

Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus des Schwärzepilzes
***Stachybotrys chartarum* Genotyp S**

von Katharina Tribelhorn

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

**Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus des Schwärzepilzes
Stachybotrys chartarum Genotyp S**

von Katharina Tribelhorn
aus Ust-Kamenogorsk

München 2023

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

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Frank Ebel

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Sebastian Ulrich

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Ebel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka
Priv.-Doz. Dr. Kristina Schauer
Univ.-Prof. Dr. Herbert Kaltner
Priv.-Doz. Dr. Petra Kölle

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Gattung <i>Stachybotrys</i>.....	3
1.1	Taxonomie.....	3
1.2	Wachstumsbedingungen.....	5
1.3	Metabolite des sekundären Stoffwechsels.....	7
1.3.1	Trichothecene	8
1.3.2	Atranone	10
1.3.3	Phenylspirodrimane.....	12
1.4	Vorkommen.....	13
1.4.1	Futtermittel	13
1.4.2	Lebensmittel	14
1.4.3	Innenraum.....	14
1.5	Medizinische Bedeutung	16
1.5.1	Bedeutung in der Tiermedizin.....	17
1.5.2	Bedeutung in der Humanmedizin.....	19
2	Sekundärmetabolismus von filamentösen Schimmelpilzen.....	22
2.1	Mykotoxine	23
2.2	Sekundärmetabolismus und Pilzentwicklung.....	24
3	Methoden zur Untersuchung von <i>Stachybotrys</i>-Spezies	26
3.1	Kultur- und Mikromorphologie.....	26
3.2	ATR-Infrarotspektroskopie	28
3.3	MTT-Test – Zytotoxizitätstest mittels Zellkultur.....	29
3.4	Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie	31
3.4.1	HPLC.....	31
3.4.2	LC-MS/MS.....	33
III.	PUBLIKATIONEN.....	36
1	Publikation Sekundärmetabolismus.....	36
2	Publikation Stickstoff- und Kohlenstoffquellen	55
IV.	DISKUSSION	78

1	Sporulation und Produktion von Mykotoxinen	79
2	Charakterisierung von Melanin.....	84
3	Kommunikation zwischen Schimmelpilzkolonien	84
4	Einfluss verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen.....	85
V.	ZUSAMMENFASSUNG	94
VI.	SUMMARY.....	97
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	100
VIII.	DANKSAGUNG	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMM	<i>Aspergillus</i> Minimal Medium
ATR	attenuated total reflection (dt.: abgeschwächte Totalreflexion)
a_w -Wert	Wasseraktivität
<i>chs1</i>	Chitinsynthase 1
dt.	deutsch
engl.	englisch
FT-IR-Spektroskopie	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
<i>M</i>	Molare Masse
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MEA	Malzextrakt-Agar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
PDA	Potato-Dextrose-Agar
PDA-S	Potato-Dextrose-Agar (Sigma-Aldrich)
PDA-V	Potato-Dextrose-Agar (VWR Chemicals)
<i>S.</i>	<i>Stachybotrys</i>
SBS	Sick-Building-Syndrom
SK	Swine Kidney
Syn.	Synonym
<i>tri5</i>	Trichodiensynthase 5
<i>tub1</i>	β -Tubulin 1

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Chemische Strukturformeln von makrozyklischen Trichothecenen, die von <i>S. chartarum</i> Chemotyp S gebildet werden, Isoformen sind nicht dargestellt.....	9
Abbildung 2: <i>S.-chartarum</i> -Genotyp-S-Stämme ATCC 34916 (A), IBT 40293 (B) und DSM 114129 (C) nach 21 Tagen Anzucht auf Potato-Dextrose-Agar bei 25 °C.....	26
Abbildung 3: Guttationstropfen einer <i>S.-chartarum</i> -Kultur (ATCC 34916) nach sieben Tagen Anzucht auf Potato-Dextrose-Agar bei 25 °C.....	27
Abbildung 4: Stereomikroskopische Aufnahmen von <i>S.-chartarum</i> -Kulturen (ATCC 34916) nach 21 Tagen (A, 160-fache Vergrößerung) und sieben Tagen (B, 630-fache Vergrößerung, Lactophenolblau-Klebestreifenpräparat) Anzucht auf Potato-Dextrose-Agar bei 25 °C.....	27
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Tandem-Massenspektrometers ..	35

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Nachweise von <i>Stachybotrys</i> -Spezies in Innenräumen	15
--	----

I. EINLEITUNG

Filamentöse Schimmelpilze der Gattung *Stachybotrys* (*S.*) kommen ubiquitär in der Umwelt vor, wachsen jedoch bevorzugt auf feuchten, zellulosehaltigen Materialien (MCQUADE, 1963; NIELSEN *et al.*, 1998). Daher werden sie häufig aus wassergeschädigten Gebäuden und Baumaterialien sowie unsachgemäß gelagerten Futtermitteln (z. B. Stroh und Heu) isoliert (EL-KADY & MOUBASHER, 1982; NIELSEN *et al.*, 1998; ANDERSEN *et al.*, 2002). Die von dieser Gattung gebildeten Sekundärmetaboliten werden mit diversen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Bei Tieren, insbesondere Pferden, kann die Stachybotryotoxikose nach oraler Aufnahme oder Inhalation von Mykotoxinen aus unsachgemäß gelagertem, verschimmeltem Futter auftreten (FORGACS *et al.*, 1958; FORGACS, 1972). Menschen sind insbesondere in wassergeschädigten Gebäuden gefährdet. *Stachybotrys*-Spezies können Symptome des Sick-Building-Syndroms hervorrufen und stehen im Verdacht bei Säuglingen pulmonale Hämorrhagien verursacht zu haben (JOHANNING *et al.*, 1996; DEARBORN *et al.*, 2002; HINTIKKA, 2004). *S. chartarum* ist eine der am häufigsten isolierten Spezies der Gattung *Stachybotrys* (LOMBARD *et al.*, 2016). Die von dieser Art produzierten, hochtoxischen makrozyklischen Trichothecene (vor allem Satratoxine) besitzen ein ausgeprägtes zyto- und neurotoxisches Potenzial gegenüber Säugetierzellen (JARVIS *et al.*, 1995; GAREIS, 2006; ISLAM *et al.*, 2009) und stellen somit eine Gefahr für Menschen und Tiere dar. Aber auch andere von *S. chartarum* gebildete Metabolite, wie die Phenylspirodrimane, stehen im Verdacht aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung an der Entstehung von Erkrankungen beteiligt zu sein (HONG *et al.*, 1979; MIYAZAKI *et al.*, 1980; JAGELS *et al.*, 2019).

In zahlreichen wissenschaftlichen Studien wird beschrieben, dass verschiedene externe Faktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Nährstoffe das Mykotoxinprofil und Mykotoxinkonzentrationen deutlich beeinflussen (NIELSEN *et al.*, 2004; MAGAN & ALDRED, 2007). Hierbei spielen bei Schimmelpilzen wie *Aspergillus*- und *Fusarium*-Spezies die verfügbaren Stickstoff- und Kohlenstoffquellen eine wichtige Rolle (MEDINA *et al.*, 2008; KOHUT *et al.*, 2009). Trotz des von *S. chartarum* ausgehenden Gefährdungspotentials für Menschen und Tiere ist wenig über den Einfluss spezifischer Nährstoffe auf die Produktion von Mykotoxinen bekannt. Um Toxin-produzierende, gesundheitsschädliche Stämme

jedoch eindeutig zu identifizieren, ist es notwendig diese unter Bedingungen anzuzüchten, die die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen zuverlässig ermöglichen. Verschiedene Baumaterialien und komplexe Nährmedien wie Potato-Dextrose-Agar wurden in Studien getestet (ALEKSIC *et al.*, 2016; JAGELS *et al.*, 2020; ULRICH & SCHÄFER, 2020). Die darin enthaltenen komplexen Bestandteile lassen jedoch keine eindeutige Aussage über den Einfluss einzelner Stickstoff- und Kohlenstoffquellen zu. Für andere Schimmelpilze wie *Aspergillus*-Spezies werden aus diesem Grund Minimal-Nährmedien verwendet. Diese sind in ihren Inhaltsstoffen eindeutig definiert und ermöglichen einen gezielten Austausch einzelner Komponenten (HILL & KAFER, 2001). So können Nährstoffe bestimmt werden, die die Produktion von Mykotoxinen begünstigen oder unterdrücken. Für *S. chartarum* war ein solches Medium bisher unbekannt.

Des Weiteren ist bekannt, dass die Mykotoxinproduktion und die Sporulation bei verschiedenen filamentösen Schimmelpilzen wie *Aspergillus*-, *Fusarium*- und *Penicillium*-Spezies funktionell miteinander verbunden sind. Eine Hemmung der Sporulation führt demnach bei diesen Schimmelpilzen zu einer Hemmung der Mykotoxinproduktion (SEKIGUCHI & GAUCHER, 1977; REIß, 1982; SHIM & WOLOSHUK, 2001). Für *S. chartarum* wird ebenfalls ein Zusammenhang vermutet, dieser wurde bisher jedoch nicht experimentell bestätigt (CALVO *et al.*, 2002).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, im ersten Teil zunächst den Zusammenhang zwischen der Sporulation und der Produktion von makrozyklischen Trichothecenen zu untersuchen und zu prüfen, ob diese beiden Vorgänge miteinander in Verbindung stehen. Hierbei sollte zudem getestet werden, inwieweit sich die Anzahl der Kolonien, die sich auf einer Agarplatte befinden, auf den Grad der Sporulation und die Toxinproduktion auswirkt. Ein weiteres Ziel war es, das in den Sporen von *S. chartarum* eingelagerte dunkle Pigment näher zu untersuchen und mittels ATR-Infrarotspektroskopie zu charakterisieren. Im zweiten Teil sollte anschließend der Einfluss verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Konzentrationen auf das Myzelwachstum und die Mykotoxinproduktion untersucht werden. Hierfür war es notwendig ein für *S. chartarum* geeignetes Minimal-Nährmedium zu bestimmen, dessen Inhaltsstoffe genau definiert sind, sodass ein gezielter Austausch einzelner Komponenten möglich ist.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 Gattung *Stachybotrys*

1.1 Taxonomie

Die Gattung *Stachybotrys* wurde im Jahr 2014 taxonomisch neu eingeordnet (CROUS *et al.*, 2014). Hierbei wurde sie der Familie Stachybotryaceae der Ordnung Hypocreales, Unterklasse Hypocreomycetidae, Klasse Sordariomycetes, Unterabteilung Pezizomycotina, Abteilung Ascomycota, Unterreich Dikarya und letztendlich dem Reich der Pilze (Mycota) zugeordnet.

Die erste Spezies der Gattung *Stachybotrys* (*S.*) wurde im Jahr 1837 von einer Tapete in einem Gebäude in Prag isoliert. Der österreichische Botaniker Corda beschrieb den schwarzen Schimmelpilz morphologisch und benannte ihn *S. atra* Corda (CORDA, 1837). Seitdem wurden etwa 179 *Stachybotrys*-Spezies beschrieben, von denen jedoch nicht alle vollständig analysiert wurden (MYCOBANK DATABASE; CROUS *et al.*, 2004).

LOMBARD *et al.* (2016) stellten fest, dass taxonomische Studien zur Familie der Stachybotryaceae hauptsächlich auf Analysen des Phänotyps basieren. Tatsächlich richtete sich in den vergangenen Jahren die Zuordnung eines Isolates zur Gattung *Stachybotrys* und die Identifikation als eigene Spezies zunächst nach der Farbe der Kolonien (BISBY, 1943). BISBY (1943) reduzierte die bis 1943 beschriebenen Spezies auf zwei, nämlich *S. atra* Corda und *S. subsimplex*. Er wies darauf hin, dass extrinsische Faktoren einen Einfluss auf einzelne Kolonien nehmen können, diese jedoch nicht als neue Spezies behandelt werden dürfen. Später erfolgte die taxonomische Klassifizierung anhand der Form und Beschaffenheit der Konidiophoren und Konidien (HUGHES, 1953). HUGHES (1958) stellte später fest, dass *S. atra* Corda und *Stilbospora chartarum* (Ehrenb.) derselben Art angehören und schlug eine Umbenennung beider Spezies in *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes vor. Derzeit ist der Name *S. chartarum* allgemein anerkannt und wird weltweit von Mykologen verwendet (LI & YANG, 2005; LOMBARD *et al.*, 2016).

Die Gattung *Stachybotrys* wird, basierend auf dem Phänotyp, Genotyp, Proteom und Metabolom, als sehr heterogen beschrieben (CRUSE *et al.*, 2002; WANG *et*

al., 2015b; LOMBARD *et al.*, 2016; ULRICH *et al.*, 2016). Daher stellt sich die Zuordnung von Isolaten zur Gattung *Stachybotrys* und die Charakterisierung von *Stachybotrys*-Spezies nur anhand morphologischer Eigenschaften als problematisch dar. Immer wieder werden neue, fragliche Spezies beschrieben, deren taxonomische Einordnung für Verwirrung sorgt (CRUSE *et al.*, 2002; SCHULTES *et al.*, 2021). Auch die Einordnung der eng verwandten Gattungen *Memnoniella* und *Myrothecium*, die aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten und Ähnlichkeiten ihrer Sekundärmetaboliten erfolgte, wurde kontrovers diskutiert (CASTLEBURY *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2015a; WANG *et al.*, 2015b). Da die drei Gattungen jedoch genetisch voneinander unterscheidbar sind, wurden sie in neueren Studien als verschiedene Gattungen gelistet (LOMBARD *et al.*, 2016).

Aufgrund der unzureichenden Einordnung anhand morphologischer Eigenschaften wiesen WANG *et al.* (2015b) und LOMBARD *et al.* (2016) auf die Notwendigkeit einer umfassenden phänotypischen, genetischen und metabolomischen Untersuchung der *Stachybotrys*-Spezies hin, um die taxonomische Klassifizierung zu klären.

Eine Untersuchung metabolomischer und genetischer Daten ließ eine weitere Differenzierung von Isolaten zu, die zuvor als *S. chartarum* identifiziert wurden. Die Analyse der Sekundärmetaboliten und der *tri5*-, *chs1*- und *tub1*-Gensequenzen ermöglichte es ANDERSEN *et al.* (2003) die Isolate in zwei Chemotypen zu unterteilen, die beide der Spezies *S. chartarum* angehören. Demnach bildet der Chemotyp S die hochgradig zytotoxischen makrozyklischen Trichothecene (z. B. Satratoxine) und der Chemotyp A die weniger zytotoxischen Atranone. Außerdem unterscheiden sich die beiden Chemotypen innerhalb ihrer *tri5*-Gensequenzen. Zusätzlich konnte eine bis dahin unbekannte Spezies als *S. chlorohalonata* abgegrenzt werden. *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* unterscheiden sich zum einen morphologisch voneinander, weisen aber auch Unterschiede innerhalb ihrer *tri5*-, *chs1*- und *tub1*-Gensequenzen auf (ANDERSEN *et al.*, 2003). Später wurde dieser Ansatz durch Proteom-Analysen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ergänzt (ULRICH *et al.*, 2016) und die Untergliederung in zwei eng verwandte, jedoch eigenständige Spezies von LOMBARD *et al.* (2016) bestätigt. Einige Jahre später stieß eine Arbeitsgruppe auf mehrere *S.-chartarum*-Stämme des Chemotyps S, die anhand des *tri5*-Gens identifiziert wurden, aber nicht in der Lage waren makrozyklische Trichothecene zu produzieren (ULRICH *et al.*, 2016).

Hierdurch wurde deutlich, dass eine Einteilung in zwei Chemotypen nach der Definition von ANDERSEN *et al.* (2003) unzureichend ist. ULRICH *et al.* (2019) führten daher eine neue Einteilung von *S.-chartarum*-Stämmen in drei Genotypen ein. Je nach Vorhandensein oder Fehlen von Genen, von denen man annimmt, dass sie für relevante Enzyme für die Biosynthese von Atranonen oder Satratoxinen kodieren, werden die Stämme dem Genotyp A, S oder H zugeordnet. Der Genotyp A besitzt den Atranoncluster (*atr1-14*), aber nicht die Satratoxincluster und bildet demnach nur Atranone. Satratoxin-produzierende Stämme, die alle Satratoxincluster (SC1-SC3, *sat1-21*), aber nicht den Atranoncluster besitzen, werden dem Genotyp S zugeordnet. Der Genotyp H stellt einen Hybridtyp dar, der den Atranoncluster (*atr1-14*), aber nur Teile der Satratoxincluster (SC1, SC3) besitzt und somit keine Satratoxine bildet. Da die Gene der SC1- und SC3-Cluster in diesen Stämmen unterschiedlich gut konserviert sind, zeigen die H-Stämme eine größere genetische Heterogenität (ULRICH *et al.*, 2019).

Im Vergleich zu anderen filamentösen Schimmelpilzen, wie *Fusarium*- oder *Aspergillus*-Spezies, stehen nur wenige genetische Informationen zur Gattung *Stachybotrys* zur Verfügung. Derzeit sind die Genome von nur vier *S.-chartarum*-Stämmen und jeweils einem *S.-chlorohalonata*-, *S.-microspora*- und *S.-elegans*-Stamm in der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) hinterlegt (SEMEIKS *et al.*, 2014; BETANCOURT *et al.*, 2015; MESNY *et al.*, 2021). Verschiedene Autoren weisen daher darauf hin, dass weitere Gesamtgenomuntersuchungen und sequenzbasierte Analysen notwendig sind, um bestehende taxonomische Unklarheiten zu klären (WANG *et al.*, 2015b; LOMBARD *et al.*, 2016; ULRICH *et al.*, 2019).

1.2 Wachstumsbedingungen

Seit der Entdeckung von *S. chartarum* (ehemals *S. atra* Corda) im Jahr 1837 (CORDA, 1837) wurden verschiedene Faktoren, die das Wachstum beeinflussen können, untersucht und beschrieben.

In älterer Literatur werden Nährstoffe wie Glucose als limitierende Faktoren für das Wachstum und die Sporulation von *Stachybotrys*-Spezies und *Memnoniella echinata* genannt (STEINBERG, 1939; BUSTON & BASU, 1948; MCQUADE, 1963). Eine andere Studie beschreibt einen positiven Effekt von Biotin auf das Wachstum und die Sporulation von *Stachybotrys*- und

Memnoniella-Isolaten (MARSH & BOLLENBACHER, 1946). MCQUADE (1963) untersuchte den Einfluss verschiedener anorganischer Verbindungen auf das Wachstum von *Stachybotrys*-Stämmen. Dieser Veröffentlichung zufolge führen hohe Konzentrationen von Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) zu einem gesteigerten filamentösen Myzelwachstum, wohingegen Ammoniumchlorid (NH_4Cl) in höheren Konzentrationen die Sporulation unterdrückt.

Außerdem werden zellulosehaltige Materialien als bevorzugte Matrix für das Wachstum von *Stachybotrys*-Spezies beschrieben, da Zellulose enzymatisch abgebaut und als Kohlenstoffquelle verwertet werden kann (SAMSON *et al.*, 2010). Weitere Studien zeigten zudem, dass das Wachstum auf zellulosehaltigen Materialien die Produktion von Mykotoxinen stimuliert (CROFT *et al.*, 1986; ALEKSIC *et al.*, 2016; ULRICH & SCHÄFER, 2020).

Die komplexen Nährmedien Malzextrakt-Agar (MEA) und Potato-Dextrose-Agar (PDA) werden in neueren Studien als geeignete Medien für das Wachstum und eine hohe Produktion von makrozyklischen Trichothecenen beschrieben. Daher werden sie üblicherweise zur Charakterisierung von *Stachybotrys*-Spezies verwendet (ANDERSEN *et al.*, 2003; SAMSON *et al.*, 2010; GAREIS & GOTTSCHALK, 2014; JAGELS *et al.*, 2019; ULRICH & SCHÄFER, 2020).

Als weitere wichtige Faktoren werden die Temperatur und die Wasseraktivität (a_w -Wert) genannt. *Stachybotrys*-Spezies wachsen hauptsächlich auf Materialien mit hohen a_w -Werten (NIELSEN, 2001; SAMSON *et al.*, 2010). AYERST (1969) nennt in seiner Studie eine optimale Wachstumstemperatur von 23 °C und einen a_w -Wert von 0,98 für *S. atra* (Syn.: *S. chartarum*). Zusätzlich schränkt er den Temperaturbereich für das Wachstum auf 7 °C bis 37 °C ein. OCHIAI *et al.* (2005) testeten 21 *S.-chartarum*-Isolate und zeigten ebenfalls, dass keines der Isolate bei Temperaturen über 37 °C wachsen konnte. Für das Nährmedium PDA beschrieben FRAZER *et al.* (2011) für das Wachstum ein Optimum bei 25 °C und einem a_w -Wert von 0,997 und für die Sporulation einen Temperaturbereich von 25 °C bis 30 °C und einen a_w -Wert von 0,95 bis 0,98. Später wurde gezeigt, dass die Produktion von Satratoxinen bei 20 °C und einem a_w -Wert von 0,98 am höchsten ist (FRAZER *et al.*, 2012). NIELSEN (2003) beschrieb zudem, dass auf Baumaterialien nennenswerte Mengen an Biomasse und an Mykotoxinen erst ab einem a_w -Wert von mindestens 0,95 gebildet werden.

1.3 Metabolite des sekundären Stoffwechsels

Stachybotrys-Spezies sind in der Lage, eine Vielzahl strukturell verschiedener sekundärer Metaboliten zu produzieren, darunter Trichothecene, Atranone, Phenylspirodrimane, Isoindolin-Derivate, Xanthone, Chromene, Cochlioquinone, Cyclosporine und andere (IBRAHIM *et al.*, 2022).

Die Identifizierung toxigener *S. chartarum*-Stämme erfolgt hauptsächlich anhand der Untersuchung der Isolate auf die Produktion von einfachen und makrozyklischen Trichothecenen, Atranonen sowie Phenylspirodrimanen (ANDERSEN *et al.*, 2003). Die Spezies *S. chartarum* kann in zwei Chemotypen unterteilt werden, wobei der Chemotyp A Atranone und der Chemotyp S makrozyklische Trichothecene produziert. Beide bilden zudem nicht-makrozyklische Trichothecene (ANDERSEN *et al.*, 2003). Außerdem kann die Spezies in die drei Genotypen A, S und H unterteilt werden. Dies erfolgt auf der Grundlage von Genen, die für relevante Enzyme kodieren, welche für die Biosynthese dieser Mykotoxine notwendig sind (ULRICH *et al.*, 2019). Der Genotyp S bildet sowohl nicht-makrozyklische als auch makrozyklische Trichothecene, jedoch keine Atranone. Der Genotyp A hingegen bildet Atranone und nicht-makrozyklische Trichothecene, aber keine makrozyklischen Trichothecene. Für den Genotyp H wurde bisher nur ausgeschlossen, dass er makrozyklische Trichothecene produziert (ULRICH *et al.*, 2019).

Für andere Spezies wie *S. chlorohalonata* und *S. dichroa* konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sie nicht-makrozyklische Trichothecene bilden. *S. chlorohalonata* bildet zusätzlich Atranone und *S. dichroa* zusätzlich makrozyklische Trichothecene wie Roridin E (JARVIS *et al.*, 1995; ANDERSEN *et al.*, 2002; ANDERSEN *et al.*, 2003). Für andere *Stachybotrys*-Spezies wie *S. albipes*, *S. kampalensis* und *S. microspora* sind die Angaben in der Literatur über die Produktion von nicht-makrozyklischen und makrozyklischen Trichothecenen widersprüchlich (EL-KADY & MOUBASHER, 1982; EL-MAGHRABY *et al.*, 1991; ANDERSEN *et al.*, 2002; ANDERSEN *et al.*, 2003). Derzeit ist kein Stamm bekannt, der sowohl makrozyklische Trichothecene als auch Atranone bildet (HINKLEY *et al.*, 1999; ANDERSEN *et al.*, 2003; SEMEIKS *et al.*, 2014; ULRICH *et al.*, 2022).

Phenylspirodrimane werden nach heutigem Wissensstand von allen *Stachybotrys*-Arten gebildet und stellen die größte Gruppe von Metaboliten dar (JARVIS *et al.*, 1995; JAGELS *et al.*, 2019).

1.3.1 Trichothecene

Trichothecene sind eine große Gruppe von chemisch verwandten Verbindungen, die strukturell zur Gruppe der zyklischen Sesquiterpene gehören. Sie werden von mehreren Gattungen filamentöser Schimmelpilze gebildet (BAMBURG, 1983). Als gemeinsame strukturelle Merkmale besitzen sie ein trizyklisches Grundgerüst, einen 12,13-Epoxy-Ring und eine 9,10-Doppelbindung (BAMBURG, 1983; UENO, 1983).

Die Gruppe der Trichothecene ist nach dem ersten Isolat, Trichothecin, benannt, das 1948 entdeckt wurde. Trichothecin wird von *Trichothecium roseum* gebildet (BAMBURG, 1983). Aufgrund unterschiedlicher chemischer Strukturen werden Trichothecene in die vier Typen A bis D unterteilt (UENO, 1983). Außerdem werden sie übergeordnet als makrozyklisch oder nicht-makrozyklisch eingestuft (UENO, 1983).

Die Typen A und B kommen am häufigsten vor und zählen zu den nicht-makrozyklischen Trichothecen. Typ-B-Trichothecene unterscheiden sich durch eine C-8-Carbonylgruppe von Typ-A-Trichothecen (UENO, 1983). Typ-C-Trichothecene sind ebenfalls nicht-makrozyklische Trichothecene, die eine oder mehrere zusätzliche Epoxygruppen aufweisen (COLE *et al.*, 2003). Zu den Typ-D-Trichothecen werden die makrozyklischen Trichothecene gezählt. Charakteristisch ist ein makrozyklisches Ringsystem zwischen C-4 bis C-15, das unterschiedlich aufgebaut ist (UENO, 1983; GROVE, 1993).

Typ-A- und Typ-B-Trichothecene werden vor allem von Spezies der Gattung *Fusarium* gebildet (UENO, 1983). Dennoch produzieren auch *Stachybotrys*- und *Myrothecium*-Spezies Typ-A-Trichothecene, wie Trichodermol und Trichodermin (UENO, 1983; NIELSEN *et al.*, 1998; ANDERSEN *et al.*, 2002; ANDERSEN *et al.*, 2003). Typ-C-Trichothecene werden hauptsächlich von den Gattungen *Cephalosporium* und *Trichothecium* produziert (COLE *et al.*, 2003). Typ-D-Trichothecene, also makrozyklische Trichothecene, werden von *S. chartarum* Chemotyp S, *S. dichroa*, *Myrothecium roridum* und *Myrothecium verrucaria* sowie von einigen Pflanzen der Gattung *Baccharis*

gebildet (ANDERSEN *et al.*, 2003; JARVIS, 2003). Nicht alle dieser Organismen bilden identische makrozyklische Trichothecene: *S. chartarum* Chemotyp S produziert die Satratoxine G, H und F und deren Isoformen sowie Roridin E, Roridin L-2 und Verrucarin J. *S. dichroa* produziert Roridin E, während Roridin A und Verrucarin A nur von *Myrothecium roridum* und *Myrothecium verrucaria* gebildet werden (ANDERSEN *et al.*, 2002; COLE *et al.*, 2003).

Nach heutigem Wissensstand produzieren *Stachybotrys*-Spezies nur Trichothecene des Typs A und D (UENO, 1983; JARVIS *et al.*, 1995). Die chemischen Strukturformeln, der von *S. chartarum* gebildeten makrozyklischen Trichothecene sind in Abbildung 1 dargestellt.

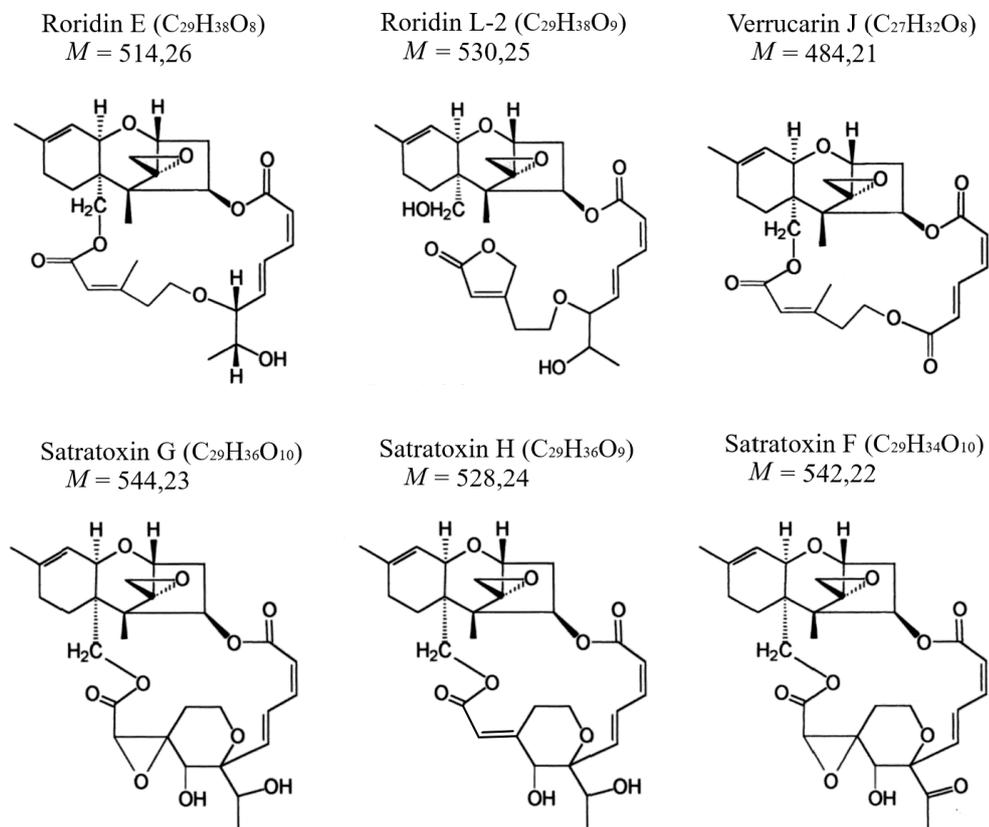


Abbildung 1: Chemische Strukturformeln von makrozyklischen Trichothecenen, die von *S. chartarum* Chemotyp S gebildet werden, Isoformen sind nicht dargestellt

Modifiziert nach COLE *et al.* (2003), Molare Masse (M) in g/mol

Makrozyklische Trichothecene sind die Mykotoxine mit der höchsten Zytotoxizität gegenüber Säugetierzellen (HANELT *et al.*, 1994; ISLAM *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2020). Mittels eines diagnostischen Zellkulturtests konnte nachgewiesen werden, dass die makrozyklischen Trichothecene Roridin A, Verrucarin A und Satratoxin G in etwa zwanzig Mal toxischer sind als das T2-Toxin vom Typ A (GAREIS, 2006). Es wird vermutet, dass sie aufgrund ihrer Makrozyklen irreversibel an die 60S Untereinheit der Ribosomen binden und dadurch die Proteinsynthese irreversibel hemmen. Nicht-makrozyklische Trichothecene binden im Gegensatz dazu vermutlich reversibel (UENO, 1977; HERNÁNDEZ & CANNON, 1982; FEINBERG & MACLAUGHLIN, 1989; ROCHA *et al.*, 2005).

Trichothecene besitzen durch die Hemmung der DNA- und Proteinsynthese sowie des mitochondrialen Elektronentransportsystems ein ausgeprägtes zytotoxisches Potenzial gegenüber eukaryotischen Organismen (UENO, 1977; LI *et al.*, 2017b). Es wird angenommen, dass der 12,13-Epoxy-Ring für die Hemmung der Proteinsynthese wesentlich ist (UENO, 1977). Nach UENO (1983) wird hierbei die Initiationsphase der Proteinbiosynthese gehemmt. Neben ihrer zytotoxischen Wirkung können Trichothecene auch als Immunsuppressiva wirken und Ödeme und Hautschädigungen verursachen, indem sie Membranen und Kapillargefäße schädigen (DANKÓ, 1975; UENO, 1984). Zusätzlich wirken Trichothecene vom Typ D proinflammatorisch, indem sie die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und Zytokinen induzieren (RUOTSALAINEN *et al.*, 1998; LEINO *et al.*, 2003; YIKE *et al.*, 2005; ISLAM *et al.*, 2006; PIECKOVA *et al.*, 2009; LICHTENSTEIN *et al.*, 2010).

1.3.2 Atranone

HINKLEY *et al.* (1999) kultivierten zahlreiche *S.-atra*-Isolate (Syn.: *S. chartarum*) auf Reis und untersuchten die Extrakte auf die darin enthaltenen Sekundärmetaboliten. Aus den Extrakten der Isolate, die nachweislich keine makrozyklischen Trichothecene produzierten, konnten sie eine Reihe neuer Verbindungen, die Atranone A bis G, isolieren. Atranone bestehen in ihrer Grundstruktur aus einem Dolabellan-Diterpen-Ringsystem, das durch ein Enol-Lacton-System erweitert ist. Bei dem Enol-Lacton-System an C-4 handelt es sich um eine für Atranone charakteristische und einzigartige Struktureinheit (HINKLEY *et al.*, 1999).

Später konnten zahlreiche weitere Atranone, die Atranone H bis U, isoliert und strukturell verifiziert werden (HINKLEY *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2017a; YANG *et al.*, 2019; QIN *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2022).

Stämme des *S. chartarum* Chemotyps A bzw. Genotyps A und *S. chlorohalonata* bilden nachweislich Atranone (HINKLEY *et al.*, 1999; ANDERSEN *et al.*, 2003; RAND *et al.*, 2006; SEMEIKS *et al.*, 2014). Zusätzlich konnten für Isolate des Genotyps H die Gene nachgewiesen werden, von denen angenommen wird, dass sie für die Synthese von Atranonen ausschlaggebend sind (SEMEIKS *et al.*, 2014; ULRICH *et al.*, 2019). Die Bildung von Atranonen durch den Genotyp H wurde bisher jedoch noch nicht verifiziert (ULRICH *et al.*, 2019).

Verschiedene Autoren gehen auf die biologische Aktivität von Atranonen ein, die Datenlage ist jedoch sehr übersichtlich. Atranone wurden im Vergleich zu makrozyklischen Trichothecenen als schwach zytotoxisch gegenüber murinen Makrophagen beschrieben (NIELSEN *et al.*, 2002). Dennoch konnte eine deutliche zytotoxische Wirkung von Atranon Q gegen MG-63-Zellen (menschliche Osteosarkom-Zellen) nachgewiesen werden (QIN *et al.*, 2020). Diese Ergebnisse deuten laut QIN *et al.* (2020) darauf hin, dass Atranon Q als vielversprechendes Antitumormittel weiterentwickelt werden kann. Zudem ist beschrieben, dass Atranone proinflammatorisch wirken. RAND *et al.* (2006) injizierten Mäusen intratracheal die Atranone A und C. Hohe Dosen induzierten signifikante Entzündungsreaktionen, die sich in unterschiedlich stark erhöhten Konzentrationen von Makrophagen und Neutrophilen, des Makrophagen-Entzündungsproteins-2 sowie des Tumornekrosefaktors-alpha und Interleukin-6 äußerten (RAND *et al.*, 2006). Für das Atranon B konnte gezeigt werden, dass es das Auswachsen von Neuriten aus adulten Spinalganglien-Neuronen deutlich fördert, ohne das Zellüberleben zu beeinträchtigen (LI *et al.*, 2017a). Im Jahr 2019 charakterisierten YANG *et al.* (2019) weitere Atranone und wiesen signifikante antimikrobielle Aktivitäten von Atranon Q gegen *Candida albicans* und *Enterococcus faecalis* sowie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* nach. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind unbekannt (YANG *et al.*, 2019).

1.3.3 Phenylspirodrimane

Phenylspirodrimane stellen die größte Gruppe von Metaboliten dar, die von *Stachybotrys*-Spezies gebildet werden (JARVIS *et al.*, 1995; JAGELS *et al.*, 2019).

Sie gehören strukturell zur Gruppe der Meroterpene (Terpenophenole). Diese sind Naturstoffe, deren Molekülstrukturen Elemente enthalten, die sowohl aus dem Polyketidweg als auch aus dem Terpenweg stammen (GERIS & SIMPSON, 2009; MATSUDA & ABE, 2016). Derzeit wird angenommen, dass alle *Stachybotrys*-Spezies Phenylspirodrimane produzieren. Dies wurde jedoch nicht für alle beschriebenen Arten verifiziert (JARVIS *et al.*, 1995; HINKLEY *et al.*, 1999; JAGELS *et al.*, 2019). Außerdem ist bekannt, dass Phenylspirodrimane in höheren Konzentrationen als Satratoxine und Atranone gebildet werden (JARVIS *et al.*, 1995; JAGELS *et al.*, 2019). Bisher wurde eine Vielzahl dieser Verbindungen aus *Stachybotrys*-Spezies isoliert und strukturell analysiert (JARVIS *et al.*, 1995; ZHAO *et al.*, 2017a; JAGELS *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019a; LIU *et al.*, 2020; BAO *et al.*, 2021; LIN *et al.*, 2022).

Für die strukturell einzigartige und heterogene Gruppe der Phenylspirodrimane sind eine große Vielfalt biologischer Aktivitäten beschrieben worden. Es konnte gezeigt werden, dass Phenylspirodrimane das Potential haben als immunsuppressive Wirkstoffe zu fungieren, da zum Beispiel K-76 sowie dessen Derivate, das Komplementsystem hemmen (MIYAZAKI *et al.*, 1980). Des Weiteren ist beschrieben, dass sie sowohl zytotoxisch als auch neurotoxisch sind, wobei die Zytotoxizität gegenüber Säugetierzellen im Vergleich zu makrozyklischen Trichothecenen deutlich geringer ist (JARVIS *et al.*, 1995; NIELSEN, 2003; ZHAO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019b; BAO *et al.*, 2021). SAWADJOON *et al.* (2004) wiesen eine antivirale Wirkung nach, die vergleichbar mit dem Arzneistoff Aciclovir ist. Für einige Phenylspirodrimane wurde außerdem eine signifikante Aktivität gegen das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) beschrieben (MA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2017b). Zusätzlich wirken Phenylspirodrimane fibrinolytisch, indem sie die Synthese von Plasminogen aktivieren (NIELSEN, 2003; SASAOKA *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2017).

1.4 Vorkommen

Stachybotrys-Spezies kommen ubiquitär in der Umwelt vor und wachsen bevorzugt auf feuchten, zellulosehaltigen Materialien (MCQUADE, 1963; NIELSEN *et al.*, 1998). Daher werden sie vor allem aus Baumaterialien von Gebäuden mit Wasserschäden (z. B. Wandverkleidungen und Tapeten) sowie abgestorbenem Pflanzenmaterial (z. B. Stroh und Heu), aber auch Kräutern und Gewürzen isoliert (EL-KADY & MOUBASHER, 1982; ANDERSEN *et al.*, 2002; BIERMAIER *et al.*, 2015). *S. chartarum* ist eine der am häufigsten isolierten Arten der Gattung *Stachybotrys* (LOMBARD *et al.*, 2016). Diese Spezies wurde sogar auf Meeresschwämmen beschrieben (LI *et al.*, 2017b).

1.4.1 Futtermittel

Es existieren zahlreiche Nachweise von *Stachybotrys*-Spezies aus Futtermitteln, die mit Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden, aber auch solche, ohne einen Bezug zu Erkrankungen. Stroh wird grundsätzlich als sehr geeignetes Substrat für das Wachstum von *S. chartarum* beschrieben (DANKÓ, 1975; HARRACH *et al.*, 1987; BARS & BARS, 1991).

In den 1930er Jahren kam es in der ehemaligen Sowjetunion zu zahlreichen Todesfällen bei Pferden. Als Ursache konnte die orale Aufnahme von unsachgemäß gelagertem Stroh, das mit schwarzem Schimmel bedeckt war, eruiert werden (DROBOTKO, 1945; FORGACS, 1972). SARKISOV und ORSHANSKAIYA (1944) berichteten, dass sie *S. alternans* (Syn.: *S. chartarum*) aus inneren Organen einiger dieser Pferde isolieren konnten. Zusätzlich gelang es ihnen *S. alternans* aus dem Stroh eines betroffenen Betriebes zu isolieren und so *Stachybotrys* mit der Erkrankung in Verbindung zu bringen (FORGACS, 1972). Auch in anderen Ländern wie Ungarn (JARMAI, 1929; DANKÓ, 1975; HARRACH *et al.*, 1987), der Ukraine (DROBOTKO *et al.*, 1946), Südafrika (KRIEK & MARASAS, 1983; BOTHA & NAUDÉ, 2002), Frankreich (LEFEBVRE *et al.*, 1994) und Deutschland (LAUNER *et al.*, 1987) wurden *Stachybotrys*-Spezies aus Heu und Stroh isoliert und mit Erkrankungen bei Pferden und Wiederkäuern in Verbindung gebracht.

Es konnten zudem zahlreiche *Stachybotrys*-Stämme aus Futtermitteln isoliert werden, bei denen der Bezug zu Erkrankungen nicht weiter untersucht wurde. In Frankreich isolierten BARS und BARS (1991) zahlreiche *S.-atra*-Stämme (Syn.: *S. chartarum*) aus Stroh. EL-KADY und MOUBASHER (1982) konnten in

Ägypten 164 *S.-chartarum*-Isolate aus 50 Strohproben gewinnen. OHFF und WEISSBACH (1984) isolierten elf *S.-atra*-Stämme aus verschiedenen Futtermitteln. BATA *et al.* (1985) beschrieben 17 *S.-atra*-Stämme, die aus Stroh in Ungarn und der ehemaligen Tschechoslowakei isoliert worden waren, und wiesen nach, dass diese makrozyklische Trichothecene bildeten. In einer neueren Studie beschrieb KLUWE (2006) das Vorkommen zahlreicher *Stachybotrys*-Isolate in Stroh- und Heuproben, welche aus Pferdeställen in Deutschland stammten. In Rumänien konnte *Stachybotrys* neben Schimmelpilzen zahlreicher anderer Gattungen aus dem Einstreustroh von Schweinen isoliert werden (PUIA *et al.*, 2012).

1.4.2 Lebensmittel

In den vergangenen Jahren konnten *Stachybotrys*-Spezies aus verschiedenen Lebensmitteln isoliert werden. Ende der 1990er Jahre wurde *S. chartarum* auf Pfeffer, Rosmarin und Zimt nachgewiesen (ABDEL-HAFEZ & EL-SAID, 1997). Im Iran isolierten NEJAT-SALARI und ERSHAD (1994) *S. chartarum* aus Gerste. Zudem wurden *Stachybotrys*-Spezies auf Sojabohnen nachgewiesen (LI *et al.*, 2002). ABDEL-HAFEZ und EL NAGGAR (2006) isolierten *S. chartarum* aus medizinischen Heilpflanzen, wobei andere filamentöse Schimmelpilze wie *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum* und *Ulocladium botrytis* in deutlich höherer Zahl nachgewiesen werden konnten. Bei einer Untersuchung von getrockneten Kräutern (Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut) konnten 50 *Stachybotrys*-Isolate, von denen fünf nachweislich hochtoxisch waren, isoliert werden (BIERMAIER *et al.*, 2015). Zudem wurde das Vorkommen von sechs *S.-chartarum*-Isolaten in Ackerbohnenstaub in Ägypten beschrieben (GHERBAWY *et al.*, 2021).

1.4.3 Innenraum

Die meisten Pilze, auch *Stachybotrys*-Spezies, sind Saprophyten. Innenräume bieten daher zahlreiche, kohlenstoffreiche Nährstoffquellen, die ihr Wachstum begünstigen (z. B. Baumaterialien wie Tapeten und Holzbaustoffe) (VACHER *et al.*, 2010; D'ORAZIO, 2012). Schimmelbildung in Innenräumen ist eine Folge von Feuchtigkeit durch Wasserschäden, Wasserlecks, Kondensation, unangemessen hoher Luftfeuchtigkeit oder Überschwemmungen (NIELSEN *et al.*, 2002; D'ORAZIO, 2012).

S. chartarum benötigt, als sogenannter tertiärer Besiedler, im Gegensatz zu anderen Schimmelpilzen, konstant hohe a_w -Werte von mindestens 0,9 und eine relative Luftfeuchtigkeit von über 90 %, um zu wachsen (ANDERSEN & NISSEN, 2000; D’ORAZIO, 2012). *S. chartarum* wird außerdem wegen seiner Cellulase-Aktivität als zellulolytischer Schimmelpilz beschrieben (THOMAS, 1956; SAMSON *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Eigenschaften wird er häufig in Gebäuden mit langanhaltenden Wasserschäden aus feuchten, zellulosehaltigen Baumaterialien (z. B. Tapete, Gips, Glasfaser und Papierprodukte) isoliert (NIELSEN *et al.*, 1998; ANDERSEN *et al.*, 2002). Das erste Isolat der Gattung *Stachybotrys* wurde im Jahr 1837 beschrieben und stammte von einer Tapete aus einem Gebäude in Prag (CORDA, 1837). In den folgenden Jahren wurden weitere Isolate von *S. chartarum* in Innenräumen aus verschiedenen feuchtigkeitsgeschädigten Materialien beschrieben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Nachweise von *Stachybotrys*-Spezies in Innenräumen

Land	Matrix	Referenz
England/Schottland	Staub	HUNTER <i>et al.</i> (1988)
Niederlande	Tapete	VAN REENEN-HOEKSTRA <i>et al.</i> (1991)
Finnland	Luftproben	REPONEN <i>et al.</i> (1994)
USA	Gipskartonplatten, Bücher, Luftproben, Luftfilter	JOHANNING <i>et al.</i> (1996)
Finnland	Staub, Baumaterial	ANDERSSON <i>et al.</i> (1997)
Deutschland	kompostierbare Töpfe aus Altpapier	DILL <i>et al.</i> (1997)
USA	Luftproben	ETZEL <i>et al.</i> (1998)
USA	Wände, Tapete, Holz	JOHANNING <i>et al.</i> (1998)
Dänemark	Holz, Gips, Isoliermaterial	GRAVESEN <i>et al.</i> (1999)
Deutschland	Tapete	USLEBER <i>et al.</i> (2001)
Schweden	Baumaterial	ENGVALL <i>et al.</i> (2001)
USA	Baumaterial	SCHEEL <i>et al.</i> (2001)
USA	Luftproben, Baumaterial	BRASEL <i>et al.</i> (2005)
Deutschland	Tapete, Gipskartonplatten, Wandmaterial	GOTTSCHALK <i>et al.</i> (2006)
USA	Staub	BLOOM <i>et al.</i> (2009)
Finnland	Baumaterial	MUSSALO-RAUHAMAA <i>et al.</i> (2010)
Polen	Tapete, Wandmaterial	PIONTEK und ŁUSZCZYNSKA (2021)

1.5 Medizinische Bedeutung

In den letzten Jahren wurden verschiedene Erkrankungen mit *S.-chartarum*-Stämmen in Verbindung gebracht (FORGACS *et al.*, 1958; DEARBORN *et al.*, 2002; HINTIKKA, 2004). *S. chartarum* ist in der Lage eine große Anzahl strukturell verschiedener Sekundärmetaboliten zu produzieren, darunter Trichothecene, Atranone und Phenylspirodrimane (IBRAHIM *et al.*, 2022). Die von dieser Spezies gebildeten makrozyklischen Trichothecene (vor allem Satratoxin G und H) werden als die zytotoxischsten Mykotoxine gegenüber Säugetierzellen beschrieben. Sie besitzen ein ausgeprägtes zytotoxisches und neurotoxisches Potenzial, indem sie die Protein-, DNA- und RNA-Biosynthese blockieren (CUNDLIFFE & DAVIES, 1977; MCLAUGHLIN *et al.*, 1977; THOMPSON & WANNEMACHER JR, 1990) und die Apoptose von neuronalen Zelllinien induzieren (ISLAM *et al.*, 2008). Die Exposition von Säugern gegenüber diesen Metaboliten kann zu schweren gesundheitlichen Problemen führen (HARRACH *et al.*, 1987; PAGE & TROUT, 2001; PESTKA *et al.*, 2008). Phenylspirodrimane stellen die größte Gruppe von Metaboliten dar, die von *Stachybotrys*-Spezies gebildet werden (JARVIS *et al.*, 1995; JAGELS *et al.*, 2019). Dennoch ist ihre Rolle für die Gesundheit von Menschen und Tieren noch unklar. Es wird jedoch vermutet, dass sie durch die Hemmung des Komplementsystems eine immunsuppressive Wirkung haben (HONG *et al.*, 1979; MIYAZAKI *et al.*, 1980). Atranone werden im Vergleich zu makrozyklischen Trichothecenen als weniger zytotoxisch beschrieben, dennoch ist auch ihre Rolle im Zusammenhang mit Erkrankungen bisher unklar (NIELSEN *et al.*, 2002).

Makrozyklische Trichothecene und andere Metaboliten, die von *S. chartarum* gebildet werden, besitzen jedoch nicht nur ein Gefährdungspotenzial für Menschen und Tiere, sondern zeigen außerdem einen selektiven zytotoxischen Effekt gegen bestimmte menschliche Krebszelllinien und eine Inhibition von Tumor-assoziierten Tyrosinkinasen (LI *et al.*, 2017b; YANG *et al.*, 2020). Der gezielte Einsatz solcher Verbindungen könnte demnach Möglichkeiten für neue Krebstherapien eröffnen (HAIDAR *et al.*, 2021).

1.5.1 Bedeutung in der Tiermedizin

Die Stachybotryotoxikose ist eine Mykotoxikose, die durch makrozyklische Trichothecene des Schwärzepilzes *S. chartarum* hervorgerufen werden kann (BÜTTNER *et al.*, 2007). Bei Tieren kann die sogenannte Stachybotryotoxikose nach Inhalation oder oraler Aufnahme von Mykotoxinen aus verschimmeltem Futter, oder seltener nach Hautkontakt, auftreten (FORGACS *et al.*, 1958; SCHNEIDER *et al.*, 1979; KRIEK & MARASAS, 1983).

Die ersten Krankheitsfälle, die vermutlich auf *S. chartarum* zurückzuführen sind, traten im 13. Jahrhundert auf. Eine Vielzahl mongolischer Pferde verstarb im heutigen Russland, nachdem diesen verschimmeltes Stroh von Dächern verfüttert worden war (FORGACS, 1972; DANKÓ, 1975). Weitere Krankheitsfälle wurden in den 1930er Jahren in der ehemaligen Sowjetunion von Wissenschaftlern beschrieben und betrafen Nutztiere, wobei es vor allem bei Pferden zu Todesfällen kam. Die Tiere erkrankten nach der oralen Aufnahme von unsachgemäß gelagertem Stroh, das mit schwarzem Schimmel bedeckt war (DROBOTKO, 1945; FORGACS, 1972). Nachdem es dem russischen Wissenschaftler Sarkisov gelang, *S. alternans* (Syn.: *S. chartarum*) aus Stroh eines betroffenen Betriebs zu isolieren, konnte *Stachybotrys* mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden (FORGACS, 1972). Die Erkrankung war zu diesem Zeitpunkt unter dem Namen „NZ“ (neizvestnoe zabolevanie, dt.: unbekannte Erkrankung) oder „MZ“ (massovoe zabolevanie, dt.: Massenerkrankung) bekannt (FORGACS, 1972). Ein ähnlicher Krankheitsverlauf wurde in Ungarn beobachtet und war dort als Pyoseptikämie bekannt (DANKÓ, 1975). Der Name Stachybotryotoxikose wurde laut KLUWE (2006) erstmals in einer sowjetischen Fachzeitschrift des Militärs erwähnt, in der auch Hygienemaßnahmen zur Verhinderung weiterer Todesfälle durch verschimmeltes Stroh genannt wurden. Da bis dahin das Auftreten der Erkrankung vor allem bei Pferden beschrieben wurde, testete FORGACS *et al.* (1958) zahlreiche *S.-chartarum*-Stämme auf ihre Toxizität gegenüber anderen Tierarten. Er führte Tierversuche an Mäusen, Kaninchen, Pferden, Rindern, Schafen und Schweinen durch. Bei Kaninchen, Rindern und Pferden konnten Reaktionen der Haut, die durch Hyperämie, Ödeme und anschließende Nekrosen gekennzeichnet waren, ausgelöst werden. Zudem löste die Verfütterung von verschimmeltem Stroh und Hafer bei Pferden, Kälbern, Schweinen, Schafen und Mäusen klinische Anzeichen einer Stachybotryotoxikose aus.

Später wurde die Stachybotryotoxikose auch bei zahlreichen Nutztieren aus verschiedenen Teilen der Welt beschrieben (HINTIKKA, 1977a; WANG *et al.*, 2015b). Neben Fällen von erkrankten Pferden waren auch Rinder, Schafe, Hühner und Schweine betroffen (SZABÓ *et al.*, 1970; FORGACS, 1972; DANKÓ, 1975; SCHNEIDER *et al.*, 1979; HARRACH *et al.*, 1983; BOTHA & NAUDÉ, 2002). Außerdem konnte die Stachybotryotoxikose bei einem Bison und einem Nilpferd in einem Zoo diagnostiziert werden (FORGACS, 1972).

Das Krankheitsbild der Stachybotryotoxikose bei Pferden wurde von FORGACS (1972) beschrieben. Der Krankheitsverlauf anderer Tierarten ähnelt dem des Pferdes, wobei Rinder mildere klinische Anzeichen entwickeln (FORGACS *et al.*, 1958).

Es werden drei Verlaufsformen der Stachybotryotoxikose unterschieden: die typische Form, die atypische Form und die Schockform (FORGACS, 1972). Welche Form auftritt, hängt von der Menge der aufgenommenen Mykotoxine und der Dauer der Exposition ab.

Die typische Form tritt ein, wenn über einen längeren Zeitraum niedrige Toxindosen aufgenommen werden. Sie wird in drei Stadien unterteilt. Das erste Stadium beginnt nach zwei bis zehn Tagen und ist durch Stomatitis, übermäßigen Speichelfluss, oberflächliche bis tiefe Verletzungen der Maulwinkel und Nekrosen gekennzeichnet. Zudem können Ödeme im Kopfbereich und schmerzhafte Schwellungen der lokalen Lymphknoten auftreten. Die Dauer der klinischen Anzeichen des ersten Stadiums kann zwischen acht und 30 Tagen variieren (FORGACS, 1972). Das zweite Stadium ist durch eine deutlich verlangsamte Blutgerinnung sowie eine fortschreitende Thrombozytopenie und Leukopenie gekennzeichnet. Dieses Stadium dauert in der Regel fünf bis 20 Tage (FORGACS, 1972). Im dritten Stadium erhöht sich die Körpertemperatur auf bis zu 41,5 °C und die Zahl der Thrombozyten und Leukozyten nimmt weiter ab. Außerdem sind ein schneller, schwacher Puls und Herzrhythmusstörungen zu beobachten. Die lokalen Läsionen aller Schleimhäute des Maulbereichs weisen zahlreiche nekrotische Stellen auf und das Pferd wird zunehmend apathisch. Das dritte Stadium dauert zwischen ein bis sechs Tagen und verläuft in der Regel tödlich (FORGACS, 1972).

Die atypische Form tritt ein, wenn größere Mengen von verschimmeltem Stroh aufgenommen werden. Sie entwickelt sich meist innerhalb von 72 Stunden und ist vor allem durch Störungen des Nervensystems gekennzeichnet (FORGACS *et al.*, 1958). Es kommt zu verminderten Reflexen oder einer Hyperästhesie. Außerdem treten Schluckstörungen und ein fortschreitender Verlust des Sehvermögens auf. Die meisten Tiere, die an der atypischen Form erkranken, verenden durch Atemstillstand (FORGACS, 1972).

Die Schockform verläuft sehr schnell und ist immer innerhalb von zehn bis zwölf Stunden tödlich. Die betroffenen Pferde zeigen klinische Anzeichen eines Schocks mit einer erhöhten Körpertemperatur von bis zu 41 °C, Zyanosen, Hämorrhagien an sichtbaren Schleimhäuten und einen sehr schwachen Puls (FORGACS, 1972).

1.5.2 Bedeutung in der Humanmedizin

Erkrankungen, die beim Menschen durch die Exposition gegenüber *S. chartarum* hervorgerufen werden, werden auf die von ihm gebildeten Mykotoxine zurückgeführt (PAGE & TROUT, 2001; MILLER *et al.*, 2003; PESTKA *et al.*, 2008). Der Mensch ist diesen in der Regel durch aerogene Übertragung und Inhalation oder direkten Hautkontakt ausgesetzt, wobei auch eine orale Aufnahme nicht ausgeschlossen werden kann (JARVIS, 2003).

Der erste Nachweis für die Toxizität von *S. chartarum* gegenüber Menschen erfolgte durch ein humanmedizinisches Experiment. Hier führte das Auftragen von hochgradig kontaminiertem Stroh auf die Haut zu Veränderungen dieser Hautstellen. Darüber hinaus traten Irritationen der Schleimhäute und Atemwegsbeschwerden auf (DROBOTKO, 1945). Später wurde von Fällen von Stachybotryotoxikose bei Landarbeitern berichtet, die mit verschimmeltem Stroh oder Heu gearbeitet hatten sowie in Regionen, in denen Heu oder Stroh als Einstreumaterial verwendet wurden (GAJDUSEK, 1953; OZEGOVIC *et al.*, 1971). Die Landarbeiter entwickelten Dermatitis, Konjunktivitis, Rhinitis, Pharyngitis und Laryngitis (OZEGOVIC *et al.*, 1971). Im Jahr 1986 wurde ein Fallbericht über eine Familie mit klinischen Symptomen veröffentlicht, die denen der Stachybotryotoxikose ähnelten. Die Toxikose wurde auf eine Exposition gegenüber *S. atra* (Syn.: *S. chartarum*) und die von ihm gebildeten makrozyklischen Trichothecene zurückgeführt (CROFT *et al.*, 1986).

Seitdem wurden zahlreiche Fallberichte veröffentlicht, in denen Metabolite von *Stachybotrys*-Spezies, und hier vor allem *S. chartarum*, mit respiratorischen und neurologischen Symptomen in Verbindung gebracht werden (KOSKINEN *et al.*, 1995; JOHANNING *et al.*, 1996; ANDERSSON *et al.*, 1997; DEARBORN *et al.*, 1999; ENGVALL *et al.*, 2001; SCHEEL *et al.*, 2001; MUSSALO-RAUHAMAA *et al.*, 2010; PIONTEK & ŁUSZCZYNSKA, 2021).

Menschen sind in erster Linie in wassergeschädigten, mit Schimmel befallenen Gebäuden gefährdet (CROFT *et al.*, 1986; SMORAGIEWICZ *et al.*, 1993; JOHANNING *et al.*, 1996), aber auch Landwirte und Arbeiter, die mit kontaminierten Materialien umgehen, können gefährdet sein (HINTIKKA & NIKULIN, 1998; LANIER *et al.*, 2012).

In den 1990er Jahren kam es zu zahlreichen Fällen von pulmonaler Häm siderose bei Säuglingen, die in Cleveland, Ohio, USA, lebten. Zwischen Januar 1993 und Dezember 1993 wurde von zehn betroffenen Kindern berichtet (ETZEL *et al.*, 1998). Später wurden weitere Fallberichte veröffentlicht, aus denen hervorgeht, dass die pulmonale Häm siderose im Zeitraum von 1993 bis 1998 bei insgesamt 37 Kindern diagnostiziert wurde, von denen 12 verstarben (DEARBORN *et al.*, 1999). Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und der Kontamination der Gebäude mit *S. chartarum* nach Wasserschäden festgestellt werden (ETZEL *et al.*, 1998; DEARBORN *et al.*, 1999). In späteren Untersuchungen der Stämme, die aus den Gebäuden der betroffenen Kinder isoliert wurden, konnten JARVIS *et al.* (1998) nachweisen, dass die Isolate eine Reihe hochgiftiger Verbindungen, unter anderem makrozyklische Trichothecene, bildeten. Später untersuchte man die Isolate nochmals und stellte fest, dass wahrscheinlich nicht nur die Mykotoxine, sondern auch andere Sekundärmetaboliten, wie das Stachylysin (ein von *S. chartarum* gebildetes Hämolyisin), ebenfalls an der Entstehung der pulmonalen Häm siderose beteiligt sein könnten (VESPER & VESPER, 2002).

Des Weiteren ist eine Beteiligung von *S. chartarum* an der Entstehung des „Sick-Building-Syndroms“ beschrieben (SCHEEL *et al.*, 2001; KUHN & GHANNOUM, 2003; HINTIKKA, 2004). Ein längerer Aufenthalt in betroffenen Gebäuden kann unspezifische Beschwerden und Symptome hervorrufen, die unter dem Begriff „Sick-Building-Syndrom“ (SBS) zusammengefasst werden (ENGVALL *et al.*, 2001; SCHEEL *et al.*, 2001; ADITAMA & ANDARINI, 2002). Das SBS ist ein Komplex verschiedener klinischer Symptome, wie Haut- und

Schleimhautreizungen, tränenden Augen, Ermüdungserscheinungen, Kopfschmerzen, Allergien sowie gastrointestinales, respiratorisches und neurologisches Beschwerden (REDLICH *et al.*, 1997; JOHANNING *et al.*, 1999; SABIR *et al.*, 1999; ADITAMA & ANDARINI, 2002). Die Ursachen des SBS werden als multifaktoriell beschrieben (ADITAMA & ANDARINI, 2002). Es wird angenommen, dass Expositionen gegenüber Mykotoxinen, bakteriellen Endotoxinen, Bioaerosolen, flüchtigen organischen Bestandteilen, eine schlechte Luftqualität sowie psychischer und physischer Stress zu Symptomen des SBS führen können (OOI & GOH, 1997; TROUT *et al.*, 2001; ADITAMA & ANDARINI, 2002; PANDEY & YADAV, 2018).

In der Literatur sind außerdem ein Fall einer *S.-chartarum*-Infektion der Kopfhaut eines 80-jährigen immunkompetenten Mannes (AYOUBI & DASS, 2019) und ein Fall einer invasiven *S.-chlorohalonata*-Sinusitis beschrieben, die bei einem 23-jährigen Mann mit akuter lymphatischer Leukämie auftrat (SEMIS *et al.*, 2020). Da es sich hierbei um Einzelfälle handelt, ist die medizinische Relevanz solcher Infektionen fraglich.

Ein weiterer möglicher Expositionsweg für den Menschen ist die orale Aufnahme von Mykotoxinen über die Nahrung. Obwohl Sporen von toxischen *Stachybotrys*-Stämmen aus verschiedenen Küchenkräutern isoliert werden konnten, konnte in keiner der bisher durchgeführten Studien sowohl *S. chartarum* selbst als auch die von ihm produzierten zytotoxischen makrozyklischen Trichothecene in Lebensmitteln nachgewiesen werden (GOTTSCHALK *et al.*, 2009; SULYOK *et al.*, 2010; BARTHEL *et al.*, 2012; BIERMAIER *et al.*, 2015).

2 Sekundärmetabolismus von filamentösen Schimmelpilzen

Der Sekundärmetabolismus fasst alle Stoffwechselprozesse zusammen, die nicht an lebenswichtigen Funktionen beteiligt sind und demnach nicht direkt zur Lebenserhaltung eines Organismus beitragen. Die dabei entstehenden Metaboliten sind nicht unmittelbar für das Wachstum von Bakterien, Pflanzen und Pilzen notwendig (BETINA, 1994b; MAGAN & ALDRED, 2007). Der Primärstoffwechsel fasst im Gegensatz dazu alle Prozesse zusammen, die Energie, synthetische Zwischenprodukte und wichtige Makromoleküle liefern und demnach für das Wachstum unerlässlich sind (BETINA, 1989).

Filamentöse Schimmelpilze kommen ubiquitär in der Umwelt vor und besitzen die Fähigkeit eine Vielzahl strukturell diverser Sekundärmetaboliten zu produzieren. Diese können für den Menschen entweder sehr nützlich sein und als Arzneistoffe eingesetzt werden (z. B. Penicillin und Cyclosporin A), oder toxisch sein. Die Gruppe der toxischen Verbindungen wird als Mykotoxine bezeichnet (FLEMING, 1929; NIELSEN, 2003; MAGAN & ALDRED, 2007).

Es bestehen immer noch Unklarheiten, wann und warum Mikroorganismen Sekundärmetaboliten produzieren und welchen Zweck sie für den produzierenden Organismus haben (AHARONOWITZ & COHEN, 1985; MAGAN & ALDRED, 2007). Aufgrund der vermutlich fehlenden Bedeutung im Rahmen des Wachstumsprozesses, wird in der Literatur häufig beschrieben, dass es sich bei Sekundärmetaboliten um „Abfall-, Reserve- oder Detoxifikationsprodukte“ handelt (HASLAM, 1986; VINING, 1986). Andere Hypothesen besagen, dass der Sekundärmetabolismus ein Prozess ist, der dem produzierenden Organismus in jedem Fall einen Vorteil verschaffen muss (MAGAN & ALDRED, 2007). Für diese Hypothese spricht, dass Sekundärmetaboliten verstärkt gebildet werden, wenn die Bedingungen kein ausgeglichenes Wachstum mehr zulassen, z. B. bei Nährstoffmangel (HASLAM, 1985; HASLAM, 1986; RATLEDGE, 1993). Somit könnte die Produktion von Sekundärmetaboliten als eine Art Überlebensstrategie und zur Vorteilsbeschaffung dienen, um weiter konkurrenzfähig zu bleiben (JANZEN, 1977; MAPLESTONE *et al.*, 1992; JARVIS *et al.*, 1995; GAREIS & GOTTSCHALK, 2014). Es ist außerdem bekannt, dass das Metabolitenprofil vieler filamentöser Schimmelpilze sich aufgrund unterschiedlicher Wachstumsbedingungen, wie Nährstoff- und Wasserverfügbarkeit sowie temperaturbedingt verändert

(NIELSEN *et al.*, 2004; MAGAN & ALDRED, 2007). Mikroorganismen, die in nährstoffreichen Umgebungen leben, in denen wenig Konkurrenz herrscht, bilden in der Regel keine Sekundärmetaboliten (VINING, 1990; DEMAIN, 2007). Außerdem ist aufgrund der sehr langen, komplexen und energieaufwendigen Synthesewege ein positiver Effekt auf das Wachstum, die Physiologie und Reproduktion des Organismus zu erwarten (MAGAN & ALDRED, 2007). *Stachybotrys*-Spezies produzieren eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten, die genaue Funktion dieser Verbindungen ist jedoch häufig unbekannt (IBRAHIM *et al.*, 2022). Dennoch ist auch für *S.-chartarum*-Stämme beschrieben, dass sich das Metabolitenprofil, abhängig von den zur Verfügung stehenden Nährstoffen, verändert. Die Ursache hierfür und die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht erforscht (JAGELS *et al.*, 2019; ULRICH & SCHÄFER, 2020). Die meisten mit *Stachybotrys*-Spezies durchgeführten Studien beschäftigen sich, aufgrund ihrer hochgradigen Zytotoxizität, mit den von ihnen gebildeten Mykotoxinen (vor allem Satratoxine) (ANDERSEN *et al.*, 2003; JARVIS, 2003; ULRICH *et al.*, 2019).

2.1 Mykotoxine

Mykotoxine wie Trichothecene, Fumonisine, Aflatoxine, Patulin und Zearalenon spielen vor allem als Kontaminanten von Innenräumen, Futtermitteln und Lebensmitteln eine Rolle (KELLER, 2019). Die meisten sind nicht flüchtig und haben ein Molekulargewicht von unter 1.500 Dalton (NIELSEN, 2003). Mykotoxin-bildende Schimmelpilze kommen in der Regel nicht allein vor, sondern sind Teil einer vielfältigen Gemeinschaft. Um bestimmte ökologische Nischen zu besiedeln, müssen sie mit anderen Mikroorganismen um Ressourcen konkurrieren (MAGAN & ALDRED, 2007). Filamentöse Schimmelpilze konkurrieren, interagieren und kommunizieren miteinander, indem sie extrazelluläre Verbindungen, wie Enzyme, Oxylipine oder flüchtige organische Verbindungen (engl.: Volatile Organic Compounds, kurz VOC) in ihre unmittelbare Umgebung abgeben (MAGAN & ALDRED, 2007; GESSLER *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2021). Außerdem ist beschrieben, dass einige Mykotoxine als Reaktion auf eine Veränderung der Umweltbedingungen gebildet werden. Dies geschieht in der Regel durch das Eintreten von Stressbedingungen wie Nährstoffmangel, Konkurrenz durch andere Mikroorganismen oder als Reaktion auf eine geringe Wasserverfügbarkeit (MARIN *et al.*, 1998; YATES *et al.*, 1999; CAIRNS *et al.*,

2003; MAGAN & ALDRED, 2007). Auch *Stachybotrys*-Spezies bilden eine Vielzahl von Mykotoxinen, von denen vor allem makrozyklische Trichothecene als besonders toxisch für Säugetiere beschrieben werden (GAREIS, 2006; ZHU *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2022). Die Toxizität gegenüber Säugetieren könnte ein möglicher Grund für die Entstehung dieser Verbindungen sein, dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da kein offensichtlicher Vorteil aus dieser antagonistischen Wechselwirkung hervorgeht. Aufgrund ihres langsamen Wachstums sind *Stachybotrys*-Spezies im Vergleich zu schneller wachsenden Schimmelpilzen (*Aspergillus*- oder *Penicillium*-Spezies), die in der gleichen Umgebung vorkommen, im Nachteil (DYLAĞ *et al.*, 2022). Die Fähigkeit von *Stachybotrys*-Spezies, in bestimmten ökologischen Nischen zu wachsen, deutet jedoch darauf hin, dass sie in der Lage sind, mit anderen Schimmelpilzen zu konkurrieren. Die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen könnte ein Mittel sein, das zu dieser Konkurrenzfähigkeit beiträgt (BUTT & GHAFAR, 1972).

Es ist denkbar, dass die Produktion von Mykotoxinen ein Prozess ist, mit dem filamentöse Schimmelpilze auf Veränderungen im Wettbewerb mit anderen Arten oder auf sich verändernde abiotische Faktoren reagieren können. Dennoch ist der Zweck von Mykotoxinen immer noch nicht vollständig geklärt, sie scheinen jedoch eine ökologische Funktion zu haben (SAMSON & FRISVAD, 2004; MAGAN & ALDRED, 2007; SCHARF *et al.*, 2014; BILLS & GLOER, 2017).

2.2 Sekundärmetabolismus und Pilzentwicklung

Die optimalen Bedingungen für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten sind nicht immer identisch mit denen für die Pilzentwicklung bzw. das Wachstum. In der Regel sind die optimalen Bereiche für die Produktion von Sekundärmetaboliten kleiner. Die physiologische Regulierung dieser Prozesse kann innerhalb verschiedener Mikroorganismen variieren (BETINA, 1994a; BETINA, 1994b).

Die Bildung von Sekundärmetaboliten wird häufig mit der Sporulation von Schimmelpilzen in Verbindung gebracht (BU'LOCK, 1961; SEKIGUCHI & GAUCHER, 1977; MAPLESTONE *et al.*, 1992). Die dabei entstehenden Verbindungen können laut CALVO *et al.* (2002) in drei große Gruppen unterteilt werden: Metaboliten, die die Sporulation aktivieren (z. B. Derivate der Linolsäure), Pigmente (z. B. Melanine) und Mykotoxine.

Melanine sind die Pigmente, die am häufigsten von Schimmelpilzen gebildet werden. Diese dunkelbraunen bis schwarzen Verbindungen werden während der Sporenbildung produziert und in die Zellwand eingelagert (DURRELL, 1964; KUBO & FURUSAWA, 1991). Das Pigment schützt die Sporen vor schädlichem UV-Licht, ist aber auch ein wichtiger Virulenzfaktor (TSAI *et al.*, 1998; KAWAMURA *et al.*, 1999; GÓMEZ & NOSANCHUK, 2003; EISENMAN & CASADEVALL, 2012). Auch *S.-chartarum*-Spezies bilden ein dunkles Pigment, welches aber noch nicht genauer untersucht wurde. Es wird jedoch vermutet, dass es sich hierbei um ein Melanin handeln könnte (BUSKIRK *et al.*, 2011; ULRICH *et al.*, 2016).

Eine Reihe von Daten sprechen dafür, dass die Mykotoxinproduktion und die Sporulation bei filamentösen Schimmelpilzen wie *Aspergillus*-, *Fusarium*- und *Penicillium*-Spezies aber auch *Claviceps purpurea* funktionell miteinander verbunden sind. Eine Hemmung der Sporulation führt bei diesen Schimmelpilzen zu einer Hemmung der Mykotoxinproduktion (PAŽOUTOVÁ *et al.*, 1977; SEKIGUCHI & GAUCHER, 1977; GUZMÁN-DE-PEÑA *et al.*, 1998; SHIM & WOLOSHUK, 2001). Bei *Aspergillus*- und *Fusarium*-Spezies werden beide Prozesse durch einen ähnlichen G-Protein-vermittelten Signalweg gesteuert (TAG *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 2018). Diese Signalwege regulieren die Entwicklung des Pilzes, die Stressreaktion und die Ausprägung von Virulenzfaktoren (BRODHAGEN & KELLER, 2006). Die Bildung von Sekundärmetaboliten muss jedoch nicht immer an die Sporulation gekoppelt sein. Für einige Schimmelpilz-Stämme ist beschrieben, dass sie trotz einsetzender Sporulation, bestimmte Sekundärmetaboliten nur in geringen Konzentrationen oder gar nicht bilden (SEKIGUCHI & GAUCHER, 1977; SHIMIZU & KELLER, 2001).

Für *S. chartarum* wurde noch nicht genauer beschrieben, ob und durch welche Mechanismen die Sporulation funktionell mit der Mykotoxinproduktion verbunden ist. Dies wurde bisher lediglich vermutet (CALVO *et al.*, 2002). Jedoch konnte in einer Studie gezeigt werden, dass das Mykotoxin Satratoxin G vor allem in den Sporen und nur in geringen Konzentrationen im Myzel lokalisiert ist (GREGORY *et al.*, 2004).

3 Methoden zur Untersuchung von *Stachybotrys*-Spezies

In diesem Kapitel werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden zur Untersuchung des Sekundärmetabolismus von *S. chartarum* beschrieben.

3.1 Kultur- und Mikromorphologie

Aufgrund ihres langsamen Wachstums werden *Stachybotrys*-Spezies häufig, beim Versuch diese aus der Umwelt zu isolieren und zu kultivieren, von Vertretern schneller wachsender Gattungen wie *Aspergillus* und *Penicillium* überwachsen (HINTIKKA, 1977b; CHAPMAN, 2003). Da *Stachybotrys*-Spezies bevorzugt auf feuchten, zellulosehaltigen Materialien wachsen, werden für die Anzucht Medien empfohlen, die Zellulose als Kohlenstoffquelle enthalten. Aufgrund ihrer Cellulase-Aktivität erhalten *Stachybotrys*-Spezies so einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Schimmelpilzen (YOUATT, 1958; NIELSEN, 2001). Eine weitere Möglichkeit ist die Anzucht auf sterilen zellulosehaltigen Papierfiltern, die mit einem Minimal-Nährmedium (z. B. Van-Iterson-Medium) befeuchtet werden (HINTIKKA, 1977b). Grundsätzlich können *Stachybotrys*-Spezies jedoch auf verschiedenen Nährmedien angezchtet werden (SAMSON *et al.*, 2010). Malzextrakt-Agar (MEA) und Potato-Dextrose-Agar (PDA, Abbildung 2) wurden bisher üblicherweise in Studien zur Charakterisierung von *Stachybotrys*-Spezies verwendet (ANDERSEN *et al.*, 2003; JAGELS *et al.*, 2019).

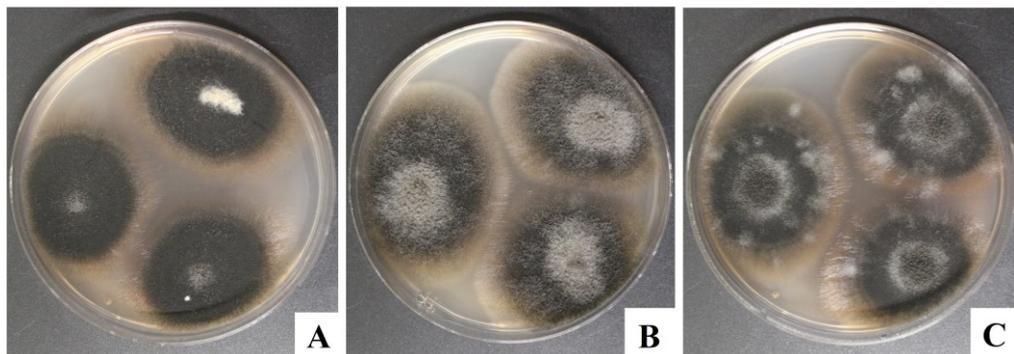


Abbildung 2: *S.-chartarum*-Genotyp-S-Stämme ATCC 34916 (A), IBT 40293 (B) und DSM 114129 (C) nach 21 Tagen Anzucht auf Potato-Dextrose-Agar bei 25 °C

S. chartarum bildet auf MEA und auf PDA zunächst grau-weiße und später grau-schwarze Kolonien. Während die Rückseite der Kolonie immer schwarz bleibt, kann sich auf der Vorderseite weißes Luftmyzel entwickeln (ANDERSEN *et al.*, 2003; SAMSON *et al.*, 2010; WALSH *et al.*, 2018). Eine Besonderheit von *S. chartarum* ist die Fähigkeit, ein extrazelluläres orange-braunes Pigment auf MEA zu produzieren,

welches das Medium um die Kulturen entsprechend einfärbt (SAMSON *et al.*, 2010). Die meisten Isolate bilden außerdem an Tag sieben bis vierzehn Guttationstropfen (Abbildung 3) auf ihrer Kolonieoberfläche (GAREIS & GOTTSCHALK, 2014).



Abbildung 3: Guttationstropfen einer *S.-chartarum*-Kultur (ATCC 34916) nach sieben Tagen Anzucht auf Potato-Dextrose-Agar bei 25 °C

Mikroskopisch lassen sich bei *S.-chartarum*-Isolaten regelmäßig septierte Hyphen erkennen, denen olivbraune oder olivgraue Konidiophoren aufsitzen (Abbildung 4). Diese sind gerade aufgerichtet und können mehrfach verzweigt sein. Ältere Konidiophoren haben in der Regel eine leicht papilläre Oberfläche und sind im oberen Teil dunkler (BISBY, 1943; JONG & DAVIS, 1976; ANDERSEN *et al.*, 2002; LOMBARD *et al.*, 2016). Den Konidiophoren sitzen strahlenförmig Phialiden auf. Diese sind meist keulenförmig und haben eine glatte Oberfläche. *S. chartarum* bildet ellipsoide Konidien mit einer rauen Oberfläche (JONG & DAVIS, 1976; ANDERSEN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2015b). Die Konidien sind von einer schleimigen, klebrigen Masse umgeben, die sie zu Paketen, den sogenannten „slimy heads“, zusammenfasst (PINRUAN *et al.*, 2004; SAMSON *et al.*, 2010).

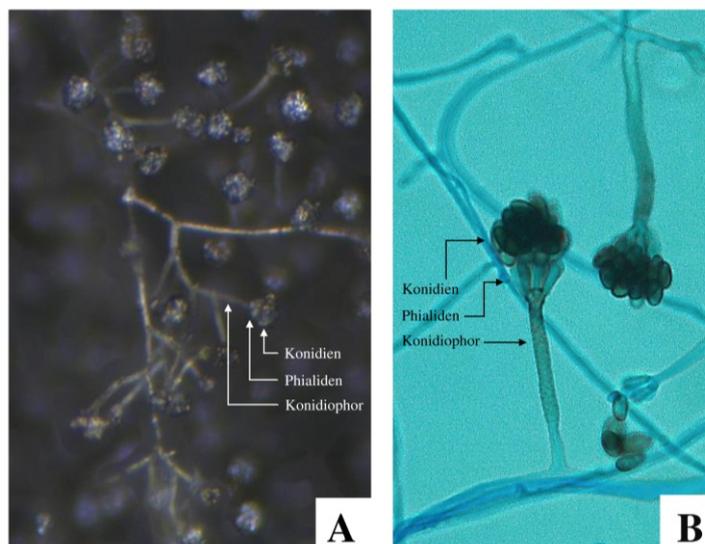


Abbildung 4: Stereomikroskopische Aufnahmen von *S.-chartarum*-Kulturen (ATCC 34916) nach 21 Tagen (A, 160-fache Vergrößerung) und sieben Tagen (B, 630-fache Vergrößerung, Lactophenolblau-Klebestreifenpräparat) Anzucht auf Potato-Dextrose-Agar bei 25 °C

3.2 ATR-Infrarotspektroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde die ATR-Infrarotspektroskopie dazu verwendet, das in den Sporen von *S. chartarum* eingelagerte, dunkle Pigment zu charakterisieren und zu überprüfen, ob es sich hierbei um ein für filamentöse Schimmelpilze typisches Melanin handelt.

Die ATR-Infrarotspektroskopie (engl.: attenuated total reflection, dt.: abgeschwächte Totalreflexion) ist eine Infrarot-spektroskopische Messmethode für die chemische Oberflächenuntersuchung von homogenen festen und flüssigen Proben. Sie wird unter anderem zur Überprüfung von Rohstoffen, zur Qualitätskontrolle aber auch in der Forschung zur Charakterisierung von Substanzen eingesetzt (HERRES & GRONHOLZ, 1984; MOHEBI, 2008; GÜNZLER & GREMLICH, 2012; BRUKER CORPORATION, 2020).

Das Prinzip der klassischen Infrarotspektroskopie beruht auf der Eigenschaft vieler Moleküle, Licht im Infrarotbereich des elektromagnetischen Spektrums zu absorbieren. Substanzen verschiedener Aggregatzustände können mit der Infrarotstrahlung durchleuchtet und untersucht werden. Hierbei wird die Transmission, also die Durchlässigkeit einer Substanz, mit Hilfe eines Spektrometers bestimmt. Diese ist charakteristisch für die chemischen Bindungsverhältnisse eines Materials (GÜNZLER & GREMLICH, 2012). Die Lichtintensität kann anschließend als Funktion der Wellenzahl in einem Infrarot-Spektrum dargestellt werden (BRUKER CORPORATION, 2023). Mit Hilfe der Absorptionsbanden in den generierten Spektren können so Aussagen über Strukturgruppen (z. B. Hydroxylgruppen und Doppelbindungen) getroffen werden. Zusätzlich können stoffspezifische Absorptionsbanden mit kommerziell erhältlichen Spektrenbibliotheken abgeglichen werden und so organische und anorganische Substanzen chemisch eindeutig identifiziert werden (GÜNZLER & GREMLICH, 2012). Durch die Weiterentwicklung zu der Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) können zudem alle Infrarot-Wellenlängen mit einer Messung analysiert werden (HERRES & GRONHOLZ, 1984). Hierbei wird das Infrarotlicht durch ein Interferometer auf die Probe und anschließend zum Detektor geleitet. Das Interferogramm wird von dem Detektor registriert und mittels Fourier-Transformation in ein sogenanntes Einkanalspektrum transformiert. Das endgültige Spektrum wird anschließend aus dem Verhältnis des Einkanalspektrums zu einer Referenz (Messung der Messplatte ohne Probenmaterial) generiert (HERRES & GRONHOLZ, 1984).

Die abgeschwächte Totalreflexion (ATR) wird mittlerweile als Standardtechnik bei der FT-IR-Spektroskopie verwendet. Mittels ATR können Proben analysiert werden, die entweder zu dick sind oder zu stark absorbierende Eigenschaften für das Standard-Durchstrahlverfahren haben (GÜNZLER & GREMLICH, 2012; BRUKER CORPORATION, 2020). Das Prinzip der ATR-Infrarotspektroskopie beruht auf der bei der Totalreflexion auftretenden Wechselwirkung der evaneszenten Welle mit der Probe. Die Probe wird für die Untersuchung direkt auf den ATR-Kristall gepresst. Das Infrarotlicht wird zunächst durch den ATR-Kristall, der aus Infrarot-transparentem Material (z. B. Diamant, Germanium oder Zinkselenid) besteht, geleitet und interagiert anschließend mit der Probe (BRUKER CORPORATION, 2020). Eine Voraussetzung für die Verwendung dieser Methode ist ein höherer Brechungsindex des ATR-Kristalls im Vergleich zur untersuchten Probe (GÜNZLER & GREMLICH, 2012; BRUKER CORPORATION, 2020). Das Infrarotlicht wird im Inneren des ATR-Kristalls an der Grenzfläche zur Probe reflektiert und teilweise von der Oberfläche der Probe absorbiert. Aufgrund seiner wellenartigen Eigenschaften dringt das Infrarotlicht leicht in die optisch weniger dichte Probe ein. In diesem sogenannten evaneszenten Feld interagiert das Infrarotlicht mit den ersten Mikrometern der Probenoberfläche, kann sich jedoch nicht ausbreiten. Die Intensität des evaneszenten Feldes nimmt exponentiell ab. Das reflektierte Licht wird anschließend detektiert und ein ATR-Spektrum generiert (BRUKER CORPORATION, 2020).

3.3 MTT-Test – Zytotoxizitätstest mittels Zellkultur

Der MTT-Test ist ein biologisches Testverfahren, das bei Vergleichsuntersuchungen von Mykotoxinen, Pestiziden, Mikroorganismen und für die Qualitätskontrolle von Umweltproben, Futtermitteln und Nahrungsmitteln eingesetzt werden kann (GAREIS, 2006). Namensgebend ist das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid). Der MTT-Test stellt kein *in vitro* Modell für toxikologische Untersuchungen dar, sondern wird in der Regel anderen qualitativen und quantitativen Methoden (Flüssigkeits- und Gaschromatographie, Massenspektrometrie) als Screeningverfahren bzw. unspezifisches Testverfahren vorangestellt. Diese können so ergänzt werden.

Das Prinzip des MTT-Test beruht auf dem Vergleich des zytotoxischen Effekts von Proben gegenüber einer SK (Swine-Kidney)-Zelllinie mit dem zytotoxischen Effekt der Kontrollprobe (GAREIS, 2006). Hierfür werden die SK-Zellen zunächst in einem Minimal-Medium kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen werden anschließend mit Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät (HANELT *et al.*, 1994). SK-Zellen werden aufgrund ihrer hohen Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen bei geringer Spezifität sowie ihrer geringen Sensitivität gegenüber Matrixbestandteilen verschiedener Ausgangsproben eingesetzt (GAREIS, 2006). Im nächsten Schritt werden die Rohextrakte der zu untersuchenden Proben in verschiedenen Verdünnungsstufen zu den Zielzellen pipettiert. Nach einer mehrstündigen Inkubation wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT zugegeben und das Gemisch nochmals vier Stunden inkubiert. Der MTT-Test beruht auf einer kolorimetrischen Reaktion, bei der das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT, in den Mitochondrien lebender Zellen, in ein wasserunlösliches, violette Formazan umgesetzt wird (KUHNS & JERCHEL, 1941; MOSMANN, 1983). Jede Schädigung der Zielzellen durch zytotoxische Substanzen führt zu einem Rückgang der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalz und damit zu einem geringeren Farbumschlag. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Anzahl der intakten und stoffwechselaktiven Zellen und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 510 nm (maximale Absorptionswellenlänge der Formazanderivate) gemessen werden (HANELT *et al.*, 1994; GAREIS, 2006). Anschließend werden die Extinktionen jedes Ansatzes bzw. jeder Probenkonzentration mit der Extinktion der unbehandelten Zellkontrolle verglichen. Als toxische Grenzkonzentration wird der IC_{50} -Wert (mittlere inhibitorische Konzentration) ermittelt. Der IC_{50} -Wert gibt die niedrigste Konzentration der getesteten Probe pro Milliliter Zellkulturmedium an, welche die Spaltungsaktivität der Zielzellen im Vergleich zur Kontrollprobe um 50 % reduziert (YUNG-CHI & PRUSOFF, 1973; GAREIS, 2006). Je niedriger der Wert, umso zytotoxischer eine Probe. Der MTT-Test ermöglicht so eine schnelle und einfache Durchführbarkeit und eine objektive Befunderhebung (HANELT *et al.*, 1994; GAREIS, 2006).

3.4 Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

3.4.1 HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ist eine flüssigkeitschromatographische Methode zur Untersuchung löslicher fester und flüssiger Substanzgemische (SNYDER *et al.*, 2011). Komplexe Probengemische können in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt, diese identifiziert und auch quantifiziert werden. Die HPLC hat sich als Trenn- und Analysetechnik in unterschiedlichen Bereichen wie der Umwelt- und Pharmachemie bewährt (KARGER & GIESE, 1978; SNYDER *et al.*, 2011).

Bei der Chromatographie handelt es sich um ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, mit dem Stoffgemische durch unterschiedliche Verteilung der Einzelbestandteile zwischen einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt werden. Bei der Flüssigkeitschromatographie bilden Flüssigkeiten bzw. Lösungsmittel die mobile Phase, die als Transportmedium für das Analytengemisch durch die stationäre Phase dienen (SNYDER *et al.*, 2011). Die stationäre Phase kann grundsätzlich flächenförmig (Papier- & Dünnschichtchromatographie) oder säulenförmig (Säulenchromatographie) sein. Bei der HPLC handelt es sich um eine technisch optimierte Säulenchromatographie, bei der die mobile Phase nicht aufgrund der Schwerkraft durch die stationäre Phase fließt, sondern unter hohem Druck durch die Säule gepumpt wird. Hierdurch können Säulen mit kleineren und damit dichter gepackten Partikeln verwendet werden, wodurch die Trennleistung und Trenngeschwindigkeit deutlich verbessert werden (SNYDER *et al.*, 2011).

Heutzutage existieren verschiedene Trennmethoden und zugrunde liegende Trennmechanismen. Die wichtigsten Trennverfahren bilden die Normalphasen-HPLC (engl.: normal-phase HPLC) und die Umkehrphasen-HPLC (engl.: reversed-phase HPLC), wobei letztere deutlich häufiger Anwendung findet (KIRKLAND, 2004; SNYDER *et al.*, 2011). Bei diesen beiden Trennverfahren werden die Analyten im Wesentlichen nach ihrer Polarität aufgetrennt. Die mobile und die stationäre Phase werden so gewählt, dass sie eine möglichst unterschiedliche Polarität aufweisen. In der Normalphasen-HPLC werden als stationäre Phase meist Kieselgelpartikel verwendet, die aufgrund der Hydroxylgruppen auf ihrer Oberfläche der stationären Phase einen polaren Charakter geben. Die polare stationäre Phase wird mit einer unpolaren mobilen Phase, also einem Lösungsmittel wie Hexan, kombiniert. Polare

Substanzen werden länger an der stationären Phase zurückgehalten, wodurch sie später die Säule verlassen und detektiert werden (SNYDER *et al.*, 2011). In der Umkehrphasen-HPLC werden meist chemisch modifizierte Kieselgelpartikel als stationäre Phase verwendet, die durch kovalent gebundene Alkylketten an ihrer Oberfläche einen unpolaren Charakter erhalten. Demnach ist die stationäre Phase ebenfalls unpolar. Bei der Umkehrphasen-HPLC werden polare Lösungsmittel wie z. B. Wasser, aber auch solche mit leicht unpolaren Eigenschaften, wie z. B. Methanol und Acetonitril, verwendet. Die gewünschte Polarität lässt sich durch das Mischen von polaren (z. B. Wasser) mit leicht unpolaren (z. B. Acetonitril) Lösungsmitteln einstellen (BIDLINGMEYER, 1980). Unpolare Verbindungen treten stärker mit der unpolaren stationären Phase in Wechselwirkung und werden somit länger zurückgehalten. Polare Verbindungen verlassen die Säule hingegen schneller. Die Substanzen eluieren daher in einer allgemeinen Reihenfolge abnehmender Polarität. Hierdurch ergibt sich für jeden Analyten eine charakteristische Retentionszeit, die zur Identifikation des jeweiligen Stoffes dient (KARGER & GIESE, 1978; BIDLINGMEYER, 1980; KIRKLAND, 2004; SNYDER *et al.*, 2011).

In der HPLC wird zudem häufig eine Gradientenelution verwendet, bei der die Zusammensetzung der mobilen Phase graduell, während der Auftrennung des Stoffgemisches, geändert wird (SNYDER *et al.*, 2011). Hierbei wird die Elutionskraft der mobilen Phase kontinuierlich erhöht und die Polarität der mobilen Phase an die Polarität der stationären Phase angepasst. Stark zurückgehaltene Substanzen können so schneller von der stationären Phase in die mobile Phase überführt werden. So wird z. B. in der Umkehrphasen-HPLC der mobilen Phase (polar) immer mehr unpolares Lösungsmittel (z. B. Acetonitril) zugemischt, wodurch die Polarität des Lösungsmittelgemisches abnimmt. Dies kann die Trennung bestimmter Substanzen verbessern und Analysezeiten verkürzen (SNYDER *et al.*, 2011; GLÖCKNER, 2012).

Nach Verlassen der Trennsäule werden die abgetrennten Substanzen kontinuierlich von einem Detektor erfasst. Der UV/VIS-Detektor wird aufgrund seiner guten Nachweisgrenzen am häufigsten in der HPLC eingesetzt (MORGAN & SMITH, 2010; SWARTZ, 2010). UV/VIS-Detektoren basieren auf dem Prinzip eines UV/VIS-Spektrometers. Hierbei wird Licht verschiedener Wellenlängen im UV/VIS-Bereich von einer Lichtquelle ausgestrahlt. Anschließend wird die

Intensität des Lichtes am Ende der Durchflussmesszelle gemessen, die von der mobilen Phase mit den darin enthaltenen Analyten durchflossen wird. So kann die Extinktion der Lösung bestimmt werden (MORGAN & SMITH, 2010). Der Analyt muss hierfür ausreichend UV-Strahlung bzw. sichtbares Licht einer entsprechenden Wellenlänge absorbieren, um detektiert werden zu können (SWARTZ, 2010). Die Messung wird anschließend mit Hilfe eines Computerprogramms graphisch dargestellt. Das resultierende Detektorsignal (Peak), aufgetragen gegen die Zeit (Retentionszeit des jeweiligen Analyten), bildet das Chromatogramm. Indem die Retentionszeiten der abgetrennten Substanzen mit denen von Referenzstandards verglichen werden, können die jeweiligen Substanzen identifiziert werden. Durch Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetz, kann die Konzentration des Analyten bestimmt werden (MORGAN & SMITH, 2010; SWARTZ, 2010). Mittlerweile werden außerdem häufig Diodenarraydetektoren eingesetzt, die die leistungstärksten UV/VIS-Detektoren darstellen. Aufgrund der vielen Einzeldetektoren können mehrere Wellenlängen parallel detektiert und so das gesamte Spektrum für jeden Peak aufgezeichnet werden (SWARTZ, 2010; SNYDER *et al.*, 2011).

3.4.2 LC-MS/MS

Die Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (engl.: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) ist ein analytisches Verfahren zur Trennung und qualitativen sowie quantitativen Bestimmung niedermolekularer Analyten in Stoffgemischen, wie z. B. Mykotoxinen, Arzneistoffen, Hormonen und Enzymen (LIM & LORD, 2002; LOTTSPREICH *et al.*, 2012; KUHN, 2013; EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2021). Die LC-MS/MS kann sowohl zur Untersuchung von Lebens- und Futtermittelproben, als auch in der klinisch-chemischen Diagnostik eingesetzt werden (KUHN *et al.*, 2006; XAVIER & SCUSSEL, 2008; GOTTSCHALK *et al.*, 2009; SULYOK *et al.*, 2010; KUHN, 2013). Die Flüssigkeitschromatographie dient hierbei der Auftrennung der in einer Probe enthalten Substanzen und die anschließende Massenspektrometrie der Identifikation und/oder Quantifizierung dieser Substanzen. Da das Prinzip der Flüssigkeitschromatographie bereits ausführlich unter Punkt 3.4.1 beschrieben wurde, wird im Folgenden lediglich auf die Massenspektrometrie eingegangen.

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, bei dem Verbindungen, die in Form von Ionen vorliegen, anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses getrennt und detektiert werden können. In der LC-MS/MS werden die Analyten zunächst chromatographisch aufgetrennt, die eigentliche Messung der Analyten erfolgt jedoch im nachgeschalteten Tandem-Massenspektrometer (MACLAFFERTY & TUREČEK, 1995; KUHN, 2013).

Ein Tandem-Massenspektrometer besteht aus zwei Massenanalytoren und einer dazwischen geschalteten Reaktionseinheit, der sogenannten Kollisionszelle (Abbildung 5) (MACLAFFERTY & TUREČEK, 1995; KUHN, 2013). Damit die qualitative und quantitative Analyse der einzelnen Analyten jedoch möglich ist, müssen diese zunächst ionisiert werden. In der Ionenquelle des Massenspektrometers werden die Moleküle meist mittels Elektrospray-Ionisation schonend unter Atmosphärendruck in die Gasphase überführt und anschließend ionisiert. Die dabei entstehenden Ionen sind meist positiv geladen (Kationen) (MACLAFFERTY & TUREČEK, 1995; KUHN, 2013). Anschließend werden die Molekül-Ionen im ersten Massenanalysator durch ein elektrisches Feld beschleunigt, sodass sie an vier parallel angeordneten Stabelektroden entlang fliegen. Mit Hilfe des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses wird das Molekül-Ion des zu messenden Analyten (Mutter-Ion) selektiert. Die meisten Ionen werden von ihrer Flugbahn abgelenkt, sodass alle Verunreinigungen entfernt werden können (LOTTSPREICH *et al.*, 2012; KUHN, 2013). Anschließend wird das selektierte Mutter-Ion in der Kollisionszelle fragmentiert. Dabei entstehen charakteristische Fragmente und Spaltprodukte, die sogenannten Produkt- oder Tochter-Ionen (LOTTSPREICH *et al.*, 2012). Diese werden im zweiten Massenanalysator nochmals selektiert, sodass nur Fragment-Ionen einer definierten Masse den Detektor des Massenspektrometers erreichen.

Die Übergänge von Mutter-Ion zu Tochter-Ionen sind sehr spezifisch, da die Fragmentierung nach einem eindeutigen Muster erfolgt (KUHN, 2013). Die Produkt-Ionen werden anschließend umgewandelt, sodass sie ein elektronisch messbares Signal erzeugen. Das Signal der Produkt-Ionen tritt hierbei zu einer charakteristischen Retentionszeit auf und wird in sogenannten Peaks zusammengefasst (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2021). Da die Moleküle zu Fragmenten zerfallen sind, entsteht ein Spektrum mit mehreren Peaks. Die Peakflächen im Chromatogramm stehen in einem spezifischen Verhältnis

zueinander und treten zur selben Retentionszeit auf. Meist verwendet man den empfindlichsten Übergang zur Quantifizierung des Analyten (Quantifier) und einen weiteren Übergang zur Bestätigung (Qualifier) der Messung (KUHN, 2013). Dadurch ist eine eindeutige Identifizierung der Substanz möglich. Bei bekannten Substanzen kann mit Hilfe eines Referenzstandards auch die Konzentration der Analyten bestimmt werden (MACLAFFERTY & TUREČEK, 1995; LOTTSPREICH *et al.*, 2012; KUHN, 2013).

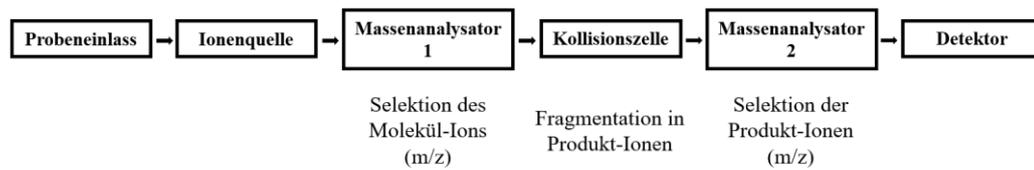


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Tandem-Massenspektrometers

III. PUBLIKATIONEN

1 Publikation Sekundärmetabolismus



toxins



Article

Production of Satratoxin G and H Is Tightly Linked to Sporulation in *Stachybotrys chartarum*

Katharina Tribelhorn ¹, Magdalena Twarużek ², Ewelina Soszczyńska ², Jörg Rau ³, Christiane Baschien ⁴, Reinhard K. Straubinger ¹, Frank Ebel ¹ and Sebastian Ulrich ^{1,*}

- ¹ Chair of Bacteriology and Mycology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Institute for Infectious Diseases and Zoonosis, LMU Munich, 80539 Munich, Germany; katharina.tribelhorn@micro.vetmed.uni-muenchen.de (K.T.); r.straubinger@lmu.de (R.K.S.); frank.ebel@micro.vetmed.uni-muenchen.de (F.E.)
 - ² Department of Physiology and Toxicology, Faculty of Biological Sciences, Kazimierz Wielki University, 85-064 Bydgoszcz, Poland; twarmag@ukw.edu.pl (M.T.); eweso@ukw.edu.pl (E.S.)
 - ³ Chemical and Veterinary Analysis Agency Stuttgart, 70736 Fellbach, Germany; joerg.rau@cvuas.bwl.de
 - ⁴ Leibniz-Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, 38124 Braunschweig, Germany; christiane.baschien@dsmz.de
- * Correspondence: s.ulrich@lmu.de; Tel.: +49-(0)89-2180-5899



Citation: Tribelhorn, K.; Twarużek, M.; Soszczyńska, E.; Rau, J.; Baschien, C.; Straubinger, R.K.; Ebel, F.; Ulrich, S. Production of Satratoxin G and H Is Tightly Linked to Sporulation in *Stachybotrys chartarum*. *Toxins* **2022**, *14*, 515. <https://doi.org/10.3390/toxins14080515>

Received: 10 July 2022

Accepted: 26 July 2022

Published: 28 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Stachybotrys chartarum* is a toxigenic fungus that is frequently isolated from damp building materials or improperly stored forage. Macrocytic trichothecenes and in particular satratoxins are the most potent mycotoxins known to be produced by this fungus. Exposure of humans or animals to these secondary metabolites can be associated with severe health problems. To assess the pathogenic potential of *S. chartarum* isolates, it is essential to cultivate them under conditions that reliably promote toxin production. Potato dextrose agar (PDA) was reported to be the optimal nutrition medium for satratoxin production. In this study, the growth of *S. chartarum* genotype S strains on PDA from two manufacturers led to divergent results, namely, well-grown and sporulating cultures with high satratoxin concentrations ($20.8 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus cultures with sparse sporulation and low satratoxin production ($0.3 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). This finding is important for any attempt to identify toxigenic *S. chartarum* isolates. Further experiments performed with the two media provided strong evidence for a link between satratoxin production and sporulation. A comparison of three-point and one-point cultures grown on the two types of PDA, furthermore, demonstrated an inter-colony communication that influences both sporulation and mycotoxin production of *S. chartarum* genotype S strains.

Keywords: *Stachybotrys chartarum* genotype S; sporulation; satratoxins; macrocytic trichothecenes; inter-colony communication

Key Contribution: Different potato dextrose media can have distinct effects on the mycotoxin production of *S. chartarum*. The amounts of satratoxins G and H directly correlated with the level of sporulation. Communication between neighboring *S. chartarum* colonies enhanced sporulation.

1. Introduction

Stachybotrys chartarum occurs ubiquitously in the environment and is frequently found on dead plants (e.g., straw), other cellulosic (e.g., culinary herbs), and building materials (e.g., gypsum and wallpaper) [1–3]. The species *S. chartarum* can be subdivided into two distinct chemotypes based on the production of either atranones (chemotype A) or macrocytic trichothecenes (MT; chemotype S) [4]. Alternatively, the three genotypes S, A, and H can be differentiated according to the presence or absence of genes that are presumed to encode relevant enzymes for the biosynthesis of these mycotoxins (*atr1-14* and *sat1-21*) [4–8]. *S. chartarum* genotype S strains harbor the three satratoxin gene clusters

SC1, SC2, and SC3 and have been implicated in several types of diseases [9–15]. In animals, stachybotryotoxicosis can occur after oral uptake of mycotoxins, especially in horses and less frequently in ruminants [16–18]. Humans, in particular infants, are primarily at risk after exposure to airborne toxins in water-damaged buildings [9,19]. Exposure to MT may cause pulmonary hemorrhage in infants or symptoms related to the sick building syndrome complex [9,20,21]. MT represents the most cell-toxic trichothecenes currently known and includes roridin E and L-2, verrucarins J, and satratoxins F, G, and H [22]. By binding irreversibly to the 60S ribosomal subunit, satratoxins inhibit protein biosynthesis and induce apoptosis in neuronal cell lines [23–26].

Despite the medical relevance of the MT of *S. chartarum*, little is known about the factors that influence their production and that are therefore of crucial importance for efficient diagnostics. Reliable protocols are needed to determine the ability of individual isolates to produce MT and thereby evaluate their hazard potential. Apart from cellulose-containing media, potato dextrose agar (PDA) was shown to be an excellent medium for MT production [27], but the nutritional factors that govern MT production have not been identified yet. Temperature and humidity have been shown to influence MT production, but the underlying mechanisms and regulatory genes are still unknown [6,28,29].

In other fungi, mycotoxin production and sporulation are often functionally linked. In *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp., both processes are regulated by similar G-protein signaling pathways [28,29]. These pathways commonly regulate fungal development, stress response, and the expression of virulence traits [30]. Sporulation can be influenced by many external factors, including molecules that are produced by other fungi, such as oxylipids or volatile organic components (VOC) [31,32]. For *S. chartarum*, all this is still uncharted territory, but research in this field is clearly necessary given the critical health hazard that especially satratoxins G, H, and F of all the above-mentioned MTs pose to humans and animals.

In this study, we have investigated the production of satratoxins G and H by three genotype S strains of *S. chartarum* on two commercially available PDA media; this resulted in two completely different phenotypes, one with high sporulation and strong satratoxin production and another almost without sporulation and satratoxin production. These data indicate that sporulation and satratoxin production are linked in *S. chartarum*. We, furthermore, observed that the presence of neighboring colonies of the same *S. chartarum* strain stimulated both sporulation and satratoxin production.

2. Results

The starting point of this study was the unexpected observation that the growth of *S. chartarum* genotype S strains on PDA of different manufacturers (VWR Chemicals and Sigma-Aldrich) resulted in colonies with surprisingly different phenotypic appearances (Figure 1). We compared both media using three *S. chartarum* strains that are known for their effective MT production [2,4,27]. These strains originate from three different habitats, namely building material (IBT 40293), animal feed (ATCC 34916), and food (DSM 114129). They were cultivated as three-point and one-point cultures on PDA with three technical replicates for 21 days in the dark with an a_w of 0.98 (each culture in triplicates $n = 36$ agar plates).

2.1. Colonies Formed under the Different Experimental Conditions

Although nominally identical, the two media differed in one component: VWR Chemicals (PDA-V) comprises potato peptone (4.0 g/L), whereas PDA-S from Sigma-Aldrich contains potato infusion (4.0 g/L). This difference is most likely responsible for the marked differences in growth and sporulation shown in Figure 1.

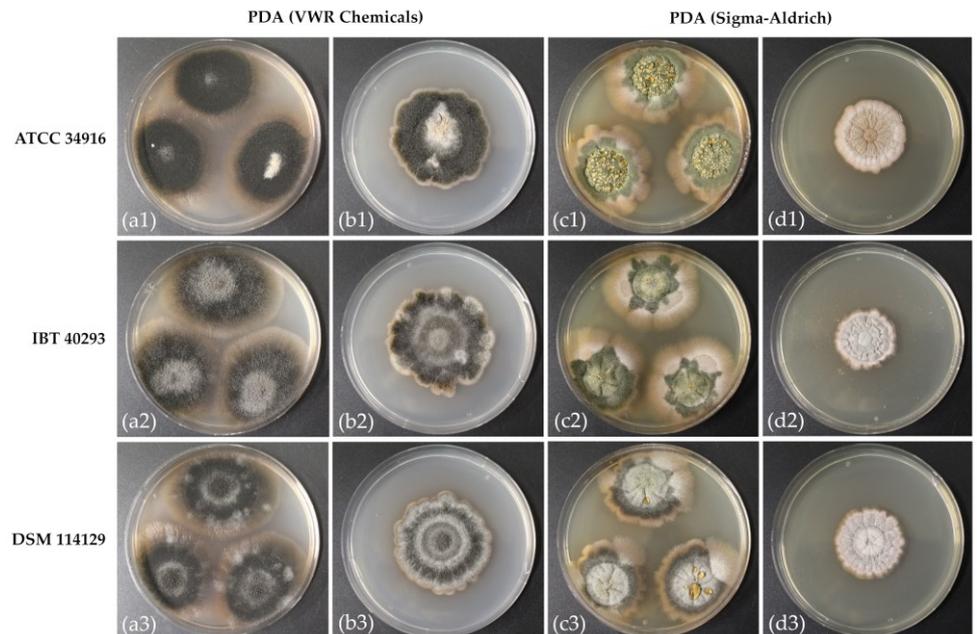


Figure 1. Colonies of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916 (a1–d1), IBT 40293 (a2–d2), and DSM 114129 (a3–d3) were grown as three-point and one-point cultures on PDA-VWR (a1–a3) and (b1–b3) and PDA-Sigma (c1–c3) and (d1–d3). The images are representative of three parallel cultures for each condition.

PDA was previously described as the optimum medium for mycotoxin production and sporulation of *S. chartarum* [1,27,33]. With respect to sporulation, this was true for PDA-V and three-point cultures, whereas PDA-S supported only limited sporulation (Figure 1). The difference was even more pronounced for one-point cultures: colonies on PDA-V sporulated although less well than those of the three-point cultures, whereas single colonies of all three strains showed a nearly complete lack of sporulation on PDA-S (Figure 1).

We next investigated whether sporulation and satratoxin production are linked in *S. chartarum*. We measured the colony size and determined the number of spores per cm^2 colony area. In addition, we cultured the strains also in potato dextrose broth (VWR Chemicals), since *Stachybotrys* spp. is known to produce no spores in broth culture [34].

The colony areas of the three- and the one-point cultures grown on PDA-V were significantly larger than those of the corresponding colonies on PDA-S. This demonstrates that PDA-V supports better growth than PDA-S (Table 1). Interestingly, the single colonies on PDA-V were larger than the corresponding colonies of the three-point cultures (average difference of 2.0 cm^2) most likely due to competition between the colonies (Table 1). Surprisingly, we observed an opposite effect on PDA-S: the colonies of the three-point cultures were 4.0 cm^2 larger than the colonies of the corresponding one-point culture (Table 1). A microscopic comparison of the mycelia of these colonies revealed a much denser hyphal network on PDA-V, regardless of the number of colonies present on the agar plate (Figure S1). To rule out that the observed differences between the two PDAs were due to batch differences, we tested a second batch for each medium and obtained very similar results as in the initial experiments (data not shown).

Table 1. Colony size and the amounts of satratoxin G and H measured for three-point and one-point cultures grown on PDA-V and PDA-S. For representative images of these corresponding cultures compare with Figure 1.

	Colony Area cm ²	SG	SH	SG + SH	SG	SH	SG + SH
		µg/Agar Plate			µg/cm ²		
ATCC 34916 PDA-V 3-point culture	51.5 ± 3.6	293.0 ± 6.2	488.4 ± 8.8	781.3 ± 14.9	5.7 ± 0.3	9.5 ± 0.5	15.2 ± 0.8
IBT 40293 PDA-V 3-point culture	48.7 ± 2.4	346.8 ± 11.6	579.0 ± 36.0	925.8 ± 47.6	7.1 ± 0.1	11.9 ± 0.2	19.0 ± 0.1
DSM 114129 PDA-V 3-point culture	46.4 ± 1.7	225.0 ± 6.9	438.4 ± 4.5	663.4 ± 5.9	4.9 ± 0.1	9.5 ± 0.5	14.3 ± 0.5
ATCC 34916 PDA-S 3-point culture	35.9 ± 1.1	38.5 ± 6.7	65.2 ± 2.2	103.7 ± 4.9	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1
IBT 40293 PDA-S 3-point culture	38.3 ± 3.8	53.2 ± 1.1	111.6 ± 33.8	164.8 ± 34.8	1.4 ± 0.1	2.9 ± 0.7	4.2 ± 0.5
DSM 114129 PDA-S 3-point culture	33.7 ± 2.3	37.8 ± 5.9	80.4 ± 11.5	118.3 ± 15.8	1.1 ± 0.1	2.4 ± 0.3	3.5 ± 0.4
ATCC 34916 PDA-V 1-point culture	17.3 ± 0.4	137.2 ± 2.2	223.2 ± 1.3	360.4 ± 1.9	7.9 ± 0.1	12.9 ± 0.3	20.8 ± 0.4
IBT 40293 PDA-V 1-point culture	20.8 ± 0.8	132.7 ± 20.1	215.9 ± 16.5	348.6 ± 36.3	6.4 ± 0.8	10.4 ± 0.4	16.7 ± 1.2
DSM 114129 PDA-V 1-point culture	16.9 ± 0.4	71.2 ± 8.4	118.1 ± 4.5	189.3 ± 10.2	4.2 ± 0.4	7.0 ± 0.3	11.2 ± 0.3
ATCC 34916 PDA-S 1-point culture	9.3 ± 0.0	2.6 ± 1.1 *	n.d.	2.6 ± 1.1	0.3 ± 0.1	n.d.	0.3 ± 0.1
IBT 40293 PDA-S 1-point culture	6.7 ± 0.3	12.2 ± 1.1	14.5 ± 4.5	26.7 ± 4.4	1.8 ± 0.2	2.2 ± 0.6	4.0 ± 0.4
DSM 114129 PDA-S 1-point culture	8.8 ± 0.3	12.2 ± 1.1 *	n.d.	12.2 ± 1.1	1.4 ± 0.1	n.d.	1.4 ± 0.1

SG: satratoxin G, SH: satratoxin H; n.d.: not detectable or rather under the limit of detection (LOD, signal-to-noise ratio (S/N) ≥ 3, LOD for SG: 1.9 µg/agar plate, for SH: 10.0 µg/agar plate); * above the LOD but below the limit of quantification (LOQ, signal-to-noise ratio (S/N) ≥ 10).

Apart from their size, the colonies also clearly differed in their level of sporulation. We, therefore, isolated the spores, counted them, and calculated the number of conidia per plate (Figure 2) and per cm² colony area (Figure S2).

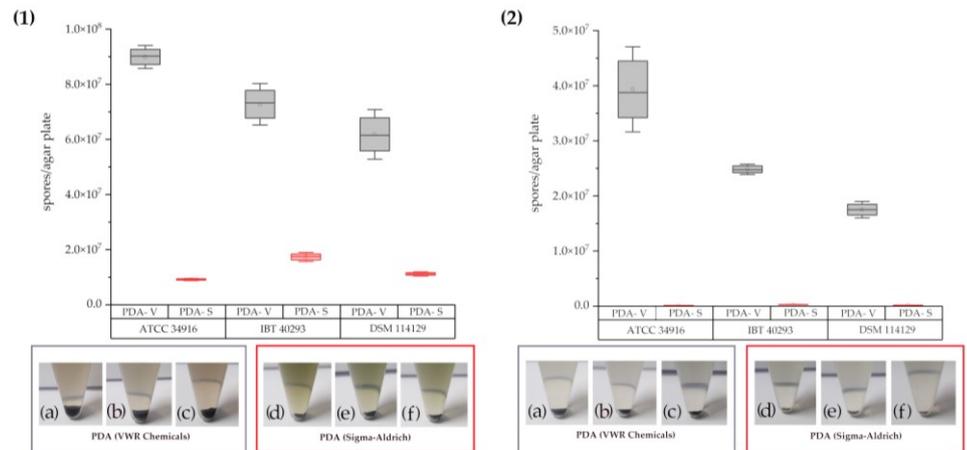


Figure 2. The spore count and images of conidial pellets of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916 (1(a)/1(d) and 2(a)/2(d)), IBT 40293 (1(b)/1(e) and 2(b)/2(e)), and DSM 114129 (1(c)/1(f) and 2(c)/2(f)) obtained after growth on PDA-V (gray box plots) and PDA-S (red box plots). (1): three-point cultures, (2): one-point cultures. The spores were isolated from the cultures shown in Figure 1.

Not surprisingly, we found more spores per plate for three-point than for one-point cultures regardless of the PDA used. However, the picture becomes more complicated if the data are presented as spores per cm^2 colony area. For two strains, IBT 40293 and DSM 114129, the colonies of the one-point cultures formed 20% and 18% fewer spores per cm^2 , respectively, than the colonies of the three-point cultures. However, strain ATCC 34916 behaved differently and produced about 30% more spores per cm^2 in the one-point culture than in the three-point culture. These findings align well with the colony images shown in Figure 1.

All strains produced fewer spores on PDA-S than on PDA-V (Figure 1, Table S2). The PDA-S cultures generated consistently more spores per cm^2 in the three-point cultures than in the one-point cultures. As shown in Figure S2, one-point cultures on PDA-S produced 92.5% fewer spores per cm^2 than the corresponding three-point cultures and were, in fact, more or less devoid of spores. Figure 2 shows the pellets of the harvested conidia from the different plates. The spores formed a black pellet, and the size of these pellets correlates well to the number of spores obtained by counting. Since the number of colonies per plate was the only parameter that differed between the three- and the one-point cultures, our data demonstrate that the level of sporulation is not only determined by the medium but also by interactions between different colonies present on the same plate.

We also observed that three-point cultures on PDA-S produced a green pigment, whereas no such pigment was detectable for colonies on PDA-V. After centrifugation of the spores, the supernatant of the one-point cultures was almost clear, whereas brownish (Figures 1a–c and 2) and greenish (Figures 1d–f and 2) solutions were obtained from the three-point cultures.

We also cultured the three strains in broth, a condition that is known to prevent sporulation [34] probably due to the lack of contact with the air [35]. We used potato dextrose broth of VWR Chemicals that, as a solid medium (PDA-V), promoted particularly strong sporulation. Figure 3 shows the well-grown mycelial balls that were obtained after 21 days in broth culture that lacked any detectable sporulation (Table 2).

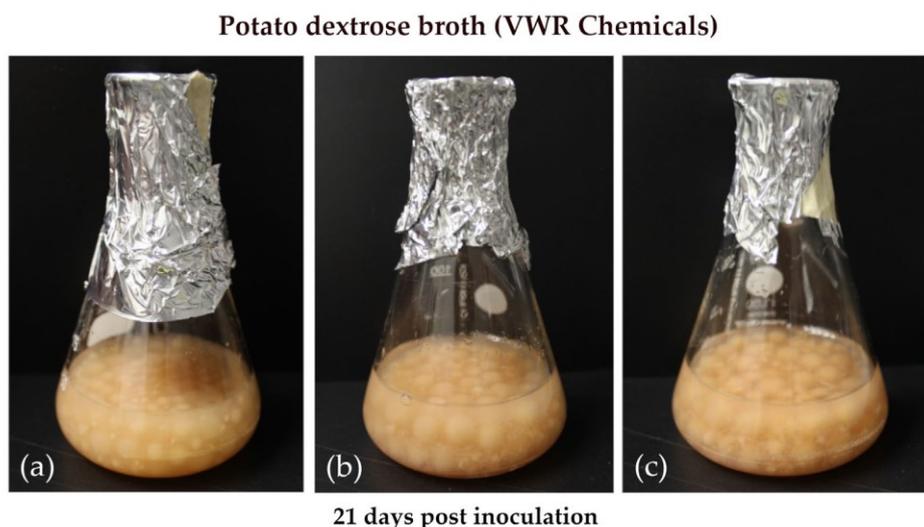


Figure 3. Cultures of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916 (a), IBT 40293 (b), and DSM 114129 (c) grown in potato dextrose broth.

Table 2. Results obtained for *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129 grown in potato dextrose broth (VWR Chemicals, Darmstadt, Germany).

	Mycelium (Wet Weight)	SG	SH	Spore Count
	mg	µg/Flask		Spores/Flask
ATCC 34916	1203.3 ± 50.3	n.d.	n.d.	n.d.
IBT 40293	1070.0 ± 60.8	n.d.	n.d.	n.d.
DSM 114129	1500.0 ± 52.9	n.d.	n.d.	n.d.

SG: satratoxin G, SH: satratoxin H; n.d.: not detectable or rather under the limit of detection (LOD, signal-to-noise ratio (S/N) ≥ 3 , LOD for SG: 1.9 µg/agar plate, for SH: 10.0 µg/agar plate) for the mycotoxins.

2.2. ATR-IR Measurements

As mentioned above, we have observed halos of different colors in the vicinity of the colonies, but the spore pellets had a similar, black appearance. To further characterize this, we extracted melanin from plugs excised from 21-day-old colonies and recorded infrared spectra (Figure S3 and Table S1). Regardless of the combination of *S. chartarum* isolate and medium, basic bands were observed in all preparations: a strong band at 3300–3260 cm^{-1} corresponding to the primary amine ($-\text{NH}_2$) or associated $-\text{OH}$, the prominent bands at 2920 and 2851 cm^{-1} representing $-\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2$ groups, as expected for organic substances. The band at 1710 cm^{-1} corresponds to an aliphatic ketone ($-\text{C}=\text{O}$), and the broader band at 1680 cm^{-1} to 1620 cm^{-1} indicates $\text{C}=\text{C}$ double bonds. The spectra were very similar to previously described spectra for melanin produced by other filamentous fungi [36,37].

2.3. Mycotoxin Cytotoxicity Assessed with an MTT Assay

To examine whether the degree of sporulation is related to cytotoxicity, we tested the extracts from the different agar plates and broth cultures using a swine-kidney cell MTT-test as an unselective cytotoxicity assay. The extracts of the well-sporulated PDA-V three-point cultures were the most cytotoxic samples, independent of the strain tested (Table 3). The extracts of the PDA-V one-point cultures were all less toxic than the extracts of the corresponding three-point cultures. Hence, the plates with three colonies contained more spores and more toxins than those with a solitary colony, which suggests a link between mycotoxin production and sporulation.

Table 3. Mycotoxin cytotoxicity assessed with an MTT assay of the extracts obtained from the different cultures on agar plates and broth culture.

Isolate	Culture Medium	Culture Type	Dilution Steps *
IBT 40293	PDA-V	three-point culture	17
		one-point culture	15
	PDA-S	three-point culture	13
		one-point culture	11
	Potato dextrose broth **	fluid	5
ATCC 34916	PDA-V	three-point culture	17
		one-point culture	14
	PDA-S	three-point culture	14
		one-point culture	7
	Potato dextrose broth **	fluid	6
DSM 114129	PDA-V	three-point culture	17
		one-point culture	15
	PDA-S	three-point culture	12
		one-point culture	8
	Potato dextrose broth **	fluid	6

* Dilution steps (2-fold serial dilution method) until the absorbance values decreased below 50% of the controls; PDA-V: potato dextrose agar of VWR Chemicals; PDA-S: potato dextrose agar of Sigma-Aldrich; ** potato dextrose broth of VWR Chemicals.

Another apparent trend is that the cytotoxicity values of PDA-V cultures were always higher than those of the corresponding PDA-S cultures. The cytotoxicity of PDA-S three-point cultures was even lower than those of the PDA-V one-point cultures, which correlates with the number of spores for IBT 40293 and DSM 114129 (Table S2). The one-point culture of IBT 40293 on PDA-S was more cytotoxic than the other one-point cultures on PDA-S that in turn were only slightly more toxic than those of the broth cultures.

2.4. Measurement of Satratoxin G and H Content by HPLC

Since satratoxins are the most cytotoxic metabolites formed by *S. chartarum*, we focused on the two most relevant satratoxins, G and H (SG and SH, respectively), and quantified them by HPLC. The chemical structures of satratoxins G and H are shown in Figure S4.

If the amounts of SG and SH are combined (SG + SH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)), all strains produced clearly more satratoxins on PDA-V than on PDA-S (Figure 4; gray box plots (PDA-V) vs. red box plots (PDA-S)), irrespective of whether they were grown as three-point or one-point cultures. Strikingly, the one-point cultures on PDA-V ($299.4 \pm 95.6 \mu\text{g}/\text{agar plate}$) produced approximately 2.5 times more SG + SH ($\mu\text{g}/\text{agar plate}$) than the three-point cultures on PDA-S ($128.9 \pm 31.9 \mu\text{g}/\text{agar plate}$), although the three-point cultures had a colony area that was two times larger (one-point cultures: $18.3 \pm 2.1 \text{ cm}^2$; three-point cultures: $36.0 \pm 2.3 \text{ cm}^2$ (compare Table 1)). The measured concentrations of satratoxins correlate well with the respective spore counts (Figure 2). Hence, we observed the following clear order for the amounts of satratoxins normalized to the colony area: (three-point cultures on PDA-V) > (one-point cultures on PDA-V) > (three-point cultures on PDA-S) > (one-point cultures on PDA-S) > (broth culture in PD-V medium).

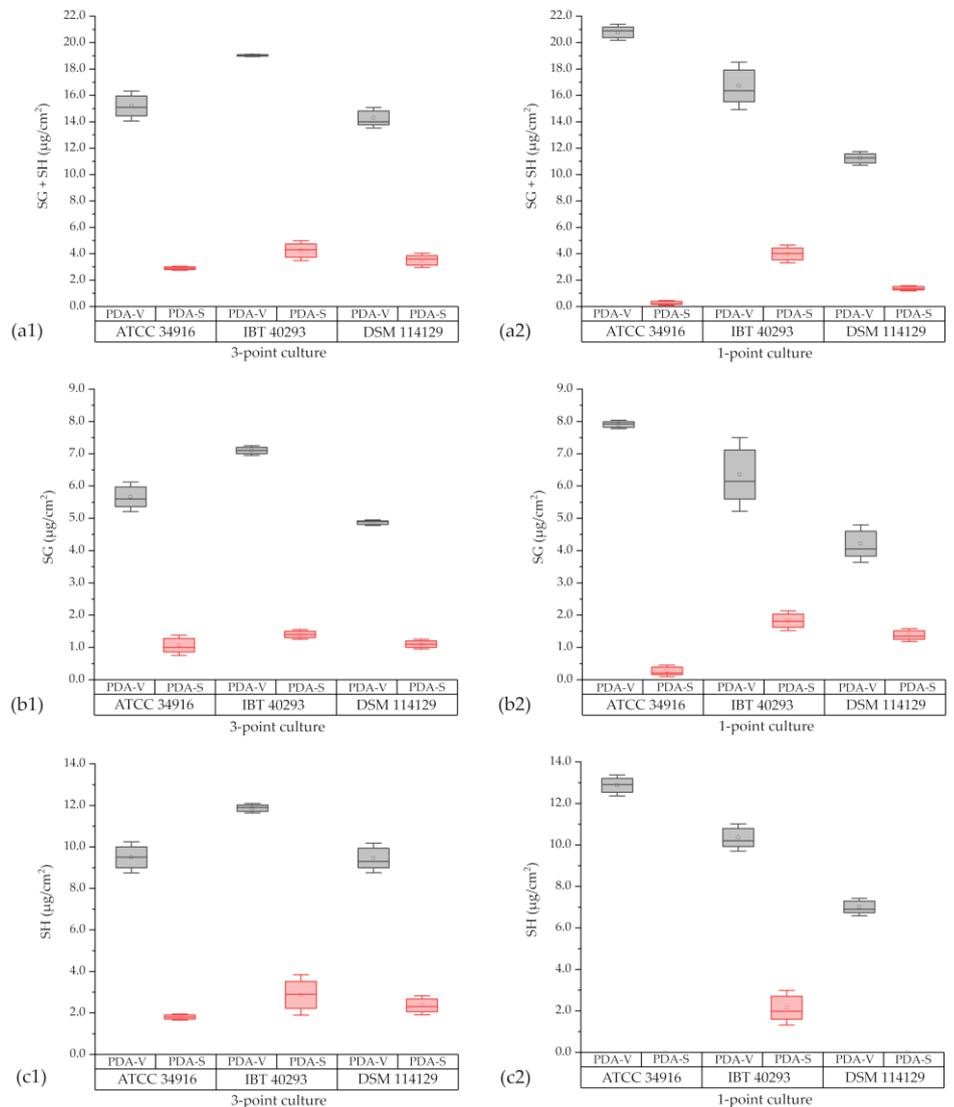


Figure 4. Concentrations of satratoxin G and H measured for cultures of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129 grown on either PDA-V (gray box plots) or PDA-S (red box plots). The concentrations are normalized to the area of the respective colonies ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (a1/a2): accumulated satratoxin G and H in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; (b1/b2): satratoxin G in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and (c1/c2): satratoxin H in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

In accordance with data from previous studies [27,38,39], the detected concentrations for SH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) were generally higher than for SG ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Figure 4). The only exceptions were the one-point cultures of ATCC 34916 and DSM 114129 on PDA-S. In these cases, SG was detected and SH was not detectable. However, a reliable interpretation of these data is difficult since the detected values for SG are in a very low range, above the LOD (signal-to-noise ratio (S/N) ≥ 3) but below the LOQ (S/N ≥ 10).

A comparison of the concentrations of the detected satratoxins ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and the number of spores (spores/ cm^2) of the different one-point and three-point cultures shows that reduced sporulation correlates with a reduced satratoxin production and increased sporulation correlates with a higher satratoxin concentration. This direct relation between sporulation and satratoxin production is evident from the data presented in Figure 5. We assessed the correlation between the spore count (spores/ cm^2) and the measured

concentration of SG + SH ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for all strains using the Pearson correlation coefficient. The calculated coefficient for this relationship for all three strains is $r \hat{=} 0.95$, which indicates a direct correlation.

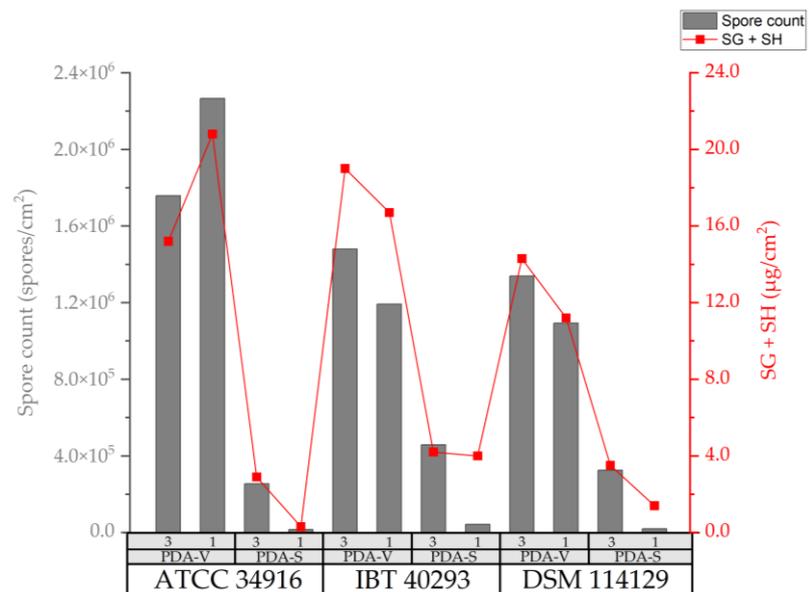


Figure 5. Detected satratoxin concentrations in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (red line) of *S. chartarum* genotype S strains (ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129) on PDA-V and PDA-S three-point cultures (3) and one-point cultures (1) plotted against the respective spore count in spores/cm² (gray columns).

2.5. Evidence for a Communication between *S. chartarum* Colonies

The results presented above indicate that nutrition media have a significant impact on the sporulation and toxin production of *S. chartarum* but that other factors are also clearly relevant, e.g., the presence of colonies per plate. To gain more information on the communication between colonies, we analyzed whether the relevant signals are exchanged through the air. On this behalf, we separated two colonies of the same strain by a parting wall to restrict communication with volatile substances. The results obtained with strain ATCC 34916 are shown in Figure 6. We found that separated colonies (b) showed only a reduced level of sporulation and thereby resembled an isolated colony (a). The separated colonies showed a clearly reduced sporulation level compared to colonies grown on the same agar (c). These results suggest that the sporulation of neighboring colonies is stimulated either by direct physical contact or by secreted components that are exchanged through the agar.

Stachybotrys chartarum - ATCC 34916

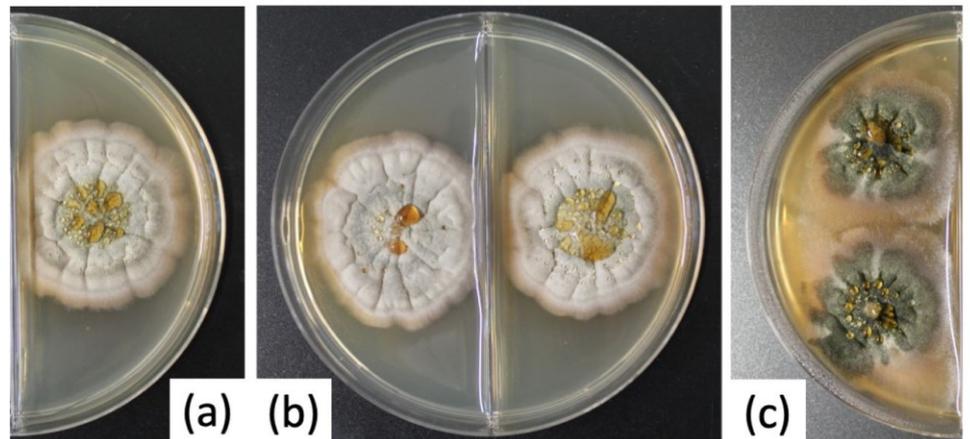


Figure 6. Colonies of the *S. chartarum* genotype S strain ATCC 34916 were grown as one-point culture (a) or as a two-point culture that were either neighboring (c) or separated by a parting wall (b). The cultures were grown on PDA-S.

3. Discussion

Secondary metabolites are small molecules produced by microorganisms that are not essential for their growth but supposed to play a role in their internal economy [40]. Mycotoxins are typical secondary metabolites; their production may change depending on different external and internal conditions, such as the availability of nutrients and water [41,42]. For a better understanding of mycotoxins and their biological significance, it is necessary to analyze the mechanisms that trigger or prevent their production. External factors such as temperature and humidity are already known to influence satratoxin production [41,43], but surprisingly little is known about other factors, such as light, pH, and nutrients. This prompted us to launch the current study in order to obtain first insights into the satratoxin production of *S. chartarum*.

The starting point was the finding that two PDA media of different manufacturers led to totally different growth patterns. On PDA-V, the colonies sporulated well and had a black appearance, whereas, on PDA-S, the sporulation of the colonies was sparse.

The only evident difference in composition between the two media used in this study is that PDA-V contains potato peptone as its main component, whereas PDA-S includes potato infusion instead. Both potato peptone and potato infusion are complex mixtures and their ingredients and concentrations are largely unknown. According to Beever and Bollard [44], potato infusion is derived from an aqueous extract of potato tubers. The infusion was described as a suitable source of nitrogen and mineral salts and consequently a good growth factor [44]. Potato peptone is an often-used alternative. With regard to its ingredients, it is better but not well defined. Potato peptone is obtained by hydrolyzation of potato protein. It contains peptides and free amino acids that can serve as a suitable nitrogen source for growth. Nitrogen-rich small molecules are most likely more accessible in potato peptone than in potato infusion. The better growth and sporulation of *S. chartarum* on PDA-V may therefore reflect a better supply of nitrogen in this medium. An influence of nitrogen on the growth and satratoxin production of *S. chartarum* was already suggested by previous data [27,45].

For *Alternaria alternata*, the production of alternariol and other secondary metabolites also depends on the presence of nitrogen and the respective type of nitrogen source [46]. Nitrogen starvation, in turn, was described to induce the production of ochratoxin A in *Aspergillus* spp. and fumonisin in *Fusarium proliferatum*, whereas high amounts of nitrogen

impede fumonisin production [47–49]. Hence nitrogen has a different impact depending on its concentration, the fungus, and the mycotoxin.

Cultures on PDA-V produced more spores and more satratoxins G and H compared to cultures on PDA-S. The detected satratoxin concentration per cm² of colony area was positively correlated with the number of spores per cm². To provide additional proof for this correlation, we grew the strains in PD broth culture. No sporulation was detectable under this condition. This lack of sporulation has been observed for many fungi. A possible reason that sporulation requires direct contact with the air is that this contact is necessary for an efficient distribution of the conidia.

Both the HPLC data and the cytotoxicity assay results indicate that the satratoxin production in broth was hardly detectable, if not completely absent. Thus, although *S. chartarum* grew well in broth culture, it produced no or only very low amounts of satratoxins. This provides further evidence that sporulation and mycotoxin production are tightly linked in *S. chartarum*. Similar results were previously obtained with *Aspergillus* spp. and their secondary metabolites [30,50,51]. Some mycotoxins of several fungi are known to be associated with sporulation and are secreted by growing colonies [51]. A link between secondary metabolism and sporulation is, therefore, a common feature in many filamentous fungi [30], and both processes may share common regulatory elements [50].

In *Aspergillus* spp., mycotoxin production is regulated by a G-protein signaling pathway [50,52] and similar data were obtained for *Fusarium* species [52]. Intensive genetic research has revealed the signaling circuitry that connects sterigmatocystin-afatoxin production and sporulation in *A. nidulans*. Both are regulated by two genes, *fluG* and *flbA*, and a loss of function of *fluG* abrogates sporulation and sterigmatocystin production [50]. Whether the same is true for *S. chartarum* is an open question and the lack of genetic tools currently hampers any progress in this field. To date, genetic research on *S. chartarum* largely relies on the analysis of available genomic information, e.g., a comparison of the core trichothecene gene cluster revealed similarities between *Fusarium* and *Stachybotrys* [53]. Since *Fusarium* spp. and *Stachybotrys* spp. produce similar mycotoxin classes, e.g., trichothecenes [25], it is possible that satratoxin production and sporulation may in both species be linked via a G-protein signaling pathway.

In line with previous publications, *S. chartarum* showed a trend to produce more satratoxin H than satratoxin G. The reason for this is unknown, but the pattern was stable and detected using different nutrition media [27,38] or other substrates, such as building materials [39].

A remarkable feature of colonies of *S. chartarum* grown on PDA-S is their green halo. This green halo was also described by Samson and Houbraken [33] using PDA from Difco (BD, Fisher Scientific GmbH) to be a key for discrimination of *S. chartarum* and *S. chlorohalonata*. Our data demonstrate that the appearance of a green halo can also occur with *S. chartarum* and is a phenomenon that depends on the type of PDA used (Figures 1 and 2). This result emphasizes that for studies aimed to distinguish *S. chlorohalonata* and *S. chartarum*, the PDA type is a critical element.

Our ATR-IR data indicate that *S. chartarum* conidia contain a melanin that was similar in the different spore preparations obtained in this study. This is the first report on the melanin of *S. chartarum*. The black pigment was noted in previous studies, e.g., as a mean that suppresses the ionization during MALDI-TOF MS measurements [34,54], but it was only presumed to be a melanin. The spectra detected in this study are very similar to previously described melanin spectra of other fungi [36,37]. It is, therefore, reasonable to assume that *S. chartarum* produces a typical fungal melanin.

Apart from the correlation between sporulation and satratoxin production, we observed another factor that influences the production of satratoxins. A comparison of one- and three-point cultures revealed that interactions between colonies provide a positive trigger for sporulation and satratoxin production. This is a strong indication that neighboring colonies of the same strain communicate with each other. Such interactions often involve volatile compounds, but our experiments largely exclude this possibility. Our data

rather suggest that the communication involves molecules that are secreted into the agar or occur by direct physical contact. The fact that these interactions result in an enhanced mycotoxin production suggests a rather antagonistic character. The colonies seem to be able to perceive a potential competitor for the available resources and respond with the production of satratoxins. These mycotoxins are unlikely to harm another genotype S strain, as in our experimental setting, but they may be able to hamper the growth of other fungi as previously suggested [55]. If these antagonistic responses are indeed triggered by competition for the same resources, the question arises of how hyphae differentiate between hyphae that belong to the same colony and those that belong to a different and rivaling colony. Further experiments are clearly required to investigate these fascinating processes in more detail.

Satratoxin production and sporulation seem to be controlled by a combination of different signals. In general, the effect of the culture medium on sporulation and toxin production was stronger than the impact of inoculation as a three- versus a one-point culture. Other factors, like temperature and humidity, are also involved and contribute to the complicated pattern that determines the production of satratoxins.

Although a previous study showed that spores contain higher concentrations of satratoxin G than mycelia [56], our study is the first to demonstrate a positive correlation between sporulation and satratoxin production for *S. chartarum*. This finding has a direct, practical impact on the diagnostics of indoor mycological samples. If mold contamination is detected or presumed, samples are initially screened for spores and mycelia. A positive result is then followed by an identification of the fungal isolate. For subsequent analytic assays for satratoxin detection, our data strongly recommend using PDA-V or another validated PD medium.

4. Conclusions

Culturing *S. chartarum* genotype S on two PDAs from two different manufacturers resulted in different growth patterns, levels of sporulation, and satratoxin production. This has to be considered in future experiments and diagnostic procedures. We provide evidence for a positive correlation between sporulation and satratoxin production. Reduced sporulation correlates with reduced cytotoxicity due to low satratoxin production and vice versa. Due to a lack of genetic tools, this correlation cannot be studied based on the available genetic information but requires other genetic manipulations. The development of such tools is a primary task for the future. Sporulation and satratoxin production are dependent on the nutrition medium and are also influenced by the presence of other cultures on the agar. The enhanced sporulation in the presence of neighboring colonies requires communication and the corresponding signals are apparently exchanged via the aqueous phase and not by volatile compounds. The mechanisms and molecules that are engaged in this interaction are currently unknown and will be the subject of future studies.

5. Materials and Methods

5.1. Fungal Strains and Culture Conditions

This study analyzed three well-characterized and highly effective satratoxin-producing strains of *S. chartarum* genotype S. They comprise two reference strains (ATCC 34916, IBT 40293) and one field strain (DSM 114129). *S. chartarum* ATCC 34916 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), and *S. chartarum* IBT 40293 was kindly provided by the BioCentrum of the Technical University of Denmark (DTU, Lyngby, Denmark), and *S. chartarum* DSM 114,129 was provided by the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany).

The fungal strains were long-term preserved in sterile 80% glycerol and maintained at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Working cultures were grown as three-point cultures on potato dextrose agar (VWR Chemicals, Darmstadt, Germany) for 21 days at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, a_w 0.98 in the dark.

Although the cultures were checked microscopically for their identity, five single spore isolates per strain ($\hat{=}$ five biological replicates) were prepared to ensure that the used strains were pure and to confirm that they were genotype S strains. For this purpose, fungal material from the working cultures was used, and the spores were separated on SNA (Synthetischer Nährstoffarmer Agar; consisting of 0.2 g/L glucose, 0.2 g/L sucrose, 1.0 g/L potassium dihydrogen phosphate, 1.0 g/L potassium nitrate, 0.25 g/L magnesium sulfate anhydrous, 0.5 g/L potassium chloride, 14.0 g/L agar; recipe according to Nirenberg [57]) by spreading them out using an inoculating loop. The SNA plates were incubated for 24 h at 25 °C, a_w 0.98 in the dark, until the spores germinated. Then, the germinated spores were localized microscopically, removed using a pipette tip, transferred individually on PDA-V, and grown for 10 d at 25 °C, a_w 0.98 in the dark. The genotype of the single spore isolates was confirmed as *S. chartarum* genotype S using the triplex PCR published previously [5]. Afterward, a spore solution derived from every single spore isolate was generated. The spore solutions of one strain were pooled for each strain into one culture and grown for seven days at 25 °C, a_w 0.98 in the dark in a cell culture flask. The spore suspensions for each strain were prepared from these cultures by adding 10 mL H₂O + Tween20 0.01% and 5 glass beads (5 mm, A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Germany). The cell culture flasks were shaken vigorously, and the washing solution, including spores, was transferred to a 15 mL flask. Spores were counted using a Neubauer counting chamber, and spore suspensions were diluted to 10⁷ spores/mL.

Subsequently, 10 μ L spore suspension was applied by three-point or one-point inoculation on the respective medium, and the cultures were grown for 21 days at 25 °C, a_w 0.98 in the dark. The colony areas (cm²) were determined for three colonies of three independent agar plates (technical replicates) and the average values were calculated.

The nutrition media used for the three-point and one-point cultures were potato dextrose agar from VWR Chemicals, consisting of 4.0 g/L potato peptone, 20.0 g/L glucose, and 15.0 g/L agar (according to the manufacturer's ingredient list), and potato dextrose agar from Sigma-Aldrich consisting of 4.0 g/L potato infusion, 20.0 g/L glucose, and 15.0 g/L agar (according to the manufacturer's ingredient list) (St. Louis, MI, USA). For obvious reasons, harvesting of spores and toxin extraction could not be done from the same agar plate. Thus, we used a second set of plates for the toxin extraction. The data for both agar plate sets are shown in Table S2. Both groups were comparable, and no significant differences were observed between these two plate sets. For the second set of plates, we used a different batch of the media to rule out batch differences.

Liquid cultures were grown in Erlenmeyer flasks by adding 50 mL potato dextrose broth (VWR Chemicals) inoculated with 20 μ L of the spore suspension of 10⁷ conidia/mL. Then, the cultures were grown for 21 days in the flask on a laboratory shaker (180 rpm) (LAUDA, GFL Technology, Lauda-Königshofen, Germany). The wet weight was determined during the extraction process.

All media were adjusted to pH 5.6 and sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min before use.

5.2. Sample Preparation for Cytotoxicity Assessment and Mycotoxin Analysis

For toxin extraction and purification, each strain was cultured on PDA-V, PDA-S, and in potato dextrose broth, each in triplicate, as described above. Cultures were stored at -20 °C until extraction. For toxin extraction, the content of a whole plate was transferred to a mixing bag (Stomacher[®] 80 Biomaster Bags, BA6040/STR/DBL strainer double bags, Seward Limited, Worthing, UK). Then, 50 mL ACN/H₂O (84/16, v/v) were added (acetonitrile >99.9% and water, HiPerSolv CHROMANORM[®] for HPLC, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), and bags were treated for 5 min in a bag mixer (Stomacher[®] 80 micro Biomaster, Seward Limited, Worthing, UK). Subsequently, sample extracts were filtered through a paper filter (Whatman[™], 595 $\frac{1}{2}$, 185 mm in diameter, Maidstone, UK). The wet weight of liquid cultures was determined after the mycelium had been collected from the filter. For cytotoxicity testing, 10 mL of the filtered extracts were evaporated to

dryness under a gentle flow of nitrogen at 30 °C (puriVap-6TM, Interchim[®], Montluçon, France). The samples were then sent from the LMU (Munich, Germany) to the Kazimierz Wielki University (Bydgoszcz, Poland) for testing of the cytotoxicity using a bioassay.

For HPLC measurements, we modified an extraction method described by Hinkley and Jarvis [38]. For this purpose, 15 mL of filtered extracts were mixed with 15 mL hexane (HiPerSolv CHROMANORM[®] for HPLC, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) and mixed on a laboratory shaker (5 min, 400 rpm) (LAUDA, GFL Technology, Lauda-Königshofen, Germany). Afterward, the extract-hexane mixtures were transferred to separatory funnels (Lenz Laborglas GmbH & Co. KG, Wertheim, Germany) and allowed to stand until three phases (hexane, oily, and extract layer) had completely separated from each other (~30 min). The hexane wash removes oily compounds and improves the purity of the toxin extracts. Then, 10 mL of the toxin extracts (lowest layer) were transferred into reaction tubes and evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at 30 °C (puriVap-6TM, Interchim[®], Montluçon, France). The dry extracts were dissolved in 10 mL H₂O by shaking them on a laboratory shaker (5 min, 400 rpm) followed by ultrasonication (30 min) (Ultrasonic Cleaner USC-T, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany). The aqueous toxin extracts were purified using SPE cartridges (StrataTM-X 33 µm Polymeric Reversed-Phase 500 mg/6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) as follows: 1. conditioning: 5 mL methanol (ROTIPURAN[®] >99.9%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany), 2. equilibration: 5 mL H₂O (HiPerSolv CHROMANORM[®] for HPLC, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), 3. loading: 10 mL aqueous extract, 4. washing: 10 mL methanol/H₂O (30/70, v/v), 5. elution: 10 mL dichloromethane (LiChrosolv[®] for liquid chromatography, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The fractions eluted with dichloromethane were evaporated to dryness and dissolved in 1 mL methanol by shaking them on a laboratory shaker (5 min, 400 rpm) with subsequent ultrasonication (30 min). As a final step, the toxin extracts were filtered through a PVDF (polyvinylidene difluoride) syringe filter (0.20 µm, Ø 13 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) and transferred to a 1.5-mL glass thread vial with a cap (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany).

5.3. Sample Preparation for Determination of Spore Count

For spore count determination, three agar plates per strain and nutrition medium (PDA-V or PDA-S) were grown as three-point and one-point cultures ($n = 36$), as described above. Subsequently, 10 mL H₂O + Tween26 0.01% and 15 glass beads (5 mm, A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Germany) were added to each Petri dish. The plates were sealed well with a strip of Parafilm M[®] (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA) and then shaken (5 min, 350 rpm) on a laboratory shaker (LAUDA, GFL Technology, Lauda-Königshofen, Germany). The washing solution, including spores, was transferred to a 15 mL flask, and the spores were counted using a Neubauer counting chamber.

5.4. Melanin Extraction and ATR-Infrared Spectroscopy

For melanin extraction, ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129 were grown on PDA-V and PDA-S for 21 days at 25 °C, a_w 0.98 in the dark. A slightly modified extraction method developed by Gadd was used [58]. Melanin extracts were prepared by cutting a 10 mm diameter plug from 21-day-old colonies and boiling them in 5 mL distilled water for 10 min. The extracts were centrifuged ($5000 \times g$, 5 min), washed with 5 mL distilled water, and centrifuged again ($10,000 \times g$, 5 min). The supernatant was discarded, 3 mL 1 M NaOH (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) was added, and the samples were autoclaved (20 min, 121 °C). To precipitate the melanin, the alkaline extract was acidified with concentrated HCl (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) to pH 2. After centrifugation ($12,000 \times g$, 10 min), the precipitate was washed three times with distilled water and dried under a vacuum at 60 °C (Eppendorf 5301 Concentrator, Hamburg, Germany). The obtained pellets were sent to CVUA Stuttgart (Germany) for attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-IR) measurements. The samples were placed on

the ATR sample zone (base plate diamond) of a Spectrum Two FT-IR Spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Every sample was measured four times in attenuated total reflection mode from 600 to 4000 cm^{-1} with the coupled software (NIOS2). After export, raw data were displayed in Microsoft Excel to obtain the IR spectra (Figure S3).

5.5. Cytotoxicity Assessment

Cytotoxicity was measured by the researchers of the Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland, by using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium salt) test. Cells that were not damaged by a mycotoxin can convert a yellow tetrazolium salt, MTT, to a violet, water-insoluble formazan. The reaction takes place in the mitochondria of living cells. The intensity of the color reaction is proportional to the number of intact and metabolically active cells and can be measured photometrically.

The study was performed using a swine-kidney (SK) cell line. The cells were cultured in MEM (Minimum Essential Medium Eagle; Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) supplemented with an antibiotic solution (stock solution: 10,000 units of penicillin and 10 mg of streptomycin per mL in 0.9% NaCl (Sigma-Aldrich)), and 5% fetal calf serum (Sigma-Aldrich) in a CO_2 -incubator (CB, BINDER GmbH, Tuttlingen, Germany) (5% CO_2 , 37 °C, 98% humidity). Cells were detached from the bottom of the culture vessel using 0.25% (*w/v*) trypsin in 0.53 mM EDTA solution and suspended in the culture medium. Their number was determined using a cell counter (Scepter™ 2.0 Cell Counter, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Subsequently, 2.0×10^4 cells were seeded per well of a 96-well microtiter plate.

Evaporated toxin extracts were dissolved in 1 mL of a mixture of ethanol/dimethyl sulfoxide/MEM (1.7/0.3/98 *v/v/v*) and different concentrations were prepared using a 2-fold serial dilution method. First, 100 μL of the prepared dilutions were applied to the plate with SK cells and incubated for 48 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . Then, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (20 μL) was added, and plates were incubated for another 4 h. Subsequently, the supernatant was removed, and 100 μL dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well. The formation of formazan was measured by spectrophotometric absorbance using an ELISA microplate reader (ELISA LEDETECT 96, Biomed Dr. Wieser GmbH, Salzburg, Austria) at a wavelength of 510 nm (=maximum absorption wavelength of formazan derivatives). The threshold toxicity level was defined as the lowest concentration of the extract that causes a decrease in sample absorption to values <50% of cell metabolic activity.

5.6. HPLC Measurement and Method Performance

HPLC analysis of all samples was carried out using a Shimadzu LC-40D linked to a degassing unit (DGU-403), a column oven (CTO-40S), an autosampler (SIL-40C), and a photodiode array detector (SPD-M40) (Shimadzu, Duisburg, Germany). The LabSolutions Lite software (Version 5.99; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany) was used for data acquisition and analysis.

Chromatography was performed using a Gemini® C18 110 Å Reversed-Phase LC Column (150 × 4.6 mm, 5 μm , Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) attached to a guard column (SecurityGuard™ cartridge, 4 × 3.0 mm internal diameters (ID), Phenomenex, Aschaffenburg, Germany).

The column oven temperature was set to 40 °C, and the maximum operating pressure was 345 bar. The binary gradient consisting of eluent A (water) and eluent B (acetonitrile) (both containing 0.1% formic acid) with a flow rate of 0.4 mL/min and a sample injection volume of 10 μL was applied as follows: 0 min 25% B, 30 min 80% B, 31 min 100% B, 40 min 100% B, 42 min 25% B. The column was equilibrated at starting conditions for 10 min before each run. HPLC-grade water, acetonitrile, and LC-MS-grade formic acid were purchased from VWR International GmbH.

Data collection was performed using a Diode Array Detector. Chromatograms were recorded at 256 nm, and UV/Vis spectra were saved from 200 to 400 nm (Figure S5).

Satratoxin G (SG) and Satratoxin H (SH) standards were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MN, USA), and a five-point matrix-matched calibration was performed separately for every nutrition medium tested by preparing five standard matrix solutions (containing 2, 10, 50, 75, or 100 µg/mL). The retention time of SG was 20.8 ± 0.14 min and that of SH was 21.8 ± 0.15 min.

To determine matrix suppression effects, solvent calibration and matrix calibration were done. The matrix effect of PDA-VWR was 1.3% for SG and 6.2% for SH. For PDA-Sigma, it was slightly higher with 3.9% for SG and 8.6% for SH. The highest matrix suppression effect was recorded for potato dextrose broth (12.6% for SG and 21.0% for SH).

The method's precision was defined by measuring three different concentrations (2, 50, and 100 µg/mL) multiple times ($n = 15$) and comparing the results with the target value. The obtained precision was between 0.4% and 3.8% for SG and 0.3% and 9.2% for SH.

The recovery rate of the extraction method was determined, and the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were defined. A signal-to-noise ratio (S/N) of ≥ 3 was determined for LODs and a signal-to-noise ratio (S/N) of ≥ 10 for the limit of quantification (LOQ). The determined limit of detection for SG was 1.9 µg/agar plate and for SH 10.0 µg/agar plate.

5.7. Statistical Analysis

The software OriginPro 2021b (64-bit) SR2 (Version 9.8.5.212) was used for statistical analysis. The correlation between the spore count and the measured concentrations of SG + SH was assessed using the Pearson correlation coefficient.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxins14080515/s1>, Figure S1: Microscopy (light microscopy, 200×, lactophenol blue staining) of *S. chartarum* genotype S strain ATCC 34916 as three-point (a and b) and one-point (c and d) culture shows the significantly reduced spore production on PDA-S (b and d) and thinner mycelium compared to the high rate of sporulation with well-grown mycelium on PDA-V (a and c). Figure S2: Spore count per cm² of *S. chartarum* genotype S strains (ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129) on PDA-V (gray box plots) and PDA-S (red box plots) harvested from the nutrition media shown in Figure 1 (a: three-point cultures, b: one-point cultures). Figure S3: ATR-IR spectra of melanin extracted from *S. chartarum* genotype S strains (ATCC 34916: dark blue and orange, IBT 40293: gray and yellow, DSM 114129: light blue and green) grown on PDA-V and PDA-S (raw data can be found in Table S1). Figure S4: The chemical structures of the macrocyclic trichothecenes satratoxin G (a) and satratoxin H (b) produced by *S. chartarum* genotype S strains (Ulrich 2016). Figure S5: The HPLC chromatograms recorded at 256 nm of satratoxin G (SG) with a retention time (RT) of 20.73 min and satratoxin H (SH) with an RT of 21.62 min diluted in methanol (standard solution) at a concentration of 10.0 µg/mL (1a) with the corresponding UV spectra for SG (1b) and SH (1c) and the detected satratoxin G (15.6 µg/mL, RT: 20.60 min) and satratoxin H (22.9 µg/mL, RT: 21.60 min) in a toxin extract of *S. chartarum* genotype S strain ATCC 34916 grown on PDA-V as a three-point culture (2a) with the corresponding UV spectra for SG (2b) and SH (2c). Table S1: Raw data of the ATR-IR spectra of melanin extracted from *S. chartarum* genotype S strains (ATCC 34916: dark blue and orange, IBT 40293: gray and yellow, DSM 114129: light blue and green) grown on PDA-V and PDA-S. Table S2: Parameters describing colonies of ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129 on PDA-V and PDA-S were used to determine the spore count after 21 days of growth (3-point cultures and 1-point cultures).

Author Contributions: Conceptualization: F.E. and S.U.; data curation: K.T., E.S., F.E. and S.U.; formal analysis: K.T., E.S., J.R., F.E. and S.U.; funding acquisition: R.K.S. and S.U.; investigation: K.T. and S.U.; methodology: K.T., M.T., J.R. and S.U.; project administration: F.E. and S.U.; resources: C.B. and S.U.; supervision: R.K.S., F.E. and S.U.; validation: K.T.; Visualization: K.T. and S.U.; writing—original draft: F.E. and S.U.; writing—review and editing: K.T., E.S., M.T., J.R., C.B., R.K.S., F.E. and S.U. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Brigitte and Wolfram Gedek foundation, Ismaning, Germany. Furthermore, this research was also funded by the Polish Minister of Science and Higher Education, under the program “Regional Initiative of Excellence” in 2019–2022 (Grant No. 008/RID/2018/19).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank the IBT (BioCentrum of the Technical University of Denmark, DTU, Lyngby, Denmark) and Brigitte Andersen for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Andersen, B.; Nielsen, K.F.; Jarvis, B.B. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* **2002**, *94*, 392–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Biermaier, B.; Gottschalk, C.; Schwaiger, K.; Gareis, M. Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. *Mycotoxin Res.* **2015**, *31*, 23–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. El-Kady, A.I.; Moubasher, M.H. Toxicogenicity and toxins of *Stachybotrys* isolates from wheat straw samples in Egypt. *Exp. Mycol.* **1982**, *6*, 25–30. [[CrossRef](#)]
4. Andersen, B.; Nielsen, K.F.; Thrane, U.; Szaro, T.; Taylor, J.W.; Jarvis, B.B. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* **2003**, *95*, 1227–1258. [[CrossRef](#)]
5. Ulrich, S.; Niessen, L.; Ekruth, J.; Schäfer, C.; Kaltner, F.; Gottschalk, C. Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Res.* **2020**, *36*, 83–91. [[CrossRef](#)]
6. Jarvis, B.B.; Sorenson, W.G.; Hintikka, E.L.; Nikulin, M.; Zhou, Y.; Jiang, J.; Wang, S.; Hinkley, S.; Etzel, R.A.; Dearborn, D. Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memmoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3620–3625. [[CrossRef](#)]
7. Hinkley, S.F.; Moore, J.A.; Squillari, J.; Tak, H.; Oleszewski, R.; Mazzola, E.P.; Jarvis, B.B. New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 337–343. [[CrossRef](#)]
8. Hinkley, S.F.; Jiang, J.; Mazzola, E.P.; Jarvis, B.B. Atranones: Novel diterpenoids from the toxicogenic mold *Stachybotrys atra*. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2725–2728. [[CrossRef](#)]
9. Dearborn, D.G.; Smith, P.G.; Dahms, B.B.; Allan, T.M.; Sorenson, W.G.; Montana, E.; Etzel, R.A. Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. *Pediatrics* **2002**, *110*, 627–637. [[CrossRef](#)]
10. Miller, J.D.; Rand, T.G.; Jarvis, B.B. *Stachybotrys chartarum*: Cause of human disease or media darling? *Med. Mycol.* **2003**, *41*, 271–291. [[CrossRef](#)]
11. CDC. *Pulmonary Hemorrhage/Hemosiderosis among Infants—Cleveland, Ohio, 1993/1996*; Morbidity and Mortality Weekly Report; CDC: Atlanta, GA, USA, 2002; pp. 180–184.
12. Johanning, E.; Biagini, R.; Hull, D.; Morey, P.; Jarvis, B.; Landsbergis, P. Health and immunology study following exposure to toxicogenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1996**, *68*, 207–218. [[CrossRef](#)]
13. Hintikka, E.-L. The Role of *Stachybotrys* in the Phenomenon Known as Sick Building Syndrome. In *Advances in Applied Microbiology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2004; pp. 155–173.
14. Nikulin, M.; Reijula, K.; Jarvis, B.B.; Hintikka, E.L. Experimental lung mycotoxicosis in mice induced by *Stachybotrys atra*. *Int. J. Exp. Pathol.* **1996**, *77*, 213–218. [[CrossRef](#)]
15. Vesper, S.; Dearborn, D.G.; Yike, I.; Allan, T.; Sobolewski, J.; Hinkley, S.F.; Jarvis, B.B.; Haugland, R.A. Evaluation of *Stachybotrys chartarum* in the house of an infant with pulmonary hemorrhage: Quantitative assessment before, during, and after remediation. *J. Urban Health* **2000**, *77*, 68–85. [[CrossRef](#)]
16. Forgacs, J.; Carll, W.T.; Herring, A.S.; Hinshaw, W.R. Toxicity of *Stachybotrys atra* for animals. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **1958**, *20*, 787–808. [[CrossRef](#)]
17. Schneider, D.J.; Marasas, W.F.; Dale Kuys, J.C.; Kriek, N.P.; Van Schalkwyk, G.C. A field outbreak of suspected *Stachybotryotoxicosis* in sheep. *J. South Afr. Vet. Assoc.* **1979**, *50*, 73–81.
18. Kriek, N.P.J.; Marasas, W.F.O. Field outbreak of ovine *Stachybotryotoxicosis* in South Africa. In *Trichothecenes—Chemical, Biological and Toxicological Aspects*; Ueno, Y., Ed.; Elsevier Science Publisher: Amsterdam, The Netherlands, 1983; pp. 279–284.
19. Semis, M.; Dadwal, S.S.; Tegtmeier, B.R.; Wilczynski, S.P.; Ito, J.I.; Kalkum, M. First Case of Invasive *Stachybotrys Sinusitis*. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *72*, 1386–1391. [[CrossRef](#)]
20. Vesper, S.J.; Magnuson, M.L.; Dearborn, D.G.; Yike, I.; Haugland, R.A. Initial characterization of the hemolysin stachylysin from *Stachybotrys chartarum*. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 912–916. [[CrossRef](#)]
21. Johanning, E.; Landsbergis, P.; Gareis, M.; Yang, C.S.; Olmsted, E. Clinical experience and results of a Sentinel Health Investigation related to indoor fungal exposure. *Environ. Health Perspect.* **1999**, *107*, 489–494. [[CrossRef](#)]

22. Hanelt, M.; Gareis, M.; Kollarczik, B. Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* **1994**, *128*, 167–174. [[CrossRef](#)]
23. Hernández, F.; Cannon, M. Inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the 12,13-epoxytrichothecenes trichodermol, diacetoxyscirpenol and verrucarol. Reversibility of the effects. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 875–881. [[CrossRef](#)]
24. Rocha, O.; Ansari, K.; Doohan, F.M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 369–378. [[CrossRef](#)]
25. Ueno, Y. *Trichothecenes—Chemical, Biological and Toxicological Aspects*; Elsevier Science Publisher: Amsterdam, The Netherlands, 1983.
26. Karunasena, E.; Larranaga, M.D.; Simoni, J.S.; Douglas, D.R.; Straus, D.C. Building-associated neurological damage modeled in human cells: A mechanism of neurotoxic effects by exposure to mycotoxins in the indoor environment. *Mycopathologia* **2010**, *170*, 377–390. [[CrossRef](#)]
27. Ulrich, S.; Schäfer, C. Toxin Production by *Stachybotrys chartarum* Genotype S on Different Culture Media. *J. Fungi* **2020**, *6*, 159. [[CrossRef](#)]
28. Tag, A.; Hicks, J.; Garifullina, G.; Ake, C., Jr.; Phillips, T.D.; Beremand, M.; Keller, N. G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol. Microbiol.* **2000**, *38*, 658–665. [[CrossRef](#)]
29. Brown, N.A.; Schrevels, S.; van Dijk, P.; Goldman, G.H. Fungal G-protein-coupled receptors: Mediators of pathogenesis and targets for disease control. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 402–414. [[CrossRef](#)]
30. Brodhagen, M.; Keller, N.P. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol. Plant Pathol.* **2006**, *7*, 285–301. [[CrossRef](#)]
31. Gessler, N.N.; Filippovich, S.Y.; Bachurina, G.P.; Kharchenko, E.A.; Groza, N.V.; Belozerskaya, T.A. Oxylinins and oxylinin synthesis pathways in fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2017**, *53*, 628–639. [[CrossRef](#)]
32. Guo, Y.; Jud, W.; Weigl, F.; Ghirardo, A.; Junker, R.R.; Polle, A.; Benz, J.P.; Pritsch, K.; Schnitzler, J.-P.; Rosenkranz, M. Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 673. [[CrossRef](#)]
33. Samson, R.A.; Houbraken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J.C.; Andersen, B. *Food and Indoor Fungi*, 2nd ed; Crous, P.W., Samson, R.A., Eds.; Westerdijk Laboratory Manual Series; Westerdijk Fungal Biodiversity Institute: Utrecht, The Netherlands, 2019; Volume 2, p. 481.
34. Ulrich, S.; Biermaier, B.; Bader, O.; Wolf, G.; Straubinger, R.K.; Didier, A.; Sperner, B.; Schwaiger, K.; Gareis, M.; Gottschalk, C. Identification of *Stachybotrys* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 7565–7581. [[CrossRef](#)]
35. Marsh, P.B.; Bollenbacher, K. The Vitamin requirements of memnoniella and *Stachybotrys*. *Am. J. Bot.* **1946**, *33*, 245–249. [[CrossRef](#)]
36. Pinto, L.; Granja, L.F.Z.; Almeida, M.A.; Alviano, D.S.; Silva, M.H.D.; Ejzemberg, R.; Rozental, S.; Alviano, C.S. Melanin particles isolated from the fungus *Fonsecaea pedrosoi* activates the human complement system. *Memórias Do Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, e180120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ribera, J.; Panzarasa, G.; Stobbe, A.; Osypova, A.; Rupper, P.; Klose, D.; Schwarze, F. Scalable Biosynthesis of Melanin by the Basidiomycete *Armillaria cepistipes*. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 132–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hinkley, S.F.; Jarvis, B.B. Chromatographic Method for *Stachybotrys* Toxins. In *Mycotoxin Protocols*; Trucksess, M.W., Pohland, A.E., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2000; pp. 173–194.
39. Aleksic, B.; Bailly, S.; Draghi, M.; Pestka, J.J.; Oswald, I.P.; Robine, E.; Bailly, J.D.; Lacroix, M.Z. Production of four macrocyclic trichothecenes by *Stachybotrys chartarum* during its development on different building materials as measured by UPLC-MS/MS. *Buill. Environ.* **2016**, *106*, 265–273. [[CrossRef](#)]
40. Williams, D.H. Functional role of secondary metabolites. In *Discovering Drugs in Nature (8-9.12.94)*; IBC Technical Service: London, UK, 1994.
41. Nielsen, K.F.; Holm, G.; Uttrup, L.P.; Nielsen, P.A. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2004**, *54*, 325–336. [[CrossRef](#)]
42. Lozowicka, B.; Iwaniuk, P.; Konecki, R.; Kaczynski, P.; Kuldybayev, N.; Dutbayev, Y. Impact of Diversified Chemical and Biostimulator Protection on Yield, Health Status, Mycotoxin Level, and Economic Profitability in Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivation. *Agronomy* **2022**, *12*, 258. [[CrossRef](#)]
43. Bata, A.; Vanyi, A.; Lepom, P.; Dashek, W.V.; Llewellyn, G.C. Temperature-Dependent Toxin Production by *Stachybotrys* Species. In *Biodeterioration Research 2*; O’Rear, C., Llewellyn, G., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 1989; pp. 393–400.
44. Beever, R.E.; Bollard, E.G. The Nature of the Stimulation of Fungal Growth by Potato Extract. *Microbiology* **1970**, *60*, 273–279. [[CrossRef](#)]
45. Jagels, A.; Stephan, F.; Ernst, S.; Lindemann, V.; Cramer, B.; Hubner, F.; Humpf, H.U. Artificial vs. Natural *Stachybotrys* Infestation—Comparison of Mycotoxin Production on Various Building Materials. *Indoor Air* **2020**, *30*, 1268–1282. [[CrossRef](#)]
46. Brzonkalik, K.; Herrling, T.; Syltatk, C.; Neumann, A. The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *147*, 120–126. [[CrossRef](#)]
47. Medina, Á.; Mateo, E.M.; Valle-Algarra, F.M.; Mateo, F.; Mateo, R.; Jiménez, M. Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *122*, 93–99. [[CrossRef](#)]
48. Tudzynski, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 656. [[CrossRef](#)]

49. Shim, W.-B.; Woloshuk, C.P. Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *177*, 109–116. [[CrossRef](#)]
50. Hicks, J.K.; Yu, J.-H.; Keller, N.P.; Adams, T.H. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA α protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* **1997**, *16*, 4916–4923. [[CrossRef](#)]
51. Calvo, A.M.; Wilson, R.A.; Bok, J.W.; Keller, N.P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 447–459. [[CrossRef](#)]
52. McDonald, T.; Devi, T.; Shimizu, K.; Sim, S.; Keller, N. Signaling events connecting mycotoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *JSM Mycotoxins* **2004**, *2003* (Suppl. 3), 139–147. [[CrossRef](#)]
53. Semeiks, J.; Borek, D.; Otwinowski, Z.; Grishin, N.V. Comparative genome sequencing reveals chemotype-specific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 590. [[CrossRef](#)]
54. Buskirk, A.D.; Hettick, J.M.; Chipinda, I.; Law, B.F.; Siegel, P.D.; Slaven, J.E.; Green, B.J.; Beezhold, D.H. Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. *Anal. Biochem.* **2011**, *411*, 122–128. [[CrossRef](#)]
55. Butt, Z.L.; Ghaffar, A. Inhibition of fungi, actinomycetes and bacteria by *Stachybotrys atra*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **1972**, *47*, 241–251. [[CrossRef](#)]
56. Gregory, L.; Pestka, J.J.; Dearborn, D.G.; Rand, T.G. Localization of satratoxin-G in *Stachybotrys chartarum* spores and spore-impacted mouse lung using immunocytochemistry. *Toxicol. Pathol.* **2004**, *32*, 26–34. [[CrossRef](#)]
57. Nirenberg, H. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanstalt Land- Forstwirtschaft.* **1976**, *169*, 117.
58. Gadd, G. Effects of media composition and light on colony differentiation and melanin synthesis in *Microdochium bolleyi*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1982**, *78*, 115–122. [[CrossRef](#)]

2 Publikation Stickstoff- und Kohlenstoffquellen



ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY



A Chemically Defined Medium That Supports Mycotoxin Production by *Stachybotrys chartarum* Enabled Analysis of the Impact of Nitrogen and Carbon Sources on the Biosynthesis of Macrocylic Trichothecenes and Stachybotrylactam

Katharina Tribelhorn,^a Magdalena Twaruzek,^b Robert Kosicki,^b Reinhard K. Straubinger,^a Frank Ebel,^a  Sebastian Ulrich^a

^aChair of Bacteriology and Mycology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Institute for Infectious Diseases and Zoonosis, LMU Munich, Munich, Germany

^bDepartment of Physiology and Toxicology, Faculty of Biological Sciences, Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz, Poland

ABSTRACT *Stachybotrys chartarum* (*Hypocreales*, *Ascomycota*) is a toxigenic fungus that is frequently isolated from water-damaged buildings or improperly stored feed. The secondary metabolites formed by this mold have been associated with health problems in humans and animals. Several authors have studied the influence of environmental conditions on the production of mycotoxins, but these studies focused on undefined or complex substrates, such as building materials and media that impeded investigations of the influence of specific nutrients. In this study, a chemically defined cultivation medium was used to investigate the impact of several nitrogen and carbon sources on growth of *S. chartarum* and its production of macrocylic trichothecenes (MTs) and stachybotrylactam (STLAC). Increasing concentrations of sodium nitrate were found to positively affect mycelial growth, the level of sporulation, and MT production, while ammonium nitrate and ammonium chloride had an inhibitory effect. Potato starch was the superior and most reliable carbon source tested. Additionally, we observed that the level of sporulation was correlated with the production of MTs but not with that of STLAC. In this study, we provide a chemically well-defined cultivation medium suitable for standardized *in vitro* testing of the capacity of *S. chartarum* isolates to produce macrocylic trichothecenes.

IMPORTANCE Macrocylic trichothecenes (MTs) are highly toxic secondary metabolites that are produced by certain *Stachybotrys chartarum* strains, which consequently pose a risk for animals and humans. To identify hazardous, toxin-producing strains by analytical means, it is important to grow them under conditions that support MT production. Nutrients determine growth and development and thus the synthesis of secondary metabolites. Complex rich media are commonly used for diagnostics, but batch differences of supplements pose a risk for inconsistent data. We have established a chemically defined medium for *S. chartarum* and used it to analyze the impact of nitrogen and carbon sources. A key finding is that nitrate stimulates MT production, whereas ammonium suppresses it. Defining nutrients that support MT production will enable a more reliable identification of hazardous *S. chartarum* isolates. The new medium will also be instrumental in analyzing the biosynthetic pathways and regulatory mechanisms that control mycotoxin production in *S. chartarum*.

KEYWORDS *Stachybotrys*, nitrogen source, carbon source, nutrients, macrocylic trichothecenes, stachybotrylactam, LC-MS/MS

S *tachybotrys chartarum* (*Hypocreales*, *Ascomycota*) is one of the most frequently isolated species of the genus *Stachybotrys* (1). This filamentous fungus occurs ubiquitously in the environment and is commonly found in water-damaged buildings and

Editor Irina S. Druzhinina, Royal Botanic Gardens

Copyright © 2023 Tribelhorn et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Sebastian Ulrich, s.ulrich@lmu.de.

The authors declare no conflict of interest.

Received 15 February 2023

Accepted 21 May 2023

construction materials (e.g., wallpaper and gypsum) as well as on dead plant material (e.g., straw and hay), culinary herbs, and marine sponges (2–7). *S. chartarum* is capable of producing a large variety of structurally diverse secondary metabolites, including trichothecenes, atranones, phenylspirodrimanes, and others (8). The species *S. chartarum* can be subdivided into (i) two distinct chemotypes based on their ability to produce either atranones (chemotype A) or macrocyclic trichothecenes (MTs; chemotype S) (9) or (ii) three genotypes A, S, and H according to the presence or absence of genes that are presumed to encode relevant enzymes for the biosynthesis of these mycotoxins (*atr1-14* and *sat1-21*) (10).

S. chartarum strains have been implicated in several types of intoxications (11–17). In animals, especially horses, stachybotryotoxicosis can occur after oral ingestion or inhalation of mycotoxins from improperly stored moldy feed or, more rarely, after cutaneous contact (18–20). Humans, in particular infants, are primarily at risk in water-damaged, mold-loaded buildings (14, 21, 22). *S. chartarum* can provoke symptoms related to the sick-building syndrome complex and is the suspected cause of pulmonary hemorrhage in infants after the uptake of airborne toxins (11, 15, 17). In addition, cases of stachybotryotoxicosis have been reported for farm workers who have handled *Stachybotrys*-contaminated straw or hay and in regions where hay or straw was used as bedding material (23, 24).

Trichothecenes structurally comprise four main groups: the trichothecenes types A, B, and C as well as D, which comprises the MTs (25–27). MTs represent the most toxic trichothecene group and include roridins, verrucarins, and satratoxins. *S. chartarum* genotype S strains are potent producers of roridin E (RE) and roridin L-2 (RL-2), satratoxins G, H, and F (SG, SH, and SF, respectively), and verrucarins J (VJ) (26, 28–30). MTs possess a marked cyto- and neurotoxic potential for mammals by blocking protein, DNA, and RNA biosynthesis (31–33) and induction of apoptosis (34, 35). However, MTs do not only possess a hazardous potential for humans and animals and are also reported to have a selective cytotoxic impact on certain human cancer cell lines, and Yang et al. emphasized the importance of SF (36). An inhibitory effect on tumor-related tyrosine kinases was described and attributed to RE, SG, and SH (7).

Phenylspirodrimanes (PSDs; e.g., stachybotrylactam [STLAC]) represent the largest and most abundant class of secondary metabolites produced by *Stachybotrys* species (37, 38). Despite this, their role in human and animal health is still unclear, but they are presumed to possess an immunosuppressive activity through inhibition of the complement system (39, 40).

Fungi use elaborate pathways that involve many different enzymes to produce mycotoxins and other secondary metabolites. The corresponding genes are commonly clustered, and their expression is highly variable and regulated by a variety of factors. To identify isolates that produce hazardous mycotoxins, it is of prime importance to use media that allow a robust and reliable production of these molecules. Factors known to influence mycotoxin biosynthesis are the time of growth, temperature, humidity, and nutrients (38, 41, 42). Regarding the impact of nutrients, the available nitrogen and carbon sources play a major role in these processes. This is not surprising considering the fact that nitrogen and carbon are essentially required for proteins, nucleic acids, and other cell substances. Their constant supply is therefore a prerequisite for fungal growth, including the production of secondary metabolites (43, 44).

The production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata* (*Pleosporales*, *Ascomycota*) and of ochratoxin A (OTA) in *Aspergillus* species (*Eurotiales*, *Ascomycota*) clearly depends on the available nitrogen and carbon sources (45–47). For the latter, increased OTA production is triggered by lower levels of nitrogen and higher carbon concentrations (46). In *Fusarium proliferatum* (*Hypocreales*, *Ascomycota*), stress by nitrogen starvation induces the expression of genes for the biosynthesis of fumonisins (48), whereas high concentrations of nitrogen repress fumonisin production (49).

Despite their medical relevance, little is known about the factors that control the production of the mycotoxins in *S. chartarum*. Time of growth, humidity, and temperature have been investigated for their impact on growth and mycotoxin production in

S. chartarum (38, 41, 50). Moreover, different building materials and certain commercially available media have been tested (51–54). Materials and media that are rich in cellulose and low in nitrogen as well as potato dextrose agar (PDA) were described to stimulate the production of mycotoxins (4, 54–56). Jarvis et al. (56) described that optimum mycotoxin production for the generation of higher quantities of satratoxins can be achieved with parboiled Ben's Original rice as a solid culture medium. However, PDA and rice contain complex components, which makes it difficult to identify factors that influence mycotoxin production. Another drawback of PDA is that its complex components can vary, and this can have a dramatic impact on the amounts of mycotoxins that are produced (57). In other fungi, defined media have been established, such as *Aspergillus* minimal medium (AMM) (58), in which all ingredients are known and can be replaced or varied in concentration. For *S. chartarum*, such a medium so far is unknown, which complicates investigations of metabolic and biosynthetic processes.

The aim of this study was to investigate the impact of several nitrogen and carbon sources on mycelial growth and mycotoxin production of three genotype S strains of *S. chartarum*. AMM was identified as a suitable and well-defined nutrition medium, a finding that will facilitate a standardization of mycotoxin research in *S. chartarum* and will also be helpful in the analysis of the biosynthetic and metabolic pathways as well as the regulatory genes that control mycotoxin production in *S. chartarum*. Three nitrogen sources were tested in different concentrations and in combination with six carbon sources.

RESULTS

The starting point of this study was the observation that the cultivation of *S. chartarum* in AMM results in strongly sporulating and extensively growing colonies comparable to PDA. This finding enabled us to analyze various carbon and nitrogen (N) sources for their impact on the toxin-forming capacity of *S. chartarum*. We included three *S. chartarum* strains in this study that are known for their effective production of macrocyclic trichothecenes (MTs) and stachybotrylactam (STLAC) (6, 9, 38, 54). Since our previously published data demonstrated that satratoxin production is tightly linked to sporulation (57), this work considered the size of the resulting colonies and their level of sporulation. The selected strains come from three substrates, namely, oats (ATCC 34916), building material from an apartment in Oakland (IBT 40293), and oregano (DSM 114129).

Influence of various nitrogen sources on fungal growth and sporulation. The influences of the nitrogen sources sodium nitrate (NaNO_3), ammonium nitrate (NH_4NO_3), and ammonium chloride (NH_4Cl) were analyzed at different concentrations that corresponded to 0, 1, 5, 10, 25, 50, 250, and 500 mg N/L. Nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) are the major inorganic nitrogen sources present in the environment and are assimilated by distinct mechanisms. We have therefore analyzed their impact either as sole nitrogen sources (NaNO_3 , NH_4Cl) or as a combination of both sources (NH_4NO_3). All samples in these initial experiments contained 10 g/L glucose as the sole carbon source.

The visually evaluable parameters were similar for all three strains; representative results obtained with strain ATCC 34916 are shown in Fig. 1. The colonies formed by IBT 40293 and DSM 114129 are presented in Fig. S1 in the supplemental material, and data on the colony areas of all three strains are summarized in Table S1.

The different nitrogen sources and their concentrations (normalized as mg N/L) had a striking impact on the size, morphology, and sporulation of the colonies. Large but flat and hardly sporulating colonies were found on plates containing small amounts of nitrogen (1 and 5 mg N/L) regardless of the chemical nature of the nitrogen source. A very similar growth phenotype was observed for plates without a nitrogen source, which suggests that a scarcity of nitrogen triggered an extensive spreading with hyphae that explored the environment for substrates richer in nitrogen. A comparison of the plates containing ≥ 10 mg N/L identified NaNO_3 as the preferable nitrogen

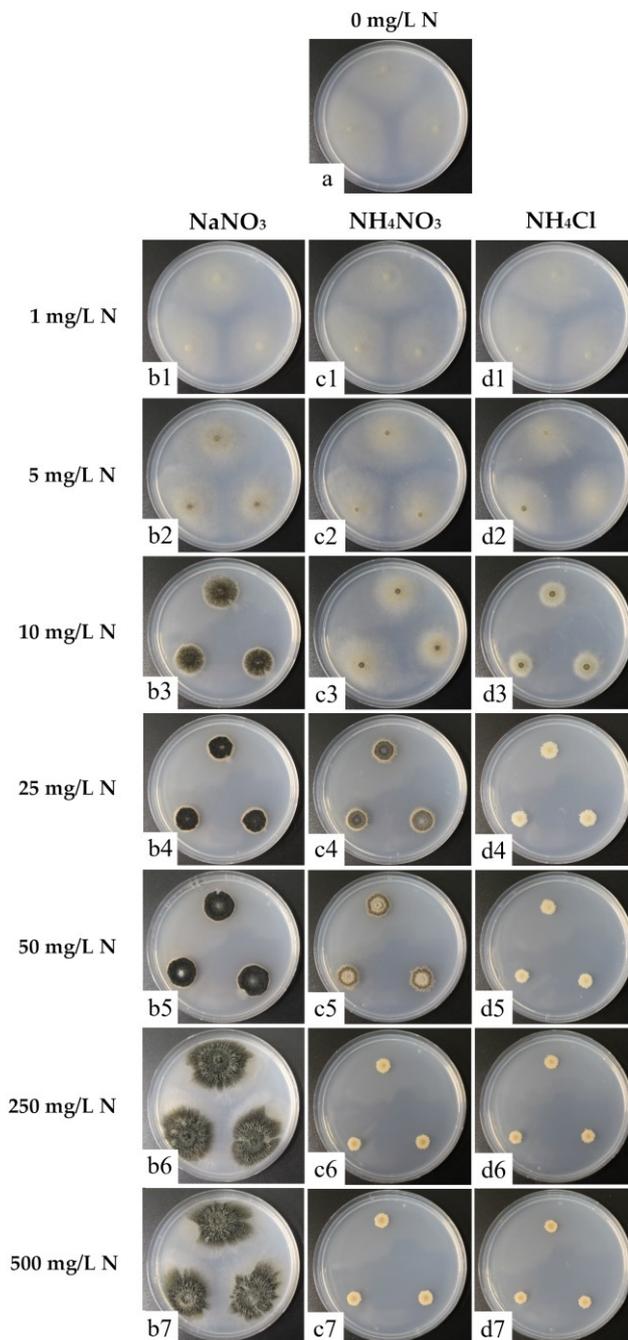
Stachybotrys chartarum - ATCC 34916

FIG 1 Colonies of *S. chartarum* genotype S strain ATCC 34916 were grown as three-point cultures on AMM containing glucose (10 g/L) as the sole carbon source. The different panels show cultures without nitrogen addition (a) or supplemented with NaNO_3 (b1 to b7), NH_4NO_3 (c1 to c7), or NH_4Cl (d1 to d7) at the following nitrogen concentrations: 1 mg/L (b1/c1/d1), 5 mg/L (b2/c2/d2), 10 mg/L (b3/c3/d3), 25 mg/L (b4/c4/d4), 50 mg/L (b5/c5/d5), 250 mg/L (b6/c6/d6), and 500 mg/L (b7/c7/d7). Each image is representative of three parallel cultures per condition.

source. Smaller but dense, very dark, and therefore strongly sporulating colonies were found on plates containing 25 and 50 mg N/L. At higher concentrations (250 and 500 mg N/L), the colonies grown on NaNO_3 were also substantially larger than the colonies grown on the lower nitrogen concentrations and resulted in large, dense, and well-sporulating colonies. NH_4Cl was surprisingly a much poorer nitrogen source than

NaNO₃. Compared to the lower concentrations, 10 mg N/L NH₄Cl triggered the formation of smaller colonies with a small, dark zone in the center that indicates the onset of sporulation. Remarkably, this positive trend was reversed on plates containing higher NH₄Cl concentrations (25 to 500 mg N/L), where small, nonsporulating colonies occurred. The colonies on plates containing NH₄NO₃ were, at most concentrations, similar to those on plates supplemented with NH₄Cl. The only exception was at 25 mg N/L, when colonies on plates with NH₄NO₃ had a more intermediate phenotype. These data indicate that sporulation was effectively prevented if NH₄⁺ was present in concentrations corresponding to 25 mg N/L or more, regardless of whether NO₃⁻ was present or not. In conclusion, these results demonstrate that NaNO₃ is a superior nitrogen source for *S. chartarum* and that NH₄⁺ was able to override the positive impact of NO₃⁻ on growth and sporulation but only if it was present at concentrations above 25 mg N/L.

Influence of different carbon sources on fungal growth and sporulation. In the next step, we investigated the impact of different carbon sources, namely, glucose, fructose, maltose, potato starch, wheat starch, and cellulose in combination with nitrogen sources NaNO₃, NH₄NO₃, and NH₄Cl. As carbon sources, we selected mono-, di-, and polysaccharides that are commonly used in culture media or that were described to enable efficient growth of *S. chartarum*. The aim was to determine whether the chemical structure of the carbon source has an influence on growth and sporulation, as the assimilation of polysaccharides is an elaborate process that requires different enzymatic systems to degrade a polymer and to take up monomeric sugars. Because the results obtained in the analysis of nitrogen impact and described above were similar for all three strains tested, the first set of these experiments was performed only with strain ATCC 34916 (Fig. 2).

The most significant observation for all carbon sources tested was the consistently positive effect of NaNO₃ on mycelial growth and sporulation and the comparatively negative effect of NH₄NO₃ and NH₄Cl, results that resemble those obtained with glucose as the sole carbon source. It was noticeable that sporulation was completely prevented by NH₄Cl concentrations of ≥25 mg N/L and an NH₄NO₃ concentration of 250 mg N/L, which underlines the dominant-negative effect of NH₄⁺ when combined with NO₃⁻. With respect to the size of the colonies, those formed with NH₄NO₃ and NH₄Cl at 250 mg N/L were, on average, 88.1 ± 7.5% smaller than those formed with NaNO₃ (*P* < 0.05) (Table S2). The only carbon source that led to a distinct colony phenotype was cellulose. These colonies spread extensively (regardless of the nitrogen source and its concentration), and on plates with NaNO₃ (25 + 250 mg N/L) and NH₄NO₃ (25 mg N/L), the mycelium covered the whole surface of the plates.

One aspect was common to all cultures: only NaNO₃ led to consistent and strong sporulation (Fig. 2). Thus, the inhibitory effect of NH₄⁺ and the beneficial effect of NO₃⁻ ions were equally pronounced for all carbon sources tested.

In further experiments, we compared the influence of the different carbon sources on all three genotype S strains. In this experiment, we used NaNO₃ as the sole nitrogen source at a concentration of 250 mg N/L, a condition that enabled strong growth and sporulation in the initial experiments with ATCC 34916.

Comparison of the different cultures revealed that not only the nitrogen source but also the carbon source (each normalized to 4 g C/L) had a striking impact on the size, morphology, and sporulation of the resulting colonies (Fig. 3; Table S2). Cellulose was again the only carbon source that led to a distinct phenotype. The fungal colonies spread extensively, and their flat and weakly sporulating mycelium covered the complete available surface of the plates (60.8 ± 0.0 cm²), indicating that the size of these colonies was clearly limited by the dimension of the plate. A very similar growth phenotype had been observed for plates with a low supply of nitrogen, suggesting that both a scarcity of nitrogen and carbon causes a hunger phenotype that was characterized by extensive hyphal spreading and colonies of low density.

Potato and wheat starch, the other two complex carbon sources, had a different effect than cellulose. Colonies grown on starch-containing medium were large, and their dark appearance indicated an extensive level of sporulation.

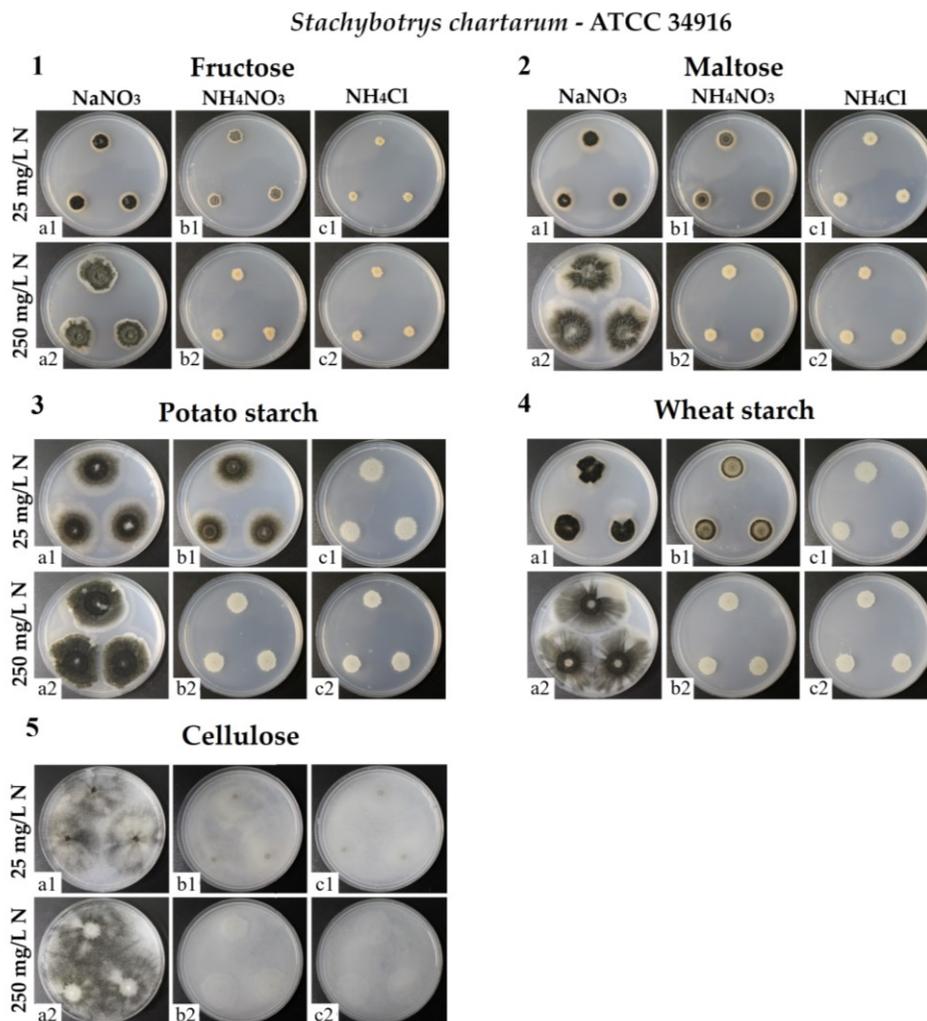


FIG 2 Colonies of *S. chartarum* genotype 5 strain ATCC 34916 were grown as three-point cultures on AMM containing fructose (1), maltose (2), potato starch (3), wheat starch (4), or cellulose (5) as the sole carbon source (with concentrations that were normalized to 4 g C/L) and combined with the nitrogen sources NaNO_3 (1a1 to 5a1 and 1a2 to 5a2), NH_4NO_3 (1b1 to 5b1 and 1b2 to 5b2), or NH_4Cl (1c1 to 5c1 and 1c2 to 5c2), each at two concentrations (25 and 250 mg N/L). Each image is representative of three parallel cultures per condition.

Differences between the three strains analyzed became evident on plates containing the mono- and disaccharides glucose, fructose, and maltose. Strain ATCC 34916 grew and sporulated best on these plates, strain IBT 40293 showed intermediate growth, and strain DSM 114129 showed the weakest growth. For the two latter strains, sporulation was best on glucose, and the growth of DSM 114129 was particularly impaired on fructose and maltose, resulting in small colonies with very little visible sporulation. Thus, compared with starch, the tested mono- and disaccharides were clearly inferior carbon sources, and this was particularly obvious for IBT 40293 and DSM 114129.

Production of macrocyclic trichothecenes. To evaluate the effect of different nitrogen and carbon sources on MT production, toxins were extracted from selected cultures and purified and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). We considered three ways to normalize the data: amount of mycotoxin per plate, amount of mycotoxin per cm^2 of colony area, or amount of mycotoxin per gram of mycelium. The latter appeared to be the best option. On the one hand, it turned out that it was technically impossible to harvest all fungal material from the plates. On the other hand, we realized that mycotoxins diffuse into the medium and that the analysis of pure fungal material would therefore not reflect the total amount

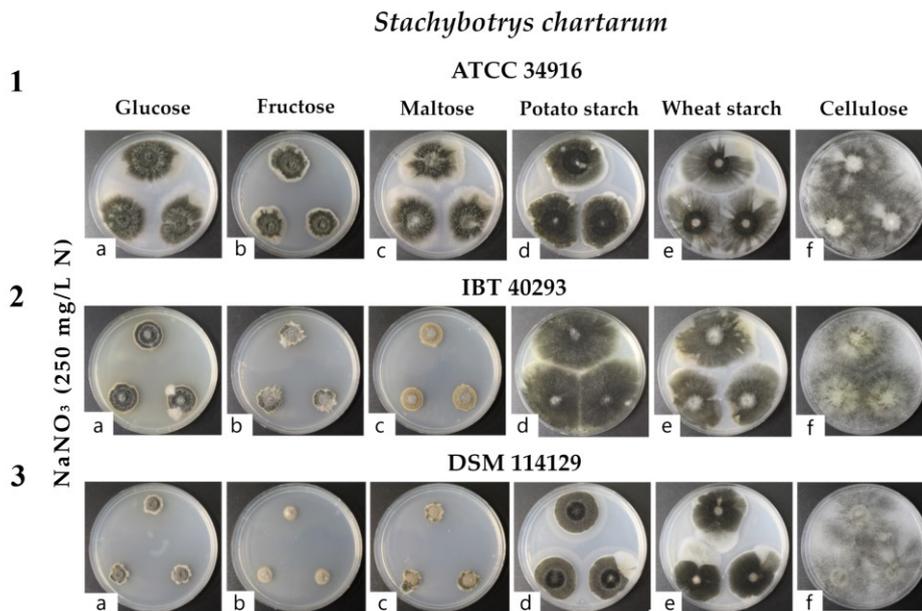


FIG 3 Colonies of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916 (1), IBT 40293 (2), and DSM 114129 (3) were grown as three-point cultures on AMM containing glucose (1a to 3a), fructose (1b to 3b), maltose (1c to 3c), potato starch (1d to 3d), wheat starch (1e to 3e), or cellulose (1f to 3f) as the carbon source (with concentrations that were normalized to 4 g C/L) and NaNO_3 as the nitrogen source (250 mg N/L). Each image is representative of three parallel cultures per condition.

of mycotoxins produced. The presentation as amount of mycotoxin per plate had the limitation that different culture conditions led to colonies of variable size, which had a strong impact on the calculated values. To avoid this limitation, we also calculated the MT concentrations per cm^2 of colony area.

(i) Influence of various nitrogen sources on the production of macrocyclic trichothecenes. The impact of NaNO_3 , NH_4NO_3 , and NH_4Cl on the production of MTs was investigated using cultures of the three genotype S strains grown on plates containing 1, 25, or 250 mg N/L and 10 g glucose/L (Fig. 1; Fig. S1). After acetonitrile/water (ACN/ H_2O) extraction (84/16 [vol/vol]), the purified toxin extracts were analyzed by LC-MS/MS for their content of roridin E (RE), roridin L-2 (RL-2), verrucarins J (VJ), verrucarins A (VA), satratoxins G (SG), satratoxins H (SH), and satratoxins F (SF).

As shown in Table S3, an increase in NaNO_3 concentrations had a positive effect on the total amount of MTs per agar plate (ng/agar plate). This effect was observed for all three strains tested. In the case of ATCC 34916, the cultures that were grown with a nitrogen concentration of 25 mg N/L produced approximately seven times more MTs than those grown with 1 mg N/L. In turn, the cultures grown on medium containing 250 mg N/L produced approximately 1.8 times more MTs than those grown with 25 mg N/L.

For NH_4NO_3 , increasing the concentration from 1 mg N/L to 25 mg N/L also resulted in increasing MT concentrations per plate for all three strains (e.g., approximately 4-fold for ATCC 34916), but a further increase to 250 mg N/L abrogated MT production (values below the limit of detection [LOD]). When NH_4Cl was used as the sole nitrogen source, MTs were only detectable at low concentrations and only in cultures grown with 1 mg N/L.

Strikingly, the large colonies found on plates containing 1 mg N/L produced only small amounts of MTs per plate, demonstrating that MT production was not proportional to the colony size but rather to the level of sporulation.

Taken together, for all three strains, NaNO_3 was the superior nitrogen source to trigger MT production, and the highest toxin concentrations per plate were produced when NaNO_3 was added at the highest concentration tested. Growth on NH_4Cl -containing plates led to very low or even undetectable levels of MT production, in particular in cultures containing 25 and 250 mg N/L. For NH_4NO_3 , concentrations of up to 25 mg N/L stimulated MT

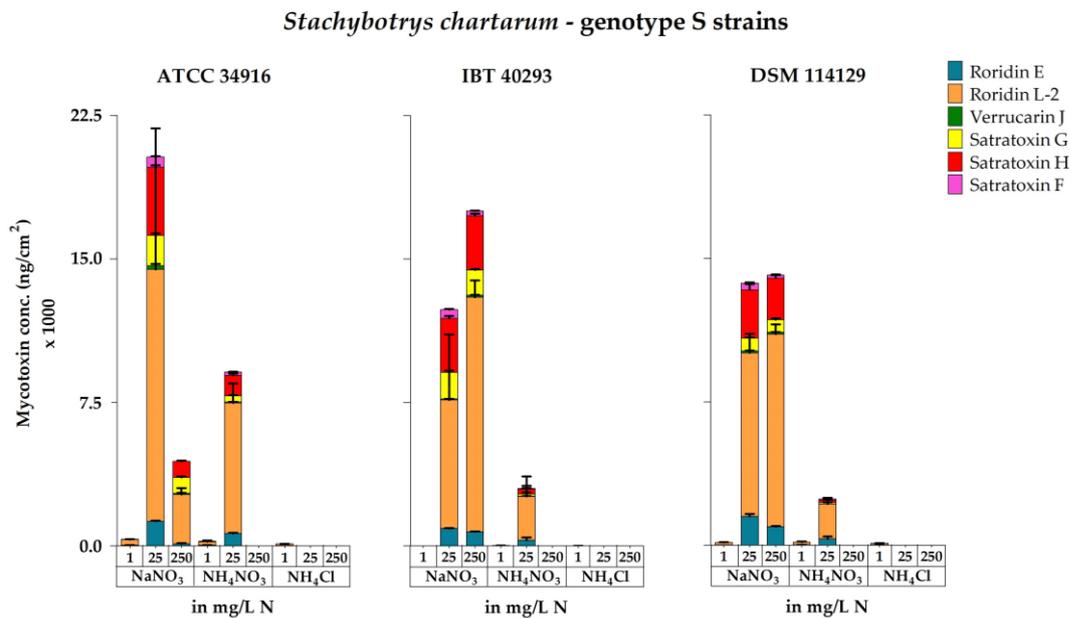


FIG 4 Accumulated concentrations of the macrocyclic trichothecenes roridin E, roridin L-2, verrucarin J, satratoxin G, satratoxin H, and satratoxin F measured for cultures of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129 grown on AMM supplemented with NaNO₃, NH₄NO₃, or NH₄Cl as the nitrogen source at concentrations of 1, 25, or 250 mg N/L. In this figure, the concentrations are normalized to the area of the respective colonies (ng/cm²). For representative images of these corresponding cultures, compare Fig. 1 and Fig. S1 in the supplemental material.

production, but it was strongly repressed and below the LOD at 250 mg N/L. In conclusion, the impact of the three different nitrogen sources on MT production was very similar to that on growth and especially on sporulation, or, in other words, large and in particular strongly sporulating colonies formed the largest amounts of MTs per agar plate.

When calculated as MT production per cm² of colony area, the results again revealed similarities between the three strains: NaNO₃ was the superior nitrogen source and NH₄Cl was the inferior nitrogen source to trigger MT production. NH₄NO₃ stimulated toxin production at low concentrations but also abrogated toxin production at high concentrations (1 and 25 versus 250 mg N/L) (Fig. 4).

The large colonies of ATCC 34916 on plates containing 250 mg N/L produced significantly lower levels of MTs per cm² of colony area than the smaller colonies grown with 25 mg N/L ($P < 0.05$). This is different to the results calculated per plate, but in both experiments, the amounts of MTs correlated well with the respective level of sporulation.

In the following, we also considered every single MT that was investigated. The LC-MS/MS analysis revealed that the overall pattern of MTs was comparable for the three strains and differed only in their individual concentrations, a finding that is in line with previous studies (54). Each strain produced RL-2, RE, VJ, SG, SH, and SF. In all samples, RL-2 was the most abundant MT, and its highest concentrations were obtained with NaNO₃ (Table S3). RE, SG, and SH were produced in lower concentrations, whereby more SH was produced than SG (79%). We also screened the samples for VJ and SF, but the respective values were the lowest of all MTs analyzed. VA was not detectable in any of the samples, which is in line with previous studies (54, 59). The data for the production of individual MTs largely mirrored all trends described above for accumulated MT production, a positive impact of NaNO₃ and a negative, or even inhibitory, effect of NH₄NO₃ and NH₄Cl, especially at higher concentrations (Fig. 5).

(ii) Influence of different carbon sources on the production of macrocyclic trichothecenes. We also analyzed the potential impact of different carbon sources in combination with NaNO₃, NH₄NO₃, or NH₄Cl on MT production. If the results obtained with strain ATCC 34916 are calculated as accumulated MT production per plate (Table S4), all cultures reproduced the above-described trends observed with glucose; NaNO₃ stimulated and

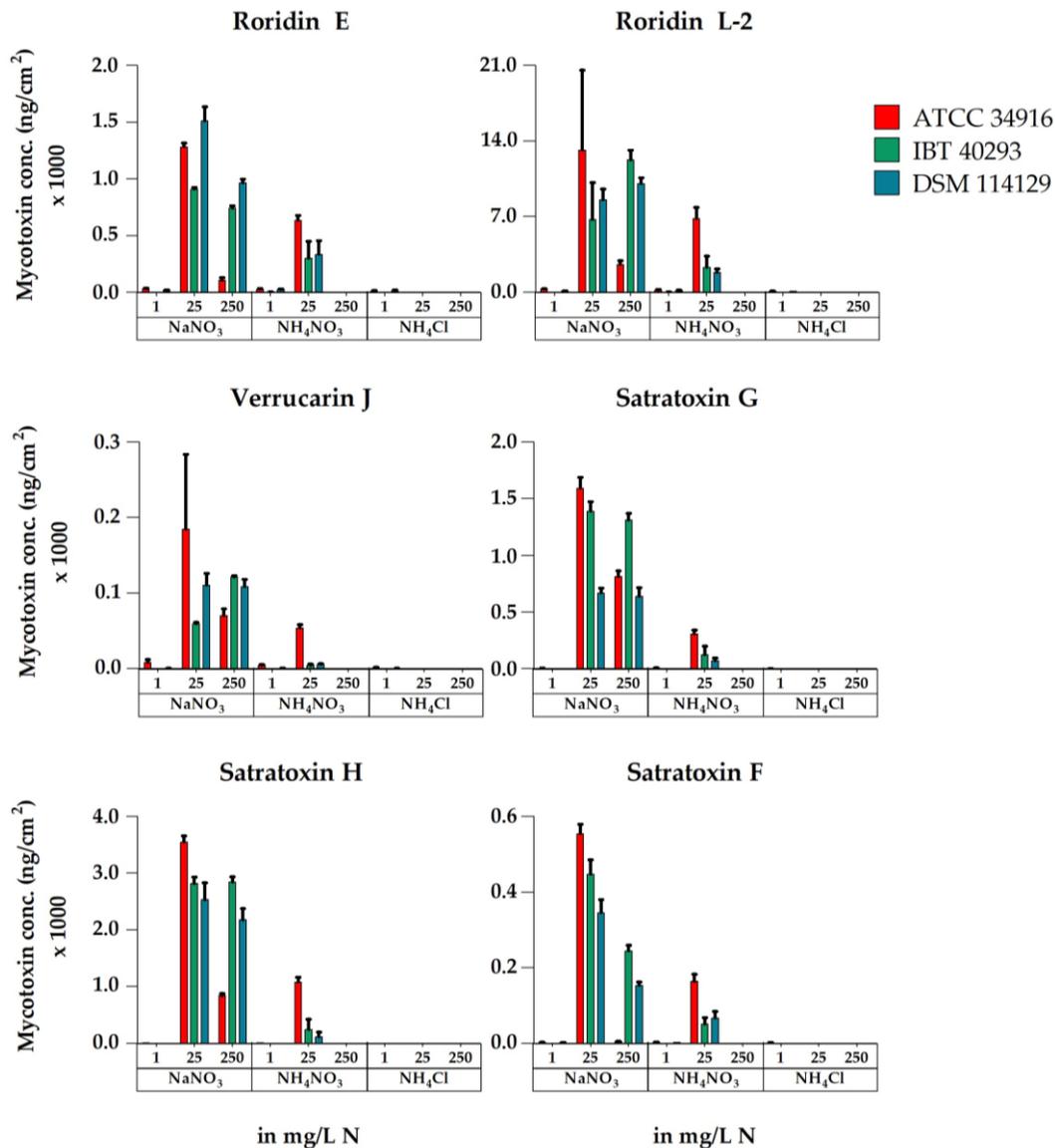


FIG 5 Concentrations of the macrocyclic trichothecenes roridin E, roridin L-2, verrucarin J, satratoxin G, satratoxin H, and satratoxin F measured for cultures of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916 (red columns), IBT 40293 (green columns), and DSM 114129 (blue columns) grown on AMM supplemented with NaNO₃, NH₄NO₃, or NH₄Cl at concentrations of 1, 25, or 250 mg N/L. The concentration values are normalized to the area of the respective colonies (ng/cm²).

NH₄⁺ repressed MT production, especially at higher concentrations. Again, large and strongly sporulating colonies formed the largest amounts of MTs. Because the positive effect of NaNO₃ and the negative effect of NH₄⁺ on MT production were equally pronounced for all carbon sources tested, combinatorial effects could be excluded, a result that resembled that obtained for mycelial growth and sporulation. The MT concentrations in the individual cultures were nevertheless dependent on the available carbon source, reaching the highest levels with potato starch ($369.7 \pm 17.6 \mu\text{g}/\text{agar plate}$) and the lowest levels with fructose ($73.9 \pm 12.1 \mu\text{g}/\text{agar plate}$).

If MTs were calculated in ng per cm² of colony area (Fig. 6), the data revealed a correlation between sporulation and MT production. Larger colonies grown on medium containing fructose, maltose, or wheat starch and a higher NaNO₃ concentration (250 mg N/L) resulted in a high yield of MTs per plate, but the toxin amounts per cm² were higher for the smaller, darker, and more densely sporulating colonies grown with lower concentrations of NaNO₃ (25 mg N/L).

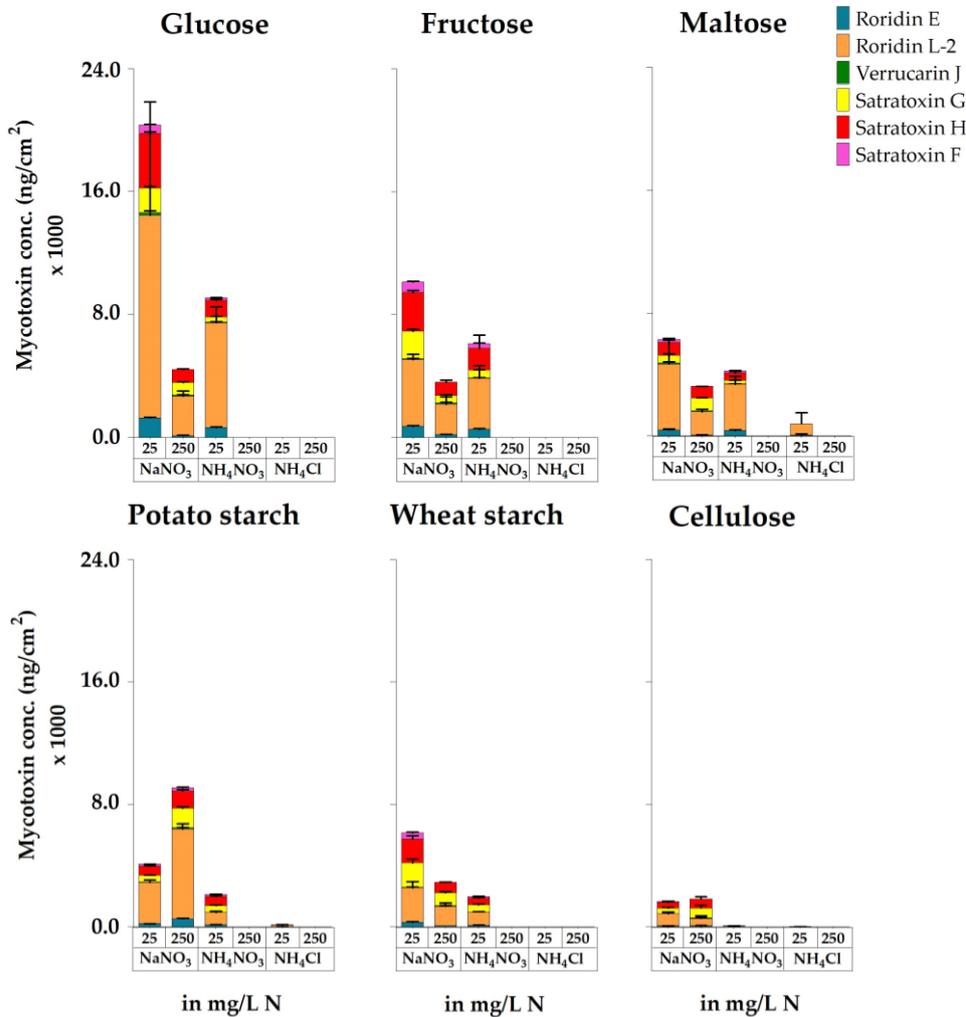
Stachybotrys chartarum - ATCC 34916

FIG 6 Accumulated concentrations of the macrocyclic trichothecenes roridin E, roridin L-2, verrucarin J, satratoxin G, satratoxin H, and satratoxin F measured for cultures of *S. chartarum* genotype S strain ATCC 34916 grown on AMM containing glucose, fructose, maltose, potato starch, wheat starch, or cellulose as the sole carbon source (with concentrations that were normalized to 4 g C/L) and combined with the nitrogen sources NaNO₃, NH₄NO₃, or NH₄Cl (either 25 or 250 mg N/L). The MT concentrations are normalized to the area of the respective colonies (ng/cm²). For representative images of these corresponding cultures, compare Fig. 1 and 2.

The highest levels of MTs per cm² of colony area were reached with glucose ($20.3 \pm 7.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and fructose ($10.1 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) in combination with the lower NaNO₃ concentration and potato starch ($9.1 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) combined with the higher NaNO₃ concentration. The lowest levels of MT production were found for colonies grown with cellulose ($1.7 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

At the level of individual MT characterization, again NaNO₃ was superior to NH₄⁺ as the nitrogen source, particularly when present at higher concentrations (Table S4). Strain ATCC 34916 produced RL-2, RE, VJ, SG, SH, and SF but no VA. RL-2 was the most abundant, and VJ and SF were the MTs produced at the lowest amounts.

Effects of the different carbon sources on all three genotype S strains were compared using the cultures shown in Fig. 3. Here, NaNO₃ was used as the sole nitrogen source at a concentration of 250 mg N/L, a condition that led to strong sporulation in the initial experiments with ATCC 34916.

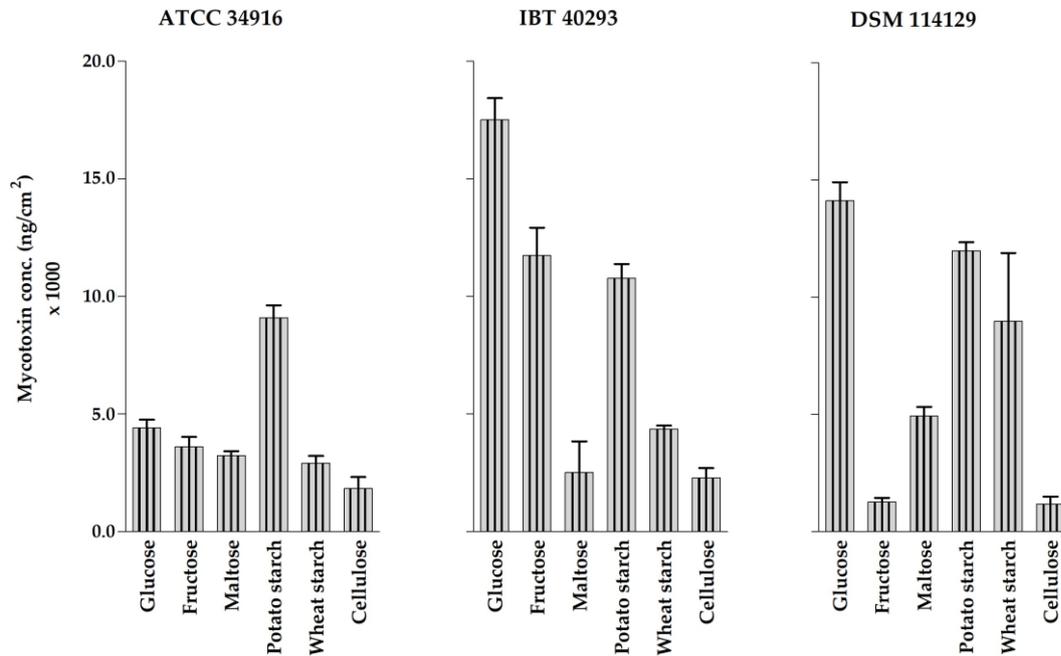
***Stachybotrys chartarum* - genotype S strains**

FIG 7 Accumulated concentrations of the macrocyclic trichothecenes roridin E, roridin L-2, verrucarol J, satratoxin G, satratoxin H, and satratoxin F measured for cultures of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129 grown on AMM containing glucose, fructose, maltose, potato starch, wheat starch, or cellulose as the carbon source (with concentrations that were normalized to 4 g C/L) and NaNO₃ as the nitrogen source (with 250 mg N/L). The data are normalized to the area of the respective colonies (ng/cm²). For representative images of these corresponding cultures, compare with Fig. 3.

Comparison of the total amounts of MTs produced per plate (Table S4) demonstrated that the cultures grown with potato starch produced the highest levels of MTs. The highest concentration was measured for IBT 40293, which was significantly higher ($P < 0.05$; $632.6 \pm 32.9 \mu\text{g}/\text{agar plate}$) than those produced by ATCC 34916 and DSM 114129. The colonies grown on plates containing wheat starch or cellulose produced generally lower levels of MTs.

The MT concentrations measured for colonies grown on plates containing the mono- and disaccharides glucose, fructose, and maltose revealed differences between the three strains. ATCC 34916 produced higher levels of MTs per plate, strain IBT 40293 showed an intermediate phenotype, and strain DSM 114129 showed the weakest level of MT production. The two latter strains formed substantial MT levels only on glucose. The lowest levels of MT production for ATCC 34916 and DSM 114129 were reached with fructose (73.9 ± 12.1 and $3.8 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{agar plate}$), while the lowest levels of MT production for IBT 40293 were reached with maltose ($18.2 \pm 9.5 \mu\text{g}/\text{agar plate}$).

The tested mono- and disaccharides were clearly the inferior carbon sources and stimulated lower MT production than starch and cellulose, which was particularly obvious for IBT 40293 and DSM 114129.

MT production calculated as total amount of MTs per cm² of colony area (Fig. 7) revealed some differences between the six carbon sources: colonies grown on potato starch produced relatively high amounts of MTs (ATCC 34916: $9.1 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; IBT 40293: $10.8 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; DSM 114129: $12.0 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), and colonies grown on cellulose produced comparatively lower amounts (ATCC 34916: $1.8 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; IBT 40293: $2.3 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; DSM 114129: $1.2 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). These results resembled those obtained for colony growth and sporulation, as all three strains formed very dark and densely sporulating colonies when grown on potato starch but flat, weakly sporulating and flimsy colonies on cellulose.

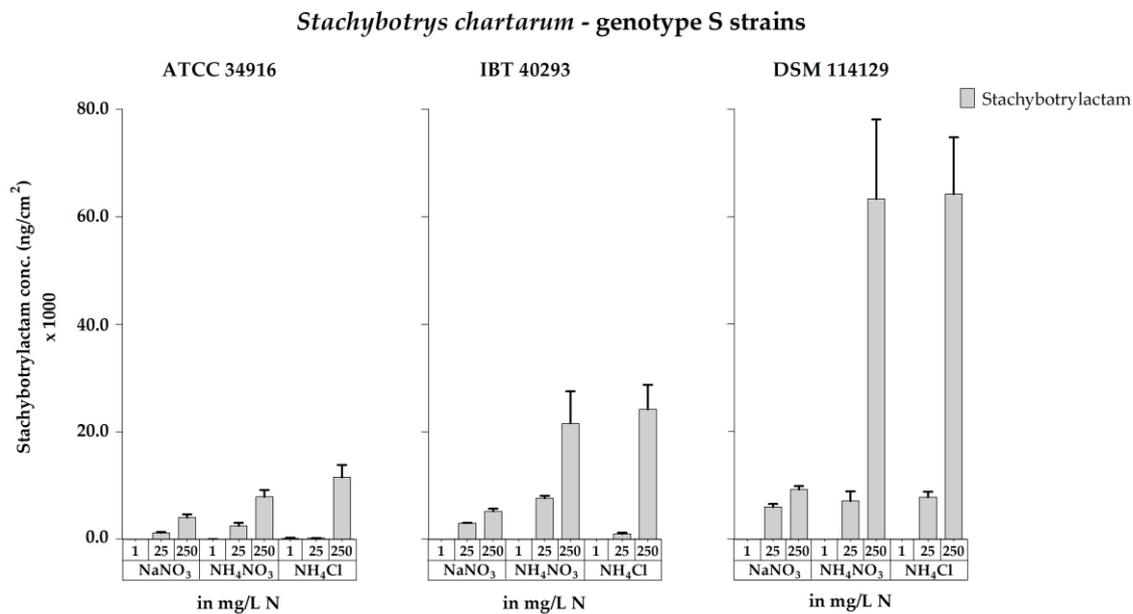


FIG 8 Stachybotrylactam concentrations measured for cultures of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129 grown on AMM supplemented with NaNO₃, NH₄NO₃, or NH₄Cl as the nitrogen source at concentrations of 1, 25, or 250 mg N/L. The data are normalized to the area of the respective colonies (ng/cm²). For representative images of these corresponding cultures, compare Fig. 1 and Fig. S1 in the supplemental material.

In conclusion, considering the data for growth, sporulation, and MT production (calculated as either ng of MTs per plate or ng of MTs per cm²), potato starch was clearly the superior and most reliable carbon source for all three strains tested. Growth on potato starch resulted in large colonies with dense mycelium and high levels of sporulation and MT production.

Production of stachybotrylactam. To evaluate the effect of the different nitrogen and carbon sources on STLAC production, the same cultures already analyzed for MT production were also screened for STLAC production.

(i) Influence of various nitrogen sources on the production of stachybotrylactam.

The impact of NaNO₃, NH₄NO₃, and NH₄Cl on the production of STLAC was investigated using cultures of the three genotype S strains grown on plates containing 1, 25, or 250 mg N/L and 10 g glucose/L (Fig. 1; Fig. S1). After toxin extraction, the purified samples were analyzed by LC-MS/MS, and their STLAC content was determined.

As shown in Fig. 8 and Table S5, increasing NaNO₃ concentrations had a positive effect on STLAC production in all three strains, but NaNO₃ was a comparatively inferior nitrogen source to trigger STLAC production, and significantly smaller amounts of STLAC ($P < 0.05$) were produced than observed when NH₄NO₃ and NH₄Cl were the nitrogen sources, a pattern that was clearly different than that obtained for MT production (Fig. 4). The impacts of NH₄NO₃ and NH₄Cl were very similar, and both nitrogen sources supported a strong production of STLAC. DSM 114129 was the best STLAC producer, while ATCC 34916 was the weakest. We observed no positive correlation between sporulation and STLAC production, since nonsporulating colonies also produced large amounts of STLAC.

(ii) Influence of different carbon sources on the production of stachybotrylactam.

To determine a potential impact of different carbon sources on STLAC production, we also tested the cultures of strain ATCC 34916 shown in Fig. 2.

The observation that NaNO₃ was the inferior nitrogen source for STLAC production compared to NH₄NO₃ and NH₄Cl could not be confirmed in this data set, but for ATCC 34916, this effect was also not particularly pronounced on the glucose-containing plates. For ATCC 34916, the impact of all nitrogen sources was similar in that all these sources supported stronger STLAC production at higher concentrations (Fig. 9; Table S6).

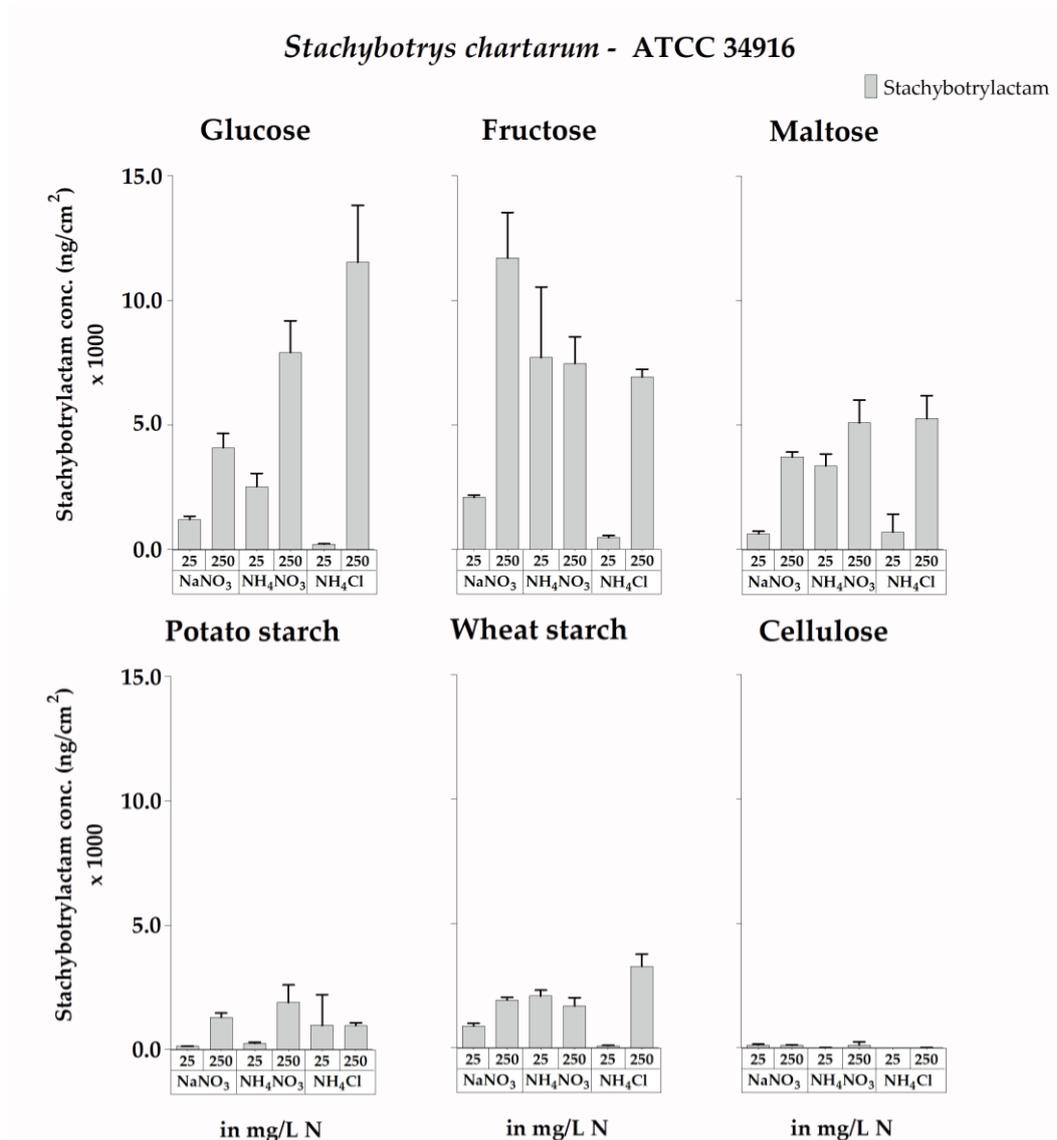


FIG 9 Stachybotrylactam concentrations measured for cultures of *S. chartarum* genotype S strain ATCC 34916 grown on AMM containing glucose, fructose, maltose, potato starch, wheat starch, or cellulose as the sole carbon source (with concentrations that were normalized to 4 g C/L) and combined with the nitrogen sources NaNO₃, NH₄NO₃, or NH₄Cl (either 25 or 250 mg N/L). The data are normalized to the area of the respective colonies (ng/cm²). For representative images of these corresponding cultures, compare Fig. 1 and 2.

Comparison of the six different carbon sources revealed that, overall, STLAC production was more affected by the carbon source than by the nitrogen source. The mono- and disaccharides led to better STLAC production than the two types of starch and cellulose, and no correlation was evident between STLAC production and colony size or the level of sporulation. Again, these patterns are contrary to those observed for MT production.

In further experiments, we compared the influence of the different carbon sources on all three genotype S strains. In this experiment, NaNO₃ was used as the sole nitrogen source at a concentration of 250 mg N/L. The corresponding cultures are shown in Fig. 3.

For STLAC production in all three strains (Fig. 10; Table S6), the mono- and disaccharides yielded larger amounts than the two types of starch and in particular cellulose that nearly abolished STLAC production.

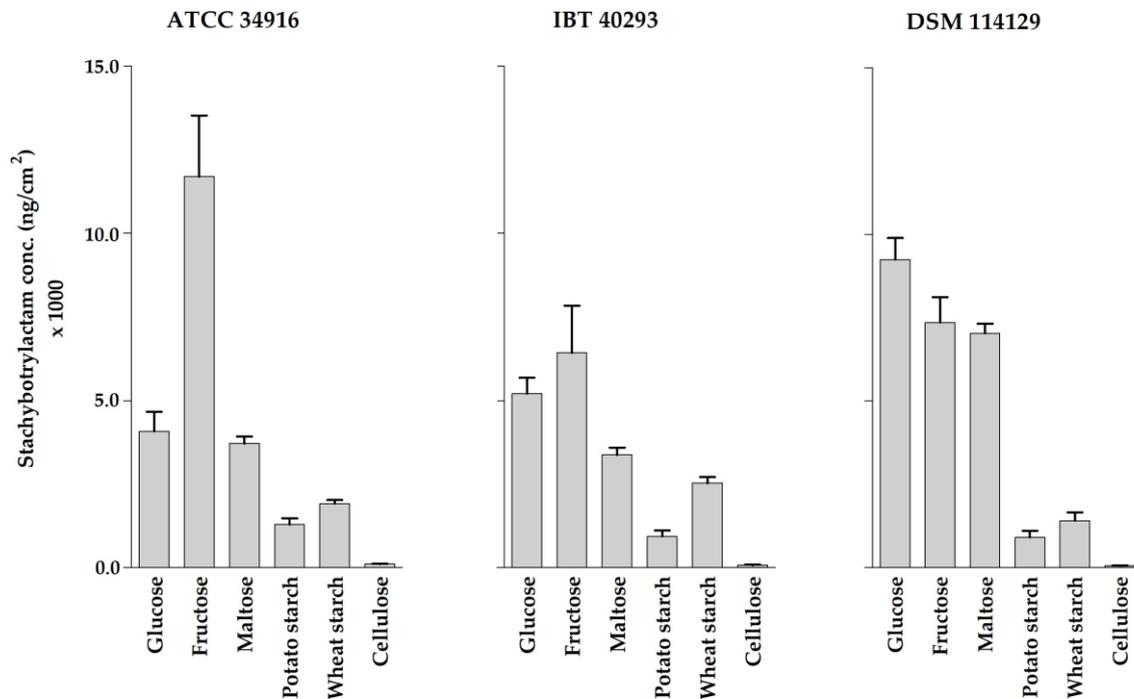
Stachybotrys chartarum - genotype S strains

FIG 10 Stachybotrylactam concentrations measured for cultures of *S. chartarum* genotype S strains ATCC 34916, IBT 40293, and DSM 114129 grown on AMM containing glucose, fructose, maltose, potato starch, wheat starch, or cellulose as the carbon source (with concentrations that were normalized to 4 g C/L) and NaNO₃ as the nitrogen source (with 250 mg N/L). The data are normalized to the area of the respective colonies (ng/cm²). For representative images of these corresponding cultures, compare Fig. 3.

DISCUSSION

Fungi are potent producers of a wide array of extra- and intracellular compounds, including secondary metabolites and other molecules. While some of these molecules are essential for fungal growth, many others are not directly required, and, in many cases, their benefit for the producing organism remains elusive (60). *Stachybotrys* species produce a broad spectrum of secondary metabolites, and, to date, more than 200 different compounds have been discovered, including macrocyclic trichothecenes (MTs) and phenylspirodrimanans (PSDs) (8). Most of these metabolites have been linked to either hazardous or beneficial health effects in humans and animals (30).

Despite their medical relevance, there is a substantial lack of knowledge about the impact of nutrients on mycotoxin production in *S. chartarum*. Several studies analyzed the effects of complex media and substrates on growth and toxin production (51, 53, 54), but this approach is not suitable to define the impact of single nutrients. In various fungi, it was shown that hyphal growth, mycotoxin profiles, and concentrations are significantly influenced by the available nutrients, especially the nitrogen and carbon sources (45–47). The strong effect of these compounds is not surprising considering the fact that nitrogen and carbon are essentially required for proteins, nucleic acids, and other cell substances, and their constant supply is a prerequisite for growth.

The observation that *S. chartarum* grows well in *Aspergillus* minimal medium (AMM) was the starting point of this study. It allowed us to analyze the impact of defined nitrogen and carbon sources on growth, sporulation, and mycotoxin production of *S. chartarum*. We studied three genotype S strains of the species *S. chartarum*. The selected strains originated from three substrates, namely, oats (ATCC 34916), building material from an apartment in Oakland (IBT 40293), and oregano (DSM 114129). Despite their different origins, the overall effect of nutrients on mycelial growth and mycotoxin production was well comparable for the three strains.

According to our data, the impact of the different nitrogen and carbon sources tested on growth and especially sporulation was very similar to that on MT production, or, in other words, large and strongly sporulating colonies formed the highest concentrations of MTs, and less or nonsporulating colonies formed lower or even undetectable amounts of MTs. Mycotoxins of several fungi are known to be associated with sporulation and are secreted by growing colonies (61), and a link between secondary metabolism and sporulation is a common feature in many filamentous fungi (62). Previously, similar results were obtained with *S. chartarum* (57), and, therefore, our observations are in good agreement with published data.

Due to different pathways that are engaged in nitrogen catabolism, many fungi are competent in using a large variety of nitrogen sources (63). NH_4^+ and NO_3^- play a major role in various biochemical processes; they differ in the oxidation state of nitrogen and are suitable nitrogen sources for many fungi. In this study, we compared the impact of three inorganic nitrogen sources, namely, NaNO_3 , NH_4NO_3 , and NH_4Cl . The resulting colonies grown on AMM agar differed and revealed that each nitrogen source had a distinct impact.

NaNO_3 was shown to be the superior nitrogen source for all three strains and allowed substantially better growth that resulted in dense and heavily sporulating mycelium with high MT production. Our data also imply that NaNO_3 had to be present in concentrations corresponding to 10 mg N/L or higher to enable good growth of the cultures. NO_3^- has to be reduced to the level of NH_4^+ before it can feed into metabolism, a process that requires genes that encode nitrate and nitrite reductases (64). Such genes are well defined in other fungi, for example, *Neurospora crassa* (Sordariales, Ascomycota) (65) and *Aspergillus nidulans* (Eurotiales, Ascomycota) (66), but are not yet identified in the genome of *S. chartarum*.

In contrast, NH_4Cl was surprisingly a much poorer nitrogen source, and cultivation on NH_4Cl -containing medium resulted in small, nonsporulating colonies with low or even undetectable MT production. A first hint that cultivation on NH_4Cl -containing medium can lead to abrogation of sporulation of *Stachybotrys* species dates back to 1963 (67). Our data demonstrate that this impact is already evident at low concentrations (≥ 25 mg N/L). This negative impact of NH_4^+ is surprising since NH_4^+ ions can be directly used to produce glutamine from glutamate (68), whereas the assimilation of NO_3^- is a more elaborate process. NH_4^+ -mediated inhibition of sporulation has been reported for several fungi (69–71), but the underlying mechanism has not yet been disclosed.

The finding that NaNO_3 enables better growth than NH_4Cl is one of the key findings of this study. For different organisms, it is well known that due to the potential toxicity of NH_4^+ , the sensing and uptake of this ion are carefully regulated by specific transporters and can be inhibited by regulatory proteins (72). Scarce growth with NH_4^+ salts was observed for different fungi. Brian, Curtis, and Hemming (73) suggested that certain types of organic acids are required during growth with NH_4^+ to provide keto acids that prevent an accumulation of toxic NH_4^+ ions in cells by stopping the uptake mechanisms until acceptor molecules are again available. According to an alternative explanation, the inhibitory effect of NH_4^+ results from a pH shift since the assimilation of NH_4^+ is always accompanied by a release of H^+ cations and a concomitant acidification (74). The resulting weak assimilation can then be improved by addition of buffering organic acid salts (75). Hence, the influence of pH on growth, sporulation, and mycotoxin production should clearly be investigated in future studies. Another aspect that may be relevant in this context is that NO_3^- could be used and could therefore be beneficial as an electron acceptor during nitrate respiration, a process that is found in many fungi (76). Alternative respiration pathways are used by certain fungi under oxygen limitation (77), although this condition is unlikely under the experimental settings of this study.

Interestingly, mycelial growth, sporulation, and MT production of colonies grown on NH_4NO_3 were more similar to those of colonies grown on NH_4Cl , suggesting that the assimilation of NO_3^- is suppressed, and the negative impact of NH_4^+ prevails. This

regulatory system has not yet been described for *S. chartarum*, but it is known as nitrogen catabolite repression and has been found in various other fungi (78). When NH_4^+ is present, other genes that are involved in the acquisition and utilization of alternative nitrogen sources are repressed (68). This seems to have an adaptive significance in natural habitats, such as in soil, where NH_4^+ and NO_3^- frequently occur together. Since more energy has to be expended for the assimilation of NO_3^- , it can be assumed that the latter is not preferentially used (75). Whether the mechanism of nitrogen catabolite repression applies for *S. chartarum* is an open question and clearly requires further studies.

Since for other fungi nitrogen concentration was described to have a major impact on the biosynthesis of mycotoxins (46, 48, 49), we analyzed this production at different nitrogen concentrations, namely, 0, 1, 5, 10, 25, 50, 250, and 500 mg N/L. For *S. chartarum*, there are hardly any data available on the impact of different nitrogen concentrations. Building materials have a low nitrogen content but have been described to provide suitable conditions for growth and toxin formation; however, the actual influence of nitrogen remained unclear (22). Ulrich et al. (54) also speculated on a possible effect of nitrogen concentration on the production of mycotoxins, since fewer mycotoxins were detected on nitrogen-rich complex media than on media with a lower nitrogen content. However, this study used complex, not well-defined media, which hampers any clear analysis of the impact of individual nutrients.

When *S. chartarum* was cultivated on higher concentrations of NH_4^+ , MT production decreased to levels that were undetectable, whereas it increased clearly when cultivated on increasing concentrations of NO_3^- . The cultivation on small amounts of nitrogen (1 and 5 mg/L), regardless of their chemical nature, led to large but flat and hardly sporulating colonies. This suggests that a scarcity of nitrogen triggered an extensive spreading of hyphae that explored the environment for a substrate richer in nitrogen, which resulted in a small amount of fungal mass. Similar growth phenotypes have also been demonstrated for *Candida albicans* (*Saccharomycetales*, *Ascomycota*) and *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomycetales*, *Ascomycota*). They are controlled by nitrogen transceptors, nitrogen transporters that act also as receptors and control downstream signaling pathways and enable survival in a nitrogen-depleted environment through the formation of pseudohyphae and filamentous growth toward new nitrogen sources (79, 80).

Since previous studies were not sufficient to describe the impact of different monosaccharides and polysaccharides on the growth and mycotoxin production of *Stachybotrys*, we tested the effects of different carbon sources, namely, glucose, fructose, maltose, potato starch, wheat starch, and cellulose. The different carbon substrates were combined with the three nitrogen sources NaNO_3 , NH_4NO_3 , and NH_4Cl . The two most significant observations of this study, the dominant inhibitory effect of NH_4^+ on mycelial growth, sporulation, and MT production and the beneficial effect of NO_3^- , were equally pronounced for all carbon sources tested. This implies that combinatorial effects could be largely excluded, and the effects of the nitrogen sources clearly prevail.

When the cultures grown on NaNO_3 -containing medium were compared, it became apparent that the carbon sources also had a striking impact on colony size, morphology, and sporulation and MT production. Colonies grown on starch-containing medium were strongly sporulating, dark, and composed of a dense mycelial network. The tested mono- and disaccharides were clearly inferior carbon sources compared with starch, and this was particularly obvious for IBT 40293 and DSM 114129. These observations are in good agreement with previous studies that proposed that potato dextrose agar is the optimal nutrition medium for growth and MT production (54, 81). Interestingly, strain ATCC 34916 grew and sporulated better on plates containing mono- and disaccharides. Whether this reflects an adaptation to laboratory conditions or represents a strain-specific trait is unknown.

It is known, however, that the carbon source can have an impact on the production of mycotoxins, but the underlying mechanisms are unknown and most likely are not consistent in different fungal genera (82).

In our experiments, cellulose led to a clearly distinct phenotype. The fungus spread extensively, and the resulting flat and weakly sporulating mycelium covered the whole surface of the plates, indicating that the size of the colonies was limited by the size of the plate and could have been larger. This growth phenotype resembled that observed for plates with low amounts of nitrogen, suggesting that both a scarcity of nitrogen and the presence of cellulose as a sole carbon source trigger a hunger phenotype. The low growth efficiency on cellulose plates most likely reflects that the assimilation of cellulose is an elaborate process that requires a multienzymatic system to degrade the polymer and to obtain glucose molecules (83). This limited supply of glucose may also explain the low MT production. Previous data suggested that high cellulose content promotes MT production (22), and *Stachybotrys* is always described as a cellulolytic fungus (81). Our data demonstrated that this might be true in comparison to other fungi, but other carbon sources are better suited for *S. chartarum*, and cultivation on them enables the formation of a dense mycelial network and high MT production.

We also analyzed the impact of the tested nitrogen and carbon sources on production of a set of seven individual MTs. Our data revealed similar patterns for the three strains, and each strain produced RL-2, RE, VJ, SG, SH, and SF but no VA, which is in line with previous studies (37, 54). The observation that an increase or decrease in the total amount of MTs was also largely reflected in the concentrations of the individual MT suggests that the biosynthetic pathways of these compounds are closely linked. This is particularly interesting since such a linkage of the individual MT is expected, although little data exist on the synthesis pathway of these metabolites, and their interpretation relies to a large extent on presumptions. If correct, the current model suggests RE to be the precursor of a biosynthetic process in which VJ, SH, SG, and SF are consecutively formed (84, 85). According to Degenkolb et al. (84), RL-2 takes on a special role as the end product of a side branch that commences at RE, which implies that RL-2 is not a precursor of the satratoxins.

The question of which MT is the most abundantly produced on agar plates or building materials is not answered yet. In previous studies, SH and RE were detected in larger amounts than the other MTs (51, 54). In the present study, RL-2 was the most abundant MT in all samples. Hence, AMM seems to affect the production of mycotoxins in a different way than the other, less defined media. A limitation of the previous studies is that no RL-2 standard was used in these analyses. Instead, the RL-2 concentrations were determined semiquantitatively with the help of other toxins (54). Hinkley and Jarvis (86) produced an RL-2 standard by isolating RL-2 from rice and applying it in their study. Such laboratory-made reagents are prone to variations, for example, due to a different degree of purity. Additionally, it is conceivable that the commercially available standard used in this study may also differ from the one used by Hinkley and Jarvis in the degree of purity.

The measured concentrations of VJ and SF were the lowest of all MTs analyzed. This result must be considered critically since no reference standards were commercially available for VJ and SF, and we had to measure them using a semiquantitative method and determined their concentrations as equivalents of RE and SG (59). It is conceivable that the concentrations could be higher or lower due to a different ionization behavior in LC-MS/MS than RE and SG.

In contrast to MT production, no correlation between colony area, sporulation, and stachybotrylactam (STLAC) production was observed, indicating that the production of STLAC was not tied to colony growth or sporulation and is therefore most likely controlled by different regulatory circuits than MTs. Our results demonstrate that small and nonsporulating colonies were also able to produce high concentrations of STLAC. These data follow previous results described by Jagels et al. (38) where production of PSDs, including STLAC, already takes place at early stages of colony development (i.e., day 3) before any quantities of MTs are detectable and that STLAC is therefore not a suitable marker for fungal growth. Another striking difference between STLAC and MT production is that all nitrogen sources supported a stronger production of STLAC in a

manner that was proportional to increasing nitrogen concentrations of up to 250 mg/L. Thus, production was not linked to the phenotype of the corresponding colonies but to the available amount of nitrogen. These findings are in good agreement with previous studies demonstrating that the production of isoindolinone derivatives is favored on nitrogen-rich media (38).

For STLAC production of all three strains, the mono- and disaccharides yielded larger amounts than the two types of starch and in particular cellulose that nearly prevented STLAC production. This correlates well with the previous finding of Ulrich and Schäfer (54) that showed that growth on potato dextrose agar resulted in small amounts of STLAC. However, the finding that the highest STLAC concentrations were detectable on cellulose-containing medium is in contrast to the current results. This discrepancy may reflect the impact of other yet unknown molecules that were present in the cellulose-containing medium used by Ulrich and Schäfer (54).

Since STLAC is a representative of PSDs that are presumed to be immunosuppressive (39, 40), it should be considered that nonsporulating, small colonies may also pose a health risk due to the production of STLAC. Unfortunately, since other PSD toxin standards are not available, it is currently impossible to monitor other PSDs.

Conclusions. The analysis of *S. chartarum* genotype S cultures grown on AMM agar plates revealed that various nitrogen and carbon sources distinctly affect morphology and mycotoxin production. NaNO_3 enabled substantially better growth, resulting in a dense and heavily sporulating mycelium with high MT production if present at concentrations higher than 10 mg N/L. In contrast, a strong nonsupportive effect was observed for ammonium. The different nitrogen sources had a strong impact on growth and MT production, but the different carbon sources that were analyzed also had their influence. Considering the data for growth, sporulation, and MT production, potato starch was the superior and most reliable carbon source for all three strains tested. The results confirmed a positive correlation between sporulation and MT production. In contrast, STLAC production was not linked to colony growth and sporulation, indicating that STLAC and MT production are regulated differently. In view of the supplied compounds, the question of whether well-sporulating or nonsporulating phenotypes are the result of nutrient-induced stress is still a matter of debate. But, the obvious impact of nutrients on secondary metabolism emphasizes the importance of standardization in mycotoxin research of *S. chartarum* and the need for well-defined culture media. AMM was identified as a defined medium, which will be helpful in further investigations of the biosynthetic and metabolic pathways and the regulatory mechanisms that control mycotoxin production in *S. chartarum*. The use of AMM will also allow us to determine the impact of other nutritional components, for example, amino acids and salts, in future experiments.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains and culture conditions. In this study, three well-characterized and highly effective MT- and STLAC-producing strains of *S. chartarum* genotype S were analyzed (9, 54), two reference strains (ATCC 34916 and IBT 40293) and one field strain (DSM 114129) that were isolated from animal feed, building material, and culinary herbs, respectively. *S. chartarum* ATCC 34916 was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA), *S. chartarum* IBT 40293 was kindly provided by the BioCentrum of the Technical University of Denmark (DTU, Lyngby, Denmark), and *S. chartarum* DSM 114129 was obtained from the Leibniz-Institute DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany).

The fungal strains were preserved long term in sterile 80% glycerol and maintained at -80°C . Working cultures were grown as three-point cultures on potato dextrose agar (VWR Chemicals, Darmstadt, Germany) for 21 days at 25°C and a water activity (a_w) of 0.98 in the dark. The cultures were checked microscopically for their identity. Five single-spore isolates per strain (\pm five biological replicates) were prepared as described previously (57) to ensure that the used strains were pure and to confirm the species, chemotype, and genotype. The respective species identifications were confirmed for all strains by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (87). Since *S. chartarum* strains cannot be further differentiated into chemotypes by this method, the production of macrocyclic trichothecenes was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (57) to verify them as chemotype S. Additionally, the genotype of the single-spore isolates was confirmed as *S. chartarum* genotype S by triplex PCR according to Ulrich et al. (10).

Spore suspensions of each strain were prepared from single-spore isolates as described previously (57). Afterward, 10 μL of spore suspension was applied by three-point inoculation on the respective agar plates with the indicated additives (three technical replicates). The plates were analyzed after an incubation period of 21 days at 25°C in the dark. The a_w was kept constant at 0.98. The colony areas

TABLE 1 Preparation of *Aspergillus* minimal medium and modifications

Stock solutions	
1. Salt mix (20× stock)	Dissolve the listed salts in 800 mL of distilled water, bring the final volume to 1,000 mL and autoclave. Nitrogen source ^a KCl (potassium chloride) 10.4 g KH ₂ PO ₄ (potassium dihydrogen phosphate) 16.3 g K ₂ HPO ₄ (dipotassium hydrogen phosphate) 20.9 g
2. MgSO ₄ solution (200× stock)	Dissolve in distilled water, bring the final volume to 500 mL, and autoclave. MgSO ₄ • 7H ₂ O (magnesium sulfate heptahydrate) 52.0 g
3. Hunter's trace element solution (1,000× stock)	Solution 1 Dissolve the listed salts in 80 mL of distilled water in the following order: FeSO ₄ • 7H ₂ O (ferrous sulfate heptahydrate) 1.0 g EDTA 10.0 g Adjust the pH with KOH pellets until a golden yellow solution is obtained (pH ~ 5.5). Solution 2 Dissolve the listed salts in 80 mL of distilled water in the following order: ZnSO ₄ • 7H ₂ O (zinc sulfate heptahydrate) 4.40 g H ₃ BO ₃ (boric acid) 2.20 g MnCl ₂ • 4H ₂ O (manganese chloride tetrahydrate) 1.00 g CoCl ₂ • 6H ₂ O (cobalt chloride hexahydrate) 0.32 g CuSO ₄ • 5H ₂ O (copper sulfate pentahydrate) 0.32 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O 0.22 g (ammoniumheptamolybdate tetrahydrate) Combine solutions 1 and 2 and adjust the pH to 6.5 using KOH pellets first and then KOH solutions of decreasing concentration. Bring the final volume to 200 mL with distilled water.
<i>Aspergillus</i> minimal medium ^b	
	Salt mix (20× stock) 50.0 mL MgSO ₄ solution (200× stock) 5.0 mL Carbon source ^c Hunter's trace element solution 1.0 mL The pH was adjusted to 5.6 and the final volume to 1,000 mL using distilled water. For solid media, add agar (20 g/L) and autoclave for 20 min at 121°C.

^aNaNO₃, NH₄NO₃, or NH₄Cl were used at concentrations corresponding to total nitrogen concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 250, or 500 mg/L.

^bAccording to Hill and Kafer (58).

^cGlucose, fructose, maltose, potato starch, wheat starch, or cellulose was used as the carbon source, and the carbon concentrations were uniformly set to 4 g C/L.

(cm²) were determined for three colonies of three independent agar plates (technical replicates), and the average values were calculated.

The nutrition medium used was *Aspergillus* minimal medium (AMM) (58); the composition and modifications are shown in Table 1. AMM contains glucose (10 g/L $\hat{=}$ 4 g C/L) as the carbon source and NaNO₃ (6 g/L $\hat{=}$ 988.8 mg N/L) as the nitrogen source. To investigate the impact of the nitrogen source, NaNO₃ was replaced in some experiments with NH₄NO₃ or NH₄Cl at the indicated concentrations. The amount of the three tested nitrogen sources was adjusted to total concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 250, or 500 mg N/L. In addition, samples without nitrogen addition were tested. All these media contained 10 g/L glucose as the sole carbon source.

To investigate the influence of the carbon source, glucose was replaced by fructose, maltose, potato starch, wheat starch, or cellulose. In all samples, the carbon concentration was uniformly set to 4 g C/L. Thus, concentrations of 10.0 g/L fructose, 9.5 g/L maltose, 9.0 g/L potato starch, 9.0 g/L wheat starch, and 9.0 g/L cellulose were used. NaNO₃ (250 mg N/L) was uniformly added as the sole nitrogen source. In addition, strain ATCC 34916 was also tested with NaNO₃ at a concentration of 25 mg N/L and NH₄NO₃ and NH₄Cl at a concentration of 25 and 250 mg N/L to rule out a variable impact of this nitrogen source in combination with different carbon sources.

Ingredients for preparation of AMM are shown in Table 1, and NaNO₃ and NH₄Cl were purchased from Carl Roth GmbH and Co. KG (\geq 99% *pro analysis* [*p.a.*]; Karlsruhe, Germany). NH₄NO₃ was purchased from Sigma-Aldrich (\geq 99% *p.a.*; St. Louis, MO, USA). Fructose and wheat starch were purchased from Merck Millipore (for biochemistry; Burlington, MA, USA), and maltose, potato starch, and cellulose were purchased from Sigma-Aldrich (\geq 99% *p.a.*; St. Louis, MO, USA). All media were adjusted to pH 5.6 and sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min before use.

Sample preparation for mycotoxin analysis by LC-MS/MS. For toxin extraction and purification, each strain was cultured on AMM in triplicate, as described above. Cultures were stored at -20°C until extraction. For toxin extraction, the content of a whole plate was transferred to a mixing bag (Stomacher 80 Biomaster bags, BA6040/STR/DBL strainer double bags, Seward Limited, Worthing, UK). Then, 50 mL of acetonitrile/water (84/16 [vol/vol]) was added (acetonitrile >99.9% and water; HiPerSolv

TABLE 2 MRM transitions and substance-specific parameters for the identification of seven macrocyclic trichothecenes and stachybotrylactam by LC-MS/MS

Analyte	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	DP ^a (V)	EP ^a (V)	CE ^a (eV)	CXP ^a (V)	Dwell time (ms)
Roridin E	532.36	361.30	71	10	12	26	60
		113.00			35	22	
Roridin L-2	548.37	249.20	46	10	21	16	60
		283.10			17	20	
Verrucaric acid	520.30	249.10	71	10	25	14	40
		457.30			19	26	
Verrucaric acid J	502.30	343.20	71	10	25	20	40
		249.20			29	14	
Satratoxin G	562.28	249.10	56	10	19	16	60
		231.10			27	16	
Satratoxin H	546.38	511.30	56	10	15	38	60
		245.00			27	16	
Satratoxin F	560.30	249.10	71	10	23	14	40
		231.20			27	14	
Stachybotrylactam	386.28	178.00	126	10	49	10	60
		150.20			61	30	

^aDP, declustering potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, cell exit potential.

CHROMANORM for HPLC, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), and bags were treated for 5 min in a bag mixer (Stomacher 80 microBiomaster, Seward Limited, Worthing, UK). Subsequently, sample extracts were filtered through a paper filter (Whatman, 595.5, diameter of 185 mm, Maidstone, UK).

Afterward, 3 mL of filtered extract was diluted with 12 mL of water (1:5), and 10 mL of the aqueous toxin extract was purified using solid-phase extraction (SPE) cartridges (Strata-X 33- μ m polymeric reversed-phase 500 mg/6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) as follows: (i) conditioning: 5 mL of methanol (ROTIPURAN >99.9%; Carl Roth GmbH and Co. KG, Karlsruhe, Germany), (ii) equilibration: 5 mL of water (HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), (iii) loading: 10 mL of diluted aqueous toxin extract, (iv) washing: 10 mL of methanol/water (30/70 [vol/vol]), and (v) elution: 10 mL of methanol (ROTIPURAN >99.9%; Carl Roth GmbH and Co. KG, Karlsruhe, Germany).

The fractions eluted with methanol were evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen and then sent from Ludwig Maximilian University (LMU; Munich, Germany) to Kazimierz Wielki University (Bydgoszcz, Poland) for LC-MS/MS measurements.

The evaporated samples were dissolved in 1 mL of acetonitrile/water (30/70 [vol/vol]) by shaking them for 15 min on a laboratory shaker (2,000 rpm; Multi Reax, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany). As a final step, the toxin extracts were filtered through a polyvinylidene difluoride (PVDF) syringe filter (0.20 μ m, \emptyset 13 mm, Macherey-Nagel GmbH and Co. KG, Düren, Germany) and transferred to a 1.5-mL glass thread vial with a cap (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany).

LC-MS/MS measurement and method performance. LC-MS/MS analysis of all samples was performed using a Shimadzu LC-30AD HPLC equipped with a degassing unit (DGU-20AS), a column oven (CTO-20AC), and an autosampler (SIL-30AC; Duisburg, Germany) and linked to an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany). Analyst 1.6.2 software (Sciex, Darmstadt, Germany) was used for data acquisition and SCIEX OS software 3.0 (Sciex, Darmstadt, Germany) for data analysis.

Chromatography was performed using a Gemini C₁₈ 110-Å reversed-phase LC column (150 \times 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) attached to a guard column (SecurityGuard cartridge, Gemini C₁₈ 4 \times 3.0 mm inside diameter [i.d.], Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The column oven temperature was set to 30°C, and the injection volume was 20 μ L. The binary gradient consisting of eluent A (water) and eluent B (methanol; both containing 5 mmol/L ammonium formate and 0.1% formic acid) with a flow rate of 0.75 mL/min was applied as follows: 0 min 10% B, 2 min 10% B, 14 min 97% B, 16 min 97% B, and 16 min 10% B. The column was equilibrated for 4 min under starting conditions before each run. LC-MS-grade water and methanol were purchased from Merck Millipore (Burlington, MA, USA), and LC-MS-grade formic acid and high-purity ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Mass spectrometric measurements were performed using setting parameters as follows: ion spray voltage (electrospray ionization [ESI+]), 5,000 V; temperature, 550°C; nebulizer gas, 50 lb/in²; heating gas, 50 lb/in²; curtain gas, 25 lb/in²; and collision gas (nitrogen, CAD), level 7.

For analyte tuning and qualitative determination, the compounds were identified in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Reference standards for roridin E (RE), roridin L-2 (RL-2), satratoxin G (SG), satratoxin H (SH), and stachybotrylactam (STLAC) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Verrucaric acid J (VJ) and satratoxin F (SF) were purified from rice cultures (using strain ATCC 34916), as described previously (86), and were identified by comparison with substance-specific parameters for identification by LC-MS/MS as described by Ulrich et al. (10). Although verrucaric acid (VA) was described to be not produced by *Stachybotrys* species (54, 59), the samples were also analyzed for this mycotoxin. Since no reference standards for VA were commercially available, identification was performed as for VJ and SF. The determined MRM transitions and substance-specific parameters for all compounds used are shown in Table 2.

Quantification of RE, RL-2, SG, SH, and STLAC was done by a six-point matrix calibration in triplicate for each point (linear regression). Since no reference standards for VA, VJ, and SF were commercially

TABLE 3 Limit of detection and limit of quantification

Target analyte	<i>Aspergillus minimal medium</i> ^a	
	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Roridin E	1.35	4.50
Roridin L-2	0.87	2.90
Satratoxin G	0.33	1.11
Satratoxin H	0.64	2.14
Stachybotrylactam	0.53	1.76

^aWith glucose (10 g/L) as the carbon source and NaNO₃ (25 mg N/L) as the nitrogen source.

available, they were semiquantitatively determined as equivalents of RE and SG (59). The determined retention times for RE, RL-2, VJ, SG, SH, SF, and STLAC were 14.83 min, 12.66 min, 14.72 min, 13.06 min, 13.30 min, 13.61 min, and 15.28 min, respectively.

To determine matrix suppression effects, solvent and matrix calibrations were done. The matrix effect of AMM was 65% for RE, 40% for RL-2, 63% for SG, 29% for SH, and 25% for STLAC.

The method's precision was defined by measuring two different concentration levels (20 and 100 ng/mL) multiple times ($n = 10$) and comparing the results with the target value. The precision was between 5.9% and 8.8% for RE, 7.2% and 8.9% for RL-2, 4.1% and 6.7% for SG, 5.0% and 6.6% for SH, and 1.8% and 3.1% for STLAC.

The recovery rate of the extraction method was determined, and the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were defined. A signal-to-noise (S/N) ratio of 3 was used for LODs, and a signal-to-noise ratio (S/N) of 10 was used for LOQs. The determined LODs and LOQs are shown in Table 3.

Statistical analysis. Statistical analyses were conducted using the software OriginPro 2021b (64-bit) SR2 (version 9.8.5.212). Comparisons of colony areas and mycotoxin levels observed under various conditions were evaluated for significance by unpaired *t* test (significance level set to a *P* value of <0.05), assuming equal variances for colony areas and unequal variances for mycotoxin levels. Normal distribution was assessed with the Shapiro-Wilk test.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, DOCX file, 6.6 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brigitte Andersen (IBT Culture Collection of Fungi, BioCentrum of the Technical University of Denmark, DTU, Lyngby, Denmark) and Christiane Baschien (Leibniz-Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) for their support.

This research was funded by the Brigitte and Wolfram Gedek Foundation, Ismaning, Germany. Furthermore, this research was also funded by the Polish Minister of Science and Higher Education under the program "Regional Initiative of Excellence" in 2019 to 2022 (grant number 008/RID/2018/19). The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Lombard L, Houbraken J, Decock C, Samson R, Meijer M, Réblová M, Groenewald JZ, Crous PW. 2016. Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia* 36:156–246. <https://doi.org/10.3767/003158516X691582>.
- Hodgson MJ, Morey P, Leung W-Y, Morrow L, Miller D, Jarvis BB, Robbins H, Halsey JF, Storey E. 1998. Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *J Occup Environ Med* 40:241–249. <https://doi.org/10.1097/00043764-199803000-00006>.
- Kuhn DM, Ghannoum M. 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev* 16:144–172. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.144-172.2003>.
- Andersen B, Nielsen KF, Jarvis BB. 2002. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 94:392–403.
- El-Kady IA, Moubasher MH. 1982. Toxicogenicity and toxins of *Stachybotrys* isolates from wheat straw samples in Egypt. *Exp Mycol* 6:25–30. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(82\)90060-3](https://doi.org/10.1016/0147-5975(82)90060-3).
- Biermaier B, Gottschalk C, Schwaiger K, Gareis M. 2015. Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. *Mycotoxin Res* 31:23–32. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0213-3>.
- Li Y, Liu D, Cheng Z, Proksch P, Lin W. 2017. Cytotoxic trichothecene-type sesquiterpenes from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum* with tyrosine kinase inhibition. *RSC Adv* 7:7259–7267. <https://doi.org/10.1039/C6RA26956G>.
- Ibrahim SR, Choudhry H, Asseri AH, Elfaky MA, Mohamed SG, Mohamed GA. 2022. *Stachybotrys chartarum*—a hidden treasure: secondary metabolites, bioactivities, and biotechnological relevance. *J Fungi (Basel)* 8:504. <https://doi.org/10.3390/jof8050504>.
- Andersen B, Nielsen KF, Thrane U, Szaro T, Taylor JW, Jarvis BB. 2003. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* 95:1227–1238. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833031>.

10. Ulrich S, Niessen L, Ekruth J, Schäfer C, Kaltner F, Gottschalk C. 2020. Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Res* 36: 83–91. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00371-x>.
11. Dearborn DG, Smith PG, Dahms BB, Allan TM, Sorenson WG, Montana E, Etzel RA. 2002. Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. *Pediatrics* 110:627–637. <https://doi.org/10.1542/peds.110.3.627>.
12. Miller JD, Rand TG, Jarvis BB. 2003. *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? *Med Mycol* 41:271–291. <https://doi.org/10.1080/1369378031000137350>.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2000. Update: pulmonary hemorrhage/hemosiderosis among infants—Cleveland, Ohio, 1993–1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 49:180–184.
14. Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. 1996. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health* 68:207–218. <https://doi.org/10.1007/BF00381430>.
15. Hintikka E-L. 2004. The role of *Stachybotrys* in the phenomenon known as sick building syndrome. *Adv Appl Microbiol* 55:155–173.
16. Nikulin M, Reijula K, Jarvis BB, Hintikka EL. 1996. Experimental lung mycotoxicosis in mice induced by *Stachybotrys atra*. *Int J Exp Pathol* 77: 213–218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1996.9250323.x>.
17. Vesper S, Dearborn DG, Yike I, Allan T, Sobolewski J, Hinkley SF, Jarvis BB, Haugland RA. 2000. Evaluation of *Stachybotrys chartarum* in the house of an infant with pulmonary hemorrhage: quantitative assessment before, during, and after remediation. *J Urban Health* 77:68–85. <https://doi.org/10.1007/BF02350963>.
18. Forgacs J, Carll WT, Herring AS, Hinshaw WR. 1958. Toxicity of *Stachybotrys atra* for animals. *Trans N Y Acad Sci* 20:787–808. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1958.tb00638.x>.
19. Schneider DJ, Marasas WF, Dale Kuys JC, Kriek NP, Van Schalkwyk GC. 1979. A field outbreak of suspected stachybotryotoxicosis in sheep. *J S Afr Vet Assoc* 50:73–81.
20. Kriek N, Marasas W. 1983. Field outbreak of ovine stachybotryotoxicosis in South Africa, p 279–284. In Ueno Y (ed), *Trichothecenes-chemical, biological and toxicological aspects*. Elsevier Science Ltd, Amsterdam, the Netherlands.
21. Semis M, Dadwal SS, Tegmeier BR, Wilczynski SP, Ito JI, Kalkum M. 2021. First case of invasive *Stachybotrys sinusitis*. *Clin Infect Dis* 72:1386–1391. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa231>.
22. Croft WA, Jarvis BB, Yatawara CS. 1986. Airborne outbreak of trichothecene toxicosis. *Atmos Environ* 20:549–552. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(86\)90096-X](https://doi.org/10.1016/0004-6981(86)90096-X).
23. Gajdusek DC. 1953. Acute infectious hemorrhagic fevers and mycotoxicoses in the union of soviet socialist republics. Literary Licensing, LLC, Whitefish, MT.
24. Ozegovic L, Pavlovic R, Milosev B. 1971. Toxic dermatitis, conjunctivitis, rhinitis, pharyngitis and laryngitis in fattening cattle and farm workers caused by moulds from contaminated straw (stachybotryotoxicosis?). *Veterinaria, Sarajevo* 20:263–267.
25. Grove J. 1988. Non-macrocytic trichothecenes. *Nat Prod Rep* 5:187–209. <https://doi.org/10.1039/np9880500187>.
26. Grove J. 1993. Macrocytic trichothecenes. *Nat Prod Rep* 10:429–448. <https://doi.org/10.1039/np9931000429>.
27. Ueno Y. 1984. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol* 4:124–132.
28. Hanelt M, Gareis M, Kollarczik B. 1994. Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* 128:167–174. <https://doi.org/10.1007/BF01138479>.
29. Thompson WL, Wannemacher RW. 1986. Structure-function relationships of 12, 13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. *Toxicon* 24:985–994. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90004-8).
30. Wang A, Xu Y, Gao Y, Huang Q, Luo X, An H, Dong J. 2015. Chemical and bioactive diversities of the genera *Stachybotrys* and *Memnoniella* secondary metabolites. *Phytochem Rev* 14:623–655. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9365-1>.
31. McLaughlin C, Vaughan M, Campbell I, Wei CM, Stafford M, Hansen B. 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. *Mycotoxins in Human and Animal Health* 1977:263–273.
32. Thompson WL, Wannemacher RW. 1990. *In vivo* effects of T-2 mycotoxin on synthesis of proteins and DNA in rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 105:483–491. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(90\)90151-j](https://doi.org/10.1016/0041-008x(90)90151-j).
33. Cundliffe E, Davies JE. 1977. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob Agents Chemother* 11:491–499. <https://doi.org/10.1128/AAC.11.3.491>.
34. Islam Z, Harkema JR, Pestka JJ. 2006. Satratoxin G from the black mold *Stachybotrys chartarum* evokes olfactory sensory neuron loss and inflammation in the murine nose and brain. *Environ Health Perspect* 114: 1099–1107. <https://doi.org/10.1289/ehp.8854>.
35. Karunasena E, Larranaga MD, Simoni JS, Douglas DR, Straus DC. 2010. Building-associated neurological damage modeled in human cells: a mechanism of neurotoxic effects by exposure to mycotoxins in the indoor environment. *Mycopathologia* 170:377–390. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9330-5>.
36. Yang B, Long J, Pang X, Lin X, Liao S, Wang J, Zhou X, Li Y, Liu Y. 2021. Structurally diverse polyketides and phenylspirodrimanes from the soft coral-associated fungus *Stachybotrys chartarum* SCSIO41201. *J Antibiot (Tokyo)* 74:190–198. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00386-y>.
37. Jarvis BB, Saleme J, Morais A. 1995. *Stachybotrys* toxins. 1. *Nat Toxins* 3: 10–16. <https://doi.org/10.1002/nt.2620030104>.
38. Jagels A, Lindemann V, Ulrich S, Gottschalk C, Cramer B, Hubner F, Gareis M, Humpf HU. 2019. Exploring secondary metabolite profiles of *Stachybotrys* spp. by LC-MS/MS. *Toxins (Basel)* 11:133. <https://doi.org/10.3390/toxins11030133>.
39. Hong K, Kinoshita T, Miyazaki W, Izawa T, Inoue K. 1979. An anticomplementary agent, K-76 monocarboxylic acid: its site and mechanism of inhibition of the complement activation cascade. *J Immunol* 122:2418–2423.
40. Miyazaki W, Tamaoka H, Shinohara M, Kaise H, Izawa T, Nakano Y, Kinoshita T, Hong K, Inoue K. 1980. A complement inhibitor produced by *Stachybotrys complementi*, nov. sp. K-76, a new species of fungi imperfecti. *Microbiol Immunol* 24:1091–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1980.tb02914.x>.
41. Nielsen KF, Holm G, Uttrup L, Nielsen P. 2004. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *Int Biodeterior Biodegradation* 54:325–336. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.05.002>.
42. El-Kady IA, Moubasher MH. 1982. Some cultural conditions that control production of rotridin E and Satra H by *Stachybotrys-chartarum*. *Cryptogam Mycol* 3:151–162.
43. Betina V. 1994. Microbial primary and secondary metabolism. *Prog Ind Microbiol* 30:1–15.
44. Betina V. 1994. Bioactive secondary metabolite of microorganisms. *Prog Ind Microbiol* 30:468.
45. Brzonkalik K, Herrling T, Sylđatk C, Neumann A. 2011. The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *Int J Food Microbiol* 147:120–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.016>.
46. Medina Á, Mateo EM, Valle-Algarra FM, Mateo F, Jiménez M. 2008. Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. *Int J Food Microbiol* 122:93–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.055>.
47. Mühlencoert E, Mayer I, Zapf MW, Vogel RF, Niessen L. 2004. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *Eur J Plant Pathol* 110:651–659. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032404.71695.6b>.
48. Kohut G, Ádám AL, Fazekas B, Hornok L. 2009. N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *Int J Food Microbiol* 130:65–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.002>.
49. Shim W-B, Woloshuk CP. 1999. Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol Lett* 177:109–116. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13720.x>.
50. Bata A, Vanyi A, Lepom P, Dashek W, Llewellyn G. 1989. Temperature-dependent toxin production by *Stachybotrys* species, p 393–400. In O'Rear CE, Llewellyn GC (ed), *Biodegradation research 2*. Springer, New York, NY.
51. Aleksic B, Bailly S, Draghi M, Pestka JJ, Oswald IP, Robine E, Bailly JD, Lacroix MZ. 2016. Production of four macrocyclic trichothecenes by *Stachybotrys chartarum* during its development on different building materials as measured by UPLC-MS/MS. *Build Environ* 106:265–273. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2016.07.002>.
52. Andersen B, Frisvad JC, Sondergaard I, Rasmussen IS, Larsen LS. 2011. Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol* 77:4180–4188. <https://doi.org/10.1128/AEM.02513-10>.
53. Jagels A, Stephan F, Ernst S, Lindemann V, Cramer B, Hubner F, Humpf HU. 2020. Artificial vs. natural *Stachybotrys* infestation—comparison of mycotoxin production on various building materials. *Indoor Air* 30:1268–1282. <https://doi.org/10.1111/ina.12705>.

54. Ulrich S, Schäfer C. 2020. Toxin production by *Stachybotrys chartarum* genotype S on different culture media. *J Fungi (Basel)* 6:159. <https://doi.org/10.3390/jof6030159>.
55. Jarvis B, Hinkley S, Nielsen K. 2000. *Stachybotrys*: an unusual mold associated with water-damaged buildings. *Mycotox Res* 16:105–108. <https://doi.org/10.1007/BF02942994>.
56. Jarvis BB, Lee YW, Comezoglu SN, Yatawara CS. 1986. Trichothecenes produced by *Stachybotrys atra* from Eastern Europe. *Appl Environ Microbiol* 51:915–918. <https://doi.org/10.1128/aem.51.5.915-918.1986>.
57. Tribelhorn K, Twarużek M, Soszczyńska E, Rau J, Baschien C, Straubinger RK, Ebel F, Ulrich S. 2022. Production of satratoxin G and H is tightly linked to sporulation in *Stachybotrys chartarum*. *Toxins (Basel)* 14:515. <https://doi.org/10.3390/toxins14080515>.
58. Hill TW, Kafer E. 2001. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genet Newsl* 48:20–21. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1173>.
59. Gareis M, Gottschalk C. 2014. *Stachybotrys* spp. and the guttation phenomenon. *Mycotoxin Res* 30:151–159. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0193-3>.
60. Cole RJ, Jarvis BB, Schweikert MA. 2003. Handbook of secondary fungal metabolites, vol 3. Gulf Professional Publishing, Houston, TX.
61. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:447–459. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002>.
62. Brodhagen M, Keller NP. 2006. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol Plant Pathol* 7:285–301. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00338.x>.
63. Marzluf G. 1996. Regulation of nitrogen metabolism in mycelial fungi, p 357–368. In Brambl R, Marzluf GA (ed), *Biochemistry and molecular biology*. Springer, New York, NY.
64. Keller NP, Hohn TM. 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 21:17–29. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.0970>.
65. Tomsett AB, Garrett RH. 1980. The isolation and characterization of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 95:649–660. <https://doi.org/10.1093/genetics/95.3.649>.
66. Johnstone I, McCabe P, Greaves P, Gurr S, Cole G, Brow M, Unkles S, Clutterbuck A, Kinghorn J, Innis M. 1990. Isolation and characterisation of the crnA-niiA-niaD gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 90:181–192. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90178-t](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90178-t).
67. McQuade AB. 1963. Morphogenesis and nutrition in the *Memnionella-Stachybotrys* group of fungi. *J Gen Microbiol* 30:429–435. <https://doi.org/10.1099/00221287-30-3-429>.
68. ter Schure EG, van Riel NA, Verrips CT. 2000. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 24:67–83. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00533.x>.
69. Pinon R. 1977. Effects of ammonium ions on sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* 105:367–378. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90134-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90134-3).
70. Chiu SW, Moore D. 1988. Ammonium ions and glutamine inhibit sporulation of *Coprinus cinereus basidia* assayed *in vitro*. *Cell Biol Int Rep* 12:519–526. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(88\)90038-0](https://doi.org/10.1016/0309-1651(88)90038-0).
71. Dickinson JR, Dawes IW. 1983. Ammonium ion repression of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 129:1883–1888. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-6-1883>.
72. van den Berg B, Lister S, Rutherford JC. 2019. Ammonium transceptors: novel regulators of fungal development. *PLoS Pathog* 15:e1008059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008059>.
73. Brian PW, Curtis P, Hemming H. 1947. Glutinosin: a fungistatic metabolic product of the mould *Metarrhizium glutinosum* S. Pope. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 135:106–132. <https://doi.org/10.1098/rspb.1947.0038>.
74. Patrovsky M, Sinovska K, Branska B, Patakova P. 2019. Effect of initial pH, different nitrogen sources, and cultivation time on the production of yellow or orange *Monascus purpureus* pigments and the mycotoxin citrinin. *Food Sci Nutr* 7:3494–3500. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1197>.
75. Morton A, MacMillan A. 1954. The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J Exp Bot* 5:232–252. <https://doi.org/10.1093/jxb/5.2.232>.
76. Takaya N. 2002. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *J Biosci Bioeng* 94:506–510. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(02\)80187-6](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(02)80187-6).
77. Kamp A, Høglund S, Risgaard-Petersen N, Stief P. 2015. Nitrate storage and dissimilatory nitrate reduction by eukaryotic microbes. *Front Microbiol* 6:1492. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01492>.
78. Wiame J-M, Grenson M, Ars HN, Jr. 1985. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv Microb Physiol* 26:1–88.
79. Biswas K, Morschhäuser J. 2005. The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 56:649–669. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04576.x>.
80. Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68:1077–1090. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90079-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90079-r).
81. Samson R, Houbraken J, Thrane U, Frisvad J, Andersen B. 2010. Food and indoor fungi: CBS-KNAW fungal biodiversity centre, vol 2. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands.
82. Wang W, Liang X, Li Y, Wang P, Keller NP. 2022. Genetic regulation of mycotoxin biosynthesis. *J Fungi (Basel)* 9:21. <https://doi.org/10.3390/jof9010021>.
83. Saibi W, Abdeljalil S, Gargouri A. 2011. Carbon source directs the differential expression of β -glucosidases in *Stachybotrys microspora*. *World J Microbiol Biotechnol* 27:1765–1774. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0634-x>.
84. Degenkolb T, Dieckmann R, Nielsen KF, Gräfenhan T, Theis C, Zafari D, Chaverri P, Ismael A, Brückner H, von Döhren H, Thrane U, Petrini O, Samuels GJ. 2008. The *Trichoderma brevicomactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycol Progress* 7:177–219. <https://doi.org/10.1007/s11557-008-0563-3>.
85. McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins (Basel)* 3:802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>.
86. Hinkley SF, Jarvis BB. 2000. Chromatographic method for *Stachybotrys* toxins, p 173–194. In Trucksess MW, Pohland AE (ed), *Mycotoxin protocols*, vol 157. Humana Press, Totowa, NJ.
87. Ulrich S, Biermaier B, Bader O, Wolf G, Straubinger RK, Didier A, Sperner B, Schwaiger K, Gareis M, Gottschalk C. 2016. Identification of *Stachybotrys* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 408:7565–7581. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9800-9>.

IV. DISKUSSION

Filamentöse Schimmelpilze und andere Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, eine Vielzahl strukturell diverser, extrazellulärer Verbindungen zu bilden, die als Sekundärmetaboliten bekannt sind. Diese kleinen Moleküle sind nicht unmittelbar für das Pilzwachstum notwendig und in vielen Fällen ist ihr Nutzen für den produzierenden Organismus unklar (WILLIAMS, 1994; COLE *et al.*, 2003). Die Gruppe der toxischen Sekundärmetaboliten wird als Mykotoxine bezeichnet (FLEMING, 1929; NIELSEN, 2003; MAGAN & ALDRED, 2007). *Stachybotrys*-Spezies bilden ein breites Spektrum an Sekundärmetaboliten und bis heute wurden mehr als 200 verschiedene Verbindungen entdeckt. Zu diesen zählen Mykotoxine wie makrozyklische Trichothecene (Satratoxine G, H und F, Roridin L-2, Roridin E, Verrucarin J) und Phenylspirodrimane (z. B. Stachybotrylactam) (IBRAHIM *et al.*, 2022). Diese Metaboliten können toxisch und demnach schädlich, oder nützlich für Menschen und Tiere sein (WANG *et al.*, 2015a).

Für ein besseres Verständnis der Mykotoxine und ihrer biologischen Bedeutung ist es notwendig, die Mechanismen zu analysieren, die ihre Produktion auslösen, verhindern oder regulieren. Für verschiedene filamentöse Schimmelpilze ist beschrieben, dass die Sporulation und die Produktion von Mykotoxinen funktionell miteinander verbunden sind und Mykotoxine von wachsenden Kolonien gebildet werden (SEKIGUCHI & GAUCHER, 1977; REIß, 1982; SHIM & WOLOSHUK, 2001; CALVO *et al.*, 2002). Für *S. chartarum* wird ebenfalls ein Zusammenhang dieser beiden Prozesse vermutet. Dies wurde bisher jedoch nicht experimentell bestätigt (CALVO *et al.*, 2002).

Die Produktion von Mykotoxinen kann sich außerdem aufgrund unterschiedlicher Wachstumsbedingungen, wie Nährstoff- und Wasserverfügbarkeit sowie temperaturbedingt verändern (NIELSEN *et al.*, 2004; MAGAN & ALDRED, 2007; LOZOWICKA *et al.*, 2022). Es ist beschrieben, dass äußere Faktoren wie Temperatur und Feuchtigkeit die Mykotoxinproduktion von *S. chartarum* beeinflussen (BATA *et al.*, 1989; NIELSEN *et al.*, 2004). Über weitere Faktoren wie Licht, pH-Wert und Nährstoffverfügbarkeit ist jedoch erstaunlich wenig bekannt. In verschiedenen Studien wurde der Einfluss komplexer Medien und Substrate auf das Wachstum und die Mykotoxinproduktion untersucht (ALEKSIC

et al., 2016; JAGELS *et al.*, 2020; ULRICH & SCHÄFER, 2020). Dieser Ansatz ist allerdings für die Untersuchung des Einflusses einzelner Nährstoffe nicht optimal. Für verschiedene Schimmelpilze konnte gezeigt werden, dass das Hyphenwachstum aber auch Mykotoxinprofile und Mykotoxinkonzentrationen erheblich von den verfügbaren Nährstoffen, insbesondere den Stickstoff- und Kohlenstoffquellen, abhängig sind (MÜHLENCOERT *et al.*, 2004; MEDINA *et al.*, 2008; BRZONKALIK *et al.*, 2011). Der Einfluss dieser Nährstoffe ist nicht überraschend, da Stickstoff und Kohlenstoff wesentliche Bestandteile von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Zellsubstanzen darstellen. Ihre kontinuierliche Versorgung ist somit eine Voraussetzung für das Wachstum.

Das Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Faktoren, die Einfluss auf die Mykotoxinproduktion von *S. chartarum* nehmen, zu untersuchen. Hierfür wurden drei Stämme des Genotyps S der Spezies *S. chartarum* untersucht. Die ausgewählten Stämme wurden aus drei verschiedenen Lebensräumen isoliert, nämlich Futtermittel (ATCC 34916), Baumaterial (IBT 40293) und Lebensmittel (DSM 114129). In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Sporulation und der Produktion von Mykotoxinen untersucht und geprüft, ob diese beiden Vorgänge funktionell miteinander in Verbindung stehen. Außerdem wurde mit Hilfe eines chemisch definierten Minimal-Nährmediums der Einfluss verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, die in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurden, auf das Myzelwachstum und die Mykotoxinproduktion untersucht.

1 Sporulation und Produktion von Mykotoxinen

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Feststellung, dass die Verwendung von zwei Potato-Dextrose-Medien verschiedener Hersteller (VWR Chemicals und Sigma-Aldrich) zu gänzlich unterschiedlichen Wachstumsphänotypen der angezüchteten Kolonien führten (Publikation 1, Kapitel 2.1, Abbildung 1). Auf Potato-Dextrose-Agar des Herstellers VWR Chemicals (PDA-V) sporulierten die Kolonien deutlich und hatten durch die Sporen ein schwarzes Erscheinungsbild, während auf Potato-Dextrose-Agar des Herstellers Sigma-Aldrich (PDA-S) die Sporenbildung der Kolonien deutlich geringer bzw. kaum vorhanden war. Der einzige offensichtliche Unterschied in der Zusammensetzung der beiden Medien war, dass PDA-V Kartoffel-Pepton und PDA-S stattdessen Kartoffel-Infusion als

Hauptbestandteil enthält. Ansonsten wurden durch die beiden Hersteller keine exakteren Daten zur Herstellung und Zusammensetzung bereitgestellt. Sowohl Kartoffel-Pepton als auch Kartoffel-Infusion sind komplexe Gemische und ihre Einzelbestandteile und Konzentrationen sind weitgehend undefiniert. Nach BEEVER und BOLLARD (1970) wird Kartoffel-Infusion aus einem wässrigen Extrakt aus Kartoffelknollen gewonnen. Kartoffel-Infusion wird als geeignete Quelle für Stickstoff und Mineralsalze und damit als ein gutes Nährmedium für Schimmelpilze beschrieben (BEEVER & BOLLARD, 1970). Kartoffel-Pepton ist eine häufig verwendete Alternative. Die Inhaltsstoffe sind besser, jedoch dennoch nicht vollumfänglich definiert. Kartoffel-Pepton ist ein Gemisch aus Peptiden und freien Aminosäuren und wird durch enzymatische Hydrolyse aus Kartoffelprotein gewonnen. Die darin enthaltenen Peptide und Aminosäuren können als geeignete Stickstoffquellen für das Wachstum dienen. Es kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass die stickstoffreichen, kleinen Moleküle in Kartoffel-Pepton leichter zugänglich sind als in Kartoffel-Infusion. Das bessere Wachstum und die starke Sporulation von *S. chartarum* auf PDA-V könnte daher auf eine bessere Stickstoffversorgung in diesem Medium zurückzuführen sein. Ein Einfluss von Stickstoff auf das Wachstum und die Satratoxinproduktion von *S. chartarum* wurde bereits in früheren Studien vermutet (JAGELS *et al.*, 2020; ULRICH & SCHÄFER, 2020). Auch bei anderen filamentösen Schimmelpilzen wie *Alternaria alternata* hängt die Produktion von Alternariol und anderen Sekundärmetaboliten von der Stickstoffkonzentration und der jeweiligen Art der Stickstoffquelle ab (BRZONKALIK *et al.*, 2011). Die Produktion von Ochratoxin A durch *Aspergillus*-Spezies und Fumonisin durch *Fusarium proliferatum* wird durch Stickstoffmangel induziert, während hohe Stickstoffmengen die Fumonisinproduktion hemmen (SHIM & WOLOSHUK, 1999; MEDINA *et al.*, 2008; TUDZYNSKI, 2014). Stickstoff kann demnach, je nach Konzentration, aber auch in Abhängigkeit vom jeweiligen Schimmelpilz und vom Mykotoxin, unterschiedliche Einflüsse nehmen.

Vergleicht man die Kulturen auf PDA-S mit denen auf PDA-V, sporulierten die Kulturen auf PDA-V deutlich stärker und bildeten höhere Konzentrationen von Satratoxin G und H (Publikation 1, Kapitel 2.1, Abbildung 2 & Kapitel 2.4, Abbildung 4). Die nachgewiesene Satratoxinkonzentration pro cm² der Koloniefäche korrelierte positiv mit der Anzahl der Sporen pro cm² (Publikation

1, Kapitel 2.4, Abbildung 5). Um einen weiteren Beweis für diese Korrelation zu liefern, wurden die Stämme zusätzlich in Kartoffel-Dextrose-Bouillon des Herstellers VWR Chemicals angezüchtet. Es ist bekannt, dass bei der Anzucht in Flüssigmedium das gebildete Myzel von *S. chartarum* nicht sporuliert (Publikation 1, Kapitel 2.1, Abbildung 3). Die ausbleibende Sporulation bei Anzucht in Flüssignährmedien konnte bereits bei diversen Schimmelpilzen beobachtet werden. Demnach sporulieren diese Schimmelpilze nur bei direktem Kontakt mit der Luft. Dies lässt die Annahme zu, dass dieses Phänomen auftritt, da der Luftkontakt für eine effiziente Verteilung der Konidien notwendig ist.

Sowohl die HPLC-Daten als auch die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests (MTT-Test) (Publikation 1, Kapitel 2.1, Tabelle 2 & Kapitel 2.3, Tabelle 3) zeigen deutlich, dass die Produktion von Satratoxinen in der Flüssigkultur nicht nachweisbar war. Demnach produzierte *S. chartarum* trotz des guten Wachstums in Flüssigkultur keine oder nur sehr geringe, nicht nachweisbare Mengen an Satratoxinen. Dies dient als weiterer Beweis dafür, dass die Sporulation und die Produktion von Satratoxinen bei *S. chartarum* eng miteinander verbunden sind.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit (Publikation 2) gezeigt werden, dass die verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen das Wachstum und insbesondere die Sporulation auf eine ähnliche Weise beeinflussen wie die Produktion der makrozyklischen Trichothecene (Satratoxine G, H und F, Roridin L-2, Roridin E, Verrucarin J). Das heißt, große und stark sporulierende Kolonien bildeten die höchsten Konzentrationen von makrozyklischen Trichothecenen, wohingegen weniger oder nicht sporulierende Kolonien geringere bzw. nicht nachweisbare Mengen an makrozyklischen Trichothecenen produzierten (Publikation 2, Kapitel 2.1, Abbildung 1 & Kapitel 2.3.1, Abbildung 4). Damit konnten die Ergebnisse der ersten Studie, mit den Daten der zweiten Studie, bestätigt werden. Ergänzend lässt sich feststellen, dass die Sporulation nicht nur mit der Produktion von Satratoxin G und H korreliert (Publikation 1), sondern ebenfalls mit allen anderen von *S. chartarum* gebildeten makrozyklischen Trichothecenen (Satratoxin G, H und F, Roridin L-2, Roridin E, Verrucarin J) (Publikation 2, Kapitel 2.3.1, Abbildung 5).

Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor für *Aspergillus*-Spezies und deren Sekundärmetaboliten (Sterigmatocystin, Aflatoxine) beschrieben (HICKS *et al.*, 1997; CALVO *et al.*, 2002; BRODHAGEN & KELLER, 2006). Eine Verbindung zwischen Sekundärmetabolismus und Sporulation ist daher ein gemeinsames Merkmal vieler filamentöser Schimmelpilze (BRODHAGEN & KELLER, 2006). Beide Prozesse können außerdem gemeinsame regulatorische Elemente aufweisen (HICKS *et al.*, 1997). Bei *Aspergillus*- und *Fusarium*-Spezies wird die Mykotoxinproduktion durch einen G-Protein-vermittelten Signalweg reguliert (HICKS *et al.*, 1997; MCDONALD *et al.*, 2004). Durch intensive genetische Forschung konnte der Signalweg entschlüsselt werden, der die Sterigmatocystin-Aflatoxin-Produktion und die Sporulation in *Aspergillus nidulans* miteinander verbindet. Beide Prozesse werden von zwei Genen, *fluG* und *flbA*, reguliert. Ein Funktionsverlust des Gens *fluG* führt zum Einbruch der Sporulation und der Sterigmatocystin-Produktion (HICKS *et al.*, 1997). Für *S. chartarum* ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt, wie diese beiden Prozesse reguliert werden und der Mangel an genetischen Daten erschwert derzeit jeden Fortschritt auf diesem Gebiet. Bislang beruht die genetische Forschung weitgehend auf der Analyse der verfügbaren genomischen Informationen. So konnten z. B. durch den Vergleich des Core-Trichothecen-Genclusters Ähnlichkeiten zwischen den Gattungen *Fusarium* und *Stachybotrys* festgestellt werden (SEMEIKS *et al.*, 2014). Da *Fusarium*- und *Stachybotrys*-Spezies ähnliche Mykotoxin-Klassen produzieren, z. B. die Trichothecene (UENO, 1983), ist es denkbar, dass die Produktion von Trichothecenen und die Sporulation sowohl bei *Fusarium*-, als auch bei *Stachybotrys*-Spezies über einen G-Protein-vermittelten Signalweg reguliert werden.

Des Weiteren zeigte *S. chartarum* in Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen einen Trend zur Produktion von mehr Satratoxin H als Satratoxin G (Publikation 1 und 2). Die Ursache hierfür ist unbekannt. Dennoch wurde dies von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Diese untersuchten z. B. Baumaterialien, die mit *S. chartarum* kontaminiert waren, oder komplexe Nährmedien (HINKLEY & JARVIS, 2000; ALEKSIC *et al.*, 2016; ULRICH & SCHÄFER, 2020).

Obwohl in früheren Untersuchungen beschrieben wurde, dass Sporen höhere Konzentrationen von Satratoxin G enthalten als das Myzel (ABDEL-HAFEZ & EL-SAID, 1997), ist dies die erste Studie, die eine positive Korrelation zwischen der Sporulation und der Produktion von makrozyklischen Trichothecenen bei *S. chartarum* aufzeigt. Dieses Ergebnis hat eine direkte, praktische Auswirkung auf die Diagnostik von mykologischen Proben in Innenräumen. Wird eine Kontamination mit Schimmelpilzen festgestellt oder vermutet, kann das in der Probe vorhandene Myzel zunächst auf Sporenbildung untersucht werden. Bei einem positiven Ergebnis folgt dann die Identifizierung des Schimmelpilz-Isolats. Für analytische Tests zum Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen kann durch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse PDA als geeignetes Medium bestätigt werden. Dennoch kann die Verwendung von PDA-V oder eines anderen validierten Potato-Dextrose-Mediums nur dringend empfohlen werden, da nicht jedes PDA die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen zuverlässig gewährleistet.

Im Gegensatz zu der Bildung von makrozyklischen Trichothecenen konnte für die Produktion von Stachybotrylactam, einem Vertreter der Gruppe der Phenylspirodrimane, keine Abhängigkeit von der Koloniefläche oder der Sporulation festgestellt werden (Publikation 2, Kapitel 2.1, Abbildung 1 & Kapitel 2.4.1, Abbildung 8). Diese Beobachtung lässt die Annahme zu, dass die Produktion von Stachybotrylactam durch andere Mechanismen als die Sporulation und die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen reguliert wird. Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch kleine und nicht sporulierende Kolonien in der Lage sind, hohe Konzentrationen von Stachybotrylactam zu bilden. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit früheren Studien. So beschrieben JAGELS *et al.* (2019), dass die Produktion von Phenylspirodrimanen, einschließlich Stachybotrylactam, bereits in frühen Stadien der Kolonieentwicklung (ca. am dritten Tag) beginnt. Zu diesem Zeitpunkt sind makrozyklische Trichothecene noch nicht in nennenswerten Konzentrationen nachweisbar. Demnach ist Stachybotrylactam nach JAGELS *et al.* (2019) kein geeigneter Marker für das Pilzwachstum. Da Stachybotrylactam ein Vertreter der Phenylspirodrimane ist und diese unter Verdacht stehen immunsuppressiv zu sein (HONG *et al.*, 1979; MIYAZAKI *et al.*, 1980), sollte in Betracht gezogen werden, dass auch nicht-sporulierende, kleine Kolonien aufgrund der Produktion von Stachybotrylactam ein Gesundheitsrisiko darstellen können.

2 Charakterisierung von Melanin

Ein weiteres bemerkenswertes Merkmal der *S.-chartarum*-Kolonien, die auf PDA-S angezchtet wurden, stellte der grün eingefärbte Bereich um die Kolonien dar (Publikation 1, Kapitel 2.1, Abbildung 1). Dieser wurde bereits von SAMSON *et al.* (2010) als „green halo“ beschrieben und als Schlüssel zur Unterscheidung von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* auf PDA der Marke Difco genannt. Unsere Daten zeigen, dass der sogenannte „green halo“ ebenfalls bei Kolonien der Spezies *S. chartarum* auftreten kann. Dieses Ergebnis lässt die Annahme zu, dass das Auftreten des „green halos“ wiederum von der Art des verwendeten PDAs abhängt, jedoch nicht charakteristisch für die eine oder andere Spezies ist.

Des Weiteren wurde das in den Sporen von *S. chartarum* enthaltene Pigment untersucht. Die erhobenen ATR-Infrarotspektroskopie-Daten deuten darauf hin, dass die Konidien verschiedener Kolonien und Stämme von *S. chartarum*, die in dieser Studie auf PDA-V und PDA-S angezchtet wurden, ein gleichartiges Pigment enthalten (Publikation 1, Kapitel 2.1, Abbildung 1). Das dunkle Pigment wurde bereits in früheren Studien beschrieben, z. B. als eine Struktur, die die Ionisierung bei Messungen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie unterdrückt (BUSKIRK *et al.*, 2011; ULRICH *et al.*, 2016). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde jedoch nur vermutet, dass es sich hierbei um ein Melanin handelte. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Spektren weisen eine deutliche Ähnlichkeit zu zuvor beschriebenen Melanin-Spektren anderer filamentöser Schimmelpilze auf (PINTO *et al.*, 2018; RIBERA *et al.*, 2018). Es ist daher anzunehmen, dass *S. chartarum* ein für Schimmelpilze typisches Melanin produziert.

3 Kommunikation zwischen Schimmelpilzkolonien

Neben der positiven Korrelation zwischen der Sporulation und der Bildung von Satratoxinen konnte in der Arbeit „Production of Satratoxin G and H Is Tightly Linked to Sporulation in *Stachybotrys chartarum*“ ein weiterer Faktor beobachtet werden, der die Bildung von Satratoxinen deutlich beeinflusste. Der Vergleich von Ein- und Drei-Punkt-Kulturen zeigte, dass die Interaktionen zwischen den Kolonien einen positiven Einfluss auf die Sporulation und auch die Satratoxinproduktion nahmen (Publikation 1, Kapitel 2.1, Abbildung 1 & Kapitel 2.4, Abbildung 4). Diese Beobachtung ist ein starker Hinweis dafür, dass benachbarte Kolonien desselben Stammes miteinander kommunizieren. An solchen Interaktionen sind

oftmals flüchtige Verbindungen beteiligt, jedoch schließen die Experimente dieser Studie dies weitgehend aus, da für Kolonien, die durch eine Wand voneinander getrennt waren, keine Zunahme der Sporulation im Vergleich zur Einzelkolonie festgestellt werden konnte (Publikation 1, Kapitel 2.5, Abbildung 6b). Die erhobenen Daten lassen die Annahme zu, dass die Kommunikation wahrscheinlich über direkten physischen Kontakt oder über Moleküle erfolgt, die in den Agar sezerniert werden (Publikation 1, Kapitel 2.5, Abbildung 6c). Die Erkenntnis, dass diese Interaktionen zu einer erhöhten Produktion von Satratoxinen führten, deutet auf eine antagonistische Wechselwirkung hin. Die Kolonien scheinen in der Lage zu sein einen potenziellen Konkurrenten um verfügbare Ressourcen wahrzunehmen und hierauf mit der Produktion von Satratoxinen zu reagieren. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Mykotoxine in der Lage sind, einem anderen Genotyp-S-Stamm von *S. chartarum* zu schaden, wie es durch unseren Versuch anzunehmen wäre. Dennoch ist denkbar, dass sie das Wachstum anderer Schimmelpilze beeinträchtigen könnten. Dies wurde bereits in einer anderen Arbeit vermutet (BUTT & GHAFAR, 1972). Wenn diese antagonistischen Reaktionen tatsächlich durch den Wettbewerb um dieselben Ressourcen ausgelöst werden, stellt sich die Frage, wie Kolonien zwischen Hyphen, die zur selben Kolonie gehören, und solchen, die zu einer benachbarten und rivalisierenden Kolonie gehören, differenzieren. Weitere Experimente sind erforderlich, um diese faszinierenden Prozesse genauer zu beleuchten und aufzuklären.

Aus der vorgestellten Arbeit geht hervor, dass die Mykotoxinproduktion und die Sporulation offenbar durch eine Kombination verschiedener Signale gesteuert werden (Publikation 1). Insgesamt war der Einfluss des Nährmediums (PDA-V gegenüber PDA-S) auf die Sporulation und die Mykotoxinproduktion jedoch deutlich stärker als der Einfluss der Anzucht als Drei- gegenüber einer Ein-Punkt-Kultur. Andere Faktoren wie Temperatur und Feuchtigkeit spielen ebenfalls eine Rolle und tragen zu den komplexen Mechanismen, die die Produktion von Mykotoxinen bestimmen, bei.

4 Einfluss verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen

Die Beobachtung, dass *S. chartarum* auf *Aspergillus* Minimal Medium (AMM) angezüchtet werden kann, ermöglichte eine Untersuchung des Einflusses verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen auf das Wachstum, die

Sporulation und die Mykotoxinproduktion von *S. chartarum* (Publikation 2). Der Gesamteinfluss der getesteten Nährstoffe auf das Myzelwachstum und die Mykotoxinproduktion war trotz der unterschiedlichen Herkunft der drei getesteten Stämme vergleichbar.

Schimmelpilze sind in der Lage eine Vielzahl von Stickstoffquellen zu metabolisieren (MARZLUF, 1996). NH_4^+ und NO_3^- spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen biochemischen Prozessen, sie unterscheiden sich in der Oxidationsstufe des Stickstoffs und sind für viele Schimmelpilze geeignete Stickstoffquellen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von drei anorganischen Stickstoffquellen, nämlich NaNO_3 , NH_4NO_3 und NH_4Cl , näher beleuchtet. Diese Stickstoffquellen dissoziieren in Wasser zu Ammonium- bzw. Nitrat-Ionen. Die Kolonien, die auf AMM-Agar mit je einer dieser Stickstoffquellen angezüchtet wurden, unterschieden sich deutlich in ihrem Wachstum, Phänotyp und in ihrer Mykotoxinproduktion (Publikation 2, Kapitel 2.1, Abbildung 1). Hiermit konnte gezeigt werden, dass jede Stickstoffquelle einen unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung von *S. chartarum* nimmt.

NaNO_3 erwies sich in der vorliegenden Arbeit als geeignetste Stickstoffquelle für alle drei getesteten Stämme. Es ermöglichte das beste Wachstum, mit einem dichten und stark sporulierenden Myzel und einer hohen Produktion von makrozyklischen Trichothecenen. Außerdem lassen die erhobenen Daten die Annahme zu, dass NaNO_3 in Konzentrationen von mindestens 10 mg Stickstoff pro Liter Medium enthalten sein muss, um ein gutes Wachstum der Kulturen zu gewährleisten (Publikation 2, Kapitel 2.1, Abbildung 1 & Kapitel 2.3.1, Abbildung 4). Bevor NO_3^- in den Stoffwechsel eingespeist werden kann, ist zunächst eine Reduktion auf das Niveau von NH_4^+ notwendig. Dieser Prozess erfordert Gene, die für Nitrat- und Nitritreduktasen kodieren (KELLER & HOHN, 1997). Solche Gene sind in anderen Schimmelpilzen wie *Neurospora crassa* (TOMSETT & GARRETT, 1980) und *Aspergillus nidulans* (JOHNSTONE *et al.*, 1990) gut definiert. Sie wurden jedoch bisher noch nicht im Genom von *S. chartarum* identifiziert.

Im Gegensatz zu NaNO_3 wurde festgestellt, dass NH_4Cl überraschenderweise deutlich schlechter als Stickstoffquelle geeignet ist. Die Anzucht auf NH_4Cl führte zu kleinen, nicht-sporulierenden Kolonien mit geringer bzw. nicht nachweisbarer Produktion von makrozyklischen Trichothecenen (Publikation 2, Kapitel 2.1, Abbildung 1 & Kapitel 2.3.1, Abbildung 4). Ein erster Hinweis darauf, dass NH_4Cl

die Sporulation von *Stachybotrys*-Spezies zum Erliegen bringen kann, stammt aus dem Jahr 1963 (MCQUADE, 1963). Unsere Daten zeigen, dass dieser Effekt bereits bei niedrigen Konzentrationen (≥ 25 mg Stickstoff pro Liter) eintritt. Da NH_4^+ -Ionen direkt zur Synthese von Glutamin aus Glutamat eingesetzt werden können und die Assimilation von NO_3^- ein aufwendigerer Prozess ist, stellte sich der negative Einfluss von NH_4^+ als überraschendes Ergebnis dar (TER SCHURE *et al.*, 2000). Eine NH_4^+ -vermittelte Hemmung der Sporulation wurde auch für zahlreiche andere Schimmelpilze beschrieben (PINON, 1977; DICKINSON & DAWES, 1983; CHIU & MOORE, 1988), jedoch ist der zugrundeliegende Mechanismus bislang unklar.

Die Beobachtung, dass NaNO_3 zu einem besseren Wachstum als NH_4Cl führte, ist eine der wichtigsten Ergebnisse dieser Studie. Es ist bekannt, dass für verschiedene Organismen, aufgrund der potenziellen Toxizität von NH_4^+ , die Erkennung und Aufnahme dieses Ions durch spezifische Transporter sorgfältig reguliert wird und durch regulatorische Proteine unterbunden werden kann (VAN DEN BERG *et al.*, 2019). Des Weiteren konnte für verschiedene filamentöse Schimmelpilze ein unzureichendes Wachstum in Verbindung mit NH_4^+ -Salzen beobachtet werden. BRIAN *et al.* (1947) nahmen an, dass organische Säuren während des Wachstums mit NH_4^+ zur Bereitstellung von Ketosäuren benötigt werden. Die Aufnahme von NH_4^+ wird unterbrochen bis ausreichend Akzeptor-Moleküle verfügbar sind, um so eine Akkumulation von toxischen NH_4^+ -Ionen in den Zellen zu verhindern. Eine alternative Erklärung ist, dass die hemmende Wirkung von NH_4^+ das Resultat einer pH-Verschiebung ist, da die Assimilation von NH_4^+ mit einer stetigen Freisetzung von H^+ -Kationen einhergeht. Dies führt zu einer Ansäuerung des Mediums (PATROVSKY *et al.*, 2019). MORTON und MACMILLAN (1954) beschrieben jedoch, dass der aus diesem pH-Effekt resultierenden schwachen Assimilation von NH_4^+ durch die Zugabe von puffernden organischen Säuresalzen entgegengewirkt werden kann. Der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum, die Sporulation und die Mykotoxinproduktion sollte daher in zukünftigen Studien dringend untersucht werden. Ein weiterer Aspekt, der in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnte, ist die Tatsache, dass NO_3^- als Elektronenakzeptor bei der Nitratatmung genutzt werden kann, ein Prozess, der bei vielen Pilzen zu finden ist (TAKAYA, 2002). Zudem nutzen einige Schimmelpilze bei Sauerstoffmangel alternative Atmungswege (KAMP *et al.*, 2015). Dies ist jedoch aufgrund des experimentellen Aufbaus dieser Studie, bei der die Schimmelpilze in

direktem Kontakt zur Luft wuchsen, unwahrscheinlich.

Interessanterweise waren das Myzelwachstum, die Sporulation und die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen der Kolonien, die auf NH_4NO_3 angezüchtet wurden, denen auf NH_4Cl ähnlicher als denen auf NaNO_3 . Diese Beobachtung lässt die Annahme zu, dass die Assimilation von NO_3^- unterdrückt wurde und der Einfluss von NH_4^+ überwog. Für *S. chartarum* wurde dieser Regulierungsmechanismus bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben. Er ist jedoch als Stickstoff-Katabolit-Repression bekannt und wurde bei verschiedenen anderen Schimmelpilzen nachgewiesen (WIAME *et al.*, 1985). Hierbei werden Gene, die an der Metabolisierung alternativer Stickstoffquellen beteiligt sind, solange unterdrückt, solange NH_4^+ vorhanden ist (TER SCHURE *et al.*, 2000). Dies scheint eine adaptive Bedeutung in natürlichen Lebensräumen zu haben, z. B. im Boden, in dem sowohl NH_4^+ als auch NO_3^- vorkommt. Da die Assimilation von NO_3^- ein energieaufwendigerer Prozess ist, kann angenommen werden, dass NO_3^- nicht bevorzugt genutzt wird (MORTON & MACMILLAN, 1954). Ob der Mechanismus der Stickstoff-Katabolit-Repression auch für *S. chartarum* gilt, konnte nicht geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Da für andere Schimmelpilze beschrieben wurde, dass die Stickstoffkonzentration einen erheblichen Einfluss auf die Biosynthese von Mykotoxinen nimmt (SHIM & WOLOSHUK, 1999; MEDINA *et al.*, 2008; KOHUT *et al.*, 2009), wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Stickstoffkonzentrationen, nämlich 0, 1, 5, 10, 25, 50, 250 und 500 mg Stickstoff pro Liter AMM, getestet (Publikation 2, Kapitel 2.1, Abbildung 1). Für *S. chartarum* existierten zu Beginn dieser Arbeit kaum Daten über den Einfluss verschiedener Stickstoffkonzentrationen. Für Baumaterialien, die einen geringen Stickstoffgehalt aufweisen, wurde allerdings beschrieben, dass sie geeignete Bedingungen für das Wachstum und die Mykotoxinproduktion bieten. Der tatsächliche Einfluss von Stickstoff blieb hierbei jedoch unklar (CROFT *et al.*, 1986). Auch ULRICH und SCHÄFER (2020) vermuteten einen Einfluss der Stickstoffkonzentration auf die Bildung von Mykotoxinen, da auf stickstoffreichen Nährmedien weniger Mykotoxine nachgewiesen werden konnten als auf stickstoffarmen Medien. In dieser Studie wurden jedoch komplexe, nicht ausreichend definierte Nährmedien verwendet. Diese lassen eine Analyse des Einflusses einzelner Nährstoffe nicht zu.

In der vorliegenden Studie führten bereits geringe Konzentrationen von NH_4^+ zu einer drastischen Verringerung der Produktion von makrozyklischen Trichothecenen, sodass diese nicht mehr nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu führten steigende Konzentrationen von NO_3^- zu einem deutlichen Anstieg der Produktion von makrozyklischen Trichothecenen. Des Weiteren resultierte die Anzucht von *S. chartarum* auf AMM-Agarplatten mit niedrigen Stickstoffkonzentrationen (1 und 5 mg/L), unabhängig von der Stickstoffquelle, in großen, jedoch flachen und kaum sporulierenden Kolonien. Diese Beobachtung lässt annehmen, dass eine Stickstoffknappheit eine umfangreiche Ausbreitung von Hyphen auslöst, die die Umgebung nach einem stickstoffreicheren Substrat absuchen. Dies führt jedoch im Umkehrschluss zu einer verminderten Bildung von Pilzbiomasse. Ähnliche Wachstumsphänotypen wurden bereits für *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Die Steuerung des Wachstums erfolgt hierbei durch Stickstoff-Transzeptoren. Stickstoff-Transzeptoren sind Transporter, die auch als Rezeptoren fungieren und nachgeschaltete Signalwege steuern. Ein Überleben in einer stickstoffarmen Umgebung wird bei diesen sonst in der Hefe-Form wachsenden Schimmelpilzen durch die Bildung von Pseudohyphen und fadenförmiges Wachstum in Richtung neuer Stickstoffquellen ermöglicht (GIMENO *et al.*, 1992; BISWAS & MORSCHHÄUSER, 2005).

Da in früheren Studien der Einfluss verschiedener Mono- und Polysaccharide auf das Wachstum und die Mykotoxinproduktion von *Stachybotrys*-Spezies aufgrund der Verwendung von komplexen Medien nicht ausreichend beschrieben wurde, wurden in dieser Arbeit zusätzlich verschiedene Kohlenstoffquellen (Glucose, Fructose, Maltose, Kartoffelstärke, Weizenstärke und Zellulose) getestet und verglichen. Die Kohlenstoffquellen wurden dabei mit den drei Stickstoffquellen NaNO_3 , NH_4NO_3 und NH_4Cl kombiniert. Die beiden wichtigsten Beobachtungen dieser Studie, die negative Wirkung von NH_4^+ auf das Myzelwachstum, die Sporulation und die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen, und die positive Wirkung von NO_3^- , traten in Kombination mit allen getesteten Kohlenstoffquellen auf (Publikation 2, Kapitel 2.2, Abbildung 2 & Kapitel 2.3.2, Abbildung 6). Dies bedeutet, dass kombinatorische Effekte weitgehend ausgeschlossen werden können und der Einfluss der Stickstoffquellen überwiegt.

Der Vergleich der auf NaNO_3 -haltigen Medien angezüchteten Kulturen macht jedoch deutlich, dass die Kohlenstoffquellen ebenfalls einen nicht unwesentlichen

Einfluss auf die Größe, die Morphologie, die Sporulation und die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen nahmen (Publikation 2, Kapitel 2.2, Abbildung 3 & Kapitel 2.3.2, Abbildung 7). Die auf stärkehaltigen Medien angezüchteten Kolonien sporulierten stark, waren sehr dunkel und bildeten ein dichtes Myzel. Die getesteten Mono- und Disaccharide waren im Vergleich zur Stärke eindeutig schlechter geeignete Kohlenstoffquellen. Dies war bei den Stämmen IBT 40293 und DSM 114129 besonders deutlich. Die Beobachtungen stimmen gut mit früheren Studien überein, in denen Kartoffel-Dextrose-Agar als optimales Nährmedium für das Wachstum und die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen beschrieben wurde (SAMSON *et al.*, 2010; ULRICH & SCHÄFER, 2020). Interessanterweise wuchs und sporulierte der Stamm ATCC 34916 besser auf den Medien, die Mono- und Disaccharide enthielten, als die anderen beiden Stämme. Ob diese Beobachtung auf eine Anpassung des Stammes an Laborbedingungen zurückzuführen ist, oder eine stammspezifische Eigenschaft darstellt, ist unbekannt.

Es ist beschrieben, dass die Kohlenstoffquelle einen Einfluss auf die Produktion von Mykotoxinen haben kann, jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen bis zum heutigen Zeitpunkt unbekannt und mit hoher Wahrscheinlichkeit bei verschiedenen Schimmelpilzgattungen nicht einheitlich (WANG *et al.*, 2023).

In unseren Experimenten wiesen die Kolonien, die auf zellulosehaltigen AMM-Agarplatten angezüchtet wurden, einen deutlich abweichenden Phänotyp auf. Der Schimmelpilz breitete sich stark aus und das flache und schwach sporulierende Myzel bedeckte die gesamte Oberfläche der Agarplatte (Publikation 2, Kapitel 2.2, Abbildung 3). Diese Beobachtung lässt die Annahme zu, dass die Größe der Kolonien zu Versuchsende durch die Größe der Petrischale begrenzt wurde. Diese hätten demnach größer sein können. Der Wachstumsphänotyp ähnelte dem, der bei Kolonien beobachtet wurde, die auf AMM mit geringen Stickstoffkonzentrationen angezüchtet wurden. Somit scheinen sowohl Stickstoffknappheit als auch Zellulose, wenn diese als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, einen Hungerphänotyp auszulösen. Es ist anzunehmen, dass die geringe Wachstumseffizienz auf Agarplatten mit Zellulose mit hoher Wahrscheinlichkeit den aufwendigen Prozess der Zelluloseverwertung widerspiegelt. Die Assimilation von Zellulose ist ein Prozess, der ein multi-enzymatisches System zum Abbau des Polymers zur Gewinnung von

Glucosemolekülen erfordert (SAIBI *et al.*, 2011). Das begrenzte Angebot an Glucose könnte damit das hinsichtlich der produzierten Biomasse begrenzte Wachstum und die geringe Produktion von makrozyklischen Trichothecenen erklären. Frühere Daten deuten darauf hin, dass ein hoher Zellulosegehalt in Nährmedien oder Substraten die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen fördert (CROFT *et al.*, 1986). *Stachybotrys* wird außerdem stets als zellulolytischer Schimmelpilz beschrieben (SAMSON *et al.*, 2010). Unsere Daten zeigen, dass dies im Vergleich mit anderen Schimmelpilzen möglicherweise zutrifft, aber andere Kohlenstoffquellen als Zellulose für das Wachstum von *S. chartarum* deutlich besser geeignet sind. Diese ermöglichen die Bildung eines dichten Myzels und einer erhöhten Produktion von makrozyklischen Trichothecenen (Publikation 2, Kapitel 2.2, Abbildung 3 & Kapitel 2.3.2, Abbildung 7).

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem im Einzelnen der Einfluss der getesteten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen auf die Produktion von sieben makrozyklischen Trichothecenen untersucht. Durch unsere Daten wird deutlich, dass jeder der drei getesteten Stämme Roridin L-2, Roridin E, Verrucarin J, Satratoxin G, Satratoxin H und Satratoxin F, jedoch kein Verrucarin A bildete. Dies stimmt mit früheren Studien überein (JARVIS *et al.*, 1995; ULRICH & SCHÄFER, 2020). Die Beobachtung, dass sich eine Zunahme oder Abnahme der Gesamtkonzentration an makrozyklischen Trichothecenen auch weitgehend in den Konzentrationen jedes einzelnen Mykotoxins widerspiegelt, deutet darauf hin, dass die Biosynthesewege dieser Toxine eng miteinander verbunden sind und ähnlich reguliert werden. Eine solche Verbindung der einzelnen Biosynthesewege wird auf Grundlage früherer Untersuchungen zwar angenommen, jedoch liegen bisher nur wenige Daten hierzu vor. Die Interpretation der wenigen, verfügbaren Daten beruht daher weitgehend auf Vermutungen. Im derzeitigen Modell wird angenommen, dass Roridin E der Vorläufer eines biosynthetischen Prozesses ist, bei dem nacheinander Verrucarin J und die Satratoxine G, H und F gebildet werden (DEGENKOLB *et al.*, 2008; MCCORMICK *et al.*, 2011). Nach DEGENKOLB *et al.* (2008) nimmt Roridin L-2 eine gesonderte Rolle ein und entsteht als ein Endprodukt aus Roridin E und ist demnach keine Vorstufe der Satratoxine.

Welches makrozyklische Trichothecen auf Agarplatten oder Baumaterialien in der höchsten Konzentration gebildet wird, bleibt weiterhin ungeklärt. In früheren Studien konnten Satratoxin H und Roridin E in höheren Konzentrationen als die

anderen makrozyklischen Trichothecene nachgewiesen werden (ALEKSIC *et al.*, 2016; ULRICH & SCHÄFER, 2020). In der vorliegenden Arbeit war Roridin L-2 in allen gemessenen Proben das Mykotoxin, das in deutlich höheren Konzentrationen nachgewiesen wurde. Daher scheint AMM die Produktion von Mykotoxinen auf eine andere Weise zu beeinflussen als andere, weniger definierte Medien. Hierbei muss jedoch zusätzlich berücksichtigt werden, dass bei früheren Studien andere Messmethoden angewendet wurden. Um den Einfluss der Messmethode beurteilen zu können, müsste die Produktion von Mykotoxinen auf verschiedenen Medien mit einer einheitlichen Messmethode verglichen werden. Des Weiteren wurde in anderen Studien kein kommerziell erhältlicher Roridin L-2 Standard verwendet. Stattdessen wurde die Konzentration von Roridin L-2 semiquantitativ mit Hilfe anderer Toxine bestimmt (ULRICH & SCHÄFER, 2020). HINKLEY und JARVIS (2000) stellten außerdem selbst einen Roridin L-2 Standard her, indem sie Roridin L-2 aus Reis isolierten. Solche im Labor hergestellten Reagenzien sind jedoch anfällig für Schwankungen, z. B. hinsichtlich ihres Reinheitsgrades. Es ist denkbar, dass sich der in unserer Studie verwendete handelsübliche Standard, in seinem Reinheitsgrad, von dem von HINKLEY und JARVIS (2000) verwendeten Standard, unterscheidet.

Die gemessenen Konzentrationen von Verrucaridin J und Satratoxin F waren die niedrigsten von allen untersuchten makrozyklischen Trichothecenen. Dieses Ergebnis ist jedoch kritisch zu betrachten, da für Verrucaridin J und Satratoxin F kein handelsüblicher Referenzstandard erhältlich war. Die Konzentrationen dieser Mykotoxine wurden semiquantitativ als Äquivalent von Roridin E bzw. Satratoxin G bestimmt (GAREIS & GOTTSCHALK, 2014). Es ist denkbar, dass die Konzentrationen aufgrund eines abweichenden Ionisierungsverhaltens der Toxine in der LC-MS/MS im Vergleich zu Roridin E und Satratoxin G höher oder niedriger sein könnten.

Wie bereits im Kapitel „Sporulation und Produktion von Mykotoxinen“ beschrieben, konnte im Gegensatz zur Produktion von makrozyklischen Trichothecenen, keine Korrelation zwischen der Koloniefäche, der Sporulation und der Produktion von Stachybotrylactam festgestellt werden.

Ein weiterer auffälliger Unterschied zwischen der Produktion von Stachybotrylactam und makrozyklischen Trichothecenen bestand darin, dass alle Stickstoffquellen mit steigender Konzentration zu einer Zunahme der Produktion

von Stachybotrylactam führten (Publikation 2, Kapitel 2.4.1, Abbildung 8). Die Produktion stand demnach nicht in Verbindung mit dem Phänotyp der entsprechenden Kolonie, sondern mit der verfügbaren Stickstoffmenge. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit früheren Studien, die zeigen, dass die Produktion von Isoindolinon-Derivaten auf stickstoffreichen Medien begünstigt wird (JAGELS *et al.*, 2019).

Die Produktion von Stachybotrylactam aller drei Stämme war auf AMM mit Glucose, Fructose oder Maltose deutlich höher als auf AMM mit Kartoffelstärke, Weizenstärke und insbesondere Zellulose (Publikation 2, Kapitel 2.4.2, Abbildung 9 & 10). Zellulose führte zu einem nahezu vollständigen Einbruch der Produktion von Stachybotrylactam. Diese Beobachtungen stimmen gut mit früheren Ergebnissen von ULRICH und SCHÄFER (2020) überein. Sie beschrieben, dass das Wachstum auf Kartoffel-Dextrose-Agar zu einer Produktion geringer Mengen von Stachybotrylactam führt. Die Feststellung, dass die höchsten Konzentrationen auf zellulosehaltigen Medien nachweisbar waren, steht jedoch im Gegensatz zu unseren aktuellen Ergebnissen. Diese Diskrepanz könnte auf den Einfluss anderer, noch unbekannter Moleküle zurückzuführen sein, die in dem von ULRICH und SCHÄFER (2020) verwendeten zellulosehaltigen Medium enthalten waren (z. B. Hefeextrakt).

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass das Wachstum und die Mykotoxinproduktion bei Anzucht von *S.-chartarum*-Genotyp-S-Stämmen auf AMM durch verschiedene Stickstoff- und Kohlenstoffquellen deutlich beeinflusst werden. Dies unterstreicht die Bedeutung der Standardisierung in der Mykotoxinforschung von *S. chartarum* und die Notwendigkeit chemisch eindeutig definierter Kulturmedien.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Stachybotrys chartarum ist ein toxigener Schimmelpilz, der häufig aus wassergeschädigten Gebäuden oder unsachgemäß gelagerten Futtermitteln isoliert wird. Die von diesem Schimmelpilz gebildeten Sekundärmetaboliten werden mit schweren Erkrankungen bei Menschen und Tieren in Verbindung gebracht. Makrozyklische Trichothecene und insbesondere Satratoxine sind hochtoxisch und die potentesten bekannten Mykotoxine, die von diesem Schimmelpilz produziert werden. Phenylspirodrimane, z. B. Stachybotrylactam, bilden die größte Klasse von Sekundärmetaboliten und besitzen vermutlich eine immunsuppressive Wirkung. Da die Synthese von Sekundärmetaboliten von verschiedenen Faktoren wie Wachstumszeit, Temperatur, Feuchtigkeit und verfügbaren Nährstoffen beeinflusst wird, ist es zur Bewertung des pathogenen Potenzials von *S.-chartarum*-Isolaten notwendig, sie unter Bedingungen anzuzüchten, die die Toxinproduktion zuverlässig gewährleisten. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluss der Kulturbedingungen auf die Produktion von Mykotoxinen, jedoch konzentrierten sich diese Studien auf undefinierte oder komplexe Baumaterialien und Medien. Diese machen eine Analyse des Einflusses spezifischer Nährstoffe unmöglich.

Ziel dieser Studie war es, verschiedene Faktoren zu untersuchen, die das Myzelwachstum und die Mykotoxinproduktion von *S. chartarum* beeinflussen und hierdurch einen tieferen Einblick in den Sekundärmetabolismus dieses Schimmelpilzes zu erhalten. In dieser Studie führte das Wachstum von *S.-chartarum*-Stämmen des Genotyps S auf Potato-Dextrose-Agar von zwei verschiedenen Herstellern zu unterschiedlichen Ergebnissen, nämlich einerseits gut wachsenden und sporulierenden Kulturen mit hohen Satratoxinkonzentrationen, und andererseits Kulturen mit spärlicher Sporenbildung und geringer Satratoxinproduktion. Da Potato-Dextrose-Agar ein Medium ist, das für Untersuchungen der Mykotoxinbildung durch *S. chartarum* empfohlen wird, ist diese Beobachtung von besonderer Bedeutung und sollte bei künftigen Studien und Diagnoseverfahren berücksichtigt werden. Weitere Experimente, die mit den beiden Medien durchgeführt wurden, lieferten deutliche Hinweise auf eine positive Korrelation zwischen der Bildung von Satratoxinen und der Sporulation, d. h., große und insbesondere stark sporulierende Kolonien bildeten die größten Mengen an makrozyklischen Trichothecenen.

Hierbei korrelierte eine geringere Sporulation mit einer geringeren Zytotoxizität aufgrund einer geringeren Satratoxinproduktion und umgekehrt. Ein Vergleich von Drei-Punkt- und Ein-Punkt-Kulturen, die auf den beiden Potato-Dextrose-Agars angezüchtet wurden, zeigte außerdem, dass zwischen den Kolonien eine Kommunikation stattfand. Diese beeinflusste sowohl die Sporulation als auch die Mykotoxinproduktion von *S. chartarum*. Die verstärkte Sporulation in Gegenwart benachbarter Kolonien bedarf entsprechender Signale. Diese werden offenbar über die wässrige Phase oder direkten physischen Kontakt, und nicht über flüchtige Verbindungen ausgetauscht. Die Mechanismen und Moleküle, die daran beteiligt sind, sind derzeit noch unbekannt. Darüber hinaus wurde das in den Konidien von *S. chartarum* enthaltene Pigment mittels ATR-Infrarotspektroskopie analysiert. Die in dieser Studie ermittelten Spektren ähneln Spektren, die zuvor für das von anderen Fadenpilzen produzierte Melanin beschrieben wurden. Es kann daher angenommen werden, dass *S. chartarum* ein typisches Pilzmelanin produziert.

Um den Einfluss verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen auf das Wachstum von *S. chartarum* und die Produktion von makrozyklischen Trichothecenen und Stachybotrylactam zu untersuchen, wurde ein chemisch definiertes Medium gesucht, auf dem *S.-chartarum*-Kulturen wachsen. Das *Aspergillus* Minimal Medium erwies sich als geeignet. Die mit Variationen dieses Mediums erhaltenen Daten zeigen, dass verschiedene Stickstoff- und Kohlenstoffquellen die Morphologie und die Mykotoxinproduktion deutlich beeinflussen. Es konnte festgestellt werden, dass steigende Konzentrationen von Natriumnitrat das Wachstum positiv beeinflussen und zu einem dichten und stark sporulierenden Myzel mit hoher Produktion von makrozyklischen Trichothecenen führen. Im Gegensatz dazu wurde für Ammonium eine negative und nicht-unterstützende Wirkung beobachtet, und dies insbesondere in hohen Konzentrationen. Unter Berücksichtigung der Daten für das Wachstum, die Sporulation und Produktion von makrozyklischen Trichothecenen erwies sich Kartoffelstärke für alle drei getesteten Stämme als die beste Kohlenstoffquelle. Außerdem bestätigten die Ergebnisse eine positive Korrelation zwischen der Sporulation und der Bildung von makrozyklischen Trichothecenen. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Stachybotrylactam nicht mit dem Koloniewachstum und der Sporulation in Verbindung steht. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von Stachybotrylactam und makrozyklischen Trichothecenen deutlich unterschiedlich reguliert wird.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das Wachstum, die Sporulation und die Mykotoxinproduktion maßgeblich von dem Nährmedium und den darin enthaltenen Komponenten abhängen, aber auch durch die Anwesenheit anderer Kolonien beeinflusst werden. Dies hebt die Notwendigkeit der Standardisierung in der Mykotoxinforschung von *S. chartarum* und den Bedarf an chemisch eindeutig definierten Nährmedien hervor. Das *Aspergillus* Minimal Medium wurde als erstes definiertes Medium für *S. chartarum* eingeführt. Hierdurch wird eine zuverlässige Identifizierung von gesundheitsgefährdenden, Mykotoxin-produzierenden *S.-chartarum*-Isolaten ermöglicht. Das Medium wird zudem zukünftige Untersuchungen der Biosynthese- und Stoffwechselwege sowie der Regulationsmechanismen, die die Mykotoxinproduktion in *S. chartarum* steuern, erleichtern und die Reproduzierbarkeit der Daten verbessern. Des Weiteren kann nun in künftigen Experimenten auch der Einfluss anderer Nährstoffkomponenten, z. B. von Aminosäuren und Salzen, untersucht werden.

VI. SUMMARY

Stachybotrys chartarum is a toxigenic fungus that is frequently isolated from water damaged buildings or improperly stored forage. The secondary metabolites formed by this mold have been associated with severe health problems in humans and animals. Macrocyclic trichothecenes and in particular satratoxins are highly toxic and the most potent mycotoxins known to be produced by this fungus. Phenylspirodrimanes, e.g. stachybotrylactam, represent the largest and most abundant class of secondary metabolites produced by *Stachybotrys* species and are presumed to possess an immunosuppressive activity. To assess the pathogenic potential of *S. chartarum* isolates, it is important to grow them under conditions that reliably promote toxin production. It was already known that the synthesis of secondary metabolites depends on different factors, including time of growth, temperature, humidity, and the available nutrients. Several authors have studied the influence of culture conditions and growth media on the production of mycotoxins by *S. chartarum*, but these studies focused on undefined or complex media and building materials, which impeded investigations on the influence of specific nutrients.

The aim of this study was to investigate different factors that influence the mycelial growth and mycotoxin production of *S. chartarum* and to provide more insights into the secondary metabolism of this mold. A key finding of this study is that growth of *S. chartarum* genotype S strains on potato dextrose agar from two different manufacturers led to divergent results, namely, well-grown and sporulating cultures with high satratoxin concentrations versus cultures with sparse sporulation and low satratoxin production. Since potato dextrose agar is a medium recommended for investigations on mycotoxin production by *S. chartarum*, this finding is of particular importance and has to be considered in future experiments and diagnostic procedures. Further experiments performed with the two media provided strong evidence for a positive correlation between satratoxin production and sporulation, or in other words, large and in particular strongly sporulating colonies formed the highest amounts of macrocyclic trichothecenes. Reduced sporulation correlates with reduced cytotoxicity due to low satratoxin production and *vice versa*. A comparison of three-point and one-point cultures grown on the two types of potato dextrose agar furthermore demonstrated an inter-colony communication that

influenced both sporulation and mycotoxin production of *S. chartarum*. The enhanced sporulation in the presence of neighboring colonies requires communication and the corresponding signals are apparently exchanged via the aqueous phase or occur by direct physical contact and not by volatile compounds. The mechanisms and molecules that are engaged in this interaction are currently unknown. An ATR-IR analysis of the pigment found in the conidia of *S. chartarum* demonstrated that the spectra detected in this study were very similar to previously described spectra for melanin, which was derived from other filamentous fungi. It can therefore be assumed that *S. chartarum* produces a typical fungal melanin.

A chemically defined medium was used to investigate the impact of several nitrogen and carbon sources on growth of *S. chartarum* and its production of macrocyclic trichothecenes and stachybotrylactam. *Aspergillus* Minimal Medium has been found to be suitable for this purpose. Data obtained with variations of this medium revealed that different nitrogen and carbon sources distinctly affect the morphology and mycotoxin production. Increasing concentrations of sodium nitrate were found to stimulate growth, resulting in a dense and heavily sporulating mycelium with high macrocyclic trichothecene production. In contrast, a strong non-supportive effect was observed for ammonium, particularly at high concentrations. Considering the data for growth, sporulation, and macrocyclic trichothecene production, potato starch was the superior and most reliable carbon source for all three strains tested. Additionally, the results confirmed a positive correlation between sporulation and macrocyclic trichothecene production. In contrast, stachybotrylactam production was not linked to colony growth and sporulation, indicating that stachybotrylactam and macrocyclic trichothecene production are differently regulated.

The results of this study demonstrate that mycelial growth, sporulation and mycotoxin production are primarily dependent on the nutrition medium, but are also influenced by the presence of other cultures on the agar. The obvious impact of nutrients on the secondary metabolism emphasizes the importance of standardization in mycotoxin research of *S. chartarum* and the need for well-defined culture media. *Aspergillus* Minimal Medium was established as a first defined medium for *S. chartarum* that supports the production of macrocyclic trichothecenes. This will enable a more reliable identification of hazardous *S. chartarum* isolates. The new medium will also be instrumental to analyze the biosynthetic and metabolic

pathways and the regulatory mechanisms that control mycotoxin production in *S. chartarum* and to improve the reproducibility of the data. Furthermore, the impact of other nutritional components, e.g., amino acids and salts can now be investigated in future experiments.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdel-Hafez S, El-Said A. Effect of garlic, onion and sodium benzoate on the mycoflora of pepper, cinnamon and rosemary in Egypt. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1997; 39: 67-77.

Abdel-Hafez S, El Naggar S. Morphological, reproductive and mycobiota characters of three wild medicinal plants inhabiting Western Mediterranean coastal land, Egypt. *Feddes Repertorium: Zeitschrift für botanische Taxonomie und Geobotanik* 2006; 117: 240-9.

Aditama TY, Andarini SL. Sick building syndrome. *Medical Journal of Indonesia* 2002: 124-31.

Aharonowitz Y, Cohen B (1985) Bioactive microbial secondary metabolites. In: *Biotechnology: Potential and Limitations*. Springer Verlag

Aleksic B, Bailly S, Draghi M, Pestka JJ, Oswald IP, Robine E, Bailly JD, Lacroix MZ. Production of four macrocyclic trichothecenes by *Stachybotrys chartarum* during its development on different building materials as measured by UPLC-MS/MS. *Building and Environment* 2016; 106: 265-73.

Andersen B, Nissen AT. Evaluation of media for detection of *Stachybotrys* and *Chaetomium* species associated with water-damaged buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2000; 46: 111-6.

Andersen B, Nielsen KF, Jarvis BB. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 2002; 94: 392-403.

Andersen B, Nielsen KF, Thrane U, Szaro T, Taylor JW, Jarvis BB. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* 2003; 95: 1227-38.

Andersson MA, Nikulin M, Koljalg U, Andersson MC, Rainey F, Reijula K, Hintikka EL, Salkinoja-Salonen M. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63: 387-93.

Ayerst G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research* 1969; 5: 127-41.

Ayoubi N, Dass V. Black Mold: A Case Presentation and Discussion of Cutaneous *Stachybotrys chartarum* Infection. *Dermatology Archives* 2019; 3: 80-1.

Bamburg JR. Biological and biochemical actions of trichothecene mycotoxins. In: *Progress in Molecular and Subcellular Biology*: Springer 1983: 41-110.

Bao Y-R, Feng H-L, Yao X-S. Stachybotranes A–D, phenylspirodrimanones from the wetland fungus *Stachybotrys chartarum* with cytotoxic activities. *Natural Product Research* 2021: 1-7.

Bars JL, Bars PL. Toxinogenesis and development conditions of *Stachybothrys atra* in France. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum (Denmark)* 1991: 349-51.

Barthel J, Gottschalk C, Rapp M, Berger M, Bauer J, Meyer K. Occurrence of type A, B and D trichothecenes in barley and barley products from the Bavarian market. *Mycotoxin Research* 2012; 28: 97-106.

Bata A, Harrach B, Ujszaszi K, Kis-Tamas A, Lasztity R. Macrocyclic trichothecene toxins produced by *Stachybotrys atra* strains isolated in Middle Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 1985; 49: 678-81.

Bata A, Vanyi A, Lepom P, Dashek W, Llewellyn G. Temperature-Dependent Toxin Production by *Stachybotrys* Species. In: Biodeterioration Research 2: Springer 1989: 393-400.

Beever R, Bollard E. The Nature of the Stimulation of Fungal Growth by Potato Extract. Microbiology 1970; 60: 273-9.

Betancourt DA, Dean TR, Kim J, Levy J. Genome Sequence of *Stachybotrys chartarum* Strain 51-11. Genome Announcements 2015; 3: e01114-15.

Betina V (1989) Mycotoxins: Chemical, biological and environmental aspects. In: Bioactive Molecules. Elsevier

Betina V. Bioactive secondary metabolite of microorganisms. Progress in Industrial Microbiology 1994a; 30: 468.

Betina V. Microbial primary and secondary metabolism Progress in Industrial Microbiology 1994b; 30: 1-15.

Bidlingmeyer BA. Separation of ionic compounds by reversed-phase liquid chromatography an update of ion-pairing techniques. Journal of Chromatographic Science 1980; 18: 525-39.

Biermaier B, Gottschalk C, Schwaiger K, Gareis M. Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. Mycotoxin Research 2015; 31: 23-32.

Bills GF, Gloer JB. Biologically active secondary metabolites from the fungi. The fungal kingdom 2017: 1087-1119.

Bisby G. *Stachybotrys*. Transactions of the British Mycological Society 1943; 26: 133-43.

Biswas K, Morschhäuser J. The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 2005; 56: 649-69.

Bloom E, Grimsley LF, Pehrson C, Lewis J, Larsson L. Molds and mycotoxins in dust from water-damaged homes in New Orleans after hurricane Katrina. *Indoor Air* 2009; 19: 153-8.

Botha C, Naudé T. Plant poisonings and mycotoxicoses of importance in horses in southern Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 2002; 73: 91-7.

Brasel TL, Martin JM, Carriker CG, Wilson SC, Straus DC. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71: 7376-88.

Brian PW, Curtis P, Hemming H. Glutinosin: a fungistatic metabolic product of the mould *Metarrhizium glutinosum* S. Pope. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 1947; 135: 106-32.

Brodhagen M, Keller NP. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Molecular Plant Pathology* 2006; 7: 285-301.

Brown NA, Schrevens S, Van Dijck P, Goldman GH. Fungal G-protein-coupled receptors: mediators of pathogenesis and targets for disease control. *Nature Microbiology* 2018; 3: 402-14.

Bruker Corporation. ATR Basics – Principles of Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. 2020: <https://www.youtube.com/watch?v=q0evGXCK-sY>. 21.01.2023.

Bruker Corporation. Infrarotspektroskopie und Fourier-Transform Infrarotspektroskopie: FT-IR Spektroskopie Grundlagen. 2023: <https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>. 21.01.2023.

Brzonkalik K, Herrling T, Sylatk C, Neumann A. The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. International Journal of Food Microbiology 2011; 147: 120-6.

Bu'Lock J. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. In: Advances in applied microbiology: Elsevier 1961: 293-342.

Buskirk AD, Hettick JM, Chipinda I, Law BF, Siegel PD, Slaven JE, Green BJ, Beezhold DH. Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. Analytical Biochemistry 2011; 411: 122-8.

Buston H, Basu S. Some factors affecting the growth and sporulation of *Chaetomium globosum* and *Memnoniella echinata*. Microbiology 1948; 2: 162-72.

Butt ZL, Ghaffar A. Inhibition of fungi, actinomycetes and bacteria by *Stachybotrys atra*. Mycopathologia et Mycologia Applicata 1972; 47: 241-51.

Büttner M, Gedek B, Kaaden OR, Krüger M, Seidler T, Selbitz HJ (2007) Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Georg Thieme Verlag KG

Cairns V, Hope R, Magan N. Environmental factors and competing mycoflora affect growth and ochratoxin production by *Penicillium verrucosum* on wheat grain. Aspects of Applied Biology 2003; 68: 81-90.

Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002; 66: 447-59.

Castlebury LA, Rossman AY, Sung GH, Hyten AS, Spatafora JW. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological Research* 2004; 108: 864-72.

Chapman JA (2003) *Stachybotrys chartarum* (chartarum= atra= alternans) and other problems caused by allergenic fungi. *Allergy and Asthma Proceedings*. 1

Chiu SW, Moore D. Ammonium ions and glutamine inhibit sporulation of *Coprinus cinereus* basidia assayed in vitro. *Cell Biology International Reports* 1988; 12: 519-26.

Cole RJ, Jarvis BB, Schweikert MA (2003) *Handbook of secondary fungal metabolites*. Gulf Professional Publishing

Corda ACJ (1837) *Icones fungorum hucusque cognitorum: Abbildungen der Pilze und Schwaemme*. Wheldon & Wesley, LTD and Hafner Publishing Co. Codidote, Herts.

Croft WA, Jarvis BB, Yatawara C. Airborne Outbreak of Trichothecene Toxicosis. *Atmospheric Environment* 1986; 20: 549-52.

Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V, Stegehuis G. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in mycology* 2004; 50: 19-22.

Crous PW, Shivas RG, Quaedvlieg W, van der Bank M, Zhang Y, Summerell BA, Guarro J, Wingfield MJ, Wood AR, Alfenas AC, Braun U, Cano-Lira JF, Garcia D, Marin-Felix Y, Alvarado P, Andrade JP, Armengol J, Assefa A, den Breeyen A, Camele I, Cheewangkoon R, De Souza JT, Duong TA, Esteve-Raventos F, Fournier J, Frisullo S, Garcia-Jimenez J, Gardiennet A, Gene J, Hernandez-Restrepo M, Hirooka Y, Hospenthal DR, King A, Lechat C, Lombard L, Mang SM, Marbach PA, Marincowitz S, Marin-Felix Y, Montano-Mata NJ, Moreno G, Perez CA, Perez Sierra AM, Robertson JL, Roux J, Rubio E, Schumacher RK, Stchigel AM, Sutton DA, Tan YP, Thompson EH, van der Linde E, Walker AK, Walker DM, Wickes BL, Wong PT, Groenewald JZ. Fungal Planet description sheets: 214-280. *Persoonia* 2014; 32: 184-306.

Cruse M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 2002; 94: 814-22.

Cundliffe E, Davies JE. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1977; 11: 491-9.

D'Orazio M. Materials prone to mould growth. In: *Toxicity of building materials*: Elsevier 2012: 334-50.

Dankó G. Stachybotryotoxicosis and immunosuppression. *International Journal of Environmental Studies* 1975; 8: 209-11.

Dearborn DG, Yike I, Sorenson WG, Miller MJ, Etzel RA. Overview of investigations into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 495-9.

Dearborn DG, Smith PG, Dahms BB, Allan TM, Sorenson WG, Montana E, Etzel RA. Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. *Pediatrics* 2002; 110: 627-37.

Degenkolb T, Dieckmann R, Nielsen KF, Gräfenhan T, Theis C, Zafari D, Chaverri P, Ismaiel A, Brückner H, von Döhren H, Thrane U, Petrini O, Samuels GJ. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress* 2008; 7: 177-219.

Demain AL. Microbial Secondary Metabolism: A new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: *Ciba Foundation Symposium 171-Secondary Metabolites: their Function and Evolution: Ciba Foundation Symposium 171: Wiley Online Library* 2007: 3-23.

Dickinson JR, Dawes IW. Ammonium ion repression of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 1983; 129: 1883-8.

Dill I, Trautmann C, Szewzyk R. Mass development of *Stachybotrys chartarum* on compostable plant pots made from recycled paper. *Mycoses* 1997; 40: 110-4.

Drobotko V, Marushenko P, Aizeman B, Kolesnik N, Kudlai D, Iatel P, Melnichenko V. Stahkibotriotoksikoz, novoe zabolivanie loshadei i liudei (Stachybotryotoxicosis, a new disease of horses and humans). *Vrachebni Delo* 1946; 26: 125.

Drobotko VGe. Stachybotryotoxicosis, a new disease of horses and humans. *American Review of Soviet Medicine* 1945; 2.

Durrell L. The composition and structure of walls of dark fungus spores. *Mycopathologia et mycologia applicata* 1964; 23: 339-45.

Dylağ M, Spychała K, Zielinski J, Łagowski D, Gnat S. Update on *Stachybotrys chartarum*—Black Mold Perceived as Toxigenic and Potentially Pathogenic to Humans. *Biology* 2022; 11: 352.

Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology* 2012; 93: 931-40.

El-Kady IA, Moubasher MH. Toxicity and toxins of *Stachybotrys* isolates from wheat straw samples in Egypt. *Experimental Mycology* 1982; 6: 25-30.

El-Maghraby OM, Bean GA, Jarvis BB, Aboul-Nasr MB. Macrocyclic trichothecenes produced by *Stachybotrys* isolated from Egypt and eastern Europe. *Mycopathologia* 1991; 113: 109-15.

Engvall K, Norrby C, Norbäck D. Sick building syndrome in relation to building dampness in multi-family residential buildings in Stockholm. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2001; 74: 270-8.

Etzel RA, Montana E, Sorenson WG, Kullman GJ, Allan TM, Dearborn DG, Olson DR, Jarvis BB, Miller JD. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 1998; 152: 757-62.

Europäische Kommission (2021) Durchführungsverordnung (EU) 2021/808 der Kommission vom 22. März 2021 über Leistungskriterien für Analysemethoden für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in zur Lebensmittelerzeugung genutzten Tieren und über die Auswertung von Ergebnissen sowie über die für Probenahmen anzuwendenden Methoden und zur Aufhebung der Entscheidungen 2002/657/EG und 98/179/EG

Feinberg B, MacLaughlin CS. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: *Trichothecene mycotoxins: pathophysiologic effects*. Beasley VR, ed.: CRC Press 1989: 27-36.

Feng J, Zhang M, Jia X, Zhao J, Chen R, Xie K, Chen D, Li Y, Liu J, Dai J. Bistachybotrynsins FJ, five new phenylspirodrimane dimers with a central cyclopentanone linkage from *Stachybotrys chartarum*. *Fitoterapia* 2019; 136: 104-58.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology 1929; 10: 226-36.

Forgacs J, Carll WT, Herring AS, Hinshaw WR. Toxicity of *Stachybotrys atra* for animals. Transactions of the New York Academy of Sciences 1958; 20: 787-808.

FORGACS J. Stachybotryotoxicosis. In: Fungal Toxins: Elsevier 1972: 95-128.

Frazer S, Magan N, Aldred D. The influence of water activity and temperature on germination, growth and sporulation of *Stachybotrys chartarum* strains. Mycopathologia 2011; 172: 17-23.

Frazer S, Pestka J, Kim J, Medina A, Aldred D, Magan N. Impact of environmental factors on growth and satratoxin G production by strains of *Stachybotrys chartarum*. World Mycotoxin Journal 2012; 5: 37-43.

Gajdusek DC (1953) Acute Infectious Hemorrhagic Fevers and Mycotoxicoses in the Union of Soviet Socialist Republics

Gareis M. Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2006; 1: 354-63.

Gareis M, Gottschalk C. *Stachybotrys* spp. and the guttation phenomenon. Mycotoxin Research 2014; 30: 151-9.

Geris R, Simpson TJ. Meroterpenoids produced by fungi. Natural Product Reports 2009; 26: 1063-94.

Gessler N, Filippovich SY, Bachurina G, Kharchenko E, Groza N, Belozerskaya T. Oxylipins and oxylipin synthesis pathways in fungi. Applied Biochemistry and Microbiology 2017; 53: 628-39.

Gherbawy YA, Shebany YM, El-Dawy EGAEM. Detection of *Stachybotrys chartarum* isolates from faba beans dust during threshing. Archives of Microbiology 2021; 203: 5591-8.

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. Cell 1992; 68: 1077-90.

Glöckner G (2012) Gradient HPLC of copolymers and chromatographic cross-fractionation. Springer Science & Business Media

Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. Current opinion in infectious diseases 2003; 16: 91-6.

Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. Mycotoxin Research 2006; 22: 189-92.

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. Food Additives and Contaminants: Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 2009; 26: 1273-89.

Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. Environmental Health Perspectives 1999; 107 Suppl 3: 505-8.

Gregory L, Pestka JJ, Dearborn DG, Rand TG. Localization of satratoxin-G in *Stachybotrys chartarum* spores and spore-impacted mouse lung using immunocytochemistry. Toxicologic Pathology 2004; 32: 26-34.

Grove J. Macrocyclic trichothecenes. Natural Product Reports 1993; 10: 429-48.

Günzler H, Gremlich H-U (2012) IR-Spektroskopie: Eine Einführung. John Wiley & Sons

Guo Y, Jud W, Weigl F, Ghirardo A, Junker RR, Polle A, Benz JP, Pritsch K, Schnitzler J-P, Rosenkranz M. Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Communications biology* 2021; 4: 1-12.

Guzmán-de-Peña D, Aguirre J, Ruiz-Herrera J. Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998; 73: 199-205.

Haidar S, Jürgens FM, Aichele D, Jagels A, Humpf H-U, Jose J. Natural Compounds Isolated from *Stachybotrys chartarum* Are Potent Inhibitors of Human Protein Kinase CK2. *Molecules* 2021; 26: 4453.

Hanelt M, Gareis M, Kollarczik B. Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* 1994; 128: 167-74.

Harrach B, Bata A, Bajmocy E, Benko M. Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis. *Applied and Environmental Microbiology* 1983; 45: 1419-22.

Harrach B, Bata A, Sándor G, Ványi A. Isolation of macrocyclic and non-macrocyclic trichothecenes (*stachybotrys* and *fusarium* toxins) from the Environment of 200 III Sport Horses. *Mycotoxin Research* 1987; 3: 65-8.

Haslam E (1985) Some general characteristics of secondary metabolism. In: *Metabolites and Metabolism*. Oxford University Press. 117-47

Haslam E. Secondary metabolism—fact and fiction. *Natural Product Reports* 1986; 3: 217-49.

Hernández F, Cannon M. Inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the 12,13-epoxytrichothecenes trichodermol, diacetoxyscirpenol and verrucarol A. Reversibility of the effects. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) 1982; 35: 875-81.

Herres W, Gronholz J. Understanding FT-IR data processing. Part 1984; 1: 352-6.

Hicks JK, Yu J-H, Keller NP, Adams TH. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FdaA Gα protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal* 1997; 16: 4916-23.

Hill TW, Kafer E. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter* 2001; 48: 20-1.

Hinkley SF, Jiang J, Mazzola EP, Jarvis BB. Atranones: Novel diterpenoids from the toxigenic mold *Stachybotrys atra*. *Tetrahedron Letters* 1999; 40: 2725-8.

Hinkley SF, Jarvis BB. Chromatographic Method for *Stachybotrys* Toxins. In: *Mycotoxin Protocols*. Trucksess MW, Pohland AE, eds.: Humana Press 2000: 173-94.

Hinkley SF, Moore JA, Squillari J, Tak H, Oleszewski R, Mazzola EP, Jarvis BB. New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2003; 41: 337-43.

Hintikka E-L. Stachybotryotoxicosis as a veterinary problem. *Mycotoxins in human and animal health* 1977a: 277-84.

Hintikka E-L. The Genus *Stachybotrys*. In: *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedia Handbook*. Wyllie TD, Morehouse LG, eds. New York, Basel: Marcel Dekker Inc. 1977b: 91-8.

Hintikka E-L, Nikulin M. Airborne Mycotoxins in Agricultural and Indoor Environments. *Indoor Air* 1998; 8: 66-70.

Hintikka E-L. The Role of *Stachybotrys* in the Phenomenon Known as Sick Building Syndrome. *Advances in Applied Microbiology* 2004; 55: 155-73.

Hong K, Kinoshita T, Miyazaki W, Izawa T, Inoue K. An anticomplementary agent, K-76 monocarboxylic acid: its site and mechanism of inhibition of the complement activation cascade. *Journal of Immunology* 1979; 122: 2418-23.

Hughes SJ. Conidiophores, conidia, and classification. *Canadian Journal of Botany* 1953; 31: 577-659.

Hughes SJ. Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. *Canadian Journal of Botany* 1958; 36: 727-836.

Hunter CA, Grant C, Flannigan B, Bravery AF. Mold in Buildings - the Air Spora of Domestic Dwellings. *International Biodeterioration* 1988; 24: 81-101.

Ibrahim SR, Choudhry H, Asseri AH, Elfaky MA, Mohamed SG, Mohamed GA. *Stachybotrys chartarum*—A Hidden Treasure: Secondary Metabolites, Bioactivities, and Biotechnological Relevance. *Journal of Fungi* 2022; 8: 504.

Islam Z, Harkema JR, Pestka JJ. Satratoxin G from the black mold *Stachybotrys chartarum* evokes olfactory sensory neuron loss and inflammation in the murine nose and brain. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114: 1099-107.

Islam Z, Hegg CC, Bae HK, Pestka JJ. Satratoxin G-induced apoptosis in PC-12 neuronal cells is mediated by PKR and caspase independent. *Toxicological Sciences* 2008; 105: 142-52.

Islam Z, Shinozuka J, Harkema JR, Pestka JJ. Purification and comparative neurotoxicity of the trichothecenes satratoxin G and roridin L2 from *Stachybotrys chartarum*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 2009; 72: 1242-51.

Jagels A, Hövelmann Y, Zielinski A, Esselen M, Köhler J, Hübner F, Humpf HU. Stachybotrychromenes A-C: novel cytotoxic meroterpenoids from *Stachybotrys* sp. Mycotoxin Research 2018; 34: 179-85.

Jagels A, Lindemann V, Ulrich S, Gottschalk C, Cramer B, Hubner F, Gareis M, Humpf HU. Exploring Secondary Metabolite Profiles of *Stachybotrys* spp. by LC-MS/MS. Toxins 2019; 11: 133.

Jagels A, Stephan F, Ernst S, Lindemann V, Cramer B, Hubner F, Humpf HU. Artificial vs. Natural *Stachybotrys* Infestation - Comparison of Mycotoxin Production on Various Building Materials. Indoor Air 2020; 30: 1268-82.

Janzen DH. Why fruits rot, seeds mold, and meat spoils. The American Naturalist 1977; 111: 691-713.

Jarmai K. Viskosusseptikamien bei alteren Fohlen und erwachsenen Pferden. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 1929; 33: 517-9.

Jarvis BB, Salemme J, Morals A. *Stachybotrys* toxins. 1. Natural Toxins 1995; 3: 10-6.

Jarvis BB, Sorenson WG, Hintikka EL, Nikulin M, Zhou Y, Jiang J, Wang S, Hinkley S, Etzel RA, Dearborn D. Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. Applied and Environmental Microbiology 1998; 64: 3620-5.

Jarvis BB. *Stachybotrys chartarum* : a fungus for our time. *Phytochemistry* 2003; 64: 53-60.

Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 1996; 68: 207-18.

Johanning E, Gareis M, Yang Chin S, Hintikka E-L, Nikulin M, Jarvis B, Dietrich R. Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*). *Mycotoxin Research* 1998; 14: 60-73.

Johanning E, Landsbergis P, Gareis M, Yang CS, Olmsted E. Clinical experience and results of a Sentinel Health Investigation related to indoor fungal exposure. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 489-94.

Johnstone I, McCabe P, Greaves P, Gurr S, Cole G, Brow M, Unkles S, Clutterbuck A, Kinghorn J, Innis M. Isolation and characterisation of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 1990; 90: 181-92.

Jong SC, Davis EE. Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture. *Mycotaxon* 1976; 3: 409-85.

Kamp A, Høgslund S, Risgaard-Petersen N, Stief P. Nitrate storage and dissimilatory nitrate reduction by eukaryotic microbes. *Frontiers in Microbiology* 2015: 1492.

Karger BL, Giese RW. Reversed phase liquid chromatography and its application to biochemistry. *Analytical Chemistry* 1978; 50: 1048A-73A.

Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1999; 12: 59-63.

Keller NP, Hohn TM. Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 1997; 21: 17-29.

Keller NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology* 2019; 17: 167-80.

Kirkland J. Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC. *Journal of Chromatography A* 2004; 1060: 9-21.

Kluwe H (2006) Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Stachybotrys* spp. in Heu- und Strohproben aus Pferdeställen. Ludwig-Maximilians-Universität München

Kohut G, Ádám AL, Fazekas B, Hornok L. N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 2009; 130: 65-9.

Koskinen O, Husman T, Hyvarinen A, Reponen T, Nevalainen A. Respiratory Symptoms and Infections among Children in a Day-Care-Center with Mold Problems. *Indoor Air-International Journal of Indoor Air Quality and Climate* 1995; 5: 3-9.

Kriek N, Marasas W. Field outbreak of ovine stachybotryotoxicosis in South Africa. In: *Trichothecenes-chemical, biological and toxicological aspects*: Elsevier Science Ltd 1983: 279-84.

Kubo Y, Furusawa I. Melanin biosynthesis. In: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*: Springer 1991: 205-18.

Kuhn DM, Ghannoum M. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16: 144-72.

Kuhn J, Prante C, Schon S, Gotting C, Kleesiek K. Measurement of fibrosis marker xylosyltransferase I activity by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 2006; 52: 2243-9.

Kuhn J (2013) Massenspektrometrische Technologien in der klinischen Forschung, Schwerpunkt auf der klinisch-chemischen Diagnostik. In: Wiley Analytical Science. Wiley-VCH GmbH

Kuhn R, Jerchel D. Über Invertseifen. VII Mitteil.: Tetrazoliumsalze. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1941; 73: 941-8.

Lanier C, Andre V, Seguin V, Heutte N, El Kaddoumi A, Bouchart V, Picquet R, Garon D. Recurrence of *Stachybotrys chartarum* during mycological and toxicological study of bioaerosols collected in a dairy cattle shed. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2012; 19: 61-7.

Launer P, Drechsler H, Sowa M. Stachybotryotoxicosis in a horse herd. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 1987; 42: 593-4.

Lefebvre H, Le Bars J, Legrand C, Le Bars P, Dossin O, Toutain P, Braun J. Three cases of equine stachybotryotoxicosis. *Revue de Médecine Vétérinaire* 1994; 145: 267-9.

Leino M, Makela M, Reijula K, Haahtela T, Mussalo-Rauhamaa H, Tuomi T, Hintikka EL, Alenius H. Intranasal exposure to a damp building mould, *Stachybotrys chartarum*, induces lung inflammation in mice by satratoxin-independent mechanisms. *Clinical and Experimental Allergy* 2003; 33: 1603-10.

Li DW, Yang CS. Taxonomic history and current status of *Stachybotrys chartarum* and related species. *Indoor Air* 2005; 15 Suppl 9: 5-10.

Li S, Hartman GL, Jarvis BB, Tak H. A *Stachybotrys chartarum* isolate from soybean. *Mycopathologia* 2002; 154: 41-9.

Li Y-F, Zhang P-P, Yan S-J, Xu J-Y, Niaz S-I, Chand R, Ma CHE, Lin Y-C, Li J, Liu L. Atranones with enhancement neurite outgrowth capacities from the crinoid-derived fungus *Stachybotrys chartarum* 952. *Tetrahedron* 2017a; 73: 7260-6.

Li Y, Liu D, Cheng Z, Proksch P, Lin W. Cytotoxic trichothecene-type sesquiterpenes from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum* with tyrosine kinase inhibition. *RSC advances* 2017b; 7: 7259-67.

Lichtenstein JH, Molina RM, Donaghey TC, Amuzie CJ, Pestka JJ, Coull BA, Brain JD. Pulmonary responses to *Stachybotrys chartarum* and its toxins: mouse strain affects clearance and macrophage cytotoxicity. *Toxicological Sciences* 2010; 116: 113-21.

Lim C-K, Lord G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25: 547-57.

Lin S, Huang J, Zeng H, Tong Q, Zhang X, Yang B, Ye Y, Wang J, Hu Z, Zhang Y. Distachydrimanes A–F, phenylspirodrimane dimers and hybrids with cytotoxic activity from the coral-derived fungus *Stachybotrys chartarum*. *Chinese Chemical Letters* 2022; 33: 4587-94.

Liu J, Feng J, Jia X, Zhao J, Chen R, Xie K, Chen D, Li Y, Dai J. Bistachybotrysins W-Y, three new phenylspirodrimane dimers with a 6/7 oxygen heterocycle from *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry Letters* 2020; 35: 73-7.

Lombard L, Houbraken J, Decock C, Samson R, Meijer M, Réblová M, Groenewald JZ, Crous PW. Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 2016; 36: 156-246.

Lottspeich F, Engels JW, Solodkoff ZL (2012) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag

Lozowicka B, Iwaniuk P, Konecki R, Kaczynski P, Kuldybayev N, Dutbayev Y. Impact of Diversified Chemical and Biostimulator Protection on Yield, Health Status, Mycotoxin Level, and Economic Profitability in Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivation. *Agronomy* 2022; 12: 258.

Ma X, Li L, Zhu T, Ba M, Li G, Gu Q, Guo Y, Li D. Phenylspirodrimanones with anti-HIV activity from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum* MXH-X73. *Journal of Natural Products* 2013; 76: 2298-306.

MacLafferty FW, Tureček F (1995) Interpretation von Massenspektren. Spektrum Akademischer Verlag

Magan N, Aldred D. Why do fungi produce mycotoxins? In: Food mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food. Dijksterhuis J, Samson RA, eds.: CRC Press Taylor & Francis Group 2007: 121-33.

Maplestone RA, Stone MJ, Williams DH. The evolutionary role of secondary metabolites—a review. *Gene* 1992; 115: 151-7.

Marin S, Sanchis V, Ramos AJ, Vinas I, Magan N. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research* 1998; 102: 831-7.

Marsh PB, Bollenbacher K. The vitamin requirements of *Memnoniella* and *Stachybotrys*. *American Journal of Botany* 1946; 33: 245-9.

Marzluf G. Regulation of nitrogen metabolism in mycelial fungi. In: Biochemistry and Molecular Biology: Springer 1996: 357-68.

Matsuda Y, Abe I. Biosynthesis of fungal meroterpenoids. *Natural Product Reports* 2016; 33: 26-53.

McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 2011; 3: 802-14.

McDONALD T, DEVI T, SHIMIZU K, SIM S, KELLER N. Signaling events connecting mycotoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *JSM Mycotoxins* 2004; 2003: 139-47.

McLaughlin C, Vaughan M, Campbell I, Wei CM, Stafford M, Hansen B. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. *Mycotoxins in human and animal health* 1977; 1977: 263-73.

McQuade AB. Morphogenesis and Nutrition in the *Memnionella-Stachybotrys* Group of Fungi. *Journal of General Microbiology* 1963; 30: 429-35.

Medina Á, Mateo EM, Valle-Algarra FM, Mateo F, Mateo R, Jiménez M. Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 122: 93-9.

Mesny F, Miyauchi S, Thiergart T, Pickel B, Atanasova L, Karlsson M, Hüttel B, Barry KW, Haridas S, Chen C. Genetic determinants of endophytism in the Arabidopsis root microbiome. *Nature Communications* 2021; 12: 1-15.

Miller JD, Rand TG, Jarvis BB. *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? *Medical Mycology* 2003; 41: 271-91.

Miyazaki W, Tamaoka H, Shinohara M, Kaise H, Izawa T, Nakano Y, Kinoshita T, Hong K, Inoue K. A Complement Inhibitor Produced by *Stachybotrys complementi*, nov. sp. K-76, a New Species of Fungi Imperfecti. *Microbiology and Immunology* 1980; 24: 1091-108.

Mohebi B. Application of ATR infrared spectroscopy in wood acetylation. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2008; 10: 253-9.

Morgan NY, Smith PD. HPLC detectors. Handbook of HPLC 2010; 7: 207-31.

Morton A, MacMillan A. The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. Journal of Experimental Botany 1954; 5: 232-52.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 1983; 65: 55–63.

Mühlencoert E, Mayer I, Zapf MW, Vogel RF, Niessen L. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. European Journal of Plant Pathology 2004; 110: 651-9.

Mussalo-Rauhamaa H, Nikulin M, Koukila-Kähkölä P, Hintikka E-L, Malmberg M, Haahtela T. Health Effects of Residents Exposed to *Stachybotrys* in Water-damaged Houses in Finland. Indoor and Built Environment 2010; 19: 476–85.

MycoBank Database. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks; 2023: <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>. 10.01.2023.

Nejat-Salari A, Ershad D. An investigation on mycoflora of barley seeds in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology (Iran Islamic Republic) 1994: 56-68.

Nielsen KF, Hansen MØ, Larsen TO, Thrane U. Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. International Biodeterioration & Biodegradation 1998; 42: 1-7.

Nielsen KF (2001) Mould growth on building materials: Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Biocentrum-DTU, Technical University of Denmark

Nielsen KF, Huttunen K, Hyvarinen A, Andersen B, Jarvis BB, Hirvonen MR. Metabolite profiles of *Stachybotrys* isolates from water-damaged buildings and their induction of inflammatory mediators and cytotoxicity in macrophages. *Mycopathologia* 2002; 154: 201-5.

Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology* 2003; 39: 103-17.

Nielsen KF, Holm G, Utrup LP, Nielsen PA. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2004; 54: 325-36.

Ochiai E, Kamei K, Hiroshima K, Watanabe A, Hashimoto Y, Sato A, Ando A. The pathogenicity of *Stachybotrys chartarum*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2005; 46: 109-17.

Ohff R, Weissbach F. Studies into *Stachybotrys atra*-detection and occurrence in feedstuffs in GDR. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 1984; 39: 628-31.

Ooi P, Goh K. Sick building syndrome: an emerging stress-related disorder? *International Journal of Epidemiology* 1997; 26: 1243-9.

Ozegovic L, Pavlovic R, Milosev B. Toxic dermatitis, conjunctivitis, rhinitis, pharyngitis and laryngitis in fattening cattle and farm workers caused by moulds from contaminated straw (*stachybotryotoxicosis?*). *Veterinaria, Sarajevo* 1971; 20: 263-7.

Page EH, Trout DB. The role of *Stachybotrys* mycotoxins in building-related illness. *AIHA Journal* 2001; 62: 644-8.

Pandey P, Yadav R. A review on volatile organic compounds (VOCs) as environmental pollutants: fate and distribution. *International Journal of Plant and Environment* 2018; 4: 14-26.

Patrovsky M, Sinovska K, Branska B, Patakova P. Effect of initial pH, different nitrogen sources, and cultivation time on the production of yellow or orange *Monascus purpureus* pigments and the mycotoxin citrinin. *Food Science and Nutrition* 2019; 7: 3494-500.

Pažoutová S, Pokorný V, Šeháček Z. The relationship between conidiation and alkaloid production in saprophytic strains of *Claviceps purpurea*. *Canadian Journal of Microbiology* 1977; 23: 1182-7.

Pestka JJ, Yike I, Dearborn DG, Ward MD, Harkema JR. *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: new insights into a public health enigma. *Toxicological Sciences* 2008; 104: 4-26.

Pieckova E, Hurbankova M, Cerna S, Liskova A, Kovacikova Z, Kollarikova Z, Wimmerova S. Inflammatory and haematotoxic potential of indoor *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) Hughes metabolites. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju* 2009; 60: 401-9.

Pinon R. Effects of ammonium ions on sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Cell Research* 1977; 105: 367-78.

Pinruan U, McKenzie EHC, Jones EBG, Hyde KD. Two new species of *Stachybotrys*, and a key to the genus. *Fungal Diversity* 2004: 145-57.

Pinto L, Granja LFZ, Almeida MAd, Alviano DS, Silva MHd, Ejzemberg R, Rozental S, Alviano CS. Melanin particles isolated from the fungus *Fonsecaea pedrosoi* activates the human complement system. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2018; 113: e180120.

Piontek M, Łuszczynska K. Testing the Toxicity of *Stachybotrys chartarum* in Indoor Environments—A Case Study. *Energies* 2021; 14: 1602.

Puia CE, Miclea R, Toader I, Cornoiu I. Biological Control of Potential Toxigenic Fungi in Straw Used as Bedding Material for Swine. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies* 2012; 69: 335-6.

Qin Y-D, Fang F-M, Zhou J-J, Wang R-B, Xu S-X, Li L-h, Zhang H-L. Atranones from *Stachybotrys chartarum* and their antitumor activities in MG-63 human osteosarcoma cells. *Fitoterapia* 2020: 104727.

Rand TG, Flemming J, David Miller J, Womiloju TO. Comparison of inflammatory responses in mouse lungs exposed to atranones A and C from *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2006; 69: 1239-51.

Ratledge C. Secondary products and fungal biochemistry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1993; 56: 219-22.

Redlich CA, Sparer J, Cullen MR. Sick-building syndrome. *The Lancet* 1997; 349: 1013-6.

Reiß J. Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B 1 under the influence of conidiogenesis affecting compounds. *Archives of Microbiology* 1982; 133: 236-8.

Reponen T, Hyvarinen A, Ruuskanen J, Raunemaa T, Nevalainen A. Comparison of Concentrations and Size Distributions of Fungal Spores in Buildings with and without Mold Problems. *Journal of Aerosol Science* 1994; 25: 1595-603.

Ribera J, Panzarasa G, Stobbe A, Osypova A, Rupper P, Klose D, Schwarze FW. Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *Armillaria cepistipes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018; 67: 132-9.

Rocha O, Ansari K, Doohan FM. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Additives & Contaminants* 2005; 22: 369-78.

Ruotsalainen M, Hirvonen MR, Hyvarinen A, Teijja M, Savolainen K, Nevalainen A. Cytotoxicity, production of reactive oxygen species and cytokines induced by different strains of *Stachybotrys* sp. from moldy buildings in RAW264.7 macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1998; 6: 193-9.

Sabir M, Shashikiran U, Kochar SK. Building related illnesses and indoor air pollution. *The Journal of the Association of Physicians of India* 1999; 47: 426-30.

Saibi W, Abdeljalil S, Gargouri A. Carbon source directs the differential expression of β -glucosidases in *Stachybotrys microspora*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2011; 27: 1765-74.

Samson R, Houbraken J, Thrane U, Frisvad J, Andersen B (2010) Food and indoor fungi: CBS-KNAW fungal biodiversity centre. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht

Samson RA, Frisvad JC. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology* 2004; 49: 257.

Sarkisov AK, Orshanskaiya V. Laboratory diagnosis of toxic strains of *Stachybotrys alternans*. *Veterinariya* 1944; 21: 38-40.

Sasaoka M, Wada Y, Hasumi K. Stachybotrydial selectively enhances fibrin binding and activation of Glu-plasminogen. *The Journal of Antibiotics* 2007; 60: 674-81.

Sawadjoon S, Kittakoop P, Isaka M, Kirtikara K, Madla S, Thebtaranonth Y. Antiviral and antiplasmodial spirodihydrobenzofuran terpenes from the fungus *Stachybotrys nephrospora*. *Planta Medica* 2004; 70: 1085-7.

Scharf DH, Heinekamp T, Brakhage AA. Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS Pathogens* 2014; 10: e1003859.

Scheel CM, Rosing WC, Farone AL. Possible sources of sick building syndrome in a Tennessee middle school. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2001; 56: 413-7.

Schneider DJ, Marasas WF, Dale Kuys JC, Kriek NP, Van Schalkwyk GC. A field outbreak of suspected stachybotryotoxicosis in sheep. *Journal of the South African Veterinary Association* 1979; 50: 73-81.

Schultes NP, Castañeda-Ruiz RF, Marra RE, Strzalkowski N, De-Wei L. *Striatibotrys neoecylindrosporus* sp. nov., a *Stachybotrys*-like fungus from North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2021; 71.

Sekiguchi J, Gaucher GM. Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*. *Applied and Environmental Microbiology* 1977; 33: 147-58.

Semeiks J, Borek D, Otwinowski Z, Grishin NV. Comparative genome sequencing reveals chemotype-specific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. *BMC Genomics* 2014; 15: 590.

Semis M, Dadwal SS, Tegtmeier BR, Wilczynski SP, Ito JI, Kalkum M. First Case of Invasive *Stachybotrys* Sinusitis. *Clinical Infectious Diseases* 2020; 72: 1386–91.

Shim W-B, Woloshuk CP. Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters* 1999; 177: 109-16.

Shim W-B, Woloshuk CP. Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67: 1607-12.

Shimizu K, Keller NP. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 2001; 157: 591-600.

Smoragiewicz W, Cossette B, Boutard A, Krzystyniak K. Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 1993; 65: 113-7.

Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW (2011) Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley & Sons

Steinberg RA. Growth of fungi in synthetic nutrient solutions. *The Botanical Review* 1939; 5: 327-50.

Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry* 2010; 119: 408-16.

Swartz M. HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2010; 33: 1130-50.

Szabó L, Ratz F, Áldásy P, Szabó P, Gaál L. Skin lesions and rhinitis in pigs attributable to stachybotryotoxicosis. I. Clinical picture and aetiology. *Magyar Allatorvosok Lapja* 1970; 25: 21-6.

Tag A, Hicks J, Garifullina G, Ake Jr C, Phillips T, Beremand M, Keller N. G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Molecular Microbiology* 2000; 38: 658-65.

Takaya N. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002; 94: 506-10.

ter Schure EG, van Riel NA, Verrips CT. The Role of Ammonia Metabolism in Nitrogen Catabolite Repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 2000; 24: 67-83.

Thomas R. Fungal cellulases VII. *Stachybotrys atra*: production and properties of the cellulolytic enzyme. *Australian Journal of Biological Sciences* 1956; 9: 159-83.

Thompson W, Wannemacher Jr R. In vivo effects of T-2 mycotoxin on synthesis of proteins and DNA in rat tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1990; 105: 483-91.

Tomsett AB, Garrett RH. The isolation and characterization of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 1980; 95: 649-60.

Trout D, Bernstein J, Martinez K, Biagini R, Wallingford K. Bioaerosol lung damage in a worker with repeated exposure to fungi in a water-damaged building. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 641-4.

Tsai H-F, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, Kwon-Chung K. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *Journal of Bacteriology* 1998; 180: 3031-8.

Tudzynski B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology* 2014; 5: 656.

Ueno Y. Mode of action of trichothecenes. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* 1977; 31: 885-900.

Ueno Y (1983) *Trichothecenes - Chemical, biological and toxicological aspects*. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam

Ueno Y. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundamental and Applied Toxicology* 1984; 4: 124-32.

Ulrich S, Biermaier B, Bader O, Wolf G, Straubinger RK, Didier A, Sperner B, Schwaiger K, Gareis M, Gottschalk C. Identification of *Stachybotrys* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016; 408: 7565-81.

Ulrich S, Niessen L, Ekruth J, Schäfer C, Kaltner F, Gottschalk C. Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Research* 2019; 36: 83-91.

Ulrich S, Schäfer C. Toxin Production by *Stachybotrys chartarum* Genotype S on Different Culture Media. *Journal of Fungi* 2020; 6: 159.

Ulrich S, Lang K, Niessen L, Baschien C, Kosicki R, Twarużek M, Straubinger RK, Ebel F. The Evolution of the Satratoxin and Atranone Gene Clusters of *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Fungi* 2022; 8: 340.

Usleber E, Dietrich R, Schneider E, Martlbauer E. *Stachybotrys*-Toxine in einer Münchner Wohnung mit Wasserschaden. *Mycotoxin Research* 2001; 17 Suppl 2: 234-7.

Vacher S, Hernandez C, Bärtschi C, Poussereau N. Impact of paint and wall-paper on mould growth on plasterboards and aluminum. *Building and Environment* 2010; 45: 916-21.

van den Berg B, Lister S, Rutherford JC. Ammonium transceptors: Novel regulators of fungal development. *PLoS Pathogens* 2019; 15: e1008059.

Van Reenen-Hoekstra ES, Samson RA, Verhoeff J, Van Wijnen H, Brunekreef B. Detection and identification of moulds in dutch houses and non-industrial working environments. *Grana* 1991; 30: 418-23.

Vesper SJ, Vesper MJ. Stachylysin may be a cause of hemorrhaging in humans exposed to *Stachybotrys chartarum*. *Infection and Immunity* 2002; 70: 2065-9.

Vining L. Secondary metabolism. *Biotechnology* 1986; 4: 19-38.

Vining LC. Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology* 1990; 44: 395-427.

Walsh TJ, Hayden RT, Larone DH (2018) *Larone's medically important fungi: A guide to identification*. John Wiley & Sons

Wang A, Xu Y, Gao Y, Huang Q, Luo X, An H, Dong J. Chemical and bioactive diversities of the genera *Stachybotrys* and *Memnoniella* secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 2015a; 14: 623-55.

Wang W, Liang X, Li Y, Wang P, Keller NP. Genetic Regulation of Mycotoxin Biosynthesis. *Journal of Fungi* 2023; 9: 21.

Wang Y, Hyde KD, McKenzie EHC, Jiang Y-L, Li D-W, Zhao D-G. Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. *Fungal Diversity* 2015b; 71: 1-67.

Wiame J-M, Grenson M, Ars Jr HN. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in Microbial Physiology* 1985; 26: 1-88.

Williams D (1994) Functional roles of secondary metabolites. *Discovering Drugs from Nature*. Conference Documentation. 8-9

Xavier JJM, Scussel VM. Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Brazil nut. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2008; 88: 425-33.

Yang B, He Y, Lin S, Zhang J, Li H, Wang J, Hu Z, Zhang Y. Antimicrobial dolabellanes and atranones from a marine-derived strain of the toxigenic fungus *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Natural Products* 2019; 82: 1923-9.

Yang B, Long J, Pang X, Lin X, Liao S, Wang J, Zhou X, Li Y, Liu Y. Structurally diverse polyketides and phenylspirodrimanes from the soft coral-associated fungus *Stachybotrys chartarum* SCSIO41201. *The Journal of Antibiotics* 2020; 74: 190-8.

Yates I, Meredith F, Smart W, Bacon C, Jaworski A. *Trichoderma viride* suppresses fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Food Protection* 1999; 62: 1326-32.

Yike I, Rand TG, Dearborn DG. Acute inflammatory responses to *Stachybotrys chartarum* in the lungs of infant rats: time course and possible mechanisms. *Toxicological Sciences* 2005; 84: 408-17.

Yin Y, Fu Q, Wu W, Cai M, Zhou X, Zhang Y. Producing novel fibrinolytic isoindolinone derivatives in marine fungus *Stachybotrys longispora* FG216 by the rational supply of amino compounds according to its biosynthesis pathway. *Marine Drugs* 2017; 15: 214.

Youatt G. Fungal Cellulases IX. Growth of *Stachybotrys Atra* on Cellulose and Production of a β -Glucosidase Hydrolysing Cellobiose. *Australian Journal of Biological Sciences* 1958; 11: 209-18.

Yung-Chi C, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* 1973; 22: 3099-108.

Zhang H, Yang M-H, Zhuo F-f, Gao N, Cheng X-B, Wang X-B, Pei Y-H, Kong L-Y. Seven new cytotoxic phenylspirodrimane derivatives from the endophytic fungus *Stachybotrys chartarum*. RSC advances 2019a; 9: 3520-31.

Zhang M, Feng J, Jia X, Zhao J, Liu J, Chen R, Xie K, Chen D, Li Y, Zhang D. Bistachybotrysins D and E, one stereoisomeric pair of cytotoxic phenylspirodrimane dimers from *Stachybotrys chartarum*. Chinese Chemical Letters 2019b; 30: 435-8.

Zhao J, Feng J, Tan Z, Liu J, Zhao J, Chen R, Xie K, Zhang D, Li Y, Yu L. Stachybotrysins A–G, phenylspirodrimane derivatives from the fungus *Stachybotrys chartarum*. Journal of Natural Products 2017a; 80: 1819-26.

Zhao J, Liu J, Shen Y, Tan Z, Zhang M, Chen R, Zhao J, Zhang D, Yu L, Dai J. Stachybotrysams A–E, prenylated isoindolinone derivatives with anti-HIV activity from the fungus *Stachybotrys chartarum*. Phytochemistry Letters 2017b; 20: 289-94.

Zhao J, Feng J, Tan Z, Liu J, Zhang M, Chen R, Xie K, Chen D, Li Y, Chen X. Bistachybotrysins A–C, three phenylspirodrimane dimers with cytotoxicity from *Stachybotrys chartarum*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2018; 28: 355-9.

Zhu M, Cen Y, Ye W, Li S, Zhang W. Recent advances on macrocyclic trichothecenes, their bioactivities and biosynthetic pathway. Toxins 2020; 12: 417.

VIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Ebel, der mich jederzeit fachlich unterstützt hat, dessen Expertise mir immer sehr weitergeholfen hat und auf die ich mich stets verlassen konnte.

Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei Dr. Sebastian Ulrich für das Überlassen dieses Themas aber auch für die fachliche Betreuung während meiner Promotion bedanken.

Herrn Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger danke ich für seine fachlichen Ratschläge und Hilfestellungen.

Der Brigitte und Wolfram Gedek-Stiftung für Mykotoxinforschung danke ich für die Finanzierung der durchgeführten Projekte.

Ein großer Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München für ihre tatkräftige Unterstützung, ihren mentalen Beistand und viele großartige gemeinsame Erlebnisse. Eva, Stephanie, Christoph, Astrid, Sebastian und Jasmin möchte ich für ihre fachliche Kompetenz aber auch für die unterstützenden und sehr humorvollen Gespräche danken. Meinen Mitstreiterinnen und Freunden Anna, Katharina, Isabell, Cornelia und Katharina danke ich für die großartige gemeinsame Zeit, Unterstützung sowie die zahlreichen bewusstseinsweiternden Gespräche und Spaziergänge im Englischen Garten.

Vor allem danke ich meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Lebenspartner Christian, die immer an mich glauben, mich bedingungslos unterstützen, für mich da sind und auf die ich mich jederzeit verlassen kann.