

Proteine und Nukleinsäuren als Bestandteile der extrazellulären polymeren Substanzen von Trinkwasserbiofilmen

(Kennziffer: 2867)

Witold Michalowski, Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie, Biofilm Centre, Aquatische Mikrobiologie

Abschlussbericht über die Förderungsperiode vom 01.07.2010 bis 30.06.2012

Zusammenfassung

Es wurde die Bildung und mikrobiologische und biochemische Zusammensetzung von Trinkwasserbiofilmen auf einem elastomeren Werkstoff und ihren extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) untersucht. Ab einem Biofilmalter von 14 Tagen befanden sich die Biofilme in einem quasi-stationären Zustand mit einer Zellzahl von etwa $2,5 \times 10^8$ Zellen/cm². Die Populationszusammensetzung zeigte eine hohe Diversität an Mikroorganismen und geringe Variationen im Verlauf der Biofilmbildung. Unabhängig vom Alter der Biofilme erwiesen sich Proteine als Hauptbestandteile der EPS, gefolgt von Kohlenhydraten und DNA. Die EPS zeigten eine hohe Diversität an Proteinen. Im Verlauf der Biofilmbildung nahmen Anzahl und molekulare Masse der Proteine ab, was durch den Abbau der Proteine durch extrazelluläre Enzyme hervorgerufen wurde, welche im Verlauf der Biofilmbildung verstärkt gebildet wurden. Vergleiche von Trinkwasserbiofilmen an verschiedenen Standorten zeigten trotz ähnlichen Zellzahlen deutliche Unterschiede in der Populations- und biochemischen Zusammensetzung der Biofilme und ihren EPS in verschiedenen Verteilungsnetzen. Die Unterschiede waren zudem ausgeprägter durch den Einfluss der Trinkwasserinstallation aus Kupfer.

Einleitung

Biofilme sind ubiquitär vorhanden, unter anderem in technischen Systemen wie z.B. Trinkwasserverteilungssystemen. Dort können Biofilme als Reservoir für pathogene Mikroorganismen fungieren, wodurch sie eine potenzielle Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen^[1]. Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) sind neben Wasser der Hauptbestandteil eines Biofilms. Prinzipiell bestehen EPS aus Makromolekülen wie Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren. Sie formen die extrazelluläre Matrix von Biofilmen und bieten den Biofilmorganismen Schutz gegen äußere Stresseinflüsse, z.B. gegen Desinfektionsmittel wie Chlor.

Um Biofilmbildung verstehen, kontrollieren und vermeiden zu können ist es wichtig, Erkenntnisse über die Menge und Zusammensetzung der Biofilme und ihren EPS zu sammeln, da die EPS ein wichtiges Zielobjekt für die Inaktivierung und Entfernung von Biofilmorganismen ist^[2]. Ein Problem bei der Untersuchung von Trinkwasserbiofilmen besteht darin, dass sie häufig nur in geringen Mengen vorliegen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der EPS von Trinkwasserbiofilmen. Dafür wurden Trinkwasserbiofilme auf einem elastomeren Material, welches die Biofilmbildung förderte^[1,3], angezüchtet. In der ersten Förderungsperiode wurde eine miniaturisierte Methode zur Isolierung von EPS aus relativ geringen Mengen von

Trinkwasserbiofilmen, wie sie typischerweise in Trinkwasserverteilungssystemen entstehen, unter Verwendung eines Kationenaustauscherharzes entwickelt und mit anderen Methoden verglichen. Die Zusammensetzung der EPS wurde durch die quantitative Analyse der Kohlenhydrate, Proteine und extrazellulärer DNA bestimmt, welche die charakteristischen Bestandteile mikrobieller EPS darstellen. Zusätzlich wurde eine gelelektrophoretische Analyse der Proteine durchgeführt.

Methoden

Anzucht der Biofilme

Die Anzucht der Biofilme erfolgte in Durchflussreaktoren aus Edelstahl. Die Reaktoren wurden mit Tygon-Schläuchen an Kaltwasserhähne in Trinkwasserverteilungsnetzen oder in Hausinstallationen aus Kupfer angeschlossen und kontinuierlich mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 50 mL/min mit Trinkwasser durchspült. Biofilme wurden auf Coupons (76 mm x 26 mm) aus dem Elastomer Ethylen-Propylen-Dien-Monomer (EPDM 65 Shore; Schmitztechnik GmbH, Deutschland), das den KTW-Anforderungen, jedoch nicht den Anforderungen nach DVGW-Arbeitsblatt W 270 entsprach, über bis zu 28 Tage angezchtet. Die Biofilme wurden von den Coupons abgeschabt und in 6 mM Phosphat-Puffer (2 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, 4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$, 9 mM NaCl, 1 mM KCl; pH 7,0) durch Rühren dispergiert. In diesen Biofilmsuspensionen wurden die Gesamtzellzahl mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6'-Diamidino-2-phenylindol und die Koloniezahl auf R2A-Medium nach Inkubation für 7 Tage bei 20 °C bestimmt.

Isolierung der EPS

Die Isolierung der EPS erfolgte in miniaturisierter Form verglichen mit vielfach beschriebenen EPS-Isolierungen aus Klärschlämmen^[4] oder Reinkulturbiofilmen durch 20 minütige Schüttelbehandlung von 8-mL Volumina der Biofilmsuspension mit Zugabe des Kationen-austauscherharzes Dowex (Marathon C, Na^+ -Form) durchgeführt. Das Schütteln erfolgte bei Maximalleistung auf einem Schüttler (Vortex, Genie 2) mit einem Halterkopf für 4 Zentrifugationsröhrchen. Die behandelte Biofilmsuspension wurde zentrifugiert (20.000 g; 4 °C) und der Überstand sterilfiltriert (Porengröße 0,2 μm). Die Überstände entsprachen den zellfreien EPS-Lösungen und wurden auf Protein-, Kohlenhydrat- und DNA-Konzentration analysiert. Diese Methode wurde im 1. Förderungsjahr optimiert und mit anderen EPS-Isolierungsmethoden verglichen und zeigte deutliche Vorteile gegenüber anderen Methoden, die sich in der Ausbeute der EPS-Komponenten widerspiegeln, ohne nachfolgende Analysenmethoden zu stören, oder Zellschädigung hervorzurufen.

Analysen

Die Diversität von Biofilmpopulationen wurde mittels PCR-DGGE untersucht. DNA wurde mit dem DNeasy Plant MiniKit (Qiagen) mit einem zusätzlichen Bead-beater Schritt aus den Biofilmzellen isoliert. 16S rDNA-Fragmente wurden mit Hilfe von 27f Primern mit GC-Klammer und 517r Primern mittels PCR vervielfältigt. Die DGGE wurde mit 500 ng der PCR-Produkte und einem 7,5 % Acrylamidgel mit einem 40 – 60 % Denaturierungsgradienten (100 % entspricht 7 M Harnstoff und 40 % Formamid) durchgeführt^[3].

Die zellfreie EPS-Lösung wurde mittels photometrischer bzw. fluorimetrischer Methoden auf extrazelluläre Kohlenhydrat-, Protein- und DNA-Konzentration analysiert. Kohlenhydrate wurde mittels Schwefelsäure/Phenol Assay nach Dubois et al. (1956)

mit Glukose als Referenz und Absorptionsmessungen bei 490 nm (Spectrophotometer Cary 50 Bio UV-Visible, Varian) quantifiziert. Proteinbestimmung wurde mit dem nach Petersen (1977) modifiziertem Lowry Test mit Absorptionsmessungen bei 750 nm (Spectrophotometer Cary 50 Bio UV-Visible, Varian) durchgeführt. Rinderserum Albumin (BSA; Sigma) diente als Referenz. Extrazelluläre DNA wurde mit dem Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagenz (Invitrogen, Molecular Probes) und λ -DNA als Referenz bestimmt. Die Messungen wurden mit einem Fluorimeter (SFM 25, Kontron Instruments) bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und Emissionsmessung bei 520 nm durchgeführt.

Extrazelluläre Proteine wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE) aufgetrennt. Die Probenvorbereitung wurde an die Beschaffenheit der EPS von Trinkwasserbiofilmen angepasst und optimiert, um Interferenzen während der isoelektrischen Fokussierung zu minimieren. Dazu wurden 9 ml mit CER gewonnene, zellfreie EPS-Lösung mit 1 mL 500 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit 10 mM $MgCl_2$ und 62,5 U der Nuklease Benzonase (Novagen) behandelt (37 °C, 1 h), um vorhandene DNA zu entfernen, welche bei der 2DE störend wirkte. Die EPS-Lösungen wurden danach gegen deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 12 – 14 kDa), durch Gefriertrocknung bis zur Trockene eingengt und schließlich mittels 2-DE untersucht. Ausgewählte Proteinspots wurden ausgestochen, tryptisch verdaut, und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert.

Proteaseaktivität wurde mittels Gelelektrophorese in Zymogram Gelen mit Gelatine als Substrat untersucht. Für die quantitative Bestimmung von Enzymaktivitäten von Aminopeptidasen, α -D-Glucosidasen, β -D-Glucosidase, N-acetyl- β -D-Glucosaminidasen, Lipasen, Esterasen und Phosphatasen wurde ein Mikrotitreplatten Assay unter Verwendung fluorogener Methylumbelliferyl (MUF)-Substrate (L-Leucin-4-methoxy- β -naphthylamid, 4-MUF- α -D-Glucopyranosid, 4-MUF- β -D-Glucopyranosid, 4-MUF-N-Acetyl- β -D-Glucosaminid, 4-MUF-Stearat, 4-MUF-Butyrat und 4-MUF-Phosphat) entwickelt.

Ergebnisse

Dynamik der Trinkwasserbiofilmbildung

Das in dieser Arbeit verwendete Elastomer erwies sich als geeignetes Aufwuchsmaterial für die Erzeugung von Trinkwasserbiofilmen. Nach 14 Tagen erreichten die Biofilme einen quasi-stationären Zustand, ab dem die Gesamtzellzahl relativ konstant um 4×10^8 Zellen/cm² lag (Abb. 1a). Der Anteil an kultivierbaren Bakterien fiel mit steigendem Alter des Biofilms von 64 % (7 Tage alter Biofilm) auf 7 % (> 3 Wochen alte Biofilme).

Die PCR-DGGE zeigte ab einem Biofilmalter von 7 Tagen ein relativ konstantes Populationsmuster (Abb. 1b), was sich in Ähnlichkeiten der Muster von 70 % bis 93 % widerspiegelte. Die Zunahme (durchgezogen eingerahmt) bzw. Abnahme gepunktet eingerahmt (Abb. 1b) der Intensität von Banden oder das Erscheinen einzelner Banden gegen Ende der Anzuchtperiode (Pfeile) weisen auf eine gewisse Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaften während der Reifung der Biofilme hin.

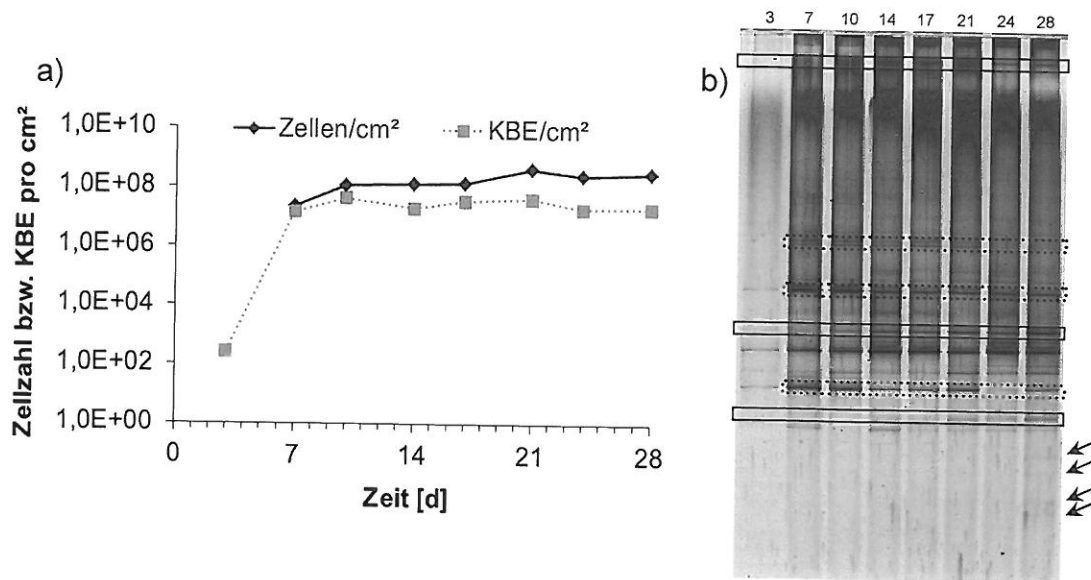


Abb. 1: Zeitlich abhängiger Verlauf a) der Gesamtzellzahl und der Koloniezahl (KBE) und b) der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften von Trinkwasserbiofilmen (PCR-DGGE).

In den isolierten EPS stellten Proteine unabhängig vom Alter der Biofilme den dominierenden EPS-Bestandteil der Trinkwasserbiofilme dar, gefolgt von Kohlenhydraten und DNA (Abb. 2). Die Protein- und Kohlenhydratkonzentrationen im Biofilm und in den EPS stiegen bis zum Ende des Untersuchungszeitraums an. Auf die Einzelzelle bezogen, nahmen die Protein- und Kohlenhydratkonzentrationen im Biofilm zunächst ab bis der Biofilm ein Alter von 18 Tagen erreicht hat und stiegen anschließend wieder an. Die Protein- und Kohlenhydratkonzentrationen pro Zelle in den EPS blieben konstant. Die DNA-Konzentration pro Zelle in den EPS fiel deutlich innerhalb der ersten 13 Tage von > 8 fg/Zelle auf 1 fg/Zelle und blieb danach konstant.

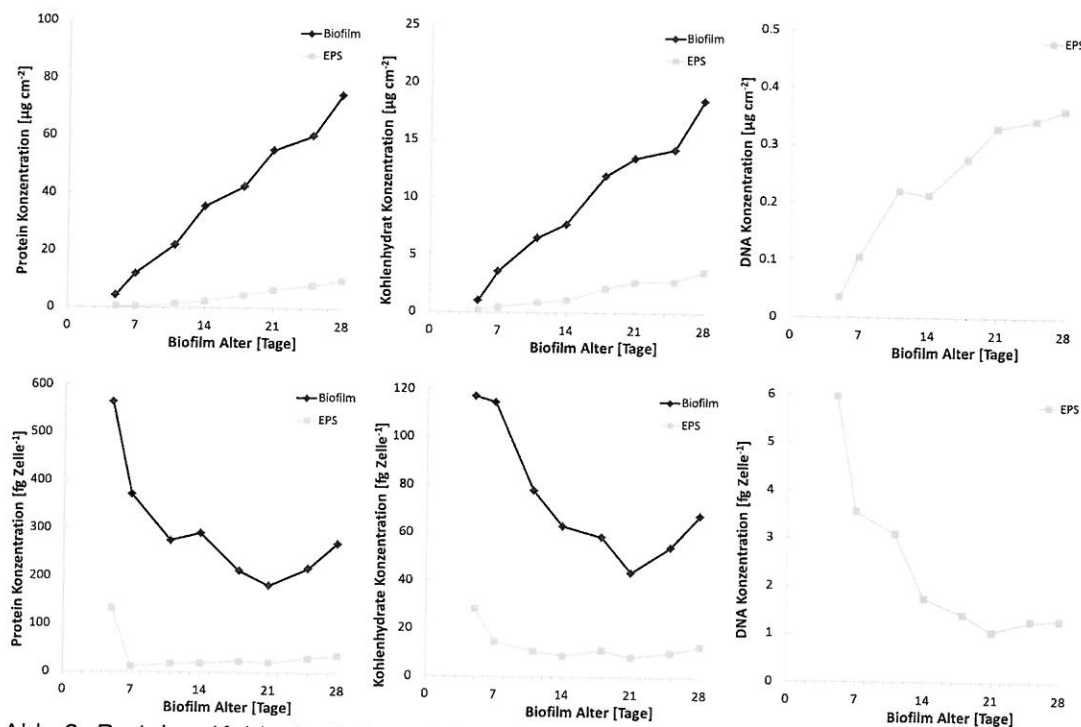


Abb. 2: Protein-, Kohlenhydrat- und DNA-Konzentrationen in Trinkwasserbiofilmen und den daraus isolierten EPS.

Die Auftrennung von EPS-Proteinen mittels 2DE lieferte reproduzierbare Proteinmuster (Abb. 3). 7 bis 13 Tage alte Biofilme zeigten mit bis zu 650 Spots zwischen molekularen Massen von 20 – 200 kDa und isoelektrischen Punkten von pI 3 bis pI 10 die höchste extrazelluläre Protein-Diversität. Ab einem Biofilmalter von 13 Tagen nahm die Spotanzahl wieder ab, wobei mit der Zeit Proteine mit niedrigerer molekularer Masse zu finden waren und eine Verlagerung der isoelektrischen Punkte in den sauren pH-Bereich stattfand. Eine Identifizierung der Proteinspots ist in Vorbereitung.

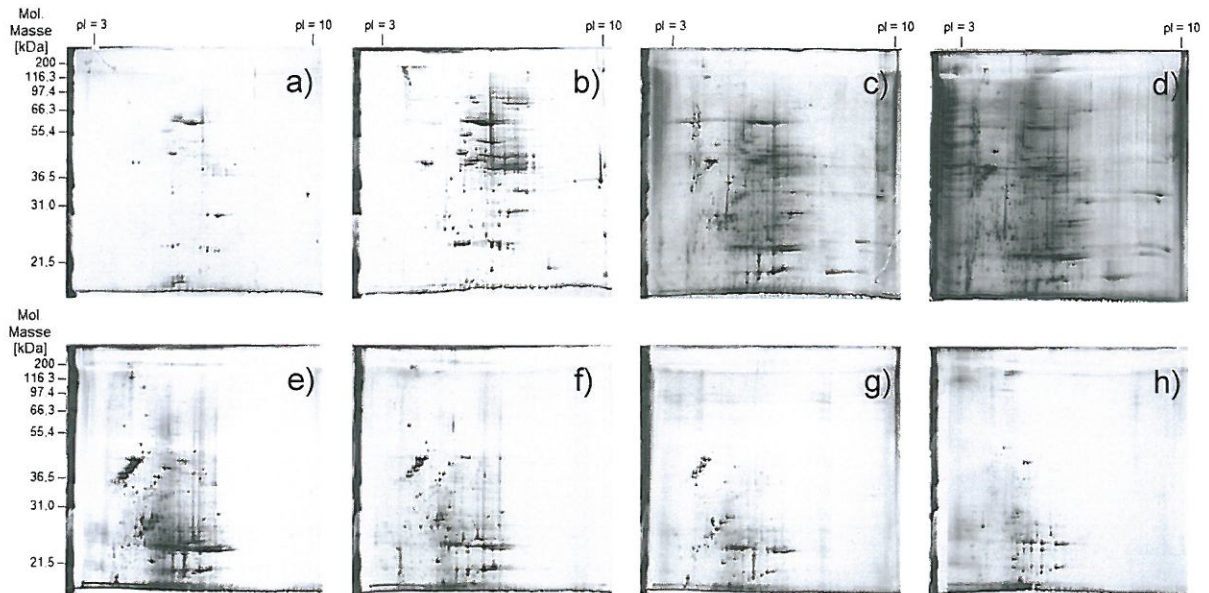


Abb. 3: 2DE gele von EPS-Proteinen von a) 5 Tage, b) 7 Tage, c) 11 Tage, d) 13 Tage, e) 18 Tage, f) 21 Tage, g) 25 Tage, und h) 28 Tage alten Trinkwasserbiofilmen. Es wurde ein pH-Gradient von 3 bis 10 und ein 12 %iges Polyacrylamidgel verwendet.

Die Bestimmung der Proteaseaktivität mittels Zymogram-Gelen deutete in anfänglichen Stadien der Biofilmbildung keine Anwesenheit von Proteasen (Abb. 4). Im Verlauf der Biofilmbildung zeigte sich für Biofilme ≥ 11 Tage jedoch eine zunehmende Aktivität in Form von klaren Banden, mit insgesamt 13 Banden in der Gesamtbiofilmprobe und 9 Banden in der EPS Probe von 28 Tage-alten Biofilmen.

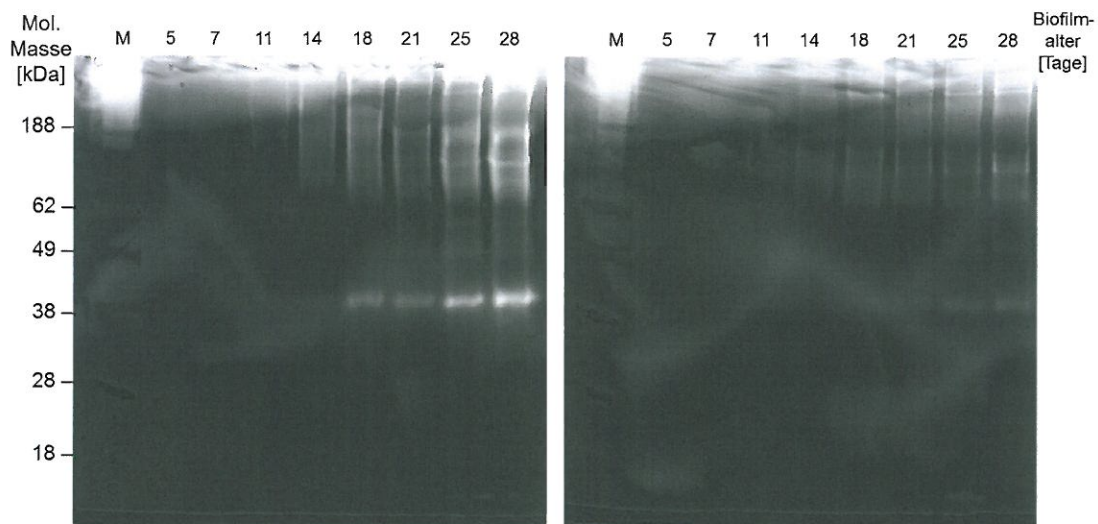


Abb. 4: Zymogram-Gele von a) Gesamtbiofilmproben (Proteinmenge pro Laufspur: 8.5 μ g) und b) isolierten EPS (Proteinmenge pro Laufspur: 0.4 μ g). Klare Banden zeigen Aktivität von Proteasen.

Die Bestimmung der absoluten Enzymaktivitäten von 7 weiteren Enzymklassen zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Aktivitäten aller Enzymklassen im Verlauf der Biofilmbildung (Abb. 5). Die Substratumsatzraten zeigten die folgende Rangordnung: esterases > lipases > phosphatases \geq N-acetyl- β -D-glucosaminidasen > peptidasen \geq α -/ β -glucosidasen. Spezifische Enzymaktivitäten, welche Substratumsatz pro Zeit und Protein angibt, zeigten eine verhältnismäßig höhere Produktion an extrazellulären Enzymen im Verlauf der Biofilmbildung im Vergleich zum Gesamtbiofilm bzw. Biofilmzellen (Abb. 6).

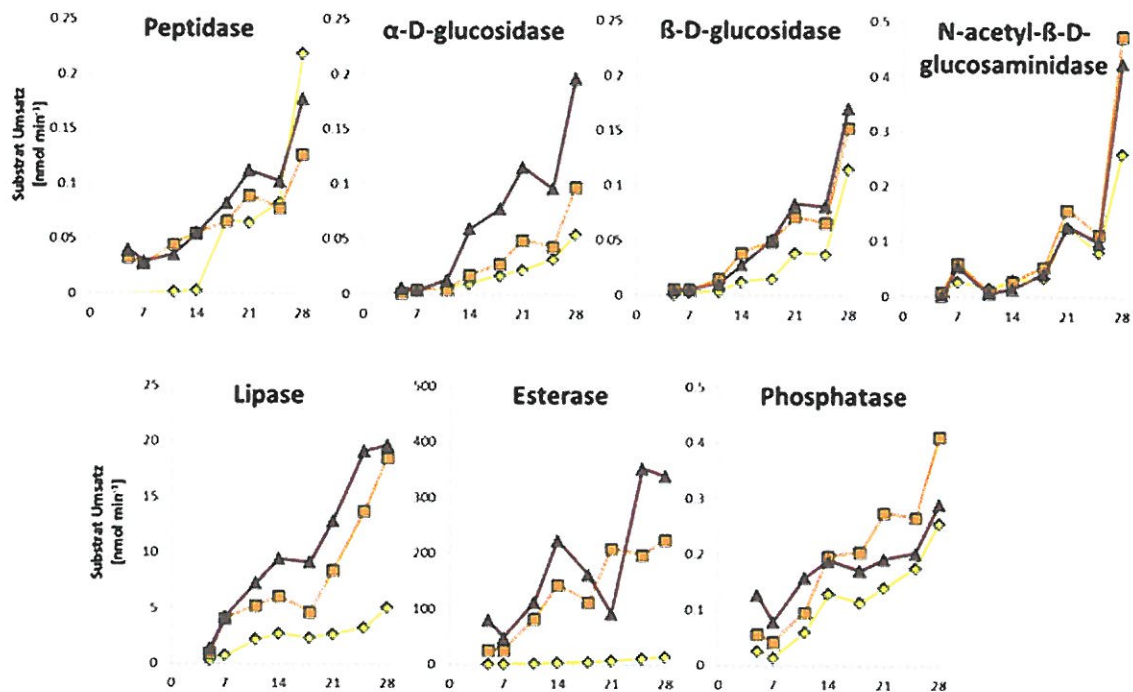


Abb. 5: Absolute Enzymaktivitäten von Trinkwasserbiofilmen (braun), Biofilmzellen nach der EPS Isolierung (orange) und der EPS (gelb); n = 2 unabhängige Versuche.

Einfluss von Hausinstallationen auf die Biofilmbildung

Die optimierten Methoden zur Isolierung und Analyse der EPS von Trinkwasserbiofilmen, die in der ersten Förderungsperiode etabliert wurden, wurden verwendet, um den Einfluss von Hausinstallationen aus Kupfer auf die Biofilmbildung zu untersuchen. Dazu wurden Biofilmreaktoren an das zu dem Universitätslabor zuführende Trinkwasserverteilungsnetz angeschlossen. Biofilme wurden mit Trinkwässern aus Trinkwasserverteilungsnetzen bzw. aus Hausinstallationen kultiviert und verglichen.

Der Vergleich zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Biofilmen und ihren EPS. Trotz sehr ähnlichen Zellzahlen (Abb. 7), zeigten Biofilme aus Hausinstallationen aus Kupfer höhere Feuchtgewichte um den Faktor 2,9 (System A) bzw. 2,1 (System B) (Tab. x). Die Kultivierbarkeit war in Trinkwasserverteilungsnetzen deutlich begünstigter und zeigte einen höheren Anteil an kultivierbarenellen, im Vergleich zu Hausinstallationen. Die Untersuchung der Populationsdiversität zeigt nur eine geringe Ähnlichkeit der Populationsmuster, was auf den Einfluss der Werkstoffe in den Hausinstallationen zurückzuführen war, welche das Wachstum anderer Spezies begünstigten (Abb. 8).

Tab. x: Physicalische Charakteristika von Trinkwasserbiofilmen aus Trinkwassernetzen bzw. Hausinstallationen; System A und C: n = 2; System B: n = 1.

Parameter	Drinking-water biofilm cultivation sites				
	Hausinstallation	Verteilungsnetz	Hausinstallation	Verteilungsnetz	Hausinstallation
	A	A	B	B	C
Feuchtgewicht [mg cm ⁻²]	11.3 ± 3.6	3.5 ± 1.9	11.1	5.4	16.2 ± 7.3
Trockenmasse [mg cm ⁻²]	0.085 ± 0.027	0.095 ± 0.032	0.18	0.073	0.136 ± 0.004
Glührückstand [mg cm ⁻²]	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.003	0.024	0.012	0.026 ± 0.004
Glühverlust [mg cm ⁻²]	0.075 ± 0.026	0.083 ± 0.029	0.16	0.061	0.111 ± 0.000
Watergehalt [% w/w]	99.2	96.5	98.3	98.6	99.1

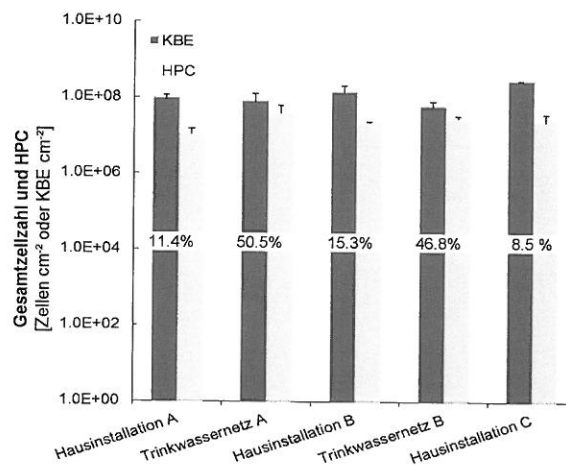


Abb. 7: Gesamtzellzahl und HPC von Trinkwasserbiofilmen aus verschiedenen Hausinstallationen bzw. Trinkwasserverteilungsnetzen. Prozentangabe entspricht dem Anteil der kultivierbaren Zellen. (n = 3 unabhängige Reaktorläufe).

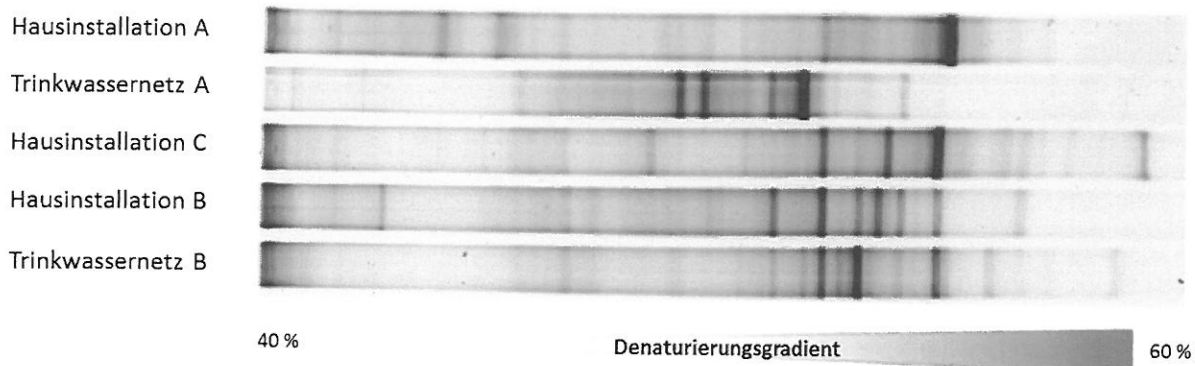


Abb. 8: Vergleich der Populationsdiversitäten von Trinkwasserbiofilmen aus Hausinstallationen und den zuführenden Trinkwasserverteilungsnetzen mittels PCR-DGGE. DNA-Menge pro Spur: 750 ng.

Die Biochemische Untersuchung der Biofilme und der EPS zeigte Konzentrationen an Gesamtproteinen und -kohlenhydraten im Bereich zwischen $22 \pm 1.9 \mu\text{g cm}^{-2}$ und $41 \pm 17.6 \mu\text{g cm}^{-2}$ bzw. $6.7 \pm 0.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ und $9.0 \pm 5.0 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Abb. 9). Die quantitative Bestimmung der EPS-Bestandteile zeigte Proteinkonzentrationen im Bereich von $1.4 \pm 0.6 \mu\text{g cm}^{-2}$ und $7.6 \pm 1.0 \mu\text{g cm}^{-2}$, Kohlenhydratkonzentrationen im Bereich von

0.8 ± 0.2 µg cm⁻² und 3.3 ± 0.6 µg cm⁻², und DNA Konzentrationen im Bereich von 0.09 ± 0.02 µg cm⁻² und 0.35 ± 0.14 µg cm⁻². Die EPS-Isolierung mittels CER resultierte in höheren Erträgen der EPS-Komponenten in Biofilm aus Trinkwassernetzen im Vergleich zu Biofilmen aus Hausinstallationen aus Kupfer. Dies deutet auf eine weniger stabile und durch das CER leichter zu desintegrierende EPS-Matrix hin.

Die unterschiedliche Beschaffenheit der EPS wurde auch durch die qualitative Untersuchung der EPS-Proteine deutlich. Die 2DE zeigte sehr unterschiedliche Muster der EPS-Proteine von Trinkwasserbiofilmen, insbesondere bei dem Vergleich von Biofilmen aus Trinkwassersystemen zu denen aus Hausinstallationen (Abb. 8). Drei Proteinspotcluster wurden gefunden, die nur in Trinkwasserbiofilmen aus Hausinstallationen aus Kupfer vorkamen, aber nicht in denen aus Trinkwassersystemen vorhanden waren (Abb. 8, orange eingekreist). Diese beinhalteten Proteine beteiligt an Transmembrantransport oder Genregulation.

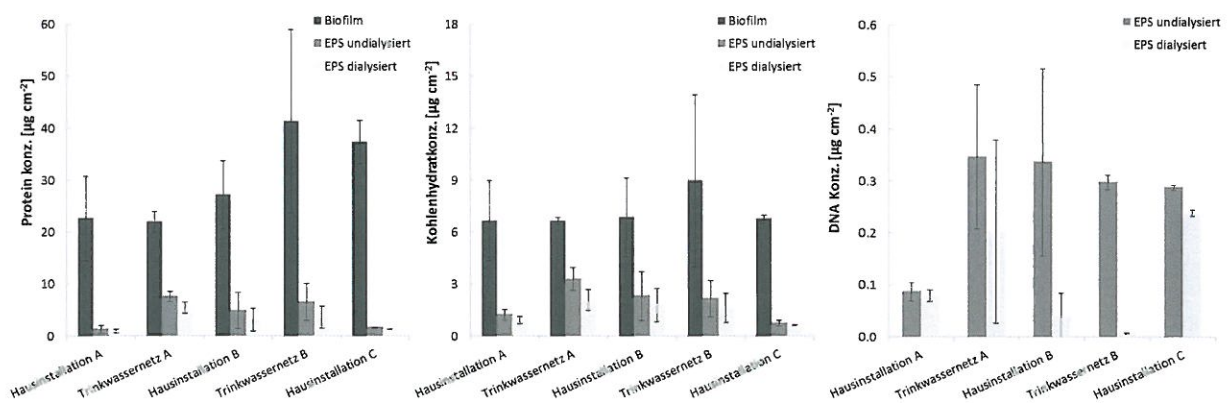


Abb. 7: Protein-, Kohlenhydrat- und DNA-Konzentrationen in den Biofilmen und in den EPS von Trinkwasserbiofilmen im Universitätslabor bzw. im Trinkwassernetz (n = 3 unabhängige Reaktorläufe).

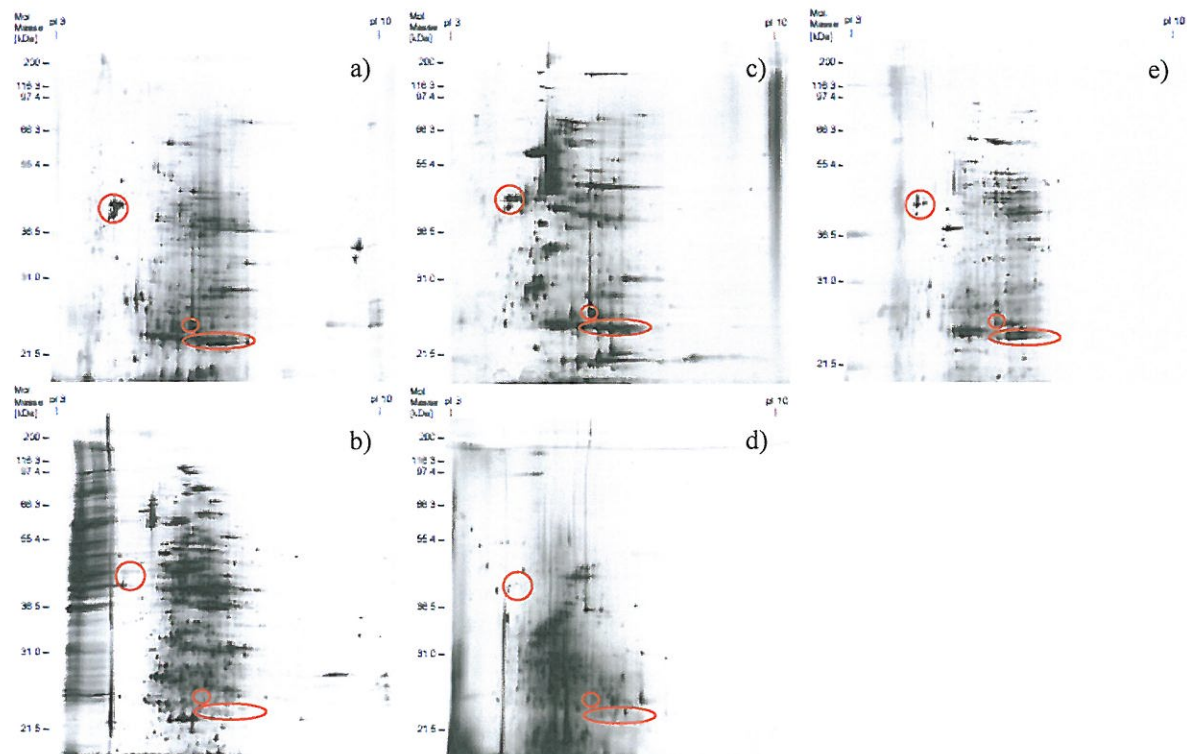


Abb. 8: Vergleich der EPS-Proteinmuster von Trinkwasserbiofilmen angezuechtet in a) Hausinstallation A, b) im Trinkwassernetz A, c) Hausinstallation B, d) Trinkwassernetz B, oder e) Hausinstallation C. Proteinmenge pro Gel: 100 µg.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass das verwendete elastomere Material ein geeignetes Substratum für die Anzucht von Trinkwasserbiofilmen darstellt. Es förderte das Wachstum von genügend Biomasse, die für eine Isolierung und Quantifizierung der EPS schon nach einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen ausreichte. Die quantitative Analyse der EPS ergab, dass Trinkwasserbiofilme ein weiteres Beispiel für Biofilme sind, in denen Proteine unabhängig vom Biofilmlalter und Standort den Hauptbestandteil der EPS darstellen. Häufig wird davon ausgegangen, dass Kohlenhydrate den Hauptbestandteil von EPS bilden. Jedoch weisen neuere Studien in vielen Fällen Proteine als die dominierende EPS-Komponente aus^[3,4,5]. Extrazelluläre DNA, die unter anderem strukturbildende Eigenschaften in Biofilmen hat^[2], steuert einen beträchtlichen Anteil zur EPS von Trinkwasserbiofilmen bei. Eine Proteinauftrennung mittels 2-DE konnte mit der isolierten EPS durchgeführt werden und zeigte eine große Vielfalt an Proteinen. Die Proteine wiesen wichtige Funktionen als hydrolytische Enzyme auf und deuten damit auf das metabolische Potential von Trinkwasserbiofilmen diverse Kohlenstoffquellen als Nährstoffe zu verwerten und die Bedeutung der EPS als externes Verdauungssystem hin^[6]. Die Untersuchung der Biofilmbildung an verschiedenen Standorten zeigte, dass Trinkwasserbiofilme an unterschiedlichen Systemen stark variieren können, was auf Unterschiede in den Nährstoffbedingungen, Wassertemperatur, Art und Alter der Rohrwerkstoffen, oder Art und Periodizität der angewandten Desinfektionsmaßnahmen zurückzuführen ist. Außerdem wurde gezeigt, dass Hausinstallationen aus Kupfer im Vergleich zu den zuführenden Trinkwasserverteilungsnetzen trotz gleichem Wasser die Biofilmbildung beeinflussen und zu starken Veränderungen in der Biofilmmzusammensetzung führen.

Literatur

- [1] Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.-C., Wingender, J., *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2003**, 206, 563 – 573.
- [2] Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D., *J. Bacteriol.* **2007**, 189, 7945 - 7947.
- [3] Bressler, D., Balzer, M., Dannehl, A., Flemming, H.-C., Wingender, J., *Wat. Sci. Tech. Wat. Suppl.* **2009**, 9, 81 - 87.
- [4] Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P. H., *Wat. Res.* **1996**, 30, 1749 – 1758.
- [5] Jahn, A., Nielsen, P. H., *Wat. Sci. Tech.* **1995**, 32(8), 157 – 164.
- [6] Wingender, J., Jaeger, K.-E., In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, **2002**, 3, 1207–1223. Edited by G. Bitton. New York: Wiley.

Publikationen

Ergebnisse der Studie wurden während der Förderungsperiode bei den folgenden Tagungen präsentiert:

Michalowski, W. D., Flemming, H.-C., Wingender, J. (2010). Isolation of extracellular polymeric substances from drinking-water biofilms - a critical assessment of standard isolation methods. Poster und Beitrag im Tagungsband der Biofilms IV Konferenz, Winchester/UK.

Alfer, B., **Michalowski, W. D.**, Flemming, H.-C., Wingender, J. (2011). Dynamik der mikrobiellen Population und biochemischen Zusammensetzung von Trinkwasserbiofilmen. Poster und Beitrag im Tagungsband der Wasser 2011 - Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Norderney.

Alfer, B., **Michalowski, W. D.**, Flemming, H.-C., Wingender, J. (2011). Dynamics of microbial populations and biochemical composition of drinking-water biofilms. Vortrag und Beitrag im Tagungsband der IWA Biofilms Conference 2011 - Processes in Biofilms, Shanghai/China.