

Myzelbildende Pilze und Anisole in der Luft von Weinkellern

Mag. rer. nat. Herbert Galler

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. scient. med.

**Institut für Hygiene,
Mikrobiologie und Umweltmedizin**

Medizinische Universität Graz

Betreuer

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Franz F. Reinthaler

Graz 2011



Danksagung

Herrn Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Franz F. Reinthaler für die Betreuung der Dissertation und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Univ. Prof. DDr. Egon Marth für die Möglichkeit die Einrichtungen des Instituts zur Bearbeitung der zu untersuchenden Proben zu benutzen.

Frau Mag. Dr. Doris Haas für die fachliche Unterstützung und kompetente Beratung.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin, die mich bei der Arbeit unterstützt haben.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich meiner Familie, die mich immer unterstützt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, September 2011

Publizierte Beiträge dieser Studie

Originalarbeiten

Haas D., Galler H., Habib J., Melkes A., Schlacher R., Buzina W., Friedl H., Marth E., Reinthaler F.F., Concentrations of viable airborne fungal spores and trichloroanisole in wine cellars; International Journal of Food Microbiology, 2010, 144/1: 126-132.

Vorträge

Galler H., Haas D., Melkes A., Schlacher R., Feierl G., Buzina W., Marth E., Reinthaler F.F., Aeromycological screening of Styrian wine cellars. 44. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V. gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Medizinische Mykologie; 9.-11. September 2010, Wien, Österreich.

Galler H., Haas D., Melkes A., Schlacher R., Feierl G., Mascher F., Buzina W., Marth E., Reinthaler F.F., Aeromycological screening in Styrian wine cellars. 2. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene, Umweltmedizin und Präventivmedizin; 1.-4. Oktober 2008, Graz, Österreich

Haas D., Galler H., Melkes A., Schlacher R., Buzina W., Feierl G., Marth E., Reinthaler F.F., Trichloroanisole (TCA) generated by molds in Styrian wine cellars. 2. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene, Umweltmedizin und Präventivmedizin; 1.-4. Oktober 2008, Graz, Österreich

Galler H., Haas D., Melkes A., Schlacher R., Feierl G., Mascher F., Buzina W., Marth E., Reinthaler F.F., Charakterisierung und Identifikation der Mikroflora in steirischen Weinkellern. 30. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin, 26. -29. Mai 2008, Bad Ischl, Österreich

Poster

Galler H., Haas D., Melkes A., Schlacher R., Feierl G., Mascher F., Buzina W., Marth E., Reinthaler F.F., Characterization and identification of the microflora in Styrian wine cellars. The 4th European Symposium on Aerobiology; August, 12-16, 2008, Turku, Finland.

Haas D., Galler H., Melkes A., Schlacher R., Buzina W., Feierl G., Mascher F., Marth E., Reinthaler F.F., Fungal spores in the air of Styrian wine cellars. 42. Scientific Conference of MYK; 4th – 6th September 2008, Jena, Germany

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	8
2	Summary	9
3	Abkürzungsverzeichnis	10
4	Einleitung	12
4.1	Wissenschaftlicher Hintergrund	12
4.2	Ziel der Arbeit	14
4.3	Schimmelpilze	15
4.3.1	Definition.....	15
4.3.2	Morphologie und Fortpflanzung	16
4.3.3	Verbreitung	17
4.3.4	Lebensbedingungen	18
4.3.5	Zasmidium cellare.....	20
4.4	Tri-, Tetrachloranisol und Tribromanisol	21
4.4.1	Weinkontamination durch Anisole	21
5	Material und Methoden	27
5.1	Studiendesign.....	27
5.2	Untersuchte Weinkeller.....	28
5.3	Mikrobiologische Methodik	29
5.3.1	Luftkeimmessungen.....	29
5.3.2	Verwendete Nährmedien	31
5.4	Anisol - Analyse	33
5.5	Verwendete Messgeräte.....	34
5.5.1	Merck Air Sampler MAS-100® (MAS-100)	34
5.5.2	Andersen® Kaskaden Sammler (ACFM).....	35
5.5.3	Testo 845 Infrarot-Temperatur-Messgerät.....	37
5.6	Molekularbiologische Arbeitstechniken	38
5.6.1	DNA-Isolierung	38
5.6.2	PCR: Enzymatische Amplifizierung eines DNA-Abschnitts	39
5.6.3	Gelelektrophorese: Auftrennen der PCR-Produkte.....	40
5.6.4	Aufreinigung der PCR-Produkte	40

5.6.5	Cycle Sequencing und Aufreinigung.....	41
5.7	Statistische Auswertung	42
6	Ergebnisse	44
6.1	Vergleich der Sporenkonzentrationen (KBE/m ³) in der Weinkellerluft und in der Außenluft	44
6.2	Vergleich der Sporenkonzentrationen (KBE/m ³) in Relation zum Bautyp des Weinkellers und zu den klimatischen Bedingungen.....	46
6.2.1	Darstellung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die mittleren Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft anhand eines log-linearen Gammamodells	46
6.2.2	Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten eines schweren sichtbaren Schimmelpilzbefalls mittels eines multinomialen Modells.....	52
6.2.3	Darstellung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die medianen Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft.....	54
6.3	Identifizierte Schimmelpilzgattungen	59
6.3.1	Schimmelpilzgattungen in der Weinkellerluft	59
6.3.2	Schimmelpilzgattungen von Weinkellerwand- und Fassproben	60
6.4	Tri-, Tetrachloranisol und Tribromanisol	62
7	Diskussion	64
7.1	Vergleich der Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft und in der Außenluft.....	64
7.2	Vergleich der Sporenkonzentrationen in Relation zum Bautyp des Weinkellers und zu den klimatischen Bedingungen	66
7.3	Identifizierte Schimmelpilzarten	70
7.4	Tri-, Tetrachloranisol und Tribromanisol	73
8	Literatur.....	76

1 Zusammenfassung

In Wein produzierenden Betrieben kann das Vorkommen von unerwünschten Mikroorganismen ein hygienisches Problem darstellen und auch die Qualität des Weines ungünstig beeinflussen. Eine Evaluierung der steirischen Weinkeller im Hinblick auf die Menge und Zusammensetzung der Schimmelpilzflora ist sowohl für den Weinherstellungsprozess als auch aus Gründen des Arbeitnehmerschutzes von Bedeutung.

Im Zeitraum von Februar 2007 bis September 2008 wurden 36 Weinkeller von 20 Weinkellereien in der Steiermark auf das Vorkommen von Schimmelpilzen in der Luft und auf Materialoberflächen sowie auf das Vorhandensein von Trichloranisol (TCA), Tetrachloranisol (TeCA) und Tribromanisol (TBA) in der Luft untersucht. Die Luftkeimmessungen erfolgten nach dem Impaktionsverfahren mittels sechsstufigem Andersen® Kaskaden Sammler und einstufigem Merck Air Sampler MAS-100®. Die Untersuchung auf TCA, TeCA und TBA erfolgte mittels Solid Phase Micro Extraction (SPME) mit Gaschromatographie/Massenspektroskopie.

Die Ergebnisse zeigen, dass die höchsten medianen Sporenkonzentrationen von $1,6 \times 10^4$ KBE/m³ Luft in Weinkellern zu finden waren, die aus Ziegel und vor 1950 erbaut wurden und eine sichtbare Schimmelpilzbefallsfläche der Kategorie „mittel“ aufwiesen. Mit dem multiplen Gammamodell wurde ermittelt, dass die mittleren Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen in der Weinkellerluft signifikant von der Temperatur der Außenluft beeinflusst wurden. Mit steigender Außenlufttemperatur stieg auch die Pilzsporenkonzentration in den Weinkellern an. Abhängig von der Temperatur der Außenluft war die mittlere Konzentration von xerophilen Pilzen in der Luft von Weinkellern ohne Raumlufotechnische Anlage höher als in jenen mit einer Raumlufotechnischen Anlage. Die Wahrscheinlichkeit für einen schweren Schimmelpilzbefall im Weinkeller nahm mit steigender relativer Luftfeuchtigkeit im Weinkeller zu. In der Raumluf der Weinkeller wurden 14 dominante Gattungen nachgewiesen, wobei die Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Cladosporium* vorherrschend waren. Die Pilzart *Zasmidium cellare* wurde in 5 Weinkellern (13%) in Ziegelbauweise mit einer Schimmelpilzbefallsfläche der Kategorie „schwer“ nachgewiesen. Während in vier von 38 Kellerluftproben TCA über der Nachweisgrenze von <1 ng/L vorhanden war, konnte TeCA nur einmal und TBA nicht detektiert werden.

Diese Ergebnisse bilden eine Datengrundlage für weiterführende Studien über die Zusammensetzung der Schimmelpilzarten und deren Beteiligung an der Synthese von TCA in Weinkellern, sowie für arbeitsmedizinische Untersuchungen.

Schlagwörter: Sporenkonzentration, Schimmelpilze, Weinkeller, Trichloranisol

2 Summary

The presence of unwanted microorganisms in wineries presents not only hygienic and medical problems but also has a negative influence on wine quality. An evaluation of Styrian wine cellars with regard to the volume and the composition of the mycoflora is very important both for the process of wine production and for occupational safety.

36 wine cellars of 20 vintners in Styria were investigated with regard to microorganisms in the air and on material surfaces. Moreover, the presence of Trichloroanisole (TCA), Tetrachloroanisole (TeCA) and Tribromoanisole (TBA) in the air was determined by means of solid-phase micro-extraction. Microorganisms were measured using the six-stage Andersen[®] cascade impactor and the one stage Merck MAS-100[®] impactor.

The results showed that the highest median spore concentrations of 1.6×10^4 cfu/m³ air were in wine cellars with medium mold infestation which were built of brick and before 1950. The multiple Gamma model showed that mean xerophilic spore concentrations were significantly influenced by outdoor temperature. An increase of outdoor temperature led to an increase of the spore concentration in the air of the wine cellars. Cellars without air conditioning system showed higher spore concentrations in the air than cellars with an air conditioning system. The probability for a large mold infestation increases with the increase of air humidity in the wine cellars. In the air of the wine cellars 14 predominant species were found. *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium* were the most frequent species. *Zasmidium cellare* was found in five wine cellars (13%) built of brick with large mold infestation. TCA was detected in the air of four wine cellars and TeCA in one wine cellar. TBA was not detected.

These results will serve as a data basis for further studies regarding the spectrum of the fungal species and their role in the synthesis of TCA in wine cellars and also for occupational health.

Keywords: spore concentration, fungi, mold, wine cellar, trichloroanisole

3 Abkürzungsverzeichnis

A.d.	aqua destillata - destilliertes Wasser
ACFM	sechsstufiger Graseby [®] Andersen Kaskadenimpaktor
a_w	Wasseraktivität
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CPOMT	Chlorophenol O-Methyltransferase
DG18	Dichloran Glycerol Agar
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAA	exogen allergische Alveolitis
et al.	et alii - und andere
EtOH	Ethanol
FASTA	fast all - Tool zur Homologiesuche
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektroskopie
ISO	International Organisation for Standardisation - Internationale Organisation für Normung
ITS	internal transcribed spacer - interne transkribierte Zwischenabschnitte
KBE	Koloniebildende Einheit
MAS-100 [®]	einstufiger Merck MAS-100 [®] Impaktor
Max	Maximum
MEA	Malz Extrakt Agar
Med	Median
Min	Minimum
mM	mmol/Liter
MS	Massenspektroskopie
MUG	Medizinische Universität Graz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OTA	Ochratoxin A
PCR	polymerase chain reaction - Polymerase Kettenreaktion
RH	relative Luftfeuchtigkeit
rpm	revolutions per minute - Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

SPME	Solid Phase Micro Extraction - Festphasenmikroextraktion
TBA	Tribromanisol
TBP	Tribromphenol
TCA	Trichloranisol
TCP	Trichlorphenol
TeCA	Tetrachloranisol
TeCP	Tetrachlorphenol
VDI	Verein Deutscher Ingenieure

4 Einleitung

4.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

In Wein produzierenden Betrieben kann das Vorkommen von unerwünschten Mikroorganismen, wie Bakterien und Schimmelpilzen nicht nur ein hygienisches Problem darstellen, sondern auch die Qualität des Weines ungünstig beeinflussen. Die Weinqualität kann durch Fehler während der Traubenproduktion, der Weinlese, der Verarbeitung, aber auch bei Tätigkeiten im Weinkeller vermindert werden, wodurch Aussehen, Geruch oder Geschmack des Weines verändert werden kann.

Einer der häufigsten Weinfehler, der durch äußere Einflüsse entsteht, ist der Korkgeschmack, der in der Regel den Wein ungenießbar macht (Tanner und Zanier, 1981). Er verleiht dem Wein einen schimmelähnlichen, muffigen Beigeschmack. Der Geschmack beruht auf Aktivitäten von Schimmelpilzen, die den Korken bereits bei der Produktion besiedeln können.

Als wesentliche Ursachen für den Fehlgeschmack oder sog. Korkschmecker, gelten das Kochen des Korks in chlorhaltigem Wasser und die Chlorbleiche bei der Korkherstellung, durch die Trichloranisol entstehen kann, welches schon in geringsten Konzentrationen einen sensorisch wahrnehmbaren Fehlton hervorruft. Die am häufigsten gebildete chemische Verbindung hat die Bezeichnung 2,4,6-Trichloranisol, allgemein auch TCA genannt. Zahlreiche Untersuchungen bestätigen das Vorkommen von Trichloranisolen im Kork (Simpson und Sefton, 2007; Coque et al., 2003; Juanola et al., 2002; Alvarez-Rodriguez et al., 2002; Fischer, 2000).

Neben diesem echten Korkgeschmack gibt es aber auch zahlreiche Fehler bei der Weinherstellung oder Lagerung, die zu Unrecht dem Korken zugeschrieben werden. Die Weinproduktion stellt beispielsweise sehr hohe Anforderungen an das Lagerklima des Weinkellers. Wenn die Bedingungen im Keller nicht optimal sind, kann das Wachstum von verschiedenen Mikroorganismen begünstigt werden. Durch die mikrobielle Aktivität im Weinkeller können Schimmelpilze, wie z.B. die Gattungen *Penicillium* und *Trichoderma* zur Bildung von TCA

beitragen, indem Chlorphenole zu Chloranisolen methyliert werden (Prak et al., 2007). Bestimmte Schimmelpilzarten können auch Toxine wie z.B. das Ochratoxin A (OTA) produzieren, die in hohen Konzentrationen im Wein vorkommen können (Gambutti et al., 2005). Neben Schimmelpilzen können auch Bakterien, wie z.B. *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*, *Lactobacillus brevis* und *Leuconostoc mesenteroides* u.a. der Grund für einen fehlerhaften Wein sein (Hühn et al., 1999).

In vielen Materialien, die man im Keller vorfindet, sind Zusatzstoffe enthalten. Phenolhaltige Zusatzstoffe in Holzpaletten, Fässern, Bodenbelägen aus Kunstharz etc. können mit freiem Chlor in Kontakt geraten und durch Schimmelpilze zu Chloranisolen umgesetzt werden. Dieses Chlor kann beispielsweise aus chlorhaltigen Reinigungsmitteln, oder aus chlorhaltigem Wasser stammen, das oft in Barriquekellern zum Wässern des Bodens benutzt wird, um das Austrocknen der Fässer zu verhindern. Chlorphenole werden in der Verpackungsindustrie und in der Holz- und Korkherstellung als Schutzmittel eingesetzt (Coque et al., 2006; Pfeifer, 2002). Bromierte Verbindungen wie z.B. 2,4,6-Tribromphenol (TBP) werden bei Kunststoffen und zellulosehaltigen Materialien als Schutz vor Pilzbefall und als Flammenschutz eingesetzt. Durch Schimmelpilze kann wiederum das sensorisch dem echten Korkgeschmack ähnelnde Tribromanisol (TBA) gebildet werden (Coque et al., 2006; Pfeifer, 2002).

Pilze können bei ausreichendem Schimmelpilzbefall in den Weinkellern hohe Sporenkonzentrationen an die Luft abgeben. Für einen Schimmelpilzbefall wird häufig eine Kombination verschiedener Faktoren wie z.B. Substrat-, Luftfeuchtigkeit oder Temperatur als Ursache genannt. Das Substrat für Schimmelpilze besteht aus organischen Stoffen, wie z.B. Erde, Holz, Staubpartikel, Kunststoff und anderen. Außerdem können die Substratoberflächen und diverse Materialien im Innenraum die Wachstumsbedingungen der Pilze beeinflussen.

Für die Weinqualität sollte im Weinkeller eine Raumtemperatur zwischen 8°C und 15°C vorherrschen (Vogt et al., 1984). Weinkeller sollten weder zu trocken noch zu feucht sein. Eine gute Lüftung ist von großer Wichtigkeit, denn muffige Gerüche können sich auf den Wein übertragen. Die Innenraumluft der

Weinkeller sollte idealer Weise 50-75% relative Luftfeuchtigkeit (RH) aufweisen. Bei Weinkellern mit einer RH von weniger als 65% können die Korke in den Flaschen austrocknen. Zu hohe Luftfeuchtigkeit kann Schimmelpilzwachstum an Wänden und Oberflächenmaterialien hervorrufen und in weiterer Folge dazu führen, dass z.B. Korke und Flaschenetikette verschimmeln.

Erfahrungen zeigten, dass in unbelasteten Weinkellern dieselben Schimmelpilzarten vorkommen wie in der Außenluft und dass die Innenraumluft von der Außenluft beeinflusst wird (Picco et al., 2004). Die Zahl der Schimmelpilzsporen in der Außenluft wird von der Beschaffenheit der Umgebung, der Vegetation, dem Klima, der Tages- und Jahreszeit beeinflusst. Für das Auftreten von myzelbildenden Pilzen in der Luft von Weinkellereien gibt es derzeit keine Richt- bzw. Grenzwerte. Generell wird jedoch angestrebt auch in den Weinkellern das Wachstum von Schimmelpilzen zu vermeiden.

Im Zusammenhang mit einer hohen Sporenkonzentration von Schimmelpilzen in der Luft steht die exogen allergische Alveolitis (EAA), eine Berufskrankheit, die als „Winzerlunge“ bezeichnet wird. Diese Hypersensitiväts pneumonitis kann sich bei anhaltendem Allergenkontakt zu einer diffusen interstitiellen Lungenfibrose mit Spätschäden entwickeln. Hauptverantwortlich zeichnet sich dafür die Pilzart *Botrytis cinerea* (Buchter, 2011; Buzina, 2007; Trautmann, 2006; Bessot et al., 1997; Popp et al., 1987).

4.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser wissenschaftlichen Studie war es, eine erste Evaluierung der steirischen Weinkeller im Hinblick auf das Vorkommen von Schimmelpilzen durchzuführen. Anhand von quantitativen und qualitativen Analysen sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß die Mikroorganismen Kellerräume belasten und infolge die Qualität des Weines beeinträchtigen könnten. Die Untersuchungen über die Menge und Zusammensetzung der Mikroflora in Weinkellern sind sowohl für den Weinherstellungsprozess als auch aus Gründen des Arbeitnehmerschutzes von Bedeutung. Ein weiteres Ziel war es, die Konzentration von TCA, TeCA (Tetrachloranisol) und TBA in der Luft der untersuchten Weinkeller zu erfassen.

4.3 Schimmelpilze

4.3.1 Definition

Eine besondere Gruppe der Pilze sind die „Schimmelpilze“. Das Wort „Schimmel“ stammt aus dem Althochdeutschen und bedeutet „Kahm“ und ist mit dem Wort „Schimmer“ verwandt (Kluge, 1963). Der Begriff „Schimmelpilz“ umfasst keine systematisch abgetrennte Pilzgruppe, sondern bildet eine ökologische Kategorie, die verschiedene Organismen vereint, die bestimmte gemeinsame ökologische Nischen besiedeln.

Für Schimmelpilze gelten nach der Definition von Delitsch (1943) folgende Merkmale (Mücke und Lemmen, 2004; Reiß, 1998):

- Ihr Lebensraum ist der Boden oder es sind konzentrierte Nährlösungen (keine ausgesprochenen Wasserpilze).
- Sie können saprophytisch leben, d.h., sie gewinnen ihre Nährstoffe aus abgestorbenen organischen Substanzen, die sie dadurch zersetzen.
- Sie bilden ein typisches Myzel, ein Fadengeflecht aus Hyphen. Hefen dagegen bilden durch Sprossung lockere Zellverbände, aber kein echtes Myzel.
- Die Vermehrung erfolgt überwiegend durch ungeschlechtliche Sporen (Sporangiosporen oder Konidien).
- Wenn sexuelle Fortpflanzungsorgane gebildet werden, dann sind diese klein.
- Nach dieser Definition gehören zu den Schimmelpilzen fast alle imperfekten Pilze und viele Schlauch- und Jochpilze.

Genauere Kriterien für die Zuordnung eines Pilzes zu den Schimmelpilzen wurden von Kreisel (1988) gefasst:

- Sie weisen eine ruderalen Lebensstrategie auf, d.h., es erfolgt eine Anpassung an nährstoffreiche, aber nur kurzfristig verfügbare Substrate. Als Erstbesiedler haben sie nur wenige Konkurrenten.

- Es wird ein Hyphenmyzel ausgebildet.
- Die Wachstumsgeschwindigkeit bis zur Sporenbildung ist hoch. Die Entwicklung von der keimenden Spore bis zur ersten Sporenbildung verläuft innerhalb weniger Tage.
- Es werden große Mengen an Sporen gebildet, um infolge der Kurzlebigkeit des Substrates rasch neue Substrate zu besiedeln.
- Die Vermehrung erfolgt überwiegend oder ausschließlich vegetativ, meist durch Konidien oder endogene Sporen. Die zeitlich und energetisch aufwendigen Phasen der geschlechtlichen Vermehrung werden vermieden.
- Ein parasexueller Zyklus ohne sexuelle Fortpflanzung sichert die genetische Rekombination.
- In der Fungistase ist die Empfindlichkeit gegenüber Nährstoffen vorhanden. Stehen plötzlich geeignete Substrate zur Verfügung, können die Nährstoffe die Fungistase aufheben und eine sofortige Keimung der Sporen ermöglichen.
- Sie kommen ubiquitär vor. Als Saprophyten können sie in einem weiten Spektrum an Substraten gedeihen und infolge ihres gering spezialisierten Stoffwechsels weltweit in allen Klimazonen wachsen.
- Es wird eine große Anzahl an Stoffwechselprodukten gebildet (Primär- und Sekundärmetabolite), die ausgeschieden werden.
- Eine klare Zuordnung welche Pilze zu den Schimmelpilzen gehören ist schwer. Der Übergang von saprophytischer und parasitischer Lebensweise erfolgt fließend und hängt von den äußeren Gegebenheiten ab. Die Ausbildung des typischen Myzels ist nicht unveränderlich, da viele Pilze je nach Umweltbedingungen mit Myzel oder aber auch hefeähnlich wachsen können (Dimorphismus).

4.3.2 Morphologie und Fortpflanzung

Man unterscheidet bei der Entwicklung der Schimmelpilze die vegetative Phase oder Wachstumsphase und die generative oder Vermehrungsphase. In der

vegetativen Phase bildet der Pilz fadenartige Zellfäden, die Hyphen. Hyphen entstehen durch Auskeimen von Sporen und bilden nach Wachstum und fortlaufender Verzweigung das Myzel. Das Myzel kann sich im Substrat (Substratmyzel) oder auf der Substratoberfläche (Oberflächenmyzel) entwickeln. Das Myzel ist mit Cytoplasma ausgefüllt und kann durch Querwände (Septen) in einzelne Zellen untergliedert oder völlig unseptiert sein.

In der generativen Phase werden Fortpflanzungszellen gebildet. Erst durch diese Strukturen ist ein Schimmelpilz morphologisch bestimmbar. Die ausgebildeten Vermehrungszellen werden als Sporen bezeichnet und je nach Art ihrer Entstehung in ungeschlechtliche und geschlechtliche Sporen unterteilt. Bildet ein Schimmelpilz diese beiden Sporentypen aus, wird er als „perfekt“ bezeichnet. Wenn er ein unseptiertes Myzel besitzt, wird er der Klasse der Zygomycetes (Jochpilze) zugeordnet, verfügt er über septierte Hyphen der Klasse der Ascomycetes (Schlauchpilze). Da für die meisten Schimmelpilze nur eine ungeschlechtliche Fortpflanzung bekannt ist, wurde die Pilzklasse der Deuteromycetes (Fungi imperfecti) eingeführt (Reiß, 1998).

4.3.3 Verbreitung

Schimmelpilze kommen ubiquitär vor und sind in erster Linie im Erdboden auf verwesenden tierischen und pflanzlichen Substraten zu finden. Begrenzt wird ihr Vorkommen durch Nährstoffmangel, Hemmsubstanzen oder konkurrierende Arten und ungeeignete physikalische Bedingungen. Die Besiedelung anderer Lebensräume erfolgt mit Hilfe der gebildeten Sporen. Jede atmosphärische Luft, Außen- oder Innenraumluft enthält Sporen bestimmter Schimmelpilzarten. Die Sporenkonzentration variiert je nach Ort, Höhe, Tages- und Jahreszeit, Umgebungsbedingungen und Klimabedingungen. Die Lebensdauer der Pilzsporen ist in der freien Luft von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Sonneneinstrahlung abhängig. Farblose Sporen werden im Gegensatz zu pigmentierten Sporen rasch durch die UV-Strahlung im Sonnenlicht abgetötet. In Innenräumen sind Schimmelpilze spezifischen Umweltbedingungen ausgesetzt, wobei Heiz- und Lüftungsverhalten dazu führen, dass xerotolerante Arten einen großen Anteil an der Schimmelpilzflora haben. Die jahreszeitliche

Zusammensetzung der Pilzarten im Innenraum wird qualitativ vom Artenspektrum der Außenluft beeinflusst (Mücke und Lemmen, 2004; Reiß, 1998).

4.3.4 Lebensbedingungen

Sporenceimung, Myzelwachstum und Sporenbildung hängen vom Nährsubstrat, der Temperatur, dem pH-Wert des Substrates und dem Gehalt an frei verfügbarem Wasser des Substrates (Wasseraktivität, a_w -Wert) ab.

4.3.4.1 Temperatur

Schimmelpilze wachsen in einem weiten mittleren Temperaturbereich (Mesophilie). Für das Myzelwachstum liegt die Minimaltemperatur um 0°C, die Optimaltemperatur bei 25°C-35°C und die Maximaltemperatur zwischen 30°C und 40°C. Thermotolerante Schimmelpilze haben mit einer Maximaltemperatur von 50°C einen noch größeren Bereich für das Wachstum zur Verfügung, wobei Thermophile erst bei Temperaturen über 20°C wachsen (Tabelle 4.1). So gedeihen z.B. Vertreter der Gattung *Penicillium* bevorzugt bei 20-25°C und wärmeliebendere *Aspergillus* Arten bei 25-35°C (Mücke und Lemmen, 2004; Reiß, 1998).

Tabelle 4.1: Temperaturbereiche für das Wachstum von Schimmelpilzen

Bezeichnung	Minimum °C	Optimum °C	Maximum °C
Mesophilie	0	25-35	ca. 40
Thermotoleranz	0	30-40	ca. 50
Thermophilie	20-25	35-55	ca. 60

4.3.4.2 Wassergehalt des Substrates

Schimmelpilzen und auch anderen Mikroorganismen steht nicht der gesamte Wasseranteil des Substrates zur Verfügung sondern nur der Teil des Gesamtwassergehaltes, der nicht an lösliche Substanzen wie Salze, Kohlenhydrate und Eiweißstoffe gebunden ist. Diese Wasseraktivität (a_w -Wert) ist abhängig von der chemischen Zusammensetzung, der Temperatur und dem

pH-Wert des Substrates. Der Zusammenhang zwischen dem a_w -Wert und der RH, die im Gleichgewicht mit dem Substrat steht, wird in der Gleichung nach Scott (1957) ausgedrückt:

$$RH (\%) = a_w * 100$$

Die meisten Schimmelpilze haben ihr a_w -Minimum bei 0,80-0,85, ihr Optimum bei 0,95-0,98. Unterschiedliche a_w -Werte sind für das Wachstum und für einzelne Stoffwechsellleistungen erforderlich. Für die Sporenkeimung und das Myzelwachstum reichen geringere a_w -Werte aus als für die Sporenbildung. Bei Optimaltemperatur ist der a_w -Bereich, der die Sporenkeimung erlaubt, am größten. Fällt die Wasseraktivität unter 0,61, so ist ein Pilzwachstum sehr unwahrscheinlich (Mücke und Lemmen, 2004; Reiß, 1998).

4.3.4.3 Wassergehalt der Luft

Die Freisetzungsrates der Sporen wird durch die RH beeinflusst (Mücke und Lemmen, 2004; Reiß, 1998). Eine Unterscheidung der Pilzsporen in „Schönwettersporen“ bzw. „dry air spora“ und „Schlechtwettersporen“ bzw. „wet weather spora“ kann erfolgen (Grinn-Gofroń, 2007; Troutt and Levetin, 2001; Reiß, 1998). Die Sporen unterschiedlicher Schimmelpilzgattungen wie z.B. *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* und andere, die zu den „dry air spora“ zählen, werden bei geringer RH und niedriger Windstärke durch die Luftbewegungen verbreitet (Reiß, 1998; Levetin, 1995; Hirst and Stedman, 1963). Die Verbreitung von hydrophilen Sporen erfolgt passiv durch Regen und diese Gattungen werden als „wet weather spora“ bezeichnet (<http://pollen.utulsa.edu/Spores/AIRSPORA.html>; 04.2011). Während oder nach Regen befinden sich daher viele Asco- und Basidiosporen in der Luft (Troutt and Levetin, 2001; Li and Kendrick, 1995b). Asco- bzw. Basidiosporen werden bei der sexuellen Vermehrung von Ascomyceten oder Schlauchpilzen in schlauchförmigen Ascii bzw. von Basidiomyceten in Sporenständen oder Basidien gebildet (Hawksworth et al., 1995).

4.3.4.4 pH-Wert des Substrates

Schimmelpilze bevorzugen Substrate mit leicht saurem Milieu, d.h., ihr pH-Optimum liegt bei 4,5-6,5. Durch Ausscheiden von Stoffwechselprodukten sind Schimmelpilze in der Lage den pH-Wert des Substrats zu verändern (Mücke und Lemmen, 2004; Reiß, 1998).

4.3.4.5 Licht

Bei einigen Schimmelpilzarten konnte beobachtet werden, dass die Sporenbildung durch Licht angeregt wird, wobei Dunkelheit die Produktion von geschlechtlichen Ascosporen sowie Sklerotien fördert (Mücke und Lemmen, 2004; Reiß, 1998).

4.3.4.6 Chemische Faktoren

Schimmelpilze sind heterotroph und daher auf die Anwesenheit organischer Kohlenstoffverbindungen angewiesen. Da sie kleine und wasserlösliche Moleküle durch die Zellwand aufnehmen, ist ihr Wachstum in Gegenwart von Glucose, Maltose, Saccharose und ähnlichen Verbindungen gut (Mücke und Lemmen, 2004; Reiß, 1998).

4.3.5 *Zasmidium cellare*

In einigen Weinkellern älteren Baujahres sind oft Wände, Fässer und Flaschen mit dem Schimmelpilz *Zasmidium cellare* Syn.: *Racodium cellare* bzw. *Cladosporium cellare* bedeckt (Haas et al., 2010, Arzanlou et al., 2007, Tribe et al. 2006; Schanderl, 1936). Dieser geruchsneutrale Kellerschimmel („Kellertuch“) bildet mit dem Luftmyzel dunkelgraue bis grünschwärze watteartige Polster und überwächst auch Oberflächen wie Glas, Porzellan und Metall, da er gasförmig in der Kellerluft vorkommende organische Stoffe wie z.B. Ethylalkohol metabolisieren kann (Dittrich und Grossmann, 2005). Erstmals wurde der Weinkellerschimmel 1696 in London dokumentiert (Tribe et al., 2006). Zylindrische, blasse braun-olivfarbene, gewarzte Konidien (9-14 µm x 2-2,5 µm) werden selten ausgebildet. Wenn Konidiophoren vorhanden sind, sind sie vereinzelt im Luftmyzel verteilt. Die zylindrischen Konidiophoren sind häufig zu konidiogenen Zellen (20-60 µm x 2-2,5 µm) reduziert und erheben sich vom

Luftmyzel (Arzanlou et al., 2007, Tribe et al., 2006). *Z. cellare* ist laut Dittrich und Grossmann (2005) ein Indikator für mindestens 85% Luftfeuchtigkeit und soll nach mündlichen Überlieferungen der Weinbauern durch die Regulation der Luftfeuchtigkeit für optimale Lagerbedingungen in den Weinkellern sorgen (Dittrich und Grossmann, 2005). Aussagen von Winzern lauten häufig: „Der schwarze Schimmel ist der Gute, der weiße Schimmel der Schlechte“. Schanderl (1958) hat bei Ernährungsversuchen von *Z. cellare* mit gasförmigen Verbindungen festgestellt, dass der Pilz nicht nur Alkohole sondern auch Formaldehyd, Thymol und Essigsäure als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Als Stickstoffquellen können dem Pilz Ammoniak und Pyridin bzw. als Schwefelquelle können Thiosulfat und schwefelige Säure dienen (Kiene, 1939). Im Gegensatz zu anderen Schimmelpilzgattungen wie *Penicillium*, *Fusarium* oder *Trichoderma* soll der Weinkellerschimmel *Z. cellare* geruchsneutrale Eigenschaften haben und nicht in Verbindung mit chlor- oder bromhaltigen Substanzen zur Bildung von halogenierten Anisolen beitragen, welche einen unangenehmen muffigen Geruch erzeugen (Prak et al., 2007; Tribe et al., 2006; Chatonnet et al., 2004; Alvarez-Rodriguez et al., 2002; Fischer, 2000).

4.4 Tri-, Tetrachloranisol und Tribromanisol

4.4.1 Weinkontamination durch Anisole

Trichloranisol (TCA) konnte bereits 1981 als Verursacher des Korkgeschmacks, einem der häufigsten Weinfehler, der durch äußere Einflüsse entsteht und den Wein in der Regel durch einen schimmelähnlichen, muffigen Beigeschmack ungenießbar macht, identifiziert werden (Tanner und Zanier, 1981). Der Geschmack beruht auf Aktivitäten von Schimmelpilzen, die den Korken bereits bei der Produktion besiedeln können. Mathieu führte 1900 schimmelige und modrige Fehltöne im Wein auf Schimmelpilze der Gattung *Penicillium* zurück, die in den Lentizellen nachgewiesen wurden (Mathieu, 1900). Kork wird aus der Rinde der Korkeiche (Lat. *Quercus suber*) gewonnen. Bei der Korkherstellung gelten das Kochen des Korks in chlorhaltigem Wasser und die Chlorbleiche als Ursachen für diesen Fehlgeschmack bzw. Korkschmecker und für die Bildung von TCA. Da durch den Kochvorgang bzw. die Bleichung mit Hypochlorid Chlorphenole entstehen können, wurde diese verboten bzw. durch

Wasserstoffperoxid mit Ammoniak ersetzt. Aufgrund unzureichender Kontrollen scheint die Chlorbleiche nach wie vor eine Ursache für den Fehlgeschmack zu sein (Simpson und Sefton, 2007; Coque et al., 2006). Ein Befall mit Mikroorganismen erfolgt bei der Zwischenlagerung der Korkplatten nach dem Bleichen und Waschen des Korks beim Herstellungsprozess. Schimmelpilze und Bakterien können sich im Lentizellengewebe des Korks entwickeln. Die toxischen Chlorphenole werden durch Biomethylierungsreaktionen der Mikroorganismen zu nicht toxischen Chloranisolen umgewandelt (Coque et al., 2006; Sponholz und Muno, 1994; Maujean et al., 1985). Durch die mikrobielle Aktivität im Weinkeller können daher Schimmelpilze zur Bildung von halogenierten Anisolen beitragen, indem Chlorphenole zu Chloranisolen methyliert werden (Prak et al. 2007). Zahlreiche Untersuchungen bestätigen das Vorkommen von Chloranisolen im Kork (Simpson und Sefton, 2007; Coque et al., 2003; Alvarez-Rodriguez et al., 2002; Juanola et al., 2002; Fischer et al., 2000). In Abbildung 4.1 sind die häufigsten Vertreter der halogenierten Anisole, die bei der Weinkontamination auftreten, angeführt.

Der Einsatz von Herbiziden, Insektiziden und Fungiziden auf Chlorphenolbasis wird als eine der Hauptursachen für den Eintrag von Chlorphenolen in den Weinkeller bzw. im Kork angesehen (Simpson und Sefton, 2007; Coque et al., 2006; Simpson und Lee, 1990). Chlorphenole wurden auch in Holzschutzmitteln verwendet und gelangen auch über diesen Weg in die Weinkeller (Coque et al., 2006; Tanner und Zanier, 1981). In Europa wurde der Einsatz von Chlorphenolen in der Land- und Forstwirtschaft bereits 2002 verboten (EC 2002). Da viele Chlorphenole nur sehr schwer biologisch abbaubar sind, persistieren sie lange in der Umwelt (Abbildung 4.2; Coque et al., 2006).

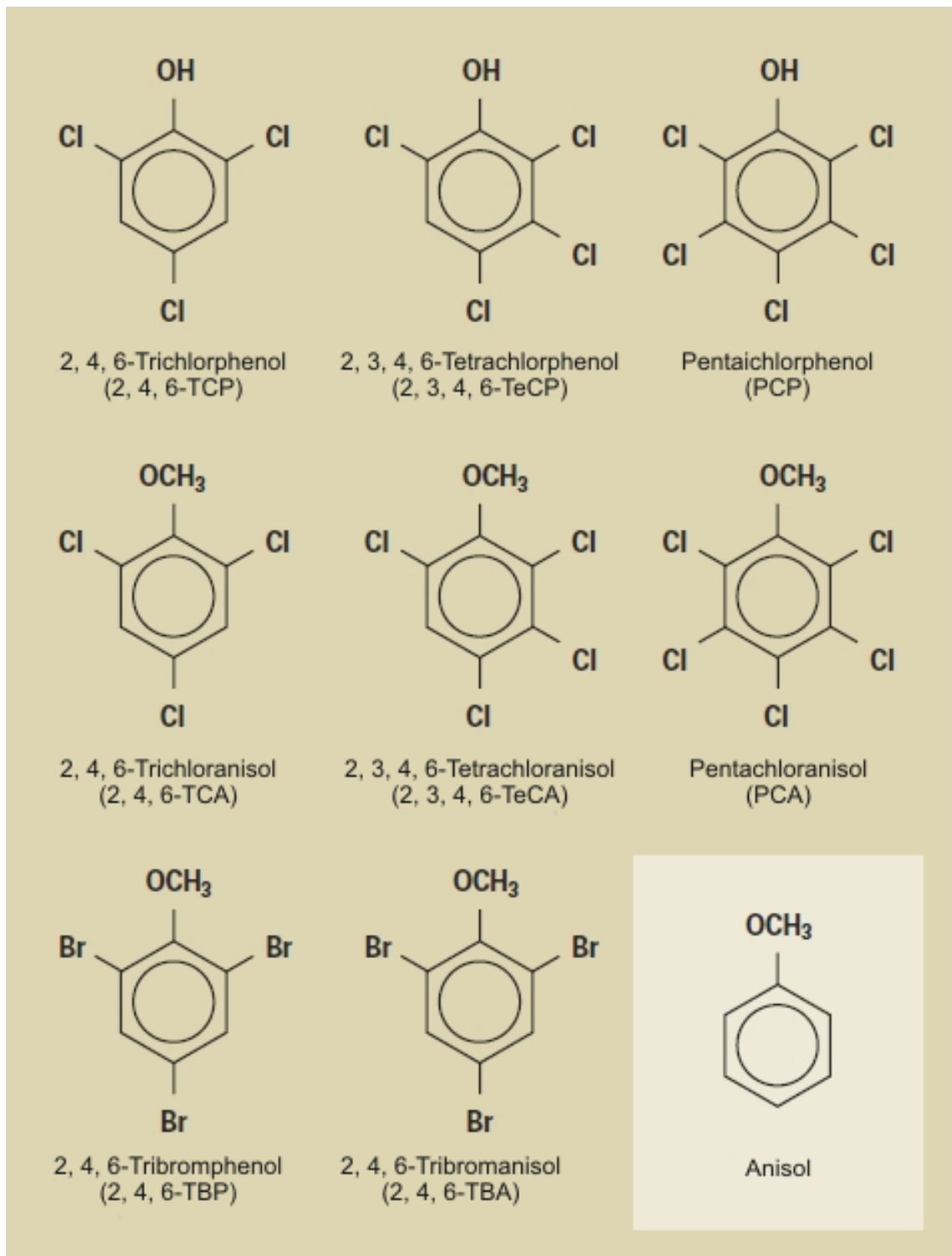


Abbildung 4.1: Strukturformeln von Anisol und den häufigsten Halophenolen und Haloanisolen, die bei der Kontamination von Wein eine Rolle spielen (Coque et al., 2006)

Phenolhaltige Zusatzstoffe sind meist in vielen Kellermaterialien wie z.B. Holzpaletten, Fässern und Bodenbelägen aus Kunstharz enthalten. Kommen diese phenolhaltigen Materialien mit freiem Chlor in Kontakt, können sich

Chlorphenole bilden, die durch Schimmelpilze zu Chloranisolen umgewandelt werden. Quellen für freies Chlor können z.B. chlorhaltige Reinigungsmitteln oder die Verwendung von chlorhaltigem Wasser zum Wässern des Bodens in Barriquekellern sein. Chlorphenole werden in der Verpackungsindustrie und in der Holz- und Korkherstellung als Schutzmittel eingesetzt (Coque et al., 2006; Pfeifer, 2002). Viele Kunststoffe und zellulosehaltige Materialien enthalten zum Schutz vor Pilzbefall und als Flammschutz bromierte Verbindungen wie z.B. 2,4,6-Tribromphenol. TBP kann in Verpackungsfolien, Kunststoffschläuchen, Holz, Pappe, Wand- und Bodenfarben vorkommen und es kann wiederum durch Schimmelpilze das sensorisch dem echten Korkgeschmack ähnelnde TBA gebildet werden (Coque et al., 2006; Chatonnet et al., 2004; Pfeifer, 2002).

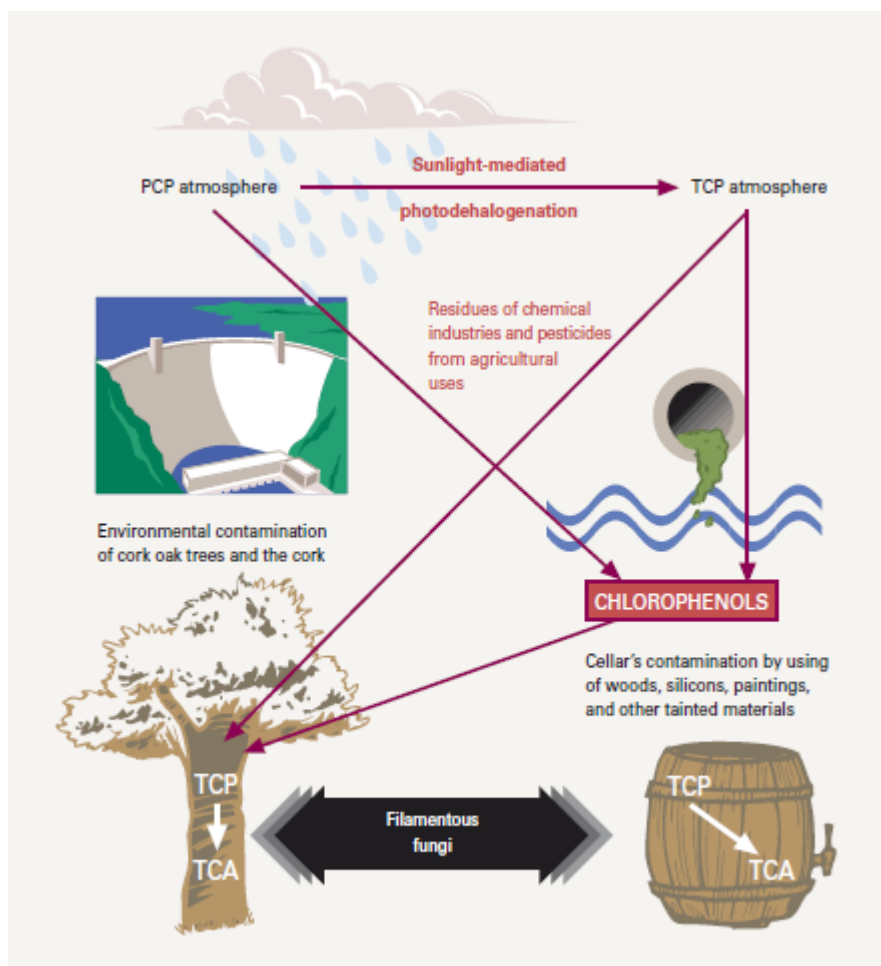


Abbildung 4.2: Kreisläufe von Chlorphenolen und Chloranisolen in der Umwelt (Coque et al., 2006)

Der molekulare Mechanismus der TCA-Bildung durch Biomethylierung von Trichlorphenol (TCP) im Weinkeller ist wissenschaftlich geklärt. Die Biomethylierungsreaktion, die im Weinkeller hauptsächlich von Schimmelpilzen ausgeführt wird, wird durch das Enzym Chlorphenol O-Methyltransferase (CPOMT) katalysiert (Abbildung 4.3).

In Abbildung 4.4 nach Pfeifer (2002) ist die Bildung von TCA im Wein über drei miteinander verbundenen mikrobiellen Wegen dargestellt. Die Chlorierung erfolgt durch frei werdendes Chlor aus dem Hypochlorid. Die phenolische Grundsubstanz stammt entweder aus dem Kork als Phenol oder Anisol oder Schimmelpilze selbst bilden Phenole im Pentosephosphatweg über Shikimisäure, einer Vorstufe bei der Synthese aromatischer Aminosäuren. Die Methylierung vom Phenol zum Anisol erfolgt über die CPOMT der Mikroorganismen (Pfeifer, 2002; Maujean et al., 1985).

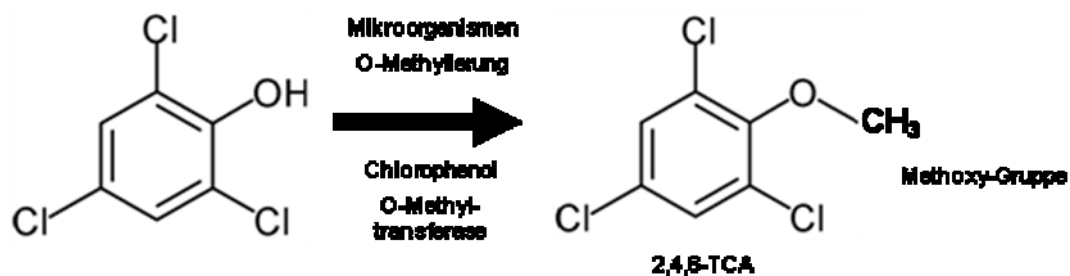


Abbildung 4.3: Mikrobieller Umsetzungsschritt von TCP zu TCA katalysiert durch die Chlorphenol O-Methyltransferase

Die Fähigkeit durch Biomethylierung TCP zu TCA abzubauen ist für Schimmelpilze wie *Penicillium glabrum*, *Penicillium roqueforti*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Paecilomyces variotii*, *Chrysonilia sitophila* und andere dokumentiert (Coque et al., 2003; Alvarez-Rodriguez et al., 2002; Simpson und Lee, 1990). Die Effizienz der Abbauleistung der Schimmelpilze durch Biomethylierung von TCP ist unterschiedlich. So werden z.B. von *Mucor plumbeus* oder *Penicillium decumbens* weniger als 1% TCP zu TCA umgesetzt, wogegen von *Trichoderma longibrachiatum* 38% oder von *Fusarium oxysporum* 29% umgesetzt werden. Die Menge an eingesetztem TCP korreliert nicht mit der Menge an TCA, das durch die Biodegradation entsteht (Coque et al., 2003; Alvarez-Rodriguez et al., 2002).

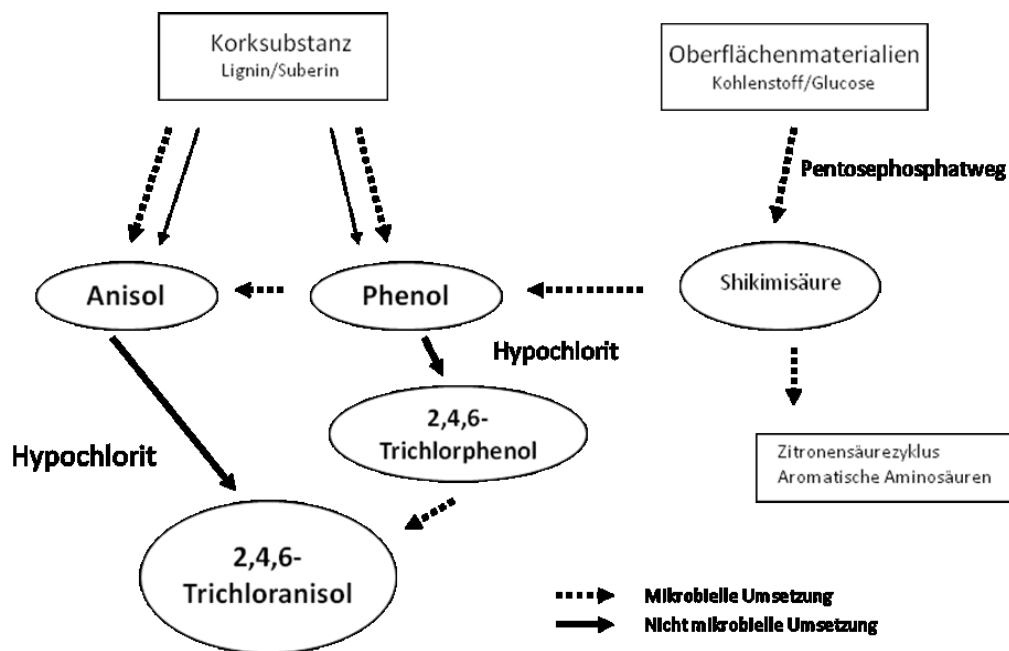


Abbildung 4.4: Bildung von TCA in Wein nach Pfeifer (2002), verändert

Penicillium roqueforti und *Chrysonilia sitophila* weisen eine hohe biologische Abbaukapazität auf und bauen das Suberin des Korks bzw. das Lignin des Holzes und die Zellulosebestandteile ab. Aus den verschiedenen Abbauprodukten kann wiederum TCA gebildet werden, wenn Hypochlorid vorhanden ist (Vitorino et al., 2007; Chatonnet et al., 1994).

Um diese für den Korkschmecker verantwortlichen Verbindungen im Wein wahrnehmen zu können, muss eine bestimmte Konzentration, der sensorische Schwellenwert erreicht werden. Wird dieser Schwellenwert überschritten, kann der Fehlton wahrgenommen werden, wobei die Schwellenwerte für jede Substanz und für jede Matrix, wie z.B. Wasser oder Wein unterschiedlich sind. In Tabelle 4.2 sind die sensorischen Schwellenwerte für TCA, TeCA und TBA angeführt. Die wahrnehmbaren Schwellenwerte sind nicht nur für Weiß- oder Rotweine unterschiedlich, sondern auch der Mensch spielt eine Rolle, da verschiedene Personen unterschiedliche sensorische Wahrnehmungsstufen aufweisen.

Tabelle 4.2: Sensorische Geruchsschwellenwerte für TCA, TeCA und TBA aus der Literatur nach Coque et al., (2006)

Verbindung	Matrix	Sensorischer Schwellenwert
2,4,6-TCA	Wasser	30-300 pg/L
	Wein	1,5-3,0 ng/L
2,3,4,6-TeCA	Wasser	4 ng/L
	Weiß-, Rotwein	10-15 ng/L
	Schaumwein	5 ng/L
2,4,6-TBA	Wasser	8-30 pg/L
	Wein	3,4 ng/L

5 Material und Methoden

5.1 Studiendesign

In dieser Studie wurden Luftkeimmessungen in verschiedenen Typen von Weinkellern wie z.B. Ziegel- und Betonkeller, in Kellern mit und ohne Raumluftechnischen Anlagen und in Kellern mit Stahltank- oder Holzfassgärung vorgenommen. Um abschätzen zu können, wie hoch die Sporenkonzentration in der Luft von Weinkellereien sein kann, wurden Keller, die einen unerwünschten sichtbaren Schimmelbefall aufwiesen, mit Kellern ohne Schimmelprobleme verglichen. Weiters wurde die Raumluf auf ihren Gehalt an TCA, TeCA und TBA untersucht. Neben der Bestimmung der Pilzsporenkonzentration pro m³ Luft wurden zur weiteren Beurteilung der Weinkeller zusätzlich Proben von div. Materialien (Mauerwerk, Weinfässer etc.) entnommen und qualitativ mit den Schimmelpilzarten der Kellerluft verglichen.

Zu jeder Raumlufmessung wurde eine Vergleichsmessung in der Außenluft durchgeführt, da die Differenz der Anzahl koloniebildender Einheiten pro m³ Luft

(KBE/m³) Rückschlüsse auf eine mögliche Belastung durch Schimmelpilzsporen im Innenraum zulässt. Anhand der quantitativen und qualitativen Analyse der Keimkonzentrationen sollte untersucht werden, inwieweit sich bestimmte Keimgruppen selektiv auf mit Schimmel belastete Kellerräume eingrenzen lassen.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Dokumentation von Außenlufttemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit, um den jahreszeitlichen Verlauf der Sporenkonzentration und -zusammensetzung der Luft vergleichen zu können. In diesem Kontext wurden parallel zu jeder Sporenkonzentrationsmessung Lufttemperatur und Luftfeuchtigkeit der Innenraum- und Außenluft bestimmt, sowie der Taupunkt der Kellerluft ermittelt. Oberflächentemperatur-Messungen sollten Hinweise auf mögliche Ursachen für Schimmelpilzwachstum an den Konstruktionsteilen geben. Zusätzlich wurden Daten über die baulichen Gegebenheiten, die raumluftechnischen Einrichtungen und die Kellerlüftung erhoben.

5.2 Untersuchte Weinkeller

Im Zeitraum von Februar 2007 bis September 2008 wurden 36 Weinkeller von 20 steirischen Weinkellereien in Österreich auf das Vorkommen von Schimmelpilzen in der Luft und auf Materialien sowie auf das Vorhandensein von TCA, TeCA und TBA in der Luft untersucht. Von den insgesamt 36 beprobten Weinkellern waren 16 aus Ziegel und 20 aus Beton gebaut. 22 Keller waren mit einer Raumluftechnischen Anlage (Lüftungsanlage, Klimaanlage) ausgestattet. Die Weinkeller ohne Klimaanlage wiesen eine mechanische oder natürliche Belüftung auf.

Unter der Kategorisierung „Ziegelkeller“ bzw. „Betonkeller“ sind folgende baulichen Unterschiede zu verstehen:

Ziegelkeller: Sind primär alte Keller, die mit Lehmziegel gemauert wurden, aber auch alte Wirtschafts- oder Stallgebäude, die später zu „Weinkellern“ umgebaut wurden. Die Ziegelkeller befinden sich gänzlich oder partiell unter der Erde und sind durchwegs ebenerdige Gebäude.

Betonkeller: Diese Bauweise setzte in den 50er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts ein. Der Großteil moderner Weinkeller weist den Raum begrenzende Stahlbetonelemente auf, die zusätzlich mit anderen Oberflächenmaterialien versehen sein können, z.B. Kunststoffpaneele, Ziegel, Putze etc.

Eine Unterteilung der Keller konnte auch noch hinsichtlich ihres Verwendungszweckes getroffen werden. Kellerräume in denen Großteils nur Barriquefässer gelagert wurden, wurden als „Lagerkeller“ bezeichnet, die anderen Keller als „Produktionskeller“.

Eine weitere Kategorisierung der Weinkeller erfolgte nach der Größe der befallenen Oberflächen der Wände, Decken und Böden mit Schimmelpilzen. Die Keller wurden in drei Kategorien gegliedert: Weinkeller mit einer Schimmelpilzbefallsfläche von <20% wurde der Kategorie „leicht“ zugeordnet. Eine Befallsfläche von 20-80% wurde als „mittel“ bezeichnet. Weinkeller mit einer Befallsfläche von mehr als 80% wurden als „schwer“ eingestuft.

5.3 Mikrobiologische Methodik

5.3.1 Luftkeimmessungen

5.3.1.1 Probennahme

Die Luftkeimmessungen erfolgten nach dem Impaktionsverfahren, einem direkten Sammelverfahren bei dem die abgeschiedenen Mikroorganismen direkt auf geeigneten Nährböden gesammelt wurden. Die Luftkeimsammler wurden in einer Höhe von 1,50 m über Bodenniveau in der Raummitte platziert. Von jedem der 36 Weinkeller wurden Luftproben im Frühling, in den Monaten Februar bis Mai und im Sommer, von Juni bis September, gezogen. Parallel zu jeder Kellerraumluftmessung wurde eine Vergleichsmessung der Außenluft vorgenommen.

Als Impaktoren wurden der sechsstufige Graseby[®] Andersen-Kaskaden-Sammler (ACFM) und der einstufige Merck Air Sampler MAS-100[®] (MAS) eingesetzt. Die Sammelzeit wurde beim MAS-100[®] mit einem Luftdurchsatz von 100 L/min, mit 1 min, beim ACFM mit einem Luftdurchsatz von 28,3 L/min, mit

2 min gewählt. Als Impaktionsmedien wurden Malzextraktagar (MEA) für mesophile und Dichloran-Glycerolagar (DG18) für xerophile Schimmelpilze verwendet (Tabelle 5.1). Die Luftkeimmessungen erfolgten in Anlehnung an die VDI 4300 Blatt 10.

Um weitere Kriterien zur Beurteilung der Weinkeller zu erhalten, wurden Material- und Abstrichproben von Wand- und Fassoberflächen mit sterilen Tupfern entnommen und auf die in Tabelle 5.1 angeführten Nährmedien übertragen.

5.3.1.2 Probenaufarbeitung und Probenauswertung

Die Nährmedien der Material- bzw. Abstrichproben und die von den Impaktoren beaufschlagten Agarplatten wurden für sieben bis zehn Tage bei 25°C inkubiert. Um die Gesamtkeimzahl zu ermitteln, wurden die Kolonien jeder Platte nach der Inkubation ausgezählt und addiert. Die statistische Korrekturtabelle nach Feller (1950) wurde nicht verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Daten mit vorangegangenen Studien zu ermöglichen. Um die Gesamtkeimzahl des ACFM zu ermitteln, wurden die Kolonien auf den Nährmedienplatten von den sechs Stufen des ACFM addiert. Die Gesamtkeimzahl wurde für beide Impaktoren in KBE/m³ Luft angegeben und nach folgender Formel umgerechnet:

$$KBE/m^3 = \frac{n \text{ KBE} \times 1000}{\text{flow} \times \text{time}}$$

n KBE...Summe der Kolonien auf der Nährmedienplatte

flow...Luftdurchflussrate pro Minute

time...Sammeldauer in Minuten

In Anlehnung an die VDI wurden für die Auswertung der Sporenkonzentrationen die xerophilen Schimmelpilze herangezogen.

Eine Vordifferenzierung der Pilzisolates wurde direkt unter dem Stereomikroskop anhand der Oberflächenstruktur und der Wuchsform der Kolonien durchgeführt.

Mit dem Lichtmikroskop wurden die einzelnen Pilzisolat e auf Objektträger anhand vorgegebener Bestimmungsschlüssel nach morphologischen Kriterien bestimmt (De Hoog et al., 2002; Samson et al., 1996; Kilch, 1988; Pitt 1985). Die molekularbiologische Identifizierung der Schimmelpilzarten erfolgte mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und anschließender Sequenzierung der Internal transcribed spacer (ITS) Region der nukleären ribosomalen DNA (Schwieger und Tebbe, 1998; White et al., 1990; Saiki et al., 1988). Die PCR der ITS Region wurde mit dem Primerpaar ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') und ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') durchgeführt (White et al., 1990). Für die Sequenzierung wurde der interne Primer ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') mit dem Sequenzer Hitachi 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems verwendet. Die Identifizierung der Sequenzen erfolgte über die Datenbankrecherche der NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) bzw. über FASTA (fast all) zur Homologiesuche. Entsprechend den Angaben der VDI 4300 Blatt 10 wurden die Kultivierungsverfahren durchgeführt und die Ergebnisse beurteilt. Die Prozentanteile der dominanten Schimmelpilzgattungen in der Luft und auf Wänden bzw. Fässern der Weinkeller (n=72) wurden bestimmt.

5.3.2 Verwendete Nährmedien

5.3.2.1 Malzextrakt Agar (MEA), Merck KGaA Art.-Nr.: 105398

Zusammensetzung g/L

Malzextrakt	30,0
Pepton aus Sojamehl	3,0
Agar-Agar	15,0
pH	5,6±0,2

Zubereitung

24 g Basisnährboden werden in 500 ml Aqua dest. suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Anschließend wird die Suspension bei 121°C über

10 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C gut mischen und in Petrischalen gießen (Merck KGaA, Applikationen, http://www.merck-chemicals.com/germany/food-analytics/malzextrakt-agar/MDA_CHEM-105398/p_uuid?attachments=APPL, 04.2011).

5.3.2.2 Dichloran-Glycerol Agar (DG18), Oxoid Ltd Art.-Nr.: CM0729

Zusammensetzung g/L

Pepton	5,0
Glucose	10,0
Kaliumhydrogenphosphat	1,0
Magnesiumsulfat	0,5
Dichloran	0,002
Agar-Agar	15,0
pH	5,6±0,2

Zubereitung

15,75 g Basisnährboden werden in 500 ml Aqua dest. suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Danach 100 g Glycerin zugeben. Den Inhalt eines Röhrchens Chloramphenicol-Selektiv-Supplement (50 mg) in 3 ml Aceton lösen und zu 500 ml flüssigem Basisnährboden mit Glycerin zugeben. Die Chloramphenicol-Konzentration in 1 L Medium beträgt 100 mg/L. Anschließend wird die Suspension bei 121°C über 15 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C gut mischen und in Petrischalen gießen. Das Chloramphenicol-Selektiv-Supplement kann auch nach dem Autoklavieren zugegeben werden (Oxoid Handbuch, 1993, S. 152).

5.3.2.3 Chloramphenicol-Selektiv-Supplement, Oxoid Ltd Art.-Nr.: SR0078E

Zusammensetzung

Chloramphenicol 50 mg

Zubereitung

Den Inhalt eines Röhrchens Chloramphenicol-Selektiv-Supplement in 3 ml Aceton lösen und zu 500 ml flüssigem Basisnährboden mit Glycerin zugeben.

Tabelle 5.1: Verwendete Nährmedien für das Impaktionsverfahren und die Abstrichproben

Nährmedien	Inkubation (Temp., Zeit)	Nachzuweisende Mikroorganismen
Malzextrakt Agar (MEA) Merck KGaA	25°C, 7-10 Tage	mesophile Schimmelpilze
Dichloran-Glycerol Agar (DG18) Oxoid Ltd	25°C, 7-10 Tage	xerophile Schimmelpilze

5.4 Anisol - Analyse

Um den TCA-, TeCA- und TBA-Gehalt der Weinkellerluft zu bestimmen, wurde die Solid Phase Micro Extraction (SPME) mit anschließender Gaschromatographie/Massenspektroskopie GC/MS eingesetzt (Fischer, 2000). Da die Probe in flüssiger Form vorliegen musste, wurde als Modelllösung eine 10%ige alkoholische Lösung mit einem pH-Wert von 2, der mit Hilfe von Milchsäure eingestellt wurde, verwendet.

Je 150 ml der Weinmodell-Lösung wurde in den Weinkellern in einem Aluminiumschälchen für mindesten 48 Stunden aufgestellt und anschließend mittels SPME/GC/MS gemäß ISO 20752 auf den Gehalt an TCA, TeCA und TBA untersucht. Die Nachweisgrenze nach DIN 32645 liegt für die Analyten bei 1 ng/L.

Bei der SPME bzw. Festphasenmikroextraktion wird eine mit Polydimethylsiloxan beschichtete Faser, die in eine Spritznadel integriert ist, in die Gasphase eines Probegläschens, das mit der Testflüssigkeit zu etwa der Hälfte gefüllt ist, gebracht. Innerhalb von wenigen Minuten erfolgt die Anreicherung an der Faser. Anschließend wird die Faser in das heiße Innere des Injektors eines Gaschromatographen gebracht. Die Analyten werden von der Faser desorbiert und in der Trennsäule des Gaschromatographen in die Einzelbestandteile aufgetrennt. Am Ende der Trennsäule eluieren die Verbindungen, die am Detektor aufgetrennt, mit einem Massenspektrometer qualitativ und quantitativ ermittelt werden.

Da Anisolverbindungen bereits bei extrem geringen Konzentrationen (ca. 5 ng/L) sensorisch aktiv werden, mußten die Messungen an der Nachweisgrenze des Gerätes (<1 ng/L) durchgeführt werden. Der Nachweis der Anisolverbindungen wurde auf zwei GC/MS Geräten parallel durchgeführt.

5.5 Verwendete Messgeräte

5.5.1 Merck Air Sampler MAS-100[®] (MAS-100)

Der Merck Air Sampler MAS-100[®] (Merck, Germany) arbeitet nach dem Prinzip der einstufigen Impaktion, bei dem die Luft horizontal oder vertikal durch eine perforierte Platte mit 400 Löchern von je 0,7 mm Durchmesser angesaugt wird (Meier und Zingre, 2000). Die Herstellerfirma garantiert mit dem Hochleistungsgebläse einen Luftstrom von 100 L/min \pm 2,5%, welcher automatisch durch Volumenmessungen überprüft wird (Abbildung 5.1). Die Geschwindigkeit, mit der die Partikel auf Nähragarplatten auftreffen, beträgt in etwa 11 m/sec und entspricht der Stufe 5 des Andersen-Samplers (MAS-100[®], Bedienungsanleitung).

Die Wirksamkeit der Abscheidung von Luftkeimen eines Sammelgerätes wird durch den cut-off-Wert d_{50} beschrieben (Nevalainen et al., 1992). Für eine effiziente Sammlung von luftgetragenen Pilzen müssen Impaktoren verwendet werden, dessen cut-off-Werte unter der mittleren Größe der zu sammelnden Mikroorganismen liegen (Buttner, 1997). Der cut-off-Wert beim MAS-100[®]

Sammler ($d_{50} = 1,7 \mu\text{m}$) ist geeignet um luftgetragene Pilzsporen $\geq 2 \mu\text{m}$ im aerodynamischen Durchmesser zu sammeln (Yao und Mainelis, 2006).



Abbildung 5.1: Merck Air Sampler MAS-100[®] (MAS)
(Quelle: Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin; Merck KGaA, http://microbiology.merck.de/pharmaceutical-ingredients/mas-100-microbial-air-monitoring-systems/german/c_FMcb.s1OQgYAAAEoFldh9ENU; 04.2011))

5.5.2 Andersen[®] Kaskaden Sammler (ACFM)

Der sechsstufige Andersen[®] Kaskaden Sammler (ACFM, Graseby[®] Andersen, USA) ist ein Multi-Düsen-Stufen-Impaktor, der aus sechs hintereinander angeordneten Siebplatten mit je 400 Löchern, die im Durchmesser von Stufe zu Stufe kleiner werden, besteht (Abbildung 5.2, 5.4). Es können somit alle Partikelgrößen eingesammelt werden, wobei sich bei Stufe 1 des Andersen Sammlers Teilchen von $\geq 8,2 \mu\text{m}$ absetzen, bei Stufe 5 lungengängige Stoffe mit $1,0\text{-}2,0 \mu\text{m}$ Durchmesser hängen bleiben, sowie kleinste Teile mit $0,65\text{-}1,0 \mu\text{m}$ auf Stufe 6. Mit diesem Kaskaden-Impaktor können die Partikel nach ihrem aerodynamischen Verhalten getrennt und direkt mit der Absetzung im menschlichen Respirationstrakt verglichen werden (Abbildung 5.3). Die Pumpe sorgt im Dauerbetrieb für einen konstanten Luftdurchsatz von $28,3 \text{ L}$ Luft pro Minute (Andersen, 1958). Die koloniebildenden Einheiten der einzelnen Stufen werden gezählt und addiert, um die Pilzsporenkonzentration der Proben zu

ermitteln. Der cut-off-Wert des Andersen Sammlers ($d_{50} = 7,0 \mu\text{m} - 0,65 \mu\text{m}$) ist geeignet um luftgetragene Pilzsporen mit einer Größe von $1-10 \mu\text{m}$ und höher im aerodynamischen Durchmesser zu sammeln.



Abbildung 5.2: Andersen® Kaskaden Sammler (ACFM)
(Quelle: Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin)

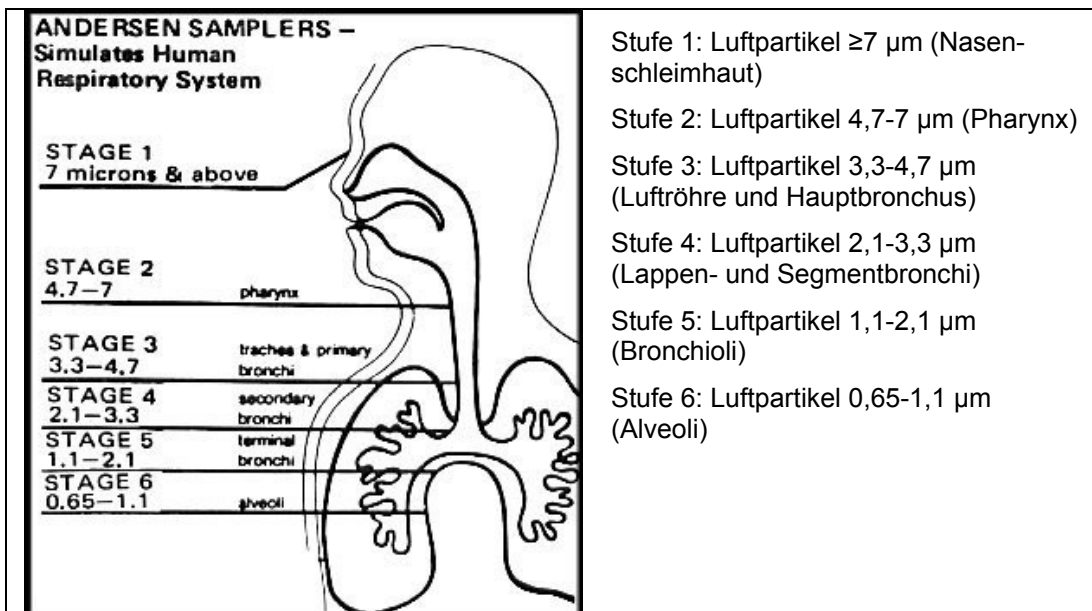


Abbildung 5.3: Simulation des menschlichen Respirationstraktes durch den Andersen Kaskaden Sammler (Quelle: Pacwill Environmental Ltd., <http://www.pacwill.ca/en/ProductsServices/6stage.htm>, 04.2011)

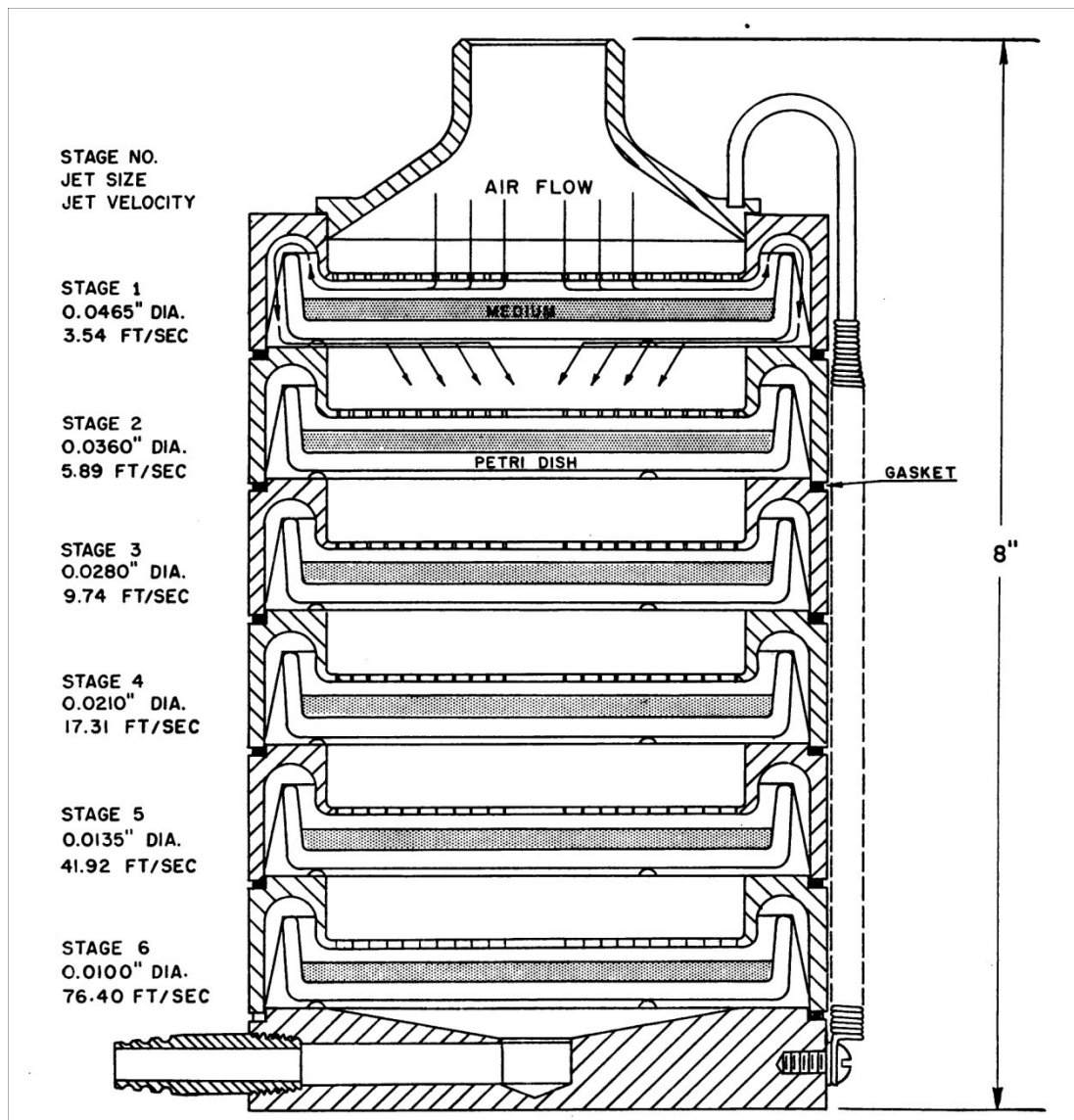


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung des sechsstufigen Andersen® Kaskaden Sammlers (Quelle: Andersen, 1958)

5.5.3 Testo 845 Infrarot-Temperatur-Messgerät

Dieses Infrarot-Temperatur-Messgerät eignet sich für die Messung der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit für Nah- und Fernfeldmessungen und bestimmt automatisch den Taupunkt (testo®845, GmbH, Austria). Die Oberflächentemperatur wird mittels Infrarotmessung bestimmt und mit einem Feuchtemodul werden die RH und der Taupunkt angezeigt.

5.6 Molekularbiologische Arbeitstechniken

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

5.6.1 DNA-Isolierung: mittels Epicenter Kit (nach Anweisung des Herstellers)

- in ein autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß 300 µl Yeast Cell Lysis Solution vorlegen
- ein kleines Stück Pilz dazu geben und mit einem Pistill die Probe homogenisieren
- die Probe bei 65°C 15 min im Thermoblock inkubieren
- dann 5 min auf Eis stellen
- 150 µl Protein Precipitation Reagent zugeben und 15-20 sek vortexen
- 10 min bei 10000 rpm bei RT zentrifugieren
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß geben
- 500 µl Isopropanol zugeben
- kurz schütteln
- 10 min bei 10000 rpm bei RT zentrifugieren
- Überstand abheben und verwerfen
- Zugabe von 500 µl 70% Ethanol
- 5 min bei 10000 rpm bei RT zentrifugieren
- Überstand abheben und verwerfen
- Pellet im Trockenschrank bei 45°C für 15 min trocknen oder für 2-3 min in die Vakuumzentrifuge stellen
- Pellet je nach Größe in 50 oder 100 µl A.d. lösen

5.6.2 PCR: Enzymatische Amplifizierung eines DNA-Abschnitts

Die PCR wurde in einem automatischen PCR-Cycler nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Ansatz: Mastermix:

A.d.	37 μ l
10xBuffer	5 μ l
dNTPs	1 μ l
Primer ITS1 10 μ M	2 μ l
Primer ITS4 10 μ M	2 μ l
TaqPolymerase	1 μ l
	<hr/>
	48 μ l

Pro Ansatz 48 μ l Mastermix + 2 μ l Template

PCR Programm:

94°C	2 min	
94°C	45 sek	
48°C	45 sek	30 Zyklen
72°C	1 min 30 sek	
68°C	5 min	
4°C	60 min	
8°C	-	

5.6.3 Gelelektrophorese: Auftrennen der PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe

Die negativ geladenen Nucleinsäuremoleküle der PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines elektrischen Feldes im Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

5.6.4 Aufreinigung der PCR-Produkte: mittels InvisorbSpin Rapid Kit

Die Primer wurden aus dem PCR-Produkt entfernt, um Störungen bei der anschließenden Sequenzierung zu vermeiden.

- zu jeder Probe 130 µl Puffer P zugeben
- mischen und in Spin Reaktionsgefäße überführen
- 1 min bei RT stehen lassen
- 30 sek bei RT bei 10000 rpm zentrifugieren
- in die Spin Reaktionsgefäße 700 µl Waschpuffer zugeben
- 30 sek bei RT bei 10000 rpm zentrifugieren
- durchgeflossenen Waschpuffer verwerfen
- 3 min bei RT bei 13200 rpm zentrifugieren (EtOH wird entfernt)
- Spinfilter in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben
- 100 µl Elutions Buffer zugeben
- für 3 min bei RT stehen lassen
- 1 min bei RT bei 10000 rpm zentrifugieren
- aufgereinigtes Eluat für Cycle Sequencing

5.6.5 Cycle Sequencing und Aufreinigung

Die PCR-Produkte wurden für die Sequenzierung mit dem Sequenzer Hitachi 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems vorbereitet.

Ansatz:

A.d	4,2 µl	
5 x Buffer	2 µl	
BigDye	1,8 µl	
Primer ITS5 1,6 µM	1 µl	
Template	1 µl	
	<hr/>	
	10 µl	

Cycle Sequencing Programm:

94°C	18 sek	
94°C	15 sek	
50°C	10 sek	25Zyklen
60°C	2 min	
4°C	60 min	
8°C	-	

Aufreinigung nach Cycle Sequencing:

- in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß: Cycle Sequencing Produkt geben + 2,5 µl 125 mM EDTA + 25 µl 100% EtOH → vortexen
- 20 min bei 4°C bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand abheben und verwerfen

- + 200 µl 70% EtOH (nicht mehr vortexen)
- 15 min bei 4°C bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Im Trockenschrank bei 45°C 15 min trocknen oder für 2-3 min in der Speedvac trocknen
- „Pellet“ in 15 µl HiDi (Formamide) lösen

5.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die Software SPSS® Version 15.0 und R, eine freie Software für statistisches Rechnen und statistische Grafiken, verwendet (www.r-project.org). Zur Datenauswertung mittels SPSS wurden der Kruskal Wallis H-Test, der Mann-Whitney U-Test und der Spearman Rangkorrelationstest herangezogen. Die als „signifikant“ bezeichneten Korrelationen oder Unterschiede sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5% gegeben. In den Ergebnissen wurden Minimum, Maximum und Median angegeben, wobei bei den Auswertungen der Sporenkonzentrationen der Median herangezogen wurde.

Zusätzlich wurden mittels R parametrische statistische Modelle, die auf den Mittelwerten basieren, erstellt. Diese Modelle sind spezifische Gruppen von Klassen generalisierter linearer Modelle (McCullagh and Nelder, 1989). Für die statistische Auswertung der Pilzsporenkonzentration auf den Medien DG18 und MEA wurden log-lineare Gamma Modelle erstellt. Ein multinomiales Modell (Venables and Ripley, 2002) wurde angepasst um mögliche Risikofaktoren für leichten, mittleren und schweren Schimmelpilzbefall zu finden. Logistische Regressionsmodelle wurden dazu eingesetzt, um relevante Faktoren zu identifizieren, die einen Einfluss auf das Auftreten von bestimmten Pilzarten haben. Für jedes Modell wurden erklärende Risikofaktoren und ihre Interaktionen für die linearen Prediktoren herangezogen. p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Zu diesen untersuchten Risikofaktoren gehörten Variablen wie Lufttemperatur, RH, Taupunkt, Alter und Typ der Konstruktion, Verwendungstyp des Kellers und Grad der Befallsfläche. Die Komplexität der

Prediktoren wurde schrittweise reduziert, solange es zu keiner signifikanten Änderung der Validität der entsprechenden Kriterien kam.

6 Ergebnisse

6.1 Vergleich der Sporenkonzentrationen (KBE/m³) in der Weinkellerluft und in der Außenluft

In den 36 untersuchten Weinkellern (n=72) wurden mit dem ACFM mediane Pilzsporenkonzentrationen (KBE/m³) in der Luft für xerophile und mesophile Pilze von $1,5 \times 10^3$ KBE/m³ und $1,3 \times 10^3$ KBE/m³ ermittelt. In der umgebenden Außenluft betrug die Sporenkonzentration im Median $9,4 \times 10^2$ KBE/m³ für xerophile und $1,1 \times 10^3$ KBE/m³ für mesophile Pilze. Die höchsten Sporenkonzentrationen für luftgetragene Pilze wurden mit $1,6 \times 10^4$ KBE/m³ (DG18) in Ziegelkellern und mit $5,9 \times 10^3$ KBE/m³ (DG18) im Median in der Außenluft ermittelt (Tabelle 6.2).

Nach Anlieferung der Trauben kam im Weinkeller zum Ablösen der Trauben vom Rappen, dem Traubenstielgerüst eine Abbeer- bzw. Rebelmaschine (Rebler) zum Einsatz.

Tabelle 6.1: Pilzsporenkonzentrationen in der Weinkellerluft bei Einsatz einer Abbeermaschine und in der Außenluft (n=3)

	Rebler ACFM	Rebler MAS	Außenluft ACFM	Außenluft MAS
DG18	Pilzsporenkonzentrationen/m ³ Luft			
min [KBE/m ³]	$3,9 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$7,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
Median [KBE/m ³]	$4,6 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$5,9 \times 10^2$
max [KBE/m ³]	$2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
MEA				
min [KBE/m ³]	$9,1 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$
Median [KBE/m ³]	$3,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
max [KBE/m ³]	$3,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$

Bei diesem Arbeitsschritt wurde mit dem ACFM eine mediane Pilzsporenkonzentration in der Luft für xerophile und mesophile Pilze von $4,6 \times 10^3$ KBE/m³ bzw. $3,2 \times 10^4$ KBE/m³ gemessen (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.2: Pilzsporenkonzentrationen in der Luft der Weinkeller und in der Außenluft

ACFM	Keller gesamt n=72	Ziegel- keller n=34	Beton- keller n=38	Produk- tionskeller n=40	Lager- keller n=32	Außen- luft
DG18	Pilzsporenkonzentrationen/m ³ Luft					
min [KBE/m ³]	1,1x10 ²	2,8x10 ²	1,1x10 ²	2,8x10 ²	1,1x10 ²	1,8x10 ¹
Median [KBE/m ³]	1,5x10 ³	2,5x10 ³	1,3x10 ³	1,6x10 ³	1,3x10 ³	9,4x10 ²
max [KBE/m ³]	1,6x10 ⁴	1,6x10 ⁴	3,7x10 ³	1,6x10 ⁴	1,4x10 ⁴	5,9x10 ³
MEA						
min [KBE/m ³]	3,5x10 ¹	4,4x10 ²	3,5x10 ¹	3,5x10 ¹	8,8x10 ¹	2,0x10 ²
Median [KBE/m ³]	1,3x10 ³	1,7x10 ³	9,5x10 ²	1,4x10 ³	1,2x10 ³	1,1x10 ³
max [KBE/m ³]	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	5,1x10 ³	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	5,4x10 ³
MAS	Keller gesamt n=72	Ziegel- keller n=34	Beton- keller n=38	Produk- tionskeller n=40	Lager- keller n=32	Außen- luft
DG18	Pilzsporenkonzentrationen/m ³ Luft					
min [KBE/m ³]	5,0x10 ¹	1,8x10 ²	5,0x10 ¹	1,7x10 ²	5,0x10 ¹	2,0x10 ¹
Median [KBE/m ³]	1,2x10 ³	1,9x10 ³	9,5x10 ²	1,6x10 ³	9,6x10 ²	7,7x10 ²
max [KBE/m ³]	8,5x10 ³	8,5x10 ³	4,2x10 ³	8,5x10 ³	8,2x10 ³	3,4x10 ³
MEA						
min [KBE/m ³]	4,0x10 ¹	1,8x10 ²	4,0x10 ¹	1,4x10 ²	4,0x10 ¹	6,0x10 ¹
Median [KBE/m ³]	1,0x10 ³	1,3x10 ³	7,3x10 ²	1,3x10 ³	8,4x10 ²	7,8x10 ²
max [KBE/m ³]	7,5x10 ³	7,5x10 ³	3,3x10 ³	7,2x10 ³	7,5x10 ³	3,3x10 ³

Mit dem multiplen Gammamodell konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Sporenkonzentration für mesophile Pilze in der Außenluft zu einem signifikanten Anstieg ($p \leq 0,02$) der mesophilen Sporenkonzentration in der Weinkellerluft führte. Für xerophile Pilze konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

6.2 Vergleich der Sporenkonzentrationen (KBE/m³) in Relation zum Bautyp des Weinkellers und zu den klimatischen Bedingungen

6.2.1 Darstellung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die mittleren Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft anhand eines log-linearen Gammamodells

Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Sporenkonzentration in der Weinkellerluft wurde mit Hilfe eines einfachen log-linearen-Gammamodells überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die mittlere Sporenkonzentration der Weinkellerluft signifikant ($p \leq 0,05$) unterschiedlich in Bezug auf den Bautyp und das Alter der Weinkeller, das Vorhandensein einer Raumluftechnischen Anlage (Lüftungsanlage, Klimaanlage), sichtbaren Schimmelpilzbefall, Außenlufttemperatur, RH und Taupunkt ist.

Das multiple Gammamodell zeigte, dass die mittleren Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen in der Weinkellerluft signifikant von der Außenlufttemperatur beeinflusst wurden. Mit einer Signifikanz von $p \leq 0,0002$ zeigte sich dieser Effekt bei Weinkellern mit sichtbaren Schimmelpilzbefallsflächen der Kategorie „mittel“ am stärksten. In Abbildung 6.1 und 6.2 ist ersichtlich, dass die Sporenkonzentration von xerophilen Pilzen in Weinkellern, die vor 1950 erbaut wurden und die Schimmelbefallskategorie „schwer“ aufwiesen im Mittel am höchsten war. Mit steigender Außenlufttemperatur stieg auch die Pilzsporenkonzentration in den Weinkellern an. Abhängig von der Temperatur der Außenluft war die mittlere Konzentration von xerophilen Pilzen in der Luft von Weinkellern ohne Raumluftechnische Anlage höher als in jenen mit einer Raumluftechnischen Anlage. Keller, die nach 1979 erbaut wurden und Schimmelpilzbefallsflächen der Kategorie „leicht“ aufwiesen, zeigten die geringsten mittleren Sporenkonzentrationen in der Luft.

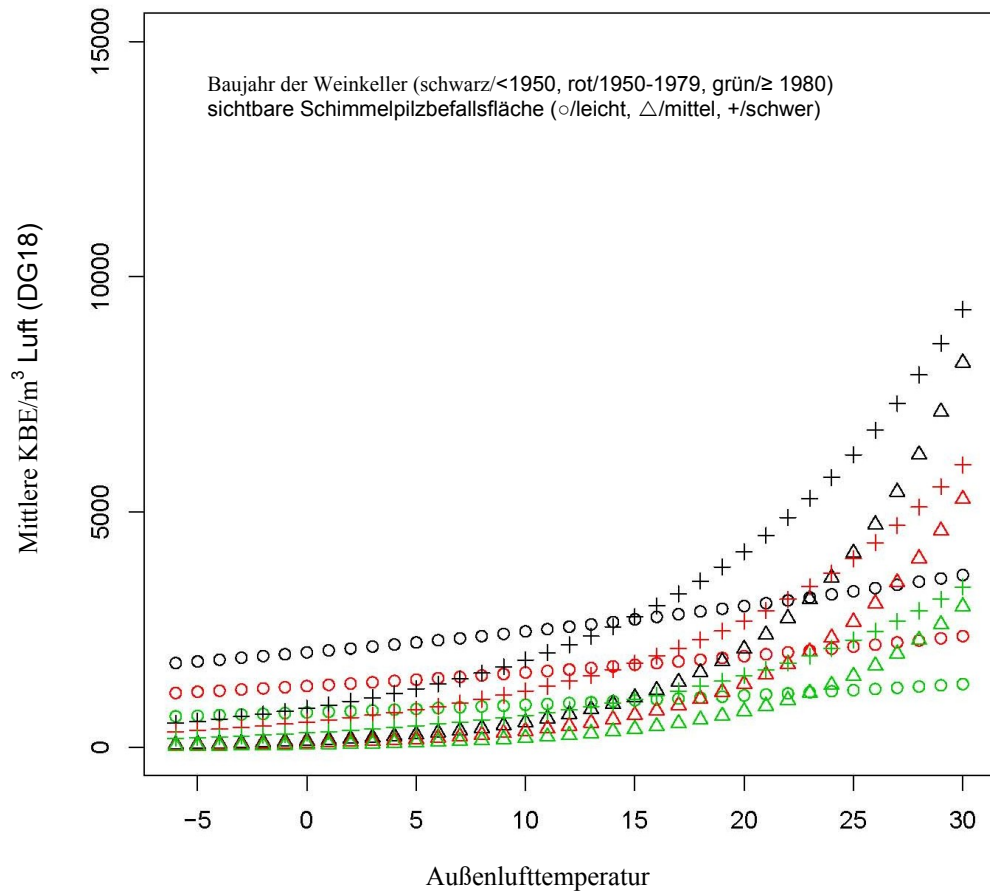


Abbildung 6.1: Die mittleren Sporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern mit raumluftechnischen Anlagen in Relation zur Außenlufttemperatur. Das Baujahr der Weinkeller ist in 3 Kategorien (schwarz/<1950, rot/1950-1979, grün/≥1980) unterteilt. Die Kategorien der Schimmelpilzbefallsfläche sind als ○/leicht, △/mittel und +/schwer symbolisiert.

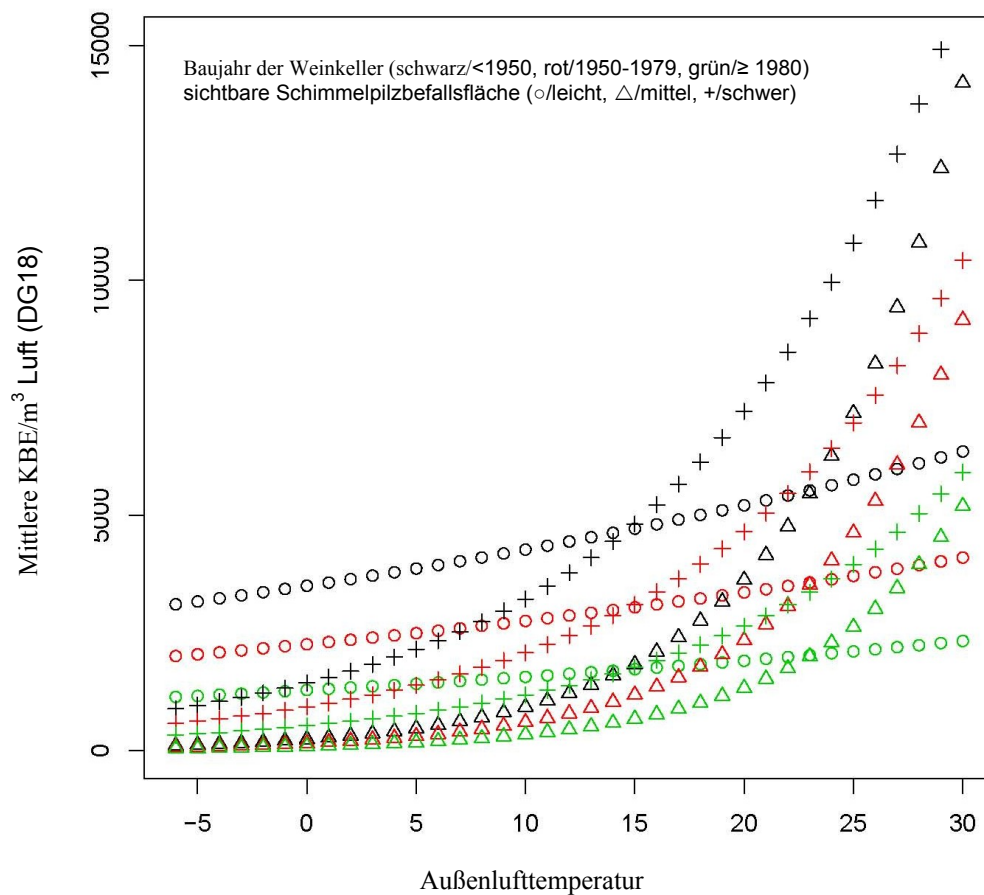


Abbildung 6.2: Die mittleren Sporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern ohne raumluftechnische Anlagen in Relation zur Außenlufttemperatur. Das Baujahr der Weinkeller ist in 3 Kategorien (schwarz/<1950, rot/1950-1979, grün/≥1980) unterteilt. Die Kategorien der Schimmelpilzbefallsfläche sind als ○/leicht, △/mittel und +/schwer symbolisiert.

Die mittleren Sporenkonzentrationen von mesophilen Pilzen in der Weinkellerluft wurden signifikant ($p \leq 0,05$) von der Temperatur und der RH im Außenbereich beeinflusst. Das multiple Gammamodell (Abbildung 6.3 und 6.4) zeigte, dass sich in den Weinkellern mit „leichter“ sichtbarer Schimmelpilzbefallsfläche bei einer Außenlufttemperatur von 10°C die KBE/m^3 Luft signifikant ($p \leq 0,00005$) mit steigender RH der Außenluft erhöhten. Im Gegensatz dazu nahmen die KBE/m^3 Luft im Mittel signifikant in den Kellern mit „mittleren“ ($p \leq 0,02$) und „schweren“ ($p \leq 0,003$) Schimmelpilzbefallsflächen mit ansteigender RH in der Außenluft ab. Waren die Keller mit einer

Raumluftechnischen Anlage ausgestattet, so wurden im Mittel geringere KBE/m³ Luft erfasst als bei Kellern ohne einer Raumluftechnischen Anlage. Bei einer Außenlufttemperatur von 30°C konnte bei höheren Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft, die gleiche Beobachtung gemacht werden (Abbildung 6.5 und 6.6).

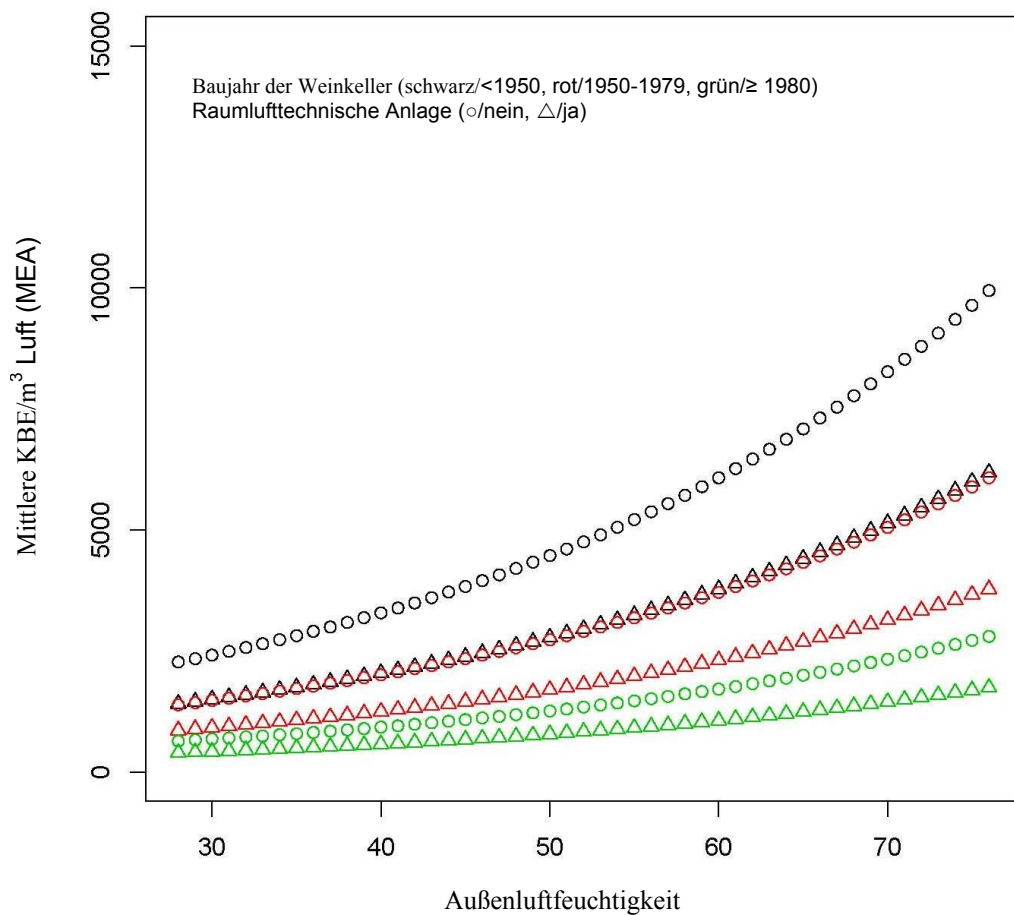


Abbildung 6.3: Die mittleren Sporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern mit der Schimmelpilzbefallsfläche der Kategorie „leicht“ bei einer Außenlufttemperatur von 10°C in Relation zur Außenluftfeuchtigkeit. Das Baujahr der Weinkeller ist in 3 Kategorien (schwarz/<1950, rot/1950-1979, grün/≥1980) unterteilt. Die Ausstattung der Keller mit einer Raumluftechnischen Anlage wird mit ○/nein, △/ja symbolisiert.

Die Sporenkonzentrationen von mesophilen Pilzen waren im Mittel in Weinkellern der Schimmelpilzbefallskategorie „schwer“, die vor 1950 erbaut wurden, am höchsten und in Kellern, die nach 1979 erbaut wurden und Schimmelpilzbefallsflächen der Kategorie „leicht“ aufwiesen am geringsten (Abbildung 6.3 - 6.6).

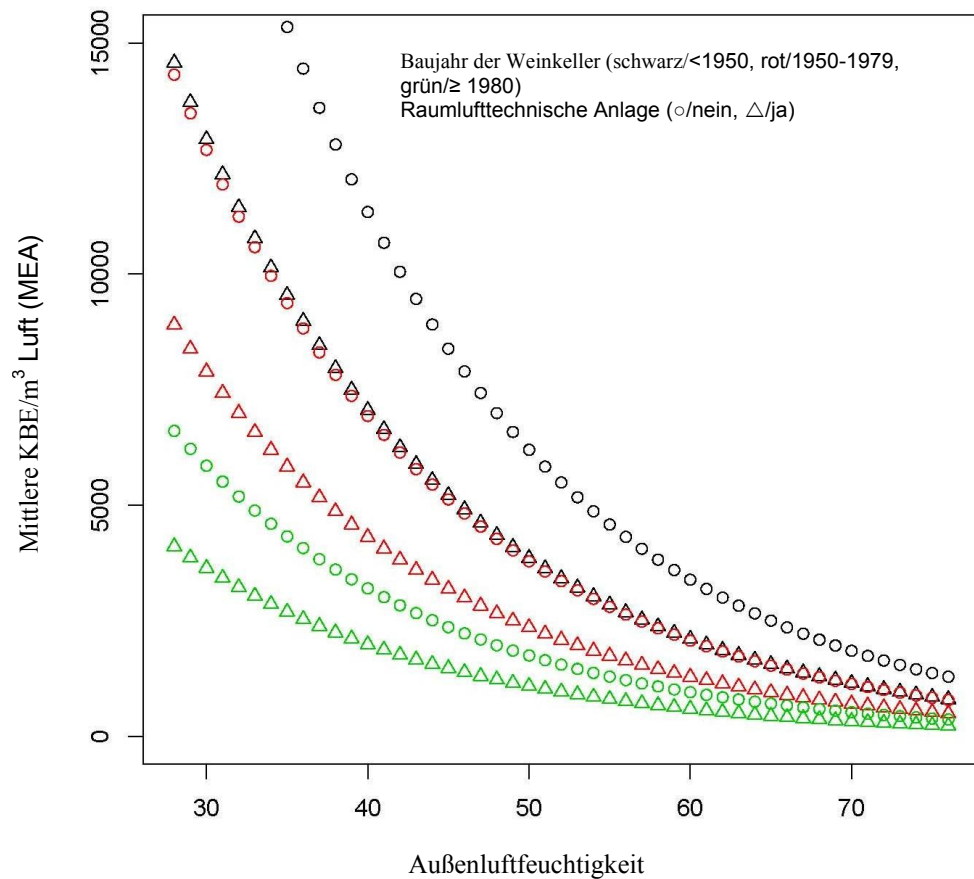


Abbildung 6.4: Die mittleren Sporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern mit der Schimmelpilzbefallsfläche der Kategorie „schwer“ bei einer Außenlufttemperatur von 10°C in Relation zur Außenluftfeuchtigkeit. Das Baujahr der Weinkeller ist in 3 Kategorien (schwarz/<1950, rot/1950-1979, grün/≥1980) unterteilt. Die Ausstattung der Keller mit einer Raumlufteinrichtung wird mit ○/nein, △/ja symbolisiert.

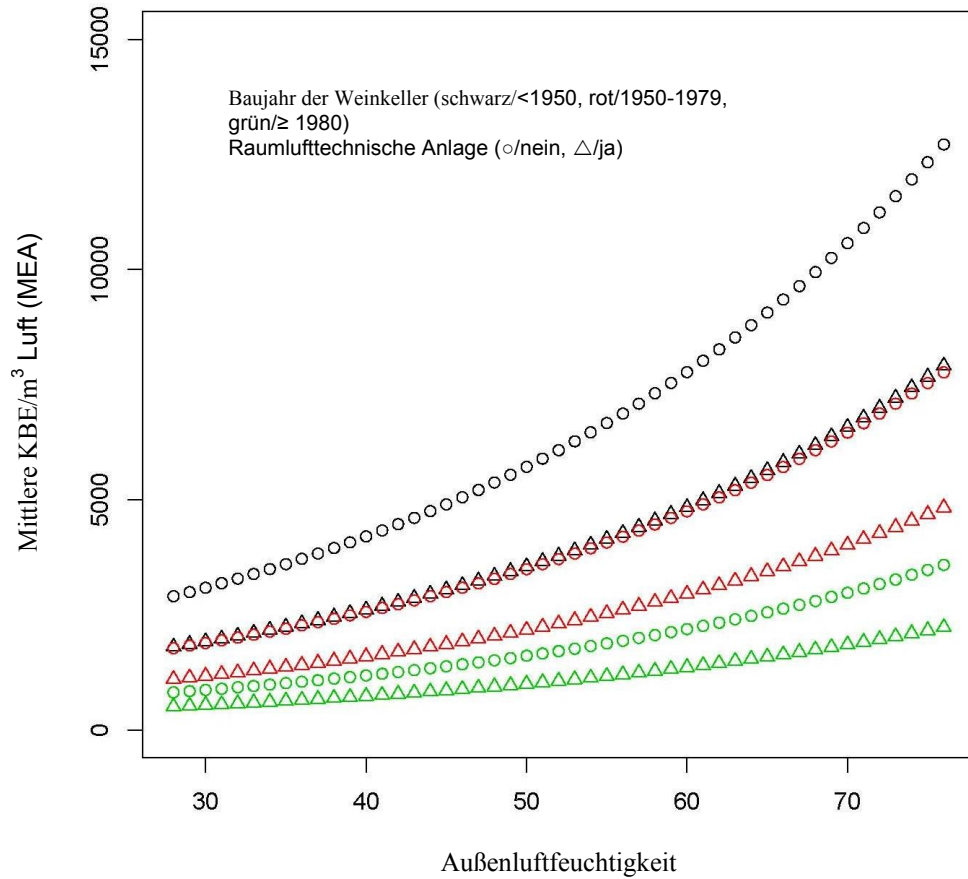


Abbildung 6.5: Die mittleren Sporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern mit der Schimmelpilzbefallsfläche der Kategorie „leicht“ bei einer Außenlufttemperatur von 30°C in Relation zur Außenluftfeuchtigkeit. Das Baujahr der Weinkeller ist in 3 Kategorien (schwarz/<1950, rot/1950-1979, grün/≥1980) unterteilt. Die Ausstattung der Keller mit einer Raumluftechnischen Anlage wird mit ○/nein, △/ja symbolisiert.

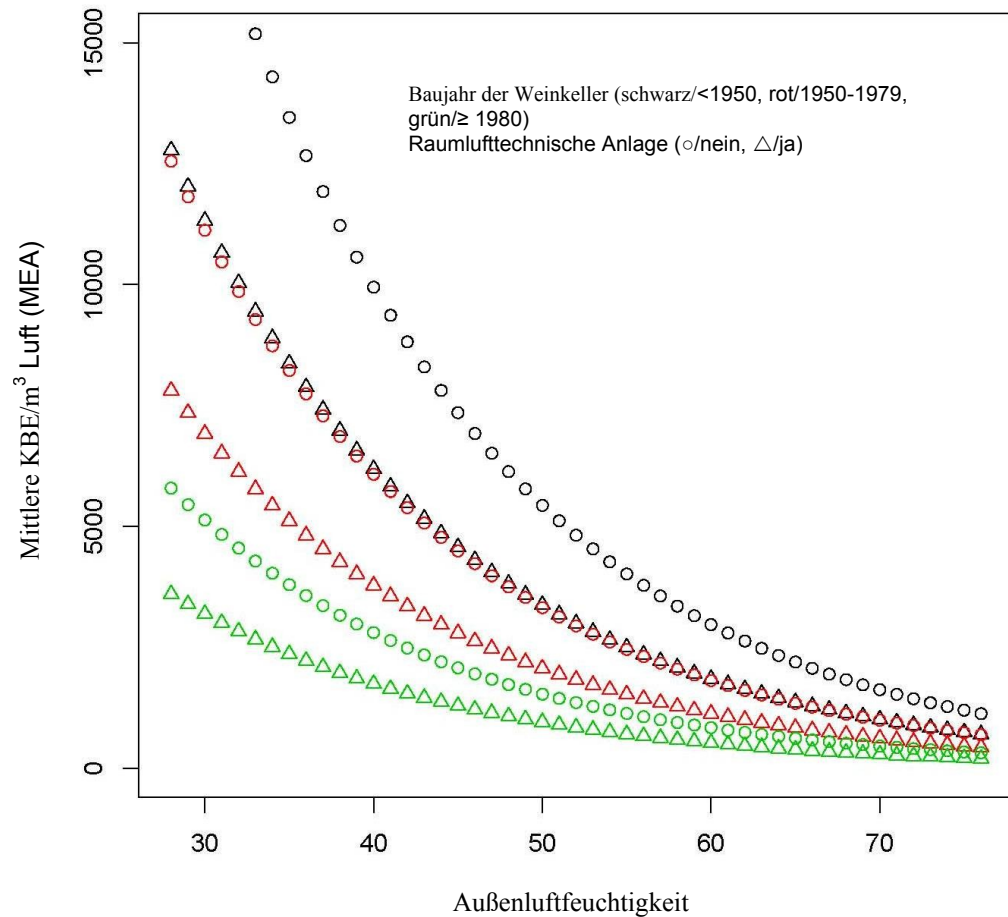


Abbildung 6.6: Die mittleren Sporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern mit der Schimmelpilzbefallsfläche der Kategorie „schwer“ bei einer Außenlufttemperatur von 30°C in Relation zur Außenluftfeuchtigkeit. Das Baujahr der Weinkeller ist in 3 Kategorien (schwarz/<1950, rot/1950-1979, grün/≥1980) unterteilt. Die Ausstattung der Keller mit einer Raumlufttechnischen Anlage wird mit ○/nein, △/ja symbolisiert.

6.2.2 Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten eines schweren sichtbaren Schimmelpilzbefalls mittels eines multinomialen Modells

Die Studie zeigte, dass im Weinkeller die RH im Gegensatz zur Innenraumtemperatur einen Einfluss auf den „schweren“ sichtbaren Schimmelpilzbefall hatte. Die RH in den Weinkellern variierte zwischen 39%

und 85%. In den untersuchten Weinkellern wurden Innenraumtemperaturen von 9,6°C bis 23°C gemessen. Im Mittel lag die Raumtemperatur bei 15,3°C.

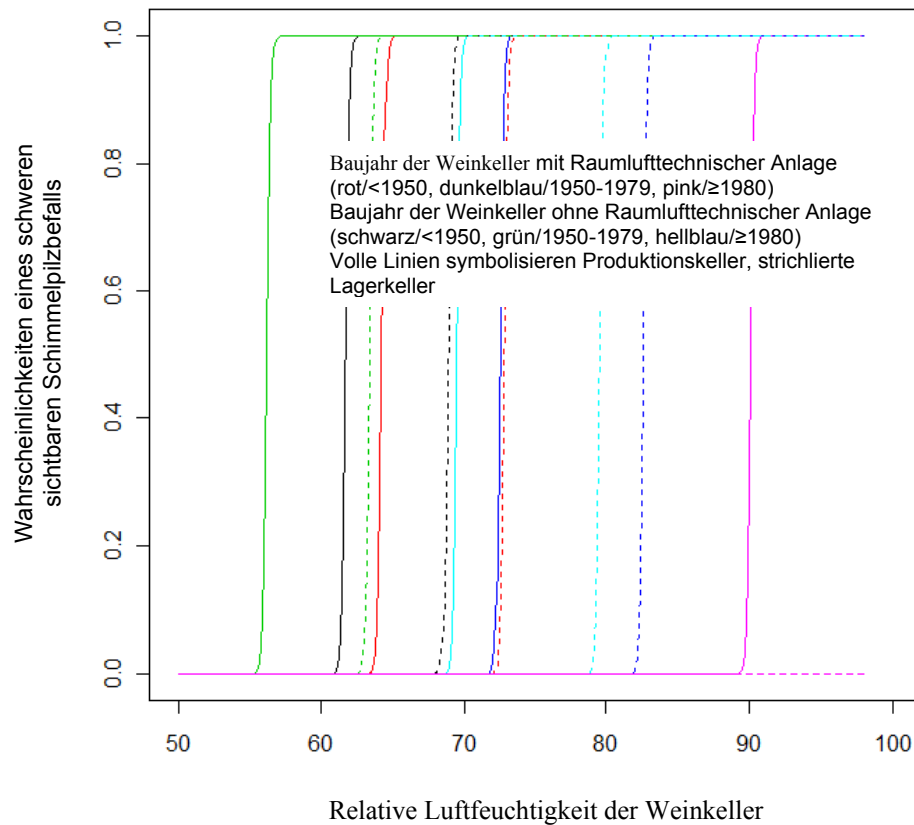


Abbildung 6.7: Die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten eines schweren sichtbaren Schimmelpilzbefalls in Weinkellern bei einer Raumtemperatur von 10°C. Die Farben symbolisieren das Baujahr der Weinkeller mit einer Raumluftechnischen Anlage (rot/<1950, dunkelblau/1950-1979, pink/≥1980) und ohne eine Raumluftechnische Anlage (schwarz/<1950, grün/1950-1979, hellblau/≥1980). Volle Linien symbolisieren Produktionskeller, strichlierte Lagerkeller.

Mit einem multinomialen Modell wurden die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten eines schweren sichtbaren Schimmelpilzbefalls in den Weinkellern bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender RH im Weinkeller die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines schweren Schimmelpilzbefalls zunimmt. Ist keine Raumluftechnische Anlage im Keller vorhanden, steigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines „mittleren“ und „schweren“ sichtbaren Schimmelpilzbefalls ebenso. Diese Wahrscheinlichkeit trifft auch auf Weinkeller, die zur Produktion genutzt werden zu. Bei Produktionskellern ohne

Raumlufttechnischer Anlage und einem Baujahr von 1950-1979 bzw. vor 1950 tritt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines „schweren“ sichtbaren Schimmelpilzbefalls bereits bei einer RH im Keller von 55% bzw. 60% auf (Abbildung 6.7).

6.2.3 Darstellung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die medianen Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft

In der Luft der untersuchten Weinkeller (n=72) wurden mit dem ACFM Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen für Ziegelkeller (n=34) mit $1,6 \times 10^3$ KBE/m³ und für Betonkeller (n=38) mit $1,3 \times 10^3$ KBE/m³ im Median ermittelt (Tabelle 6.2, Abbildung 6.8).

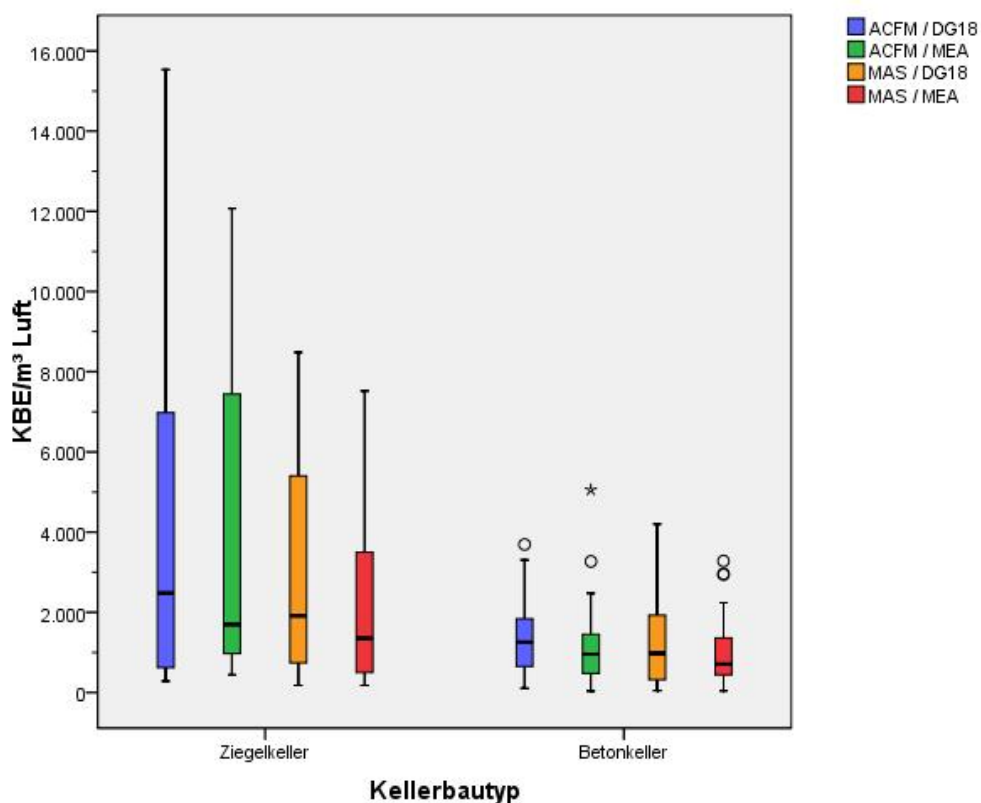


Abbildung 6.8: Mediane Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft im Jahresmittel kategorisiert nach dem Bautyp

Die Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen in der Luft von Produktionskellern (n=40) betragen im Median $1,6 \times 10^3$ KBE/m³ und von Lagerkellern (n=32) $1,3 \times 10^3$ KBE/m³ (Tabelle 6.2, Abbildung 6.9).

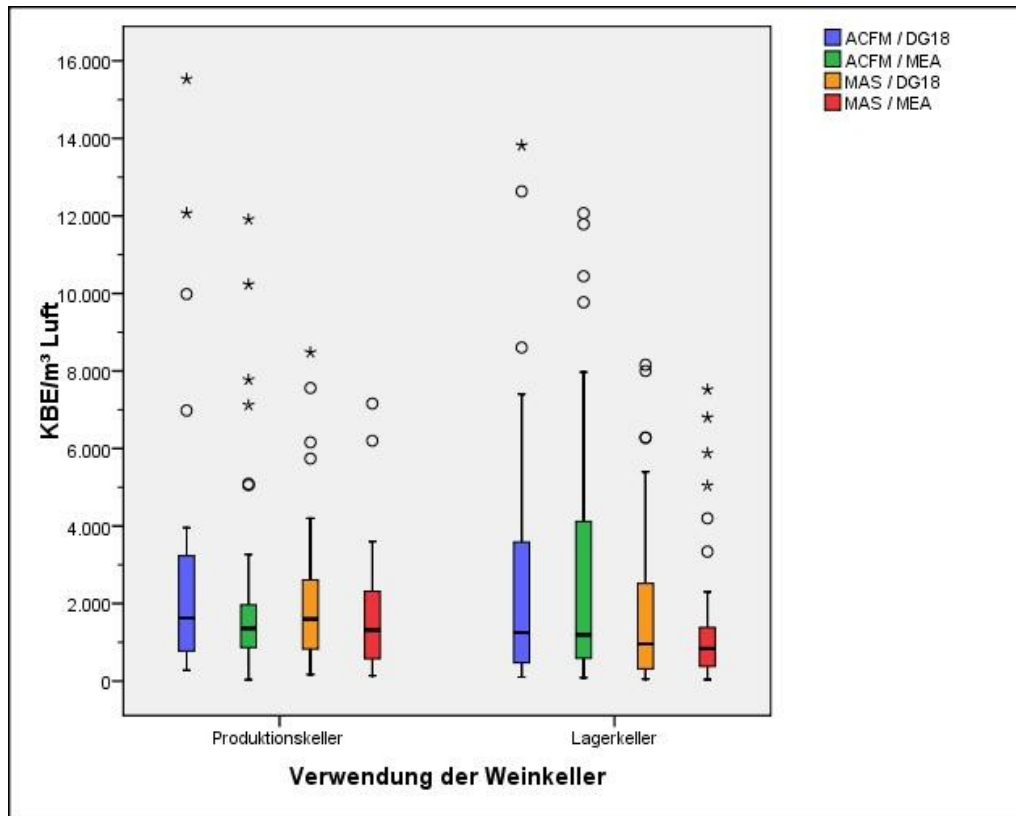


Abbildung 6.9: Mediane Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft kategorisiert nach der Verwendung

Von 36 untersuchten Weinkellern wurde in fünf Ziegel- und zwei Betonkellern eine Taupunktunterschreitung an zumindest einem Raum umhüllenden Bauteil wie z.B. Decke, Wände gemessen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung konnten in drei Ziegelkellern und einem Betonkeller eine kritische Oberflächentemperatur an zumindest einem Raum umhüllenden Bauteil festgestellt werden. Das bedeutet, dass die gemessene Oberflächentemperatur im Bereich von $<3^{\circ}\text{C}$ über dem ermittelten Taupunkt lag. Die Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen in Kellern mit Taupunktunterschreitung lagen im Median bei $3,9 \times 10^3$ KBE/m³ Luft und waren somit signifikant höher ($p \leq 0,05$) als in Kellerräumen ohne Taupunktproblemen (Abbildung 6.10).

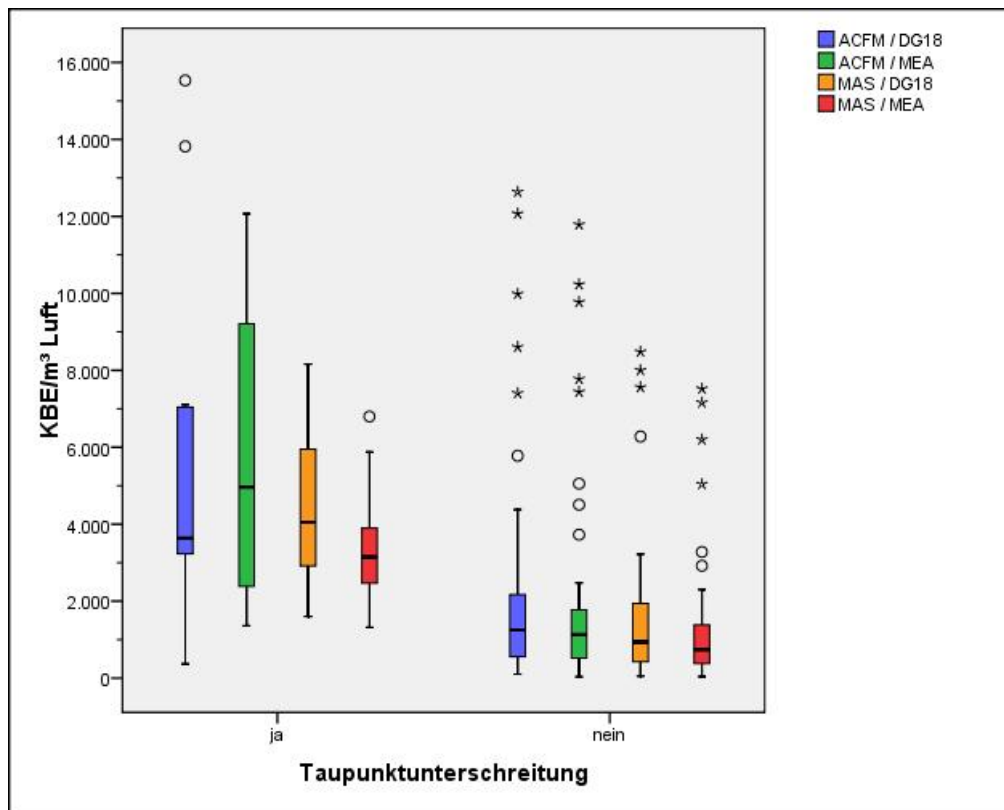


Abbildung 6.10: Mediane Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft kategorisiert nach dem Auftreten von Taupunktunterschreitungen

Die Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen in der Luft von Weinkellern mit „schwerem“ sichtbarem Schimmelpilzbefall (>80%) erreichten im Median Werte zwischen $2,8 \times 10^2$ KBE/m³ und $1,4 \times 10^4$ KBE/m³. In Weinkellern mit „leichtem“ sichtbarem Schimmelpilzbefall (<20%) wurden Werte von $1,1 \times 10^2$ KBE/m³ bis $7,4 \times 10^3$ KBE/m³ Luft festgestellt. Die höchsten Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen wurden im Median in Ziegelkellern mit „mittlerem“ sichtbarem Schimmelpilzbefall ($1,6 \times 10^4$ KBE/m³), die niedrigsten in Betonkellern mit „leichtem“ sichtbarem Schimmelpilzbefall ($1,1 \times 10^2$ KBE/m³) festgestellt. In Tabelle 6.3 sind die KBE/m³ Luft mit den Kategorien der Schimmelpilzbefallsflächen angeführt.

Tabelle 6.3: Mediane Sporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern in Relation zur Schimmelpilzbefallsfläche Teil 1

Schimmelpilz- befallsfläche	DG18/ACFM*	Keller gesamt n=72	Ziegel- keller n=34	Beton- keller n=38	Außenluft
leicht <20%	min [KBE/m ³]	1,1x10 ²	3,4x10 ²	1,1x10 ²	1,8x10 ¹
	Median [KBE/m ³]	1,2x10 ³	1,4x10 ³	1,1x10 ³	7,2x10 ²
	max [KBE/m ³]	7,4x10 ³	7,4x10 ³	3,7x10 ³	4,1x10 ³
mittel 20-80%	min [KBE/m ³]	3,7x10 ²	3,7x10 ²	1,8x10 ³	2,3x10 ²
	Median [KBE/m ³]	1,8x10 ³	1,9x10 ³	1,8x10 ³	8,0x10 ²
	max [KBE/m ³]	1,6x10 ⁴	1,6x10 ⁴	1,8x10 ³	3,3x10 ³
schwer >80%	min [KBE/m ³]	2,8x10 ²	2,8x10 ²	-	7,1x10 ¹
	Median [KBE/m ³]	7,1x10 ³	7,1x10 ³	-	9,5x10 ²
	max [KBE/m ³]	1,4x10 ⁴	1,4x10 ⁴	-	5,9x10 ³
Schimmelpilz- befallsfläche	MEA/ACFM*	Keller gesamt n=72	Ziegel- keller n=34	Beton- keller n=38	Außenluft
leicht <20%	min [KBE/m ³]	3,5x10 ¹	4,6x10 ²	3,5x10 ¹	2,1x10 ²
	Median [KBE/m ³]	1,0x10 ³	1,4x10 ³	8,7x10 ²	1,1x10 ³
	max [KBE/m ³]	9,8x10 ³	9,8x10 ³	5,1x10 ³	3,9x10 ³
mittel 20-80%	min [KBE/m ³]	6,4x10 ²	6,4x10 ²	1,4x10 ³	1,9x10 ²
	Median [KBE/m ³]	1,5x10 ³	3,2x10 ³	1,5x10 ³	1,2x10 ³
	max [KBE/m ³]	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,6x10 ³	2,9x10 ³
schwer >80%	min [KBE/m ³]	1,4x10 ³	1,4x10 ³	-	2,1x10 ²
	Median [KBE/m ³]	7,4x10 ³	7,4x10 ³	-	2,0x10 ³
	max [KBE/m ³]	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	-	5,4x10 ³

Tabelle 6.3: Mediane Sporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern in Relation zur Schimmelpilzbefallsfläche Teil 2

Schimmelpilz- befallsfläche	DG18/MAS	Keller gesamt n=72	Ziegel- keller n=34	Beton- keller n=38	Außenluft
leicht <20%	min [KBE/m ³]	5,0x10 ¹	3,2x10 ²	5,0x10 ¹	2,0x10 ¹
	Median [KBE/m ³]	8,9x10 ²	1,0x10 ³	8,5x10 ²	7,7x10 ²
	max [KBE/m ³]	5,4x10 ³	5,4x10 ³	4,2x10 ³	2,6x10 ³
mittel 20-80%	min [KBE/m ³]	4,8x10 ²	4,8x10 ²	1,1x10 ³	1,8x10 ²
	Median [KBE/m ³]	1,7x10 ³	2,5x10 ³	1,4x10 ³	4,0x10 ²
	max [KBE/m ³]	8,2x10 ³	8,2x10 ³	1,6x10 ³	3,4x10 ³
schwer >80%	min [KBE/m ³]	1,4x10 ³	1,4x10 ³	-	2,0x10 ¹
	Median [KBE/m ³]	6,2x10 ³	6,2x10 ³	-	8,6x10 ²
	max [KBE/m ³]	8,5x10 ³	8,5x10 ³	-	3,2x10 ³
Schimmelpilz- befallsfläche	MEA/MAS	Keller gesamt n=72	Ziegel- keller n=34	Beton- keller n=38	Außenluft
leicht <20%	min [KBE/m ³]	4,0x10 ¹	1,8x10 ²	4,0x10 ¹	6,0x10 ¹
	Median [KBE/m ³]	6,5x10 ²	8,9x10 ²	6,1x10 ²	7,4x10 ²
	max [KBE/m ³]	4,2x10 ³	4,2x10 ³	3,3x10 ³	2,9x10 ³
mittel 20-80%	min [KBE/m ³]	3,2x10 ²	3,2x10 ²	8,5x10 ²	1,3x10 ²
	Median [KBE/m ³]	1,4x10 ³	2,0x10 ³	1,1x10 ³	1,1x10 ³
	max [KBE/m ³]	7,5x10 ³	7,5x10 ³	1,4x10 ³	2,2x10 ³
schwer >80%	min [KBE/m ³]	1,3x10 ³	1,3x10 ³	-	2,2x10 ²
	Median [KBE/m ³]	3,5x10 ³	3,5x10 ³	-	1,2x10 ³
	max [KBE/m ³]	7,2x10 ³	7,2x10 ³	-	3,3x10 ³

6.3 Identifizierte Schimmelpilzgattungen

6.3.1 Schimmelpilzgattungen in der Weinkellerluft

In der Raumlufte der Weinkeller (n=72) waren 14 der 28 aus der Luft identifizierten Pilzgattungen vorherrschend.

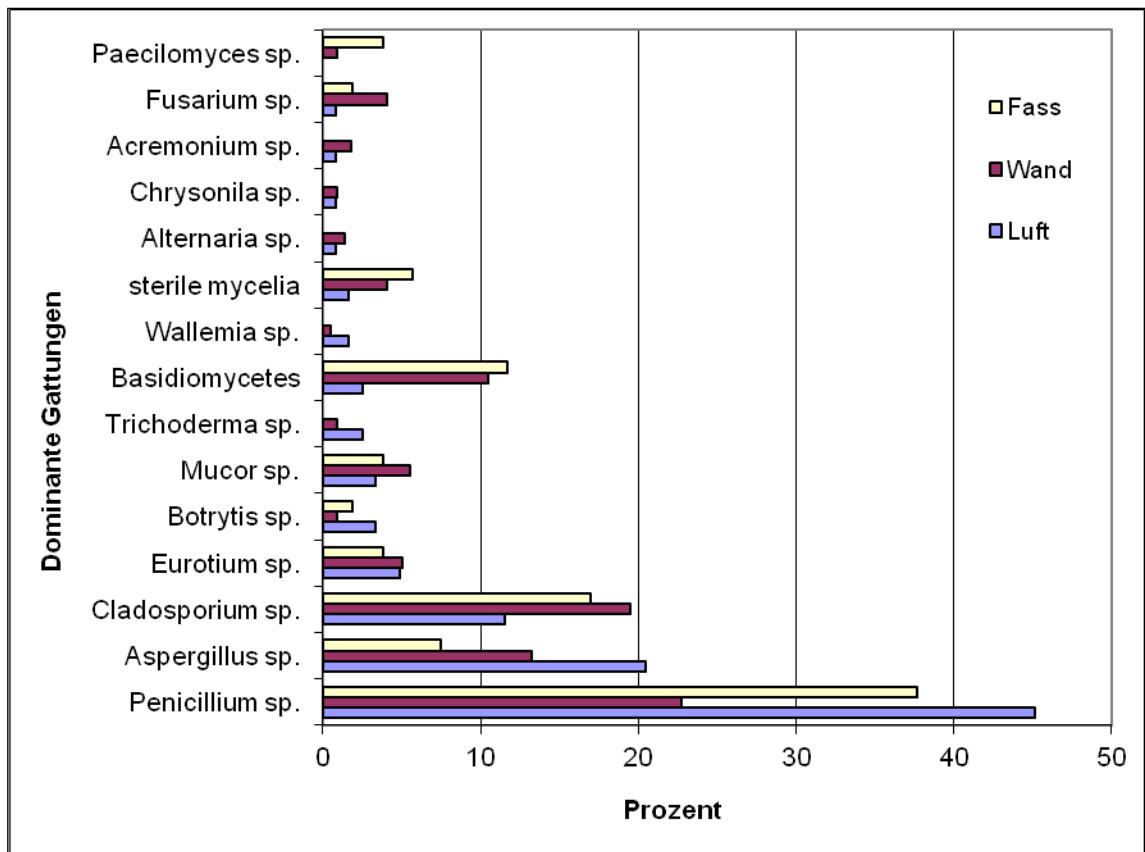


Abbildung 6.11: Identifizierte dominante Schimmelpilzgattungen aus der Weinkellerluft (n=72), von Wandproben (n=62) und Fassproben (n=36) aus den 36 Weinkellern

Es wurden vorwiegend Schimmelpilze der Gattung *Penicillium*, *Aspergillus* und *Cladosporium* nachgewiesen. Die Gattung *Penicillium* war mit 45% vorherrschend, gefolgt von *Aspergillus* mit 21% und *Cladosporium* mit 12%. Die übrigen Gattungen wurden mit einem Anteil von $\leq 5\%$ dokumentiert (Abbildung 6.11). In Tabelle 6.4 sind alle identifizierten 35 Schimmelpilzgattungen und 84 Arten, welche aus der Weinkellerluft, von Wand- und von Fassproben isoliert wurden, aufgelistet.

6.3.2 Schimmelpilzgattungen von Weinkellerwand- und Fassproben

In den Weinkellern wurden 62 Abstrichproben von Wandoberflächen und 23 von Fassoberflächen genommen. Von den Wandoberflächen wurden 15 Gattungen und von den Fassoberflächen 23 Gattungen isoliert. Bei den Wandproben waren die Gattungen *Penicillium* mit 23%, *Cladosporium* mit 20%, *Aspergillus* mit 13% und Basidiomyceten mit 11% dominant. Bei den Fassproben waren die dominanten Gattungen *Penicillium* mit 38%, *Cladosporium* mit 17%, *Basidiomyceten* mit 12% und *Aspergillus* mit 8%. Die Gattungen *Mucor*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Acremonium* und *Botrytis* waren mit einem Anteil von 6% und weniger vertreten (Abbildung 6.11).

Mit logistischen Regressionsmodellen wurden die Ursachen und Bedingungen für das Auftreten bestimmter Pilzarten im Weinkeller untersucht. Es wurde festgestellt, dass das Wachstum von *Aspergillus versicolor* signifikant ($p \leq 0,01$) begünstigt wird, wenn an Bauteiloberflächen im Weinkeller der Taupunkt unterschritten wird. Die Auftrittswahrscheinlichkeit von *Aspergillus fumigatus* war signifikant höher in Ziegelkellern ($p \leq 0,006$) als in Betonkellern und wurde signifikant begünstigt, wenn der Taupunkt ($p \leq 0,02$) unterschritten wurde. Das Auftreten dieser Pilzart reduzierte sich, wenn die Innenraumtemperatur ($p \leq 0,03$) und RH ($p \leq 0,02$) im Weinkeller anstiegen. Die Gattung *Mucor* sp. wurde mit einer signifikant ($p \leq 0,02$) höheren Wahrscheinlichkeit in Weinkellern, die vor 1950 erbaut wurden, gefunden. Die Art *Botrytis cinerea* wurde mit einer signifikant ($p \leq 0,02$) höheren Wahrscheinlichkeit in Weinkellern, die zur Produktion genutzt wurden, ermittelt. Die Auftrittswahrscheinlichkeit von *Alternaria alternata* war signifikant geringer in Ziegelkellern ($p \leq 0,01$) als in Betonkellern.

Die Pilzart *Zasmidium cellare* wurde in fünf Weinkellern (13%) in Ziegelbauweise mit einer Schimmelpilzbefallsfläche der Kategorie „schwer“ entdeckt. *Z. cellare* bedeckte in diesen Kellern ca. 50-80% der Bauteiloberflächen. Es wurden Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen von $3,6 \times 10^3$ KBE/m³ im Median in der Luft gemessen.

Tabelle 6.4: Identifizierte Schimmelpilzgattungen und –arten

Fungal Taxa	A ¹	B ²	W ³	Fungal Taxa	A	B	W	Fungal Taxa	A	B	W
Absidia				Fusarium				<i>Penicillium thomii</i>	+	+	
<i>Absidia macrospora</i>			+	<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+	<i>Penicillium tricolor</i>	+		
<i>Absidia repens</i>			+	<i>Fusarium poae</i>	+	+		<i>Penicillium variabile</i>	+	+	+
Acremonium				<i>Fusarium solani</i>	+		+	Phanerochaete			
<i>Acremonium murorum</i>	+			Geotrichum				<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	+		
<i>Acremonium strictum</i>	+		+	<i>Geotrichum candidum</i>	+			Phialophora			
Alternaria				Lecanicillium				<i>Phialophora europaea</i>		+	
<i>Alternaria alternata</i>	+		+	<i>Lecanicillium psalliotae</i>			+	Phoma			
Aspergillus				Moniliella				<i>Phoma glomerata</i>	+		+
<i>Aspergillus candidus</i>	+			<i>Moniliella acetoabutens</i>	+			Rhizomucor			
<i>Aspergillus clavatus</i>	+			Mortierella				<i>Rhizomucor sp.</i>		+	
<i>Aspergillus flavus</i>	+			<i>Mortierella sp.</i>	+			Rhizopus			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	Mucor				<i>Rhizopus microsporus</i>	+		
<i>Aspergillus neoelipticus</i>	+			<i>Mucor circinelloides</i>	+	+	+	<i>Rhizopus oryzae</i>	+		
<i>Aspergillus niger</i>	+		+	<i>Mucor fragilis</i>			+	<i>Rhizopus stolonifer</i>	+	+	+
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+		+	<i>Mucor hiemalis</i>	+	+	+	Scopulariopsis			
<i>Aspergillus versicolor</i>	+	+	+	<i>Mucor plumbeus</i>	+		+	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	+		
<i>Aspergillus tamari</i>	+			<i>Mucor racemosus</i>	+		+	<i>Scopulariopsis fusca</i>	+		
<i>Aspergillus terreus</i>	+		+	Paecilomyces				Schizophyllum			
Aureobasidium				<i>Paecilomyces variotii</i>	+	+	+	<i>Schizophyllum commune</i>	+		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	Penicillium				Simplicillium			
Botrytis				<i>Penicillium adanetzioides</i>	+			<i>Simplicillium lamellicola</i>			+
<i>Botrytis cinerea</i>	+	+	+	<i>Penicillium angulare</i>	+			Stachybotrys			
<i>Botrytis fabae</i>	+			<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	+			<i>Stachybotrys chartarum</i>	+		
Byssoschlamys				<i>Penicillium brevicompactum</i>	+			Trametes			
<i>Byssoschlamys nivea</i>		+		<i>Penicillium canembertii</i>	+		+	<i>Trametes hirsuta</i>	+		
Cladosporium				<i>Penicillium carneum</i>	+			<i>Trametes versicolor</i>	+		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	+	+	<i>Penicillium chrysogenum</i>	+		+	Trichoderma			
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	+	+	+	<i>Penicillium corylophilum</i>	+	+	+	<i>Trichoderma viridae</i>	+		+
Chrysonilia				<i>Penicillium crustosum</i>	+			<i>Trichoderma harzianum</i>	+		
<i>Chrysonilia sitophila</i>	+		+	<i>Penicillium decumbens</i>	+	+		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>		+	
Emericella				<i>Penicillium expansum</i>	+		+	Trichothecium			
<i>Emericella nidulans</i>	+		+	<i>Penicillium glabrum</i>	+	+	+	<i>Trichothecium roseum</i>	+		
Eurotium				<i>Penicillium griseofulvum</i>	+			Ulocladium			
<i>Eurotium amstelodami</i>	+	+	+	<i>Penicillium italicum</i>			+	<i>Ulocladium chartarum</i>	+		+
<i>Eurotium chevalieri</i>	+			<i>Penicillium nalgiovense</i>			+	Wallemia			
<i>Eurotium herbariorum</i>	+	+	+	<i>Penicillium olsonii</i>	+		+	<i>Wallemia sebi</i>	+		+
Epicoccum				<i>Penicillium piceum</i>			+	Zasmidium			
<i>Epicoccum nigrum</i>	+	+	+	<i>Penicillium purpurescens</i>	+	+		<i>Zasmidium cellare</i>		+	+
				<i>Penicillium roqueforti</i>	+						
				<i>Penicillium spinulosum</i>	+	+	+				

A¹...Luft
B²...Fass
W³...Wand

In Ziegelkellern ohne *Z. cellare* Bewuchs wurden im Median um das 2,5 fach geringere Sporenkonzentrationen von $1,4 \times 10^3$ KBE/m³ von xerophilen Pilzen in der Luft festgestellt. Mit dem logistischen Regressionsmodell wurde festgestellt,

dass das Auftreten von *Z. cellare* mit zunehmender RH im Weinkeller signifikant ($p \leq 0,006$) zunimmt.

6.4 Tri-, Tetrachloranisol und Tribromanisol

Es wurden 38 Weinkellerluftproben auf Tri-, Tetrachloranisol und Tribromanisol untersucht. In sechs Proben konnte kein TCA nachgewiesen werden. In 27 Proben lagen die TCA-Werte unter der Nachweisgrenze von 1ng/L und in vier Proben war TCA über der Nachweisgrenze von <1 ng/L vorhanden. Bei einer Probe war das TCA durch eine andere Substanz überlagert, sodass kein TCA Nachweis möglich war. TeCA wurde in 34 Proben nicht, in drei Proben unter und in einer Probe über der Nachweisgrenze von <1 ng/L gemessen. In keiner der 38 Proben konnte TBA nachgewiesen werden (Tabelle 6.5).

In Abbildung 6.12 wurde der Gehalt an TCA und die Medianwerte der Sporenkonzentrationen in der Kellerraumluft verglichen. Aus den Ergebnissen lässt sich erkennen, dass die Medianwerte der xerophilen Pilze in der Luft von Weinkellern mit TCA-Werten über der Nachweisgrenze von 1 ng/L bei $6,8 \times 10^3$ KBE/m³ lagen.

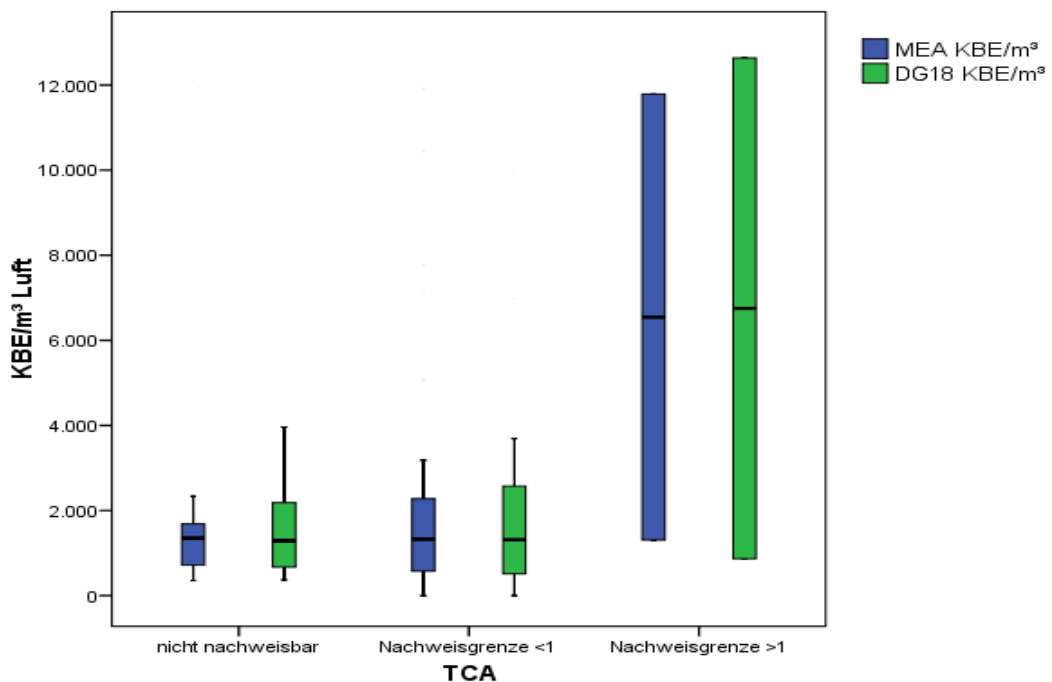


Abbildung 6.12: Mediane Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft kategorisiert nach dem Vorhandensein von TCA

Tabelle 6.5: Konzentration von Anisolverbindungen in der Weinkellerluft

Probennummer	Bezeichnung	TCA [ng/L]	TeCA [ng/L]	TBA [ng/L]
1	W-B	<1	nn	nn
2	W-B	<1	<1	nn
3	W-Z	<1	<1	nn
4	W-Z	nn	nn	nn
5	W-B	nn	nn	nn
6	W-Z	nn	nn	nn
7	W-B	<1	nn	nn
8	W-B	<1	nn	nn
9	W-Z	<1	nn	nn
10	W-B	nn	nn	nn
11	W-Z	<1	nn	nn
12	W-Z	na	nn	nn
13	W-B	<1	nn	nn
14	W-B	<1	nn	nn
15	W-Z	nn	nn	nn
16	W-Z	<1	nn	nn
17	W-Z	nn	<1	nn
18	W-B	<1	nn	nn
19	W-Z	<1	nn	nn
20	W-Z	1,6	nn	nn
21	W-Z	<1	nn	nn
22	W-B	<1	nn	nn
23	W-Z	<1	2,7	nn
24	W-Z	<1	nn	nn
25	W-Z	<1	nn	nn
26	W-B	<1	nn	nn
27	W-Z	12,5	nn	nn
28	W-Z	<1	nn	nn
29	W-B	<1	nn	nn
30	W-Z	<1	nn	nn
31	W-B	<1	nn	nn
32	W-Z	<1	nn	nn
33	W-B	<1	nn	nn
34	W-B	<1	nn	nn
35	W-Z	1	nn	nn
36	W-Z	<1	nn	nn
37	W-Z	1	nn	nn
38	W-Z	<1	nn	nn

W-Z...Weinkellerluftprobe Ziegelbauweise

W-B...Weinkellerluftprobe Betonbauweise

nn...nicht nachweisbar

na...nicht auswertbar

7 Diskussion

7.1 Vergleich der Sporenkonzentrationen in der Weinkellerluft und in der Außenluft

Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass die Pilzsporenkonzentrationen in der Luft von Weinkellern durch die Temperatur und RH der Außenluft, der RH im Weinkeller und dem Wachstum von Schimmelpilzen auf Bauteiloberflächen beeinflusst werden. Eine wichtige Rolle spielen auch der Bautyp des Weinkellers und der Einsatz einer Raumluftechnischen Anlage im Weinkeller.

Schimmelpilze haben eine wichtige Rolle beim Abbau von organischen Materialien und kommen in der Vegetationsperiode vermehrt in der Außenluft vor. In den Monaten mit niedriger Außenlufttemperatur zeigte sich eine Reduktion der Sporenkonzentration sowohl in der Außen- als auch in der Innenraumluft. Die Zahl der Schimmelpilzsporen in der Außenluft wird von der Beschaffenheit der Umgebung, dem Klima, der Tages- und Jahreszeit beeinflusst. Dennoch dürfte die Konzentration der Schimmelpilzsporen in der Außenluft weniger wichtig für die Sporenkonzentration in den Weinkellern sein, da die spezifischen Bedingungen, die im Innenraum vorherrschen, für die Ausbildung einer Mikroflora ausschlaggebend sind. Auch Ocon et al. (2011) konnte in einem Weinkeller in Logrono (Spanien) feststellen, dass die Bauweise des Weinkellers und die RH im Keller die ausschlaggebenden Faktoren für die Schimmelpilzsporenkonzentration in der Kellerraumluft sind. In Innenräumen, welche den Schimmelpilzen ungünstige Lebensbedingungen bieten, unterscheiden sich die Sporenkonzentration und die Zusammensetzung der Pilzarten in der Raumluf nicht wesentlich von jener der Außenluft (Obeloer et al. 2001). In dieser Studie wurden Sporenkonzentrationen für xerophile Pilze in allen Weinkellern im Median von $1,5 \times 10^3$ KBE/m³, in Ziegelkellern von $2,5 \times 10^3$ KBE/m³ und in Betonkellern von $1,3 \times 10^3$ KBE/m³ ermittelt. Für mesophile Pilze wurden Sporenkonzentrationen in allen Weinkellern von $1,3 \times 10^3$ KBE/m³, in Ziegelkellern von $1,7 \times 10^3$ KBE/m³ und in Betonkellern von $9,5 \times 10^2$ KBE/m³ im Median gemessen. Mandl et al. (2010) ermittelten in alten Erdkellern

Sporenkonzentrationen von xerophilen Pilzen im Mittel von $4,1 \times 10^3$ KBE/m³ Luft und von mesophilen Pilzen von $4,8 \times 10^3$ KBE/m³. Simeray et al. (2001) konnten für mesophile Schimmelpilze Werte von $5,7 \times 10^2$ KBE/m³ bis zu $2,4 \times 10^3$ KBE/m³ Luft feststellen. In der Studie von Picco et al. (2004) wurden im Mittel Sporenkonzentrationen von xerophilen Schimmelpilzen in industriell- und in familienbetriebenen Weinkellern von $3,0 \times 10^2$ KBE/m³ bis zu $6,5 \times 10^3$ KBE/m³ nachgewiesen. Ocon et al. (2011) zeigten, dass in einem modernen betonierten Weinkeller im unter Erdniveau liegenden Fasskeller höhere Sporenkonzentrationen auftraten als im ebenerdig liegenden Produktionskeller.

Wurden im Weinkeller Arbeitsvorgänge mit erhöhten Sporenemissionen durchgeführt, wie z.B. das Ablösen der Trauben vom Rappen mit einer Abbeermaaschine, stiegen die Sporenkonzentrationen für xero- bzw. mesophile Pilze bis $2,1 \times 10^4$ KBE/m³ bzw. $3,6 \times 10^4$ KBE/m³ an. Rosa et al. (2002) konnten auf Trauben Sporenkonzentrationen filamentöser Pilze im Mittel von $1,3 \times 10^4$ bis $5,4 \times 10^6$ KBE/g nachweisen. Picco et al. (2004) konnten die höchsten Pilzsporenkonzentrationen von $6,5 \times 10^3$ KBE/m³ während der Produktion und im Bereich der Flaschenabfüllung feststellen. Auch Simeray et al. (2001) konnten nach dem Pressen der Trauben im Weinkeller erhöhte KBE/m³ für *Botrytis cinerea* ermitteln. In dieser Studie wurde *Botrytis cinerea* vermehrt in Weinkellern, die zur Produktion verwendet werden, nachgewiesen. Diese Schimmelpilzart tritt vermehrt auf Weintrauben auf (Tournas et al., 2005). Garijo et al. (2008) stellten fest, dass die Sporenbelastung für die Weinbauern beim Abladen der Trauben und beim Entrappen der Trauben hoch war.

Hohe Sporenkonzentrationen von Schimmelpilzen, vor allem von *Botrytis cinerea* werden als Ursache der Berufskrankheit „Winzerlunge“ bzw. „Spätleselunge“, einer exogen allergischen Alveolitis (EAA) angesehen. Diese Hypersensitivitätspneumonitis wird durch eine allergische Reaktion der Alveolen vom Typ III u. IV durch wiederholte Exposition gegenüber hohen Konzentrationen an Pilzsporen (10^6 bis 10^{10} Sporen/m³) ausgelöst. Bei anhaltendem Allergenkontakt können sich diffuse interstitielle Lungenfibrosen mit Spätschäden entwickeln (Buchter, 2011; Buzina, 2007; Trautmann, 2006; UBA, 2002; Bessot et al., 1997; Popp et al., 1987). Diese Berufskrankheit ist in der Landwirtschaft allgemein als „Farmerlunge“ bekannt. Das Krankheitsbild

äußert sich in Form der Leitsymptome Atemnot und Husten und den Allgemeinsymptomen Abgeschlagenheit, Fieber, Schüttelfrost, Schweißneigung, Kopfschmerzen, Übelkeit und Appetitlosigkeit. Die oberen Atemwege können in Form einer Rhinitis, Pharyngitis oder Laryngitis ebenso betroffen sein. Die Symptome halten in der Regel mehrere Stunden, selten über wenige Tage an (Buchter, 2011; Trautmann, 2006). Beschäftigte von Wein erzeugenden Betrieben sollten daher bei Tätigkeiten, wie dem Entrappen der Trauben, bei denen mit hohen Sporenkonzentrationen von Schimmelpilzen zu rechnen ist, Schutzmasken (FP3) tragen.

7.2 Vergleich der Sporenkonzentrationen in Relation zum Bautyp des Weinkellers und zu den klimatischen Bedingungen

In Bezug auf den Bautyp der Weinkeller waren die Sporenkonzentrationen in Ziegelkellern, die vor 1950 erbaut wurden, signifikant höher als in Weinkellern, die später erbaut wurden. Simeray et al. (2001) konnten in alten traditionellen semi-subterranean Weinkellern mit festen Erdböden höhere Sporenkonzentrationen nachweisen als in neu erbauten Kellern. Ocon et al. (2011) stellten ebenfalls fest, dass die Bauweise des Weinkellers und die relative Luftfeuchtigkeit bzw. Bereiche im Weinkeller mit geringem Luftaustausch und hoher RH wichtige Faktoren für die Schimmelpilzsporenkonzentration in der Kellerraumlufte waren. Auch in unserer Studie konnte beobachtet werden, dass vor allem Ziegelkeller nur bis zu einem gewissen Grad konditionierte Raumlufteverhältnisse über das gesamte Raumvolumen aufwiesen und die höheren Sporenkonzentration in der Luft auf die höheren RH in den Kellern zurückzuführen war. In Weinkellern ohne Raumlufte technische Anlagen waren die Sporenkonzentrationen signifikant höher als in Weinkellern mit Raumlufte technischen Anlagen. Zehn Weinkeller in Ziegelbauweise, die vor 1950 erbaut wurden, wiesen sichtbare Schimmelpilzbefallsflächen der Kategorie „schwer“ auf. Die Ziegelkeller wiesen in der Regel keine Feuchtigkeitsisolierung auf. In ihnen führten Meteor- oder Sickerwässer zur Befeuchtung von Konstruktionsteilen, die wiederum entsprechende Schimmelpilzquellen darstellen. Weitere Faktoren für Schimmelpilzwachstum stellten

unterschiedliche Temperatur- und RH Werte der Weinkellerinnenraumluft und der Außenluft, speziell bei warmen Außentemperaturen dar. Bei leichten Veränderungen der Rahmenbedingungen (höhere RH, geringere Raumtemperatur) in Weinkellern ohne Raumluftechnische Anlagen waren Taupunktunterschreitungen an Bauteilen möglich. Blieben diese geänderten Bedingungen in einem gewissen Rahmen und treten diese Ereignisse nicht zu häufig auf, konnte das Kondensat wieder abtrocknen und an diesem Bauteil war kein Schimmelpilzwachstum zu erwarten. Besonders im Frühsommer war die Gefahr von Taupunktunterschreitungen durch die einströmende warme Außenluft groß, da die Kellerwände noch relativ kühl waren. In diesem Kellertyp kann es an jenen Konstruktionsteilen, die durch niedrigere Oberflächentemperaturen gekennzeichnet sind, zu einer höheren Substratfeuchtigkeit kommen. Beim Einströmen wärmerer Außenluft in die Keller kühlt diese ab und die überschüssige RH kondensiert an den kalten Bauteiloberflächen aus. Dies führt wiederum lokal zu vermehrtem Schimmelpilzwachstum. Die Feuchtigkeitsverhältnisse an den Konstruktionsteilen und die RH im Keller spielen eine entscheidende Rolle für das Schimmelpilzwachstum. Von außen können Keller durch Bodenfeuchte, Hang- oder Sickerwasser und evtl. durch drückendes Wasser belastet werden. Bei den Betonkellern wurden die Fundamente und Kellerwände meist so errichtet, dass kein Wasser von außen eindringen kann. Bei den untersuchten Ziegelkellern waren zumeist keine Feuchtigkeitsisolationen vorhanden. Auch einige Betonkeller hatten keine gedämmte Bauweise, sodass auch hier Kondenswasserniederschlag zu einer Durchfeuchtung der Bauteile und in weiterer Folge zu sichtbarem Schimmelpilzbefall an den Bauteiloberflächen führte.

Weinkeller in denen eine Raumluftechnische Anlage zum Einsatz kam, hatten generell ein trockeneres Innenraumklima. In Betonkellern mit einer Klimaanlage waren die Sporenkonzentrationen in der Luft niedrig, weil einerseits diese Anlagen für ein ausgeglichenes Kellerklima (Temperatur, RH) sorgten und andererseits zusätzliche Feuchtigkeitsquellen gebäudebedingt soweit wie möglich ausgeschlossen waren. In diesen Kellern lag die RH zwischen 39 und 45%, wogegen in den Weinkellern ohne Raumluftechnische Anlagen eine RH

bis zu 85% verzeichnet wurde. Die ermittelten RH aller Weinkeller lagen zwischen 39% und 85%. Picco et al. (2004) haben in ihrer Studie eine RH in Weinproduktionsbereichen von $82,5 \pm 6,2\%$ und in Kellern zur Weinlagerung und Reifung des Weines von $74,4 \pm 4,8\%$ gemessen. Ocon et al. (2011) konnten in Weinkellerbereichen, die unter der Erde lagen und als Lagerkeller verwendet wurden, eine RH von 55,5% bis zu 85,3% gemessen. Simeray et al. (2001) ermittelten in alten, teilweise subterranean Lagerkellern eine RH von 40% bis 60% und in modernen, betonierten Lagerkellern eine RH von 43% bis 50%. In Weinkellern, die zum Ausbau und zur Lagerung des Weines verwendet werden, sollte die RH zwischen 50% und 75% liegen, um den Schwund in den Holzfässern gering zu halten bzw. um ein Austrocknen der Korken zu vermeiden. Clemenz (2007) zeigte, dass in Gewölbekellern eine RH im Mittel von 90% und in klimatisierten Kellern im Mittel von 67% vorherrschen. Ocon et al. (2011) stellten fest, dass nicht die Temperatur im Weinkeller, sondern die RH der determinierende Faktor für hohe Sporenkonzentrationen ist. Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die RH in den Weinkellern einen größeren Einfluss auf Schimmelpilzbefall hatte als die Raumtemperatur. Die Wahrscheinlichkeit für einen schweren Schimmelpilzbefall im Weinkeller nahm mit steigender RH zu. Herrschen Konditionen mit einer RH über 70%, so sind diese optimal für Schimmelpilzwachstum (Burge, 1990). Die idealen Lebensbedingungen für die meisten Schimmelpilze sind bei einer RH um 80% und bei Temperaturen um 20°C gegeben. Bei einem ausreichenden Feuchtigkeitsangebot können Schimmelpilze auf fast allen organischen Substraten wachsen (Jorde et al., 1988). Reinigungsvorgänge mit Wasser in den Weinkellern führen zu einer höheren Luftfeuchtigkeit im Raum. Aus der Literatur ist bekannt, dass pro Liter produziertem Wein zwischen 3,5 und 7,5 Liter Wasser verbraucht werden (Huck et al., 2007). Rund 80% dieses Wassers werden in der Weinbereitung für Reinigungs- und Desinfektionszwecke benötigt. Schimmelpilzwachstum wird einerseits durch eine länger währende, höhere relative Luftfeuchtigkeit, andererseits durch eine entsprechende Verfügbarkeit von freiem Wasser (a_w -Wert von 0,7–0,95) im Substrat induziert (Sedlbauer, 2001). Viele Schimmelpilze wachsen bereits unter Konditionen mit niedriger Wasseraktivität (a_w), wogegen andere einen a_w von 0,85 und höher bevorzugen. Unter 30% RH erfolgt nur geringes Schimmelpilzwachstum im

Innenraum, jedoch Konditionen über 70% sind optimal für Schimmelpilzwachstum (Levetin, 1995). Bei ausreichendem Myzelwachstum setzt bei niedriger Luftfeuchtigkeit wiederum die Sporulation ein. Hohe RH in Weinkellern kann zu einem Problem bei der Weinlagerung führen, da ein hohes Risiko besteht, dass bei alten Weinfässern Schimmelpilzwachstum auftritt (Guerrero und Ocana, 2005). Diese Studie hat gezeigt, dass mit einem Anstieg der Außenluft-RH die Sporenkonzentration in Weinkellern mit einer sichtbaren Schimmelpilzbefallsfläche der Kategorie „schwer“ abnimmt. Der Grund dafür dürfte sein, dass keine Sporulation bzw. Freisetzen der Pilzsporen stattfindet, wenn die Verfügbarkeit von freiem Wasser an Oberflächen im Sättigungsbereich liegt. Die Konditionen, die für die Sporulation von Schimmelpilzen vorhanden sein müssen, hängen von der Variabilität der Schimmelpilze und der adäquaten Verfügbarkeit von Feuchtigkeit ab. Nach Levetin (1995) werden bestimmte Nährstoffe oder Umweltfaktoren benötigt, um die Sporenentwicklung zu initiieren.

In der Studie wurden Temperaturen in den Weinkellern im Bereich von 9,6°C bis 23°C bzw. im Mittel 15,3°C gemessen. In der Arbeit von Picco et al. (2004) lagen die Raumtemperaturen während der Weinproduktion bei $15,1 \pm 1,9^\circ\text{C}$ und zum Zeitpunkt der Weinlagerung und Entwicklung des Weines bei $12,2 \pm 1^\circ\text{C}$. In einer spanischen Studie wurden Temperaturen in einem Weinkeller von 11,2°C bis 21,5°C bzw. im Mittel 16,5°C gemessen (Ocon et al., 2011). Simeray et al. (2001) konnten in alten, teilweise subterranean Lagerkellern Temperaturen von 9°C bis 14°C und in modernen, betonierten Lagerkellern von 8°C bis 16°C messen. Clemenz (2007) konnte in Gewölbekellern eine mittlere Raumtemperatur von 10,5°C und in klimatisierten Kellern von 13,4°C feststellen. Im Lagerkeller sollten im Idealfall 8 bis 18°C herrschen unter der Voraussetzung, dass die Temperatur konstant bleibt. Eine Erhöhung der Kellertemperatur auf 12°C im Winter oder auf 20°C im Sommer ist unbedenklich, wenn die Temperaturen an den raumumhüllenden Bauteilen über dem Taupunkt bleiben. Hingegen können sich Jahresschwankungen von mehr als 5-6°C negativ auf den Wein auswirken (Vogt et al., 1984).

Der geringe Unterschied in den Keimkonzentrationen zwischen Lager- und Produktionskellern lässt sich damit erklären, dass sowohl Lager- als auch

Produktionskeller teilweise aus Ziegel oder aus Beton gebaut sind. So sind 30% der Lagerkeller und 60% der Produktionskeller aus Beton. Vergleicht man die Lager- bzw. Produktionskeller nach Bautyp so kann man feststellen, dass jene Keller höhere Sporenkonzentrationen in der Luft aufweisen, die aus Ziegel errichtet sind. Picco et al. (2004) konnten die höchsten Pilzsporenkonzentrationen von $6,5 \times 10^3$ KBE/m³ Luft sowohl bei der Produktion im Bereich der Flaschenabfüllung als auch im Lagerkeller feststellen. Generell konnten in dieser Studie hohe Sporenkonzentrationen in Kellerbereichen, wo Fermentationsprozesse ablaufen und in Bereichen der Flaschenabfüllung nachgewiesen werden. Simeray et al. (2001) ermittelten für mesophile Schimmelpilze Werte von $5,7 \times 10^2$ KBE/m³ bis zu $2,4 \times 10^3$ KBE/m³ Luft, wobei sie beobachteten, dass alte, teilweise subterrane Keller höhere Sporenkonzentrationen als moderne Weinkeller aufweisen. Ocon et al. (2011) zeigten, dass in einem modernen betonierten Weinkeller im unter Erdniveau gelegenen Fasskeller höhere Sporenkonzentrationen auftraten als im ebenerdig gelegenen Produktionskeller. Der Bautyp der Weinkeller spielt somit eine entscheidende Rolle in Bezug zur auftretenden Sporenkonzentration.

7.3 Identifizierte Schimmelpilzarten

In dieser Studie brachte die qualitative Auswertung der Weinkellerluft 35 Schimmelpilzgattungen und 84 Arten. Simeray et al. (2001) konnten in verschiedenen Weinkellern von 48 Pilzarten am häufigsten *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. und *Aspergillus* spp. identifizieren. Picco et al. (2004) wiesen in ihrer Studie in der Luft von Weinkellern 21 Gattungen und 42 Arten in den Weinkellern nach, und beschrieben *Penicillium* spp. und *Aspergillus* spp. als dominante Gattungen. In der vorliegenden Studie konnten in den Weinkellern 14 dominante Gattungen gefunden werden. Davon waren die Gattungen *Penicillium* mit 45%, *Aspergillus* mit 21% und *Cladosporium* mit 12% am häufigsten in der Luft vertreten. Garijo et al. (2008) konnten in der Weinkellerluft *Botrytis* sp., Mandl et al. (2010) am häufigsten *Penicillium* sp. und *Aspergillus* sp. nachweisen. Haas et al. (2007) zeigten, dass hohe Sporenkonzentrationen von *Pencillium* und *Aspergillus* im Innenraum stets bei sichtbarem Schimmelpilzbefall auftraten. Garijo et al. (2008) berichteten, dass

es sich bei den vorhin erwähnten zwei Schimmelpilzgattungen um typische „ware-house molds“ handelt, welche als einzige immer in Weinkellereiosystemen gefunden wurden.

Die Gattungen *Pencillium* und *Cladosporium* wurden in dieser Studie am häufigsten auf Fass- und Wandproben nachgewiesen. Auch Goto et al. (1989) identifizierten die Gattungen *Pencillium* und *Cladosporium* als dominante Gattungen in Lagerkellern. Die Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* werden häufig in Innenräumen gefunden, weil diese Pilze gerne auf Nährböden wie Holz, Pappe oder Wandoberflächen gedeihen (Burge, 1990). In Abhängigkeit von den Feuchtigkeitsansprüchen wachsen die Schimmelpilze auf organischen Substraten nach einer bestimmten Sukzession. Als Erstbesiedler gelten Arten von *Pencillium* und *Aspergillus*. Eine sekundäre Besiedelung findet durch die Gattung *Cladosporium* statt usw. (Pratt et al. 1999). Die Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* sind aber nicht nur Biokontaminanten in Innenräumen, sondern stellen eine wichtige Quelle für Allergene dar (Morey et al. 2002; Icenhour et al. 1997). Garijo et al. (2008) konnten in der Weinkellerluft neben den am häufigsten vertretenen *Penicillium* sp. und *Aspergillus* sp. auch *Botrytis* sp. nachweisen. Während *Botrytis* sp. vorwiegend beim Abladen der Trauben im Kelterhaus präsent war, dominierte *Penicillium* sp. bei der Weinlagerung in der Luft. Auch in unserer Studie wurde die Art *Botrytis cinerea* mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit in Weinkellern, die zur Produktion genutzt wurden, nachgewiesen. Tournas et al. (2005) untersuchten verschiedene Früchte auf Befall durch Mikroorganismen und konnten *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp. und *Cladosporium* sp. am häufigsten auf Weintrauben nachweisen. Bei blauen Trauben wurden vermehrt *Alternaria* sp. und *Cladosporium* sp. gefunden, während auf grünen Trauben besonders *Botrytis* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. sowie Hefen der Gattung *Rhodotorula* vorhanden waren. Der Eintrag von Schimmelpilzen durch Weintrauben in die Weinkeller könnte, wenn man die freigesetzten Sporenkonzentrationen beim Entrappen der Trauben mit einer Abbeermaaschine betrachtet als Quelle für Sporenemissionen ebenfalls eine Rolle spielen. *Aspergillus fumigatus* wurde in unserer Studie in Luft-, Wand- und Fassproben gefunden. Das Auftreten dieser Art war signifikant höher in Ziegelkellern als in

Betonkellern und wurde begünstigt, wenn der Taupunkt an Bauteiloberflächen unterschritten wurde. Sein Auftreten reduzierte sich aber, wenn die Innenraumtemperatur und RH im Weinkeller anstiegen. Auch Simeray et al. (2001) konnten *Aspergillus fumigatus* in Weinkellern in geringer Häufigkeit nachweisen. Das Wachstum von *Aspergillus versicolor* an Bauteiloberflächen im Weinkeller wurde signifikant begünstigt, wenn eine Taupunktunterschreitung festgestellt wurde. *Aspergillus versicolor* wurde auch in anderen Studien in Weinkellern häufig nachgewiesen (Picco et al., 2004; Simeray et al., 2001).

Auf Wänden, Fässern und Weinflaschen fünf untersuchter Weinkeller in Ziegelbauweise wurde der Schimmelpilz *Z. cellare* nachgewiesen. Auch andere Studien berichten über das Vorkommen von *Z. cellare* in Weinkellern (Tribe et al. 2006; Schanderl, 1958; Schanderl, 1936). Er überwächst Oberflächen wie Glas, Porzellan und Metall, da er in der Kellerluft gasförmig vorkommende organische Stoffe wie Ethylalkohol und andere metabolisieren kann (Dittrich und Grossmann, 2005). Nach Dittrich und Grossmann (2005) ist *Z. cellare* ein Indikator für eine RH über 80% in den Weinkellern. Auch in unserer Studie konnten wir zeigen, dass *Z. cellare* ab einer RH von etwa 70% auftritt und sein Auftreten mit zunehmender RH im Weinkeller ansteigt. In einem Bericht von Tribe et al. (2006) wurde die Biodegradierung von organischen Kohlenstoffquellen durch *Z. cellare* und seine geruchsneutralen Eigenschaften hervorgehoben. Studien von Schanderl (1958) und Kiene (1939) zeigten, dass der Pilz nicht nur Alkohole, sondern auch Formaldehyd, Thymol und Essigsäure als Kohlenstoffquellen nutzen kann. In dieser Studie wurden höhere Sporenkonzentrationen in den Weinkellern mit Zasmidiumbewuchs registriert. Offensichtlich weist die erhöhte Sporenkonzentration in der Luft auf eine Vergesellschaftung von *Z. cellare* mit anderen Schimmelpilzen hin. Ob *Z. cellare* positive Effekte auf die Weinkellerluft haben kann, indem die Konzentration von ungünstigen Volatilen wie TCA in der Luft reduziert wird oder die Luftfeuchtigkeit reguliert wird, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

7.4 Tri-, Tetrachloranisol und Tribromanisol

In dieser Studie wurde das Auftreten der Chloranisole TCA, TeCA und TBA in der Luft der Weinkeller erfasst, um Kontaminationsquellen, die für einen Fehlgeschmack im Wein verantwortlich sein könnten, aufzuzeigen. Von 38 untersuchten Luftproben wurden in fünf Proben Werte von Chloranisolen über der Nachweisgrenze von <1ng/L festgestellt. In vier Weinkellerluftproben wurde TCA und in einer Luftprobe TeCA über der Nachweisgrenze von <1ng/L festgestellt. TBA wurde in keiner Luftprobe über der Nachweisgrenze von <1ng/L nachgewiesen. Aufgrund der geringen Konzentration der Chloranisolverbindungen in der Weinkellerluft von maximal 12,5 ng/L dürfte es keine negativen Auswirkungen auf die Weinqualität geben. Chatonnet et al. (2004, 1994) fanden in der Innenraumlufte von Weinkellern hohe Konzentrationen an Chlorphenolen und Chloranisolen als auch in Weinflaschen, die mit Kork verschlossen waren und in Weinen, die in Barriquefässern ausgebaut wurden. Schimmelpilze produzieren auf Holzfässern oder Schläuchen Geruchs- und Geschmacksstoffe, die in Wein gut löslich sind und daher vom Wein rasch extrahiert werden können. So kann in Weinfässern aus Eiche auch TBA entstehen, wenn Bakterien die fungizide Substanz, mit der Holz imprägniert wurde, abbauen. TBA kann sich auch in den Kellerwänden festsetzen und von dort über einen langen Zeitraum in die Atmosphäre abgegeben werden. Chatonnet et al. (2004) konnten feststellen, dass bereits geringe Mengen an TBA in den Kellerwänden ausreichen, um einen Keller für die Weinproduktion und -lagerung unbrauchbar zu machen. Als Ursache wurde beispielsweise das als Holzschutzmittel angewandte Tribromphenol (TBP) und Pentachlorphenol (PCP) genannt. In dieser Studie konnte in keinem der untersuchten Weinkeller TBA nachgewiesen werden.

Zahlreiche Untersuchungen bestätigen das Vorkommen von Chloranisolen im Kork durch Methylierungsprozesse von Chlorphenolen von Schimmelpilzen (Simpson und Sefton, 2007; Coque et al., 2006; Coque et al., 2003; Alvarez-Rodriguez et al., 2002; Juanola et al., 2002; Fischer et al., 2000). Schimmelpilze wie *Penicillium granulatum*, *Penicillium glabrum*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces variotii* u.a.m. haben die Fähigkeit durch direkte Methylierung von Chlorphenolen Chloranisole zu bilden

(Coque et al., 2003; Alvarez-Rodriguez et al., 2002). Die Kapazität der Methylierung ist jedoch bei den Schimmelpilzen unterschiedlich. Eine hohe Kapazität weisen nach Alvarez-Rodriguez et al. (2002) die Gattungen *Fusarium* und *Trichoderma* auf. Untersuchungen von Coque et al. (2003) konnten bei *Trichoderma longibrachiatum* eine besonders effektive Umsetzung von Chlorphenolen zu Chloranisolen bestätigen. In der vorliegenden Studie konnte in der Kellerraumluft kein Zusammenhang zwischen TCA und dem Vorkommen von Schimmelpilzen mit hoher Methylierungskapazität festgestellt werden. Von den in der Literatur beschriebenen Schimmelpilzarten, die in der Lage sind mit hoher Methylierungskapazität Trichloranisol zu synthetisieren, konnte in dieser Studie am häufigsten *Paecilomyces variotii* auf den Holzfässern nachgewiesen werden.

Chlorphenole und Chloranisole in der Luft von Weinkellern können auch im Wein in Eichenfässern einen Korkgeschmack induzieren. *Penicillium roqueforti* baut mit seiner hohen Abbaukapazität Suberin, Lignin und Zellulose auf Holz ab (Chatonnet et al. 1994). Vitorino et al. (2007) beschreiben die Entwicklung von *Chrysonilia sitophila* und ihren Abbau von Suberin im Naturkorken. Verschiedene Abbauprodukte können in Gegenwart von Hypochlorit das TCA bilden. Ebenso konnten Oliveira et al. (2003) in der Raumluft mit dem 2-stufigen Andersen Kaskaden Impaktor während der Korkproduktion vorwiegend *C. sitophila* nachweisen. In der vorliegenden Studie konnte *C. sitophila* häufig im Frühjahr in der Luft nachgewiesen werden, *Penicillium roquefortii* wurde auf Holzfässern nicht gefunden. Auf den Holzfässern wurden vielmehr *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Eurotium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* sp. und Basidiomyceten erfaßt. Kein Zusammenhang war jedoch zwischen *P. variotii* auf Fässern und dem Gehalt an TCA in der Raumluft zu erkennen. Picco et al. (2004) konnten auf Holzfässern vor allem *Aspergillus granulatus*, *Phialophora* sp. und *Scopulariopsis brevicaulis* isolieren.

Diese Ergebnisse bilden eine Datengrundlage für weiterführende Studien über die Zusammensetzung der Schimmelpilzarten und deren Beteiligung an der

Synthese von Anisolen in Weinkellern, sowie für arbeitsmedizinische Untersuchungen.

8 Literatur

Alvarez-Rodriguez, M.L., Lopez-Ocana, L., Lopez-Coronado, J.M., Rodriguez, E., Martinez, M.J., Larriba, G., Coque, J.J., 2002. Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by o methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5860-5869.

Andersen, A.A., 1958. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of Bacteriology* 76, 471-484.

Arzanlou, M., Groenewald, J.Z., Gams, W., Braun, U., Shin, H.D., Crous, P.W., 2007. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. *Studies in Mycology* 58, 57-93.

Bessot, J.C., Stenger, R., Pauli, G., 1997. Respiratory allergies in winegrowers. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 37, 732-740.

Buchter, A., 2000-2011. Diagnostik arbeitsbedingter Erkrankungen und arbeitsmedizinisch-diagnostische Tabellen. <http://www.uniklinikum-saarland.de/einrichtungen/fachrichtungen/arbeitsmedizin/veroeffentlichungen/>.

Burge, H., 1990. Bioaerosols: prevalence and health effects in the indoor environment. *The Journal of allergy and clinical immunology* 86, 687-701.

Buzina, W., 2007. Gesundheitliche Relevanz von Schimmelpilzen in Innenräumen. *WMW Wiener Medizinische Wochenschrift* 157, 462-465.

Chatonnet, P., Guimbertau, G., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., 1994. Nature Et Origine Des Odeurs De "Moisi" Dans Les Cavs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 183, 131.

Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S., Labadie, M.D., 2004. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1255-1262.

Clemenzenz, A., 2007. Kellerklima - Mikroflora. Universität für Bodenkultur, Wien, Austria.

Coque, J.J.R., Rodríguez, M.L.Á., Goswami, M., Martínez, R.F. 2006. Causes and origins of wine contamination by haloanisoles (chloroanisoles and bromoanisoles). In: Anonymous INBIOTEC, Spain.

Coque, J.J., Alvarez-Rodriguez, M.L., Larriba, G., 2003. Characterization of an inducible chlorophenol O-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5089-5095.

De Hoog, G.S. and Guarro, J., 2002. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft and Universitat Rovira i Virgili Resus.

Delitsch, H., 1943. Systematik der Schimmelpilze. J. Neumann, Neudamm.

Dittrich, H.H. and Großmann, M. 2005. Mikrobiologie Des Weines In: Anonymous Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., 206-207.

EC, 2002. Commission Regulation (EC) No 2076/2002 Official Journal of the European Communities, L 319/3; 23.11.2002.

Feller, W., 1950. An introduction to the probability theory and its application. New York: Wiley 1.

Fischer, C., 2000. Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork into the wine – kinetics and sensorial relevance. Univ. Kaiserslautern, Fachbereich Chemie.

Gambutì, A., Strollo, D., Genovese, A., Ugliano, M., Ritieni, A., Moio, L., 2005. Influence of Enological Practices on Ochratoxin A Concentration in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 155-162.

- Garijo, P., Santamaria, P., Lopez, R., Sanz, S., Olarte, C., Gutierrez, A.R., 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *International journal of food microbiology* 125, 141-145.
- Goto, S., Kimiaki, T., Takashi, S., 1989. Occurrence of molds in wine storage cellars. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 68, 230-232.
- Grinn-Gofroń, A., 2007. The Cladosporium spores in the air of Szczecin. *Acta Agrobotanica* 60, 99-104.
- Guerrero, i.C. and Ocana, S.M., 2005. Study of the thermal behaviour of traditional wine cellars: the case of the area of "Tierras Sorianas del Cid" (Spain). *Renewable Energy* 30, 43-55.
- Haas, D., Galler, H., Habib, J., Melkes, A., Schlacher, R., Buzina, W., Friedl, H., Marth, E., Reinthaler, F.F., 2010. Concentrations of viable airborne fungal spores and trichloroanisole in wine cellars. *International journal of food microbiology* 144, 126-132.
- Haas, D., Habib, J., Galler, H., Buzina, W., Schlacher, R., Marth, E., Reinthaler, F., 2007. Assessment of indoor air in Austrian apartments with and without visible mold growth. *Atmospheric Environment* 41, 5192-5201.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N., 1995. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. CAB International, UK.
- Hirst, J.M. and Stedman, O.J., 1963. Dry Liberation of Fungus Spores by Raindrops. *Journal of general microbiology* 33, 335-344.
- Huck, V., 2007. Maßnahmen zum nachhaltigen Umgang mit Wasser bei der Weinproduktion. Centre de Ressources des Technologies pour L` Environnement (CRTE) Luxembourg.
- Hühn, T., Sponholz, W.R., Pulver, D., 1999. Mikroorganismen bei der Weinbereitung. *Mitteilungen für Wissenschaft und Technik*, 42-88.
- Icenhour, C., Crystal, R., Levetin, E., 1997. Penicillium and Aspergillus species in the habits of allergy patients in the Tulsa, Oklahoma area. *Aerobiologia* 13, 161-166.

- Jorde, W., Schata, M., Linsken, H.F., Elixmann, J.H., 1988. Gesundheitsrisiken durch Schimmelpilze in Gebäuden. *Wissenschaft und Umwelt* 2, 86-90.
- Juanola, R., Subira, D., Salvado, V., Garcia Regueiro, J.A., Antico, E., 2002. Evaluation of an extraction method in the determination of the 2,4,6-trichloroanisole content of tainted cork. *Journal of chromatography.A* 953, 207-214.
- Kiene, E., 1939. Über die Ernährung des Kellerschimmels mit verschiedenen gasförmigen Verbindungen und zur Frage seiner Duldung im Weinkeller. *Vorratspflege Lebensmittelforschung* 2, 693-706.
- Kilch, M.A., 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
- Kluge, F., 2002. *Etymologisches Wörterbuch der deutschen Sprache*. Bearbeitet von Seebold E. 24. Auflage. Berlin.
- Kreisel, H., 1988. Zur Bestimmung des Begriffs Schimmelpilze= Définition du terme «moisissures» About a definition of the term moulds. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 143, 263-267.
- Levetin, E., 1995. Fungi. Burge, H. A (Ed.) *Bioaerosols*, CRC Press, Florida, 87-120.
- Li, D.W. and Kendrick, B., 1995b. A year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors. *International journal of biometeorology* 39, 74-80.
- Mandl, K., Clemenz, A., Sterflinger, K., Kneifel, W., 2010. Characterisation of the aeromycological flora of selected wine cellars in Austria. *Vom Lebensmittel zum Genussmittel- was essen wir morgen?*, 183-185.
- Mathieu, L., 1900. Les goûts de bouchon dans les vins mousseux. *Rev. Viticulture* 1, 273-280.
- Maujean, A., Millery, P., Lemaesquier, H., 1985. Explications biochimiques et métaboliques de la confusion entre goût de bouchon et goût de moisi. *Revue française d'oenologie* 99, 55-62.

- McCullagh, P. and Nelder, J.A. 1989. Generalized Linear Models. In: Anonymous Chapman & Hall, CRC.
- Meier, R. and Zingre, H., 2000. Qualifizierung von Luftkeimsammelgeräten am Beispiel des MAS-100. Swiss Chem 12.
- Morey, P.R., Andrew, M., Ligman, B., Jarvis, J., 2002. Proceedings of the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate-Indoor Air '02. Indoor air '02, 455-460.
- Mücke, W. and Lemmen, C., 2004. Schimmelpilze: Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen. Hüthig Jehle Rehm.
- Nevalainen, A., Pastuszka, J., Liebhaber, F., Willeke, K., 1992. Performance of bioaerosol samplers: collection characteristics and sampler design considerations. Atmospheric Environment 26A, 531-540.
- Obeloer, M. and Lichtnecker, H., 2001. Schimmelpilze und andere biogene Innenraum-Allergene. VDI Koordinierungsstellen Umwelttechnik Jahrbuch 2000/2001, 97-113.
- Ocon, E., Gutierrez, A.R., Garijo, P., Santamaria, P., Lopez, R., Olarte, C., Sanz, S., 2011. Factors of influence in the distribution of mold in the air in a wine cellar. Journal of Food Science 76, M169-74.
- Oliveira, A.C., Peres, C.M., Correia Pires, J.M., Silva Pereira, C., Vitorino, S., Figueiredo Marques, J.J., Barreto Crespo, M.T., San Romao, M.V., 2003. Cork stoppers industry: defining appropriate mould colonization. Microbiological research 158, 117-124.
- Pfeifer, O., 2002. Spurenanalyse halogener Phenylmethylether (Anisole) in der aquatischen Umwelt. Universität Ulm, Abteilung Analytische Chemie und Umweltchemie.
- Picco, A.M. and Rodolfi, M., 2004. Assessments of Indoor Fungi in Selected Wineries of Oltrepo Pavese (Northern Italy) and Sottoceneri (Switzerland). Am. J. Enol. Vitic. 55, 355-362.
- Pitt, J.I., 1985. A laboratory guide to common Penicillium species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.

- Popp, W., Ritschka, L., Zwick, H., Rauscher, H., 1987. "Berry sorter's lung" or wine grower's lung--an exogenous allergic alveolitis caused by *Botrytis cinerea* spores. *Praxis und Klinik der Pneumologie* 41, 165-169.
- Prak, S., Gunata, Z., Guiraud, J.P., Schorr-Galindo, S., 2007. Fungal strains isolated from cork stoppers and the formation of 2,4,6-trichloroanisole involved in the cork taint of wine. *Food Microbiology* 24, 271-280.
- Pratt, A.J., Tiffany, J.A., Bader, H.A., Detection of *Stachybotrys* by culturable air samples. *Proceedings of the 8th International Conference on Indoor Air Quality and Climate-Indoor Air '99. Indoor air '99*, 8-13.
- Reiß, J., 1998. *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer-Verlag.
- Riedl, H., 1968. Die Gattungsnamen *Racodium* Persoon und *Zasmidium* Fries. *Taxon* 17, 34-37.
- Rosa, C.A.D.R., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M., Rekson, A.D.O., Magnoli, C., Dalcerro, A., 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A - Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 19, 408-414.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239, 487-491.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1996. *Introduction to food-borne fungi*. 5th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn.
- Schanderl, H., 1958. Ein zwanzigjähriger Ernährungsversuch von *Cladosporium*-Arten, insbesondere *Cladosporium cellare* mit flüchtigen organischen Verbindungen. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Abt. II*, 116-120.

Schanderl, H., 1936. Untersuchungen über die systematische Stellung und die Physiologie des Kellerschimmels *Rhacodium cellare* Persoon. Zentralblatt für Bakteriologie Abt. II, 112-127.

Schwieger, F. and Tebbe, C.C., 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Applied and Environmental Microbiology 64, 4870-4876.

Scott, W., 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. Advances in Food Research 7, 83-127.

Sedlbauer, K., 2001. Vorhersage von Schimmelpilzen auf und in Bauteilen. Universität Stuttgart, Fakultät Bauingenieur- und Vermessungswesen.

Simeray, J., Mandin, D., Mercier, M., Chaumont, J.P.E.R., 2001. Survey of viable airborne fungal propagules in French wine cellars. Aerobiologia 17, 19-24.

Simpson, R.F. and Sefton, M.A., 2007. Origin and fate of 2,4,6-trichloroanisole in cork bark and wine corks. Australian Journal of Grape and Wine Research 13, 106-116.

Sponholz, W.R. and Muno, H., 1994. Corkiness. A microbiological problem? Industrie delle Bevande 23, 133-138.

Tanner, H. and Zanier, C., 1981. Zur analytischen Differenzierung von Muffton und Korkgeschmack in Weinen. Schweizer Zeitschrift für Obst und Weinbau 117, 752-757.

Tournas, V.H. and Katsoudas, E., 2005. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. International journal of food microbiology 105, 11-17.

Trautmann, A., 2006. Allergiediagnose, Allergietherapie. Georg Thieme Verlag.

Tribe, H.T., Thines, E., Weber, R.W.S., 2006. Moulds that should be better known: the wine cellar mould, *Rhacodium cellare* Persoon. Mycologist 20, 171-175.

Troutt, C. and Levetin, E., 2001. Correlation of spring spore concentrations and meteorological conditions in Tulsa, Oklahoma. *International journal of biometeorology* 45, 64-74.

UBA–Umweltbundesamt, I., 2002. Leitfaden zur Vorbeugung, Untersuchung, Bewertung und Sanierung von Schimmelpilzwachstum in Innenräumen ("Schimmelpilz-Leitfaden"). UBA Eigenverlag, Berlin.

Venables, W.N. and Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Springer Verlag, New York.

Vitorino, S.I., Neves, E.S.G., Gaspar, F., Figueiredo Marques, J.J., San Romao, M.V., Suberin Utilization by *Chrysonilia sitophila*: Evidence for Lipolytic Enzymes Production. *Ciencia Tecnica Vitivinicola* 22, 1-4.

Vogt, E., Jakob, L., Lemperle, E., Weiss, E. 1984. Der Wein: Bereitung, Behandlung, Untersuchung. In: Anonymous Eugen Ulmer Stuttgart, 142-147.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. *PCR: Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc, 315-322.

Yao, M. and Mainelis, G., 2006. Investigation of cut-off sizes and collection efficiencies of portable microbial samplers. *Aerosol science and technology* 40, 595-606.