

# Erfassung der bakteriellen Diversität in der Innenraumluft

E. Martin, P. Kämpfer, U. Jäckel

**Zusammenfassung** Die Innenraumluft von zwei Wohnungen wurde exemplarisch quantitativ und qualitativ auf das Vorkommen kultivierbarer Bakterien untersucht. Hierfür wurden jeweils Luftproben in den Wohnzimmern und Küchen mittels Impaktion gesammelt und untersucht. Als Referenzstandorte dienten die jeweiligen Außenbereiche. Die Konzentrationen luftgetragener Bakterien auf den als selektiv für Actinomyceten geltenden Nähragarmedien Glycerin-Arginin-Agar und dem Mineralmedium nach *Gauze* lagen in den Räumen zwischen 20 und 328 KBE m<sup>-3</sup>. In den Außenbereichen wurden ähnlich hohe Bakterienkonzentrationen beobachtet. Insgesamt wurden 294 Bakterien isoliert. Die Isolate konnten aufgrund der 16S rRNA-Gensequenzanalyse insgesamt 30 verschiedenen Gattungen innerhalb der Phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* und *Bacteroidetes* zugeordnet werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht die eingeschränkte Selektivität der verwendeten Nährmedien, da nur 60 % der identifizierten Bakterienisolate tatsächlich den Actinomyceten zugeordnet werden konnten. Der Vergleich von Innenraum- und Außenluft zeigte einen deutlichen Unterschied in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften, obwohl die Konzentration kultivierbarer Bakterien sehr ähnlich war. Unter den Isolaten befanden sich Vertreter der Gattungen *Nocardiopsis* und *Streptomyces*, die u. a. Vertreter mit klinischer Bedeutung enthalten. Weitere Isolate gehören zu den Gattungen *Rhodococcus*, *Aeromicrobium*, *Arthrobacter*, *Dietzia* und *Kocuria*. Die Isolate der Phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* und *Bacteroidetes* gehören u. a. zu den Gattungen *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus* und *Spirosoma*.

## Identification of bacterial diversity in the indoor air environment

**Summary** Indoor air samples of two dwellings were investigated quantitatively and qualitatively for the presence and genus allocation of culturable bacteria. Glycerol-arginine-agar and a mineral-agar according to *Gauze*, both described as selective media for Actinomycetes were used. By impaction to agar surfaces, the bacteria were collected from both living rooms and kitchens of each dwelling. Reference samples were collected from outdoor air. Concentrations of airborne bacteria in the dwellings and outdoor ranged between 20 and 328 CFU m<sup>-3</sup>. In total, 294 bacterial isolates were obtained. The isolates could be assigned to 30 different genera of the phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* by 16S rRNA-gene sequence analyses. Only 60% of them belong to the order *Actinomycetales* indicating the limited selectivity of used culture media. The comparison of the compositions of indoor and outdoor bacterial communities revealed pronounced differences, although concentrations of culturable bacteria were quite similar. Some of the isolates from the order *Actinomycetes* could be assigned to the genera *Nocardiopsis* and *Streptomyces* which contain also species of medical importance. Further isolates were identified to the genera *Rhodococcus*, *Aeromicrobium*, *Arthrobacter*, *Dietzia* and *Kocuria*. Isolates belonging to the *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were also present, among them representatives of the genera *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Spirosoma*.

Elena Martin, Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer,

Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Dr. rer. nat. Udo Jäckel,

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Berlin.

## 1 Einleitung

Detaillierte mikrobiologische Analysen in Innenräumen beschränken sich häufig auf die Quantifizierung und Identifizierung der vorhandenen Schimmelpilzgemeinschaften. Im Gegensatz zu diesen Analysen ist über die in Innenräumen vorhandenen Bakteriengemeinschaften und deren Zusammensetzung nur sehr wenig bekannt. Dennoch scheinen Bakterien eine nicht zu vernachlässigende Rolle im Innenraum zu spielen. So berichteten z. B. Lorenz et al. [1] in einer Studie, dass von über 600 Materialproben aus Wohnungen mit Feuchtschäden mehr als 80 % neben Schimmelpilzen auch Bakterien enthielten. Häufig handelte es sich dabei um Vertreter der Gattungen *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia* und *Streptomyces*. Die deutlichen Unterschiede um das Wissen von Schimmelpilzen und Bakterien im Innenraum ist vor allem darauf zurückzuführen, dass im Bereich der Schimmelpilzdiagnostik die Differenzierung über eine Vielzahl morphologischer Eigenschaften mit entsprechender mykologischer Erfahrung relativ rasch möglich ist, während sich die Identifizierung von Bakterien oftmals weitaus schwieriger gestaltet.

Diese Schwierigkeiten werden insbesondere bei der Identifizierung von Vertretern der Ordnung *Actinomycetales* deutlich. Diese Ordnung repräsentiert eine heterogene Gruppe grampositiver, primär aerob lebender Bakterien, die sich durch einen hohen Guanin- und Cytosingehalt in der DNA (zwischen 65 und 78 %) auszeichnen [2]. Die zu der Ordnung *Actinomycetales* gehörenden Bakteriengattungen sind in ihrer Zellmorphologie sehr unterschiedlich. Die Zellmorphologie variiert von Kokken, z. B. in der Gattung *Micrococcus*, Zellen, die einen Stäbchen-Kokken-Zyklus durchlaufen, z. B. in der Gattung *Arthrobacter*, über Gattungen, die fragmentierende Hyphenformen ausbilden (z. B. *Nocardia*, *Rothia*), bis hin zu Gattungen, die ein verzweigtes Mycel entwickeln (z. B. *Micromonospora* und *Streptomyces*) [5]. Einige der Gattungen sind in der Lage, Sporen zu bilden, die aber nicht mit den bakteriellen Endosporen der Gattungen *Bacillus* bzw. *Clostridium* vergleichbar sind. Die Ausprägung des Phänotyps variiert hier deutlich in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen. Gleichzeitig gibt es jedoch keine den Schimmelpilzen vergleichbare, gut differenzierbare, morphologische Unterschiede, um rasche Gattungs- bzw. Artzuordnungen machen zu können.

Aus diesem Grund wird die derzeitige Klassifizierung der Bakterien, d. h. die Einordnung in Gattungen und Arten, in einem polyphasischen Ansatz aus nukleinsäurebasierender, chemotaxonomischer und physiologischer Analyse durchgeführt. Die Identifizierung allein über die Morphologie bzw. chemotaxonomische Methoden, wie Fettsäureanalysen oder Untersuchungen zum Aufbau der Zellwand, können in wenigen Speziallaboratorien durchgeführt werden. Zur systematischen Einordnung von Prokaryoten auf Gattungsebene verwendet man derzeit die Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene. Bei diesen Genen handelt es sich um stark konservierte Abschnitte im Genom, die in allen Prokaryoten vorhanden sind [4]. Die dennoch vorhandenen variablen Bereiche innerhalb solcher Genabschnitte sind gruppen- oder sogar

speziesspezifisch und können daher zur Identifizierung von Bakterien und Archaeen auf Gattungsebene herangezogen werden. Derzeit ist die vergleichende Sequenzanalyse von 16S rRNA-Genen die am häufigsten eingesetzte Methode zur „phylogenetischen“ Einteilung von Prokaryoten. Bei dem 16S rRNA-Gen handelt es sich um einen ca. 1 500 Basenpaar langen Sequenzabschnitt, der genetische Informationen für die kleine Untereinheit der Ribosomen von Prokaryoten enthält. Da das Ribosom für die Proteinbiosynthese und damit für das Leben eines Organismus unentbehrlich ist, ist die 16S rRNA in allen lebenden Bakterienzellen enthalten. Des Weiteren ist sie funktionell konstant und hochgradig konserviert und erfüllt so alle Voraussetzungen für die Nutzung als phylogenetischer Marker [2].

Ausgehend von der o. g. Verbindung zwischen Bakterien der Ordnung *Actinomycetales* in belasteten Innenräumen stellte sich die Frage nach der quantitativen und qualitativen Relevanz von Actinomyceten in „unbelasteten“ Innenräumen. Daher wurde in dieser Arbeit die Diversität, der auf den für Actinomyceten „selektiven“ Nährmedien Glycerin-Arginin (G/A) [5; 6] und Mineralmedium nach *Gauze* [7] kultivierbaren Bakterien in zwei Wohnungen, jeweils im Wohnzimmer und in der Küche, untersucht.

**2 Material und Methoden**

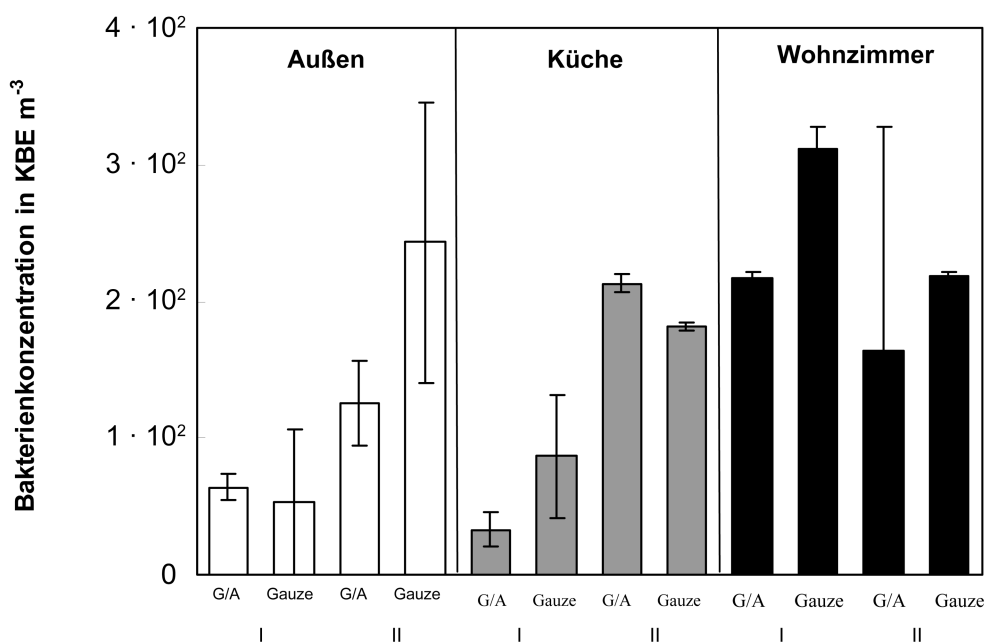
Die Probenahme erfolgte in zwei Wohnungen, die keinen sichtbaren Mikroorganismenbefall (Schimmelpilzbefall der Wände) aufwiesen und deren Bewohner über keine gesundheitlichen Beschwerden berichteten. In jeder Wohnung wurden die Bioaerosolproben sowohl im Wohnzimmer als auch in der Küche gesammelt. Als Referenzen wurde jeweils Probenahmen im Außenbereich der Wohnungen durchgeführt. Die Bioaerosolsammlung wurde mit dem Impaktor FH 5 (Fa. Loreco Reckert, Natendorf) unter Verwendung der beiden Nährmedien G/A [5; 6] und Mineral-Nährmedium nach *Gauze* [7] mit einem Volumen von 500 l und einem Volumenstrom von 50 l/min durchgeführt. Je Probenahmeort wurden zwei Probenahmen pro Nährmedium durchgeführt. Das G/A-Nährmedium setzt sich wie folgt zusammen:

Glycerin (99 %) 12,5 g, L-Arginin 1,0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7 g, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,51 g, NaCl 1,0 g, Agar 15,0 g, 960 ml voll entionisiertes Wasser, Spurenelementlösung 0,1 ml (EDTA 50,0 mg, FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 50,0 mg, MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 0,3 mg, CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,5 mg, CuCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O 0,1 mg, NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,2 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 5,0 mg in 100 ml deionisiertem H<sub>2</sub>O) und 40,0 ml Cycloheximid [5 mg ml<sup>-1</sup>].

Das Mineralmedium nach *Gauze* hatte folgende Inhaltsstoffe:

lösliche Stärke 20,0 g, KNO<sub>3</sub> 1,0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g, NaCl 0,5 g, FeSO<sub>4</sub> 0,01 g, Agar 20,0 g, 960 ml voll entionisiertes Wasser, Cycloheximidlösung 40,0 ml [5 mg ml<sup>-1</sup>]. Die mit Mikroorganismen beaufschlagten Nähragarmedien wurden bei 25 °C im Dunkeln für zwölf Tage inkubiert. Die Bakterienkonzentration in der Luft wurde ermittelt, indem die Anzahl der mit dem Auge sichtbaren Kolonien pro Platte durch das jeweils beprobte Sammelvolumen, in m<sup>3</sup>, dividiert wurde. Die Ergebnisse werden als Kolonie bildende Einheiten (KBE) pro m<sup>3</sup> Luft angegeben.

Um die Diversität der kultivierten Bakterien zu ermitteln, wurden zunächst alle unterschiedlichen Koloniemorphologietypen erfasst. Von jedem erkennbaren Typ wurde ein Isolat durch weitere Kultivierungsschritte auf frischen Nähragarplatten (GYM-Medium; DSMZ, Medium Nr. 65; www.dsmz.de/microorganisms/media\_list.php) gewonnen. Mehrfach isolierte Organismen wurden über die Zellmorphologie, Gramfärbung und eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus(RFLP)-Analyse [8] in Gruppen zusammengefasst. Die Identifizierung eines repräsentativen Isolats einer Gruppe erfolgte durch die Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens und anschließenden Vergleich mit hinterlegten Sequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die DNS-Extraktion fand mit einem kommerziell erhältlichen Extraktionskit der Fa. Sigma (GenElute™ Plant Genomic DNA Kit) statt und wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Vervielfältigung des 16S-rRNA-Gens der Isolate erfolgte mittels PCR, unter Verwendung der 16S rRNA-spezifischen Primer MRf und MRr [9]. Die Sequenzierung dieses PCR-Produkts erfolgte nach der Methode von *Sanger*, dem sog.



Konzentration luftgetragener kultivierbarer Bakterien in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium (G/A und *Gauze*) und dem Standort der Probenahmen. Die weißen Balken repräsentieren die Konzentrationen der Messungen in den Außenbereichen, die grauen Balken zeigen die Konzentration in den Küchen (K) und die schwarzen die Konzentrationen in den Wohnzimmern. Differenziert sind die Konzentrationen nach Wohnung 1 (I) und Wohnung 2 (II). Die Werte entsprechen Mittelwerten von zwei Messungen pro Messort. Die Fehlerbalken zeigen die Schwankungen der Einzelmessungen um den Mittelwert.

Tabelle 1. Vergleichende Darstellung der in den Außen- und Innenbereichen detektierten Bakterienphyla und -gattungen.

	Anzahl der Isolate *)	
	außen	innen
<b>Actinobacteria</b>		
<i>Aeromicrobium</i>	/	11 <sup>(1)</sup>
<i>Agromyces</i>	16 <sup>(1)</sup>	/
<i>Arthrobacter</i>	8 <sup>(5)</sup>	47 <sup>(5)</sup>
<i>Brachybacterium</i>	/	2 <sup>(1)</sup>
<i>Curtobacterium</i>	/	6 <sup>(1)</sup>
<i>Dietzia</i>	/	7 <sup>(2)</sup>
<i>Janibacter</i>	/	2 <sup>(1)</sup>
<i>Kocuria</i>	/	15 <sup>(3)</sup>
<i>Microbacterium</i>	3 <sup>(2)</sup>	2
<i>Micrococcus</i>	/	17 <sup>(1)</sup>
<i>Micromonospora</i>	/	1 <sup>(1)</sup>
<i>Nocardia</i>	/	1 <sup>(1)</sup>
<i>Nocardiopsis</i>	/	2 <sup>(2)</sup>
<i>Oerskovia</i>	/	20 <sup>(1)</sup>
<i>Rhodococcus</i>	30 <sup>(1)</sup>	21 <sup>(2)</sup>
<i>Streptomyces</i>	6	20
<b>Proteobacteria</b>		
<i>Acinetobacter</i>	5 <sup>(1)</sup>	/
<i>Massilia</i>	4 <sup>(1)</sup>	11 <sup>(2)</sup>
<i>Methylobacterium</i>	34 <sup>(2)</sup>	/
<i>Novosphingobium</i>	/	2 <sup>(1)</sup>
<i>Pantoea</i>	/	2 <sup>(1)</sup>
<i>Paracoccus</i>	21	2 <sup>(2)</sup>
<i>Pseudomonas</i>	1 <sup>(1)</sup>	1
<i>Rahnella</i>	2 <sup>(1)</sup>	/
<i>Rhizobium</i>	/	3 <sup>(1)</sup>
<i>Sphingomonas</i>	15	16 <sup>(1)</sup>
<i>Stenotrophomonas</i>	/	1 <sup>(1)</sup>
<b>Firmicutes</b>		
<i>Bacillus</i>	/	8 <sup>(3)</sup>
<i>Paenibacillus</i>	3	2 <sup>(2)</sup>
<b>Bacteroidetes</b>		
<i>Spirosoma</i>	1 <sup>(1)</sup>	/

\*) hochgestellte Zahlen zeigen die Anzahl der Isolate, bei denen eine Vollsequenzierung der 16SrRNA-Gensequenz durchgeführt wurde.

Didesoxy-Verfahren. Die Identifizierung bzw. phylogenetische Eingruppierung über die 16S rRNA-Gensequenzen wurde mithilfe des Softwarepakets Mega Version 5.1 [10] durchgeführt. Hierfür wurde eine Clusterbildung sowohl mit der Neighbour-Joining- und als auch der Maximum-Parsimony-Methode unter Verwendung der Isolat-Sequenzen und den 16S rRNA-Gensequenzen der Gattungszugehörigen Typstämme erreicht.

### 3 Ergebnisse

Die Bakterienkonzentrationen in den Wohnzimmern lagen zwischen 212 und 328 KBE m<sup>-3</sup> (Bild). Im Vergleich hierzu wurden in den Küchen unter Verwendung der beiden Nährmedien Bakterienkonzentrationen zwischen 20 und 220 KBE m<sup>-3</sup> ermittelt. Die Konzentrationen im Außenbereich waren mit Werten zwischen 50 und 346 KBE m<sup>-3</sup> vergleichbar zu den Werten in den Küchen (Bild). Um die auf

den Nährmedien (G/A und Gauze) vorhandene bakterielle Diversität zu erfassen, wurden die Sequenzen der 16S rRNA-Gene der Isolate herangezogen. Diese Sequenzen wurden zunächst über die BLAST-Suche in der Gendatenbank der NCBI-Gattungen zugeordnet. Anschließend wurde mit den 16S rRNA-Gensequenzen der Typstämme aus den entsprechenden Gattungen ein Sequenzvergleich („phylogenetische“ Berechnung) durchgeführt. Für die Auswahl der Typstämme wurde die Liste: „List of prokaryotic names with standing in Nomenclature“ (www.bacterio.cict.fr/ac.html) herangezogen.

Wie in Tabelle 1 zu erkennen ist, wurden 16 Gattungen nur im Innenraum nachgewiesen, neun Gattungen sowohl im Innenraum als auch im Außenbereich und fünf nur im Außenbereich. In dem Phylum *Actinobacteria* konnten Vertreter der Gattungen *Aeromicrobium*, *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Curtobacterium*, *Dietzia*, *Janibacter*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Oerskovia*, *Rhodococcus* und *Streptomyces* detektiert werden. Weiterhin wurden mit den beiden Nährmedien G/A und Mineralmedium nach Gauze Vertreter der Gattungen *Acinetobacter*, *Massilia*, *Methylobacterium*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* und *Stenotrophomonas* aus dem Phylum *Proteobacteria* detektiert, die Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* aus dem Phylum *Firmicutes* und die Gattung *Spirosoma* aus dem Phylum *Bacteroidetes*.

Beruhend auf der 16S rRNA-Gensequenzanalyse wiesen einige der Isolate sehr hohe Sequenzähnlichkeiten zu gültig beschriebenen Bakterienspezies auf. In Tabelle 2 sind alle Isolate aus dem Innenraum aufgelistet, die eine über 99,5%ige 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit zu gültig beschriebenen Art aufwiesen.

### 4 Diskussion

In den untersuchten Innenräumen wurden mit kultivierungsbasierten Methoden Bakterienkonzentrationen zwischen 20 und 328 KBE pro m<sup>3</sup> Luft auf den verwendeten Nährmedien GA und Mineralmedium nach Gauze detektiert (Bild). Diese Konzentrationen sind somit vergleichbar zu Ergebnissen früherer Studien [11 bis 14], obwohl hier andere Sammelsysteme bzw. Nährmedien eingesetzt wurden. Die durchschnittliche Konzentrationen kultivierbarer Bakterien an den beprobten Außenmessstellen waren mit 50 bis 346 KBE pro m<sup>3</sup> Luft sehr ähnlich zu denen in den untersuchten Küchen und lagen geringfügig unterhalb derer in den Wohnzimmern (Bild). Lighthart [15] wiesen u. a. mit ihren Untersuchungen in Außenbereichen ebenfalls Bakterienkonzentrationen zwischen 10<sup>2</sup> bis 10<sup>5</sup> KBE pro m<sup>3</sup> Luft nach. In Studien von Kalogerakis et al. [11] waren die Bakterienkonzentrationen auf einem Balkon im Vergleich zu den Konzentrationen in den Innenräumen immer niedriger, während bei Tsai et al. [16] mehr luftgetragene kultivierbare Bakterien im Außenbereich detektiert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein rein quantitativer Vergleich von Innenraum- und Außenluftkonzentrationen für Bakterien insgesamt nur bedingt aussagekräftig ist. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass viele abiotische Faktoren einen deutlichen Einfluss auf die Konzentration der Mikroorganismen haben können [17]. In diesem Zusammenhang werden vor allen Temperatur und Windverhältnisse genannt [18],

Tabelle 2. Auflistung beschriebener Bakterienspezies, zu denen die Isolate die höchste 16S rRNA-Gensequenz-Ähnlichkeit (> 99,5 %) hatten.

Isolat	Phylum	Gattung	Art	Acc.-Nummer <sup>3</sup>	Ähnlichkeit <sup>2</sup> in %	Risikogruppe <sup>1</sup>
II Gauze W 10.2	<b>Actinobacteria</b>	<i>Arthrobacter</i>	<i>ilicis</i>	X83407	99,60	1, p
II GA K 5.2		<i>Arthrobacter</i>	<i>sulfonivorans</i>	AF235091	99,80	1
II Gauze W 12.19		<i>Brachybacterium</i>	<i>paraconglomeratum</i>	AJ415377	100,00	1
I Gauze W 10.15		<i>Curtobacterium</i>	<i>flaccumfaciens</i>	AJ312209	99,60	1
I Gauze K 8.13		<i>Janibacter</i>	<i>limosus</i>	Y08539	99,70	1
I GA K 7.7		<i>Kocuria</i>	<i>palustris</i>	Y16263	99,90	1
I GA W 11.16		<i>Kocuria</i>	<i>kristinae</i>	X80749	99,60	1, +
II Gauze W 10.8		<i>Kocuria</i>	<i>erythromyxa</i>	Y11330	99,80	1
I Gauze K 6.4		<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	AJ536198	99,70	1
I Gauze W 10.2		<i>Nocardia</i>	<i>arthritidis</i>	DQ659896	99,80	k. A.
II Gauze K 8.1		<i>Nocardiopsis</i>	<i>alba</i>	X97884	99,80	1
I Gauze W 10.6		<i>Nocardispsis</i>	<i>alborubida</i>	X97882	100,00	2
I Gauze W 12.3		<i>Oerskovia</i>	<i>enterophila</i>	X83807	99,90	1
I GA K 5.3		<i>Rhodococcus</i>	<i>fascians</i>	X79186	100,00	1, p
I GA W 11.12		<i>Rhodococcus</i>	<i>kroppenstedtii</i>	AY726605	99,60	k. A.
II Gauze W 12.10	<b>Proteobacteria</b>	<i>Massilia</i>	<i>aurea</i>	AM231588	99,70	k. A.
II Gauze W 10.4		<i>Massilia</i>	<i>timonae</i>	U54470	99,50	1, +
II Gauze W 10.17		<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	AJ233423	100,00	2
I GA W 9.13		<i>Paracoccus</i>	<i>marcusi</i>	Y12703	99,80	1
II Gauze W 12.8		<i>Sphingomonas</i>	<i>faeni</i>	AJ429239	100,00	1
I Gauze K 8.5		<i>Stenotrophomonas</i>	<i>rhizophila</i>	AJ293463	99,80	1
II Gauze W 10.6	<b>Firmicutes</b>	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	D16273	99,90	1, +
I GA W 11.8		<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	X60637	99,60	1, +
I Gauze W 10.9		<i>Paenibacillus</i>	<i>amolyticus</i>	D85396	99,70	1

<sup>1</sup> Einstufung nach Technischer Regel für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 466  
<sup>2</sup> Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen zwischen Isolat und aufgelisteter Bakterienspezies  
<sup>3</sup> Accession-Nummer: Datenbanknummer  
+ In Einzelfällen als Krankheitserreger nachgewiesen oder vermutet  
k. A. Keine Angaben vorhanden  
p Pathogen für Pflanzen

die sich auf die Mikroorganismenkonzentration auswirken. Die detaillierte Betrachtung der nachgewiesenen Gattungen zeigte hingegen deutliche Unterschiede zwischen der Außen- und Innenraumluft. In den zwei Wohnungen mit den jeweiligen Außenproben wurden 294 Bakterien isoliert. Insgesamt konnten die Bakterienisolate 30 Gattungen zugeordnet werden. Fünf Gattungen wurden nur in den Außenluftproben nachgewiesen, neun Gattungen wurden sowohl im Innen- als auch im Außenbereich detektiert und 16 Gattungen, und damit die höchste Diversität, wurden ausschließlich in den Wohnungen erfasst (Tabelle 1).

Obwohl die für Actinomyceten „als selektiv geltenden“ Nährmedien, G/A und Mineralmedium nach Gauze, in dieser Studie eingesetzt wurden, zeigte die Identifizierung der Isolate, dass auch Vertreter weiterer Genera der Phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* und *Bacteroidetes* erfasst wurden. Nur 60 % der identifizierten Isolate konnten dem Phylum *Actinobacteria* zugeordnet werden.

Die Gattungen *Arthrobacter*, *Streptomyces* und *Sphingomonas* wurden z. B. sowohl im Wohnzimmer und in der Küche als auch im Außenbereich nachgewiesen, sodass von einer sehr weiten Verbreitung ausgegangen werden kann. Alle drei Gattungen weisen eine hohe Heterogenität sowie eine breite Ernährungsvielfalt und gewisse Resistenzen gegenüber Austrocknung und Nahrungsmangel auf.

Demgegenüber wurden Vertreter der Gattung *Methylobacterium* nur in den Proben der Außenluft erfasst. Methylo-trophe Bakterien sind in und auf Pflanzen sowie in der Rhizo-

sphäre vorhanden [19]. Omer et al. [20] stellten in ihrer Studie fest, dass gerade im späten Frühling bzw. beginnenden Sommer die geeigneten Bedingungen für Vertreter der Gattung *Methylobacterium* auf den Blattoberflächen vorhanden sind, da zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg der Population verzeichnet wurde. So kann angenommen werden, dass die in detektierten Vertreter der Gattung *Methylobacterium* von Pflanzenoberflächen stammen, da die Probenahme im Mai stattgefunden hat.

Mit 16 Gattungen konnte die höchste Diversität in den Wohnungen festgestellt werden, darunter die Isolate II Gauze W 10.17 und I Gauze W 10.6, die aufgrund ihrer 16S rRNA-Gene die höchste Ähnlichkeit zu den Bakterienarten *Pantoea agglomerans* und *Nocardiopsis alborubida* aufwiesen. Beide Arten sind nach der TRBA 466 in die Risikogruppe 2 eingestuft<sup>1</sup>. Das Isolat II Gauze W 10.17 mit der höchsten Sequenzähnlichkeit zu *Pantoea agglomerans* zeigte besonders in Cytotoxizitätsuntersuchungen an der Lungenkarzinomzelllinie A549 (Daten nicht gezeigt) eine deutlich schädigende Wirkung, sodass bei einer Exposition gegenüber hohen Konzentrationen dieses Bakterienisolats durchaus von einem negativen gesundheitlichen Effekt ausgegangen werden kann. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass besonders *P. agglomerans* bei der Ursache von allergischer

<sup>1</sup> BioStoffV § 3: „Risikogruppe 2: Biologische Arbeitsstoffe, die eine Krankheit beim Menschen hervorrufen können und eine Gefahr für Beschäftigte darstellen können; eine Verbreitung des Stoffes in der Bevölkerung ist unwahrscheinlich; eine wirksame Vorbeugung oder Behandlung ist normalerweise möglich“.

Alveolitis benannt wird [21]. Da diese Bakterienart im landwirtschaftlichen Umfeld als Auslöser von Allergien und Lungenerkrankungen bekannt ist [22; 23], könnte eine gesundheitsbeeinträchtigende Wirkung von dieser Art auch in Wohnungen nicht ausgeschlossen werden.

Eine Artidentifizierung wurde in den meisten vergleichbaren Studien nicht durchgeführt, sodass lediglich ein Vergleich auf Gattungsebene gemacht werden kann. Der Vergleich der hier vorliegenden 16S rRNA-Gensequenzbasiert eingeordneten Isolate mit anderen Studien zeigt zum Teil große Übereinstimmung. So zeigt ein Vergleich mit den von Gorny et al. [24] erzielten Beobachtungen in Innenräumen, dass in dieser Studie wie auch in der vorliegenden Untersuchung die Gattungen *Micrococcus*, *Kocuria*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* und *Pantoea* detektiert wurden. In einer weiteren Studie von Pastuszka et al. [12] wurden außerdem die in dieser Arbeit nachgewiesenen Gattungen *Acinetobacter* und *Agromyces* in der Innenraumluft detektiert.

Die Einordnung auf Gattungsebene ist jedoch in vielen Fällen nur eingeschränkt aussagekräftig, da innerhalb einer Gattung durchaus Vertreter mit unterschiedlicher klinischer Relevanz vorhanden sein können. Andererseits ist eine rasche Spezies-Identifizierung von Bakterienisolaten aus Umweltproben nur bedingt möglich. Mithilfe molekularbiologischer Methoden, d. h. der Analyse des 16S rRNA-Gens ist heute jedoch die Grundlage geschaffen, Sequenzvergleiche der aus Innenräumen gewonnenen Isolate durchzuführen, um zunächst relevante Bakteriengattungen zu ermitteln und somit eine entsprechende Datenbasis zu schaffen. Allerdings ist ein einheitliches Vorgehen zur Sammlung von Bakterien in Innenräumen bislang weder auf nationaler noch internationaler Ebene vorhanden. Weiterhin fehlt eine standardisierte Beschreibung der 16S rRNA-Genanalyse. Die 16S rRNA-Gensequenzen der aus in dieser Arbeit isolierten Bakterien sind in den öffentlichen Datenbanken hinterlegt und können somit zu Vergleichszwecken von anderen Institutionen genutzt werden (Datenbanknummern FJ 267536-FJ 267587).

## Literatur

- [1] Lorenz, W.; Kroppenstedt, R. M.; Trautmann, C.; Stackebrandt, E.; Dill, I.: *Actinomycetes* in building materials. International Conference Healthy Buildings. Singapore 2003.
- [2] Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.: Brock Mikrobiologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2006.
- [3] Goodfellow, M.; Williams, S. T.: Ecology of *Actinomycetes*. Ann. Rev. Microbiol. 37 (1983), S. 189-216.
- [4] Ludwig, W.; Klenk, H. P.: Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Boone, D. R.; Castenholz, R. W. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology, S. 49-65. 2nd Ed. Vol. 1. Berlin: Springer 2001.
- [5] El-Nakeeb, M. A.; Lechevalier, H. A.: Selective isolation of aerobic *Actinomycetes*. Appl. Microbiol. 11 (1962), S. 75-77.
- [6] Albrecht, A.; Kämpfer, P.: Wachstum und koloniemorphologisches Erscheinungsbild thermotoleranter und thermophiler Actinomyceten. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 60 (2000) Nr. 4, S. 139-145.
- [7] Gauze, G. F.; Preobrazhenskaya, T. P.; Sveshnikova, M. A.; Terekova, L. P.; Maksimova, T. S.: Opredelitel Aktinomycetov. Rody *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. Moskau: Izd. Nauka (russisch) 1983.
- [8] Lottspeich, F.; Zorbas, H.: Bioanalytik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 1998.
- [9] Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173 (1991) Nr. 2, S. 697-704.
- [10] Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M.: MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5 (2004), S. 150-163.
- [11] Kalogerakis, N.; Paschali, D.; Lekaditis, V.; Pantidou, A.; Eleftheriadis, K.; Lazaradis, M.: Indoor air quality – bioaerosol measurements in domestic and office premises. J. Aerosol Sci. 36 (2005), S. 751-761.
- [12] Pastuszka, J. S.; Kyaw Tha Paw, U.; Lis, D. O.; Wlazlo, A.; Ulfing, K.: Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. Atmosph. Environm. 34 (2000), S. 3833-3842.
- [13] Tham, K. W.; Zuraimi, M. S.: Size relationship between airborne viable bacteria and particles in a controlled indoor environment study. Indoor Air 15 (Suppl. 9) (2005), S. 48-57.
- [14] Andersson, A. M.; Weiss, N.; Rainey, F.; Salkinoja-Salonen, M. S.: Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. J. Appl. Microbiol. 86 (1999), S. 622-634.
- [15] Lighthart, B.: The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. FEMS Microbiol. Ecol. 23 (1997), S. 263-274.
- [16] Tsai, F. C.; Macher, J. M.: Concentrations of airborne culturable bacteria in 100 large US office buildings from BASE study. Indoor Air 15 (Suppl. 9) (2005), S. 71-81.
- [17] Kämpfer, P.; Weißenfels, W. D.: Luftgetragene Mikroorganismen in Abfallbehandlungsanlagen. Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e. V. – Fachgruppe Umweltmikrobiologie, VHM Lieskau 1997.
- [18] Bovallius, A.; Bucht, B.; Roffey, R.; Anas, P.: Three-year investigation of natural bacterial flora at four localities in Sweden. Appl. Environm. Microbiol. 35 (1978), S. 847-852.
- [19] Romanovskaya, V. A.; Stolyar, S. M.; Malashenko, Y. R.: Distribution of bacteria of the genus *Methylobacterium* in different ecosystems of Ukraine. Microbiol. Zh. 58 (1996), S. 3-10.
- [20] Omer, Z. S.; Tombolini, R.; Gerhardson, B.: Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). FEMS Microbiol. Ecol. 47 (2004), S. 319-326.
- [21] Dutkiewicz, J.: Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. Ann. Agricult. Environm. Med. 4 (1997), S. 11-16.
- [22] Van Rostenberghe, H.; Noraida, R.; Wan Pauzi, W. I.; Habsah, H.; Zeehaida, M.; Rosliza, A. R.; Fatimah, I.; Nik Sharimah, N. Y.; Maimunah, H.: The clinical picture of neonatal infection with *Pantoea* species. Japan. J. Infect. Disease 59 (2006), S. 120-121.
- [23] Milanowski, J. D.; Potoczna, H.; Kus, L.; Urbanowicz, B.: Allergic alveolitis among agricultural workers in eastern Poland: a study of twenty cases. Ann. Agricult. Environm. Med. 5 (1998), S. 31-34.
- [24] Górný, R. L.; Dutkiewicz, J.: Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in central and eastern European countries. Ann. Agricult. Environm. Med. 9 (2002), S. 17-23. [www.dsmz.de/microorganisms/media\\_list.php](http://www.dsmz.de/microorganisms/media_list.php)