

Mycologisches Materialgutachten

Auftraggeber:

Kirchengemeinde Musterstadt
Kirchstraße 1
12345 Musterstadt

Durchgeführt von:

UmAnLab Malsfeld
Dr. Ulrich Schmelz
Buchenweg 20
34323 Malsfeld

1. Einführung und Fragestellung:

Gegenstand des Gutachtens:

Untersuchung einer Mischprobe des Oberflächenbesatzes der Orgel der Kirche zu Musterstadt

Probeentnahme durch Horst Meyer am 30.03.2009

Beginn der Untersuchung: 06.04.2009

Abschluss der mikrobiologischen Untersuchungen: 07.05.2009

Die Fragestellung der Untersuchung richtet sich ausschließlich im Hinblick auf einen *Schimmelpilzbefall*; parallel auftretende Hefekulturen werden (wegen geringer innenraumhygienischer und bausubstanztechnischer Relevanz) *nicht* berücksichtigt. Sofern Verdacht auf bezüglich des Auftretens von *holzdestruierenden Pilzen* besteht (Schwammpilze), wird dies gesondert vermerkt.

Schimmelpilze stellen eine große und heterogene Gruppe der sog. „Fungi imperfecti“ dar, die im Hinblick auf die *Innenraumhygiene* (Punkte 1-3) und auf die *Bausubstanz* (Punkt 4) aufgrund verschiedener Sachverhalte von Bedeutung sind:

- o Bildung von Mycotoxinen: Gesundheitsschädliche (leber- und nierenschädigende), oft gleichzeitig krebserzeugende, organische Stoffwechselprodukte vieler Schimmelpilze.
- o Bildung von Mycoallergenen: In der Regel sind hierunter die Pilzsporen zu verstehen, mittels derer die ungeschlechtliche Verbreitung der Schimmelpilze erfolgt. Diese Sporen enthalten Fremdeiweiße als starke Antigene und vermögen beim Menschen Sensibilisierungen und Überempfindlichkeitsreaktionen (Soforttyp = Typ I, sowie Spättyp = Typ IV nach Coombs und Gell) auszulösen.
- o Bildung von geruchlich imponierenden Pilzmetaboliten: Mehr oder weniger unschön riechende, leichtflüchtige organische Substanzen, die den typischen „muffigen“ Kellergeruch in schimmelpilzbefallenen Räumen bedingen und demnach ein ästhetisches Defizit darstellen.
- o Bausubstanzkorrodierende Wirkung der Schimmelpilze: Im Gegensatz zu Schwammpilzen (Destruktion) tritt im Hinblick auf Schimmelpilze eine „Substanzkorrosion“ auf. Hierbei kommt es im Hinblick auf Holz im wesentlichen zu einer Metabolisierung des Lignins des Holzparenchyms (Füllstoff); die

struktur determinierende, holzparenchymeigene Cellulose wird meist nicht angegriffen. Als Resultat der Holzkorrosion sind zwar primär keine Instabilitäten tragender Teile zu erwarten, jedoch werden die Oberflächenkontinuität und die Stabilität von z.B. Holzverbindungen beeinträchtigt. Im Hinblick auf die mineralische Bausubstanz werden Stabilität und Kontinuität z.B. des Putzes nachteilig beeinflusst.

Da nicht sämtliche Schimmelpilzgattungen in gleicher Weise die genannten Wirkungen ausüben, ist die Kenntnis der aktuell vorliegenden Gattungen notwendig.

Darüber hinaus ist es ferner von Bedeutung, welcher Grad des Befalls („Befallsdichte“) vorliegt. Dieser wird anhand der „Koloniebildenden Einheiten pro Gramm Probenmatrix“ (KBE/g) als Befallsdichte quantitativ ausgedrückt. Hierzu erfolgt die mikrobiologische Untersuchung der homogenisierten Materialprobe.

Anhand der KBE/g und der vorliegenden Pilzgattungen kann die Dringlichkeit der Sanierung objektiv und quantifizierbar beschrieben werden.

Die erforderlichen Sanierungsmaßnahmen werden als fungizide Behandlung durchgeführt. Um den Erfolg im Vorfeld abschätzen zu können, wird ein Hemmtest als Agardiffusionstest durchgeführt, aus dem schließlich ein Hemmfaktor berechnet werden kann. Hierzu wird das von uns entwickelte Fungizid „Fungo-EX-forte“ eingesetzt und die Befallsreduktion im Vergleich zu einer nicht behandelten Probe untersucht.

Zusammenfassung der in Anlehnung der beschriebenen Problematik resultierenden Fragestellungen, die im Rahmen dieses Gutachtens betrachtet werden:

- o Bestimmung der KBE/g
 - o Gattungsbestimmung der vorhandenen Schimmelpilze
 - o Hemmtest als Agardiffusionstest.
-

2. Materialien und Methoden:

2.1 Bestimmung der KBE/g:

Hierzu wird ein aliquoter Anteil der zur Untersuchung vorgelegten, zuvor in einer Porzellanreibeschale (Fa. Haldenwanger, Berlin) komplett homogenisierten Materialprobe, (Probe Nr. 01) zur Bestimmung eingesetzt.

- o Der aliquote Anteil wird in ein Kunststoffprobenröhrchen mit Stopfen (PS-Kunststoff, Fa. Brand) überführt und mit 10 mL einer sterilfiltrierten Extraktionslösung (wässrig, darin 0,9 % NaCl, 0,01 % Tween 80; beides von Fa. Acros, B-Geel) versetzt.
- o Innerhalb von 30 Minuten wird durch 5 mal kräftiges Schütteln eine Suspension hergestellt und aufrecht erhalten.
- o Danach werden nach erneutem Resuspendieren mittels einer 1 mL - Messpipette (Fa. Hirschmann, Klasse A) genau 0,10 mL der erzeugten Suspension entnommen.
- o Dieses Volumen wird auf einen Sabouraud-Agar-Nährboden (Merckoplate Sabouraud-Agar mit 4% Glucose und Enthemmungsmitteln, Merck Nr. 1.8359) aufgetropft und mittels einer ausgeglühten Platinöse gleichmäßig verteilt (sog. „Beimpfung“ des Nährbodens“).
- o In gleicher Weise wird ein weiterer Nährboden mit 0,10 mL Suspension beimpft (Faktor 1).

- o Die Suspension wird nun 1:10 verdünnt. Es erfolgt die Beimpfung zweier weiterer Nährböden mit je 0,10 mL der 1:10 verdünnten Suspension (Faktor 10).
- o Nach 10 tägiger Inkubation bei 18°C erfolgt die Auswertung durch Auszählung der Kulturen („Kolonien“) auf den Nährböden, statistischen Ausgleich durch Mittelwertbildung und Berechnung der KBE/g.

2.2 Bestimmung der vorliegenden Pilzgattungen:

Diese wird als mikroskopische Bestimmung aufgrund der Tatsache durchgeführt, daß Schimmelpilzgattungen anhand der Conidiophoren (Sporenträger) an den Terminalen der Hyphen (Stränge) des Mycels (Pilzwurzelgeflecht) differenziert werden können.

- o Von je einer morphologisch unterschiedlichen Kolonie, die unter 2.1 angezüchtet wurde, wird mittels eines spitzen Skalpells (Fa. Bayha) eine Mycelprobe an der Oberfläche des Kolonie-Randes entnommen.
- o Diese wird auf einen Objektträger (Fa. Menzel) überführt und durch Auftropfen von „Pfeiffer´s Reagenz“ fixiert (1/3 Volumenanteil Formaldehydlösung w=37%; 1/3 Volumenanteil Essigsäure w = 100%; 1/3 Volumenanteil Methanol w=100%; Fa. Acros, Geel).
- o Nach der Fixation (vollständiges Verdampfen des Reagenz) erfolgt die Färbung durch Auftropfen von gesättigter Lactophenolblaulösung (Merck, Darmstadt), die nach 10 min. Expositionszeit mit dest. Wasser abgespült wird.
- o Ist dies geschehen, so werden Dauerpräparate angefertigt, in dem die gefärbten, getrockneten Präparate durch Deckgläser unter Zuhilfenahme von Entellan-Schnelleinschlußkitt (Fa. Merck, Darmstadt) abgedeckt werden.
- o Nach dem Trocknen des Entellan-Kittes erfolgt die lichtmikroskopische Beurteilung bei 100 bis 600-facher Vergrößerung. Zu diesem Zwecke wird die Durchlichtmikroskopie in Verbindung mit einem Phasenkontrastfilter und einer Dunkelfeldbetrachtung durchgeführt.

2.3 Hemmtest als Agardiffusionstest:

Zur Durchführung des Hemmtests wird eine gleichvolumige Mischung der Suspensionen, die aus der Materialprobe erhalten wurde, eingesetzt.

- o Es werden, wie unter 2.1 beschrieben, vier Nährböden mit jeweils 0,10 mL einer aliquotierten Mischung der unverdünnten Suspensionen der Probe beimpft.
- o Ist dies erfolgt, so wird auf zwei der beimpften Nährböden ein Filterpapier (Schleicher&Schuell, Nr. 508) gelegt, das zuvor mit 0,10 mL Fungo-EX-forte betropft (Messpipette 1,0 mL, Fa Hirschmann, Klasse A) wurde [Positivprobe].
 - o Die Wirkstoffe diffundieren aus dem Filterpapier in den Agar-Agar (Nährbodenmatrix) und hemmen dort das Wachstums / die Auskeimung der in der Suspension vorhandenen Pilzsporen und Mycelbestandteile.
- o Auf die anderen beiden beimpften Nährböden wird ein gleiches Filterpapier ohne Fungizid gelegt [Negativprobe].
- o Nach 10 tägiger Inkubation wird die Koloniezahl der Nährböden ausgezählt und der Hemmfaktor anhand der KBE/g - Differenz zwischen den Positiv- und den Negativproben berechnet.
- o Zugrundeliegende Funktion: $k = 1/t * \lg(N_0/N_t)$
 - o k = Hemmkonstante
 - o t = Zeit in Tagen
 - o N_t = Anzahl der Kolonien nach t Tagen in Positivprobe
 - o N_0 = Anzahl der Kolonien nach t Tagen in Negativprobe

3. Ergebnisse:

3.1 Bestimmung der „Koloniebildenden Einheiten/g“:

Table 1: Einsatz von 0,10 mL Suspension direkt (*unverdünnt*)

Probe Nr.:	Enahmestelle:	Kolonien/Platte:	Probemasse	KBE/g [Fakt. 1]
01	Mischprobe	900	0,100 g	900.000 KBE/g
01	Mischprobe	840	0,100 g	840.000 KBE/g

Table 2: Einsatz von 0,10 mL Suspension 1:10 verdünnt

Probe Nr.:	Enahmestelle:	Kolonien/Platte:	Probemasse	KBE/g [Fakt.10]
01	Mischprobe	95	0,100 g	950.000 KBE/g
01	Mischprobe	90	0,100 g	900.000 KBE/g

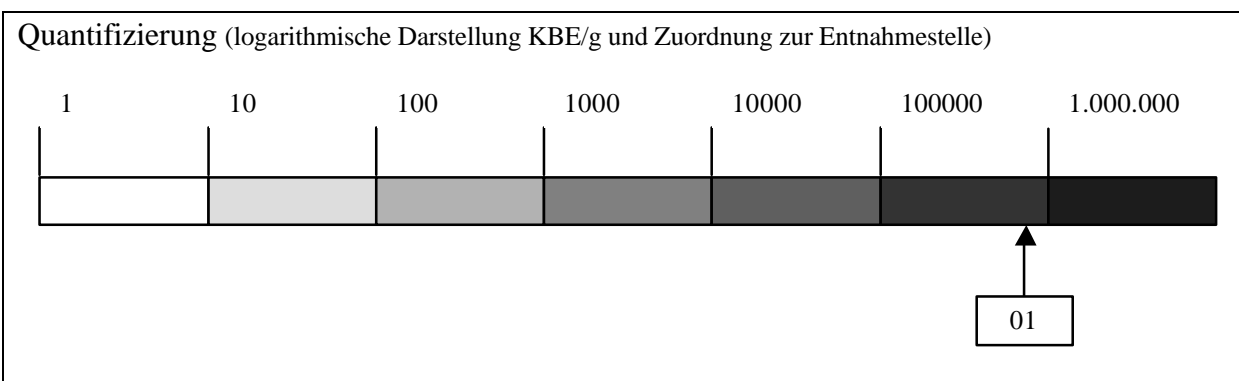
Table 3: Mittelwerte der KBE/g für unverdünnte und 1:10 verd. Probensuspension:

Probe Nr.:	Entnahmestelle:	KBE/g F. 1	KBE/g F. 10	Mittelwert:
01	Mischprobe	860.000	925.000	892.500 KBE/g

Anmerkung: Die Bildung des Mittelwertes ist notwendig, da bei Einsatz verdünnter Suspensionsvolumina oft eine bessere Differenzierung der Kolonien möglich ist, da ggf. zwischen den Kolonien auftretende Hemmwirkungen in geringerem Maße zu beobachten sind.

Die Bildung des Mittelwertes ist möglich, da die eingesetzten Verdünnungen (d.h. Faktor 1 und 10) auf die eingesetzte Probenmasse bezogen werden und daraufhin die KBE-Zahl auf 1,000g berechnet wird.

Die Anzucht erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen.



3.2: Bestimmung der vorliegenden Pilzgattungen:

Nachgewiesene Pilzgattungen:

Table 4:

Pilzgattungen	Toxine und Allergene:
Probe 01	
Penicillium sp.	+++
Aspergillus sp.	+++

3.3 Hemmtest als Agardiffusionstest:

Tabelle 5: Positivprobe (mit Fungizid):

Koloniezahl:
1
1

Mittelwert: 1 Kolonie

Tabelle 6: Negativprobe (ohne Fungizid):

Koloniezahl:
840
860

Mittelwert: 850 Kolonien

$$k = 1/t * \lg(N_0/N_t) = 1/10 * \lg(1/850) = -0,292$$

Hinweis: Je kleiner die Hemmkonstante, desto stärker die Befallsreduktion, desto stärker die Wirkung des Fungizids.

4. Diskussion der Werte und notwendige Maßnahmen:

Die untersuchte Mischprobe des Oberflächenbesatzes der Orgel und der Bausubstanz der Kirche zu Musterstadt weist mit einer Befallsdichte von ca. 893.000 KBE/g einen als sehr hochgradig einzustufenden Schimmelpilzbefall auf. Für organische Bausubstanz (Holzmaterialien) werden Referenzwerte von bis zu 1000 KBE/g angenommen. Daher ist allein unter Zugrundelegen des Parameters „Befallsdichte“ ein sanierungsbedürftiger Befall im Hinblick auf die untersuchte Bausubstanz vorhanden.

Es konnten zwei unterschiedliche Pilzgattungen nachgewiesen werden: *Penicillium* sp. und *Aspergillus* sp.

Die beiden nachgewiesenen Pilzgattungen sind im Hinblick auf die *Bausubstanz von Relevanz*, da organisches Material abgebaut wird und auf diese Weise Oberflächenschäden, Versprödungen und das Lösen von Leimverbindungen zu erwarten ist.

Die *innenraumhygienische Relevanz* ist im Hinblick auf beide Pilzgattungen gegeben. Die Pilzgattungen produzieren stark allergen wirkende Sporen; ferner sind Mycotoxine (Aflatoxine, Ochratoxine und Patulin) zu erwarten, die leber- und nierenschädlich sind. Diese Mycotoxine können über die Sporen des Pilzes oder an Partikel gebunden in die Raumluft gelangen und auf diese Weise eingeatmet werden (im Sinne eines inhalativen Expositionspfades).

Der Hemmtest mit „Fungo-EX-Forte“ ergab praktisch eine Totalhemmung; eine Befallsreduktion von $-0,292$ konnte festgestellt werden. Das Präparat zeigt demnach eine sehr gute Wirkung.

Vor dem Hintergrund des hochgradigen Befalls auf anorganischer Substanz, erfolgt die Einstufung des Befalles in Kategorie 3 nach den Empfehlungen des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg (Kategorien 1 bis 3 sind möglich); d.h. es besteht ein dringender Handlungsbedarf!

Im Hinblick auf die gesundheitliche Bewertung ist festzuhalten, daß durch den Nachweis der Gattungen *Penicillium* sp. und *Aspergillus* sp. Pilzgattungen nachgewiesen wurden, die nach der BioStoff-Verordnung in die Risikogruppe 1 eingestuft werden. Das bedeutet, daß es sich hierbei um Mikroorganismen handelt, die eine nachhaltige Beeinträchtigung der menschlichen Gesundheit verursachen können und deswegen unter besonderer Kontrolle zu handhaben sind. Auch aus dieser Sicht wird hier ein dringlicher Handlungsbedarf unterstrichen; ein Auftreten dieser Pilzgattung im Innenraum in erhöhter Anzahl dichte im Sinne eines Befalls ist daher nicht zu tolerieren!

Bei der Sanierung sind die Richtlinien der Bundesanstalt für Arbeitsschutz (Dortmund) zu beachten. Konkret handelt es sich um die TRBA 400 und die TRBA 460.

TRBA 400:

http://www.baua.de/nn_15164/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-400.pdf

TRBA 460:

http://www.baua.de/nn_15226/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-460.pdf

Zusammenfassend kann der Befund, wie folgt formuliert werden:

Ein sehr hochgradiger Schimmelpilzbefall der Mischprobe wurde im Rahmen der Untersuchung festgestellt. Es wurden darüber hinaus baustanztechnisch- und innenraumhygienisch relevante Pilzgattungen nachgewiesen, die zum Teil in die Risikogruppe 1 nach der BioStoffverordnung einzustufen sind.

Vor dem Hintergrund der hohen Befallsdichte erfolgte die Einstufung in die Befallskategorie 3 nach den Empfehlungen des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg.

Eine Sanierung ist dringlich angezeigt!

Weitere Hinweise:

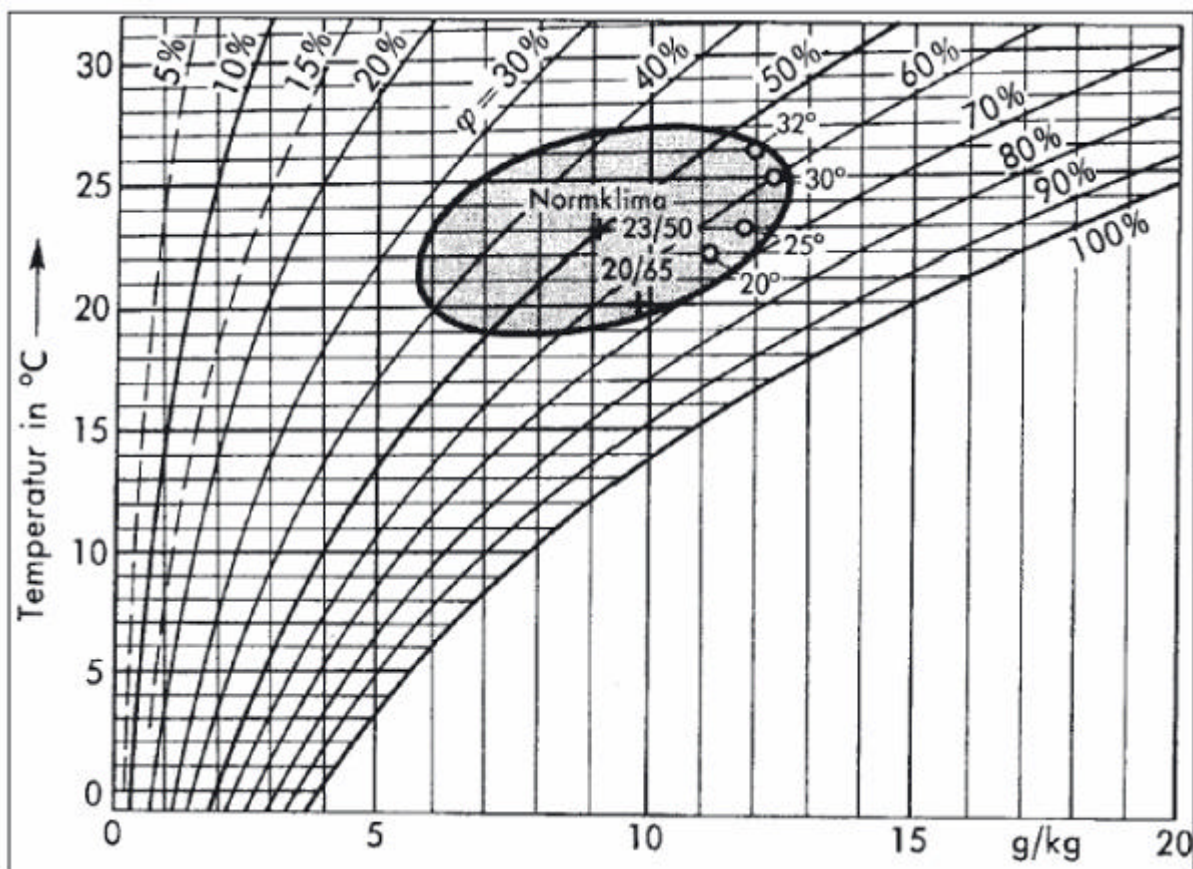
Überall, natürlicherweise in der Raumluft vorhandene Pilzsporen wachsen an Stellen organischer Kohlenstoffquellen (Cellulose, Lignin, Kollagen, d.h. Holz und Leder) nur an, sofern die kritische Feuchte der Bausubstanzoberflächen überschritten ist und ein unmittelbarer Lichtzutritt (der UV-Anteil des Sonnenlichtes führt zu einer Inaktivierung) verwehrt ist.

Daher ist vor allem eine kontrollierte, raumluftechnische Temperaturführung insbesondere mit dem Ziel, eine Oberflächenauskuhlung und damit das lokale Unterschreiten des Taupunktes (mit der Folge einer Kondenswasserbildung = Feuchteintrag in die Bausubstanzoberfläche) zu verhindern, obligat erforderlich.

Dies ist nur möglich, sofern eine Temperatur zwischen ca. 12 und 20°C (für Innenräume in der Klimazone der Bundesrepublik Deutschland) möglichst kontinuierlich, insbesondere aber im Winterhalbjahr, aufrecht erhalten wird.

Ferner sollte nach dem Eintrag größerer Wasserdampfmengen durch kurzzeitiges Stoßlüftungen ein Ausgleich mit der Außenluft geschaffen werden. Auch muß bauseitig aus dem Grund aufsteigende Feuchte ausgeschlossen werden.

Im übrigen sollte versucht werden, daß der innenraumklimatische Normbereich nach DIN 1948 annähernd erreicht wird. Es wird dann zum einen ein Behaglichkeitsbereich der Wahrnehmung des Innenraumklimas durch die Besucher erreicht, zum anderen wird der Entstehung von Wärmebrücken durch kontinuierliche Beheizung vorgebeugt und gleichzeitig ein Temperatur-Feuchte-Bereich geschaffen, der ein erneutes Auftreten eines Pilzbefalls unterbindet.



Die Auswirkung der nachgewiesenen Schimmelpilzgattungen auf die Bausubstanz ist wegen der sog. „Bausubstanzkorrosion“ weiterhin als ungünstig zu werten. Daher ist es sinnvoll, den Befall zunächst zu eliminieren und zusätzlich die innenraumklimatische Fragestellung zu beleuchten, z.B. durch Einstellung des innenraumklimatischen Normbereichs und Vermeidung des Eintritts von Feuchte von außen.

Wir raten daher folgendes:

- o Eine Sanierung des Befalls ist aus den dargestellten Gründen der Innenraumhygiene und der Problematik der Bausubstanzkorrosion dringlich notwendig.
- o Die Sanierung sollte wegen der großflächigen Ausdehnung des Befalls als generelle, fungizide Behandlung des Instruments erfolgen.
- o **Die Sanierung sollte wie folgt, gestaltet werden:**
 - o Oberflächliches Entfernen des sichtbaren Besatzes durch Pinsel und Staubsauger (unter Verwendung von z.B. Swirl-Micropore® - Beuteln, die die Emission von Sporen aus dem Staubsauger verhindern; ggf. Feinstaubmaske P3 zum Personalschutz).
 - o Feuchte, mechanische Reinigung der Holzteile der Orgel mit einer Reinigungslösung aus „Fungo-Clean“ (Konzentrat) und Wasser, um die oberflächlich sedimentierten Sporen und Mycelbestandteile zu entfernen.
 - o Gründliche, fungizide Behandlung der Holzteile der Orgel mit „Fungo-EX-Forte“. Durch das Präparat wird der aktuelle Befall beseitigt und gleichzeitig eine Remanenzwirkung geschaffen, d.h. ein erneutes Auftreten des Befalls wird verhindert.

Eine raumluftklimatische Optimierung, u.a. durch Optimierung der Temperaturführung wird weiterhin empfohlen.

Malsfeld, den 12.05.2009



Dr. Ulrich Schmelz, Arzt, Hygiene und Umweltmedizin, Laborleiter UmAnLab Malsfeld
Telefon und Fax: 05661/4875; Mobiltelefon: 0175/9150334