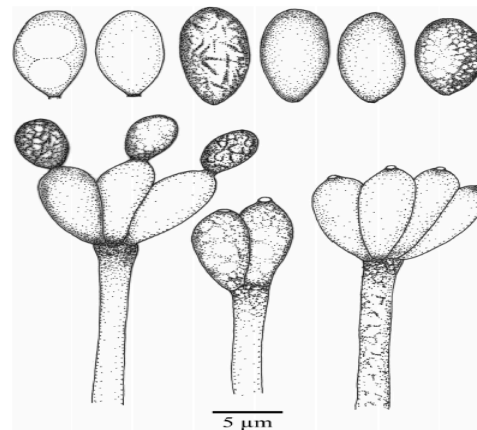
*Memnoniella echinata* (MYA-584)



*Memnoniella echinata* nach Jong und Davis (1976)

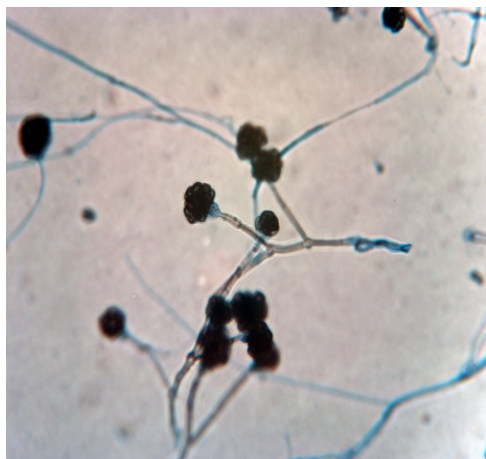


*S. chartarum* Chemotyp A (IBT 40288)

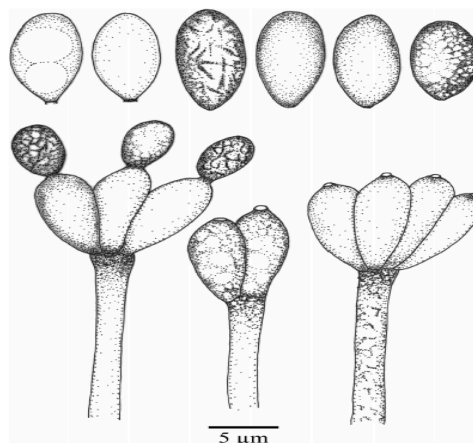


*S. chartarum* nach Jong und Davis (1976)

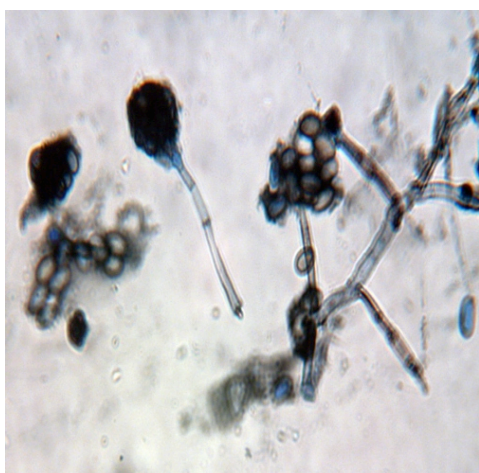
**Abbildung 23:** Mikroskopische Abbildung (Klebestreifenpräparat, Anilinblaufärbung, 400-fache Vergrößerung), \*anamorphe Form von *Melanopsamma pomiformis* (Zeichnungen aus Wang et al. (2015))



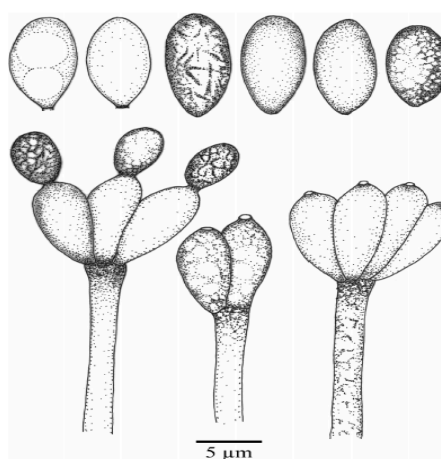
*S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293)



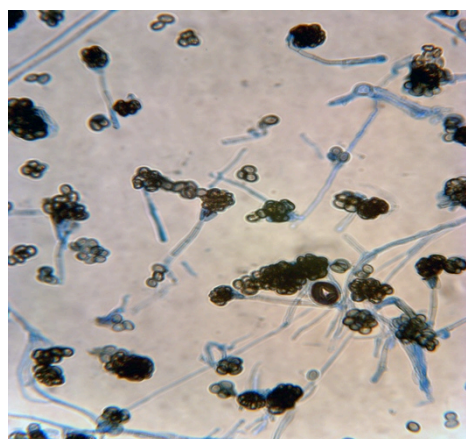
*S. chartarum* nach Jong und Davis (1976)



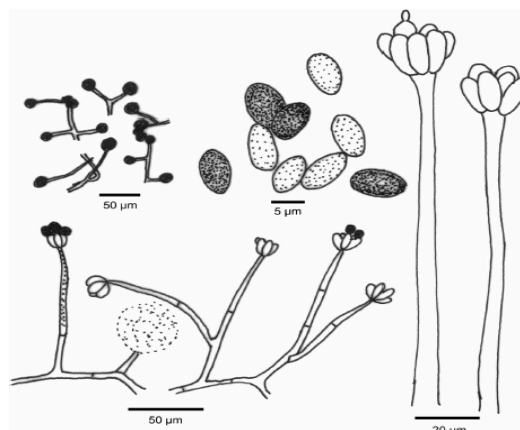
*S. chartarum* (ATCC 34916)



*S. chartarum* nach Jong und Davis (1976)



*S. chlorohalonata* (IBT 40285)



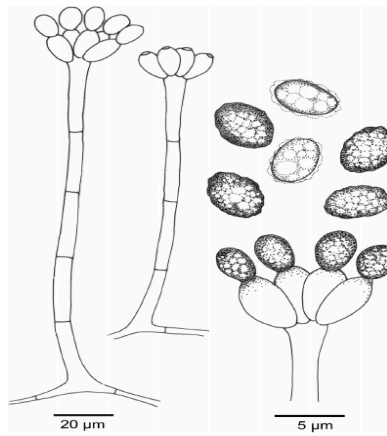
*S. chlorohalonata* nach Andersen et al. (2003)

**Abbildung 24:** Mikroskopische Abbildung (Klebestreifenpräparat, Anilinblaufärbung, 400-fache Vergrößerung) (Zeichnungen aus Wang et al. (2015))

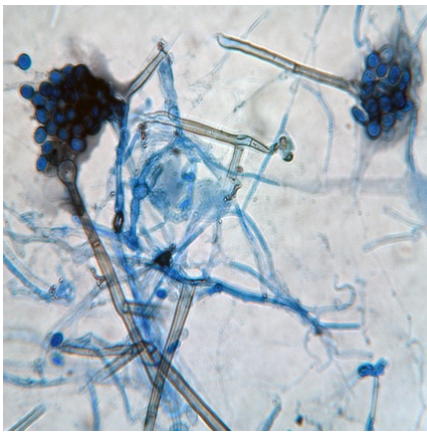




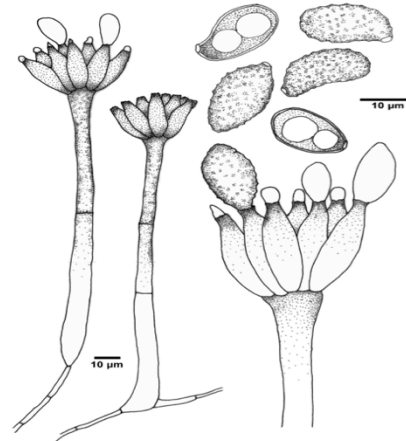
*S. dichroa* (ATCC 18913)



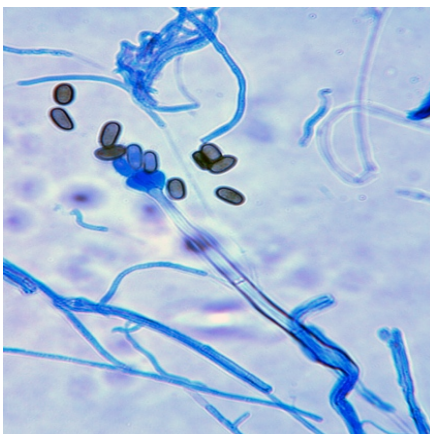
*S. dichroa* nach Jong und Davis (1976)



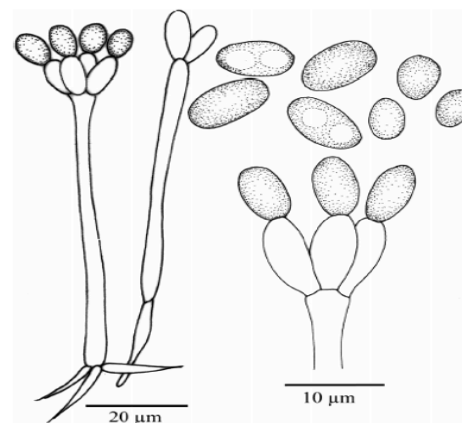
*S. oenantes* (ATCC 22844)



*S. oenantes* nach Ellis (1971)



*S. kampalensis* (ATCC 22705)



*S. kampalensis* nach Hansford (1943)

**Abbildung 25:** Mikroskopische Abbildung (Klebestreifenpräparat, Anilinblaufärbung, 400-fache Vergrößerung) (Zeichnungen aus Wang et al. (2015))

#### 4.1.2 *Stachybotrys*-Isolate

Alle *Stachybotrys*-Isolate aus Umwelt-, Futtermittel- und Lebensmittelproben konnten auf Malzextraktagar angezüchtet werden und zeigten eine zur möglichen Identifizierung ausreichende Versporung. Für die Angabe der jeweiligen Spezies wurden die unter 4.2.4 beschriebenen Ergebnisse der Sequenzierung bzw. diejenigen der LC-MS/MS (vgl. 4.4.2) verwendet. Die Isolate wurden innerhalb der jeweiligen Spezies und Chemotypen anhand ihres makroskopischen Erscheinungsbildes eingeteilt.

In Tabelle 27 sind die untersuchten phänotypischen Merkmale nach *Stachybotrys* spp. und Chemotypen zusammengefasst.

**Tabelle 27:** Zusammenfassung der phänotypischen Merkmale aller untersuchten *Stachybotrys* Isolate (01-45/14)

<i>Stachybotrys</i> spp.*	Makroskopisches Erscheinungsbild			Mikroskopisches Erscheinungsbild		
	Kolonie- farbe	Pigment im Agar	Guttations- tropfen	Phialiden	Konidien	
				Form	Form	Ober- fläche
<i>S. chartarum</i> Chemotyp A <sup>1</sup>	s/sw	Ja/Nein	Ja	obovoid	ellipsoid/ obovoid	glatt/rau
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S <sup>2</sup>	s/sw/w	Ja/Nein	Ja/Nein	obovoid	ellipsoid/ obovoid	glatt/rau
<i>S. chlorohalonata</i> <sup>3</sup>	s/sw/w/r	Ja/Nein	Ja/Nein	obovoid	ellipsoid/ obovoid	glatt/rau

s: schwarz sw: schwarz-weiß w: weiß r: rosa <sup>1</sup>n=4 <sup>2</sup>n=23 <sup>3</sup>n=18

\*Identifizierung anhand der Sequenzierungsergebnisse (vgl. Kap. 4.2.4)

In Tabelle 28 sind die makroskopischen Charakteristika der einzelnen Isolate anhand ihrer Habitate zusammengefasst.

Es traten schwarze, schwarz-weiße und weiße *Stachybotrys* Isolate und ein rosafarbenes Isolat mit variierender Sporenbildung auf. Die Isolate bewuchsen bis zu zwei Drittel der Nährmedien und bildeten scharf und unscharf begrenzte Kolonien. Teilweise bildeten einzelne Isolate Guttationströpfchen auf den Kolonien und Farbveränderungen im Nährmedium.

**Tabelle 28:** Zusammenfassung der phänotypischen Merkmale von *Stachybotrys*-Isolaten (01-45/14)

Eigene Isolatbezeichnung	Koloniefarbe	Verfärbung des Agar	Bildung von	
			Sporen	Guttationstropfen
UM01/14	s	Ja	+++	Ja
UM02/14	s	Ja	+++	Nein
UM03/14	s	Ja	+++	Nein
UM04/14	s	Ja	+++	Ja
UM05/14	s	Ja	+++	Ja
UM06/14	s	Nein	+++	Ja
UM07/14	s	Nein	+++	Ja
UM08/14	sw	Ja	+++	Ja
UM09/14	s	Ja	+++	Ja
UM10/14	s	Ja	+++	Ja
UM11/14	w	Ja	++	Ja
UM12/14	s	Nein	+++	Ja
UM13/14	s	Ja	+++	Ja
UM14/14	sw	Ja	+++	Ja
UM15/14	s	Ja	+++	Ja
FM16/14	s	Ja	+++	Ja
FM17/14	w	Ja	++	Ja
FM18/14	s	Ja	+++	Ja
FM19/14	sw	Ja	+++	Ja
FM20/14	sw	Nein	+++	Ja
FM21/14	s	Ja	+++	Ja
FM22/14	sw	Nein	++	Ja
FM23/14	s	Ja	+++	Ja
FM24/14	sw	Ja	+++	Ja
FM25/14	s	Ja	+++	Nein
FM26/14	s	Ja	+++	Ja
FM27/14	s	Ja	+++	Ja
FM28/14	s	Nein	+++	Ja
FM29/14	w	Ja	+++	Ja
FM30/14	s	Ja	+++	Nein
LM31/14	sw	Ja	+++	Ja
LM32/14	sw	Nein	+++	Nein
LM33/14	r	Nein	+	Nein
LM34/14	sw	Ja	+++	Nein
LM35/14	s	Nein	+++	Nein
LM36/14	w	Ja	+++	Ja
LM37/14	s	Nein	+++	Ja
LM38/14	w	Ja	++	Nein
LM39/14	s	Ja	+++	Nein
LM40/14	w	Nein	++	Ja
LM41/14	s	Ja	+++	Ja
LM42/14	s	Ja	+++	Ja
LM43/14	s	Ja	+++	Nein
LM44/14	s	Ja	+++	Ja
LM45/14	s	Nein	+++	Ja

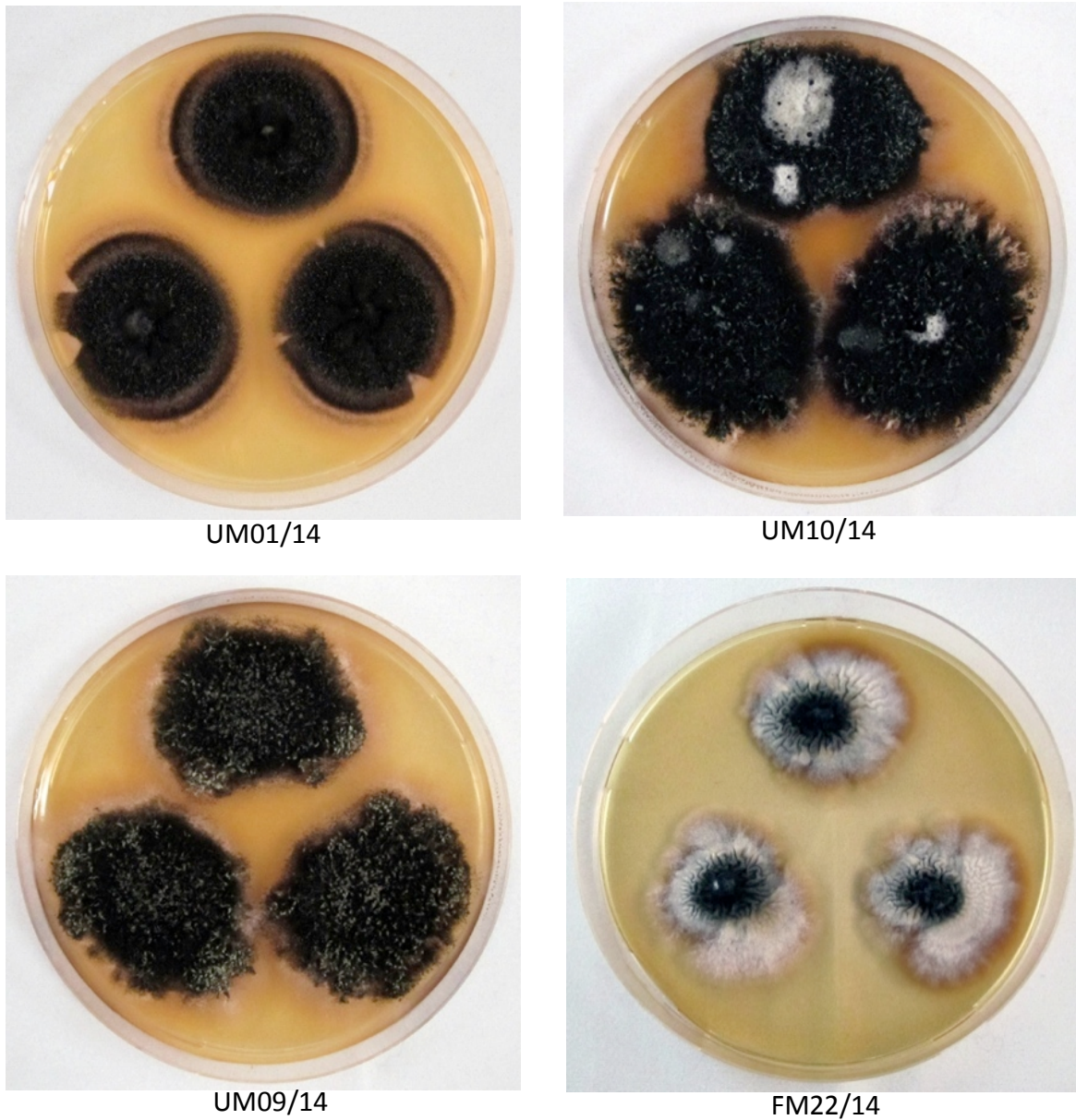
s: schwarz    sw: schwarz-weiß    w: weiß    r: rosa    +: wenige Sporen    ++: einige Sporen  
 +++: sehr viele Sporen    UM: Umweltproben    FM: Futtermittelproben    LM: Lebensmittelproben

Es konnte letztendlich kein Zusammenhang zwischen dem Habitat eines Isolates und seinen phänotypischen Charakteristika festgestellt werden. Zudem konnte weder die Gattung noch die Spezies oder der Chemotyp anhand des makroskopischen Erscheinungsbildes identifiziert werden. Lediglich eine Gattungsidentifikation mittels Mikroskopie konnte auf Grund der typischen keulenförmigen Phialiden erfolgen. Sechs von 15 in dieser Studie beschriebenen makroskopischen Erscheinungsbilder unterschieden sich von den von Biermaier (2013) beobachteten makroskopischen Erscheinungsbildern.

Den unterschiedlichen Ausprägungen des makroskopischen Erscheinungsbildes folgend sind verschiedene Kombinationen von Koloniefarbe, Pigment- und Guttationstropfenbildung möglich. Diesen Merkmalen folgend erfolgte die Einteilung in die folgenden Abbildungen 26 - 39.

Drei der vier *S. chartarum* Chemotyp A-Isolate zeigten auf Malzextraktagar ein schwarzes Erscheinungsbild und bedeckten mehr als 2/3 der Nährböden (Abbildung 26).

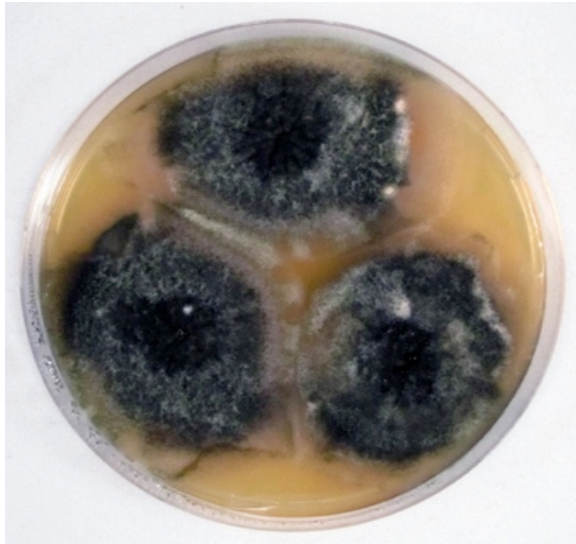
Ein Isolat (FM22/14) bildete schwarz-weiße Kolonien, rief als einziges *S. chartarum* Chemotyp A-Isolat keine Farbveränderungen im Nährmedium hervor und bedeckte nur knapp die Hälfte des Nährbodens. Von den vier *S. chartarum* Chemotyp A Isolaten wies nur das Isolat UM01/14 deutlich begrenzte Kolonieränder auf. Alle vier Isolate bildeten Guttationströpfchen.



**Abbildung 26:** *S. chartarum* Chemotyp A-Isolate auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

Von 23 *S. chartarum* Chemotyp S-Isolaten bildeten 18 schwarze (Abbildung 27 - 31), vier schwarz-weiße (Abbildung 32) und eines weiße Kolonien (Abbildung 33).

Von den schwarz wachsenden *S. chartarum* Chemotyp S-Isolaten bildeten acht sowohl Farbveränderungen im Nährmedium als auch Guttationstropfen (Abbildung 27 und 28). Sechs Isolate (Abbildung 29 und 30) bildeten Guttationstropfen, aber riefen keine Farbveränderung im Nährmedium hervor.



UM04/14



UM13/14



UM05/14

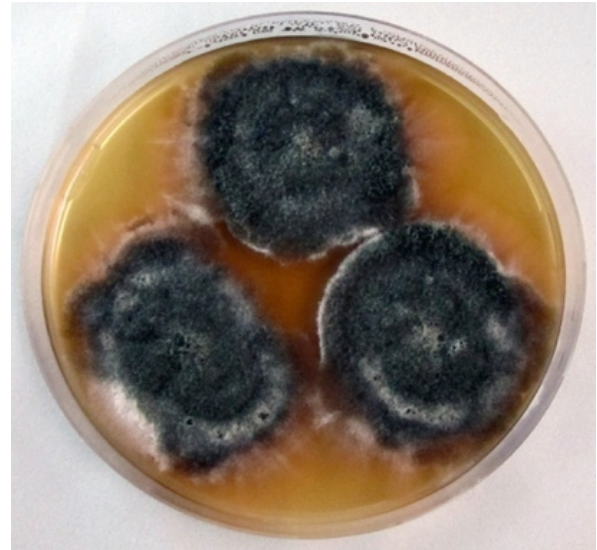


UM15/14

**Abbildung 27:** Schwarz wachsende *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate mit Guttationstropfen und Farbveränderung im Nährmedium auf Malzextraktagar nach 21 Tagen



FM18/14



FM23/14

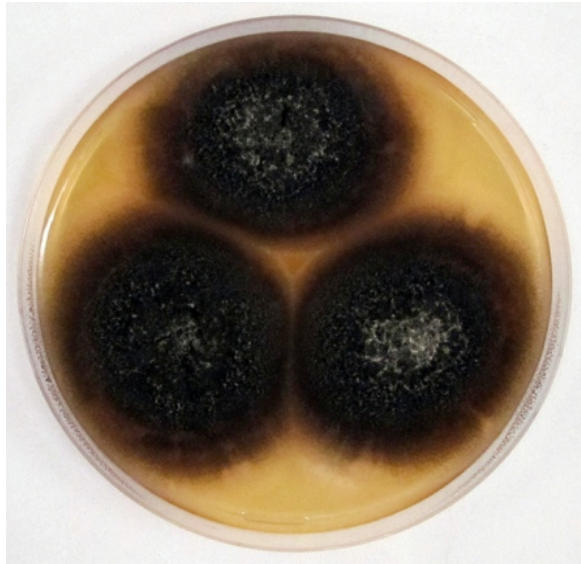


FM27/14

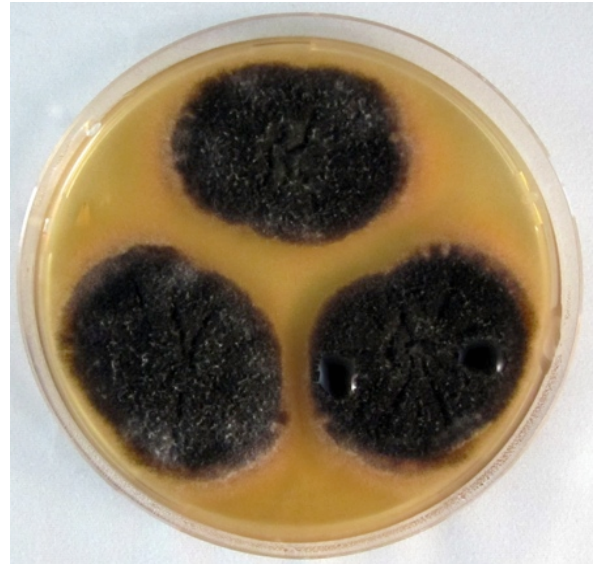


LM42/14

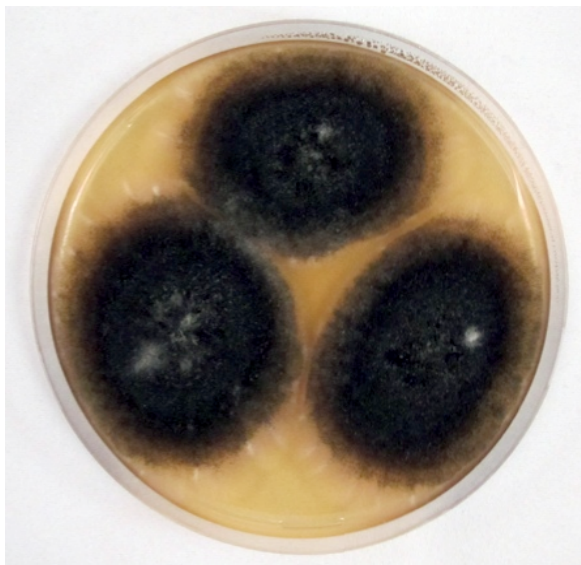
**Abbildung 28:** Schwarz wachsende *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate mit Guttationstropfen und Farbveränderung im Nährmedium auf Malzextraktagar nach 21 Tagen



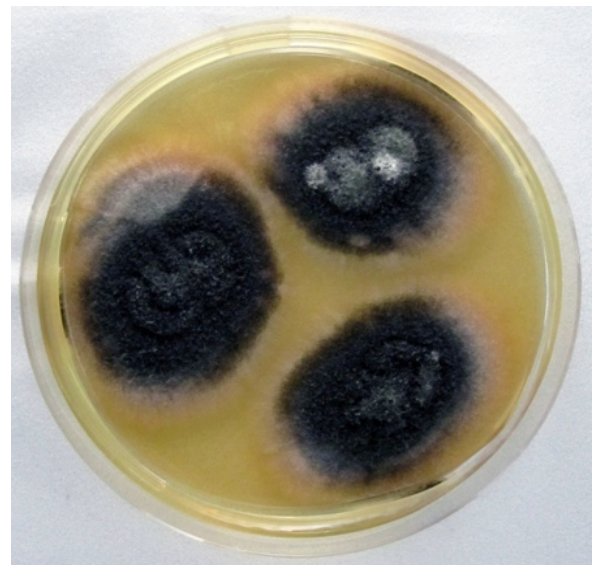
UM06/14



FM30/14



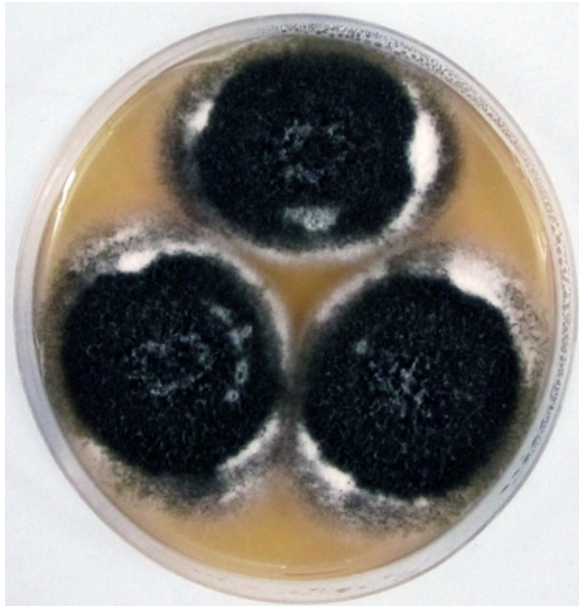
UM07/14



LM37/14

**Abbildung 29:** Schwarz wachsende *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate mit Guttationstropfen und ohne Farbveränderungen im Nährmedium auf Malzextraktagar nach 21 Tagen





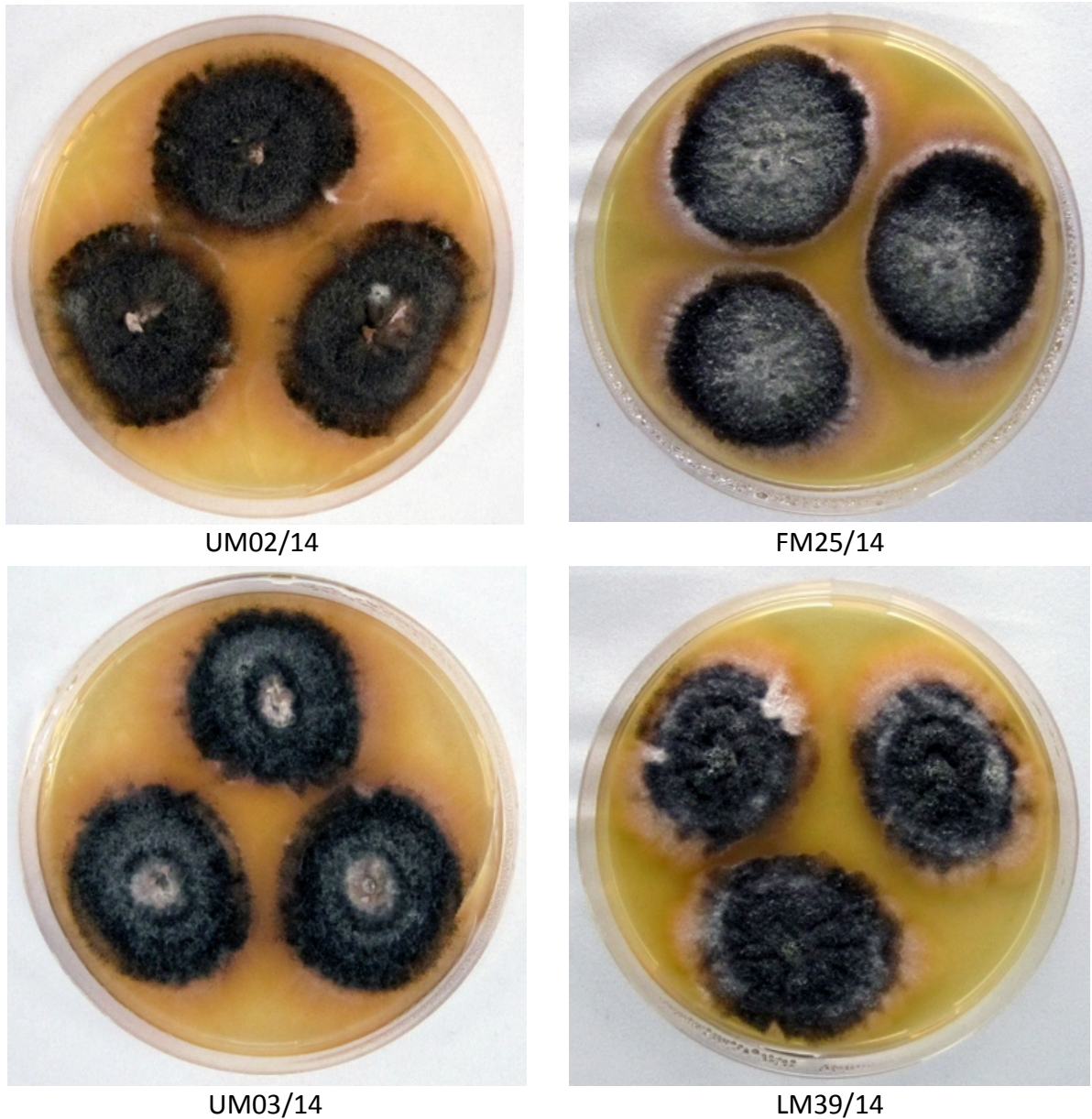
UM12/14



LM43/14

**Abbildung 30:** Schwarz wachsende *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate mit Guttationstropfen und ohne Farbveränderungen im Nährmedium auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

Die restlichen vier Isolate bildeten keine Guttationstropfen und riefen Farbveränderungen im Nährmedium hervor (Abbildung 31). Vier von den schwarz wachsenden Isolaten (UM04/14, UM13/14, FM23/14 und LM42/14) wuchsen nicht scharf begrenzt. Alle schwarz wachsenden Isolate bedeckten mehr als zwei Drittel der Nährböden.

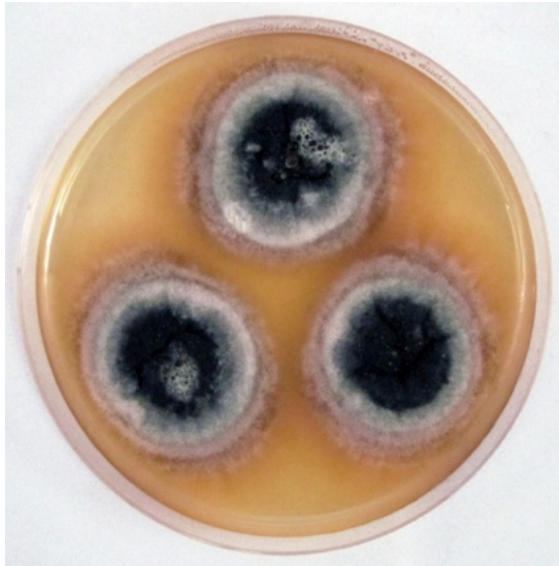


**Abbildung 31:** Schwarz wachsende *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate ohne Guttationstropfen und mit Farbveränderung im Nährmedium auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

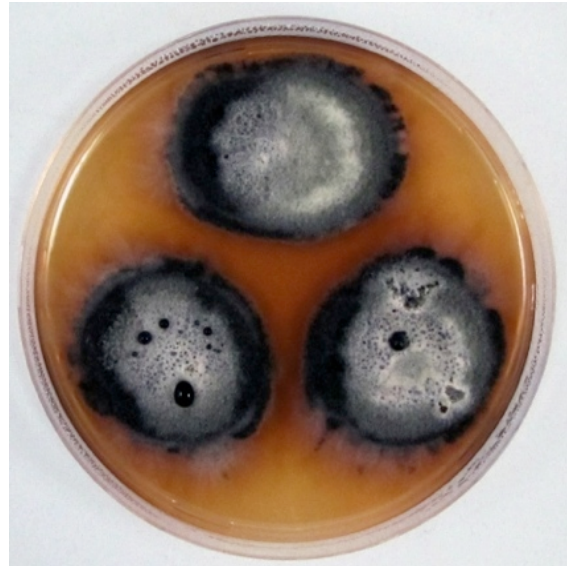
Alle vier der schwarz-weiß wachsenden *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate bildeten Guttationstropfen (UM08/14, UM14/14, FM19/14 und FM20/14) (Abbildung 32). Zwei dieser Isolate bildeten eine Farbveränderung im Nährmedium aus (UM08/14 und UM14/14).

Alle schwarz-weißen Isolate bedeckten mehr als zwei Drittel der Nährmedien und zwei (FM20/14 und UM14/14) wuchsen mit nicht scharf begrenzten Kolonien.

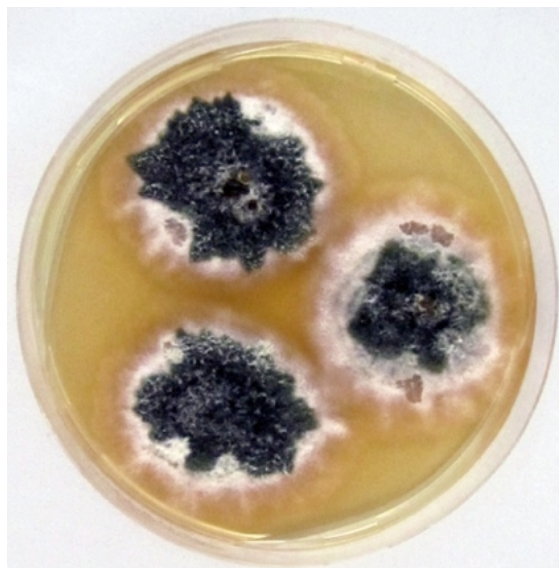
Das Isolat FM20/14 wies am Rand der Kolonien ein nahezu sporenfrees, in gleichen Abständen zueinander strahlenförmig wachsendes, weißes Myzel auf (Abbildung 32).



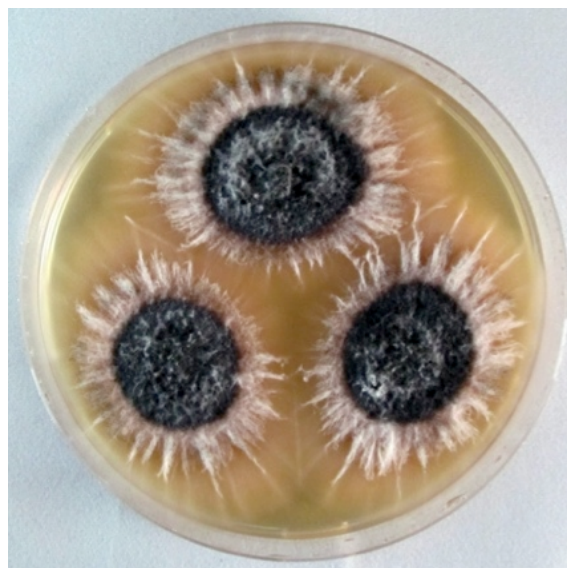
UM08/14



FM19/14



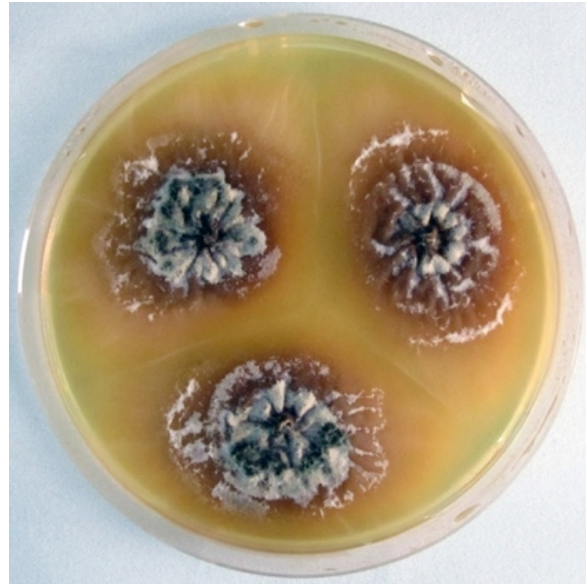
UM14/14



FM20/14

**Abbildung 32:** Schwarz-weiß wachsende *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

Das Isolat LM38/14 bildete als einziges *S. chartarum* Chemotyp S-Isolat weißes Myzel mit wenig Sporen. Das Myzel wuchs mit unregelmäßig geformten Kolonien hauptsächlich ins Innere des Nährmediums auf über zwei Drittel der Nährbodenfläche (Abbildung 33).



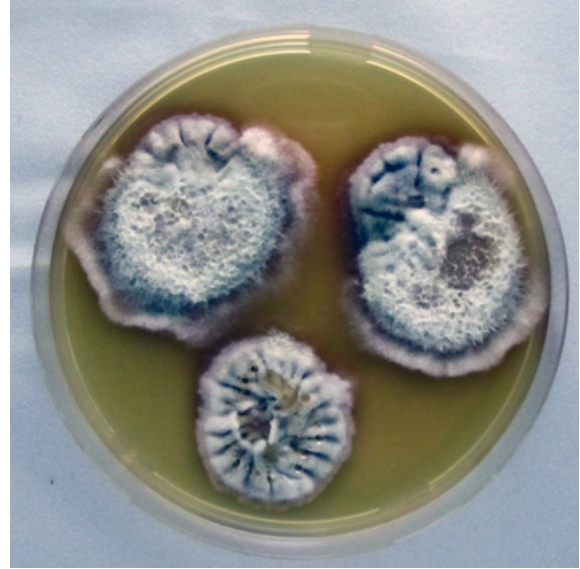
LM38/14

**Abbildung 33:** Weiß wachsendes *S. chartarum* Chemotyp S-Isolat auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

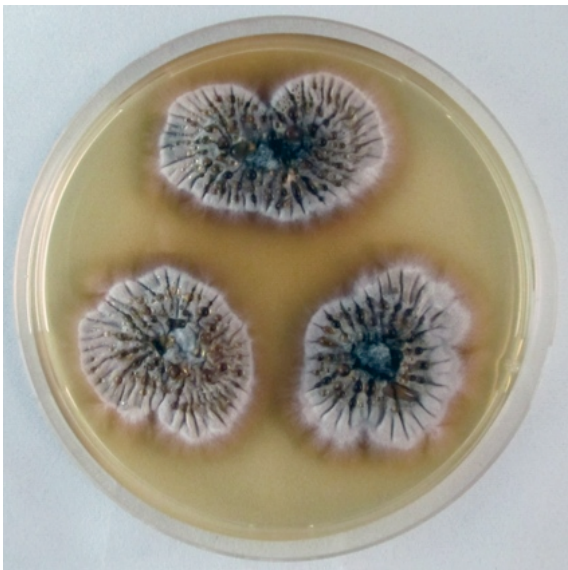
Von den 18 untersuchten *S. chlorohalonata*-Isolaten wuchsen fünf weiß (Abbildung 34 und 35) und acht schwarz (Abbildung 36 und 37) und vier bildeten schwarz-weiße Kolonien (Abbildung 38) und eines rosa Kolonien (Abbildung 39). Von allen untersuchten *Stachybotrys*-Isolaten traten weiße Kolonien am häufigsten bei den *S. chlorohalonata*-Isolaten auf. Alle weiß wachsenden Isolate bildeten Guttationstropfen und riefen Farbveränderungen im Nährmedium direkt um die Kolonien hervor.



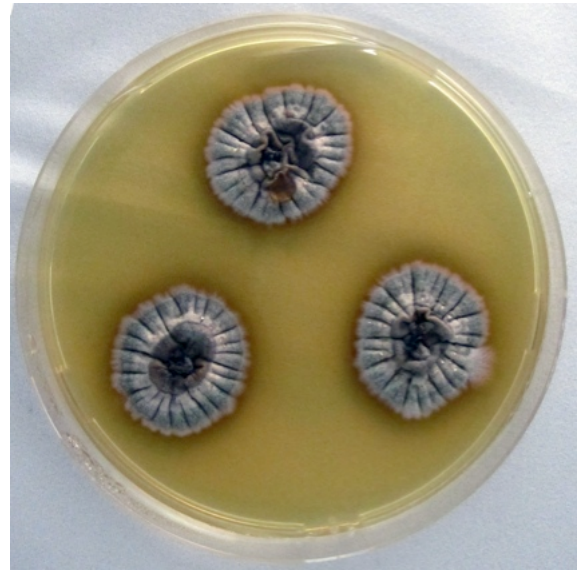
FM17/14



LM36/14

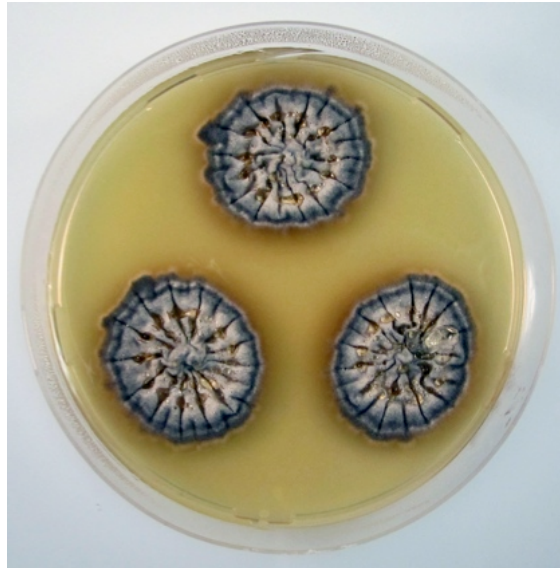


FM29/14



LM40/14

**Abbildung 34:** Weiß wachsende *S. chlorohalonata*-Isolate auf Malzextraktagar nach 21 Tagen



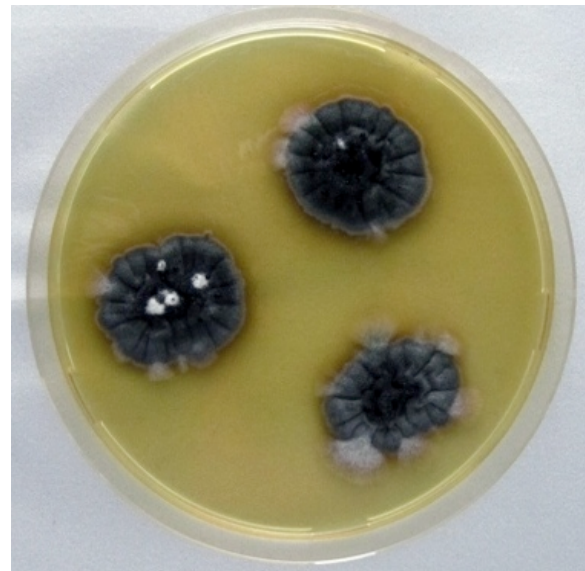
UM11/14

**Abbildung 35:** Weiß wachsendes *S. chlorohalonata*-Isolat auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

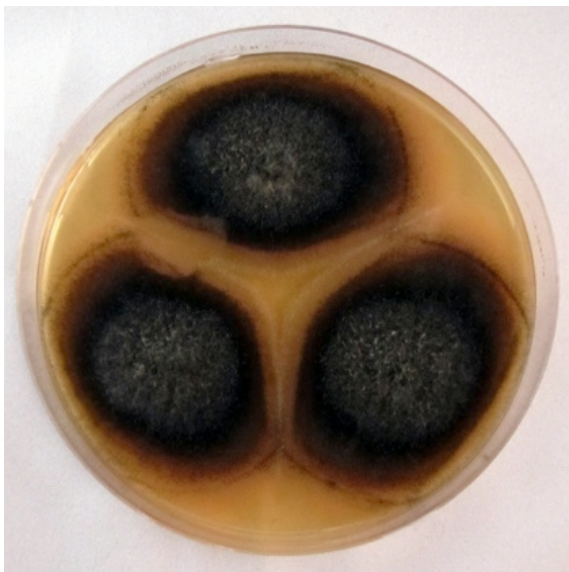
Alle schwarz wachsenden *S. chlorohalonata*-Isolate bildeten Guttationströpfchen und zwei von diesen Isolaten (LM44/14 und LM45/14) riefen keine Farbveränderungen im Nährmedium hervor. Von den Isolaten, die schwarz-weiße Kolonien bildeten, rief ein Isolat (LM32/14) keine Farbveränderungen im Nährmedium hervor, zwei Isolate (FM24/14 und LM45/14) bildeten Guttationströpfchen.



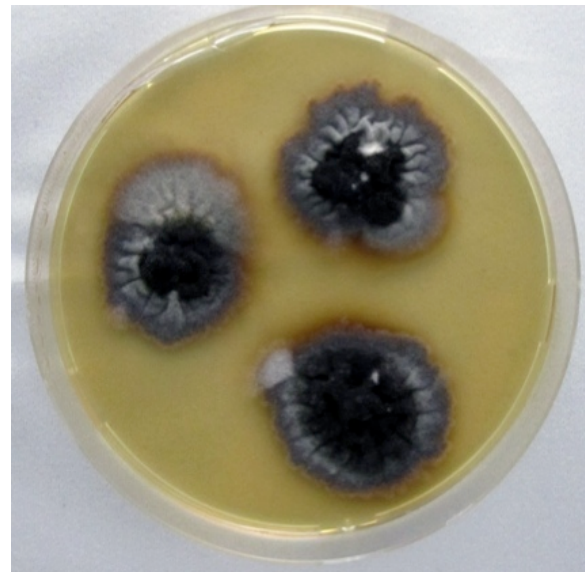
FM16/14



LM45/14

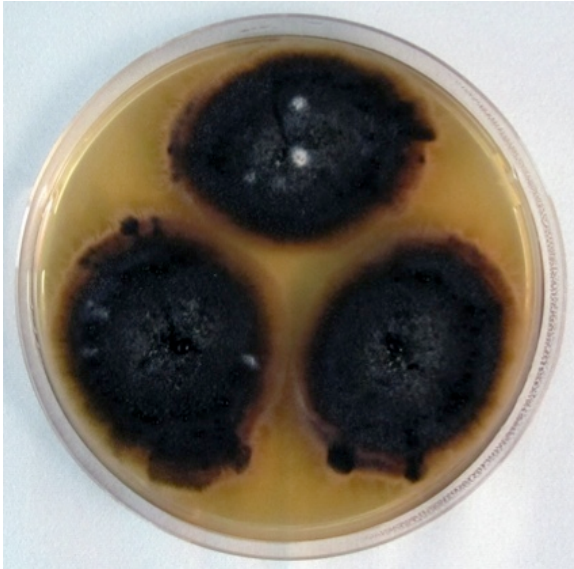


FM21/14

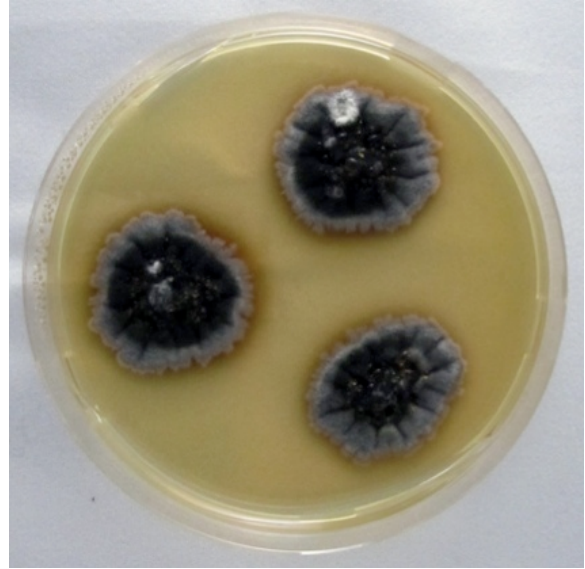


LM35/14

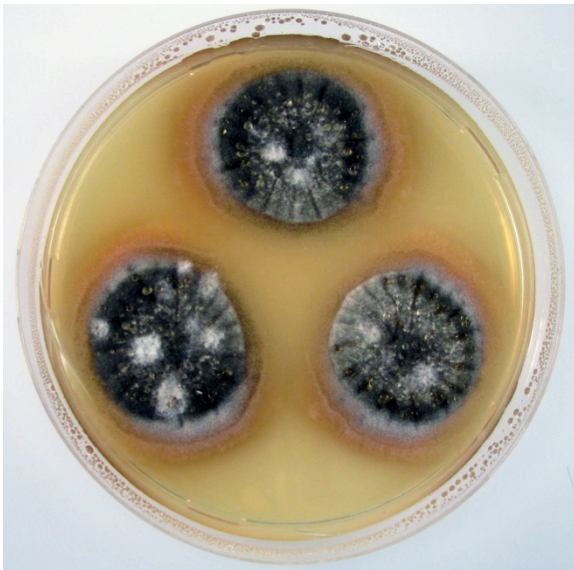
**Abbildung 36:** Schwarz wachsende *S. chlorohalonata*-Isolate auf Malzextraktagar nach 21 Tagen



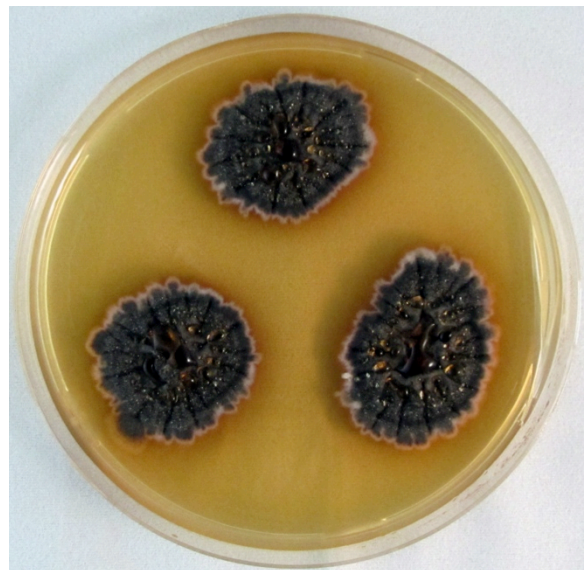
FM28/14



LM44/14



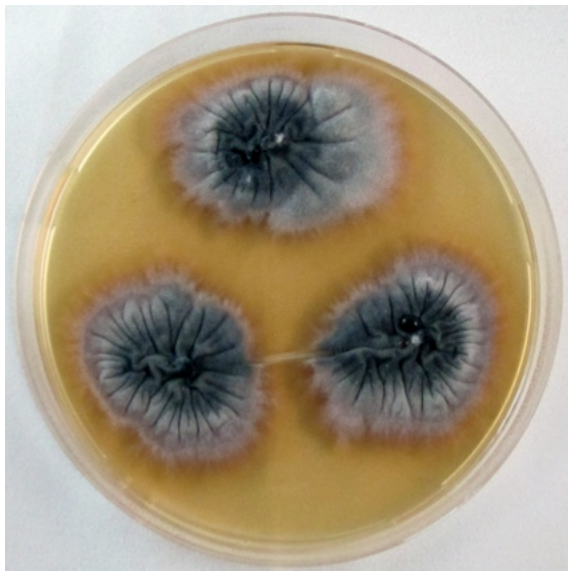
LM41/14



FM26/14

**Abbildung 37:** Schwarz wachsende *S. chlorohalonata*-Isolate auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

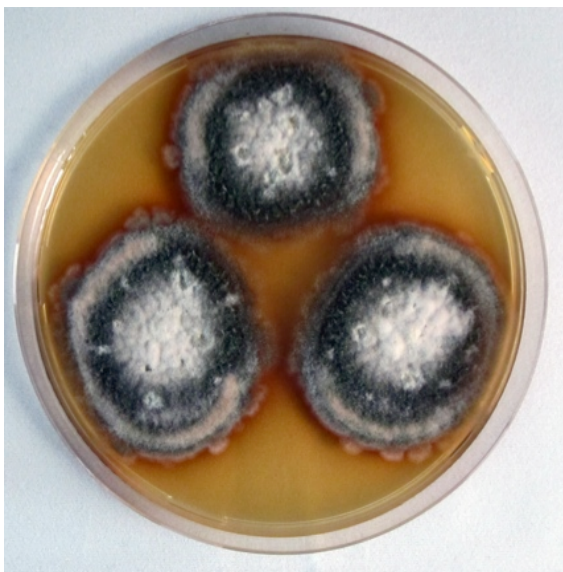




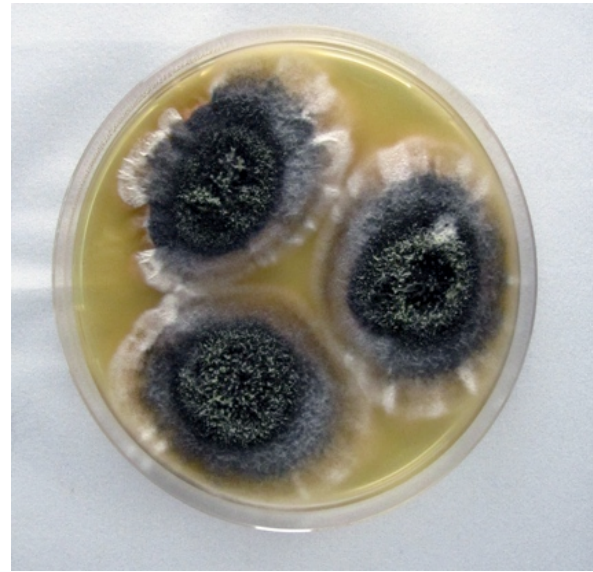
FM24/14



LM34/14



LM31/14



LM32/14

**Abbildung 38:** Schwarz-weiß wachsende *S. chlorohalonata*-Isolate auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

Isolat LM34/14, ebenfalls *S. chlorohalonata*, schien in der Mitte der Kulturplatte an den Berührungspunkten der Kolonien mittels Myzel zu „kommunizieren“. In diesem Bereich lag eine veränderte Myzelstruktur im Vergleich zu den übrigen Bereichen der Dreipunktkultur vor, wobei die Myzelfäden in die Richtung der jeweilig gegenüberliegenden Kolonie wiesen (Abbildung 38).

Das *S. chlorohalonata* Isolat LM33/14 (Abbildung 39) bildete ein rosafarbenes Myzel aus. Das Isolat bildete erst ab dem 18. Tag, im Vergleich mit anderen *S. chlorohalonata* Isolaten, sehr wenige Sporen am Rand der Kolonien. Guttationströpfchen wurden nicht makroskopisch sichtbar gebildet und das Isolat rief keine Farbveränderung im Nährmedium hervor. Alle *S. chlorohalonata* Isolate bildeten scharf begrenzte Kolonien, sechs Isolate füllten mehr als zwei Drittel der Nährböden aus (FM21/14, FM28/14, LM31/14, LM33/14, LM36/14 und LM32/14).



LM33/14

**Abbildung 39:** Rosafarben wachsendes *S. chlorohalonata*-Isolat auf Malzextraktagar nach 21 Tagen

In Analogie mit den Referenzstämmen (Kap.4.1.1) konnten keine makroskopisch prägnanten Merkmale, die einen sicheren Rückschluss auf die Spezies zuließen, festgestellt werden. Obwohl Ähnlichkeiten in der Farbe der Kolonien zwischen den einzelnen Isolaten einer Spezies zu erkennen waren, waren diese nicht markant genug, um anhand dessen und der eventuellen Farbveränderung der Nährböden eine Identifizierung vorzunehmen.

Die eventuelle Bildung von Guttationströpfchen konnte nicht zur Identifikation herangezogen werden. Auffällig war, dass vor allem die *S. chlorohalonata*-Isolate nur selten mehr als zwei Drittel der Nährböden ausfüllten, aber in der Regel scharf begrenzte Kolonien bildeten.

Ein Abgleich mit Referenzstämmen lieferte ebenso keine belastbaren Ergebnisse aufgrund der beschriebenen heterogenen Varianzen im makroskopischen Erscheinungsbild.

Die lichtmikroskopische Differenzierung ergab, dass auch mittels dieser Methode keine Speziesidentifizierung möglich ist. Der Vergleich mit den entsprechenden Referenzstämmen lies ebenfalls keine eindeutige Spezieszuordnung zu.

Die für die Gattung *Stachybotrys* typischen, keulenförmigen Phialiden konnten als markantes Merkmal identifiziert werden.

Es waren Unterschiede in der Form und Oberfläche der Konidiophoren, Phialiden und Konidien zu erkennen, diese waren selbst innerhalb eines Isolates so verschieden, dass keine Speziesidentifikation möglich war. Die Form der Konidien variierte von länglich bis rund oder ovoid. Die Oberflächen der Konidien waren sowohl glatt als auch rau. Bei allen *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* Isolaten konnte eine die Phialiden und Konidien einhüllende dunkle Masse beschrieben werden, dabei handelt es sich um die sogenannten "slimy heads" (vgl. Kap. 2.3.1) (Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Lichtmikroskopische Aufnahme von *S. chlorohalonata* (Isolat LM35/14) (Klebestreifenpräparat, Anilinblaufärbung, Vergrößerung: 1000-fach), Pfeil: Schleimkapsel

## 4.2 Molekularbiologische Differenzierung

### 4.2.1 PCR

Jedes PCR-Amplifikat wurde auf ein Agarose-Elektrophoresegel aufgetragen und auf den Amplifikationserfolg und die Länge hin überprüft (vgl. Kap. 3.2.3.1).

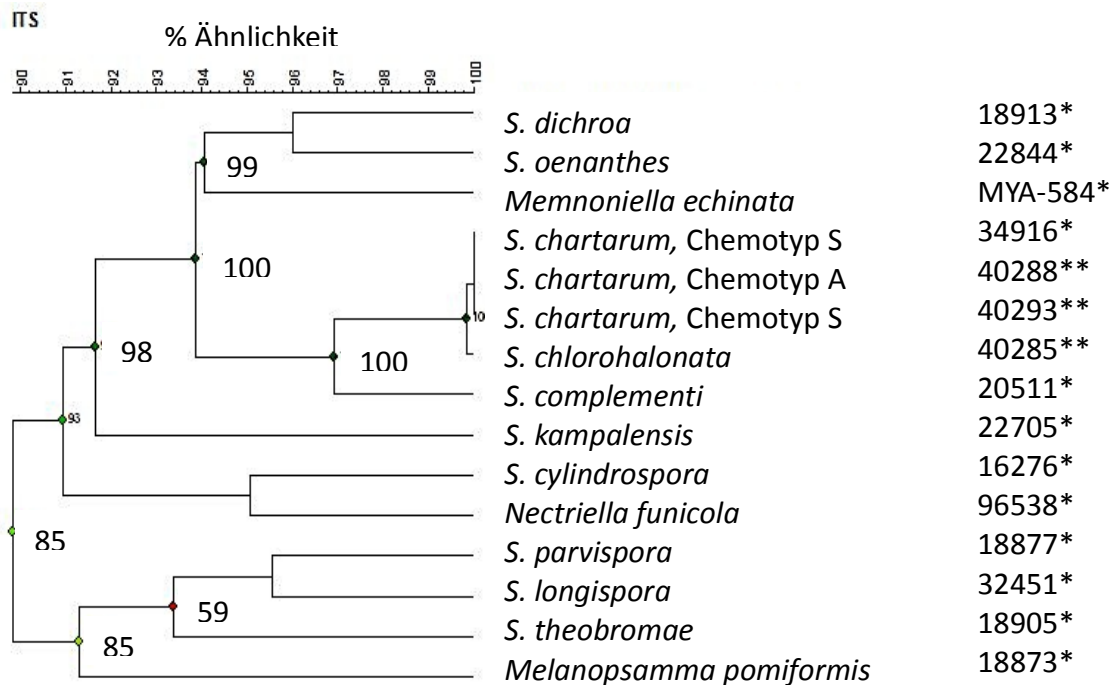
Die Sequenzierungsprodukte des ITS-Genabschnittes (1/4) waren ca. 550 bp die des *tri5*-Genabschnittes ca. 560 bp groß.

### 4.2.2 Sequenzierungsergebnisse des ITS-1/4 Genabschnittes der Referenzstämmе

Die Sequenzierungsergebnisse der Referenzstämmе wurden über die NCBI- und MycoBank-Datenbank ausgewertet. Die im Dendrogramm (Abbildung 41) angegebenen Chemotypen basieren auf den Ergebnissen der *tri5*-Sequenzierungsergebnisse.

Der Referenzstamm *S. complementi* (ATCC 20511) wurde in den Datenbanken des NCBI und der MycoBank als *S. microspora* (GenBank: KC305353.1, HGUP 0120) identifiziert. Die restlichen Referenzstämmе entsprachen den von ATCC und IBT angegebenen Spezies bzw. den asexuellen Formen und konnten sowohl auf Gattungsebene, als auch auf Speziesebene in ihrer Identität bestätigt werden.

Eine Identifizierung der beiden Chemotypen von *S. chartarum* (A und S) war mittels der Sequenzierung der ITS-Region nicht möglich. Die Referenzstämmе unterschieden sich in ihren ITS-Sequenzen deutlich. In Abbildung 41 ist ein Dendrogramm basierend auf den ITS-Sequenzen aller untersuchten Referenzstämmе dargestellt. Die Verwandtschaftsgrade reichten von ca. 89 bis 100 %, wobei *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873) mit 91 % am weitesten abwich.



**Abbildung 41:** Dendrogramm der ITS-Region (1/4) der Referenzstämmen (n=15), Zahlen im Dendrogramm entsprechen den Korrelationskoeffizienten, \*ATCC, \*\*IBT

Im Dendrogramm der ITS-Region bildeten die Referenzstämmen für *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* eine eng verwandte, aber eindeutig differenzierbare Gruppe (Abbildung 41).

Die ITS-1-Sequenzen von *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) und *S. chartarum* (ATCC 34916), der anhand der *tri5*-Ergebnisse ebenfalls als Chemotyp S identifiziert wurde (siehe Kap. 4.2.3), unterschieden sich in einer Deletionsmutation (Ähnlichkeit 100 %, Einstellung: Gap penalty 0 %). Die ITS-4-Sequenzen der beiden Referenzstämmen waren deckungsgleich.

#### 4.2.3 Sequenzierungsergebnisse der *tri5* - Region der Referenzstämmen

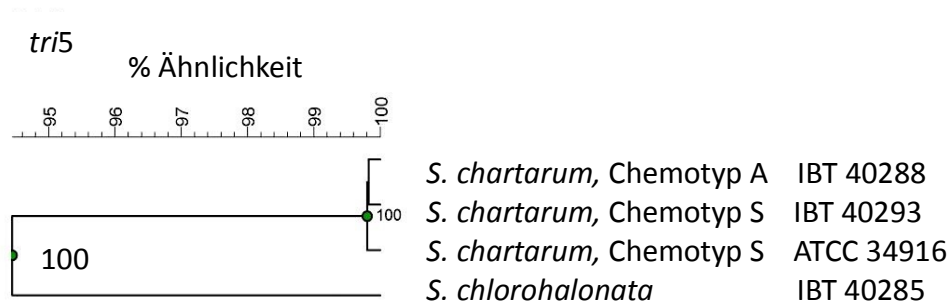
Für die Referenzstämmen *S. chlorohalonata* (IBT 40285), *S. chartarum* Chemotyp A (IBT 40288) und *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293 und ATCC 34916) wurden Amplifikate des *tri5*-Genabschnittes sequenziert, die eindeutig den erwarteten Spezies und Chemotypen zugeordnet werden konnten.

Bei dem von Andersen et al. (2003) beschriebenen Basenaustausch in der *tri5*-Sequenz, in der sich *S. chartarum* Chemotyp A und S unterscheiden (vgl. Kap. 2.3.2), handelt es sich um eine stille Mutation. Für die restlichen Referenzstämmen (vgl. Kap. 3.1.2) konnten mittels dieses Primerpaars keine Amplifikate generiert werden.

Wie in Abbildung 42 dargestellt, bildete sich ein Cluster eng verwandter *S. chartarum*-Stämme (IBT 40288, 40293 und ATCC 34916), wohingegen sich der *S. chlorohalonata*-Stamm IBT 40285 um 5,6 % von den *S. chartarum*-Stämmen unterschied.

Der Referenzstamm *S. chartarum* (ATCC 34916), für den bisher keine Chemotypen-Zuordnung beschrieben war, unterschied sich in dem die Chemotypen definierenden Basenaustausch von *S. chartarum* Chemotyp A (IBT 40288) (Cruse et al., 2002) und deckten sich mit den entsprechenden Basen von Referenzstamm *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293).

Somit handelte es sich bei diesem Isolat um *S. chartarum* Chemotyp S, was sich auch mit dem Ergebnis der LC-MS/MS Untersuchung deckte (Bildung makrozyklischer Trichothecene, vgl. Kap. 4.4.1).



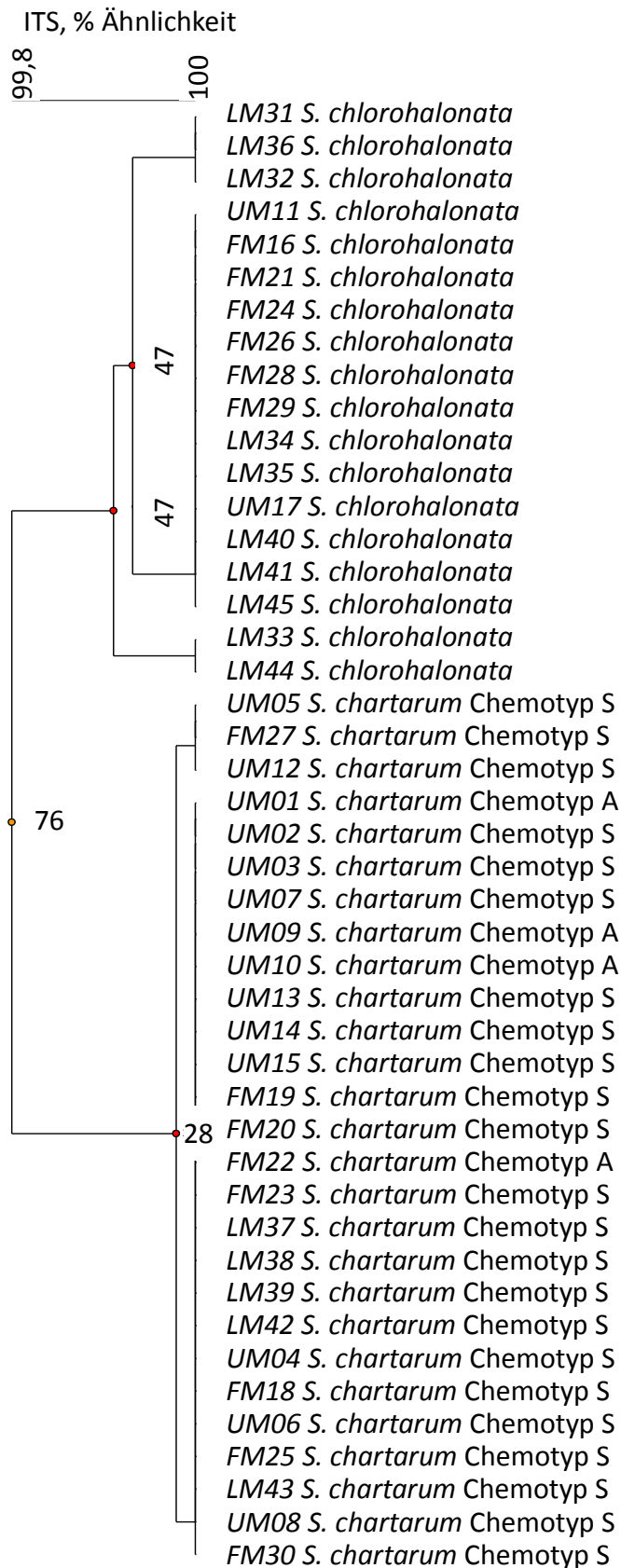
**Abbildung 42:** Dendrogramm der Amplifikate der *tri5*-Region von vier Referenzstämmen, Zahlen im Dendrogramm entsprechen den Korrelationskoeffizienten

#### 4.2.4 Sequenzierungsergebnisse der ITS- und *tri5*-Regionen der *Stachybotrys*-Isolate

In Abbildung 43 ist ein Dendrogramm basierend auf den ITS-1-Sequenzierungsergebnissen aller untersuchten Isolate aus Umwelt, Futtermitteln und Lebensmitteln (n=45) dargestellt. Es konnten zwei Gruppen unterschieden werden, wobei eine Gruppe die *S. chlorohalonata*- und die zweite Gruppe die *S. chartarum*-Isolate repräsentiert.

Siebenundzwanzig Isolate wurden als *S. chartarum* und 18 Isolate als *S. chlorohalonata* identifiziert. Eine weitere Unterscheidung von *S. chartarum* auf Basis der Chemotypen war anhand der ITS-Sequenzen nicht möglich.

Anhand der *tri5*-Sequenzierungsergebnisse wurden vier *S. chartarum* Chemotyp A-, 23 *S. chartarum* Chemotyp S- und 18 *S. chlorohalonata*-Isolate identifiziert.



**Abbildung 43:** Dendrogramm (pairwise alignment) ITS-1-Region der *Stachybotrys* (*S.*)-Isolate aus Umwelt- (UM), Futtermittel-(FM) und Lebensmittelproben (LM) (n=45). Die Einteilung in Chemotypen A und S erfolgte anhand der *tri5*-Sequenzen. Zahlen im Dendrogramm entsprechen den Korrelationskoeffizienten.



Die vier *S. chartarum* Chemotyp A-Isolate stimmten mit der Chemotyp A-Referenzsequenz von IBT 40288 zu 99,9 - 100 % im Durchschnitt aller Sequenzierungsergebnisse überein.

Das Isolat FM22/14 war das einzige der vier *S. chartarum* Chemotyp A Isolate, welches im *tri5*-Abschnitt einen Basenaustausch im Vergleich zur Referenzsequenz aufwies, wobei es sich bei dieser Mutation um eine stille Mutation handelte, da sie zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz führt.

Die Gruppe der 23 *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate unterschied sich geringfügig von dem entsprechenden Referenzstamm IBT 40293. Die *tri5*-Sequenzen stimmten zu 99,1 - 100 % überein (Tabelle 29).

**Tabelle 29:** Sequenzübereinstimmung (ITS-1/4 und *tri5*-Genabschnitte) der *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate mit Referenzstamm *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293)

<i>Stachybotrys</i> - Isolat	ITS - 1/4	<i>tri5</i>
UM02/14	100 %	99,5 %
UM03/14	100 %	99,4 %
UM04/14	99,5 %	99,3 %
UM05/14	100 %	99,7 %
UM06/14	99,5 %	99,4 %
UM07/14	100 %	99,5 %
UM08/14	99,5 %	99,5 %
UM12/14	99,5 %	99,2 %
UM13/14	100 %	99,7 %
UM14/14	100 %	99,4 %
UM15/14	100 %	99,9 %
FM18/14	99,5 %	99,5 %
FM19/14	99,5 %	99,2 %
FM20/14	100 %	99,7 %
FM23/14	100 %	99,8 %
FM25/14	99,5 %	99,9 %
FM27/14	100 %	99,9 %
FM30/14	99,5 %	99,2 %
LM37/14	99,5 %	99,1 %
LM38/14	100 %	99,7 %
LM39/14	100 %	99,6 %
LM42/14	100 %	99,6 %
LM43/14	100 %	99,4 %

ITS: internal transcribed spacer  
LM: Lebensmittelproben

*tri*: Trichodiensynthese

UM: Umweltproben

FM: Futtermittelproben

Die 18 bereits anhand der ITS-Sequenzen identifizierten *S. chlorohalonata*-Isolate konnten mittels der *tri5*-Sequenzen bestätigt werden. Im Vergleich zu der Referenzsequenz von IBT 40285 gab es eine Übereinstimmung von 99,4 - 100 % (Tabelle 30).

**Tabelle 30:** Sequenzübereinstimmung (ITS-1/4 und *tri5* - Genabschnitte) der *S. chlorohalonata*-Isolate mit Referenzstamm *S. chlorohalonata* (IBT 40285)

<i>Stachybotrys</i> -Isolat	ITS - 1/4	<i>tri5</i>
UM11/14	100 %	99,7 %
FM16/14	100 %	99,5 %
FM17/14	99,0 %	99,9 %
FM21/14	100 %	99,9 %
FM24/14	100 %	99,5 %
FM26/14	99,5 %	99,6 %
FM28/14	99,5 %	99,5 %
FM29/14	100 %	99,6 %
LM31/14	99,0 %	99,4 %
LM32/14	99,5 %	99,6 %
LM33/14	99,0 %	99,6 %
LM34/14	100 %	99,6 %
LM35/14	99,0 %	99,7 %
LM36/14	100 %	99,8 %
LM40/14	99,5 %	99,5 %
LM41/14	100 %	99,5 %
LM44/14	100 %	99,5 %
LM45/14	99,5 %	99,5 %

ITS: internal transcribed spacer    *tri*: Trichodiensynthese    UM: Umweltproben    FM: Futtermittelproben  
LM: Lebensmittelproben

### 4.3 Differenzierung mittels MALDI-TOF MS

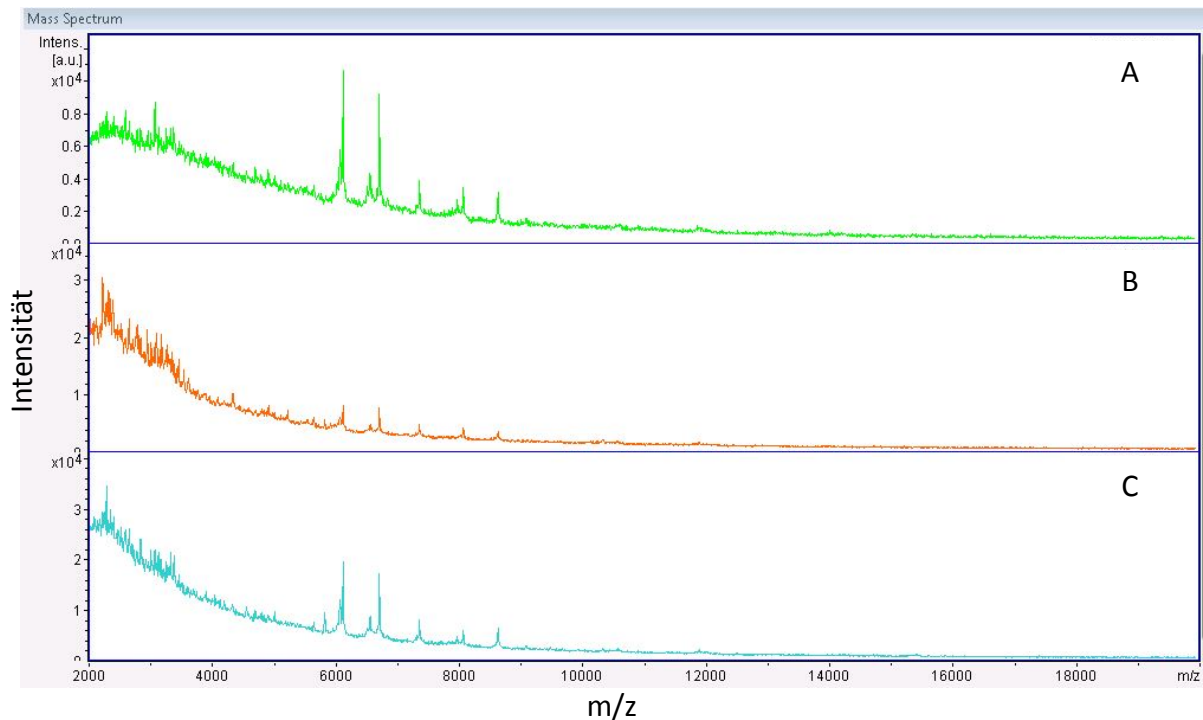
Von jedem Isolat wurden drei biologische Replikate (A-C) jeweils im Dreifachansatz untersucht. Die Beurteilung der Spektrenqualität erfolgte anhand der von Bruker Daltoniks empfohlenen Qualitätsmerkmale (vgl. Kap. 3.2.4.3). Somit sind nur Messungen als erfolgreich gewertet worden, deren Spektren den Qualitätsanforderungen für die Erstellung eines MSPs entsprachen.

Zur Gewinnung eines ribosomalen Proteinextraktes, der die Generierung hochwertiger Spektren ermöglicht, wurden verschiedene Proteinextraktionsprotokolle getestet und miteinander verglichen.

Weder mittels direktem Transfer von Randmyzel („Extended Direct Transfer“) noch mit „Formic Acid Extraction“ von Randmyzel konnten geeignete Spektren generiert werden. Es traten im Durchschnitt nur ca. 20 verwertbare Massenpeaks mit einem  $S/N \geq 3$  auf. Die Spektren waren in den meisten Fällen zu massenarm, um von der von Bruker Daltoniks erstellten automatischen Messmethode (MBT\_AutoX) als geeignete Spektren akzeptiert zu werden. Die Messung der mit den oben genannten Extraktionsmethoden extrahierten Proben ergaben somit Null-Linien („Flatlines“).

Bei einer Erhöhung der Laserleistung (um bis zu 20 %) konnten zwar massenreichere Spektren erzeugt werden, die jedoch aufgrund eines zu niedrigen  $S/N$  nicht aussagekräftig genug waren, um eine Identifikation zu ermöglichen. Zusätzlich kam es zu einer deutlichen Fragmentierung der Moleküle (ISD, in source decay) ab über 20 % mehr Laserleistung.

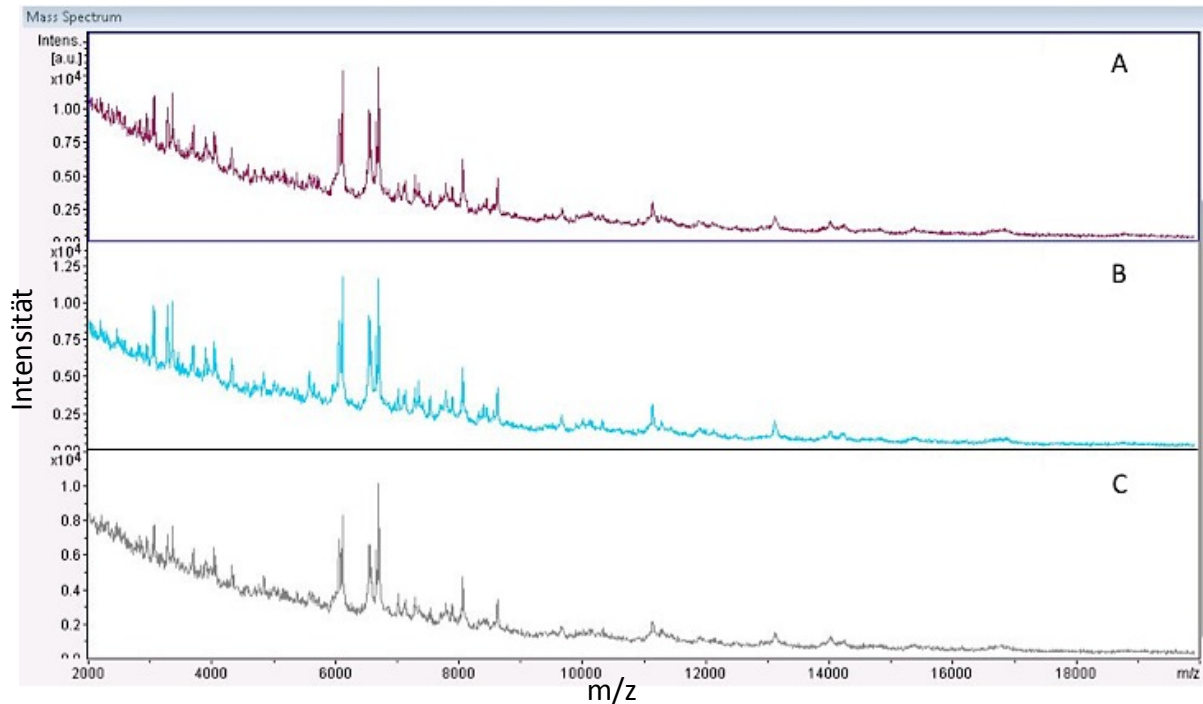
Nachdem die von Bruker Daltoniks vorgesehenen Extraktionsprotokolle getestet und für nicht ausreichend befunden wurden, wurde das Extraktionsprotokoll für filamentöse Pilze (Abbildung 53 im Anhang) eingesetzt. Jedoch reichte auch das nicht aus, um Spektren mit der für die Erstellung von MSPs ausreichenden Qualität zur Unterscheidung von *Stachybotrys* spp. zu generieren. Die Spektren waren innerhalb der biologischen Replikate (A-C) bezüglich der Massen mit der höchsten Intensität zwar reproduzierbar, jedoch nicht hinsichtlich den Intensitäten der Massen und dem Auftreten kleinerer Massen (Abbildung 44). Daher wurde das Protokoll für filamentöse Schimmelpilze von Bruker Daltoniks für die Gattung *Stachybotrys* optimiert.



**Abbildung 43:** Spektren von *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) (A-C biologische Replikate), die mittels Extraktionsprotokoll von Bruker Daltoniks für filamentöse Pilze erstellt wurden

Um einen mechanischen Einfluss auf die Zellverbände auszuüben, wurden zusätzlich angeraute Glasperlen verwendet und das Extraktionsprotokoll für filamentöse Pilze von Bruker Daltoniks wurde dahingehend optimiert. Dadurch konnten mehr Peaks (ca. 40 - 60 Peaks) detektiert werden mit einem gleichbleibenden S/N Verhältnis (Abbildung 45).

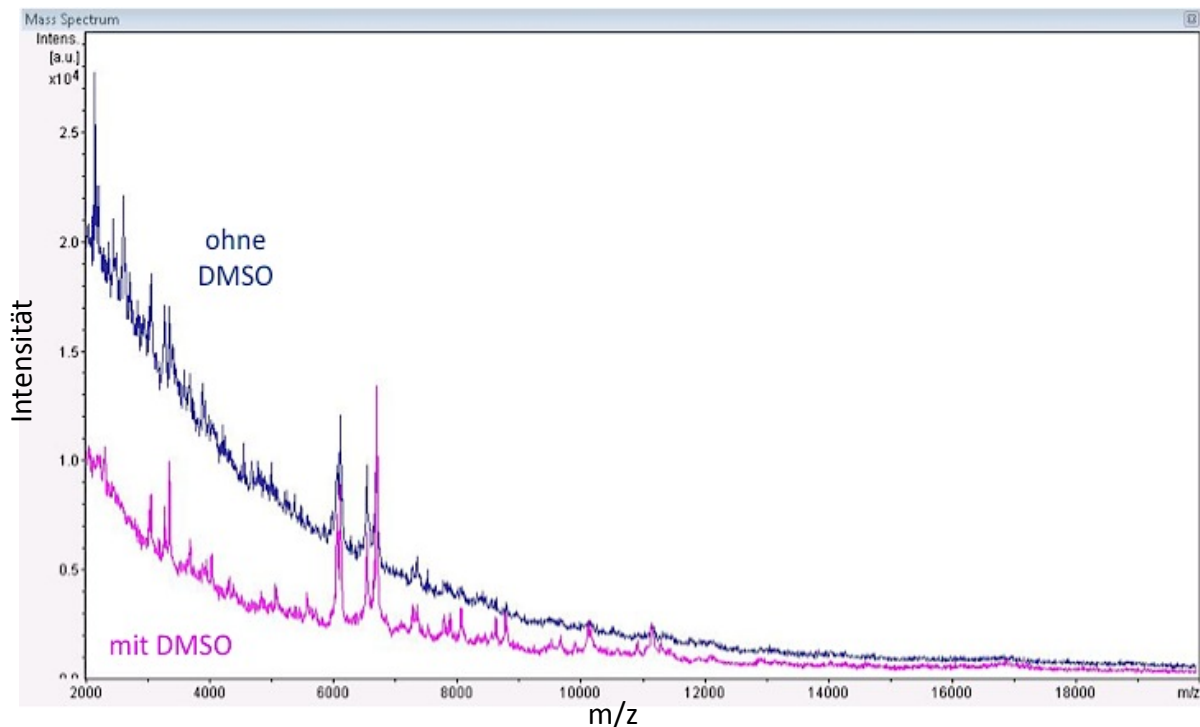
Die unter Kapitel 3.2.4.3 für die MALDI-TOF MS Analytik von Mikroorganismen beschriebene automatische Messmethode (MBT\_AutoX) zeigte sich in Verbindung mit der oben genannten Extraktionsmethode als nicht zuverlässig, da aufgrund einer inhomogenen Kristallisation bzw. einer zu geringen Konzentration der Proteine im Extrakt nicht genügend hochwertige Spektren generiert wurden. Dies führte dazu, dass stattdessen manuell nachgemessen werden musste, indem sogenannte „Sweet Spots“ manuell auf dem Targetspot ausgewählt und gemessen wurden. Dabei handelt es sich um optimal kristallisierte und proteinreiche Stellen auf dem Targetspot. Diese „Sweet Spots“ waren oft am Rand der Targetspots zu finden.



**Abbildung 45:** Spektren von *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) (A-C biologische Replikate), die mittels Extraktionsprotokoll von Bruker Daltoniks für filamentöse Pilze nach Zugabe von angerauten Glasperlen erstellt wurden

Wie in Abbildung 46 zu sehen ist, wies der Proteinextrakt des Referenzstammes *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) relativ viele niedermolekulare Massen im Massenbereich von  $m/z$  2000 - 4000 Da auf. Um das Rauschen in diesen Bereich zu reduzieren und somit ein besseres S/N - Verhältnis zu erlangen, wurde ein zusätzlicher Waschschrift mit dem Lösungsvermittler DMSO (10 %) ergänzt. Dieser zusätzliche Schritt sollte als eine Art Wegbereiter für die Ameisensäure dienen und zusätzlich niedermolekulare Massen wie z.B. Bestandteile von Schleimkapseln reduzieren.

Dies führte zu einem besseren Aufschluss der Zellwände durch Ameisensäure (70 %), was zu deutlich besseren Spektren führte (Abbildung 46). Es konnten dadurch insgesamt mehr spezifische Massensignale im Bereich von  $m/z$  2000 - 20000 Da detektiert werden, die zuvor aufgrund des schlechten S/N nicht identifiziert wurden. Ein weiterer Nebeneffekt davon war eine Zunahme an Intensität aller Massen.



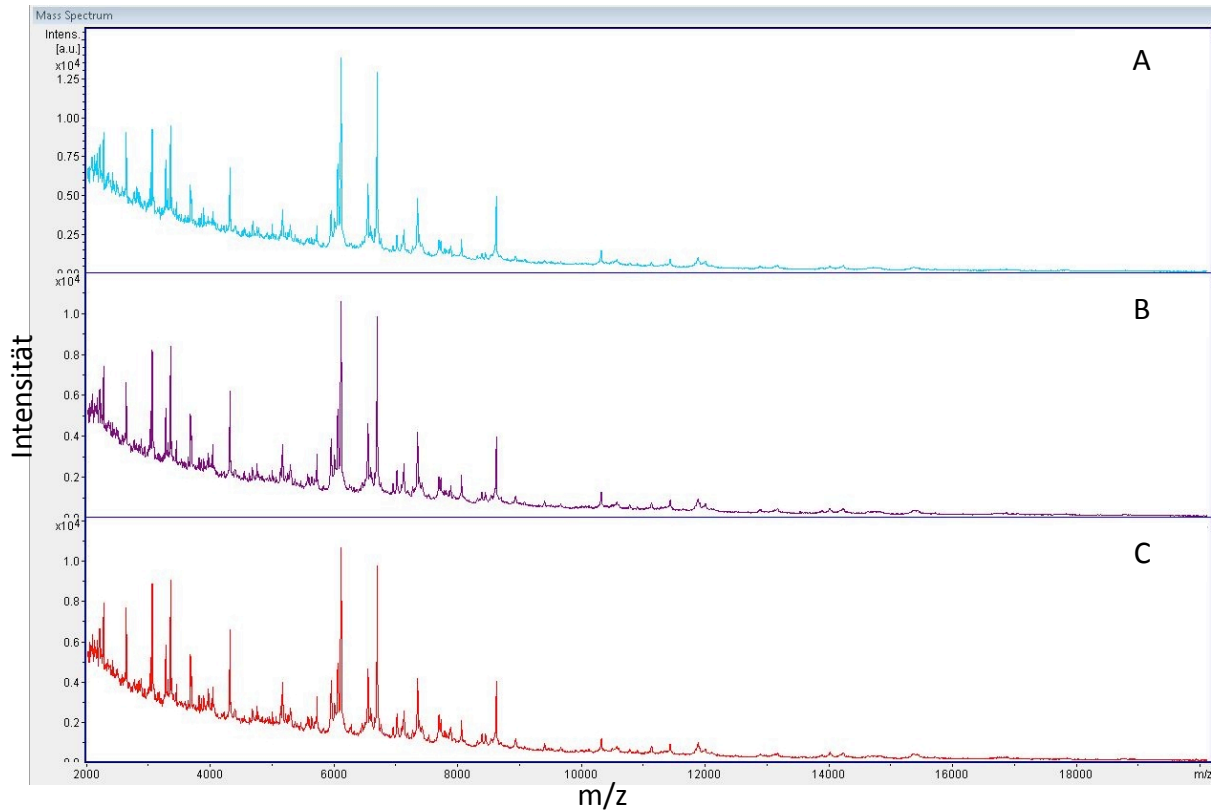
**Abbildung 46:** Spektren von *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293), die mittels Extraktionsprotokoll von Bruker Daltoniks für filamentöse Pilze mit und ohne DMSO (Dimethylsulfoxid) (10 %) - Waschschrift

Durch die Kombination beider zusätzlicher Schritte mit dem Protokoll für filamentöse Pilze von Bruker Daltoniks war es schließlich möglich, spezifische und reproduzierbare Spektren für *Stachybotrys* spp. zu generieren.

Wie in Abbildung 47 zu erkennen ist, konnten Spektren mit einem deutlich verbesserten Massenreichtum erstellt werden. Die Reproduzierbarkeit wurde mittels automatischer Messungen (je  $n=3$ ) der Referenzstämme IBT 40293, IBT 40288 und IBT 40285 überprüft. Hierfür wurden je drei biologische Replikate angezchtet und jedes Replikat im 12-fach Ansatz gemessen.

Die Spezifität der generierten Spektren konnte bestätigt werden, da ein Spektrenabgleich mit in der „Taxonomy-Datenbank“ von Bruker Daltoniks existierenden Einträgen für Pilze ( $n=651$ ) keinen Score Value  $> 1,7$  ergab und *Stachybotrys* bislang nicht in der Datenbank erfasst ist.

Für alle Referenzstämme wurden jeweils 36 Spektren aufgezeichnet (bestehend aus jeweils 240 Einzelmessungen) und als gut reproduzierbar beurteilt. Lediglich einzelne Spektren stimmten nicht komplett mit den anderen überein, so dass diese nicht für die Erstellung von Referenzspektren herangezogen wurden (vgl. folgendes Kapitel).



**Abbildung 47:** Spektren von *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) (A-C biologische Replikate), die mittels des optimierten Extraktionsprotokoll für *Stachybotrys* spp. erstellt wurden

#### 4.3.1 Erstellung von Referenzspektren mittels MALDI-Biotyper

Für die folgenden Referenzstämme (n=8) konnten Referenzspektren (MSP) erstellt werden: *S. chartarum* (ATCC 34916), *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293), *S. chartarum* Chemotyp A (IBT 40288), *S. chlorohalonata* (IBT 40285), *S. cylindrospora* (ATCC 18877), *S. parvispora* (ATCC 16276), *Memnoniella echinata* (MYA-584) und *S. kampalensis* (ATCC 22705).

Für die anderen sieben Referenzstämme konnte keine ausreichende Sporulation erreicht werden, um die Flüssignährmedien zu beimpfen.

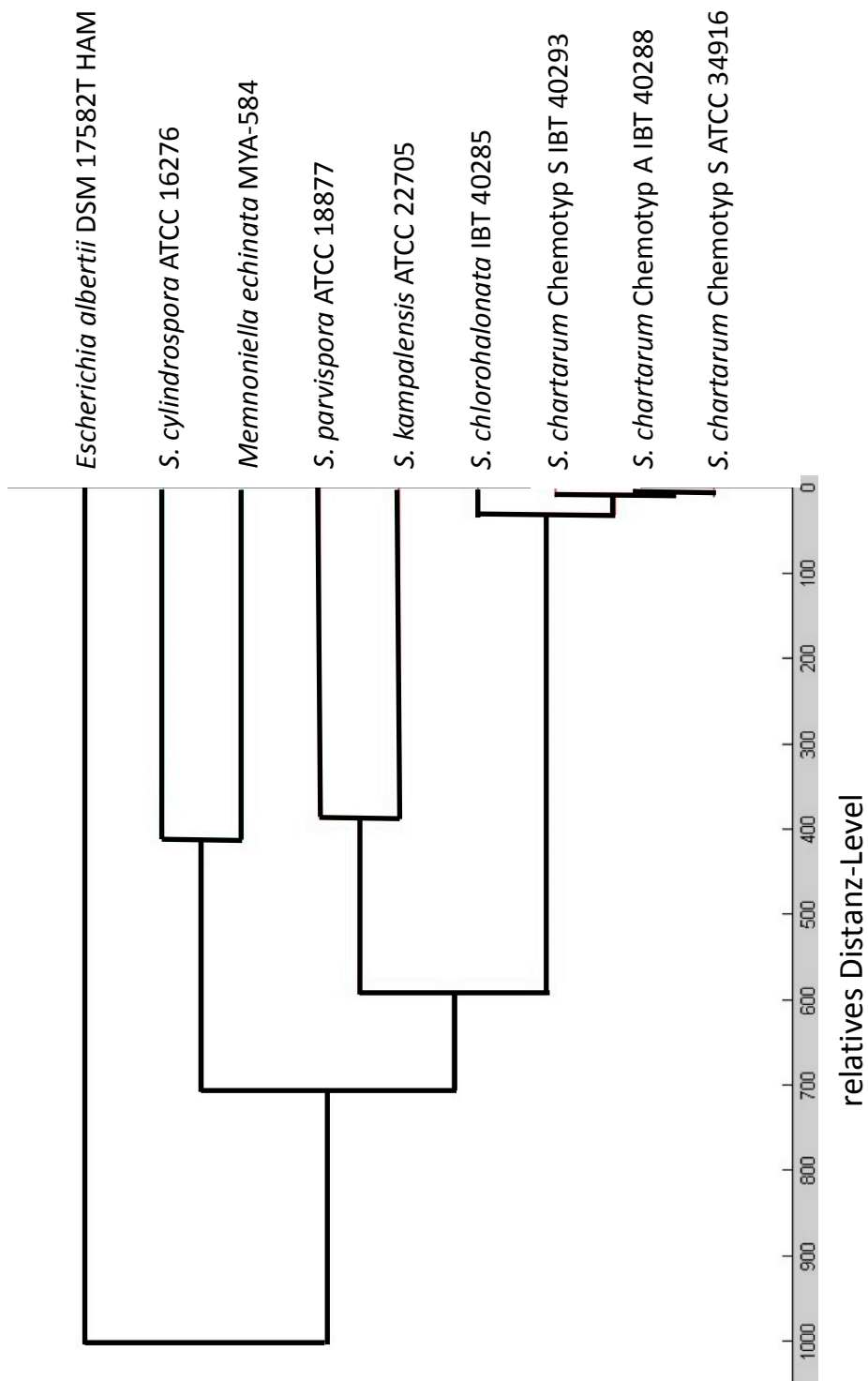
Die einzelnen Referenzstämme unterschieden sich sehr deutlich (Score Value < 1,7) voneinander. Lediglich die *S. chartarum*- und *S. chlorohalonata*-Referenzspektren ergaben jeweils für die andere Spezies mindestens Score Values von 1,7 und waren sich vergleichsweise ähnlich.

In Abbildung 48 ist ein mittels der Software „Biotyper OC“ erstelltes Dendrogramm dargestellt. In dem Dendrogramm werden die Ähnlichkeiten der acht erstellten MSPs miteinander abgeglichen, zusätzlich ist als Vergleich ein *Escherichia albertii* aus der „Taxonomy Datenbank“ von Bruker Daltoniks hinzugefügt worden. Die Aufzweigungen im Dendrogramm decken sich mit den oben genannten Score Value Bereichen.

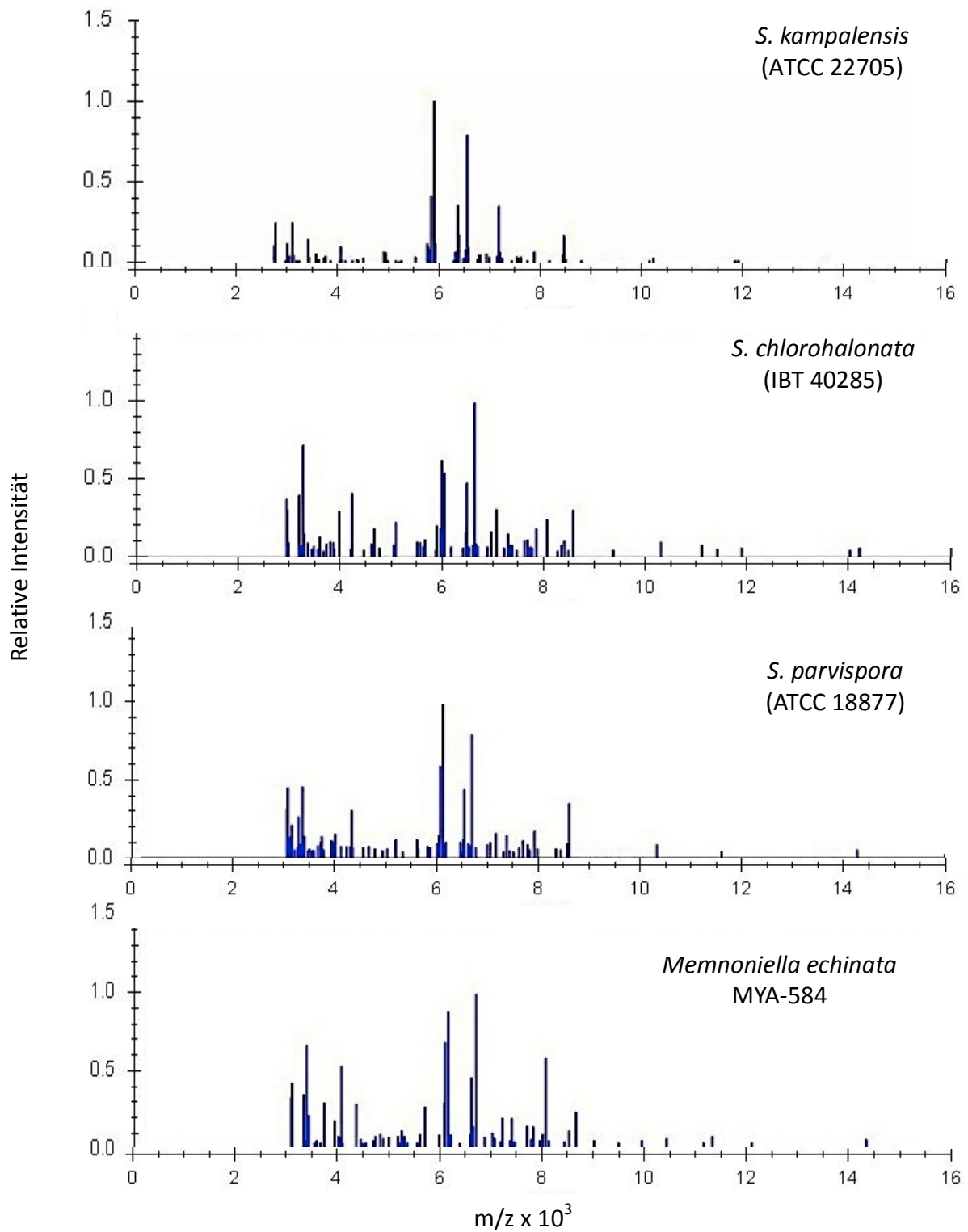
*S. chlorohalonata* und *S. chartarum* (Chemotypen A und S) bilden einen gemeinsamen Cluster. *S. parvispora* und *S. kampalensis* bilden einen weiteren Cluster genauso wie *S. cylindrospora* und *Memnoniella echinata*.

Alle in die Datenbank übernommenen Referenzstämme waren auf Speziesebene mittels des MALDI-Biotypers eindeutig voneinander zu unterscheiden und enthielten die geforderten maximal möglichen 70 Massen; eine Unterscheidung der Chemotypen von *S. chartarum* war jedoch nicht möglich. In den Abbildungen 49 und 50 sind die erstellten Referenzspektren dargestellt.

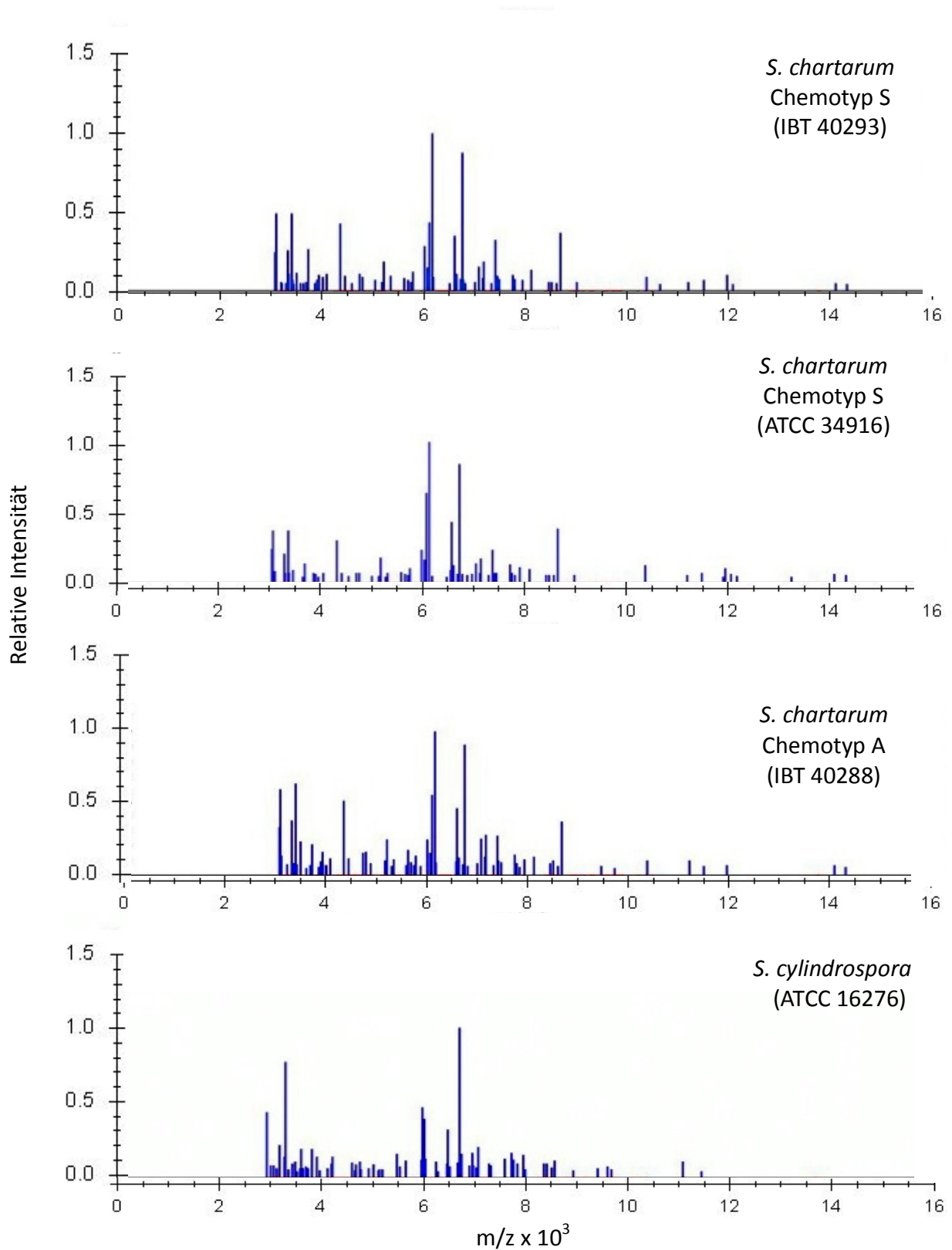




**Abbildung: 48:** Dendrogramm der acht erstellten MSPs von Referenzstämmen und einem *Escherichia albertii* aus der Bruker Daltoniks "Taxonomy Datenbank"



**Abbildung 49:** Referenzspektren erstellt mittels des optimierten Extraktionsprotokolls (MALDI Biotyper MSPs) (siehe Kapitel 3.2.4.2)



**Abbildung 50:** Referenzspektren erstellt mittels des optimierten Extraktionsprotokolls (MALDI Biotyper MSPs) (siehe Kapitel 3.2.4.2)

### 4.3.2 Identifizierung der *Stachybotrys*-Isolate mittels MALDI-Biotyper

Die Identifizierung der *Stachybotrys*-Isolate aus Umweltproben, Futtermittel- und Lebensmittelproben (je n=15) erfolgte anhand der zuvor erstellten Referenzspektren (Kap. 4.3.1) und der Datenbank des MALDI Biotypers (Bruker Daltoniks, Bremen).

Es wurden insgesamt 27 Isolate als *S. chartarum* mit Score Values von durchschnittlich 2,509 - 2,739 (Mittelwert aus je drei biologischen und drei technologischen Replikaten) identifiziert. Die durchschnittliche Score Value-Differenz zur nächstidentifizierten Spezies (*S. chlorohalonata*) betrug 0,313 - 0,642.

Insgesamt 18 Isolate wurden mit durchschnittlichen Score Values von 2,148 bis 2,622 als *S. chlorohalonata* identifiziert, wobei die durchschnittliche Score Value-Differenz zur nächsten Spezies (*S. chartarum*) 0,184 - 0,476 betrug (Tabellen 31, 32 und 33).

Die Score Values der Wiederholungsmessung wiesen nur eine geringe Streuung auf (RSD 0,2 - 9,0 %), was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Präparations- und Messmethode hindeutet.

**Tabelle 31:** Ergebnisse Identifizierung (1. und 2. Speziesidentifikation) der *Stachybotrys*-Isolate aus Umweltproben (n=15) mittels MALDI-TOF MS

Isolat	biologische Replikate	erste identifizierte Spezies	Score Value 1		Mittelwert	RSD	nächste identifizierte Spezies	Score Value 2		Mittelwert	RSD	SCV 1 - SCV 2*
			2,556	2,572				2,200	2,186			
UM01/14	A	<i>S. chartarum</i> **	2,551	2,572	1,0%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,153	2,186	1,1%	0,386		
	B		2,608				2,205					
	C		2,504				2,147					
UM02/14	A	<i>S. chartarum</i> **	2,456	2,509	1,8%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,043	2,085	2,1%	0,424		
	B		2,567				2,065					
	C		2,529				2,098					
UM03/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,513	2,552	1,7%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,143	2,143	1,7%	0,408		
	B		2,613				2,189					
	C		2,543				2,157					
UM04/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,547	2,537	0,5%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,149	2,178	1,6%	0,359		
	B		2,603				2,228					
	C		2,475				2,190					
UM05/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,598	2,559	2,3%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,316	2,246	2,3%	0,313		
	B		2,586				2,231					
	C		2,408				2,280					
UM06/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,607	2,537	3,6%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,163	2,221	2,2%	0,316		
	B		2,607				2,219					
	C		2,478				2,343					
UM07/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,593	2,556	2,2%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,105	2,239	4,4%	0,317		
	B		2,583				2,270					
	C		2,542				2,151					
UM08/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,534	2,553	0,8%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,283	2,200	2,7%	0,353		
	B		2,669				2,167					
	C		2,671				2,309					
UM09/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,654	2,665	0,3%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,265	2,247	2,7%	0,417		
	B		2,644				2,262					
	C		2,694				2,287					
UM10/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,619	2,652	1,2%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,301	2,283	0,7%	0,369		
	B		2,624				2,384					
	C		2,611				2,205					
UM11/14	A	<i>S. chlorohalonata</i>	2,631	2,622	0,3%	<i>S. chartarum</i>	2,187	2,258	3,9%	0,364		
	B		2,579				2,129					
	C		2,534				2,172					
UM12/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,645	2,586	1,8%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,162	2,155	0,8%	0,432		
	B		2,563				2,098					
	C		2,613				2,212					
UM13/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,684	2,620	1,9%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,226	2,179	2,6%	0,441		
	B		2,568				2,165					
	C		2,621				2,180					
UM14/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,690	2,627	1,9%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,254	2,199	1,8%	0,427		
	B		2,679				2,301					
	C		2,654				2,216					
UM15/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,649	2,661	0,5%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,246	2,254	1,6%	0,406		
	B		2,649				2,246					

RSD: relative Standardabweichung \* Differenz zwischen mittleren Score Values

UM: Isolate aus Umwelt- und Innenraumproben

\*\*Ergebnisse stimmen mit Sequenzierungsergebnissen aus vorherigen Studien überein

**Tabelle 32:** Ergebnisse Identifizierung (1. und 2. Speziesidentifikation) der *Stachybotrys*-Isolate aus Futtermitteln (n=15) mittels MALDI-TOF MS

Isolat	biologische Replikate	erste identifizierte Spezies	Score Value 1		Mittelwert	RSD	nächste identifizierte Spezies	Score Value 2		Mittelwert	RSD	SCV 1 - SCV 2*
			Score Value 1	Mittelwert				Score Value 2	Mittelwert			
FM16/14	A	<i>S. chlorohalonata</i>	2,473	2,504	2,504	1,4%	<i>S. chartarum</i>	2,088	2,124	2,124	2,3%	0,380
	B		2,484					2,091				
	C		2,554					2,193				
FM17/14	A	<i>S. chlorohalonata</i>	2,388	2,362	2,362	1,1%	<i>S. chartarum</i>	1,965	2,031	2,031	3,0%	0,331
	B		2,371					2,113				
	C		2,327					2,014				
FM18/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,547	2,568	2,568	0,7%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,147	2,196	2,196	1,6%	0,372
	B		2,570					2,220				
	C		2,588					2,221				
FM19/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,577	2,613	2,613	1,1%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,246	2,229	2,229	1,4%	0,384
	B		2,612					2,255				
	C		2,650					2,187				
FM20/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,693	2,707	2,707	0,4%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,058	2,065	2,065	0,2%	0,642
	B		2,713					2,067				
	C		2,715					2,069				
FM21/14	A	<i>S. chlorohalonata</i>	2,475	2,496	2,496	1,4%	<i>S. chartarum</i>	2,219	2,248	2,248	1,7%	0,247
	B		2,469					2,303				
	C		2,544					2,223				
FM22/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,587	2,614	2,614	0,9%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,123	2,135	2,135	0,4%	0,479
	B		2,614					2,145				
	C		2,641					2,138				
FM23/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,548	2,580	2,580	2,0%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,185	2,160	2,160	3,8%	0,420
	B		2,651					2,246				
	C		2,541					2,048				
FM24/14	A	<i>S. chlorohalonata</i>	2,370	2,472	2,472	2,9%	<i>S. chartarum</i>	2,061	2,075	2,075	0,9%	0,397
	B		2,529					2,064				
	C		2,518					2,100				
FM25/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,713	2,739	2,739	0,7%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,107	2,189	2,189	3,1%	0,550
	B		2,757					2,185				
	C		2,747					2,274				
FM26/14	A	<i>S. chlorohalonata</i>	2,250	2,289	2,289	1,9%	<i>S. chartarum</i>	2,118	2,105	2,105	1,7%	0,184
	B		2,266					2,058				
	C		2,351					2,140				
FM27/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,677	2,631	2,631	1,4%	<i>S. chlorohalonata</i>	2,122	2,048	2,048	2,7%	0,583
	B		2,587					2,035				
	C		2,629					1,987				
FM28/14	A	<i>S. chlorohalonata</i>	2,448	2,404	2,404	4,8%	<i>S. chartarum</i>	2,105	2,098	2,098	5,7%	0,306
	B		2,516					2,241				
	C		2,246					1,947				
FM29/14	A	<i>S. chlorohalonata</i>	1,986	2,173	2,173	6,8%	keine eindeutige Identifizierung	1,670	1,765	1,765	4,2%	0,408
	B		2,346					1,851				
	C		2,186					1,773				
FM30/14	A	<i>S. chartarum</i>	2,540	2,654	2,654	3,1%	<i>S. chlorohalonata</i>	1,980	2,144	2,144	7,8%	0,511
	B		2,689					2,373				
	C		2,734					2,078				

RSD: relative Standardabweichung \* Differenz zwischen mittleren Score Values

FM: Isolate aus Futtermitteln

**Tabelle 33:** Ergebnisse Identifizierung (1. und 2. Speziesidentifikation) der *Stachybotrys*-Isolate aus Lebensmitteln (n=15) mittels MALDI-TOF MS

Isolat	biologische Replikate	erste identifizierte Spezies	Score Value 1		RSD	Mittelwert	RSD	Mittelwert	Score Value 2		RSD	SCV 1 - SCV 2*
			Score Value 1	Mittelwert					Score Value 2	Mittelwert		
LM31/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,110	2,148	4,9%	1,815	7,5%	1,815	1,790	0,333	7,5%	0,333
	B		2,292									
	C		2,043									
LM32/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,654	2,608	1,3%	2,213	0,7%	2,213	2,231	0,395	0,7%	0,395
	B		2,583									
	C		2,586									
LM33/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,463	2,405	1,7%	1,930	1,4%	1,930	1,961	0,476	1,4%	0,476
	B		2,367									
	C		2,386									
LM34/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,191	2,227	2,9%	1,868	2,8%	1,868	1,861	0,359	2,8%	0,359
	B		2,318									
	C		2,172									
LM35/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,527	2,467	2,5%	2,167	2,8%	2,167	2,242	0,300	2,8%	0,300
	B		2,382									
	C		2,493									
LM36/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,483	2,509	2,2%	2,161	1,4%	2,161	2,132	0,348	1,4%	0,348
	B		2,457									
	C		2,587									
LM37/14	A	<i>S. chartarum</i> **	2,678	2,645	1,1%	2,131	1,0%	2,131	2,106	0,513	1,0%	0,513
	B		2,652									
	C		2,604									
LM38/14	A	<i>S. chartarum</i> **	2,528	2,522	0,3%	1,884	1,0%	1,884	1,885	0,637	1,0%	0,637
	B		2,510									
	C		2,527									
LM39/14	A	<i>S. chartarum</i> **	2,599	2,525	3,8%	2,110	0,5%	2,110	2,101	0,415	0,5%	0,415
	B		2,587									
	C		2,390									
LM40/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,075	2,262	5,9%	1,982	9,0%	1,982	1,739	0,280	9,0%	0,280
	B		2,329									
	C		2,381									
LM41/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,384	2,309	4,8%	1,877	5,9%	1,877	2,029	0,432	5,9%	0,432
	B		2,391									
	C		2,152									
LM42/14	A	<i>S. chartarum</i> **	2,697	2,669	0,8%	2,210	0,9%	2,210	2,228	0,459	0,9%	0,459
	B		2,645									
	C		2,665									
LM43/14	A	<i>S. chartarum</i> **	2,690	2,654	1,5%	2,123	0,7%	2,123	2,120	0,532	0,7%	0,532
	B		2,600									
	C		2,672									
LM44/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,578	2,491	5,3%	2,065	2,5%	2,065	2,046	0,426	2,5%	0,426
	B		2,590									
	C		2,305									
LM45/14	A	<i>S. chlorohalonata</i> **	2,351	2,335	2,0%	1,996	1,6%	1,996	2,023	0,339	1,6%	0,339
	B		2,382									
	C		2,272									

RSD: relative Standardabweichung \* Differenz zwischen mittleren Score Values

LM: Isolate aus Lebensmittelproben

\*\*Ergebnisse stimmen mit Sequenzierungsergebnissen aus vorherigen Studien überein

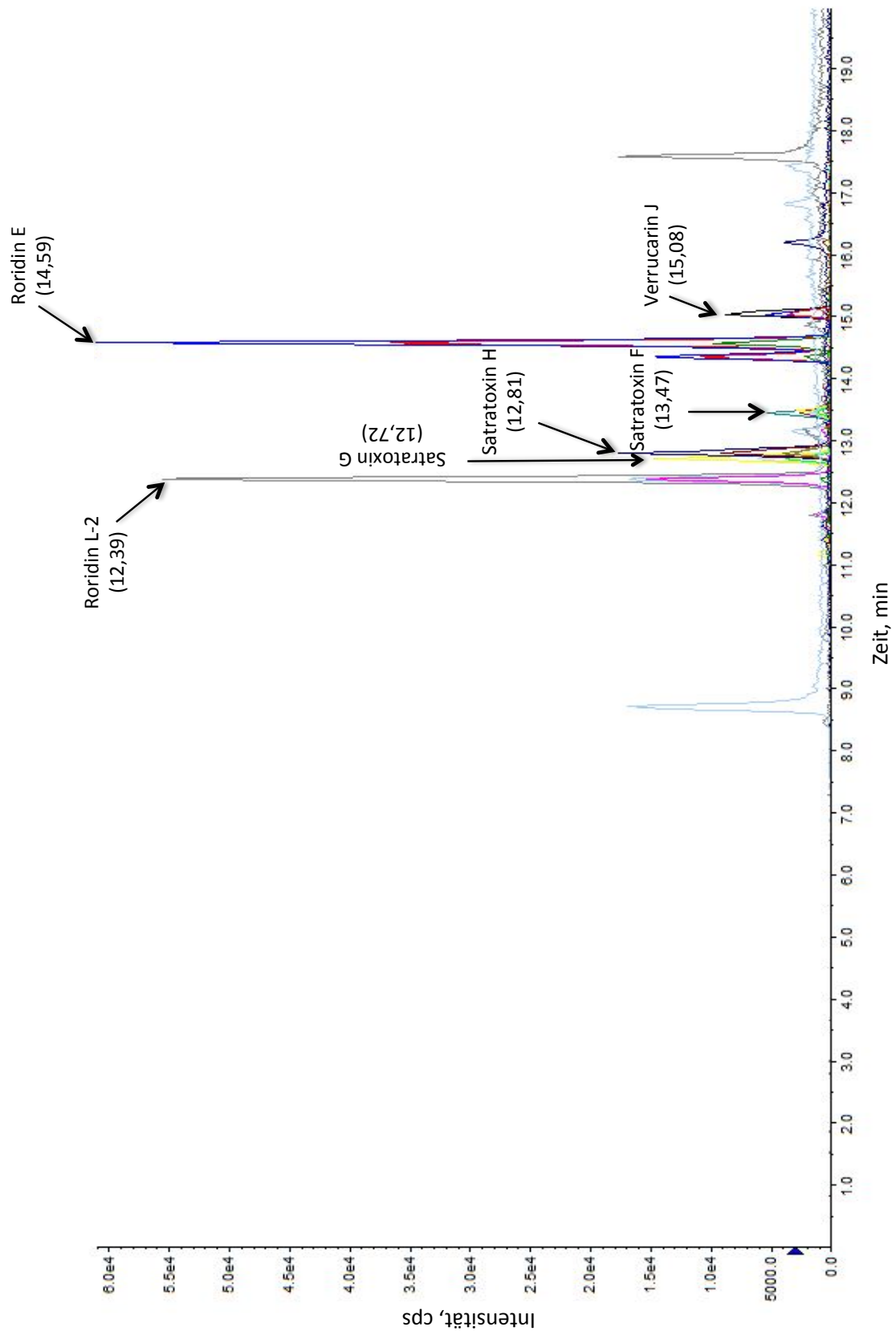
#### 4.4 Nachweis makrozyklischer Trichothecene mittels LC-MS/MS

Mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen LC-MS/MS Methode konnten die von *S. chartarum* Chemotyp S gebildeten makrozyklischen Trichothecene detektiert und eindeutig identifiziert werden.

In Abbildung 51 findet sich ein Chromatogramm einer Messung eines Toxinextraktes des Vergleichsstandards S8 (*S. chartarum* Chemotyp S).

Aufgrund des Mangels an kommerziell verfügbaren Standardsubstanzen wurden die Stachybotrytoxine Satratoxin F, G und H, Roridin E und L-2, sowie Verrucarin J bzw. Isoformen semiquantitativ als Äquivalent von Verrucarin A bestimmt.





**Abbildung 51:** LC-MS/MS - Chromatogramm makrozyklischer Trichothecene mit dem Referenzstandard S8 (vgl. 3.2.5, Stammsammlung des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit)

#### 4.4.1 Referenzstämme

Von den 15 mit LC-MS/MS analysierten Referenzstämmen erwiesen sich drei als Bildner von makrozyklischen Trichothecenen (Tabelle 34). Die Referenzstämme wurden mit LC-MS/MS wie unter Kapitel 3.2.5 beschrieben auf ihr Bildungsvermögen von makrozyklischen Trichothecenen untersucht.

Zwei Referenzstämme, *S. chartarum* Chemotyp S (IBT 40293) und *S. chartarum* Chemotyp S (ATCC 34916), bildeten folgende makrozyklische Trichothecene: Roridin E, Roridin L-2, Satratoxin G, H und F und Verrucarin J.

Bei dem Referenzstamm *S. dichroa* (ATCC 18913) konnten Roridin E (Andersen et al., 2002) und Verrucarin J in geringen Mengen (5,0 und 4,0 ng/g Agar) nachgewiesen werden.

In Tabelle 34 sind die semiquantitativen Messergebnisse für die Referenzstämme dargestellt. Die Bildung der genannten makrozyklischen Trichothecene durch den ATCC - Stamm 34916 bestätigte die molekularbiologische Zuordnung zu *S. chartarum* Chemotyp S.

Die Summe der gebildeten makrozyklischen Trichothecene war bei diesem Referenzstamm deutlich höher im Vergleich zu allen anderen untersuchten Referenzstämmen, die prozentualen Anteile der einzelnen Toxine am Gesamttoxingehalt waren jedoch ähnlich denen des zweiten Referenzstamms (IBT 40293, *S. chartarum* Chemotyp S).

**Tabelle 34:** Semiquantitative Ergebnisse der LC-MS/MS Untersuchung (Verrucarin A - Äquivalent in ng/g Agar) und prozentuale Anteile der einzelnen Analyten am Gesamttoxingehalt der von den Referenzstämmen gebildeten makrozyklischen Trichothecene (n=15)

Referenzstämme*	ID	RE		RL-2		SF		SG		SH		VJ		Summe ng/g Agar
		ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	
<i>Melanopsamma pomiformis</i>	ATCC 18873	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Memnoniella echinata</i>	MYA-584	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nectriella funicola</i>	ATCC 96538	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	IBT 40288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	IBT 40293	1500	61,0	240	10,0	55	2,0	110	4,0	520	21,0	40	2,0	2465
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	ATCC 34916	6379	52,0	1010	8,0	440	4,0	1810	15,0	2200	18,0	495	4,0	12335
<i>S. chlorohalonata</i>	IBT 40285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. complementi</i>	ATCC 20511	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cylindrospora</i>	ATCC 16276	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. dichroa</i>	ATCC 18913	5,0	56,0	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	44,0	9,0
<i>S. kampalensis</i>	ATCC 22705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. longispora</i>	ATCC 32451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. oenanthos</i>	ATCC 22844	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. parvispora</i>	ATCC 18877	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. theobromae</i>	ATCC 18905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Mittelwert (n=2 biologische Replikate im Doppelansatz) RE: Roridin E RL-2: Roridin L-2 SF: Satratoxin F

SG: Satratoxin G SH: Satratoxin H VJ: Verrucarin J

- : nicht nachweisbar ID: Identifikationsnummer

#### 4.4.2 *Stachybotrys*-Isolate

Von den untersuchten Isolaten (n=45) bildeten 19 der *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate makrozyklische Trichothecene. Bei vier *S. chartarum* Chemotyp S-Isolaten (UM04/14, UM06/14, UM12/14 und FM19/14) konnten keine nachweisbaren Mengen an makrozyklischen Trichothecenen detektiert werden (Nachweisgrenze bezogen auf Verrucarín-A Äquivalente: 0,1 ng/g Agar). Dies kann bei Isolaten UM04/14, UM06/14, UM12/14 und FM19/14 in den nur geringen Produktionsmengen an makrozyklischen Trichothecenen begründet sein und deckt sich mit Ergebnissen aus vorangegangenen Untersuchungen (Kap. 3.1.1, vgl. Tabelle 13 - 15).

In Tabelle 35 sind die semiquantitativen Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen für die *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate als Äquivalente des Referenzstandards Verrucarín A dargestellt.

Der Gesamtgehalt an Verrucarín A-Äquivalenten reichte von 395 bis 8305 ng/g Agar. Die größten Mengen wurden von UM07/14 und LM37/14 gebildet (8305 ng/g Agar bzw. 8120 ng/g Agar).

Bei allen *S. chartarum* Chemotyp S-Isolaten hatte Roridin E im Bezug auf die Gesamttoxinstoffmenge den größten relativen Anteil (62 % +/- 12 %), gefolgt von Satratoxin H und Satratoxin G sowie den anderen Toxinen in deutlich stärker schwankenden Anteilen (Tabelle 35). Das Isolat FM18/14 bildete im Vergleich zu den anderen Isolaten viel Satratoxin H (29 %). Das Isolat LM43/14 war ebenfalls auffällig, da es mit 22 % deutlich mehr Satratoxin F bildete als alle anderen Isolate und als einziges Isolat kein Satratoxin H in nachweisbaren Mengen produzierte. Dies deckte sich mit vorherigen Untersuchungen (Biermaier, 2013)

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Toxizität der Isolate und den ursprünglichen Habitaten aufgezeigt werden.

**Tabelle 35:** Semiquantitative Ergebnisse der LC-MS/MS Untersuchungen (Verrucarin A – Äquivalent in ng/g Agar) und prozentuale Anteile der einzelnen Analyten am Gesamttoxingehalt der von *S. chartarum* Chemotyp S gebildeten makrozyklischen Trichothecene (n=23)

Isolate*	RE		RL-2		SF		SG		SH		VJ		Summe ng/g Agar
	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	ng/g Agar	Anteil in %	
UM02/14	1280	57,0	220	10,0	135	6,0	240	11,0	310	14,0	60	3,0	2245
UM03/14	1335	61,0	190	9,0	250	11,0	180	8,0	175	8,0	70	3,0	2200
UM04/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UM05/14	855	56,0	80	5,0	40	2,0	200	13,0	280	18,0	75	5,0	1530
UM06/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UM07/14	5430	65,0	1015	12,0	435	5,0	440	5,0	605	7,0	380	5,0	8305
UM08/14	1075	64,0	235	14,0	85	5,0	70	4,0	75	4,0	140	8,0	1680
UM12/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UM13/14	920	57,0	100	6,0	20	1,0	200	12,0	315	19,0	70	4,0	1625
UM14/14	1215	62,0	145	7,0	20	1,0	130	7,0	380	19,0	70	3,0	1955
UM15/14	240	63,0	30	7,0	10	2,0	30	7,0	60	15,0	25	6,0	395
FM18/14	1760	53,0	220	7,0	50	1,0	240	7,0	980	29,0	100	3,0	3350
FM19/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FM20/14	735	69,0	70	7,0	30	3,0	70	6,0	125	12,0	30	3,0	1060
FM23/14	585	66,0	60	6,0	70	8,0	70	8,0	30	3,0	90	10,0	905
FM25/14	2300	55,0	390	9,0	170	4,0	480	11,0	730	17,0	145	3,0	4215
FM27/14	610	57,0	60	6,0	15	1,0	130	12,0	180	17,0	80	7,0	1075
FM30/14	930	54,0	110	6,0	105	6,0	245	14,0	210	12,0	140	8,0	1740
LM37/14	5550	68,0	660	8,0	100	1,0	390	5,0	1235	15,0	185	2,0	8120
LM38/14	710	73,0	120	12,0	15	1,0	30	3,0	60	6,0	45	4,0	980
LM39/14	2855	81,0	190	5,0	35	1,0	140	4,0	240	7,0	55	2,0	3515
LM42/14	985	63,0	110	7,0	26	2,0	140	9,0	160	10,0	135	9,0	1560
LM43/14	835	54,0	140	9,0	340	22,0	140	9,0	-	-	100	6,0	1555
Mittelwert		62,0		8,0		3,0		8,0		13,0		5,0	
+/-RSD		12,0		31,0		81,0		41,0		50,0		50,0	

\*Mittelwert (n=2 biologische Replikate im Doppelansatz) RE: Roridin E

RL-2: Roridin L-2 SF: Satratoxin F SG: Satratoxin G SH: Satratoxin H

VJ: Verrucarin J - : nicht nachweisbar RSD: relative Standardabweichung LM: Isolate aus Lebensmitteln

UM: Isolate aus Innenraum- und Umweltproben FM: Isolate aus Futtermittelproben

## 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurden 15 *Stachybotrys*-Referenzstämme und 45 *Stachybotrys*-Isolate (je n=15 aus Umwelt-, Futtermittel- und Lebensmittelproben) aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit mittels Phänotypisierung, Genotypisierung und Massenspektrometrie charakterisiert. In Tabelle 36 - 39 sind die Untersuchungsergebnisse der 45 *Stachybotrys*-Isolate und der Referenzstämme dargestellt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Herkunft der Isolate und ihren beschriebenen Eigenschaften festgestellt werden. Mittels Phänotypisierung konnte keine Identifizierung auf Ebene der Spezies oder der Chemotypen erfolgen, lediglich auf Gattungsebene konnte anhand der Mikromorphologie bestätigt werden, dass es sich um *Stachybotrys* handelt. *Nectriella funicola* (ATCC 96538) wurde als dessen anamorphe Form *S. oleronensis* identifiziert.

Bei *S. complementi* (ATCC 20511) handelte es sich den Sequenzierungsergebnissen zufolge um *S. microspora*. Zudem wurde der *S. chartarum*-Referenzstamm ATCC 34916 mittels Sequenzierung und über den Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen mittels LC-MS/MS als Chemotyp S identifiziert. Alle anderen zwölf Referenzstämme wurden als die von der ATCC und IBT angegebenen Spezies identifiziert.

Mittels Sequenzierung der ITS-1/4 und *tri5*-Genabschnitte konnten alle 45 Isolate identifiziert werden. Dabei handelte es sich um 23 *S. chartarum* Chemotyp S, vier *S. chartarum* Chemotyp A und 18 *S. chlorohalonata* Isolate (Tabelle 37 - 39). Dies konnte über die MALDI-TOF Massenspektrometrie unter Anwendung der optimierten Proteinextraktionsmethode und Erstellung spezifischer Referenzspektren bestätigt werden. Die Ergebnisse deckten sich zu 100 % mit denen der Genotypisierung und Identifizierung aus vorherigen Studien, lediglich die Identifikation der Chemotypen war nicht möglich.

Parallel dazu lieferten die Ergebnisse der Untersuchungen mittels LC-MS/MS mit den Sequenzierungs- und MALDI-TOF MS-Ergebnissen zumeist übereinstimmende Resultate: Für 19 *S. chartarum* Chemotyp S Isolate konnten mittels LC-MS/MS makrozyklische Trichothecene nachgewiesen werden. Allerdings wurde bei einem Isolat (LM43/14) kein Satratoxin H nachgewiesen und vier *S. chartarum* Chemotyp S Isolate (UM04/14, UM06/14, UM12/14, FM19/14) bildeten keine makrozyklischen Trichothecene oberhalb der Nachweisgrenze. Bei dem Referenzstamm *S. dichroa* (ATCC 18913) konnte die Bildung von Roridin E und erstmals die Bildung von Verrucarin J beschrieben werden.

Die Ergebnisse aus früheren Untersuchungen stimmten mit den Ergebnissen aus dieser Untersuchung bei 40 von 45 Isolaten überein. Die Ergebnisse stimmen mit den Identifikationen und dem MTT-Zytotoxizitätstest und dem ELISA (Roridin A-Äquivalent) überein. Somit konnten die Isolate umfassend beschrieben werden und eine eindeutige Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Bildung von makrozyklischen Trichothecenen und den Ergebnissen des MTT-Zytotoxizitätstests aus früheren Studien aufgezeigt werden.

Es konnten ausschließlich mittels der Genotypisierung und der MALDI-TOF MS die Isolate und Referenzstämme auf Gattungs- und Speziesebene eindeutig charakterisiert, identifiziert und in sich verifiziert werden.

**Tabelle 36:** Zusammenfassung der untersuchten Charakteristika der Referenzstämme (n=15)

Isolat	Angaben ATCC bzw. IBT	Koloniefarbe	Verfärbung Agar	Bildung von Guttationstropfen	Ergebnisse der Sequenzierung		Bildung von makrozyklischen Trichothecenen
					ITS-1/4	trf5	
ATCC/18873	<i>Melanopsamma pomiformis</i>	sw	Ja	Nein	<i>Melanopsamma pomiformis</i>	kein Amplifikat	LC-MS/MS n.n.
MYA-584	<i>Memnoniella echinata</i>	gra	Ja	Nein	<i>Memnoniella echinata</i>	kein Amplifikat	n.n.
ATCC/96538	<i>Nectriella funicola</i>	w	Nein	Nein	<i>S. oleronensis</i>	kein Amplifikat	n.n.
IBT/40288	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (A)	n.n.
IBT/40293	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	sw	Nein	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ
ATCC/34916	<i>S. chartarum</i>	sw	Nein	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ
IBT/40285	<i>S. chlorohalonata</i>	s	Nein	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.
ATCC/20511	<i>S. complementi</i>	sw	Ja	Nein	<i>S. microspora</i>	kein Amplifikat	n.n.
ATCC/16276	<i>S. cylindrospora</i>	gra	Ja	Nein	<i>S. cylindrospora</i>	kein Amplifikat	n.n.
ATCC/18913	<i>S. dichroa</i>	w	Ja	Nein	<i>S. dichroa</i>	kein Amplifikat	RE, VJ
ATCC/22705	<i>S. kampalensis</i>	o	Nein	Nein	<i>S. kampalensis</i>	kein Amplifikat	n.n.
ATCC/32451	<i>S. longispora</i>	grü	Nein	Nein	<i>S. longispora</i>	kein Amplifikat	n.n.
ATCC/22844	<i>S. oenanthes</i>	o	Nein	Ja	<i>S. oenanthes</i>	kein Amplifikat	n.n.
ATCC/18877	<i>S. parvispora</i>	sw	Nein	Ja	<i>S. parvispora</i>	kein Amplifikat	n.n.
ATCC/18905	<i>S. theobromae</i>	gra	Ja	Nein	<i>S. theobromae</i>	kein Amplifikat	n.n.

sw: schwarz-weiß    gra: grau    w: weiß    s: schwarz    o: orange    grü: grün  
 RE: Roridin E    RL-2: Roridin L-2    SF: Satratoxin F    SG: Satratoxin G    SH: Satratoxin H    VJ: Verrucaridin  
 ITS: Internal Transcribed Spacer    trf5: Trichodiensynthase5    n.n.: nicht nachweisbar



**Tabelle 37:** Zusammenfassung der untersuchten Charakteristika der *Stachybotrys* Isolate aus Umwelt- und Innenraumproben (n=15)

Isolat	Koloniefarbe	Verfärbung im Agar	Bildung von Guttationstropfen	Ergebnisse der Sequenzierung		Bildung von makrozyklischen Trichotheenen	Ergebnisse der MALDI-TOF MS Identifizierung
				ITS-1/4	trf5		
UM01/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (A)	n.n.	<i>S. chartarum</i>
UM02/14	s	Ja	Nein	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
UM03/14	s	Ja	Nein	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
UM04/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	n.n.	<i>S. chartarum</i>
UM05/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
UM06/14	s	Nein	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	n.n.	<i>S. chartarum</i>
UM07/14	s	Nein	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
UM08/14	sw	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
UM09/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (A)	n.n.	<i>S. chartarum</i>
UM10/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (A)	n.n.	<i>S. chartarum</i>
UM11/14	w	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.	<i>S. chlorohalonata</i>
UM12/14	s	Nein	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	n.n.	<i>S. chartarum</i>
UM13/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
UM14/14	sw	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
UM15/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>

sw: schwarz-weiß w: weiß s: schwarz UM: Isolate aus Innenraum- und Umweltproben  
 RE: Roridin E RL-2: Roridin L-2 SF: Satratoxin F SG: Satratoxin G SH: Satratoxin H VJ: Verrucaridin  
 ITS: Internal Transcribed Spacer trf5: Trichodiensynthase5 n.n.: nicht nachweisbar

**Tabelle 38:** Zusammenfassung der untersuchten Charakteristika der *Stachybotrys* Isolate aus Futtermitteln (n=15)

Isolat	Koloniefarbe	Verfärbung Agar	Bildung von Guttationstropfen	Ergebnisse der Sequenzierung		Bildung von makrozyklischen Trichothecen	Ergebnisse der MALDI-TOF MS Identifizierung
				ITS-1/4	trf5		
FM16/14	s	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.	<i>S. chlorohalonata</i>
FM17/14	w	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.	<i>S. chlorohalonata</i>
FM18/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
FM19/14	sw	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	n.n.	<i>S. chartarum</i>
FM20/14	sw	Nein	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
FM21/14	s	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.	<i>S. chlorohalonata</i>
FM22/14	sw	Nein	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (A)	n.n.	<i>S. chartarum</i>
FM23/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
FM24/14	sw	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.	<i>S. chlorohalonata</i>
FM25/14	s	Ja	Nein	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
FM26/14	s	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.	<i>S. chlorohalonata</i>
FM27/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
FM28/14	s	Nein	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.	<i>S. chlorohalonata</i>
FM29/14	w	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n.	<i>S. chlorohalonata</i>
FM30/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>

sw: schwarz-weiß w: weiß s: schwarz

RE: Roridin E RL-2: Roridin L-2 SF: Satratoxin F

ITS: Internal Transcribed Spacer trf5: Trichodien synthase5 n.n.: nicht nachweisbar

FM: Isolate aus Futtermittelproben

SH: Satratoxin H

VJ: Verrucaridin

**Tabelle 39:** Zusammenfassung der untersuchten Charakteristika der *Stachybotrys* Isolate aus Lebensmitteln (n=15)

Isolat	Koloniefarbe	Verfärbung Agar	Bildung von Guttationstropfen	Ergebnisse der Sequenzierung		Bildung von makrozyklischen Trichothecen	Ergebnisse der MALDI-TOF MS Identifizierung
				ITS-1/4	trf5		
LM31/14	sw	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM32/14	s	Nein	Nein	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM33/14	r	Nein	Nein	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM34/14	sw	Ja	Nein	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM35/14	s	Nein	Nein	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM36/14	w	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM37/14	s	Nein	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
LM38/14	w	Ja	Nein	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
LM39/14	s	Ja	Nein	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
LM40/14	w	Nein	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM41/14	s	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM42/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG, SH und VJ	<i>S. chartarum</i>
LM43/14	s	Ja	Ja	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chartarum</i> (S)	RE, RL-2, SF, SG und VJ	<i>S. chartarum</i>
LM44/14	s	Ja	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>
LM45/14	s	Nein	Ja	<i>S. chlorohalonata</i>	<i>S. chlorohalonata</i>	n.n	<i>S. chlorohalonata</i>

sw: schwarz-weiß w: weiß s: schwarz r: rosa

RE: Roridin E RL-2: Roridin L-2 SF: Satratoxin F

SG: Satratoxin G SH: Satratoxin H

VJ: Verrucaridin

ITS: Internal Transcribed Spacer trf5: Trichodiensynthase5 n.n.: nicht nachweisbar

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 15 *Stachybotrys* Referenzstämme (ATCC und IBT) und 45 *Stachybotrys*-Isolate aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit mittels phänotypischer, molekularbiologischer und massenspektrometrischer Methoden charakterisiert.

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Erstellung einer Proteinextraktionsmethode zur Identifikation von *Stachybotrys* spp. für die Identifizierung mit MALDI-TOF Massenspektrometrie. Die Ergebnisse der fünf Isolate, die mit vorherigen Studien nicht übereinstimmen, sind womöglich auf eine nicht akkurate Erfassung von Isolaten innerhalb der Stammsammlung bzw. Verwechslungen zurückzuführen.

Bisherige Arbeiten zur Gattung *Stachybotrys* beschäftigten sich seit deren Erstbeschreibung meist mit einzelnen Methoden wie Phänotypisierung, Genotypisierung und Untersuchung des Metabolitenprofils (Jong und Davis, 1976; Pan et al., 2014; Wang et al., 2015), jedoch wurden diese Methoden selten parallel angewandt (Andersen et al., 2003). Die erfolgreiche Anwendung der MALDI-TOF Massenspektrometrie auf diese Gattung wurde bisher nur von einer Arbeitsgruppe veröffentlicht (Gruenwald et al., 2015).

Die Taxonomie der *Mycota* gilt nach wie vor als sehr uneinheitlich (Hawksworth et al., 2011; Hibbett und Taylor, 2013; Norvell, 2011; Schoch et al., 2012). Momentan wird die ITS-Sequenzierung als das Mittel der Wahl gesehen, um ein sogenanntes „Barcoding“ der *Mycota* durchzuführen (Schoch et al., 2012). Eine Speziesidentifizierung sollte im besten Fall mittels Sequenzierung mehrerer Genabschnitte erfolgen (Hibbett und Taylor, 2013; Taylor et al., 2000).

Trotz dieser Empfehlungen werden immer noch neue *Stachybotrys* spp. allein aufgrund ihres mikroskopischen Erscheinungsbildes beschrieben und davon lediglich Zeichnungen veröffentlicht (Pan et al., 2014). Derzeit sind 78 *Stachybotrys* spp. nach den Vorgaben des Internationalen Botanischen Kongresses 2011 (IBC) anerkannt. Davon sind allerdings nur 22 in der Datenbank NCBI anhand ihrer Nukleotidsequenzen erfasst (Crous et al., 2004; The Royal Botanic Gardens Kew et al., 2014), was eine eindeutige molekularbiologische Zuordnung erschwert. Zudem sind nur 15 *Stachybotrys* spp. als Referenzstämme kommerziell verfügbar.

Tabelle 40 im Anhang listet die für die Gattung *Stachybotrys* existierenden Speziesnamen und Synonyme. Die Quellen widersprechen sich (vgl. Kap. 2.1.1) in der Anzahl an genannten *Stachybotrys* spp. sowie in der Synonym-Nomenklatur. Eine Spezieszuordnung innerhalb der Gattung *Stachybotrys* wird zudem erschwert, da oftmals dieselbe Spezies mit unterschiedlichen Namen beschrieben wurde (z.B. *S. chartarum* und *S. atra*). Hinzu kommt, dass sexuelle und asexuelle Formen einer Spezies häufig mit unterschiedlichen Namen belegt wurden. Eine Zuordnung war rein mikroskopisch aufgrund des Mangels an Vergleichsliteratur der sexuellen Stadien nicht möglich (z.B. *Melanopsamma pomiformis* und *S. albipes*). Zusätzlich waren in diesem Fall scheinbar keine sexuellen Formen ausgebildet.

Die ITS-Sequenzierungsergebnisse des Referenzstamms *Nectriella funicola* (ATCC 96538) deuten darauf hin, dass es sich bei diesem Stamm tatsächlich um die neu beschriebene anamorphe Form, also *S. oleronensis*, handelt (Lechat et al., 2013).

Obwohl insgesamt je 15 *Stachybotrys*-Feldisolate aus Umweltproben, Futter- und Lebensmitteln charakterisiert wurden, wurden nur zwei unterschiedliche *Stachybotrys*-Spezies identifiziert (*S. chartarum* und *S. chlorohalonata*). Dies könnte darin begründet sein, dass aufgrund der angewandten Anzuchtmethoden eine unbewusste Vorselektion vorgenommen wurde. Diese Vermutung liegt insofern nahe, da die meisten Referenzstämme in dieser Studie keine oder nur eine geringgradige Versporung auf Malzextraktagar zeigten, jedoch *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* mit wenigen Ausnahmen zuverlässig versporteten. Allerdings ist auch bekannt, dass die in diesen Habitaten dominant vorkommenden *Stachybotrys*-Spezies *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* zu sein scheinen (Andersen et al., 2002; Biermaier et al., 2015; El-Kady et al., 1981).

## 5.1 Phänotypische Charakterisierung

Die Ergebnisse der phänotypischen Differenzierung zeigten im makromorphologischen Erscheinungsbild, dass alle Referenzstämme sich in ihrem Wachstum auf Malzextraktagar voneinander unterscheiden.

Alle Referenzstämme zeigten verschiedene Koloniemorphologien bezüglich Farbe, Größe, Form und Textur, wobei alle innerhalb ihrer biologischen und technologischen Replikate (jeweils  $n=2$ ) identisch waren. Wie von Andersen et al. (2003) beschrieben, wiesen Referenzstämme von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* ein ähnliches makromorphologisches Erscheinungsbild auf. Allerdings ist eine eindeutige Identifizierung anhand der von Samson (2010) beschriebenen Kriterien nicht durchführbar. So zeigten sechs von 15 untersuchten Isolaten aus Lebensmitteln eine deutlich abweichende Kulturmorphologie zu vorherigen Untersuchungen (Biermaier, 2013).

Die Isolate der Stammsammlung wiesen zwar ähnliche Erscheinungsbilder auf, jedoch nicht ausreichend konstant innerhalb der Spezies oder der Chemotypen, als dass eine sichere Spezieszuordnung möglich wäre; eine belastbare Übereinstimmung von den makroskopischen Erscheinungsbildern mit den von Samson (2010) und Andersen et al. (2003) beschriebenen makroskopischen Merkmalen konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. Bereits 1943 beschrieb Bisby, dass sich die makroskopischen Erscheinungsbilder der Isolate durch weitere Subkultivierung und Temperatureinflüsse verändern können.

Um diese Einflussfaktoren in dieser Arbeit weitestgehend auszuschließen, wurde jede Kultur von einer Urkultur angelegt, die direkt aus einem Lyophilisat gewonnen wurde. Somit war keine zwischenzeitliche Lagerung im Kühlschrank und nur eine Subkultivierung nötig. Ausgehend von dieser Subkultur erfolgten alle weiteren Untersuchungen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Jegliches Probenmaterial, das für die verschiedenen Untersuchungsmethoden benötigt wurde, wurde deshalb jeweils von der gleichen Dreipunktkultur entnommen.

Da alle Referenzstämme und Isolate unter denselben Bedingungen angezchtet wurden, konnten zudem die von Frazer et al. (2011) beschriebenen Einflüsse durch Temperatur,  $a_w$ -Wert oder andere extrinsische Faktoren für die Varianz unter den Isolaten gleicher Gattung, Spezies und Chemotypen nahezu ausgeschlossen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Abweichungen des makroskopischen Erscheinungsbildes auf erneutes Anzüchten bzw. auf das Nährmedium zurückzuführen waren.

Jede erneute Anzucht birgt das Risiko einer weiteren Mutation und/oder Veränderung des makroskopischen Erscheinungsbildes (Bisby, 1943). Ein weiterer beschriebener Grund für Mutationen könnten pilzeigene Mutagene sein, wie z.B. Mykotoxine und andere Metabolite (Paterson und Lima, 2009).

Im Vergleich zu Festnährmedien haben Flüssignährmedien (z.B. Malzextrakt-Bouillon) den Vorteil, dass keine Sporen gebildet werden, da die filamentösen Pilze in einem vegetativen oder Hyphen-Stadium verbleiben (Smith, 1978). Dies bedeutet, dass keine Zellreproduktion stattfindet, sondern lediglich ein Wachsen der bereits vorhandenen Zellen und damit eine höhere Stabilität des Genoms gewährleistet ist.

Die in dieser Studie beobachteten Myzel-Pellets in für die MALDI-TOF MS Messung angelegten Flüssigmedien wurden bisher für *Stachybotrys* spp. nicht beschrieben. Sie scheinen aber ein charakteristisches Merkmal dieser Gattung darzustellen.

Im Gegensatz zu den makroskopischen Erscheinungsbildern ähnelten sich die mikroskopischen Erscheinungsbilder der einzelnen Spezies sehr. Außerdem lagen in einem mikroskopischen Präparat einer Reinkultur häufig sowohl raue, längliche Sporen als auch raue, runde oder glatte, längliche Sporen vor. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass innerhalb einer Kolonie sowohl jüngere als auch ältere Sporen vorliegen, je nachdem, ob man Pilzmaterial von der Mitte oder vom Rand der Kolonie abnimmt (Kap. 2.3.1) (Bisby, 1943; Wang et al., 2015).

Da jedoch bislang nicht eindeutig geklärt ist, ab wann eine Spore oder ein Myzel als ausgewachsen zu beurteilen ist, konnte keine Standardisierung erfolgen.

Es konnten der Literatur zwar Zeichnungen von den untersuchten Referenzstämmen-Spezies entnommen werden, jedoch waren diese nicht ausreichend, um eine sichere Speziesidentifikation durchführen zu können (vgl. Kap. 4.1.1).

Bei dem Referenzstamm *S. oenanthae* (ATCC 22844) war eine vesikelähnliche, apikale Auftreibung der Konidiophore deutlich ausgeprägt zu erkennen (Abbildung 25). Die Zeichnung von Ellis (1971) zeigt diese Struktur jedoch nicht. Dies kann auf eine unzureichende Zeichnung zurückgeführt werden oder auf Salze, die das Myzel zur Ausbildung solcher Auftreibungen anregt. Derartige Einflüsse durch Salze in Nährmedien wurden bereits beschrieben (McQuade, 1963), wobei bei keinem anderen Isolat solche vesikelartigen Strukturen ausgebildet waren und alle auf dem gleichen Nährmedium angezüchtet wurden.

Allein der Referenzstamm *Memnoniella echinata* (MYA-584) konnte innerhalb der vorliegenden *Stachybotrys* spp. mikroskopisch sicher identifiziert werden, da dieser als einziger runde Sporen in Kettenform bildete. Allerdings ist *Memnoniella echinata* auch in der Lage, längliche Sporen in schleimigen Köpfen zu bilden (Wang et al., 2015).

Problematisch erwies sich die Tatsache, dass die vier Referenzstämme *Nectriella funicola* (ATCC 96538), *S. complementi* (ATCC 20511), *S. longispora* (ATCC 32451) und *S. theobromae* (ATCC 18905) sowohl auf Malzextraktagar als auch dem von ATCC empfohlenen Agar keine Sporen bildeten.

Auch der bislang als eines der Standardnährmedien geltende PDA (Magan et al., 2012; Samson, 2010) stellte sich, wie auch bereits in anderen Studien beobachtet (McQuade, 1963), als nicht optimal für die Sporulation von *Stachybotrys* spp. heraus (vgl. Kap. 2.1.2). *S. oenanthae* (ATCC 22844) und *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873) bildeten nur vereinzelt sehr wenige Sporen und *S. dichroa* (ATCC 18913), *S. cylindrospora* (ATCC 16276) sowie *S. parvispora* (ATCC 18877) bildeten zwar mehr Sporen, im Fall von *S. oenanthae* (ATCC 22844), *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873) und *S. dichroa* (ATCC 18913) lagen dennoch zu wenige für die Beimpfung des Flüssignährmediums vor. Dies hatte zur Konsequenz, dass zum Einen wichtige Charakteristika für eine mikromorphologische Beschreibung fehlten, und zum Anderen nicht für alle Stämme eine Anzucht in Flüssignährmedium für deren weitere Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS nach der entwickelten Methodik (vgl. Kap 4.1.1) möglich war.



Die vier nicht sporenbildenden Referenzstämme (*Nectriella funicola* (ATCC 96538), *S. complementi* (ATCC 20511), *S. longispora* (ATCC 32451), *S. theobromae* (ATCC 18905)) wuchsen deutlich langsamer im Vergleich zu den IBT-Referenzstämmen *S. chartarum* Chemotyp A und S, *S. chlorohalonata* (IBT 40288, 40293 bzw. 40285) und dem *S. chartarum* ATCC-Stamm 34916.

Vermutlich handelt es sich bei Malzextraktagar um ein Substrat, das den neun oben genannten sich in der Sporulation als problematisch erwiesenen Spezies nicht die entsprechenden Voraussetzungen zur Bildung von Konidien bietet.

Zudem kann auch ein Überangebot an Nährstoffen dazu führen, dass nur vegetatives Myzel gebildet wird, im Gegensatz dazu kann durch ein Überimpfen auf Nährmedien ohne Stickstoff- oder Kohlenstoffquellen eine Sporulation induziert werden (Skromne et al., 1995). Der Nährstoffmangel allein gilt jedoch per se nicht als Stimulus für eine Sporulation (Adams et al., 1998).

Es ist ebenfalls für einige Mikromyzeten beschrieben, dass der Mangel an Licht zu einer geringeren Versporung führen kann und Licht bestimmter Wellenlänge die Sporulation sogar anregen kann (Mooney und Yager, 1990).

In der vorliegenden Studie konnte nicht geklärt werden, ob es am Mangel derartiger extrinsischer Stimuli oder der Nährstoffversorgung lag, weshalb einige Referenzstämme (*Nectriella funicola* (ATCC 96538), *S. complementi* (ATCC 20511), *S. longispora* (ATCC 32451), *S. theobromae* (ATCC 18905), *S. oenanthae* (ATCC 22844), *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873), *S. dichroa* (ATCC 18913), *S. cylindrospora* (ATCC 16276) und *S. parvispora* (ATCC 18877)) und auch untersuchte Isolate wie LM33/14 (vgl. Kap. 4.1.2) nicht oder nur geringfügig Sporen bildeten.

Die Gattung *Stachybotrys* sollte gemäß der Literatur auf Malzextraktagar unter den beschriebenen Bedingungen (Kap. 3.2.1) Sporen bilden (Samson, 2010). Da zu den Referenzstämmen *Nectriella funicola* (ATCC 96538), *S. complementi* (ATCC 20511), *S. longispora* (ATCC 32451), *S. theobromae* (ATCC 18905) *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873), *S. cylindrospora* (ATCC 16276), *S. dichroa* (ATCC 18913) und *S. parvispora* (ATCC 18877) bislang keine Daten zum Wachstum auf Malzextraktagar vorlagen, konnten keine Vergleiche mit anderen Untersuchungen erfolgen.

Die Unterschiede im Wachstum sprechen dafür, dass unterschiedliche *Stachybotrys* spp. sich in ihren Ansprüchen an das Nährmedium und die Anzuchtbedingungen deutlich voneinander unterscheiden. Lediglich *S. chlorohalonata*, *S. chartarum* und *Memnoniella echinata* waren auf Malzextraktagar in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und Versporung (mit Ausnahme von Isolat LM33/14) vergleichbar (vgl. Kap. 4.1).

## 5.2 Molekularbiologische Differenzierung

In dieser Studie ergab sich, wie bereits in vorherigen Studien, dass die mikroskopische Beschreibung ein probates Mittel ist, Gattungen zu differenzieren, es jedoch nicht möglich ist, innerhalb der Gattung *Stachybotrys* eine sichere Spezieszuordnung vorzunehmen (Biermaier, 2013; Kluwe, 2006; Wang et al., 2015).

Zudem ist auch die Sequenzierung einzelner Genabschnitte nicht immer ausreichend oder aussagekräftig genug, um Gattung oder sogar Spezies zu identifizieren (Hibbett und Taylor, 2013).

Außerdem gibt es Hinweise, dass die Gattung *Stachybotrys* mehrere Cluster nah verwandter Spezies enthält, aber auch andere *Stachybotrys* spp. vorkommen, die sich deutlich voneinander unterscheiden (Wang et al., 2015). So gab es im ITS-1/4 Genabschnitt zwischen *Melanopsamma pomiformis* (ATCC 18873) und dem *S. chartarum* und *S. chlorohalonata*-Cluster nur 89 % Sequenzhomologien, während *S. complementi* (ATCC 20511) einen viel höheren Verwandtschaftsgrad (97 %) gegenüber diesen Spezies aufwies. Bei dieser *Stachybotrys*-Art handelt es sich laut Wang et al. (2015) um eine nicht valide Spezies, die aber bei der ATCC als Referenzstamm geführt wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie decken sich mit den Ergebnissen von Wang et al. (2015). Die Sequenzierungsergebnisse des ITS-Genabschnittes ergaben, dass es sich bei *S. complementi* um *S. microspora* handelt.

Wang et al. (2015) schlugen aufgrund der molekularbiologischen Charakteristika vor, Untergruppen innerhalb der Gattung *Stachybotrys* zu bilden. Dabei fassten sie mehrere Isolate anhand vorhandener Sequenzen u.a. aus der Onlinedatenbank MycoBank zu einzelnen Clustern wie z.B. *S. chartarum*, *S. chlorohalonata* und *S. complementi* (*S. microspora*, HGUP 0120) zusammen.

Eine Differenzierung der *S. chartarum* Chemotypen A und S ist bislang lediglich anhand des *tri5*-Genabschnittes möglich (Andersen et al., 2003). Der Unterschied zwischen den Chemotypen in diesem Sequenzabschnitt ist jedoch mit nur einem Basenaustausch als sehr gering anzusehen (vgl. Kap. 3.2.3.2). Es handelt sich dabei um eine stille Mutation in einem Genabschnitt, der für das Enzym Trichodiensynthase kodiert, das für die Bildung von Trichodien als ersten Schritt der Trichothecensynthese entscheidend ist (Kap. 2.3.2).

Semeiks et al. (2014) identifizierten den Genabschnitt, der für die Ausbildung des makrozyklischen Rings von Trichothecenen verantwortlich ist. Die Sequenzierung dieser Satratoxin Gencluster (SC1-3) würde im Hinblick auf die Bildung von makrozyklischen Trichothecenen eine genaue Differenzierung von *Stachybotrys*-Isolaten ermöglichen. Zudem könnte die Amplifikation dieses Genabschnittes mittels Realtime-PCR zu einer zuverlässigen Identifikation toxinbildender *Stachybotrys*-Stämme führen.

### 5.3 Differenzierung mittels MALDI-TOF MS

Frühere Arbeiten zeigten, dass filamentöse Pilze schwieriger mittels MALDI-TOF MS zu bestimmen sind als Bakterien und Hefen. Der Grund dafür sind dickere und stabiler aufgebaute Zellwände, die aufwendige Proteinextraktionsmethoden notwendig machen (Anonymous, 2014; Carlile et al., 2001; Clarka et al., 2013).

Vor allem filamentöse Schimmelpilze, die ein schwarzes Pigment bilden, führten in der Vergangenheit zu qualitativ minderwertigen Spektren, da das schwarze Pigment als Energiesuppressor wirkt und die Ionisierung der Proteine hemmt (Alshawa et al., 2012; Buskirk et al., 2011; Hettick et al., 2008a; Valentine et al., 2002). Dies ist bei *Stachybotrys* ebenfalls der Fall, da einige *Stachybotrys* spp. auf Festnährmedien schwarze Kolonien bilden (vgl. Kap. 4.1).

Bislang gelang es nur in einer Arbeit, die Gattung *Stachybotrys* mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie zu identifizieren, da die schwarzen Sporen eine Messung bislang unmöglich machten (Buskirk et al., 2011; Gruenwald et al., 2015). Gruenwald et al. (2015) lösten das Problem der schwarzen Sporen, indem sie im Anschluss an die „Formic Acid Extraction“ nach Bruker (Abbildung 52 im Anhang) 2,0 µl Matrix ( $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, (CHCA)) auf die Pilzsporen auftrugen.

Dadurch gewannen die Spektren zwar an Intensität, jedoch wurde eine Extraktion der ribosomalen Proteine nicht sicher gewährleistet. Da Sporen in der Regel im Rahmen der Intakt-Zell Methode zur Proteinextraktion herangezogen werden, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den generierten Spektren hauptsächlich um Zellwandproteine handelt.

Die Intakt-Zell Methode wurde immer wieder aufgrund der einfachen Probenvorbereitung angewandt (Chen und Chen, 2005; Fenselau und Demirev, 2001; Kemptner et al., 2009). Diese Methode konnte sich jedoch nicht durchsetzen, da sie nicht für alle Mikroorganismen eingesetzt werden konnte (Clarka et al., 2013; Hettick et al., 2008a, b). Außerdem liefern Sporen oftmals sehr unterschiedliche Spektren; je nach Alter kann es zu Ungenauigkeiten bei der Identifizierung kommen, da Sporen eine sehr große Diversität in ihrem Proteinspektrum aufweisen können (Janoschek, 2015). Um jedoch eine möglichst genaue und robuste Identifizierung der filamentösen Schimmelpilze zu gewährleisten, haben Schrodler et al. (2012) und Anonymous (2014) die Kultivierung von filamentösen Schimmelpilzen in Flüssignährmedien empfohlen.

Da filamentöse Schimmelpilze in Flüssignährmedien weder Sporen noch schwarzes Pigment entwickeln und ein einheitliches Wachstumsstadium aufweisen, können so spezifische und reproduzierbare Spektren generiert werden. Außerdem wird in Flüssignährmedien schneller Myzel (ca. 2 Tage) als auf einem Festnährmedium (ca. 7 Tage) gebildet.

Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Studie Flüssignährmedium verwendet, um eine möglichst robuste Proteinextraktionsmethode zu entwickeln.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass das Proteinextraktionsprotokoll von Bruker für filamentöse Pilze (Abbildung 53 im Anhang) in seiner ursprünglichen Art für die ribosomale Proteinextraktion von *Stachybotrys* spp. nicht ausreichend war, um qualitativ hochwertige Spektren zu erzeugen.

Es traten zu wenig Massen mit zudem schlechter Reproduzierbarkeit und einem zu niedrigem S/N-Verhältnis auf (vgl. Kap. 4.3), was vermutlich auf die eher schwer aufschließbaren Zellwände von Pilzen zurückzuführen ist. Daher wurde ein zusätzlicher mechanischer Aufschluss mit Glasperlen durchgeführt, was in der Molekularbiologie eine etablierte Methode für Zellen darstellt, die sich durch eine besonders stabile Zellwand auszeichnen (Carlile et al., 2001). Hettick et al. (2008b) beobachteten bereits, dass Spektren durch den zusätzlichen Einsatz von Glasperlen an Massen und an Intensität hinzugewinnen.

Wie in Abbildung 46 zu sehen ist, weisen Massenspektren von *Stachybotrys* vor allem im Bereich von m/z 2000 – 4000 Da ein sehr hohes Rauschen auf. Um diese unspezifischen Massensignale zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit ein Reinigungsschritt mittels DMSO (10 %) ergänzt. Diese niedermolekularen Massen führen zu einer Suppression der Ionisierungsenergie, wodurch auch die Intensität anderer Signale über den gesamten Massenbereich von m/z 2000 - 20000 Da abnimmt. Zudem wird die Detektionsleistung im Bereich von m/z 2000 - 4000 Da durch kleinere unspezifische Massen gemindert.

Mittels des optimierten Extraktionsprotokolls (vgl. Kap. 3.2.4.2) auf Basis des Protokolls für filamentöse Schimmelpilze in Kombination mit Glasperlen-Aufschluss und DMSO (10 %)-Waschschritt konnten massenreiche Referenzspektren (ca. 70 Massenpeaks, S/N  $\geq$  3) generiert werden.

Für alle als *S. chartarum* identifizierten Isolate (n=27) betrug der durchschnittliche Score Value 2,604 bei einer RSD von 2,3 %. Für *S. chlorohalonata*-Isolate (n=18) betrug dieser 2,380 mit einer RSD von 5,4 %, was auf eine weniger robuste Messbarkeit dieser Spezies im Vergleich mit *S. chartarum* hindeutet.

Generell sind diese Score Values und deren Reproduzierbarkeit als sehr gut einzustufen. In der einzigen Arbeit, in der *Stachybotrys* spp. und die Chemotypen von *S. chartarum* mittels MALDI-TOF MS - allerdings anhand der Sporenproteinprofile - identifiziert wurden (Gruenwald et al., 2015), schwankten die errechneten Score Values in einem weiten Bereich zwischen 1,691 und 2,441 (*S. chartarum*) und 1,955 und 2,348 (*S. chlorohalonata*), wobei keine Mittelwerte oder Standardabweichungen angegeben wurden, um die Robustheit der Methodik einschätzen zu können. Im Unterschied zu Gruenwald et al. (2015) konnte bei den

eigenen Untersuchungen mittels MALDI-TOF MS keine Differenzierung zwischen den *S. chartarum* Chemotypen A und S erzielt werden.

Trotz einer gegenüber Gruenwald et al. (2015) verbesserten Extraktionsmethode mit einer deutlich erhöhten Massen- und Intensitätsausbeute bei gleichzeitiger Verbesserung des S/N Verhältnisses war eine Differenzierung der Chemotypen mittels der Software Biotyper OC nicht möglich. Gruenwald et al. (2015) legten für die Differenzierung der Chemotypen sechs *S. chartarum* Chemotyp S und fünf *S. chartarum* Chemotyp A zu Grunde. Zusätzlich konnten die von Gruenwald et al. (2015) für die Chemotypen beschriebenen charakteristischen Massen gegenüber den 27 Isolaten dieser Studie nicht bestätigt werden.

Daher bleibt unklar, ob eine Unterscheidung von Chemotypen mittels MALDI-TOF MS ohne Weiteres zuverlässig möglich oder eine weitere Subspezifizierung notwendig ist. Weitere Studien können zudem klären, ob das entwickelte modifizierte Extraktionsprotokoll auch auf alle filamentösen Schimmelpilzen anwendbar ist und somit als Methode für die Erstellung von Datenbanken für die Identifizierung von Schimmelpilzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie geeignet ist.

#### **5.4 Nachweis makrozyklischer Trichothecene**

Bislang galt ausschließlich *S. chartarum* Chemotyp S als Bildner von makrozyklischen Trichothecenen, weshalb auch die *tri5*-Sequenz ein probates Mittel zur Identifikation der Gattung, Spezies und Chemotypen darstellte. Da auch *S. dichroa* in der Lage war, makrozyklische Trichothecene zu bilden (Kap. 4.4.1), müssen die in dieser Studie verwendeten *tri5*-Primer als nicht optimal zur Beurteilung des Bildungsvermögens von makrozyklischen Trichothecenen erachtet werden, da mittels dieses Primers der *tri5*-Genabschnitt bei *S. dichroa* nicht amplifiziert werden konnte.

Andere *Stachybotrys* spp. neben *S. chartarum* Chemotyp S sollten daher als Produzenten von makrozyklischen Trichothecenen nicht außer Acht gelassen werden.

Bei 19 Isolaten von *S. chartarum* Chemotyp S wurden mittels LC-MS/MS unterschiedliche Gehalte an makrozyklischen Trichothecenen detektiert.

Die Toxingesamtmenge je Isolat variierte von 395 bis 8305 ng Verrucarin A-Äquivalent/g Agar. Diese Berechnung ist aufgrund des Mangels an kommerziell verfügbaren Standardsubstanzen nur als semiquantitativ zu betrachten, dennoch aber geeignet, um die gebildeten Toxinmengen vergleichend zu beurteilen. Auffällig war diesbezüglich, dass bei

allen untersuchten Isolaten Roridin E durchwegs den höchsten Anteil an der Gesamtsumme der jeweils gebildeten makrozyklischen Trichothecene (62 % +/- 12 %) hatte.

Bezogen auf die Menge scheinen außerdem besonders toxische und weniger toxische Isolate zu existieren (vgl. Kap. 4.4.2).

Allerdings ist fraglich, inwiefern die vorab diskutierten Einflüsse der Subkultivierung und dadurch verursachte Modifikationen sowie extrinsische Faktoren derartige Schlüsse zulassen.

Weshalb bei einem Isolat wie bereits bei Biermaier et al. (2015) beschrieben kein Satratoxin H detektiert werden konnte, dafür aber im Verhältnis zum Gesamtgehalt prozentual mehr Satratoxin F, konnte bisher nicht geklärt werden. Möglich wären auch hier eventuelle Mutationen, Gen-Inaktivierungen oder eventuell sogar das Vorliegen anderer Subspezies/Chemotypen.

Die Bildung von Roridin E wurde für *S. dichroa* (ATCC 18913) bereits von Andersen et al. (2002) beschrieben und konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Bildung von Verrucarin J nachgewiesen (Kap. 4.4.1). Nachdem selbst Roridin E bei diesem Isolat nur in sehr geringen Mengen detektiert werden konnte, könnten die anderen für *S. chartarum* Chemotyp S typischen makrozyklischen Trichothecene zwar produziert worden sein, jedoch nicht in nachweisbaren Mengen. Das Vorliegen lediglich geringer Mengen könnte auch durch eine zu kurze Wachstumszeit verursacht worden sein. Allerdings wurden in vorherigen Untersuchungen 21 Tage als optimal für eine Toxinproduktion zumindest für *S. chartarum* ermittelt (Höhne, 2008).

Für die *Stachybotrys*-Spezies *S. albipes*, *S. kampalensis* und *S. microspora* wurde eine Bildung makrozyklischer Trichothecene in vorherigen Studien beschrieben (El-Kady und Moubasher, 1982; El-Maghraby et al., 1991), was in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Andersen et al. (2002) nicht bestätigt werden konnte.

Bei vier Isolaten, die gemäß der Sequenzierungsergebnisse als *S. chartarum* Chemotyp S identifiziert wurden, wurden mittels der LC-MS/MS Analyse keine makrozyklischen Trichothecene nachgewiesen.

Bei anderen *Mycota* wurde bereits beschrieben, dass es aufgrund von UV-Strahlen, epigenetischen Einflüssen oder der wiederholten Subkultivierung zu einem Verlust der

Fähigkeit zur Bildung von Mykotoxinen kommen kann (Andersen et al., 2002; Bu`Lock et al., 1986; Horn und Dorner, 2001; Woloshuk und Shim, 2013).

UV-Strahlung konnte in dieser Studie als möglicher Grund eliminiert werden. Obwohl sich die Anzucht auf eine Subkultivierung beschränkte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es dadurch bereits zum Verlust der Fähigkeit zur Mykotoxinbildung gekommen ist.

Bilgrami et al. (1988) führten dieses Phänomen auf das Fehlen widriger Wachstumsbedingungen und fehlende Konkurrenz um die Nährstoffe bei Anzucht in Reinkultur zurück. Solche optimalen Wachstumsbedingungen bewirkten einer Studie von Horn und Dorner (2001) zufolge den Verlust der Fähigkeiten zur Bildung von Mykotoxinen bei *Aspergillus flavus* Isolaten. Andere Studien konnten ebenfalls bestätigen, dass infolge eines wiederholten Subkultivierens von filamentösen Schimmelpilzen keine Mykotoxine mehr gebildet werden (Dingley et al., 1962; Ducan und Bu`Lock, 1985; Kobel, 1969; Kobel und Sanglier, 1978).

In allen Studien kam es gleichzeitig zu einer Veränderung der Koloniemorphologie. Ob ein direkter oder indirekter Zusammenhang zwischen Toxinbildung und Phänotyp besteht, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Die in der vorliegenden Studie untersuchten *S. chartarum* Chemotyp S Isolate aus Gewürzen zeigten zum Teil ein verändertes Erscheinungsbild im Vergleich zu ihrer ursprünglichen Beschreibung in der Studie von Biermaier et al. (2015), keines der Isolate (n=15) verlor jedoch sein Toxinbildungsvermögen.

Weiterhin wurde auf molekularbiologischer Ebene beschrieben, dass das inverted repeat transgene (IRT) für eine RNA-Stilllegung verantwortlich sein soll und dies zu einer Inaktivierung der Fähigkeit zur Toxinbildung führen kann (McDonald et al., 2005).

Transgene Modifikationen sind ein weiterer möglicher Grund für die Einstellung der Mykotoxinbildung, was bereits für *Aspergillus* spp. und *Fusarium* spp. beschrieben wurde (Woloshuk und Shim, 2013).

Die Ergebnisse aller Charakterisierungsmethoden stimmten miteinander überein, lediglich der fehlende Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen bei vier Isolaten von *S. chartarum* Chemotyp S und der Nachweis von weiteren makrozyklischen Trichothecenen bei *S. dichroa* zeigten, dass allein der Nachweis der An- bzw. Abwesenheit dieser Toxine keinen Rückschluss auf die *Stachybotrys* sp. zulässt.





## 6 Zusammenfassung

*Stachybotrys* ist ein zelluloseliebender Schwärzepilz, der die Fähigkeit besitzt, hochzytotoxische Mykotoxine zu bilden, die eine Gefährdung für Menschen und Tiere darstellen können. Aktuell sind 78 *Stachybotrys* spp. beschrieben und nach den Vorgaben des Internationalen Botanischen Kongresses (IBC) 2011 anerkannt, von denen bislang lediglich 22 Spezies anhand ihrer Nukleotidsequenzen in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) erfasst sind. Hinzu kommt, dass oftmals die Nomenklatur nicht eindeutig geklärt ist und einige Spezies mit bis zu 23 Synonymen aufgeführt werden.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, 45 ausgewählte Isolate aus Umwelt-, Futtermittel- und Lebensmittelproben (je n=15) und 15 Referenzstämme stellvertretend für die Gattung *Stachybotrys* erstmals mittels phänotypischer, genotypischer und massenspektrometrischer Verfahren gleichzeitig zu charakterisieren. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Etablierung eines optimierten Protokolls zur Extraktion ribosomaler Proteine, anhand derer *Stachybotrys*-Spezies mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie differenziert und identifiziert werden sollten. Im Zuge dessen wurden Referenzspektren für insgesamt acht *Stachybotrys* spp. erstellt.

Die Ergebnisse der Phänotypisierung zeigen, dass eine Identifikation auf dieser Ebene nur unzureichend möglich ist und diese vornehmlich nur zur Gattungsidentifikation geeignet ist. Mittels der ribosomalen Proteomanalyse (MALDI-TOF MS) konnten von insgesamt 45 untersuchten *Stachybotrys* Isolaten aus Umwelt-, Futtermittel- und Lebensmittelproben (je n=15) 27 *S. chartarum* und 18 *S. chlorohalonata* Isolate erfolgreich identifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden anhand der Genotypisierung auf Gattungs- und Speziesebene eindeutig bestätigt. Damit erwies sich die MALDI-TOF MS gegenüber der molekularbiologischen Identifikation als eine schnelle und zuverlässige Alternative.

Bei 19 der 23 *S. chartarum* Chemotyp S Isolate wurden makrozyklische Trichothecene durch LC-MS/MS Analysen nachgewiesen. Für den Referenzstamm *S. dichroa* (ATCC 18913) ist neben Roridin E erstmals die Bildung von Verrucarin J nachgewiesen worden.

Die gleichzeitige Charakterisierung aus einer Urkultur, anhand phänotypischer, molekularbiologischer und massenspektrometrischer Verfahren ermöglichte erstmals die Erstellung eines umfassenden Profils von *Stachybotrys* spp..

## 7 Summary

*Stachybotrys* is a black mould that can be found worldwide on cellulose-rich materials. Due to its ability to produce highly cytotoxic mycotoxins, this genus represents a potential hazard for human and animal health. Seventy-eight *Stachybotrys* spp. are currently recognised according to the rules of the International Botanic Congress (IBC). Only 22 out of 78 are included in the genome database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The taxonomy remains rather unclear particularly with regard to a large number of synonyms e.g. *S. chartarum* with up to 23 synonyms.

The aim of this study was to contribute to a more comprehensive profile of the genus *Stachybotrys* by morphology, genome, proteome as well as metabolome based techniques. For this purpose, 45 selected isolates of *Stachybotrys* originating from three different habitats (environmental, feed and food samples, each n=15) and 15 reference strains of the American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel) and the Technical University of Denmark (DTU, IBT, Lyngby) were examined in this study. Furthermore, the optimisation of an extraction protocol for fungal ribosomal proteins was a key challenge for subsequent MALDI-TOF mass spectrometry measurements.

The results of the morphological description demonstrated that it was rather impossible to reliably identify *Stachybotrys* on a species level, however, this method allowed a genus identification.

The optimised protein extraction protocol enabled the generation of MALDI-TOF MS reference spectra for eight *Stachybotrys* species which were successfully applied for the identification of the isolates: the MALDI-TOF mass spectrometry analyses identified 27 *S. chartarum* and 18 *S. chlorohalonata* isolates which exactly matched the results of the genome-based identification. In addition, MALDI-TOF MS proved to be a fast and reliable alternative to identification by nucleotide sequencing.

Nineteen isolates of *S. chartarum* chemotype S (n=23) produced macrocyclic trichothecenes according to LC-MS/MS analyses. Furthermore, roridin E and for the first time also verrucarins J were detected as metabolites of the reference strain *S. dichroa*.

The simultaneous application of morphology, genome as well as mass spectrometry based methods first allowed a comprehensive characterization of the 45 *Stachybotrys* isolates and 15 reference strains.

## 8 Literaturverzeichnis

- ABDEL-HAFEZ, S.I.I., EL-SAID & NAGGAR, S. M. (2006) Morphological, reproductive and mycobiota characters of three wild medicinal plants inhabiting Western Mediterranean coastal land, Egypt. Feddes Repert 117, 240-249
- ABDEL-HAFEZ, S. I. I. & EL-SAID, A. H. M. (1997) Effect of garlic, onion and sodium benzoate on the mycoflora of pepper, cinnamon and rosemary in Egypt. International Biodeterioration & Biodegradation 39, 67-77
- ACKERMANN, B. L., HALE, J. E. & DUFFIN, K. L. (2006) The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement. Curr Drug Metab 7, 525-539
- ADAMS, T. H., WIESER, J. W. & YU, J.-H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61, 35-54
- ADITAMA, T. Y. & ANDARINI, S. L. (2002) Sick building syndrome. Medical Journal of Indonesia 11, 124-131
- AGARWAL, G. P. & SHARMA, N. D. (1974). Journal of indian botanical society nach Crous et al. 2004
- AINLEY, R. & SMITH, B. (1965) Fungal flora of the conjunctival sac in healthy and diseased eyes. Br J Ophthalmol 49, 505-515
- ALANIO, A., BERETTI, J. L., DAUPHIN, B., MELLADO, E., QUESNE, G., LACROIX, C., AMARA, A., BERCHE, P., NASSIF, X. & BOUGNOUX, M. E. (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. Clin Microbiol Infect 17, 750-755
- ALSHAWA, K., BERETTI, J.-L., LACROIX, C., FEUILHADE, M., DAUPHIN, B., QUESNE, G., HASSOUNI, N., NASSIF, X. & BOUGNOUX, M.-E. (2012) Successful identification of clinical dermatophyte and *Neoscytalidium* species by matrix- assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology 50, 2277-2281
- ANDERSEN, B., NIELSEN, K. F. & JARVIS, B. B. (2002) Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. Mycologia 94, 392-403
- ANDERSEN, B., NIELSEN, K. F., THRANE, U., SZARO, T., TAYLOR, J. W. & JARVIS, B. B. (2003) Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. Mycologia 95, 1227-1258
- ANDERSSON, M. A., NIKULIN, M., KOLJALG, U., ANDERSSON, M. C., RAINEY, F., REIJULA, K., HINTIKKA, E. L. & SALKINOJA-SALONEN, M. (1997) Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. Appl Environ Microbiol 63, 387-393
- ANONYMOUS (2012) MALDI Biotyper 3.1 User Manual. Bremen, Bruker Daltoniks GmbH

ANONYMOUS (2014) MALDI Biotyper Protocol Guide. Bremen, Bruker Daltoniks GmbH

ASKALONOV, S. P. (1949) Pathogenicity of *Stachybotrys alternans* fungus for cattle and laboratory animals. In A new fungal disease of horses and humans. *Stachybotryotoxicosis*. 37-47 nach Forgacs (1972)

AYERST, G. (1969) The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research* 5, 127-141

BARTHEL, J., GOTTSCHALK, C., RAPP, M., BERGER, M., BAUER, J. & MEYER, K. (2012) Occurrence of type A, B and D trichothecenes in barley and barley products from the Bavarian market. *Mycotoxin Res* 28, 97-106

BATA, A., HARRACH, B., UJSZASZI, K., KIS-TAMAS, A. & LASZTITY, R. (1985) Macrocyclic trichothecene toxins produced by *Stachybotrys atra* strains isolated in Middle Europe. *Appl Environ Microbiol* 49, 678-681

BATISTA, A. C., BEZERRA, J. L. & PERES, G. E. P. (1960) Singera n. gen. e outros fungos Moniliales. *Publicacoes do Instituto de Micologia da Universidade do Recife* 298, 1-33

BEAVIS, R. C. & CHAIT, B. T. (1989) Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 3, 432-435

BENNETT, J. W. & KLICH, M. (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16, 497-516

BIERMAIER, B. (2013) Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Stachybotrys chartarum* in getrockneten Kräutern. Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit. München, Ludwig-Maximilians-Universität

BIERMAIER, B., GOTTSCHALK, C., SCHWAIGER, K. & GAREIS, M. (2015) Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. *Mycotoxin Res* 31, 23-32

BILGRAMI, K. S., SINHA, S. P. & JESWAL, P. (1988) Loss of toxigenicity of *Aspergillus flavus* strains during subculturing - a genetic interpretation. *Current Science* 57, 551-552

BISBY, G. R. (1943) *Stachybotrys*. *Transactions of the British Mycological Society* 26, 133-143

BLACK, J. A., DEAN, T. R., FOARDE, K. & MENETREZ, M. (2008) Detection of *Stachybotrys chartarum* using rRNA, *tri5*, and beta-tubulin primers and determining their relative copy number by real-time PCR. *Mycol Res* 112, 845-851

BLACK, J. A. & FOARDE, K. K. (2007) Comparison of four different methods for extraction of *Stachybotrys chartarum* spore DNA and verification by real-time PCR. *J Microbiol Methods* 70, 75-81

BLOOM, E., BAL, K., NYMAN, E. & LARSSON, L. (2007) Optimizing a GC-MS method for screening of *Stachybotrys* mycotoxins in indoor environments. *J Environ Monit* 9, 151-156

BLOOM, E., GRIMSLEY, L. F., PEHRSON, C., LEWIS, J. & LARSSON, L. (2009) Molds and mycotoxins in dust from water-damaged homes in New Orleans after hurricane Katrina. *Indoor Air* 19, 153-158

- BOOTH, C. (1957) Studies of Pyrenomycetes 11. *Melanopsamma pomiformis* and its *Stachybotrys* conidia. Mycological Papers 68, 1-27
- BRASEL, T. L., MARTIN, J. M., CARRIKER, C. G., WILSON, S. C. & STRAUS, D. C. (2005) Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. Appl Environ Microbiol 71, 7376-7388
- BU`LOCK, J. D., MOONEY, J. P. & WRIGHT, C. E. (1986) Regulation of mycotoxin production by *Fusarium graminearum*: Complementation effects between two mutant types. Biotechnology Letters 8, 323-326
- BURCHARD, G. (1930) Phytopath. Z. nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014)
- BUSKIRK, A. D., HETTICK, J. M., CHIPINDA, I., LAW, B. F., SIEGEL, P. D., SLAVEN, J. E., GREEN, B. J. & BEEZHOLD, D. H. (2011) Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. Anal Biochem 411, 122-128
- BUSTON, H. W. & BASU, S. N. (1947) Some factors affecting the growth and sporulation of *Chaetomium globosum* and *Memnoniella echinata*. Journal of General Microbiology 2, 167-172
- CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C. & GOODAY, G. W. (2001) The Fungi. London. Great Britain, Elsevier
- CASSAGNE, C., RANQUE, S., NORMAND, A. C., FOURQUET, P., THIEBAULT, S., PLANARD, C., HENDRICKX, M. & PIARROUX, R. (2011) Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. PLoS ONE 6, e28425
- CASTLEBURY, L. A., ROSSMAN, A. Y., SUNG, G. H., HYTEN, A. S. & SPATAFORA, J. W. (2004) Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. Mycol Res 108, 864-872
- CATANIA, M., HLADKI, A., SCHIAVONE, M. M. & RAMALLO, J. C. (1998) Contribution to the study of the microflora in *Nicotiana tabacum* L. var. Burley. Lilloa 39, 109-113
- CHEN, H. Y. & CHEN, Y. C. (2005) Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 19, 3564-3568
- CIFERRI, R. (1922) Notae mycologicae et phytopathologicae. Annales Mycologici 20, 34-53
- CLARKA, A. E., KALETAB, E. J., ARORAC, A. & WOLK, D. M. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clinical Microbiology Reviews 27, 547-603
- COLE, R. J., JARVIS, B. B. & SCHWEIKERT, M. A. (2003) Handbook of secondary fungal metabolites. London, Academic Press

CORDA, A. C. J. (1837) *Icones fungorum hucusque cognitorum*. New York, Wheldon & Wesley, LTD and Hafner Publishing Co. Codidote, Herts.

COTTER, R. J. (1997) *Time-of-flight mass spectrometry: instrumentation and applications in biological research*. Washington, DC, American Chemical Society

CRANER, J. (1999) Building-related illness in occupants of mold-contaminated houses: a case series. In *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control*. Ed E. JOHANNING. New York, Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany New York. 146-157

CROFT, W. A., JARVIS, B. B. & YATAWARA, C. S. (1986) Airborne outbreak of Trichotecene toxicosis. *Atmospheric Environment* 20, 549-552

CROUS, P. W., GAMS, W., STALPERS, J. A., ROBERT, V. & STEGEHUIS, G. (2004) MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Stud Mycol* 50, 19-22

CROUS, P. W. S., R.G.; QUAEDVLIEG, W.; VAN DER BANK, M.; ZHANG, Y.; SUMMERELL, B.A.; GUARRO, J.; WINGFIELD, M.J.; WOOD, A.R.; ALFENAS, A.C.; BRAUN, U.; CANO-LIRA, J.F.; GARCÍA, D.; MARIN-FELIX, Y.; ALVARADO, P.; ANDRADE, J.P.; ARMENGOL, J.; ASSEFA, A.; DEN BREEËN, A.; CAMELE, I.; CHEEWANGKON, R.; DE SOUZA, J.T.; DUONG, T.A.; ESTEVE-RAVENTÓS, F.; FOURNIER, J.; FRISULLO, S.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; GARDIENNET, A.; GENÉ, J.; HERNÁNDEZ-RESTREPO, M.; HIROOKA, Y.; HOSPENTHAL, D.R.; KING, A.; LECHAT, C.; LOMBARD, L.; MANG, S.M.; MARBACH, P.A.S.; MARINCOWITZ, S.; MARIN-FELIX, Y.; MONTAÑO-MATA, N.J.; MORENO, G.; PEREZ, C.A.; PÉREZ SIERRA, A.M.; ROBERTSON, J.L.; ROUX, J.; RUBIO, E.; SCHUMACHER, R.K.; STCHIGEL, A.M.; SUTTON, D.A.; TAN, Y.P.; THOMPSON, E.H.; VANDERLINDE, E.; WALKER, A.K.; WALKER, D.M.; WICKES, B.L.; WONG, P.T.W.; GROENEWALD, J.Z. (2014) Fungal Planet description sheets: 214-280. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 32, 184-306

CRUSE, M., TELERANT, R., GALLAGHER, T., LEE, T. & TAYLOR, J. W. (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94, 814-822

CRUZ-PEREZ, P., BUTTNER, M. P. & STETZENBACH, L. D. (2001) Specific detection of *Stachybotrys chartarum* in pure culture using quantitative polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 15, 129-138

DANKÓ, G. (1975) Stachybotryotoxicosis and immunosuppression. *International Journal of Environmental Studies* 8, 209-211

DE CAROLIS, E., POSTERARO, B., LASS-FLORL, C., VELLA, A., FLORIO, A. R., TORELLI, R., GIRMENIA, C., COLOZZA, C., TORTORANO, A. M., SANGUINETTI, M. & FADDA, G. (2012) Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 18, 475-484

DE RESPINIS, S., VOGEL, G., BENAGLI, C., TONOLLA, M., PETRINI, O. & SAMUELS, G. J. (2009) MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress* 9, 79-100

- DE SILVA, L. B., HERATH, W. H. M. W., GUNAWARDENA, D. S. S., WIJESUNDERA, R. L. C., MEDIS, S. A., CHOUDHARY, M. I. & CLARDY, J. (1995) Bisbynin, a novel secondary metabolite from the fungus *Stachybotrys bisbyi* (Srinivasan) Barron. *Tetrahedron Letters* 36, 1997-2000
- DEARBORN, D. G., YIKE, I., SORENSON, W. G., MILLER, M. J. & ETZEL, R. A. (1999) Overview of investigations into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. *Environmental Health Perspectives* 107, 495-499
- DEARBORN, D. G., SMITH, P. G., DAHMS, B. B., ALLAN, T. M., SORENSON, W. G., MONTANA, E. & ETZEL, R. A. (2002) Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. *Pediatrics* 110, 627-637
- DEIGHTON, F. C. (1960) African fungi I. *Mycological Papers* 78, 1-43
- DEL CHIERICO, F., MASOTTI, A., ONORI, M., FISCARELLI, E., MANCINELLI, L., RICCIOTTI, G., ALGHISI, F., DIMIZIANI, L., MANETTI, C., URBANI, A., MURACA, M. & PUTIGNANI, L. (2012) MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. *J Proteomics* 75, 3314-3330
- DILL, I., TRAUTMANN, C. & SZEWZYK, R. (1997) Mass development of *Stachybotrys chartarum* on compostable plant pots made from recycled paper. *Mycoses* 40, 110-114
- DINGLEY, J. M., DONE, J., TAYLOR, A. & RUSSELL, D. W. (1962) The production of sporidesmin and sporidesmolides by wild isolates of *Pithomyces chartarum* in surface and in submerged culture. *Journal of General Microbiology* 29, 127-135
- DOMSCH, K. H. & GAMS, W. (1970) *Fungi from agricultural soils*. nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014)
- DOMSCH, K. H., GAMS, W. & ANDERSON, T.-H. (1980) *Compendium of Soil Fungi*. London nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014)
- DORAI, M. & VITTAL, B. P. R. (1986) A New *Stachybotrys* from Eucalyptus Litter. *Transactions of the British Mycological Society* 87, 642-644
- DROBOTKO, V. G. (1945) Stachybotryotoxicosis. A new disease of horses and humans. *Am. Rev. Soviet Med.* 2, 238-242 nach Forgacs (1972)
- DROBOTKO, V. G., MARUSHENKO, P. E., AIZEMAN, B. E., KOLESNIK, N. G., IATEL, P. D. & MELNICHENKO, V. D. (1946). *Vrachebnoe Delo* 26
- DUCAN, J. S. & BU`LOCK, J. D. (1985) Degeneration of zearalenone production in *Fusarium graminearum*. *Experimental Mycology* 9, 133-140
- DWIVEDI, R. S. & SINGH, B. P. (1969) *Fungi from agricultural soils*. Proc. 56th Indian Sci. Congr. nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014)
- EL-KADY, I. A., ABDEL-HAFEZ, S. I. I. & MOUBASHER, M. H. (1981) Survey on the cellulose-decomposing fungi of wheat straw in Egypt. *Mycopathologia* 76, 59-64
- EL-KADY, I. A. & MOUBASHER, M. H. (1982) Toxigenicity and toxins of *Stachybotrys* isolates from wheat straw samples in Egypt. *Experimental Mycology* 6, 25-30



- EL-MAGHRABY, O. M., BEAN, G. A., JARVIS, B. B. & ABOUL-NASR, M. B. (1991) Macrocyclic trichothecenes produced by *Stachybotrys* isolated from Egypt and eastern Europe. *Mycopathologia* 113, 109-115
- ELLIS, M. B. (1967) Dematiaceous hyphomycetes. *Mycological Papers* 111, 1-46 nach Crous et al. (2004)
- ELLIS, M. B. (1971) Dematiaceous hyphomycetes. *Mycological Papers* 125, 1-30 nach Crous et al. (2004)
- ELLIS, M. B. (1976) more dematiaceous hyphomycetes, 1-507 nach Crous et al. (2004)
- ENGELHART, S., BURGHARDT, H., NEUMANN, R., EWERS, U., EXNER, M. & KRAMER, M. H. (1999) Sick building syndrome in an office building formerly used by a pharmaceutical company: a case study. *Indoor Air* 9, 139-143
- ENGVALL, K., NORRBY, C. & NORBACK, D. (2001) Sick building syndrome in relation to building dampness in multi-family residential buildings in Stockholm. *Int Arch Occup Environ Health* 74, 270-278
- ERHARD, M., HIPLER, U. C., BURMESTER, A., BRAKHAGE, A. A. & WOSTEMEYER, J. (2008) Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp Dermatol* 17, 356-361
- ETZEL, R., MONTANA, E., SORENSON, W. G., KULLMAN, G., MILLER, J. D., JARVIS, B. & DEARBORN, D. G. (1996) Pulmonary hemosiderosis associated with exposure to *Stachybotrys atra*: T 78. *Epidemiology* 7, S38
- ETZEL, R. A., MONTANA, E., SORENSON, W. G., KULLMAN, G. J., ALLAN, T. M., DEARBORN, D. G., OLSON, D. R., JARVIS, B. B. & MILLER, J. D. (1998) Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch Pediatr Adolesc Med* 152, 757-762
- EUROPÄISCHE-KOMMISSION (2002) Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen.
- FARR, D. F. & ROSSMANN, A.Y. (2014) Fungal Database, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabase>. Accessed 29.07.2014
- FEINBERG, B. & MCLAUGHLIN, C. S. (1989) Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. CRC Press, Boca Raton, Florida
- FENSELAU, C. & DEMIREV, P. A. (2001) Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 20, 157-171
- FERRARIS, T. (1909) Osservazioni micologiche. *Annales Mycologici* 7, 273-286

- FLEMING, A. (1929) On the antibacterial action of culture of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology 10, 226-236
- FORGACS, J. (1972) Stachybotryotoxicosis. In Fungal Toxins. Eds A. KADIS & A. J. L., CIEGLER, New York, United States of America, Academic Press, 95 - 128
- FORGACS, J., CARLL, W. T., HERRING, A. S. & HINSHAW, W. R. (1958) Toxicity of *Stachybotrys atra* for animals. Trans N Y Acad Sci 20, 787-808
- FORTUSKNY, V. A., GOVROV, A. M., TEBYBENKO, I. Z., BIOCHENKO, A. S. & KALITENKO, E. T. (1959). Veterinariya 36 nach Forgacs (1972)
- FRAZER, S., MAGAN, N. & ALDRED, D. (2011) The influence of water activity and temperature on germination, growth and sporulation of *Stachybotrys chartarum* strains. Mycopathologia 172, 17-23
- FUNG, F., CLARK, R. & WILLIAMS, S. (1998) *Stachybotrys*, a mycotoxin-producing fungus of increasing toxicologic importance. J Toxicol Clin Toxicol 36, 79-86
- GALLOWAY, L. D. (1933) Note on an unusual mould fungus. Transactions of the British Mycological Society 18, 163-166
- GAREIS, M. (1995) Cytotoxicity testing of samples originating from problem buildings. In Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments. Eds E. JOHANNING & C. S. YANG. Saratoga Springs, New York, Eastern New York Occupational Health Program. 139-144
- GAREIS, M. (2006) Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1, 354-363
- GAREIS, M. (2014) Phänotypisierung von *Stachybotrys* spp. Persönliche Mitteilung
- GAREIS, M. & GOTTSCHALK, C. (2014) *Stachybotrys* spp. and the guttation phenomenon. Mycotoxin Research 30, 151-169
- GEDEK, B. (1980) Kompendium der medizinischen Mykologie, Verlag Paul Parey, Singhofen
- GORIS, J. (2014) Bionumerics Basic Training. Inhalte des Trainings. Persönliche Mitteilung. Gent, Belgium, Applied Maths NV
- GOTTSCHALK, C. (2009) LC-MS/MS-Nachweismethoden für Typ A, B und D Trichothecene in der Lebensmittel- und Umweltanalytik. Dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Weihenstephan, Technische Universität München
- GOTTSCHALK, C., BAUER, J. & MEYER, K. (2006) Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. Mycotoxin Res 22, 189-192
- GOTTSCHALK, C., BAUER, J. & MEYER, K. (2008) Detection of satratoxin G and H in indoor air from a water-damaged building. Mycopathologia 166, 103-107

- GOTTSCHALK, C., BARTHEL, J., ENGELHARDT, G., BAUER, J. & MEYER, K. (2009) Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives & Contaminants: Part A* 26, 1273-1289
- GRANT, C., HUNTER, C. A., FLANNIGAN, B. & BRAVERY, A. F. (1989) The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *International Biodeterioration* 25, 259-284
- GRAVESEN, S., NIELSEN, P. A., IVERSEN, R. & NIELSEN, K. F. (1999) Microfungal contamination of damp buildings-examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 3, 505-508
- GROVE, W. B. (1886) New or noteworthy fungi. *Journal of Botany British and Foreign* 24, 197-207
- GRUENWALD, M., RABENSTEIN, A., REMESCH, M. & KUEVER, J. (2015) MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting: A diagnostic tool to differentiate dematiaceous fungi *Stachybotrys chartarum* and *Stachybotrys chlorohalonata*. *Journal of Microbiological Methods* 115, 83-88
- HANELT, M., GAREIS, M. & KOLLARCZIK, B. (1994) Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* 128, 167-174
- HANSFORD, C. G. (1943) Contributions towards the fungus flora of Uganda. V. Fungi Imperfecti. *Proceedings of the Linnean Society of London* 155, 34-67
- HARRACH, B., BATA, A., BAJMOCY, E. & BENKO, M. (1983) Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis. *Appl Environ Microbiol* 45, 1419-1422
- HARRACH, B., BATA, A., SÁNDOR, G. & VÁNYI, A. (1987) Isolation of macrocyclic and non-makrocyclic trichothecenes (*Stachybotrys* and *Fusarium* toxins) from the environment of 200 sport horses. *Mycotoxin Research* 3, 65-68
- HAUGLAND, R. A. & HECKMAN, J. L. (1998) Identification of putative sequence specific PCR primers for detection of the toxigenic fungal species *Stachybotrys chartarum*. *Mol Cell Probes* 12, 387-396
- HAUGLAND, R. A., VESPER, S. J. & HARMON, S. M. (2001) Phylogenetic relationships of *Memnoniella* and *Stachybotrys* species and evaluation of morphological features for *Memnoniella* species identification. *Mycologia* 93, 54-65

HAWKSWORTH, D. L., CROUS, P. W., REDHEAD, S. A., REYNOLDS, D. R., SAMSON, R. A., SEIFERT, K. A., TAYLOR, J. W., WINGFIELD, M. J., ABACI, O., AIME, C., ASAN, A., BAI, F. Y., DE BEER, Z. W., BEGEROW, D., BERIKTEN, D., BOEKHOUT, T., BUCHANAN, P. K., BURGESS, T., BUZINA, W., CAI, L., CANNON, P. F., CRANE, J. L., DAMM, U., DANIEL, H. M., VAN DIEPENINGEN, A. D., DRUZHININA, I., DYER, P. S., EBERHARDT, U., FELL, J. W., FRISVAD, J. C., GEISER, D. M., GEML, J., GLIENKE, C., GRAFENHAN, T., GROENEWALD, J. Z., GROENEWALD, M., DE GRUYTER, J., GUEHO-KELLERMANN, E., GUO, L. D., HIBBETT, D. S., HONG, S. B., DE HOOG, G. S., HOUBRAKEN, J., HUHDORF, S. M., HYDE, K. D., ISMAIL, A., JOHNSTON, P. R., KADAIFCILER, D. G., KIRK, P. M., KOLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LAGNEAU, P. E., LEVESQUE, C. A., LIU, X., LOMBARD, L., MEYER, W., MILLER, A., MINTER, D. W., NAJAFZADEH, M. J., NORVELL, L., OZERSKAYA, S. M., OZIC, R., PENNYCOOK, S. R., PETERSON, S. W., PETERSSON, O. V., QUAEDVLIET, W., ROBERT, V. A., RUIBAL, C., SCHNURER, J., SCHROERS, H. J., SHIVAS, R., SLIPPERS, B., SPIERENBURG, H., TAKASHIMA, M., TASKIN, E., THINES, M., THRANE, U., UZTAN, A. H., VAN RAAK, M., VARGA, J., VASCO, A., VERKLEY, G., VIDEIRA, S. I., DE VRIES, R. P., WEIR, B. S., YILMAZ, N., YURKOV, A. & ZHANG, N. (2011) The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2, 105-112

HERNANDEZ, F. & CANNON, M. (1982) Inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the 12,13-epoxytrichothecenes trichodermol, diacetoxyscirpenol and verrucarol. Reversibility of the effects. *J Antibiot (Tokyo)* 35, 875-881

HETTICK, J. M., GREEN, B. J., BUSKIRK, A. D., KASHON, M. L., SLAVEN, J. E., JANOTKA, E., BLACHERE, F. M., SCHMECHEL, D. & BEEZHOLD, D. H. (2008a) Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Anal Biochem* 380, 276-281

HETTICK, J. M., GREEN, B. J., BUSKIRK, A. D., KASHON, M. L., SLAVEN, J. E., JANOTKA, E., BLACHERE, F. M., SCHMECHEL, D. & BEEZHOLD, D. H. (2008b) Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22, 2555-2560

HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LUCKING, R., THORSTEN LUMBSCH, H., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y. C., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K. D., IRONSIDE, J. E., KOLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K. H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J. M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHUSSLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y. J. & ZHANG, N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 111, 509-547

HIBBETT, D. S. & TAYLOR, J. W. (2013) Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand. *Nature Review* 11, 129 - 133

- HINKLEY, S. F., JIANG, J., MAZZOLA, E. P. & JARVIS, B. B. (1999) Atranones: Novel diterpenoids from the toxigenic mold *Stachybotrys atra*. *Tetrahedron Letters* 40, 2725-2728
- HINKLEY, S. F., MAZZOLA, E. P., FETTINGER, J. C., LAM, Y. F. & JARVIS, B. B. (2000) Atranones A-G, from the toxigenic mold *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry* 55, 663-673
- HINKLEY, S. F., MOORE, J. A., SQUILLARI, J., TAK, H., OLESZEWSKI, R., MAZZOLA, E. P. & JARVIS, B. B. (2003) New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Magnetic Resonance in Chemistry* 41, 337-343
- HINTIKKA, E.-L. (1977) The genus *Stachybotrys*. In *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedia Handbook*. Eds T. D. WYLLIE & L. G. MOREHOUSE. New York, Basel, Marcel Dekker Inc. 91-98
- HINTIKKA, E. L. (1978) *Human Stachybotryotoxicosis*. New York, Marcel Dekker Inc. nach Johanning (1999)
- HODGSON, M. J., MOREY, P., LEUNG, W. Y., MORROW, L., JARVIS, B. B., ROBBINS, H., HALSEY, J. F. & STROEY, E. (1998) Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 40, 241-249 nach Johanning (1999)
- HÖHNE, M. (2008) Untersuchungen zur Mykotoxinbildung durch *Stachybotrys chartarum* Chemotyp S. Diplomarbeit. Fachhochschule Jena.
- HORKA, M., KUBESOVA, A., SALPLACHTA, J., ZAPLETALOVA, E., HORKY, J. & SLAIS, K. (2012) Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS-suitable tools for identification of filamentous fungi. *Anal Chim Acta* 716, 155-162
- HORN, B. W. & DORNER, J. W. (2001) Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. *Mycologia* 94, 741-751
- HUGHES, S. J. (1958) Revisiones Hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. *Canadian Journal of Botany* 36, 727-836
- HUGHES, S. J. (1952) Fungi from the Gold Coast. *Mycological Papers* 48, 1-91
- HUGHES, S. J. (1953) Conidiophores, conidia, and classification. *Can. J. Bot.* 31, 577-659
- HUNTER, C. A., GRANT, C., FLANNIGAN, B. & BRAVERY, A. F. (1988) Mould in buildings: the air spora of domestic dwellings. *International Biodeterioration* 24, 81-101
- ISLAM, Z., HARKEMA, J. R. & PESTKA, J. J. (2006) Satratoxin G from the black mold *Stachybotrys chartarum* evokes olfactory sensory neuron loss and inflammation in the murine nose and brain. *Environ Health Perspect* 114, 1099-1107
- ISMAILOV, I. A. & MOROSHKIN, B. F. (1962). *Veterinariya* 4 nach Forgacs (1972)
- JANOSCHEK, D. (2015) Flüssignährmedien, Proteinextraktion filamentöse Pilze. Persönliche Mitteilung. Bruker Daltoniks GmbH. Bremen

- JARMAI, K. (1929) Viskosusseptikaemien bei älteren Fohlen und erwachsenen Pferden. Dt. Tierärztl. Wschr. 33, 517-519 nach Kluwe (2006)
- JARVIS, B. B. (2003) *Stachybotrys chartarum*: a fungus for our time. *Phytochemistry* 64, 53-60
- JARVIS, B. B., EPPLEY, R. M. & MAZZOLA, E. P. (1983) Chemistry of trichothecenes - Chemistry and bioproduction of macrocyclic trichothecenes. In *Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Ed Y. UENO. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V. 20-38
- JARVIS, B. B., MIDIWO, J. O., BEAN, G. A., ABOUL-NASR, M. B. & BARROS, C. S. (1988) The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. *J Nat Prod* 51, 736-744
- JARVIS, B. B., SALEMME, J. & MORAIS, A. (1995) *Stachybotrys* toxins. 1. *Nat Toxins* 3, 10-16
- JARVIS, B. B., WANG, S. & AMMON, H. L. (1996) Trichoverroid Stereoisomers. *Journal of Natural Products* 59, 254-261
- JARVIS, B. B., ZHOU, Y., JIANG, J., WANG, S., SORENSON, W. G., HINTIKKA, E. L., NIKULIN, M., PARIKKA, P., ETZEL, R. A. & DEARBORN, D. G. (1996) Toxicogenic molds in water-damaged buildings: dechlorogriseofulvins from *Memnoniella echinata*. *J Nat Prod* 59, 553-554
- JASKOLLA, T. W., LEHMANN, W. D. & KARAS, M. (2008) 4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 12200-12205
- JENSEN, C. N. (1912) Fungous flora of the soil. *Bulletin of the Cornell University Agricultural Experimental Station* 315, 415-501
- JIANG, Y.-L. & ZHANG, T.-Y. (2009) Notes on soil dematiaceous hyphomycetes from Sichuan Province, China. *Mycosystema* 28, 644-647
- JIE, C.-Y., GENG, K., JIANG, Y.-L., XU, J.-J., HYDE, K. D., MCKENZIE, E. H. C., ZHANG, T.-Y., BAHKALI, A. H., LI, D.-W. & WANG, Y. (2012) *Stachybotrys* from soil in China, identified by morphology and molecular phylogeny. *Mycological Progress* 12, 693-698
- JOHANNING, E. (1994) Health problems related to fungal exposure - the example of toxigenic *Stachybotrys chartarum*. In *Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments*. Eds E. JOHANNING & C. S. YANG. Saratoga Springs, New York. pp 169-182
- JOHANNING, E. (1999) *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control*. New York, Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany New York
- JOHANNING, E., BIAGINI, R., HULL, D., 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, C. S., HINTIKKA, E. L., NIKULIN, M., JARVIS, B. B. & DIETRICH, R. (1998) Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*). *Mycotoxin Res* 14, 60-73

- JOHANNING, E. & LANDSBERGIS, P. (1999) Clinical findings related to indoor fungal exposure - review of clinic data of a specialty clinic. New York, Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany New York
- JOHANNING, E., LANDSBERGIS, P., GAREIS, M., YANG, C. S. & OLMSTED, E. (1999) Clinical experience and results of a Sentinel Health Investigation related to indoor fungal exposure. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 3, 489-494
- JOLLÈS, P. (1999) Chitin and chitinases. Basel [u.a.], Birkhäuser
- JONG, S. C. & DAVIS, E. E. (1976) Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture. *Mycotaxon* 3, 409-485
- KARANDIKAR, K. G., KULKARNI, S. M. & PATWARDHAN, P. G. (1992) Some new and interesting hyphomycetes from India. *Biovigyanam* 18, 78-81
- KARAS, M., BACHMANN, D., BAHR, U. & HILLENKAMP, F. (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78, 53-68
- KEMPTNER, J., MARCHETTI-DESCHMANN, M., MACH, R., DRUZHININA, I. S., KUBICEK, C. P. & ALLMAIER, G. (2009) Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23, 877-884
- KIRK, P. M., CANNON, P. F. & STALPERS, J. A. (2008) Dictionary of the Fungi. Amsterdam, Netherlands, CBS
- KLUWE, H. (2006) Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Stachybotrys* spp. in Heu- und Strohproben aus Pferdeställen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München
- KOBAYASI, Y. (1971) Mycological reports from New-Guinea an the Solomon Islands. *Bulletin of the National Science Museum Tokyo* 14, 367-551
- KOBEL, H. (1969) Degenerationsprobleme bei Produktionsstämmen von *Claviceps*. *Pathol Microbiol* 34, 249-251
- KOBEL, H. & SANGLIER, J. J. (1978) Formation of ergotoxine alkaloids by fermentation and attempts to control their biosynthesis. In *Antibiotics and other secondary metabolites: biosynthesis and production*. Eds R. HUTTER, T. LEISINGER, J. NEUSCH & W. WEHRLI. London, Academic Press. pp 233-242
- KONG, H.-Z. (1997) *Stachybotrys yunnanensis* sp. nov. and *Neosartorya delicata* sp. nov. isolated from Yunnan. *Mycotaxon* 62, 427-434
- KONG, J. H. & ZHANG, T. Y. (2007) Notes on soil dematiaceous hyphomycetes from Hexi Corridor, Gansu Province. *Mycosystema* 26, 196-201
- KORNEEV, N. E. (1948). *Veterinariya* 25 nach Forgacs (1972)

- KORPINEN, E.-L. & UOTI, J. (2009) Studies on *Stachybotrys alternans*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology 82B, 1-6
- KORPINEN, E.-L. & YLIMÄKI, A. (1972) Discovery of toxicogenic *Stachybotrys chartarum* strains in Finland. Experientia 28, 108-109
- KOSKINEN, O., HUSMAN, T., HYVARINEN, A., REPONEN, T. & NEVALAINEN, A. (1995) Respiratory symptoms and infections among children in a day-care center with mold problems. Indoor Air 5, 3-9
- KRIEK, N. P. J. & MARASAS, W. F. O. (1983) Field outbreak of ovine stachybotryotoxicosis in South Africa. In Thrichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Ed Y. UENO. Amsterdam, Elsevier Science Publisher B.V. pp 279-284 nach Kluwe (2006)
- KRZEMIENIEWSKA, H. & BADURA, L. (1954) A contribution to knowledge of the microorganisms from the litter and soil of the beech-wood. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 23, 727-776
- KUHN, D. M. & GHANNOUM, M. A. (2003) Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. Clin Microbiol Rev 16, 144-172
- KURMANOV, I. A. (1961). Veterinariya 38 nach Forgacs (1972)
- LANIER, C., ANDRE, V., SEGUIN, V., HEUTTE, N., EL KADDOUMI, A., BOUCHART, V., PICQUET, R. & GARON, D. (2012) Recurrence of *Stachybotrys chartarum* during mycological and toxicological study of bioaerosols collected in a dairy cattle shed. Ann Agric Environ Med 19, 61-67
- LAUNER, P., DRECHSLER, H. & SOWA, M. (1987) Stachybotryotoxicosis in a horse herd. Monatshefte für Veterinärmedizin 42, 593-594 nach Kluwe (2006)
- LAY, J. O., Jr. (2001) MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass Spectrom Rev 20, 172-194
- LE BARS, J. & LE BARS, P. (1991) Toxinogenesis and development conditions of *Stachybotrys atra* in France. Acta Veterinaria Scandinavia 87, 349-351
- LECHAT, C., HAIRAUD, M. & LESAGE-MEESSEN, L. (2013) *Stachybotrys oleronensis* Lechat, Hairaud & Lesage-Messen, sp. nov. Fungal Planet 31, 282-283
- LEFEBVRE, H. P., LE BARS, J., LEGRAND, C., LE BARS, P., DOSSIN, O., TOUTTAIN, P. L. & BRAUN, J. P. (1994) Three cases of equine stachybotryotoxikosis. Rev. Méd. Vet. 145, 267-269 nach Kluwe (2006)
- LEINO, M., MAKELA, M., REIJULA, K., HAAHTELA, T., MUSSALO-RAUHAMAA, H., TUOMI, T., HINTIKKA, E. L. & ALENIOUS, H. (2003) Intranasal exposure to a damp building mould, *Stachybotrys chartarum*, induces lung inflammation in mice by satratoxin-independent mechanisms. Clin Exp Allergy 33, 1603-1610
- LEVENBERG, I. G., IVANTSOV, L. I. & PROSTAKOV, M. P. (1961). Veterinariya 38 nach Forgacs (1972)



- LI, C. S., HSU, C. W. & TAI, M. L. (1997) Indoor pollution and sick building syndromes among workers in day-care centers. *Arch Environ Health* 52, 200-207
- LI, D. W. (2007) *Stachybotrys eucylindrospora*, sp. nov. resulting from a re-examination of *Stachybotrys cylindrospora*. *Mycologia* 99, 332-339
- LI, D. W. (2011) *Stachybotrys thaxteri* sp. nov. and the nomenclatural status of three *Stachybotrys* species. *Mycotaxon* 115, 239-250
- LI, Q. R. & JIANG, Y. L. (2011) *Stachybotrys subreniformis*, new from soil in China. *Mycotaxon* 115, 171-173
- LI, S. & HARTMAN, G. L. (2000) First report of *Stachybotrys chartarum* causing soybean root rot. *Plant Disease* 84, 100-100
- LI, S., HARTMAN, G. L., JARVIS, B. B. & TAK, H. (2002) A *Stachybotrys chartarum* isolate from soybean. *Mycopathologia* 154, 41-49
- LI, Y., WU, C., LIU, D., PROKSCH, P., GUO, P. & LIN, W. (2014) Chartarlactams A-P, phenylspirodrimanans from the sponge-associated fungus *Stachybotrys chartarum* with antihyperlipidemic activities. *J Nat Prod* 77, 138-147
- LICHTENSTEIN, J. H., MOLINA, R. M., DONAGHEY, T. C., AMUZIE, C. J., PESTKA, J. J., COULL, B. A. & BRAIN, J. D. (2010) Pulmonary responses to *Stachybotrys chartarum* and its toxins: mouse strain affects clearance and macrophage cytotoxicity. *Toxicol Sci* 116, 113-121
- LÖFFLER, G. (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg, Springer
- LORENZ, W., BUHRMANN, C., MOBASHERI, A., LUEDERS, C. & SHAKIBAEI, M. (2013) Bacterial lipopolysaccharides form procollagen-endotoxin complexes that trigger cartilage inflammation and degeneration: implications for the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 15, R111
- LOTTSPEICH, F., ENGELS, J. W. & SOLODKOFF, Z. L. (2012) *Bioanalytik*. Darmstadt, Spektrum Akademischer Verlag
- MAGAN, N., ALDRED, D., MEDINA, A., KIM, J. K., PESTKA, J. J. & FRAZER, S. (2012) Impact of environmental factors on growth and satratoxin G production by strains of *Stachybotrys chartarum*. *World Mycotoxin Journal* 5, 37-43
- MARCHAL, E. (1895) Champignons coprophiles de Belgique. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 34, 125-149
- MARINACH-PATRICE, C., LETHUILLIER, A., MARLY, A., BROSSAS, J.-Y., GENÉ, J., SYMOENS, F., DATRY, A., GIARRO, J., MAZIER, D. & HENNEQUIN, C. (2009) Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect* 15 (7), pp. 634-42
- MARVIN, L. F., ROBERST, M. A. & FAY, L. B. (2003) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 377, 11-21

- MATSUSHIMA, K. & MATSUSHIMA, T. (1995) *Fragmenta Mycologica I*. Matsushima Mycological Memoirs 8, 45-54 nach Crous et al. (2004)
- MATSUSHIMA, T. (1989) Matsushima Mycological Memoirs Matsushima Mycological Memoirs 6, 1-100 nach Crous et al. (2004)
- MATSUSHIMA, T. (1975) *Icones Microfungorum a Matsushima lectorum.*, 1-209, 145 nach Crous et al. (2004)
- MATSUSHIMA, T. (1985) Matsushima Mycological Memoirs. Matsushima Mycological Memoirs 4, 1-68 nach Crous et al. (2004)
- MATUSEVICH, V. G., FEKILSTOV, M. H. & ROZHDESTVENSKII, V. A. (1960). *Veterinariya* 37 nach Forgacs (1972)
- MCCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. (2011) Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins (Basel)* 3, 802-814
- MCDONALD, T., BROWN, D., KELLER, N. P. & HAMMOND, T. M. (2005) RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 539-545
- MCKENZIE, E. H. C. (1991) Dermatiaceous hyphomycetes on Freycinetia(Pandanaceae) 1. *Stachybotrys*. *Mycotaxon* 41, 179-188
- MCLAFFERTY, F. W. & TURECEK, F. (1995) *Interpretation von Massenspektren*. Würzburg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- MCQUADE, A. B. (1963) Morphogenesis and nutrition in the *Memnoniella-Stachybotrys* group of fungi. *J Gen Microbiol* 30, 429-435
- MCTAGGART, L. R., LEI, E., RICHARDSON, S. E., HOANG, L., FOTHERGILL, A. & ZHANG, S. X. (2011) Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Journal of Clinical Microbiology* 49 (8), pp. 3050-3053
- MELLMANN, A., BIMET, F., BIZET, C., BOROVSKAYA, A. D., DRAKE, R. R., EIGNER, U., FAHR, A. M., HE, Y., ILINA, E. N., KOSTRZEWA, M., MAIER, T., MANCINELLI, L., MOUSSAOUI, W., PREVOST, G., PUTIGNANI, L., SEACHORD, C. L., TANG, Y. W. & HARMSSEN, D. (2009) High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 47, 3732-3734
- MENA, J. & HEREDIA (2009) nach Crous et al. 2004
- MERCADO-SIERRA, A. & MENA-PORTALES, J. (1988) Nuevos o raros hifomicetes de Cuba V Especies de *Stachybotrys*. *Acta Botanica Cubana* 55, 1-8
- MISRA, P. C. (1976) *Stachybotrys renispora* sp. nov. *Mycotaxon* 4, 161-162 nach Crous et al. (2004)

- MISRA, P. C. (1975) A new species of *Stachybotrys*. Mycotaxon 2, 107-108 nach Crous et al. (2004)
- MISRA, P. C. & SRIVAST., S. K. (1982) Two undescribed *Stachybotrys* species from India. Transactions of the British Mycological Society 78, 556-559
- MIYAZAKI, W., TAMAOKA, H., SHINOHARA, M., KAISE, H., IZAWA, T., NAKANO, Y., KINOSHITA, T., HONG, K. & INOUE, K. (1980). Microbiology and Immunology 24, 1091-1108
- MONTANA, E., ETZEL, R. A., ALLAN, T., HORGAN, T. E. & DEARBORN, D. G. (1997) Environmental risk factors associated with pediatric idiopathic pulmonary hemorrhage/hemosiderosis in a Cleveland community. Pediatrics 99 nach Johanning (1999)
- MOONEY, J. L. & YAGER, L. N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. Genes Dev. 4, 1473-1482
- MORGAN-JONES, G. & KARR, G. W. J. (1976) Notes on hyphomycetes XVI a new Species of *Stachybotrys*. Mycotaxon 4, 510-512
- MORGAN-JONES, G. & SINCLAIR, R. C. (1979) Notes on hyphomycetes. Mycotaxon 10, 372-374
- MUSHIN, T. M. & AL-HELFI, M. A. (1981) Hyphomycetes of Iraq - the genus *Stachybotrys*. Sydowia 34, 130-134
- MUSSALO-RAUHAMAA, H., NIKULIN, M., KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P., HINTIKKA, E.-L., MALMBERG, M. & HAAHTELA, T. (2010) Health effects of residents exposed to *Stachybotrys* in water-damaged houses in Finland, Indoor and Built Environment, 19, pp. 476-485
- NAGORNYI, I. S., POSSINGINSKII, M. M., GOVZDOV, A. V. & RYBKA, N. V. (1960). Veterinariya 37 nach Forgacs (1972)
- NCBI (2014) National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 29.07.2014
- NEJAT, S. A. & ERSHAD, D. (1994) An investigation on mycoflora of barley seeds in Iran. Iranian J Plant Pathology 30, 23-28
- NIELSEN, K. F. (2002) Mould growth on building materials. Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Dissertation.
- NIELSEN, K. F. (2003) Mycotoxin production by indoor molds. Fungal Genet Biol 39, 103-117
- NIELSEN, K. F., HANSEN, M. Ø., LARSEN, T. O. & THRANE, U. (1998a) Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. International Biodeterioration & Biodegradation 42, 1-7
- NIELSEN, K. F., THRANE, U., LARSEN, T. O., NIELSEN, P. A. & GRAVESEN, S. (1998b) Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. International Biodeterioration & Biodegradation 42, 9-16

NIKULIN, M., PASANEN, A.-L., BERG, S. & HINTIKKA, E.-L. (1994) *Stachybotrys atra* growth and toxin production in some building materials and fodder under different relative humidities. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 3421-3424

NOLARD, N. (1999) Indoor moulds: a public health problem in Belgium: overview of 15 years experience. In *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control*. Ed E. JOHANNING. New York, Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany New York. pp 48-53

NORMAND, A.-C., CASSAGNE, C., RANQUE, S., L'OLLIVIER, C., FOURQUET, P., ROESEMS, S., HENDRICKY, M. & PIARROUX, R. (2013) Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiology* 13, pp. 1471-2180

NORVELL, L. L. (2011) Fungal nomenclature 1. *Mycotaxon* 116 nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014)

NOVOTNY, W. E. & DIXIT, A. (2000) Pulmonary hemorrhage in an infant following 2 weeks of fungal exposure. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154, 271-275

OHFF, R. & WEISSBACH, F. (1984) Studies into *Stachybotrys atra* - detection and occurrence in feedstuffs in GDR. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 39, 628-631

OLIVEIRA, M. M., SANTOS, C., SAMPAIO, P., ROMEO, O., ALMEIDA-PAES, R., PAIS, C., LIMA, N. & ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. (2015) Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Res Microbiol* 166, 102-110

OOI, P. L. & GOH, K. T. (1997) Sick building syndrome: an emerging stress-related disorder? *Int J Epidemiol* 26, 1243-1249

ORPURT (1954) Studies on the soil microfungi of Wisconsin prairies. Wisconsin The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014)

OTOKAWA, M. (1983) Immunological disorders. In *Trichothecenes-Chemical, Biological, and Toxicological Aspects*. ed. Y. Ueno, 163-170

OUDEMANS, C. A. J. A. (1886) Contributions á la flore mycologique des Pays-Bas. XI. *Nederlandsch Kruidkundig Archief* 2, 502-562

PALYUSIK, M. (1970) Experimental stachybotryotoxicosis of young chicks. *Sabouraudia* 8, 4-8

PAN, H.-Q., KONG, J.-H., XU, J.-J., ZHANG, Y.-L. & ZHANG, T.-Y. (2014) Four new species of *Stachybotrys* and a key to species of the genus known from soil in China. *Mycosystema* 33, 785-792

PATERSON, R. R. M. & LIMA, N. (2009) Mutagens manufactured in fungal culture may affect DNA/RNA of producing fungi. *J Appl Microbiol* 106, 1070-1080

PAUL, G. C. & THOMAS, C. R. (1998) Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 60, 1-59

- PECK, C. H. (1890) Report of the botanist. Annual Report on the New York State Museum of Natural History 43, 51-97
- PHOTITA, W., LUMYONG, P., MCKENZIE, E. H. C., HYDE, K. D. & LUMYONG, S. (2003) *Memnoniella* and *Stachybotrys* species from *Musa acuminata*. *Cryptogamie mycologie* 24, 147-152
- PIECKOVA, E., HURBANKOVA, M., CERNA, S., PIVOVAROVA, Z. & KOVACIKOVA, Z. (2006) Pulmonary cytotoxicity of secondary metabolites of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) Hughes. *Ann Agric Environ Med* 13, 259-262
- PIECKOVA, E., HURBANKOVA, M., CERNA, S., LISKOVA, A., KOVACIKOVA, Z., KOLLARIKOVA, Z. & WIMMEROVA, S. (2009) Inflammatory and haematotoxic potential of indoor *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) Hughes metabolites. *Arh Hig Rada Toksikol* 60, 401-409
- PINRUAN, U., MCKENZIE, E. H. C., JONES, E. B. G. & HYDE, K. D. (2004) Two new species of *Stachybotrys*, and a key to the genus. *Fungal Diversity* 17, 145-157
- PUTIGNANI, L., DEL CHIERICO, F., ONORI, M., MANCINELLI, L., ARGENTIERI, M., BERNASCHI, P., COLTELLA, L., LUCIGNANO, B., PANSANI, L., RANNO, S., RUSSO, C., URBANI, A., FEDERICI, G. & MENICHELLA, D. (2011) MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol Biosyst* 7, 620-629
- RAMOS, A., SANTOS, L., MARÍN, S. & SANCHIS, V. (2013) Micotoxinas en hierbas medicinales y/o aromáticas-Revisión. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12
- RAND, T. G., FLEMMING, J., DAVID MILLER, J. & WOMILOJU, T. O. (2006) Comparison of inflammatory responses in mouse lungs exposed to atranones A and C from *Stachybotrys chartarum*. *J Toxicol Environ Health A* 69, 1239-1251
- REDLICH, C. A., SPARER, J. & CULLEN, M. R. (1997) Sick-building syndrome. *Lancet* 349, 1013-1016
- REED, S. M., BAYLY, W. M. & SELLON, D. C. (2009) *Equine Internal Medicine*, London, Elsevier
- REIJULA, K. (1999) Occupational exposure to molds, diseases and diagnosis. In *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control*. Ed E. JOHANNING. New York, Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany New York. pp 38-47
- REPONEN, T., HYVÄRINEN, A., RUUSKANEN, J., RAUNEMAA, T. & NEVALAINEN, A. (1994) Comparison of concentrations and size distributions of fungal spores in buildings with and without mould problems. *Journal of Aerosol Science* 25, 1595-1603
- RIFAI, M. A. (1964) *Stachybotrys bambusicola* sp. nov. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47, 269-272
- RIFAI, M. A. (1974) Another pink-spored and brown stalked species of *Stachybotrys*. *Reinwardtia* 8, 537-540

- ROBERT, V., STEGEHUIS, G. & STALPERS, J. (2005) The MycoBank engine and related databases. <http://www.mycobank.org>. Accessed 29.07.2005
- ROCHA, O., ANSARI, K. & DOOHAN, F. M. (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam* 22, 369-378
- RODRIGUES, P., SANTOS, C., KOZAKIEWICZ, Z., VENANCIO, A. & LIMA, N. (2010) MALDI-TOF ICMS as a modern approach to identify potential aflatoxigenic fungi. In VI Latinamerican Congress of Mycotoxicology and II International Symposium on Fungal and Algal Toxins in Industry. Merida, México
- ROHLF, F. J. & SOKAL, R. R. (1962) The description of taxonomic relationships by factor analysis. *Systematic Zool* 11, 1-16
- RUOTSALAINEN, M., HIRVONEN, M. R., HYVARINEN, A., TEIJA, M., SAVOLAINEN, K. & NEVALAINEN, A. (1998) Cytotoxicity, production of reactive oxygen species and cytokines induced by different strains of *Stachybotrys* sp. from moldy buildings in RAW264.7 macrophages. *Environ Toxicol Pharmacol* 6, 193-199
- SABIR, M., SHASHIKIRAN, U. & KOCHAR, S. K. (1999) Building related illnesses and indoor air pollution. *J Assoc Physicians India* 47, 426-430
- SACCARDO, P. A. (1878) *Fungi Italici autographice delineati a Prof. P.A. Saccardo. Fascicoli V.-VIII.*, 326-350
- SAMSON, R. A. (2010) *Food and indoor fungi*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre
- SAMSONOV & SAMSONOV (1960) nach persönlicher Mitteilung von Gareis (2015)
- SARKISOV, A. K. (1947). *Veterinariya* 24 nach Forgacs (1972)
- SARKISOV, A. K. (1954) Stakhibotrioksikoz(Stachybotryotoxicosis). Moskau, In *Mikotoksikozi (Mycotoxicoses)*. Gosudarstvennoe Izdatelstvo Selskohozaistvennoi Literatury. nach Forgacs (1972)
- SCHEEL, C. M., ROSING, W. C. & FARONE, A. L. (2001) Possible sources of sick building syndrome in a Tennessee middle school. *Arch Environ Health* 56, 413-417
- SCHMIDT, O. & KALLOW, W. (2005) Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. *Holzforschung* 59, 374–377
- SCHNEIDER, D. J., MARASAS, W. F., DALE KUYS, J. C., KRIEK, N. P. & VAN SCHALKWYK, G. C. (1979) A field outbreak of suspected stachybotryotoxicosis in sheep. *J S Afr Vet Assoc* 50, 73-81

SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A., CHEN, W., FUNGAL BARCODING, C., FUNGAL BARCODING CONSORTIUM AUTHOR, L., BOLCHACOVA, E., VOIGT, K., CROUS, P. W., MILLER, A. N., WINGFIELD, M. J., AIME, M. C., AN, K.-D., BAI, F.-Y., BARRETO, R. W., BEGEROW, D., BERGERON, M.-J., BLACKWELL, M., BOEKHOUT, T., BOGALE, M., BOONYUEN, N., BURGAZ, A. R., BUYCK, B., CAI, L., CAI, Q., CARDINALI, G., CHAVERRI, P., COPPINS, B. J., CRESPO, A., CUBAS, P., CUMMINGS, C., DAMM, U., DE BEER, Z. W., DE HOOG, G. S., DEL-PRADO, R., DENTINGER, B., DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., DIVAKAR, P. K., DOUGLAS, B., DUEÑAS, M., DUONG, T. A., EBERHARDT, U., EDWARDS, J. E., ELSHAHED, M. S., FLIEGEROVA, K., FURTADO, M., GARCÍA, M. A., GE, Z.-W., GRIFFITH, G. W., GRIFFITHS, K., GROENEWALD, J. Z., GROENEWALD, M., GRUBE, M., GRYZENHOUT, M., GUO, L.-D., HAGEN, F., HAMBLETON, S., HAMELIN, R. C., HANSEN, K., HARROLD, P., HELLER, G., HERRERA, C., HIRAYAMA, K., HIROOKA, Y., HO, H.-M., HOFFMANN, K., HOFSTETTER, V., HÖGNABBA, F., HOLLINGSWORTH, P. M., HONG, S.-B., HOSAKA, K., HOUBRAKEN, J., HUGHES, K., HUHTINEN, S., HYDE, K. D., JAMES, T., JOHNSON, E. M., JOHNSON, J. E., JOHNSTON, P. R., JONES, E. B. G., KELLY, L. J., KIRK, P. M., KNAPP, D. G., KÖLJALG, U., KOVÁCS, G. M., KURTZMAN, C. P., LANDVIK, S., LEAVITT, S. D., LIGGENSTOFFER, A. S., LIIMATAINEN, K., LOMBARD, L., LUANGSA-ARD, J. J., LUMBSCH, H. T., MAGANTI, H., MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N., MARTIN, M. P., MAY, T. W., MCTAGGART, A. R., METHVEN, A. S., MEYER, W., MONCALVO, J.-M., MONGKOLSAMRIT, S., NAGY, L. G., NILSSON, R. H., NISKANEN, T., NYILASI, I., OKADA, G., OKANE, I., OLARIAGA, I., OTTE, J., PAPP, T., PARK, D., PETKOVITS, T., PINO-BODAS, R., QUAEDVLIEG, W., RAJA, H. A., REDECKER, D., RINTOUL, T. L., RUIBAL, C., SARMIENTO-RAMÍREZ, J. M., SCHMITT, I., SCHÜSSLE, A., SHEARER, C., SOTOME, K., STEFANI, F. O. P., STENROOS, S., STIELOW, B., STOCKINGER, H., SUETRONG, S., SUH, S.-O., SUNG, G.-H., SUZUKI, M., TANAKA, K., TEDERSOO, L., TELLERIA, M. T., TRETTER, E., UNTEREINER, W. A., URBINA, H., VÁGVÖLGYI, C., VIALLE, A., VU, T. D., WALTHER, G., WANG, Q.-M., WANG, Y., WEIR, B. S., WEIS, M., WHITE, M. M., XU, J., YAHR, R., YANG, Z. L., YURKOV, A., ZAMORA, J.-C., ZHANG, N., ZHUANG, W.-Y. & SCHINDEL, D. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 6241-6246

SCHRODL, W., HEYDEL, T., SCHWARTZE, V. U., HOFFMANN, K., GROSSE-HERRENTHEY, A., WALTHER, G., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L., OLIAS, P., JACOBSEN, I. D., DE HOOG, G. S. & VOIGT, K. (2012) Direct analysis and identification of pathogenic *Lichtheimia* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analyzer-mediated mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50, 419-427

SCHUBERT, S. & WIESER, A. (2011) Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik/Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiological routine diagnostics. *LaboratoriumsMedizin* 35, 195-203

SCHUMAIER, G., DE VOLT, H. M., LAFFER, N. C. & CREEK, R. D. (1963). *Poultry Science* 62 nach Forgacs (1972)

SEIFERT, K. A., MORGAN-JONES, G., GAMS, W. & KENDRICK, B. (2011) The genera of hyphomycetes. Amsterdam, Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

- SEMEIKS, J., BOREK, D., OTWINOWKI, Z. & GRISHIN, N. V. (2014) Comparative genome sequencing reveals chemotypespecific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. *BMC Genomics* 15
- SEYFARTH, F., ZIEMER, M., SAYER, H. G., BURMESTER, A., ERHARD, M., WELKER, M., SCHLIEMANN, S., STRAUBE, E. & HIPLER, U. C. (2008) The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Exp Dermatol* 17, 965-971
- SHULYUMOV, Y. S., KUZMIN, A. F. & FEDKO, P. A. (1960) Mycotoxicoses of man and agricultural animals, 167-180 nach Forgacs (1972)
- SKROMNE, I., SANCHEZ, O. & AGUIRRE, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141, 21-28
- SMITH, J. E. (1978) Asexual sporulation in filamentous fungi. In *The Filamentous Fungi, Developmental Mycology*. Bristol, Edward Arnold. pp 214-239
- STEINBERG, R. A. (1939) Growth of fungi in synthetic nutrient solutions. *The Botanical Review* 5, 327-350
- SUBRAMANIAN, C. V. (1957) Hyphomycetes. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences Section B* 46, 324-335 nach Crous et al. 2004
- SUCKAU, D., RESEMANN, A., SCHUERENBERG, M., HUFNAGEL, P., FRANZEN, J. & HOLLE, A. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 952-965
- SULYOK, M., KRKA, R. & SCHUHMACHER, R. (2010) Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry* 119, 408-416
- SZILVINYI, A. (1941) Mikrobiologische Bodenuntersuchungen im Lunzer Gebiet. *Zentralblatt Bakteriologie und Parasitenkunde Abteilung 2* 103, 122-189
- SVISHCHUK, A. A., SEREDYUK, L. S., LEVCHUK, Y. N. & KOLESNIKOVA, S. G. (1970) Sterols of the fungus *Stachybotrys alternans*. *Chemistry of Natural Compounds* 6, 319-321
- TANAKA, K., WAKI, H., IDO, Y., AKITA, S., YOSHIDA, Y. & YOSHIDA, T. (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2, 151-153
- TANTAOUI-ELARAKI, A., MEKOUAR, S.-L., EL HAMIDI, M. & SENHAJI, M. (1994) Toxigenic strains of *Stachybotrys atra* associated with poisonous straw in Morocco. *Vet. Human. Toxicol.* 36, 93-96
- TAO, J., ZHANG, G., JIANG, Z., CHENG, Y., FENG, J. & CHEN, Z. (2009) Detection of pathogenic *Verticillium* spp. using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23, 3647-3654



- TAYLOR, J. W., JACOBSON, D. J., KROKEN, S., KASUGA, T., GEISER, D. M., HIBBETT, D. S. & FISHER, M. C. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31, 21-32
- THE ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, M. S., LANDCARE RESEARCH-NZ, M. G. A. I. O. M. & CHINESE ACADEMY OF SCIENCE, S. K. L. O. M. (2014) Index Fungorum. <http://www.indexfungorum.org>. Accessed 29.07.2014
- TKACHENKO, A. F. (1960) Mycotoxicoses of man and agricultural animals, 187-195 nach Forgacs (1972)
- TRIPPI, P. A., MODLIN, S., SORENSON, W. G. & DEARBORN, D. G. (2000) Acute pulmonary haemorrhage in an infant during induction of general anaesthesia. *Paediatr Anaesth* 10, 92-94
- TROUT, D., BERNSTEIN, J., MARTINEZ, K., BIAGINI, R. & WALLINGFORD, K. (2001) Bioaerosol lung damage in a worker with repeated exposure to fungi in a water-damaged building. *Environ Health Perspect* 109, 641-644
- TUBAKI, K. (1963) Notes on the Japanese Hyphomycetes. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 4, 83-90
- TUOMI, T., REIJULA, K., JOHANSSON, T., HEMMINKI, K., HINTIKKA, E. L., LINDROOS, O., KALSO, S., KOUKILA-KAHKOLA, P., MUSSALO-RAUHAMAA, H. & HAAHTELA, T. (2000) Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol* 66, 1899-1904
- UENO, Y. (1977) Mode of action of trichothecenes. *Ann Nutr Aliment* 31, 885-900
- UENO, Y. (1983) *Trichothecenes - Chemical, biological and toxicological aspects*. Amsterdam, Elsevier
- USLEBER, E., DIETRICH, R., SCHNEIDER, E. & MÄRTLBAUER, E. (2001) *Stachybotrys*-Toxine in einer Münchner Wohnung mit Wasserschaden. *Mycotoxin Res* 17 Suppl 2, 234-237
- VALENTINE, N. B., WAHL, J. H., KINGSLEY, M. T. & WAHL, K. L. (2002) Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16, 1352-1357
- VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S., SAMSON, R. A., VERHOEFF, J., VAN WIJNEN, H. & BRUNEKREEF, B. (1991) Detection and identification of moulds in Dutch houses and non-industrial working environments. *Grana* 30, 418-423
- VESPER, S. J. (2002) Stachylysin may be a cause of hemorrhaging in humans exposed to *Stachybotrys chartarum*. *Infection and Immunity* 70, 2065-2069
- VESPER, S., DEARBORN, D. G., YIKE, I., ALLAN, T., SOBOLEWSKI, J., HINKLEY, S. F., JARVIS, B. B. & HAUGLAND, R. A. (2000a) Evaluation of *Stachybotrys chartarum* in the house of an infant with pulmonary hemorrhage: quantitative assessment before, during, and after remediation. *Journal of Urban Health* 77, 68-85

- VESPER, S. J., DEARBORN, D. G., ELIDEMIR, O. & HAUGLAND, R. A. (2000b) Quantification of siderophore and hemolysin from *Stachybotrys chartarum* strains, including a strain isolated from the lung of a child with pulmonary hemorrhage and hemosiderosis. *Appl Environ Microbiol* 66, 2678-2681
- VESPER, S. J., MAGNUSON, M. L., DEARBORN, D. G., YIKE, I. & HAUGLAND, R. A. (2001) Initial characterization of the hemolysin stachylysin from *Stachybotrys chartarum*. *Infect Immun* 69, 912-916
- WANG, A., XU, Y., GAO, Y., HUANG, Q., LUO, X., AN, H. & DONG, J. (2014) Chemical and bioactive diversities of the genera *Stachybotrys* and *Memnoniella* secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 14, 1-33
- WANG, H. F. & ZHANG, T. Y. (2009) Notes on soil dematiaceous hyphomycetes from the Qaidam Basin. *Mycosystema* 28, 20-24
- WANG, J., KLIKS, M. M., QU, W., JUN, S., SHI, G. & LI, Q. X. (2009) Rapid Determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10081-10088
- WANG, Y., HYDE, K. D., MCKENZIE, E. H. C., JIANG, Y.-L., LI, D.-W. & ZHAO, D.-G. (2015) Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. *Fungal Diversity* 71, 1-67
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Eds M. INNIS, D. GELFAND, J. SHINSKY, T. WHITE. New York, Academic Press. 315-322
- WHITTON, S. R., MCKENZIE, E. H. C. & HYDE, D. M. (2012) Teleomorphic microfungi associated with Pandanaceae. In *Fungi associated with Pandanaceae*, Amsterdam, Springer Netherlands. 23-124
- WHITTON, S. R., MCKENZIE, E. H. C. & HYDE, K. D. (2001) Microfungi on the Pandanaceae: *Stachybotrys*, with three new species. *New Zealand Journal of Botany* 39, 489-499
- WILLIAMS, D. H., STONE, M. J., HAUCK, P. R. & RAHMAN, S. K. (1989) Why are secondary Metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal of Natural Products* 52, 1189-1208
- WOLF, G. & STRAUBINGER, R. (2014) MALDI Matrixherstellung und Extraktion Juli 2014. Persönliche Mitteilung, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München
- WOLOSHUK, C. P. & SHIM, W. B. (2013) Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. *FEMS Microbiol Rev* 37, 94-109
- WU, Y. M. & ZHANG, T. Y. (2009) Two new species of *Stachybotrys* from soil. *Mycotaxon* 109, 461-464
- WU, Y. M. & ZHANG, T. Y. (2011) Two new species of *Stachybotrys* from soil. *Mycotaxon* 114, 459-462

XAVIER, J. J. M. & SCUSSEL, V. M. (2008) Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Brazil nut. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 88, 425-433

XU, X., DE GUZMAN, F. S., GLOER, J. B. & SHEARER, C. A. (1992) Stachybotrins A and B: novel bioactive metabolites from a brackish water isolate of the fungus *Stachybotrys* sp. *The Journal of Organic Chemistry* 57, 6700-6703

YIKE, I., RAND, T. G. & DEARBORN, D. G. (2005) Acute inflammatory responses to *Stachybotrys chartarum* in the lungs of infant rats: time course and possible mechanisms. *Toxicol Sci* 84, 408-417

YOSHIZAWA, T., OTSUBO, K., SASAKI, T. & NAKAMURA, K. (1986) Acute toxicities of satratoxins G and H in mice. A histopathological observation with special reference to the liver injury caused by satratoxin G. *Maikotokishin (Tokyo)* 23, 53-57. nach JARVIS, B.B. (1991) Macrocylic Trichothecenes. In: *Mycotoxins and Phytoalexins*. SHARMA, R.P., SALUNKHE, D.K., Eds Boca Raton, Florida, USA. CRC Press, pp. 1361-1421

ZHOU, G., WHONG, W. Z., ONG, T. & CHEN, B. (2000) Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol Cell Probes* 14, 339-348

ZUCK, K. R. (1946) Isolates intermediate between *Stachybotrys* and *Memnoniella*. *Mycologia* 38, 69-76

## 9 Anhang

**Tabelle 40:** Überblick über als *Stachybotrys* eingeordnete Spezies zusammengestellt nach Bisby (1943), Crous et al. (2004), NCBI (2014) und The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014); Referenzen nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014) und Crous et al. (2004)

Spezies	Literatur	Synonyme	Eintrag in MycoBank	Anzahl Nukleotid Einträge (NCBI)
<i>Melanopsamma pomiformis</i> ( <i>S. albipes</i> (anamorph))	Saccardo (1878)	<i>Chaetosphaeria pomiformis</i> <i>Eriosphaeria pomiformis</i> <i>Fuckelina albipes</i> <i>Melanomma pomiforme</i> <i>Melanopsamma pomiformis</i> var. <i>minor</i> <i>Melanopsamma pomiformis</i> var. <i>monosticha</i> <i>Melanopsamma pomiformis</i> var. <i>pomiformis</i> <i>Nectria pomiformis</i> <i>Psilosphaeria pomiformis</i> <i>Sphaeria corona</i> <i>Sphaeria pomiformis</i> <i>Sporocybe albipes</i>	Ja	14 ( <i>Melanopsamma pomiformis</i> )
<i>S. aloeticola</i>	Crous (2014)	-	Ja	-
<i>S. bambusicola</i>	Rifai (1964)	-	Ja	-
<i>S. breviscula</i>	McKenzie (1991)	-	Ja	-

**Fortsetzung Tabelle 40:** Überblick über als *Stachybotrys* eingeordnete Spezies zusammengestellt nach Bisby (1943), Crous et al. (2004), NCBI (2014) und The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014); Referenzen nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014) und Crous et al. (2004)

Spezies	Literatur	Synonyme	Eintrag in MycoBank	Anzahl Nukleotid Einträge (NCBI)
<i>S. chartarum</i>	Hughes (1958)	<i>Oospora chartarum</i> <i>S. atra</i> <i>S. atra f. lobulata</i> <i>S. atra var. atra</i> <i>S. atra var. brevicaulis</i> <i>S. atragrisea</i> <i>S. lobulata</i> <i>S. lobulata var. angustispora</i> <i>S. lobulata var. lobulata</i> <i>S. lobulata var. marca</i> <i>S. scabra</i> <i>Stilbospora chartarum</i> <i>S. alternans</i> <i>S. alternans var. alternans</i> <i>S. alternans var. atoxica</i> <i>S. alternans var. jateli</i> <i>S. asperula</i> <i>S. verrucosa</i> <i>S. gracilis</i> <i>S. elasticae</i> <i>S. dakotensis</i> <i>S. pulchra</i>	Ja	7248
<i>S. cylindrospora</i>	Jensen (1912)	<i>S. atra var. cylindrospora</i>	Ja	12
<i>S. chlorohalonata</i>	Andersen et al. (2003)	-	Ja	67

**Fortsetzung Tabelle 40:** Überblick über als *Stachybotrys* eingeordnete Spezies zusammengestellt nach Bisby (1943), Crous et al. (2004), NCBI (2014) und The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014); Referenzen nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014) und Crous et al. (2004)

Spezies	Literatur	Synonyme	Eintrag in MycoBank	Anzahl Nukleotid Einträge (NCBI)
<i>S. clitoriae</i>	Batista et al. (1960)	-	Ja	-
<i>S. elegans</i>	Domsch et al. (1980)	<i>Hyalobotrys elegans</i> <i>Hyalostachybotrys bisby</i> <i>Hyalostachybotrys sacchari</i> <i>S. aurantia</i> <i>S. sacchari</i>	Ja	89
<i>Periconiella portoricensis</i>	Ellis (1967)	<i>Cephalotrichum portoricense</i> <i>Haplographium portoricense</i> <i>S. cannae</i>	Ja	-
<i>S. complementi</i>	Miyazaki et al. (1980)	-	Ja	-
<i>S. cordylines</i>	Pinruan et al. (2004)	-	Ja	-
<i>S. crassa</i>	Marchal (1895)	-	Ja	-
<i>S. dichroa</i>	Grove (1886)	-	Ja	17
<i>Memmoniella echinata</i>	Galloway (1933)	<i>Cephalotrichum echinatum</i> <i>Haplographium echinatum</i> <i>Penicillium echinatum</i> <i>S. echinata</i>	Ja	44
<i>Sterigmatobotrys elata</i>	Oudemans (1886)	<i>S. elata</i>	Ja	-

**Fortsetzung Tabelle 40:** Überblick über als *Stachybotrys* eingeordnete Spezies zusammengestellt nach Bisby (1943), Crous et al. (2004), NCBI (2014) und The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014); Referenzen nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014) und Crous et al. (2004)

Spezies	Literatur	Synonyme	Eintrag in MycoBank	Anzahl Nukleotid Einträge (NCBI)
<i>S. elongata</i>	Peck (1890)	<i>Sterigmatobotrys elongata</i>	Ja	-
<i>S. eucylindospora</i>	Li (2007)	-	Ja	16
<i>S. freycinetiae</i>	McKenzie (1991)	-	Ja	-
<i>S. globosa</i>	Misra und Srivast. (1982)	-	Ja	-
<i>S. guttulispora</i>	Mushin und Al-Helf (1981)	-	Ja	-
<i>S. havanensis</i>	Mercado-Sierra und Mena-Portales (1988)	-	Ja	-
<i>S. humilis</i>	Krzemieniewska und Badura (1954)	-	Ja	-
<i>S. indica</i>	Misra (1975)	-	Ja	-
<i>S. jiangziensis</i>	Wu und Zhang (2011)	-	Ja	-
<i>S. kampalensis</i>	Hansford (1943)	-	Ja	18
<i>S. kapiti</i>	Whitton et al. (2001)	-	Ja	-
<i>S. klebahnii</i>	Burchard (1930)	-	Ja	-
<i>S. longispora</i>	Matsushima (1975)	-	Ja	1
<i>S. lunzinensis</i>	Svishchuk et al. (1970)	-	Ja	-

**Fortsetzung Tabelle 40:** Überblick über als *Stachybotrys* eingeordnete Spezies zusammengestellt nach Bisby (1943), Crous et al. (2004), NCBI (2014) und The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014); Referenzen nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014) und Crous et al. (2004)

Spezies	Literatur	Synonyme	Eintrag in MycoBank	Anzahl Nukleotid Einträge (NCBI)
<i>S. mangiferae</i>	Misra und Srivast. (1982)	-	Ja	1
<i>S. mexicanus</i>	Mena und Heredia (2009)	-	Ja	-
<i>S. microspora</i>	Jong und Davis (1976)	<i>S. atra</i> var. <i>microspora</i>	Ja	23
<i>S. nephrodes</i>	McKenzie (1991)	-	Ja	-
<i>S. nephrospora</i>	Hansford (1943)	-	Ja	1
<i>S. nielamuensis</i>	Wu und Zhang (2009)	-	Ja	-
<i>S. nilagirica</i>	Subramanian (1957)	-	Ja	-
<i>S. oenanthes</i>	Ellis (1971)	-	Ja	3
<i>S. oleronensis</i>	Lechat et al. (2013)	-	Ja	1
<i>S. pallescens</i>	Jiang und Zhang (2009)	-	Ja	-
<i>S. pallida</i>	Orpurt (1954)	-	Ja	-
<i>S. palmae</i>	Pinruan et al. (2004)	-	Ja	-
<i>S. palmijunci</i>	Rifjai (1974)	-	Ja	-
<i>S. papyrogena</i>	Saccardo (1878)	<i>Periconia papyrogena</i>	Ja	-
<i>S. parva</i>	Dwivedi und Singh (1969)	-	Ja	-



**Fortsetzung Tabelle 40:** Überblick über als *Stachybotrys* eingeordnete Spezies zusammengestellt nach Bisby (1943), Crous et al. (2004), NCBI (2014) und The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014); Referenzen nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014) und Crous et al. (2004)

Spezies	Literatur	Synonyme	Eintrag in MycoBank	Anzahl Nukleotid Einträge (NCBI)
<i>S. parvispora</i>	Hughes (1952)	-	Ja	5
<i>S. proliferata</i>	Karandikar et al. (1992)	-	Ja	-
<i>S. queenslandica</i>	Matsushima (1989)	-	Ja	-
<i>S. ramosa</i>	Dorai und Vittal (1986)	-	Ja	-
<i>S. reniformis</i>	Tubaki (1963)	-	Ja	-
<i>S. renisporea</i>	Misra (1976)	-	Ja	-
<i>S. renisporoides</i>	Karandikar et al. (1992)	-	Ja	-
<i>S. reniverrucosa</i>	Whitton et al. (2001)	-	Ja	-
<i>S. ruwenzoriensis</i>	Matsushima (1985)	-	Ja	-
<i>S. sansevieriae</i>	Agarwal und Sharma (1974)	-	Ja	-
<i>S. sinuatophora</i>	Kobayasi (1971)	-	Ja	-
<i>S. socia</i>	Ferraris (1909)	<i>Fuckelina socia</i>	Ja	-
<i>S. sphaerospora</i>	Morgan-Jones und Sinclair (1979)	-	Ja	-
<i>Memnoniella stilboidea</i>	Ellis (1976)	<i>S. stilboidea</i>	Ja	-
<i>S. striatisporea</i>	Orpurt (1954)	-	Ja	-

**Fortsetzung Tabelle 40:** Überblick über als *Stachybotrys* eingeordnete Spezies zusammengestellt nach Bisby (1943), Crous et al. (2004), NCBI (2014) und The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014); Referenzen nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014) und Crous et al. (2004)

Spezies	Literatur	Synonyme	Eintrag in MycoBank	Anzahl Nukleotid Einträge (NCBI)
<i>S. subreniformis</i>	Li und Jiang (2011)	-	Ja	2
<i>Memnoniella subsimplex</i>	Deighton (1960)	<i>S. subsimplex</i>	Ja	10
<i>S. suthpensis</i>	Photita et al. (2003)	-	Ja	-
<i>S. thermotolerans</i>	Pinruan et al. (2004)	<i>S. ramosa</i>	Ja ( <i>S. ramosa</i> )	-
<i>S. terrestris</i>	Kong und Zhang (2007)	-	Ja	1
<i>S. thaxteri</i>	Li (2011)	-	Ja	-
<i>S. theobromae</i>	Hansford (1943)	-	Ja	1
<i>S. variabilis</i>	Wang und Zhang (2009)	-	Ja	-
<i>S. verrucispora</i>	Matsushima (1985)	-	Ja	-
<i>S. virgata</i>	Krzemieniewska und Badura (1954)	-	Ja	-
<i>S. voglinii</i>	Ciferri (1922)	-	Ja	-
<i>S. waitakere</i>	Whitton et al. (2001)	-	Ja	-
<i>S. xanthosomatica</i>	Mercado-Sierra und Mena-Portales (1988)	-	Ja	-
<i>S. xigazensis</i>	Wu und Zhang (2011)	-	Ja	-
<i>S. yunnanensis</i>	Kong (1997)	-	Ja	3

**Fortsetzung Tabelle 40:** Überblick über als *Stachybotrys* eingeordnete Spezies zusammengestellt nach Bisby (1943), Crous et al. (2004), NCBI (2014) und The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014); Referenzen nach The Royal Botanic Gardens Kew et al. (2014) und Crous et al. (2004)

Spezies	Literatur	Synonyme	Eintrag in MycoBank	Anzahl Nukleotid Einträge (NCBI)
<i>S. zeae</i>	Morgan-Jones und Karr (1976)	-	Ja	2
<i>S. zhangmuensis</i>	Wu und Zhang (2009)	-	Ja	-
<i>S. zuckii</i>	Matsushima und Matsushima (1995)	-	Ja	-

1. 300 µl Aqua dest. in ein Eppendorf Cup
2. 5 – 10 mg Probenmaterial in Eppendorf Cup, gut mischen
3. 900 µl EtOH, gut mischen
4. Zentrifugieren ( $\geq 13000$  rpm) 2 min, Überstand verwerfen, Zentrifugation wiederholen und Überstand verwerfen
5. Bei Raumtemperatur trocknen lassen (2 – 3 min)
6. 70 % Ameisensäure (1 bis 80 µl), gut mischen
7. ACN (1 bis 80 µl) Menge analog der Ameisensäure, gut mischen
8. Zentrifugieren ( $\geq 13000$  rpm) 2 min
9. 1 µl vom Überstand auf Target pipettieren, bei Raumtemperatur trocknen
10. 1 µl CHCA Matrix innerhalb einer Stunde aufbringen

**Abbildung 52:** Schema des Ameisensäure-Proteinextraktionsprotokolls („Formic Acid Extraction“) nach Anonymous (2014)

1. Sabouraud-Flüssignährmedium, modifiziert, 8 ml mit biologischem Material beimpfen
2. Rotierend „über Kopf“ inkubieren, bis ausreichend Material gewachsen ist
3. Material im Flüssignährmedium sedimentieren lassen (10 min)
4. Bis zu 1,5 ml des Sediments entnehmen und in ein Eppendorf Cup überführen
5. Zentrifugieren ( $\geq 13000$  rpm) 2 min, Überstand vorsichtig verwerfen
6. 1 ml Aqua dest., gut mischen und vortexen für 1 min
7. Zentrifugieren ( $\geq 13000$  rpm) 2 min, Überstand vorsichtig verwerfen
8. Schritt 6 und 7 noch einmal wiederholen
9. Pellet in 300 µl Aqua dest. und 900 µl EtOH resuspendieren und vortexen
10. Zentrifugieren ( $\geq 13000$  rpm) 2 min, Überstand vorsichtig verwerfen
11. Kurz zentrifugieren und restliche Flüssigkeit verwerfen
12. Pellet in SpeedVac bei 37 °C für 5 bis 10 min trocknen
13. 70 % Ameisensäure proportional zur Pelletgröße hinzufügen (kleines Pellet ca. 10 bis 20 µl)
14. Gleiche Menge ACN hinzufügen, vortexen
15. Zentrifugieren ( $\geq 13000$  rpm) 2 min
16. 1 µl vom Überstand auf Target pipettieren, bei Raumtemperatur trocknen
17. 1 µl CHCA Matrix innerhalb einer Stunde aufbringen

**Abbildung 53:** Schema des Proteinextraktionsprotokolls zur Identifikation von filamentösen Schimmelpilzen nach Anonymous (2014)

**Tabelle 41:** Ausgewählte Proteinextraktionsmethoden zur Identifikation von Schimmelpilzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS	Fungi	Extraktionsmethode	Quelle
Biflex III (Bruker Daltoniks)	<i>Penicillium</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Intakte Sporen</li> <li>2. 3 µl Matrixlösung</li> <li>3. 0,5 µl der Sporen / Matrix Suspension auf Target</li> </ol>	Chen und Chen (2005)
Voyager DE Pro (Applied Biosystems)	<i>Serpula</i> spp. <i>Coniophora</i> spp. <i>Antrodia</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 50 mg feuchtes Myzel</li> <li>2. Target</li> <li>3. Trocknen</li> <li>4. Mit 0,2 - 0,5 ml Matrix mischen</li> </ol>	Schmidt und Kallow (2005)
	<i>Fusarium</i> sp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 50 µg Zellen (Randmyzel) auf Target</li> <li>2. 0,3 µl Matrix</li> </ol>	Seyfarth et al. (2008)
	<i>Trichophyton</i> spp. <i>Arthroderma</i> sp. <i>Microsporium</i> sp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 50 µg Zellmaterial</li> <li>2. Target</li> <li>3. 0,3 ml Matrix</li> <li>4. Trocknen</li> </ol>	Erhard et al. (2008)
Ciphergen PBS - IIc (Bio-Rad)	<i>Aspergillus</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ca. 10<sup>8</sup> Zellen mit 100 µl Glasperlen</li> <li>2. 1 ml Acetonitril / TFA (4 %) (50/50)</li> <li>3. 3 x 1 min Glasperlen Bearbeitung</li> <li>4. Zentrifugieren</li> <li>5. Target</li> </ol>	Hettick et al. (2008a)

**Fortsetzung Tabelle 43:** Ausgewählte Proteinextraktionsmethoden zur Identifikation von Schimmelpilzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS	Fungi	Extraktionsmethode	Quelle
Ciphergen PBS-IIc (Bio-Rad)	<i>Penicillium</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Konidien und Hyphen</li> <li>2. In 1 ml 50:50 Acetonitril / TFA (4 %)</li> <li>3. Glasperlen</li> <li>4. 3 x 1 min Glasperlen Bearbeitung</li> <li>5. Zentrifugieren</li> <li>6. Überstand 1:1 mit Matrix mischen</li> <li>7. 1 µl auf Target</li> <li>8. Trocknen</li> </ol>	Hettick et al. (2008b)
Autoflex I (Bruker Daltoniks)	<i>Fusarium</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Myzel und Sporen</li> <li>2. In 50 µl TFA (80 %) (30 min)</li> <li>3. 150 µl H<sub>2</sub>O</li> <li>4. 200 µl ACN</li> <li>5. Zentrifugieren</li> </ol>	Marinach-Patrice et al. (2009)
Microflex (Bruker Daltoniks)	<i>Verticillium</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Myzel in 1,5 ml Cup</li> <li>2. 300 µl steriles Aqua dest.</li> <li>3. Zentrifugieren</li> <li>4. 300 µl steriles Aqua dest. und 900 µl Ethanol mischen, zentrifugieren</li> <li>5. Lysis in 50 µl folgender verschiedener Lösungen: <ol style="list-style-type: none"> <li>a) 70 % Ameisensäure / Acetonitril (1:1; v/v);</li> <li>b) CHCl<sub>3</sub> / Methanol (1:1; v/v)</li> <li>c) TFA (0,1 %) / Isopropanol / Aqua dest. (1:2:3; v/v)</li> </ol> </li> <li>6. Ultraschall für 0 min, 5 min, 10 min oder 15 min auf Eis</li> <li>7. Zentrifugieren</li> <li>8. Target</li> </ol>	Tao et al. (2009)

**Fortsetzung Tabelle 43:** Ausgewählte Proteinextraktionsmethoden zur Identifikation von Schimmelpilzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS	Fungi	Extraktionsmethode	Quelle
AXIMA TOF <sup>2</sup> AXIMA CFR <sup>+</sup> (Shimadzu)	<i>Fusarium</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 50 - 100 µl Sporensuspension</li> <li>2. 3 x 100 µl mit H<sub>2</sub>O waschen</li> <li>3. A) Dünnschicht Methode B) Sandwichmethode C) Dried- droplet Technik</li> </ol>	Kemptoner et al. (2009)
Axima-LNR (Shimadzu)	<i>Aspergillus</i> sp.	n.b.	Rodrigues et al. (2010)
AXIMA Confidence (Shimadzu)	<i>Trichoderma</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Myzel und Sporen</li> <li>2. Target</li> </ol>	De Respinis et al. (2009)
Microflex (Bruker Daltoniks)	<i>Aspergillus</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Konidiophoren + Myzel in 1 µl H<sub>2</sub>O</li> <li>2. Target</li> <li>3. Trocknen</li> <li>4. 1 µl Ethanol</li> <li>5. Trocknen</li> </ol>	Alanio et al. (2011)

**Fortsetzung Tabelle 43:** Ausgewählte Proteinextraktionsmethoden zur Identifikation von Schimmelpilzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS	Fungi	Extraktionsmethode	Quelle
<p>Autoflex speed I Autoflex speed II UltrafleXtreme (Bruker Daltoniks)</p>	<p><i>Aspergillus</i> spp. <i>Beauveria</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp. <i>Fomitopsis</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Geosmithia</i> sp. <i>Geotrichum</i> sp. <i>Hamigera</i> sp. <i>Hypocrea</i> sp. <i>Nectria</i> sp. <i>Paecilomyces</i> sp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Scedosporium</i> sp. <i>Trichoderma</i> spp.</p>	<p>1. Pilzmaterial in 300 µl sterilem H<sub>2</sub>O und in 900 µl Ethylalkohol 2. Zentrifugieren 3. Pellet 5 min in 10 µl Ameisensäure (70 %) inkubieren 4. 10 µl Acetonitril für 10 min inkubieren 5. Zentrifugieren 6. 1 µl auf Target 7. 1 µl Matrix</p>	<p>Cassagne et al. (2011)</p>
<p>Microflex (Bruker Daltoniks)</p>	<p><i>Aspergillus</i> spp. <i>Mucor</i> spp. <i>Lichtheimia</i> spp. <i>Rhizopus</i> spp. <i>Rhizarmucor</i> sp. <i>Fusarium</i> spp.</p>	<p>1. Myzel und Sporen 2. 200 µl Aqua dest. 3. 1 µl auf Target 4. Trocknen 5. 1 µl Ethanol 6. Trocknen</p>	<p>De Carolis et al. (2012)</p>



**Fortsetzung Tabelle 43:** Ausgewählte Proteinextraktionsmethoden zur Identifikation von Schimmelpilzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS	Fungi	Extraktionsmethode	Quelle
<p>Microflex LT (Bruker Daltoniks)</p>	<p>Fungi <i>Aspergillus</i> spp. <i>Emmericella</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Geosmithia</i> spp. <i>Neosartorya</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Pseudallescheria</i> spp. <i>Scedosporium</i> spp. <i>Talaromyces</i> spp. <i>Fomitopsis</i> spp.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Intermediäre Wachstumszone</li> <li>2. Waschen in H<sub>2</sub>O/Ethanol (1:3; v/v)</li> <li>3. Weiteres siehe Putignani et al. (2011)</li> <li>4. Trockenes Pellet mit 50 µl Ameisensäure (70 %) und 50 µl Acetonitril mixen und jeweils 10 min inkubieren</li> <li>5. Dekantieren</li> <li>6. Überstand auf Target auftragen</li> </ol>	<p>Del Chierico et al. (2012)</p>

**Fortsetzung Tabelle 43:** Ausgewählte Proteinextraktionsmethoden zur Identifikation von Schimmelpilzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS	Fungi	Extraktionsmethode	Quelle
<p>4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems)</p>	<p><i>Monilia</i> sp.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 100 µl Sporen in Aqua dest.</li> <li>2. Zentrifugieren</li> <li>3. Überstand verwerfen</li> <li>4. 100 µl Ethanol (70 %) hinzu</li> <li>5. Schütteln</li> <li>6. Zentrifugieren</li> <li>7. Überstand verwerfen</li> <li>8. Pellet in 100 µl Acetonitril / Ameisensäure (5 %) (1:1, v/v)</li> <li>9. 10 µl Sporensuspension mit 10 µl der Matrix mischen</li> <li>10. 0,8 µl der Matrix / Sporensuspension auf Target geben</li> <li>11. Matrix auf Target</li> <li>12. Trocknen</li> <li>13. Acetonitril (60 %) hinzu</li> </ol>	<p>Horka et al. (2012)</p>

**Fortsetzung Tabelle 43:** Ausgewählte Proteinextraktionsmethoden zur Identifikation von Schimmelpilzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF MS	Fungi	Extraktionsmethode	Quelle
UltrafleXtreme (Bruker Daltoniks)	<i>Acremonium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Beauveria</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp. <i>Fomitopsis</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Geotrichum</i> sp. <i>Hamigera</i> sp. <i>Hypocrea</i> sp. <i>Microsporium</i> spp. <i>Onychocola</i> sp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Scedosporium</i> sp. <i>Trichoderma</i> spp. <i>Trichophyton</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 3 - 4 mm Durchmesser Sporen und Hyphen</li> <li>2. In Ethanol (75 %)</li> <li>3. Zentrifugieren</li> <li>4. Hydroalkoholische Lösung entfernen</li> <li>5. Pellet in 10 µl Ameisensäure (70 %) lösen</li> <li>6. 5 min Inkubation</li> <li>7. 10 µl Acetonitril</li> <li>8. 5 min Inkubation</li> <li>9. Zentrifugieren</li> </ol>	Normand et al. (2013)
Axima LNR (Shimadzu)	<i>Sporothrix</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ca. 1 µg Zellen in ein 500 µl</li> <li>2. 20 µl Ameisensäure (25 %)</li> <li>3. Vortexen</li> <li>4. Ultraschall bei Raumtemperatur für 15 min</li> <li>5. Inkubation bei 4 °C für 3 Stunden</li> <li>6. 1 µl auf Paraffinfilm</li> <li>7. 2 µl Matrix</li> <li>8. Mischen</li> </ol>	Oliveira et al. (2015)

n.b.: nicht beschrieben  
TFA: Trifluoressigsäure

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Inhaber des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für das Überlassen dieses Themas. Die Messungen am MALDI-TOF Massenspektrometer wurden am Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Fakultät, LMU München, Leitung Prof. Dr. Dr. Ph. D. R. Straubinger, durchgeführt. Für die dortige fachliche Unterstützung von Herrn Dr. G. Wolf bedanke ich mich herzlich. Mein Dank gilt Dr. C. Gottschalk, der mich mit viel Geduld bei meiner Arbeit begleitet und betreut hat. Auch danke ich Frau Dr. B. Biermaier, Frau Dr. habil. K. Schwaiger und allen Mitarbeitern des Teams Bioanalytik des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der LMU München.

Frau Dr. A. Didier, Mitarbeiterin des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät, LMU München, danke ich für die Einarbeitung bei der Erstellung eines PCR-Protokolls für die von mir verwendeten Primer. Vielen Dank an Herrn Dr. O. Bader, Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen für die fachliche Unterstützung.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation danke ich der Brigitte und Wolfram Gedek-Stiftung für Mykotoxinforschung ganz herzlich.

Dank gilt auch dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der mir im Rahmen eines Reisestipendiums den wissenschaftlichen Austausch mit der Universität Kazimierz Wielki (Bydgoszcz, Polen) ermöglicht hat.

Ein herzlicher Dank an Frau Julia Lutter dafür, dass sie mich auf meinem Weg in all der Zeit treu begleitet hat.

Vor allem bedanke ich mich bei meinen Eltern, Margret und Uwe Ulrich. Sie haben mich bedingungslos bei allen meinen Projekten gefördert. Sie standen mir nicht nur finanziell, sondern auch bei Tag und Nacht mit Rat und Tat zur Seite.

Ein herzliches Vergelt`'s Gott.