

Actinomyceten in Feuchteschäden

C. Trautmann, Umweltmykologie GbR Berlin

Einleitung

Als Actinomyceten wurden ursprünglich Gram-positive Bakterien bezeichnet, die verzweigte Filamente und häufig ein feines Luftmyzel bilden können. Ursprünglich wurden in diese auf morphologischen Merkmalen basierende Gruppe auch Thermoactinomyceten eingeschlossen, aber Gram-positive einzellige Kokken, Kurzstäbchen sowie Bacillusarten ausgeschlossen. Inzwischen weiß man allerdings, dass die Actinomyceten nur eine Formengruppe sind und keinen phylogenetisch sehr eng miteinander verwandten Artenzweig darstellen. Durch molekularbiologische Methoden konnten inzwischen die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse vieler Actinomyceten genauer geklärt werden, und es wurde deutlich, dass z.B. die als Thermoactinomyceten bezeichneten Arten enger mit Bacillusarten als mit den übrigen Actinomyceten verwandt sind. Nach Stackebrand et al. [8] gehören die Actinomyceten in unterschiedliche Familien bzw. Gattungen der Actinomycetales, zu denen die Thermoactinomyceten und Bacillusarten nicht mehr gehören. Die Actinomycetales zeichnen sich vor allem durch eine Gram-positive Zellwand und einen hohen GC-Gehalt in ihrer DNA aus. Zusätzlich zu substrat- und luftmyzelbildenden Arten enthalten die Actinomycetales auch einzellige wachsende Arten.

Auch wenn die Entwicklung vieler Arten vergleichsweise langsam erfolgt, können diese ernährungsphysiologisch dennoch sehr vielseitig sein. Zu ihren vielseitigen Stoffwechselleistungen gehört auch die Bildung medizinischer Wirkstoffe wie Antibiotika (z.B. Streptomycin), Toxine (Neomycin) und vieler weiterer pharmakologisch nutzbarer Substanzen, wodurch diese Arten auch für die Naturstoffforschung interessant sind.

Innerhalb der Actinomycetales gibt es einige bekannte Krankheitserreger wie z.B. die Erreger der Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*), Lepra (*Mycobacterium leprae*) oder Diphtherie (*Corynebacterium diphtheriae*). Die Lebensweise der meisten in unserer Umwelt auftretenden Actinomyceten ist aerob, saprophytisch, d.h. sie ernähren sich von abgestorbener organischer Substanz. Einzelne dieser Arten können, wenn sie z.B. über Wunden oder mit der Atmung in den menschlichen Körper gelangen, eine Infektion auslösen. In diesem Zusammenhang sind für Deutschland einzelne Vertreter der Gattung *Nocardia* relevant, die vor allem in Erdbodenproben festgestellt werden. Nocardien können als opportunistische Infektionserreger vor allem Personen mit geschwächtem Immunsystem infizieren. Nach Schaal [7] konnten mehrere Infektionen in einem Krankenhaus mit Abbrucharbeiten in einem dem Patiententrakt gegenüberliegenden Gebäude in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei wurde festgestellt, dass fast alle Infektionen auf den gleichen Erregerstamm (*Nocardia farcinica*) zurückzuführen waren. Allergische Erkrankungen wie die Alveolitis bzw. Hypersensitivitätspneumonie wurden bei hohen Thermoactinomycetenkonzentrationen beschrieben, wie sie z.B. in der Landwirtschaft oder in Abfallsortieranlagen auftreten können. Im Innenraum treten sie vor allem bei schlecht gewarteten Befeuchteranlagen in hohen Konzentrationen in der Atemluft auf.

Welche Bedeutung haben Actinomyceten bei der Beurteilung von Feuchteschäden?

Eine wissenschaftlich fundierte Bewertung der Auswirkungen von Mikroorganismen aus bzw. in Feuchteschäden auf die Gesundheit von Bewohnern ist bisher nicht möglich, obwohl epidemiologische Studien belegen, dass ein Zusammenhang zwischen Feuchteschäden in Innenräumen und gesundheitlichen Beschwerden der Bewohner bzw. Raumnutzer besteht [6]. Es ist davon auszugehen, dass die beobachteten gesundheitlichen Beschwerden in einem ursächlichen Zusammenhang zur Mikroorganismenflora stehen, die sich am feuchten Material entwickelt hat; trotzdem wurde bisher keine enge Korrelation zwischen den gesundheitlichen Beschwerden der Raumnutzer und den ermittelten Sporenkonzentrationen festgestellt. Zur Aufklärung dieser Zusammenhänge wurden allerdings bisher vor allem Luftkeimuntersuchungen durchgeführt, weil Schimmelpilze eine Vielzahl von Sporen bilden, die leicht an die Umgebungsluft abgegeben werden und so über die Atemluft in den Respirationstrakt der Raumnutzer gelangen können. Der Bakterienflora in Feuchteschäden wurde in diesem Zusammenhang bisher nur wenig Beachtung geschenkt, da sich die meisten Bakterien in schleimigen Biofilmen am Material entwickeln und daher kaum an die Raumluft abgegeben werden. Die Bildung von verzweigten Filamenten und insbesondere die Bildung von Luftmyzel ist für Bakterien ungewöhnlich. Hierdurch wird zum einen die Überbrückung kleiner Distanzen und dadurch eine verbesserte Entwicklung im Lückengefüge des Bodens oder auch in Wandputzen sowie anderen Innenraummaterialien ermöglicht. Weiterhin ist ein Wachstum zumindest über geringe Distanzen in Richtung günstigerer Lebensbedingungen möglich.

Durch die Ausbildung von Luftmyzelien können Myzelstücke bzw. Sporen vom Material abgehoben und so besser an die Luft abgegeben und verbreitet werden. Dadurch wird primär die Verbreitung der Arten ermöglicht; allerdings wird auch die Menge des Zellmaterials in der Atemluft erhöht, so dass sensible Personen ggf. gesundheitliche Probleme bekommen können. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass von den Actinomyceten in Feuchteschäden eine Vielzahl von Stoffwechselverbindungen freigesetzt werden, die sich ebenfalls negativ auf die Raumnutzer auswirken können. Untersuchungen zu Toxinen von Actinomyceten in feuchten Innenräumen wurden zum Beispiel von Andersson et al. [1] durchgeführt. Hierbei wurde das Mitochondrien schädigende Toxin Valinomycin in der Luft und im Staub festgestellt.

Die Erfassung von Actinomyceten und deren Stoffwechselprodukten ist daher eine sinnvolle Ergänzung zu den bisher durchgeführten Schimmelpilzuntersuchungen bei Feuchteschäden.

Erfassung von Actinomyceten in Feuchteschäden

Das Vorkommen von Actinomyceten in Feuchteschäden ist bisher nur lückenhaft untersucht. In den wenigen Untersuchungen, in denen Actinomyceten in feuchten Baumaterialien und im Hausstaub analysiert wurden, konnten häufig bisher unbekannte Arten festgestellt werden [2] [3] [4]. Die Analyse von Actinomyceten gehört bisher nicht zur Routine von Umweltlabors und wird nur von wenigen Labors angeboten.

Prinzipiell könnte die Actinomycetenzusammensetzung einer Probe mit der Klonierungsmethode analysiert werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Gewinnung der Actinomyceten-DNA ohne Kultivierungsschritt direkt aus der Probe erfolgt. Andererseits ist die Methode sehr aufwändig, und die mit

der Methode gewonnenen Sequenzierungsdaten können nicht auf ihre Plausibilität überprüft werden, da keine Kulturen vorliegen.

Mit kultivierungstechnischen Methoden werden nur wachstumsfähige Actinomyceten erfasst. Diese stehen dann aber für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Verfügung, so dass auch eine Plausibilitätsprüfung der gewonnenen Ergebnisse möglich ist.

Für Untersuchungen von Actinomyceten in feuchten Baumaterialien wird daher ein polyphasischer Ansatz empfohlen, bei dem mit kultivierungstechnischen Methoden Isolate gewonnen werden, die sowohl morphologisch bewertet werden als auch für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen verwendet werden.

Der Einsatz gängiger Methoden wurde in einem vom Umweltbundesamt geförderten Forschungs- und Entwicklungsvorhaben [3] an Materialproben aus Feuchteschäden untersucht. Hierbei wurden mehrere Kultivierungsmedien für die Ersterfassung der Actinomyceten in Materialproben verwendet, um die unterschiedlichen Lebensansprüche der Arten abzudecken. Dabei zeigte sich, dass die parallele Verwendung eines proteinreichen (z.B. HBI-Agar) und eines glucose- bzw. kohlehydratreichen (z.B. Gauzeagar) Nähragars wichtig ist, um ein möglichst breites Artenspektrum zu bekommen. Innerhalb der Studie wurden sowohl Klonierungsverfahren als auch Fettsäureanalysen eingesetzt. Beide Methoden sind zu aufwändig, so dass sie in der nachfolgend vorgeschlagenen Untersuchungsstrategie zur Analyse von Actinomyceten im Routinelabor nicht berücksichtigt wurden.

Analyse von Actinomyceten in Materialproben

1. Im ersten Schritt werden die Actinomyceten mit der Suspensionsmethode quantifiziert und Referenzstämme der verschiedenen Isolate gereinigt und für weitere Untersuchungen aufbewahrt.
2. Im nächsten Schritt werden die unterschiedlichen Referenzstämme einer Probe morphologisch beschrieben.
3. Zusätzlich wird die Diaminopimelinsäure (DAP) aus den Zellwänden der Isolate nach der Methode von Hasegawa et al. [5] bestimmt. Der Nachweis von DAP ist hilfreich für eine Vorcharakterisierung und der Zuordnung der Isolate zu bestimmten Gattungen. Es existieren Gattungen mit LL-, meso- und ohne DAP.
4. Von den gereinigten Referenzstämmen werden mit Primersystemen die 16S rRNA vervielfältigt und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen werden mit Sequenzen von Vergleichsstämmen verglichen und für die Berechnung von Dendrogrammen genutzt.

Bei diesen Untersuchungen wurden in den untersuchten Proben Actinomycetenkonzentrationen zwischen $1,8 \times 10^4$ KBE/g und $1,5 \times 10^7$ KBE/g festgestellt und insgesamt 282 Referenzstämme aus 35 verschiedenen Gattungen der Ordnung *Actinomycetales* gewonnen und konserviert. In der Studie wurden neben coccoid und coryneform wachsenden Arten vor allem myzelartig wachsende Arten festgestellt. Unter diesen Isolaten wurden am häufigsten Vertreter der Gattungen *Amycolatopsis*, *Nocardiosis*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora* und *Streptomyces* festgestellt. Trotz der im Vergleich zu anderen Bakteriengruppen deutlich stärkeren morphologischen Differenzierung dieser Isolate war eine Artenbestimmung anhand der morphologischen Merkmale nicht möglich. Durch die Kulturmorphologie, die Mikromorphologie und die DAP-Bestimmung konnte in vielen Fällen allerdings eine Gattungszuordnung erfolgen. Weiterhin konnte durch die erhobenen Daten (Kulturmorphologie, DAP und Mikromorphologie) eine Vor-

Selektierung der Referenzstämme erfolgen, so dass die molekularbiologischen Analysen nur noch mit einer reduzierten Isolatanzahl durchgeführt werden mussten.

Die myzelbildenden oder sporenbildenden Actinomyceten benötigen für eine gute Ausprägung wichtiger Merkmale in der Regel eine Entwicklungszeit von ca. 2 – 3 Wochen. Bei der Kulturbeschreibung sollten die Farbe, Form und Oberflächenbeschaffenheit der Kultur, die Bildung von Substrat- und Luftmyzel sowie die Konsistenz der Kultur ermittelt werden. Außerdem kann die Abgabe von Exsudat oder löslichen Pigmenten festgestellt werden. Unter den mikroskopischen Merkmalen sind vor allem die Zellform, die Bildung und der Zerfall von Myzelien sowie die Art der Sporenbildung wichtige Merkmale.

Nachfolgend werden die wichtigsten Merkmale der häufig festgestellten Gattungen in der UBA-Studie skizziert. Die Kulturbilder und Mikroskopbilder sind der UBA-Studie [3] entnommen, ausführliche Informationen können in der Studie nachgelesen werden.

Amycolatopsisarten bilden häufig helle bis gelbe Kolonien mit mäßiger bis starker Verzweigung des Substratmyzels, das im Alter in unregelmäßige Fragmente zerfällt. Abhängig von der Art und den Wachstumsbedingungen kann das Luftmyzel wenig bis gut entwickelt sein (Bild 1). Nach mehreren Wochen setzt eine Fragmentierung ein (Bild 2). Die Zellwände enthalten meso-DAP.



Bild 1: Kolonie von *Amycolatopsis* sp.

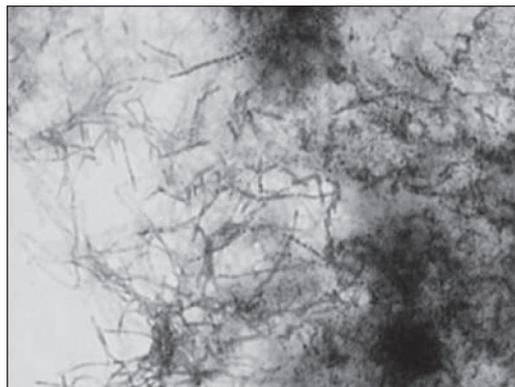


Bild 2: Fragmentiertes Myzel von *Amycolatopsis* sp.

Nocardiaarten bilden häufig relativ langsam wachsende helle, gelb- und orangefarbene Kolonien (Bild 3). Ihr Substratmyzel ist nur mäßig verzweigt, und es erfolgt in alternden Kulturen eine starke Fragmentierung in kurze bis coccoide Fragmente, wodurch die Kulturen bei der Präparation relativ weich erscheinen (Bild 4). In der Regel wird ein Luftmyzel gebildet und die Zellen enthalten meso-DAP.

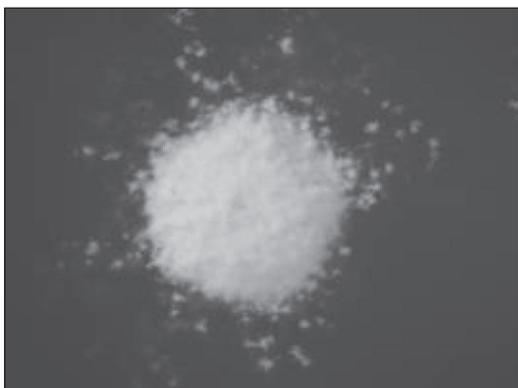


Bild 3: Kolonie von *Nocardia* sp.

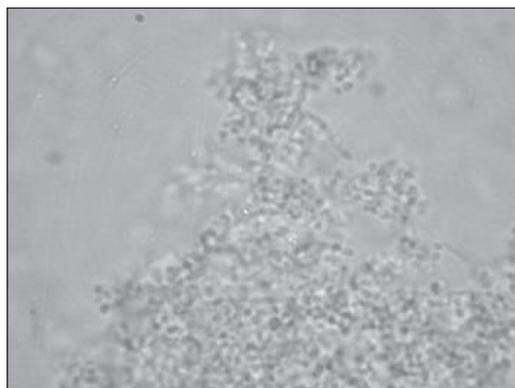


Bild 4: Zerfallenes Substratmyzel von *Nocardia* sp.

Nocardioopsisarten sind in der Regel weiß und zeichnen sich durch ein vergleichsweise schnelles Koloniewachstum aus. Das Substratmyzel ist immer stark entwickelt und besteht aus gestreckten, häufig verzweigten Filamenten. Ihr Luftmyzel ist fast immer stark watteartig entwickelt (Bild 5). Beim Zerfall entstehen typische Zickzack-Filamente (vgl. Bild 6). Die Zellwand enthält meso-DAP.



Bild 5: Kolonie von *Nocardioopsis* sp.

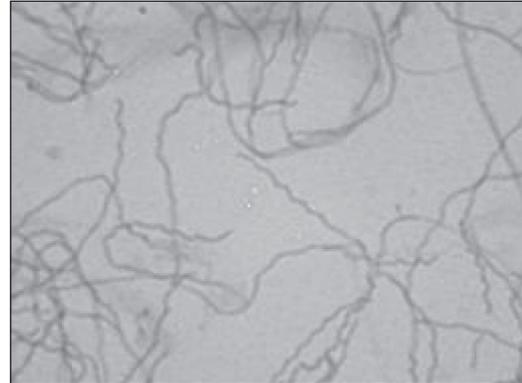


Bild 6: Zickzackförmiges Luftmyzel von *Nocardioopsis* sp.

Promicromonosporaarten bilden beigefarbene bis gelbe Kulturen. Sie bilden zu Beginn Filamente, die bereits nach wenigen Tagen in kleine Einzelzellen zerfallen, so dass die Kulturen schleimig wirken (Bild 7 und Bild 8). Ihre Zellwände enthalten kein DAP.

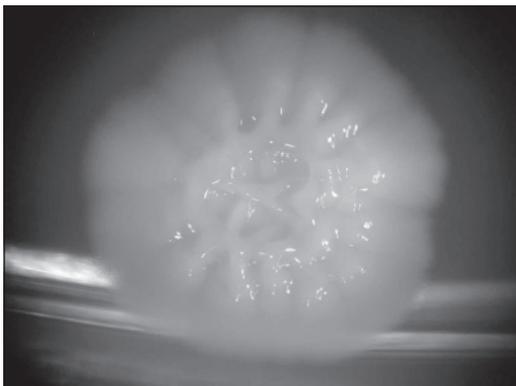


Bild 7: Kolonie von *Promicromonospora* sp.



Bild 8: Substratmyzel von *Promicromonospora* sp.

Pseudonocardiaarten zeichnen sich durch eine langsame Entwicklung und beigefarbene bis braune Kulturen aus. Ihr Substratmyzel ist stark verzweigt und auch in älteren Kulturen erfolgt nur eine mäßige Fragmentierung, so dass die Kulturen bei der Präparation relativ zäh wirken. Bei zunehmendem Koloniewachstum kommt es häufig zu einem brüchigen Erscheinungsbild der Kolonieoberfläche (Bild 8). Sie bilden Luftmyzel aus kurzen Filamenten, die später in kleine Fragmente zerfallen können (Bild 9). Die Zellwände enthalten meso-DAP.



Bild 9: Kolonie von *Pseudonocardia* sp.

Saccharopolysporaarten bilden häufig beigefarbene bis gelbe Kolonien. Das Substratmyzel ist erst mäßig bis stärker verzweigt und zerfällt später in kurze Fragmente. Ein Luftmyzel wird, wenn überhaupt, häufig erst nach Wochen gebildet (Bild 10). Im Luftmyzel entstehen charakteristische Ketten aus runden bis ovalen Sporen (Bild 11). Die Zellwände enthalten meso-DAP.

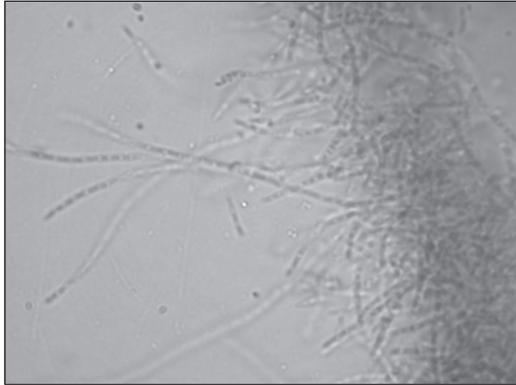


Bild 10: Luftmyzel von *Pseudonocardia* sp.



Bild 11: Kolonie von *Saccharopolyspora* sp..

Streptomycesarten können sehr unterschiedliche Koloniefarben haben. Sie bilden ein sehr stark verzweigtes Substratmyzel mit geringer Fragmentierung, so dass die Kulturen bei der Präparation einen sehr zähen Eindruck machen. Nur wenige Streptomyceten bilden auf den üblichen Nährmedien kein Luftmyzel. In der Regel wird ein üppiges Luftmyzel (Bild 12) mit Sporenketten gebildet, die gerade, gewellt oder helixartig ausgebildet sein können (Bild 13). Die Zellwände enthalten LL-DAP.

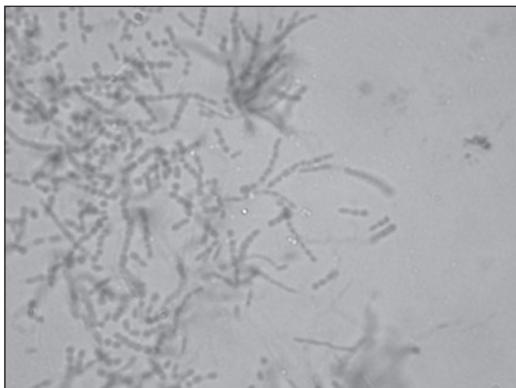


Bild 12: Sporenketten von *Saccharopolyspora* sp.

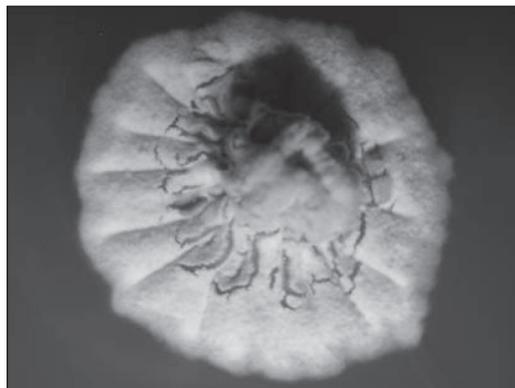


Bild 13: Kolonie von *Streptomyces* sp.

Die Erfassung von Actinomyceten in Luftproben war in der UBA-Studie kein Untersuchungsschwerpunkt. Eigene Untersuchungen zeigen, dass Actinomycetenkonzentrationen in der Außenluft und in unbelasteten Innenräumen sehr selten 50 KBE/m³ erreichen. Allerdings wurden bisher auch in Räumen mit bekannten Feuchteschäden, in denen Actinomyceten in Materialproben festgestellt wurden, nur in wenigen Fällen hohe Actinomycetenkonzentrationen in der Luft (> 500 KBE/g) festgestellt.

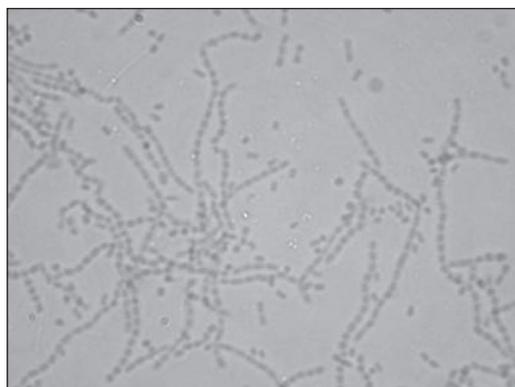


Bild 14: Sporenketten von *Streptomyces* sp.

In den Fällen, in denen Actinomyceten in der Luft festgestellt wurden, handelte es sich meistens um Vertreter aus der sporenbildenden Gattung *Streptomyces* und seltener um Vertreter der Gattungen *Nocardioopsis* und *Pseudonocardia*. Einschränkend ist zu bedenken, dass die von uns verwendeten Impaktionsammler für die Erfassung von Actinomyceten in der Raumluft nicht ideal sind, da einzelne Sporen bzw. Zellfragmente Größen von ca. 1 µm haben und die Austrocknungstoleranz im Vergleich zu der von Schimmelpilzsporen niedriger ist. Es kann daher sein, dass mit den zurzeit überwiegend verwendeten Impaktionsmethoden nur ein geringer Anteil der in der Luft enthaltenen Actinomyceten ermittelt werden kann.

Abschlussbemerkung

Die bisher verfügbaren Ergebnisse über Actinomyceten in Feuchteschäden sind noch sehr lückenhaft. Eine Abschätzung der gesundheitlichen Gefährdung durch Actinomyceten aus feuchten Innenräumen ist bisher nicht möglich. Gesundheitliche Auswirkung von Actinomyceten auf den Menschen sind jedoch zumindest in einem ähnlichen Ausmaß wie für Schimmelpilze zu erwarten (allergene, toxische und infektiöse Wirkung). Auch hier dürfte insbesondere die jeweilige immunologische Disposition der Bewohner oder Nutzer einen entscheidenden Einfluss haben. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass sich die gesundheitlichen Auswirkungen auf die Bewohner, die durch Actinomycten hervorgerufen werden, im Zusammenwirken mit anderen Mikroorganismen verstärken können.

Sinnvolle Studien zur Verbreitung einzelner Arten und deren potenzielle sowie tatsächliche gesundheitliche Auswirkung auf die Raumnutzer können nur in geförderten interdisziplinären Verbundprojekten erarbeitet werden, da sowohl die Auswahl geeigneter Objekte, die Wahl der Probenahmeverfahren, die Identifizierung der Arten, die Untersuchung von Sekundärmetaboliten sowie die Abschätzung von gesundheitlichen Auswirkungen spezielle Kenntnisse auf unterschiedlichen Gebieten voraussetzen.

Literaturverzeichnis:

- [1] Andersson, M.A., Mikkola, R., Kroppenstedt, R.M.: The Mitochondrial Toxin Produced by *Streptomyces griseus* Strains isolated from an Indoor Environment is Valinomycin. *Applied and Environmental Microbiology*, 4767-4773 (1998).
- [2] Andersson, M.A., Weiss, N., Rainey F., Salkinoja-Salonen, M.S.: Dust borne bacteria in animal sheds, schools and children´s day care centres. *Journal of Applied Microbiology* 86, 622-634 (1999).
- [3] Dill, I., Fischer, G., Gabrio, T., Groth, I., Jäckel, U., Kämpfer, P., Lorenz, W., Martin, K., Schäfer, J., Trautmann, C., Weidner, U.: Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in der Innenraumluft. Forschungs- und Entwicklungsvorhaben Förderkennzeichen 205 62 236. (2008).
- [4] Lorenz W., Trautmann C., Dill I.: 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, 12/2003.
- [5] Hasegawa, T., Takizawa, M., Tanida, S.: A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 29, 319-322 (1983).
- [6] Peat J.K., Dickerson J., Li J., Effects of damp and mould in the home on respiratory health: a review of the literature. *Allergy*, 28: 459-467. (1998).
- [7] Schaal, K. P. Infektionen durch Aktinomyzeten. Im Tagungsband: Nachweis, Bewertung, Sanierung und Qualitätssicherung von Schimmelpilzen in Innenräumen, 11. Pilztagung des VDB, 2007 in Dresden.
- [8] Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L.: Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:479-491. (1997).