

# Schnelle automatische Identifizierung von Bakterien und Pilzen

## Automatische Probenvorbereitung MIROB

Die schnelle und sichere Identifikation von Bakterien und Pilzen ist für die heutige Mikrobiologie oberstes Ziel. So sind korrekte Bestimmungen von Krankheiten und das Auffinden neuer Antibiotika oder neuartiger biochemischer Verbindungen notwendig. Viele Mikroorganismen sind noch unbekannt und man erhofft sich neue Medikamente, industriell einsetzbare Enzyme oder bisher unbekannte Rohstoffe für weitergehende Synthesen. Dazu werden viele Mikroorganismen angezüchtet und identifiziert.

Typische Identifizierungsverfahren wie PCR oder biochemische Reaktionsmuster finden Anwendung im Bereich der humanpathogenen Mikrobiologie, Veterinär-mikrobiologie, Umweltmikrobiologie, Biotechnologie, Naturstoffproduktion und Life Science Forschung. Seit wenigen Jahren etabliert sich jedoch eine neue Methode basierend auf der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Charakterisierung und Identifizierung von Bakterien und Pilzen [1]. Der Einsatz der Massenspektrometrie konnte dabei die Identifikationszeiten von mehreren Tagen auf wenige Minuten reduzieren. Der massenspektrometrische Gesamtprozess war

bisher jedoch nur teilweise automatisiert und besteht aus der Probenvorbereitung (Zellübertragung auf die MALDI-Probenplatte), der eigentlichen MALDI-TOF-MS Messung und der Auswertung bzw. Identifizierung mittels der SARAMIS Software und Datenbank (Spectral ARchive And Microbial Identification System). Diese Publikation zeigt erstmals den Lösungsvorschlag für die automatische Probenvorbereitung, des zeitintensivsten Schrittes und der möglicherweise gefährlichen Handhabung der Übertragung von Kolonien von der Petrischale auf das Target des Massenspektrometers. Dadurch kann die gesamte SARAMIS-MALDI-TOF-MS Identifizierung von Mikroorganismen automatisch durchgeführt werden.

Ziel des neuartigen Roboters (MIROB Mikroorganismen-Transfer-ROBoter) ist die automatische Probenvorbereitung zur mikrobiellen Artbestimmung mittels SARAMIS-MALDI-TOF Massenspektrometrie. Der Roboter reduziert die Vorbereitungszeit auf unter eine Minute. Dabei etabliert er zusätzlich in einer Mikrotiterplatte eine Reinzucht. Neben der einfachen Proben-Rückverfolgung über eine Datenbank ist somit auch der Zugriff auf den Mikroorganismus für Folgeuntersuchungen möglich. Zusätzlich wird im Laborbetrieb ein sicherer Umgang mit pathogenen Erregern gewährleistet.

### Ablauf

Bebrütete Petrischalen (AGAR-Platten) mit Bakterien- oder Pilzkolonien werden über ein Förderband in den Roboter einzeln eingeschleust und genau positioniert (Abb. 2). Eine pneumatische Hub-Schwenkeinheit mit Vakuumsauger entfernt den Deckel. Die Petrischale wird auf einem 3D-Tisch abgesetzt (Abb. 3). Eine Kamera vermisst die Kolonien. Mit diesen Informationen wird der Tisch hochgenau positioniert, um die jeweilige Probe mittels eines Probenstabes sicher zu entnehmen (Abb. 4). Das Zellmaterial wird auf dem Target abgestreift oder suspendiert (Abb. 4). Danach impft derselbe Probenstab das in der Mikrotiterschale vorbereitete Kulturmedium an. Der Probenstab ist als Disposable ausgeführt und wird automatisch gewechselt. Nach Aufsetzen des Deckels wird die Petrischale wieder über das Förderband aus der Roboterstation transportiert.

Die Materialflusskontrolle ist für das Massenscreening essentiell, um eine eindeutige Zuordnung der Ergebnisse zur Probe zu gewährleisten. Die eingesetzten Barcodes müssen, um die Bildverarbeitung nicht zu beeinträchtigen, seitlich an die untere Petrischale angebracht werden. Da die Rundung kleiner Schalen das Ablesen durch Barcodescanner er-

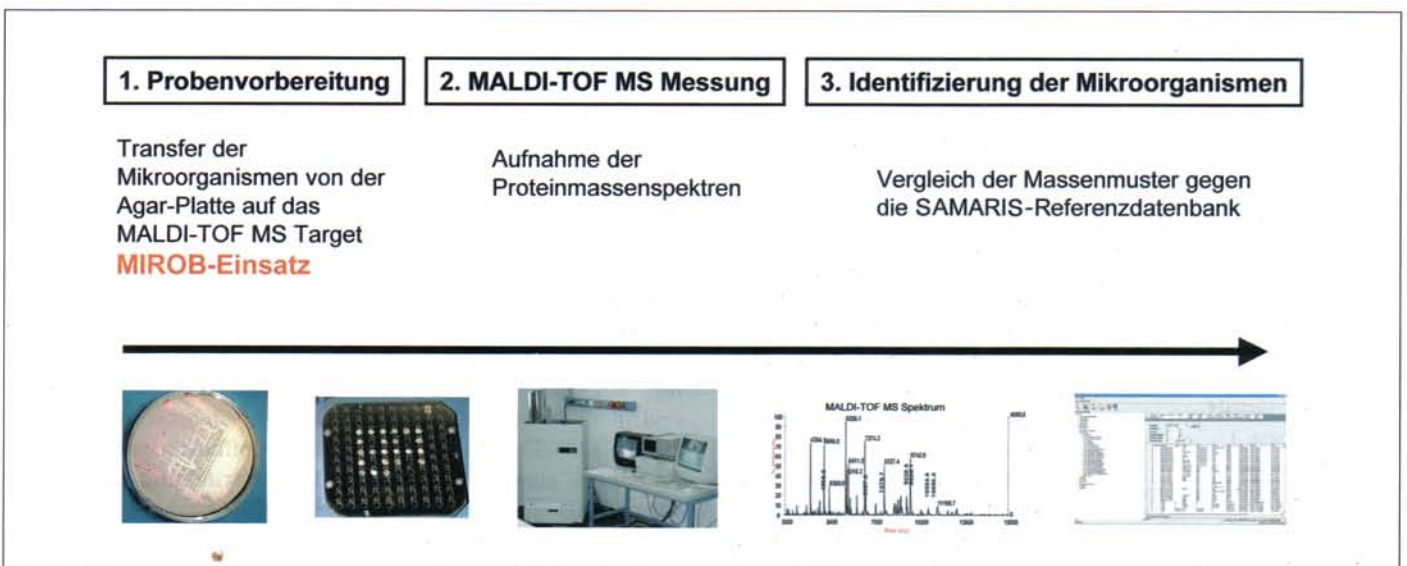


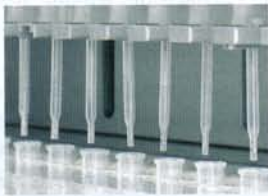
Abb. 1: Schnelle Artbestimmung von Mikroorganismen durch Massenspektrometrie. Der zeitintensive und fehleranfällige Schritt der Probenvorbereitung wurde hier durch einen neuartigen Roboter beschleunigt.

## Automatisierung mit der Biomagnetic Workstation



# X-Tract

- ▶ Isolierung von DNA/RNA z.B. aus Gewebe, Tissue, Food
- ▶ Isolierung von Zellen und Bakterien
- ▶ Konjugation von z.B. Antikörpern an Magnetic Beads



- ▶ Bearbeitung von bis zu 12 Proben
- ▶ innovative Separationstechnik
- ▶ 8 editierbare Programme
- ▶ einfache Bedienung



Engineering  
For Your Needs

**HTI bio-X GmbH**  
Kolpingstraße 3  
85560 Ebersberg  
Tel. +49 (0) 8092-2092-0  
Fax +49 (0) 8092-2092-28  
info@hti-bio-x.com  
www.hti-bio-x.com



Abb. 2: Ein- und Ausschleusen der Petrischalen erfolgt über ein Förderband und ein Greifersystem. Ein Sauger nimmt zuvor die Deckel ab und verschließt die Schalen nach dem Ablauf.

schwert, wurde eine kamera-basierte Lösung integriert. Ein Rundumspiegel macht den Barcode für die Bildverarbeitungskamera sichtbar, eine handelsübliche Software deckt ein breites Spektrum der üblichen Barcodes ab. Sämtliche Bilder mit Barcodes und Entnahmepositionen werden gespeichert.

Der Roboter erzeugt für jede Probe einen zugehörigen Datenbankeintrag. Die Rückverfolgung der Probe zur ursprünglichen Kolonie ist z.B. auch über das Übersichtsbild und den Barcode nachvollziehbar.

Die Auswertekriterien der Bilderkennung werden durch den Benutzer eingerichtet. Danach kategorisiert der Roboter die Kolonien nach der Größe, Farbe und Oberflächenstruktur. Anhand der Kategorien erfolgt dann die Probenentnahme. Eine spezielle Schräglichttechnologie ermöglicht die Auswertung sehr kleiner und durchsichtiger Kolonien. Um eine Reinzucht zu gewährleisten, können unrunde Kolonien von der Probenentnahme ausgeschlossen werden.

Nach der Ablage der Petrischale durch den Roboter erzeugt eine Kamera ein Farbbild der Szene, und die Software zur automatischen Objektdetektion und -auswertung



Abb. 3: Präzisions-Positioniertisch mit Rundumspiegel zur Barcoderkennung, Mikrotiterplatte zur Reinzuchtetablirung und MALDI-TOF Target zur Artidentifikation.

wird gestartet. Eine adaptive Belichtungskorrektur gleicht unterschiedliche Lichtverhältnisse und Farbdifferenzen aus und ermöglicht der nachfolgenden Auswertesoftware das sichere Bestimmen der definierten Objektparameter. Die Algorithmen zur Farb-Bildverarbeitung nutzen intelligente Segmentierungsverfahren, um Bakterienkolonien vom Agar im Hintergrund zu unterscheiden. Mit einer grob-zu-fein Strategie werden verschiedene ROI (regions of interest) identifiziert und hinsichtlich wesentlicher Farb-, Form- und Texturparameter analysiert. Als Ergebnis stehen die verschiedenen organischen Strukturen in Form von Objekten zur Verfügung. In weiteren Schritten wird zu jedem Objekt ein Merkmalsvektor erzeugt, der Informationen über Position, Größe und Textur enthält.

Die Software stellt zudem eine Benutzer-Schnittstelle zur Verfügung, mit der interaktiv auf den Detektionsprozess Einfluss genommen werden kann, um beispielsweise nur Objekte einer bestimmten Größen- oder Farbklasse zu detektieren und auszuwerten. Ebenso existieren Parameter für minimale Koloniegröße und den Sicherheitsabstand zweier Kolonien. So wird die Entnahme einer Mischprobe vermieden.

Bei der halbautomatischen Auswahl legt der Labormitarbeiter selbst die zu pickenden Stellen am Bildschirm fest. Der

Vorteil ist, dass dafür kein Kontakt mit der Probe bzw. physische Anwesenheit im Labor notwendig ist. Über ein Computernetzwerk kann diese Aufgabe auch vom Büro oder von zu Hause erledigt werden.

Der Probenstab kann vibrieren oder über einen Zwischenschritt mit Wasser benetzt werden. Vorversuche zeigten, dass so auch von harten oder krustigen Kolonien ausreichend Zellen aufgenommen werden. Das Ablegen folgt dem gleichen Muster. Hierbei kann die Ablagestelle ebenfalls mit Wasser benetzt werden, so dass durch Vibrieren des Stabes eine Zellsuspension erstellt wird. Droht ein Überladen der Probenposition auf dem Target, kann durch mehrfaches Ablegen eine Verdünnung erfolgen. Zuletzt wird die Mikrotiterplatte beimpft. Der benutzte Probenstab wird ausgeworfen und ein neuer aus dem Vorratsbehälter automatisch von oben nachgeführt.

### Zusammenfassung

Der mikrobielle Mikroorganismen-Transfer-Roboter entnimmt Proben von Kolonien ohne verfälschende Medienbeimischungen. Dies erlaubt die schnelle SARAFIS-MALDI-TOF [2] massenspektrometrische Artidentifikation und Inhaltsstoffbestimmung. Die Bildverarbeitung trennt die Kolonien nach Größe, Farbe und Oberflächenstruktur und ermöglicht die Einstellung von Sicherheitsparametern. Gleichzeitig wird neben der

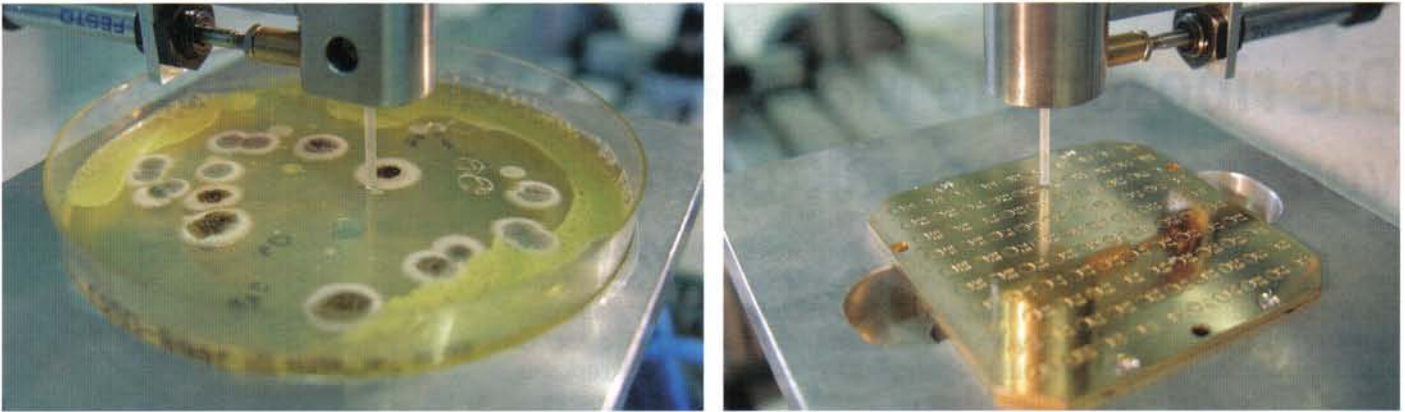


Abb. 4: Entnahme direkt aus der Petrischale (links) und Ablage der Probe auf dem Target (rechts). Der Stab wird nur sanft aufgesetzt und überträgt so nur das Probenmaterial ohne Mediumbeimengungen.

Probenaufarbeitung eine Reinzucht für Folgeuntersuchungen angepfl. 100 Proben werden in etwa einer Stunde vorbereitet.

Die Möglichkeiten der „fabrikartigen“ Wissenschaft sind in den Anfängen. Auch kleine und mittlere Unternehmen können derartige Lösungen für ihren Bedarf mitentwickeln oder entwickeln lassen und selbst komplexe Laborabläufe können durch Roboter unterstützt werden.

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit dem IMOS der Universität Magdeburg und den Firmen Symacon GmbH, engelke engineering art GmbH, Proteofactory AG und Anagnostec GmbH durchgeführt

und durch das BMBF im Rahmen „Produktion für morgen“ gefördert.

**Referenzen**

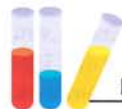
- [1] Erhard, M.; v. Döhren H.; Jungblut, P.: Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry, *Nat. Biotech.* 15 1997, 906–909
- [2] Weiterführende Informationen zum SARAMIS-MALDI-TOF MS Gesamtsystem: Herr Dr. Marcel Erhard; Anagnostec GmbH; Im Biotechnologiepark, TGZ II; 14943 Luckenwalde, Tel.: 03371/681-126, Fax: 03371/681-127, m.erhard@anagnostec.de, www.anagnostec.de

**Dr. rer. nat. Oliver Lange**  
**Dipl.-Ing. Christian Teutsch**  
 Wissenschaftliche Mitarbeiter  
 Hauptabteilung Automatisierung  
 Fraunhofer Institut für Fabrikbetrieb und -automatisierung  
 Sandtorstrasse 22  
 39106 Magdeburg

**Dr. rer. nat. Marcel Erhard**  
 Anagnostec GmbH  
 Im Biotechnologiepark, TGZ II  
 14943 Luckenwalde

**Dipl.-Ing. Jörg Sander**  
 engelke engineering art GmbH  
 Schillbreite 3, 39120 Magdeburg

Durch das Studium von Mäusen haben Wissenschaftler einen bislang unbekanntem Mechanismus für **neurodegenerative Erbkrankheiten** entdeckt. Ihr Ergebnis: Bei der so genannten „Wobbler-Maus“, die an einem fortschreitenden Verlust von Nervenzellen leidet, ist ein Gen verändert, das eine wichtige Rolle bei Transport und Verteilung von Stoffen in der Zelle spielt. Der Defekt lässt sich durch die Einführung eines voll funktionsfähigen Gens heilen. Die Arbeiten der Bielefelder Forscherteams um Prof. Jockusch und Dr. Thomas Schmitt-John, inzwischen Professor an der Universität Aarhus in Dänemark, zeigen jetzt: Ein Defekt in einem Gen namens Vps54 ist die Ursache für den Verlust der Nervenzellen bei der Wobbler-Maus – und dieser Befund wirft ein neues Licht auf mögliche Krankheitsmechanismen, die auch für ALS-kranken Menschen von Bedeutung sein können. Die Befunde der Bielefelder Arbeitsgruppe wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Lengeling von der GBF und Prof. Miriam Meisler aus Ann Arbor gewonnen. Ihre Ergebnisse beschreiben sie in der Online-Version von *Nature Genetics* (Oktober 2005). [www.uni-bielefeld.de](http://www.uni-bielefeld.de)



**FORSCHUNG + ENTWICKLUNG**

**DNA-Methyltransferasen** spielen eine zentrale Rolle in der Epigenetik. Dieses komplexe regulatorische Netzwerk von Modifikationen betrifft nicht direkt die in der DNA enthaltene Erbinformation, sind aber entscheidend für die Genaktivität. Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA werden häufig bei Krebszellen gefunden. Bislang war sehr wenig über die DNA-Methyltransferasen bekannt. Mangels anderer experimenteller Optionen wurden die Enzyme bislang nur im Reagenzglas untersucht. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sind aber nur von limitierter Aussagekraft, weil die Enzyme nicht in ihrer natürlichen Umgebung beobachtet werden können. Den erhofften Blick in die lebende Zelle erlaubt jetzt aber eine neue experimentelle Methode, die von Heinrich Leonhardt und seinen Mitarbeitern in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Cristina Cardoso vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin entwickelt wurde. Die Ergebnisse wurden in *Nature Methods* veröffentlicht (September 2005). [www.mdc-berlin.de](http://www.mdc-berlin.de), [www.uni-muenchen.de](http://www.uni-muenchen.de), [www.nature.com](http://www.nature.com)

Das Genom eines weiteren unter Extrembedingungen lebenden Mikroorganismus ist entschlüsselt. Durch **Analyse des Genoms von *Natronomonas pharaonis*** haben die Wissenschaftler der Abteilung Membranbiochemie des Max-Planck-Instituts für Biochemie jene Überlebens-Strategien aufgedeckt, mit denen das Archaeon unter tödlichen Umweltbedingungen noch bestens gedeihen kann. In *Genome Research* (Oktober 2005) präsentieren Prof. Dieter Oesterhelt und seine Kollegen ihre Ergebnisse

[www.mpg.de](http://www.mpg.de)  
[www.biochem.mpg.de](http://www.biochem.mpg.de)

Mit einem erhöhten Cholesterinspiegel steigt auch das Risiko einer **Alzheimer-Erkrankung**. Zu diesem Ergebnis kommen Wissenschaftler des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN). Sie deckten die molekularen Zusammenhänge zwischen einem gestörten Fettstoffwechsel und der Gehirnerkrankung auf. Die Forscher erhoffen sich nun in Zukunft, durch eine gezielte Veränderung des Fettstoffwechsels, zum Beispiel durch cholesterinsenkende Medikamente und durch eine Ernährungsumstellung, vielleicht die übermäßige Produktion von Amyloid Beta verringern und so das Absterben der Nervenzellen verhindern, zu können. Vielleicht ließe sich die Alzheimer-Erkrankung dadurch besiegen. Die Ergebnisse der Studie wurden in *Nature Cell Biology* veröffentlicht. [www.ngfn.de](http://www.ngfn.de)

Neue Impulse zur Therapie des Schlaganfalls, einer der vorherrschenden Erkrankungen unserer Zeit, soll der nun gegründete Forschungsverbund **„Stammzellbasierte Regeneration nach Schlaganfall“** unter der Koordination von Prof. Dr. Magdalena Götz vom Institut für Stammzellforschung am GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit und Prof. Dr. Ulrich Dirnagl von der Charité in Berlin bringen. Der Verbund ist in das Programm „Zellbasierte, regenerative Medizin“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) eingebettet.

[www.bmbf.de](http://www.bmbf.de), [www.gsf.de](http://www.gsf.de), [www.charite.de](http://www.charite.de)