

MVOC - zum Nachweis von Schimmel ungeeignet?

**H Schleibinger^{1*}, D Marchl², D Laußmann³, P Braun²,
C Brattig¹, M Mangler¹, D Eis³, A Nickelmann¹ und H Rueden¹**

Zusammenfassung

In Laborversuchen wurde das Spektrum der Produktion mikrobiologisch produzierter flüchtiger organischer Verbindungen (MVOC) untersucht, die als Indikatoren für einen verdeckten Schimmelbefall dienen können. Die Experimente zeigten, dass das analysierte Emissionsspektrum abhängig war von den Gebäudematerialien, die als Substrat eingesetzt wurden, und den jeweiligen Schimmelpilzarten bzw. -stämmen. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sowohl das Emissionsspektrum als auch die Emissionsrate einiger MVOC nicht konsistent bzw. reproduzierbar ist. Insgesamt wurden sehr niedrige Emissionsraten an MVOC festgestellt. Extrapoliert man die in den Laborversuchen ermittelten Emissionsraten auf Innenraumsituationen mit typischen Luftwechselzahlen, erhält man in den meisten Fällen Konzentrationen unterhalb der analytischen Nachweisgrenze. Aufgrund dieser Ergebnisse können mit dieser Methode nur großflächige Schimmelpilzkontaminationen in der Innenraumlufte nachgewiesen werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die MVOC-Analytik für die Suche nach mikrobiologischen Schäden in Hohlräumen mit normalerweise sehr niedrigen Luftwechselraten und hohen Oberflächen/Volumenverhältnissen geeignet sein könnte.

1. Einleitung

Schimmelpilze, Bakterien und andere Mikroorganismen können bei entsprechender Vermehrung Schäden an verschiedensten Gebäudeteilen verursachen. Meist sind die Ursachen Wasserschäden, Oberflächentemperaturen unter dem Taupunkt, Gebäudemängel aufgrund schlechter, falscher oder fehlender Isolierungen, Übernutzung von Innenräumen, oft in Verbindung mit reduzierten Luftwechselraten. Fast alle gebräuchlichen Materialien, die für die Konstruktion oder Einrichtung von Innenräumen Verwendung finden, wie z. B. Tapeten, Bodenbeläge, Textilien und Holz können als Nährböden für Mikroorganismen dienen. Der limitierende Faktor ist zumeist das verfügbare Wasser in bzw. auf den Substraten. Das Wachstum von Mikroorganismen in Innenräumen sollte ausgeschlossen oder zumindest weitestgehend unterdrückt werden, da Mikroorganismen eine Vielzahl von Substanzen produzieren, die gesundheitsschädigende Wirkungen haben können. Schimmelpilzsporen können z. B. Allergien auslösen oder Asthma hervorrufen. Bestimmte Gattungen bzw. Arten wie *Stachybotris charatarum* enthalten schädigende Mykotoxine. Mikroorganismen produzieren auch eine Vielzahl von flüchtigen organischen Verbindungen (MVOC), die zum Teil einen unangenehmen Geruch hervorrufen. Die toxikologische Relevanz der MVOC ist nach dem augenblicklichen Stand der Wissenschaft zu vernachlässigen, da sie in sehr niedrigen Konzentrationen auftreten. Diese Verbindungen werden in der Praxis immer häufiger für die Suche nach verstecktem Schimmelpilzwachstum eingesetzt. Es wurden große Hoffnungen in die Analytik von MVOC gesetzt, da den „traditionellen“ mikrobiologischen Methoden wie der Sammlung luftgetragener Bakterien oder Schimmelpilzsporen eine zu geringe Sensiti-

¹Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Charité - Universitätsmedizin in Berlin

²Beratung und Analyse - Verein für Umweltchemie B.A.U.CH. e. V., Berlin

³Robert Koch-Institut (RKI), Berlin

vität bzw. Spezifität unterstellt wurde, d.h. dass sie für den Nachweis verdeckter Schimmelschäden nicht geeignet wären. Die Möglichkeit, dass bei einem verdeckten mikrobiologischen Befall die produzierten MVOC durch Teppiche, Tapeten und andere Gewebematerialien diffundieren können, wurde als Hauptvorteil dieser Methode angesehen.

Kenntnisse über emittierte MVOC-Spektren werden i.d.R. aus Laborexperimenten gewonnen. Zuerst muss in den Laborversuchen nachgewiesen werden, dass das gesamte System frei von Blindwerten ist, um Kontaminationen aus der Laborluft, den eingesetzten Gerätschaften oder den Baumaterialien selbst nicht als MVOC fehlzuinterpretieren. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Laborversuchen wurden meist mikrobiologische Nährmedien als Substrat eingesetzt, die ein gutes Wachstum der Schimmelpilze ermöglichen. Das Wachstum auf "realen" Substraten wie Baumaterialien ist aber meist deutlich schwächer ausgeprägt. Daher ist davon auszugehen, dass auch die Emissionsraten der MVOC wesentlich niedriger ausfallen. Weiterhin ist bekannt, dass die Bildung der sogenannten sekundären Metaboliten sehr stark substratabhängig ist und damit die Ergebnisse, die auf mikrobiologischen Nährmedien erhalten werden, nicht auf die Ergebnisse von Baumaterialien übertragen werden können.

2. Ziele der Studie

Aufgrund der genannten Gründe wurden in der vorliegenden Studie 3 Ziele verfolgt:

1. Welche Emissionsraten an MVOC sind zu erwarten bei einem Schimmelpilzbefall auf typischen Baumaterialien?
2. Wie wird das Emissionsspektrum der MVOC durch die Gattung bzw. Art bzw. durch den Stamm von typischen schadensverursachenden Schimmelpilzen beeinflusst?
3. Führen diese Emissionsraten zu messbaren Konzentrationen in der Raumluft in Abhängigkeit von der Größe der befallenen Fläche und der Luftwechselrate?

3. Methoden

3.1 MVOC-Emissionsraten und -spektren in Abhängigkeit vom Substrat

Um die Substratabhängigkeit der MVOC-Produktion nachzuweisen wurden in hochreine und vollständig sterilisierte Emissionskammern aus Glas fünf typische Baumaterialien (siehe Tabelle 1) unter sterilen Bedingungen überführt. Diese Baumaterialien wurden definiert mit Sporen von *Aspergillus versicolor* # 1943 beimpft. Der Stamm wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

3.2 MVOC-Emissionsraten und -spektren in Abhängigkeit von verschiedenen Schimmelpilzstämmen

Um die MVOC-Spektren zu untersuchen, die von verschiedenen Schimmelpilzgattungen bzw. -arten produziert und emittiert werden, wurden 4 verschiedene Schimmelpilze auf Raufasertapete aufgebracht:

- *Penicillium brevicompactum*,
- *Aspergillus versicolor*,
- *Eurotium amstelodami* und
- *Chaetomium globosum* (siehe Tabelle 2).

Von jeder Schimmelpilzart wurden 5 verschiedene Stämme eingesetzt, um die Variabilität innerhalb der Art zu erkennen. Dazu wurden jeweils 2 zertifizierte Stämme aus Stammsammlungen (CBS, Baarn, Holland und DSMZ, Braunschweig, Deutschland) und 3 Wildstämme, die aus aktuellen Schimmelschäden isoliert wurden, eingesetzt. Hintergrund dafür war die Hypothese, dass Stämme aus Stammsammlungen aufgrund der häufigen Überimpfungen in Kultur ihren Stoffwechsel verändern bzw. degenerieren könnten. Jeder Versuchsansatz umfasste mindestens 4 unabhängige Messreihen, um die Reproduzierbarkeit der MVOC-Emissionen zu überprüfen.

3.3 Versuchsaufbau und Probenahme

Während der zweiten Inkubationswoche wurden in Intervallen Luftproben gezogen. Die zugeführte Luft wurde mittels Aktivkohle aufgereinigt, um Blindwerte aus der Laborumgebung auszuschließen. Um zu vermeiden, dass durch einen evtl. bei der Probenahme entstehenden Unterdruck Laborluft in die Inkubationskammern gesaugt wird, wurde die Strömungsrichtung so gewählt, dass die aufgereinigte Luft in die Inkubationskammern gedrückt wurde und die zu beprobende Luft durch den sich einstellenden Überdruck auf die Thermodesorptionsröhrchen gelangt. Die Probenahmeröhrchen wurden direkt an die Probenahmestutzen der Emissionskammer angeschlossen, um Verluste an MVOC zu minimieren. Alle Verbindungen wurden aus Glas und Metall angefertigt, um Sorptions- bzw. Desorptionsprozesse zu vermeiden. Um mikrobiologische Kontaminationen auszuschließen, wurden Partikelfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm vorgeschaltet. Die Thermodesorptionsröhrchen wurden mit 250 mg TENAX TA gefüllt und mit einem Heliumstrom der Reinheit 6.0 bei 270°C maximal 24 h vor der Probenahme konditioniert.

Die Luftproben wurden mittels GC/MS im SIM (selected ion monitoring)-Modus auf folgende 36 Verbindungen analysiert:

Dimethylsulfid, 2-Methylfuran, 3-Methylfuran, 3-Methyl-2-butanon, 3-Methyl-2-butanol, 2-Pentanon, 2-Pentanol, 3-Methyl-1-butanol, Pyrazin, 2-Methyl-1-butanol, Dimethyldisulfid, 1-Pentanol, 2-Butanonoxim, 2-Hexanon, 3-Methoxy-1-butanol, Furfural, Dimethylsulfoxid, 1-Hexanol, 2-Heptanon, 1-Heptanol, 1-Octen-3-ol, 3-Octanon, 3-Octen-2-ol, 3-Octanol, 2-n-Pentylfuran, 2-Octanol, 2-Ethyl-1-hexanol, cis-3-Octen-1-ol, trans-2-Octen-1-ol, 1-Octanol, 1-Nonanol, 4-Hydroxyanisol, 1-Decanol, 2,4,6-Trimethylbenzaldehyd, Diphenylsulfid.

3.4 Qualitätssicherung

Zur Qualitätssicherung wurde folgendes Verfahren eingehalten. Alle Versuche wurden mindestens vier mal wiederholt, i.d.R. in unabhängigen Versuchsdurchgängen. Blindwerte wurden kontrolliert, in dem einerseits Emissionskammern ohne Baumaterial eingesetzt wurden (Kammerblindwert), andererseits wurden sterile Baumaterialien beprobt, die nicht inokuliert wurden. Wiederfindungsraten mit dem gesamten Spektrum der o.g. Substanzen wurden ebenfalls mit leeren Emissionskammern durchgeführt als auch mit sterilen Baumaterialien.

4. Ergebnisse

4.1 MVOC-Emissionsraten und -spektren in Abhängigkeit vom Substrat

Der Stamm *Aspergillus versicolor* (DSMZ # 1943) produzierte eine Vielzahl von MVOC, die in Tabelle 1 aufgeführt werden. Nur 2-Ethyl-1-hexanol wurde von *Aspergillus versicolor* auf allen 5 Substraten erzeugt. 3-Methylfuran, Pyrazin und 2-Methyl-1-butanol wurden von *Aspergillus versicolor* auf 4 unterschiedlichen Substraten emittiert, 2-Pentanol wurde auf 3 Substraten produziert.

Tabelle 1: Emissionsspektrum an MVOC durch *Aspergillus versicolor* (DSMZ8 # 1943) Inkubation auf 5 verschiedenen Substraten (Baumaterialien)

Material (Substrat) MVOC	Gipskartonplatte	Fichtenholz	Kiefernholz	Raufasertapete ohne Kleber	Raufasertapete mit Spezialkleber*
3-Methylfuran	+	++			+
2-Methylfuran				+	
2-Pentanol		++	++	+	
3-Methyl-2-butanol	+			+	+
3-Methyl-1-butanol	+			+	
Pyrazin	++	++	+	+	
2-Methyl-1-butanol	+	++	+	+	
2-Butanonoxim		+			
1-Octen-3-ol	++			++	
3-Octanon	+++			+	
3-Octen-2-ol		++			
3-Octanol	++				
2-Octanol		++			
2-n-Pentylfuran				++	
2-Ethyl-1-hexanol	+++	++	++	++++	++
cis-3-Octen-1-ol		++			

* Ein Spezialkleber aus Stärke und Polyvinylacetat für schwere Tapeten etc.

Emissionsrate: +: 0,001 – 0,01; ++: 0,01 – 0,1; +++: 0,1 – 1,0 +++++: 1,0 – 10 µg / Woche

4.2 MVOC - Spektrum in Abhängigkeit von verschiedenen Schimmelpilzstämmen

Die Verbindungen 2-Methylfuran, 3-Methyl-2-butanol, 2-Pentanol, 3-Methyl-1-butanol, Pyrazin, 2-Methyl-1-butanol, 1-Octen-3-ol, 3-Octanon, 3-Octanol, 2-n-Pentylfuran, 2-Ethyl-1-hexanol und 2,4,6-Trimethylbenzaldehyd wurden von allen 4 Stämmen produziert (siehe Tab. 2). Dabei wurde eine gute Übereinstimmung des Emissionsspektrums zwischen Wildstämmen aus Schimmelpilzschäden und Laborstämmen aus den Stammsammlungen festgestellt. Andere MVOC aus dem Untersuchungsspektrum wurden nicht von allen untersuchten Arten produziert. Das jeweilige Emissionsspektrum einer bestimmten Art war nur teilweise reproduzierbar, d. h. in einigen Fällen wurden bestimmte MVOC nicht in allen Versuchsreihen nachgewiesen.

⁸ DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Tabelle 2: Emission von MVOC auf Raufasertapete durch 4 verschiedene Schimmelpilzstämmen: Prozentualer Anteil des Nachweises einzelner MVOC in unabhängigen Versuchsreihen

Schimmelpilzart	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Chaetomium globosum</i>
MVOC	[%]	[%]	[%]	[%]
3-Methylfuran	0	0	11	0
2-Methylfuran	70	100	94	93
3-Methyl-2-butanon	100	0	64	96
3-Methyl-2-butanol	70	91	82	62
2-Pentanon	20	0	47	69
2-Pentanol	50	25	24	27
3-Methyl-1-butanol	40	8	41	62
Pyrazin	45	50	65	12
2-Methyl-1-butanol	70	67	53	81
Dimethylsulfid	10	0	29	0
1-Pentanol	0	0	0	4
2-Hexanon	0	0	18	19
1-Hexanol	0	0	0	8
2-Heptanon	0	0	0	4
1-Octen-3-ol	70	91	100	4
3-Octanon	55	96	76	81
3-Octanol	5	17	12	54
2-n-Pentylfuran	25	17	41	23
2-Octanol	0	0	0	19
2-Ethyl-1-hexanol	100	100	100	96
2-Ethylhexylacrylat	0	33	12	0
1-Decanol	0	4	0	0
2,4,6-Trimethyl-benzaldehyd	5	4	6	4
Diphenylsulfid	0	8	12	8

5. Diskussion

5.1 Emissionsspektrum durch Schimmelpilze auf Baumaterialien

Ein Mangel des MVOC-Konzeptes ist die deutliche Abhängigkeit der MVOC-Produktion von der Schimmelpilzart und gegebenenfalls von den jeweiligen Stämmen und zusätzlich der Abhängigkeit vom Substrat (siehe Tabellen 1 + 2). Dies bedeutet, dass es sehr schwierig ist, für chemische Luftuntersuchungen ein gemeinsames Untersuchungsspektrum zu finden. Weiterhin wird die Aussagekraft durch die teilweise nicht reproduzierbaren Emissionsspektren eingeschränkt. Z. B. wurde das typische MVOC 1-Octen-3-ol nur in 70% aller Versuchsreihen von *Penicillium brevicompactum* emittiert. Eine weitere Schwierigkeit in der Festlegung eines Spektrums für die MVOC-Analyse ist, dass viele der häufig gebildeten MVOC auch andere chemische Quellen in Innenräumen haben. So werden von Schleibinger et al. (2003) aufgrund einer Literaturstudie weitere

nichtmikrobiologische bzw. nichtbiologische Innenraumluftquellen für „typische“ MVOC genannt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Nicht(mikro)biologische Innenraumquellen von ausgewählten „M“VOC, Literaturstudie von Schleibinger et al. (2003)

„Indikator-MVOC“	Nichtbiologische Innenraumquellen
2-Methyl-1-propanol	1, 8,13, 14, 17, 18
2-Methyl-1-butanol	13, 14
3-Methyl-1-butanol	13, 14
2-Pentanol	8, 13, 14
1-Octene-3-ol	1 (Seefisch, Krabben), 7 (Lavendel, Minze)
1-Decanol	6, 15, 19
2-Heptanon	5, 12, 13, 14
3-Octanone	13, 15
2-Methylisoborneol	1, 10
2-Methylfuran	22
3-Methylfuran	22
Dimethylsulfid	3, 16, 20, 21
Dimethyldisulfid	1 (Bier, Kaffee, Kohl)
Dimethylsulfoxid	4 (selten)

1 Aromastoffe	8 Farben	15 Parfüme
2 Bier	9 Kaffee	16 Porree (gekocht)
3 Blumenkohl (gekocht)	10 Kaffeearoma	17 Reinigungsmittel
4 Beschichtungsstoffe	11 Kohl	18 Riechstoffe
5 Butterfett	12 Kokosfett	19 Salbenbestandteile
6 Cremebestandteile	13 Lacke	20 Schellfisch (gekocht)
7 etherische Öle	14 Lösungsmittel	21 Schnittlauch
22 Tabakrauch		

5.2 Können MVOC hinsichtlich der Emissionsraten als Indikatoren für einen Schimmelpilzbefall dienen?

Ein weiteres Ziel der Studie war es, zu evaluieren, ob MVOC-Emissionen aus flächenhaften Befällen zu messbaren Raumluftkonzentrationen führen können. Zu diesem Zweck wurden aus den Laborexperimenten die sich theoretisch ergebenden Raumluftkonzentrationen errechnet. Die Berechnungen basieren auf einer angenommenen schimmelpilzbefallenen Fläche von 0,25 m² bei einem Raumluftvolumen von 50 m³. Dabei sollte die angenommene Fläche als „Bestimmungsgrenze“ des Verfahrens gelten, d. h. eine Befallsstärke von 0,25 m² sollte noch sicher erkannt werden. Obwohl eine klare Dosis-Wirkungskurve zwischen der befallenen Fläche und möglichen nachteiligen Gesundheitseffekten nicht ableitbar ist, muss eine untere Grenze des Verfahrens angenommen werden, obwohl natürlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass nachteilige Effekte auf die Gesundheit oder auch Befindlichkeitsstörungen bei geringen Befallsstärken auftreten könnten. Zwischen der letzten Fensterlüftung und der angenommenen Probenahme der MVOC wurde ein Intervall von 8 Stunden angenommen, damit sich eine bestimmte Konzentration in der Raumluft einstellen kann. Luftwechselraten zwischen 0,1 und 1 h⁻¹ wurden berücksichtigt.

Für die Berechnung der sich unter den genannten Randbedingungen einstellenden Innenraumkonzentration wurde folgende Gleichung angewandt:

$$C(t) = E \cdot R_v^{-1} \cdot n^{-1} \cdot (1 - e^{-n \cdot t})$$

Tabelle 4: Aus Laborexperimenten abgeleitete Innenraumluftkonzentrationen Befallene Fläche: 0,25 m². Luftwechselrate (LWR) = 0,1, 0,2, 0,5 und 1,0 h⁻¹. Zeitintervall zwischen letzter Lüftung und Schließen der Fenster = 8 Stunden. Raumvolumen = 50 m³.

Emissionsraten in Emissions- kammern (Laborversuche)	Berechnete Emissionsraten basierend auf definierter Fläche	Berechnete Raumluftkonzentrationen bei einer befallenen Fläche von 0,25 m ² bei verschiedenen Luftwechseln			
		LWR = 0,1 [µg/m ³]	LWR = 0,2 [µg/m ³]	LWR = 0,5 [µg/m ³]	LWR = 1,0 [µg/m ³]
Fläche = 20 cm ² [µg/Woche]	Fläche = 0,25 m ² [µg/h]				
0,001	0,00074	0,000082	0,000059	0,000029	0,000015
0,005	0,0037	0,00041	0,00030	0,00015	0,000074
0,01	0,0074	0,00082	0,00059	0,00029	0,00015
0,05	0,037	0,0041	0,0030	0,0015	0,00074
0,1	0,074	0,0082	0,0059	0,0029	0,0015
0,5	0,370	0,041	0,030	0,015	0,0074
1	0,74	0,082	0,059	0,029	0,015
5	3,7	0,41	0,30	0,15	0,074

Wie aus der Tabelle 4 zu entnehmen ist, führen nur Emissionsraten > 1 µg pro Stunde zu messbaren Innenraumluftkonzentrationen, die über 0,1 µg/m³ liegen. Bei erhöhten VOC-Konzentrationen in realen Innenraumsituationen können die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen für einige MVOC zudem signifikant schlechter sein. In diesen Fällen würde eine noch höhere Quellstärke notwendig sein, um Schimmelwachstum mittels der MVOC-Analytik eindeutig nachweisen zu können. Auf Grund dieser Ergebnisse sind vermutlich die meisten in Innenräumen gefundenen "MVOC" vorwiegend auf nicht(mikro)biologische, also chemische Quellen zurückzuführen.

6. Schlussfolgerungen

Ergänzend zur den hier vorgestellten Laborversuchen konnte in einer Feldstudie mit Schimmel- und Nichtschimmelwohnungen mit einem logistischen Regressionsmodell gezeigt werden, dass die Konzentrationen der sogenannten MVOC i.d.R. nicht mit dem Schimmelstatus der Wohnungen erklärt werden können. Vielmehr konnte in dieser Feldstudie mit anderen Parametern, wie dem Raucherstatus der Wohnungen, der Inneneinrichtung, der absoluten Luftfeuchte und dem Luftwechsel die gefundenen Konzentrationen vorausgesagt werden (Schleibinger et al. 2004).

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen aus den Laborversuchen, aus theoretischen Überlegungen, aus den statistischen Erkenntnissen von Feldversuchen und aus der Kenntnis auch chemischer Quellen für MVOC folgern die Autoren, dass bei den meisten Innenraumbedingungen ein versteckter Schimmelschaden mittels der Analyse der MVOC

nicht nachzuweisen ist. Auszunehmen sind möglicherweise Schimmelpilzschäden auf großen Flächen oder von einer hohen Dichte. Es scheint aber nicht ausgeschlossen zu sein, dass die MVOC-Analytik zumindest beim Aufspüren von Schimmelpilzbefällen in abgeschlossenen Zwischen- und Hohlräumen, unter der Voraussetzung eines hohen Oberflächen/Volumenverhältnisses und einer geringen Luftwechselrate, hilfreich sein könnte.

7. Literatur

Schleibinger H, Keller R, Rüden H: Indoor Air Pollution by Microorganisms and their Metabolites Handbook of Chemistry and Physics, Volume: Indoor Air Pollution (im Druck; angenommen: April 2003)

Schleibinger H, Laußmann D, Samwer H, Eis D, Rüden H Sind MVOC geeignete Indikatoren für einen verdeckten Schimmelpilzbefall? Angenommen von Umweltmedizin in Forschung und Praxis (Januar 2004)