

**Untersuchung an Bioaerosolen in Tierställen
unter Etablierung einer REAL-TIME PCR-basierten Methode
zur Erfassung luftgetragener
Salmonella und *Thermoactinomyces* Zellen**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
dem Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
und der Gemeinsamen Kommission Naturwissenschaften der Justus-Liebig Universität
vorgelegt von

Dipl. Ing. agr. Kerstin Fallschissel

Giessen, im August 2011

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2005 bis Mai 2010 am Institut für Angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer durchgeführt.

Von der Gemeinsamen Kommission Naturwissenschaften für die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche als Dissertation angenommen im August 2011.

Dekan: Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer
Justus-Liebig Universität Giessen
Institut für Angewandte Mikrobiologie
Heinrich-Buff-Ring 26-52
35392 Giessen

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Annegret Wilde
Justus-Liebig Universität Giessen
Institut für Mikro- und Molekularbiologie
Heinrich-Buff-Ring 26-52
35392 Giessen

Tag der Disputation: 21.10.2011

Teile der in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Analysis of bioaerosols from livestock stables by realtime PCR

Kerstin Fallschissel, Peter Kämpfer, Udo Jäckel

Air Quality Control 68(9):365-368

Comparative measurement of airborne microorganisms by impingement and filtration in poultry stables

Kerstin Fallschissel, Peter Kämpfer, Udo Jäckel

Air Quality Control 68(9):365-368

Direct detection of *Salmonella* cells in the air of livestock stables by real-time PCR

Kerstin Fallschissel, Peter Kämpfer and Udo Jäckel

The Annals of Occupational Hygiene 53(8):859-868, 2009

Detection and identification of airborne bacteria in a German turkey stable by cultivation-based and molecular methods

Kerstin Fallschissel, Peter Kämpfer and Udo Jäckel

The Annals of Occupational Hygiene 54 (8): 934-943

Teile der in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse wurden auf folgenden Tagungen als Vortrag präsentiert:

KRDL Expertenforum „Mikrobielle Luftverunreinigungen“

11. - 12.10.2007, Freising-Weihenstephan, Deutschland

Untersuchung von Bioaerosolen aus Tierställen mittels RealTime PCR

K. Fallschissel, U. Jäckel, P. Kämpfer

2nd International Congress of the Society of Hygiene, Environmental and Public Health Sciences (GHUP)

01. - 04.10.2008, Graz, Österreich

Realtime PCR quantification of salmonellae in indoor bioaerosols

K. Fallschissel, U. Jäckel, P. Kämpfer

14th International Congress of the International Society For Animal Hygiene (ISAH) “Sustainable Animal Husbandry: Prevention is Better than Cure”

19. - 23.07.2009, Vechta, Deutschland

Detection and identification of airborne bacteria in a German turkey stable

Kerstin Fallschissel, Kerstin Klug, Peter Kämpfer, Udo Jäckel

Meinen Eltern und Heiko.

Inhaltsverzeichnis

<i>Liste der Publikationen</i>	<i>I</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>III-VII</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VIII - IX</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>X - XI</i>

1. EINLEITUNG	1
1.1. <u>Aerosole und Bioaerosole</u>	1
1.2. <u>Bioaerosole in der Landwirtschaft – medizinische Relevanz luftgetragener Mikroorganismen</u>	5
1.3. <u>Methoden zur Bestimmung und Quantifizierung luftgetragener Mikroorganismen</u>	9
1.3.1. <u>Gesetzeslage und Richtlinien</u>	10
1.3.2. <u>Kultivierungsabhängige Methoden</u>	11
1.3.3. <u>Molekularbiologische Methoden</u>	12
1.4. <u>Ziele dieser Arbeit</u>	16
2. MATERIAL & METHODEN	17
2.1. <u>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</u>	17
2.2. <u>Verwendete Nährmedien zur Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Stämme sowie Medien zur Bestimmung der KBE bei Probenahmen</u>	17
2.3. <u>Gesamtzellzahlbestimmung auf Polycarbonatfiltern anhand der DAPI-Färbung (PORTER und FEIG [138])</u>	22
2.3.1. <u>Fixierung von Zellen durch Paraformaldehyd (PFA)</u>	22
2.3.2. <u>Durchführung der Färbung</u>	23
2.4. <u>Vergleich der physikalischen Sammeleffizienz von Filtration und Impingement bei Bioaerosolsammlungen an unterschiedlichen Arbeitsplätzen</u>	24
2.5. <u>Untersuchung der Sammelresistenz für Referenzstämme bakterieller Gattungen durch die Lebend-Tot Färbung</u>	24
2.5.1. <u>Eingesetzte Referenzstämme</u>	24
2.5.2. <u>Untersuchung der Eignung der Lebend-Tot-Färbung für unterschiedliche Stämme</u>	25
2.5.2.1. <u>Prinzip der Lebend-Tot-Färbung</u>	25
2.5.2.2. <u>Überprüfung der Präzision zur Differenzierung durch die Lebend-Tot-Färbung</u>	26
2.5.3. <u>Versuche zur Sammelresistenz: Impingement</u>	27
2.5.4. <u>Versuche zur Sammelresistenz: Filtration</u>	28
2.6. <u>Proben</u>	29

2.6.1.	<u>Probenahme 1: Legehennen (LUA NRW)</u>	30
2.6.2.	<u>Probenahmen 2 - 4: Putenmast</u>	30
2.6.3.	<u>Probenahme 5: Masthähnchen</u>	31
2.7.	<u>Probenahme 6: Mastentenstall, Verladung und Schlachtung</u>	32
2.8.	<u>Durchführung der Bioaerosolsammlungen</u>	32
2.8.1.	<u>Impingementsammlungen</u>	33
2.8.1.1.	<u>Aufarbeitung der Impingementproben</u>	33
2.8.2.	<u>Filtrationssammlungen (stationär)</u>	34
2.8.3.	<u>Filtrationssammlungen (personen-getragen)</u>	34
2.8.3.1.	<u>Aufarbeitung der Filtrationsproben</u>	37
2.9.	<u>Untersuchung der Zusammensetzung der bakteriellen Artengemeinschaft mittels Kultivierung und kultivierungsunabhängigen Methoden</u>	37
2.9.1.	<u>Kultivierung</u>	38
2.9.2.	<u>Kultivierungsunabhängige Untersuchung</u>	38
2.9.2.1.	<u>DNA-Extraktion nach PITCHER et al. [141]</u>	38
2.9.2.2.	<u>PCR</u>	39
2.9.2.3.	<u>Aufreinigung der PCR-Produkte</u>	40
2.9.2.4.	<u>Klonierung</u>	40
2.9.2.5.	<u>Plasmidextraktion</u>	42
2.9.2.6.	<u>Sequenzierung und phylogenetische Analyse</u>	42
2.9.2.7.	<u>Statistische Analyse</u>	42
2.10.	<u>Nachweis infektiöser Organismen: Etablierung des Nachweises der Gattung Salmonella aus Bioaerosolproben durch quantitative PCR</u>	43
2.10.1.	<u>Verwendete Referenzstämme</u>	43
2.10.1.1.	<u>DNA Extraktion nach HENCKEL [150]</u>	43
2.10.2.	<u>Untersuchung der DNA-Extraktionseffizienz für die Gattung Salmonella</u>	44
2.10.3.	<u>Etablierung der Realtime PCR zum quantitativen, spezifischen Nachweis der Gattung Salmonella</u>	45
2.10.3.1.	<u>Herstellung der Quantifizierungsstandards</u>	46
2.10.4.	<u>Versuche zur Wiederfindung von Salmonella invA-Genen mittels Realtime PCR</u>	46
2.10.4.1.	<u>Wiederfindung unter Zugabe von Zellen eines Nicht-Ziel-Organismus (Escherichia coli)</u>	46
2.10.4.2.	<u>Wiederfindung unter Zugabe von DNA Extrakten aus Bioaerosolproben</u>	47
2.10.4.3.	<u>Bestimmung der Wiederfindung nach Zugabe definierter Salmonellen Konzentrationen zu Bioaerosolproben</u>	47
2.11.	<u>Quantifizierung der Salmonellen Konzentration in Bioaerosolproben durch Kultivierung und das etablierte Realtime PCR System</u>	47

2.12.	<u>Nachweis der Spezifität: Klonierung</u>	48
2.12.1.	<u>Plasmidextraktion</u>	48
2.12.2.	<u>Sequenzierung und phylogenetische Analyse</u>	49
2.13.	<u>Nachweis allergie-auslösender Organismen: Etablierung des Nachweises der Gattung Thermoactinomyces aus Bioaerosolproben anhand quantitativer PCR</u>	49
2.13.1.	<u>Verwendete Referenzstämme</u>	49
2.14.	<u>DNA-Extraktion aus Spezies der Gattung Thermoactinomyces</u>	50
2.14.1.	<u>Untersuchung der DNA-Extraktionseffizienz für die Gattung Thermoactinomyces</u> 50	
2.15.	<u>Etablierung der Realtime PCR zum spezifischen, quantitativen Nachweis der Gattung Thermoactinomyces</u>	51
2.16.	<u>Bestimmung der Anzahl der 16S rRNA Operons für die Gattung Thermoactinomyces anhand einer Southern-Blot-Analyse (SOUTHERN [159])</u>	52
2.16.1.	<u>Markierung der Sonde mit Digoxigenin</u>	52
2.16.2.	<u>Restriktionsverdau</u>	53
2.16.3.	<u>Kapillartransfer der verdauten DNA auf die Membran</u>	53
2.16.4.	<u>Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten Sonde</u>	55
2.16.5.	<u>Chemilumineszenz-Detektion</u>	56
2.17.	<u>Versuche zur Wiederfindung von Thermoctinomyces sp. mittels Realtime PCR</u> . 57	
2.18.	<u>Untersuchung verschiedener Bioaerosolproben mit dem neu etablierten System zum Nachweis von Thermoactinomyces sp.</u>	57
2.19.	<u>Nachweis der Spezifität: Klonierung</u>	57
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	59
3.1.	<u>Vergleich der physikalischen Sammeleffizienz von Filtration und Impingement bei Bioaerosolsammlungen an unterschiedlichen Arbeitsplätzen</u>	59
3.1.1.	<u>Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf die GZZ</u>	61
3.2.	<u>Untersuchung der biologischen Sammeleffizienz für Filtration und Impingement</u> 62	
3.2.1.	<u>Vergleich der mittels DAPI-Färbung und Lebend-Tot-Färbung ermittelten Gesamtzellzahlen</u>	63
3.2.2.	<u>Ermittlung der Auswertbarkeit von Lebend-Tot gefärbten Zellpräparaten in Abhängigkeit von der Zeit</u>	63
3.2.3.	<u>Anwendbarkeit der Lebend-Tot-Färbung für unterschiedliche Stämme</u>	64
3.3.	<u>Untersuchung der biologischen Sammeleffizienz für das Impingement am Beispiel ausgesuchter Stämme verschiedener Gattungen</u>	67
3.4.	<u>Untersuchung der biologischen Sammeleffizienz für die Filtration am Beispiel ausgesuchter Stämme verschiedener Gattungen</u>	70
3.5.	<u>Untersuchung der Zusammensetzung der bakteriellen Artengemeinschaft mittels Kultivierung und molekularbiologischer Methoden</u>	72

3.5.1.	<u>Kultivierungsabhängiger Ansatz</u>	72
3.5.2.	<u>Molekularbiologischer Ansatz</u>	74
3.5.2.1.	<u>Rarefaction Analyse</u>	75
3.6.	<u>Nachweis infektiöser Organismen: Etablierung des Nachweises der Gattung Salmonella aus Bioaerosolproben anhand quantitativer PCR</u>	76
3.6.1.	<u>DNA-Extraktionseffizienz für die Gattung Salmonella</u>	76
3.6.1.1.	<u>Vergleich der DNA-Extraktionseffizienzen für die Extraktionen nach HENCKEL [150] und PITCHER et al. [141]</u>	76
3.6.1.2.	<u>DNA-Extraktionseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl</u>	77
3.7.	<u>Etablierung des Primersystems zum spezifischen Nachweis von Salmonella sp.</u>	78
3.7.1.	<u>Etablierung der Realtime PCR zum spezifischen Nachweis sowie der Quantifizierung der Gattung Salmonella</u>	79
3.7.2.	<u>Bestimmung der Wiederfindung von Salmonellen mittels quantitativer Realtime PCR</u>	80
3.7.2.1.	<u>Bestimmung der Wiederfindung von Salmonellen unter Zugabe definierter Zellzahlen Escherichia coli (Nicht-Zielgen-DNA)</u>	81
3.7.2.2.	<u>Wiederfindung definierter Salmonellen Zellzahlen unter Zugabe von DNA Extrakten extrahiert aus Milchviehstall-Bioaerosolproben</u>	82
3.7.2.3.	<u>Untersuchungen zur Wiederfindung von Salmonellen in Bioaerosolproben</u> ...	82
3.7.3.	<u>Anwendung des etablierten Protokolls zur Detektion und Quantifizierung von Salmonellen an Bioaerosolproben unterschiedlicher Arbeitsplätze</u>	83
3.7.4.	<u>Nachweis der Spezifität der quantitativen PCR in komplexen Proben anhand Klonierung</u>	85
3.8.	<u>Nachweis Allergie-Auslösender Organismen: Etablierung des Nachweises der Gattung Thermoactinomyces aus Bioaerosolproben anhand quantitativer PCR</u>	86
3.8.1.	<u>Bestimmung der Anzahl der 16S rRNA Operons für die Gattung Thermoactinomyces anhand des Blottings nach SOUTHERN [159]</u>	87
3.8.2.	<u>Entwicklung eines Primersystems und Etablierung der Realtime PCR zum Nachweis von Thermoactinomyces sp.</u>	88
3.8.3.	<u>Untersuchung des Einflusses von Bioaerosolbestandteilen auf die Realtime PCR Quantifizierung von Thermoactinomyces sp.</u>	93
3.8.4.	<u>Nachweis und Quantifizierung von Thermoactinomyces sp. aus Umwelt-Bioaerosolproben</u>	93
3.8.5.	<u>Nachweis der Spezifität. des NSPTf-7/TAcRmod Primersystems für Thermoactinomyces sp durch Klonierung von PCR-Fragmenten aus einer komplexen Umweltprobe</u>	95
4.	<u>DISKUSSION</u>	97
4.1.	<u>Physikalische Sammeleffizienz – Möglichkeiten und Grenzen der Erfassung luftgetragener Mikroorganismen</u>	97

4.2.	<u>Biologische Sammeleffizienz – (Über-)Lebensfähigkeit von Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Sammelmethodik.....</u>	99
4.3.	<u>Untersuchung der Diversität von Mikroorganismen in Tierstall-Bioaerosolen.....</u>	104
4.4.	<u>Standardisierung molekularbiologischer Nachweissysteme von Mikroorganismen aus Bioaerosolen landwirtschaftlicher Tierställe.....</u>	109
4.4.1.	<u>Etablierung des Nachweises zur Detektion infektiöser Erreger am Beispiel der Gattung Salmonella.....</u>	109
4.4.2.	<u>Etablierung des Nachweises zur Detektion Allergie-Auslösender Erreger am Beispiel der Gattung Thermoactinomyces.....</u>	117
5.	<u>Allgemeine Abschlussbetrachtung.....</u>	123
	<u>Literatur.....</u>	126
	<u>Anhang A.....</u>	A
	<u>Anhang B.....</u>	K

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AIM	Aktinomyeten Isolations-Medium
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
ca.	Circa
CASO	Casein-Soja-Pepton Medium
C _T -Wert	Cycle Threshold
CSPD	Di-Natrium 3-(4-methoxyyspiro {1,2-dioxethan-3,2`-(5`-chloro)tricycle [3.3.1.1. ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat
DAPI	4`,6-Diamino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
ddNTP	Didesoxynucleosid-5´-triphosphat
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (engl., Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleosid-5´-triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
fg	Femtogramm
<i>g</i>	Einheit der Erdbeschleunigung
GYM	<i>Glucose, Yeast, Malt medium</i> (engl., Glukose, Hefe-, Malzextrakt Medium)
GZZ	Gesamtzellzahl
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-Galactosid
KBE	Koloniebildende Einheiten
l	Liter
m ³	Kubikmeter
mbar	Millibar
MCC	MacConkey Agar
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
Nu	Nutrient Agar
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
OD ₂₈₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm
PC-Filter	Polycarbonat-Filter

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (engl., Polymerase Ketten Reaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PN	Probenahme
RPM	<i>Rounds per minute</i> (engl., Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SA	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
s. o.	siehe oben
ssDNA	<i>Single stranded DNA</i> (engl., einzelsträngige DNA)
s. u.	siehe unten
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
TS	Trypton Soja Agar
TSB	Trypticase™-Soja Bouillon
VE	Vollentsalzt (Wasser)
WSA	Wismut-Sulfit-Agar
z. B.	Zum Beispiel

ZUSAMMENFASSUNG

Bioerosole aus bzw. in landwirtschaftlichen Tierställen beeinhalteten häufig hohe Konzentrationen an Mikroorganismen in stark zeitlich und räumlich variierender Zusammensetzung. In diesen Ställen arbeitende Menschen sind damit potentiell infektiösen und allergie-auslösenden Mikroorganismen und deren Bestandteilen oder Stoffwechselprodukten exponiert, die ein erhebliches Gesundheitsrisiko darstellen können.

Die kultivierungsbasierte Untersuchung von Bioaerosolen eines Putenstalles erfasste im Vergleich zur molekularbiologischen Methode einen geringeren Anteil vorhandener Organismen bei gleichzeitig geringerer Diversität. Insgesamt wurden 28 Isolate durch die kultivierungsabhängige Analyse gewonnen und nach Sequenzierung des 16S rRNA Gens 19 Arten zugeordnet. Dominierend waren Gensequenzen mit höchster Ähnlichkeit zu Sequenzen der Gattungen *Nocardioptis* (n=4), *Bacillus* (n=4) und *Brevibacterium* (n=3). Innerhalb der Klonbibliotheken (n=165) dominierten Sequenzen des 16S rRNA Gens mit höchster Sequenzähnlichkeit zu Spezies der Gattungen *Aerococcus*, *Lactobacillus* und *Megamonas* für beide Probenahmeorte unabhängig von der Sammelmethode. Anhand beider Methoden wurden Organismen mit einem potentiellen Gesundheitsrisiko (Risikogruppe 2) für den Menschen nachgewiesen (u. a. *Acinetobacter johnsonii*, *Pantoea agglomerans*, *Aerococcus viridans*, *Shigella flexneri*).

Die umfassende Untersuchung des Einflusses der Sammlung auf die Lebensfähigkeit einzelner Stämme anhand der Lebend-Tot-Färbung zeigte sehr heterogene Ergebnisse, die auf eine stamm- oder speziesspezifische Widerstandsfähigkeit gegenüber den Effekten durch die Filtration und das Impingement hinweisen. Für *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T konnten nach 30 Minuten Beaufschlagung mittels Impingement noch 90,8% der Zellen als lebend detektiert werden, nach 20 Minuten Filtrationsbeaufschlagung nur noch 18%. Zellen von *Bacillus subtilis* DSM 10^T zeigten bei beiden Methoden keine Beeinflussung der Lebensfähigkeit. Für Zellen von *Escherichia coli* DSM 30083^T wurden schon nach 10 Minuten Filtrationsbeaufschlagung keine Zellen mehr als lebend detektiert. Die stärksten Absterbe-Effekte auf Zellen der untersuchten Stämme zeigte insgesamt die Filtration.

Da molekularbiologische Methoden die Organismen unabhängig vom Lebenszustand erfassen, spielt die biologische Sammeleffizienz beim Nachweis anhand der Realtime PCR nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr ist ein möglichst hoher Erfassungsgrad des Sammelsystems ausschlaggebend. Im Vergleich war in dieser Arbeit die physikalische Sammeleffizienz für die Filtration durchschnittlich 40% höher als beim Impingement. Dies wird vor allem auf eine Vorabscheidung von Partikeln im Einlasssystem des AGI-30 Impingers zurückgeführt.

Die Etablierung eines spezifischen Nachweissystems auf Basis der Realtime PCR zur schnellen Quantifizierung von Mikroorganismen aus Bioerosolen am Beispiel einer infektiösen (*Salmonella* sp.) sowie einer allergie-auslösenden Bakterien-Gruppe (*Thermoactinomyces* sp.) wurde entwickelt. Verluste waren vor allem methodisch durch die DNA-Extraktion bedingt. Die Größenordnung der Wiederfindung variierte in Abhängigkeit vom eingesetzten Verfahren und der eingesetzten Zellzahl zwischen 23,3% und 58,2%. Hemmeffekte durch Matrixmaterial auf die Realtime PCR traten nicht auf, konnten jedoch nicht grundlegend ausgeschlossen werden. Ein sekundäres Ziel war eine mögliche Standardisierung zur Gefährdungsbeurteilung von Arbeitsplätzen basierend auf den validierten Nachweissystemen.

1. EINLEITUNG

1.1. Aerosole und Bioaerosole

Aerosole sind definiert als Gemische fester und/oder flüssiger Schwebeteilchen und einem Gas [1]. Demnach ist auch die Luft ein Aerosol, zusammengesetzt aus den unterschiedlichsten Komponenten, die uns als Rauch, Dampf, Nebel oder Staub umgibt. Diese Komponenten variieren in ihrer Zusammensetzung stark; einzelne Moleküle, Mineralstaub, Gase, anorganische Partikel und auch biologische Bestandteile sind in je nach Standort, Jahreszeit, Klima und z.B. anthropogenen Aktivitäten unterschiedlichen Anteilen zu finden. Im Zusammenspiel der einzelnen Bestandteile kann es, vor allem im Zusammenhang mit Wassertröpfchen zu Reaktionen untereinander kommen (chemische Reaktionen wie sie z. B. dem sauren Regen zugrunde liegen). Aerosole sind durch diese Variabilität und Reaktivität insgesamt sehr dynamische Systeme.

Da die Luft ein den Menschen umgebendes und lebensnotwendiges Medium ist, hat ihre Zusammensetzung auf ihn und seine Gesundheit unmittelbar Einfluss. Aerosole werden von Menschen eingeatmet und gelangen so in den Atemtrakt. Bei Erkrankungen/Allergien des Menschen im Zusammenhang mit luftgetragenen Partikeln ist neben der Art und Konzentration der Luft-Inhaltsstoffe vor allem die Partikelgröße von Bedeutung, da diese die Depositionstiefe innerhalb des menschlichen Atemtrakts bestimmt [2, 3]. Partikel im Durchmesser kleiner als 10 µm können bis in die Bronchien vordringen, sind also lungengängig. Partikel zwischen 0,1 und 1 µm sind bis in die empfindlichen Alveolen inhalierbar [4, 5] (Tabelle 1). Bei kugelförmigen Partikeln hängt die Deposition vor allem vom Durchmesser ab, bei faserförmigen ist deren Länge entscheidender (z. B. Pilze oder fadenförmige Bakterien wie Aktinomyzeten). Um verschiedene Partikel vergleichbar zu machen, wird der sog. „aerodynamische Durchmesser“ d_{AE} herangezogen. Dieser ist definiert als der Durchmesser einer Kugel mit der normierten Dichte von 1 g cm⁻³, welche die gleiche Sinkgeschwindigkeit hat wie der zugehörige Partikel [4].

Tabelle 1 Depositionstiefe von Partikeln im menschlichen Atemtrakt in Abhängigkeit vom Durchmesser der Partikel [2, 4].

Depositionstiefe	Partikeldurchmesser [μm]	Partikelgröße*
Nasen-Rachenraum	5 - 10	„PM ₁₀ “
Luftröhre	2,5 - 5	
Bronchien	1 – 2,5	„PM _{2,5} “
Bronchiolen	0,1 - 1	
Alveolen	< 0,1	„UP“

PM: Particulate Matter, UP: Ultrafine Particles nach 2008/50/EG [6]

Zusammengefasst bestimmen vier Faktoren das Gefährdungspotential eines luftgetragenen Partikels für den Menschen:

- Der Partikeltyp und seine damit einhergehenden biologischen Effekte
- Die Konzentration des Partikels innerhalb der Atemzone
- Die Größe des Partikels (aerodynamischer Durchmesser) innerhalb der Atemzone
- Die Dauer der Exposition

Der Begriff „Bio“-Aerosole bezieht sich auf luftgetragene Teilchen biologischer Herkunft (DIN EN 13098, [7]). Entsprechend werden Bioaerosole als alle im Luftraum befindlichen Ansammlungen von Partikeln bezeichnet, denen Pilze (Sporen, Konidien, Hyphenbruchstücke), Bakterien, Viren und/oder Pollen, sowie deren Zellwandbestandteile und Stoffwechselprodukte (z. B. Endotoxine, Mykotoxine) bzw. diese beinhalten oder bilden. Auch Bestandteile von Insekten oder deren Stoffwechselprodukte sind in dieser Definition mit eingeschlossen [8]. Aus diesem Grund werden Bioaerosole oft auch als „organic dust“ bezeichnet.

Diese biologischen Partikel variieren in ihrem Durchmesser. So können Viren einen Durchmesser von unter 10 nm haben, während Pollen oder Pilzsporen bis zu 100 μm aufweisen können (siehe auch Abbildung 1). Die meisten Bakterien haben einen Durchmesser von 1 μm und können daher bis in die Alveolen (siehe Tabelle 1) des menschlichen Atemtraktes inhaliert werden und so einen negativen Einfluss auf die Gesundheit des Menschen in Form von Allergien oder Infektionen ausüben.

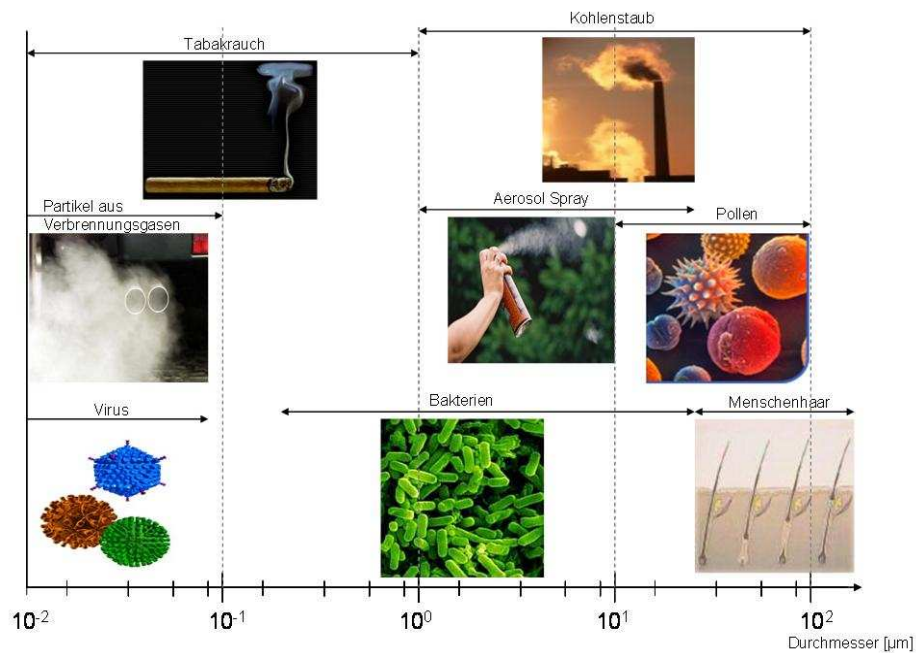


Abbildung 1 Darstellung der durchschnittlichen Partikeldurchmesser $[\mu\text{m}]$ für Partikel unterschiedlicher Aerosole.

Das (längere) Überleben in der Luft ist für Bakterien meist schwierig, bedingt durch die schnelle Dehydratation während der Aerosolbildung, da die Wasserverfügbarkeit ausschlaggebend für das Überleben von Mikroorganismen ist (relative Luftfeuchtigkeit bzw. A_w -Wert). Hohe Temperaturen und eine geringe Luftfeuchtigkeit beschleunigen diese Austrocknung und mindern so die Überlebensrate luftgetragener Mikroorganismen [9]. DNA-Schädigende UV-Strahlung durch Sonnenlicht ist ebenfalls ein erheblicher Stressfaktor für Mikroorganismen und beeinflusst damit die Überlebensfähigkeit von Bakterien. Trotzdem sind viele Bakterien in der Lage in Abhängigkeit von ihrer individuellen Tenazität, zumindest zeitweise, luftgetragen zu überleben [10]. Eine widerstandsfähige Zellwand, wie bei Gram-positiven Organismen und/oder die Fähigkeit zu Sporenbildung oder Pigmentierung bieten einen Selektionsvorteil zum Überleben [11]. Viele Organismen kommen an (Wasser)tröpfchen oder partikelgebunden in der Luft vor [12, 13] und sind so z. T. physikalisch geschützt vor der UV-Einstrahlung des Sonnenlichts und verfügen gleichzeitig über Nährstoffe und/oder Wasser. Für *Escherichia coli* zeigten HANDLEY und WEBSTER [14], dass die Überlebensrate für Agglomerate von Zellen erheblich höher ist, als bei einzeln dispergierten Zellen. COCKELL *et al.* [15] zeigten, dass eine $500 \mu\text{m}$ dicke Staubschicht ausreicht, um die UV-Licht Exposition dermassen zu verringern, dass keine Inaktivierung von *Bacillus subtilis* Sporen durch

UV-Licht mehr zu detektieren war. Auch MANCINELLI und KLOVSTAD [16] zeigten für eine Staubschicht von 1 mm Dicke, dass sie die Inaktivierung von *Bacillus subtilis* Sporen bei einer Strahlungsintensität von 12 kJ sogar vollständig verhinderte.

Generell kommt der atmosphärischen Transmission eine entscheidende Rolle bei der Verteilung von Bakterien zu. Die Transmission von Mikroorganismen über z. T. sehr weite Strecken ist mittlerweile mehrfach durch Studien belegt worden. So wurden Mikroorganismen z. B. mit Sahara-Staub über den Atlantik in die Karibik transportiert und waren dort immer noch lebensfähig [17]. Die Transmission von Pathogenen kann entscheidenden Einfluss auf Ökosysteme [18-20], die menschliche Gesundheit [21, 22] oder auch die landwirtschaftliche Produktion haben [13]. So spielen neben der Geruchsbelästigung die Immissionen von Mikroorganismen und die Angst vor Erkrankungen der Anlieger immer wieder eine Rolle bei der Zulassung von Industrieanlagen, landwirtschaftlichen Tierställen oder Biogasanlagen.

Wie in jedem mikrobiellen Lebensraum können sowohl die Konzentration als auch die Artenzusammensetzung in Abhängigkeit von Zeit und Raum schwanken. So zeigten verschiedene Studien, dass sich die relative Abundanz von Bakterien und Pilzen in Luftproben verschiedener Standorte unterscheiden [23-25]. Aber auch in Proben, die an einem Standort gewonnen wurden, schwankte die Artenzusammensetzung signifikant innerhalb eines Jahres, Monats oder sogar Tages [24, 26, 27]. FIERER *et al.* [28] stellten während ihrer Untersuchungen fest, dass in Proben aus unterschiedlichen Standorten ähnlichere Spezies zu finden waren, als in Proben des gleichen Standorts zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Diese Schwankungen können auf den Einfluss der lokalen oder regionalen meteorologischen Bedingungen (Wind, Luftfeuchte, Sonneneinstrahlung, Mikroklima [27, 29, 30]), des Untergrunds (Vegetation, Boden, Bebauung) oder auch der menschlichen oder industriellen Tätigkeit zurück geführt werden.

Diese Ergebnisse zeigen die Schwierigkeit „typische“ Vertreter luftgetragener Bakterien zu benennen, die vorherrschen und dadurch potentiell als sog. „Leitkeime“ analysiert werden könnten, wie es bei der Analytik von Trinkwasserproben gebräuchlich ist [31]. Am häufigsten werden Spezies der Gattungen *Staphylococcus*, *Bacillus* oder der Gruppe der Aktinomycceten in Luftproben „normaler“ (sowohl urbaner als auch ruraler) Außen-Umgebungsluft [25, 32, 33] nachgewiesen. Daneben konnten aber auch immer wieder Vertreter gefunden werden, die *per se* als nicht sehr resistent gegenüber den in der Luft vorherrschenden Umweltbedingungen

gelten, wie z. B. Gram-negative Organismen. DI GEORGIO *et al.* [34] finden diese Gruppe in 60% der Luftproben der Stadt Marseille und ZUCKER *et al.* [35] in Luftproben verschiedener Tierställe (beide kultivierungsbasiert). Eine besondere Problematik geht mit den Gram-negativen Organismen durch die in deren äußerer Zellmembran enthaltenen Lipopolysaccharide (LPS) einher, den Endotoxinen. Diese wirken in Abhängigkeit vom Einwirkungsort und der Stärke der Exposition im Menschen. Typisch sind plötzlich auftretendes hohes Fieber, Störungen der Blutgerinnung bis hin zu einem anaphylaktischen Schock [36]. An Arbeitsplätzen kommt es meist zur Exposition mit Endotoxinen über die Atemwege und kann beim Menschen zu Husten, Beeinträchtigungen der Lungenfunktion und grippeähnlichen Symptomen führen [37]. Arbeitsmedizinisch ist für einige Arbeitsplätze der Zusammenhang zwischen Endotoxinbelastung und der Entwicklung von berufsbedingten Erkrankungen der Lunge erwiesen. So wurde wurden Lungenveränderungen durch Endotoxine z. B. bei Baumwollarbeitern, bei Schweinemästern und bei Hühnerfängern beobachtet [38-40].

Neben der Zahl der vorkommenden Taxa ist auch ihre räumliche Verteilung, ihre Konzentration innerhalb des Mediums Luft stark variabel. Im Allgemeinen sind über den offenen Ozeanen die geringsten, über Landflächen etwas höhere, und in den urbanen und landwirtschaftlich genutzten Regionen die höchsten Konzentrationen zu finden [41, 42]. Diese betragen im Mittel 1 bis 10^3 KBE m^{-3} Luft [20, 41] und werden als sog. Hintergrundkonzentration bezeichnet. Im Vergleich dazu können weitaus höhere Konzentrationen luftgetragener Mikroorganismen, darunter auch Organismen mit infektiösem oder allergenem Potential, in der Industrie oder dem verarbeitenden Gewerbe gefunden werden. Arbeitsplätze mit bekannt hoher Exposition ($\geq 10^5$ KBE m^{-3} Luft) der dort tätigen Arbeitnehmer sind hauptsächlich in der Metallverarbeitung [43], der Lebensmittelproduktion und der Müllaufbereitung zu finden (z. B. Kompostierungsanlagen [44-47], Müllsortierung [48, 49], Kläranlagen [50, 51]).

1.2. Bioaerosole in der Landwirtschaft – medizinische Relevanz luftgetragener Mikroorganismen

Weltweit stehen die meisten Menschen mit der landwirtschaftlichen Produktion in Verbindung (2008: 38% der Weltbevölkerung, Quelle: FAOSTAT). In den Industrieländern beträgt der Anteil der in der Landwirtschaft arbeitenden Menschen

unter 2% und sinkt weiter mit der voranschreitenden technologischen Entwicklung [52]. Diese Entwicklungen haben zum Großteil Erleichterung der Arbeit und eine Minderung der gesundheitlichen Risiken gebracht. Durch die Intensivierung der Tierhaltung und den Übergang zur intensiven Massen-Stallhaltung von Tieren Anfang der 1960er Jahre stieg jedoch die Gesundheitsgefährdung der Arbeitnehmer vor allem durch Gase, Stäube und Bioaerosole an. Neben der Haltung großer Zahlen an Tieren in geschlossenen Gebäuden fand die Arbeitsteilung Eingang in die Landwirtschaft. Wo früher viele Personen unterschiedliche Arbeiten verrichteten, sind heute wenige Personen spezialisiert auf Tätigkeiten und sind so oft über ihre gesamte Arbeitsschicht in einem Stallgebäude. Typische Arbeiten sind dabei Herstellung des Futters, Fütterung der Tiere, Reinigung der Ställe (Teile des Stalles regelmäßig oder der komplette Stall nach einem Zyklus, inklusive Desinfektion); allesamt korreliert mit der Entstehung von Aerosolen und Bioaerosolen. Neben der eigentlichen Produktion gehört auch die Schlachtung, mittlerweile stark industrialisiert und arbeitsgeteilt, zu den landwirtschaftlichen Arbeitsgebieten, die mit einer hohen Exposition der Arbeitnehmer durch luftgetragene Organismen einhergeht [53-59].

In der Luft landwirtschaftlicher Tierställe werden, wie an industriellen Arbeitsplätzen auch (s. o.), im Allgemeinen hohe Konzentrationen luftgetragener Mikroorganismen gefunden [60-64]. RADON *et al.* [65] fanden in einer umfangreichen Studie in Bioaerosolen verschiedener Tierställe bis zu 10^8 KBE bzw. bis zu 10^{10} Zellen m^{-3} Luft. Untersuchungen zur Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in der Luft unterschiedlicher, landwirtschaftlicher Tierställe zeigten ein variables Bild. So wurden Zusammenhänge der Konzentration luftgetragener Bakterien mit der jeweils eingestellten Tierart gefunden [63].



Abbildung 2 Bioaerosole in landwirtschaftlichen Tierställen. A) Staubaufwirbelung durch Ventilatoren zur Stallklimatisierung. B) Aufwirbelung von Staub durch die Kratz- und Gefiederschüttelaktivitäten der Tiere. C) Ablagerung von Staub auf dem Inventar des Stalles (Tränke). D) Aktive Aerosolbildung durch Nebelung eines Masthähnchenstalles zur Befeuchtung und Desinfektion durch ätherische Öle in einem Masthähnchenstall.

Viele kultivierungsabhängige Studien fanden in der Luft landwirtschaftlicher Tierställe hauptsächlich Vertreter der Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* [33, 66-70], die jedoch nicht weiter spezifiziert wurden. Die genaue Zuordnung zu Gattungen ist dabei durch kultivierungsbasierte Untersuchungen nicht immer eindeutig durchzuführen. Andere Studie zeigen, dass die Luft in Tierställen durchaus eine interessante und hohe Artendiversität beinhalten kann. MARTIN *et al.* [71] isolierten aus Bioaerosolen eines Mastentenstalles mehrere Stämme, die verschiedenen neuen Spezies, z. B. *Leucobacter aerolatus* [72], oder Gattungen, z. B. *Paenochrobactrum gallinarii* [73], zugeordnet werden konnten. Darüber hinaus wurden Organismen gefunden, die nach TRBA 466 [74] der Risikogruppe 2¹ zugeordnet sind. So z. B. *Cellulosimicrobium funkei*, *Corynebacterium falsenii*, *Corynebacterium xerosis*, *Mycobacterium arupense* und *Staphylococcus epidermidis*. Auch andere Studien zeigten, dass Bioaerosole häufig Vertreter von Gattungen oder

¹ Organismen der Risikogruppe 2 nach BiostoffV: Biologische Arbeitsstoffe, die eine Krankheit beim Menschen hervorrufen können und eine Gefahr für Beschäftigte darstellen können; eine Verbreitung des Stoffes in der Bevölkerung ist unwahrscheinlich; eine wirksame Vorbeugung oder Behandlung ist normalerweise möglich.

Spezies beinhalten, die ein Gefährdungspotential für die Tiere, vor allem aber für die Menschen, die in diesen Ställen arbeiten, aufweisen. So wurden in anderen Studien u. a. *Listeria monocytogenes* [55], *Pantoea agglomerans* [75-77], *Salmonella* Typhimurium [78-81], *Aspergillus flavus* und *Aspergillus fumigatus* [82] in Bioaerosolen verschiedener Tierställe gefunden.

Eine weitere wichtige Gruppe von Organismen, die assoziiert mit landwirtschaftlichen Bioaerosolen ist, sind Vertreter der Actinobacteria (auch: Aktinomyzeten²). Die Actinobacteria bilden eines der artenreichsten Phyla unter den Bakterien (aktuell etwa 300 Gattungen) und sind sowohl morphologisch als auch genetisch eine sehr heterogene Gruppe. Zu Ihnen gehören einige Organismen, die zu Infektionen (z. B. Nocardiose [83, 84]) oder allergischen Reaktionen des Atemtraktes des Menschen führen. Die Exogen Allergische Alveolitis (EAA) auch „Hypersensitiväts-pneumonitis“ oder umgangssprachlich „Farmerlunge“ genannt, ist eine Erkrankung des Menschen, bei der die Lungen-Alveolen betroffen sind. In einer komplexen Immunreaktion des Typs III und einer zellulären Immunreaktion des Typs IV entzündet sich das Lungengewebe, wodurch es zu (akutem) Husten, Atemnot und hohem Fieber kommt. In Deutschland ist die EAA eine meldepflichtige Arbeitserkrankung. Als Auslöser kommen verschiedene organische Substanzen der Atemluft in Frage. Dazu zählen neben Mehlstaub und Chemikalien hauptsächlich Bakterien und Bakterienbestandteile als Auslöser. Erste Studien belegten schon 1971, dass u. a. *Thermoactinomyces* sp. [47, 85, 86] zu den eindeutigen Auslösern einer EAA gehören. So zeigte ein Patient der unter Bagassose litt (EAA, ausgelöst durch mit thermophilen Aktinomyzeten kontaminierte Zuckerrohrrückstände) eindeutige Symptome einer EAA nach Einatmen von Extrakten von *Thermoactinomyces sacchari* (Syn.: *Laceyella sacchari*) [86]. Eine ebenso große Rolle als Auslöser von Lungenerkrankungen in der Landwirtschaft wird dem Organismus *Pantoea agglomerans* (Syn. *Erwinia agglomerans*, *Enterobacter agglomerans*) zugeschrieben. Diese Art ist ubiquitär in der Umwelt zu finden, sehr häufig jedoch auf Pflanzenoberflächen [87], wodurch Vertreter dieser Spezies durch Heu und Stroh in landwirtschaftliche Tierställe gelangen und gerade bei Tätigkeiten, wie z. B. dem

² Actinobacteria (ugs. „Aktinomyzeten“) sind Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt. Einige sind filamentös und mehrzellig, viele können Sporen bilden. Das Phylum der Actinobacteria enthält derzeit nur eine einzige gleichnamige Klasse. Oft werden auch Gruppen, die einen niedrigen GC-Gehalt besitzen, aufgrund ihrer ähnlichen Morphologie und Anspruchsbedingungen, zu den Aktinomyzeten gezählt. Aufgrund von 16S rRNA-Gen-Sequenzanalysen (16S rRNA Gen) gehören sie jedoch nicht zu diesem Phylum.

Einstreuen der Ställe, in hoher Konzentration in die Umgebungsluft frei gesetzt werden. *P. agglomerans* wurde als vorrangiger Auslöser Landwirtschafts-arbeitsplatzbezogener Lungenerkrankungen identifiziert [88, 89] und wurde folglich in die Risikogruppe 2 eingeordnet (nach TRBA 466 [74]). DUTKIEWICZ *et al.* [90] zeigten, dass *P. agglomerans* Hypersensitivitätspneumonien im Menschen auslöst. Dies belegen auch MARTIN *et al.* [91], die für einen Stamm von *P. agglomerans* einen eindeutigen zytotoxischen Effekt auf Lungenzellen beschreiben. Die Reaktion humaner Lungenzellen wird sehr wahrscheinlich durch ein starkes Endotoxin hervorgerufen, das von *P. agglomerans* Zellen produziert wird [88, 92-94]. Eine singuläre Ursache einer akuten EAA ist selten direkt definierbar, da immer auch der Immunstatus des Betroffenen eine Rolle spielt.

Diese Beispiele zeigen, dass Lungenerkrankungen von in der Landwirtschaft tätigen Menschen sehr vielfältig, aber auch sehr weit verbreitet sind. Auch wenn der individuelle Immunstatus eine sehr große Rolle in der Ausprägung der Erkrankung spielt, gibt es eindeutige Zusammenhänge zwischen Expositionsumfang und -art mit dem Auftreten von Erkrankungen. Bislang gibt es keine Grenzwerte für Konzentrationen luftgetragener Mikroorganismen an Arbeitsplätzen in der Landwirtschaft. Es existieren lediglich Empfehlungen von Höchstgrenzen, die aber rechtlich nicht verbindlich sind und auch eher auf Erfahrungswerten beruhen. Aus diesem Grund ist eine genaue und reproduzierbare Quantifizierung und Identifizierung sowohl von lebenden als auch toten (die ebenfalls ein allergenes Potential besitzen) luftgetragenen Mikroorganismen für diese Arbeitsplätze nötig.

1.3. Methoden zur Bestimmung und Quantifizierung luftgetragener Mikroorganismen

Die Freisetzung von Mikroorganismen in die Luft erfolgt aus z. T. sehr unterschiedlichen Quellen, ist sowohl zeitlich als auch räumlich diskontinuierlich und somit nicht homogen. Messungen von Mikroorganismen-Konzentrationen sind demzufolge stets Momentaufnahmen des aktuellen Zustandes. Sie sind weiterhin direkt vom gewählten Sammelverfahren und zum Teil auch vom Detektionsverfahren abhängig. Auch die Abstreuerung der Mikroorganismen von der Körperoberfläche des Menschen kann zu diesen Schwankungen beitragen. Unterschiedliche Ergebnisse an gleichen Messpunkten hängen u. a. mit unterschiedlichen Messstrategien

zusammen, die jeweils angewendet wurden und deren Ergebnisse oft nicht direkt vergleichbar sind.

1.3.1. Gesetzeslage und Richtlinien

Bislang gibt es weltweit keine eindeutigen Grenzwerte für Konzentrationen biologischer Arbeitsstoffe an Arbeitsplätzen. In Deutschland regelt die Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz (Biostoffverordnung – BioStoffV) Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen, enthält allerdings ebenfalls kein Grenzwertkonzept. Es können für Arbeitsplätze nach TRBA 405 sog. „technische Kontrollwerte“ (TKW) vom Ausschuss für biologische Arbeitsstoffe (ABAS) festgelegt werden, die für jeden Arbeitsplatz einzeln zu bestimmen und abhängig vom jeweiligen Stand der Technik am Arbeitsplatz sind. Diese Kontrollwerte sind dann einzuhalten und regelmäßig zu überprüfen. Einige EU Länder haben indirekte Grenzwerte für biologische Arbeitsstoffe, indem Grenzwerte für Toxine, die von einigen Organismen gebildet werden können, angegeben werden. In Australien z. B. gibt es derzeit nur einen Richtwert für die einatembare Staubfraktion („rough dust“) von 10 mg m^{-3} Luft und für die alveolengängige Staubfraktion („respirable dust“) einen Expositionsrichtwert von 3 mg m^{-3} Luft³ [95]. Allerdings gelten diese Werte nicht für die Landwirtschaft, für die sie wahrscheinlich niedriger sein müssten, wenn genauere Expositions-Immunreaktions-Zusammenhänge untersucht sind.

Die Festsetzung von Grenzwerten oder zumindest Richtwerten war in der Vergangenheit immer wieder Diskussionsgegenstand. Die Fähigkeit der Mikroorganismen sich zu replizieren, das veränderliche Gefährdungspotential einzelner Organismen und die hohe Variabilität der Artenzusammensetzung in Bioaerosolen macht die Festlegung eines Grenzwertes jedoch schwierig. Dazu kommt als weitere unbekannte Variable die individuelle Immunreaktion des Menschen gegenüber der Exposition von Mikroorganismen.

Im Rahmen der Gefährdungsbeurteilung gemäß den Vorgaben der BioStoffV müssen zur Expositionsabschätzung Informationen bezüglich Art und Menge der vorkommenden biologischen Arbeitsstoffe ermittelt werden. Momentan gültige Vorgaben zur Bestimmung der Konzentration luftgetragener Organismen sind in den VDI RICHTLINIEN BLATT 2 (Filtration) und BLATT 3 (Impingement) [96, 97]

³ Kalkuliert als Mittel über eine Arbeitschicht von acht Stunden.

festgelegt. Die standardisierte Quantifizierung und Identifizierung von Mikroorganismen beruht dabei derzeit auf kultivierungsabhängigen Verfahren.

1.3.2. Kultivierungsabhängige Methoden

Bisher angewandte Methoden zur Untersuchung und Quantifizierung von Mikroorganismen in Bioaerosolen basieren auf klassischen kultivierungsbasierten Methoden. Hierbei werden unterschiedliche Nährböden verwendet, die Bioaerosolprobe nach der Sammlung ausgespatelt und nach einer entsprechenden Bebrütungszeit die Kolonien ausgezählt. Hierdurch kann eine Quantifizierung der Mikroorganismen durchgeführt werden. Es wird jedoch nur der Anteil der zu den gewählten Bedingungen wachstumsfähigen Mikroorganismen erfasst. Hier spielen Enzymausstattung, Lebenszustand und Stoffwechselaktivität der jeweiligen Organismen eine große Rolle. Eine Identifizierung von Bakterien (im Gegensatz zu Pilzen) kann aufgrund der Koloniemorphologie nur bedingt bis gar nicht vorgenommen werden. Selektive Differenzierungsmedien, die eine eindeutige Identifizierung ermöglichen, sind nur für wenige Gruppen wirklich verlässlich. So können z. B. Salmonellen recht eindeutig auf dem selektiven und differenzierenden WSA nachgewiesen werden [98], eine Quantifizierung ist hierbei aber oft nur bedingt möglich, da gerade für geringe Konzentrationen oft ein Anreicherungsschritt vorangestellt werden muss. Im Gegensatz dazu stehen Kulturmedien, die Gruppen von Bakterien halb-selektiv erfassen, aber keine weitere Identifizierung ermöglichen. So werden häufig Medien als „spezifisch“ für z. B. *Enterobacteriaceae* (z. B. MacConkey oder Endo-Agar) oder Aktinomyzeten (z. B. G/A Agar oder GYM Medium) verwendet, die erwiesenermaßen auch anderen Organismen ein Wachstum ermöglichen [99]. Viele Studien gehen jedoch davon aus, dass in Abhängigkeit vom untersuchten Habitat zwischen 1 und 10% der tatsächlich vorhandenen Mikroorganismen durch Kultivierung überhaupt erfasst werden können [100]. Zur Kultivierbarkeit speziell von luftgetragenen Organismen gibt es bislang wenige systematische Untersuchungen. So fanden ALBRECHT *et al.* [46], dass der Anteil kultivierbarer Mikroorganismen (CASO Medium) erheblich geringer ist, als die parallel bestimmte Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung). Auch ALVAREZ *et al.* [101] beschrieben schon 1994, dass ein erheblicher Anteil luftgetragener Organismen durch die Kultivierung nicht erfassbar ist. Dies kann durch die Kultivierungsbedingungen, die schwierige/unmögliche Kultivierbarkeit der erfassten Art, Konkurrenzvorteile

einzelner Arten gegenüber anderen (z. B. schnell wachsende gegenüber langsam wachsenden Arten) oder durch den physiologischen Zustand der Zellen bedingt sein. Hier spielen so genannte VBNC („viable but non-cultivable“) Organismen eine erhebliche Rolle [102, 103].

Hinzu kommen bei der Untersuchung luftgetragener Organismen auch die generelle Erfassungseffizienz des verwendeten Systems („Physikalische Sammeleffizienz“ [104, 105]) sowie die Einflüsse der Sammlung auf die Organismen („Biologische Sammeleffizienz“). Letztere hat wahrscheinlich eine unterschiedliche starke Wirkung auf jede Bakteriengattung oder sogar –art [106-109]. Insgesamt können kultivierungsabhängige Methoden einen guten Überblick über vorkommende Bakterien-Gruppen geben; einen bedeutend detaillierteren Einblick bieten aber kultivierungsunabhängige, molekularbiologische Methoden.

1.3.3. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden werden immer häufiger zur Untersuchung unterschiedlichster Habitate in der Umwelt eingesetzt [110-113] und finden langsam auch in der Analytik luftgetragener Mikroorganismen Einzug [69, 114, 115]. Dabei ist neben der Identifizierung von Organismen, die durch kultivierungsabhängige Methoden nicht erfasst werden können, auch eine Quantifizierung dieser Organismen von Interesse. Molekularbiologische Methoden bieten die Möglichkeit, beide Punkte in einem Untersuchungsansatz (gleichzeitig) zu analysieren, zusammen mit einer erheblichen Zeitersparnis bis zur Ergebnisfindung.

Die grundlegende Methode nukleinsäurebasierter Analysesysteme ist die PCR (engl., polymerase chain reaction) [116]. Durch die PCR werden bestimmte DNA-Abschnitte („*targets*“) mit bekannter Sequenz selektiv vervielfältigt und können so u. a. zum Nachweis und zur Identifizierung von Bakterien eingesetzt werden. Häufig werden dazu gruppenspezifische Sequenzunterschiede auf dem bakteriellen 16S rRNA Gen genutzt. Dieses Gen ist hierfür besonders geeignet, da es hoch konservierte Bereiche, also in allen Bakterien auftretende Bereiche gleicher Sequenz, aber auch sehr variable Bereiche besitzt, deren Sequenz für jede Gattung oder sogar Art variiert. So ist es möglich, durch Auswahl der Primer-Zielsequenz, Mikroorganismen auf Gattungs- bzw. in einigen Fällen sogar Speziesebene spezifisch nachzuweisen.

Meist reicht jedoch die reine Bestimmung der Anwesenheit eines Mikroorganismus in einer Umweltprobe nicht aus. Oft stellt sich die Frage nach Konzentrationen bestimmter Mikroorganismen in der zu analysierenden Umweltprobe. Diese Quantifizierung kann durch die Methodik der Realtime PCR vorgenommen werden.

Es gibt mittlerweile unterschiedliche Verfahren der Realtime PCR, die auf der unspezifischen Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an doppelsträngige DNA (dsDNA) basieren oder der spezifischen Bindung an Einzelstrang-DNA (ssDNA) unterschiedlich aufgebauter SONDENSYSTEME (z.B. TaqMan[®], Molecular Beacons, Scorpion Sonden). Im einfachsten Ansatz wird zum Reaktionsansatz neben den spezifischen Primern ein Fluoreszenzfarbstoff (z. B. Sybr[®]Green) gegeben, der unspezifisch an dsDNA bindet, wodurch sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes um etwa das tausendfache erhöht. Während der Amplifikation bindet der Farbstoff an das entstandene Produkt. Die Fluoreszenz steigt somit proportional zur Produktmenge. Da die fluormetrische Messung in Echtzeit während der Reaktion erfolgt, wird dieses Verfahren als Realtime PCR bezeichnet (Abbildung 3, A).

Die Amplifikationseffizienz (Rate der Zunahme des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes pro Zyklus) ist die ausschlaggebende Komponente bei der späteren Quantifizierung der unbekannten Konzentrationen aus Umweltproben. Zur Berechnung der Reaktionseffizienz (E) gibt es verschiedene mathematische Modelle [117, 118]. Die meist verwendete Methode ist die Erstellung einer Standardgeraden mit DNA bekannter Konzentration des Zielfragments [119]. In Vierfach-Ansätzen dezimaler Verdünnungen des zu amplifizierenden Ziel-DNA-Fragments kann die Amplifikationsrate für diese Konzentrationen bestimmt werden. Durch Auftragen der eingesetzten Konzentrationen (logarithmisch) zu den ermittelten C_T-Werten wird die zugehörige Standardgerade erstellt. Die Effizienz der Reaktion lässt sich im Anschluss aus der Steigung dieser Standardgeraden berechnen ($E=10^{-1/\text{Steigung}}$). Im Idealfall ist die Effizienz einer Reaktion gleich zwei (entspricht einer Verdoppelung pro PCR-Zyklus; Abbildung 3, B).

In der Literatur werden unterschiedliche Verfahren zur Quantifizierung unbekannter Konzentrationen anhand der Realtime PCR beschrieben. Grundsätzlich wird dabei zwischen relativer und absoluter Quantifizierung unterschieden. Bei der relativen Quantifizierung wird die Variation der Expression eines Genes relativ zu einem Housekeeping Gen, das als Kontrolle mit amplifiziert wird, quantifiziert (in diesem Fall dient cDNA als template). Hier können keine absoluten Zahlen zur Konzentration

berechnet werden, nur eine Angabe zu Steigerung und Abnahme bzw. zu deren Grad ist möglich. Diese Ansätze werden häufig für Expressionsversuche auf mRNA Basis eingesetzt [120]. Im Gegensatz dazu wird bei der absoluten Quantifizierung die unbekannte Konzentration der Zielgene mit einem Standard bekannter Konzentration verglichen und so auch die in einer Probe absolut vorhandene Konzentration bestimmt (Abbildung 3, B).

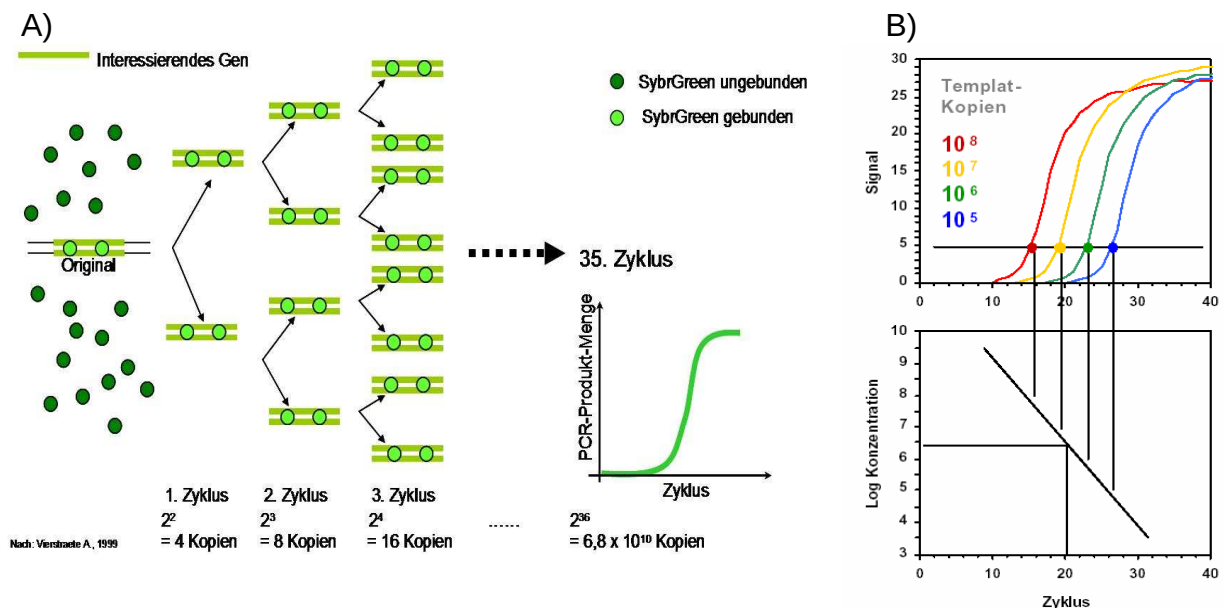


Abbildung 3 A) Darstellung des Prinzips der Phasen einer Realtime PCR. B) Darstellung des Prinzips der Erstellung einer Kalibriergeraden (Abbildungen modifiziert nach A) VIERSTRAETE [121] B) WILHELM [122]).

Häufig wird zur Quantifizierung von Mikroorganismen in Umweltproben zur Erstellung der nötigen Standardgleichgeraden das reine Amplicon des zu detektierenden Gens verwendet (z. B. [123, 124]). Dies bietet den Vorteil keine störenden DNA Fragmente im Reaktionsansatz zu haben, zusätzlich können die Primer sehr spezifisch binden. Voraussetzung für eine genaue Quantifizierung anhand der Realtime PCR ist eine gleich hohe Reaktionseffizienz für Standard und Umweltprobe, was durch die Mit-Extraktion von potentiellen Hemmstoffen aus Umweltproben (Huminsäuren, Proteine, Nicht-Ziel-DNA etc.) erschwert werden kann [125-127]. Auch aus Bioaerosolen könnten solche hemmenden Substanzen mit extrahiert werden [128, 129], da sie aus sehr komplexen Stäuben, die Futtermittel, Einstreu, Fäkalbestandteile, Hautpartikel, Haare, Hautschuppen oder Federn enthalten können [130], bestehen. Diese können zu einer Hemmung der PCR führen. Neben den in den Umwelt-Proben enthaltenen Inhibitoren kann auch DNA anderer Organismen (Nicht-Ziel-DNA) zu einer

Beeinflussung der spezifischen PCR-Reaktion führen [131], da auch sie die Effektivität der *Taq*-Polymerase einschränken.

Da molekularbiologische Methoden die DNA als Ausgangsmaterial verwenden, kommt der DNA Extraktion eine Schlüsselrolle zu. Jegliche Verluste oder eine selektive Isolation haben einen Einfluß auf die nachfolgende Analyse und können so zu Unterschätzungen insgesamt, oder auch zu einer Überproportionalisierung einzelner Gruppen führen. Da die Zahl der Operons des zu erfassenden Gens abhängig von der Wachstumsphase pro Zelle stark schwanken kann⁴ [132] oder auch von Spezies zu Spezies unterschiedlich ist [133] kann es zur Überschätzung der tatsächlichen Konzentration kommen. Da die DNA unabhängig vom „Lebenszustand“ der Organismen erfasst wird, kann es jedoch gleichzeitig auch zu Überschätzungen der Konzentration kommen, wenn DNA zwar vorliegt, aber aus abgestorbenen Zellen stammt. Gerade in der Analytik luftgetragener Mikroorganismen sind jedoch auch die abgestorbenen Organismen von Interesse, da sie oft zwar kein infektiöses aber z. B. durch die Bildung von Endotoxinen ein starkes allergenes Potential besitzen [37]. Im Zusammenhang mit der Problematik der *viable but non-cultivable*-Organismen [102, 103] haben molekularbiologische Methoden den Vorteil, dass sie, im Gegensatz zu kultivierungsabhängigen Methoden, auch diese Organismen erfassen. In natürlichen, gemischten Bakterien-Populationen ist es generell schwierig, den Lebenszustand der einzelnen Organismen zu bestimmen. Auch die Kultivierung ist hier nur begrenzt einsetzbar, da subletal geschädigte Zellen oft nicht erfasst werden [102, 103, 134]. Dazu kommt die generelle Selektivität der Kultivierung durch die verwendeten Kultivierungsbedingungen. Mittlerweile sind Methoden zur Untersuchung des Lebenszustandes von Zellen in Umweltproben, wie z. B. Lebend-Tot Färbungen durch Fluoreszenzfarbstoffe [135] oder auch Realtime PCR Ansätze [136], verfügbar, die ohne nötige Kultivierung zwischen lebenden und toten Organismen unterscheiden können. Deren Kombination mit molekularbiologischen Quantifizierungs- und Identifizierungsmethoden bieten so einen erheblich detaillierteren Einblick in die uns umgebende mikrobielle Umwelt.

⁴ Für Stämme von *Escherichia coli* werden in der stationären Phase im Durchschnitt n=7 16S rRNA Operons gefunden, während bis zu n=36 Operons in der exponentiellen Phase beobachtet wurden [132].

1.4. Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen der Gefährdungsbeurteilung gemäß den Vorgaben der BioStoffV müssen zur Expositionsabschätzung Informationen bezüglich Art und Menge der vorkommenden biologischen Arbeitsstoffe ermittelt werden. Eine standardisierte Quantifizierung und Identifizierung von Mikroorganismen beruht derzeit auf kultivierungsabhängigen Verfahren [137]. Zur Bestimmung der Anzahl der KBE an der Anzahl Gesamtbakterien und Gesamtschimmelpilzen als Parameter der Gesamtexposition, werden häufig Nährmedien verwendet, die vielen, jedoch nicht allen Mikroorganismen das Wachstum ermöglichen, und die nach längerer Bebrütungsdauer (24 Stunden bis 7 Tage, je nach Zielorganismus) ausgewertet werden müssen. Diese kultivierungsabhängige Vorgehensweise ist material- und zeitintensiv. Der Informationsgehalt der Ergebnisse (Gesamt-KBE pro m³ Luft) ist jedoch häufig unzureichend, da durch die Wahl der Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Medium, Zeit etc.) jeweils nur die Organismen erfasst werden, die unter den jeweiligen Bedingungen vermehrungsfähig sind. Molekularbiologische Methoden, die bereits erfolgreich zur Beantwortung vieler wissenschaftlicher Fragestellungen eingesetzt wurden, könnten hier detailliertere Informationen liefern. In dieser Arbeit sollte deshalb die Realtime PCR zur Detektion von Mikroorganismen als eine alternative bzw. geeignete Methode zum quantitativen Nachweis eines infektiösen und eines allergie-auslösenden Organismus in Bioaerosolen aus Tierställen erprobt werden. Eine mögliche Standardisierung spielte hierbei eine besondere Rolle.

Um ein auf die Messaufgabe angepasstes Methodenprotokoll zu entwickeln, wurden zusätzliche Faktoren, die die Quantifizierung mittels der Realtime PCR-Methode beeinflussen können, untersucht. Hierzu wurden umfassend sowohl Hemmeffekte auf die Realtime PCR, als auch das Auftreten methodisch bedingter Verluste und deren Größenordnung durch die Aufarbeitung untersucht. Durch Kenntnis und Einbeziehen dieser Verlustquellen kann eine Expositionsabschätzung auch durch die Realtime PCR durchgeführt werden.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders im Text genannt, von folgenden Firmen bezogen:

- o Fermentas, St. Leon Rot
- o Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
- o Invitrogen, Leek, Niederlande
- o Merck KG, Darmstadt
- o Riedel De Haen, Seelze
- o Roth, Karlsruhe
- o Serva, Heidelberg
- o Sigma Aldrich, Steinheim

Für Nährmedien und Lösungen wurde vollentsalztes Wasser, das zusätzlich durch eine Reinstwasseranlage (Purelab Plus, Elga Labwater) über Ionenaustausch entsalzt wurde, verwendet. Dieses wird im Folgenden als „Reinstwasser“ bezeichnet. Für nukleinsäurebasierte Analysen wurde DNase und RNase freies Wasser (Invitrogen, Niederlande) verwendet, das im Folgenden als „PCR-Wasser“ bezeichnet wird.

Als Verfestigungsmittel für feste Nährmedienplatten wurde ausschließlich Bacto™ Agar (Difco™ Laboratories, USA) verwendet. Dieser ist hoch aufgereinigt, Fremdstoffe und Salze sind auf ein Minimum reduziert.

2.2. Verwendete Nährmedien zur Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Stämme sowie Medien zur Bestimmung der KBE bei Probenahmen

Nutrient Agar

Zusammensetzung pro Liter (Oxoid Ltd., UK) nach Herstellerangaben:

Fleischextrakt „Lab Lemco“	1,0	g
Hefeextrakt	2,0	g
Pepton	5,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar-Agar	15,0	g

28 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Aktinomyzeten-Isolations-Medium (AIM)

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (Difco, USA):

Natriumcaseinat	2,0	g
Asparagin	0,1	g
Natriumpropionat	4,0	g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,5	g
Magnesiumsulfat 7-Hydrat	0,1	g
Eisen(II)-Sulfat	0,001	g
Agar-Agar	15,0	g

22 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Corynebacterium Selektivmedium (DSMZ Medium 53)

Zusammensetzung pro Liter:

Caseinpepton, tryptisch verdaut	10,0	g
Hefeextrakt	5,0	g
Glukose	5,0	g
Natriumchlorid	5,0	g

Die Zutaten wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Zur Herstellung von Festnährmedien wurden zusätzlich 15,0 g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzu gegeben.

MacConkey Medium (MCC)

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (Merck KG, BRD):

Pepton aus Casein	17,0	g
Pepton aus Fleisch	3,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Lactose	10,0	g
Gallesalzmischung	1,5	g
Neutralrot	0,03	g
Kristallviolett	0,001	g
Agar-Agar	13,5	g

50 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Trypton Soja Medium (TS)

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (Becton Dickinson, USA):

Casein, pankreatisch abgebaut	17,0	g
Sojamehl, enzymatisch abgebaut	3,0	g
Glukose	2,5	g
Natriumchlorid	5,0	g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	2,5	g

30 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Zur Herstellung von Festnährmedien wurden zusätzlich 15,0 g Agar vor dem Autoklavieren hinzu gegeben.

R2A Bouillon

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (LabM Ltd., UK):

Hefeextrakt	0,5	g
Fleischpepton	0,5	g
Casaminosäuren	0,5	g
Glukose	0,5	g
Stärke	0,5	g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,3	g
Magnesiumsulfat 7-Hydrat	0,05	g
Natriumpyruvat	0,3	g

3 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

R2A Agar

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (Oxoid Ltd., UK):

Hefeextrakt	0,5	g
Proteosepepton	0,5	g
Caseinhydrolysat	0,5	g
Glukose	0,5	g
Stärke, löslich	0,5	g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,3	g
Magnesiumsulfat 7-Hydrat	0,024	g
Natriumpyruvat	0,3	g
Agar-Agar	15,0	g

18,1 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Wismut Sulfit Agar (WSA)

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (Difco, USA):

Fleischextrakt	5,0	g
Pepton	10,0	g
Glukose	5,0	g
Di-Natriumphosphat	4,0	g
Eisen(II)-Sulfat	0,3	g
Wismut Sulfit	8,0	g
Brillantgrün	0,025	g
Agar-Agar	20,0	g

52 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und unter Rühren aufgekocht, bis alle Inhaltsstoffe gelöst waren. Nach dem Abkühlen wurden Nährmedienplatten gegossen und innerhalb von 48 Stunden verbraucht.

CYC-Medium (DSMZ Medium 550)

Zusammensetzung pro Liter:

Czapek Dox Agar (Merck, BRD)	48,0	g
Hefeextrakt	2,0	g
Casaminosäuren (Difco, USA)	6,1	g
Tryptophan	0,02	g

Die Zutaten wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Chapman Medium

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (Oxoid Ltd., UK):

Hefeextrakt	2,5	g
Trypton	10,0	g
Laktose	2,0	g
Mannitol	10,0	g
Natriumchlorid	75,0	g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	5,0	g
Gelatine	30,0	g
Agar-Agar	15,0	g

Casein Soja Pepton Medium (CASO, Merck 105158)

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (Merck KG, BRD):

Pepton aus Casein	15,0	g
Pepton aus Sojamehl	5,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar-Agar	15,0	g

40 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert.

NBRC Medium 802

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben (Wako pure Chemical, Japan):

Polypepton	10,0	g
Hefeextrakt	2,0	g
Magnesiumsulfat 7-Hydrat	1,0	g

13 g des fertigen Pulvers wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Zur Herstellung von Festnährmedien wurden zusätzlich 15,0 g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzu gegeben.

Trypton Soja Hefeextrakt Medium (DSMZ M92)

Zusammensetzung pro Liter:

Trypton Soja Bouillon (Becton Dickinson, USA)	30,0	g
Hefeextrakt	3,0	g
Agar-Agar	15,0	g

Die Zutaten wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

De Man-Rogosa-Sharpe Medium (MRS, DSMZ Medium 11)

Zusammensetzung pro Liter:

Caseinpepton, tryptisch verdaut	10,0	g
Fleischextrakt	10,0	g
Hefeextrakt	5,0	g
Glukose	20,0	g
Tween80	1,0	g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	2,0	g
Natriumacetat	5,0	g
Di-Ammoniumhydrogencitrat	2,0	g
Magnesiumsulfat 7-Hydrat	0,2	g
Mangan(II)-sulfat Monohydrat	0,05	g

Die Zutaten wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst und bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Für Festnährmedien wurden zusätzlich 15,0 g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzu gegeben.

GYM *Streptomyces* Medium (DSMZ Medium 65)

Zusammensetzung pro Liter:

Glukose	4,0	g
Hefeextrakt	4,0	g
Malzextrakt	10,0	g
Kalziumkarbonat	2,0	g
Agar-Agar	12,0	g

Alle Zutaten bis auf den Agar wurden in 1 Liter Reinstwasser gelöst, der pH Wert auf 7,2 eingestellt und erst dann der Agar hinzugefügt. Anschließend wurde der Ansatz bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Zur Herstellung von Flüssigmedien wurde unter Auslassen des Agar-Agars und des Kalziumkarbonats genauso verfahren.

2.3. Gesamtzellzahlbestimmung auf Polycarbonatfiltern anhand der DAPI-Färbung (PORTER und FEIG [138])

2.3.1. Fixierung von Zellen durch Paraformaldehyd (PFA)

Die Fixierung von Zellen wird durch eine irreversible Vernetzung der Zellproteine durch das Paraformaldehyd (PFA) erreicht. Dadurch bleibt die Zellstruktur auch bei längerer Lagerung erhalten.

Die Zellen aus den Proben wurden pelletiert (Heraeus, Deutschland) und nach Abgießen des Überstandes in 200 µl 1x PBS aufgenommen. Dazu wurde das dreifache Volumen (600 µl) der PFA-Lösung gegeben, kurz gemischt und für mindestens 30 Minuten bei 4 °C gelagert. Danach wurden die Zellen erneut pelletiert und 2x mit 200 µl 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden in Abhängigkeit von der erwarteten Zelldichte 100-300 µl 1x PBS und das gleiche Volumen eiskaltes Ethanol [abs.] dazu gegeben und gemischt. Die Probe wurde ab jetzt bei -20 °C gelagert.

1x PBS (Phosphate-buffered Saline)

NaH ₂ PO ₄	1,38	g
NaCl	7,59	g

Mit sterilfiltriertem Reinstwasser auf 1 l auffüllen

PFA-Lösung

Paraformaldehyd	2,0	g
-----------------	-----	---

in 30 ml sterilfiltriertes Reinstwasser geben. 2 Tropfen 1 N NaOH zugeben und bei 75 °C auf dem Rührer lösen bis die Lösung klar ist.

3xPBS	16,6	ml
-------	------	----

Den pH-Wert mit 1N HCl auf 7,2 einstellen. Die Lösung sterilfiltrieren und auf Eis lagern (maximal 48 h).

2.3.2. Durchführung der Färbung

Um alle vorhandenen Zellen zu visualisieren, wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff 4',6-Diamino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI) gefärbt. DAPI bindet besonders an AT-reiche Regionen der DNA. DNA-enhaltende Zellen erscheinen daher nach dieser Färbung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop blau (Emission 461 nm), während mineralische Partikel gelb erscheinen und beide gut unterschieden werden können [138].

Ein Aliquot (Volumen in Abhängigkeit von der zu erwartenden Zellzahl, um eine Über- bzw. Unterbelegung zu vermeiden) des fixierten Extraktes wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben, wenn nötig mit steril filtriertem Reinstwasser auf 100 µl aufgefüllt und 50 µl der DAPI-Arbeitslösung [1 µg/ml] zupipettiert. Nach kurzem Vortexen (Heidolph, Schwabach) wurde das Gemisch 15-20 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde in das Reaktionsgefäß 1 ml steriles Reinstwasser gegeben und erneut gemischt (Heidolph, Schwabach). Jetzt wurde auf einen Filter (Whatman Kent, Nucleopore®; Porendurchmesser 0,2 µm), der in einer Filtereinheit (bestehend aus Vakuum-Saugflasche, Fritte, Filter und Filteraufsatz, Schleicher und Schüll, Dassel) eingespannt war, 1 ml sterilfiltriertes Reinstwasser vorgelegt. Anschließend wurde der gefärbte Zellextrakt quantitativ auf den Filter übertragen und durch das Anlegen eines Vakuums (Vakuumpumpe KNF Neuberger, Freiburg-Munzingen, FT18) abgesaugt. Hiernach wurde nochmals das Reaktionsgefäß mit 1 ml sterilem Reinstwasser befüllt. Mit diesem Wasser wurde der Rand des Filteraufsatzes vorsichtig abgespült, um noch potentiell dort vorhandene Zellen mit auf den Filter abzuspülen. Nun wurde die Flüssigkeit nochmals abgesaugt. Die so belegten Filter wurden auf Glasobjektträgern (IDL Nidderau, 76 x 26 mm, Mattrand) in Citifluor (Citifluor Ltd., UK) eingebettet und mikroskopisch (Zeiss Jena, Fluoreszenzmikroskop Axiophot2) ausgewertet. Dazu wurden die Zellen von 20 Feldern mit je 100 Gitterfeldern (10 x 10) pro Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung gezählt.

2.4. Vergleich der physikalischen Sammeleffizienz von Filtration und Impingement bei Bioaerosolsammlungen an unterschiedlichen Arbeitsplätzen

Zur Ermittlung des Unterschiedes der physikalischen Sammeleffizienz wurde die anhand der DAPI-Färbung (siehe 2.3.) ermittelte GZZ m^{-3} für beide Sammelssysteme im Verlauf der Probennahmen in den Puten- und dem Masthähnchenstall herangezogen. Dabei wurden die Konzentrationen einem Signifikanztest (t -test, $\alpha=99,9\%$) unterzogen und eine Korrelationsanalyse angewendet (Excel, Microsoft Corp., USA).

2.5. Untersuchung der Sammelresistenz für Referenzstämme bakterieller Gattungen durch die Lebend-Tot Färbung

Da der Einfluss der Sammelmethode auf jede Mikroorganismenart unterschiedlich ist, muss dieser Faktor beim quantitativen Nachweis beachtet werden. Um deshalb die Stärke des Einflusses auf Zellen zu untersuchen (biologische Sammeleffizienz), wurde die Überlebensrate für verschiedene Bakterienarten bei Durchführung verschiedener Luftsammelmethoden (Impingement und Filtration) untersucht. Dazu wurde neben der Kultivierung auf spezifischen Nährböden die kultivierungsunabhängige Fluoreszenzfärbemethode der Lebend-Tot-Färbung (Live/Dead BacLight™, Invitrogen Corp., USA) angewendet. Diese erlaubt eine gleichzeitige Differenzierung in „lebende“ und „tote“ Zellen (siehe 2.5.2.1).

2.5.1. Eingesetzte Referenzstämme

Um die Anwendbarkeit der Lebend-Tot-Färbung zu testen und eventuelle Unterschiede in der Färbbarkeit unterschiedlicher Spezies zu untersuchen, wurden insgesamt 16 Stämme unterschiedlicher Gattungen in die Versuche einbezogen (Tabelle 2).

Tabelle 2 Zur Untersuchung des Einflusses der Bioaerosolsammlung auf die Lebensfähigkeit (Live/Dead BacLight™ Kit, Invitrogen Corp., USA) von Bakterienzellen verwendeten Stämme.

Nr.	Bakterienstamm	Stamm Nr.	Sammelmethodik
1	<i>Alcaligenes faecalis</i>	DSM 30300 ^T	n. d.*
2	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10 ^T	Impingement, Filtration
3	<i>Comamonas testosteroni</i>	DSM 20244	Impingement
4	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	DSM 20300 ^T	Impingement
5	<i>Enterobacter cowanii</i>	ENB 186 ^T	n.d.*
6	<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083 ^T	Impingement, Filtration
7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 5622 ^T	Impingement
8	<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030 ^T	Filtration
9	<i>Micrococcus roseus</i>	DSM 20447 ^T	Impingement
10	<i>Mycobacterium aurum</i>	NC 10437 ^T	Filtration
11	<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	Impingement
12	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSM 43066	Impingement
13	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DSM 70403 ^T	Filtration
14	<i>Salmonella enterica</i> subs. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	CIP60.62 ^T	Impingement, Filtration
15	<i>Sphingomonas terrae</i>	IFO 15098	Impingement
16	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231	Impingement

* keine Auswertung der Präparate möglich.

2.5.2. Untersuchung der Eignung der Lebend-Tot-Färbung für unterschiedliche Stämme

Die Anwendbarkeit wurde an allen 16 Bakterienstämmen getestet (Tabelle 2). Dazu wurden einerseits die GZZ im Vergleich zur DAPI-Färbung und andererseits die Wiederfindung definierter Verhältnisse lebender und toter Zellen untersucht.

2.5.2.1. Prinzip der Lebend-Tot-Färbung

Die Lebend-Tot-Färbung wurde mit dem Live/Dead BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen) durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe des Lebend-Tot-Färbekits binden an die DNA der Zellen. Hierbei handelt es sich um eine Zellfärbung mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen zur Differenzierung von „lebenden“ und „toten“ Zellen in einem Ansatz. Die Differenzierung ist auf die beiden Farbstoffe, SYTO9 und Propidiumiodid, zurückzuführen, welche sich in ihren Spektraleigenschaften und der Fähigkeit in Bakterienzellen einzudringen, unterscheiden. Der grün fluoreszierende Farbstoff SYTO9 bindet an DNA von sowohl lebenden als auch toten Zellen, da er sowohl intakte als auch geschädigte Zellmembranen passieren kann. Dagegen ist der rot fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid ausschließlich dazu in der Lage, geschädigte Zellmembranen zu passieren [135]. In Kombination der beiden Farbstoffe unterdrückt der rote Farbstoff die Fluoreszenz des grünen Farbstoffes,

wodurch eine Differenzierung in lebende und tote Zellen bei Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge vorgenommen werden kann (Abbildung 4). Das Anregungsoptimum der Farbstoffe liegt bei einer Wellenlänge von 480 nm (SYTO9) bzw. 490 nm (Propidiumiodid), wodurch Licht einer Wellenlänge von 500 nm (SYTO9) bzw. 635 nm (Propidiumiodid) emittiert wird.

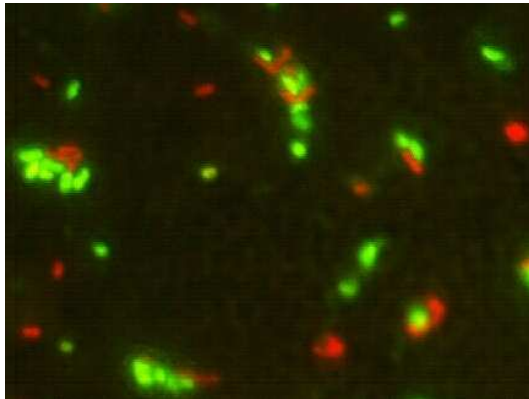


Abbildung 4 Bild eines mikroskopischen Gesichtsfeldes von mit dem Live/Dead BacLight™ Bacterial Viability Kit for microscopy and quantitative assays (L7012) (Molecular Probes, Inc., USA) gefärbten *Salmonella* CIP60.62^T Zellen. Die roten Zellen sind tot, während die grünen Zellen leben (Axiophot, Zeiss, Jena, 1000fache Vergrößerung, Cy3-Filter).

2.5.2.2. Überprüfung der Präzision zur Differenzierung durch die Lebend-Tot-Färbung

Um die Anwendbarkeit des Färbekits an Zellen o. g. genannter Stämme (Tabelle 2) zu bestätigen, wurde die Präzision der Differenzierung in lebende und tote Zellen überprüft. Dazu wurde die vom Hersteller empfohlene Vorgehensweise [135] angewendet.

Eine Flüssigkultur jeden Stammes wurde bis zur stationären Phase angezogen und die Zellen aus 30 ml der Kultur pelletiert (Heraeus, Osterode, Megafuge 1.0R, 3.345 g, 20 Minuten). Die Zellen wurden in 2 ml sterilfiltrierter NaCl 0,9% [w/v] resuspendiert und davon jeweils 1 ml in 20 ml sterilfiltrierter NaCl 0,9% [w/v] („lebend“) und in 20 ml sterilfiltriertes Isopropanol 70% [v/v] („tot“) verbracht. Die Zelllösungen wurden jetzt 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dabei alle 15 Minuten gemischt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, indem sie zunächst abzentrifugiert (Heraeus, Osterode, Megafuge 1.0R, 3.345 g, 20 Minuten), der Überstand verworfen und anschließend in 20 ml sterilfiltrierter NaCl 0,9% [w/v] resuspendiert wurden. Dieses Vorgehen wurde einmal wiederholt, die Zellpellets beim zweiten Waschschrift aber in 10 ml sterilfiltrierter 0,9%iger [w/v] NaCl aufgenommen. Anschließend wurde je ein Aliquot der lebenden bzw. toten Zellen in einem Gesamtvolumen von 10 µl in verschiedenen prozentualen Anteilen gemischt.

Die Zelllösungen wurden auf 100 µl mit sterilfiltrierter NaCl 0,9% [w/v] aufgefüllt und mit je 1,5 µl der beiden Farbstoffe (je 1:10 mit sterilfiltrierter NaCl 0,9% [w/v] verdünnt) gemischt und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch über eine Filtrationseinheit (Schleicher und Schüll, Dassel) auf schwarze PC-Filter (Nucleopore® Polycarbonate Ø 25 mm, Whatman Int. Ltd., UK) gesaugt und im Dunkeln kurz trocknen gelassen. Direkt im Anschluss wurden die Filter mit dem im Kit enthaltenen Mounting Oil auf Objektträger eingebettet, mit einem Deckglas versehen und zeitnah mikroskopisch ausgewertet.

2.5.3. Versuche zur Sammelresistenz: Impingement

In vorbereitete sterilisierte AGI-30 Impingerflaschen (Ace Glass Inc., Vineland USA) wurden 30 ml sterilfiltrierte und autoklavierte 0,9% [w/v] NaCl gegeben und so bei 4°C steril bis zur Sammlung aufbewahrt. Kurz vor der Sammlung wurde 1 ml aus einer in der stationären Phase befindlichen Flüssigkultur o. g. Spezies entnommen und in den so vorbereiteten Impinger gegeben. Zur Gesamtzellzahlbestimmung zu Beginn des Versuchs durch die DAPI-Färbung (siehe 2.3.) wurden steril 2,0 ml aus der Impingerflüssigkeit entnommen und PFA-fixiert (siehe 2.3.1) bzw. direkt zur Färbung eingesetzt (alle restlichen Stämme). Zusätzlich wurden 500 µl entnommen, um den Anteil kultivierbarer Zellen zu bestimmen. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe von 4 dezimalen Verdünnungsstufen á 4,5 ml ebenfalls 0,9%iger [w/v] NaCl angelegt. 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-4} wurden anschließend in 2 Parallelen auf die entsprechenden Medien (Tabelle 10) ausplattiert und aerob bebrütet. Die Anzahl der KBE wurden nach Bebrütung durch Auszählung der entstandenen Kolonien ermittelt.

Um den Einfluss der Sammlung auf die Zellen im Impinger zu bestimmen, wurde unter einer zuvor durch UV-Strahlung sterilisierten Sicherheitswerkbank (HeraSafe, Heraeus, Osterode) 30 Minuten Luft bei einem Volumenstrom von $12,7 \text{ l min}^{-1}$ (GSA50-1, GSM GmbH, Neuss-Norf) gesammelt. Alle 5 Minuten während der Sammlung wurden, wie oben beschrieben, aus der Sammelflüssigkeit 2,0 ml zur Gesamtzellzahlbestimmung (siehe 2.3) und 500 µl zur KBE-Bestimmung (siehe 2.8.1.1) entnommen. Pro Beaufschlagungszeit wurden jeweils 3 parallele Sammlungen durchgeführt. Als Kontrolle wurde jeweils ein Impinger, mit dem Unterschied, dass keine Luft gesammelt wurde, bei Raumtemperatur für die entsprechende Sammelzeit stehen gelassen und dieser ebenso aufgearbeitet.

2.5.4. Versuche zur Sammelresistenz: Filtration

Als weitere Methode zur Sammlung von Bioaerosolen wird die Filtration auf verschiedenen Filtermaterialien, wie z. B. Gelatine, Cellulose-Acetat oder Polycarbonat (PC) angewendet. In den hier beschriebenen Versuchen wurde der PC-Filter verwendet, wobei die Filter zuvor mit einer definierten Zellzahl belegt wurden. Dadurch sollte der Stress durch die Sammlung auf die Zellen ermittelt werden.

Eine Flüssigkultur des zu untersuchenden Stammes wurde bis zur stationären Phase bei den in Tabelle 10 angegebenen Bedingungen kultiviert. Zur Ermittlung der GZZ ml⁻¹ und der Anteile lebender und toter Zellen vor der Luftsammlung wurden der Kultur jeweils 0,5 ml (GZZ) sowie 0,1 ml für die Lebend/Tot-Färbung entnommen und in sterile Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen zur GZZ-Bestimmung wurden PFA-fixiert und bis zur Zählung bei -20° aufbewahrt. Für die Lebend/Tot-Färbung wurde 1 µl mit 99 µl sterilfiltrierter NaCl 0,9%ig [w/v] versetzt und je 1,5 µl (1:10 mit sterilfiltrierter NaCl 0,9% [w/v] verdünnt) 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Lösung wurde auf PC-Filter überführt und ein Teil der Filter sofort in dem vom Hersteller mitgelieferten Mounting-Oil eingebettet und ab hier bis zur Auszählung dunkel gelagert.

Aus der Kultur wurden jeweils mit einer elektronischen Mehrkanalpipette 120 µl entnommen und auf einen vorbereiteten PC-Filter in Tropfen á 5 µl gegeben. Die Filter wurden zuvor unter sterilen Bedingungen in die entsprechenden sterilen Filterhalter des MD8 (Sartorius, Göttingen) eingespannt. Die so beaufschlagten Filter wurden mit einer sterilen Petrischale verschlossen und an einem vorbereiteten Filterhalter befestigt. Der Filterhalter wurde in der Sicherheitswerkbank an einem Stativ befestigt und über einen Schlauch an eine außerhalb stehende Pumpe (ZA 2000, Umweltanalytik Holbach, Wadern) angeschlossen. Der Durchfluss wurde anhand einer Gasuhr (Remus4 G1.6, Schlumberger) gemessen. Die Sicherheitswerkbank wurde vor den Sammlungen mit einer UV-Lampe 60 Minuten sterilisiert. Nach Befestigen des vorbereiteten Filters an den Filterhalter wurde sofort mit der Sammlung begonnen. Dazu wurde jeweils 10 bzw. 20 Minuten bei einer Leistung von durchschnittlich 37,3 l min⁻¹ gesammelt (in jeweils 3 Parallelen).

Nach der Sammlung wurde der Filter zeitnah aufgearbeitet. Dazu wurde der Filter in einen sterilen Stomacherbeutel (Seward Ltd., UK, Model80 Bags, 101x152 mm) mit einer vorher abgeflamten Pinzette überführt, mit 10 ml sterilfiltrierter 0,9%iger NaCl [w/v] abgespült und 1 Minute auf Stufe „normal“ im Stomacher (Stomacher® 80

Biomaster, Seward Ltd.) die Zellen vom Filter gelöst. Anschließend wurden je 0,5 und 0,1 ml in ein steriles Reaktionsgefäß zur Bestimmung der GZZ und Lebend-Tot-Färbung überführt.

Aus den so entnommenen Proben wurde nach Färbung der Zellen die mikroskopische Auszählung zur Bestimmung der Anteile der lebenden und toten Zellen jeweils vor und nach der Sammlung, vorgenommen. Dazu wurden je 5 Felder pro Filter ausgezählt und die so ermittelte Zahl auf Zellen Filter⁻¹ analog zu 2.3.2 umgerechnet.

2.6. Proben

Eine Übersicht über alle Probennahmen und die Anzahl der dort genommenen Proben ist in Tabelle 3 dargestellt. Alle Probennahmen wurden in derselben Art und Weise vorbereitet und durchgeführt (siehe 2.8 ff). Lediglich die Anzahl der genommenen Proben variierte.

Tabelle 3 Übersicht über alle in dieser Arbeit durchgeführten Probennahmen. Angegeben sind die Nummer der Probennahme mit Datum, eingestellte Tierart und Anzahl der genommenen Proben in Abhängigkeit von der Sammelmethode. Bei jeder Probennahme wurden zusätzlich je Sammelmethode eine Blindprobe im Stall und ein Laborblindprobe mitgeführt. Zusätzlich wurden bei Probenahme 1-5 im Außenbereich des Stalles Proben genommen („Außen“), um die Hintergrundkonzentration zu bestimmen. Bei Probennahme 3, 4 und 5 wurden zwei Ställe parallel beprobt, wobei „Stall 2“ der mittig liegende Stall des Stallkomplexes war (Abbildung 5, C).

Nr.	Datum	Tierart	Impinger (n)	Filtration (n)	Sammlung
1	09/2006	Legehennen	1	--	Stationär
2	06.03.2007	Mastputen	Stall 1 = 4 + 1 Außen	Stall 1 = 4 + 1 Außen	Stationär
3	27.03.2007	Mastputen	Stall 1 = 3 Stall 2 = 3 + 1 Außen	Stall 1 = 3 Stall 2 = 3 + 1 Außen	Stationär
4	11.04.2007	Mastputen	Stall 1 = 2 Stall 2 = 2 + 1 Außen	Stall 1 = 2 Stall 2 = 2 + 1 Außen	Stationär
5	26.06.2007	Masthähnchen	Stall 1 = 4 Stall 2 = 3	Stall 1 = 4 Stall 2 = 3	Stationär
6	09 bis 11/2007 (12 Termine)	Mastenten*	--	Insgesamt n=82	Personen- getragen

*Beprobung verschiedener Arbeitstätigkeiten im Stall (Eier-Sammeln, Schlupf, Eierwäsche, Stall Einstreuen, Tier Umtrieb, Stallkächern, Tierimpfung, Verladung) und im Schlachthof (Hänger, Stecher). Details siehe Tabelle 4.

2.6.1. Probenahme 1: Legehennen (LUA NRW)

Die Proben wurden in der 38. Kalenderwoche 2006 vom Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (LUA NRW) in einer Legehennenanlage in Dülmen (Volierenhaltung mit Auslauf) im Innenraum der Anlage genommen. Zur Sammlung wurden spezielle LANUV-Impinger⁵ mit einem Kapillardurchmesser von 2,1 mm eingesetzt. Die Sammelflüssigkeit bestand aus 0,9 % NaCl ohne weitere Zusätze, das Sammelvolumen betrug vor dem Autoklavieren der Impinger 32 ml. Nach 30-minütiger Probennahme bei einem Durchfluss von 16,5 l min⁻¹ wurden insgesamt 497 l Luft gesammelt. Die beaufschlagte Flüssigkeit einer Probe wurde unter sterilen Bedingungen in ein steriles, dicht schließendes Probennahmeröhrchen (Nalge Nunc International, Rochester USA) übertragen und gekühlt per Post nach Giessen verschickt, wo sie am folgenden Tag weiter bearbeitet wurde.

2.6.2. Probenahmen 2 - 4: Putenmast

Der Putenstall liegt in Hessen und gehört zu einem Komplex von insgesamt drei konventionell geführten Putenmastställen (Abbildung 5, A). Insgesamt werden auf dem Betrieb 7000 Puten aus eigener Nachzucht in 16 (Hennen) bzw. 18 (Hähne) Wochen bis zur Schlachtreife gemästet, im Betrieb geschlachtet und vermarktet. Die Tiere werden dabei im Mastverlauf auf die drei Ställe aufgeteilt, so dass jeder Stall zum Ende der Mast ca. 2.500 Tiere beinhaltet. Die Ställe sind nach dem Offenstallprinzip gebaut wobei das Stallklima mittels Außenjalousien je nach Temperatur und Klima automatisch geregelt wird. Im Sommer können zusätzlich zwei Ventilatoren zur Kühlung der Stallluft eingesetzt werden (Abbildung 5, B). Futter und Wasser werden den Tieren *ad libitum* automatisch zur Verfügung gestellt. Die Tiere stehen auf Stroheinstreu, die wöchentlich neu überstreut wird. Ein Austausch der Einstreu erfolgt erst am Ende der Mast, nach Ausstallung der Tiere und Desinfektion des Stalles.

⁵ Vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrheinwestfalen konzipierter Glas-Impinger auf Basis des AGI30 Impingers. Der Impinger verfügt über einen Kapillardurchmesser von 2,1 mm, eine bauchige Flasche und angesetzte Schliffe.

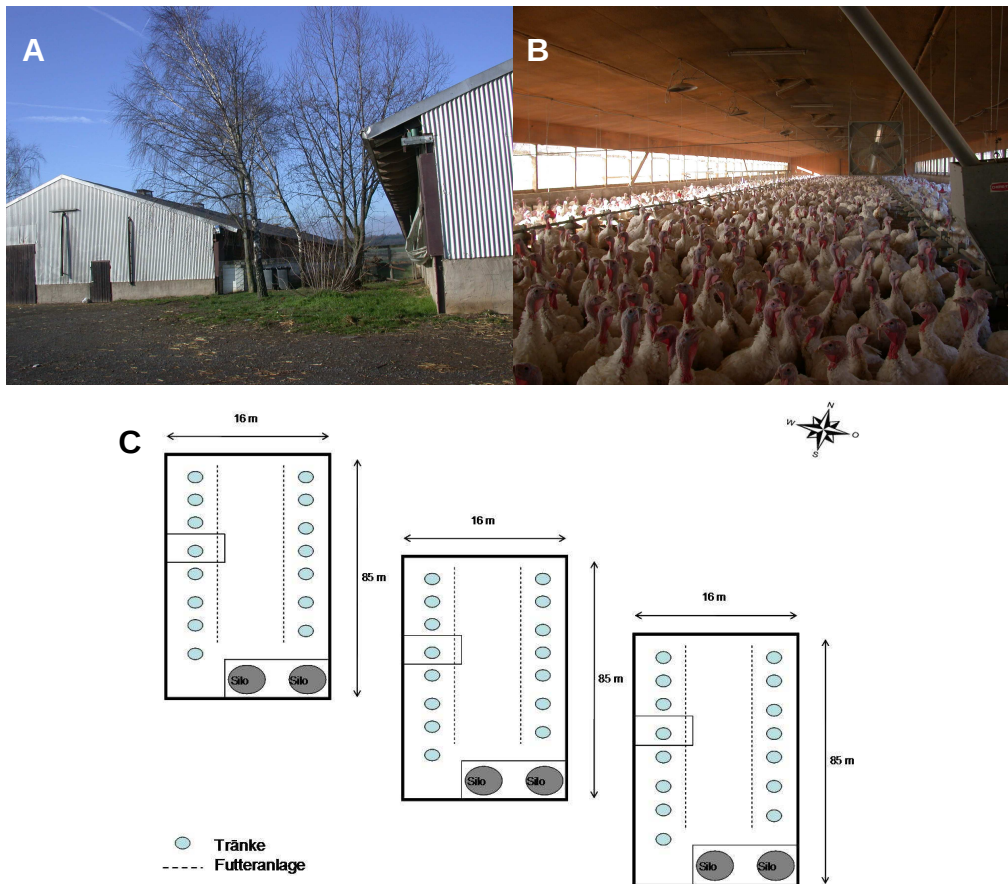


Abbildung 5 Probennahme Putenmast. A) Putenstall 2, Außenansicht, B) Putenstall 2, Innenansicht C) Schematischer Stallaufbau mit Platzierung der Fütterungsanlagen.

Zusätzlich wurde im Außenbereich des Stalles in ca. 40 m Entfernung bei gleichem Vorgehen eine weitere Probe zur Bestimmung der Hintergrundbelastung der Außenluft genommen, Insgesamt wurden 4 Probenahmen durchgeführt.

2.6.3. **Probenahme 5: Masthähnchen**

Die beiden baugleichen hier beprobten Hähnchenmastställe lagen in der Nähe von Osnabrück. Der Betrieb stellt seine Ställe der Firma LH Agrartechnik zu Versuchszwecken unter realen Bedingungen zur Verfügung. In einem Stall („Stall 1“) ist ein „Aerocleaner“ installiert, der andere Stall dient als Referenz („Stall 2“). Der „Aerocleaner“ versprüht im Abstand von 15 min. eine Emulsion aus Wasser und bakteriziden, ätherischen Ölen (Abbildung 6, B), welche die mikrobielle Konzentration und die Staubbelastung verringern soll. In beiden Ställen wurden je ca. 26.000 Tiere in Bodenhaltung in 30-32 Tagen bis zur Schlachtreife gemästet. Die Ställe werden konventionell geführt. Fütterung, Lichtregime, Lüftung (Zwangsentlüftung) und Klima werden in den komplett geschlossenen, hallenartigen Ställen vollautomatisch

geregelt. Die Tiere stehen auf Sägespaneinstreu, die den ganzen Mastdurchgang nicht gewechselt oder übergestreut wird.



Abbildung 6 Probenahme Masthähnchen Innenansicht Stall 1. A) ohne Betrieb des „Aerocleaners“, B) bei Betrieb des „Aerocleaners“.

2.7. Probenahme 6: Mastentenstall, Verladung und Schlachtung

Als weiterer Geflügelstall wurde eine Mastentenanlage mit angeschlossenem Schlachtbetrieb in Ostdeutschland beprobt. Dazu wurden umfangreiche Bioaerosolsammlungen bei der Verladung von Entenküken, im Stall, den umliegenden Räumen bei verschiedenen Tätigkeiten und der Schlachtung der Tiere an verschiedenen Arbeitstagen durchgeführt (siehe Tabelle 4). Zur Luftsammlung wurden personengetragene Filtrations-Geräte (PGP/GSP-3.5, BIA, Deutschland) in Kombination mit den Pumpen SG-10 (GSA, Deutschland) verwendet. Dieses Sammelsystem sammelt die inhalierbare Staubfraktion (PM_{10}) auf Polycarbonat Filter ($0,8\ \mu m$ Porengröße, $\varnothing\ 3,7\ cm$, Whatman) wie in EN481 definiert [4] bei einer Sammelrate von $3,5\ l\ min^{-1}$ während einer Arbeitsschicht.

2.8. Durchführung der Bioaerosolsammlungen

Im Folgenden ist die Durchführung der Probennahmen mittels Impingement und Filtration dargestellt. Die Vorbereitung und Durchführung war dabei für alle Probennahmen gleich und unterschied sich nur in der Anzahl der genommenen Proben. Dabei wurden sowohl die Sammlung als auch die kultivierungsabhängige Aufarbeitung in Anlehnung an die derzeit geltenden Richtlinien der VDI [8, 96, 97, 139] durchgeführt.

2.8.1. Impingementsammlungen

Beim Impingement wird ein definiertes Luftvolumen durch eine Flüssigkeit gesaugt, in der sich die im Aerosol enthaltenen Mikroorganismen und Partikel aufgrund ihrer Trägheit abscheiden und so im Sammelmedium anreichern [140]. Diese Lösung kann im weiteren Schritt direkt zur Analyse mittels Kultivierung oder molekularbiologischer Methoden verwendet werden.

Die Impingerflaschen AGI30 (Ace Glass Inc., Vineland USA) wurden an allen Öffnungen mit Alufolie verschlossen und bei 180 °C für fünf Stunden sterilisiert. Anschließend wurden 32 ml sterilfiltrierte und autoklavierte NaCl 0,9% (w/v) unter sterilen Bedingungen in die Impingerflaschen gegeben. Zur Errechnung des Sammelverlustes wurden die Flaschen vor und nach dem Befüllen gewogen und so vorbereitet bis zur Sammlung bei 4 °C aufbewahrt.

Die präparierten Impinger wurden gekühlt und kippsicher zum Probenahmeort transportiert und erst zur jeweiligen Probennahme geöffnet. Dazu wurde das entsprechende Impingersammelgefäß in einer Höhe von 1,50 m an einem Stativ angebracht und die Pumpe (MP 2-39, Umweltanalytik Holbach) angeschlossen. Zur Sammlung wurde die Alufolie von der Öffnung entfernt und ein Unterdruck von 400 mbar für 30 Minuten angelegt, der einem Volumenstrom von $12,4 \text{ l min}^{-1}$ entspricht. Das gesammelte Luftvolumen wurde zusätzlich mit Hilfe einer Gasuhr (Remus4, GSA, Deutschland und Gallus2000, Actaris, Deutschland) gemessen und dokumentiert. Nach der Sammlung wurde das Sammelgefäß wieder steril mit Alufolie verschlossen und gekühlt bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Zur Bestimmung des Einflusses der Probennahme und der Behandlung der Sammelgefäße während der Probennahme, wurde ein Gefäß im Stall wie die Proben behandelt, ohne jedoch die Sammelflüssigkeit zu beaufschlagen („Blindprobe“). Außerdem wurde ein Gefäß („Laborblindprobe“) mitgeführt, das nicht geöffnet und beaufschlagt wurde. Beide wurden im Folgenden genauso wie die Proben aufgearbeitet.

2.8.1.1. Aufarbeitung der Impingementproben

Zur Aufarbeitung wurden je 500 µl der Proben nach vorheriger guter Durchmischung entnommen und eine dekadische Verdünnungsreihe in 4,5 ml autoklavierter physiologischer Kochsalzlösung bis zur Stufe 10^{-8} vorgenommen. Für die Blindwerte wurde keine Verdünnung vorgenommen. Von den so erstellten Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-8} wurden zur Bestimmung der KBE jeweils 100 µl in drei Parallelen auf

CASO-Medium gegeben, ausgespatelt und bei 37 °C bebrütet. Die Anzahl an KBE wurde nach vier Tagen für das CASO-Medium bestimmt.

Weiterhin wurden je 15 ml der Flüssigkeit zur PFA-Fixierung und anschließenden DAPI-Färbung (siehe 2.3) sowie zur DNA-Extraktion (siehe 2.9.2.1) verwendet. Die Zellen wurden dazu durch Zentrifugieren des gesamten Volumens in je 2 ml Aliquots bei $14.810 \times g$ für 10 Minuten pellettiert. Die so erhaltenen Zellpellets wurden PFA-fixiert (2.3.1) bzw. bis zur Durchführung der DNA-Extraktion (2.9.2.1) bei -20 °C eingefroren.

2.8.2. Filtrationssammlungen (stationär)

Vorbereitend wurden die einzelnen Filterhalter zu einem Filterturm zusammengesetzt und bei 180 °C für sechs Stunden sterilisiert. Anschließend wurden die abgekühlten Filterhalter unter sterilen Bedingungen mit PC-Filtern ($\varnothing$ 76 mm, 0,8 μ m Porendurchmesser, Millipore, IsoporeTM membrane filters) beladen. Dazu wurden die Filter mit der glänzenden Seite nach oben mit einer zuvor abgeflammt Pinzette auf den Haltern platziert und die Halter wieder zusammen gesteckt. Die Filtertürme wurden in Plastiktüten verpackt gelagert und erst direkt vor der Sammlung entnommen.

Zur Sammlung wurde jeweils ein bestückter Filterhalter aus dem Turm entnommen und an die Haltevorrichtung in einer Höhe von 1,50 m mit nach unten zeigender Öffnung angebracht. Nach Anschluss der Pumpe (MP 2-39, Umweltanalytik Holbach) wurde zur Sammlung ein Unterdruck von 200 mbar für 20 Minuten angelegt. Dies entspricht einem Luftdurchsatz von $27,2 \text{ l min}^{-1}$. Das gesammelte Luftvolumen wurde mit Hilfe einer Gasuhr (Remus4, GSA, Deutschland und Gallus2000, Actaris, Deutschland) erfasst und dokumentiert. Anschließend wurde der beaufschlagte Filter in den Filterturm zurück verbracht, wobei die beprobten Filter ab jetzt gekühlt und kippsicher mit der beaufschlagten Seite nach oben aufbewahrt wurden. Zur Bestimmung des Einflusses der Probennahme wurde jeweils pro Stall eine Blindwertprobe mitgeführt sowie eine Laborblindprobe (siehe 2.8.1) erfasst und beide analog den beaufschlagten Proben aufgearbeitet.

2.8.3. Filtrationssammlungen (personen-getragen)

Die Vorbereitung der Filterhalter wurde analog zu 2.8.2 durchgeführt. Die Proben wurden anhand personen-getragener Filtrations-Luftsammlensysteme (PGP/GSP,

BIA, Deutschland, Pumpe SG-10, GSA, Deutschland, 3,5 l min⁻¹) erfasst. Dieses System erfasst die inhalierbare Fraktion der Luft auf Polycarbonatfilter (Ø 3,5 cm, 0,8 µm Porendurchmesser, Whatman, Kent, UK) wie in DIN EN481 [4] beschrieben.

Die Sammelsysteme wurden an der Schulter der Probanden befestigt. Die Beaufschlagungszeit der Filter betrug die Zeit der gesamten Arbeitsschicht (6-8 Stunden). Zur Bestimmung der Hintergrundkonzentration wurde im Außenbereich analog der personen-getragenen Sammlung durch die Probanden zusätzlich eine Sammlung an einem Stativ durchgeführt („LUV“). Insgesamt wurden auf diese Weise an 12 Tagen 75 Proben gesammelt (Tabelle 4). Des Weiteren wurde bei jeder Sammlung eine Blindprobe mitgeführt, die ohne Beaufschlagung, aber sonst analog den beaufschlagten Proben behandelt und aufgearbeitet wurde, um ggf. Kontaminationen durch die Aufarbeitung zu erkennen.

Die Sammlung der Proben wurde durch die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitssicherheit (Berlin) durchgeführt. Die beaufschlagten Filter wurden kippsicher verpackt und sofort per Expressdienst nach Giessen versendet. Aufarbeitung und Analytik fanden am Institut für Angewandte Mikrobiologie statt.

Tabelle 4 Übersicht über die Bioaerosol-Proben des Mastentenstalls und zugehöriger Arbeitsbereiche. Angegeben sind das Datum der Sammlung, die Probenbezeichnung, die Tätigkeit des Probanden sowie das Sammelvolumen in m³. Gesammelt wurde mittels personen-getragener Filtration über eine gesamte Arbeitsschicht des Probanden.

Nr.	Datum	Proben- Bezeichnung	Ort*	Tätigkeit	Volumen [m³]
1	25.09.2007	070925-2/2	B	Eiersammlung	1,228
2		070925-4/4	B	Eiersammlung	1,106
3		070925-5/5	B	Eiersammlung	1,344
4		070925-6/6	B	Eiersammlung	1,291
5		070925-7/7	B	Eiersammlung	0,745
6		070925-3/9	B	Eiersammlung	0,157
7		070925-8/8	B	LUV	1,428
8	26.09.2007	070926-2/11	B	Schwarzbereich	1,662
9		070926-4/13	B	Eiersammlung	0,994
10		070926-6/14	B	Eier fahren Stall, Begasung	1,326
11		070926-3/15	B	Eiersammlung, Vitamingabe	1,505
12		070926-1/16	B	Eiersammlung	1,246
13		070926-5/17	B	Eiersammlung	1,428
14		070926-8/18	B	LUV	1,344
15	27.09.2007	070927-5/23	B	Nester-Wäsche	0,871
16		070927-7/25	B	Nester-Wäsche	0,311
17		070927-4/22	B	Schlupf	1,277
18		070927-2/26	B	Schlupf	0,906
19		070927-3/27	B	Schlupf	1,529

20		070927-1/28	B	Schlupf	1,256
21		070927-8/29	B	Eiersammlung	1,578
22	09.10.2007	071009-1/1	H	Verwaltung, Büro	1,547
23		071009-2/2	B	Eiersammlung	1,613
24		071009-3/3	B	Eiersammlung	1,547
25		071009-4/4	B	Schwarzbereich	1,585
26		071009-5/5	B	Eier fahren Stall, Begasung	1,512
27		071009-7/7	H	Fahrer (Werkstatt)	1,144
28	10.10.2007	071010-3/11	H	Fahrer (Werkstatt)	1,347
29		071010-5/12	--	LUV	1,575
30		071010-10/14	B	Einstreuen; Stroh blasen	1,134
31		071010-9/15	B	Einstreuen	1,148
32		071010-4/16	H	Fahrer (Kraftfahrer)	1,067
33		071010-8/17	B	Elterntiere Einstreuen	1,239
34		071010-2/18	H	Verwaltung, Büro	1,554
35		071010-1/19	H	Fahrer	1,610
36	11.10.2007	071011-2/21	B	Schlupf	1,575
37		071011-3/22	B	Schlupf	1,585
38		071011-4/23	B	Schlupf	1,571
39		071011-1/25	B	Schlupf	0,857
40		071011-5/24	B	Eierwäsche weiß	1,585
41		071011-7/26	--	LUV	1,372
42	23.10.2007	071023-4/1	M	Einstreuen, Umtrieb	1,610
43		071023-5/3	M	Einstreuen, Umtrieb	1,617
44		071023-1/4	M	Stallvorbereitung	1,725
45		071023-3/5	B	Aufzucht Küken	1,704
46		071023-2/6	B	Eiersammlung, Einstreuen	1,613
47		071023-7/7	--	LUV	1,298
48	24.10.2007	071024-1/12	M	Abluftreinigung	1,603
49		071024-6/14	M	Stallarbeiten	1,190
50		071024-5/17	M	Stallarbeiten	1,281
51		071024-3/15	H	Getreidelager	0,959
52		071023-4/13	S	Entfedern	1,298
53	25.10.2007	071025-3/21	S	Hänger	0,927
54		071025-6/23	S	Hänger	0,437
55		071025-1/25	S	Hänger	1,127
56		071025-2/26	S	Hänger	1,057
57		071025-4/24	S	Hänger - Stecher	0,966
58		071025-5/22	S	Hänger - Stecher	0,959
59		071025-7/27	--	LUV	0,801
60	29.10.2007	071029-1/3	B	Elterntiere impfen	1,057
61		071029-2/5	B	Elterntiere impfen	1,085
62		071029-5/4	S	Werkstatt	1,039
63		071029-4/8	S	Werkstatt	0,994
64		071029-3/9	S	Werkstatt	1,088
65		071029-6/10	--	LUV	1,095
66	30.10.2007	071030-4/1	S	Veterinärbegehung	1,767
67		071030-1/13	S	Veterinärbegehung	1,876
68		071030-2/14	S	S	1,627

69		071030-3/15	S	Werkstatt	1,610
70		071030-5/17	--	LUV	1,634
71	01.11.2007	071101-4/18	H	Verwaltung, Büro	1,267
72		071101-3/20	B	Aufzucht Küken	1,309
73		071101-5/27	--	LUV	1,610
74		071101-1/29	H	Fahrer (Werkstatt)	1,169
75		071101-2/30	H	Getreidelager	1,459

* B=Brütereier, M=Maststall, S=Schlachthof, H=Hof.

2.8.3.1. Aufarbeitung der Filtrationsproben

Zur Aufarbeitung wurden die Filter im Labor unter sterilen Bedingungen mit einer abgeflamten Pinzette in sterile Stomacher-Beutel (Bags 6040, Seward Stomacher 80 Lab Systems, London UK) verbracht und 10 ml sterilfiltrierte NaCl [0,9 %] (w/v) dazu gegeben. Die Beutel wurden anschließend für 60 Sekunden auf Stufe „normal“ im Stomacher (Seward Stomacher 80 Lab Systems, London UK) behandelt, um die Zellen quantitativ vom Filter zu lösen.

a) Filtrationsproben stationär

Zur Bestimmung der KBE auf CASO- sowie auf WSA-Medium wurde wie bei den Impingement-Proben verfahren (siehe oben). Zur Fixierung (2.3.1) und DNA-Extraktion (2.9.2.1) wurden hier jeweils die Zellen aus 4 ml Flüssigkeit abzentrifugiert ($14.810 \times g$, 10 Minuten) und analog der Impingementprobe fixiert. Zur Lebend-Tot-Färbung (2.5.2.1) wurden 0,7 bis 1 ml der Flüssigkeit direkt für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und auf PC-Filter zur mikroskopischen Auswertung überführt.

b) Filtrationsproben personen-getragen

Die Zellen aus 5 ml Flüssigkeit wurden abzentrifugiert ($14.810 \times g$, 10 Minuten) und zur DNA-Extraktion (2.9.2.1) eingesetzt. Zur Bestimmung der KBE auf CASO-Medium wurde wie bei den Impingement-Proben verfahren (siehe oben). Zur Bestimmung der GZZ wurde wie in 2.3.2 beschrieben vorgegangen.

2.9. Untersuchung der Zusammensetzung der bakteriellen Artengemeinschaft mittels Kultivierung und kultivierungsunabhängigen Methoden

Um einen Hinweis auf die Zusammensetzung der Artengemeinschaft in Bioaerosolen aus Tierställen zu bekommen, wurden sowohl kultivierungsabhängige als auch -unabhängige Methoden angewandt. Dazu wurden Bioaerosolproben der

Probennahme 3 aus dem Putenmaststall verwendet (Tabelle 3) und näher untersucht.

2.9.1. Kultivierung

Nach Probennahme und Aufarbeitung der Proben, wurde analog zur Kultivierung auf CASO-Medium (siehe 2.8.1.1) eine Kultivierung auf MacConkey (*Enterobacteriaceae*) und Aktinomyceten-Isolations-Medium (Aktinomyceten) durchgeführt. Dies wurde sowohl für die Impingement-Proben, als auch für die Filtrations-Proben vorgenommen.

2.9.2. Kultivierungsunabhängige Untersuchung

2.9.2.1. DNA-Extraktion nach PITCHER et al. [141]

Zur DNA-Extraktion aus den Bioaerosolproben wurde ein modifiziertes Protokoll nach PITCHER *et al.* [141] verwendet.

Um die Zellen aufzuschließen, wurde das Zellpellet in 100 µl einer Lysozymlösung (677.500 Units in 100 µl TE-Puffer gelöst) resuspendiert und für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 50 µl GES-Puffer dazu gegeben und erneut bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen lysiert waren. Nach Zugabe von 50 µl SDS 10% [w/v], 1.820 Units RNase A (Sigma Aldrich, gelöst in 15 µl Wasser) und 1,8 Units Proteinase K (Sigma Aldrich, gelöst in 15 µl Wasser) wurde der Ansatz erneut bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 100 µl eiskaltem Ammonium Acetat [7,5 M] versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung der Proteine wurden 200 µl Chloroform/2-Pentanol-Gemisch (24:1) dazu gegeben, für 5 Sekunden gevortext und bei 13.800 g für 25 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige, DNA-enhaltende Phase wurde ohne Reste der darunter liegenden Phasen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur DNA-Fällung wurde das 0,54-fache Volumen an eiskaltem Isopropanol dazu gegeben und der Ansatz 1 Minute gevortext. Die ausgefällte DNA wurde im Anschluss bei 8200 g für 10 Minuten abgeschrieben, der Überstand verworfen. Um Reste des Isopropanols zu entfernen, wurde das DNA-Pellet 3x mit 600 µl 70%igem Ethanol [v/v] gewaschen. Nach Trocknen des DNA-Pellets (Vakuumzentrifugation, Lufttrocknung) wurde die DNA in 75 µl TE-Puffer über Nacht bei 4 °C resuspendiert, bis zur weiteren Verwendung in Volumina á 15 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer

TRIS [1 M]	2,0	ml
EDTA [0,2 M]	0,2	ml

auf 100 ml mit Reinstwasser auffüllen. Anschließend autoklavieren und sterilfiltrieren.

GES-Puffer

Guanidiumthiocyanat	60,0	g
EDTA [0,5 M] pH8	20,0	ml
Reinstwasser	20,0	ml

Alle Zutaten wurden unter Rühren bei 65 °C gelöst.

Sarkosyl 10% [v/v]	5,0	ml
--------------------	-----	----

dazu geben, auf 100 ml mit Reinstwasser auffüllen und die Lösung sterilfiltrieren (0,45 µm). Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.9.2.2. PCR

Die PCR wurde in Reaktionsvolumen zu je 25 µl angesetzt und setzte sich aus den in Tabelle 5 angegebenen Reagenzien zusammen. Dazu wurde ein Mastermix erstellt, der auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt wurde. Anschließend wurde jeweils 1 µl der zu analysierenden genomischen DNA hinzu gegeben. Zur Amplifikation des gesamten 16S rRNA Gens wurde das Primersystem EUB9f/EUB1492r (EUB9f 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', EUB1492r 5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', [142]) unter Anwendung des in Tabelle 5 angegebenen Temperaturprofils verwendet. Die PCR-Produkte wurden über ein 1,8%iges [w/v] Agarosegel aus 1X TBE aufgetrennt, um die Spezifität zu überprüfen. Anschließend wurden die Fragmente mit Ethidiumbromid (500 µg l⁻¹ in VE Wasser) angefärbt und zur Dokumentation digital fotografiert.

Tabelle 5 Zur Amplifikation des 16S rRNA Gens aus Umweltproben verwendete Reaktionskomponenten sowie die Amplifikationsbedingungen unter Verwendung der in [142] beschriebenen Primer.

Reagenz	1x-Ansatz [µl]	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
10x PCR Puffer	1,5	1. Initiale Denaturierung	95,0	180
MgCl ₂ [25 mM]	1,5	2. Denaturierung	94,0	45
dNTP [je 2 mM]	1,5	3. Annealing	57,3	45
Primer EUB9f [25 pmol]	0,3	4. Elongation	72,0	120
Primer EUB1492r [25 pmol]	0,3	<i>Schritt 2 bis 4 wurden 30x wiederholt</i>		
H ₂ O	9,84	5. Finale Elongation	72,0	240
Taq-Polymerase [5U/µl]*	0,06	6. Lagerung	4,0	∞

*Taq DNA Polymerase, recombinant (Fermentas GmbH, BRD)

2.9.2.3. Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte von Resten der Mastermix-Komponenten zu reinigen, wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) eingesetzt. Die Aufreinigung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde abschließend mit 30 µl PCR Wasser von der Säule eluiert.

2.9.2.4. Klonierung

Die Klonierung wurde nach dem Prinzip der TA-Klonierung [143] mit einem Klonierungskit (Promega pGEM-T® Vector Systems, USA) nach leicht abgeänderten Herstellerangaben durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Eigenschaft vieler DNA-Polymerasen ausgenutzt, PCR-Fragmente mit einem Adenosin-Überhang zu synthetisieren. Durch Verwendung eines Vektors mit Thymin-Überhang („*sticky ends*“) lassen sich die PCR-Fragmente leichter in diese Vektoren insertieren, als in Vektoren mit glatten Enden („*blunt ends*“).

Die Ligation des 16S rRNA Genabschnittes in den pGEM®Vektor fand über Nacht bei 4 °C statt. Das Reaktionsgemisch enthielt pro Ligationsansatz 4 µl [6,25 ng µl⁻¹] aufgereinigtes PCR-Produkt, 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer, 0,5 µl T4 DNA-Ligase und 0,5 µl pGEM®Vektor [50 ng µl⁻¹] (Promega, Hilden; alles im Kit vorhanden). Für die anschließende Transformation wurden 25 µl chemisch kompetente *Escherichia coli* JM 109 Zellen (Promega, Hilden, im Kit beinhaltet) zu 4 µl des Ligationsansatzes pipettiert und nach einer Hitzeschockbehandlung für 50 Sekunden bei 42 °C mit 475 µl SOC-Medium für 1,5 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler (220 RPM, Titramax100, Heidolph) inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Volumina (10 µl, 50 µl, 100 µl) auf LB-Nährmedien Platten ausgespatelt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Auswahl der das gewünschte Insert enthaltenden Klone fand anhand einer Blau-Weiß-Selektion statt. Das Prinzip der Blau-Weiss-Selektion beruht auf der Unterbrechung des innerhalb der *multiple cloning site* des Plasmidvektors liegenden *lacZ'*-Gens. *lacZ'* kodiert für das N-terminale α-Fragment der β-Galaktosidase. Das Enzym ist nur durch Zusammenwirken des α-Fragments mit dem C-terminalen ω-Fragment der β-Galaktosidase aktiv (α-Komplementation) während beide Fragmente allein keine β-Galaktosidase-Aktivität besitzen. Das intakte *lacZ'*-Gen kann nur abgelesen bzw. das α-Fragment synthetisiert werden, wenn der Induktor Galaktose oder ein Analogon wie z.B. IPTG vorhanden ist. Ist das Substratanalogon X-Gal zugegen, wird dieses gespalten, es entsteht ein blaues

Abbauprodukt. Unterbleibt die Bildung von β -Galaktosidase, weil das *lacZ'*-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments inaktiviert wurde, erscheint ein Bakterienklon weiß, wird das Enzym gebildet, erscheint ein Bakterienklon blau [144, 145].

Es wurden 60 positive *E. coli* Klonkolonien („weiß“) ausgewählt und mit einem sterilen Zahnstocher (handelsüblich, autoklaviert) von der Nährmedienplatte entnommen. Die Kolonien wurden einmal punktförmig in ein steriles Reaktionsgefäß sowie fünfmal auf eine neue LB-Nährmedienplatte verbracht. Die Nährmedienplatte wurde erneut bei 37 °C über Nacht bebrütet, um so das Zellmaterial des ausgewählten Klon für weitere Untersuchungen zu konservieren. Das in das Reaktionsgefäß überbrachte Zellmaterial wurde einer sog. „Klondip-PCR“ unterzogen, um sicher zu stellen, dass das gewünschte Insert in den *E. coli* Zellen vorhanden ist. Dazu wurde direkt zum Zellmaterial der Mastermix hinzugegeben und der das Insert enthaltende Plasmidabschnitt mit dem M13f/M13r Primersystem (M13f 5'-GTAAAAGGACGGCCAG-3', M13r 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') amplifiziert [146]. Zur Langzeitlagerung der als positiv detektierten Zellen wurde von jedem Klon eine Glyzerinkultur angelegt. Dazu wurden jeweils 300 μ l Glyzerin (99%) in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben und autoklaviert. In diese wurden von jeder zu konservierenden Klonkultur 700 μ l der Übernachtskulturen gegeben, geschüttelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

Trypton	5,0	g
Hefeextrakt	2,5	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar-Agar	7,5	g

Alle Zutaten wurden in 500 ml Reinstwasser gelöst und mit 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 7-7,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden die in Tabelle 6 angegebenen Stoffe als sterilfiltrierte Lösungen zugesetzt.

Tabelle 6 Dem LB-Medium zugesetzte Lösungen. Angegeben sind die Ausgangskonzentration, das zugesetzte Volumen, die Endkonzentration im Medium sowie das Lösungsmittel.

Chemikalie	Ausgangs-konzentration	Volumen [ml]	End-konzentration	Gelöst in
Ampicillin	[50mg ml ⁻¹]	1,0	[75 μ g ml ⁻¹]	PCR-Wasser
X-Gal	[50 mg ml ⁻¹]	0,8	[80 μ g ml ⁻¹]	Dimethylformamid
IPTG	[100mg ml ⁻¹]	2,5	[0,5 mM]	PCR-Wasser

2.9.2.5. Plasmidextraktion

Bei der Präparation von Plasmiden aus Bakterien wird Plasmid-DNA von chromosomaler DNA getrennt. Die Klonkolonien wurden für die nachfolgende Plasmidextraktion verwendet, um die enthaltenen Inserts sequenzieren und damit identifizieren zu können. Die dazu nötige Plasmidextraktion wurde als Auftragsarbeit von der Firma Agowa (Berlin) durchgeführt.

2.9.2.6. Sequenzierung und phylogenetische Analyse

Die Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit durch die Firma Agowa (Berlin) vorgenommen (EUB9f/EUB1492r (EUB9f 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', EUB1492r 5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', [142])).

Die phylogenetische Analyse wurde anhand des Softwarepaketes MEGA3 [147] durchgeführt.

Die Rohsequenzen wurden anhand des Programms ClustalW [148] zusammen mit den entsprechenden 16SrRNA-Gen-Sequenzen abgeglichen. Reste der Plasmidsequenz konnten so *in-silico* abgeschnitten werden. Die so korrigierten Sequenzfolgen wurden einem Datenbankvergleich in der NCBI Datenbank anhand des BLAST Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) unterzogen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), um die nächst ähnlichen Sequenzen zu ermitteln. Mit den hierbei gefundenen Sequenzen wurde erneut eine Alignment mit ClustalW durchgeführt. Für die anschließenden phylogenetischen Berechnungen wurde die Neighbour-Joining Methode [149] mit 1000 Bootstrap Wiederholungen angewendet.

2.9.2.7. Statistische Analyse

Zur Auswertung der klonierten 16S rRNA Genfragmente aus den untersuchten Bioaerosolproben wurde die „Rarefaction Analyse“ anhand der von Steven M. Holland entwickelten Freeware Analytic Rarefaction (Version 1.3, verfügbar unter www.uga.edu/~strata/software/; Stand April 2009) durchgeführt. Diese Analyse bietet eine Abschätzung, ob eine ausreichende Menge an Klonen untersucht wurde, um die Diversität der in den Bioaerosolproben vorhandenen bakteriellen 16S rRNA Gene ausreichend darzustellen.

2.10. Nachweis infektiöser Organismen: Etablierung des Nachweises der Gattung *Salmonella* aus Bioaerosolproben durch quantitative PCR

2.10.1. Verwendete Referenzstämme

Zur Etablierung des Nachweises der Gattung *Salmonella* wurde DNA der in Tabelle 7 angegebenen Stämme verwendet. Zusätzlich wurde der Stamm *Escherichia coli* ATCC 25922^T als Referenzstamm für die auf 16S rRNA Gen-Ebene nah verwandte Gattung *Escherichia* verwendet, die durch dieses System nicht erfasst werden sollte.

Tabelle 7 In dieser Arbeit verwendete Stämme zur Etablierung des Primersystems zur spezifischen Detektion der Gattung *Salmonella*.

Spezies	Stammnummer	Verwendung
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	CCUG 1743	Referenzstämme für die zu erfassende Gattung <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	CCUG 29867	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	CCUG 49677 ^T	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	CCUG 32352 ^T	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	CIP 60.62 ^T	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 ^T	Referenzstamm Nicht-Ziel-Organismus

2.10.1.1. DNA Extraktion nach HENCKEL [150]

Die Zellen wurden bei 8.154 g für zwei Minuten pelletiert und anschließend das überstehende Medium abgenommen. Zum Zellaufschluss wurden 150 µl Lysozym in TE gelöst [400.000 Units ml⁻¹] dazu geben und der Ansatz eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 567 µl 10% [w/v] SDS und 15 µl Proteinase K [20 mg/ml] dazu geben, gevortext und 15 Minuten bei 60 °C im Thermoblock inkubiert, wobei die Ansätze zwischendurch geschwenkt wurden. Weiterhin wurden 700 µl Na-Phosphat ([120 mM], pH 8,0) sowie 40 Vol-% des Reaktionsgefäß-Volumens kaltes Ammonium-Acetat [7,5 M] dazu gegeben und der Ansatz fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 11.742 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Halbieren des Volumens auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Zum Fällern der DNA wurden 70 Vol-% des Inhalts Isopropanol dazu geben und der Ansatz für eine Stunde bei 4 °C und 11.742 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA 3 x mit 600 µl 70%-igem Ethanol [v/v] gewaschen.

Abschließend wurde die DNA an der Luft getrocknet und in 2 x 75 µl TE-Puffer über Nacht bei 4 °C gelöst.

2.10.2. Untersuchung der DNA-Extraktionseffizienz für die Gattung *Salmonella*

Da durch methodisch bedingte DNA-Verluste die Konzentration der vorhandenen Mikroorganismen bei einer anschließenden Realtime PCR unterschätzt werden kann, ist neben einem hohen Reinheitsgrad der DNA eine hohe DNA-Extraktionseffizienz Voraussetzung für eine optimale Quantifizierung.

Die Effizienz der DNA-Extraktionsmethode wurde an Reinkulturen des Stammes *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium CIP 60.62^T anhand der Extraktionsmethoden nach PITCHER *et al.* [141] (siehe 2.9.2.1) und HENCKEL [150] (siehe 2.10.1.1) ermittelt.

Zunächst wurde der Wachstumsverlauf einer Reinkultur *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Typhimurium CIP 60.62^T anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm über 2-3 Tage verfolgt, um sicherzustellen, dass sich die Kultur in der stationären Wachstumsphase befindet. Für die stationäre Wachstumsphase wurde von FEY und EICHLER [151] gezeigt, dass für die Gattung *Salmonella* das Genom, und damit der *invA*-Zielgenabschnitt, durchschnittlich nur einmal pro Zelle vorhanden ist. 0,5 ml wurden aus dem Kulturansatz bei Erreichen der stationären Phase entnommen. Damit wurde eine dezimale Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁹ mit 0,9%iger [w/v] NaCl Lösung erstellt. Aus den Verdünnungsstufen 10⁰ bis 10⁻² wurden die Zellen aus 2 ml der Zellsuspension mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurde mittels DAPI-Färbung (siehe 2.3.) die Gesamtzellzahl der Lösung ermittelt.

Aus 2 ml der Verdünnungsstufen 10⁰ bis 10⁻² wurde eine DNA-Extraktion nach dem in 2.10.1.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die DNA-Konzentration dieser Extrakte wurde photometrisch (260 und 280 nm, Ultrospec 4000, UV/Visible Spectrophotometer, Cambridge UK, nach Herstellerangaben) und fluormetrisch (DynaQuant 200, Höfer Inc., USA, nach Herstellerangaben) bestimmt und in die entsprechende Zahl an Genomen bzw. Zellen umgerechnet.

Zur Berechnung der Kopienzahl aus der gemessenen DNA-Konzentration wurde die Größe des *Salmonella*-Genoms mit 4,9 x 10⁶ bp und der Guanin-Cytosin-Anteil von 53% berücksichtigt [152]. Hieraus ergibt sich ein Gewicht von 4,07 fg DNA pro

Genom für *Salmonella*. Die hieraus errechneten Werte wurden nun mit der mikroskopisch ermittelten GZZ verglichen und so die DNA-Extraktionseffizienz (%) angegeben.

2.10.3. Etablierung der Realtime PCR zum quantitativen, spezifischen Nachweis der Gattung *Salmonella*

Zunächst wurden die spezifischen Bedingungen anhand einer PCR eingegrenzt (Tabelle 8), bevor durch die Optimierung die spezifischen Amplifikationsbedingungen für die quantitative Realtime PCR im RotorGene (Corbett, USA) ermittelt wurden (Tabelle 9). Das in dieser Arbeit zum Nachweis der Gattung *Salmonella* erprobte Primersystem auf Basis des *invA*-Gens ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 8 Für das Primersystem 139/141 ermittelte spezifische Standard-PCR Thermocyclerprogramm sowie die Reagenzien und deren Konzentration pro 25 µl Ansatz.

Thermocyclerprogramm		Mastermix pro 25 µl Ansatz	
Schritt	Bedingungen	Reagenzien	µl
1. Initiale Denaturierung	94,0 °C / 3 Minuten	PCR-Wasser	16,4
2. Denaturierung*	94,0 °C / 1 Minute	Puffer 10x	2,5
3. Annealing*	54,0 °C / 45 Sekunden	MgCl ₂ [25 mM]	2,5
4. Elongation*	72,0 °C / 2 Minuten	dNTP's je [2 mM]	2,5
5. Finale Elongation	72,0 °C / 7 Minuten	Primer 139/141 je [10 pM]	0,5
6. Endtemperatur	4,0 °C / ∞	Taq Polymerase [5 U µl ⁻¹]	0,1

Die Schritte 2 bis 5 wurden 28x wiederholt.

Tabelle 9 Für das Primersystem 139/141 ermittelte spezifische Realtime PCR Thermocyclerprogramm sowie die Reagenzien und deren Konzentration pro 10 µl Ansatz.

Realtime Thermocyclerprogramm		Mastermix pro 10 µl Ansatz	
Schritt	Bedingungen	Reagenzien	µl
1. Initiale Denaturierung	95,0 °C / 15 Minuten	PCR-Wasser	3,6
2. Denaturierung	94,0 °C / 20 Sekunden	ABGene Kit [2x]	5,0
3. Annealing	54,0 °C / 20 Sekunden	Primer 139 [10 pM]	0,2
4. Elongation*	72,0 °C / 15 Sekunden	Primer 141 [10 pM]	0,2
5. Acquisition*	80,0 °C / 15 Sekunden	DNA	1,0
6. Schmelzkurve	60-95 °C je 0,5 Sekunden	Alle Ansätze 4-fach parallel	

Die Schritte 2 bis 5 wurden 40x wiederholt.

* Fluoreszenzmessung bei 470 nm Ex/ und 585 nm Em

Tabelle 10 Das in dieser Arbeit verwendete Primersystem zum Nachweis der Gattung *Salmonella*

Primer	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Fragment-Länge	Quelle
139	<i>invA</i>	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	247 bp	[153]
141	<i>invA</i>	TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C		

2.10.3.1. Herstellung der Quantifizierungsstandards

Zur Erstellung der Quantifizierungsstandards wurde eine Flüssigkultur *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T zur DNA-Extraktion verwendet. Da nur in der stationären Wachstumsphase eine einzelne *invA*-Genkopie in *Salmonella* Zellen vorhanden ist [151], wurde durch OD₆₀₀-Messungen sicher gestellt, dass eine sich in der stationären Phase befindliche Kultur eingesetzt wurde. Die extrahierte DNA wurde fluorometrisch quantifiziert (DynaQuant, Höfer Inc. USA, nach Herstellerangaben). Anhand der DNA-Menge wurde die korrespondierende Genomzahl pro µl DNA-Lösung (targets µl⁻¹) errechnet. Dabei wurde von einem Genomgewicht von 4,07 fg pro Genom [152] ausgegangen. Basierend auf der so bestimmten Konzentration wurden durch dekadische Verdünnungen der Ausgangslösung Konzentrationen von 10⁰ bis 10⁷ targets µl⁻¹ erstellt.

2.10.4. Versuche zur Wiederfindung von *Salmonella invA*-Genen mittels Realtime PCR

Zur Untersuchung des Einflusses der Probenmatrix auf die Wiederfindung wurden unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit die Matrix bzw. die Aufarbeitung (z. B. DNA-Extraktion) einen Einfluss auf die Wiederfindung der Salmonellen anhand des in dieser Arbeit etablierten Realtime PCR Nachweissystems hat.

2.10.4.1. Wiederfindung unter Zugabe von Zellen eines Nicht-Ziel-Organismus (*Escherichia coli*)

Es wurden absteigende Konzentrationen von 10⁸ bis 10⁴ Zellen ml⁻¹ einer stationären Kultur *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T durch Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe angefertigt. Je 1 ml dieser Verdünnungsstufen wurde in sterile Reaktionsgefäße überführt und je 1 ml einer ebenfalls stationären Kultur *Escherichia coli* ATCC 25922^T dazu gegeben, die zuvor auf eine Zelldichte von 10⁸ Zellen ml⁻¹ eingestellt wurde. Anschließend wurde die DNA-Extraktion wie in 2.9.2.1 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden je 2 parallele Ansätze unter Zugabe von *E. coli* Zellen, sowie eine Parallele ohne Zugabe, durchgeführt. Die DNA Konzentrationen der jeweiligen DNA Extrakte wurden anschließend anhand einer Realtime PCR (2.10.3) ermittelt und in targets ml⁻¹ umgerechnet.

2.10.4.2. Wiederfindung unter Zugabe von DNA Extrakten aus Bioaerosolproben

Um erste Hinweise auf eventuelle Hemmeffekte aus unterschiedlichen Umweltproben zu erhalten, wurden *Salmonella* DNA-Extrakte bekannter Konzentration mit DNA-Extrakten aus Kompostmaterial, Boden und Bioaerosolen eines Rinderstalles versetzt. Dazu wurden in einem Realtime PCR Ansatz jeweils zu 1 µl der *Salmonella*-Standards der Konzentrationen 10^2 bis 10^6 targets µl⁻¹ (n=4) je 1 µl unverdünnter DNA-Extrakt gegeben. Zum Vergleich wurde 1 µl *Salmonella* Standard der gleichen Konzentrationen (n=4) ohne Zugabe von Bioaerosol-DNA-Extrakt eingesetzt. Für diese wurden parallel die *invA*-Zielgene mit den als spezifisch ermittelten Bedingungen (siehe 2.10.3) anhand einer Realtime PCR (RotorGene3000, Corbett) quantifiziert und die erhaltenen Ergebnisse verglichen.

2.10.4.3. Bestimmung der Wiederfindung nach Zugabe definierter Salmonellen Konzentrationen zu Bioaerosolproben

Um die Wiederfindung von Salmonellen in originären Bioaerosolproben zu analysieren, wurden definierte Salmonellen Zellkonzentrationen, bestimmt durch DAPI-Zählung (siehe 2.3ff), zu Bioaerosolproben (Tabelle 3) gegeben. Nach der Aufarbeitung (siehe 2.8ff) wurde die *invA*-Genkopienzahl durch eine Realtime PCR (siehe 2.10.3) bestimmt.

2.11. Quantifizierung der Salmonellen Konzentration in Bioaerosolproben durch Kultivierung und das etablierte Realtime PCR System

Der quantitative Nachweis von Salmonellen in Bioaerosolen wurde in Proben der Probennahmen 2-5 (Puten und Masthähnchen, siehe 2.6.2 und 2.6.3) durchgeführt. Dazu wurde einerseits eine kultivierungsabhängige KBE Bestimmung sowie eine Bestimmung der *invA*-Genkopienzahl durch die soweit etablierte Realtime PCR vorgenommen.

a) Kultivierungsabhängig

Zur Bestimmung der KBE für Salmonellen wurden aus den Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-4} der beaufschlagten Proben jeweils 100 µl in drei Parallelen auf Wismut-Sulfit-Agar (WSA, siehe 2.2) ausgespatelt und bei 37 °C bebrütet. WSA ist ein selektives

Differenzierungsmedium für Salmonellen. Kolonien der Gattung *Salmonella* erscheinen auf diesem Medium grau bis metallisch-silbern, während das Wachstum anderer *Enterobacteriaceae* überwiegend unterdrückt wird oder sie farblose Kolonien bilden [98]. Für die Laborkontrollproben wurden dreimal jeweils 100 µl 0,9%ige [w/v] NaCl Lösung, die zur Erstellung der Verdünnungsreihen verwendet wurde, direkt auf WSA ausgespatelt. Die Auswertung und Bestimmung der KBE fand nach 48 Stunden statt.

b) Kultivierungsunabhängig

Der Nachweis von Salmonellen aus Bioaerosolen wurde anhand des in dieser Arbeit entwickelten Realtime PCR Systems durchgeführt. Dazu wurde aus einem Aliquot der Proben die DNA isoliert (2.9.2.1) und anschließend unter den in 2.10.3 genannten Bedingungen einer Realtime PCR Analyse unterzogen.

2.12. Nachweis der Spezifität: Klonierung

Da die Spezifität des 139/141 Primersystems bislang nur anhand von Datenbanken und kultivierten Stämmen gezeigt wurde, wurde eine Klonierung der mit diesem Primersystem erhaltenen PCR-Produkte aus den Masthähnchen Bioaerosol DNA Extrakten (PN5, Emsbüren) durchgeführt. Ausgehend von den so erhaltenen *invA*-Gen PCR-Produkten wurde eine Klonierung mit dem Promega pGEM-T Vector Systems Kit wie in 2.9.2.4ff beschrieben, durchgeführt (Insert ca. 248 bp lang). Zur Analyse wurden hierbei insgesamt 50 Klone zufällig ausgewählt und von diesen 10 Klonkolonien zur weiteren Analyse herangezogen.

2.12.1. Plasmidextraktion

Bei der Präparation von Plasmiden aus Bakterien wird Plasmid-DNA von chromosomaler DNA getrennt.

Die Klonkolonien wurden für die nachfolgende Plasmidextraktion verwendet, um die enthaltenen Inserts sequenzieren und damit identifizieren zu können. Dazu wurden die ausgewählten *E. coli* Klonkolonien über Nacht in flüssigem LB-Medium (siehe. 2.9.2.4, ohne X-Gal) angezogen und die Zellen aus 4 ml pelletiert. Anschließend wurde die Extraktion nach dem bei SAMBROOK und RUSSEL [144] angegebenen Protokoll nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Der Plasmidgehalt

wurde photometrisch bestimmt und anhand der Messergebnisse auf eine Konzentration von 100 ng μl^{-1} eingestellt.

2.12.2. Sequenzierung und phylogenetische Analyse

Die Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger [154] durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion wurde das BigDye™ Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Für die Amplifikation des kurzen Inserts (248 bp) wurde nur der M13f Primer (siehe 2.9.2.4) verwendet, um die volle Sequenz des Inserts zu erfassen. Die nachfolgende Aufreinigung der Produkte erfolgte mit einem DyeEx Spin Kit (Quiagen, Hilden) nach beiliegendem Protokoll. Die so vorbereitete Probe wurde anhand des AbiPrism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Die Auftrennung erfolgte dabei auf einer mit einem spezifischen Polymer gefüllten Kapillare (Länge = 61 cm, $\varnothing$ = 50 μm). Die Detektion der durch die ddNTP's unterschiedlich fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte über einen Argonlaser (488 bis 514,5 nm). Die Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit vom Institut für Mikro- und Molekularbiologie der JLU Giessen durchgeführt.

Die phylogenetische Analyse wurde anhand des Softwarepaketes MEGA 3 durchgeführt, in dem alle erforderlichen Programmbausteine enthalten sind. Dazu wurde wie unter 2.9.2.6 beschrieben vorgegangen, mit dem Unterschied, dass die entsprechenden *invA*-Gen-Sequenzen zum Vergleich heran gezogen wurden.

2.13. Nachweis allergie-auslösender Organismen: Etablierung des Nachweises der Gattung *Thermoactinomyces* aus Bioaerosolproben anhand quantitativer PCR

Neben dem Nachweis infektiöser Organismen wurde eine Gruppe Allergie-auslösender Organismen untersucht. Die Etablierung des Nachweises am Beispiel der Gattung *Thermoactinomyces* ist im Folgenden dargestellt.

2.13.1. Verwendete Referenzstämme

Zur Etablierung des Primersystems wurden basierend auf dem Gen der 16S rRNA nah verwandte Arten mit einbezogen (Tabelle 11). Die Gattung *Thermoactinomyces* umfasst derzeit zwei Arten: *Thermoactinomyces vulgaris* und *Thermoactinomyces intermedius*. In den letzten Jahren wurden einige ursprünglich der Gattung

zugeordnete Arten nach näherer Untersuchung der 16S rRNA Gensequenz, DNA G+C Gehalt, Phänotyp sowie Fettsäureprofilen anderen Gattungen zugeordnet [155]. Auch wenn diese Arten sich u. a. aufgrund der 16S rRNA Gensequenzen unterscheiden, weisen doch große Teile des 16S rRNA Gens hohe Sequenzähnlichkeiten untereinander auf. Nur die unterschiedlichen Bereiche können als Ansatzpunkt der PCR zum spezifischen Nachweis der Gattung genutzt werden.

Tabelle 11 In dieser Arbeit verwendete Stämme zur Etablierung des Primersystems zur spezifischen Detektion der Gattung *Thermoactinomyces*.

Spezies	Stammnummer	Verwendung
<i>Thermoactinomyces intermedius</i> *	DSM 43846 [†]	Ziel-Organismen des <i>Thermoactinomyces</i> Nachweis-Systems
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> *	DSM 43016 [†]	
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> *	DSM 43352	
<i>Laceyella putida</i> ⁺	DSM 44608 [†]	Nicht-Ziel-Organismen des <i>Thermoactinomyces</i> Nachweis-Systems
<i>Laceyella sacchari</i> ⁺	DSM 43356 [†]	
<i>Laceyella sacchari</i> ⁺	DSM 43354	
<i>Thermoflavimicrobium dichotomicum</i> ⁺	CECT 5331, DSM 46168	

* Aktuell der Gattung *Thermoactinomyces* zugeordnet [155].

⁺ Ehemals der Gattung *Thermoactinomyces* zugeordnet [155].

2.14. DNA-Extraktion aus Spezies der Gattung *Thermoactinomyces*

Die Extraktion der DNA aus Spezies der Gattung *Thermoactinomyces* wurde nach leicht abgewandelten Herstellerangaben mit dem GenElute Plant Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde das Zellmaterial mit 350 µl der Lyse-Lösung A und 50 µl der Lyse-Lösung B (beide im Kit enthalten) gemischt und 1 g sterile Zirkonium-Kügelchen dazu gegeben. Anschließend wurden die Zellen 60 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit in der Schwingmühle (Retsch GmbH, BRD) aufgeschlossen. Ab hier wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll weiter verfahren.

2.14.1. Untersuchung der DNA-Extraktionseffizienz für die Gattung *Thermoactinomyces*

Aufgrund der fädigen Zellmorphologie, die keine genaue GZZ-Bestimmung zuließ, konnte die DNA-Extraktionseffizienz für diese Gattung nicht bestimmt werden.

2.15. Etablierung der Realtime PCR zum spezifischen, quantitativen Nachweis der Gattung *Thermoactinomyces*

Die in dieser Arbeit erprobten Primersysteme zur Detektion von *Thermoactinomyces* sp. sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12 In dieser Arbeit verwendete Primer zum spezifischen Nachweis der Gattung *Thermoactinomyces*. Angegeben sind die Bezeichnung der Primer, das Zielgen, die Sequenz des Primers, die Bindungsposition innerhalb des Zielgens, die Länge des amplifizierten Fragments sowie ggf. die Referenz des Primers.

Primer	Zielgen	Sequenz 5' → 3'	Bindungs-Position*	Fragment-Länge	Referenz
TAM601	16S rRNA	GCC GCA GCC TTT CAC ACC	601-583	594 bp	[156]
616F	16S rRNA	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	7-26		[157]
TAcF	16S rRNA	GCT AGG TGT TGG GGG GGC TA	818-838	296 bp	Diese Arbeit
699RII	16S rRNA	AGG GTT GCG CTC GTT GC	1114-1099		[157]
TAcR	16S rRNA	TAG CCC CCC AAC ACC TAG C	838-818	~237 bp	Diese Arbeit
TAM601F	16S rRNA	GGT GTG AAA GGC TGC GGC	601-619		[156]
NSPTf	16S rRNA	TCC AGG CGA ACA GCC TGG AAG GTT	452-476	388bp	Diese Arbeit
TAcRmod	16S rRNA	CGT AGC CCC CCA ACA CCT AGC AC	817-840		
NSPTf-7	16S rRNA	AAT TCC TTC CAG GCG AAC A	445-464	~396bp	Diese Arbeit
TAcRmod	16S rRNA	CGT AGC CCC CCA ACA CCT AGC AC	817-840		

* Bindungsposition in Relation zum 16S rRNA Gen von *Escherichia coli* nach BROSIUS *et al.* [158].

Tabelle 13 Für das Primersystem TAcF/699RII ermitteltes spezifisches Thermocyclerprogramm sowie die Reagenzien und deren Konzentration pro 25 µl Ansatz.

Thermocyclerprogramm			Mastermix pro 25 µl Ansatz	
Schritt	Bedingungen		Reagenzien	µl
1. Initiale Denaturierung	94,0 °C	180 Sek.	PCR-Wasser	16,4
2. Denaturierung*	94,0 °C	60 Sek.	Puffer 10x	2,5
3. Annealing*	66,0 °C	30 Sek.	MgCl ₂ [25 mM]	2,5
4. Elongation*	72,0 °C	45 Sek.	dNTP's je [2 mM]	2,5
5. Finale Elongation	72,0 °C	420 Sek.	Primer je [10 pM]	0,5
6. Endtemperatur	4,0 °C	∞	Taq Polymerase [5 U µl ⁻¹]	0,1

* Die Schritte 2 bis 4 wurden 29x wiederholt.

Tabelle 14 Für das Primersystem NSPTf-7/TAcRmod ermitteltes spezifisches Thermocyclerprogramm sowie die Reagenzien und deren Konzentration pro 10 µl Ansatz.

Realtime Thermocyclerprogramm			Mastermix pro 10 µl Ansatz	
Schritt	Bedingungen		Reagenzien	µl
1. Initiale Denaturierung	94,0 °C	15 Min.	PCR-Wasser	16,4
2. Denaturierung	94,0 °C	20 Sek.	ABGene Kit [2x]	5,0
3. Annealing	57,0 °C	20 Sek.	Primer NSPTf-7 [10 pM]	0,2
4. Elongation*	72,0 °C	45 Sek.	Primer TAcRmod [10 pM]	0,2
5. Acquisition*	80,0 °C	15 Sek.	DNA	1,0
6. Schmelzkurve	65-95 °C	je 0,5 Sek.	Alle Ansätze 4fach parallel	

Die Schritte 2 bis 5 wurden 40x wiederholt.

* Fluoreszenzmessung bei 470 nm Ex/ und 585 nm Em

2.16. Bestimmung der Anzahl der 16S rRNA Operons für die Gattung *Thermoactinomyces* anhand einer Southern-Blot-Analyse (SOUTHERN [159])

Da das 16S rRNA Gen in vielen Organismen in mehrfacher Kopienzahl innerhalb des Genoms vorliegen, ist es für eine genaue Realtime PCR Quantifizierung auf Basis dieses Gens nötig, dessen Anzahl zu kennen. Da bislang keine vollständige Genomsequenz für einen Vertreter der Gattung *Thermoactinomyces* verfügbar ist, wurde die Blot-Analyse nach SOUTHERN [159] angewendet, um die Anzahl der 16S rRNA Operons zu bestimmen.

Zunächst wurde DNA aus einer Kultur *Thermoactinomyces intermedius* DSM 43846^T (24 h in TS Bouillon) extrahiert. Hierzu wurde durch Zentrifugation pelletiertes Zellmaterial aus 50 ml Flüssigkultur auf zwei sterile 2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden 1g Zirkoniumkügelchen (Ø 0,1 mm) sowie 500 µl Lysozym [100 mg ml⁻¹] dazu gegeben und die Zellen in einer Schwingmühle (MM200, Retsch GmbH, Deutschland) für 4 Minuten aufgeschlossen. Die Suspension wurde anschließend in einem neuen Reaktionsgefäß zusammen geführt und ab hier nach dem in 2.14 beschriebenen Protokoll die DNA extrahiert.

Zur Durchführung des Blottings wurden die Lösungen des DIG-High Prime Random Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Molecular Biochemicals) nach Herstellerangaben verwendet.

2.16.1. Markierung der Sonde mit Digoxigenin

Zur Herstellung der Sonde wurde DNA verwendet, die aus *Escherichia coli* W3110 extrahiert wurde (2.9.2.1). Im Anschluss wurde eine PCR mit den Primern MrF/Com1R (MrF 5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' [142];

Com1R 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3' [160]) in 4 Ansätzen á 100 µl durchgeführt, wodurch ein 511 bp langes Fragment des 16S rRNA Gens amplifiziert wurde. Nach elektrophoretischer Auftrennung über ein 1,5 %iges [w/v] Agarosegel wurden die Banden mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und knapp ausgeschnitten. Aus diesen wurden die Fragmente mit dem GelPurification Kit (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DIG-Markierung wurde anschließend mit dem DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 16 µl (~1 µg DNA) DNA Extrakt für 10 Minuten im Wasserbad aufgekocht und zum Abkühlen sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4 µl DIG High Primer dazu gegeben, alles vorsichtig gemischt und der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) mit anschließender Inkubation bei 65 °C für 10 Minuten gestoppt. Ab jetzt wurde die Sonde bei -20 °C gelagert.

2.16.2. Restriktionsverdau

Die genomische DNA von *Thermoactinomyces intermedius* DSM 43846^T wurde mit insgesamt 7 verschiedenen Restriktionsenzymen (*Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sma*I, *Eco*RI, *Sal*I, *Nde*I alle Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben über Nacht verdaut. Dieser Verdau wurde über ein 0,8%iges [w/v] Agarosegel aus 0,5x TBE bei 85V für 4 Stunden aufgetrennt. Anschließend wurden die Fragmente mit Ethidiumbromid (500 µg l⁻¹ in VE Wasser) angefärbt und fotografiert.

2.16.3. Kapillartransfer der verdauten DNA auf die Membran

Der Transfer der verdauten DNA-Fragmente wurde anhand des Kapillartransfer-Verfahrens durchgeführt. Dazu wurde das Gel unter leichtem Schütteln jeweils 30 Minuten in die Depurinierungslösung, Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung gelegt. Wobei zwischen jedem Wechsel der Lösungen einmal mit dest. Wasser gespült wurde, um Reste der Lösungen zu entfernen.

Depurinierungslösung

0,2 N HCl	17,24 ml l ⁻¹	HCl (konz.)
-----------	--------------------------	-------------

Denaturierungslösung

0,5 M NaOH	20,0 g l ⁻¹	NaOH
1,5 M NaCl	87,66 g l ⁻¹	NaCl

Neutralisierungslösung

1,0 M Tris-HCl	121,1	g l ⁻¹	Tris-HCl
1,5 M NaCl	87,66	g l ⁻¹	NaCl

mit HCl (konz.) auf pH 7,5 einstellen.

Anschließend wurden die Tanks einer Gelkammer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mit 1x SSC Puffer gefüllt und mit zwei zuvor in 1x SSC Puffer getränkten Lagen Blotting Papier (GB002 Gel Blotting Papier, Schleicher und Schüll, Dassel) verbunden. Luftblasen wurden mit Hilfe eines Reagenzglases entfernt. Das Gel wurde mittig in die Gelkammer auf das Blotting Papier gelegt. Darauf wurde die zuvor genau passend geschnittene Membran gelegt (Biodyne® A Transfer Membrane, Pall Corp., USA) und ebenfalls vorsichtig Luftblasen entfernt. Zur Orientierung wurden je eine Ecke des Gels und der Membran abgeschnitten. Darauf wurden 4 zugeschnittene Lagen Blotting Papier, genau passend für die Größe des Gels, gelegt. Auf diese wurde ein ca. 10 cm hoher Stapel passend zugeschnittenes Handtuchpapier gelegt, eine Glasplatte darauf platziert und mit einem Gewicht von ca. 500 g gleichmäßig beschwert (Abbildung 7). Der durch die Lagen Papier ermöglichte Kapillartransfer der DNA auf die Membran wurde über Nacht durchgeführt. Zur Immobilisierung der DNA auf der Membran wurden die DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht (GATC link; GATC, Freiburg) für 2 Minuten vernetzt.

10x SSC Stocklösung

1,5 M NaCl	87,66 g/L NaCl
0,15M Na-Citrat	44,10 g/L Na-Citrat-Dihydrat

Die Chemikalien wurden eingewogen, auf 800 ml mit Reinstwasser aufgefüllt und der pH auf 7,0 mit 1 N HCl eingestellt. Abschließend wurde auf 1 Liter aufgefüllt.

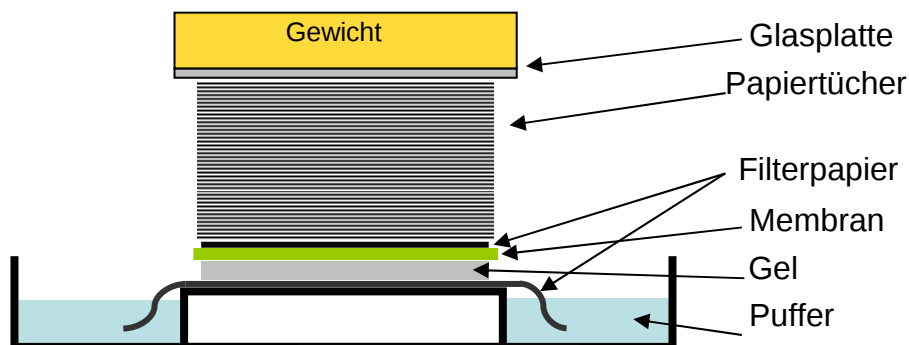


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Kapillartransfers der verdauten DNA-Fragmente auf die Membran.

2.16.4. Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten Sonde

Zunächst wurden der Hybridisierungssofen (OV2, Biometra, Deutschland) sowie die Hybridisierungslösung auf 45 °C vorgewärmt. Zur Vor-Hybridisierung wurde die Membran vorsichtig mit der DNA-Seite nach innen in eine Hybridisierungsflasche gegeben, 0,5 ml Hybridisierungslösung pro cm² Membranfläche dazu gegeben, die Flasche verschlossen und für 4 h bei 45 °C unter Rotation inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde die Sonde zur Verwendung vorbereitet. Bei erster Verwendung wurde die DIG-markierte Sonde für 5 Minuten bei 70 °C im Wasserbad denaturiert. Anschließend wurde die Sondenlösung auf Eis auf ca. 40-50 °C abgekühlt und in 15 ml Hybridisierungslösung aufgenommen. Bei Wiederverwendung der Sonde wurde die zuvor bei -20 °C gelagerte Sondenlösung für 10 Minuten bei 68 °C im Wasserbad aufgetaut und war sofort zur Verwendung bereit.

Die Hybridisierungslösung der Vor-Hybridisierung wurde verworfen, die vorbereitete Sondenlösung auf die Membran gegeben und der Ansatz bei 45 °C für 12-24 h rotierend inkubiert. Hierbei hybridisiert die Sonde mit komplementären Fragmenten auf der Membran. Zum Entfernen ungebundener Sonde wurden mehrere Waschschriffe durchgeführt. Zunächst wurde die Membran kurz mit Waschpuffer I gespült und der Puffer sofort verworfen. Anschließend wurde die Membran 2 x je 15 Minuten bei Raumtemperatur mit ca. 50 ml Waschpuffer I gewaschen, wobei der Waschpuffer jeweils verworfen wurde. Dieser Vorgang wurde mit Waschpuffer II ebenso wiederholt. Hiernach wurde die Membran mit 1X Maleinsäurepuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Waschpuffer I

2 X SSC	200 ml 10 X SSC Lösung
0,1% SDS	5 ml einer 20% [w/v] SDS Lösung

Volumina der Lösungen abfüllen und mit Reinstwasser auf 1000 ml auffüllen.

Waschpuffer II

0,2 X SSC	20 ml der 10 X SSC Lösung
0,1% SDS	5 ml einer 20% [w/v] SDS Lösung

Volumina der Lösungen abfüllen und mit Reinstwasser auf 1000 ml auffüllen.

1X Maleinsäure Puffer

0,1 M Maleinsäure	11,608 g
0,15 M NaCl	8,766 g

Chemikalien einwiegen und mit Reinstwasser auf 900 ml auffüllen. Den pH auf 7,5 mit NaOH Pellets einstellen und mit Reinstwasser auf 1000 ml auffüllen.

2.16.5. Chemilumineszenz-Detektion

Nach Auftauen der 10X Blockinglösung (im Kit enthalten) wurde diese 1:10 mit 1X Maleinsäurepuffer verdünnt und in die Hybridisierungsflasche auf die Membran gegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Rotation inkubiert und die Lösung verworfen. Anschließend wurde das Anti-DIG conjugate 1:20.000 mit der Blockinglösung (1x) verdünnt, auf die Membran gegeben und so ebenfalls bei Raumtemperatur unter Rotation für 30 Minuten inkubiert. Diese Lösung enthält einen Antikörper, der mit einer alkalinen Phosphatase konjugiert ist, die an die DIG-markierten Abschnitte bindet. Um überschüssige Antikörper Lösung zu entfernen, wurde ein Waschschrift durchgeführt. Dazu wurde die Membran in eine mit Waschpuffer III gefüllte Schale gegeben, so dass sie gleichmäßig bedeckt war und unter leichtem horizontalem Schütteln 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer wurde verworfen und dieser Schritt einmal wiederholt. Nach erneutem Verwerfen des Waschpuffers III wurden ca. 30 ml Detektionslösung zu der Membran gegeben und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Hierbei werden die optimalen Konditionen für die alkaline Phosphatase eingestellt, die an die DIG-markierten Ziel-Abschnitte gebunden ist. Anschließend wurde die Membran in eine saubere Klarsichthülle gelegt, mit ca. 1 ml CSPD™ (ready-to-use, im Kit enthalten) betropft und die obere Seite der Klarsichthülle leicht angedrückt, so dass keine Luftblasen vorhanden waren. Außen anhaftende Lösungsreste wurden vorsichtig entfernt. Die so vorbereitete Membran wurde in einer Röntgenkassette bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde unter Lichtabschluss ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech Ltd., UK) aufgelegt und für 30 Minuten bis über Nacht, je nach Intensität der Chemilumineszenz aufgelegt. Dabei dephosphoriliert die alkaline Phosphatase das CSPD, was zur Bildung eines reaktiven Anions (Phenolat) führt. Dies wiederum wird unter Lichtemission von blauem Licht (477 nm) in Adamantan und 1,2-Dioxethan gespalten. Der Zerfall von 1,2-Dioxethan führt zu einer weiteren Lichtemission. Diese Lichtemission wird auf einem lichtsensitiven Film detektiert. Zur Entwicklung wurde der Röntgenfilm unter Lichtabschluss in Entwicklerlösung (Agfa, Deutschland) gelegt, bis Banden sichtbar wurden. Anschließend wurde der Film kurz mit dest. Wasser gewaschen, 5 Minuten in Fixierlösung (Agfa, Deutschland) gelegt, erneut für 10 Minuten in dest. Wasser gewaschen und abschließend frei hängend getrocknet.

Waschpuffer III

1X Maleinsäurepuffer
0,3% Tween20

985 ml 1x Maleinsäurepuffer
15 ml einer 20% [v/v] Tween20® Lösung

Detektions Puffer

0,1 M Tris-HCl, pH 9.5

10 ml 1,0 M Tris-HCl pH 9.5

0,1 M NaCl

2 ml 5 M NaCl

Die entsprechenden Volumina der Lösungen mischen und mit 88 ml Reinstwasser auffüllen. Jeweils frisch vor Gebrauch ansetzen.

2.17. Versuche zur Wiederfindung von *Thermoactinomyces* sp. mittels Realtime PCR

Um eventuelle Hemmeffekte aus unterschiedlichen Umweltproben zu untersuchen, wurden DNA Extrakte aus *Thermoactinomyces* (mit bekannter Konzentration Ziel-Gene) mit DNA-Extrakten aus Kompostmaterial, Boden und Bioaerosolen eines Rinderstalles versetzt. Dazu wurden in einem Realtime PCR Ansatz jeweils zu 1 µl der *Thermoactinomyces* Standards der Konzentrationen 10^2 bis 10^6 Zielgenen µl⁻¹ (n=4) je 1 µl unverdünnter DNA-Extrakt aus auf PC-Filtern gesammelten Bioaerosolen eines Masthähnchenstalles gegeben. Im Vergleich wurde 1 µl *Thermoactinomyces* Standard DNA der gleichen Konzentrationen (n=4) ohne Zugabe von Bioaerosol-DNA-Extrakt eingesetzt. Diese Ansätze wurden mit den für das NSPTf-7/TAcRmod Primersystem als spezifisch ermittelten Bedingungen (Tabelle 14) im RotorGene (Corbett, USA) amplifiziert.

2.18. Untersuchung verschiedener Bioaerosolproben mit dem neu etablierten System zum Nachweis von *Thermoactinomyces* sp.

Nachdem das Detektionssystem etabliert war, wurden Umweltproben unterschiedlicher Herkunft auf das Vorkommen von *Thermoactinomyces* sp. untersucht. Dazu wurde eine Realtime PCR mit dem NSPTf-7/TAcRmod Primersystem unter Einsatz einer Auswahl von DNA-Extrakten aus Bioaerosolproben der Probenahmen 2-6 (Tabelle 4) mit den in 2.10.3 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

2.19. Nachweis der Spezifität: Klonierung

Da die Spezifität des NSPTf-7/TAcRmod Primersystems bislang nur anhand von Datenbanken und kultivierten Referenz-Stämmen gezeigt wurde, wurde eine

Klonierung der mit diesem Primersystem erhaltenen Realtime PCR-Produkte aus den Mastentenstall Bioaerosol DNA-Extrakten (PN 6) durchgeführt.

Ausgehend von den so erhaltenen 16S rRNA Gen PCR-Produkten, wurde eine Klonierung (n=44 Klone) als Auftragsarbeit von der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt (Insert 395 bp lang).

Die Auswertung der Sequenzen fand analog zu 2.9.2.6 statt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vergleich der physikalischen Sammeleffizienz von Filtration und Impingement bei Bioaerosolsammlungen an unterschiedlichen Arbeitsplätzen

Die Konzentrationen kultivierbarer Bakterien aus den Luftproben des Puten- und Masthähnchenstalles lagen zwischen $5,3 \times 10^4$ und $2,1 \times 10^8$ KBE m^{-3} Luft. Die höchsten Konzentrationen luftgetragener Mikroorganismen wurden in den Bioaerosolproben des Masthähnchenstalles gefunden und lagen um bis zu zwei Log-Stufen über den Konzentrationen der Putenstall-Bioaerosolproben (Abbildung 8).

Insgesamt lagen die Konzentrationen der mittels Impingement genommenen Proben bis auf drei Ausnahmen (PN 1 Stall 1; PN 4, Stall 1; PN 5 Stall 2) alle unter denen der mittels Filtration gesammelten Bioaerosolproben (Abbildung 8).

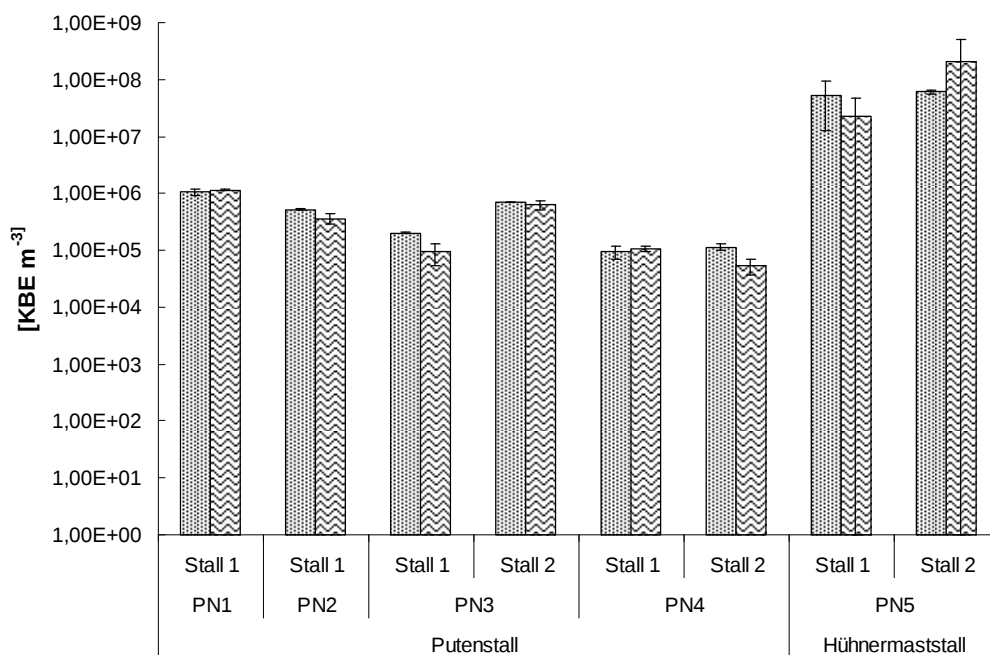


Abbildung 8 Darstellung der KBE m^{-3} Luft für die Probennahmen (PN) im Putenmast- und Hähnchenmaststall, gesammelt mittels Filtration  und Impingement . Die Balken zeigen Mittelwerte aus n= 3 Parallelen $\pm$ SA.

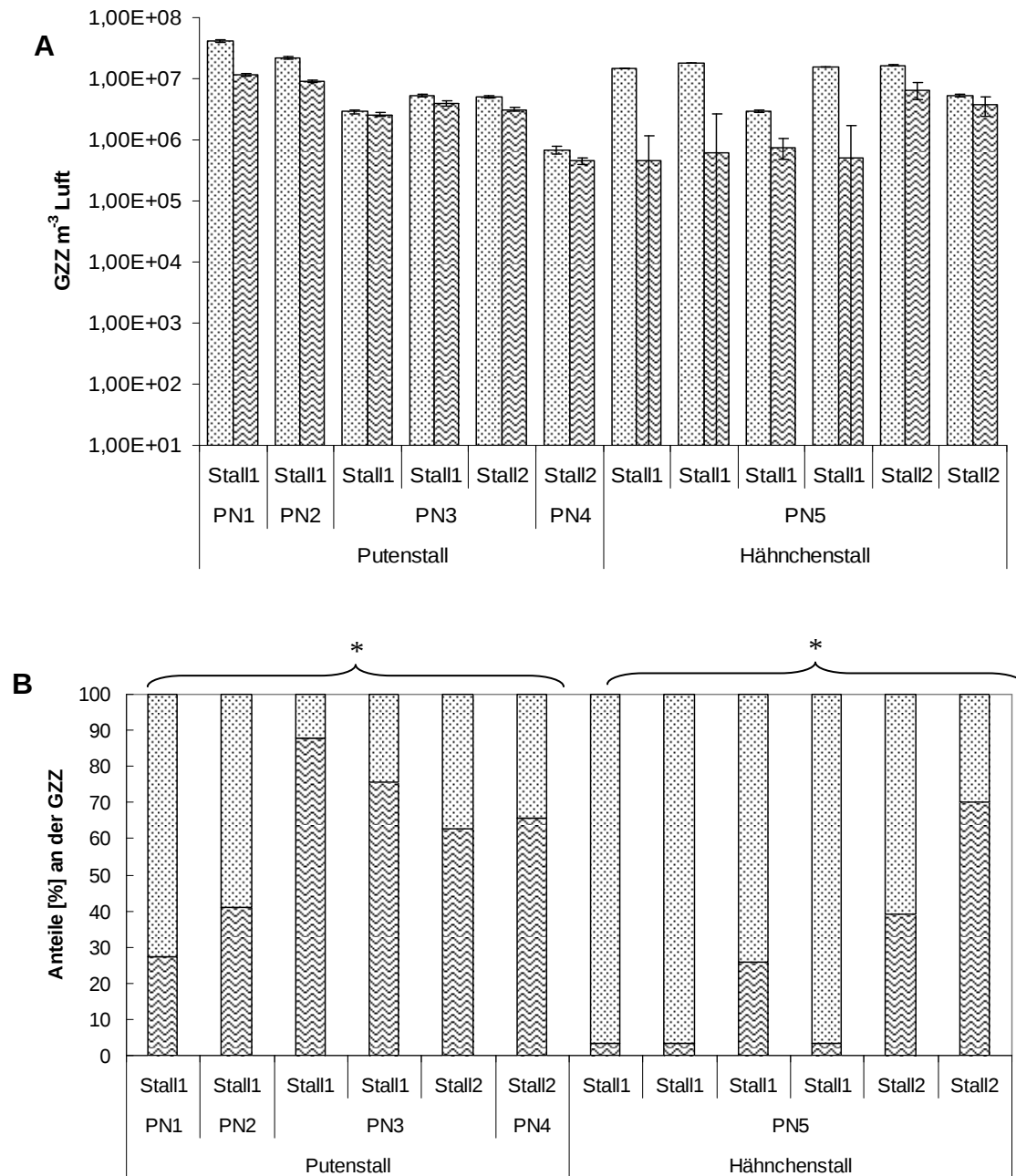


Abbildung 9 Darstellung der Konzentrationen luftgetragener Bakterien in Abhängigkeit vom verwendeten Luftsammelverfahren (Filtration , Impingement ) für die Probenahmen im Puten- und Masthähnchenstall. Dargestellt sind A) die absoluten Zahlen [Zellen m⁻³ Luft] sowie B) die GZZ der mittels Impingement gesammelten bezogen auf die mittels Filtration gesammelten Bioaerosol-Proben [%].

Die parallel ermittelten GZZ-Konzentrationen für Bioaerosol-Proben des Puten- und Masthähnchenstalles variierten zwischen $4,6 \times 10^5$ und $1,8 \times 10^7$ Zellen m⁻³ Luft (Abbildung 9, A). Damit betrug der Anteil der KBE an der GZZ im Mittel 8,5%.

Insgesamt lag die Gesamtzellzahl m⁻³ bei den mittels Impingement gewonnenen Bioaerosolproben quantitativ ohne Ausnahme immer unter der Gesamtzellzahl der Filtrationsproben. Die Anteile (% Impingement/Filtration) schwankten in Abhängigkeit

A log-log scatter plot showing the relationship between GZZ [Zellen m³ Luft] Impingement (x-axis) and GZZ [Zellen m³ Luft] Filtration (y-axis). The data points are represented by open triangles, and a solid line indicates a linear fit. The coefficient of determination is $R^2 = 0,9557$.

GZZ [Zellen m ³ Luft] Impingement	GZZ [Zellen m ³ Luft] Filtration
~6.0E+04	~7.0E+04
~8.0E+04	~1.5E+05
~1.0E+05	~1.0E+05
~1.5E+05	~2.5E+05
~2.0E+05	~8.0E+05
~3.0E+05	~5.0E+05
~4.0E+05	~8.0E+05
~5.0E+05	~1.0E+06
~6.0E+05	~1.2E+06
~1.0E+06	~1.0E+06
~3.0E+07	~3.0E+07
~6.0E+07	~6.0E+07
~1.0E+08	~1.0E+08
~3.0E+08	~3.0E+08
~4.0E+08	~5.0E+07

3.1.1. Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf die GZZ

61

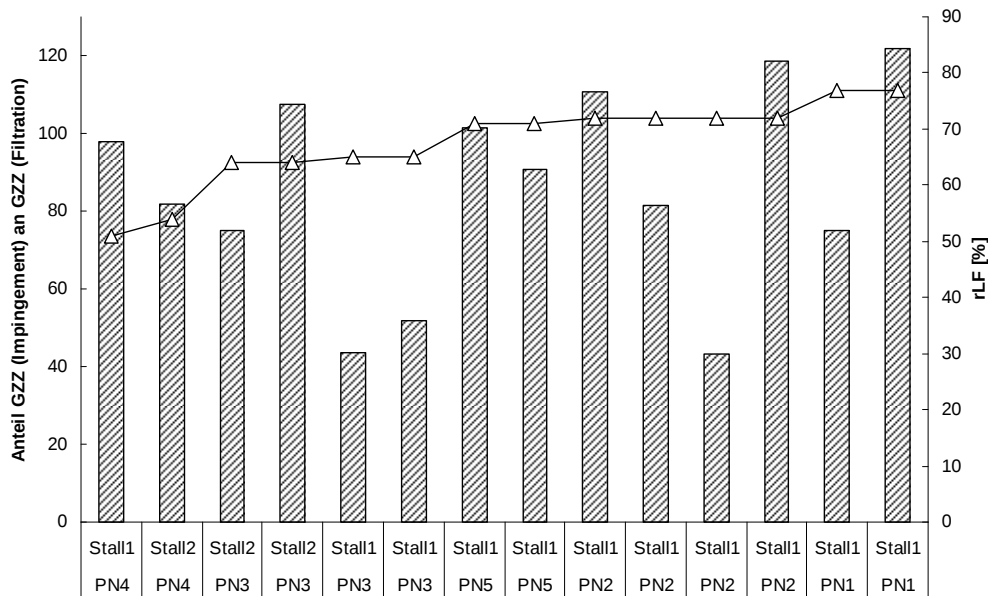


Abbildung 11 Darstellung des Anteils der GZZ der mittels Impingement gesammelten Bioaerosolproben an der GZZ der parallel mittels Filtration gesammelten Bioaerosolproben (▨ %, linke y-Achse) im Vergleich zur relativen Luftfeuchte (Δ in %, rechte y-Achse) im Verlauf der Messungen. Die Messwerte der relativen Luftfeuchte wurden zur besseren Übersichtlichkeit verbunden.

3.2. Untersuchung der biologischen Sammeleffizienz für Filtration und Impingement

Der Anteil Mikroorganismen, der nach der Bioaerosolsammlung noch als „lebend“ erfasst wird, gibt die biologische Sammeleffizienz eines Sammelsystems an. Meist wird „lebend“ gleichgesetzt mit „kultivierbar“, einhergehend mit den für diese Methodik bekannten Nachteilen. Hier müssen die Kultivierbarkeit der Organismen sowie adäquate Kultivierungsbedingungen nach der Sammlung zwingend gegeben sein, um aussagekräftige Quantifizierungen und Qualifizierungen durchführen zu können. Zusätzlich gibt es Farbstoffe zur Zellfärbung, die eine Differenzierung in „lebende“⁶ und „tote“ Zellen kultivierungsunabhängig zulassen und auch Zwischenstadien (VBNC) erfassen. Hierdurch können gleichzeitig sowohl die Anteile lebender Zellen, die klassischerweise über die KBE quantifiziert werden, als auch die Anteile toter Zellen und die Gesamtzellzahl in einem Ansatz ermittelt werden. Da diese Methodik bislang nur wenig Anwendung gefunden hat, sollte zunächst die Anwendbarkeit im Allgemeinen sowie für die hier eingesetzten Stämme evaluiert werden. Diese Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

⁶ „lebend“ wird in diesem Fall definiert als bei Fluoreszenzmikroskopie grüne Fluoreszenzsignale zeigend (Ex: 480 nm, Em: 500 nm (SYTO9) bzw. 635 nm (Propidiumiodid), BacLight™ Live/Dead Kit (Molecular Probes, Inc.)).

3.2.1. Vergleich der mittels DAPI-Färbung und Lebend-Tot-Färbung ermittelten Gesamtzellzahlen

Zur Ermittlung der generellen Anwendbarkeit der Lebend-Tot-Färbung wurde die GZZ pro ml eingesetzter Kultur heran gezogen und mit den Ergebnissen der DAPI-Färbung verglichen. Insgesamt wurden 16 Stämme untersucht. Hierbei ergaben sich für die meisten Stämme (n=13) vergleichbare Ergebnisse der GZZ Konzentration. Unterschiede in der GZZ Konzentration ergaben sich für Zellen der Stämme *Rhodococcus erythropolis* DSM 45066 und *Staphylococcus aureus* DSM 20251^T sowie besonders stark für den Stamm *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 70405^T (Abbildung 12).

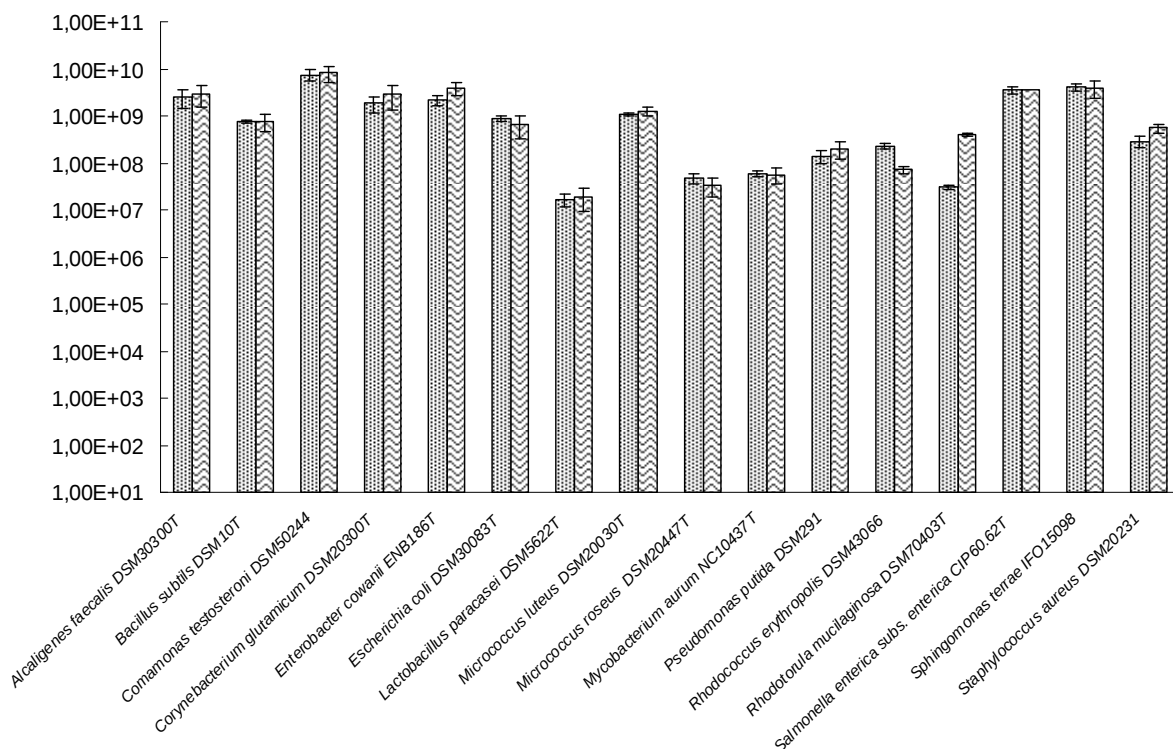


Abbildung 12 Vergleich der anhand der Lebend/Tot-Färbung (▨) und der DAPI-Färbung (▤) ermittelten GZZ pro ml eingesetzter Kultur für unterschiedliche Stämme. Die Balken zeigen Mittelwerte aus n=20 gezählten mikroskopischen Gesichtsfeldern ±SA. Die Werte für die Lebend/Tot-Färbung ergeben sich als Summe aus den separat gezählten Zellzahlen für „lebende“ und „tote“ Zellen.

3.2.2. Ermittlung der Auswertbarkeit von Lebend-Tot gefärbten Zellpräparaten in Abhängigkeit von der Zeit

Bei Bioaerosolprobenahmen ist mitunter die Zeit zwischen Probenahme und Auswertung relativ lang (z. B. durch lange Anfahrten zu den Probenahmeorten). Um

die mögliche Zeitspanne zur Analyse der durch Lebend-Tot-Färbung gefärbten Zellen nach einer Probenahme zu bestimmen, wurden Zellen einer *Escherichia coli* Kultur gefärbt und stündlich ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass keine Veränderung der ermittelten GZZ, sowie der Anteile lebender bzw. toter Zellen innerhalb von 24 Stunden auftrat (Abbildung 13). Allerdings konnten die Zellen nach ca. 20 Stunden schwächer und nach 24 Stunden gar nicht mehr deutlich erkannt werden, weshalb ab diesem Zeitpunkt keine Auswertung mehr möglich war.

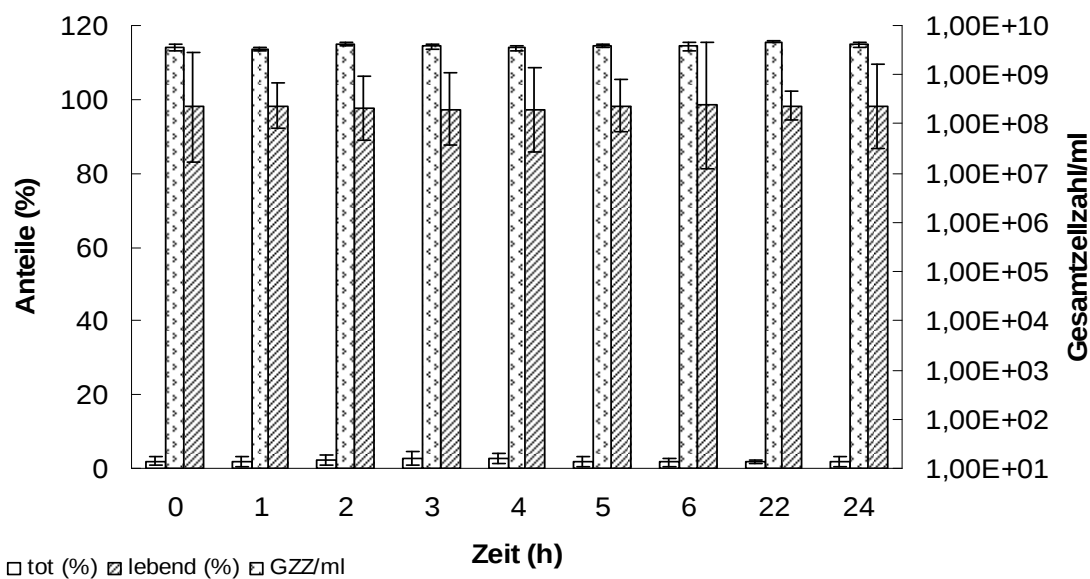


Abbildung 13 Darstellung des prozentualen Anteils lebender (▨) und toter (□) Zellen an der Gesamt gezählten Zellzahl sowie der absoluten Gesamtzellzahl/ml (■). Gezählt wurde stündlich nach einmaliger Lebend/Tot-Färbung einer stationären *E. coli* Kultur mit dem Live/Dead BacLight™ Bacterial Viability Kit for microscopy and quantitative assays (L7012) (Molecular Probes, Inc., USA) nach Herstellerangaben. Angegeben sind Mittelwerte aus n=5 Feldern pro Zeit ± SA. Gezählt wurde am Axioplan (Zeiss, Jena) bei 1000facher Vergrößerung. Der Objektträger wurde zwischenzeitlich dunkel bei RT aufbewahrt.

3.2.3. Anwendbarkeit der Lebend-Tot-Färbung für unterschiedliche Stämme

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Anwendbarkeit der Lebend-Tot-Färbung für Stämme verschiedener Gattungen dargestellt (Abbildung 14). Dazu ist die Wiederfindung (%) lebender und toter Zellen in Zellsuspensionen definierter Verhältnisse lebender und toter Zellen durch mikroskopische Auswertung nach der Lebend-Tot-Färbung gezeigt. Der Anteil an Zellen, die in der Ausgangslösung bereits als tot markiert waren, werden jeweils im Verhältnis E deutlich. Dieser Anteil toter Zellen wurde daher im Folgenden von den Ergebnissen der übrigen Verhältnisse A-D abgezogen.

Für *Comamonas testosteroni* DSM 50244 wurde eine Übereinstimmung der eingesetzten zu den ermittelten Verhältnissen gefunden (Abbildung 14, a). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (t-Test, $\alpha=99,99\%$) für alle Vergleiche. Für *Bacillus subtilis* DSM 10^T zeigten sich geringfügige Abweichungen eingesetzter zu wieder gefundenen Anteilen (Abbildung 14, b). Diese waren jedoch nicht signifikant (t-Test, $\alpha=99,99\%$).

Für den Stamm *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300^T zeigte sich für das Verhältnis A [50:50] sowie für das Verhältnis C [60:40] ein signifikanter Unterschied zwischen erwartetem und wiedergefundenem Verhältnis lebender und toter Zellen (t-Test, $\alpha=99,99\%$). Es wurden 59% bzw. 66% lebende Zellen und 41% bzw. 34% tote Zellen ermittelt. Für alle anderen Verhältnisse wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Abbildung 14, c).

Für *Sphingomonas terrae* IFO 15098 zeigten sich geringfügige Abweichungen zwischen eingesetzten und ermittelten Anteilen (Abbildung 14, d). Diese waren jedoch nicht signifikant (t-Test, $\alpha=99,99\%$).

Für den Stamm *Staphylococcus aureus* DSM 20231 zeigte sich für das Verhältnis B [70:30] ein signifikanter Unterschied zwischen erwartetem und wiedergefundenem Verhältnis lebender und toter Zellen (t-Test, $\alpha=99,99\%$). Es wurden 61% lebende Zellen und 39% tote Zellen ermittelt. Für alle anderen Verhältnisse wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Abbildung 14, e).

Mycobacterium aurum NC 10437^T, *Enterobacter cowanii* ENB 186^T und *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T zeigten übereinstimmende Ergebnisse von eingesetzten zu ermittelten Verhältnissen lebender und toter Zellen (Abbildung 14, f, g, h). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (t-Test, $\alpha=99,99\%$) für alle Vergleiche. Für *Micrococcus roseus* DSM 20447^T und *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 waren, aufgrund der Bildung von komplexen Zellaggregaten, keine differenzierenden Auszählungen lebender und toter Zellen möglich. Die Zellen wurden durch die Färbung zwar sichtbar differenziert, allerdings war eine Zellzahlbestimmung aufgrund der dichten Zusammenlagerung der Zellen in verschiedenen Ebenen nicht möglich. Auch der Einsatz einer geringeren Zelldichte und der Zusatz von Tween80 im Wachstumsmedium führten zu keiner Trennung der Zellaggregate und somit zu keiner deutlichen Verbesserung der Auswertung.

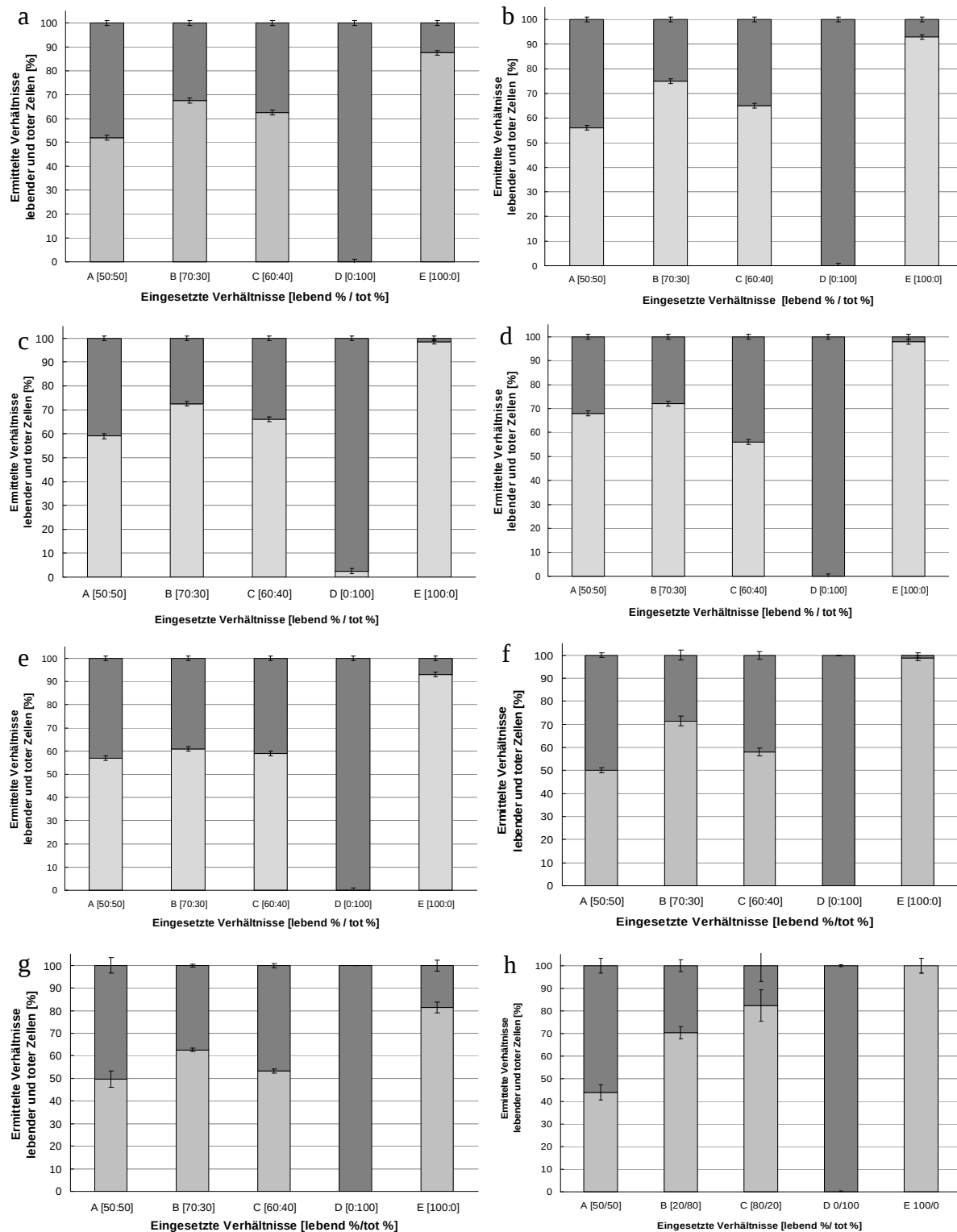


Abbildung 14 Mikroskopisch anhand Lebend/Tot Färbung ermittelte Konzentrationen [%] lebender (■) und toter (■) Zellen nach der Herstellung definierter Verhältnismischungen lebender und toter Zellen (A[50:50], B[70:30], C[60:40], D[0:100], E[100:0]) von verschiedenen Spezies: a) *Comamonas testosteroni* DSM 50244 b) *Bacillus subtilis* DSM 10^T c) *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300^T d) *Sphingomonas terrae* IFO 15098 e) *Staphylococcus aureus* DSM 20231, f) *Mycobacterium aurum* NC 10437^T g) *Enterobacter cowanii* ENB 186^T h) *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T. Dargestellt sind Mittelwerte errechnet aus n=10 mikroskopischen Gesichtsfeldern ± SA.

Bei *Pseudomonas putida* DSM 291 konnte anhand der Lebend-Tot Färbung zwischen lebenden und toten Zellen differenziert werden, welche sich in kettenartigen Strukturen zusammenlagerten. Es ergaben sich deutliche Längenunterschiede der Zellstrukturen, wobei die einzelnen Zellen nicht klar voneinander unterscheidbar waren. Daher konnte hier ebenfalls keine genaue Bestimmung der Zellzahl vorgenommen werden. Die Lebend-Tot Färbung der Zellen von *Lactobacillus paracasei* DSM 5622^T ergab eine sehr schwache Fluoreszenz der grün fluoreszierenden lebenden Zellen. Lediglich die toten Zellen wurden durch rote Fluoreszenz deutlich sichtbar und konnten ausgezählt werden. Eine genaue Bestimmung der Lebendzellzahl konnte nicht durchgeführt werden.

3.3. Untersuchung der biologischen Sammeleffizienz für das Impingement am Beispiel ausgesuchter Stämme verschiedener Gattungen

Zur Bestimmung der biologischen Sammeleffizienz wurden Zellen ausgewählter Stämme verschiedener Gattungen mit ansteigenden Luftvolumina mittels Impingement beaufschlagt. In Abhängigkeit vom beaufschlagten Luftvolumen wurde die Zahl lebender Zellen ml⁻¹ Impingerflüssigkeit bestimmt und auf die Gesamtzellzahl bezogen [%]. Hierdurch wird der Einfluss des gesammelten Luftvolumens bzw. der Sammelzeit deutlich.

Für *Comamonas testosteroni* DSM 50244 wurde eine stetige Abnahme der Lebendzellzahl im Verlauf der Beaufschlagung beobachtet. Dabei sank der Anteil der als lebend detektierten Zellen von anfänglich 92,7% auf 57,2% nach 30 Minuten ab. Für *Bacillus subtilis* DSM 10^T blieb der Anteil lebender Zellen im Zeitverlauf nahezu gleich.

Für *Staphylococcus aureus* DSM 20231 schwankte der Anteil lebender Zellen im Verlauf der Beaufschlagung, sank aber insgesamt von 57% auf 47,5% ab. Bei *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300^T wurde von Beginn der Beaufschlagung an ein sehr hoher Anteil lebender Zellen (81,4%) detektiert. Im Verlauf der Beaufschlagung stieg der Anteil sogar auf 97,7% an. Allerdings war bei diesem Ansatz der Flüssigkeitsaustrag und damit die Aufkonzentrierung der Zellen im Impinger sehr hoch. Ein ähnlicher Trend konnte für *Sphingomonas terrae* IFO 15098 und *Escherichia coli* DSM 30083^T beobachtet werden. Hier stieg der Anteil lebender

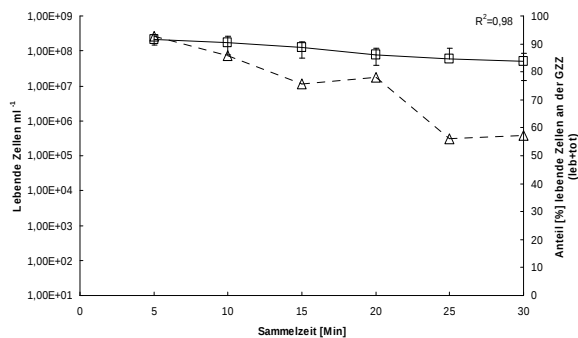
Zellen im Beaufschlagungszeitraum von 66,1% auf 81,4% bzw. von 81% auf 91,5% an.

Für *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T lagen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Stämmen nur drei Messdatenpunkte vor. Jedoch konnte hier eine Abnahme lebender Zellen von 98,7 % zu Beginn auf 90,8 % am Ende der Beaufschlagung beobachtet werden.

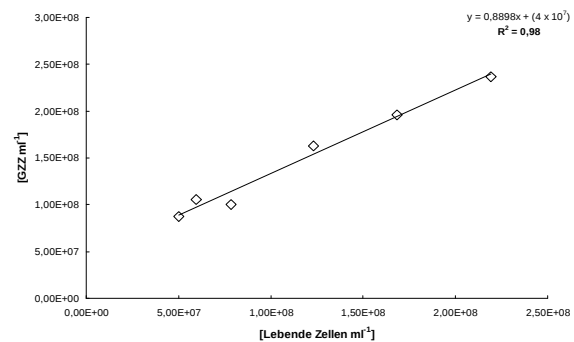
Für alle Stämme wurde eine positive Korrelation unterschiedlicher Stärke von GZZ (lebende + tote Zellen) und der Lebendzellzahl festgestellt (Abbildung 15, jeweils Teil B).

Comamonas testosteroni DSM 50244

A

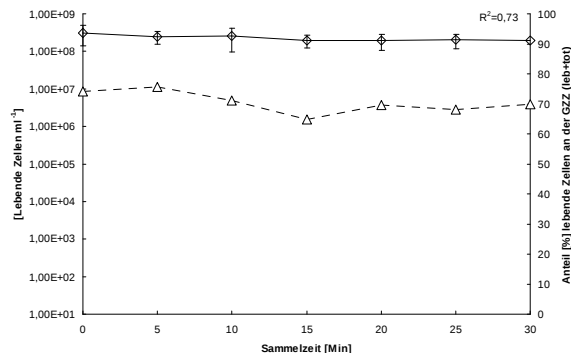


B

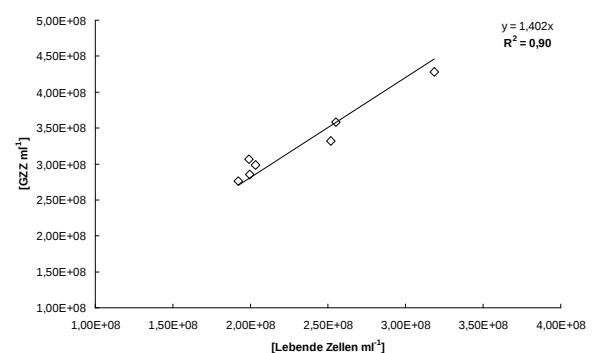


Bacillus subtilis DSM 10^T

A

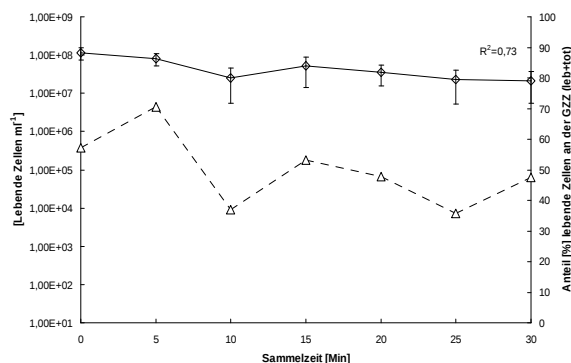


B

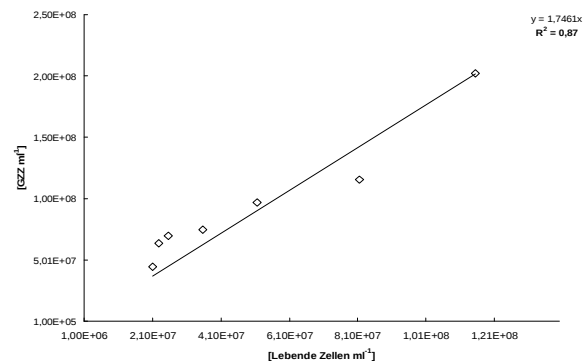


Staphylococcus aureus DSM 20231

A

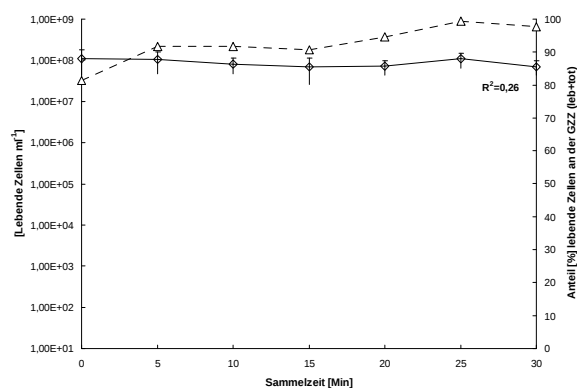


B

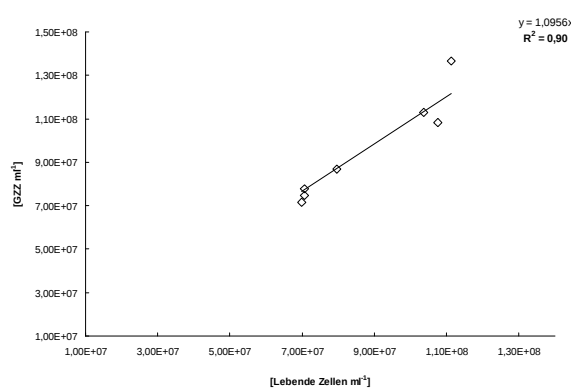


Corynebacterium glutamicum DSM 20300^T

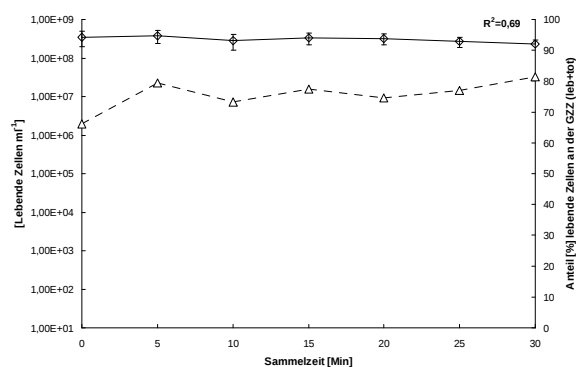
A



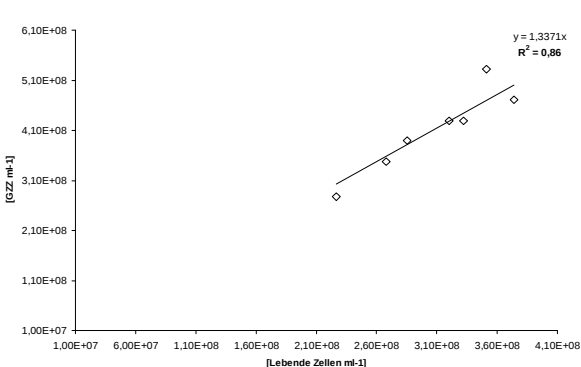
B

*Sphingomonas terrae* IFO 15098

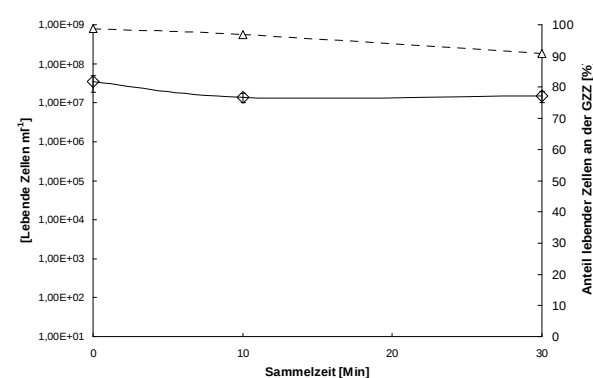
A



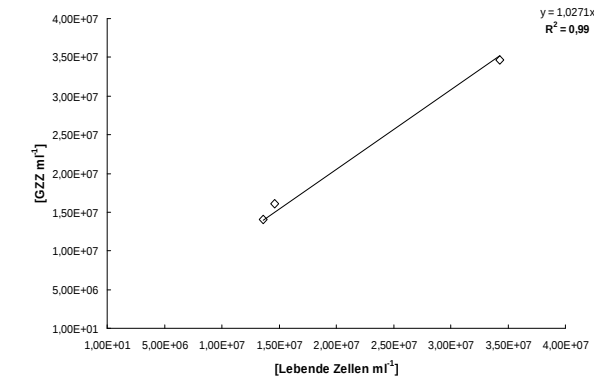
B

*Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Typhimurium CIP 60.62^T

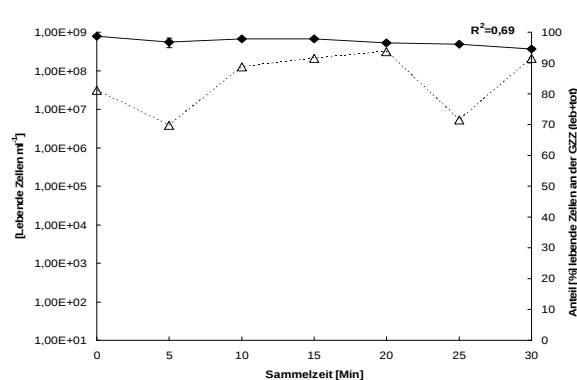
A



B

*Escherichia coli* DSM 30083^T

A



B

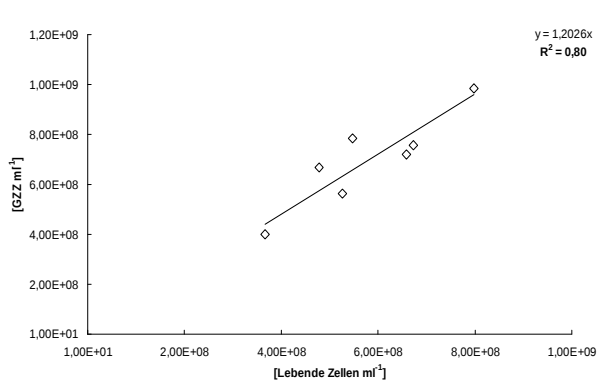
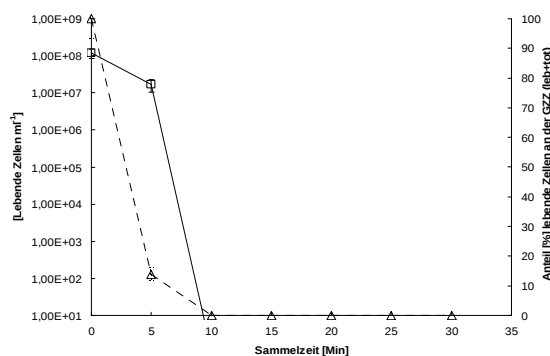


Abbildung 15 (A): Verlauf des Anteils ([%], Δ) der als lebend detektierten Zellen an der GZZ (lebende + tote Zellen absolut, $\blacklozenge$) für unterschiedliche Stämme in Abhängigkeit vom mittels Impingement beaufschlagten Luftvolumen (max. 0,3 m³, hier angegeben als Beaufschlagungszeit in Minuten). Dargestellt sind Mittelwerte aus n=10 Gesichtsfeldern (Salmonella n= 30 Gesichtsfelder $\pm$ SA. (B): Korrelation der GZZ (lebende + tote Zellen, absolut, $\diamond$) und der Anzahl lebender Zellen (absolut) pro ml Ausgangslösung von verschiedenen Stämmen nach Beaufschlagung mittels Impingement, ermittelt anhand Lebend/Tot-Färbung. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=10 Gesichtsfeldern (Salmonella n= 30 Gesichtsfelder) $\pm$ SA. Die Anteile lebender und toter Zellen wurden fluorezenzmikroskopisch nach Live/Dead Färbung ermittelt und jeweils zur Gesamtzellzahl (=lebende +tote Zellen) in Relation gesetzt.

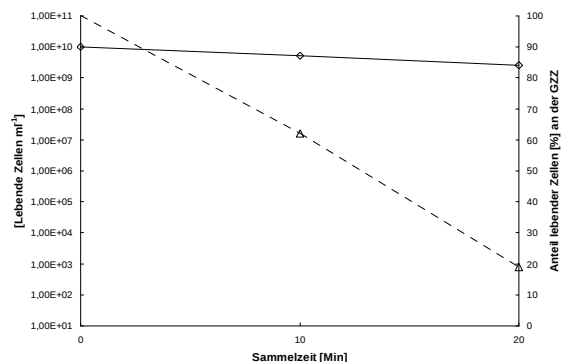
3.4. Untersuchung der biologischen Sammeleffizienz für die Filtration am Beispiel ausgesuchter Stämme verschiedener Gattungen

Die Untersuchung der biologischen Sammeleffizienz für die Filtration wurde an ausgesuchten Stämmen (n=6) unterschiedlicher Gattungen nach Beaufschlagung mit verschiedenen Luftvolumina bestimmt. Dabei konnten starke Unterschiede für die untersuchten Stämme in Abhängigkeit vom beaufschlagten Luftvolumen gefunden werden (Abbildung 16).

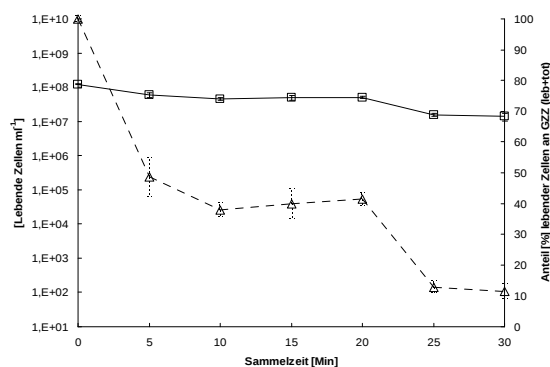
Escherichia coli DSM 30083^T



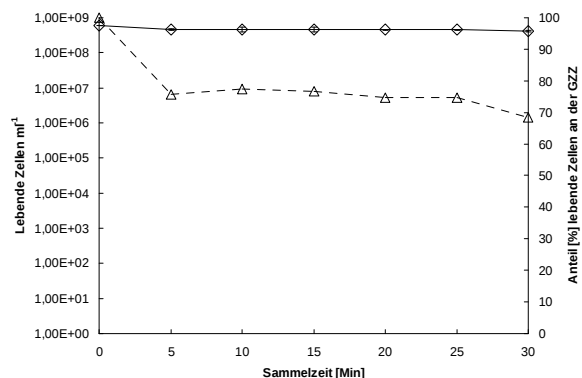
Salmonella Typhimurium CIP 60.62^T



Rhodotorula mucilaginosa DSM 70403^T



Micrococcus luteus DSM 20030^T



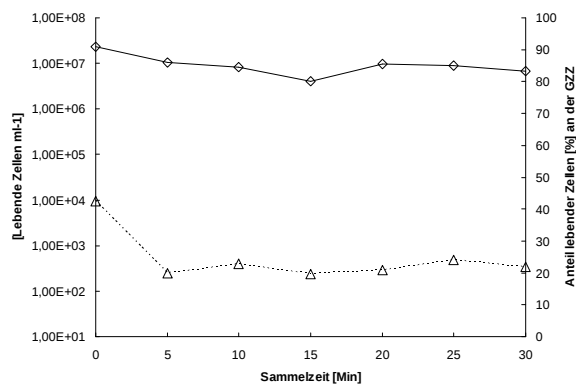
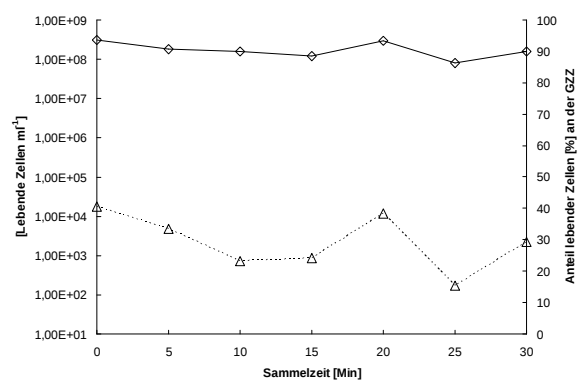
Mycobacterium aurum NC 10437^T*Bacillus subtilis* DSM 10^T

Abbildung 16 Verlauf des Anteils der als lebend detektierten Zellen an der GZZ (lebend+tot) für unterschiedliche Stämme ([%]; Δ , absolut $\diamond$) in Abhängigkeit vom mittels Filtration beaufschlagten Luftvolumen (max. 0,3 m³, hier angegeben als Beaufschlagungszeit in Minuten). Dargestellt sind Mittelwerte aus n= 20 mikroskopischen Gesichtsfeldern $\pm$ SA. Die Anteile lebender und toter Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch nach Live/Dead Färbung ermittelt und jeweils in Relation zur Gesamtzellzahl (lebende +tote Zellen) gesetzt.

Am auffälligsten war der Einfluss der Sammlung für Zellen des Stammes *Escherichia coli* DSM 30083^T. Hier nahm der Anteil lebender Zellen innerhalb von 5 Minuten Beaufschlagung von 100% auf 20% ab, nach 10 Minuten wurden keine Zellen mehr als lebend detektiert (Abbildung 16).

Für *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T wurde ein ähnlich starker Einfluss detektiert. Hier wurden nach 5 Minuten Beaufschlagung 45% und nach 20 Minuten 82% der Zellen als tot detektiert.

Für den Stamm *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 70403^T wurde eine stetige Abnahme des Anteils lebender Zellen beobachtet. Der Anteil sank im Verlauf der Beaufschlagung von 100% auf 11% ab, wobei die stärkste Abnahme (48%) lebender Zellen nach 5 Minuten Luftsammlung beobachtet wurde.

Bei *Micrococcus luteus* DSM 20030^T wurde nur nach 5-minütiger Sammlung eine plötzliche Abnahme der Lebendzellzahl beobachtet. Anschließend blieb der Anteil lebender Zellen bis zum Ende der Beaufschlagung gleich.

Für *Mycobacterium aurum* NC 10437^T und *Bacillus subtilis* DSM 10^T blieb der Anteil lebender Zellen im Zeitverlauf relativ ähnlich. Allerdings wurde hier schon zu Beginn nur ein niedriger Anteil lebender Zellen quantifiziert.

Es konnte keine Korrelation von GZZ (lebend+ tot) und der Lebendzellzahl für alle Stämme festgestellt werden.

3.5. Untersuchung der Zusammensetzung der bakteriellen Artengemeinschaft mittels Kultivierung und molekularbiologischer Methoden

Zur Bestimmung der bakteriellen Artengemeinschaft in Tierstall-Bioaerosolen wurden mittels Kultivierung Isolate gewonnen bzw. direkt aus denselben Bioaerosolproben die phylogenetische Einordnung anhand der Sequenzierung des 16S rRNA Gens vorgenommen.

3.5.1. Kultivierungsabhängiger Ansatz

Bei Probennahme 3 wurden Differenzierungsmedien zur Erfassung unterschiedlicher Mikroorganismen-Gruppen eingesetzt. Dazu wurde neben CASO-Medium das für die Gruppe der *Enterobacteriaceae* spezifisch geltende McConkey Medium und für die Gruppe der Aktinomyzeten das Aktinomyzeten-Isolations-Medium (AIM) eingesetzt.

Die Konzentration der gesamten aeroben, heterotrophen Bakterien, kultiviert auf CASO Medium, lag in Stall 1 (Filtration: 2×10^5 ; Impingement: $9,5 \times 10^4$ KBE m^{-3}) leicht unter der in Stall 2 (Filtration: $7,1 \times 10^5$, Impingement: $6,3 \times 10^5$ KBE m^{-3}) detektierten Konzentration. Dies entspricht einem Anteil von 4,9% (Stall 1) und 16,7% (Stall 2) für die Filtrations- bzw. 2,3% (Stall 1) und 14,9% (Stall2) für die Impingementproben an der korrespondierenden GZZ. Das für die Gruppe der *Enterobacteriaceae* spezifisch geltende McConkey Medium zeigte sehr unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von der Probe. So konnten keine gewachsenen Kolonien für die Impingementproben detektiert werden. Für die Filtrationsproben lag die Konzentration in Stall 1 mit $3,1 \times 10^3$ KBE m^{-3} (0,08% an der GZZ) weit unter der in Stall 2 mit $2,6 \times 10^6$ KBE m^{-3} detektierten Konzentration (62,2% an der GZZ).

Auf dem Aktinomyzeten-Isolations Medium-wurden sehr ähnliche Ergebnisse für beide Ställe und beide Luftsammelmethoden detektiert. Hier konnten Konzentrationen von $1,0 \times 10^5$ (Stall 1) und $2,7 \times 10^5$ (Stall 2) KBE m^{-3} (Filtration) bzw. $3,3 \times 10^4$ und 7×10^4 KBE m^{-3} (Impingement) quantifiziert werden. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen sind in Abbildung 17 dargestellt.

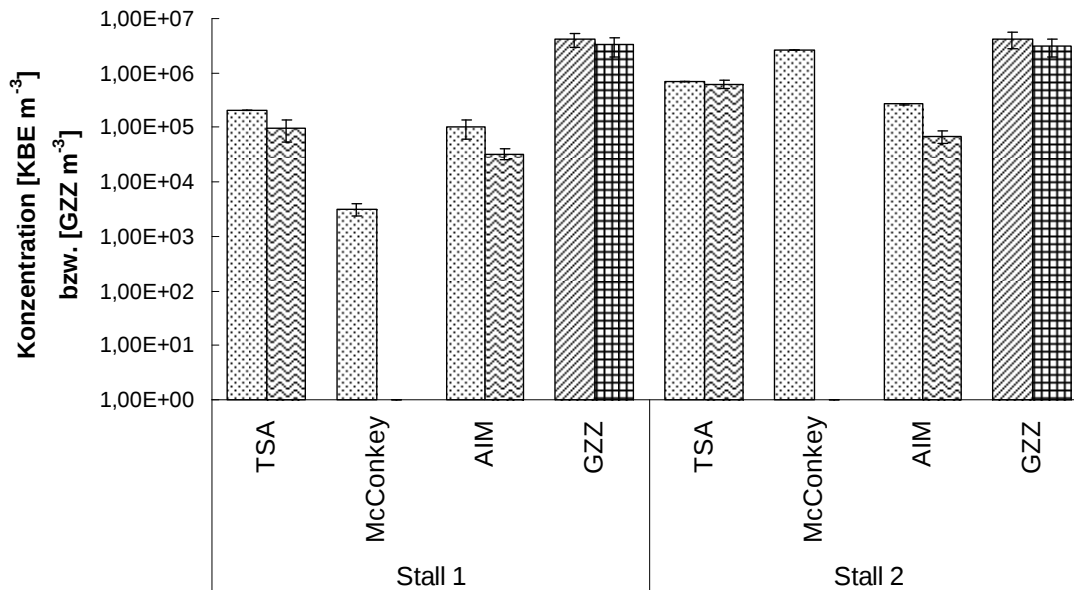


Abbildung 17 Darstellung der Konzentrationen [KBE m⁻³ Luft], ermittelt nach Bioaerosol-Probennahme mittels Filtration (▨) und Impingement (▩), in Abhängigkeit vom verwendeten Medium für Stall 1 und 2 bei Probennahme 3 (Puten). Angegeben sind Mittelwerte aus n=3 Parallelen ± SA. Zusätzlich ist die GZZ für die Filtrations- (▧) und Impingement-Proben (▩) dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte aus n=20 Gesichtsfeldern (GZZ) ± SA.

Zur näheren Differenzierung wurden Isolate von den zur Quantifizierung verwendeten Nährmedienplatten gewonnen. So sollte ein genauerer Einblick in die Artenzusammensetzung der mittels Kultivierung erfassten Organismen erhalten werden.

Insgesamt wurden 28 Isolate durch die kultivierungsabhängige Analyse gewonnen. Diese konnten nach der Sequenzierung des 16S rRNA Gens insgesamt 19 Arten zugeordnet werden. Die Gensequenzen zeigten am häufigsten die höchste Ähnlichkeit zu Sequenzen von Arten der Gattung *Nocardiosis* (n=4) und *Bacillus* (n=4) sowie der Art *Brevibacterium stationis* (n=3). Fünf Isolate wiesen die höchste 16S rRNA Gen Sequenzähnlichkeit zu Arten mit potentielltem Gesundheitsrisiko auf (TRBA466 [74] in Risikogruppe 2 eingeordnet): *Aerococcus viridans*, *Acinetobacter johnsonii* (n=2), *Pantoea agglomerans* und *Shigella flexneri*. Es wurde für kein Isolat eine Sequenzähnlichkeit zu Salmonellen nachgewiesen. Insgesamt konnte für Stall 2 eine höhere Diversität beobachtet werden als für Stall 1. Eine Übersicht über alle gewonnen Isolate und deren nächst verwandte Art ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15 Übersicht über die gewonnenen Isolate. Angegeben sind die Quelle des Isolats, dessen Nummer, die Bebrütungstemperatur sowie die durch Analyse des 16S rRNA Gens erhaltene nächst verwandte Spezies mit zugehöriger Accession Nummer, die Sequenzähnlichkeit (%) und die Einordnung dieser Spezies in die Risikogruppe nach TRBA 466.

Quelle	Isolat Nr.	Temp.	Nächst verwandte Spezies	Acc. No.	Sequenz Ähnlichkeit %*	Risiko Gruppe**
Stall 1	MPA-34	37°C	<i>Aerococcus viridans</i>	M58797	100	2, TA
	MPA-31	37°C	<i>Bacillus</i> sp.		n. d.	
	MPA-23	37°C	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	AJ415377	100	1
	MPA-26	37°C	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	D83361	99.83	1, +
	MPA-35	37°C	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i>	AF527483	99.92	1
	MPA-16B	26°C	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	X81663	99.77	2
	MPA-06C	26°C	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	X81663	99.77	2
	MPA-13A	26°C	<i>Bacillus</i> sp.		n. d.	
	MPA-29	37°C	<i>Bacillus</i> sp.		n. d.	
	MPA-28	50°C	<i>Bacillus</i> sp.		n. d.	
Stall 2	MPA-11	26°C	<i>Brevibacterium stationis</i>	AJ620367	100	1
	MPA-08	26°C	<i>Brevibacterium stationis</i>	AJ620367	100	1
	MPA-27	37°C	<i>Brevibacterium stationis</i>	AJ620367	100	1
	MPA-32	37°C	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	46753/X80629	100	1
	MPA-18	26°C	<i>Glycomyces arizonensis</i>	AY462042	97.06	n. a.
	MPA-33	37°C	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>	AY028926	98.40	1
	MPA-09	26°C	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	AM040156	99.10	n. a.
	MPA-03	26°C	<i>Microbacterium indicum</i>	AM158907	98.00	n. a.
	MPA-12	26°C	<i>Nocardiopsis alba</i>	X97883	100	1
	MPA-07	26°C	<i>Nocardiopsis alba</i>	X97883	99.77	1
	MPA-14A	26°C	<i>Nocardiopsis prasina</i>	X97884	99.77	1
	MPA-06A1	26°C	<i>Nocardiopsis prasina</i>	X97884	99.77	1
	MPA-20B	37°C	<i>Pantoea agglomerans</i>	AF130953	99.54	2
	MPA-17	26°C	<i>Rathayibacter festucae</i>	AF159365	99.91	1
	MPA-02	26°C	<i>Rhodococcus fascians</i>	X79186/X81930	100	1
	MPA-22A2	37°C	<i>Shigella flexneri</i>	X96963	99.57	2
	MPA-05	26°C	<i>Streptomyces</i> sp.		n. d.	
	MPA-30	37°C	<i>Streptomyces</i> sp.		n. d.	

* = Berechnung basiert auf multiplem Alignment von ca. 1300 bp des 16S rRNA Gens

** = Nach der Technischen Richtlinie für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 466)

n. d. = Die 16S rRNA Gen Sequenz Analyse führt nur auf Gattungsebene zu einer zweifelsfreien Zuordnung.

3.5.2. Molekularbiologischer Ansatz

Die durch die kultivierungsunabhängige Klonierungsanalyse gefundenen 16S rRNA Gensequenzen mit der höchsten Abundanz zeigten höchste Sequenzähnlichkeit zu Sequenzen der Gattungen *Aerococcus*, *Lactobacillus* und *Megamonas*. Die Dominanz dieser Gattungen innerhalb der Klonbibliotheken konnte für beide Probenahmeorte unabhängig von der Sammelmethode gezeigt werden. Weiterhin

konnte in allen Klonbibliotheken ein hoher Anteil Sequenzen gefunden werden, die höchste Ähnlichkeit zu Sequenzen zeigten, die aus bislang nicht kultivierten („uncultured“) Organismen gewonnen wurden. Auffällig war dabei, dass alle Sequenzen mit der höchsten Ähnlichkeit anhand molekularbiologischer Methoden aus Geflügeldarminhalten gewonnenen wurden. Ähnlichkeiten zu Sequenzen der Gattung *Salmonella* konnten in keiner der Klonbibliotheken nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Klonierungsanalysen sind in Abbildung 18 dargestellt.

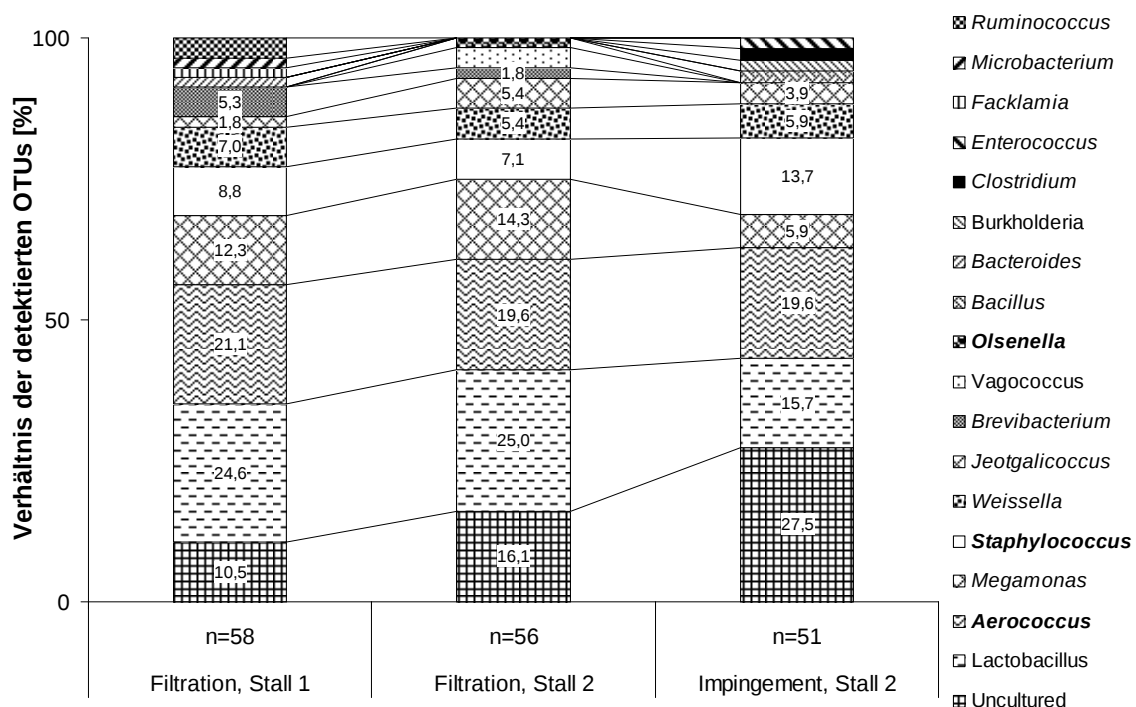


Abbildung 18 Verteilung der 16S rRNA Gensequenzen aus Klonbibliotheken, generiert aus Bioaerosolproben zweier Putenställe von Probenahme 3. Die Proben wurden mittels Filtration bzw. Impingement gesammelt. Die Zahlen geben die prozentualen Anteile in Relation zur Anzahl der gesamt analysierten Klone an. Fett markierte Gattungsnamen beinhalten Klonsequenzen, die zu Risikogruppe 2 eingeordneten Organismen nächst verwandt sind (16S rRNA Gen, Ergebnisse basieren auf ~900 bp).

3.5.2.1. Rarefaction Analyse

Es wurde eine Rarefaction Analyse durchgeführt, um zu prüfen, ob mit den hier generierten Klonbibliotheken ausreichend Klone zur Darstellung der Spezies-Abundanz untersucht wurden. Das Ergebnis zeigte für die einzelnen aus unterschiedlichen Bioaerosolproben generierten Klonbibliotheken (Filtration Stall 1 n=58; Filtration Stall 2, n=56; Impingement Stall 2, n=51) eine Sättigung der Kurven (Abbildung 19, A). Auch bei Einrechnung aller untersuchten Kloninserts (n=165)

wurde eine asymptotische Annäherung erreicht (Abbildung 19, B). Damit wurden ausreichend Klonsequenzen untersucht.

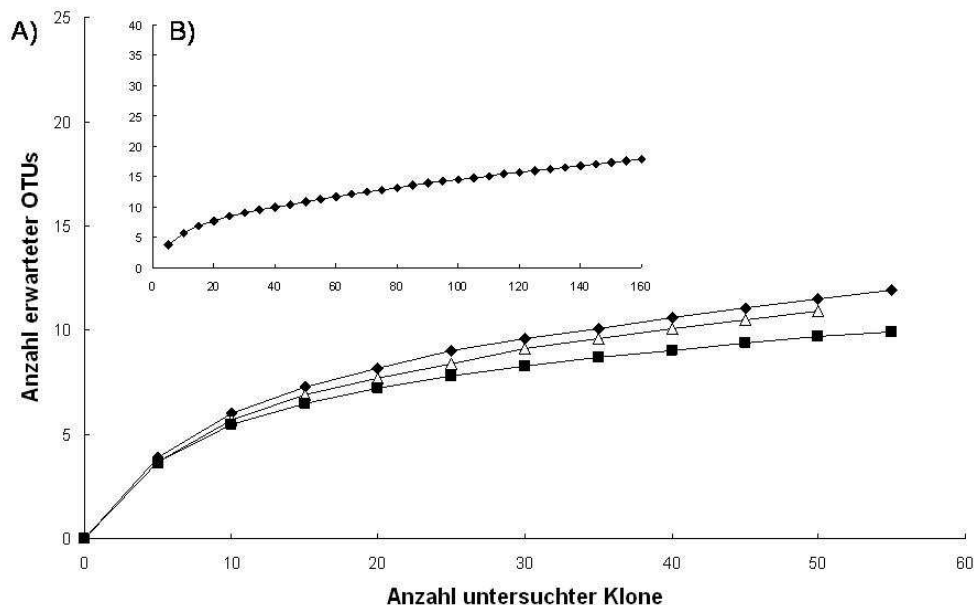


Abbildung 19 A) Rarefaction Kurve zur Darstellung der Biodiversität innerhalb der untersuchten 3 Klonbibliotheken, generiert aus Bioaerosolproben zweier Putenställe. Die Bioaerosolproben wurden mittels Filtration (◆ Stall 1, n=58; ■ Stall 2, n=56) und Impingement (△ Stall 2, n=51) gesammelt. OTU's waren definiert als Gruppen von Sequenzen, die Sequenzunterschiede von weniger als 2% zeigten. B) Rarefaction Kurve aller 164 untersuchten 16S rRNA Gensequenzen, generiert aus Bioaerosolproben.

3.6. Nachweis infektiöser Organismen: Etablierung des Nachweises der Gattung *Salmonella* aus Bioaerosolproben anhand quantitativer PCR

Als Modellorganismus zum Nachweis eines infektiösen Erregers wurde die Gattung *Salmonella* gewählt. Salmonellen wurden mehrfach in Bioaerosolen an landwirtschaftlichen Arbeitsplätzen detektiert [80, 81, 161, 162]. Die Gattung bietet den Vorteil, dass ihre Vertreter anhand spezieller Differenzierungsmedien kultivierungsbasiert nachweisbar sind und damit ein Vergleich der Ergebnisse möglich ist.

3.6.1. DNA-Extraktionseffizienz für die Gattung *Salmonella*

3.6.1.1. Vergleich der DNA-Extraktionseffizienzen für die Extraktionen nach HENCKEL [150] und PITCHER et al. [141]

Zur Ermittlung der DNA-Extraktionseffizienz wurden zwei Protokolle erprobt und deren Effizienz verglichen. Die Methoden unterschieden sich grundsätzlich hinsichtlich des Trenn-Prinzips von Proteinen, Zellbestandteilen und der DNA. Dabei

wurde für das Protokoll nach HENCKEL [150] im Mittel eine Effizienz von 4,17% ermittelt, während das Protokoll nach PITCHER *et al.* [141] im Mittel eine Effizienz von 16,73% aufwies (Abbildung 20).

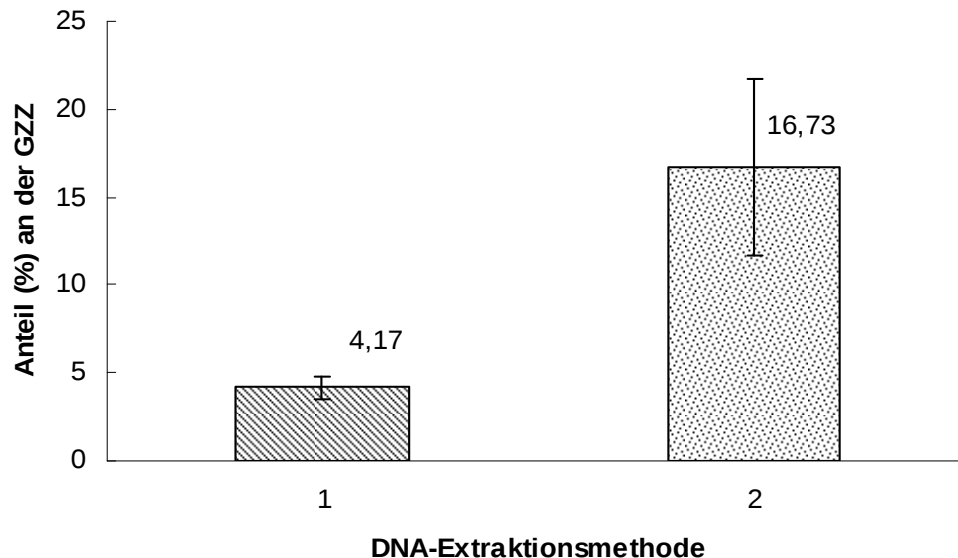


Abbildung 20 Darstellung der DNA-Extraktionseffizienz in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmethode (1= Extraktion nach HENCKEL [150], 2= Extraktion nach PITCHER *et al.* [141]). Dabei wurde die eingesetzte Zellzahl gleich 100% gesetzt und zur anhand der erhaltenen DNA Menge äquivalente Anzahl Zellen/Genome in Relation gestellt. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=11 (Methode 1) bzw. n=20 (Methode 2) $\pm$ SA.

3.6.1.2. DNA-Extraktionseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl

Die weitere Untersuchung der DNA-Extraktionseffizienz für das Protokoll nach Pitcher *et al.* [141] zeigte in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellkonzentration unterschiedliche Resultate. Die höchste Effizienz wurde unter Einsatz von etwa 10^8 Zellen in den Extraktionsansatz ermittelt. Mit Zunahme der eingesetzten Zellzahl nahm die Extraktionseffizienz ab, bis sie bei Einsatz von etwa 10^{10} Zellen bei nahezu 0 lag (Abbildung 21). Bei Einsatz von weniger Zellen als 10^7 Zellen pro Ansatz konnte keine DNA mehr ausgefällt werden (Abbildung 21).

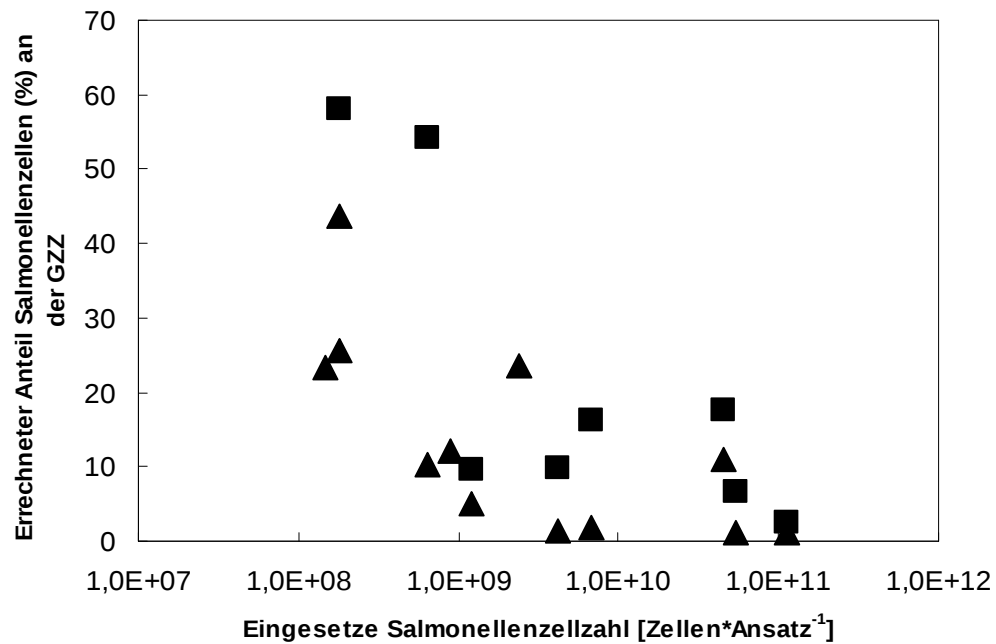


Abbildung 21 Darstellung der DNA-Extraktionseffizienz [%] als Anteil der wiedergefundenen Zelläquivalente an der tatsächlich eingesetzten Zellzahl. Die Zelläquivalente wurden aufgrund der bekannten Genomgröße von *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T aus den photometrisch (■) bzw. fluorometrisch (▲) gemessenen DNA Konzentrationen nach der DNA Extraktion ermittelt.

3.7. Etablierung des Primersystems zum spezifischen Nachweis von *Salmonella* sp.

Auf Basis des 16S rRNA-Gens ließ sich nach intensiver *in-silico* Analyse kein spezifisches Primersystem finden, da sich keine Differenzierungsmöglichkeiten zu Sequenzen anderer Gattungen ergaben. Problematisch waren vor allem Sequenzen der Gattung *Escherichia*, die einen hohen Grad an Sequenzähnlichkeit aufwiesen. Aus diesem Grund wurde das von RAHN *et al.* [153] etablierte Primersystem zur Detektion des *invA* Gens getestet. Dieses Gen ist spezifisch für die Gattung *Salmonella* [163] und somit ein geeignetes Zielgen zur Identifizierung. Die Amplifikation in einer Standard-PCR unter Einsatz von DNA extrahiert aus den in dieser Arbeit verwendeten Spezies der Gattung *Salmonella* (n=5, Tabelle 7) zeigte spezifische Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Abbildung 22).

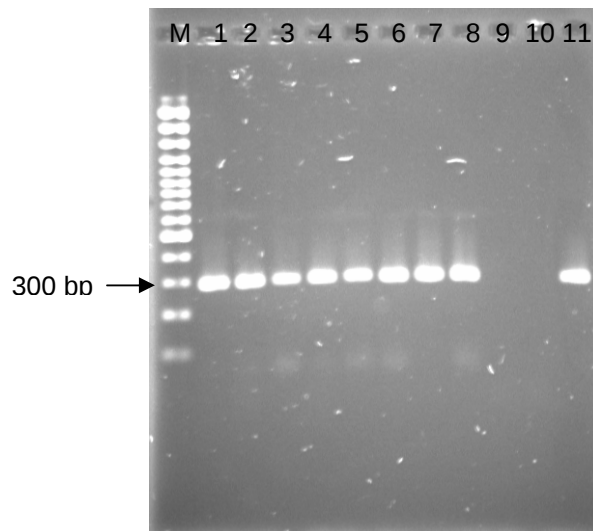


Abbildung 22 PCR-Produkte amplifiziert mit dem 139/141 Primersystem [153] in einer Standard-PCR (Tabelle 8) aus DNA-Extrakten von 1, 2=*Salmonella enterica* subsp. *arizonae* CCUG 1743, 3, 4=*Salmonella enterica* subsp. *arizonae* CCUG 29867, 5, 6= *Salmonella* Enteritidis CCUG 32352, 7, 8= *Salmonella* Choleraesuis CCUG 49677^T, 9=Wasser, 10=*Escherichia coli* ATCC 25922^T, 11=*Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die Banden haben eine Größe von 248 bp. Zum Vergleich ist die 300 bp Bande des 100 bp-Fragmentgrößenmarkers gekennzeichnet.

3.7.1. Etablierung der Realtime PCR zum spezifischen Nachweis sowie der Quantifizierung der Gattung *Salmonella*

Die Grundlage zur Quantifizierung unbekannter Zellkonzentrationen des Zielorganismus ist die Etablierung einer Eichgerade mit bekannten Konzentrationen des Zielorganismus. Da in Umweltproben die gesamte genomische DNA als Ausgangsbasis der Amplifikation zur Verfügung steht, wurde auch in den Etablierungsansätzen genomische DNA in der Realtime PCR eingesetzt, um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu haben. Die dazu verwendeten DNA Extrakte wurden aus einer in der stationären Wachstumsphase befindlichen Reinkultur *Salmonella* gewonnen, um sicher zu stellen, dass ein *invA* Zielgen pro Genom vorhanden ist. Die erfolgreiche und spezifische Amplifikation wurde unter Verwendung der in Tabelle 9 angegebenen Bedingungen erreicht. Um eine höhere Reproduzierbarkeit zu erreichen, auch im Hinblick auf eine eventuelle Standardisierung, wurde die Etablierung unter Verwendung eines kommerziellen Kits zur Realtime PCR-Amplifikation (ABGene Absolute QPCR SYBR Green Mix, AbGene, UK) durchgeführt. Dabei konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten *invA* Gen Konzentration und dem korrespondierenden C_T -Wert detektiert werden (Abbildung 23, A). Die Reaktionseffizienz betrug dabei 0,9. Zusätzlich wurde die Spezifität der PCR-Produkte durch eine Schmelzkurve

(Abbildung 23, B) bzw. eine Agarosegelelektrophorese nachgewiesen (Abbildung 23, C).

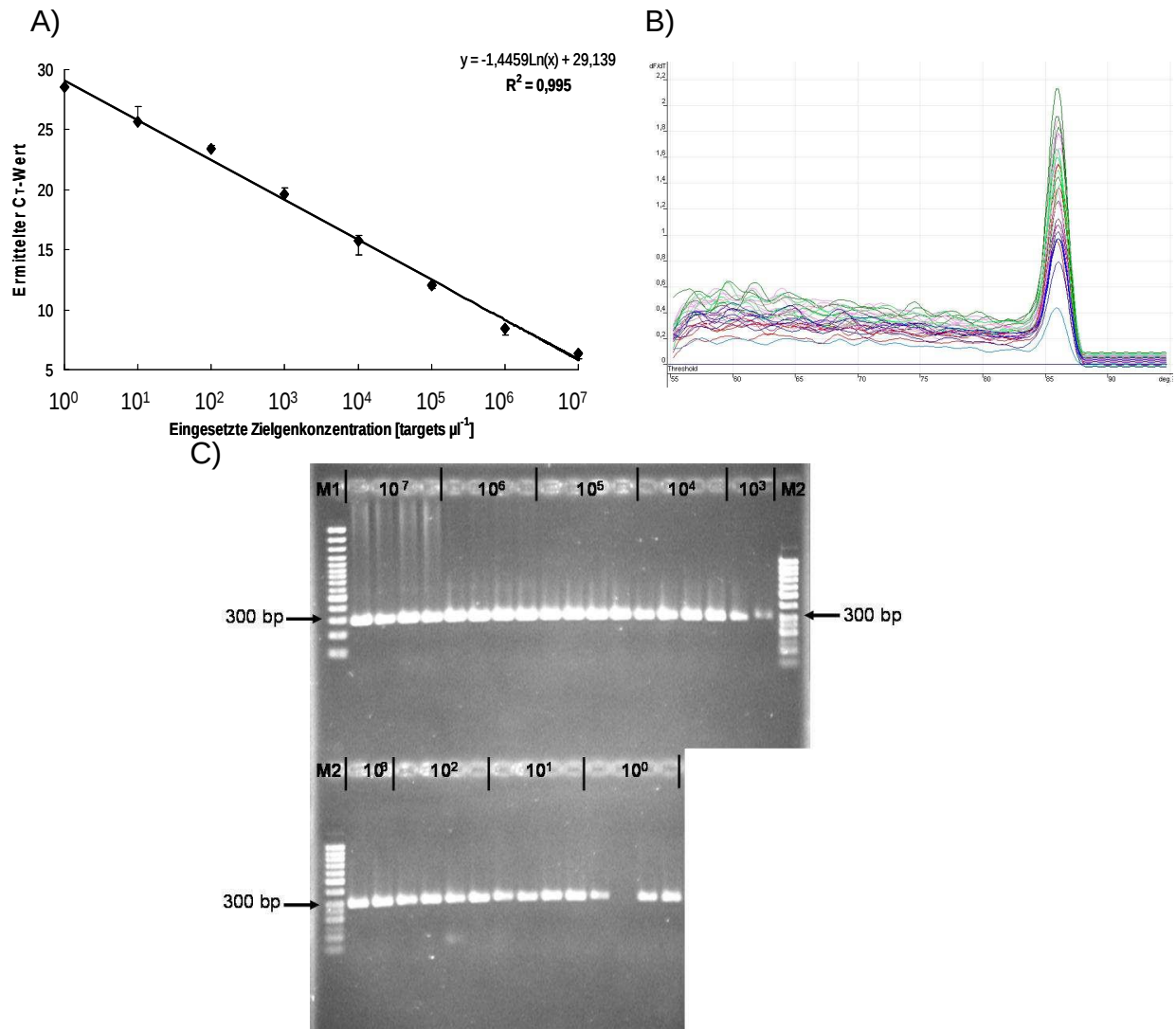


Abbildung 23 Etablierung der zur Quantifizierung notwendigen Eichgerade. A) Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen der eingesetzten Zielgen-Konzentration [targets μl^{-1}] und der zugehörigen C_T-Werte. B) Darstellung der Spezifität der PCR-Produkte anhand der Schmelzkurve als 1. Ableitung der Fluoreszenzintensitätsänderung in Abhängigkeit von der Temperatur [ds/dT]. C) PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Dargestellt sind abnehmende Konzentrationen von 10^7 bis 10^0 *invA* Gen targets μl^{-1} in vierfach-Ansätzen. Die PCR-Produkte haben eine spezifische Größe von 248 bp. Zum Vergleich ist die 300 bp Bande des 100 bp Fragmentgrößenmarkers markiert.

3.7.2. Bestimmung der Wiederfindung von Salmonellen mittels quantitativer Realtime PCR

Um das bis hierhin etablierte Protokoll zum Nachweis von Salmonellen aus Bioaerosolproben zu validieren, wurden verschiedene Versuchsansätze zur Wiederfindung definierter Zellkonzentrationen durchgeführt. Insgesamt sollten so die Einflüsse der unterschiedlichen Kontaminations- bzw. Verlustmöglichkeiten (Nicht-

Ziel-DNA, Bioaerosolbestandteile, DNA Extraktion) untersucht werden. Zunächst wurden definierte Zellzahlen eines Nicht-Zielorganismus (*Escherichia coli*) zusätzlich zum Extraktionsansatz zugegeben und daraus die Wiederfindung der Salmonellen bestimmt. Anschließend wurde zu DNA Extrakten, gewonnen aus Bioaerosolen eines Kuhstalles, DNA mit bekannter *invA* Zielgenkopienzahl dazu gegeben und auch hier deren Wiederfindung bestimmt. Anschließend wurde je eine originäre Bioaerosolprobe aus einem Putenstall (Impingement und Filtration) mit definierten Zellzahlen Salmonellen versetzt und deren Wiederfindung bestimmt.

3.7.2.1. Bestimmung der Wiederfindung von Salmonellen unter Zugabe definierter Zellzahlen *Escherichia coli* (Nicht-Zielgen-DNA)

Unter Zugabe definierter Zellzahlen *Escherichia coli* ATCC 25922^T wurde die Wiederfindung verschiedener Konzentrationen Salmonellen ermittelt. Hierbei ergab sich eine positive Korrelation zwischen eingesetzter *Salmonella* Zell-Konzentration und detektierter *invA* Gen-Anzahl ($R^2=0,99$, Abbildung 24, linke y-Achse). Weiterhin betrug die Wiederfindung im Mittel $22,3\% \pm 4,8\%$ SA (Abbildung 24; Wiederfindungsrate [%] rechte y-Achse).

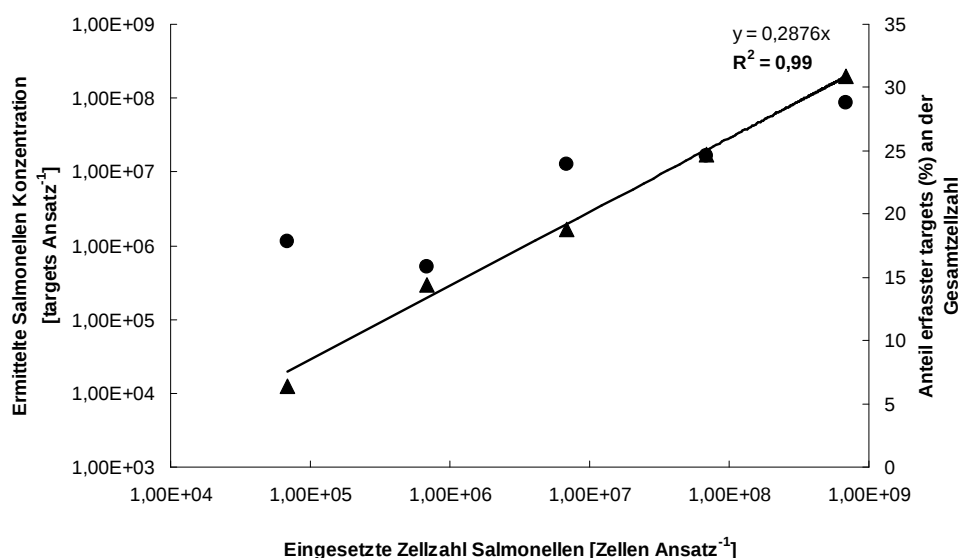


Abbildung 24 Darstellung der Wiederfindung von Salmonellen Zielgenen (absolut [Zielgene Ansatz⁻¹], linke Y-Achse ▲; bzw. anteilig [%], rechte Y-Achse ●) unter Zugabe von *Escherichia coli* ATCC 25922^T Zellen (Nicht-Ziel-DNA) in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl Salmonellen. Zusätzlich ist der lineare Zusammenhang für die absoluten Werte durch eine Regressionsgerade unter Angabe des Bestimmtheitsmaßes R^2 dargestellt.

3.7.2.2. Wiederfindung definierter Salmonellen Zellzahlen unter Zugabe von DNA Extrakten extrahiert aus Milchviehstall-Bioaerosolproben

Unter Zugabe von DNA Extrakten extrahiert aus Milchvieh-Bioaerosolproben konnte kein hemmender Einfluss ermittelt werden. Die Wiederfindung betrug hier im Mittel $92\% \pm 28\%$ SA. Die eingesetzte Zellzahl korrelierte positiv mit den wieder gefundenen *Salmonella invA* Gen Konzentrationen ($R^2=0,99$, Abbildung 25).

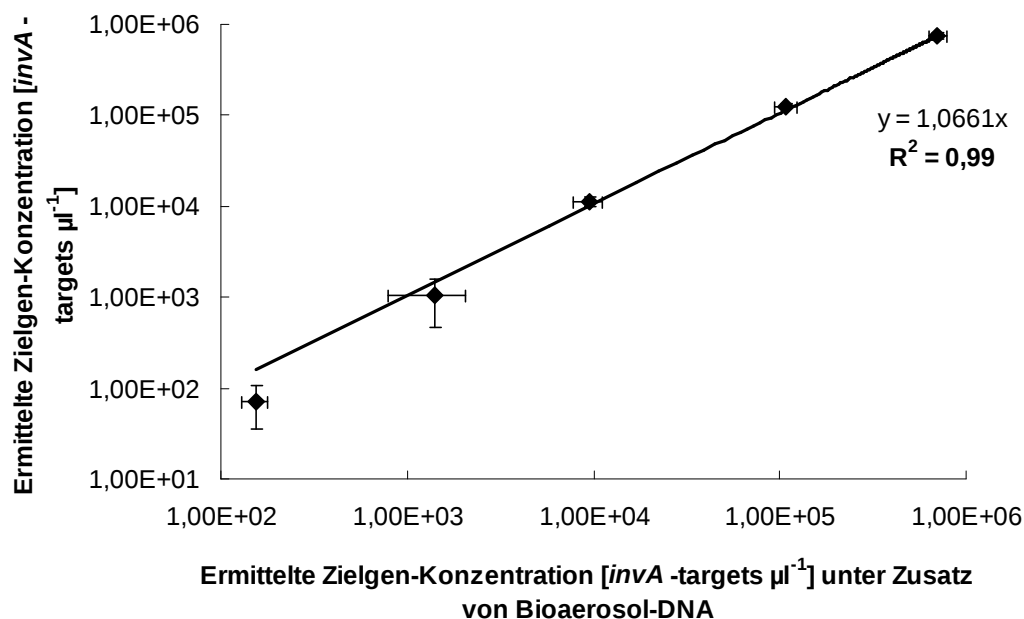


Abbildung 25 Darstellung der Wiederfindung von Salmonellen *invA* Zielgenen [Zielgene µl⁻¹] (◆) unter Zugabe von DNA extrahiert aus Bioaerosolen eines Milchviehstalles in Abhängigkeit von der eingesetzten Zielgen-Konzentration. Zusätzlich ist der lineare Zusammenhang durch eine Regressionsgerade unter Angabe des Bestimmtheitsmaßes R^2 dargestellt.

3.7.2.3. Untersuchungen zur Wiederfindung von Salmonellen in Bioaerosolproben

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Salmonellen anhand der Realtime PCR wurden definierte Zellzahlen zu Bioaerosolproben aus einem Putenstall gegeben. Dazu wurden nach Gewinnung der Zellen aus den Proben und DNA Extraktion Aliquots des DNA Extraktes einer Realtime PCR unterzogen und die eingesetzte Zellzahl und die wieder gefundene äquivalente target-Konzentration bestimmt und verglichen. Hierbei ergaben sich Unterschiede in Abhängigkeit von der Luftsammelmethode. Für die mittels Filtration gesammelte Bioaerosolprobe ergab

sich eine Wiederfindung von 24%, während sich für die Impingementprobe eine Wiederfindung von 66% ergab (Abbildung 26).

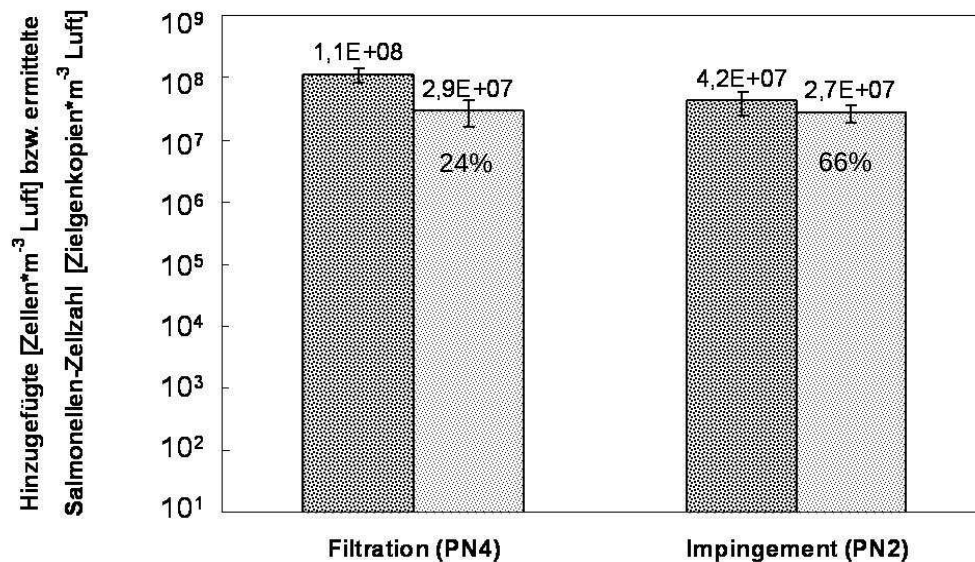


Abbildung 26 Zu einer Impingement- und einer Filtrationsprobe zugesetzte (■) und wieder gefundene (□) *Salmonella* Zell-Konzentrationen nach deren Aufarbeitung. Die Konzentrationsbestimmung nach der Aufarbeitung wurde anhand des in dieser Arbeit etablierten Realtime PCR Protokolls durchgeführt. Dabei basierte die Berechnung der Zellkonzentration auf der Annahme eines *invA* Gens pro *Salmonella* Genom/Zelle einer stationären Kultur.

3.7.3. Anwendung des etablierten Protokolls zur Detektion und Quantifizierung von Salmonellen an Bioaerosolproben unterschiedlicher Arbeitsplätze

Nach Etablierung des Protokolls zum Nachweis von Salmonellen wurden unterschiedliche Bioaerosolproben aus verschiedenen Putenställen und einem Masthähnchenstall sowie unterschiedlichen Räumen in der Mastentenproduktion einer Analyse unterzogen. Parallel wurden für alle Probennahmen (außer im Mastentenstall) kultivierungsbasierte Methoden zum Nachweis von Salmonellen durchgeführt.

Insgesamt wurden weder anhand der kultivierungsbasierten noch anhand der Realtime PCR Salmonellen in Bioaerosolproben der Putenställe gefunden. Nach Angaben des Betreibers der Anlage traten seit Jahren keine Erkrankungen durch Salmonellen bei den Tieren auf.

Bei der Untersuchung von Bioaerosolen des Masthähnchenstalles mit erkrankten Tieren konnten in einigen Proben luftgetragene Salmonellen nachgewiesen werden.

Dabei konnten allerdings nur bei den Filtrationsproben, sowohl durch die Realtime PCR als auch durch Kultivierung, Salmonellen nachgewiesen werden. Hier zeigten die parallel durchgeführten kultivierungsabhängigen Konzentrationsbestimmungen auf dem für Salmonellen spezifischen Wismut-Sulfit-Agar für die gleichen Proben, wie die Realtime PCR, positive Ergebnisse ($1,6 \times 10^5$ Zielgene m^{-3} Luft). Diese Konzentrationen lagen jedoch bis zu 3 Größenordnungen unter den durch die Realtime PCR bestimmten Konzentrationen ($3,3 \times 10^2$ KBE m^{-3} Luft, Abbildung 27). Durch die im Referenzstall durchgeführten Untersuchungen (keine Erkrankung der Tiere) konnten weder anhand kultivierungsbasierter, noch anhand molekularer Methoden Salmonellen nachgewiesen werden.

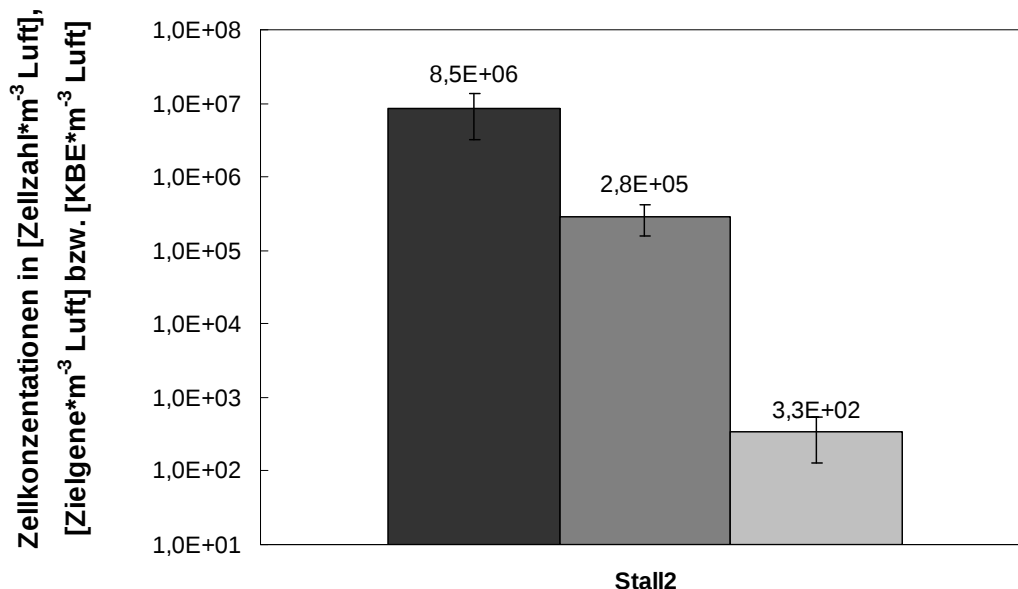


Abbildung 27 Darstellung der in einer Bioaerosolprobe, gesammelt mittels Impingement in einem Masthähnchenstall, detektierten GZZ Konzentrationen (■), sowie der korrespondierenden *invA* Gen Konzentrationen (■) und der KBE für Salmonellen auf WSA Medium (□). Dargestellt sind Mittelwerte aus $n=20$ mikroskopischen Gesichtsfeldern (GZZ), $n=4$ parallelen Realtime Quantifizierungen bzw. $n=3$ Parallelen (KBE) $\pm$ SA.

Weiterhin wurden mit dem so etablierten Protokoll Bioaerosolproben verschiedener Arbeitsplätze in der Entenmast (Brüterei, Mast, Schlachtung, Hofarbeiten) untersucht. Hierbei konnten in 13 von insgesamt 75 Proben (17,3%) spezifische *invA* Gen PCR-Produkte nachgewiesen werden. Die detektierten Konzentrationen lagen im Mittel zwischen $2,2 \times 10^1$ und $2,2 \times 10^6$ Zielgenen m^{-3} Luft (Abbildung 28). Es wurden nicht in allen Arbeitsbereichen Salmonellen nachgewiesen. In allen Hof- und Verwaltungsluftproben, also allen Stall-unabhängigen Bereichen, wurden keine

Salmonellen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden in Arbeitsplatz-Luftproben (personen-getragen), die direkt im Stall (Stallreinigung und Abluftreinigung), in direktem Kontakt mit den Tieren (Impfen) oder der Schlachtung (vor allem die „Hänger“ und „Stecher“) gewonnen wurden, Salmonellen in z. T. hohen Konzentrationen dokumentiert (Abbildung 28). Auch die Frequenz der nachgewiesenen Salmonellenkonzentrationen variierte in Abhängigkeit vom Arbeitsplatz. So wurde in 100% der Bioaerosolproben, die beim Impfen der Elterntiere, bei der Abluftreinigung sowie am Arbeitsplatz der „Stecher“ gewonnen wurden, Salmonellen detektiert (Abbildung 28).

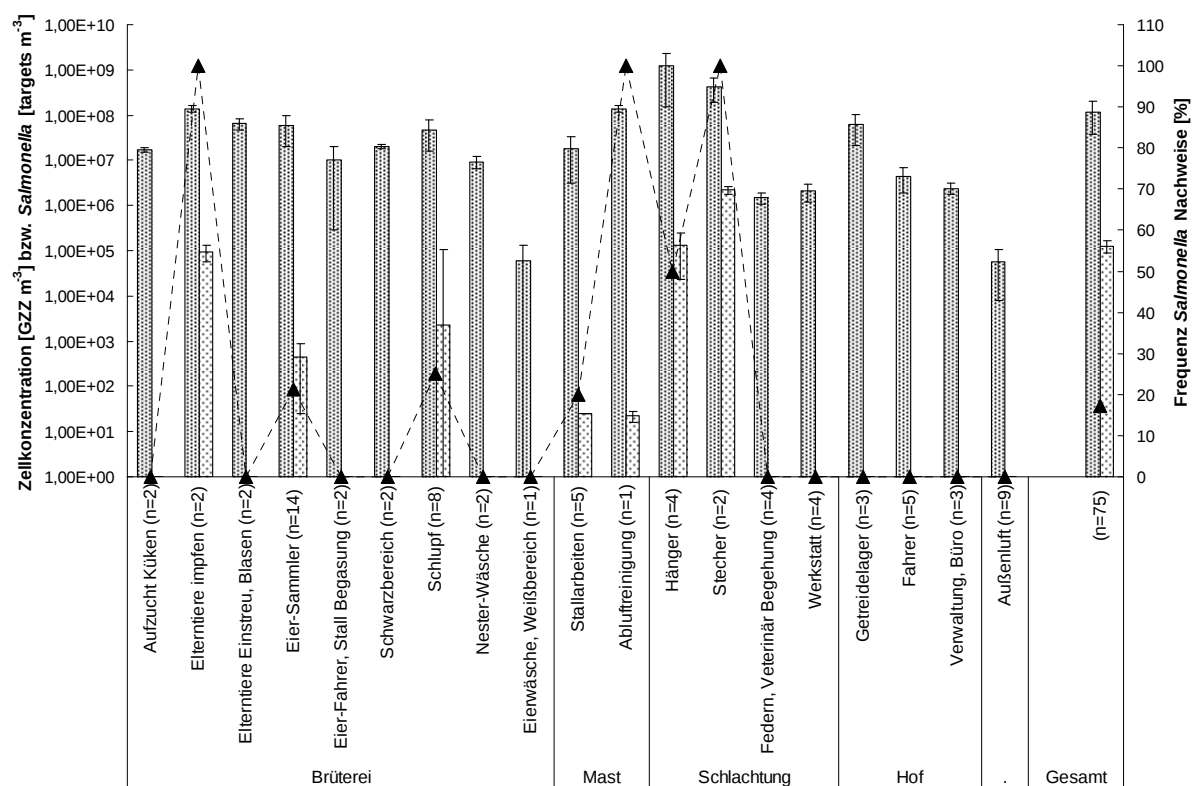


Abbildung 28 Ermittelte Gesamtzellzahl (▨; [GZZ m⁻³]) und korrespondierende *Salmonella* Zellzahl (▤; [targets m⁻³]; n=13) sowie deren auf den jeweiligen Stichprobenumfang errechnete Frequenz (▲; [%]) an verschiedenen Arbeitsplätzen in der Entenmast (Brüterei, Mast, Schlachtung, Hof; n_{Gesamt}=75). Dargestellt sind Mittelwerte aus n=20 mikroskopischen Gesichtsfeldern (GZZ) bzw. n=4 parallelen Quantifizierungen anhand einer Realtime PCR spezifisch für Salmonellen mit dem 139/142 Primersystem.

3.7.4. Nachweis der Spezifität der quantitativen PCR in komplexen Proben anhand Klonierung

Das Primersystem 139/141 nach RAHN *et al.* [153] wurde zur Analyse und zur Quantifizierung von Salmonellen aus Bioaerosolen mit Hilfe der Realtime PCR

verwendet. Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und der Gelelektrophorese zeigten die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte. Weiterhin wurde die Spezifität der PCR-Produkte, amplifiziert aus den DNA Extrakten der Bioaerosolproben, anhand einer *invA* Gen Klonbibliothek nachgewiesen. Diese PCR-Produkte zeigten eine Sequenzähnlichkeit zwischen 98,9% und 99,6% zu *invA* Gensequenzen von *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Typhimurium (EU348365; Abbildung 29).

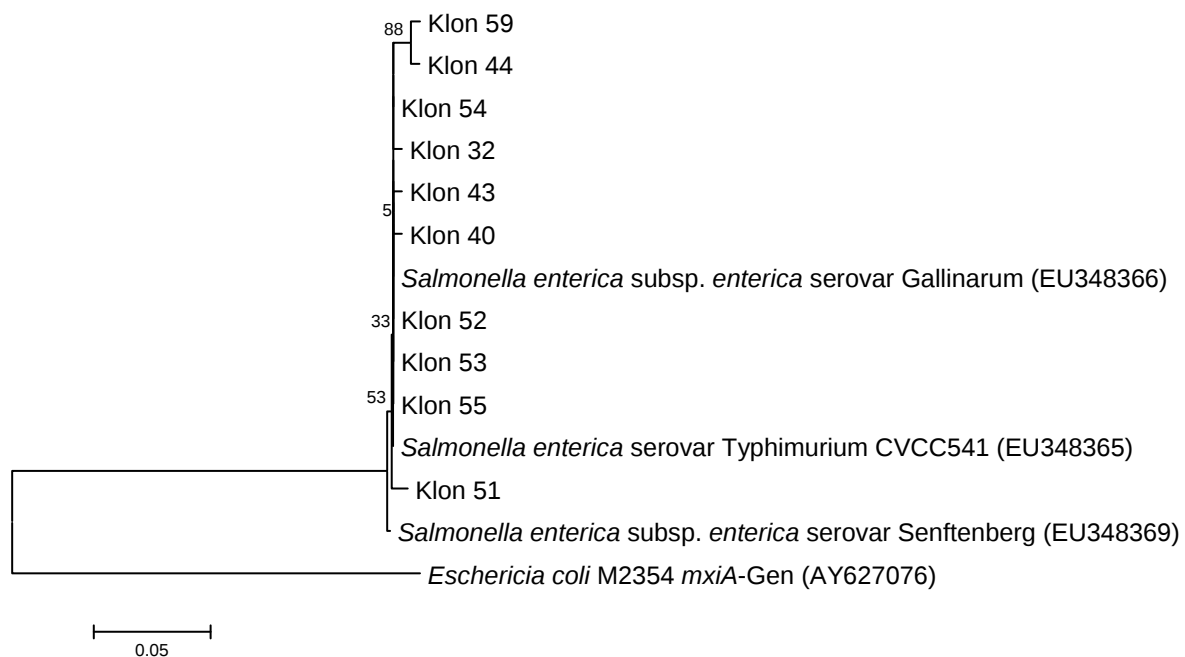


Abbildung 29 Neighbour-joining Baum, errechnet aus n=10 *invA* Gensequenzen (247 bp), die durch Klonierung von PCR-Produkten aus dem DNA Extrakt einer Bioaerosolprobe eines Masthähnchenstalles unter Verwendung des 139/141 Primersystems erhalten wurden. Als Vergleichssequenzen wurden die in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verfügbaren *invA* Gensequenzen der Gattung *Salmonella* verwendet. Zur Wurzelung des Baumes wurde die Sequenz des *mxiA*-Gens von *Escherichia coli* (M2354) verwendet. Die Accession-Nummern der Sequenzen sind in Klammern angegeben. Der Baum und die dazugehörigen Distanzen wurden anhand des Programms MEGA 4.0 erstellt. Die Stabilität der Äste wurde auf Basis von 1000 Wiederholungen abgesichert (bootstraps). Die Länge des Maßstabs entspricht 0,05 Nukleotid-Substitutionen pro Basenposition

3.8. Nachweis Allergie-Auslösender Organismen: Etablierung des Nachweises der Gattung *Thermoactinomyces* aus Bioaerosolproben anhand quantitativer PCR

Neben dem Nachweis eines infektiösen Erregers wurde zusätzlich der Nachweis eines Allergie-Auslösenden Organismus etabliert. Dazu wurde die Gattung *Thermoactinomyces* ausgewählt, da Vertreter dieser Gattung im Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen an Arbeitsplätzen stehen.

3.8.1. Bestimmung der Anzahl der 16S rRNA Operons für die Gattung *Thermoactinomyces* anhand des Blottings nach SOUTHERN [159]

Zur Quantifizierung von Zellen anhand spezifischer Gene muss zunächst bekannt sein, ob und in welcher Anzahl diese im Genom der zu detektierenden Spezies vorliegen. Eine verlässliche Aussage darüber kann, neben der Genomsequenzierung, anhand einer Southern-Blot-Analyse [159] vorgenommen werden.

Die Analyse zur Quantifizierung der 16S rRNA Operons wurde mit insgesamt 6 unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Auswertung ergab bei vier Enzymen sechs 16S rRNA Operons, und bei je einem Enzym fünf bzw. vier Operons für das 16S rRNA Gen (Abbildung 30). Fragmente kleiner als 1.500 bp wurden nicht berücksichtigt, da bei ihnen angenommen wurde, dass das Enzym innerhalb des Gens geschnitten hat. Eine zuvor durchgeführte *in-silico* Analyse hatte sichergestellt, dass die eingesetzten Enzyme laut ihrer Erkennungssequenz nicht innerhalb der Sequenz des 16S rRNA Gens von *Thermoactinomyces intermedius* 43846^T schneiden. Im Mittel ergibt sich so eine Operonzahl von 5,5 für das 16S rRNA Gen für *Thermoactinomyces intermedius* 43846^T. Diese Zahl wurde für im Folgenden für die gesamte Gattung angenommen und basierend auf diesem Ergebnis alle folgenden Quantifizierungen anhand der Realtime PCR vorgenommen.

Organismus: *Thermoactinomyces intermedius* DSM 43845^T

Restriktionsendonukleasen: 1/6=PstI, 2/7=PvuII, 3/8=SacI, 4/9=SmaI, 5/10=EcoRI, 6/11=Sall

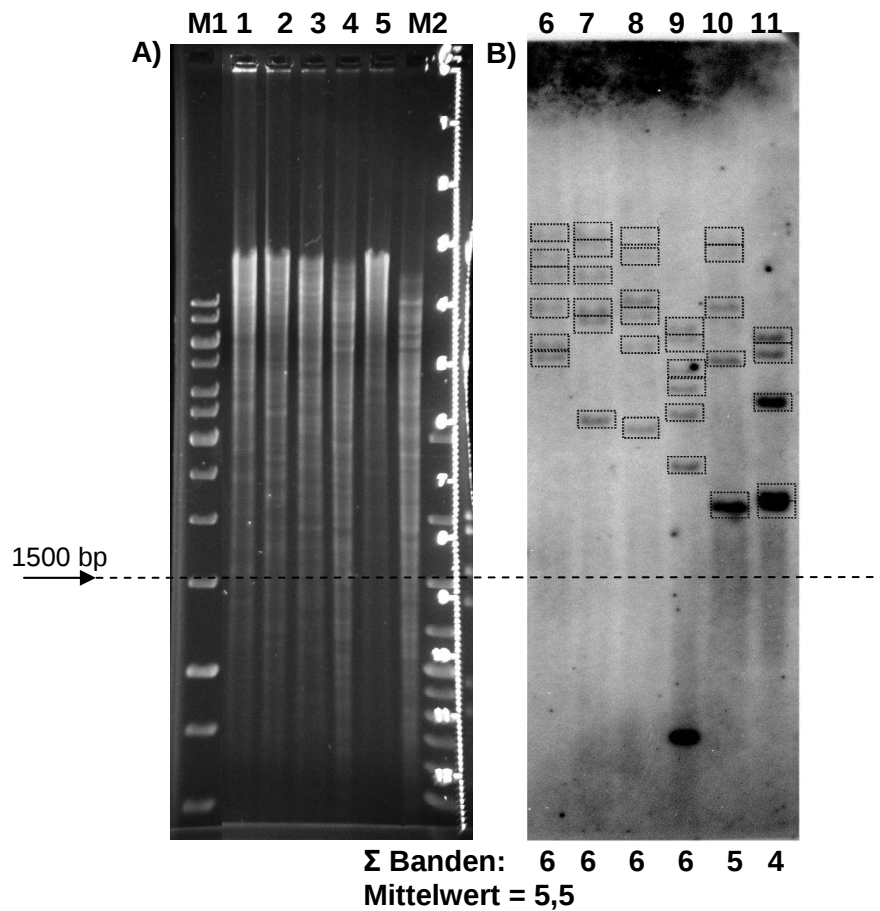


Abbildung 30 A) Mit verschiedenen Enzymen verdaute DNA von *Thermoactinomyces intermedius* DSM 43846^T nach gelelektrophoretischer Auftrennung. M1= 1kb Marker, M2= 100 bp Marker; Reihe 1-6: DNA *Thermoactinomyces intermedius* DSM 43846^T verdaute mit folgenden Enzymen: 1=PstI, 2=PvuII, 3=SacI, 4=SmaI, 5=EcoRI, 6=Sall. An der rechten Seite ist ein Maßstab von 1-12 cm zu erkennen. B) Ergebnis des Blots nach Chemilumineszenz-Detektion DIG-markierter spezifischer Gen-Abschnitte nach Verdau mit folgenden Enzymen: 6=PstI, 7=PvuII, 8=SacI, 9=SmaI, 10=EcoRI, 11=Sall. Deutlich sichtbare Banden sind markiert und unter der Abbildung für jedes Enzym summiert. Die gestrichelte Linie gibt die 1500 bp Fragmentgröße an, die durch einen Fragmentgrößenmarker bei der Gelelektrophorese bestimmt wurde. Fragmente unterhalb dieser Fragmentgröße wurden nicht berücksichtigt, da dort das Enzym innerhalb des Gens geschnitten haben muss.

3.8.2. Entwicklung eines Primersystems und Etablierung der Realtime PCR zum Nachweis von *Thermoactinomyces* sp.

Zur Etablierung des spezifischen Primersystems wurde DNA aller Stämme verwendet, die aktuell nicht mehr zur Gattung *Thermoactinomyces* zugeordnet werden, jedoch eine hohe 16S rRNA Gen Sequenzähnlichkeit zu *Thermoactinomyces* sp. aufwiesen (siehe Tabelle 11). Die Anwendbarkeit der entwickelten Primer wurde für jedes System zunächst *in-silico* anhand verschiedener Datenbanken erprobt. Zeigte sich deren Spezifität, wurden die Systeme anschließend *in-vitro* eingesetzt. In Tabelle 16 sind alle im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion der Gattung *Thermoactinomyces* erprobten Primersysteme aufgeführt.

Tabelle 16 Zusammenstellung der verwendeten Primer, deren Sequenzen, Bindungsposition innerhalb des 16S rRNA Gens sowie die amplifizierte Fragmentlänge der Primerkombinationen.

Primer	Sequenz 5'→3'	Bindungs- position [#]	Fragment Länge	Spezifisch PCR ⁺	Spezifisch Realtime [*]
NSPTf	TCC AGG CGA ACA GCC TGG AAG GTT	452-476	389 bp	Ja	Ja ^{*1}
TAcRmod	CGT AGC CCC CCA ACA CCT AGC AC	840-817			
NSPTf-7	AAT TCC TTC CAG GCG AAC A	445-464	156 bp	Ja	Ja ^{*1}
TAM601	GCC GCA GCC TTT CAC ACC	601-583			
NSPTf-7	AAT TCC TTC CAG GCG AAC A	445-464	396 bp	Ja	Ja [*]
TAcRmod	CGT AGC CCC CCA ACA CCT AGC AC	840-817			

[#] Bindungsposition in Relation zum 16S rRNA Gen von *Escherichia coli*. Nach BROSIUS *et al.* [158]

⁺Spezifisch: Keine Banden/Signale bei Negativkontrollen

^{*} Fluoreszenz bei Negativkontrolle und Blindwerten, anhand der Schmelzkurve und des Gelbilds als Primerdimer erkennbar, führt z. T. zu Schwierigkeiten bei der Auswertung

¹ Spezifische Produkte, jedoch geringe Effizienz der Realtime PCR Reaktion

Zunächst wurde das Primersystem NSPTf/TAcRmod entwickelt. Bei Verwendung dieses Primersystems in einem PCR-Ansatz konnten spezifische PCR-Produkte für die nachzuweisenden Spezies detektiert werden. Auch unter Verwendung in der Realtime PCR wurde eine spezifische Amplifikation nur für DNA Extrakte aus *Thermoactinomyces* sp. beobachtet. Unter Einsatz von genomischer DNA als Vergleichsstandard bekannter Konzentration lag die Amplifikationseffizienz jedoch nur bei maximal 60%. Eine Steigerung der Effizienz konnte nur durch den Einsatz von mittels Klonierung erstellten 16S rRNA Genfragmenten erreicht werden.

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei Kombination des NSPTf Primers mit dem TAM601 Primer beobachtet. Die geringe Amplifikationseffizienz wurde auf die Sekundärstruktur des 16S rRNA Gens im Bindungsbereich des NSPTf-Primers zurückgeführt. Hierdurch ist die interne Bindung stärker, so dass der Primer nicht effektiv binden kann. Analysen mit einem Online-Tool (mFold: <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>, [164]) bestätigten dies (Abbildung 31).

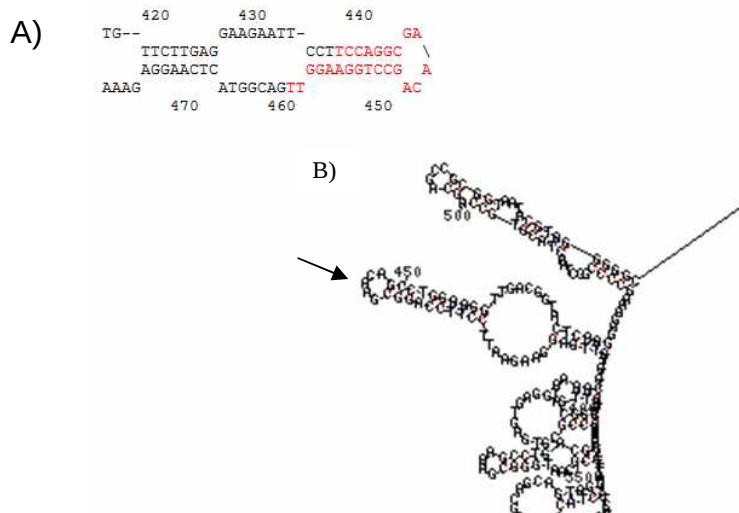


Abbildung 31 Darstellung der Haarnadelbildung der Bindungsstelle des NSPTf Primers. A) Sequenzabschnitt, die Sequenz des Primers ist rot markiert B) Darstellung der Haarnadelsequenz in 2D.

Um dieses zu unterbinden, wurde der NSPTf Primer soweit modifiziert, dass er innerhalb des 16S rRNA Gens um sieben Basen verschoben (Richtung 5'-Ende) bindet („NSPTf-7“). Hierdurch bindet der Primer in einer Sequenz-Region, die keine interne Haarnadelstruktur bildet. Kombiniert mit dem TAcRmod Primer wurde die spezifische *Annealing* Temperatur in einer PCR ermittelt (Abbildung 32).

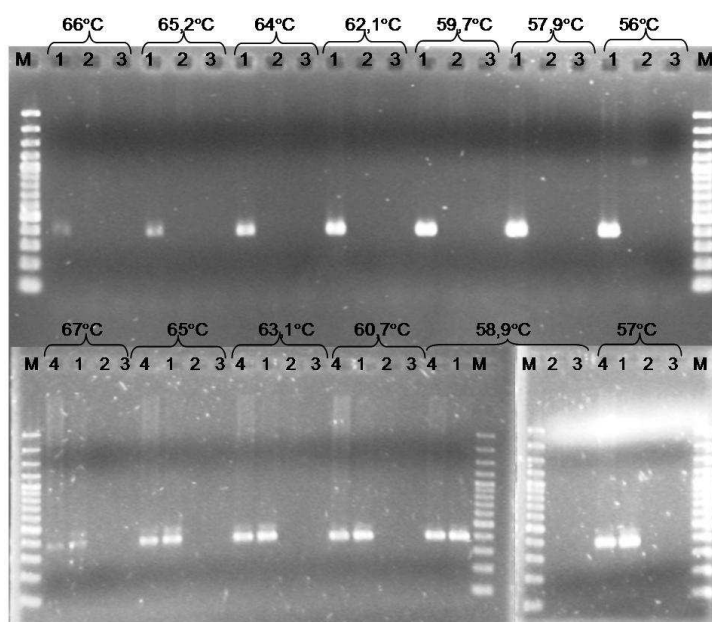


Abbildung 32 PCR-Produkte (395 bp) amplifiziert mit dem NSPTf-7/TAcRmod Primersystem bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen aus DNA-Extrakten von 1=*Thermoactinomyces intermedius* DSM 43846^T, 2= *Laceyella putida* DSM 44608^T (Syn. *Thermoactinomyces putidus*), 3=Blindwert, 4= *Thermoactinomyces vulgaris* DSM 43016^T nach elektrophoretischer Auftrennung. M=100 bp Marker.

Dieses Primersystem erwies sich im Folgenden ausschließlich für alle Spezies der Gattung *Thermoactinomyces* als spezifisch. Die nah verwandten Nicht-Ziel-Organismen zeigten keine PCR-Produkte (Abbildung 33).

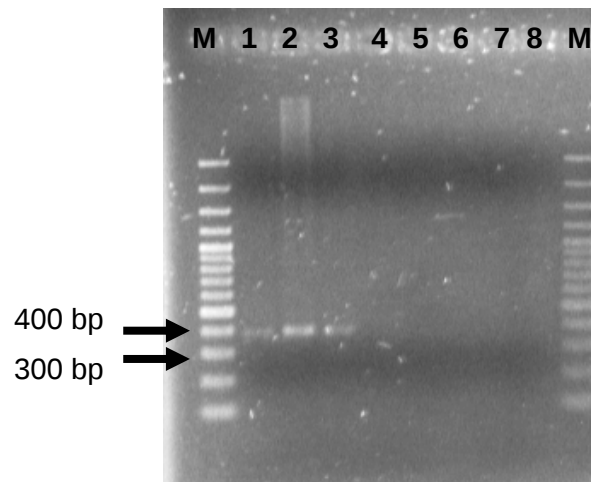


Abbildung 33 Agarosegelbild. Die Banden zeigen PCR-Produkte (395 bp) folgender DNA Extrakte amplifiziert bei 57°C mit dem NSPTf-7/TAcRmod Prime rsystem nach elektrophoretischer Auftrennung: 1=*Thermoactinomyces vulgaris* (Syn. *Thermoactinomyces candidus*) DSM 43352^T, 2=*Thermoactinomyces vulgaris* DSM 43016^T, 3=*Thermoactinomyces intermedius* DSM 43846^T, 4=*Laceyella sacchari* (Syn. *Thermoactinomyces thalpophilus*) DSM 43354^T, 5=*Laceyella sacchari* (Syn. *Thermoactinomyces sacchari*) DSM 43356^T, 6=*Thermoflavomicrobium dichotomicum* (Syn. *Thermoactinomyces dichotomicus*) CECT 5331^T, 7= *Laceyella putida* (Syn. *Thermoactinomyces putidus*) DSM44608^T, 8=Blindwert, M=100 bp Marker. Die markierten Banden mit ca. 300 und 400 bp dienen als Vergleichsfragmentlängen.

Auch die Detektion und Quantifizierung anhand der Realtime PCR wurde mit diesem Primersystem erfolgreich durchgeführt (Abbildung 34, A). Unter Einsatz einer dezimalen Verdünnungsreihe von 16S rRNA Genfragmenten, gewonnen aus genomischer DNA des Stammes *Thermoactinomyces vulgaris* DSM 43016^T, zeigten die Fluoreszenzmessdaten einen hohen linearen Zusammenhang ($R^2=0,99$) zwischen C_T -Wert und der eingesetzten 16S rRNA Gen-Konzentration (Abbildung 34, C). Es wurden jedoch in den Konzentrationen $<10^4$ häufig Primerdimere detektiert. Falsch-positive Ergebnisse konnten jedoch durch eine Schmelzkurvenanalyse ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 34, B). Zusätzlich wurde für dieses System die Fluoreszenzmessung zur Konzentrationsbestimmung bei 80°C durchgeführt, da hier alle Primerdimere dissoziiert waren und so ausschließlich spezifische Produkte detektiert wurden.

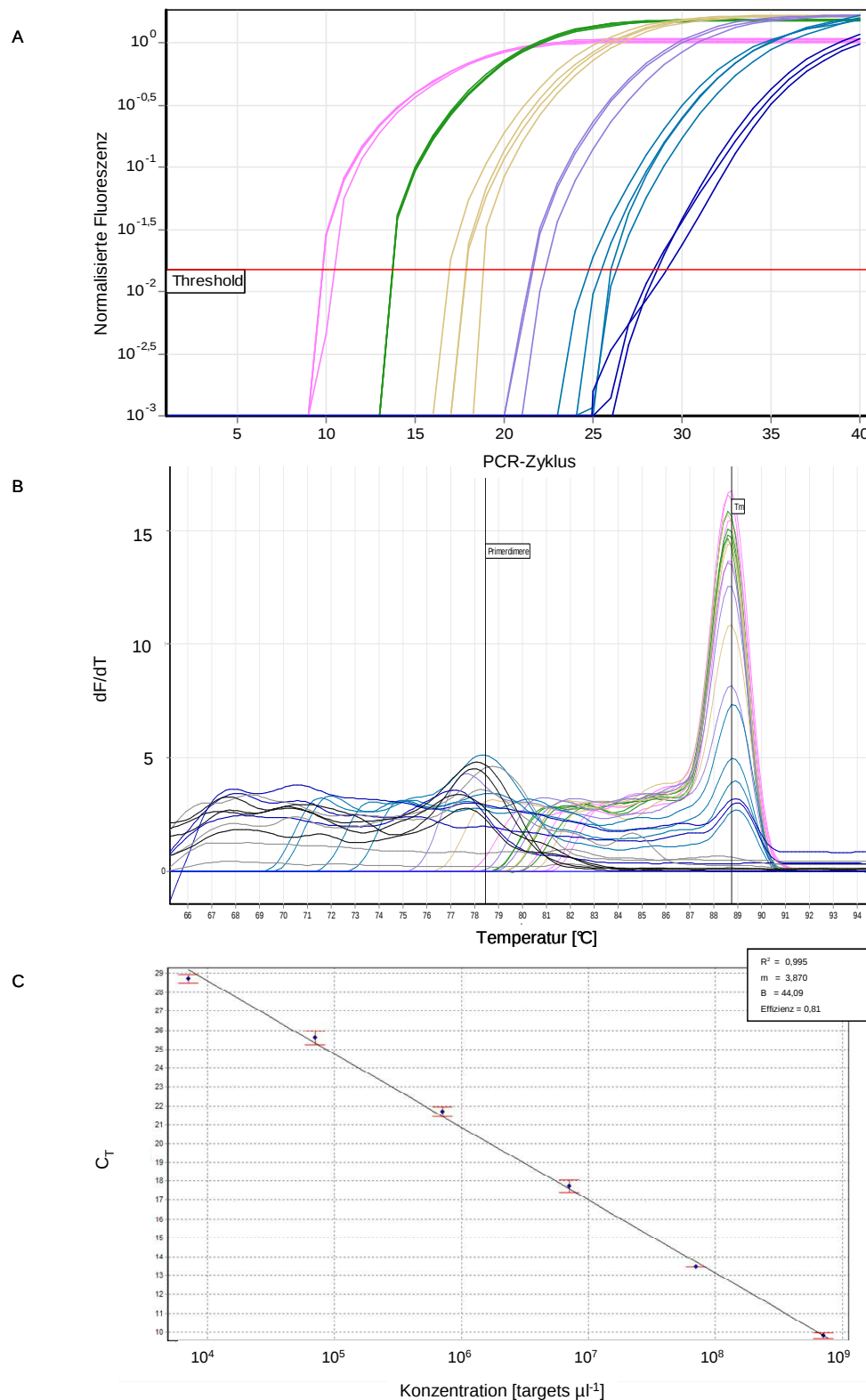


Abbildung 34 (A) Fluoreszenzmessdaten der Quantifizierungsstandards der Konzentrationen $7,1 \times 10^8$ (■), $7,1 \times 10^7$ (■), $7,1 \times 10^6$ (■), $7,1 \times 10^5$ (■), $7,1 \times 10^4$ (■), $7,1 \times 10^3$ (■) targets/µl sowie der Negativkontrolle *Laceyella sacchari* DSM 43354^T (■) und des Blindwertes ohne DNA (■) im Zyklusverlauf. (B) Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur nach abgeschlossener Amplifikation (Schmelzkurve). Markiert sind die Schmelzpunkte für das spezifische Produkt (88,75 °C) sowie für die Primerdimere (78,44 °C). (C) Grafische Darstellung des linearen Zusammenhangs der *Thermoactinomyces*-Standard-Konzentrationen 10^4 - 10^8 targets/µl und der für diese ermittelten C_T-Werte. Amplifiziert wurde mit dem NSPTf-7/TAcRmod Primersystem unter Verwendung des ABGene-Kits. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=4 \pm SA$.

3.8.3. Untersuchung des Einflusses von Bioaerosolbestandteilen auf die Realtime PCR Quantifizierung von *Thermoactinomyces* sp.

Um eventuelle Hemmeffekte aus unterschiedlichen Umweltproben zu untersuchen, wurden DNA Extrakte aus *Thermoactinomyces* (mit einer bekannten Zielgenzahl) mit DNA Extrakten aus auf PC-Filtern gesammelten Bioaerosolen eines Masthähnchenstalles versetzt. Jetzt wurden parallel die 16S rRNA Zielgene über eine Realtime PCR quantifiziert und die erhaltenen Ergebnisse mit denen verglichen, die ohne Zugabe von Bioaerosol DNA Extrakt amplifiziert wurden. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zu den ohne Bioaerosol-DNA-Extrakt amplifizierten Standards (Abbildung 35). Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten keinen Einfluss der mitextrahierten Stoffe.

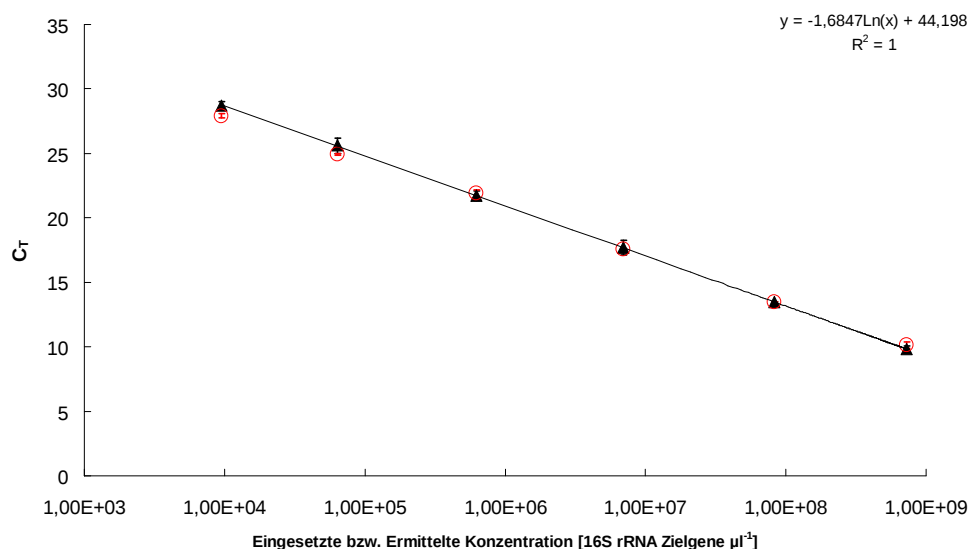


Abbildung 35 Einfluss von DNA Extrakten aus Bioaerosolen eines Masthähnchenstalles (Filtration stationär, Volumen=2,33 m³) auf die Quantifizierung von 16S rRNA Zielgenabschnitten über eine Realtime PCR (targets/µl). Dargestellt sind Mittelwerte (n=4 ±SA) für die *Thermoactinomyces* Quantifizierungsstandards der Konzentrationen 10⁴ bis 10⁹ targets µl⁻¹ (▲) und derselben *Thermoactinomyces* Quantifizierungsstandards, die unter Zugabe von aus Masthähnchenstall-Bioaerosolen extrahierter DNA (○) im gleichen Ansatz amplifiziert (NSPTf-7/TAcRmod) wurden.

3.8.4. Nachweis und Quantifizierung von *Thermoactinomyces* sp. aus Umwelt-Bioaerosolproben

Nachdem das Detektionssystem etabliert war, wurden Umweltproben unterschiedlicher Herkunft auf das Vorkommen von *Thermoactinomyces* sp. untersucht. Dabei konnten in einer eingesetzten Bioaerosolprobe des Mastentenstalles (während Einstreutätigkeiten eines Mitarbeiters) spezifische PCR-Produkte nachgewiesen werden (Abbildung 36).

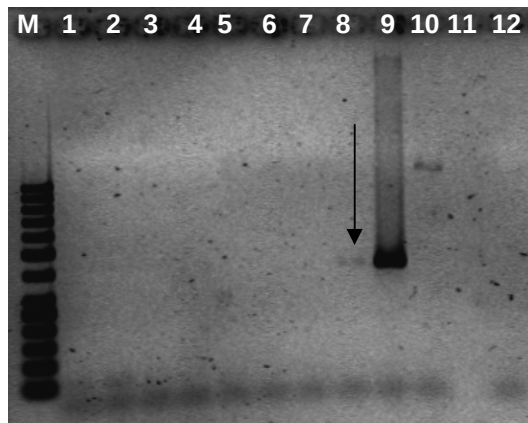


Abbildung 36 PCR Produkte amplifiziert mit dem NSPTf-7/TAcRmod Primersystem unter den oben angegebenen Bedingungen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Eingesetzt wurden DNA-Extrakte extrahiert aus Umweltproben folgender Herkunft: 1: Rinderstall (Impingement), 2: Kompost (1:100 verdünnt), 3: Masthähnchen (Filtration stationär, 2,33 m³), 4: Masthähnchen (Filtration stationär, 1,7171 m³), 5: Mastputen (Filtration, 0,622 m³), 6: Mastputen (Filtration stationär, 0,620 m³), 7: Mastenten (Filtration personengetragen, 0,745 m³), 8: Mastenten (Filtration personengetragen, 1,239 m³), 9: *T. vulgaris* DSM 43016^T, 10: *Laceyella putida* DSM 44608^T, 11: leer, 12: Ansatzkontrolle.

Auf Basis des vorangegangenen Nachweises für *Thermoactinomyces* sp. in der Bioaerosolprobe des Mastentenstalles, wurde dieser DNA Extrakt in einer Realtime PCR eingesetzt und auch hier spezifische PCR Produkte detektiert. Die in diesem Ansatz ermittelte Konzentration betrug nach Umrechnung auf das gesammelte Luftvolumen $6,7 \times 10^5$ 16S rRNA Zielgene m⁻³ Luft (Abbildung 37). Unter Einrechnung von 6 Operons (gerundet), die für das 16S rRNA Gen dieser Gattung ermittelt wurden (siehe Abschnitt 3.8.1), ergibt sich eine Konzentration von $1,1 \times 10^5$ Zellen m⁻³ Luft. Die für diese Probe parallel anhand DAPI-Färbung ermittelte Gesamtzellzahl zeigte eine Konzentration von 4×10^7 Zellen m⁻³ Luft. Damit beträgt der Anteil der *Thermoactinomyces* sp. in dieser Probe 0,3 % an der Gesamtzellzahl.

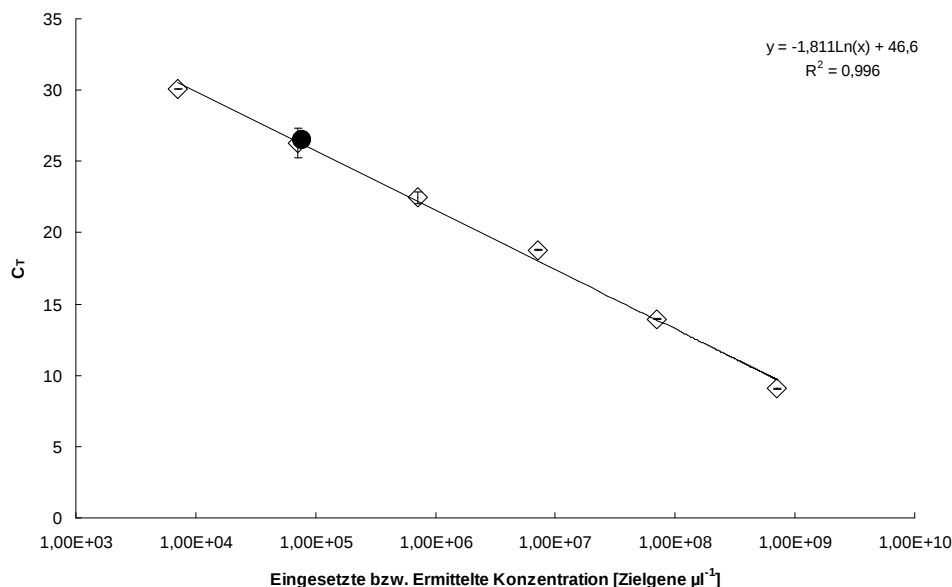


Abbildung 37 Darstellung der in Bioaerosol DNA Extrakten eines Mastentenstalles anhand einer Realtime PCR (NSPTf-7/TAcRmod) detektierten *Thermoactinomyces* 16S rRNA Gen Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=3 \pm SA$) für Quantifizierungsstandards der Konzentrationen $7,1 \times 10^4$ - $7,1 \times 10^9$ Zielgene µl⁻¹ (◇). Die ermittelte Konzentration *Thermoactinomyces* 16S rRNA Zielgene aus Umwelt-Bioaerosol DNA Extrakten (●) ist errechnet als Mittelwert aus $n=4 \pm SA$ unter Annahme von 6 Operons für das 16S rRNA Gen.

3.8.5. Nachweis der Spezifität. des NSPTf-7/TAcRmod Primersystems für *Thermoactinomyces* sp durch Klonierung von PCR-Fragmenten aus einer komplexen Umweltprobe

Um die Spezifität für das entwickelte Realtime PCR System zu überprüfen, wurde mit dem aus den Bioaerosolproben des Entenstalles gewonnenen PCR Produkt eine Klonbibliothek (n=44) angelegt (AGOWA; Berlin). Zur anschließenden Auswertung wurde das Programm MEGA 4.0 verwendet [165]. Zunächst wurde eine BLAST Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) zur Einordnung der 16S rRNA Gensequenzen innerhalb der Gattungen durchgeführt. Hier ergab sich für alle Sequenzen die höchste Ähnlichkeit und Übereinstimmung zu Sequenzen der Gattung *Thermoactinomyces*. Zur Errechnung der Ähnlichkeiten zu Spezies innerhalb der Gattung wurden Sequenzen der Typstämme der Gattung *Thermoactinomyces* mit einbezogen. Zusätzlich wurden Typstamm-Sequenzen der Arten, die mittlerweile nicht mehr zu dieser Gattung gehören, eingerechnet (Tabelle 11).

Die anschließende Auswertung der in *Escherichia coli* klonierten 16S rRNA Genfragmente ergab eine Ähnlichkeit von 30 sequenzierten Inserts (Ähnlichkeit > 98,3%) zu der Sequenz des 16S rRNA Gens von *Thermoactinomyces intermedius* (AJ251775) bzw. von 14 Inserts (Ähnlichkeit > 99,7%) zu der 16S rRNA-Gen Sequenz von *Thermoactinomyces vulgaris* (AF138736 und AF138732; Abbildung 38, die Ergebnisse wurden zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst). Hierdurch wurde die Spezifität des entwickelten Protokolls auch für komplexe Umweltproben bestätigt.

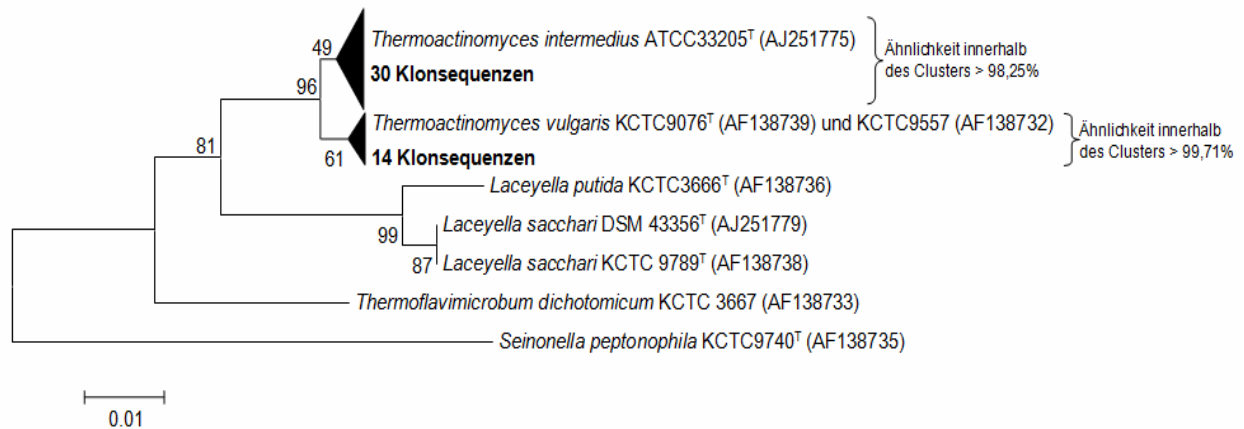


Abbildung 38 Neighbor-joining Baum, errechnet aus n=44 Sequenzen (396bp), generiert durch Klonierung von PCR-Produkten aus dem DNA Extrakt einer Bioaerosolprobe eines Mastentenstalles unter Verwendung des NSPTf-7/TAcRmod Primersystems. Der Baum und die dazugehörigen Distanzen wurden anhand des Programms MEGA 4.0 erstellt. Die Stabilität der Äste wurde auf Basis von 1.000 Wiederholungen abgesichert (bootstraps). Eingerechnet wurden alle Typstamm-Sequenzen der Gattung *Thermoactinomyces* sowie Sequenzen der ehemals zu dieser Gattung gehörenden Spezies (jetzt den Gattungen *Laceyella*, *Thermoflavomicrobium* und *Seionella* zugeordnet). Die Accession-Nummern der Sequenzen sind in Klammern angegeben. Die Länge des Maßstabs entspricht 0,01 Nukleotid-Substitutionen pro Basenposition. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse der Klonsequenzen zusammengefasst.

4. DISKUSSION

4.1. Physikalische Sammeleffizienz – Möglichkeiten und Grenzen der Erfassung luftgetragener Mikroorganismen

Zur Analyse von Bioaerosolen müssen diese zunächst möglichst quantitativ erfasst werden. Die gängigsten Verfahren sind die Impaktion (direkt auf Agarnährmedien), das Impingement oder die Filtration. Je nach Sammelmethode und Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen, ergeben sich Unterschiede in der physikalischen⁷ bzw. biologischen⁸ Sammeleffizienz, so dass Messungen, die mit unterschiedlichen Sammelsystemen durchgeführt wurden nur bedingt vergleichbar sind. Da die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegenüber dem Sammelstress spezies- bzw. stammspezifisch ist [106, 108], müssen diese Sammeleffekte vor allem beim speziesselktiven, kultivierungsabhängigen Nachweis berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu kultivierungsbasierten Ansätzen haben molekulare Methoden jedoch den Vorteil, dass die biologische Sammeleffizienz vernachlässigbar ist, da sie die Organismen unabhängig von ihrem Lebenszustand erfassen. Für diese Methoden ist zunächst die physikalische Sammeleffizienz des verwendeten Sammelsystems für die nachfolgenden Quantifizierungen ausschlaggebend. Die physikalische Sammeleffizienz gibt den Grad der Erfassung luftgetragener Partikel für ein Sammelsystem in % an [96]. Generell wird für Filtrationsverfahren die höchste physikalische Sammeleffizienz angegeben, Partikel werden nahezu vollständig abgeschieden [5]. Partikel und Organismen werden quasi aus der Luft gesiebt.

Da für die Sammlung von luftgetragenen Bakterien kein Referenzverfahren vorgegeben ist, wurde anhand von DAPI Gesamtzellzahlbestimmungen die Sammeleffizienz von Mikroorganismen für die Filtration und das Impingement in Geflügelställen verglichen. Die in Putenställen und Masthähnchenställen mittels Impinger ermittelte GZZ-Konzentrationen lag hier durchschnittlich bei nur 40% bzw. 23% der mittels Filtration bestimmten Konzentrationen (Abbildung 9, B). Besonders bei Probennahme 5 (Masthähnchenstall) ergab sich in Stall 1 ein deutlicher Unterschied in der GZZ in Abhängigkeit von der Sammelmethode, während in Stall 2

⁷ Das Produkt aus Erfassungsgrad des Einlasssystems und Abscheidegrad des Sammelsystems.

⁸ Anteil (in % der Gesamtzahl, der bei der Sammlung erfassten Mikroorganismen) der während einer Sammlung erfassten Mikroorganismen, die durch diesen Sammelprozess keinen Verlust der Kultivierbarkeit erfahren haben. (Anmerkung: Die biologische Sammeleffizienz ist ein Maß zur Beurteilung der Eigenschaft eines Sammelsystems, die Lebensfähigkeit von Mikroorganismen bei deren Erfassung aufrechtzuerhalten. Sie ist stamm- und speziesspezifisch).

für die GZZ unabhängig von der Sammelmethode ähnliche Konzentrationen ermittelt wurden. Die Errechnung der Anteile der über Impingement ermittelten GZZ an der mittels Filtration ermittelten GZZ ergibt für Stall 1 nur einen Anteil von 4,57% und für Stall 2 einen Anteil von 60,1%. Ein im Bereich von 60% liegender Anteil war auch für die Probennahmen 1 bis 4 im Putenstall schon beobachtet worden (Abbildung 9, B). Der statistische Vergleich zeigte für die Ergebnisse beider Tierhaltungsanlagen, dass die mittels Filtration gefunden Anteile jeweils signifikant ($\alpha=99\%$) über den mittels Impinger ermittelten Konzentrationen lagen. Die Korrelationsanalyse bestätigte diesen Zusammenhang (Abbildung 10).

Dieser Umstand könnte durch eine Vor-Abscheidung von Partikeln und somit auch ihnen anhaftender bakterieller Zellen bedingt sein. Eine starke Abscheidung von Partikeln konnte während Probennahme 5 sehr deutlich in der 90° Krümmung (Abbildung 39, A) und vor der Düse im Einlassrohr (Abbildung 39, B) des Impingers beobachtet werden. GRINSPHUN *et al.* [104] bestätigen, dass Partikel ab einem Durchmesser $>10\ \mu\text{m}$ an der Krümmung und auch an der Düse zu einer signifikanten Minderung der physikalischen Sammeleffizienz führen. Sie geben für den AGI-30 Impinger insgesamt nur eine Erfassung von 20-30% an. Weiterhin könnte die Luftfeuchte einen Einfluss auf die Sammeleffizienz haben, da der aerodynamische Durchmesser bei einer höheren Luftfeuchte größer ist, was ebenfalls zu einer Minderung der Erfassung durch den Impinger führen könnte. Im Hinblick auf die festgestellten Unterschiede der GZZ zwischen Stall 1 und 2 (siehe 3.1) gerade auch im Vergleich zur Filtration, könnte gerade hier dieser Effekt eine große Rolle spielen, da in Stall 1 die Luftfeuchtigkeit durch den „Aerocleaner“ deutlich erhöht wird. Der „Aerocleaner“ versprüht alle 15 Minuten eine Emulsion aus Wasser und ätherischen Ölen im Stall zur Minderung der Partikel-Konzentration in der Stallluft (siehe Abbildung 6, B). Um diesen Einfluss für alle Probennahmen zu untersuchen, wurde die Luftfeuchtigkeit in Relation zu den Anteilen der GZZ der Impingement-Proben an der GZZ der Filtrations-Proben gesetzt. Hier konnte jedoch keine Korrelation erkannt werden (Abbildung 11). Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Untersuchungen, die einen Einfluss der Luftfeuchte auf die Abscheideeffizienz des Impingers beobachten. So berichten GÄRTNER *et al.* [105], dass Partikel aus trockenen Abgasen zu 95% abgeschieden werden, jedoch schon ab einer Tröpfchengröße von $6\ \mu\text{m}$ ein erheblicher Anteil der Partikel in der ersten Krümmung des Impingers abgeschieden werden.

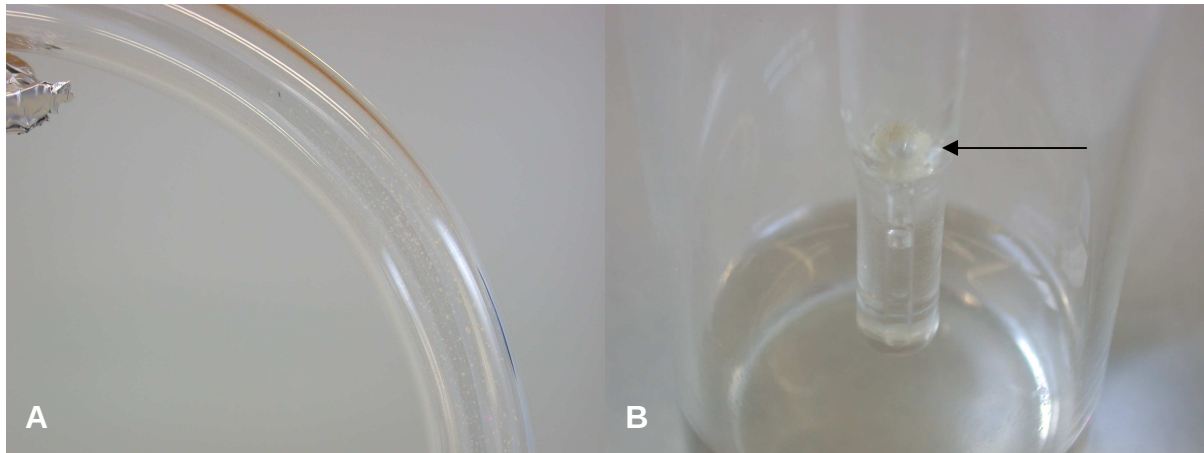


Abbildung 39 Rückstände von Staubpartikeln nach Sammlung von Bioaerosolen in einem Hähnchenmaststall. A) Im oberen Einlassrohr, B) vor der Düse.

Da ein Großteil luftgetragener Mikroorganismen partikelgebunden vorkommt [12, 13], besteht hier eine Verlustquelle, die zu einer erheblichen Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Konzentration und Artenzusammensetzung führen kann. Aus diesem Grund empfehlen GÄRTNER *et al.* [105] das Durchspülen der Einlassöffnung des Impingers mit steriler NaCl-Lösung.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse auch im Zusammenhang mit der zusätzlich einfacheren Aufarbeitung von Filtrationsproben, eine bessere Eignung der Filtration zur Analyse von Mikroorganismen aus Bioaerosolen unter Verwendung molekularbiologischer Methoden.

4.2. Biologische Sammeleffizienz – (Über-)Lebensfähigkeit von Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Sammelmethode

Molekularbiologische Methoden weisen Organismen durch die Detektion von spezifischen DNA-Abschnitten, unabhängig von ihrem Lebenszustand, in der zu untersuchenden Probe nach. Jedoch ist die Infektiösität pathogener Mikroorganismen von deren Lebensfähigkeit abhängig. Zur Ermittlung des infektiösen Potentials von Bioaerosolen ist es somit wichtig, die Ausgangskonzentration der lebenden pathogenen Organismen zu kennen, da durch die Bioaerosolsammlung selbst ein Teil der Zellen absterben kann.

Ein Maß für die Fähigkeit eines Sammelsystems, die Lebensfähigkeit luftgetragener Mikroorganismen während der Probennahme zu erhalten ist die biologische Sammeleffizienz [7]. Diese wird als Anteil (%) der Organismen angegeben, die während der Sammlung keinen Einfluss der Kultivierbarkeit erfahren haben [97].

Dieser Anteil hängt zum einen vom verwendeten Sammelsystem ab und ist zum anderen stamm- oder speziesspezifisch [106]. So hängt das Überleben der Organismen von ihrer Tenazität gegenüber verschiedenen physikalischen Stresseinwirkungen wie z. B. Austrocknung, Scherkräften und osmotischen Veränderungen ab [11, 106, 166]. Ausschlaggebend für eine längere Überlebensfähigkeit können dabei Pigmentierung [167], Zellwandaufbau [167], die Fähigkeit zur Sporenbildung [11] oder auch die genetische Ausstattung in Bezug auf Überdauerungsmechanismen sein [102]. Bislang sind die Daten zur Überlebensfähigkeit allerdings unzureichend, da nur für einige wenige Arten gezielte und systematische Untersuchungen durchgeführt wurden.

Das Impingement wird als das schonendste Verfahren zur Sammlung von Bioaerosolen beschrieben, da hier keine Austrocknungsgefahr der gesammelten Mikroorganismen besteht [11]. Beim Impingement beeinflusst nach KÄMPFER und WEIßENFELS [11] besonders der Aufschlag auf die Sammelflüssigkeit die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen, da die Luft vor dem Aufprall auf die Flüssigkeit auf bis zu 265 m s^{-1} beschleunigt wird. Durch den in dieser Arbeit gewählten Versuchsaufbau konnte der Aufprall der Zellen auf die Flüssigkeit nicht untersucht werden. Dagegen gilt die Filtration als die einfachste und effektivste Luftsammelmethode, allerdings ist der Stress für die Mikroorganismen aufgrund des sehr hohen Austrocknungseffekts am größten [168].

Bisherige eingesetzte Verfahren zur Emissionsmessung an Arbeitsplätzen basieren auf kultivierungsabhängigen Ansätzen. Dadurch muss zwingend die Lebensfähigkeit der Organismen nach der Sammlung gegeben sein, um aussagekräftige Quantifizierungen und Qualifizierungen der vorhandenen Organismen durchführen zu können. Sterben Organismen durch die Sammlung ab, kann es zu einer erheblichen Unterschätzung der tatsächlichen Konzentration kommen; zusätzlich zu der methodisch bedingten Unterschätzung durch die Kultivierung. In dieser Arbeit zeigte ein Vergleich der Anteile der KBE an der parallel bestimmten GZZ für unterschiedliche Arbeitsplatzproben schwankende Erfassungsanteile im Verlauf der Probennahmen. Es konnte dabei keine Korrelation zu einem Sammelsystem erkannt werden. Meist lag der Anteil kultivierbarer Bakterien zwischen 3 und 10%. (Abbildung 40). Bei Probenahme 3 wurden die höchsten Anteile der KBE an der GZZ im Verlauf aller Probennahmen mit 20,04% für die Impingementproben bzw. 16,7% für die Filtrationsproben gefunden. Auch AMANN *et al.* [100] geben in ihrem umfassenden

Review für die Kultivierbarkeit von Mikroorganismen aus unterschiedlichen Umwelthabitaten nur einen maximalen Anteil von 10% an.

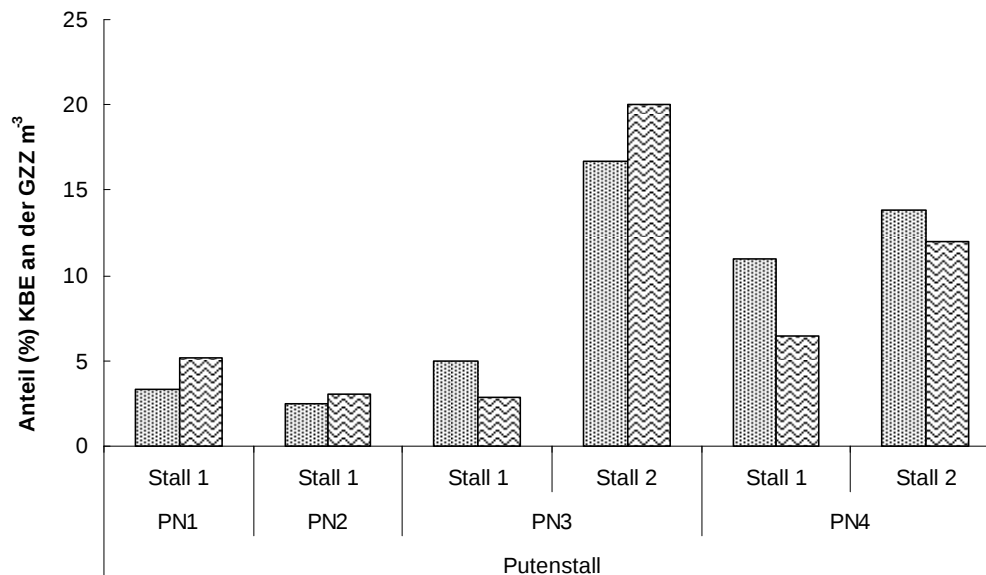


Abbildung 40 Darstellung der Anteile der KBE an der mittels DAPI-Zählung ermittelten GZZ in Abhängigkeit von der Luftsammelmethode (Filtration , Impingement ) bei Probenahmen 1-4 im Putenmaststall. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=6 (PN 1), n=8 (PN 2), n= 9 (PN 3, PC) bzw. 6 (PN 3, Impinger) und n= 4 (PN 4).

Mittlerweile sind jedoch auch Methoden verfügbar, die eine Aussage über den Zustand der Organismen kultivierungsunabhängig zulassen, wie z. B. differenzierende Fluoreszenzfärbungen. Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit in Abhängigkeit vom Sammelssystem wurde die Lebend-Tot-Färbung eingesetzt. Diese ermöglicht eine Differenzierung in „lebende“ und „tote“ Zellen durch eine einfache Fluoreszenzfärbung. Zusätzlich können hierdurch auch VBNC Organismen (viable but non-cultivable) erfasst werden, die durch die Kultivierung nicht mehr erfasst werden.

Die Lebend-Tot-Färbung ist bislang für einige Stämme unterschiedlicher Spezies angewendet worden [135]. Da in Bioaerosolen jedoch Spezies unterschiedlichster Bakterienarten vorkommen können, sollte zunächst die Anwendbarkeit der Färbung zunächst gewährleistet sein. Hierzu wurden Stämme von Spezies unterschiedlicher Organismengruppen eingesetzt (Tabelle 2). Hierbei zeigte die Etablierung die Anwendbarkeit der Lebend-Tot-Färbung für die hier untersuchten Spezies. Die definierten Verhältnisse lebender und toter Zellen konnten für alle in dieser Arbeit eingesetzten Stämme wieder gefunden werden (Abbildung 12). Diese Ergebnisse

zeigen zusätzlich, dass im Rahmen einer Messreihe eine Auswertung innerhalb von 24 Stunden nach den Probenahmen nötig ist, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Abbildung 13).

Zur Ermittlung der spezifischen biologischen Sammeleffizienz wurden die Zellen der zu untersuchenden Bakterienstämme einerseits in einem AGI-30 Impinger und andererseits auf einem Polycarbonat-Filter mit steigendem Volumen partikelfreier Luft beaufschlagt, um eine Bioaerosolsammlung zu imitieren. Im Anschluss wurden die Anteile lebender und toter Zellen bestimmt und der kultivierbaren Bakterienkonzentration gegenübergestellt.

Insgesamt waren diese Ergebnisse sehr heterogen. So konnte für *Bacillus subtilis* DSM 10^T im Verlauf der Beaufschlagung weder durch das Impingement noch durch die Filtration ein Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen detektiert werden (Abbildung 15). Auch für *Mycobacterium aurum* NC 10437^T (Filtration) und *Staphylococcus aureus* DSM 20231 (Impingement) blieb der Anteil lebender Zellen während der Beaufschlagung relativ konstant (Abbildung 15). WANG *et al.* [106] zeigten bei Untersuchungen der Überlebensfähigkeit nach Filtrationssammlung für Sporen von *Aspergillus versicolor* und *Penicillium melinii* keinen nennenswerten Einfluss, während sie für vegetative Zellen von *Serratia marcescens* und *Pseudomonas fluorescens* nur nach Beaufschlagung von weniger als 10 Minuten noch Zellen kultivieren konnten. Für *Bacillus subtilis* Sporen fanden sie in Abhängigkeit vom beaufschlagten Luftvolumen eine langsame Abnahme der Kultivierbarkeit, die zusätzlich von der relativen Luftfeuchtigkeit beeinflusst wurde. Auch LI [108] zeigt für *Bacillus subtilis* Zellen einen nur geringen Einfluss der Filtrationssammlung, hier bleibt der Anteil kultivierbarer Zellen sogar über einen Beaufschlagungszeitraum von 60 Minuten konstant bei ca. 80 % der eingesetzten Konzentration.

Bedeutende Unterschiede der Lebensfähigkeit in Abhängigkeit vom verwendeten Sammelsystem konnte für *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T beobachtet werden (Abbildung 15). So wurden nach 30-minütiger Impingementsammlung noch 91%, nach 20-minütiger Filtration jedoch nur noch 18% als lebend detektiert. Auch für *Escherichia coli* DSM 30083^T wurden starke Unterschiede der Zell-Lebensfähigkeit in Abhängigkeit vom Sammelsystem gefunden. Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses auf *E. coli* DSM 30083^T durch das Impingement sind allerdings nur eingeschränkt auswertbar. Hier nahm der Anteil lebender Zellen sogar zu, bedingt

wahrscheinlich durch Verdunstung aus dem Impinger (Abbildung 15), jedoch trat kein starker Abfall der Konzentration lebender Zellen auf, was auf einen eher geringen Einfluss der Impingementsammlung auf Zellen dieses *E. coli* Stammes hindeutet. Im Gegensatz dazu, konnten während der Filtration nach 10 Minuten lediglich 20% und nach 20 Minuten gar keine Zellen mehr als lebend detektiert werden (Abbildung 15). Einen ähnlich starken Abfall der Konzentration kultivierbarer *E. coli* Zellen nach Filtrations-Beaufschlagung zeigt auch LI [108]. Hier wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellkonzentration nach 2 bzw. 5 Minuten Filtrations-Beaufschlagung der Zellen eine starke Abnahme der kultivierbaren *E. coli* Zellen gezeigt. Nach 15-minütiger Beaufschlagung konnten keine Zellen mehr kultiviert werden, wenn eine mittlere Konzentration (10^6 Zellen m^{-3}) Zellen eingesetzt wurde. Obwohl Spezies der Gattungen *Salmonella* und *Escherichia* auf 16S rRNA Gen-Ebene sehr nah verwandt sind und sich auch sonst phänotypisch sehr ähnlich sind (Wachstumsbedingungen, Wirt, natürliches Vorkommen etc.) zeigen diese Ergebnisse, wie unterschiedlich die Resistenz gegenüber dem Sammelstress durch unterschiedliche Erfassungssysteme ist. Anhand kultivierungsbasierter Nachweissysteme kann es so zu einem von der tatsächlichen Konzentration und Diversität sehr abweichenden Ergebnis kommen. Die Lebensfähigkeit nahm nicht in allen Fällen in gleichem Maße stetig in Abhängigkeit vom beaufschlagten Luftvolumen ab. Besonders auffällig war dies bei Stämmen, die der Filtrationssammlung ausgesetzt waren (z. B. *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 70403^T, *Micrococcus luteus* DSM 20030^T, *Mycobacterium aurum* NC10437^T). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten für diese Stämme eine zunächst sehr starke Abnahme lebender Zellen in kurzer Zeit, die sich im Anschluss verlangsamte oder konstant blieb. Der Einfluss der Sammlung scheint also besonders intensiv während der ersten Minuten der Beaufschlagung zu sein. Fraglich ist, welcher Anteil an Zellen in dieser Zeit wirklich abstirbt und welcher Anteil lediglich in einen Zwischenzustand (VBNC [102, 103]) übergeht und sich im Anschluss wieder regenerieren kann. Diese Zellen können durchaus einen infektiösen Effekt auf Mensch und Tier haben und werden durch kultivierungsbasierte Methoden nicht erfasst. HEIDELBERG *et al.* [169] zeigten in einer Untersuchung für *Klebsiella planticola* und *Serratia marcescens*, dass nach Sammlung mit einem Impinger im Anschluss keine Zellen mehr kultiviert werden konnten, durch Epifluoreszenzmikroskopie konnten jedoch immer noch Zellen als lebend detektiert

werden. Sie nennen eine Unterschätzung der tatsächlichen Konzentration lebender Zellen um das 100- bis 1000-fache.

4.3. Untersuchung der Diversität von Mikroorganismen in Tierstall-Bioaerosolen

In der Außenluft sind die verschiedensten Mikroorganismen, abhängig von Klima, Jahreszeit und anthropogenen Einflüssen zu finden. Entsprechendes gilt auch für Bioaerosole in Tierställen, in denen sich unterschiedliche Quellen aus denen Mikroorganismen in z. T. hohen Konzentrationen aerosolisiert werden können, addieren. Die baulichen Bedingungen der meist geschlossenen Ställe, wie Be- und Entlüftung, Futter und Fütterungssysteme, das verwendete Einstreumaterial und auch die eingestallte Tierart und der Tierbesatz haben hierbei den größten Einfluss [63]. Einen beträchtlichen Einfluss auf die vorkommenden Mikroorganismen sowie deren Konzentration haben ebenfalls die klimatischen Bedingungen im Stall (Temperatur, Luftfeuchtigkeit). Bereits ohne starke Luftbewegungen, die den Staub verwirbeln und so die Mikroorganismen in die Luft transferieren, sind hohe Konzentrationen luftgetragener Mikroorganismen in Tierställen zu finden [63]. Darüber hinaus beeinflussen die vorgenommenen Arbeiten im Stall, in unterschiedlichem Maße sowohl die Zusammensetzung als auch die Konzentration luftgetragener Mikroorganismen. So stieg der Anteil kultivierbarer Mikroorganismen pro m^{-3} Luft während einer Impfkation von Legehennen durch einen Veterinär und drei Assistenten um den Faktor zehn [170]. In einer weiteren Studie führte das Einfangen der Tiere, z. B. beim Ausstallen in der Geflügelhaltung, durch die Flatterbewegungen sowie das Zusammentreiben der Tiere durch Arbeiter zu starker Staubentwicklung, die mit einer entsprechenden Konzentrationserhöhung der Mikroorganismen einhergehen kann [69]. In einer dänischen Studie wurden während des Zusammentreibens von Masthähnchen erhebliche Konzentrationen „organischen Staubs“ („organic dust“, bis zu $11,3 \text{ mg m}^{-3}$), Endotoxin ($6,5 \text{ ng mg}^{-1}$) und Gesamtbakterien, sowohl mittels Kultivierung (Mittelwert $3 \times 10^7 \text{ KBE m}^{-3}$) als auch mikroskopischer Zählung (Mittelwert $7 \times 10^8 \text{ Zellen m}^{-3}$) in der Stallluft detektiert [60]. Eine zusammenfassende Darstellung der an landwirtschaftlichen Arbeitsplätzen gefundenen Konzentrationen (KBE m^{-3} Luft) findet sich bei EDUARD [171]; der Konzentrationsbereich reicht dabei von 10^3 bis zu 10^9 KBE m^{-3} Luft, in Abhängigkeit von der durchgeführten Tätigkeit. Kultivierungsunabhängig durchgeführte

Untersuchungen zeigten meist Konzentrationen im Bereich einer Zehnerpotenz höher [171].

Neben der Konzentration kann auch die Zusammensetzung der Mikroorganismen in der Luft landwirtschaftlicher Arbeitsplätze zeitlich und räumlich sehr stark schwanken. Vorherrschende Mikroorganismen, die in Bioaerosolen gefunden werden, gehören meist zu den Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* [63, 66, 67]. Allerdings werden auch häufig nach TRBA 466 [172] in Risikogruppe 2 eingeordnete Spezies anderer Gattungen gefunden. So fanden DUTKIEWICZ *et al.* [75] in Bioaerosolproben unterschiedlicher landwirtschaftlicher Arbeitsplätze hauptsächlich *Pantoea agglomerans*, *Corynebacterium* spp., *Thermoactinomyces vulgaris*, *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Bacillus* spp. und *Alcaligenes faecalis*. Die vorherrschenden Gattungen variierten dabei in Abhängigkeit vom untersuchten Arbeitsplatz.

Probenahmen durch unterschiedliche Luftsammelsysteme zeigen nur eine Momentaufnahme der Zusammensetzung und Konzentrationen. Dazu kommt der Einfluss der Nachweismethode. Kultivierungsbasierte Methoden erfassen nur den lebenden und vor allem kultivierbaren Anteil der Mikroorganismen. Dieser wird mit bis zu maximal 10% der tatsächlich vorhandenen Zellzahlen angegeben [100]. Jedoch sind auch tote Zellen als potentielle Allergie-Auslöser nicht zu vernachlässigen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit parallel kultivierungsabhängige und molekulare Ansätze verwendet, um einen genaueren Einblick in die Zusammensetzung der Mikroorganismen-Gemeinschaften innerhalb der untersuchten Ställe zu bekommen.

In Abhängigkeit von der verwendeten Methode wurden Unterschiede in der detektierten Artenzusammensetzung der Bioaerosolproben gefunden. Anhand des kultivierungsbasierten Ansatzes, nach Sequenzierung des 16S rRNA Gens der insgesamt 28 Isolate, wurden vornehmlich Sequenzen mit der höchsten Ähnlichkeit zu 16S rRNA Sequenzen von *Nocardiopsis* sp. *Bacillus* sp. und *Brevibacterium* sp. gefunden (Tabelle 15). Vertreter aller drei Gattungen wurden auch häufig durch andere Studien in arbeitsplatzbezogenen Bioaerosolproben kultivierungsbasiert detektiert [33, 55, 77, 173-175].

Auffällig war weiterhin, dass anhand des kultivierungsbasierten Ansatzes größtenteils (n=23, 82%) Gram-positive Organismen detektiert wurden (z. B. *Corynebacterium glutamicum*, *Nocardiopsis* sp., *Streptomyces* sp.). Aufgrund ihrer Zellwandstruktur

wird für Gram-positive Organismen eine höhere Widerstandsfähigkeit („resilience“) gegenüber den unwirtlichen Bedingungen in der Luft angenommen (Austrocknung, UV-Strahlung, Nährstoffmangel). Dazu sind diese Organismen oftmals pigmentiert, was einen zusätzlichen Schutz vor der schädigenden UV-Strahlung des Sonnenlichts bietet [25, 167]. Der Gruppe der Aktinomyceten wird diese hohe Tenazität zugeschrieben. So werden deren Vertreter häufig aus extremen Habitaten isoliert (z. B. Permafrostböden [176], heißen Quellen [177] oder Tiefseesedimenten [178]). Gram-negativen Organismen wird aufgrund ihres Zellwandaufbaus keine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber den Einflüssen durch den Aufenthalt in der Luft zugeschrieben. Kultivierungsbasierte Studien zeigten oft keine oder nur einen geringen Anteil Gram-negativer Organismen in der Luft von Tierställen. So fanden ZUCKER *et al.* [35] zwischen 0,02 und 5,2% Gram-negative Organismen aller kultivierbaren Organismen in verschiedenen Tierställen. VENTER *et al.* [62] zeigten ähnliche Ergebnisse für einen Legehennenstall (0,04%). Im Gegensatz zum kultivierungsbasierten Ansatz wurden anhand des molekularen Ansatzes auch Gram-negative Organismen nachgewiesen. Dazu gehören 16S rRNA Sequenzen von Klonen, die die höchste Ähnlichkeit zu 16S rRNA Sequenzen von Spezies der Gram-negativen Gattungen *Burkholderia* (n=1), *Megamonas* (n=18) und *Bacteroides* (n=1) aufwiesen. Dies entspricht einem Anteil von insgesamt 12,2 % an allen ermittelten OTUs (n=164) und fällt hauptsächlich auf Vertreter der Gattung *Megamonas* zurück. Gram-negative Organismen können z. T. direkt Infektionen beim Menschen auslösen. Eine höhere toxische Potenz haben jedoch die in der Zellwand vorkommenden Endotoxine, die zu starken allergischen Reaktionen bei akuter, intensiver Exposition oder auch bei lang anhaltender Exposition führen können [61, 179-182]. Hierbei ist es unerheblich, ob die Zellen leben oder tot sind, da Endotoxine unabhängig vom Lebenszustand vorhanden sind [37].

Unabhängig vom gewählten Ansatz, wurden Spezies mit höchster Sequenzähnlichkeit zu *Aerococcus viridans*, *Acinetobacter johnsonii*, *Pantoea agglomerans* und *Shigella flexneri* gefunden, die für den Menschen aufgrund ihres Gefährdungspotentials als gefährdend eingestuft wurden [74]; erstere drei Spezies stehen vor allem im Zusammenhang mit pulmonalen Erkrankungen.

Für *Pantoea agglomerans* wurde eindeutig gezeigt, dass diese Spezies der Auslöser von Allergien und Lungenerkrankungen von Arbeitern im landwirtschaftlichen Umfeld ist [88, 89]. MARTIN *et al.* [91] zeigen einen klaren zytotoxischen Effekt eines

Stammes von *P. agglomerans* auf Lungenzellen der Zelllinie A549. Auch DUTKIEWICZ [90] zeigte das speziell *P. agglomerans* Hypersensitivitätspneumonien auslöst während RYLANDER [93, 94] zeigte, dass *P. agglomerans* ein hoch potentes Endotoxin produziert, das im Verdacht steht, akute Byssinosis Symptome auszulösen. Dies belegen auch Arbeiten von DUTKIEWICZ *et al.* [92] und MILANOWSKI *et al.* [88], die Allergene, produziert von *P. agglomerans* als Auslöser für die Allergische Alveolitis angeben.

In dieser Arbeit wurde weiterhin *Acinetobacter* sp. detektiert. Spezies dieser Gram-negativen Gattung werden häufig in Bioaerosolen nachgewiesen und beherbergen ebenfalls ein Gefährdungspotential für den Menschen [183, 184]. Auch in Krankenhäusern werden einige Vertreter dieser Spezies seit Jahren immer wieder als Auslöser für Atemtraktinfektionen beschrieben [185]. Die hohe Austrocknungstoleranz zusammen mit einem hohen Grad an Resistenzentwicklung einzelner *Acinetobacter* Spezies gegenüber Antibiotika [186, 187], die in der Geflügelproduktion häufig eingesetzt werden, erhöht das Gesundheitsrisiko für Menschen an diesen Arbeitsplätzen durch diese Spezies noch.

Spezies der Gattung *Aerococcus* sind Gram-positive Kokken, die häufig in der Luft und im Staub von Arbeitsplätzen gefunden werden [174, 188]. Auch in Geflügelställen wurden Spezies dieser Gattung regelmäßig nachgewiesen [56, 60]. Die klinische Relevanz der Spezies *Aerococcus viridans* wurde eindeutig durch verschiedene Fälle von Infektionen beim Menschen gezeigt [189-191]. In dieser Arbeit wurden *Aerococcus* sp. durch Kultivierung (n=1, 3,6%), in besonders hohem Anteil jedoch durch den molekularbiologischen Ansatz (n=32, 19,5%) gefunden (Abbildung 41).

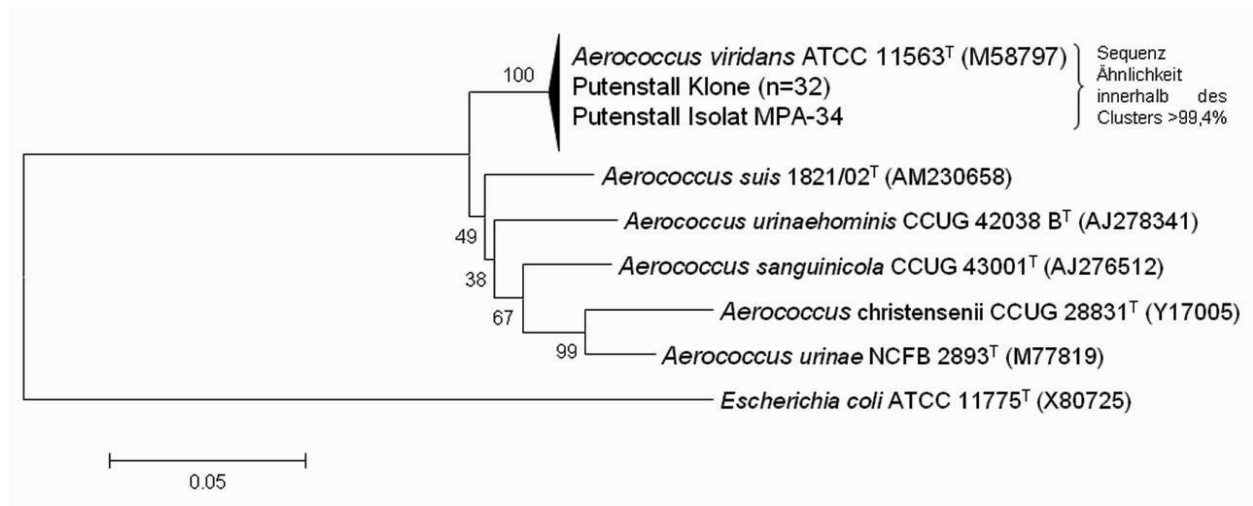


Abbildung 41 Dendrogramm zur Veranschaulichung der Position der 16S rRNA Genfragmente (765 bp) eines Isolates und 32 Klonsequenzen innerhalb der Gruppe der valide beschriebenen *Aerococcus* Spezies. Die Accession Nummern der Sequenzen sind in Klammern angegeben. Das multiple Alignment, die Distanzberechnung und Clusteranalyse wurde anhand der Neighbor-Joining Methode durchgeführt. Die Bootstrap Werte basieren auf 1000 Wiederholungen und sind in Prozent an den Knoten angeführt. Der Maßstab entspricht 0,05 Nukleotid Substitutionen pro 100 bp.

Die durch die kultivierungsunabhängige Analyse ermittelten 16S rRNA-Gen Sequenzen, die keinem bislang kultivierten Stamm zugeordnet werden konnten („uncultured“) zeigten nahezu alle eine höchste Sequenzähnlichkeit zu 16S rRNA Sequenzen, die anhand molekularbiologischer Methoden aus Darminhalten unterschiedlichen Geflügels isoliert wurden (Tabelle 17). Dies deutet auf eine Aerosolisierung von Geflügelkotbestandteilen, möglicherweise durch Aktivitäten der Tiere (Scharren, Flattern) im Einstreumaterial, hin.

Tabelle 17 Übersicht der in dieser Arbeit ermittelten 16S rRNA Sequenzen, die höchste Ähnlichkeit zu bislang nicht kultivierten Stämmen zeigten. Angegeben sind die Anzahl der Sequenzen für die einzelnen Tiergruppen sowie die Studie, in der die Sequenzen ermittelt wurden.

	Masthähnchen	Puten	n Gänse	Geflügel allg.	Andere
Filtration Stall 1	2 [192]	1 [193]	1 [194]	2 [195]	--
Filtration Stall 2	5 [192]	2 [193, 195]	--	--	2 [196]*
Impingement Stall 2	3 [192]	5 [193, 195, 197]	1 [194]	3 [198]	2 [199, 200]

* sowie höchste Ähnlichkeit zu eine Sequenz (EF515668), isoliert aus einem Bioreaktor (unpublished).

4.4. Standardisierung molekularbiologischer Nachweissysteme von Mikroorganismen aus Bioaerosolen landwirtschaftlicher Tierställe

Um die Analyse von Mikroorganismen in Bioaerosolen anhand molekularbiologischer Methoden zu standardisieren, wurden in dieser Arbeit am Beispiel eines infektiösen (*Salmonella*) und eines Allergie-Auslösenden Organismus (*Thermoactinomyces*) Realtime PCR-basierende Nachweissysteme etabliert und validiert.

4.4.1. Etablierung des Nachweises zur Detektion infektiöser Erreger am Beispiel der Gattung *Salmonella*

Gerade infektiösen Organismen kommt in Bioaerosolen eine besondere Rolle zu, da sie durch ihre geringe Größe bis in die empfindlichen Alveolen der menschlichen Lunge vordringen und dort ihr infektiöses Potential entfalten können. Auch wenn der individuelle Immunstatus des Menschen sowie eine speziesabhängige Infektionsdosis eine erhebliche Rolle bei der Etablierung einer Infektion des Menschen spielen, können diese durch das tiefe Eindringen der Organismen in das Lungengewebe schon in geringer Konzentration zu Infektionen führen.

Für die Gattung *Salmonella* gilt nach Informationen des ROBERT KOCH INSTITUTS der fäkal-orale Weg als der häufigste Infektionsweg des Menschen [201]. Allerdings zeigten verschiedenen Studien, dass eine Infektion durch Salmonellen ebenfalls durch eine aerogene Übertragung möglich ist [81, 202-206]. Das ROBERT KOCH INSTITUT gibt als Infektionsdosis für die fäkal-orale Route 10^4 bis 10^6 KBE an. In stark fetthaltigen Lebensmitteln oder bei Bestehen einer besonderen Disposition (Säuglinge, geschwächte Personen) kann die Infektionsdosis bis auf 100 KBE herab sinken [201]. WATHES *et al.* [203] beschreiben ähnliche Werte: für den oralen Infektionsweg eine Dosis von 10^5 bis 10^8 KBE, für eine Übertragung durch Dauerausscheider weniger als 10^5 KBE, und vermuten speziell für die aerogene Übertragung eine noch geringere benötigte Dosis. Dies zeigten auch die Ergebnisse früherer Tierversuche von DARLOW *et al.* [205], in denen die letale Dosis von *Salmonella* Typimurium bei respiratorischen Infektionen geringer war als auf oralem Weg.

Es gibt seit vielen Jahren verschiedene Nachweissysteme für Salmonellen in Abhängigkeit vom ausgehenden Untersuchungsmaterial. Da Salmonellen besonders in der Lebensmittelproduktion problematisch sind, wurden in diesem Bereich sehr

viele Methoden entwickelt und etabliert, nahezu alle kultivierungsbasiert (Tabelle 18). Diese Referenzverfahren beruhen dabei i. d. R. auf einer kulturellen Voranreicherung zur Resuszipitation möglicherweise vorgeschädigter Zellen, da Salmonellen aufgrund der Lebensmittelkonservierung häufig subletal geschädigt vorliegen. Anschließend folgt eine selektive Anreicherung in Flüssignährmedien und einer Subkultivierung auf selektiven Festnährmedien. Die daraus hervorgehenden *Salmonella*-verdächtigen Kolonien müssen anschließend serologisch und/oder biochemisch bestätigt werden.

Tabelle 18 Auswahl nationaler und internationaler Referenznachweisverfahren für Salmonellen aus Lebensmitteln.

Herausgeber	Vorschrift Nr.		Verfahren	Ø Dauer
FAO/WHO	Food & Nutrition Paper 14/4 Rev. 1 Chapter 4	[207]	Kultivierung	4-5 Tage
AOAC	967.25 - 967.28, 978.24, 989.12, 991.13, 994.04, 995.20	[208]		
FDA (USA)	Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5	[209]		
EU	DIN EN ISO 6579:2002	[210]		
Nordic Committee on Food Analysis (NMKL)	NMKL 71	[211]		
EU	DIN 10135:1999	[212]	Molekular	2 Tage

Allen gemein ist dabei die vorangehende Anreicherung der Salmonellen aus dem Untersuchungsmaterial, um ausreichend Material für die folgende Nachweismethode zu haben. Eine exakte Quantifizierung wird dadurch unmöglich. Hier wird lediglich die reine Präsenz von Salmonellen im Probenmaterial nachgewiesen. Somit haben diese Methoden neben einem hohen Zeitaufwand auch eine unzureichende Aussagekräftigkeit. Für die Lebensmittelanalytik ist dieses Vorgehen völlig ausreichend, es können die erforderlichen Konsequenzen zur Qualitätssicherung erfolgen. Zur Gefährdungsbeurteilung luftgetragener Salmonellen an Arbeitsplätzen der Landwirtschaft ist jedoch neben dem Nachweis der Anwesenheit eines Organismus auch dessen Konzentration von erheblichem Interesse. In diese Beurteilung müssen zusätzlich die Überlebensfähigkeit in der Luft und die Infektionsdosis des Organismus mit einbezogen werden.

Das Untersuchungsmaterial molekularer Methoden ist oftmals die DNA, die in möglichst hoher Qualität und Quantität aus den Mikroorganismen des Untersuchungsmaterials zu gewinnen ist. Dazu kommt die Schwierigkeit, die Mikroorganismen von der Probenmatrix zu trennen, um sie möglichst effektiv aufzuschließen zu können. Zur DNA Extraktion kommen anschließend unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Ziel ist jedoch in jedem Fall eine möglichst hohe DNA-Extraktionseffizienz. Im Hinblick auf eine mögliche Standardisierung sollte neben der Reproduzierbarkeit auch die Höhe der DNA-Extraktionseffizienz bekannt sein.

Bislang gibt es wenige systematische und vergleichbare Untersuchungen zur DNA-Extraktionseffizienz für unterschiedliche Organismen. Anzunehmen ist jedoch, dass die DNA-Extraktionseffizienz in Abhängigkeit vom Organismus schwankt, begründet durch phänotypische Gegebenheiten wie Zellwandaufbau (z. B. Gram-Verhalten), Größe (z. B. fadenförmige Bakterien, deren genetisches Material sehr auseinander gezogen innerhalb der Zelle ist) und DNA-Gehalt (abhängig von der aktuellen Wachstumsphase). Für Zellen eines *Escherichia coli* Stammes zeigten z. B. EINEN *et al.* [213] eine DNA Extraktionseffizienz von 1,6% ($\pm 0,5\%$ SA) bei Verwendung des Bio101 Kits (Qbiogen). Dazu kommen die in den Umweltproben enthaltenen Substanzen, die zu Hemmungen oder komplexen Bindungsreaktionen der DNA führen können und so die Effizienz der Extraktion mindern (z. B. Huminsäuren, [214]). Bei Analysen der Gesellschaftszusammensetzung von Mikroorganismen kann es so zu einem systematischen Fehler kommen, der einzelne Gruppen, deren DNA sich leicht extrahieren lässt, überproportionalisiert. Dies wurde in einzelnen Studien schon gezeigt. So fanden KRSEK und WELLINGTON [215] in Abhängigkeit vom verwendeten DNA-Extraktionsverfahren Unterschiede in DGGE Fingerprint-Mustern für Böden. Eine weitere Studie zeigte DNA Extraktionseffizienzen für λ -Phagen DNA aus Sedimentproben zwischen 0 und 43,3 %, abhängig vom verwendeten Protokoll [216] und unterstreicht so die breite Spanne und hohe Abhängigkeit der Effizienz vom eingesetzten Protokoll. In dieser Arbeit wurde anhand unterschiedlicher Extraktionsmethoden die DNA Extraktions-Effizienz grundlegend für die Gattung *Salmonella* am Beispiel des Stammes *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium CIP 60.62^T untersucht. Im Hinblick auf die hohe genetische Ähnlichkeit dieser Spezies innerhalb der Gattung, die sich prinzipiell hauptsächlich in Bezug auf die Gene ihrer Oberflächen-Antigene unterscheiden (aktuell 2 Spezies [217, 218], 2.579 Serovare [219]), sollte durch die Verwendung dieses Modellorganismus auf die

DNA Extraktionseffizienz für die gesamte Gattung zurück zu schließen sein. Bei diesen Versuchen konnte, abhängig vom verwendeten Protokoll, eine DNA Extraktionseffizienz zwischen 23,3% und 58,2% gefunden werden, wenn relativ hohe *Salmonella* Zellkonzentrationen ($> 10^8$ Zellen pro Ansatz) eingesetzt wurden. Wurden geringere Zellzahlen eingesetzt konnte keine DNA mehr ausgefällt werden, wurden höhere Zellzahlen eingesetzt, sank die DNA Extraktionseffizienz. Insgesamt konnte eine inverse Proportionalität zwischen der eingesetzten Zellzahl und der DNA Extraktionseffizienz detektiert werden (Abbildung 21). Da für alle Zellkonzentrationen eine gleich bleibende Konzentration der Reagenzien eingesetzt wird, kann dieser Zusammenhang u. a. auf die begrenzte Menge an Chemikalien und Enzymen zur Lyse der Zellen im Extraktionsansatz zurückzuführen sein. In die abschließende Abschätzung der aktuellen Exposition muss dieser Verlust entsprechend berücksichtigt werden. Im Mittel lag die DNA Extraktionseffizienz bei 16,73 % ($\pm 5,05$ % SF) für die Extraktion nach PITCHER *et al.* [141] bzw. 4,17 % ($\pm 0,62$ % SF) für die Extraktion nach HENCKEL [150] (Abbildung 20). Damit liegen die Ergebnisse unter denen von WOLFFS *et al.* [220], die für die DNA Extraktion (Chloroform-Extraktion kombiniert mit Ethanol Fällung, vergleichbar mit der Extraktion nach PITCHER) aus *Salmonellen* direkt von einem Filtermaterial eine DNA Extraktionseffizienz von 29 % (± 13 % SA) angeben.

Zur schnellen Quantifizierung von *Salmonella* sp. aus Bioaerosolen wurde die Methode der Realtime PCR eingesetzt und optimiert. Diese Methode ist eine spezielle Form der PCR, bei der zusätzlich zu den erforderlichen Amplifikationsreagenzien ein Fluoreszenzfarbstoff gegeben wird, der es ermöglicht, eine Quantifizierung der Ausgangskonzentration zuzulassen. Es gibt verschiedene Prinzipien der Realtime PCR, allen gemein ist die Fluoreszenzmessung während der Amplifikation in Echtzeit („*real time*“), die ihr den Namen gibt. Im Hinblick auf eine spätere Standardisierung sollte ein möglichst einfach zu reproduzierender Ansatz etabliert werden, weshalb die Quantifizierung anhand von SybrGreen® gewählt wurde.

Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrads der Gattungen *Salmonella* und *Escherichia* basierend auf dem 16S rRNA Gen, konnte auch in mehreren Anläufen kein spezifisches Primerpaar gefunden werden, dass eine eindeutige Differenzierung

dieser beiden Gattungen zuließ. Aus diesem Grund wurde ein alternatives „housekeeping Gen“ gesucht, dass sowohl eine verlässliche Identifizierung als gleichzeitig auch eine Quantifizierung zuließ. Da außerhalb der Sequenzen des 16S rRNA Gens für viele Spezies nur sehr wenig Sequenzmaterial in öffentlichen Datenbanken zu finden ist, wurde auf das für die Gattung *Salmonella* als spezifisch geltende *invA*-Gen zurückgegriffen [163]. Dieses Gen kodiert, zusammen mit einem ganzen Komplex an *inv*-Genen, einen Typ III Nadelkomplex (type III secretion system needle complex), der bei der Invasion der Salmonellen Zellen in die Darmepithelzellen des Menschen eine zentrale Rolle spielt [221]. Diese Gene bilden zusammen ein Operon, das innerhalb der *Salmonella Pathogenicity Island I* liegt (SPI I, [222]). Innerhalb des Genoms der Salmonellen gibt es mehrere solcher Pathogenitäts Inseln, die die spezifischen Gene beinhalten, die letztendlich die Pathogenität gegenüber dem Menschen ausmachen.

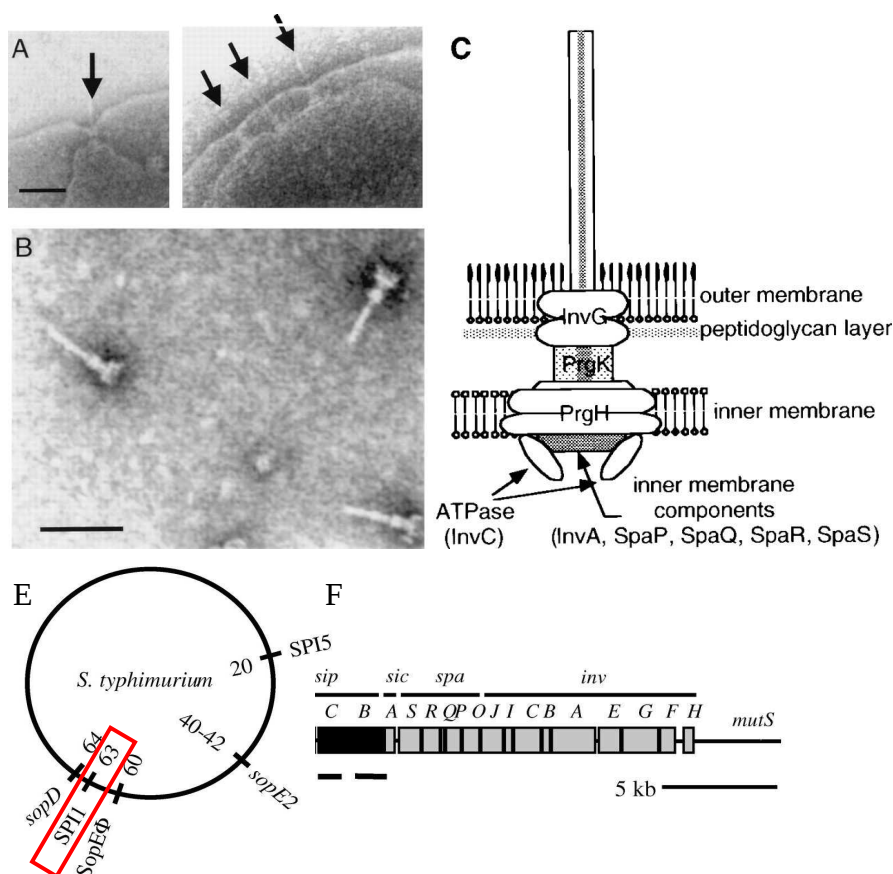


Abbildung 42 Das *Salmonella Typhimurium* Typ III Sekretionssystem. A) Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von osmotisch geschockten *S. Typhimurium* die den Nadel Komplex auf der bakteriellen Zelloberfläche aufbauen. B) REM Aufnahme der Nadel Komplexe. Der Maßstab entspricht 100 nm. C) Schematischer Aufbau des *S. Typhimurium* Nadel Komplexes und seine möglichen Komponenten. Die Lage der Komponenten ist hypothetisch. D) Lage des *invA*-Gens innerhalb des Genoms sowie E) Lage innerhalb des *inv* Gen Clusters. A-C aus [223], D aus [224], E-F aus [222].

RAHN *et al.* [153] etablierten 1992 dieses Primersystem (248 bp langes Amplifikat) zum spezifischen Nachweis von Salmonellen anhand von 630 *Salmonella*-Stämmen (100 Serovare), und 142 Non-*Salmonellae* 21 anderer Gattungen. Hierbei konnte bei 99,4 % der überprüften *Salmonella*-Stämme das *invA* Gen mit einer 100%-igen Spezifität nachgewiesen werden. Mittlerweile ist der Nachweis anhand dieses Primersystems auch in der DIN 10135:1999 [212] zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln als Referenzverfahren niedergelegt. Der Nachweis von Salmonellen aus Bioaerosolen wurde in dieser Arbeit, ausgehend von dem von RAHN *et al.* [153] entwickelten Primerpaar 139/142 etabliert und zur Quantifizierung von Salmonellen aus Bioaerosolen durch eine Realtime PCR modifiziert (ohne vorausgehende Anreicherung). Zunächst wurde die zur Quantifizierung nötige Standardreihe etabliert. Dazu wurden DNA Extrakte aus *Salmonella* Typhimurium CIP 60.62^T Reinkulturen bekannter Konzentration eingesetzt. Die Kopienzahl wurde unter Einberechnung des spezifischen Genomgewichts sowie des GC-Gehalts für den eingesetzten DNA Extrakt berechnet (siehe 2.10.2). Da eine Studie von FEY und EICHLER [151] zeigt, dass in der stationären Wachstumsphase von *Salmonella* nur ein *invA*-Gen pro Zellen vorhanden ist, und in Bioaerosolen sehr wahrscheinlich aufgrund der Umgebungsbedingungen keine Zellen außerhalb der stationären Wachstumsphase zu erwarten sind, wurde auch in dieser Arbeit ein *invA*-Gen pro Zelle zur Berechnung angenommen. Daraus ließ sich weiterhin ein detektiertes Zielgen einer Salmonellen-Zelle gleich setzen.

Mit den in dieser Arbeit als spezifisch ermittelten Bedingungen konnte eine hohe Korrelation zwischen eingesetzten *invA* Gen Konzentration und den korrespondierenden C_T-Werten ermittelt werden (Abbildung 23, r²=0,99). Zusätzlich konnte ein breiter Konzentrationsbereich (1 bis 10⁹ *invA* Gene) abgedeckt werden, der es ermöglicht, vor allem auch geringe Konzentrationen spezifisch zu detektieren.

Voraussetzung für eine genaue Quantifizierung anhand der Realtime PCR ist eine gleich hohe Reaktionseffizienz für Standard und Umweltprobe, was durch die Mit-Extraktion von potentiellen Hemmstoffen aus Umweltproben (Huminsäuren, Proteine, Phenol, Nicht-Ziel-DNA etc.) erschwert werden kann [125-127]. Auch aus Bioaerosolen könnten solche hemmenden Substanzen mit extrahiert werden [128, 129]. Bioaerosole in Tierställen bestehen aus sehr komplexen Stäuben, die Futtermittel, Einstreu, Fäkalbestandteile, Hautpartikel, Haare, Hautschuppen oder

Federn enthalten können [130]. Diese können zu einer Hemmung der PCR führen. Neben den in den Umwelt-Proben enthaltenen Inhibitoren kann auch DNA anderer Organismen (Nicht-Ziel-DNA) zu einer Beeinflussung der spezifischen PCR-Reaktion führen [131], da auch sie die Effektivität der *Taq*-Polymerase einschränken. In dieser Arbeit wurden aus diesem Grund Versuche unternommen, den Einfluss dieser Hemmstoffe auf die Quantifizierung abzuschätzen, bzw. die Wiederfindung definierter *invA* Gen-Konzentrationen in Kombination mit *non-target*-DNA und anschließend in originären Bioaerosolen mittels Realtime PCR zu bestimmen. Bei Einsatz unterschiedlicher *Salmonella* Zellzahlen in Kombination mit konstant hohen *Escherichia coli* Zellzahlen wurde eine Korrelation zwischen eingesetzter Zellzahl und detektierter Zahl *invA* Gene gefunden (Abbildung 23, $r^2=0,99$). Die Wiederfindung betrug dabei zwischen 15% und 28%. Bei Untersuchungen zur Wiederfindung von Salmonellen in originären Bioaerosolproben, die in Putenställen mittels Filtration und Impingement genommen wurden, konnte eine höhere Wiederfindungsrate zwischen 24 % (Filtration) und 66 % (Impingement) ermittelt werden (Abbildung 26). Für dieses Realtime PCR-Nachweissystem lag die Reaktionseffizienz unter idealen Bedingungen bei etwa 90% (3.7.1). In Umweltproben, bedingt durch enthaltene Hemmstoffe, kann diese z. T. reduziert sein und so zu dieser geringeren Wiederfindungsrate beitragen. Darüber hinaus könnte eine unvollständige DNA Extraktion eine Ursache sein, da die DNA Extraktionseffizienz in etwa den Größenordnungen der hier gefundenen Verluste entspricht.

Um das etablierte Realtime PCR Protokoll an originären Bioaerosolproben zu überprüfen, wurden Bioaerosolproben an unterschiedlichen Arbeitsplätzen in einem Masthähnchenstall (n=7 (Impingement), n=7 (Filtration)) und einem Entenstall (n=75) mittels Impingement und Filtration gesammelt.

Im Masthähnchenstall war im Vorfeld eine Erkrankung der Tiere eines Stallabteils mit Salmonellen festgestellt worden. In diesem Stall konnten für die Filtrationsproben sowohl mittels Kultivierung (Wismut-Sulfit-Agar) als auch Realtime PCR Salmonellen detektiert werden. Die Konzentration betrug hierbei $3,3 \times 10^2$ KBE m^{-3} bzw. $1,5 \times 10^5$ Zielgene m^{-3} Luft. Damit lagen die molekularbiologisch ermittelten Konzentrationen erheblich über den durch Kultivierung ermittelten Konzentrationen.

Bei den Entenstallproben verschiedener Arbeitsplätze wurden in 13 von 75 Proben (17,3%) positive *PCR*-Produkte mit dem Salmonellen-Primersystem nachgewiesen. Diese Proben wurden mittels personen-getragener Geräte gesammelt, die die Fraktion der inhalierbaren Partikel nach EU DIREKTIVE 2000/54 [225] erfasst und so die tatsächliche Depositionstiefe der Organismen im menschlichen Atemtrakt nachstellt. Die so ermittelten Konzentrationen lagen dabei im Bereich von $2,5 \times 10^1$ bis 3×10^6 Zielgenen m^{-3} Luft in Abhängigkeit vom Arbeitsplatz (Abbildung 28). Besonders hervor zu heben sind dabei einerseits die Proben, die während einer Impfaktion der Tiere genommen wurden, auch wenn es nur ein sehr kleiner Stichprobenumfang ist ($n=2$). In beiden Proben wurden Salmonellen mittels des in dieser Arbeit etablierten Quantifizierungssystems in einer relativ hohen Konzentration von im Mittel $9,6 \times 10^4$ *invA* Genen m^{-3} Luft nachgewiesen. Auch in den Bioaerosolproben, die während der Schlachtung der gleichen Tiere genommen wurden, konnten vor allem in den Proben der „Hänger“ ($n=4$; $1,4 \times 10^5 \pm 4,2 \times 10^2$ *invA* Gene m^{-3}) und auch der „Stecher“ ($n=2$; $2,2 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^5$ *invA* Gene m^{-3}) sehr hohe Konzentrationen Salmonellen ermittelt werden. Damit kann unter Berücksichtigung der von WATHES *et al.* [203] und VON DARLOW *et al.* [205] vermuteten nötigen Infektionsdosis von $<10^5$ Zellen für die aerogene Übertragung ein entsprechenden Infektionsrisiko für dort tätige Menschen bestehen.

Prinzipiell ist die Spezifität der *PCR* bzw. Realtime *PCR* durch die Auswahl der Primer und den Amplifikationsbedingungen gegeben. Die Primer und deren Bindungsstellen im jeweiligen Ziel-Genom werden *in-silico* anhand von Datenbanken ausgewählt und überprüft, die spezifischen Amplifikationsbedingungen werden im Anschluss *in-vitro* ermittelt. Da in Umweltproben aber auch Organismen bzw. deren DNA von bislang unbekannten (nicht in den Datenbanken vorkommenden) Organismen vorhanden ist, kann eine unspezifische Primerbindung im Vorfeld nicht ausgeschlossen werden. So ist eine Spezifitätsüberprüfung der erhaltenen *PCR*-Produkte aus Umweltproben notwendig.

Um dies für das entwickelte Realtime *PCR* System zu überprüfen, wurde mit dem aus den Bioaerosolproben des Masthähnchenstalles gewonnenen *PCR*-Produkt eine Klonbibliothek angelegt. Die anschließende Auswertung der in *Escherichia coli* klonierten *InvA*-Genfragmente ergab eine Ähnlichkeit von 98,9% bis 99,6% aller

sequenzierten Inserts zum *invA*-Gen von *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar typhimurium (EU348365). Hierdurch wurde die Spezifität des entwickelten Protokolls auch für komplexe Umweltproben bestätigt (Abbildung 29).

In Abbildung 43 ist abschließend das in dieser Arbeit entwickelte Fließschema zur spezifischen Quantifizierung von Salmonellen anhand der Realtime PCR schematisch dargestellt.

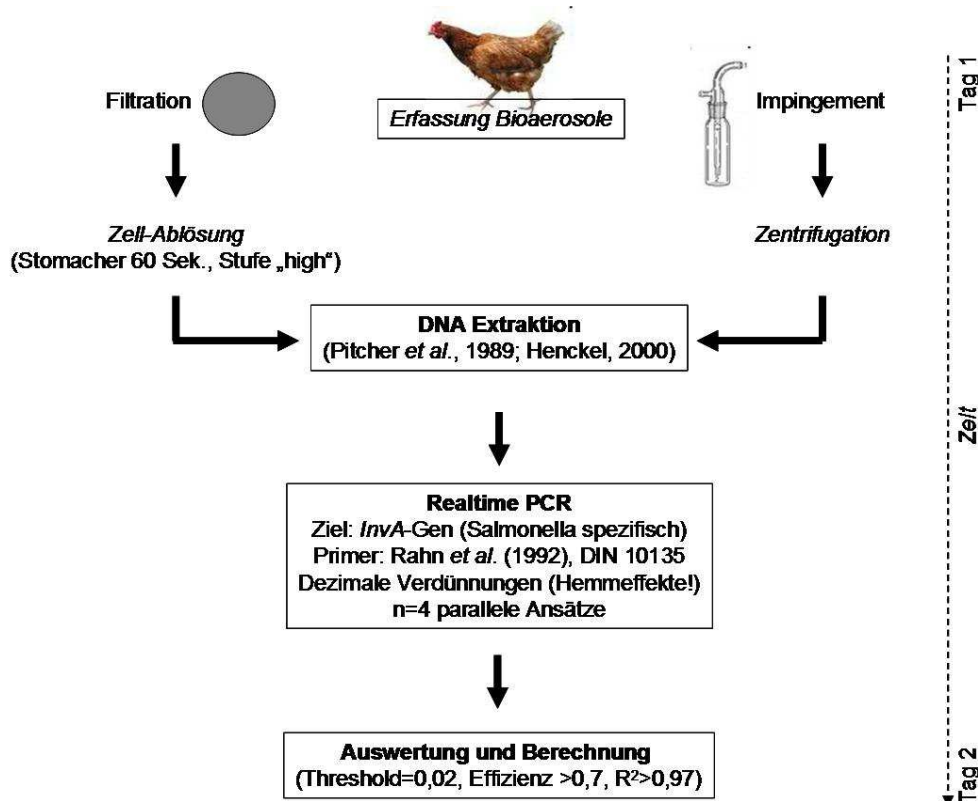


Abbildung 43 Fließschema des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens zur Quantifizierung von Salmonellen anhand der Realtime PCR.

4.4.2. Etablierung des Nachweises zur Detektion Allergie-Auslösender Erreger am Beispiel der Gattung Thermoactinomyces

Neben infektiösen Mikroorganismen spielen Allergie-Auslösende Organismen eine wichtige Rolle bei Atemwegserkrankungen von Arbeitern an durch luftgetragene Mikroorganismen hoch belasteten Arbeitsplätzen. Im Gegensatz zu Infektionen, die durch ein aktives oder passives Eindringen mit folgender Vermehrung eines pathogenen Organismus in einen Wirt gekennzeichnet ist und so eine Immunreaktion des Körpers auslöst, steht die Allergie. Bei einer allergischen Reaktion kommt es zu einer Immunantwort auf ansonsten harmlose Allergene/Antigene, häufig Proteine, vorwiegend Enzyme. Typisch für Allergien ist, dass es bei Kontakt zunächst zu keiner

direkten Reaktion kommt. Erst nach einer Sensibilisierung des Immunsystems, d. h. eine allergenspezifische IgE Antikörperbildung, kommt es bei erneutem Kontakt zu allergischen Reaktionen, wie z. B. Hautausschlag, Atemnot, Reizhusten, im schlimmsten Fall zu einem anaphylaktischen Schock.

Allergische Erkrankungen durch Inhalation von bakteriellen Organismen, deren Bestandteile oder Stoffwechselprodukte verursachen unterschiedliche Krankheitsbilder beim Menschen. Es wird zwischen der Exogen allergischen Alveolitis (EAA) und dem organic dust toxic syndrome (ODTS) unterschieden [11]. Beide werden als akute Erkrankungen beschrieben, die EAA kann auch chronisch werden. Je nach Arbeitsplatz besitzt die EAA unterschiedliche Bezeichnungen (z. B. Farmerlunge, Holzarbeiterlunge, Pilzarbeiterlunge). Dazu kommen Rhinitis und Asthma als Erkrankungen der oberen Atemwege, ausgelöst durch allergische Reaktionen auf Pilze [61, 90, 226].

Spezies der Gattung *Thermoactinomyces* werden immer wieder in Bioaerosolen verschiedenster, hoch belasteter Arbeitsplätze nachgewiesen [47, 75-77, 227]. Einige Spezies dieser Gattung stehen deshalb in Verdacht, allergenes Potential im Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen an solchen Arbeitsplätzen zu besitzen. So zeigen KLEYN *et al.* [47], daß Antiseren von Arbeitern, die an einer Exogen-Allergischen Alveolitis erkrankt waren, u. a. Antikörper für *Thermoactinomyces vulgaris* aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch SHEN *et al.* [228] und HUSMANN *et al.* [229]. SEPPÄ *et al.* [85] konnten eine starke inflammatorische Reaktion bei Mäusen auf eine Antigen-Lösung von *Thermoactinomyces vulgaris* beobachten. Eine intra-nasale Gabe der Antigene löste bei den Mäusen eine allergische Alveolitis, ähnlich der menschlichen Farmerlunge, aus.

Die Gattung *Thermoactinomyces* umfaßt derzeit zwei Arten: *Thermoactinomyces vulgaris* und *Thermoactinomyces intermedius*. Nur für diese beiden, aktuell zur Gattung *Thermoactinomyces* gehörenden Arten, sollte in dieser Arbeit ein spezifisches Nachweissystem etabliert werden. In den letzten Jahren wurden einige ursprünglich der Gattung zugeordnete Arten nach näherer Untersuchung der 16S rRNA Gensequenz, DNA G+C Gehalt, Phänotyp sowie Fettsäureprofilen [155] anderen Gattungen zugeordnet (siehe Tabelle 11). Diese Nicht-Ziel-Organismen sollten durch das in diesem Projekt zu etablierende Nachweissystem ausgeschlossen werden. Zum Nachweis und zur Identifizierung von Bakterien wird häufig das 16S rRNA Gen verwendet. Dies eignet sich aufgrund seines Vorkommens

in allen Bakterien besonders dazu. Die gruppenspezifischen Sequenzunterschiede können dazu heran gezogen werden. Auch wenn sich die 16S rRNA Gensequenzen der Spezies der Gattung *Thermoactinomyces* und die der Nicht-Ziel-Organismen unterscheiden, weisen diese trotzdem einen hohen Grad an Sequenzähnlichkeit auf. Nur die unterschiedlichen Bereiche können als Ansatzpunkt der PCR zum spezifischen Nachweis der Gattung genutzt werden. Da für die Gattung *Thermoactinomyces* nur wenige Sequenzdaten in öffentlichen Datenbanken zur Verfügung steht, können andere Gene als mögliche Ziele eines Nachweissystems nicht überprüft werden.

Da die DNA-Extraktionsmethodik bei der Etablierung des Nachweises für Spezies der Gattung *Salmonella* den höchsten Einfluß auf Verluste während der Aufarbeitung zeigte (3.6.1), sollte auch für die Gattung *Thermoactinomyces* eine optimale DNA-Extraktionsmethodik ermittelt werden. Wichtig ist neben einer hohen quantitativen Ausbeute auch eine hohe Qualität (möglichst wenige Verunreinigungen durch z. B. Proteine, wenig gescherte DNA). Dies wurde am Beispiel der beiden Typstämme, sowie eines zusätzlichen Stammes der Spezies *T. vulgaris* (Tabelle 11) untersucht. Gleichzeitig wurden Stämme der nah verwandten, aber mittlerweile nicht mehr zur Gattung gehörenden Gattungen eingesetzt (Nicht-Ziel-Organismen, Tabelle 11). Die DNA-Extraktion mit vorangehendem enzymatischem Zellaufschluss war hierbei nicht erfolgreich. Dies kann auf die hohe Beständigkeit der Zellwände dieser Gram-positiven Organismen zurückgeführt werden. Verschiedene Enzyme weisen eine unterschiedliche Effizienz zur Lyse bakterieller, vor allem Gram-positiver Organismen auf: Lysozym ist inaktiv bei Staphylokokken und verschiedenen *Bacillus* Spezies; Lysostaphin lysiert nur Staphylokokken [230]; Proteinase K ist sehr effektiv zur Lyse von Gram-negativen, aber nicht von Gram-positiven Bakterien [231, 232]; Achromopeptidase lysiert zwar viele Gram-positive Bakterien (außer *Mycobacterium* sp. und *Corynebacterium* sp.), führt aber oft zu Scherung der DNA [233]. Ein mechanischer Zellaufschluss mit anschließender enzymatischer Lyse unter Verwendung des GenElute Plant Genomic DNA Kits (Sigma Aldrich, Deutschland) führte jedoch zu quantitativ hohen DNA-Mengen einer hohen Qualität. Auch ZHOU *et al.* [214] beschreiben um das zwei- bis sechsfach höhere extrahierte DNA Mengen aus Gram-positiven Organismen nach physikalischem Aufschluß der Zellen durch mörsern oder mehrere Gefrier- Auftau-Zyklen.

Zur Etablierung des spezifischen Primersystems zur Detektion von *Thermoactinomyces* sp. wurde DNA aller Stämme (Tabelle 11), die eine hohe Sequenzähnlichkeit des 16S rRNA Gens zur Ziel-Gattung aufwiesen, verwendet. Die Anwendbarkeit der entwickelten Primer wurde für jedes System zunächst *in-silico* anhand der NCBI *Nucleotide* Datenbank (BLAST) erprobt. Zeigte sich deren Spezifität, wurden die Systeme anschließend in eine PCR eingesetzt und nach Ermittlung der spezifischen Reaktionsbedingungen ggf. für die Realtime PCR optimiert.

Insgesamt wurden drei Primersysteme zum Nachweis von *Thermoactinomyces* sp. erprobt (Tabelle 16). Zwar erwiesen sich alle drei *in-silico* und auch in der nachfolgenden PCR als spezifisch, jedoch konnte für die beiden Primerkombinationen NSPTf/TAcRmod und NSPTf/TAM601 keine befriedigende Reaktionseffizienz in der Realtime PCR ermittelt werden (60%). Dies wurde auf die Bildung einer stabilen Haarnadelstruktur innerhalb des Gens zurückgeführt (Abbildung 31). Erst die Kombination NSPTf-7/TAcRmod zeigte bei spezifischer Amplifikation eine ausreichende Reaktionseffizienz (ca. 70%) in der Realtime PCR, die eine mathematisch abgesicherte Quantifizierung durchführbar macht [234].

Da neben der Reaktionseffizienz der Realtime PCR potentiell mitextrahiertes Matrixmaterial der Umweltproben zur Beeinflussung der Quantifizierung führen kann [234], wurde der Einfluss von originären Bioaerosolproben untersucht. Hierbei konnte kein Hemmeffekt durch mitextrahiertes Matrixmaterial aus Bioaerosolproben gefunden werden (Abbildung 35).

Prinzipiell ist die Spezifität der PCR bzw. Realtime PCR durch die Auswahl der Primer und den Amplifikationsbedingungen gegeben. Die Primer und deren Bindungsstellen im jeweiligen Ziel-Genom werden *in-silico* anhand von Datenbanken ausgewählt und überprüft, die spezifischen Amplifikationsbedingungen werden im Anschluss empirisch ermittelt. Da in Umweltproben aber auch Organismen bzw. deren DNA bislang unbekannter (und entsprechend nicht in den Datenbanken vorkommender) Organismen vorhanden ist, kann eine unspezifische Primerbindung im Vorfeld nicht ausgeschlossen werden. So ist eine Spezifitätsüberprüfung der erhaltenen PCR Produkte aus Umweltproben notwendig.

Um die Spezifität für das entwickelte Realtime PCR System zu überprüfen, wurde mit dem aus den Bioaerosolproben des Entenstalles (Abbildung 36) gewonnenen PCR

Produkt eine Klonbibliothek (n=44) angelegt. Die Auswertung der in *Escherichia coli* klonierten 16S rRNA-Genfragmente ergab für 30 sequenzierte Inserts eine Ähnlichkeit > 98,3% zu der Sequenz des 16S rRNA Gens von *Thermoactinomyces intermedius* (AJ251775) bzw. für 14 Inserts eine Ähnlichkeit > 99,7% zu der Sequenz des 16S rRNA Gens von *Thermoactinomyces vulgaris* (AF138736 und AF138732). Hierdurch wurde die Spezifität des entwickelten Protokolls auch für komplexe Umweltproben bestätigt.

Zur Quantifizierung in der Realtime PCR werden DNA-Standards mit bekannter Konzentration des Zielgens im Vergleich zu Umweltproben unbekannter Konzentration eingesetzt. Dabei basiert die Quantifizierung auf der Detektion bestimmter Genabschnitte. Diese sind in Bakterien jedoch in unterschiedlicher Kopienzahl vorhanden. Meist variiert die Kopien-Anzahl jedes Gens zwischen verschiedenen Gattungen, zum Teil sogar zwischen Spezies einer Gattung [235, 236]. Basierend auf Daten der bislang vollständig sequenzierten Genome schwankt z. B. die Anzahl des 16S rRNA Gens zwischen 1 und 15 Kopien (<http://ribosome.mmg.msu.edu/rndb/index.php>) in Abhängigkeit von der Spezies. Zur Quantifizierung anhand der Realtime PCR ist entsprechend die genaue Bestimmung der Genkopienzahl des Zielgens Voraussetzung.

Für Spezies der Gattung *Thermoactinomyces* liegt bislang keine vollständige Genom-Sequenz vor. Auch Datenmaterial zu Genomgröße und der Anzahl Operons verschiedener Gene ist für keine Spezies dieser Gattung bekannt. So müssten Berechnungen mit einem Durchschnittswert der bekannten Genome des Phylums *Firmicutes* bzw. der Klasse *Bacilli* durchgeführt werden, wodurch die Genauigkeit gemindert, für eine erste Abschätzung jedoch ausreichend ist. Der Mittelwert für ausgewählte Spezies innerhalb der Klasse *Bacilli* beträgt 7,35 Operons (basierend auf vollständig sequenzierten Genomen von 119 Spezies) und schwankt zwischen 4 und 14. Für das Phylum *Firmicutes* beträgt der Mittelwert 6,3 Operons (basierend auf sequenzierten Genomen von 191 Spezies) und schwankt zwischen 1 und 15 (nach <http://ribosome.mmg.msu.edu/rndb/index.php>, Stand Januar 2010). Um jedoch eine genauere Quantifizierung vornehmen zu können, ist eine Bestimmung der Anzahl unerlässlich. Aus diesem Grund wurde die Kopienzahl des 16S rRNA Gens anhand einer Southern-Blot-Hybridisierung [159] bestimmt. Hierbei konnte eine durchschnittliche Anzahl von 5,5 Operons pro Genom bestimmt werden (Abbildung

30, B). Eingrenzend ist zu sagen, dass ein unvollständiger Verdau der DNA nicht ausgeschlossen werden kann. Auch besteht bei größeren Fragmenten die Möglichkeit, dass zwei Operons pro Fragment hybridisieren, was zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Operon-Zahl führen könnte. Insgesamt liegt der ermittelte Wert in der Größenordnung der oben genannten Zahlen nah verwandter Gruppen. Diese Ergebnisse ermöglichen eine genauere Quantifizierung von *Thermoactinomyces* sp. anhand der Realtime PCR.

5. Allgemeine Abschlussbetrachtung

Bioaerosole in Tierställen beinhalten vielfältige Mikroorganismen in z. T. erheblichen Konzentrationen, die für Mensch und Tier eine erhebliche Gesundheitsgefährdung darstellen. Besonders für Menschen, die in diesen Tierställen arbeiten und so dauerhaft einer hohen Exposition ausgesetzt sind, müssen Lösungen für einen möglichst effektiven Schutz gefunden werden. Um passende Schutzvorkehrungen ableiten zu können, muss eine Gefährdungsbeurteilung gemäß den Vorgaben der Biostoffverordnung (BioStoffV) dieser Arbeitsplätze durchgeführt werden, bei der zur Expositionsabschätzung Informationen bezüglich Art und Menge der vorkommenden Mikroorganismen ermittelt werden. Die standardisierte Quantifizierung und Identifizierung von Mikroorganismen beruht derzeit auf kultivierungsabhängigen Verfahren [137]. Für die Ermittlung der „kolonie-bildenden Einheiten (KBE) an Gesamtbakterien und Gesamtschimmelpilzen als Parameter der Gesamtexposition, werden häufig Nährmedien verwendet, die vielen, jedoch nicht allen Mikroorganismen das Wachstum ermöglichen, und die nach längerer Bebrütungsdauer (24 Stunden bis 7 Tage, je nach Zielorganismen) ausgewertet werden müssen. Diese kultivierungsabhängige Vorgehensweise ist material- und vor allem zeitintensiv. Der Informationsgehalt der Ergebnisse (Gesamt KBE pro m³ Luft) ist jedoch häufig unzureichend, da durch die Wahl der Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Medium, Zeit etc.) jeweils nur die Organismen erfasst werden, die unter den jeweiligen Bedingungen vermehrungsfähig sind. Dazu kommt der durch die Sammlung bedingt Einfluss auf die Mikroorganismen, der die Kultivierbarkeit zusätzlich reduziert.

Zur Analyse von Bioaerosolen müssen diese im ersten Schritt möglichst quantitativ erfasst werden. Dies geschieht meist mittels Impaktion, Impingement oder Filtration. Je nach Sammelmethode und Tenazität der Mikroorganismen, ergeben sich Unterschiede in der biologischen bzw. physikalischen Sammeleffizienz, so dass Messungen, die mit unterschiedlichen Sammelsystemen durchgeführt wurden nur bedingt vergleichbar sind. Da die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegenüber dem Sammelstress speziesspezifisch ist, müssen diese Sammeleffekte vor allem beim speziesspezifischen, kultivierungsabhängigen Nachweis berücksichtigt werden. Auch in dieser Arbeit konnten sehr heterogene, gattungsspezifische Unterschiede der Tenazität gegenüber der beiden Sammelverfahren Impingement

und Filtration gefunden werden. Im Gegensatz zu kultivierungsbasierten Ansätzen haben kultivierungsunabhängige Methoden jedoch den Vorteil, dass die biologische Sammeleffizienz vernachlässigbar ist, da sie die Organismen unabhängig von ihrem Lebenszustand erfassen. Für diese Methoden ist zunächst die physikalische Sammeleffizienz des verwendeten Sammelsystems für die nachfolgenden Quantifizierungen ausschlaggebend. Anhand von DAPI Gesamtzellzahlbestimmungen wurde in dieser Arbeit die physikalische Sammeleffizienz von Mikroorganismen für die Filtration und das Impingement in Geflügelställen verglichen. Die in Putenställen und Masthähnchenställen mittels Impinger ermittelten GZZ-Konzentrationen lagen hier durchschnittlich bei nur 40% der mittels Filtration bestimmten Konzentrationen. Der statistische Vergleich zeigte für beide Tierhaltungsanlagen, dass die mittels Filtration gefunden Anteile jeweils signifikant ($\alpha=99\%$) über den mittels Impinger ermittelten Konzentrationen lagen.

Das zur kultivierungs-unabhängigen Quantifizierung in dieser Arbeit etablierte Realtime PCR Nachweissystem zeigte seine Eignung als eine alternative bzw. geeignetere Methode zur Detektion von Bakterien aus hoch belasteten Bioaerosolen in Tierställen am Beispiel des quantitativen Nachweises von a) infektiösen (Gattung *Salmonella*) sowie b) Allergie-Auslösenden Organismen (Gattung *Thermoactinomyces*). Die Spezifität konnte gezeigt werden und lässt (im Vergleich zur Kultivierung) schnelle Quantifizierungen innerhalb von zwei Tagen zu. Ein weiterer Vorteil ist die zusätzliche Erfassung toter Organismen, die ebenfalls ein allergenes Potential besitzen. Zusätzliche Faktoren, die die Quantifizierung mittels der Realtime PCR beeinflussen können, wie z. B. Hemmeffekte oder das Auftreten methodisch bedingter Verluste sowie deren Größenordnung durch die Aufarbeitung wurden untersucht. Während keinerlei Hemmeffekte durch mitextrahiertes Matrixmaterial ermittelt werden konnten, wurde die DNA Extraktionsmethode als stärkste Quelle potentieller Verluste ermittelt.

Unter Einsatz der so etablierten Nachweissysteme konnten in umfangreichen Umweltbioaerosolproben verschiedener Geflügelställe vor allem hohe Konzentrationen *Salmonella* sp. nachgewiesen werden. Die im Putenstall ermittelten Konzentrationen betrugen $1,5 \times 10^5$ Zielgene m^{-3} Luft, im Entenstall lagen sie im Bereich von $2,5 \times 10^1$ bis 3×10^6 Zielgenen m^{-3} Luft in Abhängigkeit vom Arbeitsplatz

Insgesamt wurden innerhalb der 83 Bioaerosolproben verschiedener Arbeitsplätze im Entenstall 13 Proben (15,7%) als positiv anhand des Nachweissystems für Salmonellen detektiert. *Thermoactinomyces* sp. wurden nur in einer Probe des Mastentenstalles, die einer Konzentration von $1,1 \times 10^5$ Zellen m^{-3} Luft entsprachen, nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Anwendung der Realtime PCR zur Quantifizierung und Identifizierung von Mikroorganismen in Bioaerosolen geeignet ist. Durch die Anwendung dieser Methode können sowohl qualitative (über spezifische Primersysteme), als auch quantitative Ergebnisse innerhalb von zwei Tagen erhalten werden. Vergleichbare Auswertungen mittels kultivierungsbasierter Verfahren nehmen z. T. Wochen in Anspruch; dazu kommt ein hoher Personal- und Zeitaufwand bis zur abschließenden Beurteilung. Weiterhin können durch die Realtime PCR Zielgruppen ausgewählter Mikroorganismen bis hin zur Gesamtzellzahl parallel in einem Ansatz bestimmt werden. Insgesamt ist die (Gefährdungs-)Beurteilung der Konzentration und der vorkommenden Arten von infektiösen und Allergie-Auslösenden Organismen in Bioaerosolen durch die individuelle Reaktion des einzelnen Menschen erschwert. Die unterschiedliche Reaktion auf Konzentration, Mikroorganismenart oder Mikroorganismen-Bestandteile ist hier bedeutsam. Bei dieser ist der persönliche Immunstatus, Art und Dauer der Belastung, eine eventuelle Vorbelastung durch andere Organismen oder auch eine Vorerkrankung mit in eine abschließende Betrachtung einzubeziehen. Diese Problematik erschwert auch die Findung von Expositions-Grenzwerten. Die hier gezeigten Ergebnisse geben aber eine Messstrategie an die Hand, um zukünftig einheitlich und vor allem in kurzer Zeit genaue Ergebnisse der vorkommenden Arten und Konzentrationen luftgetragener Bakterien, die ein gefährdendes Potential beinhalten, liefern.

Literatur

1. Schmauss, A., *Kolloidchemie und Meteorologie*. Colloid & Polymer Science, 1922. **31**(5): p. 266-269.
2. Orenstein, A.J. in *Proceedings of Pneumoconiosis 1959 Conference, Johannesburg*. 1960: Churchill, London.
3. Brown, J.H., et al., *Influence of Particle Size upon the Retention of Particulate Matter in the Human Lung*. Am J Pub Health, 1950. **40**: p. 450-480.
4. Deutsches Institut für Normung, *DIN EN481:1993 Workplaces atmospheres; size fraction definitions for measurement of airborne particles*. 1993. p. 16.
5. Kiefer, S., *Leistungsvergleich verschiedener Keimsammler zum Nachweis luftgetragener Bakterien*, in *Institut für Tierproduktion in den Tropen und Subtropen*. 1992, Universität Hohenheim: Hohenheim. p. S. 1-98.
6. Anonym, *Richtlinie 2008/50/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Mai 2008 über Luftqualität und saubere Luft für Europa*, in (ABl. L 163 vom 29.6.1999, S. 41). 2008, Amtsblatt der Europäischen Union L152/1.
7. Normenausschuss Sicherheitstechnische Grundsätze (NASG), *Arbeitsplatzatmosphäre - Leitlinien für die Messung von Mikroorganismen und Endotoxin in der Luft; Deutsche Fassung EN 13098:2000*. 2001.
8. Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN, *VDI Richtlinie 4253 Blatt 2: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilz-Konzentrationen in der Luft - Indirektes Verfahren nach Probenahme auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern*. 2004.
9. Marthi, B., et al., *Survival of Bacteria during Aerosolization*. Appl Env Microbiol, 1990. **56**(11): p. 3463-3467.
10. Dinter, P. und W. Müller, *The tenacity of bacteria in the airborne state. VI. Tenacity of airborne S. senftenberg*. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B, 1988 **186**(3): p. 278-288.
11. Kämpfer, P. und W.D. Weißenfels, *Luftgetragene Mikroorganismen in Abfallbehandlungsanlagen*, ed. Kämpfer P. und Weißenfels W. D. 1997, Lieskau: VAAM Fachgruppe Umweltmikrobiologie.
12. Donham, K., et al., *Environmental and health studies of farm workers in Swedish swine confinement buildings*. Br J Ind Med, 1989. **46**(1): p. 31-7.
13. Seedorf, J. und J. Hartung. *Emission of Airborne Particulates from Animal Production in "Sustainable Animal Production"*. 2000: Research Consortium Sustainable Animal Production.
14. Handley, B.A. und A.J.F. Webster, *Some factors affecting the airborne survival of bacteria outdoors*. J Appl Bacteriol, 1995. **79**: p. 386-378.
15. Cockell, C., et al., *Measurements of microbial protection from ultraviolet radiation in polar terrestrial microhabitats*. Polar Biology, 2003. **26**(1): p. 62-69.
16. Mancinelli, R.L. und M. Klovstad, *Martian soil and UV radiation: microbial viability assessment on spacecraft surfaces*. Planetary and Space Science, 2000. **48**(11): p. 1093-1097.

17. Prospero, J.M., et al., *Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust*. Aerobiologia, 2005. **21**(1): p. 1-19.
18. Anna Hervàs, L.C.I.R.E.O.C., *Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe*. Environmental Microbiology, 2009. **11**(6): p. 1612-1623.
19. Lighthart, B. und B.T. Shaffer, *Airborne Bacteria in the Atmospheric Surface Layer: Temporal Distribution above a Grass Seed Field*. Appl Environ Microbio, 1995. **61**(4): p. 1492-1496.
20. Jones, B.L. und J.T. Cookson, *Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area*. Appl. Environ. Microbiol., 1983. **45**(3): p. 919-934.
21. Olsson, M., et al., *Identification of Pneumocystis carinii f. sp. hominis gene sequences in filtered air in hospital environments*. J Clin Microbiol, 1998. **36**: p. 1737-1740.
22. Sawyer, M.H.C., et al., *Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms*. J Infect Dis, 1994. **169**: p. 91-94.
23. Brodie, E.L., et al., *Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations*. PNAS, 2007 **104**(1): p. 299-304.
24. Lighthart, B. und L. Stetzenbach, *Distribution of microbial bioaerosol*. In: Atmospheric microbial aerosols: theory and applications, ed. B. Lighthart und A. Mohr. 1994, New York, NY: Chapman & Hall. 68-98.
25. Shaffer, B.T. und B. Lighthart, *Survey of Culturable Airborne Bacteria at Four Diverse Locations in Oregon: Urban, Rural, Forest, and Coastal*. Mic Ecol, 1997. **34**(3): p. 167-177.
26. Bridge, P. und B. Spooner, *Soil fungi: diversity and detection*. Plant Soil, 2001. **232**: p. 147-154.
27. Lighthart, B., *The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere*. FEMS Microb Ecol, 1997. **23**: p. 263-274.
28. Fierer, N., et al., *Short-Term Temporal Variability in Airborne Bacterial and Fungal Populations*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(1): p. 200-207.
29. Jones, A.M. und R.M. Harrison, *The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations--a review*. Science of The Total Environment, 2004. **326**(1-3): p. 151-180.
30. Lindemann, J. und C. Upper, *Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants*. Appl Environ Microbiol, 1985. **50**: p. 1229-1232.
31. Anonym, *Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001)*. 2001, ABl. EG Nr. L 330 S. 32.
32. Mancinelli, R.L. und W.A. Shulls, *Airborne Bacteria in an Urban Environment*. Appl. Environ. Microbiol., 1978. **35**(6): p. 1095-1101.
33. Andersson, A., et al., *Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres*. J Appl Microbiol, 1999. **86**(4): p. 622-634.

34. Di Giorgio, C., et al., *Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of marseilles*. Athm Environ, 1996. **30**(1): p. 155-160.
35. Zucker, B.-A., S. Trojan, und W. Müller, *Airborne Gram-Negative Bacterial Flora in Animal Houses*. J Vet Med B, 2000. **47**(1): p. 37-46.
36. Rylander, R., *Endotoxin in the environment - exposure and effects*. Review J of Endotoxin research, 2002. **8**(4): p. 241-252.
37. Burrell, R. und S.H. Ye, *Toxic risks from inhalation of bacterial endotoxin*. British Journal of Industrial Medicine, 1990. **47**(10): p. 688-691.
38. Christiani, C., et al., *Cotton dust and endotoxin exposure and long term decline in lung function: results of a longitudinal study*. American Journal of Ind Medicine, 1999. **35**: p. 321-331.
39. Heederik, D., et al., *Relationship of airborne endotoxin and bacteria levels in pig farms with the lung function and respiratory symptoms of farmers*. Int Arch Occ Env Health, 1991. **62**(8): p. 595-601.
40. Kennedy, S., et al., *Cotton dust and endotoxin exposure-response relationships in cotton textile workers*. Am Rev Respir Dis, 1998. **135**: p. 194-200.
41. Bovallius, A., et al., *Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in sweden*. Appl. Environ. Microbiol., 1978. **35**(5): p. 847-852.
42. Blomquist, G., *Sampling of Biological Particles*. Analyst, 1994. **119**: p. 53-56.
43. Rhodes, G., et al., *Detection of Mycobacterium immunogenum by real-time quantitative Taqman PCR*. Journal of Microbiological Methods, 2008. **73**(3): p. 266-268.
44. Neef, A. und P. Kämpfer, *Molecular Identification of Airborne Microorganisms from Composting Facilities*, in *Microbiology of Composting*, R.N. Insam H., Klammer S., Editor. 2002, Springer Verlag Berlin Heidelberg. p. 585-594.
45. Albrecht, A., et al., *Vergleichende Messungen luftgetragener Bakterien mittels Filtration (MD8) und Impingement (AGI30) in einer Kompostierungsanlage*. Gefahrstoffe-Reinhalt Luft, 2005. **65**(9): p. 358-362.
46. Albrecht, A., et al., *Detection of airborne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation-independent methods*. Ann Agr Environ Med, 2007. **14**: p. 81-85.
47. Kleyn, J.G., W.M. Johnson, und T.F. Wetzler, *Microbial aerosols and actinomycetes in etiological considerations of mushroom workers' lungs*. Appl. Environ. Microbiol., 1981. **41**(6): p. 1454-1460.
48. Nielsen, E.M., B.H. Nielsen, und N.O. Breum, *Occupational bioaerosol exposure during collection of household waste*. Ann Agric Environ Med, 1995. **2**: p. 53-59.
49. Wust, G., et al., *Comparative studies of airborne, cultivatable microorganisms at selected sites of waste managements, domestic animal husbandry and in the surrounding residential area*. Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg, 1999. **104**: p. 703-11.

50. Laitinen, S., et al., *Workers' exposure to airborne bacteria and endotoxins at industrial wastewater treatment plants*. Am Ind Hyg Assoc J, 1994 **55**(11): p. 1055-1060.
51. Fannin, K.F., S.C. Vana, und W. Jakubowski, *Effect of an activated sludge wastewater treatment plant on ambient air densities of aerosols containing bacteria and viruses*. Appl. Environ. Microbiol., 1985. **49**(5): p. 1191-1196.
52. The World Bank, *World Development Indicators*. April 2010.
53. Jones, F.T., et al., *A survey of Salmonella contamination in modern broiler production*. J food prot, 1991. **54**(7): p. 502-507.
54. Ellerbroek, L., *Airborne microflora in poultry slaughtering establishments*. Food Microbiology, 1997. **14**(6): p. 527-531.
55. Lues, J.F.R., et al., *Microbial Composition in Bioaerosols of a High-Throughput Chicken-Slaughtering Facility*. Poult Sci, 2007. **86**(1): p. 142-149.
56. Haas, D., et al., *A case study of airborne culturable microorganisms in a poultry slaughterhouse in Styria, Austria*. Aerobiologia, 2005. **21**(3): p. 193-201.
57. Berndtson, E., M.L. Danielsson-Tham, und A. Engvall, *Campylobacter incidence on a chicken farm and the spread of Campylobacter during the slaughter process*. Int J Food Microbiol, 1996. **32**(1-2): p. 35-47.
58. González-Miret, M.L., M.L. Escudero-Gilete, und F.J. Heredia, *The establishment of critical control points at the washing and air chilling stages in poultry meat production using multivariate statistics*. Food Control, 2006. **17**(12): p. 935-941.
59. Reiter, M.G.R., et al., *Prevalence of Salmonella in a Poultry Slaughterhouse*. Journal of Food Protection, 2007. **70**(7): p. 1723-1725.
60. Nielsen, B. und N. Breum, *Exposure to air contaminants in chicken catching*. Am Ind Hyg Assoc J, 1995. **56**(8): p. 804-808.
61. Clark, S.C., R. Rylander, und L. Larson, *Airborne bacteria, Endotoxin and fungi in dust of poultry and swine confinement buildings*. Am Ind Hyg Ass J, 1983. **44**: p. 537-541.
62. Venter, P., J.F. Lues, und H. Theron, *Quantification of bioaerosols in automated chicken egg production plants*. Poult Sci, 2004. **83**(7): p. 1226-1231.
63. Seedorf, J., et al., *Concentrations and Emissions of Airborne Endotoxins and Microorganisms in Livestock Buildings in Northern Europe*. Journal of Agricultural Engineering Research, 1998. **70**(1): p. 97-109.
64. Cormier, Y., et al., *Airborne microbial contents in two types of swine confinement buildings in Quebec*. Am Ind Hyg Assoc, 1990. **51**: p. 304-309.
65. Radon, K., et al., *Air contaminants in different europe farming environments*. Ann Agr Environ Med, 2002. **9**: p. 41-48.
66. Hartung, J., J. Schulz, und J. Seedorf, *Bioaerosolemissionen aus einem Masthühnerstall (Emissions of bioaerosols from a broiler barn)*, in In: KRdL Expertenforum "Mikrobielle Luftverunreinigungen". 2005, Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN -Normenausschuß KRdL: Freising-Weihenstephan.

-
67. Seedorf, J., J. Schulz, und J. Hartung, *Outdoor measurements of airborne emission of staphylococci from a broiler barn and its predictability by dispersion models*, in *Environmental Exposure and Health* M.M. Aral, Editor. 2005, WIT Press: Southampton, UK. p. 528.
 68. Elliott, L.F., T.M. McCalla, und J.A. Deshazer, *Bacteria in the Air of Housed Swine Units*. Appl Environ Microbiol, 1976. **32**(2): p. 270-273.
 69. Oppliger, A., et al., *Exposure to Bioaerosols in Poultry Houses at Different Stages of Fattening; Use of Real-time PCR for Airborne Bacterial Quantification*. Ann Occup Hyg, 2008. **52**(5): p. 405-412.
 70. Ghasemkhani, M., A.K. Daini, und S. Eshraghi, *Assessment of exposures to bioaerosols among poultry feed plant workers*. J Applied Sci, 2006. **6**(9): p. 2051-2055.
 71. Martin, E., P. Kampfer, und U. Jackel, *Quantification and Identification of Culturable Airborne Bacteria from Duck Houses*. Ann Occup Hyg, 2009: p. mep088.
 72. Martin, E., et al., *Leucobacter aerolatus* sp. nov., from the air of a duck barn. nt J Syst Evol Microbiol, 2010. **60** p. 2838-2842.
 73. Kämpfer, P., et al., *Paenochrobactrum gallinarii* gen. nov., sp. nov., isolated from air of a duck barn, and reclassification of *Pseudochrobactrum glaciei* as *Paenochrobactrum glaciei* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2010. **60** p. 1493-1498.
 74. Anonym, *TRBA 466 Einstufung von Bakterien (Bacteria) und Archaeobakterien (Archaea) in Risikogruppen*. 2005, BArbBl. 7/2006. p. 33-193.
 75. Dutkiewicz, J., et al., *Exposure of agricultural workers to airborne microorganisms and endotoxin during handling of various vegetable products*. Aerobiologia, 2000. **16**(2): p. 193-198.
 76. Swan, J.R. und B. Crook, *Airborne microorganisms associated with grain handling*. Ann Agric Environ Med, 1998. **5**(1): p. 7-15.
 77. Lacey, J. und M.E. Lacey, *Micro-organisms in the air of cotton mills*. Ann Occup Hyg, 1987. **31**(1): p. 1-19.
 78. Hartung, J., *Art und Umfang der von Nutztierställen ausgehenden Luftverunreinigungen*. Dtsch tierärztl Wschr, 1998. **105**(6): p. 209-252.
 79. McDermid, A.S. und M.S. Lever, *Survival of Salmonella enteritidis PT4 and Salm. typhimurium Swindon in aerosols*. Letters in Applied Microbiology, 1996. **23**(2): p. 107-109.
 80. Pearce, R.A., J.J. Sheridan, und D.J. Bolton, *Distribution of airborne microorganisms in commercial pork slaughter processes*. J Food Microbiol, 2006. **107**: p. 186-191.
 81. Holt, P.S., B.W. Mitchell, und R.K. Gast, *Airborne Horizontal Transmission of Salmonella enteritidis in Molted Laying Chickens*. Av Dis, 1988. **42**(1): p. 45-52.
 82. Lacey, J. und B. Crook, *Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens*. Ann Occup Hyg, 1988. **32**(4): p. 515-533.

-
83. Curry, W.A., *Human Nocardiosis: A Clinical Review With Selected Case Reports*. Arch Intern Med., 1980. **140**(6): p. 818-826.
84. Lerner, P.I., *Nocardiosis Clin Inf Dis*, 1996. **22**(6): p. 891-903
85. Seppä, A., H. Jägerroos, und R.A. Mäntyjärvi, *Experimental Allergic Alveolitis in mice induced by Thermoactinomyces vulgaris*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 1984. **92A**(1-6): p. 125-131.
86. Lacey, J., *Thermoactinomyces sacchari sp.nov., a Thermophilic Actinomycete Causing Bagassosis*. J Gen Microbiol, 1971. **66**(3): p. 327-338.
87. Kado, C.I., *Erwinia and related genera*, in *The Prokaryotes, Volume 6: Proteobacteria: Gamma subclass*, M. Dworkin, et al., Editors. 2006, Springer: New York. p. 443-450.
88. Milanowski, J., et al., *Allergic Alveolitis Among Agricultural Workers in Eastern Poland: A Study Of Twenty Cases*. Ann Agric Environ Med, 1998. **5**(1): p. 31-43.
89. Van Rostenberghe, H., et al., *The Clinical Picture of Neonatal Infection with Pantoea Species*. Jpn J Infect Dis, 2006. **59** (2): p. 120-121.
90. Dutkiewicz, J., *Bacteria and Fungi in organic dust as potential health hazard*. Ann Agr Environ Med, 1997. **4**: p. 11-16.
91. Martin, E., et al., *Detection of Jeotgalicoccus spp. in poultry house air*. Sys App Microbiol, 2010. **33**(4): p. 188-192.
92. Dutkiewicz, J., L. Kus, und E. Dutkiewicz, *Hypersensitivity pneumonitis in grain farmers due to sensitization to Erwinia herbicola*. Ann Allergy, 1985. **54**(1): p. 65-68
93. Rylander, R., *Bacterial Toxins and Etiology of Byssinosis*. Chest 1981. **79**(34S-38S).
94. Rylander, R., *The role of endotoxin for reactions after exposure to cotton dust*. American Journal of Industrial Medicine, 1987. **12**(6): p. 687-697.
95. National Occupational Health and Safety Commission (NOHSC), *Adopted National Exposure Standards For Atmospheric Contaminants In The Occupational Environment [NOHSC:1003(1995)]*. 1995.
96. Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN, *Richtlinie VDI 4252 Blatt 2 : Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft; Aktive Probenahme von Bioaerosolen; Abscheidung von luftgetragenen Schimmelpilzen auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern*. 2004.
97. Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN, *Richtlinie VDI 4252 Blatt 3: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft – Aktive Probenahme von Bioaerosolen – Abscheidung von luftgetragenen Bakterien mit Impingern nach dem Prinzip der kritischen Düse*. 2004.
98. Wilson, W.J. und E.M. Blair, *Use of glucose bismuth sulphite ironmedium for the isolation of Bacillus typhosus and Bacillus proteus*. J Hyg, 1927. **26**: p. 374-391.
99. Albrecht, A. und P. Kämpfer, *Potential overestimation of the actinomycetes concentration by growth of thermophilic species of Bacillus and Geobacillus on selective media for thermophilic actinomycetes*. Air quality control, 2006. **9**: p. 365-367.

100. Amann, R.L., W. Ludwig, und K.H. Schleifer, *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol. Rev., 1995. **59**(1): p. 143-169.
101. Alvarez, J.A., M.P. Buttner, und L. Stetzenbach, *Use of Solid-Phase PCR for Enhanced Detection of Airborne Microorganisms*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(1): p. 374-376.
102. Roszak, D.B. und R.R. Colwell, *Survival Strategies of Bacteria in the natural Environment*. Microbiol Rev, 1987. **51**(3): p. 365-379.
103. Lebaron, P., et al. *The ecological role of VBNC cells in the marine environment*. in *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology (ISME)*. 1999. Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.
104. Grinshpun, S.A., et al., *Inlet characteristics of bioaerosol samplers*. Journal of Aerosol Science, 1994. **25**(8): p. 1503-1522.
105. Gärtner, A., L. Mölter, und A. Gessner, *Determination of the collection efficiency of an impinger for emission measurements of microorganisms*. Air quality control, 2008. **68**(9): p. 351-356.
106. Wang, Z., et al., *Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection*. Journal of Aerosol Science, 2001. **32**(5): p. 661-674.
107. Juozaitis, A., et al., *Impaction onto a Glass Slide or Agar versus Impingement into a Liquid for the Collection and Recovery of Airborne Microorganisms*. Appl. Environ. Microbiol., 1994. **60**(3): p. 861-870.
108. Li, C.-S., *Evaluation of Microbial Samplers for Bacterial Microorganisms*. Aerosol Science and Technology, 1999. **30**(2): p. 100 - 108.
109. Lin, W.-H. und C.-S. Li, *The Effect of Sampling Time and Flow Rates on the Bioefficiency of Three Fungal Spore Sampling Methods*. Aerosol Science and Technology, 1998. **28**(6): p. 511 - 522.
110. Stubner, S., *Enumeration of 16S rDNA of Desulfotomaculum lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen detection*. J Microbial Meth, 2002. **50**: p. 155-164.
111. Rompre, A. und P. Servais, *Detection and Enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches*. J Microbial Meth, 2002. **49**: p. 31-54.
112. Muyzer, G. und N.B. Ramsing, *Molecular Methods to study the organization of microbial communities*. Wat Sci Tech, 1995. **32**(8): p. 1-9.
113. DeLong, E.F. und N.R. Pace, *Environmental Diversity of Bacteria and Archaea*. Systematic Biology, 2001. **50**(4): p. 470 - 478.
114. Zeng, Q., et al., *Detection and quantification of Cladosporium in aerosols by real-time PCR*. J Env Mon, 2006. **8**: p. 153-160.
115. Olsen, K.N., et al., *Detection of Campylobacter bacteria in air samples for continuous real-time monitoring of Campylobacter colonization in broiler flocks*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(7): p. 2074-8.

116. Mullis, K. und H. Erlich, *Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction*. Symposia on Quantitative Biology, 1986. **LI**: p. 263-273.
117. Ramakers, C., et al., *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. Neurosci. Lett, 2003. **339**: p. 62-66.
118. Liu, W. und D.A. Saint, *Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics*. Biochem Biophys Res Comm, 2002. **294**(2): p. 347-353.
119. Rasmussen, R., *Quantification on the Light-Cycler*, in *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications.*, S. Meuer, Wittwer, C. and Nakagawara, K., Editor. 2001, Springer Press: Heidelberg. p. 21-34.
120. Cikos, S., A. Bukovska, und J. Koppel, *Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis*. BMC Molecular Biology, 2007. **8**(1): p. 113.
121. Vierstraete, A., *The exponential amplification of the gene in PCR* (<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>). 1999.
122. Wilhelm, J., *Quantitative Realtime PCR - Prinzipien und Probleme (Vortrag)*. 2005.
123. Chen, P.-S. und C.-S. Li, *Quantification of Airborne Mycobacterium tuberculosis in Health Care Setting Using Real-Time qPCR Coupled to an Air-Sampling Filter Method*. Aerosol Science and Technology, 2005. **39**(4): p. 371 - 376.
124. Makino, S.-I., et al., *Detection of anthrax spores from the air by real-Time PCR*. Let Appl Microbiol, 2001. **33**: p. 237-240.
125. Wilson, I.G., *Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification*. Appl Env Microbiol, 1997. **63**(10): p. 3741-3751.
126. McDevitt, J.J., et al., *Inhibition of quantitative PCR analysis of fungal conidia associated with indoor air particulate matter*. Aerobiol, 2007. **23**: p. 35-45.
127. Rossen, L., et al., *Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions*. Int J Food Microbiol, 1992. **17**: p. 37 - 45.
128. Roose-Amsaleg, C.L., E. Garnier-Sillam, und M. Harry, *Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples*. Appl Soil Ecol, 2001. **18**: p. 47-60.
129. Tsai, Y.L. und B.H. Olson, *Detection of Low Numbers of Bacterial Cells in Soils and Sediments by Polymerase Chain Reaction*. Appl Env Microbiol, 1992. **58**(2): p. 754-757.
130. Seedorf, J. und J. Hartung, *Stäube und Mikroorganismen in der Tierhaltung*. 2002: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL). 166.
131. Alvarez, J.A., M.P. Buttner, und L. Stetzenbach, *PCR for Bioaerosol Monitoring: Sensitivity and Environmental Interference*. Appl Environ Microbio, 1995. **61**(10): p. 3639-3644.
132. Bremer, H. und P.P. Dennis, *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, et al., Editors. 1987, American Society for Microbiology: Washington, D. C. p. 1553-1569.

133. Farrelly, V., F.A. Rainey, und E. Stackebrandt, *Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species*. Appl. Environ. Microbiol., 1995. **61**(7): p. 2798-2801.
134. James, D.O., *Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria*. FEMS Microbiology Reviews, 2010. **34**(4): p. 415-425.
135. Molecular Probes™ Invitrogen Corporation, *LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kits*. Product Information MP07007, 2004.
136. Rudi, K., et al., *Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples*. Appl. Environ. Microbiol., 2005. **71**(2): p. 1018-1024.
137. Kolk A., *Messverfahren für Gefahrstoffe (Analysenverfahren) - Verfahren zur Bestimmung der Bakterienkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz (Kennzahl 9430)*, in *IFA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen (Loseblatt-Sammlung)*. 2004, Hrsg.: Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin. Erich Schmidt, Berlin 1989 – Losebl.-Ausg.
138. Porter, K.G. und Y.S. Feig, *The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora*. Limnol Oceanogr, 1980. **25**: p. 943-948.
139. Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN, *VDI Richtlinie 4253 Blatt 3: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum quantitativen kulturellen Nachweis von Bakterien in der Luft - Verfahren nach Abscheidung in Flüssigkeiten*. 2004.
140. Jarynych, V.S., *Aerosole in der Veterinärmedizin*. 1976, Berlin: VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag.
141. Pitcher, D.G., N.A. Saunders, und O.R. J., *Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate*. Lett Appl Microbiol, 1989. **8**: p. 151-156.
142. Weisburg, W.G., et al., *16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study*. J Bac, 1991. **173**(2): p. 697-703.
143. Bimboim, H.C. und J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Acids Res., 1979. **7**(6): p. 1513-1523.
144. Sambrook, J. und D.W. Russel, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3. ed, ed. C.S.H.L. Press. Vol. 1. 2001, New York.
145. Zabin, I., *Beta-galactosidase and the lactose operon*. UCLA Forum Med Sci, 1979: p. 49-62.
146. Invitrogen Corporation, *TOPO TA Cloning®. Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products*. 2004.
147. Kumar, S., K. Tamura, und M. Nei, *MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment*. Brief Bioinform, 2004. **5**(2): p. 150-163.
148. Higgins, D., et al., *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**: p. 4673-4680.

149. Saitou, N. und M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol, 1987. **4**(4): p. 406-425.
150. Henckel, T.H.E., *Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaften im Reisfeld- und Waldboden*, in *Fachbereich Biologie*. 2000, Philipps-Universität Marburg/Lahn: Marburg.
151. Fey, A. und S. Eichler, *Establishment of Real-Time PCR-Based Approach for Accurate Quantification of Bacterial RNA-Targets in Water, Using Salmonella as a Model Organism*. Appl Environ Microbio, 2004. **70**(6): p. 3618-3623.
152. McClelland, M., K.E. Sanderson, und J. Spieth, *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Nature, 2001. **413**(25): p. 852-856.
153. Rahn, K., et al., *Amplification of an InvA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella*. Mol Cell Probes, 1992. **6**: p. 271-279.
154. Sanger, F., S. Nicklen, und A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
155. Yoon, J.-H., et al., *Proposal of the genus Thermoactinomyces sensu stricto and three new genera, Laceyella, Thermoflavimicrobium and Seinonella, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(1): p. 395-400.
156. Neef, A., et al., *Fluorescence based rRNA sensor systems for detection of whole cells of Saccharomonospora spp. and Thermoactinomyces spp.* Biosensors and Bioelectronics, 2003. **18**(5-6): p. 565-569.
157. Gerhardt, I., et al., *Methods for general and molecular bacteriology*. 1994, Washington D.C.: American Society for Microbiology. 791.
158. Brosius, J., et al., *Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology, 1981. **148**(2): p. 107-127.
159. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. Journal of Molecular Biology, 1975. **98**(3): p. 503-517.
160. Schwieger, F. und C.C. Tebbe, *A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(12): p. 4870-4876.
161. Berrang, M.E., N.A. Cox, und N.S. Bailey, *Measuring Air-Borne Microbial Contamination of Broiler Hatching Cabinets*. Appl Poul Sc, 1995. **4**: p. 83-87.
162. Hoover, N.J., et al., *Preharvest Sources of Salmonella Colonization in Turkey Production*. Poultry Sc, 1997. **76**(3): p. 1232-1238.
163. Galan, J.E. und C. Ginocchio, *Molecular and Functional Characterization of the Salmonella Invasion Gene invA: Homology of InvA to Members of a New Protein Family*. J Bac, 1992. **174**(13): p. 4338-4349.
164. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucl. Acids Res., 2003. **31**(13): p. 3406-3415.

-
165. Tamura, K., et al., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(8): p. 1596-1599.
166. Grinshpun, S.A., T. Reponen, und K. Willeke, *Aerosol characteristics of airborne actinomycetes and fungi*. Journal of Aerosol Science, 1997. **28**(Supplement 1): p. S667-S668.
167. Fahlgren, C., et al., *Annual Variations in the Diversity, Viability, and Origin of Airborne Bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. **76**(9): p. 3015-3025.
168. Crook, B. und J.L. Sherwood-Higham, *Sampling and assay of bioaerosols in the work environment*. J Aer Sci, 1997. **28**: p. 417-426.
169. Heidelberg, J.F., et al., *Effect of Aerosolization on Culturability and Viability of Gram-Negative Bacteria*. Appl Env Microbiol, 1997. **63**(9): p. 3585-3588.
170. Albrecht, A., T. Redmann, und P. Kämpfer, *Untersuchung luftgetragener Mikroorganismen in einem Aufzuchtstall für Legehennen während einer Impfaktion*. Dtsch Tierärztl Wschr, 2003. **110**(12): p. 473-512.
171. Eduard, W., *Exposure to non-infectious microorganisms and endotoxins in agriculture*. Ann Agr Environ Med, 1997. **4**(2): p. 179-186.
172. Anonym, *Einstufung von Organismen: Bakterien*. 2003, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL).
173. Goff, O.L., et al., *The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting*. Journal of Applied Microbiology, 2009. **108**(1): p. 325-340.
174. Crook, B., et al., *Airborne dust, ammonia, microorganisms, and antigens in pig confinement houses and respiratory health of exposed farm workers*. American Industrial Hygiene Association Journal, 1991. **52**(7): p. 271 - 279.
175. Dutkiewicz, J., et al., *Response of sawmill workers to work-related airborne allergens*. Ann Agric Environ Med, 2001. **8**(1): p. 81-90.
176. Finster, K.W., et al., *Demequina lutea sp. nov., isolated from a high Arctic permafrost soil*. Int J Syst Evol Microbiol, 2009. **59**(4): p. 649-653.
177. Kämpfer, P., et al., *Salinicoccus lutaonensis sp. nov., isolated from a coastal hot spring of Green Island (Lutao), Taiwan*. Int J Syst Evol Microbiol, 2010. **in Press**.
178. Xiao, J., et al., *Serinicoccus profundus sp. nov., an actinomycete isolated from deep-sea sediment, and emended description of the genus Serinicoccus*. Int J Syst Evol Microbiol, 2011. **61**(1): p. 16-19.
179. DeLucca, A.J., K.A. Brogden, und R. Engen, *Enterobacter agglomerans lipopolysaccharide-induced changes in pulmonary surfactant as a factor in the pathogenesis of byssinosis*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(4): p. 778-780.
180. Duan, H., et al., *Concentration of airborne endotoxins and airborne bacteria in Chinese rabbit houses*. Berl Münch Tierärztl Wochenschr, 2006. **190**: p. 40-44.
181. Lacey, J. und J. Dutkiewicz, *Bioaerosols and occupational lung disease*. Journal of Aerosol Science, 1994. **25**(8): p. 1371-1404.

182. Baseler, M.W., B. Fogelmark, und R. Burell, *Differential Toxicity of Inhaled Gram-negative Bacteria*. Infect Immun, 1983. **40**(1): p. 133-138.
183. Haglind, P., M. Lundholm, und R. Rylander, *Prevalence of byssinosis in Swedish cotton mills*. British Journal of Industrial Medicine, 1981. **38**(2): p. 138-143.
184. Skórska, C., et al., *Health effects of exposure to organic dust in workers of a modern hatchery*. Ann Agric Environ Med, 2007. **14**(2): p. 341-345.
185. Forster, D.H. und F.D. Daschner, *Acinetobacter Species as Nosocomial Pathogens*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 1998. **17**(2): p. 73-77.
186. Towner, K., *The Genus Acinetobacter*, in *The Prokaryotes, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass M*. Dworkin, et al., Editors. 2006, Springer: New York. p. 746-758.
187. Towner, K.J., *Biology of Acinetobacter spp.*, in *Acinetobacter: Microbiology, Epidemiology, Infections, Management*, E. und M.L.J.-G. Bergogne-Bérézin, and K. J. Towner, Editors. 1996, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 13-36.
188. Williams, R.E.O., A. Hirsch, und S.T. Cowan, *Aerococcus, a New Bacterial Genus*. J Gen Microbiol, 1953. **8**(3): p. 475-480.
189. Facklam, R. und J.A. Elliott, *Identification, classification, and clinical relevance of catalase- negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci*. Clin. Microbiol. Rev., 1995. **8**(4): p. 479-495.
190. Gopalachar, A., et al., *Urinary tract infection caused by Aerococcus viridans, a case report*. Med Sci Monit, 2004. **10**(11): p. CS73-75.
191. Popescu, G., et al., *An unusual bacterium, Aerococcus viridans, and four cases of infective endocarditis*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(3): p. 317-319.
192. Bjerrum, L., et al., *Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques*. Poult Sci, 2006. **85**(7): p. 1151-1164.
193. Scupham, J.A., et al., *Comparison of the Cecal Microbiota of Domestic and Wild Turkeys*. Mic Ecol, 2008. **56**(2): p. 322-331.
194. Lu, J., et al., *Microbial diversity and host-specific sequences of Canada goose feces*. Appl Environ Microbiol, 2009 **75**(18): p. 5919-5926.
195. Scupham, A.J., *Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys*. FEMS Microbiology Ecology, 2007. **60**(1): p. 136-147.
196. Turnbaugh, P.J., et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 480-484.
197. Lu, J. und J. Domingo, *Turkey fecal microbial community structure and functional gene diversity revealed by 16S rRNA gene and metagenomic sequences*. The Journal of Microbiology, 2008. **46**(5): p. 469-477.
198. Scupham, A., et al., *Antibiotic manipulation of intestinal microbiota to identify microbes associated with Campylobacter jejuni exclusion in poultry*. Appl Environ Microbiol, 2010 **76**(24): p. 8026-8032.

199. Dethlefsen, L., et al., *The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing*. PLoS Biol, 2008. **6**(11): p. e280.
200. Gill, S.R., et al., *Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1355-1359.
201. Robert Koch Institut, *RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte: Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis)*. Epidemiologisches Bulletin, 2009(13): p. 117-122.
202. Lever, M.S. und A. Williams, *Cross-infection of chicks by airborne transmission of Salmonella enteritidis PT4*. Letters in Applied Microbiology, 1996. **23**(5): p. 347-349.
203. Wathes, C.M., et al., *Aerosol Infections of calves and mice with Salmonella typhimurium*. Vet Rec, 1988. **123**: p. 590-594.
204. Harbaugh, E., et al., *Rapid Aerosol Transmission of Salmonella Among Turkeys in a Simulated Holding-Shed Environment*. Poult Sci, 2006. **85**(10): p. 1693-1699.
205. Darlow, H.M., W.R. Bale, und G.B. Carter *Infection of mice by the respiratory route with Salmonella typhimurium*. J Hyg, 1961. **59**: p. 303-8.
206. Dupont, H.L., et al., *Immunity in Shigellosis. II. Protection Induced by Oral Live Vaccine or Primary Infection*. The Journal of Infectious Diseases, 1972. **125**(1): p. 12-16.
207. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), *Food & Nutrition Paper 14/4 Rev. 1 Chapter 4.*, in *Manual of Food Quality Control. 4.Rev-1. Microbiological Analysis*. 1992: Rom.
208. AOAC International, *Official Methods of Analysis, 17th ed., Methods 967.25-967.28, 978.24, 989.12, 991.13, 994.04, and 995.20.* . 2000, AOAC International, Gaithersburg, USA.
209. Wallace, H.A. und T. Hammack, *Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, Chapter 5*. 1998.
210. Anonym, *Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of Salmonella spp., ISO 6579:2002 E standard*. 2002, ISO Central Secretariat 1, Genf, Schweiz.
211. Anonym, *Salmonella. Detection in foods, 5th ed. Method no. 71* 1999, Nordic Committee on Food Analysis (NKML), Oslo, Norwegen.
212. Deutsches Institut für Normung, *DIN 10135: Verfahren zum Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*. 1999, Deutsches Institut für Normung: Berlin. p. 8.
213. Einen, J., I.H. Thorseth, und L. Ovreas, *Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy*. FEMS Microbiology Letters, 2008. **282**(2): p. 182-187.
214. Zhou, J., M.A. Bruns, und J.M. Tiedje, *DNA recovery from soils of diverse composition*. Appl. Environ. Microbiol., 1996. **62**(2): p. 316-322.

215. Krsek, M. und E.M.H. Wellington, *Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil*. Journal of Microbiological Methods, 1999. **39**(1): p. 1-16.
216. Mumy, K.L. und R.H. Findlay, *Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR*. Journal of Microbiological Methods, 2004. **57**(2): p. 259-268.
217. Tindall, B.J., et al., *Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(1): p. 521-524.
218. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of, P., *The type species of the genus Salmonella Lignieres 1900 is Salmonella enterica (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet enterica in Salmonella enterica over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(1): p. 519-520.
219. Grimont, P.A.D. und F.-X. Weill, *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. 9th edition, 2007.
220. Wolffs, P.F.G., et al., *Direct Quantitation and Detection of Salmonellae in Biological Samples without enrichment, Using Two-Step Filtration and REal-Time PCR*. Appl Env Microbiol, 2006. **72**(6): p. 3896-3900.
221. Sukhan, A. und T. Kubori, *Genetic Analysis of Assembly of the Salmonella enterica Serovar Typhimurium Type III Secretion-Associated Needle Complex*. J Bac, 2001. **183**(4): p. 1159-1167.
222. Miroid, S. und K. Ehrbar, *Salmonella Host Cell Invasion Emerged by Acquisition of a Mosaic of Separate Genetic Elements, Including Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI1), SPI5, and sopE2*. J Bac, 2001. **183**(7): p. 2348-2358.
223. Kubori, T., et al., *Supramolecular Structure of the Salmonella typhimurium Type III Protein Secretion System*. Science 1998. **280** (5363): p. 602-605.
224. Galán, J.E. und A. Collmer, *Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells*. Science 1999. **284** (5418): p. 1322-1328.
225. Anonym, *Directive 2000/54/EC: On the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work*. 2000, Official Journal of the European Communities L 262/21 (online at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:262:0021:0045:EN:PDF>).
226. Schweigkofler, W., K. O'Donnell, und M. Garbelotto, *Detection and Quantification of Airborne Conidia of Fusarium circinatum, the Causal Agent of Pine Pitch Canker, from Two California Sites by Using a Real-Time PCR Approach Combined with a Simple Spore Trapping Method*. Appl. Environ. Microbiol., 2004. **70**(6): p. 3512-3520.
227. Kämpfer, P., et al., *Extrinsic Allergic Alveolitis (Hypersensitivity Pneumonitis) Caused by Sphingobacterium spiritivorum from the Water Reservoir of a Steam Iron*. J Clin Microbiol, 2005 **43**(9): p. 4908-4910.
228. Shen, Y.E., V.P. Kurup, und J.N. Fink, *Circulating antibodies against thermophilic actinomycetes in farmers and mushroom workers*. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1991. **35**(3): p. 309-316.

-
229. Husman, K., et al., *Precipitins against microbes in mouldy hay in the sera of farmers with farmer's lung or chronic bronchitis and of healthy farmers*. Eur J Respir Dis Suppl, 1987. **152**: p. 122-127.
230. Bollet, C., et al., *A simple method for the isolation of chromosomal DNA from gram positive or acid-fast bacteria*. Nucleic Acids Res, 1991 **19**(8): p. 1955.
231. Grimberg, J., S. Maguire, und L. Belluscio, *A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal E. coli DNA*. Nucleic Acids Res, 1989 **17**(21): p. 8893.
232. Grimberg, J., et al., *A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood*. Nucleic Acids Res, 1989 **17**(20): p. 8390.
233. Barsotti, O., et al., *Achromopeptidase for rapid lysis of oral anaerobic Gram-positive rods*. Oral Microbiology and Immunology, 1988. **3**(2): p. 86-88.
234. Cankar, K., et al., *Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms*. BMC Biotechnology, 2006. **6**(1): p. 37.
235. Rainey, F.A., et al., *Clostridium paradoxum DSM 730aT contains multiple 16s rRNA genes with heterogeneous intervening sequences*. Microbiol, 1996. **142**: p. 2087-2095.
236. Klappenbach, J.A., et al., *rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database*. Nucl. Acids Res., 2001. **29**(1): p. 181-184.

Anhang A

Ann. Occup. Hyg., pp. 1–10
 © The Author 2010. Published by Oxford University Press
 on behalf of the British Occupational Hygiene Society
 doi:10.1093/annhyg/meq054

Detection of Airborne Bacteria in a German Turkey House by Cultivation-Based and Molecular Methods

KERSTIN FALLSCHISSEL¹, KERSTIN KLUG², PETER KÄMPFER¹ and UDO JÄCKEL^{2*}

¹*Institute for Applied Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany;* ²*Federal Institute for Occupational Safety and Health, Nöldnerstraße 40-42, 10317 Berlin, Germany*

Received 22 February 2010; in final form 8 June 2010

Today's large-scale poultry production with densely stocked and enclosed production buildings is often accompanied by very high concentrations of airborne microorganisms leading to a clear health hazard for employees working in such environments. Depending on the expected exposure to microorganisms, work has to be performed under occupational safety conditions. In this study, turkey houses bioaerosols were investigated by cultivation-based and molecular methods in parallel to determine the concentrations and the composition of bacterial community. Results obtained with the molecular approach showed clearly its applicability for qualitative exposure measurements. With both, cultivation-based and molecular methods species of microorganism with a potential health risk for employees (*Acinetobacter johnsonii*, *Aerococcus viridans*, *Pantoea agglomerans*, and *Shigella flexneri*) were identified. These results underline the necessity of adequate protection measures, including the recommendation to wear breathing masks during work in poultry houses.

Keywords: airborne bacteria; bioaerosol; cloning analyses; PCR; poultry; 16S rRNA gene; turkey house

INTRODUCTION

According to the European Council Directive (EC) 2000/54/EC (Anonymous, 2000) on the 'Protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work', nature, degree, and duration of workers' exposure to microorganisms must be assessed. In Germany, the Ordinance on safety and health protection at work involving biological agents [Biological agents ordinance—BioStoffV (Anonymous, 1999)] is the national implementation of this EC Council Directive. Based on the possible infection risks of bacteria, viruses, fungi, or parasites, these biological agents have been classified into four risk groups (ranging from Risk Group 1, non-pathogenic, up to Risk Group 4, highly pathogenic microorganism)

for a work-related risk assessment in the European Union's statutory classifications (Annex III Directive 2000/54/EC), which have been implemented and extended, for example, in Germany by the Technical Rules for Biological Agents (TRBA) 460–466 (Anonymous, 1998, 2002a,b, 2005b) or in Switzerland by the Swiss guidelines (Anonymous, 2003a,b, 2004, 2005a). Depending on the expected exposure circumstances, work has to be performed taking occupational safety measures into consideration. This has already been implemented in the German rule TRBA 230 (Anonymous, 2007), in which the basic safety measures to protect workers, exposed to biological agents in forestry and agriculture are described in detail.

An exposure to biological agents via the air is of particular concern. Bioaerosols at agricultural working places show a very complex composition. The organic dust often found in these environments is composed of particles, originating from e.g. litter,

*Author to whom correspondence should be addressed.
 Tel: +49-30-51548-4188; fax: +49-30-51548-4171;
 e-mail: jaeckel.udo@baua.bund.de

manure, feed, silage, dandruff, or feather formation, and may contain viable but also non-viable microorganisms like fungi and bacteria or viruses. In particular, the large-scale poultry production with densely stocked and enclosed production buildings is often accompanied with very high concentrations of airborne microorganisms. However, for many specific work places in poultry houses, only few data about bioaerosol composition exist, which is a prerequisite for an adequate risk assessment.

The established methods for quantitative as well as qualitative exposition assessment are most often cultivation-based. However, these cultivation-based approaches have clear limitations because they underestimate the total number as well as the number of viable cells (see Amann *et al.*, 1995 for a summary). In addition to dead cells, samples may contain viable but non-cultivable organisms (VBNC) (Heidelberg *et al.*, 1997). As a further problem, viable organisms may be unable to grow in or on the media or at the incubation temperatures offered. Dead microbial cells are no longer infectious agents, but they may still cause allergic reactions. Other microbial components, e.g. toxic metabolites or cell components like endotoxins or mycotoxins, may induce additional adverse health effects. This refers as well to biological agents assigned to Risk Group 1. It has frequently been shown that, for example, inhalation of members of the genera *Thermoactinomyces* and *Saccharopolyspora* is associated with extrinsic allergic alveolitis of workers at agricultural working places (summarized in Sennekamp, 2004). This complex situation demonstrates the difficulties in bioaerosol investigation, and consequently, further sophisticated techniques are required in addition to the cultivation-based approaches. Microscopic methods like DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole) or Live Dead staining offer the opportunity of quantification but without identification. Polymerase chain reaction (PCR)-based techniques may provide the advance of quantification and identification in one step, independently of viability or cultivability. As those methods find more and more application within environmental studies today, they were not often engaged for occupational exposure studies. But even for these DNA-based methods, bias has been shown (Chandler, 1998; Polz and Cavanaugh, 1998; Acinas *et al.*, 2005). Application of both approaches may deliver a higher resolution of abundant bacteria. Therefore, in this study, bioaerosols sampled in turkey houses were investigated by cultivation-based and molecular methods in parallel to determine the concentration and the composition of the bacterial communities.

MATERIAL AND METHODS

Sampling site

Samples were taken in a conventional farmed turkey fattening facility (2×7000 animals) in Germany at the end of March 2007. The complex consisted of three equally constructed houses. Temperature and ventilation were regulated by inflow of ambient air through automatically controlled roller blinds. Turkeys were separated by male ($n = 6526$) and female ($n = 3500$) birds and had an age of 7 weeks at the time of aerosol sampling. The birds were allowed to move freely on the litter, consisting of straw, which was renewed once a week.

Bioaerosol sampling

Airborne microorganisms were sampled using filtration devices (MD8 aluminium stacks; Sartorius, Göttingen, Germany) and all-glass impingers (AGI-30; Ace Glass Inc., Vineland, NJ, USA) in parallel. An air volume of 0.6 m^3 (MP2-39; Umweltanalytik Holbach, Wadern, Germany) was collected by filtration within 20 min (28.1 l min^{-1}) through polycarbonate membrane filters (Millipore, Isopore™ ATTP $0.8\text{-}\mu\text{m}$ pore size). For impingement, a mean air volume of 0.342 m^3 (GSA 50-1; GSM GmbH, Neuss-Norf, Germany) was collected within 30 min (11.4 l min^{-1}) through impingers filled with $\sim 32 \text{ ml}$ sterile filtered 0.9% (w/v) NaCl solution. The sampled air volume was monitored by calibrated gas meters (Remus4; GSM GmbH, Neuss-Norf, Germany and Gallus 2000; Actaris, Karlsruhe, Germany). For each measurement, the filtration devices (vent downside) and impingers were mounted on a tripod (1.5 m height) in the middle of the houses. For each method, two samples were taken consecutively at the same daytime in both houses. Additionally, for each sampling method, one control sample was generated as described above but without air sampling.

Preparation of bioaerosol samples for cultivation and molecular methods

Cells collected on polycarbonate filters were detached into isotonic NaCl using a Stomacher 80 (Biomaster, Seward, UK). Impingement suspensions were used directly for analysis. For isolation and quantification of culturable bacteria, Tryptone Soy Agar (TSA; Roth, Karlsruhe, Germany), MacConkey Agar (McC; Merck KG, Darmstadt, Germany), and Actinomycete Isolation Agar (AIM; Difco, Detroit, MI, USA) were used. Bioaerosol sample liquids were serially diluted and aliquots of 0.1 ml plated onto media plates in triplicates. Visible colonies were counted after an incubation time of 3 days (McC), 7 days (TSA), and 14 days (AIM) at 37°C , respectively.

Recovery of isolates from bioaerosol samples and phylogenetic affiliation

After quantification of colony-forming units (CFUs), colonies were randomly chosen on the basis of different colony morphology and pure cultures were obtained by sub-cultivation on the corresponding media. Purity was checked by microscopy, Gram staining, and finally by 16S rRNA gene sequence analysis. Isolates of similar colony and cell morphology were studied by Restriction Fragment Length Polymorphism (Saiki *et al.*, 1985) and isolates of equivalent patterns were grouped together.

For genomic DNA extraction, a loop of bacterial cells was transferred and mixed with 1.0 g Zirconium beads (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) in a reaction tube. Afterwards, cells were mechanically disrupted by vortexing (Vortex-Genie2; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) this mixture for 1 minute. Subsequent DNA extraction steps were performed using the GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich, München, Germany) following the manufacturers' instructions. For identification, the 16S rRNA gene of one isolate representing one of each group was amplified by PCR using universal bacterial 16S rRNA gene primers (Weisburg *et al.*, 1991). The PCR was performed (iQ5 cycler; BioRad, München, Germany) using the following thermal programme: initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 32 cycles of denaturation at 95°C for 45 s, annealing at 57.3°C for 45 s, and extension at 72°C for 1 min. The reaction was stopped after a final extension of 15 min at 72°C by cooling to 4°C. Assays were performed in a total volume of 50 µl containing 27.8 µl RNase/DNase-free water (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), 5 µl 10× 'Taq' buffer [containing (NH₄)₂SO₄], 10 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl dNTP's (2 mM) (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 1 µl of each primer (10 pmol µl⁻¹) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany), 0.2 µl Taq (5 U µl⁻¹) (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), and 2 µl of genomic DNA. Amplicons were visualized after gel electrophoresis by ethidium bromide staining (0.05 µg ml⁻¹) for verification of product specificity. Specific PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the instructions of the manufacturer. Subsequent sequencing analyses were performed as remittance work (Agowa GmbH, Berlin, Germany). Sequence analysis was conducted using MEGA Version 4.0 software (Tamura *et al.*, 2007). The 16S rRNA gene sequences of ~1300 bp length were compared to available sequences in Genbank using Basic local alignment search tool (BLAST) provided

by the National Center for Biotechnology Information. Subsequently, all available 16S rRNA gene sequences of currently described type strains ['List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature' by J. P. Euzéby (<http://www.bacterio.cict.fr/>)] of the closest BLAST match were aligned by ClustalW included in MEGA 4.0. Evolutionary distances between the sequence pairs were calculated using the Kimura 2 parameter model. Phylogenetic trees were calculated by the neighbour-joining method. Stability of the tree branches was assessed with the bootstrap method using 1000 replicates.

Extraction of total community DNA from bioaerosol samples and determination of total cell count

Extraction of total community DNA directly from bioaerosol samples for the molecular approach and total cell counts (TCCs) by DAPI staining were conducted as described previously (Fallschissel *et al.*, 2009).

Cloning analyses, sequencing, and assignment of operational taxonomic units to known genera

DNA extracted directly from filtration samples of both turkey houses and from the impingement sample of House 2 was used for amplification of the bacterial 16S rRNA gene by the primers fD1 and rP1 (Weisburg *et al.*, 1991). These amplicons were employed to generate three independent *Escherichia coli* clone libraries (pGEM®T vector system kit; Promega, Madison, WI, USA); whereby gene inserts of 58 (Filtration House 1), 56 (Filtration House 2), and 51 (Impingement House 2) randomly picked clones were sequenced (~900 bp).

Comparative analysis was conducted using the MEGA programme Version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) as described above for affiliation of the sequences obtained from the isolates. A sequence similarity of ≥98% between the clone sequences was defined as the level for operational taxonomic unit (OTU) separation.

Diversity of the clone libraries was further investigated by rarefaction analysis. Calculations were carried out using the windows-based freeware programme Analytic Rarefaction by Steven Holland (Version 1.3; www.uga.edu/~strata/software/, April 2009).

RESULTS

Concentrations of airborne microorganisms (CFU and TCC)

Concentrations of overall cultivable bacteria (on TSA) ranged between 9×10^4 and 7×10^5 CFU m⁻³

air. The corresponding TCCs were up to two magnitudes higher (data not shown). Concentrations of cultivable airborne bacteria, sampled by the impingement device, were generally below those obtained for the filtration samples. This was found for the cultivation-dependent and for the cultivation-independent TCC approaches. The concentration of airborne bacteria quantified by selective media McC and AIM varied between 3×10^3 and 3×10^6 m⁻³ air and 3×10^4 and 3×10^5 CFU m⁻³, respectively.

Identification of isolates

By cultivation-based techniques, overall 28 isolates, mostly Gram-positive organisms (23 of 28 isolates, 82.1%), were obtained. Sequencing of the 16S rRNA genes of all isolates revealed sequence assignment to the three phyla Firmicutes ($n = 8$), Actinobacteria ($n = 15$), and Proteobacteria ($n = 5$). Most sequences could be allocated to the phylum Actinobacteria, and of these, most of them were closely related to the genera *Nocardiopsis* ($n = 4$, 14.3%) and *Brevibacterium stationis* ($n = 3$, 10.7%, Table 1). Four isolates belong to the genus *Bacillus* ($n = 4$, 14.3%). Five isolates were found to be most closely related to species *Aerococcus viridans*, *Acinetobacter johnsonii* ($n = 2$), *Pantoea agglomerans*, and *Shigella flexneri*. An overview of the identified species by cultivation is given in Table 1.

16S rRNA gene clone library

In general, within the investigated clone libraries, which were generated from DNA extracted directly from bioaerosol samples, mostly sequences closely related to Gram-positive organisms were found. Abundant OTU were most closely related to sequences of species of the genera *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Megamonas*, *Staphylococcus*, and *Weissella*. The relative proportions of those genera varied only slightly within the samples of both houses. A high amount of clone sequences next related (sequence similarity >99.5%) to Risk Group 2 assigned species *A. viridans*, *Olse-nella uli*, and *Staphylococcus saprophyticus* subs. *saprophyticus* were found (bold marked in Fig. 1). Overall, the proportion of assigned sequences to not yet cultured species was higher within the clone library obtained from the impingement bioaerosol samples of Poultry House 2 (>10%) than within the clone libraries from both filtration samples.

Rarefaction analysis evaluated statistically whether screening of these clones was sufficient to estimate the total diversity within each sample. Here, for clone libraries of all three samples, the analysis of 51, 56, and 57 clones, respectively, were sufficient to detect the majority of species (Fig. 2).

DISCUSSION

Concentrations of bacteria in the investigated turkey house air samples of this study (between 9×10^4 and 7×10^5 CFU m⁻³, TSA) were similar to those found in earlier investigations (Zucker *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2003; Venter *et al.*, 2004). In relation to the background level of airborne microorganisms with an average of ~ 100 CFU m⁻³ air (Bovallius *et al.*, 1978), these concentrations are notably high and exceeded the suggested occupational exposure level of 10^5 CFU m⁻³ suggested by Dutkiewicz *et al.* (2000). The total cell numbers observed directly by fluorescence microscopy were even up to two magnitudes higher underlining the high Work-Related-Microbial-Exposure-Level (WoRMEL) in investigated turkey houses. In contrast, Eduard and Heederik (1998) suggest a no-effect-level for respiratory disorders and fever of 10^6 – 10^8 spores m⁻³ air in highly contaminated working environments by a systematic review. To date, there have been no specifications regarding the exposure level from which breathing protection must be worn. In view of increasing respiratory disorders related to dust-laden environments, however, the recommendation has been formulated that respirators should be worn during activities in dust-laden atmospheres, even for activities of short duration (TRBA 230).

Comparison of quantification results showed differences in concentrations depending on the used sampling method. Both, TCCs as well as concentration of cultivable bacteria determined after impinger sampling were generally below those obtained by filter sampling. This can be explained by the lower physical sampling efficiency of the impingement device. An accumulation of particles e.g. at the bend of the impinger inlet tubes has been observed after sampling, which has been described as one effect lowering the sampling efficiency (Grinshpun *et al.*, 1994; Albrecht *et al.*, 2005; Gärtner *et al.*, 2008; Fallschissel *et al.*, 2009).

The significant differences in concentrations observed between the used detection methods can generally be attributed to the limited detection capability of cultivation-based approaches in general and in particular for bioaerosol monitoring (e.g. Oppliger *et al.*, 2008; Fallschissel *et al.*, 2009). Such differences are particularly very pronounced if a high percentage of dead microorganisms is present and/or the abundant microorganisms feature a high metabolic diversity. Basically, the air is considered as an extreme environment for microorganisms. Beside the VBNC (Heidelberg *et al.*, 1997), a high percentage of dead microorganisms can be expected, which

Table 1. Details for the isolates. Parameters shown are sampling location, nomenclature, incubation temperature, next related type species with corresponding accession number, and calculated 16S rRNA gene sequence similarity, as well as the risk group of the next related type species

Source	Isolate No.	Temperature (°C)	Most closely related taxon	Accession number	Sequence similarity (%) ^a	Risk Group ^b
House 1	MPA-34	37	<i>Aerococcus viridans</i>	M58797	100	2, TA
	MPA-31	37	<i>Bacillus</i> sp.	n.d.		
	MPA-23	37	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	AJ415377	100	1
	MPA-26	37	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	D83361	99.83	1, +
	MPA-35	37	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i>	AF527483	99.92	1
House 2	MPA-16B	26	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	X81663	99.77	2
	MPA-06C	26	<i>A. johnsonii</i>	X81663	99.77	2
	MPA-13A	26	<i>Bacillus</i> sp.	n.d.		
	MPA-29	37	<i>Bacillus</i> sp.	n.d.		
	MPA-28	50	<i>Bacillus</i> sp.	n.d.		
	MPA-11	26	<i>Brevibacterium stationis</i>	AJ620367	100	1
	MPA-08	26	<i>B. stationis</i>	AJ620367	100	1
	MPA-27	37	<i>B. stationis</i>	AJ620367	100	1
	MPA-32	37	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	46753/X80629	100	1
	MPA-18	26	<i>Glycomyces arizonensis</i>	AY462042	97.06	n.a.
	MPA-33	37	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>	AY028926	98.40	1
	MPA-09	26	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	AM040156	99.10	n.a.
	MPA-03	26	<i>Microbacterium indicum</i>	AM158907	98.00	n.a.
	MPA-12	26	<i>Nocardiopsis alba</i>	X97883	100	1
	MPA-07	26	<i>N. alba</i>	X97883	99.77	1
	MPA-14A	26	<i>Nocardiopsis prasina</i>	X97884	99.77	1
	MPA-06A1	26	<i>N. prasina</i>	X97884	99.77	1
	MPA-20B	37	<i>Pantoea agglomerans</i>	AF130953	99.54	2
	MPA-17	26	<i>Rathayibacter festucae</i>	AF159365	99.91	1
	MPA-02	26	<i>Rhodococcus fascians</i>	X79186/X81930	100	1
	MPA-22A2	37	<i>Shigella flexneri</i>	X96963	99.57	2
	MPA-05	26	<i>Streptomyces</i> sp.	n.d.		
	MPA-30	37	<i>Streptomyces</i> sp.	n.d.		

n.a. = Not assigned within German TRBA (TRBA 466); n.d. = Genera are, based on 16S rRNA gene sequence analysis alone, not certainly distinguishable on species level.

^aCalculation is based on multiple alignment of ~1300 bp of the 16S rRNA gene.

^bAccording to the German TRBA 466.

will explain the differences. Overall, by both methodological approaches, members of 28 different bacterial genera were detected. The variety of different genera that have been observed reflects the high diversity and indicates the presence of bacteria originating from different microbial habitats.

The animals seem to be the most important sources of airborne microorganisms in the investigated turkey houses. Lactobacilli, which we detected in confinements air by the molecular cloning approach e.g. have been detected as dominant colonizer in tur-

key faeces (Lu and Domingo, 2008). Furthermore, the molecular assay revealed sequences most closely related to the family *Enterobacteriaceae* and to yet uncultured species which were nearly all obtained as poultry intestinal microbiota (Bjerrum *et al.*, 2006; Bull *et al.*, 2006; Gill *et al.*, 2006; Scupham, 2007a,b; Dethlefsen *et al.*, 2008; Lu and Domingo, 2008; Scupham *et al.*, 2008; Turnbaugh *et al.*, 2009). *Staphylococcus* spp., which we found as one dominant group in 16S rRNA gene clone libraries, have commonly been found in the air of poultry

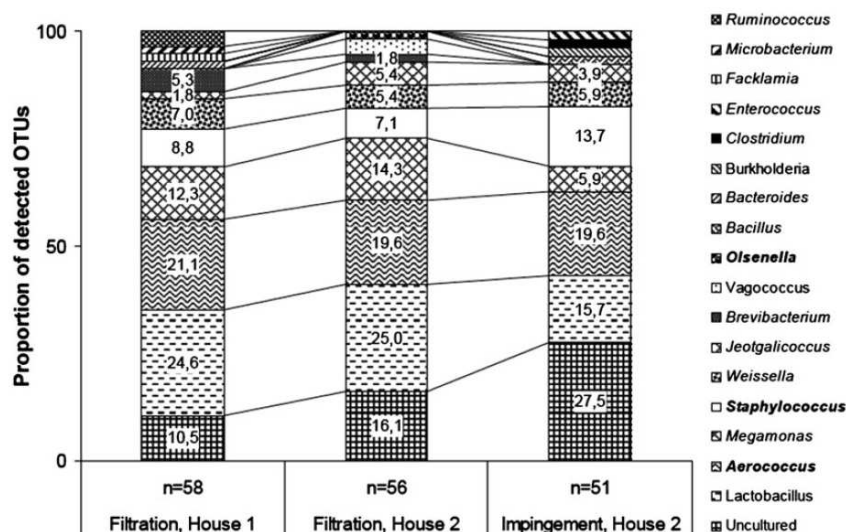


Fig. 1. Allocation of 16S rRNA gene sequences obtained from clone libraries of bioaerosol samples of two turkey house compartments sampled by filtration and impingement, respectively, and frequency of their appearance as percentage of the total number of analysed clones. Bold marked genus names indicate clone sequences, which were found to be next related (sequence similarity >99.5%) to Risk Group 2 assigned species (16S rRNA gene, results based on ~900 bp).

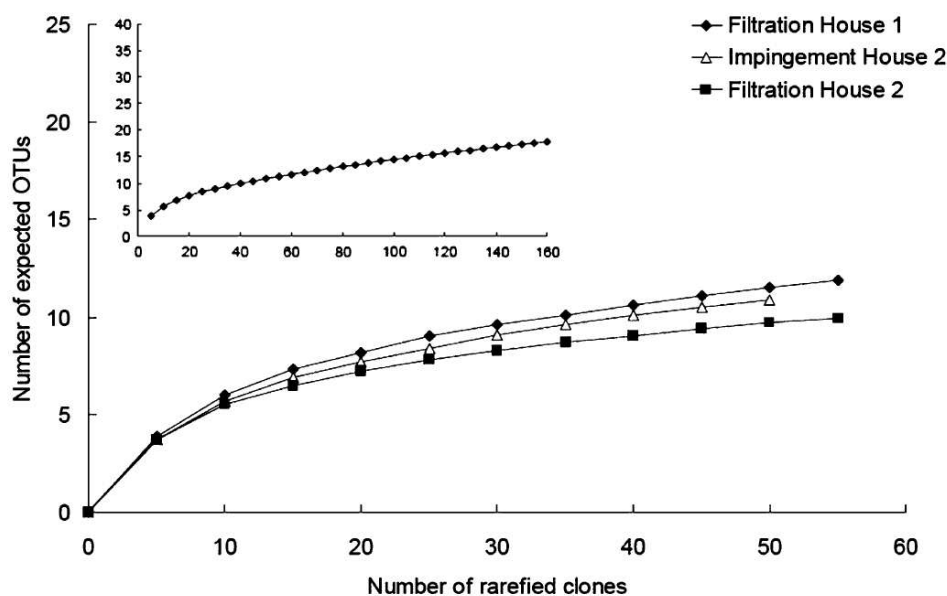


Fig. 2. Rarefaction curves indicating bacterial 16S rRNA gene richness within clone libraries derived from turkey house bioaerosol samples obtained by filtration and impingement. OTUs were defined as groups of sequences differing by $\leq 2\%$ at the DNA level. (Inset) Complete rarefaction curve for 164 sequences from bioaerosol clone library.

houses or poultry slaughtering plants by different approaches (Ellerbroek, 1997; Seedorf *et al.*, 2005; Hartung and Schulz, 2007; Oppliger *et al.*, 2008). These bacteria are generally expected as normal inhabitants of the human or animal skin. *Staphylococcus epidermidis* was detected as one frequent bacterium in the air of a poultry slaughterhouse, poultry feed plants, and eyes from newly hatched and

young domestic ducklings (Chalmers and Kewley, 1985; Haas *et al.*, 2005; Ghasemkhani *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2010). In this study, 16S rRNA gene sequences most closely related to *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus equorum* were obtained.

To our knowledge, this study represents the first analysis of bacterial exposure quality in turkey houses by generation of 16S rRNA gene clone

libraries together with cultivation-based approaches. The taxonomic classification (and identification) of prokaryotes at genus level is currently based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. Because these molecules are involved in essential cellular functions (e. g. protein biosynthesis), this gene can be found in all prokaryotes. This gene is functionally stable; wherefore, it meets all the requirements for use as phylogenetic marker. The 16S rRNA gene has a length of ~1500 nucleotides. It comprises highly conserved sequence regions, which are the same in all prokaryotic genomes (Ludwig and Klenk, 2001). In contrast, the hypervariable sequence regions can be used to distinguish bacteria.

The composition of detected genera in investigated bioaerosol samples differed, depending on the applied analytical approaches (Fig. 1, Table 1). In total, species of 28 different genera were detected. Only six genera, *Aerococcus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Jeotgalicoccus*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus*, were detected by both methods. Each method revealed 11 further genera, which were not detected by the second method. This can be explained by the different objectives of both methods. Cultivation is always selective and only living and cultivable microorganisms are detected. Molecular techniques do not discriminate between living and dead microorganisms. However, molecular techniques show other obstacles, e.g. the efficiency restrictions of DNA extraction or the sequence selective PCR amplification (Wilson, 1997; Polz and Cavanaugh, 1998; Acinas *et al.*, 2005). By the applied cloning analyses, the composition of bacterial 16S rRNA gene sequences in the genomic DNA, which has been directly extracted from the bioaerosol can be derived after an initial gene amplification by PCR. Depending on the number of analysed clones, following the probability law (sampling without replacement), only the dominating 16S rRNA gene sequences can be detected. Therefore, multiple 16S rRNA gene operons in a bacterial genome or a sequence selective amplification can overestimate its proportion in a clone library so that results do not allow quantification. In total, however, results of the rarefaction analysis showed that the majority of the dominant species has been comprehended in our examination (Fig. 3) and compositions of the bacterial communities detected in the houses were very similar at the genus level (Fig. 1). Dominating sequences in each of the three clone libraries were most closely related to species of the genera *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Megamonas*, and *Staphylococcus*.

The majority of isolated bacteria were most closely related to bacterial species of the Risk

Group 1. Nevertheless, some isolates, based on 16S rRNA gene comparison, were most closely related to members of the Risk Group 2 (Table 1), which means one that can cause human disease and might be a hazard to workers; it is unlikely to spread to the community; there is usually effective prophylaxis or treatment available. Independent of the applied analytical approach, the community analyses revealed species most closely related to *A. viridans*, *A. johnsonii*, *P. agglomerans*, and *S. flexneri*, which are known as bacteria of potential health risk, the first three species especially as causatives of different pulmonary disorders. *P. agglomerans* is shown to act as a causative agent for allergies and lung diseases in workers of agricultural work environments (Milanowski *et al.*, 1998; Van Rostenberghe *et al.*, 2006). Martin *et al.* (2010), for example, described a clear cytotoxic effect of one strain of *P. agglomerans* on the cell lung cancer cell line A549. Furthermore, Dutkiewicz (1997) has shown that in particular, *P. agglomerans* causes hypersensitive alveolitis. *P. agglomerans* has been shown to produce a strong endotoxin, which is suspected to be a main cause for acute byssinosis symptoms (Rylander, 1981, 1987) and allergens, which may be cause of allergic alveolitis (Dutkiewicz *et al.*, 1985; Milanowski *et al.*, 1998). These results together with our findings of *P. agglomerans* independently of the applied approach underline the health risk for employees. Another Gram-negative genus common in organic dusts and constituting a potential hazard to exposed workers is *Acinetobacter* (Haglund *et al.*, 1981; Skórska *et al.*, 2007). *Acinetobacter* spp. have previously been reported as nosocomial pathogens since many years, whereas the human respiratory tract is the most common site for infections (Forster and Daschner, 1998). The high desiccation resistance together with the increasing resistance of *Acinetobacter* species against antibiotics (Towner, 1996, 2006), which are frequently used in poultry production, may lead to an increasing health hazard for employees at this working places by these species.

In addition, *A. viridans* was detected by isolation as well as by the molecular approach to a high extent (Fig. 3). Species of the genus *Aerococcus* are Gram-positive cocci that are commonly found in the air of occupied places and in dust (Williams *et al.*, 1953). It has frequently been found in poultry houses (Nielsen and Breum, 1995; Haas *et al.*, 2005). The clinical significance of *A. viridans* has clearly been shown as it has been associated with different human infections (Facklam and Elliott, 1995; Gopalachar *et al.*, 2004; Popescu *et al.*, 2005).

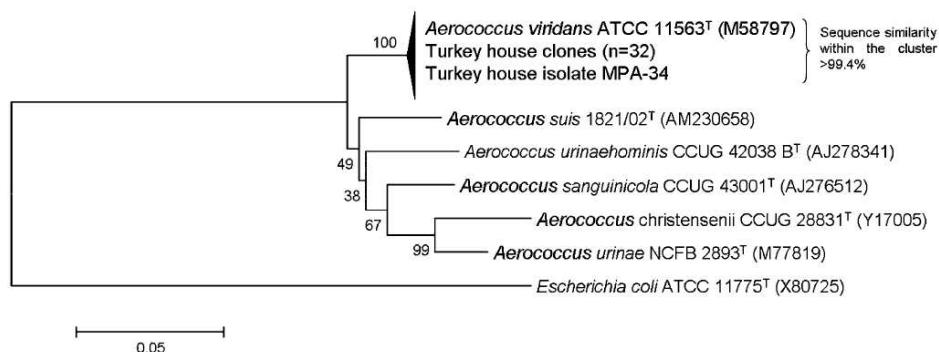


Fig. 3. Dendrogram illustrating the phylogenetic position of 16S rRNA gene fragments (765 bp) from 1 isolate and 32 clone sequences within the group of validly described *Aerococcus* species. Accession numbers are given in brackets. Multiple alignments, distance calculations (distance options according to the Kimura-2 model), and clustering were performed by the neighbour-joining method. Bootstrap values based on 1000 replications are indicated as percentages at the branching points. The scale bar corresponds to 0.05 nucleotide substitutions per 100 base pairs.

Further sequences most closely related to genera, which harbour Risk Group 2-related species are highlighted in Fig. 1 by bold letters. In contrast, *Campylobacter* and *Salmonella* were not detected, although both have frequently been found by other research groups in poultry houses (Berrang *et al.*, 1995; Berndtson *et al.*, 1996; Albrecht *et al.*, 2003; Venter *et al.*, 2004; Bull *et al.*, 2006; Harbaugh *et al.*, 2006; Lues *et al.*, 2007; Chinivasagam *et al.*, 2009; Fallschissel *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2009) and livestock-related bioaerosols (Wathes *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 2001; Haas *et al.*, 2005). By these techniques, a better insight into abundant and dominating microorganisms in bioaerosols can be obtained. However, there have to be more measurements for validation and data acquisition. With knowledge of occurring organisms, genus- or species-specific quantitative real-time PCR may be a high-potential method for future workplace exposure measurements. These results can subsequently be applied in epidemiological surveys and quantitative exposure studies (e. g. Fallschissel *et al.*, 2009).

CONCLUSIONS

Results of the molecular approach showed clearly its applicability for qualitative exposure measurements. With both cultivation-based and molecular methods high concentrations as well as species of potential health risk (*A. johnsonii*, *A. viridans*, *P. agglomerans*, and *S. flexneri*) were detected. The results of the presented study underline the necessity of an adequate breathing protection during work in poultry houses. After further validation, these techniques may lead to group-specific quantitative real-time PCR measurements, useful in new epidemiological and quantitative exposure studies.

Acknowledgements—We thank Gundula Will for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Acinas SG, Sarma-Rupavtarm R, Klepac-Ceraj V *et al.* (2005) PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl Environ Microbiol*; 71: 8966–9.
- Albrecht A, Redmann T, Nuchter H *et al.* (2003) Airborne microorganisms in a rearing henhouse for layers during vaccination. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*; 110: 487–93.
- Albrecht A, Witzemberger R, Bernzen U *et al.* (2005) Vergleichende Messungen luftgetragener Bakterien mittels Filtration (MD8) und Impingement (AGI30) in einer Kompostierungsanlage. *Gefahrstoffe Reinhalt Luft*; 65: 358–62.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*; 59: 143–69.
- Anonymous. (1998) TRBA 462 Einstufung von Viren in Risikogruppen, Bundesarbeitsblatt. 12/1998. 41–3.
- Anonymous. (1999) BioStoffV—Biostoffverordnung; BGBl I. p50 (english version) Available at <http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/Rechtstexte/Rechtstexte.html>. Accessed 3 August 2010.
- Anonymous. (2000) Directive 2000/54/EC: on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work, Official Journal of the European Communities L 262/21. Available at <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32000L0054:EN:NOT>. Accessed 3 August 2010.
- Anonymous. (2002a) TRBA 460: Einstufung von Pilzen in Risikogruppen, Bundesarbeitsblatt. 10/2002, 41–3.
- Anonymous. (2002b) TRBA 464: Einstufung von Parasiten in Risikogruppen, Bundesarbeitsblatt. 10/2002.
- Anonymous. (2003a) Einstufung von Organismen: Bakterien, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern, Austria. VU-4401-D.
- Anonymous. (2003b) Einstufung von Organismen: Parasiten, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern, Austria. VU-4400-D.
- Anonymous. (2004) Einstufung von Organismen: Pilze, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern, Austria. VU-4402-D.

- Anonymous. (2005a) Einstufung von Organismen: Viren, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern, Austria. VU-4403-D.
- Anonymous. (2005b) TRBA 466 Einstufung von Bakterien (Bacteria) und Archaeabakterien (Archaea) in Risikogruppen, BArbBl. Vol. 7/2006, 33–193.
- Anonymous. (2007) TRBA 230-Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in der Land- und Forstwirtschaft und vergleichbaren Tätigkeiten, GMBI. 58. Jahrgang, Nr. 49–51: 1015ff. (english version) Available at http://www.baua.de/nr_15074/en/Topics-from-A-to-Z/Biological-Agents/TRBA/TRBA-230.html. Accessed 3 August 2010.
- Berndtson E, Danielsson-Tham ML, Engvall A. (1996) *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int J Food Microbiol*; 32: 35–47.
- Berrang ME, Cox NA, Bailey NS. (1995) Measuring air-borne microbial contamination of broiler hatching cabinets. *J Appl Poul Res*; 4: 83–7.
- Bjerrum L, Engberg RM, Leser TD *et al.* (2006) Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult Sci*; 85: 1151–64.
- Bovallius A, Bucht B, Roffey R *et al.* (1978) Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. *Appl Environ Microbiol*; 35: 847–52.
- Bull SA, Allen VM, Domingue G *et al.* (2006) Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl Environ Microbiol*; 72: 645–52.
- Chalmers WSK, Kewley DR. (1985) Bacterial flora of clinically normal conjunctivae in the domestic duckling. *Avian Pathol*; 14: 69–74.
- Chandler DP. (1998) Redefining relativity: quantitative PCR at low template concentrations for industrial and environmental microbiology. *J Ind Microbiol Biotech*; 21: 128–40.
- Chinivasagam HN, Tran T, Maddock L *et al.* (2009) Mechanically ventilated broiler sheds: a possible source of aerosolized *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*; 75: 7417–25.
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML *et al.* (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*; 6: e280.
- Dutkiewicz J. (1997) Bacteria and Fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann Agric Environ Med*; 4: 11–6.
- Dutkiewicz J, Krysińska-Traczyk E, Skórska C *et al.* (2000) Exposure of agricultural workers to airborne microorganisms and endotoxin during handling of various vegetable products. *Aerobiologia*; 16: 193–8.
- Dutkiewicz J, Kus L, Dutkiewicz E. (1985) Hypersensitivity pneumonitis in grain farmers due to sensitization to *Erwinia herbicola*. *Ann Allergy*; 54: 65–8.
- Eduard W, Heederik D. (1998) Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments. *Am Ind Hyg Assoc J*; 59: 113–27.
- Ellerbroek L. (1997) Airborne microflora in poultry slaughtering establishments. *Food Microbiol*; 14: 527–31.
- Facklam R, Elliott JA. (1995) Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev*; 8: 479–95.
- Fallschissel K, Kämpfer P, Jäckel U. (2009) Direct detection of *Salmonella* cells in the air of livestock stables by real-time PCR. *Ann Occup Hyg*; 53: 859–68.
- Forster DH, Daschner FD. (1998) *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 17: 73–7.
- Gärtner A, Mölter L, Gessner A. (2008) Determination of the collection efficiency of an impinger for emission measurements of microorganisms. *Air Qual Control*; 68: 351–6.
- Ghasemkhani M, Daini AK, Eshraghi S. (2006) Assessment of exposures to bioaerosols among poultry feed plant workers. *J Applied Sci*; 6: 2051–5.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT *et al.* (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*; 312: 1355–9.
- Gopalachar A, Akins R, Davis W *et al.* (2004) Urinary tract infection caused by *Aerococcus viridans*, a case report. *Med Sci Monit*; 10: CS73–5.
- Grinshpun SA, Chang C-W, Nevalainen A *et al.* (1994) Inlet characteristics of bioaerosol samplers. *J Aerosol Sci*; 25: 1503–22.
- Haas D, Posch J, Schmidt S *et al.* (2005) A case study of airborne culturable microorganisms in a poultry slaughterhouse in Styria, Austria. *Aerobiologia*; 21: 193–201.
- Haglund P, Lundholm M, Rylander R. (1981) Prevalence of byssinosis in Swedish cotton mills. *Br J Ind Med*; 38: 138–43.
- Harbaugh E, Trampel D, Wesley I *et al.* (2006) Rapid aerosol transmission of *Salmonella* among turkeys in a simulated holding-shed environment. *Poult Sci*; 85: 1693–9.
- Hartung J, Schulz J. (2007) Risks caused by bio-aerosols in poultry houses. In Thieme O, Pilling D, editors. *Proceedings of the 9th International Poultry Conference—poultry in the 21st century—Avian influenza and beyond*, Bangkok, Thailand. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISSN 1810-0732.
- Heidelberg JF, Shahamat M, Levin M *et al.* (1997) Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*; 63: 3585–8.
- Lu J, Domingo J. (2008) Turkey fecal microbial community structure and functional gene diversity revealed by 16S rRNA gene and metagenomic sequences. *J Microbiol*; 46: 469–77.
- Ludwig W, Klenk H. (2001) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematic. In Boone DR, Castenholz RW, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany; pp. 49–65.
- Lues JFR, Theron MM, Venter P *et al.* (2007) Microbial composition in bioaerosols of a high-throughput chicken-slaughtering facility. *Poult Sci*; 86: 142–9.
- Martin E, Kämpfer P, Jäckel U. (2010) Quantification and identification of culturable airborne bacteria from duck houses. *Ann Occup Hyg*; 54: 217–27.
- Milanowski J, Dutkiewicz J, Potoczna H *et al.* (1998) Allergic alveolitis among agricultural workers in eastern Poland: a study of twenty cases. *Ann Agric Environ Med*; 5: 31–43.
- Nielsen B, Breum N. (1995) Exposure to air contaminants in chicken catching. *Am Ind Hyg Assoc J*; 56: 804–8.
- Olsen KN, Lund M, Skov J *et al.* (2009) Detection of *Campylobacter* bacteria in air samples for continuous real-time monitoring of *Campylobacter* colonization in broiler flocks. *Appl Environ Microbiol*; 75: 2074–8.
- Oppliger A, Charriere N, Droz P-O *et al.* (2008) Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *Ann Occup Hyg*; 52: 405–12.
- Polz MF, Cavanaugh CM. (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol*; 64: 3724–30.

- Popescu G, Benea E, Mitache E *et al.* (2005) An unusual bacterium, *Aerococcus viridans*, and four cases of infective endocarditis. *J Heart Valve Dis*; 14: 317–9.
- Rylander R. (1981) Bacterial toxins and etiology of byssinosis. *Chest*; 79: 34S–38S.
- Rylander R. (1987) The role of endotoxin for reactions after exposure to cotton dust. *Am J Ind Med*; 12: 687–97.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F *et al.* (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*; 230: 1350–4.
- Saleh M, Seedorf J, Hartung J. (2003) Total count of bacteria in the air of different laying hen housing systems. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*; 110: 394–7.
- Scupham AJ. (2007a) Examination of the microbial ecology of the avian intestine *in vivo* using bromodeoxyuridine. *Environ Microbiol*; 9: 1801–9.
- Scupham AJ. (2007b) Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiol Ecol*; 60: 136–47.
- Scupham JA, Patton T, Bent E *et al.* (2008) Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. *Microb Ecol*; 56: 322–31.
- Seedorf J, Schulz J, Hartung J. (2005) Outdoor measurements of airborne emission of staphylococci from a broiler barn and its predictability by dispersion models. In Aral MM, editor. *Environmental exposure and health*. Southampton UK: WIT Press. 85:528.
- Sennekamp H-J. (2004) Bacteria, moulds, and yeasts induced allergic alveolitis. In *Extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity pneumonitis)*. Munich, Germany: Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle GmbH & Co. KG; pp. 336–341.
- Skórska C, Mackiewicz B, Golec M *et al.* (2007) Health effects of exposure to organic dust in workers of a modern hatchery. *Ann Agric Environ Med*; 14: 341–5.
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al.* (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*; 24: 1596–9.
- Towner K. (2006) The genus *Acinetobacter*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The prokaryotes*, Volume 6: Proteobacteria: gamma subclass. New York: Springer; pp. 746–758.
- Towner KJ. (1996) Biology of *Acinetobacter* spp. In Bergogne-Bérézin E, Joly-Guillon ML, Towner KJ, editors. *Acinetobacter: microbiology, epidemiology, infections, management*. Boca Raton, FL: CRC Press; pp. 13–36.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T *et al.* (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*; 457: 480–4.
- Van Rostenberghe H, Noraida R, Wan Pauzi WI *et al.* (2006) The clinical picture of neonatal infection with *Pantoea* species. *Jpn J Infect Dis*; 59: 120–1.
- Venter P, Lues JF, Theron H. (2004) Quantification of bioaerosols in automated chicken egg production plants. *Poult Sci*; 83: 1226–31.
- Wathes CM, Zaidan WAR, Pearson GR *et al.* (1988) Aerosol infections of calves and mice with *Salmonella typhimurium*. *Vet Rec*; 123: 590–4.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA *et al.* (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*; 173: 697–703.
- Whyte P, Collins JD, McGill K *et al.* (2001) Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. *J Food Protect*; 64: 388–91.
- Williams REO, Hirsch A, Cowan ST. (1953) *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J Gen Microbiol*; 8: 475–80.
- Wilson IG. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*; 63: 3741–51.
- Zucker B-A, Trojan S, Müller W. (2000) Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses. *J Vet Med B*; 47: 37–46.

Anhang B

Ann. Occup. Hyg., pp. 1–10
 © The Author 2009. Published by Oxford University Press
 on behalf of the British Occupational Hygiene Society
 doi:10.1093/annhyg/mep060

Direct Detection of *Salmonella* Cells in the Air of Livestock Stables by Real-Time PCR

KERSTIN FALLSCHISSEL¹, PETER KÄMPFER¹ and UDO JÄCKEL^{2*}

¹*Institute for Applied Microbiology, Justus-Liebig University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 34637 Giessen, Germany;* ²*Federal Institute for Occupational Safety and Health, Nöldnerstraße 40-42; 10317 Berlin, Germany*

Received 16 March 2009; in final form 16 July 2009

A SYBR[®] Green real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay for specific detection and quantification of airborne *Salmonella* cells in livestock housings is presented. A set of specific primers was tested and validated for specific detection and quantification of *Salmonella*-specific *invA* genes of DNA extracted from bioaerosol samples. Application of the method to poultry house bioaerosol samples showed concentrations ranging from 2.2×10^1 to 3×10^6 *Salmonella* targets m^{-3} of air. *Salmonella* were also detected by a cultivation-based approach in some samples, but concentrations were two to three magnitudes lower than the concentrations detected by molecular biological results. Specificity of results was demonstrated by cloning analyses of PCR products, which were exclusively assigned to the genus *Salmonella*. However, by molecular methods, microorganisms are detected independently of their viability status, leading to an overestimation of concentration. Hence, the survival rate of *Salmonella* cells was measured on filter surfaces during filtration samplings where 82% of the cells died within 20 min of filtration. The results clearly show the specificity and practicability of the established qPCR assay for analysis and quantification of salmonellae in bioaerosols. The results demonstrate airborne *Salmonella* workplace concentrations in poultry production of up to 3.3% of 4',6-Diamidino-2-phenylindole-counted total cell numbers.

Keywords: bioaerosol; DNA extraction efficiency; livestock stables; poultry; real-time PCR; *Salmonella*; sampling efficiency; SYBR Green

INTRODUCTION

Employees in modern agriculture environments are exposed to many different agents such as organic and inorganic dusts containing, e.g. endotoxins, bacteria, fungi, gases, and chemicals (Clark *et al.* 1983; Carlile 1984; Radon *et al.* 2002; Roy *et al.* 2003). These substances mainly affect the respiratory system and can lead to, e.g. asthma, asthma-like syndrome, mucous membrane irritation or chronic bronchitis, and hypersensitivity pneumonitis (Rylander 1986; Heederik *et al.* 1991; Eduard *et al.* 2004; Liebers *et al.* 2006).

In densely stocked and enclosed animal production buildings, bioaerosols mainly consist of microorganisms as well as their metabolic products and microbial cell constituents. Exposure assessment shows that the concentration of airborne microorganisms in livestock stable air can reach values up to 10^{10} cells m^{-3} (Radon

et al. 2002). *Staphylococcus* and *Streptococcus* have been described as the predominant bacterial genera in these agricultural environments (Nielsen and Breum 1995; Seedorf and Hartung 2002; Haas *et al.* 2005), whereas sensitizing, toxin-producing, or infection-causing bacteria like *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var., and *Pantoea agglomerans* (formerly *Enterobacter agglomerans*) have been found as well (Cormier *et al.* 1990; Wathes 1995). Nevertheless, airborne microbial communities found at agricultural working places are rarely characterized in detail.

Usually, microbial communities are analyzed by cultivation-based methods. Here, exposure levels are examined on low selective agar media. By these approaches, only viable microorganisms that are able to grow at the selected nutrient and cultivation conditions (medium, pH, temperature, humidity etc.) are detectable. For this reason, cultivation-based

*Author to whom correspondence should be addressed.
 Tel: +49 3051548-4788; fax: +49 3051548-4171;
 e-mail: jaeckel.udo@baua.bund.de

methods are unsuitable for the detection of dead or slow-growing microorganisms and for viable but non-cultivable (VBNC) microbes. In addition, selective media may not restrict growth of undesired organisms (Albrecht and Kämpfer 2006). It is also widely accepted that the vast majority of naturally occurring microorganisms cannot be cultivated using standard cultivation techniques (Parkes and Taylor 1985; Amann *et al.* 1995).

An air sampling by personal carried devices during a whole working day, which is a basic requirement for an ideal exposure measurement, is also not feasible in cultivation-based approaches because many bacteria are not resistant to desiccation and sampling stress (Marthi *et al.* 1990; Potts 1994; Durand *et al.* 2002).

Molecular biological methods like polymerase chain reaction (PCR) may offer the advantage of a more sensitive and specific detection method. These methods, which target the DNA, have already been applied successfully to investigate microorganisms in different environmental samples (Stach *et al.* 2001; Stubner 2002; Kolb *et al.* 2005). Real-time quantitative PCR (qPCR) is a potential method for species- or genus-specific quantification. While this method has rarely been applied to bioaerosols (Makino *et al.* 2001; Makino and Cheun 2003; Zeng *et al.* 2006; Cayer *et al.* 2007; Dutil *et al.* 2007; Oppliger *et al.* 2008), it has not been standardized for occupational exposure measurements. Therefore, the purposes of this study were (i) to develop a fast and reliable method to determine concentrations of airborne bacteria in animal houses by application of a real-time qPCR, (ii) to determine possible losses during DNA extraction and air sampling, and (iii) to evaluate the methods for suitability of rapid exposure measurements in the air of livestock stables.

The genus *Salmonella* was chosen as a model organism because the genus has been frequently reported in livestock stable aerosols especially in poultry confinements (Hoover *et al.* 1997; Venter *et al.* 2004; Lues *et al.* 2007).

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains used for inclusivity testing of the *invA* gene-specific real-time PCR assay are listed in

Table 1. Additionally, *Escherichia coli* ATCC 29522^T was used as a negative control. All *Salmonella* strains and *E. coli* were grown in Tryptic Soy Broth (Difco) at 37°C with shaking (Innova4000; New Brunswick Scientific, 110 rpm). Bacterial growth was monitored by determination of optical density at 600 nm.

Because for all *Salmonella* strains specific PCR products were detected (data not shown), all following experiments and preparation of quantification standards for real-time PCR were carried out using the strain *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium CIP 60.62^T.

Determination of total cell count by fluorescence staining and microscopy

For quantification of total cell count (TCC), 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescence staining (Porter and Feig 1980) was applied to pure cultures and bioaerosol samples. Cells were washed two times with ×1 phosphate-buffered saline, followed by paraformaldehyde fixation (Amann *et al.* 1990). Aliquots of the cell extract were mixed with 50 µl of DAPI solution (10 µM) and incubated in the dark for 20 min. Subsequently, cells were filtered onto a black polycarbonate filter (Nucleopore, 0.2-µm pore size; Whatman, Kent, UK) using a vacuum filtration unit (Schleicher and Schüll, Dassel, Germany). The air-dried filters were immersed in Citifluor (AF1 Citifluor Ltd, London, UK) on a glass slide.

Analysis of the filters was carried out microscopically with an epifluorescence microscope (Axiophot, 1000-fold magnification; Zeiss, Germany). Blue fluorescent cells of 20 randomly chosen microscopic fields on the filter were counted manually using a counting ocular (Zeiss). By taking into account the effective filter surface, the dilution, and the sampled air volume, the cell concentration was calculated m⁻³ of air.

Sampling resistance of *Salmonella* cells during filtration by live/dead staining

To study the effect of the filtration sampling, cells were added onto a sterile polycarbonate filter (IsoporeTM ATTP 0.8-µm pore size, Ø 80 mm; Millipore), followed by sampling of increasing volumes of cell-free air (0, 362, and 724 l). The cells were then detached and homogenized in 10 ml NaCl

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Strain no.	Specific PCR product ^a
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	CIP 60.62 ^T , CCUG 42060 ^T	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	CCUG 1743	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	CCUG 32352, ATCC 25928	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	CIP 58.57, CCUG 49677, ATCC 13312	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 ^T	–

^aDNA of the species showed specific PCR products after amplification with the 139/141 primer system.

0.9% (w/v) using a stomacher (Stomacher 80 lab systems; Seward, London, UK) for 60 s. The proportions of 'living/dead' (intact/damaged cell membranes) cells were determined using the BacLight™ Live/Dead Kit for quantitative assays (Invitrogen Corp., USA) according to the manufacturer's instructions. A 1:10 dilution with 0.9% NaCl (w/v) of both dyes was used for staining. Stained samples were analyzed immediately but at least within 24 h as described for TCC by fluorescence microscopy.

Sampling site

Samples were taken at different working places in a conventional farmed duck fattening facility and two broiler chicken houses (each accommodated with a flock of 26 000 animals) in Germany between January and September 2007. The birds were allowed to move freely on the litter, which consisted of sawdust.

The broiler chicken confinement plant consisted of two equally constructed compartments. In one of the compartments, an aerocleaner system (LH Agrartechnik, Germany) was installed, spraying an emulsion of water and essential oils into the air every 15 min to reduce dust and microorganisms. Air inlets were located at the gable wall and air outlets at the ceiling and were both automatically controlled.

The bioaerosols in a duck feeding facility (anonymous) were collected by personal carried sample devices at different working locations and during different activities of the employees during the entire work shift on different days—(i) in the duck stables: (a) during egg collecting and (b) during general stable work (straw dispersing, cleaning); (ii) in the slaughterhouse: during shackling/hanging; (iii) in the duck hatchery: during packaging of ducklings; (iv) outdoor (upwind direction); and (v) in the office: at desk work. Locations (i–v) were spatially separated, so that a direct exchange of bioaerosols could be excluded.

Bioaerosol sampling

In the broiler chicken house, airborne microorganisms were sampled using filtration devices (MD8 aluminum stacks; Sartorius, Germany). An air volume of 0.50–0.55 m³ (MP2/39; Umweltanalytik Holbach, Germany) was collected by filtration through polycarbonate membrane filters (Isopore™ ATTP 0.8-µm pore size; Millipore) within 20 min (27.2 l min⁻¹). The exact sampled volume was monitored by calibrated gas meters (Remus4; GSA, Germany, and Gallus 2000; Actaris). For each measurement, the downside facing filtration devices were mounted on a tripod (1.5-m height) in the middle of the stables. One blank field sample was taken in the same way for each sampling method (samplers were not operated in these cases).

In the duck fattening facility, personal air samplers (PGP/GSP-3.5; BIA, Germany) in combination with specific pumps SG-10 (GSA) were used. The sampling

system collected the inhalable dust fraction as defined by EN481 (Deutsches Institut für Normung 1993) at a sampling rate of 3.5 l min⁻¹ during the entire work shift with working activities as given previously. Here, bioaerosols were collected on polycarbonate filters (0.8-µm pore size, Ø 3.7 cm; Whatman), which were fixed onto the filter cassette of the PGP system.

Preparation of bioaerosol samples for cultivation and molecular methods

Collected cells were detached and homogenized as described previously. For selective detection of *Salmonella* cells, resuspended cells were serially diluted. Bismuth sulfite agar plates [Difco; colony-forming units (cfu) *Salmonella*] were inoculated with 0.1-ml aliquots of each dilution in triplicates. Characteristic colonies were counted after an incubation of 24 h at 37°C. Concentrations were calculated as cfu per volume of sampled air (cfu m⁻³).

For DNA extraction and TCC determination, 4.5-ml cell suspension was concentrated by centrifugation at 17 400 g for 10 min.

Extraction of total community DNA from bioaerosol samples

Extraction of total genomic DNA was performed according to Pitcher *et al.* (1989). Total extracted DNA was resuspended in a final volume of 75 µl TE buffer (10 mM Tris, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8). Only DNase-, RNase-, and DNA-free solutions and consumables were used.

Determination of DNA extraction efficiency

To analyze the DNA extraction efficiency, varying cell numbers between 1.5×10^8 and 1.1×10^{11} cells of *Salmonella* (of the stationary growth phase) were used for a DNA extraction assay. Cell numbers at this point of time were determined by the DAPI staining method as described previously. DNA extraction was done as previously described and total DNA concentration was determined by ultraviolet photometric as well as by fluorometric measurements. *Salmonella* cell equivalents were calculated based on the genome size of 4.9×10^3 kb and a GC content of 53% (McClelland *et al.* 2001) according to the following equation: genome weight $W = (\% \text{ GC} \times \text{genome length}) \times 615.4/100 + (100 - \% \text{ GC} \times \text{genome length}) \times 616.4/100 + 61$. Genome copies per nanogram of DNA were calculated as follows: ng DNA = $(\text{NL}/W \times 10^{-9})$, where NL is the Avogadro constant (6.02×10^{23} molecules mol⁻¹). Extraction efficiencies (%) were calculated by the quotient of determined and assumed DNA concentrations multiplied by 100.

Real-time qPCR

Real-time PCR was performed using the Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, UK). Primers 139/141 were those described by Rahn *et al.* (1992) and

purchased from MWG Biotech (Germany). Assays were performed in a total volume of 10 μl mixing 1 μl of DNA with 5 μl SYBR[®] Green Mix (ABGene Absolute QPCR SYBR[®] Green Mix), 3.6 μl molecular grade water, and 0.2 μl of each primer. All samples and standards were analyzed in quadruplicates. The following thermal program was used for amplification: 15 min initial denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation (95°C, 1 min), annealing (54°C, 15 s), elongation (72°C, 20 s, first acquisition), and a second acquisition step at 80°C for 20 s to identify primer dimers. After cycling, a melt curve, ranging from 60 to 95°C at 0.5°C steps, was added, with fluorescence acquisition at each temperature rising.

Development of a real-time PCR standard curve for *Salmonella* quantification

For preparation of quantification standards, genomic DNA from a *Salmonella* culture was extracted and later quantified by fluorometric measurement. The DNA concentration in the real-time PCR assay was adjusted to gene target numbers between 1 and 10^7 targets μl^{-1} under the assumption of one *invA* gene per genome (Fey and Eichler 2004). For each concentration, the cycle threshold (C_T) value was plotted against the log value of corresponding *Salmonella invA* genes. The calibration curve was generated by the RotorGene software version 6.0.16. Consequently, initial target copy numbers in the samples were computed by the slope of the resulting linear equation (1). Then, the slope of each calibration curve was used (equation 2) to determine the reaction efficiency (perfect exponential amplification has an efficiency of 1).

$$\text{Log concentration} = m \times \log C_T + b \quad (1)$$

$$\text{Efficiency} = 10^{-1/m} - 1, \quad (2)$$

where m is the slope and b the intercept.

Recovery rate of *Salmonella* by real-time PCR

To examine possible inhibitory effects, the following experiments were conducted to analyze the recovery of real-time PCR *Salmonella* detection.

To study inhibition by non-target DNA, 10^8 *E. coli* cells were supplemented with declining *Salmonella* cell numbers between 10^4 and 10^8 cells. Assuming a total cell count of 10^8 – 10^9 cells m^{-3} of air, this would correspond to a theoretical proportion of 0.01–100% *Salmonella* cells covering a wide proportion range. From these mixtures, DNA was extracted and *invA* gene copy number determined by real-time PCR.

To analyze the recovery of *Salmonella* cells from bioaerosol samples, bioaerosol samples from a turkey stable were spiked with $1.1 \times 10^8 \pm 3.1 \times 10^7$ and $4.2 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^7$ *Salmonella* cells.

Construction of an *invA* gene clone library and sequencing of the plasmid inserts

Specificity of PCR products was tested by cloning analyses of amplicons obtained from bioaerosol samples collected in the broiler houses. The PCR products retrieved with the 139/141 primer system were cloned into *E. coli* using the pGEM[®]T Vector System Kit (Promega Corp., USA) according to the manufacturer's instructions. Ten clones were randomly chosen from the library. Cultures were grown overnight in liquid Lysogeny broth medium at 37°C and cells harvested by centrifugation. Pellets were used for plasmid extraction by alkaline lysis (Sambrook and Russel 2001). Plasmid inserts were sequenced (remittance work by the Institute of Microbiology, Justus-Liebig University of Giessen) using the M13 primers (Invitrogen Corp.).

Sequence data were analyzed using MEGA version 4 (Tamura *et al.* 2007). First, a BLAST search (www.ncbi.nlm.nih.gov) was carried out to ensure the correct placement of the obtained partial *invA* gene sequences. Subsequently, the closest BLAST matches were aligned with ClustalW (Higgins *et al.* 1994) provided by MEGA4. Distances between sequence pairs were calculated and trees were constructed with the neighbor-joining method included in MEGA4. Stability of branches was assessed with the bootstrap method using 1000 replicates.

RESULTS

DNA extraction efficiency

A decreasing DNA extraction efficiency was found with increasing applied cell concentrations (Fig. 1). The efficiency rate ranged between 58 and 1%.

Standard curve for quantification by real-time PCR

For molecular detection of salmonellae, the primer system described in DIN 10135 (Deutsches Institut für Normung 1999) was optimized for real-time

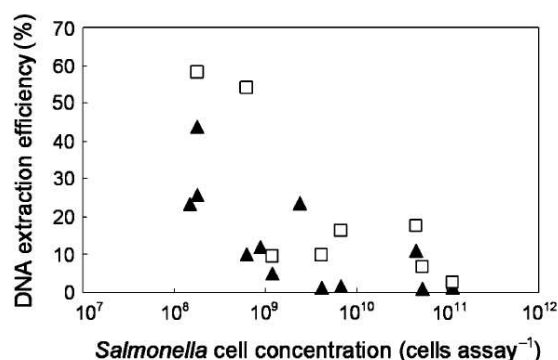


Fig. 1. DNA extraction efficiency (%) as a function of total applied *Salmonella* cell number. Extraction efficiency was calculated based on photometric (□) and fluorometric (▲) DNA quantification.

qPCR. These primers induce the amplification of a fragment of the *invA* gene, specific for the genus *Salmonella*. A linear correlation of C_T value and target concentrations ($r^2 = 0.99$) was found for concentrations between 10^0 and 10^7 targets μL^{-1} (Fig. 2). The initial number of equivalent *Salmonella* in environmental samples was calculated using this calibration curve.

Recovery rate of *Salmonella* by real-time PCR

In a first set of experiments, defined cell numbers of *Salmonella* were mixed with constant *E. coli* numbers. Here, a clear linear correlation of applied cell number and quantified target number was found ($r^2 = 0.99$). The recovery rate for this approach ranged between 15 and 28%.

In the second assay, defined numbers of *S. enterica* cells were added to bioaerosol samples collected by impingement or filtration in poultry houses. Depending on the sampling method, the recovery rate varied between 26 and 66%.

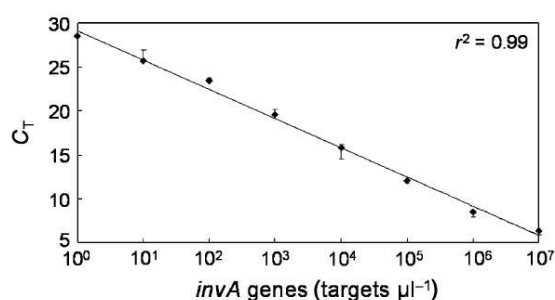


Fig. 2. Linear correlation of *Salmonella* *invA* gene concentrations from 10^0 to 10^7 targets μL^{-1} amplified by real-time qPCR and C_T values. Values are means of $n = 4 \pm$ standard deviation.

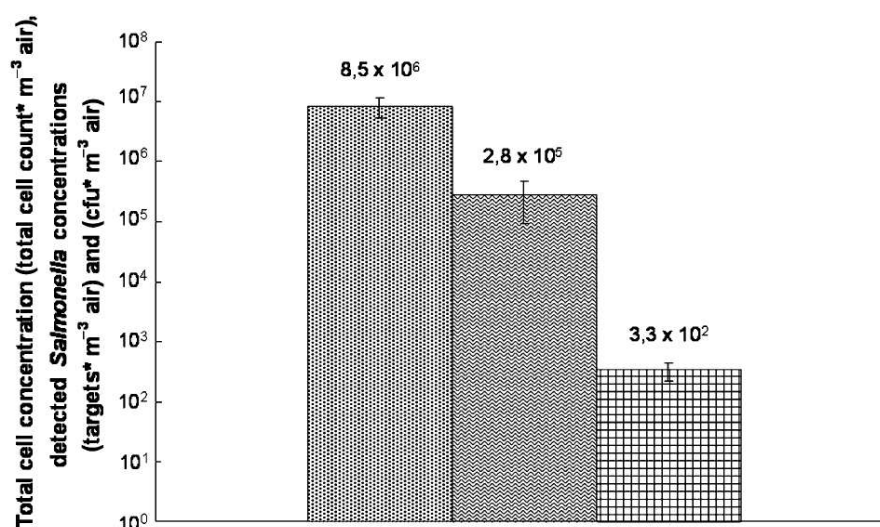


Fig. 3. Total cell count m^{-3} of air (■) determined after DAPI staining for bioaerosol samples obtained by filtration of a broiler chicken house. Furthermore, *Salmonella* concentrations m^{-3} of air determined by real-time qPCR (▨) and cultivation (▤) are shown. Values are means of three bioaerosol samples $\pm$ standard error.

Application of the developed real-time PCR detection system to common bioaerosol samples

For testing the established analytical PCR protocol, bioaerosol samples of a broiler chicken house with prior salmonellosis finding of the animals were analyzed. A cultivation-based approach was carried out in parallel.

In the samples collected by filtration, *Salmonella* were detected both by cultivation and by real-time qPCR. Concentrations found with the cultivation-based approach were $3.3 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$ cfu *Salmonella* m^{-3} of air and for the molecular approach $2.8 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$ *invA* gene targets m^{-3} of air (Fig. 3). *Salmonella* were not found in bioaerosol samples of the reference house (without salmonellosis finding), neither by the cultivation-based approach nor by the real-time qPCR.

With the established protocol, specific *invA* gene PCR products were obtained by real-time PCR in 16% of 83 bioaerosol samples from different working places in the duck fattening industry. Depending on the examined working area, concentrations ranged between 2.5×10^1 and 3×10^6 targets m^{-3} of air (Fig. 4).

Testing of primer specificity by cloning analyses

The 139/141 primer pair originally described by Rahn *et al.* (1992) was used in real-time PCR reactions containing SYBR Green as fluorescent marker. Results from gel electrophoresis confirmed the correct molecular size of the amplicon (~ 250 bp), indicating primer specificity (data not shown). PCR products from the *Salmonella*-containing bioaerosols were used for construction of an *invA* clone library. Sequence analyses of the library showed sequence similarities between 98.9 and 99.6% to *invA* gene

sequences of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (EU348365; Fig. 5).

40% and >80% of the cells were detected 'dead' after 10 and 20 min, respectively.

Biological sampling efficiency

For investigating the pathogenic potential of bioaerosol microorganisms, the biological sampling efficiency of different sampling systems is of high importance. This was studied for filtration by the use of live/dead staining. Results showed differences in the effect of *Salmonella* cells correlated to sampling method and sampled air volume. More than

DISCUSSION

Compared with background exposure levels, cultivable and dead microorganisms as well as their by-products like endotoxins and mycotoxins can be detected in very high concentrations at working places in agriculture (Clark *et al.* 1983; Cormier *et al.* 1990; Nielsen and Breum 1995; Ellerbroek 1997;

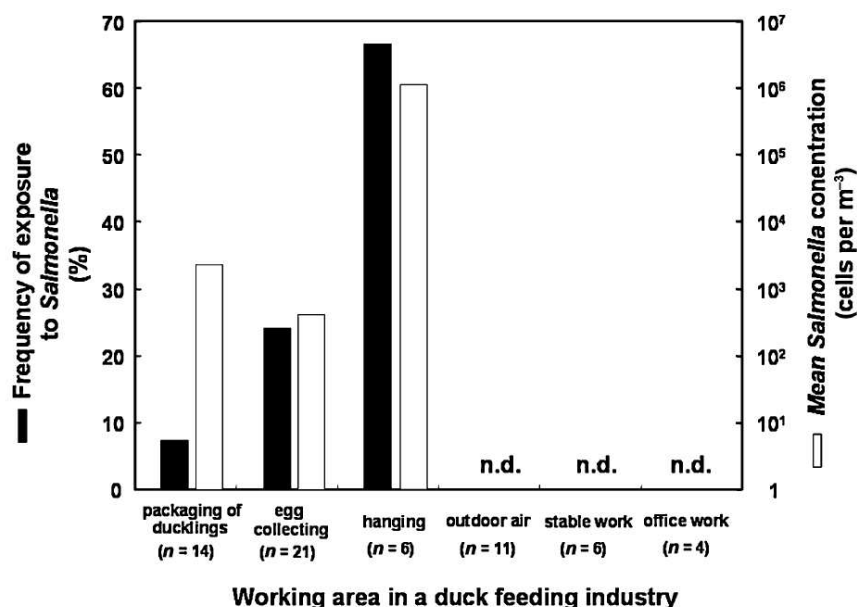


Fig. 4. Frequency of exposure to *Salmonella* (%) and mean airborne *Salmonella* concentration (cells m⁻³) subject to the working areas in a duck feeding industry. Concentrations were determined by real-time qPCR using the primer system described by Rahn *et al.* (1992). Bioaerosol samples were obtained by personal air samplers during a whole working day. Values are means $\pm$ standard deviation. n.d., not detectable.

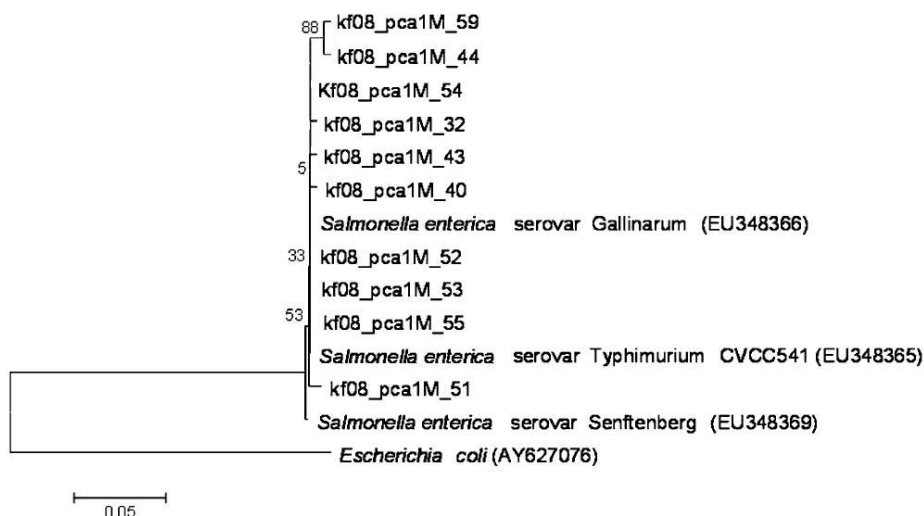


Fig. 5. Neighbor-joining tree of sequences (295 bp) of the operational taxonomic units obtained from bioaerosol samples of the broiler houses after cloning analysis. Distances were calculated and the tree was constructed in MEGA4 after BLAST search to ensure correct placement of the obtained partial *invA* gene sequences. Stability of the tree branches was assessed with the bootstrap method using 1000 replicates. Bar, 0.05 nucleotide substitutions per nucleotide position.

Zucker *et al.* 2000; Radon *et al.* 2002; Venter *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006). The organic dusts at these working places are known as causative agents for various pulmonary health effects, e.g. allergic reactions such as occupational asthma or allergic alveolitis. Therefore, bioaerosol monitoring should be carried out for risk assessment at these working places.

Many different sampling systems can be used for bioaerosol collection. The most common systems are based on impaction, filtration, and impingement. Because of the differences of these systems in biological and physical sampling efficiency, the results cannot be compared directly.

One major problem for exposure measurements is the lack of a standardized methodology measuring total bacterial burden. Up to now, bioaerosol monitoring assays at workplaces are carried out by analyzing sum parameters like endotoxins, inhalable dust, and total cultivable bacteria or fungi without consideration of the composition of the microbial communities. However, from a microbiological point of view, a species-specific exposure-response relationship can be assumed (Thurston *et al.* 1979; Baseler *et al.* 1983; Fogelmark *et al.* 1991; Dutkiewicz 1997; Milanowski *et al.* 1998). For this reason, a species-specific detection is highly desirable. At present, standardized guidelines, e.g. in Germany for analysis of airborne microorganisms, are based on a cultivation-based approach (Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN 2004a,b,c,d). Because of the known methodological limitation of cultivation-based approaches, molecular methods may present an attractive alternative for both quantification and differentiation of microorganisms. In this study, the genus *Salmonella* was chosen as a model organism group to prove the applicability of real-time qPCR for a species-specific bioaerosol monitoring at working places.

As a first step, DNA has to be extracted quantitatively from investigated samples. For qualitative analysis, a preferably high DNA extraction efficiency is desirable. For standardization, a reproducible protocol with known extraction efficiency is needed. The variation of biochemical components in different samples, the different extraction protocols used, and also the presence of different organisms usually lead to variable efficiencies of DNA extraction methods. To our knowledge, DNA extraction efficiency has not been evaluated consistently for microorganisms. Einen *et al.* (2008) showed a DNA extraction efficiency of ~1.6% for *E. coli* by application of the Bio101 Kit (Qbiogen) to pure cultures. Another study showed DNA extraction efficiencies of overall undetectable to 43.3%, depending on the protocol used (Mumy and Findlay 2004). It must be stressed that not only the overall efficiency varied but also that the extraction efficiency was found to be species dependent. Krsk and Wellington (1999) found, e.g.

differences in denaturing gradient gel electrophoresis fingerprint patterns depending on the DNA extraction method used. In our study, basic examinations were conducted concerning DNA extraction efficiency for *Salmonella*. An inverse proportionality of adjusted cell number and extraction efficiency was detected (Fig. 1). The DNA extraction efficiencies varied between 10.1 and 58.5%, if cell numbers were $<10^9$ cells per extraction assay. Lower extraction efficiencies were obtained for cell numbers $>10^9$ cells per assay. This can be due to the limitations imposed by chemicals and enzymes. For estimation of the initial exposure, the loss of DNA by extraction has to be considered as aforementioned. The actual exposure may be higher by a multiple.

Basically, selectivity and specificity of PCR depend on the primer system and amplification conditions used. The primers used in this study target the *Salmonella invA* gene, which is assumed to be genus specific (Galan and Ginocchio 1992) with one copy per genome (Fey and Eichler 2004). The calibration curve needed for quantification has been carried out for $1-10^7$ targets μl^{-1} of DNA extracted from a pure culture ($r^2 = 0.99$; Fig. 2). In contrast, environmental samples may contain inhibitory substances. For bioaerosol samples from animal stables, this may be associated with animal dander, feces, feathers, pollen, or dust particles from feeding stuff or straw. The qualitative and quantitative chemical composition can vary highly and may be affected by animal species, season, stable climate, or architecture. The different chemicals are co-extracted and may cause inhibitory effects.

In our experiments for inhibition analysis, defined amounts of *Salmonella* cells were mixed both with constant numbers of *E. coli* cells and with bioaerosol samples of a turkey stable. The recovery was determined by real-time qPCR. The recovery of *Salmonella* in the mixed assays of *E. coli* and *Salmonella* ranged between 15 and 28%, and 26 and 66% in the supplemented bioaerosol samples. The loss of DNA is most probably due to an inefficient DNA extraction because the obtained recovery rates correspond to those in the pure culture experiments.

Bioaerosol samples from a poultry confinement with prior *Salmonella* findings of the animals were investigated to validate the implemented system. *Salmonella* were found by both the cultivation-based approach and the real-time PCR. In contrast to the cultivation-based quantification, the counts of airborne microorganisms by real-time PCR were between 4- and 100-fold higher. Concentrations were $3.3 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$ cfu m^{-3} of air and $2.8 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$ cells m^{-3} of air, respectively (Fig. 3). For estimation of the initial exposure, the loss of DNA by extraction has to be considered as aforementioned. Therefore, the actual exposure is expected to be 5-fold higher.

The clear differences of detected *Salmonella* concentrations by cultivation-based and molecular methods can basically be explained by the limitation of the determination method. On the one hand, cell agglomerates, particle-bound microorganisms, dead cells, and VBNC microbes lead to an underestimation of the total cell concentration by the non-equivalent number of cfu. On the other hand, molecular methods ideally determine all cells, without differentiation between cultivable and non-culturable organisms (dead cells and VBNC cells). In this context, our results show that 40% of *Salmonella* cells placed on a filter were stained by the 'dead' dye from the live/dead staining kit after a 10-min sampling period. These results indicate membrane damages to *Salmonella* cells due to the sampling procedure, which may result in a loss of cultivability. To alleviate those stress effects, a resuscitation step could be very helpful (Crozier-Dodson and Fung 2002).

Bioaerosol samples may contain a lot of unknown organisms with genes never analyzed before. Therefore, for evaluation of a new PCR system, it has to be ensured that the gene fragments amplified from environmental origin (e.g. soil or organic matter) belong to the targeted species. In this study, a clone library of PCR products gained from the *Salmonella*-positive broiler chicken houses was generated. All sequences analyzed showed high similarities (>98.9) to sequences from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (EU348365), indicating a high specificity of the PCR protocol used.

With the implemented and validated PCR protocol, a total of 62 bioaerosol samples collected at six different working environments in a duck fattening industry during the entire working day by personal aerosol samplers were analyzed. Exposure to *Salmonella* was determined in samples collected during three working activities: egg collection, general work in the duck stables, and during shackling of birds before slaughter. The incidence of airborne bacteria as well as the exposure levels showed the highest values in the samples collected during shackling of ducks. Here, in 66% of air samples, *Salmonella* were detected at a mean concentration of $\sim 10^6$ cells m^{-3} of air (Fig. 4).

Despite frequently observed workers' respiratory disorders, till now there are no general accepted occupational exposure limits at agricultural working places. On the one hand, this fact can be drawn back to the mentioned lack of generally accepted standardized quantification methods. On the other hand, by insufficient knowledge about dose-response relationships that highly depend on the individual disposition of occupants.

Dutkiewicz (2000) and Górny and Dutkiewicz (2002) proposed a maximum load of 10^5 cfu bacteria (total cultivable bacteria) m^{-3} of air. As shown previously, these exposure levels are exceeded in the duck

fattening industry even by the potential pathogenic *Salmonella* serotypes at duck shackling activity.

In particular for mice, calves, and chicken, an airborne transmission of *Salmonella* has already been shown; the infection dose via respiration was assumed to be even lower than for the oral route of infection (Darlow *et al.* 1961; Wathes *et al.* 1988; Lever and Williams 1996). Workers at duck shackling are presumably exposed during the entire work shift to airborne *Salmonella*. The risk for infection at these working places therefore seems quite probable.

In future, next to technical and organizational measures, an adequate breathing protection is recommended for protection of workers at these working environments (Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe 2007).

FUNDING

Federal Institute for Occupational Safety and Health (Germany).

REFERENCES

- Albrecht A, Kämpfer P. (2006) Potential overestimation of the actinomycetes concentration by growth of thermophilic species of *Bacillus* and *Geobacillus* on selective media for thermophilic actinomycetes. *Air Quality Control*; 9: 365–7.
- Amann R, Binder BJ, Olson RJ *et al.* (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*; 56: 1919–25.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*; 59: 143–69.
- Baseler MW, Fogelmark B, Burell R. (1983) Differential toxicity of inhaled Gram-negative bacteria. *Infect Immun*; 40: 133–8.
- Carlile FS. (1984) Ammonia in poultry houses: a literature review. *World's Poultry Science Journal*; 40: 99–113.
- Cayer M-P, Veillette M, Pageau P *et al.* (2007) Identification of mycobacteria in peat moss processing plants: application of molecular biology approaches. *Can J Microbiol*; 53: 92–9.
- Clark SC, Rylander R, Larson L. (1983) Airborne bacteria, endotoxin and fungi in dust poultry and swine confinement buildings. *Am Ind Hyg Ass J*; 44: 537–541.
- Cormier Y, Tremblay G, Meriaux A, Brochu G, Lavoie J. (1990) Airborne microbial contents in two types of swine confinement buildings in Quebec. *Am Ind Hyg Assoc J*; 51: 304–9.
- Crozier-Dodson BA, Fung DY. (2002) Comparison of recovery of airborne microorganisms in a dairy cattle facility using selective agar and thin agar layer resuscitation media. *J Food Prot*; 65: 1488–92.
- Darlow HM, Bale WR, Carter GB. (1961) Infection of mice by the respiratory route with *Salmonella typhimurium*. *J Hyg*; 59: 303–8.
- Deutsches Institut für Normung. (1993) DIN EN481: 1993 Workplaces atmospheres; size fraction definitions for measurement of airborne particles. Berlin, Germany: Beuth Verlag.
- Deutsches Institut für Normung. (1999) Verfahren zum Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Vol. DIN10135. Berlin, Germany: Deutsches Institut für Normung.
- Durand KTH, Muilenberg ML, Burge HA *et al.* (2002) Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration. *Ann Occup Hyg*; 46: 113–8.

- Dutil S, Veillette M, Mériaux A *et al.* (2007) Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environ Microbiol*; 9: 2836–43.
- Dutkiewicz J. (1997) Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann Agric Environ Med*; 4: 11–6.
- Dutkiewicz J, Krysińska-Traczyk E, Skórska C *et al.* (2000) Exposure of agricultural workers to airborne microorganisms and endotoxin during handling of various vegetable products. *Aerobiologia*; 16: 193–8.
- Eduard W, Douwes J, Omenaas E *et al.* (2004) Do farming exposures cause or prevent asthma? Results from a study of adult Norwegian farmers. *Thorax*; 59: 381–6.
- Einen J, Thorseth IH, Ovreaas L. (2008) Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol Lett*; 282: 182–7.
- Ellerbroek L. (1997) Airborne microflora in poultry slaughtering establishments. *Food Microbiol*; 14: 527–31.
- Fey A, Eichler S. (2004) Establishment of real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA-targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl Environ Microbiol*; 70: 3618–23.
- Fogelmark B, Lacey J, Rylander R. (1991) Experimental allergic alveolitis after exposure to different microorganisms. *Int J Exp Pathol*; 72: 387–95.
- Galan JE, Ginocchio C. (1992) Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J Bacteriol*; 174: 4338–49.
- Górny R, Dutkiewicz J. (2002) Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries. *Ann Agric Environ Med*; 9: 17–23.
- Haas D, Posch J, Schmidt S *et al.* (2005) A case study of airborne culturable microorganisms in a poultry slaughterhouse in Styria, Austria. *Aerobiologia*; 21: 193–201.
- Heederik D, Brouwer R, Biersteker K *et al.* (1991) Relationship of airborne endotoxin and bacteria levels in pig farms with the lung function and respiratory symptoms of farmers. *Int Arch Occup Environ Health*; 62: 595–601.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T *et al.* (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*; 22: 4673–80.
- Hoover NJ, Kenney PB, Amick JD *et al.* (1997) Preharvest sources of *Salmonella* colonization in turkey production. *Poult Sci*; 76: 1232–8.
- Kolb S, Carbrera A, Kammann C *et al.* (2005) Quantitative impact of CO₂ enriched atmosphere on abundances of methanotrophic bacteria in a meadow soil. *Biol Fert Soils*; 41: 337–42.
- Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN. (2004a) Richtlinie VDI 4252 Blatt 2: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft; Aktive Probenahme von Bioaerosolen; Abscheidung von luftgetragenen Schimmelpilzen auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern. Berlin, Germany: Beuth Verlag.
- Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN. (2004b) Richtlinie VDI 4252 Blatt 3: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft—Aktive Probenahme von Bioaerosolen—Abscheidung von luftgetragenen Bakterien mit Impingem nach dem Prinzip der kritischen Düse. Berlin, Germany: Beuth Verlag.
- Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN. (2004c) VDI Richtlinie 4253 Blatt 2: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft—Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilz-Konzentrationen in der Luft—Indirektes Verfahren nach Probenahme auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern. Berlin, Germany: Beuth Verlag.
- Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN. (2004d) VDI Richtlinie 4253 Blatt 3: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft—Verfahren zum quantitativen kulturellen Nachweis von Bakterien in der Luft—Verfahren nach Abscheidung in Flüssigkeiten. Berlin, Germany: Beuth Verlag.
- Krsek M, Wellington EMH. (1999) Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J Microbiol Methods*; 39: 1–16.
- Lee S-A, Adhikari A, Grinshpun SA *et al.* (2006) Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments. *J Occup Environ Hyg*; 3: 118–30.
- Lever MS, Williams A. (1996) Cross-infection of chicks by airborne transmission of *Salmonella enteritidis* PT4. *Lett Appl Microbiol*; 23: 347–49.
- Liebers V, Brüning T, Raulf-Heimsoth M. (2006) Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans (review). *Am J Ind Med*; 49: 474–91.
- Lues JFR, Theron MM, Venter P *et al.* (2007) Microbial composition in bioaerosols of a high-throughput chicken-slaughtering facility. *Poult Sci*; 86: 142–49.
- Makino S, Cheun HI. (2003) Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *J Microb Meth*; 53: 141–147.
- Makino SI, Cheun HI, Watarai M *et al.* (2001) Detection of *anthrax* spores from the air by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*; 33: 237–40.
- Marthi B, Fieland VP, Walter M *et al.* (1990) Survival of bacteria during aerosolization. *Appl Environ Microbiol*; 56: 3463–67.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*; 413: 852–6.
- Milanowski J, Dutkiewicz J, Potoczna H *et al.* (1998) Allergic alveolitis among agricultural workers in Eastern Poland: a study of twenty cases. *Ann Agric Environ Med*; 5: 31–43.
- Mumy KL, Findlay RH. (2004) Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *J Microbiol Methods*; 57: 259–68.
- Nielsen B, Breum N. (1995) Exposure to air contaminants in chicken catching. *Am Ind Hyg Assoc J*; 56: 804–8.
- Oppliger A, Charriere N, Droz P-O *et al.* (2008) Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *Ann Occup Hyg*; 52: 405–12.
- Parkes RJ, Taylor J. (1985) Characterization of microbial populations in polluted marine sediments. *J Appl Bacteriol*; 59: 155S–73S.
- Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*; 8: 151–6.
- Porter KG, Feig YS. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr*; 25: 943–8.
- Potts M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev*; 58: 755–805.
- Radon K, Danuser B, Iversen M *et al.* (2002) Air contaminants in different European farming environments. *Ann Agric Environ Med*; 9: 41–8.
- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC *et al.* (1992) Amplification of an *InvA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes*; 6: 271–9.
- Roy SR, Schiltz AM, Marotta A. (2003) Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J Allergy Clin Immun*; 112: 571–8.
- Rylander R. (1986) Lung diseases caused by organic dusts in the farm environment. *Am J Ind Med*; 10: 221–7.
- Sambrook J, Russell DW. (2001) Molecular cloning—a laboratory manual. Vol. 1. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Seedorf J, Hartung J. (2002) Stäube und Mikroorganismen in der Tierhaltung. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL-Schrift 393). Münster, Germany: Landwirtschaftsverlag; pp. 166
- Stach JEM, Bathe S, Clapp JP *et al.* (2001) PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol*; 36: 139–51.
- Stubner S. (2002) Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with Sybr-Green detection. *J Microbial Methods*; 50: 155–64.
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al.* (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*; 24: 1596–9.
- Thurston JR, Cysewski SJ, Richard JL. (1979) Exposure of rabbits to spores of *Aspergillus fumigatus* or *Penicillium* sp.: survival of fungi and microscopic changes in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Am J Vet Res*; 40: 1443–9.
- TRBA 230:2007-11. (2008) Technische Regel für biologische Arbeitsstoffe: Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in der Land- und Forstwirtschaft und vergleichbaren Tätigkeiten. Gemeinsames Ministerialblatt. Vol. 4, 71–83 Available from: http://www.baua.de/nm_15074/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-230.pdf?
- Venter P, Lues JF, Theron H. (2004) Quantification of bioaerosols in automated chicken egg production plants. *Poult Sci*; 83: 1226–31.
- Wathes CM. (1995) Bioaerosols in animal houses. In Cox CS, Wathes CM, editors. *Bioaerosols handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press; pp. 547–77.
- Wathes CM, Zaidan WAR, Pearson GR *et al.* (1988) Aerosol infections of calves and mice with *Salmonella typhimurium*. *Vet Rec*; 123: 590–4.
- Zeng Q, Westermark S, Rasmuson-Lestander A *et al.* (2006) Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real-time PCR. *J Environ Monit*; 8: 153–60.
- Zucker B-A, Trojan S, Müller W. (2000) Airborne Gram-negative bacterial flora in animal houses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*; 47: 37–46.

Danke...

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Kämpfer für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Doktorarbeit, seine Geduld sowie für die Gewährung der Freiräume für meine wissenschaftliche Arbeit.

Frau Prof. Dr. Wilde danke ich für die Begutachtung der Arbeit und die hilfreichen Hinweise bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gäth und Herrn Prof. Dr. Wissemann danke ich für Ihre Funktion als Prüfer.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Udo Jäckel für die Betreuung dieser Arbeit. Seine unermüdliche Unterstützung, wissenschaftlichen Diskussionen zu jeder Tages- und Nachtzeit, praktischen Tipps und seine moralische Unterstützung auch aus dem entfernten Berlin haben einen Großteil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Rita Geißler-Plaum, Maria Sowinsky, Katja Grebing und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für die Unterstützung bei Probennahmen und die ausdauernde Hilfe bei allen Notlagen und Problemchen im Labor. Besonderer Dank gilt dabei Gundula Will, die mir stets mit Eifer und Herz unter die Arme gegriffen hat. So manche späte Abendstunde haben wir zusammen an der Cleanbench verbracht, um Proben aufzuarbeiten. Frau Prof. Schnell, PD Dr. Benckiser, Dr. Stefan Ratering und Dr. Michael Bunge danke ich für interessante und bereichernde Diskussionen und Ideen zu jeder Zeit – gern auch am Mittagstisch. Dr. Nicole Lodders danke ich darüber hinaus für die Durchsicht des Manuskripts. An die tolle Gemeinschaft neben der Arbeit werde ich immer gern (und etwas wehmütig) denken.

Kathrin Thummes und Jenny Schäfer möchte ich für ihre praktische, vor allem aber für ihre freundschaftliche und moralische Unterstützung danken. Die Zeit mit Euch war wunderschön, Ihr seid mir besondere und wichtige Freundinnen geworden.

Ein besonderer Dank an Heiko für die Unterstützung und Geduld während Studium und Dissertation. So manchen Tiefpunkt hätte ich ohne Dich nicht überstanden, Du hast mich immer wieder aufgebaut.

Ganz besondere Dankbarkeit gilt natürlich meinen Eltern und Großeltern, die mir das Studium ermöglicht, mich zur Dissertation ermutigt und mir auch sonst in allen Lebenslagen aus der Ferne – im wahrsten Sinne des Wortes – „den Rücken gestärkt haben“.

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation

Untersuchung an Bioaerosolen in Tierställen
unter Etablierung einer REAL-TIME PCR-basierten Methode zur Erfassung
luftgetragener *Salmonella* und *Thermoactinomyces* Zellen

Selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den

Kerstin Fallschissel