

**Entwicklung zweier methodischer Ansätze zur
Charakterisierung von Emissionen aus
Tierhaltungsanlagen mit
der MALDI-TOF Massenspektrometrie
und der NIR-Spektroskopie**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Katharina Druckenmüller
aus
Köln

Bonn 2024

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter/Betreuer: Professor Dr. Klaus Günther

Gutachter: Professor Dr. Matthias Wüst

Tag der Promotion: 28.04.2025

Erscheinungsjahr: 2025

Für
meine Familie, meine Lieben
und mich

Φύσις κρύπτεσθαι φιλεῖ
Die Natur liebt es, sich zu verbergen
-Heraklit (B 123)-

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Bioaerosol-Emissionen in der Tierhaltung	3
1.1.1 Gesundheitliche Auswirkung.....	4
1.1.2 Probenahme, Analyse und Bewertung von Emissionen	5
2 Zielsetzung.....	9
3 Verwendete Methoden.....	11
3.1 NIR-Spektroskopie	11
3.1.1 Grundlagen der NIR-Spektroskopie	12
3.1.2 Spektrometer.....	17
3.1.3 Datenvorbehandlung und Chemometrie	19
3.1.3.1 Datenvorbehandlung	19
3.1.3.2 Chemometrie und multivariate Datenanalyse	21
3.1.4 NIRS in der Anwendung.....	26
3.1.4.1 NIRS in der Prozessüberwachung.....	28
3.1.4.2 NIRS und Luftqualität.....	28
3.1.4.3 NIRS und Mikroorganismen	29

3.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	30
3.2.1 Grundlagen der MALDI-TOF Massenspektrometrie	30
3.2.2 Grundlagen der Messung von Mikroorganismen	33
3.2.3 Lösungsmittel und MALDI-Matrices	34
3.2.4 Reproduzierbarkeit der MALDI-Spektren.....	35
3.2.5 Identifizierung von Mikroorganismen über Biomarkerionen	36
3.2.6 Taxonomische Differenzierungsleistung	38
3.2.7 MALDI-Verfahren in der Umweltmikrobiologie	39
3.2.8 MALDI-TOF-MS als kultivierungsunabhängige Methode.....	40
 4 Darstellung der wissenschaftlichen Beiträge Publikation 1	42
4.1 Zusammenfassung Publikation 1.....	43
 5 Darstellung der wissenschaftlichen Beiträge Publikation 2	46
5.1 Zusammenfassung Publikation 2.....	47
 6 Zusammenfassende Darstellung.....	51
6.1 Erkenntnisfortschritt.....	61
 7 Literaturverzeichnis	62
 8 Appendix	80
8.1 Publikation 1	80

8.2 Publikation 2	97
8.3 Summary.....	115
9 Danksagung.....	118

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** – Anzahl Schweinemastbetriebe in Deutschland.
- Abb. 1.2** – Verbreitung von Bioaerosolen aus Tierhaltungsanlagen in die Umwelt.
- Abb. 1.3** – Beispiel einer In-Stack-Probenahmeeinrichtung.
- Abb. 1.4** – Out-stack-Probenahme von Bioaerosolen mit Emissionsimpinger.
- Abb. 3.1** – Elektromagnetisches Spektrum.
- Abb. 3.2** – Übersicht über die Anregungseigenschaften der NIR-Strahlung.
- Abb. 3.4** – Michelson Interferometer.
- Abb. 3.5** – Anwendungsgebiet MALDI-TOF-Massenspektrometrie.
- Abb. 3.6** – Prinzip eines MALDI-TOF Massenspektrometers.
- Abb. 3.7** – Identifizierung von Mikroorganismen.
- Abb. 3.8** – Einflussfaktoren auf das Erscheinungsbild des MALDI-TOF Massenspektrums.
- Abb. 3.9** – Vergleich zweier Analyseverfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen.
- Abb. 3.10** – Differenzierungsleistung der MALDI-TOF-MS in der Mikrobiologie.

Abkürzungsverzeichnis

A

ACCA 4-Hydroxy-3-Methoxyzimtsäure
(4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid)

ACN Acetonitril

B

BImSchG Bundes-Immissionsschutzgesetz

C

CHCA Alpha-Cyano-4-Hydroxymimtsäure
(Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid)

cm⁻¹ Wellenzahl

CMBT 5-Chlor-2-Mercaptobenzothiazol

D

DHB 2,4-Dihydroxybenzoesäure

DNA Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)

DT Trendbereinigung (Detrending)

E

ESI Elektrosprayionisation

F

FA Faktorenanalyse

FT Fouriertransformation

G

GKZ Gesamtkeimzahl

GV Großvieheinheit

I

IR Infrarot

K

KBE Koloniebildende Einheiten

L

LANUV Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz

LDA Lineare Diskriminanten Analyse

M

MALDI Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation

MIR Mittleres Infrarot

MS Massenspektrometrie

m/z Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

N

NIRS Nahinfrarot-Spektroskopie

P

PbS-Detektor Polykristalliner Bleisulfid Detektor

PCA Hauptkomponentenanalyse (Principal component analysis)

PCR Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)

R

RNA Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)

rRNA Ribosomale RNA

S

SA Sinapinsäure (Sinapic acid)

S/N ratio Signal-zu-Rausch Verhältnis (Signal-to-noise ratio)

SNV Standard-Normal-Variate-Korrektur

T

TFA Trifluoressigsäure (Trifluoroacetic acid)

TOF Flugzeitmassenanalysator

U

UV Ultraviolett

V

VDI Verein Deutscher Ingenieure

VIS Sichtbar (Visible)

Zusammenfassung

Nicht erst seit dem weltweiten Ausbruch der jüngsten Virusinfektion weiß man, dass die Gesundheit des Menschen durch den Kontakt mit Bioaerosolen gefährdet sein kann. Viele und durchaus wichtige Prozesse, z. B. in der Landwirtschaft, erzeugen Bioaerosole. Eine spezifische Erfassung und Analyse von Bakterien, Pilzsporen und Viren sind folglich für Millionen von Menschen in Deutschland von Bedeutung, und doch bleibt die Forschung hier hinter den Erwartungen zurück. Ein Grund sind zeit- und kostenaufwändige Messverfahren, die nur von wenigen Fachleuten beherrscht werden. Der Gesetzgeber fordert im Bundes-Immissionsschutzgesetz u. a. für bestimmte Tierhaltungsanlagen die Emission von Bioaerosolen zu mindern und dass der Effektivität emissionsmindernder Maßnahmen zu überprüfen ist. Ein dafür wichtiger Schritt, die Unbedenklichkeit von Bioaerosol-Emissionen aufzuzeigen, liegt in der schnellen Bereitstellung von Ergebnissen.

Diese Arbeit schließt die beschriebene Lücke zwischen Forschung und Regelwerk, indem sie aufzeigt, wie die Analyse von Bioaerosol-Emissionen aus Tierhaltungsanlagen schneller und günstiger erfolgen kann. Dazu wurden zwei Verfahren, die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) und die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF-MS), zum ersten Mal so angepasst, dass sie auf den aufwändigsten Schritt - die Kultivierung - verzichten. Dank dieser Arbeit kann ein Bioaerosol nun direkt bzw. mit geringer Aufarbeitung analysiert werden. Damit die Verfahren auch für die Praxis tauglich sind, muss man von der Probenahme bis zur Datenauswertung Prozesse beschreiben können, die reproduzierbare, valide und verlässliche Ergebnisse liefern. Genau das hat diese Arbeit mit Feldstudien in Tierhaltungsanlagen unter Beweis gestellt. Da sie auf standardisierten und etablierten Probenahmeverfahren aufbaut, sind ihre Ergebnisse für andere leicht anwendbar. Teile dieser Arbeit haben auch schon Eingang in die Normung gefunden (DIN EN 13098:2019-12). Damit ist ein weiterer Grundstein für vergleichbare Bioaerosol-Messungen gelegt.

Die NIRS wurde in dieser Arbeit mit dem Ziel eingesetzt, Veränderungen im Gesamt-Aerosol zu entdecken. Einfache Fragen wie “Funktioniert die Absaugung?” oder “Erhöht sich die Bioaerosol-Emission bei Verlängerung der Mastdauer?” können jetzt dank des Verzichts auf die Kultivierung mit der einfachen Analyse von Filterproben schnell beantwortet werden. Auch für eine Prozesskontrolle reicht es aus, Veränderungen in dem spektralen Muster der Probe zu sehen; genau dies erlaubt die NIRS. In dieser Arbeit wurden spektrale Bereiche identifiziert, die Aussagen über Staubmenge (Abluftreinigung) und Mast erlauben. Die statistischen Methoden sind robust und sollten daher einfach auf andere Tierhaltungsanlagen übertragbar sein. Nächste Schritte können darin bestehen, weitere Parameter in das Modell aufzunehmen (z. B. KBE/m³) oder die Ergebnisse mit weiteren Referenzverfahren zu kalibrieren.

Die MALDI-TOF-MS wiederum kann eingesetzt werden, um ein Bioaerosol genauer zu untersuchen, in diesem Fall die Bakterienfraktion. Den Kultivierungsschritt weglassen zu können, bedeutet auch hier eine erhebliche Erleichterung. Dies ist in dieser Arbeit gelungen. Hierfür wurden in einer Tierhaltungsanlage Impingerproben genommen und zweigeteilt analysiert. Ein Teil wurde nach dem klassischen Verfahren kultiviert, dann sequenziert und mit der MALDI-TOF-MS gemessen. Aus diesen Spektren wurden Biomarkerionen ermittelt und zu einer Bioaerosol-Datenbank zusammengefasst. Der andere Teil wurde direkt mit der MALDI-TOF-MS gemessen. Die in dieser Arbeit erstmals angewendete Probenvorbereitung zeigt, wie mittels Kaskadenfiltration die Erzeugung von auswertbaren Spektren gelingt. Darüber hinaus konnten die Spektren den in der Datenbank hinterlegten Spektren aus den kultivierten Proben zugeordnet werden. Zur Validierung wurden Impingerproben aus weiteren Tierhaltungsanlagen entnommen und deren MALDI-TOF-MS-Proben mit Hilfe der Datenbank erfolgreich analysiert. Fazit, je weiter die Datenbank ausgebaut wird, desto wahrscheinlicher wird es, die bakterielle Fraktion einer Probe künftig ohne Kultivierungsschritt bewerten zu können. Im Bereich des Arbeitsschutzes soll dieser Ansatz durch weitergehende Untersuchungen adaptiert werden, um insbesondere Legionellen direkt aus Luft- und aus Materialproben detektieren zu können.

Sowohl für die Prozesskontrolle und die Überwachung von Schutzmaßnahmen (NIRS) als auch für die Identifizierung von Bakterien im Bioaerosol (MALDI-TOF-MS) wurden in dieser Arbeit Verfahren entwickelt, die einfach und schnell anwendbar sind.

1 Einleitung

Den ökonomischen Vorteilen der intensiven Tierhaltung stehen Nachteile im Bereich der Gesundheit von Mensch und Tier sowie der Umwelt gegenüber. Daher hat der Gesetzgeber in der Vergangenheit darauf reagiert; im Gesundheitsbereich sind die Verordnungen zu Käfighaltungen von Hühnern oder das Einschränken der Antibiotikagabe, um die Verbreitung resistenter Bakterien zu verringern, zu nennen (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015, 2020a). Im Bereich der Umwelt spielt die Belastung des Grundwassers mit Gülle aus intensiver Tierhaltung derzeit eine große Rolle (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2020b). Obwohl der Tierbestand an Nutztieren in Deutschland seit Jahren zurückgeht, die Zahl der Schweine sank seit 2012 um rund 20,8 % oder 5,8 Millionen Tiere, während die Anzahl an Betrieben sogar um 41,0 % (12400 Betriebe) abnahm, erhöhte sich der durchschnittliche Schweinebestand je Betrieb jedoch von 929 auf 1 248 Schweine je Betrieb (Statistisches Bundesamt, 2022). Durch diese Entwicklung bleiben die Nachteile der intensiven Tierhaltung weiterhin spürbar.

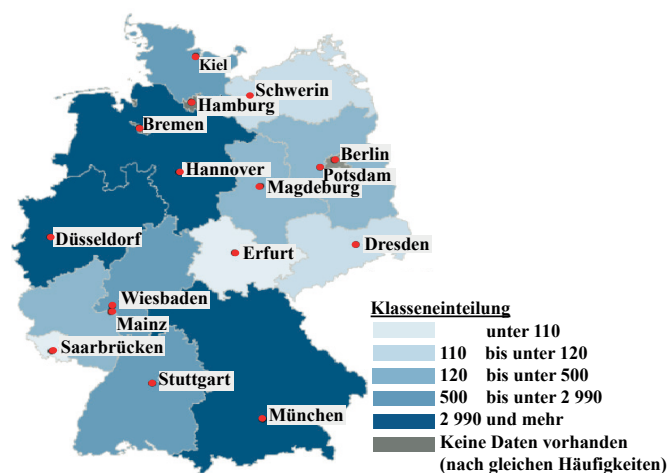
Neben dem Grundwasser kann durch Mastbetriebe aber auch die Luft belastet sein, insbesondere bei Betrieben mit einer hohen Belegungsdichte an Tieren, wobei die Emission von der Haltungsform und der Nutztierart abhängen kann. Solche Betriebe liegen in Deutschland auch in dicht besiedelten Bundesländern (Abb. 1.1), weswegen es einen Bedarf für Messverfahren gibt, um solche Belastungen erfassen und bewerten zu können (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2023 | Stand: 04.02.2023 / 13:28:49). Damit kann man auch das Einhalten von Grenzwerten überprüfen oder Emissionsminderungsmaßnahmen beurteilen. Darüber hinaus erhält man Eingangsdaten für Modelle, mit denen die Ausbreitung von Emissionen in die Umwelt vorhergesagt werden können.

Im nächsten Abschnitt wird zunächst vorgestellt, welche Stoffe aus Mastbetrieben die Luft belasten können (Kapitel 1.1), um im darauffolgenden Abschnitt einen Überblick über die gesundheitlichen Folgen (Kapitel 1.1.1) und über die derzeitigen Regelungen zum Messen und Bewerten dieser Luftbelastungen zu geben (Kapitel 1.1.2). In Kapitel 3 wird in zwei Abschnitten ein Überblick zu den verwendeten Methoden gegeben, die im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt wurden, um sie zur Emissionsmessung an Tierhaltungsanlagen einsetzen zu können (Kapitel 3.1 und 3.2).

**Betriebe mit Mastschweinen, Mastschweine: Bundesländer,
Stichmonat, Bestandsgrößenklassen**

Viehbestandserhebung Schweine

Betriebe mit Mastschweinen (Anzahl), 11/2022, Insgesamt



(C)opyright Statistisches Bundesamt (Destatis), 2023 | Stand: 04.02.2023 / 13:28:49

Abb. 1.1 – Anzahl Schweinemastbetriebe in Deutschland.
Darstellung der Anzahl von Betrieben mit Mastschweinen (Anzahl) in den einzelnen deutschen Bundesländern vom 11/2022 anhand von Farben (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2023 | Stand: 04.02.2023 / 13:28:49).

1.1 Bioaerosol-Emissionen in der Tierhaltung

Neben Gasen, die hier nicht weiter betrachtet werden, emittieren Tierhaltungsanlagen partikelförmige Verunreinigungen anorganischen und organischen Ursprungs. Diese Partikel zählen zu den Umweltaerosolen. Sie sind Bestandteile der Abluft der Tierhaltungsanlagen, die in die Umwelt abgegeben (Emission) und dort durch physikalische Prozesse z. B. Wind verbreitet werden (Transmission), um schließlich auf Mensch und Umwelt einzuwirken (Immission) (siehe Abb. 1.2).

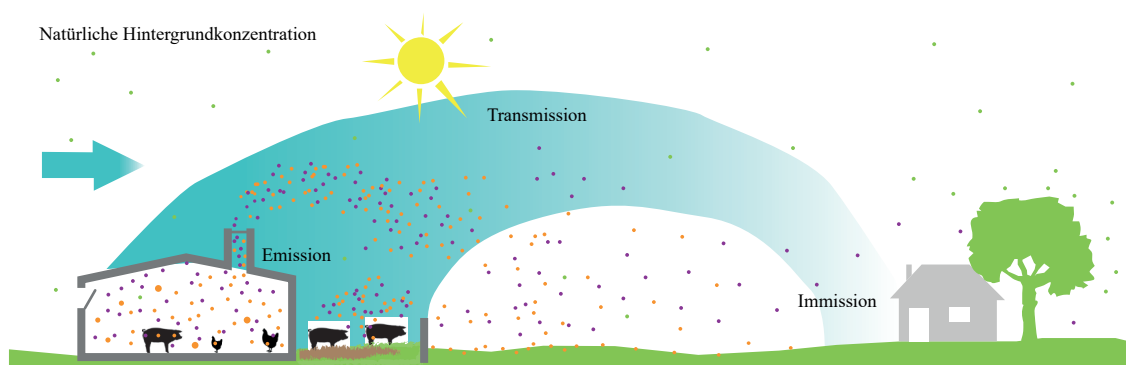


Abb. 1.2 – Verbreitung von Bioaerosolen aus Tierhaltungsanlagen in die Umwelt.
Die Darstellung zeigt schematisch die Verbreitung vom anthropogen erzeugten Bioaerosol aus Tierhaltungsanlagen (Emissionsquelle) durch Wind (Transmission) in die Umwelt bzw. Umgebung (Immission) (Clauß, 2020).

Diese Arbeit konzentriert sich auf das Bioaerosol. Nach der Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft (TA Luft) sind Bioaerosole im Luftraum befindliche Ansammlungen von Partikeln, denen Pilze, deren Sporen, Konidien oder Hyphenbruchstücke oder Bakterien, Viren oder Pollen oder deren Zellwandbestandteile und Stoffwechselprodukte anhaften oder die diese beinhalten (Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft – TA Luft 2002). Der Begriff Bioaerosol beschreibt somit ein komplexes Gemisch aus sehr variablen Einzelbestandteilen, die in der Umgebungsluft allgegenwärtig sind.

Die Bioaerosol-Komponenten können sowohl in der Form von Tröpfchen als auch in Form von Staub in die Luft emittiert werden. Sie liegen dann entweder einzeln, aber meist im Verbund vor. Daher kann die Bioaerosol-Konzentration in ihrer Zusammensetzung und Menge in Raum und Zeit erheblich variieren (Millner, 2009).

1.1.1 Gesundheitliche Auswirkung

Diese Arbeit konzentriert sich auf Bioaerosole, weil sie eine bekannte Quelle für Pathogene, Endotoxine und Allergene sind (Madsen et al., 2016; Straumfors et al., 2016). Bakterien, Pilzsporen und Viren sind Beispiele für häufige Bestandteile von Bioaerosolen (Zamfir et al., 2019).

Es ist bekannt, dass Bioaerosol-Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser unter ca. 10 µm in die unteren Atemwege gelangen können. Dort können sie Entzündungsreaktionen auslösen (Oremland et al., 2016). Größere Bioaerosol-Partikel und Bioaerosol-Aggregate verbleiben meist in den oberen Atemwegen (Oremland et al., 2016). Des Weiteren ist anerkannt, dass Expositionen gegenüber hohen Konzentrationen von Bioaerosolen zu Krankheiten wie z. B. Granulomen und Lungenfibrosen führen können (Blease et al., 2000; Dutkiewicz et al., 1988; Olenchock et al., 1983). Der Begriff Exposition beschreibt die Konzentration an Bioaerosol, der ein Mensch ausgesetzt sein kann. Sie wird in der Regel an der Person gemessen.

Jüngere Studien konzentrieren sich auf die schädliche Wirkung von Bioaerosolen durch wiederholte Exposition bei niedrigen Konzentrationen. Diese Expositionen können latente Symptome erzeugen und zu Sensibilisierung sowie Allergien führen (Buskirk et al., 2014). Darüber hinaus ist bekannt, dass das Einatmen von Bioaerosolen zu klinisch relevanten Ereignissen führen kann. Hier ist beispielsweise die Verschlechterung einer bereits bestehenden chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung oder die Entwicklung eines organischen staubtoxischen Syndroms zu nennen (Eduard et al., 2009; Malmberg et al., 1993).

Obwohl die Exposition gegenüber hohen Gehalten an Bioaerosolen mit einer gesundheitlichen Verschlechterung der menschlichen Atemwege verbunden sein

kann, sind die genauen Expositionswerte, die für solche Effekte verantwortlich sind, noch nicht bekannt.

Deswegen können bis heute keine Grenzwerte abgeleitet werden, da es an evidenzbasierten Tierversuchsstudien mit definiert erzeugten Bioaerosolen fehlt (Zamfir et al., 2019).

1.1.2 Probenahme, Analyse und Bewertung von Emissionen

Zur Ermittlung belastbarer Messwerte müssen standardisierte Probenahmeverfahren angewendet werden, wie sie zum Beispiel in den Richtlinien VDI 2066 Blatt 1 und 4257 Blatt 2 beschrieben sind (VDI-2066-1, 2006; VDI-4257-2, 2011). Diese zwei Arten der Probenahme erfolgen isokinetisch am Abluftkamin der Anlage (siehe Abb. 1.3 und 1.4) und wurden auch in dieser Arbeit eingesetzt.

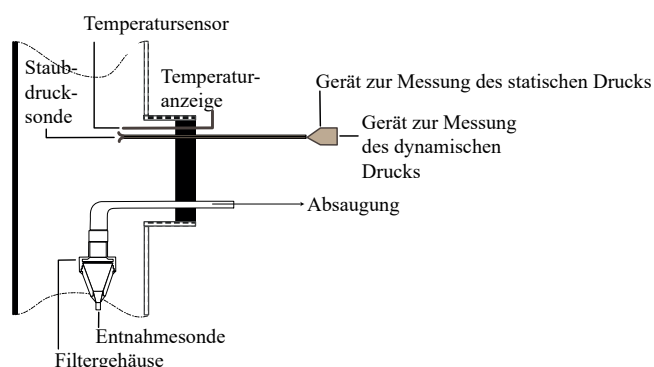


Abb. 1.3 – Beispiel einer In-Stack-Probenahmeeinrichtung.
Die In-Stack Probenahmeeinrichtung dient zur Bestimmung der Staubbelastung (Staubgehalt) und des Staubmassenstromes eines strömenden Staub-Gas-Gemisches (VDI-2066-1 2006).

Bei beiden Probenahmeverfahren handelt es sich um standardisierte Verfahren zur Ermittlung der Gesamtemission. Allerdings liegt der Anwendungsbereich der Richtlinie VDI 2066 Blatt 1 auf der Bestimmung von Staubemissionen in strömenden Staub-Gas-Gemischen durch Abscheidung auf Filter, während dieser bei der Richtlinie VDI 4257 Blatt 2 auf der gezielten Probenahme von Bioaerosolen unter

Verwendung eines Emissionsimpingers beruht (VDI-2066-1, 2006; VDI- 4257-2, 2011). Weitere Verfahren zur Probenahme von Bioaerosolen, allerdings in Innenräumen, wie z. B. durch Impaktion und Zyklon werden in der Arbeit von Gosh et al. beschrieben (Ghosh et al., 2015).

Die Probenahme mit einem Emissionsimpinger ist die Voraussetzung zur Gewinnung einer Probe zum Nachweis von Schimmelpilzen gemäß Richtlinie VDI 4253 Blatt 2, von Bakterien gemäß VDI 4253 Blatt 3 und gemäß VDI 4253 Blatt 4 für die Bestimmung der Gesamtzellzahl (VDI-4253-2, 2004; VDI-4253-3, 2019; VDI-4253-4, 2013). Die ersten beiden Verfahren beruhen auf einem kultivierungsabhängigen Nachweis, welcher zeitaufwändig und kostenintensiv ist, sowie auf der Bestimmung von vermehrungsfähigen Mikroorganismen.

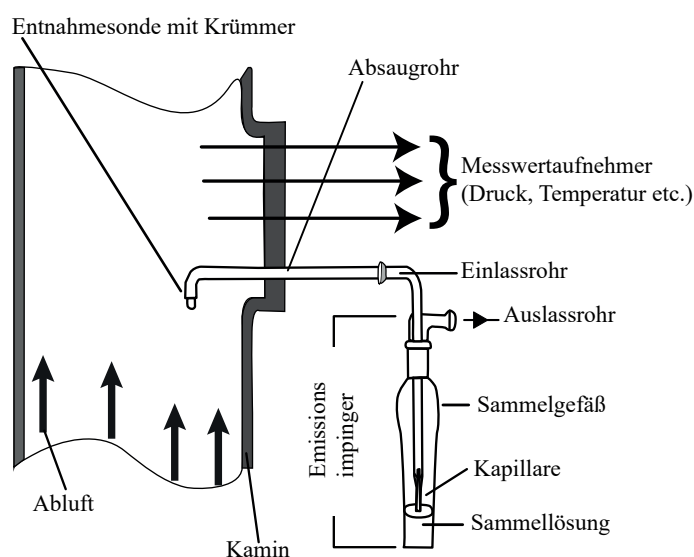


Abb. 1.4 – Out-stack-Probenahme von Bioaerosolen mit Emissionsimpinger. Die Out-Stack-Probenahmeeinrichtung dient zur aktiven Probenahme von Bioaerosolen aus Abluftkaminen von Tierhaltungsanlagen gemäß VDI- 4257-2 2011. Die Probenahme ist die Voraussetzung zur Gewinnung einer Probe zum Nachweis von Schimmelpilzen, Bakterien und zur Bestimmung der Gesamtzellzahl nach VDI-4253-2, VDI-4253-3 und VDI-4253-4.

Im Gegensatz dazu beschreibt die VDI 4253 Blatt 4 ein Verfahren zur Quantifizierung von Mikroorganismen durch Zählung von DNA-haltigen Strukturen (DNA, Deoxyribonucleic acid). Diese werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) eingefärbt und unter dem Mikroskop gezählt (VDI-4253-4, 2013). Zwar benötigt dieses Verfahren keinen Kultivierungsschritt, hat aber den Nachteil, dass der Fluoreszenzfarbstoff nicht sehr selektiv ist und keine Differenzierung von Mikroorganismen durchgeführt werden kann. Des Weiteren muss der Anwender grundsätzlich in der Lage sein, luftgetragene biogene Partikel wie Bakterien, Sporen, Hyphen, Pollen oder Pflanzenhaare (Trichome) anhand von morphologischen Kriterien zu unterscheiden (VDI-4253-4, 2013).

Durch die Anwendung von standardisierten Probenahmen- und Analyseverfahren können u. a. Emissionsprofile erstellt und anlagenbezogene Messparameter für die Tierhaltung abgeleitet werden. Die Auswahl der Messparameter richtet sich nach den Emissionen der zu beurteilenden Anlage und nach der Fragestellung der Messungen.

In der Richtlinie VDI 4250 Blatt 1 wird festgelegt, dass grundsätzlich die Messparameter kultivierbare Gesamtbakterienzahl ($36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), kultivierbare Gesamtpilzzahl ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) sowie die jeweiligen Leitkomponenten bei einer Messung erfasst werden sollen (VDI-4250-1, 2014). Als Leitparameter werden die Bioaerosolbestandteile bezeichnet, die für die Emission aus einer Anlage charakteristisch und mit derzeit zur Verfügung stehenden Probenahme- und Analysenmethoden nachweisbar sind (VDI-4255-3, 2016). Zu beachten ist, dass man sich dabei auf eine begrenzte Auswahl an Mikroorganismen konzentriert, um den Messaufwand zu begrenzen. Zur Bewertung der Immission von Tierhaltungsanlagen wird außerdem die Hintergrundkonzentration herangezogen. Die Hintergrundkonzentration ist die Bioaerosol-Konzentration, die ohne die Existenz der zu betrachtenden Anlage vorhanden ist (VDI-4250-1, 2014). Im Bereich der Geflügelhaltung werden in der VDI-Richtlinie 4255 Blatt 3 Konventionswerte für Emissionsfaktoren für die Leitparameter Staphylokokken und Enterokokken festgelegt (VDI-4255-3, 2016). In der Richtlinie VDI 4255 Blatt 2 werden mittlere Emissionsraten für

Gesamtbakterien ($GKZ/(GV \cdot h)$, GKZ = Gesamtkeimzahl, GV = Großvieheinheit und h = Stunde), Parameter zur Untersuchung von Emissionen und mittlere Bioaerosol-Konzentrationen in Tierställen aufgeführt (KBE/m^3 , KBE = Koloniebildende Einheit) (VDI-4255-2, 2019).

Trotz dieser Informationslage und weil aus medizinischen Gründen keine Wirkungsschwelle festgelegt werden kann, gibt es derzeit keine gesetzlichen Grenzwerte für Bestandteile des Bioaerosols. Es besteht ein Prüfauftrag, da Tierhaltungsanlagen in Abhängigkeit vom Tierbesatz nach dem Bundes-Immissionsschutzgesetz (BImSchG) zu genehmigen und zu überwachen sind (BImSchG, 2020). Der Prüfauftrag wird in der TA Luft unter der Nummer 5.4.7.1 erteilt „Die Möglichkeiten, die Emissionen an Keimen und Endotoxinen durch den Stand der Technik entsprechende Maßnahmen zu vermindern, sind zu prüfen“ (Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft – TA Luft 2002).

Neben den bisher vorgestellten standardisierten Analyseverfahren, werden unter anderem noch Verfahren in Erprobung wie PCR (Polymerase-Kettenreaktion) Techniken, Durchflusszytometrie und massenspektroskopische Methoden eingesetzt (Ghosh et al., 2015).

In dieser Arbeit sollen aber zwei Verfahren im Mittelpunkt stehen, die eine direkte Analyse von Bioaerosolen ermöglichen: die Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) und eine massenspektroskopische Methode: MALDI-TOF-MS (Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation Time-of-Flight Massenspektrometrie). Beide Verfahren bieten den Vorteil, Proben schnell und unkompliziert ohne Kultivierungsschritt zu analysieren. Des Weiteren ist die NIRS eine nicht-invasive Methode, sodass die Probe für weitere Analysen zur Verfügung steht. Diese Ausgangssituation und die Vorteile beider Methoden sind der Grundstein dieser Arbeit, mit dem Ziel, Bioaerosol-Emissionen mit beiden Methoden kultivierungsunabhängig messen und analysieren zu können. Im Kapitel 3 werden die beiden Messtechniken vorgestellt.

2 Zielsetzung

Die Abluft von industriellen Tierhaltungsanlagen ist mit Bioaerosolen belastet, und es ist notwendig, diese zu bewerten, um Schutzmaßnahmen ergreifen sowie mögliche Gesundheitsgefährdungen vermindern zu können. Gängige Analyseverfahren, die auf Kultivierungen basieren, sind zeitintensiv und man benötigt zusätzlich für die Anwendung molekularbiologischer Methoden gut geschultes Personal.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, zwei neue Methoden zu entwickeln, um schnell und einfach zusätzliche Informationen über Emissionen aus Tierhaltungsanlagen zu messen und zu bewerten: eine für die Analyse der bakteriellen Fraktion des Bioaerosols, eine für die Analyse des gesamten Bioaerosols.

Für die Analyse der bakteriellen Fraktion bietet sich die MALDI-TOF-MS Methode an. Damit sollen mikrobielle Proben ohne Kultivierungen gemessen und anhand von Daten aus Reinkulturen identifiziert werden. Allerdings wurde das bisher nur für klinische Proben beschrieben. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, ein Aufarbeitungs- sowie Probenpräparationsverfahren zu entwickeln, um die bakterielle Fraktion in Bioaerosol-Emissionen aus Impingerprobennahmen direkt mit der MALDI-Methode messen zu können. Außerdem müssen Messparameter definiert und Referenzspektren aufgenommen werden. Schließlich muss noch der Nachweis erbracht werden, dass unbekannte Spektren mit Hilfe der Referenzspektren ausgewertet werden können. Viren, Pilze und Endotoxine können auch Bestandteile von Bioaerosolen sein, von denen MALDI-Spektren aufgenommen werden können. In dieser Arbeit wurde gezielt die bakteriellen Bestandteile untersucht.

Bei der zweiten Methode soll das gesamte Bioaerosol untersucht werden. Dazu eignet sich die NIRS-Methode, mit der schnell, einfach und zerstörungsfrei Spektren aufgenommen werden können, etwa mit einem direktanzeigenden Messgerät. Auch hier wurde die Methode noch nicht im Bereich der Luftanalyse von

Tierhaltungsanlagen eingesetzt. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, zunächst einmal den Nachweis zu führen, dass die NIRS-Methode für diese Fragestellung einsetzbar ist (proof of principle). Die Herausforderung besteht vor allem in der Analyse der Spektraldaten, da die Veränderungen im Bioaerosol sich nur in Änderungen spektraler Strukturen (fingerprints) widerspiegeln. Daher ist es das vordringliche Ziel, geeignete Methoden der Datenaufbereitung und Chemometrie zu finden, um Veränderungen im Bioaerosol eines ausgewählten Probenpools nachzuweisen.

3 Verwendete Methoden

3.1 NIR-Spektroskopie

Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die Grundlagen und Anwendungen der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS), die für diese Arbeit wichtig sind. Das nahe Infrarot hat W. Herschel bereits im Jahr 1800 entdeckt und beschrieben (Herschel, 1800a, b, c). Herschel hat durch ein einfaches Experiment mit einem Prisma und einem Thermometer gezeigt, dass die Temperatur der dispergierten Strahlung in Richtung des roten Teils ansteigt und direkt hinter dem sichtbaren Bereich die Temperatur ihr Maximum erreicht (siehe Abb. 3.1).

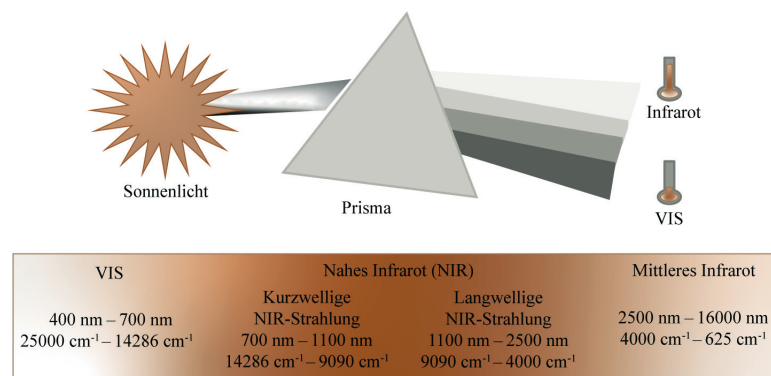


Abb. 3.1 – Elektromagnetisches Spektrum.

Oben: Dispersion von polychromatischem Licht in seine Bestandteile unter Verwendung eines Prismas. In Richtung des höheren Wellenlängenbereichs des sichtbaren Spektrums und in Richtung des NIR-Bereichs steigt die Temperatur der Strahlung an.

Unten: Der NIR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums in Bezug auf den sichtbaren (visible, VIS) und den Bereich des mittleren Infrarots (MIR) (Swarbrick, 2016).

Diese nicht sichtbare Strahlung wird nach dem lateinischen Wort “infra”, was unterhalb bedeutet, als Infrarot (IR) bezeichnet. Die infrarote Strahlung befindet sich im elektromagnetischen Spektrum zwischen dem sichtbaren Bereich und dem Mikrowellenbereich und wird anhand ihrer Energie in drei Bereiche unterteilt (Abb. 3.1): das Nah-Infrarot (NIR, $14\,286\text{ cm}^{-1}$ – $4\,000\text{ cm}^{-1}$), das Mittelinfrarot (MIR, $4\,000\text{ cm}^{-1}$ – 625 cm^{-1}) und das Ferninfrarot (625 cm^{-1} – 90 cm^{-1}). Da die Ergebnisse der NIR-Spektroskopie meist nicht direkt, sondern nur mit statistischen Methoden ausgewertet werden können, ist sie erst ab den 1980er Jahren verstärkt zum Einsatz gekommen. Heute wird die NIR-Strahlung vor allem in den Bereichen der Landwirtschaft, Nahrungsmittelproduktion, Medizin sowie in der chemischen, pharmazeutischen und Textilindustrie, in der Qualitätskontrolle und Prozesskontrolle angewendet.

3.1.1 Grundlagen der NIR-Spektroskopie

Das Prinzip bei den Absorptionsmethoden liegt darin, dass elektromagnetische Strahlung mit unterschiedlicher Energie in Wechselwirkung mit Molekülen oder Atomen tritt. Während bei der IR-Strahlung (200 cm^{-1} – $4\,000\text{ cm}^{-1}$) in erster Linie Moleküle oder einzelne Bindungen aus ihrem Schwingungsgrundzustand in den ersten angeregten Zustand wechseln, werden bei der höher energetischen NIR-Strahlung überwiegend Oberton- und Kombinationsschwingungen angeregt. In der NIR-Spektroskopie sind kaum Elektronenübergänge zu beobachten. Die NIR-Banden organischer Stoffe stammen vornehmlich von Molekülgruppen, die ein Wasserstoffatom und ein schwereres Atom über eine chemische Bindung wie z. B. C–H, N–H oder Wasserstoffbrücken miteinander verknüpfen.

Das Übergangsdipolmoment μ_{EA} beschreibt die Änderung der Ladungsverteilung durch den Übergang von einem Grundzustand (Wellenfunktion ψ_{A}) in einen angeregten Zustand (Wellenfunktion ψ_{E}). Die nachfolgende Gleichung definiert μ_{EA} , wobei e die Elementarladung ist, r die Ortsvektoren der Elektronen und die Integration über das Raumelement d_{τ} aller Elektron- und Kernkoordinaten erfolgt.

$$\mu_{\text{EA}} = -e \int \psi_{\text{E}}^* r \psi_{\text{A}} d_{\tau} \quad (1)$$

Die messbare Intensität dieses Übergangs ist proportional dem Quadrat des Übergangsdipolmomentes ($I \sim |\mu_{\text{EA}}|^2$) und liefert nur einen Betrag zum Spektrum, wenn $|\mu_{\text{EA}}|^2 \neq 0$. Dies ermöglicht es, Übergänge zwischen Zuständen in Auswahlregeln als “verboten” zu klassifizieren, wenn das zugehörige Übergangsdipolmoment gleich null ist (Atkins, 1987). Für die Schwingungsspektroskopie hat das die Konsequenz, dass die Anregung z. B. von Obertönen in der NIR-Spektroskopie nur mit geringen Intensitäten verbunden ist (Bokobza, 1998; Siesler et al., 2002; Workman und Weyer, 2008).

Zunächst muss man sich klar machen, dass die meisten Moleküle und Moleküleinheiten sich in ihrem Schwingungsgrundzustand befinden. Dieser kann gut mit dem harmonischen Oszillator beschrieben werden, weshalb dessen Auswahlregeln für die Schwingungsspektroskopie wichtig sind. Beim harmonischen Oszillator haben die Schwingungszustände die Energien

$$E_v = h c \nu (v + 1/2) \quad (2)$$

mit dem Planck’schen Wirkungsquantum h , der Lichtgeschwindigkeit c , der Wellenzahl der Schwingung ν und der Schwingungsquantenzahl $v = \{0, 1, 2, \dots\}$. Der Grundzustand, in dem sich die meisten Moleküle bei Raumtemperatur befinden, hat die Schwingungsquantenzahl $v = 0$. Setzt man in Gleichung (1) Wellenfunktionen des harmonischen Oszillators ein, ist $|\mu_{\text{EA}}|^2$ nur dann ungleich null, wenn sich die Schwingungsquantenzahl um genau eins ändert. Es gilt also die Auswahlregel $\Delta v = \pm 1$. Daher sind die Übergänge vom vornehmlich besetzten Grundzustand $E_{v=0}$ zum ersten angeregten Zustand $E_{v=1}$ in der MIR-Spektroskopie gut zu beobachten. In der NIR-Spektroskopie sind aber die höherenergetischen Obertonanregungen von $E_{v=0}$ zu $E_{v>1}$ im harmonischen Oszillator quantenmechanisch „verboten“: Ihr Übergangsdipolmoment ist null. Sie sind nur deswegen zu beobachten, weil die tatsächlichen Schwingungszustände anharmonischen Oszillatoren entsprechen. Da der harmonische Oszillator aber für $v = 0$ eine gute Näherung ist, sind die Obertonschwingungen im NIR nur mit einer geringen Intensität zu beobachten.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist eine niedrige Intensität I bei gleicher Konzentration c und Pfadlänge d verbunden mit einem geringen molaren Extinktionskoeffizienten ε_λ

$$\ln(I/I_0) = -\varepsilon_\lambda c d \quad (3)$$

wobei λ die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes mit der Intensität I_0 ist. Daher machen die Überlegungen zu den Auswahlregeln es plausibel, dass es im Bereich der Obertonschwingungen einen Bereich mit niedrigem ε_λ gibt, wie es in Abb. 3.2 zu sehen ist. In diesem Bereich kann dem niedrigen ε_λ dadurch entgegengewirkt werden, dass die Pfadlänge d erhöht wird. Dies geht bei Messungen in Transmission durch Vergrößern der Küvette von flüssigen Proben bis 30 mm (Swarbrick, 2016).

Bei opaken Feststoffproben, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurden, ist nur eine Messung in Reflexion möglich ($9\,090\text{ cm}^{-1}$ – $4\,000\text{ cm}^{-1}$, Abb. 3.2). Hier kann je nach Packung auf dem Filter die Pfadlänge stark variieren, obwohl die NIR-Strahlung wegen ihrer hohen Energie vergleichsweise tief in die Probe eindringen kann. Bei Reflexionsmessungen ist die Pfadlänge aber meist nicht lang genug, um bei hohen Energien aussagekräftige Spektren zu erzeugen. Daher ist bei NIR-Spektren in Reflexion bei hohen Energien oft kaum spektrale Information vorhanden und bei niedrigen Energien ein (oft quadratischer) Anstieg der Grundlinie durch den Anstieg des Extinktionskoeffizienten ε_λ zu sehen, wie er in Abb. 3.2 schematisch dargestellt ist.

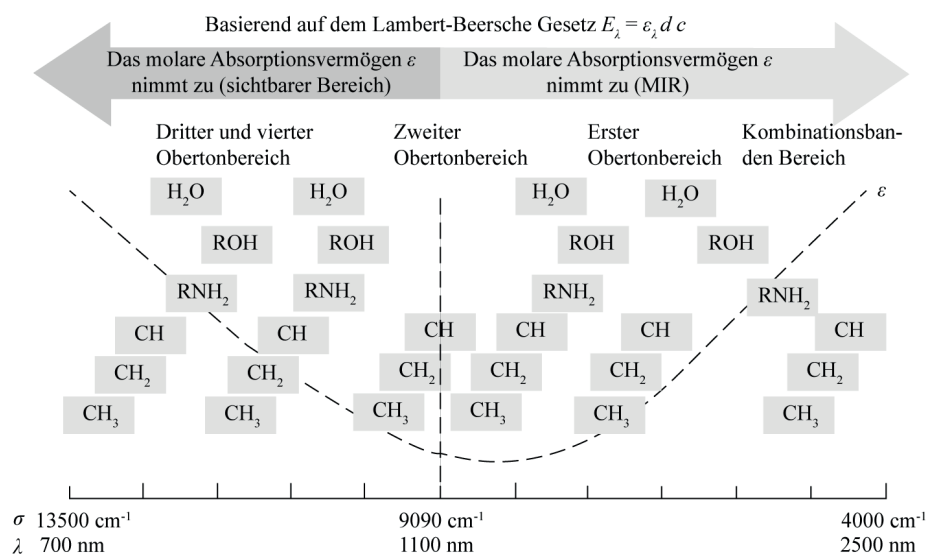


Abb. 3.2– Übersicht über die Anregungseigenschaften der NIR-Strahlung. Darstellung des Auftretens von Oberton- und Kombinationsschwingungen im NIR-Spektrum, sowie Wellenlängen bzw. Wellenzahlbereiche der Anregung bestimmter Molekülgruppen (Swarbrick, 2016).

Die große Anzahl von möglichen Schwingungen führt zu sehr komplexen Spektren, die meist mit chemometrischen Methoden ausgewertet werden. Dem Nachteil komplexer Spektren steht der Vorteil gegenüber, dass durch die hohe Energie der Strahlung die Eindringtiefen groß genug sind, um in der Praxis nicht-invasiv Proben untersuchen zu können. Da auch die Auswertung vor Ort stattfinden kann, ist die Methode schnell und einfach einsetzbar (Norris et al., 1989). Wie bereits gesagt, ist die Lichtabsorption im NIR meist recht gering, da vor allem quantenmechanisch “verbotene” Übergänge zwischen verschiedenen Schwingungszuständen angeregt werden. Daher können viele Proben ohne Probenvorbereitung, unverdünnt gemessen werden (Blanco et al., 1998). Die Messung von Feststoffen, Flüssigkeiten und Gasen ist möglich.

Die Literatur zeigt, dass die NIR-Spektroskopie in vielen Bereichen als Monitoring Werkzeug eingesetzt wird: in der Medizin zur Überwachung von Patientenparameter (Fouad et al., 2018), in der Lebensmittelindustrie zur Überwachung der Qualität

bzw. von Herstellungsprozessen (Grassi und Alamprese, 2018), in der Biotechnologie (Nomikos und MacGregor, 1994) sowie in der Pharmazie (Hattori et al., 2018). Auch eine direkte Messung von Luftpartikeln ist möglich. In dem Review Artikel von Marti Philip von 2002 wird eine NIR-Anwendung beschrieben, mit der die CO und CO₂ Konzentration in Abgasen von fahrenden Autos direkt bestimmt werden kann (Philip A., 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass online die Konzentration an Methan im laufenden Betrieb einer Laborbiogasanlage bestimmt werden kann (Druckenmüller, 2010). Wenn eine direkte Messung der Luft bzw. Gase nicht möglich ist, wie in der Arbeit von Casale et al., gezeigt, kann auch indirekt eine Veränderung z. B. der Luftqualität gemessen werden (Casale et al., 2015). Es ist aber bisher noch keine NIRS Arbeit bekannt, die sich mit der direkten Messung von Emissionen aus Tierhaltungsanlagen befasst.

Der nächste Abschnitt bietet einen Überblick über die zur Erfassung von NIR-Spektren verwendeten Instrumente in dieser Arbeit.

3.1.2 Spektrometer

Spektralphotometer bestehen im Allgemeinen aus Strahlungsquelle, Spektralapparat, Detektor und Auswerteeinheit. In dieser Arbeit wurde die beaufschlagten Filterproben mit Hilfe eines Fourier-Transformations (FT)-NIR-Spektrometers Vector 22/N der Firma Bruker analysiert.

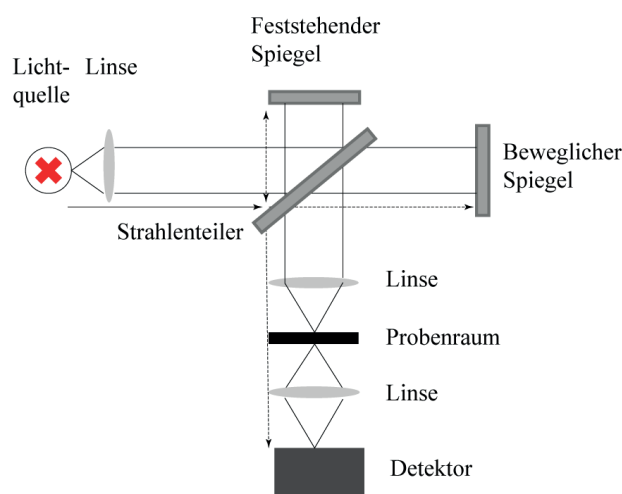


Abb. 3.4 – Michelson Interferometer.
Genereller Aufbau eines Fourier-Transformations
(FT)-Spektrometers unter Verwendung eines
Michelson Interferometers (Siesler et al., 2002).

Die Strahlungsquelle dieses Spektrometers ist eine Wolfram-Lampe, die polychromatische Strahlung im gesamten NIR-Bereich emittiert. Statt eines Spektralapparates, der monochromatisches Licht der Wellenzahl ν erzeugt, wird ein Michelson-Interferometer genutzt (siehe Abb. 3.4). Hier teilt der Strahlteiler das einfallende Licht in zwei Strahlengänge, wobei der eine durch den beweglichen Spiegel einen Gangunterschied δ gegenüber dem anderen erzeugt. Das Licht aus beiden Strahlengängen wird vereinigt, bevor es in den Probenraum geleitet wird, und interferiert je nach Gangunterschied konstruktiv oder destruktiv.

Um die Intensität mit Probe (I) zu messen, wird der vereinigte Strahl des Michelson-Interferometers auf den mit Bioaerosolen belegten Filter geleitet. Dieser befindet sich in einer Integrationskugel, die das vom Filter reflektierte Licht durch diffuse Reflexion weiter gleichmäßig in der Kugel verteilt. Der in der Kugel installierte Detektor, in diesem Fall ein hochempfindlicher PbS-Detektor, misst somit immer einen definierten Teil des gesamten reflektierten Lichtes, unabhängig von der Reflexionsrichtung. Für die Messung der Intensität ohne Probe (I_0) wird der Filter durch einen Goldspiegel ersetzt.

Als Auswerteeinheit wird ein Computer genutzt, der aus den Intensitäten in Abhängigkeit vom Gangunterschied durch Fourier-Transformation Intensitäten in Abhängigkeit von Wellenzahlen berechnet (Bell und Sanderson, 1972).

$$I(\nu) \sim \int_{-\infty}^{\infty} [I_R(\delta) - 1/2 I_R(0)] e^{-i2\pi\delta\nu} d\delta \quad (4)$$

Dabei enthält der Term in den eckigen Klammern das Interferogramm, das beschreibt, wie die resultierende Intensität $I_R(\delta)$ in Abhängigkeit von δ um die Intensität $I_R(\delta = 0)$ fluktuiert. Indem man mit Gleichung (4) einmal die Intensität mit ($I(\nu)$) und ohne ($I_0(\nu)$) Probe bestimmt, erhält man die Information für das Lambert-Beer'sche Gesetz in Gleichung (3).

3.1.3 Datenvorbehandlung und Chemometrie

3.1.3.1 Datenvorbehandlung

Bei der Datenvorbehandlung handelt es sich um die Anwendung von Algorithmen, die probeninhärente Quereinflüsse zurückdrängen (Esbensen und Swarbrick, 2018). Diese Einflüsse ändern die Absorptionswerte, obwohl sie nicht auf die chemische oder biologische Zusammensetzung der Probe zurückzuführen sind. Sie werden als additiv oder multiplikativ beschrieben, je nachdem ob sie die Grundlinie des Spektrums (additiv) verändern, oder einzelne Spektralbanden (multiplikativ) beeinflussen (Swarbrick, 2016).

Bei den Proben ist mit einem additiven, quadratischen Anstieg der Grundlinie bei den Spektren zu rechnen (Abbildung 3.2). Ein weiterer additiver Effekt ergibt sich aus der unterschiedlichen Weglänge aufgrund schwankender Packungsdichte auf dem Filter (Gleichung (3), Esbensen et al., 2018). Die schwankende Partikelgrößenverteilung kann ebenfalls zu additiven Effekten führen aber auch zu multiplikativen, wenn es zu Streulichteffekten kleinerer Partikel kommt (Swarbrick, 2016).

Da sich an die Datenvorbehandlung unterschiedliche chemometrische Analysen anschließen, wurden zwei unterschiedliche Vorbehandlungen eingesetzt: zum einen die Standard-Normal-Variate-Korrektur (SNV) mit anschließendem Detrending (DT), zum anderen die Vektornormierung mit anschließender ersten Ableitung. In beiden Fällen werden die Spektren zunächst um den Mittelwert zentriert und umskaliert (SNV; Vektornormierung). Im zweiten Schritt werden im Wesentlichen die verbleibenden Abweichungen der Grundlinie ausgeglichen (DT, erste Ableitung). Dies wird in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

Bei der SNV wird von jedem Absorptionswert einer Bande der arithmetische Mittelwert dieser Bande aus allen Spektren abgezogen. Diese Differenz wird dann durch die empirische Standardabweichung geteilt (Barnes et al., 1989). Das so transformierte Spektrum ist um den Mittelwert von Null zentriert, was einen

konstanten, additiven Effekt (Offset) ausgleichen kann. Aber auch multiplikative Effekte werden ausgeglichen, da die Absorptionswerte umskaliert werden. Die empirische Standardabweichung der transformierten Absorptionswerte beträgt 1. Beim anschließenden DT wird an die Grundlinie des durch SNV transformierten Spektrums ein Polynom der diskreten Wellenlängen des Spektrums angepasst (Methode der kleinsten Fehlerquadrate). Diese angepasste Funktion wird dann von den SNV-transformierten Spektralwerten abgezogen. Da wir nach Abb. 3.2 eine Krümmung der Grundlinie erwarten, muss in unserem Fall ein Polynom zweiten Grades angepasst werden.

Als zweite Methode wird in dieser Arbeit die Vektornormierung eingesetzt, da andere Normierungen bei verrauschten Daten unerwünschte Auswirkungen auf die nachfolgenden Analysen haben können (Rinnan et al., 2009). Bei der Vektornormierung wird, wie bei der SNV, zunächst der Mittelwert von den Absorptionswerten abgezogen. Fasst man die so transformierten Werte als Komponenten eines Vektors auf, dann werden die Absorptionswerte noch durch die Länge dieses Vektors geteilt. Als Resultat ist das transformierte Spektrum ebenso um Null zentriert wie bei der SNV. Somit werden auch hier additive Grundlinieneffekte ausgeglichen. Die multiplikativen Effekte werden auch hier ausgeglichen. Allerdings wird nicht mit der Standardabweichung umskaliert sondern mit der rechnerischen Vektorlänge. Die transformierten Werte liegen zwischen -1 und 1. Um die quadratischen, additiven Effekte ausgleichen zu können, benötigt man im zweiten Schritt eigentlich die zweite Ableitung der transformierten Signale. Da mit jeder Ableitung die Intensität und damit das S/N-Verhältnis des transformierten Signals abnimmt, kann man sich auf Segmente des Spektrums beschränken.

In dieser Arbeit ist der Bereich von $7\,500\text{ cm}^{-1}$ – $4\,000\text{ cm}^{-1}$ aussagekräftig. Zusätzlich wurde nur die erste Ableitung berücksichtigt. Zwar kann so der Effekt der Krümmung nicht ausgeglichen werden, allerdings überwiegt hier der Vorteil der stärkeren Intensitäten, die es trotz der verbliebenen additiven Quereinflüsse der nachfolgenden Faktorenanalyse erlaubt haben, die Unterschiede in den Spektren richtig zuzuordnen.

3.1.3.2 Chemometrie und multivariate Datenanalyse

Durch die Datenvorbehandlung, die im vorigen Abschnitt beschrieben ist, wird die verbleibende Information im Spektrum maßgeblich dadurch bestimmt, welche chemischen und biologischen Bestandteile in der Probe vorhanden sind. Trotz der Datenvorbehandlung ist die Information in den Spektren immer noch zufälligen Effekten unterworfen, weswegen chemometrische Methoden zum Einsatz kommen müssen.

Die Chemometrie nutzt ganz allgemein mathematische und statistische Methoden, um chemische Experimente auszuwerten und zu analysieren. Für die Analyse von NIR-Spektren wendet diese Arbeit multivariate Verfahren an, die den Zusammenhang zwischen mehreren Variablen beschreiben. Dabei wird jeder Spektralwert als Variable aufgefasst, die verschiedene Werte (Absorptionen) annehmen kann. Das ganze Spektrum einer Probe ist dann ein Objekt, das sich in jeder Variablen von den anderen Objekten unterscheiden kann.

Damit man nun mit der NIR-Spektroskopie Bioaerosole aus Emissionsproben messen und bewerten kann, muss man zunächst durch strukturentdeckende oder explorative Verfahren einen Zusammenhang zwischen einzelnen Spektralbanden und Merkmalen wie Staubmenge oder Fütterungstag herstellen. Wenn dann klar ist, welche spektrale Information auf diese Merkmale reagiert, können strukturprüfende Verfahren bei neuen Proben überwachen, ob die Staubmenge oder die Zusammensetzung sich ändert. Schließlich ist es auch möglich, durch definierte Proben die spektrale Information zur Kalibrierung zu nutzen.

In dieser Arbeit geht es in einem ersten Schritt aber nur um den Nachweis, dass mit strukturentdeckenden Verfahren Merkmale von Bioaerosol-Emissionen beschrieben werden können. Dazu werden mehrere Proben aus der Abluft von Tierhaltungsanlagen entnommen und Merkmalen wie Staubmenge und Fütterungstag zugeordnet. Die Spektren der Proben werden dann nach Datenvorbehandlung mehreren multivariaten Analysemethoden unterzogen: Principal Component Analysis (PCA),

Linear Discriminant Analysis (LDA) sowie Faktorenanalyse (FA). Dabei wird bei der PCA und FA in dieser Arbeit die Analyse rein aufgrund der Information in den Spektren vollzogen ohne Wissen um die Merkmale (unsupervised method). Der Erfolg der Analyse lässt sich zum Schluss daran ablesen, ob es anhand der aufbereiteten spektralen Information möglich ist, die Spektren den Merkmalen zuzuordnen.

Im Folgenden wird zunächst die PCA beschrieben und dann die FA. Beide Methoden sind so eng miteinander verwandt, dass sie zum Teil als zwei verschiedene Ansätze ein und derselben Methode beschrieben werden (Backhaus et al. 2015). Die LDA wird benutzt, um die Ergebnisse der PCA zu verbessern und wird zum Schluss beschrieben. Allen Methoden gemeinsam ist, dass sie aus den alten spektralen Variablen durch Linearkombination neue Variablen bilden. Die Linearkoeffizienten der alten Variablen in den neuen werden oft „loadings“ genannt, da sie das Gewicht der alten Variablen für die jeweilige neue Variable beschreiben. Die Absorptionswerte in den neuen Variablen hingegen heißen auch „score“, weil sie beschreiben, was das Spektrum in der neuen Variablen erzielt.

Varianz

Dabei ist die Varianz der Spektren das Kriterium, um diese neuen Linearkombinationen zu bilden. Sie wird als Maß der spektralen Information angesehen. Je mehr Varianz eine Linearkombination beschreibt, desto höher ist ihr Informationsgehalt. Das ermöglicht es, die Linearkombinationen zu vernachlässigen, die kaum zur Varianz beitragen. Somit kann man die Anzahl der Variablen verringern, ohne (zu viel) spektrale Information zu verlieren.

Um die Varianz zu bestimmen fasst man jedes der n Spektren (Objekte) als einen Vektor $\vec{X}_k = (X_{k,1} \dots X_{k,i} \dots X_{k,m})'$ auf. Dieser Vektor wird in einem m -dimensionalen Vektorraum dargestellt mit den m Spektralwerten als Achsen. Die Komponenten $X_{k,i}$ der Vektoren sind die (vorbehandelten) Absorptionswerte.

Man kann die n Spektren als Stichprobe auffassen, die den Zufallsvektor $\vec{X}$ beschreibt. Jedes Spektrum ist eine zufällige Realisierung von $\vec{X}$. Aus dieser Stichprobe lässt sich der Schätzer der Varianz von $\vec{X}$, nämlich die Varianz-Kovarianz-Matrix, $\hat{\mathbf{R}}$ berechnen.

$$\hat{R}_{ii} = 1/n-1 \sum_{k=1}^{k=n} (X_{k,i} - \bar{X})^2 \quad (5)$$

$$\hat{R}_{ij} = 1/n-1 \sum_{k=1}^{k=n} (X_{k,i} - \bar{X}_i)(X_{k,j} - \bar{X}_j)$$

Dabei sind die Diagonalelemente $\hat{R}_{ii}$ die empirischen Varianzen der Spektralbande X_i für die Stichprobe der n Spektren und $\hat{R}_{ij}$ ist die analoge Formel für die Kovarianz zwischen zwei Spektralwerten (Backhaus et al., 2015). Da die Matrix $\hat{\mathbf{R}}$ symmetrisch und reell ist, lassen sich ihre Eigenwerte λ_q und Eigenvektoren $\vec{A}_q = (a_{1q}, \dots, a_{mq})'$ aus der Eigenwertgleichung bestimmen:

$$\mathbf{A}' \hat{\mathbf{R}} \mathbf{A} = \vec{\lambda} \mathbf{I} \quad (6)$$

Die $\vec{A}_q$ bilden die Spalten der Matrix $\mathbf{A}$. Der Vektor der Eigenwerte ist $\vec{\lambda} = (\lambda_1, \dots, \lambda_m)'$, und $\mathbf{I}$ ist die Einheitsmatrix. Zu jedem $\vec{A}_q$ gehört der Eigenwert λ_q , der die Varianz von $\vec{A}_q$ ist. Für kleine m lassen sich die a_{iq} durch das Lösen von linearen Gleichungssystemen bestimmen (Backhaus et al., 2015). Für größere m gibt es iterative Verfahren für die numerische Lösung von Gleichung (6).

Principal Component Analysis (PCA)

An diesem Punkt setzt die PCA an. Die $\vec{A}_q$ mit den größten Eigenwerten sind die gesuchten „Principal Components“. Die a_{iq} sind die dazu gehörenden „loadings“, und die Eigenwerte λ_q sind die Varianzen der Komponenten $\vec{A}_q$. Die „scores“ ergeben sich wieder als Summen der a_{iq} und $X_{k,i}$ (Backhaus et al., 2015). Wenn man alle Komponenten behält, entspricht die PCA also nur einer Drehung des Koordinatensystems von dem m Spektralbanden als Achsen zu den m orthogonalen Hauptkomponenten.

Entlang der Hauptkomponenten mit den größten Eigenwerten ist die Varianz der Spektren der Stichprobe und damit die spektrale Information am größten. Da die meisten Hauptkomponenten oft nur sehr geringe Eigenwerte haben, kann man die Analyse vereinfachen, indem man diese Hauptkomponenten vernachlässigt, wobei der Verlust an spektraler Information (Varianz) gering ist.

Dabei bleibt das Problem der Interpretation der $\vec{A}_q$. Denn es ist a priori nicht klar, ob die Varianz, die durch $\vec{A}_q$ beschrieben wird, durch ein einzelnes Merkmal wie Staubmenge, durch eine Kombination von Merkmalen, durch einen unbekannten, zufälligen Effekt (Messunsicherheit) oder durch eine Kombination aus all diesen Effekten hervorgerufen wird.

Faktorenanalyse (FA)

Die FA geht davon aus, dass es ein lineares Modell gibt, das die beobachteten Variablen $X_{k,i}$ beschreibt. Durch diese Modellannahme unterscheidet sich die FA von der PCA. Das Modell sieht explizit eine rein zufällige, unkorrelierte Komponente ε vor, die auf jeden Absorptionswert einwirkt. Da es sich um ein lineares Modell handelt, wird die Varianz der Spektren im Wesentlichen wieder durch die Varianz-Kovarianz-Matrix aus Gleichung (5) beschrieben. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die Varianz von ε zu den Diagonalelementen addiert werden muss. Mit dieser Änderung ist $\hat{\mathbf{R}}$ aus Gleichung (5) auch der Ausgangspunkt der FA.

Theoretisch ist es möglich, durch die Modellannahme Vorwissen in die Analyse einzubringen, sowohl was die Art als auch die Anzahl der Faktoren betrifft und den Einfluss von ε . Davon wird in dieser Arbeit aber kein Gebrauch gemacht. Es wird, wann immer es nötig ist, nur auf Informationen des Datensatzes selbst zurückgegriffen. Das betrifft auch die Varianz von ε , die man zum Beispiel aus den größten Nicht-Diagonalelementen einer Spalte oder Zeile schätzen kann (Backhaus et al., 2015).

Im nächsten Schritt werden analog zu Gleichung (6) Eigenvektoren und Eigenwerte der modifizierten Matrix $\hat{\mathbf{R}}$ bestimmt. Die Eigenvektoren heißen nun Faktoren, deren Anzahl, wieder anhand ihrer Eigenwerte verringert werden, falls das nicht

schon im Modell geschehen ist. In der FA wird in einem nächsten Schritt zumeist das Koordinatensystem der Eigenvektoren noch gedreht, um die Beschreibung zu verbessern. Denselben Zweck verfolgt die LDA im Anschluss an eine PCA, was im nächsten Abschnitt beschrieben wird. Im Rahmen dieser Arbeit ist aber mit der Bestimmung der Faktoren die explorative Analyse abgeschlossen.

(PCA-) Linear Discriminant Analysis (LDA)

Die LDA verfolgt das Ziel, Daten anhand einer Diskriminanzfunktion Y aufzuteilen, die zu verschiedenen Gruppen (eines Merkmals) gehören. Um die Gruppen aufzuteilen, müssen die Merkmale bekannt sein. Die LDA ist also ein Verfahren, das auf Vorkenntnissen beruht (supervised method). Sie erstellt mit diesem Wissen Y , die eine Linearkombination aus den Hauptkomponenten der PCA ist, sodass die Y -Werte für jede Gruppe möglichst eng zusammenliegen, und dass die Y -Werte der unterschiedlichen Gruppen möglichst weit auseinanderliegen.

Mathematisch muss man dazu das Diskriminanzkriterium Γ maximieren. So ist Γ eine Funktion, die umso größer wird, je enger die Y -Werte innerhalb der Gruppen zusammenliegen, und je weiter die Mittelwerte der Gruppen auseinander liegen. Maximieren von Γ bedeutet, dass die Ableitung von Γ nach den Linearkoeffizienten von Y gleich null sein muss. Diese Bedingung lässt sich wieder in eine Eigenwertgleichung überführen, die die Linearkoeffizienten von Y bestimmt. Die Eigenvektoren mit den größten Eigenwerten sind die gesuchten LDA-Komponenten.

Vorgehen in dieser Arbeit

In dieser Arbeit wird zunächst ein Datensatz von Spektren untersucht, die von Messungen stammen, die sich in bestimmten Merkmalen unterscheiden, zum Beispiel im Fütterungstag eines Mastzyklus oder im Vorhandensein einer Filteranlage. Es ist das Ziel, eine chemometrische Methode mit dazu passender Datenvorbehandlung zu finden, die diese Merkmale auflöst. Das heißt, dass die „scores“ für jedes Merkmal im Koordinatensystem der Hauptkomponenten, Faktoren und LDA-Komponenten rein optisch nah beieinander liegen sollen.

Da nicht auf kausale Zusammenhänge zurückgegriffen wird (unsupervised method) soll noch ausgeschlossen werden, dass es sich bei einer erfolgreichen Trennung um ein Artefakt der Methode handelt. Daher soll für dieselbe Stichprobe die Analyse mit unterschiedlichen Methoden erfolgen. Die Auswahl der Methoden erfolgt rein heuristisch (Versuch und Irrtum).

Die Spektren werden zunächst unterschiedlichen Datenvorbehandlungen unterworfen, wobei die SNV mit anschließendem DT für die PCA/LDA am besten gewesen ist, und die Vektornormierung mit erster Ableitung für die FA. Dann wird die (modifizierte) Varianz-Kovarianz-Matrix gebildet (Gleichung (5)) und die Eigenwertgleichung gelöst (Gleichung (6)). Damit erhält man die Eigenvektoren mit den größten Eigenwerten. Sollten sich die „scores“ für einen Eigenvektor für ein Merkmal (z.B. Filteranlage vorhanden ja/nein) rein optisch hinreichend voneinander unterscheiden, dann geht diese Arbeit davon aus, dass der Eigenvektor mit diesem Merkmal assoziiert ist.

3.1.4 NIRS in der Anwendung

Mit der Nahinfrarotspektroskopie und der richtigen Datenaufarbeitung (multivariate Datenanalyse) ist man in der Lage komplexe und unbekannte Systeme auf bestimmte Eigenschaften (physikalisch, chemisch oder biologisch) qualitativ und quantitativ hin zu untersuchen. Veränderungen in Prozessen können so auf verschiedenen Ebenen schnell sichtbar gemacht werden, ohne aufwendige Analysen und Messtechnik einsetzen zu müssen. Die größten Vorteile liegen in der Schnelligkeit der Analyse, ihrer Genauigkeit, der geringen bis keiner Probenvorbereitung, berührungsloser/nicht destruktiver Ansatz, Fernbetrieb über kleine und flexible faseroptische Sonden, berührungslose Analyse verschiedener Proben sowie die Aufnahme von Fingerprints zur qualitativen Überwachung aber auch zur Quantifizierung von bestimmten Spezies. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aufgrund der Anregung der wesentlich schwächeren Oberton Schwingungen, es können Proben mit einem großem Probenvolumen gemessen werden.

Aufgrund dieser beschriebenen Eigenschaften ist die NIRS eine Sensoriklösung, die Qualitätskontrolle und -sicherung in Echtzeit ermöglicht. Firmen verschiedenster Branchen nutzen die NIRS, um z. B. eine gleichbleibende Produktqualität zu garantieren. Daher ist es nicht verwunderlich, dass in verschiedenen Review Artikeln publiziert wird, dass die NIR-Spektroskopie "wie für die Prozessanalytik geschaffen ist" (De Bleye et al., 2012; Grassi and Alamprese, 2018).

Es bleibt festzuhalten, dass trotz all dieser Vorteile ein Hürde im Übergang vom Forschungsansatz in die praktische Anwendung liegt. Auch in dieser Arbeit wird aufgezeigt, dass die NIRS ein aussichtsreiches analytisches Verfahren ist, um Bioaerosol-Emissionen zu charakterisieren. Es bleibt allerdings weiterer Forschung vorbehalten, kausale Zusammenhänge zwischen Merkmalen der Emission aus Tierhaltungsanlagen und den NIR-Spektren zu zeigen, um eine valide Methode für die Praxis zu erarbeiten.

Wie in Kapitel 1 beschrieben, stellt die Messung Bioaerosolen eine Herausforderung da. Aufgrund der aufwendigen Probenahme ist eine zeitnahe Analyse der Proben wünschenswert, um schnell einen Einblick in die Emissionsqualität zu erhalten. Zwar gibt es derzeit keine gesetzlichen Grenzwerte für Bestandteile des Bioaerosols, doch können Betreiber von Tierhaltungsanlagen Kenndaten von Herstellern von Luftreinhaltungsanlagen nutzen, um die Arbeit solcher Filteranlagen bewerten zu können (z. B. über die Anzeige des Volumenstroms einer Filteranlage). Dies ist sehr hilfreich, doch sagt dies nur bedingt etwas über die Luftqualität aus. Die NIRS bietet als Methode diese Möglichkeit, wesentlich Merkmale von (Bioaerosol)-Emissionen zu beschreiben.

In den nachfolgenden Kapiteln wird die NIRS in der Prozessüberwachung vorgestellt sowie deren Eignung als Überwachungstool in der Luftreinhaltung. Des Weiteren wird sie als Methode der Mikroorganismenidentifizierung dargestellt, da der Ausstoß von biogenen Bestandteilen in der Tiermast eine Rolle spielt (siehe Kapitel 1.1).

3.1.4.1 NIRS in der Prozessüberwachung

Wie bereits festgestellt, liegen die Vorteile der NIRS gegenüber anderen spektroskopischen Verfahren in ihrer nicht-invasiven und nicht-destruktiven Arbeitsweise, die Möglichkeit der Messung von Feststoffen, Flüssigkeiten, Gasen, dies meist ohne Probenvorbereitung, sowie die Möglichkeit der In-, On- oder At-Line Messung (Fulgêncio et al., 2022; Kröncke and Benning, 2022; Weishaupt et al., 2022). Dieses große Anwendungsfeld hat vor allem die Branche der Landwirtschaft für sich genutzt, um landwirtschaftliche Produkte vor Ort analysieren zu können (Ben-Gera and Norris, 1968; McBratney et al., 2005; Shenk and Westerhaus, 1991). Die Pharmaindustrie, eine Branche mit starker Qualitätskontrolle, verwendet die NIRS verstärkt seit der Einführung des Process Analytical Technology-Programms durch die US-Behörde Food and Drug Administration (Blanco et al., 2010; Wang et al., 2010).

Neben den genannten Branchen hat die NIRS in den letzten Jahrzehnten auch in weiteren Bereichen der Industrie Einzug gehalten: Recycling, Medizin oder in der chemischen Industrie (Adedipe et al., 2016; Chen et al., 2013; Gallello et al., 2016; Galvez-Sola et al., 2010; Zhang and Su, 2014).

3.1.4.2 NIRS und Luftqualität

Das Potenzial mit der NIRS industrielle und städtische Luftschadstoffe nachzuweisen, wurde bereits durch verschiedene Arbeiten gezeigt. So stellte die Arbeitsgruppe von Malaspina dar, dass über die Messung von Flechten eine Aussage über die Luftverschmutzung gegeben werden kann (Casale et al., 2015). Brackx et al. konnten über VIS-NIR-Reflexionsspektren von Blättern eine Abschätzung über die Luftqualität machen (Brackx et al., 2017). Die Arbeit von Gäb et al. und Nieren et al. zeigte, dass mit der NIRS die Wirkung toxischer Effekte von Luftverschmutzungen bzw. Ozon auf Bäumen sichtbar gemacht werden kann (Gäb et al., 2006; Nieren et al., 2008).

3.1.4.3 NIRS und Mikroorganismen

Die Arbeiten von Gärtner et al. und Martin et al. belegen, dass Mikroorganismen ein integraler Bestandteil von Emissionen aus Tierhaltungsanlagen sind (Gärtner et al., 2016; Gärtner et al., 2009; Gärtner et al., 2014a; Gärtner et al., 2011; Gärtner et al., 2014b, c; Martin et al., 2012). Aus diesem Grund werden in den einschlägigen VDI-Richtlinien Messgrößen und Leitparameter für Mikroorganismen vorgeschlagen (siehe Kapitel 1.1.2).

In dieser Arbeit werden Banden in Bereichen gemessen, die von Bakterien stammen können (siehe Kapitel 3.2). Diese Annahme basiert darauf, dass ähnliche Banden von der Arbeitsgruppe um Calvey beobachtet werden konnten. Sie zeigten mit ihrer Arbeit, dass mit der NIRS eine Bakterienkontamination detektiert und Bakterienspezies identifiziert werden können (Rodriguez-Saona et al., 2001).

In unzähligen weiteren Arbeiten wird gezeigt, dass mit der NIRS Mikroorganismen nicht nur identifiziert sondern auch quantifiziert werden können (Quintelas et al., 2015; Rodriguez-Saona et al., 2001; Rodriguez-Saona et al., 2004; Suthiluk et al., 2008; Tian et al., 2021). Daher kann es nur als sinnvoll erachtet werden, zu prüfen, ob eine quantitative und qualitative Methode für Bioaerosol-Emissionen auf Bakterien erarbeitet werden kann.

3.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

3.2.1 Grundlagen der MALDI-TOF Massenspektrometrie

In der Massenspektrometrie (MS) stellt die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI), in Verbindung mit einem Time-of-Flight (TOF) Massenanalysator, ein wichtiges analytisches Werkzeug im Bereich der mikrobiologischen, medizinischen und Polymerforschung dar. Die MALDI eignet sich vornehmlich für die Ionisation großer Biomoleküle bis zu einer Masse von 500 kDa, ohne dass diese dabei fragmentieren. Sie wird zu den sanften Ionisationsmethoden gezählt. In Abbildung 3.5 werden verschiedene Ionisationsverfahren nach ihrer Ionisationshärte und der Größe des durch den Prozess erfassbaren Analyten gegeneinander aufgetragen. Wie in der Abbildung zu sehen ist, können mit der MALDI-Methode, neben der Elektrosprayionisation (ESI), große intakte Makromoleküle ionisiert und somit gemessen werden.

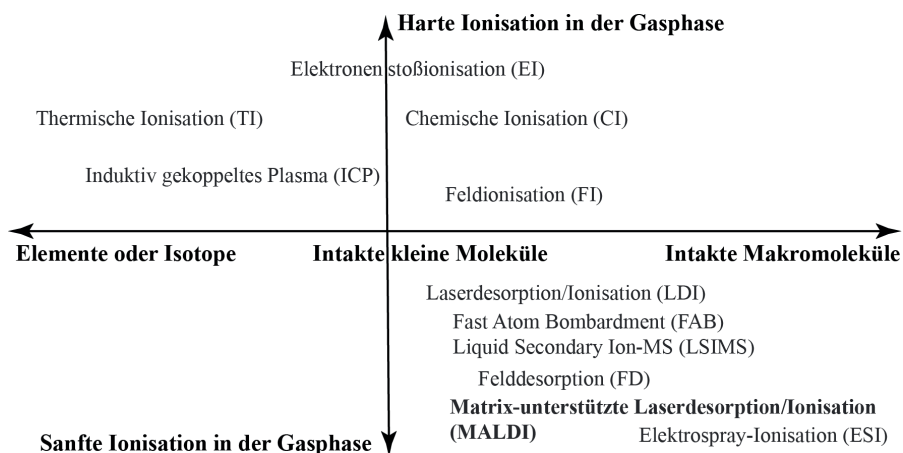


Abb. 3.5 – Anwendungsgebiet MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Vergleich der MALDI-Massenspektrometrie mit anderen massenspektrometrischen Ionisierungs-Methoden und deren Anwendungsgebieten (Gross, 2012).

Die MALDI-Methode hat gegenüber der ESI den Vorteil, dass bei der MALDI vornehmlich einfach bis zweifach geladene Molekülionen beim Ionisationsprozess entstehen, während bei der ESI das Massenspektrum von mehrfachgeladenen Molekülen geprägt ist, was eine Auswertung erschwert (Goodacre et al., 1999; Krishnamurthy und Ross, 1996). Für die Analyse von Bioaerosolen mit massenspektrometrischen Methoden bietet sich daher die MALDI an, weil hier eine sanfte Ionisation großer Moleküle mit geringer Fragmentierung und geringer Ionenladung möglich ist. Dies sollte die Analyse komplex zusammengesetzter Bioaerosole erleichtern.

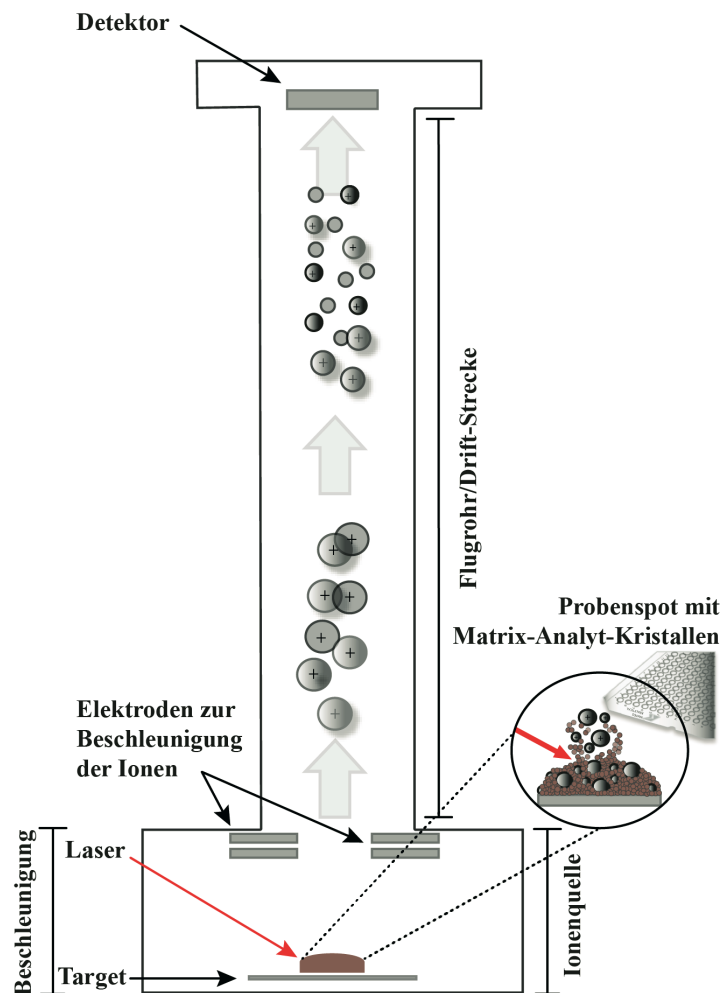


Abb. 3.6 – Prinzip eines MALDI-TOF Massenspektrometers.
Schematische Darstellung des Aufbaus und des Prinzips eines linearen MALDI-TOF Massenspektrometers.

Das Prinzip eines MALDI-TOF Massenspektrometers, ausgestattet mit einem linearen Flugzeitanalysator, wird in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt. Für den Messvorgang wird auf einer Edelstahlplatte die Probe mit einer stark lichtabsorbierenden Substanz (Matrix) vermischt und getrocknet. Die ausgebildeten Matrix-Analyt-Kristalle werden dann mit einem UV- oder IR-Pulslaser bestrahlt. Dieser Lichtimpuls reicht bereits aus, um einen Teil der Probenschicht von der Oberfläche zu desorbieren und zu ionisieren. Die so gebildeten Ionen werden dann über ein elektrostatisches Feld extrahiert und beschleunigt. Nach Verlassen der Beschleunigungsregion sollten die Ionen, beim Eintritt in die feldfreie Drift-Strecke, die gleiche kinetische Energie besitzen. Nach Überwindung des Flugrohrs (ca. 1–2 m) treffen die Ionen getrennt nach ihren Masse-Ladungs-Verhältnissen (m/z -Werten) auf den Detektor oder, anders ausgedrückt, die Ionen werden infolge unterschiedlicher Geschwindigkeit zeitlich voneinander getrennt; leichtere Ionen erreichen den Detektor früher als schwerere Ionen.

Um die Auflösung zu verbessern, kann bei der MALDI-TOF-MS die verzögerte Extraktion angewendet werden, oder vom bisher beschriebenen linearen- zu einem Reflektor-Flugzeitanalysator gewechselt werden. Bei der verzögerten Extraktion werden die gebildeten Ionen zeitlich verzögert durch ein gepulstes elektrisches Feld aus der Ionenquelle in den TOF-Analysator extrahiert, wodurch eine ungleiche Energie- und Startzeitverteilung komprimiert sowie mögliche Fragmentierungen von Molekül-Ionen durch Kollisionen vermieden werden (Gross, 2012). Der Reflektor-Flugzeitanalysator bewirkt durch das Eindringen der Ionen in ein elektrisches Gegenfeld eine Flugzeitkorrektur, die das Auflösungsvermögen des TOF-Analysators erheblich verbessert. Allerdings muss hier eine höhere Konzentration an Analyt vorhanden sein, um ein vergleichbares Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) wie bei einem linearen Flugzeitanalysator zu erhalten. Zur weiteren Verbesserung der Auslösung, kann ein Filter bzw. “Blank” gesetzt werden. Dieser vermindert Suppressionseffekte aufgrund des Abschirmens von Molekülionen die nicht von der Probe stammen, wie z.B. Matrixmolekülionen.

3.2.2 Grundlagen der Messung von Mikroorganismen

Durch die Entwicklung einheitlicher Arbeitsprotokolle hat sich die MALDI-TOF-MS in dem Bereich der klinischen Mikrobiologie etablieren können. Sie hat sich wegen der im vorherigen Abschnitt genannten Vorteile gegen andere massenspektrometrische Methoden wie z. B. der ESI-MS oder der Flüssigchromatographie-(LC)-MS durchsetzen können. Des Weiteren ist das Vorgehen der Messung von Mikroorganismen bzw. Bakterien einfach. Der Zielorganismus wird auf eine Metallplatte aufgetragen, mit einer Matrix gemischt und gemessen (direkte Messung). Durch eine vorherige Proteinextraktion kann die Spektrenqualität (S/N-Verhältnis oder Anzahl Peaks) und somit das Analyseergebnis erheblich verbessert werden.

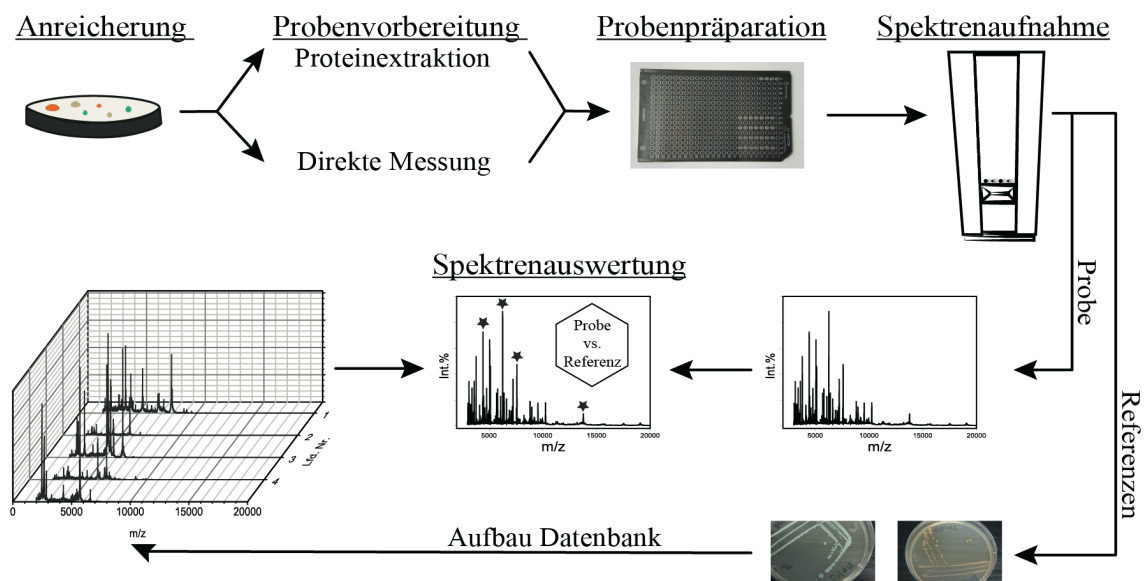


Abb. 3.7 – Identifizierung von Mikroorganismen.
Schematische Darstellung des Ablaufs der Identifizierung von Mikroorganismen mit der MALDI-TOF-MS über Referenzspektren.

Die Identifizierung der Isolate erfolgt dann über den Abgleich des Probenspektrums mit den vorhandenen Referenzspektren. In Abbildung 3.7 wird dieses Vorgehen schematisch dargestellt. Als Ausgangsmaterial eignen sich vor allem Isolate, die auf festen Nährmedien gewachsen sind (Evason et al., 2001; Madonna et al., 2000). Der Messbereich für Mikroorganismen liegt zwischen 3 000 Da und 20 000 Da.

3.2.3 Lösungsmittel und MALDI-Matrices

Wasser, Ethanol, Acetonitril (ACN) und Trifluoressigsäure (TFA) sind die gängigsten Komponenten eines Matrix-Lösungsmittels. TFA ist eine starke Säure, die die Zellwand von Mikroorganismen angreift, sodass die zellulären Bestandteile freigelegt und gleichzeitig auch protoniert werden können. Mit der ACN Komponente werden diese zellulären Bestandteile aus der Zelle extrahiert. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels und dem dadurch startenden Kristallisationsprozess der Matrixmoleküle werden die zellulären Bestandteile des Organismus separiert und in die Matrixkristalle eingebettet (Horneffer et al., 2001).

Zur Detektion von Protein-Biomarkern aus Mikroorganismen stehen vornehmlich die α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHCA), 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizinsäure/Sinapinsäure (SA), 2,4-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 4-Hydroxy-3-methoxymizinsäure/Ferulasäure (ACCA) und 5-Chlor-2-mercaptobenzothiazol (CMBT) zur Verfügung. Für Bakterienzellen wird hauptsächlich CHCA als Matrix eingesetzt, weil damit sowohl die Messung von Peptiden als auch von Proteinen möglich ist. Auch werden, selbst bei Verunreinigungen, kleine Matrix-Analyt-Kristalle ausgebildet, wodurch die Reproduzierbarkeit der Spektrenmuster verbessert und somit eine automatische Datenauswertung wesentlich zuverlässiger durchgeführt werden kann (Ilina et al., 2010).

3.2.4 Reproduzierbarkeit der MALDI-Spektren

Die Identifizierung von Mikroorganismen mit der MALDI-TOF-MS setzt voraus, dass gut reproduzierbare Spektren erzeugt werden. Dies ist als Herausforderung anzusehen, da sowohl experimentelle als auch wachstumsbezogene Bedingungen direkt oder indirekt Einfluss auf das MALDI-Spektrum ausüben (Wang et al., 1998). In Abbildung 3.8 werden Einflussfaktoren auf das Muster des MALDI-Spektrums eines gegebenen Mikroorganismus aufgelistet.

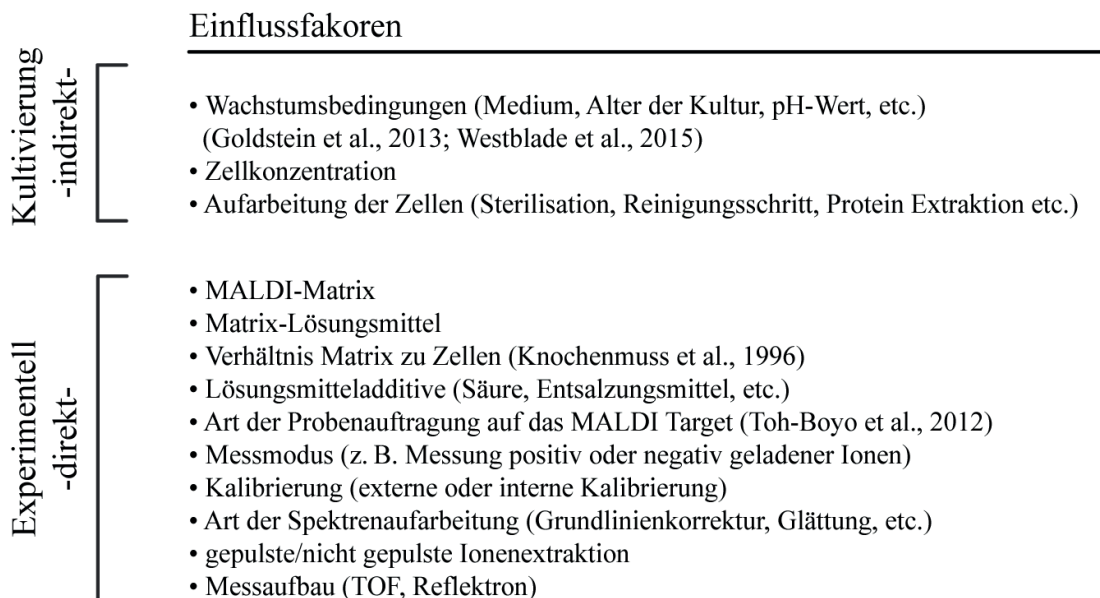


Abb. 3.8 – Einflussfaktoren auf das Erscheinungsbild des MALDI-TOF Massenspektrums. Experimentelle, messtechnische und biologische Einflussfaktoren, die auf das Aussehen des MALDI-Spektrums Einfluss nehmen (Goldstein et al., 2013; Knochenmuss et al., 1996; Toh-Boyo et al., 2012; Westblade et al., 2015).

Die Aufzucht der Mikroorganismen zählt mit zu den wichtigsten Faktoren, die indirekt einen Einfluss auf das Aussehen eines MALDI-Massenspektrums

ausüben. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass der Proteinhaushalt eines Organismus hauptsächlich durch seine Kultivierungsbedingungen, wie die Art des Kultivierungsmediums oder dessen pH-Wert beeinflusst wird (Wieme et al., 2014). Wie in den Arbeiten von Arnold und Reilly, Valentine et al. und Wunschel et al. gezeigt wird, spielen die Wachstumsphase, die Wachstumstemperatur und das Alter der Zellen ebenfalls eine wichtige Rolle (Arnold und Reilly, 1999; Valentine et al., 2005; Wunschel et al., 2005). Trotz dieser Einflussfaktoren ist man mit der MALDI-Methode in der Lage, Biomarkerionen für die Identifizierung von Mikroorganismen zu ermitteln.

3.2.5 Identifizierung von Mikroorganismen über Biomarkerionen

Die MALDI-TOF-MS zählt zu den sogenannten Phänotypisierungsmethoden. Unter Phänotypisierung versteht man die Charakterisierung und Identifizierung eines Organismus nach seinem Erscheinungsbild wie z. B. der Antibiotika-Empfindlichkeit oder der biochemischen Reaktionen. Eine entscheidende Rolle bei der Identifizierung von Mikroorganismen mit Phänotypisierungsmethoden spielt die Genexpression. Dieser Prozess wird stark von dem Umfeld, in dem der Organismus sich gerade befindet, beeinflusst.

Im Gegensatz dazu stehen genotypische Methoden, bei denen die genetische Information eines Organismus zur Identifizierung und Differenzierung verwendet wird. Die molekulargenetischen Untersuchungsmethoden gehören zu den zuverlässigsten Verfahren, um Mikroorganismen zu charakterisieren. Die Sequenzanalyse bakterieller 16S rRNA-Gene (16S rRNA sequencing) ist seit Jahren der Goldstandard unter den Identifikationsmethoden und ist breit etabliert (Keller et al., 2010). Allerdings ist dieses Verfahren meist sehr kosten- und zeitintensiv. In Abbildung 3.9 werden die Vor- und Nachteile dieser genotypischen Methoden im Vergleich mit der MALDI-TOF-MS dargestellt.

- *Verwendete Methoden* -
MALDI-TOF Massenspektrometrie

Verfahren	Prinzip	Vorteil	Nachteil
MALDI-TOF-MS	Messen der Massen von Biomolekülen zur Identifizierung von Mikroorganismen	Hoher Probendurchsatz, einfache Handhabung und niedrige Kosten pro Analyse	Hohe Anschaffungskosten, Auflösungsvermögen wirkt limitierend und Abhängigkeit von der vorhandenen Referenzdatenbank
16S rRNA sequencing	PCR-Amplifikation und Sequenzierung von der 16S rRNA Gensequenz	Gute Diskriminierungsleistung bis zur Gattungsebene	Teuer und limitierende Diskriminierungsleistung

Abb. 3.9 – Vergleich zweier Analyseverfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen. Auflistung der Vor- und Nachteile und deren Anwendungsprinzipien (Santos et al., 2016).

Auf Grundlage verschiedener Studien und der Erweiterung genetischer Datenbanken ist es allgemein anerkannt, dass bei der direkten Auftragung und Messung von Mikroorganismen mit der MALDI-TOF-MS hauptsächlich die im Cytosol befindlichen Zellbestandteile gemessen werden, sogenannte Biomarkerionen. Hier sind vor allem die ribosomalen Proteine zu nennen, die laut einer Studie über 20 % des gesamten Proteinhaushaltes ausmachen (Bremer and Dennis, 1996). In einer anderen Studie wird gezeigt, dass die Messung von ribosomalen Proteinen und deren posttranslationalen Modifikationen mit der MALDI-TOF-MS möglich ist (Arnold und Reilly, 1999).

Neben den ribosomalen Proteinen werden weitere Haushaltsproteine (“house-keeping” Proteine) mit der MALDI-TOF-MS gemessen. Darunter versteht man Proteine, die einen konstitutiven Part in der Zelle einnehmen. Dazu zählen ribosomale Modulationsfaktoren, Hitzeschockproteine, Regulatoren zur Speicherung von Kohlenstoff, Kälteschockproteine, DNA-Bindungsproteine oder RNA-Chaperone. Die Anzahl an Signalen in einem Massenspektrum schwankt zwischen 10–200 pro Mikroorganismus, obwohl nach genomischen Daten mindestens 2 000 Proteine im Massenbereich zwischen 4 000 Da–2 000 Da zur Verfügung stehen (Arnold und Reilly, 1999). Aufgrund dieser Feststellung haben Ryzhov und Fenselau 2001 untersucht, welche Eigenschaften Proteine aufweisen sollten, um mit dem MALDI-Verfahren gemessen werden zu können (Ryzhov und Fenselau, 2001).

Sie haben festgestellt, dass die mit der MALDI-TOF-MS gemessenen mikrobiellen Proteine hauptsächlich aus dem Cytosol stammen, häufig in der Zelle vorkommen, eine starke Basizität und eine mittlere Hydrophilie aufweisen (bei der Messung positiver Ionen).

3.2.6 Taxonomische Differenzierungsleistung

Nach dem aktuellen Stand der Technik liegen die Stärken der MALDI-TOF-MS in der Identifizierung von Mikroorganismen auf der Ebene der Gattung und der Art. Mit den genotypischen Methoden kann, je nach Fragestellung, bis zur Stammesebene eine Charakterisierung von Mikroorganismen erfolgen (siehe Abb. 3.10).

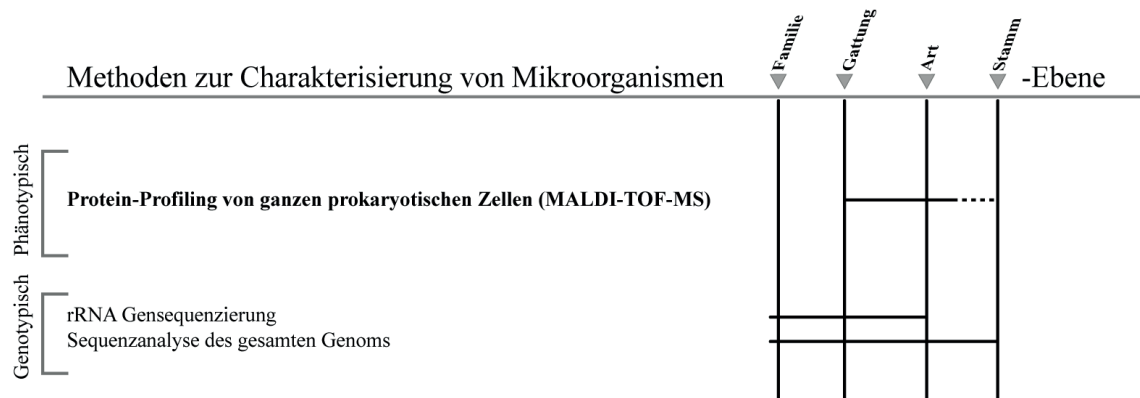


Abb. 3.10 – Differenzierungsleistung der MALDI-TOF-MS in der Mikrobiologie. Auflistung genotypischer Analysemethoden und Abbildung deren Differenzierungsleistung zur taxonomischen Einordnung von Mikroorganismen gegenüber der MALDI-TOF-MS (Welker und Moore, 2011).

Obwohl die Charakterisierung auf Gattungs- und Artebene für viele Anwendungen ausreicht, ist die Charakterisierung auf Stammesebene in einigen Anwendungsgebieten von Nöten. Zum Beispiel erfordern epidemiologische Untersuchungen die rasche Identifizierung eines einzelnen Stammes innerhalb einer einzigen Spezies zur Bestimmung des Ursprungs und die Ausbreitung eines Ausbruchs (Murray, 2010). Auch erfordert die Bestimmung der Quelle von mikrobiellen Verunreinigungen in Trink- und Erholungsgewässern in der Umwelt die Charakterisierung vieler

Stämme einer einzelnen Spezies. Die Möglichkeit der MALDI-TOF-MS Mikroorganismen unterhalb der Spezies zuverlässig zu identifizieren ist nicht vollständig geklärt (Sandrin et al., 2013). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Bakterien unterhalb des Speziesniveaus nicht charakterisiert werden können (Gaia et al., 2011; Rezzonico et al., 2010). Die Schwierigkeit liegt hauptsächlich in der Tatsache, dass Mitglieder einer einzelnen Spezies dazu neigen, bemerkenswert ähnliche MALDI TOF-MS-Profile zu zeigen. Zwar weisen Arbeiten daraufhin, dass für einige Spezies stammspezifische Peaks gemessen werden können, allerdings machen diese nur einen sehr kleinen Teil des gesamten Spektrums aus (Carbonnelle et al., 2007; Ricchi et al., 2017; Teramoto et al., 2007). Für die Identifikation einer Spezies auf Stammesebene muss das Spektrum in seiner Profilqualität, in seinem Signalreichtum, in seiner Reproduzierbarkeit und der Massengenauigkeit besser sein als auf Ebene der Gattung oder der Art (Dieckmann et al., 2008).

3.2.7 MALDI-Verfahren in der Umweltmikrobiologie

Trotz der stetigen Weiterentwicklungen der MALDI-TOF-MS zur Analyse von Mikroorganismen seit den frühen 90er Jahren des 20. Jahrhunderts, ist die Messung und Auswertung von mikrobiellen Mischproben, genommen aus der Umwelt, eine große analytische Herausforderung (Sandrin und Demirev, 2018). Ein Grund ist, dass Umweltproben auf ihrer chemischen, biologischen und physikalischen Ebene erheblich komplexer sind. Zudem enthalten sie wesentlich mehr unterschiedliche Mikroorganismen in einem weiteren Konzentrationsbereich als klinische Proben. Des Weiteren ist der Aufbau von MALDI-Datenbanken im Bereich der klinischen Mikrobiologie von größerem wirtschaftlichem Interesse als im Umweltbereich. Dennoch kann die MALDI-TOF-MS zur Charakterisierung und Identifizierung von aus der Umwelt isolierten Mikroorganismen verwendet werden.

Die untersuchten Habitate sind vielschichtig. So wurden Proben verschiedener Herkunft mikrobiologisch und mit MALDI-TOF-MS untersucht: aus Wasser, (kontaminierten) Böden, Schlamm, Pflanzen, Luft, Lebensmitteln und im Sanitärbereich (Emami et al., 2012; Ferreira et al., 2011; Lovecka et al., 2015; Sala-Comorera et al., 2016; Stepień-Pysniak et al., 2017). In fast allen Studien wird die

Schwäche der MALDI-TOF-MS in den unvollständigen Referenzdatenbanken und in den nicht vorhandenen standardisierten Aufarbeitungsprotokollen gesehen. Daher ist es zum gegenwärtigen Zeitpunkt sinnvoll, eine eigene MALDI-Referenzdatenbank aufzubauen, mit Daten die repräsentativ für das zu untersuchende Medium sind.

3.2.8 MALDI-TOF-MS als kultivierungsunabhängige Methode

Die Differenzierungsleistung der MALDI-TOF-MS bei polymikrobiellen Gemeinschaften ist im Gegensatz zu monomikrobiellen Kulturen bisher weniger erforscht. Die Herausforderung liegt:

- an den je nach Spezies unterschiedlich vorhandenen und verfügbar zu machenden Biomarkern.
- an der Verstärkung der Ionensuppressionseffekte.
- in schwieriger Differenzierung zwischen Hintergrund und Analytsignal.
- in schwieriger Adaption der vorhandenen MS Identifizierungssysteme.

Trotz all dieser Punkte wurden MALDI-TOF-MS Protokolle entwickelt, die es ermöglichen, Mikroorganismen direkt aus einer Probe zu analysieren. Zum Beispiel wurde ein Testkit zur schnellen Diagnostik von Blutbahninfektionen bei Patienten entwickelt. Dadurch ist es möglich, innerhalb von zwei Stunden ein Resultat zu erhalten (Kok et al., 2011). Dies ist ein enormer Vorteil gegenüber klassischen Phänotypisierungsmethoden, die eine Analysezeit von ca. 24–48 Stunden aufweisen. Bei Genotypisierungsmethoden liegt die Analysezeit zwar auch nur bei ca. 6 Stunden, sie sind aber kostenintensiver und anspruchsvoller in der Handhabung. Allerdings wurde festgestellt, dass mit der MALDI-TOF-MS hauptsächlich gram-negative Organismen identifiziert werden können (Kok et al., 2011).

Gram-positive Organismen treten somit mehr in den Hintergrund, was eine methodenbedingte Limitation zur Folge hat. Des Weiteren hat die Studie von Kok et al. gezeigt, dass Fehlanalysen bei der Differenzierung zwischen taxonomisch nahverwandten Spezies auftreten können.

Um die Identifizierungsleistung zu verbessern, werden Ansätze verfolgt, in denen die Mikroorganismen auf festen Nährböden für kurze Zeit inkubiert werden und diese angereicherten polymikrobiellen Isolate dann mit der MALDI-TOF-MS gemessen werden (Altun et al., 2015). Ein anderer Ansatz, um Mikroorganismen aus verschiedenen Matrices (Wasser, Blut und Urin) direkt zu messen, beschreibt die Gruppe um Voorhees (Madonna et al., 2001). Der Ansatz basiert auf magnetischen Partikeln, deren Oberfläche mit polyklonalen Antikörpern überzogen sind, die Mikroorganismen spezifisch binden und aus der Probenmatrix extrahieren.

Es bleibt festzuhalten, dass die Verwendung der MADI-TOF Massenspektrometrie als kultivierungsunabhängige Methode eine analytische Herausforderung darstellt, die wohl nur durch weitere Grundlagenforschung in Zukunft überwunden werden wird.

4 Darstellung der wissenschaftlichen Beiträge Publikation 1

Druckenmüller, Katharina ^a, Günther, Klaus ^b, and Elbers, Gereon ^a (2018) Near-infrared spectroscopy (NIRS) as a tool to monitor exhaust air from poultry operations. *Science of the Total Environment* 630: 536–543.

Copyright © 2018 *Science of the Total Environment*

^a Faculty of Chemistry and Biotechnology, FH Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, Germany

^b Institute of Nutritional and Food Sciences, Food Chemistry, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.072>

Wissenschaftliche Beiträge im Überblick:

Die Messung an den Hähnchenmastanlagen wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Andrea Gärtner (LANUV NRW, Emissionsmessungen) organisiert und koordiniert. Zudem wurden die Emissionsprobenahmen und die gravimetrische Bestimmung der Staubbeladung auf den Filtern von dieser Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Doktorandin Katharina Druckenmüller führte alle im Nachfolgenden beschriebenen NIR-Messungen und Auswertungen durch und erarbeitete die in der Publikation beschriebenen Schlussfolgerungen. Des Weiteren ist sie für die Erstellung, Einreichung und Veröffentlichung der Publikation verantwortlich, unterstützt von Herrn Gereon Elbers, Herrn Klaus Günther sowie Frau Sandra Kirby.

4.1 Zusammenfassung Publikation 1

Am Beispiel einer Hähnchenmastanlage zeigt diese Arbeit, dass wesentliche Merkmale von Gesamtstaub einer Tierhaltungsanlage mit Hilfe eines Standard-Probenahmeverfahrens (Kapitel 1) und von Gesamtstaub bzw. Gesamtpartikeln mit NIR-spektroskopischen Methoden (Kapitel 3.1) beschrieben werden können.

Die Probenahme der Gesamtstaubemissionen sowie die Analyse der Filterproben erfolgte nach der VDI-Richtlinie 2066 Blatt 1 (VDI 2066 Blatt 1, 2006). Die Richtlinie beschreibt den Ablauf eines manuellen gravimetrischen Referenzmessverfahrens u. a. zur Bestimmung der Staubbeladung durch einen definierten Querschnitt. Als Probenträger dienen in dieser Arbeit Quarzfaserfilter von 5 cm Durchmesser. Für die Bioaerosol-Emissions-Probenahmen wurden zwei Geflügelmastanlagen ausgewählt (Stall 1 und 2), in denen Mastgeflügel in 40 Tagen zur Schlachtreife gebracht wird. Die Anlagen unterscheiden sich darin, dass Stall 2 mit einer Abluftreinigungsanlage ausgestattet ist. Zum Zeitpunkt der Messungen werden in den Anlagen je 41 400 Tiere auf einer Fläche von je 1 800 m² gehalten. Im Stall 1 erfolgt die Probenahme am 3., 10., 19., 24. und 33. Tag der 40-tägigen Mastperiode. Die am dritten und zehnten Tag der Mastperiode entnommenen Proben dienen dazu, um sich mit den Merkmalen der Probenahmestelle vertraut zu machen. Im Stall 2 findet die Probenahme am 19., 24. und 33. Tag der Mastperiode statt. Die Probenahmen finden parallel zur Futtergabe statt. Die Dauer der Probenahme betrug je 1 Stunde. Je nach Masttag werden zwei oder drei Abluftproben an jedem Probenahmetag entnommen. Ausgewählte Probenahmedaten sind im Appendix: Publikation 1 Tabelle 1 und der 'Supporting information' einzusehen.

Bei der Herstellung, Lagerung und Verwendung der Probenträger wird gemäß der Richtlinie VDI 2066 Blatt 1 vorgegangen (VDI 2066 Blatt 1, 2006). Nach der Probenahme werden die beaufschlagten Filter aus dem Probenahmesystem entnommen und in einem staubdichten Transportbehälter gelagert. Zur Bestimmung der Staubmenge werden die Filterproben für mindestens 2 h bei 150 °C getrocknet und danach gewogen. Zur Bestimmung der Hintergrundbelastung der Filter an

Staub, wird vor der Probenahme, mindestens einmal täglich, eine Blindprobe genommen. Der Blindwert dient dazu, um zu überprüfen, ob die Probenahme fachgerecht durchgeführt wurde (z.B. ob nicht irgendwo zusätzliche Partikel eingetragen wurden bzw. Verunreinigungen die Staubmasse verfälscht haben). Die Herstellung eines Blindfilters erfolgt nach dem gleichen Verfahren wie für die beaufschlagten Filterproben, mit dem Unterschied, dass das Probenahmegerät nicht gestartet wird. Weitere Informationen zu dem Probenahmeverfahren, den Probenahmeorten und der gravimetrischen Bestimmung der Staubbeladung sind im Appendix: Publikation 1 Kapitel 2.1.1. bis 2.1.4. und in der 'Supporting information' nachzulesen.

Es werden drei Merkmale untersucht, um die Emissionsproben zweier Hähnchenmastanlagen in dieser Arbeit zu beschreiben: das Vorhandensein einer Filteranlage, die Staubmenge und der Masttag. Von den so erhaltenen 34 Filterproben werden Nahinfrarotspektren mit einem Fourier-Transformations-NIR-Spektrometer Vector 22-N mit einer Integrationskugel aufgenommen (Bruker, Karlsruhe, Deutschland). Für die Messung in Reflexion ist das NIRS mit einem kreisförmigen Quarzfaserfenster von 2,2 cm Durchmesser ausgestattet. Die Filterproben können so direkt auf das Fenster aufgelegt und gemessen werden. Für die Proben stellt sich eine Auflösung von 8 cm^{-1} , ein Wellenzahlbereich von $3\ 700\text{ cm}^{-1}$ bis $12\ 500\text{ cm}^{-1}$ und eine Mittelung von 64 Scans pro Analyse als sinnvoll heraus. Für die Vorbehandlung der Daten und die multivariate Datenanalyse wird die Unscrambler X Software Version 10.4.1 (Camo Smart, Woodbridge, NJ, USA) und das Softwarepaket Bruker OPUS IDENT 5.0 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Insgesamt werden für die chemometrischen Methoden 42 NIR-Spektren verwendet, die sich aus 2 Wiederholungen von 21 Proben aus Stall 1 ($n=13$) und Stall 2 ($n=8$) zusammensetzen. Zusätzlich kommen 13 Blindfilter (Leerwerte) dazu, um den Hintergrund zu definieren.

Der gemessene rohe Datensatz zeigt breite, relativ schwache und mit einem Grundlinienshift behaftete Absorptionsbanden. Aus diesem Grund wird die Datenvorbehandlung so gewählt, dass ein additiver und quadratischer Anstieg der Grundlinie minimiert wird (Kapitel 3.1.3). Es wird davon ausgegangen, dass der Anstieg der

Grundlinie auf die Staubbeladung, die Staubverteilung und auf die Größenverteilung der Staubpartikel auf dem Filter zurückzuführen ist. Die Datenvorbehandlung wird rein heuristisch, auf der Grundlage der Ergebnisse von der PCA, LDA und FA ausgewählt. Unter diesem Vorgehen werden zwei Datenvorbehandlungspakete ausgewählt: (1) die SNV zusammen mit DT für die PCA und LDA und (2) Vektornormalisierung zusammen mit der ersten Ableitung für die FA. Die Einflüsse der SNV- und DT-Spektrentransformation sind in Appendix Publikation 1 Abbildung 1[B], [C], und [D] dargestellt. Die durch die Vektornormalisierung/erste Ableitung modifizierten Spektraldaten sind im Appendix: Publikation 1 'Supporting information' Abbildung S3 abgebildet.

Neben der Auswahl der Datenvorbehandlung ist die Auswahl des Wellenzahlbereiches entscheidend für die Methodenerstellung. Eine besonders gute Trennung der Daten wird für die PCA- und LDA-Modelle für den Wellenzahlbereich von $7\,500\text{ cm}^{-1}$ bis $4\,000\text{ cm}^{-1}$ und für das FA-Modell zwischen $4\,667\text{ cm}^{-1}$ und $5\,007\text{ cm}^{-1}$ erreicht. Somit ist es mit der PCA, der LDA oder der FA möglich, die Filterproben nach den Merkmalen Staubbeladung, Masttag und Anlage mit und ohne Abluftreinigungsanlage zu klassifizieren. Die Modelle geben auch einen Hinweis darauf, dass die Staubbeladung auf dem Filter das Spektrenmuster beeinflusst (erste Hauptkomponente) und deuten daraufhin, dass der Masttag und die Stall-Lüftung auch Einfluss nehmen (zweite und dritte Hauptkomponente).

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass sich die NIRS zur schnellen Analyse von Gesamtstaubfilterproben eignet. In Kapitel 6 werden die hier dargestellten Ergebnisse diskutiert sowie der Erkenntnisfortschritt für die wissenschaftliche Fragestellung verdeutlicht.

5 Darstellung der wissenschaftlichen Beiträge Publikation 2

Druckenmüller, Katharina ^a, Gärtner, Andrea ^b, Jäckel, Udo ^c, Klug, Kerstin ^c, Schiffels, Johannes ^a, Günther, Klaus ^d, and Elbers, Gereon ^a (2017) Development of a methodological approach for the characterization of bioaerosols in exhaust air from pig fattening farms with MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220: 974–983.

Copyright © 2017 *International Journal of Hygiene and Environmental Health*

^a Faculty of Chemistry and Biotechnology, FH Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, Germany

^b North Rhine-Westphalia State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (LANUV NRW), Essen, Germany

^c Federal Institute for Occupational Safety and Health (BAuA), Berlin, Germany

^d Institute of Nutritional and Food Sciences, Food Chemistry, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany

<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.05.003>

Wissenschaftliche Beiträge im Überblick:

Die Arbeitsgruppe von Frau Andrea Gärtner (LANUV NRW, Emissionsmessungen) organisierte und koordinierte die Messung und führte die Emissionsprobenahmen durch. Die Herstellung der Bakterienisolate und die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchung führte Frau Kerstin Klug aus der Arbeitsgruppe von Udo Jäckel durch (BAuA, Biologische Arbeitsstoffe). Die Doktorandin Katharina Druckenmüller führte alle MALDI-TOF-MS betreffenden Schritte, von der Entwicklung bis zur Verifikation des Aufarbeitungs- und des Analyseverfahrens sowie den Aufbau einer MALDI-Referenzdatenbank durch. Des Weiteren war Sie für die Erstellung, Einreichung und Veröffentlichung der Publikation verantwortlich, mit Unterstützung von Herrn Gereon Elbers, Herrn Klaus Günther, Herrn Udo Jäckel und Herrn Johannes Schiffels.

5.1 Zusammenfassung Publikation 2

Anhand von insgesamt 36 Emissions-Impingerproben, die an insgesamt acht Schweinemastbetrieben entnommen wurden, wird eine neuartige, auf MALDI-TOF-MS basierendes, Verfahren zur Identifizierung von Bakterien entwickelt und anschließend verifiziert. Besonders ist, dass dieses Verfahren kultivierungsunabhängig arbeitet.

Für die Entwicklung und Verifizierung wurden acht Schweinemastbetriebe in verschiedenen Regionen Nordrhein-Westfalens (NRW, Deutschland), für die Probenahme von Bioaerosol-Emissionen ausgewählt (Appendix Publikation 2 'Supporting information'). Die Probenahme der Bioaerosole erfolgt nach der VDI-Richtlinie 4257 Blatt 2 mit Emissions-Impingern (VDI-4257-2, 2011). Die VDI-Richtlinie beschreibt das Verfahren der Emissionsprobenahme unter isokinetischen Bedingungen mit einem Emissions-Impinger (modifizierter AGI 30) (Appendix Publikation 2 'Supporting information' Abbildung S2 und Tabelle S2). Die Probenahme erfolgt isokinetisch an Abluftkaminen zwischen März 2014 und Februar 2015. Das Probenvolumen beträgt 52 ml, bestehend aus einem Volumen der Impingerlösung von 32 ml und 20 ml Spülflüssigkeit. An den Anlagen 1–5 sowie 7 und 8 werden vier Proben pro Probenahmetag genommen, in der Einrichtung 6 hingegen acht Proben: vier Proben für die MALDI-TOF MS Messung und die weiteren vier Proben für die taxonomische Klassifizierung.

Die Proben aus den Anlagen 1–5 werden für die Entwicklung eines Aufarbeitungsprotokolls verwendet, während die Proben aus den Einrichtungen 6, 7 und 8 zur Validierung des entwickelten Aufarbeitungsprotokolls unter Verwendung der erstellten MALDI-Datenbank dienen. An jeder Probenahmestelle wird zur Qualitätssicherung eine Feld- und eine Laborblindprobe genommen. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) wird als Impingerprobenahmelösung verwendet (VDI-4257-2, 2011). Die Lagerung und der Versand der Proben erfolgt bei 5 ± 3 °C. Die Proben werden innerhalb von 24 Stunden nach der Probenahme in die Laboratorien gebracht und im Dunkeln bei 5 ± 3 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Mit einer direkten Messung der luftgetragenen Partikel können keine aussagekräftigen MALDI-Spektren aufgenommen werden. Daher wird eine Strategie zur Probenvorbehandlung entwickelt, um die bakteriellen Fraktionen aus den Emissions-Proben durch sequentielle Filtrations- und Zentrifugationsschritte abzutrennen. Es werden vier verschiedene Filtrationsschritte im Größenbereich von 70 µm–5 µm (Cut-off) angewandt, von denen sich die 20 µm und 5 µm Fraktion als geeignet für die MALDI-TOF-MS Analyse erweisen (Appendix Publikation 2 Abbildung 1). Die Qualität und Reproduzierbarkeit der erzeugten Spektren wurde durch Anwendung der MALDI-Spot-Präparationstechnik weiter optimiert (Appendix Publikation 2 Abschnitt 2.2.4).

In allen erzeugten MALDI-TOF-Massenspektren der auf diese Weise vorbehandelten Proben werden m/z -Werte bis zu 15 kDa beobachtet, während die vorherrschende Peakfraktion den Bereich von 3 000 Da–8 000 Da abdeckt. Dieser Bereich wird für die Identifizierung von Biomarkern verwendet (Appendix Publikation 2 Abbildung 2). Wenn das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) ≥ 3 beträgt, wird dies als signifikantes Signal gewertet. Unter den gegebenen Bedingungen enthalten die Spektren insgesamt zwischen 19 und 80 zur Auswertung zu verwendende Molekülonen (Appendix Publikation 2 Tabelle 2).

Nach der systematischen Auswertung der Spektren von den Tierhaltungsanlagen 6–8 werden unabhängig von der Probenahmeeinrichtung oder dem Datum, m/z -Werte bei 4 719 Da, 4 817 Da, 4 846 Da und 6 465 Da in allen Spektren wiedergefunden. Diese „universellen“ Peaks sind in fast allen Fraktionen vorhanden, mit Ausnahme der 5 µm Fraktion von Anlage 7 (Appendix Publikation 2 Abbildung 3, grüne Balken). Somit ist es möglich, die vier Signale nicht nur als spezifische Biomarker, sondern auch als Indikatoren für die Reproduzierbarkeit zu verwenden. Um den Molekülonen Bakterienarten und -gattungen zuzuordnen, wird mit den Bakterien aus den Emissionsproben von der Anlage 6 die MALDI-Datenbank aufgebaut. Die MALDI-Datenbank besteht aus Spektren identifizierter bakterieller Reinkulturen, gewonnen durch Isolierung und taxonomische Klassifizierung (Appendix Publikation 2 Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3). Aus vier der acht Proben von Anlage 6 wurden 65 aerobe Bakterienkulturen durch Ausplattieren und Abtrennung isoliert

(Appendix Publikation 2 Abschnitte 2.2.2). Die gewonnenen Isolate werden durch Sequenzierung des 16S rRNA-Gens taxonomisch klassifiziert, mit der MALDI-TOF-MS gemessen und Biomarker-Ionen bestimmt (Appendix Publikation 2 Abbildung 1 und Tabelle 1). Von den 65 bakteriellen Isolaten können insgesamt 21 verschiedene Arten durch 16S rRNA-Gensequenzierung identifiziert werden, die zu 10 verschiedenen Gattungen und drei verschiedenen Phyla gehören. Davon sind sieben Zuordnungen eng mit Bakterien verwandt, die als biologische Arbeitsstoffe der Risikogruppe 2 (TRBA 466, 2015) eingestuft werden. Für alle 21 Organismen wurden MALDI-Referenzspektren erstellt und erste gattungs- bzw. artspezifische Peaks erfolgreich abgeleitet. Diese Biomarker bilden in dieser Studie die verwendete MALDI-Datenbank (Appendix Publikation 2 Tabelle 1).

Unter den Referenzorganismen der MALDI-Datenbank ergeben verschiedene Gattungen und Spezies unterschiedliche Mengen an Biomarkern. Die Anzahl an Biomarkern in dieser Arbeit liegt im Bereich von 1 – 16. In den Probenspektren werden im Allgemeinen ein bis vier Molekülionen, für den jeweiligen Referenzorganismus, nachgewiesen (Appendix Publikation 2 Tabelle 1). Da die Biomarker auf der Grundlage ihrer Einzigartigkeit und auch nur dann ausgewählt wurden, wenn sie in den Spektren anderer Organismen fehlten, wird das Auffinden eines oder mehrerer Signale auf Gattungs- oder Artniveau als Indikator für das Vorhandensein der betreffenden Gattung oder Art in einer bestimmten Probe angenommen. Mit Hilfe dieser MALDI-Datenbank werden die Probenspektren aus der Tierhaltungsanlage Nr. 6, 7 und 8 ausgewertet. Eine genauere Darstellung des Vorgehens zur Datenbankerstellung und der Auswertung der Probenspektren sind im Appendix: Publikation 2 Kapitel 2.2.5. nachzulesen.

Zunächst ist es möglich, zwei der vier oben genannten universellen Signale (4 719 Da, 4 817 Da, 4 846 Da und 6 465 Da) zuzuordnen: Die Peaks bei 4 817 Da und 4 846 Da stimmen mit den Fingerabdruck-Ionen von *Staphylococcus epidermidis* (4 814 Da) und *Enterococcus avium* (4 842 Da) überein. Es werden 18 von 21 kultivierten und identifizierten Bakterienarten in einer oder mehreren Emissionsproben aus den Anlagen 6 – 8 nachgewiesen.

Drei Bakterienarten, nämlich *Corynebacterium striatum*, *Moraxiella pluranimalium* und *Staphylococcus epidermidis*, werden in allen Emissionsproben unabhängig von der Anlage oder Fraktion gefunden (Appendix Publikation 2 Abbildung 4 und 5). *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinaeequi* und *Corynebacterium casei* müssen separat betrachtet werden, da ihre Zuordnung auf Gattungsebene erfolgen kann (Appendix Publikation 2 Tabelle 1 und Abbildung 4). Die Arten *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium xerosis* und *Nocardiopsis listeria* werden nicht nachgewiesen (Appendix Publikation 2 Abbildung 4). Von den drei analysierten Tierhaltungsanlagen (6–8) weisen die Anlagen 6 und 8 auffällige Ähnlichkeiten auf: Peaks bei 3 232 Da, 3 680 Da, 3 852 Da, 6 592 Da, 7 090 Da und 7 706 Da werden zusammen mit den vier bereits erwähnten „universellen“ Peaks in den beiden Filtratfraktionen, der beiden Anlagenemissionsproben beobachtet (Appendix Publikation 2 Abbildung 3, graue Balken). Es wird angenommen, dass es sich bei den Fragmenten mit 7 706 Da und 3 852 Da um einfach und doppelt geladene Ionen desselben Ausgangsmoleküls handelt, während 6 592 Da wahrscheinlich *Brevibacterium ptyocampae* (6 590 Da), einem Organismus der Risikogruppe 1, entspricht (TRBA466, 2015).

In dieser Arbeit wird die MALDI-TOF-MS als kultivierungsunabhängiger, routinemäßig anwendbarer Ansatz zur Identifizierung mikrobieller Fraktionen in Bioaerosol-Emissionsproben bewertet. Ein Aufarbeitungsprotokoll wurde erstellt, das sich an der VDI-Richtlinie 4257 Blatt 2 orientiert, die dem Stand der Technik entspricht. Über eine selbst aufgebaute MALDI-Datenbank können die Bioaerosol-Spektren erfolgreich analysiert werden. 18 von 21 in der Datenbank hinterlegten Bakterienarten werden erfolgreich gefunden, darunter auch Organismen der Risikogruppe 2, die zur Bewertung des pathogenen Potenzials der beprobten Abluft herangezogen werden können. Insgesamt verfolgt diese Arbeit einen völlig neuen Ansatz zur schnellen Analyse von mikrobiellen Fraktionen in der Luft. Es wird gezeigt, dass sich die MALDI-TOF-MS als Analyseverfahren zur schnellen Untersuchung von Bioaerosol-Emissionen eignet. In Kapitel 6 werden die Ergebnisse diskutiert sowie der Erkenntnisfortschritt für die wissenschaftliche Fragestellung verdeutlicht.

6 Zusammenfassende Darstellung

Im ersten Kapitel dieser Arbeit ist dargestellt, dass Bioaerosole eine bekannte Quelle für Pathogene, Endotoxine und Allergene sind und sich auf die Gesundheit des Menschen negativ auswirken können. Es wird erläutert, dass es für die meisten Bestandteile von Bioaerosolen - den Bakterien, Pilzsporen und Viren - aufgrund fehlender Dosis-Wirkung-Beziehungen keine gesundheitsbasierten Grenzwerte gibt. Als eine der möglichen Ursachen für die fehlende Ermittlung von Dosis-Wirkung-Beziehungen wird der zu geringe Datenbestand angeführt. Dieser lässt sich durch u. a. aufwendige Probenahme- und Analyseverfahren erklären. Daraus leitet sich die Notwendigkeit ab, die Analyseverfahren in ihrem Aufwand zu reduzieren, was durch das Auslassen der Kultivierung zu erreichen ist. Dieses Ziel wird im zweiten Kapitel dieser Arbeit formuliert und konkretisiert, d. h. ein Aufarbeitungs- sowie Probenpräparationsverfahren zu entwickeln, um Bioaerosol-Emissionen direkt analysieren und auswerten zu können. Im dritten Kapitel dieser Arbeit werden die Grundlagen von zwei analytischen Methoden vorgestellt, die es ermöglichen, schnell und einfach die Bioaerosol-Emissionen beispielhaft aus Tierhaltungsanlagen zu analysieren. Dabei wird erklärt, wie die NIRS genutzt werden soll, um die Emission ohne aufwendige Probenvorbereitung charakterisieren zu können und wie die MALDI-TOF-MS genutzt werden soll, um die Bakterienfraktion ohne Kultivierungsschritt zu untersuchen. Dass diese Anforderungen umgesetzt werden können, ist in zwei begutachteten wissenschaftlichen Publikationen dargestellt. Die Beiträge der einzelnen Akteure und insbesondere die Leistungen der Doktorandin Katharina Druckenmüller werden in Kapitel 4 und 5 vorgestellt.

In diesem sechsten Kapitel werden die Ergebnisse der ersten Publikation 'Near-infrared spectroscopy (NIRS) as a tool to monitor exhaust air from poultry operations' und der zweiten Publikation 'Development of a methodological approach for the characterization of bioaerosols in exhaust air from pig fattening farms with MALDI-TOF mass spectrometry' im Detail vorstellt, diskutiert und der dadurch erreichte Erkenntnisfortschritt aufgezeigt.

Die Anwendung der NIRS als Überwachungswerkzeug und die Verwendung der MALDI-TOF-MS zur Identifizierung von Mikroorganismen ist bekannt und für bestimmte Branchen standardisiert (Kapitel 3.1.4 - 3.1.4.3, 3.2.7 und 3.2.8). Der wissenschaftliche Beitrag dieser Arbeit ist in der neuen, innovativen Anwendung der beiden Analyseverfahren in Kombination mit zwei standardisierten Luftprobenahmenverfahren zu sehen. Im Laufe der Arbeit wurden neue Erkenntnisse in Bezug auf die Limitierungen und Unsicherheiten der analytischen Methoden gewonnen. In den nachfolgenden Abschnitten wird gezeigt, dass der innovative Einsatz der Methoden dazu führt, vielversprechende Messergebnisse zu erzeugen.

Um Emissionen mit der NIRS beschreiben zu können, ist es notwendig, das Probenahmesystem und die Probenahmeparameter so auszuwählen, dass sie das Ergebnis nicht beeinflussen. Zudem sind alle Einflussgrößen, die nicht bewertet werden sollen, so konstant wie möglich zu halten. Für die NIRS zeigt sich, dass als Probenahmesystem das Abscheiden von Staub aus der Abluft der Mastanlagen auf Filter zu bevorzugen ist. Das Impinger-Verfahren eignet sich weniger gut, weil das Auftreten breiter NIR-Absorptionen von Wasser (O–H Schwingungen) in dem Bereich zwischen $12\,500\text{ cm}^{-1}$ und $4\,000\text{ cm}^{-1}$ eine Auswertung erschwert. Die Annahme, dass sich Quarzglas als Filtermaterial eignet, da die Absorption des Filters im NIR-Licht sehr gering ist, wird bestätigt (Rodriguez-Saona et al., 2001). Eine einstündige Probenahmedauer stellt sich bei den Fütterungstagen 3 und 10 im Stall 1 als robuster gegenüber kürzeren Probenahmedauern heraus. Diese längere Probenahmezeit geht über die generelle Anforderung der VDI 2066 Blatt 1 hinaus, hat aber den Vorteil, dass die Ergebnisse pro Fütterungstag nur schwach streuen (Appendix Publikation 1 Tabelle 1). Dies wird auch durch einen gleichbleibenden Probenahmezeitraum (um die Mittagszeit) erreicht. Bei der Analyse der Spektren können alle beobachteten Banden funktionellen Gruppen kleiner organischer Moleküle zugeordnet werden.

Darüber hinaus wurden einige Banden, die in dieser Arbeit beobachtet werden, auch in anderen Messungen an biologischem Material beobachtet (Rodriguez-Saona et al., 2001):

- Um $5\,700\text{ cm}^{-1}$: in Spektren von Mikroben und Bakterien wahrscheinliche RNA/DNA Signatur, erste Oberschwingung primärer oder sekundärer Amide (Marques et al., 2015)
- Um $5\,200\text{ cm}^{-1}$: Bakterienstämme, Lecithin
- $4\,335\text{ cm}^{-1}$: Bakterienstämme, Lecithin, DNA-Standard

Somit ist es plausibel, dass die gemessenen NIR-Spektren tatsächlich auf Bioaerosole zurückgehen (Appendix Publikation 1 Supporting information Tabelle S2).

Um bei Bioaerosol-Emissionen aus Hähnchenmastanlagen die „Staubmenge“, das „Vorhandensein einer Filteranlage“ und den „Fütterungstag“ mittels NIRS unterscheiden zu können, ist die Datenanalyse von entscheidender Bedeutung. Ohne eine Datenbehandlung sind in den Spektren nur schwache Banden und keine großen Unterschiede, z. B. zwischen den Ställen, erkennbar. Diese werden erst nach der SNV/DT Datenvorbehandlung sichtbar (siehe Appendix Publikation 1 Abbildung 1 [D]). Dabei ist festzuhalten, dass die Leerproben des Quarzfilters bei etwa $7\,200\text{ cm}^{-1}$, $5\,200\text{ cm}^{-1}$, $4\,700\text{ cm}^{-1}$ und $4\,500\text{ cm}^{-1}$ Absorptionen zeigen, die stark vom Mittelwert aller Spektren abweichen. Die Spektren der staubbeladenen Proben zeigen neben den Absorptionen bei $7\,200\text{ cm}^{-1}$ und im Bereich um $5\,200\text{ cm}^{-1}$; auch bei $5\,700\text{ cm}^{-1}$ ein starkes Band sowie mehrere Banden zwischen $4\,800\text{ cm}^{-1}$ und $4\,200\text{ cm}^{-1}$. Bei den Proben von unterschiedlichen Fütterungstagen und den verschiedenen Ställen, sind die meisten Unterschiede im Absorptionsbereich zwischen $6\,000\text{ cm}^{-1}$ und $4\,100\text{ cm}^{-1}$ zu sehen. Nach der angewandten Vorbehandlung ist durch die angewandte PCA eine weitergehende Analyse und Variablenreduktion möglich. In dem erhaltenen Datensatz können 99 % der Varianz der Absorptionswerte durch drei Hauptkomponenten beschrieben werden. Die erste Hauptkomponente trägt 82 % zur Gesamtvarianz bei und zeigt besonders hohe Loadings an den Banden der Leerproben. Sie kann vornehmlich mit der Staubmenge in Verbindung gebracht werden (Abbildung 2 [C] (Appendix Publikation 1)). Die zweite Hauptkomponente

trennt die Fütterungstage - hier 19, 24, 33 - auf, und die dritte Hauptkomponente separiert den Messort, also die Werte zwischen den Ställen (Appendix Publikation 1 Abbildung 2 [D]).

Die Werte der Fütterungstage 3 und 10 beruhen auf unterschiedlichen Probenahmedauern (Appendix Publikation 1 Supporting information Abbildung S1). Es zeigt sich, dass sie zwar zur Varianz und damit zur Bildung der Hauptkomponenten beitragen, aber nicht eindeutig dem Merkmal „Staubmenge“ zugeordnet werden können. Die Empfehlung einer gleichbleibenden Probenahmedauer wird dadurch bestärkt. Umgekehrt stört die Varianz der Fütterungstage 3 und 10 nicht die Zuordnung der restlichen Daten zu den Merkmalen, d. h. das Belassen dieser Werte im Datensatz führt nicht zu einer großen, ungeklärten Restvarianz. In einer nachfolgenden angewandten LDA ist es zudem möglich, auch die Spektralwerte der Fütterungstage 3 und 10 aufzuteilen (Appendix Publikation 1 Abbildung 3 [A]). Dennoch ist für die erste Hauptkomponente der PCA zu vermuten, dass sie neben der Staubmenge noch von weiteren, unbekannten Merkmalen abhängt. Denn in zwei Proben werden trotz identischer Staubmenge (6,1 mg), „scores“ zwischen -1 und 1 erhalten. Obwohl die FA gegenüber der PCA/LDA auf weniger Information aus einem viel kleineren Bereich zurückgreift, zeigen die Ergebnisse, dass die Fütterungstage (19 bis 33) und die Messdaten der beiden Ställe auch mit einer FA der Spektren unterschieden werden können (Appendix Publikation 1 Abbildung 3 [B]).

Aufgrund der aussagekräftigen, aber kleinen Stichprobe wird empfohlen, die hier aufgezeigten Methoden mit weiteren Messdaten zu stärken bzw. mit weiteren Referenzverfahren zu kalibrieren. Des Weiteren empfiehlt es sich zu prüfen, ob weitere Messparameter abgedeckt werden können. So könnte für die Emissionsuntersuchung die Erarbeitung einer quantitativen NIRS Methode insbesondere für die biologische Fraktion (KBE/m³), aber auch für die allgemeine Staubmenge (mg/m³) oder für Gase wie Ammoniak oder Methan von Interesse sein. Allerdings existieren für beide Gase etablierte und sehr gut geeignete online-Messverfahren, wie z.B. die FTIR-Spektroskopie. Auch wäre es empfehlenswert zu prüfen, ob die NIRS ein Frühwarnsystem für den Ausstoß von biologischen Leitparametern sein kann (Leitparameter siehe Kapitel 1.1.2). Hierfür müsste entschieden werden, welche

Referenzverfahren sich für die Methodenentwicklung eignen. Auch sollte auf die Methodenvvalidierung Wert gelegt werden, um zu zeigen, dass die Methoden wirksam und gesichert arbeiten. Dies wäre entscheidend, um die NIRS in die gängige Praxisanwendung einzuführen. Des Weiteren ist zu prüfen, ob die NIRS als In- oder On-Line Messsystem angewendet werden kann.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen auf, dass es anhand von NIR-Spektren möglich ist die Abluft von Tierhaltungsanlagen mit der entwickelten Datenvorbehandlung und PCA-Verfahren in den drei genannten Merkmalen zu beschreiben. Damit wird ein erstes wesentliches Ziel erreicht. Sowohl die messtechnischen Rahmenbedingungen als auch die Ergebnisse der PCA bilden eine Grundlage, um weitere Emissionen aus Tierhaltungsanlagen beschreiben und in Zukunft auch kontrollieren zu können.

Am Beispiel von Schweinemastanlagen zeigt diese Arbeit, dass die bakterielle Fraktion von Emissionen mit Hilfe eines standardisierten Probenahmeverfahrens und der massenspektrometrischen Methode MALDI-TOF direkt gemessen werden kann. In den nächsten Abschnitten wird das erarbeitete Aufarbeitungs- und Analysenprotokoll zur Messung des Bakterienkonsortiums erläutert und diskutiert. Für die Methodenentwicklung und deren Verifizierung werden insgesamt 36 Impingerproben verwendet, die an acht verschiedenen Schweinemastanlagen gezogen wurden. Das Impingerprobenahme-Verfahren wurde ausgewählt, da die Sammeleigenschaften des Probenahmesystems durch die Arbeit von Gärtner et al. bestimmt wurden und das Verfahren in VDI-Richtlinie 4257 Blatt 2 inzwischen als Standardmethode beschrieben ist (Gärtner et al., 2008a; Gärtner et al., 2008b; VDI-4257-2, 2011).

Bioaerosole sind ein komplexes Gemisch verschiedener Komponenten mit einer Größenverteilung im Nanometerbereich bis zu Partikeln mit einem Durchmesser von 100 µm (Adell et al., 2012; Stetzenbach et al., 2004). Bakterien, die in Aggregaten oder in Fremdbestandteilen eingefasst sind, wie tierisches oder pflanzliches Material, sind mit der MALDI-TOF-MS schwer zu erfassen, da die Einbettung des Analyten in die MALDI-Matrix gestört und somit der

Ionisationsprozess negativ beeinflusst wird (siehe Kapitel 3.2.2, 3.2.3 und 3.2.4). Auch in dieser Arbeit sind erste Versuche zur Messung von Proben ohne vorherige Probenbereinigung fehlgeschlagen. Es wird zudem gezeigt, dass die Bakterienfraktion durch eine Differenzialzentrifugation nicht erfolgreich von den inhärenten Partikeln getrennt werden. Das unterstützt die Annahme, dass Bakterien in der Emission von Tierhaltungsanlagen hauptsächlich in Form von Aggregaten auftreten, die in einer umgebenden Matrix eingebettet oder an größere Partikel gebunden sind, anstatt als einzelne Zellen suspendiert zu sein (Lighthart, 1994). Als Konsequenz wird in dieser Arbeit eine Aufbereitungsmethode auf der Basis einer vierstufigen Kaskadenfiltration entwickelt. Dabei wechseln Wasch- und Zentrifugationsschritte sich ab. Es werden vier verschiedene Filtrationsschritte im Größenbereich von 70 µm bis 5 µm (Cut-off) angewendet, von denen sich die 20 µm und 5 µm Fraktionen für die MALDI-TOF-Analyse eignen. Es wird empfohlen, dieses Aufarbeitungsprozedere einzuhalten, da die direkte Anwendung von Filtern mit kleiner Porengröße zwar weitere störende Bestandteile aus dem Impinger, aber größtenteils auch den mikrobiellen Bestandteil und damit den Analyten entfernt.

Das Analysenprotokoll ist bei der MALDI-basierten Technik - d.h. wenn Protei-
nextraktion, Spotting, Matrices oder Lösungsmittel berücksichtigt werden müssen
- von entscheidender Bedeutung und beeinflusst das Erscheinungsbild von Mas-
senspektren in ihrer Reproduzierbarkeit, Massengenauigkeit und ihren Signalin-
tensitäten (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) (Sedo et al., 2011; Wang et al., 1998). Es
wurde ein modifiziertes Probenpräparationsverfahren, basierend auf Donohue et
al., (2006) und Bizzini et al., (2010), für die Herstellung von „MALDI-Ionen“ für
ganze Zellen entwickelt und angewendet. Die Modifikationen wurden eingeführt,
um die Konzentration an intaktem Bakterienmaterial auf dem Target zu erhöhen.
Auch wird ermittelt, dass sich die α -Cyano-4-hydroxymethylsäure aufgrund ihrer
Vorteile bei der Bildung kleiner Kristalle am besten für Impingerproben eignet.
Weitere Stärken dieser Lösung liegen in der guten Reproduzierbarkeit von Profilen,
ihrer Unempfindlichkeit gegenüber Probenverunreinigungen und in der Möglich-
keit zur Messung von Peptiden als auch kleinen Proteinen (siehe Kapitel 3.2.3)
(Wang et al., 1998).

Als Lösungsmittel wird für diese Arbeit ein Gemisch aus 50 % Acetonitril, 47 % Wasser und 3 % TFA (v/v/v) verwendet, um die Extraktion und Ionisation von den im Cytosol befindlichen Proteinen zu begünstigen (siehe Kapitel 3.2.3).

Die vorherrschenden Signale im Massenspektrum von Bioaerosol-Emissionen in dieser Arbeit werden im Bereich von 3 000 Da – 15 000 Da beobachtet. Die Gesamtzahl der in diesem Bereich beobachteten Signale ist geringer als zuvor angenommen. Die Massenspektren dieser Arbeit enthalten, unter den vorherrschenden Bedingungen zwischen 19 und 80 Molekülonen (Appendix Publikation 2 Tabelle 2). Beachtet werden Molekülonen die ein S/N-Verhältnis von ≥ 3 zeigen. Generell sollte das S/N-Verhältnis bei ≥ 5 liegen. Bei der Analytik von Umweltproben kann das S/N-Verhältnis aber so weit heruntergesetzt werden, dass ein Signal noch vom Rauschen sicher unterschieden werden kann (Gross, 2012). Die systematische Auswertung der Proben von den Anlagen 6–8 der betreffenden Schweinemastbetriebe ergeben, dass die Peaks mit einem m/z-Verhältnis 4 719, 4 817, 4 846 und 6 465 unabhängig von der Art des Stalls und des Probenahmedatums stets wiederzufinden sind. Diese Peaks sind - mit einer einzigen Ausnahme der 5 μm Fraktion der Probe aus Anlage 7 - in allen 20 μm und 5 μm Fraktionen präsent (Appendix Publikation 2 Abbildung 3). Somit ist es möglich, die vier Signale nicht nur als spezifische Biomarker, sondern auch als Indikatoren für die Reproduzierbarkeit zu verwenden.

Um diese und weitere Signale zuordnen zu können, wurde eine Datenbank mit Spektraldaten aufgebaut. Die Vorgehensweise wird nachfolgend erläutert. Aus vier Proben der Anlage 6 werden insgesamt 65 Isolate hergestellt und mittels 16S rRNA-Gensequenzierung taxonomisch bestimmt (Appendix Publikation 2 Abbildung 1). Insgesamt werden so 21 verschiedene Spezies sequenziert, die zehn verschiedenen Gattungen und drei verschiedenen Phyla angehören. Sieben Identifizierungen können Bakterien zugeordnet werden, die der Risikogruppe 2 angehören (TRBA 466, 2015). In dieser Arbeit werden mit der MALDI-TOF-MS Methode Referenzspektren für alle 21 Organismen erzeugt und vorläufige gattungs- oder speziesspezifische Peaks abgeleitet (Appendix Publikation 2 Tabelle 1). Diese Biomarker bilden den Anfang der in dieser Arbeit weitergehenden

MALDI-Datenbank. Die Datenbank besteht aus Peaks, die mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) ≥ 3 und einer Wiederholungsrate $\geq 90\%$ im kumulativen Fingerabdruckspektrum einzelner Spezies regelmäßig gemessen wurden. Die maximale Abweichung für die Zuordnung von Signalen beträgt ± 5 Da. Des Weiteren wird die Suche auf Peptidmassen mit einem N-terminalen Methionin-Verlust ausgedehnt, wenn kein Treffer für das nicht modifizierte Peptid erhalten wird. Methionin wird bei der Proteinsynthese in Eukaryoten meist an den Anfang einer Aminosäurekette gesetzt, welches nach der vollständigen Translation oft wieder abgespalten wird. Andere bekannte posttranslationale Modifikationen, z. B. Acetylierung und Methylierung werden nicht berücksichtigt. Zur weiteren Verifikation der Biomarker werden diese mit veröffentlichten Peptidmassen unter Verwendung der Proteinsequenzdatenbank UniProt (<http://www.uniprot.org/proteomes>; access2016-04-05) abgeglichen (Apweiler et al., 2004; Pundir et al., 2015; The-UniProt-Consortium, 2017). Weiter gibt die Arbeit von Arnold und Reilly aus dem Jahr 1999 einen Überblick über die mit der MALDI-TOF-MS zu beobachtenden posttranslationalen Modifikationen und unter welchen Umständen sie zu beobachten sind (Arnold und Reilly, 1999).

Da die Datenbank aus Proben einer Tierhaltungsanlage aufgebaut wurde, muss in einem nächsten Schritt getestet werden, ob sie auch repräsentativ für andere Anlagen ist. Dazu werden auch Proben aus den Anlagen 7 und 8 untersucht. Von den reproduzierbaren Signalen (4 719 Da, 4 817 Da, 4 846 Da und 6 465 Da) können mit Hilfe der Datenbank zwei zugeordnet werden: die Peaks bei 4 817 Da und 4 846 Da passen zu Ionen von *Staphylococcus epidermidis* (4 814 Da) und *Enterococcus avium* (4 842 Da). Diese beiden Arten sind in die Risikogruppe 2 eingestuft und ihr Befund in allen getesteten Bioaerosolproben könnte von Bedeutung sein, wenn anlagenbezogene Leitparameter für die Charakterisierung und den Vergleich von Bioaerosol-Emissionsproben im Allgemeinen für Tierhaltungsanlagen festgelegt werden sollen. Darüber hinaus werden in den Spektren zwischen 1 – 16 Peaks weiteren möglichen Biomarkern mit Hilfe der Datenbank zugeordnet. Mit Ausnahme von *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium xerosis* und *Nocardiopsis listeria* werden 18 von 21 Referenzspezies in einer oder mehreren Emissionsproben aus den Einrichtungen

6–8 erfolgreich nachgewiesen (siehe Appendix Publikation 2 Abbildung 4). Drei Referenzspezies, nämlich *Corynebacterium striatum*, *Moraxiella pluranimalium* und *Staphylococcus epidermidis*, werden in allen Emissionsproben unabhängig von Einrichtung oder Fraktion nachgewiesen (siehe Appendix Publikation 2 Abbildung 4 und 5).

Für *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinaeequi* und *Corynebacterium casei* können nur auf der Ebene der Gattung Biomarker ermittelt werden (Appendix Publikation 2 Tabelle 1 und Abbildung 4). Unter den drei getesteten Tierhaltungsbetrieben (6–8) zeigen die Anlagen 6 und 8 bemerkenswerte Ähnlichkeiten auf: Peaks bei 3 232 Da, 3 680 Da, 3 852 Da, 6 592 Da, 7 090 Da und 7 706 Da sind zusammen mit den vier oben genannten übereinstimmend (Appendix Publikation 2 Abbildung 4) und werden auch in den beiden Filtrations-Fractionen gefunden (Appendix Publikation 2 Abbildung 3, graue Linien). Es erscheint plausibel, dass die Peaks bei 7 706 Da und 3 852 Da einfach und doppelt geladene Ionen des gleichen Moleküls sind. Der Peak bei 6 592 Da entspricht wahrscheinlich *Brevibacterium pityocampae* (6 590 Da), einem Organismus der Risikogruppe 1 (TRBA 466, 2015). Bemerkenswert ist, dass in mehreren Fällen Gattungen oder Arten durch die Zuordnung verschiedener Biomarker identifiziert werden. Dieses Ergebnis bestätigt den Ansatz, jedem Organismus mehr als einen Peak zuzuordnen, und wirft die Frage auf, ob es notwendig sein könnte, zwischen wiederkehrenden Signalen, die als Schlüsselparаметer für den Vergleich verschiedener Bioaerosol-Emissionen verwendet werden können, und variablen Signalen zur Identifizierung bestimmter Organismen zu unterscheiden.

Das Verhältnis von zuweisbaren Biomarkern zur Gesamtzahl der Peaks erweist sich unter Berücksichtigung unterschiedlicher Probenahmestellen und Probenfraktionen (20 µm und 5 µm) als nicht konsistent (Appendix Publikation 2 Tabelle 2). Im Fall der Probe von Anlage 6 z. B. erzeugt die 5 µm Fraktion die doppelte Anzahl zuweisbarer Peaks im Vergleich zur 20 µm Fraktion. Unterschiedliche Verhältnisse werden auch in den Probenfraktionen der Anlagen 7 und 8 beobachtet. Wie bereits erwähnt, setzt sich das Bioaerosol aus vielen verschiedenen Komponenten zusammen. Diese Diversität, auch an Bakterien, beeinflusst wahrscheinlich stark die

Qualität des Spektrums, was wiederum die Nachweisbarkeit von Biomarkern direkt beeinflusst und somit das Verhältnis der zuweisbaren Peaks zur Gesamtanzahl. Die Diskrepanz unterstreicht die Herausforderung reproduzierbare Spektren zu erzeugen (Nishikaze et al., 2012; Toh-Boyo et al., 2012). Ein wichtiger Parameter für die Qualität der erzeugten Spektren ist die Konzentration intakter Zellen in den Proben. Die allgemeine Zusammensetzung einer komplexen Probe legt Messbarkeits- und Nachweisgrenzen fest, wie in früheren Studien an Milch- und Urinproben gezeigt wird (Barreiro et al., 2012; Demarco und Burnham, 2014). In den oben genannten Studien werden Nachweisgrenzen von 10^5 – 10^7 KBE/ml für das Modellbakterium *E. coli* ermittelt. Bioaerosol-Emissionen aus Schweinemastanlagen enthalten 10^7 – 10^8 Zellen/m³ (Gärtner et al., 2016). Dies entspricht ungefähr 10^5 – 10^6 Zellen pro ml Impingerprobe und bis zu 10^8 – 10^9 Zellen pro ml 20 µm oder 5 µm Fraktion, was nach den bisherigen Vorstellungen ausreichend intaktes Zellmaterial für MALDI-basierte Analysen ist. Dennoch hängt dieser Ansatz hauptsächlich von den physiologischen Bedingungen der Zielmikroorganismen und ihrer Ionisierungseffizienz ab. Zukünftige Studien müssen somit potenzielle Störungen durch Hintergrundsignale und -artefakte, den Einfluss und die Interferenz verschiedener Probenbestandteile sowie mögliche Fehlerquellen, die durch unterschiedliche Ionisationsaffinitäten verursacht werden, abdecken.

Es ist zu sehen, dass über die bisher erarbeitete Datenbank viele Peaks zugeordnet werden können, aber auch, dass ein erheblicher Teil der Peaks unbestimmt bleibt. Als mögliche Erklärung ist anzunehmen, dass ein hoher Anteil der Bakteriengattungen und -arten in den Impingerproben nicht erfasst wurde, da anaerobe oder nicht kultivierbare Bakterien in den hier durchgeführten Referenzuntersuchungen zur bakteriellen Isolierung nicht berücksichtigt werden. Darüber hinaus wurden in früheren Studien Stämme der Gattungen *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Terrisporobacter*, *Turicibacter*, *Romboutsia*, *Prevotella* und *Streptococcus* der dominanten Bakterienfraktion zugeordnet, die in Bioaerosol-Emissionen aus Schweinemastanlagen auftritt (Gärtner et al., 2016; Kim und Isaacson, 2015; Marti et al., 2009; Nehme et al., 2008). Hierzu zählen ausschließlich anaerobe Bakterien, die unter den in dieser Studie angewendeten Kultivierungsbedingungen nicht kultiviert werden. Es ist sinnvoll, die erstellte Referenzdatenbank systematisch zu

erweitern und zu aktualisieren, indem diese Organismen und andere Arten, die in Bioaerosolproben von Tierhaltungsanlagen gefunden werden, einbezogen werden. Es sollte jedoch beachtet werden, dass Datenbanken in dieser Hinsicht aufgrund der Anwesenheit von mikrobiellen Konsortien, die schwierig oder unmöglich zu kultivieren sind, niemals vollständig sein können. Daher wird empfohlen eine Prioritätenliste zu erstellen. Außerdem ist anzunehmen, dass Fragmente, die von Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren oder anderem organischen Material stammen, Hintergrundpeaks liefern können. Die Beschreibung des Hintergrundes wird daher ein wichtiger Teil weiterer Arbeiten sein.

6.1 Erkenntnisfortschritt

In dieser Arbeit werden zwei Methoden erarbeitet, mit denen Bioaerosol-Emissionen auf unterschiedliche Weisen untersucht werden können. Mit der NIR-Spektroskopie ist man in der Lage, die gesamte partikelförmige Emission schnell, nicht-destruktiv und nicht-invasiv zu untersuchen. Dies eröffnet die Möglichkeit, bei genauerer Fragestellung über das Bioaerosol weitere Analysen durchzuführen, z. B. mit Hilfe der hier vorgestellten MALDI-TOF Massenspektrometrie. In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Probenträger verwendet, um zunächst die Eignung der jeweiligen Methoden zu zeigen. Es wird empfohlen, künftig einen Probenträger für beide Methoden zu verwenden. Erste Versuche zeigen, dass mit Filterextrakten auch auswertbare MALDI-Spektren erzeugt werden können. Dieses Extrakt bietet die Möglichkeit durch Gensequenzierung weitere Fragestellungen zu beantworten, die zur Beurteilung von Bioaerosol-Emissionen aus Tierhaltungsanlagen notwendig sind. Diese Möglichkeit des modularen Analyseverfahrens lässt sich langfristig als Strategie ausbauen, um Bioaerosol-Emissionen bewerten zu können.

7 Literaturverzeichnis

Adedipe, O.E., Johanningsmeier, S.D., Truong, V.D., Yencho, G.C., 2016. Development and Validation of a Near-Infrared Spectroscopy Method for the Prediction of Acrylamide Content in French-Fried Potato. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1850-1860.

Adell, E., Estelles, F., Torres, A.G., Cambra-Lopez, M., 2012. Morphology, Chemical Composition, and Bacterial Concentration of Airborne Particulate Matter in Rabbit Farms. *World Rabbit Science* 20, 241-252.

Altun, O., Botero-Kleiven, S., Carlsson, S., Ullberg, M., Ozenci, V., 2015. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *J Med Microbiol* 64, 1346-1352.

Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N., Yeh, L.S.L., 2004. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 32, D115-D119.

Arnold, R.J., Reilly, J.P., 1999. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem* 269, 105-112.

Atkins, P.W., 1987. *Physikalische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim.

Backhaus, K., Erichson, B., Weiber, R., 2015. *Fortgeschrittene Multivariate Analysenmethode*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J., 1989. Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy* 43, 772-777.

Barreiro, J.R., Braga, P.A., Ferreira, C.R., Kostrzewa, M., Maier, T., Wegemann, B., Boettcher, V., Eberlin, M.N., dos Santos, M.V., 2012. Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting. *Proteomics* 12, 2739-2745.

Bell, E.E., Sanderson, R.B., 1972. Spectral Errors Resulting from Random Sampling-Position Errors in Fourier Transform Spectroscopy. *Appl. Opt.* 11, 688-689.

Ben-Gera, I., Norris, K.H., 1968. Direct Spectrophotometric Determination of Fat and Moisture in Meat Products. *Journal of Food Science* 33, 64-67.

Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., Prod'hom, G., 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 48, 1549-1554.

Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., de la Pezuela, C., 1998. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry . *Critical Review. Analyst* 123, 135R-150R.

Blanco, M., Cueva-Mestanza, R., Peguero, A., 2010. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 797-804.

Blease, K., Mehrad, B., Standiford, T.J., Lukacs, N.W., Gosling, J., Boring, L., Charo, I.F., Kunkel, S.L., Hogaboam, C.M., 2000. Enhanced Pulmonary Allergic Responses to *Aspergillus* in CCR2^{-/-} Mice. *The Journal of Immunology* 165, 2603-2611.

Bokobza, L., 1998. Near Infrared Spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 6, 3-17.

Brackx, M., Van Wittenberghe, S., Verhelst, J., Scheunders, P., Samson, R., 2017. Hyperspectral leaf reflectance of *Carpinus betulus* L. saplings for urban air quality estimation. *Environ Pollut* 220, 159-167.

Bremer, H., Dennis, P.P., 1996. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rate. *EcoSal Plus*, 1533-1569.

Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2013. Gesetz zum Schutz vor schädlichen Umwelteinwirkungen durch Luftverunreinigungen, Geräusche, Erschütterungen und ähnliche Vorgänge (Bundes-Immissionsschutzgesetz - BImSchG), Bundes-Immissionsschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Mai 2013 (BGBl. I S. 1274), das zuletzt durch Artikel 103 der Verordnung vom 19. Juni 2020 (BGBl. I S. 1328) geändert worden ist, in: Justiz, B.f. (Ed.).

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2015): Titel. Mehr Tierschutz in der Legehennenhaltung, Artikel. [online] Homepage: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. URL: <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/haltung-legehennen.html> [Stand 12.05.2020].

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2020a): Titel. Antibiotika in der Tiermast: Kabinett beschließt Änderung des Arzneimittelgesetzes (AMG), Pressemitteilung Nr. 114/2020. [online] Homepage: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. URL: <https://www.bmel.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/DE/2020/114-arzneimittelgesetz.html> [Stand 12.05.2020].

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2020b): Titel. Düngung, Artikel. [online] Homepage: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. URL: <https://www.bmel.de/DE/themen/landwirtschaft/pflanzenbau/ackerbau/duengung.html> [Stand 12.05.2020].

Buskirk, A.D., Green, B.J., Lemons, A.R., Nayak, A.P., Goldsmith, W.T., Kashon, M.L., Anderson, S.E., Hettick, J.M., Templeton, S.P., Germolec, D.R., Beezhold, D.H., 2014. A Murine Inhalation Model to Characterize Pulmonary Exposure to Dry *Aspergillus fumigatus* Conidia. PLoS One 9, e109855.

Carbonnelle, E., Beretti, J.L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., Ferri, A., 2007. Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 45, 2156-2161.

Casale, M., Bagnasco, L., Giordani, P., Mariotti, M.G., Malaspina, P., 2015. NIR spectroscopy as a tool for discriminating between lichens exposed to air pollution. Chemosphere 134, 355-360.

Chen, L., Xing, L., Han, L., 2013. Review of the application of near-infrared spectroscopy technology to determine the chemical composition of animal manure. J. Environ. Qual. 42, 1015-1028.

Clauß, M., 2020. Emission von Bioaerosolen aus Tierhaltungsanlagen: Methoden und Ergebnisse verfügbarer Bioaerosoluntersuchungen in und um landwirtschaftliche Nutztierhaltung, Thünen Working Paper, No. 138. Johann Heinrich von Thünen-Institut, Braunschweig.

De Bleye, C., Chavez, P.F., Mantanus, J., Marini, R., Hubert, P., Rozet, E., Ziemons, E., 2012. Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications. J Pharm Biomed Anal 69, 125-132.

Demarco, M.L., Burnham, C.A., 2014. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. Am. J. Clin. Pathol. 141, 204-212.

Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M., Malorny, B., 2008. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74, 7767-7778.

DIN EN 13098:2019-12, Exposition am Arbeitsplatz - Messung von luftgetragenen Mikroorganismen und mikrobiellen Bestandteilen - Allgemeine Anforderungen, Beuth-Verlag, Berlin, 2019.

Donohue, M.J., Smallwood, A.W., Pfaller, S., Rodgers, M., Shoemaker, J.A., 2006. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. *J Microbiol Methods* 65, 380-389.

Druckenmüller, K., 2010. Entwicklung eines Prozessanalyse-Verfahrens zur Überwachung der Gas- und Substratphase abfallstoffbetriebener Biogasanlagen mit der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS), Chemie und Biotechnologie. FH Aachen - University of Applied Science.

Dutkiewicz, J., Jabłoński, L., Olenchok, S.A., 1988. Occupational biohazards: A review. *Am J Ind Med* 14, 605-623.

Eduard, W., Pearce, N., Douwes, J., 2009. Chronic Bronchitis, COPD, and Lung Function in Farmers: The Role of Biological Agents. *Chest* 136, 716-725.

Emami, K., Askari, V., Ullrich, M., Mohinudeen, K., Anil, A.C., Khandeparker, L., Burgess, J.G., Mesbahi, E., 2012. Characterization of Bacteria in Ballast Water Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Plos One* 7.

Esbensen, K.H., Swarbrick, B., 2018. Multivariate Data Analysis. CAMO Software AS, Norway, United States.

Esbensen, K.H., Swarbrick, B., Westad, F., 2018. Multivariate Daten-Analyse: Eine Einführung in die Multivariate Analyse, Prozessanalytik und Qualität durch Design. CAMO Software AS.

Evason, D.J., Claydon, M.A., Gordon, D.B., 2001. Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 12, 49-54.

Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Garcia-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Gonzalez-Buitrago, J.M., Velazquez, E., 2011. MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae. *Plos One* 6.

Fulgêncio, A.C.C., Resende, G.A.P., Teixeira, M.C.F., Botelho, B.G., Sena, M.M., 2022. Screening method for the rapid detection of diethylene glycol in beer based on chemometrics and portable near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 391, 133258.

Fouad, M.M., Mahmoud, D.Y., Ghany, M.A.A.E., 2018. Joint NIR-BIS Based Non-Invasive Glucose Monitoring System, 2018 30th International Conference on Microelectronics (ICM), pp. 88-91.

Gaia, V., Casati, S., Tonolla, M., 2011. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* 34, 40-44.

Gallelo, G., Ghorbani, S., Ghorbani, S., Pastor, A., de la Guardia, M., 2016. Non-destructive analytical methods to study the conservation state of Apadana Hall of Persepolis. *Sci. Total Environ.* 544, 291-298.

Galvez-Sola, L., Moral, R., Perez-Murcia, M.D., Perez-Espinosa, A., Bustamante, M.A., Martinez-Sabater, E., Paredes, C., 2010. The potential of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of agroindustrial compost quality. *Sci. Total Environ.* 408, 1414-1421.

Gäb, M., Hoffmann, K., Lobe, M., Metzger, R., Ooyen, S.v., Elbers, G., Köllner, B., 2006. NIR-spectroscopic investigation of foliage of ozone-stressed *Fagus sylvatica* trees. *Journal of Forest Research* 11, 69-75.

Gärtner, A., Gessner, A., Balfanz, J., Jäckel, U., 2008a. Performance characteristics for the measurement of microorganisms sampled with the LANUV-emission impinger. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 68, 357-360.

Gärtner, A., Gessner, A., Gromöller, S., Klug, K., Knust, K., Jäckel, U., 2016. Emissions from pig barns – Investigation on the composition of bacterial community and antibiotic resistance. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 76, 31-38.

Gärtner, A., Gessner, A., Jäckel, U., 2009. Determination of microorganism emissions from a poultry house. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 69, 359-362.

Gärtner, A., Gessner, A., Knust, S., 2014a. Determination of microorganism emissions from pig houses. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 74, 505 - 510.

Gärtner, A., Gessner, A., Martin, E., Jäckel, U., 2011. Determination of microorganism emissions from poultry houses - current measurement results and comparative study at three different stables. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 71, 362-366.

Gärtner, A., Gessner, A., Martin, E., Schneider, D., Jäckel, U., 2014b. Emissions from poultry houses - Investigation on the composition of bacterial community and antibiotic resistance - Part 2: Results. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 74, 377-383.

Gärtner, A., Gessner, A., Martin, E., Schneider, D., Jäckel, U., 2014c. Emissions from poultry houses - Investigation on the composition of bacterial community and antibiotic resistance - Part 2: Results. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 74, 377-383.

Gärtner, A., Molter, L., Gessner, A., 2008b. Determination of the collection efficiency of an impinger for emission measurements of microorganisms. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 68, 351-356.

Ghosh, B., Lal, H., Srivastava, A., 2015. Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. *Environ Int* 85, 254-272.

Goldstein, J.E., Zhang, L., Borror, C.M., Rago, J.V., Sandrin, T.R., 2013. Culture conditions and sample preparation methods affect spectrum quality and reproducibility during profiling of *Staphylococcus aureus* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Letts Appl Microbiol* 57, 144-150.

Goodacre, R., Heald, J.K., Kell, D.B., 1999. Characterisation of intact microorganisms using electrospray ionisation mass spectrometry. *FEMS Microbiology Letters* 176, 17-24.

Grassi, S., Alamprese, C., 2018. Advances in NIR spectroscopy applied to process analytical technology in food industries. *Current Opinion in Food Science* 22, 17-21.

Gross, J.H., 2012. Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation, Massenspektrometrie, Ein Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 545-600.

Hattori, Y., Sugata, M., Kamata, H., Nagata, M., Nagato, T., Hasegawa, K., Otsuka, M., 2018. Real-time monitoring of the tablet-coating process by near-infrared spectroscopy - Effects of coating polymer concentrations on pharmaceutical properties of tablets. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 46, 111-121.

Herschel, W., 1800a. XIII. Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 90, 255-283.

Herschel, W., 1800b. XIV. Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 90, 284-292.

Herschel, W., 1800c. XIX. Experiments on the solar, and on the terrestrial rays that occasion heat; with a comparative view of the laws to which light and heat, or rather the rays which occasion them, are subject, in order to determine whether they are the same, or different. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 90, 437-538.

Horneffer, V., Forsmann, A., Strupat, K., Hillenkamp, F., Kubitscheck, U., 2001. Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy. Anal Chem 73, 1016-1022.

Ilina, E.N., Borovskaya, A.D., Serebryakova, M.V., Chelysheva, V.V., Momynaliev, K.T., Maier, T., Kostrzewa, M., Govorun, V.M., 2010. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 24, 328-334.

Keller, P.M., Hombach, M., Bleomberg, G.V., 2010. 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. Biospektrum 755-758.

Kim, H.B., Isaacson, R.E., 2015. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. Veterinary Microbiology 177, 242-251.

Knochenmuss, R., Dubois, F., Dale, M.J., Zenobi, R., 1996. The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 871-877.

Kok, J., Thomas, L.C., Olma, T., Chen, S.C., Iredell, J.R., 2011. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 6, e23285.

Krishnamurthy, T., Ross, P.L., 1996. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1992-1996.

Kröncke, N., Benning, R., 2022. Determination of Moisture and Protein Content in Living Mealworm Larvae (*Tenebrio molitor* L.) Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). *Insects* 13, 560.

Lighthart, B., 1994. Physics of Microbial Bioaerosols, in: Lighthart, B., Mohr, A.J. (Eds.), *In Atmospheric Microbial Aerosols: Theory and Applications*. Chapman & Hall, London, pp. 5-27.

Lovecka, P., Pacovska, I., Stursa, P., Vrchotova, B., Kochankova, L., Demnerova, K., 2015. Organochlorinated pesticide degrading microorganisms isolated from contaminated soil. *N Biotechnol* 32, 26-31.

McBratney, A., Whelan, B., Ancev, T., Bouma, J., 2005. Future Directions of Precision Agriculture. *Precision Agriculture* 6, 7-23.

Madonna, A.J., Basile, F., Ferrer, I., Meetani, M.A., Rees, J.C., Voorhees, K.J., 2000. On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2220-2229.

Madonna, A.J., Basile, F., Furlong, E., Voorhees, K.J., 2001. Detection of bacteria from biological mixtures using immunomagnetic separation combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1068-1074.

Madsen, A.M., Alwan, T., Orberg, A., Uhrbrand, K., Jorgensen, M.B., 2016. Waste Workers' Exposure to Airborne Fungal and Bacterial Species in the Truck Cab and During Waste Collection. *Ann Occup Hyg* 60, 651-668.

Malmberg, P., Rask-Andersen, A., Rosenhall, L., 1993. Exposure to Microorganisms Associated With Allergic Alveolitis and Febrile Reactions to Mold Dust in Farmers. *CHEST* 103, 1202-1209.

Marques, A.S., Moraes, E.P., Junior, M.A., Moura, A.D., Neto, V.F., Neto, R.M., Lima, K.M., 2015. Rapid discrimination of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing and non-producing *Klebsiella pneumoniae* strains using near-infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate analysis. *Talanta* 134, 126-131.

Martin, E., Gessner, A., Gärtner, A., Jäckel, U., 2012. Molecular characterization of airborne bacteria in emission samples of broiler houses. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 72, 99-103.

Marti, R., Dabert, P., Pourcher, A.M., 2009. Pig manure contamination marker selection based on the influence of biological treatment on the dominant fecal microbial groups. *AEM* 75, 4967-4974.

Millner, P.D., 2009. Bioaerosols associated with animal production operations. *Bioresource Technol* 100, 5379-5385.

Murray, P.R., 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 16, 1626-1630.

Nehme, B., Letourneau, V., Forster, R.J., Veillette, M., Duchaine, C., 2008. Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. *Environ. Microbiol.* 10, 665-675.

Nieren, M., Hoffmann, K., Gäb, M., van Ooyen, S., Köllner, B., Elbers, G., 2008. Schnellerfassung der Wirkung von Luftschadstoffen auf Pflanzen mit der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) Immissionsschutz 02, 82 - 90

Nishikaze, T., Okumura, H., Jinmei, H., Amano, J., 2012. Correlation between Sweet Spots of Glycopeptides and Polymorphism of the Matrix Crystal in MALDI Samples. *Mass Spectrom. (Tokyo)* 1, A0006.

Nomikos, P., MacGregor, J.F., 1994. Monitoring batch processes using multiway principal component analysis. *AIChE Journal* 40, 1361-1375.

Norris, K.H., Marten, G.C., Shenk, J.S., Barton, F.E., 1989. Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality. U.S. Government Printing Office:, Washington, DC.

Olenchok, S.A., Green, F.H.Y., Mentnech, M.S., Mull, J.C., Sorenson, W.G., 1983. In vivo pulmonary response to *Aspergillus terreus* spores. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 6, 67-80.

Oppliger, A., Charriere, N., Droz, P.O., Rinsoz, T., 2008. Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; Use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *Ann Occup Hyg* 52, 405-412.

Oremland, M., Michels, K.R., Bettina, A.M., Lawrence, C., Mehrad, B., Laubacher, R., 2016. A computational model of invasive aspergillosis in the lung and the role of iron. *BMC Systems Biology* 10, 34.

Philip A., M., 2002. Near-infrared diode laser spectroscopy in chemical process and environmental air monitoring. Chemical society Reviews.

Pundir, S., Magrane, M., Martin, M.J., O'Donovan, C., Consortium, T.U., 2015a. Searching and Navigating UniProt Databases. Current Protocols in Bioinformatics 50, 1.27.21-21.27.10.

Quintelas, C., Mesquita, D.P., Lopes, J.A., Ferreira, E.C., Sousa, C., 2015. Near-infrared spectroscopy for the detection and quantification of bacterial contaminations in pharmaceutical products. International Journal of Pharmaceutics 492, 199-206.

Rezzonico, F., Vogel, G., Duffy, B., Tonolla, M., 2010. Application of whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification and clustering analysis of pantoea species. Appl Environ Microbiol 76, 4497-4509.

Ricchi, M., Mazzarelli, A., Piscini, A., Di Caro, A., Cannas, A., Leo, S., Russo, S., Arrigoni, N., 2017. Exploring MALDI-TOF MS approach for a rapid identification of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis field isolates. J Appl Microbiol 122, 568-577.

Rinnan, Å., Berg, F.v.d., Engelsen, S.B., 2009. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. TrAC Trends in Analytical Chemistry 28, 1201-1222.

Rodriguez-Saona, L.E., Khambaty, F.M., Fry, F.S., Calvey, E.M., 2001. Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy. J Agric Food Chem 49, 574-579.

Ryzhov, V., Fenselau, C., 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. Anal. Chem. 73, 746-750.

Sala-Comorera, L., Vilaró, C., Galofré, B., Blanch, A.R., García-Aljaro, C., 2016. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI–TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine analysis at a drinking water treatment plant. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 219, 577-584.

Sandrin, T.R., Demirev, P.A., 2018. Characterization of microbial mixtures by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Reviews* 37, 321-349.

Sandrin, T.R., Goldstein, J.E., Schumaker, S., 2013. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom. Rev.* 32, 188-217.

Santos, I.C., Hildenbrand, Z.L., Schug, K.A., 2016. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst* 141, 2827-2837.

Sedo, O., Sedlacek, I., Zdrahal, Z., 2011. Sample Preparation Methods for MALDI-MS Profiling of Bacteria. *Mass Spectrom. Rev.* 30, 417-434.

Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1991. Population Definition, Sample Selection, and Calibration Procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Science* 31, cropscl1991.0011183X003100020049x.

Siesler, H., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H., 2002. Near-infrared spectroscopy: Principles, instruments, applications.

Statistisches Bundesamt (2022): Titel. Niedrigster Schweinebestand seit der deutschen Vereinigung. [online] URL: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2022/06/PD22_266_413.html [abgerufen am 03.10.2022].

Stepien-Pysniak, D., Hauschild, T., Rozanski, P., Marek, A., 2017. MALDI-TOF Mass Spectrometry as a Useful Tool for Identification of *Enterococcus* spp. from Wild Birds and Differentiation of Closely Related Species. *J Microbiol Biotechn* 27, 1128-1137.

Stetzenbach, L.D., Buttner, M.P., Cruz, P., 2004. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr Opin Biotech* 15, 170-174.

Straumfors, A., Heldal, K.K., Eduard, W., Wouters, I.M., Ellingsen, D.G., Skogstad, M., 2016. Cross-shift study of exposure–response relationships between bioaerosol exposure and respiratory effects in the Norwegian grain and animal feed production industry. *Occupational and Environmental Medicine* 73, 685-693.

Suthiluk, P., Saranwong, S., Kawano, S., Numthuam, S., Satake, T., 2008. Possibility of using near infrared spectroscopy for evaluation of bacterial contamination in shredded cabbage. *International Journal of Food Science & Technology* 43, 160-165.

Swarbrick, B., 2016. Near Infrared Spectroscopy and its role in scientific and Engineering Applications, p. 69.

Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft – TA Luft 2002. Erste Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Bundes–Immissionsschutzgesetz, in: *Reaktorsicherheit*, B.f.U.N.u. (Ed.).

Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M., Tao, H., Yoshikawa, H., Hotta, Y., Hosoda, A., Tamura, H., 2007. Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. *Anal Chem* 79, 8712-8719.

The-UniProt-Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 45, D158-D169.

Tian, Y., Gao, X., Qi, W.-L., Wang, Y., Wang, X., Zhou, J., Lu, D., Chen, B., 2021. Advances in differentiation and identification of foodborne bacteria using near infrared spectroscopy. *Analytical Methods* 13, 2558-2566.

Toh-Boyo, G.M., Wulff, S.S., Basile, F., 2012. Comparison of sample preparation methods and evaluation of intra- and intersample reproducibility in bacteria MAL-DI-MS profiling. *Anal Chem* 84, 9971-9980.

TRBA 466, 2015. Technical Rules for Biological Agents: Classification of Prokaryotes (Bacteria and Archaea) into Risk Groups . Committee on Biological Agents – ABAS. Joint Ministerial Gazette (GMBI), Berlin, pp. 65, 317, 116.

Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C., Wahl, K., 2005. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 71, 58-64.

VDI-2066-1, 2006. Messen von Partikeln - Staubmessungen in strömenden Gasen - Gravimetrische Bestimmung der Staubbeladung, in: *Umweltmesstechnik*, F. (Ed.). VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss Düsseldorf, pp. 1-111.

VDI-4250-1, 2014. Bioaerosole und biologische Agenzien - Umweltmedizinische Bewertung von Bioaerosol-Immissionen - Wirkungen mikrobieller Luftverunreinigungen auf den Menschen, in: *Umweltqualität*, F. (Ed.). VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss Düsseldorf, 1-25.

VDI-4253-2, 2004. Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilz-Konzentrationen in der Luft - Indirektes Verfahren nach Probenahme auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern, in: *Umweltmesstechnik*, F. (Ed.). VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss Düsseldorf, 1-32.

VDI-4253-3, 2019. Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum quantitativen kulturellen Nachweis von Bakterien in der Luft - Verfahren nach Abscheidung in Flüssigkeiten, in: *Normenausschuss, V.D.-K.R.d.L.K.-.* (Ed.). Fachbereich Umweltmesstechnik Düsseldorf, pp. 1-60.

VDI-4253-4, 2013. Bioaerosole und biologische Agenzien - Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Fluoreszenzanalyse nach Anfärbung mit DAPI, in: Umweltqualität, F. (Ed.). VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss Düsseldorf, 1-27.

VDI-4255-2, 2019. Bioaerosole und biologische Agenzien - Emissionsquellen und -minderungsmaßnahmen in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung - Übersicht, in: Umweltqualität, F. (Ed.). VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss Düsseldorf, 1-48.

VDI-4255-3, 2016. Bioaerosole und biologische Agenzien - Emissionsfaktoren für Geflügelhaltung, in: Umweltqualität, F. (Ed.). VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss Düsseldorf, 1-29.

VDI-4257-2, 2011. Bioaerosole und biologische Agenzien - Messen von Emissionen - Probenahme von Bioaerosolen und Abscheidung in Flüssigkeiten, in: Umweltmesstechnik, F. (Ed.). VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss Düsseldorf, pp. 1-60.

Wang, Z.P., Russon, L., Li, L., Roser, D.C., Long, S.R., 1998. Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy. Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 456-464.

Wang, X., Fu, Q., Sheng, J., Yang, X., Jia, J., Du, W., 2010. Construction of a universal quantitative model for ibuprofen sustained-release capsules from different manufacturers using near-infrared diffuse reflection spectroscopy. Vibrational Spectroscopy 53, 214-217.

Weishaupt, I., Neubauer, P., Schneider, J., 2022. Near-infrared spectroscopy for the inline classification and characterization of fruit juices for a product-customized flash pasteurization. Food Science & Nutrition 10, 800-812.

Welker, M., Moore, E.R., 2011. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 34, 2-11.

Westblade, L.F., Garner, O.B., MacDonald, K., Bradford, C., Pincus, D.H., Mochon, A.B., Jennemann, R., Manji, R., Bythrow, M., Lewinski, M.A., Burnham, C.A., Ginocchio, C.C., 2015. Assessment of Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Bacterial and Yeast Identification. *J Clin Microbiol* 53, 2349-2352.

Wieme, A.D., Spitaels, F., Aerts, M., De Bruyne, K., Van Landschoot, A., Vandamme, P., 2014. Effects of growth medium on matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectra: a case study of acetic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 80, 1528-1538.

Workman, J., Weyer, L., 2008. *Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy* CRC Press, New York.

Wunschel, D.S., Hill, E.A., McLean, J.S., Jarman, K., Gorby, Y.A., Valentine, N., Wahl, K., 2005. Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on matrix assisted laser desorption/ionization whole cell protein fingerprints. *J Microbiol Methods* 62, 259-271.

Zamfir, M., Gerstner, D.G., Walser, S.M., Bunger, J., Eikmann, T., Heinze, S., Kolk, A., Nowak, D., Raulf, M., Sagunski, H., Sedlmaier, N., Suchenwirth, R., Wiesmuller, G.A., Wollin, K.M., Tesseraux, I., Herr, C.E.W., 2019. A systematic review of experimental animal studies on microbial bioaerosols: Dose-response data for the derivation of exposure limits. *Int J Hyg Environ Health* 222, 249-259.

Zhang, C., Su, J., 2014. Application of near infrared spectroscopy to the analysis and fast quality assessment of traditional Chinese medicinal products. *Acta Pharm. Sin. B* 4, 182-192.

8 Appendix

8.1 Publikation 1

Near-infrared spectroscopy (NIRS) as a tool to monitor exhaust air from poultry operations

Druckenmüller, K., Günther, K., and Elbers, G. (2018) Near-infrared spectroscopy (NIRS) as a tool to monitor exhaust air from poultry operations. Science of the Total Environment 630: 536–543.

Copyright © 2018 Science of the Total Environment

Autorenbeiträge:

- Katharina Druckenmüller führte alle NIRS betreffenden Messungen und Auswertungen durch.
- Katharina Druckenmüller war für die Erstellung, Einreichung und Veröffentlichung der Publikation verantwortlich.
- Katharina Druckenmüller erhielt bei der Erstellung der Publikation Unterstützung von Gereon Elbers und Klaus Günther
- Die Arbeitsgruppe von Andrea Gärtner (LANUV NRW, Emissionsmessungen) organisierte und führte die Emissionsprobenahmen und die gravimetrische Bestimmung der Staubbelastung durch.



Near-infrared spectroscopy (NIRS) as a tool to monitor exhaust air from poultry operations

Katharina Druckenmüller^a, Klaus Günther^b, Gereon Elbers^{a,*}

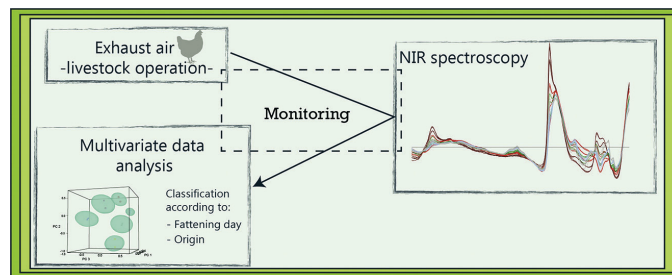
^a Faculty of Chemistry and Biotechnology, FH Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, Germany

^b Institute of Nutritional and Food Sciences, Food Chemistry, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany

HIGHLIGHTS

- The suitability of NIR spectroscopy as a monitoring tool for exhaust air from poultry operation systems was investigated.
- One of the two poultry sites was equipped with an exhaust air cleaning system.
- Sample classification according to fattening days, raw, and cleaned exhaust air was possible by using chemometric methods.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2017

Received in revised form 5 February 2018

Accepted 7 February 2018

Available online xxxx

Editor: Jianmin Chen

Keywords:

NIRS
Exhaust air
Rapid detection
Poultry
Monitoring
Emission

ABSTRACT

Intensive poultry operation systems emit a considerable volume of inorganic and organic matter in the surrounding environment. Monitoring cleaning properties of exhaust air cleaning systems and to detect small but significant changes in emission characteristics during a fattening cycle is important for both emission and fattening process control. In the present study, we evaluated the potential of near-infrared spectroscopy (NIRS) combined with chemometric techniques as a monitoring tool of exhaust air from poultry operation systems. To generate a high-quality data set for evaluation, the exhaust air of two poultry houses was sampled by applying state-of-the-art filter sampling protocols. The two stables were identical except for one crucial difference, the presence or absence of an exhaust air cleaning system. In total, twenty-one exhaust air samples were collected at the two sites to monitor spectral differences caused by the cleaning device, and to follow changes in exhaust air characteristics during a fattening period. The total dust load was analyzed by gravimetric determination and included as a response variable in multivariate data analysis. The filter samples were directly measured with NIR spectroscopy. Principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA), and factor analysis (FA) were effective in classifying the NIR exhaust air spectra according to fattening day and origin. The results indicate that the dust load and the composition of exhaust air (inorganic or organic matter) substantially influence the NIR spectral patterns. In conclusion, NIR spectroscopy as a tool is a promising and very rapid way to detect differences between exhaust air samples based on still not clearly defined circumstances triggered during a fattening period and the availability of an exhaust air cleaning system.

© 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.
E-mail address: elbers@fh-aachen.de (G. Elbers).

1. Introduction

Intensive poultry farming and, in particular, confinement systems emit considerable volume of dust produced by exfoliated epithelial cells of skin and gastrointestinal origin, as well as litter, feed, feather and fecal material (Ghosh et al., 2015). Further, microorganisms are an integral part of ambient air in poultry houses (Vucemilo et al., 2007) and can readily spread to the surrounding areas. Studies suggest adverse health effects of such emissions on the people living in the surrounding areas of such intensive animal facilities or on people working in it (Walser et al., 2015). Hence, it is not surprising that public awareness of contaminated air and food crops associated with these emitted pollutants is increasing (Ferguson et al., 2016; Friese et al., 2013; Jahne et al., 2015; Jahne et al., 2016; Smit et al., 2014). Currently, valid health-related main parameters for exhaust air emissions from animal fattening facilities are not yet clear (Walser et al., 2015). This circumstance may be attributed to firstly, air quality research at animal production facilities is elaborate and time-consuming and, secondly, the analysis of such environmental samples is not an easy task. Therefore, there is a constant need for innovative measurement techniques with available practical benefits and applications that can provide economically feasible real-time measurement tools for process information and control.

A promising approach is the user friendly, non-destructive and fast data generating measurement method called near-infrared spectroscopy (NIRS). The NIRS is a well-established technique to monitor composition changes in complex samples and to predict physical, chemical or biological process values within the fields of medicine, agricultural, and food science (Addiepe et al., 2016; Chen et al., 2013; Gallelo et al., 2016; Galvez-Sola et al., 2010; Zhang and Su, 2014). Chemometric techniques, multivariate data analysis as it is also referred to, have made these applications feasible. These techniques, together with transformation algorithms, make it possible to extract and picture the hidden sample information from the relatively weak and highly overlapping NIR spectral bands at $4000\text{--}14000\text{ cm}^{-1}$ and to build qualitative and quantitative assays. For sample classification, the most commonly used chemometric techniques are principal component analysis (PCA) (Jackson, 1991) and linear discriminant analysis (LDA) (Næs et al., 2002). The unique features of NIR spectroscopy, namely, speed, accuracy, little or no sample work-up, and non-invasive or non-contact measurement makes it an attractive and economically applicable real-time measurement technique. In the pharmaceutical and food industries, for example, NIRS is used as a reliable quality measurement and process-controlling tool to receive continuous data without the need to take samples and wait for hours for the analytical results (Dixit et al., 2017; Gowen et al., 2008; Kona et al., 2013).

The potential of NIR spectroscopy to analyze industrial and urban air pollutants in various matrices has been demonstrated in different works. For example, the group of Malaspina reported that lichens analyzed by NIRS can be used as biomarkers to illustrate the extents of environmental air pollution in industrial surroundings (Casale et al., 2015). Brackx et al. used VIS-NIR reflectance spectra of leaf samples for urban air quality estimation (Brackx et al., 2017), whereas Gäb et al. described an NIRS approach to determine the toxic effects of air pollution on trees by using leaf sample (Gäb et al., 2006). However, the application of NIRS to real exhaust air filter samples from intensive livestock production systems has not yet been done.

In this baseline study, NIR spectroscopy was evaluated for its potential in the recording of unique exhaust air fingerprints, which could be evaluated by multivariate data analysis methods. To that end, particulate matter in exhaust air from two poultry houses (stables 1 and 2) was collected by filter sampling according to the German protocol VDI 2066 Part 1 during a fattening period (VDI 2066 Part 1, 2006). The exhaust air of two poultry operation sites, only one with an exhaust air cleaning system, were sampled in parallel. The dust loads were determined by using the manual gravimetric reference method according

to German VDI protocol 2066 Part 1 (VDI 2066 Part 1, 2006). Here, a progressive analytical application is proposed for NIR spectroscopy combined with chemometric techniques as a possible monitoring tool of exhaust air from livestock operation systems.

2. Material and methods

2.1. Description of the sampling sites and determination of the total dust load

2.1.1. The poultry houses (stables 1 and 2)

Two identical poultry fattening facilities were selected for dust measurement in exhaust air (stables 1 and 2). These facilities housed poultry to be fattened over a period of 40 days. During the entire sampling period of 40 days, each stable housed approximately 41,400 poultries on an area of 1800 m^2 . In addition, only stable 2 was equipped with an exhaust air cleaning system (Co. Schulz, Systemtechnik). The exhaust air cleaning system involved streaming the exhaust air through a grating of polypropylene irrigated with water, which had a geometric surface of $80\text{ m}^2/\text{m}^3$ (Co. Gea 2H Water Technologies GmbH, type NET-138). See the Supporting information deposited in the online version of this paper for a further description of the sampling sites including a scheme of the installed exhaust air cleaning system.

2.1.2. Exhaust air sampling

All dust samples were taken according to the German guideline (VDI 2066 Part 1, 2006). The guideline describes the procedure of a manual gravimetric reference measurement method for the determination of the dust load and the dust mass flow of flue gas, flowing through a defined cross section. All dust samples were taken on quartz fiber filters of 5 cm diameter (Munktell MK 360). The selection of the convenient filter surface was an important factor for NIRS measurement to avoid background signals. Therefore, we used in this study quartz fiber filters due to results from Rodriguez et al. that polycarbonate and microporous polyethylene filters show strong absorption bands between 4000 and 6000 cm^{-1} (Rodriguez-Saona et al., 2001). At stable 1, the sampling took place on the 3rd, 10th, 19th, 24th and 33rd day of the 40 days fattening period. Samples generated at fattening day three and ten were used to become familiar with the sampling site characteristics. At stable 2, the sampling took place on the 19th, 24th and 33rd day of the fattening period, and was carried out at the same time of day as stable 1 (Table 1). The sampling duration time was 1 h. Two or three exhaust air samples were taken on each sampling day (Table 1). A more detailed description of the sampling device and the procedure can be found in the supporting document to this paper.

2.1.3. Gravimetric determination of dust load

All filter were pre-treated before and after sampling according to the guideline VDI 2066 Part 1 (VDI 2066 Part 1, 2006). Before sampling, the pre-sampling condition of each filter was determined (blank filter value). This was achieved by drying the filters until a constant weight was measured. The filters were dried in a drying oven for at least 1 h at $\geq 180^\circ\text{C}$ and were cooled down to ambient temperature in a desiccator for at least 8 h. The drying times were noted and kept constant for all samples. The filters were weighed in light-weighted closed boxes. After weighing, the filters were protected against dust and damage until used. Directly before the sample measurements the filters were removed from the transport container using forceps and laid into the sampling device. The latter was provided with seals, put into the connecting case and screwed gas-tight to the inlet cone by using the union nut. A more detailed description of the sampling system is described and figured in the supporting information to this paper. After sampling, the measurement filters were removed from the filtration device and stored in a dust-proof transport container. The filter samples were dried for at least 2 h at 150°C . Reweighing of the filter samples was carried out

Table 1
 Experimental data on the exhaust air sampling and the gravimetric dust load determination.

Poultry stable 1 (without exhaust air clean up)					Poultry stable 2 (with exhaust air clean up)				
Fattening day	Sampling			Total dust [mg]	Fattening day	Sampling			Total dust [mg]
	Beginning [time]	End [time]	Duration [min]			Beginning [time]	End [time]	Duration [min]	
3	12:41	13:41	60	1.0					
3	13:54	15:24	90	2.1					
10	10:38	12:08	90	11.3					
10	12:17	13:47	90	5.4					
10	14:02	15:02	60	3.4					
19	12:02	13:01	60	7.4	19	12:02	13:01	60	4.4
19	13:05	14:04	60	6.5	19	13:05	14:04	60	4.9
24	10:41	11:40	60	9.2	24	10:41	11:40	60	5.1
24	11:48	12:47	60	10.7	24	11:48	12:47	60	6.1
24	12:59	13:58	60	9.9	24	12:59	13:58	60	4.8
33	10:17	11:16	60	5.8	33	10:17	11:16	60	3.3
33	11:22	12:21	60	6.3	33	11:22	12:21	60	3.4
33	12:26	13:25	60	6.1	33	12:26	13:25	60	3.6

under precisely the same conditions that were used in the determination of the filter blank values before sampling.

2.1.4. Background

For background characterization, a blank sample was taken at least once a day prior to any sample measurements being initiated. The production of a blank filter was the same procedure described in Section 2.1.3 for the gravimetric determination of dust load, except the sampling device was not started.

2.2. Spectrometric analysis and NIRS model building

2.2.1. NIRS sample preparation

The near-infrared reflectance spectra of all dust samples were taken directly from the filters after drying in a desiccator (see Section 2.1.3.).

2.2.2. NIR spectra acquisition

Near-infrared spectra were recorded using a Fourier transform NIR spectrometer Vector 22-N (Bruker, Karlsruhe, Germany) operating with an integration sphere. The filter samples were placed directly on a circular quartz window of 2.2 cm diameter above the integration sphere. NIR reflectance spectra were recorded between 3700 and 12,500 cm^{-1} with a resolution of 8 cm^{-1} . In total 64 scans were averaged per sample.

2.2.3. NIR data processing and model development

Data pretreatments and multivariate data analysis were performed using the Unscrambler X Software Version 10.4.1 (Camo Smart, Woodbridge, NJ, USA) and Bruker OPUS IDENT 5.0 Software package (Bruker, Karlsruhe, Germany).

In total 42 NIR spectra were used for model development, generated from 2 replicates of 21 samples from stable 1 ($n = 13$) and stable 2 ($n = 8$). Further, 13 control filters without exhaust air pollutions (blanks) were used to define the background (see Section 2.1.4). Thus, the original NIR data matrix was comprised of 55 rows (samples) and 1080 columns (variables: (1) stable, (2) fattening day, (3) dust load, and absorbance at different wavenumbers). In this study, the absorption bands of the non-pretreated NIR spectra were broad, relatively weak, and show a consistent baseline offset in the spectra patterns. This was perhaps due to the different dust loadings and dust particle size distribution sampled by the filter material. Therefore, we used transformation algorithms to eliminate scatter effects, baseline shifts and offsets such as to minimize non-chemical effects, and to resolve overlapping bands for visualization of significant spectral patterns. Based on the classification outputs of multivariate data analysis models from PCA, LDA and FA, we systematically

examined the optimal spectra transformation algorithms, and, in this way, we also determined the significant NIR spectral region. Finally, we applied two pre-treatment packages composed of (1) the standard normal variate (SNV) (Geladi et al., 1985) together with detrending (DT) and (2) vector normalization together with the first derivative. The results of SNV and DT transform spectral data are shown in Fig. 1[B], [C], and [D]. The vector normalization/first derivative modified spectral data are presented in the supporting information (Fig. S3). However, further different spectral pre-treatments of the sample spectra from NIRS give similar results to those obtained here with our two pre-treatment packages. This observation should be investigated by further studies.

The principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) show the best results when pre-treatment package number one was used, whereas pre-treatment package number two fits for the factor analysis (FA). The NIR spectra region for PCA and LDA models covered the wavenumber region from 7500 to 4000 cm^{-1} . For FA model, the best results, however, was reached with the absorption bands between 4667 and 5007 cm^{-1} . Finally, PCA results we presented here were produced with a data matrix of 55 objects (samples), 452 variables (NIR wavenumbers) and three category variables (stable, fattening day and dust load).

For Linear discriminant analysis (LDA), which yields the simplest form of classification methods, the number of objects must be larger than the number of variables. In this work, the number of variables (452 wavenumbers) was much larger than the number of objects (55 samples). Therefore, the PCA data matrix (55 objects $\times$ 7 variables) was submitted to LDA for analysis (PCA-LDA-model). The PCA and LDA models were created by using the Unscrambler X Software Version 10.4.1 (Camo Smart, Woodbridge, NJ, USA). The FA model was created by using the Bruker OPUS IDENT Software package.

3. Results and discussion

In this study, exhaust air samples were used to determine the suitability of NIR spectroscopy combined with chemometric techniques as a tool to monitor emission characteristics originating in intensive housing facilities for maturing poultry. Since exhaust air is a complex compound mixture lacking detailed characterization, the suitability of NIRS as a reliable monitoring tool can be broken down to two basic requirements: (i) the capability to discriminate between samples containing different particle (dust) loads; (ii) the capability to monitor changes in the sample compositions. The strategy to address these two requirements required a sampling setup to generate a reliable data size which could give us a modest but important “big picture” of emission characteristic trends during the poultry fattening cycle. After careful

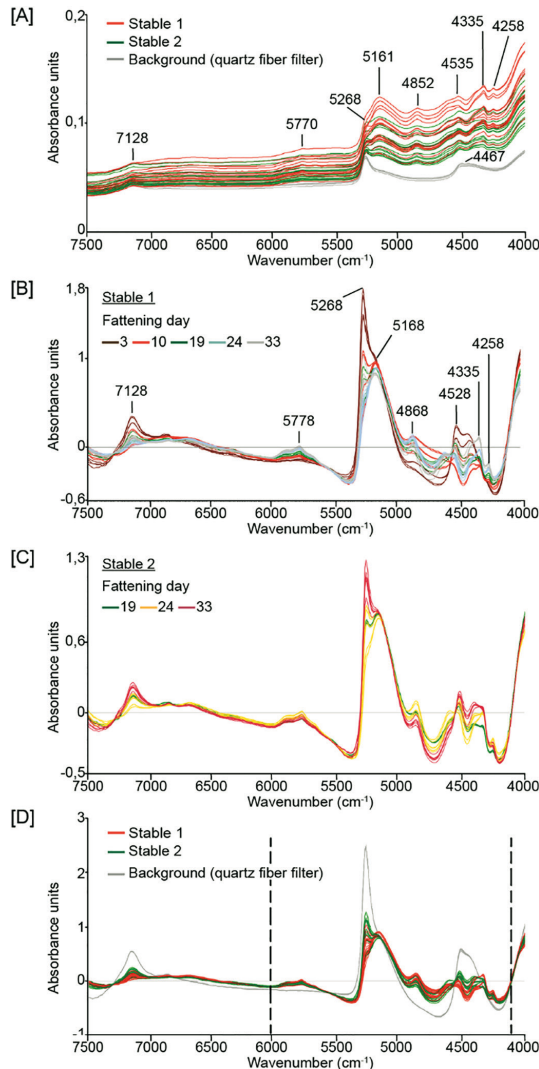


Fig. 1. [A] Raw NIR-spectra of all exhaust air samples and the filter background. [B] Standard normal variate (SNV) and detrending (DT) transformed NIR-spectra of samples from stable 1 taken on different fattening days. [C] SNV and DT transformed NIR-spectra of samples from stable 2 taken on different fattening days. Notably, stable 2 was equipped with an exhaust air cleaning system. [D] SNV and DT transformed NIR-spectra of all samples from stables 1 and 2 and the filter background.

consideration, a total of 16 exhaust air samples were taken in parallel at two poultry operating systems during a poultry fattening cycle. The two sampled stables were equal in terms of space and the number of poultry, but crucially, one of the poultry houses was equipped with an exhaust air cleaning system, the other not. This approach was essential to address (i) the potential effects of the air cleaning system on the spectral patterns, and (ii) to follow changes in the sample composition at both sites individually. This way, NIRS could be evaluated as a monitoring tool during fattening cycles even in the presence of a functional exhaust air cleaning system.

3.1. NIR spectra of exhaust air samples

The unmodified NIR spectra of exhaust air samples from stables 1 and 2, as well as the quartz fiber filter background, are shown in Fig. 1A. All sample spectra were readily distinguishable from the filter background by six absorption bands at 5770, 5161, 4852, 4535, 4335 and 4258 cm⁻¹, respectively. The use of transformation algorithms revealed the hidden structure of the NIR exhaust air data set. After the pre-treatment, we were able to determine the differences among the exhaust air samples according to fattening day (Fig. 1[B] and [C]) and origin (Fig. 2[D]) by using SNV and DT transformation algorithms at the previously named six wavenumber regions. These wavenumbers are intriguing targets for qualitative and quantitative model building by chemometric techniques, because variations in these regions were pronounced and tentative assignments to microbial biomarkers might be possible based on previous reports (Supplementary Table S2). At the moment, these spectra-structure correlations are speculative, however, and reference methods need to be implemented in future research to allow for detailed spectra characterization. Table S2 in the supporting document to this paper gives a summary on the tentative assignments of the spectral bands found in this study to microbial markers or spectra-structure correlations based on literature.

3.2. Spectra interpretation

All raw and pretreated sample spectra yielded absorption bands in the range from 4000 to 7500 cm⁻¹, which cover mainly overtones and combinations of lower energy fundamental vibrations associated with C—H, O—H and N—H bonds (Fig. 1[A]–[D]). The first band at 7128 cm⁻¹ could be related to the first overtones of asymmetric and symmetric stretching modes of N—H and the O—H (water) groups (Workman and Weyer, 2008). The region from 5600 to 6100 cm⁻¹ contains first overtones of the CH stretching modes of CH₃, CH₂, and aromatic CH groups (Siesler et al., 2002). According to Rodríguez et al. and Marques et al., this absorption region was also present in microbial spectra and attributed to bacterial aromatic/heterocyclic groups, which are mainly associated with the first overtone –CONH– secondary and primary amides, a probable biochemical signature of DNA/RNA (Marques et al., 2015; Rodríguez-Saona et al., 2001). The absorption bands at 5168 and 5268 cm⁻¹ could be associated with second overtone vibrations of C=O stretching modes in carboxylic acids and esters (Workman and Weyer, 2008). These signals were also observed by Rodríguez et al. for bacterial strains, lecithin (~5246 cm⁻¹), and glycogen/N-acetylmuramic acid (~5192 cm⁻¹) standards (Rodríguez-Saona et al., 2001). The band at 4528 cm⁻¹ could be attributed to 2νC=O + “amide III”, which are signatures of secondary amides in proteins. The region from 4444 to 4200 cm⁻¹ is mostly associated with alkenes (CH₂ stretching and bend) or methylene groups (CH stretching and bend) (Kammies et al., 2016; Marques et al., 2015). The exhaust air samples showed a characteristic, universally present absorption region around 4335 cm⁻¹. Calvey and coworkers reported a prominent absorption signal at 4335 cm⁻¹ after measuring bacterial strains, lecithin, and deoxyribonucleic acid standards (Rodríguez-Saona et al., 2001).

To summarize, NIR spectra from stables 1 and 2 pictured crucial differences between the fattening days in each stable as well as on fattening days between the two stables at the wavenumber region from 4150 to 6000 cm⁻¹ (see Fig. 2[D]). We saw that the most informative wavenumber absorption bands were measured at 5778, 5266, 5168, 4868, 4528, 4335, and 4258 cm⁻¹. These wavenumbers may be suitable for qualitative and quantitative model building by chemometric techniques because of crucial variations in the absorption curve and the absorption intensity. Interestingly, the NIR-fingerprints of emission samples were similar to the fingerprints of microbial substances reported in other studies (Kammies et al., 2016; Marques et al., 2013; Rodríguez-Saona et al., 2001). Considering that the microbial fraction is an integral part of the exhaust air from livestock operations (Gärtner et al., 2016;

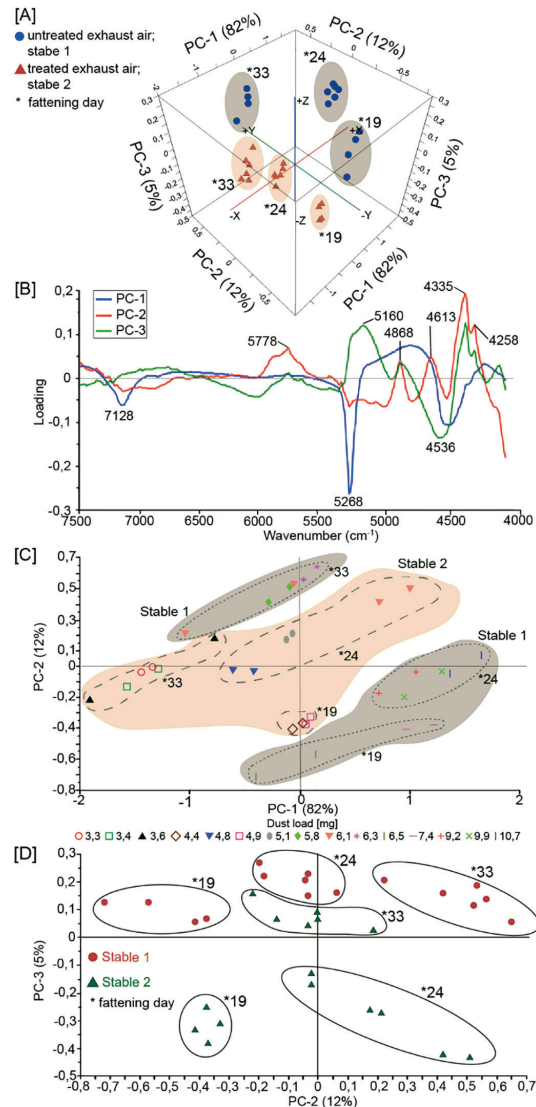


Fig. 2. Scores and loadings of PCA produced by using SNV + DT transformed NIR spectra in the region between 4000 and 7500 cm^{-1} : [A] 3-D scores plot assessing the combined data from 16 air exhaust samples done in parallel. [B] Loadings profiles for the first three PCs of the PCA data model shown in [A]. [C] Scores plot of principal components one and two with dust load [mg] as response variable. [D] Scores plot with the second and third principal components.

Gärtner et al., 2014a; Gärtner et al., 2014b), this similarity makes good sense.

3.3. Graphical presentation of emission samples by principal component analysis (PCA)

The pretreated spectra yielded first indications for spectral differences according to sample origin and fattening day, but were not effective in gaining a “full picture” of the influences of total dust load and

sample compositions. Thus, PCA was used to clearly reveal and visualize these effects. PCA is the most used customary method for data compression and allows to extract the important information from a multidimensional data set into a 2-D or 3-D dimensional level and to cluster samples with similarities together. PCA was applied to the SNV and DT transformed NIR spectroscopic emission data set (55 objects $\times$ 455 variables; wavenumber range 7500–4000 cm^{-1}).

The result of the PCA modeling for the parallel sampled exhaust air data set (32 objects $\times$ 455 variables) is shown in Fig. 2[A]–[D]. The 3-D scores plot, shown in Fig. [A], of PC-1 (82%) versus PC-2 (12%) versus PC-3 (5%) revealed seven distinct clusters for the exhaust air samples depending on the fattening day and origin (stables 1 and 2). The PCA results on data from stables 1 and 2 are displayed in the supporting information of this paper (Fig. S4 for stable 1 and Fig. S5 and S6 for stable 2).

For a better understanding of the sample cluster characteristic display in the PCA scores plot, the loadings plot shows the relationship between the principal components and the important wavenumbers. In Fig. 2[B], the loadings for PC-1, 2 and 3 are shown in a line plot. For PC-1, the highest loading values were found at 7128, 5268, and 4459 cm^{-1} , and these loadings describe 82% of the data variance. These spectral bands also appeared in the transformed NIR spectra of the filter background displayed in Fig. 1[D].

Based on these results, we conclude that the mass of dust residuals, loaded on and in the quartz fiber filters, provided the strongest variation in the dataset. These values can be factored in as a response variable in the PCA model and the samples with the smallest and highest dust load have the most influence on PC-1 (Fig. 2[C]). In general, the dust load on the filters varied between 3.3 and 10.7 mg from 16 air exhaust samples done in parallel (see Table 1 and Fig. 2[C]). In conclusion, by applying PCA on pretreated NIR spectra, the effects of different dust loads can be visualized, thus fulfilling the first requirement of NIRS as a monitoring tool. For future investigations, the high influence of the dust load could be related to discrete values, which, for example, can represent a good or bad cleaning power of the installed exhaust air cleaning system. A thesis by Decius concluded that an efficient reduction of bioaerosol particles is critically dependent on the effectiveness of cleaning systems (Decius, 2016). The possibility of simply measuring precipitator efficiency of an exhaust air cleaning would find application as an economically feasible emission quality-control tool for non-scientists.

Another promising application of NIRS is the prediction of physical variables, for example, the particle sizes in exhaust air. This is an interesting application because exhaust air from poultry houses contain numerous dust particles in a size range between 0.5 and 100 μm , and these particles are associated with a wide range of adverse health effects, especially particles with an aerodynamic diameter of less than or equal to 4 μm (Jerez et al., 2014). Ilari et al. describe a procedure to determine particle sizes in different powders by using scatter correction in diffuse near-infrared reflectance (Ilari et al., 1988). Rosas et al. used NIRS as process controlling tool of pharmaceutical granulates by monitoring critical quality attributes like pH, moisture and particle size (Rosas et al., 2012). A further consideration for NIRS use might be that despite a good precipitator efficiency of exhaust air cleaning systems, with the result of a reduced dust load, there still may be health-related components emitted from the fattened poultry. Therefore, NIRS appears to be very useful tool in determining various quality values for emission-control.

To fulfill the second requirement of NIRS as a suitable exhaust air monitoring tool (which is the capability to follow composition changes in sampled airborne material), PC-2 and PC-3 were addressed. The loadings of PC-2 and PC-3 together describe 17% of the data variance (Fig. 2[B] and [D]). In Fig. 2[D], using these two principal components it is possible to classify the NIR spectra in seven distinct clusters, which are related to the bands in the spectra region between 4000 and 6000 cm^{-1} . This data variance may be attributed to relevant variations in emission composition.

When the objects were projected onto PC-2, the NIR data from stables 1 and 2 from fattening day 19 yielded negative scores, while data from stable 1 of fattening day 33 and stable 2 of fattening day 24 exhibited primarily positive scores. On PC-3, the exhaust air samples from stable 1 of fattening days 19, 24 and 33 showed positive scores, whereas negative scores were found for samples from stable 2 of fattening days 19 and 24. Samples from stable 2 and fattening day 33 showed positive scores similar to the same-day data from stable 1. Examination of the loading weights revealed the characteristic NIR wavenumbers which significantly contribute to the variation in the dataset (Fig. 2 [B]). For PC-2, positive loading values were found at 5778, 4868, 4613, and 4335 cm^{-1} , respectively. The negative values were found at 5269, 4752, and 4474 cm^{-1} . Therefore, we suggest that the loadings profile of PC-2 represents the variations between fattening days. For PC-3, the positive loading values were found at 5160, 4868 and 4335 cm^{-1} . The highest negative value was found at 4536 cm^{-1} . Therefore, we suggest that the loadings profile of PC-3 represents the variations between stables 1 and 2. Although these changes may be induced by as yet unknown circumstances, the dataset could be clearly classified into seven groups based on fattening day and origin (stables 1 and 2).

In Fig. 2[B], the loadings of PC-2 and PC-3 showed highly positive and negative values at about 5778, 5160, 4868, 4613, 4536, 4335, and 4258 cm^{-1} . These spectral bands were also found by Rodríguez et al., Kammies et al. and Marques et al. by NIR measurement of samples from gram-positive and gram-negative bacteria (Kammies et al., 2016; Marques et al., 2015; Rodríguez-Saona et al., 2001). This result is an important finding and leads us to positively consider the use of NIRS as tracking tool for the microbial fraction in air exhausted from all livestock operations, not just poultry operations.

The possibility of NIRS combined with chemometrics to identify and quantify bacterial contaminations on and in different matrices has been demonstrated in previous studies. Tidwell et al. used near-infrared spectroscopy for differentiation between three classes of bacteria embedded in a biofilm, which was deposited on orthopedic implant material (Tidwell et al., 2015). The Sousa group demonstrated the applicability of FT-NIR spectroscopy for detection and quantification of bacteria in saline solutions at various concentrations ($10\text{--}10^8$ CFUs/ml) (Quintelas et al., 2015). Combined with the results presented here, these findings suggest that it is feasible to use NIRS for the qualitative or even quantitative determination of microorganisms emitted from animal housing facilities.

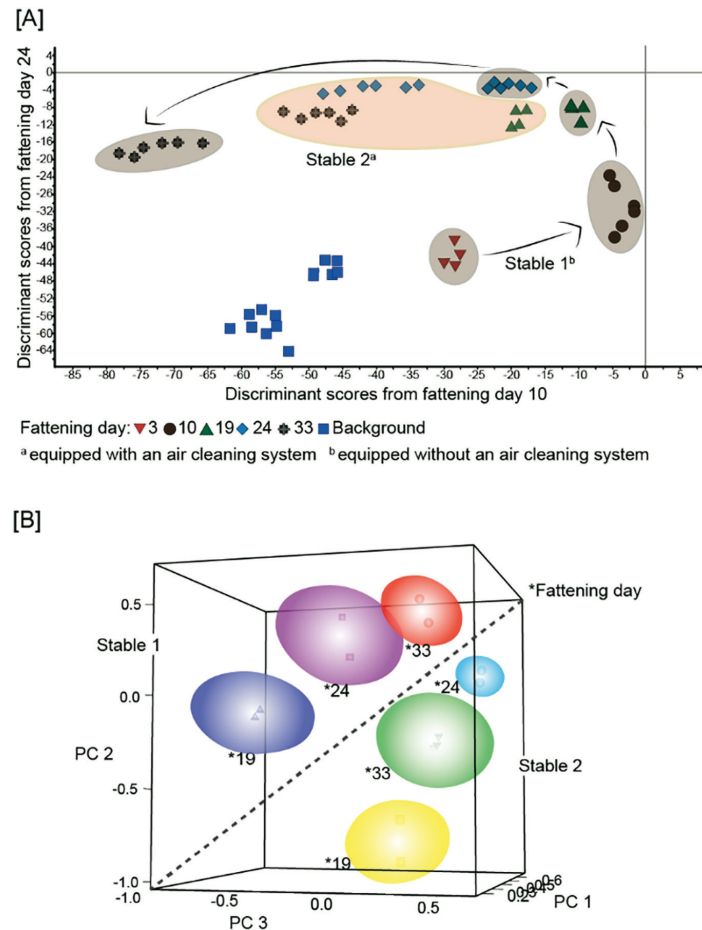


Fig. 3. [A] PCA-LDA discrimination plot of the 21 exhaust air samples together with the background (quartz fiber filter), and [B] factor analysis (FA) scores plot for vector normalized + first derivative pre-processed NIR exhaust air data from stables 1 and 2.

We offer a cautionary note. In contrast to medical samples, environmental samples are less easy to define and present a challenge to the qualitative and quantitative NIR method development. Exhaust air from animal facilities is a complex mixture of chemical and biological components and the composition permanently varies during a fattening cycle. Oppliger et al. observed a significant increase in the levels of total inhalable dust, endotoxins, and total bacterial cells in poultry houses in the course of different stages of fattening (Oppliger et al., 2008). A study by Vucemilo et al. reported that total dust and fungal concentrations measured at the end of the fattening period in a broiler house were almost identical to the initial ones, whereas the concentrations of bacteria and ammonia showed a sinusoidal increase from beginning to end of the fattening period (Vucemilo et al., 2007). Studies by Gärtner et al. (2014c) and Martin et al. (2012) showed that the composition of the bacterial community in emissions from poultry houses changed significantly during a fattening cycle. This high sample complexity presents a challenge that NIR spectroscopy combined with chemometrics has yet to address. The challenge lays, firstly, in the derivation of continuous process-controlling variables. Secondly, NIR spectroscopy requires reference techniques to build up reliable quantitative and qualitative NIRS models. Thirdly, structurally similar and strongly interacting components constrain the modeling of qualitative and quantitative NIRS models. However, investigations by Nyden et al. show the possibility to quantify single components despite incomplete knowledge of the sample spectra with appropriate algorithms (Nyden et al., 1988).

3.4. LDA and FA model

The linear discriminant analysis (LDA) is a supervised method for sample classification, by finding maximal variance between individual classes and minimal variance within classes. The LDA model constructed with the previously condensed NIR data matrix by PCA (55 objects $\times$ 7 variables) was tested for its suitability to additionally classify the exhaust air samples according to stable origin and fattening days. The discrimination of the 2 replicates of 21 exhaust air samples and the background is displayed in a biplot (Fig. 3[A]). Evaluation of the PCA-LDA model convincingly demonstrated a natural grouping of the data with respect to the sample origin (stables) and dates (fattening days). Moreover, it is shown that by using this model, the effects of the constituents of exhaust air samples can be convincingly discriminated from the background.

Factor analysis (FA) was performed as an additional multivariate classification model based on the abovementioned discriminate criteria. A 3-D plot of the first three principal components (PC-1, PC-2, and PC-3) revealed a clear grouping of the sample data with respect to their origin (stable 1 or 2) and sampling day (fattening day) (Fig. 3[B]). Overall, the PCA-LDA results reflected the results of the PCA and FA models displayed in Figs. 2, and 3[B].

4. Conclusions

NIR spectroscopy combined with chemometric techniques shows a high potential to provide the nature of exhaust air from poultry operation systems in a non-destructive, quick, and elegant way. In pursuance of this aim, exhaust air was sampled in parallel during a 40 days fattening process at two equal operation systems. The crucial and only difference was that only one of the two poultry houses was equipped with an exhaust air cleaning system. The analysis of the resulting data revealed much about the use of NIR spectroscopy in exhaust air analysis. Transformed exhaust air fingerprints show formidable differences at 10 absorption bands in the wavenumber region at 7128, 5268, 5778, 5160, 4868, 4613, 4536, 4459, 4335, and 4258 cm^{-1} . These absorption bands allow PCA to group the exhaust air samples into fattening day and treated or untreated exhaust air (stables 1 and 2). We demonstrate the capability of NIRS combined with chemometric techniques to (i) discriminate exhaust air samples according to the nature and total

amount of deposited dust load, and (ii) to clearly reveal differences in the compositions of samples from different stables and/or taken on different fattening days. Thus, in this initial study, we demonstrate the potential for NIR spectroscopy to provide unique characteristic exhaust air fingerprints. At this point, however, further information regarding the chemical, biological and physical properties of exhaust air is missing. In future research, continuous values for exhaust air characteristics like particle size, total microbial count, concentration of ammonia etc. should be generated by reference methods to establish reliable NIR calibration routines for future use.

Acknowledgements

We thank Andrea Gärtner, Andreas Gessner and their team (North Rhine-Westphalia State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (LANUV NRW), Essen, Germany) for the organization and execution of the exhaust air sampling and gravimetric determination of dust load. Finally, we thank Johannes Schiffels, Sandra Kirby and Leila Büttner Mostaco-Guidolin for editorial support.

Funding sources

This work was supported by the North Rhine-Westphalia State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (LANUV NRW), Essen, Germany; the FH Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, Germany; and the Society for Chemical Engineering and Biotechnology e.V. (DECHEMA), Frankfurt, Germany.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.072>.

References

- Adeipe, O.E., Johanningsmeier, S.D., Truong, V.D., Yencho, G.C., 2016. Development and validation of a near-infrared spectroscopy method for the prediction of acrylamide content in French-fried potato. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1850–1860.
- Brackx, M., Van Wittenberghe, S., Verhelst, J., Scheunders, P., Samson, R., 2017. Hyperspectral leaf reflectance of *Carpinus betulus* L. saplings for urban air quality estimation. *Environ. Pollut.* 220, 159–167.
- Casale, M., Bagnasco, L., Giordani, P., Mariotti, M.G., Malaspina, P., 2015. NIR spectroscopy as a tool for discriminating between lichens exposed to air pollution. *Chemosphere* 134, 355–360.
- Chen, L., Xing, L., Han, L., 2013. Review of the application of near-infrared spectroscopy technology to determine the chemical composition of animal manure. *J. Environ. Qual.* 42, 1015–1028.
- Decius, M., 2016. Examination of the Function and Efficiency of a Biological Air Cleaner under Practical Conditions With Regard to the Reduction Potential for Bioaerosols. Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztiertierethologie. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Dixit, Y., Casado-Gavaldà, M.P., Cama-Moncunill, R., Cullen, P.J., Sullivan, C., 2017. Challenges in model development for meat composition using multipoint NIR spectroscopy from at-line to in-line monitoring. *J. Food Sci.* 82, 1557–1562.
- Ferguson, D.D., Smith, T.C., Hanson, B.M., Wardyn, S.E., Donham, K.J., 2016. Detection of airborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* inside and downwind of a swine building, and in animal feed: potential occupational, animal health, and environmental implications. *J. Agromedicine* 21, 149–153.
- Friese, A., Schulz, J., Zimmermann, K., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., Hartung, J., Rosler, U., 2013. Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2759–2766.
- Gab, M., Hoffmann, K., Lobe, M., Metzger, R., Ooyen, S., Elbers, G., Köllner, B., 2006. NIR-spectroscopic investigation of foliage of ozone-stressed *Fagus sylvatica* trees. *J. For. Res.* 11, 69–75.
- Gallelo, G., Ghorbani, S., Ghorbani, S., Pastor, A., de la Guardia, M., 2016. Non-destructive analytical methods to study the conservation state of Apadana Hall of Persepolis. *Sci. Total Environ.* 544, 291–298.
- Galvez-Sola, L., Moral, R., Perez-Murcia, M.D., Perez-Espinosa, A., Bustamante, M.A., Martinez-Sabater, E., Paredes, C., 2010. The potential of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of agroindustrial compost quality. *Sci. Total Environ.* 408, 1414–1421.
- Gärtner, A., Gessner, A., Knust, S., 2014a. Determination of microorganism emissions from pig houses. *Gefahrstoffe - Reinhalt. Luft* 74, 505–510.

- Gärtner, A., Gessner, A., Martin, E., Schneider, D., Jäckel, U., 2014b. Emissions from poultry houses - investigation on the composition of bacterial community and antibiotic resistance - part 2: results. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 74, 377–383.
- Gärtner, A., Gessner, A., Martin, E., Schneider, D., Jäckel, U., 2014c. Emissions from poultry houses - investigation on the composition of bacterial community and antibiotic resistance - part 2: results. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 74, 377–383.
- Gärtner, A., Gessner, A., Gromöller, S., Klug, K., Knust, K., Jäckel, U., 2016. Emissions from pig barns - investigation on the composition of bacterial community and antibiotic resistance. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 76, 31–38.
- Geladi, P., MacDougall, D., Martens, H., 1985. Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Appl. Spectrosc.* 39, 491–500.
- Ghosh, B., Lal, H., Srivastava, A., 2015. Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. *Environ. Int.* 85, 254–272.
- Gowen, A.A., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., Bell, S.E., 2008. Recent applications of chemical imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 10–22.
- Ilari, J.L., Martens, H., Isaksson, T., 1988. Determination of particle size in powders by scatter correction in diffuse near-infrared reflectance. *Appl. Spectrosc.* 42, 722–728.
- Jackson, J.E., 1991. *A Users Guide to Principal Components*. Wiley & Sons Inc., New York.
- Jahne, M.A., Rogers, S.W., Holsen, T.M., Grimberg, S.J., Ramler, I.P., 2015. Emission and dispersion of bioaerosols from dairy manure application sites: human health risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 49, 9842–9849.
- Jahne, M.A., Rogers, S.W., Holsen, T.M., Grimberg, S.J., Ramler, I.P., Kim, S., 2016. Bioaerosol deposition to food crops near manure application: quantitative microbial risk assessment. *J. Environ. Qual.* 45, 666–674.
- Jerez, S.B., Cheng, Y., Bray, J., 2014. Exposure of workers to dust and bioaerosol on a poultry farm. *J. Appl. Poult. Res.* 23, 7–14.
- Kammies, T.L., Manley, M., Gouws, P.A., Williams, P.J., 2016. Differentiation of foodborne bacteria using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9305–9320.
- Kona, R., Qu, H., Mattes, R., Jancsik, B., Fahmy, R.M., Hoag, S.W., 2013. Application of in-line near infrared spectroscopy and multivariate batch modeling for process monitoring in fluid bed granulation. *Int. J. Pharm.* 452, 63–72.
- Marques, A.D., Nicacio, J.T.N., Cidral, T.A., de Melo, M.C.N., de Lima, K.M.G., 2013. The use of near infrared spectroscopy and multivariate techniques to differentiate *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* inoculated into pulp juice. *J. Microbiol. Methods* 93, 90–94.
- Marques, A.S., Moraes, E.P., Junior, M.A., Moura, A.D., Neto, V.F., Neto, R.M., Lima, K.M., 2015. Rapid discrimination of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing and non-producing *Klebsiella pneumoniae* strains using near-infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate analysis. *Talanta* 134, 126–131.
- Martin, E., Gessner, A., Gärtner, A., Jäckel, U., 2012. Molecular characterization of airborne bacteria in emission samples of broiler houses. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 72, 99–103.
- Næs, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T., 2002. *A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications, Chichester, UK.
- Nyden, M.R., Forney, G.P., Chittur, K., 1988. Spectroscopic quantitative analysis of strongly interacting systems: human plasma protein mixtures. *Appl. Spectrosc.* 42, 588–594.
- Oppliger, A., Charriere, N., Droz, P.O., Rinsoz, T., 2008. Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *Ann. Occup. Hyg.* 52, 405–412.
- Quintelas, C., Mesquita, D.P., Lopes, J.A., Ferreira, E.C., Sousa, C., 2015. Near-infrared spectroscopy for the detection and quantification of bacterial contaminations in pharmaceutical products. *Int. J. Pharm.* 492, 199–206.
- Rodriguez-Saona, L.E., Khambaty, F.M., Fry, F.S., Calvey, E.M., 2001. Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 49, 574–579.
- Rosas, J.G., Blanco, M., Gonzalez, J.M., Alcalá, M., 2012. Real-time determination of critical quality attributes using near-infrared spectroscopy: a contribution for process analytical technology (PAT). *Talanta* 97, 163–170.
- Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M., 2002. *Near-infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH Weinheim.
- Smit, L.A., Hooiveld, M., van der Sman-de Beer, F., Opstal-van Winden, A.W., Beekhuizen, J., Wouters, I.M., Yzermans, C.J., Heederik, D., 2014. Air pollution from livestock farms, and asthma, allergic rhinitis and COPD among neighbouring residents. *Occup. Environ. Med.* 71, 134–140.
- Tidwell, J.E., Dawson-Andoh, B., Adedipe, E.O., Nkansah, K., Dietz, M.J., 2015. Can near-infrared spectroscopy detect and differentiate implant-associated biofilms? *Clin. Orthop. Relat. Res.* 473, 3638–3646.
- VDI 2066 Part 1, 2006. Particulate matter measurement; dust measurement in flowing gases; gravimetric determination of dust load. Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN-Normenausschuss KRdL. Düsseldorf, Beuth, Berlin, pp. 1–111.
- Vucemilo, M., Matkovic, K., Vinkovic, B., Jakšić, S., Granić, K., Mas, N., 2007. The effect of animal age on air pollutant concentration in a broiler house. *Czech J. Anim. Sci.* 52, 170–174.
- Walser, S.M., Gerstner, D.G., Brenner, B., Bunger, J., Eikmann, T., Janssen, B., Kolb, S., Kolk, A., Nowak, D., Raulf, M., Sagunski, H., Sedlmaier, N., Suchenwirth, R., Wiesmüller, G., Wollin, K.M., Tesseraux, I., Herr, C.E., 2015. Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols - a systematic review. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218, 577–589.
- Workman, J., Weyer, L., 2008. *Practical Guide to Interpretive Near-infrared Spectroscopy*. CRC Press, New York.
- Zhang, C., Su, J., 2014. Application of near infrared spectroscopy to the analysis and fast quality assessment of traditional Chinese medicinal products. *Acta Pharm. Sin.* 34, 182–192.

Supporting Information to the manuscript entitled

“Near-infrared spectroscopy (NIRS) as a tool to monitor exhaust air from poultry operations”

by

Katharina Druckenmüller, Klaus Günther and Gereon Elbers

Supplementary Material and Methods

• Poultry farm description

Both stables 1 and 2 used floor systems for poultry farming. Softwood chipping material was used for floor bedding. The poultry were fed with a dry mixed feed composed of corn, wheat, and soy. Between 3.25 and 3.50 kg were fed per poultry and per fattening period. On average, a fattening period lasted 40 days and then nine days were usually needed for stable cleaning. The poultry facilities have an annual utilization rate of approx. 8760 operational hours or 300 days per year including cleaning. For our purposes, 7200 h were relevant for sampling and for emission monitoring. In Table S1, information on stable space, number of chimneys, date of the first poultry fattening after building completion, and number of poultry is included.

Table S1: General stable description

Stable no.	Space	Number of chimneys	Date of the first poultry fattening after building completion	Number of poultry
1	20 * 90 m	16	26.05.2010	~41400
2	20 * 90 m	16	09.04.2010	~41400

- **Exhaust air cleaning system**

Stable 2 was equipped with a pilot exhaust air cleaning system. A scheme of the device is shown in Figure S1.

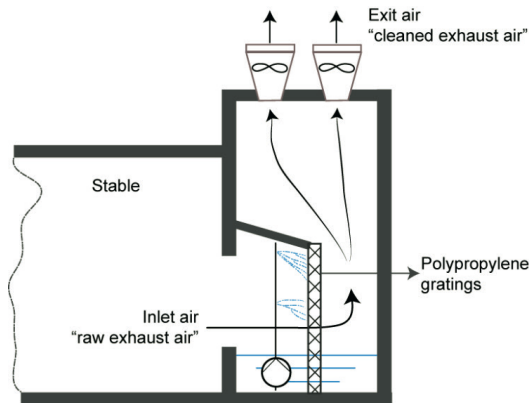


Figure S1: Scheme of the exhaust air cleaning system installed in stable 2 (LANUV NRW; FB 68 Emission measurement).

- **German guideline VDI 2066 Part 1**

The following paragraphs contain relevant information regarding the procedure of particle measurement in flowing gases according to VDI 2066 Part 1, which was applied in this study. In general, the German VDI guideline 2066 Part 1 describes a manual gravimetric reference procedure for the determination of the dust load (dust content) and the dust mass flow of a dust/gas mixture flowing through a defined cross-section under isokinetic conditions. In this study, an in-stack sampling device configuration was used (Figure S2). The sampling device was installed with the plane filter head device and a removal entry nozzle located inside the flue gas duct. The dust from the exhaust air was deposited on quartz fiber filters for further analysis.

- **Measurement conditions**

The following measurement parameters were monitored continuously during the sampling procedure: (1) temperature in the duct 1shell, (2) outdoor air temperature, (3) air pressure at height of measurement site, (4) moisture content of the flue gas, (5) static and dynamic pressure in the duct shall for determination of the gas velocity (grid measurement).

- **Sampling system**

An example of the sampling system, which was used in this study, is shown in Figure S2. The measurement is carried out with a plane filter head device. The entry nozzle is placed right in front of the filter head device. The sample volumetric flow is sucked in by use of a suction device via a cooling and drying system and quantified by a gas metric device. Flue gas temperature and dynamic and static pressure were measured in the flue gas duct.

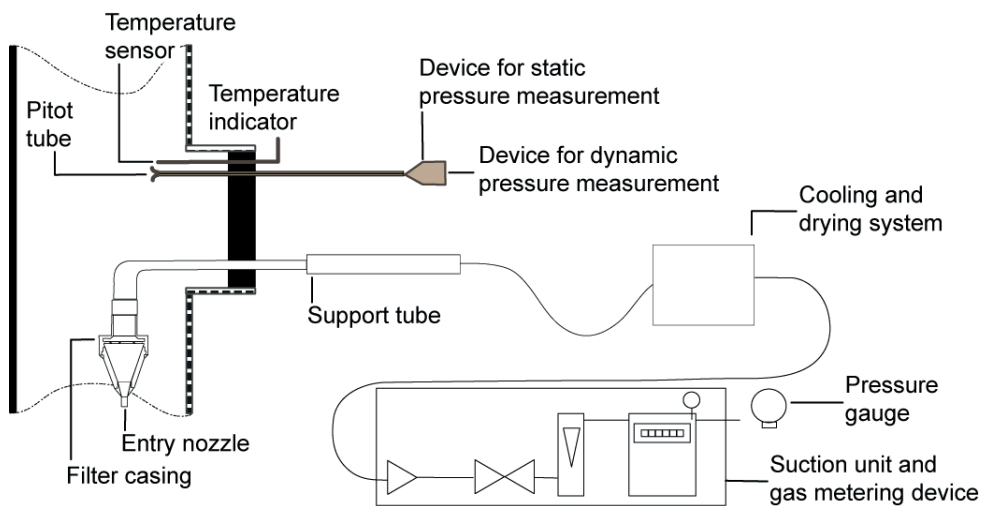


Figure S2: In-stack sampling system according to VDI 2066, Part 1.

- **Sampling**

First, the sampling equipment (Figure S2) was assembled and checked for possible leaks by sealing the nozzle and starting the suction device. A check for the zero point to ensure measurement accuracy was completed. The filtration device must be pre-heated externally or in the flue gas duct (least one hour) to achieve a temperature above or equal to the flue gas temperature before it is used. The device is then inserted into the duct with the nozzle, if possible facing downstream while avoiding contact with any parts of the duct to circumvent probe contaminations with particles adhering to or deposited on the duct wall. Although the sampling time of a single measurement is usually 30 min, the reproducibility of the measurement is significantly increased if the sampling time is increased to 60 min or 90 min. In this study, the sampling time was set at 60 minutes.

- **Filter**

In this study, quartz fiber filters were used despite their somewhat weak mechanical properties, because the filters are proven to be efficient for NIRS measurements. However, various filters types with different characteristics are available (Edrol 227/11/60 glass fiber, Sartorius cellulose nitrate 8 µm etc.) and the filters we use comply with the following minimum requirements: (1) the filter efficiency should exceed 99,5% when a test aerosol with a mean particle diameter of 0,3 µm at a maximum anticipated flow rate is used, (2) the filter material should not react with or absorb gaseous compounds contained in the gas to be sampled, (3) it should be thermally stable when the maximum anticipated temperature is considered (conditioning, sampling etc.).

Supplementary Results and Discussion

• Spectra interpretation.

Table S2: Relevant NIR absorption bands observed in this study and its possible chemical and biological origin.

Measured NIR wavenumbers [cm ⁻¹]	Tentative structure and response sample (wavenumber(s)) assignments (Workman and Weyer, 2008)	Tentative microbial sample assignments and associated wavenumber(s)/Reference
~ 7128	Structure: O-H stretching bands Samples: Alcohols (~ 7120-7030 cm ⁻¹)	Sample: <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> (~ 7117 cm ⁻¹)/ Kammies et al., 2016 Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 7023 cm ⁻¹)/ Kammies et al., 2016 Sample: Two different subspecies of <i>Klebsiella pneumoniae</i> (~ 7143-7092 cm ⁻¹)/ Marques et al., 2015
~ 5778	Structure: C-H methyl, O-H associated as ROHCH ₃ Samples: Alcohols (~ 5773 cm ⁻¹)	Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 5776 cm ⁻¹)/ Rodríguez-Saona et al., 2001
~ 5269	Structure: C=O Carbonyl (C=OOH) Samples: Acids, carboxylic (~ 5263 cm ⁻¹)	Sample: Two different subspecies of <i>Klebsiella pneumoniae</i> (~ 5291-5236 cm ⁻¹)/ Marques et al., 2015 Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 5200 cm ⁻¹)/ Rodríguez-Saona et al., 2001
~ 5160-5176	Structure: O-H Samples: Water, moisture (~ 5160-5155 cm ⁻¹) Structure: O-H stretching and HOH bending combination Samples: Polysaccharides (~ 5181 cm ⁻¹)	Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 5163 cm ⁻¹)/ Kammies et al., 2016 Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 5192 cm ⁻¹), glycogen (5194 cm ⁻¹), and N-acetylmuramic acid (5190 cm ⁻¹)/ Rodríguez-Saona et al., 2001
~ 4868	Structure: CONH ₂ combination of amide A and amide II Samples: Proteins (Polypeptides) (~ 4855 cm ⁻¹) Structure: N-H combination band -C=O amide I band Samples: N-H from Protein (~ 4867-4878 cm ⁻¹) Structure: N-H combination band from secondary amides Samples: Protein (~ 4850 cm ⁻¹)	Sample: <i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i> (~ 4838 cm ⁻¹)/ Kammies et al., 2016 Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 4866 and 4874 cm ⁻¹)/ Rodríguez-Saona et al., 2001
~ 4613	Structure: CONH ₂ Samples: Proteins (~ 4815 cm ⁻¹)	Sample: Two different subspecies of <i>Klebsiella pneumoniae</i> (~ 4651-4167 cm ⁻¹)/ Marques et al., 2015 Sample: <i>S. enteritidis</i> (~ 4615 cm ⁻¹)/ Kammies et al., 2016 Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 4606 cm ⁻¹)/ Rodríguez-Saona et al., 2001
~ 4536	Structure: N-H primary amine band of diamino-compound Samples: Amine (~ 4535 cm ⁻¹) Structure: CONH ₂ specifically due to N-H and C=O groups Samples: Proteins (~ 4525-4540 cm ⁻¹)	Sample: Two different subspecies of <i>Klebsiella pneumoniae</i> (~ 4651-4167 cm ⁻¹)/ Marques et al., 2015 Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 4584 cm ⁻¹)/ Rodríguez-Saona et al., 2001
~ 4335	Structure: C-H (bending) Samples: Lipids (~ 4329 cm ⁻¹)	Sample: <i>E. coli</i> (~ 4329 cm ⁻¹)/ Kammies et al., 2016 Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 4342 cm ⁻¹), lecithin (~ 4335 cm ⁻¹) and N-acetylmuramic acid (4355 cm ⁻¹)/ Rodríguez-Saona et al., 2001 Sample: Two different subspecies of <i>Klebsiella pneumoniae</i> (~ 4651-4167 cm ⁻¹)/ Marques et al., 2015
~ 4258	Structure: C-H (bending) Samples: Polysaccharides (~ 4252 cm ⁻¹)	Sample: Two different subspecies of <i>Klebsiella pneumoniae</i> (~ 4651-4167 cm ⁻¹)/ Marques et al., 2015 Sample: Gram ⁺ and gram ⁻ bacteria (~ 4342 cm ⁻¹) and lecithin (~ 4335 cm ⁻¹)/ Rodríguez-Saona et al., 2001

- Graphical presentation of emission samples by principal component analysis (PCA).
- NIR exhaust air spectra from stables 1 and 2

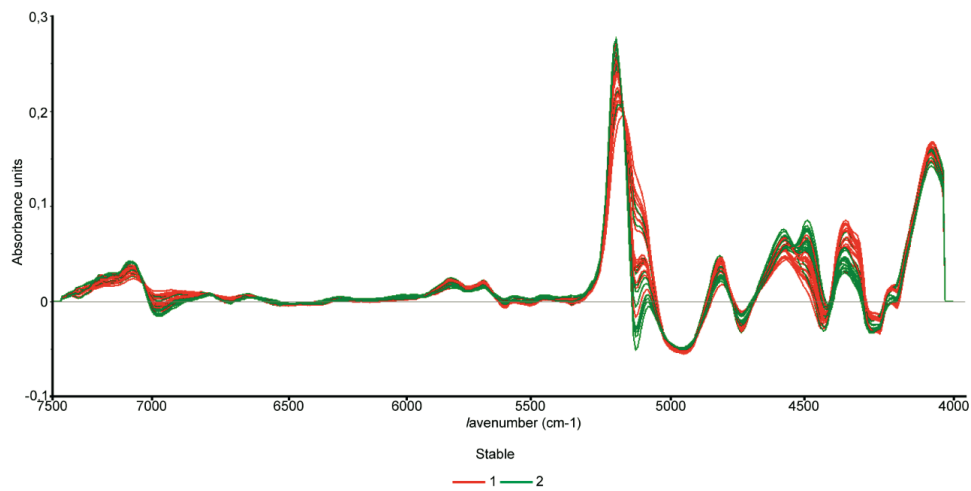


Figure S3: NIR reflectance spectra pretreated by vector normalization and first derivative algorithms of samples from stables 1 and 2 taken at different fattening days.

• PCA on data from stable 1

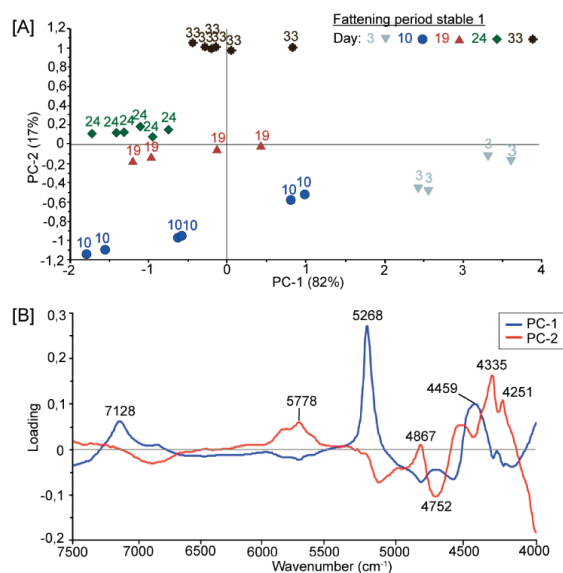


Figure S4: PCA scores [A] and loadings [B] plots of all samples from stable 1 (pretreatments SNV and DT, spectral region 7500-4000 cm⁻¹)

• PCA on data from stable 2

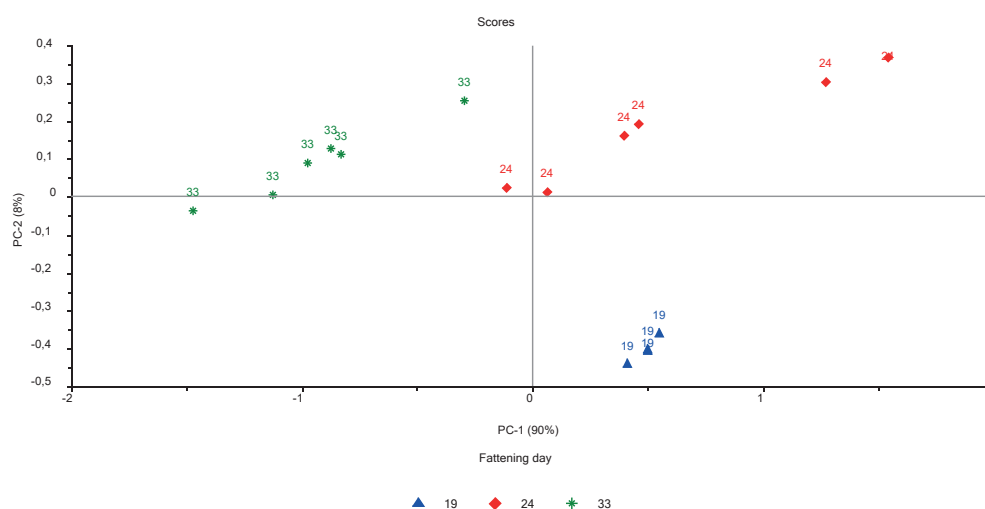


Figure S5: PCA scores plot of all samples from stable 2 (pretreatments SNV and DT, spectral region 7500-4000 cm^{-1})

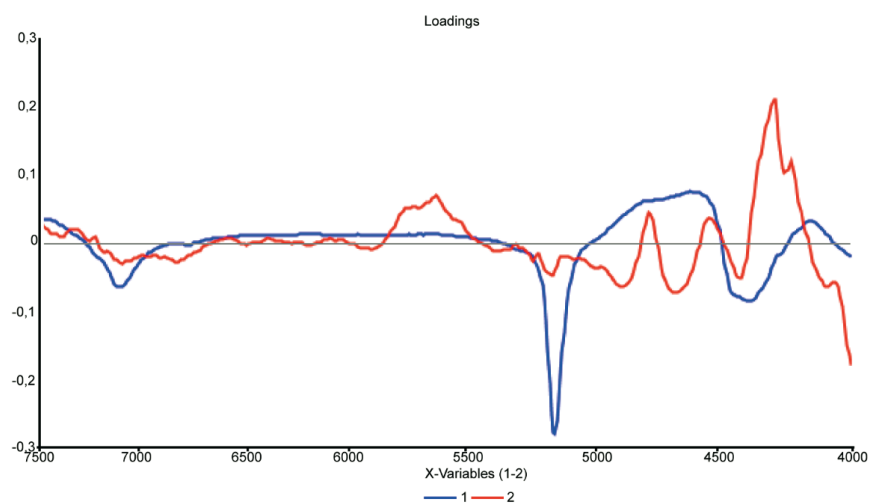


Figure S6: PCA loadings plot of all samples from stable 2 (pretreatments SNV and DT; spectral region 7500-4000 cm^{-1})

8.2 Publikation 2

Development of a methodological approach for the characterization of bioaerosols in exhaust air from pig fattening farms with MALDI-TOF mass spectrometry

Druckenmüller, K., Gärtner, A., Jäckel, U., Klug, K., Schiffels, J., Günther, K., and Elbers, G. (2017) Development of a methodological approach for the characterization of bioaerosols in exhaust air from pig fattening farms with MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220: 974–983.

Copyright © 2017 International Journal of Hygiene and Environmental Health

Autorenbeiträge:

- Katharina Druckenmüller führte alle MALDI betreffenden Schritte, von der Entwicklung bis zur Verifikation des Aufarbeitungs- und des Messverfahrens sowie den Aufbau einer MALDI-Referenzdatenbank durch.
- Katharina Druckenmüller war für die Erstellung, Einreichung und Veröffentlichung der Publikation verantwortlich.
- Katharina Druckenmüller erhielt bei der Erstellung der Publikation Unterstützung von Gereon Elbers, Udo Jäckel, Klaus Günther und Johannes Schiffels.
- Die Arbeitsgruppe von Andrea Gärtner organisierte und führte die Emissionsprobenahmen durch.
- Udo Jäckel und Kerstin Klug stellten die Bakterienisolate her und führten die molekularbiologischen Untersuchung durch.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijheh



Development of a methodological approach for the characterization of bioaerosols in exhaust air from pig fattening farms with MALDI-TOF mass spectrometry



Katharina Druckenmüller^a, Andrea Gärtner^b, Udo Jäckel^c, Kerstin Klug^c,
Johannes Schiffels^a, Klaus Günther^d, Gereon Elbers^{a,*}

^a Faculty of Chemistry and Biotechnology, FH Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, Germany

^b North Rhine-Westphalia State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (LANUV NRW), Essen, Germany

^c Federal Institute for Occupational Safety and Health (BAuA), Berlin, Germany

^d Institute of Nutritional and Food Sciences, Food Chemistry, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2016

Received in revised form 6 May 2017

Accepted 6 May 2017

Keywords:

Bioaerosol

Emission

MALDI

Bacteria

Livestock facility

Rapid identification

ABSTRACT

In this paper, we evaluated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) as a cultivation-independent, routinely applicable approach to identify microbial fractions in bioaerosol emission samples. We developed a streamlined protocol in line with the German state-of-the-art impingement sampling guideline. Following isokinetic sampling, a fast and reliable pre-treatment methodology involving a series of cascade filtration steps was implemented, which produced fractions for spectrometric measurement devoid of interfering substances. We sampled the exhaust air from eight pig fattening farms around western Germany, which yielded two sets of samples for both method development and validation. For method development, in total 65 bacterial isolates were produced directly from the exhaust air samples, taxonomically classified by 16S rRNA-Gene sequencing, and subjected to MALDI-TOF analysis. In this way, we could assign fingerprint biomarkers to classified bacterial genera or even species to build up a preliminary reference database. For verification of the novel methodology and application of the reference database, we subjected the second set of exhaust air samples to the developed protocol. Here, 18 out of 21 bacterial species deposited in the database were successfully retrieved, including organisms classified in risk group 2, which might be used to evaluate the pathogenic potential of sampled exhaust air. Overall, this study pursues an entirely new approach to rapidly analyze airborne microbial fractions.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Emissions from livestock facilities contain a variety of air pollutants, such as intact cells and cell fragments, plant and animal tissue, which are subsumed under the term “bioaerosol”. Airborne microorganisms (e.g. bacteria and fungi) constitute a large proportion of exhaust emissions from the livestock sector. In particular, intensive stock-rearing of swine and poultry is considered to be the single largest source of airborne microorganisms in the agricultural sector (Gärtner et al., 2016, 2014; Seedorf et al., 1998). The pathogenic potential of bioaerosol is still in dispute (Wienders et al.,

2017). Epidemiological exposure-response studies indicate adverse health effects upon exposure of people and animals to higher doses of bioaerosols at workplaces or in the environment (Donham et al., 1989; Douwes et al., 2003; Martin et al., 2015; Pisanic et al., 2015; Walser et al., 2015). Furthermore, the extensive use of antibiotics in intensive meat production facilities has accelerated the selection of antibiotic resistant bacteria, which may increase the risk of critical infectious diseases (Chapin et al., 2005; Gao et al., 2015; Gärtner et al., 2016; Masclaux et al., 2013; Ngbede et al., 2017). Thus, there is an increasing need for efficient monitoring tools capable of capturing and characterizing airborne microbial fractions.

In light of the complex nature of environmental bioaerosol samples, it has been speculated that this could only be achieved by combining various detection methods, thus compensating for the limitations of each individual method (Walser et al., 2015). The

* Corresponding author.

E-mail address: elbers@fh-aachen.de (G. Elbers).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.05.003>

1438-4639/© 2017 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

identification and quantification of microorganisms in bioaerosol samples has traditionally been carried out using culture-based methods (VDI-4253-3, 2008). These approaches are time consuming, and are further limited to the detection of viable microbes. The requirement for microbial cultivation steps can be circumvented by using analytical tools like epifluorescence microscopy, flow cytometry and molecular biological techniques (PCR) (Ghosh et al., 2015). None of these methods are, however, standalone techniques to enable just-in-time measurements of environmental samples in a rapid, routinely applicable manner.

Matrix-assisted laser/desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is considered an attractive screening method due to its minimal workload and excellent sensitivity, which affords the generation of unique biomarker spectra for e.g. specific microorganisms with minimum sample pre-treatment (Madsen et al., 2015; Pineda et al., 2003; Sala-Comorera et al., 2016). Rapid detection and identification of microorganisms in environmental or clinical samples remains, however, a challenging task regardless whether bacterial cultivation is implemented as a pre-measurement step. Bioaerosols may constitute a variety of particulate organic matter, which hinders a clear definition of sample matrices and the formulation of universally applicable strategies to identify inherent microbial fractions.

Recent studies highlight the application of MALDI mass spectrometry for the analysis of bacterial isolates taken from environmental samples like drinking water (Sala-Comorera et al., 2016), and food (Hausdorf et al., 2013). Further, airborne bacteria and fungi present in different environments were cultivated, and subsequently measured by MALDI-TOF-MS (Angelakis et al., 2014; Madsen et al., 2016a,b). As a first step towards cultivation-independent MALDI-based microbial detection methods, clinical blood samples have recently been screened for specific microbial targets (Prod'homme et al., 2010; Thomlin et al., 2015; Wattal and Oberoi, 2016).

In this study, we evaluated the potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a profiling method for inherent bacterial fractions in bioaerosols. We targeted bioaerosol emissions from intensive pig meat production systems by impingement sampling, and designed a simplified analysis workflow including (a) the development of a protocol for sample pre-treatment without cultivation steps, (b) the selection of suitable MALDI preparation methods and detection parameters, (c) the generation of a reference biomarker ion database by bacteria isolated from sampled bioaerosol emissions, and (d) taxonomic classification of the isolated bacteria by 16S rRNA-Gen sequencing.

2. Materials and methods

2.1. Pig fattening facilities and impinger exhaust air sampling

Eight pig fattening facilities in different regions of North Rhine-Westphalia (NRW, Germany) were selected for bioaerosol emission sampling (see Supporting information for further description of the sampled sites, e.g. regarding stable occupancy data and air sampling volumes per impinger sampling). Selection of facilities and emissions sampling were carried out by the North Rhine-Westphalian Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (LANUV NRW), Germany. Bioaerosols are sampled according to the German guideline VDI 4257 Part 2 (VDI-4257-2, 2011) using emission impingers. The guideline describes the procedure of emission sampling under isokinetic conditions using an emission impinger (modified AGI 30; Table S2) located at outside facility chimneys. The setup has been designed for out stack configuration with the sampling device being installed with the entry nozzle, the sampling bend and part of the suction tube right in front of the impinger. A

more detailed and visual description of the sampling device and the respective procedure can be found in the supporting information of this paper.

Impingement sampling was carried out isokinetically at exhaust chimneys between March 2014 and February 2015. The sample volume was 52 ml, comprising an impinger solution volume of 32 ml, and 20 ml rinsing liquid. Four samples per sampling day were taken at facilities 1–5 and 7–8. At facility 6, which served as the reference sampling site, eight samples were collected and split into four samples each for MALDI-measurement and taxonomic classification, respectively (backup samples). The samples from facilities 1–5 were used for the development of a sample pre-treatment workflow, whereas samples taken at facilities 6, 7 and 8 served to validate the developed protocol using the established reference database (see Sections 2.2.2, 3 and 5). The database itself was constructed by isolation, taxonomic classification and MALDI measurement of airborne bacteria in emission samples from facility 6. Taxonomic classification was carried out at the Federal Institute for Occupational Safety and Health (BAuA), Berlin (Sections 2.2.2 and 2.2.3).

At each sampling location, a field and a laboratory blank were taken for quality assurance. Phosphate-buffered saline (PBS) (4.3 g/l NaCl, 7.23 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ and 3.56 g/l KH_2PO_4 , pH 7) was used as impinger sampling solution (VDI-4257-2, 2011). After each sampling, the impinger liquids were transferred to cooling boxes, and shipped at $5 \pm 3^\circ\text{C}$ by using cooling packs. Samples were transferred to the laboratories in less than 24 h after sampling, and stored in darkness at $5 \pm 3^\circ\text{C}$ until further processing.

2.2. Analysis

2.2.1. Sample pre-treatment for MALDI-measurement

Sample pre-treatment was crucially required to separate and detach the microbial fraction from particles and other interfering constituents usually found in exhaust emissions. Following cascade filtration, two different size fractions ($S_{20 \mu\text{m}}$ and $S_5 \mu\text{m}$) were selected for MALDI measurement, which contained the target analyte (microbial fraction) in semi-pure form. This differs from the commonly applied technique of using cultivation-based approaches preceding spot preparation, which usually includes time-consuming incubation steps followed by direct deposition of single bacterial colonies on the target (Ghosh et al., 2015; Wang et al., 2016).

In each case, sample pre-treatment was initiated by pooling the four impinger samples taken on one day (each containing 52 ml). The resulting composite samples (208 ml total volume) were homogenized by shaking, followed by sequential filtration through 70 μm and 40 μm pore size cell strainers (Falcon, Corning Inc. Life Science, Durham, USA). The 40 μm filtrate suspension was centrifuged at $6200 \times g$ for 60 min at 4°C , and the pellets were resuspended in 3 ml PBS buffer. The resulting suspensions were passed through 20 μm pore size filtration columns (CHROMABOND, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany), and the filtrates were centrifuged at $16,100 \times g$ for 15 min. The pellets were resuspended in 100–200 μl PBS buffer (20 μm fraction; $S_{20 \mu\text{m}}$). For preparation of the 5 μm fraction ($S_5 \mu\text{m}$), the 20 μm suspension was filled up to 3 ml with PBS buffer, and filtered through a 5 μm pore size syringe filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany). The filtrates were centrifuged at $16,100 \times g$ for 15 min, and the resulting pellets were resuspended in 10–50 μl PBS buffer. The 20 μm and 5 μm fraction were used for the MALDI sample preparation.

2.2.2. Bacterial isolation from samples of reference facility 6

Isolation of single, cultivable bacterial species from heterogeneous bioaerosol samples was performed using standard

Table 1

Tentatively determined MALDI-TOF biomarker ions of isolated airborne bacteria, including indications whether a biomarker is specific for a species or the superordinate genera. Tolerated deviation: ± 5 Da.

I. Peaks masses (Da) of organisms, for which at least one more species belonging to the same genus was identified. Biomarkers were either specific for the genus-level, or the species-level.		
Organism	Genus	Species
<i>Aerococcus viridans</i> ¹	3375^b, 5610^b , 6675 ^a , 6751	
<i>Aerococcus urinaequi</i>	3374^b, 5609 , 6674 ^a , 6750 ^a	
<i>Brevibacterium ptyocampae</i> ^c	3722^b, 3780^b , 4365, 7447, 7565	3459, 3805 , 4509, 4983 , 5141, 5785, 5912, 6348 , 6445, 6518 , 6590 , 7322, 7339 , 7476, 7795, 8978
<i>Brevibacterium yomogidense</i> ^c	3723^b, 3779^b , 4362, 7447, 7562	7214, 8221, 8543, 8767, 9193, 9497 , 9810, 12940
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	3015, 4016	4626, 5539
<i>Corynebacterium casei</i>	4688^a , 6317 ^a	3698, 3769, 5662, 6371 ^a , 6780
<i>Corynebacterium humireducens</i>	4712 ^a	3235 , 3561 , 3906 , 3945, 4430 , 6305 ^a
<i>Corynebacterium stationis</i>	4017, 4689^a , 6319 ^a , 6336	6024, 6510^a , 7166 , 8469 ^a
<i>Corynebacterium striatum</i> ¹	6334 ^a	3046, 3107, 3677 , 4632 , 4659, 4675, 4752 , 4770, 5423 , 7079 , 7106
<i>Corynebacterium xerosis</i>	3013, 4711 ^a	4352
<i>Staphylococcus cohnii</i>	6382^a	3413 , 4179 , 5633 , 5819, 5998, 6412 ^a
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ¹	3834, 5303^a , 5388, 9634 ^a	3341, 3953, 4189^b , 4814 , 5112 , 6663, 7530, 8383 , 9583, 15176
<i>Staphylococcus equorum</i>	3831, 5304^a , 5390, 5877^a , 6384 , 6821^a	4046, 4231, 4990 , 5193 , 5430^a , 6066, 6235, 6249, 7520 , 7770, 9163
<i>Staphylococcus pasteurii</i> ¹	5874^a , 6820^a , 9634	6203 , 6453 , 9117
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ¹	5877^a	6039, 6291, 8068, 8157, 9092, 9652, 9854
II. Peak masses (Da) of organisms, for which no other species belonging to the same genera were identified.		
Organism	Mass (Da)	
<i>Brachybacterium nesterenkovi</i> ^c	3383 ^b , 4142 , 6377, 6576, 6768	
<i>Enterococcus avium</i> ²	3064, 3569, 4613, 4842 , 5685 , 6284	
<i>Kocuria palustris</i>	4203 , 4931 , 5021 , 5162 , 5489, 5507 , 6651, 6670, 6698	
<i>Moraxella pluranimalium</i> ^{1,c}	3135, 3475^b , 3875 , 4119 , 4447 ^b , 5990 , 6801, 6950 , 6969, 7436, 7886 , 8899 ^b , 9414, 10046, 10354	
<i>Nocardiopsis listeri</i> ^c	4073, 4173	
<i>Rothia endophytica</i> ^c	3508 , 5496, 5619 , 5674 , 6174 , 6627	

¹ Risk group 2 pathogen according to German TRBA 466.

² Signals were assigned to ribosomal proteins using the protein database UniProt. Matches with uncharacterized proteins or ambiguous assignments were not considered.

^b Putatively doubly charged ion; Masses indicated in bold were successfully retrieved in bioaerosol emission spectra.

^c Organisms lacking detailed characterization or entries in the UniProt database.

microbiological techniques with six different agar-based media (Supporting Table S2). The four backup impinger samples from facility 6 were pooled (208 ml total volume) and homogenized by shaking. A decimal dilution series was applied from 10^{-1} up to 10^{-7} . Single colonies were picked, plated on fresh agar plates and incubated at 37 °C for 5 days. This step was iteratively repeated (minimally five times) until the presence of contaminants could be excluded by means of microscopic evaluation.

2.2.3. Taxonomic classification

Bacterial isolates were identified according to Martin et al. (2009) based on 16S rRNA-Gene sequence analysis. Briefly, the 16S rRNA fractions were extracted by using the GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich, USA) following the manufacturer's descriptions. The genes were amplified using universal primers according to Weisburg et al. (1991). Taxonomic classifications of all bacterial isolates were performed by comparing the obtained 16S rRNA-Gene sequences to available sequences of all currently and validly described bacterial type strains (Euzéby) in public databases (Ribosomal Database or GenBank) (Benson et al., 2013; Cole et al., 2014).

2.2.4. MALDI sample spot preparation and measurement

$S_{20 \mu m}$ and $S_5 \mu m$ fractions (Section 2.2.1) or bacterial isolates (2.2.2) were spotted on stainless steel MALDI target plates by adopting a protocol based on (Donohue et al., 2006) and (Bizzini et al., 2010) for whole-cell MALDI spot preparation. Slight modifications were implemented to increase the concentration of matrix-embedded intact cells: In case of the $S_{20 \mu m}$ and $S_5 \mu m$ fractions, the pellets were washed twice with 1 ml ultrapure water, followed by resuspension in small volumes of ultrapure water. Samples were spotted on a stainless steel

plate by mixing 10 μl of the resulting suspensions with 1 μl of the matrix solution (10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), in 50% (v/v) acetonitrile (ACN), 47% (v/v) water and 3% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For each sample, a total volume of 10 μl was applied in iterative steps à 2 μl and dried using a common hair dryer.

In case of bacterial isolates, 1–3 colonies were resuspended in 1 ml ultrapure water. Cells were pelleted by centrifugation ($16100 \times g$, RT, 5 min), and washed twice with ultrapure water. Following final cell re-suspension in 20–200 μl of distilled water, steel target spots were prepared by mixing 2 μl of the bacterial suspensions with 1–2 μl of matrix solution (same as above). Drying was performed as described above. Mass spectra were recorded using an Axima Confidence (Shimadzu Biotech Corp., Kyoto, Japan) MALDI-TOF mass spectrometer equipped with a nitrogen UV laser (337 nm). The system was operated in linear, pulsed ion extraction and positive-ion mode with the following parameters: pulsed extraction, 2100 V; source, 20000 V; linear detector, 2750 V. The firing rate was 10 Hz. A minimum of 200 profiles per sample was generated to obtain satisfactory signal-to-noise ratios in cumulative spectra (five laser shots accumulated to one profile spectrum). The selected mass range was 700–20000 Da. Pulsed ion (delayed) extraction was optimized for ion focusing and transmission at 7800 Da. Peak processing settings were selected as described in the supporting information. External mass axis calibration was performed using spectra of the reference strain *Escherichia coli* DH5 α (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). A mass tolerance limit of ± 300 ppm was set at all calibration points by mass axis calibration.

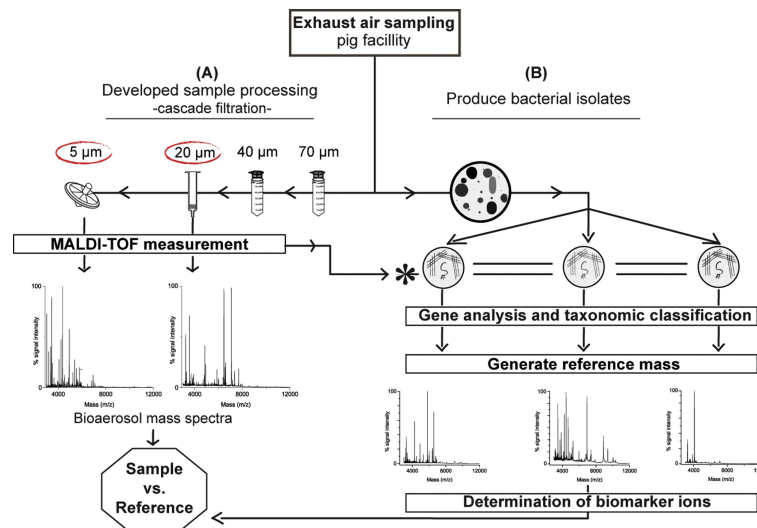


Fig. 1. Sample pre-treatment procedure to characterize bioaerosol fractions containing bacteria by MALDI-TOF, and generation of biomarker ions from bacterial cultures (scheme).

2.2.5. Reference library and protein identification

The reference library (Table 1) was generated using fingerprint ions of bacterial isolates. Peaks with a signal-to-noise ratio (S/N) ≤ 3 and repetition rate $\leq 90\%$ in the cumulative fingerprint spectrum of single species were excluded. Unspecific peaks observed in more than one bacterial isolate spectrum were excluded. Determined bacterial biomarkers were, if possible, correlated to published peptide masses using the protein sequence database UniProt (<http://www.uniprot.org/proteomes>; accessed 2016-04-05) (Apweiler et al., 2004; Pundir et al., 2015; The UniProt-Consortium, 2017). The maximal deviation for assignment of empirical to associated data was set to ± 5 Da. The search was extended to peptide masses corresponding to N-terminal methionine loss in cases where no hit was determined for the unmodified peptide. Other posttranslational modifications, e.g. acetylation and methylation, were not considered.

3. Results

A total number of 36 emission impinger samples taken at real livestock facilities was used to design and subsequently verify a novel MALDI mass spectrometry based bacterial identification methodology. For sample pre-treatment, a streamlined workflow was established to enable facile and rapid separation of the microbial cell fraction from other constituents commonly found in environmental samples. Application of the pre-treatment procedure yielded bacterial fractions devoid of interfering substances and suitable for MALDI measurement.

3.1. MALDI sample pre-treatment and spot preparation

The exhaust air from livestock facilities contains a wide range of particulate constituents which may interfere with sample cleanup and background measurement. Thus, we designed a sample pre-treatment strategy to separate bacterial fractions from complex samples by applying sequential filtration and centrifugation steps. Four different filtrations steps in the size range of 70–5 µm (cut-off

Table 2

Number of assigned and total peaks detected in bioaerosol MALDI mass spectra.

Facility	Fraction pore size [µm]	Number of peaks	Number of assigned peaks
6 ^a	20	37–38	14
6 ^b	5	70–80	26
7 ^c	20	47–61	29
7 ^d	5	40–52	18
8 ^e	20	22–27	7
8 ^f	5	19–26	11

Number of prepared MALDI target spots: ^an = 2; ^bn = 3; ^cn = 3; ^dn = 4; ^en = 8; ^fn = 8.

were applied, among which the 20 µm and 5 µm fractions proved suitable for MALDI-TOF analysis (Fig. 1). The quality and reproducibility of generated spectra (5 µm or 20 µm fractions) were further optimized by applying the MALDI spot preparation technique described in Section 2.2.4, including sample embedment in the versatile matrix CHCA dissolved in a defined mixture of acetonitrile, water and trifluoroacetic acid.

3.2. Bioaerosol MALDI mass spectra

In all generated MALDI-TOF mass spectra of samples pretreated in this manner, m/z values up to 15 kDa were observed, whereas the predominant peak fraction covered the range of 3000–8000 Da. The latter range was, consequently, used for biomarker identification (Fig. 2). Under given conditions, spectra yielded in total between 19 and 80 desorbed and detected molecules (Table 2). Following systematic evaluation, pre-treated impinger samples from livestock facilities 6–8 yielded m/z values at 4719, 4817, 4846 and 6465 Da in all analyzed spectra regardless of sampling facility or date. The aforementioned peaks were present in all fractions with one exception (S_{5 µm} of facility 7; Fig. 3, green bars). Thus, it was possible to use the four signals not only as specific biomarkers, but also as indicators for reproducibility. In order to evaluate the notion that the four signals could be specific ionized fragments assignable to bacte-

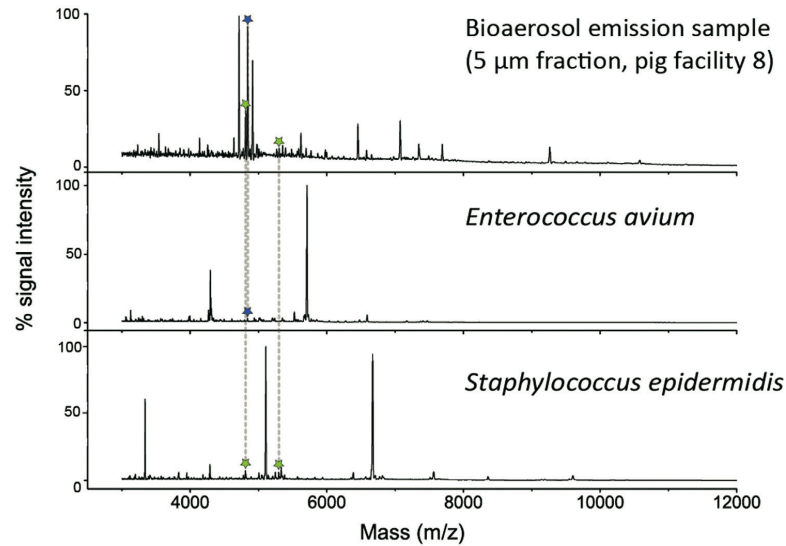


Fig. 2. Comparison of MALDI mass spectra from one bioaerosol sample and two bacterial isolates. Exemplary biomarkers assigned to the spectra are indicated.

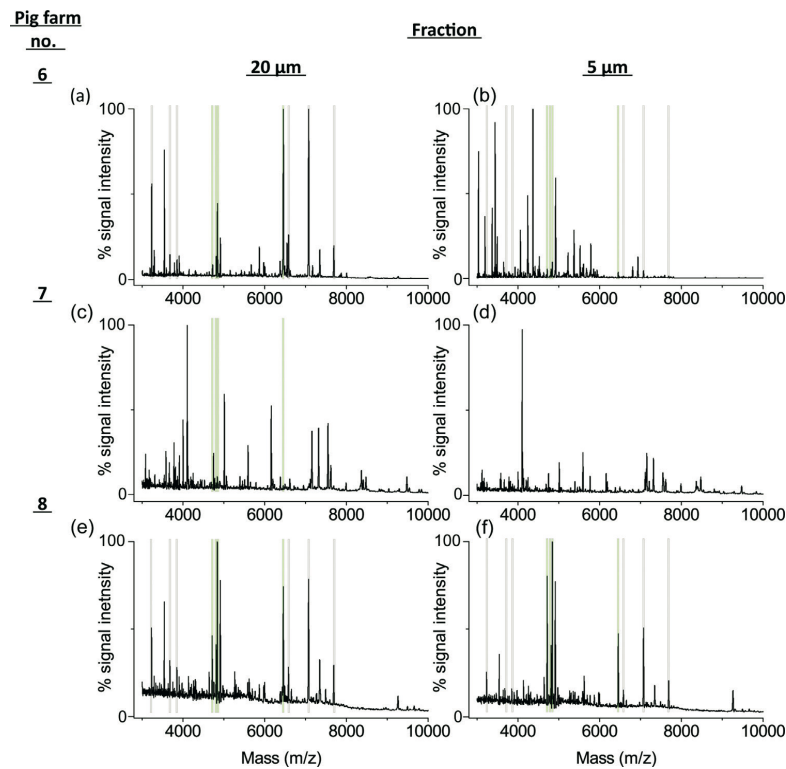


Fig. 3. MALDI mass spectra of 20 µm and 5 µm filtration fractions of bioaerosol emission samples from different pig fattening facilities. Recurring m/z values are indicated with green/grey bars. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

rial species and genera, we designed and constructed a fingerprint mass ion database.

3.3. Reference database

65 aerobic bacterial cultures were isolated, by plating and separation, from four pooled bioaerosol emission samples taken in addition to the four samples used for MALDI at facility 6 (see Section 2.2.2). The produced isolates were taxonomically classified by 16S rRNA-Gene sequencing, and subjected to MALDI-TOF pre-treatment and measurement protocols to assign biomarkers ions (Fig. 1 and Table 1). Out of 65 bacterial isolates, a total number of 21 different species belonging to 10 different genera and 3 different phyla were identified by 16S rRNA-Gene sequencing. Among these, seven assignments are closely related to bacteria, which are characterized as biological agents of risk group 2 (TRBA 466, 2015). Reference spectra for all 21 organisms in question were generated, and tentative genus- or species-specific peaks were successfully derived. These biomarkers served to construct the tentative fragment database used in this study (Table 1).

3.4. Database application

As mentioned before, reference bacteria were isolated from an emission impinger sample of one designated livestock facility (see above). Next, verification and application of the database was performed by using samples from different livestock facilities (facilities 6, 7 and 8) to ensure representativeness. Firstly, it was possible to assign two out of four of the aforementioned universally present signals (4719, 4817, 4846 and 6465 Da) to isolated bacteria: peaks at 4817 and 4846 Da matched with fingerprint ions of *Staphylococcus epidermidis* (4814 Da) and *Enterococcus avium* (4842 Da). Since these two species are classified in risk group 2, their finding in all tested bioaerosol samples might be of importance when considering guided parameters for the characterization and comparison of bioaerosol emission samples in general.

Among the reference organisms used to construct the database, different genera and species yielded different amounts of tentative biomarkers in the range of 1–16. The retrieval of one to four fragments could generally be demonstrated in sample spectra (Table 1).

Notably, in several cases we could identify genera or species through assignment of different biomarkers. This result substantiates the approach of assigning more than one peak to each organism, raising the question whether it might be necessary to distinguish between recurring signals, which can be used as key parameters for comparing different bioaerosol emission samples, and variable signals to identify specific organisms.

Since biomarkers were selected based on uniqueness and were only chosen when absent in spectra of other organisms, we considered the finding of one or more genus- or species-level signals as indicative of the presence of the genus or species in question in a given sample. We successfully retrieved 18 out of 21 reference species in one or more emission samples from facilities 6–8, with the exception of *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium xerosis* and *Nocardiopsis listeria* (Fig. 4). Three reference species, namely *Corynebacterium striatum*, *Moraxiella pluranimalium* and *Staphylococcus epidermidis*, were retrieved in all emission samples regardless of facility or fraction (Figs. 4 and 5). *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinaeequi* and *Corynebacterium casei* have to be considered separately, since their assignment is strictly bound to the genus-level identification (Table 1 and Fig. 4). Among the three livestock facilities tested (6–8), facilities 6 and 8 showed striking similarities: peaks at 3232, 3680, 3852, 6592, 7090 and 7706 Da were, together with the four aforementioned “universal”

Isolated type strains Emission samples facility 6	Facility					
	6	7	8	6	7	8
	Fraction			Fraction		
	20 µm			5 µm		
<i>Aerococcus viridans</i>						
<i>Aerococcus urinaeequi</i>						
<i>Brachybacterium nesterenkovi</i>		x	x	x	x	x
<i>Brevibacterium ptyocampae</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Brevibacterium yomogidense</i>		x		x	x	
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>						
<i>Corynebacterium casei</i>						
<i>Corynebacterium humireducens</i>	x	x		x	x	x
<i>Corynebacterium stationis</i>		x		x	x	
<i>Corynebacterium striatum</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Corynebacterium xerosis</i>						
<i>Enterococcus avium</i>	x	x	x	x		x
<i>Kocuria palustris</i>	x	x		x	x	
<i>Moraxella pluranimalium</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Nocardiopsis listeria</i>						
<i>Rothia endophytica</i>	x	x		x		
<i>Staphylococcus cohnii</i>	x	x		x	x	x
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Staphylococcus equorum</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	x	x	x	x	x	x

Fig. 4. List of bacterial species successfully assigned to bioaerosol sample spectra on the species- or genus-level using the generated biomarker database. Red x: Genus-specific bacterial biomarker, which was only assigned for the organism in question; Black x: At least one species-specific biomarker ion was assignable for the organism in question. Connecting lines indicate shared biomarker ions (not individually observed). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

peaks, observed in the two filtrate fractions of both facility emission samples (Fig. 3, grey bars). The 7706 and 3852 Da fragments are anticipated to be the singly and doubly charged ions from the same parent molecule, whereas 6592 Da likely corresponds to *Brevibacterium ptyocampae* (6590 Da), a risk group 1 organism (TRBA 466, 2015).

4. Discussion

As public awareness of potential risks arising from bioaerosol emissions increases, the demand for innovative and particularly routinely applicable methods for the detection of bacterial fractions in such emissions is growing correspondingly (Jahne et al., 2015, 2016). In this study, we aimed at establishing MALDI-TOF mass spectrometry based techniques as a technology platform for bacterial screening in bioaerosol emission samples with minimal workload. Furthermore, by choosing a German state-of-the-art in situ sampling procedure (VDI-4257-2, 2011) and by not considering artificially designed reference samples in favor of real exhaust air samples, we aimed to design a protocol applicable in line with current guidelines and close to real testing conditions.

A wide range of bioaerosol sampling devices are in use for bioaerosol monitoring. Common procedures used in this regard are impaction, impingement, and filtration. In this study, emission impingement (using a modified AGI 30 impinger) was selected as the most suitable sampling technique to cover a broad spectrum of particle sizes as demonstrated elsewhere (Gärtner et al., 2008a, 1885, 2008b). This approach was deemed crucial in light of the

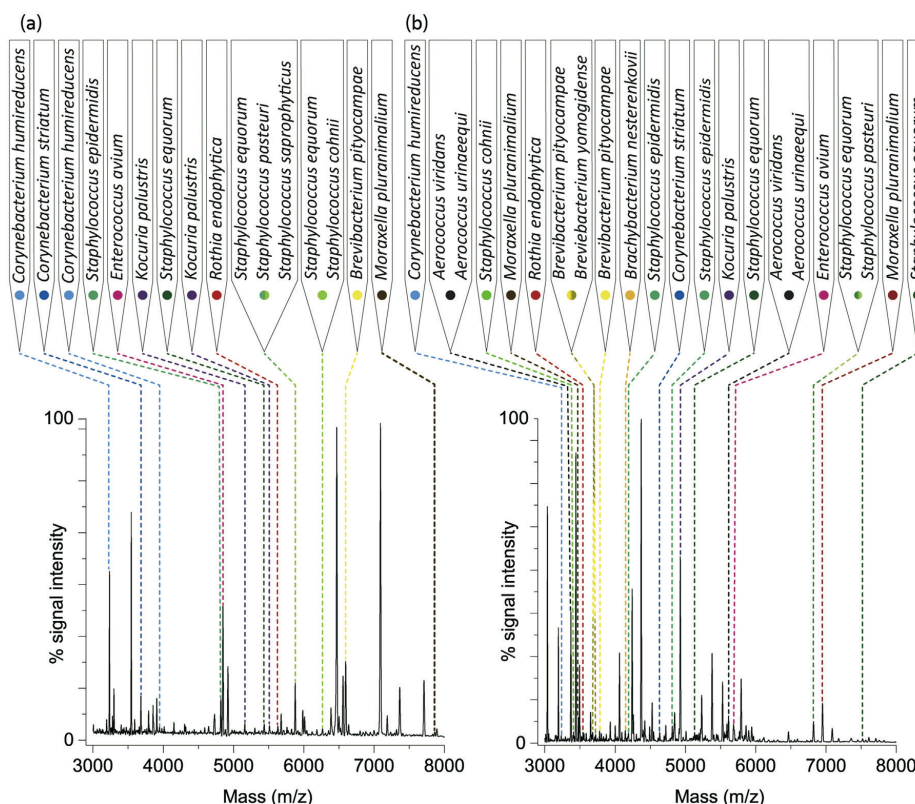


Fig. 5. MALDI-TOF mass spectra generated from (a) 20 µm and (b) 5 µm filtrate fractions of a bioaerosol emission sample taken from pig fattening facility 6. Bacterial biomarkers are indicated by different colours.

ambiguous state of air-suspended microbes being either present in free or particle-associated form (see below).

Bioaerosols are a complex mixture of different components with a size distribution from nanometer scale to particles up to 100 µm in diameter (Adell et al., 2012; Stetzenbach et al., 2004). Among these constituents are water- or solvent-soluble inorganic and organic molecules, prokaryotic and eukaryotic cells, viruses, mold as well as animal and plant fibers and debris (Curtis et al., 1975; Stetzenbach et al., 2004). In this study, initial attempts to measure samples without prior sample cleanup failed (data not shown). Apparently, due to the presence of interfering compounds like fibrous animal or plant material, both the efficiencies of analyte embedment in matrix crystals and the ionization process considerably decrease. Direct application of small pore size filters, on the other hand, removed both interfering constituents as well as the target analyte. In this regard, we anticipate that airborne bacteria mainly occur in the form of aggregates embedded in a surrounding matrix or attached to larger particles rather than suspended as single cells (Lighthart, 1994). This notion is strengthened by the observation that differential centrifugation was not successful in separating the bacterial fraction from inherent particles. Hence, we developed a preparation method based on four-step cascade filtration alternated by washing/centrifugation steps, which enabled the differential removal of larger and medium-sized

particles, followed by collection of (semi)pure bacterial cell fractions.

Sample preparation parameters (i. e. when protein extraction, spotting, matrices or solvents are considered) are crucial in case of MALDI-based techniques, and likely influence mass spectra appearance, reproducibility, mass accuracy and method sensitivity (Sedo et al., 2011; Wang et al., 1998). In this study, we used a modified preparation procedure based on (Donohue et al., 2006) and (Bizzini et al., 2010) for whole-cell MALDI preparation. Modifications were introduced to reduce workload and effort in data collection while increasing the yield of intact bacterial material. These improvements further increased the quality and reproducibility of generated spectra. CHCA was chosen as matrix in light of its benefits in forming uniform crystals which increases the reproducibility of profiles, its insensitivity toward sample impurities, and the possibility to measure a wide range of peptides and small proteins (Wang et al., 1998). A mixture of acetonitrile, water and TFA was used as solvent to enhance or facilitate cell disruption of bacteria.

The predominant peak fraction was observed in the range of 3000–15000 Da. The ratio of assignable biomarkers to the total number of peaks was not found to be consistent when different sampling facilities and sample fractions ($S_{20\text{ }\mu\text{m}}$ and $S_{5\text{ }\mu\text{m}}$) were considered (Table 2). In case of facility 6, the $S_{5\text{ }\mu\text{m}}$ fraction produced twice the number of assignable peaks compared

to the $S_{20\ \mu\text{m}}$ fraction (see Fig. 5 and Table 2). Different ratios were observed, however, in sample fractions of facilities 7 and 8. Notably, the predominant fraction of bacterial genera and species might have not been captured due to the fact that anaerobic or non-cultivable bacteria were not considered in bacterial isolation trials carried out here. Arguably, the bacterial diversity in given bioaerosol emission samples predetermines the overall signal distribution, and strongly influences the ratio of assignable peaks to the overall number of peaks as well as the probability of individual fragments to be detectable. Further, “spot-to-spot” reproducibility and inter-sample variability introduce common hurdles or errors directly influencing spectrum quality and biomarker detectability (Nishikaze et al., 2012; Toh-Boyo et al., 2012). Based on 16S rRNA gene analysis of isolates, 7 out of 21 bacteria detected in exhaust air from pig fattening farm no. 6 were closely related to species of risk group 2 (according to the German TRBA 466, 2015). Organisms classified in this risk group are opportunistic pathogens with moderate potential to cause infectious diseases, for which usually effective prophylaxis or treatments are available. Nevertheless, their presence or accumulation points to increased pathogenic risk for bioaerosol-exposed citizens and workers. Risk group 1 organisms, in turn, are not associated with infectious diseases, although their monitoring might be of importance to evaluate the feeding state and healthiness of the livestock, and to compare the “well-being” of different livestock over time.

The total number of signals observed in the range of 3–20 kDa in generated spectra was lower than previously anticipated. It has been described that a single microbial cell constitutes approximately 500–4000 proteins, whereas a typical MALDI spectrum of microorganisms yields only between 10 and 30 peaks (Arnold and Reilly, 1999; Pineda et al., 2003; Ryzhov and Fenselau, 2001). This discrepancy further emphasizes the challenge of comparing MALDI-derived microbial biomarkers when different sampling, pre-treatment and spotting techniques are applied to generate the spectra. Protein databases, in turn, should only be used as supporting tools for a further refined peak characterization.

The general composition of a complex sample predetermines measurability and detection limits as demonstrated in previous studies involving milk and urine specimens, which were subjected to MALDI-TOF MS analysis (Barreiro et al., 2012; Demarco and Burnham, 2014). An important parameter regarding the quality of generated spectra is the concentration of intact cells in investigated samples. In the abovementioned studies, detection limits of 10^5 – 10^7 CFU/ml for the model bacterium *E. coli* were determined. Bioaerosol emissions from pig fattening facilities contain 10^7 – 10^8 cells/m³ (Gärtner et al., 2016). This corresponds to approximately 10^5 – 10^6 cells per ml impinger sample, and up to 10^8 – 10^9 cells per ml $S_{20\ \mu\text{m}}$ or $S_5\ \mu\text{m}$ fraction, which in line with previous notions should be sufficient intact cellular material for MALDI-based analyses. Nevertheless, this approach mainly depends on the physiological conditions of the target microorganisms and their ionization efficiency. Future studies need to address potential disturbances by background peaks and artifacts, the influence and interference of different sample constituents, and possible sources of error introduced by different ionization affinities.

As mentioned above, a substantial fraction of peaks could not be assigned to specific organisms deposited in the database (Table 2). Arguably, fragments derived from microorganisms, plant, animal or other organic material could yield background peaks contributing to spectra of complex environmental samples. Further, in previous studies, strains belonging to the genera *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Terrisporobacter*, *Turicibacter*, *Romboutsia*, *Prevotella* and *Streptococcus* were assigned to the dominant bacterial fraction occurring in bioaerosol emissions from pig fattening facilities (Gärtner et al.,

2016; Kim and Isaacson, 2015; Marti et al., 2009; Nehme et al., 2008). Among these are strictly anaerobic bacteria, which are not cultivable using the cultivation conditions applied in this study (Section 2.2.2). Moving forward, it is planned to systematically update the constructed reference database by including these organisms and other species found in real livestock facility bioaerosol samples. It should be noted, however, that due to the presence of microbial consortia, which are difficult or impossible to cultivate, databases in this regard may never be fully exhaustive.

5. Conclusions

Overall, this study represents the first step towards routine sample preparation and analysis of the bacterial consortia present in anthropogenic bioaerosol emissions. A pre-treatment and cleanup protocol for impinger samples taken according to state-of-the-art guidelines without the need for time-consuming cultivation steps has been developed. The measurement setup allows the detection of signals up to 20 kDa, which nicely covers the expected range of bacterial signature biomarkers. Assignment of peaks to specific organisms is demonstrated. In terms of completing the presented database, the range of organisms, which in part is predetermined by the applied cultivation parameters, needs to be expanded, and systematic evaluations regarding the influence of sampling, media, culture conditions, and sample pre-treatment on protein profiles need to be implemented. Further, it may be of general interest to enlarge the scope of the presented protocol by analyzing samples from a wider range of livestock facilities. These implementations will pave the way towards the long-term aim in this regard, which is the development of rapid and reliable screening tools aided by chemometric models like principle component analysis (PCA). To enable complementary PCA analyses, data from a wider range of biological reference methods need to be correlated to implement MALDI-TOF mass spectrometry as a routine bioaerosol emission monitoring method in the field of environmental protection.

Acknowledgements

This work was supported by the North Rhine-Westphalia State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection (LANUV NRW), Essen, Germany, the Aachen University of Applied Sciences, Campus Juelich, Germany, and the Society for Chemical Engineering and Biotechnology e.V. (DECHEMA), Frankfurt, Germany. Further, we thank Andreas Gessner, Sandra Knust and her team (LANUV-NRW, Germany) for the organization and execution of the bioaerosol emission impinger sampling. Finally, we thank Mechthild Prinz and Catherine Kelly for editorial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.05.003>.

References

- Adell, E., Estelles, F., Torres, A.G., Cambra-Lopez, M., 2012. Morphology, chemical composition, and bacterial concentration of airborne particulate matter in rabbit farms. *World Rabbit Sci.* 20, 241–252.
- Angelakis, E., Yasir, M., Azhar, E.I., Papadioti, A., Bibi, F., Aburizaiza, A.S., Metidji, S., Memish, Z.A., Ashshi, A.M., Hassan, A.M., Harakeh, S., Gautret, P., Raoult, D., 2014. MALDI-TOF mass spectrometry and identification of new bacteria species in air samples from Makkah, Saudi Arabia. *BMC Res. Notes* 7, 892.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C.,

- Redaschi, N., Yeh, L.S., 2004. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 32, D115–D119.
- Arnold, R.J., Reilly, J.P., 1999. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 269, 105–112.
- Barreiro, J.R., Braga, P.A., Ferreira, C.R., Kostrzewa, M., Maier, T., Wegemann, B., Boettcher, V., Eberlin, M.N., dos Santos, M.V., 2012. Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting. *Proteomics* 12, 2739–2745.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., Prod'homme, G., 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1549–1554.
- Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T., Schwab, K., 2005. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environ. Health Perspect.* 113, 137–142.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B.L., McGarrell, D.M., Sun, Y.N., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42, D633–D642.
- Curtis, S.E., Drummond, J.G., Grunloh, D.J., Lynch, P.B., Jensen, A.H., 1975. Relative and qualitative aspects of aerobic bacteria and dust in swine houses. *J. Anim. Sci.* 41, 1512–1520.
- Demarco, M.L., Burnham, C.A., 2014. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 141, 204–212.
- Donham, K., Haglund, P., Peterson, Y., Rylander, R., Belin, L., 1989. Environmental and health studies of farm-workers in Swedish swine confinement buildings. *Br. J. Ind. Med.* 46, 31–37.
- Donohue, M.J., Smallwood, A.W., Pfaller, S., Rodgers, M., Shoemaker, J.A., 2006. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. *J. Microbiol. Methods* 65, 380–389.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47, 187–200.
- Gärtner, A., Gessner, A., Rabe, R., Mehling, M., 1985. Emissionsmessungen von Mikroorganismen: Entwicklung und Erprobung eines Messverfahrens. *VDI-Berichte Nr.*, 179–199.
- Gärtner, A., Gessner, A., Balfanz, J., Jäckel, U., 2008a. Performance characteristics for the measurement of microorganisms sampled with the LANUV-emission impinger. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 68, 357–360.
- Gärtner, A., Molter, L., Gessner, A., 2008b. Determination of the collection efficiency of an impinger for emission measurements of microorganisms. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 68, 351–356.
- Gärtner, A., Gessner, A., Martin, E., Schneider, D., Jäckel, U., 2014. Emissions from poultry houses – Investigation on the composition of bacterial community and antibiotic resistance – Part 2: Results. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 74, 377–383.
- Gärtner, A., Gessner, A., Gromöller, S., Klug, K., Knust, K., Jäckel, U., 2016. Emissions from pig barns – Investigation on the composition of bacterial community and antibiotic resistance. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 76, 31–38.
- Gao, L., Tan, Y., Zhang, X., Hu, J., Miao, Z., Wei, L., Chai, T., 2015. Emissions of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamase resistance from pig farms to the surrounding environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 4203–4213.
- Ghosh, B., Lal, H., Srivastava, A., 2015. Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. *Environ. Int.* 85, 254–272.
- Hausdorf, L., Mundt, K., Winzer, M., Cordes, C., Fröhling, A., Schlüter, O., Klocke, M., 2013. Characterization of the cultivable microbial community in a spinach-processing plant using MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.* 34, 406–411.
- Jahne, M.A., Rogers, S.W., Holsen, T.M., Grimberg, S.J., Ramler, I.P., 2015. Emission and dispersion of bioaerosols from dairy manure application sites: human health risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 49, 9842–9849.
- Jahne, M.A., Rogers, S.W., Holsen, T.M., Grimberg, S.J., Ramler, I.P., Kim, S., 2016. Bioaerosol deposition to food crops near manure application: quantitative microbial risk assessment. *J. Environ. Qual.* 45, 666–674.
- Kim, H.B., Isaacson, R.E., 2015. The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Vet. Microbiol.* 177, 242–251.
- Lighthart, B., 1994. Physics of microbial bioaerosols. In: Lighthart, B., Mohr, A.J. (Eds.), *In Atmospheric Microbial Aerosols: Theory and Applications*. Chapman & Hall, London, pp. 5–27.
- Madsen, A.M., Zervas, A., Tendal, K., Nielsen, J.L., 2015. Microbial diversity in bioaerosol samples causing ODTs compared to reference bioaerosol samples as measured using Illumina sequencing and MALDI-TOF. *Environ. Res.* 140, 255–267.
- Madsen, A.M., Alwan, T., Orberg, A., Uhrbrand, K., Jorgensen, M.B., 2016a. Waste workers' exposure to airborne fungal and bacterial species in the truck cab and during waste collection. *Ann. Occup. Hyg.* 60, 651–668.
- Madsen, A.M., Larsen, S.T., Koponen, I.K., Kling, K.I., Barooni, A., Karotki, D.G., Tendal, K., Wolkoff, P., 2016b. Generation and Characterization of Indoor Fungal Aerosols for Inhalation Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2479–2493.
- Marti, R., Dabert, P., Pourcher, A.M., 2009. Pig manure contamination marker selection based on the influence of biological treatment on the dominant fecal microbial groups. *AEM* 75, 4967–4974.
- Martin, E., Kämpfer, P., Jäckel, U., 2009. Identification of bacterial diversity in the indoor air environment. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 69, 97–101.
- Martin, E., Dziurawicz, N., Jäckel, U., Schafer, J., 2015. Detection of airborne bacteria in a duck production facility with two different personal air sampling devices for an exposure assessment. *J. Occup. Environ. Hyg.* 12, 77–86.
- Masclaux, F.G., Sakwinska, O., Charriere, N., Semaani, E., Oppliger, A., 2013. Concentration of airborne *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA), total bacteria, and endotoxins in pig farms. *Ann. Occup. Hyg.* 57, 550–557.
- Nehme, B., Letourneau, V., Forster, R.J., Veillette, M., Duchaine, C., 2008. Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. *Environ. Microbiol.* 10, 665–675.
- Ngbede, E.O., Raji, M.A., Kwanashie, C.N., Kwaga, J.K., 2017. Antimicrobial resistance and virulence profile of enterococci isolated from poultry and cattle sources in Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 49, 451–458.
- Nishikaze, T., Okumura, H., Jinmei, H., Amano, J., 2012. Correlation between Sweet Spots of Glycopeptides and Polymorphism of the Matrix Crystal in MALDI Samples. *Mass Spectrom. (Tokyo)* 1, A0006.
- Pineda, F.J., Antoine, M.D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Jackman, J., Longenecker, M., Lin, J.S., 2003. Microorganism identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Anal. Chem.* 75, 3817–3822.
- Pisanic, N., Nadimpalli, M., Rinsky, J.L., Stewart, J., Wing, S., Love, D.C., Hall, D., Heaney, C.D., 2015. Pig-2-Bac as a biomarker of occupational exposure to pigs and livestock-associated *Staphylococcus aureus* among industrial hog operation workers. *Environ. Res.* 143, 93–97.
- Prod'homme, G., Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., 2010. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1481–1483.
- Pundir, S., Magrane, M., Martin, M.J., O'Donovan, C., UniProt Consortium, 2015. Searching and navigating UniProt databases. *Curr. Protoc. Bioinf.* 50, 1.27.1–1.27.10.
- Ryzhov, V., Fenselau, C., 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal. Chem.* 73, 746–750.
- Sala-Comorera, L., Vilaró, C., Galofré, B., Blanch, A.R., García-Aljaro, C., 2016. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine analysis at a drinking water treatment plant. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 219, 577–584.
- Sedo, O., Sedlacek, I., Zdrahal, Z., 2011. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.* 30, 417–434.
- Seedorf, J., Hartung, J., Schroder, M., Linkert, K.H., Phillips, V.R., Holden, M.R., Sneath, R.W., Short, J.L., White, R.P., Pedersen, S., Takai, H., Johnsen, J.O., Metz, J.H.M., Koerkamp, P.W.G.G., Uenk, G.H., Wathes, C.M., 1998. Concentrations and emissions of airborne endotoxins and microorganisms in livestock buildings in Northern Europe. *J. Agric. Eng. Res.* 70, 97–109.
- Stetzenbach, L.D., Buttner, M.P., Cruz, P., 2004. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 170–174.
- TRBA 466, 2015. Technical Rules for Biological Agents: Classification of Prokaryotes (Bacteria and Archaea) into Risk Groups. Committee on Biological Agents – ABAS, Berlin, pp. 65, 317, 116.
- The-UniProt-Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169.
- Thomin, J., Aubin, G.G., Foubert, F., Corvec, S., 2015. Assessment of four protocols for rapid bacterial identification from positive blood culture pellets by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (Vitek (R) MS). *J. Microbiol. Meth.* 115, 54–56.
- Toh-Boyo, G.M., Wulff, S.S., Basile, F., 2012. Comparison of sample preparation methods and evaluation of intra- and intersample reproducibility in bacteria MALDI-MS profiling. *Anal. Chem.* 84, 9971–9980.
- VDI 4253 Part 3, 2008. Measurement of Airborne Microorganisms and Viruses in Ambient Air; Culture Based Method for the Quantitative Determination of Bacteria in Air; Method After Separation in Liquids. Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN – Normenausschuss KRdL, Düsseldorf, Beuth, Berlin, pp. 1–26.
- VDI 4257 Part 2, 2011. Bioaerosols and Biological Agents; Emission Measurement; Sampling of Bioaerosols and Separation in Liquids. Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN – Normenausschuss KRdL, Düsseldorf, Beuth, Berlin, pp. 1–60.
- Walser, S.M., Gerstner, D.G., Brenner, B., Bunger, J., Eikmann, T., Janssen, B., Kolb, S., Kolk, A., Nowak, D., Raulf, M., Sagunski, H., Sedlmaier, N., Suchenwirth, R., Wiesmuller, G., Wollin, K.M., Tesseraux, I., Herr, C.E., 2015. Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols – a systematic review. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218, 577–589.
- Wang, Z.P., Russon, L., Li, L., Roser, D.C., Long, S.R., 1998. Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 456–464.
- Wang, H., Chen, Y.-L., Teng, S.-H., Xu, Z., Xu, Y.-C., Hsueh, P.-R., 2016. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Front. Microbiol.* 7.

- Appendix Publikation 2 -
Druckenmüller et al., (2017) Int J Hyg Environ Health 220, 974-983

K. Druckenmüller et al. / International Journal of Hygiene and Environmental Health 220 (2017) 974–983

983

- Wattal, C., Oberoi, J.K., 2016. [Microbial identification and automated antibiotic susceptibility testing directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS and VITEK 2](#). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 75–82.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. [16 s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study](#). *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Wielders, C.C., van Hoek, A.H., Hengeveld, P.D., Veenman, C., Dierikx, C.M., ZomerT, P., Smit, L.A., van der Hoek, W., Heederik, D.J., de Greeff, S.C., Maassen, C.B., van Duijkeren, E., 2017. [Extended-spectrum beta-lactamase- and pAmpC-producing Enterobacteriaceae among the general population in a livestock-dense area](#). *Clin. Microbiol. Infect.* 23 (2), 120.e1–120.e8.

Supporting information

Supplementary Material and Methods

I. Pig fattening facilities

All pig barns are heatable, equipped with mechanical ventilation and have multi-area pens with fully-slatted floors which are not covered with bedding and not equipped with a liquid manure removal. Up to 1,440 pigs were kept in each facility. Basic conditions were documented for each fattening facility in question, including number of animals, fattening day, mean mass per animal [kg], livestock unit (LU) and air sampling volumes (see Table S1). Swine facilities no. 2, 3, 5 and 6 keep pigs of different age groups, explaining why different fattening days, numbers of animals and average weight per animal [kg] are given for certain sampling dates (Table S1).

Table S1: Stable occupancy at the time of emission measurements and sampled gas volumes.

No.	Sampling date	Fattening day	Number animals	of	Average weight per animal [kg]	Number Livestock unit (LU)	Air sampling volumes at the four samplings [L]
1	12.03.14	121	500		105	105	837/850/865/842
2	08.04.14	62/49/62/79	144/167/ 143/168		78/67/77/91	97	909/814/867/873
3	13.05.14	45/38	720/720		66/60	181	872/937/846/929
4	13.06.14	77	980		80	157	808/724/943/521
5	06.08.14	86/19/30/74/51	200/312/ 223/225/ 305		98/38/48/ 88/68	165	589/536/917/839
6	17.09.14	21/120/92/64/42	160/54/157/159/160		42/125/108/80/60	105	635/615/731/774
7	29.10.14	66	900		80	144	678/584/739/750
8	24.02.15	82	199		103	41	678/584/739/750

LU = Livestock unit (living animal mass of 500 kg)

II. Sampling solution (impinger)

Phosphate-buffered saline (PBS) (4,3 g/l NaCl, 7,23 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O and 3,56 g/l KH₂PO₄, pH 7) was used as impinger solution. All used glass bottles were sterilized at 200 °C for 2 hours before filling. The impinger solutions were freshly prepared, sterilized at 121 °C for 20 min and stored at 4 °C. In order to locate potential microbial contaminations, the solutions were plated on CASO, Malt-extract and R2A agar plates and incubated at 37 °C for three days.

III. Sampling device and procedure according to VDI 4257 Part 2

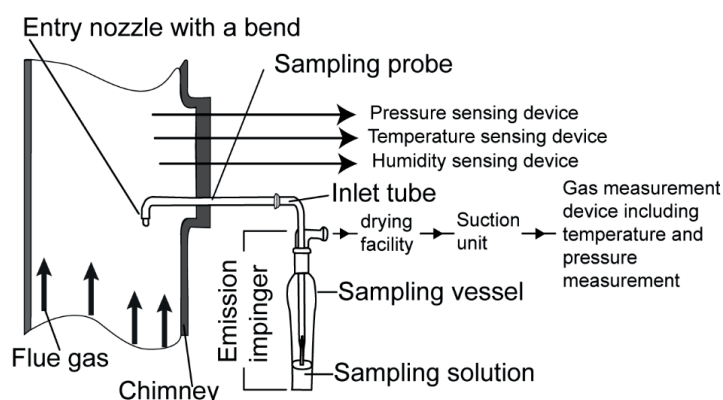
Bioaerosol emission sampling was carried out in the out stack configuration described in VDI 4257 Part 2. The measurement device is located outside the barn chimney with the entry nozzle, the bend and a part of the suction tube right in front of the impinger (see Scheme S1 and Figure S2)

IV. Brief description of the isokinetic sampling preparation

The following parameters were monitored prior to the sampling of the bioaerosols: (1) dimension of the duct; (2) number and position of the measurement points; (3) exhaust air parameters including air pressure, temperature and humidity. The flow velocity distributions in the measurement planes of the chimneys were calculated based on the previously determined exhaust air parameters. Selection of a suitable nozzle diameter [m], and calculation of the required sample volume flow at each measurement point were based on the nozzle geometry and the flow velocity at the measurement point.

V. Bioaerosol sampling procedure

The filled emission impinger was installed in the sampling device in the direction of the flow between the sampling probe and the drying unit, and gas-tightly connected (see Scheme S1). For fulfillment of the isokinetic sampling conditions, the volume flow was adjusted (for pre-considerations, see above). The total sampling duration was limited to 30 min. Upon sampling, the entry nozzle, sampling probe and the inlet tube of the emission impinger was rinsed for recovery of deposits (rinsing solution). In this study, the impinger sampling solutions (32 ml), and the rinsing solutions (20 ml), were combined for each sample.



Scheme S1. Out stack impingement sampling of bioaerosols (schematic representation).



Figure S2. Out stack impingement sampling of bioaerosols (photograph).

Table S2: Technical data of the emission impinger

Dimensions/characteristics	Value
Overall height of the emission impinger	ca. 280 mm
External diameter of the sampling vessel	40 - 60 mm
Wall thickness of the inlet tube	ca. 2,1 mm
External diameter of the inlet tube	11 mm
Internal diameter of the inlet tube	9 mm
Length of the inlet tube from bend end to capillary outlet	190 mm
Length of the inlet tube from pan joint to bend top	ca. 40 mm
Internal diameter of the capillary	(2 ± 0,2) mm
Length of the capillary	24 mm
Distance of the capillary to the bottom	30 mm
Curvature radius of the inlet tube	60 mm
Volume of the sampling liquid after autoclaving	ca. 30 ml
Ground glass joint (ball/pan)	KS 19/9
Standard ground joint	NS 29/32

VI. Bacterial isolation from samples of reference facility 6.

Table S3: List of the isolated bacteria generated from bioaerosol emission samples, corresponding risk group (TRBA 466, 2015) of type strains, and corresponding growth media.

Organisms	Risk group	Agar						Number of isolates
		CAS O	MH	R2 A	AIM	COB A	STAP H	
<i>Aerococcus viridans</i>	2, TA ¹ , ht ²	x (3)					x (4)	7
<i>Aerococcus urinaeequi</i>	1	x (4)	x (7)	x (4)	x (2)	x (2)	x (2)	21
<i>Brachybacterium nesterenkovi</i>	1				x			1
<i>Brevibacterium ptyocampae</i>		x						1
<i>Brevibacterium yomogidense</i>						x		1
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	1, + ³		x		x			2
<i>Corynebacterium casei</i>	1						x	1
<i>Corynebacterium humireducens</i>	1					x		1
<i>Corynebacterium stationis</i>	1, + ³			x			x	2
<i>Corynebacterium striatum</i>	2	x						1
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1, t+ ⁴	x	x (2)	x		x (2)		6
<i>Enterococcus avium</i>	2					x		1
<i>Kocuria palustris</i>	1		x (2)					2
<i>Moraxella pluranimalium</i>	2, t ⁵		x					1
<i>Nocardiopsis listeri</i>	1				x (2)			2
<i>Rothia endophytica</i>	1				x			1
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1, + ³		x				x	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2, ht ²			x				1
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	x						1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2	x	x (5)	x (2)				8
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2		x (2)					2
Total number of measured isolates								65

¹ Types for which strains are known which have been handled safely over many years in technical applications. These proven strains can therefore be assigned to the risk group 1 according to the classification criteria. The tag "TA" cannot claim to be exhaustive, however. In species which do not bear this tag it is therefore also possible for strains with the features of "TA" to arise;² Pathogen

for humans and vertebrates, but normally no transmission between the two host groups; ³ In individual cases identified as or suspected of being pathogens, mainly in people with considerably reduced immunity; identification of the type is often not reliable. ⁴ In individuals cases identified as or suspected of being pathogen for vertebrates; animal pathogenicity still has to be finally verified. There are no indications of human pathogenicity. ⁵ Pathogen for vertebrates; humans are not infected under natural conditions. Because of the low host specificity of pathogenic prokaryotes, however, infection risks for workers may also arise in jobs involving high pathogen concentrations from most types which are primarily only pathogenic to animals. Such types have therefore been assigned to risk group 2 with the additional tag "t". If a prokaryote is pathogenic to both humans and animals under natural conditions, the tag "ht" is used (adopted from (TRBA 466, 2015)).

CASO: casein peptone soybean flour peptone agar; MH: Mueller-Hinton agar; R2A: Reasoner's 2A agar; AIM: Actinomycete isolation agar; COBA: Columbia blood agar; STAPH: CHROMagar Staph aureus

2.2.4. MALDI sample spot preparation and measurement

Data analysis was performed using software Launchpad 2.9.3 (Shimadzu Biotech Corp., Kyoto, Japan). Peak processing of the raw spectra was carried out as follows: (a) choose 'scenario advanced' in the peak cleanup register, (b) select 1 channel at Peak width, (c) choose Gaussian spectra smoothing method, (d) select smoothing and baseline filter width 100 channels, and (e) choose gradient centroid at peak detection method.

Supporting Reference

TRBA 466, 2015. Technical Rules for Biological Agents: Classification of Prokaryotes (Bacteria and Archaea) into Risk Groups . Committee on Biological Agents – ABAS, Berlin, pp. 65, 317, 116.

8.3 Summary

Even before the pandemic outbreak of the corona virus, bioaerosol has been known as hazardous for human health. Quite a lot important processes emit bioaerosols, for example intensive livestock farming. Specific detection and analysis of bacteria, fungal spores and viruses are therefore of importance to millions of people in Germany. When evaluating bioaerosols for their potential to be hazardous, results should be easily and quickly available. However, research in this area falls short of expectations. Additionally, only a few specialists master the complex, time-consuming and expensive analysis of bioaerosol emissions. The requirements of the Federal Immission Control Act for certain bioaerosol emitting facilities indicate that the reliable evaluation of bioaerosols is of importance also for the public acceptance. In short, emissions e. g. from livestock facilities must be reduced as much as possible and the reduction is to verify. However, without simple measurement or analysis methods this would not be possible.

This work shows how the analysis of bioaerosol emissions from animal fattening facilities can be done faster and cheaper. To this end, two techniques, near-infrared spectroscopy (NIRS) and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with time-of-flight analyzer (MALDI-TOF-MS), have been adapted for the first time to skip the most elaborate step - the cultivation. A bioaerosol can now be analyzed with less sample preparation or even directly in the sample. In order to make the methods suitable for practical use, it is necessary to be able to describe processes from sampling to data evaluation that provide reproducible, valid and reliable results. This dissertation describes those processes for field studies in animal fattening facilities. Because it builds on standardized and established sampling procedures, the lab protocols are readily applicable to other user in the field of emission measurement.

Parts of this work even found their way into standardization (DIN EN 13098:2019-12). This may be another step forward to comparable bioaerosol measurements.

NIRS has been used in this work with the goal of detecting changes in the total aerosol. Questions like „Is the exhaust ventilation functioning?“ or „Does the bioaerosol emission increase when the mast cycle increases?“ can now be answered with the simple analysis of filter samples without any sample preparation. For a fast monitoring of processes, it is sufficient to see changes in the spectral pattern of the sample which is exactly what NIRS allows. In this work, spectral regions have been identified that allow conclusions about dust quantity (exhaust air cleaning) and fattening. The statistical methods are robust and should be easily applicable to other animal fattening facilities. Next steps might be the inclusion of additional parameters in the model (e.g. feed) or to calibrate the results.

MALDI-TOF-MS, in turn, can be used to study a bioaerosol in more detail, in this case the bacterial fraction. Being able to omit the cultivation step also means a considerable simplification here, which was achieved and described for the first time by this dissertation. For this purpose, impinger samples were taken in an animal fattening plant and analyzed in separate parts. One part was cultured according to the classical procedure, then sequenced and measured by MALDI-TOF-MS. Biomarker ions were determined from these spectra and the records stored in a bioaerosol database. The other part was measured directly by MALDI-TOF-MS. The sample preparation used for the first time in this work shows how cascade filtration can be used to generate analyzable spectra. Moreover, the spectra could be matched with the spectra from the cultured samples deposited in the database. For validation, impinger samples have been collected from other fattening facilities and their MALDI-TOF-MS samples have been successfully analyzed using the database. Clearly, the more the database will expand, the more it will be possible to evaluate the bacterial fraction of a sample without a cultivation step in the future.

Furthermore, it is intended to adapt this approach in the field of occupational health and safety, in particular to be able to detect *Legionella* directly from air and from material samples.

For process monitoring and control of the efficiency of protective measures (NIRS) as well as for the identification of bacteria in bioaerosol (MALDI-TOF-MS), methods have been developed in the present work that are easy and fast to apply and thus close a gap in analytics.

9 Danksagung

Ich beschränke mich auf wenige Namen, denn die Liste wäre länger als sonst üblich. Alle nicht genannten, die mich unterstützen haben, gilt kein geringerer Dank.

Ich danke **Prof. Gereon Elbers** für die fachliche und unbezahlbare persönliche Unterstützung. Ohne ihn wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.

Prof. Klaus Günther für die Übernahme der Arbeit und die Aufmerksamkeit mit der er die Arbeit begleitet hat. Bei **Prof. Matthias Wüst** für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Johannes Schiffels und **Prof. Thorsten Selmer** für die vielen kostbaren Gespräche, fachlichen Beratungen und wertvollen Hinweise.

Verschiedenen **Kollegen der FH Aachen** für die stets nette Arbeitsatmosphäre. Meinem neuem Arbeitgeber das **IFA**, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit zu beenden.

Dr. Andrea Gärtner, **Dr. Udo Jäckel** und ihren jeweiligen Arbeitsgruppen mit dessen Hilfe internationale Publikationen erstellt und meine Arbeit somit zur Reife gelangt ist.

Dr. Sandra Kirby für die intensive fachliche Diskussion und persönlichen Gespräche.

Danke an **Dr. Jörg Rissler**, dass er seine Kompetenz mit mir geteilt und mich die letzten Stufen herauf getragen hat.

Ein besonderer Dank gebührt auch **Amelia Veloso da Costa, Dr. Caroline von Oppen, Jana Dospil, Doerthe Range, Dr. Conrad Wagner** und **Christian Schumacher** die mich und meine Arbeit unterstützt haben.

Dr. Annette Kolk für Ihren unerschütterlichen Glauben an mich und ihrer Motivationsgabe (...durch u. a. in Aussicht stellen von Wein, Sekt, Party etc.).

Ich danke besonders dem **Bereich Biostoffe** für dessen Unterstützung.
Liebe **Meltem**, liebe **Carina**, vielen Dank für eure Motivation.

Danke auch an meine **Freunde Julia, Annika, Ruth, Karin, die Reitertruppe** etc., die den Prozess der Arbeit Schritt für Schritt verfolgt und mir in schlechten sowie guten Zeiten beigestanden haben (Sie mussten lange viel ertragen).

Meiner **Oma Anni**.

Und Dank an meine Eltern **Marlies** und **Juppy**, meinen Bruder **Michael**, sowie meiner Liebe **Christian**, die es verstehen, alles aus mir herauszuholen. Danke für Eure Liebe und Zuneigung.