

**Untersuchungen
zur
Diversität
von
Actinobacteria
in
Innenräumen**

Jenny Schäfer



**UNTERSUCHUNGEN ZUR DIVERSITÄT VON
ACTINOBACTERIA IN INNENRÄUMEN**

KUMULATIVE 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

Jenny Schäfer M.Sc.

Gießen, 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2006 bis September 2010 im Institut für Angewandte Mikrobiologie der Universität Giessen unter der Leitung von Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer durchgeführt.

Von der gemeinsamen Kommission für Naturwissenschaften als Dissertation angenommen in 2011.

Dekan:	Herr Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer
Erstgutachter:	Herr Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer
Zweitgutachter:	Frau Prof. Dr. Annegret Wilde

Tag der Disputation: 04.10.2011

Für meine Familie

Jenny Schäfer
Pettenkoferstraße 4
10247 Berlin

geb.: 03.10.1981

Eigenständigkeitserklärung

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation

Untersuchungen zur Diversität von *Actinobacteria* in Innenräumen

selbständig 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.“

Berlin, den

Jenny Schäfer

Liste der Publikationen

- I. Schäfer, J., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2010) Development of a new PCR primer system for selective amplification of *Actinobacteria*. *FEMS Microbiol Lett*, 311:103-112
- II. Schäfer, J., Jäckel, U., Kämpfer, P. (2010) Analysis of *Actinobacteria* from mould-colonized water damaged building material. *System Appl Microbiol*, 33:260-268
- III. Schäfer, J., Busse H.-J., Kämpfer, P. (2009) *Pseudonocardia parietis* sp. nov., from the indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59: 2449 - 2452.
- IV. Schäfer, J., Martin, K., Kämpfer, P. (2010) *Citricoccus parietis* sp. nov., isolated from a mould-colonized wall, and emended description of *Citricoccus alkalitolerans* Li *et al.* 2005. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 271-274
- V. Schäfer, J., Martin, K., Kämpfer, P. (2010) *Prauserella muralis* sp. nov., from an indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 287-290
- VI. Kämpfer P., Martin, K., Schäfer, J., Schumann, P. (2009) *Kytococcus aerolatus* sp. nov., isolated from indoor air in a room colonized with moulds. *System Appl Microbiol*, 32: 301–305
- VII. Kämpfer P., Schäfer, J., Lodders, N., Busse H.-J. (2010) *Brevibacterium sandarkinum* sp. nov., isolated from a wall of an indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 909-913
- VIII. Kämpfer, P., Schäfer, J., Lodders, N., Martin, K. (2010) *Microlunatus parietis* sp. nov., isolated from an indoor wall. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 2420 - 2423.
- IX. Kämpfer, P., Schäfer, J., Lodders, N., Martin, K. (2010) *Murinocardiopsis flavida* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete isolated from indoor walls. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 1729 - 1734
- X. Kämpfer, P., Schäfer, J., Lodders, N., Martin, K. (2010) *Jiangella muralis* sp. nov., from the indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61: 128 - 131.
- XI. Martin, K., Schäfer, J., Kämpfer, P. (2010) *Promicromonospora umidemergens* sp. nov., isolated from moisture from indoor wall material. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 537-541
- XII. Schäfer, J., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2011) Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by quantitative *Real-time* PCR. *Ann Occup Hyg*, 55: 612-619

Inhaltsverzeichnis

Eigenständigkeitserklärung	II
Liste der Publikationen	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VI/VII
Summary	VIII/IX
1. ÜBERBLICK	1
1.1 Baumaterialien mit Feuchteschäden	1
1.2 <i>Actinobacteria</i>	3
1.3 Nachweis von <i>Actinobacteria</i> im Innenraum	4
1.4 Freisetzung von <i>Actinobacteria</i>	11
1.5 Beeinträchtigung der Gesundheit durch <i>Actinobacteria</i> im Innenraum mit Feuchteschaden	13
1.6 Methoden zum Nachweis von <i>Actinobacteria</i>	15
1.7 Speziesspezifische Quantifizierung mittels quantitativer <i>Real-time</i> PCR	20
2. MATERIAL & METHODEN	23
3. PUBLIKATIONEN	24
3.1 Untersuchungen zur Diversität von <i>Actinobacteria</i> in Innenräumen (Publikation I-II)	24
3.2 Identifizierung und taxonomische Einordnung unbekannter Isolate aus Innenräumen (Publikation III-XI)	27
3.3 Entwicklung eines 16S rRNA Gen basierten Primersystems zum Nachweis von <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> (Publikation XII)	37
4. SCHLUSSFOLGERUNG & AUSBLICK	39
5. LITERATUR	40

Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
BHI:	Brain Heart Infusion
BioStoffV:	Biostoffverordnung
BLAST:	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
CMA:	Casein Mineral Agar
DAP:	<u>D</u> iaminopimelinsäure
G/A-Agar:	Glycerin/Arginin-Agar
Gauze-Agar:	Mineralagar nach Gauze et al. (1983)
GZZ:	Gesamtzellzahl
IL6:	Interleukin-6
KBE:	Kolonie Bildende Einheiten
LGA:	Landesgesundheitsamt
NO:	Stickstoffmonoxid
OUT:	Operational Taxonomic Unit
qPCR:	quantitative Polymerase Chain Reaktion
RG:	Risikogruppen
rRNA:	ribosomale Ribonukleinsäure
Sj:	Jaccard-Koeffizient
spp.:	species pluralis
SSCP:	Single Strand Conformation Polymorphism
Tab.:	Tabelle
TRBA:	Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
VBNC:	viable but not culturable
z.B.:	Zum Beispiel

Zusammenfassung

Um die Vielfalt von *Actinobacteria* in Baumaterialien zu untersuchen, wurden 18 verschiedene, feuchtegeschädigte Baumaterialien sowohl kultivierungsunabhängig als auch kultivierungsabhängig untersucht. Für den kultivierungsunabhängigen Ansatz wurde zunächst ein Nachweissystem speziell für die Klasse der *Actinobacteria*, basierend auf der 16S rRNA Gensequenz, entwickelt und etabliert. Die Analyse komplexer Umweltproben zeigte hierbei eine 100%ige Spezifität des entwickelten Primersystems, was den Einsatz für Diversitätsuntersuchungen von *Actinobacteria* in Baumaterialien erlaubt. Sowohl kultivierungsunabhängig als auch kultivierungsabhängig wurden *Actinobacteria* mit einer hohen Abundanz in feuchtegeschädigten Baumaterialien nachgewiesen. Der Anteil der 16S rRNA Gensequenzen innerhalb der generierten Klonbibliotheken, der spezifisch *Actinobacteria* zugeordnet wurde, betrug im Mittel 50%. Kultivierungsabhängig wurden *Actinobacteria*-Konzentrationen von $1,8 \times 10^4$ bis $7,6 \times 10^7$ KBE g^{-1} Materialfrischgewicht detektiert.

Insgesamt konnten in den feuchtegeschädigten Baumaterialien 68 verschiedene *Actinobacteria*-Gattungen ermittelt werden, was eine unerwartet hohe Diversität widerspiegelt. Auch wurde anhand der Neubeschreibung acht verschiedener Bakterienarten (*Pseudonocardia parietis*, *Citricoccus parietis*, *Prauserella muralis*, *Promicromonospora umidemergens*, *Brevibacterium sandarkinum*, *Jiangella muralis*, *Microbunus parietis*, *Kytococcus aerolatus*) sowie einer neuen Bakteriengattung *Murinocardiopsis (flavida)* gezeigt, dass das *Actinobacteria*-Spektrum in Baumaterialien bisher unbekannt ist. Obwohl die Ergebnisse einer Rarefactionanalyse zeigten, dass die Artenvielfalt der *Actinobacteria* in feuchtegeschädigten Baumaterialien vermutlich noch größer ist, wurden die abundanten *Actinobacteria*-Gattungen ermittelt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Vertreter der Gattungen *Streptomyces* und *Pseudonocardia* in über 90% der Proben nachweisbar waren. Aber auch Vertreter der Gattungen *Promicromonospora*, *Jiangella*, *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* und *Nocardiopsis* konnten in $\geq 60\%$ der untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Erste Zusammenhänge zwischen Material- und korrespondierenden Bioaerosolproben hinsichtlich des Vorkommens gleicher Bakterienspezies konnten anhand von 16S rRNA

Gen-Sequenzähnlichkeiten > 99% gezeigt werden. Hierbei wurden acht von insgesamt 28 Bioaerosolisolaten (28%) auch in den korrespondierenden Materialproben nachgewiesen. Aber auch anhand der hier erhaltenen Ergebnisse kann weder eine Aussage über eine spezifische Exposition von Bewohnen z.B. über Bioaerosole noch über einen direkten gesundheitlichen Zusammenhang bzw. Effekt getroffen werden. Allerdings wurden Bakterien nachgewiesen, die im Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen stehen könnten, wie *Nocardiopsis dassonvillei*. Das Detailwissen zum Vorkommen abundanter und gesundheitlich bedeutsamer *Actinobacteria* in feuchtegeschädigten Baumaterialien ermöglicht jedoch einen gezielten Nachweis spezifischer *Actinobacteria*. So konnte für *Saccharopolyspora rectivirgula*, bekannt als Auslöser der EAA, ein spezifisches und quantitatives Nachweissystem, basierend auf der 16S rRNA Gensequenz, entwickelt und etabliert werden. Die Spezifität des hier entwickelten *Real-time* PCR Systems wurde durch Klonierungsanalysen aus komplexen Umweltproben bestätigt.

Insgesamt belegen die vorliegenden Untersuchungen, dass die hier gewählten Methodiken zukünftig vielversprechend für Diversitätsuntersuchungen sowie die Bewertung von Innenräumen, hinsichtlich der Belastung mit *Actinobacteria*, eingesetzt werden können.

Summary

To analyse the diversity of *Actinobacteria* in building materials damaged by water eighteen different building materials were investigated by cultivation dependent and cultivation independent approaches. For cultivation independent analysis a detection system based on 16S rRNA gene sequences was established specifically for *Actinobacteria*. The specificity of the developed primer system was shown by generation of clone libraries from different environmental samples. These examinations guarantee the application of the primer system for diversity analyses of *Actinobacteria* in building materials. High abundancies of *Actinobacteria* in building materials damaged by water were shown both by cultivation dependent and independent analyses. The cultivation independent investigation showed high numbers of *Actinobacteria* inside building materials. The fraction of 16S rRNA gene sequences which were assigned positively to *Actinobacteria* sequences averaged 50%. Respectively, the cultivation dependent approach showed high concentrations ranging from 1.8×10^4 to 7.6×10^7 CFU g⁻¹ fresh weight in styrofoam and plaster. Altogether, 68 different genera were detectable in the analysed building material samples, which indicate an unexpected high diversity of *Actinobacteria*. Furthermore, eight bacteria species and one *Actinobacteria* genus were described for first time (*Pseudonocardia parietis*, *Citricoccus parietis*, *Prauserella muralis*, *Promicromonospora umidemergens*, *Brevibacterium sandarkinum*, *Jiangella muralis*, *Microclunatus parietis*, *Kytococcus aerolatus* and *Murinocardiopsis (flavida)*). Even if the rarefaction analysis displayed that species richness was higher when investigating a major sample size, the abundant *Actinobacteria* genera were detected. The most frequent genera detected were *Streptomyces* and *Pseudonocardia* which were found in more than 90% of the examined samples. Species of the genera *Promicromonospora*, *Jiangella*, *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* and *Nocardiopsis* were detectable in still more than 60%.

This study showed the correlation of material- and corresponding bioaerosol sample for first time. The investigations showed that based on 16S rRNA sequence similarities > 99%, eight of overall 28 isolates were detected both in water damaged building material and in the corresponding bioaerosol sample.

Depending on the results of the study no comments could be made, neither in respect to specific exposure of occupants nor in relevance on human health. But some species were detected which are potentially pathogenic, like *Nocardiosis dassonvillei*. However, the study provides detailed information on occurring and abounding *Actinobacteria* in water damaged building materials. This knowledge is urgently required in consideration of prospective and selective detection of *Actinobacteria* relevant to health. In this study a specific quantitative *Real-time* PCR system for detection of *S. rectivirgula*, known as a causative agent for extrinsic allergic alveolitis was developed. Specificity of the deployed system was shown by cloning analyses from complex environmental samples.

These results clearly demonstrated that the method mentioned above seems to be applicable for the assessment of indoor environments.

1. ÜBERBLICK

1.1 Baumaterialien mit Feuchteschäden

Feuchteschäden in Gebäuden bzw. im Mauerwerk sowie anderen Baumaterialien können durch verschiedene Arten der Wasseraufnahme verursacht werden. Ursächlich hierbei können Leitungsschäden, bauphysikalische Mängel, z.B. Wärmebrücken mit einhergehender Tauwasserbildung, aber auch Baurestfeuchte vor allem in Neubauten sein (GAEA Umweltkonsulting, Leitfaden LGA, Baden-Württemberg). Zu massiven Feuchteschäden an Gebäuden führt ebenfalls ein verstärktes Auftreten von Umweltkatastrophen, die mit starken Überschwemmungen einhergehen wie 1997 in Polen, 2005 in New Orleans, 2007 in Großbritannien (Górny, 2007), 2010 in Pakistan oder kürzlich in Australien. Die Feuchtigkeit, die dabei z.B. in das Mauerwerk aufgenommen wird, dringt nach innen und kann dort zu einer Besiedlung des Mauerwerks mit Mikroorganismen führen.

Mikrobielle Kontaminationen der Baumaterialien resultieren häufig in gesundheitlichen Problemen für die Bewohner. So wird bereits seit Pettenkofer (1858) das Leben in feuchtegeschädigten Wohnungen als gesundheitliches Risiko für die Bewohner betrachtet (Brasche *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2007). Wiederholt wurden gesundheitliche Beschwerden, wie Husten, Schnupfen, Asthma, Infektionen der Luftröhre, Müdigkeit und Kopfschmerzen von Bewohnern feuchtegeschädigter Gebäude beschrieben (Spengler *et al.*, 1994; Sundell *et al.*, 1994; Koskinen *et al.*, 1999; Bornehag *et al.*, 2001; Haverinen *et al.*, 2001; Górny, 2004). Die bis heute in diesem Zusammenhang stehenden Untersuchungen konzentrieren sich jedoch weitestgehend auf die Analyse von Schimmelpilzen. Daher beziehen sich die folgenden Angaben hauptsächlich auf mit Schimmelpilzbefall verbundene Feuchteschäden: Studien zeigen, dass in Europa zwischen 12-80% der Haushalte Probleme mit sichtbarem Schimmelpilzbefall und/oder schlechter Raumluft haben (Górny, 2004). Weiterhin belegt eine Studie von Brasche *et al.* (2003) das Vorkommen von Schimmelpilzschäden in 9,3% von 5530 zufällig ausgewählten Wohnungen in Deutschland. Sichtbare Feuchtigkeitsschäden (Feuchtefleck, Stockfleck, evtl. Schimmel) wurden sogar in 21,9% der untersuchten Wohnungen ermittelt. Auch die Ergebnisse des Kinder-Umweltsurveys des Umweltbundesamtes bestätigen das gehäufte

Auftreten von Feuchteschäden in Deutschland, wobei in 33% der Wohnungen Feuchteschäden und in 14% der Wohnungen Schimmelpilzbefall nachweisbar waren (Szewzyk, 2009). Die durch Schimmelpilzbefall verursachten Kosten werden allein in Deutschland auf mehr als 200 Millionen Euro pro Jahr geschätzt (Górny, 2004).

Es ist bekannt, dass einige der innenraumrelevanten Schimmelpilze in der Lage sind, beim Menschen infektiöse, toxische oder allergene Wirkungen auszulösen (Moriske & Szewzyk, 2003; Fischer, 2010). Allerdings konnte die gesundheitsschädliche Wirkung von Pilzexpositionen im Innenraum bisher wissenschaftlich nicht nachgewiesen werden. D.h. derzeit fehlt der kausale Zusammenhang zwischen gesundheitlichen Beschwerden und einer Schimmelpilzbelastung (Fischer, 2005, 2010; Szewzyk, 2008).

Da auf den feuchten Materialien im Innenraum nicht nur Schimmelpilze, sondern auch Bakterien, insbesondere Vertreter der Klasse *Actinobacteria* nachgewiesen wurden (Altenburger *et al.* 1996; Andersson *et al.*, 1997, 1998, 1999; Peltola, 2001a; Hyvärinen *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2003a; Lorenz *et al.*, 2003b), trat die Analyse dieser Bakteriengruppe ebenfalls in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen (Abb.1). Bereits im Jahr 1970 deuteten Untersuchungen von Schaal (1970) darauf hin, dass den Actinomyceten im Zusammenhang mit Baumaterialien und einer möglichen gesundheitlichen Relevanz eine besondere Bedeutung zukommt. So berichtete Schaal über *Nocardia*-Infektionen bei Patienten eines Krankenhauses im Zusammenhang mit dem Auftreten von *Nocardia farcinica* im Abrissstaub des Nachbargebäudes.

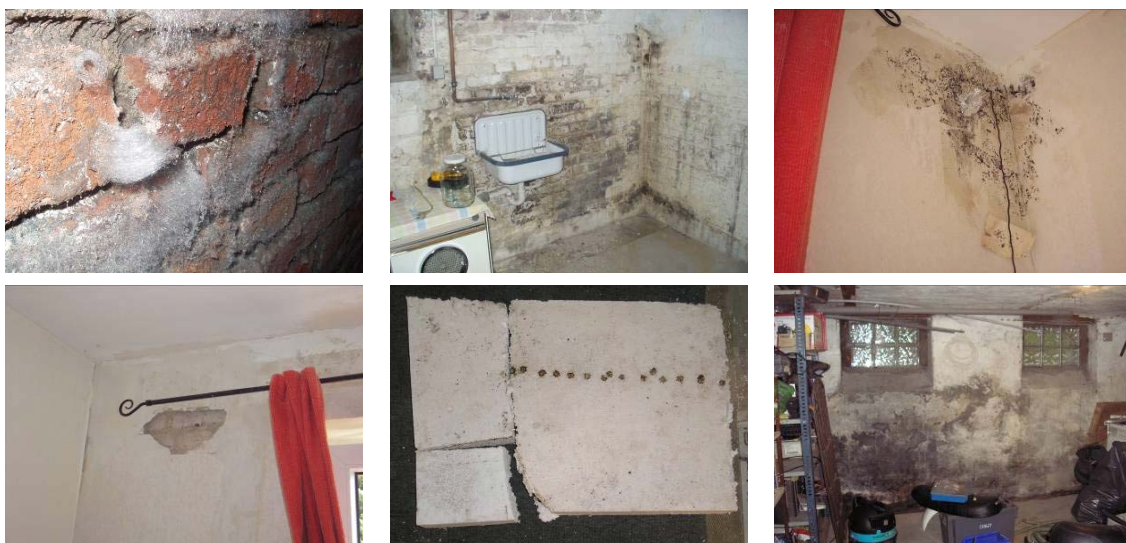


Abb. 1 Darstellung feuchtegeschädigter Gebäude bzw. Baumaterialien, in denen das Vorkommen von *Actinobacteria* untersucht wurde (Bilder: Dr. Lorenz-Institut für Innenraumdiagnostik)

1.2 Actinobacteria

Etymologie: Gr. n. aktis -inos, a ray, beam (Strahl); Gr. n. baktêria, staff, cane (Stab, Stock); suff. -ia, Endung vorgeschlagen von Gibbons und Murray und von Stackebrandt *et al.* (1997) um eine Klasse zu kennzeichnen; N.L. neut. pl. n. *Actinobacteria*, Actinomyces, Gruppe von Bakterien mit verschiedenen morphologischen Eigenschaften. (Okt. 2010, <http://www.bacterio.cict.fr/a/actinobacteria.html>), Gr *aktis* (gen. *aktinos*), von strahlenartiger Struktur.

Actinobacteria gehören innerhalb der Domäne *Eubacteria* zur phylogenetischen Gruppe (Abb.2) der Gram-positiven Prokaryoten mit einem hohen Guanin-Cytosin-Gehalt im Genom (Goodfellow, 1989; Ensign, 1992; Ludwig & Klenk, 2001; Madigan, 2006). Die Einführung der eigenständigen Klasse *Actinobacteria* wurde 1997 erstmals von Stackebrandt *et al.* vorgeschlagen, um der großen morphologischen Diversität der bis zu diesem Zeitpunkt auch als „Actinomyceten“ bezeichneten Bakteriengruppe Rechnung zu tragen. Die Klasse *Actinobacteria* enthält sechs Ordnungen, *Acidimicrobiales*, *Rubrobacterales*, *Coriobacterales*, *Bifidobacterales*, *Actinomycetales* und *Nitriliruptorales* (Sorokin *et al.*, 2009; Zhi *et al.*, 2009). Im Jahr 2009 fassten Zhi und Mitarbeiter in einem Übersichtsartikel zusammen, dass die Klasse der *Actinobacteria* zu diesem Zeitpunkt 13 Unterordnungen, 50 Familien und 219 verschiedene Gattungen umfasste. Die sechste oben genannte Ordnung, *Nitriliruptorales*, wurde im gleichen Jahr von Sorokin *et al.* (2009) vorgeschlagen.

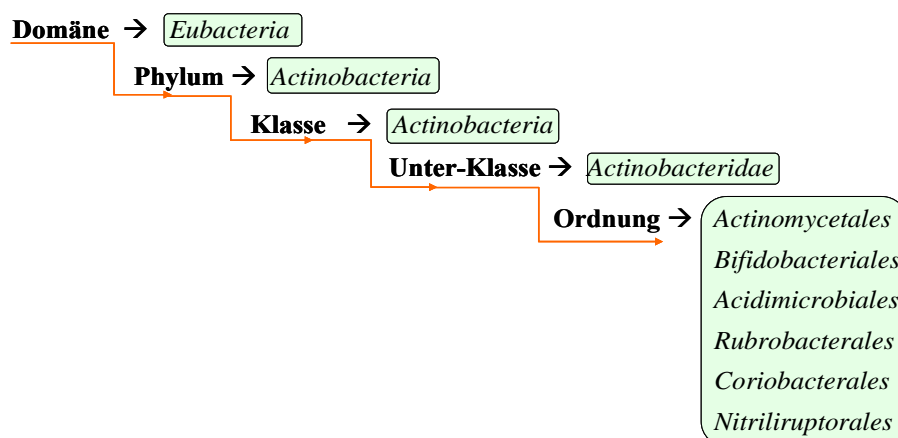


Abb. 2 Phylogenetische Einordnung von *Actinobacteria*

Die Klasse der *Actinobacteria* beinhaltet heterotrophe, überwiegend aerobe Bakterien, die in ihren morphologischen, physiologischen und cytochemischen Eigenschaften stark variieren. Die morphologische Vielfalt der Zellformen reicht von Kokken (z.B. *Micrococcus* spp.) bzw. kokkoiden Zellen (z.B. *Kocuria* spp.) über Stäbchen (z.B. *Corynebacterium* spp.) bis hin zu komplexen Mycel-Strukturen (z.B. *Streptomyces* spp.). Einige Spezies zeigen auch wechselnde Erscheinungsformen aufgrund einer Kokken-Stäbchen-Morphogenese (z.B. *Arthrobacter* spp.). Die Zellform kann auch aufgrund der Fragmentation des Mycels variieren, da hierbei das gebildete Mycel teils in kokkenförmige aber auch in langgestreckte Elemente zerfällt (z.B. *Nocardia* spp.). Aufgrund der Ausbildung eines fädig verzweigten Geflechts von Filamenten (Pseudohyphen, Mycel, Ø 0,5-2,0 µm, undefinierte Länge) entstand die Bezeichnung „Strahlenpilze“. Diese wird heute noch in der Literatur verwendet und führt damit oft zur Verwechslung von mycelbildenden *Actinobacteria* mit Schimmelpilzen.

► *Definition: In der vorliegenden Arbeit werden sowohl die Begriffe Actinobacteria (= taxonomische Bezeichnung, Actinobakterien, eingedeutschte Form) als auch Actinomyceten verwendet. Unter dem Begriff Actinobacteria sind alle Bakterien zusammengefasst, die der Klasse der Actinobacteria angehören. Der Begriff Actinomyceten wird in der Literatur für einen Teil dieser Bakterien verwendet, die sogenannten filamentösen (mycelbildenden) Actinobacteria.*

1.3 Nachweis von *Actinobacteria* im Innenraum

Aufgrund der Größe und Vielfältigkeit dieser Bakteriengruppe ist es schwierig, geeignete Detektionsverfahren für den Nachweis der gesamten Gruppe zu etablieren. Daher beschränken sich die derzeit vorliegenden Studien zum Nachweis von *Actinobacteria* im Innenraum, im Zusammenhang mit Feuchteschäden, häufig auf den gezielten Nachweis einzelner Vertreter der *Actinobacteria* (z.B. Rintala *et al.*, 2002; Torvinen *et al.* 2006, 2010, gezielter Nachweis von Streptomyceten oder Mycobakterien) oder allein auf die quantitative Erfassung von *Actinobacteria* über die Kultivierung (Hyvärinen *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2003b). Bis zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Untersuchungen lagen nur zwei Studien vor, die sich mit Vorkommen und Diversität von Bakterien im Innenraum

mit Feuchteschaden beschäftigten. Eine der Studien befasste sich gezielt mit dem Vorkommen filamentöser *Actinobacteria*, den Actinomyceten (Suhiko *et al.*, 2009). In der anderen Studie wurde allgemein die Bakteriengemeinschaft im Hausstaub untersucht (Rintala *et al.*, 2008). In der vorliegenden Studie sollte das gesamte Spektrum vorhandener *Actinobacteria* in Baumaterialien mit Feuchteschäden ermittelt werden. Dies setzt zunächst geeignete Identifizierungsmethoden voraus, welche in der vorliegenden Arbeit geprüft wurden.

Bis vor einigen Jahren dienten vor allem die koloniemorphologischen und cytochemischen Merkmale, die oft auch als „chemotaxonomische Eigenschaften“ bezeichnet werden, zur Identifizierung der *Actinobacteria*. Hierbei wurden zunächst Merkmale wie das dichte, verschiedengestaltige und farbige Luft- und Substratmycel, sowie die Form und Stellung der Sporen erfasst (Ensign, 1992). Die Gattungen der *Actinobacteria* können auch aufgrund ihrer Zellwandbestandteile in Gruppen unterteilt werden. Die Hauptunterscheidungskriterien hierbei sind einerseits das Vorkommen bzw. die Isomerie der Diaminopimelinsäure (LL-DAP, meso-DAP, ohne DAP) in der Zellwand, und andererseits das Vorhandensein bestimmter Zellwandzuckermoleküle (Xylose, Arabinose, Madurose, Galactose, Rhamnose) (Lechevalier, 1989). Diese morphologischen und chemotaxonomischen Merkmale finden auch heute noch Anwendung bei der Identifizierung und Klassifizierung, werden jedoch besonders durch genotypische Analysen, wie das Vorkommen und der Vergleich sogenannter Markergene, unterstützt. Die Anwendung dieser genotypischen Analysen zeigen allein schon zeitliche Vorzüge, da die Anwendung klassischer Verfahren einen hohen zeitlichen Aufwand erfordert.

Um in der vorliegenden Studie die Vielfalt der *Actinobacteria* in Baumaterialien zu untersuchen, diente die 16S rRNA Gensequenzanalyse als Grundlage zur Identifizierung der Bakterien. Dieser Ansatz wurde gewählt, da besonders innerhalb der Klasse *Actinobacteria* oft die Gattungs- bzw. Art-Identifizierung allein mit morphologischen und biochemischen Methoden nicht möglich war bzw. ist. *Actinobacteria* konnten jedoch unter Verwendung der 16S rRNA Gensequenz schnell auf Gattungsniveau differenziert werden. Um die Diversität der *Actinobacteria* bestmöglich zu ermitteln, wurden die Baumaterialien sowohl kultivierungsabhängig als auch kultivierungsunabhängig, basierend auf der 16S rRNA Gensequenz, untersucht. Somit wurde die *Actinobacteria*-

Gemeinschaft anhand der 16S rRNA Gensequenzen gewonnenener Isolate und im direkten Vergleich mit Hilfe von Klonierungsanalysen klassifiziert (siehe Publikation II).

Obwohl zu vermuten ist, dass das Spektrum der *Actinobacteria* auch in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig ermittelt werden konnte, wurde aufgrund der gewählten Analyseverfahren eine unerwartet hohe Diversität ermittelt. Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit 68 verschiedene Gattungen aus 12 verschiedenen (Unter-) Ordnungen (*Acidimicrobinae*, *Corynebacterinae*, *Frankinae*, *Glycomycinae*, *Micrococcinae*, *Micromonosporinae*, *Propionibacterinae*, *Pseudonocardinae*, *Rubrobacterinae*, *Solirubrobacterales*, *Streptomycinae* und *Streptosporanginae*) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse belegen somit eindeutig ein breites Spektrum an *Actinobacteria*-Arten in feuchtegeschädigten Baumaterialien (siehe Publikation I und II). Die bisher als Besiedler von Baumaterialien mit Feuchteschäden bekannten Gattungen (siehe Tab. 1) konnten mit Ausnahme von drei Gattungen (*Dietzia*, *Laceyella* und *Williamsia*) auch in der hier vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Allerdings wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen 54 zusätzliche Gattungen im Zusammenhang mit feuchtegeschädigten Baumaterialien detektiert.

Unter Berücksichtigung aller bisherigen Untersuchungen aus Innenräumen mit Feuchteschäden (siehe Tab. 1), d.h. nicht allein der Nachweis in Baumaterialien sondern einschließlich der ermittelten Gattungen aus Hausstaub- oder Bioaerosolproben, konnten 14 von 18 bisher erwähnten Gattungen in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den drei oben genannten, aus Baumaterialien detektierten Gattungen, wurde die Gattung *Spirillispora* in dieser Studie nicht detektiert.

Tab. 1 Darstellung der bisher im Innenraum und in Baumaterialien detektierten Gattungen innerhalb der *Actinobacteria**

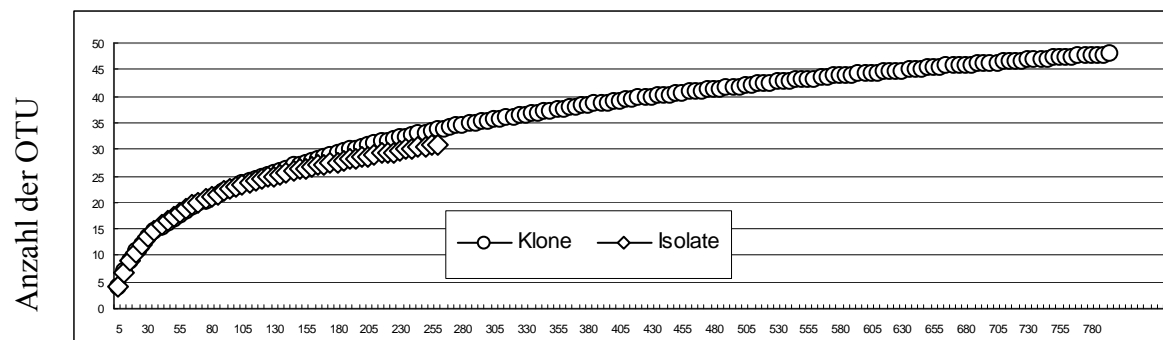
Anzahl	Gattung/Familie	in der vorliegenden Arbeit detektierte Gattungen		derzeit in der Literatur beschriebene Gattungen im Zusammenhang mit Innenraum bzw. Feuchteschäden		
		Baumaterial mit Feuchteschaden	Bioaerosolprobe	Baumaterial mit Feuchteschaden	Innenraum mit Feuchteschaden	Innenraum ohne Feuchteschaden
1	<i>Actinoalloteichus</i>	X				
2	<i>Actinomadura</i>		X			
3	<i>Actinomyces</i>	X				
4	<i>Actinoplanes</i>	X				
5	<i>Actinopolymorpha</i>	X				
6	<i>Aeromicrobium</i>	X				X (B)
7	<i>Agrococcus</i>	X				
8	<i>Agromyces</i>	X				
9	<i>Amycolatopsis</i>	X				
10	<i>Arsenicococcus</i>		X			
11	<i>Arthrobacter</i>	X		X	X (B), (S)	X (B)
12	<i>Blastococcus</i>	X				
13	<i>Brachybacterium</i>	X				X (B)
14	<i>Brevibacterium</i>	X	X		X (B)	
15	<i>Cellulomonas</i>	X		X		
16	<i>Citricoccus</i>	X				
17	<i>Clavibacter</i>	X			X (B)	
18	<i>Conexibacter</i>	X				
19	<i>Corynebacterium</i>	X			X (S)	
20	<i>Cryobacterium</i>	X				
21	<i>Curtobacterium</i>					X (B)
22	<i>Dietzia</i>			X		X (B)
23	<i>Geodermatophilus</i>	X				
24	<i>Georgenia</i>	X				
25	<i>Glaciibacter</i>	X				
26	<i>Goodfellowiella</i>	X				
27	<i>Iamia</i>	X				
28	<i>Isoptricola</i>	X				
29	<i>Janibacter</i>		X			X (B)
30	<i>Jiangella</i>	X				
31	<i>Kineococcus</i>	X				
32	<i>Klugeriella</i>	X				
33	<i>Knoellia</i>	X				
34	<i>Kocuria</i>	X	X			X (B)
35	<i>Kribbella</i>	X				
36	<i>Kytococcus</i>		X			
37	<i>Laceyella</i>			X		
38	<i>Leifsonia</i>	X				
39	<i>Lentzea</i>	X				
40	<i>Leucobacter</i>	X				
41	<i>Marmoricola</i>	X				
42	<i>Microbacterium</i>	X				X (B)
43	<i>Microcella</i>	X				
44	<i>Micrococcus</i>	X	X	X	X (B), (S)	X (B)
45	<i>Microlunatus</i>	X				
46	<i>Micromonospora</i>	X				X (B)
47	<i>Modestobacter</i>	X				
48	<i>Murinocardiopsis</i>	X				
49	<i>Mycetocola</i>	X				
50	<i>Mycobacterium</i>	X		X	X (B)	
51	<i>Nesterenkonia</i>	X				
52	<i>Nocardia</i>	X	X	X		X (B)
53	<i>Nocardioides</i>	X				
54	<i>Nocardiopsis</i>	X	X	X	X (S)	X (B)
55	<i>Oerskovia</i>	X				X (B)
56	<i>Ornithinococcus</i>	X				
57	<i>Paraoerskovia</i>	X				
58	<i>Prauserella</i>	X				
59	<i>Promicromonospora</i>	X		X		

Anzahl	Gattung/Familie	in der vorliegenden Arbeit detektierte Gattungen		derzeit in der Literatur beschriebene Gattungen im Zusammenhang mit Innenraum bzw. Feuchteschäden		
		Baumaterial mit Feuchteschaden	Bioaerosolprobe	Baumaterial mit Feuchteschaden	Innenraum mit Feuchteschaden	Innenraum ohne Feuchteschaden
60	<i>Propionibacterium</i>	X				
61	<i>Propioniceella</i>	X				
62	<i>Pseudonocardia</i>	X	X	X		
63	<i>Rhazobacter</i>	X				
64	<i>Rhodococcus /Gordonia</i>	X	X	X	X (B), (S)	X (B)
65	<i>Ruania</i>	X				
66	<i>Rubrobacter</i>	X				
67	<i>Saccharomonospora</i>	X		X		
68	<i>Saccharopolyspora</i>	X	X			X
69	<i>Solirubrobacter</i>	X				
70	<i>Spirillispora</i>				X (B)	
71	<i>Stackebrandtia</i>	X				
72	<i>Streptomyces</i>	X	X	X	X (B), (S)	X (B)
73	<i>Tsukamurella</i>	X				
74	<i>Umezawaea</i>	X				
75	<i>Williamsia</i>			X		
76	<i>Yania</i>	X				
77	<i>Yonghaparkia</i>	X				

* Gattungen zusammengetragen aus der vorliegenden Arbeit sowie von Andersson *et al.*, 1999; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999; Vuorio *et al.*, 1999; Peltola *et al.*, 2001; Roponen *et al.*, 2001; Lorenz *et al.*, 2003; Mehrer *et al.*, 2003; Górný, 2004; Torvinen *et al.*, 2006; Pietarienen *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2009), (B) in Bioaerosol- bzw. (S) in Staubproben detektierte Gattungen

Dass aus diesen vier *Actinobacteria*-Gattungen keine Vertreter in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden konnten, spricht für ein vereinzelt Vorkommen dieser Bakterien in feuchtegeschädigten Innenräumen. Im Rahmen dieser Studie wurden jedoch verschiedene Gattungen wie *Amycolatopsis*, *Jiangella* oder *Saccharopolyspora* häufig nachgewiesen, die bisher noch nicht in Verbindung mit Feuchteschäden im Innenraum detektiert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Vorkommen, die Vielfalt und Häufigkeit von *Actinobacteria* in feuchtegeschädigten Baumaterialien bzw. Innenräumen bisher nicht geklärt sind.

Trotz einer sehr heterogenen Auswahl der Proben zeigen die Ergebnisse einer Rarefactionanalyse (Abb. 3), dass die Artenvielfalt von *Actinobacteria* in Baumaterialien vermutlich noch größer ist. Der ermittelte Kurvenverlauf der Analyse lässt darauf schließen, dass eine Erhöhung des Stichprobenumfangs zum Nachweis weiterer Taxa führen würde.



Anzahl der untersuchten 16S rRNA Gensequenzen innerhalb der Klonbibliotheken
bzw. der Isolate

Abb. 3 Rarefactionanalyse der untersuchten 16S rRNA Gen Plasmidinserts aus den generierten Klonbibliotheken sowie der 16S rRNA Gen Isolatsequenzen aus verschiedenen Baumaterialien. Ein OTU (operational taxonomic unit) stellt hierbei eine detektierte Gattung dar.

Die Auswahl der Proben erfolgte unter Berücksichtigung verschiedener chemischer und physikalischer Parameter (pH-Wert, Temperatur, relative Feuchtigkeit) des Materials sowie der Analyse unterschiedlicher Materialtypen (Putz, Styropor, Mineralwolle, Tapete). Die zum Zeitpunkt der Probenahme gemessenen Temperaturen der Baumaterialienproben lagen zwischen 9,9 und 24,8 °C, die pH-Werte zwischen 6,3 und 11,3 und die relative Feuchtigkeit an der Probenahmestelle variierte zwischen 38,9 und 100%. Diese Auswahl sollte ein großes Spektrum an unterschiedlichen in den Materialproben vorhandenen Wachstumsbedingungen für *Actinobacteria* abdecken, um damit die größtmögliche Artenvielfalt der *Actinobacteria* zu erfassen. Um zunächst zu prüfen, ob das bei diesen verschiedenen Bedingungen zu vermutende unterschiedliche Artenspektrum an *Actinobacteria* tatsächlich vorliegt, wurde eine Fingerprintanalyse durchgeführt. Die hier gewählte SSCP- (Single Strand Conformation Polymorphism) Analyse (siehe Publikation I) aus 15 verschiedenen Baumaterialien erfolgte unter Verwendung *Actinobacteria*-spezifischer Primer. Eine in diesem Zusammenhang durchgeführte Clusteranalyse auf Basis der generierten SSCP-Fingerprintmuster aus den einzelnen Proben zeigte, dass die in der vorliegenden Arbeit analysierten Baumaterialienproben nur geringe Ähnlichkeiten hinsichtlich der vorliegenden *Actinobacteria*-Population aufwiesen. Auch der Vergleich gleicher Materialtypen zeigte, dass sich die generierten Fingerprintmuster deutlich voneinander unterschieden. Die Clusteranalyse der Fingerprintmuster der Styroporproben zeigte eine Ähnlichkeit von 40%. Dies deutet auf das Vorkommen verschiedener

Actinobacteria in gleichen Materialtypen hin (siehe Publikation I). Die Unterschiede in der Zusammensetzung der *Actinobacteria*-Gemeinschaft in den untersuchten Baumaterialien wurden ebenfalls durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Klonierungsanalysen bestätigt. So zeigte der paarweise Vergleich der 16S rRNA Gen Klonbibliotheken durch die Berechnung von Ähnlichkeitskoeffizienten nach Bray-Curtis (Multi-Variate Statistical Package, 2009; siehe Abb. 4), dass die höchste Ähnlichkeit zwischen den Proben (12A und 12B) nur 76,5% betrug.

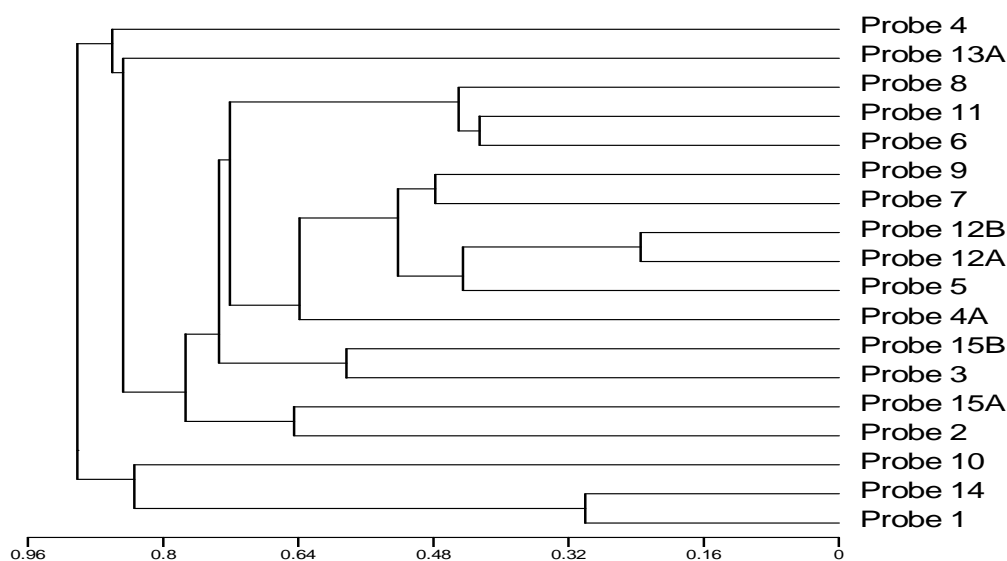


Abb. 4 Dendrogramm der Clusteranalyse der untersuchten Proben hinsichtlich der ermittelten Gattungen aus den Klonbibliotheken. Distanzen (Ähnlichkeitsindizes) wurden berechnet nach Bray Curtis, als Clustermethode wurde der UPGMA Algorithmus gewählt, Multi-Variate Statistical Package, 2009.

Insgesamt belegen die Ergebnisse, dass sich die untersuchten Proben hinsichtlich ihrer *Actinobacteria*-Zusammensetzung deutlich voneinander unterscheiden. Somit konnte ein selektiver Nachweis bestimmter *Actinobacteria* aufgrund bestimmter Materialtypen und/oder bestimmter Parameter innerhalb der vorliegenden Arbeit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Bereits frühere Untersuchungen von z.B. Kämpfer *et al.* (1999), Peltola (2001) und Lorenz *et al.* (2003) zeigten, dass nicht allein die Diversität, sondern auch bestimmte Bakterienarten in Baumaterialien mit Feuchteschäden unbekannt sind. Dementsprechend wurden Bakterien aus Baumaterialien isoliert und beschrieben, die bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte Bakterienarten darstellten. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls neun

Isolate als bislang unbeschriebene Bakterien identifiziert. Die detaillierte Analyse zur Charakterisierung dieser Bakterien führte zur Neubeschreibung von acht Spezies und einer neuen Gattung: *Pseudonocardia parietis* (Publikation III), *Citricoccus parietis* (Publikation IV), *Prauserella muralis* (Publikation V), *Kytococcus aerolatus* (Publikation VI), *Brevibacterium sandarkinum* (Publikation VII), *Microlunatus parietis* (Publikation VIII), *Jiangella muralis* (Publikation X), *Promicromonospora umidemergens* (Publikation XI) und *Murinocardiopsis* (*M. flavida*, Publikation IX).

Trotz des Vorkommens unbekannter oder vereinzelt vorliegender *Actinobacteria* wurde das in feuchteschädigten Baumaterialien vorherrschende Gattungsspektrum im Rahmen dieser Untersuchungen ermittelt. Am häufigsten detektierte Gattungen, die in ungefähr 60% der untersuchten Baumaterialien vorkamen, sind *Promicromonospora*, *Pseudonocardia*, *Jiangella*, *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Nocardiopsis* und *Streptomyces*. Vertreter der Gattungen *Streptomyces* und *Pseudonocardia* konnten in $\geq 90\%$ der untersuchten Baumaterialien ermittelt werden. Eine detailliertere Betrachtung der 16S rRNA Gensequenzen zeigte, dass z.B. die im Rahmen dieser Arbeit neu beschriebene Bakterienart *Pseudonocardia parietis* (Publikation III) in sieben verschiedenen Proben nachweisbar war. Diese häufig auftretenden Gattungen bzw. Bakterientypen könnten somit zukünftig, ähnlich wie z.B. *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum* oder *Penicillium chrysogenum* bei einer Besiedlung mit Pilzen (Fischer 2005), als Indikatoren für das Vorkommen von *Actinobacteria* in feuchteschädigten Baumaterialien dienen.

1.4 Freisetzung von *Actinobacteria*

Actinobacteria sind ubiquitär und zählen im Boden zur dominierenden Bakteriengruppe (McCarthy & Williams, 1992; Heuer *et al.*, 1997; Janssen 2006). Sie leben meist saprophytisch, d.h. sie ernähren sich von totem Material und kommen hauptsächlich dort vor, wo organisches Material abgebaut wird (McCarthy & Williams, 1992; Rintala *et al.* 2002). Die Produktion vieler extrazellulärer Enzyme (Cellulasen, Hemicellulasen, Chitinasen, Amylasen und Proteasen) ermöglicht ihnen, Makromoleküle wie Lignin, Cellulose, Pektin, Keratin, Chitin, Stärke und aromatische Verbindungen abzubauen (Ensign, 1992; Korn-Wendisch und Kutzner, 1992; Fritsche, 1998).

Die große Toleranz gegenüber hohen Salzkonzentrationen, breiten Temperatur- und pH-Wert-Schwankungen sowie die Nutzung unterschiedlichster Substrate ermöglichen die Besiedelung verschiedenster Habitats. So beschrieben Rintala *et al.* (2002), dass z.B. Spezies der Gattung *Streptomyces* auf totem Pflanzenmaterial, Müll, Wurzeln aber auch auf toten Pilzhyphen wachsen können. Damit scheint die Anpassungsfähigkeit der *Actinobacteria* an die verschiedensten Umweltbedingungen zu erklären, dass Peltola (2001) *Streptomyces* und *Nocardiopsis* Spezies detektiert hat, die in der Lage sind, sich in nährstoffarmen Baumaterialien mit wechselndem Feuchtigkeitsgrad zu vermehren. *Actinobacteria* können hierbei direkt aus dem Material stammende Nährstoffe, den organischen Staub auf dem Material und andere Mikroorganismen, wie Pilze, die dieses Material besiedeln, verwerten. Bei ausreichendem Substratangebot, Feuchtigkeit und Wärme (zum Teil durch die mikrobielle Aktivität erzeugt), kann es zu einem starken Wachstum der Actinobakterien und einer reichen Sporenbildung (Kutzner und Kempf, 1996) kommen. Die Fähigkeit vieler *Actinobacteria* Sporen zu bilden, die unter entsprechenden Bedingungen z.B. aus kontaminiertem Baumaterial in die Umgebung freigesetzt werden können, lässt vermuten, dass die Konzentration an *Actinobacteria*, im Vergleich zu natürlich vorkommenden Konzentrationen in der Innenraumluft, ansteigt. In diesem Zusammenhang stehende Untersuchungen von Material und korrespondierenden Bioaerosolproben liefern erste Hinweise darauf, dass bestimmte *Actinobacteria* tatsächlich vom Material in die umgebende Luft abgegeben werden können. Diese Hypothese wird vor allem darin begründet, dass es sich bei den meisten detektierten Gattungen um solche handelt, die in der Lage sind ein Luftmycel mit Sporen auszubilden (Wink, 2002). Diese Vermutung kann jedoch nicht abschließend beantwortet werden, da die in der Luft vorhandenen *Actinobacteria* natürlich auch das Inokulum für das feuchtegeschädigte Baumaterial dargestellt haben könnten. So ist es beispielsweise „normal“, dass eine gewisse Anzahl an *Actinobacteria* auch in der Luft unbelasteter Räume, d.h. ohne Feuchteschaden bzw. sichtbaren Schimmelpilzbefall vorkommt. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Konzentrationen an luftgetragenen Bakterien sind mit Werten zwischen 5 und 9×10^2 KBE m^{-3} Luft nicht höher als die Konzentrationen, die von Grigorevski-Lima *et al.* (2006) in Räumen ohne Feuchteschaden bzw. sichtbaren Schimmelpilzbefall ermittelt wurden. Weiterhin ist das Gattungsspektrum der *Actinobacteria* in der Luft von Räumen ohne offensichtliche Belastung zum Teil mit dem in den untersuchten Baumaterialien

vergleichbar. So wurden beispielsweise in Untersuchungen von Martin *et al.* (2009) Vertreter aus insgesamt 15 verschiedenen Gattungen der Klasse *Actinobacteria* in Bioaerosolen aus „unbelasteten“ Innenräumen nachgewiesen (siehe Tab. 1). Nur drei der 15 Gattungen (*Curtobacterium*, *Dietzia* und *Janibacter*) konnten nicht in den untersuchten Baumaterialien der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Die Gattung *Janibacter* konnte aber innerhalb der hier untersuchten Bioaerosolproben detektiert werden. Die Gattung *Dietzia* wurde von Andersson *et al.* (1999) in Bioaerosolen aus feuchtegeschädigten Innenräumen nachgewiesen. Insgesamt kann somit auch vermutet werden, dass das ubiquitäre Vorkommen von *Actinobacteria* für einen Eintrag von *Actinobacteria* z.B. aus dem Boden über Schuhe und Kleidung in den Innenraum verantwortlich ist.

1.5 Beeinträchtigung der Gesundheit durch *Actinobacteria* im Innenraum mit Feuchteschaden

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können in Bezug auf eine gesundheitliche Beeinträchtigung der Bewohner aufgrund von *Actinobacteria* in Baumaterialien grundsätzlich keine Antwort liefern. Allerdings geben die ermittelten Daten Hinweise zum Vorkommen verschiedener Vertreter der Klasse *Actinobacteria* in Baumaterialien, die im Zusammenhang mit negativen gesundheitlichen Wirkungen beschrieben sind.

Eine Identifizierung der gewonnenen Isolate bzw. eine Zuordnung der 16S rRNA Gen Klonsequenzen erfolgte zunächst basierend auf dem Vergleich der 16S rRNA Gensequenzen. Anschließend wurde überprüft, ob für die identifizierten Bakterien eine Infektiösität oder ein mögliches toxisches oder allergenes Potential bekannt ist. Für das Screening der Bakterien nach ihrer möglichen Infektiösität wurden die Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 466) und deren Einteilung der Bakterien in Risikogruppen (RG 1-4) herangezogen (siehe BioStoffV, www.baua.de). Hierbei wurden alle identifizierten Bakterien (einschließlich der Klonsequenzen), die laut TRBA in der RG 2 oder höher eingestuft sind (können beim Menschen Infektionen hervorrufen), ermittelt. Die hier erzielten Ergebnisse zeigten, dass die 16S rRNA Gensequenzen von acht isolierten Bakterienspezies und einer Klonsequenz hohe Ähnlichkeiten (>98,4%) zu Bakterienarten hatten, die laut TRBA 466 in die RG 2 eingestuft sind. Bei den hier

ermittelten Bakterien handelt es sich um Vertreter der Gattungen *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* und *Nocardiopsis*. Detailliertere Zuordnungen der 16S rRNA Gensequenzen zeigten, dass die Isolate die höchste Ähnlichkeit zu zwei Subspezies von *Nocardiopsis dassonvillei* (n=4), *Mycobacterium flavescens*, *M. wolinskyi*, *M. septicum* und *Corynebacterium amycolatum* besaßen. Eine 16S rRNA Gen-Klonsequenz wurde mit 99,5%iger Ähnlichkeit der Art *Propionibacterium granulosum* (RG 2) zugeordnet. All diese Bakterien sind in der Lage, beim Menschen (Wund-) Infektionserkrankungen der Haut, der Knochen oder im Lungengewebe auszulösen. Diese Bakterienspezies wurden aus Proben (teilweise immunsupprimierter) Patienten mit Alveolitis, Lungenentzündung, Osteomyelitis, Endocarditis, Sepsis oder chronischer Fibrose erstmalig isoliert (Branger *et al.*, 1987; Brown-Elliott & Wallace, 2002; Mastroianni, 2003; Katoch, 2004; Lejbkowitz *et al.*, 2005; Dalal *et al.*, 2008).

Das Auftreten negativer gesundheitlicher Effekte aufgrund toxischer Eigenschaften wird schon länger im Zusammenhang mit *Actinobacteria*, die aus Innenräumen isoliert wurden, diskutiert (Colston, 1996; Embil *et al.*, 1997; Hirvonen *et al.*, 1997, 2005; Peltola *et al.*, 2001b; Huttunen *et al.*, 2001, 2003; Jussila *et al.*, 2001, 2002; Mehrer *et al.*, 2003; Beckett *et al.*, 2005). So zeigten finnische Studien, dass z.B. *Streptomyces griseus* Valinomycin, ein Mitochondrientoxin produziert (ein Kalium-Ionophor, verantwortlich für den spezifischen Transport von Kalium durch die Membran) und verschiedene *Nocardiopsis* sp. in der Lage sind, Mitochondrien- oder Membrantoxine (Zerstörung der Barrierefunktion der Zellmembran) zu bilden (Andersson *et al.*, 1999b; Peltola, 2001b). Daher wurden alle hier nachgewiesenen/identifizierten Bakterien mit denen aus der Literatur bekannten, innenraumrelevanten und toxigenen Bakterien verglichen. Hierbei konnten Arten wie *Nocardiopsis exhalans*, *Nocardiopsis dassonvillei* und *Mycobacterium* sp. ermittelt werden. Die Spezies *Nocardiopsis dassonvillei* besitzt neben dem infektiösen Potential (s.o.) die Fähigkeit, das Nervengift Tetrodotoxin, bekannt vom Kugelfisch, zu produzieren (Wu *et al.*, 2005). Die zytotoxische Wirkung auf Eberspermazellen von *Nocardiopsis exhalans*, isoliert aus Staub von einem feuchtegeschädigten Innenraum, wurde von Peltola *et al.* (2001) gezeigt. Zusätzlich belegten Mehrer *et al.* (2003) zytotoxische Effekte von verschiedenen *Nocardiopsis* sp. auf Schweinenierenzellen. Basierend auf dem 16S rRNA Gensequenzvergleich waren die gewonnenen *Mycobacterium* Isolate am ähnlichsten zu *Mycobacterium flavescens*, *M. wolinskyi*, *M. moriokaense* (n=2), *M. tusciae*, *M. septicum*

und *M. alvei*. Mycobakterien sind einerseits grundsätzlich in der Lage immunologische Reaktionen hervorzurufen aufgrund der Produktion von LAM (Lipoarabinomannan, einem Stimulator des Immunsystems bzw. der TNF- α -Produktion) (Colston, 1996), andererseits zeigten verschiedene Studien, dass bestimmte *Mycobacterium* Spezies negative gesundheitliche Effekte, wie Infektionen, eine gesteigerte Immunantwort, Zytokin-, NO- und IL6- Produktion (Huttunen *et al.*, 2001; Jussila *et al.*, 2002) sowie eine Hypersensitivitätspneumonitis (Embil *et al.*, 1997; Beckett *et al.*, 2005) auslösen können. Ob allerdings von den in der vorliegenden Arbeit isolierten Arten eine Gesundheitsgefährdung ausgehen kann, ist bislang nicht geklärt.

Actinobacteria Arten, die im Zusammenhang stehen, beim Menschen Allergien auszulösen, wie *Saccharopolyspora rectivirgula* oder *Mycobacterium immunogenum*, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert.

1.6 Methoden zum Nachweis von *Actinobacteria*

Der Vergleich der detektierten Gattungen in Abhängigkeit von der angewandten Analyseverfahren (kultivierungsabhängig vs. kultivierungsunabhängig) zeigte deutliche Unterschiede bei der Nachweisbarkeit der *Actinobacteria* in den untersuchten Baumaterialien. Insgesamt wurden mit diesen beiden Analyseverfahren, summiert über alle Proben, 58 unterschiedliche Gattungen innerhalb der *Actinobacteria* erfasst. Die Schnittmenge hinsichtlich der Detektion auf Gattungsniveau betrug dabei 38% (22 Gattungen). Während unter alleiniger Verwendung der kultivierungsunabhängigen Methoden 26 *Actinobacteria*-Gattungen (~45%) detektierbar waren, wurden 17% der insgesamt nachgewiesenen Gattungen (zehn) ausschließlich mittels kultivierungsabhängiger Methoden detektiert. Um die Detektion von *Actinobacteria* auf Gattungsebene mit beiden hier angewandten Methoden in den jeweils einzelnen Proben gegenüber zu stellen, wurde der „simple matching coefficient“ nach Jaccard (Sj) berechnet (Publikation I). Die Ergebnisse der Berechnung des Ähnlichkeitskoeffizienten zeigen eine Übereinstimmung der Nachweisbarkeit der *Actinobacteria*-Gattungen beider Methoden im Mittel von 36,2%. Die höchste Kongruenz konnte in einer Putzprobe (P5) mit 83% (Sj = 0,83) detektiert werden. Hingegen konnte bei der untersuchten Lehmputzprobe (L1) keine Übereinstimmung, d.h. keine Gattung mit beiden Methoden nachgewiesen werden (Sj = 0).

Die insgesamt mittels Jaccard-Koeffizient ermittelten Übereinstimmungen der Detektion von *Actinobacteria* auf Gattungsebene der einzelnen Proben sind in Tab. 2 aufgeführt. Dieser deutliche Unterschied zeigt grundsätzlich, dass der Nachweis von *Actinobacteria* in Baumaterialien entscheidend von der gewählten Methode beeinflusst wird.

Tab. 2 Darstellung der ermittelten „simple matching coefficients“ der beiden Untersuchungsmethoden (nach Jaccard) der analysierten Proben

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7A	P7B	P8	S1	S2	M1	M2	M3	W1	L1
Jaccard Koeffizient (Sj)	0,1	0,4	0,5	0,2	0,8	0,2	0,5	0,4	0,1	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0
Übereinstimmung (%)	12	44	55	18	83	21	50	42	13	36	33	12	8,3	13	11	0

Um im Detail zu prüfen, inwieweit die jeweils ermittelten *Actinobacteria*-Gattungen mit beiden Methoden in derselben Probe nachweisbar waren, wurden zunächst alle mit beiden Methoden möglichen Gattungszuordnungen bzw. Gattungstreffer (n=232, siehe Publikation II), aus allen untersuchten Proben ermittelt. Anschließend wurden die nur mittels kultivierungsabhängiger Analysen detektierten Gattungszuordnungen, die nur mit kultivierungsunabhängigen Analysen detektierbaren Gattungszuordnungen und die mit beiden Methoden erfassten „Gattungstreffer“ analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass von der gesamten Anzahl der Gattungszuordnungen (n=232) der untersuchten Proben 31,5% (n = 73) nur über Kultivierung und 45,7% (n = 106) nur anhand der Klonierungsanalysen erfasst wurden. Insgesamt konnte nur in 55 Fällen (23,7%) eine Übereinstimmung der Gattungen mit beiden Methoden innerhalb einer Probe nachgewiesen werden (siehe Publikation II). Die Ergebnisse zur Nachweisbarkeit der verschiedenen Gattungen weisen deutlich darauf hin, dass der Nachweis der *Actinobacteria* in Baumaterialien nicht allein abhängig von der gewählten Methode ist, sondern auch abhängig von der untersuchten Probe zu sein scheint. Das bedeutet, dass die Gattungen, die zwar grundsätzlich mit beiden Methoden nachweisbar wären, nicht zwingend in einer Probe mit beiden Methoden nachgewiesen werden.

Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte im Detektionslimit der jeweiligen Methode liegen. So zeigten auch Rintala *et al.* (2004), dass nur eine geringe Korrelation zwischen kultivierungsabhängigen und kultivierungsunabhängigen Methoden besteht. Die in ihren Analysen ermittelten bzw. kalkulierten Detektionslimits lagen kultivierungsabhängig bei 450 KBE (Sporen) g⁻¹ Baumaterial und kultivierungsunabhängig (qPCR) bei 30 Sporen.

Das zeigt, dass zwar PCR basierte, molekulare Methoden sensitiver sind als kultivierungsabhängige Methoden (Rintala *et al.*, 2004), allerdings Vergleiche der beiden Verfahren nur begrenzt möglich sind.

Die Detektierbarkeit von Mikroorganismen unter alleiniger Verwendung kultivierungsabhängiger Methoden wird aufgrund verschiedener Faktoren der Lebensfähigkeit und Kultivierbarkeit der Mikroorganismen beeinflusst wie, i) der sogenannten Plattenanomalie (great plate count anomaly), gezeigt anhand von Zellzahlbestimmung (Zinder & Salyers 2001) oder ii) dem *viable but not culturable* - Status (VBNC), bei dem die metabolische Aktivität der Mikroorganismen auf ein Minimum eingestellt ist, so dass sie die Fähigkeit zur Vermehrung und somit zur Kultivierbarkeit verlieren (Staley & Konopka, 1985; Heidelberg *et al.*, 1997; Oliver, 2005). Auch *Actinobacteria* in Baumaterialien könnten in dieses Stadium z.B. bei Absenkung des verfügbaren Wassergehalts (a_w -Wert) fallen. Besonders bei älteren Feuchteschäden mit geringen Wassergehalten könnte zwar die Lebensfähigkeit aufrechterhalten bleiben, eventuell aber nicht die Kultivierbarkeit.

Gleichzeitig ist nicht auszuschließen, dass der kultivierungsabhängige Ansatz bei bestimmten Bakterien bzw. bei Verwendung bestimmter Nährmedien oder Kultivierungsbedingungen für einige Bakterien sensitiver ist. So belegten Autoren, bezogen auf Untersuchungen im Innenraum, dass die Kultivierbarkeit der Mikroorganismen z.B. zwischen 0,03 - 100%, in Abhängigkeit der Sammelmethode und der mikrobiellen Spezies, variierte (Rintala, 2008; Toivola, 2002). Um einen möglichen Einfluss von Nähragar und Inkubationstemperatur auf die Kultivierbarkeit von Bakterien aus Baumaterialien zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Studie SSCP-Fingerprintanalysen (Publikation I) aus abgeschwemmten Kolonieplatten durchgeführt. Die Ergebnisse der Analysen, der aus den kultivierten *Actinobacteria*-Spezies (Abb. 4) unter Verwendung *Actinobacteria* spezifischer Primer generierten Bandenmuster, zeigte sowohl in Abhängigkeit der verwendeten Medien als auch in Abhängigkeit der Verdünnungsstufen deutliche Unterschiede in den Fingerprintmustern. Diese Ergebnisse belegen, dass die Anzahl an kultivierbaren und somit detektierbaren *Actinobacteria* bei paralleler Verwendung verschiedener Nährmedien und unter Einsatz unterschiedlicher Verdünnungsstufen ansteigt.

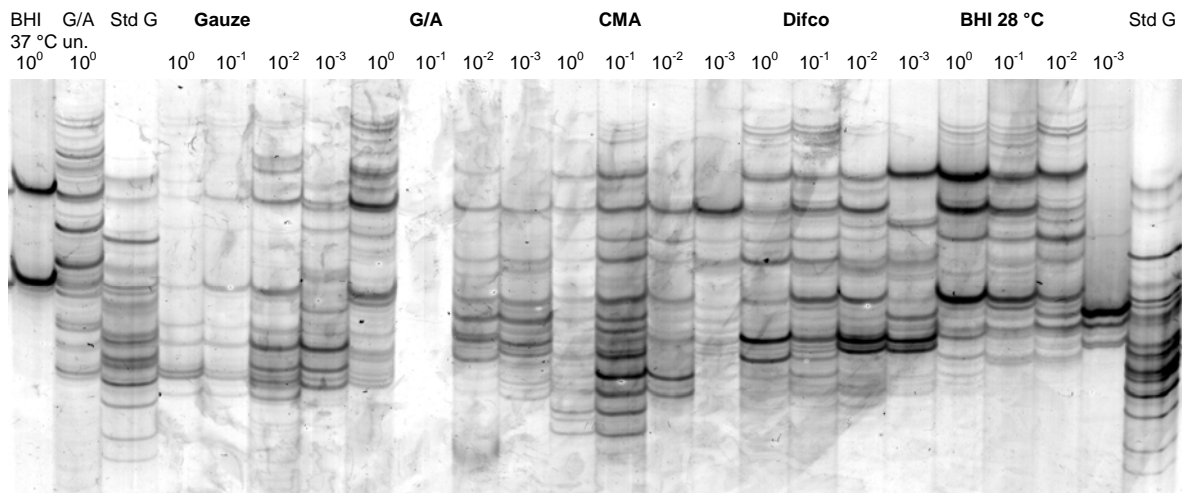


Abb. 5 Single Strand Conformation Polymorphism-Polyacrylamid-Gelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der aus den abgeschwemmten Nährmedienplatten generierten SSCP-PCR-Produkte. Die PCR wurde unter Verwendung spezifischer Actinomyceten-Primer durchgeführt. Aufgetragen wurden die amplifizierten DNA-Fragmente von Reinkulturen im Gemisch (Std G), SSCP-PCR-Produkte (650 ng), die auf unterschiedlichen Nährmedien gewachsenen Kulturgemische (CMA, Difco, BHI, Gauze und G/A) und unterschiedliche Verdünnungsstufen (10^0 - 10^{-3}). Ein Bandenmuster beruht jeweils auf den PCR-Produkten, deren molekularer Aufarbeitung und anschließender SSCP-Analyse (Publikation I).

Im Vergleich zu den kultivierungsabhängigen Analysen haben bei Anwendung direkter molekularbiologischer Methoden die DNA-Extraktionseffizienzen einen wesentlichen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Mikroorganismen (Taylor *et al.*, 2002; Wintzingerode *et al.*, 1997; Fallschissel *et al.*, 2009). Die DNA-Extraktion aus Umweltproben, als Grundlage der direkten molekularbiologischen Methoden, erfolgte in der hier vorliegenden Arbeit mit einem Extraktionskit. Das hier gewählte, mit einem mechanischen Zellaufschluss beginnende Extraktionsverfahren sollte die Ausbeute an gewünschter DNA Gram-positiver Bakterien erhöhen. So zeigten Wintzingerode *et al.* (1997), dass ein mechanischer Aufschluss mit einer Kugelmühle mit dem Verlust des Nachweises von Gram-negativen Bakterien einhergeht, jedoch die Effizienz der DNA-Extraktion bei Gram-positiven Bakterien erhöht. Auch bestätigten Mummy und Findlay (2004) den Verlust an bakterieller DNA bei der Extraktion. Allerdings zeigten ihre Untersuchungen, dass im Vergleich von drei verschiedenen Extraktionskits das auch in dieser Studie angewandte Kit (FAST DNA[®] SPIN Kit for Soil, MP Biomaterials) die beste Effizienz lieferte. Die von Mummy und Findlay (2004) ermittelten Effizienzen bei Verwendung dieses Kits lagen bei 15,5 - 43,3% (im Mittel $28,3 \pm 10,5\%$), was trotz der

besten Effizienz einen Verlust an bakterieller DNA widerspiegelt. Dieser Verlust führt mit allergrößter Wahrscheinlichkeit zu einem Verlust der Nachweisbarkeit der Bakterien anhand direkter molekularbiologischer Methoden (auch aus Baumaterialproben).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit steigerte sich die detektierbare Vielfalt von *Actinobacteria* in Baumaterialien (auf Gattungsebene) deutlich unter Verwendung der direkten molekularbiologischen Methoden. Es konnte gezeigt werden, dass selbst die Anwendung verschiedener Nährmedien und Kultivierungsbedingungen zur Unterschätzung der tatsächlich in den Proben vorkommenden Artenvielfalt führen kann.

Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass der direkte Einsatz spezifischer Primer für einen gezielten Nachweis von *Actinobacteria* den Anteil detektierbarer *Actinobacteria* noch weiter erhöht. Der Vergleich zweier Klonbibliotheken zeigte, dass das neu etablierte Primersystem im direkten Einsatz (ohne Voramplifikation der nahezu vollständigen 16S rRNA Genfragmente unter Einsatz universeller Primer) geeignet ist, das Spektrum vorhandener *Actinobacteria* in Baumaterialien abzubilden. Hierzu wurde eine Klonbibliothek aus einer Baumaterialienprobe unter Verwendung des neu entwickelten Primersystems (Com2xf/Ac1186r) generiert. Von dieser Baumaterialprobe wurde ebenfalls eine Klonbibliothek unter Einsatz universeller 16S rRNA Gen-Primer (27f/1492r, Lane, 1991; Weisburg *et al.*, 1991) erzeugt und diese auf das Vorkommen von *Actinobacteria* anhand der zuvor beschriebenen Screeningmethode untersucht. Der Vergleich dieser beiden Klonbibliotheken zeigte deutlich, dass unter direkter Verwendung des neu entwickelten Primersystems eine erhöhte Nachweisbarkeit von *Actinobacteria* zu verzeichnen war. Im Vergleich zu der gescreenten, mit universellen Primern erzeugten Klonbibliothek konnten zehn weitere Gattungen aus der Klasse der *Actinobacteria* unter direktem Einsatz des neuen Primersystems nachgewiesen werden. Diese Untersuchung zeigte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Primersystemen hinsichtlich ihrer Nachweisbarkeit von *Actinobacteria*. Insgesamt wurden bei Anwendung der Screening-Methode sieben *Actinobacteria* Gattungen in der untersuchten Probe detektiert, bei der Klonbibliothek, generiert unter Verwendung des neuen Primersystems, 19 Gattungen. Die Übereinstimmung beider Methoden auf Gattungsebene betrug nur 13% (drei Gattungen).

Eine Erklärung dafür könnten Untersuchungen von Farris und Olson (2007) liefern, die gezeigt haben, dass es einen „Bias“ bei der Detektion von *Actinobacteria* unter Verwendung der universellen (27f und 1492r Primer) Primer gibt. Sie detektierten, dass,

trotz 100%iger Übereinstimmung der Primersequenzen mit den Sequenzen der untersuchten Reinkulturen, einige *Actinobacteria* nicht nachweisbar waren. Auch werden unter Anwendung des universellen Primersystems „Nicht-*Actinobacteria*“, die ebenfalls in den untersuchten Proben vorliegen können, amplifiziert und somit nachgewiesen.

Zunächst zeigt die wiederholte Prüfung der Spezifität des hier etablierten Primersystems (einschließlich des theoretischen Re-Alignments, siehe Publikation I) sowie die Reichweite der Detektierbarkeit der „phylogenetisch diversen *Actinobacteria*“, dass dieses Primersystem prinzipiell für Analysen von *Actinobacteria*-Gemeinschaften geeignet ist. Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass der Einsatz spezifischer molekularer Nachweissysteme den Nachweis von *Actinobacterien* in Baumaterialien deutlich verbessert.

1.7 Speziesspezifische Quantifizierung mittels quantitativer

Real-time PCR

Das Detailwissen zum Vorkommen abundanter und gesundheitlich bedeutsamer *Actinobacteria* in feuchtegeschädigten Baumaterialien ermöglicht zukünftig einen gezielten Nachweis spezifischer *Actinobacteria*. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine speziesspezifische Quantifizierung mittels *Real-time* PCR z.B. auch für schwerer detektierbare *Actinobacteria*, wie *Saccharopolyspora rectivirgula*, geeignet ist. Die besondere Bedeutung dieses Bakteriums beruht auf dem allergieauslösenden Potential. *S. rectivirgula* wurde schon in den Jahren 1963-64 (Pepys, 1963; Corbaz, 1963; Lacey & Lacey, 1964) als ein Auslöser der sogenannten „Farmerlunge“, einer exogen allergischen Alveolitis beschrieben. Das Vorkommen von *S. rectivirgula* in Innenräumen wurde in einem Ballungs-Wohngebiet in Oberschlesien nachgewiesen (Górny & Dutkiewicz, 2002). Damalige Untersuchungsmethoden, aber auch gegenwärtige Analysen von *S. rectivirgula* basieren auf kultivierungsabhängigen Verfahren. Bei Anwendung dieser Methoden stellt jedoch die Identifizierung dieser Mikroorganismen, speziell aus Umweltproben, ein Problem dar. Der spezifische Nachweis von *S. rectivirgula* ist oft nur begrenzt möglich, da eine genaue Zuordnung zu *S. rectivirgula* bzw. eine präzise Abgrenzung von anderen thermophilen Actinomyceten schwierig ist. Somit wird meist nur eine Gesamtkonzentration an thermophilen

Actinomyceten angegeben (Pepys, 1963; Gregory *et al.*, 1963 a, b, c; Lacey, 1990). Besonders hinsichtlich der Koloniemorphologie, der möglichen Variabilität bei Untersuchungen von biochemischen Reaktionen, der Proteinzusammensetzung, einschließlich der Varietät, die durch das Alter der Kultur bestimmt wird, werden diese Probleme deutlich (Duchaine *et al.*, 1999). Auch bleiben tote Zellen (nonviable) aber auch lebensfähige, die nicht (mehr) kultivierbar bzw. vermehrungsfähig (viable but not culturable) sind, sowie Zellfragmente, die ebenfalls Allergien auslösen können, unentdeckt.



Abb. 6 Darstellung von *Saccharopolyspora rectivirgula* Kolonien auf M65 Agar (DSMZ).

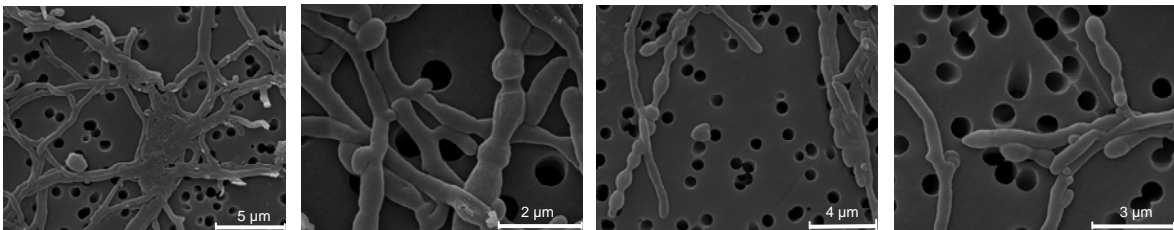


Abb. 7 Darstellung rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen von *Saccharopolyspora rectivirgula* auf Polycarbonatfiltern (0,8μm Porengröße) bei 6000-50000 facher Vergrößerung.

Von verschiedenen Autoren wurden wiederholt PCR basierte Methoden gegenüber traditionellen kultivierungsabhängigen Verfahren als sensitiver, spezifischer und schneller beschrieben (Rintala *et al.*, 2004; Pietarinen *et al.*, 2008). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die quantitative *Real-time* PCR gewählt, um ein spezifisches Detektionsverfahren zur Quantifizierung der *Actinobacteria* Spezies *Saccharopolyspora rectivirgula* zu etablieren.

Die Interpretation bzw. Auswertung von Ergebnissen, die mit der beschriebenen Methode erzielt werden, müssen jedoch immer unter Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren erfolgen. Die eigentlichen Zellzahlen der untersuchten Bakterienspezies können unterschätzt werden aufgrund von Fehlerquellen bei der Zellyse, der DNA- Extraktion und

Aufreinigung sowie der PCR-Amplifikation, bedingt durch Primerauswahl und PCR-Bedingungen (Picard *et al.*, 1992; Reysenbach *et al.*, 1992; Rainey *et al.*, 1994; Farrelly *et al.*, 1995; Schneegurt *et al.*, 2003; Fallschissel *et al.*, 2009). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Einflüsse bzw. festgestellten Verluste bei der DNA Extraktion, die Beeinflussung durch „Nicht-Ziel-DNA“ sowie der Wiederfindung von *S. rectivirgula* in mit *S. rectivirgula* versetzten Proben (siehe Publikation XII) zeigen deutlich, dass die in Umweltproben vorliegenden Zellzahlen vermutlich um das 2-10fache unterschätzt werden. Insgesamt zeigte der Einsatz des Primersystems zum quantitativen Nachweis von *S. rectivirgula* in Umweltproben deutlich höhere Konzentrationen von *S. rectivirgula* im Vergleich zu den bisher angewandten traditionellen kultivierungsabhängigen Methoden (siehe Publikation XII). Für die Quantifizierung von Zellen in Umweltproben durch eine *Real-time* PCR ist weiterhin die Heterogenität und Anzahl der im Genom vorhandenen „Zielgene“ zu berücksichtigen. Trotz des Vorkommens mehrerer Operons sowie des Vorhandenseins intragenomischer Heterogenitäten bei *S. rectivirgula* wurde in dieser Studie das 16S rRNA Gen zum quantitativen Nachweis von *S. rectivirgula* gewählt. Dieses Gen wurde insbesondere aufgrund der Kontrollmöglichkeiten der Spezifität des etablierten Systems ausgewählt. Da das 16S rRNA Gen bei allen Bakterien vorhanden ist und die Datenbanken der 16S rRNA Gensequenzen die größtmögliche Datengrundlage liefern, ist ein Abgleich der unter Einsatz des etablierten Systems amplifizierten DNA-Fragmente mit denen in den Datenbanken möglich.

Der Nachweis der Spezifität des Systems sowie die Möglichkeit, Umweltproben zu analysieren, zeigen, dass die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methodik der *Real-time* PCR für einen schnellen und spezifischen Nachweis gesundheitlich bedeutsamer *Actinobacteria* geeignet ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Primersystem entwickelt und etabliert, welches geeignet ist *S. rectivirgula*, bekannt als einer der Auslöser der exogen allergische Alveolitis (Sennekamp, 2004), quantitativ nachzuweisen.

2. MATERIAL & METHODEN

Alle verwendeten Baumaterial- und Bioaerosolproben sowie die verwendeten und analysierten Bakterienreinkulturen sind in den Publikation I-XII beschrieben.

Alle verwendeten Methoden innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden in den gelisteten Publikationen beschrieben.

Ansatz	beschrieben in Publikation
Isolierung von Bakterien und Bestimmung der KBE	
Sammlung und Aufbereitung von Bioaerosol- und Materialproben	Publikation I, II,
Kultivierung der Bakterien	Publikation I-XII
Identifizierung von Bakterien	
16S rRNA Gensequenzierung	Publikation I-XII
Fettsäurezusammensetzung	Publikation III-XI
Bestimmung der benötigten Kohlenstoffquelle, Verwertungspanels	Publikation III-XI
Bestimmung der Quinone	Publikation III-XI
Zellwandzusammensetzung	Publikation III-XI
Bestimmung der polaren Lipide und Mycolsäure	Publikation III-XI
DNA-DNA-Hybridisierung	Publikation III, IV, VI, VII, X,XI
DNA-Extraktion	
DNA-Extraktion aus Reinkulturen	Publikation I-XII
DNA-Extraktion aus Umweltproben	Publikation I, II,XII
PCR	
Primerdesign	Publikation I, XII
PCR bei Reinkulturen	Publikation I-XII
PCR bei Umweltproben	Publikation I, II,XII
Qualitative <i>Real-time</i> PCR	Publikation XII
Klonierung	
Klonierung	Publikation I, II,XII
Screening von Klonbibliotheken	Publikation II,
Sequenzierung und phylogenetische Auswertung	Publikation I-XII
PCR-SSCP Analyse	
SSCP Fingerprint	Publikation I
Clusteranalyse	Publikation I

3. PUBLIKATIONEN

3.1 Untersuchungen zur Diversität von *Actinobacteria* in Innenräumen (Publikation I-II)

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

I.

**Development of a new PCR primer system for selective amplification of
*Actinobacteria***

von: Jenny Schäfer, Udo Jäckel, Peter Kämpfer, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

FEMS Microbiology Letters, 311:103-112

<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02069.x>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Jenny Schäfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Erarbeitung, Analyse,
Interpretation der Daten, Formulierung des Manuskripts

Udo Jäckel: Anleitung zu einigen Experimenten, Unterstützung bei der
Interpretation der Daten, Formulierung des Manuskripts

Peter Kämpfer: Projektleiter, Endkorrektur des Manuskripts

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der
Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

II.

Analysis of *Actinobacteria* from mould-colonized water damaged building material

von: Jenny Schäfer, Udo Jäckel, Peter Kämpfer, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Systematic and Applied Microbiology, 33: 260-268

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202010000731>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Jenny Schäfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Erarbeitung, Analyse,
Interpretation der Daten, Formulierung des Manuskripts

Udo Jäckel: Anleitung zu einigen Experimenten, Unterstützung bei der
Interpretation der Daten, Formulierung des Manuskripts

Peter Kämpfer: Projektleiter, Endkorrektur des Manuskripts

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der
Veröffentlichung gegeben.

3.2 Identifizierung und taxonomische Einordnung unbekannter Isolate aus Innenräumen (Publikation III-XI)

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

III.

Pseudonocardia parietis sp. nov., from the indoor environment

von: J. Schäfer, H.-J. Busse und P. Kämpfer, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2449 - 2452.

<http://ijsb.sgmjournals.org/content/59/10/2449>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Jenny Schäfer: Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten, Teilformulierung des Manuskripts

Hans-Jürgen Busse: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der erhaltenen Ergebnisse

Peter Kämpfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Interpretation der Daten, Teilformulierung des Manuskripts

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

IV.

Citricoccus parietis sp. nov., from the indoor environment

von: J. Schäfer, K. Martin und P. Kämpfer, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 271-274

<http://ijs.sgmjournals.org/content/60/2/271>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Jenny Schäfer: Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten,
Teilformulierung des Manuskripts

Karin Martin: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der
erhaltenen Ergebnisse

Peter Kämpfer: Konzeption der Studien oder Experimente,
Interpretation der Daten, Teilformulierung des Manuskripts

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der
Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

V.

***Prauserella muralis* sp. nov., from the indoor environment**

von: J. Schäfer, K. Martin und P. Kämpfer, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 287-290

<http://ijs.sgmjournals.org/content/60/2/287>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Jenny Schäfer: Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten,
Teilformulierung des Manuskripts

Karin Martin: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der
erhaltenen Ergebnisse

Peter Kämpfer: Konzeption der Studien oder Experimente,
Interpretation der Daten, Teilformulierung des Manuskripts

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der
Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

VI.

***Kytococcus aerolatus* sp. nov., isolated from indoor air in a room colonized with moulds**

von: P. Kämpfer, K. Martin, J. Schäfer, P. Schumann, 2009

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

System. Appl. Microbiol. 32 301–305

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202009000654>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Peter Kämpfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Interpretation der Daten,
Formulierung des Manuskripts

Karin Martin: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der
erhaltenen Ergebnisse

Jenny Schäfer: Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten

Peter Schumann: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der
erhaltenen Ergebnisse

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der
Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

VII.

***Brevibacterium sandarkinum* sp. nov., isolated from a wall of an indoor environment**

von: P. Kämpfer, J. Schäfer, N. Lodders, H.-J. Busse, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 909-913

<http://ijsb.sgmjournals.org/content/60/4/909.full>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

- Peter Kämpfer:** Konzeption der Studien oder Experimente, Interpretation der Daten, Formulierung des Manuskripts
- Jenny Schäfer:** Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten, Teilformulierung des Manuskriptes
- Nicole Lodders:** Zulieferung der phylogenetischen Analyse anhand der Maximum Likelihood Methode
- Hans-Jürgen Busse:** Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der erhaltenen Ergebniss

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

VIII.

Microlunatus parietis sp. nov., isolated from an indoor wall

von: P. Kämpfer, J. Schäfer, N. Lodders, K. Martin, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Int. J. Syst. Evol. Microbiol 60: 2420 - 2423.

<http://ijs.sgmjournals.org/content/60/10/2420.full>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Peter Kämpfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Interpretation der Daten,
Formulierung des Manuskripts

Jenny Schäfer: Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten

Nicole Lodders: Zulieferung der phylogenetischen Analyse anhand der Maximum
Likelihood Methode

Karin Martin: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der
erhaltenen Ergebniss

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der
Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

IX.

***Murinocardiosis flavida* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete isolated from indoor walls**

von: P. Kämpfer, J. Schäfer, N. Lodders, K. Martin, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 1729 - 1734.

<http://ijs.sgmjournals.org/content/60/8/1729.full>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Peter Kämpfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Interpretation der Daten,
Formulierung des Manuskripts

Jenny Schäfer: Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten,
Teilformulierung des Manuskriptes

Nicole Lodders: Zulieferung der phylogenetischen Analyse anhand der Maximum
Likelihood Methode

Karin Martin: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der
erhaltenen Ergebniss

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der
Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

X.

***Jiangella muralis* sp. nov., from the indoor environment**

von: P. Kämpfer, J. Schäfer, N. Lodders, K. Martin, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 128 - 131.

<http://ijsb.sgmjournals.org/content/61/1/128.full>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Peter Kämpfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Interpretation der Daten,
Formulierung des Manuskripts

Jenny Schäfer: Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten,

Nicole Lodders: Zulieferung der phylogenetischen Analyse anhand der Maximum
Likelihood Methode

Karin Martin: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der
erhaltenen Ergebnisse

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der
Veröffentlichung gegeben.

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

XI.

***Promicromonospora umidemergens* sp. nov., isolated from moisture from indoor wall
material**

von: K. Martin, J. Schäfer, P. Kämpfer, 2010

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 537-541

<http://ijsb.sgmjournals.org/content/60/3/537.full>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Karin Martin: Zulieferung der Chemotaxonomischen Daten und Diskussion der erhaltenen Ergebnisse

Jenny Schäfer: Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten

Peter Kämpfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Erarbeitung, Analyse Interpretation der Daten, Formulierung des Manuskripts

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der Veröffentlichung gegeben.

**3.3 Entwicklung eines 16S rRNA Gen basierten Primersystems
zum Nachweis von *Saccharopolyspora rectivirgula*
(Publikation XII)**

Angaben zum Beitrag der einzelnen Autoren zu folgender Publikation:

XII.

Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by quantitative *Real-time* PCR

von: J. Schäfer, P. Kämpfer und U. Jäckel, 2011

Die Publikation wurde veröffentlicht in:

Ann. Occup. Hyg. 55: 612-619

<http://annhyg.oxfordjournals.org/content/55/6/612>

Der Beitrag der gelisteten Autoren ist wie folgt verteilt:

Jenny Schäfer: Konzeption der Studien oder Experimente, Durchführung der Experimente, Analyse und Interpretation der Daten, Formulierung des Manuskripts

Peter Kämpfer: Projektleiter und Endkorrektur des Manuskriptes

Udo Jäckel: Konzeption der Studien oder Experimente, Unterstützung bei der Interpretation der Daten, Formulierung des Manuskripts

Alle Autoren haben ihre Zustimmung zur Publikation vor der Einreichung der Veröffentlichung gegeben.

4. SCHLUSSFOLGERUNG & AUSBLICK

Leben und Arbeiten in „feuchtegeschädigten Gebäuden“ scheint das Risiko für negative gesundheitliche Effekte zu erhöhen (Bornehag *et al.*, 2001). Allerdings ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt, welche, in diesem Fall mikrobiellen Faktoren für einen kausalen Zusammenhang verantwortlich sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Überblick über das Vorkommen und die Diversität von *Actinobacteria* in feuchtegeschädigten Baumaterialien gegeben sowie die abundanten *Actinobacteria*-Gattungen aufgezeigt. Zwar wurden *Actinobacteria* nachgewiesen, die einen möglichen Einfluss auf die Gesundheit haben können, allerdings konnte auch in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, dass bzw. welche *Actinobacteria* im direkten kausalen Zusammenhang mit den beschriebenen Beschwerden der Bewohner stehen. Tendenziell scheint eventuell eine Kombination verschiedener Faktoren bzw. das Vorkommen verschiedener Mikroorganismen für die Beschwerden verantwortlich zu sein. Zukünftige Untersuchungen von Baumaterialien bzw. in Innenräumen mit Feuchteschäden sollten daher die Gemeinschaft der vorliegenden Mikroorganismen genauer betrachten und möglicherweise mit Schimmelpilzen interagierende *Actinobacteria* detailliert untersuchen. Die „primäre Quelle“ für das Vorkommen von *Actinobacteria* in Baumaterialien ist nicht geklärt, allerdings zeigten erste Untersuchungen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Baumaterialien- und korrespondierenden Bioaerosolproben. Weiterführende Untersuchungen müssen klären, ob die im Innenraum vorkommenden *Actinobacteria* vom Material in die Umgebung abgegeben werden oder ob, zuvor in der Luft vorherrschende Bakterien die Baumaterialien (besonders bei einem Feuchteschaden) besiedeln. Die vorliegende Arbeit liefert zunächst das Detailwissen über vorherrschende *Actinobacteria*. Dies ist notwendig, um zukünftig sowohl gezielte Nachweise relevanter und/oder abundanter *Actinobacteria* Spezies durchführen zu können (wie hier beispielhaft für *S. rectivirgula* durchgeführt) sowie gemeinsame Untersuchungen hinsichtlich synergistischer Effekte mit Schimmelpilz Spezies, welche ebenfalls aus feuchtegeschädigten Baumaterialien bekannt sind, zu ermöglichen.

5. LITERATUR

- Altenburger, P., Kämpfer, P., Makristathis, A., Lubitz, W., Busse, H.J. (1996)** Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J Biotechnol* 47: 39-52
- Andersson, M.A. (1999)** Bacterial diversity and toxicity in air, indoor environment and foods. PhD Thesis University of Helsinki, Finland
- Andersson, M.A., Nikulin, M., Kõljalg, U., Andersson, M.C., Rainey, F., Reijula, K., Hintikka, E.L., Salkinoja-Salonen, M. (1997)** Bacteria, molds, and toxins in water damaged building materials. *Appl Environ Microbiol* 63: 387-393
- Andersson, M.A., Mikkola, R., Kroppenstedt, R.M. (1998.)** The mitochondrial toxin produced by *Streptomyces griseus* strains isolated from an indoor environment is valinomycin. *Appl Environ Microbiol* 64: 4767-4773
- Andersson, M.A., Tsitko, I., Vuorio, R., Salkinoja-Salonen, M.S. (1999b)** Mycobacteria and related genera are major colonizers of a wall in a children's day care center. In: Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control. Johanning E. (Ed.), 3: 396-402
- Andersson, M.A., Weiss, N., Rainey F., Salkinoja-Salonen, M.S. (1999a)** Dust borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J Appl Microbiol* 86: 622-634
- Becker, W., Kaiser, B., Luther, S., Otremba, H. (2007)** „Um Schimmels Willen: Feuchteschäden in Wohnräumen und Soziale Lage“ Gesundheitsamt Freie Hansestadt Bremen (Hrsg.)
- Beckett, W., Kallay, M., Sood, A., Zuo, Z., Milton, D. (2005)** Hypersensitivity pneumonitis associated with environmental Mycobacteria. *Environ Health Perspect* 113: 767–770
- BioStoffV (1999)** Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung-BioStoffV). BGBl I Nr 4: 50-60
- Bornehag, C.-G., Blomquist, G., Gyntelberg, F., Järholm, B., Malmberg, GP., Nordvall, L., Nielsen, A., Pershagen, G., Sundell, J. (2001)** Dampness in buildings and health nordic interdisciplinary review of the scientific evidence on associations between exposure to “dampness” in buildings and health effects (NORDDAMP). *Indoor Air* 11: 72–86
- Branger, C., Bruneau, B., Goulet, P. (1987)** Septicemia caused by *Propionibacterium granulosum* in a compromised patient. *J Clinical Microbiol* 25: 2405-2406
- Brasche, S., Heinz, E., Hartmann, T. Richter, W., Bischof W. (2003)** Vorkommen, Ursachen und gesundheitliche Aspekte von Feuchteschäden in Wohnungen-Ergebnisse einer repräsentativen Wohnungsstudie in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 46: 683–693

- Brown-Elliott, B.A., Wallace, R.J. (2002)** Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing Mycobacteria. *Clin Microbiol Reviews* 15: 716–746
- Colston, M.J. (1996)** The cellular and molecular basis of immunity against mycobacterial diseases. *J Appl Microbiol Supplement*: 33S-39S
- Corbaz, R., Gregory, P.H., Lacey, M.E. (1963)** Thermophilic and mesophilic Actinomycetes in mouldy hay. *J gen Microbiol* 32: 449-455
- Dalal, A., Urban, C., Segal-Maurer, S. (2008)** Endocarditis due to *Corynebacterium amycolatum*, *J Med Microbiol*, 57: 1299–1302
- Duchaine, C., Meriaux, A., Brochu, G., Bernard, K., Cormier, Y. (1999)** *Saccharopolyspora rectivirgula* from Quebec dairy barns: application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmer's lung disease. *J Med Microbiol* 48: 173-180
- Embil, J., Warren, P., Yakrus, M., Stark, R., Corne, S., Forrest, D., Hershfield, E. (1997)** Pulmonary illness associated with exposure to *Mycobacterium avium* complex in hot tub water-hypersensitivity pneumonitis or infection. *Chest* 111: 813-816
- Ensign, J.C. (1992)** Introduction to the Actinomycetes. In: *The Prokaryotes*. 2nd edition, Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Hardeer, W., Schleifer, K.-H. (Ed.), Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg Vol II: 811-815
- Fallschissel, K., Jäckel, U., Kämpfer, P. (2009)** Direct detection of *Salmonella* cells in the air of livestock stables by *Real-Time* PCR. *Ann Occup Hyg* 53: 859-868
- Farrelly, V., Rainey, F.A., Stackebrandt, E. (1995)** Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *App Environ Microbiol* 61: 2798-2801
- Farris, M.H., Olson, J.B. (2007)** Detection of *Actinobacteria* cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett Appl Microbiol* 45: 376–381
- Fischer, G., Hollbach, N., Schmitz, C., Dott, W. (2005)** Luftgetragene Schimmelpilze in der Umwelt des Menschen – gesundheitliche Relevanz und Möglichkeiten der Risikobewertung. *Gefahrst Reinhalt Luft* 65: 335–340
- Fischer, G. (2010)** Biologische Gefährdung, In: *Schadstoffe in Gebäuden*, Erfassen bewerten, beseitigen. Gesamtverband Schadstoffsanierung GbR (Hrsg.) S: 241-254
- Fritsche, W. (1998)** Umweltmikrobiologie-Grundlagen und Anwendungen, Gustav Fischer Verlag, Jena, S: 58 f
- Goodfellow, M. (1989)** Suprageneric classification of *Actinomycetes*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams, S.T., Shape, M.E. and Holt J.G. (Ed.), Williams and Wilkins, Baltimore Vol. 4: 2333-2339

- Górny, R.L., Mainelis, G., Wlazło, A., Niesler, A., Lis, D.O., Marzec, St., Siwińska, E., Łudzeń-Izbińska B., Harkawy1, A., Kasznia-Kocot, J. (2007)** Viability of fungal and actinomycetal spores after microwave radiation of building materials. *Ann Agric Environ Med* 14: 313-324
- Górny, R.L., Dutkiewicz, J. (2002)** Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in central and eastern European countries. *Ann Agric Environ Med* 9: 17–23
- Górny, R.L. (2004)** Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air – a review. *Ann Agric Environ Med*, 11: 185–197
- Gregory, P.H., Lacey, M.E. (1963)** Liberation of spores from mouldy hay. *Trans Brit mycol Soc* 46: 73-80
- Gregory, P.H., Lacey, M.E. (1963a)** Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease. *J gen Microbiol* 30: 75-88
- Gregory, P.H., Lacey, M.E. Festenstein, N., Skinner, F.A. (1963c)** Microbial and biochemical changes during the moulding of hay. *J gen Microbiol* 33: 147-174
- Grigorevski-Lima, A.L., Silva-Filho, R.G., Linhares, L.F., Coelho, R.R.R. (2006)** Occurrence of actinomycetes in indoor air in Rio de Janeiro, Brazil. *Building Environment* 41: 1540-1543
- Haverinen, U., Husman, T., Pekkanen, J., Vahteristo, M., Moschandreas, D., Nevalainen A. (2001)** Characteristics of moisture damage in houses and their association with self-reported symptoms of the occupants. *Indoor Built Environ* 10: 83–94
- Heidelberg, J.F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., Colwell, RR. (1997)** Effect of aerolization on culturability and viability of Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:3585-3588
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H. (1997)** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environm Microbiol* 63: 3233-3241
- Hirvonen, M.R, Huttunen, K., Roponen, M. (2005)** Bacterial strains from moldy buildings are highly potent inducers of inflammatory and cytotoxic effects. *Indoor Air* 15: 65-70
- Hirvonen, M.R., Ruotsalainen M., Savolainen, K., Nevalainen, A. (1997)** Effect of viability of actinomycetes spores on their ability to stimulate production of nitric oxide and reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Toxicology* 124: 105-114
- Huttunen, K., Hyvärinen, A., Nevalainen, A., Komulainen, H., Hirvonen, M.R. (2003)** Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Envir Health Peerspective* 111: 85-92

- Huttunen, K., Jussila, J., Hirvonen, M.-R., Iivanainen, E., Katila, M.-L. (2001)** Comparison of *mycobacteria* induced cytotoxicity and inflammatory response in human and mouse cell lines. *Inhal Toxicol*, 13: 977-991
- Hyvärinen, A., Meklin, T., Vepsäläinen, A., Nevalainen, A. (2002)** Fungi and *Actinobacteria* in moisture-damaged building materials-concentrations and diversity. *Int Biodeter Biodegr* 49: 27-37
- Janssen, P.H. (2006)** Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72: 1719-1728
- Jussila, J., Komulainen, H., Huttunen, K., Roponen, M., Hälinen, A., Hyvärinen, A., Kosma, V.M., Pelkonen, J., Hirvonen, M.R. (2001)** Inflammatory response in mice after intratracheal instillation of spores of *Streptomyces californicus* isolated from indoor air of a mouldy building. *Toxicol Appl Pharmacol* 171: 61-69
- Jussila, J., Komulainen, H., Huttunen, K., Roponen, M., Iivanainen, E., Torkko, P., Kosma, V.-M., Pelkonen, J., Hirvonen, M.-R. (2002)** *Mycobacterium terrae* isolated from indoor air of a moisture-damaged building induces sustained biphasic inflammatory response in mouse lungs. *Environ Health Perspectives* 110: 1119-1125
- Jussila, J., Ruotsalainen, M., Komulainen, H., Savolainen, K., Nevalainen, A., Hirvonen, M.R. (1999)** *Streptomyces anulatus* from indoor air of moldy houses induce NO and IL-6 production in a human alveolar epithelial cell-line. *Environ Toxicol Pharmacol* 7: 261-266
- Kämpfer, P., Andersson, M.A., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., Salkinoja-Salonen, M.S (1999)** *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor of a children's day care centre environment. *Int J Syst Bacteriol* 49: 681-687
- Katoch, V.M. (2004)** Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res* 120: 290-304
- Koskinen, O.M., Husman, T.M., Meklin, T.M., Nevalainen, A.I. (1999)** The relationship between moisture or mould observations in houses and the state of health of their occupants. *Eur Respir J* 14: 1363-1367
- Korn-Wendisch, F. & Kutzner, H.J. (1992)** The family *Streptomycetaceae*. In: *The Prokaryotes*, 2nd edition, Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Hardeer W, Schleifer KH (Ed.), Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg Vol II: 921-995
- Kutzner, H.J., Kempf, A. (1996)** Vorkommen von Actinomyceten in der Luft von Abfallbehandlungsanlagen, In: *Schriftreihe WAR* 92, 50. Darmstädter Seminar: Abfalltechnik, Hygiene in der Abfallwirtschaft, Verein zur Förderung des Instituts WAR (Hrsg.) 92: 13-54
- Lacey, J. (1990)** Taxonomic history of actinomycete strains bearing the epithet *rectivirgula* correct citation of authorities. *Int J Syst Bacteriol* 40: 467-468
- Lacey, J., Lacey, M.E. (1964)** Spore concentration in the air of farm buildings. *Trans Brit mycol Soc* 47: 547-552

- Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart (2004)** Leitfaden: Handlungsempfehlung für die Sanierung von mit Schimmelpilzen befallenen Innenräumen. S: 7-10
- Lane, D.J. (1991)** 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY p: 115–148
- Lechevalier, H.A. (1989)** A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams, S.T. Shape, M.E. and Holt J.G. (Ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 4: 2344 - 2347
- Lejbnkowicz, F., Kudinsky, R., Samet, L., Belavsky, L., Barzilai, M., Predescu, S. (2005)** Identification of *Nocardiosis dassonvillei* in a blood sample from a child. *Am J Infect Diseases* 1: 1-4
- Lorenz, W., Trautmann, C., Dill, I. (2003a)** Nachweis und Bedeutung von Actinomyceten und sonstigen Bakterien in Innenräumen. *Handbuch für Bioklima*. Moriske und Turowski (Hrsg.) Kap. III-4.4.14 ecomed Verlag, Landsberg am Lech, Erg. Lfg 10: 12/2003
- Lorenz, W., Kroppenstedt, R.M, Trautmann, C., Stackebrandt, E., Dill, I. (2003b)** Actinomycetes in building materials. International Conference Healthy Buildings, Singapore pp. 583-589
- Ludwig, W.; Klenk, H.P. (2001)** Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn, Boone DR, Castenholz RW & Garrity GM (Ed.), Springer Verlag, New York p: 49-65
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2006)** Brock Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- Martin, E., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2009)** Erfassung der bakteriellen Diversität in der Innenraumluft. *Gef Reinhalt Luft* 69: 97-102
- Mastroianni, A. (2003)** *Mycobacterium flavescens* vertebral osteomyelitis in an immunocompetent host, osteomyelitis vertebrale da *Mycobacterium flavescens* in un ospite immunocompetente. *Le Infezioni in Medicina* 2: 95-99
- McCarthy, A.J., Williams, S.T. (1992)** Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene* 115: 189-192
- Mehrer, A., Lorenz, W., Gareis, M., Trautmann C., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. (2003)** Cytotoxicity of different actinomycetes isolated from building materials, 5th International Conference on Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins and Human Health, Saratoga Spring, N.Y. U.S.A
- Moriske, H.J., Szewzyk, R. (2003)** Leitfaden des Umweltbundesamtes zur Vorbeugung, Untersuchung, Bewertung und Sanierung von Schimmelpilzwachstum in Innenräumen („Schimmelpilz-Leitfaden“), Umweltbundesamt, Berlin

- Mumy, K.L., Findlay, R.H. (2004)** Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *J Microbiol Meth* 57: 259-268
- Oliver, J.D. (2005)** The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbio*, 43: 93-100
- Peltola, J. (2001a)** Microbial growth in building materials and toxigenic microbes in indoor environment. Ph.D thesis, University of Helsinki, Finland
- Peltola, J.S.P, Andersson, M.A., Kämpfer, P., Auling, G., Kroppenstedt, R.M, Busse, H-J., Salkinoja-Salonen, M.S., Rainey, F.A. (2001b)** Isolation of toxigenic *Nocardiosis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardiosis* Species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischolae* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 67: 4293-4304
- Pepys, J., Jenkins, P., Festensteign, A.N., Gregory, P.H., Lacey, M.E. & Skinner, A. (1963)** Farmer's lung. Thermophilic actinomycetes as a source of 'farmer's lung hay' antigens. *Lancet* 607-611
- Picard, CH., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., Simonet P. (1992)** Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 2717-2722
- Pietarinen, V.M., Rintala, H., Hyvärinen, A., Lignell, U., Kärkkäinen, P. , Nevalainen, A. (2008)** Quantitative PCR analysis of fungi and bacteria in building materials and comparison to culture-based analysis. *J Environ Monit* 10: 655–663
- Rainey, F.A., Ward, N., Sly, L.L., Stackebrandt, E. (1994)** Dependence on the taxon composition of clone libraries for PCR amplified, naturally occurring 16S rDNA, on the primer pair and the cloning system used. *Experientia* 50: 796-797
- Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S. und Pace, N.R. (1992)** Differential amplification of rRNA genes by Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3417-3418
- Rintala, H., Nevalainen, A., Suutari, M. (2002)** Diversity of streptomycetes in water damaged building materials based on 16S rDNA sequences. *Appl Microbiol* 34: 439-443
- Rintala, H., Pitkäranta, M., Toivola, M., Paulin, L., Nevalainen, A. (2008)** Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiol* 8: 56-69
- Rintala, H., Hyvärinen, A., Paulin, L., Nevalainen, A. (2004)** Detection of streptomycetes in house dust – comparison of culture and PCR methods. *Indoor Air* 14: 112-119
- Roponen, M., Toivola, M., Meklin, T., Ruotsalainen, M. Komulaine, H., Nevalainen, A. , Hirvonen, M-R. (2001)** Differences in inflammatory responses and cytotoxicity in RWA 264.7 macrophages induced by *Streptomyces anulatus* grown on different building materials. *Indoor Air* 11: 179-184

- Salkinoja-Salonen, M.S., Andersson, M.A., Mikkola, R., Paananen, A., Peltola, J., Mussalo-Rauhamaa, H., Vuorio, R., Saris, N.E., Grigorjev, P., Helin, J., Koljalg, U., Timonen, T. (1999)** Toxigenic microbes in indoor environment: identification, structure and biological effects of aerosolizing toxins, In: *Bioaerosols, fungi and mycotoxins: health effects, assessment, prevention and control*. Johanning E. (Ed.), Albany, Eastern New York Occupational Environmental Health Center; New York, NY: Mount Sinai School of Medicine, Department of Community Medicine p: 359-374
- Schaal, K.P. (1970)** Die Resistenz der Erreger der Aktinomykosen –klassische Aktinomykose und Nocardiose – gegen Umwelteinflüsse. III. Die Resistenz gegen Austrocknung. *Zentralbl Bakteriol I Abt Orig* 215: 483-497
- Schneegurt, M.A. Dore, S.Y., Kulpa, C.F. (2003)** Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Mol Biol* 5: 1-8
- Sennekamp, H.J. (2004)** Extrinsic allergic alveolitis. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München, Orlando
- Sorokin, D.Y, van Pelt, S., Tourova, T.P., & Evtushenko, L. I. (2009)** *Nitriliruptor alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a deep-lineage haloalkaliphilic actinobacterium from soda lakes capable of growth on aliphatic nitriles, and proposal of *Nitriliruptoraceae* fam. nov. and *Nitriliruptorales* ord. nov. *Int J Syst Evol Microbio*, 59: 248–253
- Spengler, J., Neas, L., Nakai, S., Dockery, D., Speizer, F., Ware, J., Raizenne, M. (1994)** Respiratory symptoms and housing characteristics. *Indoor Air* 4: 72-82
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. (1997)** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47: 479-491
- Staley, J.T., Konopka, A. (1985)** Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39: 321-346
- Suihko, M.L., Priha, O., Alakomi, H.L., Thompson, P., Mälarstig, B., Stott, R., Richardson, M. (2009)** Detection and molecular characterization of filamentous *Actinobacteria* and thermoactinomycetes present in water-damaged building materials. *Indoor Air* 19: 268–277
- Sundell, J., Lindvall, T., Stenberg, B., Wall, S. (1994)** Sick Building Syndrome (SBS) in office workers and facial skin symptoms among VDT-workers in relation to building and room characteristics: Two case-referent studies. *Indoor Air* 4: 83-94
- Szewzyk, R. (2008)** Gesundheitsgefährdung durch Schimmelpilze? *Gef Reinhalt Luft* 68: 345
- Szewzyk, R. (2009)** Schimmelpilze sind nicht die einzigen Übeltäter bei Feuchteschäden in Wohnungen. telegramm: *umwelt + gesundheit*, Umweltbundesamt (Hrgs.)
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., Burns, R.G. (2002)** Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol Biochem* 34: 387-401

- Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 466 (2006)** Einstufung von Bakterien (Bacteria) und Archaeabakterien (Archaea) in Risikogruppen. *Bundesarbeitsblatt* 7-200: 33-193
- Toivola, M., Alm, S., Reponen, T., Kolari, S., Nevalainen, A. (2002)** Personal exposures and microenvironmental concentrations of particles and bioaerosols. *J Environ Monit* 4: 166–174
- Torvinen, E., Torkko, P., Nevalainen, A., Rintala, H. (2010)** Real-time PCR detection of environmental mycobacteria in house dust. *J Microbiol Meth* 82: 78–84
- Torvinen, E., Meklin, T., Torkko, P., Suomalainen, S., Reiman, M., Katila M-L., Paulin, L., Nevalainen, A. (2006)** Mycobacteria and fungi in moisture –damaged building materials. *Appl Environ Microbiol*, 72: 6822-6824
- von Wintzigerode, F., Göbel, U.B., Stackebrandt, E. (1997)** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21: 213-229
- Vuorio, R., Andersson, M.A., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., Kämpfer, P., Busse, H-J., Viljanen, M., Salkinoja-Salonen, M.S. (1999)** A new rapidly growing mycobacterial species, *Mycobacterium murale* sp. nov., isolated from the indoor walls of a children´s day care center. *Int J Syst Bacteriol* 49: 25-35
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991)** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-704
- Wink, J. (2002)** The *Actinomycetales*, An Order in the Class of *Actinobacteria* Important to the Pharmaceutical Industry, Electronic Manual
- Wu, Z., Xie L., Xia, G., Zhang, J., Nie, Y., Hu, J., Wang, S., Zhang, R. (2005)** A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes*. *Toxicon* 45: 851-859
- Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt, E. (2009)** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 589-608
- Zinder, S.H., Salyers, A.A. (2001)** Microbial ecology-new directions, new importance. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn*, Boone DR, Castenholz RW & Garrity GM (Ed.), Springer Verlag, New York p: 101-109

Internetseiten:

www.bacterio.cict.fr/a/Actinobacteria.html

www.baua.de

www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas-3.0

www.gaea-umweltconsulting.de/startseite/index.html

www.rdp.cme.msu.edu/

www.uga.edu/strata/software/anRareReadme.html

Danksagung

Mit der Fertigstellung der Dissertation ist es an der Zeit, nochmals denjenigen zu danken, die mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat dieses wissenschaftliche Projekt zu bearbeiten sowie für seine stete Unterstützung und Flexibilität.

Frau Prof. Dr. Annegret Wilde gilt mein Dank für das bekundete Interesse und die bereitwillige Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Gäth und Herrn Prof. Dr. Holger Zorn möchte ich mich für die wohlwollende Vervollständigung meiner Prüfungskommission bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn Dr. Udo Jäckel für die qualifizierte, engagierte und geduldige Betreuung meiner Arbeit. Er hat mit seiner ansteckenden Euphorie für die Wissenschaft enorm dazu beigetragen, dass diese Arbeit entstanden ist. Danke für die spannenden Diskussionen und die liebevolle Unterstützung auch in schwierigeren Zeiten.

Ein großes Dankeschön gilt allen Projektpartnern, die zum Nachweis und zur Identifizierung von *Actinobacteria* in Baumaterialien beigetragen haben.

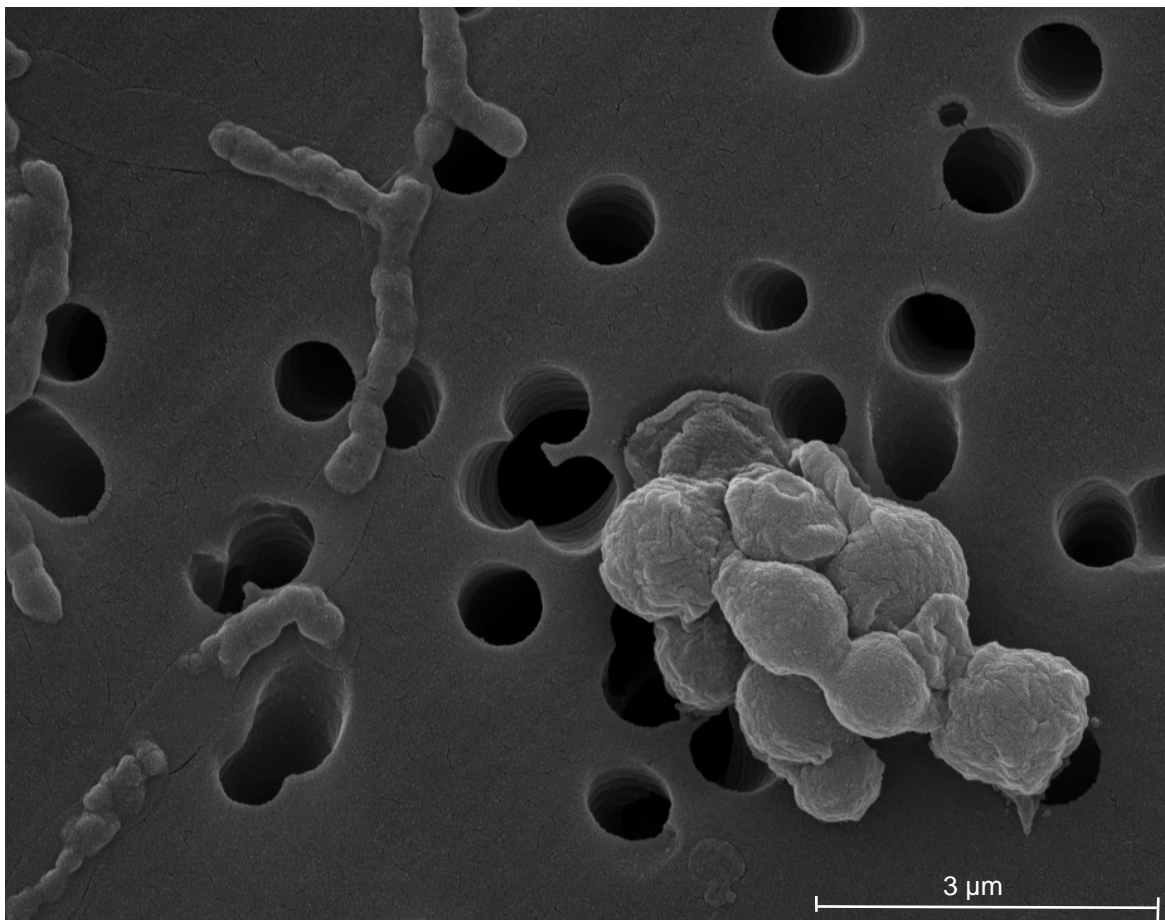
Weiterhin gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe „Angewandte Mikrobiologie“ in Giessen sowie der Gruppe 4.7 „Biologische Arbeitsstoffe“ in Berlin für die Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima an beiden Standorten. Herzlichen Dank an Gundi Will, Rita Geißler-Plaum, Maria Sowinsky und Dr. Stefan Ratering für den Beistand im Laboralltag, die wissenschaftlichen Tipps und Ratschläge! Besonderer Dank gilt Herrn Dir. Rüdiger Schöneich in Berlin für die wiederholten Anstrengungen meiner Abordnung nach Berlin und die freundliche Aufnahme in die Anstalt. Ganz besonders gilt mein Dank hier jedoch meinen Kolleginnen Kerstin Fallschissel, Kathrin Thummes und Elena Martin, die mehr als Kolleginnen für mich waren und mir immer mit kreativen Diskussionen zur Seite standen. Danke für alle aufmunternden Worte, die „Eis-Auszeiten“ auf der Dachterrasse und die Rundgänge im „BAuA-Park“ sowie jegliche Unterstützung bei nationalen und internationalen Tagungen.

Ich möchte mich auch bei der „ZELMI“ der TU Berlin bedanken, die mir die Möglichkeit gaben REM Aufnahmen von meinem „Lieblingsbakterium *Saccharopolyspora rectivirgula*“ zu machen. Besonders danke ich Nico Dziurowitz und Carmen Thim von der BAuA für ihre Hilfe bei den Aufnahmen.

Udo Jäckel, Nicole Lidders, Manuela Hippauf und Christiane Wagner gilt mein Dank für die stilistischen und orthographischen Korrekturen.

Besonders danke ich meinem Freund Thomas, meinen lieben Freundinnen und Freunden für die seelische und moralische Unterstützung und vor allem für die Geduld, die sie mit mir hatten.

Meinen lieben Eltern, meiner Schwester mit Familie und meinen Großeltern möchte ich für die dauerhafte Liebe und Unterstützung danken, dass ich diesen Punkt im Leben erreichen konnte.



REM-Aufnahme von *Saccharopolyspora rectivirgula* auf Polycarbonatfilter, 10000 fache Vergrößerung