



Hochschule Neubrandenburg

Studiengang Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie

Etablierung eines Verfahrens zur Identifizierung von
Legionella pneumophila und *Pseudomonas aeruginosa* mittels
MALDI-TOF-MS im Trinkwasser

Masterthesis

Vorgelegt von: Manel Kalai

Zur Erlangung des akademischen Grades

„Master of Science“ (M.Sc.)

Erstprüfer: Prof. Dr. Beatrice Großjohann

Zweitprüfer: Prof. Dr. Marco Ebert

Bearbeitungszeitraum: 31.08.2020 – 26.02.2021

URN:urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2020-0146-7

Erklärung über die selbstständige Anfertigung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene(n) elektronische(n) Fassung(en) mit der eingereichten Arbeit identisch sind.

Neubrandenburg, 26.02.2021

Ort,

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand der Wissenschaft und Technik	2
2.1	Gesetzliche Anforderung an die Beschaffenheit von Trinkwasser	2
2.2	Pathogene Mikroorganismen im Trinkwasser.....	3
2.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.2.2	<i>Legionella pneumophila</i>	7
2.3	Die Identifizierung von Mikroorganismen.....	11
2.3.1	Die klassischen Methoden.....	11
2.3.2	MALDI-TOF	13
3	Material und Methoden	16
3.1	Bakterienstämme	16
3.2	Nährmedien	17
3.3	Reagenzien	21
3.4	Chemikalien.....	22
3.5	Verwendete Geräte und Materialien.....	25
3.6	Methoden.....	27
3.6.1	Versuchsplanung	27
3.6.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Ansatz mit sterilem Wasser	31
3.6.3	<i>Legionella pneumophila</i> Ansatz mit sterilem Wasser	33
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Untersuchungsergebnisse von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
4.2	Untersuchungsergebnisse von <i>Legionella pneumophila</i>	46
5	Diskussion	54
5.1	Untersuchung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
5.2	Untersuchung von <i>Legionella pneumophila</i>	57
5.3	Nährmedienselektivität.....	62
6	Zusammenfassung	63
7	Abstract.....	64
8	Literaturverzeichnis	65
9	Tabellenverzeichnis	69
10	Abbildungsverzeichnis	71
11	Anhang	72

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
BCYE+AB	Gepufferter Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar mit Selektivsupplementen
BCYE	Gepufferter Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar
BTS	Bacterial Test Standard
Cys	Cystein
DIN	Deutsches Institut für Normung
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
G	Gramm
h	Stunde
HCCA	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
ISO	Internationale Organisation für Normung
KbE	Koloniebildende Einheit
l	Liter
m/z	Masse zu Ladung
μ l	Mikroliter
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry
NADH	Nicotinamidabenindinukleotid
n. n.	Nicht nachweisbar
ns	Nanosekunde
nm	Nanometer
RKI	Robert Koch Institut
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
UBA	Umwelt Bundesamt
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Leben ohne Wasser ist nicht möglich. Keine menschliche Gemeinschaft kann sich ohne eine ausreichende Versorgung mit frischem und sicherem Wasser entwickeln (Delolme, 1992). Trotz der heute hochentwickelten und modernen Trinkwasserversorgungssysteme kann es durch mikrobiologisch verunreinigtes Trinkwasser selbst in den Industrieländern zu großräumigen Epidemien kommen. Eine dieser Erkrankungen ist die Legionellose. Diese wird vornehmlich durch den Erreger *Legionella pneumophila* verursacht. Das Bakterium kann in fast jedem wässrigen oder feuchten natürlichen Milieu gefunden werden, jedoch meist in geringen Mengen. Allerdings finden sie sehr günstige Bedingungen für ihre Fortpflanzung in künstlichen Wassersystemen vor, wo sie sich in Biofilmen vermehren. Ein weiterer wichtiger pathogener Vertreter, welcher sich ebenfalls in Biofilmen vermehrt, ist *Pseudomonas aeruginosa*. Er ist ebenfalls ubiquitär vorkommend und stellt als Krankheitserreger eine besondere Gefahr für immungeschwächte Menschen dar (Kunze, 2016). Die Nachweisverfahren beider Mikroorganismen sind in der Trinkwasserverordnung festgelegt und in der DIN EN ISO 11731:2019-03 und DIN EN ISO 16266:2008-05 beschrieben.

Beide Bakterien weisen eine lange Inkubationszeit auf, wobei insbesondere *Legionella pneumophila* sehr langsam wächst. Hier kann eine Probe erst nach 10 Tagen Behandlung ausgewertet werden. Im Falle von *Pseudomonas aeruginosa* zeichnet sich die klassische Untersuchungsmethode durch eine hohe Anzahl einzelner Tests und Arbeitsschritte aus. Die langen Untersuchungszeiten und der relativ hohe Arbeitsaufwand stellen wesentliche Nachteile der klassischen Methoden nach DIN dar. Eine Alternative hierzu besteht in der molekularen Diagnostik.

Seit vielen Jahren spielt das **Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)** eine große und immer wichtigere Rolle bei der Identifizierung von Mikroorganismen. Die MALDI-TOF-Technologie beruht auf der unterschiedlichen Flugzeit ionisierter, vorrangig ribosomaler, Protein-Moleküle aus den Zellextrakten im elektrischen Feld. Wobei die Flugzeit von dem Verhältnis von Masse zu Ladung abhängig ist. Anhand der entstandenen Sequenz lässt sich der jeweilige Mikroorganismus identifizieren (Sauget, 2016). Ziel dieser Arbeit ist es eine Methode im Labor zu etablieren bei welcher, mittels MALDI-TOF-MS die beiden genannten Bakterien sicher identifiziert werden können. Die Ergebnisse werden dazu jeweils mit den klassischen Untersuchungsmethoden (nach DIN EN ISO 11731:2019-03 und DIN EN ISO 16266:2008-05) verglichen und überprüft.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 Gesetzliche Anforderung an die Beschaffenheit von Trinkwasser

Die "Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch" ist in der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2018) geregelt.

Nach § 3 dieser Verordnung ist Trinkwasser "alles Wasser, das, im ursprünglichen Zustand oder nach Aufbereitung, zum Trinken, zum Kochen, zur Zubereitung von Speisen und Getränken oder insbesondere zu den folgenden anderen häuslichen Zwecken bestimmt ist." Dies betrifft die Körperpflege und -reinigung, Reinigung von Gegenständen, die bestimmungsgemäß mit Lebensmitteln in Berührung kommen und die Reinigung von Gegenständen, die bestimmungsgemäß nicht nur vorübergehend mit dem menschlichen Körper in Kontakt kommen.

Ebenfalls wird in der TrinkwV gefordert, dass Trinkwasser so beschaffen sein muss, dass es durch seinen Konsum oder Gebrauch keine Schädigung der menschlichen Gesundheit, vor allem durch Krankheitserreger hervorruft. Auch muss es rein und genusstauglich sein.

Ebenso dürfen keine Konzentrationen von Krankheitserregern, im Sinne des § 2 Nummer 1 des Infektionsschutzgesetzes die durch Wasser übertragen werden können und eine Schädigung der menschlichen Gesundheit verursachen, enthalten sein. Zu diesen Krankheitserregern gehören auch *Legionella* und *Pseudomonas*.

Trinkwasser wird in der gesamten Versorgungskette bis zur Übergabe in Gebäude systematisch und intensiv überwacht. Dahinter beginnt eine undurchsichtige Grauzone, die durch eine Vielzahl von Faktoren entsteht und das Wachstum von Bakterien begünstigen, wie z. B. Stagnation, warme Temperaturen, hoher Nährstoffgehalt, mangelnde Wartung und Fehlfunktionen der Anlagen. Darüber hinaus erfährt das Trinkwasser chemische Veränderungen, wenn es mit Rohren und Geräten in Kontakt kommt (Werner, 2019).

Wenn Wasser längere Zeit nicht fließt sagt man, es "stagniert". Stagnationswasser ist in etwa vergleichbar einem Lebensmittel mit abgelaufenem Verfallsdatum. Es ist zwar nicht zwangsläufig nachteilig verändert, doch entziehen sich nachteilige Veränderungen möglicherweise der unmittelbaren Wahrnehmung. Stagniert Wasser in der Leitung, kann es Inhaltsstoffe des Materials der Leitungsrohre und metallische Korrosionsprodukte aufnehmen. Dadurch verschlechtert sich unter Umständen innerhalb weniger Stunden die Qualität des Trinkwassers (UBA, 2007).

Trinkwasser ist ein leicht verderbliches Lebensmittel, dessen Qualität insbesondere im Bereich der Trinkwasserinstallation in Gebäuden aus den oben beschriebenen Gründen durch

mikrobielle und chemische Verunreinigungen dauerhaft beeinträchtigt werden kann und sich dadurch schädliche auf die Gesundheit auswirkt. Aufgrund ihrer großen Komplexität stellen Trinkwassersysteme in Gebäuden ein besonderes Habitat/Ökosystem dar, das durch eine Vielzahl ganz spezieller Faktoren gekennzeichnet ist und in dem sich ein Mikrobiom entwickelt hat, das perfekt an diese Bedingungen angepasst ist. Die komplexen Strukturen von Kalt- und Warmwasserinstallationen für Trinkwasser können Hunderte von Metern von der Versorgung bis zum Verbraucher betragen. Toträume, tote Rohre, ungenutzte Bereiche, selten genutzte Entnahmestellen sind überall zu finden, was zu einer erheblichen Stagnation führt. Es sind vor allem die drei Nährstofffaktoren, Temperatur, Stagnation, die die mikrobielle Trinkwasserinstallation von der kommunalen Versorgung unterscheiden und die das Wachstum von fakultativ opportunistischen Krankheitserregern und Biofilmen fördern. Selbst Trinkwasser, das alle gesetzlichen Anforderungen erfüllt, ist nicht keimfrei oder gar steril. Fakultative wasserbürtige Krankheitserreger haben in Trinkwasserinstallationen von Gebäuden optimalere Lebensbedingungen als in ihrem natürlichen Lebensraum.

Legionellen, nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) und *Pseudomonas aeruginosa* sind von besonderer Bedeutung. Nach der vollständigen Eliminierung der fäkalen Übertragungswege sind sie heute die Hauptquelle für wasserbürtige Infektionen in den entwickelten Ländern (Werner, 2019).

2.2 Pathogene Mikroorganismen im Trinkwasser

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Beschreibung

Unter den *Pseudomonas*-Spezies ist in der Humanmedizin *Pseudomonas aeruginosa* die am längsten bekannteste und bedeutendste Spezies (RKI, 2002). *P. aeruginosa* ist ein "emerging pathogen" und gilt als einer der gefährlichsten Krankheitserreger in Krankenhäusern mit hoher natürlicher Antibiotikaresistenz. Es handelt sich um ein allgegenwärtiges Bakterium, das aufgrund seines geringen Nährstoffbedarfs an vielen Orten zu finden ist. Es ist seit 1862 bekannt und wurde 1882 erstmals isoliert. *Pseudomonas aeruginosa* wird in die Familie der Pseudomonadaceae eingeordnet (Bressler, 2008).

P. aeruginosa ist ein gramnegatives Stäbchen, das durch polare Geißeln und Pili vom Typ IV beweglich ist. Es misst 0,5 – 1,0 µm im Durchmesser und 1,5 – 5,0 µm in der Länge und besitzt Wasserstoffperoxid spaltende Enzyme und reagiert dadurch im Oxidase-Test positiv. Dieses

Bakterium ist fakultativ aerob. Durch Nitrattmung ist *P. aeruginosa* fähig unter anaeroben Bedingungen Stoffwechsel zu betreiben. Dabei wird Nitrat zu Nitrit reduziert, was einen Energiegewinn zur Folge hat. Die Bildung von blau-grün fluoreszierenden Pyocyanine ist ein weiteres Merkmal (Babić, 2017). Einer der Pathogenitätsfaktoren von *P. aeruginosa* ist Pyocyanin. Es kann unter aeroben Bedingungen enzymatisch eine Oxidation von Nicotinamidadeninucleotid (NADH) bewirken und so die Bildung von Sauerstoffradikalen katalysieren. Andere Pathogenitätsfaktoren sind Exotoxine, Proteasen und Rhamnolipide (Bressler, 2008).

Vorkommen

Als genügsamer und allgegenwärtiger Keim in Boden und Wasser, der auch im Darmtrakt von Menschen und Tieren vorkommt, hat *Pseudomonas aeruginosa* verschiedene Gebiete in der Nähe des Menschen besiedelt. Er ist überall dort zu finden, wo ausreichend Feuchtigkeit vorhanden ist, wie z. B. in Waschbecken, Toiletten, Geschirrspülern, Badewasser und auch im Trinkwasser (RKI, 2002). Die Anpassungsfähigkeit an niedrige Nährstoffkonzentrationen führt dazu, dass das Wachstum im Wasser nicht direkt mit der Höhe des Gehalts an organischer Substanz zusammenhängt. Obwohl seine optimale Wachstumstemperatur 37 °C beträgt, kann *P. aeruginosa* auch zwischen 10 und 42 °C wachsen.

Pseudomonas aeruginosa ist ein bakterieller Erreger, der für ein breites Spektrum menschlicher Infektionen verantwortlich ist, die mit erheblicher Morbidität und Mortalität verbunden sein können. Dieser opportunistische Erreger befällt vor allem immungeschwächte Patienten: Er kann in 50 – 60% der hospitalisierten Patienten (insbesondere mit Verbrennungen und Schorf) isoliert werden, im Vergleich bei gesunden Menschen zu 1,2 – 6 %. Als eine der häufigsten Ursachen für Infektionen im Gesundheitswesen war *P. aeruginosa* für 8 – 11% der zwischen 2001 und 2010 in Europa und den Vereinigten Staaten gemeldeten nosokomialen Infektionen verantwortlich. *P. aeruginosa*-Infektionen können in Gemeinschaftseinrichtungen (Spas, Whirlpools, Schwimmbäder) erworben werden, treten jedoch hauptsächlich in Einrichtungen des Gesundheitswesens auf, insbesondere auf Intensivstationen und nach Verfahren, die eine physische Schädigung der Abwehrkräfte des Wirtes mit sich bringen, wie chirurgische Eingriffe und die Verwendung invasiver Geräte (Bédard et al., 2016).

Pseudomonas aeruginosa

Im Trinkwasser gelten selbst geringe Konzentrationen von *Pseudomonas aeruginosa* als gesundheitsschädlich, da sie unter ungünstigen Bedingungen schwere Entzündungskrankheiten in verschiedenen Organen hervorrufen können. Daher kann das Vorhandensein dieses Krankheitserregers in Wasser, das für den menschlichen Gebrauch bestimmt ist, nicht toleriert werden. Aufgrund seines geringen Wachstumsbedarfs kann es leicht zu einer weiten Verbreitung kommen (RKI, 2002). Der Keim ist ein definierter Erreger im Sinne der Trinkwasserverordnung und darf in 100 ml nicht nachweisbar sein. Gegenwärtig ist die Untersuchung auf diesen Keim kein obligatorischer Bestandteil einer Trinkwasseruntersuchung, was aber im Zusammenhang mit einer Hausinstallation oder neuverlegten Rohrleitungen grundsätzlich sinnvoll wäre.

Eine 2014, auf 10 Intensivstationen durchgeführte Studie ergab, dass mit *P. aeruginosa* kontaminierte Wasserhähne signifikante Risikofaktoren im Hinblick auf eine entsprechende Infektion waren. 32 % der mit *P. aeruginosa* kolonisierten Patienten sind in ihren Zimmern positivem Wasser ausgesetzt gewesen. Auf Intensivstationen waren 30 – 50 % der Infektionen mit *P. aeruginosa* mit Wasser assoziiert (Venier et al., 2014).

Biofilm als Lebensraum für *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa kann neue Oberflächen besiedeln oder sich mit bestehenden Biofilmen verbinden. Der Biofilm spielt eine schützende Rolle für Bakterien und sorgt für eine erhöhte Resistenz gegen Desinfektionsmittel, Antibiotika und andere Umweltbelastungen. Eine 2013 durchgeführte Studie identifizierte extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) als Schlüssel zu einer erhöhten Resistenz von *P. aeruginosa*-Zellen, die mit dem Biofilm assoziiert wurden. Die auf der Zellmembranoberfläche befindliche EPS verbraucht das restliche Desinfektionsmittel, beeinträchtigt aber auch die Zugänglichkeit reaktiver Stellen auf der Zelloberfläche und verzögert die Wechselwirkung zwischen dem Desinfektionsmittel und der Zellmembran (Xue et al., 2013). Ohne die Entfernung von Biofilmen können sich Bakterien immer wieder von ihnen lösen und im Trinkwasser landen. Sie sind daher ein Faktor für das Vorhandensein von Mikroorganismen im Trinkwasser. Eine der Komponenten, wo sich ein Biofilm bilden kann, ist ein so genannter Perlator. Dabei handelt es sich um einen Strahlregler, der in den meisten Haushalten am Auslauf von Wasserhähnen installiert ist. Diese Komponente steht praktisch in ständigem Kontakt mit dem stehenden Wasser in der Leitung, was das Wachstum von Mikroorganismen fördert (Hüsch, 2015).

P. aeruginosa hat signifikant als Erreger der bakteriellen Keratitis zugenommen, insbesondere im Zusammenhang mit dem Tragen von Kontaktlinsen. Hierbei besteht die Gefahr für eine

Infektion mit *P. aeruginosa* in der Reinigung von Kontaktlinsen mit Leitungswasser, welches *P. aeruginosa* enthält. Unter Verwendung moderner Typisierungstechniken konnte ermittelt werden, dass Wasser sowohl ein Infektionsreservoir als auch ein Vehikel für *P. aeruginosa* ist.

P. aeruginosa gehört zu den fakultativ pathogenen Mikroorganismen, die zusätzlich in der Lage sind, umfangreiche Biofilme in Wassersystemen und Trinkwasseranlagen zu bilden. Untersuchungen von Exner et al. (2016) zeigten, dass *P. aeruginosa* zunächst innerhalb von 4 Tagen in Form einer Mikroplatte an geeigneten Materialien bindet und dann einen vollständigen Biofilm bildet. In den Vertiefungen der Mikrotiterplatten bildete sich beim Mediumwechsel in einem Intervall von 8 h nach 44 h ein fest haftender Biofilm. Wasserhähne, Duschköpfe und Duschschläuche können ebenfalls eine isolierte Kontaminationsquelle für *P. aeruginosa* sein (Exner et al., 2016).

Die Kontamination des Trinkwassersystems kann bereits über kontaminierte Materialien während der Bauarbeiten am Rohrnetz oder bei Arbeiten an bestehenden oder neu errichteten Trinkwasserinstallationen erfolgen. Nach dem Eintrag ist die Besiedlung verschiedener Materialklassen wie Edelstahl, Kunststoffe, Weich-PVC oder Dichtungsmaterialien möglich, wobei neue Materialien ohne vorhandenen Biofilm stärker besiedelt werden können als Oberflächen mit vorhandenem Trinkwasser-Biofilm (UMB, 2017).

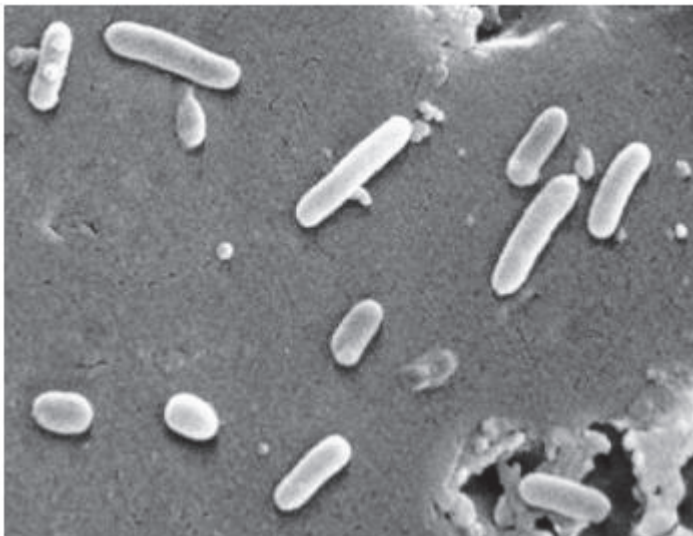


Abbildung 1: mikroskopische Aufnahme *Pseudomonas aeruginosa* (Trautmann, 2007)

2.2.2 *Legionella pneumophila*

Beschreibung

Legionellen sind eine Gattung von stäbchenförmigen Bakterien mit einer durchschnittlichen Länge von 2 – 5 μm und einem Durchmesser von 0,5 – 0,8 μm , die beim Menschen verschiedene Infektionskrankheiten verursachen können (Bürschgens, 2018). Legionellen zählen zu den gramnegativen, nicht sporenbildenden und aeroben Bakterien. Sie haben verzweigt-kettige Aminosäuren, einen nicht-fermentativen Stoffwechsel und sind für ihr Wachstum auf das Vorhandensein von L-Cystein und Eisensalzen angewiesen (Wunderlich, 2017). Daher werden für die Kultur unter Laborbedingungen Kulturmedien benötigt, die mit L-Cystein und löslichen Eisensalzen angereichert sind (Thiem, 2019). In der Natur sind Legionellen ein natürlich vorkommender Mikroorganismus, der im Grund- und Oberflächenwasser existiert. Da sie nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind, stellen sie hier kein pathogenes Risiko dar. Sie können jedoch in technische Anlagen, wie Rohrleitungssysteme oder andere, gelangen. Dort finden sie Bedingungen vor, unter denen eine Reproduktion nicht mehr ausgeschlossen werden kann. Besonders alte und schlecht gewartete Wasserleitungssysteme bieten aufgrund des Biofilms und der daran haftenden Ablagerungen ideale Lebensbedingungen für Legionellen (Wunderlich, 2017). Als thermophile Bakterien finden sie ideale Wachstumsbedingungen bei Temperaturen zwischen 25 und 45 °C. Oberhalb von 55 °C wird das Legionellen-Wachstum wirksam gehemmt, bis die Keime schließlich oberhalb von 60 °C absterben. Legionellen kommen auch in kaltem Wasser vor, aber bei Temperaturen unter 20 °C können sie sich nicht mehr signifikant vermehren (RKI, 2019).

Legionellen sind dank einer oder mehrerer polarer oder subpolarer Flagellen mobil. Ihre Zellwand besteht aus einer zytoplasmatischen Membran auf der inneren Oberfläche, einer dünnen Schicht Peptidoglykan und einer äußeren Membran, welche thermostabile Lipopolysaccharide (LPS) enthält. Die LPS-Schicht enthält speziesspezifische und serogruppenspezifische O-Antigene (Wunderlich, 2017). Aktuell sind mehr als 60 Arten bekannt, welche mindestens 79 verschiedene Serogruppen umfassen (RKI, 2019).

Vorkommen

Die Bakteriengattung *Legionella* wurde erst 1976 entdeckt, als in einem Hotel in Philadelphia/USA eine Epidemie ausbrach, bei der mehr als 200 Menschen erkrankten und etwa 30 Menschen starben (Behling, 2004). Seitdem wurden sie mit Ausbrüchen durch schlecht gewartete künstliche Wassersysteme in Verbindung gebracht. Hierbei spielten insbesondere Kühltürme oder Verdunstungskondensatoren in Verbindung mit Klimaanlage und

Industriekühlungen, Warm- und Kaltwassersystemen in öffentlichen und privaten Gebäuden und Whirlpools eine wichtige Rolle (WHO, 2007). In Deutschland hat es bisher vier große Legionellen-Epidemien mit insgesamt 208 Krankheitsfällen und 11 Todesfällen gegeben. An den Ausbrüchen in Ulm/Neu-Ulm 2010 und Warstein 2013 waren Verdunstungskühlsysteme beteiligt. Die Quelle wurde bei den Ausbrüchen in Jülich 2014 und Bremen 2016 nicht gefunden. Es wird jedoch angenommen, dass auch Verdunstungskühlsysteme beteiligt waren (UBA, 2017). Legionellen gelten neben weiteren Krankheitserregern als einer der Haupterreger von Lungenentzündungen in Deutschland (schätzungsweise 15.000 bis 30.000 Fälle pro Jahr, von denen etwa 6 – 10 % tödlich verlaufen). Die Legionärskrankheit (Legionella-Pneumonie) wird oft nicht erkannt und wenn doch, ist es schwierig, die Ursache einer Legionellen-Infektion zu finden (RKI, 2020). Eine hohe Ansammlung von Legionellen tritt gewöhnlich in Warmwasserspeichern und in Bereichen des Wasserversorgungssystems auf, in denen gelegentlich oder regelmäßig Wasser-stagnation auftritt, insbesondere in Wasserleitungen, die wochenlang stagnieren/tot sind, vorübergehend nicht genutzte Wohnungen, Neubauten, Renovierungen und Umbauten, saisonal betriebene Einrichtungen (z. B. Campingplätze, Freibäder), Sportanlagen, hydrotherapeutische Einrichtungen (Sauna, Whirlpool, Springbrunnen, Rutschen usw.) und sonstige Einrichtungen (z. B. Schwimmbäder, Schwimmhallen usw.). Hallenbäder, Springbrunnen usw. zentrale Wasserversorgungssysteme in Krankenhäusern, Sanatorien, Altenheimen, Hotels und Zahnarztpraxen (Mundspüleinrichtungen) sind besonders empfindlich, nicht zuletzt wegen der "verletzlichen" Nutzergruppe. Darüber hinaus kommen auch technische Einrichtungen wie Wasserstrahltechnik in Produktionsanlagen (Reinigung, Autowäsche), Kühltürme oder auch Lüftungsanlagen mit Aerosolbildung in Betracht, wenn eine Übertragung von Legionellen durch regelmäßige Wartung und Reinigung, ggf. Einsatz von Bioziden, Verdunstung statt mechanischer Befeuchtung der Luft oder sterilem Wasser möglichst nicht verhindert wird (Behling, 2004).

Die Spezies *Legionella pneumophila*

Die wichtigste humanpathogene Spezies ist die Spezies *Legionella pneumophila* („pneumophila“ = die Lunge liebende). Sie ist verantwortlich für etwa 90 % aller *Legionella*-Infektionen. Hierzu zählt unter anderem die Legionärskrankheit, einer besonders schweren Form der Lungenentzündung (Bürschgens, 2018). *L. pneumophila* enthält mindestens 15 verschiedene Serogruppen. Die Serogruppe 1 von *L. pneumophila* führte 1976 zur Epidemie in Philadelphia und ist die Ursache von 70 – 90 % aller Fälle der Legionärskrankheit, in denen ein Bakterium isoliert wurde (DIN EN ISO 11731:2019-03). In der Abbildung 2 wurde *Legionella pneumophila* koloriert und als mikroskopische Ansicht dargestellt.

L. pneumophila ist Katalase-positiv und lebt chemoorganotroph. Sie verwenden hauptsächlich Aminosäuren als primäre Energiequelle (Wunderlich, 2017). Darüber hinaus reagieren sie empfindlich auf freie Sauerstoffradikale (Siegbracht, 2012).

L. pneumophila kann Temperaturen von 70 °C überleben. Sie wurden aber auch in polaren Gewässern mit einer Temperatur von 0 °C gefunden. Wenn die Zellen diesen extremen Temperaturen ausgesetzt sind, ist *L. pneumophila* allerdings nicht mehr in der Lage zu wachsen, sondern nur als lebensfähig betrachtet werden. Dieser lebensfähige, aber nicht kultivierbare Zustand wird als Viable Bt Non Culturable (VBNC) bezeichnet. Er erlaubt es den Bakterien unter rauen Bedingungen zu überleben, ohne sich fortzupflanzen. Unter günstigeren Bedingungen allerdings kann *L. pneumophila* wieder wachsen und sich vermehren (Boppe, 2016).

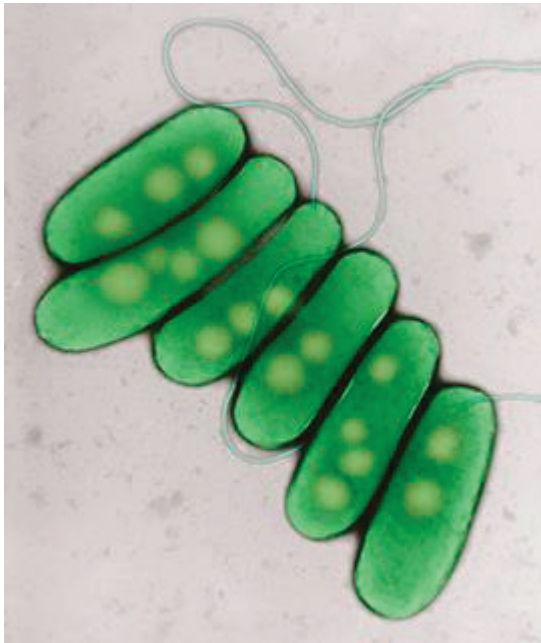


Abbildung 2: *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 (koloriert) Transmissionselektronenmikroskopie Maßstab = 1 µm (Hans R. Gelderblom, Rolf Reissbrodt / RKI, 2020)

Legionellose

Legionellen sind fakultative intrazelluläre Parasiten, da sie sich innerhalb der Zellen wasserlebender Amöben, aber auch in menschlichen Makrophagen vermehren können (RKI, 2019). Die Legionellose tritt in Form der Legionärskrankheit (mit Lungenentzündung) und des so genannten Pontiac-Fiebers auf (Bürschgens, 2018). Dabei verläuft das Pontiac-Fieber mit seinen grippeähnlichen Symptomen in der Regel harmlos und der Mensch kann nach einer Woche ohne Folgeschäden von dieser Krankheit genesen (Wunderlich, 2017). Möglich ist aber auch das Auftreten einer Legionellose in Form einer potenziell tödlichen Lungenentzündung, die mit einer Infektion der unteren Atemwege einhergeht. Symptome wie Kopfschmerzen, Muskel- und Brustschmerzen, hohes Fieber, Husten, Durchfall und Verwirrtheit treten innerhalb von 2 – 10 Tagen nach der Infektion auf (Thiem, 2019). Sporadische oder sogar epidemische Infektionen treten vor allem im Sommer und Herbst auf, da das Wachstum von Krankheitserregern durch warme Temperaturen begünstigt wird. Die Schwere der Infektion hängt nicht nur von der Menge der eingeatmeten Erreger ab, sondern auch vom Immunstatus des Patienten. Ältere Menschen, eine verminderte Atmungsleistung, eine Schwächung des Immunsystems, starkes Rauchen, aber auch das männliche Geschlecht senken die nötige Infektionsdosis für eine Legionellen Infektion (Siegbrecht, 2012).

Eine Legionellen-Infektion wird am häufigsten durch Einatmen von Krankheitserregern verursacht. Insbesondere infizierte Amöbenpartikeln in entsprechend hoher Konzentration, durch ein Luft-Wasser-Gemisch mit einem Aerosol (Tropfendurchmesser 2 – 5 μm) aus der Umgebung, z. B. beim Duschen, gilt als häufiger Infektionsweg. Aber auch das Verschlucken von erregerhaltigem Becken- und Leitungswasser kann zu einer Infektion führen. Nach Angaben des Verbandes der Wassertechnologie kann eine Infektion auch durch Trinken oder Schlucken von erregerhaltigem Wasser nicht ausgeschlossen werden, da der Schluckreflex insbesondere bei Lungenpatienten oder Rauchern nicht voll funktionsfähig ist und die Flüssigkeit daher in die Atemwege und damit in die Lunge gelangen könnte. Eine Übertragung durch infizierte Personen ist nicht möglich; Wundinfektionen sind extrem selten (Behling, 2004). Einmal im menschlichen Körper angekommen, werden sie von den Makrophagen in das Lungen- und Bronchialgewebe aufgenommen, verankern sich dort und sind so relativ gut vor äußeren Einflüssen geschützt. Auf diese Weise sind sie vor vielen gängigen Antibiotika sicher.

Die befallene Wirtszelle wird als Transportfahrzeug verwendet. Bakterien können sich im Inneren der Makrophagen vermehren und diese schließlich in der Lunge zerstören. Während dieses Prozesses gelangen die Substanzen, die Makrophagen normalerweise zur "Verdauung" von

Krankheitserregern verwenden, in das umgebende Gewebe. Dort verursachen diese Substanzen allerdings Entzündungen im Gewebe und ziehen andere Abwehrzellen an (Hüpsel, 2015). In der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) werden *Legionella spec.* als ein „spezieller Indikatorparameter für Anlagen der Trinkwasserinstallation“ geführt. Hier gilt ein technischer Maßnahmenwert von 100 KBE/100 ml. Nach §14b ist eine Untersuchung auf Legionellen in Trinkwasser-Installationen von Gebäuden erforderlich, wenn dort eine Großanlage zur Trinkwassererwärmung vorhanden ist und das Trinkwasser im Rahmen einer gewerblichen oder öffentlichen Tätigkeit abgegeben wird und es Duschen oder andere Einrichtungen zur Vernebelung des Trinkwassers gibt (Trinkwasserverordnung, 2018).

2.3 Die Identifizierung von Mikroorganismen

2.3.1 Die klassischen Methoden

Legionella pneumophila laut DIN EN ISO 11731

Die klassische Methode für die Bestimmung von Legionellen in Trinkwasserproben ist in der DIN ISO 11731 festgelegt. Demnach besteht die klassische Methode zum Nachweis von *Legionella pneumophila* in der Kultivierung auf einem Selektivnährmedium (BCYE+AB).

Legionellen benötigen hauptsächlich Aminosäuren als primäre Energiequelle (Thiem, 2019). Sie verfügen über einen nicht-fermentativen Stoffwechsel und benötigen für ihr initiales Wachstum L-Cystein und Eisensalze (Wunderlich, 2017). Daher werden für die Kultur unter Laborbedingungen Nährmedien benötigt, welche mit L-Cystein und löslichen Eisensalzen angereichert sind (Thiem, 2019). Daraufhin wurde ein Kulturmedium entwickelt, welches neben dem genannten L-Cysteinhydrochlorid und Eisenpyrophosphat aus Aktivkohle-Agar, Hefeextrakt, ACES-Puffer und α Ketoglutarat besteht. Da *Legionella pneumophila* empfindlich auf freie Sauerstoffradikale reagiert, dient die Aktivkohle im Medium der Bindung eben dieser (Siegbrecht, 2012). Der Hefeextrakt deckt den Nährstoffbedarf als Aminosäurequelle. Der ACES-Puffer dient dafür, den pH-Wert des Nährmediums auf 6,9 einzustellen. Dem BCYE-Medium werden zusätzlich drei antibiotische Supplemente hinzugefügt (Polymixin-B-Sulfat, Cefazolin-Natrium und Pimaricin). Diese Supplemente hemmen das Wachstum der unerwünschten Begleitflora (Merkl, 2014). Da Legionellen sehr langsam wachsen, beträgt die Inkubationszeit 7 – 10 Tage. Beim Auftreten einer Begleitflora würden die Platten durch das schnellere Wachstum dieser Flora überwuchert werden.

Die Identifikation des Keims erfolgt über die Morphologie und Pigmentierung der gewachsenen Kolonien. Kolonien von *Legionella* weisen für gewöhnlich eine weiß-graue Färbung auf,

können aber auch anderen Farben annehmen. Sie sind glatt mit ganzem Rand und haben ein charakteristisches milchig-glasähnliches Aussehen. Unter einer UV-Lampe fluoreszieren Kolonien mehrerer Spezies (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. herri*, *L. dumoffii*, *L. gromanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* und *L. tucsonensis*) in strahlendem Weiß; *L. erythra* und *L. rubrilucens* erscheinen rot. Kolonien von *L. pneumophila* erscheinen in einem stumpfen Grün, oft mit gelber Tönung. In Proben, die unterschiedliche Spezies von *Legionella* enthalten, kann eben diese Fluoreszenzfarbe bei der Unterscheidung der Kolonien helfen, da andere Spezies mit einem differenzierten Fluoreszenz-Verhalten auf dieses Licht reagieren können.

Um die Möglichkeit zu vermeiden, dass die Legionella-Zellen abgetötet oder beschädigt werden, sodass sie nicht wiedergefunden werden können, sollten die Platten nicht länger als notwendig dem ultravioletten Licht ausgesetzt werden.

Zur Bestätigung verdächtiger *Legionella*-Kolonien werden diese auf BCYE-Agar und auf BCYE-Cys-Agar subkultiviert und 2 bis 5 Tage inkubiert. Kolonien, welche auf BCYE wachsen aber nicht auf BCYE-Cys, gelten als Legionellen (DIN ISO 11731:2019-03).

Pseudomonas aeruginosa laut DIN EN ISO 16266

Der kulturelle Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwasserproben erfolgt entsprechend DIN EN ISO 16266 mittels Membranfiltration der Probe und Bebrütung bei 36 ± 2 °C auf einem selektiven Nährmedium (Cetrimid-Agar).

Das Cetrimid-Agar ist zusammengesetzt aus Pepton (aus Gelatine), Caseinhydrolysat, Kaliumsulfat, Magnesiumchlorid, Glycerin, Agar, Wasser und dem CN-Zusatz, welcher aus Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetrimid) und Nalidixinsäure besteht (DIN EN ISO 16266). Die Peptonmischung des *Pseudomonas*-Selektivagar Basisnährbodens ermöglicht das Wachstum eines breiten Spektrums an Pseudomonaden. Der Gehalt an Kaliumsulfat und Magnesiumchlorid fördert die Pigmentbildung. Durch den Zusatz des CN-Zusatzes wird das Wachstum von der grampositiven und gramnegativen Begleitflora gehemmt.

Pseudomonaden erzeugen ihre Energie durch einen aeroben Stoffwechsel. Einige Arten sind jedoch fakultativ anaerob, womit es ihnen bei Sauerstoffmangel möglich, ist auf Nitratatmung umschalten. Dank ihrer katabolen Eigenschaften ist es den Vertretern dieser Gattung möglich, sich an eine Vielzahl von Umweltbedingungen anzupassen (Hüsch, 2015).

Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* können in verschiedenen Farben erscheinen. Diese weisen eine blau-grüne, fluoreszierende, rote oder andere Färbung auf. Alle Kolonien, die ein

blau-grünes Pigment bilden, werden als bestätigte Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* gezählt. Der Membranfilter wird unter UV-Licht untersucht. Alle Kolonien, die kein blaugrünes Pigment (Pyocyanin) bilden und fluoreszieren, werden als verdächtige *P. aeruginosa*-Kolonien gezählt und in Acetamid-Nährlösung bestätigt. Alle anderen rötlich-braun pigmentierten Kolonien, die nicht fluoreszieren, werden als verdächtige *P. aeruginosa*-Kolonien gezählt und durch den Oxidase-Test, die Acetamid-Nährlösung und das King's B-Medium bestätigt. Dabei fördert King's B-Medium die Bildung von Fluorescein und hemmt gleichzeitig die Bildung von Pyocyanin (DIN EN ISO 16266).

Mittels des Oxidase-Tests wird das sogenannte Cytochrom c nachgewiesen werden. Cytochrom c befindet sich außerhalb der Membran von Bakterienzellen und ist für Farbstoffe zugänglich. Bei reduzierten Farbstoffen wie der farblosen Leukoform von Tetramethylparaphenyendiamin (TMPD) kann es zu einer farbigen (blauen) Form oxidieren und womit der Oxydase-Test als positiv bewertet wird (Fuchs, 2007).

2.3.2 MALDI-TOF

Bereits 1975 hatten Anhalt und Fenselau die Grundidee, Bakterien anhand ihres spezifischen massenspektrometrischen Profils zu identifizieren. Sie zeigten, dass bakterielle Komponenten, wie z. B. die Lipidmembran, charakteristische, artspezifische Muster aufweisen und somit anhand dieser Merkmale identifiziert werden können. Aufgrund der Tatsache, dass Ribosomen etwa 45 % der wachsenden Bakterienmasse ausmachen können, haben sich Teile der ribosomalen Proteine nebst anderen Proteinen, wie z. B. Hitzeschock- oder Kälteschockproteinen, als zuverlässige Biomarker für die massenspektrometrische Identifizierung von bakteriellen Isolaten erwiesen (Menzer, 2017).

Allgemein

Die Abkürzung MALDI-TOF steht für die Kombination aus einer Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisations-(MALDI)-Ionenquelle und einem „Time-of-Flight“ (TOF) Flugzeitanalysator. Der Analyt wird durch Laserpulse in die Gasphase gebracht, ionisiert, in einem elektrischen Feld beschleunigt und im Massenspektrometer detektiert (Dilger, 2018).

Die Charakterisierung von Mikroorganismen durch Massenspektrometrie wurde bereits 1975 beschrieben. In den 1980er Jahren ermöglichte die Entwicklung der weichen Ionisierung (MALDI) die Analyse großer Moleküle (z. B. Proteine). In der Folge wurde die MALDI-TOF-Technologie zur schnellen Identifizierung von Bakterien angewandt. Eine erste Datenbank, die

die Identifizierung von Bakterien durch die Analyse von Oberflächenproteinen ermöglicht, wurde 2004 referenziert. Die Zuverlässigkeit der Identifizierung auf der Ebene der Spezies wurde dann durch die Ionisierung von ribosomalen Proteinen verbessert, welche stabilere Moleküle darstellen als Oberflächenproteine (Sauget, 2016). Die Anwendungen der Massenspektrometrie sind sehr breit gefächert und betreffen hauptsächlich die Identifizierung von Peptiden oder Proteinen und die Analyse ihrer Aminosäuresequenz. Diese seit langem weit verbreitete Technologie hat sich in den letzten Jahren zusehends in der Mikrobiologie etabliert (Carbonnelle et al., 2011).

Funktionsweise

Zu Beginn wird die Bakterienkolonie direkt in Form eines dünnen Abstrichs auf das Feld eines Probenträgers, dem sogenannten Target, aufgetragen. Eine Platte bietet dabei Platz für bis zu 96 verschiedene Proben. Die Menge einer zu analysierenden Probe sollte zwischen 10^4 bis 10^6 KBE liegen. Dann wird die Probe mit einer 1 μ l-Matrix abgedeckt (Schubert et al., 2011).

Im Allgemeinen werden kleine organische Moleküle als Matrixsubstanzen verwendet, die bei den verwendeten Laserwellenlängen Energie stark absorbieren (Henning, 2015). Anwendung finden hier Substanzen mit einem ausgeprägten konjugiertem π -System wie α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure (HCCA), 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizimtsäure (Sinapinsäure, SA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (Dilger, 2018). In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde ausschließlich HCCA als Matrix verwendet, da es allgemein die höchste Sensitivität hat und vor allem bei Peptiden und kleinen Proteinen eingesetzt wird (Hennig, 2015).

Nach der Zugabe der Matrix verdampft das Lösungsmittel und führt nach wenigen Minuten zur Kristallisation des Gemisches. Die Säuremoleküle in der Matrix übertragen dabei Protonen auf die Moleküle der Probe und laden diese positiv auf (Osterhage, 2009).

Die auf diese Weise vorbereitete MALDI-Probenplatte ist somit für die eigentliche Messung im Gerät bereit und wird in der Kammer des Gerätes platziert. Dort wird ein hohes Vakuum erzeugt. Unter Videokontrolle bombardiert nun ein Stickstoff-Laserstrahl (337 nm, Pulsbreite 2 – 5 ns) die Proben mit (6 x 40 Laserschüssen je Targetfeld), wodurch eine große Energiemenge auf die Kristalle oder das π -System übertragen wird. Dabei löst sich die obere Kristallschicht der Analyt-Matrix explosionsartig ab und geht durch Verdampfen in die Gasphase über (Osterhage, 2009; Dilger, 2018). Der Analyt wird durch den Transfer des Protons aus der Carboxylgruppe ionisiert und in der Summe entsteht so eine Ionenwolke. Zwischen der Probenplatte und einer wenige Zentimeter entfernten Elektrode wird ein elektromagnetisches Feld

erzeugt. In diesem Feld werden die ionisierten Moleküle beschleunigt und durch ein Flugrohr zum Detektor geleitet. In dem Flugrohr trennen sich die Moleküle anhand ihres Verhältnisses von Masse zu Ladung ($\frac{m}{z}$). Aus der Gesetzmäßigkeit $\frac{m}{z} = 2E_{kin} \times \frac{t^2}{s^2}$ ergibt sich bei gleicher Ladung z eine direkt proportional längere Flugzeit t (TOF: Time Of-Flight) mit der Masse (und damit Größe) m des Moleküls (Dilger, 2018).

$m = \text{Masse des Ions}$

$z = \text{Ladung des Ions}$

$E_{kin} = \text{kinetische Energie des Ions}$

$t = \text{Flugzeit}$

$s = \text{Länge des Flugrohrs}$

Nach der Elektrode werden die Ionen im Flugrohr nicht weiter beschleunigt und treffen nach ca. einem Meter auf den Ionendetektor. Dort werden die Ionen durch eine Konversionsdynode in Elektronen umgewandelt und das Signal mittels eines Sekundärelektronenvervielfachers verstärkt. Die ermittelten Signale erzeugen ein Massenspektrum in Abhängigkeit der Zeit für jeden einzelnen Laserimpuls. In einem Koordinatensystem dargestellt sind diese als Peak ersichtlich. Das so erhaltene Massenspektrum ist für jede Art spezifisch und stellt somit einen einzigartigen Fingerabdruck der Proteinzusammensetzung des analysierten Mikroorganismus dar (Osterhage, 2009).

Die MALDI-Biotyper-Software vergleicht anschließend die so ermittelten Massenspektren vollautomatisch mit denen einer Referenzdatenbank. Diese enthält 8468 MSP Referenzspektren von exakt definierten Mikroorganismen aus dem industriellen, veterinären und klinischen Bereich, die von Kollaborationspartnern und aus Ringversuch stammen und ermittelt so die wahrscheinlichsten Bakteriengattungen und -spezies der Probe. In der Regel resultiert aus diesem Vergleich jedoch kein exakter Messwert, da es zu dem in der Datenbank hinterlegten Proteinspektrum einer Spezies weitere minimal abweichende Proteinspektren anderer Stämme dieser Spezies gibt. Daher erzeugt die Software Zahlenwerte (Score-values), die eine Aussage über die Validität des Messergebnisses vermitteln (Schubert, 2011). Ein Score-value zwischen 0,000 und 1,699 entspricht einer unzuverlässigen Identifikation. Bei Werten zwischen 1,700 und 1,999 handelt es sich um eine wahrscheinliche Gattungsidentifikation. Die Spezies ist bei solch einem Wert jedoch nicht sicher ermittelt. Liegen die Werte zwischen 2,000 und 2,299 so ist

dies eine sichere Gattungsidentifikation und eine wahrscheinliche Speziesidentifikation. Erst Werte zwischen 2,300 und 3,000 stehen für eine sehr wahrscheinliche Speziesidentifikation (BRUKER Daltonik MPS Library, 2019; Hüscher, 2015).

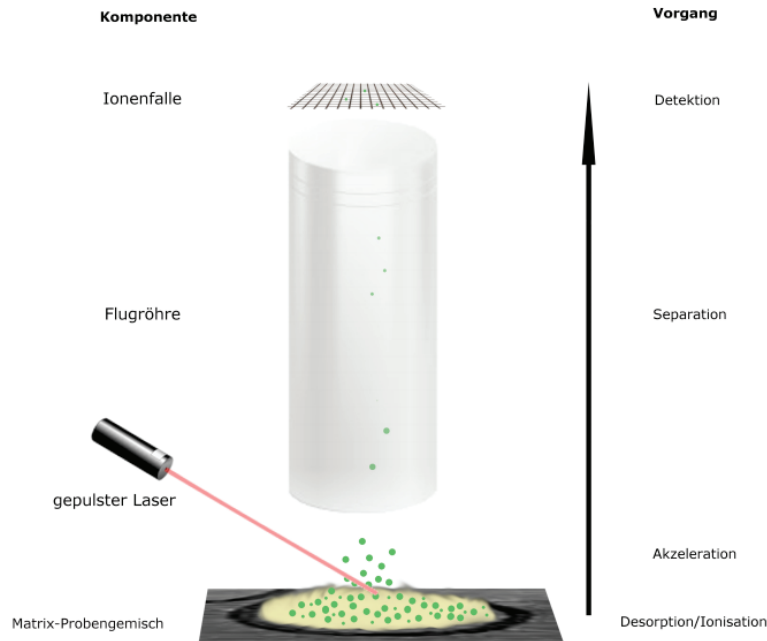


Abbildung 3: Schematische Darstellung des MALDI-TOF-MS-Prinzips (Menzer, 2017)

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Typisierung	Herkunft
<i>Legionella pneumophila</i>	Serogruppe 1	DSMZ, DSM 1713
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	DSMZ, DSM 1128
<i>Escherichia coli</i>	-	DSMZ, DSM 1153
<i>Staphylococcus aureus</i>		DSMZ, DSM 799
<i>Legionella bozemanni</i>	-	Eigenes Isolat aus Ringversuch

3.2 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten kulturellen Medien sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst. Alle genannten Nährmedien wurden als fertige Platten erworben, außer dem King's B Medium. Alle Medien wurden einer chargenweisen Qualitätssicherung gemäß der Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025 unterzogen.

Tabelle 2: Verwendeter BCYE+AB-Agar

Bezeichnung	Gepufferter Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar mit Selektivsupplementen	
Chargennummer	3156404/3166995/3200662	
Zusammensetzung des Agars	Hefeextrakt (bakteriologisch rein)	2,0 g/l
	Agar	12,0 g/l
	Aktivkohle	2,0 g/l
	α -ketoglutarat, Monokaliumsalz	1,0 g/l
	ACES-Puffer (N-2-Acetamido-2-aminoethansulfonsäure)	10,0 g/l
	Kaliumhydroxid (KOH) (Pellets)	2,8 g/l
	L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	0,4 g/l
	Eisen (III)-Pyrophosphat ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$)	0,25 g/l
	Polymyxin-B-Sulfat	80 000 IU/l
	Cefazolin-Natrium	0,009 g/l
	Pimaricin (syn. Natamycin)	0,007 g/l
Füllmenge je Platte	20 ml	
MHD	03.12.2020/15.12.2020/04.02.2021	
Hersteller	OXOID Deutschland GmbH	
Herstellersitz	Am Lippeglacis 4-8 D-46483 Wesel	

Tabelle 3: Verwendeter BCYE-Agar

Bezeichnung	Hersteller	
Chargennummer	116235/118342	
Zusammensetzung des Agars	Hefeextrakt (bakteriologisch rein)	10 g/l
	Agar	12 g/l
	Aktivkohle	2 g/l
	α -ketoglutarat, Monokaliumsalz	1 g/l
	ACES-Puffer (N-2-Acetamido-2-aminoethansulfonsäure)	10 g/l
	Kaliumhydroxid (KOH) (Pellets)	2,8 g/l
	L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	0,4 g/l
	Eisen (III)-Pyrophosphat ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$)	0,25 g/l
Füllmenge	20 ml	
MHD	08.11.2020/04.02.2021	
Hersteller	VWR Internal bvba/sprl	
Herstellersitz	Haasrode Research park Zone 3 Geldenaaksebaan 464 b-3001 Leuven	

Tabelle 4: Verwendeter BCYE-Cys-Agar

Bezeichnung	BCYE-Cys	
Chargennummer	117908/118775	
Zusammensetzung	Hefeextrakt (bakteriologisch rein)	10 g/l
Zusammensetzung des Agars	Agar	12 g/l
	Aktivkohle	2 g/l
	α -ketoglutarat, Monokaliumsalz	1 g/L
	ACES-Puffer (N-2-Acetamido-2-aminoethansulfonsäure)	10 g/l
	Kaliumhydroxid (KOH) (Pellets)	2,8 g/l
	Eisen (III)-Pyrophosphat ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$)	0,25 g/l
Füllmenge	20 ml	
MHD	20.01.2021/21.02.2021	
Hersteller	VWR Internal bvba/sprl	
Herstellersitz	Haasrode Research park Zone 3 Geldenaaksebaan 464 b-3001 Leuven	

Tabelle 5: Verwendeter Cetrimid-Agar

Bezeichnung	Selektivagar/CN-Agar	
Chargennummer	3121921/3176801/3206526	
Zusammensetzung des Agars	Pepton aus Gelatine	16 g
	Caseinhydrolysat	10 g
	Kaliumsulfat (wasserfrei) (K ₂ SO ₄)	10 g
	Magnesiumchlorid (wasserfrei) (MgCl ₂)	1,4 g
	Glycerin	10 ml
	Agar	11,0 bis 18,0 g
	CN-Zusatz Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetrimid) Nalidixinsäure	0, 2 g 0,015 g
Füllmenge	20 ml	
MHD	20.11.2020/08.02.2021/26.03.2021	
Hersteller	OXOID Deutschland GmbH	
Herstellersitz	Am Lippeglacis 4-8 D-46483 Wsesel	

Tabelle 6: Verwendeter DEV-Agar

Bezeichnung	Hersteller	
Chargennummer	117227/118620	
Zusammensetzung des Agars	Pepton	5,0 g
	Fleischextrakt	1,0 g
	Hefeextrakt	2,0 g
	Natriumchlorid	5,0 g
	Agar	15,0 g
Füllmenge	20 ml	
MHD	27.12.2020/16.02.2021	
Hersteller	VWR Internal bvba/sprl	
Herstellersitz	Haasrode Research park Zone 3 Geldenaaksebaan 464 b-3001 Leuven	

Tabelle 7: Verwendetes King's B Medium

Bezeichnung	King's B Medium	
Chargennummer	BCCC4205	
Zusammensetzung des Agars	Pepton	20,0 g/l
	Glycerin	10 ml
	Di-Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 g/l
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat H ₂ O)	1,5 g/l
	Agar	15 g/l
Füllmenge	500 G	
MHD	Oct.2024	
Hersteller	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	
Herstellersitz	Riedstr.2 D-89555 Steinheim 49 7329 970	

Zubereitung des King's B Mediums: Die Bestandteile wurden im Wasser gelöst und der pH-Wert durch Zugabe von Natriumchlorid auf $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ eingestellt. Je 5 ml pro Portion wurden in Röhren abgefüllt, mit Kappen verschlossen und bei $121 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 min autoklaviert. Die Röhren in Schräglage kühlten ab und wurden im Dunklen bei $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ maximal drei Monate aufbewahrt.

Tabelle 8: Verwendeter MacConkey Agar n°3

Bezeichnung	MacConkey Agar n°3	
Chargennummer	117357	
Zusammensetzung des Agars	Pepton aus Gelatine	17,0 g
	Casein und Fleischpepton	3 g
	Laktose	10 g
	Gallensalze	1,50 g
	Natriumchlorid	5,00 g
	Kristallviolett	0,001 g
	Neutralrot	0,03 g
	Agar	15,0 g
Füllmenge	20 ml	
MHD	30.12.2020	
Hersteller	VWR Internal bvba/sprl	
Herstellersitz	Haasrode Research park Zone 3 Geldenaaksebaan 464 b-3001 Leuven	

Tabelle 9: Verwendeter Mannitol Salt Agar

Bezeichnung	Mannitol Salt Agar	
Chargennummer	117979	
Zusammensetzung des Agars	Fleischextrakt	1,0 g
	Kasein-Pepton	5,0 g
	Fleischpepton	5,0 g
	Natriumchlorid	75,0 g
	D-Mannitol	10,0 g
	Phenolrot	0,025 g
	Agar	15,0 g
Füllmenge	20 ml	
MHD	20.01.2021	
Hersteller	VWR Internal bvba/sprl	
Herstellersitz	Haasrode Research park Zone 3 Geldenaaksebaan 464 b-3001 Leuven	

3.3 Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete Acetamid-Nährlösung

Bezeichnung	Acetamid-Lösung	
Chargennummer	2350320	
Zusammensetzung des Agars	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	1,0 g
	Magnesiumsulfat (wasserfrei) (MgSO_4)	0,2 g
	Acetamid	2,0 g
	Natriumchlorid (NaCl)	0,2 g
	Natriummolybdat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
	Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,05 g
Füllmenge	5 ml	
MHD	17.03.2021	
Hersteller	Sifin diagnostics gmbh	
Herstellersitz	Berliner Allee 317-321 13088 Berlin, Germany	

Tabelle 11: Verwendete Neßler Reagenz

Bezeichnung	Neßler-Reagenz	
Chargennummer	3520419	
Zusammensetzung des Agars	Quecksilber (II)-chlorid (HgCl ₂)	10 g
	Kaliumiodid (KI)	7 g
	Natriumhydroxid (NaOH)	16 g
Füllmenge	5 ml	
MHD	12.2023	
Hersteller	Sifin diagnostics gmbh	
Herstellersitz	Berliner Allee 317-321 13088 Berlin, Germany	

Tabelle 12: Oxidase-Reagenz

Bezeichnung	Oxidase-Reagenz	
Chargennummer	898761	
Zusammensetzung	Tetramethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid	0,01 g
Füllmenge	0,75 ml	
MHD	01.10.2021	
Hersteller	REMEL	
Herstellersitz	LENEXA KS 66215 (800) 255-6730	

3.4 Chemikalien

Tabelle 13: Verwendete Salzsäure

Bezeichnung	HCL 37 %	
Chargennummer	200115C004	
Zusammensetzung	Tetramethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid	0,01 g
Füllmenge	1 L	
MHD	15.01.2025	
Hersteller	Avantor Performance Materials Poland S. A	
Herstellersitz	Sowinskiego 11, 44-101 Gliwice, Poland	

Tabelle 14: Verwendetes Kaliumchlorid

Bezeichnung	KCL	
Chargennummer	K51228936928	
Zusammensetzung	Kaliumchlorid	M=74.55 g/mol
Füllmenge	500 g	
MHD	Keine	
Hersteller	Merck KGaA	
Herstellersitz	Merck KGaA, 64271 Darmstadt	

Tabelle 15: Verwendetes Kaliumhydroxid

Bezeichnung	Kaliumhydroxid	
Chargennummer	A0404890	
Zusammensetzung	Kaliumhydroxid	ca. 85 %
Füllmenge	250 g	
MHD	01.10.2021	
Hersteller	ACROS ORGANICS	
Herstellersitz	Janssen Pharmaceuticaaan 3a, B-2440 Geel, Belgium	

Tabelle 16: Verwendete HCCA = α - Cyano-4- Hydroxy-Zimtsäure

Bezeichnung	α - Cyano-4- Hydroxy-Zimtsäure	
Chargennummer	0000287545	
Zusammensetzung	Standardlösungsmittel (50 % Acetonitril, 47,5 % Wasser, 2,5 % Trifluoressigsäure)	250 μ l
	HCCA	2,5 mg
Füllmenge	2,5 mg/Röhrchen	
MHD	05.2021	
Hersteller	Bruker Daltonik GmbH	
Herstellersitz	Fahrenheitstraße 4, 28359 Bremen, Germany	

Tabelle 17: Verwendeter IVD BTS (Bacterial Test Standard)

Bezeichnung	BTS	
Chargennummer	0000311049	
Zusammensetzung	Standardlösungsmittel (50 % Acetonitril, 47,5 % Wasser, 2,5 % Trifluoressigsäure)	50 µl
	BTS	
MHD	02.2021	
Hersteller	Bruker Daltonik GmbH	
Herstellersitz	Fahrenheitstraße 4, 28359 Bremen, Germany	

Tabelle 18: Verwendetes Solution OS (Standardlösungsmittel)

Bezeichnung	Solution OS	
Chargennummer	193632	
Zusammensetzung	Acetonitril	50 %
	Wasser	47,5 %
	Trifluoressigsäure	2,5 %
Füllmenge	250 ml	
MHD	18.11.2020	
Hersteller	LCH CHIMIE	
Herstellersitz	ZA LA VIGNE GRANDE ,34600 LES AIRES France	

Herstellung der Säurelösung:

Um eine 0,2 mol/l Salzsäurelösung herzustellen, wurden 17,4 ml konzentrierte HCL zu 1 l Wasser gegeben (Lösung A). Eine 0,2 mol/l Kaliumchlorid-Lösung wurde durch Lösen von 14,9 g KCL in 1 l Wasser hergestellt (Lösung B). Eine 1 mol/l Kaliumhydroxidlösung wird durch Lösen von 56,44 g KOH in 1 l Wasser hergestellt.

Zur Herstellung der finalen Säurelösung wurden 3,9 ml der Lösung A mit 25 ml der Lösung B gemischt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 mol/l Kaliumhydroxidlösung auf $2,2 \pm 0,2$ eingestellt und anschließend für 15 ± 1 min bei 121 ± 3 °C autoklaviert. Die Lösung wurde in einem geeigneten Gefäß im Dunklen bei Raumtemperatur für höchstens einen Monat aufbewahrt.

3.5 Verwendete Geräte und Materialien

Die für die Experimente verwendeten Geräte wurden in Tabelle 19 und die verwendeten Materialien in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 19: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Herstellersitz	Serien Nr.
INCU-Line® IL 56 Prime Inkubator	VWR	VWR international bvba Haasrode Researchpark Zone Geldenaaksebaan, 464 B-3001	ILV11190076
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse II, Safe 2020 1.8	Thermo Scientific	Am Kalkberg. 37520 Osterode/Harz	42559362
Analog Vortex Mixer	VWR	VWR international bvba Haasrode Researchpark Zone Geldenaaksebaan, 464 B-3001	100601026
Kühlschrank, Lkv 5710	Liebherr	Liebherrstr.12 88457 Kirchdorf an der Iller	850890240
Gefrierschrank, Lkv 5010	Liebherr	Liebherrstr.12 88457 Kirchdorf an der Iller	843867327
Ultratiefkühler HERAfreesze HFC 390	VWR	VWR international bvba Haasrode Researchpark Zone Geldenaaksebaan, 464 B-3001	300266031
Autoklav Laboklav 80-MV-FA	SHP Steriltechnik AG	Detzel Schloß 1.39345 Detzel	10120480037
Koloniezähler Star-Count STC 1000	VWR	VWR international bvba Haasrode Researchpark Zone Geldenaaksebaan, 464 B-3001	19083419
Powerpette Pro	VWR	VWR international bvba Haasrode Researchpark Zone Geldenaaksebaan, 464 B-3001	BE 0691
Präzisionswaage PS4500X2M mit Epson Bondrucker TM-U220B	Radwag	Hofstr. 64 40723 Hilden	646089
MALDI-TOF	Bruker Daltonik GmbH	Farhenheitsstrasse 4, 28359 Bremen	826994404108

Mikrozentrifuge, Microstar 12	VWR	VWR international bvba Haasrode Researchpark Zone Geldenaaksebaan, 464 B-3001	VWS23519100834
Absaugleiste	PALL La- boratory		?
UV-Lampe 366 nm	Merck KGaA	Merck KGaA, 64271 Darm- stadt	4501938512
Stoppuhr	TFA	TFADostmann zum Otters- berg 12 D-97877 Wertheim	
pH-Messgerät			
Vakuumpumpe	VWR	VWR international bvba Haasrode Researchpark Zone Geldenaaksebaan, 464 B-3001	PM21978-820340

Tabelle 20: Verwendete Materialien

Materialien	Größe
Hubkolbenpipetten, Ultra High Performance	0,5 – 100 µl
Hubkolbenpipetten, Ultra High Performance	10 – 100 µl
Hubkolbenpipetten, Ultra High Performance	100 – 1000 µl
Pipettenspitzen	0,1 – 10 µl
Pipettenspitzen	1000 µl
Impföse	1 µl
Impfnadel	
Serologische Pipetten	100 ml
Serologische Pipetten	10 ml
Reagenzgläser	
Duran Flaschen	250 ml/500 ml/1000 ml
Boxen	2 l
Microfunnel Filter ø 47 mm	100 ml
Filterpapier ø 110 mm	
MSP Biotarget Adapter	
Desinfizierte Pinzetten	
Handschuhe	
Müllbeutel	
Gefäße	
Gläser	

3.6 Methoden

3.6.1 Versuchsplanung

Identifizierung *Pseudomonas aeruginosa*

Um die MALDI-TOF Methode im Labor zu etablieren, wurde in drei Schritten vorgegangen. Im ersten Schritt wurden die Versuche mit sterilem Wasser durchgeführt. Hierzu wurde das Wasser im Vorfeld bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert, abgekühlt und im Kühlschrank bei 5 ± 3 °C gelagert. 5 Proben wurde mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* beimpft und mit ihnen eine Verdünnungsreihe durchgeführt, um die Proben auswerten zu können. 5 Proben wurden nicht beimpft. Anschließend wurden die Wasserproben filtriert und die jeweiligen Filter auf Cetrimid-Agar gelegt. Die Platten wurden bei 36 °C für 44 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte auf Wachstum untersucht. Jede Probe wurde anschließend jeweils mit der Nachweismethode laut DIN EN ISO 16266 und mit MALDI untersucht, um die Bakterien zu identifizieren. So ergab sich hier ein Probenumfang von 5 negativen Proben und 5 positiven Proben.

Im zweiten Schritt wurde eine Mischkultur aus das Bakterium *P. aeruginosa* und dem Bakterium *S. aureus* hergestellt, um sich einer realen Probe zu nähern. Auch hier betrug der Probenumfang 5 positive und 5 negative Proben, welche jeweils mittels MALDI-TOF Methode und der klassischen Methoden untersucht wurden.

Im dritten Schritt wurden ausschließlich real entnommene Wasserproben untersucht. Hier wurden verschiedene Orte und Leitungssysteme ausgewählt, welche selten genutzt wurden oder über einen langen Zeitraum stagnierten. Die Auflistung der entnommenen Proben wird in Tabelle 21 dargestellt. Hierbei wurde die Probenahme Zweck C verwendet, wobei die Probe direkt aus der Armatur entnommen wurde, ohne im Vorfeld Wasser ablaufen zu lassen.

Tabelle 21: Wasserproben-Herkunft (W) = Waschbecken, (D) = Dusche

Proben Nr.	Herkunft	Proben Nr.	Herkunft
1	(D) Hotel	28	(W) Unternehmen
2	(D) Hotel	29	(D) Wohnheim
3	(W) Hotel	30	(W) Restaurant
4	(D) Privates Haus	31	(D) Wohnheim
5	(W) Unternehmen	32	(D) Unternehmen
6	(D) Privates Haus	33	(D) Private Wohnung
7	(D) Privates Haus	34	(D) Private Wohnung
8	(W) Unternehmen	35	(D) Private Wohnung
9	(W) Unternehmen	36	(D) Privates Haus
10	(W) Unternehmen	37	(D) Privates Haus
11	(D) Unternehmen	38	(D) Private Wohnung
12	(D) Unternehmen	39	(D) Unternehmen
13	(W) Unternehmen	40	(D) Unternehmen
14	(W) Unternehmen	41	(D) Unternehmen
15	(D) Unternehmen	42	(D) Unternehmen
16	(D) Unternehmen	43	(W) Unternehmen
17	(D) Private Wohnung	44	(W) Unternehmen
18	(W) Private Wohnung	45	(W) Privates Haus
19	(D) Private Wohnung	46	(D) Privates Haus
20	(W) Private Wohnung	47	(W) Privates Haus
21	(W) Private Wohnung	48	(W) Privates Haus
22	(W) Private Wohnung	49	(W) Privates Haus
23	(D) Private Wohnung	50	(W) Privates Haus
24	(D) Private Wohnung	51	(W) Privates Haus
25	(D) Private Wohnung	52	(D) Privates Haus
26	(D) Unternehmen	53	(W) Privates Haus
27	(W) Unternehmen		

Identifizierung *Legionella pneumophila*

Für die Identifizierung von *L. pneumophila* wurden grundsätzlich die gleichen Schritte wie für die Identifizierung des Bakteriums *P. aeruginosa* angewendet. Für die Untersuchung von

Legionella pneumophila nach DIN EN ISO 11731 bedurfte es zweier Methoden. Zuzüglich zur Membranfiltrationsmethode wurde demnach der direkte Ansatz zusätzlich bei jeder Probe durchgeführt.

Analog zu der Identifizierung von *P. aeruginosa* wurde im ersten Schritt mit sterilem Wasser gearbeitet. Auch hier wurden fünf Proben mit *L. pneumophila* beimpft und 5 weitere nicht. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe bis 10^{-4} hergestellt und alle Ansätze wurden jeweils mittels klassischem Verfahren nach DIN EN ISO 11731 und MALDI-TOF-MS untersucht.

Im zweiten Schritt wurde eine Mischkultur aus *L. pneumophila* und *Escherchia coli* hergestellt. Da die *E. coli*-Bakterien nur 22 Stunden zum Wachsen brauchten, war der Membranfilter demnach nach der Inkubationszeit vollständig mit *E. coli*-Kolonien überwuchert. deshalb wurden diese Versuche erneut durchgeführt und anstelle von *E. coli* wurde *Legionella bozemannii*, welches aus einem Ringversuch isoliert wurde, der Probe zugesetzt. Auch hier wurden wieder 5 negative und 5 positive Proben jeweils mittels MALDI-TOF-MS und dem klassischen Verfahren untersucht.

Für die letzten Schritt wurden auch reale Proben untersucht, welche aus stagnierenden Leitungen oder selten genutzten Wasserleitungen entnommen wurden. Diese stammten aus denselben Quellen wie die realen Proben von *Pseudomonas aeruginosa* und wurden ebenfalls in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Herkunft der einzelnen Wasserproben (W = Waschbecken, D = Dusche)

Proben Nr.	Herkunft	Proben Nr.	Herkunft
1	(D) Hotel	28	(W) Firma
2	(D) Hotel	29	(D) Wohnheim
3	(W) Hotel	30	(W) Restaurant
4	(D) Privates Haus	31	(D) Wohnheim
5	(W) Firma	32	(D) Firma
6	(D) Privates Haus	33	(D) Private Wohnung
7	(D) Privates Haus	34	(D) Private Wohnung
8	(W) Firma	35	(D) Private Wohnung
9	(W) Firma	36	(D) Privates Haus
10	(W) Firma	37	(D) Privates Haus
11	(D) Firma	38	(D) Private Wohnung
12	(D) Firma	39	(D) Firma
13	(W) Firma	40	(D) Firma
14	(W) Firma	41	(D) Firma
15	(D) Firma	42	(D) Firma
16	(D) Firma	43	(W) Unternehmen
17	(D) Private Wohnung	44	(W) Unternehmen
18	(W) Private Wohnung	45	(W) Privates Haus
19	(D) Private Wohnung	46	(D) Privates Haus
20	(W) Private Wohnung	47	(W) Privates Haus
21	(W) Private Wohnung	48	(W) Privates Haus
22	(W) Private Wohnung	49	(W) Privates Haus
23	(W) Private Wohnung	50	(W) Privates Haus
24	(D) Private Wohnung	51	(W) Privates Haus
25	(D) Private Wohnung	52	(D) Privates Haus
26	(D) Unternehmen	53	(W) Privates Haus
27	(W) Unternehmen		

3.6.2 *Pseudomonas aeruginosa*-Ansatz mit sterilem Wasser

Stammhaltung

Die bei -80 °C gelagerten *L. pneumophila*- und *P. aeruginosa* -Röhrchen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurden der Inhalt der Röhrchen auf eine Platte mit BCYE und Cetrimid-Agra gekippt („Mutterplatte“) und nach $24 \pm 4\text{ h}$ Inkubation (*Pseudomonas aeruginosa*) bzw. nach 3 Tagen Inkubation (*Legionella pneumophila*) bei $36 \pm 2\text{ °C}$ wurden die Kulturen nach dem Prinzip des Drei-Ösen-Austrisches mittels einer sterilen Impfföse auf BCYE-Agar und Certrimid-Agar neu ausgestrichen („Tochterplatte“). Die beimpften Platten wurden identisch den Mutterplatten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und jede Woche auf ein neues Nährmedium überführt.

Probenvorbereitung von *P. aeruginosa*

Im ersten Schritt wurden zunächst 100 ml entionisiertes, autoklaviertes (121 °C über 15 min) Wasser mit dem Stamm *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1128 mittels einer sterilen Impfföse beimpft. Die Flasche wurde durchgeschüttelt und dann eine dezimale Verdünnungsreihe bis zu einem Faktor von 10^{-6} erstellt. Zwischen jeder Verdünnung wurde die Flasche erneut durchgeschüttelt um zu vermeiden, dass die Kolonien sedimentieren.

Im zweiten Schritt wurden 100 ml entionisiertes, autoklaviertes (121 °C über 15 min) Wasser mit dem Stamm *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1128 und *Staphylococcus aureus* DSM 799 mittels einer sterilen Impfföse beimpft. Die Flasche wurde durchgeschüttelt und dann eine dezimale Verdünnungsreihe bis zu einem Faktor von 10^{-7} hergestellt. Zwischen jeder Verdünnung wurde die Flasche erneut durchgeschüttelt um zu vermeiden, dass die Kolonien sedimentieren.

Im dritten Schritt wurden reale Proben untersucht. Für die die Probenahme wurden sterile Probenahmegefäße mit 250 ml Fassungsvermögen und 0,5 ml Natriumthiosulphat verwendet. Die Gefäße wurden erst unmittelbar vor Probenahme geöffnet und während der Probenahme der Verschluss innen und das Gewinde nicht berührt. Danach wurde das Gefäß nach Herstellervorgabe nur zu 5/6 befüllt, um eine gute Durchmischung zu ermöglichen. Die Proben wurden nach Entnahme bei $5 \pm 3\text{ °C}$ maximal für 8 h von der Analyse gelagert.

Identifizierung von *P. aeruginosa* nach DIN EN ISO 16266:2008-05

Nach Beendigung der Verdünnungsreihe, wurden 100 ml der zu untersuchenden Wasserprobe durch sterile Membranfilter aus Cellulosenitrat mit einer Porengröße von $0,45\text{ }\mu\text{m}$ filtriert. Der Membranfilter wurde mit einer sterilen Pinzette auf eine Petrischale mit Cetrimid-Agar

gelegen, ohne dass sich Lufteinschlüsse bildeten. Die Petrischale mit dem Membranfilter wurde bei 36 ± 2 °C für 44 ± 4 h vor Austrocknung geschützt bebrütet. Der Membranfilter wurde nach 22 ± 2 h und 44 ± 4 auf Wachstum untersucht. Der Membranfilter wurde bereits nach 22 ± 2 h abgelesen, da die Gefahr besteht, dass die Kolonien nach 44 ± 4 h bereits zu groß sind und zusammenwachsen.

Beim Ablesen wurden alle Kolonien, die ein blaugrünes Pigment (Pyocyanin) gebildet hatten, als bestätigte *P. aeruginosa* gezählt. In einem solchen Fall wurden keine weiteren biochemischen Verfahren benötigt. Dann wurde der Membranfilter unter UV-Licht mit 360 ± 20 nm auf Fluoreszenz untersucht (hier sollte eine längere Bestrahlung vermieden werden, da sonst die Kolonien abgetötet werden können). Hierbei wurden alle nicht Pyocyanin-produzierenden (blau-grüne Färbung) Kolonien, die fluoreszieren, als verdächtige *Pseudomonas aeruginosa* gezählt und in Acetamid-Nährlösung bestätigt. Alle rötlich-braunen pigmentierten Kolonien, die nicht fluoreszieren, wurden als verdächtige *Pseudomonas aeruginosa* gezählt und durch den Oxidase-Test mit Acetamid-Nährlösung und dem King's B Medium bestätigt.

Tabelle 23: Bestätigungsschritte für die auf Cetrimid-Agar gewachsenen Kolonien

Beschreibung der Kolonie auf dem CN-Agar	Ammoniakbildung aus Acetamid	Oxidase-positiv	Fluoreszenz auf King's B Agar	Bestätigt als <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Blaugrün	NB	NB	NB	Ja
Fluoreszierend (nicht blaugrün)	+	NB	NB	Ja
Rötlich-braun	+	+	+	Ja
andersfarben	NB	NB	NB	Nein
NB: nicht bestimmt				

Bestätigung

Für die Bestätigung wurden alle oder ggf. so viele wie mögliche Kolonien, deren Bestätigung erforderlich war (fluoreszierend oder rötlich-braun), vom Membranfilter auf DEV-Nähragar subkultiviert und bei 36 ± 2 h für 22 ± 2 °C bebrütet. Diejenigen Kulturen, die von rötlich-braunen Kolonien stammten, wurden auf das Vorhandensein von Oxidase geprüft. In diesem Test wurden 2 bis 3 Tropfen Oxidase-Reagenz auf ein Filterpapier in einer Petrischale gegeben.

Mit einer Kunststofföse wurde etwas von der gewachsenen Kultur auf dem vorbereiteten Filterpapier zerrieben. Das Auftreten einer tiefblauen bis purpurnen Farbe innerhalb 10 bis 20 s wurde als positive Reaktion gewertet. Danach wurden die Kolonien auf das Fluoreszenzverhalten untersucht. Hierzu wurden Oxidase-positive, rötlich-braune Kolonien auf King's B Medium subkultivieren und bei 36 ± 2 °C bis zu 5 Tage bebrütet – Üblicherweise sind 24 h ausreichend. Unter UV-Licht wurden die Kolonien untersucht und das Auftreten jeglicher Fluoreszenz wurde als positiv gewertet. In diesen Versuchen wurde das King's B-Medium, wie unten beschrieben, im Labor hergestellt. 33 g des Trockennährmediums wurden in 990 ml entionisiertem Wasser gelöst und 10 ml Glycerol hinzugefügt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Salzsäure oder Natriumhydroxid so einstellen, dass er $7,2 \pm 0,2$ bei 25 °C betrug. Die Lösung wurde in Portionen zu 5 ml in Röhren abgefüllt, und mit einer Kappe verschlossen bei 121 ± 3 °C für 15 min autoklaviert. Die Röhren kühlten in Schräglage ab und wurden im Dunkeln bei 5 ± 3 °C aufbewahrt, um innerhalb von drei Monaten verbraucht zu werden.

Nach diesem Schritt wurden die Kolonien auf die Ammoniakbildung aus Acetamid untersucht. In diesem Fall wurde ein Röhren mit einer Subkultur beimpft und bei 36 ± 2 °C für 22 ± 2 h bebrütet. Danach wurden 1 bis 2 Tropfen Nessler-Reagenz zugegeben und die Röhren auf die Bildung von Ammoniak überprüft die, je nach Konzentration, eine gelbe bis ziegelrote Färbung zeigt.

Für die Zählung wurden alle Kolonien, die Pyocyanin (blau-grünes Pigment) bildeten oder die Oxidase-positiv waren und dementsprechend unter UV-Licht fluoreszierten und aus Acetamid Ammoniak bilden konnten als bestätigte *Pseudomonas aeruginosa* gezählt.

3.6.3 *Legionella pneumophila* Ansatz mit sterilem Wasser

Probenvorbereitung für *Legionella pneumophila*

Erster Schritt: Hier wurden 100 ml entionisiertes, autoklaviertes (121 °C bei 15 min) Wasser mit dem Stamm *Legionella pneumophila* DSM 1713 mittels einer sterilen Impföse beimpft. Die Flasche wurde durchgeschüttelt und anschließend eine dezimale Verdünnungsreihe bis zum 10^{-4} realisiert. Zwischen jeder Verdünnung wurde die Flasche erneut durchgeschüttelt um zu vermeiden, dass die Kolonien sedimentieren.

Zweiter Schritt: Hier wurden 100 ml entionisiertes, autoklaviertes (121 °C bei 15 min) Wasser mit dem Stamm *Legionella pneumophila* DSM 1713 und *Legionella bozemanni* (Herkunft: aus Ringversuch isoliert) mittels einer sterilen Impföse beimpft. Die Flasche wurde durchgeschüttelt und dann eine dezimale Verdünnungsreihe bis zum 10^{-5} realisiert. Zwischen jeder

Verdünnung wurde die Flasche erneut durchgeschüttelt um zu vermeiden, dass die Kolonien sedimentieren.

Dritter Schritt: In diesen Versuchen wurden reale Proben untersucht. Für die die Probenahme wurden sterile Probenahmegefäße mit 250 ml Fassungsvermögen und 0,5 ml Natriumthiosulphat verwendet. Die Gefäße wurden erst unmittelbar vor Probenahme geöffnet und während der Probenahme wurde der Verschluss innen und das Gewinde nicht berührt. Die Gefäße wurden nach Herstellervorgabe nur zu 5/6 befüllt um eine gute Durchmischung zu ermöglichen. Die Proben wurden nach Entnahme bei 5 ± 3 °C maximal 8 h von der Analyse gelagert.

Identifizierung von *Legionella pneumophila* laut DIN EN ISO 11731:2019-03

Für jede zu untersuchender Wasserprobe wurden zwei Direktansätze mit je 0,5 ml und ein Ansatz aus einer Membranfiltration mit 80 ml Probenvolumen mit Säurebehandlung angesetzt. Für den Direktansatz wurden 0,5 ml direkt auf eine BCYE+AB-Agar-Platte aufgebracht und durch leichte, kreisende Bewegungen auf der Platte verteilt. Dann wurden 80 ml Wasserprobe über einen sterilen Membranfilter aus Cellulosenitrat mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Anschließend erfolgte die Säurebehandlung direkt auf den Membranfilter. Der Membranfilter wurde in der Filtrationseinheit belassen und zur Verminderung von Begleitflora mit 30 ml Säurelösung überschichtet. Nach 5 min Einwirkzeit wurde die Säurelösung abgesaugt. Anschließend wurde mit 20 ml sterilem Wasser gespült. Der Membranfilter wurde vorsichtig mit einer desinfizierten Pinzette vom Filterhalter entfernt und direkt auf eine BCYE+AB-Agar-Platte gelegt. Dabei war sicherzustellen, dass darunter keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Nach diesem Schritt wurden die Platten 10 Tage bei 36 ± 2 °C inkubiert. In dieser Zeit wurden die Platten nach 2–5 Tagen auf Wachstum kontrolliert. Nach ein bis zwei Tagen war das aufgebrachte Probenvolumen vollständig in die Platten eingezogen, sodass sie gedreht werden konnten. Um die Austrocknung der Platten zu verhindern, wurden die Platten in einem geschlossenen Behälter platziert.

Für die Auswertung wurden die Platten zum ersten Mal entweder am 2., 3., 4. oder 5. Tag, gefolgt von einer abschließenden Kontrolle am Ende der Benutzungszeit, untersucht. Dies diente der Identifizierung von Proben, bei denen Überwucherungen durch Begleitorganismen aufgetreten waren. Die endgültige quantitative Bestimmung erfolgte am 10. Tag. Nach der Inkubationszeit wurden die Kolonien bestätigt, in diesem Fall wurden Subkulturen von der(en) Platte(n) mit der höchsten Anzahl verdächtiger *Legionella*-Kolonien je Probenvolumen angelegt. Sofern nur ein Kolonietyp vorhanden war, wurden drei verdächtige Kolonien ausgewählt.

Wenn mehrere morphologisch verschiedene Typen verdächtiger *Legionella*-Kolonien auf der Platte gewachsen waren, wurden zwei Kolonien von jedem Typ ausgewählt. Die Kolonien wurden auf BCYE-Agar- und BCYE-Cys-Agar subkultiviert. Sorgfältig wurde darauf geachtet, dass mit der Kolonie kein Nährmedium übertragen wurde und zuerst die BCYE-Cys-Agar-Platte beimpft wurde und dann die BCYE-Agar-Platte. Die Platten wurden bei $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ für 2 bis 5 Tagen bebrütet. Diejenigen Kolonien, die auf der BCYE-Agar-Platte wuchsen, jedoch auf BCYE-Cys-Agar-Platte nicht, wurden als *Legionella* betrachtet.

Identifizierung von *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa* mittels MALDI-TOF-MS

Das MICROFLEX LT®-System besteht aus zwei Teilen: einem automatischen Teil und einem Teil der Rechneinheit. Der Automat hat eine kleine Grundfläche, die seine Positionierung auf einer Arbeitsbank ermöglicht. Es besteht aus einer LASER-Stickstoff-Ionisationsquelle, einem Turm, der die "Flugröhre" und einen Detektor vom Typ TOF beinhaltet. Der Detektor ermöglicht hierbei die Signalerfassung. Die Rechneinheit hingegen, ermöglicht die Verarbeitung der in Form eines Spektrums dargestellten Signale und führt den Abgleich der erhaltenen Daten mit der BRUKER-Datenbank.

Um die Bakterien mittels MALDI-TOF zu identifizieren, wurde Das Bakterium *Legionella pneumophila* auf BCYE+AB-Agar beimpft und bei 36°C für 3 Tagen, im Falle des Direktansatzes, inkubiert. Im Falle des Membranfilters betrug die Inkubationszeit 5 Tage. Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* wurde auf Cefrimid-Agar bei $36 \pm 3^\circ\text{C}$ für 28 h inkubiert, da die Kolonien erst zu diesem Zeitpunkt die erforderliche Größe von ca. 1 mm aufwiesen.

Für die Analyse benötigte man ein Targetplatte, eine aufgelöste HCCA (Matrixlösung zum Fixieren der Mikroorganismen), einen aufgelösten BTS (Standard für die Massenkalisierung mit einem für Stamm *Escherichia coli* DH5 Alpha charakteristischen Peptid-/Protein-Profil sowie zusätzlichen Proteinen) und eine Probe. Als erstes wurde $1\ \mu\text{l}$ von den BTS auf die Messpunkte (Spot) des Einwegtarget getragen. Für jede Probe mithilfe eines sterilen Probenapplikators wurde eine isolierte Kolonie als dünner Film direkt auf zwei eingezeichnete Messpunkte (Spot) des Einwegtargets auftragen (Zwecks Doppelbestimmung). Für jede Probenposition wurde eine neue Pipettenspitze verwendet, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Die Koloniegröße musste ca. 1 mm (Abbildung 4). Das Target wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dieser Lufttrocknung, innerhalb von zehn Minuten, erfolgte in einem zweiten Schritt die Zugabe von

1 µl IVD HCCA-Matrixlösung, bestehend aus gesättigter α -Cyano-4-hydroxymizsäure in 50 % Acetonitril und 2,5 % Trifluoressigsäure, auf jede Probenposition und auf die Standardposition aufgetragen und die Spots bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Die Kristallisation des Spots wurde optisch kontrolliert. In einer Tabelle wurde für jede Position der aufgetragenen Probe notiert.

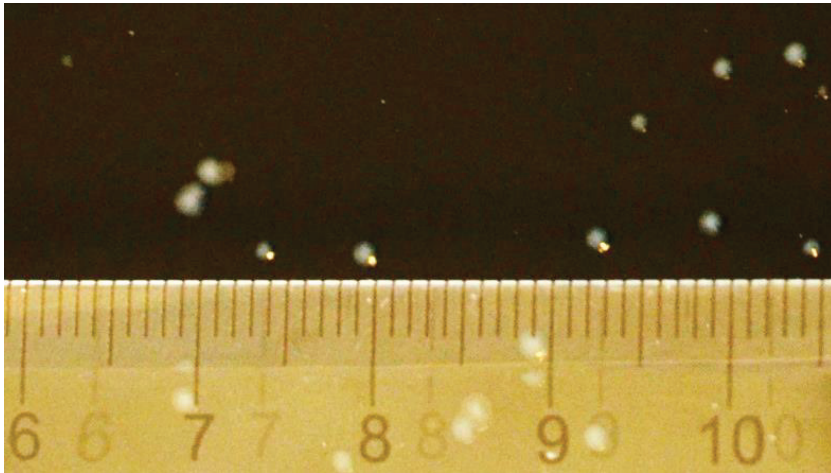


Abbildung 4: Kolonien von *Legionella pneumophila*

Es wurde sichergestellt, dass jeder Spot deutlich von der benachbarten Position getrennt war und kein Auslaufen in benachbarte Position möglich war. Die MALDI-Targetplatte wurde in den MSP Biotarget Adapter geschoben und in das Massenspektrometer gelegt. Anschließend wurde Dichtung nach dem Einlegen der MALDI-Targetplatte abgewischt und das Gerät verschlossen.

Nach dem Einschleusen der MALDI-Targetplatte konnte die Software MBT Compass und Flex Control auf dem Computer gestartet und die Plattenpositionen festgelegt werden. Nach Abschluss der Analyse wurde der Ergebnis-Report von der Software automatisch erstellt.

Auswertung der *Pseudomonas aeruginosa* Versuche nach DIN EN ISO 16266:2008-05

Alle Kolonien, welche Pyocyanin (blaugrünes Pigment) bildeten oder die Oxidase-positiv waren, unter UV-Licht fluoreszierten und aus Acetamid Ammoniak bilden konnten, wurde als bestätigte *Pseudomonas aeruginosa* gezählt.

Ausgehend von der Anzahl charakteristischer Kolonien auf dem Membranfilter und unter Berücksichtigung des Anteils bestätigter Kolonien, wurde die Anzahl der *Pseudomonas aeruginosa*, welche in einem bestimmten Volumen des Wassers (100 ml) vorhanden waren, berechnet. Alternativ wurden die Ergebnisse qualitativ ausgedrückt, ob *Pseudomonas aeruginosa* in dem untersuchten Wasservolumen nachgewiesen wurde oder nicht nachgewiesen wurde.

Die Anzahl von *Pseudomonas aeruginosa* = $P + F(c_F/n_F) + R(c_R/n_R)$

P = Anzahl der blaugrünen Kolonien, wurden alle als Zielorganismen gezählt

F = Anzahl der fluoreszierenden Kolonien

R = Anzahl der rötlich braunen Kolonien

n_F = Anzahl der fluoreszierenden Kolonien, die auf Ammoniakproduktion geprüft wurden

c_F = Anzahl der fluoreszierenden Kolonien, die positiv in der Ammoniakproduktion waren

n_R = Anzahl der rötlich braunen Kolonien, die positiv in der Ammoniak- und Oxidaseproduktion sowie auf Fluoreszenz in King's B Medium geprüft wurden

c_R = Anzahl der rötlich braunen Kolonien, die positiv in der Ammoniak- und Oxidaseproduktion waren, sowie in King's B Medium fluoreszierten

Auswertung der *Legionella pneumophila* Versuche nach DIN EN ISO 11731:2019-03

Zur Abschätzung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten von Legionellen in der ursprünglichen Wasserprobe, wurde die Platte oder das Plattenset (desselben Nährmediums) ausgewählt, die bzw. das die höchste Anzahl bestätigter Kolonien je Wasservolumen aufwies.

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *Legionella pneumophila*, in der ursprünglichen Probe je 100 ml, wurde wie folgt berechnet:

Direktes Ausplattieren: $C_S = \frac{a}{V_{tot}} * V_S$

Membranfilter auf der Platte: $C_S = \frac{a}{V_{tot}} * V_S$

Dabei ist:

C_S die Anzahl *Legionella*-Kolonien in koloniebildenden Einheiten je 100 ml

a die berechnete Anzahl *Legionella*-Kolonien nach Bestätigung

mit $a = \frac{\text{positiver Anteil bestätigt}}{\text{Gesamtanteil bestätigt}} * \text{Gesamtanzahl}$

V_{tot} das totale, geprüfte Probenvolumen je Platte bzw. je Ansatz in ml

V_s Referenzvolumen, in dem die Konzentration der Mikroorganismen in der Probe als Ergebnis angegeben wurde

Auswertung der Ergebnisse der MALDI-TOF-MS

Um die Proben zu identifizieren, wurden mittels des PCs des MALDI-TOFs die beide Softwares MBT Compass und flexControl gestartet. Bei dem Projektfeld wurde 002 eingetragen (Code für das Einwegtarget). Denn wurde in das erschienene Plattenpositions-Fenster als erstes die Position des BTS (um die Geräte zu Kalabrien) gegenzeichnet. Anschließend wurden die Proben bezeichnet z.B. für *Legionella pneumophila* wurde die Probe *Lp-stW-P1* (*Lp* = *Legionella pneumophila*, *stW* = steriles Wasser und *P1*= Probe Nummer 1). Wenn alle Proben eingetragen waren, wurde die Analyse gestartet. Nach Ablauf des MALDI-TOF-Prozesses und einem Vergleich mit der Referenzdatenbank, wurde ein Ergebnis-Report von der Software erzeugt.

Dieser Ergebnis-Report umfasst die folgenden Abschnitte:

- Informationen zur Messung: (Datum, Anzahl der Analyten...)
- Ergebnisübersicht: Analyt-Namen, Analyten-ID, Organismus erst- und zweitbester Treffer, Bewertungs-zahl ...
- Bedeutung der Konsistenz
- Bedeutung der Bewertungszahlen

Tabelle 24: Bedeutung der Bewertungszahlen der MALDI-TOF-MS

Wertebereich	Beschreibung	Symbole	Farbe
2.00 – 3.00	Sehr wahrscheinliche Identifikation	(+++)	Grün
1.70 – 1.99	Wahrscheinliche Identifikation	(+)	Gelb
0.00 – 1.69	Keine Identifikation möglich	(-)	Rot

Wenn der Wertebereich (Score-value) zwischen 2.00 – 3.00 lag, erschien die Bewertungszahl automatisch grün. Dies bedeutete, dass die Probe sehr gut von der Software identifiziert werden

konnte (sehr wahrscheinliche Identifikation). Ein Score-value zwischen 1.70 und 1.99 erschien in gelber Farbe und bedeutete eine wahrscheinliche Identifikation. Lagen die Werte zwischen 0.00 und 1.69, erschienen sie rot und es war keine Identifikation möglich. Im Ergebnis-Bericht war der Punkt Bewertungs-Zahl der wichtigste, da nach diesem Punkt die Analyse evaluiert wurde. Durch den erzielten Wert konnte ermittelt werden, ob die Probe (Kolonien) erfolgreich und gut identifiziert wurde oder ob die Analyse erneut durchgeführt werden musste. Eine Aussage über die erzielte Konsistenz, konnte mit den errechneten Kategorien der Tabelle 25 erzielt werden.

Tabelle 25: Bedeutung der Konsistenzkategorien nach Bruker (2018)

Kategorie	Beschreibung
(A)	Spezieskonsistenz: Die beste Übereinstimmung wurde als „grün“ klassifiziert. Wenn die zweitbeste Übereinstimmung ebenfalls „grün“ ist, gehört sie zur selben Spezies. Ist die zweitbeste Übereinstimmung „gelb“, weist sie mindestens denselben Gattungsnamen wie die beste Übereinstimmung auf.
(B)	Gattungskonsistenz: Die beste Übereinstimmung wurde als „grün“ oder „gelb“ klassifiziert. Wenn die zweitbeste Übereinstimmung „grün“ oder „gelb“ ist, entspricht mindestens die Gattung der besten Übereinstimmung. Die Voraussetzung für eine hohe Konsistenz (siehe oben) ist nicht erfüllt.
(C)	Keine Konsistenz: Die Voraussetzung für eine hohe oder geringe Konsistenz sind nicht erfüllt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungsergebnisse von *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa DSM 1128 Ansatz mit sterilem Wasser

Für die ersten Versuche wurde mit dem *Pseudomonas aeruginosa* Stamm DSM 1128 gearbeitet. Aufgrund der kurzen Inkubationszeit konnten 18 anstelle der 10 geplanten Proben mittels MALDI-TOF-MS analysiert werden. Der jeweils beste und zweitbeste Treffer mit den dazugehörigen Werten wurde in Tabelle 26 dargestellt. Zusammenfassend stimmen die erhaltenen Ergebnisse mit denen der Untersuchungen mittels des klassischen Verfahrens nach DIN EN ISO 16266 (Tabelle 26) überein.

In Tabelle 26 wurden die mit MALDI-TOF-MS erzielten Ergebnisse bei der Untersuchung auf *Pseudomonas aeruginosa* dargestellt. Nach dieser Tabelle betrug der Score-value

(Bewertungszahl) für die erste Probe 1,66, was bedeutet, dass hier keine Identifizierung möglich war. Probe Nr. 4 hatte einen Wert von 1,98 und wurde für den erst- und zweitbesten Treffer als *Pseudomonas aeruginosa* markiert. Bei den restlichen Proben (2, 3, 6, 7, 8 und 9) lag der Wert zwischen 2,18 (Minimum) und 2,57 (Maximum). Die Negativproben (10 – 18) führten bei der Untersuchung zu keinem Wachstum und keinem Ergebnis. Mit Ausnahme der Probe Nr. 1, stimmten hier alle Ergebnisse mit denen der klassischen Untersuchungsmethode überein.

Tabelle 26: Ergebnisse des MALDI-TOF-MS der mit *Pseudomonas aeruginosa* beimpften Wasserproben

Probe	Organismus (bester Treffer)	Score- value	Organismus (zweitbester Treffer)	Score-va- lue
1	Keine Identifikation möglich	1,66	Keine Identifikation möglich	1,64
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.18
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.18
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.98	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.97
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.34
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.54	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.30
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.57	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.35
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.31
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.49	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.26
10	n. n.	-	n. n.	-
11	n. n.	-	n. n.	-
12	n. n.	-	n. n.	-
13	n. n.	-	n. n.	-
14	n. n.	-	n. n.	-
15	n. n.	-	n. n.	-
16	n. n.	-	n. n.	-
17	n. n.	-	n. n.	-
18	n. n.	-	n. n.	-

Tabelle 27 zeigt die Anzahl der Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa*, vor und nach der Bestätigung mittels des klassischen Verfahrens. Hier wurden alle Kolonien bestätigt, da sie Pyocyanin gebildet hatten. Weitere Identifizierungsverfahren wurden in diesem ersten Versuch

nicht angewendet, da alle *Pseudomonas aeruginosa*-Kolonien Pyocyanin bildeten und somit blaugrün erscheinen.

Tabelle 27: Anzahl von *Pseudomonas aeruginosa* Kolonien vor und nach der Bestätigung mittels des klassischen Verfahrens sowie der prozentuale Anteil der bestätigten Kolonien

Probe	Kolonien gesamt [KBE/100 ml]	Bestätigte <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Kolonien	Anteil bestätigte <i>Pseudomo- nas aeruginosa</i> Kolonien [%]
1	26	26	100
2	32	32	100
3	15	15	100
4	20	20	100
5	12	12	100
6	60	60	100
7	37	37	100
8	24	24	100
9	21	21	100
10	n. n.	n. n.	n. n.
11	n. n.	n. n.	n. n.
12	n. n.	n. n.	n. n.
13	n. n.	n. n.	n. n.
14	n. n.	n. n.	n. n.
15	n. n.	n. n.	n. n.
16	n. n.	n. n.	n. n.
17	n. n.	n. n.	n. n.
18	n. n.	n. n.	n. n.

Pseudomonas aeruginosa DSM 1128 Ansatz mit *Staphylococcus aureus* DSM 799 in sterilem Wasser

Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse des Mischkultur-Ansatzes mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*. Für die Proben Nr 1, 2 und 3 wurden beide Bakterien mit MALDI-TOF-MS mit einem score-value von 2,06 – 2,44 identifiziert. Für die Proben Nr. 4 und 5 wurden

keine Analysen von *Staphylococcus aureus* beziehungsweise keine Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS vorgenommen, da auf den Platten kein Wachstum von *Staphylococcus aureus* vorhanden war. Der score-value der Probe Nr. 4 wies mit einem Wert von 1.80 das Minimum dieses Versuchs auf. Die Negativ-Proben 6 – 10 wiesen kein Wachstum auf den entsprechenden Platten auf. Hier war somit keine Identifizierung möglich. Zusammenfassend führten die Untersuchungen zu Ergebnissen, welche mit denen des klassischen Verfahrens nach DIN EN ISO 16266 (Tabelle 28) übereinstimmten.

Tabelle 28: Ergebnisse des MALDI-TOF-MS der gemischten Proben mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*

Probe	Organismus (bester Treffer)	Score- value	Organismus (zweitbester Treffer)	Score- value
Mix P1 (P. a + S. a)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.32
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.27	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.25
Mix P2 (P. a + S. a)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.10
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.09	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.06
Mix P3 (P. a + S. a)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.42
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.18	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.15
Mix P4 (P. a + S. a)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.80	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.82
	<i>Staphylococcus aureus</i>	×	<i>Staphylococcus aureus</i>	×
Mix P5 (P. a + S. a)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.34
	<i>Staphylococcus aureus</i>	×	<i>Staphylococcus aureus</i>	×
Mix P6 (P. a + S. a)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-
Mix P7 (P. a + S. a)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-
Mix P8 (P. a + S. a)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-
Mix P9 (P. a + S. a)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-
Mix P10 (P. a + S. a)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-

Tabelle 29 zeigt die Anzahl der gewachsenen und bestätigten *Pseudomonas aeruginosa*-Kolonien nach der Inkubationszeit. Alle Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* bildeten Pyocyanin und galten somit als bestätigt. Kolonien von *Staphylococcus aureus* erschienen in einer gelben Farbe (Abbildung 6). Die sterilen Negativproben (6 – 10) wiesen kein Wachstum auf.

Um die beiden Kolonietypen sicherer voneinander zu unterscheiden, wurden zusätzlich ein Oxidase-Test und ein Fluoreszenz-Test durchgeführt. Alle *S. aureus*-Kolonien waren entsprechend Oxidase-negativ und fluoreszierten ebenfalls nicht unter UV-Licht, während alle *P. aeruginosa*-Kolonien fluoreszierten (Abbildung 5) und Oxidase-positiv waren.

Tabelle 29: Kolonie-Zahlen der Mischkultur von *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* und der Anteil der bestätigten Kolonien

Probe Nr.	Kolonien gesamt [KbE/100 ml]	Bestätigte <i>Pseudomonas aeruginosa</i>-Kolonien	Anteil bestätigte <i>Pseudomonas aeruginosa</i>-Kolonien [%]
1	46	41	89
2	41	37	90
3	80	54	67
4	21	21	100
5	20	20	100
6	n. n.	n. n.	n. n.
7	n. n.	n. n.	n. n.
8	n. n.	n. n.	n. n.
9	n. n.	n. n.	n. n.
10	n. n.	n. n.	n. n.

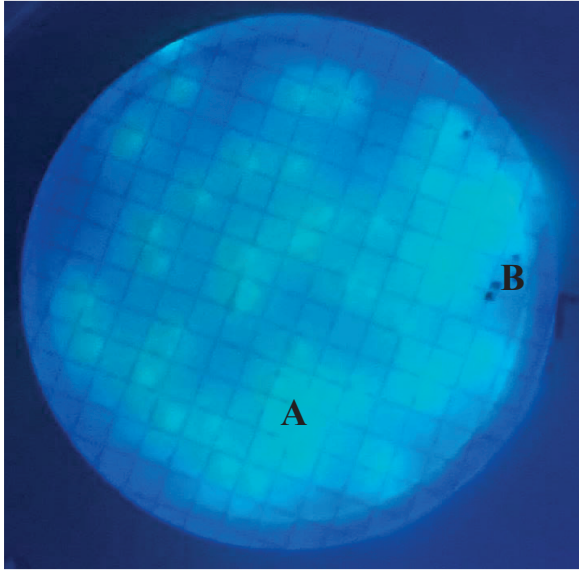


Abbildung 5: Fluoreszierende Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* (A) und nicht fluoreszierende Kolonien von *Staphylococcus aureus* (B)

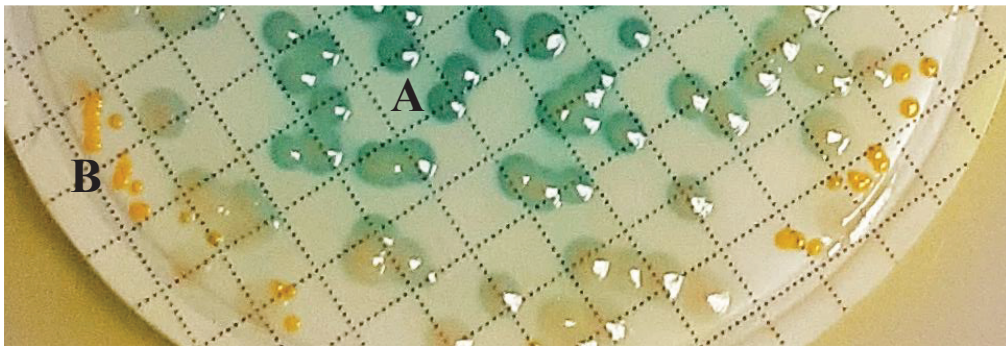


Abbildung 6: Pyocyanin-bildende Kolonien (blau) von *Pseudomonas aeruginosa* (A) und gelbliche Kolonien von *Staphylococcus aureus* (B)

Untersuchung realer Proben auf *Pseudomonas aeruginosa*

Tabelle 30 stellt die ermittelten Ergebnisse der untersuchten realen Trinkwasserproben mittels des klassischen Verfahrens und mittels MALDI-TOF-MS dar. Hierzu wurden 53 Proben aus Duschen (D) und Wasserhähnen (W) entnommen und untersucht. *Pseudomonas aeruginosa* wurde sowohl mittels des klassischen Verfahrens als auch mittels MALDI-TOF-MS in den Proben 16, 19, 20 und 23 nachgewiesen. Die Kolonien wiesen eine blau-grün Färbung auf und wurden ebenfalls durch MALDI-TOF-MS bestätigt. Für Probe Nr. 16 betrug der Score-value 2,21, Probe Nr. 19 wies einen value von 2,18, Probe Nr. 20 einen value von 2,10 und Probe Nr. 23 einen value von 2,26 auf. In der Abbildung 7 wurde die Platte der Probe Nr. 23 dargestellt. Hier wuchsen zunächst lediglich die 6 *P. aeruginosa*-Kolonien, welche eine deutliche Grünfärbung aufwiesen. Danach konnte ein Wachstum vieler kleinerer Kolonien beobachtet werden, welche sich nachträglich ebenfalls als *P. aeruginosa*-Kolonien herausstellten.

Tabelle 30: Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* mittels MALDI-TOF-MS und klassischem Verfahren realer Proben Trinkwasserproben aus Duschen und Wasserhähnen

Proben Nr.	Klassische Verfahren [KBE/100 ml]	MALDI Score-value	Proben Nr.	Klassische Verfahren [KBE/100 ml]	MALDI Sscore-value
1	0	-	28	0	-
2	0	-	29	0	-
3	0	-	30	0	-
4	0	-	31	0	-
5	0	-	32	0	-
6	0	-	33	0	-
7	0	-	34	0	-
8	0	-	35	0	-
9	0	-	36	0	-
10	0	-	37	0	-
11	0	-	38	0	-
12	0	-	39	0	-
13	0	-	40	0	-
14	0	-	41	0	-
15	0	-	42	0	-
16	1	2,21	43	0	-
17	0	-	44	0	-
18	0	-	45	0	-
19	100	2,18	47	0	-
20	10	2,10	48	0	-
21	0	-	49	0	-
22	0	-	50	0	-
23	84	2,26	51	0	-
24	0	-	52	0	-
25	0	-	52	0	-
26	0	-	53	0	-

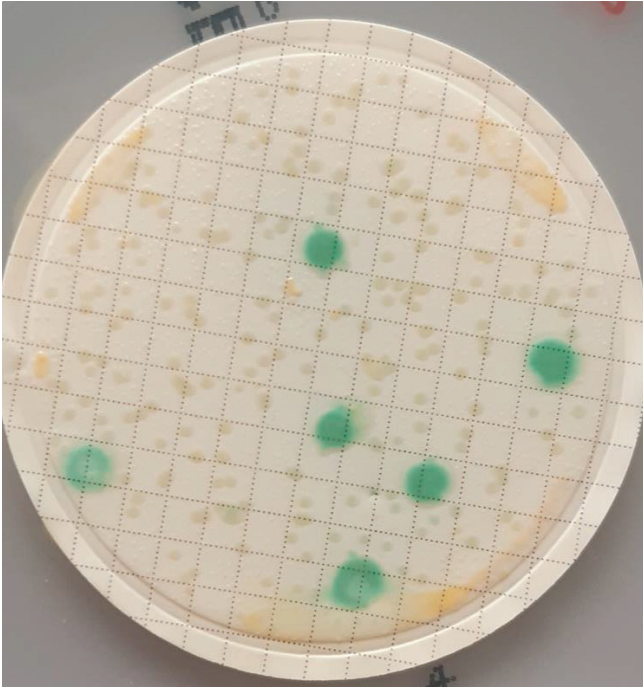


Abbildung 7: *Pseudomonas aeruginosa* in einer realen Probe mit und ohne Pyocyanin Bildung

4.2 Untersuchungsergebnisse von *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila DSM 1713 Ansatz mit sterilem Wasser

In Tabelle 31 wurden die Ergebnisse der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS dargestellt. Die fünf positiven Proben mit *Legionella pneumophila* wurden identifiziert. Alle erzielten score-values wiesen einen Wert > 2.00 auf. Die höchsten score-values wiesen die Proben Nr. 3 und Nr. 5 auf. Die 5 negativen Proben führten zu einem negativen Ergebnis. Zusammenfassend stimmen die erhaltenen Ergebnisse mit denen der Untersuchungen mittels des klassischen Verfahrens nach DIN EN ISO11731 (Tabelle 32) überein.

Tabelle 31: Ergebnisse des MALDI-TOF-MS der mit *L. pneumophila* beimpften Proben

Probe	Organismus (bester Treffer)	score-value	Organismus (zweitbester Treffer)	score-value
1	<i>Legionella pneumophila</i>	2.36	<i>Legionella pneumophila</i>	2.14
2	<i>Legionella pneumophila</i>	2.46	<i>Legionella pneumophila</i>	2.21
3	<i>Legionella pneumophila</i>	2.51	<i>Legionella pneumophila</i>	2.24
4	<i>Legionella pneumophila</i>	2.44	<i>Legionella pneumophila</i>	2.14
5	<i>Legionella pneumophila</i>	2.54	<i>Legionella pneumophila</i>	2.30
6	n. n.	-	n. n.	-
7	n. n.	-	n. n.	-
8	n. n.	-	n. n.	-
9	n. n.	-	n. n.	-
10	n. n.	-	n. n.	-

Tabelle 32 zeigt die Ergebnisse der fünf vorbereiteten *Legionella pneumophila*-Proben nach der Inkubations- und Bestätigungszeit. Die Anzahl der Kolonien wurden um den Faktor 100 multipliziert, da sich die Ergebnisse auf die jeweiligen Direktansätze beziehen (untersuchtes Gesamtvolumen 1 ml) und die Koloniezahl nach DIN EN ISO 11731:2019-03 je 100 ml angegeben wird.

Tabelle 32: Anzahl von *Legionella pneumophila* Kolonien vor und nach der Bestätigung mittels des klassischen Verfahrens sowie der prozentuale Anteil der bestätigten Kolonien

Probe	Kolonien gesamt [KbE/100ml]	Bestätigte <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> -Kolonien	Anteil bestätigte <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> -Kolonien [%]
1	700	700	100
2	600	600	100
3	300	300	100
4	500	500	100
5	800	800	100
6	n. n.	n. n.	n. n.
7	n. n.	n. n.	n. n.
8	n. n.	n. n.	n. n.
9	n. n.	n. n.	n. n.
10	n. n.	n. n.	n. n.

Legionella pneumophila als Mischkultur *Escherichia coli*, bzw. *Legionella bozemanii*

Zunächst wurde *Legionella pneumophila* mit *E. coli* gemischt. Nach der Inkubationszeit (22 h) wurden nur noch *E. coli*-Kolonien auf dem Membranfilter nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde beim direkten Ansatz nur das Wachstum von *Legionella pneumophila* nachgewiesen. Nach diesen Ergebnissen wurde eine neue Mischkultur, bestehend aus *L. pneumophila* und *Legionella bozemanii* (Isolat aus Ringversuch) gemischt.

Tabelle 33 zeigt die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS für die Mischkultur von *L. pneumophila* und *L. bozemanii*. Hier wurden beide Bakterien mit einem hohen Score-value identifiziert. Die Proben 1 und 2 erhielten die höchsten Punktwerte.

Tabelle 33: MALDI-TOF-MS-*L. pneumophila* und *L. Bozemanii*-Ergebnis-Report

Probe	Organismus (bester Treffer)	Score- value	Organismus (zweitbester Treffer)	Score- value
Mix P1 (L. p + L. b)	<i>Legionella pneumophila</i>	2.52	<i>Legionella pneumophila</i>	2.25
	<i>Legionella bozemannii</i>	2.32	<i>Legionella bozemannii</i>	2.18
Mix P2 (L. p + L. b)	<i>Legionella pneumophila</i>	2.47	<i>Legionella pneumophila</i>	2.26
	<i>Legionella bozemannii</i>	2.30	<i>Legionella bozemannii</i>	2.27
Mix P3 (L. p + L. b)	<i>Legionella pneumophila</i>	2.28	<i>Legionella pneumophila</i>	2.26
	<i>Legionella bozemanii</i>	2.38	<i>Legionella bozemannii</i>	2.29
Mix P4 (L. p + L. b)	<i>Legionella pneumophila</i>	2.30	<i>Legionella pneumophila</i>	2.29
	<i>Legionella bozemannii</i>	2.19	<i>Legionella bozemannii</i>	2.15
Mix P5 (L. p + L. b)	<i>Legionella pneumophila</i>	2.29	<i>Legionella pneumophila</i>	2.16
	<i>Legionella bozemannii</i>	2.13	<i>Legionella bozemannii</i>	2.10
Mix P6 (L. p + L. b)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-
Mix P7 (L. p + L. b)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-
Mix P8 (L. p + L. b)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-
Mix P9 (L. p + L. b)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-
Mix P10 (L. p + L. b)	n. n.	-	n. n.	-
	n. n.	-	n. n.	-

Tabelle 34 zeigt die Koloniezahl von *Legionella pneumophila* vor und nach der Inkubation mittels des klassischen Verfahrens. Nach der Inkubation erschienen die Bakterien ähnlich (gleiche Morphologie). Die Identifikation erfolgte mittels des Fluoreszenz-Tests. Hierbei wurden die Platten mittels UV-Lampe untersucht, und die Kolonien gezählt. Alle Kolonien von *L. bozemanii* fluoreszierten (Abbildung 5).

In allen 5 Proben wurde auch das Wachstum von *Legionella bozemanii* nachgewiesen. Dies war vor allem auf dem Membranfilter der Fall.

Tabelle 34: Kolonie-Zahlen der Mischkultur von *Legionella pneumophila* und *Legionella bozemanii* und der Anteil der bestätigten Kolonien

Probe	Kolonien gesamt KBE/100ml	Bestätigte <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> Kolonien	Anteil bestätigte <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> Kolonien
1	7900	7900	100
2	1700	1700	100
3	1000	1000	100
4	8600	8600	100
5	2400	2400	100
6	n. n.	n. n.	n. n.
7	n. n.	n. n.	n. n.
8	n. n.	n. n.	n. n.
9	n. n.	n. n.	n. n.
10	n. n.	n. n.	n. n.

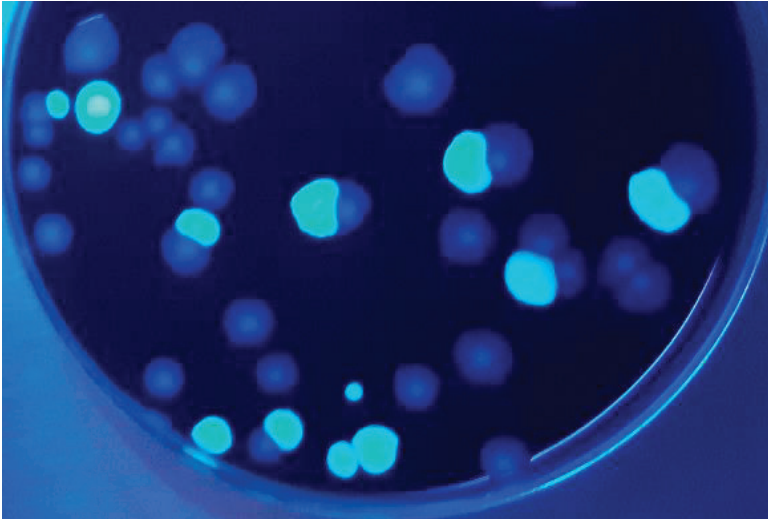


Abbildung 8: Nicht fluoreszierende Kolonien von *Legionella pneumophila* und fluoreszierende Kolonien von *Legionella bozemanii* unter UV-Licht (Direktansatz)

Untersuchung realer Proben auf *Legionella pneumophila*

Tabelle 35 zeigt die real untersuchten Trinkwasserproben. 53 Proben wurden aus Duschen und Wasserhähnen entnommen. *Legionella pneumophila* wurde in den Proben 9, 33 und 40 sowohl mittels des klassischen Verfahrens als auch mittels MALDI-TOF-MS nachgewiesen. Die Bestätigung, im klassischen Verfahren, wurde durch die Subkultivierung auf BCYE- und BCYE-Cys-Agar durchgeführt. Hier zeigte sich, dass alle verdächtigen Kolonien ein Wachstum auf BCYE- und kein Wachstum auf BCYE-Cys-Agar aufwiesen, womit die diese als bestätigt galten. Bei den Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS erhielten die Probe Nr. 9 einen score-value von 2,44, Probe Nr. 33 erhielt einen score-value von 2,40 und Probe Nr. 40 erhielt einen score-value von 2,26.

Tabelle 35: Identifizierung von *Legionella pneumophila* mittels MALDI-TOF-MS und klassischem Verfahren realer Proben Trinkwasserproben aus Duschen und Wasserhähnen

Proben Nr.	Klassische Verfahren [KbE/100 ml]	MALDI [score-value]	Proben Nr.	Klassische Verfahren [KbE/100 ml]	MALDI [score-value]
1	0	-	28	0	-
2	0	-	29	0	-
3	0	-	30	0	-
4	0	-	31	0	-
5	0	-	32	0	-
6	0	-	33	300	2,40
7	0	-	34	0	-
8	0	-	35	0	-
9	1800	2,44	36	0	-
10	0	-	37	0	-
11	0	-	38	0	-
12	0	-	39	0	-
13	0	-	40	11500	2,26
14	0	-	41	0	-
15	0	-	42	0	-
16	0	-	43	0	-
17	0	-	44	0	-
18	0	-	45	0	-
19	0	-	47	0	-
20	0	-	48	0	-
21	0	-	49	0	-
22	0	-	50	0	-
23	0	-	51	0	-
24	0	-	52	0	-
25	0	-	52	0	-
26	0	-	53	0	-
27	0	-			

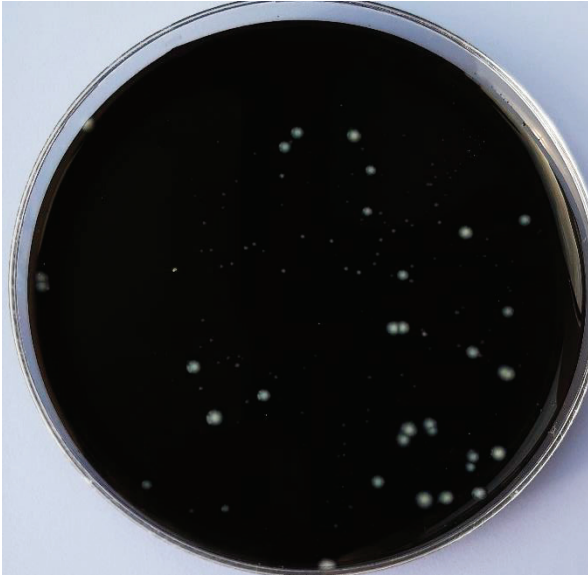


Abbildung 9: *Legionella pneumophila* Wachstum auf BCYE+AB-Agar des Direktansatzes der realen Probe Nr. 40

Nähmedienselektivität

Die Grafik Nr.10 zeigt den prozentualen Anteil des Wachstums von *Pseudomonas aeruginosa* und der Begleitflora auf den Cetrimid-Agar-Platten. Der prozentuale Anteil von *Pseudomonas aeruginosa* betrug 29,64 %, und der Anteil der Begleitflora betrug 70,36 %.

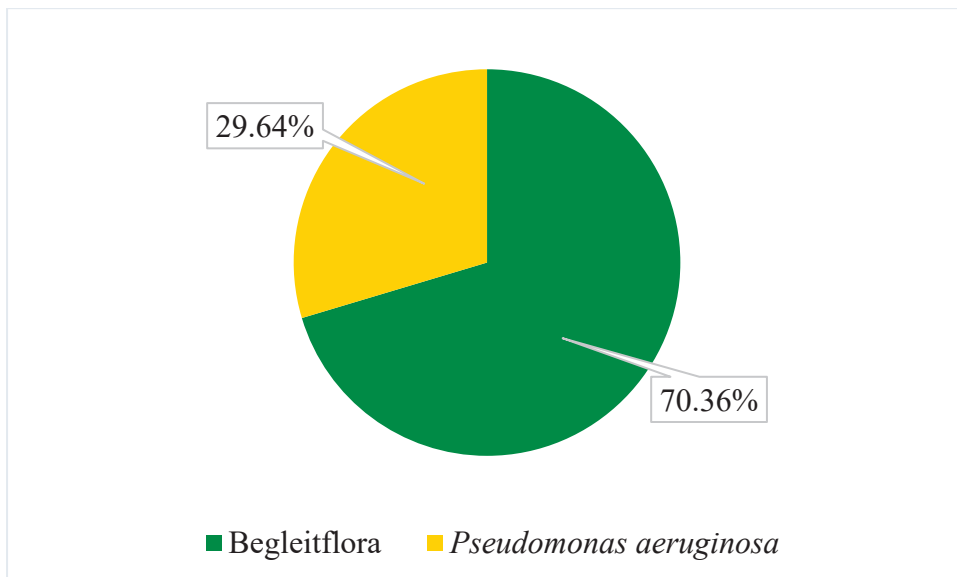


Abbildung 10: Prozentualer Anteil von *Pseudomonas aeruginosa* und Begleitflora auf den verwendeten Cetrimid-Agar-Platten

Abbildung 11 zeigt das prozentuale Wachstum von *Legionella pneumophila* Bakterien und Begleitflora auf BCYE+AB-Agarplatten im Membranfiltrationsverfahren. Laut diesem Diagramm wurde fast nur das Wachstum der Begleitflora auf dem Membranfilter nachgewiesen, da der

prozentuale Anteil einen Wert von 99,97 % hat und der prozentuale Anteil von *Legionella pneumophila* nur 0,03 % betrug.

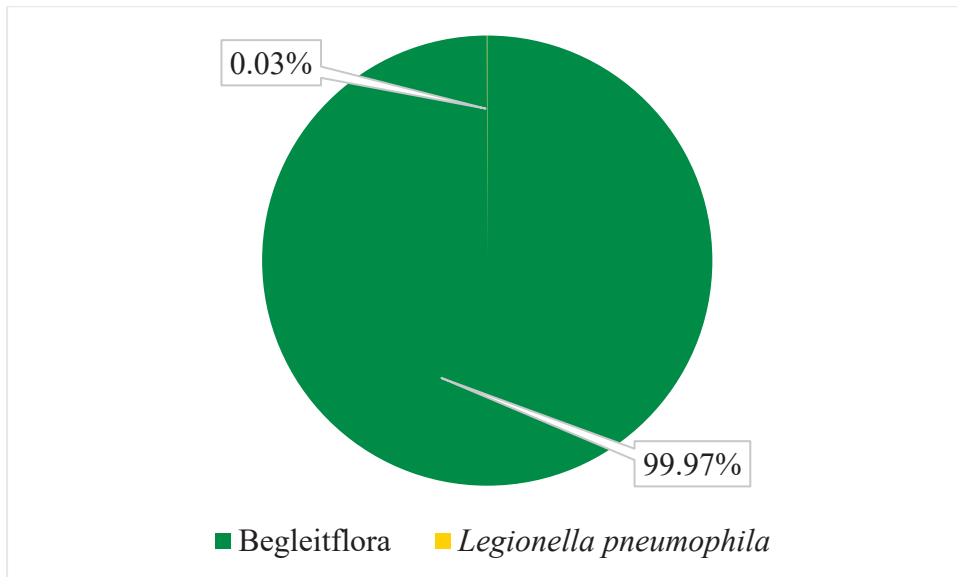


Abbildung 11: Prozentualer Anteil von *Legionella pneumophila* und das Begleitflora Wachstum auf BCYE+AB-Agra-Platten (Membranfilter Verfahren)

Abbildung Nr. 12 zeigt den prozentualen Anteil von *Legionella pneumophila* und das Begleitflora Wachstum auf BCYE+AB-Agar-Platten (Direkt-Ansatz Verfahren). Der Anteil der Begleitflora betrug 97,94% und der Anteil von *Legionella pneumophila*-Kolonien 2,06 %.

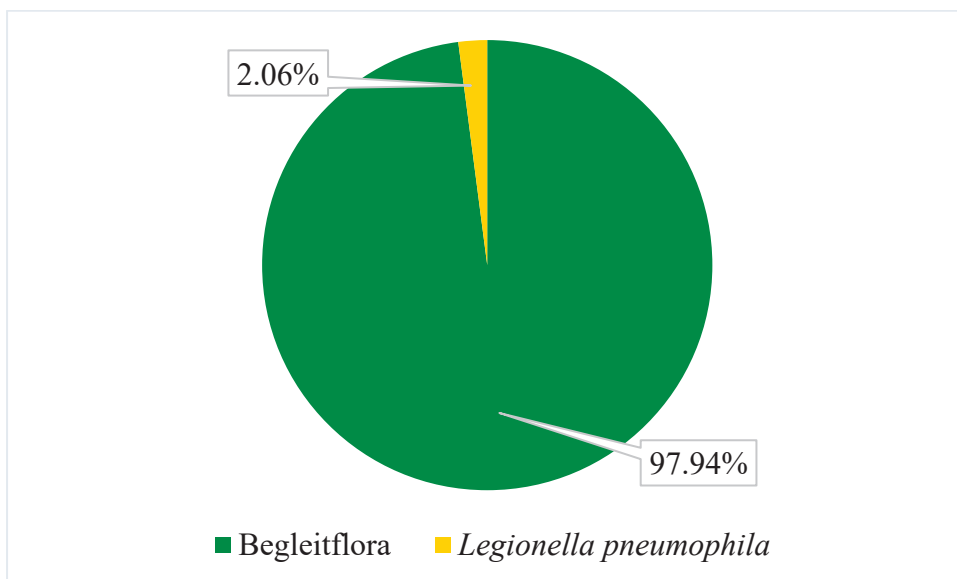


Abbildung 12: Prozentualer Anteil von *Legionella pneumophila* und der Begleitflora auf den verwendeten BCYE+AB-Agar-Platten

5 Diskussion

5.1 Untersuchung von *Pseudomonas aeruginosa*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa*- und *Legionella pneumophila*-Spezies mit dem MALDI-TOF-MS-System (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight massspectrometry) untersucht. Damit MALDI-TOF MS in der mikrobiologischen Routinediagnostik zur Speziesidentifikation in der Trinkwasseranalyse eingesetzt werden kann, musste diese Methode ihre Zuverlässigkeit beweisen. In dieser Arbeit wurde ein Vergleich zwischen den ermittelten Ergebnissen der Untersuchung nach klassischen Methoden nach DIN und nach MALDI-TOF MS durchgeführt.

Pseudomonas aeruginosa DSM 1128 Ansatz mit sterilem Wasser

Nach der MALDI-TOF-MS Messung konnte als Ergebnis festgestellt werden, dass von den 9 untersuchten Wasserproben (Tabelle 26) die erste Probe einen Score-value von 1,66 erzielte, da hier kein entsprechender Peak gefunden wurde. Dies bedeutet, dass MALDI-TOF-MS das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* nicht identifizieren konnte und der Test unter realen Bedingungen wiederholt werden müsste. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass es sich um einen manuellen Fehler bei dem Auftragen der Kolonie auf den Target-Spot handelte. Es ist möglich, dass hier die Probenmenge zu hoch oder zu niedrig gewesen sein könnte. Nach Herstellerangaben sollte die aufzutragende Anzahl zwischen 10^4 und 10^7 Zellen je Target-Spot liegen, um eine sichere Identifikation zu ermöglichen. Der Vorgang des Auftragens geschieht jedoch stets manuell ohne technische Hilfsmittel. Auf diese Weise üben die Einarbeitung und Erfahrung des Benutzers einen großen Einfluss auf das Ergebnis aus (Bruker, 2018).

Im Falle der Probe Nr. 4 genügte der erreichte Score-value von 1,98 trotz der Identifikation von *Pseudomonas aeruginosa* im ersten und zweitbesten Treffer lediglich für eine Gattungsidentifikation aus. Ein Grund für dieses Ergebnisse könnte sein, dass die Anzahl der Zellen auf dem Target-Spot zu gering war. Da dieses Ergebnis jedoch lediglich als eine wahrscheinliche Identifikation zu werten ist, sollte die Untersuchung unter realen Bedingungen wiederholt werden. Bei den verbliebenen Proben wurden die Bakterien mit einem Score-value über 2,00 sehr gut identifiziert, was eine sehr wahrscheinliche Identifikation der Gattung und Spezies bedeutet.

Im klassischen Verfahren wurden keine weiteren biochemischen Tests durchgeführt, da die Bestätigungsschritte nicht notwendig waren aufgrund der Tatsache, dass der verwendete *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm Pyocyanin bildete. Die Pyocyaninfärbung ist eine für das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* charakteristische Färbesubstanz. Die Gesamtkonzentration der

Kolonien reichte von 12 bis 60 KbE pro 100 ml in jedem Test. Die klassische Methode war im Gegensatz zu MALDI-TOF-MS in der Lage in allen beimpften Proben *Pseudomonas aeruginosa* korrekt nachzuweisen. Da die erkannten Fehlerquellen sehr wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Präparation zurückzuführen sind, ist davon auszugehen, dass die MALDI-TOF-MS-Methode bei korrekter Präparation die Proben sicher identifizieren könnte.

Pseudomonas aeruginosa DSM 1128 Ansatz mit *Staphylococcus aureus* DSM 799 in sterilem Wasser

Die mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Proben (mit Ausnahme der Proben Nr. 4 und 5, in denen kein Wachstum von *Staphylococcus aureus* festgestellt wurde) sehr gut identifiziert werden konnten. Die erhaltenen Score-values waren alle sehr hoch, sodass die Gattung und Spezies als sehr wahrscheinlich identifiziert angesehen werden können. Die Proben Nr. 4 und 5 zeigten kein Wachstum von *Staphylococcus aureus*, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Zellzahl der beimpften Kolonie zu gering war. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Probe vor der Filtration nicht gut durchmischt wurde und die Kolonien am Boden sedimentiert waren. *Pseudomonas aeruginosa* wurde in der Probe Nr.4 mit einem Score-value von 1,80 identifiziert. Dieser geringe Wert könnte auf eine zu geringe Zellzahl auf dem Target-Spot zurückzuführen sein. Bei dem so erzielten Score-value kann also lediglich von einer sicheren Identifikation der Gattung ausgegangen werden. Unter realen Bedingungen sollte diese Probe erneut untersucht werden, um eine sichere Identifikation der Spezies zu ermöglichen. In Probe Nr. 5 wurde *Pseudomonas aeruginosa* ebenfalls durch MALDI-TOF-MS nachgewiesen. Hier handelte es sich um eine sehr wahrscheinliche Identifizierung der Spezies und Gattung. In diesem Fall wurden die beiden Stämme voneinander zuverlässiger identifiziert. Dieses Ergebnis wurde durch das klassische Verfahren mittels des Oxidase-Tests und der Koloniefarbe bestätigt und ist somit als sicher anzusehen. Alle Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* wurden durch die Bildung von Pyocyanin bestätigt, sodass keine weiteren biochemischen Verfahren vorgenommen werden mussten. Die Anzahl der Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* auf Cetrimid-Agar war bei jedem Ansatz größer als die von *Staphylococcus aureus*. Eine Erklärung für diese Ergebnisse könnte sein, dass die im Agar enthaltenen Antibiotika (Cetrimid und Nalidixinsäure) das Wachstum von *Staphylococcus aureus* hemmen, ohne dieses von *Pseudomonas aeruginosa* zu beeinträchtigen. Es ist auch möglich, dass sich die *Staphylococcus aureus*-Bakterien aufgrund des geringen Nährstoffgehalts des Cetrimid-Agars nicht richtig vermehren konnten.

Die mittels MALDI-TOF-MS erzielten Ergebnisse stimmten, mit Ausnahme der Probe Nr. 4, mit den Ergebnissen der klassischen Analyseverfahren überein, womit diese als bestätigt angesehen werden können. Um genauere Aussagen über Genauigkeit der Untersuchung auf *Pseudomonas aeruginosa* mittels MALDI-TOF-MS in Proben mit einer weiteren Art von Bakterien machen zu können, sind weitere Untersuchungen mit größeren Probenumfängen und anderen Begleitarten wie z. B. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas stutzeri* notwendig, da diese ebenfalls auf Ceftrimid-Agar wachsen können (Liebmann, 2016).

Untersuchung realer Proben

Von den 53 untersuchten realen Wasserproben wurde *Pseudomonas aeruginosa* nur in 4 Proben nachgewiesen. Je zweimal betraf dies Proben aus Duschen und Waschbecken. Die mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten Proben sehr gut identifiziert werden konnten. Der Score-value lag hierbei stets $> 2,00$, was eine sehr wahrscheinliche Identifizierung darstellte und bedeutet, dass die Kolonien zur gleichen Spezies und Gattung gehören.

Beim klassischen Verfahren wurde trotz der blau-grünen Färbung der Kolonien zusätzlich ein Fluoreszenztest durchgeführt. Die blau-grünen Kolonien fluoreszierten unter der UV-Lampe. Die mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten Proben sehr gut identifiziert werden konnten und als sicher anzusehen sind, da sie mittels der klassischen Untersuchungsmethode bestätigt wurden

Die Anzahl der *Pseudomonas aeruginosa*-Kolonien auf Ceftrimid-Agar variierte zwischen 1 und 100 KbE/100 ml. Die Proben Nr. 19 und 20 entstammten der Dusche und des Wasserhahns der gleichen Wohnung. Die höhere Koloniezahl der Probe aus der Dusche könnte darauf hinweisen, dass sich das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* hier am besten in der Dusche wächst. Hierbei könnten die Installation selbst, die Wassertemperatur und das Alter der Konstruktion eine große Rolle spielen. Obwohl die Proben kalt entnommen wurden, war die Präsenz von *Pseudomonas aeruginosa* sehr hoch. Es könnte sich daher um einen bereits im Duschkopf oder in der Leitung vorhandenen Biofilm handeln welcher *Pseudomonas aeruginosa* beinhaltet. Um dies zu bestätigen, wären allerdings weitere Untersuchungen notwendig, da der Stichprobenumfang deutlich zu klein war. Bei der Probe Nr. 23 wurde ebenfalls eine hohe Koloniezahl von *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen. Diese entstammte ebenfalls einer Dusche. Eine mögliche Ursache für das Auftreten wäre die Stagnation über einen Zeitraum von einigen

Wochen oder Monaten vor der Probenahme. So könnte *Pseudomonas aeruginosa* sich vermehrt und im Biofilm angesiedelt haben. Um dies zu bestätigen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. In jedem Fall lagen die hier ermittelten Werte aller 3 positiven Proben über dem Grenzwert von 0 KBE/100 ml der Trinkwasserverordnung.

Neben *Pseudomonas aeruginosa* wurden im Laufe der Untersuchungen andere *Pseudomonas*-Spezies im Trinkwasser-Proben nachgewiesen. Diese Spezies wurden mittels MALDI-TOF-MS identifiziert, wie zum Beispiel im Falle des in einer Dusche nachgewiesenen *Pseudomonas fluorescenz*. Diese Identifikation wurde mittels des klassischen Verfahrens nach DIN EN ISO 16266 bestätigt. Hier erschien es in einer hellen weißen Färbung. Zusätzlich fluoreszierte es unter UV-Licht. Es bildete Ammoniak, aber kein Pyocyanin. Dann wurden die Kolonien auf Cetrimid-Agga subkultiviert und bei 42 °C inkubiert um zu sicher sein, da *Pseudomonas fluorescens* bei 4 °C, aber nicht bei 42 °C wächst (DIN EN ISO 16266). bei dem klassischen biochemischen Verfahren betrug die Zeit bis zu einer Aussage 4 Tage. Die Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS hingegen benötigte für die Analyse ca. 10 min. Dies verdeutlicht einen weiteren Vorteil dieser Methode, da so weniger Personalaufwand benötigt wird und mehr Proben in kürzerer Zeit untersucht werden können, da auf einer Target-Platte bis zu 96 Proben untersucht werden können. Ein weiterer Vorteil des MALDI-TOF-MS besteht in der unmittelbaren Identifikation der Spezies. Wohingegen bei vielen biochemischen Verfahren lediglich ein Ausschluss von bestimmten Bakterien möglich ist. So kann z. B. bei einem negativen Staphylase-Test nur ausgesagt werden, dass es sich bei dem untersuchten Mikroorganismus nicht um *Staphylococcus aureus* handelt. In einer durchgeführten Studie wurden 487 Bakterien mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Hierbei betrug die Rate der korrekten Identifizierung der Spezies mittels MALDI-TOF-MS 86,0 % (Score-Wert > 1,7) und der korrekten Identifizierung der Gattung 91,7 % (Score-Wert > 1,7) (Waibel, 2012).

5.2 Untersuchung von *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila DSM 1713 Ansatz mit sterilem Wasser

Die durch MALDI-TOF-MS erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten Proben sehr gut identifiziert wurden, da bei allen Proben der Score-value > 2,00 betrug, was bedeutet, dass es sich um eine sehr wahrscheinliche Identifikation handelt und in diesem Fall die Kolonien zur gleichen Spezies und Gattung gehören. Die Untersuchung von *L. pneumophila* im klassischen Verfahren basiert auf zwei Ansätzen: einer Membranfiltration und zwei direkten Ansätzen.

Beide Methoden wurden für jede untersuchte Probe verwendet. Die Koloniezahl der Direktansätze und auf dem Membranfilter war unterschiedlich. Die höchste Koloniezahl wurde dabei immer im Falle der direkten Ansätze nachgewiesen. Daher wurde in den Ergebnissen die Koloniezahl des direkten Ansatzes angegeben. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Luftschlüsse im Membranfilter eine Barriere zwischen den Mikroorganismen und dem Kulturmedium bilden könnten, womit diese keinen Zugang zu den enthaltenen Nährstoffen des Agars haben könnten und sie deshalb nicht schneller wachsen oder sich vermehren konnten. Ein weiterer möglicher Grund könnte sein, dass die Zellen durch die fünfminütige Säurebehandlung inaktiviert oder beschädigt worden sein könnten und sich so nicht mehr vermehren konnten (Schaefer, 2007).

Um *L. pneumophila* zu bestätigen wurden die gewachsenen Kolonien auf BCYE+AB, auf BCYE und BCYE-Cys subkultiviert und inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Wachstum auf BCYE und kein Wachstum auf BCYE-Cys festgestellt, da *Legionella pneumophila* Cystein für ein Wachstum benötigt. Die mittels MALDI-TOF-MS ermittelten Ergebnisse sind in diesem Fall als sicher anzusehen, da sie mittels des klassischen Verfahrens sämtlich bestätigt wurden.

Legionella pneumophila als Mischkultur mit *Escherichia coli* bzw. *Legionella bozemanii*

Zu Beginn wurde *Legionella pneumophila* mit *E. coli* vermischt. Nach der Inkubationszeit wurde nur noch das Wachstum des *E. coli*-Stammes auf dem Membranfilter nachgewiesen und in diesem Fall wurde das Wachstum von *Legionella pneumophila* vollständig gehemmt. Einer der Gründe für diese Ergebnisse könnte sein, dass aufgrund der kürzeren Inkubationszeit für *E. coli* (22 h) diese die Platten überwucherten und somit kein erkennbares Wachstum von *Legionella pneumophila* zuließen. Ein weiteres Problem könnte auch die Selektivität des verwendeten BCYE-AB-Agars dargestellt haben. Obwohl dieser Agar die Antibiotika Polymyxin, Cefazolin und das Antimykotikum Pimaricin enthält, war er nicht in der Lage, das Wachstum von *E. coli* zu hemmen. Insbesondere Polymyxin und Cefazolin haben allerdings eine besondere Hemmwirkung auf gramnegative Bakterien wie. z. B. *E. coli* (Zavascki et al., 2007; Jung et al., 2004). Da jedoch nur im Falle des Membranfilters ein Wachstum von *E. coli* beobachtet wurde, besteht der Verdacht, dass die Zellen von *E. coli* teilweise keinen Kontakt zum Agar hatten und somit nicht in Berührung mit den enthaltenen Antibiotika kamen. Um dies zu bestätigen, sollten Untersuchungen mit einem Schwerpunkt zur Kontaktfläche der Mikroorganismen in und auf Membranfiltern mit Agar durchgeführt werden.

Infolgedessen wurde in den nachfolgenden Versuchen *Legionella pneumophila* mit *Legionella bozemanii* vermischt.

Hier lagen alle erzielten Score-values bei den Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS > 2.00. Es konnten sowohl die Gattung als auch die Spezies für *Legionella pneumophila* und *Legionella bozemanii* mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit identifiziert werden.

Die Kolonien von *Legionella pneumophila* und *Legionella bozemanii* sind aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit leicht zu verwechseln, denn beide Spezies wachsen auf BCYE und weisen kein Wachstum auf BCYE-Cys auf. Lediglich unter UV-Licht ist es möglich diese beiden Bakterien voneinander zu unterscheiden, da *Legionella bozemanii* fluoresziert und *Legionella pneumophila* kein Fluoreszenz-Verhalten aufweist. Im Vergleich zu *L. pneumophila* wurde das Wachstum von *Legionella bozemanii* auf dem Membranfilter und im direkten Ansatz immer nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass bei der Membranfiltration die Proben vor dem Filtrationsprozess nicht gut geschüttelt wurden, so dass die Bakterien sedimentierten oder, dass *Legionella Bozemanii* recht schnell auf dem Membranfilter wachsen und so das Wachstum von *L. pneumophila* verlangsamte oder partiell hemmen konnte. Es ist auch möglich, dass die Säurebehandlung das Wachstum der *Legionella pneumophila*-Bakterien verhinderte oder dass die Zellen inaktiviert wurden, sodass sie sich nicht mehr richtig vermehren konnten. Eine weitere Erklärung wäre, dass *L. pneumophila* empfindlicher auf die Säurebehandlung reagierte als *L. bozemanii*. Die mittels MALDI-TOF-MS ermittelten Ergebnisse sind in diesem Fall als sicher anzusehen, da sie mittels des klassischen Verfahrens sämtlich bestätigt wurden. Die zugesetzten Zellen des Bakteriums *L. bozemanii* waren im Vorfeld bekannt und wurden ebenfalls korrekt mittels MALDI-TOF-MS identifiziert.

Untersuchung realer Proben auf *Legionella pneumophila*

Für die Untersuchungen realer Proben wurden 53 Proben an verschiedenen Orten genommen. Das Vorhandensein von *Legionella Pneumophila* wurde zweimal in der Dusche und einmal am Waschbecken nachgewiesen.

Die weißen Kolonien von *Legionella pneumophila* auf BCYE+AB-Agar erschienen milchglasähnlich im Falle der Direktansätze und des Membranfilters (Abb. 9). Kolonien mit der gleichen Morphologie wie *L. pneumophila*-Kolonien wurden mittels MALDI-TOF-MS und klassischen Verfahren untersucht. Die erzielten MALDI-TOF-MS-Ergebnisse zeigten, dass Gattung und Spezies aller Proben aufgrund ihres hohen Score-values von > 2.00 mit einer sehr hohen

Wahrscheinlichkeit identifiziert werden konnten. Diese Ergebnisse sind als sicher anzusehen, da sie mittels des klassischen Verfahrens, durch die Subkultivierung auf BCYE und BCYE-Cys, bestätigt wurden.

Bei allen positiven Proben wurden stets Koloniezahlen von *Legionella pneumophila* über dem Grenzwert von 100 KbE/100ml nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wäre, dass *Legionella pneumophila* in den beprobten trinkwasserführenden Systemen ideale Wachstumsbedingungen vorfand (ausreichend Nährstoffe, ideale Temperatur, Vorhandensein eines Biofilms). Dies ist auch ein Grund, der in der Stagnation des Wassers liegen könnte, da sämtliche Proben selten genutzten Armaturen entstammten. Hier waren die Mikroorganismen vor Stressfaktoren, wie zu hohen Temperaturen ($> 60\text{ °C}$) oder Desinfektion, geschützt. Die Anzahl der Kolonien von *Legionella pneumophila* war auf dem direkten Ansatz höher als auf dem Membranfilter. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zellen, im Falle des direkten Ansatzes, einen direkten Kontakt mit dem Nährmedium und den darin enthaltenen Antibiotika hatten, sodass letzteres die Begleitflora gehemmt haben könnte. Weiterhin wird bei den Direktansätzen lediglich 1 ml Probenvolumen untersucht und das Ergebnis mit 100 multipliziert. Somit ist das Risiko eines fehlerhaften Wertes durch eine inhomogene Verteilung der Mikroorganismen in der Probe unmittelbar vor der Untersuchung gegeben. Wird hier bereits eine Kolonie von *Legionella pneumophila* nachgewiesen, wird der technische Maßnahmenwert überschritten. Ein Grund dafür, dass *Legionella pneumophila* weniger auf dem Membranfilter nachgewiesen wurde, könnte durch ein zu starkes Wachstum der Begleitflora zu begründen sein. Es wäre möglich, dass die Begleitflora aufgrund des Membranfilters keinen direkten Kontakt zum Agar mit den enthaltenen Antibiotika gehabt haben könnte. So würde das Wachstum von *Legionella pneumophila* gehemmt oder maskiert werden, da diese eine besonders lange Inkubationszeit aufweisen. Bei dem Membranfiltrationsverfahren kann es zudem durch die Säurebehandlung zu einer Schädigung oder Inaktivierung von *Legionella pneumophila* gekommen sein. Daher wird teilweise empfohlen auf die saure Behandlung zu verzichten, da die Wahrscheinlichkeit sehr groß ist, dass die quantitativen Ergebnisse verfälscht werden könnten. Ist eine große Begleitflora in der Probe zu erwarten, bleibt eine saure Behandlung allerdings unabdingbar (Schaefer, 2007).

Da bei den positiven Proben der technische Maßnahmenwert für Legionellen von 100 KbE/100 ml überschritten wurde, wird empfohlen die ermittelten Ergebnisse dem zuständigen Gesundheitsamt zu melden.

Im Falle der Probe Nr.33 sollte der Betreiber dazu aufgefordert werden, weitergehende Untersuchungen vorzunehmen, da bei der Erstuntersuchungen für Legionellen zwischen 100 KbE und 1.000 KbE/100 ml nachgewiesen wurden. Zusätzlich wird empfohlen, vorsorglich eine thermische Desinfektion der Trinkwasserinstallation durchzuführen. Im Anschluss an die Desinfektion müssen Nachuntersuchungen zur Erfolgskontrolle beauftragt werden.

Da das Ergebnis der Probe Nr. 9 eine Legionellen-Konzentration zwischen 1.000 und 10.000 KbE/100 ml aufwies, sollte in der Regel eine thermische Desinfektion empfohlen werden, um zeitnah eine weitere Vermehrung der Legionellen zu verhindern.

In der Probe Nr. 40 wiederum wurde eine Legionellen-Konzentrationen über 10.000 KbE/100 ml nachgewiesen. Hier sollte ein sofortiges Duschverbot zur Gefahrenabwehr verhängt werden. Es sollte weiterhin empfohlen werden, kurzfristig Abhilfemaßnahmen zu ergreifen, deren Erfolg ebenfalls anhand von anschließenden Nachuntersuchungen nachzuweisen ist. Erst nach Vorlage einwandfreier Ergebnisse sollte das Duschverbot wieder aufgehoben werden (Becker und Luther, 2018).

Neben *Legionella pneumophila* wurde andere *Legionella*-Spezies in den Trinkwasserproben nachwiesen, wie z. B. *Legionella anisa*. Diese Spezies konnte durch ihr fluoreszierendes Verhalten unter UV-Licht identifiziert werden.

Alle Ergebnisse der mittels MALDI-TOF-MS untersuchten Proben konnten mit den klassischen Methoden bestätigt werden, womit diese Ergebnisse als sicher anzusehen sind. Auch wurden sämtliche Ergebnisse mit der MALDI-TOF-MS-Methode 5 Tage schneller ermittelt als die Ergebnisse der klassischen Methode, wo die endgültige Bestätigung erst durch eine zweite Inkubation auf BCYE und BCYE-Cys erfolgt.

Ein weiterer Vorteil neben der massiven Zeitersparnis durch MALDI-TOF-MS ist der geringere Materialverbrauch. Beispielsweise wurde in einer Studie eine große Anzahl von Kulturplatten eingespart, wobei 820 Agarplatten anstelle der 45.356 ursprünglich benötigten Platten verwendet wurden. Dies trug auch zu einer Kostenreduzierung bei, wobei hier die hohen Anschaffungskosten des MALDI-TOF-MS berücksichtigt werden müssen. Auch ergibt sich so ein geringer Aufwand durch die teilweise Automatisierung des Prozesses, da aufwendige biochemische Verfahren entfallen (Dilger, 2018).

5.3 Nährmedienselektivität

Beide verwendeten Nährmedien, Cetrimid-Agar und BCYE+AB-Agar, enthielten unterschiedliche Antibiotika (Cetrimid-Agar = Cetrimid und Nalidixinsäure, BCYE+AB-Agar = Polymyxin, Cefazolin, Pimaricin). Die Ergebnisse zeigten eine höhere Selektivität von Cetrimid-Agar gegenüber des BCYE+AB-Agars. Dies ließ sich dadurch erkennen, dass der prozentuale Anteil der Begleitflora auf BCYE+AB-Agar höher lag als der auf Cetrimid-Agar, wie in Abbildung 10 gezeigt wird. Die hohe Selektivität des Cetrimid-Agars wird auch dadurch bestätigt, dass fast alle Arten, die zur Begleitflora gehörten, zur Familie der Pseudomonaden zählten.

Die geringere Selektivität des BCYE+AB-Agars könnte auf die Wachstumshemmung von *Legionella pneumophila* zurückzuführen sein, insbesondere im Membranfilter-Verfahren, wo das größte Begleitfloravorkommen nachgewiesen wurde. Eine mögliche Erklärung für dieses erhöhte Wachstum könnte sein, dass der Membranfilter als Barriere zwischen den Kolonien und dem Antibiotikum wirkte, insbesondere wenn auch Luftblasen vorhanden waren, so dass die Zellen nicht mit den Antibiotika des Agars in Kontakt gekommen sein könnten. Eine weitere Erklärung hierfür könnte auch sein, dass die in der vorgestellten Arbeit die untersuchten realen Proben aus stagnierenden Bereichen und für den untersuchten Zweck (Zweck C) direkt dem Vorlauf ohne vorherige Desinfektion entnommen wurden. Hierdurch könnte der Anteil der Begleitflora in diesen Proben sehr hoch gewesen sein. Zusätzlich spielt die Zufallsverteilung eine wichtige Rolle. Im Trinkwasser sind die Mikroorganismen in der Regel nicht gleichmäßig verteilt, was das Vorhandensein und den Nachweis unterschiedlicher Mikroorganismen bei der Probenahme erklären könnte (Kistemann, 2012).

Pseudomonas aeruginosa ist außerdem in der Lage auch auf dem Selektivnährmedium von *Legionella pneumophila* (BCYE+AB-Agar) zu wachsen. *P. aeruginosa*-Kolonien auf BCYE+AB-Agar erscheinen dann in einer bräunlichen Färbung.

Zusammenfassend ließ sich jedoch feststellen, dass trotz des Einsatzes der MALDI-TOF-MS, zuverlässig wirksame Selektivnährmedien zur Vorkultivierung eingesetzt werden müssen, um eine sichere Aussage über An- bzw. Abwesenheit bestimmter Mikroorganismen treffen zu können.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Fähigkeit der MALDI-TOF MS-Methode zur Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Legionella pneumophila* zu bewerten und mit klassischen Methoden zu vergleichen. Die erzielte Qualität der Ergebnisse wurden in Form eines Score-values zwischen 1,6 und 3 bewertet. Durch MALDI-TOF-MS wurden die Bakterien entweder nicht identifiziert (keine übereinstimmenden Peaks gefunden), nur als Gattung identifiziert oder als Spezies und Gattung identifiziert. Zunächst wurde steriles entionisiertes Wasser in 9 Fällen Proben mit *P. aeruginosa* bzw. in 5 Fällen mit *L. pneumophila* beimpft. Die jeweils gleiche Anzahl von Proben wurde nicht beimpft. Im zweiten Schritt wurde das Wasser in 5 Fällen mit *P. aeruginosa* und *S. aureus* bzw. mit *L. pneumophila* und *L. bozemanii* beimpft. Auch hier wurde die jeweils gleiche Anzahl von Proben nicht beimpft. Im dritten Schritt wurden 53 reale Proben aus unterschiedlichen stagnierenden Leitungssystemen entnommen. Alle Proben wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS untersucht und durch das klassische Verfahren (nach DIN EN ISO 16266 und DIN EN ISO11731) bestätigt. Die Ergebnisse zeigten, dass es in der Regel eine starke Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden gab. MALDI-TOF-MS konnte fast alle Proben mit einer sehr hohen Identifikationswahrscheinlichkeit korrekt identifizieren. Die erzielten Score-values $> 2,00$ entsprachen genauen und zuverlässigen Informationen über Spezies und Gattungen. Eine Probe wurde nicht identifiziert und zwei weitere Proben wurde nur mit Sicherheit der Gattung zugeordnet, was auf manuelle Fehler zurückzuführen war. Hier wurde als Schwachpunkt der MALDI-TOF-MS die Menge der Zellen auf dem Target-Spot identifiziert. Diese sollte zwischen 10^4 und 10^7 liegen und lässt sich nur per Augenmaß abschätzen. Hier sind auch in Zukunft die Erfahrung und handwerkliche Kompetenz des Laborpersonals erforderlich. Weiterhin waren trotz der automatischen Analyse und Auswertung durch die MALDI-TOF-MS eine Vorkultivierung mittels Selektivnährmedien erforderlich. Zusammenfassend benötigt die Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS nach der Vorinkubation nur Minuten für eine Analyse. Mittels der klassischen Verfahren hingegen beträgt die weitere Untersuchungszeit mehrere Tage bis zum Erhalt der Ergebnisse. Dies hat eine wesentliche Kostenreduktion hinsichtlich Personals und Verbrauchsmaterialien zur Folge.

Da die Anzahl der untersuchten Proben nur sehr gering war, sind weitere Untersuchungen notwendig, um definitive Aussagen über die Richtigkeit, Robustheit und Präzision dieser Methode bei der Analyse von *P. aeruginosa* und *L. pneumophila* Trinkwasser machen zu können.

7 Abstract

The aim of this work was to determine whether the use of the relatively new matrix-assisted laser desorption/ionisation technology (MALDI), followed by mass spectrometry using a time-of-flight analyser (MALDI-TOF), can achieve the bacterial identification required by DIN EN ISO 11731 and DIN EN ISO 16266 in an equivalent and reliable manner. A total of 24 inoculated samples were analysed using the bacterium *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* and 53 real samples taken from different locations (flat, hotel...) were analysed using MALDI-TOF-MS and methods DIN EN ISO 11713 and DIN EN ISO 162666. The results obtained showed that MALDI-TOF-MS was able to correctly identify almost all samples with a high score-value > 2.00 . One sample was not identified and for two samples only the genus was identified. The suspected source of error was a too high or too low number of cells on the target spot. The advantage of MALDI-TOF-MS is the lower material requirement and the short analysis time of only a few minutes.

8 Literaturverzeichnis

Bedard, E., Prevost, M., Deziel, E.: *Pseudomonas aeruginosa in permise plumbing of large buildings. MicrobiologyOpen* 5.S 937-956,2016.

Bressler, D.: *Einnistung von Pseudomonas aeruginosa in Trinkwasserbiofilm: Eine Frage der EPS. Dissertation. Universität Duisburg-Essen, 2008.*

Behling, G.: *Legionellen Problematik im Trinkwasser Vorkommen, Infektion, Gefahrenpotenzial, Prävention und Sanierung, GFS-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in der Helmholtz Gemeinschaft, 2004.*

Babic, D.: *Induktion und Detektion des VBNC-Zustandes in Pseudomonas aeruginosa. Dissertation. Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal, 2017.*

Boppe, I.: *Controle des Legionelles dans les reseaux d'eau chaude par une Approche de Gestion de L'hydraulique et des Temperatures. Universite de Montreal, 2016.*

Bürschengs, A.: *Legionellen in Trinkwasser-Installationen Gefährdungsanalyse and Sanierung. 2Aufl. Berlin: Beuth, 2018.*

BRUKER Daltonik GmbH: *MBT Compass User Manual, MALDI Biotyper Compass,2018.*

BRUKER Daltonik GmbH: *MBT Compass. Revision F MBT 8468 MPS Library, 2019.*

Carbonelle, E., Mesquita, C., Bille, E.,Day, N., Dauphin,B., Lucberetti, J., Ferroni, A., Gutmann,L., Nassif, X.: *MALDI-TOF-MS mass spectrometry tools for bacteriel identification in clinical microbiology laboratory, 2010.*

Delolme., H, Boutin., J.P, Andre,L.-J.: *Eau douce et pathologie. Medicine d'Afrique Noire*39(3), 1992.

Dilger, T.: *Untersuchungen zu Legionellen-Kontaminationen in Warmwassersystemen in Süddeutschland. Dissertation. Fakultät für Medizin der Universität Regensburg, 2018.*

Declerck, P.: *Biofilms: the environmental playground of Legionella pneumophila, 2010.*

Engler. Hüsch, E.: *Nachweis von Pseudomonas aeruginosa und anderen Non-Fermentern in Trinkwasserproben mit anschließend Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS. Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, 2015.*

Fuchs, G., Schlegel, H.: *Allgemeine Mikrobiologie*. 8. Stuttgart: Thiem, 2007.

Hennig, A.: *Anwendungen der qualitativen und quantitativen shotgun MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie im Rahmen der Tiergesundheit: Proteomanalyse des Rinderplasmas und Untersuchungen zu Virus-Wirt-Interaktion*. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2015.

Hüpsel, M.: *Vorkommen und Tenazität von Legionella species in Trinkwasser*. Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg, 2015.

Jung, P., Stichtenoth, G., Walter, G., Johansson, J., Herting, E.: *Polymyxin B/Surfactant-Gemische reduzieren das Wachstum von E. coli in Mekoniumsuspensionen*. Zeitschrift für Geburtshilfe & Neonathologie 208 (2004) Nr. 6, S. 208-217.

Kunze, A.: *Aufkonzentrierung und Detektion viraler und bakterieller Pathogene in Trinkwasser*. Dissertation. Technische Universität München, 2016.

Liebmann, A.: *Untersuchung von Umwelt Isolat (Pseudomonas, Enterobacteriaceae)*. Karl-Franzens-Universität Graz, 2016.

Menzer, A.: *Massenspektrometrische Differenzierung bakterieller Infektionserreger mit dem Vitek MS-Routinetest-System (IVD)*. Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, 2017.

Osterhage, J.: *Die Zuverlässigkeit von MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight massspectrometry)*. Dissertation. Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität Köln, 2010.

Robert Koch Institut. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch Meldepflichtiger Krankheiten für 2018, 2019*.

Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 1, 2019*.

Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin. Pseudomonas aeruginosa in einem Trinkwassernetz, 2002*.

Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin. Norovirus-Infektionen in Deutschland 2019, Legionellosen vorbeugen, 2020*.

Schubert, S., Wieser, A.: *Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik, 2011*.

Sauget, M.: Identifikation de marqueurs epidemiologiques par spectrometrie de masse de type MALDI-TOF: application aux principales especes bacteriennes responsables d'infections nosocomiales. Dissertation. Universite de Franche-comite UFER sciences medicales et pharmaceutiques, 2016.

Siegbrecht, E.: Screening und Charakterisierung neuer Virulenzfaktoren des Lungenpathogens Legionella pneumophila. Dissertation. Fakultät III- Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin, 2012.

Thiem, S.: Phänotypische und funktionelle Charakterisierung der Zink-Methalloprotease ProA von Legionella pneumophila. Dissertation Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Willhelmina zu Braunschweig, 2019.

Umwelt Bundesamt. 42 Bundesimmissionsschutzverordnung in Kraft getreten / UBA-Empfehlung zum Legionellen-Nachweis veröffentlicht, 2017.

Umwelt Bundesamt. Empfehlung zu erforderlichen Untersuchungen auf Pseudomonas aeruginosa, zur Risikoeinschätzung und zu Maßnahmen beim Nachweis im Trinkwasser, 2017.

Venier, A., Leroyer, C, Slekovec, C, Talon, D, Bertrand, X, Parer, S, Alfandari, S, Guerin, J.-M, Magarbane, B, Lawrence, C, Clair, B, Lepape, A, Perraud, M, Cassier, P, Trivier, D, Boyer, A, Dubois, V, Annelineau, J, Rogues, A.-M, Thieabaut, R.: Risk factors for Pseudomonas aeruginosa acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. Journal of Hospital Infection. 88(2014), Nr. 2, S 1-6.

Wunderlich, A.: Antikörper-Mikroarrays zur Analyse von Legionella pneumophila in Wasser und anderen pathogenen Mikroorganismen im Lebensmittel. Dissertation. Technische Universität München, 2017.

Werner, M.: Fakultative Opportunistische Krankheitserreger in Trinkwasserinstallation von Gebäude, 2019.

Waibel, C.: Untersuchungen zur Anwendbarkeit der "Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry" - Technik für die Identifikation von klinisch relevanten, coryneformen Bakterien. Dissertation. Universitätsklinikum Ulm, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, 2012.

World Health Organisation. Legionella and the prevention of Legionellosis, 2007.

Wasserbeschaffenheit-Zählung von Legionellen (ISO 11731:2017); Deutsche Fassung EN ISO 11731:2017

Wasserbeschaffenheit-Zählung von Pseudomonas aeruginosa-Membranfiltrationsverfahren (ISO 16266:2006); Deutsche Fassung EN ISO 16266:2008

Xue, Z., Hessler, C., Panmanee, W., Hasset, J., Seo, Y.: Pseudomonas aeruginosa inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. FEMS Microbiology ecology 83 (2013), Nr. 1, S.101-111.

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung-TrinkwV) (2001), zuletzt geändert 2018.

Zavascki, A., Goldani, L., Nation, R.: Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60 (2007), S. 1206 – 1215.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme	16
Tabelle 2: Verwendeter BCYE+AB-Agar	17
Tabelle 3: Verwendeter BCYE-Agar	18
Tabelle 4: Verwendeter BCYE-Cys-Agar.....	18
Tabelle 5: Verwendeter Cetrimid-Agar.....	19
Tabelle 6: Verwendeter DEV-Agar.....	19
Tabelle 7: Verwendetes King's B Medium.....	20
Tabelle 8: Verwendeter MacConkey Agar n°3	20
Tabelle 9: Verwendeter Mannitol Salt Agar	21
Tabelle 10: Verwendete Acetamid-Nährlösung.....	21
Tabelle 11: Verwendete Neßler Reagenz.....	22
Tabelle 12: Oxidase-Reagenz.....	22
Tabelle 13: Verwendete Salzsäure	22
Tabelle 14: Verwendetes Kaliumchlorid.....	23
Tabelle 15: Verwendetes Kaliumhydroxid	23
Tabelle 16: Verwendete HCCA = α - Cyano-4- Hydroxy-Zimtsäure.....	23
Tabelle 17: Verwendeter IVD BTS (Bacterial Test Standard)	24
Tabelle 18: Verwendetes Solution OS (Standardlösungsmittel).....	24
Tabelle 19: Verwendete Geräte	25
Tabelle 20: Verwendete Materialien	26
Tabelle 21: Wasserproben-Herkunft (W) = Waschbecken, (D) = Dusche	28
Tabelle 22: Herkunft der einzelnen Wasserproben (W = Waschbecken, D = Dusche).....	30
Tabelle 23: Bestätigungsschritte für die auf Cetrimid-Agar gewachsenen Kolonien.....	32
Tabelle 24: Bedeutung der Bewertungszahlen der MALDI-TOF-MS.....	38
Tabelle 25: Bedeutung der Konsistenzkategorien nach Bruker (2018)	39
Tabelle 26: Ergebnisse des MALDI-TOF-MS der mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> beimpften Wasserproben.....	40
Tabelle 27: Anzahl von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Kolonien vor und nach der Bestätigung mittels des klassischen Verfahrens sowie der prozentuale Anteil der bestätigten Kolonien.....	41
Tabelle 28: Ergebnisse des MALDI-TOF-MS der gemischten Proben mit <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> und <i>Staphylococcus aureus</i>	42

Tabelle 29: Kolonie-Zahlen der Mischkultur von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> und der Anteil der bestätigten Kolonien.....	43
Tabelle 30: Identifizierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mittels MALDI-TOF-MS und klassischem Verfahren realer Proben Trinkwasserproben aus Duschen und Wasserhähnen	45
Tabelle 31: Ergebnisse des MALDI-TOF-MS der mit <i>L. pneumophila</i> beimpften Proben	47
Tabelle 32: Anzahl von <i>Legionella pneumophila</i> Kolonien vor und nach der Bestätigung mittels des klassischen Verfahrens sowie der prozentuale Anteil der bestätigten Kolonien	47
Tabelle 33: MALDI-TOF-MS- <i>L. pneumophila</i> und <i>L. Bozemanii</i> -Ergebnis-Report	48
Tabelle 34: Kolonie-Zahlen der Mischkultur von <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Legionella bozemanii</i> und der Anteil der bestätigten Kolonien.....	49
Tabelle 35: Identifizierung von <i>Legionella pneumophila</i> mittels MALDI-TOF-MS und klassischem Verfahren realer Proben Trinkwasserproben aus Duschen und Wasserhähnen	51

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: mikroskopische Aufnahme <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Trautmann, 2007).....	6
Abbildung 2: <i>Legionella pneumophila</i> Serogruppe 1 (koloriert) Transmissions-Elektronenmikroskopie Maßstab = 1 µm (Hans R. Gelderblom, Rolf Reissbrodt / RKI, 2020).....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des MALDI-TOF-MS-Prinzips (Menzer, 2017)	16
Abbildung 4: Kolonien von <i>Legionella pneumophila</i>	36
Abbildung 5: Fluoreszierende Kolonien von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A) und nicht fluoreszierende Kolonien von <i>Staphylococcus aureus</i> (B).....	44
Abbildung 6: Pyocyanin-bildende Kolonien (blau) von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A) und gelbliche Kolonien von <i>Staphylococcus aureus</i> (B).....	44
Abbildung 7: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in einer realen Probe mit und ohne Pyocyanin Bildung	46
Abbildung 8: Nicht fluoreszierende Kolonien von <i>Legionella pneumophila</i> und fluoreszierende Kolonien von <i>Legionella bozemanii</i> unter UV-Licht (Direktansatz).....	50
Abbildung 9: <i>Legionella pneumophila</i> Wachstum auf BCYE+AB-Agar des Direktansatzes der realen Probe Nr. 40	52
Abbildung 10: Prozentualer Anteil von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und Begleitflora auf den verwendeten Ceftrimid-Agar-Platten.....	52
Abbildung 11: Prozentualer Anteil von <i>Legionella pneumophila</i> und das Begleitflora Wachstum auf BCYE+AB-Agra-Platten (Membranfilter Verfahren).....	53
Abbildung 12: Prozentualer Anteil von <i>Legionella pneumophila</i> und der Begleitflora auf den verwendeten BCYE+AB-Agar-Platten.....	53

11 Anhang

Anlage 1: Koloniezahl von *P. aeruginosa* auf Cetrimid-Agar (1. Schritt)

Probe Nr.	Koloniezahl	Pyocyanin-Bildung
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	26	Ja
2	32	Ja
3	15	Ja
4	20	Ja
5	12	Ja
6	60	Ja
7	37	Ja
8	24	Ja
9	21	Ja

Anlage 2: Koloniezahl von *P. aeruginosa* und *S. aureus* auf Cetrimid-Agar (2. Schritt)

Probe Nr.	Koloniezahl		Pyocyanin-Bildung		Oxidase-Test	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	41	5	41	0	+	-
2	37	4	37	0	+	-
3	54	26	27	0	+	-
4	21	0	21	0	+	
5	20	0	20	0	+	

Anlage 3: Begleitflora und *P. aeruginosa* Wachstum auf Cetrimid-Agar (3. Schritt)

Probe Nr.	Membranfiltration-Verfahren	
	Begleitflora	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1	30	0
2	13	0
3	4	0
4	0	0
5	0	0
6	18	0
7	0	0
8	0	0
9	1	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	30	100
20	32	10
21	36	0
22	22	0
23	0	84
24	45	0
25	17	0
26	7	0
27	64	0
28	0	0
29	0	0
30	0	0
31	0	0
32	12	0
33	0	0
34	0	0
35	0	0
36	0	0
37	0	0
38	0	0
39	0	0
40	0	0
41	0	0
42	0	0
43	0	0
44	0	0
45	20	0
46	0	0
47	19	0
48	0	0
49	8	0
50	20	0
51	0	0
52	10	0
53	22	0

Anlage 4: Koloniezahl von *L. pneumophila* auf BCYE+AB (MF+DA) (1. Schritt)

Probe Nr	Auswertung		
	MF	DA1	DA2
	<i>L. p</i>	<i>L. p</i>	<i>L. p</i>
1	3	1	6
2	1	0	6
3	0	1	2
4	4	4	1
5	0	4	4

Anlage 5: Koloniezahl von *L. p* und *E. coli* auf BCYE+AB-Agar (MF+DA) (2. Schritt)

Probe Nr	Auswertung					
	MF		DA1		DA2	
	<i>L. p</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. p</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. p</i>	<i>E. coli</i>
1	0	102	19	0	20	0
2	0	90	12	0	10	0

Anlage 6: Koloniezahl von *L. pneumophila* und *L. bozemanii* auf den BCYE+AB-Agar (MF + DA) (2. Schritt)

Probe Nr	Auswertung					
	MF		DA1		DA2	
	<i>L. p</i>	<i>L. b</i>	<i>L. p</i>	<i>L. b</i>	<i>L. p</i>	<i>L. b</i>
1	0	>300	38	11	41	13
2	4	133	13	6	4	1
3	4	129	7	6	3	1
4	18	282	56	49	30	42
5	0	132	14	4	10	3

Anlage 7: Begleitflora und *Legionella pneumophila* Wachstum auf den BCYE+AB-Agar (3. Schritt)

Probe Nr.	Membranfiltration-Verfahren		Direktes Ansatz-Verfahren	
	Begleitflora	<i>Legionella pneumophila</i>	Begleitflora	<i>Legionella pneumophila</i>
1	1	0	212	0
2	23	0	276	0
3	4	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	90	0	0	0
7	300	0	272	0
8	2	0	5	0
9	300	0	0	18

10	300	0	26	0
11	295	0	568	0
12	120	0	31	0
13	300	0	30	0
14	100	0	9	0
15	300	0	24	0
16	300	0	172	0
17	4	0	191	0
18	300	0	138	0
19	20	0	28	0
20	55	0	141	0
21	55	0	204	0
22	224	0	200	0
23	111	0	185	0
24	122	0	184	0
25	115	0	163	0
26	66	0	58	0
27	125	0	95	0
28	0	0	84	0
29	5	0	58	0
30	4	0	70	0
31	66	0	45	0
32	60	0	81	0
33	12	3	13	3
34	240	0	181	0
35	83	0	21	0
36	300	0	5	0
37	300	0	354	0
38	300	0	290	0
39	300	0	14	0
40	13	0	0	115
41	4	0	10	0
42	0	0	4	0
43	0	0	0	0
44	300	0	1	0
45	5	0	33	0
46	110	0	0	0
47	300	0	575	0
48	1	0	0	0
49	300	0	77	0
50	300	0	28	0
51	105	0	22	0
52	300	0	579	0
53	300	0	518	0

Anlage 8: MALDI-TOF-MS Ergebnisbericht für *Pseudomonas aeruginosa* (1. Schritt)

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbesten Treffer)	Bewertungs-zahl
<u>A9</u> (+++)(A)	BTS (BTS)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.39</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.32</u>
<u>A10</u> (-)(B)	stW.Pa.1 (Standard)	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.66</u>	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.64</u>
<u>B2</u> (+++)(A)	stW.Pa.2 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.30</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.18</u>
<u>B3</u> (+++)(A)	stW.Pa.2 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.23</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.13</u>
<u>B4</u> (+++)(A)	stW.Pa.3 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.27</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.13</u>
<u>B5</u> (+++)(A)	stW.Pa.3 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.30</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.26</u>
<u>B6</u> (+)(A)	stW.Pa.4 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>1.98</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>1.97</u>
<u>B7</u> (+++)(A)	stW.Pa.4 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.22</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.23</u>
<u>B8</u> (+++)(A)	stW.Pa.5 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.45</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.34</u>
<u>B9</u> (+++)(A)	stW.Pa.5 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.42</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.26</u>
<u>C10</u> (+++)(A)	stW.Pa.6 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.33</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.41</u>
<u>C11</u> (+++)(A)	stW.Pa.7 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.48</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.14</u>
<u>C12</u> (+++)(A)	stW.Pa.7 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.57</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.35</u>
<u>D1</u> (+++)(A)	stW.Pa.8 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.40</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.31</u>
<u>D2</u> (+++)(A)	stW.Pa.8 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.37</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.31</u>
<u>D3</u> (+++)(A)	stW.Pa.9 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.29</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.28</u>
<u>D4</u> (+++)(A)	stW.Pa.9 (Standard)	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.41</u>	Pseudomonas aeruginosa	<u>2.26</u>

Anlage 9: MALDI-TOF-MS Ergebnisbericht *P. aeruginosa* + *S. aureus* (2. Schritt)

B5 (+++)(A)	BTS (BTS)	Escherichia coli	2.26	Escherichia coli	2.21
B6 (+++)(A)	P.a Mix P1.1 (Standard)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.12
B7 (+++)(A)	P.a Mix P1.1 (Standard)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.12
B8 (+++)(A)	P.a Mix P2.2 (Standard)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.08
B9 (+++)(A)	P.a Mix P2.2 (Standard)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.10
B10 (+++)(A)	S.a Mix P1.1 (Standard)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.22	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.23
B11 (+++)(A)	S.a Mix P1.1 (Standard)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.18	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.15
B12 (+++)(A)	S.a Mix P2.2 (Standard)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.09	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.06

Vorhandensein von *Pseudomonas aeruginosa* in realen Trinkwasserproben (3. Schritt)Anlage 10: *Pseudomonas aeruginosa* in Probe Nr. 23

C4 (+++)(A)	P23_D G (Standard)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.11
--------------------------------	-----------------------	-------------------------------	----------------------	-------------------------------	----------------------

Anlage 11: *Pseudomonas aeruginosa* in Probe Nr. 16

D6 (+++)(A)	P4 D (Standard)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.01
--------------------------------	--------------------	-------------------------------	----------------------	-------------------------------	----------------------

Anlage 12: *Pseudomonas aeruginosa* in Probe Nr. 19

F12 (+++)(A)	MP_P1_D (Standard)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.11
---------------------------------	-----------------------	-------------------------------	----------------------	-------------------------------	----------------------

Anlage 13: *Pseudomonas aeruginosa* in Probe Nr. 20

G2 (+++)(A)	MP_P1_D (Standard)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.19
--------------------------------	-----------------------	-------------------------------	----------------------	-------------------------------	----------------------

Anlage 14: Vorhandensein von *Pseudomonas stutzeri* im Trinkwasserproben

C9 (+++)(A)	P10 (Standard)	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2.18	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1.91
G6 (+)(A)	P52 (Standard)	Pseudomonas stutzeri	1.86	Pseudomonas stutzeri	1.83
G7 (+++)(A)	P52 (Standard)	Pseudomonas stutzeri	2.07	Pseudomonas stutzeri	1.98

Anlage 15: MALDI-TOF-MS Ergebnisbericht für *Legionella pneumophila* (1. Schritt)

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbesten Treffer)	Bewertungs-zahl
<u>B10</u> (+++)(A)	BTS (BTS)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.34</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.38</u>
<u>B11</u> (+++)(A)	stW.Lp.1 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.36</u>	Legionella pneumophila	<u>2.14</u>
<u>B12</u> (+++)(A)	stW.Lp.1 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.48</u>	Legionella pneumophila	<u>2.22</u>
<u>C1</u> (+++)(A)	stW.Lp.2 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.46</u>	Legionella pneumophila	<u>2.21</u>
<u>C2</u> (+++)(A)	stW.Lp.2 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.51</u>	Legionella pneumophila	<u>2.23</u>
<u>C3</u> (+++)(A)	stW.Lp.3 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.51</u>	Legionella pneumophila	<u>2.24</u>
<u>C4</u> (+++)(A)	stW.Lp.3 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.53</u>	Legionella pneumophila	<u>2.26</u>
<u>C5</u> (+++)(A)	stW.Lp.4 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.44</u>	Legionella pneumophila	<u>2.14</u>

Anlage 16: MALDI-TOF-MS Ergebnisbericht von der Mixkultur von *Legionella pneumophila* und *E. coli* (2. Schritt)

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbesten Treffer)	Bewertungs-zahl
<u>E12</u> (+++)(A)	BTS (BTS)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.33</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2.18</u>
<u>F1</u> (+++)(A)	Mix L.p.E.c 1 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.13</u>	Legionella pneumophila	<u>2.12</u>
<u>F2</u> (+++)(A)	Mix L.p.E.c 1 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.41</u>	Legionella pneumophila	<u>2.31</u>
<u>F3</u> (+++)(A)	Mix L.p.E.c 2 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.30</u>	Legionella pneumophila	<u>2.19</u>
<u>F4</u> (+++)(A)	Mix L.p.E.c 2 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.32</u>	Legionella pneumophila	<u>2.26</u>
<u>F5</u> (+++)(A)	Mix L.p.E.c 3 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.33</u>	Legionella pneumophila	<u>2.21</u>
<u>F6</u> (+++)(A)	Mix L.p.E.c 3 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.36</u>	Legionella pneumophila	<u>2.25</u>
<u>F7</u> (+++)(A)	Mix L.p.E.c 4 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2.19</u>	Legionella pneumophila	<u>2.13</u>

F8 (+++)(A)	Mix L.p_E.c 4 (Standard)	Legionella pneumophila	2.21	Legionella pneumophila	2.12
F9 (+++)(A)	Mix L.p_E.c 5 (Standard)	Legionella pneumophila	2.20	Legionella pneumophila	2.24
F10 (+++)(A)	Mix L.p_E.c 5 (Standard)	Legionella pneumophila	2.24	Legionella pneumophila	2.19

Anlage 17: Wachstum nur von *E. coli* auf den Membranfilter (2. Schritt)

Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungszahl	Organismus (zweitbesten Treffer)	Bewertungszahl
F11 (+++)(A)	BTS (BTS)	Escherichia coli	2.33	Escherichia coli	2.31
F12 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 1 (Standard)	Escherichia coli	2.30	Escherichia coli	2.42
G1 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 1 (Standard)	Escherichia coli	2.45	Escherichia coli	2.45
G2 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 2 (Standard)	Escherichia coli	2.42	Escherichia coli	2.32
G3 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 2 (Standard)	Escherichia coli	2.42	Escherichia coli	2.42
G4 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 3 (Standard)	Escherichia coli	2.45	Escherichia coli	2.39
G5 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 3 (Standard)	Escherichia coli	2.42	Escherichia coli	2.32
G6 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 4 (Standard)	Escherichia coli	2.44	Escherichia coli	2.36
G7 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 4 (Standard)	Escherichia coli	2.30	Escherichia coli	2.47
G8 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 5 (Standard)	Escherichia coli	2.30	Escherichia coli	2.42
G9 (+++)(A)	Mix L.p_E.c MF 5 (Standard)	Escherichia coli	2.30	Escherichia coli	2.45

Anlage 18: MALDI-TOF-MS Ergebnisbericht von Mixkultur (*L. p* + *L. bozemanii*) (2. Schritt)

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs-zahl
G10 (+++)(A)	BTS (BTS)	Escherichia coli	2.34	Escherichia coli	2.32
G11 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.DA_1 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.32	Fluoribacter bozemanæ	2.18
G12 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.DA_1 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.26	Fluoribacter bozemanæ	2.34
H1 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.DA_2 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.30	Fluoribacter bozemanæ	2.27
H2 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.DA_2 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.43	Fluoribacter bozemanæ	2.38
H3 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.DA_3 (Standard)	Legionella pneumophila	2.28	Legionella pneumophila	2.26
H4 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.DA_3 (Standard)	Legionella pneumophila	2.26	Legionella pneumophila	2.32
H5 (+++)(C)	Mix Lp.Lb.DA_4 (Standard)	Legionella pneumophila	2.39	Legionella pneumophila	2.29

H6 (+++)(C)	Mix Lp.Lb.DA_4 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.19	Fluoribacter bozemanæ	2.15
H7 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.DA_5 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.21	Fluoribacter bozemanæ	2.22
H8 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.DA_5 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.13	Fluoribacter bozemanæ	2.10
H9 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.MF_1 (Standard)	Legionella pneumophila	2.29	Legionella pneumophila	2.16
H10 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.MF_1 (Standard)	Legionella pneumophila	2.26	Legionella pneumophila	2.18
H11 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.MF_2 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.38	Fluoribacter bozemanæ	2.39
H12 (+++)(A)	Mix Lp.Lb.MF_2 (Standard)	Fluoribacter bozemanæ	2.45	Fluoribacter bozemanæ	2.42

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs-zahl
A1 (+++)(A)	BTS (BTS)	Escherichia coli	2.18	Escherichia coli	2.16
A2 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P1 (Standard)	Legionella pneumophila	2.20	Legionella pneumophila	2.24
A3 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P1 (Standard)	Legionella pneumophila	2.21	Legionella pneumophila	2.22
A4 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P2 (Standard)	Legionella pneumophila	2.21	Legionella pneumophila	2.16
A5 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P2 (Standard)	Legionella pneumophila	2.24	Legionella pneumophila	2.38
A6 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P3 (Standard)	Fluoribacter bozemanac	2.21	Fluoribacter bozemanac	2.49
A7 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P3 (Standard)	Fluoribacter bozemanac	2.26	Fluoribacter bozemanac	2.18
A8 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P4 (Standard)	Fluoribacter bozemanac	2.25	Fluoribacter bozemanac	2.23

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs-zahl
A9 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P4 (Standard)	Fluoribacter bozemanac	2.18	Fluoribacter bozemanac	2.18
A10 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P5 (Standard)	Legionella pneumophila	2.20	Legionella pneumophila	2.17
A11 (+++)(A)	Mix Lp.Lb MF_P5 (Standard)	Legionella pneumophila	2.22	Legionella pneumophila	2.24

G6 (+)(A)	P52 (Standard)	Pseudomonas stutzeri	1.86	Pseudomonas stutzeri	1.83
G7 (+++)(A)	P52 (Standard)	Pseudomonas stutzeri	2.07	Pseudomonas stutzeri	1.98

Anlage 19: *Legionella pneumophila* im Probe Nr. 9 (3. Schritt)

H11 (+++)(A)	P7 (Standard)	Legionella pneumophila	2.24	Legionella pneumophila	2.18
---------------------------------	------------------	------------------------	----------------------	------------------------	----------------------

Anlage 20: *Legionella pneumophila* im Probe Nr. 40 (3. Schritt)

<u>A6</u> (+++)(A)	P40 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2,28</u>	Legionella pneumophila	<u>2,24</u>
-----------------------	-------------------	------------------------	-------------	------------------------	-------------

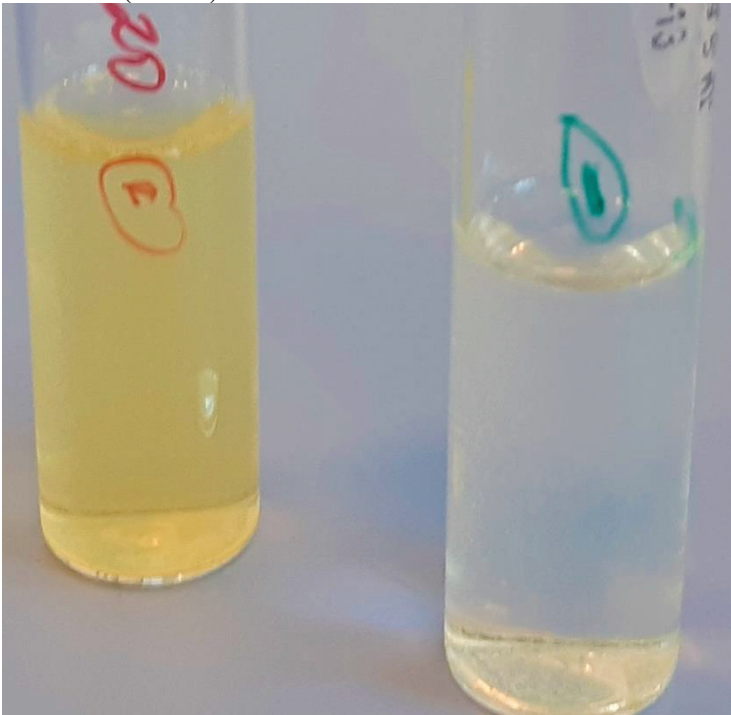
Anlage 21: *Legionella pneumophila* im Probe Nr. 33 (3. Schritt)

Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs-zahl
<u>A1</u> (+++)(A)	BTS (BTS)	<u>Escherichia coli</u>	<u>2,38</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>2,39</u>
<u>A2</u> (+++)(A)	P33 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2,09</u>	Legionella pneumophila	<u>2,08</u>
<u>A3</u> (+++)(A)	P33 (Standard)	Legionella pneumophila	<u>2,08</u>	Legionella pneumophila	<u>2,20</u>

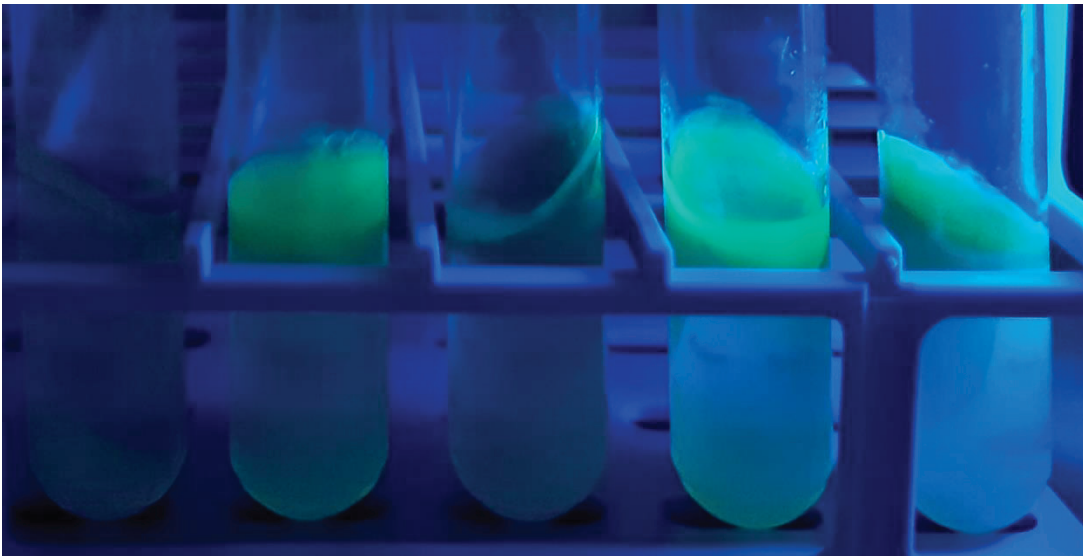
Anlage 22: *L. anisa* im Trinkwasserproben

<u>D8</u> (+++)(A)	P51 (Standard)	Legionella anisa	<u>2,18</u>	Legionella anisa	<u>2,09</u>
<u>D9</u> (+++)(A)	P51 (Standard)	Legionella anisa	<u>2,24</u>	Legionella anisa	<u>2,24</u>

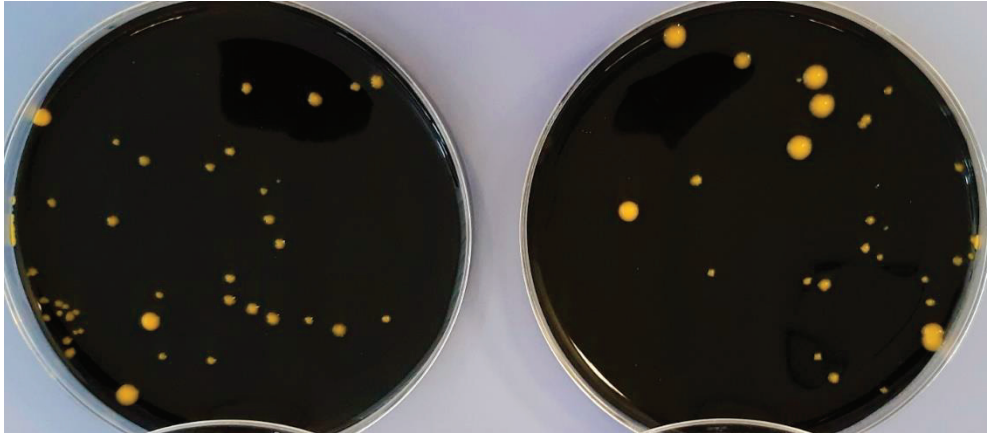
Anlage 23: Nachweis der Ammoniakbildung durch *P. fluorescens* durch die Zugabe von Nessler-Reagenz (links) und ausbleibende Reaktion durch die Abwesenheit von *P. fluorescens* (rechts)



Anlage 24: Fluoreszierende Wirkung von *P. fluorescens* in King's B Medium (2., 4., 5. Röhren von links)



Anlage 25: Gewachsene Begleitflora auf BCYE+AB-Agar im Direktansatz bei der Untersuchung auf *L. pneumophila*



Anlage 26: Aufgetragener Analyt (Zellen) auf den Positionen A 2 bis 5 und aufgetragener BTS auf der Position A 1 des target-spots

