Texte

Texte
02
09
ISSN
1862-4804

Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in Innenräumen

Umwelt
Bundes
Amt
Für Mensch und Umwelt

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 205 62 236
UBA-FB 001229

Texte
02
09
ISSN
1862-4804

Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in Innenräumen

von

Dr. T. Gabrio, U. Weidner, T. Miljanic
Regierungspräsidium Stuttgart, Landesgesundheitsamt

Prof. Dr. G. Fischer
Universitätsklinikum Aachen

Dr. I. Groth, K. Martin
Hans-Knöll-Institut, Jena

Prof. Dr. P. Kämpfer, Dr. U. Jäckel, J. Schäfer
Justus Liebig-Unversität, Gießen

Dr. W. Lorenz
Dr. Lorenz - Institut für Innenraumdiagnostik, Düsseldorf

Dr. Ch. Trautmann, Dr. I. Dill
Umweltmykologie GbR, Berlin

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter
http://www.umweltbundesamt.de
verfügbar.

Die in der Studie geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 14 06
06813 Dessau-Roßlau
Tel.: 0340/2103-0
Telefax: 0340/2103 2285
Internet: http://www.umweltbundesamt.de

Redaktion: Fachgebiet II 1.4
Dr. Regine Szewzyk

Dessau-Roßlau, Februar 2009

Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB 001229	2.	3.

4. Titel des Berichts
Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in Innenräumen

5. Autor(en), Name(n), Vorname(n)
Dr. Gabrio, U. Weidner, T. Miljanic, Prof. Dr. G. Fischer,
Dr. I. Groth, K. Martin, Prof. Dr. P. Kämpfer, Dr. U. Jäckel
J. Schäfer, Dr. W. Lorenz, Dr. Ch. Trautmann, Dr. I. Dill

6. Durchführende Institution (Name, Anschrift)

RP-Stuttgart, Landesgesundheitsamt (Projektkoordination),
Universitätsklinikum Aachen, Hans-Knöll-Institut, Jena,
Justus Liebig-Unversität, Gießen, Dr. Lorenz - Institut für
Innenraumdiagnostik, Düsseldorf, Umweltmykologie GbR, Berlin

7. Fördernde Institution (Name, Anschrift)

Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin

8. Abschlußdatum
September 2008

9. Veröffentlichungsdatum
Februar 2009

10. UFOPLAN-Nr.
205 62 236

11. Seitenzahl
276

12. Literaturangaben
105

13. Tabellen und Diagramme
29

14. Abbildungen
55

15. Zusätzliche Angaben

16. Kurzfassung

Actinomyceten treten zusammen mit Schimmelpilzen bei Feuchteschäden auf. Im Gegensatz zu den Schimmelpilzen ist das Wissen über die Actinomyceten mit einer Indikatorfunktion für Innenraumschäden gering.
Außer dem allgemeinen Wissen,dass Actinomyceten ein allergenes, toxisches und infektiöses Potential besitzen, ist wenig bekannt, welches Risiko von innenraumrelevanten Actinomyceten ausgeht.
In Baumaterialien aus 16 Objekten mit Feuchteschaden wurde ein diverses Spektum unterschiedlicher Actinomyceten in hohen Konzentrationen nachgewiesen. 283 durch Kultivierung gewonnene Isolate wurden molekularbiologisch als Actinomyceten aus 35 verschiedenen Gattungen identifiziert. Am häufigsten wurden die Gattungen Amycolatopsis, Nocardiopsis, Nocardia, Pseudonocardia, Saccharopolyspora, Promicromonospora und Streptomyces nachgewiesen. Bei dem kultivierungsunabhängigen molekularbiologischen Nachweis durch PCR und Klonierung wurden 694 Actinomyceten aus 52 Gattungen identifiziert. Mittels des MTT-Zytotoxizitätstestes und Freisetzung von TNF-α aus Makrophagen ergaben sich erste Hinweise, dass von einigen der untersuchten Proben und Actinomyceten eine zytotoxische oder inflammatorische Wirkung ausgeht.
Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, eine allgemein anwendbare Routinemethode zur Bestimmung der Actinomyceten zu etablieren. Für gewisse Fragestellungen in der Innenraumdiagnostik ist es wichtig, Angaben darüber zu machen, ob bei einem Feuchteschaden ein Actinomycetenbefall vorliegt. Deshalb wird für die Routine empfohlen, die myzelbildenden Actinomyceten auf Mineralagar nach Gauze zu isolieren, das erhaltene Ergebnis als KBE myzelbildende Actinomyceten anzugeben und bei der Interpretation darauf hinzuweisen, dass mit dieser Untersuchung nur ein Teil der Actinomyceten erfasst wird und eine gesundheitliche Interpretation des Ergebnisses nicht möglich ist. Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine Aussage darüber zu, wie die gesundheitliche Wirkung der Actinomyceten im Verhältnis zu den Schimmelpilzen zu beurteilen ist. Dazu ist weitere Forschung mit unterschiedlichen Zellkulturen notwendig.

17. Schlagwörter
Actinomyceten, Innenraum, morphologische und molekularbiologische Identifizierung, chemotaxonomische Merkmale, gesundheitliche Risiken, MTT-Zytotoxizitätstest, TNF-α, Makrophagen, PCR, Sequenzierung, Kultivierung, Baumaterialien, Feuchteschäden

18. Preis 219 923,27 €	19.	20.

Report Cover Sheet

1. Report No. UBA-FB 001229	2.	3.

4. Report Title

Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in Innenräumen

5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s)
Dr. Gabrio, U. Weidner, T. Miljanic, Prof. Dr. G. Fischer,
Dr. I. Groth, K. Martin, Prof. Dr. P. Kämpfer, Dr. U. Jäckel
J. Schäfer, Dr. W. Lorenz, Dr. Ch. Trautmann, Dr. I. Dill

6. Performing Organisation (Name, Address)

RP-Stuttgart, Landesgesundheitsamt (Projektkoordination),
Universitätsklinikum Aachen, Hans-Knöll-Institut, Jena,
Justus Liebig-Unversität, Gießen, Dr. Lorenz - Institut für
nnenraumdiagnostik, Düsseldorf, Umweltmykologie GbR, Berlin

7. Sponsoring Agency (Name, Address)

Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin

8. Report Date
September 2008

9. Publication Date
February 2009

10. UFOPLAN-Ref. No.
205 62 236

11. No. of Pages
276

12. No. of Reference
105

13. No. of Tables, Diagrams
29

14. No. of Figures
55

15. Supplementary Notes

16. Abstract

Actinomycetes have been shown to occur in damp building materials together with fungi. The knowledge on actinomycetes as dampness indicators or causes for negative health effects in damp indoor environments is scarce although their allergenic, toxic or infectious potentials are well documented.

In the present study, actinomycetes have been isolated in high numbers and high diversity from damp building materials from 16 buildings. The 283 isolates obtained were classified in 35 different genera using molecular methods. Streptomyces, Amycolatopsis, Nocardiopsis, Nocardia, Pseudonocardia, Saccharopolyspora, Promicromonospora were the dominating genera. A partly different spectrum of genera was detected in the building materials using molecular methods (PCR, cloning). A total of 694 actinomycetes from 52 genera were identified. Cell tests (MTT cytotoxicity test, release of TNF-α from macrophages) revealed a cytotoxic or inflammatory potential of some building materials and actinomycete isolates.

It was not possible to develop an easy screening method for the detection of actinomycetes due to their high diversity. Nevertheless, evaluation of the presence of actinomycetes in damp building materials is an important question when dealing with indoor hygiene and a method suitable for routine analysis is urgently needed. As a more simple approach it is, therefore, suggested to restrict the detection of actinomycetes to those actinomycetes growing with clearly visible mycelia on the Gauze mineral agar. The result of this investigation should be recorded as “cfu mycelium-forming actinomycetes” and it should be noted in the report that this parameter does only include a certain part of the actinomycetes (mainly the genera Steptomyces, Amycolatopsis, Nocardiopsis, Nocardia and Pseudonocardia) It should also be made clear that no health risk evaluations can be derived from these data. From the preliminary results obtained on the toxic and immunomodulating effects of actinomycetes, a comparison with corresponding effects of fungi is not possible. Further research is warranted including a broad spectrum of cell lines and synergistic effects between different microorganisms.

17. Keywords

actinomycetes, indoor environment, damp building materials, cultivation, sequencing, PCR, morphological and molecular characterisation, chemotaxonomy, health risks, MTT cytotoxicity test, TNF-α, macrophages

18. Price 219 923,27	19.	20.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Projekt/ Projektpartner	7
1.2	Actinomyceten/*Actinobacteria*	10
1.2.1	*Actinobacteria* in Baumaterialien/Innenräumen mit Feuchteschäden mit potentieller gesundheitlicher Relevanz	13
1.3	Zielstellung	14
1.4	Planung und Ablauf des Vorhabens	17
2	Material und Methoden	21
2.1	Auswahl von Objekten und Probenahmestelle	21
2.2	Beschreibung der Probenahmestellen	24
2.2.1	Probenahme, Transport und Lagerung der Materialproben	24
2.2.2	Probenahme, Transport und Lagerung der Luftproben	25
2.2.3	Messungen im Zusammenhang mit der Probenahme	25
2.3	Kultivierungsabhängige Analysen	26
2.3.1	Nährmedien zur Kultivierung von Actinomyceten	27
2.3.1.1	Herstellung der Nährmedien	28
2.3.1.2	Isolierungsmedien	29
2.3.1.3	Medien zur Subkultivierung	29
2.3.2	Nährmedien zur Kultivierung von Pilzen	30
2.3.3	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten der Actinomyceten	30
2.3.3.1	Vorbereitung der Materialproben	30
2.3.3.2	Kultivierung der Material- und Luftproben	30
2.3.3.3	Auszählung und Berechnung der KBE (koloniebildene Einheiten)	30
2.3.4	Festlegung der Dominanz einzelner Isolate in einer Probe	32
2.3.5	Identifizierung der Actinomyceten	32
2.3.5.1	Beschreibung der makromorphologischen Merkmale	33
2.3.5.2	Beschreibung der mikromorphologischen Merkmale	33
2.3.5.3	Gram-Färbung	34
2.3.5.4	Bestimmung der Diaminopimelinsäure (DAP)	34
2.3.5.5	Chemotaxonomische Methoden zum Nachweis von Actinomyceten	36
2.3.5.6	Bestimmung von Enzymmustern mit dem API-ZYM System	39
2.3.6	Konservierung	40
2.3.6.1	Konservierung in Glycerinmedium (Hans-Knöll-Institut Jena und	40

Umweltmykologie GbR Berlin)
2.3.6.2 Konservierung in Micronic-Röhrchen (Universität Gießen) 40
2.3.6.3 Konservierung in Glycerinmedium (LGA) 41
2.3.7 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten der Schimmelpilze 41
2.4 Molekularbiologische Methoden 41
2.4.1 DNA – Extraktion 41
2.4.1.1 DNA-Extraktion aus Reinkulturen 41
2.4.1.2 DNA-Extraktion aus Materialproben 43
2.4.1.3 DNA-Extraktion aus Kulturen der abgeschwemmten Nähragarplatten 44
2.4.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) 44
2.4.2.1 Ansetzen der PCR 45
2.4.2.2 Agarosegelelektrophorese 50
2.4.3 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism – Einzelstrang Konformationspolymorphismus) 50
2.4.3.1 Herstellen der einzelsträngigen DNA 51
2.4.3.2 Polyacrylamidgelelektrophorese 52
2.4.4 Klonierung 55
2.4.4.1 Durchführung der Klonierung 55
2.4.4.2 Konservierung der Klon-Kolonien 57
2.4.5 Sequenzierung durch Kettenabbruchverfahren (Terminatorverfahren) 58
2.4.5.1 Auswertung der Sequenzen 58
2.5 Zellkulturversuche, Toxizitätstests 59
2.5.1 MTT - Zytotoxizitätstest 59
2.5.1.1 Auswahl der Materialproben und Teststämme 60
2.5.1.2 Vorbereitung der Materialproben und Teststämme 61
2.5.1.3 Zellkultur 61
2.5.1.4 Durchführung des MTT-Zytotoxizitätstests 61
2.5.1.5 Auswertung des MTT-Zytotoxizitätstests 63
2.5.2 Zellkulturtests zur Immunmodulation (TNF-α bzw. IL-6 Test) 63
2.5.2.1 Vorbereiten der Teststämme 64
2.5.2.2 Zellkulturen 65
2.5.2.3 Durchführung des Zellkulturtests 65
2.5.2.4 Auswertung des Zellkulturtests 65

3	Ergebnisse	66
3.1	Kultivierungsabhängige Analysen (Isolierung) einschließlich Sequenzierung	66
3.1.1	Beschreibung der Schimmelpilz-Arten in den Baumaterialien	66
3.1.2	Isolierung der Bakterien	69
3.1.2.1	Vergleich der Sequenzen und „phylogenetische“ Berechnungen	71
3.1.2.2	Übersicht über die häufigen Gattungen und Arten	72
3.1.2.3	Nährmedienvergleich	82
3.1.2.4	Vergleich der Kulturentwicklung auf unterschiedlichen Differenzierungsmedien	85
3.1.2.5	Beschreibung der Isolate häufiger Gattungen	89
3.1.2.5.1	*Amycolatopsis*	89
3.1.2.5.2	*Micromonospora*	92
3.1.2.5.3	*Nocardia*	93
3.1.2.5.4	*Nocardioides*	95
3.1.2.5.5	*Nocardiopsis*	96
3.1.2.5.6	*Promicromonospora*	98
3.1.2.5.7	*Pseudonocardia*	99
3.1.2.5.8	*Saccharopolyspora*	106
3.1.2.5.9	*Streptomyces*	107
3.1.2.5.10	Isolate weiterer Gattungen	110
3.1.2.6	Vergleich der detektierten Gattungen in den Materialproben (n=1-4) mit denen aus Luftproben (n=1-4)	110
3.1.3	Ergebnisse der „phylogenetischen“ Baumberechnung	111
3.1.4	Chemotaxonomische Untersuchungen	112
3.1.5	Bestimmung von Enzymmustern mit dem API-ZYM System	121
3.2	Kultivierungsunabhängige Untersuchungen	121
3.2.1	Klonierung	121
3.2.2	SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	124
3.2.2.1	SSCP-Analyse der abgeschwemmten Nähragarplatten unter Verwendung Actinomyceten spezifischer Primer	124
3.2.2.2	SSCP-Analyse der verschiedenen Baumaterialien unter Verwendung Actinomyceten spezifischer Primer	125
3.3	Toxizitätstests	127
3.3.1	MTT-Zytotoxizitätstests mit Materialproben	127
3.3.2	MTT-Zytotoxizitätstests mit Referenzisolaten	129
3.3.3	Tests zur Immunmodulation	131

3.3.3.1 Vorversuche zur Freisetzung von TNF-α A-549 Zellen 131
3.3.3.2 Freisetzung von IL-6 aus Bronchialepithel-Zellen (A-549) 132
3.3.3.3 Freisetzung von TNF-α aus Makrophagen 133

4 Diskussion 140
4.1 Ergebnisse und Schadensbilder/Schadensarten 140
4.2 Isolierung von Actinomyceten 141
4.3 Vergleich der morphologischen, chemotaxonomischen und molekularbiologischen Identifizierung der Referenzisolate 143
4.3.1 Molekularbiologische Identifizierung 148
4.3.2 Morphologische Identifizierung 149
4.3.3 Chemotaxonomische Identifizierung 153
4.4 Diskussion Isolierung/Klonierung einschließlich deren Vergleich 159
4.5 Diskussion der toxikologischen Daten 162
4.5.1 Diskussion der MTT-Zytotoxizitätstests 162
4.5.2 Diskussion der Immunmodulation 164
4.5.3 Diskussion - Gesundheitliche Beschwerden in den untersuchten Objekten 166
4.6 Zusammenfassung 168
4.6 Summary 172
Verzeichnis der Abbildungen 176
Verzeichnis der Tabellen 178
Literatur 179
Anhang 186

1 Einleitung

1.1 Projekt/Projektpartner

Das Forschungs- und Entwicklungsvorhaben Förderkennzeichen 205 62 236 „Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in Innenräumen“ wurde vom Umweltbundesamt vom 01.12.2005 bis zum 31.05.2008 in Höhe von 219 923,27 € gefördert. Kostenneutral wurde dieses Projekt bis 30.09.2008 verlängert.

Von nachstehenden Verbundpartnern wurden folgende Teilaufgaben schwerpunktmäßig bearbeitet:

Justus Liebig-Universität, Institut für Angewandte Mikrobiologie, Gießen
Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer
Dr. Udo Jäckel
Jenny Schäfer

- Validierung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis der Actinomyceten
- Vergleich der Ergebnisse der morphologischen und molekularbiologischen Differenzierung
- Optimierung des Verfahrens zur Konservierung der Actinomyceten und Aufbau einer Stammsammlung
- Untersuchung von Wohnungen mit Feuchteschäden auf Actinomyceten (Isolierung der Actinomyceten, morphologische Beschreibung und Bilddokumentation der Proben: 1-2)
- Organisation und Durchführung des 3. Workshop – Molekularbiologische Identifizierung von Actinomyceten

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut, Jena
Dr. Ingrid Groth
Karin Martin

- Optimierung der Nährmedien für die Isolierung der Actinomyceten
- Optimierung der Nährmedien für die Differenzierung der Actinomyceten
- Biochemische Untersuchungen zur Differenzierung der Actinomyceten

- Festlegung der morphologischen Merkmale, die zur Identifizierung der Actinomyceten genutzt werden sollen
- Erarbeitung einer Vorlage zum Aufbau einer Arbeitsdokumentation für die Actinomyceten
- Optimierung des Verfahrens zur Konservierung der Actinomyceten und Aufbau einer Stammsammlung
- Vergleich der Ergebnisse der morphologischen und molekularbiologischen Differenzierung
- Untersuchung von Materialproben aus Wohnungen mit Feuchteschäden auf Actinomyceten (Isolierung der Actinomyceten, morphologische Beschreibung und Bilddokumentation der Proben: 1-4, 11 und 15; Zusammenführung der Isolate der Proben: 1-7)
- 1. Workshop – Statuskolloquium: Isolierung und morphologische Identifizierung von Actinomyceten

Dr. Lorenz – Institut, Innenraumdiagnostik, Düsseldorf
Dr. Wolfgang Lorenz

- Auswahl der 16 Wohnungen mit Feuchte- und Schimmelpilzbefall sowie Probenahme in allen Wohnungen
- Orientierende Untersuchungen über den Zusammenhang von vorliegenden Actinomyceten-Belastungen und gesundheitlichen Beschwerden

Regierungspräsidium Stuttgart, Landesgesundheitsamt, Stuttgart
Dr. Thomas Gabrio
Ursula Weidner
Tina Miljanic

- Optimierung der Nährmedien für die Isolierung der Actinomyceten
- Optimierung der Nährmedien für die Differenzierung der Actinomyceten
- Bereitstellung der Nährmedien zur Isolierung und Differenzierung der Actinomyceten für alle Projektteilnehmer
- Untersuchung von Materialproben aus Wohnungen mit Feuchteschäden auf Actinomyceten (Isolierung der Actinomyceten, morphologische Beschreibung und Bilddokumentation der Proben: 1-8, 10, 13 und 16). Untersuchung der Luftproben, die in den Objekten zu den Materialproben 1-4 erhoben wurden

- 2. Workshop – Actinomyceten-Exposition und toxische Effekte
- Koordinierung des Projektes und der Erstellung des Abschlußberichtes

RWTH Universitätsklinikum Aachen, Institut für Hygiene und Umweltmedizin – Klinikum, Aachen
Prof. Dr. Guido Fischer

- Isolierung und Differenzierung der Schimmelpilze in den Materialproben aus den 15 Wohnungen mit Feuchteschäden (Probe: 1-15)
- Orientierende Untersuchungen über den Zusammenhang von vorliegenden Actinomyceten-Belastungen und gesundheitlichen Beschwerden

Umweltmykologie Dr. Dill und Dr. Trautmann, Berlin
Dr. Christoph Trautmann
Dr. Ingrid Dill

- Festlegung der morphologischen Merkmale, die zur Identifizierung der Actinomyceten genutzt werden sollen
- Definition der Typen von Actinomyceten im Innenraumbereich
- Optimierung der Nährmedien für die Isolierung der Actinomyceten
- Optimierung der Nährmedien für die Differenzierung der Actinomyceten
- Erarbeitung einer Vorlage zum Aufbau einer Arbeitsdokumentation für die Actinomyceten
- Vergleich der Ergebnisse der morphologischen und molekularbiologischen Differenzierung
- Untersuchung von Materialproben aus Wohnungen mit Feuchteschäden auf Actinomyceten (Isolierung der Actinomyceten, morphologische Beschreibung und Bilddokumentation der Proben: 5-7, 9, 12 a und b sowie 14)
- Koordinierung und Erstellung einer Bilddokumentation der isolierten Actinomyceten

Während der Bearbeitungszeit wurden 14 Arbeitsgruppenbesprechungen durchgeführt.

Die verantwortliche Leitung des Projektes lag bei Herrn Dr. Gabrio, Regierungspräsidium Stuttgart, Landesgesundheitsamt.

Seitens des Umweltbundesamtes wurde das Projekt von Frau Dr. Szewzyk wissenschaftlich begleitet.

1.2 Actinomyceten/*Actinobacteria*

Actinobacteria gehören innerhalb der Domäne *Eubacteria* zur phylogenetischen Gruppe der Gram-positiven Prokaryonten mit einem hohen Guanin-Cytosin-Gehalt (> 55%) im Genom (Madigan, 2001; Goodfellow, 1989, Ensign, 1992). Die Klasse *Actinobacteria* wurde 1997 von Stackebrandt *et al*. vorgeschlagen, um der großen morphologischen Diversität der bis zu diesem Zeitpunkt auch als „Actinomyceten" bezeichneten Bakteriengruppe Rechnung zu tragen. In diesem Bericht wird der Begriff „Actinomyceten" auf alle Bakterien angewendet, die der taxonomischen Klasse *Actinobacteria* angehören.

Actinomyceten sind heterotrophe, überwiegend aerobe Bakterien, die in ihren morphologischen, physiologischen und cytochemischen Eigenschaften stark variieren. Zur Klasse der *Actinobacteria* werden die fünf morphologisch und physiologisch sehr heterogenen Ordnungen *Acidimicrobiales*, *Rubrobacterales*, *Coriobacterales*, *Bifidobacteriales* und *Actinomycetales* gezählt. Die Ordnung der *Actinomycetales* setzt sich bereits aus mehr als 150 verschiedenen Gattungen, wie *Streptomyces*, *Nocardia* und *Mycobacterium* zusammen (um nur wenige ausgewählte Beispiele zu nennen), die zum Teil sehr unterschiedliche Ausprägungen koloniemorphologischer Merkmale aufweisen. Innerhalb der Klasse der *Actinobacteria* reicht die morphologische Diversität von Kokken bzw. kokkoiden Zellen bis hin zu komplexen mycelialen Strukturen. Viele Actinomyceten sind in der Lage, ein Substratmycel auszubilden, dessen verzweigte Hyphen während des Wachstums die Agaroberfläche erreichen können und feste, ledrig erscheinende Kolonien bilden (Ensign, 1992, Madigan, 2001; Albrecht und Kämpfer, 2000; Jäckel und Kämpfer, 2003). Aufgrund der Ausbildung eines fädig verzweigten Geflechts von Filamenten bzw. Pseudohyphen (Mycel, Pseudomycel, Ø 0,5-2,0 µm, undefinierter Länge) entstand die frühere Bezeichnung „Strahlenpilze". Diese wird auch heute noch fälschlicherweise genutzt und führt damit zur Verwechslung von mycelbildenden Actinomyceten mit Schimmelpilzen. Bei einigen Arten erheben sich freie Mycelstränge aus den Oberflächenkolonien in den Luftraum (Luftmycel), wodurch ihr häufig charakteristisches pulvriges bzw. samtiges koloniemorphologisches Bild in Erscheinung tritt. Viele Actinomyceten vermehren

sich durch die Ausbildung und Verbreitung von Sporen. Dabei wachsen zunächst die vegetativen Hyphen zu langen Filamenten aus, die zu Sporophoren (Sporenträger) umgebildet werden. An diesen Sporophoren reifen durch Differenzierung der Fragmente Sporen, die an die Luft freigesetzt werden. Zur Identifizierung der Actinomyceten dienten noch bis vor einigen Jahren koloniemorphologische Merkmale, wie das dichte, verschiedengestaltige und farbige Luft- und Substratmycel, sowie die Form und Stellung der Sporen (Ensign, 1992; Cross,1989). Eine große Rolle bei der Unterscheidung von Actinomyceten spielen cytochemische Merkmale, die oft auch als „chemotaxonomische Eigenschaften“ bezeichnet werden. Die Gattungen innerhalb der Actinomyceten werden aufgrund ihrer Zell/ Zellwandbestandteile in vier Gruppen unterteilt. Die Hauptunterscheidungskriterien sind einerseits das Vorkommen der Diaminopimelinsäure (LL-isomer, meso-, ohne DAP) in der Zellwand, und andererseits das Vorhandensein bestimmter Zellwandzuckermoleküle (Xylose, Arabinose, Madurose, Galactose, Rhamnose) (Lechevalier, 1989).

Zu den weiteren wichtigen Eigenschaften vieler Actinomyceten zählt deren Fähigkeit, Sekundärmetabolite zu produzieren. Einzelne Vertreter dieser Klasse produzieren zum Beispiel Chloramphenicol, Polyene, Makrolide, Tetrazykline oder Aminoglycoside wie Streptomycin und Neomycin (Kämpfer, 2006). Weiterhin ist seit langem bekannt, dass einige Actinomyceten Toxine als Stoffwechselprodukte produzieren. Streptomyceten zählen zu den bekanntesten potentiellen Produzenten von antibiotischen und/oder toxischen Wirkstoffen (Puder, 1998). In Bezug auf die Bildung toxischer Stoffe sowie pathogenen Eigenschaften benennt die Kommission für Arbeitsschutz und Normung (Danneberg und Driesel, 1999) die Gattungen *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Frankia*, *Dermatophillus*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Gordona*, *Tsukamurella* und *Actinomadura* als gesundheitlich relevant. Einige Arten der Gattungen *Streptomyces* oder *Saccharopolyspora* können chronische Infektionssyndrome und allergische Reaktionen hervorrufen. Untersuchungen von Kagen *et al*. (1981) sowie Lacey und Crook (1988) zeigten, dass *Streptomyces albus, Saccharopolyspora rectivirgula* u.a. eine Exogen Allergische Alveolitis (EAA; Hypersensitivitätspneumonitis; immunologisch vermittelte, entzündliche Lungenparenchymerkrankung; Farmerlunge) auslösen können. Ebenso beschreiben Minder und Nicod (2005) eine mögliche Hypersensitivitätspneumonitis durch wiederholte Inhalation von

Mikroorganismen, wie z.B. *Saccharopolyspora rectivirgula* und *Mycobacterium immunogenum*. Weiterhin wurden von Mc Neil und Brown (1994) verschiedene *Nocardi*a Spezies, z.B. *N. asteroides* als gesundheitlich relevant eingestuft. Diese können sowohl im tierischen als auch im menschlichen Organismus Infektionen hervorrufen.

Actinomyceten sind ubiquitär verbreitet und leben zumeist saprophytisch, d.h. sie ernähren sich von totem Material und kommen überall dort vor, wo organisches Material abgebaut wird. 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 (Fritsche, 1998; Korn-Wendisch und Kutzner, 1992; Ensign, 1992). Die hohe Toleranz gegenüber Temperatur und pH-Wert, die Fähigkeit bei hohen Salzkonzentrationen zu wachsen, sowie eine große Vielseitigkeit bei der Nutzung unterschiedlicher Substrate ermöglicht z.B. Spezies der Gattungen *Streptomyces* und *Nocardiopsis,* sich in nährstoffarmen Baumaterialien mit wechselndem Feuchtigkeitsgrad zu vermehren (Peltola, 2001a). Ebenso stellen Rintala *et al*. (2002) fest, dass Spezies der Gattung *Streptomyces* auf totem Pflanzenmaterial, Müll, Wurzeln aber auch auf toten Pilzhyphen wachsen. Daher ist es plausibel, dass z.B. *Streptomyces* Spezies in der Lage sind, auf der Oberfläche von Baumaterialien zu wachsen. Sie können direkt aus dem Material stammende Nährstoffe, den organischen Staub auf dem Material und andere Mikroorganismen (Pilze), die dieses Material besiedeln, verwerten. Bei ausreichendem Substratangebot, Feuchtigkeit und Wärme (zum Teil durch die mikrobielle Aktivität erzeugt), kommt es zu einem starken Wachstum der Mikroorganismen und einer reichen Sporenbildung (Kutzner und Kempf, 1996). Aufgrund der hohen Toleranz gegenüber Trockenheit und Wärme können die Sporen vieler Spezies über die Luft verbreitet werden (Danneberg und Driesel, 1999). Die Fähigkeit vieler Actinomyceten austrocknungsresistente Sporen zu bilden, lässt darauf schließen, dass es unter entsprechenden Bedingungen zu einer Freisetzung von Sporen aus kontaminiertem Baumaterial z.B. in die Innenraumluft kommt.

1.2.1 *Actinobacteria* in Baumaterialien/Innenräumen mit Feuchteschäden mit potentieller gesundheitlicher Relevanz

Ausgehend von der ubiquitären Verbreitung, der Sporenbildung bei vielen Vertretern, sowie der potentiellen Fähigkeit toxische Stoffe zu produzieren, tritt die Erforschung der bakteriellen Diversität in Baumaterialien, sowie in Innenräumen mit Feuchteschäden verstärkt in den Vordergrund wissenschaftlicher Untersuchungen. Bisherige Studien bei Feuchteschäden beschränkten sich weitestgehend auf die Erforschung vorliegender Schimmelpilzbelastungen, wobei zunächst eine Gefährdung durch mit Schimmelpilzen vergesellschaftete Mikroorganismen unberücksichtigt blieb. Jedoch konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass mit Schimmelpilzen befallene Materialproben auch Bakterien - sehr häufig Actinomyceten - enthielten (Lorenz *et al*., 2003a, Lorenz und Kroppenstedt, 2003b, Hyvärinen *et al*., 2002, Peltola, 2001a).

Bereits im Jahr 1970 deuten 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 und dem Auftreten von *Nocardia farcinica* im Abrissstaub des Nachbargebäudes. Im Jahr 1991 beschrieb Schaal Infektionen mit *Nocardia farcinica* in einer Klinik. Dieser Bakterienstamm wurde im Vorraum zum OP nachgewiesen, ohne dass die tatsächliche Quelle ermittelt werden konnte.
Toxikologische Untersuchungen mit Maus-Makrophagen (*in-vitro*), sowie im Mausmodell (*in-vivo*) ergaben, dass Bakterien wie *Streptomyces californicus*, *Streptomyces anulatus* und *Mycobacterium terrae*, isoliert aus Baumaterialien bzw. aus Innenraumluft nach Feuchteschäden, Entzündungsreaktionen und zytotoxische Effekte hervorrufen können (Jussila *et al*., 2001, 2002, Roponen *et al.,* 2001 und Hirvonen *et al.,* 1997, 2005). Untersuchungen mit *Streptomyces californicus* und *Mycobacterium terrae* an menschlichen Makrophagen- und Lungenzelllinien konnten diese Ergebnisse bestätigen (Jussila *et al.*, 1999, Huttunen *et al.*, 2001, 2003). In einer weiteren Studie wurden in 23 % der Proben aus Baumaterialien nach Feuchteschäden Mycobakterien, die prinzipiell die Fähigkeit besitzen, Entzündungsreaktionen hervorzurufen, nachgewiesen (Torvinen *et al*. 2006).

Weiterhin wurde im Staub einer Kindertagesstätte die toxische Verbindung Valinomycin nachgewiesen. Als Produzent konnte ein aus diesem Gebäude isolierter *Streptomyces griseus* Stamm identifiziert werden (Andersson *et al*., 1998). Ebenso konnten Mehrer *et al*. (2003) bei fünf Actinomyceten-Stämmen aus Baumaterialien die Bildung von Substanzen mit signifikanter zelltoxischer Wirkung auf Schweinenierenzellen nachweisen.

1.3 Zielstellung

Epidemiologische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Feuchteschäden/Schimmelpilzbefall im Innenraum und gesundheitlichen Beschwerden. Es konnten allerdings bislang keine kausalen Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen von Schimmelpilzen und den Krankheitssymptomen nachgewiesen werden. Auf den feuchten Materialien im Innenraum wachsen aber nicht nur Schimmelpilze sondern auch andere Mikroorganismen wie Bakterien und Protozoen. Insbesondere Actinomyceten – Bakterien, die teilweise wie Schimmelpilze in Fäden wachsen und Sporen bilden – wurden immer wieder nachgewiesen.

Da viele Actinomyceten als Toxinproduzenten bekannt sind (siehe 1.2), sollte untersucht werden, wie häufig Actinomyceten in Innenräumen vorkommen und ob bestimmte Arten besonders dominieren. Eine Exposition durch Actinomyceten im Innenraum kann auf einem Befall von Baumaterialien oder Einrichtungsgegenständen mit Actinomyceten beruhen. Durch die Isolierung und Differenzierung der in den unterschiedlichen Feuchteschadensfällen (16 Wohnungen) auftretenden Actinomyceten sollten die für Innenraumschäden charakteristischen Actinomyceten ermittelt werden.

Darüber hinaus sollten erste Untersuchungen zur gesundheitlichen Relevanz der häufigsten Actinomyceten (anhand toxikologischer Zelltests) durchgeführt werden. Dabei sollten sowohl die aus den Materialproben isolierten Actinomyceten als auch die Eluate der Materialproben getestet werden. Das toxische Potenzial der Eluate aus den Materialproben wurde an Schweinenierenzellen (SK-Zellen) getestet. Die immuno-toxische Wirkung der Actinomyceten wurde *in vitro* an Bronchialepithelzellen (A 549) und an Immunzellen (Makrophagen, RAW 264.7) untersucht.

Geprüft werden sollte bei ausgewählten Objekten auch, ob und in welchem Maße die in der befallenen Materialprobe dominant vorliegenden Actinomyceten auch in der Luft nachgewiesen werden können. Außerdem war von Interesse, ob eine Korrelation von Feuchteschäden und den assoziierten Actinomyceten-Arten sowie den parallel auftretenden Schimmelpilzen vorliegt.

Für die Praxis war es von besonderer Bedeutung, ein robustes Verfahren zur Isolierung und anschließenden Differenzierung von Actinomyceten aus Material- und Luftproben zu entwickeln und zu validieren. Vorrangige Aufgabe dabei war, einerseits die Nährmedien zu ermitteln, mit denen möglichst alle in der Probe vorliegenden Actinomyceten-Arten isoliert werden können. Andererseits sollten die Nährmedien ausgewählt werden, auf denen sich die morphologischen Merkmale der Actinomyceten am besten ausprägen. Bei der Auswahl der Nährmedien war ein Kompromiss zu finden zwischen einer Vielzahl von Nährmedien, mit denen sehr viele verschiedene Actinomyceten-Arten mit unterschiedlichen morphologischen Merkmalen erfasst werden können und der Notwendigkeit, sich für die Praxis auf eine überschaubare Anzahl von Nährmedien zu beschränken, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Laboren sicherzustellen. Um die Auswahl der für die Kultivierung zu verwendenden Medien zu unterstützen, wurde die Diversität der Actinomyceten auf den unterschiedlichen Nährmedien molekularbiologisch mit Hilfe eines SSCP – Fingerprints („Single Strand Conformation Polymorphism“) untersucht.

Die Auswahl der Nährmedien schloss die Festlegung der Kultivierungsbedingungen und des Hemmstoffes zur Unterdrückung des Schimmelpilzwachstums mit ein. Der auszuwählende Hemmstoff sollte das Wachstum von Schimmelpilzen möglichst unterdrücken, das Wachstum der Actinomyceten und die Ausprägung ihrer typischen morphologischen Merkmale aber nicht beeinträchtigen. Da die Ausprägung der morphologischen Merkmale von der Zusammensetzung und der Zubereitungsart der Nährmedien abhängig ist, war zu prüfen, wie die Gleichwertigkeit der Nährmedien für alle Verbundpartner sichergestellt werden kann. Die Beschreibung der morphologischen Merkmale der Actinomyceten beruht oft auf subjektiven Wahrnehmungen und ist von den konkreten Wachstumsbedingungen sowie vom Wachstumszustand abhängig. Durch die Erstellung eines Dokumentationsblattes und

eines gemeinsamen Trainings wurde sichergestellt, dass eine hohe Vergleichbarkeit bei der Beschreibung der morphologischen Merkmale der Actinomyceten durch die einzelnen Verbundpartner gegeben war.

Für die Differenzierung der isolierten Actinomyceten war zu prüfen, welche biochemischen Untersuchungsverfahren (Bestimmung der Diaminopimelinsäure, des Fettsäurespektrums usw.) bezüglich ihrer Aussagekraft und ihrer Praktikabilität zur weiteren Charakterisierung der Actinomyceten am geeignetsten sind. Diese Verfahren sollten möglichst auch in Routineuntersuchungen anderer Labore anwendbar sein.

Es war davon auszugehen, dass eine eindeutige Identifizierung der Actinomyceten auf der Basis morphologischer Merkmale und biochemischer Untersuchungsmethoden nicht möglich ist. Folglich waren molekularbiologische Analysen der 16S rRNA-Gen-Sequenzen der isolierten Actinomyceten notwendig, um zumindest eine eindeutige Identifizierung auf der Gattungsebene zu ermöglichen.

Vergleichend zu den kultivierungsbasierten Nachweismethoden sollte durch kultivierungsunabhängige Verfahren untersucht werden, ob sich in den Materialproben Actinomyceten befinden, die nicht kultivierbar sind und damit bei der Verwendung von kultivierungsbasierten Methoden nicht nachgewiesen werden können. Dazu sollte eine Klonierung zur Untersuchung der Diversität der Actinomyceten in den Materialproben durchgeführt werden. Hierbei war die Auswahl geeigneter Primersysteme entscheidend, einerseits zur Erstellung einer Klonbibliothek und andererseits für ein Screening der Klon-Kolonien auf die Zugehörigkeit zu den Actinomyceten. Die Analyse der vorkommenden Actinomyceten-Gattungen sollte auf der Basis der 16S rRNA-Gen-Sequenzen erfolgen.

Nach Etablierung der Analysenverfahren sollten in mindestens 15 Innenräumen von Actinomyceten befallene Baumaterialien untersucht werden, um die bei Innenraumschäden vorliegenden wichtigsten Actinomyceten-Gattungen bzw. -arten zu bestimmen.

1.4 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt „Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in Innenräumen“ wurde als Verbundprojekt von 6 Partnern bearbeitet. Die Planung des Projektes erfolgte in einer 2004 etablierten informellen Arbeitsgruppe „Actinomyceten im Innenraum“. An dieser Arbeitsgruppe beteiligten sich neben den Verbundpartnern noch Herr Dr. Degen (Bayerisches Institut für Angewandte Umweltforschung und -technik GmbH (BIfA), Augsburg), Herr Prof. Dr. Kroppenstedt (DSMZ Braunschweig), Frau Dr. Tesseraux (UMEG Karlsruhe) und Herr Prof. Dr. Zeeck (Universität Göttingen).

Die Ziele des Projektes wurden gemeinsam in dieser Arbeitsgruppe abgestimmt und formuliert. Mit einem Statuskolloquium „Isolierung und morphologische Identifizierung von Actinomyceten“ vom 26.01 bis 28.01.2005 im Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut in Jena wurde nach Bewilligung des Vorhabens durch den Projektträger die Arbeit an dem Vorhaben begonnen. Dieses Kolloquium diente dazu, den Stand des Wissens auf dem Gebiet des morphologischen und biochemischen Nachweises der Actinomyceten zusammenzufassen und die Arbeit zwischen den einzelnen Verbundpartnern aufzuteilen. An diesem Kolloquium nahmen als wissenschaftliche Berater Frau Dr. Rintala, National Public Health Institute, Kuopio, Finnland und Herr Dr. Wink, *Sanofi-Aventis* Deutschland GmbH, Frankfurt teil.

Es wurde festgelegt, dass die Probennahme und deren Dokumentation vom Institut Dr. Lorenz – Institut Innenraumdiagnostik, Düsseldorf vorgenommen wird. Die Isolierung der Actinomyceten und deren morphologischer und biochemischer Nachweis sollte durch das Hans-Knöll-Institut, Jena, das LGA, Stuttgart und die Umweltmykologie, Berlin erfolgen. Die Form der Aufarbeitung der Proben sowie ein Formblatt zur Dokumentation der Isolate wurden abgestimmt. Außerdem wurde festgelegt, in welcher Form die isolierten Actinomyceten zu konservieren sind. Die Partner einigten sich darauf, dass in der Anfangsphase die Isolierung der Actinomyceten parallel von allen Verbundpartnern durchgeführt wird und dass das Hans-Knöll-Institut, Jena aufgrund seiner langjährigen Erfahrung die von den verschiedenen Partnern isolierten und beschriebenen Actinomyceten zusammenführt und jeweils einen Stamm für die weitere molekularbiologische Differenzierung

auswählt. In der Vorphase (bis zur 4. Probe) sollte die Isolierung der Actinomyceten auf Actinomyceten-Agar, Gauze-Agar, BHI-Agar (bei 28 °C und 37 °C) und CM-Agar erfolgen und die Identifizierung auf ISP-3-Agar, ISP-2-Agar, M 79-Agar und BHI-Agar. Nach Abschluss der Vorphase einigte man sich darauf, die Isolierung der Actinomyceten auf Gauze-Agar, BHI-Agar, CM-Agar und die Identifizierung der Myzelbildner auf ISP-3-Agar und der nicht-myzelbildenden Actinomyceten auf BHI-Agar vorzunehmen (s. 2 .3.1). Den Projektteilnehmern wurde es freigestellt, zusätzlich weitere Nährmedien zur Isolierung und Identifizierung der Actinomyceten zu nutzen.
Die Bereitstellung der Nährmedien erfolgte durch das LGA, Stuttgart.

Die molekularbiologischen Untersuchungen sollten von der Universität Gießen in Zusammenarbeit mit dem Umweltbundesamt erfolgen. Die Universität Aachen übernahm die Aufgabe, die Schimmelpilze in den Materialproben zu bestimmen. Außerdem wurde die Universität Aachen und das Institut Dr. Lorenz – Institut Innenraumdiagnostik damit beauftragt, erste orientierende Untersuchungen zur gesundheitlichen Wirkung von Actinomyceten an ausgewählten Zelllinien vorzunehmen.

Vom 30.06. bis 01.07.2006 fand ein zweiter Workshop „Actinomyceten-Exposition und toxische Effekte“ im LGA statt. Ziel des Workshops war es, gemeinsam mit renommierten Wissenschaftlern aus Deutschland den Stand des Wissens auf diesem Gebiet zu erarbeiten und eine Strategie für die Durchführung der vorgesehenen toxikologischen Untersuchungen abzustimmen. Zuerst stellten Herr Prof. Dr. Zeeck, Herr Prof. Dr. Fiedler (Universität Tübingen) und Frau Dr. Sattler (HKI Jena) den Wissensstand zum Thema „Toxische Wirkung von Actinomyceten aus der Sicht der Naturstoffforschung“ vor. Danach trug Herr Prof. Schaal (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) die „Pathogene Wirkung von Actinomyceten“ vor. Erste Erfahrungen über „*in-vitro*-Modellversuche zur Untersuchung der gesundheitlichen Wirkung von Actinomyceten“ wurden von Herrn Prof. Dr. Gareis (Max-Rubner-Institut, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Kulmbach), Herrn Dr. Prof. Shakibaei (LMU München), Herrn Dr. Lorenz und Herrn Prof. Dr. Fischer dargestellt. Frau Dr. Grummt (Umweltbundesamt), Frau Prof. Dr. Hornberg (Fakultät für

Gesundheitswissenschaften, Universität Bielefeld) und Herr Dr. Wiesmüller (Institut für Hygiene und Umweltmedizin des Universitätsklinikums Aachen) erläuterten aus toxikologischer und umweltmedizinischer Sicht daraufhin „Mögliche Modelle zur In-vitro-Untersuchung der gesundheitlichen Wirkung von Actinomyceten und sinnvolle Endpunkte für diese Untersuchungen unter dem Aspekt der Exposition über den Innenraum“. Anschließend berichtete Frau Dr. Rintala über die „Untersuchungen zur gesundheitlichen Wirkung von Actinomyceten in Finnland“. „Analytische Aspekte bezüglich der Abschätzung der Exposition durch Actinomyceten, deren Stoffwechselprodukte und Zellbestandteile“ wurden von Herrn Dr. Wink vorgestellt. In der Abschlussdiskussion wurde gemeinsam versucht zu klären, welche in-vitro-Modelle für die orientierenden Versuche zur Untersuchung der gesundheitlichen Wirkung von Actinomyceten in dem Verbundprojekt genutzt werden sollten. Die Beiträge der teilnehmenden Experten wurden in einem Tagungsband zusammengefasst.

Während des Workshops stimmten sich die Verbundpartner auch endgültig dahingehend ab, künftig den Actinomyceten-Agar (28 °C), den Gauze-Agar (28 °C) und den BHI-Agar (bei 28 °C und 37 °C) mit Zusatz von Natamycin als Nährmedien zur Isolierung der Actinomyceten zu verwenden. Für die morphologische Differenzierung wurden folgende Nährmedien ohne Fungizidzusatz ausgewählt: ISP-2-Agar, ISP-3-Agar, M 79-Agar und BHI-Agar.

Ein dritter Workshop vom 24.11. bis 25.11.2006 an der Universität Gießen stand unter dem Thema „Molekularbiologische Identifizierung von Actinomyceten“.
Zur Fokussierung der Arbeiten wurde anlässlich dieses Treffens beschlossen, dass nach der Aufarbeitung der 6. Probe die Isolierung und deren morphologische Beschreibung nur noch von einem Partner vorgenommen wird. Dies war möglich, da die bisherigen Versuche in den unterschiedlichen Laboratorien grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse erbracht hatten. Der Schlüssel der künftigen Probenverteilung wurde festgelegt.

Die Verbundpartner trafen sich in regelmäßigen Abständen, um sich gegenseitig über den Bearbeitungsstand des Projektes zu informieren und den Fortgang der weiteren Arbeiten abzustimmen. In Vorträgen informierten einzelne Projektmitglieder

auf wissenschaftlichen Tagungen über methodische Aspekte bei der Isolierung und Bestimmung von Actinomyceten.

Aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes, insbesondere bei der molekularbiologischen Identifizierung der Actinomyceten, war es erforderlich, das Projekt kostenneutral vom 01.05.08 bis zum 30.09.2008 zu verlängern.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl von Objekten und Probenahmestellen

Ziel des Projektes war es, u.a. einen möglichst breiten Überblick darüber zu erhalten, welche Actinomyceten im Zusammenhang mit relevanten Feuchtigkeitsschäden Innenräumen auftreten können. Um diesem Ziel möglichst nahe zu kommen, wurde versucht, die vermutlich einflussreichsten Parameter in einer möglichst umfassenden Bandbreite zu erfassen.

Einfluss auf das Wachstum bestimmter Actinomyceten in Innenräumen haben insbesondere die Temperatur, die Feuchtigkeitsverhältnisse, der pH-Wert, das Schadensalter, das Probenmaterial und auch die Organismenquelle (z.B. Gebäudeteile mit oder ohne Kontakt zum Erdreich). Bei den entnommenen 18 Proben aus 16 Gebäuden war es nicht möglich, statistisch abgesicherte Ergebnisse zu allen Parametern zu erhalten. Es wurde jedoch angestrebt, Aussagen darüber machen zu können, ob die Materialien, Temperatur und Feuchte einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Actinomycetenpopulation haben.

Zu Beginn des Projektes wurden folgende Parameter-Kombinationen (= PK) definiert (Tab.1), mit dem Ziel, zu jeder PK mindestens ein passendes Objekt zu finden.

Tab. 1: Definiten der Parameterkombination

Temperatur	Feuchtigkeit	Schadensalter	Parameterkombination
Gering (Kellertemperatur) < 17 °C	dauerhaft hoch	sehr alt (viele Jahre)	PK1
		jünger als 1 Jahr	PK2
	schwankend oder niedrig	sehr alt (viele Jahre)	PK3
		jünger als 1 Jahr	PK4
„Hoch“ (Raumtemperatur) oder schwankend	dauerhaft hoch	sehr alt (viele Jahre)	PK5
		jünger als 1 Jahr	PK6
	schwankend oder niedrig	sehr alt (viele Jahre)	PK7
		jünger als 1 Jahr	PK8

Der Parameter pH-Wert wurde bei der Vorauswahl nicht berücksichtigt, sondern erst nach der Probenahme ermittelt.

Die Auswahl der Parameter entspricht in der Praxis folgenden Schadensarten:

PK1: Altbau-Keller mit Durchfeuchtung von außen.

PK2: Neubau-Keller mit mangelhafter Gebäudeabdichtung.

PK3: Altbau-Keller mit funktionierender Gebäudeabdichtung, aber Kondensationseffekten im Sommer.

PK4: „Neubau“-Keller mit raumseitiger Wärmedämmung und Kondensationseffekten im Sommer.

PK5: Alter Schaden in den oberen Etagen, z.B. im Bereich der Sanitäranlagen.

PK6: Junger Schaden in den oberen Etagen.

PK7: Alter Kondensationsschaden in den oberen Etagen.

PK8: Junger Kondensationsschaden oder Schaden mit geringer oder schwankender Freisetzung von Feuchtigkeit in den oberen Etagen.

Es wurden im Rahmen der Projektlaufzeit folgende Objekte zur Probenahme ausgewählt (Tab. 2).

Tab. 2: Charakterisierung der Objekte

Objekt -Nr.	**Alter (Baujahr)**	**Schadensstelle / -ursache / -alter**	**Temperatur**		**Feuchtigkeit**		**PK ***
			Vermutet	**gemessen**	**vermutet**	**gemessen**	
01	1900	KG, Außenwand / Abdichtung / Viele Jahre	< 17 °C (Keller)	9,9 °C	dauerhaft hoch	100 %	**1**
02	1982	UG, Außenwand/ vermutlich hygrothermische Effekte / jünger als 2 Jahre (Einbau raumseitiger Dämmung)	< 17 °C (Schaden auf der kalten Seite der Dämmung)	13-15 °C	schwankend, vor allem im Sommer hoch	40 – 60 %	**4**
03	1980	UG, Schlafzimmer / Rohrschaden / jünger als 2 Jahre	< 17 °C (Fußboden im UG)	16,9 °C		dauerhaft hoch seit Rohrschaden / 95,2 %	**2**
04	1954	Kinderzimmer, 1. OG/ hygrothermische Effekte / vermutlich alt	mindestens zeitweise > 17 °C	16,8 °C	schwankend	59,7 %	**7**
05	1971	EG, Bad / Rohrschaden / alt	> 17 °C	20,4 °C	ehemals hoch	65,5 %	**5**
06	1971	EG Küche / Schaden im Bad / Alt	> 17 °C	21,9 °C	ehemals hoch	88,3 %	**5**

Ob-jekt -Nr.	Alter (Bau-jahr)	Schadensstelle / -ursache / -alter	Temperatur		Feuchtigkeit		PK *
			Vermutet	gemessen	vermutet	gemessen	
07	Unbe-kannt, Altbau	Küche, 1. OG, Außenwand / Fassadenrisse / vermutlich alt	> 17 °C	21,1 °C	schwankend	99,7%	**7**
08	1991	DG, Flur / undichte Stelle im Duschbereich / vermutlich jünger als 2 Jahre	> 17 °C	19,0 °C	dauerhaft hoch	97,9%	**6**
09	1920	EG, Schlafzimmer-Außenwand / aufsteigende Feuchte oder hygrothermisch / sehr alt (viele Jahre)	< 17 °C	14,7 °C	niedrig oder schwankend	72,1 %	**3**
10	vor 1800	EG, Bad, / aufsteigend oder Schornstein / sehr alt (viele Jahre)	> 17 °C	18,8 °C	dauerhaft hoch	82,9 %	**5**
11	60er Jahre	Kinderzimmer – Innenwand / vermutl. Abflussschaden / vermutlich jünger als 2 Jahre	> 17 °C	21,2 °C	eher niedrig	66,8%	**8**
12	1934	1.OG, Kinderzimmer, Außenwand, / Fassadenschaden / jünger als 2 Jahre	zeitweise > 17 °C	24,3 – 24,8 °C (Sommer)	schwankend	93,7 - 96,7 %	**8**
13	2005	EG, Büros, Fußboden / Abdichtung/Neubau	< 17 °C (unter Dämmung)	20,1-21,1 °C	anfangs hoch	Anfangs 93% später 39% **	**6**
14	1960	UG, Wäschekeller / Abdichtung / älter als 2 Jahre	< 17 °C	22,1 °C	dauerhaft hoch	95,9 %	**5**
15	1900	UG, Kellerraum / Abdichtung / sehr alt	< 17 °C	15,7 °C	dauerhaft hoch	90,2 %	**5**
16	ca. 1900	UG, Keller, Außenwand / Abdichtung / sehr alt	< 17 °C	15-17	dauerhaft hoch	> 90 %	**1**

* Die Einstufung erfolgte nicht allein aufgrund der Vermutungen, sondern unter Berücksichtigung der Messwerte und der Schadensursache und evtl. auch unter Berücksichtigung des Schadensverlaufes, soweit dies bekannt ist.
** Es handelt sich um einen Schaden mit sehr hohen Mengen an Feuchtigkeit während der Schadensentwicklung. Bei der Probenahme für dieses Projekt war zwischenzeitlich bereits die Ursache beseitigt und eine technische Trocknung durchgeführt. Zur Schadensbeschreibung wurde deshalb der Zustand vor Ursachenbeseitigung zu Grunde gelegt.
PK = Parameterkombination

Für jede Parameter-Kombination wurde somit mindestens ein Objekt bzw. eine Schadensart gefunden.

2.2 Beschreibung der Probenahmestellen

Für jedes Objekt wurde ein Probenahmedatenblatt mit Angaben zur Objektbeschreibung, zu gesundheitlichen Problemen der Bewohner, zur Probenahme und zum Probenversand sowie zu den Ergebnissen der Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen erstellt (siehe Anhang).

2.2.1 Probenahme, Transport und Lagerung der Materialproben

In den ausgewählten Objekten bzw. Schadensbereichen wurden Materialproben, sowie in den ersten Objekten Luftkeimmessungen und dort, wo es gestattet wurde, Luftpartikelsammlungen durchgeführt.

Durchgeführte Luftkeimmessungen sind den Objektdatenblättern zu entnehmen (siehe Anhang).

Die Materialproben wurden mit gereinigtem Werkzeug (Wischdesinfektion) aus dem jeweiligen Bauteil entnommen. Die Proben wurden sofort in dichte Behältnisse verpackt. Schüttmaterial wurde in jeweils neuen unbenutzten Glasbehältern verpackt, die komplett gefüllt wurden. KMF-Dämmmaterial oder Styropor wurde in Aluminium-Folie verpackt. Soweit händisch gearbeitet werden musste, wurden Nitrilkautschuk-Einweghandschuhe getragen.

Am Tag der Probenahme wurden die Proben über Nacht im Laborkühlschrank aufbewahrt.

Jeweils am Tag nach den Probenahme wurden die Materialien zerkleinert. Putz wurde zerstoßen und Styropor oder Dämmwolle mit einem Messer in kleine Teile zerschnitten. Danach wurden die zerkleinerten Materialien in einem Glasbehälter durch 10minütiges Schütteln vermischt.

Das zerkleinerte und vermischte Material wurde mit der Laborwaage gewogen und je nach Gesamtmenge gleiche Teile für alle Projektpartner, die vom jeweiligen Material Proben erhalten sollten, abgewogen.

Die abgewogenen Teilproben wurden in Aluminiumfolie und diese wiederum in einer beschrifteten Kunststofftüte verpackt und noch am gleichen Tag an die Projektpartner verschickt.

Rückstellmaterial wurde im Laborkühlschrank aufbewahrt.

2.2.2 Probenahme, Transport und Lagerung der Luftproben

Die Luftkeimessungen wurden mit einem Impaktor der Fa. Merck (MAS 100) durchgeführt. Es wurden zur Sammlung Nährmedien eingesetzt, die im LGA hergestellt und dem Institut für Innenraumdiagnostik zugeschickt wurden.
Im 1. und 2. Objekt wurden jeweils 2 x 4 Nährböden mit jeweils 100 l beaufschlagt.
im 3. und 4. Objekt zusätzlich jeweils 2 x 4 Nährböden mit 200 l.
Die Luftprobenahmen erfolgten in den gleichen Räumen, in denen die Materialproben entnommen wurden.

Zur Sammlung luftgetragener Partikel mittels Filtration wurde eine Probenahmepumpe der Fa. Holbach eingesetzt. An diese Pumpe wurde ein mit Polycabonatfiltern bestückter Probenhalter angeschlossen. Die Pumpe und der Probenhalter wurden vom LGA zur Verfügung gestellt.
Zwischen Filterhalter und Pumpe wurde ein Gaszähler zur Ermittlung der angesaugten Luftmenge installiert.
Wegen der starken Geräuschentwicklung waren Langzeitmessungen nicht in jedem Objekt möglich. Auch wurde in Einzelfällen eine Langzeitmessung von den Bewohnern nicht gewünscht, u.a. auch weil es keine Möglichkeit gab, zum gewünschten Zeitpunkt die Geräte abzuholen.

Die Laufzeit der Pumpen war aus logistischen Gründen, aber auch wegen der zum Teil durch die Bewohner vorgegebenen Zeitbegrenzung der Probenahme unterschiedlich, was zur Folge hatte, dass das gesammelte Luftvolumen zwischen 4,85 m^3 bis 46,4 m^3 schwankte.

2.2.3 Messungen im Zusammenhang mit der Probenahme

Es wurde sowohl elektronisch wie auch mit Indikatorpaper der pH-Wert der Materialien im Labor gemessen.

Vor Ort wurden mittels hygroskopischer Messung die Temperatur und die relative Feuchtigkeit im Bauteil an der Stelle, an der die Materialprobe entnommen wurde, ermittelt. Es wurde hierbei ein Messgerät der Fa. Ahlborn mit einem Temperatur-Feuchtefühler eingesetzt.

Es sollten auch mittels Datenloggern Langzeit-Raumklimamessungen durchgeführt werden. Dies war jedoch nur in den Objekten 1 und 2 möglich, da in anderen Objekten die Sanierung bereits erfolgt war, ein Auszug bevorstand oder es andere Hindernisse gab. Deshalb wurde schließlich auf diese Messungen verzichtet.
In den Objekten 1 und 2 erfolgten die Langzeitmessungen mittels Datenlogger von Gann.

In Objekt 1 ergab die hygrothermische Messung einen Feuchtewert von 100%. Aus diesem Grund wurde ergänzend eine gravimetrische Messung durchgeführt. Hierbei wird das Material unmittelbar nach der Probenahme gewogen und anschließend bei 15 °C so lange getrocknet bis kein Gewichtsverlust mehr auftritt. Der Gewichtsverlust wird auf das Gewicht der Trockensubstanz bezogen und als Materialfeuchte in % angegeben.

2.3 Kultivierungsabhängige Analysen

Die Proben wurden von folgenden Verbundpartnern aufgearbeitet, quantifiziert und so weit als möglich identifiziert:

Probe	Bearbeitet durch
01 Putz	LGA, Umweltmykologie, Hans-Knöll-Institut, Universität-Gießen, RWTH Aachen
01 Luft	LGA, Universität-Gießen
02 Dämmwolle	LGA, Umweltmykologie, Hans-Knöll-Institut, RWTH Aachen
02 Luft	LGA
03 Styropor	LGA, Umweltmykologie, Hans-Knöll-Institut, RWTH Aachen
03 Luft	LGA
04 Dämmwolle	LGA, Umweltmykologie, Hans-Knöll-Institut, RWTH Aachen
04 Luft	LGA
05 mineralische Schütte	LGA, Umweltmykologie, Hans-Knöll-Institut
06 Wandputz	LGA, Umweltmykologie, Hans-Knöll-Institut
07 Wandputz	LGA
08 Putz	LGA
09 Putz	Umweltmykologie

10 Lehmputz	LGA
11 Wandputz	Hans-Knöll-Institut
12 A Putz	Umweltmykologie
12 B Putz	Umweltmykologie
13 A Styropor	LGA
13 B Styropor	LGA
14 Tapete	Umweltmykologie
15 Putz (Kellerraum)	Hans-Knöll-Institut
16 Putz	LGA

2.3.1 Nährmedien zur Kultivierung von Actinomyceten

Eine Charakterisierung der Actinomyceten beinhaltet unter anderem eine detaillierte Erfassung morphologischer Merkmale, die eine Kultivierung zur Voraussetzung hat. Die Kultivierung setzt sich zusammen aus der

- Isolierung auf verschiedenen Nährmedien
- Subkultivierung der Isolate auf verschiedenen Nährmedien
- Konservierung der Reinkulturen

Die Untersuchungen stellen eine erste Bestandsaufnahme der in Materialproben vorkommenden Actinomyceten dar.

Actinomyceten sind chemoorganoheterotrophe Mikroorganismen, die in der Regel mit einer organischen C-Quelle (z.B. Glucose, Glycerin, Stärke) , einer organischen oder anorganischen N-Quelle (NH_4, NO_3) und Mineralsalzen wachsen.

- **Inkubation:** Actinomyceten werden üblicherweise bei 28° bis 30° kultiviert. In einigen Gattungen kommen jedoch auch psychrophile und/oder thermophile Organismen vor.
- **Sauerstoffbedarf:** Actinomyceten sind meist aerobe Organismen. Sie wachsen auf der Oberfläche fester und flüssiger Medien bzw. submers in geschüttelter Nährlösung. In Schüttelagarkultur zeigen sie mit nährstoffarmen Medien ein mikroaerophiles Wachstum.
- **Kultivierung auf Agaroberflächen – Luftmyzelbildung:** Bei der Kultivierung als Oberflächenkulturen bilden viele Actinomyceten ein Luftmyzel, wobei die apikalen Enden der Hyphen in Sporen zerfallen. Das Luftmyzel, mit der Bildung großer Mengen an Luftmyzelsporen sowie der typischen Luftmyzel-

Farbe ist zum einen für die Gewinnung des Impfmaterials wichtig, zum anderen für die Feststellung einiger taxonomischer Merkmale. Unter optimalen Bedingungen erfolgt innerhalb von 5 bis 15 Tagen eine typische Luftmycel-Bildung.

- **Zusatz eines Antibiotikums:** Da sich in Materialproben außer Bakterien meist auch Schimmelpilze befinden, ist der Zusatz eines Antibiotikums zur Wachstumshemmung der Schimmelpilze insbesondere zu den für die Isolierung der Actinomyceten verwendeten Nährmedien unverzichtbar. Vergleichsuntersuchungen mit Zusatz von Cycloheximid, Natamycin, Amphotericin B und Fluconazol in unterschiedlichen Konzentrationen haben ergeben, dass mit einem Zusatz von 0,1g /L Natamycin Konzentrat (86 % - 93 %) der Firma AddFood die beste Hemmung der Schimmelpilze erreicht wurde.
  Dazu wurden 0,1 g des pulverförmigen Natamycins in 10 ml 96 % Ethanol gelöst und dem Nährmedium vor dem Autoklavieren zugegeben.

Da kein universell einsetzbares Medium beschrieben ist, auf dem alle Actinomyceten-Arten zu guter Sporulation kommen, müssen für den Nachweis von Actinomyceten aus Umweltproben mehrere Medien parallel verwendet werden. Aus einer Anzahl möglicher, durch das internationale Streptomycetenprojekt (ISP) zwischen 1966 und 1972 untersuchten Nährmedien, haben sich die unter 2.3.1.2 und 2.3.1.3 beschriebenen Medien besonders bewährt.

2.3.1.1 Herstellung der Nährmedien

Für die Medienzubereitung wurden Bestandteile von gleichbleibender Qualität und Chemikalien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ verwendet. Alternativ wurde ein entsprechendes Fertigmedium verwendet und nach den Vorschriften des Herstellers zubereitet. Als Wasser zum Ansetzen der wässrigen Lösungen und Nährböden wurde destilliertes Wasser oder Wasser mit vergleichbarer Qualität (im Text als Aqua dest. bezeichnet), frei von Substanzen, die das Wachstum der Bakterien unter den Testbedingungen hemmen könnten, verwendet.

Für alle Medien wurden die Einzelkomponenten in 1000 ml Aqua dest. suspendiert. Zu dieser Suspension wurde nach Bedarf 0,1 g Natamycin (gelöst in 10 ml Ethanol

96 %, reinst) zugegeben. Falls nötig wurde der pH-Wert eingestellt, sodass er nach dem Autoklavieren dem in der Rezeptur angegebenen Wert entsprach.

Alle Medien wurden bei (121 ± 3) °C (15 ± 1) min autoklaviert, auf ca. 50 °C abgekühlt und zu je ca. 20 ml in Petrischalen mit Nocken (94/16 mm) dosiert.

Die erkalteten Petrischalen wurden austrocknungsgeschützt bei (5 ± 3) °C für längstens 4 Wochen aufbewahrt.

2.3.1.2 Isolierungsmedien

Als Isolierungsmedien wurden der Actinomyceten-Isolationsagar der Firma Difco (im Weiteren Actinomyceten-Agar), der Mineral-Agar nach Gauze (im Weiteren Gauze-Agar), der Brain Heart Infusion Agar (im Weiteren BHI-Agar), der Casein-Mineral-Agar (im Weiteren CM-Agar), sowie der Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (im Weiteren CASO-Agar) verwendet. Der BHI-Agar eignet sich bevorzugt für die Anzucht von Nicht-Myzelbildnern wie coryneforme Actinomyceten und Mycobakterien; der CM-Agar eignet sich insbesondere für die Anzucht von Sporoactinomyceten und Nocardioformen (Rezepturen siehe Anhang).
Bei der quantitativen Bestimmung der Actinomyceten war kein Unterschied zwischen dem Actinomyceten-Agar und den anderen zur Isolierung verwendeten Nährmedien festzustellen. Die farbliche Ausprägung des Luft- und Substratmycels sowie des löslichen Pigments war beim Actinomyceten-Agar jedoch schwach. Daher wurde ab Probe 9 auf den Actinomyceten-Agar zur Isolierung der Actinomyceten verzichtet.

2.3.1.3 Medien zur Subkultivierung

Als Medien zur Subkultivierung wurden der Hafermehlagar (modifizierter ISP-3-Agar, im Weiteren ISP-3-Agar), das Medium 79 (im Weiteren M 79-Agar), BHI- und Glucose-Yeast-Malt-Agar (im Weiteren ISP-2-Agar) verwendet. Die Herstellung dieser Nährmedien erfolgte ohne Zusatz von Natamycin (Rezepturen siehe Anhang). Der Unterschied zwischen dem modifizierten ISP-3- und dem Original-ISP-3-Agar besteht in der Verwendung von Hafermehl (Firma Holo, Reformhaus) anstelle von Haferflocken. Nachfolgend wird diese modifizierte Rezeptur als ISP-3 -Agar bezeichnet.
Für alle Projektteilnehmer wurden die Nährmedien im LGA hergestellt.

2.3.2 Nährmedien zur Kultivierung von Pilzen

Die Aufschwämmungen der Baumaterialien wurden auf DG-18 Agar in Kombination mit Malzextrakt-Agar (MEA) ausplattiert. Nur diejenigen Fadenpilzarten, die ausschließlich auf MEA vorkamen wurden zusätzlich zu den Arten auf DG-18 in die Auswertung mit einbezogen (siehe VDI 4300-10 und ISO 16000-17). Zur Identifizierung wurden die einzelnen Arten je nach Gattungszugehörigkeit auf Medien überimpft, die in der internationalen Literatur und den jeweiligen Monographien als Standard angegeben werden (VDI 4300-10).

2.3.3 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten der Actinomyceten

2.3.3.1 Vorbereitung der Materialproben

Die zerkleinerte Materialprobe wurde mit dem 10-fachen ihres Gewichts mit einer 0,9 % NaCl/0,01 % TWEEN 80-Lösung versetzt und 15 min mit einem Rundschüttler (500 U/min) geschüttelt.

Von der Ausgangssuspension wurde eine aufsteigende Verdünnung bis 1:100 000 hergestellt. 100 µl von jeder Verdünnungsstufe wurden in 3 Parallelen pro Nährmedium und Verdünnungsstufe mit dem Drigalskispatel gleichmäßig auf den zur Isolierung genannten Nährmedien ausgespatelt.

Zur Isolierung der Actinomyceten wurden bei den Proben 1-8 folgende Nährmedien mit Zusatz von Natamycin zur Hemmung der Schimmelpilze genutzt: Actinomyceten-Agar, Gauze-Agar, BHI-Agar, CM-Agar und CASO-Agar.

2.3.3.2 Kultivierung der Material- und Luftproben

Die Bebrütung der Nährmedien erfolgte mit dem Deckel der Petrischalen nach unten im Brutschrank im Dunkeln bei (28 ± 2) °C. Die Bebrütungsdauer betrug 10 Tage bis 3 Wochen.

2.3.3.3 Auszählung und Berechnung der KBE (koloniebildende Einheiten)

Die bei der Quantifizierung und Identifizierung erhaltenen Ergebnisse wurden in ein Formblatt (s. Anlage Isolatbeschreibung) eingetragen.

Die Bestimmung der Koloniezahl erfolgte visuell ohne Zuhilfenahme einer Lupe oder eines Mikroskops. Alle gewachsenen Kolonien wurden gezählt. Die Auszählung erfolgte nach 7, 14 und 21 Tagen.

Es wurde jeweils diejenige Verdünnungsstufe der Materialproben auf den verschiedenen Isolierungsmedien ausgewertet, bei der die Kolonieanzahl auf den Parallel-Platten im Durchschnitt mindestens 10 und pro Platte maximal 100 betrug. Um zu vermeiden, dass derselbe Actinomyceten-Typ, der sich auf den verschiedenen Isolierungsnährmedien möglicherweise unterschiedlich darstellt, doppelt gezählt wurde, wurden die makromorphologisch unterschiedlich aussehenden Actinomyceten-Typen mittels mikroskopischem Präparat gleichen Typen zugeordnet. Zur Berechnung der Koloniezahl eines Typs wurden entsprechend der gemittelten Anzahl in der Verdünnungsstufe die KBE/g berechnet. Für die Luftproben wurden die verschiedenen beaufschlagten Isolierungsmedien ausgewertet und daraus entsprechend die Koloniezahl der Actinomyceten-Typen berechnet.

Im Rahmen der projektorientierten Untersuchung, in der mehrere Arbeitsgruppen parallel mit gleichen Methoden an unterschiedlichen Proben arbeiteten, war eine Abstimmung bezüglich der Beschreibung der erfassten Isolate notwendig, um die Ergebnisse später miteinander abgleichen zu können.
Im vorliegenden Projekt wurden im Vorfeld der Untersuchungen Materialien von den verschiedenen Arbeitsgruppen parallel analysiert. Nach diesem Methoden-Training wurde festgelegt, welche morphologischen Merkmale erfasst wurden. Es wurde ein Formular (siehe Anhang - Formblatt „Isolatbeschreibung“) für die morphologische Beschreibung der gewonnenen Isolate entwickelt. Im Formular wurden die Isolatbezeichnungen, das Isolationsmedium sowie die Konzentration und die Dominanzklasse eines Isolattyps in der Probe erfasst. Weiterhin wurden die wichtigsten makroskopischen (Konsistenz, Form, Oberfläche, Färbung) und mikroskopischen Isolateigenschaften (Zellform, Fragmentation und Sporenbildung) zugeordnet. Zusätzlich zum DAP-Nachweis war optional die Ermittlung verschiedener biochemischer Merkmale (APIZYM) sowie weiterer chemotaxonomischer Merkmale (Bestimmung der Mycolsäure bzw. Menachinone) vorgesehen.

2.3.4 Festlegung der Dominanz einzelner Isolate in einer Probe

Referenzisolate:

Nach dem Vergleich der makroskopischen, mikroskopischen und gegebenenfalls chemotaxonomischen Merkmale der verschiedenen Actinomyceten-Typen wurde für jeden Typ ein Isolat als das jeweilige **Referenzisolat** festgelegt. Dieses Referenzisolat wurde zur anschließenden Bestimmung der 16S rRNA-Gensequenz nach Gießen versandt. In der Liste der Isolate im Anhang Tabelle 3 sind die Isolate, die nicht sequenziert wurden, mit * gekennzeichnet.

Insgesamt wurden die Dominanzstufen 1-3 festgelegt, von denen die Stufe 3 die höchste Dominanz darstellte. Die Festlegung erfolgte nach mehreren Kriterien, da die Anzahl der Isolate in der Probe sowie die Gesamtkonzentration der Proben sehr große Unterschiede aufwiesen.

Dominanzklasse 3 (höchste Dominanz in einer Probe): Isolate der Dominanzklasse 3 müssen eine Konzentration von mindestens 10.000 KBE/g erreichen, außerdem muss die Konzentration mindestens dem zweifachen Median entsprechen und über bzw. gleich dem 75. Perzentil der Gesamtprobe liegen.

Dominanzklasse 2 (mittlere Dominanz): Isolate der Dominanzklasse 2 müssen eine Konzentration von mindestens 1.000 KBE/g erreichen, außerdem muss die Konzentration mindestens dem halben Median entsprechen und über bzw. gleich dem 25. Perzentil der Gesamtprobe liegen.

Dominanzklasse 1 (geringste Dominanz): Ein Isolat wurde der Dominanzklasse 1 zugeordnet, wenn seine Konzentration unter den Kriterien der Dominanzstufe 2 lag.

2.3.5 Identifizierung der Actinomyceten

Die unterschiedlichen Actinomyceten-Typen wurden auf Subkultivierungsmedien überimpft und mit dem Deckel der Petrischalen nach unten im Brutschrank im Dunkeln bei (28 ± 2) °C bebrütet. Die Bebrütungsdauer betrug 10 Tage bis zu 3 Wochen.

Zur Identifizierung wurden makro- und mikromorphologische Merkmale, Gram-Färbung, biochemische und molekularbiologische Merkmale herangezogen.

Die bei der Identifizierung erhaltenen Ergebnisse wurden in ein Formblatt (s. Anlage Isolatbeschreibung) eingetragen. Alle konservierten Isolate wurden zur Bestimmung der 16S-rRNA-Gensequenz an die Universität-Gießen versandt.

2.3.5.1 Beschreibung der makromorphologischen Merkmale

Mit Hilfe eines Stereomikroskops mit einer 15-fachen bis 165-fachen Vergrößerung wurden die Subkulturen koloniemorphologisch charakterisiert. In einem standardisierten Probenprotokoll wurden die Merkmale der Isolate von allen zur Subkultivierung verwendeten Nährmedien dokumentiert. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera.

Folgende Beurteilungskriterien wurden dokumentiert:

- Konsistenz der Kolonie (weich, bröcklig, schleimig, zäh, hart)
- Kolonieform (flach, erhaben, unregelmäßig)
- Kolonieoberfläche (glatt, glänzend, matt, gipsig, runzlig)
- Farbe der Kolonie
- Farbe des Luftmyzels
- Farbe des Substratmyzels
- Farbe des löslichen Pigments

2.3.5.2 Beschreibung der mikromorphologischen Merkmale

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops mit einer 100-fachen bis 1000-fachen Vergrößerung wurden die Subkulturen mikromorphologisch bzw. zellmorphologisch charakterisiert. Dazu wurde auch das Gram-Präparat benutzt. Der Bildausschnitt wurde mittels einer elektronischen Bildauswertung der Firma Zeiss bzw. mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Folgende Merkmale wurden im Probenprotokoll dokumentiert:

- Zellform (Kokken, Stäbchen)
- Stäbchen-Kokken Zyklus
- Form der Sporenketten

2.3.5.3 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung stellt ein wichtiges Differenzierungsverfahren dar, mit dessen Hilfe die Bakterien in zwei Gruppen unterteilt werden können, die sich in ihrer Zellwandstruktur unterscheiden.
Actinomyceten gehören zu den grampositiven Mikroorganismen. Nach Isolation der Stämme wurde zunächst diese Differenzierungsfärbung durchgeführt.
Es wurden gebrauchsfertige Lösungen der Firma Becton Dickinson eingesetzt.

Färbemethode:
Präparate hitzefixieren

Färben:	Überschichtung mit Kristallviolett (Präparate vollständig mit Färbelösung bedecken) 1 min einwirken lassen, Färbelösung abgießen
Beizen:	mit Lugol'scher Lösung abspülen, abschütten anschließend erneut mit Lugol'scher Lösung überschichten, 1 min einwirken lassen
Differenzieren:	mit 96 % Alkohol spülen, bis keine Farbwolken mehr abgehen, mit Wasser nachspülen
Gegenfärbung:	Safranin-Lösung auftropfen nach 1 min mit Wasser abspülen

Präparat trocknen
Bei der mikroskopischen Betrachtung erscheinen gramnegative Mikroorganismen rot, die grampositiven dagegen blau bis violett.

2.3.5.4 Bestimmung der Diaminopimelinsäure (DAP)

Die Struktur des Peptidoglycans ist bei den Gram-positiven Bakterien ein wichtiges Merkmal für die Gattungsdiagnose. Bei den Actinomyceten ist die für die Vernetzung des Peptidoglycans verantwortliche Diaminosäure des Tetrapeptids und die Struktur der Interpeptidbrücke ein charakteristisches Merkmal. Weit verbreitet ist bei Actinomyceten das Vorkommen eines der Isomere der Diaminopimelinsäure (LL- bzw. meso-DAP), sie wird daher bei den Actinomyceten auch als Schlüsseldiaminosäure bezeichnet. Deshalb ist die DAP-Bestimmung immer der erste Schritt in der Zellwandanalyse, dessen Ergebnis bereits Hinweise auf bestimmte Gruppen innerhalb der Ordnung *Actinomycetales* sowie auf weitere

Analysen im Zusammenhang mit der Identifizierung unbekannter Isolate gibt. Da DAP nur in der Zellwand vorkommt, können die beiden Isomere mit Hilfe einer Gesamtzellhydrolyse und nachfolgender Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie relativ rasch nachgewiesen werden. Kann die DAP in unbekannten Actinomycetenisolaten nicht nachgewiesen werden, ist eine andere Diaminosäure, häufig L-Lysin, seltener L-Ornithin oder L-Diaminobuttersäure für die Vernetzung des Peptidoglycans verantwortlich. Der Nachweis dieser diagnostischen Diaminosäuren ist mit der aufwändigen Präparation reiner Zellwände verbunden, da diese Aminosäuren auch in den Peptiden im Zytoplasma vorkommen.

Der DAP-Nachweis basiert auf einer modifizierten Methode nach Hasegawa. *et al.* (1983). Mit einem sterilen Skalpell wurden ca. 10 bis 20 mg Reinkultur des subkultivierten Actinomyceten-Isolats von der Nährbodenplatte so abgenommen, dass sich möglichst nur die Kultur selbst und kein Nährmedium ablöste. Die so gewonnene Probe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml HCl (30%ig) versetzt. Das verschlossene Reaktionsgefäß wurde 3 h auf 120 °C erhitzt.

Nach Abkühlung des erhaltenen Hydrolysats wurde dieses in einen 10 ml-Spitzkolben überführt. Mittels eines Vakuumrotationsverdampfers (ca. 40 mbar bei 70 °C) wurde die salzsaure wässrige Lösung bis zur Trockne eingeengt. Der verbleibende Rückstand wurde in 1 ml Aqua dest. aufgenommen und anschließend nochmals mit dem Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt, um noch vorhandene HCl vollständig zu entfernen.

Das so gereinigte Hydrolysat wurde in 20 µl Aqua dest. aufgenommen. 1 µl, 2 µl und 5 µl des Hydrolysats wurden in einem Abstand von 1,5 cm untereinander und 1 cm vom unteren Rand der Dünnschichtplatte entfernt (DC Cellulose-Platten 20 x 20 cm) mit einer 10 µl Hamilton-Spritze aufgetragen. Während des Auftragens der Proben wurde mittels eines Föhns kalte Luft über die DC-Platte geblasen, um das Verdampfen des Wassers beim Auftragen der Proben zu beschleunigen. Die aufgetragene Probe soll auf der DC-Platte keine größere Ausdehnung als 5 mm besitzen. Zusätzlich zu den Proben wurden auf die DC-Platte die Referenzlösungen von LL-DAP (gewonnen aus dem Typusstamm *Streptomyces griseus* IMET 40235^{T}), von meso-DAP (gewonnen aus aus dem Typusstamm *Rhodococcus rhodochrous* IMET 7374^{T}) und eines DAP-Gemisches (Firma Sigma D 1377, 2 mg/ml) aufgetragen.

Die DC-Platte wurde anschließend in die DC-Trennkammer gestellt, die in einer Höhe von ca. 0,5 cm mit dem Laufmittel nach Takahashi *et al*., 1983 (Mischung aus 64 ml Methanol, 14 ml Aqua dest. Wasser, 2 ml 30%ige Salzsäure und 8 ml Pyridin) gefüllt war. Die DC-Platte verblieb in der DC-Trennkammer, bis sich die Lösungsmittelfront in ca. 1 cm Abstand von der oberen Kante der DC-Platte befand (ca. 2 h). Die DC-Platte wurde aus der DC-Trennkammer herausgenommen, die Lösungsmittelfront wurde angezeichnet und das Laufmittel wurde im Abzug abgedampft (ca. 30 min.).
Danach wurde die DC-Platte im Abzug mit 5 bis 10 ml Ninhydrin-Reagenz (125 mg Ninhydrin, 50 ml Aceton, 3,5 ml konzentrierte Essigsäure) besprüht und nochmals für 5 min auf 100 °C erhitzt. Die DAP wird als dunkel grünbrauner Fleck, der sich nach längerer Zeit gelb färbt, auf der DC Platte sichtbar. Mit Hilfe der DAP-Referenzen (meso-Isomer Rf 0,20 bis 0,25 LL-Isomer Rf 0,25 bis 0,30) erfolgt die Identifizierung der DAP in den Proben.

2.3.5.5 Chemotaxonomische Methoden zum Nachweis von Actinomyceten

Die Chemotaxonomie umfasst die Analyse von Zellbestandteilen wie Fettsäuren, polare Lipide, Mykolsäuren Polyamine, Chinone, Zucker, Diaminosäure- und Aminosäurezusammensetzung der Zellwand sowie von Gesamtzellproteinen (Busse *et al.*, 1996). In den verschiedenen Gattungen der Actinomyceten sind diese taxonomischen Merkmale unterschiedlich charakteristisch ausgeprägt. Deshalb werden für die Zuordnung unbekannter Isolate diese Markermoleküle bestimmt und für die Identifizierung mit herangezogen.
Für einen Teil der Isolate im Rahmen dieses Projektes wurden neben der Identifizierung der Diaminosäure der Zellwand die Analyse der Menachinone, Mycolsäuren und Fettsäuren durchgeführt sowie das Enzymmuster mit Hilfe des API-ZYM-Testes bestimmt.

<u>Menachinone</u>

Sowohl bei den Prokaryonten als auch bei den Eukaryonten sind Chinone als Bestandteil der Zytoplasmamembranen verantwortlich für den Elektronentransport. Aufgrund der Ausprägung unterschiedlicher Typen von Chinonen (Ubichinone bei Gram negativen Bakterien, Menachinone vorwiegend bei Gram positiven Bakterien) und der unterschiedlichen Länge der gesättigten oder ungesättigten isoprenoiden

Seitenketten wird das Chinonsystem als taxonomischer Marker zur Charakterisierung von Bakterien verwendet. Innerhalb der Actinomyceten sind die vorkommenden Menachinonemuster sehr vielfältig und oftmals charakteristisch für die einzelnen Gattungen.

Die Analyse der Menachinone erfolgte nach Collins *et al.* (1977). Die Isolate wurden 24 h bei 28 °C in Medium M79 (siehe 2.3.1) kultiviert. Die gewachsenen Kulturen wurden im Autoklaven abgetötet, nach Abkühlung wurde die Biomasse abzentrifugiert und dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyophilisierung der Biomasse. Die lyophilisierte Biomasse wurde gewogen und pro Gramm Trockenmasse wurden 30 ml Chloroform/Methanol-Gemisch (2:1) dazugegeben und über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch mit einem Papierfilter filtriert und anschließend bei 40 °C bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Chloroform/Methanol-Gemisch (2:1) aufgenommen und als breite Bande auf einer Silufol-Chromatographie-Platte (Alugram SIL G/UV_{254} von Macherey-Nagel) aufgetragen. Als Standard wurde Vitamin K1 aufgetragen. Nach ca. 2 h Chromatographie mit dem Laufmittel Hexan/Diethylether (55 ml+5 ml) wurde die unter UV-Licht sichtbare Bande der Menachinone markiert, das Kieselgel von der markierten Bande ausgeschabt und mit 0,5-0,8 ml HPLC-Laufmittel (65 ml Acetonitril+35 ml iso-Propanol) aufgenommen. Vor der HPLC-Analyse wurde die Probe filtriert (ultrafree centrifugal filter unit der Firma Millipore). Für die Analyse wurde eine RP18 Trennsäule (Nucleosil HPLC-Säule 120 5C18, Macherey-Nagel) verwendet, als Eluent Acetonitril+ iso-Propanol (65% ACN, 35% iso-PrOH). Die Probe wurde bei 269 nm analysiert und anhand von Referenzspektren ausgewertet.

<u>Fettsäuren</u>

Aufgrund der unterschiedlichen Struktur der Fettsäuren (Variationen in der Kettenlänge, Vorhandensein von verzweigtkettigen (iso-, anteiso-) Fettsäuren, gesättigter und ungesättigter Fettsäuren, von Hydroxygruppen an Position 2 und 3) und der relativen Zusammensetzung der Fettsäuren eines Mikroorganismus ist durch den Vergleich mit den Fettsäuremustern von Referenzstämmen oftmals eine Zuordnung von Isolaten zu bekannten Gattungen oder Arten möglich. Fettsäuren der Zell-Lipide können als Methylester gaschromatographisch getrennt werden.

Für die Analyse der Fettsäuren erfolgte die Kultivierung der Isolate entsprechend den Parametern, die in der Datenbank (MIDI-System) vorgegeben sind. Im Rahmen des Projektes wurden Lyophilisate von Submerskulturen verwendet.
Die Isolate wurden in Steilbrustflaschen in 20 ml Tryptic Soy Broth (TSB) bei 28 °C auf einem Rundschüttler 48 h inkubiert. Die gewachsenen Kulturen wurden im Autoklaven abgetötet, nach Abkühlung wurde die Biomasse abzentrifugiert und zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyophilisierung der Biomasse (Lyophilisationsanlage Alpha 2-4, Fa Christ).
Die Fettsäuren wurden nun durch Lyse der Zellen und Abspaltung von den zellulären Lipiden aus der Biomasse extrahiert: Dazu wurden 10 mg Lyophilisat eingewogen und 1 ml Reagenz 1 (45 g NaOH, 150 ml Methanol, 150 ml Aqua dest.) dazugegeben. Die gut verschlossenen Röhrchen wurden 5-10 s auf dem Vortex geschüttelt, für 5 min in einem Wasserbad auf 100 °C erhitzt, nochmals 5-10 s auf dem Vortex geschüttelt und weitere 25 min im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde das Röhrchen in einem Eisbad abgekühlt. Zur Bildung der Methylester wurde 2 ml Reagenz 2 (325 ml 6N HCl, 275 ml Methanol) dazugeben, durchmischt und 10 min auf 80 °C im Wasserbad erhitzt. Nach erneuter schneller Abkühlung wurden die Fettsäuremethylester durch Zugabe von 1,25 ml Reagenz 3 (200 ml Hexan, 200 ml Methyl-tert-butyl-äther) während zehn minütigem Schüttelns in einem Überkopfschüttler (Reax 2, Fa Heidolph) aus der wässrigen in die organische Phase überführt. Die untere wässrige Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die lipophile organische Phase wurde mit 3 ml Reagenz 4 (10,8 g NaOH, 900 ml Aqua dest.) versetzt und vorsichtig 5 min auf dem Überkopfschüttler rotiert, um die freien Fettsäuren und Reagenzreste zu entfernen. Zwei Drittel der organischen Phase wurden in ein GC-Röhrchen überführt und mit Septum und Alukappe verschlossen. Die Trennung der Fettsäurmethylestermischungen erfolgte durch Gaschromatographie mit dem 5898A Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) anhand der Standard Software des Systems.

Mycolsäuren

Mycolsäuren sind α-verzweigte oder β-hydroxylierte Fettsäuren mit unterschiedlichen Kettenlängen, die bei einigen Actinomyceten in der Zellwand lokalisiert sind.
Die Detektion von Mycolsäuren erlaubt eine Zuordnung unbekannter Isolate zur Gruppe der Mycolsäurehaltigen Gattungen (*Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus,*

Dietzia, Corynebacterium, Gordonia, Dietzia, Tsukamurella) und den Gattungen ohne Mycolsäuren (*Amycolatopsis* und verwandte Gattungen). Die Untersuchung der Mycolsäurekettenlängen differenziert zwischen *Mycobacterium* mit über 80 C-Atomen, *Nocardia* mit über 50 C-Atomen und *Corynebacterium* mit etwa 30 C-Atomen.

Für die Analyse wurden 100 mg Biotrockenmasse in einem hitzestabilen Röhrchen (Schott Schraubröhrchen) mit 5 ml trockenem Methanol, 5 ml Toluol und 0,2 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und für 16 Stunden auf 50 °C erwärmt. Nach erfolgter Hydrolyse wurden die Mycolsäuren durch Zugabe von 3 ml Hexan extrahiert. Die obere Hexanphase wurde abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und unter Zugabe von je einer Spatelspitze Ammoniumhydrogencarbonat und Natriumsulfat gereinigt und getrocknet. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 30 µl Chloroform/Methanol-Gemisch (3:1 v/v) aufgenommen und auf eine Kieselgelplatte aufgetragen (HPTLC silica plates 60, Fa Merck). Die Platte wurde zwei Mal im Laufmittel Hexan, Äther, Toluol und Essigsäure (35 ml+7,5 ml+ 7,5 ml+0,5 ml) entwickelt. Anschließend wurde die Platte in ein Chromatographiegefäß mit Jod gestellt; die Mycolsäuren wurden durch die Joddämpfe braun gefärbt. Als Referenz diente der Typusstamm der Spezies *Rhodococcus rhodochrous* IMET 7374^{T}.

2.3.5.6 Bestimmung von Enzymmustern mit dem API-ZYM-System

Das API ZYM-Testsystem der Firma bioMerieux ermöglicht den Nachweis von 19 enzymatischen Reaktionen bei Mikroorganismen. Mit dem API ZYM-Testsystem ist allerdings keine Identifizierung der Actinomyceten möglich. Es wurde genutzt, um zu klären, ob Isolate, die von unterschiedlichen Nährmedien gewonnen wurden, ein identisches Enzymbildungsmuster zeigten.
Entsprechend der Vorschrift wurden Zellen von der Agaroberfläche abgenommen, in 0,9% Kochsalzlösung suspendiert und eine definierte Zelldichte eingestellt. Diese Suspension wurde in die Mikroröhrchen der Teststreifen pipettiert. Nach vierstündiger bzw. 24-stündiger Inkubation bei 28 °C wurde die Reaktion abgelesen und entsprechend den Herstellerangaben bewertet.

2.3.6 Konservierung

Die Konservierung der Reinkulturen erfolgte bei den Projektpartnern in unterschiedlicher Weise.

2.3.6.1 Konservierung in Glycerinmedium

(Hans-Knöll-Institut Jena und Umweltmykologie GbR Berlin)

Konservierungsmediums nach Chakrabarty *et al*. (1978)

	Einzelkomponenten	Menge
1	K_2HPO_4	6,3 g
2	Na-citrat	0,45 g
3	$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,05 g
4	$(NH_4)_2SO_4$	0,9 g
5	KH_2PO_4	1,8 g
6	Glycerin	44,0 g
7	Aqua dest.	500 ml

Das sterile Medium wurde in sterile Mikrogefässe abgefüllt und 1:1 mit der gut gewachsenen Bakteriensuspension gemischt. Alternativ wurde eine Impföse von einer Plattenkultur abgenommen und im Konservierungsmedium suspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70 °C.

2.3.6.2 Konservierung in Micronic-Röhrchen (Universität Gießen)

Ein Volumen von 0,5 ml sterilem Kälberserum (Bio Wittaker™, NBS newborn bovine serum, Lonza, Belgium) wurden in zuvor autoklavierte Micronicröhrchen (1,4 ml U-tubes, Micronic B.V., Niederlande) pipettiert. Anschließend wurden ca. 3 Impfösen der Kultur (bei fest in den Agar wachsenden Kulturen mit Agarstückchen) von der Agarplatte abgenommen und in Micronicröhrchen mit Kälberserum überführt. Für jede Kultur wurden drei parallele Röhrchen angefertigt, die dann bei -20 °C (2x) und -80 °C (1x) in Micronicboxen (Reusable Tubeholder-96, PC, Micronic B.V., Niederlande) getrennt voneinander konserviert wurden.

2.3.6.3 Konservierung in Glycerinmedium (LGA)

Glycerin 99 % wurde im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. gemischt, sterilisiert und in sterile Mikrogefäße abgefüllt. Ein bewachsenes Stück Agar wurde ausgeschnitten, in dem Konservierungsmedium suspendiert und bei –80 °C konserviert.

2.3.7 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten der Schimmelpilze

Von den Baumaterialien wurde im Regelfall 1 g in 10 ml NaCl-Tween-Lösung in Erlenmeyer-Kolben suspendiert und 30 min auf einem Schüttelinkubator geschüttelt. Bei voluminöseren Proben (Glaswolle, Styropor) wurde entsprechend mehr Lösung eingesetzt. Aus dieser Suspension wurde eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt (bis 10^{-2}) und aus jeder Verdünnungsstufe 3 Parallelen ausplattiert (Anlehnung an VDI 4253 Bl. 1). Von jeder Materialprobe wurde ein Doppelansatz angesetzt und entsprechend ausgewertet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Sowohl für die taxonomische Zuordnung von Isolaten als auch für die kultivierungsunabhängige Erfassung von Actinomyceten in den Materialproben wurden molekularbiologische Methoden eingesetzt.

2.4.1 DNA – Extraktion

Die Extraktion der DNA aus den Isolaten (2.4.1.1), aus einem Gemisch gewachsener Kolonien von den Agarplatten (2.4.1.3) oder direkt aus den Materialproben (2.4.1.2) war der erste Schritt aller molekularbiologischen Untersuchungen.

2.4.1.1 DNA-Extraktion aus Reinkulturen

Um die genomische DNA aus den gewonnenen Isolaten zu extrahieren, wurde ein kommerziell erhältliches Extraktionskit (GenElute Plant Genomic DNA Kit, Sigma) verwendet. Die Extraktion wurde weitestgehend nach Anleitung des Herstellers, wie folgt beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Lösungen waren im Extraktionskit enthalten.

Für einen verbesserten Zellaufschluss wurde die Extraktion zu Beginn durch den Einsatz von Zirkoniumkugeln und einem einminütigen Aufschluss mit einer Schwingkugelmühle (Retsch, Haan) modifiziert. Dazu wurde ein Gramm steriler Zirkoniumkugeln (0,1 mm, Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe) in 2 ml Reaktionsgefäße

eingewogen und etwas Zellmateriall direkt von der Agarplatte hinzugegeben. Anschließend wurden 350 µl der Lysis Solution Part A und 50 µl der Lysis Solution Part B in das Reaktionsgefäß gegeben und das Gemisch invertiert. Die so vorbereiteten Reaktionsgefäße wurden dann bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute horizontal geschüttelt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Proben bei 65 °C 10 min auf einem Heizblock inkubiert. Zum Fällen der Proteine wurden 130 µl Precipitation Solution zur Probe pipettiert, das Reaktionsgefäß gut geschüttelt und dann fünf min auf Eis inkubiert. Der dabei entstandene Niederschlag wurde fünf min in einer Zentrifuge bei Raumtemperatur und 13.870 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, zum Reinigen der DNA auf eine blaue Filtrationssäule pipettiert und wiederholt für eine Minute bei 13.870 x g abzentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur. Der Filter wurde verworfen und der Durchfluss zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zur Vorbereitung der Bindungssäule wurden 500 µl Column Preparation Solution auf die Säule geben und eine Minute bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde das DNA enthaltende Filtrat mit 700 µl Binding Solution versetzt, gut gemischt und zum Teil (700 µl) auf die DNA-Bindungssäule übertragen. Das Gemisch wurde wiederum für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das gesamte Gemisch auf die Säule gegeben war. Zum Waschen der an die Säule gebundenen DNA wurden 500 µl Wash Solution auf die Säule pipettiert und eine Minute abzentrifugiert. Zum vollständigen Entfernen der Wash Solution wurde dieser Schritt mit einer drei minütigen Zentrifugationszeit wiederholt. Für die Elution der DNA aus dem Filter wurde die Bindungssäule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Die DNA wurde nun zweimal mit je 50 µl Elution Solution (auf 65 °C vorgewärmt) durch jeweils einminütiges Zentrifugieren aus dem Filter gelöst.

Bei jeder DNA-Extraktion wurde eine Negativkontrolle parallel aufgearbeitet. Hierzu wurde das Lysing Matrix E Reaktionsgefäß bzw. das Reaktionsgefäß mit Zirkoniumkugeln nur mit den zu Beginn eingesetzten Puffern (ohne Probe) in der Schwingkugelmühle geschüttelt. Im weiteren Verlauf wurde die Kontrolle gleich behandelt wie die Proben.

Die DNA-Extraktion der gewonnenen Isolate aus den Proben 5-16 wurden in Auftragsarbeit von der SMOLBIO (Services in Molecular Biology, Berlin) durchgeführt.

2.4.1.2 DNA-Extraktion aus Materialproben

Um die genomische DNA aus Baumaterialienproben zu extrahieren, wurde ebenfalls ein kommerziell erhältliches Extraktionskit (Bio 101, FastDNA®SPIN Kit for soil, MP Biomedicals) verwendet. Die Extraktion erfolgte nach Anleitung des Herstellers wie nachfolgend beschrieben.

Die Lysing Matrix E enthaltenden Reaktionsgefäße wurden mit 0,05 bis 0,5 g frischem Probenmaterial gefüllt und mit Natriumphosphatpuffer (978 µl) und MT-Puffer (122 µl) versetzt. Die Mikroorganismen wurden aufgeschlossen, indem die mit den Proben beladenen Reaktionsgefäße in einer Schwingkugelmühle bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute horizontal geschüttelt wurden. Anschließend wurde die Probe bei 13.870 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der DNA-enthaltende Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 250 µl PPS-Reagenz (Protein Precipitation Sol´n for Soil) versetzt und vorsichtig invertiert. Nach wiederholtem Zentrifugieren bei 13.870 x g für 5 min (4 °C) wurde der Überstand in einem 15 ml Blaudeckelröhrchen mit 1 ml Binding Matrix Suspension gemischt. Nach sorgfältiger Resuspendierung wurde ein Teil des Gemischs auf einen Spin Filter, der die DNA bindet, übertragen und wiederum 2 min bei 13.870 x g (4 °C) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis das vollständige Gemisch auf den Spin Filter gegeben wurde. Anschließend wurde der Filter mit 500 µl „SEWS-M-Lösung“ (Salt/Ethanol Wash Solution) gewaschen und zwei min abzentrifugiert. Für die Elution der DNA aus dem Filter wurde der Spin Filter in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Die DNA wurde nun mit 50 µl DES (DNase- und pyrogenfreies Wasser) durch zweiminütiges Zentrifugieren aus dem Filter gelöst.

Bei jeder DNA-Extraktion wurde eine Negativkontrolle parallel aufgearbeitet. Hierzu wurde das Lysing Matrix E Reaktionsgefäß bzw. das Reaktionsgefäß mit Zirkoniumkugeln nur mit den zu Beginn eingesetzten Puffern (ohne Probe) in der Schwingkugelmühle geschüttelt. Im weiteren Verlauf wurde die Kontrolle gleich behandelt wie die Proben.

2.4.1.3 DNA-Extraktion aus Kolonien der abgeschwemmten Nähragarplatten

Die Analyse erfolgte modifiziert nach More *et al*., (1994). Zunächst wurden die mit 1,5 ml Natrium-Phosphatpuffer (120 mM, pH 8) aufgenommenen Bakterienkulturen der abgeschwemmten Nährmedienplatten bei 13.870 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Für einen verbesserten Zellaufschluss der Bakterien wurde ein einminütiger Aufschluss mit einer Schwingkugelmühle durchgeführt. Dazu wurde ein Gramm steriler Zirkoniumkugeln (0,1 mm, Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe) zu den Bakterienzellpellets eingewogen und 700 µl Natrium-Phosphatpuffer, sowie 230 µl SDS (sodium dodecyl sulfate, 10%) hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute horizontal geschüttelt. Nach einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 13870 x g (4 °C) wurde der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 100 µl Lysozym (10 mg/ml, in Tris-EDTA-Puffer, pH 8) hinzu gegeben und das Reaktionsgemisch invertiert. Das Gemisch wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 15 µl Proteinkinase K (20 mg/ml) dazu pipettiert und das Gemisch 15 min bei 60 °C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit dem 0,4 fachen Volumen kalter Ammonium-Acetat-Lösung (7,5 M) versetzt, danach vorsichtig vermischt und für sechs min auf Eis inkubiert. Der dabei entstandene Niederschlag wurde sechs min bei 13.870 x g (4 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C durch Zugabe des 0,7 fachen Volumens Isopropanol (99%, sterilfiltriert). Am folgenden Tag wurde die DNA bei 13870 x g (4 °C) für 70 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet zweimal mit 70% igem kaltem Ethanol gewaschen. Dazu wurden 600 µl Ethanol auf das DNA-Pellet pipettiert, gemischt, anschließend bei 13.870 x g (4 °C) sechs min zentrifugiert und jeweils der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde dann an der Luft getrocknet und abschließend in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA wurde über Nacht bei 4 °C gelöst und die zuvor geteilten Proben wieder vereinigt.

2.4.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR als grundlegende molekularbiologische Methode diente der Bereitstellung großer Mengen bestimmter DNA-Fragmente, für anschließende Sequenzierungs-, Single-Strand-Conformation-Polymorphism-(SSCP)- und Klonierungsanalysen.

Ziel der PCR innerhalb dieser Arbeit war einerseits die Amplifikation des gesamten 16S rRNA-Gens verschiedener Mikroorganismen und andererseits die Vervielfältigung von 16S rRNA-Gen-Fragmenten von Actinomyceten unter Verwendung spezifischer Primersysteme. In der Arbeit wurden verschiedene Primersysteme angewendet, die hauptsächlich innerhalb des 16S rRNA-Gens binden (Ausnahme: Primer 118r, bindet an die 23S und die Plasmidprimer M13). Für die Klonierungsanalysen der Proben 2 und 3 wurde eine Nested-PCR unter Verwendung der Primerpaare 616V/118 r und EUB9f/EUB 1492r durchgeführt.

2.4.2.1 Ansetzen der PCR

Zum Ansetzen des Mastermixes einer PCR wurde an einer Sicherheitswerkbank gearbeitet. Hierfür wurden die verschiedenen Komponenten des Mastermixes nach unten stehendem Pipettierschemata (Tab. 3) in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert.

Tab. 3: Zusammensetzung der Reaktionsansätze (Mastermix) für die verschiedenen Primersysteme und deren Endkonzentration im Ansatz

	16S rRNA-Gen-Primer (EUB9f/EUB 1492r)		Actinomyceten-Primer Com2xf / Ac1186		Actinomyceten-Primer Stach et al. (2003)	
Reagenz, Konzentration	Volumen (µl)	Endkonz.im Reaktionsgefäß	Volumen (µl)	Endkonz.im Reaktionsgefäß	Volumen (µl)	Endkonz.im Reaktionsgefäß
RNase, DNase freies Wasser	16,7		16,4		16,35	
10x Puffer	2,5	1x	2,5	1x	2,5	1x
25 mM MgCl2	2,0	2,0 mM	2,0	2 mM	2,5	2,5 mM
2 mM dNTP´s	2,5	0,2 mM	2,5	0,2 mM	2,5	0,2 mM
25 pmol μl^{-1} Primer 1, forward	0,5	0,1 mM	0,5	0,5 mM	0,5	0,5 mM
25 pmol μl^{-1} Primer 2, reverse	0,5	0,1 mM	0,5	0,5 mM	0,5	0,5 mM
20 mg ml^{-1} BSA	0,2	4 mg ml^{-1}	0,2	2 mg ml^{-1}		
5 Unit μl^{-1} Taq-Polymerase	0,1	0,02 U μl^{-1}	0,1	0,01 U μl^{-1}	0,15	0,015 U μl^{-1}
Reaktionsvolumen	25 µl		25 µl		25 µl	

	Plasmid-Primer M13		Primer 616 V / 118 r	
Reagenz, Konzentration	Volumen (µl)	Endkonz. im Reaktionsgefäß	Volumen (µl)	Endkonz. im Reaktionsgefäß
RNase, DNase freies Wasser	16,4		16,2	
10x Puffer	2,5	1x	2,5	1x
25 mM MgCl2	2	2,0 mM	3	3,0 mM
2 mM dNTP´s	2,5	0,2 mM	2,5	0,2 mM
25 pmol μl^{-1} Primer 1, forward	0,75	0,1 mM	0,5	0,5 mM
25 pmol μl^{-1} Primer 2, reverse	0,75	0,1 mM	0,5	0,5 mM
20 mg ml^{-1} BSA			0,2	2 mg ml^{-1}
5 Unit μl^{-1} Taq-Polymerase	0,1	0,02 U μl^{-1}	0,1	0,01 U μl^{-1}
Reaktionsvolumen	25 µl		25 µl	

Nach kurzem Vortexen des Mastermixes (Tab. 3) wurden zu 24 µl oder 48 µl Mastermix, 1 µl bzw. 2 µl der extrahierten DNA in ein steriles 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Bei den Klonierungsanalysen wurden 20 µl des Mastermixes direkt auf die mit Zahnstochern ins Reaktionsgefäß gepickten Klonkolonien gegeben.
Zur Erfassung der Eubakterien wurden die Primerpaare EUB9f/EUB 1492r und 616V/118 r eingesetzt. Zur Detektion der Actinomyceten wurden die Primerpaare Ac1186r/Com2xf (PH-Ac1886r) und SC-Act235-aS-20/ SC-Act878-aA-19 (Stach *et al*. 2003) ausgewählt. Für die Klonierungsanalysen wurden die Plasmidprimer M13 forward und M13 reverse verwendet (Tab. 4).
Die Reaktionsgefäße wurden dann in einen Thermocycler (Biometra, Thermoblock, Göttingen oder Biorad, My Cycler, München) gestellt. Die entsprechenden Temperaturprogramme sind in der Tab. 5 dargestellt.
Weiterhin wurde parallel zu allen PCR-Läufen ein Blindwert (nur Mastermix, ohne DNA Template), eine Negativkontrolle (Referenzstämme der Nicht-Zielgruppen, Tab. 6) und eine Positivkontrolle (Referenzstämme der Zielgruppen, Tab. 6) eingesetzt. Diese wurden ebenso aufgearbeitet wie zuvor beschrieben.

Tab. 4: Zusammenstellung der Eigenschaften der verwendeten Primer für die PCR, PH = Phosphatrest am 5´-Ende für SSCP

Primer	Sequenz (5´→ 3´)	Annealing-temperatur	Prod.-Länge (bp)	Literatur
PH- Ac 1186r	CTTCCTCCGAGTTGACCC	58,2 °C	~ 250	diese Arbeit
Com 2xf	AAACTCAAAGGAATTGACGG	53,2 °C		Schwieger& Tebbe, 1998, modifiziert
SC-Act235-aS-20	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	61,4 °C	~640	Stach *et al.*, 2003
SC-Act878-aA-19	CCGTACTCCCCAGGCGGGG	67,5 °C		
EUB 9f	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	55,6 °C	1503	Lane, 1991
EUB 1492r	ACGGYTACCTTGTTACGACTT	56,9 °C		Weisburg *et al.*, 1991
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG	51,7 °C		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	50,4 °C		
616 V	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	55,3 °C	> 2000	
118 r	GGGTTYCCCCATTCGG	55,6 °C		

Tab. 5: Temperaturprogramm: Thermocycler Biometra, Biorad

Actinomyceten-Primer Com2xf/Ac1886r			
Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2.	Denaturierung	94 °C	30 sek
3.	Annealing	60 °C	30 sek
4.	Elongation	72 °C	30 sek
		Wiederholung der Schritte 2.–4., 25-30 mal	
5.	Extension	72 °C	15 min
6.	Abkühlen	4 °C	unbegrenzt
Actinomyceten-Primer SC-Act235-aS-20/ SC-Act878-aA-19			
Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	4 min
2.	Denaturierung	95 °C	30 sek
3.	Annealing	70 °C	1 min
4.	Elongation	70 °C	2 min
		Wiederholung der Schritte 2.–4., 25-30 mal	
5.	Extension	70 °C	15 min
6.	Abkühlen	4 °C	unbegrenzt

Universelle 16S rRNA Primer (EUB-Primer)			
Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2.	Denaturierung	94 °C	1 min
3.	Annealing	57,3 °C	45 sek
4.	Elongation	72 °C	2 min
		Wiederholung der Schritte 2.–4., 29 mal	
5.	Extension	72 °C	15 min
6.	Abkühlen	4 °C	unbegrenzt
Plasmid-Primer M13f/M13r			
Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2.	Denaturierung	94 °C	30 sek
3.	Annealing	55 °C	45 sek
4.	Elongation	70 °C	70 sek
		Wiederholung der Schritte 2.–4., 25 mal	
5.	Extension	70 °C	15 min
6.	Abkühlen	4 °C	unbegrenzt
Universelle 16S rRNA Primer (616v/118r)			
Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2.	Denaturierung	94 °C	1 min
3.	Annealing	57,3 °C	45 sek
4.	Elongation	72 °C	2 min
		Wiederholung der Schritte 2.–4., 30 mal	
5.	Extension	72 °C	15 min
6.	Abkühlen	4 °C	unbegrenzt

Tab. 6: Für die PCR verwendete Referenzstämme

Species	Stammnummer
Referenzstämme der Zielgruppen	
Actinokineospora riparia	DSM 44259^T
Actinomadura rubrobrunea	DSM 43750^T
Actinoplanes derwentensis	DSM 43941^T
Brachybacterium faecium	DSM 4810^T
Cellulomonas cellasea	DSM 20118^T
Janibacter limosus	DSM 11140^T
Kibdelosporangium aridum subsp. *aridum*	DSM 43828^T
Kineosporia aurantiaca	DSM 43858^T
Kitaspora cochleata	DSM 41652^T
Kutzneria viridogrisea	DSM 43850^T
Microbispora rosea subsp. *rosea*	DSM 43839^T
Micromonospora olivasterospora	DSM 43868^T
Microtetraspora glauca	DSM 43311^T
Mycobacterium abscessus	DSM 44196^T
Nocardia beijingensis	DSM 44636^T
Nocardioides simplex	DSM 20130^T
Nocardiopsis listeri	DSM 40297^T
Nonomuraea longicatenae	NRRL 15532
Pseudonocardia sulfidoxydans	DSM 44248^T
Rhodococcus zopfii	DSM 44108^T
Rubrobacter xylanophilus	DSM 9941^T
Saccharomonospora cyanea	DSM 44106^T
Saccharomonospora xinjiangensis	DSM 44391^T
Saccharopolyspora hordei	DSM 44065^T
Saccharothrix coeruleofusca	DSM 43679^T
Streptomyces cinnamoneus	DSM 40899^T
Streptomyces macrosporus	DSM 41449^T
Streptosporangium fragile	DSM 43847^T
Thermobifida fusca	DSM 43792^T
Tsukumurella paurometabola (Corynebacterium paurometabola)	DSM 20162^T
Williamsia murale	DSM 44343^T
Referenzstämme der Nicht-Zielgruppen	
Castellaniella defragrans	DSM 12141^T
Aminobacter aminovorans	DSM 7048^T
Anaeromyxobacter dehalogenans	ATCC BAA-258
Azoarcus sp.	EbN1
Bergeyella zoohelcum	NCTC 11660^T
Deinococcus grandis	DSM 3963^T
Empedobacter brevis	LMG 4011^T
Escherichia coli,	DSM 1103
Geobacter sulfurreducens	DSM 12127^T
Massilla timonae	CCUG 45783^T
Psychromonas antarctica	DSM 10704^T
Sphingomonas koreensis	KCTC 2882^T
Thermoactinomyces candidus	DSM 43796^T

2.4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die mittels PCR amplifizierte DNA wurde über eine horizontale Gelelektrophoresekammer nach der Molekülgröße aufgetrennt. Hierfür wurde je nach Kammergröße und Anzahl der aufzutrennenden Amplifikate Agarose (PEQ Gold Universal Agarose, PEQLAB, Erlangen) in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer: 54 g Tris base + 27,5 g Borsäure + 20 ml 0,5M EDTA, pH 8) durch Erhitzen in der Mikrowelle (600 W) gelöst (1,7 % w/v Agarose) und in einen Gelschlitten gegossen. In die Geltaschen wurde ein Gemisch aus 4,5 µl Amplifikat und 2 µl Ladepuffer (6 x LP, MBI Fermentas, St. Leon Rot) pipettiert. Zum Größenvergleich des erhaltenen PCR-Produktes wurden 4,5 µl eines 100 bp-Markers (Promega Corp., Madison, USA, DNA-Marker Lambda E/H) aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 110 V bis 130 V für 45 bis 55 min über dem Gel angelegt, um die Fragmente aufzutrennen.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA im Gel mit dem Fluoreszensfarbstoff Ethidiumbromid gefärbt. Hierzu wurde das Gel ca. 20 min in eine Metallwanne mit einer Ethidiumbromidfärbelösung (5 µg/100 ml) gelegt und anschließend in einem Wasserbad vom überschüssigen Ethidiumbromid befreit. Die Geldokumention erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators. Das Gel konnte dann fotografiert, als Bild gedruckt und gespeichert werden.

2.4.3 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism – Einzelstrang Konformationspolymorphismus)

In der vorliegenden Arbeit wurde ein nach Schwieger und Tebbe (1998) abgewandeltes Verfahren der SSCP eingesetzt. Bei dieser Methode wird bei der PCR-Amplifikation des gewünschten Fragmentes ein phosphorylierter Rückwärtsprimer und ein nicht-phosphorylierter Vorwärtsprimer eingesetzt. Der so gebildete am 5’-Ende phosphorylierte Strang wird anschließend durch eine λ-Exonuclease verdaut. Der verbleibende Einzelstrang kann anschließend über ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Das Verfahren diente einerseits der Untersuchung der Diversität der Actinomyceten bei der Kultivierung auf unterschiedlichen Medien und andererseits der Untersuchung der unterschiedlichen Actinomycetenpopulationen in den verschiedenen Baumaterialien.

2.4.3.1 Herstellen der einzelsträngigen DNA

Für den Vergleich der Diversität der Actinomycetenpopulation auf den verschiedenen Nährmedien wurden zunächst die Kulturen von den unterschiedlichen Nährmedienplatten (CM-Agar, Actinomyceten-Agar, BHI-Agar, Gauze-Agar und Glycerin/Arginin-Agar) unterschiedlicher Verdünnungsstufen (10^0-10^{-3}) abgeschwemmt. Dazu wurde jeweils steriler Natrium-Phosphatpuffer (1,5 ml) auf die bewachsenen Agarplatten pipettiert und mit einer sterilen Einmalimpföse verteilt. Anschließend wurden die Kolonien mit der Impföse von der Agarplatte gelöst und mit einer Pipette in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Extraktion aus den Mischkulturen erfolgte wie in Abschnitt 2.4.1.3 beschrieben.

Um eine hohe Produktmenge zu erhalten, wurde die PCR (Abschnitt 2.4.2) zur Amplifikation des zu untersuchenden 16S rRNA-Gen Abschnittes (Primersystem: Ac1886r-PH/ Com2xf) in einem zweifachen 50 µl Ansatz durchgeführt.
Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Aufreinigungskits (QiaQuick, PCR-Purification Kit, Qiagen, Hilden) und wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Um aus den doppelsträngigen DNA-Fragmenten Einzelstränge zu generieren, wurde pro zu analysierender Probe ein entsprechendes Volumen (zwischen 300-1000 ng DNA) des aufgereinigten PCR-Ansatzes mit 9 µl λ-Exonuclease-Puffer (Fermentas, St. Leon Roth, 10x Konz.-Ansatzkonz: 1x) und 0,6 µl λ-Exonuclease versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde bei 37 °C im Heizblock für eine Stunde inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Aufreinigung der nun einzelsträngigen DNA erfolgte mit Hilfe des *QiaQuick PCR Purification Kit* mit *Mini Elutions* Säulchen (Quiagen, Hilden) weitestgehend nach Anleitung des Herstellers mit dem Unterschied, dass die DNA am Ende der Aufreinigung mit 10 µl Tris-Puffer eluiert wurde.

Um Hybridisierungen innerhalb oder zwischen den vorliegenden Einzelsträngen zu lösen, wurde zu dem Eluat der einzelsträngigen DNA (~9 µl) ein gleiches Volumen an formamidhaltigem SSCP-Ladepuffer (95 % Formamid, 10 mM NaOH, Bromphenolblau, Xylene Xyonal) gegeben und durch auf- und abpipettieren

gemischt. Das Gemisch wurde zwei min bei 95 °C im Heizblock inkubiert und anschließend sofort mindestens drei min auf Eis gestellt.

2.4.3.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Zu Beginn wurden zwei Glasplatten (Abmessung 22 cm x 19,8 cm x 0,3 cm und 20 cm x 19,8 cm x 0,3 cm), sowie Abstandhalter (Spacer, 0,3 mm) und Klemmen mit 70 %igem Ethanol gereinigt und poliert (Kleenex-Tücher). Anschließend wurde die kleinere der beiden Platten mit Sea-Spray, einer Anti-Haftbeschichtung (BioLogical, Roth, Karlsruhe) eingerieben. Die größere Platte wurde mit Bindsilan-Lösung, einer Haftbeschichtung bestehend aus Ethanol, Eisessig und Bindsilan (Bind Silan plus one, Pharmacia Biotech, Sweden) versehen. Nach einer Einwirkzeit von ca. fünf min wurden beide Platten erneut mit 70 %igen Ethanol abgerieben. Anschließend wurden die beiden Glasplatten mit den jeweiligen Beschichtungen nach innen aufeinander gelegt. Durch die Spacer am Rand wurde die Geldicke auf 0,3 mm justiert und mit Klemmen fixiert (Biorad, München). Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurden die in Tab. 7 aufgeführten Lösungen in einem kleinen Becherglas auf einem Magnetrührer mit Magnetrührfisch in angegebener Reihenfolge zusammen pipettiert:

Tab. 7: Polyarcylamid - Gelmatrize

	Actinomyceten-Primer: Com2xf/ Ac1186r 0,725x MDE, mit 10 % Formamid
Reinstwasser	6,69 ml
10x Formamid	1,5 g
2x MDE-Lösung	5,44 ml
10xTBE	1,5 ml
TEMED	6 µl
40% APS	15 µl

- MDE (Mutation Detection Enhancement – Lösung, Cambrex, Bio Science Pockland, Inc. Rockland, USA),
- TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer: 54 g Tris base + 27,5 g Borsäure + 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8)
- Temed (N, N, N´, N´ -Tetramethylethylendiamin): Katalysator der Polymerisation
- APS (Ammoniumpersulfat, 10 %ig): Katalysator der Polymerisation

Nach Zugabe der APS-Lösung wurde das Gel sofort gegossen, um eine frühzeitige Polymerisation zu verhindern. Zum Gießen des Gels wurde das Gemisch mit einer 60 ml Spritze (Becton Dickinson, Plastipak) aufgezogen und so zwischen die beiden

Glasplatten gespritzt, dass keine Luftblasen entstanden. Anschließend wurde ein „Vorkamm“ („Haifischkamm umgedreht“) am oberen Rand zwischen die beiden Platten geschoben und zwei Klemmen zum Fixieren angebracht. Während des Auspolymerisierens des Gels wurden die Glasplatten horizontal bei Raumtemperatur für mindestens 2 h gelagert.
Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, wurde der „Vorkamm“ gegen einen Haifischkamm ausgetauscht und das Gel in eine Elektrophoresekammer (Protean®IIxi Cell, Biorad, München), mit integrierter Kühlapparatur (Cooling Modul, Biorad) eingebaut. Die Elektrophoresekammer wurde an ein Netzgerät (2297 Macrodrive 5, Constant Power Supply, LKB Bromma, Schweden) angeschlossen. Der obere und untere Elektrophoresetank wurde mit 1xTBE-Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden die Haifischkammtaschen mit 1xTBE-Laufpuffer gespült, um Luftblasen und eventuelle Gelreste zu entfernen[1].
Jetzt erfolgte der Probenauftrag. Hierfür wurden 6 µl der jeweiligen Probe und 2-2,5 µl des Standardgemisches in die Geltaschen pipettiert. Die Einstellungen der physikalischen Parameter der Elektrophorese sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Parameter und Zeit der elektrophoretischen Bedingungen in Abhängigkeit von den zu trennenden PCR-Produkten

Parameter	Actinomyceten-Primer
Geltemperatur	19,5 °C / 14,0 °C
Zeit (h)	12-14
elektrische Leistung (Watt)	50
elektrische Spannung (Volt)	450
elektrische Stromstärke (Milliampere)	8

Zur Kontrolle des mittels λ-Exonuclease erfolgten Verdaues wurde je eine Probe verdaut und unverdaut auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.
Zur Visualisierung der einzelsträngigen DNA-Banden im Gel wurde eine Silbernitratfärbung durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer Sensitivität (bis zu 0,03 ng/mm^2 sind möglich) und in der Möglichkeit der dauerhaften Dokumentation, da die Färbung nicht verschwindet (Mülhardt, 2002; Qu, 2005).

[1] Ein Vorlauf von ca. zwanzig min mit SSCP-Ladepuffer beladenen Geltaschen war nötig, um die Auftrennung in den einzelnen Taschen zu kontrollieren. Die Kühlung der Apparatur sollte bereits eine halbe Stunde vor dem Lauf angestellt sein.

Alle Schritte der Silbernitratfärbung erfolgten in Metallwannen, die bei 20 rpm auf einem Plattformschüttler (CAT, M. Zipperer, Staufen-Etzenbach) geschwenkt wurden. Zum Anfärben der DNA im Gel wurde die Gelapparatur auseinandergebaut und die Glasplatten voneinander getrennt. Das Gel, welches auf der größeren Glasplatte haftet, wurde zunächst dreißig min in 300 ml 10 %iger Essigsäure inkubiert, wodurch die DNA im Gel fixiert wurde. Anschließend wurde das Gel drei mal fünf min mit je 300-400 ml Reinstwasser gewaschen. Während der Fixierung wurden die Entwickler- und die Färbelösungen (Silbernitratlösung) in folgender Zusammensetzung angesetzt:

Silbernitratlösung[2]:	Silbernitrat	0,5	g
	Reinstwasser	0,5	l
	Formaldehyd	0,75	ml
Entwicklerlösung[3]	Natriumcarbonat (wasserfrei)	10,34	g
	Reinstwasser	0,5	l
	Formaldehyd	1,0	ml
	Natriumthiosulfat	0,5	ml

Im Anschluss wurde das Gel 30 min in der Silbernitratfärbelösung im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgeschüttet und ein weiterer Waschgang mit 300-400 ml Reinstwasser für 10 Sekunden durchgeführt. Die Rückseite der Glasplatte wurde außerdem mit VE-Wasser abgespült. Dann erfolgte die Inkubation des Gels in der Entwicklerlösung bis zur gewünschten Färbungsintensität in einer zweiten Metallwanne. Um die Färbung zu stoppen, wurde das Gel für 4 min in 300-400 ml 10 %ige Essigsäure gelegt. Abschließend wurde das Gel in einem Wasserbad (300 - 400 ml) für eine halbe Stunde gespült. Zum Trocknen wurde das Gel aus der Wanne genommen und senkrecht stehend bei

[2] Das Silbernitrat wurde in Wasser in einem 1 L Messbecher gelöst und mit Aluminiumfolie bedeckt im Dunkeln gelagert. Das Formaldehyd wurde während des letzten Waschganges zur Lösung zugegeben und auf einem Rührer (mit Magnetrührfisch) gemischt.

[3] Für die Entwicklerlösung wurde das Natriumcarbonat in Wasser in einen 1 L Messbecher eingewogen, auf einem Magnetrührer gemischt, mit Aluminiumfolie abgedeckt und bis zur Verwendung in den Kühlraum gestellt. Zum Ende der Inkubation des Gels in Silbernitratlösung wurde dann zur Entwicklerlösung noch 1 ml Formaldehyd und 0,5 ml Natriumthiosulfat pipettiert.

Raumtemperatur gelagert. Zur Dokumentation der Gelbilder wurden diese eingescannt und als Datei gespeichert.

2.4.4 Klonierung

Über die Klonierung wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein Gemisch verschiedener, direkt aus Umweltproben gewonnener 16S rRNA-Gen Sequenzen aufgetrennt, um im Anschluss daraus eine Klonbibliothek zu erhalten, die Aufschluss über die vorhandenen Gattungen bzw. Spezies geben kann.

2.4.4.1 Durchführung der Klonierung

Um die transformierten *E. coli* Zellen zu kultivieren, wurde zunächst folgendes Selektivmedium (LB-Amp-X-Gal-IPTG) hergestellt. Für 500 ml Medium wurden folgende Komponenten in eine 1000 ml Schottflasche eingewogen:

Trypton	5,0 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	5,0 g
Agar	7,5 g
Reinstwasser	500 ml

Die Nährlösung wurde zuerst mit NaOH (2N) auf einen pH–Wert von 7,5 eingestellt, dann wurde der Agar zugegeben und das Medium autoklaviert. Nachdem das Medium auf ca. 50° C abgekühlt war, wurden 937,5 µl Ampicillin (50mg/ml), 0,8 ml X-Gal (50 mg/ml) und 2,5 ml IPTG (100 mM) zugegeben. Anschließend wurde das Medium in sterile Petrischalen gegossen. Diese wurden bis zur Verwendung bei 4° C im Kühlraum gelagert.

Um die 16S rRNA-Gen-Abschnitte zu vervielfältigen, wurde die aus den Umweltproben extrahierte DNA als Template in eine PCR mit spezifischen 16S rRNA Primern in 4 x 25 µl Ansätzen eingesetzt (Abschnitt 2.4.2.1). In der vorliegenden Arbeit wurde ein kommerziell erhältliches Klonierungskit (Promega p GEM-T® Vector Systems, Maison, USA) verwendet, das auf der Methode der T/A–Klonierung basiert. Dieses beruht darauf, dass viele thermostabile DNA-Polymerasen die Fähigkeit besitzen, an jedes 3´-Ende eines PCR–Fragmentes überhängende A-Nucleotide anzufügen (3´-Adenylierungs-Aktivität). Anschließend lassen sich diese PCR–

Fragmente mit einem A–Überhang relativ einfach in einen linerarisierten T–Überhang Vektor ligieren (Müller, 2001).
Um einen Adenin–Überhang (A-Überhang) zu generieren war es erforderlich, einen finalen Elongationsschritt von 30 min bei 72 °C durchzuführen.
Zur Qualitätsüberprüfung des PCR-Produktes wurde ein Aliquot gelelektrophoretisch über ein Agarosegel analysiert. Die restliche Probe wurde währenddessen auf Eis gelagert. Aufgrund der Instabilität eines solchen A–Überhanges wurde sofort mit der Aufreinigung (Abschnitt 2.4.3.1) und der anschließenden Ligation fortgefahren.

Der Ligationsreaktionsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten (alle im Klonierungskit enthalten, Invitrogen, Karlsruhe) zusammen:

Rapid Ligationspuffer	5 µl
pGEM®-T Vector	0,5 µl
PCR-Produkt	4 µl
T4-DNA-Ligase	0,5 µl

Die jeweiligen Lösungen wurden zusammen pipettiert, gut gemischt, und anschließend über Nacht bei 4° C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Transformation. Vom zunächst abzentrifugierten Ligationsansatz (Minicentrifuge National Labnet Co., Woodbridge N.Y.) wurden 4 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis gelagert. Jetzt wurden 25 µl der kompetenten *E. coli* Zellen (5 min auf Eiswasser aufgetaut) dazu gegeben. Der Ansatz wurde durch leichtes „Anschnipsen“ des Reaktionsgefäßes vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 45-50 Sekunden bei 42° C im Heizblock. Danach wurde das Reaktionsgefäß sofort für zwei min auf Eis gestellt.

Zur Reaktivierung der *E. coli* -Zellen wurden 475 µl SOC-Medium (Bacto®-Trypton, Bacto®-yeast-Extrakt, 1 M NaCl, 1 M KCl, 2 M Mg^{2+}, 2 M Glucose, Klonierungskit Invitrogen, Karlsruhe) zu den einzelnen Klonierungsansätzen in die Reaktionsgefäße gegeben. Diese Reaktionsgefäße wurden dann auf einem Schüttler (220 rpm) für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden von jedem Ansatz 2 x 20 µl, 2 x 50 µl und 100 µl bzw. 150µl auf eine LB-Amp-X-Gal-IPTG-Platte (siehe oben) mit einem sterilen Drigalski-Spatel ausplattiert. Die so beimpften Platten wurden über Nacht bei

37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die mit den Klonen bewachsenen Platten nach kurzer Lagerung bei Raumtemperatur bis zum deutlichen Eintreten der Blaufärbung für zwei Stunden bei 4° C gelagert.

Anschließend konnten aufgrund der Blau-Weiß-Selektion die weißen Kolonien gepickt (nur erfolgreich ligierte Zellen erscheinen auf den X-Gal –Platten weiß) und auf eine Masterplatte[4] übertragen werden. Hierzu wurde ein autoklavierter Zahnstocher verwendet, mit dem vorsichtig eine weiße Kolonie gepickt und dann fünfmal auf das vormarkierte Feld einer Masterplatte überführt wurde. Insgesamt wurden für jede Materialprobe 100 Kolonien gepickt.

Zur Kontrolle der Ligation wurde pro Probe zunächst von 10 unterschiedlichen Klon-Kolonien Zellmaterial in PCR–Reaktionsgefäße überführt. Die anschließende PCR direkt aus dem Zellmaterial wurde mit M13-Primern durchgeführt. Diese Kontrolle wurde später auch für alle Klon-Kolonien durchgeführt, die kein positives Produkt mit Actinomyceten spezifischen Primern (siehe Abschnitt 2.4.2.1) zeigten.

Die 16S rRNA-Gen-Inserts der jeweils 100 gepickten Klone wurden auf ihre Zugehörigkeit zur Klasse der A*ctinobacteria* mit zwei, für Actinomyceten spezifischen Primersystemen (Com2xf / Ac1886r und S-C-Act-235-a-S-20/ S-C-Act-878-a-A-19, Stach *et al*. 2003) überprüft.
Die Klon-Kolonien, die ein positives PCR-Produkt mit mindestens einem der beiden Primersysteme zeigten, wurden zur weiteren Bearbeitung in Glycerin eingefroren.

2.4.4.2 Konservierung der Klon-Kolonien

Zur längeren Aufbewahrung der Zellen wurde eine Stammsammlung angelegt. Hierzu wurden 700 µl einer Übernachtkultur einer Klon-Kolonie zu 300 µl einer sterilen 99 %igen Glycerinlösung (Riedel de Haën®, Seelze) in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und bei – 80 °C gelagert.

[4] Masterplatten werden zur längeren Aufbewahrung der Klone angefertigt. Hierzu werden die Platten in kleine Kästchen/Bereiche unterteilt, wobei jeweils ein Klon auf einem dieser Kästchen mehrfach (3-5) aufgetragen wurde.

2.4.5 Sequenzierung durch Kettenabbruchverfahren (Terminatorverfahren)

Für die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene der gewonnenen Isolate und der 16S rRNA-Gen-Inserts der Klon-Kolonien wurde die enzymatisch katalysierte Synthese nach Sanger *et al*. (1977) verwendet.

Die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene der gewonnenen Isolate und der 16S rRNA-Gen-Inserts der Klon-Kolonien wurde als Auftragsarbeit größtenteils vom Sequenzierungsservice, Services in Molecular Biology (Berlin) und teilweise vom Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, JLU, Gießen durchgeführt.

Zur Sequenzierung der 16S rRNA-Gen-Inserts der Klon-Kolonien wurden der M13 reverse bzw. der M13 forward Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt.

2.4.5.1 Auswertung der Sequenzen

Die Rohdaten der Sequenzierung wurden in das Software Programm *MEGA* version 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007) eingelesen. Anhand einer BLAST®-Suche (Basic Local Alignment Search Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) in der primären Datenbank (Genebank) wurden die nächst verwandten Sequenzen und dazugehörigen Spezies (next blast relatives) ermittelt. Anschließend wurden die Vergleichssequenzen, welche von BLAST® zu den unbekannten Sequenzen im Programm *MEGA* geladen wurden mit diesen „aligned“ und Korrektur gelesen.

Im Anschluss an die Ermittlung der nächst verwandten Sequenzen zu den Isolaten bzw. Klonen mittels einer BLAST®-Suche wurden weitere verwandte Spezies der entsprechenden Gattungen aus der NCBI-Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) heruntergeladen und gemeinsam mit der unbekannten Sequenz und dem spezifischen Actinomyceten-Primerpaar im Mega 4 Programm „aligned“ und einem Vergleich (im folgenden als „Phylogenetische“ Berechnung bzw. Baumberechnung bezeichnet) unterzogen. Als Methode zur Stammbaumberechnung wurde der „Neighbour-Joining“-Algorithmus verwendet. Für eine angemessene statistische Sicherheit wurden die Berechnungen 1000-mal nach der Bootstrap-Methode wiederholt.

2.5 Zellkulturversuche, Toxizitätstests

Anders als bei physikalisch-chemischen und immun-chemischen Methoden, die zum Nachweis und zur Identifizierung einzelner Toxine eingesetzt werden, können biologische Testverfahren Hinweise zur Toxizität als Summenparameter liefern. Der Einsatz von Bioassays ist sinnvoll, wenn man generell Hinweise auf Toxine im Probenmaterial erhalten will.

Im Projekt kamen zwei unterschiedliche Bioassays zum Einsatz: Der MTT-Zytotoxizitätstest (2.5.1) und ein Zellkulturtest zur Immunmodulation mit Bronchialepithelzellen (A 549) und Makrophagen (2.5.2).

2.5.1 MTT - Zytotoxizitätstest

Ein wirkungsbezogener Zytotoxizitätstest (Gareis, 2006) ist der MTT-Test. Als Zielzelle wird die bekanntermaßen gegenüber Mykotoxinen besonders empfindliche SK-Zelllinie (Swine-Kidney) eingesetzt.

Der MTT-Test kann als Bioassay zur Untersuchung von Reinsubstanzen wie z.B. Mykotoxinen (Reubel *et al*., 1987; Reubel *et al*., 1989; Hanelt *et al*., 1995) eingesetzt werden, aber u.a. auch zur Untersuchung von Schimmelpilz- (Ostenfeld Larsen *et al*., 2002; Langseth *et al*., 1999; Langseth *et al*., 1997;) und Bakterienkulturen (Mehrer *et al.,* 2003), sowie von Umweltproben (Baumaterialien, Filterproben, Stäube) (Johanning *et al*., 1998; Gareis *et al*., 1999; Twaruzek *et al*., 2002).

Bei Umweltproben können auch nicht mikrobiell oder mikrobiell produzierte Bestandteile eine zytotoxische Wirkung auf die Zielzellen haben. Deshalb muss man Kontrollversuche durchführen, bei denen Referenzmaterialien verwendet werden, die keine mikrobielle Besiedlung aufweisen aber ansonsten dem getesteten, mikrobiell befallenen Material entsprechen.
Durch den Vergleich der Ergebnisse von Rohextrakten der Referenzproben mit Extrakten zu untersuchender Proben aus jeweils dem gleichen Matrixmaterial kann ein direkter Hinweis auf die Präsenz oder das Fehlen zytotoxisch wirkender Stoffe in der Probe abgeleitet werden.

Der MTT-Zellkulturtest zeichnet sich aus durch:

- Schnelle und einfache Durchführbarkeit (Screening-Methode)
  Die Verwendung von Mikrotiterplatten erlaubt die gleichzeitige Überprüfung mehrerer Proben.
- Hohe Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen bei geringer Spezifität, um möglichst viele Zytotoxine erfassen zu können.
- Geringe Sensitivität gegenüber Matrixbestandteilen der Proben, um die Testung von Rohextrakten verschiedener Ausgangsmaterialien zu ermöglichen.
- Die SK-Zielzelle erweist sich gegenüber den Rohextrakten und Matrixeffekten der Probenmaterialien als weitestgehend stabil, weshalb Messungen in Abhängigkeit des Ausgangsmaterials in einem Bereich zwischen etwa 50-1000 mg Probenaliquot/ml Zellkulturmedium (erste Konzentrationsstufe der Verdünnungsreihen) durchgeführt werden können.
- Objektive Befunderhebung
  Zellschäden werden durch eine colorimetrische Reaktion, bei der das gelbgefärbte Tetrazoliumsalz MTT (3-[4-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) zu violetten Formazanen quantitativ umgesetzt wird, erfasst (Mosmann, 1983, Kuhn *et al.,* 1941).

2.5.1.1 Auswahl der Materialproben und Teststämme

Vom Institut für Innenraumdiagnostik wurden Teile der homogenisierten Proben aus den für dieses Projekt ausgewählten Objekten für den MTT-Test an Prof. Gareis geschickt. Der MTT-Test wurde mit allen homogenisierten Materialproben durchgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse des MTT-Tests mit den homogenisierten Proben wurden zwei Materialproben zur Analyse der hieraus isolierten Stämme ausgewählt, und zwar die Proben aus Objekt 04 (= KMF-Dämmmaterial) und aus Objekt 12 (= Wandputz). Insgesamt wurden aus diesen Proben 27 Stämme an Prof. Gareis zur Untersuchung mittels MTT-Test geschickt, und zwar 6 Isolate vom Labor Umweltmykologie GbR und 8 tiefgefrorene Isolate vom HKI Jena aus Objekt 04 sowie 13 Isolate vom Labor Umweltmykologie GbR aus Objekt 12.

2.5.1.2 Vorbereitung der Materialproben und Teststämme

Zur Herstellung der Rohextrakte wurden 2 g homogenisiertes Probenmaterial mit 40 ml Methanol über Nacht eingeweicht, am nächsten Tag zusätzlich mit je 40 ml Chloroform und Methanol auf dem Schüttler extrahiert und filtriert. Zur Filtrierung wurden Faltenfilter verwendet (Bezeichnung MN 615 ¼, für normale Laborarbeiten, mittelschnell filtrierend, Durchmesser 185 mm).

Die ausgewählten Actinomyceten-Teststämme wurden von der Umweltmykolgie auf CASO-Agar mit Cycloheximid beimpft und an Prof. Gareis geschickt. Als erstes wurden diese auf CASO-Agar ohne Cycloheximid angezüchtet, um das Wachstum möglichst zu fördern. Die Stämme wurden hierzu großflächig und gleichmäßig auf den Kulturplatten ausgestrichen und 3 Wochen bei 25 °C bebrütet. Danach wurde unter Einsatz des gesamten bewachsenen Agars mit Chloroform (2 x 25 ml) extrahiert und die Extrakte mit Faltenfilter MN 615 ¼ gefiltert.

Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer wurden die Rückstände in entsprechende Probengefäße überführt, bei Bedarf aliquotiert, mit Stickstoff eingeengt und in 1 ml Zellkulturmedium (MEM) mit 1,7% Ethanol und 0,3% DMSO unter Schütteln auf einem Probenschüttler und Ultraschallbehandlung gelöst.

Die Probenverdünnungen (Verdünnungsschritte 1:2) wurden ebenfalls in diesem Zellkulturmedium hergestellt.

2.5.1.3 Zellkultur

Verwendet wurde die adhärent wachsende, aneuploide SK-Zelllinie (Swine Kidney) mit epitheloider Morphologie, die aus der Zellkultursammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München stammt. Die Anzucht, Kultivierung und Einsaat der Zellen in 96-Lochmikrotiterplatten erfolgte nach standardisierten Zellkulturverfahren (Friedrich, 1991; Hanelt *et al.*, 1995).

2.5.1.4 Durchführung des MTT-Zytotoxizitätstests

Als höchste getestete Probenmenge wurde die Konzentration bzw. Verdünnungsstufe verwendet, bei der eine zytotoxische Wirkung des

Probenmaterials sicher ausgeschlossen werden konnte. Ermittelt wurden diese „Grenzkonzentrationen“ mittels Kontroll- bzw. Referenzproben des gleichen Materials ohne mikrobielle Belastung.
Bei sog. „Umweltproben“ (Stäube, Luftfilter, Gipskarton etc.) wird erfahrungsgemäß von 2000 mg/ml als Grenzkonzentration ausgegangen.
Die Materialextrakte wurden dann, wenn eine deutliche zytotoxische Wirkung vorlag, jeweils um den Faktor 2 verdünnt, und zwar solange bis weniger als 50 % der Zellen gehemmt wurden. Begonnen wurde mit der Verdünnung 1000 mg/ml gefolgt von 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62,50 mg/ml, 31,25 mg/ml. Höhere Verdünnungen waren bei den Proben nicht erforderlich.

Bei der Untersuchung der Teststämme wurde die Plattenfläche als Bezugsbasis gewählt, obwohl kein Flächenabstrich erfolgte, sondern der gesamten Agar eingesetzt wurde. Diese Vereinfachung ist deshalb unproblematisch und ermöglicht uneingeschränkt qualitative Vergleiche, da die Platten einheitlich mit dem gleichen Agar in gleicher Schichtdicke von 5 mm gegossen worden sind.
Mit den Teststämmen wurde somit ausgehend von 62,5 cm^2/ml entsprechend den Materialproben verfahren, d.h. Verdünnung um jeweils den Faktor 2 (31,25 cm^2/ml, 15,62 cm^2/ml, 7,81 cm^2/ml etc.) bis weniger als 50 % der Zellen gehemmt waren.

Die Belastung der Zielzellen mit den Probenverdünnungen erfolgt gleichzeitig mit der Zelleinsaat, da die Testempfindlichkeit am höchsten ist, wenn die Probenextrakte zusammen mit den Zellsuspensionen in die Platten gegeben werden.

Von den im Zellkulturmedium gelösten Probenaliquots wurden je 100 µl der Verdünnungen mit Mehrkanalpipetten in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert.

Nach einer Inkubation von 48 h wurden 20 µl von dem in PBS (Phosphate-Buffered-Saline) gelösten und sterilfiltrierten MTT-Farbreagenz (3-[4-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) zugegeben. Nach weiteren 4 h Inkubation wurde der MTT-Umsatz als Maß der Zellschädigung gemessen.
Hierzu wurden eine photometrische Messung der in 100 µl DMSO gelösten violetten Farbkristalle bei 510 nm durchgeführt (Hanelt et al., 1995).

2.5.1.5 Auswertung des MTT-Zytotoxizitätstests

Die Auswertung der jeweiligen Fluoreszenzsignale erfolgte über ein entsprechendes Messprogramm (Mikrowin 2000). Dabei wurden die Extinktionen jeder Probenkonzentration mit der unbehandelten Zellkontrolle (100% Spaltungsaktivität) verglichen und ins Verhältnis gesetzt. Als toxische Grenzkonzentration wurde der IC_{50} Wert ermittelt, d.h. die niedrigste Konzentration (µg, mg, ml oder cm^2 Probenaliquot) pro ml Zellkulturmedium, die die Spaltungsaktivität um 50 % reduziert (Abb. 1). Ein Rückschluss auf die Präsenz von zytotoxischen Substanzen in Verdachtsproben ergibt sich aus dem Vergleich der IC_{50}-Werte zwischen den fraglichen Proben und entsprechenden Negativkontrollen der Materialien.

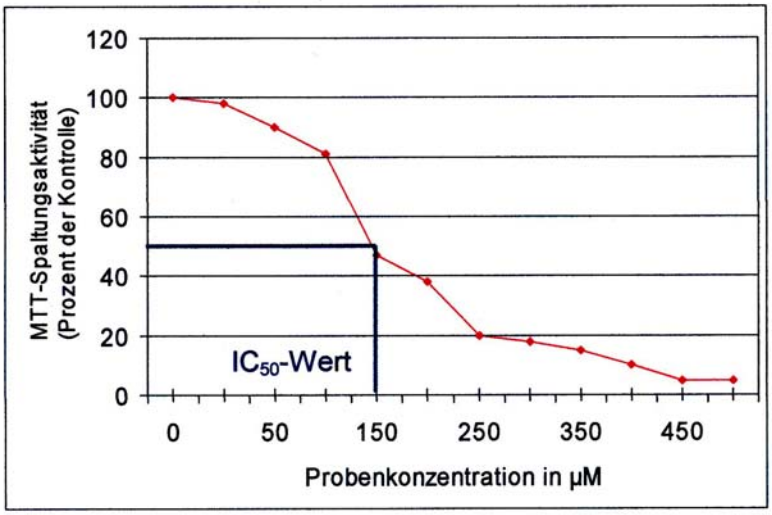


Abbildung 1: Bestimmung des IC_{50}-Wertes, d.h. der Konzentration der Probe, die in Relation zur Kontrolle eine 50%-ige Reduktion der MTT-Spaltungsaktivität bewirkt.

2.5.2 Zellkulturtests zur Immunmodulation (TNF-α bzw. IL-6 Test)

Die Zellkulturtests zur Immunmodulation wurden mit Bronchialepithelzellen (A 549) und Makrophagen (RAW 264.7) durchgeführt. Messgröße zur Bestimmung der immun-modulatorischen Eigenschaften der biogenen Noxen war die Freisetzung von TNF-α bzw. IL-6 als pro-inflammatorische Interleukine (Wang *et al.*, 1999, Ruotslainen *et al.*, 1998).

Als biogene Noxen wurden Konidien-Suspensionen von Schimmelpilzen und Sporensuspensionen von Actinomyceten eingesetzt, die aus den Materialproben der

Untersuchungsobjekte isoliert worden waren. Aufgrund der in Vortests ermittelten zytotoxischen Wirkung der Materialextrakte, wurden die Proben 4, 6, 7, und 12 für Tests zur immun-modulatorischen Wirkung ausgewählt. Zusätzliches Kriterium für die Wahl der Proben war die Erfassung eines möglichst breiten Spektrums von Mikroorganismen.

2.5.2.1 Vorbereiten der Teststämme

Die Schimmelpilze wurden auf MEA-Agar in Schrägagarröhrchen über 14 Tage angezüchtet, anschließend wurden die Konidien mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und die Suspensionen auf die benötigten Konidien-Konzentrationen eingestellt (Auszählen in Thoma-Kammer und Verdünnung der Ursprungslösung). Für die Versuche wurden nicht aufgeschlossene Sporen eingesetzt, so dass sowohl Zellinhaltsstoffe als auch Zellwandsubstanzen in den Testansätzen vorhanden waren.

Mit den Actinomyceten wurde in ähnlicher Weise verfahren. Die Kultivierung direkt aus der Materialprobe wurde auf ISP-3-Agar durchgeführt, da hier die sporenbildenden Actinomyceten am besten sporulieren und somit einerseits große Sporenmengen erhalten wurden und andererseits gerade die sporenbildenden Arten, die auch in der Luft nachweisbar sind, erfasst werden konnten. Anschließend wurden die Sporen von allen gewachsenen Kolonien mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und die Suspensionen auf die benötigten Sporenkonzentrationen eingestellt.

Für die ersten Vorversuche wurden für Schimmelpilze Suspensionen in Konzentrationen von 10^2 bis 10^7 Konidien/ml eingestellt. Für toxinogene Pilzarten wie *Stachybotrys chartarum* zeigte sich eine gewisse Sättigung der proinflammatorischen Wirkung bei den hohen Konzentrationen von 10^6 und 10^7 Konidien/ml. Vor diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung real zu erwartender Konzentrationen von Schimmelpilzen im Innenraum wurden in den weiteren Versuchen lediglich zwei Konzentrationen (10^3 und 10^5 Konidien/ml) getestet.

Ähnliches ergab sich auch für die Sporensuspensionen der Actinomyceten. Höhere Konzentrationen (> 10^4 pro ml) ergaben in den Vorversuchen eine Interleukin-

Freisetzung, die mit der Positivkontrolle (LPS, *Stachybotrys chartarum* 10^7) vergleichbar war. Daher und aufgrund der zu erwartenden Sporenkonzentrationen in der kontaminierten Innenraumluft wurden nur Konzentrationen von 10^2 und 10^3 in die Tests mit einbezogen.

2.5.2.2 Zellkulturen

Die Lungenzellen (Bronchialepithelzellen, A 549) und Makrophagen (RAW 264.7) wurden in DMEM 1g Glukose/L (Biochrom, Cat. Nr. F0415), bzw. DMEM 4,5g Glukose/L (Lonza, Cat. Nr. BE 12-614F) angezüchtet. Vor jedem Versuchsansatz wurden während der routinemäßigen Passagierung Zellen in Reaktionsgefäße überführt, auf eine Konzentration von 106 Zellen je ml eingestellt und neues Medium zugesetzt.

2.5.2.3 Durchführung des Zellkulturtests

Zu je 1 ml Zellsuspension (10^6 Zellen) wurde 1 ml einer entsprechend konzentrierten Konidien- bzw. Sporensuspension zugesetzt. Diese Ansätze wurden über 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, um daraus die Interleukin-Konzentration zu bestimmen; die Zellen wurden einer Färbung (Trypan-Blau Färbung) unterzogen, um den Anteil der lebensfähigen Zellen festzustellen.

2.5.2.4 Auswertung des Zellkulturtests

Aus den Überständen wurden die Interleukin-Konzentrationen mittels eines ELISA (Firma BD, Cat. No. 550610) bestimmt. Die Messungen wurden exakt nach den Anleitungen der Firma BD durchgeführt, die auf der Internetseite der Firma online verfügbar sind (http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/manuals/live/web_enabled/01-81014-550950-C.pdf). Anhand von 6 Standardkonzentrationen wurde eine Kalibration durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde der Zellüberstand einer Probe ohne biogene Noxen eingesetzt, als Positivkontrolle wurden zunächst *Stachybotrys chartarum* und *E. coli*, im späteren Verlauf der Experimente reines Lipopolysaccharid (LPS: 15 µg/ml) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierungsabhängige Analysen (Isolierung) einschließlich Sequenzierung

3.1.1 Beschreibung der Schimmelpilz-Arten in den Baumaterialien

Die häufigsten Schimmelpilz-Arten in den Materialproben waren *Acremonium* sp., *Aspergillus penicillioides, Aspergillus versicolor, Emericella nidulans, Eurotium herbariorum, Penicillium chrysogenum, Penicillium islandicum* und 2 Arten die als sterile Myzelien isoliert wurden und noch nicht identifiziert wurden.

Das Spektrum der Arten variierte erheblich in Abhängigkeit von der Art des Baumaterials. In 2 von 5 Zementputz-Proben (Proben 1, 9) dominierte *Aspergillus versicolor*, in ebenfalls 2 von 5 Zementputzproben dominierte *Penicillium chrysogenum* (Proben 7, 8), in einer Probe kamen beide Arten gleich häufig vor (Probe 6). Bei zwei der drei Proben (Proben 1, 6), in denen *Aspergillus versicolor* sehr häufig war, wurden Actinomyceten in der Größenordnung von 10^5 KBE/g nachgewiesen. In den Proben, in denen *Penicillium chrysogenum* dominierte, wurden Actinomyceten in der Großenordnung von 10^6 KBE/g (Proben 7, 8) bzw. 10^5 KBE/g (Probe 9) gefunden.

In Mineralwolle und Styropor aus einem Keller (Wasserschaden durch Kondensfeuchte) wurden hohe KBE-Zahlen für sterile Myzelien festgestellt, wobei in der Mineralwolle *Cladosporium cladosporioides* und im Styropor *Penicillium islandicum* die zweithäufigsten Schimmelpilz-Arten neben den sterilen Mycelien waren. Die Anzahl der Actinomyceten war hier vergleichsweise niedrig bei 10^3 bzw. 10^4 KBE/g. In einer Mineralwolle-Probe wurden insgesamt sehr niedrige KBE-Zahlen sowohl für Schimmelpilze als auch für Actinomyceten gefunden, hier waren *Eurotium herbariorum* und sterile Myzelien am häufigsten vertreten.

In drei Putz-Proben dominierte *Aspergillus penicillioides*, wobei in einer Probe (Probe 10 = Lehmputz) *Penicillium glabrum*, in der zweiten Probe (Probe 11) *Acremonium* sp. die zweithäufigsten Arten waren. Die Konzentrationen der Actinomyceten lagen hier im Bereich von 10^5 KBE/g.

Neben der Art des Baumaterials hatte die Wasseraktivität (a_W-Wert) des Substrates einen entscheidenden Einfluss auf das Spektrum der Schimmelpilz-Arten. *A. penicillioides* dominierte drei mal auf Putz (1 Lehmputz) und einmal auf Tapete. Das Vorkommen von *A. penicillioides* wird vorwiegend von der Wasserverfügbarkeit (niedriger a_W-Wert) bestimmt und hängt wahrscheinlich weniger von der Beschaffenheit des Substrates ab.

In der Styroporprobe des Objektes 13 A (rechts) dominierte *Chaetomium globosum*, gefolgt von *P. chrysogenum*, in der zweiten Styroporprobe aus diesem Objekt (13 B, links) war nur *P. chrysogenum* vorherrschend. In den beiden Styropor-Proben aus dem Objekt 13 dominierte in beiden Proben *A. versicolor*. Auf einer von 2 Tapeten-Proben des Objektes 14 fand sich vorwiegend *A. penicillioides*. Im Objekt 15 (Putz Keller) dominierte *Acremonium* sp. gefolgt von *A. versicolor*. Im Objekt 16 wurden *Acremonium* sp. und *A. penicillioides* in den beiden Parallelproben in leicht unterschiedlichen Verhältnissen nachgewiesen.

Acremonium sp. bzw. *Acremonium*-ähnliche Schimmelpilze wurden in 4 von 16 (25%) Objekten als dominante Schimmelpilze nachgewiesen. *P. chrysogenum* und *A. penicillioides* wurden in 4 von 16 Objekten (25%); *A. versicolor* in 2 von 16 Objekten (12,5%) und *Chaetomium globosum* in 1 von 16 (6,25%) als dominant nachgewiesen.

Die dominanten Schimmelpilze wurden isoliert und in die Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin der RWTH Aachen aufgenommen, so dass in weiteren Versuchen mit diesen Stämmen *in-vitro* Tests durchgeführt werden können.

Die bisherigen Daten deuten an, dass es gewisse Zusammenhänge zwischen dem Artenspektrum der Schimmelpilze und der Gesamtzahl der Actinomyceten gibt. Die Proben, in denen *P. chrysogenum* dominiert, zeigten die höchsten Actinomyceten-Konzentrationen (10^5-10^6 KBE/g), gefolgt von den Proben, in denen *A. versicolor* dominierte (10^5 KBE/g). In den Proben, in denen andere Pilzarten vorherrschten, lagen die KBE-Zahlen für Actinomyceten im Bereich von 10^3 bis 10^4 KBE/g.

Tab. 9: Koloniebildende Einheiten (KBE/g Material) der nachgewiesenen Schimmelpilzarten in den Baumaterialien (Proben 1 bis 16). Jede Probe wurde im Doppelansatz untersucht (Nr. A, B). Die KBE je g wurden aus den jeweils angegebenen Verdünnungsstufen hochgerechnet (Nr.A/B (0, 1, 2)).

Spezies:	***Acr.***	***ster.M.1 (S***	***ster.M.2 (F***	***A. can.***	***A. ver.***	***A. pen.***	***C. cla.***	***Chaet.***	***Dorat.***	***E. her.***	***E. nid.***	***P. bre.***	***P. chr.***	***P. cit.***	***P. cory.***	***P. gla.***	***P. fel.***	***P. isl.***	***P. pol.***
Probe-Nr.:																			
1A (1)	n.n.	2,3E+03	n.n.	n.n.	5,3E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,3E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
1B (1)	n.n.	1,0E+03	n.n.	3,3E+02	9,0E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,8E+04	3,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2A (2)	n.n.	6,3E+05	9,3E+05	n.n.	n.n.	n.n.	2,5E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2B (2)	n.n.	6,9E+05	9,3E+05	n.n.	n.n.	n.n.	2,7E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3A (1)	n.n.	2,9E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	8,3E+03	n.n.
3B (1)	n.n.	1,5E+04	3,3E+02	n.n.	6,7E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,3E+03	n.n.
4A (0)	n.n.	6,0E+02	6,7E+01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,7E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+01	n.n.
4B (0)	n.n.	1,7E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+01	n.n.
5A (0)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,7E+01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,7E+01	4,4E+03	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+01	n.n.	n.n.
5B (0)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,7E+01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,3E+03	n.n.	n.n.	3,3E+01	3,3E+01	n.n.	n.n.
6A (2)	6,7E+03	1,0E+05	n.n.	n.n.	6,7E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
6B (2)	n.n.	3,3E+04	n.n.	n.n.	3,3E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,0E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7A (2)	n.n.	3,3E+03	n.n.	n.n.	1,3E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,5E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7B (2)	n.n.	0,0E+00	n.n.	n.n.	3,3E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,2E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
8A (2)	n.n.	6,7E+03	n.n.	n.n.	1,0E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,6E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
8B (2)	n.n.	3,3E+03	n.n.	n.n.	6,7E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,1E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
9A (1)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,2E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+02	n.n.	n.n.
9B (1)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,8E+04	n.n.	6,7E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,7E+03	n.n.	n.n.	n.n.	6,7E+02	n.n.	n.n.
10A (2)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,1E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,0E+04	n.n.	n.n.	n.n.
10B (2)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,9E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,3E+04	n.n.	n.n.	n.n.
11 A (0)	9,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	8,7E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
11 B (0)	7,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	9,8E+04	1,0E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
12 A (1) re.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,0E+03	n.n.	n.n.	1,2E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,4E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
12 B (1) re.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,7E+03	n.n.	n.n.	1,1E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,0E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
12 A (2) li.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,3E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,6E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
12 B (2) li.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,0E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
13 A (1) E742	1,0E+03	n.n.	n.n.	n.n.	3,6E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,7E+04	6,7E+02	3,7E+03	n.n.	3,7E+03	n.n.	n.n.	n.n.
13 B (1) E742	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	9,0E+03	n.n.	3,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.	3,7E+03	n.n.	3,3E+02	1,0E+03	3,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+02
13 A (1) E 366	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,6E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,7E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+02
13 B (1) E 366	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,1E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,0E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
14 A (0)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,7E+01	1,8E+04	1,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
14 B (0)	n.n.	4,0E+02	n.n.	n.n.	3,3E+01	1,0E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
15 A (0)	6,6E+03	n.n.	n.n.	n.n.	6,3E+02	3,0E+02	1,7E+03	n.n.	3,3E+01	n.n.	n.n.	1,3E+02	3,3E+01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
15 B (0)	4,5E+03	n.n.	n.n.	n.n.	2,2E+03	n.n.	9,0E+02	n.n.	n.n.	6,7E+01	n.n.	1,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.	1,3E+02	n.n.	n.n.	n.n.
16 A (0)	5,5E+03	n.n.	n.n.	n.n.	6,7E+01	8,1E+03	1,7E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+01	n.n.	n.n.	n.n.
16 B (0)	9,8E+03	n.n.	n.n.	n.n.	2,3E+02	1,3E+03	1,7E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3E+01	n.n.	n.n.	3,3E+01	n.n.	n.n.	n.n.

Legende: n.n. = nicht nachweisbar, d.h. die Konzentration liegt unterhalb der Nachweisgrenze, die sich durch Verdünnung aus den jeweiligen Verdünnungsstufen ergibt: bei (0) = 33 KBE/g; (1) = 333 KBE/g; (2) = 3333 KBE/g). *A. = Aspergillus, Acr. = Acremonium* spp., *C. = Cladosporium, Chaet. = Chaetomium, E. her. = Eurotium herbariorum, E. nid. = Emericella nidulans, P. = Penicillium,P.* spp. = nicht differenzierte *Penicillium-Arten, W. = Wallemia*.

3.1.2 Isolierung der Bakterien

Die Isolate aus den Materialproben, sowie aus vier Bioaerosolproben wurden wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben gewonnen. Die weitere Aufbereitung (DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung) der Isolate erfolgte wie in Abschnitt 2.4 erläutert. In Probe 13B wurden weder kultivierungsabhängig noch kultivierungsunabhängig Actinomyceten nachgewiesen.

Von den insgesamt 407 gewonnenen Isolaten aus den übrigen 17 Materialproben (siehe Anhang) und vier Bioaerosolproben (1-4) wurden 325 Referenzisolate ausgewählt und die 16S rRNA Gensequenzen bzw. Teilsequenzen von 318 Isolaten analysiert (siehe Abschnitt 2.4.5). Die erste Einordnung der 16S rRNA-Gensequenzen erfolgte mit Hilfe einer BLAST®-Suche, mit der die nächst verwandten Spezies bzw. die Zugehörigkeit zu einer Gattung (Tab. 10) ermittelt wurde. Von 7 Isolaten konnte das 16S rRNA-Gen nicht sequenziert werden.

Von den 318 sequenzierten/teilsequenzierten Isolaten konnten 283 Isolate der Klasse der *Actinobacteria* zugeordnet werden und 17 Isolate zu anderen Bakterienklassen wie *Alphaproteobacteria* und *Firmicutes*. Weitere 25 Isolate konnten morphologisch bzw. molekularbiologisch nicht identifiziert werden, da entweder eine nicht analysierbare Sequenz des 16S rRNA Gens erhalten wurde, oder die Isolate später nicht mehr kultivierbar waren. Die 17 „Nicht-Actinomyceten“-Isolate wurden bei der weiteren molekularbiologischen Bearbeitung vernachlässigt, da in diesem Projekt der Schwerpunkt auf der Diversitätsanalyse der *Actinobacteria* lag.

Insgesamt wurden die 283 Isolate 35 verschiedenen Gattungen innerhalb der Klasse der *Actinobacteria* zugeordnet, wobei Vertreter der Gattungen *Amycolatopsis*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora* und *Streptomyces* am häufigsten detektiert werden konnten (Tab. 10).

Die Ergebnistabelle, in der die Daten zu den Referenzisolaten zusammengefasst sind, kann im Anhang eingesehen werden.

Tab. 10: Gattungszuordung der gewonnenen Isolate aus Material- und Bioaerosolproben anhand der Vollsequenzen des 16S rRNA-Gens

	Taxon	Probe 01	Probe 02	Probe 03	Probe 04	Probe 05	Probe 06	Probe 07	Probe 08	Probe 09	Probe 10	Probe 11	Probe 12A	Probe 12B	Probe 13A	Probe 14	Probe 15	Probe 16	Probe 01-Luft	Probe 02-Luft	Probe 03-Luft	Probe 04 Luft	Gesamt Material + Luft
1	*Actinomadura*																				1		1
2	*Agrococcus*								1														1
3	*Amycolatopsis*	1		3		3	2	2	3			2	1	1		2							20
4	*Arsenicicoccus*																			1			1
5	*Arthrobacter*	2							2				5						1				10
6	*Brachybacterium*											1					1						2
7	*Brevibacterium*	1	2	1			1														1		6
8	*Citricoccus*		1						1														2
9	*Corynebacterium*		1																				1
10	*Isoptericola*			1													1						2
11	*Janibacter*																		1				1
12	*Jiangella*	1		1		1								1			1						5
13	*Kocuria*		2								4								1				7
14	*Kribbella*	1																					1
15	*Kytococcus*																			1			1
16	*Lentzea*					1							1	1				1					4
17	*Leucobacter*										1												1
18	*Microbacterium*	1		1											2		2						6
19	*Micrococcus*	1	1		1																1		4
20	*Microlunatus*													1									1
21	*Micromonospora*		1									1	3										5
22	*Mycobacterium*	2		1		1	1										2						7
23	*Nocardia*	4		2		1	1	1	1			1	1	1		1	1						15
24	*Nocardioides*			1		3		1					2	1									8
25	*Nocardiopsis*	1	1			3	5	2		3				1		2			3	1			22
26	*Oerskovia*																1						1
27	*Ornithinicoccus*	1																					1
28	*Prauserella*					1	1																2
29	*Promicromonospora*	1		1		4	1	2	1	1		1		3			1						16
30	*Propionicicella*								1														1
31	*Pseudonocardia*		4	1	1		1	3		1			1	2	2	2	1						19
32	*Rhodococcus*	3													1		1		1		1		7
33	*Saccharopolyspora*		3				4		2	1			3										13
34	*Streptomyces*	27	4	7	3	5	11	2		3		2	2		4		7	7		1	2	1	88
35	*Tsukamurella*	1																					1
	identifizierte Isolate	48	20	20	5	23	28	13	12	9	5	8	19	12	9	7	19	8	7	4	6	1	283
	Anzahl ausgewählter Referenzisolate	49	20	20	5	27	30	18	13	10	10	9	20	14	14	14	20	12	7	5	6	2	325
	fehlende/schlechte Sequenz/ wächst nicht mehr	1	0	0	0	4	2	3	0	1	3	1	0	2	3	1	0	2	0	1	0	1	25
	keine Actinomyceten							2	1		2		1		2	6	1	2					17

3.1.2.1 Vergleich der Sequenzen und „phylogenetische“ Berechnungen

Die berechneten Stammbäume der jeweiligen Gattung zeigen die „phylogenetische“ Zuordnung der innerhalb dieser Gattung gewonnenen 16S rRNA-Gensequenzen der Isolate (ca. 1000 -1400 bp) zu beschriebenen Spezies mit validierten Namen (Typ-Stämme, http://www.bacterio.cict.fr/index.html). Die Bearbeitung und Sequenzierung der Isolate erfolgte wie in Abschnitt 2.4 beschrieben. Die Vergleichssequenzen wurden der primären Datenbank „Genbank“ entnommen. Als „Outgroup“ wurden Sequenzen von Typ-Stämmen einer jeweils anderen Gattung innerhalb der Klasse der *Actinobacteria* gewählt. Die Stammbaumberechnung erfolgte nach einem multiplen Alignment (Clustal W) über eine Distanzberechnung (Kimura-2-model) und der Neigbourjoining- Clusteranalyse. Alle dazugehörigen Schritte wurden mit dem Softwarepaket Mega Version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) durchgeführt. Die Bootstrap-Werte an den Knotenpunkten basieren auf 1000 wiederholten Berechnungen. Die Stammnummern und Datenbank- (Accession) Nummern sind im Stammbaum angegeben (siehe Anhang).

Die Verteilung der Isolate in den Stammbäumen ist innerhalb der jeweiligen Gattungen sehr heterogen.
Ein wiederholtes Auftreten bestimmter bzw. ähnlicher Spezies ist sowohl in derselben Probe, als auch bei den verschiedenen Proben festzustellen. Dies ist z.B. sehr deutlich durch die Gruppenbildung von Isolaten verschiedener Proben bei den „phylogenetischen“ Stammbäumen der Gattungen *Amycolatopsis, Saccharopolyspora, Nocardia, Nocardioides, Nocardiopsis* und *Pseudonocardia* zu erkennen. Gleichzeitig werden sowohl in den gleichen, als auch in den unterschiedlichen Proben unterschiedliche Spezies detektiert, die relativ weit über den jeweiligen phylogenetischen Stammbaum verteilt sind. Die Darstellungen der verschiedenen Bäume befinden sich im Anhang.

Nachfolgend werden die Daten für einen besseren Überblick zusammengefasst dargestellt.

3.1.2.2 Übersicht über die häufigen Gattungen und Arten

Für die nachfolgend dargestellte Auswertung der häufigsten Gattungen und Arten wurden nur die Referenzisolate der Materialproben berücksichtigt. Soweit vorhanden, wurden für die Zuordnung dieser Proben die Ergebnisse der molekularbiologischen Identifizierungen verwendet. Für einige Referenzisolate, für die keine molekularbiologische aber eine morphologisch-chemische Zuordnung vorlag, wurde diese Zuordnung verwendet.
Insgesamt wurden in der vorliegenden Studie aus den Materialproben 284 Referenzisolate aus 28 Actinomyceten-Gattungen mit morphologischen und molekularbiologischen Methoden zunächst bis auf die Gattungsebene zugeordnet (s. Anhang).

.

Bei den Proben 1 bis 4 wurden in einer Vorbereitungsphase von den Arbeitsgruppen zur Etablierung der Probenaufarbeitung, der Kultivierung sowie der Differenzierung unterschiedliche Methoden verwendet. Die zum Teil erheblichen Unterschiede in der Gesamtkonzentration an Actinomyceten und der Gattungszusammensetzung bei diesen Proben verdeutlichen, wie wichtig die Erstellung und Einhaltung abgestimmter Analysemethoden für vergleichende Untersuchungen sind.
Die Proben 5, 6 und 7 wurden von den Arbeitsgruppen Stuttgart und Berlin nach den zuvor abgestimmten Methoden parallel untersucht. Trotzdem lagen die Konzentrationen der parallel untersuchten Proben bis zu einer Zehnerpotenz auseinander (Abb. 2, Vergleich Proben 05-Be und 05-St bzw. 07-Be und 07-St).
Bei den dargestellten Proben handelte es sich in der Mehrzahl um mineralische Materialien wie Schüttungsmaterial (Probe 5), Wandputz (Proben 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15 und 16) und Lehmputz (Probe 10). Zusätzlich wurden mit der Probe 13 eine Styroporprobe und mit der Probe 14 eine Tapete untersucht.
Die höchsten Konzentrationen wurden in den mineralischen Proben festgestellt (Abb. 2). Im Einzelnen lagen die Konzentrationen in einem Bereich zwischen $3{,}4 \times 10^5$ KBE/g und $1{,}5 \times 10^7$ KBE/g Material. Die beiden niedrigsten Konzentrationen wurden in der Styroporprobe ($1{,}8 \times 10^4$ KBE/g) bzw. in der Tapetenprobe ($1{,}7 \times 10^5$ KBE) festgestellt.

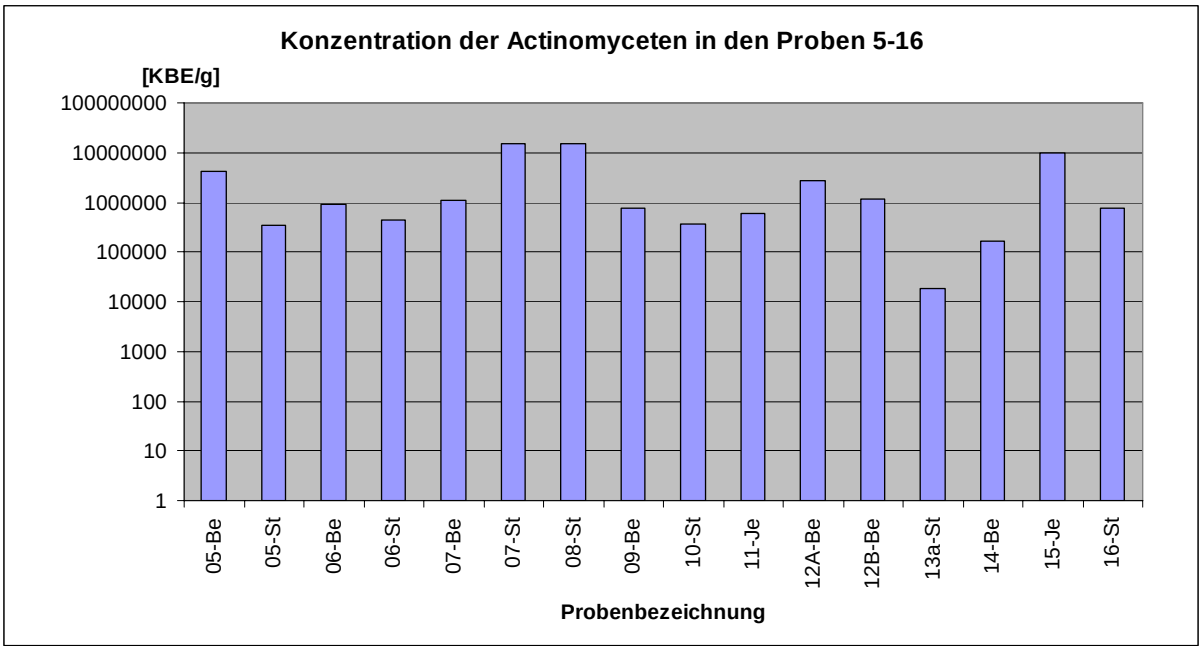


Abb. 2: Konzentration der Actinomyceten in den Proben 5 bis 16 in logarithmischer Auftragung

Probenbezeichnung: Probennummer und Projektpartner, der die Untersuchung durchgeführt hat. Be = Berlin, St= Stuttgart, Je = Jena

Tab. 11 gibt einen Überblick über die zahlenmäßige Dominanz (siehe 2.3.4) unterschiedlicher Gattungen in den Materialproben. Aufgeführt ist die Anzahl der Referenzisolate, die den Dominanzklassen 1-3 zugeordnet wurden. Gesondert aufgeführt sind die Isolate, die nicht differenziert wurden (insgesamt 15 Isolate).

Unter Dominanzklasse 3 sind die Referenzisolate aufgeführt, die die höchste Dominanzklasse in den Proben darstellten. Insgesamt wurden in den untersuchten Proben 49 Referenzisolate mit Dominanzklasse 3 festgestellt. Hierunter fallen auch unterschiedliche Referenzisolate der gleichen Gattung in einer Probe.

In der Tabelle 10 wird die dominierende Stellung von Referenzisolaten der Gattung *Streptomyces* deutlich. Insgesamt wurden 97 Referenzisolate dieser Gattung aus den Proben isoliert (molekularbiologische und morphologisch-chemische Differenzierung zusammengefasst). 20 dieser Isolate (ca. 21% der insgesamt 97 Streptomyceten-Stämme) wurden in so hohen Konzentrationen festgestellt, dass sie der Dominanzklasse 3 zugeordnet wurden.

Weitere Gattungen, deren Arten mit erhöhter Häufigkeit (12 bis 23 Referenzisolate je Gattung) in den Proben festgestellt wurden, sind *Amycolatopsis* (23 Referenzisolate), *Nocardia* (14 Referenzisolate), *Nocardiopsis* (16 Referenzisolate), *Promicromonospora* (17 Referenzisolate), *Pseudonocardia* (19 Referenzisolate) und *Saccharopolyspora* (12 Referenzisolate).

In den Proben wurden jeweils 4 bzw. 5 Referenzisolate der Gattungen *Amycolatopsis, Nocardia, Promicromonospora* und *Pseudonocardi*a mit hohen Konzentrationen erfasst und der Dominanzklasse 3 zugeordnet wurden. Zusätzlich wurden 2 Referenzisolate der Gattung *Saccharopolyspora*, aber kein Isolat der Gattung *Nocardiopsis* der Dominanzklasse 3 zugeordnet. Die Verteilung der Referenzisolate der betrachteten Gattungen auf die drei Dominanzklassen variiert. Es fällt auf, dass ein erhöhter Anteil der Referenzisolate der Gattungen *Amycolatopsis, Promicromonospora* und *Pseudonocardia* in der Dominanzklasse 2 und die der Gattung *Nocardiopsis* überwiegend in der Dominanzklasse 1 liegen. Insgesamt stellten die angeführten sieben Gattungen (*Amycolatopsis, Nocardia, Nocardiopsis, Promicromonospora, Pseudonocardia, Saccharopolyspora* und *Streptomyces*) ca. 70% der Referenzisolate (198 von 284 Referenzisolate) und ca. 80% (39 von 49) der Referenzisolate, die der Dominanzklasse 3 zugeordnet wurden.

Zusätzlich zu den angeführten Isolaten wurden aus den Materialproben 70 Referenzisolate gewonnen, die Vertreter von 21 weiteren Actinomycetengattungen darstellten. Für keine dieser 21 Gattungen wurden in den Materialproben mehr als 7 Referenzisolate festgestellt. Insgesamt erreichten nur 9 dieser 70 Referenzisolate so hohe Konzentrationen, dass sie die Dominanzklasse 3 erreichten. Diese Referenzisolate gehörten zu den Gattungen *Arthrobacter, Brevibacterium, Kocuria, Microbacterium* und *Mycobacterium*.

Tab. 11: Anzahl der Referenzisolate einer Gattung und deren Zuordnung in die Dominanzklassen 1-3

	Dominanzklasse 3	**Dominanzklasse 2**	**Dominanzklasse 1**	**Summe**
Agrococcus		1		1
Amycolatopsis	**4**	**14**	**5**	**23**
Arthrobacter	1	4	2	7
Brachybacterium		2		2
Brevibacterium	2	2	2	6
Citricoccus		1	1	2
Dietzia			1	1
Isoptericola		2		2
Jiangella		2	3	5
Kocuria	1	3	1	5
Lentzea		1	3	4
Leucobacter			1	1
Microbacterium	1	2	4	7
Micrococcus		1	2	3
Micromonospora		3		3
Mycobacterium	1	3	1	5
Nocardia	**4**	**4**	**6**	**14**
Nocardioides	2	2	3	7
Nocardiopsis		**5**	**11**	**16**
Oerskovia			1	1
Prauserella		1	1	2
Promicromonospora	**4**	**10**	**3**	**17**
Propionicicella		1		1
Pseudonocardia	**5**	**9**	**5**	**19**
Psychrobacter			1	1
Rhodococcus		2	3	5
Saccharopolyspora	**2**	**5**	**5**	**12**
Sphingomonas			1	1
Staphylococcus		2	1	3
Streptomyces	**20**	**40**	**37**	**97**
Ohne Diff	2	4	9	15
Summe aller Isolate	49	124	111	284*

* Summe der Referenzisolate. Berücksichtigt wurden die Isolate der 16 verschiedenen Materialproben. Da die Proben 1 bis 7 von mehreren Arbeitsgruppen untersucht wurden, wurden in der Tabelle die Ergebnisse von insgesamt 24 Untersuchungen berücksichtigt.

In Tab. 12 sind die Gesamtkonzentrationen der 24 untersuchten Proben angegeben. Die Gesamtkonzentrationen wurden durch Aufsummieren der KBE/g der einzelnen Referenzisolate (284, siehe oben) errechnet.

In Tab. 13 sind die Anteile an der Gesamtkonzentration der häufig auftretenden Gattungen dargestellt. Angegeben ist in der Spalte „Vorkommen in 24 -Untersuchungen“, wie häufig

in den 24 untersuchten Proben (die Proben 1 bis 7 wurden von mehreren Arbeitsgruppen und die Proben 8 bis 16 wurden jeweils nur von einer Arbeitsgruppe untersucht) die jeweilige Gattung festgestellt wurde. Weiterhin ist der geringste Anteil und der größte Anteil einer Gattung in den untersuchten Proben angegeben. In der Spalte „Median“ ist angegeben, über welchem Prozentanteil die jeweilige Gattung in 50% der Proben (12 Proben) liegt. In der Spalte 75. Perzentil ist angegeben, über welchem Prozentanteil die jeweilige Gattung in 25 % der Proben (6 Proben) liegt. Beispielsweise wurde die Gattung *Amycolatopsis* in 13 der 24 untersuchten Proben festgestellt. In diesen Proben wurde der geringste Anteil an der Gesamtkonzentration mit 1,2 % und der größte Anteil mit 53,3 % festgestellt. Weiterhin lagen die Anteile dieser Gattung in 12 Proben über 1,5 % und in 6 Proben sogar über 14 % der Gesamtkonzentration.
Auch in dieser Auflistung wird die dominante Stellung der Gattung *Streptomyces* deutlich. Diese Gattung wurde in 21 Proben festgestellt und erreichte bereits einen Medianwert von 23,3 % und ein 75. Perzentil von über 50%.

Tab. 12: Gesamtkonzentrationen in KBE/g der 24 Untersuchungen als Summe der 284 Referenzisolate

Probenbezeichnung	Gesamt KBE /g
01-Je	$7,6 \times 10^{7}$
01-St	$4,8 \times 10^{5}$
02-Je	$6,0 \times 10^{4}$
02-St	$1,5 \times 10^{3}$
03-Je	$3,4 \times 10^{7}$
03-St	$3,7 \times 10^{4}$
04-Je	$4,4 \times 10^{4}$
04-St	$6,9 \times 10^{3}$
05-Be	$4,1 \times 10^{6}$
05-St	$3,4 \times 10^{5}$
06-Be	$9,2 \times 10^{5}$
06-St	$4,4 \times 10^{5}$
07-Be	$1,1 \times 10^{6}$
07-St	$1,5 \times 10^{7}$
08-St	$1,5 \times 10^{7}$
09-Be	$7,8 \times 10^{5}$
10-St	$3,7 \times 10^{5}$
11-Je	$5,9 \times 10^{5}$
12A-Be	$2,7 \times 10^{6}$
12B-Be	$1,2 \times 10^{6}$
13A-St	$1,8 \times 10^{4}$
14-Be	$1,7 \times 10^{5}$
15-Je	$1,0 \times 10^{7}$
16-St	$1,5 \times 10^{5}$

Tab. 13: Anteile der häufigsten Gattungen an der Gesamtkonzentration einer Probe [%]

Gattung	Vorkommen in 24 Proben	Minimum [%]	Maximum [%]	Median [%]	75. Perzentil [%]
Amycolatopsis	13	1,2	53,3	1,5	14,2
Nocardia	11	0,4	29,4	0,0	3,6
Nocardiopsis	8	0,1	9,4	0,0	0,4
Promicromonospora	10	0,9	79,5	0,0	8,6
Pseudonocardia	12	2,4	87,0	1,2	9,5
Saccharopolyspora	6	0,0	43,2	0,0	0,0
Streptomyces	21	0,0	83,3	23,3	52,1

In der Abb. 3 sind die Anteile der häufigen Actinomycetengattungen in den untersuchten Proben dargestellt.

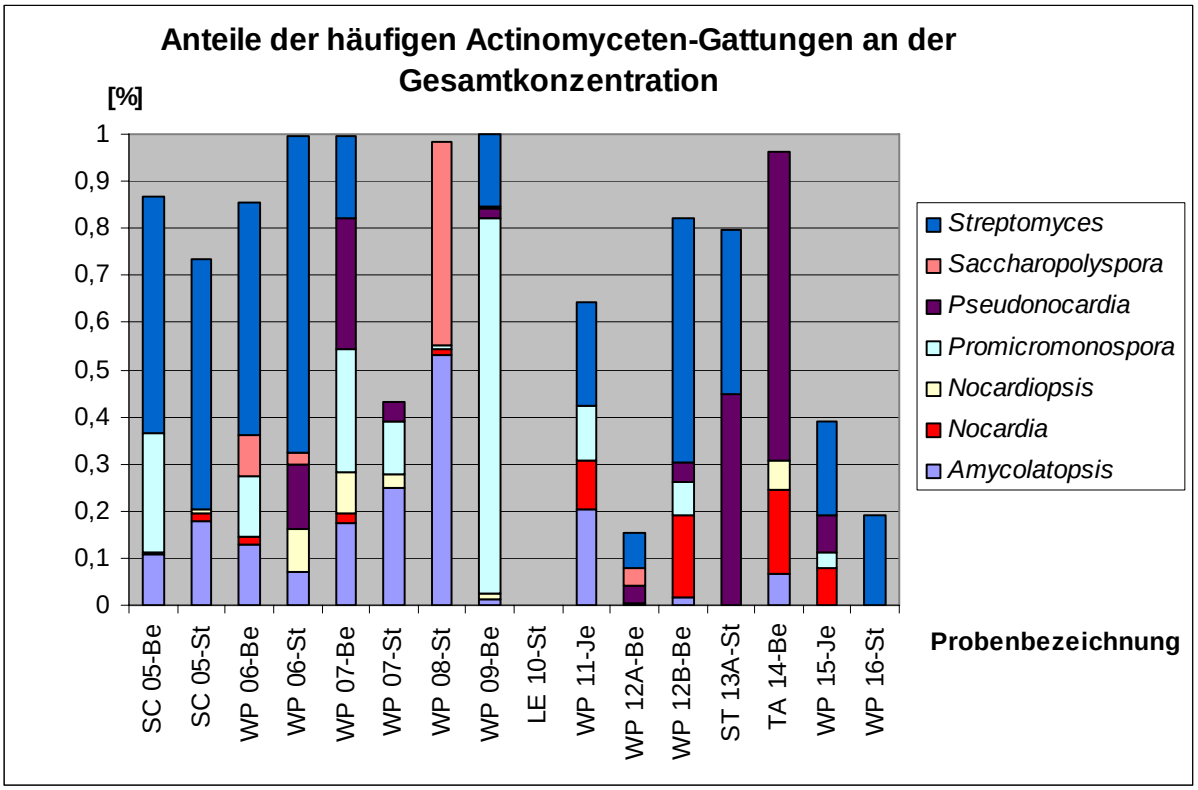


Abb. 3: Anteile der insgesamt häufigen Actinomyceten-Gattungen in 16 Proben.
Der fehlende Anteil zu 100 % entspricht anderen Gattungen in der Probe. Die Probenbezeichnung besteht aus: Materialtyp, Probenummer und Projektpartner, der die Untersuchung durchgeführt hat (z.B. SC 05-Be). Materialtyp: LE = Lehmputz, SC = Schüttungsmaterial, ST = Styropor, TA = Tapete, WP = Wandputz, Projektpartner: Be = Berlin, St= Stuttgart, Je = Jena

Die Abbildung verdeutlicht, dass in Proben, die durch zwei Arbeitsgruppen mit der gleichen Methode parallel untersucht wurden, oftmals Unterschiede in der Zusammensetzung der häufigsten Actinomyceten-Typen auftraten (Proben 05-Be und 05-St bzw. 06-Be und 06-St bzw. 07-Be und 07-St). In der Abb. 3 fällt auf, dass die einzige Lehmputzprobe (LE 10-St) offensichtlich eine wesentlich andere Zusammensetzung aufwies als die übrigen Proben. In dieser Probe wurden keine Vertreter der ansonsten häufigen Gattungen ermittelt. Es wurde die Gattung *Brevibacterium* mit 87,3 % und einer Konzentration von 3,2 x 10^5 KBE/g sowie die Gattung *Kocuria* mit 11,6 % und einer Konzentration von 4,3 x 10^4 KBE/g festgestellt. Weiterhin lag in den Proben 07-St, 12A-Be, 15-Je und 16-St der Anteil der häufigen Gattungen unter 50% der erfassten Actinomyceten. In der Probe 07-St stellte die Gattung *Nocardioides* 22% der Isolate, dennoch erreichten die Vertreter der häufigen Gattungen insgesamt nur 43% der Actinomyceten. In der Probe 12A-Be hatte die Gattung *Arthrobacter* einen Anteil von 82%.

In der Probe 15-Je wurden ca. 61% der Actinomyceten durch Vertreter der Gattungen *Microbacterium* (27%), *Brachybacterium* (8%), *Isoptericola* (8%), *Jiangella* (8%), *Oerskovia* (2%) und *Rhodococcus* (8%) repräsentiert. In der Probe 16-St hatten Vertreter der Gattung *Mesorhizobium* einen Anteil von 80%. In 11 der 16 dargestellten Proben erreichten die Vertreter der häufigen Actinomycetengattungen mehr als 50% der festgestellten Isolate. Die Vertreter der häufigen Gattungen erreichten in der einzelnen Styroporprobe (13A-St) 80% und in der einzelnen Tapetenprobe (14-Be) 96%.
Die Gattungsverteilung in den übrigen mineralischen Proben ist variabel. Tendenziell haben die Gattungen *Streptomyces* und *Amycolatopsis* in diesen Proben einen großen Anteil an der Actinomycetenkonzentration. Dennoch gibt es einzelne mineralische Proben, in der praktisch keine Vertreter der Gattungen *Streptomyces* (Proben 07-St und 08-St) bzw *Amycolatopsis* (16-St) festgestellt wurden. In Abb. 4 sind die in den Wandputzproben festgestellten Gattungen in der Reihenfolge der Proben 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15 und 16 aufsummiert dargestellt.
Insgesamt ist ein mehr oder weniger stetiger Zuwachs der Gattungen erkennbar, d.h. dass mit zunehmender Probenanzahl immer wieder neue Gattungen und Arten festgestellt werden.
In Abb. 5 sind nur die Gattungen dargestellt, die mindestens einen Anteil von 20 % an der Gesamt-Actinomycetenkonzentration erreichten. Auch diese Selektion ergibt insgesamt ein ähnliches Bild wie in Abb. 4.
Insbesondere in Abb. 5 wird verdeutlicht, dass durch die Analyse zusätzlicher Proben mit einem Anstieg von zusätzlichen Gattungen bzw. Arten zu rechnen ist.

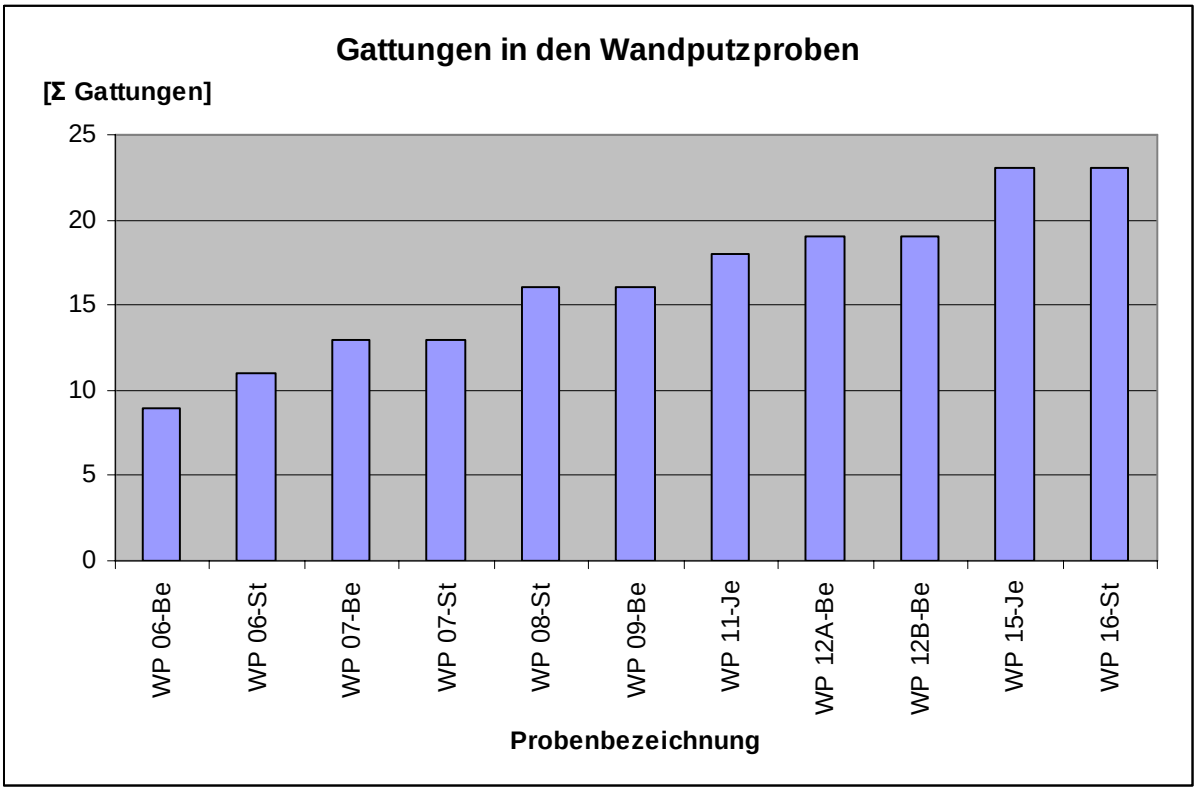


Abb. 4: Kumulativ aufsummierte Anzahl der erfassten Gattungen in den untersuchten Wandputzproben. Probenbezeichnung: Materialtyp, Probennummer und Projektpartner, der die Untersuchung durchgeführt hat. WP = Wandputz Be = Berlin, St= Stuttgart, Je = Jena

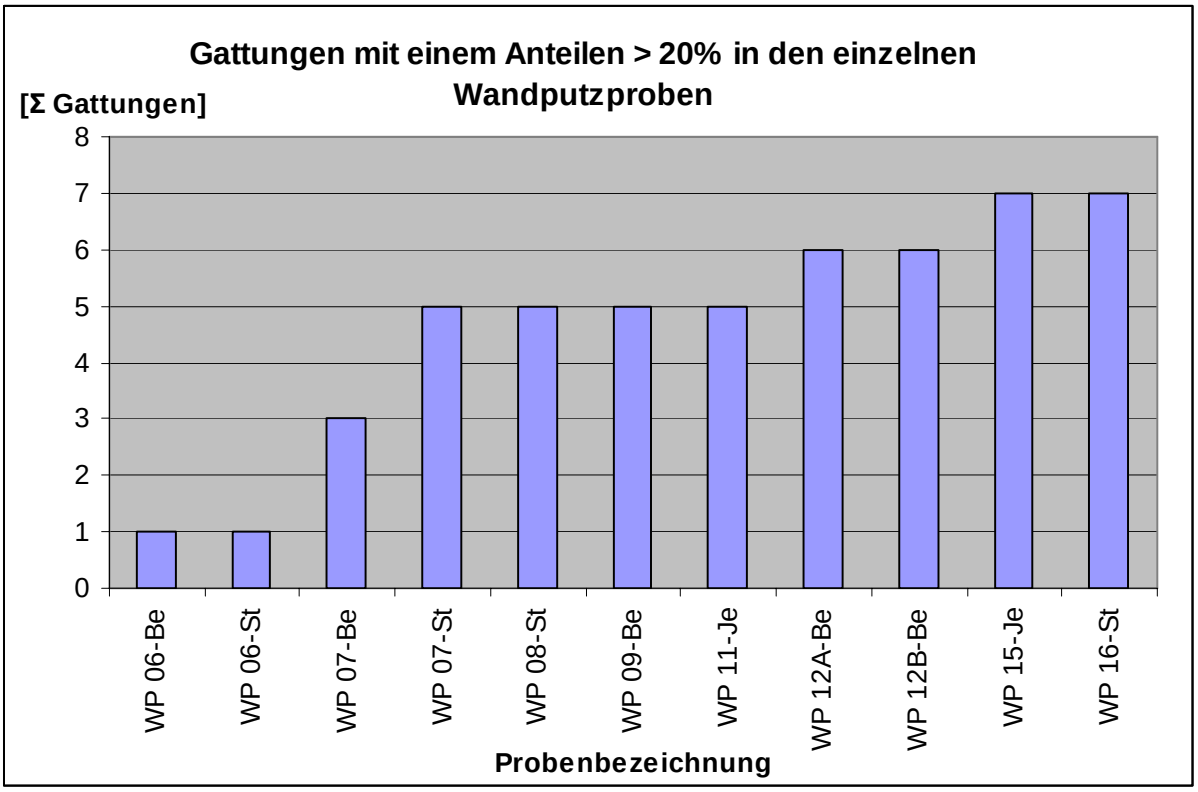


Abb. 5: Kumulativ aufsummierte Anzahl der erfassten Gattungen in den Wandputzproben, die einen Anteil von über 20% in den Putzproben erreichten. Probenbezeichnung:

Materialtyp, Probennummer und Projektpartner, der die Untersuchung durchgeführt hat.
WP = Wandputz, Be = Berlin, St= Stuttgart, Je = Jena

Durch die Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene konnte einem großen Teil der festgestellten Referenzisolate Artnamen zugeordnet werden oder es konnte zumindest die nähere Verwandtschaft zu bekannten Arten festgestellt werden. Häufig auftretende Referenzisolate sowie solche, die in einem Cluster mit einem engen Verwandtschaftsverhältnis lagen, waren:

- 15 *Amycolatopsis*-Isolate aus den Proben 3,5, 6, 7,8,11, 12A und 14 mit naher Verwandtschaft zu *A. palatopharyngis*
- 10 *Nocardia carnea* ähnliche Isolate aus den Proben 3, 5, 6, 7, 8, 11, 12A, 12B und 14
- 7 *Nocardioides*-Isolate aus den Proben 3, 5, 7, 12A und 12B mit naher Verwandschaft zu *N. albus*.
- 11 *Nocardiopsis*-Isolate aus den Proben 5, 6, 7, 9, 12B, und 14, die Ähnlichkeiten zu *N. synnemataformans* und *N. dassonvillei* zeigen.
- 10 *Promicromonospora*-Isolate aus den Proben 1, 3, 5, 7, 8, 11 und 12B zeigen Ähnlichkeiten zu *P. aerolata* und *P. vinodobonensis*.
- 6 weitere *Promicromonospora*-Isolate aus den Proben 5, 9, 12B und 15, die ein etwas erweitertes Cluster bilden, mit der nächsten Verwandschaft zu *P. sukumoe*.
- 7 *Pseudonocardia*-Isolate aus den Proben 2, 7, 12B und 13, die ein erweitertes Cluster mit Ähnlichkeiten zu *P. ammonioxydans* bilden.
- 12 weitere *Pseudonocardia*-Isolate aus den Proben 2, 3, 4, 6, 7, 9, 12A, 14 und 15, die ein Cluster mit *P. alni* und *P. antarctica* bilden.
- 11 *Saccharopolyspora*-Isolate aus den Proben 2, 6, 8, 9 und 12 A liegen in einem Cluster ohne Referenz. Von den in dieser Untersuchung mitgeführten Referenzen steht diesem Cluster die Art *S. flava* am nächsten.

Weiterhin waren andere Isolate aus unterschiedlichen Proben zu kleineren Clustern zusammengefaßt und viele Isolate wurden separat zwischen die Referenzstämme positioniert.
Naturgemäß werden bei der Differenzierung von Umweltproben auch Isolate erfasst, die nicht typisch für die untersuchten Proben sind. Derartige Befunde können jedoch aufgrund ihrer geringen Häufigkeit erst durch größere Probenzahlen erkannt werden.

Weiterhin bildeten einige Referenzisolate kleinere Cluster, die untereinander eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen, aber häufig nur eine Assoziation zu bekannten Referenzstämmen zeigten. Nachfolgend werden die Anzahl der Referenzisolate und die mitgeführten Referenzstämme mit der größten Ähnlichkeit aufgeführt:

- Es wurden drei *Amycolatopsis*-Isolate mit hoher Ähnlichkeit untereinander und zu den Arten *A. orientalis* und *A. regifaucium* gruppiert.
- In einem etwas erweiterten Cluster liegen fünf *Arthobacter*-Isolate mit Ähnlichkeiten zu *A. agilis*, *A. tumbae*, *A. parietis* und *A. tecti*.
- Es wurde ein Cluster aus vier *Brevibacterium*-Isolaten gebildet, die Ähnlichkeiten mit den Referenzstämmen *B. antiquum* und *B. aurantiacum* haben.
- Vier *Kocuria*-Isolate lagen in einem erweiterten Cluster und hatten die größte Ähnlichkeit zu *K. palustris*.
- Drei *Lentzea*-Isolate bildeten ein Cluster mit einer großen Ähnlichkeit zu *L. albidocapillata*.
- Weiterhin zeigte sich ein Cluster von drei *Microbacterium*-Isolaten, die eine Ähnlichkeit zu den Arten *M. esteramonificium* bzw. *M. arabinogalactanolyticum* aufweisen.
- Ein weiteres Cluster enthält vier *Micrococcus*-Isolate mit hoher Ähnlichkeit zu *M. luteus.*
- Für zwei Isolate konnte eine hohe Ähnlichkeit zu *Nocardia ninaedevorans* und für zwei weitere Isolate eine Ähnlichkeit zu *Nocardia fluminea* festgestellt werden.
- Ein weiteres Cluster aus drei *Nocardiopsis*-Isolaten war ähnlich zum Referenzstamm *N. tropica*.
- Zwei weitere *Nocardiopsis*-Isolate wurden zusammen relativ weit zum nächsten Referenzstamm gruppiert, so dass keine nähere Ähnlichkeit zu einem Referenzstamm erkannt werden konnte.

3.1.2.3 Nährmedienvergleich

Die Nährmedien, die für die Isolierung und Differenzierung der Actinomyceten-Kulturen verwendet wurden, zeigten einen deutlichen Einfluss auf das Untersuchungsergebnis. Entsprechend der Versuchsplanung hatten die verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Kombinationen von Nährmedien und Inkubationstemperaturen verwendet.

In den Tab. 14, 15 und 16 wurde die Anzahl der Referenzisolate für die Isolationsmedien Gauze-Agar 37 °C, Gauze-Agar 24 °C, CM-Agar 24 °C und CASO-Agar 24 °C zusammengestellt. In den Tabellen ist angegeben, wie viele Referenzisolate je Nährmedium gewonnen wurden und wie viele Referenzisolate einzig auf dem jeweiligen Nährmedium festgestellt wurden.

Beispielsweise wurden 10 Referenzisolate aus der Probe 5 vom Gauze-Agar nach Inkubation bei 37 °C aufgrund morphologischer Unterschiede ausgewählt. Für acht dieser Isolate wurden nach morphologischen Kriterien keine vergleichbaren Isolate auf den übrigen Nährmedien festgestellt.

Aus der Tabelle 14 geht hervor, dass für die Probe 5 die meisten Referenzisolate vom Gauze-Agar gewonnen wurden. Weiterhin wurden bei 37 °C acht Referenzisolate bzw. bei 24 °C sechs Referenzisolate gewonnen, die auf keinem anderen Isolationsmedium beobachtet wurden. Die höchste Gesamtkonzentration wurde für die Probe 5 dagegen mit $2{,}4 \times 10^6$ KBE/g auf CASO-Agar festgestellt.
Ein insgesamt ähnliches Bild ergibt sich auch für die Probe 6 (Tab. 15), allerdings wurde für diese Probe auch die höchste Gesamtkonzentration auf Gauze-Agar (Inkubation bei 24 °C) festgestellt. Das Ergebnis der Probe 7 (Tab. 16) zeigt dagegen, dass nicht in jedem Fall Gauze-Agar die höchste Vielfalt an unterschiedlichen Isolaten zeigte. In dieser Probe wurden die meisten Referenzisolate von dem CM-Agar gewonnen. Darüber hinaus wurden auf diesem Medium auch die meisten Referenzisolate, die auf keinem anderen Isolationsmedium festgestellt wurden, nachgewiesen. Abweichend zur Probe 5 wurden für die Probe 7 die niedrigsten Gesamtkonzentrationen auf CASO-Agar festgestellt und die höchsten Konzentrationen auf Gauze-Agar (Inkubation bei 24 °C).
Weitere in den Voruntersuchungen mit den Proben 1 bis 4 verwendeten Isolationsmedien waren BHI-Agar, Actinomyceten-Agar, Malzextraktagar und Hafermehl-Agar (Ergebnisse nicht dargestellt). Auf allen Medien konnten Actinomyceten festgestellt werden. Die insgesamt geringste Isolatausbeute wurde auf Malzextraktagar festgestellt. Der Hafermehl-Agar hatte aufgrund der ungleichmäßigen Färbung und Struktur sowie der fehlenden Durchleuchtbarkeit des Mediums für die Isolation von Actinomyceten wesentliche Nachteile. Das Wachstum von Actinomyceten auf dem Actinomyceten-Agar erfolgte vergleichsweise langsam und darüber hinaus wurde auf diesem Agar ein

ähnliches Spektrum unterschiedlicher Kolonien wie auf den übrigen Nährmedien erfasst. Der BHI-Agar lieferte ein insgesamt ähnliches Artenspektrum wie der CASO-Agar.

In allen Untersuchungen wurde deutlich, dass sowohl die Verwendung unterschiedlicher Nährmedien als auch unterschiedlicher Inkubationstemperaturen die Ausbeute an Referenzisolaten erhöht. Dies konnte auch durch die SSCP-Fingerprint-Ergebnisse der abgeschwemmten Nährmedienplatten bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.2.2.1).

Tab. 14: Vergleich der Anzahl und Konzentration [KBE/g] von Isolaten auf verschiedenen Isolationsmedien bzw. bei verschiedenen Isolationstemperaturen

Probe 5	Gauze-Agar 37 °C	Gauze-Agar 24 °C	CM-Agar 24 °C	CASO-Agar 24 °C
Anzahl verschiedener Isolate	10	10	5	6
Anzahl der nur auf diesem Medium gewonnenen Isolate	8	6	3	2
Konzentration der Isolate insgesamt	$7{,}7 \times 10^5$	$9{,}2 \times 10^5$	$1{,}2 \times 10^6$	$2{,}4 \times 10^6$

Tab. 15: Vergleich der Anzahl und Konzentration [KBE/g] von Isolaten auf verschiedenen Isolationsmedien bzw. bei verschiedenen Isolationstemperaturen

Probe 6	Gauze-Agar 37 °C	Gauze-Agar 24 °C	CM-Agar 24 °C	CASO-Agar 24 °C
Anzahl verschiedener Isolate	6	12	10	7
Anzahl der nur auf diesem Medium gewonnenen Isolate	2	5	2	2
Konzentration der Isolate insgesamt	$9{,}4 \times 10^4$	$6{,}3 \times 10^5$	$3{,}6 \times 10^5$	$5{,}8 \times 10^5$

Tab. 16: Vergleich der Anzahl und Konzentration [KBE/g] von Isolaten auf verschiedenen Isolationsmedien bzw. bei verschiedenen Isolationstemperaturen

Probe 7	Gauze-Agar 37 °C	Gauze-Agar 24 °C	CM Agar 24 °C	CASO-Agar 24 °C
Anzahl verschiedener Isolate	6	6	10	7
Anzahl der nur auf diesem Medium gewonnenen Isolate	5	1	6	5
Konzentration der Isolate insgesamt	$6{,}5 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^6$	$1{,}2 \times 10^6$	$4{,}2 \times 10^5$

3.1.2.4 Vergleich der Kolonieentwicklung auf unterschiedlichen Differenzierungsmedien

Nach der Isolierung wurden die Kulturen auf weitere Nährmedien aufgebracht, um die unterschiedliche Ausprägung von morphologischen Merkmalen zu untersuchen. Außerdem konnte auf diese Weise ein Vergleich ähnlicher Isolate und damit eine Reduktion der Anzahl gleicher bzw. identischer Isolate aus einer Probe erfolgen.
Die Referenzisolate wuchsen nicht auf jedem Differenzierungsmedium gleichermaßen gut. Insbesondere Referenzisolate der Gattung *Kocuria*, die von BHI-Agar isoliert wurden, konnten anschließend nicht mehr auf Gauze- oder Hafermehl-Agar angezüchtet werden. Darüber hinaus wurden für einzelne Isolate aus den Gattungen *Amycolatopsis, Leucobacter, Microbacterium, Micrococcus, Nocardiopsis und Rhodococcus* kein Wachstum auf Gauze-Agar und bei einzelnen Isolaten der Gattungen *Arthrobacter, Micrococcus und Micromonospora* kein Wachstum auf Hafermehl-Agar beobachtet. Einzelne Ausfälle wurden auch für die übrigen verwendeten Nährmedien (CM-Agar, Actinomyceten-Agar, Gauze-Agar und Glycerin/Arginin-Agar, CASO-Agar, M79-Agar) beobachtet.
In der Regel waren die Wachstumseigenschaften der Referenzisolate auf den verschiedenen Nährmedien unterschiedlich. In vielen Fällen zeigten Referenzisolate auf bestimmten Nährmedien typische Koloniemorphologien, die bei späteren Untersuchungen wiedererkannt wurden.
In den Abb. 6 und 7 sind die Isolate der häufigsten myzelbildenden Gattungen auf den Nährmedien Hafermehl-Agar, Gauze-Agar, CASO-Agar, Actinomyceten-Agar und CM-Agar gegenübergestellt.

Abb. 6: Referenzisolate der Gattungen *Amycolatopsis, Nocardia, Nocardioides, Nocardiopsis, Promicromonospora* sowie *Pseudonocardia* auf den unterschiedlichen Nährmedien Hafermehl-Agar, Gauze-Agar, CASO-Agar, Actinomyceten-Agar und CM-Agar

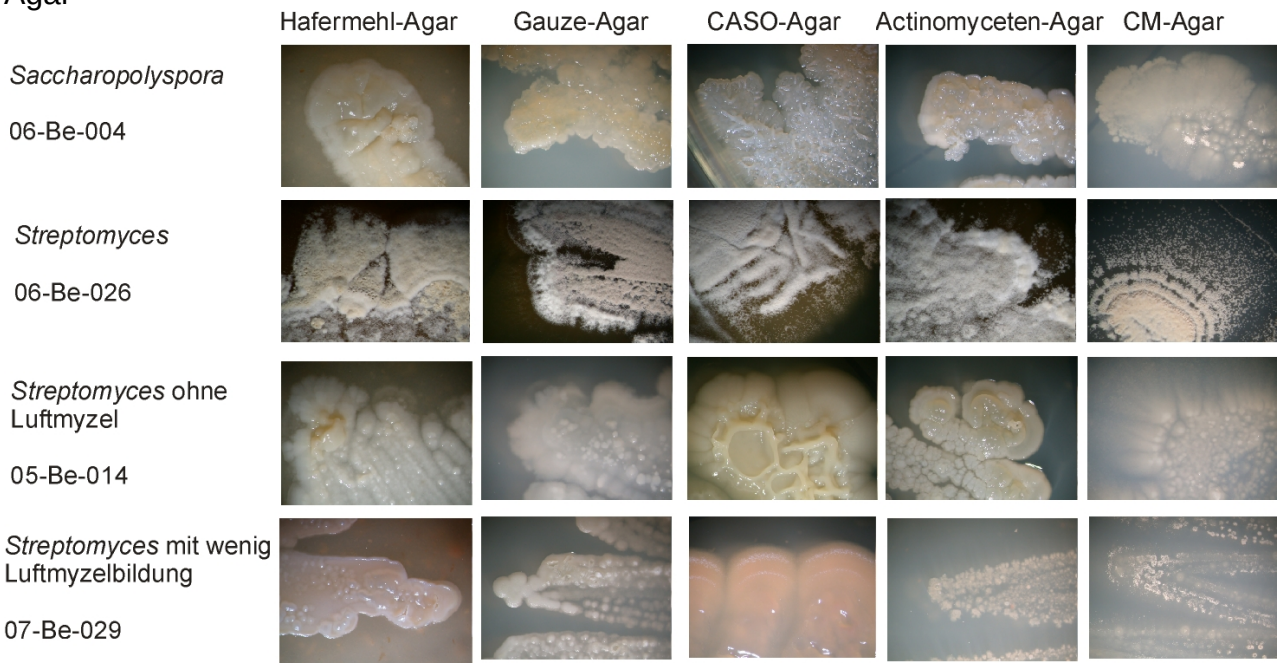


Abb. 7: Referenzisolate der Gattung *Saccharopolyspora* sowie verschiedener Vertreter der Gattung *Streptomyces* auf den unterschiedlichen Nährmedien Hafermehl-Agar, Gauze-Agar, CASO-Agar, Actinomyceten-Agar und CM-Agar

Amycolatopsis (07-Be-017**)**
Für das beispielhaft dargestellte Referenzisolat von *Amycolatopsis* wurde die beste Entwicklung auf Gauze-Agar festgestellt. Auf diesem Medium wurde ein üppiges Luftmyzel entwickelt. Auf dem Actinomyceten-Agar und dem CM-Agar wurde eine wesentlich geringere Entwicklung des Luftmyzels und des Substratmyzels festgestellt. Kein Luftmyzel, aber ein dichtes Substratmyzel wurde dagegen auf Hafermehl-Agar und Gauze-Agar beobachtet. Eine analoge Entwicklung wurde für vergleichbare Isolattypen (siehe Stammbaum) festgestellt. Andererseits wurde für ein anderes Isolat (05-Be-006 im Stammbaum ein anderes Cluster) eine intensive Luftmyzelbildung auf allen verwendeten Nährmedien beobachtet.

Nocardia (06-Be-019)
Die Isolate der Gattung *Nocardia* entwickelten das intensivste Substrat- und Luftmyzel auf den Nährmedien Hafermehl-, Gauze- und CASO-Agar. Auf CM-Agar wurde ein deutlich geringeres Subtrat- und Luftmyzel gebildet und auf Actinomyceten-Agar wurde nur ein geringes Substratmyzel gebildet. Andere Isolate wurden nur auf einzelnen Nährmedien kultiviert und bildeten dort zumindest auf Gauze-Agar ebenfalls intensive Substrat- und Luftmyzelien.

Nocardioides (05-Be-012)
Das Referenzisolat der Gattung *Nocardioides* bildete nur auf Gauze- und CM-Agar ein Luftmyzel. Andere Isolate, die allerdings nur auf einzelnen Nährmedien kultiviert wurden, bildeten häufig kein Luftmyzel. Das Referenzisolat wuchs nicht auf Actinomyceten-Agar und nur mit einzelnen Kolonien auf CASO-Agar. Weiterhin bildete das Referenzisolat auf Hafermehl-Agar ein dichtes Substratmyzel, aber kein Luftmyzel.

Nocardiopsis (05-Be-061)
Das dargestellte Isolat der Gattung *Nocardiopsis* bildete, wie auch die meisten anderen Isolate aus dieser Gattung, auf allen Nährmedien ein üppiges Substrat- und Luftmyzel. In Einzelfällen wurde ein geringeres Wachstum auf Actinomyceten-Agar beobachtet.

Promicromonospora (07-Be-012)
Für das angegebene Isolat sowie für andere Isolate wurde auf keinem der verwendeten Nährmedien eine Luftmyzelbildung festgestellt. Die intensivsten Substratmyzelien wurden

auf Hafermehl-, Gauze- und CASO-Agar festgestellt. Eine starke Zerklüftung der Oberfläche wurde nur auf dem Hafermehl-Agar, Gauze-Agar und bei anderen Isolaten auch auf CASO-Agar beobachtet.

Pseudonocardia (07-Be-018)
Das Isolat bildete das dichteste Myzel auf CASO-Agar, gefolgt von Actinomyceten-, CM-, Hafermehl- und Gauze-Agar. Auf allen Nährmedien wurde ein grau-weißes Luftmyzel gebildet. Das Substratmyzel hatte auf allen Nährmedien einen braunen Farbton.
Vor allem auf CASO-Agar wurde ein intensives Aufplatzen der Oberfläche beobachtet, das in viel geringerem Umfang auch auf Actinomyceten-Agar, aber nicht auf den übrigen Nährmedien festgestellt wurde. Ähnliche Verhältnisse wurden auch für andere Isolate festgestellt.

Saccharopolyspora (06-Be-004)
Das Isolat bildete nur auf CM-Agar wenig Luftmyzel und im Vergleich zu den übrigen Nährmedien ein relativ geringes Substratmyzel aus. Alle Kulturen hatten eine cremefarbene Färbung und z.T. eine stark gefurchte Oberfläche.

Streptomyces mit Luftmyzelbildung (06-Be-026)
Auf allen verwendeten Nährmedien wurde eine intensive Luftmyzelbildung und Sporulation beobachtet. Insgesamt war die Luftmyzel- und Sporenbildung auf dem CM-Agar etwas geringer als auf den übrigen Nährmedien. Durch die einsetzende Sporulation bekam die Kolonieoberfläche eine sandbraune Färbung.

Streptomyces ohne Luftmyzelbildung (05-Be-014)
Die intensivste Substratmyzelbildung wurde auf Hafermehl- und CASO-Agar festgestellt, während die Substratmyzelien auf Gauze-Agar verringert und auf Actinomyceten- und CM-Agar am schwächsten ausgebildet waren. Auf keinem der verwendeten Medien wurde eine Luftmyzelbildung beobachtet.

Streptomyces mit geringer Luftmyzelbildung (07-Be-029)
Das Isolat bildet auf Hafermehl-, Gauze- und CASO-Agar das intensivste Substratmyzel, das bei Hafermehl-Agar im Alter in zentralen Bereichen aufbricht. Die Substratmyzelien auf Actinomyceten- und CM-Agar blieben dagegen relativ spärlich. Auf Gauze-Agar,

CASO-Agar und CM-Agar wurde jeweils eine sehr geringe Luftmyzelbildung beobachtet. Das insgesamt intensivste Wachstum lag auf Hafermehl-Agar vor und die stärkste Sporenbildung wurde auf CM-Agar beobachtet.

3.1.2.5 Beschreibung der Isolate häufiger Gattungen

3.1.2.5.1 *Amycolatopsis*

Das Erscheinungsbild der *Amycolatopsis*-Isolate war sehr unterschiedlich. Es gab Isolate, die auf allen verwendeten Nährmedien ein üppiges Luftmyzel bildeten, sowie Isolate, die auf allen Nährmedien nur ein sehr geringes bzw. gar kein Luftmyzel bildeten.
Von den 18 Isolaten, die zur Stammbaumberechnung verwendet wurden, bildeten 3 Isolate ein Cluster mit *A. orientalis* bzw. *A. regifaucium* und 13 Isolate ein Cluster mit naher Verwandschaft zu *A. palatopharyngis*. Die Isolate eines Clusters zeigen eine hohe morphologische Übereinstimmung und unterscheiden sich gleichzeitig sehr deutlich gegenüber Isolaten des anderen Clusters. Die Referenzisolate des Clusters *A. orientalis/regifaucium* bilden ähnliche Kolonien auf den verschiedenen Nährmedien. In Abb. 8 wird z.B. deutlich, dass alle drei Referenzisolate nur wenig Luftmyzel auf CASO-Agar, aber viel auf M79- und Gauze-Agar bilden. Im Gegensatz dazu bildeten die Referenzisolate des Clusters *A. palatopharyngis* auf CASO- und M79-Agar kein Luftmyzel aber ein dichtes Substratmyzel und auf Gauze-Agar ein sehr zartes Substrat- und Luftmyzel (In Abb. 9 sind von den 13 geclusterten Referenzisolaten nur die Isolate 11Je-001, 08-St-004 und 06-Be-021 dargestellt). Die beiden übrigen, nicht in den beiden beschriebenen Clustern integrierten Referenzisolate, haben eine abweichende Koloniemorphologie (Abb. 10). In älteren Kulturen bilden sich im Luftmyzel Sporenketten (Abb. 11). Diese wurden für alle Referenzisolate mit ähnlicher Morphologie festgestellt.

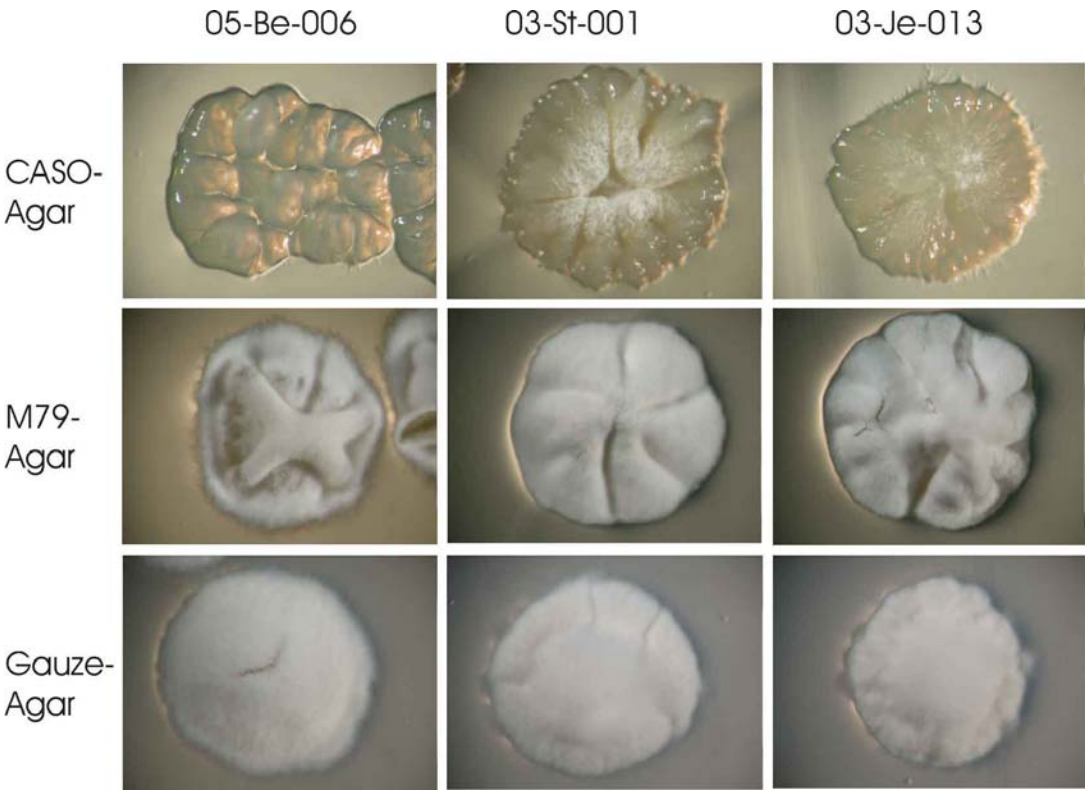


Abb. 8: Koloniemorphologie der Referenzisolate aus dem Cluster *Amycolatopsis orientalis* bzw. *A. regifaucium* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

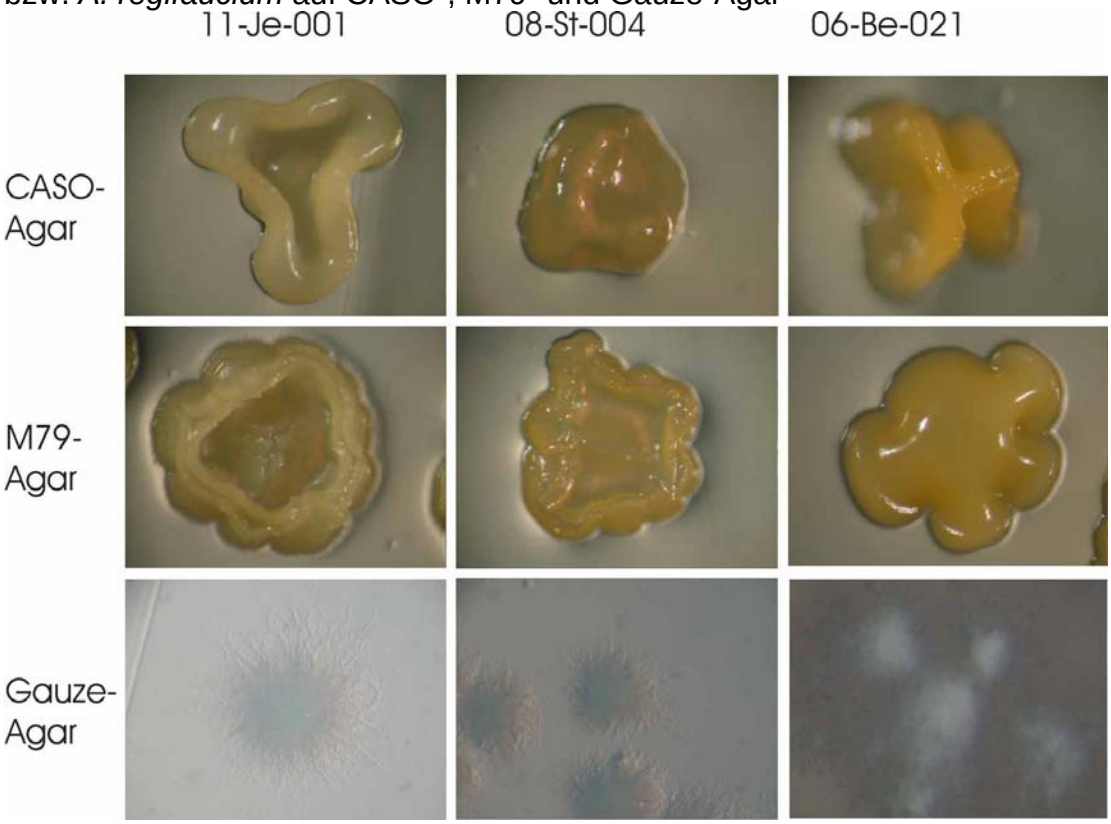


Abb. 9: Koloniemorphologie der Referenzisolate aus dem Cluster *Amycolatopsis palatopharyngis* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

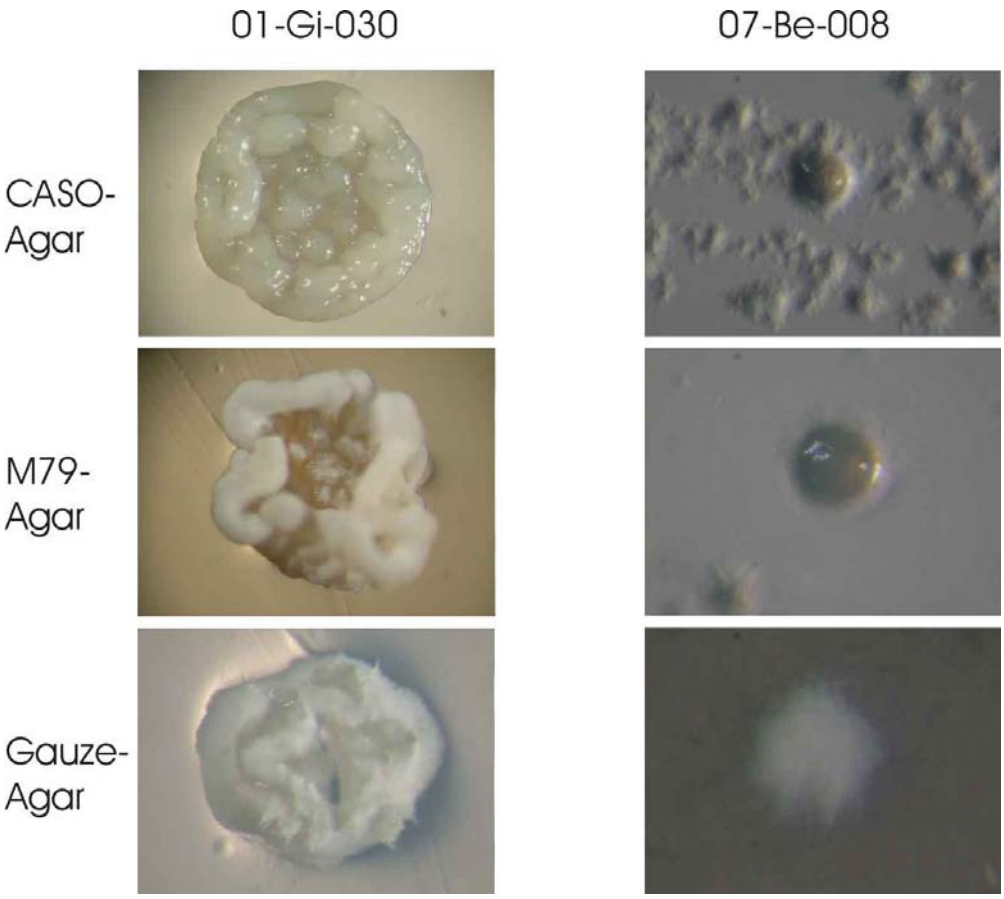


Abb. 10: Koloniemorphologie der Referenzisolate 01-Gi-030 und 07-Be-008 auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

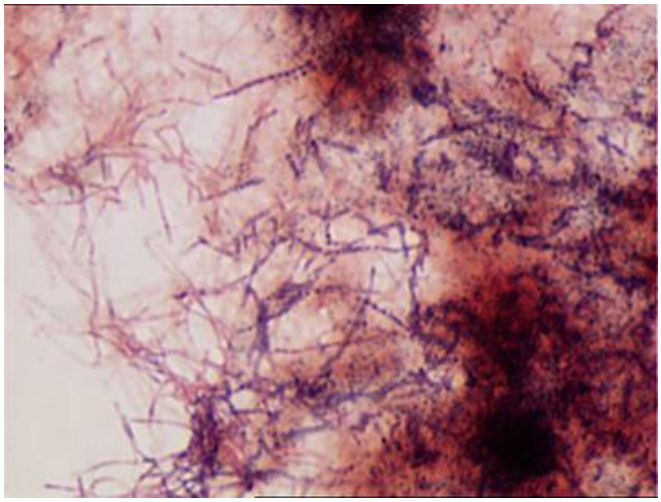


Abb. 11: Luftmyzel von *Amycolatopsis* mit Sporenketten (M79)

Isolate von *Amycolatopsis* können aufgrund ihrer Wuchsform je nach Luftmyzelbildung Ähnlichkeiten mit Isolaten von *Nocardiopsis*, *Nocardia* oder *Promicromonospora* aufweisen. Durch mikroskopische Untersuchungen können vor allem Isolate der Gattungen *Nocardiopsis* und *Promicromonospora* ausgeschlossen werden.

3.1.2.5.2 *Micromonospora*

Aus der Gattung *Micromonospora* wurden insgesamt fünf Isolate aus drei Materialproben (02, 11 und 12A) gewonnen, die sich vor allem durch ihr orangefarbenes Substratmyzel ähnelten. Nur zwei der fünf Isolate bilden ein Cluster (12A-Be-011 und 12A-Be-019), während die übrigen Isolate weit verstreut zwischen den Referenzstämmen liegen. In Abb. 12 sind die Koloniemorphologien von 14 Tage alten Kolonien auf CASO-, M79- und Gauze-Agar dargestellt. Die Kulturen waren zu Beginn orange gefärbt und wurden im Alter schwarz. Die Sporen wurden einzeln auf kurzen Stielen gebildet (vergl. Abb. 13 und 14).

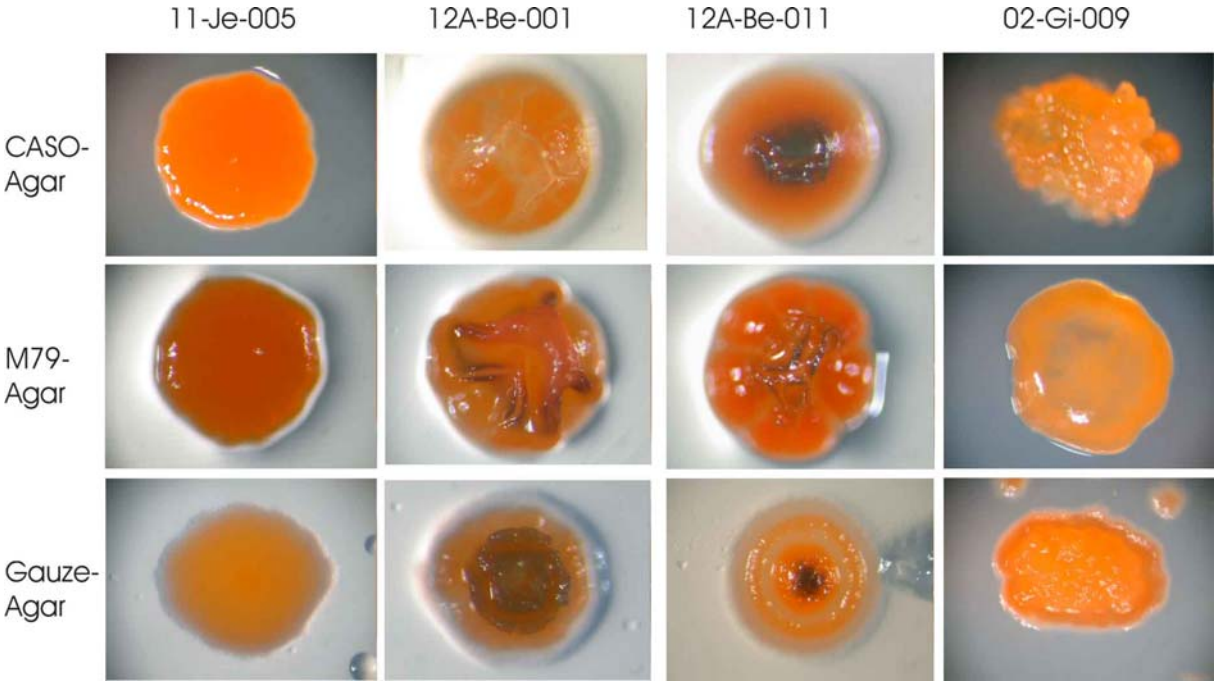


Abb. 12: Koloniemorphologien von 14 Tage alten Kolonien auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

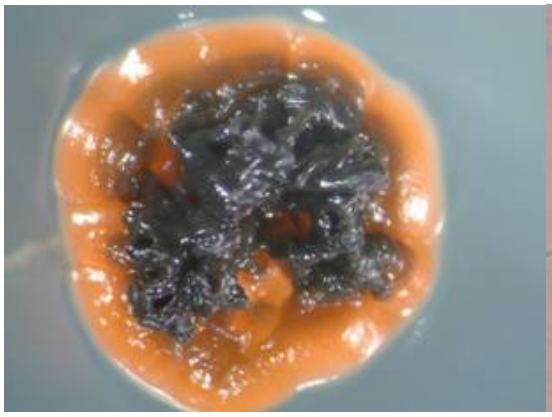


Abb. 13:
Micromonospora-Kolonie (12A-Be-001) (M79)

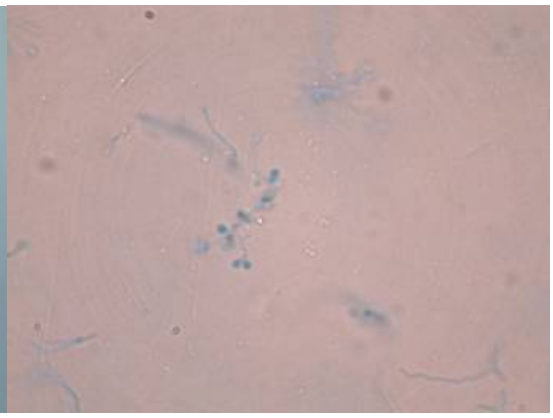


Abb. 14:
Myzel mit Einzelsporen (M79)

3.1.2.5.3 *Nocardia*

Alle untersuchten *Nocardia*-Isolate bildeten Luftmyzel. Die Luftmyzelbildung wurde im Vergleich zu anderen Actinomyceten-Gattungen weniger durch das verwendete Nährmedium beeinflusst. Eine schwache Luftmyzelbildung wurde jedoch für Isolate aus der Verwandtschaft von *Nocardia carnea* bei der Verwendung von Actinomyceten-Agar festgestellt (vergl. unter Einfluss von Nährmedien 3.1.2.3). Insgesamt wurde ein gutes Koloniewachstum und eine gute Luftmyzelbildung auf CASO- und M79-Agar festgestellt. Das radiale Koloniewachstum auf Gauze-Agar war dagegen reduziert, aber auch auf diesem Nähragar wurde eine Luftmyzelbildung beobachtet (Abb. 15). 10 Referenzisolate wurden durch die molekularbiologische Differenzierung der Art *Nocardia carnea* zugeordnet. Dabei fällt auf, dass die Referenzisolate in zwei Subcluster aufgeteilt wurden. In der Abb. 16 sind jeweils drei CASO-Agar-Petrischalen dieser Isolate dargestellt. In der Abb. 15 (Isolat 03-St-014 bzw. 11-Je-002) und auch im Kulturenvergleich in Abb. 16 wird deutlich, dass die Kulturen des einen Subclusters (07-Be-006, 08-St-007, 03-St-022, 03-St-014, 14-Be-019 und 05-St-015) heller sind als die leicht gelblichen Kulturen des anderen Subclusters (11-Je-002, 12-Be-002, 06-Be-019 und 12A-Be-004).
Von den 15 Isolaten, die zur Stammbaumberechnung verwendet wurden, lagen 10 Isolate sehr dicht an der Vergleichskultur *Nocardia carnea*. Alle 10 Isolate stimmen darüber hinaus mit typischen morphologischen Merkmalen von *Nocardia carnea* überein. Die Isolate von *N. carnea* bilden eine vergleichsweise langsam wachsende Kultur mit weißem Luftmyzel. Im Luftmyzel bildeten sich viele Sporenketten durch Fragmentation und das Substratmyzel war mäßig weich (vergl. Abb. 17 und 18). Die übrigen 5 Isolate gehören in unterschiedliche Verwandtschaftscluster und wiesen Kolonieunterschiede auf (vergl. Abb. 15, Referenzisolate 01-Gi-010 und 01-Gi-008).

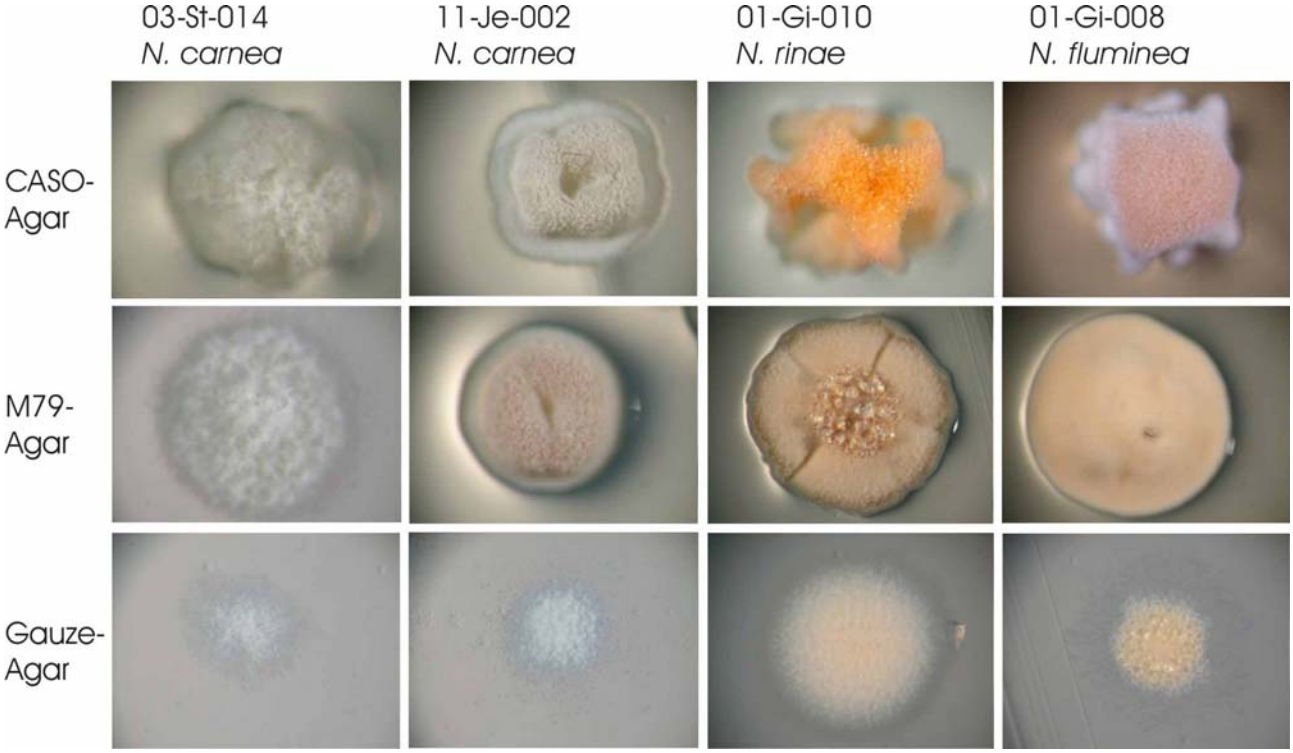


Abb. 15: Koloniemorphologien von 14 Tage alten N*ocardia*-Kolonien auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

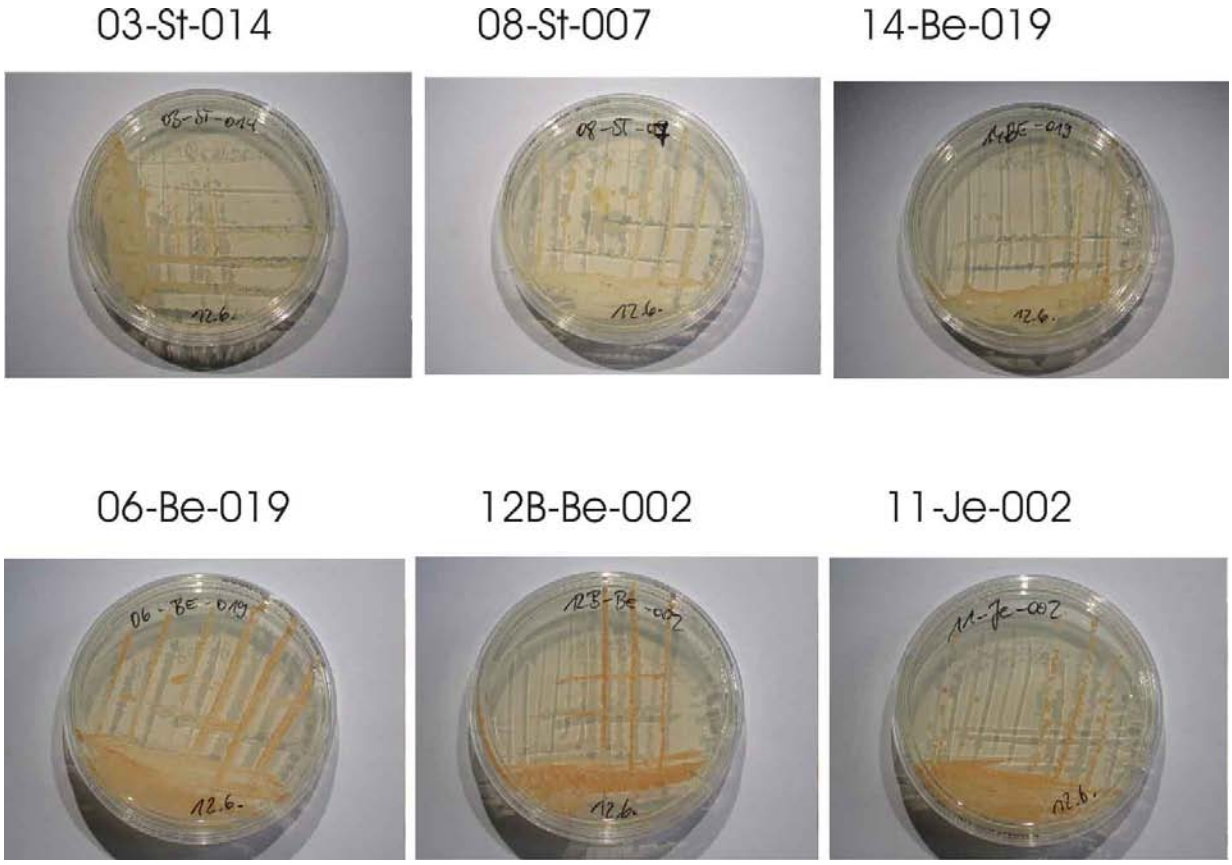


Abb. 16: Petrischalen von 14 Tage alten *Nocardia*-Isolaten auf CASO-Agar

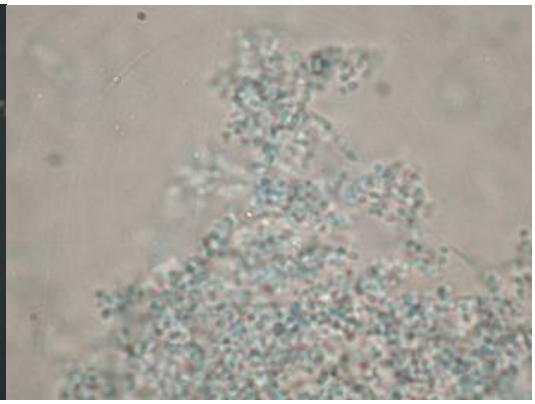


Abb.: 17
Nocardia carnea (12A-Be-005) (M79)

Abb. 18
Myzel mit Sporenketten (M79)

3.1.2.5.4 *Nocardioides*

Für die Mehrzahl der festgestellten Isolate der Gattung *Nocardioides* wurde keine Myzelbildung beschrieben. Die Luftmyzelbildung ist stark vom Nährmedium abhängig (vergl. unter Einfluss von Nährmedien 3.1.2.3). Es wurden unterschiedliche Kolonietypen, die beigefarbene bis gelbliche Farbtöne aufweisen, festgestellt. Typisch für die Kulturen war eine weiche Konsistenz und eine starke Fragmentierung des Substratmyzels (siehe Abb. 19 und 20).

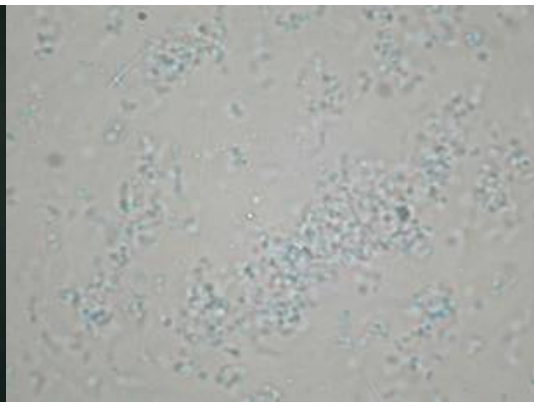


Abb. 19:
Nocardioides-Kolonie (M79)

Abb. 20:
Zerfallenes Substratmyzel (M79)

Aufgrund der makroskopischen Koloniecharakteristika könnten Verwechslungen mit „nackten“ Streptomyceten, *Lentzea*, *Amycolalotopsis* oder *Promicromonospora* auftreten. Allerdings können Streptomyceten aufgrund ihres Substratmyzelwachstums und *Amycolalotopsis*, *Lentzea* sowie *Promicromonospora* zumindest aufgrund des Zellwandbestandteils LL-DAP von *Nocardioides* abgegrenzt werden.

3.1.2.5.5 *Nocardiopsis*

Die Mehrzahl der erfassten *Nocardiopsis*-Isolate bildeten auf den verwendeten Nährmedien ein üppiges Luftmyzel, dessen Bildung nur wenig durch das verwendete Nährmedium beeinflusst wurde (vergl. Einfluss von Nährmedien 3.1.2.3).
Typische Merkmale von *Nocardiopsis*-Kolonien sind ein üppiges, leicht watteartiges, im Zentrum etwas bauschiges Luftmyzel sowie ein relativ dichtes Substratmyzel, das häufig nur zum Teil vom Luftmyzel überwachsen wird, sodass ein Substratmyzelhof um die Kolonie entsteht. Ein typisches mikroskopisches Merkmal ist die „Zick-Zack“- Form von Myzelien, bevor diese in Einzelzellen fragmentieren (vergl. Abb. 21 und 22).

Abb. 21:
Nocardiopsis-Kolonie (09-Be-001) (M79)

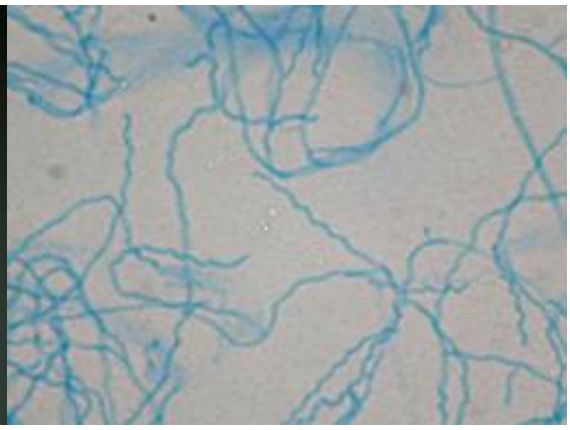


Abb. 22:
Nocardiopsis-Kolonie; “Zick-Zack”-Myzel (M79)

Von 19 für die Stammbaumberechnung verwendeten Isolaten bilden 3 ein Cluster mit einer näheren Verwandtschaft zu *N. tropica* (Abb.23), 5 mit einer näheren Verwandtschaft zu *N. dassonvillei subsp. albirubida* bzw. zu *N. dassonvillei subsp dassonvillei* (Abb. 24), und 6 Isolate mit einem nahen Verwandtschaftsverhältnis zum Referenzstamm *N. synnematoformans* (Abb. 25). Die Abb. 23, 24 und 25 verdeutlichen, dass eine gute kolonietypische Unterscheidung zwischen den Referenzisolaten der verschiedenen Cluster nicht möglich ist und dass sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede zwischen den Referenzisolaten eines Clusters bestehen. Weiterhin war auch das mikroskopische Bild dieser Referenzisolate ähnlich. Neben den Referenzisolaten in den beschriebenen Clustern traten weitere Isolate auf, die anders als bei den meisten anderen Gattungen, zerstreut zwischen den übrigen Referenzstämmen liegen. Einzelne dieser Isolate haben besondere Auffälligkeiten wie z.B. die Bildung von rotem Substratmyzel und Exsudat (Isolate 09-Be-005 Abb. 23). Andere Einzelfunde (z.B. 02-Gi-014) bilden ein feineres Substratmyzel, aber auf den verwendeten Nährmedien kein Luftmyzel. Insgesamt

kann die Gattung *Nocardiopsis* bei typischem Erscheinungsbild relativ gut gegenüber anderen Gattungen und insbesondere auch gegen *Streptomyces* abgegrenzt werden. Schwierigkeiten ergaben sich vor allem bei Isolaten mit geringem Luftmyzel. Bei derartigen Isolaten konnte in vielen Fällen allerdings auch die typische Zick-Zack-Fragmentierung im Substratmyzel beobachtet werden. Darüber hinaus konnte aufgrund des Zellwandbestandteils meso-DAP zumindest gegenüber der Gattung *Streptomyces* eine klare Abgrenzung erfolgen.

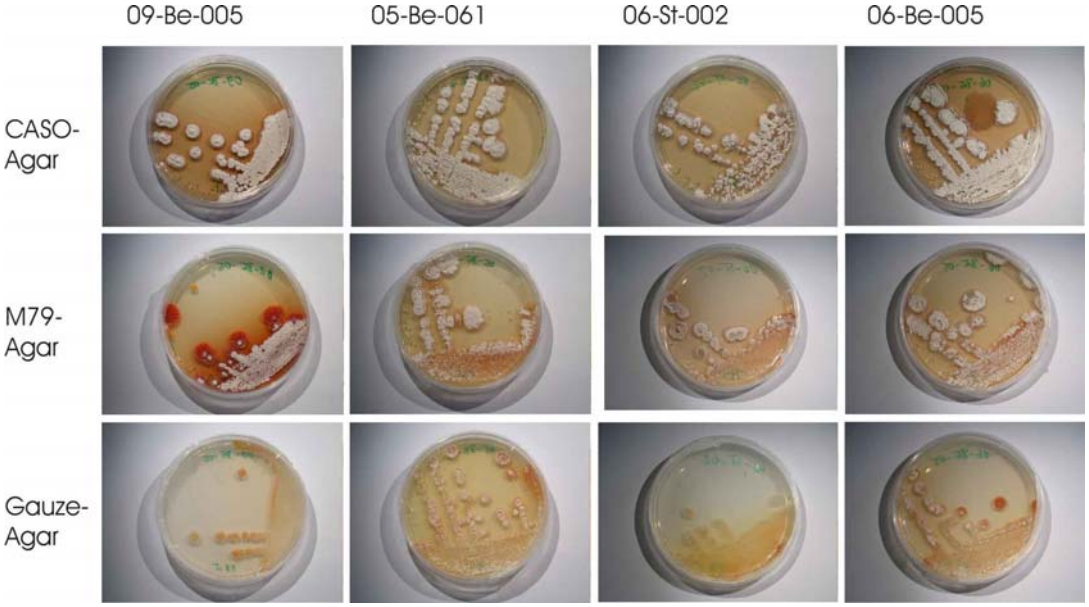


Abb. 23: 21 Tage alte Referenzisolate. 09-Be-005 mit Ähnlichkeiten zum Referenzstamm *N. umidischolae* und die übrigen drei Isolate 05-Be-061, 06-St-002 und 06-Be-005 mit Assoziation zu *N. tropica* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

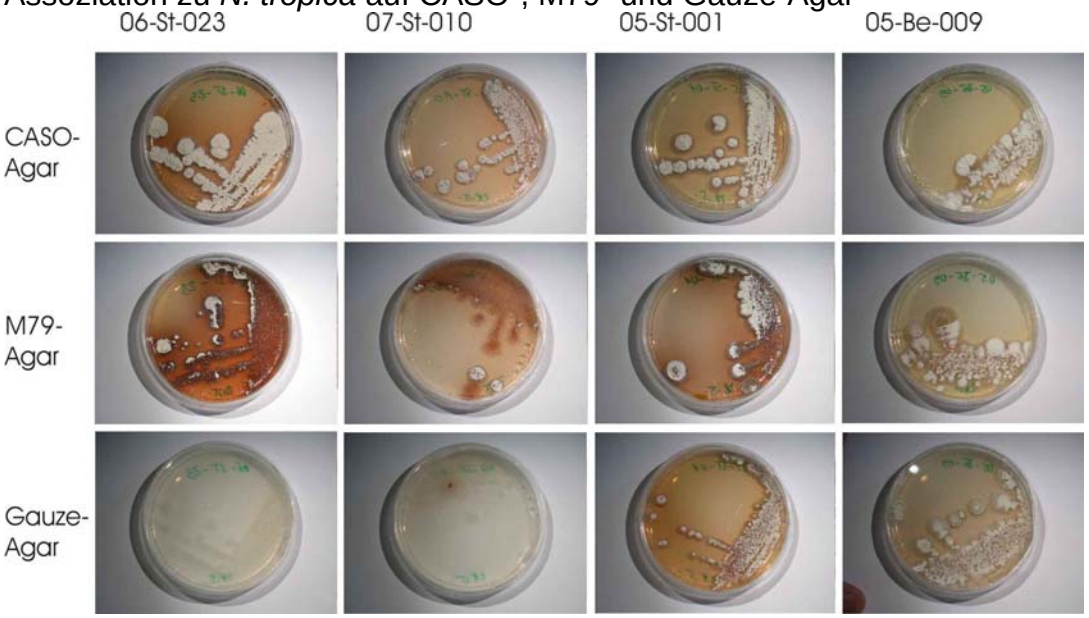


Abb. 24: 21 Tage alte Petrischalen der Referenzisolate 06-St-023 und 07-St-010 mit Assoziation zum Referenzstamm *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* bzw. der Isolate 05-St-001 und 05-Be-009 zu *N. dassonvillei* subsp. *albirubida* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

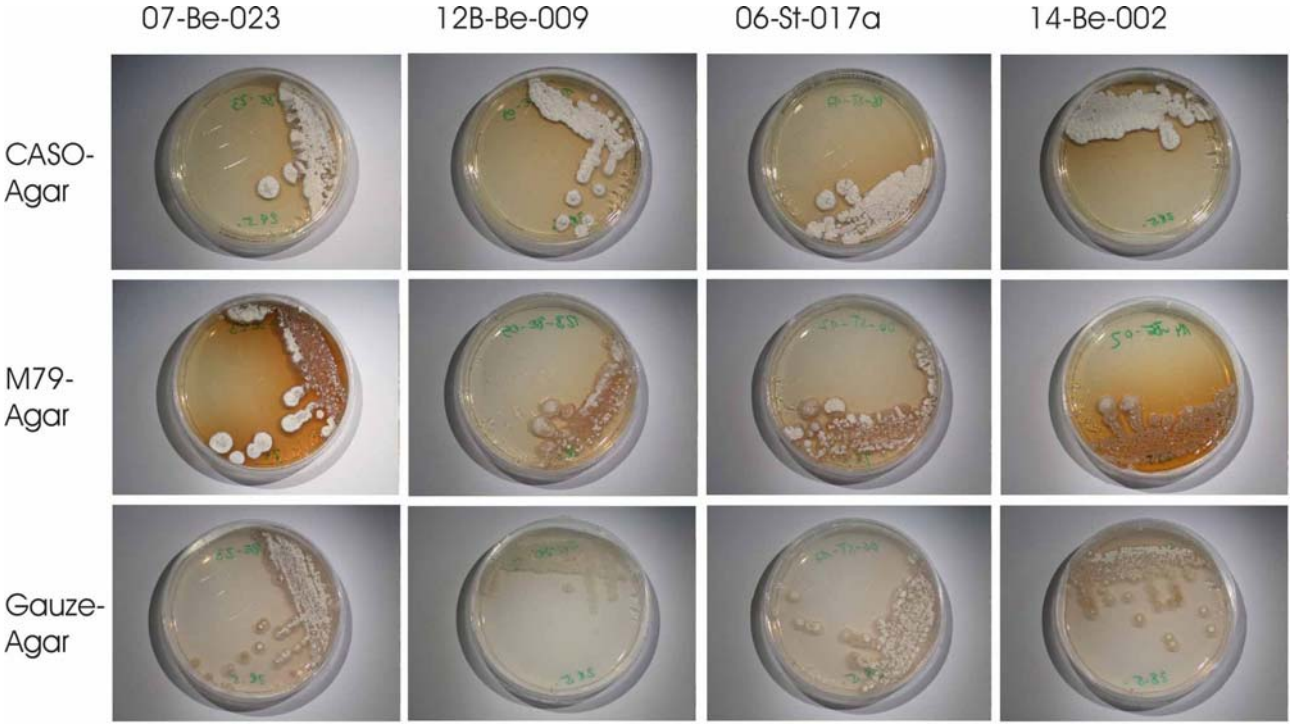


Abb. 25: 21 Tage alte Referenzisolate mit Assoziation zu dem Referenzstamm *Nocardiopsis synnemataformans* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

3.1.2.5.6 *Promicromonospora*

Die in den Materialien aus Feuchteschäden festgestellten Isolate der Gattung *Promicromonospora* zeichneten sich dadurch aus, dass sie auf den in der Untersuchung verwendeten Nährmedien kein Luftmyzel bildeten (vergl. Einfluss von Nährmedien 3.1.2.3), die Kolonieoberfläche in der Regel in Falten geworfen ist und das Substratmyzel bereits nach kurzer Zeit in kleine Zellen zu fragmentieren beginnt (vergl. Abb. 26 und 27). Die für die Stammbaumberechnung verwendeten Isolate zeigten Unterschiede in ihrer Färbung und zum Teil in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit. Es konnten jedoch keine typischen „Morphotypen“ erkannt werden.

Andererseits sind die morphologischen Eigenschaften und das Fehlen der DAP-Komponenten für eine grobe Abgrenzung von *Promicromonospora*-Isolaten gegenüber anderen Actinomyceten relativ gut geeignet und konnten auch in der vorliegenden Studie in vielen Fällen richtig durchgeführt werden.

Abb. 26:
Promicromonospora-Kolonie(12B-Be-004) Substratmyzel (M79)

Abb. 27:
Promicromonospora-Kolonie (M79) zerfallenes Substratmyzel

3.1.2.5.7 *Pseudonocardia*

Das Koloniewachstum der *Pseudonocardia*-Isolate wird im Vergleich zu vielen anderen Actinomycetengattungen nur mäßig durch das Kultivierungsmedium beeinflusst (vergl. unter Einfluss von Nährmedien 3.1.2.3). Unter den verwendeten Nährmedien wurden die charakteristischsten Kulturen auf CASO-Agar beobachtet. Auf diesem Nährmedium können die in der Untersuchung isolierten *Pseudonocardia*-Kulturen aufgrund ihres Koloniewachstums und ihrer Färbung bereits gut makroskopisch erkannt und gegenüber anderen Isolaten abgegrenzt werden.

Typische Merkmale der erfassten *Pseudonocardia*-Arten sind:

- relativ langsames Wachstum (2-4 mm in 3 Wochen)
- Kulturoberfläche weiß-grau-rosa
- Rückseite braun
- auf Primärplatten haben die Kolonien sehr häufig eine dreieckige bis vieleckige Form/Umgrenzung (vergl. Abb. 28).

Zusätzlich können mikroskopische Merkmale herangezogen werden:

- häufige Bildung von verdickten Zellen (Sporen) im Substrat- und Luftmyzel (vergl. Abb. 29)
- das Luftmyzel fragmentiert häufig in Sporenketten

Abb. 28:
Kleine Kulturen von *Pseudonocardia* mit Begleitflora (CASO)

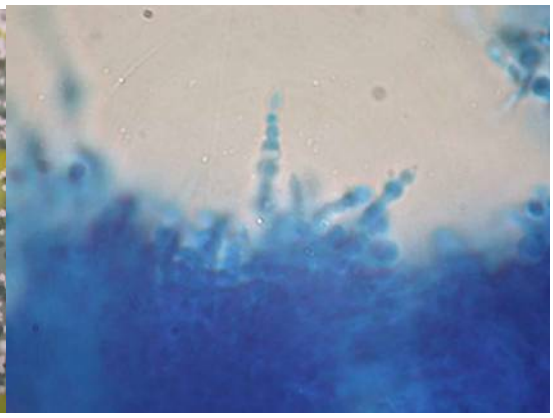


Abb. 29:
Verdickte Zellen (Sporen) im Substratmyzel (CASO)

Die Stammbaumberechnung mit den festgestellten *Pseudonocardia*-Isolaten ergab drei Cluster, bei denen die Isolate auf gleichem Niveau liegen (vergl. Anhang Stammbaumberechnung *Pseudonocardia*).

Cluster 1 enthält die vier Referenzisolate 02-Gi-001, 13A-St-013, 02-Gi-013 und 13A-St-005.

Cluster 2 enthält die vier Referenzisolate 03-St-010, 14-Be-001, 12B-Be-005 sowie 06-St-015 und

Cluster 3 enthält die zwei Referenzisolate 07-Be-018 und 12A-Be-017.

Im Umfeld des Clusters 3 sind noch weitere Referenzisolate angeordnet, die allerdings kein Cluster darstellen: 02-Je-014, 02-Gi-015, 09-Be-008, 04-St-002, 14 –Be-003 und 15-Je-008.

Die Merkmalsausprägungen der verschiedenen Cluster unterscheiden sich in

- der Bildung von Pigmenten
- der Oberflächenstruktur der Kolonien
- der Bildung von Sporen im Luftmyzel

In den Abb. 30 und. 31 sind die Ober- und Unterseiten von 16 Referenzisolaten, die auch für eine Stammbaumberechnung herangezogen wurden, zusammengestellt.

In den Abb. 34 und 35 sind die Kolonieoberflächen und die Luftmyzelien von 16 Referenzisolaten im Detail dargestellt.

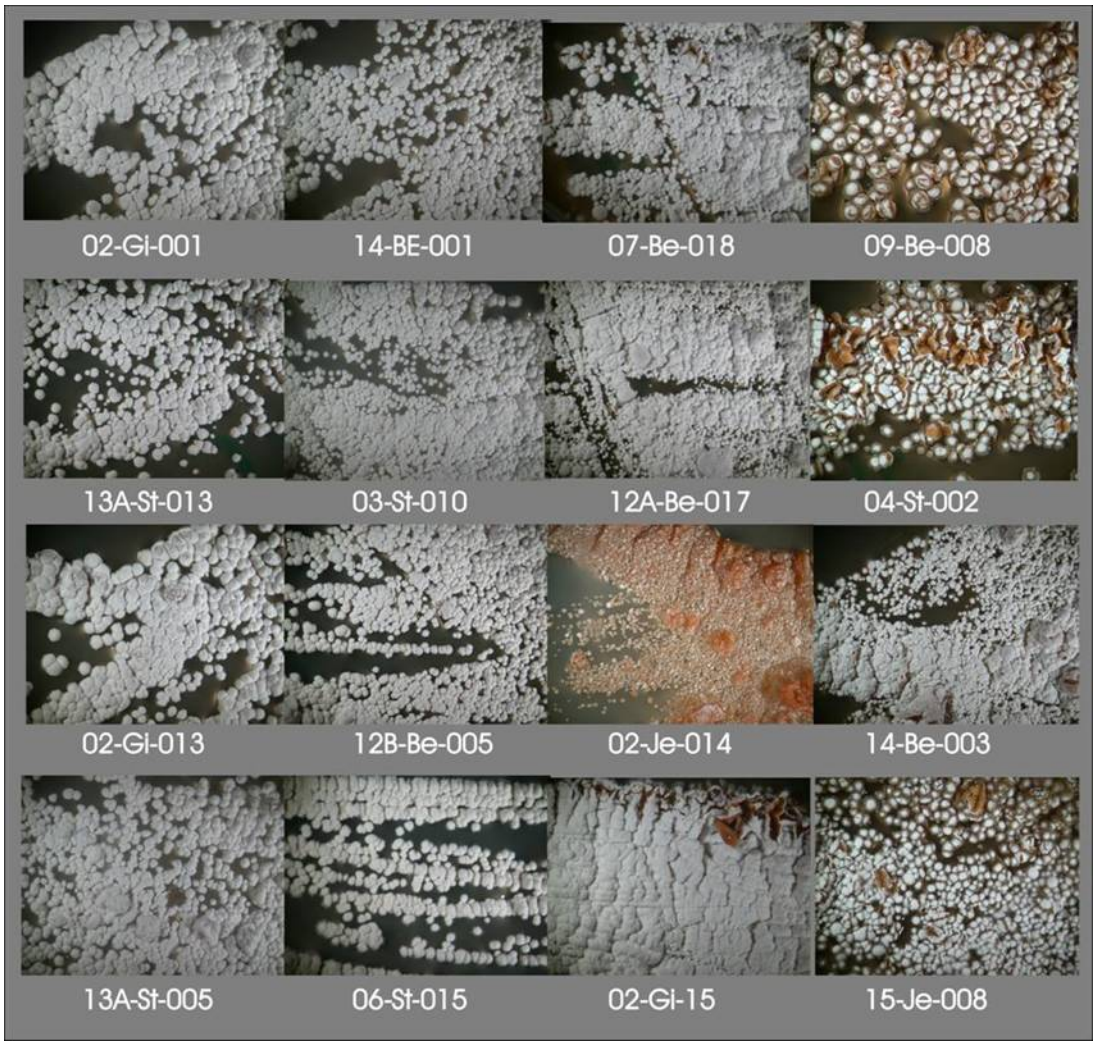


Abb. 30: Kolonien (von der Oberseite aufgenommen) von 16 Referenzisolaten der Gattung *Pseudonocardia* (CASO-Agar)

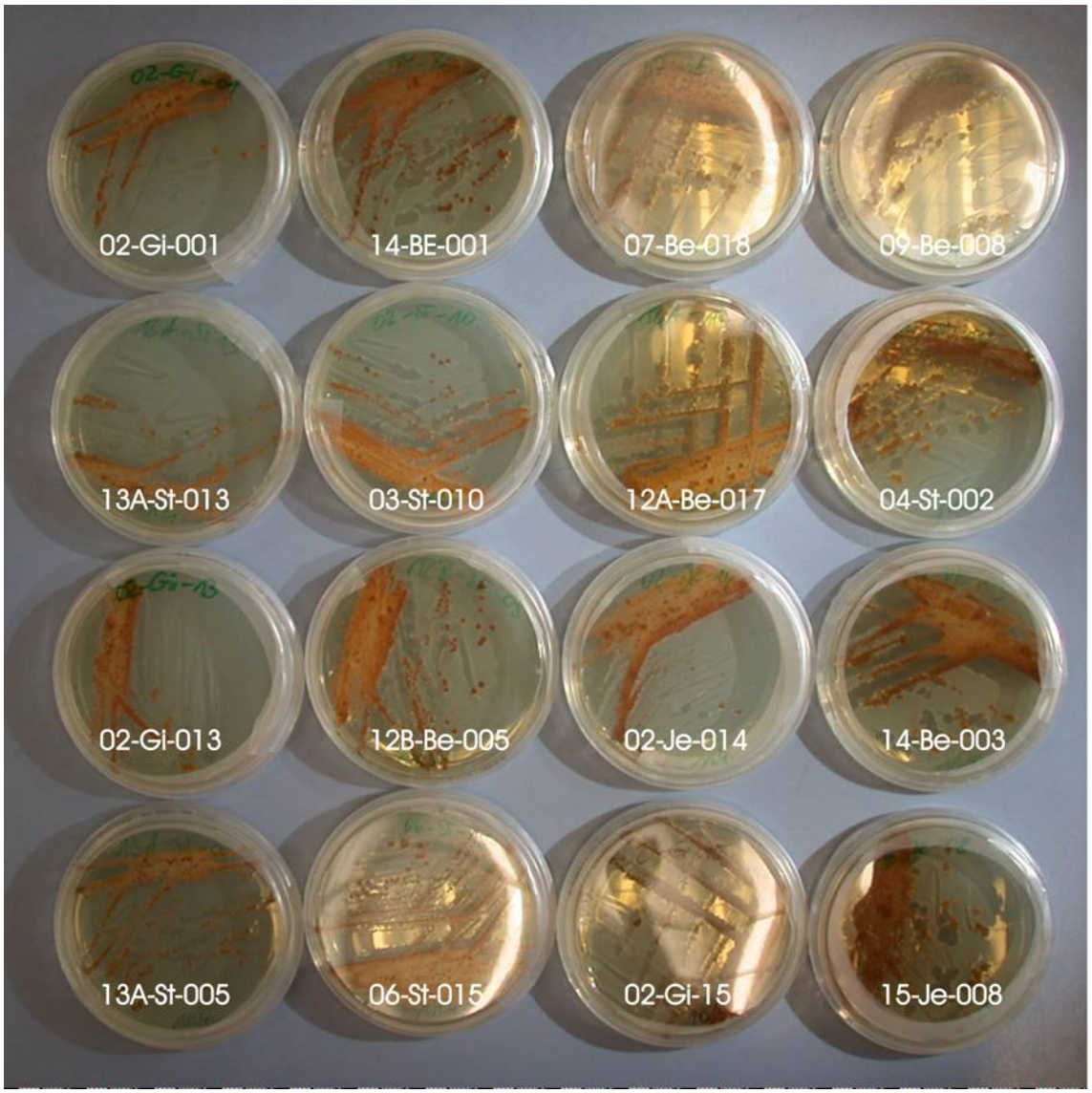


Abb. 31: Kolonien (von unten aufgenommen) von 16 Referenzisolaten der Gattung *Pseudonocardia* (CASO-Agar)

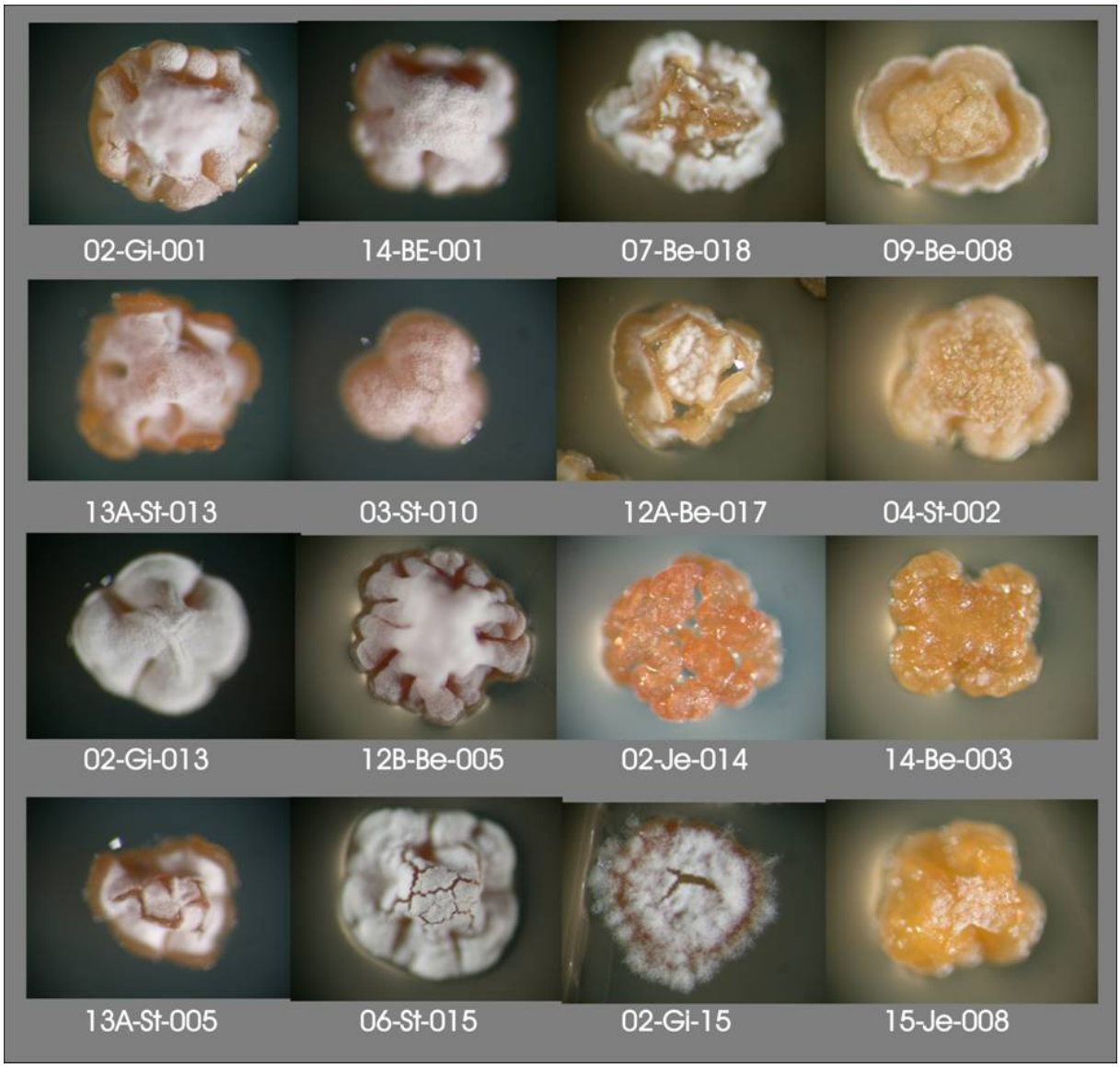


Abb. 32: Details der Kolonien von 16 Referenzisolaten der Gattung *Pseudonocardia* (CASO-Agar)

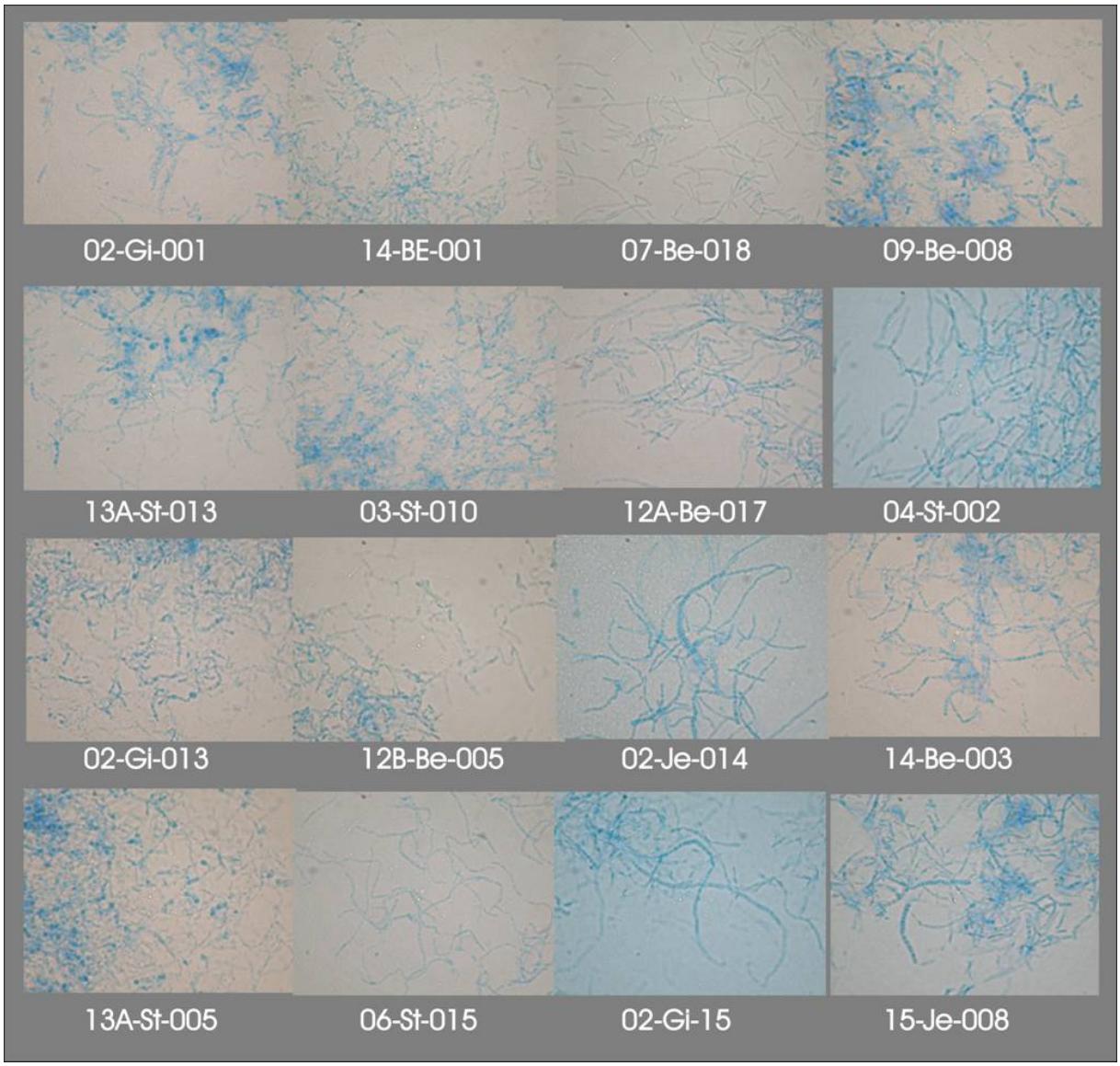


Abb. 33: Abbildung der Luftmyzelien von 16 Referenzisolaten der Gattung *Pseudonocardia* (CASO-Agar)

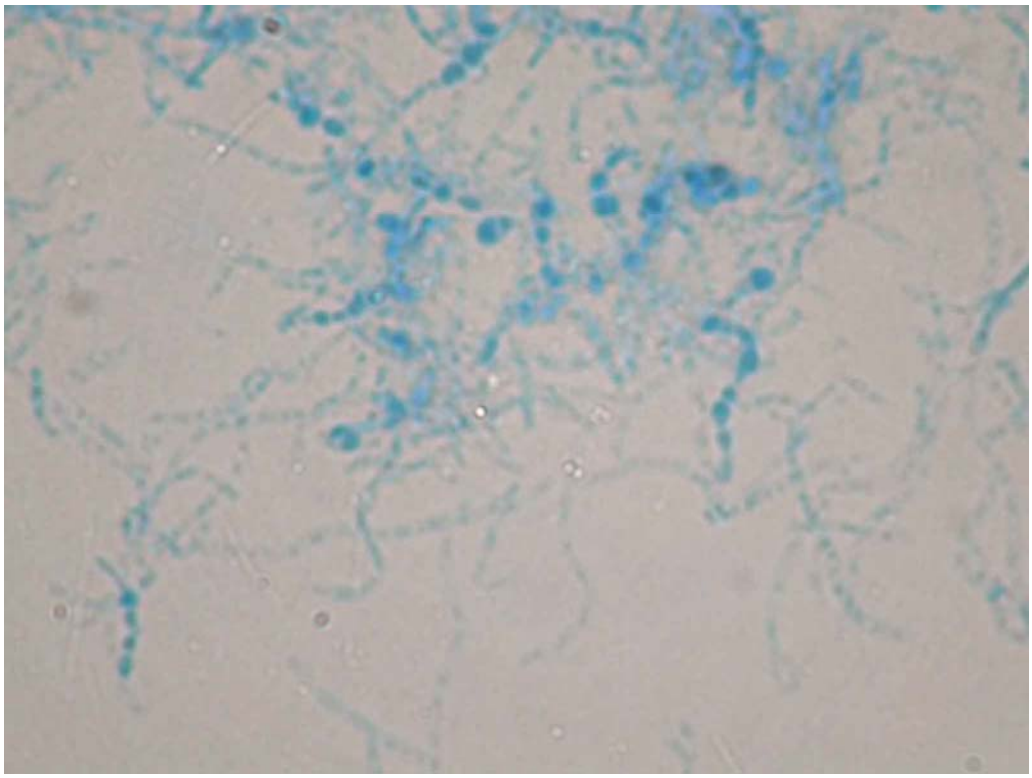


Abb. 34: Sporen im Luftmyzel von Referenzisolat 13A-St-013 (CASO-Agar)

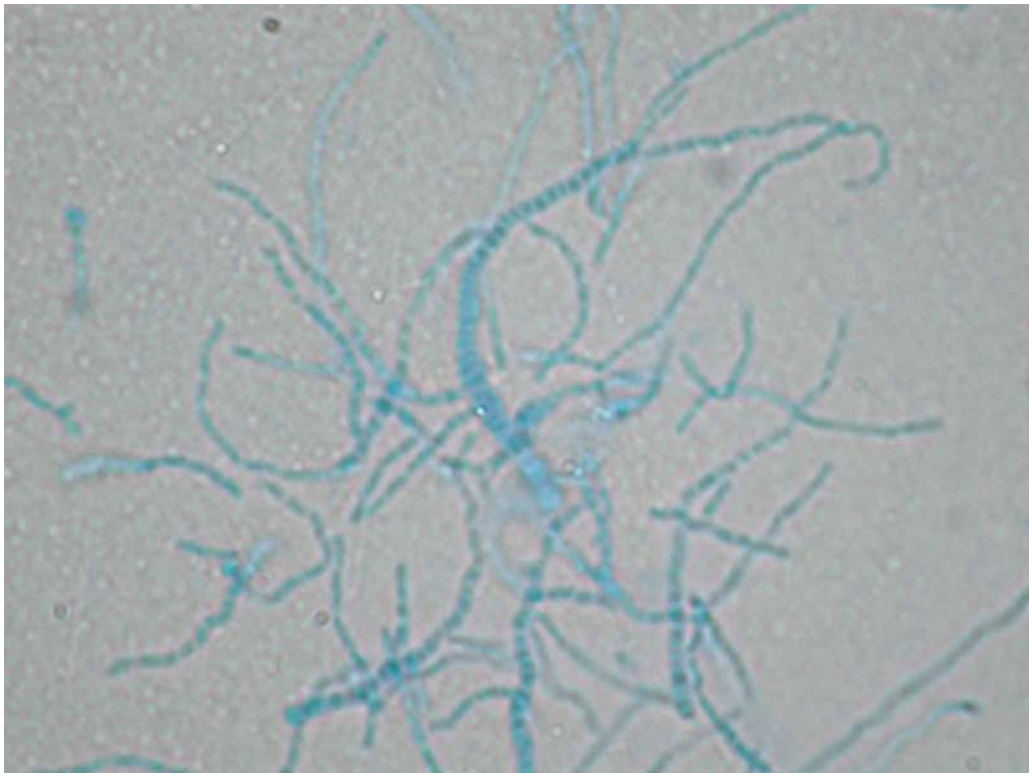


Abb. 35: Auffällige Sporen bzw. Sporenketten im Luftmyzel von Referenzisolat 02-Je-014 (CASO-Agar)

3.1.2.5.8 *Saccharopolyspora*

Die Mehrzahl der festgestellten Isolate bildete kein oder ein sehr spärliches Luftmyzel aus. Von den 13 Isolaten, die zur Stammbaumberechnung verwendet wurden, bildeten 11 Isolate ein Cluster. Die Isolate dieser Gattung bilden innerhalb von 2 Wochen in der Regel kein Luftmyzel. In Abb. 36 sind aus diesem Cluster zwei Referenzisolate (06-St-012 und 12A-Be-006) sowie zwei weitere, weit außerhalb des Clusters angeordnete Referenzisolate (02-Je-011 und 02-Gi-003) auf verschiedenen Nährmedien dargestellt. Die Abbildung verdeutlicht, dass die Kulturen der verschiedenen Referenzisolate zwar Unterschiede aufweisen, aber eine Unterscheidung in diesem frühen Stadium schwierig ist. In älteren Kulturen kann es zur Bildung von Luftmyzel kommen, allerdings tritt die Luftmyzelbildung nicht immer auf und kann auch zwischen den Kulturen eines Clusters sehr unterschiedlich sein. In Abb. 37 ist das Referenzisolat 06-St-012 nach der Isolierung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass unter den gegebenen Bedingungen ein üppiges Luftmyzel gebildet wurde

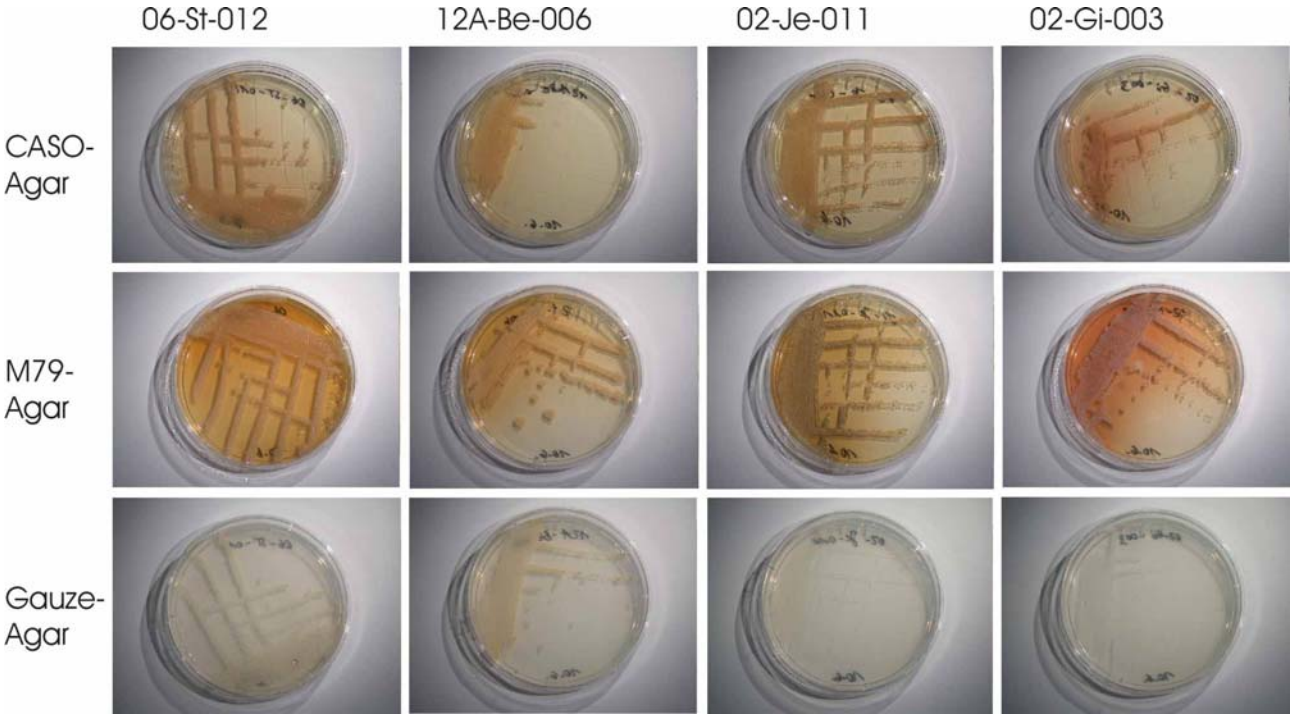


Abb 36: 14 Tage alte Referenzisolate 06-St-012 und 12A-Be-006 sowie 02-Je-011 und 02-Gi-003 auf CASO-, M79- und Gauze-Agar

Abb. 37:*Saccharopolyspora* mit Luftmyzelbildung (06-St-012) (BHI-Agar)

Entsprechend der geringeren Luftmyzelbildung vieler Isolate konnte nur für wenige Isolate die typische Sporenbildung im Myzel beobachtet werden (siehe Abb. 38).

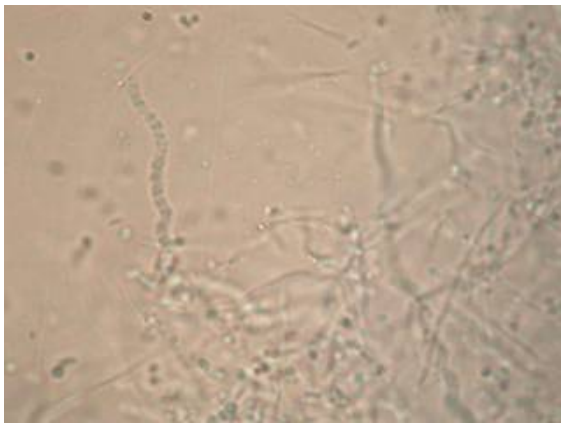


Abb. 38: Sporenkette von *Saccharopolyspora* (BHI-Agar)

Die morphologische Zuordnung der Isolate war nicht möglich, da Isolate ohne Luftmyzel denen anderer Gattungen sehr ähnlich waren. Gegenüber „nackten“ Streptomyceten sowie *Promicromonospora* konnten die Isolate aufgrund des Zellwandbestandteils meso-DAP abgegrenzt werden. Isolate, die Luftmyzel bildeten, waren denen von *Nocardiopsis* und *Nocardia* ähnlich.

3.1.2.5.9 *Streptomyces*

Typisch ist eine Kolonie mit starker Luftmyzelbildung und Sporenbildung in den Farbtönen weiß, grau, gelbgrün (siehe Abb. 39). Im mikroskopischen Bild sind gerade oder spiralige Sporenketten erkennbar (siehe Abb. 40).

Abb. 39:
Streptomycetes-Kolonie
(09-Be-010) (M79)

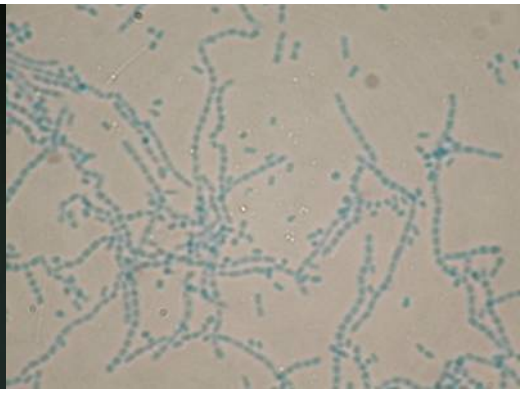


Abb. 40:
Sporenketten von *Streptomycetes* (M79)

Unter den festgestellten Streptomycetenisolaten waren neben solchen mit üppigem Luftmyzel auch solche, die praktisch kein Luftmyzel und Sporenketten auf den verwendeten Nährmedien bildeten. Die Intensität der Luftmyzelbildung konnte bei typisch wachsenden Isolaten nur wenig durch das eingesetzte Nährmedium beeinflusst (vergl. Nährmediumvergleich 3.1.2.3) werden. Allerdings konnte auch bei den so genannten „nackten“ Streptomyceten durch die Verwendung unterschiedlicher Nährmedien keine wesentliche Luftmyzelbildung induziert werden.
Weniger typische Streptomyceten-Isolate mit geringer Luftmyzelbildung können makroskopisch den Kulturen von *Pseudonocardia sp.* (Abb.41) und solche mit intensiver weißer Luftmyzelbildung denen von *Nocardiopsis sp.* ähnlich sehen (Abb. 42). In derartigen Fällen konnten erste Zuordnungen anhand des mikroskopischen Bildes erreicht werden, wenn z. B. Sporenketten gebildet wurden.

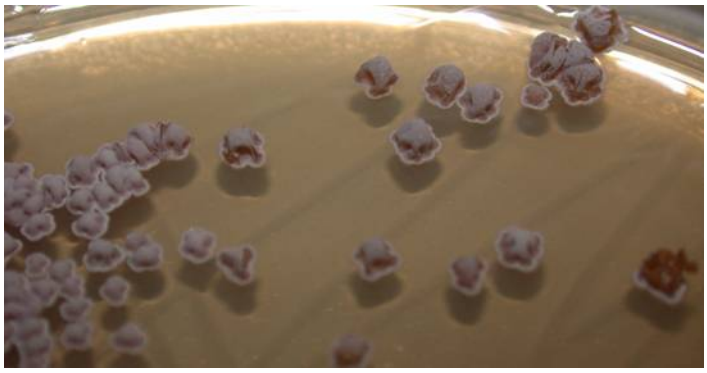


Abb. 41: *Streptomyces* mit ungewöhnlich begrenztem Wachstum und wenig Luftmyzel auf M79-Agar (morphologische Ähnlichkeit zu *Pseudonocardia*-Isolaten)

Abb. 42: *Streptomyces* mit viel Luftmyzel auf M79-Agar (morphologische Ähnlichkeit zu *Nocardiopsis*-Isolaten)

Bei der makroskopischen Zuordnung der Isolate traten insbesondere dann Probleme auf, wenn die Isolate kein Luftmyzel, aber ein gelbes Substratmyzel bildeten und daher zumindest makroskopische Ähnlichkeiten zu *Nocardia sp.* vorhanden waren (siehe Abb. 43). Auch andere Isolate ohne Luftmyzel mit unregelmäßiger Oberfläche und gelblichen Farbtönen konnten makroskopisch gegenüber anderen Gattungen nicht differenziert werden (vergleiche Medienvergleich 3.1.2.3).

Abb. 43: *Streptomyces* ohne Luftmycel auf M79-Agar (03-St-001-Luft)

Typisch für derartige Streptomyceten ist eine matte Kolonieoberfläche in beige bis gelben Farbtönen. Die Kolonie wird aus einem dichten Substratmyzel gebildet, das häufig rechtwinklige Verzweigungen aufweist. In älteren Kolonien kommt es aufgrund eines verstärken Oberflächenwachstums zu Erhebungen in radialer Ausrichtung, die später aufbrechen können, sodass die oberen Zelllagen etwas aufblättern.

Eine sichere Bestimmung auf der Primärplatte ist allerdings nicht möglich, da z.T. untypische *Amycolatopsis*-, *Nocardia*- oder *Nocardiopsis-A*rten ein ähnliches makroskopisches Bild zeigen können. Wichtige Merkmalskombinationen der Streptomyceten zur Abgrenzung gegenüber diesen Gattungen ist die relativ zähe Koloniekonsistenz und der Zellwandbestandteil LL-DAP.

Aufgrund der generellen Unsicherheit bei der morphologischen Zuordnung und einer fehlenden Überprüfbarkeit durch eine weitergehende molekularbiologische Differenzierung wurde auf eine Darstellung der unterschiedlichen Streptomycetentypen verzichtet.

3.1.2.5.10 Isolate weiterer Gattungen

Weitere Isolate wurden den Gattungen *Rhodococcus, Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* und *Kocuria* zugeordnet. Insgesamt wurden je Gattung weniger als 8 Referenzisolate festgestellt. Die Isolate dieser sechs Gattungen bilden mehr oder weniger runde Kolonien mit glatter Oberfläche in den Farben beige bis rot und bilden in älteren Kulturen stäbchenförmige oder coccoide Einzelzellen. Isolate der Gattung *Rhodococcus* bilden häufig eine leicht matte Oberfläche, einen etwas ausgefransten Kolonierand und ein geringes Myzelwachstum und können beim Auftreten dieser Merkmale gegenüber Vertretern der übrigen Gattungen unterschieden werden. Eine Differenzierung von Vertretern der Gattungen *Rhodococcus*, *Brevibacterium* und *Mycobacterium* gegenüber denen der Gattungen *Micrococcus*, *Arthrobacter* und *Kocuria* ist vor allem durch den Zellwandbestandteil meso-DAP möglich. Eine darüber hinausgehende Unterscheidung ist nur mit cytochemischen und molekularbiologischen Methoden möglich.

3.1.2.6 Vergleich der detektierten Gattungen in den Materialproben (1-4) mit denen aus Luftproben (1-4)

Die Luftproben (1-4) wurden mittels Impaktion in den jeweiligen Innenräumen gesammelt in denen die Materialproben (1-4) genommen wurden (siehe Anhang). Die Gewinnung der Isolate erfolgte wie in Abschnitt 2.3 beschrieben. Die hier dargestellte Zuordnung der Isolate auf Gattungsebene erfolgte einerseits anhand der 16S rRNA-Gen Sequenz (aus Materialproben und teilweise aus Luftproben), andererseits aufgrund morphologischer und biochemischer Parameter (Isolate aus Luftproben). In Tab. 17 sind die jeweils detektierten Gattungen aus den Material- sowie aus den Luftproben aufgeführt.

Tab. 17: Darstellung der detektierten Gattungen in Material- und Luftproben, sowie der übereinstimmenden Detektion

nur in Materialproben detektierte Gattungen	nur in den Luftproben detektierte Gattungen	sowohl in Material- als auch in den Luftproben detektierte Gattungen
Citricoccus	*Actinomadura*	*Arthrobacter*
Mycobacterium	*Arsenicicoccus*	*Amycolatopsis*
Corynebacterium	*Janibacter*	*Brevibacterium*
Isoptericola	*Kytococcus*	*Kocuria*
Jiangella		*Micrococcus*
Nocardioides		*Nocardia*
Kribbella		*Nocardiopsis*
Ornithinicoccus		*Pseudonocardia*
Microbacterium		*Rhodococcus*
Promicromonospora		*Saccharopolyspora*
Micromonospora		*Streptomyces*
Tsukamurella		

In der Tabelle 17 (Spalte 3) sind zunächst nur die detektierten Gattungen, die in Materialproben und in Luftproben ermittelt wurden, aufgeführt. Bei dem Vergleich der detektierten Gattungen in den Material- und Luftproben muss jedoch beachtet werden, ob die ermittelte Gattung in der Material- und der dazugehörigen Luftprobe detektiert wurde oder in „nicht-korrespondierenden“ Proben. Dabei konnten in ca. 37% der Fälle die jeweils detektierten Gattungen sowohl in den Materialproben als auch in den dazugehörigen Luftproben nachgewiesen werden.

Bei den 16S rRNA-Gensequenzen der vergleichbaren Isolaten konnte jedoch keine hohe Übereinstimmung detektiert werden, d.h. dass die isolierten Kulturen aus den Baumaterialien anhand der phylogenetischen Baumberechnungen der 16S rRNA-Gensequenzen nicht mit denen aus den Luftproben übereinstimmen. Hierbei ist jedoch eine Verallgemeinerung problematisch, da für die detektierten Gattungen einerseits nicht alle Isolate (besonders die Isolate aus den Luftproben) bezgl. ihrer 16S rRNA Sequenz untersucht wurden und andererseits jeweils nur ein Referenzisolat eines koloniemorphologischen Typs analysiert wurde.

3.1.3 Ergebnisse der „phylogenetischen“ Baumberechnung

Die Ergebnisse der Berechnung der verschiedenen „phylogenetischen“ Bäume befinden sich im Anhang.

3.1.4 Chemotaxonomische Untersuchungen

Chemotaxonomische Analysen wurden am HKI nur mit den Stämmen durchgeführt, die in Jena isoliert wurden. Ziel war zu prüfen, ob chemotaxonomische Untersuchungen für eine robuste und zuverlässige Identifizierung in Routineuntersuchungen anwendbar sind.
Durch die Detektion der Isomere der Diaminopimelinsäure (LL- bzw. meso-DAP) wurden unbekannte Isolate zunächst in drei große Gruppen eingeteilt: In die Gruppe der Gattungen mit LL-DAP, mit meso-DAP und ohne DAP.

<u>Isolate mit LL-DAP</u>

Zu den myzelbildenden Actinomyceten mit LL-DAP in der Zellwand gehören die Gattungen der Familien *Nocardioidaceae* und *Sporychthiaceae* sowie die Familie *Streptomycetaceae* mit den Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora.* Stämme der letztgenannten Gattung weisen sowohl LL- als auch meso-DAP auf. Vertreter dieser Gattungen besitzen vorwiegend die Menachinone MK-9(H_6), MK-9(H_8), MK-9(H_4). Eine weitere Differenzierung zwischen diesen Gattungen ist nur unter Einbeziehung weiterer Merkmale wie z.B. der Phagensensibilität (*Streptomyces* – *Kitasatospora*) oder durch molekularbiologische Analytik möglich.
Von den 31 Isolaten mit LL-DAP wurden 27 auf Grund der Morphologie und der chemotaxonomischen Analysen als *Streptomyces* sp. identifiziert. Bei 15 dieser *Streptomyces*-Isolate wurde eine Analyse des 16S rRNA-Gens durchgeführt und diese Zuordnung bestätigt, bei den übrigen 12 Isolaten wurde auf diese Analyse verzichtet. Auch die Fettsäureanalytik der 27 *Streptomyces*-Isolate bestätigte die Zuordnung zur Gattung *Streptomyces* (Tab. 18).
Vier Isolate mit LL-DAP gehörten nicht zu den Streptomyceten: Das Isolat 03-Je-020 wurde morphologisch und chemotaxonomisch als *Nocardioides* identifiziert, das Isolat 03-Je-023 als *Jiangella*. Beide Zuordnungen wurden molekularbiologisch bestätigt. Bei Isolat 15-Je-017 wurde das vermutete Taxon *Kribella* molekularbiologisch nicht bestätigt, dieser Stamm gehört ebenfalls zur Gattung *Jiangella.* Beide Gattungen wiesen das dominierende Menachinon MK-9(H_4) auf, im Unterschied zu *Kribella* findet man bei *Jiangella* LL-DAP und Spuren meso-DAP in der Zellwand. In der MIDI-Datenbank sind beide Gattungen nicht vertreten, sodass die Fettsäureanalytik keine Identifizierung ermöglichte. Ein Isolat (03-Je-004) wurde nicht identifiziert, da die morphologischen und chemotaxonomischen Daten (LL-DAP, MK-8, MK-8(H_2), Fettsäuremuster A, I, T) sowie die Untersuchung des

16S rRNA-Gens - aufgrund von Sequenzdaten geringer Qualität- keine Zuordnung erlaubten.

Isolate mit meso-DAP ohne LL-DAP

Vertreter mycelbildender Gattungen mit meso-DAP in der Zellwand weisen Menachinonmuster mit sowohl neun Isoprenoideinheiten [MK-9, MK-9(H_2), MK-9(H_4), MK-9(H_6) und MK-9(H_8) in verschiedenen Verhältnissen], mit vorwiegend zehn Isoprenoideinheiten [MK-10(H_4), MK-10(H_6), MK-10(H_2)], sowie auch Menachinonmuster mit unterschiedlicher Anzahl Isoprenoide mit gleichem Sättigungsgrad [MK-8(H_4), MK-9(H_4), MK-10(H_4) oder MK-8(H_2), MK-9(H_2)] auf. Zu ersterer Gruppe gehören die Vertreter der Gattungen *Amycolatopsis, Prauserella, Lentzea* sowie alle Gattungen der Familien *Streptosporangiaceae* und *Thermomonosporaceae.* Zur zweiten Gruppe gehören *Micromonospora, Glycomyces* und allen Gattungen der Familie *Nocardiopsaceae*, und zu letzterer gehören z.B. die Gattungen der Familie *Pseudonocardiaceae.* Wenige Gattungen sind eindeutig durch die Menachinonmuster zu erkennen, wie z.B. die Gattungen *Nocardia* bzw. *Skermania*, die das zyklische Menachinone MK-8(H_4)cyclo aufweisen. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Gattungen erfolgt unter Berücksichtigung aller morphologischen, chemotaxonomischen Daten und eindeutig auf molekularbiologischem Wege (Chun *et al.,* 1997).

Bei nicht mycelbildenden Isolaten mit meso-DAP ist die Analyse der Mycolsäuren wichtig für die Identifizierung. Das Vorkommen von Mycolsäuren ist ausschließlich bei den Gattungen mit meso-DAP von Bedeutung. Die Gattungen *Corynebacterium, Mycobacterium, Rhodococcus* können anhand der Kettenlänge der Mycolsäuren unterschieden werden (Collins *et al.,* 1982) , andererseits besitzen *Brachybacterium, Brevibacterium* und *Janibacter* keine Mycolsäuren, können aber anhand der Menachinone [*Brachybacterium* MK-7, *Brevibacterium* MK-8(H_2) MK-7(H_2), *Janibacter* MK-8(H_4)] unterschieden werden.

Von den 26 Isolaten dieser Gruppe konnten aufgrund der chemotaxonomischen Ergebnisse 21 einer Gattung zugeordnet werden, die anderen 5 Isolate konnten dagegen nur einer Gruppe von Gattungen zugeordnet werden, da bei diesen Gattungen die untersuchten chemotaxonomischen Merkmale gleich sind (Tab. 19). Durch die Fettsäureanalytik mit Hilfe des MIDI-Systems konnten nur 4 Isolate identifiziert werden.

Die Identifizierung eines dieser 4 Isolate wurde durch die Analyse des 16S rRNA-Gens bestätigt. Ursache dafür sind fehlende Referenzeinträge in der MIDI-Datenbank. 20 Isolate dieser Gruppe wurden auf der Basis des 16S rRNA-Gens Gattungen zugeordnet, bei 14 Isolaten stimmte die morphologisch-chemotaxonomische Zuordnung mit der molekularbiologischen überein.
Micromonospora-Isolate wie z.B. 11-Je-005 sind oft allein anhand ihrer auffälligen Morphologie schon erkennbar (siehe 3.1.2.5.2). Andere Gattungen sind chemotaxonomisch allein nicht klar abgrenzbar, wie im Falle der Gattungen *Brachybacterium, Brevibacterium*, und *Dermabacter* (Isolate 11-Je-010, 15-Je-003, 15-Je-013). Ebenso schwierig sind Isolate der Gattungen *Saccharothrix, Amycolatopsis* und *Saccharopolyspora* zu identifizieren. Eine eindeutige Zuordnung kann hier nur auf der Basis der Analyse der 16S rRNA-Gene erfolgen. Die Übereinstimmung der Zuordnungen zu Taxa aufgrund der morphologischen und chemotaxonomischen Daten verglichen mit den molekularbiologischen Daten war in dieser Gruppe schlechter als bei den Gattungen mit LL-DAP.

Isolate ohne DAP

Zu dieser Gruppe gehören hauptsächlich die asporogenen Gattungen mit pleomorph wachsenden Stäbchen bzw. Kokken. Es kommen vielfältige Variationen sowohl bei den Menachinonmustern als auch bei der diagnostischen Diaminosäure der Zellwand vor. Da die in Frage kommenden Diaminosäuren L-Lysin, L-Ornithin oder L-Diaminobuttersäure auch als Bestandteile von Peptiden des Zytoplasmas vorkommen, muss die Diaminosäure im Tetrapeptid des Peptidoglycans durch eine aufwändige Präparation der Zellwände nachgewiesen werden.
Von allen analysierten Isolaten hatten 16 keine Diaminopimelinsäure in der Zellwand (Tab. 20). In dieser Gruppe war die Übereinstimmung zwischen der morphologischen/chemotaxonomischen und der molekularbiologischen Identifizierung ebenfalls eingeschränkter als bei der Gruppe mit LL-DAP. So stimmte die Identifizierung anhand der Fettsäuremuster und der Analyse des 16S rRNA-Gens bei keinem der Isolate überein. Das Isolat 02-Je-010, chemotaxonomisch als *Arthrobacter* sp. identifiziert, wurde durch die Fettsäureanalyse als *Arthrobacter agilis* identifiziert, die Untersuchung des 16S rRNA-Gens ergab eine Zugehörigkeit zu *Citricoccus*. Bei sieben Isolaten stimmte die morphologisch-chemotaxonomische Zuordnung mit der molekularbiologischen Identifizierung überein (Isolate der Gattungen *Promicromonospora, Arthrobacter,*

Microbacterium und *Micrococcus*). Innerhalb dieser Gruppe sind besonders die Gattungen *Oerskovia, Cellulomonas, Isoptericola* und *Promicromonospora* schwer zu unterscheiden, da sie sehr ähnliche Merkmale aufweisen. Das Isolat 11-Je-009 besitzt eine ungewöhnliche Kombination von Merkmalen: Lysin als Diaminosäure des Peptidoglycans, die Menachinone MK-9(H_6), MK-9(H_4), MK-8(H_4) und myceliales Wachstum. Aufgrund des geringeren Wachstums konnten bisher weder ausreichend DNA für die Sequenzierung erhalten werden noch eine Gattungsdiagnose erfolgen. Die Isolate 04-Je-002 und 02-Je-012 erwiesen sich als *Staphylococcus*-Isolate, die nicht zu den Actinomyceten gehören.

Tab18: Chemotaxonomische Merkmale der Isolate mit LL-DAP in der Zellwand

Stamm-nummer	Koloniebeschreibung	Menachinone	Fett-säuren	vermutetes Taxon*	Taxon MIDI**	Taxon 16S r RNA-Gen***
01-Je-007	Mycel, RF	MK-9(H6), MK-9(H4)	I, A	*Streptomyces sp.* (Typ 2)	*Streptomyces sp.*	ND
01-Je-011	Mycel, RF	MK-9(H6), MK-9(H4), MK-9(H8)	I, A, S	*Streptomyces sp.* (Typ 2)	*Streptomyces griseus*	ND
01-Je-012	Mycel, RF, lang	MK-9(H4), MK-9(H6)	A, S, I	*Streptomyces sp.* (Typ 3)	*Streptomyces olivaceus*	ND
01-Je-015	Mycel, RF, lang	MK-9(H6), MK-9(H4)	A, S, I	*Streptomyces sp.* (Typ 3)	*Streptomyces scabiei*	ND
01-Je-016	Mycel, S, RA	MK-9(H6), MK-9(H8)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 3)	*Streptomyces griseus*	ND
01-Je-018	Mycel, RF	MK-9(H6), MK-9(H4)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 2)	*Streptomyces griseus*	ND
01-Je-019	Mycel, RF	MK-9(H4), MK-9(H6)	I, A	*Streptomyces sp.* (Typ 2)	*Streptomyces griseus*	ND
01-Je-024	Mycel, S, RA	MK-9(H6), MK-9(H4)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 3)	*Streptomyces griseus*	ND
01-Je-026	Mycel	MK-9(H4), MK-8(H2), MK-9(H6)	A, S, I	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces scabiei*	*Streptomyces*
03-Je-004	Kokken	MK-8(H2), MK-8	I, A, T, OH-FS	unbekannter Actinomycet	no match	ND
03-Je-012	Mycel, RF	MK-9(H6), MK-9(H4)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 2)	*Streptomyces annulatus*	*Streptomyces microflavus*
03-Je-015	Mycel, S, RA	MK-9(H6), MK-9(H4), MK-9(H8)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 1)	*Streptomyces rochei*	ND
03-Je-016	Mycel, S	MK-9(H6)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 1)	*Streptomyces (violaceusniger)*	*Streptomyces sannanensis*
03-Je-017	Mycel, S	MK-9(H6), MK-9(H8)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 1)	*Streptomyces (violaceusniger)*	ND
03-Je-020	unregelmäßige Filamente	MK-8(H4)	I, U	*Nocardioides albus*	no match	*Nocardioides albus*
03-Je-022	Mycel	MK-9(H6), MK-9(H8)	I, A	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces (violaceusniger)*	*Streptomyces aculeolatus*

Stamm-nummer	Koloniebeschreibung	Menachinone	Fett-säuren	vermutetes Taxon*	Taxon MIDI**	Taxon 16S r RNA-Gen***
03-Je-023	fragmentierendes Mycel in unregelmäßige Stäbchen, Cluster	MK-9(H4)	A, I	*Jiangella sp.*	no match	*Jiangella ginsengisola*
04-Je-005	Mycel	MK -9(H6), MK-9(H8)	I, A, S	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces sp. (cyaneus)*	*Streptomyces sp.*
04-Je-006	Mycel, RA, RF	MK-9(H6), MK-9(H8)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 1)	*Streptomyces rochei*	*Streptomyces sp.*
04-Je-007	Mycel, RA, RF	MK-9(H6), MK-9(H4)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 1)	*Streptomyces sp. (rochei)*	ND
04-Je-008	Mycel, RA, RF	MK-9(H6), MK-9(H8)	A, I	*Streptomyces sp.* (Typ 1)	*Streptomyces sp. (rochei)*	ND
11-Je-003	Mycel	MK-9(H6), MK-9(H8), MK-9(H4)	I, A, S	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces sp. (halstedii)*	*Streptomyces*
11-Je-006	Mycel, lang	MK-9(H8), MK-9(H6)	I, A, T	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces (violaceusniger)*	*Streptomyces*
15-Je-007	kräftiges Mycel mit einigen Verzweigungen	MK-9(H6), MK-9(H4)	I, A	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces (violaceusniger)*	*Streptomyces*
15-Je-017	fragmentiertes Mycel	MK-9(H4)	A, I	*Kribella??*	no match	*Jiangella*
15-Je-018	langes Mycel, fast unverzweigt	MK-9(H4), MK-9(H6)	A, I, S	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces sp. (halstedii)*	*Streptomyces*
15-Je-019	verzweigtes Mycel	MK-9(H6), MK-9(H4), MK-10(H6)	A, I	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces sp. (rochei)*	*Streptomyces*
15-Je-021	dickes Mycel, etwas verzweigt	MK-9(H6), MK-10(H6)	A, I	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces violaceusniger*	*Streptomyces*
15-Je-022	langes glattes Mycel, fast keine Verzweigungen	MK-9(H4), MK9(H6)	A, I	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces rochei*	*Streptomyces*
15-Je-033	verzweigendes Mycel, wellig, gekrümmt	MK-9(H6), MK-10(H6), MK-9(H4)	A, I	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces violaceusniger*	*Streptomyces*
15-Je-035	Mycel, lang, glatt, keine Verzweigung	MK-9(H6), MK-10(H6)	A, S, I	*Streptomyces sp.*	*Streptomyces sp. (halstedii)*	*Streptomyces*

*Zuordnung nach morphologischen und chemotaxonomischen Markern, ** Identifizierung durch MIDI-Software, no match – keine Zuordnung zu Taxa, Taxa in Klammern – der Ähnlichkeitswert lag unter 0,3, *** Identifizierung anhand des 16S rRNA-Gens, ND – nicht untersucht, RA - Sporenketten retinaculum apertum, RF- Sporenketten rectiflexibiles, S- Sporenketten spiralig (Shirling and Gottlieb, 1966), Abkürzungen Fettsäuren: S - gradkettig, gesättigt, U – einfach ungesättigt, A - anteiso-methyl-verzweigt, I - iso-methyl-verzweigt, T - 10-methyl-verzweigt (Tuberculostearinsäure), 2OH - 2 hydroxyliert

Tab. 19: Chemotaxonomische Merkmale der Isolate mit meso-DAP in der Zellwand

Stamm-nummer	Koloniebeschreibung	Menachinone	Mycol-säuren*	Fett-säuren	vermutetes Taxon*	Taxon MIDI***	Taxon 16S r RNA-Gen****
11-Je-001	fragmentiertes Mycel	MK-9(H4)	-	I, U, 2OH	*Amycolatopsis*	no match	*Amycolatopsis palatopharyngis*
11-Je-004	Mycel, relativ kompakt, z.T. Fragmente	MK-9(H4)	-	I, S, U	*Amycolatopsis*	no match	*Amycolatopsis palatopharyngis*
03-Je-007	Mycel und Fragmente	MK-9(H4), MK-8(H4)	-	I, U, S, T	*Amycolatopsis*	no match	*Amycolatopsis palatopharyngis,* TS
03-Je-013	Mycel und Fragmente	MK-9(H4)	-	I, S, U	*Nocardiopsis sp.*	no match	*Amycolatopsis orientalis*
11-Je-010	Kokken	MK-7, MK-8	-	A	*Brachy-, Brevibacterium, Dermabacter?*	no match	*Brachybacterium*
15-Je-003	Kokkoide, groß,	MK-7, MK-8	-	A, I, T	*Dermabacter*	no match	*Brachybacterium paraconglomeratum*
15-Je-013	Stäbchen, Kokken	MK-7	-	I, A, U	*Brachy-, Brevibacterium, Dermabacter?*	no match	*Brachybacteium paraconglomeratum*
01-Je-003	Stäbchen, Kokken	MK-8(H2)	-	A	*Brevibacterium sp.*	*Brevibacterium casei*	*Brevibacterium*
02-Je-004	Stäbchen, Kokken	MK-8(H2)	-	A	*Brevibacterium sp.*	*Brevibacterium casei*	ND
03-Je-002	Stäbchen, Kokken	MK-8(H2)	-	A, I	*Brevibacterium sp.*	no match	*Brevibacterium antiquum*
11-Je-005	kompaktes Mycel	MK-10(H6), MK-9(H4)	-	I	*Micromonospora*	no match	*Micromonospora*
15-Je-009	Kurzstäbchen	MK-9(H2)	+	S, U	*Mycobacterium*	no match	*Mycobacterium*
15-Je-005	Kurzstäbchen	MK-9(H2)	+	U, S	*Mycobacterium*	no match (*Gordona*)	*Mycobacterium*
03-Je-019	unregelmäßige Stäbchen und Kokken	MK-9(H2)	+	S, U	*Mycobacterium sp.*	no match	*Mycobacterium neglectum*
01-Je-025	fragmentiertes Mycel	MK-8(H4) cyclo	+	S, U	*Nocardia sp.*	no match (*Nocardia nova*)	*Nocardia devorans*
11-Je-002	fragmentiertes Mycel	MK-8(H4) cyclo	+	S, T	*Nocardia?/Skermania?*	no match	*Nocardia carnea*

Stamm-nummer	Koloniebeschreibung	Menachinone	Mycol-säuren*	Fett-säuren	vermutetes Taxon**	Taxon MIDI***	Taxon 16S rRNA-Gen****
15-Je-015	fragmentiertes Mycel	MK-8(H4) cyclo	+	S, T	*Nocardia sp.*	no match	*Nocardia cummidelens*
01-Je-021	fragmentiertes Mycel	MK-8(H4) cyclo	+	S, T	*Nocardia sp.*	no match	ND
01-Je-023	fragmentiertes Mycel	MK-8(H4) cyclo	+	S, U	*Nocardia sp.*	no match (*Nocardia*)	ND
02-Je-014	Mycel, dicke Fragmente	MK-8(H4)	-	I	*Pseudonocardia sp.*	no match (*Amycolata*)	*Pseudonocardia*
15-Je-008	unregelmäßiges Mycel, Konglomerate	MK-8(H4)	-	I	*Pseudonocardia*	no match	*Pseudonocardia*
15-Je-001	unregelmäßige Stäbchen, Kokken	MK-8(H2)	+	S, U	*Rhodococcus sp.*	no match	*Rhodococcus*
01-Je-005	unregelmäßige Stäbchen, Kokken	MK-8(H2)	+	S, U	*Rhodococcus sp.*	*Rhodococcus opacus*	ND
01-Je-006	unregelmäßige Stäbchen, Kokken	MK-8(H2)	+	S, U	*Rhodococcus sp.*	*Rhodococcus opacus*	ND
02-Je-011	Mycel, Fragmente	MK-9(H4)	-	I, A, U	*Saccharothrix/Amycolatopsis/ Saccharopolyspora*	no match	*Saccharopolyspora*
02-Je-013	Mycel, Fragmente	MK-9(H4)	-	I, A, U		no match	ND

* + Mycolsäuren vorhanden, – keine Mycolsäuren vorhanden, **Zuordnung nach morphologischen und chemotaxonomischen Markern, *** Identifizierung durch MIDI-Software, no match – keine Zuordnung zu Taxa, no match mit Taxa in Klammern – der Ähnlichkeitswert lag unter 0,3, **** Identifizierung anhand des 16S rRNA-Gens, ND – nicht untersucht, Abkürzungen Fettsäuren: S - gradkettig, gesättigt, U – einfach ungesättigt, A - anteiso-methyl-verzweigt, I - iso-methyl-verzweigt, T - 10-methyl-verzweigt (Tuberculostearinsäure), 2OH - 2 hydroxyliert

Tab. 20: Chemotaxonomische Merkmale der Isolate ohne DAP in der Zellwand

Stamm-nummer	Koloniebeschreibung	Menachinone	Fett-säuren	vermutetes Taxon*	Taxon MIDI**	Taxon 16S r RNA-Gen***
01-Je-001	Stäbchen, Kokken	MK-9(H2)	A, I	*Arthrobacter sp.*	no match (*Micrococcus*)	*Arthrobacter sp.*
02-Je-010	Kokken	MK-9(H2), MK-8(H2)	A, I	*Arthrobacter / Micrococcus*	*Arthrobacter agilis*	*Citricoccus*
11-Je-011	Kokken	MK-7, MK-8	A	*Arthrobacter sp., (nicotianae* group)	no match	schlechte/fehlende Sequenz
02-Je-008	Kokken, Tetraden, Cluster	MK-8(H2), MK-7(H4)	A, I	coryneformer Actinomycet	no match (*Micrococcus*)	*Micrococcus luteus*
04-Je-003	unregelmäßige Kokken, Cluster	MK -8(H2), MK-7(H4)	A, I	*Micrococcus sp.*	no match	*Micrococcus luteus*
03-Je-003	Kokkoide Stäbchen	MK-13, MK-12	A, I	*Microbacterium sp.*	no match	*Microbacterium phyllosphaeraceae*
15-Je-027	kokkoid, kurzstäbchenförmig	MK-11, MK-12	A, I	*Microbacterium*	no match	*Microbacterium*
15-Je-002	Kokkoide Kurzstäbchen	MK-12, MK-13	A, I	*Microbacterium sp.*	no match	*Microbacterium*
03-Je-006	unregelmäßige Stäbchen und Kokken	MK-9(H4)	A, I	*Oerskovia sp. ? (Cellulomonas/ Promicromonospora/Isoptericola)*	no match	*Isoptericola variabilis*
15-Je-004	coryneforme Stäbchen, haufenförmig	MK-9(H2), MK-9(H4), MK-8(H2)	A	*??*	no match	*Isoptericola*
03-Je-001	Mycel unregelmäßige Fragmente	MK-9(H4), MK-9(H6)	A, I	*Promicromonospora*	no match	*Promicromonospora citrea*
15-Je-029	fragmentierende Hyphen, bis stäbchenförmig	MK-9(H4), MK-9(H6)	A, I	*Promicromonospora*	no match	*Promicromonospora*
15-Je-026	Kurzstäbchen bis fragmentiertes Mycel	MK-9(H4)	A, I	*Oerskovia, Cellulomonas*	no match (*Streptomyces*)	*Oerskovia*
11-Je-009	kurze Stäbchen bis kurze Filamente	MK-9(H6), MK-9(H4), MK-8(H4)	I, A	???	no analysis	schlechte/fehlende Sequenz
04-Je-002	Kokken, einzeln, kurze Ketten, Cluster	MK-7, MK-8	A, I, S	*Staphylococcus sp.*	no match	ND
02-Je-012	Kokken, Paare, Cluster	MK-7, MK-8	A	*Staphylococcus sp.*	no match (*Staphylococcus*)	ND

Erläuterung siehe Tab 18

3.1.5. Bestimmung von Enzymmustern mit dem API-ZYM System

Zu Beginn des Projektes wurden 33 Isolate mit den API-ZYM-Teststreifen mit dem Ziel untersucht, ob das Nährmedium, von denen die Stämme isoliert wurden, einen Einfluss auf die enzymatischen Leistungen der Stämme hat. Es wurden Isolate der Gattungen *Amycolatopsis* (3), *Pseudonocardia* (3) und *Streptomyces* (26) untersucht (s. Anhang). Besonders die Streptomyceten wiesen ein vielfältiges Enzymspektrum auf. Nur 10 *Streptomyces*-Isolate wiesen vier verschiedene Enzymspektren auf. Drei Isolate waren identisch in ihrer Esteraseaktivität, drei in ihrer α-Galactosidaseaktivität, zwei in ihrer α- und β-Galactosidaseaktivität und zwei Isolate in ihrer Esterase- und Lipaseaktivität.

Die drei *Amycolatopsis*- Isolate wurden von Gauze-Agar (2) bzw. Actinomyceten-Agar isoliert. Die beiden Isolate vom Gauze-Agar unterschieden sich in 3 Enzymen. Alle bildeten die Enzyme Esterase, Lipase und Valine arylamidase, waren aber unterschiedlich bezüglich der Bildung der Esterase, β-Glucosidase und β-Glucuronidase.

Die drei untersuchten *Pseudonocardia*-Isolate waren in ihrer Enzymaktivität sehr ähnlich. Der von CM-Agar isolierte Stamm unterschied sich von den zwei von Gauze-Agar isolierten in der fehlenden Bildung von β-Glucosidase.

Da die Isolate sehr unterschiedliche Enzymmuster aufwiesen, die weder Rückschlüsse auf das Nährmedium zuließen noch eine eindeutige Gruppierung aufgrund des Taxons erlaubten, wurden diese Tests nicht weitergeführt.

3.2 Kultivierungsunabhängige Untersuchungen

3.2.1 Klonierung

Die Bearbeitung der Klone erfolgte wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben.

Von insgesamt 1600 generierten Klonen aus 16 Proben konnten 694 16S rRNA Gen-Inserts (45%) in die Klasse der *Actinobacteria* eingeordnet werden. Anhand der BLAST®-Suche wurden die analysierten Klonsequenzen 52 Gattungen der Klasse der *Actinobacteria* zugeordnet (Tab. 21). Eine weitere Einordnung der 16S rRNA-Gen-Inserts war aufgrund der geringen Länge der Sequenzen nicht möglich. Insgesamt wurden jedoch Vertreter der Gattungen *Amycolatopsis, Arthrobacter, Jiangella, Nocardioides, Promicromonospora, Pseudonocardia, Saccharopolyspora* und *Streptomyces* am häufigsten detektiert. Bei 17 von 52 ermittelten Gattungen konnte jeweils nur ein Vertreter detektiert werden (*Tetrasphaera, Stackebrandtia,*

Saccharothrix, Propionibacterium, Patulibacter, Prauserella, Prauseria, Crustibacterium, Conexibacter, Agromyces, Aeromonas, Actinomyces, Kineococcus, Kocuria, Kribella, Georgenia, Goodfellowia). In Abb. 44 sind die in den Proben festgestellten Gattungen in der Reihenfolge der Proben aufsummiert dargestellt. Diese Darstellung verdeutlicht die gesteigerte Detektion verschiedener Gattungen durch eine erhöhte Anzahl untersuchter Proben.

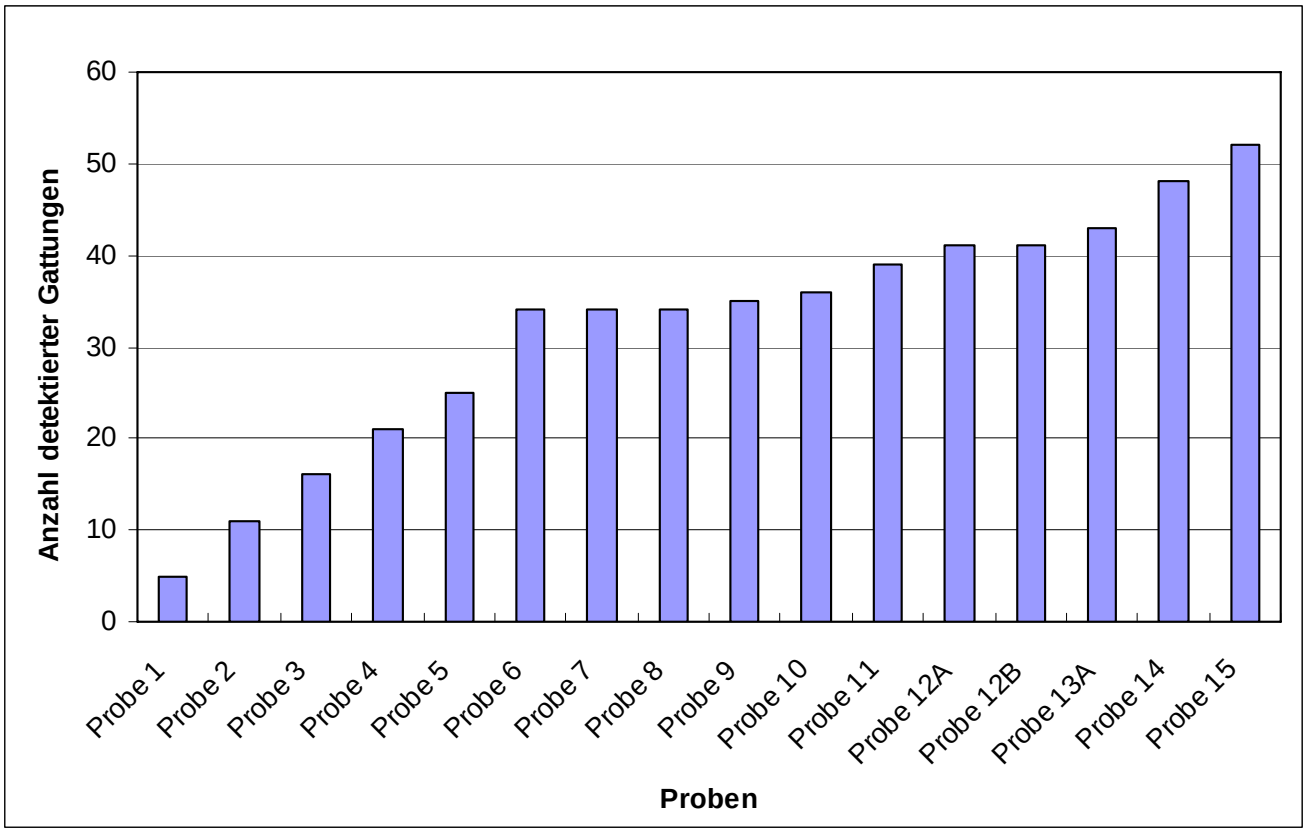


Abb. 44: Darstellung der kumulativ aufsummierten Anzahl, der mittels Klonierung erfassten Gattungen in den untersuchten Materialproben

Tab. 21: Zuordnung der Klonsequenzen (ca. 400 bp des 16S rRNA-Genes) zu den verschiedenen Gattungen innerhalb der Klasse der *Actinobacteria*

	Taxon	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	Probe 11	Probe 12A	Probe 12B	Probe 13A	Probe 14	Probe 15	total
1	*Actinomyces*																1	1
2	*Actinopolymorpha*						4										1	5
3	*Aeromicrobium*		1	1									1					3
4	*Aeromonas*	1																1
5	*Agrococcus*					1									1			2
6	*Agromyces*																1	1
7	*Amycolatopsis*					8	24	2	39			28	11	8				120
8	*Arthrobacter*	8	1			3				1	1	1	6			20	3	44
9	*Blastococcus*															3		3
10	*Brachybacterium*				1							4						5
11	*Brevibacterium*		2		1			6			1		1					11
12	*Conexibacter*															1		1
13	*Crocebacterium*												1		1			2
14	*Crossiella*											3						3
15	*Crustibacterium*		1															1
16	*Cryocola*						1								1			2
17	*Georgenia*											1						1
18	*Goodfellowia*															1		1
19	*Jiangella*	1	1	2	2		8					9						23
20	*Kineococcus*																1	1
21	*Kocuria*															1		1
22	*Kribella*												1					1
23	*Leifsonia*			1			2											3
24	*Lentzea*	1											3	1				5
25	*Microbacterium*		1			4					1				1			7
26	*Microcella*														2			2
27	*Microlunatus*											2						2
28	*Micromonospora*						1	1										2
29	*Modestobacter*						1									2		3
30	*Mycobacterium*				1												1	2
31	*Nesterenkonia*				33													33
32	*Nocardia*						1	1	2				1					5
33	*Nocardioides*					5		1				1	5	11				23
34	*Nocardiopsis*				2		9		1									12
35	*Parkia*					4		1										5
36	*Patulibacter*			1														1
37	*Prauserella*						1											1
38	*Prauseria*									1								1
39	*Promicromonospora*			1	1	12	2	7		14			7	8				52
40	*Propionibacterium*		1															1
41	*Pseudonocardia*	1	22	1	3	18	14	1	7	3		2	14	12	1	1	5	105
42	*Rathayibacter*						1	4							1			6
43	*Rhodococcus*														2			2
44	*Saccharomonospora*						2		2			5						9
45	*Saccharopolyspora*		17		3		8		33	1		10		2	3			77
46	*Saccharothrix*			1														1
47	*Sanguibacter*										3							3
48	*Solirubrobacter*															1	1	2
49	*Stackebrandtia*						1											1
50	*Streptomyces*			1			2	10	2	18		11	17	20				81
51	*Tetrasphaera*																1	1
52	*Yania*				8													8
53	*Uncultured Rubrobacteridae*														1			1
54	*uncultured Actinobacterium*									1								1
55	*Candidatus Microthrix*			3														3
	total	12	47	12	55	55	82	34	86	39	6	77	68	62	14	30	15	694

3.2.2 SSCP (Singel Strand Conformation Polymorphism)

Die SSCP-Fingerprintmethode wurde einerseits verwendet, um die Diversität der Actinomycetenkolonien auf den unterschiedlichen Nährmedien zu untersuchen, andererseits um die in den verschiedenen Proben vorkommenden Actinomycetenpopulationen miteinander zu vergleichen.

3.2.2.1 SSCP-Analyse der abgeschwemmten Nähragarplatten unter Verwendung Actinomyceten spezifischer Primer

Die SSCP Analyse der aus den kultivierten Actinomyceten-Spezies generierten Bandenmuster (siehe Abschnitt 2.4.3) zeigte sowohl in Abhängigkeit der verwendeten Medien als auch in Abhängigkeit der Verdünnungsstufen deutliche Unterschiede in den „Fingerprintmustern“. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Diversität der kultivierbaren Actinomyceten bei paralleler Verwendung verschiedener Nährmedien und dem Einsatz unterschiedlicher Verdünnungsstufen ansteigt.

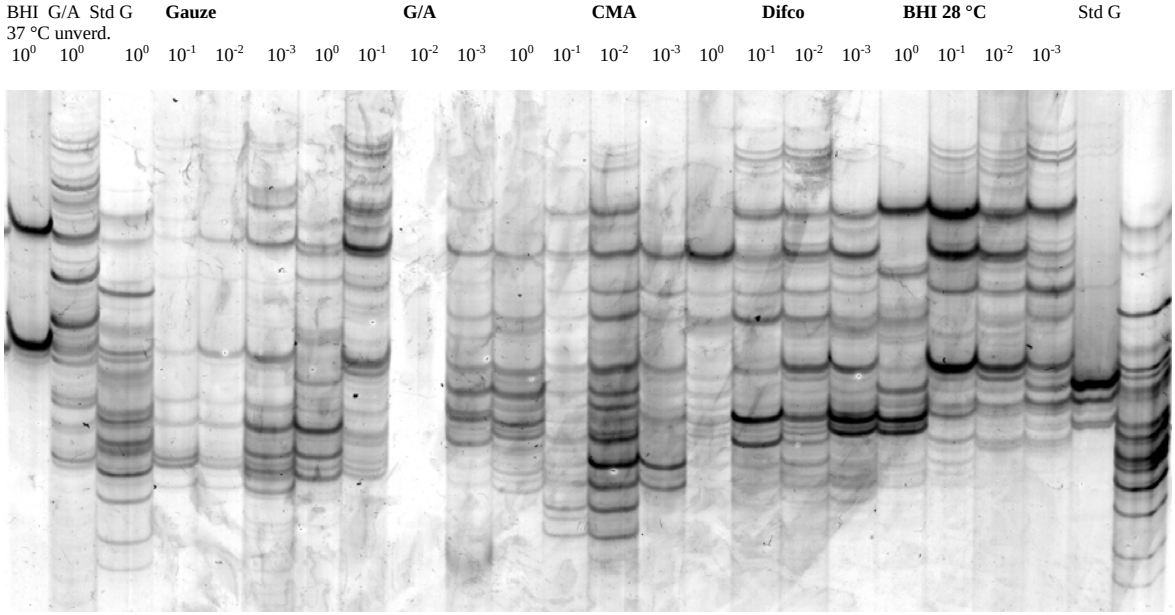


Abb. 45: SSCP-PA-Gelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der aus den abgeschwemmten Nährmedienplatten generierten SSCP-PCR-Produkte. Die PCR wurde unter Verwendung spezifischer Actinomyceten-Primer durchgeführt. Aufgetragen wurden ein Standardgemisch aus Reinkulturen (Std G), SSCP-PCR-Produkte (650 ng), die auf unterschiedlichen Nährmedien gewachsenen Kulturengemische (CMA, Difco, BHI, Gauze und G/A) unterschiedliche Verdünnungsstufen, (10^0-10^{-3}) Ein Bandenmuster beruht jeweils auf den PCR-Produkten, deren molekularer Aufarbeitung und anschließender SSCP-Analyse.

3.2.2.2 SSCP-Analyse der verschiedenen Baumaterialien unter Verwendung Actinomyceten-spezifischer Primer

Mit Hilfe der SSCP-Fingerprinttechnik unter Verwendung von Actinomyceten-spezifischen Primern, sollte festgestellt werden, ob sich die Actinomycetenpopulationen in den unterschiedlichen Materialproben unterscheiden. Beim Vergleich der aus unterschiedlichen Proben generierten Bandenmuster konnten visuell deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialproben festgestellt werden (Abb. 46). Dies bestätigt und ergänzt die Kultivierungsergebnisse, die ebenfalls zeigten, dass die Actinomycetengemeinschaft in den verschiedenen Proben stark variiert.

Materialproben

Std. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 12 13 14 A 15 B 15 15 A 16 B Std C

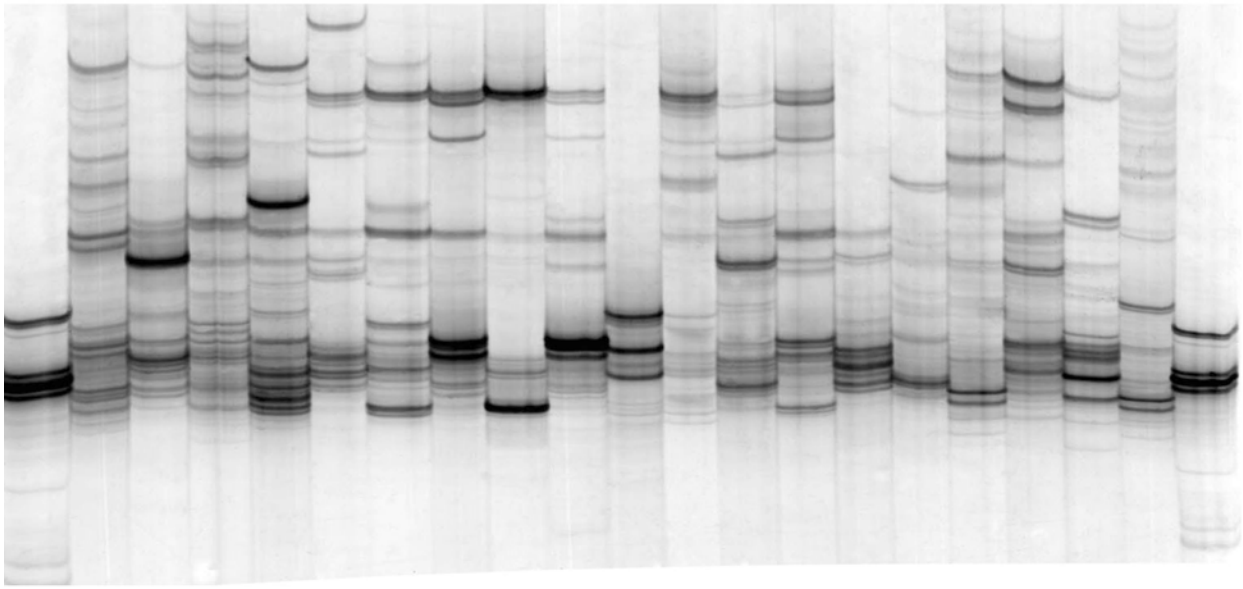


Abb. 46: SSCP-PA-Gelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der aus Baumaterialienproben generierten SSCP-PCR-Produkte. Die PCR wurde unter Verwendung spezifischer Actinomyceten-Primer durchgeführt. Aufgetragen wurden ein Standardgemisch aus Reinkulturen (Std), SSCP-PCR-Produkte (650 ng) der unterschiedlichen Baumaterialienproben. Ein Bandenmuster beruht jeweils auf einem PCR-Produkt und dessen molekulare Aufarbeitung und anschließender SSCP-Analyse

Da rein visuell bei den „PCR-SSCP-Fingerprint -Bandenmustern“ keine Zuordnung der verschiedenen Materialproben (Putz, Styropor, Dämmwolle, Tapete) zu einem bestimmten Bandenmuster vorgenommen werden konnte, sollte eine mögliche

Korrelation mit Hilfe einer Clusteranalyse (Gel Compare II, siehe Abb. 47) überprüft werden.

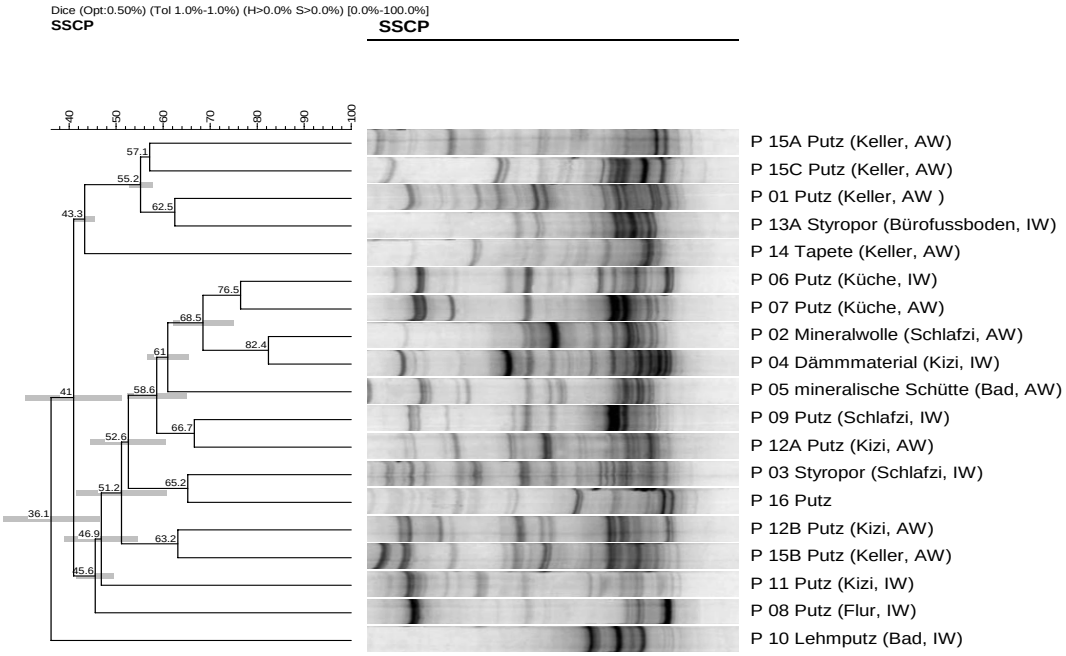


Abb. 47: Graphische Darstellung (Dendrogramm) des Bandenmustervergleiches (Clusteranalyse, Gel Compare II) eines normalisierten SSCP-PA-Gels der Materialproben unter Verwendung von Actinomyceten-spezifischen-Primern (siehe 2.4.2). Die DNA wurde direkt aus den Materialproben extrahiert und als „Template“ in die PCR-SSCP eingesetzt. Die angegebene Skala zeigt die prozentualen Unterschiede der Bandenmuster der jeweiligen Proben zueinander. Als Cluster-Methode wurde „UPGMA“ und als Ähnlichkeitsmaß „Dice“ gewählt. (AW= Außenwand, IW= Innenwand)

Anhand der Clusteranalyse konnte keine Korrelation zwischen den verschiedenen Materialproben und den erstellten Bandenmustern, d.h. der Actinomycetengemeinschaft detektiert werden. Das Bandenmuster der Lehmputzprobe (Probe 10) zeigte die größte Distanz zu allen anderen Proben. Dies unterstützt wiederum die Ergebnisse der kultivierungsabhängigen Untersuchungen. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die SSCP-Profile der unterschiedlichen Proben im Zusammenhang mit den ermittelten Parametern (Temperatur, Luftfeuchtigkeit und pH-Wert) der untersuchten Proben stehen. Hierzu wurde zunächst eine Clusteranalyse der Parameter durchgeführt (siehe Abb. 48).

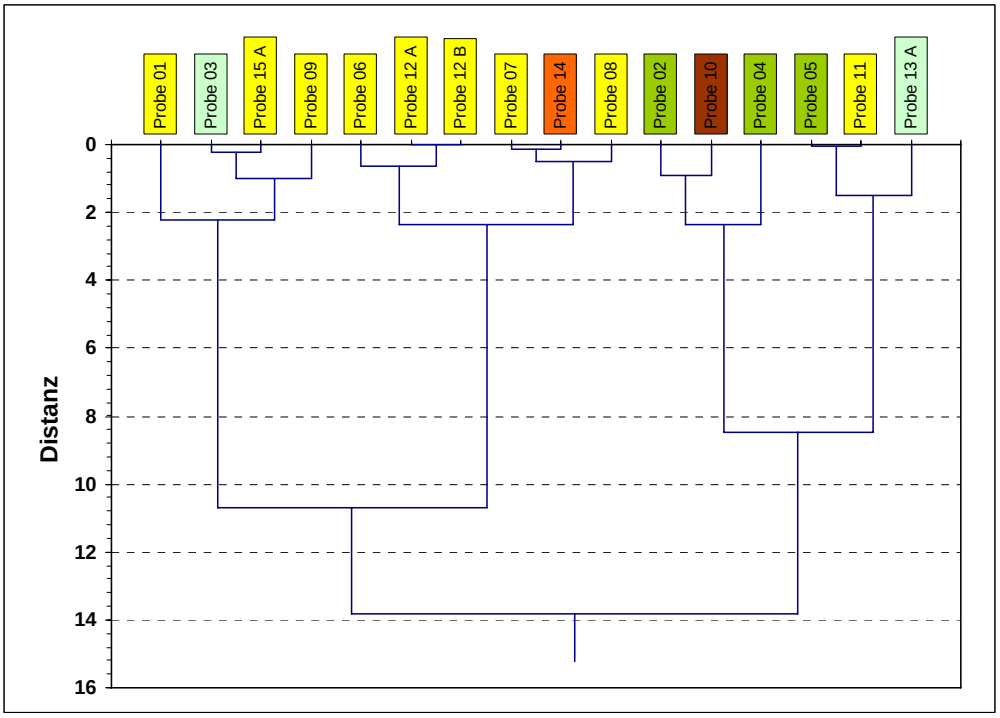


Abb. 48: Dendrogramm der Clusteranalyse der gemessenen Parameter (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, pH-Wert) der verschiedenen Baumaterialienproben (ohne Probe 16) Die Analyse fand mit der Statistik Software WinSTAT für Microsoft® EXCEL unter Verwendung des WARD Algorithmus statt. Die jeweils gleichen Baumaterialien sind farblich gekennzeichnet (Putz: gelb, Dämmmaterial/mineralische Schüttung: grün, Tapete: orange, Lehmputz: braun, Styropor: hellgrün)

Vergleicht man die Proben, die über das Parameter - Cluster zusammengeführt wurden (z.B. 01, 03, 15A und 09) mit der Clusterbildung der Bandenmuster im „SSCP-Fingerprint“ erkennt man auch hier keine Zusammenhänge.

3.3 Toxizitätstests

Es wurden MTT-Zytotoxizitätstest direkt mit den Materialproben (3.3.1) sowie mit aus den Materialproben isolierten Reinkulturen (3.3.2) durchgeführt. Außerdem wurden Tests zur Immunmodulation (3.3.3) durchgeführt.

3.3.1 MTT-Zytotoxizitätstests mit Materialproben

Als Referenzproben wurden mikrobiell unbelastete Materialien mit den in Tab. 22 genannten Konzentrationen eingesetzt.

Tab. 22: Referenzkonzentrationen von mikrobiell unbelasteten Materialien

Probe	Material	Referenzkonzetration IC^{50}
R01	Wandputz	> 1000 mg/ml
R02	Mineralwolle	1000 mg/ml
R03	Polystyrol	62,5 mg/ml
R04	gestrichene Raufasertapeten *	1000-31,25 mg/ml

* Referenzproben von gestrichenen Raufasertapeten ergaben Werte von 1000-31,25 mg/ml. Deshalb wäre eine Referenzprobe von derselben Tapete, die mit derselben Farbe gestrichen wurde, zur Beurteilung heranzuziehen. Eine entsprechende Referenzprobe lag jedoch nicht vor.

Im Vergleich mit diesen Konzentrationen wurde die Zytotoxizität der mit Actinomyceten bewachsenen Proben 1-16 beurteilt (Tab.23).

Tab. 23: Ergebnisse der Zytotoxizitätsanalysen mit den Materialproben 1-16

Objekt/Proben	Material	IC_{50}*	Bewertung
01	Wandputz	1000 mg/ml	keine Toxizität
02	Mineralwolle	1000 mg/ml	keine Toxizität
03	Polystyrol	125 mg/ml	keine Toxizität
04	Mineralwolle	31,25 mg/ml	toxisch
05	Mineral. Schüttung	1000 mg/ml	keine Toxizität
06	Wandputz	1000 mg/ml	keine Toxizität
07	Wandputz	1000 mg/ml	keine Toxizität
08	Wandputz	> 1000 mg/ml	keine Toxizität
09	Wandputz	> 1000 mg/ml	keine Toxizität
10	Lehmputz	125 mg/ml	Siehe Anmerkung **
11	Wandputz	500 mg/ml	gering toxisch
12A	Wandputz	250 mg/ml	gering toxisch
12B	Wandputz	62,50 mg/ml	toxisch
13A	Polystyrol	31,25 mg/ml	gering toxisch
13B	Polystyrol	62,50 mg/ml	keine Toxizität
14	Tapete	125 mg/ml	keine bis geringe Toxizität***
15	Wandputz	500 mg/ml	gering toxisch
16	Wandputz	500 mg/ml	gering toxisch

* IC_{50} (inhibitory concentration 50%): niedrigste Konzentration, die die MTT-Spaltungsaktivität auf 50% reduziert.
** Es gab zum Lehmputz keine Referenzwerte. Auch war es nicht möglich Lehmputz im Objekt zu entnehmen, der mit Sicherheit nicht mikrobiell belastet ist. Der Wert wäre im Vergleich zu mineralischem Putz als toxisch einzustufen.
*** Referenzproben von gestrichenen Raufasertapten ergaben Werte von 1000-31,25 mg/ml. Deshalb wäre eine Referenzprobe von derselben Tapete, die mit

derselben Farbe gestrichen wurde, zur Beurteilung heranzuziehen. Eine entsprechende Referenzprobe lag jedoch nicht vor.

Von den 10 Wandputz-Proben lagen 5 in etwa im Bereich der unbelasteten Referenzprobe (1000 mg/ml). Bei drei Proben (Objekt 11, 15, 16) war ein geringer Effekt zu erkennen, so dass man diese Proben als gering toxisch einstufen kann. Eine Probe erreichte bei einer weiteren Verdünnungsstufe 250 mg/ml (Probe 12A 06-07/01). Dies wird ebenfalls als schwach toxische Reaktion interpretiert. Eine Probe (Probe 12B 06-07/02) erreicht erst bei der nächsten Verdünnungsstufe (62,5 mg/ml) den IC_{50}-Wert. Diese Probe wird eindeutig als toxisch eingestuft.
Die mineralische Schüttung (Probe 05 09-06/01) wies eindeutig keine Toxizität auf. Referenzmaterial ist zum Vergleich nicht erforderlich, da auch bei der höchsten Konzentration kein Effekt beobachtet wurde.
Von den drei Polystyrol-Proben war nur bei einer Probe im Vergleich zur Referenzprobe ein schwacher Effekt festzustellen (Probe 13A 06-07/02).

Von den beiden Mineralwolle-Proben war bei einer Probe kein Effekt feststellbar (Probe 02 02-06/01). Die zweite Probe (Probe 04 04-06/03) zeigte einen deutlichen Effekt, denn es waren insgesamt 5 Verdünnungsstufen erforderlich, um den IC_{50} – Wert zu erreichen.

Die Ergebnisse zum Lehmputz und zur Tapete deuten auf einen toxischen Effekt hin, denn es waren jeweils 3 Verdünnungen erforderlich um den IC_{50} –Wert zu erreichen. Allerdings fehlen Referenzwerte zu diesen Materialien, so dass man die Bewertung nicht mit hinreichender Sicherheit vornehmen kann.

Ausgewählt für weitere Untersuchungen wurden die Proben 04 04-06/03 und 12B 06-07/02, mit deutlich zytotoxischem Effekt. Aus diesen Proben wurden neben den Materialproben auch die isolierten Actinomycetenkulturen mit dem MTT-Zytotoxizitätstest untersucht (siehe 3.3.2).

3.3.2 MTT-Zytotoxizitätstests mit Referenzisolaten

Von den für weitere Untersuchungen ausgewählten Proben 04 04-06/03 und 12 06-07/02 wurden die aus den Materialien gewonnenen Referenzisolate auf Toxizität analysiert. Als Referenzkonzentration für die Reinkulturen wurde 62,5 cm^2/ml

angenommen (das gesamte Wachstum auf einer Agarplatte, siehe 2.5). Im Vergleich mit dieser Konzentration wurde die Zytotoxizität der 27 Actinomyceten-Reinkulturen beurteilt (Tab. 24).

Tab. 24: Ergebnisse der Zytotoxizitätsanalysen mit den 27 Reinkulturen

Proben-Nr.	Beschreibung	Medium	IC_{50}		Bewertung
			Verdünnungsstufe	cm²/ml	
R04	Referenz	CASO-Agar	<1	> 62,5	Matrix
04-Je-002	Isolat 04 04-06/03	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
04-Je-003	Isolat 04 04-06/03	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
04-Je-004	Isolat 04 04-06/03	CASO-Agar	<1	> 62,5	keine Toxizität
04-Je-005	**Isolat 04 04-06/03**	**CASO-Agar**	**3**	**15,62**	**zytotoxisch**
04-Je-006	**Isolat 04 04-06/03**	**CASO-Agar**	**2**	**31,25**	**zytotoxisch**
04-Je-007	**Isolat 04 04-06/03**	**CASO-Agar**	**4**	**7,81**	**zytotoxisch**
04-Je-02	Tiefgefroren aus ST	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
04-Je-03	Tiefgefroren aus ST	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
04-Je-05	**Tiefgefroren aus ST**	**CASO-Agar**	**< 1**	**> 62,5**	**keine Toxizität**
04-Je-06	**Tiefgefroren aus ST**	**CASO-Agar**	**1**	**62,5**	**keine Toxizität**
04-Je-07	**Tiefgefroren aus ST**	**CASO-Agar**	**1**	**62,5**	**keine Toxizität**
04-Je-08	Tiefgefroren aus ST	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
04-St-01	Tiefgefroren aus ST	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
04-St-02	Tiefgefroren aus ST	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-01	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-02	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-03	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-04	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-06	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-07	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-08	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
12A-Be-10	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität

12A-Be-12	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-13	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
12A-Be-14	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	3	15,62	zytotoxisch
12A-Be-17	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	1	62,5	keine Toxizität
12A-Be-22	Isolat 12 06-07/02	CASO-Agar	< 1	> 62,5	keine Toxizität
12A-Be-14	**Isolat 12 06-07/02**	**CASO-Agar**	**3**	**15,62**	**zytotoxisch**

Drei der insgesamt 14 aus Probe 04 04-06/02 isolierten Stämme zeigten eine zytotoxische Wirkung, wobei mindestens zwei eine sehr deutliche bis starke Wirkung aufwiesen, nämlich 04-Je-005 (*Streptomyces roseocinereus*), (3. Verdünnungsstufe für IC_{50}) und 04-Je-007 (*Streptomyces* sp.), (4. Verdünnungsstufe für IC_{50}). Jedoch konnten für diese Isolate (04-Je-005, 04-Je-007) im Wiederholungsversuch nach dem Einfrieren keine vergleichbaren Wirkungen detektiert werden.
Von den insgesamt 13 aus Probe 12A 06-07/02 isolierten Stämmen war bei einem Stamm eine deutliche zytotoxische Wirkung feststellbar (3. Verdünnungsstufe IC_{50}), nämlich bei Probe 12A-Be-14 (*Lentzea* sp.). Alle anderen 12 Stämme waren unauffällig.

3.3.3 Tests zur Immunmodulation

Die Zellkulturtests zur Charakterisierung der immunmodulatorischen Eigenschaften wurden als Screening mit Gemischen von Actinomyceten (Abschwemmung aus Isolationsplatten) aus den jeweiligen Materialproben durchgeführt. Im Verlauf des Projekts sollten auch die dominanten Referenzisolate der Actinomyceten einzeln untersucht werden. Weil die qualitative Auswertung der Proben und die anschließende Identifizierung der Actinomyceten sich als äußerst komplex und zeitaufwändig erwies, war dies leider nicht möglich.
Zum Vergleich wurden auch die aus den Materialproben isolierten Schimmelpilze sowie Reinkulturen (und Sterigmatocystin) in die Versuche einbezogen.

3.3.3.1 Vorversuche zur Freisetzung von TNF-α aus A-549 Zellen

Versuche mit Sterigmatocystin-positiven und –negativen Stämmen von *Aspergillus versicolor* und *Emericella nidulans* brachten kein auswertbares Ergebnis. Es konnte in keinem der Versuchsansätze eine immunmodulatorische Wirkung (= veränderte

Freisetzung von TNF-α in Abhängigkeit von der Sporen-Konzentration) bei A-549 Zellen (Bronchialepithelzellen, Krebszelllinie) nachgewiesen werden. In diesen Versuchen wurde die Freisetzung des Zytokins TNF-α nach 5-stündiger Exposition gegenüber Sporensuspensionen der Pilze untersucht. Es wurden verschieden konzentrierte Sporensuspensionen in Konzentrationen von 10^2 bis 10^6 Sporen je ml getestet.

Ein weiterer Test mit verschiedenen Fadenpilz-Arten zeigte keine relevante Freisetzung von TNF-α, ebenso nicht die Verwendung einer neuen Charge der A 549-Zellen. Daraus kann man schlussfolgern, dass die A-549 Zellen kein bzw. nur sehr wenig TNF-α freisetzen, weshalb diese Zelllinie für den Versuch ungeeignet ist. Die kritische Durchsicht der Literatur, in der über eine TNF-α-Freisetzung aus A-549 Zellen berichtet wurde, waren widersprüchlich. Alternativ wurde daher die Freisetzung von IL-6 aus den A-549 Zellen untersucht (siehe 3.3.3.2).

3.3.3.2 Freisetzung von IL-6 aus Bronchialepithel-Zellen (A-549)

Die IL-6 Freisetzung nach Exposition mit Sporensuspensionen war bei den *S. chartarum* Stämmen tendenziell konzentrationsabhängig, bei *P. chrysogenum* zeigten die niedrigsten Sporenkonzentrationen die stärkste IL-6 -Ausschüttung, bei *A. versicolor* und *Chaetomium globosum* waren die Ergebnisse uneinheitlich.
Die ELISA-Ergebnisse der Konzentrationsmessung von IL-6 waren jedoch nicht verlässlich genug. Bei den Kalibrationskurven waren häufig zwei von sechs Werten Ausreißer und konnten nicht berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde dieser Versuchsansatz nicht weitergeführt. Die Variabilität der Ergebnisse scheint im Testansatz begründet zu sein.
Insgesamt zeigen sich in der Tendenz dennoch relativ geringe IL-6 Ausschüttungen bei den meisten pilzlichen Noxen im Vergleich zu einer Suspension von 10^8 Zellen von *E. coli*. Interessant ist hier auch die schwache Reaktion bei reinem LPS (15 mg/ml) und Sterigmatocystin als Reinsubstanz.
Aus diesem Grund wurden mit den Bronchialepithel-Zellen (A-549) keine weiteren Versuche durchgeführt. Alternativ wurden Versuche mit Maus-Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 durchgeführt (siehe 3.3.3.3)

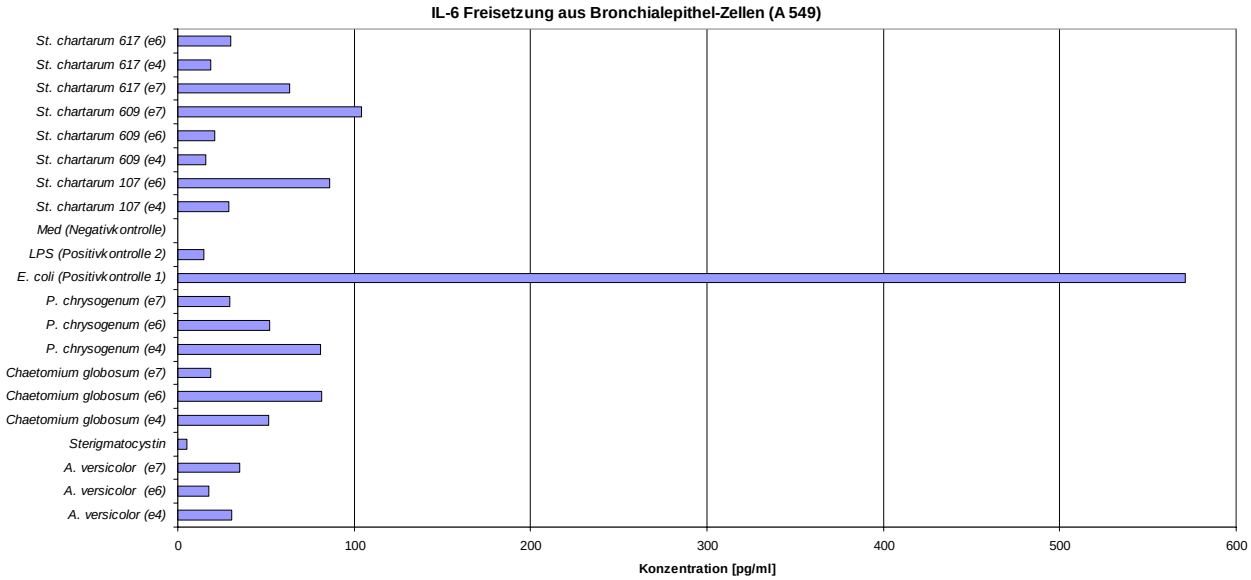


Abb. 49: IL-6 Freisetzung aus Bronchialepithelzellen nach Exposition mit Sporensuspensionen verschiedener Pilzarten. Positivkontrolle war eine *E. coli* Suspension (10^8 Zellen/ml), Negativkontrolle war das Kulturmedium (nach 24 h) für die Anzucht der Zellen. Legende: e4 = 10^4 Sporen je ml Suspension der entsprechenden Pilzart, entsprechend e6 und e7 = 10^6 bzw. 10^7 Sporen je ml Suspension.

3.3.3.3 Freisetzung von TNF-α aus Makrophagen

Die Ergebnisse der im Folgenden dargestellten Messungen wurden durch die Negativkontrolle (Zellkulturmedium) bereinigt, d.h. das Messergebnis der Negativkontrolle wurde vom jeweiligen Messwert abgezogen. Ergaben sich dadurch negative Werte (was aufgrund der Schwankungsbreite der Messergebnisse dieses biologischen Testsystems möglich ist), wurden diese gleich Null gesetzt. Die TNF-α Konzentration der Negativkontrolle ist daher definitionsgemäß immer = 0. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil zunächst nur eine Erhöhung der Freisetzung von TNF-α untersucht werden sollte.

Die Exposition der Zellen gegenüber der Positivkontrolle mit LPS zeigte immer eine sehr starke Ausschüttung von TNF-α (zwischen 1.000 und 2.000 pg/ml).

In einem orientierenden Versuch wurden zunächst Suspensionen unterschiedlicher Sporenkonzentrationen von Sammlungsstämmen relevanter Schimmelpilzarten (IHUA, RWTH Aachen) getestet. Mit steigender Sporenkonzentration konnte eine Zunahme der Freisetzung von TNF-α bei den typischen Innenraum-Arten *A. versicolor* und *P. chrysogenum* beobachtet werden (Abb. 50). Bei *S. chartarum* zeigte sich kein Unterschied in der Freisetzung von TNF-α bei 10^6 und 10^7 Sporen je

ml. Dies deutet an, dass die Interleukin-Ausschüttung ihr Maximum erreicht hat oder durch eine zytotoxische Wirkung der ganze Zellinhalt freigesetzt worden war.

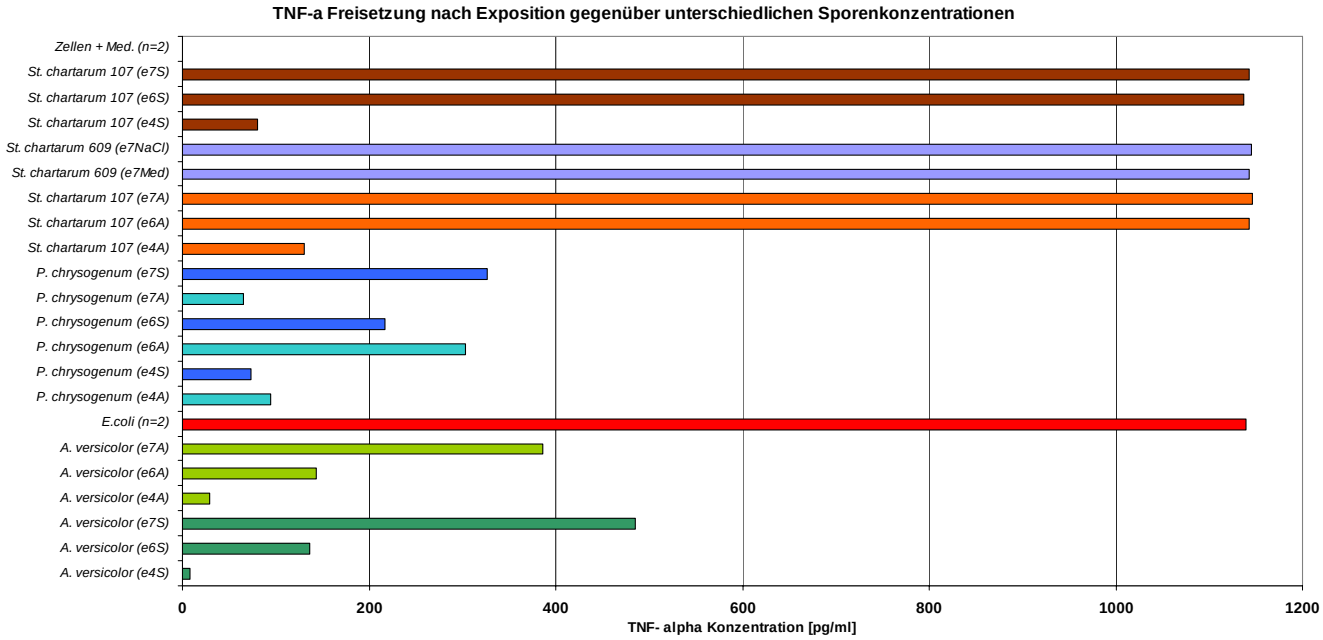


Abb. 50: Freisetzung von TNF-α bei Makrophagen nach Exposition mit Sporensuspensionen verschiedener Pilzarten. Positivkontrolle war eine *E. coli* - Suspension (10^8 Zellen/ml), Negativkontrolle war das Kulturmedium für die Anzucht der Zellen. Legende: e4 = 10^4 Sporen je ml Suspension der entsprechenden Pilzart, entsprechend e6 und e7 = 10^6 bzw. 10^7 Sporen je ml Suspension; S = Sporensuspension, A = Aufschluss der Sporensuspension, Med. = Medium, NaCl = physiologische Kochsalzlösung

Die ersten Versuche mit Actinomyceten-Gemischen aus den Proben 3, 6, 7 und 14 zeigten, dass bei Sporenkonzentrationen der Actinomyceten von 10^6 je ml bereits eine TNF-α Freisetzung in der Größenordnung der Positivkontrolle LPS auftrat. Bei niedrigeren Sporenkonzentrationen von 10^3 je ml war bereits eine deutliche Abnahme von TNF-α zu verzeichnen (Ausnahme Actinomyceten der Probe 7) – die Konzentrationen betrugen 50 -75% der Positivkontrolle. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Experimente Sporenkonzentrationen von 10^2 und 10^3 Sporen je ml für Actinomyceten gewählt. Bei Konzentrationen > 10^4 Sporen je ml musste mit einer sehr starken Reaktion gerechnet werden, die evtl. synergistische Wirkungen mit anderen Arten von Actinomyceten und Schimmelpilzen kaschiert. Außerdem ist in der Innenraumluft auch nicht mit sehr hohen Sporenkonzentrationen zu rechnen.

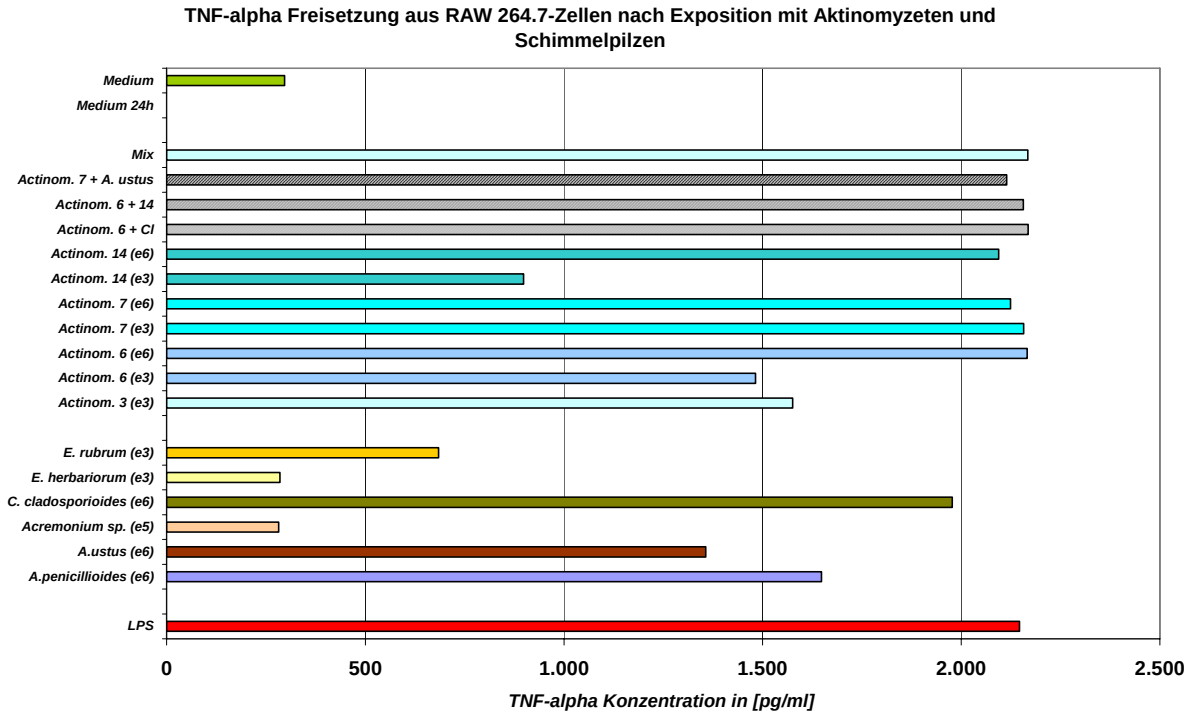


Abb. 51: Freisetzung von TNF-α bei Makrophagen nach Exposition mit Sporensuspensionen von Actinomyceten und Schimmelpilzen. Positivkontrolle ist LPS (15 µg/ml), Negativkontrolle ist das Kulturmedium für die Anzucht der Zellen nach 24 h Inkubation (frisches Medium hatte eine höhere Freisetzung zur Folge!). Legende: e3 = 10^3 Sporen je ml Suspension, entsprechend e5 und e6 = 10^5 bzw. 10^6 Sporen je ml Suspension. Cl = Cladosporium

Die zum Vergleich getesteten innenraumrelevanten Schimmelpilze zeigten geringere Reaktionen als die Actinomyceten.

Bei den Schimmelpilzen zeigten *Cladosporium cladosporioides, A. penicillioides* und *A. ustus* in Sporenkonzentrationen von 10^6/ml eine starke Freisetzung von TNF-α , die jedoch noch unterhalb der Positivkontrolle (LPS 15 µg/ml) lag.

Vor dem Hintergrund realer Konzentrationen von luftgetragenen Schimmelpilzen im Falle von Innenraumkontaminationen wurden für die Schimmelpilze in den weiteren Versuchen Sporensuspensionen in der Größenordnung von 10^3 und 10^5 Sporen je ml eingesetzt.

Die Schimmelpilze aus dem Objekt 4, für das der Rohextrakt eine starke Toxizität ergab, zeigten nur einen geringen Einfluss auf die TNF-α Freisetzung (Abb. 52). Die Konzentrationen lagen im Bereich von 100 pg/ml bei 10^5 Sporen/ml, wobei die LPS-Positivkontrolle um den Faktor 20 höher lag. Die Stämme von *Eurotium herbariorum* und *E. rubrum* hatten also nur eine geringe immunmodulatorische Wirkung zu haben. Dieses Ergebnis ist umso interessanter, als der Rohextrakt der Probe aus Objekt 4 eine sehr starke zytotoxische Wirkung auf Sk-Zellen zeigte. Die Actinomyceten aus

dieser Probe wurden nicht untersucht, weil die qualitative Auswertung der Proben und die anschließende Identifizierung der Actinomyceten sich als äußerst komplex und zeitaufwändig erwies und die Testisolate daher nicht rechtzeitig vorlagen.

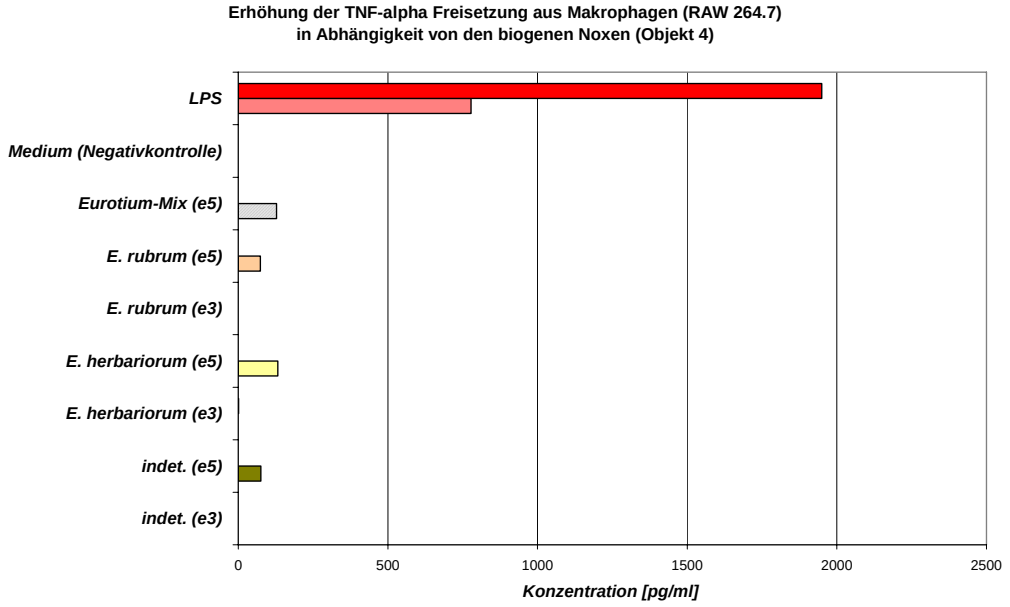


Abb. 52: Freisetzung von TNF-α bei Makrophagen nach Exposition mit biogenen Noxen aus dem Objekt 4. Positivkontrolle war aufgereinigtes LPS, Negativkontrolle war das Kulturmedium für die Anzucht der Zellen (24 h). Legende: e2 = 10^2 Sporen je ml Suspension der entsprechenden Pilzart, entsprechend e3 und e5 = 10^3 bzw. 10^5 Sporen je ml Suspension, indet. = bislang noch nicht identifizierter Stamm

Die Exposition gegenüber *A. versicolor* und *P. chrysogenum* aus dem Objekt 6 führte zu einer deutlich stärkeren Freisetzung von TNF-α. Bei *A. versicolor* ergaben sich Werte um 400 pg/ml, für *P. chrysogenum* konnten vergleichbare Konzentrationen im Wiederholungsversuch nicht reproduziert werden (Abb. 53). Die hier getesteten Actinomyceten aus der Probe 6 (Suspension einer Mischkukltur = Actinom. 6, da noch keine Testisolate vorlagen) verursachten eine relativ geringe Ausschüttung von TNF-α (ca. 200 pg/ml). Beim Test von *Aspergillus versicolor* in Kombination mit den Actinomyceten ergab sich eine Erhöhung der TNF-α Konzentration, was eine additive Wirkung nahe legt. Beim „Pilzmix“ in Kombination mit den Actinomyceten wurde dagegen keine additive Wirkung festgestellt.

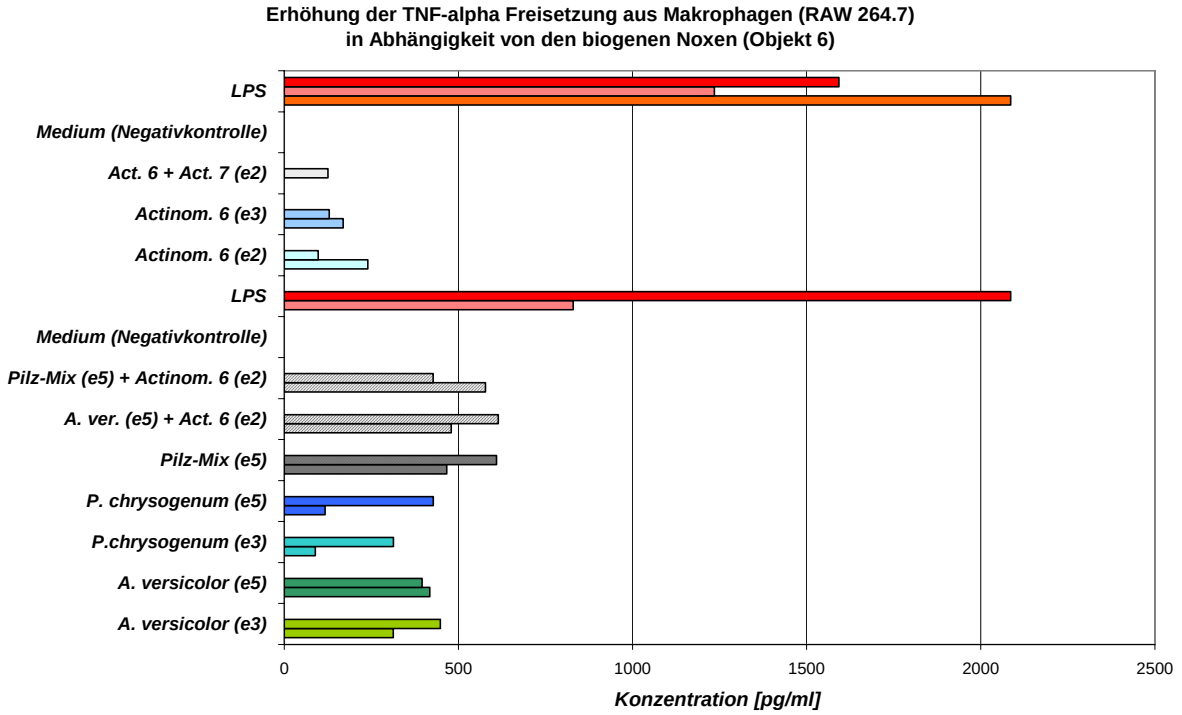


Abb. 53: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit biogenen Noxen aus dem Objekt 6. Positivkontrolle war aufgereinigtes LPS, Negativkontrolle war das Kulturmedium für die Anzucht der Zellen (24 h). Legende: e2 = 10^2 Sporen je ml Suspension der entsprechenden Pilzart, entsprechend e3 und e5 = 10^3 bzw. 10^5 Sporen je ml Suspension Pilzmix = *P. chrysogenum* und *A. versicolor*

Die Schimmelpilze aus dem Objekt 7 zeigten in den Wiederholungsversuchen uneinheitlichere Ergebnisse, obschon es sich um dieselben Arten wie in Objekt 6 handelte. *A. versicolor* und *P. chrysogenum* verursachten eine Erhöhung der TNF-α -Freisetzung um 100 bis 300 pg/ml, in einem Fall wurde für *P. chrysogenum* ein Wert von ca. 600 pg/ml erreicht, was mehr als 50% der LPS-Kontrolle (Positivkontrolle) ausmachte. Bei Exposition gegenüber dem Pilz-Mix sowie dem Pilz-Mix in Kombination mit den Actinomyceten zeigte sich in diesem Fall keine additive Wirkung. Allerdings ergaben sich auch für das Actinomyceten-Gemisch aus Probe 7 sehr uneinheitliche Ergebnisse (3 Parallelansätze). Der dritte Ansatz ergab bei beiden Sporen-Konzentrationen eine Freisetzung von 600 pg/ml TNF-α, das entspricht ca. 45% des Mittelwertes der LPS-Kontrolle (Positivkontrolle).

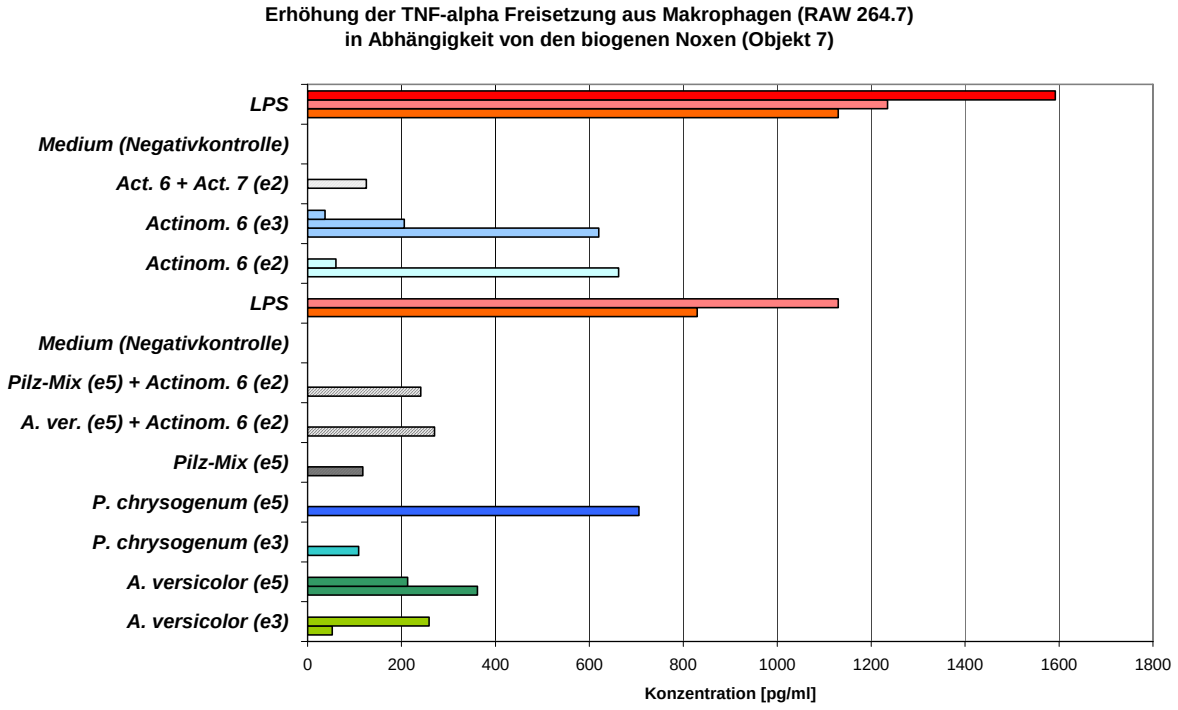


Abb. 54: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit biogenen Noxen aus dem Objekt 7. Positivkontrolle war aufgereinigtes LPS, Negativkontrolle war das Kulturmedium für die Anzucht der Zelle (24 h). Legende: e2 = 10^2 Sporen je ml Suspension der entsprechenden Actinomyceten oder Pilzart, entsprechend e3 und e5 = 10^3 bzw. 10^5 Sporen je ml

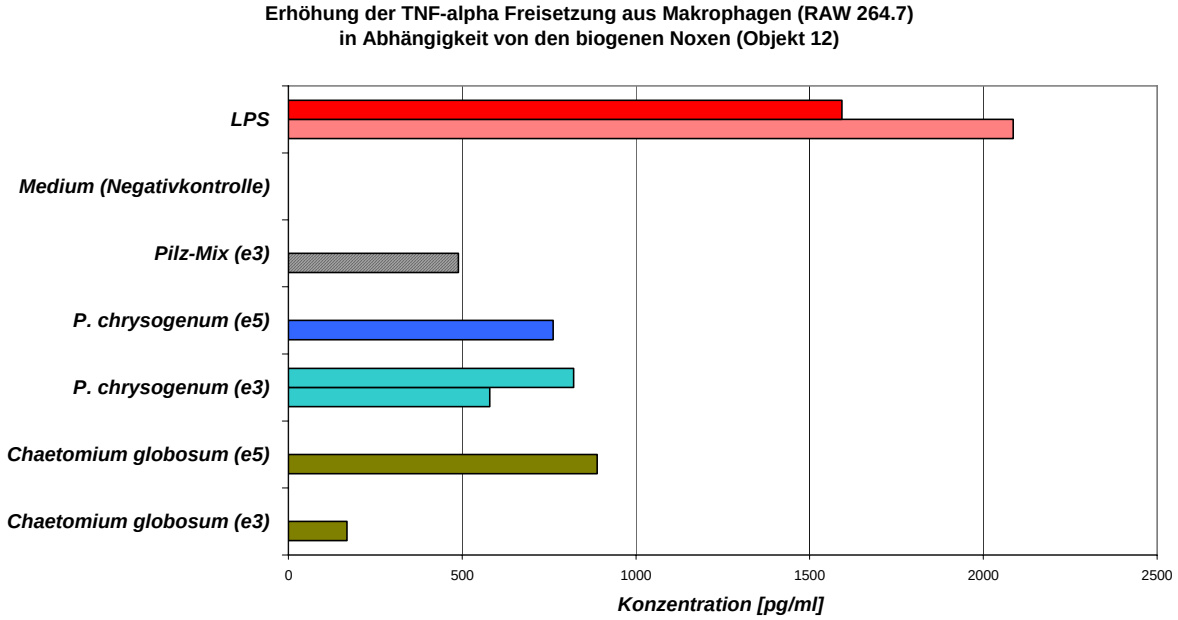


Abb. 55: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit biogenen Noxen aus dem Objekt 12. Positivkontrolle war aufgereinigtes LPS, Negativkontrolle war das Kulturmedium für die Anzucht der Zellen (24 h). Legende: e2 = 10^2 Sporen je ml

Suspension der entsprechenden Pilzart, entsprechend e3 und e5 = 10^3 bzw. 10^5 Sporen je ml Suspension

Auch bei den Schimmelpilzen des Objektes 12 waren die Ergebnisse der beiden Wiederholungen recht uneinheitlich. *Chaetomium globosum* verursachte nur in der Sporen-Konzentration von 10^5 Sporen eine deutlich stärkere Freisetzung von TNF-α, *für A. versicolor* und *P. chrysogenum* ergab sich dies nur je in einem einzelnen Test und war nicht reproduzierbar (Abb. 55). Die Actinomyceten in dieser Probe wurden nicht untersucht, weil zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Rückstellprobe des Materials mehr vorhanden war, um die Actinomyceten zu isolieren.

Insgesamt verursachten unter den Schimmelpilzen die *Eurotium*-Arten die geringste Ausschüttung von TNF-α, gefolgt von *P. chrysogenum* und *A. versicolor*. Die stärkste Reaktion wurde bei *Chaetomium globosum* beobachtet, konnte aber im Wiederholungs-Ansatz nicht reproduziert werden. Diese Reihung der Schimmelpilze in ihrer immunmodulatorischen Wirkung entspricht tendenziell der in der Literatur beschriebenen Stärke der toxinogenen Wirkung. Von *Eurotium*-Arten wurden bisher keine Mykotoxine beschrieben und in ihrer Struktur aufgeklärt. Sterigmatocystin von *A. versicolor* ist allgemein toxischer als die Sekundärmetabolite von *Penicillium chrysogenum*. Die Chaetoglobosine von *Chaetomium globosum* gelten als sehr wirksam, sind aber in ihrer Struktur und Vielfalt bisher nicht aufgeklärt.

Die Actinomyceten zeigten sehr uneinheitliche Ergebnisse in den Wiederholungsversuchen. In den Vorversuchen wurden sehr starke Wirkungen der Actinomycetenmischkulturen aus den Objekten 3,6,7 und 14 beobachtet. Dieser Effekt konnte in den folgenden Untersuchungen nicht reproduziert werden. Bei den meisten Untersuchungen ergaben sich nur geringe TNF-α Freisetzungen. Nur für das Gemisch der Actinomyceten aus der Probe 6 ergab sich eine mit den Sporensuspensionen von *A. versicolor* und *P. chrysogenum* vergleichbare TNF-α Freisetzung, allerdings schon bei Actinomycetengehalten von 10^2 und 10^3 KBE/ml. Bei der Testung von Actinomyceten-Schimmelpilz-Gemischen zeigte sich kein additiver Effekt.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse und Schadensbild/Schadensart

Die Untersuchungsobjekte waren so gewählt worden, dass möglichst viele typische Schäden erfasst wurden. Die Schäden wurden nach den Parametern Schadensalter, Temperatur und Höhe der Feuchtigkeit in sog. Parameterklassen = PK zusammengefasst und die Objekte wurden diesen Parameterklassen zugeordnet (siehe 2.1).

Die Ergebnisse der Actinomycetenbestimmungen wurden dahingehend ausgewertet, ob die nachgewiesenen Mikroorganismen und der Schadenstyp eine gewisse Korrelation zeigen. Sollte sich in allen Objekten eine vergleichbare Besiedlung mit nur relativ wenigen verschiedenen Arten ergaben, dann wäre zu folgern, dass die Besiedlung nicht durch die vorherrschenden Parameter bestimmt wird, sondern in erster Linie durch die vorhandenen Organismen. Bei sehr unterschiedlicher Besiedlung zwischen den Objekten, wäre eine Selektion der Arten durch die vorherrschenden Bedingungen möglich und es muss dann eine vergleichende Betrachtung der Objekte mit derselben Parameterkombination erfolgen. Schließlich ist zu betrachten, ob es einen erkennbaren Materialeinfluss gibt, d.h. ob gleiche Materialien mit ähnlichen Arten besiedelt werden.
Die Auswertung der Ergebnisse in Bezug auf die Fragestellungen ergab keine erkennbaren Zusammenhänge. Arten derselben Gattung waren in den verschiedensten Schadensbereichen nachweisbar.

Die Gattung *Brachybacterium* trat nur bei geringen Temperaturen auf, alle anderen Gattungen waren sowohl bei Temperaturen unter 17 °C als auch bei Temperaturen über 17 °C nachweisbar. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl ist jedoch ein zufälliges Ergebnis im Hinblick auf *Brachybacterium* genauso möglich, wie ein Parametereinfluss.

Prauserella wurde in zwei Proben gefunden, die der gleichen Parameterkategorie angehörten, allerdings befanden sich beide Schäden im gleichen Objekt. Auch dies erlaubt keinerlei weitere Schlussfolgerungen.

4.2 Isolierung von Actinomyceten

Die Isolierung der Actinomyceten von feuchten Materialien aus Innenräumen ist eine komplexe Aufgabe, weil die Gruppe der Actinomyceten sehr unterschiedliche Organismen mit sehr unterschiedlichen Wachstumsansprüchen enthält. Außerdem stellen die zu untersuchenden Materialien (z.B. Wandputz) keine homogenen Lebensbedingungen dar, sondern eine Vielzahl von Mikrohabitaten. Die Besiedlung dieser Mikrohabitate durch spezifisch angepasste Mikroorganismen ist darüber hinaus sehr stark von den Bedingungen vor Ort (insbesondere Feuchtigkeit und Temperatur) abhängig. Um die unterschiedlichen Wachstumsansprüche der Actinomyceten zu berücksichtigen, müssen unterschiedliche Nährmedien verwendet werden.

Die Schwierigkeit dieses Projektes bestand darin, eine Einschätzung des zu erwartenden Artenspektrums zu geben und gleichzeitig die Isolierungsstrategie zu optimieren. Um den Stellenwert der Actinomyceten in den Proben erfassen zu können, war außerdem neben einer qualitativen auch eine quantitative Erfassung notwendig. Die vorgestellten Ergebnisse durch kultivierungsabhängige Methoden (vergleiche Abb. 4 und 5) verdeutlichen, dass eine ausreichende Erfassung der Actinomyceten nur durch umfangreiche Erfahrung und einen hohen Arbeitsaufwand möglich ist. Neben dem hohen Arbeitsaufwand hat die Verwendung von kultivierungsabhängigen Methoden weitere Nachteile. Insbesondere muss die Auswertung der Ansätze innerhalb eines engen Zeitrahmens erfolgen und kann nicht z.B. durch Einfrieren der Proben unterbrochen werden. Da Actinomyceten im allgemeinen relativ langsam wachsen, besteht grundsätzlich die Gefahr, dass Kulturen von der Begleitflora überwachsen oder unterdrückt werden. Um dieser Beeinflussung entgegen zu wirken, wurden die Nährmedien mit dem Hemmstoff Natamycin versetzt, der insbesondere Schimmelpilze stark hemmt, der aber ggf. auch einen partiellen Einfluss auf die Entwicklung der Actinomyceten haben kann.

Mit den kultivierungsabhängigen Methoden wurde je nach Probe auf unterschiedlichen Isolationsmedien jeweils die größte Ausbeute von morphologisch verschiedenen Referenzisolaten festgestellt. Dabei war zu beachten, dass ein Isolationsmedium, auf dem die höchste koloniemorphologische Vielfalt festgestellt wurde, nicht gleichzeitig auch das Medium war, auf dem die höchsten Gesamtkonzentrationen festgestellt wurden. Weiterhin wurde bei der weiteren

Anzüchtung einzelner Isolate auf verschiedenen Differenzierungsmedien deutlich, dass einige Actinomyceten auf Nährmedien, die für viele Isolate besonders geeignetet waren, wie Gauze-Agar oder CM-Agar, nicht anwuchsen. Für die Isolierung von Actinomyceten sollten daher mindestens zwei, bzw. drei (oder mehrere) unterschiedliche Nährmedien parallel verwendet werden. Hierzu sollten ein proteinhaltiges Vollmedium wie BHI-Agar oder CASO-Agar verwendet werden sowie ein kohlenhydrathaltiges Nährmedium, z.B. Gauze-Agar und/oder CM-Agar. Trotz der Verwendung sehr unterschiedlicher Nährmedien ist es denkbar, dass die Wachstumsbedingungen einzelner Actinomyceten nicht ausreichend berücksichtigt werden und dass die einzelnen Vertreter mit dieser Vorgehensweise nicht erfasst werden.

Nach einer Inkubationszeit von bis zu 14 Tagen sollten Referenzisolate von den verschiedenen Isolationsmedien abgeimpft und gereinigt werden. Auf den verschiedenen Isolationsmedien können gleiche Actinomyceten-Arten unterschiedlich aussehen. Es muss daher in einem zweiten Schritt überprüft werden, ob abgeimpfte Referenzisolate von verschiedenen Isolationsmedien gleich sind. Für diesen Arbeitsschritt hat sich die parallele Verwendung von BHI-Agar bzw. CASO-Agar sowie M 79-Agar und Gauze-Agar als sinnvoll herausgestellt. Für eine morphologische Differenzierung ist darüber hinaus häufig Hafermehl-Agar eine ideale Ergänzung.

Die parallele Anzüchtung der Referenzisolate auf verschiedenen Nährmedien ermöglicht zumindest bei myzelbildenden Actinomyceten die Erkennung von identischen Isolaten aufgrund der Koloniemorphologie und der mikroskopischern Eigenschaften. In der Regel kann bereits nach einer zweiwöchigen Inkubation die Überprüfung der Referenzisolate erfolgen. Die gewachsenen Kulturen, insbesondere die Kulturen vom M 79-Agar, können direkt für eine DAP-Bestimmung verwendet werden.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Untersuchung ist der Nachweis für das häufige und teilweise dominante Vorkommen von Vertretern der Gattungen *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Nocardiopsis*, *Promicromonospora*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora* und *Streptomyces*. Andere Gattungen wurden seltener und häufig nur in relativ geringen Konzentrationen nachgewiesen. Insgesamt ist allerdings zu erwarten, dass die identifizierten Actinomyceten (284 Referenzisolate aus 28 Gattungen) nur einen ersten Eindruck über die Vielfalt an Gattungen bzw.

Arten in feuchten Materialien aus Innenräumen darstellen. In den Abb. 4 und 5, in denen die in den Wandputz-Proben festgestellten Gattungen aufsummiert sind, konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Gattungen dargestellt werden und es konnte gezeigt werden, dass noch in Probe 15 eine neue Gattung festgestellt wurde, die darüber hinaus in dieser Probe einen Anteil von über 20% erreichte. Überträgt man dieses Ergebnis auf die in den Gattungen zusammengefassten Arten, ist mit einer deutlichen Steigung sowie dem Auffinden vieler weiterer Arten in weiteren zusätzlichen Proben zu rechnen.
Weiterhin ist herauszustellen, dass gleiche oder zumindest sehr ähnliche Materialtypen eine abweichende Actinomyceten-Zusammensetzung aufweisen können. Z.B. wurden nur wenige Gattungen übereinstimmend in den untersuchten mineralischen Materialproben festgestellt (Abb. 3). Diese Ergebnisse konnten durch den SSCP-Fingerprint der abgeschwemmten Nährmedienplatten bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.2.2.1).
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die kultivierungsabhängige Erfassung von Actinomyceten sehr arbeitsaufwändig ist und dass mit dieser Methode nur ein Teil der vorhandenen Actinomyceten erfasst werden kann. Weiterhin ist zu erwarten, dass neben den hier erfassten Vertretern aus 28 Gattungen durch die Einbeziehung weiterer Proben sowie anderer Materialtypen zusätzliche Actinomyceten auftreten. Darüber hinaus muss damit gerechnet werden, dass in Materialtypen, die in dieser Untersuchung unterrepräsentiert waren (z.B. Gips, Styropor, Holzwerkstoffe) andere Actinomyceten dominant auftreten können.

4.3 Vergleich der morphologischen, chemotaxonomischen und molekularbiologischen Identifizierung der Referenzisolate

Die Art-Identifizierung von Actinomyceten innerhalb einer Gattung ist aufgrund der vergleichsweise geringen morphologischen Unterschiede und der ständig anwachsenden Artenzahl mit morphologischen sowie mit biochemischen Methoden nur begrenzt möglich. Häufig können Actinomycetenisolate auch durch die Kombination von morphologischen und biochemischen Methoden nicht sicher bis auf das Artniveau und in einigen Fällen auch nur unsicher auf Gattungsniveau identifiziert werden. Mit molekularbiologischen Methoden können Actinomycetenisolate relativ effizient zumindest auf Gattungsniveau differenziert werden. Leider ist nach dem heutigen Wissensstand eine Artdiffenzierung mit

molekularbiologischen Methoden für Vertreter einzelner Actinomyceten-Gattungen und insbesondere die der Gattung *Streptomyces* nicht möglich. Um die Unzulänglichkeiten der einzelnen Methoden zu überbrücken und die Ergebnisse mit alternativen Methoden zu überprüfen, wird häufig ein polyphasischer Differenzierungsansatz verfolgt, der eine molekularbiologische, cytochemische und morphologische Untersuchung der Isolate einbezieht.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die morphologische Differenzierung im Wesentlichen zur Erkennung von Referenzisolaten eingesetzt, um die Anzahl der Isolate, die anhand von biochemischen und molekularbiologischen Methoden charakterisiert werden sollten, möglichst gering zu halten. Die Anwendung biochemischer Methoden erhöhte die Sicherheit der Vorselektion. Zusätzlich ergänzte und bestätigte die Bestimmung des DAP-Typs in der Zellwand in vielen Fällen die Gattungszuordnung und ermöglichte dadurch eine bessere Vorselektion der Isolate für eine molekularbiologische Bestimmung.

Durch die Sequenzanalysen der 16S rRNA Gene konnte ein großer Teil der Referenzisolate auf Gattungsniveau bzw. Artniveau identifiziert werden. Hierbei wurden einige häufig auftretende Gattungen und Arten in verschiedenen Proben festgestellt. Das häufige Auftreten von Gattungen bzw. einzelnen Arten sowie ihre breite Verteilung in den verschiedenen Proben und insbesondere in unterschiedlichen Materialtypen gibt einen Hinweis darauf, dass diese Gattungen, bzw. Arten für die untersuchten Proben als typisch gelten können.

Aus den durchgeführten Analysen zur Gattungs- und Artenverteilung in den Proben kann festgehalten werden, dass in feuchten Materialien aus Innenräumen neben Streptomyceten Vertreter aus den Gattungen *Amycolatopsis, Arthrobacter, Brevibacterium, Kocuria, Lentzea, Microbacterum, Micrococcus, Nocardia, Nocardioides, Nocardiopsis, Promicromonospora, Pseudonocardia, Saccharopolyspora* erwartet werden können.

Weiterhin können Actinomyceten-Arten mit hoher Ähnlichkeit zu den Arten

- *Amycolatopsis palatopharyngis,*
- *Nocardia carnea,*
- *Nocardioides albus,*
- *Nocardiopsis synnemataformans* und *N. dassonvillei,*
- *Promicromonospora aerolata, P.vinodobonensis* und *P. sukumoe,*
- *Pseudonocardia ammonioxydans, P. alni* und *P. antartica*,

- *Saccharopolyspora sp. (S. flava)*

als typisch für die untersuchten Proben gelten.

Es existieren nur wenige umfangreiche Untersuchungen zu Actinomyceten aus Innenräumen. In mehreren Arbeiten werden allerdings einzelne Actinomyceten aufgelistet oder neu entdeckte Arten beschrieben.
Dass Actinomyceten eine relevante Organismengruppe in feuchten Materialien aus Innenräumen darstellen, wurde von Lorenz *et al.* (2003a) beschrieben.
Die Autoren fanden bei einer statistischen Auswertung von über 600 Materialproben, in mehr als 80 % der Proben neben Pilzen auch Bakterien. In einigen Proben dominierte die Bakterienpopulation sogar eindeutig. Sehr häufig handelte es sich bei diesen Bakterien um Vertreter der Ordnung *Actinomycetales*. Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen wurden unter den häufig festgestellten Kolonietypen Vertreter der Gattungen *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Promicromonospora*, *Pseudonocardia* und *Streptomyces* nachgewiesen, darunter sogar bisher unbekannte Arten (Lorenz *et al*., 2003b). Ebenso detektierten Hyvärinen *et al*. (2002) *Actinobacteria* in 18-48% der untersuchten Proben verschiedener Baumaterialien, wie Holz, Putz, Keramik, Dämmwolle und Tapete. Untersuchungen von Anderson *et al.* (1997, 1999) zeigten das Vorkommen verschiedener Actinomycetenarten in wassergeschädigten Baumaterialien, sowie im Staub in Schulen und Kindertagesstätten mit bekanntem Feuchteschaden. Dabei konnten Vertreter der Gattungen *Mycobacterium*, *Steptomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardiopsis* und *Micrococcus* isoliert werden. Später beschrieb Peltola (2001a) weitere Gattungen innerhalb der Klasse der *Actinobacteria*, die bisher in Innenräumen detektiert werden konnten, wie *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Dietzia*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Spirillospora*, *Streptosporangia* und *Thermomonospora*. Rintala *et al*. (2008) zeigten unter Verwendung kultivierungsunabhängiger Analysen, dass die bakterielle Flora in Staub aus Innenräumen sehr komplex und von Grampositiven Spezies dominiert ist. Aus acht Klonbibliotheken wurden 74% der untersuchten Klone über die 16S rRNA-Gene den Actinomyceten und den *Firmicutes* (Grampositiven Bakterien mit geringem G+C Gehalt in der DNA) zugeordnet. Dabei konnten, wie schon zuvor in kultivierungsabhängigen Untersuchungen, *Actinobacteria* der Familien *Corynebacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae* und

Nocardioidaceae detektiert werden. In einer weiteren Untersuchung von Grigorevski-Lima *et al*. (2006) wurden Streptomyceten und nocardioforme Bakterien in Gebäuden mit Feuchteschäden und Schimmelpilzproblemen festgestellt.
Vertreter der Gattung *Streptomyces*, die in der vorliegenden Untersuchung die höchsten Konzentrationen und Anteile in mehreren Proben ergaben, wurden auch von anderen Autoren beschrieben. Neben Andersson *et al.* (1999), die *Streptomyces griseus* im Hausstaub und in der Luft feststellten, wurde auch von Roponen *et al.* (2001) *Streptomyces anulatus* aus Gipskartonmaterial beschrieben.
Darüber hinaus existieren weitere Veröffentlichungen zu einzelnen Gattungen, die in der vorliegenden Untersuchung häufig festgestellt wurden.
Lorenz *et al.* (2002) beschreiben *Nocardia carnea* und *Promicromonospora* spp. aus Tapete und *Nocardiopsis* spp. aus Wandputz. Andersson *et al.* (2001) beschreiben *Nocardiopsis alba* und *Dietzia* spp. aus Gipskarton. Weiterhin wurden von Peltola *et al.* (2001b) *Nocardiopsis exhalans* aus der Raumluft und *Nocardiopsis umidischolae* aus Hausstaub isoliert und Vuorio *et al.* (1999) beschreiben *Mycobacterium murale nov*. aus Gipskarton.
Der Vergleich der Literaturdaten mit denen der vorliegenden Untersuchung zeigt, dass die Arten- und Gattungszusammensetzung in Materialien aus Innenräumen bisher nur wenig systematisch analysiert wurde und dementsprechend viele der in der vorliegenden Untersuchung festgestellten Arten bisher nicht von Proben aus Innenräumen bekannt sind. Es ist daher verständlich, dass viele der in dieser Untersuchung nur vereinzelt festgestellten Gattungen bzw. Arten in der Literatur bisher nicht aufgeführt werden. Andererseits fällt auf, dass selbst Vertreter der Gattungen *Amycolatopsis* und *Saccharopolyspora*, die in der vorliegenden Untersuchung häufig festgestellt wurden, bisher noch nicht aus Proben aus Innenräumen beschrieben wurden.
Die unzureichende Erforschung der Actinomyceten-Zusammensetzung von Innenraumproben wird auch in dem Ergebnis der Clusteranalyse der Sequenzdaten deutlich, bei der viele Isolate eine mehr oder weniger große Ähnlichkeit mit bestimmten Referenzstämmen aufweisen, aber mit diesen nicht exakt übereinstimmen. Hieraus wird deutlich, dass das Artenspektrum von Actinomyceten aus Innenräumen noch sehr lückenhaft beschrieben ist und es noch großer Bemühungen bedarf, um diese Lücke zu schließen.

Die vorliegende Untersuchung stellt somit eine erste umfassende Bestandsaufnahme dar, in der nur eine grobe Einschätzung der tatsächlichen Vielfalt der im Innenraum vorkommenden Actinomyceten gegeben werden kann

Der Vergleich der morphologischen und molekularbiologischen Differenzierung zeigt, dass die Clusterung der Referenzisolate anhand der Sequenzdaten in den meisten Fällen durch die kultivierungsabhängigen und mikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden kann. Die insgesamt gute Übereinstimmung der parallel an mehreren Referenzisolaten einer Art durchgeführten molekularbiologischen Analyse (z.B. *Amycolatopsis palatopharyngis, Nocardia carnea, Nocardioides* sp. (*N. albus*), *Nocardiopsis synnemataformans* und *Saccharopolyspora* sp.) mit den kulturmorphologischen und mikroskopischen Ergebnissen dieser Referenzisolate bestätigt die Zuverlässigkeit der molekularbiologischen Methode. Weiterhin ist anzunehmen, dass in den wenigen Fällen, in denen die morphologischen Ergebnisse nicht ideal mit denen der molekularbiologischen Analyse zur Deckung gebracht werden konnten, Störungen in kultivierungstechnischen Verfahren vorlagen.

In der vorliegenden Untersuchung konnten durch den Vergleich mit der molekularbiologischen Differenzierung Koloniemerkmale und mikroskopische Merkmale herausgearbeitet werden, die eine bessere Unterscheidung der myzelartig wachsenden Actinomyceten in zukünftigen Untersuchungen ermöglichen.

Im Vergleich zur morphologischen und chemotaxonomischen Identifizierung scheint für eine schnelle Identifizierung die vergleichende Analyse der 16S rRNA-Gene der Mikroorganismen die Methode der Wahl zu sein. Die rRNA-Gene sind aufgrund ihrer zentralen Funktion in der Proteinbiosynthese stark konserviert und sind deshalb als phylogenetische Markermoleküle besonders gut geeignet. Hinzu kommt, dass die Sequenziertechniken ständig optimiert werden und die exponentiell steigende Zahl von 16S rRNA-Gensequenzen in den Datenbanken eine schnelle und „automatisierte“ Identifizierung unbekannter Isolate (Woese, 1987, Stackebrandt und Göbel, 1994, Ludwig und Klenk, 2001) ermöglicht.
Trotz allem ist die Analyse der morphologischen und chemotaxonomischen Merkmale unverzichtbar, insbesondere für die Neubeschreibung von Gattungen und Arten.

4.3.1 Molekularbiologische Identifizierung

Vergleichende 16S rRNA-Gen Sequenzanalysen der vergangenen 25 Jahre haben gezeigt, dass Klassifizierungssysteme, die auf der Morphologie und Physiologie beruhen, nicht immer die natürlichen Verwandtschaftsverhältnisse der Actinomyceten repräsentieren (Stackebrandt und Schumann, 2006). Die molekularbiologische Identifizierung unbekannter Isolate beruht zunächst auf dem Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen der unbekannten Arten mit in Datenbanken hinterlegten 16S rRNA-Gensequenzen bekannter Arten (BLAST®-Search). Hierbei erfolgt eine erste Zuordnung der Isolate aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenzen zu einer bekannten Art. Anhand dieser Sequenzvergleiche kann zunächst nur die Zuordnung auf dem Gattungs-, nicht auf dem Artniveau erfolgen. Daher wurden anschließend die 16S rRNA-Gensequenzen der unbekannten Isolate mit bekannten Sequenzen aller beschriebenen Arten der zuvor ermittelten Gattung verglichen und in einem Cluster („phylogenetischer“ Stammbaum) dargestellt. Die phylogenetische Stammbaumberechnung ermöglicht eine Zuordnung des unbekannten Isolates in bestimmte Cluster, d.h. die Isolate werden in eine Gruppe beschriebener Arten eingerechnet. Die Grenze der Methode liegt jedoch in der Auflösungsbeschränkung der 16S rRNA-Gensequenz auf der Artebene (Fox *et al.,*1992). Die Zuordnung auf Artniveau ist deshalb nur in Einzelfällen möglich. Dies wird z.B. besonders deutlich innerhalb der Gattung *Streptomyces*. Innerhalb dieser Gattung sind die Sequenzen des 16S rRNA-Gens der einzelnen Arten zu ähnlich, um mit dieser Methode noch zwischen den Arten unterscheiden zu können. D.h. für eine Artzuordnung unbekannter Isolate werden die morphologischen, chemotaxonomischen und weitere Parameter (hier DNA-DNA-Hybridisierungen) benötigt.

Dennoch stellt die molekularbiologische Identifizierung auf der Basis des 16S rRNA Gens einen guten Ansatz für eine relativ einfache und schnelle Zuordnung gewonnener Isolate auf Gattungs- bzw. Gruppenebene dar. Diese Methode tritt besonders bei Gattungen, bei denen keine morphologische Zuordnung möglich ist, in den Vordergrund. Hierbei können Gattungen ohne typische morphologische und chemotaxonomische Charakteristika relativ leicht und schnell auf Gattungs- bzw. Gruppenebene zugeordnet werden.

Neue Arten (z.B. aus Umweltproben, wie den hier untersuchten Baumaterialien) können aufgrund der Cluster-Gruppenbildung innerhalb einer phylogenetischen Stammbaumberechnung einer Gattung schneller detektiert werden.

Wie bereits dargestellt, war aufgrund der großen Anzahl der Isolate und Vielseitigkeit der Klasse der *Actinobacteria*, bzw. den verschiedenen morphologischen Ausprägungen innerhalb der Gattungen eine morphologische Vordifferenzierung/Identifizierung oft nicht möglich. Daher wurden ab der fünften Probe mehrere Referenzisolate eines bestimmten Typs erst molekularbiologisch identifiziert, bzw. die nächst verwandten Spezies ermittelt und dann anhand morphologischer Merkmale überprüft.

Wird die molekularbiologische Identifizierung vorangestellt, erhält man zunächst eine schnellere Gattungszuordnung der einzelnen Isolate und kann diese nach morphologischen Kriterien dann miteinander vergleichen. Dies führt jedoch zu wiederholten Sequenzierungen gleicher Isolate und damit einem doppelten Arbeits- und finanziellen Aufwand. Der Vorteil dieses Vorgehens ist aber, dass Fehlerquellen durch eine selektive Isolierung verringert werden.

4.3.2 Morphologische Identifizierung

Um die unterschiedlichen Actinomyceten effizient vorselektieren zu können, ist eine umfangreiche Erfahrung mit Actinomyceten-Isolaten, wie z.B. deren Wachstum auf unterschiedlichen Nährmedien und deren Veränderungen mit dem Kulturalter, notwendig. Außerdem ist für die praktische Arbeit eine intensive Einarbeitung in die Methoden der morphologischen Bestimmung erforderlich.
Hierbei ist es wichtig, dass neben der Beobachtung von typischen Isolatmerkmalen auch das Wachstum auf Isolationsplatten mit einer ggf. störenden Begleitflora beachtet wird.
Bei der Vielzahl der Isolate musste auch berücksichtigt werden, dass Kontaminationen auftreten können, insbesondere wenn Referenzisolate auf Differenzierungsmedien ohne Hemmstoffe gegen Schimmelpilze inkubiert werden. Ohne derartige Vorkenntnisse und ohne die exakte Festlegung, welche Eigenschaften der Isolate mindestens ermittelt werden müssen und zu welcher Zeit die verschiedenen Kultureigenschaften möglichst objektiv beschrieben werden, ist eine effiziente Nachbearbeitung der Proben nicht möglich.

In der vorliegenden Studie wurden nicht immer alle Kolonien eines Actinomyceten-Typs einer Probe als identisch erkannt und deshalb wurden einzelne Typen mit mehreren Referenzisolaten belegt. Bei der nachfolgenden Differenzierung wurden Isolate, die sich als identisch herausstellten, zu einem Referenztyp vereint und auch die korrespondierenden Koloniekonzentrationen zusammengeführt. Derartige Mehrarbeit kann bei entsprechender Routine vermindert, aber nie ganz ausgeschlossen werden, da die Kulturen auf den Isolationsplatten von der Begleitflora beeinflusst werden. Die Übertragung der Referenzisolate auf spezielle Differenzierungsmedien und deren Inkubation unter Standardbedingungen ohne Begleitflora ist eine wichtige Voraussetzung für die Erkennung von ähnlichen Isolaten.

In der vorliegenden Studie wurden die meisten Untersuchungen an den jeweils am besten entwickelten Kulturen durchgeführt. Bei der Vordifferenzierung wurden häufig mehrere Isolattypen festgestellt, die zum Teil eindeutig einer Gattung zugeordnet werden konnten. Mehrere Kolonietypen konnten aufgrund ihres charakteristischen Koloniewachstums sowie typischer mikroskopischer Strukturen in unterschiedlichen Proben wiedererkannt werden. Die molekularbiologische Auswertung dieser Kolonietypen ergab allerdings, dass diese Kolonietypen zwar zu einer Gattung gehörten, aber nicht immer zu einer Art.

Charakteristische Kolonien konnten oft bereits mit morphologischen Methoden und mit Hilfe der DAP-Bestimmung einer Gattung zugeordnet werden. Hierzu gehörten Referenzisolate der myzelbildenden Actinomyceten, die häufig festgestellt wurden (*Amycolatopsis, Micromonospora, Nocardia, Promicromonospora, Pseudonocardia, Saccharopolyspora, Streptomyces*) oder besonders typische Merkmale aufwiesen (*Micromonospora*). Seltenere Kolonietypen konnten erst nach mehrmaligem Auftreten im Laufe des Projektes anhand ihrer Koloniemorphologie erkannt werden (*Lentzea, Nocardioides*).

Andererseits traten auch viele myzelartig wachsende uncharakteristische Kolonien auf, die auch nach einer Inkubation auf den Differenzierungsmedien nicht sicher zugeordnet werden konnten.

Eine nur sehr unsichere Vordifferenzierung konnte auch für mehr oder weniger typisch schleimige Bakterien-Kolonien durchgeführt werden. Prinzipiell können auch hier einige Isolate aufgrund geringer Myzelbildungen (z.B. Vertreter der Gattung *Rhodococcus*) sowie des Vorkommens von meso-DAP (z.B. Vertreter der Gattungen

Rhodococcus, Brevibacterium, Mycobacterium) gegenüber Vertretern von Gattungen ohne diese Eigenschaften (z.B. *Micrococcus, Arthrobacter, Kocuria*) differenziert werden. Allerdings sind diese Differenzierungsmöglichkeiten in vielen Fällen unzureichend, um gleiche von nur morphologisch ähnlichen Isolaten sicher zu unterscheiden, sodass nur in wenigen Fällen eine sinnvolle Vordifferenzierung möglich war.

Die zum Teil erheblichen Schwierigkeiten der koloniemorphologischen Zuordnung bereits auf Gattungsebene verdeutlichen den Stellenwert der molekulabiologischen Differenzierung.

Für die morphologische Gattungszuordnung sind Merkmale wichtig, die allerdings nicht immer in typischer Weise ausgebildet werden. Neben einer charakteristischen Koloniemorphologie, die bei vielen typischen Kolonien bereits auf den Isolationsmedien erkannt werden konnte, waren die Bildung von Luftmyzel und ggf. ein charakteristischer Zerfall des Myzels bei Kulturalterung sowie die Bildung von Sporenketten bzw. Einzelsporen und die Koloniekonsistenz sehr wichtige Merkmale für eine Zuordnung der Kolonien.

Bei Isolaten mit einem zähen Substratmyzel kommen vor allem die Gattungen *Streptomyces* und abgestuft (geringere Zähigkeit) auch die Gattungen *Amycolatopsis, Micromonospora* und *Nocardiopsis* in Frage.

Bei Isolaten mit einem vergleichsweise weichen Substratmyzel kommen die Gattungen *Nocardioides, Nocardia, Saccharopolyspora* und *Promicromonospora* in Frage. Eine Unterscheidung der Gattungen kann anhand ihrer DAP-Eigenschaft getroffen werden, da Vertreter der Gattung *Nocardioides* LL-DAP, Vertreter der Gattungen *Nocardia* und *Saccharopolyspora* meso-DAP und Vertreter der Gattung *Promicromonospora* keine DAP-Komponete enthalten (siehe auch 4.3.3).

In der vorliegenden Untersuchung bildeten alle Vertreter der Gattung *Pseudonocardia* eine typische Koloniemorphologie, die eine relativ sichere Zuordnung zur Gattung bereits auf den Selektionsplatten ermöglichte. Die molekularbiologische Differenzierung der festgestellten Referenzisolate zeigte jedoch eine unerwartete Artenvielfalt.

Vertreter der Gattung *Micromonospora* konnten oft aufgrund ihrer orangefarbenen bis schwarzen Kolonien sowie durch Substratmyzel mit der Bildung von Einzelsporen sehr gut von anderen Gattungen abgegrenzt werden.

Eine weitere Gattung, deren Vertreter bereits anhand ihrer morphologischen Merkmale erkannt werden können, ist die Gattung *Streptomyces*. Viele Referenzisolate bildeten ein charakteristisches Luftmyzel mit mehr oder weniger farbigen Sporenketten aus. Bei einigen Referenzisolaten, die kein Luftmyzel oder Sporen, aber typische Kolonien mit sehr zähem Substratmyzel bildeten, konnte auf die Gattung *Streptomyces* geschlossen werden.
Charakteristische Kolonien wurden bei Vertretern der Gattung *Nocardiopsis* beobachtet. Die Kolonien bilden im Vergleich zu anderen Arten in der Regel schnell wachsende Kulturen mit einem üppigen Luftmyzel. Charakteristisch ist darüber hinaus das Auftreten von „Zick-Zack"-Strukturen im zerfallenden Myzel. Verwechslungen aufgrund der Koloniemorphologie auf den Isolationsplatten können in Ausnahmefällen mit Vertretern der Gattung *Amycolatopsis* auftreten. Eine Unterscheidung von Vertretern der Gattung *Amycolatopsis* kann aber gegenüber solchen der Gattung *Nocardiopsis* anhand der fehlenden Zick-Zack-Formationen getroffen werden. Koloniemorphologische Überschneidungen können auch zwischen uncharakteristisch gewachsenen Kulturen der Gattungen *Streptomyces, Nocardioides* und *Amycolatopsis* auftreten. Eine Abgrenzung von Vertretern der Gattung *Streptomyces* gegenüber denen der beiden anderen Gattungen kann am sichersten anhand der Zellwand (LL-DAP bzw. meso-DAP) durchgeführt werden.
Die Vertreter der Gattung *Nocardia* konnten nur teilweise dieser Gattung klar zugeordnet werden. Lediglich der häufig in den Proben auftretende Typ *Nocardia carnea* konnte aufgrund seiner Koloniemorphologie sicher erkannt werden. Typische Merkmale dieser Isolate waren die langsam wachsenden weißen Kolonien mit typischer Myzelbildung und weicher Konsistenz. Andere, seltene *Nocardia*-Isolate bildeten schneller wachsende, z.T. gefärbte Kolonien mit weicher Konsistenz. Die mikroskopischen Merkmale der zahlreichen Arten dieser Gattung sind nur mit viel Erfahrung von anderen Actinomyceten und insbesondere gegenüber *Nocardioides*, *Saccharopolyspora* und *Lentzea* zu unterscheiden. Für die Abgrenzung von *Nocardia*-Arten gegenüber anderen Actinomyceten ist vor allem das Auftreten von gefärbten Kolonien, z.T. mit einem Zerfall der Hyphen in Zick-Zack-Form, sowie der Nachweis von meso-DAP in der Zellwand typisch, während Vertreter der Gattung *Saccharopolyspora* und *Lentzea* meso-DAP aufweisen, aber in der Regel eine abweichende Koloniemorphologie und Färbung haben sowie keine „Zick-Zack"-Formierung beim Myzelzerfall beobachtet wird. Vertreter der Gattung *Nocardioides*

können dagegen am besten durch die Bestimmung von LL-DAP bei ansonsten weicher Koloniekonsistenz und geringer bis mäßiger Luftmyzelbildung gegenüber Vertretern der Gattung *Nocardia* abgegrenzt werden.

Problematisch war vor allem die morphologische Zuordnung von Isolaten mit untypischem Koloniewachstum und insbesondere solchen ohne Luftmyzelbildung.
In solchen Fällen können die Koloniekonsistenz, das Vorhandensein oder Fehlen von Substratmyzel sowie mikroskopische Besonderheiten und der DAP-Gehalt Hinweise auf die Gattungszugehörigkeit ergeben.
Vertreter der Gattung *Promicromonospora* wurden in der Untersuchung häufig festgestellt und bilden typischerweise beigefarbene bis gelbe Kolonien ohne Luftmyzel mit einer unregelmäßigen Oberfläche. Weite Bereiche des Substratmyzels zerfallen frühzeitig in auffallend kleine coccoide Einzelzellen. Es bleiben jedoch in der Regel Myzelreste (häufig mit Verzweigungen) auch in älteren Kulturen in den Zellmassen zurück.

4.3.3 Chemotaxonomische Identifizierung

Bei den Actinomyceten haben viele Untersuchungen gezeigt, dass besonders die folgenden chemotaxonomischen Merkmale sehr gut mit den „phylogenetischen“ Daten übereinstimmen, Aufbau der Zellwand, zelluläre Fettsäureprofile, Spektren der Phospholipide und respiratorische Chinone (Menachinone).
Verschiedene chemotaxonomische Marker haben innerhalb der Ordnung *Actinomycetales* sehr unterschiedliche Differenzierungskapazität.
Die Struktur des Peptidoglycans ist bei den Gram-positiven Bakterien ein wichtiges Merkmal für die Gattungsdiagnose. Die Diaminosäure in Position 3 des Tetrapeptids und die Struktur der Interpeptidbrücke sind ein charakteristisches Gattungsmerkmal. Weit verbreitet ist bei Actinomyceten das Vorkommen eines der Isomere der Diaminopimelinsäure (LL- bzw. meso-DAP). Die Diaminopimelinsäure wird daher bei den Actinomyceten auch als Schlüsseldiaminosäure bezeichnet. Bei der Gattungsdiagnose der Actinomyceten ist die DAP-Bestimmung immer der erste Schritt in der Zellwandanalyse, dessen Ergebnis bereits Hinweise auf bestimmte Gruppen innerhalb der Ordnung *Actinomycetales*, und auch auf die weiteren Analysen im Zusammenhang mit der Identifizierung unbekannter Isolate gibt. Eine große Zahl der asporogenen, nicht mycelbildenden Gattungen der Ordnung

Actinomycetales besitzen L-Lysin, L-Ornithin oder L-Diaminobuttersäure als diagnostische Diaminosäure der Zellwand. Von den Sporoactinomyceten haben nur 4 Gattungen: *Couchioplanes, Catenuloplanes, Actinomyces, Actinobaculum* L-Lysin anstelle von Diaminopimelinsäure in ihrer Zellwand. Diese Diaminosäuren kommen als Bestandteile von Peptiden im Zytoplasma vor, deshalb ist bei Isolaten, in denen keine LL- bzw. meso-DAP gefunden wird, eine aufwändige Präparation reiner Zellwände nötig, um die vernetzende Diaminosäure im Peptidoglycan nachzuweisen. Die große Variabilität der vernetzenden Diaminosäure und der Interpeptidbrücke des Peptidoglycans ist im „Key to Murein (Peptidoglycan) Types“ im DSM-Katalog bzw. auf der Web-Seite der DSMZ dokumentiert.
Weitere chemotaxonomische Marker wie die Menachinonmuster, Fettsäuremuster und das Vorhandensein von Mycolsäuren tragen zur sicheren Gattungsdiagnose bei. Innerhalb der Actinomyceten sind die vorkommenden Menachinonmuster sehr vielfältig und charakteristisch für die einzelnen Gattungen.
Fettsäuren kommen als Bestandteile von Phospholipiden und Glycolipiden in der Zytoplasmamembran der Bakterien vor. Mehr als 300 unterschiedliche Strukturen mit Kettenlängen bis zu 90 C-Atomen wurden bisher bei Bakterien gefunden. Ihre Vielfalt in Bezug auf die Anzahl der C-Atome, die Position von Doppelbindungen und unterschiedliche Substituenten sowie ihre streng regulierte Biosynthese machen sie zu wertvollen taxonomischen Markern. Von besonderer diagnostischer Bedeutung sind Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C_{10} und C_{24} (Suzuki *et al.*, 1983).
Die gaschromatographische Analyse von Fettsäuremethylestern (FAME) ist eine effektive Methode, die in vielen Fällen übereinstimmende Ergebnisse mit DNA-DNA Hybridisierungen gegeben hat und findet heute eine breite Anwendung bei der Identifizierung von klinischen, aber auch von Umweltisolaten. Sie erfordert jedoch streng standardisierte Kultivierungsbedingungen und Probenvorbereitungen. Eine Identifizierung bis zur Art kann nur auf der Basis der Analyse der relativen Zusammensetzung der Fettsäuren eines Isolates und des Vergleichs mit den in der Datenbank hinterlegten Stämmen (Gattung/Art) erfolgen. Die Fettsäureanalytik zeigt vor allem die Diversität von Isolaten innerhalb von Gattungen oder taxonomischen Gruppen.
Die Differenzierung und Klassifizierung von Actinomyceten hat sich mit der Entwicklung moderner Analyseverfahren und dadurch möglichen großen Anzahl von Analysen unterschiedlicher Zellbestandteile als chemotaxonomische Marker

erheblich weiterentwickelt. Grundlage dafür sind die systematischen Analysen von Actinomyceten hinsichtlich der Peptidoglycantypen und Diaminosäuren (Schleifer und Kandler, 1972), der Chinone (Collins *et al*., 1977), der zellulären Fettsäuren (Kroppenstedt, 1985, Kämpfer und Kroppenstedt, 1996), der Mycolsäuren (Minnikin *et al.*, 1975), der polaren Lipide (Lechevalier *et al.*, 1977; Minnikin *et al.*, 1979) sowie der Polyamine (Altenburger *et al*., 1997, Gvozdiak *et al*., 1998).
In Abhängigkeit von der analysierten Gruppe haben die einzelnen chemotaxonomischen Marker unterschiedliches Auflösungsvermögen. So können z.B. die Menachinonmuster bei den Sporoactinomyceten oft nur Gattungsgruppen differenzieren, bei wenigen Gattungen wie z.B. *Amycolatopsis* [*A. nigrescens* – besitzt MK-11(H_4) anstelle von MK-9(H_4) als Hauptkomponente, Groth *et al*., 2007] differenzieren die Menachinonmuster z.T. bis auf Artebene.
Zusätzlich zu den in diesem Projekt durchgeführten chemotaxonomischen Analysen tragen die Analyse der Zellwandzucker, als auch die Analyse der Phospholipide weiter zur Gattungs- und Artdiagnose bei.
Bereits 1970 wurden die Actinomycetengattungen auf der Basis von unterschiedlichen Kombinationen der vorkommenden Zellwandzucker in 4 Gruppen eingeteilt (Lechevalier & Lechevalier, 1970). Zum Chemotyp A mit Arabinose und Galaktose in der Zellwand gehören die Gattungen *Corynebacterium*, *Nocardia* und *Mycobacterium,* zum Chemotyp B mit Madurose und variablen Gehalt an Galaktose gehören z.B. *Actinomadura, Microbispora, Nonomuraea, Streptosporangium* und *Dermatophilus. Nocardiopsis*-Isolate, die nur Galaktose, bzw. keine Zucker aufweisen, gehören zum Chemotyp C und *Actinoplanes* und *Micromonospora* besitzen Xylose und einen variablen Gehalt an Galaktose (Chemotyp D) .
Phospholipide als strukturelle Einheiten der Zytoplasmamembran bestehen aus Glycerol, langkettigen Fettsäuren (C_{14}-C_{18}) und einer polaren Gruppe wie Ethanolamine, Choline oder Inosit. Lechevallier *et al.* (1977) zeigten, dass Diphosphatidylglycerol (DPG) in fast allen Actinomyceten vorkommt. Phosphatidyl-ethanolamin (PE), Phosphatidylinosit (PI) und Phosphatidylinositmannosid (PIM) sind häufig vertreten, Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylmethylethanolamin (PME) sind selten, noch seltener ist Phosphatidylcholin (PC). Lechevalier *et al.* (1977) definierten anhand der Zusammensetzung der Phospholipide der Actinomyceten 5 Phospholipidtypen:

PI PIM, PI, (PG), DPG

PII	PIM, PI, (PG), PE, DPG
PIII	(PIM), PI, PC, (PG), (PE), PME, (DPG)
PIV	(PIM), PI, (PE) (PME), DPG
PV	(PIM), PI, (PE), DPG

Nachfolgend sind einige Gattungen der Actinomyceten den Phospholipidtypen zugeordnet:

PI	*Corynebacterium, Nocardioides, Glycomyces, Agromyces, Clavibacter, Arthrobacter, Micrococcus, Brevibacterium, Dermatophilus, Actinomadura madurae group*
PII	*Actinoplanes, Micromonospora, Catellatospora, Dactylosporangium, Pilimelia, Amycolatopsis, Saccharomonospora, Geodermatophilus, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Saccharothrix, Streptoalloteichus, Spirillospora*
PIII	*Actinopolyspora, Amycolata, Pseudonocardia, Saccharopolyspora, Kineosporia, Nocardiopsis*
PIV	*Nonomuaea, Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Streptosporangium, Thermomonospora*
PV	*Cellulomonas, Promicromonospora*

In Tab. 25 sind die chemotaxonomischen Merkmale der Gattungen aufgeführt, denen durch die Analyse der 16S rRNA-Gensequenz Isolate zugeordnet wurden.
Ein Ziel des Projektes war festzustellen, mit welchen Methoden Actinomyceten routinemäßig mittels einer Schnellanalyse bestimmt werden können.
Die Analyse der beschriebenen chemotaxonomischen Marker ist zeitaufwändig und erfordert eine Ausstattung der Labore mit vielen unterschiedlichen hochwertigen Analysegeräten (GC, HPLC, GC-MS..) und darüber hinaus geschulte und erfahrene Bearbeiter. Diese müssen über ein umfangreiches taxonomisches Wissen verfügen, um einerseits aus den bereits erfolgten Analysen die notwendigen nächsten Schritte abzuleiten, und andererseits mit Hilfe der ermittelten chemotaxonomischen Marker eine Identifizierung der unbekannten Isolate durchzuführen.

Tab. 25: Chemotaxonomische Gattungsmerkmale der identifizierten Isolate

Taxon	Familie	Zellwand	Myc*[1]	Menachinon-Hauptkomponenten	FS*[2]	Phospholipid	G+C*[3]
Lentzea	*Actinosynnemataceae*	meso-DAP	-	MK-9(H4)	ND	PE, DPG, PG, PI	70-76
Brevibacterium	*Brevibacteriaceae*	meso-DAP	-	MK-8(H2), MK-7(H2)	S,A,I	DPG,PG,GL,DMDG, PI	60-67
Oerskovia	*Cellulomonadaceae*	L-Lys	-	MK-9(H4)	A,I	DPG,PI,PG,PL	70-76
Corynebacterium	*Corynebacteriaceae*	meso-DAP	+	MK-9(H2), MK-8(H2)	S,U,A,I,T	DPG,PI,PIM,(PG,GL,PE)	51-67
Brachybacterium	*Dermabacteraceae*	meso-DAP	-	MK-7	S,A,I	DPG,PG,GL,(PGL)	68-72
Kytococcus	*Dermatophilaceae*	Lys-DCA	-	MK-8, MK-9, MK-10	A,I,(S)	DPG,PG,PI	68-69
Arsenicicoccus	*Intrasporangiaceae*	LL-DAP	-	MK-8(H_4)	S,U,I,A	ND	
Janibacter	*Intrasporangiaceae*	meso-DAP	-	MK-8(H4)	S,I,U	DPG,PG,PI	70
Ornithinicoccus	*Intrasporangiaceae*	L-Orn	-	MK-8(H4)	S,A,I	PI,PG,DPG,PL	72
Agrococcus	*Microbacteriaceae*	L-DAB	-	MK-12, MK-11	S,A,I	PG, DPG, GL	74
Leucobacter	*Microbacteriaceae*	L-DAB,	-	MK-11, (MK-10, MK-9, MK-12)	S,A,I	DPG,PG,GL	66
Microbacterium	*Microbacteriaceae*	L-Lys/D-Orn	-	MK-12, MK-11, MK-13, MK-14	S,A,I	DPG,PG,GL,DMDG	65-72
Arthrobacter	*Micrococcaceae*	L-Lys	-	MK-9(H2) / [MK-8 und/oder MK-9]	S,A,I	DPG,PG,GL,DMDG	61-66
Citricoccus	*Micrococcaceae*	L-Lys-Gly-Glu		MK-9(H(2))	A,I,	DPG, PG, PI, PL	68
Kocuria	*Micrococcaceae*	Lys-MCA	-	MK-7(H2), MK-8(H2)	S,A,I	DPG,PG,(PI,PL,GL)	66-75
Micrococcus	*Micrococcaceae*	Lys	-	MK-8, MK-8(H2)	S,A,I	DPG,PI,PG,PL,GL	69-76
Micromonospora	*Micromonosporaceae*	meso-DAP	-	MK-9(H4), MK-10(H4), MK-10(H6), MK-9(H6)	A,I,(U)	PE,PI,PIM	71-73
Mycobacterium	*Mycobacteriaceae*	meso-DAP	+	MK-9(H2)	S,U,T	PI,PIM,PE	70-72
Nocardia	*Nocardiaceae*	meso-DAP	+	MK-8(H4)cyclo, MK-9(H2), MK-8(H6)cyclo	S,U,T	PE,DPG,PI,PIM	64-72
Rhodococcus	*Nocardiaceae*	meso-DAP	+	MK-8(H2), MK-9(H2)	S,U,T	DPG,PE,PI,PIM,(G)	63-73
Jiangella	*Nocardioidaceae*	LL-DAP(meso-DAP)	-	MK-9(H4)	A,I,T	PIM, PI, DPG	70
Kribbella	*Nocardioidaceae*	LL-DAP	-	MK-9(H4)	A,I	PC	68-70
Nocardioides	*Nocardioidaceae*	LL-DAP	-	MK-8(H4), MK-9(H4)	S,A,I,U,T	PG,DPG,PL,PG-OH	66-72
Nocardiopsis	*Nocardiopsaceae*	meso-DAP	-	MK-10(H4), MK-10(H6), MK-10(H2)	(U),T,I,A	PC,PG,APG,PM,DPG	64-69
Isoptericola	*Promicromonosporaceae*	Lys-D-Asp	-	MK-9(H4)	A,I,S	PG, DPG, PI, PL	70-72
Promicromonospora	*Promicromonosporaceae*	Lys	-	MK-9(H4)	I,A	PG,PL	70-75
Microlunatus	*Propionibacteriaceae*	LL-DAP	-	MK-9(H4)	S,A,I	PI,PG,DPG,PL	68
Propionicicella	*Propionibacterineae*	meso-DAP	-	MK-9	S,I,A		69.9
Amycolatopsis	*Pseudonocardiaceae*	meso-DAP	-	MK-9(H2), MK-9(H4), [MK-9(H6)]	S,U,I,T	PI,DPG,PG,(PE,PM)	66-69
Prauserella	*Pseudonocardiaceae*	meso-DAP	-	MK-9(H4), MK-9(H2),	I,A,S,U	PI, PG, DPG, PE, PME	67-69

Pseudonocardia	*Pseudonocardiaceae*	meso-DAP	-	MK-8(H4) MK-9(H4)	I,(A,S)	PM,PE,PC	68-79
Saccharopolyspora	*Pseudonocardiaceae*	meso-DAP	-	MK-9(H4), MK-9(H6)	U,A,I	PC,PI,PM	66-77
Streptomyces	*Streptomycetaceae*	LL-DAP(meso-DAP)	-	MK-9(H6), MK-9(H8), MK-9(H4)	S,I,A	DPG,PE,PI,PIM	69-73
Actinomadura	*Thermomonosporaceae*	meso-DAP	-	MK-9(H6), MK-9(H8)	T,U,(I,A)	PIM,PI,DPG,(PE,GluNu)	65-69
Tsukamurella	*Tsukamurellaceae*	meso-DAP	+	MK-9	S,U,T	PE,PI,PIM	67-68

Myc*[1°] - Mycolsäuren: + vorhanden, – keine Mycolsäuren vorhanden, FS*[2°] - Fettsäuren: Abkürzungen: S - gradkettig, gesättigt, U – einfach ungesättigt, A - anteiso-methyl-verzweigt, I - iso-methyl-verzweigt, T - 10-methyl-verzweigt (Tuberculostearinsäure), 2OH - 2 hydroxyliert; Abkürzungen Phospholipide: APG - Acylphosphatidylglycerol, DMDG - Dimannosyldiglycerid, DPG - Diphosphatidylglycerol, GL - Glycolipid, GluNu - Phospholipid unbekannter Struktur mit Glucosamin, PC - Phosphatidylcholin, PE - Phosphatedylethanolamine, PG - Phosphatidylglycerol, PGL - Phosphoglycolipid, PI - Phosphatedylinositol, PIM - Phosphatedylinositolmannosid, PL - Phospholipid unbekannter Struktur, PM – Phosphatidylmethylethanolamin; G+C*[3] – mol% G+C der DNA

4.4 Diskussion Isolierung / Klonierung einschließlich deren Vergleich

Die Actinomyceten in den Materialproben wurden sowohl mit Kultivierungsmethoden (2.3) isoliert, als auch mit molekularbiologischen Methoden (2.4.4) direkt bestimmt. Mit beiden Methoden, Isolierung und Klonierung wurden in 16 untersuchten Materialproben insgesamt 59 verschiedene Gattungen innerhalb der Klasse der *Actinobacteria* detektiert (Tab. 26). Davon wurden 10 Gattungen (17%) nur mittels Isolierung, 27 Gattungen (46%) nur mittels Klonierung und 22 Gattungen (37%) mit beiden Methoden erfasst. Insgesamt wurden jedoch nur 17 Gattungen (~30 %) mit beiden Analyseverfahren in derselben Probe detektiert.

Tab. 26: Gegenüberstellung der mittels kultivierungsabhängiger und kultivierungsunabhängiger Analyseverfahren detektierten Gattungen, sowie die ermittelten Übereinstimmungen bei den untersuchten Proben

	Nur Isolierung	**Nur Klonierung**	**Isolierung und Klonierung**
1	*Citricoccus*	*Actinomyces*	*Agrococcus*
2	*Corynebacterium*	*Actinopolymorpha*	*Amycolatopsis*
3	*Isoptericola*	*Aeromicrobium*	*Arthrobacter*
4	*Leucobacter*	*Aeromonas*	*Brachybacterium*
5	*Micrococcus*	*Agromyces*	*Brevibacterium*
6	*Oerskovia*	*Blastococcus*	*Jiangella*
7	*Ornithinicoccus*	*Conexibacter*	*Kocuria*
8	*Propionicicella*	*Crocebacterium*	*Kribella*
9	*Saccharomonospora*	*Crossiella*	*Lentzea*
10	*Tsukamurella*	*Crustibacterium*	*Microbacterium*
11		*Cryocola*	*Microlunatus*
12		*Georgenia*	*Micromonospora*
13		*Goodfellowia*	*Mycobacterium*
14		*Leifsonia*	*Nocardia*
15		*Longispora*	*Nocardioides*
16		*Microcella*	*Nocardiopsis*
17		*Modestobacter*	*Prauserella*
18		*Parkia*	*Promicromonospora*
19		*Patulibacter*	*Pseudonocardia*
20		*Prauseria*	*Rhodococcus*
21		*Propionibacterium*	*Saccharopolyspora*
22		*Saccharothrix*	*Streptomyces*
23		*Sanguibacter*	
24		*Solirubrobacter*	
25		*Stackebrandtia*	
26		*Tetrasphaera*	
27		*Yania*	

Da bei den untersuchten Klonsequenzen nur Teilsequenzen (ca. 400 bp) vorliegen, ist eine „phylogenetische“ Stammbaumberechnung aus diesen Daten nicht aussagekräftig genug. Daher wurde auch kein direkter Vergleich zwischen den vorliegenden 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Isolate und der Klonsequenzen

durchgeführt. Auch wenn mit beiden Verfahren gleiche Gattungen detektiert worden sind, kann man nicht davon ausgehen, dass es sich dabei um gleiche Arten handelt.

Zusätzlich zu den erfassten Daten und deren Vergleich sind die Fehlerquellen beider Methoden zu beachten.

Der kultivierungsabhängige Ansatz ist besonders durch die Faktoren der Lebensfähigkeit und Kultivierbarkeit der Mikroorganismen (viable but not culturable) begrenzt. Weiterhin ist die Bearbeitung und Aufarbeitung der zu untersuchenden Proben sehr zeitaufwändig und es bedarf einer sorgfältigen Auswahl der Nährmedien zur Kultivierung und Subkultivierung, sowie einer gewissen Erfahrung hinsichtlich morphologischer, mikroskopischer und chemotaxonomischer Kenntnisse.
So zeigten Parker und Taylor (1985), dass über die Kultivierung nur ca. 0,0001-10% der Gesamtpopulation der Mikroorganismen in einer Umweltprobe erfasst werden. Die in diesem Projekt erhaltenen Ergebnisse belegen, dass die Anzahl von isolierten Referenzisolaten mit steigender Anzahl der untersuchten Proben, der verwendeten Nährmedien, der verschiedenen Inkubationstemperaturen und der Verdünnungsstufen, sowie anderer Faktoren ansteigt. Jedoch ist zu beachten, dass der damit verbundene Arbeits-, Zeit und Kostenaufwand in der Routine wahrscheinlich nicht umsetzbar ist. Dadurch kann der kultivierungsabhängige Ansatz zu einer Fehlinterpretation der Actinomycetenpopulation aufgrund der Auswahl der Nährmedien, der Kultivierbarkeit aber auch einer selektiven Isolierung führen.

Beim direkten molekularbiologischen Ansatz (z.B. über eine Klonierung) liegt die Fehlerquelle vorwiegend in der DNA-Extraktionseffizienz. So zeigten Taylor *et al.,* 2002, dass mit einem DNA – Extraktionskit nur etwa 1 % der tatsächlich in Böden vorhandenen DNA extrahiert werden kann und es weiterhin zu sequenzspezifisch selektiven PCR-Amplifikationen kommen kann. Dies kann zu einer Verschiebung der tatsächlichen Population der Actinomyceten in Baumaterialien führen. Auch in der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die DNA-Extraktion aus Umweltproben mit einem Extraktionskit, wobei die Extraktionseffizienzen nicht bestimmt wurden. Daher kann hier keine Aussage über mögliche DNA-Extraktionsverluste und DNA-Qualitäten getroffen werden. Um jedoch die Fehlerquelle bei der Vorselektion der Klonsequenzen mit Actinomyceten-spezifischen Primern zu verringern, wurden in diesem Projekt zwei verschiedene Actinomyceten-spezifische Primer eingesetzt. Dies sollte die Detektion einerseits der myzelbildenden (Primersystem 1) und andererseits der coryneformen (Primersystem 2) Actinomyceten erhöhen.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter Verwendung des Klonierungsansatzes zunächst mehr Actinomycetengattungen detektiert wurden als über die kultivierungsabhängigen Methoden. Dennoch sollten diese Beobachtungen immer mit der Einschränkung betrachtet werden, dass mit der hier angewandten molekularen Methodik z. B. nicht zwischen lebenden und toten Organismen unterschieden werden kann. Allerdings können auch tote Zellen, Zellbruchstücke und Toxine, die über den Kultivierungsansatz nicht erfasst werden, in Bezug auf eine gesundheitliche Relevanz von Bedeutung sein. Um jedoch zu klären, welche Mikroorganismen gesundheitliche Effekte auf z.B. die Bewohner feuchtegeschädigter Häuser haben können, benötigt man die Isolate für weitere Untersuchungen, wie Toxizitätstests.

Insgesamt wurden die in den verschiedenen Materialien am häufigsten aufgetretenen Gattungen mit beiden Methoden detektiert, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um Gattungen handelt, die möglicherweise typisch für die Besiedlung von Baumaterialien nach Feuchteschäden sind. Die erfasste Diversität der Actinomyceten in dieser Arbeit steigerte sich unter Verwendung der direkten molekularbiologischen Methoden um ca. 46%. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass unter alleiniger Verwendung der kultivierungsabhängigen Methoden das in den untersuchten Baumaterialien vorherrschende Artenspektrum unterschätzt wird. Weiterhin zeigt dieses Ergebnis den Vorteil der molekularbiologischen Methoden, dass auch nicht kultivierbare Bakterien bzw. deren 16S rRNA-Gensequenzen aus z.B. Umweltproben ermittelt und phylogenetisch eingeordnet werden können. Dennoch wurden nicht alle Gattungen, die über den kultivierungsabhängigen Ansatz erfasst wurden, über die Klonierung ermittelt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass für Diversitätsanalysen beide Methoden Anwendung finden sollten.

4.5 Diskussion der toxikologischen Daten

4.5.1 Diskussion der MTT-Zytotoxizitätstests

Die Zytotoxizitätstests liefern erste Hinweise darauf, ob entsprechende Wirkstoffe im untersuchten Material vorliegen. Da die Wirkung nicht auf mikrobielle oder mikrobiell produzierte Stoffe beschränkt ist, sind jeweils Referenzanalysen zur Bewertung erforderlich. Die Ergebnisse von Zytotoxizitätstests mit Baumaterialien müssen daher unter Kenntnis der Grenzen der Methode interpretiert werden. Soweit die Analyse einer mikrobiell befallenen Materialprobe auf eine zytotoxische Wirkung schließen lässt oder eindeutig belegt ist, bleibt die Frage, ob diese durch Metaboliten der vorhandenen und kultivierbaren Pilze oder Bakterien verursacht wurde. Es ist auch möglich, dass die toxischen Stoffe von Mikroorganismen produziert wurden, die zum Zeitpunkt der Probenanalyse komplett abgestorben sind, insbesondere bei alten mikrobiellen Schäden, und die aktuell im Labor anzüchtbaren Pilze und/oder Bakterien keine toxischen Stoffe produzieren können. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die im Material vorhandenen Mikroorganismen im Labor nicht kultivierbar sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die aus dem Material isolierten Mikroorganismen unter Laborbedingungen keine toxischen Stoffe produzieren, allerdings dies im Material vor Ort getan haben oder umgekehrt. Dem Projekt vorangegangene Untersuchungen zeigten bereits derartige Effekte. Im Projekt wurde mit dem MTT-Zytotoxizitätstest in 5 der untersuchten 16 Proben eine Wirkung nachgewiesen (Kap. 3.3.1). In zwei Fällen konnte mangels Referenzwerten keine sichere Bewertung vorgenommen werden. Die restlichen 9 Proben waren eindeutig negativ. Da im Rahmen des Projektes nur orientierende Untersuchungen möglich waren, wurden 2 positive Proben (04 Mineralwolle, 12A Wandputz) ausgewählt, um zu untersuchen, ob Actinomycetenstämme für die zytotoxische Wirkung verantwortlich sein können. In beiden untersuchten Proben wurde jeweils mindestens ein Referenzisolat als Produzent für zytotoxische Wirkstoffe ausgemacht. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass aus der stärker toxischen Probe (Mineralwolle) drei Actinomycetenstämme mit zytotoxischer Wirkung isoliert wurden und aus der schwächer toxischen Probe nur ein Isolat. Außerdem war die toxische Wirkung eines der drei Referenzstämme aus Mineralwolle (Isolat: 04-Je-007,79).am stärksten.

Die taxonomischen Analysen für die Referenzisolate mit nachgewiesener zytotoxischer Wirkung ergaben folgende Zuordnung:

Tab. 27: Taxonomische Zuordnung der Referenzisolate mit zytotoxischer Wirkung

Isolat	Taxonomische Zuordnung	Herkunft
04-Je-005	*Streptomyces sp*	Objekt 04, Mineralwolle
04-Je-006	*Streptomyces sp*	
04-Je-007	*Streptomyces sp.*	
12A-Be-14	*Lentzea sp*	Objekt 12A, Wandputz

Vergleicht man die Ergebnisse mit Untersuchungen von Mehrer *et al*. (2003), dann wird deutlich, dass aus im vorliegenden Projekt untersuchten Proben relativ wenig Actinomycetenstämme mit zytotoxischer Wirkung isoliert wurden. Mehrer *et al*. untersuchten insgesamt 12 Isolate und wiesen bei einem eine starke toxische Wirkung, bei 2 eine toxische und bei einem eine gering toxische Wirkung nach.

Tab. 28: Ergebnisse der zytotoxischen Untersuchungen von Mehrer *et al*., 2003

Nr.	Isolat/Stamm	Material	IC_{50} [1] [cm^2/ml]	Bewertung
1a	*Nocardia carnea*	Tapete	>15.62	keine Toxizität
1b	*Nocardia carnea*	Beton	>31.25	keine Toxizität
2a	*Nocardiopsis sp.*	Tapete	**0.98**	**stark toxisch**
2b	*Nocardiopsis sp.*	Wandputz	15.62	keine Toxizität
3a	*Nocardiopsis exhalans*	Lehmputz	31.25	keine Toxizität
3b	*Nocardiopsis exhalans*	Wandputz	**3.91**	**toxisch**
4a	*Streptomyces griseus*	Wandputz	**7.81**	**toxisch**
4b	*Streptomyces griseus*	Folie und Tapete	**15.62**	**gering toxisch**
5	*Streptomyces violaceoruber*	Staub	>31.25	keine Toxizität
6	*Streptomyces sp.*	Tapete	31.25	keine Toxizität
7	*Pseudonocardia sp.*	Tapete und Putz	>31.25	keine Toxizität
8	*Promicromonospora sp.*	Tapete	>15.62	keine Toxizität

Von Gareis durchgeführte orientierende Analysen an 4 Actinomycetenisolaten, die aus einer anderen Untersuchungsreihe stammen, ergaben eine sehr starke Toxizität bei *Streptomyces parvus*, wobei eine Verdünnung bis zur Stufe 10 erforderlich war, um den IC_{50} Wert zu erhalten. Die vorliegenden orientierenden Untersuchungsergebnisse ermöglichen keine Aussagen darüber wie die toxische Wirkung der Actinomyceten im Verhältnis zu Schimmelpilzen einzuordnen ist. Streptomyceten sind bekannt als sehr potentielle Wirkstoffproduzenten. Wie die Ergebnisse aus diesem Projekt und auch aus vorangegangen Arbeiten zeigen, treten auch Arten anderer Gattungen als Toxinproduzenten auf, wie z.B. *Lentzea* oder

Nocardiopsis. Dies zeigt, dass man die Fragestellung nach potentiellen Toxinproduzenten unter den Actinomyceten unbedingt weiter bearbeiten sollte, wenn man aussagekräftige Informationen zum Auftreten von Actinomyceten als potentielle Toxinproduzenten treffen will.

4.5.2 Diskussion der Immunmodulation

Der immunmodulierende Effekt der hier untersuchten mikrobiellen Sporensuspensionen (Actinomyceten, Schimmelpilze) hängt sowohl von der Art (teilweise auch vom Stamm) als auch von der Konzentration der Sporen/Konidien ab. Die Actinomyceten zeigten in den Vorversuchen bei höheren Konzentrationen eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit. Bei Konzentrationen von 10^6 Sporen je ml war die TNF-α Ausschüttung mit der Positivkontrolle und bekanntermaßen toxinbildenden Schimmelpilze vergleichbar. Bei Abnahme der Sporenkonzentration auf 10^3 je ml war eine Abnahme der Freisetzung zu beobachten. In den abschließenden Versuchen zeigten sich jedoch uneinheitliche Ergebnisse bei Sporenkonzentrationen von 10^2 und 10^3 je ml. Dies könnte sich darin begründen, dass die Stämme beim erneuten Animpfen bestimmte physiologische Eigenschaften verlieren, dass das Baumaterial sich während der Lagerung verändert oder die Testzellen in einem anderen physiologischen Zustand sind (siehe unten).

Die enorme Biodiversität der in den Objekten gefundenen Actinomyceten macht weitere Untersuchungen zur immunmodulatorischen Potenz dieser Organismengruppe notwendig. Diese Vielfalt konnte im Rahmen dieser Vorstudien nur ansatzweise berücksichtigt werden. Darüber hinaus müssen kombinatorische Wirkungen verschiedener Arten von Mikroorganismen intensiver untersucht werden. Unter den Schimmelpilzen wurde die geringste Freisetzung von TNF-α bei *Eurotium*-Arten beobachtet, gefolgt von *P. chrysogenum, A. versicolor* und *Chaetomium globosum.* Die stärksten Effekte traten bei *S. chartarum* und der Positivkontrolle LPS auf. Damit koinzidiert die immunmodulatorische Wirkung der Schimmelpilzarten tendenziell mit ihrem toxinogenen Potenzial. Synergistische Effekte zwischen Pilzen und Actinomyceten konnten für die im vorliegenden Projekt untersuchten Arten bisher nicht nachgewiesen werden.

Obschon weitgehend standardisiert, zeigen die Ergebnisse der *in vitro*-Testsysteme recht hohe Standardabweichungen (bis zu 25% des Mittelwertes bei LPS), wie sie in biologischen Testsystemen jedoch häufig vorkommen. Diese Varianzen können durch die Abhängigkeit vom physiologischen Zustand sowohl der Mikroorganismen als auch der Test-Zellen in den Wiederholungsversuchen erklärt werden. Die

Standardabweichungen der Positivkontrollen (LPS 15 µg/ml) deuten an, dass bereits hohe Standardabweichungen auf den physiologischen Zustand der Makrophagen zurückzuführen sind. Größere Abweichungen können auf unterschiedliche physiologische Zustände der Mikroorganismen, aus denen die Sporensuspensionen gewonnen wurden, zurückgeführt werden.

Die hier angewandten Zell-basierten Testsysteme sind noch nicht geeignet als Screening-Methode für immunmodulatorische Wirkungen herangezogen zu werden, da die Bedeutung der hier getesteten physiologischen Wirkung auf andere Immunzellen sowie deren Interaktionen noch nicht untersucht wurde und zudem viele Einflussfaktoren (Mikroorganismen, Expositionsverhältnisse, Umwelt) nicht berücksichtigt werden konnten. Die mechanistische Wirkung der hier getesteten physiologischen Reaktionen muss detaillierter aufgeklärt werden, bevor die Bedeutung des Testsystems als Indikator für eine gesundheitliche Wirkung beurteilt werden kann. Untersuchungen, um die mechanistische Wirkung von luftgetragenen Mikroorganismen (Actinomyceten, Schimmelpilzen) im Hinblick auf eine Immunmodulation aufzuklären, sind also dringend notwendig. Zudem können sie helfen aufzuklären, inwieweit eine immunmodulierende Wirkung die Voraussetzung für eine Allergieentwicklung ist.Aufgrund der jetzigen Datenlage sind keine Aussagen darüber möglich, wie die durch Actinomyceten ausgelösten immunmodulatorischen Wirkungen im Verhältnis zu den Wirkungen durch Schimmelpilze einzuordnen sind. Weitere Versuche mit relevanten Mikroorganismen aus kontaminierten Innenräumen bzw. verschiedener Gemische unterschiedlicher Arten sind notwendig, um die Wirkung von luftgetragenen Mikroorganismen und ihren Stoffwechselprodukten und Zellwandbestandteilen auf Zellsysteme der Lunge aufzuklären.

4.5.3 Diskussion - Gesundheitliche Beschwerden in den untersuchten Objekten

Die Bewohner der Wohnungen, in denen Proben entnommen wurden, litten unter folgenden ärztlich festgestellten Symptomen:

Tab. 29: Ärztlich festgestellte Symptome von Bewohnen der untersuchten Objekte

Objekt	Atem-wege	Haut-pro-bleme	Erschöp fung	Kopf-schmerzen	„Gelenk-/ Muskel-schmerzen	Übelkeit/ Durchfall	Gehäuft Infekt
01	X	X	-	-	X	X	
02	X						X
03	X						
04	X	X		X	X		X
05+06	X				X		
07	X	X		X	X		
08					X		
09	X			X	X		X
10	X	X					X
11	X						X
12	X			X	X		
14	X	X	X	X	X	X	X
15	X	X	X		X	X	X
16	X	X	X	X	X		X

Objekt 13 war ein noch nicht bezogener Neubau.

Die Beschwerden sind typisch für die im Zusammenhang mit mikrobiellen Schäden in Innenräumen häufig genannten Symptome. In allen Fällen waren die Bewohner durch einen Umweltmediziner untersucht worden, der aufgrund der Anamnese und Diagnostik eine Umweltnoxe vermutete.

Auch wenn ein Zusammenhang zwischen einem Teil der Symptome und den in den Objekten vorhandenen mikrobiellen Schäden zu befürchten ist, kann man einen kausalen Zusammenhang auch im Rahmen dieses Projektes aus mehren Gründen nicht herstellen.

Ein Grund ist, dass in fast allen Objekten mehrere Schäden gleichzeitig vorlagen, aber jeweils nur ein Schadensbereich beprobt wurde. Außerdem bedeutet eine Materialanalyse, dass nur ein Ausschnitt des Schadens untersucht wird. Vor allem im Übergangsbereich zwischen feuchten und trockenen Materialien ist aufgrund

kontinuierlich abnehmender a_w-Werte mit einer anderen Besiedlung zu rechnen als im Zentrum des Schadens.
Außerdem ist immer damit zu rechnen, dass man einzelne Mikroorganismen im Labor nicht anzüchten kann, aber vor allem auch, dass einige Mikroorganismen im feuchten Baumaterial sehr gut wachsen und deshalb dominieren, während im Labor sich evtl. andere Arten besser durchsetzen.
Solange der kausale Nachweis fehlt, kann man auch spekulieren, dass die Beschwerden evtl. gar nicht durch die mikrobiellen Schäden verursacht wurden.
Allerdings wurden die Wohnungen nicht nur auf mikrobielle Quellen untersucht, sondern auch mögliche chemische Belastungen berücksichtigt, und nur Objekte ausgewählt, bei denen diese mit relativ hoher Sicherheit ausgeschlossen werden konnten.
Die Analysen auf Zytotoxizität lassen aber vermuten, dass es nicht in erster Linie zytotoxische Stoffe sind, die die Beschwerden verursachen, denn die Beschwerden waren in den untersuchten Objekten relativ ähnlich, siehe Tabelle oben, aber es wurden nur in 5 Proben aus 4 Objekten toxische Wirkungen nachgewiesen, wobei die Wirkung in nur drei Proben aus zwei Objekten als deutlich zu bezeichnen ist.

4.6 Zusammenfassung

Diversität:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Baumaterialien nach Feuchteschäden ein diverses Spektum unterschiedlicher Actinomyceten in hohen Konzentrationen (von 1,8 x10^4-7,6 x10^7 KBE/g) enthalten können.

Vertreter der Gattungen *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora und Promicromonospora* wurden in den untersuchten Proben am häufigsten detektiert, wobei Vertreter der Gattung *Streptomyces* mit Abstand am zahlreichsten nachgewiesen werden konnten. Da diese Gattungen in den meisten Proben detektierbar waren, ist zu vermuten, dass das Auftreten dieser Gattungen allgemein als typisch für feuchtegeschädigte Materialien aus Innenräumen angenommen werden kann. In einer Probe (Lehmputz) konnte allerdings keine der oben genannten Gattungen nachgewiesen werden und nicht in allen Proben wurden alle Gattungen nachgewiesen..

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen keine eindeutigen Übereinstimmungen im Gattungs-/Artenspektrum in Bezug auf die unterschiedlichen Materialien, obwohl ein derartiger Zusammenhang aufgrund materialabhängiger Parameter wie Nährstoffzusammensetzung, Feuchtigkeit, pH-Wert, Mikrogefüge, Oberflächenstruktur sowie die relative Luftfeuchtigkeit und die Temperatur der Umgebung immer wieder in ähnlichen Untersuchungen hergestellt wird.

Die Probenanzahl der vorliegenden Untersuchung ist zu gering, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialien feststellen bzw. ausschließen zu können. Es ist auch möglich, dass „Ausreißer“ innerhalb des Probenkollektivs mögliche Unterschiede überdeckt haben.

Methoden:

Mit molekularbiologischen Untersuchungsmethoden war eine größere Diversität der Actinomyceten detektierbar als mit kultivierungsabhängigen Methoden. Daher sollten, um die Diversität der Actinomyceten in feuchtegeschädigten Materialien möglichst vollständig zu erfassen, kultivierungsabhängige und kultivierungsunabhängige Methoden parallel Anwendung finden.

Bei den kultivierungsabhängigen Methoden zeigte sich, dass im Vergleich zur morphologischen und chemotaxonomischen Identifizierung Untersuchungen der 16S rRNA-Gensequenz eine schnelle Zuordnung gewonnener Isolate auf Gattungs- bzw. Gruppenebene ermöglichen. Für eine Artzuordnung unbekannter Isolate sind jedoch zusätzliche morphologische und chemotaxonomische, z.T. auch weitere umfassende Untersuchungen (einschl. DNA-DNA Hybridisierungen) notwendig.

Um eine effiziente Bearbeitung mit kultivierungsabhängigen Methoden zu gewährleisten, ist eine umfassende Erfahrung bezüglich der Morphologie dieser Organismengruppe notwendig. Hierzu müssen die typischen Kolonieformen häufig auftretender Arten auf den verschiedenen Isolationsmedien studiert werden. Erst dadurch ist es möglich, die unterschiedlichen Typen einer Probe bereits auf den Primärplatten zu gruppieren und Referenzisolate für einen bestimmten Typ in Kultur zu nehmen.

Zur Isolierung der Actinomyceten aus Materialproben mittels Kultivierung ist der Zusatz eines Hemmstoffs zur Unterdrückung des Schimmelpilzwachstums erforderlich. Vergleichende Untersuchungen von Cycloheximid und Natamycin in unterschiedlichen Konzentrationen haben ergeben, dass mit einem Zusatz von 0,1 g/l Natamycin die beste Hemmung der Schimmelpilze erzielt wird.

Da bei der Kultivierung der verschiedenen Actinomyceten deren unterschiedliche Wachstumsbedingungen zu berücksichtigen sind, ist es nicht möglich, die Isolierung der Actinomyceten mit einem „Universalmedium“ durchzuführen. Als Isolierungsmedien für die Actinomyceten ist Casein-Mineralagar (CMA), Brain-Heart-Infusion-Agar (BHI), Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO) und Mineralagar nach Gauze geeignet.

Die Ausprägung der koloniemorphologischen Merkmale der Actinomyceten ist auf den verschiedenen Nährmedien sehr unterschiedlich. Als Identifizierungsmedien für luftmyzelbildende Actinomyceten sind ISP2- und ISP3-Agar geeignet, für Actinomyceten, die kein Luftmyzel bilden, werden BHI-Agar und Medium 79 empfohlen.

Zur Beschreibung der verschiedenen morphologischen Merkmale eines Isolates haben sich die Koloniefarbe, -form, -konsistenz, Zellform usw. bewährt, die in einem Auswertungsformular zusammengefasst sind.

Allein anhand koloniemorphologischer Merkmale lassen sich die Actinomyceten nicht identifizieren. Chemotaxonomische Bestimmungen können jedoch unterstützend zur Identifizierung der Actinomyceten eingesetzt werden. Da der Aufwand für diese Methoden mit Ausnahme der Diaminosäure in der Zellwand (DAP-Bestimmung) für Normallabore sehr hoch ist, empfiehlt es sich, zur Zuordnung der Actinomyceten bis auf Gattungsebene molekularbiologische Methoden (hier die Sequenzierung des 16S rRNA Gens) einzusetzen.

Die Ergebnisse des Projektes zeigen, dass selbst die Zuordnung der Actinomyceten zu einer Gattung den meisten Laboren in der Routine nicht möglich ist. Ohne die Molekularbiologie (hier: Sequenzierung und Analyse der 16S rRNA Gene) und/oder Nutzung sehr spezifischer chemotaxonomischer Verfahren ist eine solche Zuordnung nicht möglich. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es daher nicht möglich, eine allgemein anwendbare Routinemethode zur Bestimmung der Actinomyceten zu etablieren.

Da es für gewisse Fragestellungen in der Innenraumdiagnostik wichtig ist, Angaben darüber zu machen, ob bei einem Feuchteschaden ein Actinomycetenbefall vorliegt, wird für die Routine vorgeschlagen, die myzelbildenden Actinomyceten auf Mineralagar nach Gauze zu isolieren, das erhaltene Ergebnis als KBE myzelbildenden Actinomyceten anzugeben und bei der Interpretation darauf hinzuweisen, dass mit dieser Untersuchung nur ein Teil der Actinomyceten (insbesondere die Gattungen *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Nocardiopsis*, *Nocardia* und *Pseudonocardia*) erfasst wird und eine gesundheitliche Interpretation des Ergebnisses nicht möglich ist.

Toxizitätstests:

Actinomyceten und insbesondere Isolate der Gattung *Streptomyces* können zytotoxische Eigenschaften haben. Durch die exemplarisch durchgeführten Untersuchungen konnten erste Effekte an Zellkulturen gezeigt werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Relevanz solcher Effekte in der Praxis zu erforschen.

Sporensuspensionen bestimmter Actinomyceten und Schimmelpilze riefen bei in-viro-Versuchen proinflammatorische Reaktionen bei Makrophagen hervor (TNF-α Freisetzung, Immunmodulation). Die hier durchgeführten Screening-Untersuchungen zeigen, dass verschiedene Arten von Mikroorganismen unterschiedlich starke

immunmodulatorische Wirkungen (TNF-α Freisetzung) haben, die schon bei niedrigen Konzentrationen von 10^3 bis 10^4 Sporen je ml Testansatz nachweisbar sind. Die Ausschüttung von TNF-α ist zudem abhängig von der Sporenkonzentration.

Da verschiedene Arten von Actinomyceten und Schimmelpilzen eine unterschiedlich starke Immunmodulation bei Makrophagen hervorrufen können, scheinen auch verschiedene mikrobielle Konsortien auf Baumaterialien eine unterschiedliche gesundheitliche Bedeutung zu haben.

Da verschiedene Arten von Immunzellen an den Prozessen der Infekt- bzw. Allergenabwehr beteiligt sind, können die hier erzielten Ergebnisse noch keine mechanistische Erklärung liefern, sondern stellen einen ersten Schritt in der Aufklärung der physiologischen Zusammenhänge dar. Die durchgeführten Versuche sind daher nicht geeignet, schon als Indikator für gesundheitliche Wirkungen eingesetzt zu werden.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine Aussage darüber zu, wie die gesundheitliche Wirkung der Actinomyceten im Verhältnis zu den Schimmelpilzen zu beurteilen ist. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf. Dabei sollten unterschiedlicher Zellkulturen zum Einsatz kommen, um eine breite Palette von Wirkungen zu erfassen. Außerdem sollten synergistische Wirkungen zwischen unterschiedlichen Mikroorganismen erfasst werden. Erfahrungen von Arbeitsgruppen anderer Fachdiziplinen mit in-vitro-Modellen hinsichtlich chemischer Substanzen können hierbei wichtige Hilfestellungen geben..

4.6 Summary

Diversity

The results of the study show, that the different damp building materials contain different and diverse actinomycete communities in high concentrations (range 1,8 $x10^4$-7,6 $x10^7$ CFU/g).

Streptomyces, *Amycolatopsis*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora und Promicromonospora* were the most commonly detected genera, with representatives of the genus *Streptomyces* beeing most abundant. Because these genera were found in most samples, it can be assumed, that they are typical for humidity damaged materials in indoor environments. Nevertheless, in one sample (loam rendering) none of the above mentioned genera was detected and not all genera were present in all samples.

The results of this study show no clear correlation between the genus/species composition and the type of damp building material, although such a differentiation in regard to nutrient composition, humidity, pH-value, micro- and surface structures of the materials in addition to the air humidity and the temperature is reported in the literature.

The number of samples studied is too small to allow for general and statistically significant conclusions with regard to the different materials. Furthermore, unusual results found for one material sample may have masked a possible material effect.

Methods:

A higher diversity of actinomycetes was found with molecular methods compared to culture based methods. For this reason the application of both, cultivation-dependent and cultivation-independent methods for the study of the diversity of actinomycetes in humidity damaged materials is highly recommended.

The analyses of the 16S rRNA gene sequences of the isolates in the course of the cultivation-based approach allowed a more rapid and precise allocation at the genus or group level, than a morphological and/or chemotaxonomic characterization. For

species identification, however, a morphological, biochemical and chemotaxonomic characterization and (in most cases) further studies (including DNA-DNA hybridizations) are necessary.

A comprehensive experience with the different colony types of actinomycetes is indispensable for successfully detect actinomycetes with the cultivation approach.. For this purpose, the different colony types of the most frequently found actinomycetes must be studied on different cultivation media. This knowledge is a prerequisite for a first grouping and selection of reference types of the different actinomycete colonies for further studies.

For the isolation of actinomycetes from damp building material samples, the supplementation of the cultivation media with an inhibiting agent for moulds is necessary. Comparative studies on the suitability of cycloheximide and natamycin in different concentrations led to the result, that the supplementation of 0.1 g/l natamycin is most suitable for growth inhibition of molds.

Different actinomycetes have different growth requirements. For this reason it is not possible to isolate all representatives of this diverse group on one single isolation medium. In this study, the casein-mineral-agar (CMA), brain-heart-infusion-agar (BHI), Tryptone soy-Agar (TSA = CASO) and the mineral agar according to Gauze were found to be suitable to cover a broad range of different actinomycetes.

The appearance of different colony types and the morphological characteristics of actinomycetes may be quite different on the different agar media. For the detailed study of actinomycetes, which are able to form aerial mycelia and hyphae, the ISP2- and ISP3-agars are suitable, whereas actinomycetes, which do not form aerial mycelia, should be studied on BHI-Agar and medium 79.

Color, form, and appearance of the colony as well as microscopic characteristics are important for an initial characterization of an isolate and should preferentially be recorded in a standardized form.

However, identification of actinomycetes is not possible on the basis of morphological characteristics alone.. Chemotaxonomic studies can be very helpful for further characterization, but with the exception of the analysis of the diaminoacid DAP in the

cell wall, these methods are time-consuming and require specific experience normally not available in routine laboratories. For this reason, molecular characterization (sequence analysis of the 16S rRNA gene) is recommended for allocation of an unknown isolate at the genus- or genus group level.

The results of the project show, that even the genus identification of actinomycetes will not be possible in most routine laboratories. Without molecular methods (16S rRNA gene sequence) and the use of special chemotaxonomic methods, identification is a very difficult task. No standardized, simple routine method can, therefore, be recommended for the detection and identification of actinomycetes.

Nevertheless, the evaluation of the presence of actinomycetes in damp building materials is an important question when dealing with indoor hygiene and a method suitable for routine analysis is urgently needed. As a more simple approach it is, therefore, suggested to restrict the detection of actinomycetes to those actinomycetes growing with clearly visible mycelia on the Gauze mineral agar. The result of this investigation should be recorded as “cfu mycelium-forming actinomycetes” and it should be noted in the report that this parameter does only include a certain part of the actinomycetes (mainly the genera *Steptomyces, Amycolatopsis*, *Nocardiopsis*, *Nocardia* und *Pseudonocardia*). It should also be made clear that no health risk evaluations can be derived from these data.

Toxicity tests:

Actinomycetes - and isolates of the genus *Streptomyces* in particular - can provoke cytotoxic effects. Cytotoxic effects have been found for some actinomycetes and damp building materials in the few and preliminary investigations with cell cultures in this project. More detailed investigations are necessary to clearly show the relevance of these results.

Spore suspensions of some actinomycetes and moulds can provoke proinflammatory reactions on macrophages (release of TNF-α, immunomodulation effects). The preliminary screening-investigations in this study showed, that different species of microorganisms had different immunomodulation effects (TNF-α release), which

were in some cases even detectable at a low spore concentrations (10^3 to 10^4 spores per ml). The release of the TNF-α was correlated with the spore concentration.

Because different species of actinomycetes and moulds showed different immunomodulation effects on macrophages, it is reasonable to assume that different microbial communities in damp building materials may have different health effects. The immune system involves the action of many different cell types. The preliminary results obtained in this study with specific cells are, therefore, not yet suitable for interpretation of causal relationships or effects on human health.

From the preliminary results obtained on the toxic and immunomodulating effects of actinomycetes, a comparison with corresponding effects of fungi is not possible. Further research is warranted including a broad spectrum of cell lines and synergistic effects between different microorganisms. Experience from in vitro experiments using chemical substances may be beneficial in the planning of further experiments.

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Bestimmung des IC_{50}-Wertes, d.h. der Konzentration der Probe, die in Relation zur Kontrolle eine 50%-ige Reduktion der MTT-Spaltungsaktivität bewirkt 63
Abb. 2: Konzentration der Actinomyceten in den Proben 5 bis 16 in logarithmischer Auftragung 73
Abb. 3: Anteile der insgesamt häufigen Actinomyceten-Gattungen in 16 Proben. 78
Abb. 4: Kummulativ aufsummierte Anzahl der erfassten Gattungen in den untersuchten Wandputzproben. 80
Abb. 5: Kummulativ aufsummierte Anzahl der erfassten Gattungen in den Wandputzproben, die einen Anteil von über 20% in den Putzproben erreichten. 80
Abb. 6: Referenzisolate der Gattungen *Amycolatopsis, Nocardia, Nocardioides, Nocardiopsis, Promicromonospora* sowie *Pseudonocardia* auf den unterschiedlichen Nährmedien Hafermehl-Agar, Gauze-Agar, CASO-Agar, Actinomyceten-Agar und CM-Agar 86
Abb. 7: Referenzisolate der Gattung *Saccharopolyspora* sowie verschiedener Vertreter der Gattung *Streptomyces* auf den unterschiedlichen Nährmedien Hafermehl-Agar, Gauze-Agar, CASO-Agar, Actinomyceten-Agar und CM-Agar 86
Abb. 8: Koloniemorphologie der Referenzisolate aus dem Cluster *Amycolatopsis orientalis* bzw. *A. regifaucium* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 90
Abb. 9: Koloniemorphologie der Referenzisolate aus dem Cluster *Amycolatopsis palatopharyngis* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 90
Abb. 10: Koloniemorphologie der Referenzisolate 01-Gi-030 und 07-Be-008 auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 91
Abb. 11: Luftmyzel von *Amycolatopsis* mit Sporenketten 91
Abb. 12: Koloniemorphologien von 14 Tage alten Kolonien auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 92
Abb. 13: *Micromonospora*-Kolonie (12A-Be-001) 92
Abb. 14: Myzel mit Einzelsporen 92
Abb. 15: Koloniemorphologien von 14 Tage alten N*ocardia*-Kolonien auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 94
Abb. 16: Petrischalen von 14 Tage alten *Nocardia*-Isolaten auf CASO-Agar 94
Abb. 17: *Nocardia carnea* (12A-Be-005) 95
Abb. 18: Myzel mit Sporenketten 95
Abb. 19: *Nocardioides*-Kolonie 95
Abb. 20: zerfallenes Substratmyzel 95
Abb. 21: *Nocardiopsis* sp. (09-Be-001) 96
Abb. 22: *Nocardiopsis sp*.; “Zick-Zack”-Myzel 96
Abb. 23: 21 Tage alte Referenzisolate 09-Be-005 mit Ähnlichkeiten zum Referenzstamm *N. umidischolae* und die übrigen drei Isolate (05-Be-061, 06-St-002 und 06-Be-005) mit Assoziation zum Referenzstamm *Nocardiopsis tropica* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 97
Abb. 24: 21 Tage alte Petrischalen der Referenzisolate 06-St-023 und 07-St-010 mit naher Verwandtschaft zum Referenzstamm *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* bzw. der Isolate 05-St-001 und 05-Be-009 zu *N. dassonvillei* subsp. *albirubida* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 97
Abb. 25: 21 Tage alte Referenzisolate mit naher Verwandtschaft zu dem Referenzstamm *Nocardiopsis synnemataformans* auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 98
Abb. 26: *Promicromonospora sp*. (12B-Be-004); Substratmyzel 99
Abb. 27: *Promicromonospora sp.* 99
Abb. 28: Kleine Kulturen von *Pseudonocardia sp.* mit Begleitflora 100
Abb. 29: Verdickte Zellen (Sporen) im Substratmyzel 100

Abb. 30: Kolonien (von der Oberseite aufgenommen) von 16 Referenzisolaten der Gattung *Pseudonocardia* 101
Abb. 31: Kolonien (von unten aufgenommen) von 16 Referenzisolaten der Gattung *Pseudonocardia* 102
Abb. 32: Details der Kolonieoberseiten von 16 Referenzisolaten der Gattung *Pseudonocardia* 103
Abb. 33: Abbildung des Luftmyzelien von 16 Referenzisolaten der Gattung *Pseudonocardia* 104
Abb. 34: Sporen im Luftmyzel von Referenzisolat 13A-St-013 105
Abb. 35: Auffällige Sporen bzw. Sporenketten im Luftmyzel von Referenzisolat 02-Je-014 105
Abb 36: 14 Tage alte Referenzisolate 06-St-012 und 12A-Be-006 sowie 02-Je-011 und 02-Gi-003 auf CASO-, M79- und Gauze-Agar 106
Abb. 37:*Saccharopolyspora sp*. mit Luftmyzelbildung (06-St-012) 107
Abb. 38: Sporenkette von *Saccharopolyspora sp* 107
Abb. 39: Kolonie eines Streptomyceten (09-Be-010) 108
Abb. 40: Sporenketten eines Streptomyceten 108
Abb. 41: Streptomyces sp. mit ungewöhnlich begrenztem Wachstum und wenig Luftmyzel, (morphologische Ähnlichkeit zu *Pseudonocardia*-Isolaten) 108
Abb. 42: *Streptomyces sp.* mit viel Luftmyzel, (morphologische Ähnlichkeit zu *Nocardiopsis*-Isolaten) 109
Abb. 43: Streptomycet ohne Luftmycel (03-St-001-Luft) 109
Abb. 44 Darstellung der kummulativ aufsummierten Anzahl, der mittels Klonierung erfassten Gattungen in den untersuchten Materialprobenproben 122
Abb. 45: SSCP-PA-Gelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der aus den abgeschwemmten Nährmedienplatten generierten SSCP-PCR-Produkte. 124
Abb. 46: SSCP-PA-Gelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der aus Baumaterialienproben generierten SSCP-PCR-Produkte 125
Abb: 47: Graphische Darstellung (Dendogramm) des Bandenmustervergleiches (Clusteranalyse, Gel Compare II) eines normalisierten SSCP-PA-Gels der Materialproben unter Verwendung von Actinomyceten-spezifischen-Primern 126
Abb. 48: Dendogramm der Clusteranalyse der gemessenen Parameter (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, pH-Wert) der verschiedenen Baumaterialienproben (ohne Probe 16) 127
Abb. 49: IL-6 Freisetzung aus Bronchialepithelzellen nach Exposition mit Sporensuspensionen verschiedener Pilzarten. 133
Abb. 50: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit Sporensuspensionen verschiedener Pilzarten. 134
Abb. 51: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit Sporensuspensionen von Actinomyceten und Schimmelpilzen. 135
Abb. 52: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit biogenen Noxen aus dem Objekt 4. 136
Abb. 53: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit biogenen Noxen aus dem Objekt 6. 137
Abb. 54: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit biogenen Noxen aus dem Objekt 7. 138
Abb. 55: TNF-α Freisetzung bei Makrophagen nach Exposition mit biogenen Noxen aus dem Objekt 12. 138

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Definition der Parameterkombination 21
Tab. 2: Charakterisierung der Objekte 22
Tab. 3: Zusammensetzung der Reaktionsansätze (Mastermix) für die verschiedenen Primersysteme und deren Endkonzentration im Ansatz 45
Tab. 4: Tab. 4: Zusammenstellung der Eigenschaften der verwendeten Primer für die PCR, PH = Phosphatrest am 5´-Ende für SSCP 47
Tab. 5: Temperaturprogramm: Thermocycler Biometra, Biorad 47
Tab. 6: Für die PCR verwendete Referenzstämme 49
Tab. 7: Polyarcylamid - Gelmatrize 52
Tab. 8: Parameter und Zeit der elektrophoretischen Bedingungen in Abhängigkeit von den zu trennenden PCR-Produkten 53
Tab. 9: Koloniebildende Einheiten (KBE/g Material) der nachgewiesenen Schimmelpilzarten in den Baumaterialien (Proben 1 bis 16). 68
Tab. 10: Gattungszuordung der gewonnenen Isolate aus Material- und Bioaerosolproben anhand der Vollsequenzen des 16S rRNA-Gens 70
Tab. 11: Anzahl der Referenzisolate einer Gattung und deren Zuordnung in die Dominanzklassen 1-3 75
Tab. 12 Gesamtkonzentrationen in KBE/g der 24 Untersuchungen als Summe der 284 Referenzisolate 77
Tab. 13: Anteile der häufigsten Gattungen an der Gesamtkonzentration einer Probe [%] 77
Tab. 14: Vergleich der Anzahl und Konzentration [KBE/g] von Isolaten auf verschiedenen Isolationsmedien bzw. bei verschiedenen Isolationstemperaturen 84
Tab. 15: Vergleich der Anzahl und Konzentration [KBE/g] von Isolaten auf verschiedenen Isolationsmedien bzw. bei verschiedenen Isolationstemperaturen 84
Tab. 16: Vergleich der Anzahl und Konzentration [KBE/g] von Isolaten auf verschiedenen Isolationsmedien bzw. bei verschiedenen Isolationstemperaturen 84
Tab. 17: Darstellung der detektierten Gattungen in Material- und Luftproben, sowie der übereinstimmenden Detektion 111
Tab. 18: Chemotaxonomische Merkmale der Isolate mit LL-DAP in der Zellwand 116
Tab. 19: Chemotaxonomische Merkmale der Isolate mit meso-DAP in der Zellwand 118
Tab. 20: Chemotaxonomische Merkmale der Isolate ohne DAP in der Zellwand 120
Tab. 21: Zuordnung der Klonsequenzen (ca. 400 bp des 16S rRNA-Genes) zu den verschiedenen Gattungen innerhalb der Klasse der *Actinobacteria* 123
Tab. 22: Referenzkonzentrationen von mikrobiell unbelasteten Materialien 128
Tab. 23: Ergebnisse der Zytotoxizitätsanalysen mit den Materialproben 1-16 128
Tab. 24: Ergebnisse der Zytotoxizitätsanalysen mit den 27 Reinkulturen 130
Tab. 25: Chemotaxonomische Gattungsmerkmale der identifizierten Isolate 157
Tab. 26: Gegenüberstellung der mittels kultivierungsabhängiger und kultivierungsunabhängiger Analyseverfahren detektierten Gattungen, sowie die ermittelten Übereinstimmungen bei den untersuchten Proben 159
Tab. 27 Taxonomische Zuordnung der Referenzisolate mit zytotoxischer Wirkung 163
Tab. 28 Ergebnisse der zytotoxischen Untersuchungen von Mehrer *et al*., 2003 163
Tab. 29 Ärztlich festgestellte Symptome von Bewohnen der untersuchten Objekte 166

Literatur:

Albrecht, A., Kämpfer, P. (2000): Wachstum und koloniemorphologisches Erscheinungsbild thermotoleranter und thermophiler Aktinomyceten, Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft. 60: 139-145

Altenburger, P., Kämpfer, P., Akimov, V. N., Lubitz, W., und Busse, H.-J. (1997): Polyamine distribution in actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium, Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. Int J Syst Bacteriol 47:270-277.

Altenburger, P., Kämpfer, P., Makristathis, A., A., Lubitz, W.& Busse, H.-J. (1996): Classification of bacteria isolated from a medievial wall painting. J Biotechnol 47: 39-52

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., Nikulin, M., Köljalg, U., et al. (1997): Bacteria, Molds, and Toxins in Water Damaged Building Materials, Appl Environ Microbiol 63: 387-393

Andersson, M.A., Tsitko, I., Vuorio, R., Salkinoja-Salonen, M.S. (2001): Mycobacteria and related genera are major colonizers of a wall in a children´s day care center. Bioaerososols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control, E. Johanning (Ed.)

Andersson, M.A., Weiss, N., Rainey F., Salkinoja-Salonen, M.S. (1999): Dust borne bacteria in animal sheds, schools and children´s day care centres. J Appl Microbiol 86: 622-634

Busse, H.J., Denner, E.B.M., Lubitz, W. (1996): Classification and identification of bacteria : current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J Bacteriol 47: 3-38.

Chakrabarty A. M., Brown, J. F. (1978): Microbial Genetic Engineering by Natural Plasmid Transfer. In: Genetic Engineering (A.M. Chakrabarty, ed.). CRC Press, Inc., West Palm Beach, Fl., pp. 185-193,

Chun, J, Blackall, L.L., Kang, S.O., Hah, Y.C., Goodfellow, M. (1997): A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformes* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol 47: 127-131

Collins, M. D., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. (1977): Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. J Gen Microbiol 110: 127-136

Collins, M. D.; Goodfellow, M.; Minnikin, D. E. (1982): A survey of the structure of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. J. Gen. Microbiol.128: 129-149

Cross, T. (1989): Growth and examination of actinomycetes-some guidelines. In: Williams S.T., Shape M.E., and Holt J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore.

Danneberg, G., Driesel, A. (1999): Mikroorganismen in der Arbeitsplatzatmosphäre - Aktinomyceten; 2. erweiterte Auflage, KAN-Bericht 13

DIN ISO 16000-17 Entwurf (2007): Innenraumluftverunreinigungen - Teil 17: Nachweis und Auszählung von Schimmelpilzen - Kultivierungsverfahren

El-Nakeeb, M.A., Lechevalier, H.A. (1963): Selective isolation of aerobic *Actinomycetes*, Appl Microbiol 11: 75-77

Ensign, J.C. (1992): Introduction to the Actinomycetes. In: The Prokaryotes. 2nd edition, Eds. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Hardeer, W., Schleifer, K.-H., Vol II. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg. pp 811-815.

Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. Jurtshuk, P. JR. (1992): How close is close: 16S rRNA Sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity, Int J Syst Bacteriol 42: 166-170

Friedrich, M. (1991): Zur Leistungsfähigkeit des MTT-Testes zum Nachweis von Mykotoxinen in unterschiedlichen Probenmaterialien. Diss. Vet. Med. Ludwig-Maximilians-Unversität München

Fritsche W. (1998): Umweltmikrobiologie-Grundlagen und Anwendungen. Gustav Fischer Verlag, Jena, S.58

Gareis, M. (2006): Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1: 354-363.

Gareis, M., Johanning, E., Dietrich R. (1999): Mycotoxin Cytotoxicity Screening of Field Samples. In: Johanning, E. (ed.) Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control. Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany, NY, USA, Proceedings, 202-213

Gauze, G.F., Preobrazhenskaya, T. P., Sveshnikova, M. A., Terekova, L. P. & Maksimova, T., S. (1983): Opredelitel`Aktinomycetov. Rody *Streptomyces, Streptoverticillium, Chainia*. Moscow: Izd. Nauka (in Russian)

Goodfellow, M. (1989): Suprageneric classification of the *actinomycetes*, In: Williams, S.T., Shape, M.E. and Holt J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore. p.2333-2339.

Grigorevski-Lima, A.L., Silva-Filho, R.G., Linhares, L.F., Coelho, R.R.R. (2006): Occurence of *actinomycetes* in indoor air in Rio de Janeiro, Brazil. Building and Environment 41: 1540-1543

Groth, I., Geok Yuan, A.T., González, J.M., Laiz, L., Carlsohn, M.R., Schütze, B., Wink, J. and Goodfellow, M. (2007): *Amycolatopsis nigrescens* sp. nov., an actinomycete isolated from a Roman catacomb. Int J Syst Evol Microbiol 57: 513-519

Gvozdiak, O. R., Schumann, P., Griepenburg, U., Auling, G. (1998): Polyamine profiles of Gram-positive catalase positive cocci. Syst Appl Microbiol 21: 279-284

Hanelt, M., Gareis, M., and Kollarczik, B. (1995): Cytotoxicity evaluation of Mycotoxins evaluated by the MTT cell culture assay. Mycopathologia 128: 167-174

Hasegawa, T., Takizawa, M., Tanida, S. (1983): A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. J Gen Appl Microbiol 29: 319-322

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 (2): 105-114

http://www.bacterio.cict.fr/index.html

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, Vol. 111, 1: 85-92

Huttunen, K., Jussila, J., Hirvonen, M.-R., Iivanainen, E., Katila, M.-L. (2001): Comparison of *mycobacteria* induced cytotoxity and inflammatory responsein 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. International Biodeterioration &Biodegradation 49: 27-37.

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany

Jäckel, U., Kämpfer, P. (2003): Mikrobiologie der Kompostierung. Müll-Handbuch. Erich-Schmidt-Verlag 5: 1-24

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

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

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 Pharmakol 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

Kagen, S.L., Fink, J.N., Schlueter, D.P., Kurup, V.P., Fruchtman, R.B. (1981): *Streptomyces albus*: a new cause of hypersensitivity pneumonitis. J Allergy Clin Immunol 68: 295-299.

Kämpfer, P., und Kroppenstedt R. (1996):. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. Can J Microbiol 42: 989-1005

Kämpfer, P. (2006): The family *Streptomycetacea*. In: The Prokaryotes. 3nd edition, Eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Vol III. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg. pp 538-604

Korn-Wendisch, F. und Kutzner, H.J. (1992): The family *Streptomycetaceae*. In: The Prokaryotes. 2nd edition, Eds.: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Hardeer, W., Schleifer, K.-H., Vol II. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg. pp 921-995.

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

Kroppenstedt, R. M. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of *actinomycetes* and related organisms. In Chemical Methods in Bacterial Systematics. ed by Goodfellow, M. & Minnikin, D.E.. NewYork: Academic Press, pp 173-199

Kuhn, R. und D. Jerchel (1941): Über Invertseifen. VII Mitteil.: Tetrazoliumsalze. Ber Dtsch Chem Ges 3: 941-948

Kutzner, H. J, Kempf, A. (1996): Vorkommen von Actinomyceten in der Luft von Abfallbehandlungsanlagen.Schriftreihe WAR 92, 50. Darmstädter Seminar: Abfalltechnik, Hygiene in der Abfallwirtschaft, Hrsg.: Verein zur Förderung des Instituts WAR, 13-54

Lacey, J. and Crook, B. (1988): Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. Ann Occup Hyg 32 (4): 515-533

Lane, D.J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow, Editors, Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, pp 115–148

Langseth, W., Bernhoft A., Rundberget, T., Brekke, T., Kosiak, B., Gareis, M. (1999): Cytotoxicity and mycotoxin production of *Fusarium*-strains isolated from Norwegian grain. Mycopathol 144: 103-113

Langseth, W., Kosiak, B., Clasen, P.-E., Torp, M., Gareis, M. (1997): Toxicity and occurrence of *Fusarium species* and mycotoxins in late harvested and overwintered grain from Norway, 1993. Phytopathol 145: 409-426

Lechevalier, M.P. & Lechevalier, H.A. (1970): Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int J Syst Bacteriol 20: 435443

Lechevalier, H.A. (1989): A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: Williams, S.T. Shape, M.E.and Holt J.G. (ed.), Bergey’s manual of systematic bacteriology, vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore.

Lechevallier, M.P., de Bievre, C., and Lechevalier, H.A. (1977): Chemotaxonomy of aerobic Actinomycetes: Phospholipid composition. Biochem Syst Ecol 5: 249-260

Lorenz W., Trautmann C., Dill I. (2003a): Nachweis und Bedeutung von Actinomyceten und sonstigen Bakterien in Innenräumen. Handbuch für Bioklima (Hrsg. Moriske, Turowski), Kap. III-4.4.14 ecomed Verlag, Landsberg am Lech, 10. Erg. Lfg, 12.

Lorenz, W., Kroppenstedt, R.M, Trautmann, C., Stackebrandt, E., Dill, I. (2003b): Actinomycetes In Building Materials. International Conference Healthy Buildings, Singapore

Lorenz, W., Trautmann, C., Kroppenstedt, R.M., Sigrist, G., Stackebrandt, E, Gareis, M., Dill, I., Virnich, L. (2002): Actinomycetes in mouldy houses, the causative agent of rheumatoid symptoms? Proceedings of the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate - Indoor Air 02, Monterey: Indoor Air

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, pp. 49±65. Edited by Boone, D. R., Castenholz R. W. & Garrity G. M., New York: Springer.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2001): Brock Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Mc Neil, M.M. and Brown, J.M. (1994): The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. Clin Microbiol 7 (3): 357-417

Mehrer, A., Lorenz, W., Gareis, M., Trautmann C., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. (2003): Cytotoxicity Of Different Actinomycetes Isolated From Building Materials. Conference Saratoga Springs

Mehrer, A., Lorenz, W., Gareis, M., Trautmann, C., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. (2005): Cytotoxicity of different actinomycetes isolated from building materials. In: Johanning, E. (ed.) Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins and

Human Health: Patho-physiology, clinical effects, exposure assessment, prevention and control in indoor environment and work. Fungal Res. Group Foundation, Inc., Alabany, New York, USA, 60-65

Minder, S., und Nicod, L.P. (2005): Exogen allergische Alveolitis (Hypersensitivitätspneumonitis). Schweiz Med Forum 5: 567-574

Minnikin, D. E., Alshamaony, L. & Goodfellow, M. (1975): Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. J Gen Microbiol 88: 200-204

Minnikin, D. E., Collins, M. D. and Goodfellow, M. (1979): Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas, Oerskovia* and related taxa. J Appl Bacteriol 47:87-95

More, M. I., Herrick, J. B., Silva, M. C., Ghiorse, W. C., Madsen E. L. (1994): Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. Appl Environ Microbiol 60: 1572-1580

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. 65: 55-63

Mülhardt, C.(2002): Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin

Müller, H-J. (2001): PCR Polymerase-Kettenreaktion, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin

Ostenfeld Larsen, T., Gareis, M., Frisvad, J.C. (2003): Cell Cytotoxicity and Mycotoxin and Secondary Metabolite Production by Common Penicillia on Cheese Agar. J. Agric. Food Chem 50: 6148-6152

Parker, R.J., Taylor, J. (1985): Characterization of microbial populations in polluted marine sediments, J Appl Bact, Symp Suppl 59, 155-173

Peltola, J. (2001a): Microbial growth in building materials and toxigenic microbes in indioor environment, Dissertation Universität Helsinki

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 *Nocardiopsis* Strains from Indoor Environments and Description of two new *Nocardiopsis* Species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischolae* sp. nov. Appl Environ Microbiol 67: 4293-4304

Prauser, H. & Falta, R. (1968): Phagensensibilität, Zellwand-Zusammensetzung und Taxonomie von Actinomyceten. Z Allg Mikrobiol 8: 39-46

Puder, C. (1998): Neue Streptazoline und Rubiginone aus Streptomyceten durch Variation der Kultivierungsbedingungen sowie Untersuchungen zur Struktur und Biosynthese der Rubromycine. Dissertation Universität Göttingen

Qu. L., Li, X., Wu, G., Yang, N. (2005): Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. Electrophoresis 26: 99-101

Reubel, G.H., Gareis, M., Amselgruber, W.M. (1987): Cytotoxicity Evaluation of Mycotoxins by a MTT-Bioassay. Mycotoxin Research 3: 85-96

Reubel, G.H., Gareis, M., Amselgruber, W.M. (1989): Effects of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on the mitochondrial methylthiazoltetrazolium-cleavage of monolayer cells. Toxic. In vitro 3: 311-316

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.

Rintala, H., Nevalainen, A., Suutari, M. (2002): Diversity of *streptomyces* in water damaged building materials based on 16S rDNA sequences. Appl Microbiol 34: 439-443

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

Ruotslainen, M., Hirvonen, M.R., Hyvaerinen, A., Meklin,T., Savolainen, K., Nevalainen, A. (1998): Cytoxicity, production of reactive oxygen species and cytokines induced by different strains of *Stachybotrys sp*. from moldy buildings in RAW.264.7 macrophages. Environ Toxicol Paharmacol 6 (3):193-199

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 74: 5463-5467

Schaal K.P. (1991): Medical and microbiological problems arising from airborne infection in hospitals. J Hosp Infect 18: 451-459

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

Schleifer, K. H., Kandler, O. (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol Rev 36: 407-477

Schwieger, F., Tebbe, Ch. C. (1998): A new approach to utilize PCR-Single-Strand-Conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based community analysis, Appl Environ Microbiol 64: 4870-4876

Shirling, E.B. & Gottlieb, D., (1966): Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol 16: 313-340

Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., Bull, A.T. (2003): New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments, Environ Microbiol 5 (10): 828-841

Stackebrandt, E., Schumann, P. (2006): Introduction to the Taxonomy of *Actinobacteria*. In: The Prokaryotes. 3nd edition, Eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Vol III. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg

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

Stackebrandt, E. und Goebel. B. M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol 44: 846-849

Suzuki, K.-I., Komagata, K. (1983): Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some coryneform bacteria. Int J Syst Bacteriol 33: 188-200

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599. (Publication PDF at http://www.kumarlab.net/publications)

Takahashi Y., Iwai, Y., Omura, S. (1983): Relationship between cell morphology and the types of diaminopimelic acid in *Kitasatosporia setalba*. J Gen Appl Microbiol 29: 459-465

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

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

Twarużek M., Gareis M., Dietrich R. and Grajewski J. (2002): Cytotoxicity testing and roridin A-ELISA of samples originating from water damaged dwelling pavilions on post-flood areas. Mycotoxin workshop 2002, Berlin, Germany

VDI-Richtlinie 4300 Blatt 10, Messen von Innenraumluftverunreinigungen - Messstrategie bei der Untersuchung von Schimmelpilzen im Innenraum

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

Wang, Z., Malmberg, P., Ek, A., Larsson, K., Palmberg, L., Palmberg, M.D.L. (1999): Swine dust induces cytokine secretion from human epithelial cells and alveolar macrophages. Clin Exp Immunol 115 (1): 6-12

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991): 16S ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J Bacteriol 2: 697-703

Woese, C. R. (1987): Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 52: 221-271

Anhang:

Probendatenblätter
Probendatenblatt Objekt Nr. 01 K050767 188
Probendatenblatt Objekt Nr. 02 K050680 190
Probendatenblatt Objekt Nr. 03 050156 192
Probendatenblatt Objekt Nr. 04 K051069 194
Probendatenblatt Objekt Nr. 05 und 06 060467 196
Probendatenblatt Objekt Nr. 07 K060454 200
Probendatenblatt Objekt Nr. 08 K060682 202
Probendatenblatt Objekt Nr. 09 K060888 203
Probendatenblatt Objekt Nr. 10 K061015 205
Probendatenblatt Objekt Nr. 11 K070302 207
Probendatenblatt Objekt Nr. 12 K070387 209
Probendatenblatt Objekt Nr. 13 050148 211
Probendatenblatt Objekt Nr. 14 K07/0601 213
Probendatenblatt Objekt Nr. 15 K06/1032 215
Probendatenblatt Objekt Nr. 16 217
Isolatbeschreibung 219
Rezepturen der verwendeten Nährmedien
Actinomyceten-Isolations-Agar (Fa Difco, Art. Nr. 212168) 221
Mineral-Agar (Gauze, 1983) 221
Brain Heart Infusion Agar (Difco Artikel-Nr. 609422) 221
Casein-Mineral-Agar (Altenburger et al., 1996) 222
CASO-Medium 222
Hafermehl-Agar (ISP3) (Shirling, E.B. et al. 1966) 223
Medium 79 (Prauser, H. & Falta, R. 1968) 223
Glucose-Yeast-Malt-Agar (GYM) ISP 2 (Shirling, E.B. et al. 1966) 223
Glucose-Yeast-Malt-Agar (GYM STREPTOMYCES MEDIUM DSMZ, M65) 224
Glycerin-Arginin-Agar (G/A) (El-Nakeeb et al.1963) 224
DG 18 -Agar 225
MEA 225
Tab. A 1: API-ZYM-Test 226
Phylogenetische Baumberechnung
Actinomadura 227
Agrococcus 228
Amycolatopsis 229
Arthrobacter 230
Brachybacterium 231
Brevibacterium 232
Citricoccus 233
Corynebacterium 234
Isoptericola 235
Janibacter 236
Jiangella 237
Kocuria 238
Kribella 239
Kytococcus 240
Lentzea 241
Leucobacter 242
Microbacterium 243
Micrococcus 244

Microlunatus 245
Micromonospora 246
Mycobacterium 247
Nocardia 248
Nocardioides/Propionicicella 249
Nocardiopsis 250
Oerskovia 251
Ornithinimicrobium /Arsenicicoccus 252
Prauserella 253
Promicomonospora 254
Pseudonocardia 255
Rhodococcus 256
Saccharopolyspora 257
Tsukamurella 258
Tab. A2: Vielfalt und Dominanz der aus den verschiedenen Proben isolierten Actinomyceten 259
Tab. A3: Tabellarische Zusammenstellung der identifizierungsrelevanten Ergebnisse aller in dem Forschungs- und Entwicklungsvorhaben gewonnen Isolate 265

Probendatenblatt Objekt Nr. 01 K050767

Objektbeschreibung

EF-Reihenhaus mit Wohnräumen im EG und 1.OG, vollständig unterkellert im KG Nutzräume (Lager, Waschküche), Altbau, Bj. 1900. Massivbau: Ziegelmauerwerk Feuchtigkeit dringt wegen fehlender oder mangelhafter Abdichtung im KG von außen ein. Sichtbar sind im KG Salzausblühungen vorhanden = Beleg für Feuchtigkeit von außen

Fallbeschreibung

Bewohnt von einer Person, weiblich, 35 J., wohnhaft im Gebäude seit Geburt, früher 1 Hund, jetzt keine Haustiere, Besuch des Umweltmediziners wegen Problemen der oberen und unteren Atemwege, u.a. NNH, Hautausschlag, Schmerzen in Ellenbogen, Hände, Knie, Durchfall und Übelkeit Starke Beschwerden seit mehr als 7 Jahren (seitdem krank geschrieben!!), Besserung bei Aufenthalt außerhalb des Gebäudes.

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
01 01-06/01	KG Außenwand Wandputz	30.01.06 Lo, CB	
01 01-06/02	KG LKM, 2 x 8 Nährb., 100l	16.02.06 Lo	
01 01-06/03	Filter, 14,7m³	16.02.06 Lo	

Versand an

Probe 01 01-06/01 (jeweils 40 g)			
06.02.06	LGA	06.02.06	RWTH Aachen
06.02.06	Umweltmykologie	06.02.06	HKI Jena
06.02.06	Universität Gießen	06.02.06	Prof. Gareis

Probe 01 01-06/02 jeweils 8 Nährböden		

17.02.06	LGA	17.02.06	Umweltmykologie

Probe 01 01-06/03, 1 Filter			
17.02.06	Universität Gießen		

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Materialfeuchte-Putz: 3,82% (Fugenmörtel: 12,3%) Sondenmessung: 3 cm Tiefe: 9,9 °C, 100%. Langzeitmessung auf Wand-Oberfläche (ca. 3 Monate): ca. 10 °C, 100% siehe Anlage

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
01 01-06/01	Putz	ca. 7	-

<u>Weitere Unterlagen:</u>

Protokoll Langzeit-Raumklimamessung

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 02 K050680

Objektbeschreibung

Etagenwohnung im Souterrain mit 100m², ZFH in Hanglage Bj. 1982, Massivbauweise, Außenwände im Schlafzimmer seit 2002 mit Gipskarton verkleidet und Mineralwolle gedämmt. Vermutlich hygrothermische Ursache in Dämmmaterial

Fallbeschreibung

3 Bewohner, Sohn 1,5 Jahre + Eltern (Alter nicht bekannt). 1 Hund. Seit 8 Jahren in der Wohnung Besuch des Umweltmediziners wegen Atemwegsproblemen beim Sohn (chronischer Husten), Auch Beschwerden bei der Mutter, seit 1 Jahr Bronchitis. Vater häufiger erkältet als früher

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
02 02-06/01	Schlafzimmer, Außenwand, Mineralwolle	30.01.06 Lo, CB	
02 02-06/02	Schlafzimmer, LKM, 2 x 8 Nährböden	16.02.06 Lo	
02 02-06/03	Filter, 4,85m³	16.02.06 Lo	

Versand an

02 02-06/01			
06.02.06	LGA	06.02.06	RWTH Aachen
06.02.06	Umweltmykologie	06.02.06	HKI Jena
06.02.06	Universität Gießen	06.02.06	Prof. Gareis

Probe 02 02-06/02 jeweils 8 Nährböden			
17.02.06	LGA	17.02.06	Umweltmykologie

Probe 02 02-06/03, 1 Filter			
17.02.06	Universität Gießen		

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Sondenmessung (hinter Gipskarton): 18,9 °C, 58,2 % Langzeitmessung (in Dämmung) über ca. 3 Monate (Feb-April 06): 13 - 15 °C, 40 - 60 %

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
02 02-06/03	Mineralwolle	9	-

Weitere Unterlagen:

Protokoll Langzeit-Raumklimamessung

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 03 050156

Objektbeschreibung

EFH, Wohnräume im EG, UG 120m² Wohnfläche, Hanglage Bj. 1980, Massivbauweise, Schaden im UG: Bad, Schlafzimmer, Flur, wegen Rohrschaden im Bereich des Waschbeckens (Frischwasser).

Fallbeschreibung

3 Bewohner, Tochter Mitte 20 sowie Eltern. Seit 1980 dort wohnhaft. Keine Haustiere Mutter (ca. 50 J.) besuchte Pneumologen wegen Atemwegsbeschwerden seit Anfang 2005 (Husten, Atemnot, NNH, Bronchitis, April 2005 Lungenentzündung). Diagnose: Hinweis auf exogen-allergische Alveolitis. Ehemann seit Anfang 2005 Beschwerden obere Atemwege, u.a. NNH. Tochter ohne Symptome Wegen muffigen Geruch im Bad wurde ein Feuchtigkeitsschaden entdeckt. Es wurde bei der Sanierung die Ursache beseitigt und der Fußboden im Bad komplett erneuert. Schäden in der Innenwand vom Bad zum Flur und zum Schlafzimmer wurden hierbei übersehen, wie auch im Fußboden im Schlafzimmer und Flur. Es wurden keine Maßnahmen zum Umgebungsschutz durchgeführt. Die Beschwerden nahmen während der Sanierung deutlich zu und auch nach der Sanierung. Anmerkung: Im GK Nachweis von *Stachybotrys chartarum*, sowie im EG *Stachyb. ch.* im Staub nachgewiesen (Kontamination wegen fehlendem Umgebungsschutz

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
03 04-06/01	Schlafzimmer, Luft mit Filter, 17,3m³	25.04.06 CB,AG	
03 04-06/02	Schlafzimmer, LKM, 2 x 8 Nährböden mit 100l und 2 x 8 Nährböden mit 200l	25.04.06 CB,AG	
03 04-06/03	Schlafzimmer, Fußboden an Innenwand zum Bad, Styropor	25.04.06 CB,AG	

Versand an

Probe 03-04--06/01, 1 Filter			
26.04.06	Universität Gießen		

Probe 03-04-06/02 jeweils 16 Nährböden			
26.04.06	LGA	26.04.06	Umweltmykologie

Probe 03-04-06/03 (jeweils 2,5 g)			
26.04.06	LGA	26.04.06	RWTH Aachen
26.04.06	Umweltmykologie	26.04.06	HKI Jena
26.04.06	Universität Gießen	26.04.06	Prof. Gareis

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Sondenmessung Fußboden, Dämmlage: 16,9 °C, 95,2 % Wegen unmittelbarer Sanierung war Langzeitmessung nicht möglich

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
03-04-06/03	Styropor	6,7	-

<u>Weitere Unterlagen:</u>

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 04 K051069

Objektbeschreibung

Etagenwohnung in MFH, 1.OG, Fläche: 93m² Bj. 1954, Massivbauweise, komplett unterkellert, unter Kinderzimmer Einfahrt zum Hof Schäden im Kinderzimmer: Gebäudetrennwand, Außenwand, Fußboden Ursache: vermutlich hygrothermische Effekte

Fallbeschreibung

4 Bewohner, 2 Söhne, Eltern, dort wohnhaft seit 1998, keine Haustiere Besuch des Umweltmediziners wegen Sohn 10 Jahre: obere Atemwege, gehäuft Infekte, Augen- und Hautreizungen, Kopfschmerzen, Schmerzen im Knie, Magen-Darmbeschwerden, Bruder: obere Atemwege, Hautprobleme, Vater: Gelenkschmerzen, Mutter; obere Atemwege, u.a. NNH, Schmerzen im Knie.

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
04 04-06/01	Kinderzimmer, Luft, 46,4m²	25.04.06 CB, AG	Während der Probenahme wurde das Fenster geöffnet
04 04.06/02	Kinderzimmer, LKM 2x 8 Nährböden 100l 2 x 8 Nährböden 200l	25.04.06 CB, AG	
04 04-06/03	Kinderzimmer, Fußboden, Dämmmaterial (KMF)	25.04.06 CB, AG	

Versand an

Probe 04 04-06-/01, 1 Filter			
26.04.06	Universität Gießen		

Probe 04 04-06/02, 2 x 8 Nährböden			
26.04.06	LGA	26.04.06	Umweltmykologie

Probe 04 04-06/03, (jeweils 7 g KMF)			
26.04.06	LGA	26.04.06	RWTH Aachen
26.04.06	Umweltmykologie	26.04.06	HKI Jena
26.04.06	Universität Gießen	26.04.06	Prof. Gareis

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Sondenmessung, Fußboden: 16,8 °C, 59,7 % Langzeitmessung im Bauteil nicht möglich

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
04 04-06/03	KMF	11,3	-

<u>Weitere Unterlagen :</u>

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 05 und 06 060467

Objektbeschreibung

Etagenwohnung, EG, Fläche 85m²
Bj. 1971, Massivbauweise, unterkellert.
Nachdem mikrobielle Schäden im Kinderzimmer und im Schlafzimmer sichtbar wurden, wurden die Außenwände mit Gipskarton verkleidet.
Im Fußboden im Bad gab es ehemals ein Wasserschaden.
Im Bereich des Balkons war die Innenwand zwischen Kinderzimmer und Küche messbar feucht.
Es wurden die Schäden im Bad (Objekt 05: Schüttung in Schacht und in der Küche (Objekt 06: Wandputz) getrennt beprobt

Fallbeschreibung

5 Bewohner, Sohn 10 J, 2 Töchter, 14 und 11 Jahre, Eltern. Seit 1994 in der Wohnung. Kaninchen auf dem Balkon
Vater (42 J.) besuchte einen Umweltmediziner wegen Problemen der unteren Atemwege und Augenreizungen. Außerdem hatte er Schmerzen in Knie, Fußgelenke und Schulter.
Die Mutter hat eine Schimmelpilzallergie sowie Gelenkschmerzen in Händen, Fußgelenken und Zehen.
Die beiden Töchter haben eine Schimmelpilzallergie und die ältere Tochter Asthma.

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
05 09-06/01	Bad, Schüttung aus dem Schacht vor der Außenwand	11.09.06 CB	
06 09-06/01	Küche, Innenwand zum Kinderzimmer, Wandputz nahe Fußboden	11.09.06 CB	

Versand an

Probe 05 09-06/01 (je 50 g Schüttung)			
12.09.06	LGA	12.09.06	RWTH Aachen
12.09.06	Umweltmykologie	12.09.06	HKI Jena
12.09.06	Universität Gießen	12.09.06	Prof. Gareis

Probe 06 09-06/01 (je 100g Wandputz)			
12.09.06	LGA	12.09.06	RWTH Aachen
12.09.06	Umweltmykologie	12.09.06	HKI Jena
12.09.06	Universität Gießen	12.09.06	Prof. Gareis

Objekt 05 (Bad)

Ergebnisse Feuchtigkeits- Temperaturmessungen

Bad, Schacht, Sondenmessung: 20,4 °C, 65,5 % Ehemaliger Schaden, Ursache bereits behoben, deshalb Langzeitmessung nicht sinnvoll

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
05 09-06/01	Schüttung	7,1	-

Objekt 06 (Küche)

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Bad, Schacht, Sondenmessung: 21,9 °C, 88,3 % Keine Langzeitmessung

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
06 09-06/01	Wandputz	6,3	-

<u>Weitere Unterlagen:</u>

keine

Probendatenblatt Objekt Nr. 07 K060454

Objektbeschreibung

Etagenwohnung, 1.OG, in MFH, Fläche 80m²,
Alter nicht genau bekannt, auf jeden Fall Altbau, Massivbauweise, vollständig unterkellert
Mindestens 2 größere Schäden in der Wohnung, und zwar 1 x Außenwand und Innenwand zwischen Bad und Küche.
Entnommen wurde Material von der Außenwand in der Küche. Ursache vermutlich von außen bei Schlagregen eindringende Feuchtigkeit wg. Rissen in der Fassade oder Regenfallrohr

Fallbeschreibung

3 Bewohner, Eltern und Tochter 5 ½ Jahre. Seit 2004 in der Wohnung. Keine Haustiere.
Wegen Beschwerden der Tochter Besuch beim Umweltmediziner: ständig Kopfschmerzen, Augenjucken,- entzündungen, Hautprobleme, Beschwerden der oberen und unteren Atemwege mit Husten bis zum Erbrechen und NNH, chron. Bronchitis, Schmerzen in Beinen und Armen.
Deutliche Besserung der Beschwerden im Urlaub
Vater: Abends Husten, „Engegefühl im Hals. Mutter: keine Beschwerden

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
07 09-06/01	Küche, Außenwand, Wandputz	19.09.06 TD	

Versand an

Probe 07 09-06/01 (je 100 g Schüttung)			
20.09.06	LGA	20.09.06	RWTH Aachen
20.09.06	Umweltmykologie	20.09.06	HKI Jena
20.09.06	Universität Gießen	20.09.06	Prof. Gareis

Ergebnisse Feuchtigkeits- Temperaturmessungen

Sondenmessung, Außenwand in 3cm Tiefe 21,1 °C, 99,7%

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
07 09-06/01	Wandputz	8,0	-

<u>Weitere Unterlagen:</u>

keine

Probendatenblatt Objekt Nr. 08 K060682

Objektbeschreibung

DG-Wohnung in 2-Familienhaus, Fläche 55m² Bj. 1991, Massivbauweise, unterkellert Feuchtigkeitsschaden in der Innenwand zwischen Diele und Bad. Ursache: undichte Stelle im Bereich der Duscharmatur

Fallbeschreibung

2 Bewohner. Frau 23 Jahre + Lebensgefährte. Seit 5 Monaten in der Wohnung. Keine Haustiere Wegen Beschwerden Termin bei Umweltmediziner: ca. 4 Wochen nach Einzug erstmals Schmerzen in den Gelenken, insbesondere in Finger und Füßen.

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
08 11-06/01	Flur, Innenwand zum Bad, Wandputz	23.11.06 TD	

Versand an

Probe 08 11-06/01 (je 100 g Putz)			
28.11.06	LGA	28.11.06	RWTH Aachen
28.11.06	Umweltmykologie		HKI Jena
	Universität Gießen	28.11.06	Prof. Gareis

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Sondenmessung in der Innenwand, 3 cm Tiefe: 19,0 °C, 97,9 %

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
08 11-06/01	Wandputz	8,4	-

Weitere Unterlagen:

keine

Probendatenblatt Objekt Nr. 09 K060888

Objektbeschreibung

Etagenwohnung im EG, MFH, Wohnfläche: 96m² Bj. 1920, altes Zechenhaus, Massivbauweise, komplett unterkellert Geruch nach Mikroorganismen im Schlafzimmer, Wände mit GK verkleidet. Weitere mikrobielle Schäden im Kinderzimmer und im Keller. Ursache der Schäden im EG: Evtl. aufsteigende Feuchtigkeit oder hygrothermische Effekte

Fallbeschreibung

4 Bewohner, Eltern, Tochter 19J. Sohn 26. J. Seit 1997 in der Wohnung. Keine Haustiere Besuch der Tochter beim Umweltmediziner wegen Kopfschmerzen, Augenbrennen, Atemwegsprobleme mit chron. Schnupfen, Husten, Atemnot, häufige Infekte, Gelenkschmerzen insbesondere Finger. Bruder: gelegentlich Atemwegsprobleme Mutter: Kopfschmerzen, Husten, Bronchien, Gelenkschmerzen in Händen und Fingern, häufig Infekte Vater: Berufsbedingt Rückenschmerzen

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
09 02-07/01	Schlafzimmer, Wandputz hinter Wandverkleidung	26.02.07 CB	
09 02-07/02	Schlafzimmer, Luftmessung mit Filter 13,428 m³	08.03.07 DG	

Versand an

Probe 09 02-07/01 (je 100 g)			
27.02.07	LGA	27.02.07	RWTH Aachen
27.02.07	Umweltmykologie		HKI Jena
	Universität Gießen	27.02.07	Prof. Gareis

Probe 09 02-07/02 1 Filter			
09.03.06	Universität Gießen		

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Sondenmessung in der Dämmlage (Styropor): 14,7 °C 72,1 %

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
09 02-07/01	Wandputz	7,5	-

<u>Weitere Unterlagen:</u>

keine

Probendatenblatt Objekt Nr. 10 K061015

Objektbeschreibung

EFH, Fläche 100m“, Wohnräume im EG, 1.OG Bj. vor 1800, nur teilweise unterkellert, vermutl. Fachwerkhaus (Fassade komplett verputzt) Feuchtigkeitsschaden im Bad mit Durchfeuchtung der Innenwand zur Küche im Bereich des Schornsteins Ursache: Vermutlich Versottung des Schornsteins, aber auch aufsteigende Feuchtigkeit möglich Zusätzlich Feuchtigkeitsschäden im KG und in der Außenwand im Wohnzimmer

Fallbeschreibung

2 Bewohner, dort wohnhaft seit 6 Jahren, Haustiere: 3 Ratten Ehefrau besuchte den Umweltmediziner wegen Niesanfällen und Husten. sowie häufig Infekte, Augen- und Hautprobleme. Beschwerden seit ca. 1 Jahr Ehemann: keine Symptome

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
10 03-07/01	Luftmessung Badezimmer, Filter, 9,06m³	20.03.07 CB	
10 03-07/02	Badezimmer, Innenwand, Lehmputz	21.03.07 CB	

Versand an

Probe 10 03-07/01, 1 Filter			
21.03.07	Universität Gießen		

Probe 10 03-07/02 (je 100 g Lehmputz)			
21.03.07	LGA	21.03.07	RWTH Aachen
21.03.07	Umweltmykologie		HKI Jena
	Universität Gießen	21.03.07	Prof. Gareis

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Sondenmessung, Innenwand, 5 cm Tiefe: 18,8 °C, 82,9 %

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
10 03-07/02	Lehmputz	9,3	-

Weitere Unterlagen:

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 11 K070302

Objektbeschreibung

DHH, Wohnräume im EG, Fläche 104m² Bj. 60er Jahre, Massivbauweise, teilweise unterkellert Schaden in der Innenwand zwischen Kinderzimmer und Bad. Evtl. Schaden im Abflussbereich, aber nicht sicher. Weiterer Schaden im Schlafzimmer in der Außenwand

Fallbeschreibung

3 Bewohner, Eltern und Tochter 21 Jahre, dort wohnhaft seit 3 Jahren. 3 Hunde Besuch der Mutter (49 J.) beim Umweltmediziner wegen Husten und Infekten seit 6 Monaten Vater: Seit 6 Monaten starker Husten, vor 1 J. Lungenentzündung und Stimme war weg. Tochter: seit 1 ¼ Jahren ständige Infektionen und Atemwegsprobleme

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
11 06-04/01	Wandputz	04.06.07 Lo	

Versand an

Probe 11 06-04/01 (je 50g)			
	LGA	05.06.07	RWTH Aachen
	Umweltmykologie	05.06.07	HKI Jena
05.06.07	Universität Gießen	05.06.07	Prof. Gareis

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Sondenmessung im Kinderzimmer in der Innenwand zum Bad, 3 cm tief: 21,2 °C, 66,8 %

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
11 04-07/01	Putz	6,8	6-7

Weitere Unterlagen:

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 12 K070387

Objektbeschreibung

Etagenwohnung im 1.OG, Fläche 85m² Bj. 1934, Massivbauweise, unterkellert Schaden im Kinderzimmer, Außenwand großflächig beidseitig vom Fenster Ursache: Undichte Stelle im Balkonbereich 2.OG, Schlagregen dringt in Gebäudehülle ein

Fallbeschreibung

2 Personen, dort wohnhaft seit 2 Jahren. Keine Haustiere Ehefrau besuchte Umweltmediziner wegen Beschwerden der oberen Atemwege (seit 1,5 J.), Gelenkschmerzen seit Einzug. Ehemann leidet seit 1,5 Jahren unter Kopfschmerzen, Atemwegsbeschwerden (Nase zu und Husten)

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
12 06-07/01	Kinderzimmer, Außenwand rechts vom Fenster, Putz	14.06.07 DG	
12 06-07/02	Kinderzimmer, Außenwand, links vom Fenster, Putz	14.06.07 DG	

Versand an

Probe 12 06-07/01 (je 80 g)			
	LGA	18.06.07	RWTH Aachen
18.06.07	Umweltmykologie		HKI Jena
18.06.07	Universität Gießen	18.06.07	Prof. Gareis

Probe 12 06-07/02 (je 80 g)			
	LGA	18.06.07	RWTH Aachen
18.06.07	Umweltmykologie		HKI Jena
18.06.07	Universität Gießen	18.06.07	Prof. Gareis

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Außenwand rechts vom Fenster (Probe 12 06-07/01): 24,3 °C, 96,7 %
Außenwand links vom Fenster (Probe 12 06-07/02): 24,8 °C, 93,7 %

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
12 06-07/01	Putz	Sonde defekt	ca. 7,0
12 06-07/02	Putz	Sonde defekt	ca. 7,0

<u>Weitere Unterlagen:</u>

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 13 050148

Objektbeschreibung

Büro-Neubau 2005, Stahlbeton-Skelettbau, 5 Etagen. Gebäude auf altes Tiefgaragendach aufgesetzt. Schaden durch vergessene Abdichtung des Gebäudes in 2005. Wasser lief im EG in den Fußboden. Schaden wurde Ende 2005 technisch getrocknet, d.h. er ist seit 1,5 Jahren nicht mehr feucht.

Fallbeschreibung

Anlass waren nicht gesundheitliche Beschwerden, da das Gebäude beim Schadenseintritt noch nicht benutzt wurde. Es haben sich bisher auch noch keine Mitarbeiter wegen gesundheitlicher Probleme gemeldet.

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
13 06-07/01	Büroraum E742, Fußboden, Styropor	20.06.07 Lo, HP	
13 06-07/02	Büroraum E366, Fußboden, Styropor	20.06.07 Lo, HP	

Versand an

Probe 13 06-07/01 (je ca. 4 g)			
25.06.07	LGA	22.06.07	RWTH Aachen
	Umweltmykologie		HKI Jena
22.06.07	Universität Gießen	22.06.07	Prof. Gareis

Probe 13 06-07/02 (je ca. 4 g)			
25.06.07	LGA	22.06.07	RWTH Aachen
	Umweltmykologie		HKI Jena
22.06.07	Universität Gießen	22.06.07	Prof. Gareis

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Keine erhöhte Feuchtigkeit feststellbar bei der Probenahme: 2005 wurde im Fußboden gemessen: Stelle 13 06-07/01, Messung am 12.12.05: 21,1 °C, 38,9 % Stelle 13 06-07/02, Messung am 12.12.05: 20,1 °C, 93,1 %

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
13 06-07/01+02	Styropor	7,4	6-7

<u>Weitere Unterlagen:</u>

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 14 K07/0601

Objektbeschreibung

Reiheneckhaus, Massivbauweise, Bj. 1960, unterkellert, Wohnräume im EG, OG und DG, Waschküche und Badezimmer im KG.
Lage: kleinstädtisch in einem Wohngebiet mit schwachem Verkehr.
Feuchtigkeitsschäden im EG Eingangsbereich (Außenwand), im Obergeschoss Kinderzimmer und Badezimmer (gemeinsame Wand) sowie im Keller Außenwände flächig und Fußboden.
Ursache im Keller: fehlende/mangelhafte Gebäudeabdichtung.
Probenahme im Waschkeller, Außenwand.

Fallbeschreibung

Eltern + 2 Söhne (beide 13 Jahre alt) mit gesundheitlichen Beschwerden und zwar Atemwegsprobleme bei Mutter (Luftnot, NNH) und beiden Kindern (Asthma), rheumatische Beschwerden bei der Mutter (alle Gelenke), Neurodermitis bei Mutter und einem Kind, Schimmelpilzallergie bei einem Kind nachgewiesen, Bei der Mutter zusätzlich Müdigkeit, Konzentrationsprobleme, Schlafstörungen, Kopfschmerzen, Augenreizungen, Infektanfälligkeit, Magen/Darm-Beschwerden.
Beim Vater Nasenbluten und NNH.
Anforderung über Umweltmediziner.
Untersucht wurde außerdem Formaldehyd im Schlafzimmer (0,08 ppm) und Biotzide im Staub (Permethrin mit 3,5 mg/kg).

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
14 08-07/01	Luftmessung im Wäschekeller, mit Filter, 25,5 m³	20./21.08.07/Lo+CB	-
14 08-07/02	Wäschekeller, Tapete von der Außenwand	21.08.07/ Lo+CB	

Versand an

Probe 14 08-07/01			
22.08.07	Universität Gießen		

Probe 14 08-07/02			
-	LGA	22.08.07	RWTH Aachen (7 g)
22.08.07	Umweltmykologie (26 g)	-	HKI Jena
22.08.07	Universität Gießen(7 g)	22.08.07	Prof. Gareis (7 g)

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Außenluft: 22,3 °C, 61,6 %, 10,9 g H_2O/kg Luft
Wäschekeller- Raumluft : 22,7 °C, 63,1 %, 10,8 g H_2O/kg Luft
Wäschekeller, in der Außenwand: 22,1 °C, 95,9%, 16,0 g H_2O/kg Luft

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
14 08-07/02	Tapete	7,46	7

<u>Weitere Unterlagen:</u>

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 15 K06/1032

Objektbeschreibung

Etagenwohnung, Massivbauweise, Bj. ca. 1900, unterkellert, Wohnräume im EG, 72m². Lage: dörflich in einem Wohngebiet mit schwachem Verkehr. Feuchtigkeitsschäden im EG im Wohnzimmer durch aufsteigende Feuchtigkeit aus dem Keller, sowie massive Feuchtigkeitsschäden im Keller aufgrund mangelhafter/fehlender Gebäudeabdichtung. Probenahme im Keller unter Eltern-Schlafzimmer, Außenwand. Zusätzlich auf Wunsch/Anforderung Universität. Gießen Materialproben von zwei weiteren Stellen.

Fallbeschreibung

Ehepaar , Nichtraucher, 1 Hund, dort wohnhaft seit 2001 mit gesundheitlichen Beschwerden und zwar Frau: Allgemeine Schwäche/Müdigkeit seit 2005, Schlafstörungen, Augenreizungen (Schwellungen), drei Allergieanfälle in 2006 (Antigen unbekannt), ständig laufende Nase und Asthma (seit 2005), Neuropathiee, Magenschmerzen Mann: Seit ca. Anfang 2006 Allgemeine Schwäche/Müdigkeit, Schlafstörungen, Hautjucken, ständig laufende Nase, Gelenkschmerzen, gesteigerte Infektanfälligkeit. Anforderung über Umweltmediziner.

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
15 08-07/01	Luftmessung im Keller, mit Filter, 25,1 m³	20./21.08.07/HP	-
15 08-07/02	Keller unter Schlafzimmer, Putz von der Außenwand	21.08.07/ Lo+CB	
15-08-07/03	Waschkeller, Putz von der Außenwand	21.08.07/ Lo+CB	
15-08-07/04	Keller, Außenwand unter der Treppe	21.08.07/ Lo+CB	

Versand an

Probe 15 08-07/01			
22.08.07	Universität Gießen		

Probe 15 08-07/02			
	LGA	22.08.07	RWTH Aachen (100g)
-	Umweltmykologie (100g)	22.08.07	HKI Jena (100g)
22.08.07	Universität Gießen (100g)	22.08.07	Prof. Gareis (100g)

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Messort	Temperatur [°C]	Relative Feuchtigkeit [%]	Taupunkt-temperatur [°C]	Wasser [g/kg Luft]
Keller Außenwand 10 cm Höhe	15,7	90,2	14,0	9,9

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
15 08-07/02	Putz	7,4	7

<u>Anlagen:</u>

Fotodokumentation

Probendatenblatt Objekt Nr. 16

Objektbeschreibung

Etagenwohnung, Massivbauweise, Bj. ca. 1900, unterkellert, Wohnräume im 2.OG unter Dachboden: 110 m².
Lage: zentral in einer Kleinstadt mit normalem Verkehrsaufkommen

Feuchtigkeitsschäden im
Probenahme im Keller. Putz von 2 Stellen der Außenwand als Mischprobe.
Zusätzlich auf Wunsch/Anforderung Universität. Gießen Materialproben von zwei weiteren Stellen.

Fallbeschreibung

Ehepaar mit 3 Kindern, Raucher, Vogelkäfig mit Wellensittich, dort wohnhaft seit Sept. 2006 mit gesundheitlichen Beschwerden bei Eltern und Kindern seit dem Einzug und zwar
Mann: Allgemeine Schwäche/Müdigkeit Schlafstörungen, Kopfschmerzen, Augenreizungen, großflächige Hauterkrankung, Beschwerden der unteren Atemwege, Nasennebenhöhlenprobleme, starke Schmerzen in Händen und Füßen (kann zeitweise kaum auftreten), Infektanfälligkeit.
Frau: Allgemeine Schwäche/Müdigkeit, Schlafstörungen, starke Kopfschmerzen, Augenreizungen, Atemwegsbeschwerden (obere und untere Atemwege), Schmerzen in Schultern, Ellenbogen und Füßen, Infektanfälligkeit.
Sohn 7 J.: Augenjucken, Atemwegsprobleme (obere und untere Atemwege), Schmerzen im Knie, Infektanfälligkeit.
Sohn 8 J.: Entzündungen der Augen, Niesanfälle, laufende Nase, Schmerzen im Bereich der Schulter, Infektanfälligkeit
Sohn 16 J.: Mittelohrentzündung.
Deutliche Besserung bei allen 5 Personen im Urlaub.
Anforderung über Umweltmediziner.
Hier bestand insbesondere der Verdacht, dass das Problem im Keller durch Thermik stark das Treppenhaus und die oberste Wohnung belastet.

Probenahme

Nr.	Material	Datum/Bearbeiter	Anmerkung
16 09-07/01	Keller, Putz von 2 Stellen	06.09.07 / Lo	-

Versand an

Probe 16 09-07/01			
10.09.07	LGA B.W. (70 g)	10.09.07	RWTH Aachen (70 g)
10.09.07	Umweltmykologie (70 g)	-	HKI Jena (-)
10.09.07	Universität Gießen (70 g)	10.09.07	Prof. Gareis (100g)

Ergebnisse Feuchtigkeits- und Temperaturmessungen

Es wurde nur mittels kapazitiver Methode die Feuchtigkeit gemessen. Die Messung ergab eine sehr hohe Feuchtigkeit. Störungen der Messungen durch Materialeinfluss sind unwahrscheinlich.

Aufgrund des Messsignals ist von einer Feuchtigkeit über 90 % auszugehen. Die Temperatur lag im Bereich zwischen 15 und 16 °C.

pH-Wert

Probe Nr.	Material	elektronisch	Indikatorpapier
16 09-07/01	Putz	7,9	7-8

* IC_{50} (inhibitory concentration 50%): niedrigste Konzentration, drei die MTT-Spaltungsaktivität auf 50% reduziert.

<u>Anlagen:</u>

keine

Isolatbeschreibung

Probenbezeichnung: Datum/Eingang: Datum/Bearbeitung:

Isolierungsmedium/Temperatur: **Relevanz in der Probe:**

Identifizierungsmedium/Temperatur:

Stammnummer: **Referenzstamm:**

Makroskopie			**Taxonomische Zuordnung**					
Konsistenz	weich		**Relevanz des Isolats in der Probe**					
	bröcklig		+++		++		+	
	schleimig		**Kultivierungszeit**					
	zäh		1 Woche		2 Wochen		3 Wochen	
	hart		**Gramfärb.**	variabel		positiv	negativ	
Form	flach		**Bemerkungen:**					
	erhaben		Weitere Medien von denen das Isolat gewonnen wurde:					
	unregelmäßig							
Oberfläche	glatt							
	glänzend							
	matt							
	gipsig							
	runzlig							
Farbe	Kolonie							
	LM							
	SM							
	lsl. Pigment							

Mikroskopie					**Foto**
Zellform					
Stäb.-Kokken-Zyklus	Fragmentation				
Sporenketten-form	RF	RA	S	V	
Phenotypische Merkmale					
DAP	LL	meso	ohne		
Fettsäuren:					
APIZYM:					
Mycolsäuren					
Menachinone					

Rezepturen der verwendeten Nährmedien:

Actinomyceten-Isolations-Agar (Fa. Difco, Art. Nr. 212168), entspricht Actinomyceten-Agar

1	Natriumcaseinat	2,0 g
2	Asparagin	0,1 g
3	Natriumpropionat	4,0 g
4	K_2HPO_4	0,5 g
5	$MgSO_4$	0,1 g
6	$FeSO_4$	0,001 g
7	Agar	15,0 g
8	Glycerin	5 g
9	Aqua dest.	1000 ml
	pH	8,1

Besonderheit bei der Zubereitung: 22g Pulver des Fertigmediums in 1000ml Aqua dest. suspendieren. Gut mischen. Unter Rühren erhitzen und zur vollständigen Auflösung des Pulvers 1 min kochen lassen. 5g Glycerin hinzufügen. Außerdem wurde noch Natamycin entsprechend 2.3.1.1 zugegeben.

Mineral-Agar (Gauze, 1983), entspricht Gauze-Agar

1	Lösliche Stärke	20,0 g
2	KNO_3	1,0 g
3	K_2HPO_4	0,5 g
4	$MgSO_4 * 7 H_2O$	0,5 g
5	NaCl	0,5 g
6	$FeSO_4 * 7 H_2O$	0,01 g
7	Agar	20,0 g
8	Aqua dest.	1000 ml
	pH	7,2

Außerdem wurde noch Natamycin entsprechend 2.3.1.1 zugegeben.

Brain Heart Infusion Agar (Difco Artikel-Nr. 609422), entspricht BHI-Agar

1	Infusion aus 200g Kalbshirn	7,7 g
2	Infusion aus 250 g Rinderherz	9,8 g
3	Casein (Fleisch)-Pepton	10,0 g
4	Dextrose	2,0 g
5	NaCl	5,0 g
6	Na_2HPO_4	2,5 g

7	Agar	15,0 g
8	Aqua dest.	1000 ml
	pH	7,2

Außerdem wurde noch Natamycin entsprechend 2.3.1.1 zugegeben.

Casein-Mineral-Agar (Altenburger et al., 1996), entspricht CM-Agar

1	K_2HPO_4 oder	0,6 g
2	$K_2HPO_4 * 3 H_2O$	0,77 g
3	$Na_2HPO_4 * 2 H_2O$	0,5 g
4	$MgSO_4 * 7 H_2O$	0,05 g
5	$MgCl_2 * 6 H_2O$	0,1 g
6	KNO_3	0,2 g
7	$FeCl_3 * 6 H_2O$	0,01 g
8	Casein	0,8 g
9	Hefeextrakt	0,4 g
10	Agar	20,0 g
11	Aqua dest.	1000 ml
	pH	7,2

Außerdem wurde noch Natamycin entsprechend 2.3.1.1 zugegeben.

CASO-Agar

1	Pepton aus Casein	15,0 g
2	Pepton aus Sojamehl	5,0 g
3	NaCl	5,0 g
4	Agar	15,0 g
5	Aqua dest.	1000 ml
6	pH	7,2

Außerdem wurde noch Natamycin entsprechend 2.3.1.1 zugegeben.

Hafermehl-Agar (Shirling, E.B. et al. 1966), entspricht ISP-3-Agar

Bevorzugt für Mycelbildner

1	Hafermehl (Firma Holo/Reformhaus)	20,0 g
2	Agar	8,0 g
3	Spurenelementlösung	1ml
4	Aqua dest.	1000 ml
	pH	7,2

Spurenelementlösung

1	$FeSO_4 * 7 H_2O$	0,1 g
2	$MnCl_2 * 4 H_2O$	0,1 g
3	$ZnSO_4 * 7 H_2O$	0,1 g
4	Aqua dest.	100 ml

Medium 79 (Prauser, H. & Falta, R. 1968) , entspricht M79-Agar

Bevorzugt für Nicht-Mycelbildner wie Coryneforme und Mycobakterien

1	Dextrose	10,0 g
2	Bacto-Pepton	10,0 g
3	Pepton aus Casein	2,0 g
4	Hefeextrakt	2,0 g
5	NaCl	6,0 g
6	Agar	15,0 g
7	Trinkwasser	1000 ml
	pH	7,2

Glucose-Yeast-Malt-Agar (GYM) (Shirling, E.B. et al. 1966), entspricht ISP-2-Agar

1	Hefeextrakt	4,0 g
2	Malzextrakt	10,0 g
3	Glucose	4,0 g
4	Agar	15,0 g
5	Aqua dest.	1000 ml
	pH	6,9

Glucose-Yeast-Malt-Agar (GYM STREPTOMYCES MEDIUM DSMZ, M65)

1	Hefeextrakt	4,0 g
2	Malzextrakt	10,0 g
3	Glucose	4,0 g
4	$CaCO_3$	2,0 g
5	Agar	15,0 g
6	Aqua dest.	1000 ml
	pH	7,2

Glycerin-Arginin-Agar (G/A) (El-Nakeeb et al.1963)

Bevorzugt für thermophile/thermotolerante Actinomyceten

1	Glycerin (99 %)	12,5 g
2	L-Arginin	1,0 g
3	KH_2PO_4	0,3 g
4	K_2HPO_4	0,7 g
5	$MgSO_4 * 7 H_2O$	0,25 g
6	NaCl	1,0 g
7	Agar	12,0 g
8	Spurenelementlösung [1)]	1,0 ml / l
9	Aqua dest.	1000 ml
	pH:	7,2

[1)] Spurenelementlösung [mg / l]:

1	EDTA	500
2	$FeSO_4 * 7 H_2O$	300
3	$MnCl_2 * 4 H_2O$	3
4	$CoCl_2 * 6 H_2O$	5
5	$CuCl_2 * 2 H_2O$	1
6	$NiCl_2 * 6 H_2O$	2
7	$NaMoO_4 * 2 H_2O$	3
8	$ZnSO_4 * 7 H_2O$	5
9	H_3BO_3	2

Die Spurenelementlösung wurde mit NaOH (2N) auf einen pH – Wert von 4,0 eingestellt und mittels einer sterilen Spritze (Becton Dickinson, Plastipak) und einem sterilen Filter (Einmalfilter, Sartorius, Göttingen) unter der Sicherheitswerkbank sterilfiltriert.

DG18 (Dichloran 18% Glycerol Agar) zur Isolierung der Schimmelpilze

1	Pepton	5 g
2	Glukose	7 g
3	KH_2PO_4	1 g
4	$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,5 g
5	Dichloran	0,002 g
6	Glycerol	220 ml
7	Chloramphenicol	0,1 g (gelöst in 6 ml Ethanol)
8	Agar	15 g
9	Aqua dest.	1000 ml
	pH-Wert	5,6 ± 0,2
	a_w-Wert	0,95

MEA (Malzextrakt-Agar) zur Isolierung der Schimmelpilze

1	Malzextrakt	30 g
2	Pepton	5 g
3	Agar	15 g
4	Aqua dest.	1000 ml
	pH-Wert	5,4 ± 0,2

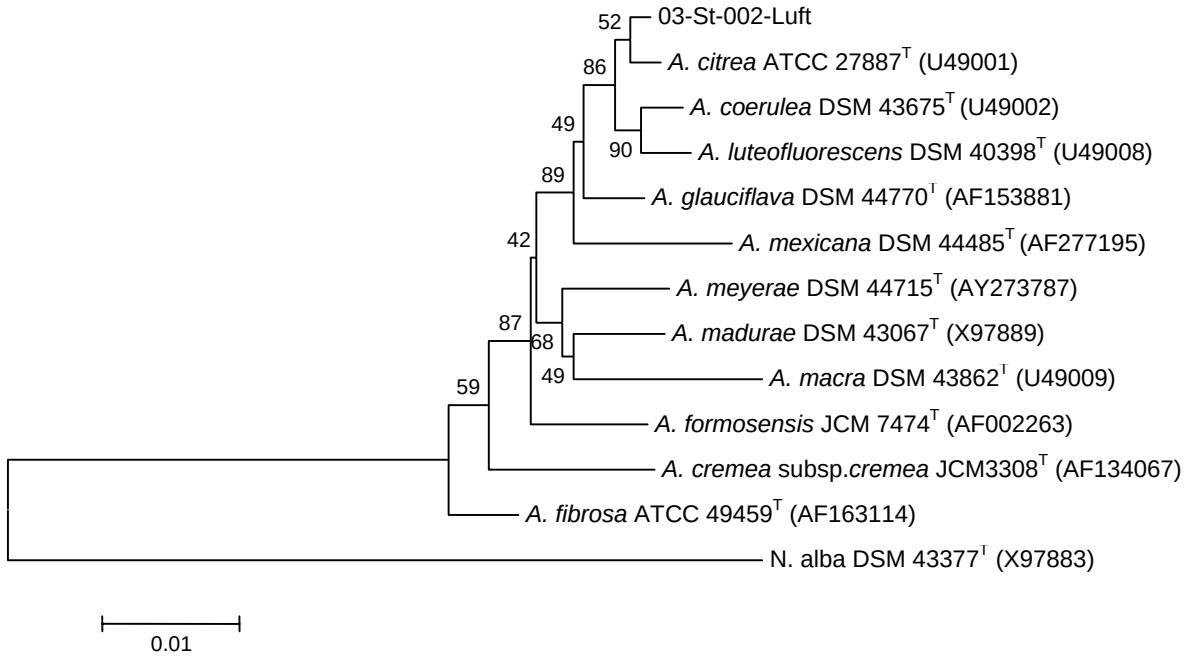
Tab. A 1: API-ZYM-Test

Isolat	Agar	Taxon	Enzym*																		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
01-St-035-Luft	ACTINO	*Amycolatopsis sp.*		x	x	x		x	x							x					
01-St-040-Luft	ACTINO	*Amycolatopsis sp.*			x	x		x													
01-Gi-030	GAUZE	*Amycolatopsis sp.*			x	x		x										x			
01-St-69/3-Luft	CMA	*Pseudonocardia sp.*		x	x	x		x	x												
01-St-024-Luft	GAUZE	*Pseudonocardia sp.*		x	x	x		x	x									x			
01-St-025-Luft	GAUZE	*Pseudonocardia sp.*		x	x	x		x	x									x			
01-St-021	ACTINO	*Streptomyces sp.*		x																	
01-St-46/2-Luft	ACTINO	*Streptomyces sp.*		x	x	x															
01-St-001	ACTINO	*Streptomyces sp.*		x		x															
01-St-002	ACTINO	*Streptomyces sp.*		x	x	x															
01-St-019	ACTINO	*Streptomyces sp.*			x	x						x									
01-St-020	ACTINO	*Streptomyces sp.*				x															
01-St-009	BHI	*Streptomyces sp.*											x	x							
01-St-013	CMA	*Streptomyces sp.*		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x					x	x	
01-St-069-Luft	CMA	*Streptomyces sp.*		x				x													
01-St-012	CMA	*Streptomyces sp.*	x	x																	
01-St-006	CMA	*Streptomyces sp.*											x	x							
01-St-014	CMA	*Streptomyces sp.*												x							
01-St-016	CMA	*Streptomyces sp.*		x										x						x	
01-St-018	CMA	*Streptomyces sp.*						x					x	x							
01-St-061-Luft	CMA	*Streptomyces sp.*		x																	
01-St-070-Luft	CMA	*Streptomyces sp.*		x				x													
01-St-022	GAUZE	*Streptomyces sp.*												x							
01-St-027	GAUZE	*Streptomyces sp.*		x	x	x		x	x	x		x	x	x					x	x	
01-St-032	GAUZE	*Streptomyces sp.*		x	x	x		x	x	x										x	
01-St-033	GAUZE	*Streptomyces sp.*		x	x			x		x		x	x							x	
01-St-024	GAUZE	*Streptomyces sp.*											x	x							
01-St-025	GAUZE	*Streptomyces sp.*												x							
01-St-026	GAUZE	*Streptomyces sp.*		x	x	x		x				x	x	x		x			x	x	
01-St-026-Luft	GAUZE	*Streptomyces sp.*		x																	
01-St-028	GAUZE	*Streptomyces sp.*						x											x	x	
01-St-032-Luft	GAUZE	*Streptomyces sp.*		x																	

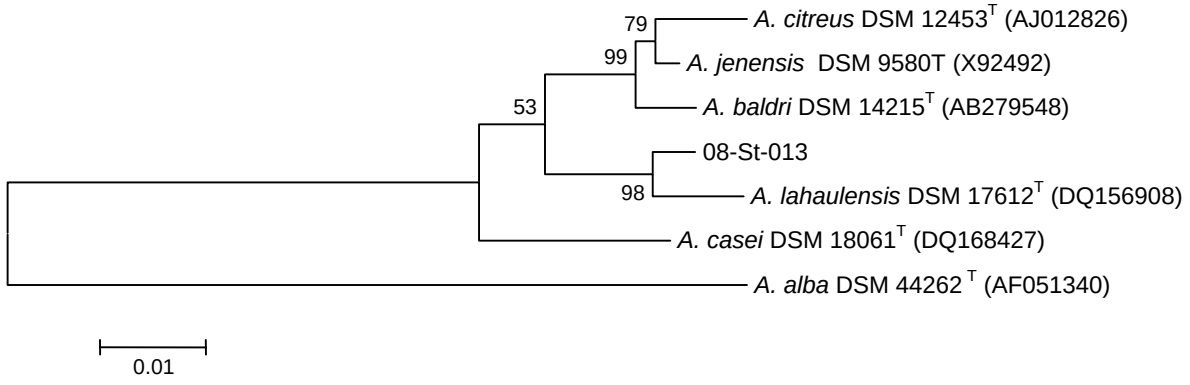
Enzyme: 1 - Phosphatase alcaline, 2 - Esterase (C 4), 3 - Esterase Lipase (C 8), 4 - Lipase (C 14), 5 - Leucine arylamidase, 6 - Valine arylamidase, 7 - Cystine arylamidase, 8 - Trypsin, 9 - Chymotrypsin, 10 - Phosphatase acid, 11 - Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, 12 - α galactosidase, 13 - β galactosidase, 14 - β glucuronidase, 15 - α glucosidase, 16 - β glucosidase, 17 - N-acetyl-β-glucoseamidase, 18 - α mannosidase, 19 - α fucosidase

Phylogenetische Baumberechnung

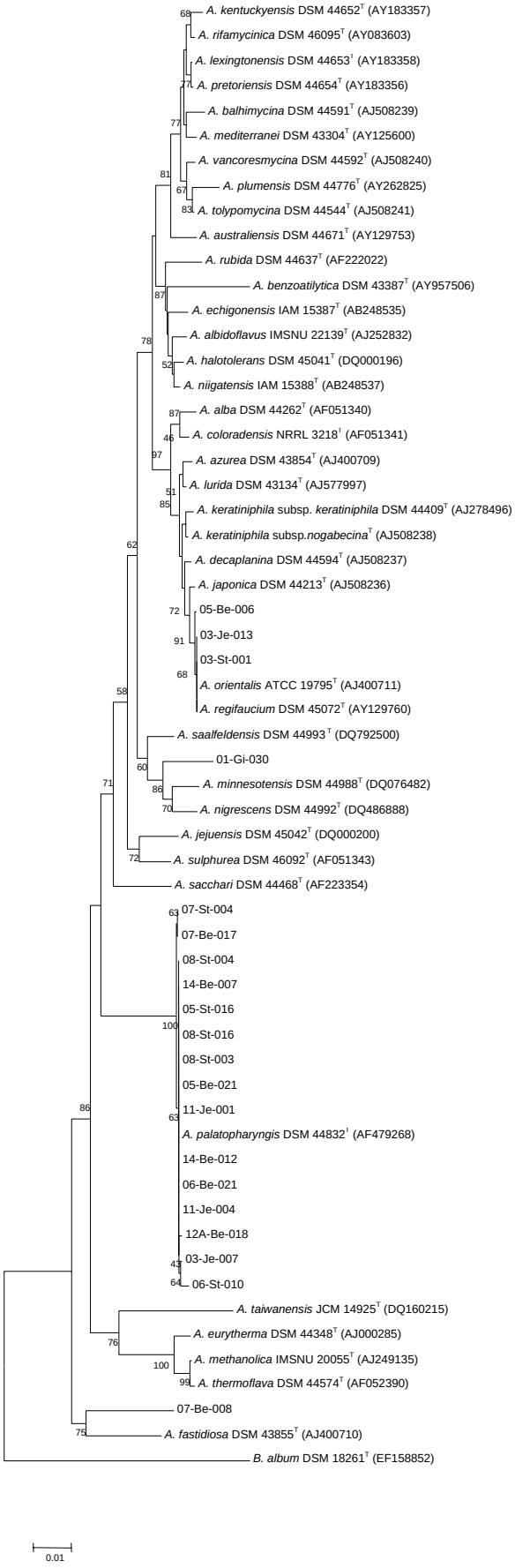
Actinomadura Teil des phylogenetischen Baumes, ca. 1370 bp, outgroup *Nocardia*



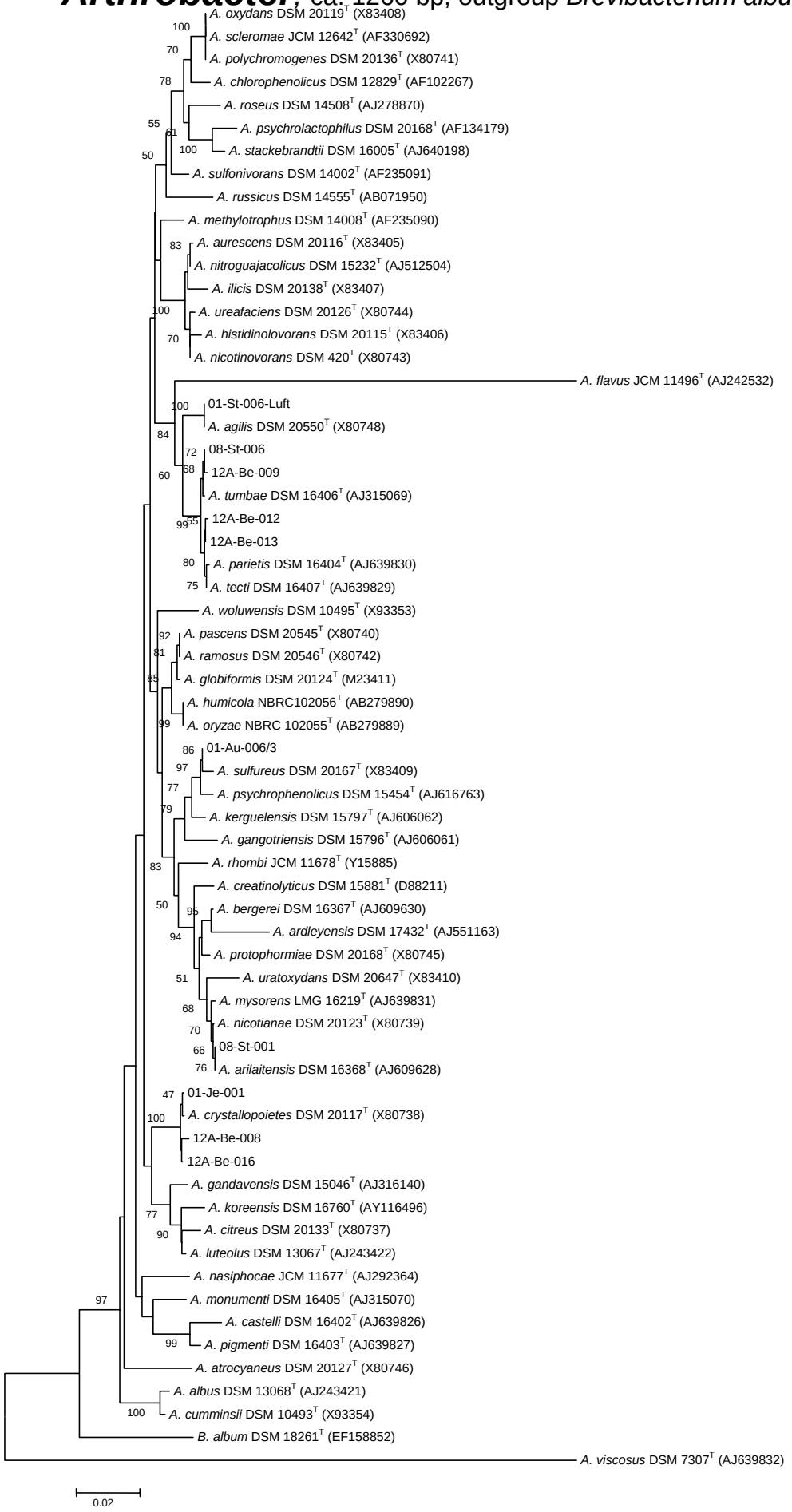
Agrococcus ca. 1200 bp



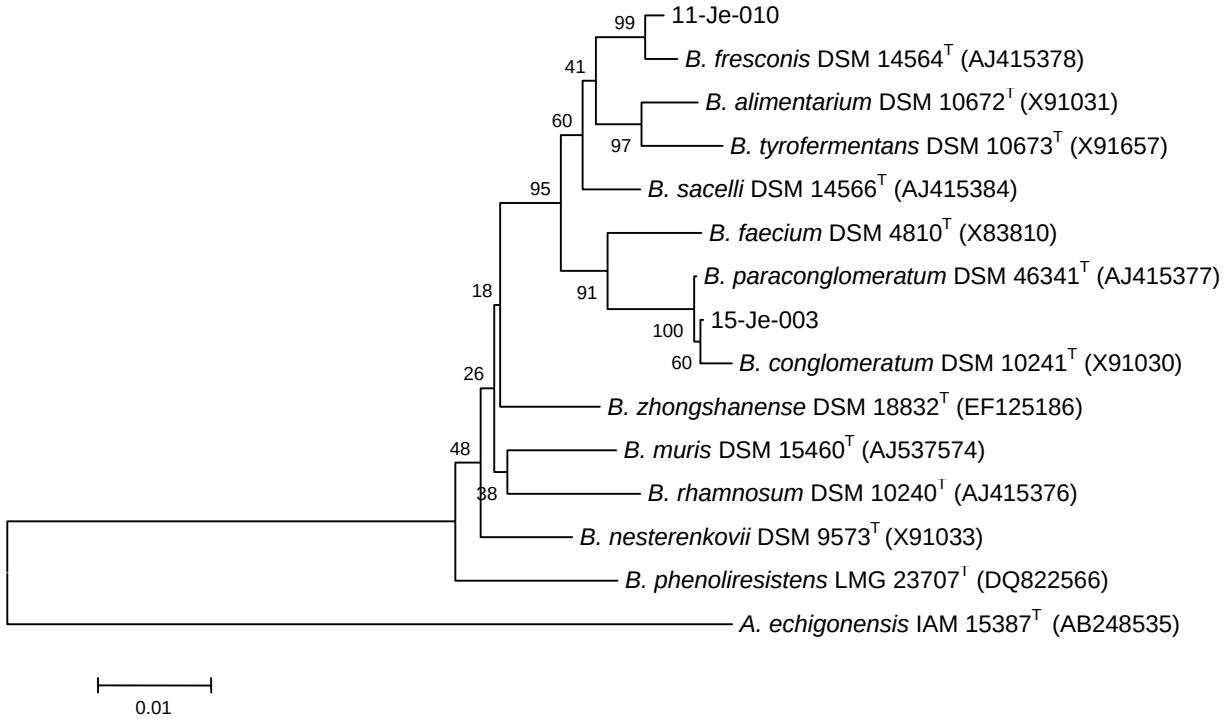
Amycolatopsis 20 Isolate, ca. 1320 bp, outgroup: *Brevibacterium albus*



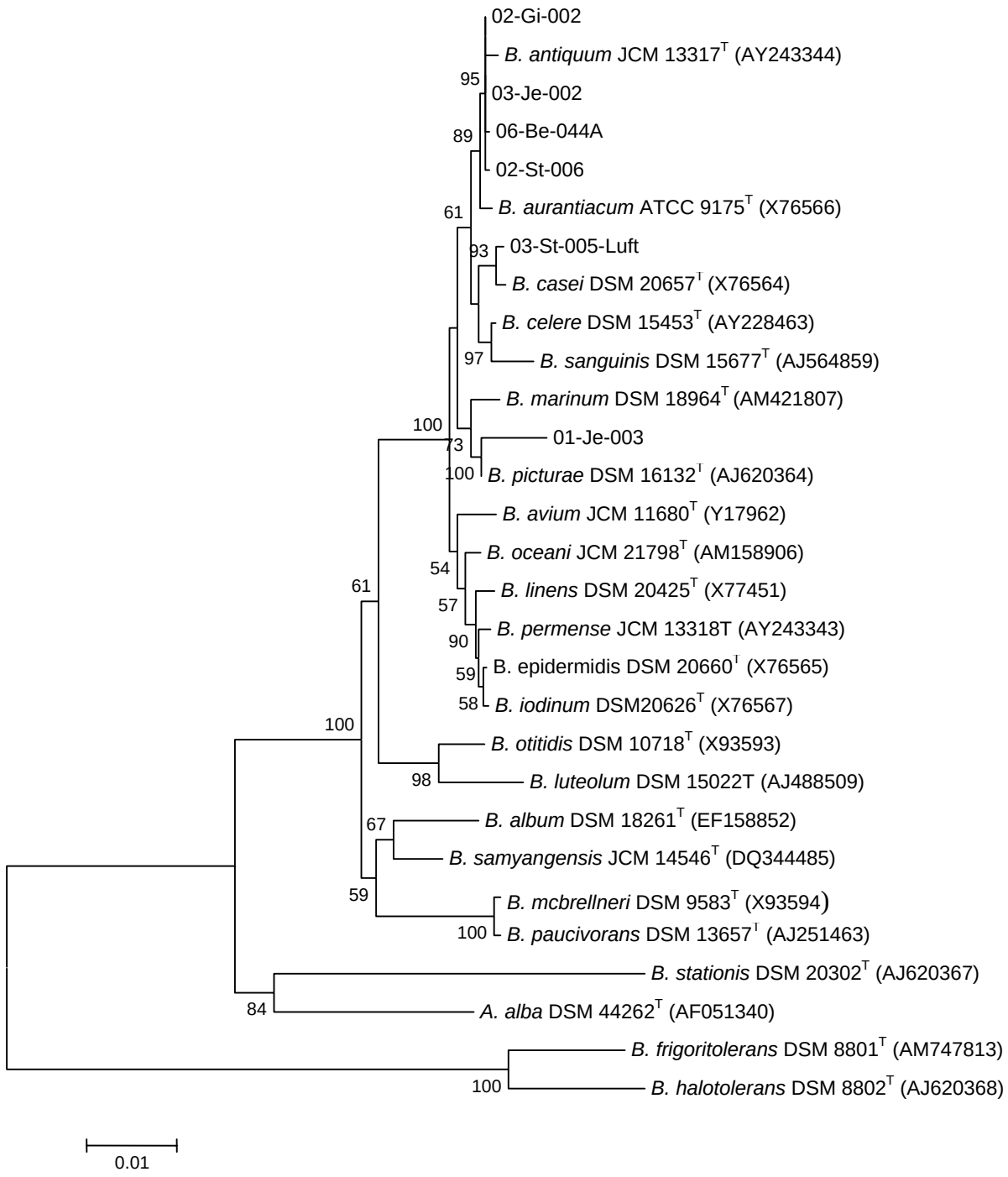
Arthrobacter, ca. 1260 bp, outgroup *Brevibacterium albus*



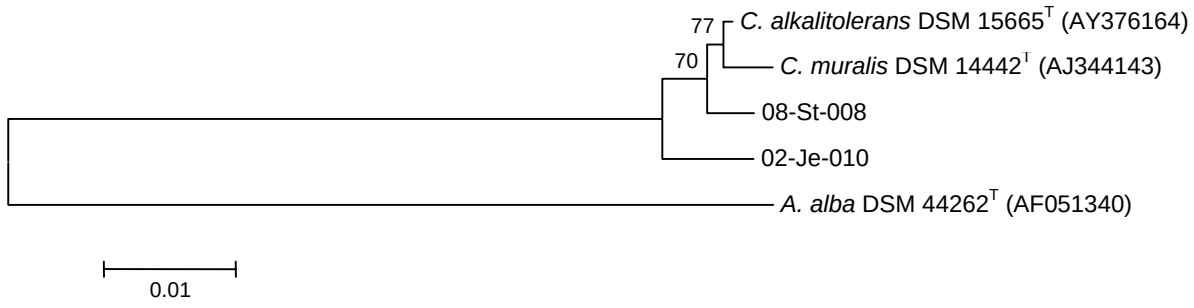
Brachybacterium ca 1340 bp



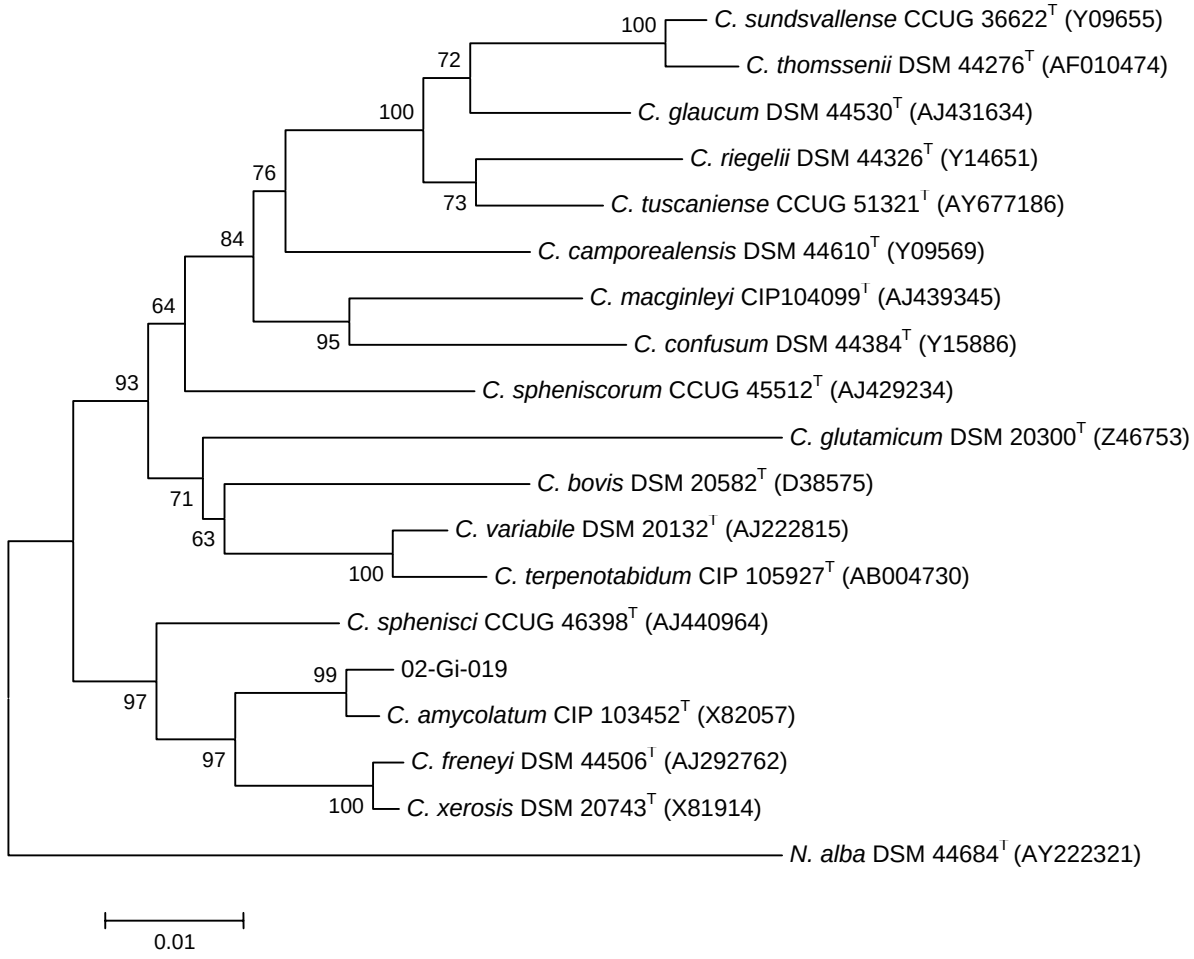
Brevibacterium ca. 1330 bp



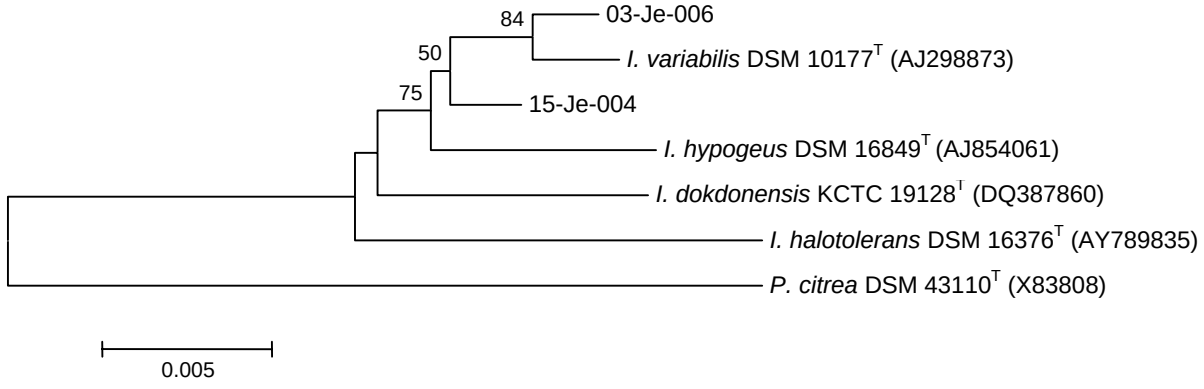
Citricoccus ca. 1330 bp



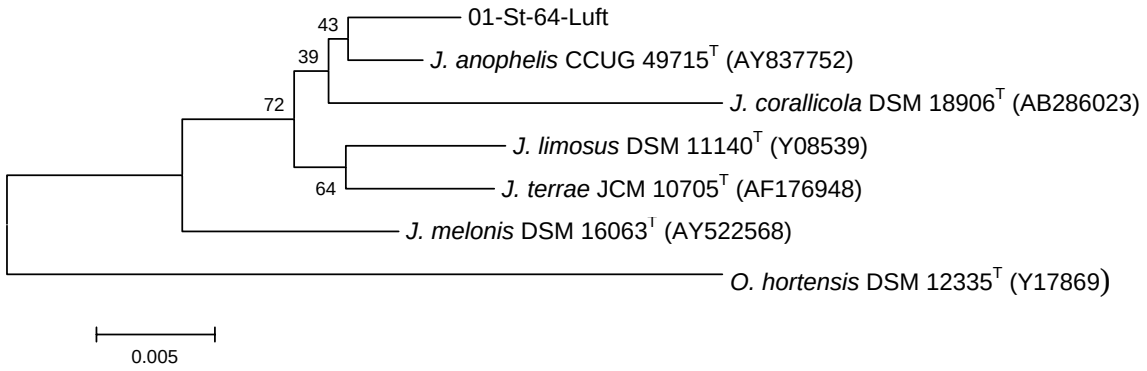
Corynebacterium Teil des phylogenetischen Baumes, ca. 1270 bp, outgroup *Nocardia*



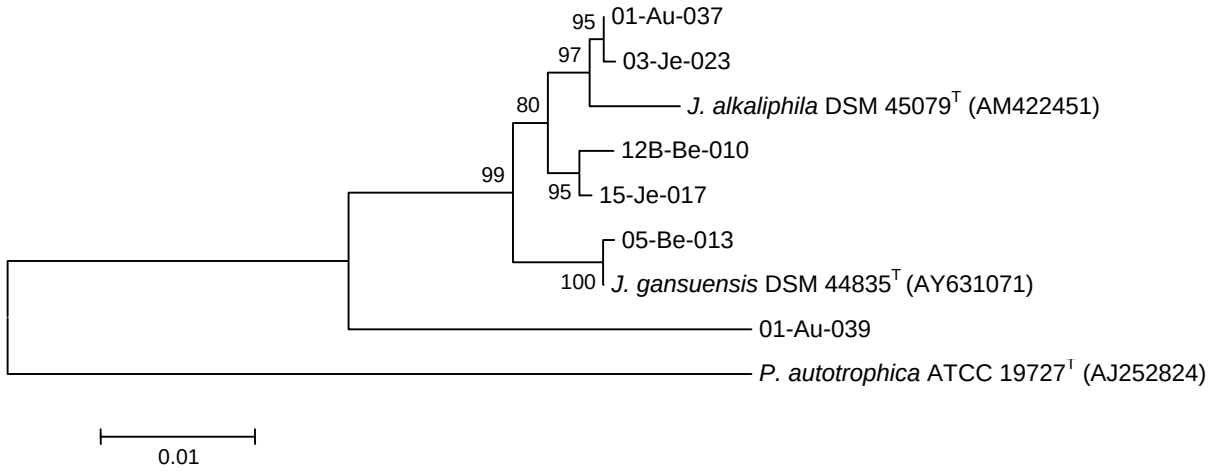
Isoptericola ca. 1330bp



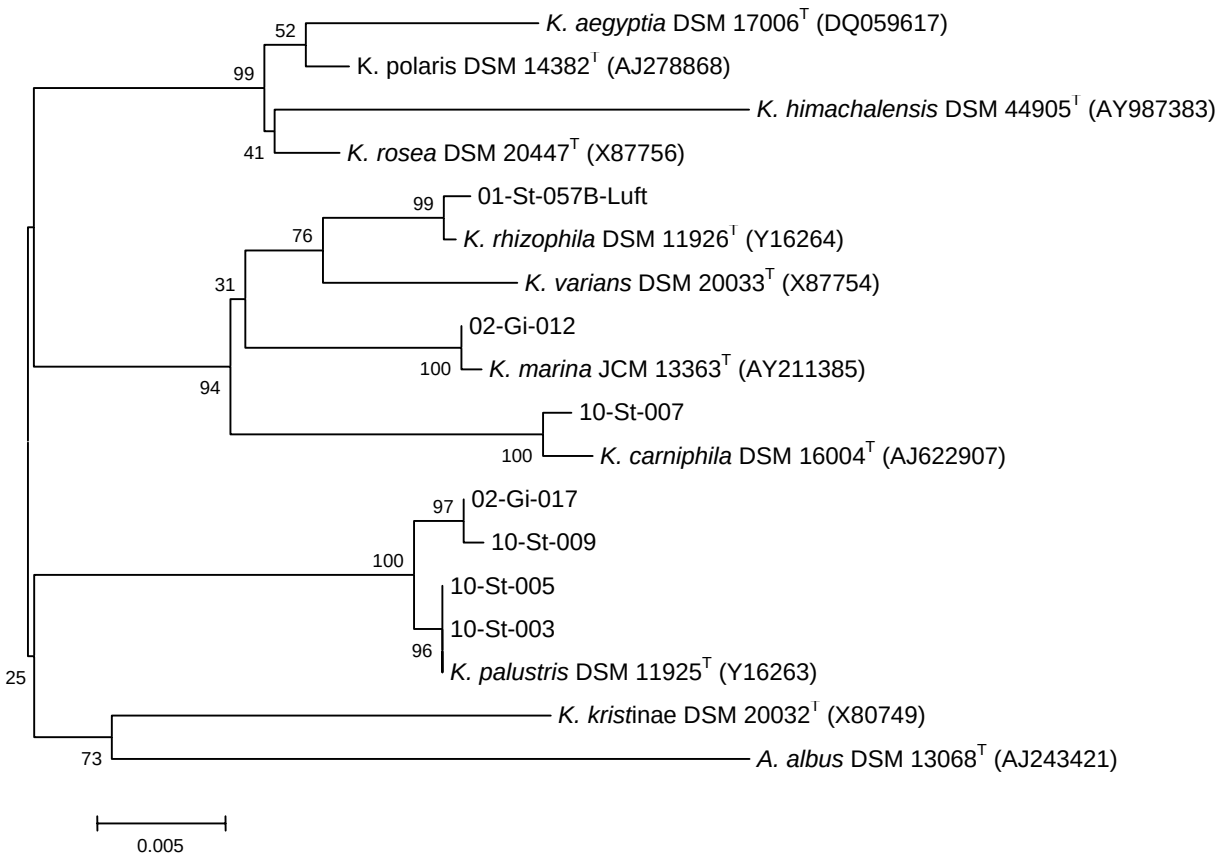
Janibacter ca. 1400 bp outgroup Ornithinicoccus



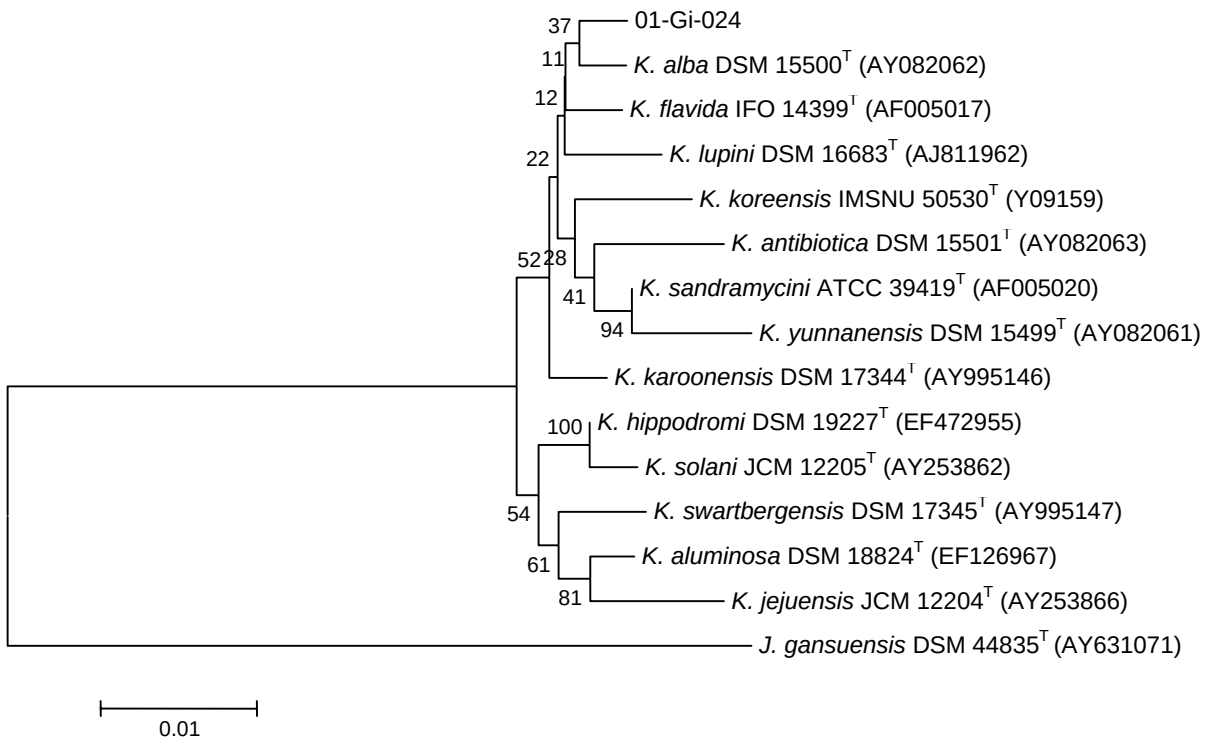
Jiangella ca. 1350 bp



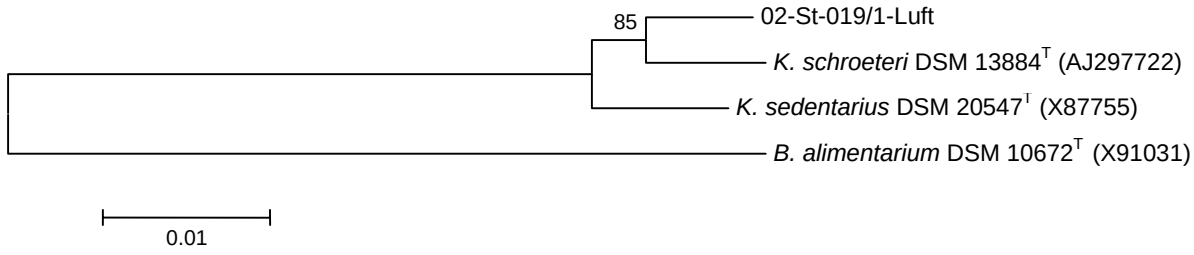
Kocuria, ca. 1330 bp, outgroup *Arthrobacter*



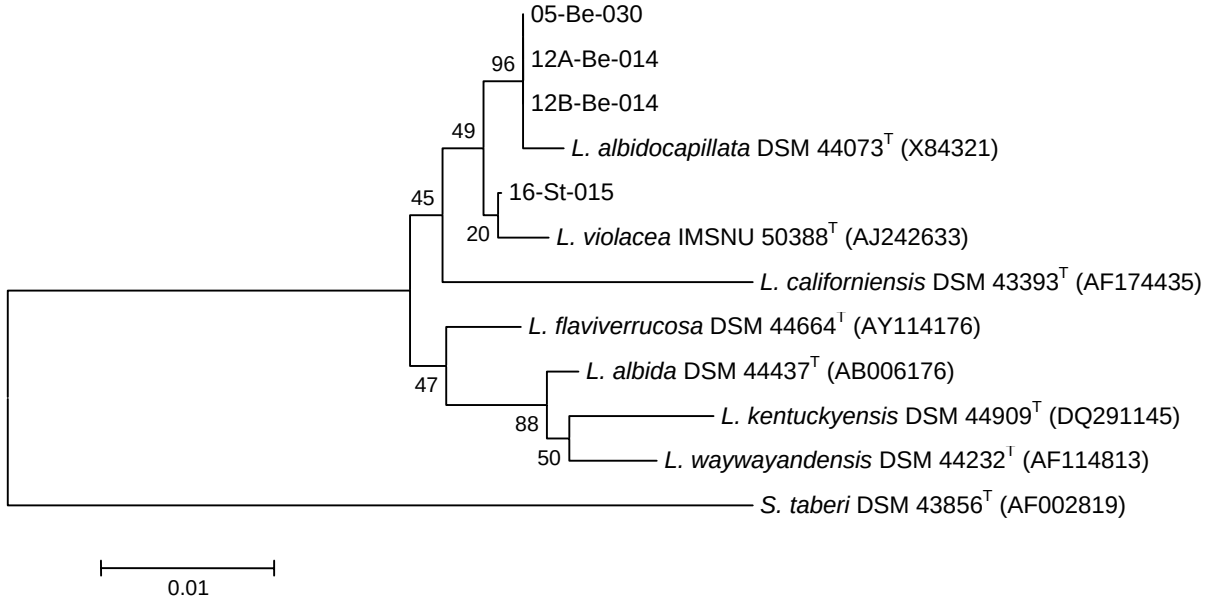
Kribella ca. 1340 bp



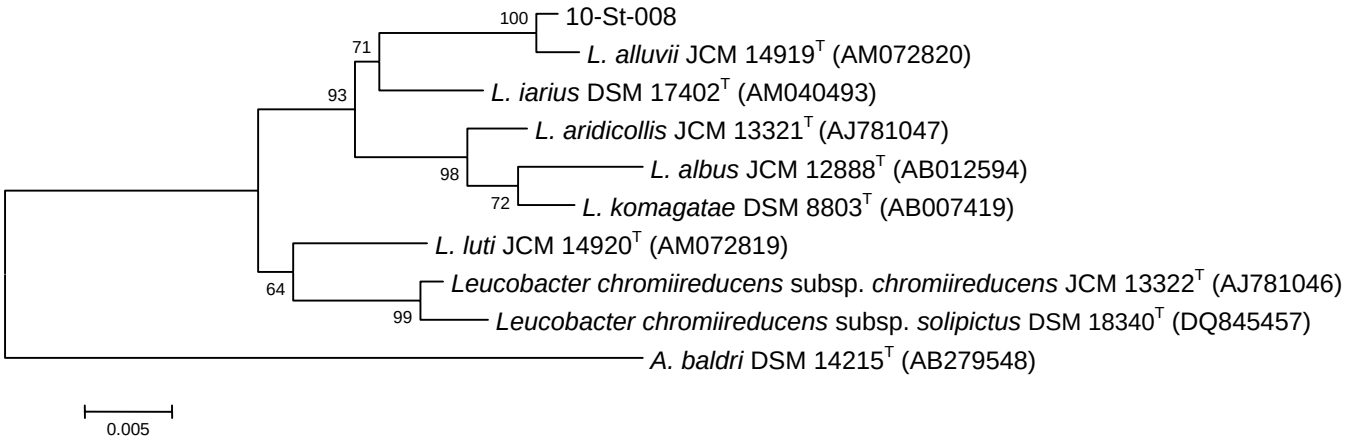
Kytococcus, ca. 1340 bp outgroup Brachybacterium



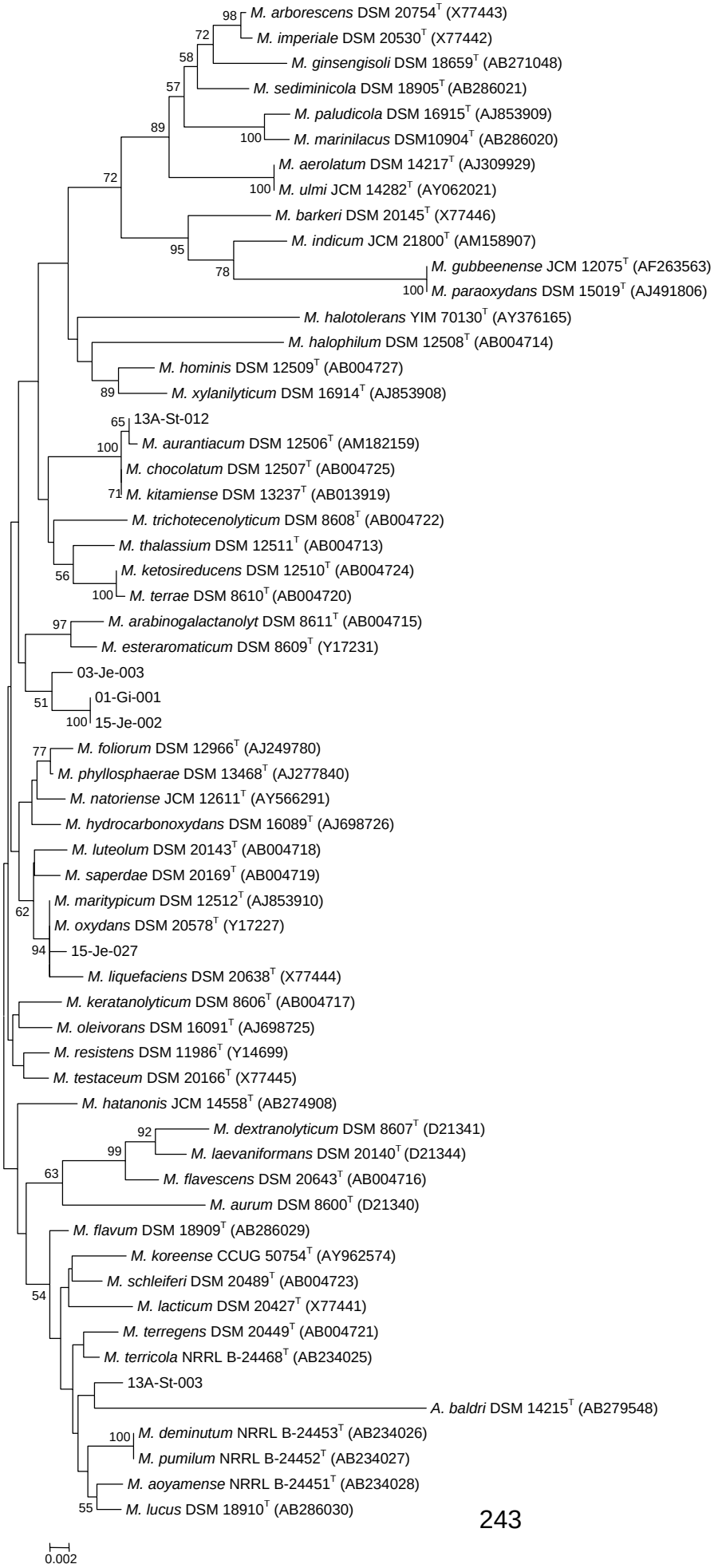
Lentzea ca. 1280 bp



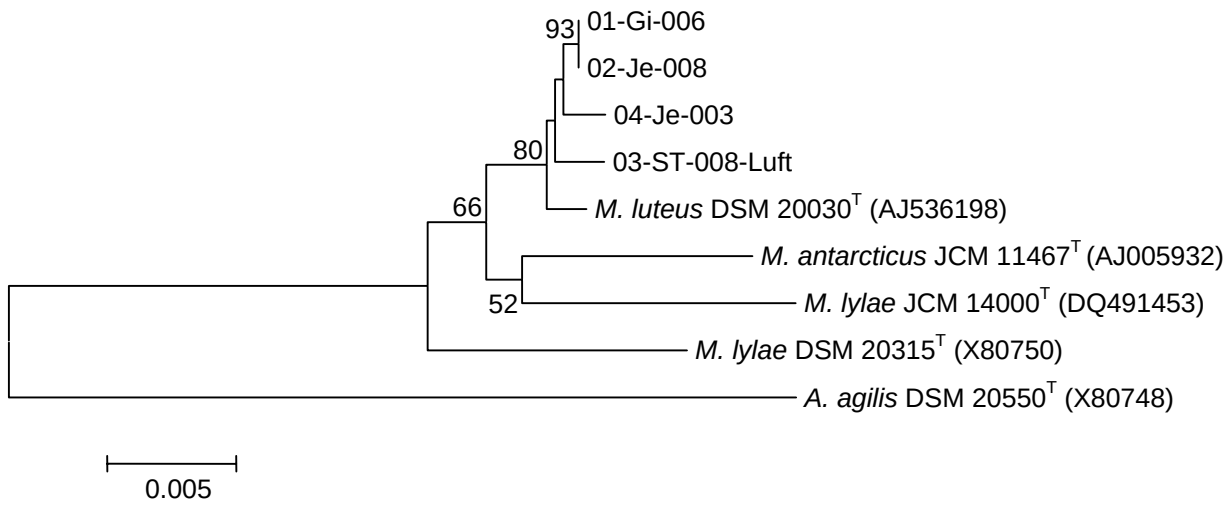
Leucobacter ca. 1360 bp



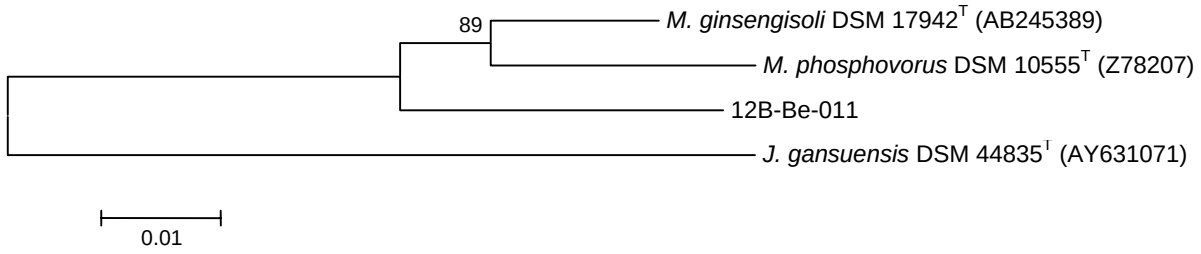
Microbacterium, ca.1220 bp, outgroup *Agrococcus*



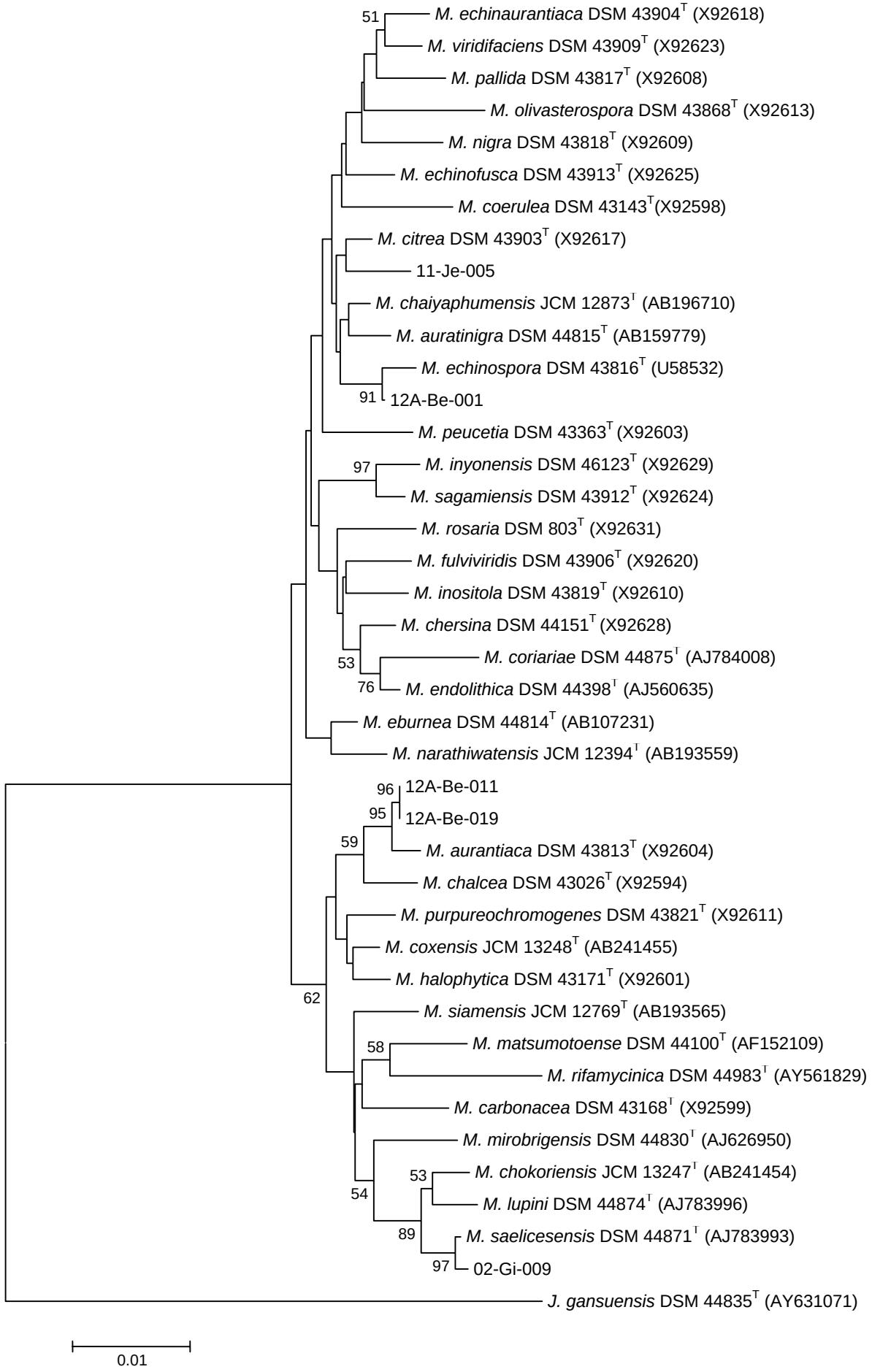
Micrococcus, ca. 1350 bp, outgroup *Arthrobacter*



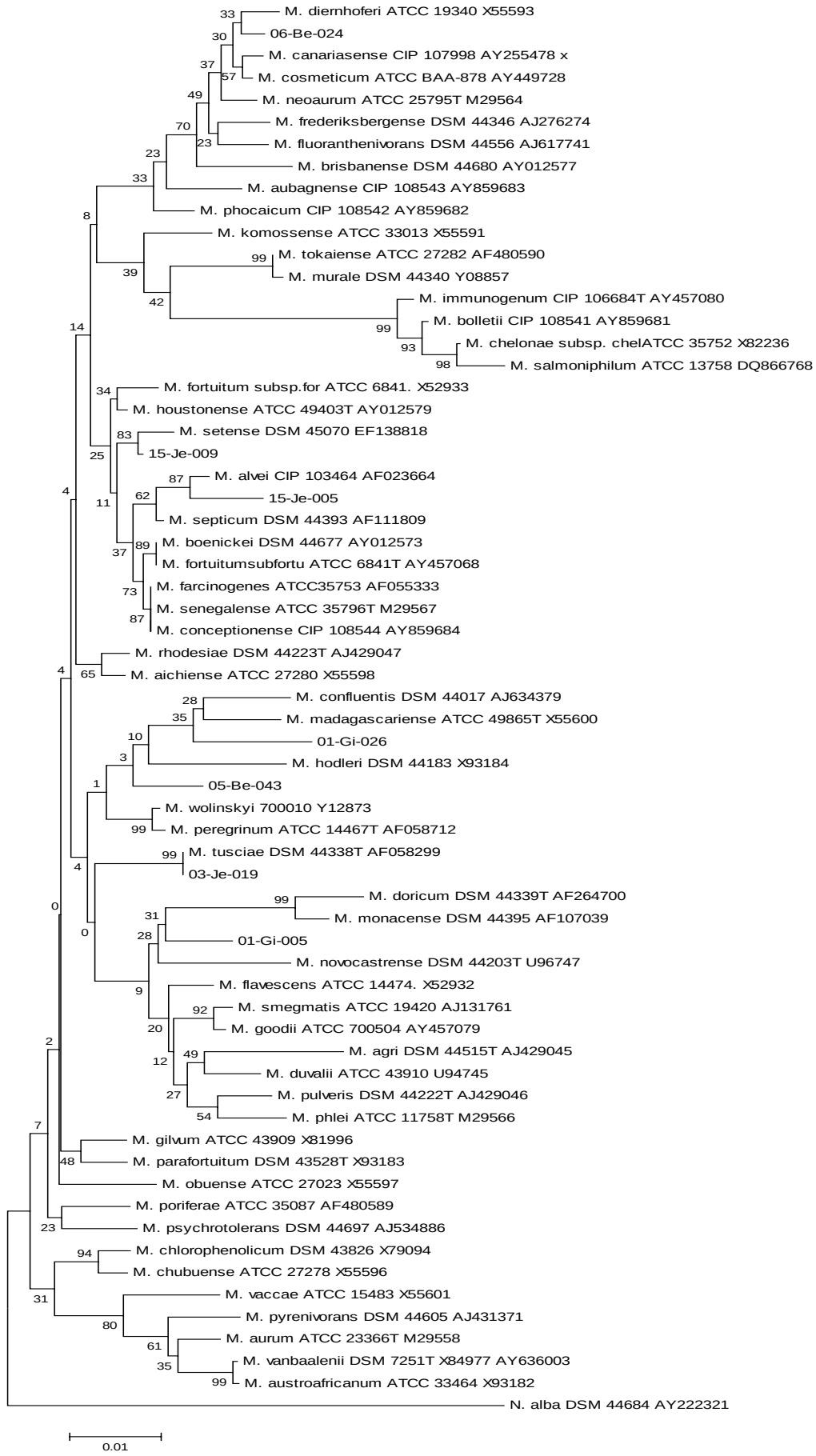
***Microlunatus*,** ca. 1360 bp, outgroup *Jiangella*



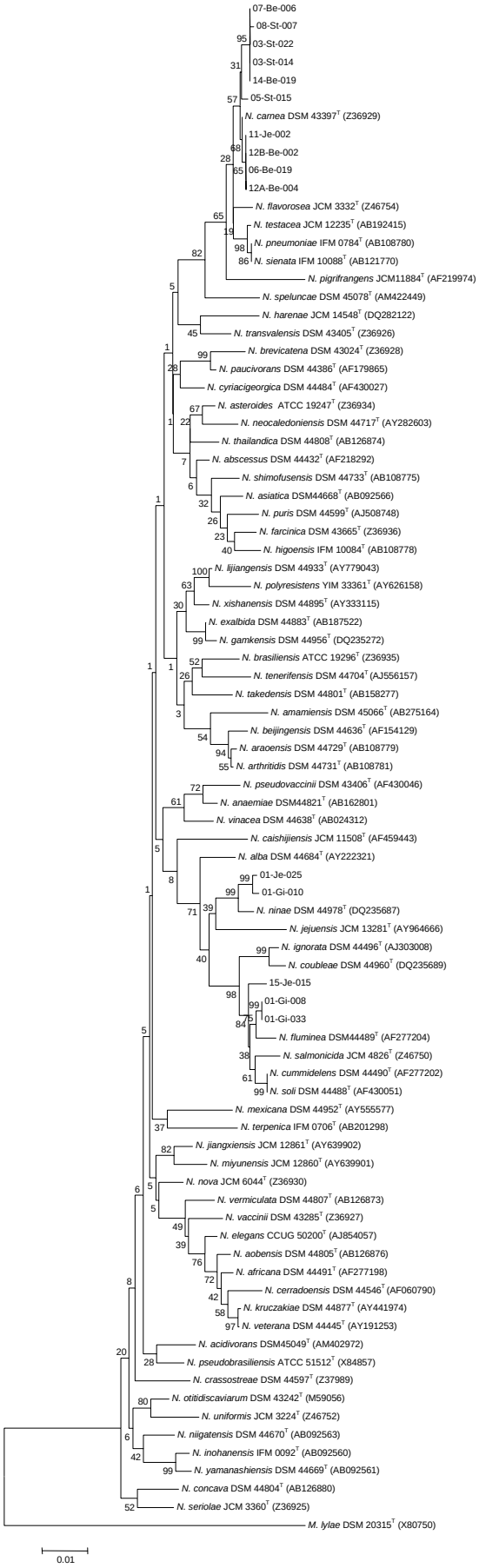
Micromonospora, ca. 1320 bp, outgroup *Jiangella*



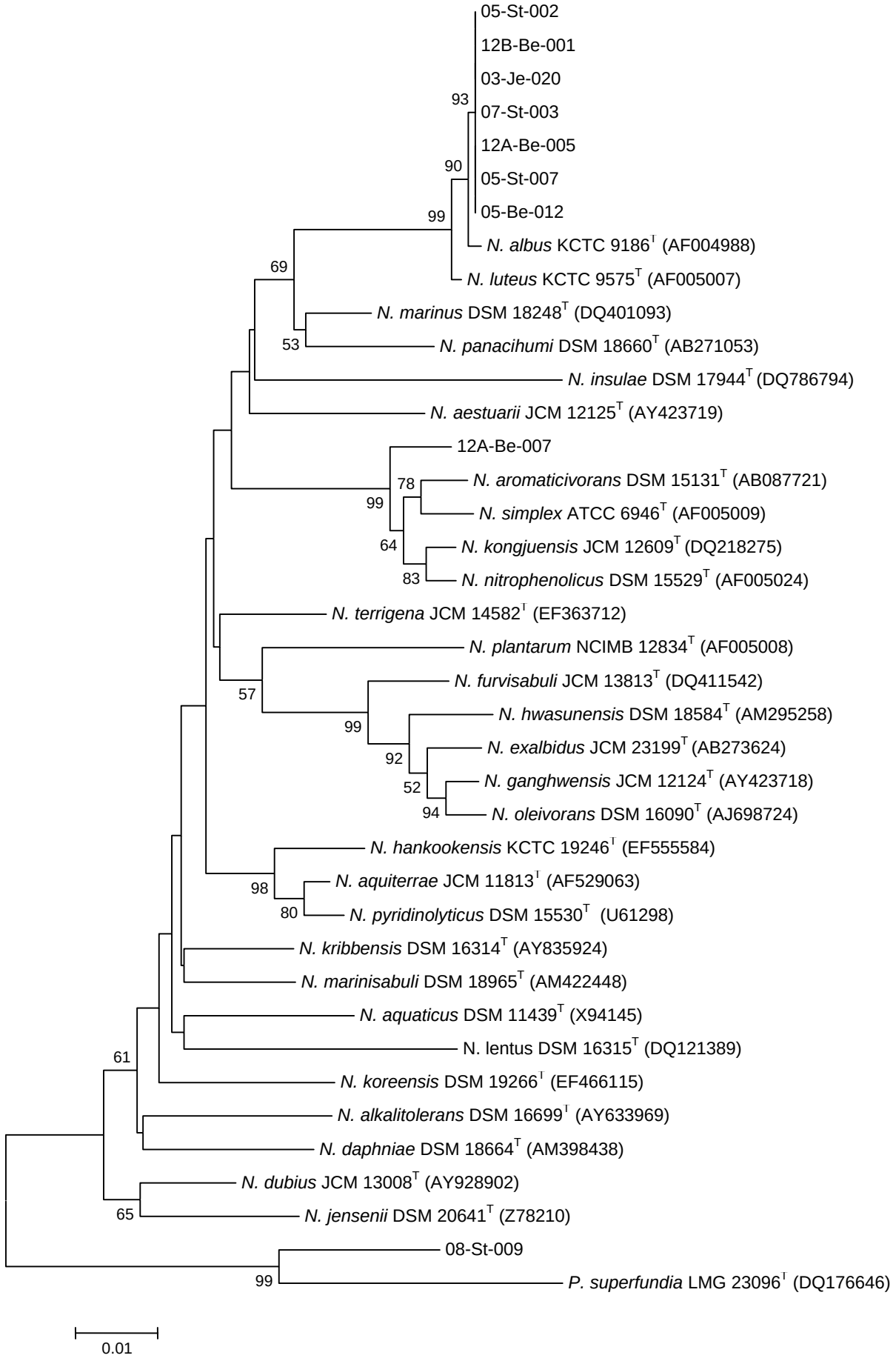
Mycobacterium, ca. 1230 bp, outgroup *Nocardia*



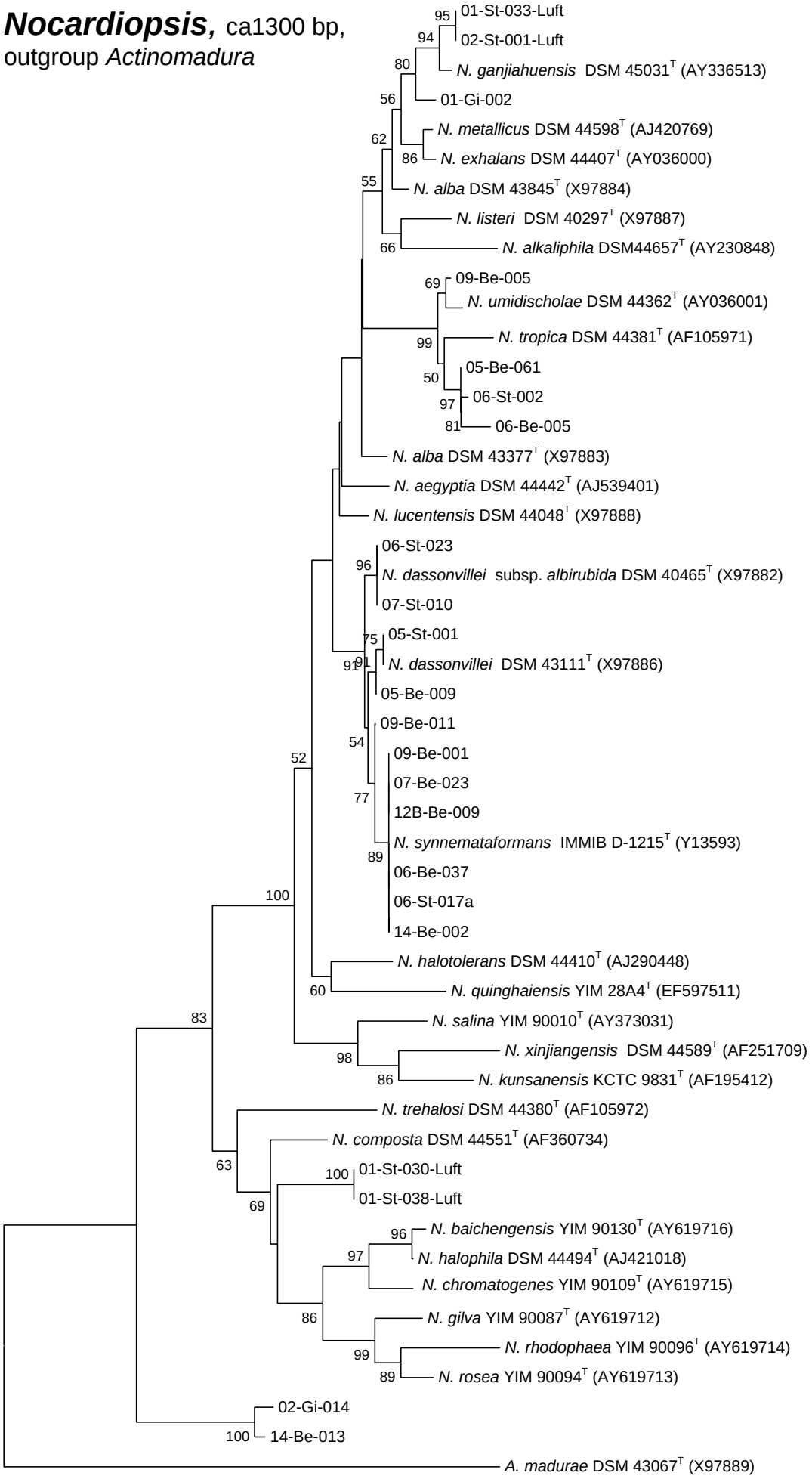
Nocardia, ca. 1280 bp, outgroup *Micrococcus*



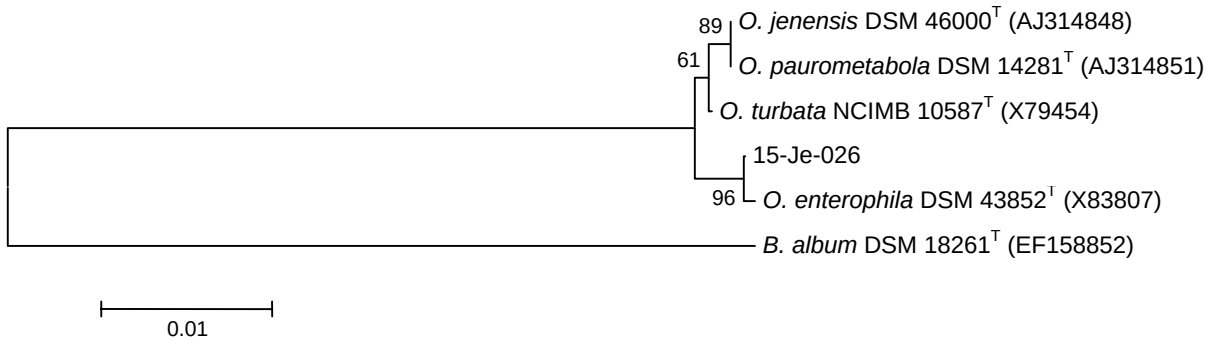
Nocardioides/Propionicicella, ca. 1280 bp



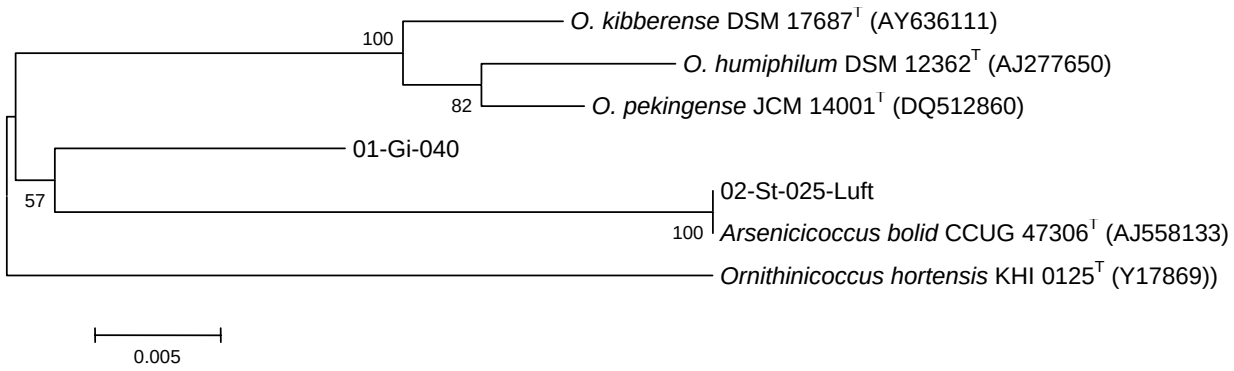
Nocardiopsis, ca1300 bp,
outgroup *Actinomadura*



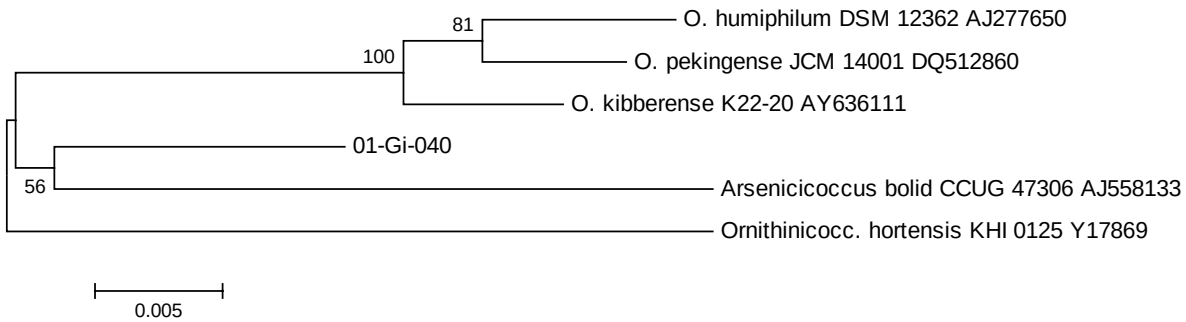
Oerskovia, ca. 1370 bp, outgroup *Brevibacterium*



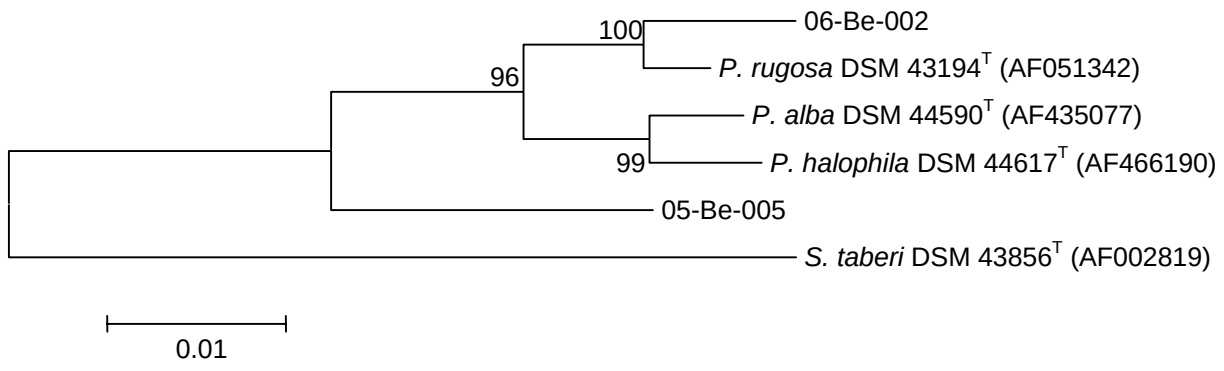
Ornithinimicrobium /Arsenicicoccus, ca. 1280bp



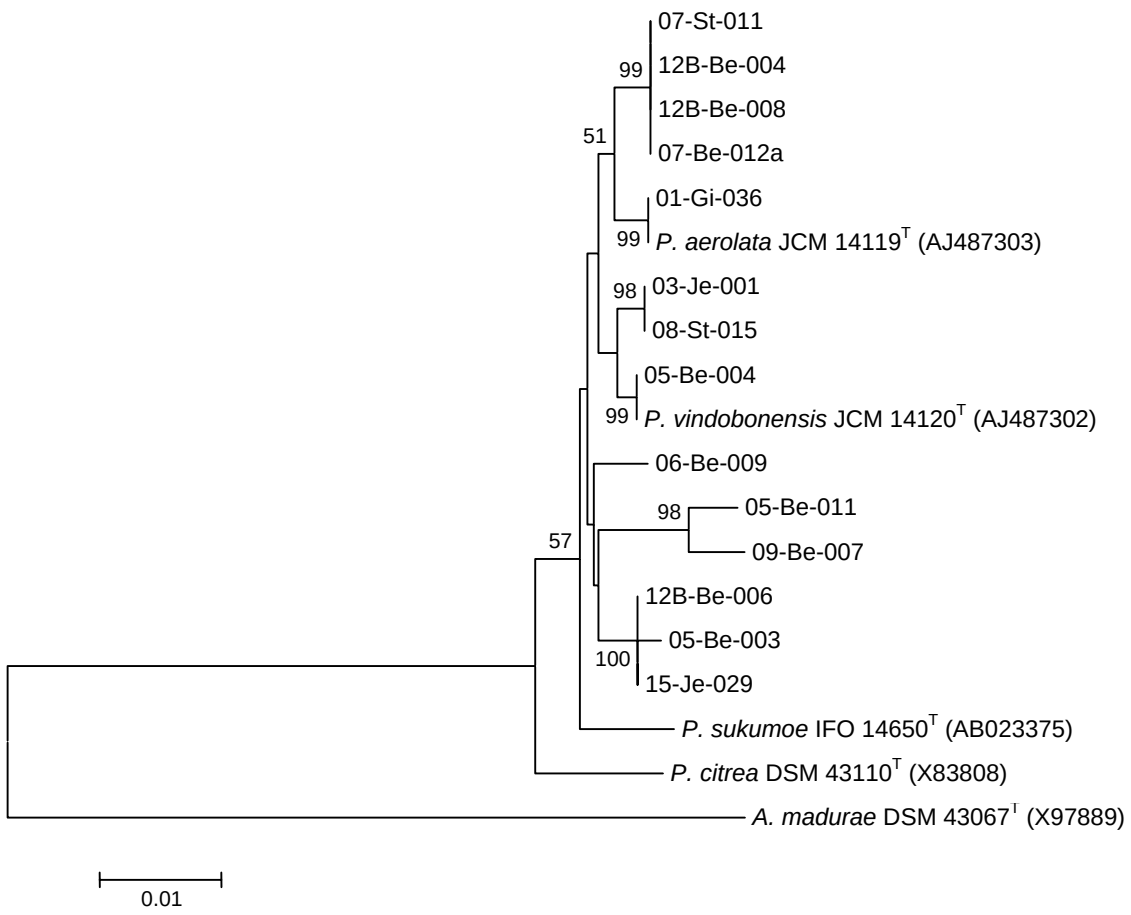
Ornithinimicrobium



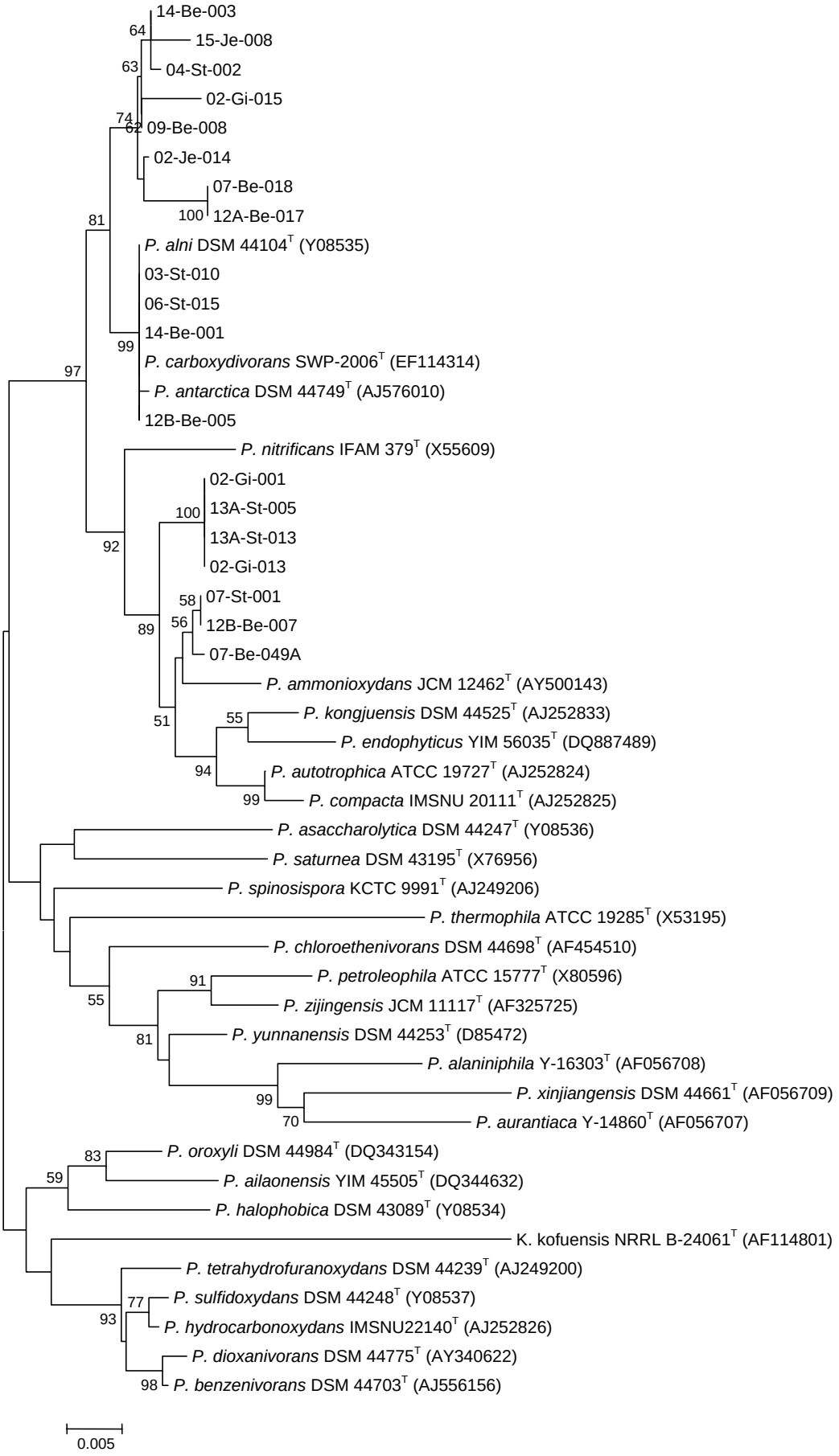
Prauserella, ca. 1400 bp, outgroup *Saccharopolyspora*



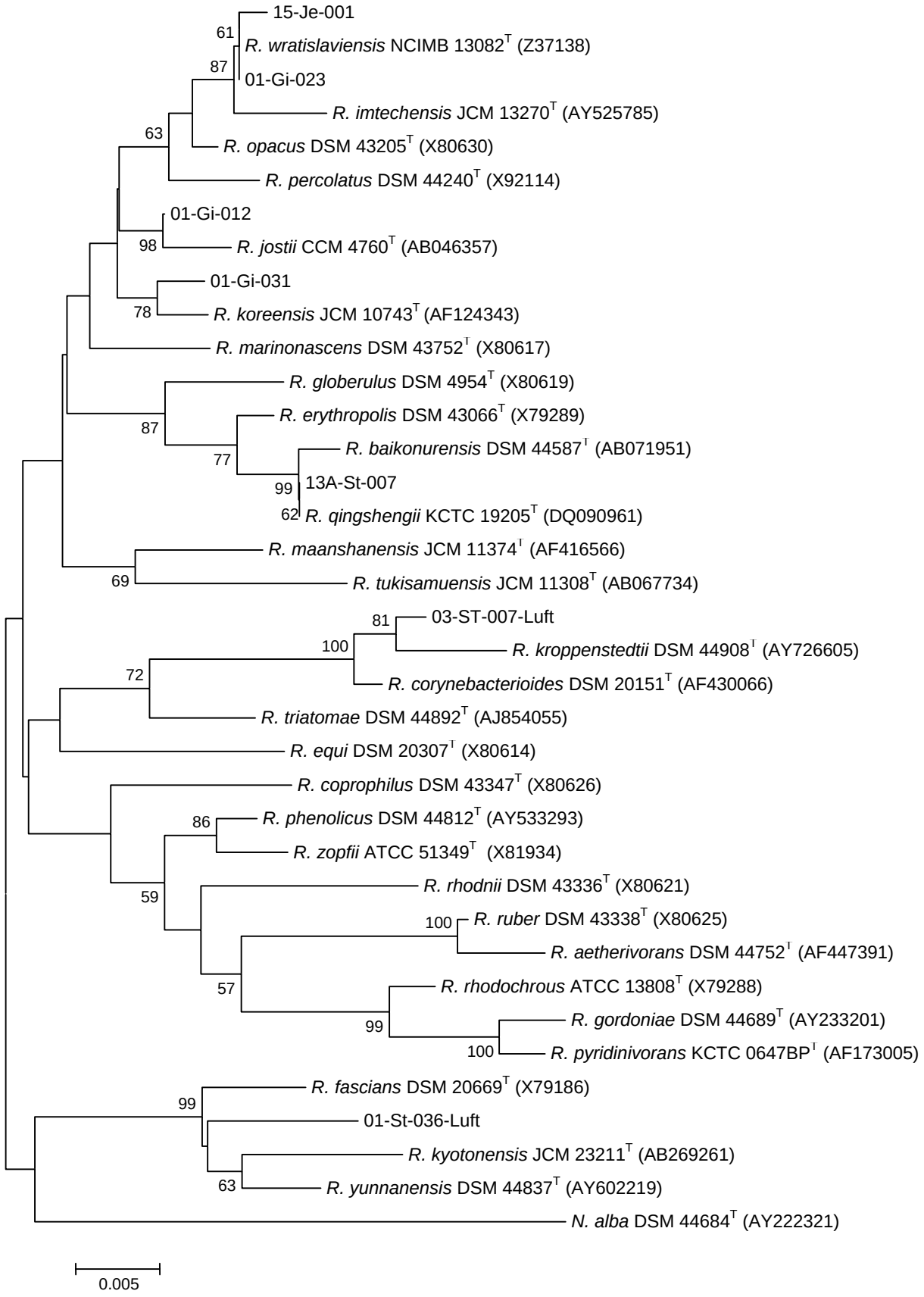
Promicomonospora, 1230 bp (14 Isolate)



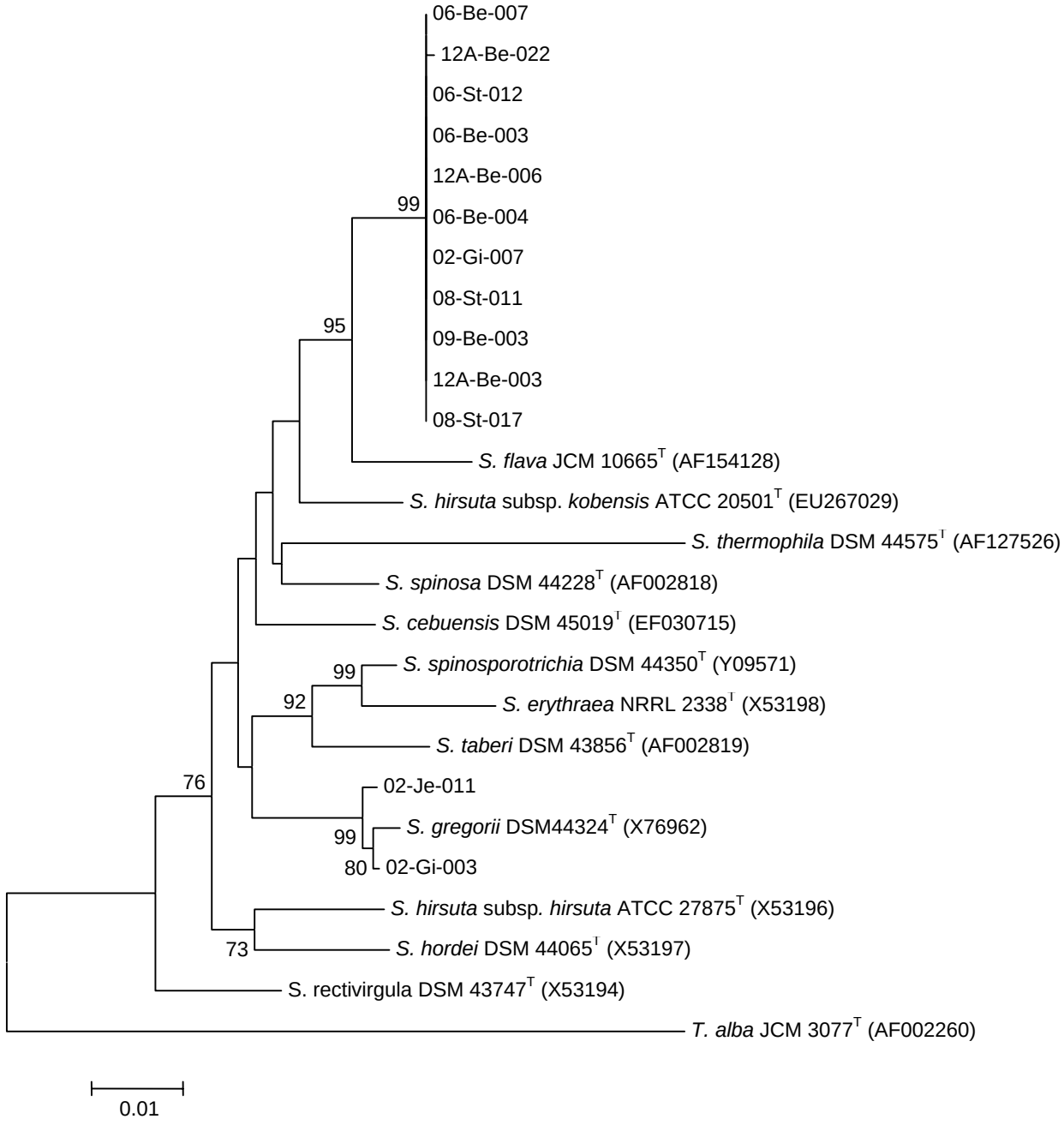
Pseudonocardia, ca. 1330 bp, outgroup Kutzneria kofuensis



Rhodococcus, ca. 1230 bp, outgroup *Nocardia*



Saccharopolyspora, ca 1260 bp, outgroup *Thermomonospora alba*



Tsukamurella, ca. 1400 bp, outgroup *Nocardia*

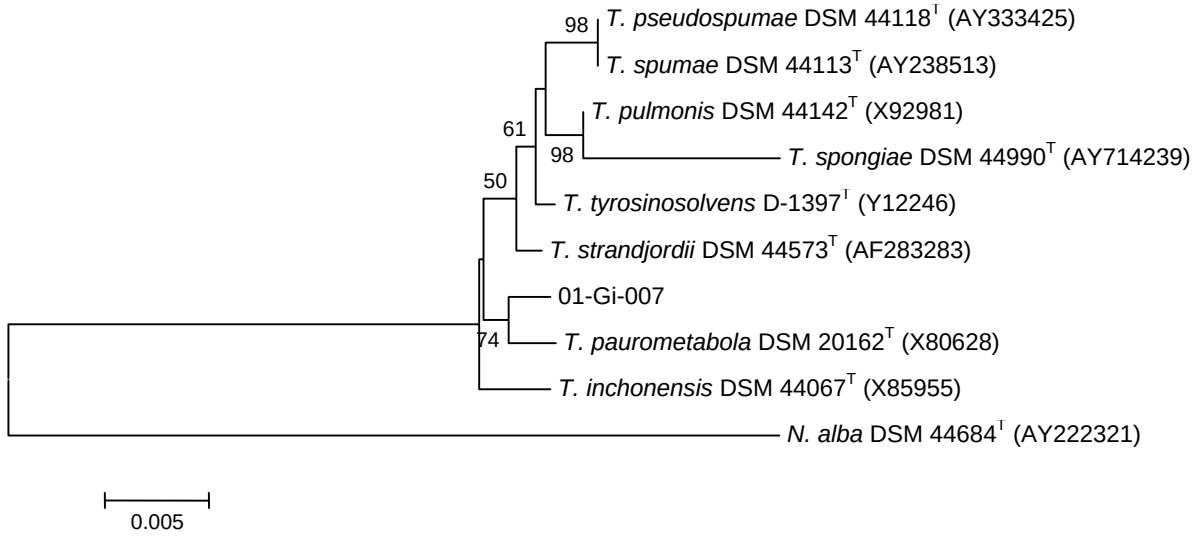


Tabelle A2: Vielfalt und Dominanz der aus den verschiedenen Proben isolierten Actinomyceten

Nährmedium	Dominanz-klasse	**Putzprobe 1**			**Putzprobe 6**		
		LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP	LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP
Actinomyceten-Agar	I	26/26 Isolate	1/2 Isolate	0	n d		
Actinomyceten-Agar	II	0	0	0			
Actinomyceten-Agar	III	0	0	0			
BHI-Agar	I	n d			5/8 Isolate	10/13 Isolate	2/4 Isolate
BHI-Agar	II				0	2/13	0
BHI-Agar	III				0	0	0
M 79-Agar	I	2/26 Isolate	1/2 Isolate	0	7/8 Isolate	13/13 Isolate	4/4 Isolate
M 79-Agar	II	0	0	0	0	0	0
M 79-Agar	III	0	0	0	1/8 Isolate	0	0
ISP-2-Agar	I	n d			n d		
ISP-2-Agar	II						
ISP-2-Agar	III						
ISP-3-Agar	I	n d			7/8 Isolate	12/13 Isolate	4/4 Isolate
ISP-3-Agar	II				0	1/13 Isolate	0
ISP-3-Agar	III				1/8	0	0
CM-Agar	I	n d			0	0	0
CM-Agar	II				4/8 Isolate	5/13 Isolate	0
CM-Agar	III				2/8 Isolate	6/13 Isolate	2/4
CASO-Agar	I	2/26 Isolate	0	0	n d		
CASO-Agar	II	0	0	0			
CASO-Agar	III	0	0	0			
Gauze-Agar	I	n d			3/8 Isolate	4/13 Isolate	2/4 Isolate
Gauze-Agar	II				2/8 Isolate	5/13 Isolate	0
Gauze-Agar	III				1/8 Isolate	3/13 Isolate	0
Sequenzierung		21x *Streptomyces*			4x *Streptomyces*	1x *Pseudonocardia* 1x *Saccharopolyspora* 3x *Nocardiopsis* 1x *Amycolatopsis*	1x *Streptomyces*

n d=nicht durchgeführt

Dominanz I=sehr gut
Dominanzklasse II=gut
Dominanzklasse III=schwach

keine ohne Isol= keine ohne-DAP-Isolate vorhanden
keine LL Isol= keine LL-DAP-Isolate vorhanden
keine meso Isol= keine meso-DAP-Isolate vorhanden

Nährmedium	Dominanzklasse	**Putzprobe 7**			**Putzprobe 8**		
		LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP	LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP
Actinomyceten-Agar	I	n d			n d		
Actinomyceten-Agar	II						
Actinomyceten-Agar	III						
BHI-Agar	I	2/2 Isolate	6/6 Isolate	1/1 Isolate	keine LL Isol	12/12 Isolate	6/6 Isolate
BHI-Agar	II	0	0	0		0	0
BHI-Agar	III	0	0	0		0	0
M 79-Agar	I	2/2 Isolate	6/6 Isolate	1/1 Isolate	keine LL Isol	12/12 Isolate	6/6 Isolate
M 79-Agar	II	0	0	0		0	0
M 79-Agar	III	0	0	0		0	0
ISP-2-Agar	I	n d			n d		
ISP-2-Agar	II						
ISP-2-Agar	III						
ISP-3-Agar	I	2/2 Isolate	6/6 Isolate	0	keine LL Isol	5/12 Isolate	2/6 Isolate
ISP-3-Agar	II	0	0	0		3/12 Isolate	2/6 Isolate
ISP-3-Agar	III	0	0	1/1 Isolate		4/12 Isolate	1/6 Isolate
CM-Agar	I	2/2 Isolate	4/6 Isolate	0	keine LL Isol	5/12 Isolate	2/6 Isolate
CM-Agar	II	0	2/6 Isolate	0		5/12 Isolate	4/6 Isolate
CM-Agar	III	0	0	1/1 Isolate		2/12 Isolate	0
CASO-Agar	I	n d			n d		
CASO-Agar	II						
CASO-Agar	III						
Gauze-Agar	I	1/2 Isolate	0	0	0	6/12 Isolate	2/6 Isolate
Gauze-Agar	II	1/2 Isolate	2/6 Isolate	0	0	0	0
Gauze-Agar	III	0	3/6 Isolate	1/1 Isolate	0	2/12 Isolate	4/6 Isolate
Sequenzierung		1x *Nocardioides*	1x *Pseudonocardia* 1x *Amycolatopsis* 1x *Nocardiopsis*	*Promicromonospora* 1x		1x *Streptomyces* 3x *Amycolatopsis* 1x *Aurantimonas* 1x *Nocardia* 1x *Propionicicella* 2x *Saccharopolyspora*	2x *Arthrobacter* 1x *Citricoccus* 1x *Agrococcus* *Promicromonospora* 1x

Nährmedium	Dominanzklasse	**Putzprobe 16**			**Styroporprobe 3**		
		LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP	LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP
Actinomyceten-Agar	I	n d			4/8 Isolate	3/8 Isolate	2/2 Isolate
Actinomyceten-Agar	II				2/8 Isolate	2/8 Isolate	0
Actinomyceten-Agar	III				1/8 Isolate	1/8 Isolate	0
BHI-Agar	I	6/6 Isolate	3/4 Isolate	2/2 Isolate	0	0	0
BHI-Agar	II	0	1/4 Isolate	0	0	0	0
BHI-Agar	III	0	0	0	0	0	0
M 79-Agar	I	6/6	4/4 Isolate	2/2 Isolate	7/8 Isolate	8/8 Isolate	1/2 Isolate
M 79-Agar	II	0	0	0	1/8 Isolate	0	0
M 79-Agar	III	0	0	0	0	0	0
ISP-2-Agar	I	n d			7/8 Isolate	6/8 Isolate	1/2 Isolate
ISP-2-Agar	II				1/8 Isolate	1/8 Isolate	0
ISP-2-Agar	III				0	1/8 Isolate	0
ISP-3-Agar	I	4/6 Isolate	4/4 Isolate	1/2 Isolate	6/8 Isolate	3/8 Isolate	0
ISP-3-Agar	II	1/6 Isolate	0	0	1/8 Isolate	3/8 Isolate	1/2 Isolate
ISP-3-Agar	III	1/6 Isolate	0	1/2 Isolate	0	2/8 Isolate	0
CM-Agar	I	4/6 Isolate	3/4 Isolate	2/2 Isolate	1/8 Isolate	3/8 Isolate	0
CM-Agar	II	1/6 Isolate	1/4 Isolate	0	4/8 Isolate	2/8 Isolate	0
CM-Agar	III	1/6 Isolate	0	0	2/8 Isolate	2/8 Isolate	2/2 Isolate
CASO-Agar	I	n d			3/8 Isolate	4/8 Isolate	2/2 Isolate
CASO-Agar	II				3/8 Isolate	2/8 Isolate	0
CASO-Agar	III				0	1/8 Isolate	0
Gauze-Agar	I	0	0	0	n d		
Gauze-Agar	II	0	1/4 Isolate	0			
Gauze-Agar	III	5/6 Isolate	3/4 Isolate	1/2 Isolate			
Sequenzierung					2x *Streptomyces* 3x unbekannt	3x *Pseudonocardia* 2x *Nocardia* 3x *Amycolatopsis*	

Nährmedium	Dominanz	**Styroporprobe 13**			**Dämmwolle 2**		
		LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP	LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP
Actinomyceten-Agar	I	n d			1/1 Isolat	3/4 Isolat	keine ohne Isol
Actinomyceten-Agar	II				0	0	
Actinomyceten-Agar	III				0	0	
BHI-Agar	I	7/7 Isolat	keine meso Isol	7/7 Isolat	n d		
BHI-Agar	II	0		0			
BHI-Agar	III	0		0			
M 79-Agar	I	7/7 Isolat	keine meso Isol	6/7 Isolat	0	1/4 Isolat	keine ohne Isol
M 79-Agar	II	0		0	0	0	
M 79-Agar	III	0		1/7 Isolat	0	0	
ISP-2-Agar	I	n d			n d		
ISP-2-Agar	II						
ISP-2-Agar	III						
ISP-3-Agar	I	5/7 Isolat	keine meso Isol	2/7 Isolat	n d		
ISP-3-Agar	II	2/7 Isolat		4/7 Isolat			
ISP-3-Agar	III	0		1/7 Isolat			
CM-Agar	I	5/7 Isolat	keine meso Isol	3/7 Isolat	n d		
CM-Agar	II	1/7 Isolat		3/7 Isolat			
CM-Agar	III	1/7 Isolat		1/7 Isolat			
CASO-Agar	I	n d			n d		
CASO-Agar	II						
CASO-Agar	III						
Gauze-Agar	I	5/7 Isolat	keine meso Isol	1/7 Isolat	n d		
Gauze-Agar	II	1/7 Isolat		0			
Gauze-Agar	III	1/7 Isolat		2/7 Isolat			
Sequenzierung		2x *Streptomyces*, 1x *Pseudonocardia*				1x *Rhodococcus*	

Nährmedium	Dominanzklasse	**Dämmwolle 4**			**Mineral. Schütte 5**		
		LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP	LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP
Actinomyceten-Agar	I	0/1 Isolate	1/1 Isolate	keine ohne Isol	n d		
Actinomyceten-Agar	II	0/1 Isolate	0				
Actinomyceten-Agar	III	0/1 Isolate	0				
BHI-Agar	I	0	0	keine ohne Isol	2/6 Isolate	2/5 Isolate	0
BHI-Agar	II	0	0		0	0	0
BHI-Agar	III	0	0		2/1 Isolate	0	0
M 79-Agar	I	1/1 Isolate	1/1 Isolate	keine ohne Isol	6/6 Isolate	5/5 Isolate	3/3 Isolate
M 79-Agar	II	0	0		0	0	0
M 79-Agar	III	0	0		0	0	0
ISP-2-Agar	I	1/1 Isolate	1/1	keine ohne Isol	n d		
ISP-2-Agar	II	0	0				
ISP-2-Agar	III	0	0				
ISP-3-Agar	I	1/1 Isolate	0	keine ohne Isol	6/6 Isolate	5/5 Isolate	3/3 Isolate
ISP-3-Agar	II	0	1/1 Isolate		0	0	0
ISP-3-Agar	III	0	0		0	0	0
CM-Agar	I	0	0	keine ohne Isol	4/6 Isolate	0	0
CM-Agar	II	0	0		0	2/5 Isolate	0
CM-Agar	III	1/1 Isolate	1/1 Isolate		0	0	0
CASO-Agar	I	0	0	keine ohne Isol	n d		
CASO-Agar	II	0	0				
CASO-Agar	III	0	0				
Gauze-Agar	I	n d			4/6 Isolate	2/5 Isolate	0
Gauze-Agar	II				0	0	0
Gauze-Agar	III				0	0	0
Sequenzierung		1x *Streptomyces*	1x *Pseudonocardia*		1x *Nocardiopsis*	1x *Nocardiopsis* 1x *Nocardia*	

Nährmedium	Dominanzklasse	**Lehmputz 10**		
		LL-DAP	meso-DAP	ohne DAP
Actinomyceten-Agar	I	n d		
Actinomyceten-Agar	II			
Actinomyceten-Agar	III			
BHI-Agar	I	keine LL Isol	3/3 Isolate	7/7 Isolate
BHI-Agar	II		0	0
BHI-Agar	III		0	0
M 79-Agar	I	keine LL Isol	3/3 Isolate	7/7 Isolate
M 79-Agar	II		0	0
M 79-Agar	III		0	0
ISP-2-Agar	I			
ISP-2-Agar	II		n d	
ISP-2-Agar	III			
ISP-3-Agar	I	keine LL Isol	0	0
ISP-3-Agar	II		1/3 Isolate	7/7 Isolate
ISP-3-Agar	III		2/3 Isolate	0
CM-Agar	I	keine LL Isol	0	0
CM-Agar	II		0	4/7 Isolate
CM-Agar	III		3/3 Isolate	3/7 Isolate
CASO-Agar	I	n d		
CASO-Agar	II			
CASO-Agar	III			
Gauze-Agar	I	keine LL Isol	0	0
Gauze-Agar	II		0	0
Gauze-Agar	III		1/3 Isolate	0
Sequenzierung				1x *Psychrobacter* 3x *Kocuria* 1x *Leucobacter*

Tab. A3 : Tabellarische Zusammenstellung der identifizierungsrelevanten Ergebnisse aller in dem Forschungs- und Entwicklungsvorhaben gewonnen Isolate

Stammnummer	KBE/g bzw. m³	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
01-St-006-Luft	10	ohne	CASO	1				1			1	1				ohne	orange				coccoid		*Arthrobacter*
01-St-026/2-Luft	10	ohne	CASO			1			1			1			1	ohne	gelb				coccoid		Actinomycet *
01-St-036-Luft	30	m	ACTINO	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Rhodococcus*
01-St-044-Luft	10	m	ACTINO	1				1			1		1			ohne	gelb				coccoid		Actinomycet *
01-St-047-Luft	10	m	HAFER	1				1			1					ohne	gelb				coccoid		Actinomycet *
01-St-052-Luft	10	m	HAFER	1	1			1		1	1		1			ohne	gelb				coccoid		*Rhodococcus*
01-St-057/b-Luft	10	ohne	HAFER	1	1				1	1			1		1	ohne	gelb				coccoid		*Kocuria*
01-St-064 -Luft	10	m	HAFER	1				1			1	1				ohne	beige				coccoid		*Janibacter*
02-St-013-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1		1		1			1	1				ohne	orange				coccoid		Actinomycet *
02-St-019/1-Luft	n.u.	ohne	HAFER	1	1				1	1			1		1	ohne	beige				coccoid		*Kytococcus*
02-St-023-Luft	n.u.	m	HAFER				1	1			1	1				ohne	braun		braun	braun	coccoid		*Saccharopolyspora*
02-St-025-Luft	n.u.	LL	BHI	1			1	1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Arsenicicoccus*
03-St-007-Luft	n.u.	m	BHI	1				1			1		1			ohne	orange				coccoid		*Rhodococcus*
03-St-008-Luft	n.u.	ohne	BHI	1				1			1		1			ohne	beige				coccoid		*Micrococcus*
04-St-005-Luft	n.u.	ohne	BHI	1					1		1		1			ohne	beige				coccoid		Actinomycet *
04-St-009-Luft	n.u.	ohne	BHI	1				1			1		1			ohne	beige				coccoid		Actinomycet *
04-St-010-Luft	n.u.	ohne	BHI	1				1			1		1			ohne	beige				coccoid		Actinomycet *
01-St-058-Luft	10	LL	HAFER		1		1		1	1			1		1		braun	weiß			Kurzstäbchen		Actinomycet *
01-St-022-Luft	20	LL	ACTINO		1			1			1		1				grau	weiß		braun	Myzel	stark	*Streptomyces*
01-St-023-Luft	20	LL	HAFER		1			1		1		1					braun	braun		braun	Myzel	mäßig	Actinomycet *
01-St-024-Luft	10	m	ACTINO		1				1		1			1			grau	weiß	braun		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
01-St-025-Luft	10	m	ACTINO		1		1	1			1		1	1			grau	weiß	braun		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
01-St-026/1-Luft	10	LL	ACTINO	1				1					1	1			grau	weiß	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-027-Luft	10	LL	ACTINO		1			1			1						grau	weiß	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-028-Luft	10	LL	ACTINO		1			1			1		1				braun	braun		braun	Myzel	mäßig	*Streptomyces* *
01-St-029-Luft	10	LL	ACTINO	1	1			1			1		1				beige	beige			Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
01-St-030-Luft	10	m	ACTINO				1		1				1				beige	beige	beige		Myzel	stark	*Nocardiopsis*
01-St-032-Luft	20	LL	ACTINO	1				1			1		1				braun	beige	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-033-Luft	20	m	ACTINO		1			1				1					beige	weiß	braun		Myzel	stark	*Nocardiopsis*
01-St-034-Luft	10	LL	ACTINO				1	1					1		1		grau	weiß	braun		Myzel	gering	*Streptomyces* Typ 1*
01-St-035-Luft	120	m	ACTINO		1				1				1		1		beige	beige	braun		Myzel	stark	*Amycolatopsis*
01-St-038-Luft	40	m	CASO				1		1				1				beige	beige			Myzel	gering	*Nocardiopsis*
01-St-040-Luft	20	m	ACTINO		1			1	1		1		1	1			braun	weiß	braun		Myzel	stark	*Amycolatopsis*
01-St-041-Luft	10	LL	ACTINO	1	1			1					1				beige	weiß			Myzel	stark	Actinomycet *

Stammnummer	KBE/g bzw. m^3	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
01-St-042-Luft	10	LL	ACTINO	1	1			1			1		1				beige	weiß	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
01-St-043-Luft	10	m	ACTINO	1					1		1		1				weiß	weiß	gelb		Myzel	stark	*Nocardiopsis*
01-St-046/1-Luft	10	m	ACTINO		1		1	1			1		1	1			gelb	weiß	braun		Myzel	stark	*Amycolatopsis*
01-St-046/2-Luft	10	LL	ACTINO		1			1			1	1					farblos	weiß			Myzel	mäßig	*Streptomyces* *
01-St-049-Luft	10	m	ACTINO	1	1				1						1		braun	weiß	hellbraun		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
01-St-051-Luft	10	LL	HAFER	1				1			1		1				beige	weiß	braun		Myzel	mäßig	*Streptomyces* Typ 1*
01-St-053-Luft	40	m	ACTINO				1		1				1				beige	beige			Myzel	stark	Actinomycet *
01-St-061-Luft	20	LL	ACTINO		1			1			1		1				grau	grau	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-066 -Luft	10	LL	M79	1		1		1		1	1	1					gelb	gelb			Myzel	mäßig	Actinomycet *
01-St-068-Luft	10	m	ACTINO	1	1			1			1		1				gelb	weiß			Myzel	stark	*Nocardiopsis*
01-St-069/1-Luft	10	LL	HAFER	1	1				1				1		1		rot	rot	rot	rot	Myzel	mäßig	Actinomycet *
01-St-069-Luft	30	LL	ACTINO	1	1			1			1		1				grau	grau	braun	braun	Myzel	stark	*Streptomyces* *
01-St-070-Luft	40	LL	ACTINO	1	1			1			1		1				grau	grau	braun	braun	Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-69/3-Luft	10	m	ACTINO	1	1			1					1				weiß	weiß	braun		Myzel	stark	*Pseudonocardia**
02-St-001-Luft	n.u.	m	ACTINO	1				1					1				weiß	weiß	gelb		Myzel	mäßig	*Nocardiopsis*
02-St-003-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1				1			1		1				weiß	weiß	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
02-St-004-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1				1			1		1	1			grau	grau	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
02-St-005-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1				1			1		1	1			grau	grau	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
02-St-006-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1	1			1			1		1	1			gelb	gelb	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
02-St-008-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1	1			1			1		1				braun	grau	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
02-St-009-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1				1			1		1				gelb	weiß	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
02-St-012/1-Luft	n.u.	m	M79				1	1			1		1		1		orange	orange	orange		Myzel	mäßig	Actinomycet *
02-St-012-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1				1			1		1				weiß	weiß	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
02-St-015-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1				1			1		1	1			gelb	weiß	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 1*
02-St-016-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1				1			1	1	1				grau	grau	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2*
02-St-019/2-Luft	n.u.	LL	HAFER	1				1			1		1				braun	beige	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 1*
02-St-020-Luft	n.u.	LL	HAFER	1	1			1			1		1	1			violett	grau	schwarz		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
02-St-027-Luft	n.u.	LL	HAFER	1	1			1			1		1				violett	grau	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
03-St-001-Luft	n.u.	LL	BHI				1		1	1			1		1		beige	beige			Myzel	gering	*Streptomyces*
03-St-002-Luft	n.u.	m	M79				1		1	1			1				beige	weiß	beige		Myzel	gering	*Actinomadura*
03-St-004-Luft	n.u.	LL	M79	1	1			1		1			1	1	1		grau	weiß	gelb		Myzel	gering	*Streptomyces* Typ 3*
03-St-006-Luft	n.u.	m	M79	1	1			1			1		1	1			weiß	weiß	gelb		Myzel	stark	*Nocardia*
03-St-011/3-Luft	n.u.	LL	M79	1	1			1			1		1	1			grau	weiß	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3 *
04-St-003-Luft	n.u.	LL	BHI				1	1					1		1		beige	beige	beige		Myzel	gering	Actinomycet *
04-St-006-Luft	n.u.	LL	BHI				1	1		1			1		1		beige	beige	beige		Myzel	gering	Actinomycet *
04-St-007-Luft	n.u.	LL	M79	1				1			1		1		1		braun	weiß	braun		Myzel	mäßig	*Streptomyces* *
02-St-002-Luft	n.u.	m	ACTINO	1				1			1						weiß	weiß	gelb		Stäbchen		*Nocardiopsis*

Stammnummer	KBE/g bzw. m^3	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
02-St-010-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1	1			1			1		1	1			violett	weiß	braun		Stäbchen		*Streptomyces* Typ 3*
02-St-011-Luft	n.u.	LL	ACTINO	1	1			1			1		1	1			violett	grau	braun		Stäbchen		*Streptomyces* Typ 3*
03-St-005-Luft	n.u.	m	BHI	1		1		1			1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Brevibacterium*
01-Gi-001	n.u.	n.u.	M65	1		1		1			1	1				ohne	gelb				kokkoide Stäbchen		*Microbacterium*
01-Gi-002	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	ohne	beige		beige		Mycel	mäßig	*Nocardiopsis*
01-Gi-003	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grün	braun	braun	Mycel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-004	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grünlich	braun		Mycel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-005	n.u.	n.u.	M65	1		1	1	1			1	1				ohne	orange				kokkoide Stäbchen		*Mycobacterium*
01-Gi-006	n.u.	n.u.	M65	1						1	1	1				ohne	gelb				coccoid		*Micrococcus*
01-Gi-007	n.u.	n.u.	M65	1	1				1				1	1	1	ohne	beige				Stäbchen		*Tsukamurella*
01-Gi-008	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	orange	weiß	orange		Myzel	mäßig	*Nocardia*
01-Gi-009	n.u.	n.u.	M65		1				1				1		1	ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-010	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	orange	weiß	orange		Myzel	mäßig	*Nocardia*
01-Gi-011	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1			viel	braun	weiß	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-012	n.u.	n.u.	M65	1			1			1	1		1			ohne	rosa				kokkoide Stäbchen		*Rhodococcus*
01-Gi-013	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	beige	weiß	beige		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-014	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grau	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-015	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	violett	braun		Myzel	mäßig	*Streptomyces*
01-Gi-016	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	weiß	braun		Myzel	mäßig	*Streptomyces*
01-Gi-017	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	weiß	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-018	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grau	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-019	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	altrosa	braun	braun	Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-020	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grün	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-022	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grau	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-023	n.u.	n.u.	M65	1		1	1		1		1	1				ohne	orange				Stäbchen		*Rhodococcus*
01-Gi-024	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	mittel	beige	weiß	beige		Myzel	mäßig	*Kribella*
01-Gi-026	n.u.	n.u.	M65	1						1		1	1			ohne	crem-farbend				kokkoide Stäbchen		*Mycobacterium*
01-Gi-029	n.u.	n.u.	M65	1					1	1			1		1	ohne	braun		rot-braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-030	n.u.	n.u.	M65	1	1				1	1			1		1	mittel	beige	weiß	beige		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
01-Gi-031	n.u.	n.u.	M65	1			1			1	1	1				ohne	orange				Stäbchen		*Rhodococcus*
01-Gi-032	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grau	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-033	n.u.	n.u.	M65		1					1			1		1	viel	braun	orange	braun		Myzel	mäßig	*Nocardia*
01-Gi-034	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	ohne	braun		braun		Mycel	gering	*Streptomyces*
01-Gi-036	n.u.	n.u.	M65	1					1	1		1	1		1	ohne	hellgelb				Myzel	stark	*Promicromonospora*
01-Gi-037	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grün	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*

Stammnummer	KBE/g bzw. m^3	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
01-Gi-040	n.u.	n.u.	M65	1			1		1		1	1				ohne	beige				kokkoide Stäbchen		*Ornithinimicrobium*
01-Je-001	2E+06	ohne	M79	1		1		1			1	1				ohne	beige				coccoid		*Arthrobacter*
01-Je-003	6E+06	m	M79	1				1			1		1			ohne	orange				Stäbchen		*Brevibacterium*
01-Je-005	1E+06	m	M79	1		1	1	1			1		1			ohne	beige				Stäbchen		*Rhodococcus* *
01-Je-006	100000	m	M79	1		1		1			1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Rhodococcus* *
01-Je-007	1E+07	LL	HAFER		1				1	1			1		1	viel	grau	grau	braun		Myzel	gering, RF	*Streptomyces* Typ 2 *
01-Je-011	5E+06	LL	HAFER		1				1	1			1		1	viel	grau	grau	braun		Myzel	gering, RF	*Streptomyces* Typ 2 *
01-Je-012	1E+07	LL	HAFER		1				1	1			1		1	mittel	rosa	grau	braun	braun	Myzel	gering, RF	*Streptomyces* Typ 3 *
01-Je-015	6E+06	LL	HAFER		1				1	1			1		1	mittel	rosa	grau	braun		Myzel	gering, RF	*Streptomyces* Typ 3 *
01-Je-016	1E+07	LL	HAFER		1				1	1			1		1	mittel	rosa	grau	braun		Myzel	gering, S, RA	*Streptomyces* Typ 3 *
01-Je-018	5E+06	LL	HAFER		1				1	1			1		1	mittel	grün	grün	orange	gelb	Myzel	gering, RF	*Streptomyces* Typ 2 *
01-Je-019	5E+06	LL	HAFER		1				1	1			1		1	wenig	grün	grau	braun		Myzel	gering, RF	*Streptomyces* Typ 2 *
01-Je-021	1E+07	m	M79		1				1	1			1		1	wenig	weiß	weiß	orange	braun	Myzel	mäßig	*Nocardia* *
01-Je-023	1E+06	m	M79		1				1	1			1		1	wenig	weiß	weiß	orange	rot	Myzel	mäßig	*Nocardia* *
01-Je-024	1E+06	LL	HAFER		1				1	1			1		1	mittel	rosa	grau	braun		Myzel	gering, S, RA	*Streptomyces* Typ 3 *
01-Je-025	1E+06	m	M79		1				1	1			1		1	wenig	weiß	weiß	orange		Myzel	mäßig	*Nocardia*
01-Je-026	1E+06	LL	HAFER				1		1	1			1		1	ohne	orange		braun	braun	Myzel	gering	*Streptomyces*
01-St-001	10000	LL	ACTINO	1					1				1	1			weiß	weiß			coccoid		*Streptomyces* Typ 2
01-St-002	10000	LL	ACTINO	1					1				1	1			weiß	weiß			coccoid		*Streptomyces* Typ 2
01-St-005	10000	LL	ACTINO	1					1				1				grau	grau	grau		Myzel	stark	Actinomycet *
01-St-006	10000	LL	M79				1	1		1		1			1		beige	beige			Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3
01-St-007	10000	LL	ACTINO	1					1				1				weiß	weiß	gelb	gelb	Myzel	mäßig	Actinomycet *
01-St-008	100000	m	ACTINO		1				1	1			1			ohne	orange				coccoid		Actinomycet *
01-St-009	30000	LL	ACTINO				1		1	1			1				farblos	weiß			coccoid		*Streptomyces* Typ 3
01-St-010	10000	LL	ACTINO				1		1	1	1	1					beige	beige	gelb	gelb	Myzel	mäßig	*Streptomyces* Typ 2
01-St-012	200000	LL	ACTINO	1					1	1			1				grau	weiß			coccoid		*Streptomyces* Typ 2
01-St-013	10000	LL	ACTINO	1		1			1		1	1				ohne	beige				Myzel	stark	*Streptomyces*
01-St-014	2000	LL	ACTINO				1		1				1				weiß	weiß			Myzel		*Streptomyces* Typ 3
01-St-015	2000	m	M79		1				1				1		1		rot	rot		rot	Myzel	stark	Actinomycet *
01-St-016	100	LL	ACTINO	1				1			1						grau	weiß			Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3
01-St-017	20000	LL	ACTINO		1				1		1	1					gelb	weiß		gelb	Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 2
01-St-018	20000	LL	M79	1	1			1		1		1			1		braun	braun		braun	Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3
01-St-019	800	LL	ACTINO		1			1			1		1	1			weiß	weiß			coccoid		*Streptomyces* Typ 2
01-St-020	10000	LL	ACTINO		1			1			1		1	1			weiß	weiß			coccoid		*Streptomyces* Typ 2
01-St-021	10000	LL	ACTINO				1	1			1	1					beige	weiß		gelb	Myzel	stark	*Streptomyces*
01-St-022	1000	LL	M79		1				1		1		1				braun	braun			Myzel	stark	*Streptomyces*

Stammnummer	KBE/g bzw. m³	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
01-St-023	1000	LL	ACTINO				1		1		1	1					grau	weiß			Myzel	mäßig	Actinomycet *
01-St-024	1000	LL	CASO				1		1		1	1					beige	beige			Myzel	gering	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-025	1000	LL	CASO				1		1	1	1	1					braun	braun			Myzel	mäßig	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-026	1000	LL	ACTINO	1	1				1	1		1			1		beige	beige			Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-027	1000	LL	ACTINO	1				1	1		1	1					beige	beige			Myzel	stark	*Streptomyces*
01-St-028	1000	LL	ACTINO	1					1		1	1					beige	weiß			Myzel	gering	*Streptomyces* Typ 3*
01-St-029	1000	LL	ACTINO	1	1			1					1				grau	weiß			Myzel	stark	Actinomycet *
01-St-032	1000	LL	ACTINO		1		1		1	1			1		1		beige	beige			Myzel	mäßig	*Streptomyces*
01-St-033	1000	LL	ACTINO	1					1	1		1			1	ohne	beige				Myzel	gering	*Streptomyces* Typ 1*
02-Gi-001	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	rosa	braun		Myzel	mäßig	*Pseudonocardia*
02-Gi-002	n.u.	n.u.	M65	1				1			1	1				ohne	orange				Stäbchen		*Brevibacterium*
02-Gi-003	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	wenig	rosa	weiß	rosa	rot	Myzel	mäßig	*Saccharopolyspora*
02-Gi-004	n.u.	n.u.	M65		1				1				1		1	viel	braun	weiß	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
02-Gi-005	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	grau	braun	braun	Myzel	gering	*Streptomyces*
02-Gi-007	n.u.	n.u.	M65		1				1	1	1	1	1			ohne	beige		beige		Myzel	mäßig	*Saccharopolyspora*
02-Gi-009	n.u.	n.u.	M65				1			1		1			1	ohne	orange		orange		Myzel	mäßig	*Micromonospora*
02-Gi-010	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Streptomyces*
02-Gi-012	n.u.	n.u.	M65	1				1			1	1				ohne	gelb				kokkoide Stäbchen		*Kocuria*
02-Gi-013	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1		braun	violett	braun		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
02-Gi-014	n.u.	n.u.	M65		1				1	1		1				ohne	beige		beige		Myzel	mäßig	*Nocardiopsis*
02-Gi-015	n.u.	n.u.	M65		1				1	1			1		1	viel	braun	weiß	braun		Myzel	mäßig	*Pseudonocardia*
02-Gi-017	n.u.	n.u.	M65	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Kocuria*
02-Gi-019	n.u.	n.u.	M65	1	1				1	1			1		1	ohne	beige				Kurzstäbchen		*Corynebacterium*
02-Je-004	20000	m	M79	1				1			1	1				ohne	orange				Stäbchen		*Brevibacterium* *
02-Je-008	20000	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	beige				coccoid		*Micrococcus*
02-Je-010	4000	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Citricoccus*
02-Je-011	4000	m	M79		1				1	1			1		1	wenig	beige	weiß	beige		Myzel	mäßig	*Saccharopolyspora*
02-Je-013	4000	m	M79		1				1	1			1		1	wenig	beige	weiß	beige		Myzel	mäßig	*Saccharopolyspora* *
02-Je-014	4000	m	M79		1				1	1			1		1	ohne	braun		braun		Myzel	mäßig	*Pseudonocardia*
02-St-002	100	m	ACTINO	1	1			1	1		1						beige	weiß	braun		Myzel	mäßig	Actinomycet *
02-St-006	200	m	ACTINO	1				1			1	1				ohne	farblos				coccoid		*Brevibacterium*
02-St-009	100	m	ACTINO	1				1			1	1				ohne	farblos				Stäbchen		*Rhodococcus*
02-St-011	100	m	M79	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		Actinomycet *
02-St-013	1000	LL	ACTINO				1		1				1				braun	weiß		braun	Myzel	stark	*Streptomyces*
03-Je-001	3E+06	ohne	M79	1				1					1		1	ohne	beige		beige		Myzel	mäßig	*Promicromonospora* citrea
03-Je-002	3E+06	m	M79	1				1			1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Brevibacterium antiquum*

Stammnummer	KBE/g bzw. m^3	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
03-Je-003	3E+06	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	gelb				Stäbchen		*Microbacterium phyllosphaeraceae*
03-Je-004	3E+06	LL	M79	1				1			1	1				ohne	beige				coccoid		Actinomycet *
03-Je-006	3E+06	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Isoptericola variabilis*
03-Je-007	3E+06	m	M79		1				1	1			1		1	wenig	orange	weiß	orange		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
03-Je-012	4E+06	LL	HAFER		1				1	1			1		1	viel	grau	grün	braun		Myzel	gering, RF	*Streptomyces microflavus*
03-Je-013	43000	m	HAFER		1				1	1			1		1	viel	beige	weiß	orange		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis orientalis*
03-Je-015	43000	LL	HAFER		1				1	1			1		1	mittel	beige	weiß	braun		Myzel	gering, S, RA	*Streptomyces* Typ 1*
03-Je-016	3E+06	LL	HAFER		1				1	1			1		1	mittel	grau	grau	braun	braun	Myzel	gering, S	*Streptomyces sannanensis*
03-Je-017	3E+06	LL	HAFER		1				1	1			1		1	mittel	grau	grau	braun		Myzel	gering, S	*Streptomyces* Typ 1*
03-Je-019	3E+06	m	HAFER	1	1				1	1			1		1	ohne	orange				Stäbchen		*Mycobacterium neglectum*
03-Je-020	3E+06	LL	M79	1				1		1		1	1			ohne	beige		beige		Myzel	mäßig	*Nocardioides albus*
03-Je-022	43000	LL	M79		1			1	1	1			1			ohne	braun		braun		Myzel	gering	*Streptomyces aculeolatus*
03-Je-023	4E+06	LL	M79		1				1	1			1		1	wenig	beige	weiß	orange		Myzel	stark	*Jiangella ginsengisola*
03-St-001	3000	m	M79	1				1			1		1	1			grau	weiß	gelb		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
03-St-003	3000	m	M79				1		1	1	1		1	1			weiß	weiß	gelb		Myzel	gering	*Amycolatopsis*
03-St-004	200	LL	BHI	1				1		1	1		1				braun	braun	braun		Myzel	stark	*Streptomyces*
03-St-006	1000	LL	M79	1	1			1			1		1	1			gelb	weiß	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 1*
03-St-007	1000	m	M79	1					1						1		weiß	weiß	gelb		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
03-St-008	1000	LL	M79	1			1	1		1		1					beige	beige			Myzel	gering	*Streptomyces*
03-St-009	2000	LL	M79		1		1		1	1			1		1		braun	braun	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
03-St-010	100	m	M79		1		1		1		1		1	1			braun	weiß	braun		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
03-St-011	100	m	M79		1		1		1				1	1			braun	weiß	braun		Myzel	mäßig	*Pseudonocardia* *
03-St-013	10000	m	M79				1		1	1	1		1	1			grau	weiß	braun		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
03-St-014	10000	m	M79				1		1		1		1	1			weiß	weiß	gelb		Myzel	stark	*Nocardia*
03-St-019	5000	LL	M79	1					1		1		1	1			weiß	weiß	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* Typ 1
03-St-022	1000	m	M79				1	1			1		1	1			weiß	weiß	gelb		Myzel	stark	*Nocardia*
04-Je-003	4000	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Micrococcus*
04-Je-005	16000	LL	M79				1	1					1			ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Streptomyces roseocinereus*
04-Je-006	4000	LL	M79				1		1	1			1		1	mittel	beige	weiß	braun	braun	Myzel	gering, RF, RA	*Streptomyces albiaxialis*
04-Je-007	4000	LL	M79		1				1	1			1			wenig	beige	weiß	braun		Myzel	gering, RF, RA	*Streptomyces* Typ 1*
04-Je-008	16000	LL	HAFER		1				1	1			1			mittel	beige	weiß	braun		Myzel	gering, RF, RA	*Streptomyces* Typ 1*
04-St-001	900	LL	M79				1		1			1					beige	beige	braun		Myzel	mäßig	*Streptomyces*
04-St-002	6000	m	M79	1	1			1		1	1		1	1			grau	weiß	braun		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
05-Be-002	720000	ohne	M79	1					1			1			1	ohne	beige		beige	braun	Myzel	RF	*Promicromonospora* TS
05-Be-003	3600	ohne	M79	1				1				1				ohne	gelb		gelb		Myzel	stark	*Promicromonospora*

Stammnummer	KBE/g bzw. m³	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
05-Be-004	306000	ohne	M79	1					1				1			ohne	beige		beige		Myzel	stark	*Promicromonospora*
05-Be-005	1800	m	M79	1				1					1			mittel	beige	weiß	braun	braun	Myzel	mittel	*Prauserella*
05-Be-006	180	m	M79	1				1					1			viel	weiß	weiß	braun		Myzel	stark	*Amycolatopsis*
05-Be-009	360	m	M79				1	1					1			mittel	weiß	weiß	beige		Myzel	gering	*Nocardiopsis*
05-Be-010	180	m	M79	1				1					1			wenig	beige	weiß	braun	braun	Myzel	mittel	Actinomycet *
05-Be-011	1800	ohne	M79	1					1			1				ohne	gelb		gelb		Myzel	stark	*Promicromonospora*
05-Be-012	1800	LL	M79	1	1			1							1	wenig	beige	weiß	beige		Myzel	stark	*Nocardioides*
05-Be-013	360	LL	M79	1					1			1			1	wenig	beige	weiß	orange		Myzel	stark	*Jiangella*
05-Be-014	1E+06	LL	M79	1				1							1	ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Streptomyces*
05-Be-016	396000	m	M79				1	1					1			ohne	orange		orange		Myzel	mittel	*Amycolatopsis*
05-Be-019	180000	m	M79				1	1					1			mittel	beige	weiß	beige		Myzel	stark	*Pseudonocardia* *
05-Be-021	54000	ohne	M79			1		1				1				ohne	gelb				coryneform		*Amycolatopsis*
05-Be-026	9000	ohne	M79	1				1					1			ohne	beige		beige		Myzel	stark	*Promicromonospora*
05-Be-027	5400	m	M79				1	1					1			mittel	weiß	weiß	beige		Myzel	RF	Actinomycet *
05-Be-030	540	m	M79				1	1					1			mittel	gelb	weiß	orange		Myzel	mittel	*Lentzea*
05-Be-037	1800	LL	M79	1				1					1		1	mittel	weiß	weiß	beige		Myzel	RF	*Streptomyces*
05-Be-040	540000	ohne	M79	1				1				1				ohne	gelb				coccoid		*Streptomyces* TS
05-Be-043	360000	m	M79	1		1		1				1				ohne	gelb				Stäbchen		*Mycobacterium*
05-Be-054	18000	LL	M79				1		1						1	ohne	beige		beige	braun	Myzel	gering	*Streptomyces*
05-Be-055	54000	LL	M79	1				1					1		1	ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Streptomyces*
05-Be-061	5400	m	M79	1				1					1			mittel	beige	weiß	gelb		Myzel		*Nocardiopsis*
05-St-001	3000	m	M79	1				1						1			beige	weiß	braun	braun	Myzel	gering	*Nocardiopsis*
05-St-002	10000	LL	M79				1		1		1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Nocardioides*
05-St-007	80000	m	M79		1			1					1				gelb	gelb	gelb		Myzel	gering	*Nocardioides*
05-St-011	180000	LL	M79				1	1			1		1				beige	beige			Myzel	gering	*Streptomyces*
05-St-015	6000	m	M79	1				1						1			weiß	weiß	gelb		coccoid		*Nocardia*
05-St-016	60000	m	M79		1				1	1	1	1					gelb	gelb	gelb		Myzel	gering	*Amycolatopsis* *
06-Be-002	120000	m	M79	1				1		1					1	ohne	beige		beige	braun	Myzel	stark	*Prauserella*
06-Be-003	36000	m	M79	1					1	1					1	ohne	braun		braun		Myzel	gering	*Saccharopolyspora*
06-Be-004	30000	m	M79				1	1					1			ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Saccharopolyspora*
06-Be-005	3600	m	M79				1	1					1			viel	gelb	weiß	gelb		Myzel	stark, RF	*Nocardiopsis*
06-Be-007	12000	m	M79	1				1					1			wenig	beige	weiß	beige		Myzel	RF	*Saccharopolyspora*
06-Be-008	180000	LL	M79	1				1				1			1	ohne	beige		beige		Myzel	stark	*Streptomyces* TS
06-Be-009	120000	LL	M79	1						1		1			1	ohne	beige		beige		Myzel	stark	*Promicromonospora*
06-Be-019	12000	m	M79	1				1					1			mittel	beige	weiß	beige		Myzel	RF	*Nocardia*
06-Be-021	120000	ohne	M79	1				1					1		1	ohne	gelb		gelb		Myzel	mittel	*Amycolatopsis*
06-Be-024	1800	ohne	M79	1					1						1	ohne	gelb				coccoid		*Mycobacterium*

Stammnummer	KBE/g bzw. m^3	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
06-Be-025	600	LL	M79	1					1						1	ohne	orange		orange		Myzel	gering	*Streptomyces*
06-Be-026	24000	LL	M79	1				1					1			viel	beige	weiß	braun	braun	Myzel	RF	*Streptomyces*
06-Be-030	132000	LL	M79	1				1					1		1	ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Streptomyces*
06-Be-037	6000	m	M79	1						1		1				mittel	beige	weiß	beige		Myzel	stark	*Nocardiopsis*
06-Be-044A	600	m	M79	1				1				1				ohne	orange				coccoid		*Brevibacterium*
06-Be-46	120000	LL	M79	1					1						1	wenig	beige	weiß	gelb	braun	Myzel	mittel	*Streptomyces*
06-St-001	500	LL	M79	1					1		1			1			weiß	weiß	braun		Myzel	mäßig	*Streptomyces*
06-St-002	35000	m	M79	1					1		1			1			weiß	weiß	gelb		Stäbchen		*Nocardiopsis*
06-St-003	50000	ohne	M79				1	1			1		1		1		braun	braun	orange		Myzel	gering	*Streptomyces*
06-St-004	20000	LL	M79				1	1			1		1				grau	grau	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
06-St-005	25000	ohne	M79		1				1		1		1				grau	weiß	braun		Myzel	mäßig	*Streptomyces*
06-St-008	70000	LL	BHI				1		1	1			1		1		beige	beige	gelb		Myzel	gering	*Streptomyces*
06-St-009	110000	LL	BHI				1		1	1			1		1		beige	beige	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
06-St-010	30000	m	BHI				1	1		1			1		1		gelb	gelb	gelb		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
06-St-012	10000	m	BHI				1		1	1			1		1		beige	beige	gelb		Myzel	gering	*Saccharopolyspora*
06-St-015	60000	m	M79		1				1		1			1			grau	weiß	braun		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
06-St-017	6000	m	HAFER	1				1			1			1			rosa	weiß	rot		Myzel	mäßig	*Nocardiopsis*
06-St-019	20000	LL	HAFER				1		1		1		1				beige	beige	braun	braun	Myzel	mäßig	*Streptomyces*
06-St-020	1300	m	HAFER				1	1			1		1				braun	weiß		braun	Myzel	gering	Actinomycet *
06-St-023	300	m	HAFER	1				1			1		1				weiß	weiß	braun	braun	Myzel	stark	*Nocardiopsis*
07-Be-006	24000	m	M79	1				1					1			mittel	beige	weiß	gelb		Myzel	mittel	*Nocardia*
07-Be-007	2400	LL	M79	1				1			1					ohne	beige		beige		Myzel	stark	*Microlunatus* TS
07-Be-008	3000	m	M79				1	1					1		1	ohne	braun		braun		Myzel	mittel	*Amycolatopsis*
07-Be-009	2400	LL	M79	1				1					1		1	wenig	beige	weiß	beige		Myzel	stark	*Jiangella* TS
07-Be-012	288000	LL	M79	1						1	1				1	ohne	beige		beige		Myzel	stark	*Promicromonospora*
07-Be-017	192000	m	M79	1				1					1		1	ohne	gelb		gelb		Myzel	mittel	*Amycolatopsis*
07-Be-018	288000	m	M79	1	1			1					1		1	mittel	weiß	weiß	braun		Myzel	mittel	*Pseudonocardia*
07-Be-023	96000	m	M79				1	1					1			mittel	weiß	weiß	braun	braun	Myzel	mittel	*Nocardiopsis*
07-Be-029	144000	LL	M79				1			1			1			wenig	beige	beige	beige		Myzel		*Streptomyces*
07-Be-049A	24000	LL	M79				1			1			1			ohne	beige		beige		Myzel	RF	*Pseudonocardia*
07-Be-053	48000	LL	M79	1					1						1	ohne	gelb		gelb		Myzel	mittel	*Streptomyces*
07-St-001	660000	m	HAFER	1				1			1		1				weiß	weiß	gelb		Myzel	stark	*Pseudonocardia*
07-St-003	3E+06	LL	HAFER	1		1			1		1	1					beige	beige			Myzel	mäßig	*Nocardioides*
07-St-004	4E+06	m	BHI				1	1		1			1		1		gelb	gelb	gelb		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
07-St-007	5E+06	m	BHI			1		1	1		1	1				ohne	gelb				coccoid		Actinomycet *
07-St-010	400000	m	HAFER	1				1			1		1				farblos	weiß	gelb		Myzel	gering	*Nocardiopsis*
07-St-011	2E+06	ohne	BHI				1	1		1	1		1		1		gelb	gelb	gelb		Myzel	stark	*Promicromonospora*

Stammnummer	KBE/g bzw. m^3	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
08-St-001	100	ohne	BHI	1		1			1		1	1					beige	beige	beige		Myzel	mäßig	*Arthrobacter*
08-St-002	1000	m	BHI		1				1	1			1		1		beige	beige	gelb		Myzel	mäßig	*Streptomyces*
08-St-003	1000	m	BHI		1		1	1		1			1		1		gelb	gelb	gelb		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
08-St-004	5E+06	m	M79		1		1	1		1			1		1		gelb	gelb			Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
08-St-006	120000	ohne	BHI	1		1		1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Arthrobacter*
08-St-007	140000	m	M79	1					1		1		1	1			weiß	weiß	gelb		Myzel	stark	*Nocardia*
08-St-008	40000	ohne	M79			1		1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Citricoccus*
08-St-009	50000	m	M79	1		1		1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Propionicicella*
08-St-011	400000	m	M79				1	1	1	1		1			1		braun	braun	beige		Myzel	stark	*Saccharopolyspora*
08-St-013	50000	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Agrococcus*
08-St-015	130000	ohne	M79	1				1					1		1		beige	beige	beige		Myzel	stark	*Promicromonospora*
08-St-016	3E+06	m	M79	1					1	1			1		1		gelb	weiß			Myzel	stark	*Amycolatopsis*
08-St-017	6E+06	m	M79				1			1		1					braun	braun	beige		Myzel	mäßig	*Saccharopolyspora*
09-Be-001	120	m	M79	1				1			1					mittel	grau	grau	beige		Myzel	stark	*Nocardiopsis*
09-Be-002	9400	m	M79	1					1	1			1			wenig	gelb	weiß	gelb		Myzel	stark	*Amycolatopsis* TS
09-Be-003	120	m	M79	1						1			1		1	ohne	beige		beige	braun	Myzel	gering, RF	*Saccharopolyspora*
09-Be-005	9400	m	M79	1				1				1				mittel	rot	weiß	rot	braun	Myzel	stark	*Nocardiopsis*
09-Be-006	120000	LL	M79				1		1			1				ohne	beige		beige		Myzel	RF	*Streptomyces*
09-Be-007	620000	ohne	M79			1	1			1	1	1				ohne	gelb		gelb	braun	Myzel	stark	*Promicromonospora*
09-Be-008	19000	m	M79		1					1				1	1	mittel	grau	grau	braun	braun	Myzel	mittel	*Pseudonocardia*
09-Be-009	620	LL	M79				1	1					1			viel	beige	weiß	beige	braun	Myzel	RF	*Streptomyces*
09-Be-010	620	LL	M79				1	1					1			mittel	beige	beige	braun	braun	Myzel	RF	*Streptomyces*
09-Be-011	620	m	M79	1				1		1			1			viel	grau	grau	beige	braun	Myzel		*Nocardiopsis*
10-St-002	2000	ohne	BHI	1				1			1	1				ohne	beige				coccoid		Actinomycet *
10-St-003	17000	ohne	BHI	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Kocuria*
10-St-004	300	m	M79	1		1		1			1		1			ohne	orange				Stäbchen		*Dietzia* TS
10-St-005	10000	ohne	BHI	1					1		1		1			ohne	beige				coccoid		*Kocuria*
10-St-007	5600	ohne	BHI	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Kocuria*
10-St-008	300	ohne	BHI	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Leucobacter*
10-St-009	10000	ohne	BHI	1				1			1		1			ohne	gelb				coccoid		*Kocuria*
10-St-010	320000	m	BHI	1			1		1		1	1				ohne	beige				coccoid		*Brevibacterium* TS
11-Je-001	60000	m	M79	1					1	1			1		1	ohne	beige		beige		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
11-Je-002	60000	m	M79		1				1	1			1	1	1	wenig	beige	weiß	orange		Myzel	stark	*Nocardia*
11-Je-003	60000	LL	M79	1					1	1			1		1	ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Streptomyces*
11-Je-004	60000	m	M79	1						1			1		1	wenig	beige	weiß	beige		Myzel	mäßig	*Amycolatopsis*
11-Je-005	70000	m	M79		1				1	1			1			ohne	orange		orange		Myzel	gering	*Micromonospora*
11-Je-006	70000	LL	M79		1				1	1		1			1	ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Streptomyces*

Stammnummer	KBE/g bzw. m³	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
11-Je-009	70000	ohne	M79	1						1		1				ohne	beige				Stäbchen		*Promicromonospora*
11-Je-010	70000	m	M79	1		1					1	1				ohne	gelb				coccoid		*Brachybacterium*
11-Je-011	70000	ohne	M79	1					1		1	1				ohne	weiß				coccoid		*Arthrobacter* *
12A-Be-001	20000	m	M79				1			1					1	ohne	orange		orange		Myzel	gering	*Micromonospora*
12A-Be-002	600	LL	M79		1		1			1					1	wenig	braun	beige	braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
12A-Be-003	100000	m	M79	1				1		1			1		1	ohne	beige		farblos	gelb	Myzel	mittel	*Saccharopolyspora*
12A-Be-004	10000	m	M79			1			1				1			mittel	weiß	weiß	beige		Myzel	mittel	*Nocardia*
12A-Be-005	2000	LL	M79	1				1		1			1		1	wenig	beige	weiß	beige		Myzel	stark	*Nocardioides*
12A-Be-006	1000	m	M79	1				1		1					1	ohne	beige		farblos		Myzel	mittel	*Saccharopolyspora*
12A-Be-008	2E+06	ohne	M79	1				1			1					ohne	beige				Stäbchen		*Arthrobacter*
12A-Be-010	200000	LL	M79				1			1			1		1	ohne	gelb		beige		Myzel	keine	*Streptomyces*
12A-Be-011	20000	m	M79				1		1		1		1			ohne	orange		orange		Myzel	gering	*Micromonospora*
12A-Be-012	100000	ohne	M79	1		1		1			1					ohne	beige				coccoid		*Arthrobacter*
12A-Be-013	100000	m	M79	1						1			1		1	ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Arthrobacter*
12A-Be-014	20000	m	M79		1					1			1		1	viel	orange	weiß	orange		Myzel	mittel	*Lentzea*
12A-Be-017	100000	m	M79		1		1			1			1		1	mittel	weiß	weiß	braun		Myzel	gering	*Pseudonocardia*
12A-Be-019	5000	m	M79				1		1	1			1			ohne	orange		orange		Myzel	gering	*Micromonospora*
12A-Be-022	1000	m	M79	1					1	1		1			1	ohne	beige		beige		Myzel	mittel	*Saccharopolyspora*
12B-Be-001	200000	LL	M79	1						1			1			wenig	beige	weiß	beige		Myzel	mittel	*Nocardioides*
12B-Be-002	200000	m	M79				1		1				1			viel	weiß	rosa	beige		Myzel	mittel	*Nocardia*
12B-Be-003	20000	m	M79	1		1			1	1			1			ohne	gelb		gelb		Myzel	gering	*Amycolatopsis*
12B-Be-004	30000	ohne	M79	1						1			1		1	ohne	beige		beige		Myzel	mittel	*Promicromonospora*
12B-Be-005	40000	m	M79		1					1					1	viel	grau	grau	braun		Myzel	gering	*Pseudonocardia*
12B-Be-006	20000	ohne	M79	1						1		1				ohne	gelb		gelb		Myzel	mittel	*Promicromonospora*
12B-Be-007	10000	m	M79		1					1					1	mittel	weiß	weiß	braun	braun	Myzel	gering	*Pseudonocardia*
12B-Be-008	20000	ohne	M79	1						1			1			ohne	beige		beige	braun	Myzel	mittel	*Promicromonospora* TS
12B-Be-009	3000	m	M79				1		1				1			viel	weiß	weiß	beige		Myzel	mittel	*Nocardiopsis*
12B-Be-010	1000	LL	M79		1				1				1			mittel	weiß	weiß	beige		Myzel	stark	*Jiangella*
12B-Be-011	1000	LL	M79	1					1				1			wenig	weiß	beige	beige	braun	Myzel	stark	*Microlunatus*
12B-Be-012	600000	LL	M79				1		1	1			1			ohne	beige		beige	gelb	Myzel	keine	*Streptomyces* TS
12B-Be-013	10000	ohne	M79	1					1	1			1			ohne	beige		beige		Myzel	mittel	*Promicromonospora*
12B-Be-014	4000	m	M79	1				1					1			viel	weiß	weiß	gelb	gelb	Myzel	gering	*Lentzea*
13A-St-001	1800	LL	M79	1	1			1			1		1	1			beige	beige		braun	Myzel	stark	*Streptomyces*
13A-St-002	260	LL	M79	1	1			1			1		1				braun	beige	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces* TS
13A-St-003	600	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Microbacterium*
13A-St-005	6800	LL	M79		1		1	1					1	1	1		rosa	weiß	braun	braun	Myzel	stark	*Pseudonocardia*
13A-St-006	1000	LL	M79	1	1			1			1		1	1			beige	weiß		braun	Myzel	mäßig	*Streptomyces*

Stammnummer	KBE/g bzw. m³	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
13A-St-007	2200	ohne	M79	1		1		1			1	1				ohne	orange				coccoid		*Rhodococcus*
13A-St-009	60	ohne	M79	1		1		1			1	1				ohne	gelb				coccoid		*Microbacterium* TS
13A-St-010	2000	LL	M79	1	1			1			1		1	1			gelb	gelb	braun	braun	Myzel	mäßig	*Streptomyces*
13A-St-011	200	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	orange				coccoid		*Kocuria* TS
13A-St-012	600	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	rot				coccoid		*Microbacterium*
13A-St-013	1200	LL	M79		1		1		1	1			1		1		rosa	weiß		braun	Myzel	stark	*Pseudonocardia*
13A-St-014	1200	LL	M79	1				1			1		1	1			beige	wie	braun	braun	Stäbchen		*Streptomyces*
14-Be-001	10000	m	M79		1					1					1	wenig	braun	weiß	braun	gelb	Myzel	mittel	*Pseudonocardia*
14-Be-002	100	m	M79	1				1					1			viel	weiß	weiß	braun		Myzel	gering	*Nocardiopsis*
14-Be-003	100000	m	M79		1					1					1	viel	braun	weiß	braun	braun	Myzel	mittel	*Pseudonocardia*
14-Be-007	1000	m	M79	1						1		1				ohne	beige		beige		Myzel	gering	*Amycolatopsis*
14-Be-012	10000	m	M79	1					1				1		1	wenig	gelb	weiß	gelb		Myzel	stark	*Amycolatopsis*
14-Be-013	10000	m	M79				1		1				1			ohne	beige		braun	braun	Myzel	gering	*Nocardiopsis*
14-Be-015	5000	m	M79	1				1				1				ohne	beige				coccoid		*Micrococcen* *
14-Be-019	30000	m	M79		1				1				1			viel	weiß	weiß	beige		Myzel	mäßig	*Nocardia*
15-Je-001	800000	m	M79	1		1			1	1	1	1				ohne	rosa				Stäbchen		*Rhodococcus*
15-Je-002	800000	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	gelb				Stäbchen		*Microbacterium*
15-Je-003	800000	m	M79	1		1		1			1	1				ohne	beige				coccoid		*Brachybacterium*
15-Je-004	800000	ohne	M79	1				1			1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Isoptericola*
15-Je-005	800000	m	M79	1					1	1			1			ohne	beige				Stäbchen		*Mycobacterium*
15-Je-007	800000	LL	M79	1					1	1			1	1		mittel	beige	weiß	orange	braun	Myzel	gering	*Streptomyces*
15-Je-008	800000	m	M79		1				1	1			1		1	mittel	beige	weiß	braun		Myzel	gering	*Pseudonocardia*
15-Je-009	800000	m	M79		1				1				1			ohne	beige				Stäbchen		*Mycobacterium*
15-Je-015	800000	m	M79		1				1	1			1			wenig	beige	weiß	braun		Myzel	stark	*Nocardia*
15-Je-017	800000	LL	M79	1					1	1			1		1	ohne	beige		beige		Myzel	stark	*Jiangella*
15-Je-018	150000	LL	M79		1		1		1	1			1		1	ohne	braun		braun		Myzel	gering	*Streptomyces*
15-Je-019	150000	LL	M79		1				1	1			1		1	wenig	orange	weiß	orange		Myzel	gering	*Streptomyces*
15-Je-021	150000	LL	M79				1		1	1			1		1	mittel	beige	weiß	braun	braun	Myzel	gering	*Streptomyces*
15-Je-022	150000	LL	M79	1					1	1			1		1	mittel	weiß	weiß	beige		Myzel	gering	*Streptomyces*
15-Je-026	150000	ohne	M79			1		1			1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Oerskovia*
15-Je-027	300000	ohne	M79	1		1		1			1	1				ohne	gelb				Stäbchen		*Microbacterium*
15-Je-029	300000	ohne	M79	1					1				1		1	ohne	gelb		gelb		Myzel	stark	*Promicromonospora*
15-Je-033	300000	LL	M79		1				1	1			1		1	wenig	braun	weiß	braun		Myzel	mittel	*Streptomyces*
15-Je-035	300000	LL	M79	1					1	1			1	1		wenig	grau	weiß	braun	braun	Myzel	gering	*Streptomyces*
16-St-001	3000	LL	M79		1		1	1		1			1		1		orange	weiß	orange	orange	Myzel	stark	*Streptomyces*
16-St-003	16500	m	M79		1				1	1			1		1		gelb	weiß	braun		Myzel	stark	*Streptomyces*
16-St-004	3000	LL	M79		1				1	1		1			1		beige	beige			Myzel	stark	*Streptomyces* TS

Stammnummer	KBE/g bzw. m^3	DAP	Ident. - medium	weich	bröckelig	schleimig	zäh	flach	erhaben	unregel-mäßig	glatt	glänzend	matt	gipsig	runzlig	Luftmyzel	Kolonie	LM-Farbe	SM-Farbe	Pigment-Farbe	Mikroskopie Zellform	Fragmentie-rung	Taxon
16-St-006	3000	ohne	M79	1	1			1			1			1		ohne	weiß				Coccoid		*Streptomyces*
16-St-007	36500	ohne	M79	1		1			1		1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Mesorhizobium*
16-St-008	580000	LL	M79			1		1			1	1				ohne	beige				Stäbchen		*Mesorhizobium*
16-St-009	70000	m	M79	1	1			1					1	1			grau	weiß	gelb		Myzel	stark	*Streptomyces*
16-St-010	3000	LL	M79		1			1					1		1		grau	weiß		braun	Myzel	stark	*Streptomyces*
16-St-011	23000	LL	M79				1	1					1		1		gelb	weiß		orange	Myzel	stark	*Streptomyces*
16-St-012	20000	m	M79	1	1			1			1		1	1			gelb	weiß	braun		Myzel	stark	*Streptomyces* TS
16-St-014	6500	LL	M79				1	1					1		1		gelb	weiß		orange	Myzel	gering	*Streptomyces*
16-St-015	3000	m	M79				1		1				1				gelb	weiß			Myzel	stark	*Lentzea*

* = nicht mit molekularbiologischer Methode überprüft