



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Bachelorarbeit

**Fakultät Life Sciences
Studiendepartment Biotechnologie**

**Nachweis von *Pseudomonas* Spezies und anderen
Non-Fermentern in Trinkwasserproben mit
anschließender Identifizierung mittels
MALDI-TOF-MS**

**Elisabeth Engler-Hüsich
Matrikelnummer: 2097312**

19. März 2015

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACN	Acetonitril
ATP	Adenintriphosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Cytosin
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EN	European Standards
EtBr	Ethidiumbromid
Fe	Eisen
G	Guanin
g	Gramm
GKZ	Gesamtkeimzahl
HCCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
ISO	International Organization for Standardization
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
kJ	Kilojoule
l	Liter
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry
ml	Milliliter

μl	Mikroliter
mm	Millimeter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
Mn	Mangan
μs	Mikrosekunde
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n. EP	nach der European Pharmacopoeia
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PH. Eur.	European Pharmacopoeia
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
rDNA	Ribosomale DNA
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
S	Sedimentationskoeffizient
s	Sekunde
T	Thymin
TBA	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ΔG	Änderung der freien Enthalpie
%	Prozent
(w/v)	weight per volume (Masse je Volumenanteil, meist in Prozent)

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
2 Theoretische Grundlagen	6
2.1 Die Bakteriengruppe der Non-Fermenter.....	6
2.2 Die Trinkwasserverordnung 2001 und die Empfehlungen des Umweltbundesamtes	9
2.3 Die Trinkwasserinstallation als Lebensraum von Mikroorganismen	10
2.4 Die Nährmedienauswahl	12
2.5 Die Identifizierung von Mikroorganismen.....	14
2.5.1 Die klassischen Methoden.....	14
2.5.2 Die MALDI-TOF-MS	15
2.5.3 Die molekularbiologische Methode	17
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Geräte	20
3.1.2 Nährmedien	20
3.1.3 Chemikalien	22
3.1.4 Weiteres	24
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Die Probeentnahme	25
3.2.2 Der Probenansatz.....	26
3.2.3 Die Identifizierung von Kolonien mittels MALDI-TOF-MS.....	29
3.2.4 Die Identifikation ausgewählter Kolonien mittels 16S-rDNA-Sequenzierung	29
3.2.5 Die Stammhaltung.....	32
3.2.6 Die photometrische Vermessung von Proben	32
3.2.7 Die Prozessoptimierung der Untersuchungsmethodik anhand ausgewählter Pseudomonaden.....	32
3.2.8 Die Prozessoptimierung der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-MS	33
4 Ergebnisse	35
4.1 Die Diversität nachgewiesener Non-Fermenter in Trinkwasserproben	35
4.2 Der Anteil der Non-Fermenter an der Gesamtkeimbelastung.....	40
4.3 Die Gesamtkeimzahlen bei unterschiedlichen Probeentnahmearten.....	42

4.4 Der Wachstumsvergleich der Non-Fermenter auf ausgewählten Nährmedien	44
4.5 Die Prozessoptimierung der Untersuchungsmethodik	47
4.6 Die Prozessoptimierung der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-MS	49
5 Diskussion	52
5.1 Die Diskussion der Diversität nachgewiesener Non-Fermenter	52
5.2 Die Diskussion des Anteils der Non-Fermenter an der Gesamtkeimbelastung	58
5.3 Die Diskussion der Gesamtkeimzahlen bei unterschiedlichen Probeentnahmearten	59
5.4 Die Diskussion des Wachstumsvergleichs der Non-Fermenter auf ausgewählten Nährmedien	60
5.5 Die Diskussion der Prozessoptimierung der Untersuchungsmethodik	61
5.6 Die Diskussion der Prozessoptimierung der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-MS	62
Zusammenfassung	65
Abstract	67
Literaturverzeichnis	68
Abbildungsverzeichnis	71
Erklärung	72
Anhang	73

1 Einleitung

Trinkwasser ist das wichtigste Lebensmittel des Menschen. Dabei ist der prozentuale Anteil des gesamten Wassers auf der Erde, der tatsächlich zum Trinken geeignet ist, gering. Lediglich 2,5 % des Wassers sind Süßwasser, von dem wiederum nur etwa 1 % als Trinkwasser genutzt werden kann. Es ist daher unbedingt notwendig, dieses wertvolle Gut zu schützen. Diese Tatsache wird durch die Krankheitsausbrüche verdeutlicht, die auch heute noch durch verunreinigtes Trinkwasser verursacht werden. So infizieren sich derzeit weltweit jährlich zwischen 3 und 5 Millionen Menschen mit *Vibrio cholera*, wovon zwischen 100000 und 120000 jährlich sterben [Rieth, 2012].

Eine regelmäßige Überwachung der Trinkwasserqualität ist eine wichtige Maßnahme, um die Bevölkerung vor Schäden durch dessen Genuss zu bewahren. Diese Überwachung wird in Deutschland unter anderem durch die Trinkwasserverordnung geregelt. Durch diese Verordnung wird unter anderem festgelegt, welche mikrobiologischen Anforderungen an das Trinkwasser gestellt und wie diese überprüft werden. Dabei werden in der Verordnung auch klare Grenzwerte bezüglich der Keimbelastung des Trinkwassers genannt [TrinkwV 2001, 2013].

Die Untersuchung befasst sich neben den chemischen Parametern (hierzu zählen beispielsweise Blei und Kupfer) mit den mikrobiologischen Parametern. Dabei handelt es sich um Mikroorganismen, die potentielle Krankheitsüberträger auf den Verbraucher sind. Beispiele für solche mikrobiologischen Parameter sind *E.Coli* und Enterokokken. Des Weiteren werden sogenannte Indikatorparameter untersucht. Diese Parameter sind ein Indiz dafür, dass die Trinkwasserversorgung einen Mangel hat, sie haben aber keine direkte gesundheitliche Relevanz [Mendel, 2001]. Es kann sich dabei um für den Menschen ungefährliche Mikroorganismen handeln, die als Marker für die Keimlast an potentiell pathogenen Mikroorganismen fungieren. Unter pathogenen versteht man die Eigenschaft, andere Organismen krank zu machen [Rehm, 2008]. Ist deren Anzahl gering, so wird dies mit einem geringen Vorkommen an pathogenen Mikroorganismen gleichgesetzt. Beispiele für solche Indikatorparameter sind der Aluminiumgehalt, die Anzahl an coliformen Bakterien sowie die Gesamtkeimzahlen nach einer Inkubation bei 22° C sowie nach einer Inkubation bei 36° C [Auckenthaler, 2003]. Zum anderen werden bekannte pathogene Mikroorganismen (als spezielle Indikatorparameter) direkt nachgewiesen. Beispiele für solche Mikroorganismen sind *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa*. Beide Bakterienarten kommen in der Umwelt ubiquitär (allgegen-

wärtig) vor. Unter bestimmten Bedingungen können sie beim Menschen jedoch pathogen wirken. So kann *Pseudomonas aeruginosa* bei Menschen mit Mukoviszidose (auch Zystische Fibrose (CF) genannt) zu chronischen Infektionen der Lungen führen [Rehm, 2008]. Der Mikroorganismus stellt vor allem für Kleinkinder, ältere, schwangere oder immungeschwächte Menschen eine Gefahr dar. Für den Grenzwert von *Pseudomonas aeruginosa* wird die sogenannte Empfehlung des Umweltbundesamtes herangezogen. Dort wird empfohlen, dass eine Untersuchung auf *Pseudomonas aeruginosa* bei Verdacht auf dieses Bakterium unbedingt durchgeführt werden sollte. Der Grenzwert, der dabei vom Umweltbundesamt empfohlen wird, beträgt 0 Koloniebildende Einheiten (KBE) in 100 ml [Umweltbundesamt, 2002].

Die routinemäßigen Trinkwasseruntersuchungen befassen sich lediglich mit dem potentiell pathogenen Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*. Im Wasser sind allerdings noch viele weitere Bakterien vertreten. Beispiele für solche Bakterien sind Flavobakterien, Chromobakterien, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* und weitere Pseudomonadenarten. Die meisten dieser Mikroorganismen sind nachweisbar nicht humanpathogen [Rieth, 2012]. Sie besitzen die Fähigkeiten, sich vielen anspruchsvollen biologischen Nischen anzupassen, teilweise hartnäckige chemische Verbindungen abzubauen sowie auch Biopolymere zu synthetisieren [Rehm, 2008]. Es handelt sich bei diesen Gattungen um Non-Fermenter, also Bakterien, die Glukose nicht fermentativ, sondern auf anderen Stoffwechselwegen nutzen, oder komplett andere Kohlenstoffquellen verwerten. Sie sind vor allem in Böden anzutreffen. Insbesondere die Gattung *Pseudomonas* ist dabei von Interesse, da sie zum einen eine hohe katabolische Diversität aufweisen (über 150 organische Verbindungen können als Kohlenstoffquelle genutzt werden) und zum anderen einen hohen potentiellen Nutzen für die Landwirtschaft, Biotechnologie und den Umweltschutz haben [Ottow, 2011].

Diese Arbeit widmet sich der Fragestellung, wie groß die Vielfalt an Non-Fermentern in Trinkwasserproben ist, die durch eine Untersuchung angelehnt an die Trinkwasserverordnung nicht nachgewiesen werden würden. Im Rahmen der Arbeit werden verschiedene Nährmedien eingesetzt und mit den bei den Untersuchungen angelehnt an die Trinkwasserverordnung eingesetzten Nährmedien verglichen. Auch der Anteil der ubiquitären Mikroorganismen an der Gesamtkeimbelastung des Trinkwassers wird untersucht.

Die Probeentnahme erfolgt bei freiwilligen Probedeilnehmern an verschiedenen Standorten in der Stadt Hamburg, um einen Vergleich des Vorkommens bestimmter Non-Fermenter zwischen den Standorten sowie zwischen Gebäudearten zu ermöglichen.

Die Ergebnisse bei verschiedenen Probeentnahmearten nach DIN 19458 werden verglichen, um Unterschiede zwischen diesen zu ermitteln

In einer Prozessoptimierung werden die verwendeten Nährmedien sowie die genutzten Inkubationsbedingungen für Pseudomonaden untersucht und die Probenvorbereitung für die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS validiert.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, zu zeigen, dass eine Vielzahl ubiquitärer Mikroorganismen unser Trinkwasser besiedelt. Wenn gezeigt wird, dass Non-Fermenter einen großen Teil der Gesamtkeimbelastung des Trinkwassers ausmachen, unabhängig von der gewählten Probeentnahmeart, lässt sich dadurch der Rückschluss ziehen, dass Non-Fermenter im Gegensatz zu vielen anderen Trinkwasserbakterien nicht nur das Stagnationswasser in den Leitungen besiedeln, sondern im gesamten Leitungssystem und in den Versorgungsleitungen der Stadt vertreten sind.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Bakteriengruppe der Non-Fermenter

Zu der Gruppe der Non-Fermenter zählen neben Pseudomonaden die Gattungen *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Acidovorax*, *Brevibacterium*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas* und *Aeromonas*. Diese gramnegativen Stäbchen und Kokken sind obligat aerob und kommen ubiquitär in der Umwelt und vor allem im Wasser vor. Non-Fermenter sind in der Lage viele verschiedene Enzyme zu produzieren und mit diesen eine Vielzahl von Substanzen als Nährstoffe zu nutzen [Rehm, 2008]. Dadurch haben sie nur geringe Nährstoffansprüche und können sich den verschiedensten Umweltbedingungen anpassen [Steinmetz, 2012].

Eine weitere wichtige Gemeinsamkeit aller Non-Fermenter ist, dass sie nicht in der Lage sind, Glukose als Kohlenstoffquelle fermentativ, also durch Gärung, zu nutzen. Der Abbau der Glukose erfolgt bei Non-Fermentern meist auf dem sogenannten Entner-Doudoroff-Weg (vergleiche Abbildung 1). Dabei wird die Glukose zunächst zu Glucose-6-phosphat dehydrogeniert (1). Nach einer weiteren Umwandlung zu 6-Phosphogluconat (2) wird unter Wasserabspaltung durch die 6-Phosphogluconat-Dehydratase 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG) gebildet (3). Durch die spezifische KDPG-Aldolase wird dies zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat gespalten (4). Letzteres wird dann durch eine Glykolyse zu Pyruvat oxidiert. Die bei den Dehydrogenisierungsschritten abgespaltenen Wasserstoffatome (H^+) werden als Reduktionsäquivalente bezeichnet [Fuchs, 2007].

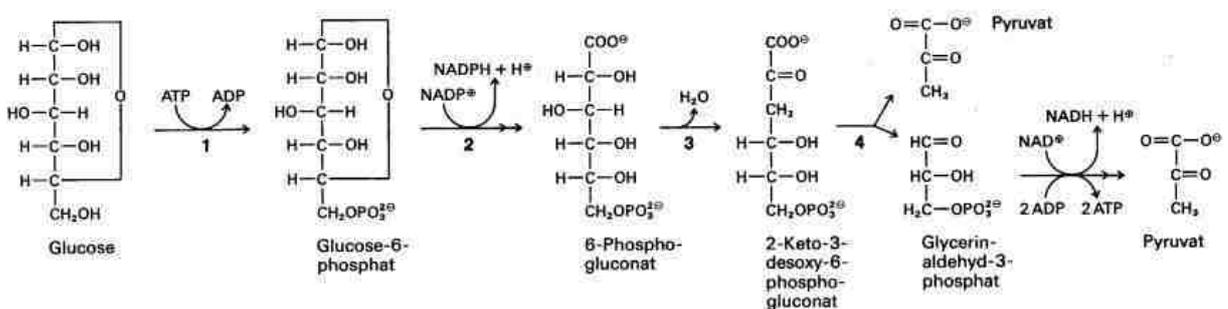


Abbildung 1: Darstellung des Entner-Doudoroff-Weges, über den der Abbau eines Moleküls Glukose in zwei Moleküle Pyruvat stattfindet [Sauermost, 2002].

Durch die Stoffumwandlungen wird Energie freigesetzt. Handelt es sich hierbei um einen größeren Betrag an Energie ($\Delta G = -40$ bis -60 kJ/mol), so wird diese Energie durch die Substratphosphorylierung in Form von ATP gespeichert. Der größte Teil der Energie wird aller-

dings (in Form der Reduktionsäquivalente) in der Elektronentransportphosphorylierung der Atmungskette in ATP überführt [Fuchs, 2007].

Viele Non-Fermenter sind neben der aeroben Atmung auch zur anaeroben Atmung fähig. In diesem Fall dient statt Sauerstoff dann beispielsweise Nitrat, Mn (IV) und Fe (III) als Elektronenakzeptor [Fuchs, 2007].

Die Gattung *Pseudomonas*

Pseudomonas ist eine Gattung der zuvor beschriebenen Gruppe der Non-Fermenter. Taxonomisch lässt sich die Gattung *Pseudomonas* der Familie der Pseudomonadaceae zuordnen. Dies ist wiederum eine Untergruppe der Klasse der Gammaproteobacteria. Ihre Zellform ist gerade oder schwach gekrümmt und sie sind 0,5-0,8 x 1,5-3,0 µm groß. Die meisten Pseudomonadenarten sind polar ein- oder mehrfach begeißelt, wodurch ihnen eine aktive Fortbewegung möglich ist. Die Energiegewinnung erfolgt in der Regel durch einen aeroben Atmungsstoffwechsel. Einige Arten sind fakultativ anaerob und können bei Sauerstoffmangel zu einer Nitratatmung übergehen. Durch diese katabolische Vielfalt können sich Vertreter dieser Gattung vielen Umweltbedingungen anpassen [Ottow, 2011].

Die Gattung *Pseudomonas* wächst in mineralischer Nährlösung mit Ammonium oder Nitrat als Stickstoffquelle sowie einer organischen Verbindung als Energie- und Kohlenstoffquelle, wobei eine einzige Kohlenstoffquelle ausreichend ist. In manchen Fällen können über 150 verschiedene organische Verbindungen als solch eine Quelle zusammen mit Nitrat oder Ammonium als Stickstoff-Quelle verwertet werden [Ottow, 2011]. Einige Arten können neben organischen Verbindungen (chemoorganotroph) auch anorganische Verbindungen (chemolithotroph) wie gasförmigen Wasserstoff und Kohlenstoffmonoxid als Elektronendonatoren verwenden. Zucker werden bei Pseudomonaden im zuvor beschriebenen Entner-Doudoroff-Weg abgebaut [O’Learey, 2000].

Das Wachstum ist in den meisten Fällen nur oberhalb eines pH-Wertes von 4,5 möglich. Die meisten Pseudomonadenarten sind mesophil (Temperaturoptimum bei 20-30° C), es gibt allerdings auch einige psychrophile (Temperaturoptimum bei 15° C und weniger) Formen. Manche Arten bilden gelbe, grüne, blaue oder rote, teilweise wasserlösliche und unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von etwa 254 nm fluoreszierende Farbstoffe wie Pyocyanin und Fluorescein. Die letztere Eigenschaft der Fluoreszenz führte zu der taxonomischen Einordnung in die sogenannte Fluoreszenzgruppe [O’Learey, 2000].

Einige Arten sind potentielle Krankheitserreger in Pflanzen, Tieren und Menschen. Beim Menschen gehören sie zur normalen Bakterienflora der Haut und des Mundes [Rissland, 2015].

Die Spezies *Pseudomonas aeruginosa*

Als wichtigster Vertreter der Gattung *Pseudomonas* sei *Pseudomonas aeruginosa* genannt (vergleiche Abbildung 2). Es handelt sich dabei um einen opportunistischen Krankheitserreger nosokomialer, also im Krankenhaus erworbener, Infektionen. Dies liegt an seiner Affinität zu feuchten Milieus, in denen nur Spuren von Nährstoffsubstraten vorhanden sein müssen (beispielsweise auch Desinfektionsmitteln). Das Bakterium kann so nicht nur die wasserführenden Leitungen eines Krankenhauses sondern auch Schlauchsysteme oder bestimmte Teile medizinischer Geräte besiedeln [Steinmetz, 2012].

Bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen und Abwehrschwächen können Lungenentzündungen (vor allem bei Patienten mit Mukoviszidose), Wundinfektionen (einschließlich von Brandwunden), Septikämien, Endokarditiden, Infektionen des Urogenitaltraktes, der Gallenwege und der Augen, sowie neonatale Infektionen hervorgerufen werden. Dabei weisen diese potentiellen Erreger eine natürliche Antibiotikaresistenz auf. Außerhalb von Krankenhäusern und anderen öffentlichen Einrichtungen haben beispielsweise Menschen, die zu Hause ambulant versorgt werden ein erhöhtes Risiko, an einer Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* zu erkranken [Rissland, 2015].



Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* [Fuchs, 2007].

2.2 Die Trinkwasserverordnung 2001 und die Empfehlungen des Umweltbundesamtes

Durch die Trinkwasserverordnung wird sichergestellt, dass das Trinkwasser für den Menschen bei Gebrauch oder Verzehr keine gesundheitsschädlichen Auswirkungen durch Verunreinigungen hat. Die gesetzliche Grundlage hinter der Trinkwasserverordnung ist das Infektionsschutzgesetz. Das Ziel dieses Gesetzes ist es, Krankheitsausbrüche zu verhindern, Infektionen zu erkennen und eine Weiterverbreitung dieser zu verhindern [IfSG, 2013]. In dem Gesetz wird die Sicherung und Überwachung der Trinkwasserqualität festgelegt. Das Bundesministerium für Gesundheit und das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft haben zusätzlich die Trinkwasserverordnung 2001 (TrinkwV 2001) herausgegeben. Ein wichtiger Bestandteil dieser sind die mit ihr verbundenden nationalen und internationalen Normen, die die Probeentnahme, die Wasseraufbereitung sowie die Beschaffenheit der Trinkwasserinstallation festlegen [TrinkwV 2001, 2013]. Im Rahmen der Verordnung werden bestimmte mikrobiologische Vorgaben in Form von Grenzwerten an Bakterienkonzentrationen gemacht, die nicht überschritten werden dürfen. Dies gilt auch für die sogenannten Indikatorparameter, die stellvertretend für eine Gesamtkeimbelastung des Wassers stehen. So liegen die Grenzwerte für die Koloniezahlen bei 22° C als auch bei 36° C als Indikatorparameter bei einem Wert von 100 KBE je untersuchtem Milliliter Probe [TrinkwV 2001, 2013].

Neben der gesetzlichen Grundlage spricht das Umweltbundesamt Empfehlungen aus, die die Verordnungen und Gesetze mit aktuellen wissenschaftlichen Untersuchungen verknüpfen. Durch das Umweltbundesamt (UBA) kann so sicher gestellt werden, dass die anerkannten Regeln der Technik gemäß § 4 Absatz 1 TrinkwV eingehalten werden, ohne, dass ein großer Verwaltungsaufwand für die Änderung einer Verordnung oder eines Gesetzes nötig wäre [Umweltbundesamt, 2002]. Der Grenzwert für die Spezies *Pseudomonas aeruginosa* wird in der Empfehlung des Umweltbundesamtes auf 0 KBE in 100 ml untersuchter Wasserprobe festgelegt. Bei Verdacht auf *Pseudomonas aeruginosa* sollen in jedem Fall routinemäßige Untersuchungen des Trinkwassers erfolgen [Umweltbundesamt, 2002].

2.3 Die Trinkwasserinstallation als Lebensraum von Mikroorganismen

Die Trinkwasserinstallation wird in § 3 Absatz 3 der Trinkwasserverordnung 2001 als die Gesamtheit der Rohrleitungen, Armaturen und Apparate wie beispielsweise Filtrationsanlagen, die zwischen dem Übergangspunkt vom Wasserversorger an den Nutzer und dem Entnahmeventil liegen, bezeichnet [TrinkwV 2001, 2013]. Dabei ist der Übergangspunkt zwischen Wasserversorger und Nutzer der zentrale Hausanschluss, genauer gesagt die Hauptabsperrvorrichtung [AVBWasserV, 2014], im Keller der meisten Gebäude. In der Abbildung 3 wird dieser Übergangspunkt durch die gestrichelte senkrechte Linie markiert.

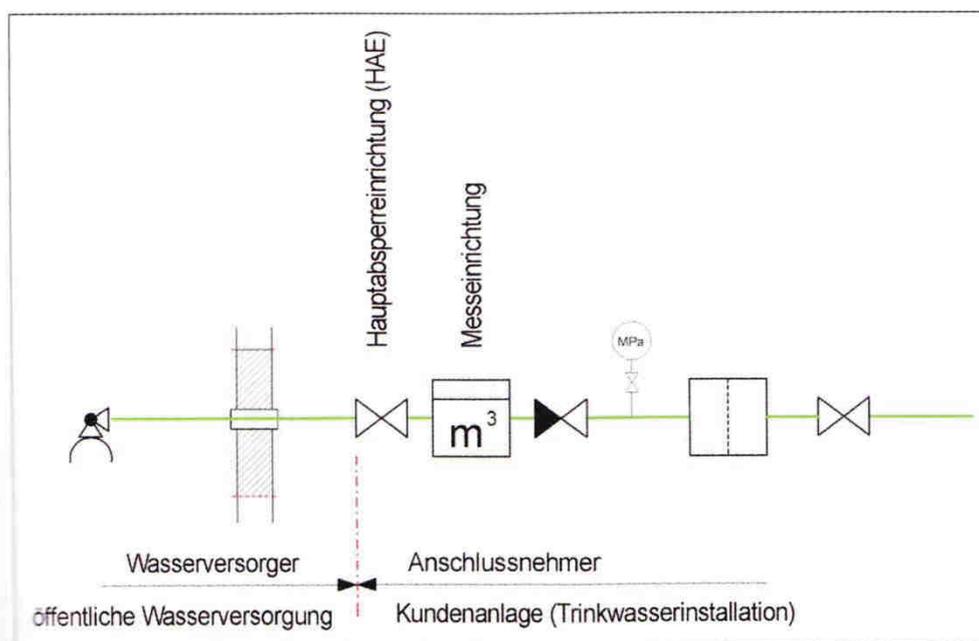


Abbildung 3: Der Beginn der Trinkwasserinstallation [Zentralverband Sanitär Heizung Klima, 2011]

Die Konzentrationen an Mikroorganismen und Stoffen im Trinkwasser überschreiten in der öffentlichen Wasserversorgung nur selten die vorgegebenen Grenzwerte [Bundesministerium für Gesundheit, Umweltbundesamt, 2011]. Diese Qualität sollte innerhalb des Gebäudes, in welches das Wasser eingespeist wird, erhalten bleiben. Die Vermehrung von Mikroorganismen kann dabei durch bestimmte Rahmenbedingungen innerhalb der Installation gefördert werden. So kann der unsachgemäße Gebrauch des Leitungssystems durch Nichtbenutzung (mangelnde Zirkulation) sowie zu niedrige Temperaturen in dem gesamten für die Warmwasserzufuhr zuständigen Bereich der Trinkwasseranlage zu begünstigenden Faktoren für die Vermehrung von Mikroorganismen werden [Krysch, 2015].

Ein kompletter Wasseraustausch durch Zirkulation soll gemäß DIN EN 806-5 alle sieben Tage in allen Teilstrecken sowie im Trinkwassererwärmer erfolgen. Die Rohrnennweiten sollen gemäß DIN 1988-300 möglichst geringe Dimensionierungen aufweisen, um die Fließgeschwindigkeiten in den Rohren und somit die Durchmischung zu erhöhen [Arens, 2014].

Der Biofilm

In den Leitungen kann sich bei Benutzung ein meist geruchloser, schleimiger Film an den Innenwänden bilden. Begünstigende Faktoren für diese sogenannten Biofilme sind raue Oberflächen, Totenden in den Leitungsnetzen sowie eine auf das Wachstumsoptimum der Bakterien (20°-30° C) erhöhte Temperatur.

Biofilme sind Zusammenschlüsse vieler verschiedener Mikroorganismen, die sowohl an den Oberflächen, als auch aneinander haften und mehr als 100 µm dick werden können. Begeißelte Bakterien verlieren in ihnen die Fähigkeit zur aktiven Fortbewegung. Gebildet wird der Biofilm aus Polysacchariden, Proteinen und anderen Polymeren, die durch die Bakterien selber ausgeschieden werden [Rieth, 2012].

Es ist schwierig, einen Biofilm durch chemische Desinfektion zu entfernen. Die eingesetzten Konzentrationen und die Einwirkzeiten müssen dementsprechend erhöht werden. Der sicherste Weg, Biofilme zu entfernen, ist auf die mechanische Art mit einem sogenannten Molch (vergleichbar mit einem Softball), der den Biofilm einfach abwischt [Rieth, 2012].

Ohne Entfernung der Biofilme können sich immer wieder Bakterien von ihnen lösen und in das Trinkwasser gelangen. Somit stellen sie einen Faktor für das Auftreten von Mikroorganismen im Trinkwasser dar [Auckenthaler, 2003].

Ein Bauteil, welches für Biofilmbildung anfällig ist, ist der sogenannte Perlator (vergleiche Abbildung 4). Darunter versteht man einen Strahlregler, der in den meisten Haushalten am Auslauf der Wasserhähne montiert wird. Dieses Bauteil ist praktisch permanent mit dem in der Leitung stehenden Stagnationswasser in Kontakt, wodurch eine Vermehrung von Mikroorganismen begünstigt wird.



Abbildung 4: Darstellung eines Perlators. Links ist das Metallteil zu sehen, in welchem die Strahlreglereinheit (rechts im Bild) liegt. Das Wasser würde in dieser Darstellung von oben nach unten durch den Perlator strömen [Eigenes Foto].

2.4 Die Nährmedienauswahl

Nährmedien bestehen meist zu 95 % aus Wasser, weitere 1-3 % bilden Proteine (meist in Form von Peptonen). Den Rest stellen anorganische Salze, Zucker (als Kohlenstoffquelle), Vitamine sowie selektiv wirkende Substanzen dar. Ein Minimalnährmedium enthält chemisch definierte anorganische Salze und meist Glukose als einzige Kohlenstoffquelle. Das Minimalnährmedium kann durch Zugabe von Peptonen, Aminosäuren und weiterer Bestandteile komplexer gestaltet werden [Rieth, 2012].

Bei allen drei **Selektivnährmedien** handelt es sich um Nährmedien mit einem geringen Nährstoffanteil, was für die Nährstoffansprüche der Pseudomonaden ideal ist (vergleiche Tabelle 1). Die Unterschiede zwischen den Nährmedien beruhen auf den zugegebenen Hemmstoffen, die ein Wachstum einer Begleitflora verhindern sollen, sowie auf unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Für die genauen Wirkmechanismen der Hemmstoffe siehe Tabelle 2. Das Cetrimid-CN-Nährmedium wird gemäß der Trinkwasserverordnung zum Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt [OXOID, Pseudomonas Cetrimid Selektivnährboden, 2015], während das Cetrimid n. EP-Nährmedium für ein etwas breiteres Spektrum an Pseudomonaden eingesetzt werden kann [Heipha, Cetrimide Agar-LI acc. EP/USP, 2015]. Das CFC-Nährmedium wird für einen Nachweis der gesamten Gattung *Pseudomonas* in Lebensmitteln eingesetzt und deckt somit ein deutlich breiteres Spektrum ab [OXOID, Pseudomonas-CFC-Selektivnährboden, 2015].

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die Selektivnährmedien, die für einen Nachweis von Pseudomonaden eingesetzt werden können. Die Angaben beziehen sich auf die Herstellerangaben [OXOID, Pseudomonas Cetrimid Selektivnährboden, 2015; Heipha, Cetrimide Agar-LI acc. EP/USP, 2015; HIMEDIA, 2015; OXOID, Pseudomonas-CFC-Selektivnährboden, 2015] .

Nährmedium:	Cetrimid-CN-Agar	Cetrimid n. EP-Agar	CFC-Agar
Förderung von	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas fluorescences</i>	<i>Pseudomonas species</i>
Hemmung von	Begleitflora, auch andere Pseudomonaden	Begleitflora, auch andere Pseudomonaden	Begleitflora
Pigmentbildung	Pyocyanin, Pyoverdin	Pyocyanin, Pyoverdin	Pyocyanin, Pyoverdin
Proteine	26,000 g/l	20,000 g/l	26,000 g/l
Salze	11,400 g/l	11,400 g/l	11,400 g/l
Cetrimid	0,200 g/l	0,300 g/l	0,010 g/l
Nalidixinsäure	0,015 g/l	nicht enthalten	nicht enthalten
Fusidinsäure	nicht enthalten	nicht enthalten	0,010 g/l
Cephalosporin	nicht enthalten	nicht enthalten	0,050 g/l
Einsatz	Trinkwasserproben gemäß TrinkwV	nicht-sterile pharmazeutische Produkte nach PH. Eur.	Lebensmittel

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht über die Hemmstoffe, die in den Selektivmedien enthalten sind [Yonezawa, 1995; OXOID, Pseudomonas Selektivnährböden, 2015].

Hemms toff	Hemmung von	Hemmmechanismus
Cetrimid	Begleitflora (alle Bakterien außer <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Stickstoff und Phosphor werden aus der Bakterienzelle freigelassen
Nalidixinsäure	Gramnegative (und teilweise grampositive) Bakterien	Hemmt in Bakterien das Enzym Gyrase
Fucidin	Staphylokokken, Neisserien, Clostridien und Corynebakterien	antibiotisch, verhindert Proteinbiosynthese
Cephalosporin	Grampositive Bakterien	antibiotisch, Hemmung des Zellwandaufbaus

Ein Nährmedium, das das Wachstum eines breiten Spektrums an Bakterien in Wasserproben gewährleistet, ist das **R2A-Nähragar**. Durch die niedrige Nährstoffkonzentration können die typischen Wasserbakterien gut wachsen. Neben einem Anteil an Proteinen von 1 % sind 0,5 % Glukose und 0,5 % Hefeextrakt enthalten. Die Salzkonzentration ist mit 0,324 % geringer als bei allen anderen aufgeführten Nährmedien. Die im Nährmedium enthaltene Stärke und das Natriumpyruvat verhindern, dass langsamer wachsende Bakterien von schneller wachsenden überwuchert werden. Dabei bewirkt die Stärke, dass sich beschädigte Organismen schneller erholen, indem sie giftige Nebenprodukte des Stoffwechsels aufnimmt. Das Natriumpyruvat beschleunigt die Erholung von gestressten Zellen, indem es das durch oxidativen Stress von Bakterienzellen gebildete und zellgiftige Wasserstoffperoxid neutralisiert. So ermöglicht dieses Nährmedium, auch zum Beispiel durch Chlor beschädigte Bakteri-

en zu zählen [Carl Roth, 2015]. Im Rahmen der Untersuchungen wird das Nährmedium eingesetzt, um allen Non-Fermentern in den Trinkwasserproben ein Wachstum zu ermöglichen und so einen Vergleich zu dem bei einer Untersuchung angelehnt an die Trinkwasserverordnung eingesetzten Cetrimid-CN-Nährmedium zu ermöglichen.

Der **DEV-Nähragar** ist mit seinem Anteil an Fleischpepton und Fleischextrakt von je 1% optimal um vielen Bakterien in Wasserproben ein gutes Wachstum zu ermöglichen. Dieses Nährmedium hat keinen hohen Selektivitätsgrad. Das bedeutet, dass es nicht spezifisch für eine Bakterienart ist. Die Bestandteile Fleischpepton (peptisch verdautes Tiergewebe) und Fleischextrakt dienen dabei als Nährstoff- (Protein-), das Natriumchlorid (0,5 %) als Salzquelle für die Zellen [Heipha, DEV-Nähragar, 2015]. Das Nährmedium wird eingesetzt, um die Gesamtkeimzahl in Trinkwasserproben zu ermitteln sowie, um Reinkulturen herzustellen.

Bei dem **CASO-Nähragar** handelt es sich um ein universelles Komplexnährmedium, das einem breiten Spektrum von Bakterien das Wachstum ermöglicht. Eine Differenzierung von Bakterien ist durch dieses Nährmedium nicht möglich. Die Mischung aus Casein, Sojamehl und Pepton als Nährstoff- und Energiequelle bietet vor allem anspruchsvollen Bakterien optimale Wachstumsbedingungen. Unter anspruchsvollen Bakterien sind solche zu verstehen, die eine Vielzahl an Ergänzungsstoffen zum Wachstum benötigen. Das Nährmedium ist zur Anzucht sowie zur Isolierung von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen geeignet [Heipha, CASO-Agar, 2015]. Während der Untersuchung wird es eingesetzt, um Reinkulturen herzustellen.

2.5 Die Identifizierung von Mikroorganismen

2.5.1 Die klassischen Methoden

Zur Identifizierung von Mikroorganismen werden unter anderem nichtselektive Nährböden eingesetzt. Eine Auswertung der gewachsenen Kolonien erfolgt dann zunächst visuell (Zellform, Sporenbildung). Im nächsten Schritt kann eine Gram-Färbung zur Ermittlung des Gram-Typs erfolgen. Nährmedien mit Hemmstoffen können genutzt werden, um Bakterien, die gegen diese Hemmstoffe resistent sind, nachzuweisen.

Eine weitere wichtige Methode stellt die Charakterisierung des Energiestoffwechsels dar. Dabei kann neben dem aeroben und anaeroben Wachstum auch beispielsweise die Reduktion von Nitrat eine Einordnung des Bakteriums in eine Gattung erleichtern [Fuchs, 2007].

Eine Analyse des Spektrums an genutzten Substraten, „Bunte Reihe“ genannt, stellt eine weitere Möglichkeit der Einteilung dar. So lassen sich auch Enzymaktivitäten und die Bildung von Stoffwechselprodukten nachweisen [Steinbüchel, 2013].

Der Nachweis von Cytochrom *c* kann durch den sogenannten Oxidase-Test erfolgen. Das Cytochrom *c* ist an der Membranaußenseite von Bakterienzellen lokalisiert und für Farbstoffe zugänglich. Bei reduzierten Farbstoffen wie der farblosen Leukoform von Tetramethylparaphenyendiamin (TMPD) kann es zur farbigen (blauen) Form oxidieren und ist somit Oxidase-positiv [Fuchs, 2007].

Katalase ist ein Enzym, das eine Schutzwirkung gegenüber Sauerstoff ausübt. Es wandelt das Sauerstoff-Derivat Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff um. Ein Nachweis auf das Vorhandensein dieses Enzyms erfolgt, indem wenige Tropfen Wasserstoffperoxid-Lösung auf eine Bakterienkolonie getropft werden. Bei Katalase-positiven Bakterien schäumt die Lösung aufgrund der Sauerstoffbildung nach wenigen Sekunden stark auf [Steinbüchel, 2013].

2.5.2 Die MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS wird eingesetzt, um Bakteriengattungen und –spezies durch eine Bestimmung der Masse ihrer Proteine und Peptide zu identifizieren. MALDI-TOF-MS steht für Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation – Time of Flight – Mass Spectrometry [Schubert, 2011].

Es handelt sich um ein massenspektrometrisches Verfahren, bei dem der Analyt auf einem Feld eines Metallträgers in eine Matrix eingebettet wird. Der Metallträger wird auch als Target bezeichnet und hat 96 dieser Felder, die sogenannten Spots. Für das Verfahren muss nur wenig Probenmaterial (10^4 bis 10^6 KBE) verwendet werden. Während der Verdunstung des Lösemittels ko-kristallisiert die Matrix mit dem Analyt. Der Metallträger wird anschließend in die Messkammer des Massenspektrometers eingesetzt und der Analyt daraufhin mit kurzen Laserimpulsen angeregt (meist UV bei 337 nm mit 6x40 Laserschüssen je Feld, also 240 Laserschüssen je Targetfeld). Dadurch verdampft die Matrix explosionsartig und reißt die Analytmoleküle in ionisierter Form mit sich. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und gelangen zum Detektor. Es erfolgt eine Trennung der Teilchen nach dem Verhältnis von Masse zu Ladung mit proportionaler Teilchengeschwindigkeit, die durch eine massenspektrometrische Analyse untersucht werden kann. Durch genaue Messung der Zeitspanne, die ein Ion benötigt, um die feldfreie, definierte Driftstrecke zwischen Beschleunigungselektrode und dem Detektor zu durchfliegen, ist die exakte Bestimmung der molekularen Masse des Biomoleküls und somit ein Erstellen eines spezifischen Spektrums möglich

(vergleiche Abbildung 5). Die gemessenen Flugzeiten liegen dabei im μs -Bereich. Für die Identifizierung relevant sind vor allem die Spektren positiv geladener ribosomaler Proteine zwischen 2 und 12 kDa, da diese sehr stabil und aussagekräftig sind [Schubert, 2011].

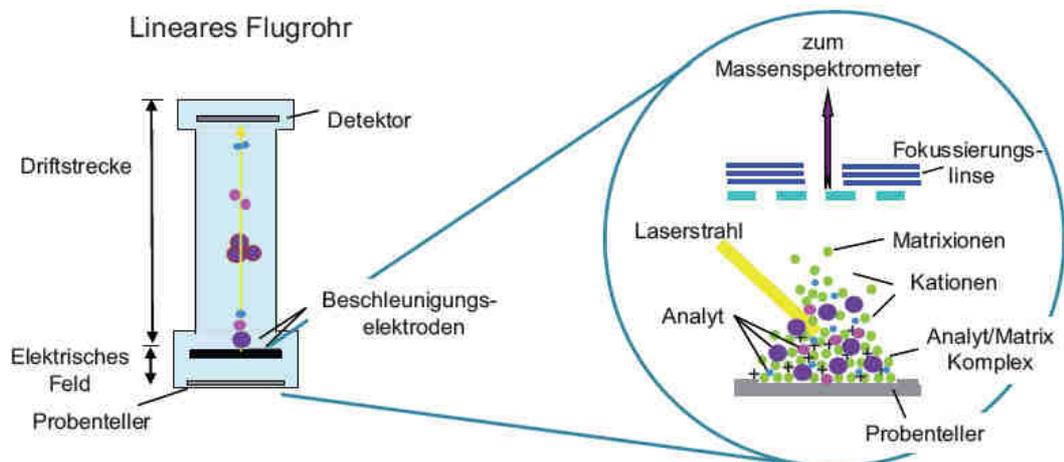


Abbildung 5: Darstellung des Prinzips einer Messung mittels MALDI-TOF-MS [Schubert, 2011].

Die MALDI Biotyper Software vergleicht die so ermittelten Massen vollautomatisch mit denen in der Referenzdatenbank vorhandenen Bakteriengattungen und -spezies und ermittelt so die wahrscheinlichsten Bakteriengattungen und -spezies. Dieser Vergleich kann nie identische Messwerte ergeben, 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-Value), die eine Aussage über die Validität des Messergebnisses machen [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. Werte zwischen 2.300 und 3.000 stehen für eine sehr wahrscheinliche Speziesidentifikation [BRUKER Daltonik, 2015].

2.5.3 Die molekularbiologische Methode

Kolonien, die mit Hilfe der MALDI-TOF-MS nicht genau identifiziert werden konnten, können mittels einer PCR und einer anschließenden Sequenzierung analysiert werden. Dadurch ist es möglich, zu zeigen, wie vertrauenswürdig ein mit der MALDI-TOF-MS ermitteltes Ergebnis ist.

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) wird zur Probenvorbereitung eingesetzt, um DNA-Abschnitte zu vervielfachen. Diese selektive Amplifikation ist nur dann möglich, wenn die Sequenzen am Ende des gewünschten Abschnitts bekannt sind.

Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt, der die unterschiedlichen Temperaturprogramme vollautomatisch nacheinander durchläuft. Es werden ein sogenannter Master Mix sowie je ein Primer Mix für die Vorwärtssynthese und für die Rückwärtssynthese der Einzelstränge verwendet [Rieth, 2012]. Im Temperaturprogramm wird eine variable Anzahl an Zyklen durchlaufen, die stets die gleichen Abschnitte enthalten. Begonnen wird mit einer Denaturierung (Auftrennung des DNA-Doppelstranges in zwei DNA-Einzelstränge), gefolgt vom Annealing. In dieser Phase lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Während der folgenden Phase der Elongation baut eine thermostabile DNA-Polymerase beginnend bei den Primern die jeweils komplementären Nukleotide entlang des komplementären Stranges ein. Das DNA-Fragment liegt am Ende in mehreren hundert Exemplaren vor [Rieth, 2012].

Bei einer 16S-rDNA-Sequenzierung ist der Bereich, der für die Sequenzierung von Interesse ist, derjenige, der am Aufbau der Ribosomen beteiligt ist. Diese sogenannte rDNA wird nach ihrem Sedimentationsverhalten in einem Saccharosegradienten nach einer abgeschlossenen Zentrifugation als 23S, 16S oder 4S-rDNA charakterisiert (vergleiche Abbildung 6). Das S steht für den Sedimentationskoeffizienten (1 Svedberg = 10⁻¹³ s). Ihr Anteil an der Gesamtheit der DNA ist sehr hoch. Der Vorteil dieses Bereichs der DNA ist, dass sie in allen Lebewesen enthalten ist. Bestimmte Abschnitte des Bereiches liegen hochkonserviert vor. Das bedeutet, dass sie für die Funktion der Zelle zuständig sind und sich bei verschiedenen Spezies kaum unterscheiden. Bei einer Sequenzanalyse kann man nun die analogen variablen Bereiche der DNA miteinander vergleichen und dadurch die Verwandtschaft zwischen den Bakterienspezies ermitteln [Hirsch-Kauffmann, 2009].

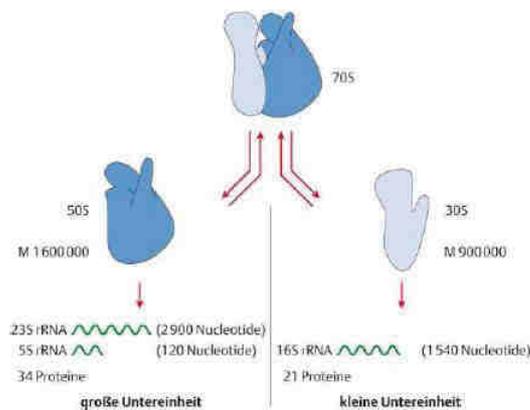


Abbildung 6: Darstellung des Ribosoms eines Bakteriums. Das Ribosom lässt sich in die 50S- und die 30S-Untereinheit aufteilen. Die 30S-Untereinheit enthält die 16S-rRNA und 21 Proteine [Fuchs, 2007].

Nach der Vervielfältigung in der PCR und vor einer Sequenzierung muss die DNA zunächst (beispielsweise enzymatisch) gereinigt werden. In diesem Schritt werden die nach der PCR übrig gebliebenen Primer und die dNTPs abgebaut, sowie die vervielfältigte DNA vor dem Abbau geschützt. Die Aufreinigung erfolgt im Thermocycler.

Im Anschluss kann die eigentliche Sequenzierung (eine Weiterentwicklung der Sequenzierung nach Sanger) erfolgen. Das PCR-Produkt wird zunächst mit den Primern und dem Puffer vermischt. Die Synthese der Stränge erfolgt erneut in einem Thermocycler (vergleiche Vorgehensweise bei der PCR). Die im Puffer enthaltenen fluoreszierend markierten ddNTPs werden während des Temperaturprogramms mit einer statistischen Streuung statt der dNTPs eingebaut. Durch einen Einbau eines ddNTPs wird eine weitere Synthese des Stranges verhindert. So entsteht eine Sammlung von Strängen unterschiedlicher Länge, wobei jede dieser abgebrochenen Molekülketten an ihrem 3'-Ende eine einzige Markierung trägt. Der Farbstoff der Markierungen unterscheidet sich je nach angehängter ddNTP. Dadurch sind keine getrennten Ansätze nötig und die Sequenzierung kann in einer Reaktion erfolgen. Die Reaktionsprodukte, also die unterschiedlich langen und unterschiedlich markierten Molekülketten, werden zur Sequenzierung in ein Röhrchen eines Kapillar-Elektrophoresesystems überführt. Hier findet ein Lauf der Proben statt, der vergleichbar mit einer Gelelektrophorese ist (vergleiche Abbildung 7). Die so gemessenen Fluoreszenzsignale werden an einen Computer übermittelt [Brown, 2002].

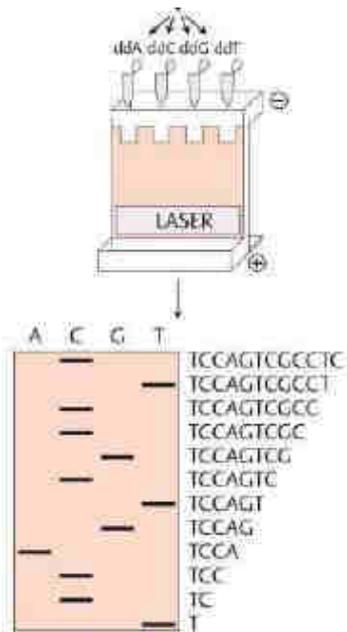


Abbildung 7: Darstellung einer DNA-Analyse nach einer Sequenzierung gemäß Sanger. In diesem Beispiel handelt es sich um fluoreszierend markierte Primer, aber das Vorgehen ist vergleichbar. Die Primer lagern sich an die aufgetrennten DNA-Stränge an und es erfolgt eine DNA-Synthese bis eine ddNTP eingebaut wird. Die verschiedenen Ansätze werden über ein Gel laufen gelassen. Je weiter ein Fragment wandert, desto kürzer ist das DNA-Stück. Das am weitesten gewanderte Stück stellt somit den Beginn des DNA-Abschnitts dar. Die Detektion ist vergleichbar mit einer Kapillarelektrophorese [Fuchs, 2007].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

1. Piptboy: Pipetus ®Hirschmann Laborgeräte
2. Wasserbad: 1003.GFL
3. Filtrationsanlage: AbsaugvorrichtungSartorius
4. Filtrationsanlage: PumpeNeuberger
5. Filter-Dispenser: Microsart™ e.motionSartorius
6. FlameboyIBS (Integra biosciences)
7. MALDI-TOF-MS Biotyper Microflex LT.Bruker Daltonik
8. Photometer SpectrophotometerJenway 7305
9. Brutschrank 25° C B15.....Mettler
10. Brutschrank 30° C Typ 6K3367Ehret
11. Brutschrank 36° C INE 800Mettler
12. Vortexer.....Vortex V1 plus
13. Heizblock: Thermomixer comfortEppendorf
14. Cycler: veriti 96 Wells Thermal CyclerApplied Biosystems
15. Gelelektrophoresekammer: wide mini-sub Cell GTBioRad
16. Spannungsquelle: PowerPac basic.BioRad
17. Sequenzierer: ABI PRISM 3130x/ Genetic AnalyserApplied Biosystems

3.1.2 Nährmedien

1. Cetrimid gebrauchsfertiges Plattennährmedium (Pseudomonas-Cetrimid-Selektivnährboden) OXOID

Pankratisch abgebaute Gelatine	16,000 g
Casein-Hydrolysat	10,000 g
Magnesiumchlorid	1,400 g
Kaliumsulfat	10,000 g
Cetrimid	0,200 g
Nalidixinsäure	0,015 g
Agar	11,500 g
Glycerin	10,000 ml
Aqua dest.	ad 1 l

pH 7,1 ± 0,2

2. Cetrimid LI n. EP gebrauchsfertiges Plattennährmedium Heipha

Pankreatisch abgebaute Gelatine	20,000 g
Magnesiumchlorid	1,400 g
Kaliumsulfat	10,000 g
Cetrimid	0,300 g
Agar	13,600 g
Glycerin	10,000 ml
Aqua dest.	ad 1 l

pH 7,2 ± 0,2

3. Pseudomonas CFC gebrauchsfertiges Plattennährmedium OXOID

Pankreatisch abgebaute Gelatine	16,000 g
Casein-Hydrolysat	10,000 g
Magnesiumchlorid	1,400 g
Kaliumsulfat	10,000 g
Cetrimid	0,010 g
Cephalosporin	0,050 g
Fusidinsäure	0,010 g
Agar	11,000 g
Glycerin	10,000 ml
Aqua dest.	ad 1 l

pH 7,1 ± 0,2

4. R2A gebrauchsfertiges Plattennährmedium OXOID

Hefeextrakt	0,500 g
Glucose	0,500 g
Stärke	0,500 g
Casein-Hydrolysat	0,500 g
Magnesiumsulfat, wasserfrei	0,024 g
Dikaliumhydrogenphosphat	0,300 g
Natriumpyruvat	0,300 g
Proteose Pepton	0,500 g
Agar	15,000 g
Aqua dest.	ad 1 l

pH 7,2 ± 0,2

5. DEV-Nährmedium Heipha

Peptisch abgebautes Tiergewebe	10,000 g
Fleischextrakt	10,000 g
Natriumchlorid	5,000 g
Agar	16,000 g
Aqua dest.	ad 1 l

pH 7,3 ± 0,2

6. CASO-Nährmedium (Tryptic Soy Agar) Heipha

Peptisch abgebautes Casein	15,000 g
Peptisch abgebautes Sojamehl	5,000 g
Natriumchlorid	5,000 g
Agar	15,000 g
Aqua dest.	ad 1 l

pH 7,3 ± 0,2

7. CASO-Bouillon nach EP + USP Heipha

Peptisch verdautes Casein	17,000 g
Peptisch verdautes Sojamehl	3,000 g
Natriumchlorid	5,000 g
Glucose	2,500 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2,500 g

pH 7,3 ± 0,2

3.1.3 Chemikalien

1. Polysorbate 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat) Fluka Analytical
getestet nach Ph.Eur.2. 80 %ige Ameisensäure

Ameisensäure (100 %)	800 µl
Aqua dest.	200 µl

3. OS

TFA (100 %)	25 µl
ACN (100 %)	500 µl
Aqua dest.	ad 1 ml

4. Matrix

OS	200-250 µl
HCCA	2,5 mg

Vortexen und 15 min im Ultraschallbad beschallen

5. Wasser für die Molekularbiologie -Aliquots 500 µl

6. HotStarTaq Master Mix Kit

Quiagen

HotStarTaq DNA-Polymerase
 Quiagen PCR Puffer mit 3 µM MgCl₂
 dNTPs (400 µM von jeder Base)

Es werden 12,5 µl je Ansatz benötigt

7. Primer Mix fw (PCR)

5 µM PVL1	5'-GGG TTT AAC ATT ACG GAT TTC-3'
5 µM MecA fw	5'-GGG ATC ATA GCG TCA TTA TTC-3'
5 µM 16S 27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

Es werden 2,5 µl je Ansatz benötigt

8. Primer Mix rev (PCR)

5 µM PVL2	5'-GAC GCA CAA ACT AAT ATC AC-3'
5 µM MecA rev	5'-AAC GAT TGT GAC ACG ATA GCC-3'
5 µM 16S 907R	5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'

Es werden 2,5 µl je Ansatz benötigt

9. ReadyAgarose precast Gel, 3 % Agarose.....BioRad

10. Probenpuffer für die Gelelektrophorese Roti®-Load DNA Carl Roth

1x Roti®-Load DNA besteht aus

TRIS/HCl pH 7,5	10 mM
Natriumacetat	5 mM
EDTA	2 mM
Glycerin	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
Xylencyanolblau	0,015 % (w/v)

11. pBR 328-Marker *ready-to-use* Carl Roth

gelöst in 1x konzentriertem Ladepuffer Roti®-Load DNA

Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
Natriumacetat	5 mM
EDTA	2 mM
Glycerin	8 % (w/v)
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
Xylencyanolblau	0,015 % (w/v)
Bakteriozider Stabilisator	0,02 % (w/v)

12. ExoSAP

EXO I (Exonuclease I)
SAP (shrimp alkaline phosphatase)
TE-Puffer (TRIS-EDTA)

13. Primer (Sequenzierung)

907R	5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'
519R	5'-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3'
27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

M steht dabei für die Base A oder C, K steht für die Base T oder G (variabel)

14. BigDye- Mix Sequenzierungs Kit life technologies
(enthält fluoreszierend markierte ddNTPs)

15. Sequenzierungspuffer

3.1.4 Weiteres

1. TVO-Probennahmegefäß 250 mLVWR International Einmalprodukt

2. Pipette: Serological 5 mL in 1/10 mL, Einmalprodukt Sarstedt
3. Abstrichtupfer: Sterile Transport Swap und BD ESwab Sarstedt
Collection & Transport System
4. Cleaner ND perform® sterile Schülke
5. Filterpapier: Microsart CN-Filter stedim biotech, 0,45 µm Sartorius
Porendurchmesser
6. Petrischalen 92x16 mm mit Nocken Sarstedt
7. Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml, PP Eppendorf
8. 96-Well Platte Microplate, PS, U-Bottom, crystal-clear greiner bio-one
9. PCR-Strips

Mehrfachartikel (intern sterilisiert)

10. Filtrationsaufsätze 250 mL
11. Filtrationsfritten
12. Pinzetten
13. Drigalski-Glasspatel
14. Glasstäbe

3.2 Methoden

3.2.1 Die Probeentnahme

Die Probennehmer werden auf freiwilliger Basis ausgesucht und die Probeentnahme nach DIN EN ISO 19458 (vergleiche Tabelle 3) durchgeführt. Die Entnahmen können bei einer warmen oder einer kalten Wassertemperatur erfolgen, für diese Arbeit wird lediglich kaltes Trinkwasser untersucht.

Eine Probeentnahme nach Zweck C wird durchgeführt, um das Wasser so, wie es der Verbraucher nutzt, zu untersuchen. Das Probennahmegefäß wird aufgedreht und das Wasser wird angestellt. Die Probe wird direkt entnommen. Anschließend wird das Probennahmegefäß wieder verschlossen und kann nun transportiert werden.

Eine Probeentnahme nach Zweck B erfolgt, um die Wasserbeschaffenheit an der Entnahmemarmatur des Verbrauchers zu untersuchen. Diese könnte beispielsweise durch eine Hausinstallation beeinflusst werden. Nach einer Demontage der Installationen sowie einer Desinfektion wird das Wasser kurz laufen gelassen, um eventuelle Einflüsse der Desinfektion auf die Wasserbeschaffenheit auszuschließen. Direkt im Anschluss erfolgt die Probeentnahme.

Für die Probeentnahme nach Zweck A erfolgen eine Demontage der Installationen sowie eine Desinfektion des Entnahmeventils. Anschließend wird das Wasser so lange laufen gelassen, bis sich eine konstante Temperatur eingeregelt hat. Dadurch wird gewährleistet, dass das gesamte Leitungssystem einmal komplett durchspült wurde und so die Wasserqualität im Verteilungsnetz geprüft werden kann. Am Schluss erfolgt die Probeentnahme in das Probennahmegefäß, welches verschlossen und transportiert wird [DIN EN ISO 19458, 2013].

Tabelle 3: Übersicht über die unterschiedlichen Probeentnahmearten gemäß DIN EN ISO 19458. Unter Installationen sind Perlatoren und Duschschräuche zu verstehen. Die Desinfektion kann thermisch oder chemisch erfolgen.

	Grund für die Entnahme	Abbau von Installationen	Desinfektion	Spülung
Zweck A	Wasserbeschaffenheit im Verteilungsnetz	ja	ja	ja, bis Temperatur konstant
Zweck B	Entnahmearmatur	ja	ja	minimal
Zweck C	Wasserbeschaffenheit direkt bei der Entnahme (durch den Verbraucher)	nein	nein	nein

Das Trinkwasser muss innerhalb von 24 Stunden untersucht werden. Die Lagerung während des Transportes muss bei $5 \pm 3^\circ \text{C}$ und vor Sonnenlicht geschützt stattfinden, um die Zusammensetzung und Anzahl der sich im Wasser befindlichen Bakterien so wenig wie möglich zu beeinflussen. Ein Gefrieren der Proben sollte wegen der möglichen Gefahr einer Abtötung der Zellen unbedingt vermieden werden [DIN EN ISO 19458, 2013].

Die verwendeten Probengefäße sind aus Kunststoff (HD-PE) mit einem Fassungsvermögen von 250 ml. Sie werden von der Herstellerseite aus mit dem Reduktionsmittel Natrium Thiosulfat versetzt, um so Einflüsse von Desinfektionsmitteln wie Chlor und Ozon auf das Untersuchungsergebnis zu verringern [Seilnacht, 2013].

Bei einigen Probeteilnehmern können die Installationen nicht ohne größeren Aufwand entfernt werden. Bei diesen Proben wird daher auf eine Entnahme nach Zweck A verzichtet. Insgesamt werden 60 Proben untersucht (für die Probenbezeichnung vergleiche Anhang I).

3.2.2 Der Probenansatz

Für den Ansatz der Proben wird zunächst eine **Membranfiltration** durchgeführt, um das Vorkommen und die Anzahl der Bakterien in einem definierten Probenvolumen von 100 ml zu ermitteln. Ein Membranfilter mit einem Porendurchmesser von $0,45 \mu\text{m}$ wird auf die ther-

misch (mittels Flameboy) desinfizierte Fritte der Filtrationsanlage gelegt. Nachdem der Filteraufsatz aufgedreht wurde, werden 100 ml der Trinkwasserprobe in den Aufsatz eingefüllt und nach dem Ansetzen eines Vakuums durch den Membranfilter gesaugt und so filtriert. Der Filteraufsatz wird vorsichtig abgenommen und der Membranfilter mit einer sterilen Pinzette blasenfrei auf das gewählte Plattennährmedium aufgebracht.

Eine **Reinkultur** wird hergestellt, um die Nachkommenschaft einer einzelnen Zelle herzustellen und untersuchen zu können. Die Reinkulturen werden üblicherweise vor Identifizierungen mittels MALDI-TOF-MS angesetzt. Verdächtige Kolonien werden mit einer sterilen Impföse aus einer heterogenen Gemeinschaft von Bakterien auf einem Plattennährmedium oder einem Membranfilter abgenommen und auf selbstgegossenes DEV- und/oder CASO-Nährmedium überführt. Die Bakterienkolonie wird so von einem selektiveren auf ein komplexeres Nährmedium überführt und für eine Vereinzellung der Kolonie dreifach fraktioniert ausgestrichen. Das Nährmedium wird bei $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$ für einen Tag inkubiert.

In Anlage 5, Teil I **TrinkwV** sind die Parameter aufgeführt, für die mikrobiologische Analyseverfahren festgelegt wurden. Es wird auf die DIN EN ISO 6222 verwiesen, in der geregelt wird, wie die Koloniezahlen bei 22°C und bei 36°C ermittelt werden sollen. Im Laboralltag wird statt der Koloniezahl bei 22°C die Koloniezahl bei 20°C gemäß der Trinkwasserverordnung von 1990 ermittelt, da diese Methode gleichwertige Ergebnisse bringt und mit den im Labor gebräuchlichen Inkubationsschränken umsetzbar ist.

Gemäß Anlage 5, Teil I, Absatz d), Unterabsatz bb) TrinkwV wird je 1 Milliliter der zu untersuchenden Wasserproben in eine leere Petrischale pipettiert. Diese wird mit etwa 15 ml verflüssigtem DEV-Nährmedium (mit einer Temperatur zwischen 42°C und 48°C) befüllt. Durch kreisende Bewegungen der Petrischale wird das Wasser in dem Nährmedium homogen verteilt und anschließend erstarren gelassen. Im Anschluss erfolgt die Inkubation einmal bei $(20 \pm 2)^\circ \text{C}$ und einmal bei $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$ für zwei Tage. Die Auszählung der gewachsenen sichtbaren Kolonien wird unter einem Hellfeldmikroskop bei 6 – 8-facher Vergrößerung durchgeführt und als Koloniezahl (KBE) angegeben.

Des Weiteren wird eine Untersuchung der Trinkwasserprobe auf *Pseudomonas aeruginosa* gemäß Anlage 5, Teil I, Absatz c) TrinkwV durchgeführt. Die Untersuchung richtet sich dabei nach der DIN EN ISO 16266. Es wird eine Membranfiltration durchgeführt und der Membranfilter wird auf ein gebrauchsfertiges Cetrimid-Plattennährmedium aufgebracht. Die anschließende Inkubation erfolgt bei $(30 \pm 2)^\circ \text{C}$ für zwei Tage. Verdächtige Kolonien auf

dem Membranfilter werden ausgezählt und reinkultiviert. Unter verdächtigen Kolonien sind 1-3 mm große creme glänzende, auch gelb bis gelb-grünliche Kolonien zu verstehen (vergleiche Abbildung 8). Eine grünliche Verfärbung des Nährmediums sowie ein süßlicher Geruch nach Lindenblüten oder Trauben ist ebenfalls ein Indiz für Pseudomonaden-Wachstum. Dieser Probenansatz ist angelehnt an die Trinkwasserverordnung.

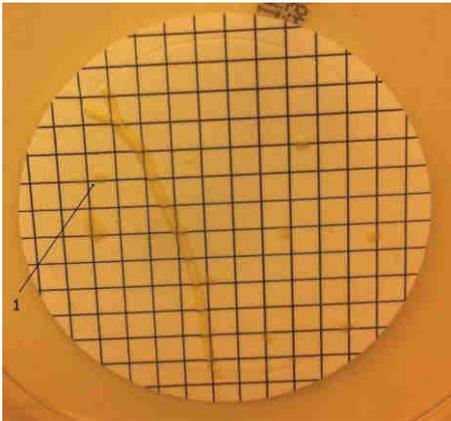


Abbildung 8: Darstellung einer gelblich glänzenden Kolonie (1) auf Cetrimid-Nährmedium. Es handelt sich um *Pseudomonas putida* (nachgewiesen in der Probe 9_C).

Zusätzlich zu dem Vorgehen angelehnt an die Trinkwasserverordnung wird zum **Nachweis eines breiteren Spektrums von Wasserbakterien** ein erweiterter Probenansatz durchgeführt. Dieser Ansatz erfolgt ausschließlich mittels Membranfiltration. Die Nährmedienauswahl stellt den Unterschied zu der regulären Trinkwasseruntersuchung gemäß Trinkwasserverordnung dar. So wird der Membranfilter auf ein R2A-Nährmedium aufgebracht. Die Inkubation erfolgt für zwei Tage bei $(30 \pm 2)^\circ \text{C}$. Anschließend werden verdächtige Kolonien ausgezählt. Dies sind grünlich-weißliche oder durchsichtige Kolonien.

Ein weiterer Probenansatz wird durchgeführt, um einen **Vergleich zwischen dem Gesamtkeimwachstum bei 36°C und dem Wachstum von Non-Fermentern** zu ermöglichen. Dadurch kann der Anteil, der Non-Fermenter an der Gesamtkeimbelastung des Trinkwassers ermittelt werden. 33 Trinkwasserproben werden anhand der ermittelten Gesamtkeimzahlen sowie des Vorkommens an Non-Fermentern auf R2A- und Cetrimid-Nährmedium ausgewählt. Der Membranfilter wird nach einer Membranfiltration auf ein selbstgegossenes DEV-Nährmedium gelegt. Die Inkubation erfolgt zwei Tage bei $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$. Anschließend werden verdächtige Kolonien ausgezählt.

3.2.3 Die Identifizierung von Kolonien mittels MALDI-TOF-MS

Nach einer Reinkultivierung wird die zu identifizierende Kolonie mit einem sauberen Zahnstocher von dem Nährmedium abgenommen und als Doppelbestimmung auf zwei nebeneinander liegende Spots des Targets durch Verschmieren aufgetragen (direct-smear-Verfahren [Rieth, 2012]). Nach dem Trocknen des Analyten wird auf eines der Felder 1 μ l 80%ige Ameisensäure aufgetragen. Dies sorgt für eine bessere Aufschlüsselung des Materials, indem die Zellwände aufgebrochen und die Proteine freigesetzt werden. Nachdem die Ameisensäure getrocknet ist, wird auf jedes Feld, auf dem eine Kolonie aufgetragen wurde, 1 μ l der angesetzten Matrixlösung aufgetragen und trocknen gelassen. Das Target wird anschließend in das Massenspektrometer eingesetzt und die Massenspektren werden aufgenommen. Die MALDI Biotyper Software vergleicht innerhalb kürzester Zeit die gemessenen Spektren (Proteinpeaks) mit den in einer Datenbank hinterlegten bereits bekannten Proteinpeaks [Validierte Labormethode, 2014].

3.2.4 Die Identifikation ausgewählter Kolonien mittels 16S-rDNA-Sequenzierung

Ausgewählte Proben werden mit einer Sequenzierung untersucht, um mit ihnen exemplarisch einen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Nachweistechniken durchzuführen.

Für die PCR werden die Bakterienkolonien zunächst in je 500 μ l Aqua dest. Aliquots gelöst und anschließend für 10 bis 15 Minuten in einem Heizblock bei 99° C erhitzt. Dies dient der Zellyse der Kolonien, um die DNA für die Sequenzierung frei zu setzen. Anschließend wird der HotStarTaq Master Mix (dieser enthält die thermostabile taq-Polymerase, den PCR-Puffer und die Vorstufen der Nukleinsäuren, die dNTPs, in äquivalenten molaren Mengen) mit den weiteren Komponenten vermischt (vergleiche Tabelle 4). Es wird ein Primer Mix für die Vorwärtssynthese (fw) und einer für die Rückwärtssynthese (rev) der Einzelstränge hinzugefügt. Diese Mixe enthalten unter anderem die Primer, die für den Bereich der 16S-rDNA spezifisch sind (16S 27F und 16S 907R). Zuletzt werden 54 μ l RNase freies Wasser hinzugefügt. Je 23,6 μ l des Ansatzes und 1,5 μ l DNA werden in ein Gefäß des sogenannten PCR-Strips überführt. In eines der Gefäße wird statt der DNA eine Positivkontrolle in ein anderes eine Negativkontrolle hinzugegeben.

Tabelle 4: Übersicht über die Zusammensetzung des Ansatzes für eine PCR-Probe

PCR-Zusammensetzung je Probe in μl	
HotStarTaq Master Mix	12,5
Primer Mix fw	2,5
Primer Mix rev	2,5
Wasser	6,0

Der Thermal Cycler von Applied Biosystems durchläuft die unterschiedlichen Temperaturprogramme der PCR (vergleiche Tabelle 5) vollautomatisch. Der Temperaturzyklus wird 35-fach wiederholt, wobei die Denaturierung in den folgenden Durchgängen nur für 30 Sekunden bei 94°C stattfindet. Nach etwa zweieinhalb Stunden liegt das 16S-rDNA-Fragment in mehreren hundert Exemplaren vor [Rieth, 2012].

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht über das Temperaturprogramm im Thermal Cycler während einer PCR.

PCR-Temperaturprogramm			
Phase	Zeit	Temperatur/ $^{\circ}\text{C}$	Zyklen
Initiale Denaturierung	15'	94	1x
Denaturierung	30''	94	35x
Annealing	45''	54	
Elongation	1'30''	72	
Finale Extension	5'	72	1x

Für die Analyse über den Erfolg der Vervielfältigung wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Es werden $5\ \mu\text{l}$ Probenmaterial (die amplifizierte DNA) mit $7\ \mu\text{l}$ Probenpuffer (dieser TBE-Puffer enthält EtBr als Farbmarker) gemischt und davon $10\ \mu\text{l}$ auf ein Fertig-Gel aufgetragen. Zusätzlich werden in zwei Taschen des Gels $2\text{-}3\ \mu\text{l}$ des pBR 328-Marker *ready-to-use* aufgetragen. Die Gelelektrophoresekammer wird an die Spannungsquelle angeschlossen und die Gelelektrophorese bei $130\ \text{V}$ für $20\ \text{min}$ laufen gelassen. Die Auswertung der Banden erfolgt unter UV-Licht. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller durch das Gel als größere. Die Banden der DNA-Stränge, die an den für den 16S-sequenzierenden Bereich spezifischen Primern verlängert wurden sind unter UV-Licht deutlich zu erkennen [Brown, 2002].

Es folgt eine enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte. In einer 96-Well Platte wird zunächst je $1\ \mu\text{l}$ ExoSAP (vergleiche Tabelle 6) vorgelegt. Die darin enthaltene Exonuclease I ist für den Abbau einzelsträngiger DNA zuständig. Sie baut die Primer ab. Das SAP steht für

Shrimp Alkaline Phosphatase und baut die dNTPs ab. Der TE-Puffer enthält TRIS und EDTA. Er bringt die DNA in Lösung und schützt sie vor dem enzymatischen Abbau. Anschließend kommen 2 µl PCR-Produkt hinzu. Die Aufreinigung erfolgt im Thermocycler (für 15 Minuten bei 37° C und darauf für 15 Minuten bei 80° C sowie einer anschließenden Kühllhaltung bei 4° C).

Tabelle 6: Übersicht über die Zusammensetzung des Ansatzes für die Aufreinigung der PCR-Produkte

ExoSAP-Zusammensetzung je Probe in µl	
EXO I	0,125
SAP	0,250
TE-Puffer	0,625

Auf einer weiteren 96-Well Platte wird je 1 µl der verschiedenen Sequenzierungsprimer vorgelegt (also drei Primer je Probe). 7 µl des Gemisches aus Sequenzierungspuffer, Big Dye und Wasser werden hinzugegeben (vergleiche Tabelle 7) und 2 µl des aufgereinigten PCR-Produkt werden hinzugefügt. Anschließend wird das Programm CycleSeq im Thermocycler durchlaufen.

Tabelle 7: Übersicht über die Zusammensetzung des Ansatzes für die 16S-rDNA-Sequenzierung

Sequenzierung Zusammensetzung je Probe in µl	
Big Dye	2,0
Sequenzierungspuffer	1,0
Wasser	4,0

Die Sequenzierung erfolgt vollautomatisch im Sequenzer. Die Proben laufen dabei durch eine Kapillarelektrophorese, in der die Trennung der DNA-Fragmente statt in einem Gel in einem Polymer stattfindet. Dieses Polymer ist nicht quervernetzt und muss demnach auch nicht polymerisieren. Vor der Beprobung wird das Polymer mit Druck in die Glaskapillare (etwa 50 µm im Durchmesser) gepresst [Wink, 2004]. Die Proben laufen an einem Fluoreszenzdetektor vorbei. Die so ermittelten Fluoreszenzsignale werden an einen Computer übermittelt, der aus den Daten die DNA-Sequenz zusammensetzt [Brown, 2002]. Die DNA-Sequenz wird mit den bereits in einer Datenbank vorhandenen Sequenzen mittels NCBI-BLAST (Webschnittstelle) abgeglichen und so wird eine Speziesidentifikation durchgeführt.

3.2.5 Die Stammhaltung

Für die bessere Aufbewahrung einiger ausgewählter identifizierten Non-Fermenter werden die Bakterienkolonien mit einer sterilen Impföse in ein kleines mit festem CASO-Nährmedium befülltes Glasgefäß überführt. Das Gefäß wird mit einem Schraubverschluss verschlossen und bei $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$ inkubiert, um die Bakterien an dem Nährmedium anwachsen zu lassen. Anschließend werden die so angelegten Bakterienstämme bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und können jederzeit wieder auf ein Nährmedium ausgestrichen werden.

3.2.6 Die photometrische Vermessung von Proben

Für die photometrische Vermessung von Bakteriensuspensionen müssen dezimale Verdünnungen angelegt werden. Die Bakteriensuspension wird dafür durch vortexen homogenisiert und anschließend wird je 1 ml Suspension mit 9 ml NaCl verdünnt (1:10 Verdünnung). Auf dieselbe Art werden 1:100 und 1:1000 Verdünnungen angesetzt. Von den Verdünnungen werden je 2 ml in eine Küvette überführt, die im Photometer gegen NaCl als Referenzwert (Blank) bei 600 nm vermessen wird. Um eine statistische Sicherheit zu erlangen, werden je 3 Messungen mit einem Abstand von 5 Sekunden durchgeführt. Der Toleranzbereich der Messergebnisse der Extinktion liegt zwischen 0,010 und 1,000, da ab einem Wert von 1,000 der Linearitätsbereich verlassen wird. Dies bedeutet, dass ab diesem Wert kein proportionaler Zusammenhang zwischen der Extinktion und der Zellkonzentration mehr vorliegt. Bei einem Messergebnis größer 1,000 wird eine höhere Verdünnungsstufe vermessen. Die Verdünnungsfaktoren werden anschließend wieder aus dem Ergebnis raus gerechnet.

3.2.7 Die Prozessoptimierung der Untersuchungsmethodik anhand ausgewählter Pseudomonaden

Für den Optimierungsversuch werden Pseudomonaden-Wildstämme eingesetzt. Die Wildstämme werden nach 3.2.5 aufbewahrt und auf CASO-Nährmedium reinkultiviert.

Nach der Reinkultivierung werden die Stämme auf Ceftrimid-Nährmedium, Ceftrimid n. EP-Nährmedium, CFC-Nährmedium und R2A-Nährmedium dreifach fraktioniert in einem Dreifachansatz ausgestrichen. Von den verschiedenen Ansätzen je Nährmedium wird je eines bei $(25 \pm 2)^\circ \text{C}$, bei $(30 \pm 2)^\circ \text{C}$ und bei $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$ für zwei Tage inkubiert. Durch dieses Vorgehen wird das Wachstum jedes Bakterienstammes auf jedem Nährmedium bei jeder Inkubationstemperatur untersucht.

Die Auswertung des Wachstums erfolgt zum einen visuell. Zum anderen wird eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte der gewachsenen Bakterienkolonien nach 3.2.6 durchgeführt. Dafür wird zunächst eine 1:10 Verdünnung von Polysorbat 20 mit NaCl hergestellt. Polysorbat 20 bewirkt als grenzflächenaktive Substanz (Tensid) eine bessere Löslichkeit der gewachsenen Bakterienzellen von dem Nährmedium. Von dieser Verdünnung werden 2 ml auf jedes Nährmedium aufgetragen und durch leichtes Schwenken verteilt. Anschließend werden die Bakterienzellen vorsichtig und ohne das Nährmedium mitzunehmen mit einem sauberen Plastikspatel von dem Nährmedium gelöst. Die so in Flüssigkeit vorliegenden Bakterien werden in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Extinktionen der Proben werden nach 3.2.6 photometrisch vermessen. Über die Extinktionen kann das unterschiedliche Zellwachstum auf den verschiedenen Nährmedien miteinander verglichen werden.

3.2.8 Die Prozessoptimierung der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-MS

Für den Optimierungsversuch werden Non-Fermenter-Wildstämme eingesetzt. Die Wildstämme werden nach 3.2.5 aufbewahrt und auf CASO-Nährmedium reinkultiviert.

Am nächsten Tag wird je Bakterienstamm eine der gewachsenen Kolonien mit einer Impföse von dem CASO-Nährmedium abgenommen und im Dreifach-Ausstrich auf einem R2A-Nährmedium verteilt. Eine Kolonie desselben Bakterienstammes wird zusätzlich in 100 ml NaCl resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wird anschließend wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben membranfiltriert. Der Membranfilter wird anschließend blasenfrei auf ein R2A-Nährmedium aufgebracht und dieses bei $(30 \pm 2)^\circ \text{C}$ für zwei Tage inkubiert. Gewachsenen Bakterienkolonien werden gemäß den Tabellen 8 bis 10 behandelt. Die Identifizierungen erfolgten dabei mittels MALDI-TOF-MS.

Tabelle 8: Übersicht über die eingesetzten Probenvorbereitungen für eine Identifizierung in der MALDI-TOF-MS. Hier sind die direkt untersuchten Kolonien aufgeführt.

Proben-ID	Bakterium	Präparation	
8_C	<i>Pseudomonas putida</i>	Direkt vom R2A-Nährmedium (Ausstrich) nach 2 Tagen Inkubation	Direkt vom R2A-Nährmedium
11_C-1	<i>Acinetobacter ursingii</i>		(Filtration) nach 2 Tagen Inkubation
11_C-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

Tabelle 9: Übersicht über die eingesetzten Probenvorbereitungen für eine Identifizierung in der MALDI-TOF-MS. Hier sind die nach einer Resuspension in 10 ml der entsprechenden Flüssigkeit untersuchten Kolonien aufgeführt.

Proben-ID	Bakterium	Präparation			
8_C	<i>Pseudomonas putida</i>	Nach einer Resuspension in NaCl (Ausstrich)	Nach einer Resuspension in NaCl (Filtration)	Nach einer Resuspension in CASO (Ausstrich)	Nach einer Resuspension in CASO (Filtration)
11_C-1	<i>Acinetobacter ursingii</i>				
11_C-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				

Tabelle 10: Übersicht über die eingesetzten Probenvorbereitungen für eine Identifizierung in der MALDI-TOF-MS. Hier sind die nach einer Reinkultivierung untersuchten Kolonien aufgeführt.

Proben-ID	Bakterium	Präparation			
8_C	<i>Pseudomonas putida</i>	Nach einer Reinkultivierung gemäß 4.2.2 auf CASO-Nährmedium (Ausstrich)	Nach einer Reinkultivierung gemäß 4.2.2 auf CASO-Nährmedium (Filtration)	Nach einer Reinkultivierung gemäß 4.2.2 auf DEV-Nährmedium (Ausstrich)	Nach einer Reinkultivierung gemäß 4.2.2 auf DEV-Nährmedium (Filtration)
11_C-1	<i>Acinetobacter ursingii</i>				
11_C-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				

4 Ergebnisse

4.1 Die Diversität nachgewiesener Non-Fermenter in Trinkwasserproben

Die membranfiltrierten Trinkwasserproben (vergleiche 3.2.2) zeigen auf dem Cetrimid- und dem R2A-Nährmedium ein unterschiedlich breit gefächertes Spektrum an mittels MALDI-TOF-MS identifizierten Bakterien und Non-Fermentern. Exemplarisch für die Vielfalt an Mikroorganismen in zwei Trinkwasserinstallationen soll die Tabelle 11 stehen (für die übrigen Proben vergleiche Anhang II).

Nach einer Untersuchung der Probe 1_C kann auf dem Cetrimid-Nährmedium kein Wachstum nachgewiesen werden, während auf dem R2A-Nährmedium ein Wachstum der Gattung *Brevundimonas* festgestellt werden kann. An derselben Entnahmearmatur, diesmal beprobt nach Zweck A (Probe 1_A), kann sowohl auf dem Cetrimid-Nährmedium als auch auf dem R2A-Nährmedium die Gattung *Pseudomonas* nachgewiesen werden. Die Spezies können bei keinem der beiden Nährmedien sicher mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden.

Innerhalb einer Trinkwasserinstallation kann eine ebenso hohe Diversität nachgewiesen werden. So werden an der Trinkwasserinstallation 1 neben der Gattung *Pseudomonas* weitere Non-Fermenter nachgewiesen. In der Probe 2_C wird kein Bakterienwachstum auf dem Cetrimid-Nährmedium nachgewiesen, während bei derselben Probe auf einem R2A-Nährmedium die Gattung *Acidovorax* nachgewiesen werden kann. In diesem Fall ist eine wahrscheinliche Speziesidentifikation (*Acidovorax temperans*) möglich. Eine ähnliche Gattungsvielfalt auf den beiden Nährmedien sowie bei den unterschiedlichen Probeentnahmearten ist bei einer Untersuchung der Probe 3 zu erkennen.

Tabelle 11: Übersicht über die nachgewiesenen Bakterienspezies in den Trinkwasserproben 1 bis 6. Für die Probenbezeichnung vergleiche Anhang I. Die Trinkwasserproben wurden nach 3.2.2 mittels Membranfiltration untersucht. Rasenwachstum bezeichnet ein nicht auszählbares Koloniewachstum. Die Werte (fettgedruckte Zahlen) beziehen sich auf Koloniebildende Einheiten je 100 ml filtrierter Probe. Die Werte in Klammern stehen für den erreichten MALDI-TOF-MS Score (vergleiche 2.5.2). Schrägstriche stehen für verschiedene mögliche Spezies. Die vertikalen Doppellinien begrenzen die unterschiedlichen Entnahmepunkte.

	Proben-ID	Identifizierte Keime auf Cetrimid/ KBE (100 ml) ⁻¹	Identifizierte Keime auf R2A/ KBE (100 ml) ⁻¹	Gebäudeart
Trinkwasserinstallation 1	1_C	0	Rasenwachstum: <i>Brevundimonas aurantiaca</i> (2.027)	Albau
	1_A	21 <i>Ps. tolaasii</i> (1.990)/ <i>extremorientalis</i> (1.949)/ <i>azotoformans</i> (1.936)/ <i>marginalis</i> (1.925)	Rasenwachstum: <i>Ps. extremorientalis</i> (1.958)/ <i>marginalis</i> (1.926)	
	2_C	0	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (2.057)	
	3_C	6 <i>Sphingomonas sp.</i> (1.919)	Rasenwachstum: <i>Chryseobacterium scophthalmum</i> (2.162)	
	3_B	7 <i>Ps. synxantha</i> (2.161)/ <i>libanensis</i> (2.071)/ <i>fluorescens</i> (2.064)	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (2.025)	
	3_A	18 <i>Ps. synxantha</i> (2.170)/ <i>libanensis</i> (2.093)/ <i>extremorientalis</i> (2.084)	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (2.144)	
Trinkwasserinstallation 2	4_C	0	Rasenwachstum: <i>Brevundimonas aurantiaca</i> (2.027) od. <i>Acinetobacter tjernbergiae</i> (1.755) od. <i>Acinetobacter parvus</i> (1.708)	Neubau
	4_A	1 <i>Ps. libanensis</i> (1.976)/ <i>synxantha</i> (1.999)/ <i>extremorientalis</i> (1.927)	12 <i>Ps. synxantha</i> (2.060)/ <i>libanensis</i> (2.001)/ <i>fluorescens</i> (1.995)	
		1 <i>Ps. synxantha</i> (2.129)/ <i>libanensis</i> (2.063)		
	5_C	0	0	
	5_A	1 <i>Ps. libanensis</i> (2.134), <i>synxantha</i> (2.160), <i>fluorescens</i> (2.126)	16 <i>Ps. synxantha</i> (2.227)/ <i>fluorescens</i> (2.090)	
		1 <i>Ps. synxantha</i> (2.189), <i>fluorescens</i> (2.102)		
	6_C		0 84 <i>Brevibacterium casei</i> (2.351)	
	6_A	10 <i>Ps. synxantha</i> (2.005)/ <i>libanensis</i> (1.983)	Rasenwachstum: <i>Ps. azotoformans</i> (1.999)/ <i>extremorientalis</i> (1.998)	

Nicht nur das Vorkommen, sondern auch die Verteilung des Vorkommens ist unterschiedlich. Vergleicht man die Installationen 1 und 2, so ist in den Abbildungen 9 und 10 zu erkennen, dass in der Trinkwasserinstallation 1 die Gattung *Acidovorax*, in der Trinkwasserinstallation 2 die Gattung *Pseudomonas* am stärksten vertreten ist. Die übrigen Trinkwasserinstallationen weisen andere Verteilungen bezüglich der Gattungen auf (vergleiche Anhang III).

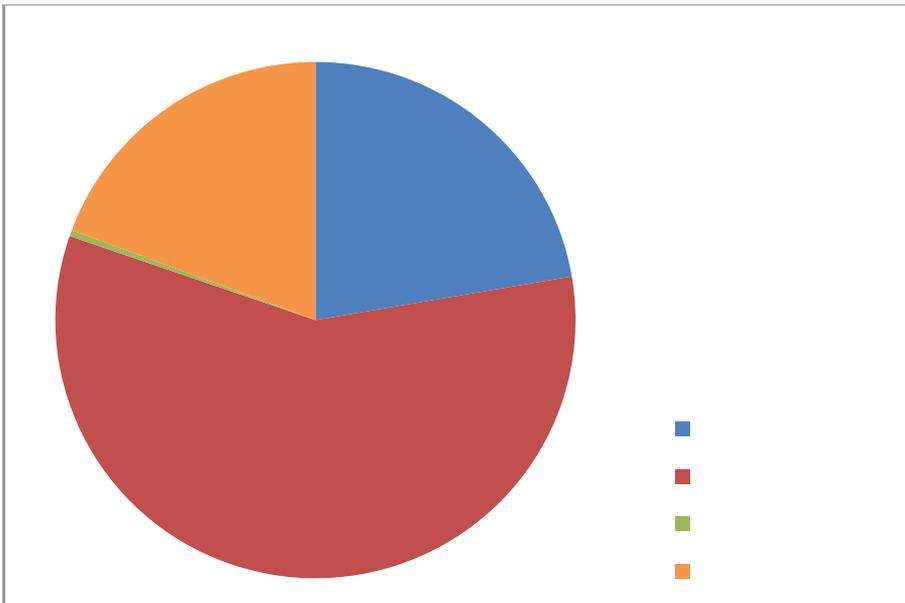


Abbildung 9: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 1. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 1, 2 und 3. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgt nicht. Die Probe 2 konnte nicht nach Zweck A untersucht werden, die Probe 3 wurde zusätzlich nach Zweck B untersucht. Insgesamt wurden 1200 ml Trinkwasserprobe untersucht.

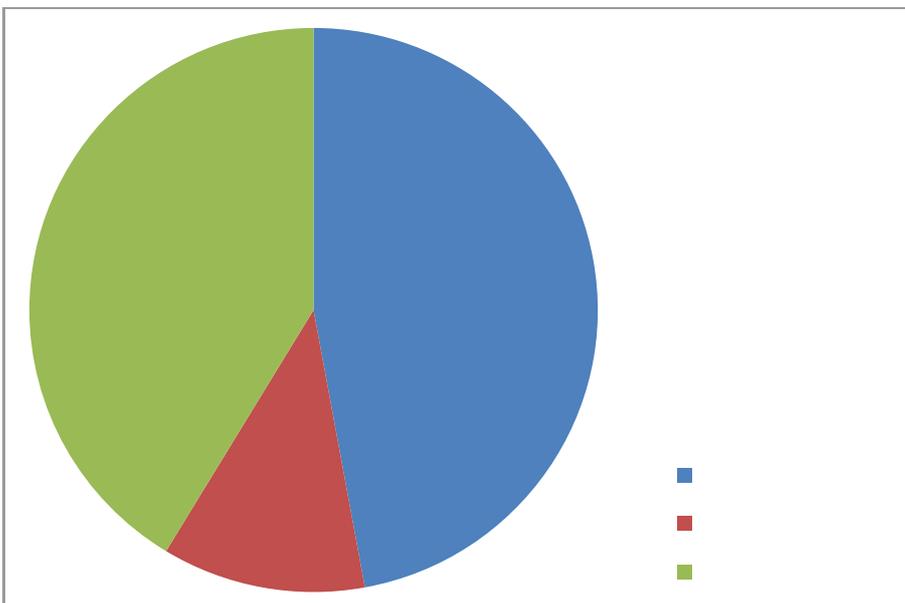


Abbildung 10: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 2. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 4, 5 und 6. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgt nicht. Insgesamt wurden 1200 ml Trinkwasserprobe untersucht.

Bei einem Vergleich aller Häuser bezüglich ihres Baujahres (Altbauten bezeichnen Gebäude, die vor 1946 errichtet wurden), wird deutlich, dass die Anzahl an Non-Fermentern in den Alt-

bauten fast doppelt so hoch ist, wie die Anzahl in Neubauten (vergleiche Abbildung 11). Die Vielzahl an unterschiedlichen Non-Fermentern ist jedoch in den Neubauten (7 Gattungen) höher als in den Altbauten (5 Gattungen) (vergleiche Abbildungen 12 und 13).

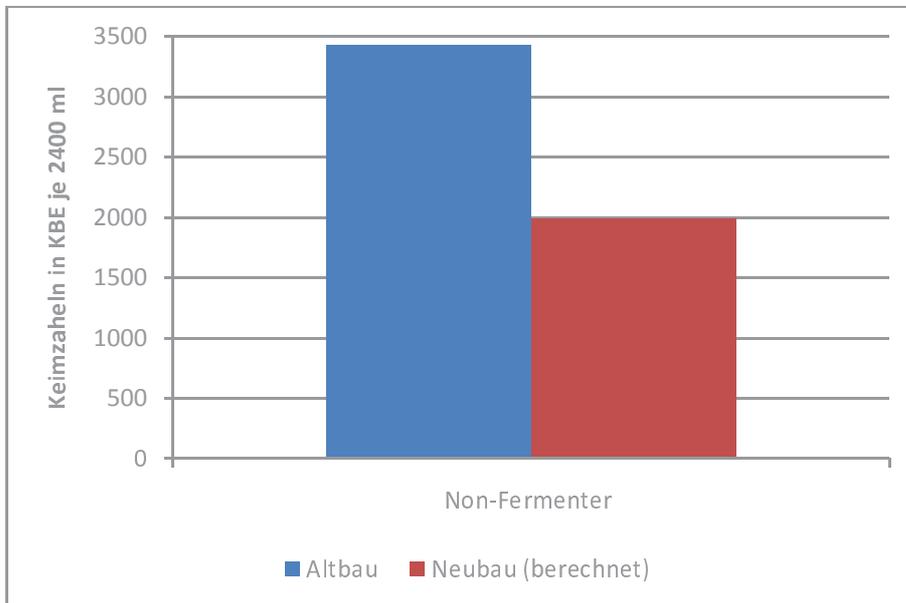


Abbildung 11: Darstellung über den Vergleich der Anzahl an nachgewiesenen Non-Fermentern in Trinkwasserproben in Altbauten und in Neubauten. Bei den Neubauten wurden insgesamt 9600 ml Trinkwasserprobe untersucht, die ermittelten Werte für den Vergleich zu den nachgewiesenen Non-Fermentern in Altbauten allerdings auf 2400 ml herunter gerechnet.

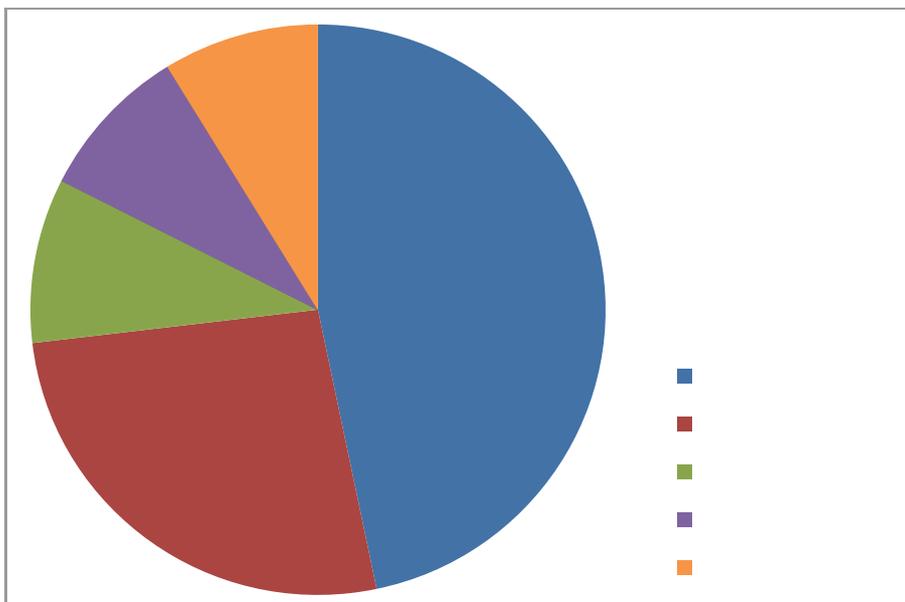


Abbildung 12: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in allen Trinkwasserproben, die in Altbauten entnommen wurden. Insgesamt wurden 1200 ml Trinkwasserprobe untersucht.

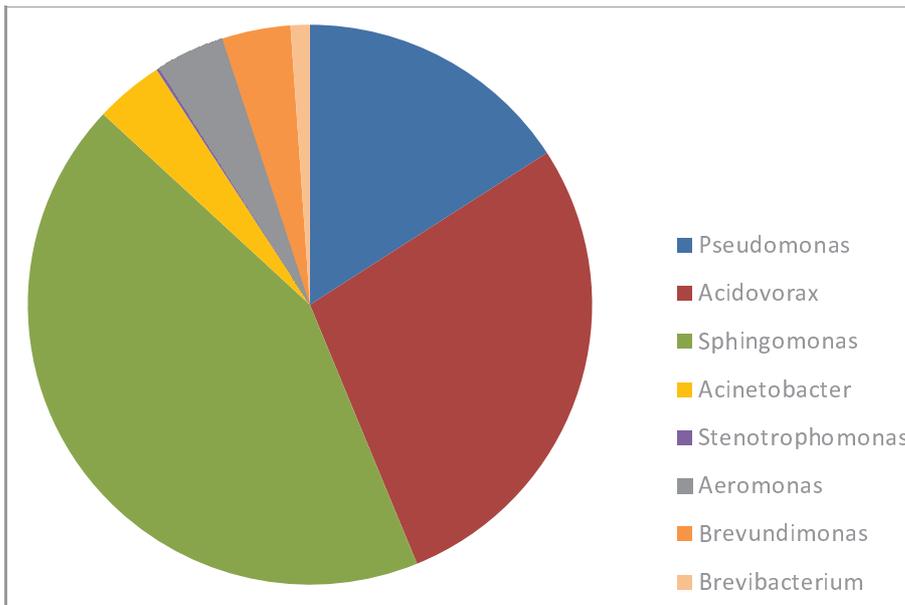


Abbildung 13: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in allen Trinkwasserproben, die in Neubauten entnommen wurden. Insgesamt wurden 4800 ml Trinkwasserprobe untersucht, die ermittelten Werte für den Vergleich zu den nachgewiesenen Non-Fermentern in Altbauten allerdings auf 1200 ml herunter gerechnet.

Sieben ausgewählte Kolonien wurden zur besseren Identifikation der Gattung und der Spezies mit einer PCR und einer anschließenden Sequenzierung nach 3.2.4 untersucht. Es wurden Proben ausgewählt, die mittels MALDI-TOF-MS eine wahrscheinliche oder sichere Gattungsidentifikation sowie teilweise eine wahrscheinliche Speziesidentifikation hatten (vergleiche Abschnitt 2.5.2). Die eingesetzten Kolonien waren zuvor auf R2A-Nährmedien gewachsen (vergleiche 3.2.2) und sind anschließend auf DEV-Nährmedium als Reinkultur angesetzt worden.

Es handelte sich um die Proben 4_A, 5_A, 7_A, 10_A, 18_C und 26_C. Die Probe 16_C wurde nach einer Vereinzelnung auf selbstgegossenem CASO-Nährmedium ebenfalls in der PCR vervielfacht. In der darauf folgenden Gelelektrophorese zeigte sie allerdings keine Bande, weswegen sie nicht sequenziert wurde (vergleiche Abbildung 14).

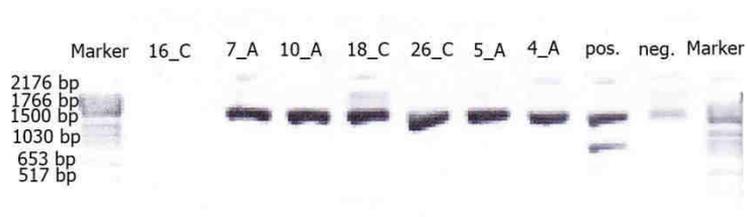


Abbildung 14: Darstellung des Gelbildes nach der PCR. Bei der Probe 16_C ist zu erkennen, dass keine Bande nachgewiesen wurde. Bei den übrigen Proben konnte jeweils die Bande bei 1500 bp nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die Größe des 16S-rDNA-Fragments.

Die restlichen Proben wurden nach 3.2.4 sequenziert und die Sequenzen (vergleiche Anhang V) mittels NCBI-BLAST mit einer Datenbank verglichen.

Das Ergebnis des BLASTs sowie der erreichte BLAST-Score und die BLAST-Genauigkeit sind in der Tabelle 12 neben den Ergebnissen, die mit der MALDI-TOF-MS ermittelt wurden, aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass die durch die Sequenzanalyse ermittelten Spezies in keinem der Fälle den mit MALDI-TOF-MS ermittelten Spezies gleichen. Der BLAST-Score variiert von Probe zu Probe, liegt aber immer zwischen 1365 und 1448. Die BLAST-Genauigkeit liegt abgesehen von Probe 26_C (hier wird ein Wert von 99 % erreicht) stets bei 100 %.

Tabelle 12: Auflistung der mittels PCR und anschließender Sequenzierung nach 3.2.4 identifizierten *Pseudomonas* Spezies sowie der BLAST-Score und die BLAST-Genauigkeit. Für die Probenbezeichnung vergleiche Anhang I. Nebenstehend sind die Ergebnisse, die mittels MALDI-TOF-MS ermittelt wurden, aufgeführt. Die Zahlen in Klammern stehen dabei für den jeweils erreichten MALDI-TOF-MS Score (vergleiche Abschnitt 2.5.2).

Proben-ID	MALDI-Ergebnis von R2A-Nährmedium nach Isolation	Ergebnis der Sequenzierung	NCBI-BLAST-Score	BLAST -Genauigkeit
4_A	<i>Pseudomonas synxantha</i> (2.060)/ <i>libanensis</i> (2.001)/ <i>fluorescens</i> (1.995)	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	1417	100%
5_A	<i>Pseudomonas synxantha</i> (2.227)/ <i>fluorescens</i> (2.090)	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	1365	100%
7_A	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (1.993)/ <i>kilonensis</i> (1.981)	<i>Pseudomonas migulae</i>	1365	100%
10_A	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (1.945)/ <i>kilonensis</i> (1.888)	<i>Pseudomonas migulae</i>	1448	100%
18_C	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (2.200), <i>oleovorans</i> (2.166)	<i>Pseudomonas migulae</i>	1445	100%
26_C	<i>Pseudomonas koreensis</i> (2.025), <i>corrugata</i> (1.761)	<i>Pseudomonas baetica</i> / <i>fluorescens</i>	1365	99%

Die massenspektrometrischen Gattungsidentifikationen werden durch die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigt. Insgesamt werden drei verschiedene *Pseudomonas* Spezies nachgewiesen. Die Probe 26_C kann als einzige auch mit der Sequenzierung nicht eindeutig identifiziert werden. Für diese Probe erzielen die Spezies *Pseudomonas baetica* sowie *Pseudomonas fluorescens* gleichwertige Score-Werte.

4.2 Der Anteil der Non-Fermenter an der Gesamtkeimbelastung

Um eine Relation der nachgewiesenen Non-Fermenter zu der Gesamtkeimbelastung der Trinkwasserproben zu ermöglichen, wurden 33 ausgewählte Trinkwasserproben angelehnt an

die Trinkwasserverordnung untersucht. Zusätzlich wurde ein erweiterter Ansatz der Proben für einen Vergleich zwischen dem Gesamtkeimwachstum bei 36° C und dem Wachstum von Non-Fermentern sowie einer Reinkultivierung und einer Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS durchgeführt (vergleiche 3.2.2). Die Werte, die bei einer Untersuchung angelehnt an die Trinkwasserverordnung ermittelt werden konnten, wurden von der Einheit KBE je ml auf KBE je 100 ml hochgerechnet, um einen Vergleich zu der Anzahl an nachgewiesenen Non-Fermentern in 100 ml zu ermöglichen. Durch dieses Vorgehen wurde lediglich ein Untersuchungsparameter (die Untersuchungsart) geändert, indem das Plattengussverfahren (Gesamtkeimzahl) mit dem Membranfiltrationsverfahren (Non-Fermenter-Anzahl) verglichen wurde.

Als Ergebnis dieser Untersuchung kann gezeigt werden, dass die Non-Fermenter in 12 der 33 untersuchten Proben weniger als 10 % der Gesamtkeimbelastung des Trinkwassers ausmachen (vergleiche Anhang VI). Bei sechs der 33 Proben können keine Non-Fermenter nachgewiesen werden. Die vier Proben, die einen Anteil an Non-Fermentern oberhalb der 10 % der Gesamtkeimbelastung haben, sind die Proben 9_A (mit einem Anteil an Non-Fermentern von 87 %), 10_A (mit einem Anteil an Non-Fermentern von 44 %), 27_A (mit einem Anteil an Non-Fermentern von 17 %) und 30_C (mit einem Anteil an Non-Fermentern von 15 %).

Einige Ergebnisse weisen eine umgekehrte Relation auf. So wird bei sechs Proben keine Gesamtkeimzahlen (Gesamtkeimzahl = 0), sondern ausschließlich Non-Fermenter nachgewiesen. Bei diesen Proben handelt es sich um die Nummern 4_A, 11_A, 17_A, 29_A und 30_A (vergleiche Tabelle 13). Sowohl bei den vier Proben oberhalb der 10 % als auch bei den sechs Proben ohne Gesamtkeimzahl handelt es sich mit Ausnahme der Proben 30_C und 30_A um Proben aus Neubauten.

Bei fünf Proben konnten weder Gesamtkeimzahlen noch ein Wachstum von Non-Fermentern nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Übersicht über die nachgewiesenen Non-Fermentern nach einem Membranfiltrationsverfahren. Aufgeführt sind die Ergebnisse, bei denen keine Gesamtkeimzahl, sondern lediglich Non-Fermenter in den Trinkwasserproben nachgewiesen werden konnten.

Proben-ID	Non-Fermenter auf DEV in KBE (100 ml) ⁻¹
4_A	4
11_A	45
17_A	19
27_A	57
29_A	18
30_A	11

4.3 Die Gesamtkeimzahlen bei unterschiedlichen Probeentnahmearten

Die Probeentnahmen wurden nach 3.2.1 nach Zweck C (wie der Verbraucher es benutzt) und Zweck A (mit vorhergehender Demontage der Installationen, Desinfektion und Spülvorgang) durchgeführt. Dabei wurden alle Proben auf die Gesamtkeimzahlen bei 20° C sowie bei 36° C untersucht. Eine Untersuchung nach Zweck A ist bei den Proben 2, 18, 19, 20 und 26 nicht möglich gewesen. Bei der Probe 3 erfolgte zusätzlich eine Untersuchung nach Zweck B.

Die Gesamtkeimzahl ist bei einer Untersuchung nach Zweck C in allen untersuchten Trinkwasserproben größer, als bei einer Untersuchung nach Zweck A. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Gesamtkeimzahlen bei einer Inkubationstemperatur von 36° C deutlich höher liegen als bei einer Inkubationstemperatur von 20° C. Bei einer exemplarischen Betrachtung der Probe 1 kann gezeigt werden, dass die Gesamtkeimzahl nach einer Inkubation bei 36° C bei einer Untersuchung nach Zweck C bei 485 KBE je ml und bei einer Untersuchung nach Zweck A bei 128 KBE je ml liegt. Dies entspricht einem Anteil von 26,39 % der Gesamtkeimzahl bei einer Untersuchung nach Zweck C. Einen hohen Wert weist die Probe 9 mit einem Wert von 3808 KBE je ml bei einer Untersuchung nach Zweck C auf. Bei einer Untersuchung derselben Probe nach Zweck A wird ein Wert von 1 KBE je ml ermittelt. Dies entspricht einem Anteil von 0,03 % (vergleiche Abbildung 15).

Die Ergebnisse einer Probeentnahme nach Zweck A sind breit gefächert. Für die Untersuchungen aller 26 Proben nach Zweck A ergibt sich mit Ausnahme der Probe 1 für die Gesamtkeimzahlbelastung bei einer Inkubationstemperatur von 20° C ein Wert von 0 KBE je ml. Für die Probe 1 wird ein Wert von 42 KBE je ml ermittelt (vergleiche Anhang VIII).

Bei einer Untersuchung der Trinkwasserproben nach Zweck A und einer Inkubationstemperatur von 36° C können divergente Werte zwischen 128 und 1 KBE je ml ermittelt werden (vergleiche Abbildung 16). Der Anteil der Proben, die einen Wert größer oder gleich 10 KBE je ml erreichen, liegt bei 4 von 27 Proben (14,81 %). Einen Wert zwischen 10 und 1 erreichen 6 der 27 Proben (22,22 %). Der größte Anteil weist eine Gesamtkeimzahl von 0 KBE je ml auf (62,96 %).

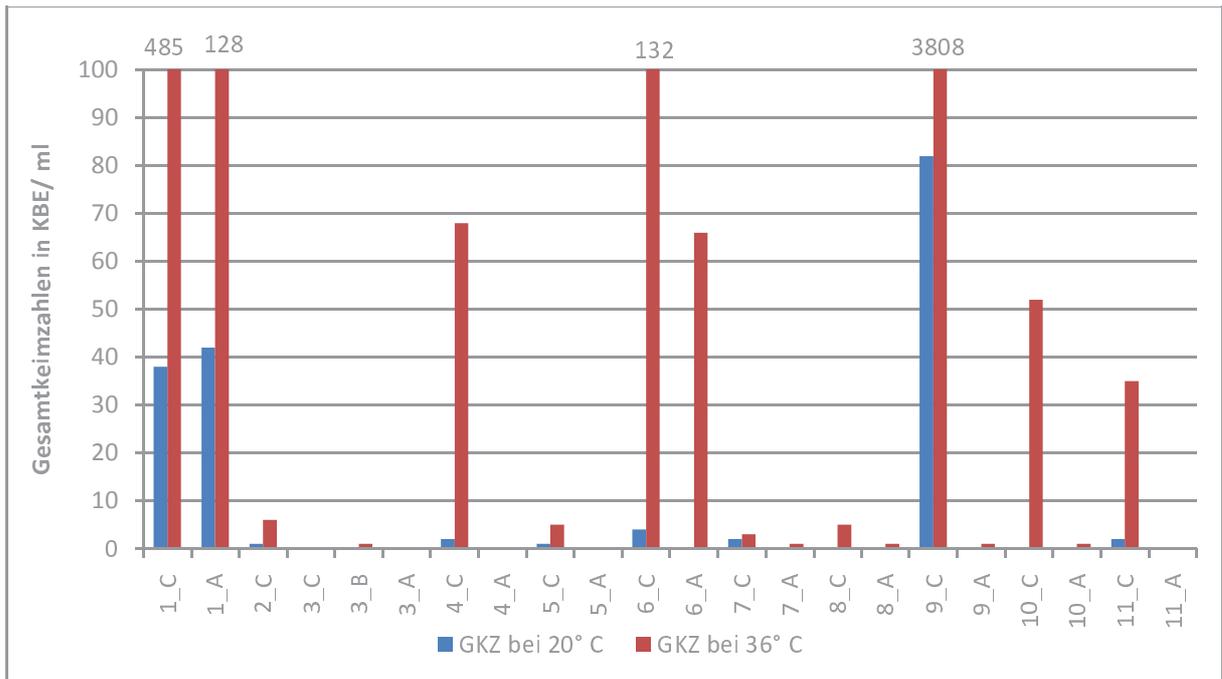


Abbildung 15: Graphische Darstellung der ermittelten Gesamtkeimzahlen der untersuchten Trinkwasserproben bei den Inkubationstemperaturen von 20° C und 36° C im Vergleich. Die Darstellung steht dabei exemplarisch für alle untersuchten Trinkwasserproben (vergleiche Anhang VII). Die Gesamtkeimzahlen wurden gemäß der Methode 3.2.2 ermittelt.

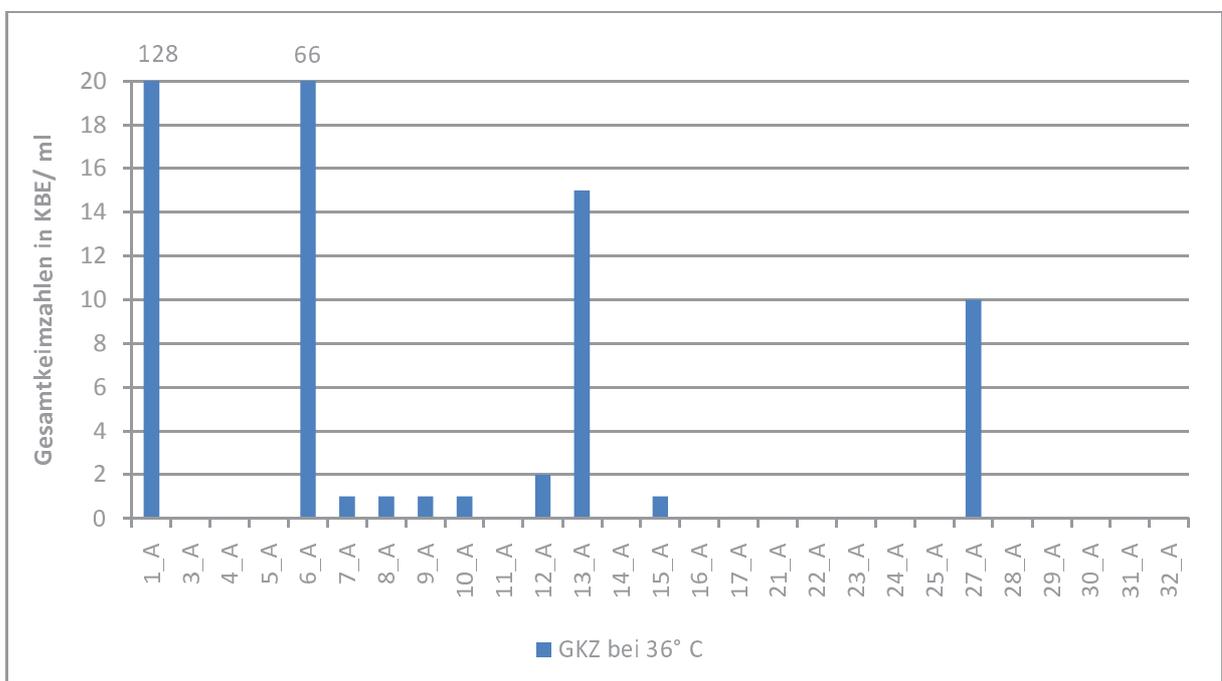


Abbildung 16: Darstellung der mittels Plattengussverfahren nach 3.2.2 ermittelten Gesamtkeimzahlen aller Trinkwasserproben bei einer Untersuchung nach Zweck A und einer Inkubationstemperatur von 36° C.

Die Grenzwerte nach 2.2 werden teilweise überschritten. Dabei ist eine Überschreitung des Grenzwertes von 100 KBE je ml bei einer Entnahme nach Zweck A nur bei einer der 27 Proben nachweisbar. Bei 10 der 32 nach Zweck C untersuchten Proben (also bei 31,25 %) können Grenzwertüberschreitungen der von der Trinkwasserverordnung vorgegebenen Grenzwerte festgestellt werden, wovon wiederum zwei Proben Werte im vierstelligen Bereich erreichen.

4.4 Der Wachstumsvergleich der Non-Fermenter auf ausgewählten Nährmedien

In 4.1 konnte das unterschiedliche Wachstum an Non-Fermentern auf den ausgewählten Nährmedien festgestellt werden. In der Abbildung 17 ist das Verhältnis des Wachstums der Non-Fermenter auf den eingesetzten Nährmedien Cetrimid und R2A zueinander dargestellt. Um eine vergleichbare Darstellung zu erhalten, wurde ein nicht auszählbares Bakterienwachstum (Rasenwachstum) einem Wert von 300 KBE je 100 ml gleichgesetzt. Dabei werden exemplarisch die Proben 12 bis 21 gezeigt, die Ergebnisse sind auf die übrigen Proben übertragbar (vergleiche Anhang IX). Es kann nachgewiesen werden, dass die Non-Fermenter abgesehen von fünf Ausnahmen bei allen Proben auf dem R2A-Nährmedium deutlich zahlreicher gewachsen sind, als auf dem Cetrimid-Nährmedium. Das Wachstum beschränkt sich auf dem Cetrimid-Nährmedium auf unter 50 KBE je 100 ml Probenvolumen. In den fünf Ausnahmefällen ist das Wachstum auf dem Cetrimid-Nährmedium bis auf eine Ausnahme (die Probe 12_C) nicht höher als das Wachstum auf dem R2A-Nährmedium, sondern auf einem ähnlichen Niveau.

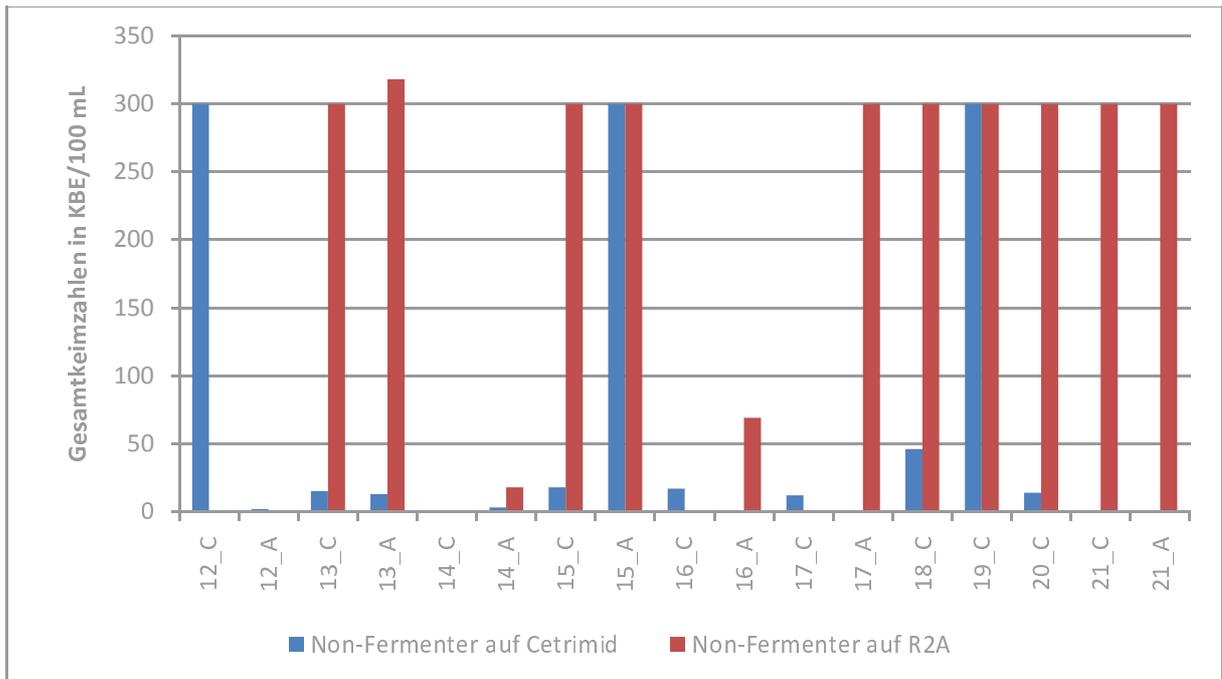


Abbildung 17: In dem Balkendiagramm ist das Wachstum der Non-Fermenter auf dem Cetrimid-Nährmedium dem Wachstum auf dem R2A-Nährmedium gegenüber gestellt. Die Proben wurden gemäß 3.2.2 untersucht. Auf der vertikalen Achse sind die Gesamtkeimzahlen der Non-Fermenter in KBE je 100 ml angegeben. Ein Rasenwachstum wird einem Wert von 300 KBE je 100 ml gleichgesetzt. Auf der horizontalen Achse stehen die Probenbezeichnungen. Die Graphik gilt als ein Exempel für alle 60 Proben (vergleiche Anhang IX).

Die Diversität der Non-Fermenter in allen untersuchten Proben ist auf dem Cetrimid-Nährmedium mit vier verschiedenen Gattungen geringer als auf dem R2A-Nährmedium (sieben Gattungen) (vergleiche Abbildungen 18 und 19).

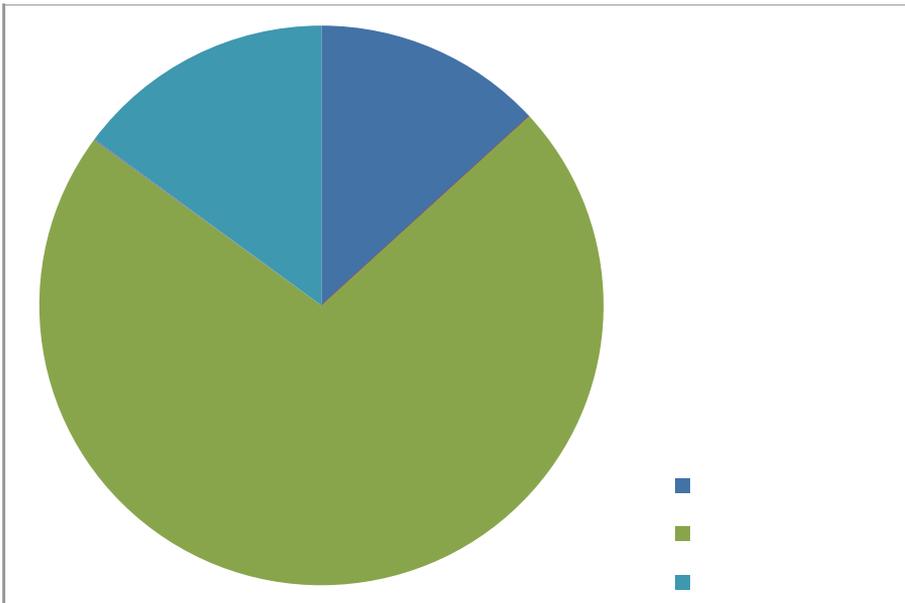


Abbildung 18: Darstellung der Vielzahl an nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen bei einer Untersuchung auf Cetrimid-Nährmedium. Es wurden insgesamt 5,9 l Trinkwasserprobe untersucht. Der Legendeneintrag der Gattung *Acinetobacter* wurde entfernt, da der Anteil von 1 KBE in 5900 ml zu gering war, um ihn im Diagramm darstellen zu können.

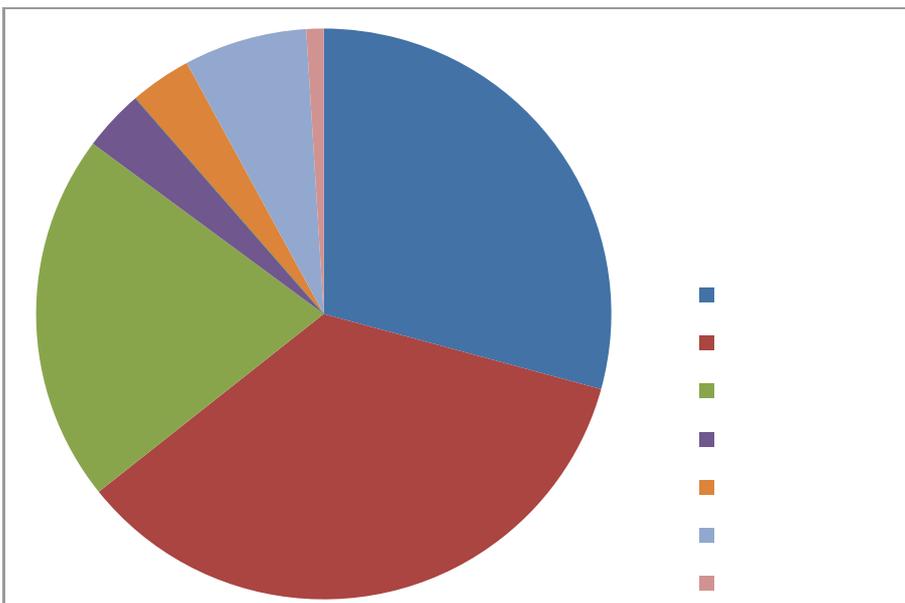


Abbildung 19: Darstellung der Vielzahl an nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen bei einer Untersuchung auf R2A-Nährmedium. Es wurden insgesamt 5,9 l Trinkwasserprobe untersucht.

Nur bei 16 der insgesamt 60 untersuchten Trinkwasserproben (26,7 %) kann die gleiche Gattung auf beiden Nährmedien nachgewiesen werden. Bei 15 Proben handelt es sich dabei um die Gattung *Pseudomonas* und bei einer Probe (15_A) um die Gattung *Sphingomonas*. Abgesehen von zwei Proben geschieht dies allerdings stets in unterschiedlichen Keimzahlen. Die

gleiche Spezies kann nur bei einer Probe der 60 Proben auf beiden Nährmedien nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um die Spezies *Pseudomonas putida*, die in der Probe 9_C nachgewiesen wurde.

4.5 Die Prozessoptimierung der Untersuchungsmethodik

Im Rahmen einer Prozessoptimierung sollte ermittelt werden, unter welchen Bedingungen die Gattung *Pseudomonas* ein optimales Wachstum zeigt. Die Untersuchung erfolgte nach 3.2.7. Der Bakterienstamm *Pseudomonas putida* wurde in einer Doppelbestimmung angesetzt (ein Bakterienstamm wurde in der Probe 9_C auf einem R2A-Nährmedium und ein weiterer auf einem Cetrimid-Nährmedium nachgewiesen), da es sich dabei um einen wichtigen Vertreter der Gattung *Pseudomonas* handelt. Der andere eingesetzte Wildstamm war *Pseudomonas koreensis* (dieser Stamm wurde in der Probe 25_A auf einem R2A-Nährmedium nachgewiesen).

Die ermittelten Werte sind mit der visuellen Auswertung der Plattennährmedien kongruent. Bakteriensuspensionen, die von Nährmedien stammen, auf denen ein dichtes (bis zum dritten Ausstrich verlaufendes) Wachstum zu erkennen ist, erreichen hohe Extinktionswerte (für die Berechnung vergleiche Anhang X), was wiederum auf eine hohe Zelldichte in der Flüssigkeit hindeutet (vergleiche Anhang XI). *Pseudomonas koreensis* zeigt bei allen Untersuchungsbedingungen im Vergleich zu *Pseudomonas putida* ein deutlich geringeres Wachstum.

Für die Ermittlung des optimalen Nährmediums sowie der optimalen Inkubationstemperatur werden die Extinktionsmesswerte graphisch dargestellt. In Abbildung 20 ist erkennbar, dass das mit den meisten Pseudomonaden bewachsene Nährmedium das CFC-Nährmedium ist. Bei dem Bakterienstamm von *Pseudomonas koreensis* ist, abgesehen von dem großen Wachstum auf dem CFC-Nährmedium, kein Unterschied zwischen den Nährmedien erkennbar. Das am zweitstärksten bewachsene Nährmedium ist bei der Gattung *Pseudomonas putida* das Cetrimid nach Ph.Eur-Nährmedium. Dahinter liegen die beiden anderen Nährmedien mit einem geringeren Wachstum. Auf dem Cetrimid-Nährmedium ist bei dem Wildstamm *Pseudomonas putida* ein höherer Wert gemessen worden. Hierbei handelt es sich um die Probe, die bei 25° C inkubiert wurde.

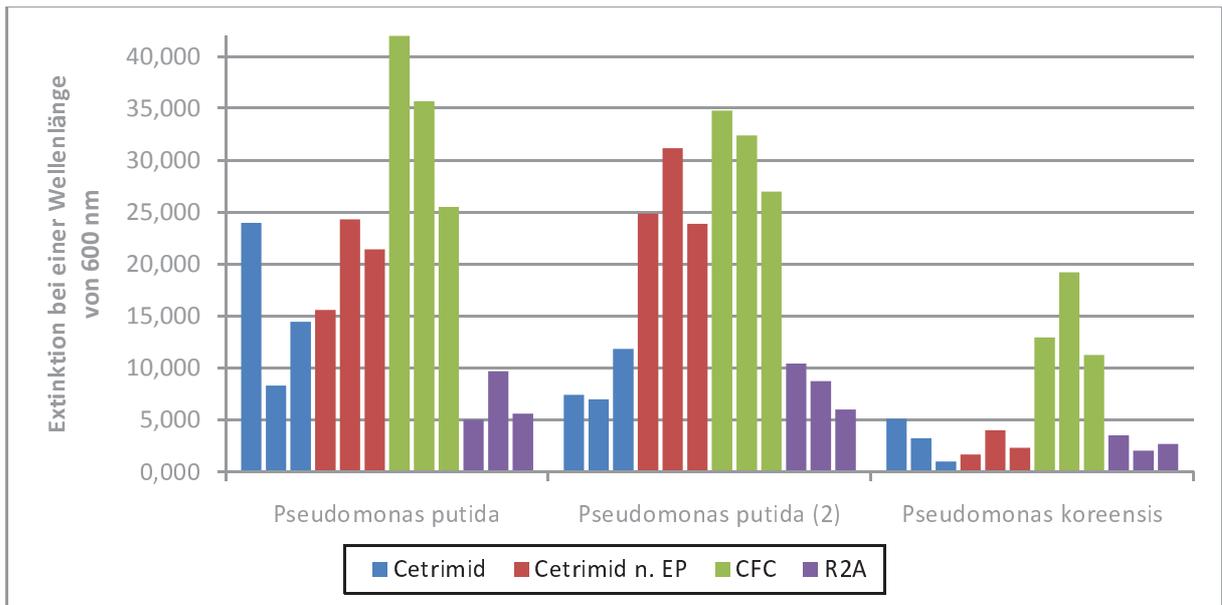


Abbildung 20: Darstellung über die Ergebnisse des Optimierungsversuches bezüglich des Nährmedium nach Abschnitt 3.2.7. Auf der Vertikalen Achse sind die berechneten Extinktionen der Bakteriensuspensionen bei einer Wellenlänge von 600 nm aufgeführt. Auf der horizontalen Achse stehen die untersuchten Spezies der Gattung *Pseudomonas*.

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass es schwierig ist, eine optimale Inkubationstemperatur festzulegen. Die Extinktionswerte für *Pseudomonas putida* liegen für alle Temperaturen zwischen 5,000 und 42,000, für *Pseudomonas putida* (2) liegen sie zwischen 7,000 und 32,000. Die Extinktionswerte für *Pseudomonas koreensis* liegen zwischen 1,000 und 19,000. *Pseudomonas putida* hat den Höchstwert bei einer Inkubationstemperatur von 25° C (auf dem CFC-Nährmedium). Für *Pseudomonas putida* (2) liegt der Höchstwert ebenfalls bei einer Temperatur von 25° C, wobei der Wert bei 30° C nur 3 Skalen-Einheiten unterhalb des Höchstwertes bei 25° C liegt. Für *Pseudomonas koreensis* liegt der Maximalwert bei einer Inkubationstemperatur von 30° C.

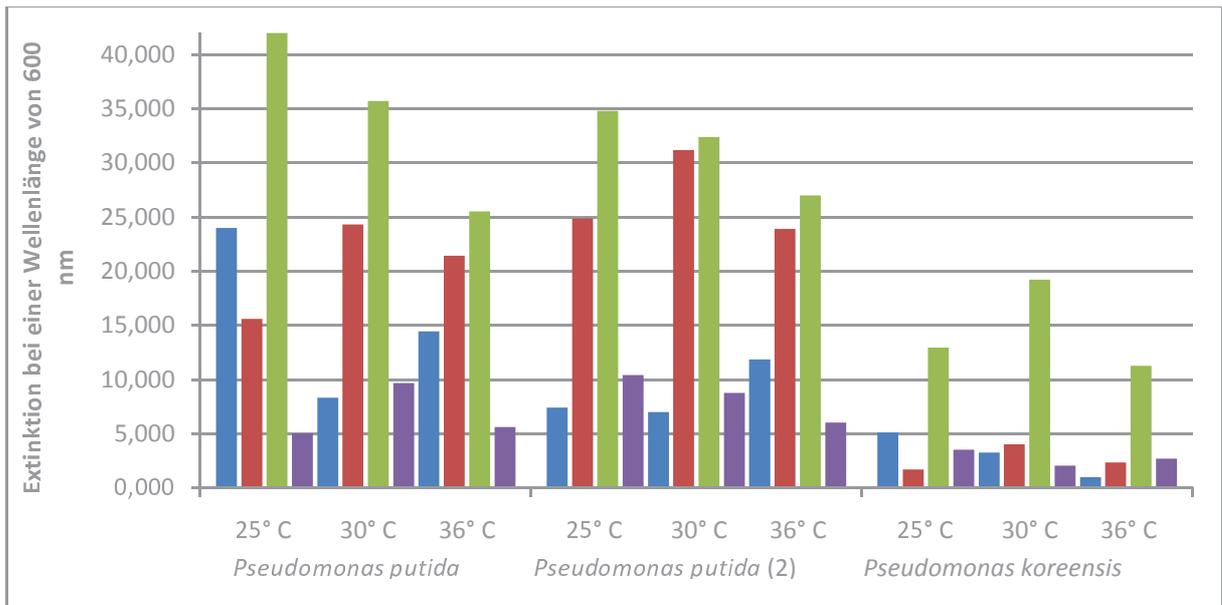


Abbildung 21: Darstellung über die Ergebnisse des Optimierungsversuches bezüglich der Inkubationstemperatur nach Abschnitt 3.2.7. Auf der Vertikalen Achse sind die berechneten Extinktionen der Bakteriensuspensionen bei einer Wellenlänge von 600 nm aufgeführt. Auf der horizontalen Achse stehen die untersuchten Spezies der Gattung *Pseudomonas* sowie die Inkubationstemperaturen. Die Farben markieren dabei die eingesetzten Nährmedien nach Abbildung 20.

4.6 Die Prozessoptimierung der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-MS

Im Rahmen einer Prozessoptimierung nach 3.2.8 sollte untersucht werden, mit welcher Probenvorbereitung die Bakterienidentifizierung der Non-Fermenter mittels MALDI-TOF-MS am zuverlässigsten gelingt. Eingesetzt wurden die Bakterienstämme *Pseudomonas putida* (nachgewiesen in der Probe 8_C nach 3.2.2 auf einem R2A-Nährmedium), *Acinetobacter ursingii* sowie *Stenotrophomonas maltophilia* (beide in der Probe 11_A nach 3.2.2 auf einem R2A-Nährmedium nachgewiesen). Die Messergebnisse werden miteinander verglichen und so ein Zusammenhang der erreichten Score-Values mit den Vorgehensweisen bei der Probenvorbereitung hergestellt.

Die beschriebene Untersuchung der in Flüssigkeit gelösten Bakterienkolonien wird von den Ergebnisdarstellungen ausgeschlossen, da diese keinen Nachweis erbrachte.

Der Nachweis des Non-Fermenters *Pseudomonas putida* ist bei allen Präparationen auf einem vergleichbaren Niveau (vergleiche Abbildung 22). So können in allen Fällen Score-Values größer 2.000 erreicht werden. Damit handelt es sich um sichere Gattungs- und wahrscheinliche Speziesidentifikationen.

Beim Nachweis von *Acinetobacter ursingii* ist ein Ausreißer des Score-Values bezüglich der Präparation zu erkennen (vergleiche Abbildung 23). Der Score-Value liegt bei einer Identifizierung direkt von dem Membranfilter auf dem R2A-Nährmedium unterhalb von 1.999. Somit handelt es sich in diesem Fall lediglich um eine wahrscheinliche Gattungsidentifikation. Bei den übrigen untersuchten Vorgehensweisen sind keine prägnanten Unterschiede zu erkennen. Die Werte sind größer 2.000 und kleiner 2.999. Es handelt sich somit um sichere Gattungs- und wahrscheinliche Speziesidentifikationen.

Bei dem Nachweis von *Stenotrophomonas maltophilia* sind die Unterschiede, die aus den Präparationen resultieren, deutlicher zu erkennen (vergleiche Abbildung 24). Die filtrierte Probe kann nach einer Isolation auf einem selbstgegossenen DEV-Nährmedium nicht identifiziert werden (in Abbildung 24 fehlt an dieser Stelle der Balken). Die ausgestrichene Probe, die direkt vom R2A-Nährmedium untersucht wurde, erreicht ein Score-Value von 1.432 und liegt somit unter 1.699. Es handelt sich um eine unzuverlässige Identifikation. Die filtrierte Probe, die direkt vom R2A-Nährmedium untersucht wurde, erreicht ein Score-Value von 1.823. Damit handelt es sich um eine wahrscheinliche Gattungsidentifikation. Lediglich die ausgestrichene und auf selbstgegossenem CASO-Nährmedium isolierte Probe, die filtrierte und auf selbstgegossenen CASO-Nährmedium isolierte Probe, sowie die ausgestrichene und auf selbstgegossenen DEV-Nährmedium isolierte Probe erreichen Werte über 2.000 und somit sichere Gattungs- und wahrscheinliche Speziesidentifikationen.

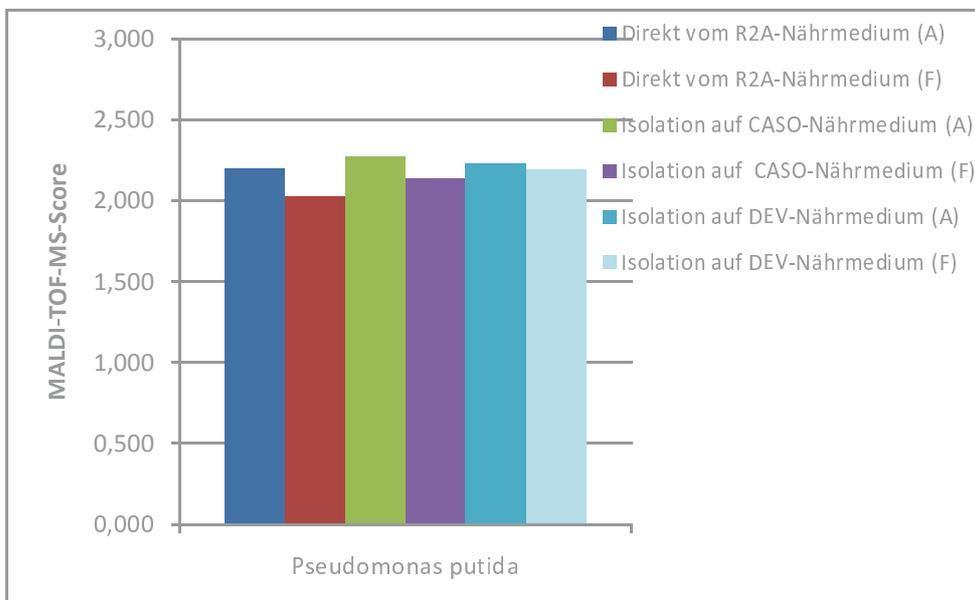


Abbildung 22: Darstellung der Ergebnisse der Prozessoptimierung nach 3.2.8 (*Pseudomonas putida*). Auf der vertikalen Achse stehen die erreichten MALDI-TOF-MS Score-Values. Untersucht wurde das Ergebnis direkt von dem R2A-Nährmedium, nach einer Isolation einer Kolonie auf selbstgegossenes CASO-Nährmedium und nach einer Isolation einer Kolonie auf selbstgegossenes DEV-Nährmedium. Das (A) steht für Ausstrich, das (F) für Filtration.

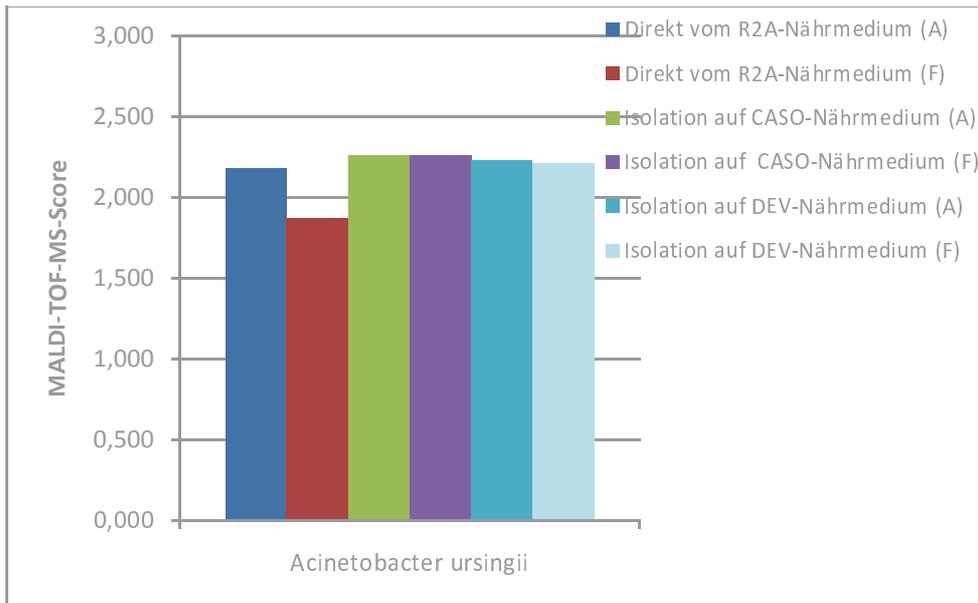


Abbildung 23: Darstellung der Ergebnisse der Prozessoptimierung nach 3.2.8 (*Acinetobacter ursingii*). Auf der vertikalen Achse stehen die erreichten MALDI-TOF-MS Score-Values. Untersucht wurde das Ergebnis direkt von dem R2A-Nährmedium, nach einer Isolation einer Kolonie auf selbstgegegossenes CASO-Nährmedium und nach einer Isolation einer Kolonie auf selbstgegegossenes DEV-Nährmedium. Das (A) steht für Ausstrich, das (F) für Filtration.

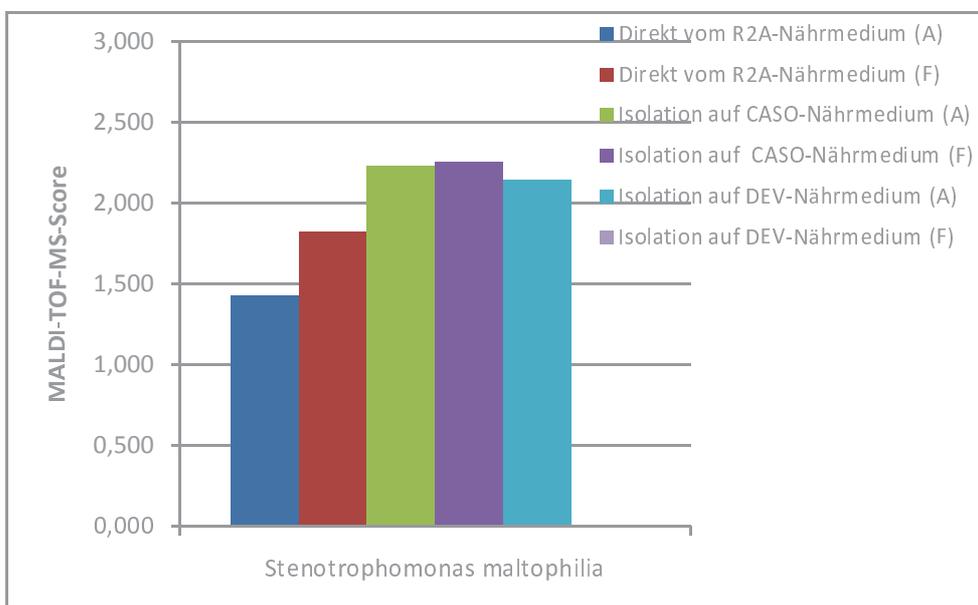


Abbildung 24: Darstellung der Ergebnisse der Prozessoptimierung nach 3.2.8 (*Stenotrophomonas maltophilia*). Auf der vertikalen Achse stehen die erreichten MALDI-TOF-MS Score-Values. Untersucht wurde das Ergebnis direkt von dem R2A-Nährmedium, nach einer Isolation einer Kolonie auf selbstgegegossenes CASO-Nährmedium und nach einer Isolation einer Kolonie auf selbstgegegossenes DEV-Nährmedium. Das (A) steht für Ausstrich, das (F) für Filtration.

5 Diskussion

5.1 Die Diskussion der Diversität nachgewiesener Non-Fermenter

Nach einer Untersuchung der Trinkwasserproben durch eine Membranfiltration und nach einer Inkubation der Membranfilter auf Cetrimid- und R2A-Nährmedium für zwei Tage bei $(30 \pm 2)^\circ \text{C}$ kann als Ergebnis (vergleiche 4.1) festgestellt werden, dass die Diversität an mittels MALDI-TOF-MS nachgewiesenen Non-Fermentern im Trinkwasser hoch ist. Die Diversität variiert nicht nur zwischen den Trinkwasserinstallationen, sondern auch zwischen den einzelnen Proben einer Installation. So können an der Trinkwasserinstallation 1 je nach Entnahmeart und ausgewähltem Nährmedium die Gattungen *Brevundimonas*, *Pseudomonas*, *Acidovorax* und *Sphingomonas* nachgewiesen werden. In der Trinkwasserinstallation 2 können die Gattungen *Brevundimonas*, *Pseudomonas* und *Brevibacterium* nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass nur ein Anteil der Gesamtanzahl verschiedener Gattungen und Spezies im Trinkwasser auf den Nährmedien gewachsen ist. Es kann sich neben den nähr- und hemmstoffbedingten Selektivitäten (näheres hierzu in Abschnitt 5.4) um zufällige Verteilungen handeln. In Trinkwassersystemen, genauer gesagt in dem darin enthaltenen Trinkwasser sind die Mikroorganismen meist nicht gleichmäßig verteilt, sodass je Probeentnahme verschiedene Mikroorganismen nachgewiesen werden können [Kistemann, 2012]. Dies ist auch eine Erklärung für das Vorkommen unterschiedlicher Non-Fermenter in einer Trinkwasserinstallation, also in einem Gebäude.

Des Weiteren lässt sich das Ergebnis durch die VBNC- Formen („viable but nonculturable“) der Bakterien erklären. Darunter wird ein Zustand verstanden, in dem sich die Bakterien nicht vermehren und so auf künstlichen Nährmedien nicht anzüchtbar sind, aber weiterhin lebensfähig bleiben [Oliver, 2005].

Neben dem Vorkommen variiert auch die Verteilung des Vorkommens an Non-Fermenter zwischen den Trinkwasserinstallationen. Während in der Trinkwasserinstallation 1 die Gattung *Acidovorax* am stärksten vertreten ist, macht in der Trinkwasserinstallation 2 die Gattung *Pseudomonas* den größten Anteil aus. Als Erklärung für dieses Ergebnis können ebenfalls die zuvor dargestellten Thesen dienen.

Aus Konkurrenzversuchen (vergleiche Abbildungen 25 und 26) wird deutlich, dass sich verschiedene Gattungen von Non-Fermentern gegenseitig nicht zu beeinflussen scheinen (für die

übrigen Konkurrenzversuche vergleiche Anhang XII). In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* zwar ein stärkeres Wachstum zeigt als die Spezies *Pseudomonas putida*, eine Verdrängung von *Pseudomonas putida* ist jedoch nicht zu erkennen. Das gleiche Ergebnis ergibt sich aus Abbildung 26. So ist zu erkennen, dass *Stenotrophomonas maltophilia* an der Spur von *Pseudomonas koreensis* entlang zu wachsen scheint, eine Konkurrenz ist aber auch in diesem Fall nicht ersichtlich. Daraus lässt sich die Hypothese der Koexistenz im Trinkwasser ableiten, was wiederum auf die geringen Nährstoffansprüche der Non-Fermenter zurückzuführen ist [Steinmetz, 2012].

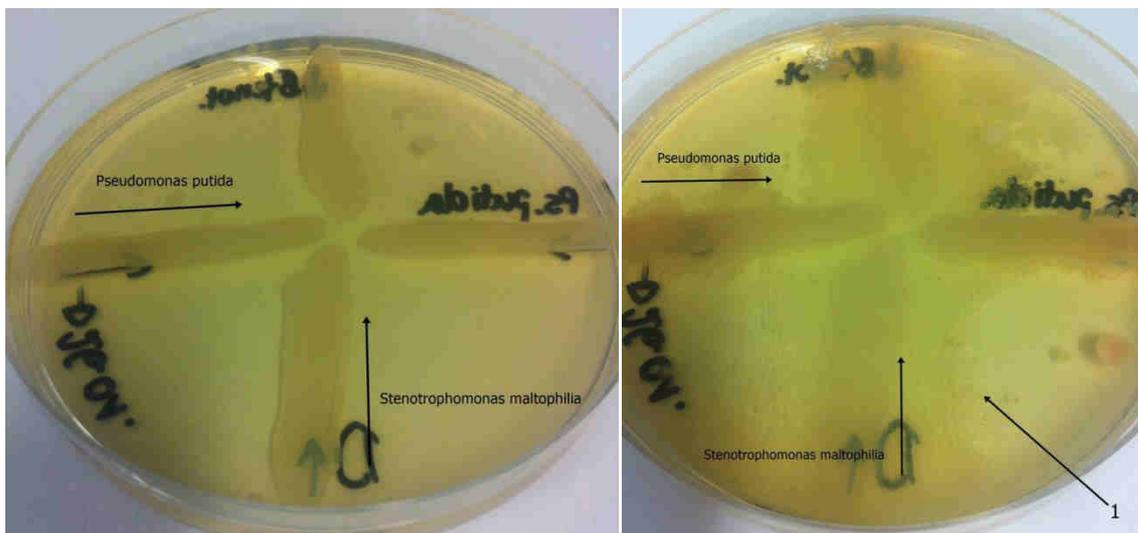


Abbildung 25: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschrieben Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis nach einem Tag Inkubation zu sehen, auf dem rechten Bild nach 4 Tagen Inkubationszeit. Die Non-Fermenter wurde zuvor auf selbstgegossenem CASO-Agar bei 36° C für einen Tag angereichert und dann mit Hilfe eines Glasstabes auf dem entsprechenden Medium entlang eines Striches verteilt. Es ist zu erkennen, dass *Pseudomonas putida* etwas aus der ausgestrichenen Spur heraus gewandert ist (vergleiche linkes mit rechtem Bild). Die 1 deutet dabei auf den Rand des Wachstums von *Stenotrophomonas maltophilia*.

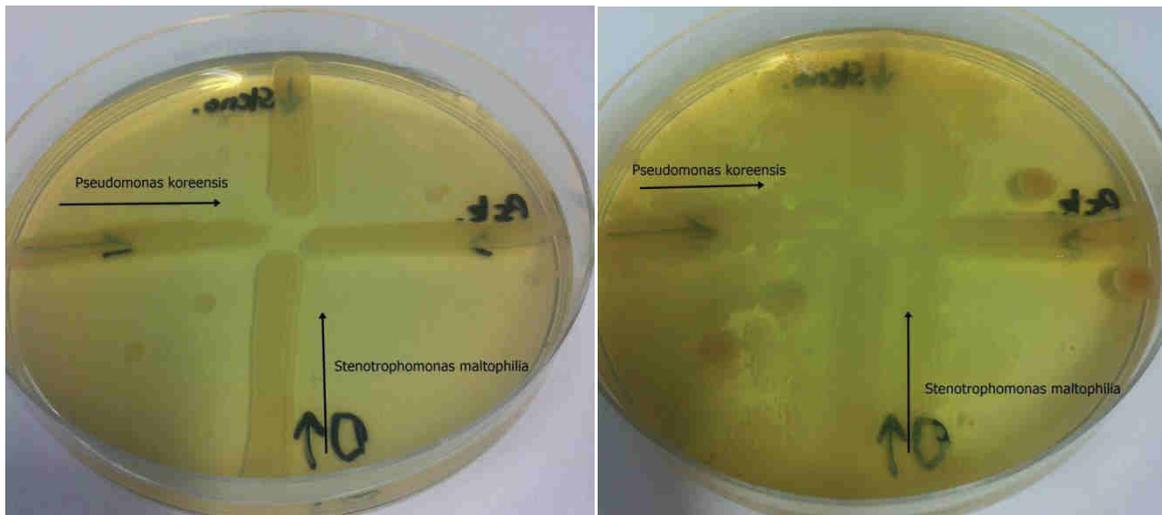


Abbildung 26: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschriebenen Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis nach einem Tag Inkubation zu sehen, auf dem rechten Bild nach 4 Tagen Inkubationszeit. Die Non-Fermenter wurde zuvor auf selbstgegossenem CASO-Agar bei 36° C für einen Tag angereichert und dann mit Hilfe eines Glasstabes auf dem entsprechenden Medium entlang eines Striches verteilt. Es ist zu erkennen, dass *Pseudomonas koreensis* etwas aus der ausgestrichenen Spur heraus gewandert ist (vergleiche linkes mit rechtem Bild). Es ist zu erkennen, dass *Stenotrophomonas maltophilia* entlang der Spur von *Pseudomonas koreensis* zu wachsen scheint.

Bei einer Untersuchung ausgewählter Perlatoren und Duschschräuche kann ebenfalls eine große Diversität nachgewiesen werden. Bei einer exemplarischen Betrachtung der nachgewiesenen Non-Fermenter in der Probe 4 ist zu erkennen, dass nach einer Beprobung nach Zweck C auf dem R2A-Nährmedium ein Rasenwachstum der Gattung *Brevundimonas* nachgewiesen werden kann, während nach einer Beprobung nach Zweck A auf dem R2A-Nährmedium 12 KBE je 100 ml der Gattung *Pseudomonas* nachgewiesen werden können. Die Untersuchung des Perlatoren dieser Entnahmearmatur erfolgte mittels Abstrich, der anschließend in 10 ml NaCl ausgedrückt wurde. Die Flüssigkeit wurde mit NaCl auf 100 ml aufgefüllt und membranfiltriert. Anschließend wurde der Membranfilter auf einem R2A-Nährmedium gelegt und zwei Tage bei 30° C inkubiert. Es kann ein Rasenwachstum der Gattung *Sphingomonas* nachgewiesen werden. Dieselbe Varianz an Gattungen kann bei den übrigen untersuchten Perlatoren (Proben 10, 13 und 21) sowie den Duschschräuchen (Proben 6, 11, 29 und 32) nachgewiesen werden (für die genauen Werte vergleiche Anhang IV). Die nachgewiesenen Mikroorganismen entsprechen in allen Untersuchungen weder den nachgewiesenen Bakterien bei einer Untersuchung nach Zweck C noch denen bei einer Untersuchung nach Zweck A, sondern weisen abweichende Gattungen auf, wobei bei den Proben 10, 13 und 32 kein Wachstum nachgewiesen werden kann. Die Vermutung, dass sich die in Bio-

filmen lebenden Non-Fermentern in Installationen (wie Pelatoren und Duschschräuchen) aus diesem Zusammenschluss lösen und in den Trinkwasserproben nachgewiesen werden können, kann durch diese Arbeit nicht hinreichend (durch eine Wiederfindung von den im Trinkwasser nachgewiesenen Bakterien in den Biofilmen) bestätigt werden. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass nur ein geringer Teil der in Biofilmen lebenden Mikroorganismen in das Wasser abgegeben und somit planktisch werden [Kistemann, 2012]. Eine ebenso wichtige Rolle spielen die zuvor erwähnten VBNC-Formen der Mikroorganismen, da es sich bei den nachgewiesenen Mikroorganismen nur um die voll lebens- und kulturfähigen (also um die nachweisbaren) Bakterien handelt [Oliver, 2005].

Bei dem Vergleich der Häuser bezüglich des Baujahres kann festgestellt werden, dass die Anzahl an Non-Fermentern in Altbauten fast doppelt so hoch ist, wie in Neubauten, während die Vielzahl an unterschiedlichen Non-Fermentern in Neubauten höher ist als in Altbauten. Insgesamt wurden 48 Proben aus Neubauten und 12 Proben aus Altbauten untersucht (vergleiche Anhang I). Die Werte für die Neubauten wurden daher auf 12 Proben herunter gerechnet wurden, um so einen Vergleich zwischen den Gebäudearten zu ermöglichen. Die Berechnung der Werte kann zu Ungenauigkeiten in den Ergebnissen geführt haben. Vergleicht man die Trinkwasserinstallation 1 (Altbau) mit der Trinkwasserinstallation 2 (Neubau) so ist zu erkennen, dass in dem Altbau vier verschiedene Gattungen nachgewiesen werden können, von denen die Gattung *Acidovorax* den größten Anteil ausmacht, während in dem Neubau nur drei verschiedene Gattungen nachgewiesen werden können, von denen die Gattung *Pseudomonas* den größten Anteil ausmacht. Es kann sich bei den nachgewiesenen Mikroorganismen des Vergleiches von Alt- und Neubauten ebenfalls um zufällige Verteilungen aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung von Mikroorganismen innerhalb eines Trinkwassersystems handeln, die unabhängig von der Gebäudeart sind [Kistemann, 2012].

In der zugänglichen Literatur konnte kein Hinweis auf das unterschiedliche Auftreten von Non-Fermentern in verschiedenen Gebäudearten gefunden werden.

Nach einer 16S-rDNA-Sequenzierung sieben ausgewählter Kolonien (die Proben 4_A, 5_A, 7_A, 10_A, 18_C und 26_C) können die mittels MALDI-TOF-MS ermittelten Gattungen bestätigt werden. Die identifizierten Spezies können jedoch widerlegt werden.

Eine Trennung genetisch eng verwandter Mikroorganismen ist aufgrund der Untersuchung ribosomaler Proteine und der daraus resultierenden Ähnlichkeit mit dem Differenzierungs-

muster der 16S-rDNA-Sequenzanalyse mit der MALDI-TOF-MS (vergleiche Score-Values nach 2.5.2) ebenso wenig möglich wie mit einer 16S-Sequenzierung [Schubert, 2011].

Wie schon in vorhergehenden Untersuchungen von [Mellmann, 2008] festgestellt wurde, ist einer Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS der Vorrang gegenüber den klassischen biochemischen Reaktionen zu geben, da Non-Fermenter nur eine begrenzte biochemische Reaktivität zeigen und zudem auch eine morphologische Vielfalt aufweisen, sodass es mit diesen Methoden immer wieder zu Fehlidentifizierungen kommt. Im Vergleich zu einer Sequenzierung haben Identifizierungen mittels MALDI-TOF-MS den Vorteil, dass sie weniger zeitaufwendig und weniger kostenintensiv sind.

Im Rahmen der Untersuchung kann gezeigt werden, dass viele verschiedene Gattungen von Non-Fermentern unser Trinkwasser besiedeln, ohne dass dies durch Gesetze kontrolliert werden würde. Dies liegt daran, dass die Vielzahl an Non-Fermentern bei allen Ergebnissen nicht direkt aussagekräftig für die Qualität des Trinkwassers ist, da sie keine Bedrohung für die Bevölkerung (wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* als potentieller Krankheitserreger) darstellt.

Viele Non-Fermenter weisen positive Eigenschaften auf. So ist *Pseudomonas putida* in der Lage, organische Lösungsmittel wie beispielsweise Toluol abzubauen [Rehm, 2008] und kann so für Haushalte von Nutzen sein, wenn Lösungsmittel in die Trinkwasserleitungen gelangen. Ein Vorkommen an *Pseudomonas putida* könnte unter Umständen dafür sorgen, dass diese Verbindungen abgebaut werden und so nicht in die Umwelt freigesetzt werden. Andere Non-Fermenter besitzen ähnliche Fähigkeiten. *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis* und *Pseudomonas aeruginosa* sind in der Lage, polyzyklische Kohlenwasserstoffe, wie beispielsweise Naphtalin abzubauen. Diese Gruppe von Verbindungen weist hoch toxische und karzinogene Eigenschaften auf [Rehm, 2008].

Einige Arten sind allerdings auch krankheitserregend. Neben Pflanzenpathogenen (*Pseudomonas syringae*, *Burkholderia caryophylli* sowie *Ralstonia* Arten [Sauermost, 2002]) gibt es auch für den Menschen potentiell krankheitserregende Non-Fermenter (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida* [Yoshino, 2011], *Stenotrophomonas maltophilia* [Lewis, 2015])

Einen Überblick über einige Charakteristika der nachgewiesenen Non-Fermenter (neben der Gattung *Pseudomonas*) verschafft die Tabelle 14.

Gattung	Sauerstoff	Energiequelle	Morphologie	Geißeln/Flagellen	Gramfärbung	Oxidase	Katalase	Besonderheiten
<i>Sphingomonas</i>	aerob	chemoorganotroph	Stäbchen	polar begeißelt	negativ	positiv	positiv	Glykosphingolipide in äußerer Zellmembran
<i>Acidovorax</i>	aerob	chemoorganotroph	Stäbchen	polar begeißelt	negativ	positiv	positiv	
<i>Stenotrophomonas</i>	aerob, fakultativ anaerob	chemoorganotroph	Stäbchen	Flagellen	negativ	negativ	positiv	opportunistischer Krankheitserreger
<i>Acinetobacter</i>	aerob	chemoorganotroph	Kurzstäbchen, die paarweise erscheinen (kokkoide Formen)	unbeweglich	negativ	negativ	positiv	können große Mengen an Polyphosphat speichern
<i>Aeromonas</i>	aerob, fakultativ anaerob	chemoorganotroph	Stäbchen	polar begeißelt	negativ	positiv	positiv	

Tabelle 14: Übersicht über einige der am häufigsten nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen mit ihren wichtigsten Eigenschaften [Ottow, 2011; Cypionka, 2010; Melo, 2014; Gilardi, 1967; Lewis, 2015]

5.2 Die Diskussion des Anteils der Non-Fermenter an der Gesamtkeimbelastung

Die Untersuchungen der Trinkwasserproben bezüglich der Gesamtkeimbelastung in DEV-Nährmedium (Plattengussverfahren) nach einer zweitägigen Inkubation bei 36° C sowie bezüglich der Anzahl der Non-Fermenter nach einer Membranfiltration und einer Inkubation des Membranfilters auf DEV-Nährmedium für zwei Tage bei 36° C führten zu dem Ergebnis, dass die Non-Fermenter bei 12 der 33 untersuchten Proben weniger als 10 % der Gesamtkeimbelastung ausmachen, während bei sechs Proben keine Non-Fermenter und bei weiteren sechs Proben keine Gesamtkeimzahl nachgewiesen werden können.

Die Werte der Gesamtkeimzahlen sind kritisch zu betrachten, da sie von der Einheit KBE je ml auf KBE je 100 ml hochgerechnet wurden, wodurch sich Ungenauigkeiten ergeben können. Das Ergebnis lässt sich mit der Hypothese aus 5.1 erklären, dass lediglich ein Anteil der gesamten Anzahl an Non-Fermentern im Trinkwasser nachgewiesen wird, während mit dem Plattengussverfahren auch die Non-Fermenter gewachsen sein könnten, die durch das Membranfiltrationsverfahren nicht nachgewiesen werden. Nach einem Vergleich mit vorhergehenden Trinkwasseruntersuchungen [Staradumskyte, 2014] könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass mehr als die Hälfte der Bakterien in den Trinkwasserproben Non-Fermenter sind, was den Erwartungen an das Trinkwasser entsprechen würde. Neben den nachgewiesenen Non-Fermentern wären weitere Gattungen (wie *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Caulobacter*, Enterobakterien (coliforme wie *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter*, aber auch nicht-coliforme wie *Erwinia*), Streptococci, Micrococci, *Legionella*, *Methylobacterium*, *Sediminibacterium*, *Deinococcus*, *Sphaerotilus natans*, Chromobacteria und Clostridien [Rieth, 2012]) nachweisbar, die jedoch keine Bestandteile der vorliegenden Arbeit sind.

Bei den vier Proben oberhalb der 10 % und bei den sechs Proben ohne Gesamtkeimzahl wurden lediglich die Proben der Nummer 30 in einem Altbau entnommen. So kann das Ergebnis (aus 4.1), dass in Altbauten fast doppelt so viele Non-Fermenter zu finden sind, wie in Neubauten durch dieses Ergebnis nicht gefestigt werden und es wird gezeigt, dass es sich bei dem Auftreten der Non-Fermenter um zufällige Verteilungen in dem Trinkwasser (unabhängig von dem Baujahr des Hauses) handelt (vergleiche 5.1).

5.3 Die Diskussion der Gesamtkeimzahlen bei unterschiedlichen

Probeentnahmearten

Die Untersuchung der Gesamtkeimzahlen der Trinkwasserproben angelehnt an die Trinkwasserverordnung wurden nach Zweck C (wie der Verbraucher es benutzt) und Zweck A (mit vorhergehender Demontage der Installationen, Desinfektion und Spülvorgang) durchgeführt. Bei einem Vergleich der Entnahmearten wird als Ergebnis ermittelt, dass die Gesamtkeimzahlen bei den Untersuchungen nach Zweck C höher sind, als die bei einer Untersuchung nach Zweck A. Diese Ergebnis entspricht den Erwartungen. Da es sich bei dem untersuchten Wasser nach Zweck A theoretisch um das Wasser im Verteilungsnetz der Stadt handelt, sollte dieses Wasser verglichen mit dem Wasser direkt beim Verbraucher (nach Zweck C) eine höhere Qualität bezüglich der Gesamtkeimzahl aufweisen. In der Theorie sollen bei einer Entnahme nach Zweck A die Einflüsse der Hausinstallation, oder des Stagnationswassers sowie der Installationen nicht mehr nachweisbar sein. Die Ergebnisse würden auf einem gleich niedrigen Niveau (von 0 KBE je ml) erwartet werden. In der Praxis erkennt man jedoch, dass die Ergebnisse bei einer Entnahme nach Zweck A unterschiedlich ausfallen. Während bei einer Inkubationstemperatur von 20° C lediglich eine Probe oberhalb der 0 KBE je ml liegt (Probe 1 mit 42 KBE je ml), können bei einer Inkubationstemperatur von 36° C Werte zwischen 128 und 1 KBE je ml ermittelt werden. Einen Wert größer als 10 KBE je ml erreichen dabei 4 der 27 Proben, 6 Proben erreichen Werte zwischen 10 und 1 KBE je ml und 17 Proben erreichen den erwarteten Wert von 0 KBE je ml.

Dies lässt sich dadurch erklären, dass die untersuchten Proben nicht an dem Übergangspunkt zwischen Wasserversorger und Nutzer entnommen wurden (vergleiche Abbildung 3 in Abschnitt 2.3), sondern an Entnahmearmaturen an den aufsteigenden Leitungen und deren Abzweigungen (in die Wohnungen). Die Hausinstallation übt trotz Desinfektion und Spülung der Leitungen einen Einfluss auf die Wasserqualität aus. Andernfalls würde das Ergebnis bedeuten, dass die Gesamtkeimzahlen in dem gesamten Verteilungsnetz in Hamburg variieren und die Trinkwasserqualität innerhalb der Stadt ebenfalls unterschiedlich ist.

Bei einer Untersuchung nach Zweck C wurden ebenfalls unterschiedliche Gesamtkeimzahlen ermittelt. Da es sich hier um das Wasser handelt, welches vom Verbraucher verwendet und welches in der Qualität durch die Hausinstallationen beeinflusst wird, liegt dieses Ergebnis im Erwartungsbereich. Die Wasserqualität wird von der Hausinstallation dabei durch die Zirkulation, die vorherrschenden Temperaturen, die Rohreigenschaften (wie Nennweiten) sowie eine

eventuelle Biofilmbildung innerhalb der Rohrleitungen beeinflusst [Krysch, 2015; Arens, 2014].

Die ermittelten Grenzwertüberschreitungen bei einer der 27 Entnahmen nach Zweck A und bei 10 der 32 Entnahmen nach Zweck C (31,25 %) liegen teilweise deutlich oberhalb des Grenzwertes von 100 KBE je ml. Die Überschreitungen werden in vier Fällen in Altbauten und in 6 Fällen in Neubauten nachgewiesen, womit die Grenzwerte in beiden Gebäudearten in einer ähnlichen Anzahl überschritten werden. Sieben Grenzwertüberschreitungen können an Entnahmestellen im Badezimmer (zwei Duscharmaturen, zwei Badewannenarmaturen und drei Wachsbeckenarmaturen) nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Ergebnisses könnte vermutet werden, dass die Leitungen, die in das Badezimmer führen, bakterienbelasteter sind, als Leitungen, die in die Küche führen. Gründe hierfür können eine mangelnde Wasserzirkulation in diesen Bereichen sowie Stagnationswasser in diesen Leitungen sein. Solche Grenzwertüberschreitungen hätten bei einer Untersuchung nach der Trinkwasserverordnung Folgen, die in der Verordnung geregelt sind [TrinkwV 2001, 2013]. So müssen „Maßnahmen zur hygienisch-technischen Überprüfung der Trinkwasser-Installation im Sinne einer Gefährdungsanalyse eingeleitet werden“ [TrinkwV 2001, 2013]. Konkret muss das Gesundheitsamt bei einer Überschreitung entscheiden, wie stark die Verbraucher durch diese gefährdet sind und ob die betroffene Wasserversorgungsanlage weiter genutzt werden kann. Des Weiteren ordnet das Gesundheitsamt die Maßnahmen an, die durchzuführen sind, um die Gefahr der Verbraucher zu minimieren. Maßnahmen können dabei eine verbesserte Wasseraufbereitung mit beispielsweise einer Desinfektion des Wassers sein [TrinkwV 2001, 2013].

5.4 Die Diskussion des Wachstumsvergleichs der Non-Fermenter auf ausgewählten Nährmedien

Nach der Untersuchung des Non-Fermenter-Wachstums auf dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium kann festgestellt werden, dass bei allen bis auf fünf Proben auf dem R2A-Nährmedium eine höhere Anzahl gewachsen ist, als auf dem Cetrimid-Nährmedium (hier ist das Wachstum auf unter 50 KBE je 100 ml beschränkt). In den fünf Ausnahmefällen ist das Wachstum auf dem Cetrimid-Nährmedium meist auf einem gleichen Niveau wie das Wachstum auf dem R2A-Nährmedium. Die Diversität der Non-Fermenter ist auf dem Cetrimid-Nährmedium ebenfalls geringer als auf dem R2A-Nährmedium.

Nur bei 16 der insgesamt 60 untersuchten Trinkwasserproben (26,7 %) kann die gleiche Gattung (abgesehen von zwei Proben in unterschiedlichen Keimzahlen) auf beiden Nährmedien nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis basiert auf den unterschiedlichen in den Nährmedien zur Verfügung gestellten Nähr- und Hemmstoffen (vergleiche die Tabellen 1 und 2 in Abschnitt 2.4). Auf dem Cetrimid-Nährmedium wachsen weniger Non-Fermenter bei ansonsten äquivalentem Vorgehen (Probenvorbereitung, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur), da ein geringerer Nährstoffanteil vorliegt als im R2A-Nährmedium. Zusätzlich sind die Hemmstoffe Cetrimid und die Nalidixinsäure wichtige Faktoren der Selektivität. Sie hemmen die Begleitflora und somit auch andere Non-Fermenter, die durch das R2A-Nährmedium keine Hemmung erfahren. Des Weiteren kann es sich hierbei um Ungenauigkeiten handeln, da ein Rasenwachstum stets gleich 300 KBE je 100 ml gesetzt wird, um eine Darstellung der Ergebnisse zu ermöglichen. Das Cetrimid-Nährmedium wird bei einem Nachweis gemäß Trinkwasserverordnung eingesetzt, da für die Gesundheit der Menschen das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* von Interesse ist.

Bemerkenswert ist, dass die Herstellerangaben bezüglich der gehemmten Begleitflora (vergleiche Abschnitt 2.4) durch diese Arbeit widerlegt werden können. So soll auf dem Cetrimid-Nährmedium lediglich der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* das Wachstum ermöglicht werden [OXOID, Pseudomonas Cetrimid Selektivnährboden, 2015]. Während der Untersuchungen sind auf diesem Nährmedium jedoch noch viele weitere *Pseudomonas* Spezies und andere Non-Fermenter Gattungen wie *Sphingomonas* und *Stenotrophomonas* gewachsen. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Hemmstoffe diesen Gattungen und Spezies keinen Schaden zufügen können, da diese ähnliche Eigenschaften und Fähigkeiten wie *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen.

5.5 Die Diskussion der Prozessoptimierung der Untersuchungsmethodik

Nach der Untersuchung des optimalen Nährmediums und der optimalen Inkubationstemperatur für die Gattung *Pseudomonas* anhand von Wildstämmen (nach 3.2.7) kann als Ergebnis festgehalten werden, dass das beste Wachstum auf dem CFC-Nährmedium möglich ist. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erwartungen überein, wenn die Tabelle 1 aus Abschnitt 2.4 (Seite 13) betrachtet wird. Die Herstellerangabe lautet, dass auf diesem Nährmedium zwar eine Begleitflora gehemmt wird, das Wachstum aller Vertreter der Gattung *Pseudomonas* aber

gefördert wird [OXOID, Pseudomonas-CFC-Selektivnährboden, 2015]. Das Nährmedium erlaubt demnach einem breiten Spektrum an Pseudomonaden das Wachstum.

Als zweitbestes Nährmedium kann das Ceftrimid n. EP.-Nährmedium ermittelt werden. Dies ist im Vergleich zu dem Ceftrimid-CN-Nährmedium ebenfalls aus der Zusammensetzung des Nährmediums erkennbar. So enthält das Ceftrimid-CN-Nährmedium neben dem Ceftrimid zusätzlich noch Nalidixinsäure als einen weiteren Hemmstoff [Heipha, Ceftrimide Agar-LI acc. EP/USP, 2015].

Das niedrige Ergebnis des R2A-Nährmediums kann darauf zurückgeführt werden, dass das Nährmedium für ein zu breites Spektrum an Wasserbakterien geeignet ist. Für die vorhergehenden Untersuchungen war das Nährmedium dadurch geeignet, da das Wachstum verschiedener Non-Fermenter als typische Wasserbakterien erwünscht war. Für das Wachstum der Gattung *Pseudomonas* ist dieses Nährmedium jedoch zu nährstoffreich [Carl Roth, 2015].

Bezüglich der Inkubationstemperatur lässt sich aus den Ergebnissen keine allgemeingültige Aussage ableiten. Die Extinktionswerte liegen abhängig von den genutzten Nährmedien auf unterschiedlichen Niveaus. Das Temperaturoptimum für Pseudomonaden liegt zwischen 20° und 30° C [O'Learey, 2000]. Daher entspricht es den Erwartungen, wenn zwischen den Temperaturen von 25° C und von 30° C kaum einen Unterschied im Wachstumsverhalten auf den verschiedenen Nährmedien zu sehen ist. Generell sind Pseudomonaden bezogen auf die Wachstumsbedingungen sehr tolerante Mikroorganismen [Rehm, 2008].

Bei 36° C sind bei allen Proben niedrigere Werte bezüglich der Extinktion und demnach des Wachstums zu erkennen. Hierbei kann es sich um statistische Schwankungen handeln. Weitere Untersuchungen bezüglich der Inkubationstemperatur könnten in weiterführenden Studien behandelt werden.

5.6 Die Diskussion der Prozessoptimierung der Probenvorbereitung für die

MALDI-TOF-MS

Die Versuche zur Prozessoptimierung bezüglich der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-MS am Beispiel von Non-Fermenter-Wildstämmen zeigen, dass eine Resuspension der Bakterienkolonien in Flüssigkeit keine Besserung der Messergebnisse bewirkt, da diese Proben überhaupt nicht vermessen werden können. Ein Grund dafür könnte der zu geringe Anteil an Probenmaterial in einem zu großen Volumen an Flüssigkeit sein, wodurch die Probe zu

hoch verdünnt wäre, um dem Massenspektrometer ausreichend Material für die Identifizierung zur Verfügung zu stellen.

Die Ergebnisse der anderen Probenvorbereitungen (vergleiche Abschnitt 4.6) lassen keinen konkreten Rückschluss auf das optimale Vorgehen zu. Ein Score-Value von 2.300 wird bei keiner Probe erreicht, somit liegt in keinem Fall eine sehr wahrscheinliche Speziesidentifikation vor (vergleiche Abschnitt 2.5.2).

Bei der Spezies *Pseudomonas putida* werden mit allen Probenvorbereitungen (direkt vom Nährmedium sowie nach Reinkultivierung auf CASO- und auf DEV-Nährmedium untersucht) gute Ergebnisse mit Score-Values größer 2.000 erzielt. Damit handelte es sich um sichere Gattungs- und wahrscheinliche Speziesidentifikationen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Spezies *Acinetobacter ursingii* können dahingehend interpretiert werden, dass ein Nachweis einer Bakterienkolonie bei einer Identifizierung direkt von dem R2A-Nährmedium das Ergebnis der Identifizierung verschlechtern und ungenauer machen kann, da bei dieser Präparation ein Score-Value kleiner 1.999 erreicht wurde. Somit handelt es sich in diesem Fall lediglich um eine wahrscheinliche Gattungsidentifikation. Bei den übrigen untersuchten Präparationen (eine der Identifizierung vorgestellte Reinkulturbildung auf CASO-Nährmedium und auf DEV-Nährmedium) sind kaum Unterschiede zu erkennen. Die Werte liegen zwischen 2.000 und 2.999.

Aus den niedrigen Score-Values bei einer Direktmessung vom Nährmedium (1.432 bei der ausgestrichenen Probe und 1.823 bei der filtrierten Probe) der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* kann geschlussfolgert werden, dass vor einer Identifizierung in der MALDI-TOF-MS stets eine Reinkultivierung erfolgen sollte. Dabei spricht die nicht identifizierbare filtrierte Probe nach einer Vereinzelung auf DEV-Nährmedium gegen eine Reinkultivierung auf diesem Nährmedium. Die einzig sichere Methode der Probenvorbereitung ist nach dieser Untersuchung eine Isolation auf CASO-Nährmedium (mit Score-Values über 2.000).

Diese Empfehlungen bezüglich der Probenvorbereitung entsprechen der im Laboralltag angewandten Methodik. So werden Bakterienkolonien vor der Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS stets isoliert. Das Vorgehen der Resuspension in Flüssigkeit ist unüblich.

Abschließend bleibt anzumerken, dass bei keiner der untersuchten Spezies eine Identifikation mit einem Score größer als 2.300 gemacht werden konnte. Eine weitere Möglichkeit, die Genauigkeit der Ergebnisse zu verbessern, kann eine Ethanol-Ameisensäuren Extraktion sein. Dies wird vor allem bei Mikroorganismen angewandt, die schwierig zu verschmieren oder in einem Flüssignährmedium gewachsen sind. So werden die Bakterien zunächst in etwas destilliertem Wasser gelöst und mit 100 %igen Ethanol vermischt. Nach einer Zentrifugation wird das entstandene Pellet trocken gelassen und anschließend mit 70 %iger Ameisensäure und Acetonitril behandelt. Nach einer erneuten Zentrifugation wird 1 µl der Flüssigkeit auf das Target überführt. Dieses Vorgehen könnte einen Untersuchungsansatz für weitere Untersuchungen sein [Pavlovic, 2013].

Zusammenfassung

Trinkwasseruntersuchungen werden in Deutschland in regelmäßigen Abständen durchgeführt, um die Menschen vor Schäden durch dessen Genuss zu bewahren. Dabei wird durch die Trinkwasserverordnung geregelt, auf welche Mikroorganismen das Wasser untersucht werden soll. Aus der Gruppe der Non-Fermenter wird dabei lediglich die Gattung *Pseudomonas aeruginosa* untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, nachzuweisen, wie hoch die Diversität anderer Spezies der Gattung *Pseudomonas* sowie anderer Gattungen der Gruppe der Non-Fermenter im Trinkwasser ist. Dabei sollten auch die unterschiedlichen Probeentnahmearten sowie die Untersuchungsmethodik geprüft werden.

Die Herangehensweise bestand aus einer Probeentnahme bei freiwilligen Untersuchungsteilnehmern in der Stadt Hamburg und einer anschließenden mikrobiologischen Untersuchung der Trinkwasserprobe. Es wurden verschiedene Nährmedien eingesetzt und gewachsene Kolonien mittels MALDI-TOF-MS sowie ausgewählte Kolonien mittels 16S-rDNA-Sequenzierung identifiziert.

Nach der Untersuchung der 60 Trinkwasserproben kann eine große Diversität an Non-Fermentern im Trinkwasser nachgewiesen werden, die allerdings mit in der Regel maximal 10 % einen deutlich geringeren Anteil an der Gesamtkeimbelastung der Trinkwasserproben ausmacht, als zu Beginn der Untersuchung angenommen. Eine Erklärung für dieses Ergebnis können die unterschiedlichen Verteilungen von Mikroorganismen in den Trinkwasserleitungen sowie die VBNC-Formen der Bakterien sein.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es zudem gelungen, zu ermitteln, dass das CFC-Nährmedium den Pseudomonaden die besten Wachstumsbedingungen geben kann. Die Herstellerangaben bezüglich der Selektivität der untersuchten Nährmedien können dabei teilweise widerlegt werden.

Aus den Ermittlungen der Gesamtkeimzahlen bei unterschiedlichen Probeentnahmearten kann nachgewiesen werden, dass der Einfluss, die die Hausinstallation auf die Wassergüte hat, durch Desinfektion und Spülvorgänge nicht beseitigt werden kann.

Durch eine Untersuchung der Probenvorbereitung für einen massenspektrometrischen Nachweis kann festgestellt werden, dass das bisher in den Labormethoden aufgeführte Verfahren die sichersten Identifikationen erbringt.

Abstract

In Germany examinations of drinking water are performed on a regular base in order to protect people against damages by its consumption. What microorganisms the water should be tested on is regulated by the Drinking Water Ordinance. The genus *Pseudomonas aeruginosa* is the only bacteria species being covered by that ordinance as a part of the group of non-fermenting bacteria.

Goal of this thesis was to show the scale of diversity of other species of the genus *Pseudomonas* as well as other genera of the group of non-fermenting bacteria in drinking water. Thereby the different kinds of sample taking and methods of examination were being investigated.

As a base for this thesis drinking water samples were taken in households of voluntary attendants in Hamburg. The samples were then microbiologically examined. Thereby various culture media were used and after that grown colonies were identified by MALDI-TOF-MS. Some colonies were identified by 16S-rDNA-sequencing.

After the examination of 60 samples a vast diversity of non-fermenting bacteria in drinking water was proven. However the amount of this group of bacteria on the total plate count of the samples is by far smaller (less than 10 %) than initially expected. An uneven allocation of microorganisms in the drinking water system as well as the VBNC-forms of bacteria could be a reason for this result.

During the work on this thesis the CFC-culture media was figured out to be the culture media with the best conditions for growth for pseudomonads. The provided data by the manufacturer regarding the selectivity of the examined culture media are partly refuted.

Due to the investigations regarding the total plate count against the background of different kinds of sample takings it is proven, that the effects of the house installations on the quality of the water cannot be undone by disinfection or by letting the water run out of the tub. By investigating the sample preparations for the mass spectrometric verification it has become clear, that the procedure used in the laboratory is the safest way to identify microorganisms

Literaturverzeichnis

- Arens P. (2014). Normen, Regelwerke und Kommentare zum Erhalt der Wassergüte. *Energie/Wasser-Praxis*, 14-19.
- Auckenthaler A, Huggenberger P. (2003). *Pathogene Mikroorganismen im Grund- und Trinkwasser*. Basel: Birkhäuser.
- AVBWasserV. (2014). § 10 Abs. 1 .
- Brown TA. (2002). *Gentechnologie für Einsteiger*. Heidelberg: Spektrum.
- BRUKER Daltonik. (2015). Gerätebeschreibung.
- Bundesministerium für Gesundheit, Umweltbundesamt. (2011). *Bericht des Bundesministeriums für Gesundheit und des Umweltbundesamtes an die Verbraucherinnen und Verbraucher über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasser) in Deutschland*. Bonn/Dessau-Roßlau.
- Carl Roth (2015). R2A-Agar. Produktbeschreibung.
- Cypionka H. (2010). *Grundlagen der Mikrobiologie*. Heidelberg: Springer.
- DIN EN ISO 19458. (2013).
- Gilardi GL. (1967). Morphological and Biochemical Characteristics of *Aeromonas punctata* (hydrophila, liquefaciens) isolates from Human Sources. *Appl. Microbiol.*, 417-421.
- Heipha. (2015). CASO-Agar. Produktbeschreibung.
- Heipha. (2015). Cetrimide Agar-LI acc. EP/USP. Produktbeschreibung.
- Heipha. (2015). DEV-Nähragar. Produktbeschreibung.
- HIMEDIA. (2015). Cetrimide Agar Base. Produktbeschreibung.
- Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. (2009). *Biologie und molekulare Medizin für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart: Thieme.
- IfSG. (2013).
- Kistemann T, Schulte W, Rudat K, Hentschel W, Häußermann D. (2012). *Gebäudetechnik für Trinkwasser: Fachgerecht planen - Rechtssicher ausschreiben - Nachhaltig sanieren*. Heidelberg: Springer.
- Krysch R. (2015). Hygiene in Trinkwasser-Installationen - die Richtlinie VDI/DVGW 6023. *Energie/Wasser-Praxis*, 48-51.
- Lewis SS, Zaas A. (2015). *UpToDate*. Abgerufen am 24. 02 2015 von www.uptodate.de

- Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 1946-1954.
- Melo LA, Tebaldi ND, Mehta A, Marques ASA. (2014). Comparing *Acidovorax citrulli* strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity. *Trop. Plant Pathol.*, 154-162
- Mendel B, Ließfeld R, Castell-Exner C. (2001). Die neue Trinkwasserverordnung, Teil 2. *Energie | Wasser-Praxis*, 32-37
- O'Leary WM. (2000). *Practical Handbook of Microbiology*. Florida: CRC.
- Oliver JD. (2005). The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Microbiol.*, 93-100.
- Ottow JCG. (2011). *Mikrobiologie von Böden . Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik*. Heidelberg: Springer.
- OXOID. (2015). *Pseudomonas Cetrimid Selektivnährboden*. Produktbeschreibung.
- OXOID. (2015). *Pseudomonas Selektivnährböden*. Produktbeschreibung.
- OXOID. (2015). *Pseudomonas-CFC-Selektivnährboden*. Produktbeschreibung.
- Pavlovic M, Huber I, Konrad R, Busch U. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *Open Microbiol. J.*, 135-141.
- Rehm BHA. (2008). *Pseudomonas - Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Rieth M. (2012). *Pharmazeutische Mikrobiologie - Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Rissland J. (2015). Mikrobiologische Grundlagen einzelner trinkwasserrelevanter Erreger und gesundheitliche Aspekte. *Energie | Wasser-Praxis*, 54-58.
- Sauermost R, Freudig D. (2002). *Lexikon der Biologie*. Heidelberg: Spektrum.
- Fuchs G. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme.
- Schubert S, Wieser A. (2011). Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik. *J. Lab. Med.*, 195-203.
- Seilnacht T. (2013). *Naturwissenschaftliches Arbeiten*. Abgerufen am 15. 02.2015 von www.Seilnacht.com
- Staradumskyte D, Paulauskas A. (2014). Non-Fermenting Gram-Negative Bacteria in Drinking Water. *J. of Water Resource and Protection*, 114-119
- Steinbüchel A, Ewerin C, Oppermann-Sanio FB, Pötter M. (2013). *Mikrobiologisches Praktikum*. Heidelberg: Springer.

Steinmetz I. (2012). *Nichtfermentierende Bakterien (Nonfermenter): Pseudomonas, Burkholderia, Stenotrophomonas, Acinetobacter*. Heidelberg: Springer.

TrinkwV 2001. (2013).

Umweltbundesamt. (2002). Empfehlung der Trinkwasserkommission zur Risikoeinschätzung, zum Vorkommen und zu Maßnahmen beim Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwassersystemen. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 187-188.

Validierte Labormethode. (2014).

Wink M. (2004). *Molekulare Biotechnologie - Konzepte und Methoden*. Weinheim: Wiley-VCH.

Yonezawa M, Takahata M, Matsubara N, Watanabe Y, Narita H. (1995). DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1970–1972.

Yoshino Y, Kitazawa T, Kamimura M, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H. (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J. Infect. Chemother.*, 278-282.

Zentralverband Sanitär Heizung Klima. (2011). Trinkwasser-Installation. *Schutz des Trinkwassers - Kommentar*, 20-21.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Entner-Doudoroff-Weges.....	6
Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme der Spezies <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
Abbildung 3: Der Beginn der Trinkwasserinstallation	10
Abbildung 4: Darstellung eines Perlatators.....	12
Abbildung 5: Darstellung des Prinzips einer Messung mittels MALDI-TOF-MS	16
Abbildung 6: Darstellung des Ribosoms eines Bakteriums	18
Abbildung 7: Darstellung einer DNA-Analyse nach einer Sequenzierung gemäß Sanger.	19
Abbildung 8: Darstellung einer gelblich glänzenden Kolonie (1) auf Cetrimid-Nährmedium.....	28
Abbildung 9: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstalation 1.....	37
Abbildung 10: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstalation 2.....	37
Abbildung 11: Darstellung über den Vergleich der Anzahl an nachgewiesenen Non-Fermentern in Trinkwasserproben in Altbauten und in Neubauten.....	38
Abbildung 12: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in allen Trinkwasserproben, die in Altbauten entnommen wurden	38
Abbildung 13: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in allen Trinkwasserproben, die in Neubauten entnommen wurden.	39
Abbildung 14: Darstellung des Gelbildes nach der PCR	39
Abbildung 15: Graphische Darstellung der ermittelten Gesamtkeimzahlen der untersuchten Trinkwasserproben bei den Inkubationstemperaturen von 20° C und 36° C im Vergleich	43
Abbildung 16: Darstellung der mittels Plattengussverfahren ermittelten Gesamtkeimzahlen aller Trinkwasserproben bei einer Untersuchung nach Zweck A.....	43
Abbildung 17: In dem Balkendiagramm ist das Wachstum der Non-Fermenter auf dem Cetrimid- Nährmedium dem Wachstum auf dem R2A-Nährmedium gegenüber gestellt.....	45
Abbildung 18: Darstellung der Vielzahl an nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen bei einer Untersuchung auf Cetrimid-Nährmedium.....	46
Abbildung 19: Darstellung der Vielzahl an nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen bei einer Untersuchung auf R2A-Nährmedium.	46
Abbildung 20: Darstellung über die Ergebnisse des Optimierungsversuches bezüglich des Nährmedium nach Abschnitt 3.2.7.....	48
Abbildung 21: Darstellung über die Ergebnisse des Optimierungsversuches bezüglich der Inkubationstemperatur nach Abschnitt 3.2.7.....	49
Abbildung 22: Darstellung der Ergebnisse der Prozessoptimierung nach 3.2.8 (<i>Pseudomonas putida</i>).....	50
Abbildung 23: Darstellung der Ergebnisse der Prozessoptimierung nach 3.2.8 (<i>Acinetobacter ursingii</i>).	51
Abbildung 24: Darstellung der Ergebnisse der Prozessoptimierung nach 3.2.8 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>).....	51
Abbildung 25: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschrieben Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen (Konkurrenzversuch).....	53
Abbildung 26: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschrieben Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen (Konkurrenzversuch).....	54

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)

Anhang

Verzeichnis

Anhang I Die Probenbezeichnungen	74
Anhang II Die nachgewiesenen Spezies	76
Anhang III Die Trinkwasserinstallationen.....	80
Anhang IV Die Perlatoren und Duschschläuche.....	85
Anhang V Die 16S-rDNA-Sequenzen	86
Anhang VI Der Anteil der Non-Fermenter	88
Anhang VII Die Gesamtkeimzahlen	90
Anhang VIII Die Gesamtkeimzahlen nach Zweck A.....	91
Anhang IX Das Wachstum auf verschiedenen Nährmedien	92
Anhang X Die Berechnung der Extinktionen	93
Anhang XI Die Ergebnisse des Optimierungsversuches.....	96
Anhang XII Die Konkurrenzversuche.....	99
Anhang XIII MALDI-TOF-MS-Rohdaten	102

Anhang I Die Probenbezeichnungen

Tabelle 15: Übersicht über die Probenbezeichnungen der Installationen 1-6

	Proben-ID	Entnahmeart	Entnahmeort	Gebäudeart
Trinkwasserinstallation 1	1_C	Zweck C	Badewannenarmatur	Altbau
	1_A	Zweck A	Badewannenarmatur	
	2_C	Zweck C	Duschkopf	
	3_C	Zweck C	Keller, Entnahmevertil	
	3_B	Zweck B	Keller, Entnahmevertil	
	3_A	Zweck A	Keller, Entnahmevertil	
Trinkwasserinstallation 2	4_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	Neubau
	4_A	Zweck A	Bad Waschbeckenarmatur	
	5_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	
	5_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	
	6_C	Zweck C	Duschkopf	
	6_A	Zweck A	Duscharmatur (ohne Schlauch)	
Trinkwasserinstallation 3	7_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	Neubau
	7_A	Zweck A	Bad Waschbeckenarmatur	
	8_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	
	8_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	
Trinkwasserinstallation 4	9_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	Neubau
	9_A	Zweck A	Bad Waschbeckenarmatur	
	10_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	
	10_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	
	11_C	Zweck C	Duschkopf	
	11_A	Zweck A	Duscharmatur (ohne Schlauch)	
Trinkwasserinstallation 5	12_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	Neubau
	12_A	Zweck A	Bad Waschbeckenarmatur	
	13_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	
	13_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	
	14_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	
	14_A	Zweck A	Bad Waschbeckenarmatur	
Trinkwasserinstallation 6	15_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	Neubau
	15_A	Zweck A	Bad Waschbeckenarmatur	
	16_C	Zweck C	Badewannenarmatur	
	16_A	Zweck A	Badewannenarmatur	
	17_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	
	17_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	

Tabelle 16: Übersicht über die Probenbezeichnungen der Installationen 7-11

	Proben-ID	Entnahmeart	Entnahmeort	Gebäudeart
Trinkwasserinstallation 7	18_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	Altbau
	19_C	Zweck C	Duschkopf	
	20_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	
Trinkwasserinstallation 8	21_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	Neubau
	21_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	
	22_C	Zweck C	Waschbeckenarmatur Raum 1320	
	22_A	Zweck A	Waschbeckenarmatur Raum 1320	
	23_C	Zweck C	Waschbeckenarmatur Raum 1324	
	23_A	Zweck A	Waschbeckenarmatur Raum 1324	
	24_C	Zweck C	Waschbeckenarmatur Raum 1319	
24_A	Zweck A	Waschbeckenarmatur Raum 1319		
Trinkwasserinstallation 9	25_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	Altbau
	25_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	
	26_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	
Trinkwasserinstallation 10	27_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	Neubau
	27_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	
	28_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	
	28_A	Zweck A	Bad Waschbeckenarmatur	
	29_C	Zweck C	Duschkopf	
	29_A	Zweck A	Duscharmatur (ohne Schlauch)	
Trinkwasserinstallation 11	30_C	Zweck C	Küche Waschbeckenarmatur	Altbau
	30_A	Zweck A	Küche Waschbeckenarmatur	
	31_C	Zweck C	Bad Waschbeckenarmatur	
	31_A	Zweck A	Bad Waschbeckenarmatur	
	32_C	Zweck C	Duschkopf	
	32_A	Zweck A	Duscharmatur (ohne Schlauch)	

Anhang II Die nachgewiesenen Spezies

Tabelle 17: Übersicht über die nachgewiesenen Bakterienspezies in den Trinkwasserproben 7 bis 9.

	Proben-ID	Identifizierte Keime auf Cetrimid/ KBE (100 ml) ⁻¹	Identifizierte Keime auf R2A/ KBE (100 ml) ⁻¹	Gebäudeart
Trinkwasserinstallation 3	7_C	0	0	Neubau
	7_A	41 <i>Ps. vancouverensis</i> (1.826)/ <i>rhodesiae</i> (1.801)/	100 <i>Ps. brassicacearum</i> (1.993)/ <i>kilonensis</i> (1.981)	
		<i>brassicacearum</i> (1.897)/ <i>kilonensis</i> (1.762)		
	8_C	0	14 <i>Acidovorax temperans</i> (2.049)	
	8_A	15 <i>Ps. brassicacearum</i> (1.954)/ <i>kilonensis</i> (1.937)	54 <i>Ps. brassicacearum</i> (1.971)/ <i>kilonensis</i> (1.926)	
Trinkwasserinstallation 4	9_C	11 <i>Ps. putida</i> (2.458)	Rasenwachstum: <i>Ps. putida</i> (2.38)	Neubau
	9_A	1 <i>Ps. libanensis</i> (2.037)/ <i>synxantha</i> (2.127)/ <i>extremorientalis</i> (2.051)	19 <i>Ps. brassicacearum</i> (1.955)/ <i>kilonensis</i> (1.862)	
		1 <i>Ps. extremorientalis</i> (2.064)/ <i>libanensis</i> (2.052)/ <i>synxantha</i> (2.112)/ <i>fluorescens</i> (2.080)		

Tabelle 18: Übersicht über die nachgewiesenen Bakterienspezies in den Trinkwasserproben 10 bis 16.

	Proben-ID	Identifizierte Keime auf Cetrimid/ KBE (100 ml) ⁻¹	Identifizierte Keime auf R2A/ KBE (100 ml) ⁻¹	Gebäudeart
Trinkwasserinstallation 4	10_C	0	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (2.105)/ <i>sanguinis</i> (2.073)	Neubau
	10_A	4 <i>Ps. libanensis</i> (2.100)/ <i>synxantha</i> (2.224)	4 <i>Ps. brassicacearum</i> (1.945)/ <i>kilonensis</i> (1.888)	
	11_C	15 <i>Ps. cedrina</i> (1.826)/ <i>fluorescens</i> (1.993)/ <i>extremorientalis</i> (1.813)/ <i>libanensis</i> (1.992)	23 <i>Ps. synxantha</i> (2.009)/ <i>azotoformans</i> (1.969)/ <i>fluorescens</i> (1.967)	
	11_A	28 <i>Ps. synxantha</i> (2.097)/ <i>fluorescens</i> (2.007)/ <i>libanensis</i> (2.096)	46 <i>Ps. fluorescens</i> (1.934)/ <i>azotoformans</i> (1.903)	
Trinkwasserinstallation 5	12_C	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas sp.</i> (1.889)	Rasenwachstum: <i>Brachybacterium faecium</i> (1.738)	Neubau
	12_A	2 <i>Ps. savastanoi</i> (1.744)/ <i>agarici</i> (1.740)	4 <i>Bacillus Cereus</i> (1.975)/ <i>mycoides</i> (1.938)	
	13_C	1 <i>Acinetobacter ursingii</i> (2.279)	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (2.361)	
		14 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2.412)		
	13_A	13 <i>Ps. koreensis</i> (1.847)/ <i>gessardii</i> (2.061)	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (2.360)	
			18 <i>Ps. brassicacearum</i> (2.011)/ <i>kilonensis</i> (1.930)	
	14_C	0	0	
14_A	3 <i>Ps. Brassicacearum</i> (1.858)/ <i>gessardii</i> (1.724)/ <i>thivervalensis</i>	6 <i>Ps. brassicacearum</i> (2.020), <i>kilonensis</i> (1.925) 3 <i>Yersinia mollaretii</i> (2.205), <i>enterocolitica</i> (2.062) 12 <i>Ps. brassicacearum</i> (1.962), <i>kilonensis</i> (1.925), <i>thivervalensis</i> (1.818)		
Trinkwasserinstallation 6	15_C	2 <i>Ps. koreensis</i> (2.015)/ <i>corrugata</i> (2.012)	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas sp.</i> (1.832)	Neubau
		16 <i>Sphingomonas sp.</i> (1.872)		
	15_A	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas sp.</i> (1.836)	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas xenophagum</i> (2.205)	
	16_C	(1.976) 16 <i>Ps. jessenii</i> (2.158)/ <i>chlororaphis</i> (2.042)	0	
16_A	0	69 <i>Ps. brassicacearum</i> (2.031), <i>kilonensis</i> (1.957)		

Tabelle 19: Übersicht über die nachgewiesenen Bakterienspezies in den Trinkwasserproben 17 bis 27.

	Proben-ID	Identifizierte Keime auf Cetrimid/ KBE (100 ml) ⁻¹	Identifizierte Keime auf R2A/ KBE (100 ml) ⁻¹	Gebäudeart
Trinkwasser- installation 6	17_C	12 <i>Ps. gessardii</i> (1.96)/ <i>brenneri</i> (1.791)/ <i>koreensis</i> (1.808)	0	Neubau
	17_A	0	Rasenwachstum: <i>Aeromonas molluscorum</i> (2.132)	
Trinkwasser- installation 7	18_C	46 <i>Ps. koreensis</i> (2.076)/ <i>kilonensis</i> (1.892)	Rasenwachstum: <i>Ps. pseudoalcaligenes</i> (2.200),	Altbau
	19_C	Rasenwachstum: <i>Stenotrophomonas</i>	Rasenwachstum: <i>Ps. aeruginosa</i>	
	20_C	14 <i>Sphingomonas sp.</i> (1.775)	Rasenwachstum: <i>Ps. oleovorans</i> (2.150), <i>pseudoalcaligenes</i> (2.096)	
Trinkwasserinstallation 8	21_C	0	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (2.112)	Neubau
	21_A	0	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (2.230)	
	22_C	280 <i>Sphingomonas sp.</i> (1.758)	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (1.668)	
	22_A	0	2 <i>Micrococcus luteus</i> (2.342)	
	23_C	0	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas sp</i> (1.895)	
	23_A	0	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (2.117)	
	24_C	1 <i>Sphingomonas sp.</i> (1.760)	12 <i>Acidovorax temperans</i> (2.266)	
	24_A	0	6 <i>Acidovorax temperans</i> (2.253)	
Trinkwasserinstallation 9	25_C	5 <i>Ps. azofoformans</i> (2.095)/ <i>libanensis</i> (2.151)	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (2.343)	Altbau
	25_A	0	4 <i>Acidovorax facilis</i> (2.202)/ <i>delafieldii</i> (1.704)	
			3 <i>Pseudomonas koreensis</i> (2.185)	
	26_C	0	Rasenwachstum: <i>Ps. koreensis</i> (2.025), <i>corrugata</i> (1.761)	
Trinkwasser- installation 10	27_C	0	Rasenwachstum: <i>Acinetobacter parvus</i> (1.988)	Neubau
	27_A	0	5 <i>Ps. brassicacearum</i> (1.965)/ <i>mandelii</i> (1.796)/ <i>thivervalensis</i> (1.864)	

Tabelle 20: Übersicht über die nachgewiesenen Bakterienspezies in den Trinkwasserproben 28 bis 32.

	Proben-ID	Identifizierte Keime auf Cetrimid/ KBE (100 ml) ⁻¹	Identifizierte Keime auf R2A/ KBE (100 ml) ⁻¹	Gebäudeart
Trinkwasser-installation 10	28_C	0	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (2.252)	Altbau
	28_A	0	36 <i>Ps. Brassicacearum</i> (1.994)/ <i>kilonensis</i> (1.877)/ <i>thiervalensis</i> (1.971)	
	29_C	2 <i>Ps. koreensis</i> (2.001)/ <i>chlororaphis</i> (1.949)/ <i>kilonensis</i> (1.848)	0	
	29_A	0	11 <i>Ps. kilonensis</i> (2.086)/ <i>frederiksbergensis</i> (1.739)/ <i>brassicacearum</i> (1.986)	
Trinkwasserinstallation 11	30_C	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas sp.</i> (1.757)	Rasenwachstum: <i>Acidovorax temperans</i> (2.080)	Neubau
	30_A	0	(2.478)	
	31_C	0	Rasenwachstum: <i>Sphingomonas sp.</i> (1.757)	
	31_A	0	0	
	32_C	0	Rasenwachstum: <i>Acidovorax delafieldii</i> (1.845)	
	32_A	0	0	

Anhang III Die Trinkwasserinstallationen

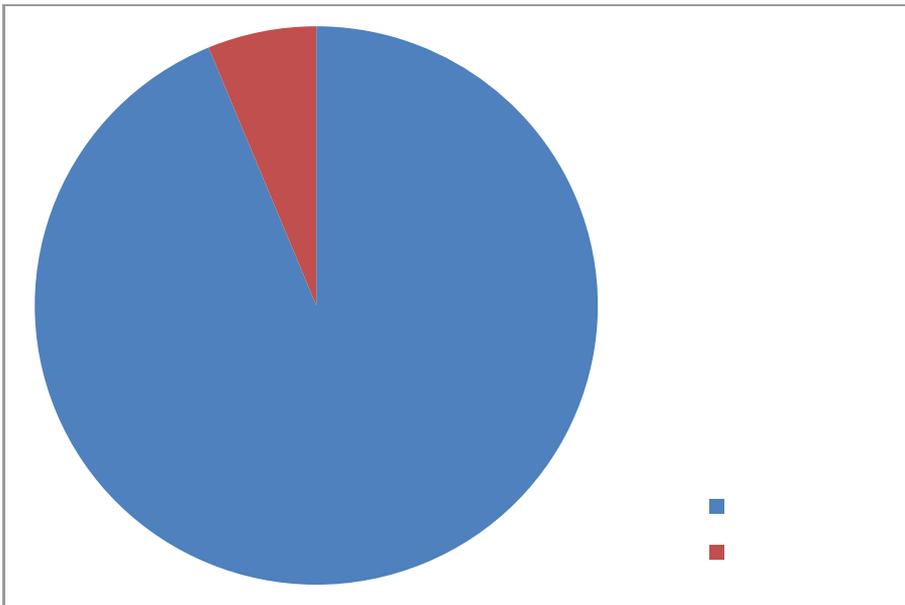


Abbildung 27: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 3. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 7 und 8. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 800 ml Trinkwasserprobe untersucht.

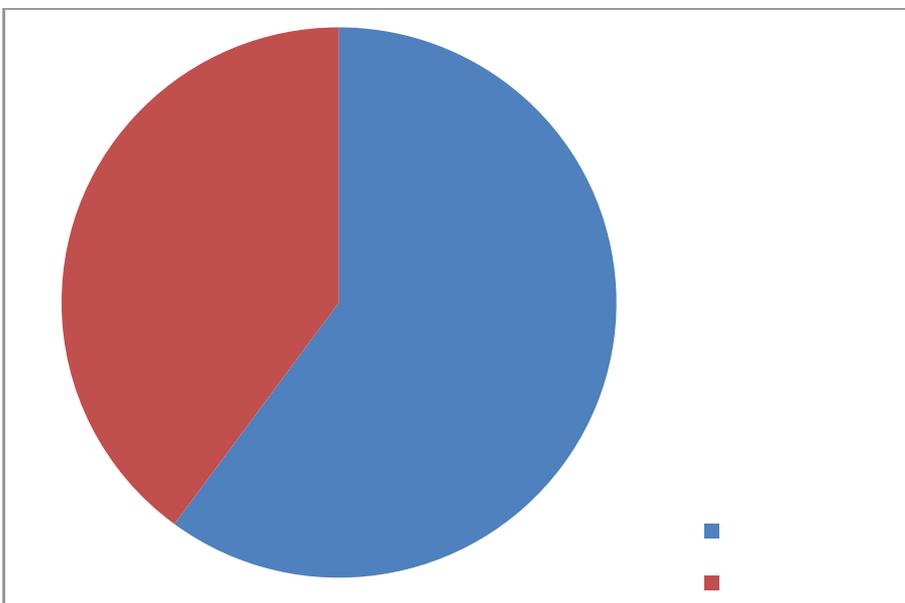


Abbildung 28: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 4. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 9, 10 und 11. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 1200 ml Trinkwasserprobe untersucht.

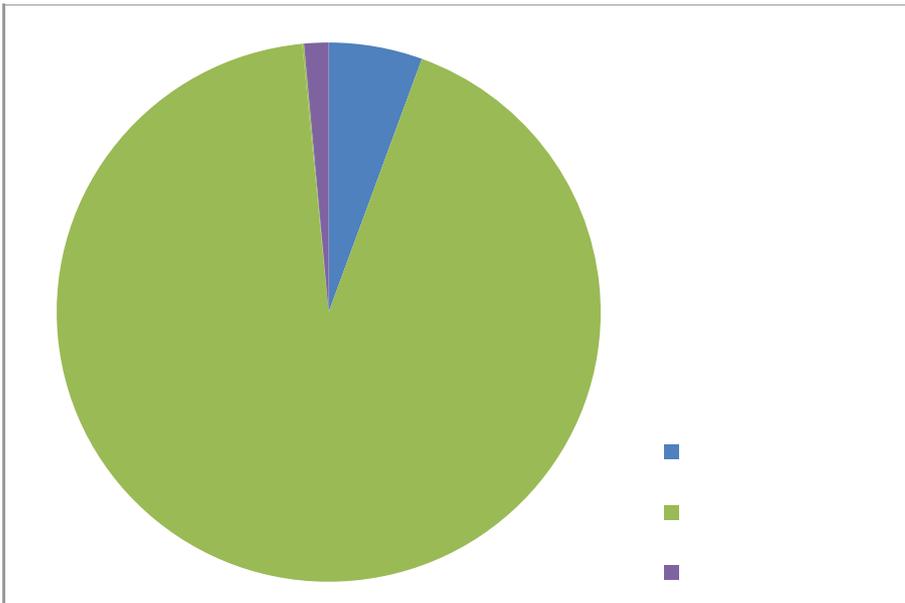


Abbildung 29: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 5. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 12, 13 und 14. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 1200 ml Trinkwasserprobe untersucht.

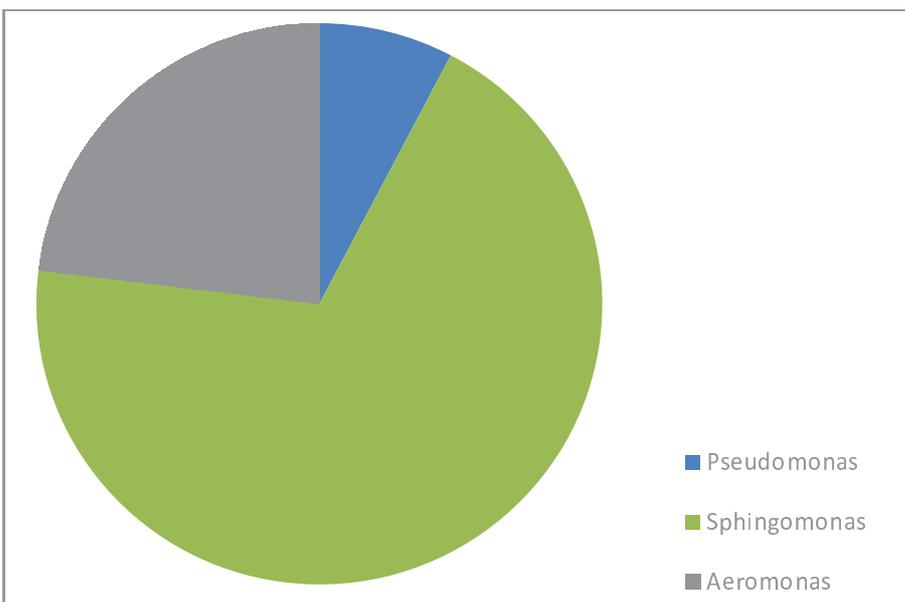


Abbildung 30: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 6. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 15, 16 und 17. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 1200 ml Trinkwasserprobe untersucht.

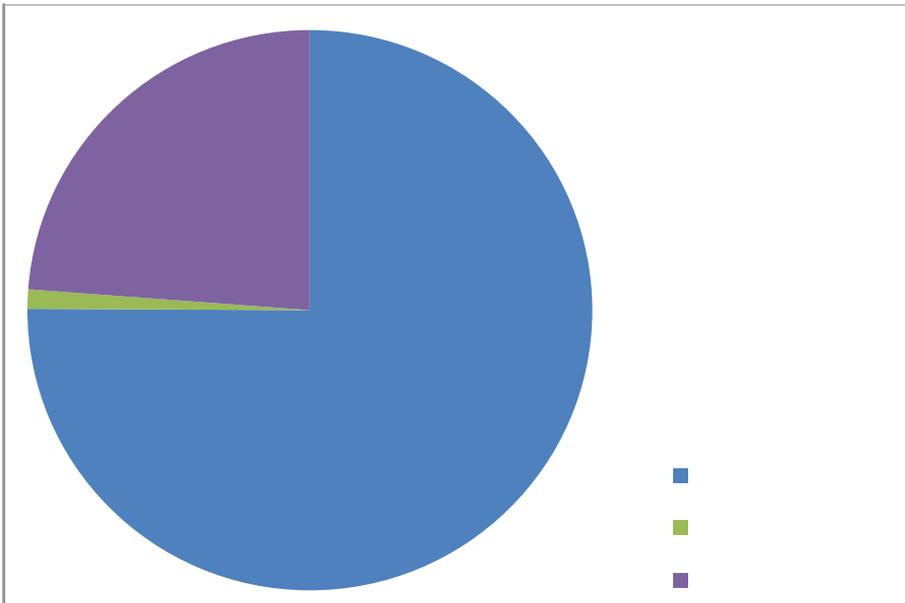


Abbildung 31: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 7. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 18, 19 und 20. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 600 ml Trinkwasserprobe untersucht.

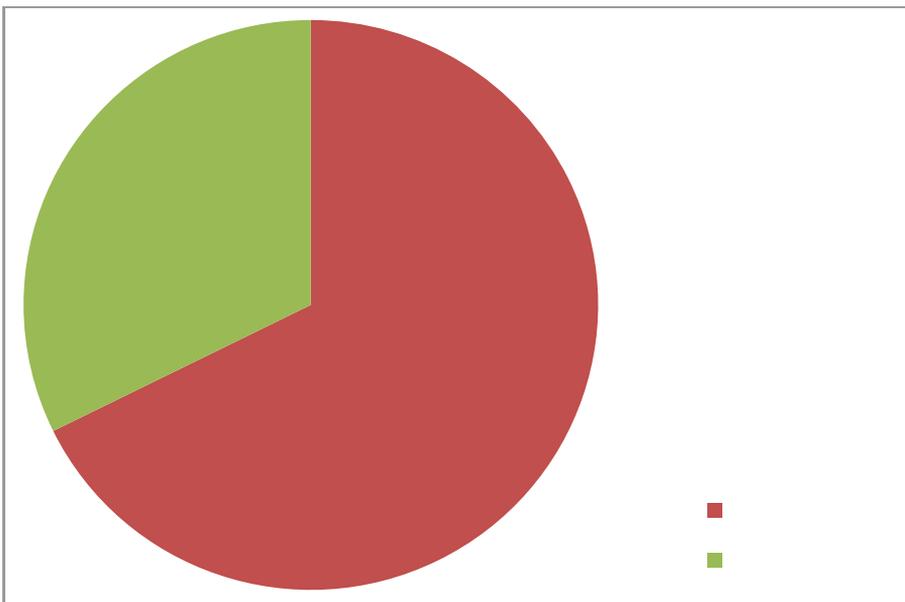


Abbildung 32: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 8. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 21, 22, 23 und 24. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 1600 ml Trinkwasserprobe untersucht.

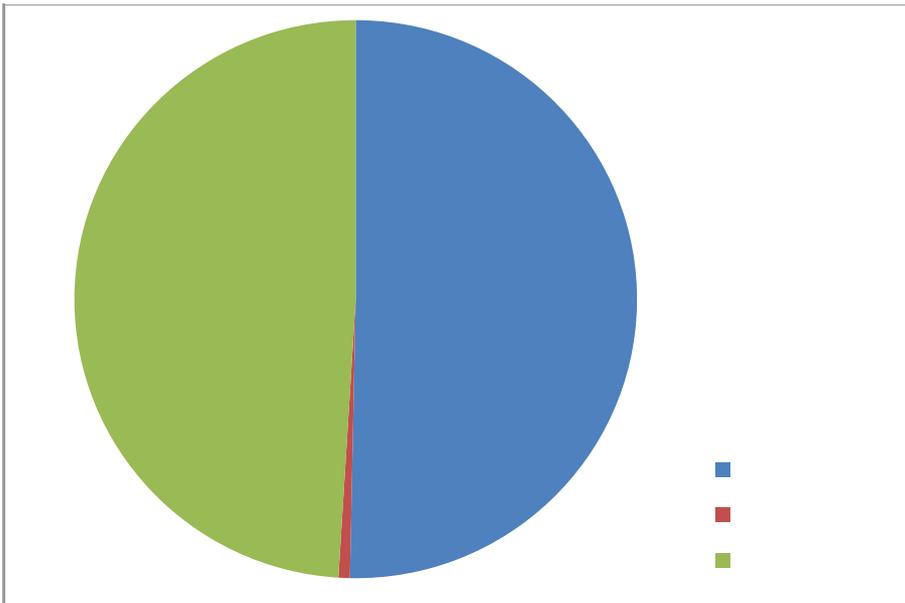


Abbildung 33: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 9. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 25 und 26. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 600 ml Trinkwasserprobe untersucht.

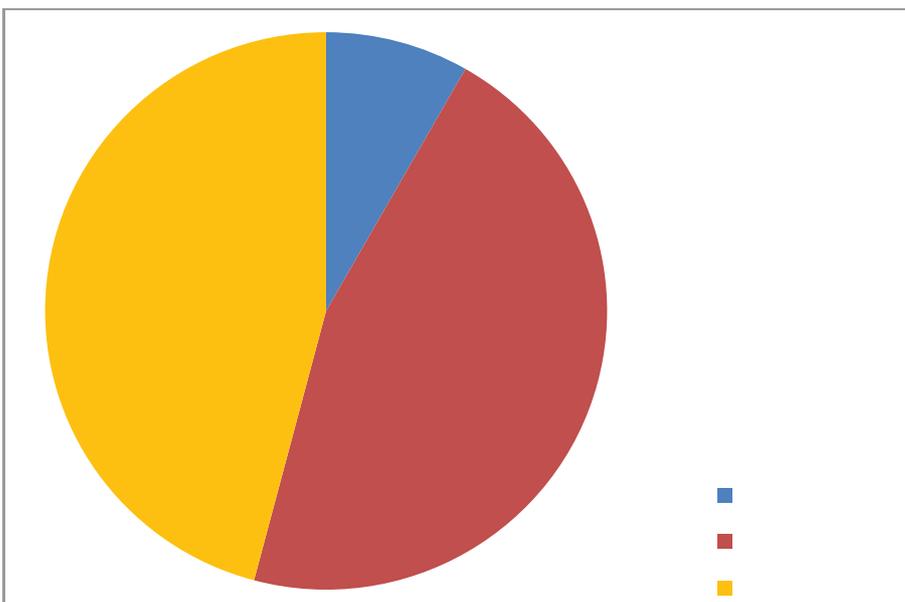


Abbildung 34: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 10. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 27, 28 und 29. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 1200 ml Trinkwasserprobe untersucht.

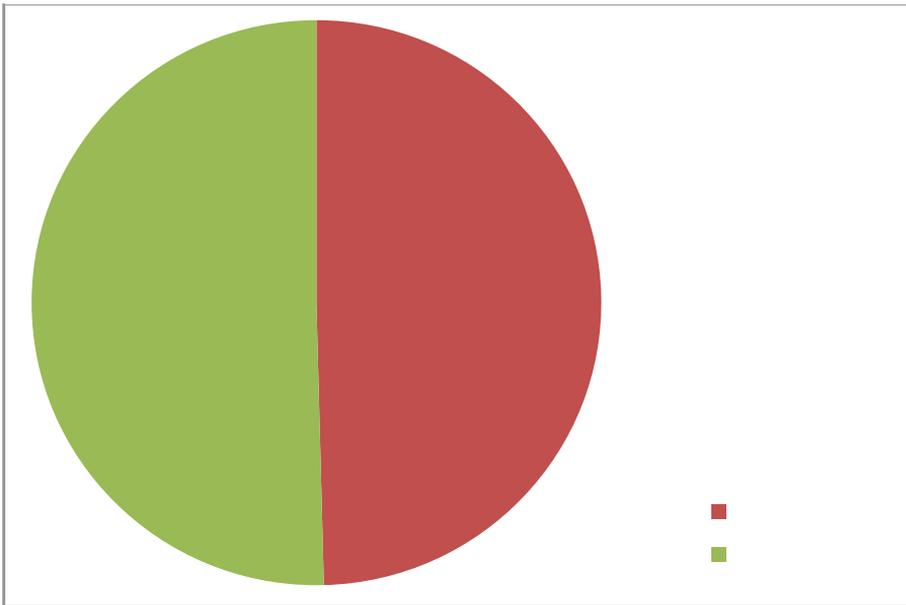


Abbildung 35: Darstellung über die nachgewiesenen Non-Fermenter Gattungen in den Trinkwasserproben der Trinkwasserinstallation 11. Hierzu zählen die Trinkwasserproben 30, 31 und 32. Eine Unterscheidung zwischen dem R2A- und dem Cetrimid-Nährmedium sowie zwischen Zweck C und Zweck A erfolgte hierbei nicht. Insgesamt wurden 1200 ml Trinkwasserprobe untersucht.

Anhang IV Die Perlatoren und Duschschläuche

Proben-ID	Identifizierte Keime nach Zweck C	Identifizierte Keime im Perlator	Identifizierte Keime nach Zweck A
4	300 <i>Brevundimonas aurantiaca</i> (2.027)	300 <i>Sphingomonas koreensis</i> (2.270)	12 <i>Pseudomonas synxantha</i> (2.06)
10	300 <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (2.105)	0	4 <i>Pseudomonas brassicacearum</i> (1.945)
13	300 <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (2.361)	0	300 <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (2.36), 18 <i>Pseudomonas brassicacearum</i> (2.011)
21	300 <i>Acidovorax temperans</i> (2.112)	300 <i>Pseudomonas oleovorans</i> (2.221)/ <i>pseudoalcaligenes</i> (1.914)	300 <i>Acidovorax temperans</i> (2.23)

Proben-ID	Identifizierte Keime nach Zweck C	Identifizierte Keime im Duschschauch	Identifizierte Keime nach Zweck A
6	84 <i>Brevibacterium casei</i> (2.351)	300 <i>Delftia acidovorans</i> (1.940)	Rasenwachstum: <i>Ps. azotoformans</i> (1.999)/ <i>extremorientalis</i> (1.998)
11	23 <i>Ps. synxantha</i> (2.009)/ <i>azotoformans</i> (1.969)/ <i>fluorescens</i> (1.967)	300 <i>Acidovorax delafieldii</i> (1,775)	46 <i>Ps. fluorescens</i> (1.934)/ <i>azotoformans</i> (1.903)
29	0	300 <i>Brachybacterium faecium</i> (1.706)	11 <i>Ps. kilonensis</i> (2.086)/ <i>frederiksbergensis</i> (1.739)/
32	Rasenwachstum: <i>Acidovorax delafieldii</i> (1.845)	0	0

Anhang V Die 16S-rDNA-Sequenzen

Ermittelte Sequenzen der 16S-rDNA-Sequenzierung

>Consensus for segment Copied-Reference for specimen 2 (7_A)

GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCG
 GAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT
 GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGC
 GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
 CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
 CAGTAACCTAATACGTTGCTGTCTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGCGCGTAGGTTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
 ATTCAAAAGTACAAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGA
 AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGA
 CACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGA

>Consensus for segment Copied-Reference for specimen 3 (10_A)

GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCG
 GAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT
 GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGC
 GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
 CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
 CAGTAACCTAATACGTTGCTGTCTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGCGCGTAGGTTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
 ATTCAAAAGTACAAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGA
 AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGA
 CACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTA
 AGTTGACCGCC

>Consensus for segment Copied-Reference for specimen 4 (18_C)

GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGYTCG
 GAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT
 GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGRGGTAATGGCTACCAAGGC
 GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
 CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
 CAGTAACCTAATACGTTGCTGTGTYTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGCGCGTAGGTTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
 ATTCAAAAGTACAAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGA
 AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGA
 CACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG

TAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTA
AGTTGACCGCCTGGG

>Consensus for segment Copied-Reference for specimen 5 (26_C)

AGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCG
AAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG
ACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCC
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGC
AGTAAATTAATACTTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TTCAAACCTGTCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGAC
ACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGT

>Consensus for segment Copied-Reference for specimen 6 (5_A)

GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCG
GAAACGGACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT
GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
TTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TTCAAACCTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGAC
ACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAA

>Consensus for segment Copied-Reference for specimen 7 (4_A)

GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCG
GAAACGGACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT
GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
TTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TTCAAACCTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGAC
ACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAAC

Proben-ID	GKZ auf DEV in KBE ml ⁻¹	GKZ auf DEV in KBE (100 ml) ⁻¹ (berechnet)	Non-Fermenter auf DEV in KBE (100 ml) ⁻¹
1_C	485	48500	0
1_A	128	12800	300
4_C	68	6800	300
4_A	0	0	4
6_C	132	13200	9
6_A	66	6600	0
9_C	3808	380800	0
9_A	1	100	87
10_C	52	5200	300
10_A	1	100	44
11_C	35	3500	27
11_A	0	0	45

Proben-ID	GKZ auf DEV in KBE ml ⁻¹	GKZ auf DEV in KBE (100 ml) ⁻¹ (berechnet)	Non-Fermenter auf DEV in KBE (100 ml) ⁻¹
15_C	456	45600	300
15_A	1	100	5
16_C	188	18800	0
16_A	0	0	0
17_C	23	2300	0
17_A	0	0	19
18_C	262	26200	300
19_C	3808	380800	0
20_C	150	15000	7
23_C	354	35400	300
23_A	0	0	0

Anhang VI
Der Anteil der Non-Fermenter

Proben-ID	GKZ auf DEV in KBE ml⁻¹	GKZ auf DEV in KBE (100 ml)⁻¹ (berechnet)	Non-Fermenter auf DEV in KBE (100 ml)⁻¹
27_C	18	1800	300
27_A	0	0	57
29_C	54	5400	300
29_A	0	0	18
30_C	20	2000	300
30_A	0	0	11
31_C	57	5700	300
31_A	0	0	0
32_C	0	0	0
32_A	0	0	0

Anhang VII Die Gesamtkeimzahlen

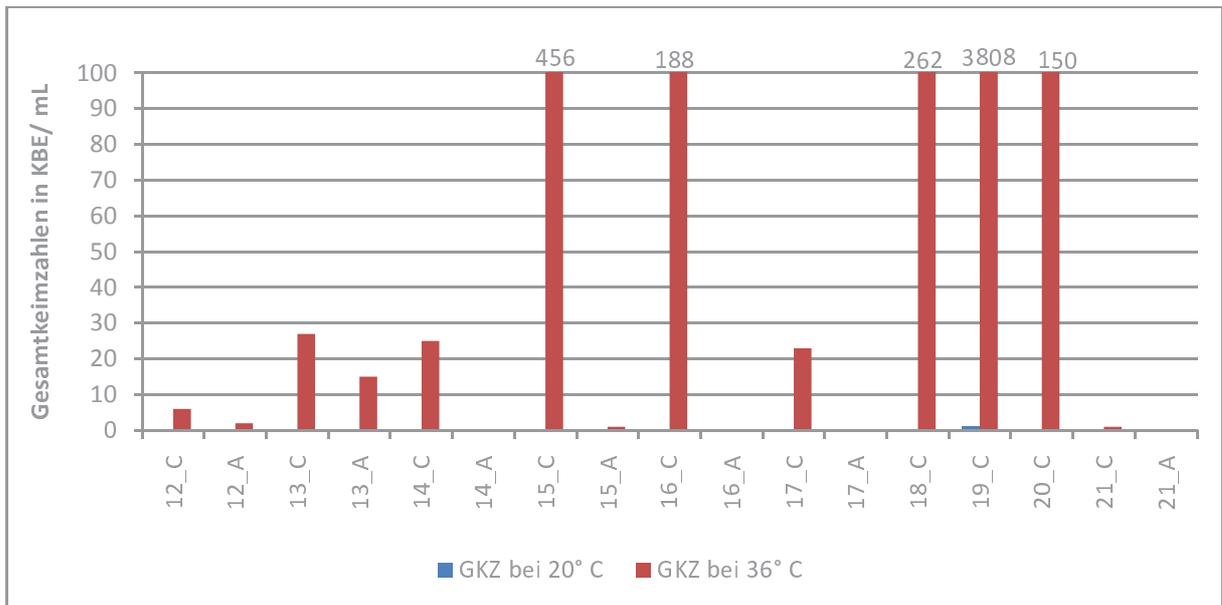


Abbildung 36: Graphische Darstellung der ermittelten Gesamtkeimzahlen der untersuchten Trinkwasserproben bei den Inkubationstemperaturen von 20° C und 36° C im Vergleich.

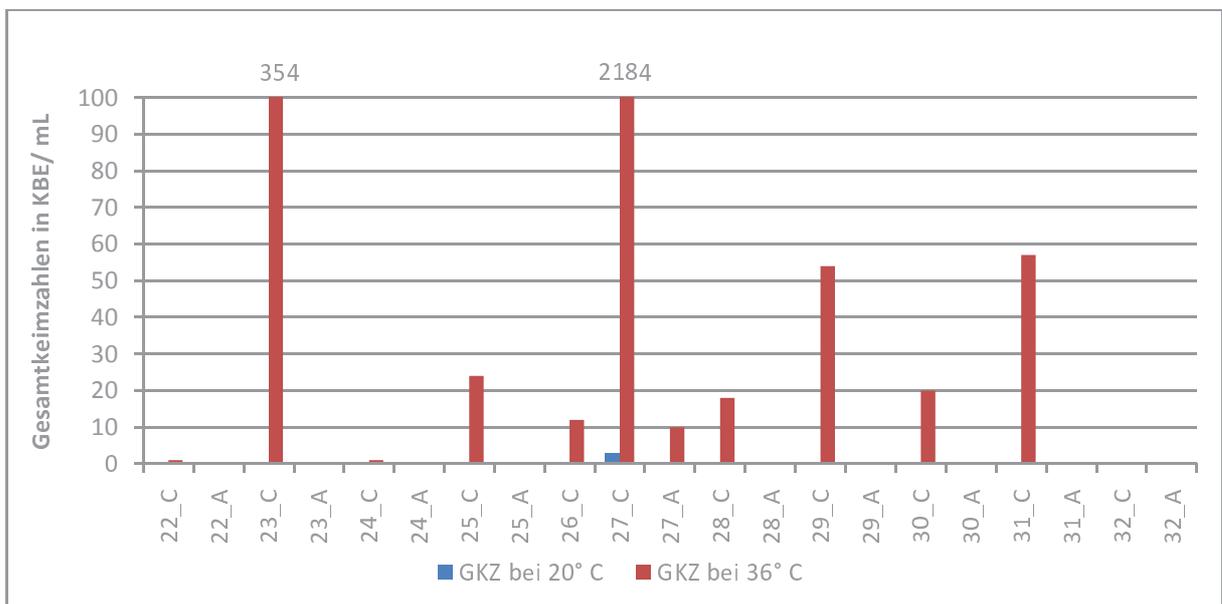


Abbildung 37: Graphische Darstellung der ermittelten Gesamtkeimzahlen der untersuchten Trinkwasserproben bei den Inkubationstemperaturen von 20° C und 36° C im Vergleich.

Anhang VIII *Die Gesamtkeimzahlen nach Zweck A*

Tabelle 24: Übersicht über die Gesamtkeimzahlen der nach Zweck A entnommenen Trinkwasserproben nach einer zweitägigen Inkubation bei 20° C.

Proben-ID	GKZ bei 20° C/ KBE ml⁻¹
1_A	42
3_A	0
4_A	0
5_A	0
6_A	0
7_A	0
8_A	0
9_A	0
10_A	0
11_A	0
12_A	0
13_A	0
14_A	0
15_A	0
16_A	0
17_A	0
21_A	0
22_A	0
23_A	0
24_A	0
25_A	0
27_A	0
28_A	0
29_A	0
30_A	0
31_A	0
32_A	0

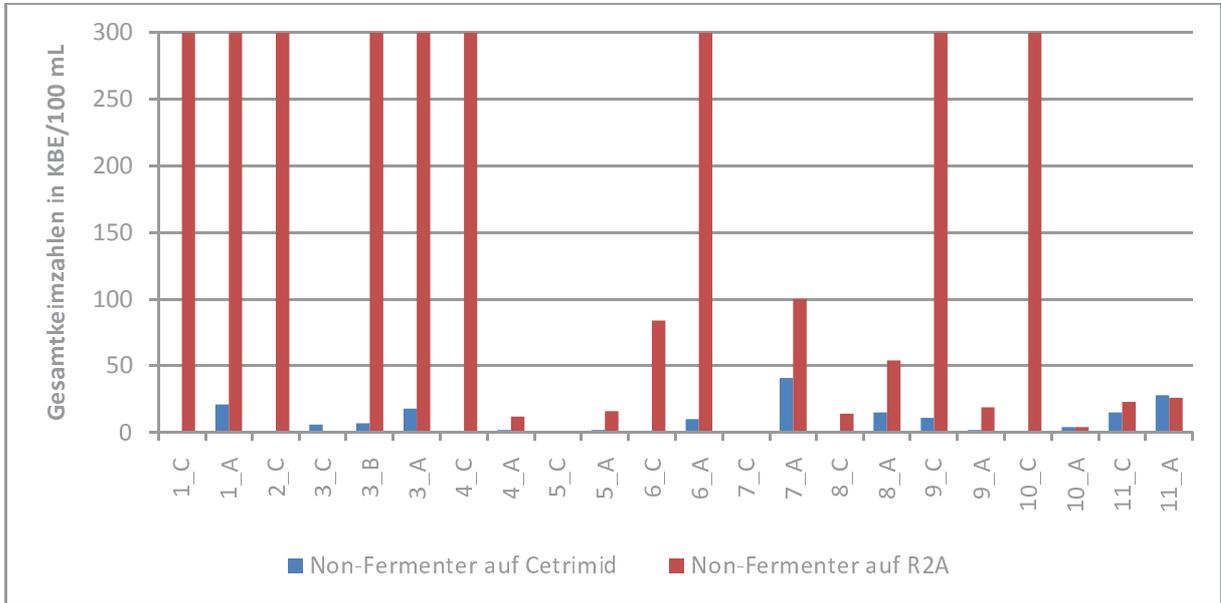
Anhang IX *Das Wachstum auf verschiedenen Nährmedien*

Abbildung 38: In dem Balkendiagramm ist das Wachstum der Non-Fermenter auf dem Cetrimid-Nährmedium dem Wachstum auf dem R2A-Nährmedium gegenüber gestellt.

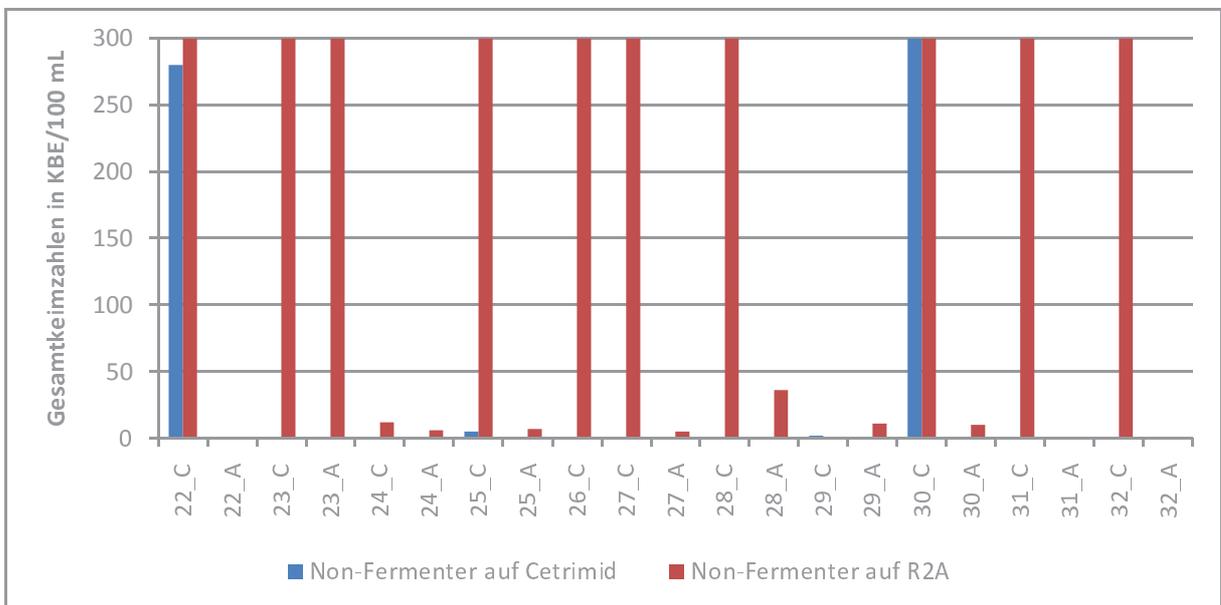


Abbildung 39: In dem Balkendiagramm ist das Wachstum der Non-Fermenter auf dem Cetrimid-Nährmedium dem Wachstum auf dem R2A-Nährmedium gegenüber gestellt.

Anhang X *Die Berechnung der Extinktionen***Tabelle 25: Übersicht über die gemessenen Extinktionen sowie der Herausrechnung der Verdünnung und der Bildung des Mittelwertes.**

Probennummer	Extinktion	Verdünnung	Extinktion mit berechneter Verdünnung	Mittelwert
1	0,240	1:100	24,000	
	0,240	1:100	24,000	24,000
	0,240	1:100	24,000	
2	0,826	1:10	8,260	
	0,838	1:10	8,380	8,340
	0,838	1:10	8,380	
3	0,144	1:100	14,400	
	0,145	1:100	14,500	14,467
	0,145	1:100	14,500	
4	0,156	1:100	15,600	
	0,156	1:100	15,600	15,600
	0,156	1:100	15,600	
5	0,024	1:1000	24,000	
	0,024	1:1000	24,000	24,333
	0,025	1:1000	25,000	
6	0,214	1:100	21,400	
	0,214	1:100	21,400	21,433
	0,215	1:100	21,500	
7	0,041	1:1000	41,000	
	0,042	1:1000	42,000	42,000
	0,043	1:1000	43,000	
8	0,357	1:100	35,700	
	0,357	1:100	35,700	35,700
	0,357	1:100	35,700	
9	0,253	1:100	25,300	
	0,254	1:100	25,400	25,533
	0,259	1:100	25,900	
10	0,050	1:100	5,000	
	0,050	1:100	5,000	5,033
	0,051	1:100	5,100	
11	0,096	1:100	9,600	
	0,097	1:100	9,700	9,700
	0,098	1:100	9,800	
12	0,056	1:100	5,600	
	0,056	1:100	5,600	5,633
	0,057	1:100	5,700	

Tabelle 26: Siehe Erklärung Tabelle 25.

Probennummer	Extinktion	Verdünnung	Extinktion mit berechneter Verdünnung	Mittelwert
13	0,074	1:100	7,400	7,433
	0,074	1:100	7,400	
	0,075	1:100	7,500	
14	0,069	1:100	6,900	7,000
	0,070	1:100	7,000	
	0,071	1:100	7,100	
15	0,118	1:100	11,800	11,867
	0,119	1:100	11,900	
	0,119	1:100	11,900	
16	0,244	1:100	24,400	24,867
	0,251	1:100	25,100	
	0,251	1:100	25,100	
17	0,311	1:100	31,100	31,167
	0,312	1:100	31,200	
	0,312	1:100	31,200	
18	0,238	1:100	23,800	23,900
	0,239	1:100	23,900	
	0,240	1:100	24,000	
19	0,343	1:100	34,300	34,800
	0,351	1:100	35,100	
	0,350	1:100	35,000	
20	0,321	1:100	32,100	32,400
	0,325	1:100	32,500	
	0,326	1:100	32,600	
21	0,266	1:100	26,600	27,000
	0,272	1:100	27,200	
	0,272	1:100	27,200	
22	0,104	1:100	10,400	10,433
	0,104	1:100	10,400	
	0,105	1:100	10,500	
23	0,086	1:100	8,600	8,767
	0,086	1:100	8,600	
	0,091	1:100	9,100	
24	0,060	1:100	6,000	6,033
	0,060	1:100	6,000	
	0,061	1:100	6,100	

Tabelle 27: Siehe Erklärung Tabelle 25.

Probennummer	Extinktion	Verdünnung	Extinktion mit berechneter Verdünnung	Mittelwert
25	0,051	1:100	5,100	5,133
	0,051	1:100	5,100	
	0,052	1:100	5,200	
26	0,326	1:10	3,260	3,267
	0,327	1:10	3,270	
	0,327	1:10	3,270	
27	0,101	1:10	1,010	1,017
	0,102	1:10	1,020	
	0,102	1:10	1,020	
28	0,170	1:10	1,700	1,700
	0,170	1:10	1,700	
	0,170	1:10	1,700	
29	0,402	1:10	4,020	4,027
	0,403	1:10	4,030	
	0,403	1:10	4,030	
30	0,233	1:10	2,330	2,347
	0,233	1:10	2,330	
	0,238	1:10	2,380	
31	0,127	1:100	12,700	12,967
	0,128	1:100	12,800	
	0,134	1:100	13,400	
32	0,188	1:100	18,800	19,233
	0,194	1:100	19,400	
	0,195	1:100	19,500	
33	0,112	1:100	11,200	11,267
	0,113	1:100	11,300	
	0,113	1:100	11,300	
34	0,035	1:100	3,500	3,533
	0,035	1:100	3,500	
	0,036	1:100	3,600	
35	0,020	1:100	2,000	2,067
	0,021	1:100	2,100	
	0,021	1:100	2,100	
36	0,267	1:10	2,670	2,697
	0,271	1:10	2,710	
	0,271	1:10	2,710	

Anhang XI Die Ergebnisse des Optimierungsversuches

Tabelle 28: Es sind die Ergebnisse des Optimierungsversuches aufgelistet. Diese Tabelle beinhaltet die Werte (unterhalb der Abbildungen) der Extinktionen bei den entsprechenden Inkubationstemperaturen auf den verschiedenen Nährmedien. Dargestellt sind die Abbildungen und die Ergebnisse der Spezies *Pseudomonas putida*.

<i>Pseudomonas putida</i>	25° C	30° C	36° C
Cetrimid- Nährmedium			
	24,000	8,340	14,467
Cetrimid n. EP- Nährmedium			
	15,600	24,333	21,433
CFC- Nährmedium			
	42,000	35,700	25,533
R2A- Nährmedium			
	5,033	9,700	5,633

Tabelle 29: Es sind die Ergebnisse des Optimierungsversuches aufgelistet. Diese Tabelle beinhaltet die Werte (unterhalb der Abbildungen) der Extinktionen bei den entsprechenden Inkubationstemperaturen auf den verschiedenen Nährmedien. Dargestellt sind die Abbildungen und die Ergebnisse der Spezies *Pseudomonas putida* (2).

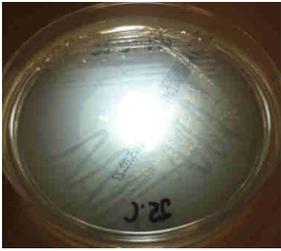
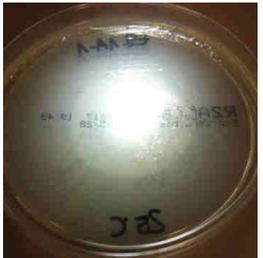
<i>Pseudomonas putida</i> (2)	25° C	30° C	36° C
Cetrimid- Nährmedium			
	7,433	7,000	11,867
Cetrimid n. EP- Nährmedium			
	24,867	31,167	23,900
CFC- Nährmedium			
	34,800	32,400	27,000
R2A- Nährmedium			
	10,433	8,767	6,033

Tabelle 30: Es sind die Ergebnisse des Optimierungsversuches aufgelistet. Diese Tabelle beinhaltet die Werte (unterhalb der Abbildungen) der Extinktionen bei den entsprechenden Inkubationstemperaturen auf den verschiedenen Nährmedien. Dargestellt sind die Abbildungen und die Ergebnisse der Spezies *Pseudomonas koreensis*.

<i>Pseudomonas koreensis</i>	25° C	30° C	36° C
Cetrimid- Nährmedium			
	5,133	3,267	1,017
Cetrimid n. EP- Nährmedium			
	1,700	4,027	2,347
CFC- Nährmedium			
	12,967	19,233	11,267
R2A- Nährmedium			
	3,533	2,067	2,697

Anhang XII

Die Konkurrenzversuche

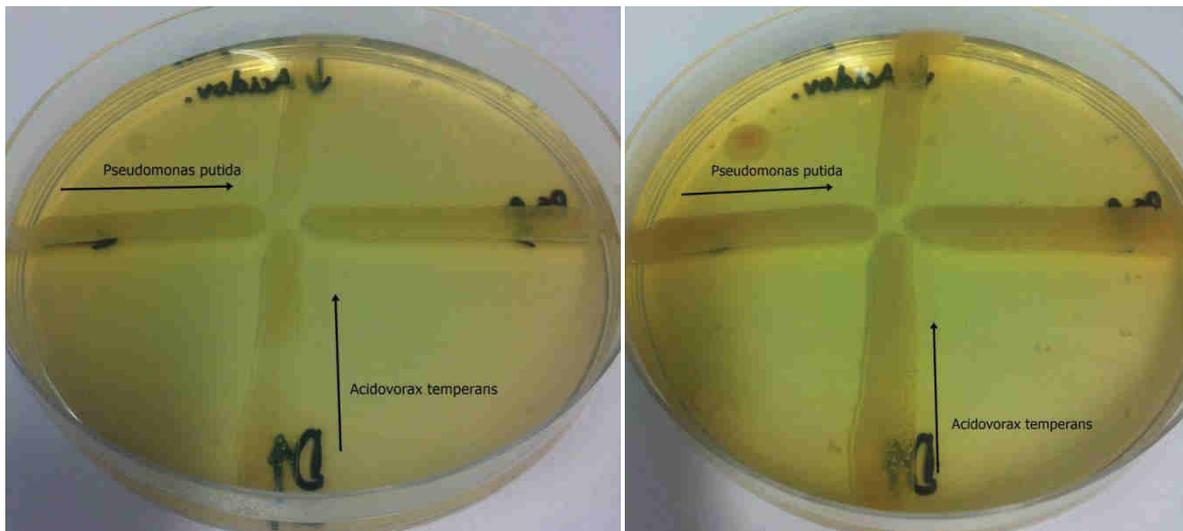


Abbildung 40: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschrieben Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis nach einem Tag Inkubation zu sehen, auf dem rechten Bild nach 4 Tagen Inkubationszeit. Die Non-Fermenter wurde zuvor auf selbstgegossenem CASO-Agar bei 36° C für einen Tag angereichert und dann mit Hilfe eines Glasstabes auf dem entsprechenden Medium entlang eines Striches verteilt. Es ist zu erkennen, dass die Spur von *Pseudomonas putida* etwas breiter geworden ist. Ebenso die Spur von *Acidovorax temperans*. Keiner der beiden Non-Fermenter hat sich auf das Medium ausgebreitet.

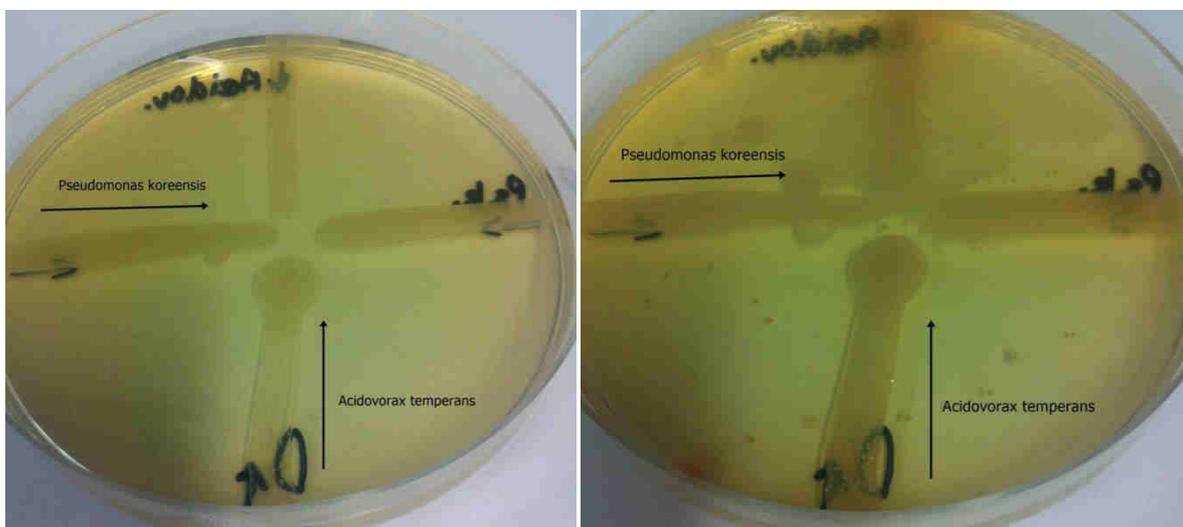


Abbildung 41: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschrieben Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis nach einem Tag Inkubation zu sehen, auf dem rechten Bild nach 4 Tagen Inkubationszeit. Die Non-Fermenter wurde zuvor auf selbstgegossenem CASO-Agar bei 36° C für einen Tag angereichert und dann mit Hilfe eines Glasstabes auf dem entsprechenden Medium entlang eines Striches verteilt. Es ist zu erkennen, dass die Spur von *Pseudomonas koreensis* etwas breiter geworden sein scheint. *Acidovorax temperans* ist, wie an dem oberen Ausstrich zu erkennen ist, von der ausgestrichenen Spur weg und in das Medium gewandert.

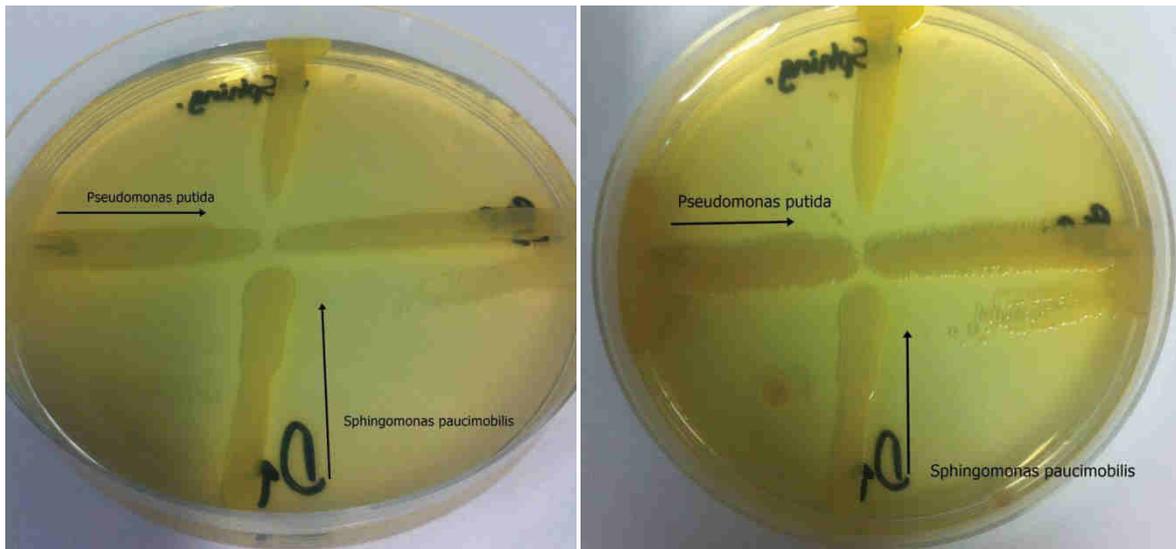


Abbildung 42: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschriebenen Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis nach einem Tag Inkubation zu sehen, auf dem rechten Bild nach 4 Tagen Inkubationszeit. Die Non-Fermenter wurde zuvor auf selbstgegossenem CASO-Agar bei 36° C für einen Tag angereichert und dann mit Hilfe eines Glasstabes auf dem entsprechenden Medium entlang eines Striches verteilt. Es ist zu erkennen, dass *Pseudomonas putida* etwas aus der ausgestrichenen Spur heraus gewandert zu sein scheint. *Sphingomonas paucimobilis* scheint sich in den drei Tagen Inkubationszeit nicht wesentlich ausgebreitet zu haben.

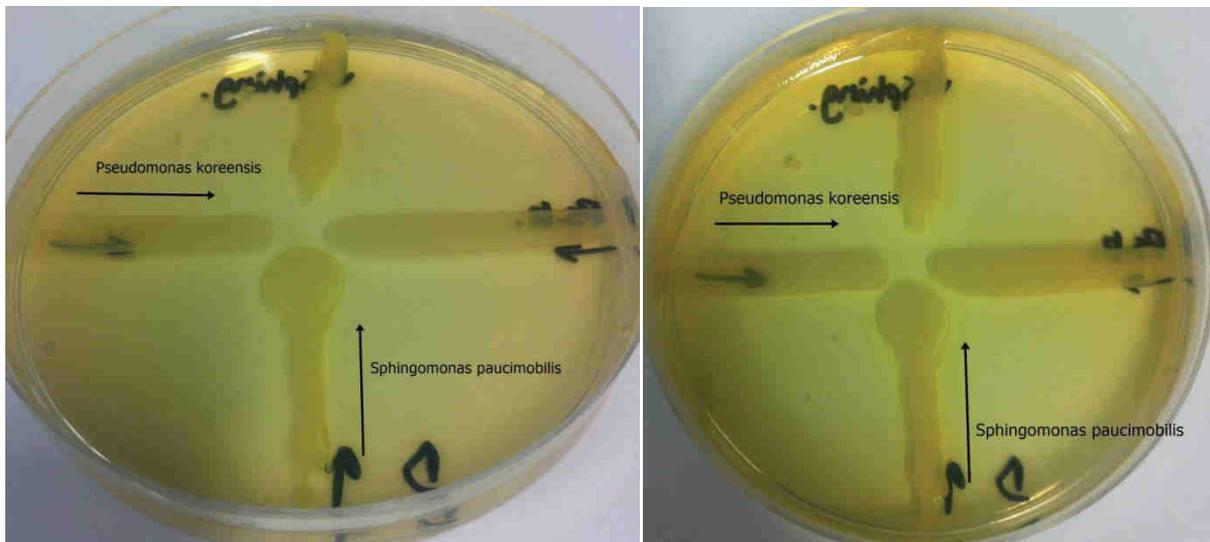


Abbildung 43: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschriebenen Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis nach einem Tag Inkubation zu sehen, auf dem rechten Bild nach 4 Tagen Inkubationszeit. Die Non-Fermenter wurde zuvor auf selbstgegossenem CASO-Agar bei 36° C für einen Tag angereichert und dann mit Hilfe eines Glasstabes auf dem entsprechenden Medium entlang eines Striches verteilt. Es ist zu erkennen, dass *Pseudomonas koreensis* minimal aus der ausgestrichenen Spur heraus gewandert zu sein scheint. *Sphingomonas paucimobilis* hat sich ebenfalls etwas in seiner Spur verbreitert. Kontaktstellen zwischen den Non-Fermenter sind nicht zu erkennen.

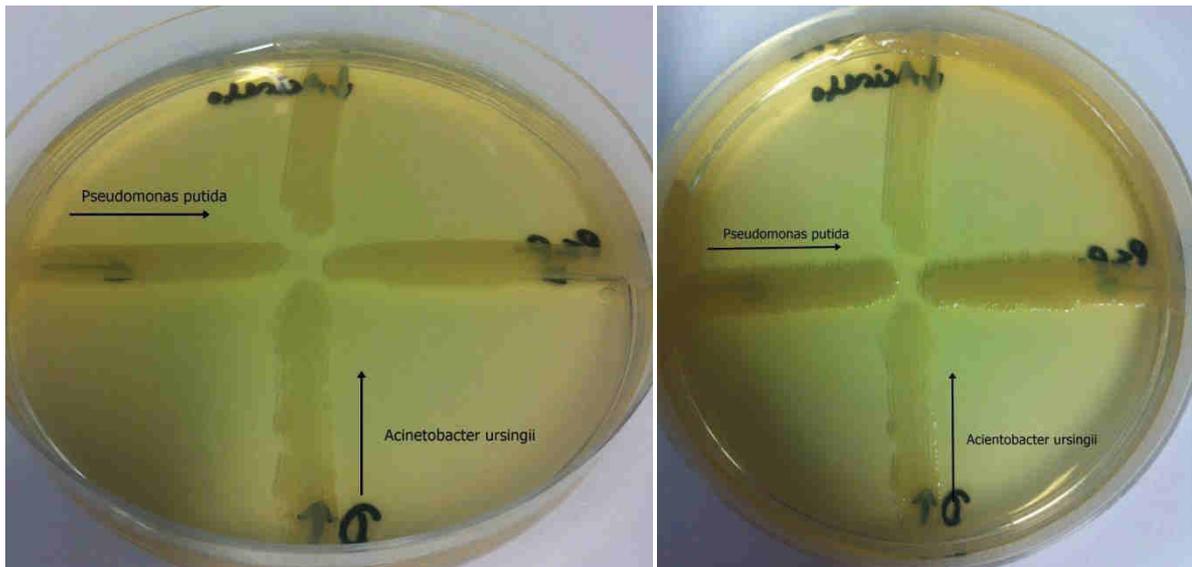


Abbildung 44: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschrieben Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis nach einem Tag Inkubation zu sehen, auf dem rechten Bild nach 4 Tagen Inkubationszeit. Die Non-Fermenter wurde zuvor auf selbstgegossenem CASO-Agar bei 36° C für einen Tag angereichert und dann mit Hilfe eines Glasstabes auf dem entsprechenden Medium entlang eines Striches verteilt. Es ist zu erkennen, dass *Pseudomonas putida* etwas aus der ausgestrichenen Spur heraus gewandert zu sein scheint. *Acinetobacter ursingii* scheint sich nicht ausgebreitet zu haben. Ein Kontaktpunkt zwischen den beiden Non-Fermentern ist nicht zu erkennen.

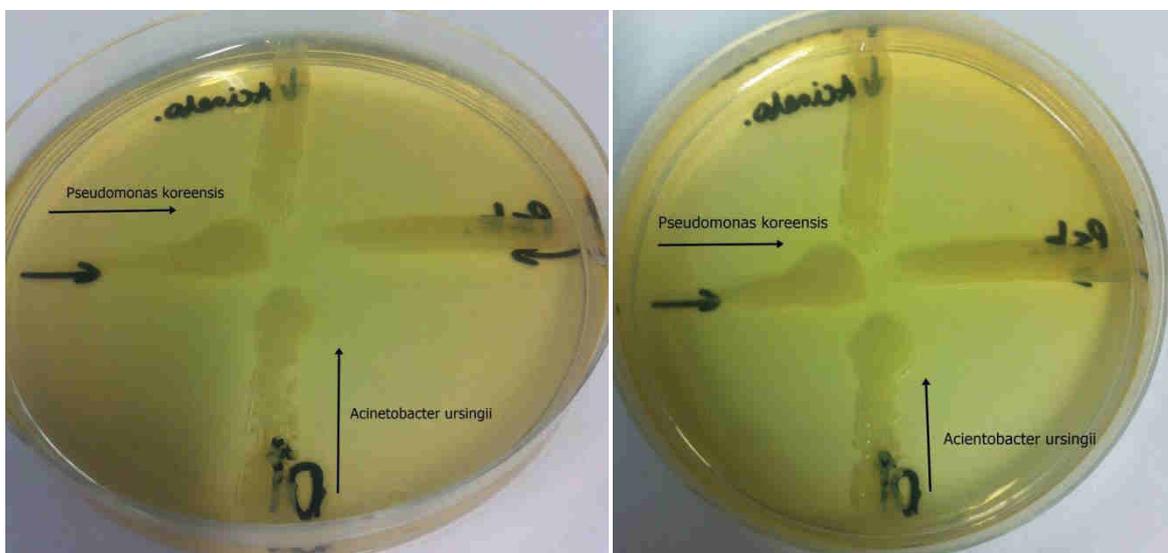


Abbildung 45: Auf den Abbildungen sind die gewachsenen Kolonien der in den Abbildungen durch die Pfeile beschrieben Non-Fermenter auf selbstgegossenem DEV-Nähragar einer Inkubation bei 36° C zu sehen. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis nach einem Tag Inkubation zu sehen, auf dem rechten Bild nach 4 Tagen Inkubationszeit. Die Non-Fermenter wurde zuvor auf selbstgegossenem CASO-Agar bei 36° C für einen Tag angereichert und dann mit Hilfe eines Glasstabes auf dem entsprechenden Medium entlang eines Striches verteilt. Es ist zu erkennen, dass *Pseudomonas koreensis* kaum weiter gewachsen zu sein scheint. Die Spur von *Acinetobacter ursingii* scheint etwas dichter bewachsen zu sein. Ein Kontaktpunkt zwischen den beiden Non-Fermentern ist nicht zu erkennen.

Anhang XIII

MALDI-TOF-MS-Rohdaten

<u>A8</u> (++) (A)	E1.2C	Brevundimonas diminuta	<u>2.061</u>	Brevundimonas diminuta	<u>1.953</u>
<u>A9</u> (-) (C)	E3.1A-1	<i>Flavobacterium hibernum</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.51</u>	<i>Sphingobacterium falcatum</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.387</u>
<u>A10</u> (-) (C)	E3.1A-1	<i>Morganella morganii</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.463</u>	<i>Lactobacillus brevis</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.38</u>
<u>A11</u> (+) (B)	E3.1A-2	Pseudomonas kilonensis	<u>1.95</u>	Pseudomonas chlororaphis	<u>1.931</u>
<u>A12</u> (+) (B)	E3.1A-2	Pseudomonas chlororaphis	<u>1.959</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.951</u>

<u>C5</u> (++) (A)	E1.1C	Brevundimonas aurantiaca	<u>2.027</u>	<i>Brevundimonas ssp</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.557</u>
<u>C6</u> (+) (B)	E1.1C	Brevundimonas aurantiaca	<u>1.988</u>	<i>Burkholderia glathei</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.41</u>
<u>C7</u> (+) (B)	E1.2C	Acidovorax temperans	<u>1.766</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.668</u>
<u>C8</u> (++) (A)	E1.2C	Acidovorax temperans	<u>2.057</u>	Acidovorax temperans	<u>2.048</u>
<u>C9</u> (+) (B)	E2.1C	Brevundimonas aurantiaca	<u>1.788</u>	<i>Brevundimonas ssp</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.499</u>
<u>C10</u> (+) (B)	E2.1C	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	<u>1.755</u>	<i>Acinetobacter parvus</i>	<u>1.708</u>
<u>C11</u> (++) (B)	E2.1A-2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>2.06</u>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<u>2.001</u>
<u>C12</u> (++) (A)	E2.1A-2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>2.027</u>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<u>1.995</u>
<u>D1</u> (-) (C)	E2.2C-1	<i>Arthrobacter psychromogenus</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.216</u>	<i>Pseudomonas straminea</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.188</u>
<u>D2</u> (-) (C)	E2.2C-1	unzuverlässige Identifikation	<u>1.393</u>	<i>Burkholderia fungorum</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.287</u>
	E2.2C-2	Bacillus subtilis	<u>2.028</u>	Bacillus subtilis	<u>1.966</u>

D3 (++) (A)					
D4 (+) (B)	E2.2C-2	Bacillus subtilis	<u>1.909</u>	Bacillus subtilis	<u>1.886</u>
D5 (+) (B)	E2.2A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.929</u>	Pseudomonas thivervalensis	<u>1.884</u>
D6 (+) (B)	E2.2A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.964</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.868</u>
D7 (-)(C)	E3.1C	<i>Citrobacter koseri</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.37</u>	<i>Streptococcus parvaangulus</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.257</u>
D8 (-)(C)	E3.1C	<i>Stenobacillus nitulinus</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.384</u>	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.226</u>
D9 (+) (B)	E3.1A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.993</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.981</u>
D10 (+) (B)	E3.1A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.917</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.831</u>
D11 (++) (A)	E3.2C-1	Acidovorax temperans	<u>2.044</u>	Acidovorax temperans	<u>2.02</u>
D12 (++) (A)	E3.2C-1	Acidovorax temperans	<u>2.049</u>	Acidovorax temperans	<u>2.023</u>
E1 (-)(C)	E3.2C-2	<i>Arthrobacter castelli</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.463</u>	<i>Paracoccus rufus</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.346</u>
E2 (-)(C)	E3.2C-2	<i>Pseudomonas proteolytica</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.375</u>	<i>Ps. koreanus</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.239</u>
E3 (+) (B)	E3.2A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.935</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.865</u>
E4 (+) (B)	E3.2A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.971</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.926</u>
E5 (+++) (A)	E4.1C	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.349</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.239</u>
E6 (+++) (A)	E4.1C	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.38</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.18</u>

<u>F10</u> (++) (B)					
<u>F11</u> (++) (B)	E2.2A-2	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.189</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>	<u>2.102</u>
<u>F12</u> (++) (B)	E2.2A-2	<u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>	<u>2.099</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.072</u>
<u>G1</u> (+) (B)	E3.1A	<u>Pseudomonas</u> <u>vancouverensis</u>	<u>1.826</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>rhodesiae</u>	<u>1.801</u>
<u>G2</u> (+) (B)	E3.1A	<u>Pseudomonas</u> <u>brassicacearum</u>	<u>1.897</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>kilonensis</u>	<u>1.762</u>
<u>G3</u> (+) (B)	E3.2A	<u>Pseudomonas</u> <u>brassicacearum</u>	<u>1.944</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>kilonensis</u>	<u>1.889</u>
<u>G4</u> (+) (B)	E3.2A	<u>Pseudomonas</u> <u>brassicacearum</u>	<u>1.954</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>kilonensis</u>	<u>1.937</u>
<u>G5</u> (+++) (A)	E4.1C-1	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.458</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.345</u>
<u>G6</u> (+++) (A)	E4.1C-1	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.35</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.343</u>
<u>G7</u> (+++) (A)	E4.1C-2	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.34</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.263</u>
<u>G8</u> (+++) (B)	E4.1C-2	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.427</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.406</u>
<u>G9</u> (++) (A)	E4.1A-1	<u>Pseudomonas</u> <u>libanensis</u>	<u>2.037</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>1.99</u>
<u>G10</u> (++) (B)	E4.1A-1	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.127</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>extremorientalis</u>	<u>2.051</u>
<u>G11</u> (++) (B)	E4.1A-2	<u>Pseudomonas</u> <u>extremorientalis</u>	<u>2.064</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>libanensis</u>	<u>2.052</u>
	E4.1A-2	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.112</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>	<u>2.08</u>

<u>E7</u> (+) (B)	E4.1A-1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.943</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.834</u>
<u>E8</u> (+) (B)	E4.1A-1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.955</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.862</u>
<u>E9</u> (-)(C)	E4.1A-2	<i>Ps. chloroxydus</i> ssp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.658</u>	<i>Sphingomonas</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.59</u>
<u>E10</u> (-)(C)	E4.1A-2	unzuverlässige Identifikation	<u>1.327</u>	<i>Steph. aureus</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.305</u>
<u>E11</u> (++) (C)	E4.2C-1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<u>2.072</u>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<u>2.064</u>
<u>E12</u> (++) (B)	E4.2C-1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<u>2.105</u>	<i>Sphingomonas sanguinis</i>	<u>2.073</u>
<u>E1</u> (-)(C)	E4.2C-2	<i>Gordonia rubropertincta</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.556</u>	<i>Sphingomonas adhaesiva</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.527</u>
<u>E2</u> (-)(C)	E4.2C-2	<i>Arctobacterium fructivorus</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.556</u>	<i>Arctobacter rustelli</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.551</u>
<u>E3</u> (+) (B)	E4.2A-1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.854</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.758</u>
<u>E4</u> (+) (B)	E4.2A-1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.945</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.888</u>
<u>E5</u> (+) (B)	E2.1A-1	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<u>1.976</u>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>1.95</u>
<u>E6</u> (+) (B)	E2.1A-1	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>1.999</u>	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	<u>1.927</u>
<u>E7</u> (++) (B)	E2.1A-2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>2.129</u>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<u>2.063</u>
<u>E8</u> (++) (B)	E2.1A-2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>2.127</u>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<u>2.033</u>
<u>E9</u> (++) (B)	E2.2A-1	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<u>2.134</u>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>2.115</u>
	E2.2A-1	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>2.16</u>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<u>2.126</u>

<u>G12</u> (++) (B)					
<u>H1</u> (++) (B)	E4.2A-1	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>2.076</u>	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>2.075</u>
<u>H2</u> (++) (B)	E4.2A-1	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>2.224</u>	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>2.1</u>
<u>H3</u> (-)(C)	E4.1C	<u>Cupriavidus paspali</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.62</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.534</u>
<u>H4</u> (-)(C)	E4.1C	<u>Cupriavidus metallidurans</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.47</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.458</u>

<u>A7</u> (++) (A)	E6.2C	<u>Aeromonas molluscorum</u>	<u>2.147</u>	<u>Aeromonas molluscorum</u>	<u>2.083</u>
--------------------------	-------	------------------------------	--------------	------------------------------	--------------

<u>A8</u> (++) (A)	E6.2C	<u>Aeromonas molluscorum</u>	<u>2.195</u>	<u>Aeromonas molluscorum</u>	<u>2.02</u>
<u>A9</u> (-)(C)	E5.1C	<u>Arthrobacter chlorogeneticus</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.251</u>	<u>Lactobacillus kimohari</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.251</u>
<u>A10</u> (+)(B)	E5.1C	Brachy bacterium faecium	<u>1.738</u>	<u>Arthrobacter roseus</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.503</u>
<u>A11</u> (+)(B)	E5.1A-1	<u>Bacillus cereus</u>	<u>1.87</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.564</u>
<u>A12</u> (+)(B)	E5.1A-1	<u>Bacillus cereus</u>	<u>1.975</u>	<u>Bacillus mycoides</u>	<u>1.938</u>
<u>B1</u> (+++) (B)	E5.2C	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.333</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.297</u>
<u>B2</u> (+++) (A)	E5.2C	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.361</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.32</u>
<u>B3</u> (+++) (A)	E5.2A-1	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.36</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.279</u>
<u>B4</u> (++) (B)	E5.2A-1	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.239</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.217</u>
<u>B5</u> (+)(B)	E5.2A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.979</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.851</u>
<u>B6</u> (++) (A)	E5.2A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>2.011</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.93</u>
<u>B7</u> (-)(C)	E5.3C	<u>Sphingomonas pectinacea</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.535</u>	<u>Brevibacterium cambensis</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.403</u>
<u>B8</u> (-)(C)	E5.3C	unzuverlässige Identifikation	<u>1.63</u>	<u>Sphingomonas ssp</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.596</u>
<u>B9</u> (+)(B)	E5.3A-1	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.962</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.925</u>
<u>B10</u> (+)(B)	E5.3A-1	Pseudomonas thivervalensis	<u>1.818</u>	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.754</u>
<u>B11</u> (++) (A)	E5.3A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>2.012</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.925</u>
<u>B12</u> (++) (A)	E5.3A-2	Pseudomonas brassicacearum	<u>2.02</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.888</u>

<u>C1</u> (++) (B)	E5.3A-3	<i>Yersinia mollaretii</i>	<u>2.122</u>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<u>2.062</u>
<u>C2</u> (++) (B)	E5.3A-3	<i>Yersinia mollaretii</i>	<u>2.205</u>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<u>2.036</u>
<u>C3</u> (+)(B)	E6.1C	<i>Sphingobium xenophagum</i>	<u>1.768</u>	<i>Sphingomonas</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.574</u>
<u>C4</u> (-)(C)	E6.1C	unzuverlässige Identifikation	<u>1.646</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.442</u>
<u>C5</u> (+)(B)	E6.1A	<i>Sphingomonas</i> sp.	<u>1.832</u>	<i>Novosphingobium Subterraneum</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.458</u>
<u>C6</u> (-)(C)	E6.1A	unzuverlässige Identifikation	<u>1.619</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.497</u>
<u>C7</u> (++) (A)	E6.2C	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>2.031</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.957</u>
<u>C8</u> (+)(B)	E6.2C	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.989</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.914</u>
<u>C9</u> (++) (A)	E6.3C	<i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>2.132</u>	<i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>2.108</u>
<u>C10</u> (++) (A)	E6.3C	<i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>2.117</u>	<i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>2.011</u>
<u>C11</u> (-)(C)	E6.3A	<i>Rhizobium radiobacter</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.38</u>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.376</u>
<u>C12</u> (-)(C)	E6.3A	<i>Achromobacter spanius</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.368</u>	<i>Sphingobium herbicidiorum</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.354</u>
<u>D1</u> (+)(B)	E2.1C(II)	<i>Acinetobacter parvus</i>	<u>1.84</u>	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	<u>1.815</u>
<u>D2</u> (++) (A)	E2.1C(II)	<i>Acinetobacter parvus</i>	<u>2.096</u>	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	<u>1.932</u>
<u>D3</u> (++) (B)	E2.1A-2(II)	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<u>2.117</u>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<u>2.082</u>
<u>D4</u> (++) (B)	E2.1A-2(II)	<i>Pseudomonas syriacantha</i>	<u>2.16</u>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<u>2.073</u>
<u>D5</u> (+)(B)	E2.2A-2(II)	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.954</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.938</u>

<u>D6</u> (+)(B)	E2.2A-2(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>1.969</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>kilonensis</i>	<u>1.963</u>
<u>D7</u> (+)(B)	E3.1A-2(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>1.818</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>cichorii</i>	<u>1.766</u>
<u>D8</u> (++)(B)	E3.1A-2(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>2.133</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>thivervalensis</i>	<u>2.063</u>
<u>D9</u> (-)(C)	E3.2C-2(II)	<i>Corynebacterium</i> ssp unzuverlässige Identifikation	<u>1.209</u>	<i>Chryseobacterium</i> ssp unzuverlässige Identifikation	<u>1.161</u>
<u>D10</u> (-)(C)	E3.2C-2(II)	unzuverlässige Identifikation	<u>1.513</u>	<i>Burkholderia vietnamsis</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.337</u>
<u>D11</u> (++)(B)	E3.2A-2(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>2.066</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>thivervalensis</i>	<u>2.008</u>
<u>D12</u> (+)(B)	E3.2A-2(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>1.941</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>thivervalensis</i>	<u>1.912</u>
<u>E1</u> (+)(B)	E4.1A-1(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>1.88</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>thivervalensis</i>	<u>1.783</u>
<u>E2</u> (++)(A)	E4.1A-1(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>kilonensis</i>	<u>2.076</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>thivervalensis</i>	<u>1.993</u>
<u>E3</u> (+++)(B)	E4.2C-1(II)	<i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i>	<u>2.302</u>	<i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i>	<u>2.23</u>
<u>E4</u> (++)(A)	E4.2C-1(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>2.04</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>kilonensis</i>	<u>1.953</u>
<u>E5</u> (+)(B)	E4.2A-1(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>1.954</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>kilonensis</i>	<u>1.793</u>
<u>E6</u> (+)(B)	E4.2A-1(II)	<i>Pseudomonas</i> <i>brassicacearum</i>	<u>1.963</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>thivervalensis</i>	<u>1.895</u>
<u>E7</u> (++)(A)	E2.1A-1C (II)	<i>Pseudomonas</i> <i>extremorientalis</i>	<u>2.014</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<u>1.886</u>
<u>E8</u> (++)(A)	E2.1A-1C (II)	<i>Pseudomonas</i> <i>synxantha</i>	<u>2.077</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>extremorientalis</i>	<u>1.847</u>
<u>E9</u> (++)(A)	E2.1A-2C (II)	<i>Pseudomonas</i> <i>synxantha</i>	<u>2.067</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<u>1.936</u>
<u>E10</u> (++)(B)	E2.1A-2C (II)	<i>Pseudomonas</i> <i>synxantha</i>	<u>2.153</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<u>2.002</u>

<u>F11</u> (++) (A)	E2.2A-1C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.056</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>	<u>1.996</u>
<u>F12</u> (++) (A)	E2.2A-1C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.04</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>libanensis</u>	<u>1.959</u>
<u>F1</u> (-)(C)	E2.2A-2C (II)	keine Peaks gefunden	<u>< 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>< 0</u>
<u>F2</u> (+)(B)	E2.2A-2C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>1.976</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>libanensis</u>	<u>1.943</u>
<u>F3</u> (+)(B)	E3.1AC(II)	<u>Pseudomonas</u> <u>brassicacearum</u>	<u>1.996</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>thivervalensis</u>	<u>1.991</u>
<u>F4</u> (++) (B)	E3.1AC(II)	<u>Pseudomonas</u> <u>brassicacearum</u>	<u>2.101</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>kilonensis</u>	<u>2.076</u>
<u>F5</u> (++) (A)	E3.2AC(II)	<u>Pseudomonas</u> <u>brassicacearum</u>	<u>2.038</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>kilonensis</u>	<u>1.99</u>
<u>F6</u> (++) (A)	E3.2AC(II)	<u>Pseudomonas</u> <u>brassicacearum</u>	<u>2.091</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>kilonensis</u>	<u>1.97</u>
<u>F7</u> (+)(B)	E4.1A-1C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>tolasii</u>	<u>1.922</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>1.881</u>
<u>F8</u> (++) (A)	E4.1A-1C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.091</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>	<u>1.971</u>
<u>F9</u> (++) (B)	E4.1A-2C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.093</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>libanensis</u>	<u>2.01</u>
<u>F10</u> (++) (B)	E4.1A-2C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.091</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>extremorientalis</u>	<u>2.064</u>
<u>F11</u> (++) (B)	E4.2A-1C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>extremorientalis</u>	<u>2.035</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>2.014</u>
<u>F12</u> (+)(B)	E4.2A-1C (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>synxantha</u>	<u>1.911</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>extremorientalis</u>	<u>1.879</u>

<u>C3</u> (++) (B)	E7.1C	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>2.2</u>	Pseudomonas oleovorans	<u>2.129</u>
<u>C4</u> (++) (B)	E7.1C	Pseudomonas oleovorans	<u>2.166</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>2.162</u>
<u>C5</u> (-) (C)	E7.1A	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C6</u> (+) (B)	E7.1A	Pseudomonas chlororaphis	<u>1.916</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.91</u>
<u>C7</u> (-) (C)	E7.2C	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C8</u> (-) (C)	E7.2C	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C9</u> (-) (C)	E7.2A	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C10</u> (-) (C)	E7.2A	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C11</u> (-) (C)	E7.3C	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C12</u> (-) (C)	E7.3C	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D1</u> (++) (A)	E7.3A	<u>Aeromonas molluscorum</u>	<u>2.175</u>	<u>Aeromonas molluscorum</u>	<u>2.143</u>
<u>D2</u> (++) (B)	E7.3A	<u>Aeromonas molluscorum</u>	<u>2.23</u>	<u>Aeromonas molluscorum</u>	<u>2.182</u>
<u>D3</u> (-) (C)	1905-12	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D4</u> (+) (B)	1905-12	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.805</u>	Pseudomonas koreensis	<u>1.775</u>
<u>D5</u> (-) (C)	1905-14	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0

<u>A7</u> (-) (C)	E7.1A-1	<u>Pseudomonas chlororaphis</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.676</u>	<u>Pseudomonas koreensis</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.641</u>
<u>A8</u> (-) (C)	E7.1A-1	unzuverlässige Identifikation	<u>1.668</u>	<u>Pseudomonas agathae</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.657</u>

<u>A9</u> (-)(C)	E7.1A-2	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
<u>A10</u> (-)(C)	E7.1A-2	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
<u>A11</u> (++)(A)	E7.2C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>2.026</u>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>1.87</u>
<u>A12</u> (+++)(A)	E7.2C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>2.316</u>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>2.172</u>
<u>B1</u> (-)(C)	E7.2A	<i>Azarcus</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.359</u>	<i>Zachrobacillus</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.317</u>
<u>B2</u> (+)(B)	E7.2A	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.844</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>1.805</u>
<u>B3</u> (-)(C)	E7.3C	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
<u>B4</u> (-)(C)	E7.3C	<i>Pseudomonas umsongensis</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.522</u>	<i>Pseudomonas norcauwensis</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.492</u>
<u>B5</u> (-)(C)	E1905-12	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
<u>B6</u> (-)(C)	E1905-12	<i>Pseudomonas brassicensis</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.454</u>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.425</u>

<u>B3</u> (++)(A)	E2.1AD	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	<u>2.068</u>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<u>1.926</u>
<u>B4</u> (-)(C)	E2.1AD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>B5</u> (+)(B)	E2.1A-1CD	<i>Pseudomonas brenneri</i>	<u>1.92</u>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	<u>1.919</u>
<u>B6</u> (-)(C)	E2.1A-1CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>B7</u> (-)(C)	E2.2A-2D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
	E2.2A-2D	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<u>2.227</u>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<u>2.09</u>

<u>B8</u> (++) (B)					
<u>B9</u> (++) (A)	E2.2A-ACD	<u>Pseudomonas marginalis</u>	<u>2.016</u>	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>1.964</u>
<u>B10</u> (-) (C)	E2.2A-ACD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>B11</u> (+) (B)	E3.1A-2D	<u>Pseudomonas thivervalensis</u>	<u>1.786</u>	<u>Pseudomonas brassicacearum</u> not reliable identification	<u>1.695</u>
<u>B12</u> (+) (B)	E3.1A-2D	<u>Pseudomonas brassicacearum</u>	<u>1.874</u>	<u>Pseudomonas migulae</u>	<u>1.869</u>
<u>C1</u> (+) (B)	E3.1ACD	<u>Pseudomonas agarici</u>	<u>1.756</u>	<u>Pseudomonas chlororaphis</u>	<u>1.748</u>
<u>C2</u> (+) (B)	E3.1ACD	<u>Pseudomonas tolaasii</u>	<u>1.807</u>	<u>Pseudomonas chlororaphis</u>	<u>1.76</u>
<u>C3</u> (-) (C)	E3.2A-2D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C4</u> (-) (C)	E3.2A-2D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C5</u> (-) (C)	E3.2ACD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C6</u> (+) (B)	E3.2ACD	<u>Pseudomonas brassicacearum</u>	<u>1.901</u>	<u>Pseudomonas kilonensis</u>	<u>1.864</u>
<u>C7</u> (-) (C)	E4.1A-1D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C8</u> (-) (C)	E4.1A-1D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C9</u> (-) (C)	E4.1A-1CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
	E4.1A-1CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0

<u>C10</u> (-) (C)					
<u>C11</u> (-) (C)	E4.2A-1D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>C12</u> (+) (B)	E4.2A-1D	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.877</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.799</u>
<u>D1</u> (-) (C)	E4.2A-2CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D2</u> (-) (C)	E4.2A-2CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D3</u> (-) (C)	E5.2A-2D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D4</u> (-) (C)	E5.2A-2D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D5</u> (-) (C)	E5.3A-1D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D6</u> (-) (C)	E5.3A-1D	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D7</u> (-) (C)	E6.2CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D8</u> (-) (C)	E6.2CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D9</u> (-) (C)	E7.1CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D10</u> (-) (C)	E7.1CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>D11</u> (-) (C)	E7.1AD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
	E7.1AD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0

<u>D12</u> (-) (C)					
<u>E1</u> (++) (C)	E7.2CD	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u> (<u>Pseudomonas geniculata #</u>)	<u>2.149</u>	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>1.846</u>
<u>E2</u> (-) (C)	E7.2CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>E3</u> (-) (C)	E7.2AD	no peaks found	< 0	no peaks found	< 0
<u>E4</u> (-) (C)	E7.2AD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>E5</u> (-) (C)	E7.3CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>E6</u> (-) (C)	E7.3CD	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>A1</u> (-)(C)	E3.2A-2D (II)	no peaks found	≤ 0	no peaks found	≤ 0
<u>A2</u> (+)(B)	E3.2A-2D (II)	<u>Pseudomonas jessenii</u>	<u>1.878</u>	<u>Pseudomonas brassicacearum</u>	<u>1.872</u>
<u>A3</u> (+)(B)	E3.2ACD (II)	<u>Pseudomonas brassicacearum</u>	<u>1.82</u>	<u>Pseudomonas chlororaphis</u>	<u>1.787</u>
<u>A4</u> (++) (A)	E3.2ACD (II)	<u>Pseudomonas brassicacearum</u>	<u>2.007</u>	<u>Pseudomonas thivervalensis</u>	<u>1.852</u>
<u>A5</u> (+)(B)	E4.1A-1D (II)	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>1.958</u>	<u>Pseudomonas extremorientalis</u>	<u>1.907</u>
<u>A6</u> (++) (A)	E4.1A-1D (II)	<u>Pseudomonas extremorientalis</u>	<u>2.088</u>	<u>Pseudomonas cedrina</u>	<u>1.918</u>
<u>A7</u> (+)(B)	E4.1A-1CD (II)	<u>Pseudomonas tolaasii</u>	<u>1.779</u>	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>1.745</u>
			<u>2.118</u>	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>1.985</u>

<u>A8</u> (++) (A)	E4.1A-1CD (II)	<u>Pseudomonas</u> <u>extremorientalis</u>			
<u>A9</u> (+)(B)	E4.2A-2CD (II)	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.869</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.826</u>
<u>A10</u> (+)(B)	E4.2A-2CD (II)	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.817</u>	<u>Pseudomonas chlororaphis</u> not reliable identification	<u>1.687</u>
<u>A11</u> (-)(C)	E5.2A-2D (II)	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>A12</u> (+)(B)	E5.2A-2D (II)	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.938</u>	Pseudomonas thivervalensis	<u>1.767</u>
<u>B1</u> (+)(B)	E5.3A-1D (II)	Pseudomonas thivervalensis	<u>1.784</u>	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.701</u>
<u>B2</u> (+)(B)	E5.3A-1D (II)	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.962</u>	Pseudomonas thivervalensis	<u>1.807</u>
<u>B3</u> (-)(C)	E6.2CD(II)	<u>Enterobacter chloacae</u> not reliable identification	<u>1.007</u>	<u>Arthrobacter panetis</u> not reliable identification	<u>1.005</u>
<u>B4</u> (+)(B)	E6.2CD(II)	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.894</u>	Pseudomonas thivervalensis	<u>1.755</u>
<u>B5</u> (++) (A)	E7.1CD(II)	Pseudomonas oleovorans	<u>2.052</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>1.986</u>
<u>B6</u> (+)(B)	E7.1CD(II)	Pseudomonas oleovorans	<u>1.902</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>1.819</u>
<u>B7</u> (+)(B)	E7.1AD(II)	Pseudomonas chlororaphis	<u>1.895</u>	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.785</u>
<u>B8</u> (+)(B)	E7.1AD(II)	<u>Pseudomonas gessardii</u>	<u>1.762</u>	Pseudomonas chlororaphis	<u>1.702</u>
<u>B9</u> (-)(C)	E7.2AD(II)	<u>Pseudomonas kilonensis</u> not reliable identification	<u>1.509</u>	<u>Pseudomonas cichoni</u> not reliable identification	<u>1.471</u>
<u>B10</u> (-)(C)	E7.2AD(II)	<u>Pseudomonas brassicacearum</u> not reliable identification	<u>1.618</u>	<u>Pseudomonas kilonensis</u> not reliable identification	<u>1.575</u>
<u>B11</u> (-)(C)	E7.3CD(II)	<u>Pseudomonas olabrans</u> not reliable identification	<u>1.684</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>pseudoalcaligenes</u> not reliable identification	<u>1.615</u>
<u>B12</u> (++) (B)	E7.3CD(II)	Pseudomonas oleovorans	<u>2.15</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>2.096</u>
<u>C1</u> (+)(B)	E8.1C	Acidovorax temperans	<u>1.957</u>	Acidovorax temperans	<u>1.917</u>
<u>C2</u> (++) (A)	E8.1C	Acidovorax temperans	<u>2.102</u>	Acidovorax temperans	<u>2.061</u>

<u>C3</u> (++) (A)	E8.1A	Acidovorax temperans	<u>2.058</u>	Acidovorax temperans	<u>1.937</u>
<u>C4</u> (++) (A)	E8.1A	Acidovorax temperans	<u>2.23</u>	Acidovorax temperans	<u>2.109</u>
<u>C5</u> (+)(B)	E8.1CD	Acidovorax temperans	<u>1.984</u>	Acidovorax temperans	<u>1.966</u>
<u>C6</u> (++) (A)	E8.1CD	Acidovorax temperans	<u>2.112</u>	Acidovorax temperans	<u>2.01</u>
<u>C7</u> (+)(B)	E8.1AD	Acidovorax temperans	<u>1.871</u>	Acidovorax temperans	<u>1.85</u>
<u>C8</u> (+)(B)	E8.1AD	Acidovorax temperans	<u>1.979</u>	Acidovorax temperans	<u>1.915</u>
<u>C9</u> (-)(C)	E8.2C	no peaks found	<u><0</u>	no peaks found	<u><0</u>
<u>C10</u> (-)(C)	E8.2C	Acidovorax temperans not reliable identification	<u>1.668</u>	Acidovorax temperans not reliable identification	<u>1.585</u>
<u>C11</u> (+)(B)	E8.2A	Micrococcus luteus	<u>1.849</u>	Micrococcus luteus	<u>1.778</u>
<u>C12</u> (+++) (A)	E8.2A	Micrococcus luteus	<u>2.342</u>	Micrococcus luteus	<u>2.295</u>
<u>D1</u> (-)(C)	E8.2CD	no peaks found	<u><0</u>	no peaks found	<u><0</u>
<u>D2</u> (-)(C)	E8.2CD	Acidovorax temperans not reliable identification	<u>1.619</u>	Acidovorax temperans not reliable identification	<u>1.588</u>
<u>D3</u> (++) (A)	E8.2AD	Micrococcus luteus	<u>2.131</u>	Micrococcus luteus	<u>1.996</u>
<u>D4</u> (++) (A)	E8.2AD	Micrococcus luteus	<u>2.101</u>	Micrococcus luteus	<u>1.952</u>
<u>D5</u> (+)(B)	E8.3C	Sphingomonas sp	<u>1.876</u>	Sphingomonas oleaceae not reliable identification	<u>1.577</u>
<u>D6</u> (+)(B)	E8.3C	Sphingomonas sp	<u>1.895</u>	Sphingomonas sp not reliable identification	<u>1.474</u>
<u>D7</u> (-)(C)	E8.3A	Acidovorax temperans not reliable identification	<u>1.661</u>	Acidovorax temperans not reliable identification	<u>1.618</u>
	E8.3A	Acidovorax temperans	<u>2.062</u>	Acidovorax temperans	<u>1.911</u>

<u>D8</u> (++) (A)					
<u>D9</u> (+)(B)	E8.3CD	Sphingomonas sp	<u>1.775</u>	<i>Sphingomonas sp.</i> not reliable identification	<u>1.508</u>
<u>D10</u> (-)(C)	E8.3CD	<i>Sphingomonas sp.</i> not reliable identification	<u>1.635</u>	<i>Sphingomonas sp.</i> not reliable identification	<u>1.435</u>
<u>D11</u> (++) (A)	E8.3AD	Acidovorax temperans	<u>2.117</u>	Acidovorax temperans	<u>1.965</u>
<u>D12</u> (++) (A)	E8.3AD	Acidovorax temperans	<u>2.075</u>	Acidovorax temperans	<u>1.948</u>
<u>E1</u> (+)(B)	E8.4C	Acidovorax temperans	<u>1.739</u>	<i>Acidovorax temperans</i> not reliable identification	<u>1.608</u>
<u>E2</u> (++) (A)	E8.4C	Acidovorax temperans	<u>2.266</u>	Acidovorax temperans	<u>2.085</u>
<u>E3</u> (++) (A)	E8.4A	Acidovorax temperans	<u>2.253</u>	Acidovorax temperans	<u>1.942</u>
<u>E4</u> (++) (A)	E8.4A	Acidovorax temperans	<u>2.226</u>	Acidovorax temperans	<u>1.933</u>
<u>E5</u> (-)(C)	E8.4CD	<i>Serratia marcescens</i> not reliable identification	<u>1.222</u>	<i>Acidovorax facilis</i> not reliable identification	<u>1.205</u>
<u>E6</u> (+)(B)	E8.4CD	Acidovorax temperans	<u>1.901</u>	<i>Acidovorax temperans</i> not reliable identification	<u>1.642</u>
<u>E7</u> (-)(C)	E8.4AD	<i>Acidovorax temperans</i> not reliable identification	<u>1.62</u>	<i>Acidovorax facilis</i> not reliable identification	<u>1.481</u>
<u>E8</u> (-)(C)	E8.4AD	<i>Sphingobium oleaceae</i> not reliable identification	<u>1.2</u>	<i>Acidovorax facilis</i> not reliable identification	<u>1.166</u>

<u>E5</u> (+++) (A)	E9.1C	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.343</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.298</u>
<u>E6</u> (+++) (B)	E9.1C	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.3</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.282</u>
<u>E7</u> (+++) (A)	E9.1CD	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.316</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.249</u>
<u>E8</u> (++) (A)	E9.1CD	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.236</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.154</u>
<u>E9</u> (+) (B)	E9.1A-1	Pseudomonas koreensis	<u>1.893</u>	Pseudomonas koreensis	<u>1.892</u>
<u>E10</u> (+) (B)	E9.1A-1	Pseudomonas koreensis	<u>1.982</u>	Pseudomonas koreensis	<u>1.95</u>
<u>E11</u> (++) (A)	E9.1A-2	Acidovorax facilis	<u>2.185</u>	Acidovorax delafieldii	<u>1.704</u>
<u>E12</u> (++) (A)	E9.1A-2	Acidovorax facilis	<u>2.202</u>	Acidovorax facilis	<u>1.753</u>
<u>E1</u> (+) (B)	E9.1A-1D	Pseudomonas koreensis	<u>1.945</u>	<u>Pseudomonas corrugata</u>	<u>1.894</u>
	E9.1A-1D	Pseudomonas koreensis	<u>2.033</u>	Pseudomonas koreensis	<u>2.012</u>

<u>F2</u> (++) (A)					
<u>F3</u> (++) (A)	E9.1A-2D	Acidovorax facilis	<u>2.137</u>	Acidovorax facilis	<u>1.858</u>
<u>F4</u> (++) (A)	E9.1A-2D	Acidovorax facilis	<u>2.225</u>	Acidovorax delafieldii	<u>1.72</u>
<u>F5</u> (+) (B)	E9.2C	Pseudomonas koreensis	<u>1.778</u>	<u>Pseudomonas corrugata</u>	<u>1.761</u>
<u>F6</u> (++) (A)	E9.2C	Pseudomonas koreensis	<u>2.025</u>	Pseudomonas koreensis	<u>2.011</u>
<u>F7</u> (+) (B)	E9.2CD	Pseudomonas koreensis	<u>1.961</u>	<u>Pseudomonas gessardii</u>	<u>1.848</u>
<u>F8</u> (+) (B)	E9.2CD	Pseudomonas koreensis	<u>1.996</u>	Pseudomonas koreensis	<u>1.943</u>

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>A1</u> (+++) (B)	E8.1-T-C	Pseudomonas oleovorans	<u>2.308</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>2.087</u>
<u>A2</u> (+++) (B)	E8.1-T-C	Pseudomonas oleovorans	<u>2.352</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>2.268</u>
<u>A3</u> (++) (A)	E8.1-T-CD	Pseudomonas oleovorans	<u>2.174</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>1.95</u>
<u>A4</u> (++) (A)	E8.1-T-CD	Pseudomonas oleovorans	<u>2.129</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>1.928</u>
<u>A5</u> (+++) (B)	E8.1C-2	Pseudomonas oleovorans	<u>2.366</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>2.278</u>
<u>A6</u> (++) (B)	E8.1C-2	Pseudomonas oleovorans	<u>2.271</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>2.135</u>
<u>A7</u> (++) (B)	E8.1C-1D	Pseudomonas oleovorans	<u>2.197</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>2.12</u>

<u>A8</u> (++) (B)	E8.1C-1D	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	<u>2.146</u>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<u>2.04</u>
<u>A9</u> (-) (C)	E8.2C	not reliable identification <i>Sphingomonas</i> sp	<u>1.469</u>	not reliable identification <i>Chryseobacterium scaphthalmum</i>	<u>1.388</u>
<u>A10</u> (+) (B)	E8.2C	<i>Sphingomonas</i> sp	<u>1.758</u>	not reliable identification	<u>1.435</u>
<u>A11</u> (+) (B)	E8.4C	<i>Sphingomonas</i> sp	<u>1.76</u>	<i>Sphingobium clea case</i> not reliable identification	<u>1.55</u>
<u>A12</u> (+) (B)	E8.4C	<i>Sphingomonas</i> sp	<u>1.726</u>	<i>Sphingomonas</i> sp	<u>1.71</u>
<u>B1</u> (+) (B)	E2.1-T1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<u>1.86</u>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<u>1.774</u>
<u>B2</u> (++) (A)	E2.1-T1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<u>2.148</u>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<u>2.115</u>
<u>B3</u> (++) (C)	E2.1-T2	<i>Sphingomonas koreensis</i>	<u>2.165</u>	<i>Acidovorax temperans</i>	<u>2.163</u>
<u>B4</u> (++) (C)	E2.1-T2	<i>Sphingomonas koreensis</i>	<u>2.213</u>	<i>Sphingomonas koreensis</i>	<u>2.124</u>
<u>B5</u> (++) (B)	E5.2-T1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	<u>2.18</u>	<i>Pseudomonas putida</i> Group	<u>2.143</u>
<u>B6</u> (+++) (B)	E5.2-T1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	<u>2.426</u>	<i>Pseudomonas monteilii</i>	<u>2.36</u>
<u>B7</u> (+++) (B)	E5.2-T2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<u>2.499</u>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<u>2.496</u>
<u>B8</u> (+++) (B)	E5.2-T2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<u>2.525</u>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<u>2.479</u>
<u>B9</u> (-) (C)	E5.2-T3	not reliable identification <i>Chryseobacterium</i> sp	<u>1.677</u>	not reliable identification	<u>1.658</u>
<u>B10</u> (+) (B)	E5.2-T3	<i>Chryseobacterium joostei</i>	<u>1.802</u>	<i>Chryseobacterium gleum</i>	<u>1.737</u>

Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungszahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungszahl
<u>A1</u> (+)(B)	E2.1C-TR	Sphingomonas koreensis	<u>1.829</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.65</u>
<u>A2</u> (-)(C)	E2.1C-TR	unzuverlässige Identifikation	<u>1.678</u>	<i>Acidovorax thabassensis</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.624</u>
<u>A3</u> (-)(C)	E4.2C-TR	<i>Novosphingobium</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.544</u>	<i>Sphingobacterium</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.424</u>
<u>A4</u> (-)(C)	E4.2C-TR	unzuverlässige Identifikation	<u>1.677</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.602</u>
<u>A5</u> (++)(C)	E5.2C-TR	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.106</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>1.937</u>
<u>A6</u> (++)(A)	E5.2C-TR	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.202</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.103</u>
<u>A7</u> (+)(B)	E1.3C	Sphingomonas sp	<u>1.734</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.562</u>
	E1.3C	Sphingomonas sp	<u>1.919</u>		<u>1.592</u>

<u>A8</u> (+)(B)				unzuverlässige Identifikation	
<u>A9</u> (++)(B)	E1.3B	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>2.161</u>	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>2.071</u>
<u>A10</u> (++)(B)	E1.3B	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>2.103</u>	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	<u>2.064</u>
<u>A11</u> (++)(B)	E1.3A	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>2.17</u>	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>2.093</u>
<u>A12</u> (++)(B)	E1.3A	<u>Pseudomonas extremorientalis</u>	<u>2.084</u>	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>2.08</u>
<u>B1</u> (+)(C)	E2.1C- RD	<u>Brevundimonas aurantiaca</u>	<u>1.914</u>	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>1.72</u>
<u>B2</u> (++)(C)	E2.1C- RD	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>2.033</u>	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>1.98</u>
<u>B3</u> (+++)(A)	E4.2C- 1R	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.365</u>	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.283</u>
<u>B4</u> (++)(A)	E4.2C- 1R	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.255</u>	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.188</u>
<u>B5</u> (+++)(A)	E4.2C- 2R	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.351</u>	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.212</u>
<u>B6</u> (++)(A)	E4.2C- 2R	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.205</u>	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.14</u>
<u>B7</u> (+++)(A)	E5.2C- 1R	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.397</u>	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.347</u>
<u>B8</u> (+++)(B)	E5.2C- 1R	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.368</u>	<u>Sphingomonas paucimobilis</u>	<u>2.356</u>
<u>B9</u> (++)(A)	E5.2C- 2R	<u>Acinetobacter johnsonii</u>	<u>2.144</u>	<u>Acinetobacter johnsonii</u>	<u>2.064</u>
<u>B10</u> (+)(C)	E5.2C- 2R	<u>Wautersiella falsenii</u>	<u>1.839</u>	<u>Acinetobacter johnsonii</u>	<u>1.81</u>
	E6.3C- 1R	<u>Pseudomonas koreensis</u>	<u>2.061</u>	<u>Pseudomonas fuscovaginae</u>	<u>1.91</u>

<u>B11</u> (++) (A)					
<u>B12</u> (+)(B)	E6.3C-1R	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.861</u>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<u>1.804</u>
<u>C1</u> (+)(B)	E6.3C-2R	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>1.767</u>	<i>Pseudomonas jessenii</i>	<u>1.717</u>
<u>C2</u> (++) (A)	E6.3C-2R	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>2.025</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.84</u>
<u>C3</u> (+)(B)	E5.1C	<i>Sphingomonas</i> sp	<u>1.835</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.403</u>
<u>C4</u> (+)(B)	E5.1C	<i>Sphingomonas</i> sp	<u>1.889</u>	<i>Sphingomonas</i> sp unzuverlässige Identifikation	<u>1.435</u>
<u>C5</u> (+)(B)	E5.1A	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	<u>1.744</u>	<i>Pseudomonas agarici</i>	<u>1.74</u>
<u>C6</u> (+)(B)	E5.1A	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	<u>1.717</u>	<i>Pseudomonas</i> unzuverlässige Identifikation <i>graminis</i>	<u>1.662</u>
<u>C7</u> (++) (A)	E5.2C-1	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>2.179</u>	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>2.14</u>
<u>C8</u> (++) (A)	E5.2C-1	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>2.279</u>	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>2.221</u>
<u>C9</u> (++) (C)	E5.2C-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>2.281</u>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>2.2</u>
<u>C10</u> (+++) (C)	E5.2C-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>2.412</u>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>2.353</u>
<u>C11</u> (++) (A)	E5.2A	<i>Pseudomonas gessardii</i>	<u>2.061</u>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<u>1.847</u>
<u>C12</u> (+)(B)	E5.2A	<i>Pseudomonas gessardii</i>	<u>1.85</u>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<u>1.807</u>
<u>D1</u> (+)(B)	E5.3A	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.858</u>	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	<u>1.818</u>
<u>D2</u> (+)(B)	E5.3A	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	<u>1.746</u>	<i>Pseudomonas gessardii</i>	<u>1.724</u>
<u>D3</u> (++) (B)	E6.1C-1D	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<u>2.012</u>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<u>2</u>

<u>D4</u> (++) (A)	E6.1C-1D	<u>Pseudomonas koreensis</u>	<u>2.015</u>	<u>Pseudomonas corrugata</u>	<u>1.878</u>
<u>D5</u> (+)(B)	E6.1C-2D	<u>Sphingomonas sp</u>	<u>1.81</u>	<u>unzuverlässige Identifikation</u> <i>Sphingomonas sp.</i>	<u>1.57</u>
<u>D6</u> (+)(B)	E6.1C-2D	<u>Sphingomonas sp</u>	<u>1.872</u>	<u>unzuverlässige Identifikation</u> <i>Sphingomonas sp.</i>	<u>1.525</u>
<u>D7</u> (+)(B)	E6.1AD	<u>Sphingomonas sp</u>	<u>1.721</u>	<u>unzuverlässige Identifikation</u> <i>Sphingomonas sp.</i>	<u>1.557</u>
<u>D8</u> (+)(B)	E6.1AD	<u>Sphingomonas sp</u>	<u>1.836</u>	<u>unzuverlässige Identifikation</u> <i>Sphingomonas sp.</i>	<u>1.376</u>
<u>D9</u> (+)(B)	E6.2C-1D	<u>Pseudomonas koreensis</u>	<u>1.994</u>	<u>Pseudomonas corrugata</u>	<u>1.943</u>
<u>D10</u> (++) (A)	E6.2C-1D	<u>Pseudomonas koreensis</u>	<u>2.122</u>	<u>Pseudomonas corrugata</u>	<u>1.976</u>
<u>D11</u> (++) (A)	E6.2C-2	<u>Pseudomonas jessenii</u>	<u>2.138</u>	<u>Pseudomonas chlororaphis</u>	<u>1.964</u>
<u>D12</u> (++) (B)	E6.2C-2	<u>Pseudomonas jessenii</u>	<u>2.158</u>	<u>Pseudomonas chlororaphis</u>	<u>2.042</u>
<u>E1</u> (+)(B)	E6.3C	<u>Pseudomonas gessardii</u>	<u>1.96</u>	<u>Pseudomonas brenneri</u>	<u>1.791</u>
<u>E2</u> (+)(B)	E6.3C	<u>Pseudomonas gessardii</u>	<u>1.993</u>	<u>Pseudomonas koreensis</u>	<u>1.808</u>
<u>E3</u> (+)(B)	E9.1C	<u>Pseudomonas azotoformans</u>	<u>1.957</u>	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>1.949</u>
<u>E4</u> (++) (B)	E9.1C	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>2.151</u>	<u>Pseudomonas azotoformans</u>	<u>2.095</u>
<u>E5</u> (-)(C)	E9.2CD	<u>unzuverlässige Identifikation</u> <i>Sphingomonas sp.</i>	<u>1.642</u>	<u>unzuverlässige Identifikation</u> <i>Sphingomonas sp.</i>	<u>1.567</u>
<u>E6</u> (-)(C)	E9.2CD	<u>unzuverlässige Identifikation</u>	<u>1.66</u>	<u>unzuverlässige Identifikation</u>	<u>1.555</u>

Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungszahl	Organismus (zweitbesten Treffer)	Bewertungszahl
<u>A1</u> (++) (A)	E1.3C	Chryseobacterium scophthalmum	<u>2.102</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.381</u>
<u>A2</u> (++) (A)	E1.3C	Chryseobacterium scophthalmum	<u>2.162</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.294</u>
<u>A3</u> (-)(C)	E1.3B-1	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
<u>A4</u> (++) (A)	E1.3B-1	Acidovorax temperans	<u>2.025</u>	Acidovorax temperans	<u>1.779</u>
<u>A5</u> (-)(C)	E1.3B-2	unzuverlässige Identifikation	<u>1.361</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.318</u>
<u>A6</u> (-)(C)	E1.3B-2	unzuverlässige Identifikation	<u>1.429</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.34</u>
<u>A7</u> (-)(C)	E1.3A	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>

<u>A8</u> (++) (A)	E1.3A	Acidovorax temperans	<u>2.144</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.496</u>
<u>A9</u> (++) (A)	E2.1-T2 (ii)	Acidovorax temperans	<u>2.04</u>	Acidovorax temperans	<u>1.826</u>
<u>A10</u> (+) (B)	E2.1-T2 (ii)	Acidovorax temperans	<u>1.871</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.666</u>
<u>A11</u> (-)(C)	E8.2C(ii)	unzuverlässige Identifikation	<u>1.535</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.425</u>
<u>A12</u> (+) (B)	E8.2C(ii)	Sphingomonas sp	<u>1.814</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.517</u>
<u>B1</u> (-)(C)	E8.4C(ii)	unzuverlässige Identifikation	<u>1.515</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.457</u>
<u>B2</u> (-)(C)	E8.4C(ii)	unzuverlässige Identifikation	<u>1.623</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.59</u>

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>A1</u> (++) (A)	E7.1CD	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<u>2.076</u>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<u>1.981</u>
<u>A2</u> (+)(B)	E7.1CD	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.892</u>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<u>1.886</u>
<u>A3</u> (+)(B)	E7.1AD	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.93</u>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<u>1.875</u>
<u>A4</u> (+)(B)	E7.1AD	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.856</u>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.734</u>
<u>A5</u> (-)(C)	E7.2CD	not reliable identification ↑	<u>1.504</u>	<i>Pseudomonas boreopalis</i> not reliable identification	<u>1.5</u>
<u>A6</u> (+)(B)	E7.2CD	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>1.752</u>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> not reliable identification	<u>1.424</u>
<u>A7</u> (+)(B)	E7.2AD	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>1.83</u>	not reliable identification	<u>1.479</u>
<u>A8</u> (+)(B)	E7.2AD	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>1.84</u>	not reliable identification	<u>1.465</u>

<u>A9</u> (-)(C)	E7.3CD	not reliable identification ↑	<u>1.663</u>	not reliable identification <i>Sphingobium cellacae</i>	<u>1.506</u>
<u>A10</u> (+)(B)	E7.3CD	<i>Sphingomonas</i> sp	<u>1.775</u>	not reliable identification	<u>1.631</u>
<u>A11</u> (+)(B)	E7.3AD	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<u>1.77</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>1.74</u>
<u>A12</u> (++) (A)	E7.3AD	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<u>2.035</u>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<u>2.023</u>

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>A1</u> (+)(B)	E1.1AD	<u>Pseudomonas extremorientalis</u>	<u>1.958</u>	<u>Pseudomonas marginalis</u>	<u>1.926</u>
<u>A2</u> (-)(C)	E1.1AD	no peaks found	< 0	no peaks found	< 0
<u>A3</u> (+)(B)	E1.1A-CD	<u>Pseudomonas tolaasii</u>	<u>1.99</u>	<u>Pseudomonas extremorientalis</u>	<u>1.949</u>
<u>A4</u> (+)(B)	E1.1A-CD	<u>Pseudomonas azotoformans</u>	<u>1.936</u>	<u>Pseudomonas marginalis</u>	<u>1.925</u>
<u>A5</u> (++)(A)	E8.1-T2D	<u>Pseudomonas oleovorans</u>	<u>2.221</u>	<u>Pseudomonas pseudoalcaligenes</u>	<u>1.914</u>
<u>A6</u> (++)(A)	E8.1-T2D	<u>Pseudomonas oleovorans</u>	<u>2.191</u>	<u>Pseudomonas oleovorans</u>	<u>1.981</u>
<u>A7</u> (++)(A)	E2.1-T2D	<u>Sphingomonas koreensis</u>	<u>2.081</u>	<u>Sphingomonas koreensis</u>	<u>1.827</u>

<u>A8</u> (++)(A)	E2.1-T2D	<u>Sphingomonas koreensis</u>	<u>2.27</u>	<u>Sphingomonas koreensis</u>	<u>2.014</u>
<u>A9</u> (-)(C)	E4.2-T2D	<u>Lactobacillus helveticus</u> not reliable identification	<u>1.633</u>	<u>Azococcus sp</u> not reliable identification	<u>1.401</u>
<u>A10</u> (-)(C)	E4.2-T2D	not reliable identification	<u>1.574</u>	<u>Shewanella putrefaciens</u> not reliable identification	<u>1.395</u>
<u>A11</u> (+)(B)	E5.2-T2D	<u>Enterobacter cloacae</u>	<u>1.721</u>	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u> not reliable identification	<u>1.566</u>
<u>A12</u> (+)(B)	E5.2-T2D	<u>Enterobacter cloacae</u>	<u>1.86</u>	<u>Enterobacter cloacae</u>	<u>1.733</u>

Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungszahl	Organismus (zweitbesten Treffer)	Bewertungszahl
$\Delta 1$ (-)(C)	E2.3C	unzuverlässige Identifikation	1.454	<i>Arcmobacterium</i> unzuverlässige Identifikation <i>diolium</i>	1.359
$\Delta 2$ (+++)(A)	E2.3C	Brevibacterium casei	2.351	Brevibacterium casei	2.307
$\Delta 3$ (-)(C)	E2.3A	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
$\Delta 4$ (+)(B)	E2.3A	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	1.999	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	1.998
$\Delta 5$ (-)(C)	E2.3A-C	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
$\Delta 6$ (++)(A)	E2.3A-C	<i>Pseudomonas synxantha</i>	2.005	<i>Pseudomonas libanensis</i>	1.983
$\Delta 7$ (++)(A)	E4.3C	<i>Pseudomonas synxantha</i>	2.009	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	1.938

<u>A8</u> (+)(B)	E4.3C	<u>Pseudomonas azotoformans</u>	<u>1.969</u>	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	<u>1.967</u>
<u>A9</u> (+)(B)	E4.3C-C	<u>Pseudomonas cedrina</u>	<u>1.826</u>	<u>Pseudomonas extremorientalis</u>	<u>1.813</u>
<u>A10</u> (+)(B)	E4.3C-C	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	<u>1.993</u>	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>1.992</u>
<u>A11</u> (-)(C)	E4.3A	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
<u>A12</u> (+)(B)	E4.3A	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	<u>1.934</u>	<u>Pseudomonas azotoformans</u>	<u>1.903</u>
<u>B1</u> (++)(B)	E4.3A-C	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>2.024</u>	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	<u>2.007</u>
<u>B2</u> (++)(B)	E4.3A-C	<u>Pseudomonas synxantha</u>	<u>2.097</u>	<u>Pseudomonas libanensis</u>	<u>2.096</u>
<u>B3</u> (-)(C)	E10.1C	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
<u>B4</u> (++)(A)	E10.1C	Acidovorax temperans	<u>2.252</u>	Acidovorax temperans	<u>2.161</u>
<u>B5</u> (+)(B)	E10.1A	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.969</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.877</u>
<u>B6</u> (+)(B)	E10.1A	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.994</u>	Pseudomonas thivalensis	<u>1.971</u>
<u>B7</u> (+)(B)	E10.2C	<u>Acinetobacter parvus</u>	<u>1.988</u>	<u>Acinetobacter</u> unzuverlässige Identifikation	<u>1.569</u>
<u>B8</u> (-)(C)	E10.2C	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
<u>B9</u> (+)(B)	E10.2A	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.809</u>	<u>Pseudomonas mandelii</u>	<u>1.796</u>
<u>B10</u> (+)(B)	E10.2A	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.965</u>	Pseudomonas thivalensis	<u>1.864</u>
<u>B11</u> (-)(C)	E10.3C	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
<u>B12</u> (-)(C)	E10.3C	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
<u>C1</u> (++)(A)	E10.3C-C	Pseudomonas koreensis	<u>2.001</u>	Pseudomonas chlororaphis	<u>1.949</u>
<u>C2</u> (+)(B)	E10.3C-C	Pseudomonas koreensis	<u>1.866</u>	Pseudomonas kilonensis	<u>1.848</u>

<u>C3</u> (+)(B)	E10.3A	Pseudomonas kilonensis	<u>1.748</u>	Pseudomonas frederiksbergensis	<u>1.739</u>
<u>C4</u> (++)(A)	E10.3A	Pseudomonas kilonensis	<u>2.086</u>	Pseudomonas brassicacearum	<u>1.986</u>
<u>C5</u> (+)(B)	E11.1C	Acidovorax temperans	<u>1.936</u>	Acidovorax temperans	<u>1.86</u>
<u>C6</u> (++)(A)	E11.1C	Acidovorax temperans	<u>2.08</u>	Acidovorax temperans	<u>2.03</u>
<u>C7</u> (-)(C)	E11.1C-C	<i>Sphingomonas</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.617</u>	<i>Sphingomonas</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.505</u>
<u>C8</u> (+)(B)	E11.1C-C	Sphingomonas sp	<u>1.875</u>	<i>Sphingomonas</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.459</u>
<u>C9</u> (+++)(A)	E11.1A	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.478</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.472</u>
<u>C10</u> (+++)(B)	E11.1A	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.381</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.366</u>
<u>C11</u> (-)(C)	E11.2C	unzuverlässige Identifikation	<u>1.65</u>	<i>Sphingomonas</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.577</u>
<u>C12</u> (+)(B)	E11.2C	Sphingomonas sp	<u>1.757</u>	Sphingomonas sp	<u>1.704</u>
<u>D1</u> (-)(C)	E11.3C	<i>Acidovorax</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.603</u>	<i>Acidovorax</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.532</u>
<u>D2</u> (+)(B)	E11.3C	Acidovorax delafieldii	<u>1.845</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.618</u>
<u>D3</u> (-)(C)	E2.3-T	keine Peaks gefunden	<u><0</u>	keine Peaks gefunden	<u><0</u>
<u>D4</u> (+)(B)	E2.3-T	Brachy bacterium faecium	<u>1.706</u>	<i>Brachy bacterium</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.311</u>
<u>D5</u> (-)(C)	E4.3-T	<i>Brachy bacterium</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.397</u>	<i>Sphingomonas</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.36</u>
<u>D6</u> (-)(C)	E4.3-T	unzuverlässige Identifikation	<u>1.628</u>	<i>Sphingomonas</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.551</u>
<u>D7</u> (+)(B)	E10.3-T	Delftia acidovorans	<u>1.94</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.6</u>
<u>D8</u> (+)(B)	E10.3-T	Delftia acidovorans	<u>1.866</u>	Delftia acidovorans	<u>1.829</u>
<u>D9</u> (-)(C)	E11.3-T	<i>Acidovorax</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.686</u>	<i>Acidovorax</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.481</u>
<u>D10</u> (+)(B)	E11.3-T	Acidovorax delafieldii	<u>1.775</u>	<i>Acidovorax facilis</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.506</u>

Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungszahl	Organismus (zweitbesten Treffer)	Bewertungszahl
A1 (-) (C)	K1	unzuverlässige Identifikation ↑	<u>1.618</u>	Lactobacillus unzuverlässige Identifikation <i>pentosus</i>	<u>1.325</u>
A2 (+) (B)	K1	<u>Lysinibacillus fusiformis</u>	<u>1.967</u>	Lysinibacillus unzuverlässige Identifikation <i>fusiformis</i>	<u>1.504</u>
A3 (-) (C)	E10.1C	keine Peaks gefunden	<u>≤0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤0</u>
A4 (+++) (A)	E10.1C	Acidovorax temperans	<u>2.373</u>	Acidovorax temperans	<u>2.162</u>
A5 (++) (A)	E10.1A	Acidovorax temperans	<u>2.149</u>	Acidovorax temperans	<u>1.913</u>
A6 (++) (A)	E10.1A	Acidovorax temperans	<u>2.265</u>	Acidovorax temperans	<u>1.876</u>
A7 (++) (C)	E10.3C	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u> (<u>Pseudomonas beteli</u> #)	<u>2.018</u>	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>1.973</u>
A8 (+) (C)	E10.3C	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u> (<u>Pseudomonas beteli</u> #)	<u>1.98</u>	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u> (<u>Pseudomonas geniculata</u> #)	<u>1.883</u>
	E10.3A	Brevibacterium casei	<u>1.742</u>	unzuverlässige Identifikation <i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>1.59</u>

<u>A9</u> (+) (B)					
<u>A10</u> (+++) (A)	E10.3A	Brevibacterium casei	<u>2.43</u>	Brevibacterium casei	<u>2.337</u>
<u>A11</u> (+++) (A)	E11.1C	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.411</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.2</u>
<u>A12</u> (+++) (A)	E11.1C	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.385</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.269</u>
<u>B1</u> (++) (A)	E11.1A	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.13</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.108</u>
<u>B2</u> (+++) (A)	E11.1A	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.351</u>	Sphingomonas paucimobilis	<u>2.222</u>
<u>B3</u> (+) (B)	E11.2C	Brevundimonas diminuta	<u>1.973</u>	Brevundimonas diminuta	<u>1.723</u>
<u>B4</u> (+) (C)	E11.2C	Brevundimonas diminuta	<u>1.939</u>	Brevundimonas diminuta	<u>1.743</u>
<u>B5</u> (-) (C)	E11.3C	<i>Moraxella</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.649</u>	<i>Moraxella</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.503</u>
<u>B6</u> (-) (C)	E11.3C	<i>Moraxella</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.558</u>	<i>Moraxella</i> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.472</u>
<u>B7</u> (+) (B)	E11.3A-1	Micrococcus luteus	<u>1.791</u>	Micrococcus luteus	<u>1.782</u>
<u>B8</u> (++) (A)	E11.3A-1	Micrococcus luteus	<u>2.032</u>	Micrococcus luteus	<u>1.947</u>
<u>B9</u> (++) (A)	E11.3A-2	Micrococcus luteus	<u>2.062</u>	Micrococcus luteus	<u>1.935</u>
<u>B10</u> (++) (A)	E11.3A-2	Micrococcus luteus	<u>2.193</u>	Micrococcus luteus	<u>2.144</u>

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
$\Delta 1$ (+) (B)	E4.1C	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>1.793</u>	not reliable identification	<u>1.632</u>
$\Delta 2$ (++) (A)	E4.1C	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.201</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.098</u>
$\Delta 3$ (-) (C)	E5.2C-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> not reliable identification	<u>1.432</u>	not reliable identification	<u>1.422</u>
$\Delta 4$ (-) (C)	E5.2C-2	not reliable identification	<u>1.16</u>	<i>Stenotrophomonas nitroreducens</i> not reliable identification	<u>1.158</u>
$\Delta 5$ (-) (C)	E2.1C	not reliable identification	<u>1.682</u>	<i>Morganella morganii</i> not reliable identification	<u>1.381</u>
$\Delta 6$ (++) (A)	E2.1C	<u>Brevundimonas aurantiaca</u>	<u>2.024</u>	<i>Brevundimonas intermedia</i> not reliable identification	<u>1.624</u>
$\Delta 7$ (++) (A)	E5.2C-1	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.183</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.019</u>

<u>A8</u> (-)(C)	E5.2C-1	<i>Acinetobacter</i> not reliable identification <i>ursarii</i>	<u>1.694</u>	not reliable identification	<u>1.652</u>
<u>A9</u> (-)(C)	E4.1CF	<i>Pseudomonas</i> not reliable identification <i>plicatoglossoides</i>	<u>1.472</u>	<i>Pseudomonas</i> not reliable identification <i>montelii</i>	<u>1.425</u>
<u>A10</u> (++)(A)	E4.1CF	<i>Pseudomonas putida</i>	<u>2.026</u>	<i>Pseudomonas putida</i>	<u>2.016</u>
<u>A11</u> (+)(B)	E5.2C-2F	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>1.823</u>	not reliable identification	<u>1.642</u>
<u>A12</u> (+)(B)	E5.2C-2F	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>1.799</u>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>1.787</u>
<u>B1</u> (++)(A)	E2.1CF	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	<u>2.031</u>	<i>Acidovorax</i> not reliable identification <i>temperans</i>	<u>1.599</u>
<u>B2</u> (+)(B)	E2.1CF	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	<u>1.941</u>	<i>Brevundimonas</i> not reliable identification <i>intermedia</i>	<u>1.371</u>
<u>B3</u> (+)(B)	E5.2C-1F	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>1.798</u>	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>1.716</u>
<u>B4</u> (+)(B)	E5.2C-1F	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>1.872</u>	<i>Acinetobacter ursingii</i>	<u>1.769</u>
<u>B5</u> (-)(C)	E4.1CN	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>B6</u> (-)(C)	E4.1CN	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>B7</u> (-)(C)	E5.2C-2N	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>B8</u> (-)(C)	E5.2C-2N	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>B9</u> (-)(C)	E2.1CN	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>B10</u> (-)(C)	E2.1CN	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>B11</u> (-)(C)	E5.2C-1N	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>B12</u> (-)(C)	E5.2C-1N	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>C1</u> (-)(C)	E4.1CFN	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>C2</u> (-)(C)	E4.1CFN	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
		no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>

Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungszahl	Organismus (zweitbeste Treffer)	Bewertungszahl
Δ_1 (-) (C)	E4.1CC	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
Δ_2 (++) (A)	E4.1CC	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.272</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.175</u>
Δ_3 (+) (C)	E5.2C-2C	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>1.94</u>	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>1.755</u>
Δ_4 (++) (C)	E5.2C-2C	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>2.231</u>	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>2.147</u>
Δ_5 (++) (A)	E4.1CD	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.222</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.176</u>
Δ_6 (++) (A)	E4.1CD	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.23</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.228</u>
	E5.2C-2D		<u>1.8</u>		<u>1.462</u>

<u>A7</u> (+)(B)		<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>		unzuverlässige Identifikation	
<u>A8</u> (++)(C)	E5.2C-2D	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>2.144</u>	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>2.006</u>
<u>A9</u> (++)(A)	E2.1CC	<u>Brevundimonas aurantiaca</u>	<u>2.136</u>	<u>Brevundimonas</u> sp. unzuverlässige Identifikation	<u>1.602</u>
<u>A10</u> (++)(A)	E2.1CC	<u>Brevundimonas aurantiaca</u>	<u>2.138</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.684</u>
<u>A11</u> (++)(A)	E5.2C-1C	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.26</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.196</u>
<u>A12</u> (++)(A)	E5.2C-1C	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.222</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.21</u>
<u>B1</u> (+)(B)	E2.1CD	<u>Brevundimonas aurantiaca</u>	<u>1.945</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.328</u>
<u>B2</u> (++)(A)	E2.1CD	<u>Brevundimonas aurantiaca</u>	<u>2.007</u>	<u>Brevundimonas</u> unzuverlässige Identifikation nos due	<u>1.443</u>
<u>B3</u> (++)(A)	E5.2C-1D	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.163</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.045</u>
<u>B4</u> (++)(A)	E5.2C-1D	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.229</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.007</u>
<u>B5</u> (-)(C)	E4.1CFC	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
<u>B6</u> (++)(A)	E4.1CFC	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.14</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.066</u>
<u>B7</u> (-)(C)	E5.2C-2FC	unzuverlässige Identifikation	<u>1.677</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.476</u>
<u>B8</u> (++)(C)	E5.2C-2FC	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>2.257</u>	<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	<u>2.096</u>
<u>B9</u> (++)(A)	E4.1CFD	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.195</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>2.136</u>
<u>B10</u> (+)(B)	E4.1CFD	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>1.806</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>1.768</u>

<u>B11</u> (-)(C)	E5.2C-2FD	keine Peaks gefunden	<u>< 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>< 0</u>
<u>B12</u> (-)(C)	E5.2C-2FD	keine Peaks gefunden	<u>< 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>< 0</u>
<u>C1</u> (+)(B)	E2.1CFC	<u>Micrococcus luteus</u>	<u>1.974</u>	<u>Micrococcus luteus</u>	<u>1.891</u>
<u>C2</u> (++)(A)	E2.1CFC	<u>Micrococcus luteus</u>	<u>2.298</u>	<u>Micrococcus luteus</u>	<u>2.271</u>
<u>C3</u> (++)(A)	E5.2C-1FC	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.261</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.237</u>
<u>C4</u> (++)(A)	E5.2C-1FC	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.232</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.068</u>
<u>C5</u> (+)(C)	E2.1CFD	<u>Micrococcus luteus</u>	<u>1.986</u>	<u>Brevundimonas aurantiaca</u>	<u>1.785</u>
<u>C6</u> (++)(A)	E2.1CFD	<u>Micrococcus luteus</u>	<u>2.21</u>	<u>Micrococcus luteus</u>	<u>2.207</u>
<u>C7</u> (++)(A)	E5.2C-1FD	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.213</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.04</u>
<u>C8</u> (++)(A)	E5.2C-1FD	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>2.172</u>	<u>Acinetobacter ursingii</u>	<u>1.871</u>
<u>C9</u> (+)(C)	E2.1C	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>1.928</u>	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>1.916</u>
<u>C10</u> (++)(C)	E2.1C	<u>Brevundimonas aurantiaca</u>	<u>2.002</u>	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>1.812</u>
<u>C11</u> (++)(A)	E2.1A	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>2.246</u>	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>2.023</u>
<u>C12</u> (+++)(A)	E2.1A	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>2.392</u>	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>2.238</u>
<u>D1</u> (-)(C)	E2.3C-1	keine Peaks gefunden	<u>< 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>< 0</u>
<u>D2</u> (+++)(A)	E2.3C-1	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>2.399</u>	<u>Acidovorax temperans</u>	<u>2.211</u>

D3 (-)(C)	E2.3C-2	<i>capnocytophaga</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.249</u>	<i>Bacterium</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.207</u>
D4 (-)(C)	E2.3C-2	unzuverlässige Identifikation	<u>1.337</u>	<i>casia</i> <i>actinobacterium</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.251</u>
D5 (-)(C)	E2.3A	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
D6 (-)(C)	E2.3A	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
D7 (-)(C)	E4.1C	<i>Saccharobacterium</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.33</u>	<i>Cyphobacterium</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.285</u>
D8 (-)(C)	E4.1C	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
D9 (++)(A)	E4.1A	<i>Pseudomonas</i> <i>synxantha</i>	<u>2.024</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>libanensis</i>	<u>1.958</u>
D10 (-)(C)	E4.1A	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
D11 (++)(A)	E4.2C	<i>Acinetobacter</i> <i>johnsonii</i>	<u>2.163</u>	<i>Acinetobacter</i> <i>johnsonii</i>	<u>2.088</u>
D12 (++)(A)	E4.2C	<i>Acinetobacter</i> <i>johnsonii</i>	<u>2.155</u>	<i>Acinetobacter</i> <i>johnsonii</i>	<u>2.037</u>
E1 (-)(C)	E4.2A	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
E2 (++)(B)	E4.2A	<i>Pseudomonas</i> <i>synxantha</i>	<u>2.034</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>extremorientalis</i>	<u>2.024</u>
E3 (+)(B)	E4.3C	<i>Pseudomonas</i> <i>azotoformans</i>	<u>1.911</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>libanensis</i>	<u>1.9</u>
E4 (+)(B)	E4.3C	<i>Pseudomonas</i> <i>extremorientalis</i>	<u>1.969</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>veronii</i>	<u>1.931</u>
E5 (-)(C)	E4.3A	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
E6 (+)(B)	E4.3A	<i>Pseudomonas</i> <i>synxantha</i>	<u>1.99</u>	<i>Pseudomonas</i> <i>extremorientalis</i>	<u>1.981</u>
E7 (-)(C)	E6.1C	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤ 0</u>
E8 (++)(A)	E6.1C	<i>Aeromonas</i> <i>molluscorum</i>	<u>2.071</u>	<i>Aeromonas</i> <i>molluscorum</i>	<u>1.899</u>

<u>E9</u> (-)(C)	E6.1A	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
<u>E10</u> (++) (A)	E6.1A	Brevibacterium casei	<u>2.157</u>	Brevibacterium casei	<u>1.998</u>
<u>E11</u> (-)(C)	E6.2C-1	<i>A. tritibacter</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.407</u>	<i>Brevib.</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.286</u>
<u>E12</u> (-)(C)	E6.2C-1	<i>Corynebacterium</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.523</u>	<i>A. tritibacter</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.325</u>
<u>F1</u> (-)(C)	E6.2C-2	<i>Sphingomonas</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.455</u>	<i>Pseudomonas</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.43</u>
<u>F2</u> (-)(C)	E6.2C-2	<i>Brevib.</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.509</u>	<i>Brevib. casei</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.403</u>
<u>F3</u> (-)(C)	E6.2A	unzuverlässige Identifikation	<u>1.339</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.28</u>
<u>F4</u> (-)(C)	E6.2A	<i>Brevib.</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.375</u>	<i>Brevib.</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.371</u>
<u>F5</u> (++) (A)	E6.3C	<i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>2.06</u>	<i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>2.003</u>
<u>F6</u> (++) (A)	E6.3C	<i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>2.002</u>	<i>Aeromonas molluscorum</i>	<u>1.894</u>
<u>F7</u> (-)(C)	E6.3A	<i>Moraxella</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.338</u>	<i>B. tritibacter</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.255</u>
<u>F8</u> (-)(C)	E6.3A	<i>Corynebacterium</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.346</u>	<i>Brevib. casei</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.345</u>
<u>F9</u> (++) (A)	E7.1C	Brevundimonas diminuta	<u>2.011</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.61</u>
<u>F10</u> (++) (A)	E7.1C	Brevundimonas diminuta	<u>2.207</u>	Brevundimonas diminuta	<u>1.743</u>
<u>F11</u> (-)(C)	E7.2C	unzuverlässige Identifikation	<u>1.599</u>	<i>Histidin</i> unzuverlässige Identifikation	<u>1.21</u>
<u>F12</u> (++) (A)	E7.2C	Staphylococcus hominis	<u>2.065</u>	Staphylococcus hominis	<u>1.996</u>
<u>G1</u> (-)(C)	E7.3C	keine Peaks gefunden	≤ 0	keine Peaks gefunden	≤ 0
<u>G2</u> (+)(B)	E7.3C	Pseudomonas oleovorans	<u>1.94</u>	Pseudomonas pseudoalcaligenes	<u>1.842</u>

<u>G3</u> (+)(B)	E8.3C	Sphingomonas sp	<u>1.839</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.638</u>
<u>G4</u> (+)(B)	E8.3C	Sphingomonas sp	<u>1.775</u>	unzuverlässige Identifikation	<u>1.554</u>

Analyt-Name	Analyt-ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungszahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungszahl
<u>A1</u> (-)(C)	E1.1C	keine Peaks gefunden	<u>≤0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤0</u>
<u>A2</u> (++)(A)	E1.1C	Delftia acidovorans	<u>2.123</u>	Delftia acidovorans	<u>2.046</u>
<u>A3</u> (++)(C)	E1.1A	Pseudomonas koreensis	<u>2.248</u>	<u>Pseudomonas corrugata</u>	<u>1.891</u>
<u>A4</u> (++)(C)	E1.1A	Pseudomonas koreensis	<u>2.186</u>	Brevundimonas diminuta	<u>1.904</u>
<u>A5</u> (+)(B)	E5.2A	<u>Yersinia enterocolitica</u>	<u>1.865</u>	Yersinia mollaretii	<u>1.701</u>
<u>A6</u> (-)(C)	E5.2A	keine Peaks gefunden	<u>≤0</u>	keine Peaks gefunden	<u>≤0</u>
<u>A7</u> (++)(B)	E5.3A	<u>Yersinia enterocolitica</u>	<u>2.1</u>	Yersinia mollaretii	<u>2.073</u>
<u>A8</u> (++)(B)	E5.3A	Yersinia mollaretii	<u>2.12</u>	<u>Yersinia enterocolitica</u>	<u>2.09</u>