

Entwicklung eines differenzierenden Systems zur Bestimmung materialschädigender Schimmelpilze

Development of a differentiating system to determine material-damaging moulds

Projektleiterin

Project leader:

Katharina Plaschkies

Projektbearbeiterinnen

Project team:

Sabrina Meltzer,
Franziska Zimmer,
Kordula Jacobs

Fördermittelgeber

Sponsor:

Sächsische Aufbaubank
(SAB)

Projektpartner

Project partners:

FILK - Forschungsinstitut
für Leder und Kunststoff-
bahnen (Federführung);
Hochschule Mittweida

AUSGANGSSITUATION UND ZIELSTELLUNG

Naturmaterialien wie Leder und Holz werden während Produktionsprozessen, beim Transport und der Lagerung sowie bei der Nutzung von Schimmelpilzen befallen, wenn sie ungünstigen klimatischen Bedingungen ausgesetzt sind. Dies kann zur Materialschädigung sowie zu optischen und gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Für die Schadensbewertung und Planung geeigneter Maßnahmen zur Beseitigung ist neben der Ermittlung der Schadensursachen auch die Kenntnis der auftretenden Pilzarten aufgrund artspezifischer Auswirkungen wichtig. Die Artbestimmung ist ein bedeutender Zeit- und Kostenfaktor und kann derzeit ausschließlich durch spezialisierte Labore mit mikrobiologischer bzw. molekularbiologischer Ausstattung erfolgen. Durch vereinfachte, auch durch Hersteller oder Gutachter anwendbare Bestimmungsverfahren könnten sehr gezielte Maßnahmen frühzeitig eingeleitet werden.

Im Kooperationsprojekt sollte eine kostengünstige und weitgehend automatisierbare Methode zur schnellen Bestimmung materialschädigender und gesundheitsgefährdender Schimmelpilze mit integrierter Merkmalsdatenbank für Leder und Holz erarbeitet werden. Parameter waren dabei substratspezifisch ausgeprägte physiologische und phänotypische Merkmale der Pilze sowie molekularbiologische Daten. Als Basis für das elektronische, synoptische Bestimmungssystem sollte eine Datenbank mit Merkmalen und den dazugehörigen Ausprägungen erarbeitet werden.

INITIAL SITUATION AND OBJECTIVE

Natural materials, such as leather and wood, are under attack by mould during production processes, transport and storage as well as during use if they are exposed to unfavourable climatic conditions. This can result in material damage as well as visual and health impairments. In addition to determining the causes of damage, knowledge of the fungal species that occur due to species-related effects is important for assessing damage and planning appropriate measures for their elimination. Species identification is a significant time and cost factor and can currently only be carried out by specialised laboratories with microbiological or molecular biological equipment. Simplified identification procedures that can also be used by manufacturers or experts could enable very targeted measures to be initiated at an early stage.

In the cooperation project, a cost-effective and largely automatable method for the rapid determination of material-damaging and health-threatening moulds with an integrated characteristics database for leather and wood was to be worked out. The respective parameters were substrate-specific physiological and phenotypical characteristics of the fungi as well as molecular biological data. As a basis for the electronic, synoptic determination system, a database with characteristics and corresponding expressions was to be developed.

VORGEHENSWEISE

Von folgenden Schimmelpilzarten, die speziell an Leder und Holz häufig Schäden verursachen, wurden unter Berücksichtigung von jeweils drei Stämmen Merkmalsdaten in Form substratspezifischer physiologischer, phänotypischer und molekularbiologischer Merkmale erfasst und dokumentiert:

- Leder: *Amorphotheca resinae*, *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Penicillium brevicompactum*, *P. glabrum*;
- Holz: *Aspergillus glaucus*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*;
- Leder und Holz: *Alternaria alternata*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma viride*.

Dazu erfolgte die Kultivierung auf gängigen Nährmedien sowie auf Leder und Holz unter variablen Temperaturbedingungen. Die Fotodokumentation der Kolonie- und Mikrostrukturmerkmale war dabei ein wesentlicher Bestandteil. Anhand der variablen nrDNA-ITS-Region (Internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA) sowie der proteinkodierenden Genbereiche des Betatubulin-Gens (*benA*) und des Elongationsfaktor-1 Alpha-Gens (*TEF1 α*) wurde die Artzugehörigkeit der Stämme überprüft. Alle Daten wurden in einer Merkmalsdatei als Excel-file zusammengeführt und in eine Datenbank (Matrixstruktur) als Datengrundlage des Bestimmungssystems eingelesen und mit einem Glossar und Abbildungen ergänzt.

APPROACH

Characteristic data in the form of substrate-specific physiological, phenotypic and molecular biological characteristics were recorded and documented for the following mould species, which frequently cause damage especially to leather and wood, considering three strains each:

- leather: *Amorphotheca resinae*, *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Penicillium brevicompactum*, *P. glabrum*;
- wood: *Aspergillus glaucus*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*;
- leather and wood: *Alternaria alternata*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma viride*.

For this purpose, they were cultivated on common culture media as well as on leather and wood under variable temperature conditions. Thereby, photo-documentation of colony and microstructure characteristics was an essential part. The variable nrDNA-ITS region (internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA) as well as the protein-coding gene regions of the beta tubulin gene (*benA*) and the elongation factor-1 alpha gene (*TEF1 α*) were used to verify the species classification of the strains. All data were compiled in a spreadsheet and imported into a database (matrix structure) as the data basis for the identification system and supplemented with a glossary and illustrations.



Abb. 1: Auszug aus dem Bestimmungssystem
 Fig. 1: Extract from the identification system

ERGEBNISSE

Es wurde ein Bestimmungssystem in seiner Struktur entwickelt, in dem die Informationen zu phänotypischen und physiologischen Merkmalen auf Nährmedien, molekularbiologische Daten sowie Erläuterungen und Abbildungen im Glossar erfolgreich verknüpft wurden, sodass eine Bestimmung der Schimmelpilze nach Kultivierung durchgeführt werden kann. Dagegen ist eine direkte Bestimmung des befallenen Materials derzeit nur eingeschränkt mit Hilfe solcher Merkmale möglich, die unabhängig vom Nährmedium gleichartig ausgeprägt werden. Das ist artspezifisch und betrifft vor allem bestimmte mikroskopische Merkmale, wie z. B. die Art der Sporenbildung sowie die Sporengröße und -form. Abb. 1 zeigt die Grundstruktur der Datenbank und die Artbeschreibung am Beispiel von *Aureobasidium pullulans*.

Die umfangreichen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kultivierung auf unterschiedlichen Medien für eine sichere Art-

RESULTS

An identification system was developed in its structure, in which the information on phenotypic and physiological characteristics on culture media, molecular biological data as well as explanations and illustrations in the glossary were successfully linked, so that the moulds could be identified after cultivation. In contrast, direct determination of the infested material is currently only possible to a limited extent with the help of such characteristics that are manifested in the same way regardless of the culture medium. This is species-related and primarily concerns certain microscopic features, such as the type of spore formation and spore size and shape. Fig. 1 shows the general structure of the database and the species description by example of *Aureobasidium pullulans*.

The extensive investigations have shown that cultivation on different media is necessary for reliable species identification and that the characteristic expression of the strains varies greatly in some cases, as Fig. 2 shows by ex-

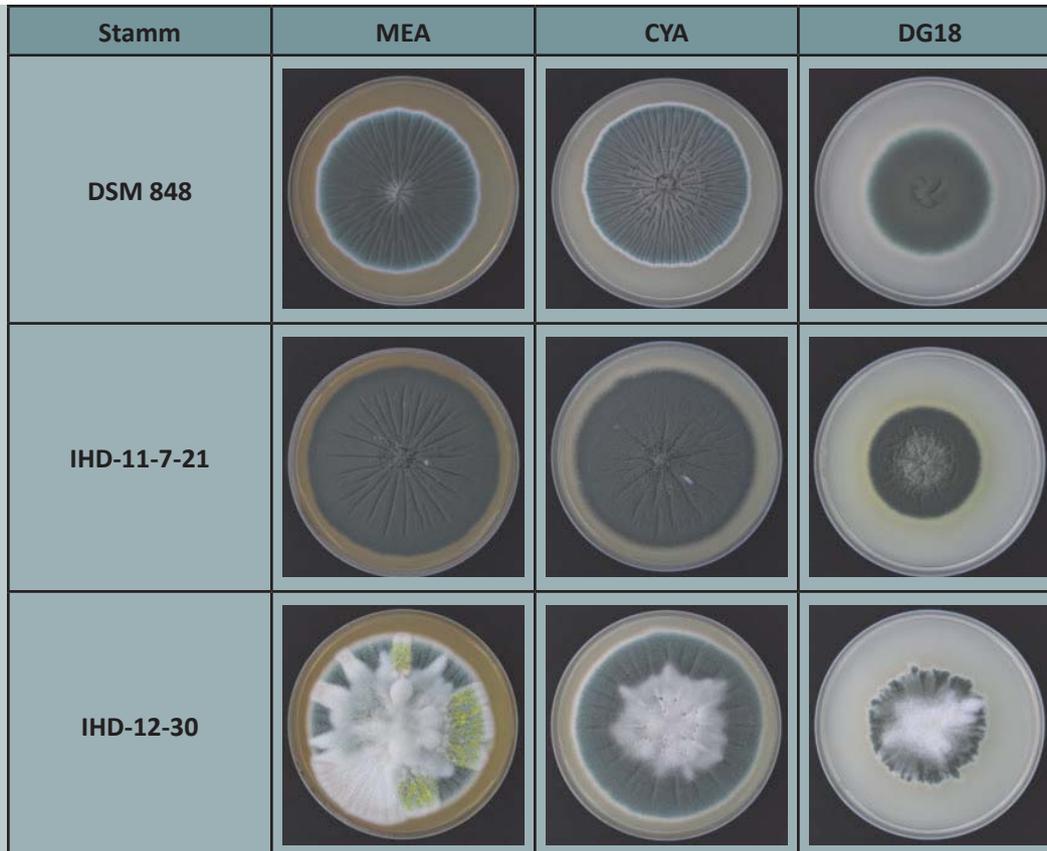


Abb. 2: Beispiele für die substrat- und stammspezifische Merkmalsausprägung bei *Penicillium chrysogenum* (14-tägige Inkubation bei 25 °C auf verschiedenen Nährmedien)

Fig. 2: Examples for the substrate-specific and strain-specific characteristic expression in *Penicillium chrysogenum* (14-day incubation at 25 °C on different culture media)

bestimmung notwendig ist und die Merkmalsausprägung der Stämme teilweise stark variiert, wie Abb. 2 am Beispiel von *Penicillium chrysogenum* zeigt. Diese Variabilität wird im Unterschied zu derzeit verfügbarer Bestimmungsliteratur auch bei der geplanten Erweiterung der Datenbank und Optimierung des Bestimmungssystems berücksichtigt.

ample of *Penicillium chrysogenum*. In contrast to currently available identification literature, this variability will also be taken into account in the planned expansion of the database and optimisation of the identification system.