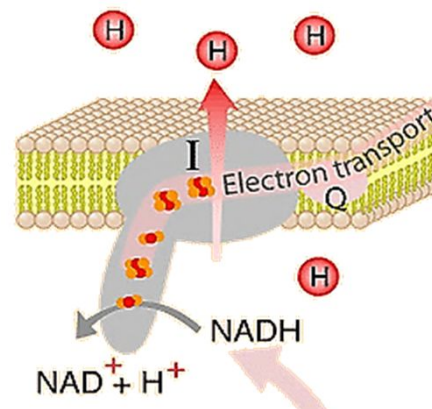


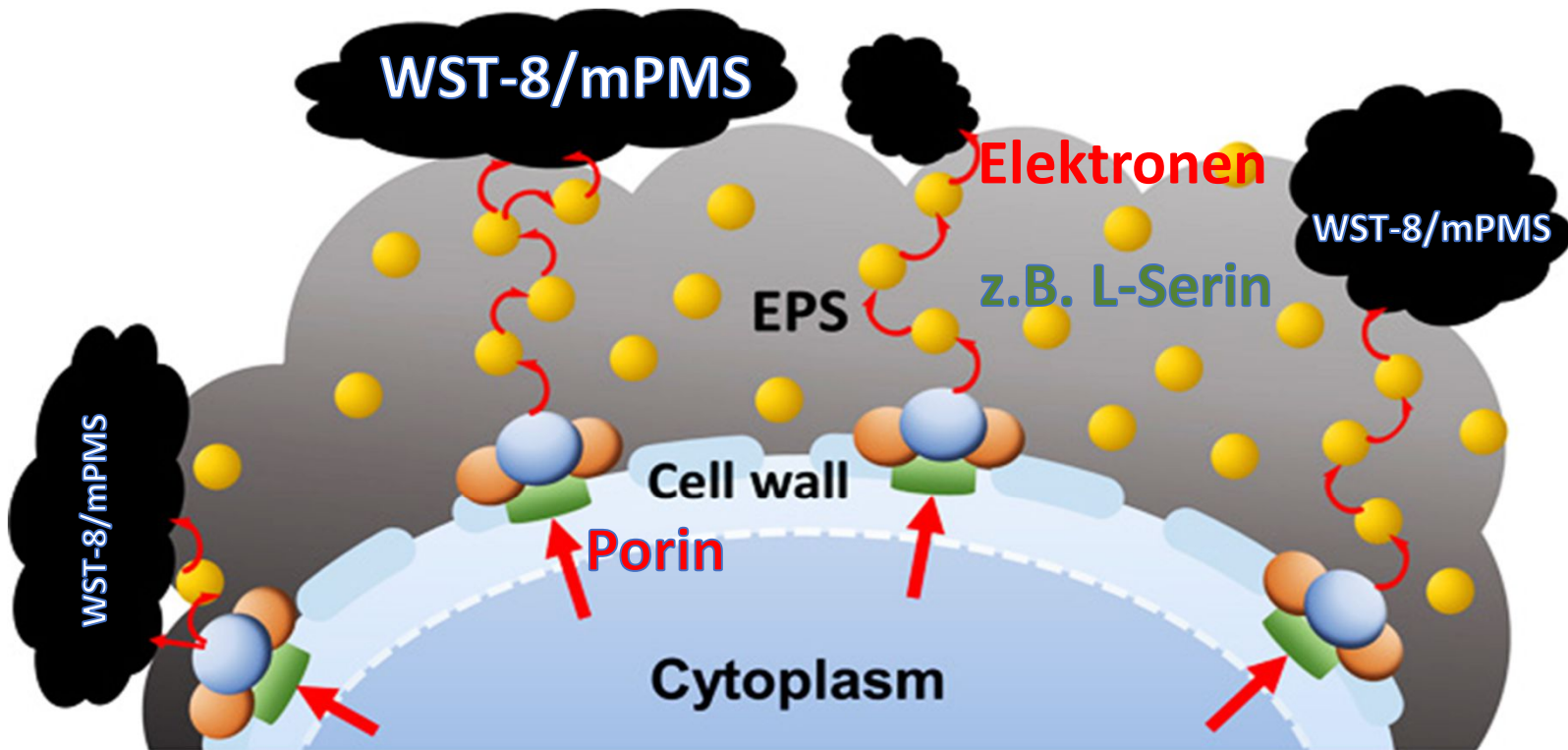


Schneller Nachweis von lebenden Biofilmbakterien in Trink- und Kühlturmwasser durch biochemische Verfahren



Dr. habil. Anna Salek

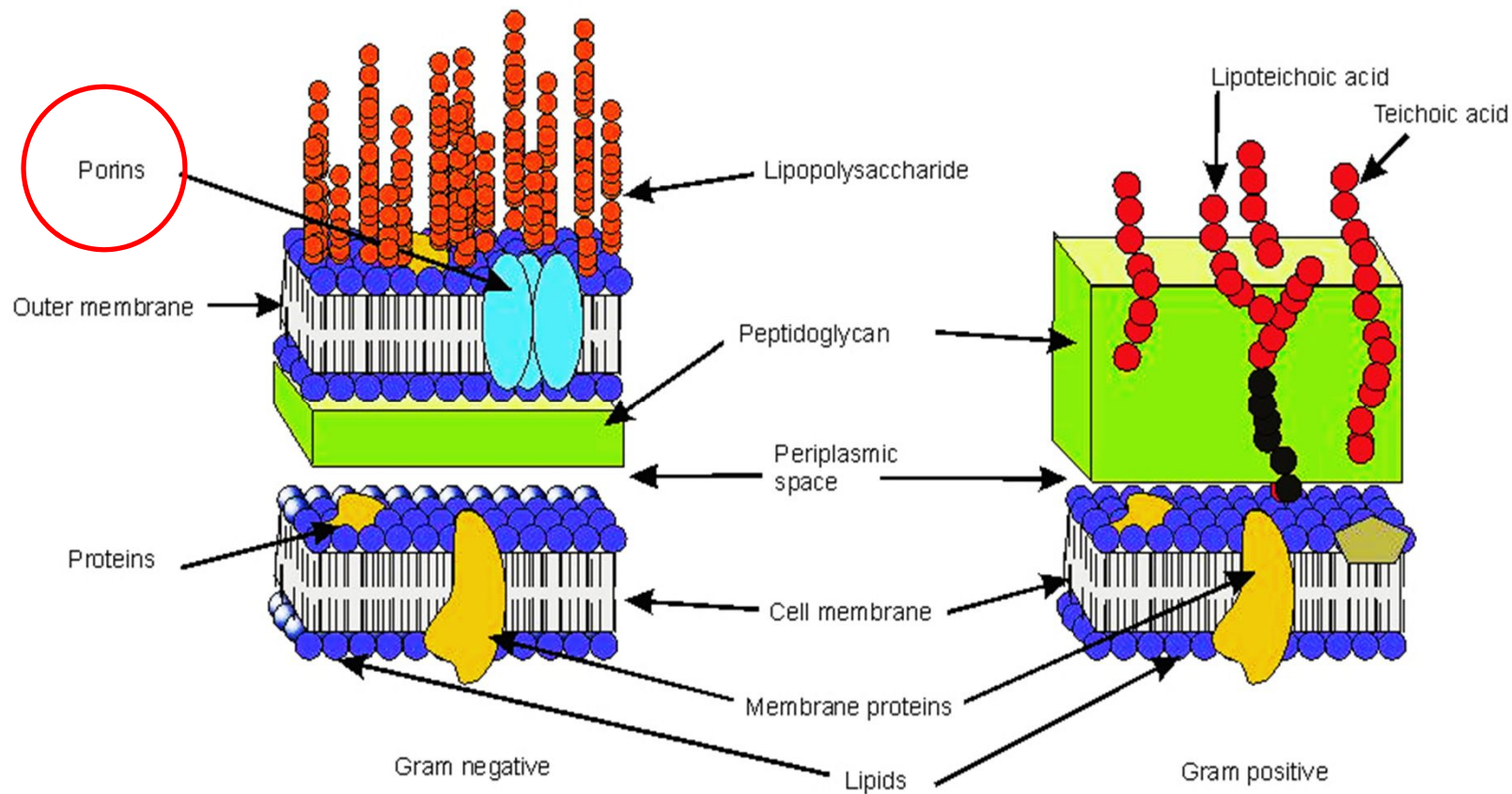
Struktur des Biofilms (Zellen mit EPS)



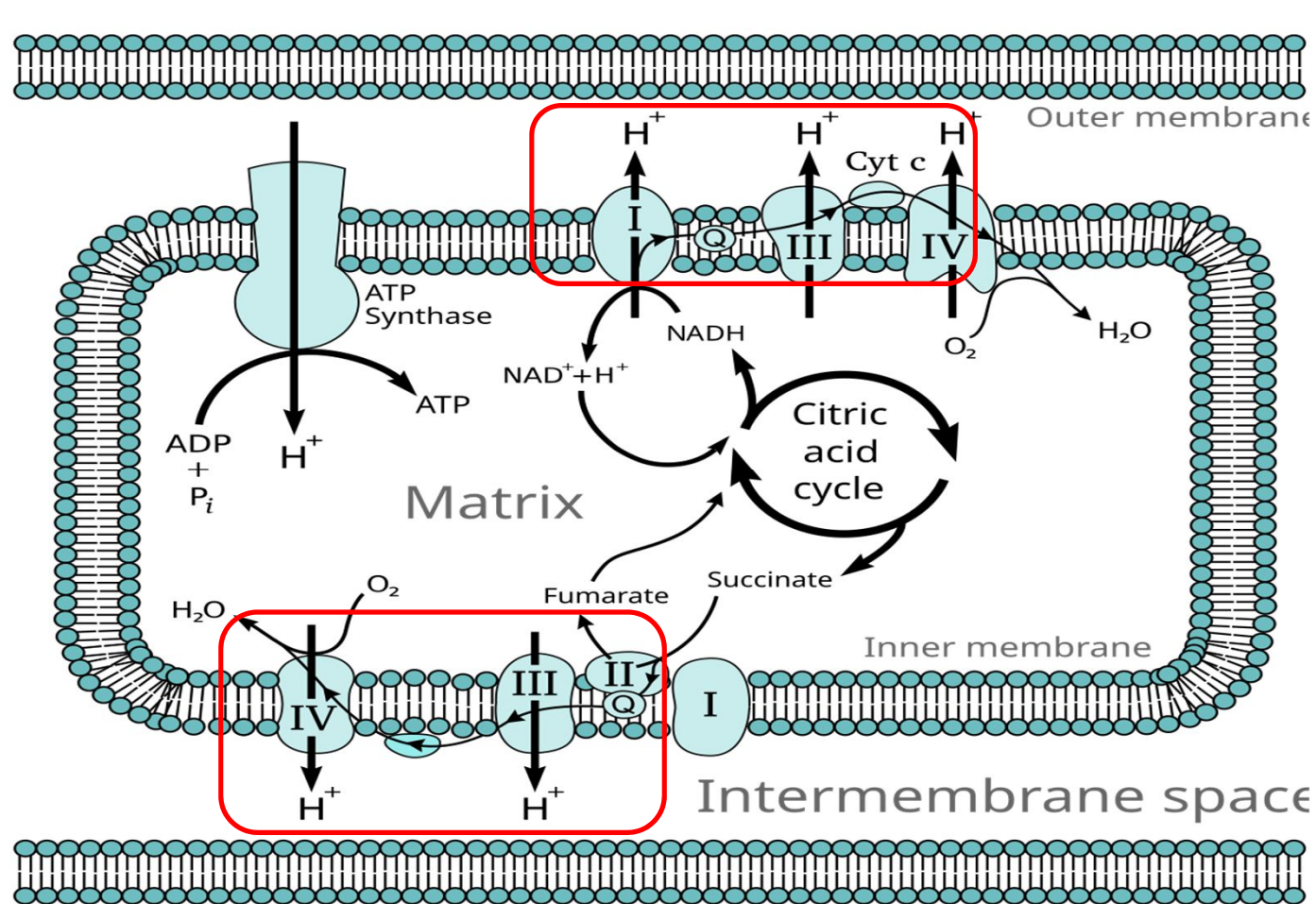
- Redox substance
- ↑ Tunneling current

- Electron acceptor/donor
-) Hopping current

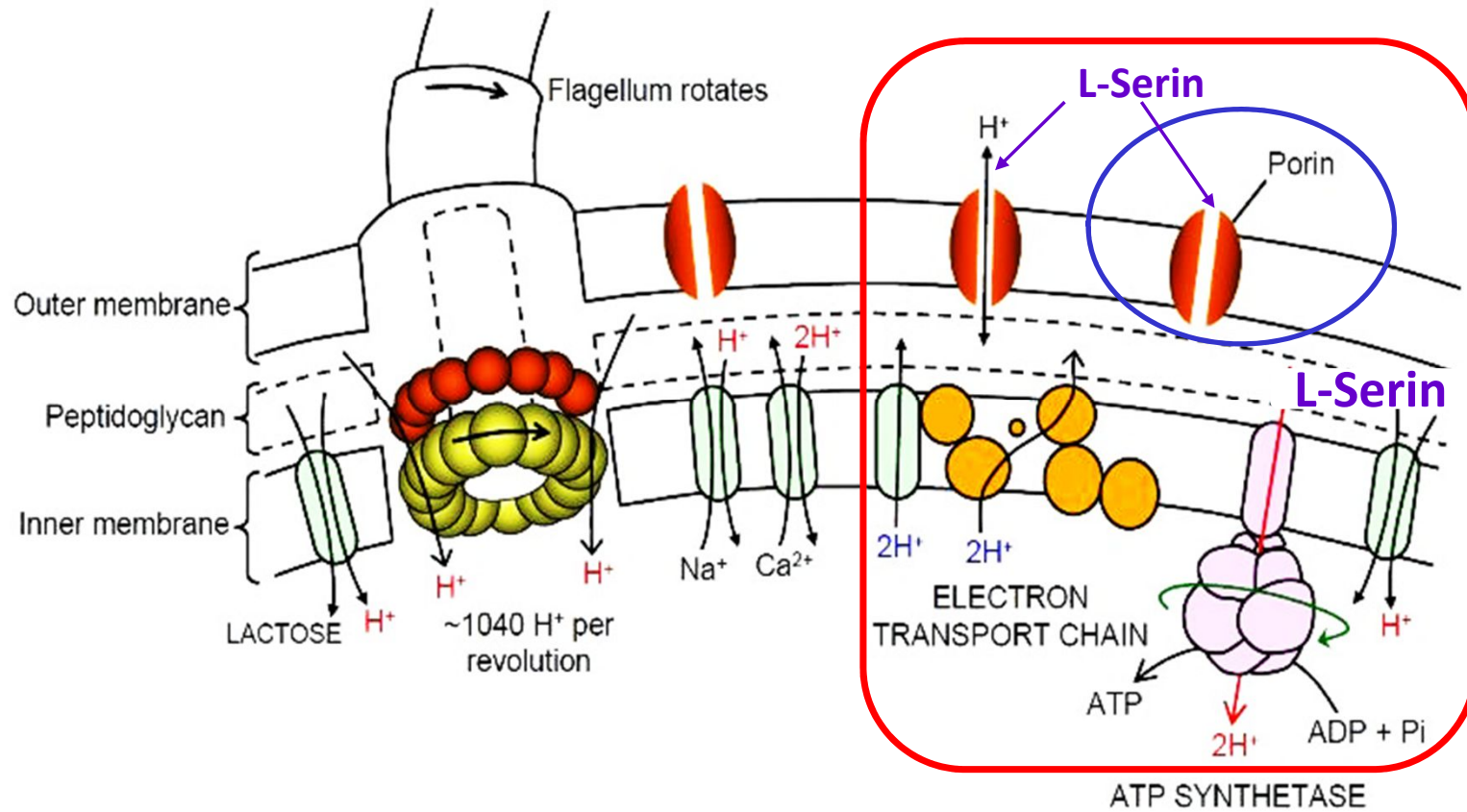
Struktur der Membranen von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien



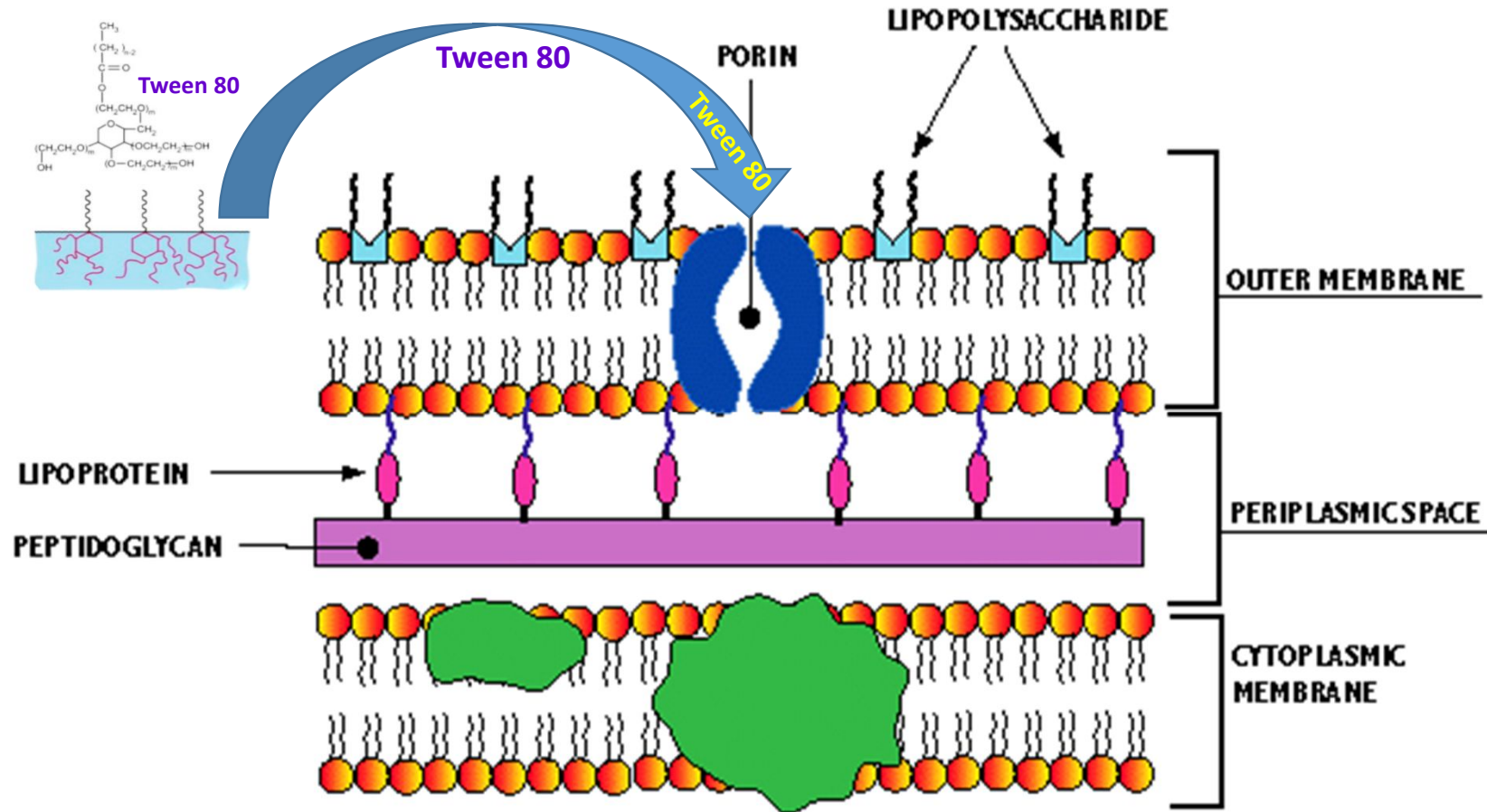
Schematische Übersicht der Membran bei Gram-negativen Bakterien



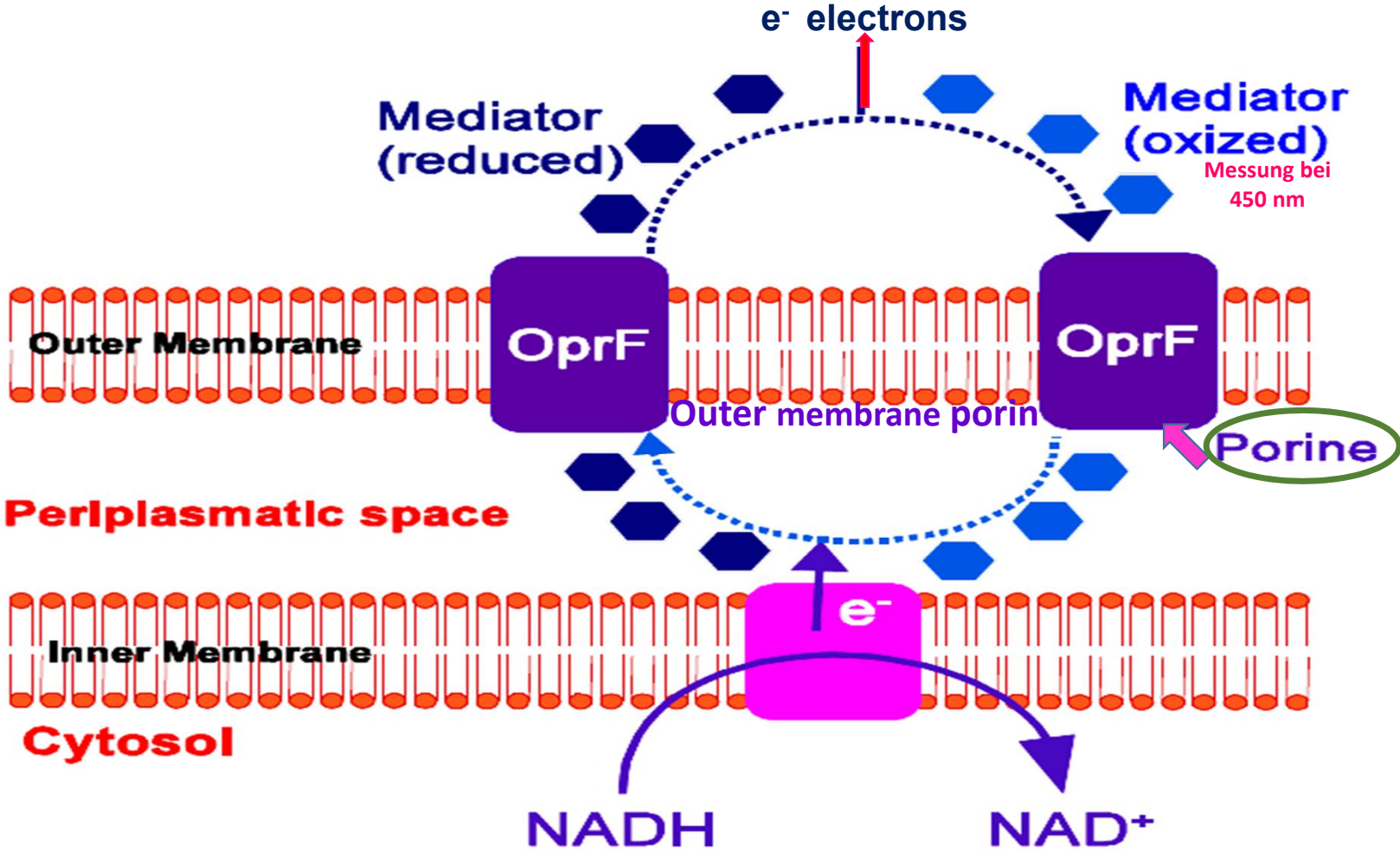
Membran von Gram-negativen Bakterien: Bedeutung des Porins



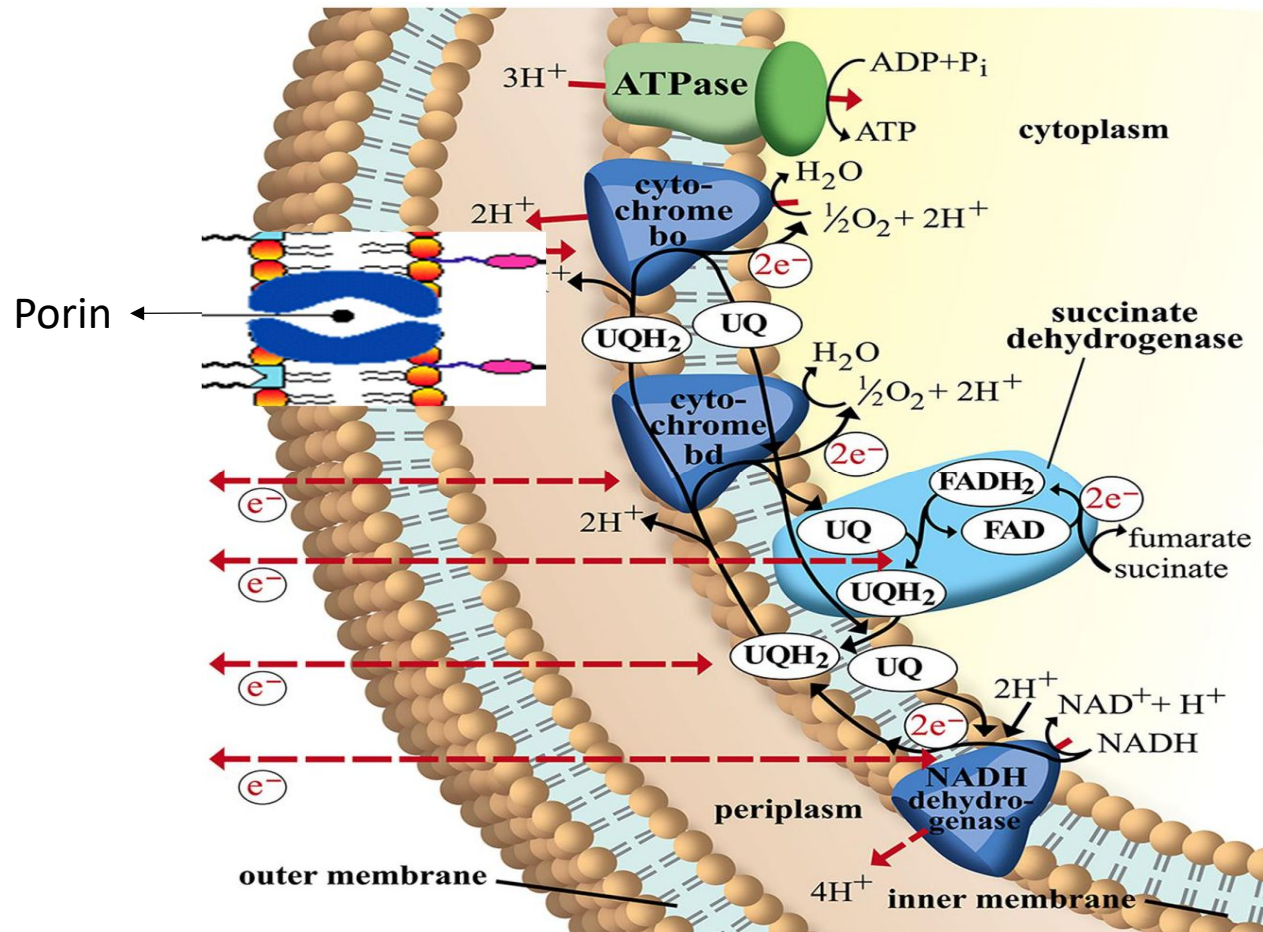
Membran von Gram-negativen Bakterien: Bedeutung des Porins



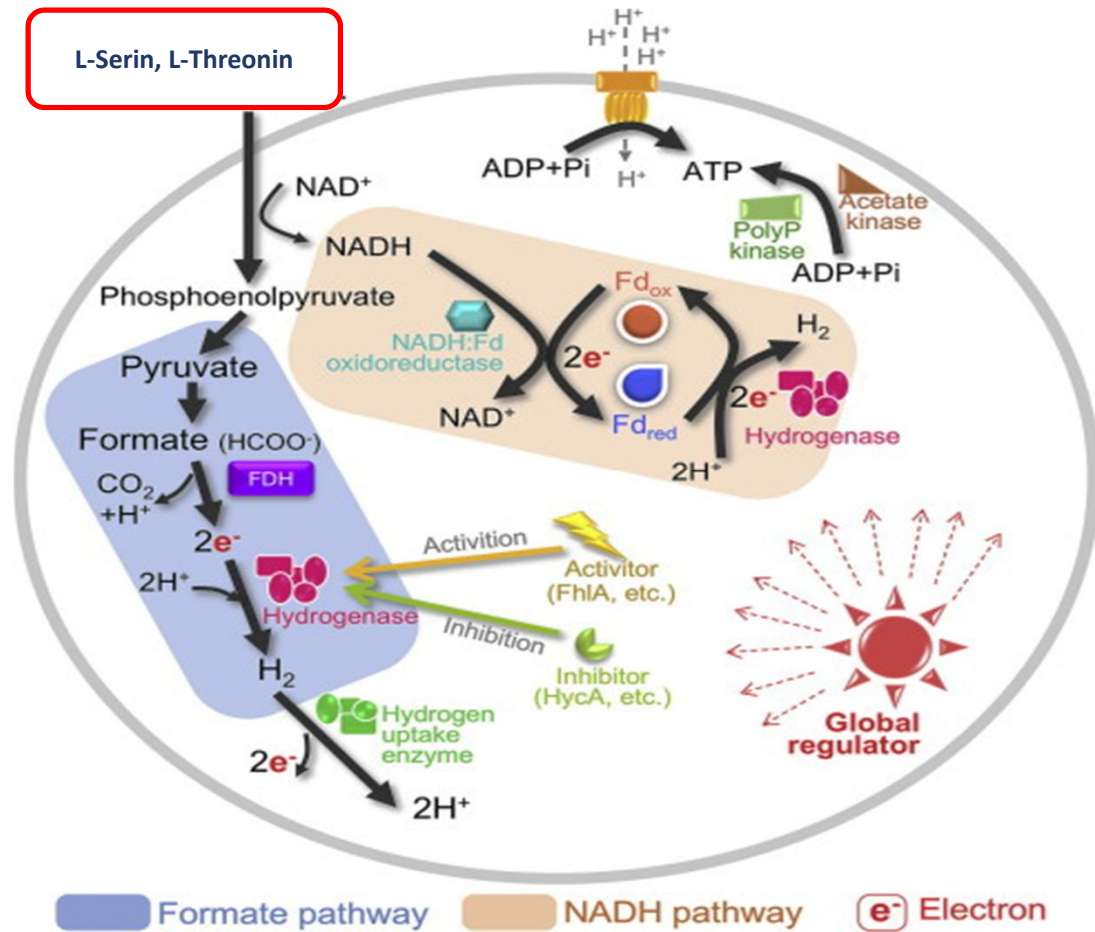
Membran von Gram-negativen Bakterien: Elektronentransport



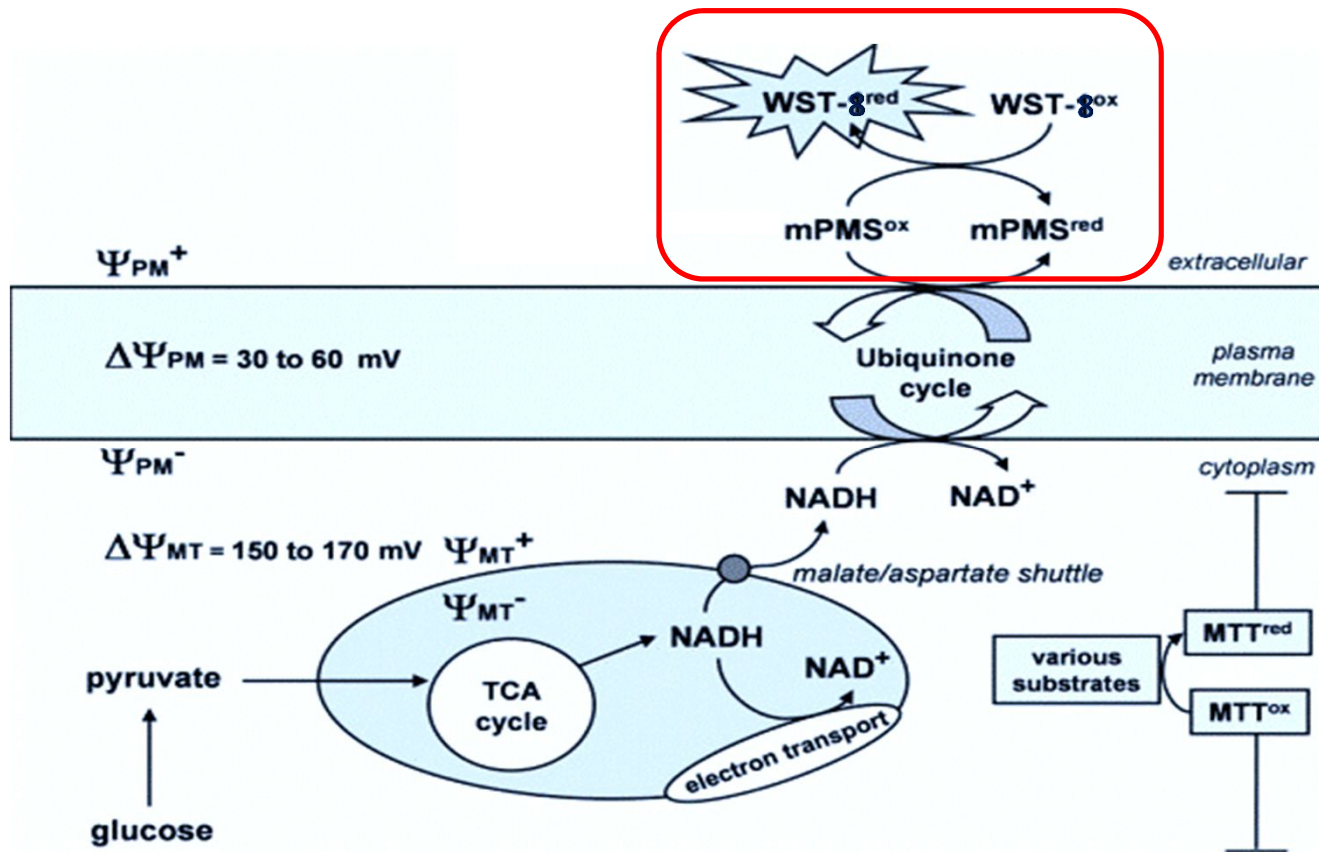
Membran von Gram-negativen Bakterien: Elektronentransport



“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:

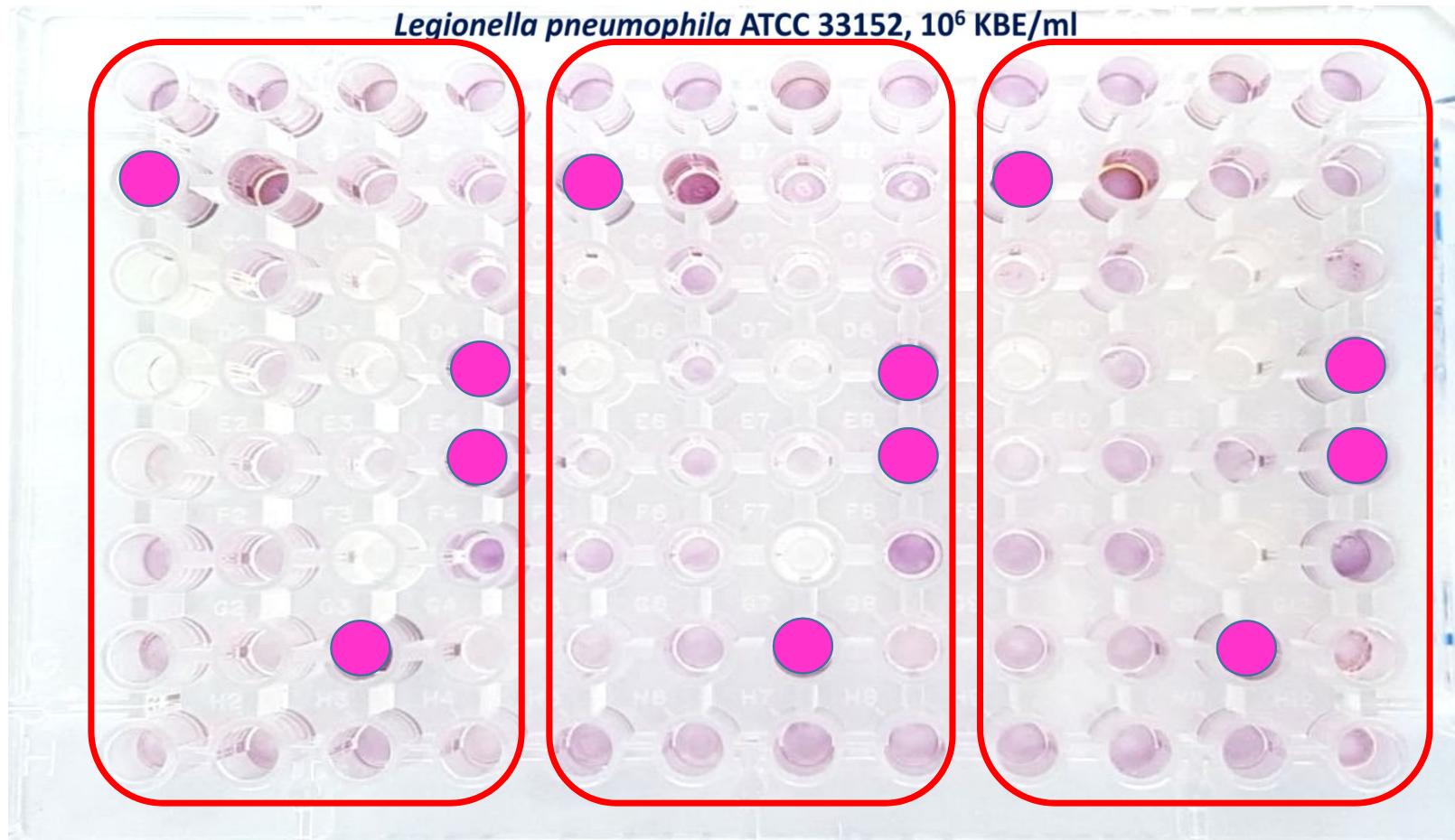
- Biochemische Analysen von metabolischen Effekten mit spezifischen Substraten für jede Bakterienart auf der selbst produzierten „InfoPlatte“. Prinzip: Detektion der Redoxreaktion (Elektronentransport) auf Bakterien-spezifischen Substraten; das entspricht deren Energie/ Vitalität/ Aktivität (insbesondere *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

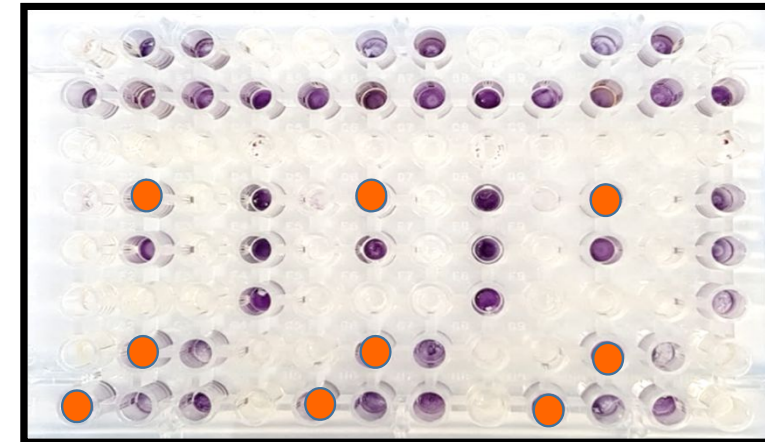
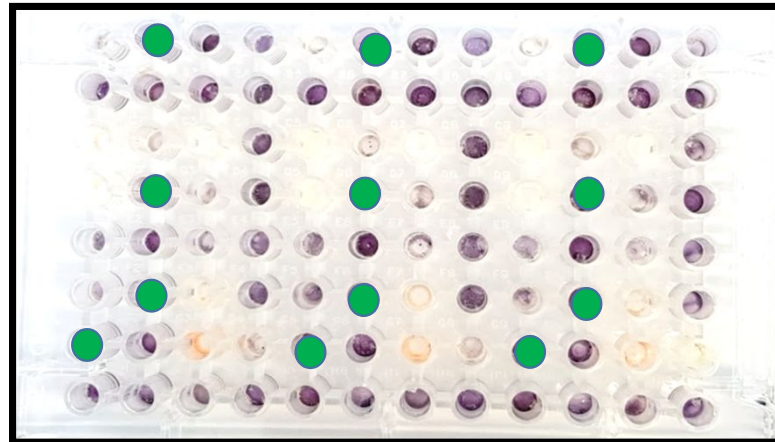
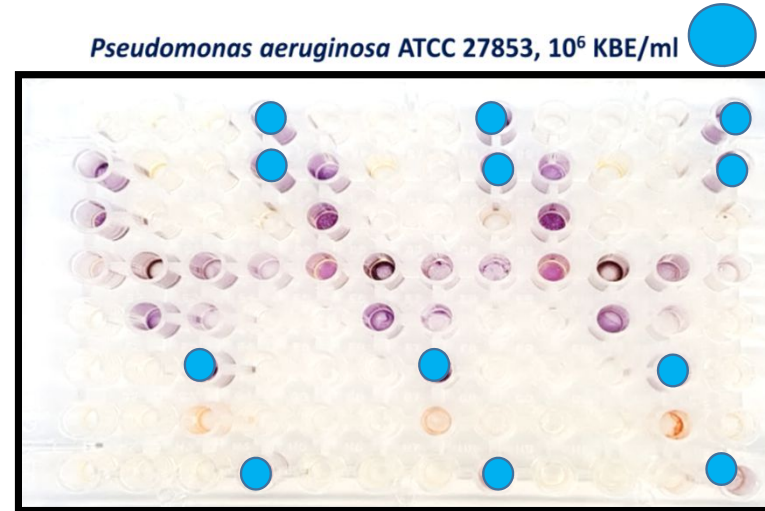
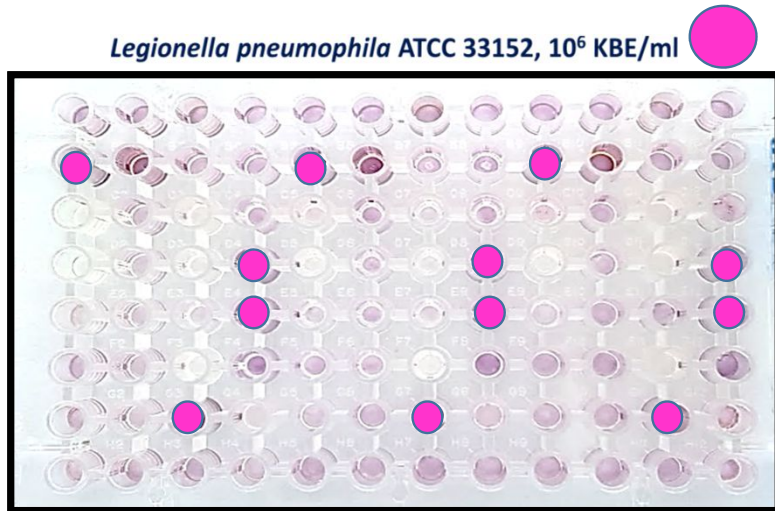


- S.g. InfoPlatten-Legio und InfoPlatten-Biofilm, mit herkömmlichen Substraten, die auf der Messung der Redoxreaktion basieren.
- Damit erfolgt eine Messung der Energie (Vitalität / Aktivität / Energie), die typisch für die getesteten Bakterien ist.
- Mit Hilfe dieser Methode können Bakterienkonzentrationen 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

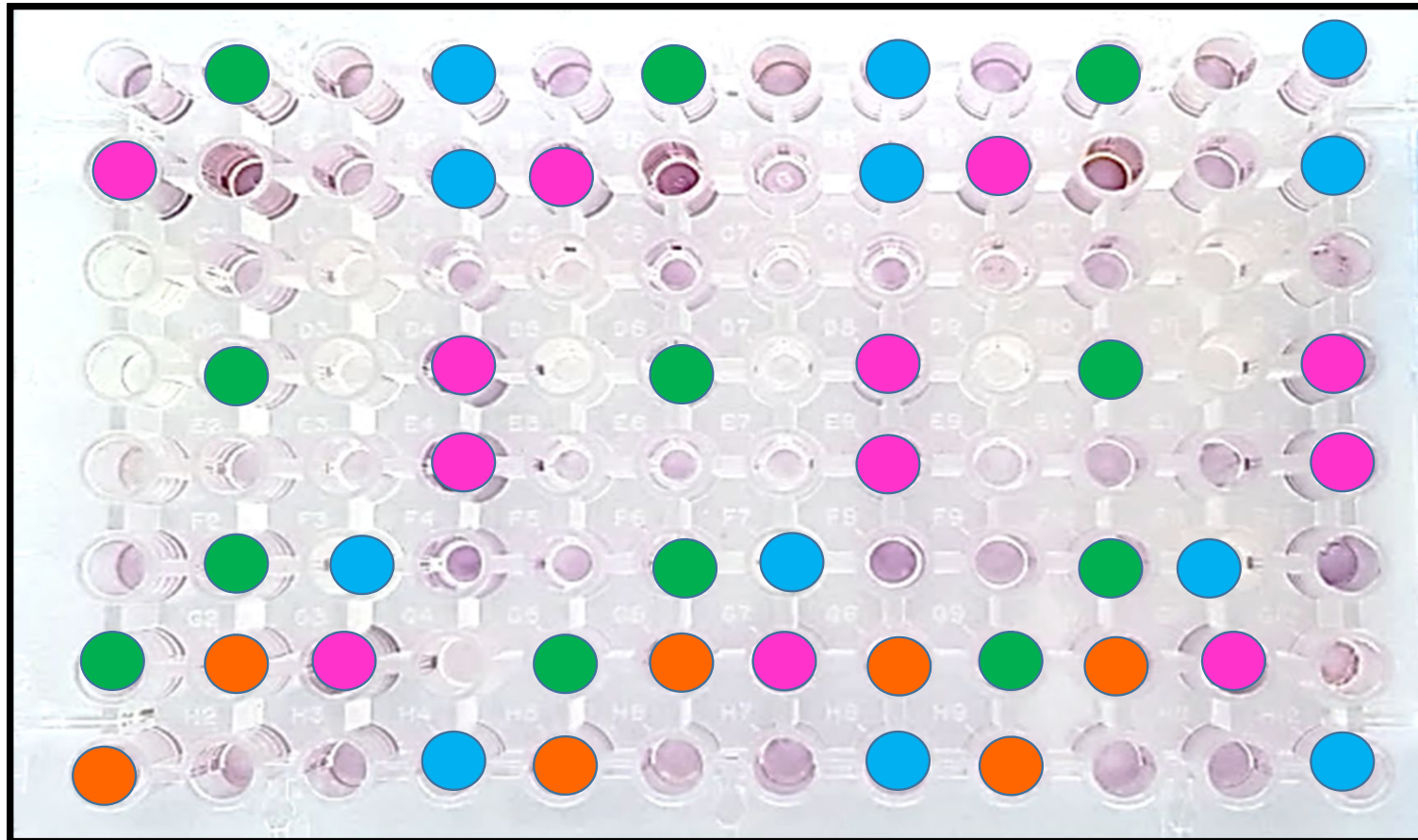


Enterobacter aerogenes ATCC 13048, 10⁶ KBE/ml

Dr. habil. Anna Salek

Escherichiacoli ATCC 25922, 10⁶ KBE/ml

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



Dr. habil. Anna Salek

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. |
| β -Methyl-D-Glucosid <i>Enterobacter aerogenes</i> | Mannitol <i>Enterobacter aerogenes</i> | D-Cellobiose <i>Enterobacter aerogenes</i> | D-Gluosaminsäure <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. |
| α -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.



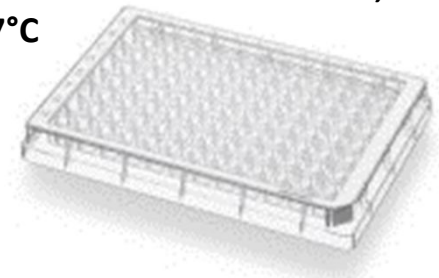
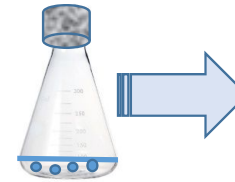
B.



C.

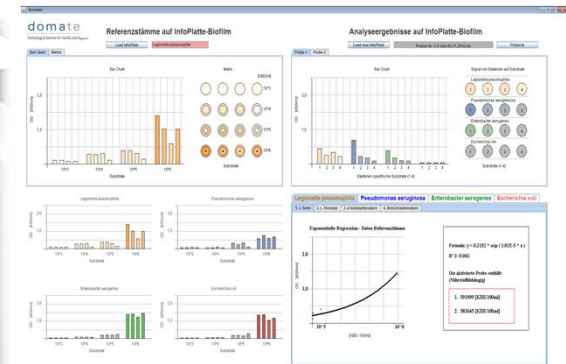


Phase 2: Konzentrierte 500x Wasserprobe (Stepp 1 und 2 in Phase 2) weitergeben (100 µm) für je Kavität Titerplatte mit spezifische Substrate und Indikatoren, danach 24 h bebrüten bei 37°C



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)

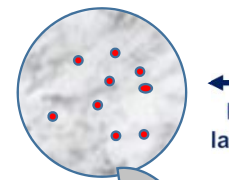
Phase 1



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

Phase 2

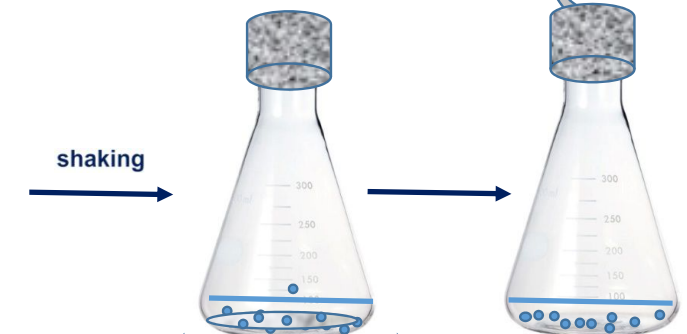
Stepp 1 in Phase 2



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



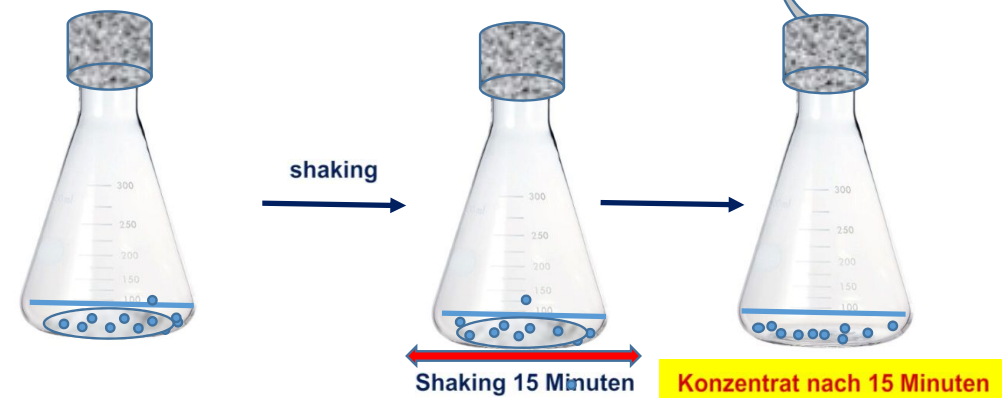
Filtration durch Polycarbonat Filter in System: A oder B oder C

Phase 2

Stepp 1 in Phase 2



Stepp 2 in Phase 2 Konzentration



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.



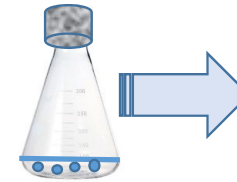
B.



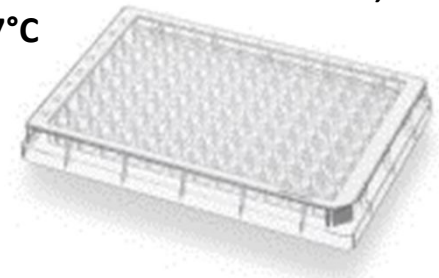
C.



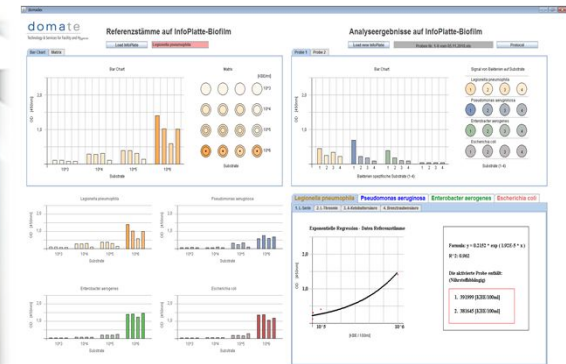
Phase 2: Konzentrierte 500x Wasserprobe (Stepp 1 und 2 in Phase 2) weitergeben (100 µm) für je Kavität Titerplatte mit spezifische Substrate und Indikatoren, danach 24 h bebrüten bei 37°C



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 ($\text{\O} 47 \text{ mm}$, $0,20 \text{ \mu m}$) filtrieren abgewaschen, d.h. 15 Min. mit Glaskugel in 1 ml Puffer mit 1 % Tween 80 (50 ml dieses Puffer hat: 50 \mu l 500x Konz. NADH + 33 \mu l 100x Konz. ATP + 500 \mu l 100x Konz. CoQ_1 + 3 \mu l Zn^{+2} 1% Lsg) rühren;
- Konzentrat (1000 x) 15 Minuten im Ultraschallbad beschallen (mit Pulsen);
- danach jede Vertiefung der Platte (1-12) mit 100 \mu l dieses Konzentrats beimpfen und 10 \mu l des Redox-dye WST-1/ mPMS zugeben.

Inkubation und Messung:

- Temp. $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% 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.

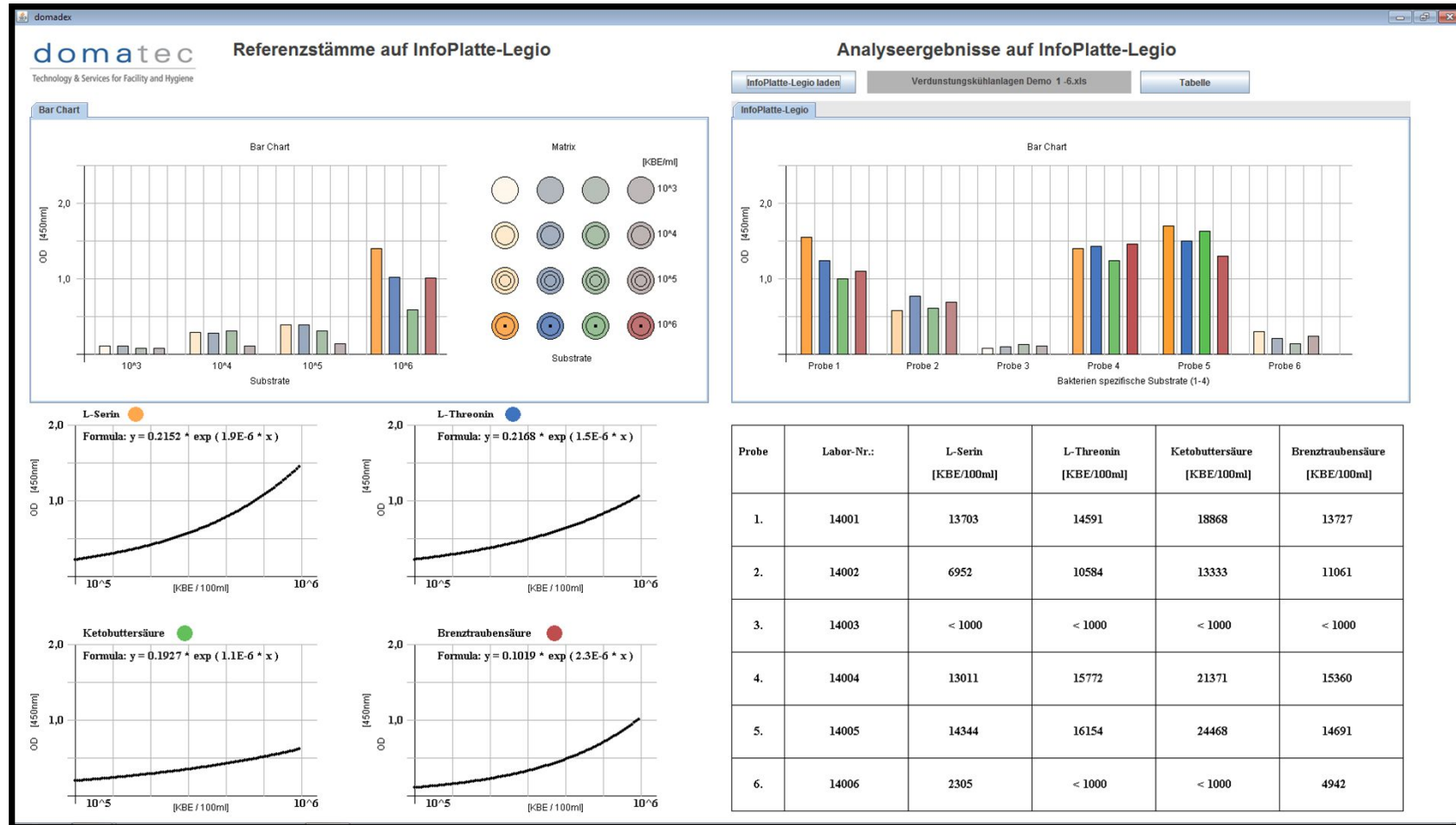
Muster der InfoPlatte-Legio für 6 Trinkw.-Proben mit 3mal Bestimmung:

Legionella pneumophila SG1

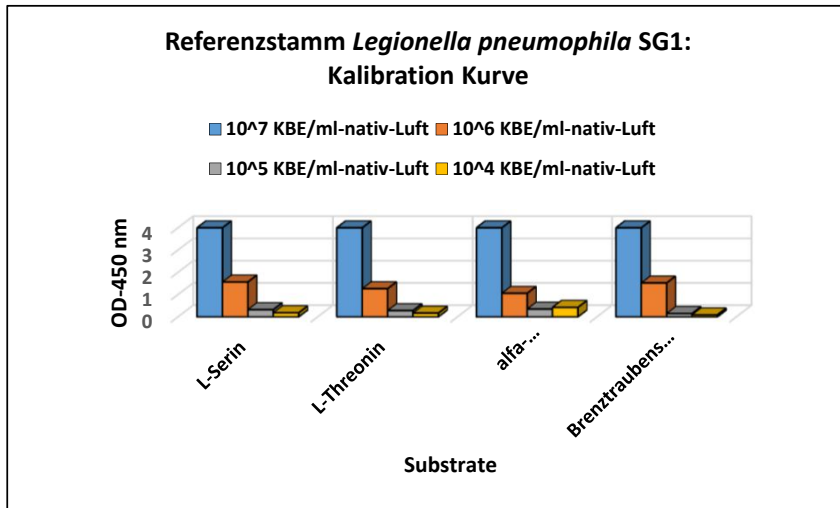
| Proben | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Leer | Wasser | Wasser | Wasser | Wasser | Wasser | Wasser | Wasser | Wasser | Wasser | Wasser | Wasser | 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 | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien | Ohne Bakterien |



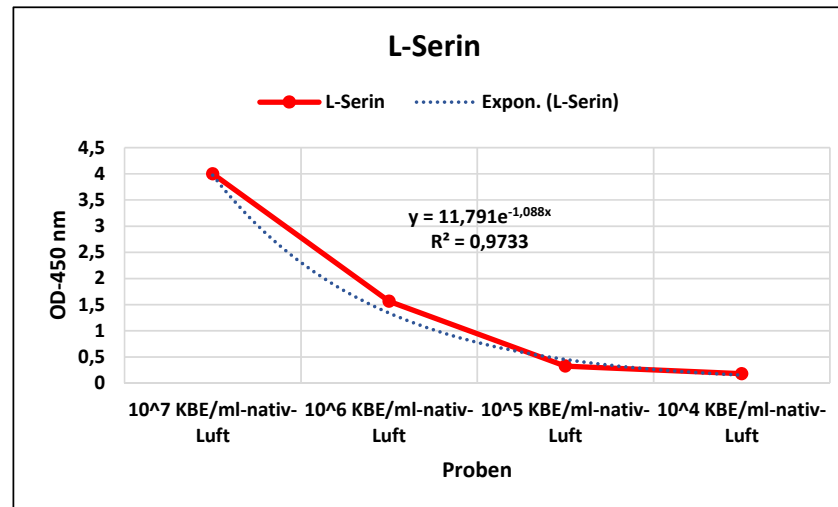
Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



InfoPlatte-Legio: Legionella pneumophila SG1: Kalibrationskurve



| Luft | L-Serin | L-Threonin | α-Ketobuttersäure | Brenztraubensäure ME |
|-----------------------------------|---------|------------|-------------------|----------------------|
| 10 ⁷ KBE/ml-nativ-Luft | 4,000 | 4,000 | 4,000 | 4,000 |
| 10 ⁶ KBE/ml-nativ-Luft | 1,564 | 1,265 | 1,059 | 1,522 |
| 10 ⁵ KBE/ml-nativ-Luft | 0,324 | 0,282 | 0,350 | 0,148 |
| 10 ⁴ 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 ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ 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 |

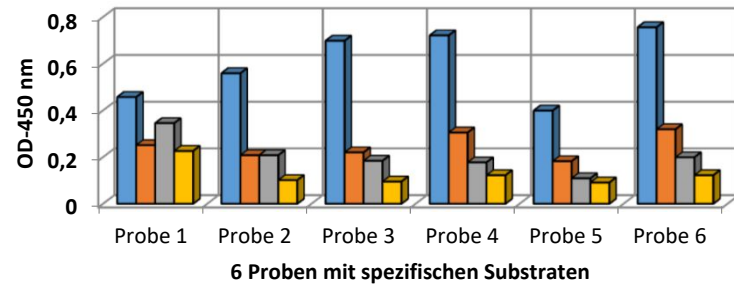
InfoPlatte-Legio für 6 Trinkw.-Proben mit 3mal Bestimmung:

Untersuchung *Legionella pneumophila* SG1



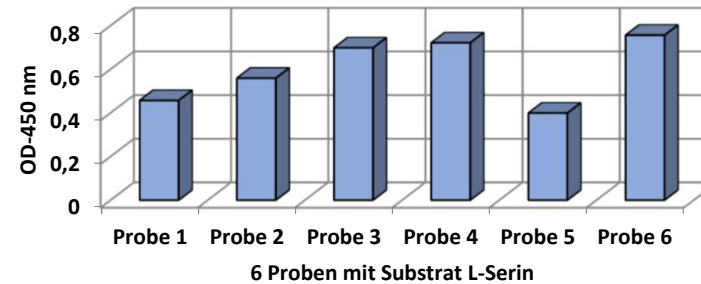
6 Proben Trinkw vom 06.11.2018: 75x Konzentrierende

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



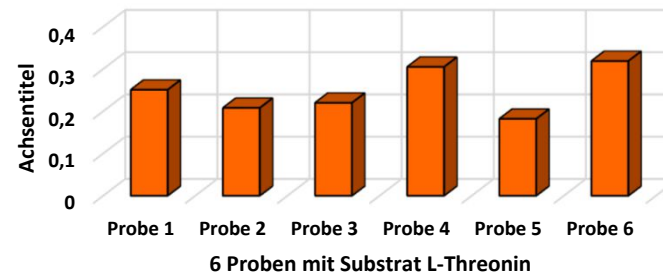
L-Serin

■ L-Serin

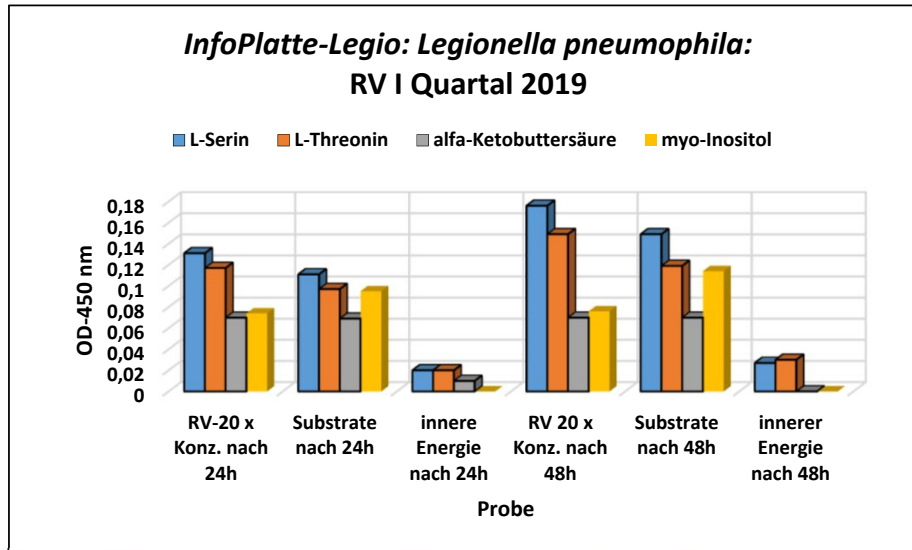


L-Threonin

■ 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 OD₄₅₀ - 219200 KBE/100 ml

0,131 OD₄₅₀ - X₁

X₁ = 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*



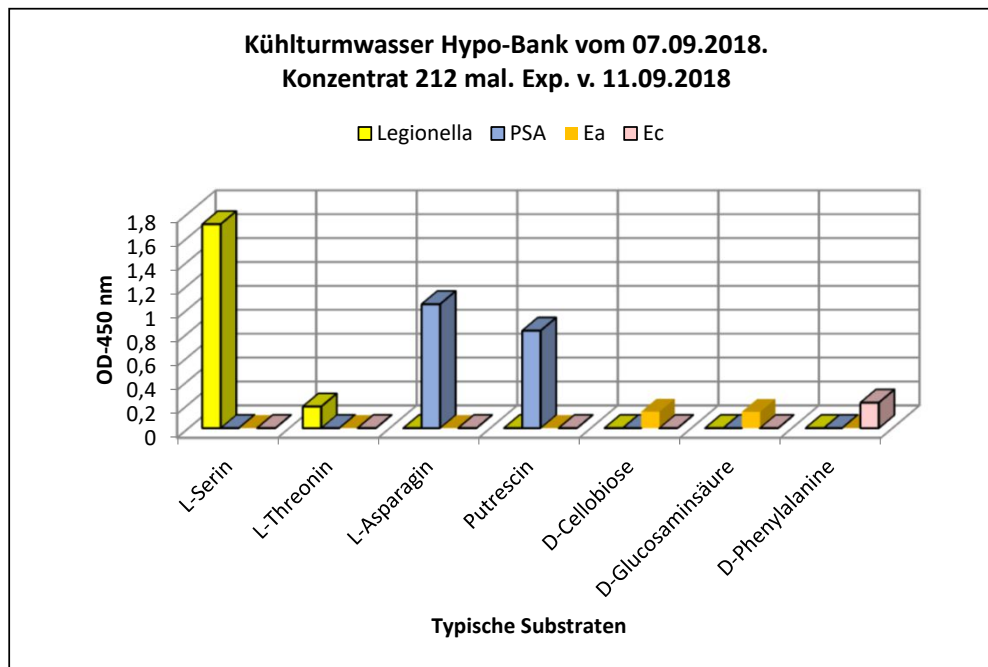
| 2 Proben | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Probe 1- Legio | L-Serin | L-Serin | L-Serin | L-Threonin | L-Threonin | L-Threonin | α -Ketobutters. | α -Ketobutters. | α -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 | β -Methyl-D-Glukozid | β -Methyl-D-Glukozid | β -Methyl-D-Glukozid | D-Cellobiose | D-Cellobiose | D-Cellobiose | D-Glukozaminsäure | D-Glukozaminsäure | D-Glukozaminsäure | D-Mannitol | D-Mannitol | D-Mannitol |
| Probe 1- Ec | α -D-Glukose | α -D-Glukose | α -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 | α -Ketobutters. | α -Ketobutters. | α -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 | β -Methyl-D-Glukozid | β -Methyl-D-Glukozid | β -Methyl-D-Glukozid | D-Cellobiose | D-Cellobiose | D-Cellobiose | D-Glukozaminsäure | D-Glukozaminsäure | D-Glukozaminsäure | D-Mannitol | D-Mannitol | D-Mannitol |
| Probe 2- Ec | α -D-Glukose | α -D-Glukose | α -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

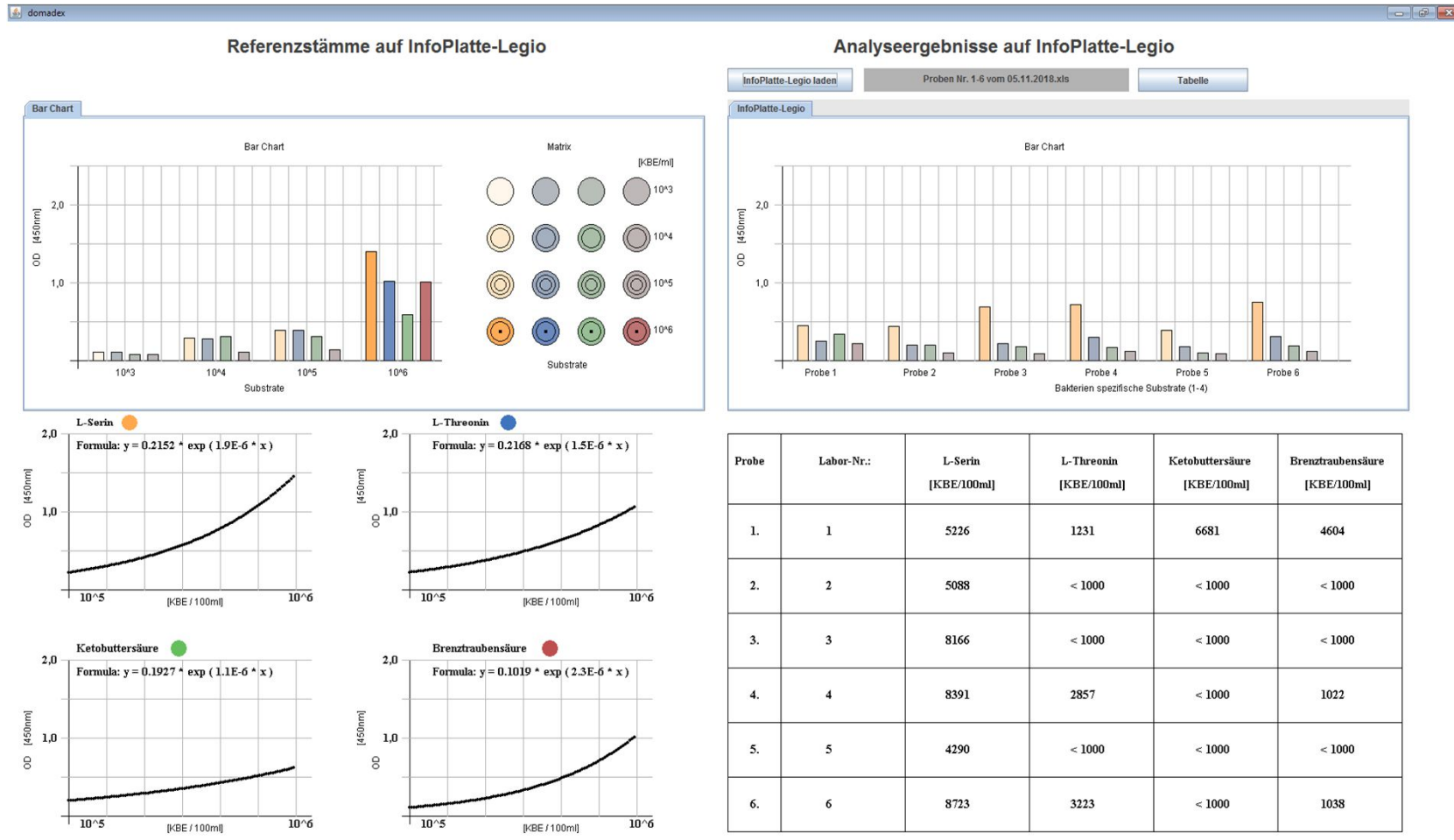


| Bakterien | L-Serin | L-Threonin | L-Asparagin | Putrescin | D-Cellobiose | D-Glucosamin-säure | D-Phenyl-amin |
|------------------------|---------|------------|-------------|-----------|--------------|--------------------|---------------|
| Legionella pneumophila | 1,706 | 0,180 | 0 | 0 | 0 | 0 | 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 |

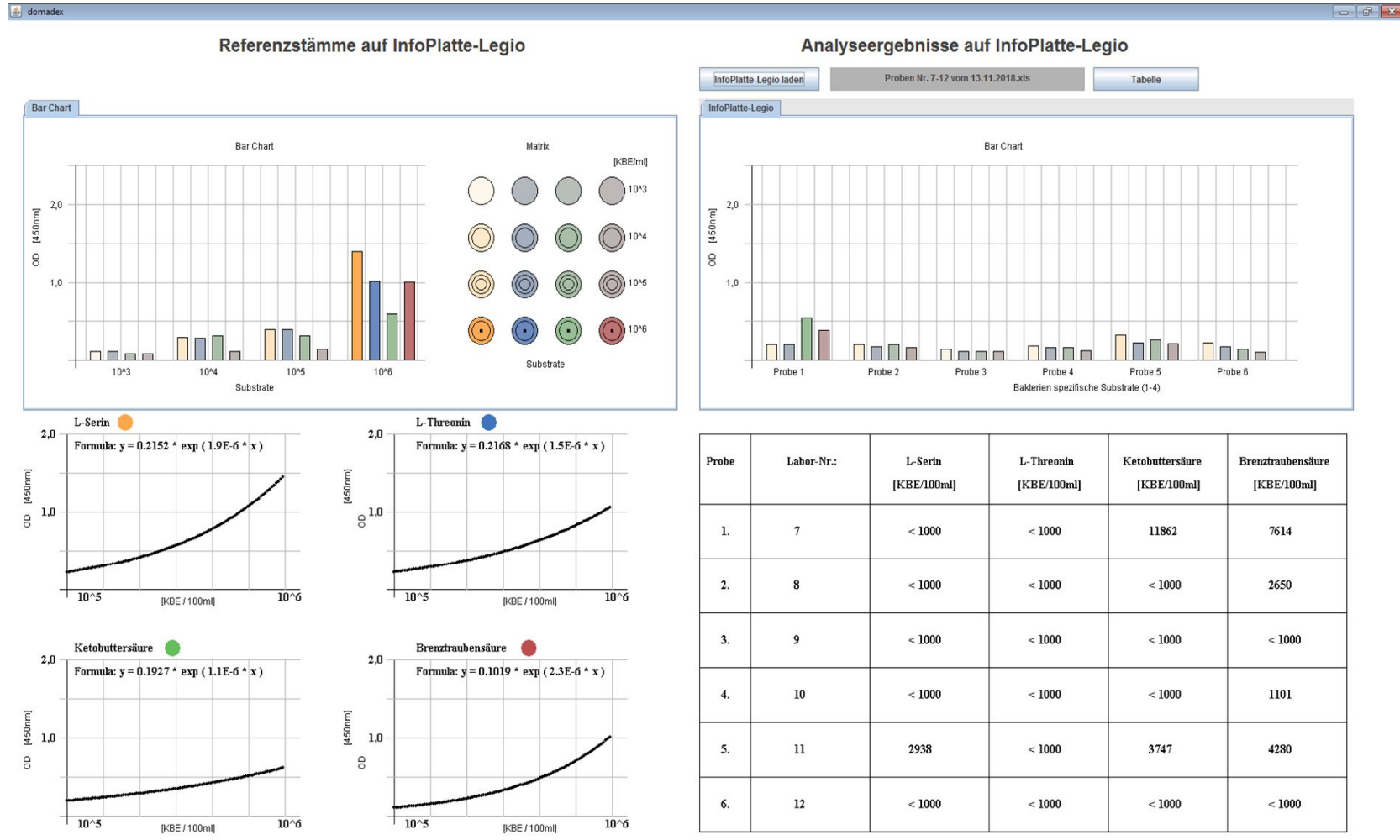
Software „domadex“ für InfoPlatte-Biofilm



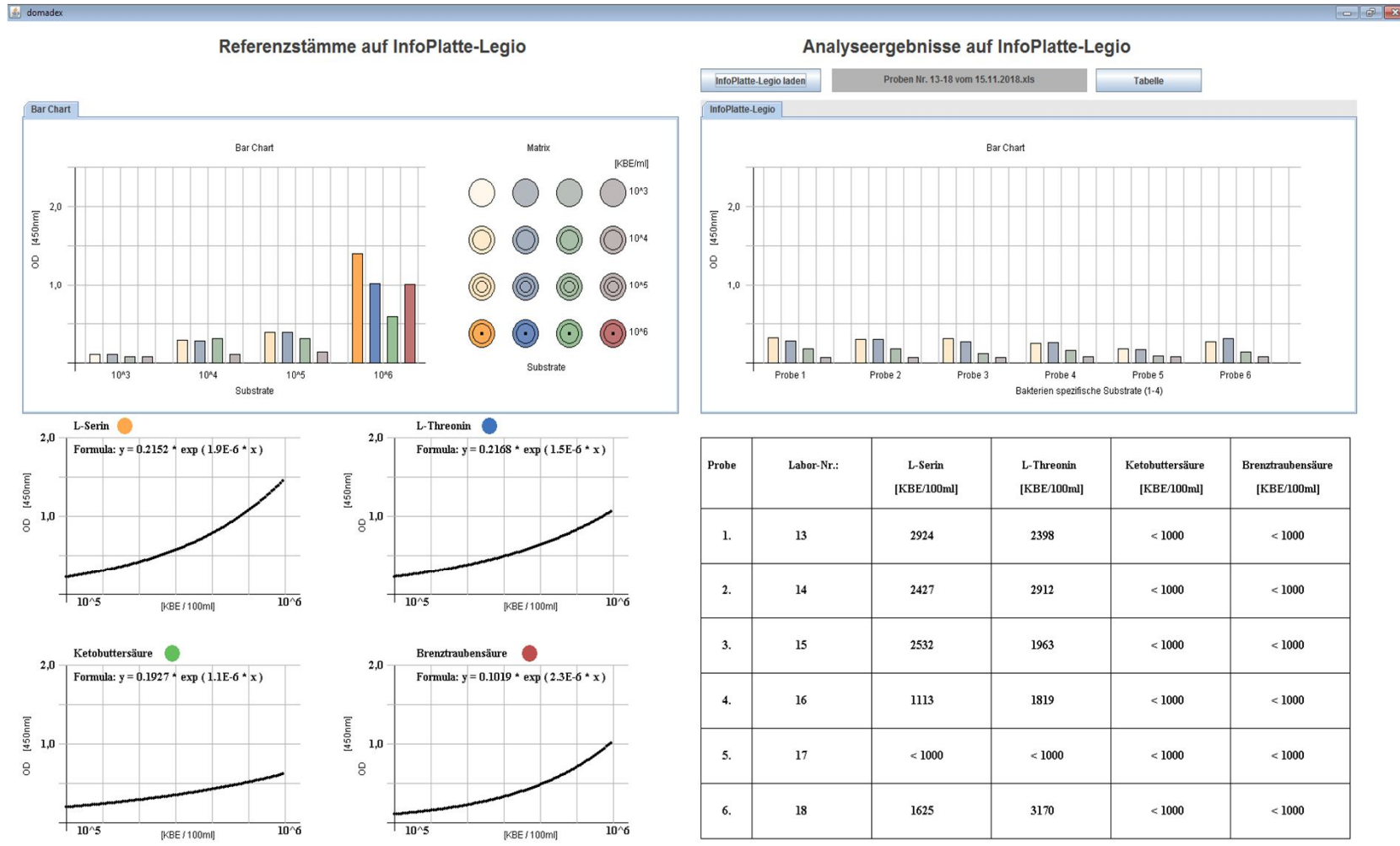
Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio - Verifizierung



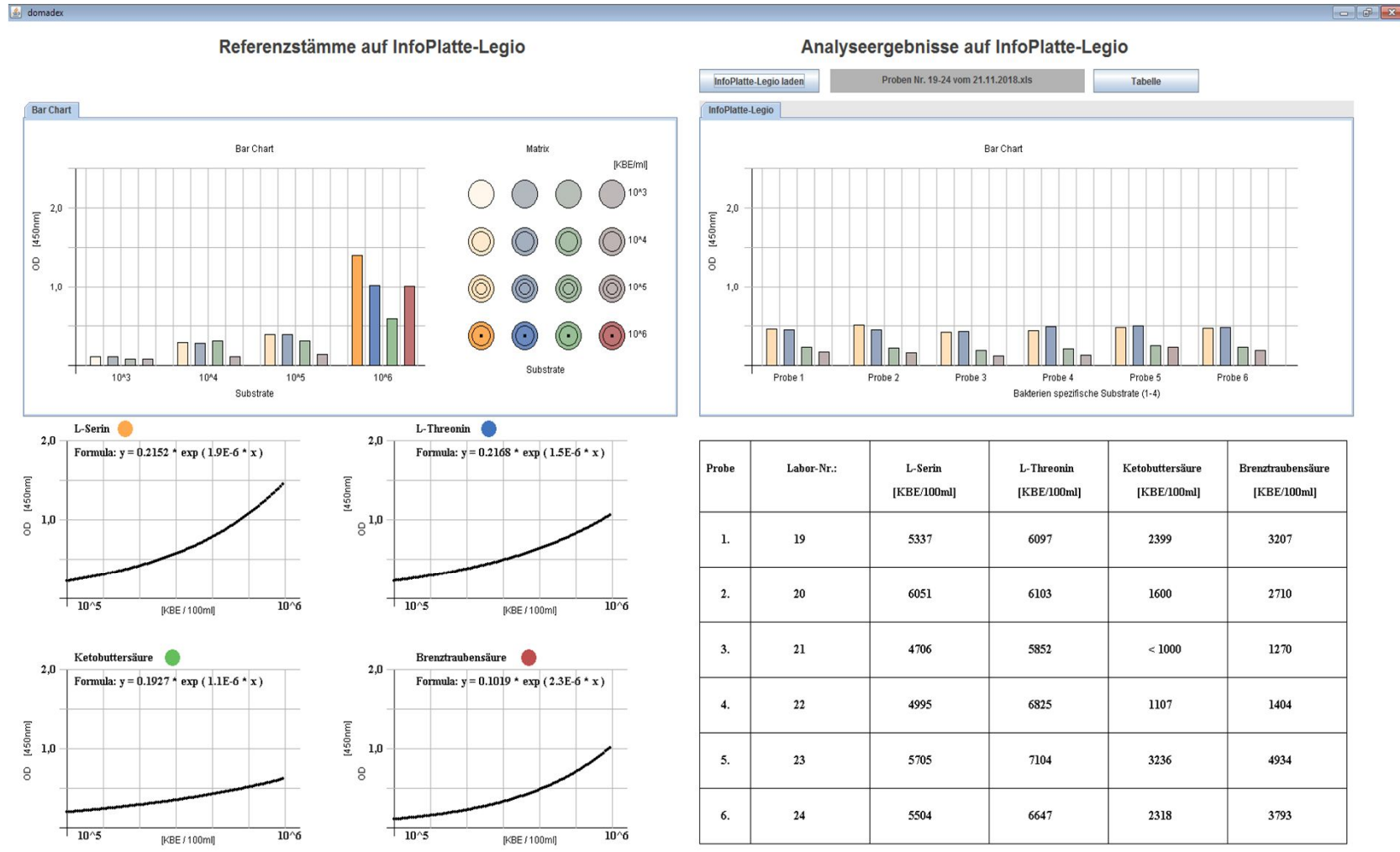
Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



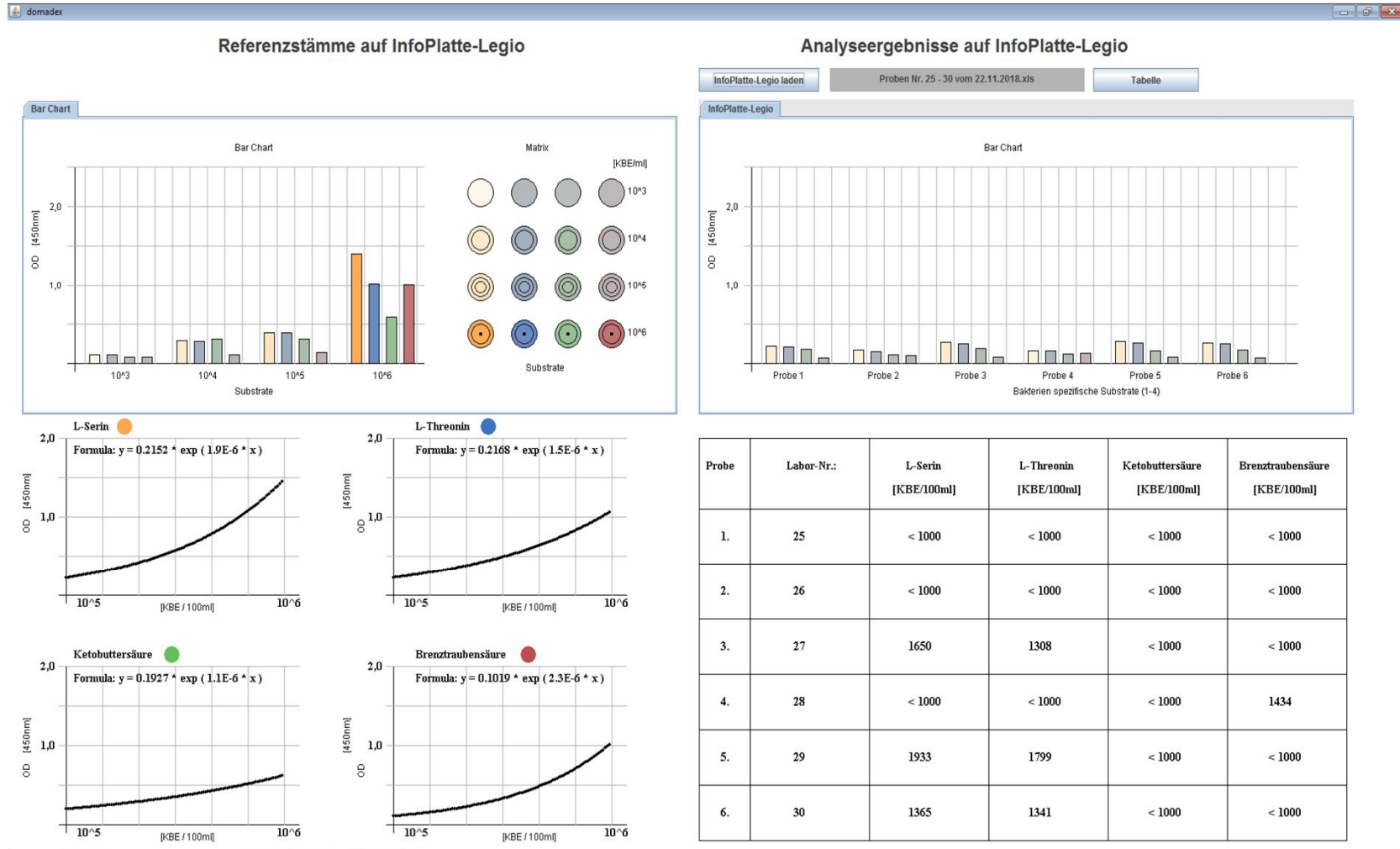
Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



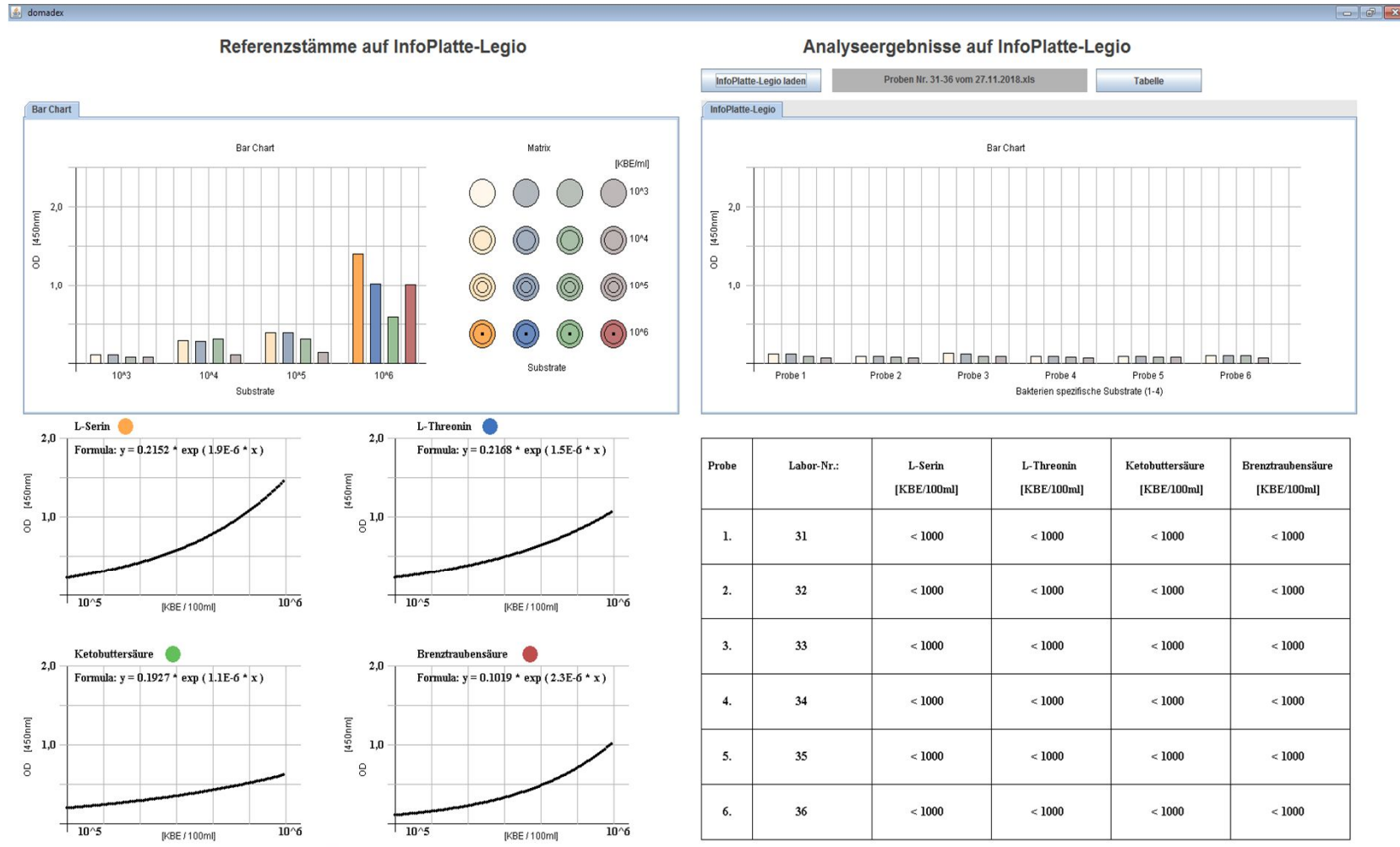
Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



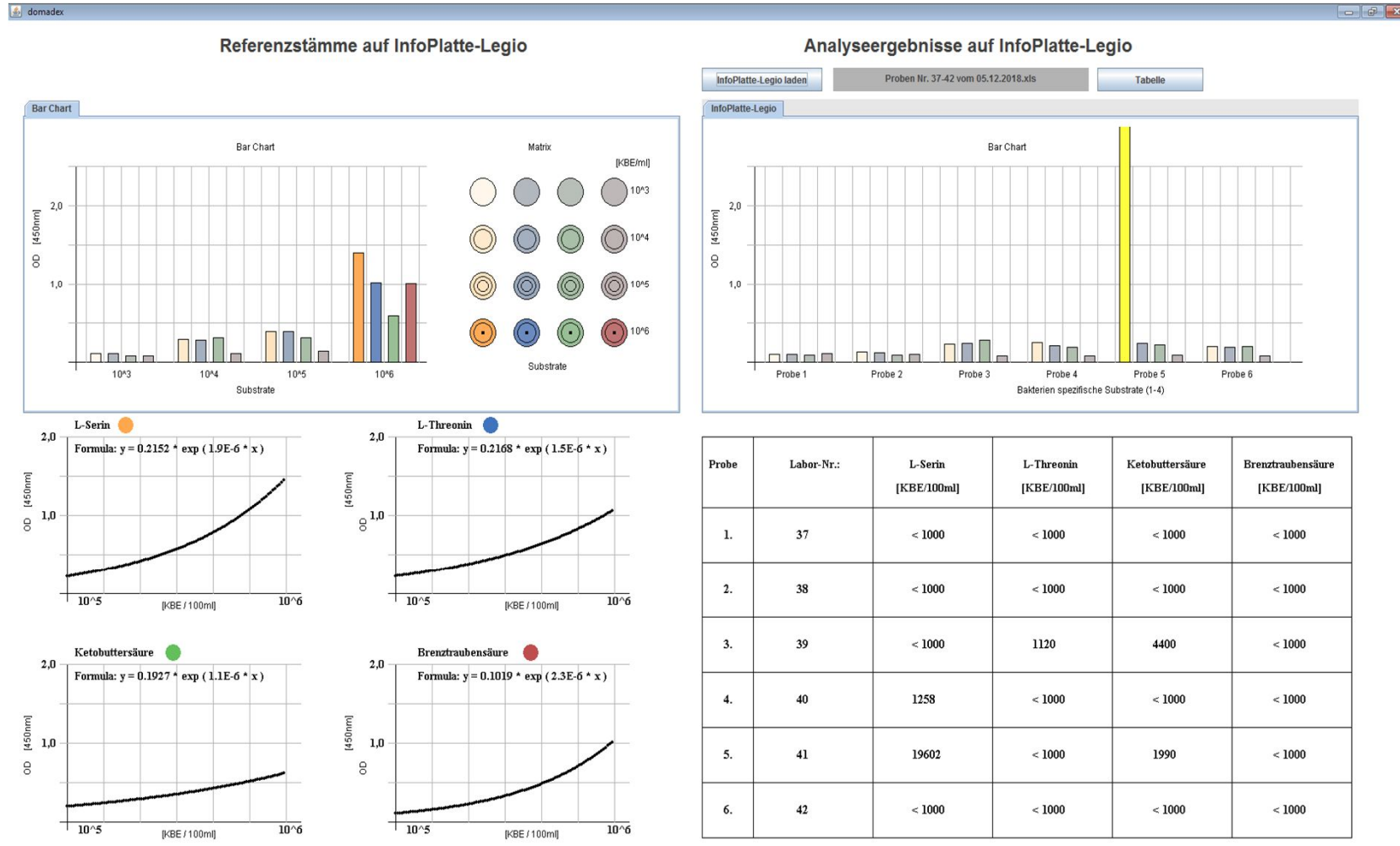
Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio

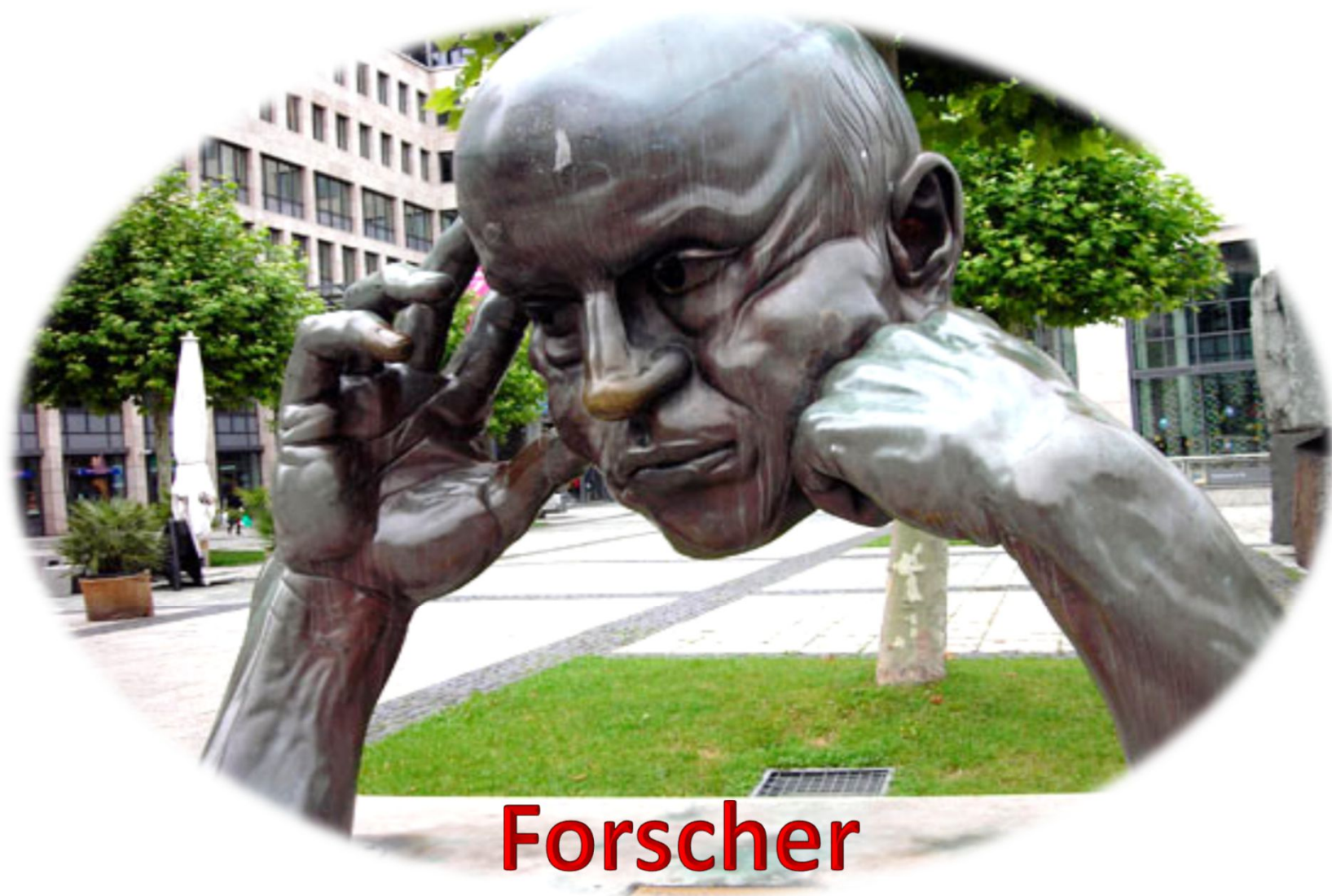


Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio



Software „domadex“ für InfoPlatte-Legio





Dr. habil. Anna Salek