

DGZfP-Berichtsband BB 69-CD
Vortrag H1

Identifikation von Mikroorganismen als Verursacher von Schäden an Bauwerken

S. Rölleke, Institut für genetische Analytik, Wien

1 Kurzfassung

Neben chemischen und physikalischen Einflüssen spielen Mikroorganismen eine maßgebliche Rolle bei der Zerstörung von Bauwerken. Erhöhte Feuchtigkeit begünstigt mikrobielles Wachstum. Es entstehen häufig „mikrobielle Lebensgemeinschaften“, die infolge ihrer Stoffwechselaktivität erheblichen Schaden auf und in Materialien verursachen können. Insbesondere bei der Restaurierung und Sanierung von Gebäuden muß großer Wert auf die Beseitigung von Mikroorganismen gelegt werden, um das Bauwerk dauerhaft zu schützen. Biozid- oder Fungizidbehandlungen allein reichen hierfür jedoch nicht aus, weil die dabei verwendeten chemischen Substanzen Grundlage für das Wachstum anderer, möglicherweise sogar noch schädlicherer Mikroorganismen sein können. Auch die Reduktion der Luftfeuchtigkeit in Gebäuden allein wird das Wachstum von Mikroorganismen nicht grundsätzlich vermeiden. Deshalb ist eine Information über Ausmaß und Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften zur Auswahl geeigneter Gegenmaßnahmen des Bakterien- und Pilzbewuchses an und in Materialien notwendig. Zudem wird ein wirksamer Schutz der Bauwerke (und ihrer Bewohner) nur dann erreicht, wenn Maßnahmen zur Verminderung des mikrobiellen Bewuchses von Baumaterialien mit regelmäßigen Kontrollen einhergehen. Herkömmliche Verfahren zur Untersuchung mikrobiell bedingter Schäden erlauben nur eine unzureichende Bestandsaufnahme von im Material vorhandenen Mikroorganismen. Einerseits gibt es keine standardisierten Untersuchungsverfahren. Zum anderen gibt es nur ein recht begrenztes Wissen über Mikroorganismen und ihr Schadenspotential. Mit Hilfe von DNA-analytischen Nachweisverfahren können Mikroorganismen identifiziert werden, ohne sie im Labor anzuzüchten. Deshalb können alle, auch völlig unbekannte Mikroorganismen detektiert werden. Es ist auch nicht erforderlich, sich bei der Identifizierung von Bakterien oder Pilzen auf bestimmte Arten zu konzentrieren oder umfangreiches Vorwissen über die mögliche Art der Besiedelung in und an Materialien zu haben. Diese Informationen sind notwendig, um Bauwerke effektiv und dauerhaft vor Mikrobenbefall schützen zu können.

2 Einleitung

Bauwerke sind Umwelteinflüssen und damit einem stetigen Prozeß der Verwitterung ausgesetzt. Die Gründe für Zersetzungsprozesse sind vielfältig. Neben chemischen und physikalischen Einflüssen sind Mikroorganismen maßgeblich und häufig ursächlich für die Materialzersetzung verantwortlich (Pochon et al. 1960; Eckhardt 1985; Krumbein; 1968, 1990; Sorlini et al. 1987; Warscheid et al. 1989; Weirich 1989; Karpovich-Tate und Rebrikova 1990; Lyalikova et al. 1991; Bock und Sand 1993, Mansch und Bock 1998).

Grundsätzlich können alle Mikroorganismen an Zerstörungsprozessen von Materialien beteiligt sein. Man kann davon ausgehen, daß früher oder später jede Oberfläche eines Materials von Mikroorganismen besiedelt wird (Flemming 1994). Die Besiedelung erfolgt häufig über die Umgebung (Eckhardt 1994). Mikroorganismen können durch Mikroporen, Risse und Spalten in das Material eindringen. Die Schädigung für das Material erfolgt mechanisch oder durch biochemische Vorgänge. In der Natur kommen Mikroorganismen auf Oberflächen meistens in mehr oder weniger komplexen Lebensgemeinschaften vor. Sie bestehen nicht etwa aus Reinkulturen von Bakterien, Pilzen oder Algen, wie sie im Labor künstlich herangezogen werden können, sondern aus mikrobiellen Lebensgemeinschaften. Wie jedoch diese Lebensgemeinschaften im einzelnen zusammengesetzt -- und welche Mitglieder die metabolisch aktiven -- sind, ist häufig noch ebenso unbekannt, wie mikrobielle Interaktionen. Die "mikrobielle Ökologie", eine Teildisziplin der Mikrobiologie, beschäftigt sich mit der Beschreibung von Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung. Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei die Identifizierung und die metabolische Aktivität von Mikroorganismen. Ein Verständnis der mikrobiellen Ökologie ist unerlässlich, will man ein besseres Verständnis darüber erlangen, welche Materialschäden durch eine mikrobielle Lebensgemeinschaft verursacht werden können.

Die Besiedelung von Bauwerken und Baumaterialien verursacht nicht nur erheblichen finanziellen Schaden, sondern stellt auch ein gesundheitliches Risiko für Menschen dar, da auch Baumaterialien in Innenräumen besiedelt werden und Mikroorganismen zum Wachstum dienen können. Im Folgenden sind einige Beispiele dafür aufgeführt, wie Mikroorganismen zur Zerstörung von Bauwerken und Baumaterialien beitragen können.

a) Bildung von anorganischen Säuren:

"Hochspezialisierte" lithoautotroph wachsende nitrifizierende Bakterien und Schwefelbakterien können anorganische Säuren wie Salpetersäure und Schwefelsäure produzieren. Mikroorganismen dieser Gruppe konnten im Zusammenhang mit der biologischen Zerstörung von verschiedensten Materialien nachgewiesen werden (Bock und Sand 1993, Mansch und Bock 1998). Wachsen solche säureproduzierenden Mikroorganismen z.B. auf Calciumhydroxid reichem Untergrund, so kann hieraus Gips (Calciumsulfat) entstehen. Karcher hat dies in einer populärwissenschaftlichen Veröffentlichung so beschrieben: "In der Reaktion von Schwefelsäure mit kalkhaltigen Mineralen und Bindemitteln wird Sandstein zu Sand zerbröseln und edler Marmor in schnöden Gips (CaSO_4) verwandelt. Zusätzlich entsteht ein ähnlich brisanter Effekt wie beim Gefrieren von Wasser: Weil Gips mehr Raum fordert als der ursprüngliche Kalkstein, dehnt sich das Mineral aus, bildet Risse und Schichten und zerfällt wie Blätterteig." (Karcher 1994)

b) Bildung von organischen Säuren

Fast alle Mikroorganismen sind unter bestimmten Bedingungen in der Lage, verschiedene organische Säuren auszuscheiden. Bei diesen Säuren handelt es sich z.B. um Essig-, Glucon-, Oxal-, oder Zitronensäure. Im Prinzip können alle im Stoffwechsel vorkommenden Säuren abgegeben werden. Die Wechselwirkungen mit dem Material können ähnlich der der anorganischen Säuren sein. Auch organische Säuren führen zu Lösungsvorgängen von Mineralbestandteilen (Krumbein und Petersen 1990).

c) Bildung von organischen Lösungsmitteln

Viele Mikroorganismen sind in der Lage, organische Verbindungen zu fermentieren. Als Endprodukte entstehen andere organische Stoffe, häufig organische Säuren, aber auch organische Lösungsmittel, wie Ethanol, Butanol und andere. Diese Lösungsmittel können zu Schwellungen bis hin zum völligen Auflösen der Materialien führen.

d) Bildung von Exoenzymen

Mikroorganismen können Exoenzyme, wie Proteasen oder Lipasen ausscheiden, mit deren Hilfe sie diese Polymere in kleinere Fragmente "zerlegen" und ihrem Metabolismus zugänglich machen können.

3 Identifizierung von Mikroorganismen als Schadensverursacher

3.1 Probleme klassischer Untersuchungen

Sollen langfristig geeignete Maßnahmen zum Schutz von besiedelten Bauwerken gesetzt werden, ist es wichtig zu wissen, welche Mikroorganismen für die festgestellten Schadensprozesse verantwortlich sind und welche Materialien betroffen sind. Moderne mikroskopische Techniken können zeigen, ob und wie stark Objekte durch Mikroorganismen besiedelt sind. Allerdings lassen sich aus den so gewonnenen morphologischen Daten höchstens Rückschlüsse darauf ziehen, ob Bakterien oder Pilze vorkommen, allerdings nicht um welche Mikroorganismen genau es sich handelt. Konventionelle mikrobiologische Verfahren erlauben eine Identifizierung von kultivierbaren Mikroorganismen aus Probenmaterial. Zur Kultivierung von Mikroorganismen wird Material entnommen, um sie anschließend in geeignete Flüssig- oder Festmedien zu überführen und unter Laborbedingungen wachsen zu lassen. Auf diese Weise wurde ein weites Spektrum von verschiedenen Pilzen, Algen und Bakterien von Bauwerken isoliert und identifiziert. Zweifellos ist die Liste der bislang von Bauwerken isolierten Mikroorganismen lang. Freilich bleibt die Relevanz der beschriebenen Mikroorganismen für die beobachteten Schadensphänomene fraglich, da die Kultivierung aus Probenmaterial zu selektiven Anreicherungen bestimmter Spezies führt. Man geht heute davon aus, daß bislang nur ein Bruchteil aller Mikroorganismen bekannt ist. Unter Laborbedingungen sind nur weniger als 1% der in Proben enthaltenen Bakterien kultivierbar (Amann et al. 1996). Die Gründe hierfür liegen zum einen darin, daß zu wenig über die Wachstumsbedürfnisse der entsprechenden Organismen bekannt ist. Hieraus ergeben sich insbesondere Schwierigkeiten, die genauen Bedingungen für das Wachstum einzelner Mikroorganismen im Labor zu schaffen, wie sie in der Natur vorhanden sind. Zum anderen gibt es Bakterien, die in ein Stadium der

Nichtkultivierbarkeit verfallen, so daß sie unter Laborbedingungen auch dann nicht anwachsen, wenn ihnen entsprechend günstige Wachstumsbedingungen angeboten werden.

Die selektive Isolierung von Mikroorganismen durch in vitro Kultivierung hat zur Folge, daß andere, vielleicht viel häufiger im Material vorkommende und vielleicht für den Schadensprozeß relevantere Organismen nicht erfaßt werden. Eine Schlußfolgerung bezüglich der Bedeutung einzelner Mikroorganismen am Gesamtschädigungsprozeß, die allein auf den im Labor isolierten Mikroorganismen beruht, mag deshalb mitunter einen falschen Eindruck über deren tatsächlichen Beitrag zur Schädigung erwecken. Molekularbiologische Herangehensweisen vermögen diese Probleme zu lösen.

3.2 DNA Fingerprints zur Untersuchung von mikrobiellen Schäden an Bauwerken

Mit der Einführung molekularbiologischer Methoden wurde es möglich, einzelne mikrobielle Spezies mikrobieller Lebensgemeinschaften direkt aus Probenmaterial zu identifizieren, ohne sie zuvor kultivieren zu müssen. Dies geschieht über die Identifizierung von im Material vorhandenen, spezifischen DNA Sequenzen. Dabei werden für deren Bestimmung bestimmte Gene als phylogenetische Marker benutzt, deren Sequenzen Organismen identifizieren und eindeutig unterscheiden können. Obwohl sich im Prinzip eine ganze Reihe von Genen als phylogenetische Marker eignen, sind es besonders die ribosomalen RNAs bzw. deren Gene, die vorzugsweise für solche Untersuchungen eingesetzt werden. Nachdem diese Verfahrensweise vor wenigen Jahren erstmals zur Untersuchung von Mikroorganismen in natürlichen Standorten benutzt wurde (Muyzer et al. 1993) fand sie nur wenige Jahre später erstmals Anwendung in der Untersuchung von Mikroorganismen, die im Zusammenhang mit biologischer Materialschädigung stehen (Röllerke et al. 1996/98/99). Für die erforderlichen Analysen werden nur geringe Probenmengen benötigt. Die Strategie zur Herstellung von DNA-Fingerprints der vorhandenen Mikroben umfaßt die folgenden Schritte:

1. Probennahme;
2. Extraktion der DNA/RNA;
3. Vervielfältigung von Markergenen in der PCR;
4. Erzeugung von DNA Fingerprints;
5. Sequenzierung einzelner Banden;
6. Identifizierung von Mikroorganismen.

3.2.1 Vervielfältigung von genetischen Markern aus Probenmaterial mit der PCR

Anstatt die zu identifizierenden Mikroorganismen aus Probenmaterial zu kultivieren, werden für die genetische Analyse nur bestimmte DNA Sequenzen der Probe vervielfältigt. Die technische Grundlage für diese Untersuchung ist die PCR (Polymerase Ketten Reaktion). Dieses Verfahren hat bereits kurz nach seiner Entwicklung durch Kary Mullis im Jahre 1983 Einzug in viele Bereiche der Biologie gehalten und ist aus dem modernen molekularbiologischen Untersuchungsspektrum

nicht mehr wegzudenken. Das Verfahren ermöglicht eine Vervielfältigung von spezifischen vorher ausgewählten DNA Fragmenten, wobei wenige Ausgangsmoleküle der Probe so vervielfältigt werden, daß "sichtbare" Mengen von identischen Molekülen entstehen. Das Prinzip funktioniert ähnlich wie die Verdoppelung der DNA vor einer Zellteilung. Die DNA einer Probe wird durch Hitze in Einzelstränge aufgeschmolzen, wobei jeder Einzelstrang als Matrize für die enzymatische Ergänzung des fehlenden Stranges dient. Anfang und Ende dieser Reaktion wird durch kurze, für ein bestimmtes Gen oder Sequenzabschnitt spezifische DNA Startermoleküle (DNA Primer) definiert, die der Reaktion zugegeben werden. Dieser Vermehrungszyklus wird mehrfach wiederholt, so daß einzelne Abschnitte exponentiell vermehrt werden können. Aus einem einzigen Sequenzabschnitt erhält man nach 30 solcher Zyklen eine Milliarde Kopien.

Zur Identifizierung von Mikroorganismen in Probenmaterial wird zunächst die gesamte DNA aus einer Probe extrahiert. Dann werden mit PCR-Primern für ribosomale DNA, definierte Bereiche der gesamt-DNA vervielfältigt, die für alle Mikroorganismen oder für Gruppen von Mikroorganismen spezifisch sind.

3.2.2 Erzeugung von DNA-Fingerprints

Als Resultat des oben beschriebenen Reaktionsansatzes entstehen PCR-Produkte. Diese bestehen aufgrund der Primerwahl aus gleich großen DNA Fragmenten. Sie unterscheiden sich aber in den variablen Sequenzabschnitten zwischen den allgemeingültigen Primersequenzen, entsprechend der unterschiedlichen Mikroorganismen in einer Probe. Diese unterschiedlichen, aber gleich langen DNA Moleküle müssen für die weitere Analyse voneinander getrennt werden. Dies ist mit Hilfe einer speziellen Elektrophorese möglich (Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese/ DGGE). Dieses Verfahren erlaubt eine Auftrennung von DNA Molekülen gleicher Größe aber unterschiedlicher Sequenz (Muyzer et al. 1993, Rölleke et al. 1996/98/99).

Abbildung 1 zeigt einen DNA-Fingerprint, der mit Hilfe einer DGGE Analyse von PCR Produkten, die von Probenmaterial amplifiziert wurden, erzeugt werden konnte. Das entstandene Bandenmuster enthält, wie ein „Barcode“, Informationen über die mikrobielle Artenzusammensetzung einer Probe. Jede Bande entspricht einem Mikroorganismus im Ausgangsmaterial. Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß viele Proben parallel aufgearbeitet werden können. Nachdem jedes Fragment ein charakteristisches Laufverhalten hat, sind Banden in gleichen Positionen unterschiedlicher Proben in der Sequenz identisch und stammen also vom gleichen Organismus. Damit wird es möglich, DNA-Fingerprints von unterschiedlicher Proben zu vergleichen. Ein solcher Vergleich gibt Aufschluß darüber, wieviel unterschiedliche Mikroorganismen in verschiedenen Proben vorhanden sind.

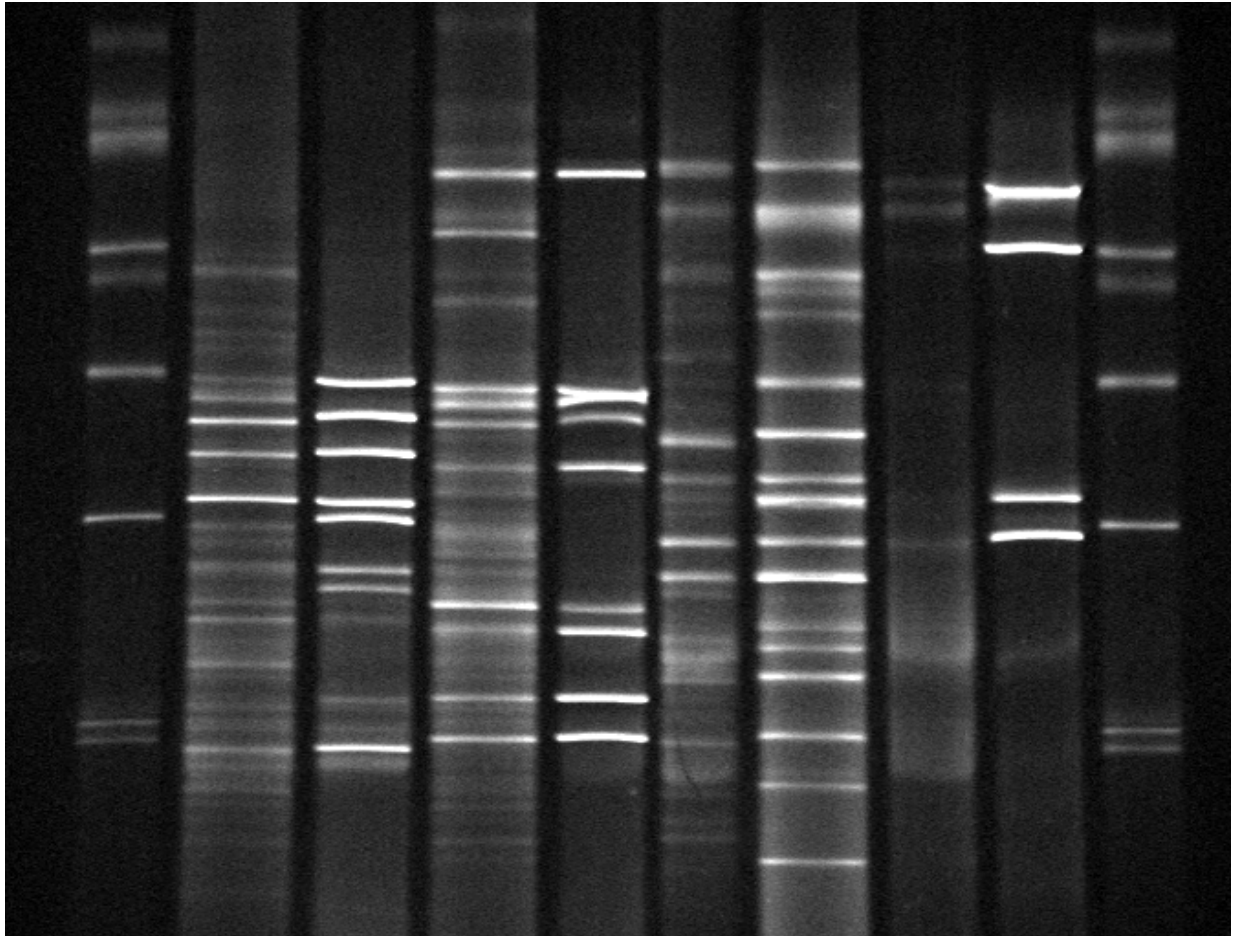


Abbildung 1: DNA-Fingerprints der in verschiedenen Probenmaterialien vorkommenden Mikroorganismen

3.2.3 Identifizierung der Mikroorganismen durch vergleichende Sequenzanalysen

Wie erläutert, geben die mit der DGGE Analyse produzierten DNA-Fingerprints bereits Auskunft über Komplexität und Diversität der Mikroorganismen im Probenmaterial. Um aber die Mikroorganismen zu identifizieren, die einzelnen Banden entsprechen, muß die in den Banden enthaltene DNA sequenziert werden. Hierzu werden einzelne Banden ausgeschnitten und die Basenabfolge der DNA-Fragmente bestimmt. Die erhaltenen Sequenzen werden in DNA-Datenbanken mit den Sequenzen bisher bekannter Organismen verglichen. Auf diese Weise ist eine phylogenetische Zuordnung und Identifizierung der im Probenmaterial enthaltenen Mikroorganismen möglich.

4 Perspektiven für den Schutz von Bauwerken

4.1 Effektivere Therapie

Die vorgestellte Methode hat den Vorteil, daß für die erforderlichen Untersuchungen nur sehr wenig Probenmenge benötigt wird. Ein weiterer Vorzug der Methode ist der benötigte Zeitaufwand. Ergebnisse aus solchen Untersuchungen können bereits

innerhalb weniger Tage vorliegen, während für klassische Kultivierungsversuche häufig Monate benötigt werden. Gleichzeitig werden mit dem Verfahren alle Mikroorganismen erfaßt, unabhängig davon, ob es sich um kultivierbare Mikroben handelt oder nicht. Die Untersuchung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften auf besiedelten Bauten und Baumaterialien trägt dazu bei, unser begrenztes Wissen über mikrobiell verursachte Schädigungen auf eine breitere Basis zu stellen, da mit dem hier vorgestellten methodischen Ansatz eine verbesserte und gezieltere Bestimmung von Mikroorganismen möglich ist. Es ist äußerst wünschenswert, daß die Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften an vielen Objekten durchgeführt wird. Solche Informationen werden dann Aufschluß über die Rolle bestimmter Mikroorganismen in der biologischen Schädigung von Bauwerken geben. Diese Vorgehensweise ist vergleichbar mit medizinischen Untersuchungen von Krankheiten, wo der ursächliche Zusammenhang zwischen Symptom und Krankerregger erkannt werden muß, um eine effektive Therapie veranlassen zu können. Solche Informationen könnten, wenn sie in Bausanierungsmaßnahmen einbezogen werden, zu gezielten Maßnahmen führen, die in einen besseren Schutz des Objekts münden.

Hingegen reicht der Einsatz von Bioziden dann nicht aus, wenn nicht bekannt ist, welche Mikroben im speziellen Fall beseitigt werden sollen. Denn der falsche Einsatz von Bioziden mag den (oder die) konkreten Schadensverursacher nicht wirksam bekämpfen. Biozide können sogar von bestimmten Mikroorganismen als Substrat verwendet werden (Tayler und May 1994). Deshalb können letztlich Biozide ungewünschtes Wachstum mittelfristig und langfristig verstärken, statt es zu verhindern. Durch eine genau Analyse der vorhandenen Mikroorganismen und der Effektivität von Maßnahmen mit der hier vorgestellten Methode können solche negativen Effekte langfristig vermieden werden.

4.2 Monitoring

Ein verbessertes Monitoring der Besiedelung von Objekten ist als begleitende konservatorische Maßnahme wünschenswert, da eine Veränderung oder eine quantitative oder qualitative Verschiebung der Population früh erkannt werden kann. Nur wenn man weiß, welche schädigenden Bakterien oder Pilze vorhanden sind, wird man in der Lage sein, gezielte und langfristige Gegenmaßnahmen zu setzen. Es ist wichtig, daß die Methode Schlüsse über zeitliche Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft zuläßt. Solche Verschiebungen können sich beispielsweise durch sich ändernde Umwelteinflüsse ergeben. Ein verbessertes Monitoring vermag auch Einblicke in die Kolonisierung oder Rekolonisierung von Materialien durch Mikroben zu geben, nachdem Konservierungs- und Sanierungsmaßnahmen beendet wurden. Ein langfristiges Monitoring eines Objektes gibt somit Aufschluß über die Effektivität von Maßnahmen. Wenn Banden in der DGGE-Analyse im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen bei Kontrolluntersuchungen nicht mehr vorkommen, kann man davon ausgehen, daß sich die den Banden entsprechenden Mikroorganismen nicht mehr im Material befinden. Zugleich weisen etwa neu vorkommende Banden auf die Präsenz anderer Organismen hin, die früher nicht vorhanden waren. Desweiteren ist ein Monitoring mit dem hier dargestellten Methodenspektrum als Ergänzung zu notwendigen Eignungstests von Materialien zu empfehlen, die zur Sanierung von Objekten eingesetzt werden. Damit kann verhindert werden, daß Restaurierungs-

und Sanierungsmaßnahmen, das Wachstum bestimmter Mikroorganismen begünstigen, statt es zu verhindern.

5 Literatur

- Amann, R. I., Ludwig, W. und K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetik identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Bock, E. und W. Sand.** 1993. The microbiology of masonry biodeterioration. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:503-514.
- Costerton, J. W. und J. Boivin.** 1991. Biofilms and Corrosion. In: H.-C. Flemming and G. G. Geesey (Eds.): *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Springer: Berlin, Heidelberg; 195-204.
- Eckhardt, F. E. W.** 1985. Mechanisms of the microbial degradation of minerals in sandstone monuments, medieval frescoes, and plaster. In: 5th international congress on deterioration and conservation of stone (Ed. Felix, G.), Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, 643-652.
- Eckhardt, F. E. W.** 1994. Mikrobielle Vielfalt auf Werkstoffen und Besiedelungswege. *Werkstoffe und Korrosion.* **45**:152-156.
- Flemming, H.-C.** 1994. Biofilme Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. Habilitationsschrift. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft. Kommissionsverlag R. Oldenburg: München. S.1.
- Flemming, H.-C.** 1995. Auswirkungen mikrobieller Materialzerstörung. In: H. Brill: *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz*. Gustav Fischer: Jena. S. 15-22.
- Karcher, H. L.** 1994. Der Zahn der Zeit. *Bild der Wissenschaft.* S.66-73.
- Karpovich-Tate, N. und N. L. Rebrikova.** 1990. Microbial communities on damaged frescoes and building materials in the cathedral of the nativity of the virgin in the Pafnutii-Borovskii monastery, Russia. *Internat. Biodeterioration.* **27**: 281-296.
- Krumbein, W. E.** 1968. Zur Frage der biologischen Verwitterung: Einfluß der Mikroflora auf die Bausteinverwitterung und ihre Abhängigkeit von edaphischen Faktoren. *Z. Allg. Mikrobiol.* **8**:107-117.
- Lyalikova, N. N. und Y. P. Petushkova.** 1991. Role of microorganisms in the weathering of minerals in building stone of historical buildings. *Geomicrobiol. J.* **9**:91-101.
- Mansch, R. and Bock E.** 1998. Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation* **9/1**: 47-64.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
- Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner G. and W. Lubitz.** 1996. Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2059-2065.

Rölleke S., Witte A., Wanner G. and W. Lubitz. 1998 Medieval wall paintings: A habitat for *Archaea* - Identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR- amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *Int. Biodeter. Biodegr.* **41/1**: 85-92.

Rölleke, S., Gurtner, C., Drewello, U., Drewello, R., Lubitz, W. and R. Weissmann. 1999. Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *J. Microbiol. Methods.* **36**: 107-114.

Taylor, S. und E. May. 1994. The investigation of biocides against bacteria isolated from stone and their effectiveness against in situ population. *Mater. Organismen* **28**: 265-277

Warscheid, Th., Petersen, K. und W. E. Krumbein. 1989. Die Besiedelung unterschiedlicher Sandsteine durch chemoorganotrophe Bakterien und deren Einfluß auf den Prozeß der Gesteinszerstörung. *Z. dt. Geol. Ges.* **140**: 209-217.