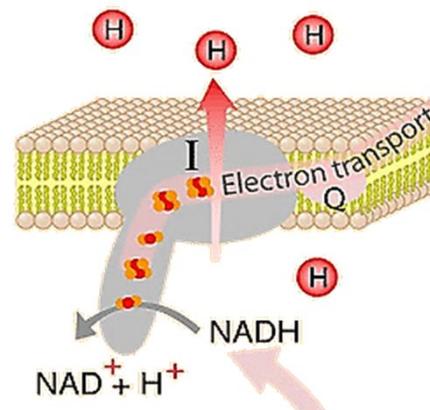


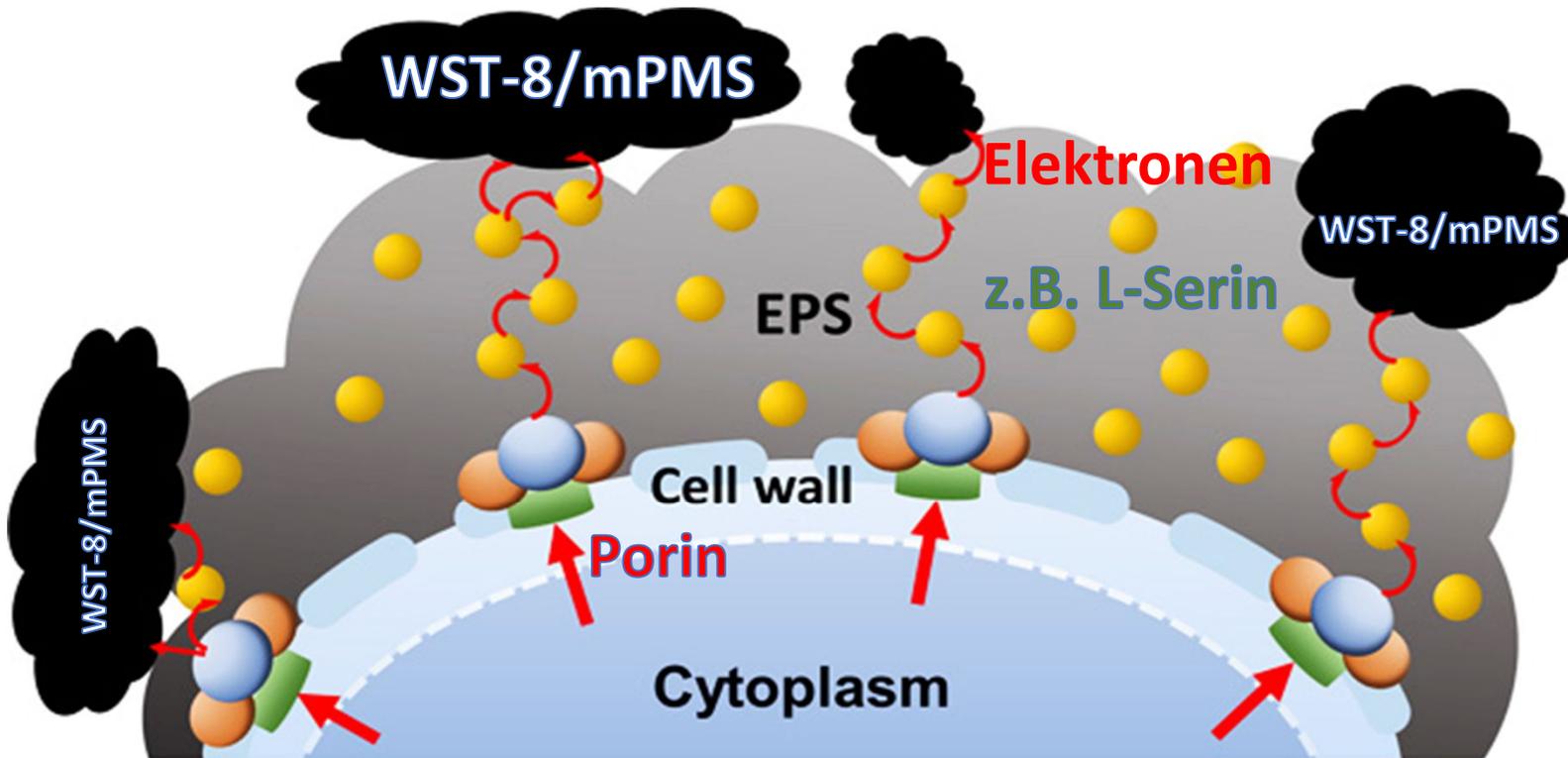


# Schneller Nachweis von lebenden Biofilmbakterien in Trink- und Kühlturmwasser durch biochemische Verfahren



Dr. habil. Anna Salek

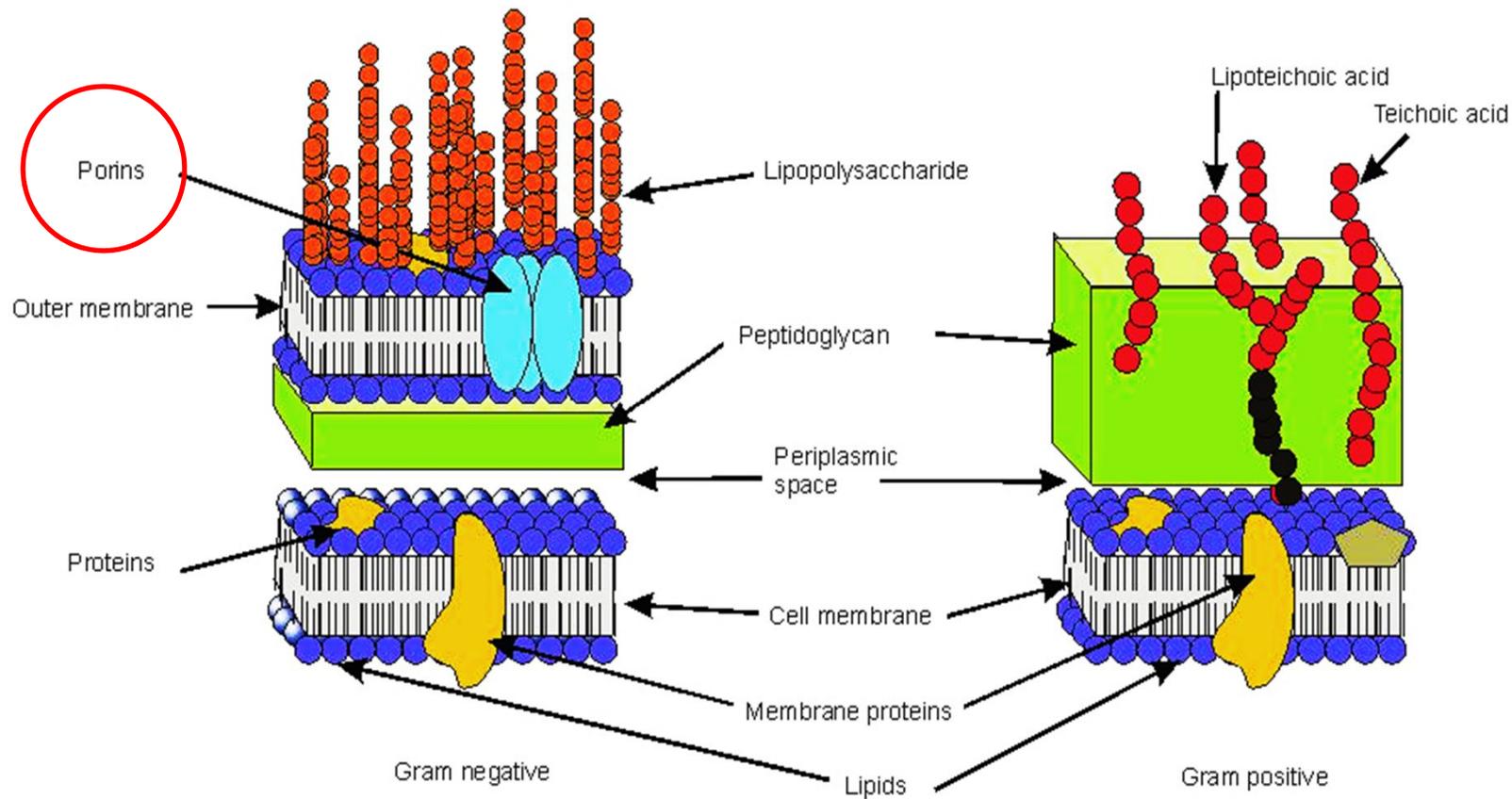
## Struktur des Biofilms (Zellen mit EPS)



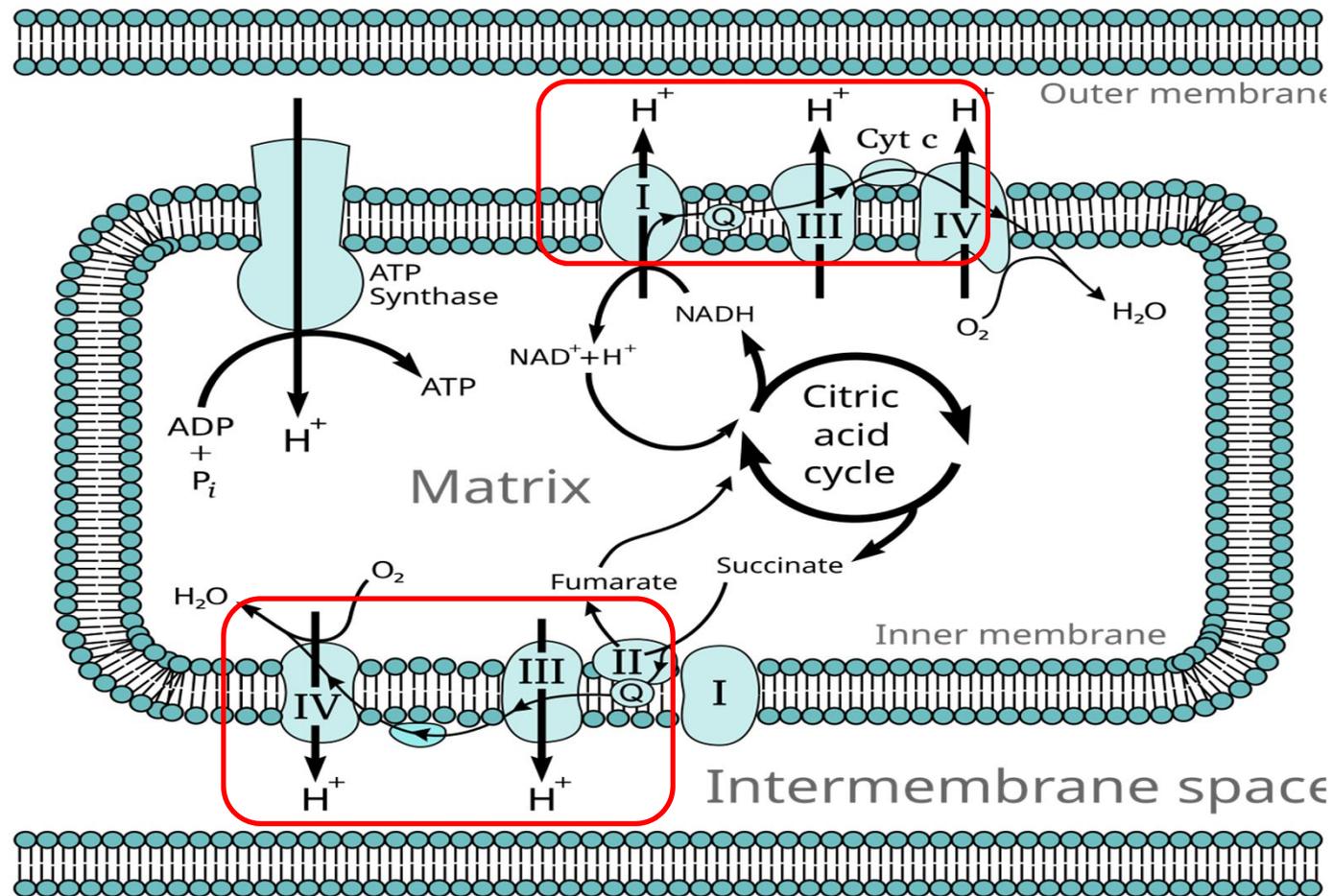
● Redox substance  
↑ Tunneling current

● Electron acceptor/donor  
⤵ Hopping current

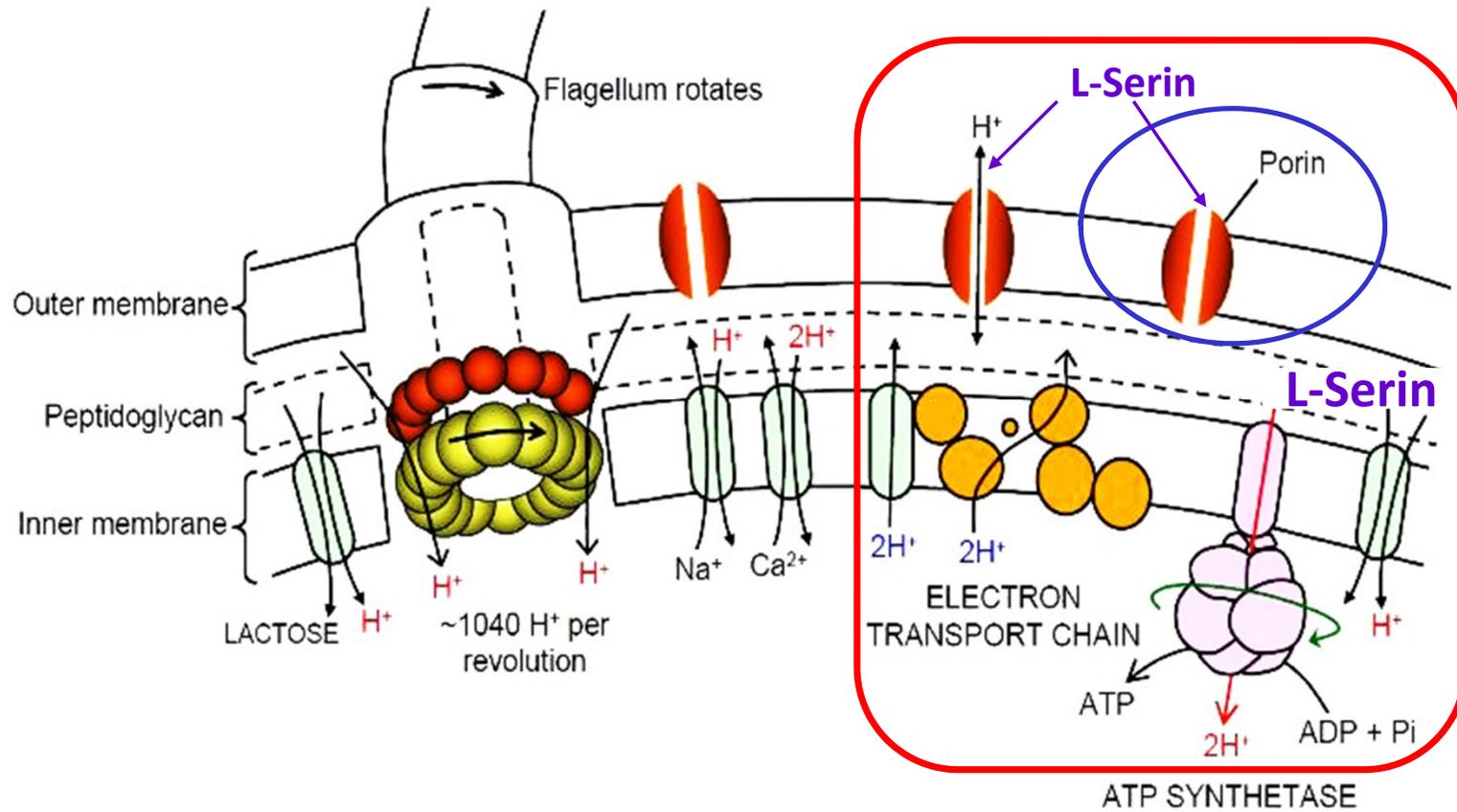
# Struktur der Membranen von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien



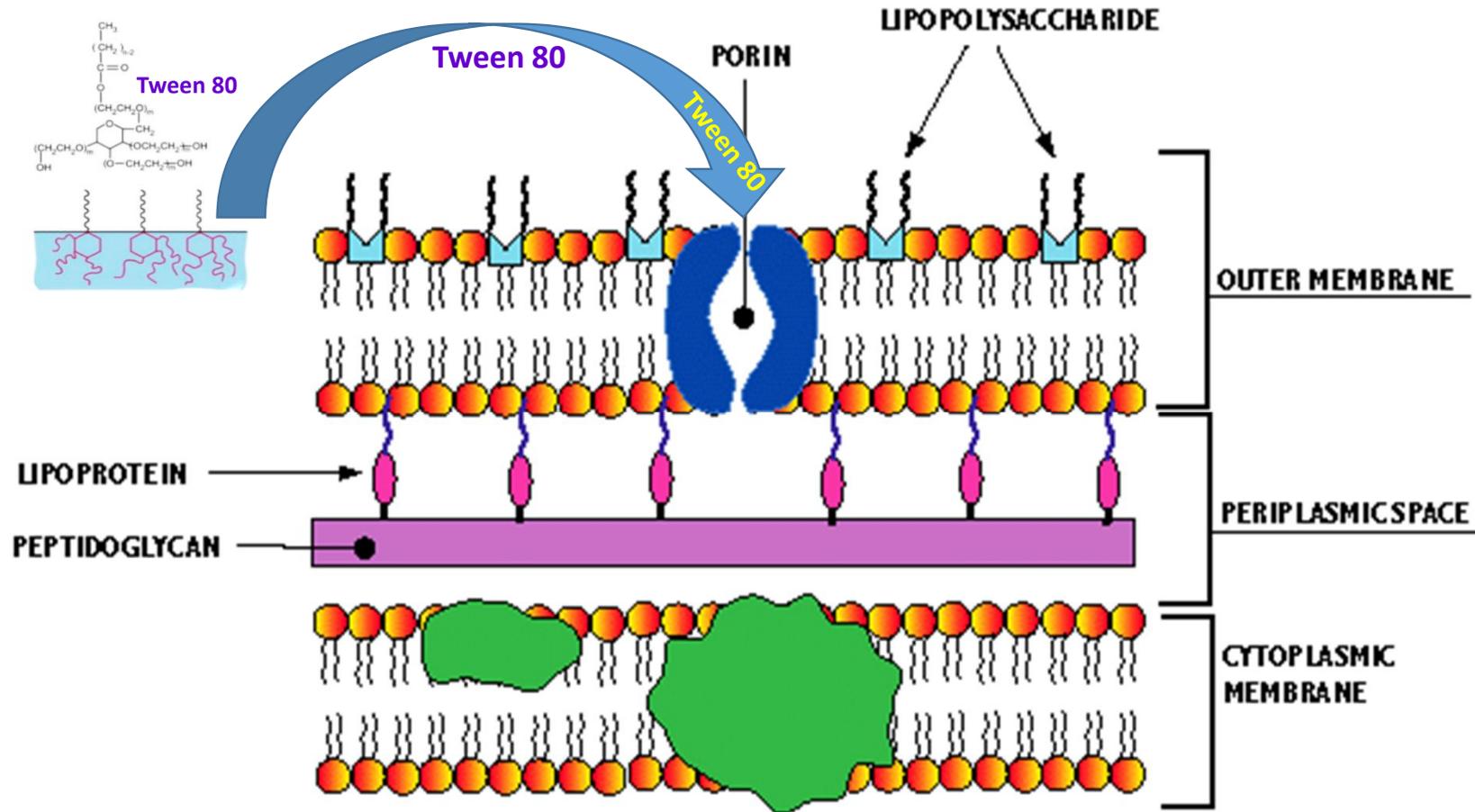
# Schematische Übersicht der Membran bei Gram-negativen Bakterien



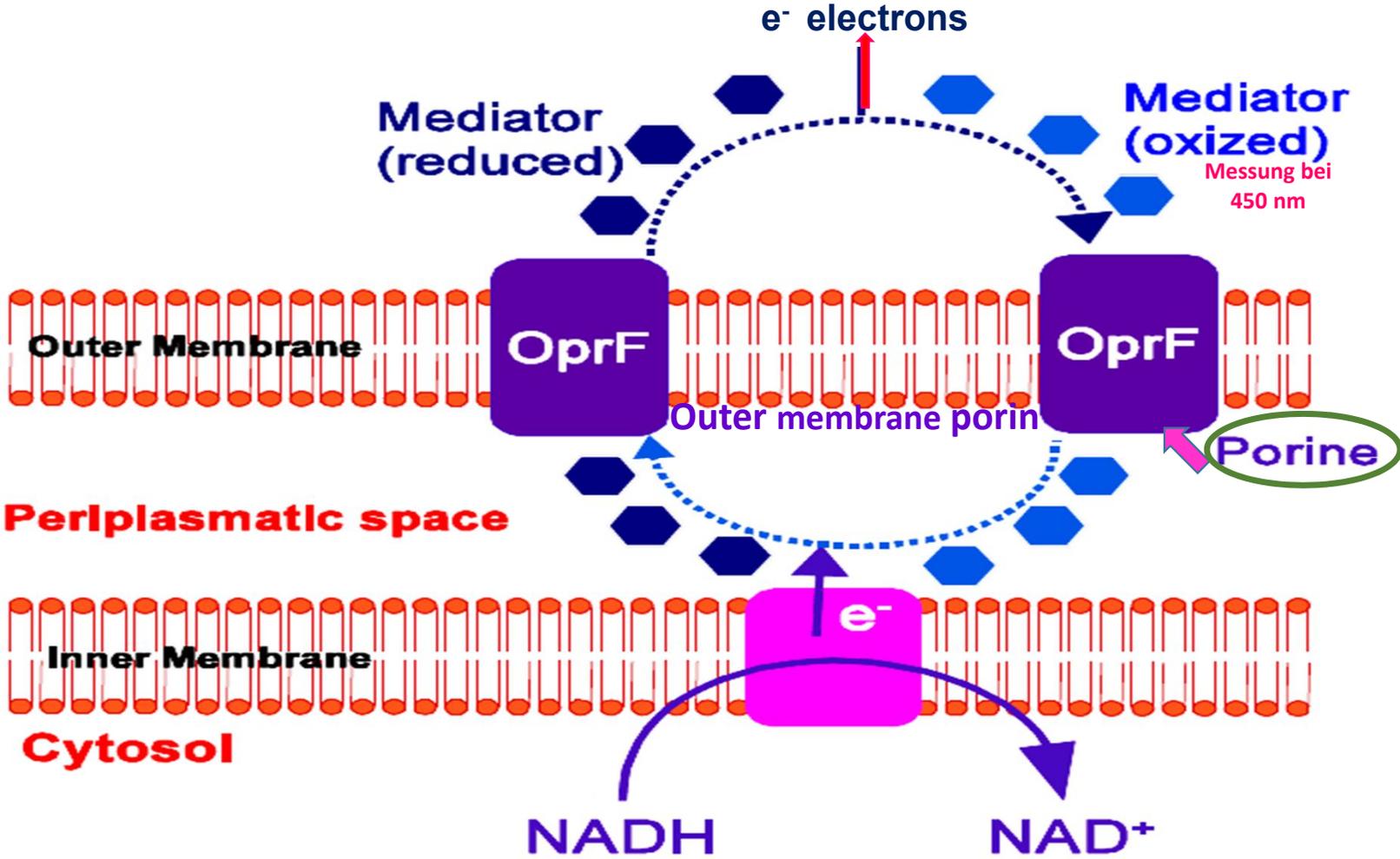
# Membran von Gram-negativen Bakterien: Bedeutung des Porins



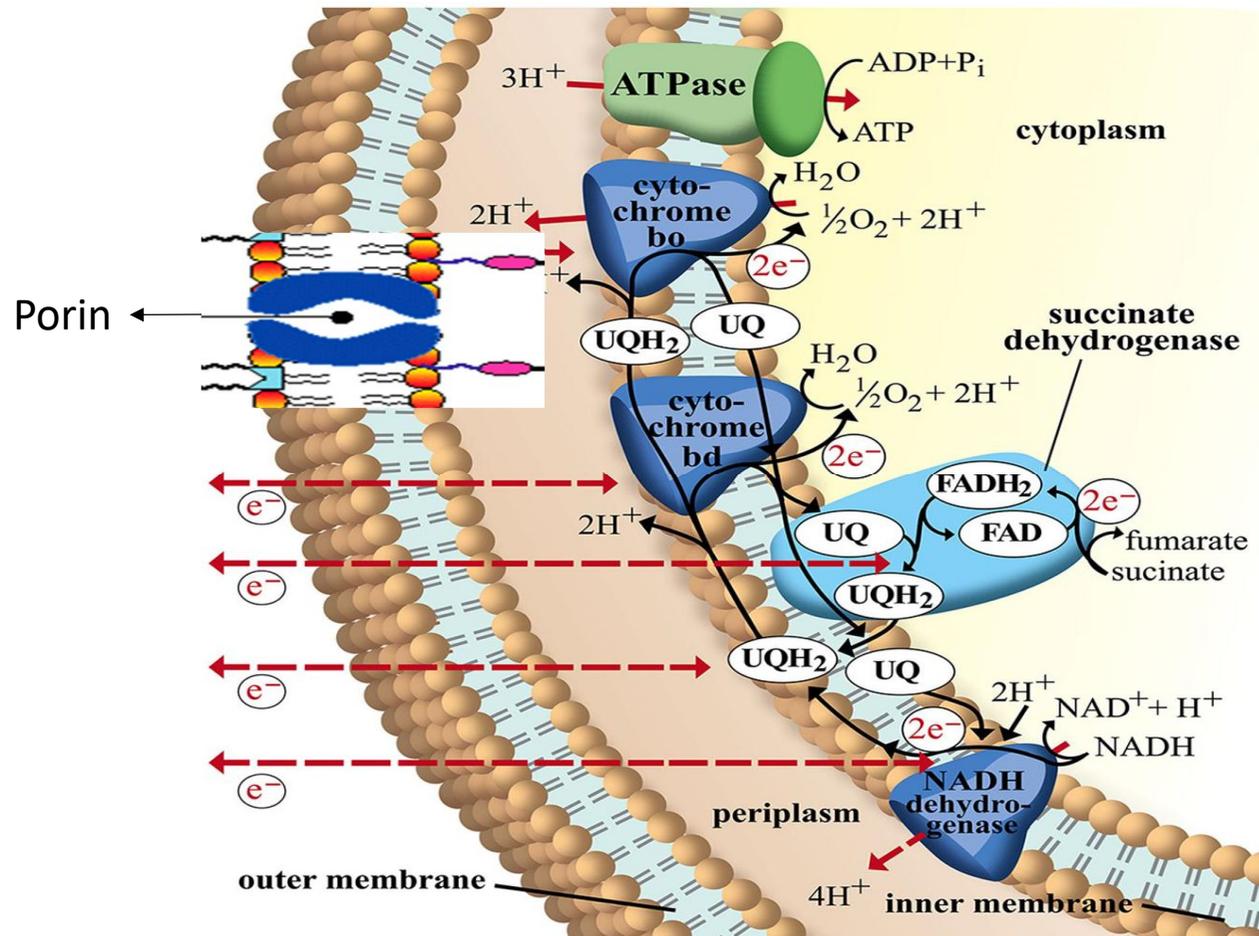
# Membran von Gram-negativen Bakterien: Bedeutung des Porins



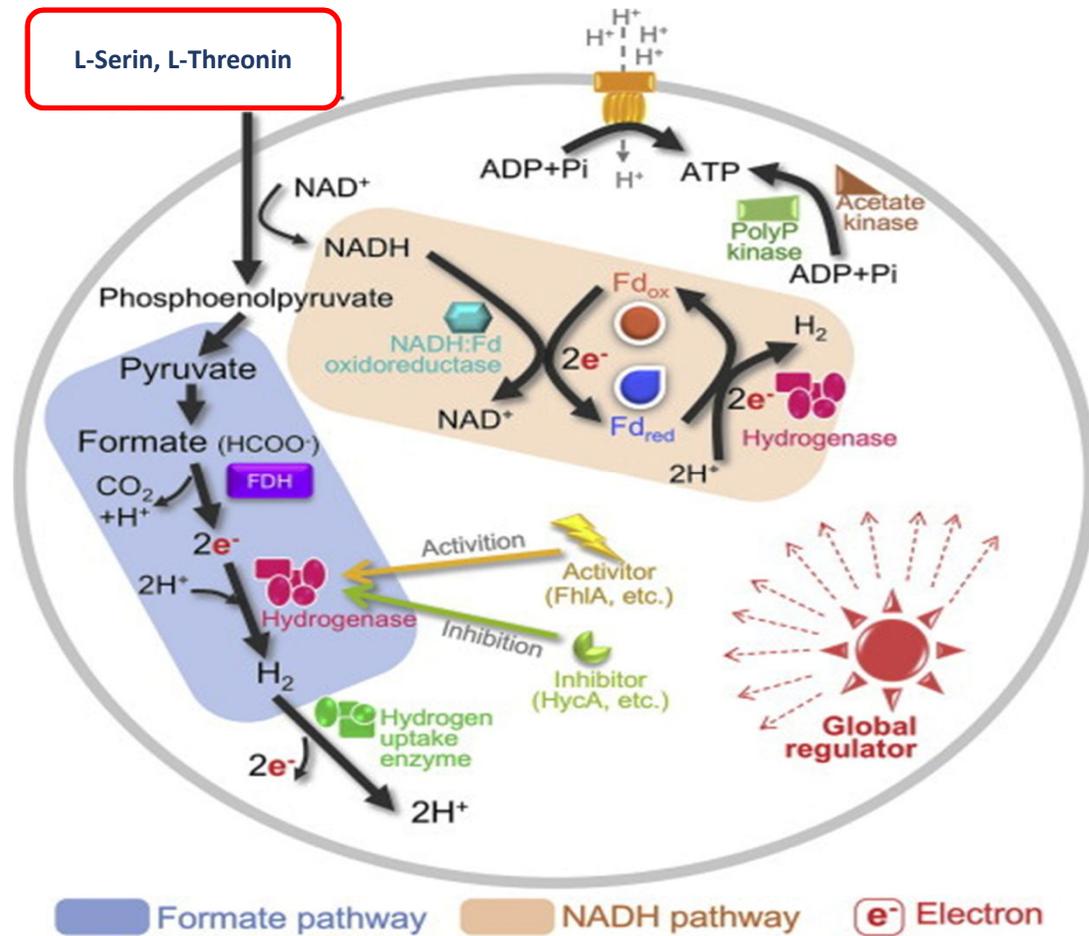
# Membran von Gram-negativen Bakterien: Elektronentransport



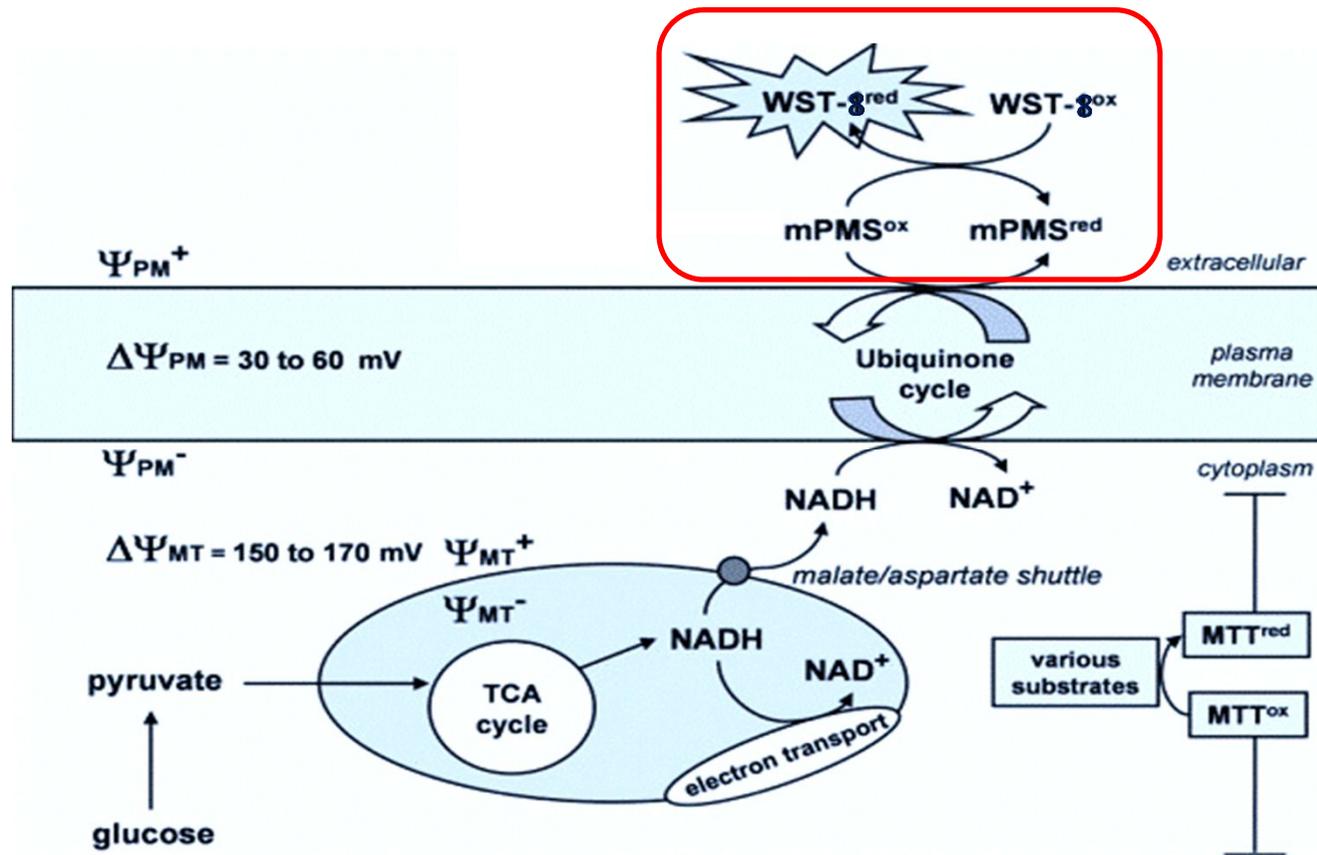
# Membran von Gram-negativen Bakterien: Elektronentransport



# “Redox pathways” in *Legionella pneumophila*



# Membran von Gram-negativen Bakterien: Elektronen Transport System (ETS): Messstrategie



# Schnelle biochemische Methode für die Biofilm-Prognose: Prinzip der Messungen



Durch folgende Methoden werden biofilmproduzierende Bakterien in Trink-, oder Kühlturmwässern innerhalb von 24 Stunden detektiert und quantifizieren:

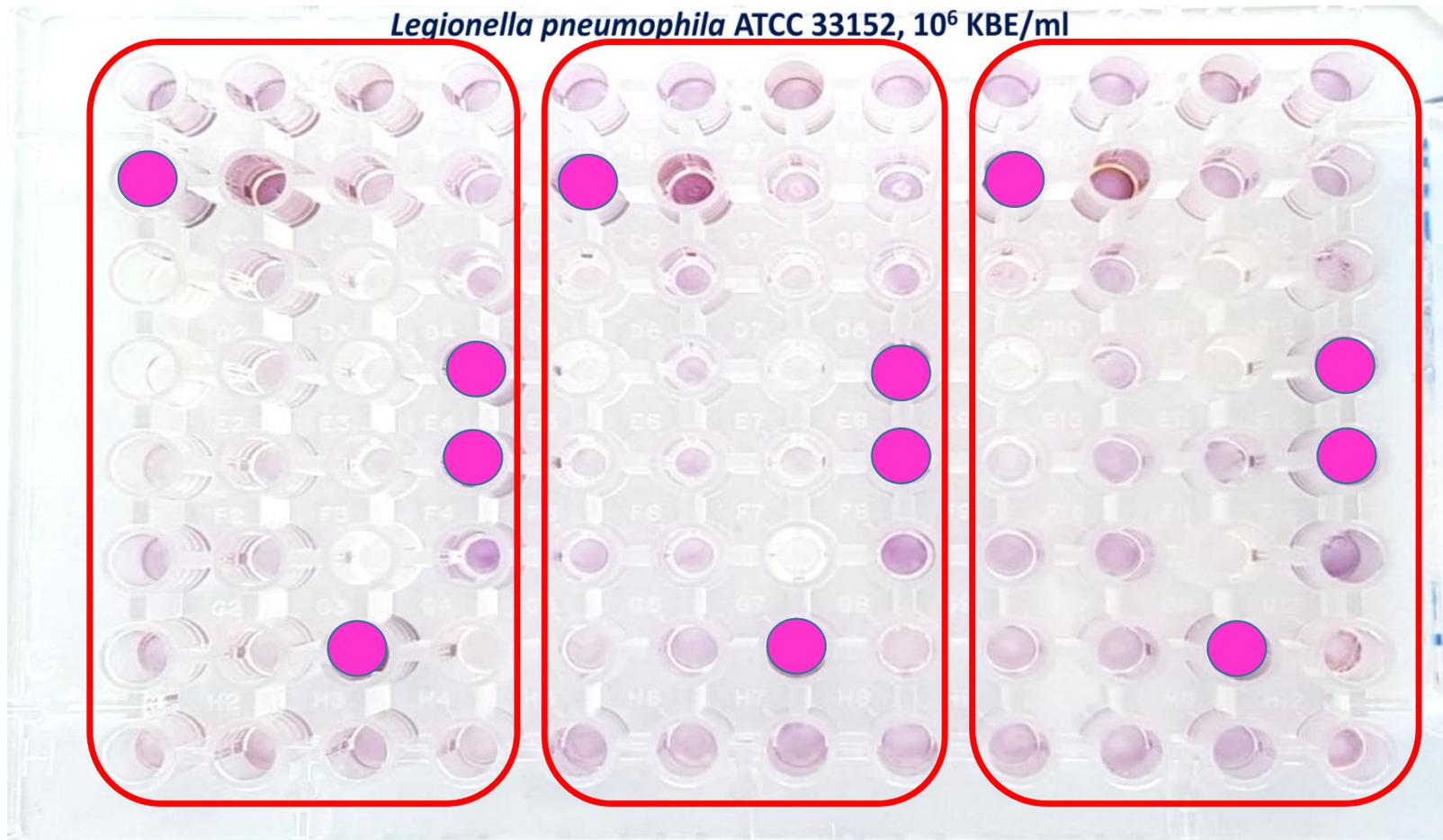
- **Biochemische Analysen** von metabolischen Effekten mit spezifischen Substraten für jede Bakterienart auf der selbst produzierten „InfoPlatte“. **Prinzip:** Detektion der Redoxreaktion (Elektronentransport) auf Bakterien-spezifischen Substraten; das entspricht deren Energie/ Vitalität/ Aktivität (insbesondere *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Enterobacter aerogenes*).
- **Durch die statistische Interpretation** der biochemischen Nachweismethoden der „InfoPlatten – *Biofilm*“ lassen sich hilfreiche Prognosen (in Rahmen von 24 h) über den aktuellen Zustand der Biofilm-bauenden Bakterien in einem Kühlturmwasser vorhersagen (Nachweisgrenze liegt unter  $10^3$  KBE/ ml).
- Für Trinkwasserproben befindet sich die „InfoPlatte – *Legio*“ in Vorbereitung.

## Schnelle biochemische Methode für die Biofilm-Prognose: Prinzip der Messungen

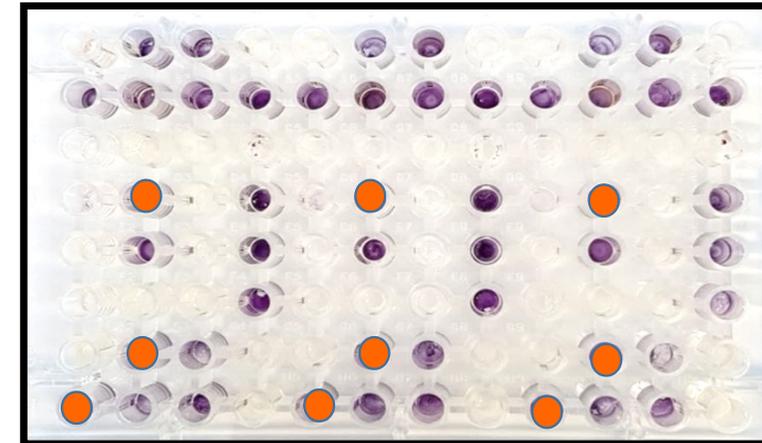
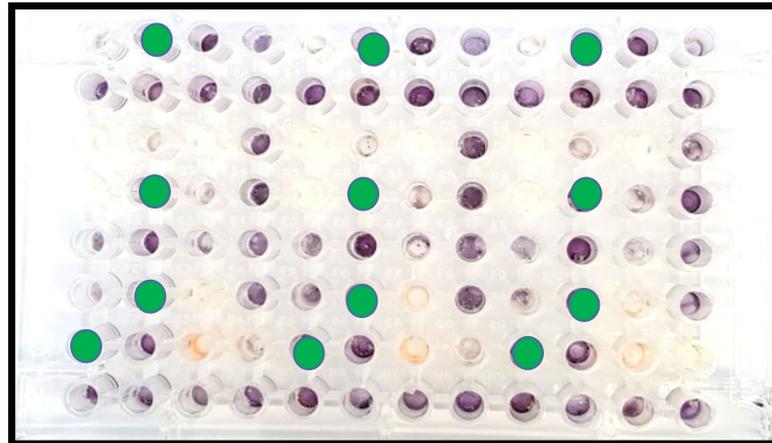
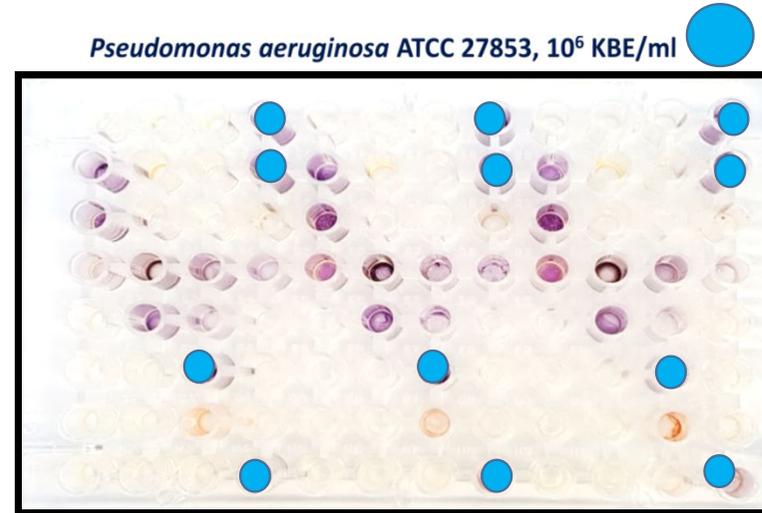
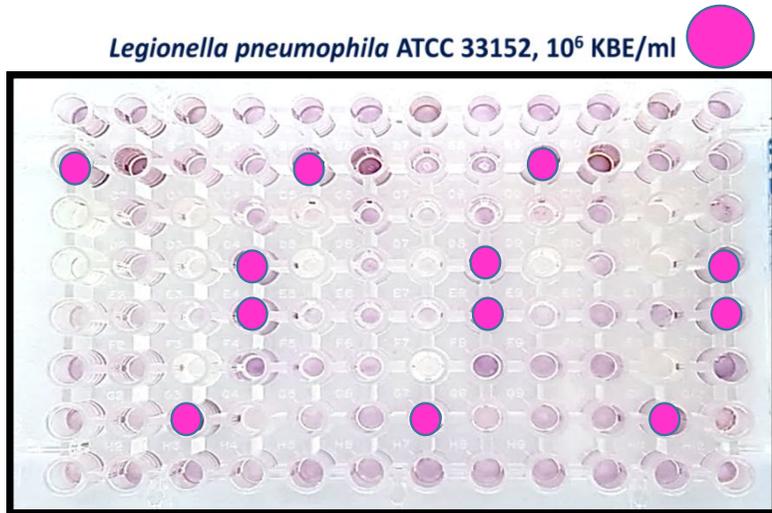


- S.g. InfoPlatten-Legio und InfoPlatten-Biofilm, mit herkömmlichen Substraten, die auf der Messung der Redoxreaktion basieren.
- Damit erfolgt eine Messung der Energie (Vitalität / Aktivität / Energie), die typisch für die getesteten Bakterien ist.
- Mit Hilfe dieser Methode können Bakterienkonzentrationen über  $10^2$  KBE/100 ml diagnostiziert werden (statistisch relevant ab  $10^3$  KBE/100 ml). Zur Bestätigung der Diagnose wurden einige Verifizierungstest durchgeführt.

# EcoPlate® (Biolog): Nachweis von *Legionella* spp. anhand spezifischer Substrate



# EcoPlate® (Biolog): Nachweis von typischen Biofilm-Bakterien anhand spezifischer Substrate

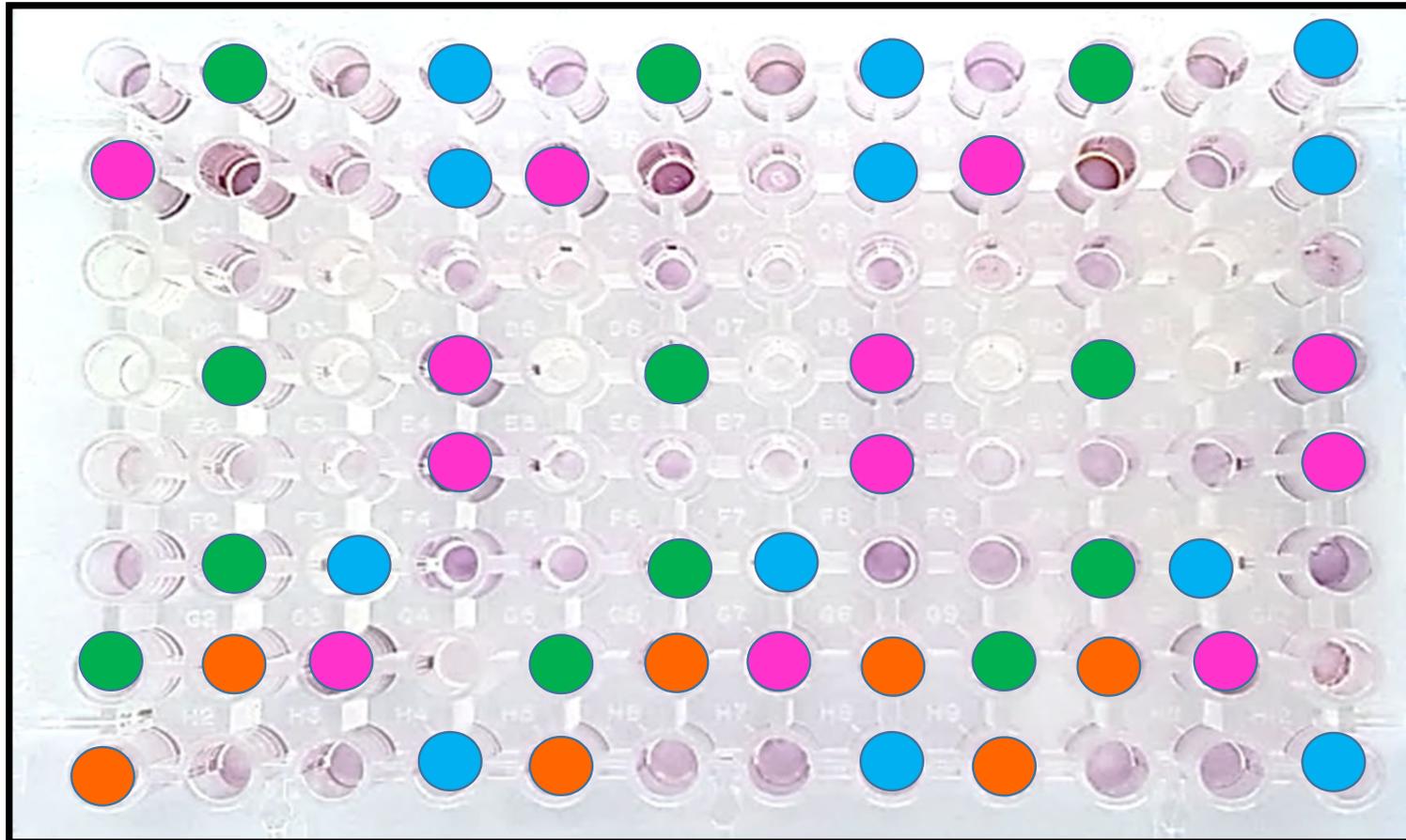


*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, 10<sup>6</sup> KBE/ml

Dr. habil. Anna Salek

*Escherichiacoli* ATCC 25922, 10<sup>6</sup> KBE/ml

# EcoPlate® (Biolog): Nachweis von typischen Biofilm-Bakterien anhand spezifischer Substrate (Mischkultur auf eine Platte)



## Spezifische Substrate für Biofilm-Bakterien



1.	2.	3.	4.
L-Serin <i>Legionella pneumophila</i>	L-Threonin <i>Legionella pneumophila</i>	Glutamat <i>Legionella pneumophila</i>	myo-Inositol <i>Legionella pneumophila</i>
5.	6.	7.	8.
$\beta$ -Methyl-D-Glucosid <i>Enterobacter aerogenes</i>	Mannitol <i>Enterobacter aerogenes</i>	D-Cellobiose <i>Enterobacter aerogenes</i>	D-Glucosaminsäure <i>Enterobacter aerogenes</i>
9.	10.	11.	12.
L-Asparagin <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	L-Arginin <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Itaconsäure <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Putrescin <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
13.	14.	15.	16.
$\alpha$ -D-Glukose <i>Escherichia coli</i>	D-Mannitol <i>Escherichia coli</i>	D-Glukose-1-Phosphat <i>Escherichia coli</i>	D-Phenylamin <i>Escherichia coli</i>

# Probenvorbereitung (15 Minuten) danach 24 h Bebrütung und Messung

**Phase 1:** Wasserprobe (500 ml) filtrieren (durch Filter 0,20 µm) in System A oder B oder C

A.



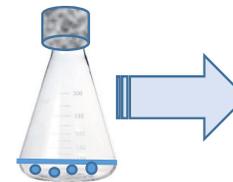
B.



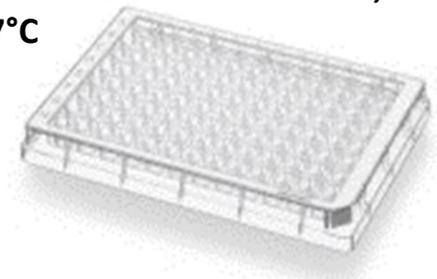
C.



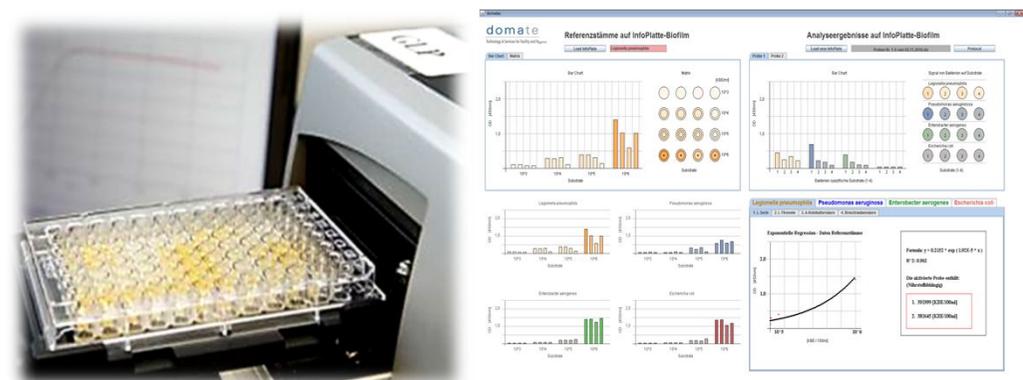
**Phase 2:** Konzentrierte 500x Wasserprobe (Stepp 1 und 2 in Phase 2) weitergeben (100 µm) für je Kavität Titerplatte mit spezifische Substrate und Indikatoren, danach 24 h bebrüten bei 37°C



Konzentrat nach 15 Minuten



**Phase 3:** Messung der optische Dichte (bei 450 nm) und Prüfergebnis aus Software lesen:



# Konzentrationen von lebenden Biofilmbakterien in Trinkwasser durch Stepp 1 und 2 in Phase (2)

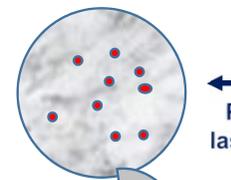
## Phase 1



Filtration durch Polycarbonat Filter in System: A oder B oder C

## Phase 2

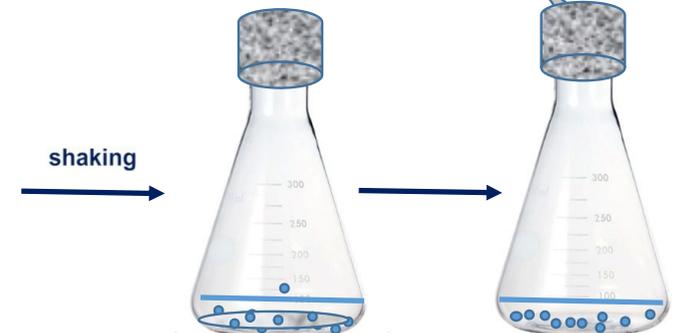
### Stepp 1 in Phase 2



Nach Filtration  
Polycarbonat Filter mit einige Bakterien  
lassen in Erlenmeyer Kolben mit glas Kugel

Nach shaking  
Polycarbonat Filter ohne Bakterien

### Stepp 2 in Phase 2 Konzentration



shaking

Shaking 15 Minuten

Konzentrat nach 15 Minuten

# Konzentrationen von lebenden Biofilmbakterien in Trinkwasser durch Stepp 1 und 2 in Phase (2)

Phase 1



Filtration durch Polycarbonat Filter in System:  
A oder B oder C

Phase 2

Stepp 1 in Phase 2

Nach shaking  
Polycarbonat Filter ohne Bakterien

← Nach Filtration  
Polycarbonat Filter mit einige Bakterien  
lassen in Erlenmeyer Kolben mit glas Kugel

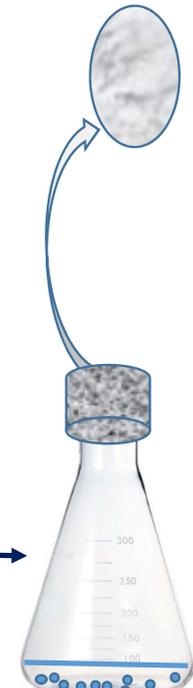
Stepp 2 in Phase 2  
Konzentration



shaking



Shaking 15 Minuten



Konzentrat nach 15 Minuten

# Probenvorbereitung (15 Minuten) danach 24 h Bebrütung und Messung

**Phase 1:** Wasserprobe (500 ml) filtrieren (durch Filter 0,20 µm) in System A oder B oder C

A.



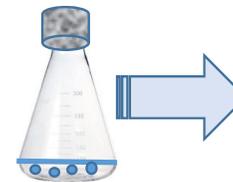
B.



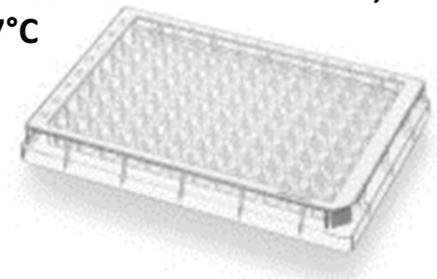
C.



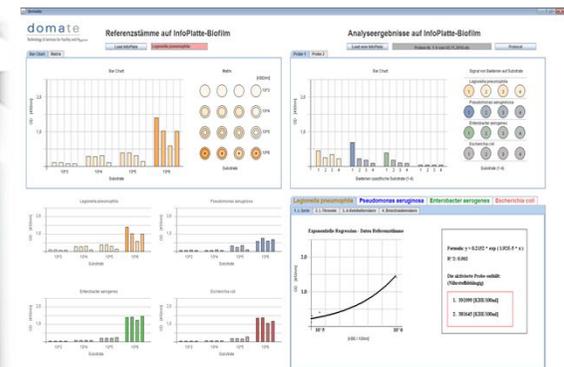
**Phase 2:** Konzentrierte 500x Wasserprobe (Stepp 1 und 2 in Phase 2) weitergeben (100 µm) für je Kavität Titerplatte mit spezifische Substrate und Indikatoren, danach 24 h bebrüten bei 37°C



Konzentrat nach 15 Minuten



**Phase 3:** Messung der optische Dichte (bei 450 nm) und Prüfergebnis aus Software lesen:



## InfoPlatte-Legio & InfoPlatte-Biofilm: Verfahren



### Spezifische Lösungen (werden in den Vertiefungen getrocknet):

- Für *Legionella pneumophila*: 75 µl ACES (pH 6,6) mit 1% Tween 80 + 25 µl L-Serin oder 25 µl L-Threonin (Substrate in Puffer mit 1 % Tween 80) und 75 µl PBS-Puffer (pH 7,4) mit 1% Tween 80 + 25 µl Glutamat oder 25 µl myo-Inositol (Substrate in Puffer mit 1% Tween 80);
- Für *Pseudomonas aeruginosa*: 75 µl PBS (pH 7,4) mit 1 % Tween 80 + 25 µl L-Asparagin + L-Arginin + 25 µl Itakonsäure + 25 µl Putrescin (Substrate in Puffer PBS mit 1 % Tween 80);
- Für *Enterobacter aerogenes*: 75 µl PBS (pH 7,4) mit 1 % Tween 80 + 25 µl β-Methyl-D-Glukozid oder 25 µl D-Cellobiose + 25 µl D-Glukosaminsäure + 25 µl D-Mannitol (Substrate in Puffer PBS mit 1 % Tween 80);
- Für *Escherichia coli*: 75 µl PBS (pH 7,4) mit 1 % Tween 80 + 25 µl α-D-Glukose + 25 µl D-Mannitol + 25 µl L-Phenylamin oder 25 µl Glukose-1-Phosphat (Substrate in Puffer PBS mit 1 % Tween 80).



### Proben Vorbereitung:

- 1000 ml Wasserprobe werden durch Polycarbonat Filter ( $\text{\O} 47 \text{ mm}$ ,  $0,20 \text{ }\mu\text{m}$ ) filtrieren abgewaschen, d.h. 15 Min. mit Glaskugel in 1 ml Puffer mit 1 % Tween 80 (50 ml dieses Puffer hat:  $50 \text{ }\mu\text{l}$  500x Konz. NADH +  $33 \text{ }\mu\text{l}$  100x Konz. ATP +  $500 \text{ }\mu\text{l}$  100x Konz.  $\text{CoQ}_1$  +  $3 \text{ }\mu\text{l}$   $\text{Zn}^{+2}$  1% Lsg) rühren;
- Konzentrat (1000 x) 15 Minuten im Ultraschallbad beschallen (mit Pulsen);
- danach jede Vertiefung der Platte (1-12) mit  $100 \text{ }\mu\text{l}$  dieses Konzentrats beimpfen und  $10 \text{ }\mu\text{l}$  des Redox-dye WST-1/ mPMS zugeben.

### Inkubation und Messung:

- Temp.  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  (für „InfoPlatte-Legio“) oder in normaler Atmosphäre (für „InfoPlatte-Biofilm“);
- Zeit: bis 24 h;
- Messung in Mikroplattenphotometer bei 450 nm.

### Ergebnisse:

- ❖ Quantitative Ergebnisse in KBE/ 100 ml Wasserprobe von „domadex“ Software.

Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio & InfoPlatte-Biofilm



Bei Software „domadex“ handelt es sich um ein Programm,  
welches zum Abgleich von Trinkwasser- oder Kühlturmproben mit  
Referenzstämmen (*Legionella pneumophila*, *Pseudomonas  
aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* und *Escherichia coli*)  
eingesetzt werden kann.

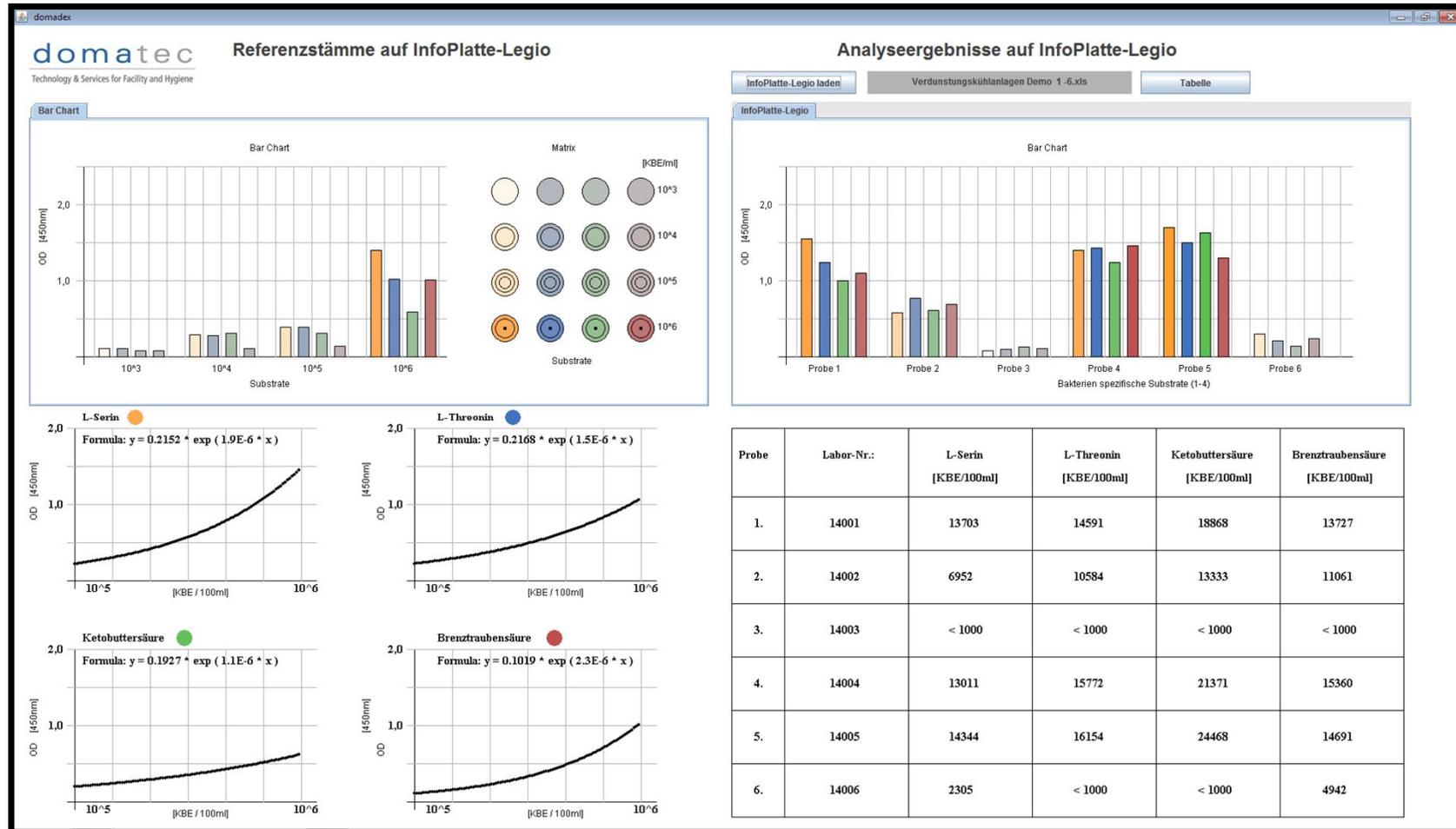
# Muster der InfoPlatte-Legio für 6 Trinkw.-Proben mit 3mal Bestimmung:

## *Legionella pneumophila* SG1

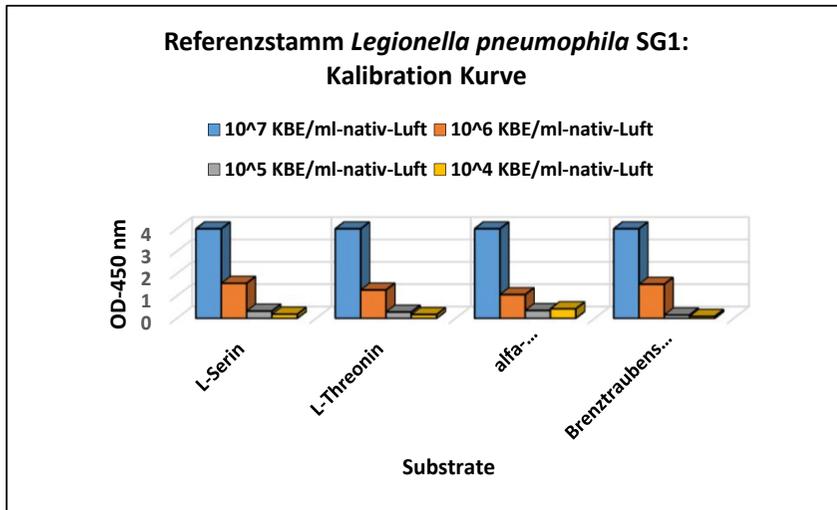
Proben	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Leer	Wasser											
Probe 1	L-Serin	L-Serin	L-Serin	L-Threonin	L-Threonin	L-Threonin	Glutamat	Glutamat	Glutamat	myo-Inositol	myo-Inositol	myo-Inositol
Probe 2	L-Serin	L-Serin	L-Serin	L-Threonin	L-Threonin	L-Threonin	Glutamat	Glutamat	Glutamat	myo-Inositol	myo-Inositol	myo-Inositol
Probe 3	L-Serin	L-Serin	L-Serin	L-Threonin	L-Threonin	L-Threonin	Glutamat	Glutamat	Glutamat	myo-Inositol	myo-Inositol	myo-Inositol
Probe 4	L-Serin	L-Serin	L-Serin	L-Threonin	L-Threonin	L-Threonin	Glutamat	Glutamat	Glutamat	myo-Inositol	myo-Inositol	myo-Inositol
Probe 5	L-Serin	L-Serin	L-Serin	L-Threonin	L-Threonin	L-Threonin	Glutamat	Glutamat	Glutamat	myo-Inositol	myo-Inositol	myo-Inositol
Probe 6	L-Serin	L-Serin	L-Serin	L-Threonin	L-Threonin	L-Threonin	Glutamat	Glutamat	Glutamat	myo-Inositol	myo-Inositol	myo-Inositol
Blind	Ohne Bakterien											



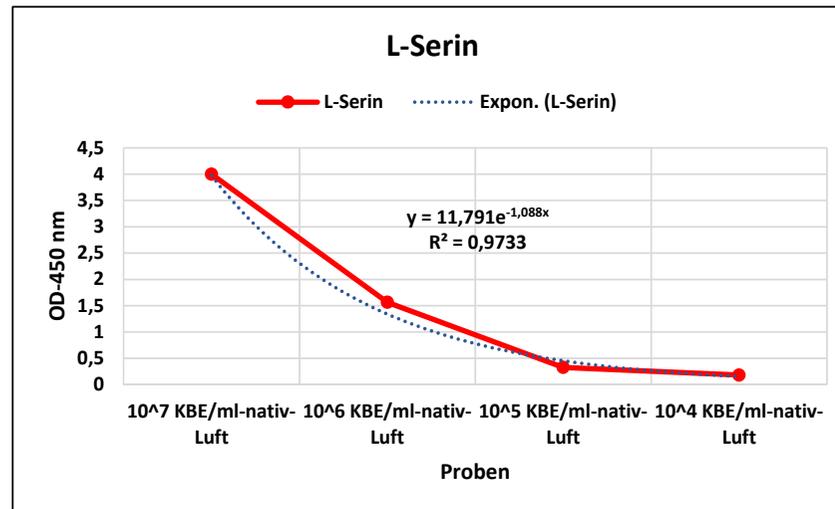
# Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



# InfoPlatte-Legio: Legionella pneumophila SG1: Kalibrationskurve



Luft	L-Serin	L-Threonin	α-Ketobuttersäure	Brenztraubensäure ME
10 <sup>7</sup> KBE/ml-nativ-Luft	4,000	4,000	4,000	4,000
10 <sup>6</sup> KBE/ml-nativ-Luft	1,564	1,265	1,059	1,522
10 <sup>5</sup> KBE/ml-nativ-Luft	0,324	0,282	0,350	0,148
10 <sup>4</sup> KBE/ml-nativ-Luft	0,180	0,168	0,422	0,089



# InfoPlatte-Legio für 6 Trinkw.-Proben mit 3mal Bestimmung:

## Untersuchung *Legionella pneumophila* SG1



Proben	H <sub>2</sub> O											
Probe 1	0,424	0,500	0,447	0,278	0,234	0,242	0,344	0,324	0,368	0,223	0,247	0,209
Probe 2	0,626	0,617	0,501	0,216	0,201	0,206	0,188	0,232	0,205	0,105	0,099	0,099
Probe 3	0,649	0,712	0,733	0,215	0,214	0,231	0,159	0,191	0,202	0,097	0,096	0,092
Probe 4	0,556	0,692	0,915	0,312	0,286	0,318	0,179	0,18	0,173	0,128	0,125	0,112
Probe 5	0,408	0,373	0,417	0,181	0,182	0,182	0,108	0,116	0,103	0,091	0,092	0,09
Probe 6	0,579	0,862	0,828	0,24	0,368	0,349	0,214	0,198	0,185	0,131	0,128	0,107
Blind	Blind	Blind	Blind	Blind	Blind	Blind	Blind	Blind	Blind	Blind	Blind	Blind

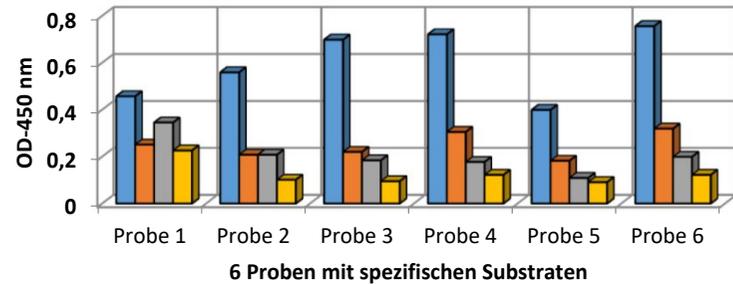
# InfoPlatte-Legio für 6 Trinkw.-Proben mit 3mal Bestimmung:

## Untersuchung *Legionella pneumophila* SG1



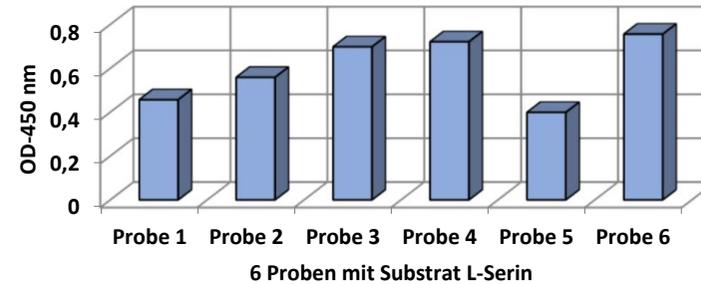
6 Proben Trinkw vom 06.11.2018: 75x Konzentrierende

■ L-Serin ■ L-Threonin ■ alfa-Ketobuttersäure ■ Brenztraubensäure ME



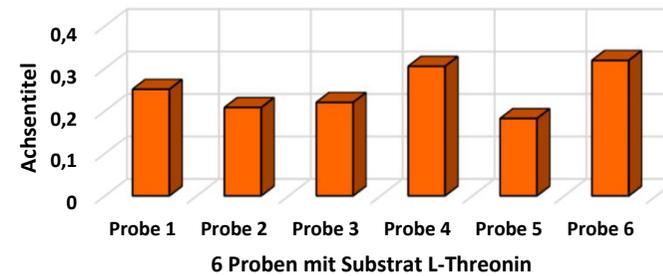
L-Serin

■ L-Serin



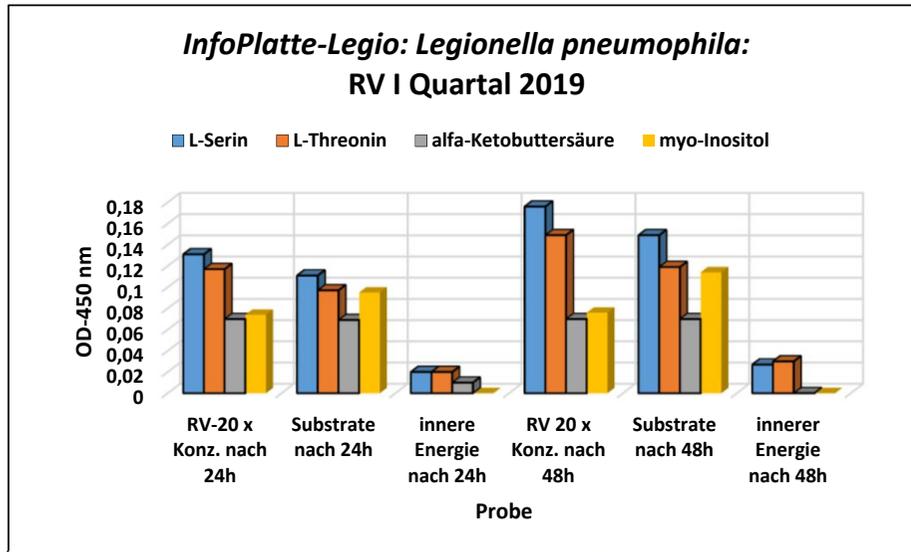
L-Threonin

■ L-Threonin



# Legionella pneumophila: RV I Quartal 2019. 20x Konzentrat

## 22.01.2019



Probe	L-Serin	L-Threonin	α-Ketobuttersäure	myo-Inositol
RV-20 x Konz. nach 24h	0,131	0,117	0,070	0,074
Substrate nach 24h	0,111	0,097	0,069	0,095
innere Energie nach 24h	0,020	0,020	0,010	0,000
RV 20 x Konz. nach 48h	0,176	0,149	0,070	0,076
Substrate nach 48h	0,149	0,119	0,070	0,114
innerer Energie nach 48h	0,027	0,030	0,000	0,000

### Nach 24h:

0,695 OD<sub>450</sub> - 219200 KBE/100 ml

0,131 OD<sub>450</sub> - X<sub>1</sub>

X<sub>1</sub> = 41317 KBE / 100 ml 20x Konzentrat

**In Wasser (nicht konzentrierte) ist 2066 KBE / 100 ml nach 24 h (Labor nach 5 T. = 2060 KBE / 100 ml)**

**In Wasser (nicht konzentrierte) ist in Labor nach 10 Tage = 2233 KBE 100 ml mit Z(u)-Score = - 0,6.**

RV 1-2019: Mittelwert nach NLGA ist 2664,7 KBE / 100 ml.

# Muster InfoPlatte-Biofilm für 2 Trinkw.-Proben mit 3mal Bestimmung: *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*



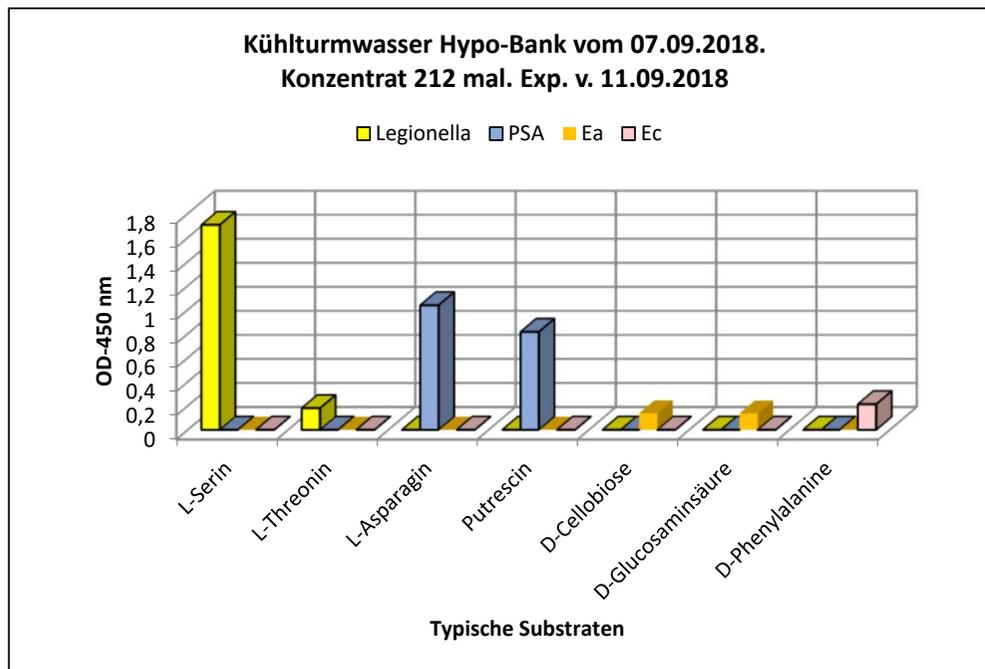
2 Proben	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Probe 1- Legio	L-Serin	L-Serin	L-Serin	L-Threonin	L-Threonin	L-Threonin	$\alpha$ -Ketobutters.	$\alpha$ -Ketobutters.	$\alpha$ -Ketobutters.	Brenztraubensäure	Brenztraubensäure	Brenztraubensäure
Probe 1- PSA	L-Asparagin	L-Asparagin	L-Asparagin	L-Arginin	L-Arginin	L-Arginin	Itakonsäure	Itakonsäure	Itakonsäure	Putrescin	Putrescin	Putrescin
Probe 1- Ea	$\beta$ -Methyl-D-Glukozid	$\beta$ -Methyl-D-Glukozid	$\beta$ -Methyl-D-Glukozid	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Glukozaminsäure	D-Glukozaminsäure	D-Glukozaminsäure	D-Mannitol	D-Mannitol	D-Mannitol
Probe 1- Ec	$\alpha$ -D-Glukose	$\alpha$ -D-Glukose	$\alpha$ -D-Glukose	D-Mannitol	D-Mannitol	D-Mannitol	D-Phenylamin	D-Phenylamin	D-Phenylamin	Glukose-1-Phosphat	Glukose-1-Phosphat	Glukose-1-Phosphat
Probe 2- Legio	L-Serin	L-Serin	L-Serin	L-Threonin	L-Threonin	L-Threonin	$\alpha$ -Ketobutters.	$\alpha$ -Ketobutters.	$\alpha$ -Ketobutters.	Brenztraubensäure	Brenztraubensäure	Brenztraubensäure
Probe 2- PSA	L-Asparagin	L-Asparagin	L-Asparagin	L-Arginin	L-Arginin	L-Arginin	Itakonsäure	Itakonsäure	Itakonsäure	Putrescin	Putrescin	Putrescin
Probe 2- Ea	$\beta$ -Methyl-D-Glukozid	$\beta$ -Methyl-D-Glukozid	$\beta$ -Methyl-D-Glukozid	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Cellobiose	D-Glukozaminsäure	D-Glukozaminsäure	D-Glukozaminsäure	D-Mannitol	D-Mannitol	D-Mannitol
Probe 2- Ec	$\alpha$ -D-Glukose	$\alpha$ -D-Glukose	$\alpha$ -D-Glukose	D-Mannitol	D-Mannitol	D-Mannitol	D-Phenylamin	D-Phenylamin	D-Phenylamin	Glukose-1-Phosphat	Glukose-1-Phosphat	Glukose-1-Phosphat

# InfoPlatte-Biofilm für eine Kühlturmwasserprobe (Hypo-Bank) mit 3mal Bestimmung: Untersuchung von vier Biofilmbakterien



Leer m. Wasser	0,05	0,051	0,05	0,05	0,051	0,05	0,051	0,049	0,05	0,05	0,049	0,05
Legionella pn.	1,685	1,781	1,652	0,182	0,176	0,183	0,087	0,089	0,090	0,130	0,132	0,126
P. aeruginosa	1,036	1,017	1,058	0,184	0,165	0,182	0,112	0,115	0,128	0,888	0,753	0,804
E. aerogenes	0,094	0,093	0,102	0,14	0,133	0,139	0,135	0,131	0,139	0,114	0,100	0,100
E. coli	0,111	0,112	0,118	0,117	0,118	0,117	0,220	0,209	0,211	0,106	0,100	0,052
Leer m. Wasser	0,049	0,049	0,050	0,051	0,050	0,051	0,053	0,050	0,050	0,052	0,052	0,052
Blind: Inokulat o. Bakterien	0,111	0,119	0,128	0,110	0,112	0,109	0,092	0,096	0,095	0,075	0,073	0,069
Leer m. Wasser	0,050	0,049	0,055	0,051	0,051	0,051	0,052	0,052	0,053	0,054	0,050	0,050

# InfoPlatte-Biofilm für eine Kühlturmwasserproben (Hypo-Bank) mit 3mal Bestimmung: Untersuchung von vier Biofilmbakterien

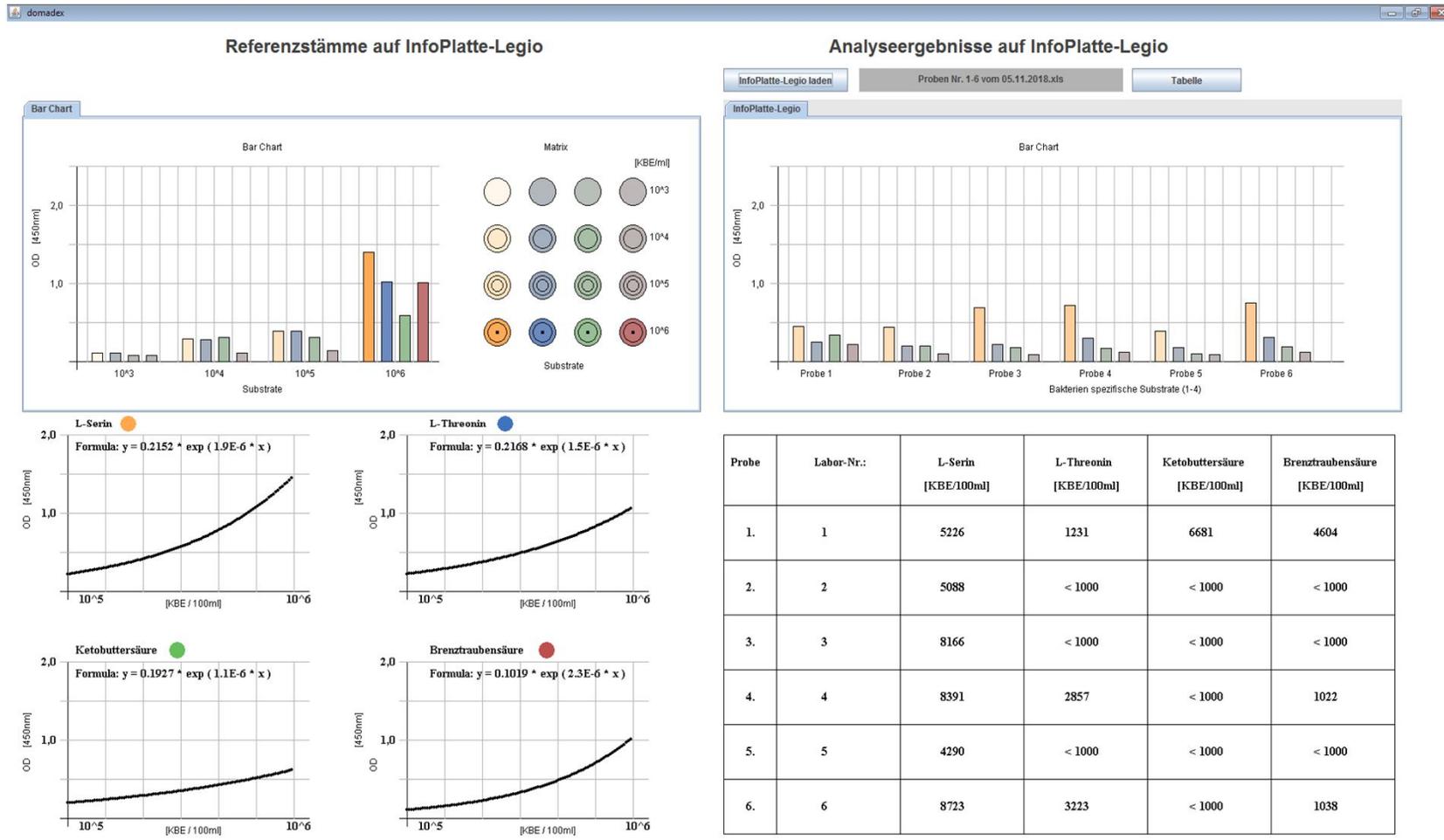


Bakterien	L-Serin	L-Threonin	L-Asparagin	Putrescin	D-Cellobiose	D-Glucosamin-säure	D-Phenyl-amin
Legionella pneumophila	1,706	0,180	0	0	0	0	0
P. aeruginosa (PSA)	0	0	1,037	0,815	0	0	0
E. aerogenes (Ea)	0	0	0	0	0,137	0,135	0
E. coli (Ec)	0	0	0	0	0	0	0,213

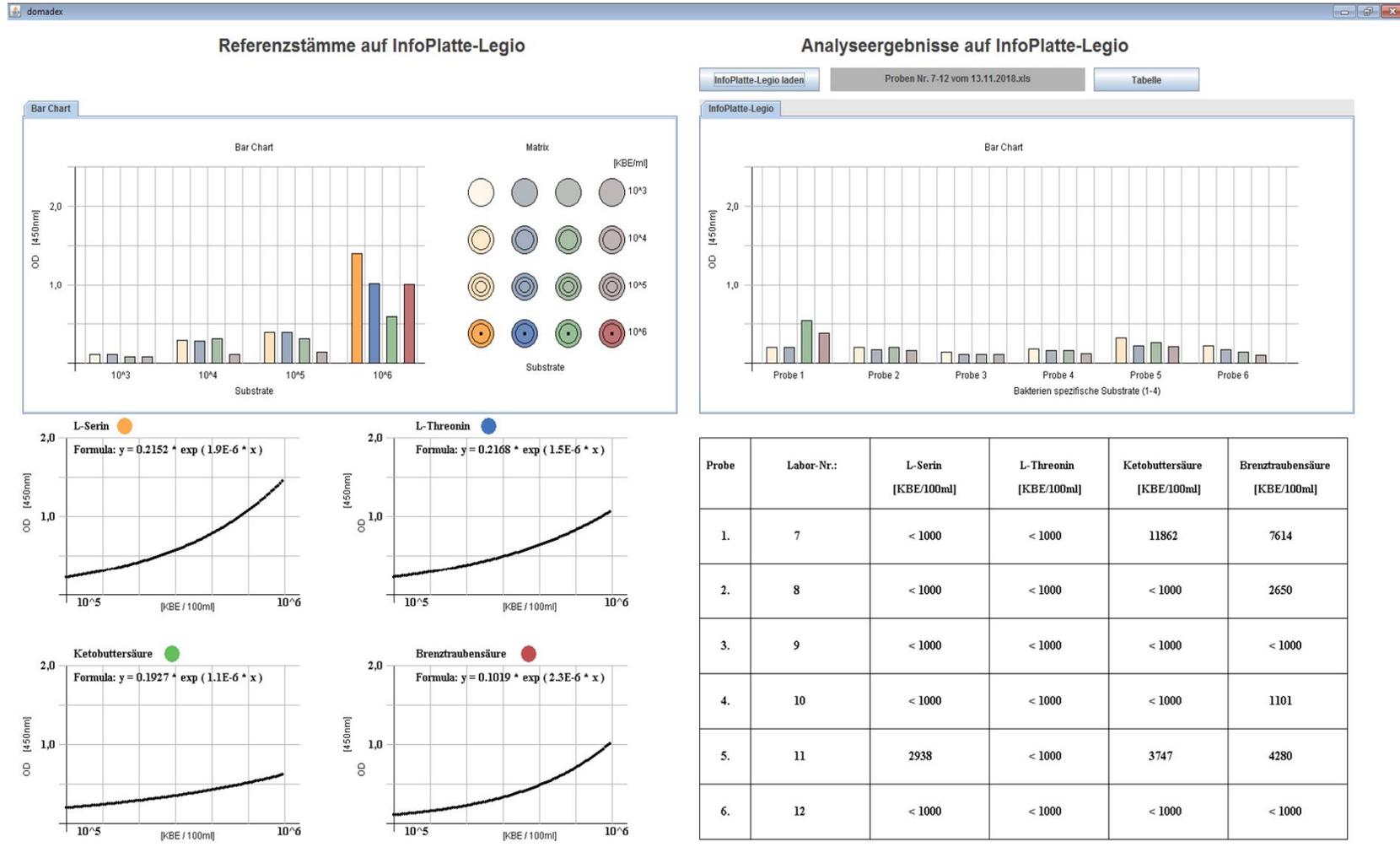
# Software „domadex“ für InfoPlatte-Biofilm



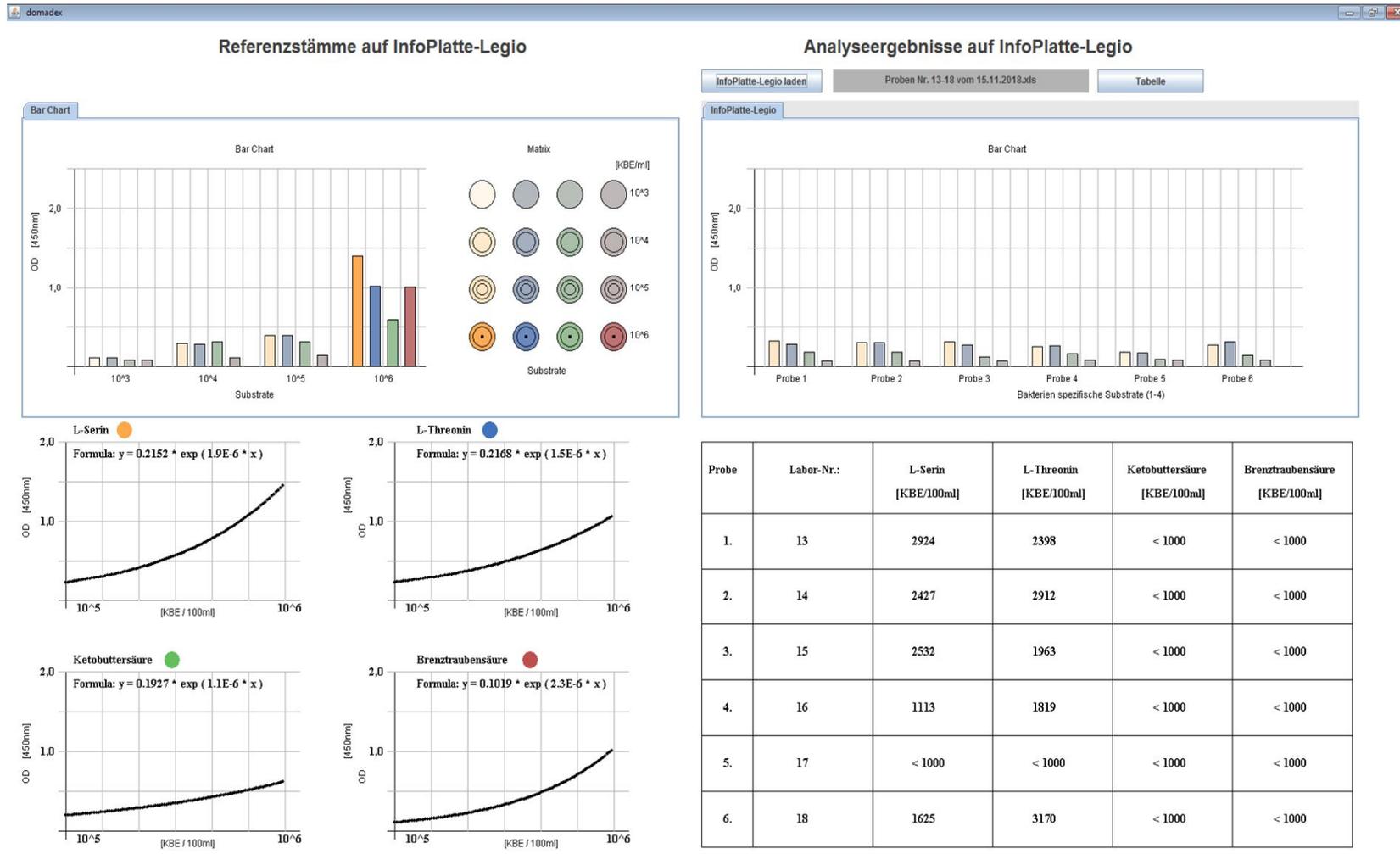
# Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio - Verifizierung



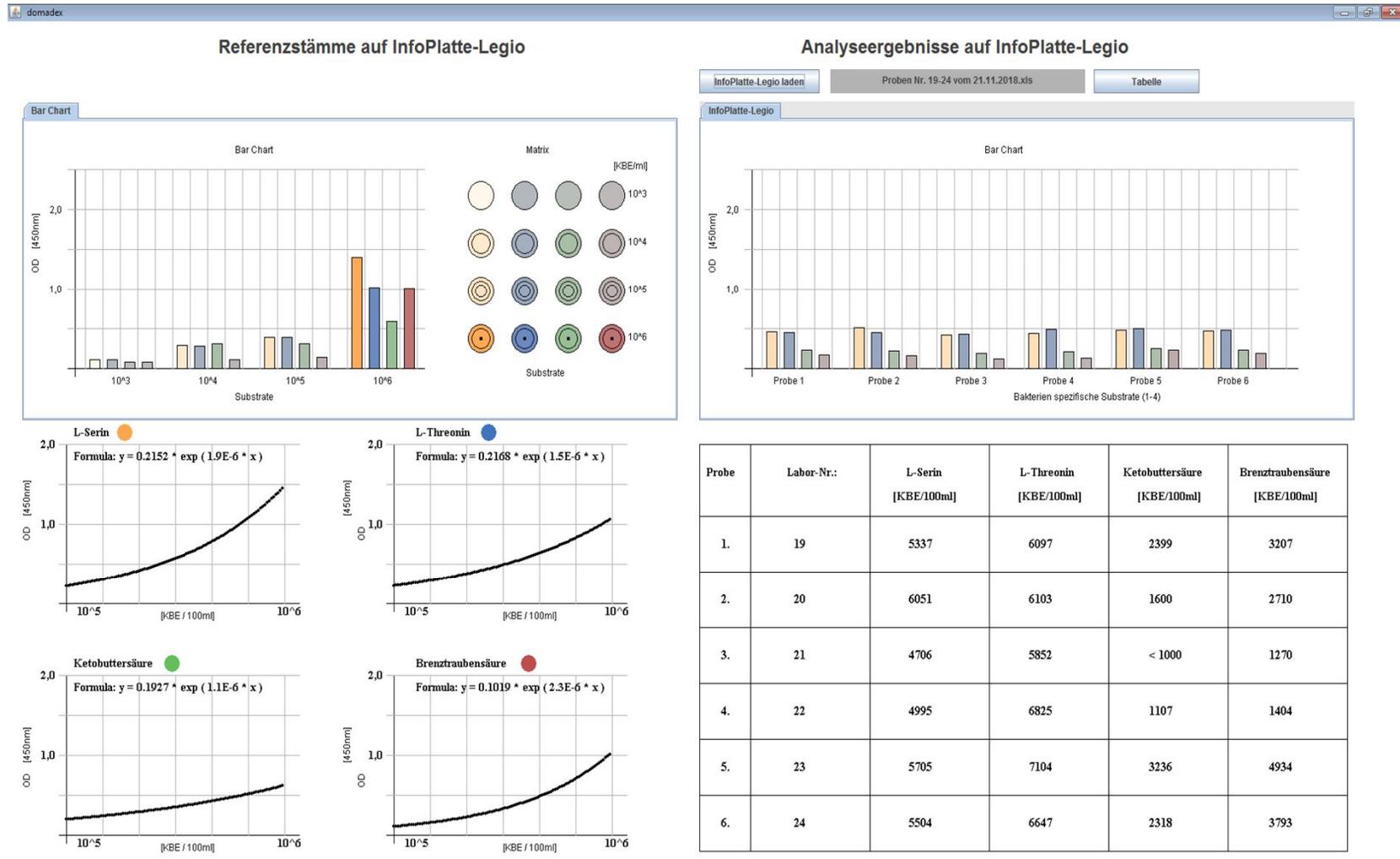
# Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



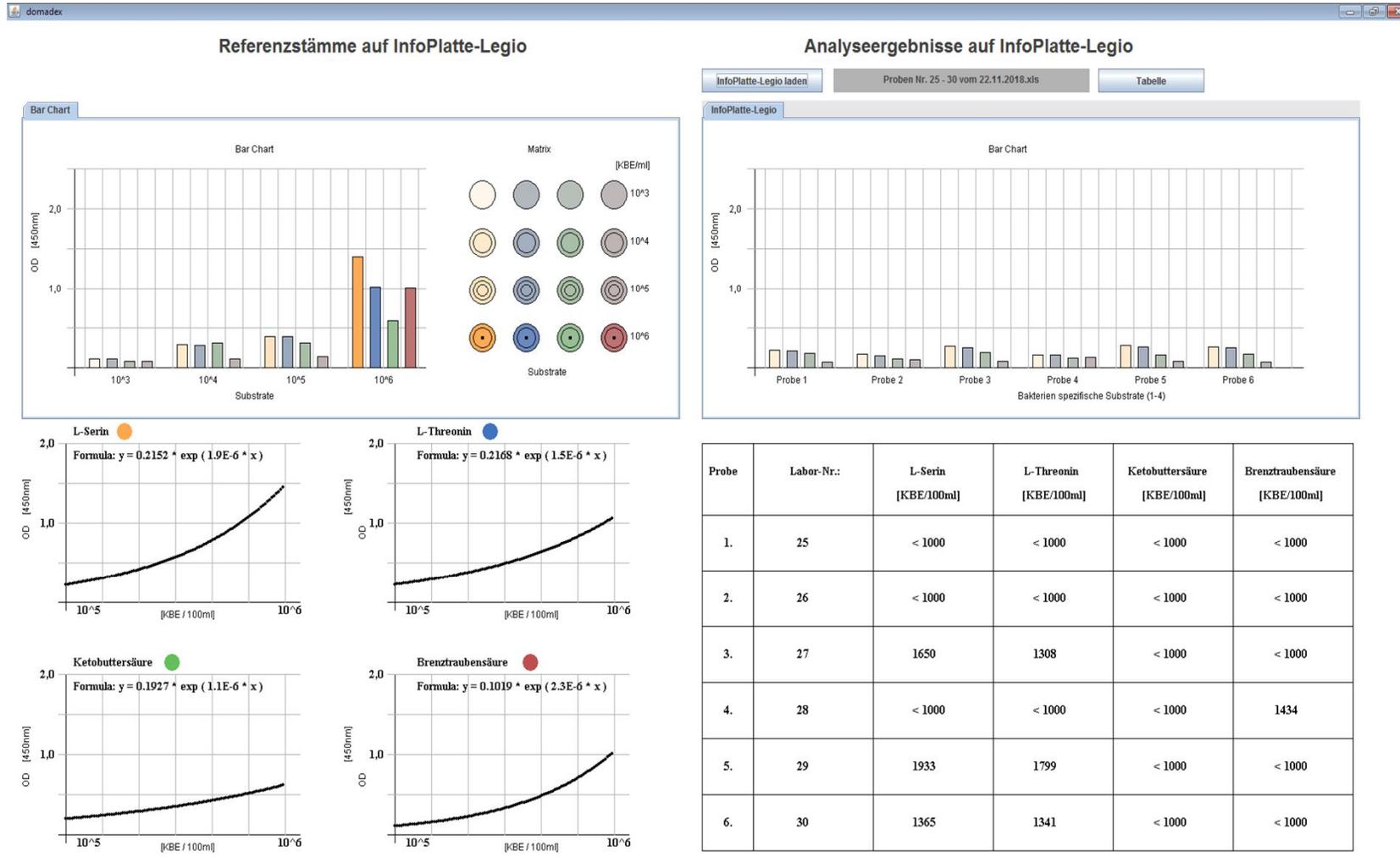
# Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



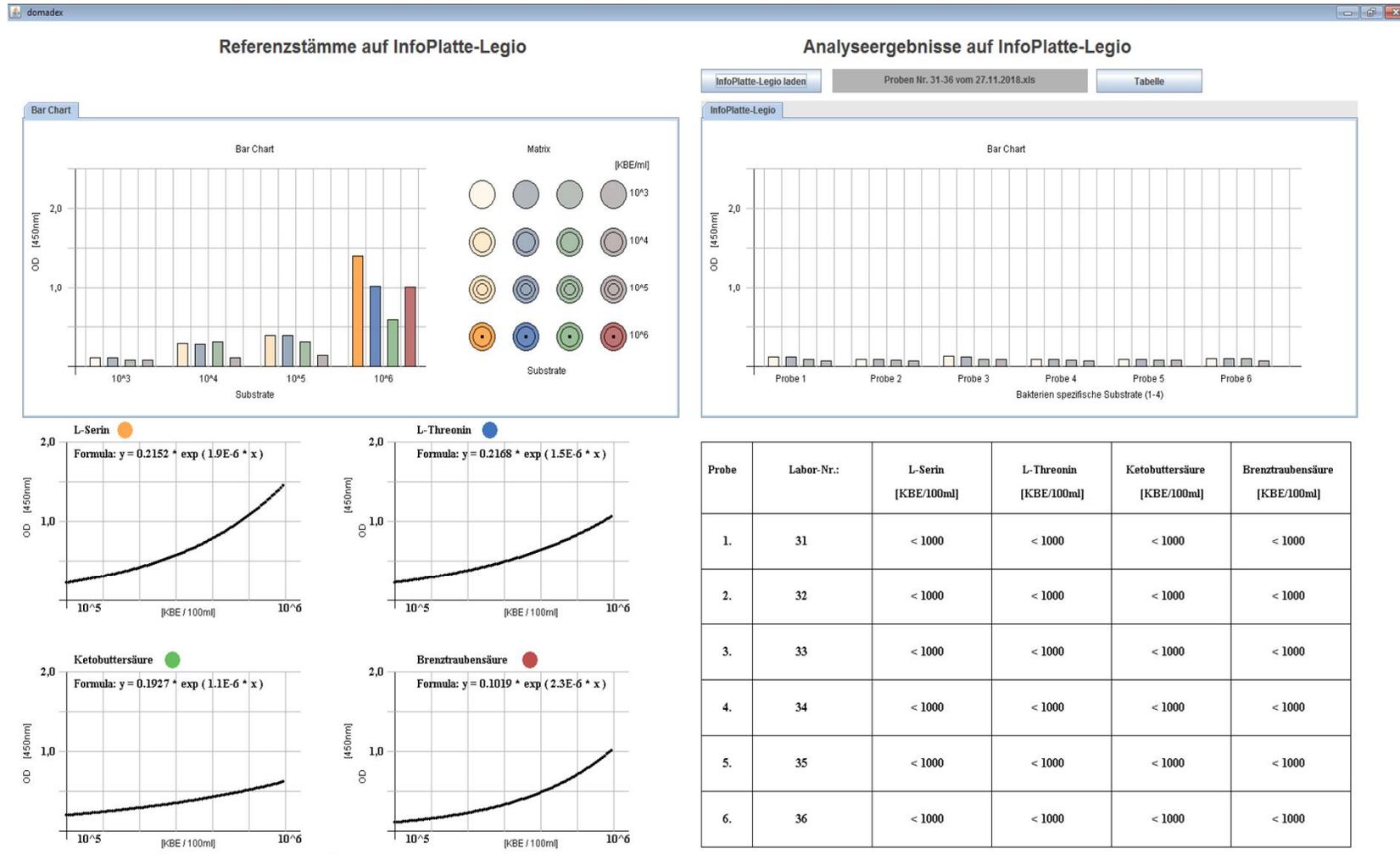
# Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



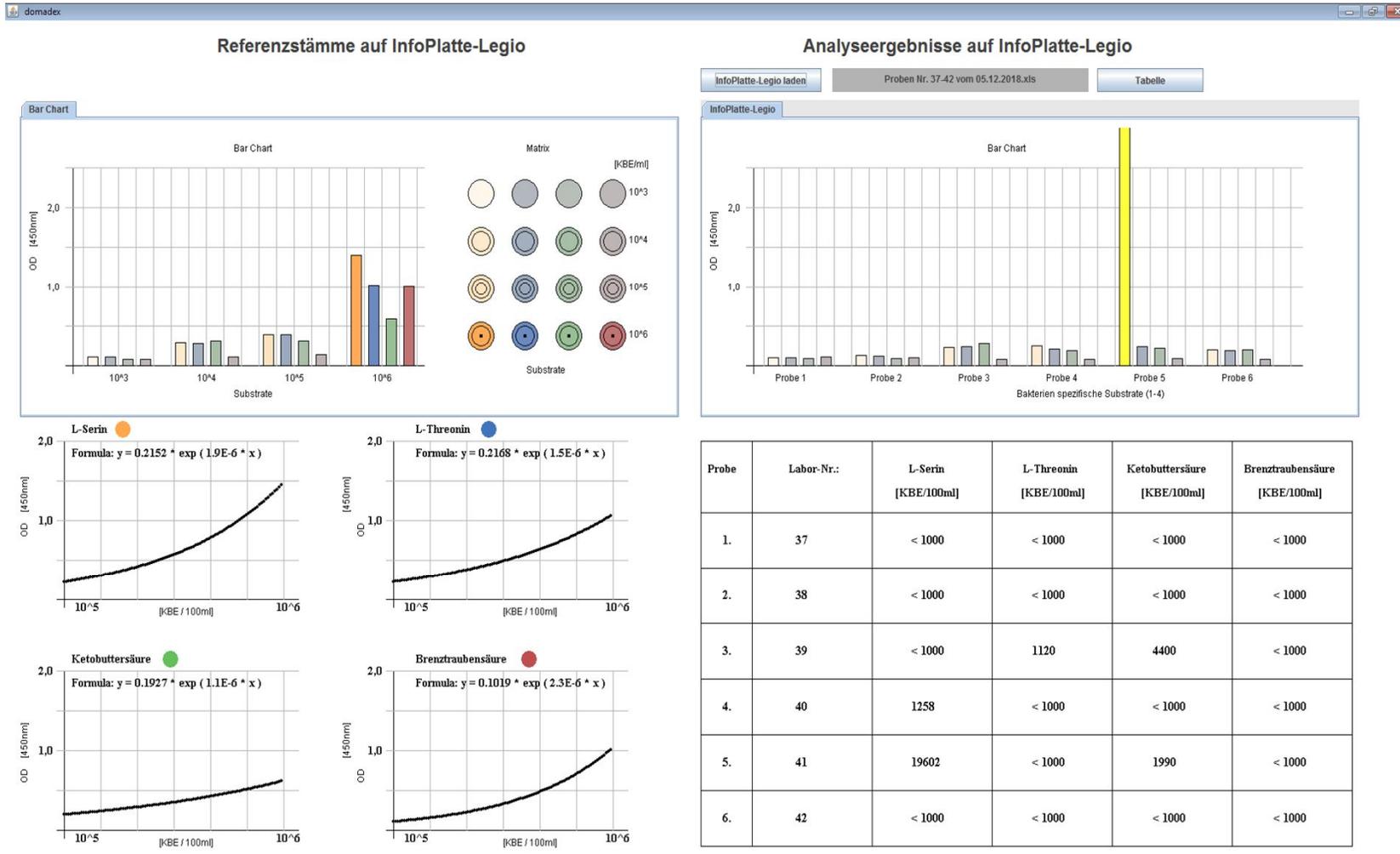
# Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio

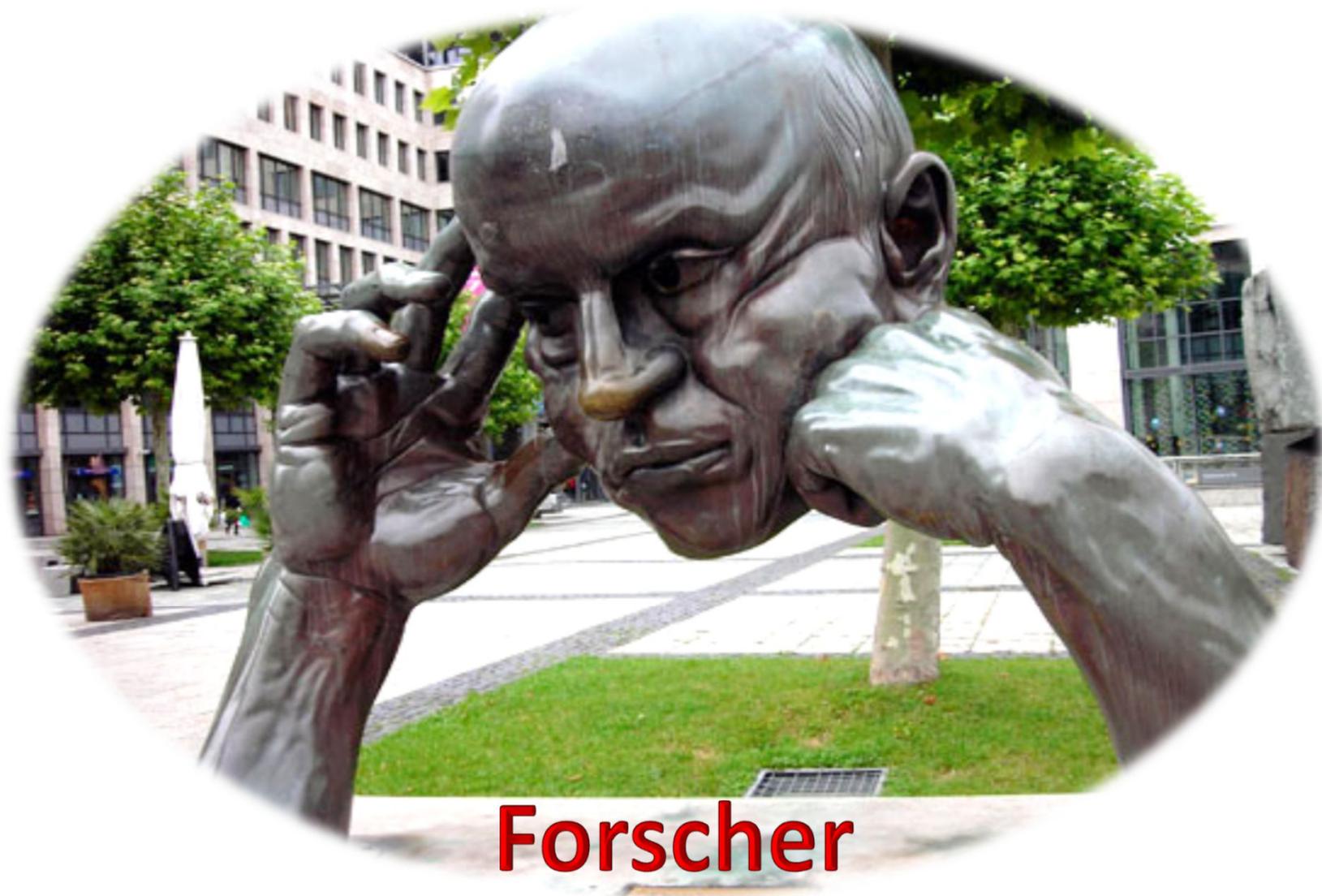


# Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



# Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio





Dr. habil. Anna Salek