

**Etablierung und Anwendung einer durchflusszytometrischen
Methode für die Vitalitätsbestimmung von
P. aeruginosa, *B. cepacia* und *S. aureus*
in Mischkulturen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktoringenieur
(Dr.-Ing.)**

von Dipl.-Ing. Marc Rüger

geb. am: 24.04.1982 in Marienberg (Erzgebirge)

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission: PD Dr. Yvonne Genzel (Vorsitz)
Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl (Gutachter)
Prof. Dr. Susann Müller (Gutachterin)
Prof. Dr. Christiana Cordes (Gutachterin)

eingereicht am: 12.04.2016

Promotionskolloquium am: 25.10.2016

Abstract

For species-specific cell counting of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus*, a quantitative method using terminal restrictive fragment length polymorphisms (qT-RFLP) was established in a previous study, which allowed for description of growth dynamics of single species in a mixed model community, relevant to lung infections of Cystic Fibrosis patients. Unfortunately, this method cannot provide viability data. However, knowledge concerning viability of single species is of high interest for antibiotic susceptibility testing in mixed cultures, especially when cell damaging results in a loss of cellular functions, for example membrane integrity, rather than in lysis. Furthermore, combining qT-RFLP analysis with species-specific viability analysis would allow for more detailed description of dynamics in mixed culture and thus it may contribute to a better understanding of the interaction occurring between the species.

In the presented research work, a flow cytometric method was established for the assessment of viability of *P. aeruginosa*, *B. cepacia* and *S. aureus* in mixed cultures by membrane integrity analysis using nucleic acid double staining. Propidium iodide (PI) was used for identification of dead bacteria and SYBR Green I for total bacteria staining. For species-specific determination in mixed cultures, comprising up to three species, the viability staining protocol was combined with immunolabeling of *B. cepacia* and Gram-specific staining of *S. aureus* using fluorescently labeled antibodies and wheat germ agglutinin (WGA), respectively. For optimum staining conditions, the choice of buffer or solution, in which bacteria are suspended, and the applied amount of staining reagent or fluorescently-conjugated protein (antibody or WGA) were crucial. Due to variations between species, for viability determination in mixed culture, staining conditions were defined as a compromise between optimum conditions determined before in pure culture testing.

Finally, for sample preparation and staining, Ringer solution with addition of glutaraldehyde, potassium chloride and bovine serum albumin, and a SYBR Green I dilution of 5×10^3 and a PI concentration of $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ were applied. These conditions allowed for efficient species discrimination using immunofluorescence of *B. cepacia* and Gram-specific labeling of *S. aureus*, and subsequently for proper detection of viable and dead bacteria.

By applying the established four-colour method, viability of *P. aeruginosa*, *B. cepacia* and *S. aureus* was determined in model-mixed cultures during 32 h of cultivation. The mixed cultures comprised two or three species. In parallel with flow cytometric analyses, qT-RFLP analyses were performed for determination of species-specific cell concentrations.

Comparison between pure and mixed culture experiments revealed co-culture effects based on obtained differences for every species in growth dynamics and for *S. aureus* in viability dynamics. Substrate competition and antagonism were recognized in mixed cultures as the major reasons in changing the dynamics. In particular, in mixed cultures with *B. cepacia*, *P. aeruginosa* grew faster and over extended time periods than in pure cultures. Furthermore, for all mixed cultures, growth and viability data suggested an outcompeting of *B. cepacia* and *S. aureus*. Growth of *B. cepacia* was directly inhibited by *P. aeruginosa*, whereas cells of *S. aureus* were damaged by *P. aeruginosa*, which resulted in loss of membrane integrity and cell lysis. In particular, for *S. aureus*, the earlier decrease in viability in mixed cultures with a faster rate in comparison to pure cultures, which resulted in a lower number of viable bacteria, and the decrease in cell number in mixed cultures towards the end of cultivations provided strong evidence for antagonistic interspecies effects from *P. aeruginosa* to *S. aureus* through release (production) of virulence factors. Consequently, *P. aeruginosa* clearly dominated the investigated mixed cultures in terms of cell numbers after 8 h of cultivation.

Overall the obtained results emphasized predominance of *P. aeruginosa* over *B. cepacia* and *S. aureus* in mixed cultures under the applied conditions, due to efficient substrate consumption and effective antagonistic action against the other two species.

For the first time, as provided by the new flow cytometric method, the viability of *P. aeruginosa*, *B. cepacia* and *S. aureus* was assessed during co-cultivation in mixed cultures. Additionally, with the presented study, the potential of flow cytometry for species-specific cell counting in three-species mixed cultures has been demonstrated.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. Udo Reichl, der mir in Magdeburg die Möglichkeit geboten hat, unter hervorragenden Bedingungen meine wissenschaftlichen Arbeiten am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik an der Otto-von-Guericke-Universität sowie am Max-Planck-Institut durchzuführen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei ihm für die anregenden fachlichen Diskussionen, die konstruktive Kritik und die Freiräume bei der Gestaltung meiner Projekte.

Prof. Dr. Christiana Cordes und Prof. Dr. Susann Müller danke ich sehr für ihr Interesse an meiner Arbeit und für die Bereitschaft zur Begutachtung der Dissertation.

Ein großer Dank geht an Corina Siewert und Liane Geisler, die mich im Labor bei der Vorbereitung und Durchführung von Experimenten exzellent unterstützten.

Des Weiteren danke ich Gerald Bensch, Ralf Tüngler und Mandy Ackermann vielmals für die außerordentlich gute Bereitschaft, Motivation und Leistung bei der Bearbeitung und Fertigstellung ihrer Abschlussarbeiten.

Für die Möglichkeit der Nutzung des Durchflusszytometers am Max-Planck-Institut danke ich Dr. Katja Bettenbrock und Andrea Focke.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Kollegen und Freunden Björn Heynisch, Robert Janke, Susann Freund und Jana Rödig für die erfrischenden Gespräche, die „offenen Ohren“, das Feedback und die witzigen Momente.

Mein Dank geht auch an Felicitas Hasewinkel, Claudia Best, Nancy Wynserski und Ruxandra Rehner für ihre Unterstützung im Laboralltag.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Thomas Mund, Annegret Frauendienst und Susann Behling für ihre Hilfe bei der Bewältigung administrativer Aufgaben, sowie bei Robert Rehner, Gerd Schachtschneider und Eigbert Riewald für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei IT-Fragestellungen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Weggefährten des Lehrstuhls und der Fachgruppe Bioprozesstechnik für die angenehme Zeit.

Ein großer Dank geht an meine gesamte Familie, insbesondere an Annelie Rüger, Rita Rödig, Thomas Rödig, Klaus Fiebelkorn und Carola Schachtebeck.

Zu guter Letzt danke ich Jana, der Dame meines Herzens, für die stete mentale Unterstützung, für ihr großes Verständnis und die zeitlichen Freiräume bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

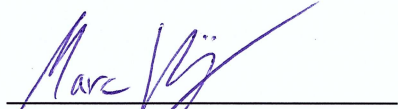
Erklärung zum selbstständigen Arbeiten

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Magdeburg, 09.02.17



Dipl.-Ing. Marc Rüger

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Danksagung	III
Erklärung zum selbstständigen Arbeiten	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	VIII
1. Einleitung und Motivation der Arbeit	1
2. Theoretische Grundlagen	5
2.1. Bakterielle Mischgemeinschaften	5
2.1.1. Lungeninfektionen von Patienten mit Mukoviszidose	5
2.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.1.3. <i>Burkholderia cepacia</i>	8
2.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.1.5. Besonderheiten im Metabolismus von <i>P. aeruginosa</i> und <i>B. cepacia</i>	11
2.1.6. Modell-Mischkulturen für systematische Untersuchungen	12
2.2. Durchflusszytometrische Analyse von Bakterien	13
2.2.1. Allgemeines Prinzip der Durchflusszytometrie	13
2.2.2. Aufzeichnung, Darstellung und Evaluierung der Daten	18
2.2.3. Detektion von Bakterien mittels Fluoreszenzmarkierung	24
2.2.3.1. Intrazelluläre Fluoreszenzmarkierungen	26
2.2.3.2. Extrazelluläre Fluoreszenzmarkierungen	29
2.2.4. Fluoreszenzbasierte Vitalitätsanalyse von Bakterien	32
2.2.4.1. Welche zellulären Vorgänge bestimmen die Vitalität? (Wann ist ein Bakterium tot?)	32
2.2.4.2. Fluoreszenzfärbemethoden zur Vitalitätsbestimmung	33
2.2.4.3. Bestimmung der Vitalität in Mischkulturen	35
3. Material und Methoden	37
3.1. Herstellung von Lösungen, Puffer und Medien	37
3.1.1. Arbeitslösungen und Puffer	37
3.1.2. Medien	41

3.1.3. Farbstofflösungen für die Fluoreszenzmarkierung	42
3.1.4. Weizenkeimagglutinin für die Fluoreszenzmarkierung	42
3.1.5. Antikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung	43
3.2. Bakterienstämme	45
3.3. Kultivierung von Bakterien	45
3.3.1. Kultivierung auf Agarplatten	45
3.3.2. Kultivierung in Schüttelkolben	46
3.3.3. Kultivierung von <i>Campylobacter jejuni</i> für qT-RFLP	48
3.4. Durchflusszytometrische Analyse	49
3.4.1. Messprozedur	50
3.4.2. Probenbehandlung und Färbung	55
3.4.3. Evaluierung durchflusszytometrischer Daten	58
3.5. Weitere analytische Methoden	60
3.5.1. Optische Dichte mittels Spektrophotometrie	60
3.5.2. Spezies-spezifische Konzentration mittels qT-RFLP-Analyse	60
3.5.3. Lebendzellkonzentration mittels Plattenausstrich	62
3.5.4. Bestimmung von Substrat- und Metabolitkonzentrationen	63
3.6. Fluoreszenzmikroskopie von Bakterien	64
3.6.1. Aufnahmen mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510	65
3.6.2. Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135	66
3.7. Statistische Prüfverfahren	67
3.7.1. F-test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen	67
3.7.2. t-Test zum Vergleich von Mittelwerten	68
3.8. Chemikalienliste	69
3.9. Geräte- und Materialienliste	71
4. Ergebnisse	73
4.1. Etablierung durchflusszytometrischer Methoden	73
4.1.1. Immunfluoreszenz zur Spezies-spezifischen Detektion	76
4.1.2. WGA zur Gram-spezifischen Detektion von <i>S. aureus</i>	81
4.1.3. Methode zur Bestimmung der Vitalität	85

4.1.3.1. Optimierung der Vitalitätsfärbung für einzelne Spezies	86
4.1.3.2. Etablierung einer einheitlichen Färbemethode für die Vitalitätsbestimmung in Mischkulturen	94
4.1.4. Sind Bakterien mit intakter Membran vermehrungsfähig?	100
4.1.5. Spezies-spezifische Vitalitätsbestimmung in Mischkulturen	101
4.2. Vitalität und Wachstum in Rein- und Mischkulturen	104
4.2.1. Drei-Spezies-Mischkultur	104
4.2.2. Zwei-Spezies-Mischkulturen	109
4.2.3. Wachstumsanalyse mittels quantitativer DZM	118
5. Diskussion	122
5.1. Methode zur Vitalitätsbestimmung in Mischkulturen	122
5.1.1. Spezies-spezifische Detektion für die Mischkulturanalyse.....	123
5.1.2. Anpassung der Vitalitätsfärbebedingungen an die Spezies.....	125
5.1.3. Vierfarbenprotokoll für die Spezies-spezifische Bestimmung	129
5.2. Effekte der Mischkultivierung auf die Vitalität und das Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i> und <i>S. aureus</i>	132
6. Zusammenfassung	139
7. Ausblick	141
Literaturverzeichnis	143
Abbildungsverzeichnis	158
Tabellenverzeichnis	160
Anhang	i
A1 Eigene Publikationen und sonstige Beiträge	ii
A2 Arbeitsanweisungen	v

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
2-KDG	2-Keto-D-gluconat
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
A/D	Analog-zu-Digital
AHLs	N-Acyl-Homoserin-Lactone
Ala	Alanin
AK	Antikörper
A-T	Adenin-Thymin
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	Amerikanische Mikroorganismen-Kultursammlung (engl. <i>American Type Culture Collection</i>)
Bcc	<i>Burkholderia-cepacia</i> -Komplex
BP	Bandpass
Bp	Basenpaar
BS-1	Banderaea (Griffonia) simplicifolia Lektin 1
BSA	Rinderalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat (engl. <i>cyclic adenosin monophosphate</i>)
CF	Mukoviszidose (engl. <i>cystic fibrosis</i>)
CFDA	Carboxyfluoreszeindiazetat
CFTR	Regulator der Transmembran-Leitfähigkeit bei CF (engl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
Ch	Kanal (engl. <i>channel</i>)
ChD	Durchlichtkanal (Hellfeld)
CHIC	Bildvergleich der zytometrischen Histogramme (engl. <i>Cytometric Histogram Image Comparison</i>)
CoA	Coenzym A
Con A	Concanavalin A
CV	Variationskoeffizient (engl. <i>coefficient of variation</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DiBAC ₄ (3)	bis-(1,3-Dibutyl-Barbitursäure) Trimethinoxonol

DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngige
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DZM	Durchflusszytometrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	Exopolysaccharid
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alteri</i>)
Fc-Region	Fragment-kristallisierbaren Region
FCS	Durchflusszytometrie-Standard-Format (engl. <i>flow cytometry standard</i>)
FLM	Fluoreszenzmikroskopie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter light</i>)
ge	Genomäquivalente (engl. <i>genome equivalents</i>)
Gl.	Gleichung
GlcNAc	N-Acetylglukosamine
Gly	Glyzin
GTA	Glutaraldehyd
GZK	Gesamtzellkonzentration
HFT	Hauptfarbteiler
IgG	Immunoglobulin G
IQS	interner Quantifizierungsstandard
ISAC	Internationale Gesellschaft für Förderung der Zytometrie (engl. <i>International Society of Advancement of Cytometry</i>)
KBE	Koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop (engl. <i>laser scanning microscope</i>)
LB	Luriani Bertani
L-L	unterer Schwellenwert (engl. <i>lower limit</i>)
LP	Langpass
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
LZK	Lebendzellkonzentration

mAK	monoklonaler Antikörper
mMAK	monoklonaler Maus-Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (engl. <i>mean fluorescence intensity</i>)
MIFlowCyt	Mindestangaben eines Durchflusszytometrie-Experiments zur Dokumentation (engl. <i>minimum information about a flow cytometry experiment required for documentation</i>)
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i> (oder auch multiresistente)
MurNAc	Acetylmuraminsäure
NaCl-P	Natrium-Chlorid-Phosphatpuffer
NADS	Nukleinsäuren-Doppelfärbemethode (engl. <i>nucleic acid double staining</i>)
n.d.	nicht detektiert
n.t.	nicht überprüft
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
QS	Populationsdichte-abhängige Genregulation (engl. <i>quorum sensing</i>)
PAK	Primärantikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Natrium-Chlorid-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PHA-P	Phytohämagglutinin
PMA	Propidiummonoazid
PMT	Photonenvervielfacherröhre (engl. <i>photomultiplier tube</i>)
PI	Propidiumiodid
qT-RFLP	quantitative T-RFLP
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (engl. <i>relative fluorescence units</i>)
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
Ringerlösung B_opt	1/4 Ringerlösung mit 0,05 mg mL ⁻¹ GTA, 3 M KCl und 0,05 % BSA
R-PE	R-Phycoerithrin
RT	Raumtemperatur
SAK	Sekundärantikörper
SP	Kurzpass (engl. <i>short pass</i>)
ss	einzelsträngige (engl. <i>single stranded</i>)

SSC	Seitstreulicht (engl. <i>side scatter light</i>)
Tab.	Tabelle
TPE	TRIS-Phosphat-EDTA Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RT	Raumtemperatur
UEA-1	<i>Ulex europeaus</i> Lektin I
UV	Ultraviolett
VZK	vitale Zellkonzentration
WGA	Weizenkeimagglutinin (engl. <i>wheat germ agglutinin</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i>)

Symbol	Bezeichnung	Einheit
A_i	Peakfläche der Spezies i aus Fragmentanalyse (qT-RFLP-Analyse)	-
A_{IQS}	Peakfläche des IQS aus Fragmentanalyse (qT-RFLP-Analyse)	-
C_i	Zellkonzentration der Spezies i	Zellen mL ⁻¹
$C_{iso, i}$	Konzentration mit Isopropanol behandelte Zellen der Spezies i	Zellen mL ⁻¹
$C_{lebensd, i}$	Konzentration lebender Zellen der Spezies i	KBE mL ⁻¹
$C_{total, i}$	Gesamtzellkonzentration der Spezies i	Zellen mL ⁻¹
$C_{T-RFLP, i}$	Zellkonzentration der Spezies i bestimmt mittels qT-RFLP-Analyse	ge mL ⁻¹
$C_{vital, i}$	Konzentration vitaler Zellen der Spezies i	Zellen mL ⁻¹
CV_c	CV der erfassten Signalintensitäten im Messkanal c	%
F	F-Wert für F-Test	-
f	Freiheitsgrad für statistische Prüfverfahren	-
f_i	PCR-Effizienzparameter für Spezies i (qT-RFLP-Analyse)	-
f_{IQS}	PCR-Effizienzparameter für IQS (qT-RFLP-Analyse)	-
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (engl. <i>mean fluorescence intensity</i>)	RFU
N_{DAPI+}	Anzahl DAPI-fluoreszierender Ereignisse	-
N_{IQS}	definierte absolute Zellzahl IQS (qT-RFLP-Analyse)	-
N_{SYBR}	Anzahl SYBR Green I-fluoreszierender Ereignisse	-
$N_{T-RFLP, i}$	absolute Zellzahl der Spezies i bestimmt mittels qT-RFLP-Analyse	ge
OD	optische Dichte	-
OD_{650}	optische Dichte bei 650 nm	-
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm	-
$OD_{650, ref, i}$	Referenz OD_{650} einer Spezies i für Inokulation der Hauptkultur	-
$OD_{650, VK, i}$	gemessene OD_{650} der Vorkultur nach 1,5 h Kultivierung	-
P	Leistung	W
p_i	Anzahl Genkopien im Genom der Spezies i	

P_{IQS}	Anzahl Genkopien im Genom von <i>C. jejuni</i>	-
R^2	Bestimmtheitsmaß einer Regression	-
s_D	Standardabweichung	
$s_{D,c}$	Standardabweichung der erfassten Signalintensitäten im Messkanal c	RFU
s_D^2	Varianz	
t	Zeit	h
t_P	Prüfgröße für t-Test	-
V	Flüssigkeitsvolumen	mL
$V_{Analyse}$	Zählanalysevolumen	mL
V_{Kultur}	Flüssigkeitsgesamtvolumen der Kultur	mL
$V_{2-MK,i}$	Flüssigkeitsvolumen der jeweiligen Spezies i zur Inokulation in Zwei-Spezies-Mischkultur	mL
$V_{3-MK,i}$	Flüssigkeitsvolumen der jeweiligen Spezies i zur Inokulation in Drei-Spezies-Mischkultur	mL
$V_{RK,i}$	Flüssigkeitsvolumen der jeweiligen Spezies i zur Inokulation in Reinkultur	mL
V_{Probe}	Flüssigkeitsvolumen an ausgestrichener Probe für Plattenausstrich	mL
V_{T-RFLP}	Flüssigkeitsvolumen der Probe am Ausgang für qT-RFLP-Analyse	mL
$VF_{Analyse}$	Verdünnungsfaktor aus Verdünnung der behandelten Probesuspension mit MilliQ unmittelbar vor Analyse	-
$VF_{Färbung}$	Verdünnungsfaktor aus Verdünnung der Probesuspension mit Puffer durch Behandlung / Färbung	-
$VF_{seriell}$	Verdünnungsfaktor durch serielle Verdünnung	-
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert	-
$X_{vital, i}$	gemessene relative Häufigkeit vitaler Zellen der Spezies i	-
$X_{vital, definiert, i}$	definierte relative Häufigkeit vitaler Zellen der Spezies i	-
$X_{vital, theoretisch, i}$	theoretische relative Häufigkeit vitaler Zellen der Spezies i	-
$X_{tot, i}$	gemessene relative Häufigkeit toter Zellen der Spezies i	-

$X_{\text{tot, definiert, i}}$	definierte relative Häufigkeit toter Zellen der Spezies i	-
\bar{z}_c	mittlere Lichtintensität der erfassten Signalintensitäten im Messkanal c (geometrischer Mittelwert)	RFU (bei Fluoreszenz)
z_c	Lichtintensität eines Partikels im Messkanal c	RFU (bei Fluoreszenz)

Griechisches Symbol	Bezeichnung	Einheit
ε	Extinktionskoeffizient	$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Φ	Fluoreszenzquantenausbeute	-

1. Einleitung und Motivation der Arbeit

Bakterien kommen bei mikrobiellen Infektionen im Menschen häufig in komplexen Mischgemeinschaften in einer Vielzahl verschiedener Spezies vor. Zwischen den Arten können einseitige oder wechselseitige Beziehungen, wie z.B. Mutualismus, Antagonismus oder Kommensalismus, bestehen bzw. sich ausbilden. Diese bestimmen in erheblichem Maße die Spezies-Zusammensetzung einer bakteriellen Gemeinschaft sowie die zeitliche Entwicklung der Anzahl der Individuen einer jeden Spezies. Folglich können die Beziehungen auch den Verlauf und den Schweregrad einer polymikrobiellen Infektion beeinflussen. Ferner können die Interaktionen zwischen den Spezies der Mischgemeinschaft die Wirksamkeit eingesetzter Antibiotika gegenüber Krankheitserregern im Rahmen der medizinischen Behandlung beeinflussen. Zur besseren Aufklärung der komplexen Vorgänge in bakteriellen Mischgemeinschaften in Infektionen sind somit die Identifikation der Spezies und die Quantifizierung absoluter Spezies-spezifischer Zellzahlen im zeitlichen Verlauf von hohem Interesse. Zudem ist die Erfassung der Vitalität der einzelnen Spezies, insbesondere zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika, von großer Bedeutung. Die Spezies-Zusammensetzung in Mischgemeinschaften kann anhand der Analyse des Terminalen Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP) bestimmt werden, wie bereits in zahlreichen veröffentlichten Studien dargelegt worden ist (Hullar et al. 2006; Katsivela et al. 2005; Kleinsteuber et al. 2008; Liu et al. 1997; Rogers et al. 2003; Thies et al. 2007). Die Studie von Trotha *et al.* ist eine der wenigen Studien, die die T-RFLP zur Quantifizierung absoluter Spezies-spezifischer Zellzahlen einsetzte. Die Einführung eines internen Quantifizierungsstandards (IQS), eines 16S ribosomalen Ribonukleinsäuren- (rRNS) Genfragments einer bekannten Bakterienspezies mit einer definierten Zellzahl, erlaubte die Quantifizierung der Zellzahlen (Trotha et al. 2002). Diese quantitative T-RFLP Methode (qT-RFLP) wurde in der Dissertation von Schmidt für die Bestimmung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration in einer bakteriellen Modell-Mischgemeinschaft, bestehend aus drei für Lungeninfektionen von Mukoviszidose-Patienten relevanten Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und *Staphylococcus aureus*, adaptiert und validiert (Schmidt 2008; Schmidt et al. 2007). Mithilfe dieser Methode wurde das Wachstum der genannten Spezies in definierten Mischkulturen in Chemostat-Kultivierungen im

Bioreaktor charakterisiert. Zudem wurde von Schmidt *et al.* ein mathematisches Modell für das Wachstum im Chemostat entwickelt, welches in Kombination mit den Wachstumsdaten die Identifizierung unbekannter Interaktionen zwischen den Spezies ermöglichte (Schmidt *et al.* 2011). In einer weiterführenden Studie von Riedele und Reichl wurde darüber hinaus die qT-RFLP-Methode zur Untersuchung der Wirksamkeit des Antibiotikums Ceftazidim auf das Wachstum der für Lungeninfektionen von Mukoviszidose-Patienten relevanten Bakterienspezies in definierten Mischkulturen eingesetzt (Riedele and Reichl 2011). Zwar erlaubt die qT-RFLP die quantitative Beschreibung der Wachstumsdynamik der einzelnen Spezies in Mischkulturen, jedoch liefert diese Methode keine Vitalitätsdaten, da die zu quantifizierenden rRNS-Genfragmente aus der gesamten Zellpopulation der jeweiligen Spezies gewonnen werden. Die Vitalität der einzelnen Bakterienspezies ist jedoch bei der Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika von entscheidender Bedeutung, insbesondere wenn die Zellschäden nicht zur Lyse, sondern nur zum Verlust wesentlicher zellulärer Funktionen führen, wie z.B. der Membranintegrität. Der Einsatz der qT-RFLP-Methode in Kombination mit einer Methode zur Bestimmung der Spezies-spezifischen Vitalität würde eine genauere Beschreibung des dynamischen Wachstumsverhaltens der für Lungeninfektionen von Mukoviszidose-Patienten relevanten drei Spezies in der Mischkultur ermöglichen und zum besseren Verständnis der zwischen den Spezies auftretenden Wechselbeziehungen beitragen.

Zur Bestimmung der Vitalität von Bakterien ist die Durchflusszytometrie (DZM) besonders geeignet. Das Laser-basierte Partikelmessverfahren erlaubt eine multidimensionale Darstellung einzelner Zellen durch die simultane Erfassung unterschiedlicher Streulicht- und Fluoreszenzsignale. Durch Anwendung der DZM in Kombination mit der Färbung von Bakterien durch Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die gezielt oder indirekt spezifische zelluläre Funktionen anzeigen, können verschiedene Vitalitätsmerkmale einzelner Zellen nachgewiesen werden, u.a. die Aktivität von Enzymen, die Efflux-Aktivität von Membranpumpen, das energetische Membranpotenzial oder die Membranintegrität (Hammes *et al.* 2011). Darüber hinaus ermöglicht der Einsatz fluoreszenzmarkierter Spezies-spezifischer Markermoleküle zur Färbung von Bakterien, z.B. monoklonaler Antikörper, den Nachweis der Spezies mit der durchflusszytometrischen Analyse.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Spezies-spezifischen Vitalität der für Lungeninfektionen von Mukoviszidose-Patienten relevanten Bakterienspezies *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturen unter Anwendung der DZM. Die Vitalität der Bakterien wurde durch den Nachweis der Membranintegrität der Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. In Anlehnung an die Studien anderer Autoren erfolgte die Vitalitätsbestimmung anhand der Doppelfärbung der Bakterien mit den Nukleinsäuren-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen SYBR Green I und Propidiumiodid (PI) (Barbesti et al. 2000; Gregori et al. 2001). PI diente zur Identifikation toter Zellen mit permeabilisierter Membran, SYBR Green I hingegen zur Färbung aller Zellen. Somit konnten tote und vitale Bakterien mit permeabilisierter bzw. intakter Membran gleichzeitig nachgewiesen werden. Zwingende Voraussetzung für die Spezies-spezifische Bestimmung der Vitalität in Mischkulturen war die Diskriminierung der Bakterien in der Analyse nach Spezies. Dazu wurden in der hier vorliegenden Arbeit verschiedene kommerziell verfügbare monoklonale Antikörper zur Immunfluoreszenzdetektion zum Spezies-spezifischen Nachweis von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* getestet. Ausgehend davon wurde für die DZM eine Färbemethode zur Spezies-spezifischen Detektion von *B. cepacia* etabliert. Zusätzlich wurde eine Färbemethode zum Gram-spezifischen Nachweis von *S. aureus*, unter Anwendung des fluoreszenzmarkierten Lektins Weizenkeimagglutinin (WGA, engl. *wheat germ agglutinin*), erarbeitet. Die Kombination beider Färbemethoden mit der SYBR Green I / PI - Vitalitätsfärbung erlaubte die Diskriminierung der drei relevanten Spezies in Mischkulturproben in der durchflusszytometrischen Analyse.

Da sich die drei relevanten Spezies hinsichtlich ihres Zellwandaufbaus und ihrer metabolischen Fähigkeiten voneinander unterscheiden, wurden die Bedingungen der Vitalitätsfärbung, z.B. die Fluoreszenzfarbstoffkonzentration, zunächst für jede einzelne Spezies angepasst. Möglicherweise beeinflusst darüber hinaus der physiologische Zustand der Bakterien die Penetration der Farbstoffe in die Zelle aber auch die Wechselwirkung der Farbstoffe mit dem biologischen Zielmolekül (Comas and Vives-Rego 1998). Es wurden deshalb Färbetests für jede Spezies mit Bakterien aus unterschiedlichen Wachstumsphasen durchgeführt.

Zur Bestimmung der Vitalität der Bakterien in Mischkulturen mit einem einheitlichen Färbeprotokoll wurden Kompromissbedingungen anhand der zuvor für die jeweilige Spezies ermittelten optimalen Bedingungen definiert und auf deren Eignung für jede

Spezies überprüft. Hierbei wurde auch die Kompatibilität mit den etablierten zwei Färbemethoden zur Speziesdiskriminierung berücksichtigt. Als Resultat wurde ein fluoreszenzbasiertes Vierfarbenprotokoll für die DZM etabliert. Unter Anwendung der etablierten Methode wurde die Vitalität von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Modell-Mischkulturen im Schüttelkolben, bestehend aus zwei bzw. drei Spezies, charakterisiert. Zusätzlich wurde das Wachstum der Spezies mittels der in der Fachgruppe etablierten qT-RFLP Methode bestimmt. Da in Mischkulturen auch Interaktionen zwischen den Spezies in Abhängigkeit von den zur Verfügung stehenden Substraten auftreten können, u.a. durch Konkurrenz um ein Substrat, wurden in den Drei-Spezies-Kulturen zusätzlich die Konzentration wichtiger Substrate und Metabolite im Medium mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) sowie enzymatischer Methoden quantifiziert.

Ziel der zusammengefassten Analysen war die umfassende Untersuchung des Einflusses der Mischkultivierung auf die Vitalität und das Wachstum der einzelnen Spezies während der Kultivierung.

Wesentliche Inhalte der vorgelegten Arbeit wurden vom Autor in begutachteten internationalen Fachmagazinen in englischer Sprache in Erst-Autorenschaft veröffentlicht (Rüger et al. 2014; Rüger et al. 2012). Im Anhang der Arbeit ist eine detaillierte Übersicht an relevanten wissenschaftlichen Beiträgen des Autors dargestellt.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Bakterielle Mischgemeinschaften

Gegenstand der Untersuchungen war eine Modell-Mischkultur, bestehend aus zwei oder drei unterschiedlichen Bakterienspezies, definiert zusammengesetzt aus den Stämmen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Burkholderia cepacia* DSM 7288 und *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Die Spezies kommen als Erreger polybakterieller Infektionen der Lunge von Mukoviszidose-Patienten vor.

In der Dissertation von Schmidt, wurden die drei genannten Bakterienstämme für die Modell-Mischkultur aufgrund vergleichbarer Wachstumscharakteristika ausgewählt. Vorausgegangen waren Kultivierungstests mit acht unterschiedlichen für Lungeninfektionen von Mukoviszidose-Patienten relevanten Stämme (fünf Spezies, insgesamt acht Stämme, (Schmidt 2008)).

2.1.1. Lungeninfektionen von Patienten mit Mukoviszidose

Die drei Spezies *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* zählen zu den wesentlichen Erregern polybakterieller Infektionen der Lunge von Menschen mit der Erbkrankheit Mukoviszidose (Synonym: Zystische Fibrose, CF, engl. *cystic fibrosis*) (Gilligan 1991). CF ist die am häufigsten vorkommende autosomal-rezessiv vererbte Krankheit in der mitteleuropäischen Bevölkerung. Einem Bericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. *World Health Organisation*) zufolge tritt diese in Europa in einem von 2000 bis 3000 Fällen bei Neugeborenen auf (WHO Report 2002). Die Krankheit wird durch einen Defekt im Gen des Transmembranproteins CFTR, dem sogenannten Regulator der Transmembran-Leitfähigkeit bei CF (CFTR, engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) hervorgerufen (Riordan et al. 1989). Das Protein CFTR stellt einen Chloridionen-Kanal in der Zellmembran von Epithelzellen exokriner Organe dar (Drumm et al. 1990) und dient darüber hinaus zur Regulation anderer Ionen-Kanäle (Greger et al. 1996). Infolge des Gendefekts fällt die Aktivierbarkeit des Kanals durch intrazelluläres zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP, engl. *cyclic adenosin monophosphate*) aus (Frizzell et al. 1986; Reinhardt et al. 2001). Das hat im Wesentlichen die Störung des transmembranen Chlorid- und Natriumionentransports in den Epithelzellen aller exokrinen Organe zur Folge. Der dadurch gestörte

Elektrolytausgleich führt zur Austrocknung und Erhöhung der Viskosität des Flüssigkeitsfilms im extrazellulären Raum. Davon sind die Schleimhäute der unteren Atemwege von CF-Patienten schwer betroffen. Hier kann der zähe Schleim nur schwer abfließen und behindert somit den Abtransport von Fremdkörpern aus der Lunge. Die sogenannte mukoziliäre Klärung, ein Mechanismus der angeborenen Immunantwort, wird besonders beeinträchtigt (Knowles and Boucher 2002; Puchelle et al. 2002). Dieser Vorgang begünstigt maßgeblich die Besiedlung der im Normalfall keimfreien Schleimhaut mit Bakterien unterschiedlicher Spezies. Hierbei reichern sich insbesondere humanpathogene Bakterienarten an, welche Infektionen der Lungenschleimhäute hervorrufen (Ulrich et al. 1998; Worlitzsch et al. 2002). An der Stelle sei erwähnt, dass in der Literatur neben der Beeinträchtigung der mukoziliären Klärung weitere Ursachen für die Etablierung bakterieller Lungeninfektionen bei CF-Patienten beschrieben werden. Hierzu wird der Leser auf veröffentlichte Literaturübersichten (Döring and Gulbins 2009; Gibson et al. 2003; Hauser et al. 2011; Lyczak et al. 2002) verwiesen. Mit zunehmendem Krankheitsverlauf werden die Lungeninfektionen meist chronisch mit schwerwiegenden Folgen für den Gesundheitszustand der CF-Patienten. Die chronische Infektion führt zu permanenten Entzündungsreaktionen des Immunsystems, die mit fortschreitender Krankheitsdauer zur Schädigung des Lungengewebes und dem allmählichen Rückgang der Lungenfunktion führt (Tümmler and Kiewitz 1999; Yang et al. 2011). Der daraus resultierender Ausfall der Lungenfunktion stellt die häufigste Todesursache von CF-Patienten dar (George et al. 2009).

Bakterielle Lungeninfektionen werden im Falle von CF in der Regel mit Antibiotika intensiv behandelt, können jedoch dadurch bisher nur eingedämmt werden. Chronische Lungeninfektionen bleiben den Patienten ein Leben lang erhalten (Yang et al. 2011). Die Eliminierung der Infektion wird im Wesentlichen durch das Auftreten antibiotika-resistenter pathogener Stämme erschwert (George et al. 2009; Lyczak et al. 2002). Zudem können in chronischen Infektionen im Zuge der Adaptation der Bakterien an das Schleimhautmilieu durch genetische Variation im Phänotyp-veränderte Zellen auftreten, welche mitunter Biofilme bilden können, die gegen Antibiotika zusätzlichen Schutz bieten (Hauser et al. 2011; Lyczak et al. 2002).

Lungeninfektionen im Zusammenhang mit CF sind, wie bereits eingangs erwähnt, polybakteriell. Diese Infektionen werden in klinischen Studien am häufigsten mit den Arten *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *Haemophilus influenzae* assoziiert

(Gilligan 1991; Harrison 2007). Die Zusammensetzung dieser Mischgemeinschaften ändert sich im Laufe der Krankheit. Während *H. influenzae* und *S. aureus* oft bei Patienten im Kindesalter vorkommen, treten *B. cepacia* und *P. aeruginosa* häufiger bei erwachsenen Patienten auf (Yang et al. 2011).

Aktuelle Studien in Anwendung neuer kulturunabhängiger-molekularbiologischer Nachweismethoden, wie z.B. der T-RFLP, berichten dagegen häufiger von Spezies-reicherer Mischgemeinschaften bei Lungeninfektionen von CF-Patienten (Harris et al. 2007; Rogers et al. 2003; Rogers et al. 2010; Sibley et al. 2008). Die Untersuchung des Einflusses der Spezies-Zusammensetzung der Mischinfektionen auf den Krankheitsverlauf wird in diesem Zusammenhang zunehmend in den Fokus neuer Fachstudien gestellt (Klepac-Ceraj et al. 2010; Zemanick et al. 2011).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass polybakterielle Infektionen der unteren Atemwege im Zusammenhang mit CF die Regel sind (Yang et al. 2011). Des Weiteren hat in hohem Maße das Auftreten von Wechselwirkungen zwischen den Spezies eine Änderung der Spezies-Zusammensetzung im zeitlichen Verlauf von Mischinfektionen zur Folge.

2.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Als Vertreter der Gattung *Pseudomonas* sind die Bakterien der Spezies *P. aeruginosa* stäbchenförmig, Gram-negativ, monopolar polytrich begeißelt und bilden keine Sporen aus. Zudem wachsen die Bakterien fakultativ anaerob und betreiben chemoorganotrophen Energiestoffwechsel. Für *P. aeruginosa* ist die Bildung von wasserlöslichen fluoreszierenden Pigmenten, u.a. von Phenazinen, charakteristisch (Fuchs and Schlegel 2007).

Die Spezies ist human pathogen und kommt ubiquitär in feuchten Habitaten in der Umwelt vor, tritt aber auch vermehrt in Krankenhäusern in Waschbecken, Toiletten, und Duschen auf (Steinmetz 2009). *P. aeruginosa* tritt häufig beim Menschen als Erreger von Krankenhausinfektionen, u.a. Harnwegs-, Wund- und Lungeninfektionen, sowie von Infektionen im Zusammenhang mit Grundkrankheiten, u.a. Erbkrankheiten, auf (Steinmetz 2009). Bei CF-Patienten gelten die Bakterien dieser Spezies als Haupterreger chronischer Infektionen der Lungen (Gilligan 1991; Govan and Deretic 1996; Hauser et al. 2011). Die Spezies ist bekannt für die Bildung einer Vielzahl von Virulenzfaktoren, die maßgeblich zur Pathogenese von Infektionen im Menschen

beitragen. Zu den Faktoren zählen Exotoxine, Proteasen, Pigmente und Glykolipide (Döring 1987). Bakterien dieser Spezies können Exopolysaccharid- (EPS-) Schichten, im Wesentlichen aus Alginat, an der äußeren Zellmembran ausbilden. Diese Schicht dient den Zellen als Schutz, z. B. gegen andauernden oxidativen Stress oder permanenter Angriffe des Immunsystems der Wirtszellen (Simpson et al. 1988; Simpson et al. 1989), sowie zur Adhäsion an Oberflächen, z.B. an Epithelzellen (Doig et al. 1987; Ramphal and Pier 1985). Bei chronischen Infektionen mit *P. aeruginosa* ist die Überproduktion von Alginat charakteristisch, welche zu einem mukösem Phänotyp führt (Steinmetz 2009). *P. aeruginosa* ist gegen eine Vielzahl von Antibiotika intrinsisch resistent bzw. ist in der Lage neue Resistenzen bei anhaltender Behandlungen mit Antibiotika durch genetische Adaptation auszubilden (Yang et al. 2011). In dem Zusammenhang ist die Expression von Multi-Efflux-Pumpensystemen von *P. aeruginosa* hervorzuheben, die zum aktiven Auspumpen von Antibiotika und anderen Molekülen aus der Zelle führen (Hauser et al. 2011; Li et al. 1994; Lyczak et al. 2002; Poole 2001).

Darüber hinaus sind *P. aeruginosa* zur Populationsdichte-abhängigen Genregulation (QS, engl. *quorum sensing*) befähigt. Die Populationsdichte wird zwischen den Zellen mittels freigesetzter chemischer Botenstoffe, sogenannter N-Acylhomoserine lactone, vermittelt (Riedel et al. 2001). Systeme des QS sind maßgeblich an der Regulierung der Expression von Virulenzfaktor-Genen sowie Biofilm-assoziiierter Gene beteiligt (Whitehead et al. 2001).

2.1.3. *Burkholderia cepacia*

In der Gruppe *Burkholderia-cepacia*-Komplex (Bcc) werden nah miteinander verwandte Spezies der Gattung *Burkholderia* (bis 1992 *Pseudomonas*, (Yabuuchi et al. 1992)), u.a. *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, zusammengefasst. Den Autoren Drevinek und Mahenthiralingam zufolge wird zwischen 17 genetisch verschiedenen, aber phänotypisch vergleichbaren Spezies unterschieden (Drevinek and Mahenthiralingam 2013). Vertreter dieser Gruppe sind Gram-negativ, stäbchenförmig, polytrich polar begeißelt und bilden keine Sporen aus. Zum Wachsen wird Sauerstoff vorausgesetzt (obligatorisch aerob) und die Energiegewinnung erfolgt chemoorganotroph (Govan et al. 1996). Die Spezies ist für

ihre hohe Vielseitigkeit hinsichtlich der zu verwertenden organischen Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle bekannt (Madigan and Martinko 2006).

Bakterien des Bcc kommen ubiquitär in der Umwelt vor: in Böden, im Wasser und an Pflanzen. Sie treten aber auch häufig in Krankenhäusern in kontaminierten Desinfektionslösungen und auf medizinischen Geräten und Materialien auf. Vertreter der Bcc gelten als human pathogen und lösen vor allem Infektionen bei immungeschwächten Patienten aus. So kommen Lungen, Weichteil- und Wundinfektionen sowie Blutvergiftungen und Harnwegsinfektionen, insbesondere in Krankenhäusern in Verbindung mit dem Einsatz von Kathetern, vor (Steinmetz 2009). Darüber hinaus kommen Bcc-Bakterien in chronischen Infektionen der Lunge von CF-Patienten vor (Govan and Deretic 1996). Die Spezies sind in der Lage eine große Vielzahl extrazellulärer Virulenzfaktoren zu bilden. Zu den Faktoren zählen Exotoxine, Proteasen, Lipasen und Siderophore, welche zur Pathogenese bei Infektionen im Menschen beitragen (Mahenthiralingam et al. 2005). Bakterien des Bcc weisen darüber hinaus eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika auf (LiPuma 1998). Zur Resistenz tragen mitunter Lipopolysaccharide (LPS) an der äußeren Zellmembran (Vinion-Dubiel and Goldberg 2003), Multi-Efflux-Pumpensysteme (Rushton et al. 2013) und die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen (Van Acker et al.) bei.

Bakterien des Bcc sind zum QS befähigt. So wird die Expression von einer Vielzahl von Virulenzfaktor-Genen durch QS reguliert (Venturi et al. 2004).

2.1.4. *Staphylococcus aureus*

Als Vertreter der Gattung *Staphylococcus* sind die Bakterien der Spezies *S. aureus* kugelförmig (kokkoid), Gram-positiv, nicht sporulierend und unbeweglich (Fuchs and Schlegel 2007; landolo 2000). Die Zellen tendieren zur Aggregation, in Form von Trauben oder Haufen (Shapiro 2001). Staphylokokken weisen im Allgemeinen eine sehr hohe Toleranz gegenüber Trockenheit und hohen Salzgehalten auf (Madigan and Martinko 2006). Als Gram-positive Bakterium ist die Zellwand von *S. aureus* nicht von einer äußeren Membran umgeben. Die Zellwand besteht im Wesentlichen aus quervernetzten Peptidoglykanschichten, aus Teichonsäuren, Lipoteichonsäuren und Proteinen (Abb. 1 (A)). Das Peptidoglykanrückgrat besteht aus sich wiederholenden β -1,4 verknüpften N-Acetylglukosaminen und N-Acetylmuramin-

säuren (Fuchs and Schlegel 2007). Im Falle von *S. aureus* sind die nahbeieinander liegenden Tetrapeptidseitenketten von N-Acetylmuraminsäure, wie in Abb. 1 (B) dargestellt, durch Pentaglyzinbrücken quervernetzt (Iandolo 2000). Die Peptidoglykanschicht stellt ein gutes Angriffsziel für die Fluoreszenzmarkierung der Zellen mittels Lektinen dar. Ein weiteres Charakteristikum für *S. aureus* stellt die Bildung von Koagulase dar, welche diagnostisch zur Identifizierung der Spezies in der Klinik genutzt wird (Gatermann 2009).

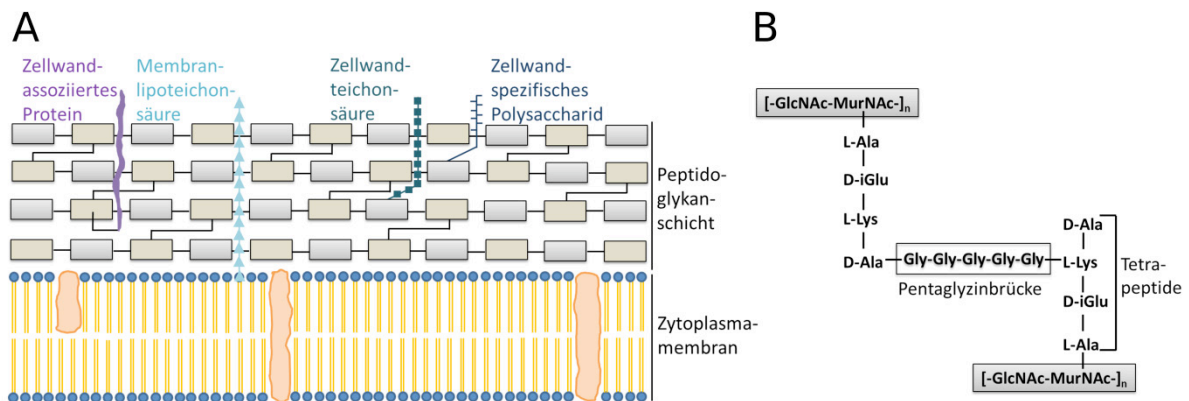


Abb. 1 Zellwand von *S. aureus*.

(A) Zellwandstruktur Gram-positiver Bakterien (Fuchs and Schlegel 2007), modifiziert). Peptidoglykanrückgrat besteht aus alternierenden β -1,4 verknüpften N-Acetylglucosaminen (GlcNAc, graue Rechtecke) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc, beige Rechtecke). **(B)** Peptidoglykanquervernetzung in der Zellwand von *S. aureus* ((Navarre and Schneewind 1999), modifiziert). Nahbeieinander liegende Tetrapeptidseitenketten von N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) sind über Pentaglyzinbrücken miteinander verbunden.

Bakterien der Spezies *S. aureus* wachsen fakultativ anaerob und betreiben chemoorganotrophen Stoffwechsel (Gatermann 2009). Hexosen wie Glukose werden über die Glykolyse und den Pentose-Phosphat-Weg zu Pyruvat abgebaut (Strasters and Winkler 1963). Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat oxidativ zu Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA) decarboxyliert (Gardner and Lascelles 1962). Während des Wachstums wird Adenosintriphosphat (ATP) vorwiegend durch Abbau von Acetyl-CoA zu Acetat gewonnen (Somerville et al. 2003). Unter anaeroben Bedingungen dagegen wird Pyruvat zur Gewinnung von ATP zu Laktat reduziert (Ferreira et al. 2013).

Die Spezies *S. aureus* ist human pathogen und kommt ubiquitär vor: in Böden, Staub, Luft, im Wasser sowie in Lebensmitteln, vor allem in Milchprodukten (Iandolo 2000). Darüber hinaus kolonisieren sie oftmals die Haut und Schleimhäute des

Menschen (Gatermann 2009). Bakterien der Spezies *S. aureus* sind häufig Erreger von lokalen Hautinfektionen, die oberflächlich-eitrig (Pickel, Abszesse, Pustelflechte (Impetigo)) verlaufen. Bei Menschen mit geschwächter Immunabwehr können tief-invasive Infektionen verursacht werden (Gatermann 2009). Letztere werden häufig im Krankenhaus ausgehend von Wundinfektionen, u.a. durch direkten Kontakt mit den Händen des medizinischen Personals bei der Versorgung der Wunden, aber auch systemisch, u.a. durch das Legen von Kathedern, hervorgerufen. Diese Infektionen können zur Entzündung der Atemwege (Sinusitis, Pneumonie), der Gelenke (Arthritis), des Knochenmarks (Osteomyelitis), des Herzens (Karditis), der Hirnhaut (Meningitis) oder zu Blutvergiftungen (Sepsis) führen (Madigan and Martinko 2006). Zudem kommen Infektionen mit *S. aureus* beim Menschen im Zusammenhang mit Erbkrankheiten vor. *S. aureus* gehört zu den wesentlichen Erregern von Infektionen der Lunge von CF-Patienten (Gilligan 1991). Darüber hinaus werden Bakterien dieser Spezies auch mit Lebensmittelvergiftungen oder der Erkrankung am toxischen Schocksyndrom assoziiert (Gatermann 2009). Für die Pathogenese dieser Krankheiten ist die ausgeprägte Fähigkeit von *S. aureus* zur Bildung einer Vielzahl extrazellulärer Virulenzfaktoren, wie Exotoxine, Proteasen und Lipasen (Iandolo 2000), von großer Bedeutung.

Bakterien der Spezies sind von Natur aus gegenüber β -Laktam-Antibiotika (Penicillin, Cephalosporine) empfindlich (Gatermann 2009). Jedoch sind in Krankenhäusern Stämme mit Resistenzen durch die vermehrte und jahrelange Antibiotikatherapie von *S. aureus* Infektionen aufgekommen. Dazu zählen die in der Klinik sehr häufig auftretenden Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Stämme, auch multi-resistent genannt, die zusätzlich gegenüber Antibiotika anderer Klassen resistent sind (Gatermann 2009).

2.1.5. Besonderheiten im Metabolismus von *P. aeruginosa* und *B. cepacia*

Im Falle von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* ist die Umwandlung von Glukose zu 6-Phosphogluconat über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege charakteristisch (Lessie and Phibbs 1984). Zum einen kann Glukose direkt im Zytosol durch Phosphorylierung und anschließende Oxidation vom Zwischenprodukt Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconat umgewandelt werden. Zum anderen

kann die Glukose extrazellulär im Periplasma durch membrangebundene Hydrogenasen zu Gluconat bzw. über Gluconat zu 2-Keto-D-gluconat (2-KDG) oxidiert werden (Roberts et al. 1973). Sowohl Gluconat als auch 2-KDG können über transmembrane Transporter-Systeme ins Zellinnere aufgenommen werden. Gluconat und 2-KDG können ferner im Zytosol durch Phosphorylierung bzw. durch Phosphorylierung und anschließender Oxidation zu 6-Phosphogluconat umgewandelt werden (Roberts et al. 1973), welches dann weiter über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut werden kann (Lessie and Phibbs 1984).

2.1.6. Modell-Mischkulturen für systematische Untersuchungen

Die Kultivierungsbedingungen der in dieser Studie untersuchten Modell-Mischkulturen unterscheiden sich von den für die Lungeninfektion von CF-Patienten charakteristischen *in vivo* Bedingungen. Da sich die polybakterielle Lungeninfektion in einem Patienten einzigartig verhält können systematischen Studien zur Erfassung der (Wachstums-) Dynamik der einzelnen Spezies in einem oder in mehreren Patienten als parallele und reproduzierbare Experimente *in vivo* kaum durchgeführt werden. Es variiert z.B. die Zusammensetzung der Spezies in der Infektion in Abhängigkeit von der bisherigen Therapie sowie vom Alter des Patienten (Klepac-Ceraj et al. 2010; Renders et al. 2001). Die Modell-Mischkultur hingegen erlaubt, auch wenn die Vergleichbarkeit zu einer polybakteriellen *in vivo* Lungeninfektion nur teilweise gegeben ist, die Co-Kultivierung drei für CF-relevanter Bakterienstämme unter definierten und kontrollierten Wachstumsbedingungen, z.B. bei identischen spezifischen Wachstumsraten im Bioreaktor im Chemostat (Schmidt et al. 2007). Diese Modell-Mischkulturen stellen somit geeignete Versuchsanordnungen zur systematischen Untersuchung des Einflusses der Co-Kultivierung auf das Wachstum und der Vitalität der einzelnen Spezies dar. Darüber hinaus kann der Effekt von Antibiotika auf die einzelnen Spezies in Mischkulturen untersucht werden (Riedele and Reichl 2011; Schmidt et al. 2011). Des Weiteren eignet sich die Versuchsanordnung auch zur systematischen Untersuchung von Wechselbeziehungen zwischen den Spezies, z.B. durch die zeitliche Erfassung des Niveaus der Expression relevanter Proteine mittels Proteom-Analyse (Kluge et al. 2012). An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass *in vitro* Tests in der klinischen Forschung zur Untersuchung der Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber

Antibiotika in der Regel mit Reinkulturen durchgeführt werden. In polybakteriellen Infektionen wie in der Lunge von CF-Patienten kann jedoch durch Wechselwirkungen zwischen den Spezies u.a. der Effekt von Antibiotika reduziert aber auch begünstigt werden. Dieses Phänomen kann in Reinkulturversuchen nicht erfasst werden. Die Bedeutung einer Durchführung von Antibiotika-Empfindlichkeitstests in Mischkulturen anstatt in Reinkulturen, insbesondere den zusätzlichen Erkenntnisgewinn durch Mischkulturversuche, spiegeln die Ergebnisse einer Studie von Riedele und Reichl wider. Die Autoren stellten in Mischkulturen mit *B. cepacia* und *S. aureus*, eine erhöhte Wirksamkeit des β -Lactam-Antibiotikums Ceftazidim gegen *P. aeruginosa* im Vergleich zur Reinkultur fest (Riedele and Reichl 2011).

2.2. Durchflusszytometrische Analyse von Bakterien

2.2.1. Allgemeines Prinzip der Durchflusszytometrie

Die DZM stellt ein technisches Partikelmessverfahren dar, das die Quantifizierung einzelner Partikel sowie die multiparametrische Charakterisierung einzelner Partikel hinsichtlich physikalischer und biologischer Merkmale erlaubt. Diese Technik wird vorwiegend mit der fluoreszenzbasierten Analyse biologischer Partikel, meist eukaryotischer oder prokaryotischer Zellen, assoziiert. Die Partikel einer Probesuspension werden im Wesentlichen mittels eines Flüssigkeitshüllstroms vereinzelt und wie in der am häufigsten vorkommenden technischen DZM-Konfiguration durch einen oder mehrere Lichtstrahl(en) geführt. Beim Durchqueren der Partikel werden verschiedene Streulicht- und Fluoreszenzsignale simultan detektiert. Letzteres setzt die Markierung der Partikel mit entsprechenden Farbstoffen oder eine Eigenfluoreszenz voraus. Bei der Untersuchung von Zellen ermöglichen Fluoreszenzmarkierungen, welche gezielt oder indirekt zelluläre Merkmale, Strukturen oder Funktionen anzeigen, die Charakterisierung bzw. die Klassifizierung von Zellpopulationen hinsichtlich struktureller oder physiologischer Eigenschaften. Streulichtsignale können zudem Aufschluss über die Struktur von Zellen, wie Morphologie und Granularität, geben.

Als Alternative zur fluoreszenzbasierten Technik existieren Durchflusszytometer bei der die vereinzelt Partikel mittels eines Hüllstromes durch ein elektrisches Feld geführt werden. Die Erfassung der Änderung des elektrischen Feldes durch die Zelle erlaubt die Quantifizierung von Zellen sowie die strukturelle Charakterisierung von

Zellpopulationen (Coulter-Zähler oder auch Impedanz-basierte DZM, (Cheung et al. 2010; David et al. 2012)).

Da in dieser Arbeit die fluoreszenzbasierte Technik zur Vermessung fluoreszenzmarkierter Bakterienzellen eingesetzt wurde, wird nachfolgend ausschließlich auf dieses durchflusszytometrische Verfahren eingegangen.

Ein Durchflusszytometer besteht grundlegend, wie in Abb. 2 schematisch dargestellt, aus strömungstechnischen, optischen und elektronischen Bauteilen einschließlich eines Computers zur Steuerung, Visualisierung und Evaluierung der Messungen. Nachfolgend wird das Funktionsprinzip der DZM anhand der wesentlichen Bauteile des Messgerätes erläutert.

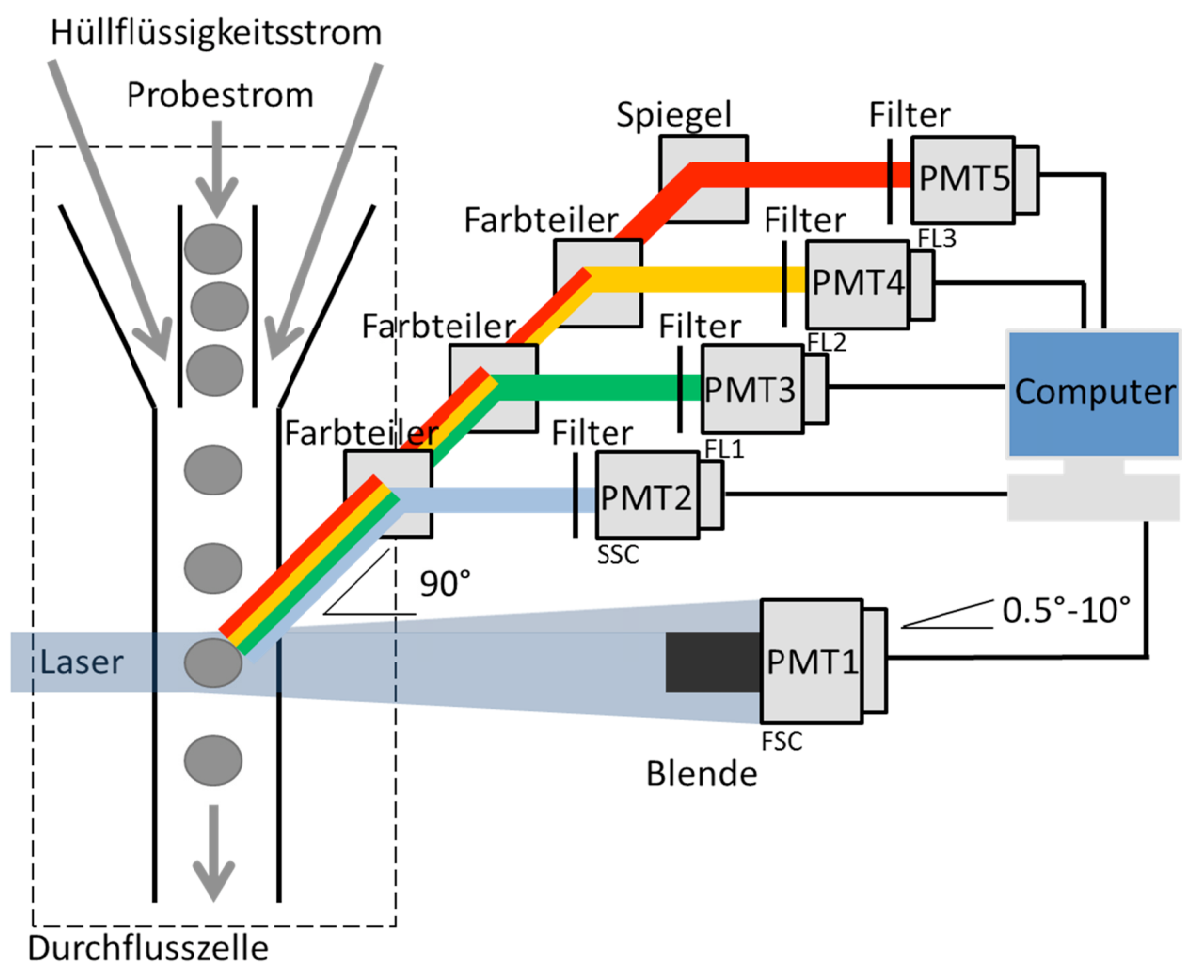


Abb. 2 Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.

Messgerät für fluoreszenzbasierte multiparametrische Analyse einzelner Zellen. Konfiguration für fünf Messparameter. Detektoren sind Photonenvervielfacher-Röhren (PMT, engl. *photomultiplier tube*): PMT1 für Vorwärtstreulicht (FSC, engl. *forward scatter light*); PMT2 für Seitstreulicht (SSC, engl. *side scatter light*); PMT3 für grüne Fluoreszenz (FL1); PMT4 für orange Fluoreszenz (FL2); PMT5 für rote Fluoreszenz (FL3).

Voraussetzung für die Messung ist ein Hüllflüssigkeitsstrom (engl. *sheath fluid stream*), der aus einem Reservoir durch Ansaugen von Luft über einen Schlauch durch die Durchflusszelle (Abb. 2) gepumpt wird. In der Durchflusszelle wird die Probesuspension zentriert in einem schneller fließenden, laminaren Hüllflüssigkeitsstrom zur Vereinzelung und zur Förderung der Zellen zum Lichtstrahl eingeleitet (hydrodynamische Fokussierung). Die Probe wird entweder direkt durch eine motorbetriebene Spritze eingesogen oder durch das Einleiten eines Luftstroms in das Probengefäß, bei luftdichtverschließbarem Proben-Anschluss, in die Durchflusszelle gepumpt. Durch Verringerung des Durchmessers des Flüssigkeitskanals in der Durchflusszelle, in Richtung des Lichtstrahls, wird der Fluss beider Ströme (Probenstrom umgeben von Hüllflüssigkeitsstrom) erhöht. So werden die Zellen vereinzelt und wie Perlen an einer Schnur gereiht durch den Lichtstrahl geführt (Abb. 2). Laser dienen in der Regel als Lichtquelle, da diese stark gebündeltes Licht mit einer definierten Wellenlänge (monochromatisch) und hoher Energieleistung erzeugen. Je nach technischer Konfiguration des Gerätes sind ein oder mehrere Laser eingebaut. Mithilfe kreuzzyklischer Linsen wird der Laserstrahl gebündelt und auf einem festen Punkt in der Durchflusszelle gelenkt (Givan 2001), der von den Zellen durchquert wird. Am sogenannten Messpunkt trifft der Laserstrahl auf die Zelle. Der Flüssigkeitsstrom verläuft im rechten Winkel zum Laserstrahl (Abb. 2). Bei mehreren Lasern werden die einzelnen Strahlen in der Regel auf verschiedene, in Richtung des Probenflusses, aufeinanderfolgende Messpunkte fokussiert. Durchqueren die Zellen den Messpunkt, wird das Licht des Lasers an den Zellen gestreut bzw. von den Zellen, z.B. durch intrazelluläre Kompartimente, gebrochen. Das Streulicht und das gebrochene Licht, im Folgenden zusammen als Streulicht bezeichnet, werden in einem vorderen Winkelbereich sowie im rechten Winkel zum durchstrahlenden Laserlicht über Linsen und Detektoren abgegriffen. Streulichtsignale im vorderen Winkelbereich, in der Regel zwischen $0,5^\circ$ und 10° (Shapiro 2000b), werden als Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter light*) bezeichnet und sind u.a. abhängig von der Größe der durchleuchteten Zelle. Das Signal korreliert aber nicht direkt mit der Zellgröße, da es auch vom Brechungsindex zwischen Zelle und umgebenden Medium abhängt. Das FSC ist daher als Größenrelevant zu betrachten. Die Streulichtsignale im 90° Winkel werden als Seitstreulicht (SSC, engl. *side scatter light*) bezeichnet. Das SSC wird durch eine Kombination aus Lichtbrechung im Inneren der Zelle zwischen den intrazellulären Kompartimenten

und Streuung an granulösen Zellstrukturen hervorgerufen (Shapiro 2003). Das SSC stellt daher ein „abstraktes Maß für die Granularität“ (Schulze-Horsel 2011) sowie für den inneren Gehalt der Zelle (Shapiro 2001) dar. Neben der Streulichtmessung erlaubt die DZM die Detektion von Fluoreszenzsignalen bei vorausgegangener Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit Fluoreszenzfarbstoffen-konjugierter Marker. Durchqueren die Zellen den Messpunkt, werden die Fluoreszenzfarbstoffe mittels des Laserlichts angeregt und emittieren Licht höherer Wellenlängen (Fluoreszenz) in einem für den Farbstoff spezifischen Wellenlängenbereich. Dieses Spektrum ist abhängig von der Wellenlänge des Laserstrahls sowie von den Anregungs- und Emissionscharakteristika des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffs. Die Fluoreszenzsignale werden wie das SSC im 90° Winkel zum durchstrahlenden Laserlicht über Linsen und Detektoren abgegriffen (Abb. 2). Dieser Lichtstrahl wird durch dichroitische Farbteiler und Spiegel in unterschiedliche Wellenlängenbereiche seines Spektrums unterteilt und zu räumlich voneinander getrennten Detektoren geleitet (Abb. 2). Somit können für jede Zelle mehrere Fluoreszenzsignale, hervorgerufen durch die Anregung einer oder mehrerer angewandter Farbstoffmarkierung(en), gleichzeitig detektiert werden. Vor den Detektoren sind Filter geschaltet. Zur Detektion definierter Wellenlängenbereiche werden sogenannte Bandpassfilter (BP-Filter) eingesetzt. Darüber hinaus werden Langpass- (LP) und Kurzpassfilter (SP, engl. *short pass*) verwendet, die Licht oberhalb bzw. unterhalb einer fixen Wellenlänge durchlassen. Farbteiler dagegen reflektieren das Licht entweder oberhalb oder unterhalb einer festen Wellenlänge. Die abgegriffenen Photonen des Streulichts und der Fluoreszenz erzeugen beim Eintreffen in die Detektoren einen Stromstärkepuls. Die Intensität des Lichts bzw. der Fluoreszenz korreliert mit der Anzahl der am Detektor eintreffenden Photonen. Als Detektoren kommen in der Regel Photonenvervielfacher-Röhren (PMT, engl. *photomultiplier tubes*) zum Einsatz, die den Stromstärkepuls verstärken und anschließend zu einem Spannungspuls konvertieren (Givan 2001). Die Verstärkung des Stromstärke- bzw. Spannungspulses kann durch Erhöhung der am PMT einzustellenden Vorspannung vergrößert werden (Shapiro 2003). Mit Eintritt der Zelle in den Laserstrahl wird mittels PMT eine Spannung detektiert, die mit weiterer Bewegung durch den Laser zunimmt (Abb. 3). Bei vollständiger Durchleuchtung der Zelle erreicht die Spannung ihr Maximum und nimmt beim Austreten der Zelle aus dem Laserstrahl ab. Der zeitliche Verlauf der Spannung (Puls) folgt in der Regel

einer Gaußschen Normalverteilung (Givan 2001). Die Pulsfläche entspricht der Gesamtstreu- bzw. Gesamtfluoreszenzlichtintensität. Die Pulshöhe ist proportional zur Pulsfläche, wenn die Zellen aufgrund ihres im Vergleich zum Laserstrahl kleineren Durchmessers vollständig vom Laser durchstrahlt werden (Nebe-von-Caron 2009). In diesem Fall kann die Pulshöhe auch zur Bestimmung der Gesamtlichtintensität herangezogen werden. Die mittels PMT detektierten Spannungspulse werden im Durchflusszytometer durch nachgeschaltete Analog-zu-Digital-Wandler (A/D-Wandler) digitalisiert und in diskrete Signaltbereiche (Kanäle) eingeteilt. Der dynamische Messspannungsbereich der PMT (0 – 10 mV) wird in der Regel in 256 oder 1024 Kanäle unterteilt. Die Signalumwandlung bzw. Unterteilung des dynamischen Messbereichs kann je nach Einstellung linear oder logarithmisch erfolgen. Zur Detektion eines engen Messbereichs empfiehlt sich die lineare Einstellung, insbesondere zur besseren Auflösung kleiner Unterschiede zwischen den Signalintensitäten. Zur gleichzeitigen Detektion von schwachen und starken Signalintensitäten über einen weiten Messbereich hingegen empfiehlt sich die logarithmische Einstellung. Hierbei können die Messsignale in der Regel über vier Dekaden (10^{-1} bis 10^3) dargestellt werden.

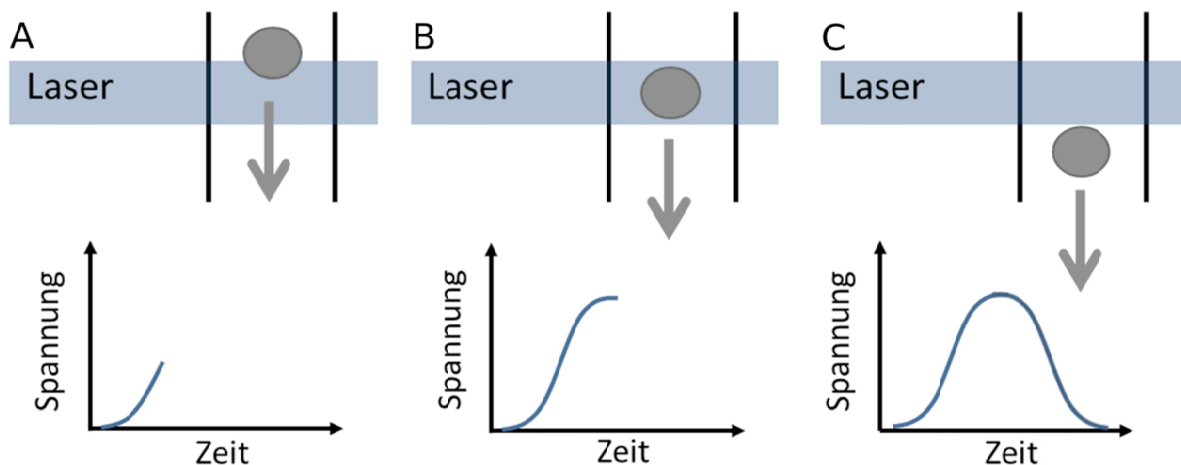


Abb. 3 Detektion eines Spannungspulses mittels PMT in der DZM.

Beispielhaft ist das Durchqueren der Zelle durch einen Laserstrahl im Durchflusszytometer dargestellt. Darunter ist der zeitliche Verlauf der detektierten Spannung zu unterschiedlichen aufeinanderfolgenden Zeitpunkten dargestellt: **(A)** Eintritt der Zelle in den Strahl, **(B)** Zelle wird vom Laser vollständig durchleuchtet, **(C)** Austritt der Zelle aus dem Strahl.

Mithilfe der parallelen, automatisierten und schnellen Signalverarbeitung eines Durchflusszytometers können bis zu 10.000 Zellen pro Sekunde multiparametrisch erfasst werden (Müller and Bley 1999). Diese Analysetechnik eignet sich daher

bestens zur Charakterisierung und Quantifizierung von Zellpopulationen. Die erfassten Signale werden mit dem am Gerät angeschlossenen oder im Gerät integrierten Computer, mithilfe der dazugehörigen Software, aufgezeichnet und visualisiert. Neben der Datenaufzeichnung und -darstellung wird im nächsten Kapitel auch auf die Möglichkeiten der statistischen Datenauswertung eingegangen. Für eine detailliertere Beschreibung des Funktionsprinzips der DZM sei auf das Fachbuch von Howard Shapiro verwiesen (Shapiro 2003).

2.2.2. Aufzeichnung, Darstellung und Evaluierung der Daten

Die Messempfindlichkeit der Detektoren ist maßgeblich von der Intensität der während der durchflusszytometrischen Analyse detektierten Hintergrundsignale abhängig. Hintergrundsignale werden durch elektronisches Grundrauschen, durch Fremdstreulicht und durch Streu- und Fluoreszenzlicht abiotischer Partikel erzeugt. Fremdstreulicht wird durch Streuung und Reflexion des Laserlichts an optischen Komponenten, z.B. an Grenzflächen der Durchflusszelle, hervorgerufen. Da Streulichtsignale (FSC und SSC) in der Wellenlänge des Laserlichts abgegriffen werden, kann das Fremdstreulicht nicht durch vorgeschaltete Filter geblockt werden. Somit ist das Hintergrundsignal in Streulichtdetektoren höher als in Fluoreszenzdetektoren (Shapiro 2003). Zur Verringerung von Hintergrundsignalen während der durchflusszytometrischen Analyse wird in der Datenaufzeichnung ein Messparameter, Streulicht- oder Fluoreszenzkanal, als Diskriminator (engl. *trigger*) definiert. Hierfür wird der Messkanal mit der höchsten Messempfindlichkeit sowie der geringsten Varianz empfohlen (Nebe-von-Caron 2009). Für diesen wird ein Schwellenwert festgelegt, sodass nur Signale mit einer Intensität oberhalb des Wertes aufgezeichnet werden. Mit diesem Vorgehen können Signale mit geringerer Intensität, vor allem Hintergrundsignale aber auch Signale nicht relevanter Zellen, von der Datenerfassung ausgeschlossen werden. Damit wird zugleich die Messempfindlichkeit der für die zu untersuchenden Zellen relevanten Detektoren erhöht.

Durch die hydrodynamische Fokussierung des Probenstroms durchqueren die Zellen, wie bereits erwähnt, einzeln und zeitversetzt den Laserstrahl. Somit kann jeder Zelle „ein Vektor der simultan erfassten Lichtintensitäten aller Detektoren (FSC, SSC, Fluoreszenzen in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen) zugeordnet

werden“ (Schulze-Horsel 2011). „Die Vektoren werden zu einer Matrix zusammengefasst und als *listmode*-Datei gespeichert“ (Schulze-Horsel 2011), d.h. die Vektoren werden in der Reihenfolge, in der die Zellen den Laserstrahl durchquerten, aufgelistet. Durchflusszytometer erzeugen in der Regel *listmode*-Dateien im DZM-Standard-Format (FCS, engl. *flow cytometry standard*) der Version 3.0 (Seamer et al. 1997). Das FCS 3.0-Format erlaubt die Analyse der durchflusszytometrischen Daten, unabhängig von der Datenaufzeichnung, sowohl mit der gerätespezifischen oder einer eigenständigen Auswertungssoftware (Rothe 2009). Die *listmode*-Datenanordnung ermöglicht die Auswertung der Lichtintensität(en) einzelner Messparameter einer Zelle oder der gesamten Zellpopulation, sowie die Korrelation der Intensitäten verschiedener Messparameter zueinander bzw. zwischen unterschiedlicher Zellen (Givan 2001).

Die Verteilung der Lichtintensitäten eines einzelnen Messparameters der vermessenen Zellen einer Probe lässt sich in Histogrammen darstellen. In Histogrammen wird die Anzahl der Zellen über der Lichtintensität eines Messparameters, z.B. der grünen Fluoreszenz, aufgetragen (Abb. 4 (B)). Zur Darstellung der Verteilung der Zellen in Abhängigkeit von zwei oder drei Messparametern werden häufig zwei- bzw. dreidimensionale Punktdiagramme (engl. *dot plots*) verwendet. In solchen Diagrammen wird jede detektierte Zelle als ein Punkt mit x,y-bzw. x,y,z-Koordinaten hinsichtlich ihrer gemessenen Intensitäten dargestellt (zweidimensionales Diagramm, Abb. 4 (C)). Zur besseren Darstellung übereinander liegender Punkte (Zellen mit identischer Intensität der betrachtenden Messparameter) wird in sogenannten Pseudofarben-Punktdiagrammen eine farbliche Markierung in Abhängigkeit von der Anzahl an Ereignissen eingeführt. Die Färbeskala geht mit zunehmender Anzahl an übereinander liegenden Punkten von blau über gelb bis hin zu rot (Abb. 5 (A)). Alternativ zu Punktdiagrammen werden zur zweidimensionalen Darstellung Konturdiagramme verwendet. Häufig werden 5 %-Quantil-Konturdiagramme verwendet. Hier sind 20 Konturlinien so verteilt, dass jede Konturlinie jeweils einer Anzahl an Ereignissen entspricht, die 5 % an der Gesamtanzahl von allen detektierten Ereignissen ausmacht. Jede Konturlinie umschließt doppelt so viele Ereignisse wie die vorherige Linie (von innen nach außen, Abb. 5 (B)).

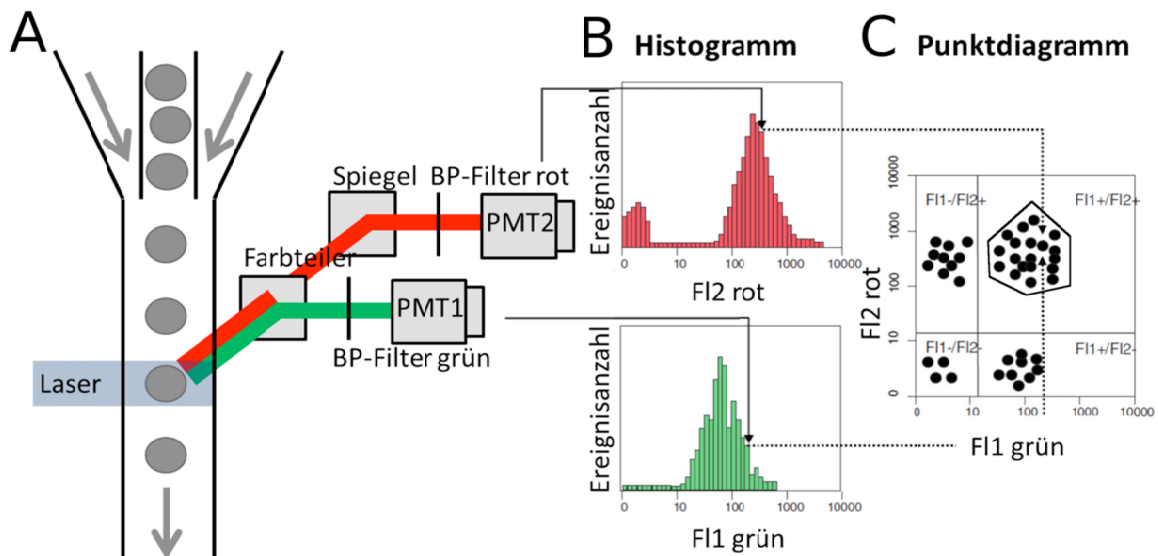


Abb. 4 Visualisierung durchflusszytometrischer Daten ((Rothe 2009), modifiziert).

(A) Simultane Erfassung grüner und roter Fluoreszenzsignale (F11 bzw. F12) fluoreszenzmarkierter Zellen mittels DZM. Detektion mit PMTs unter Einsatz von Bandpassfiltern (BP), PMT 1 für FL 1 und PMT 2 für F12. (B) Darstellung der detektierten Fluoreszenzintensitäten im Histogramm in der Auftragung der Anzahl an gemessenen Zellen über der Fluoreszenzintensität. (C) Biparametrische Darstellung der Intensitäten roter über grüner Fluoreszenz im Punktdiagramm. Jeder Punkt entspricht einer Zelle mit der jeweils detektierten Fluoreszenzintensität (gestrichelte Linie). Zellen mit vergleichbaren Intensitäten können mittels Fenster (Gates) abgegrenzt werden, z.B. mittels polygonaler Gates oder Quadranten-Gates.

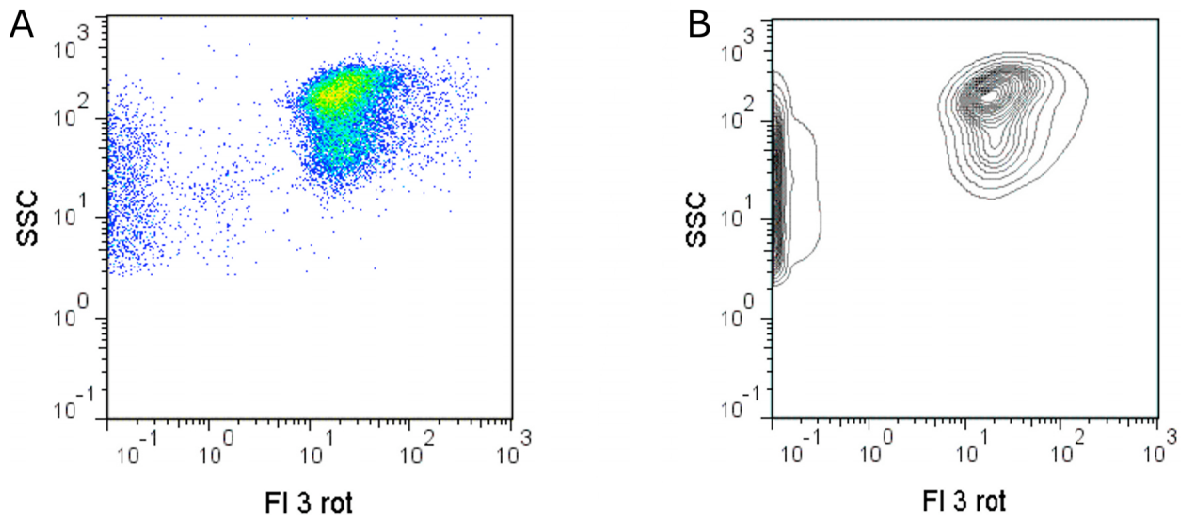


Abb. 5 Biparametrische Darstellung durchflusszytometrischer Daten.

Darstellung der Intensitäten von Seitstreulichtsignalen (SSC) über roter Fluoreszenz (FI3) bei der Detektion von Bakterien mittels DZM: (A) Pseudocolorpunktdiagramm und (B) 5 %-Quantil-Konturdiagramm.

Die multiparametrische Auftragung der Streulicht- und Fluoreszenzintensitäten erlaubt eine Klassifizierung der Gesamtzellpopulationen in Subpopulationen mit

vergleichbaren Eigenschaften. Darüber hinaus erlauben diese Darstellungen die Identifikation von Abhängigkeiten zwischen mehreren Messparametern. Durch Einzeichnen von Regionen in Histogrammen oder Fenstern in zweidimensionalen Punktdiagrammen, nachfolgend als Gate bezeichnet, können Zellen mit vergleichbaren Lichtintensitäten bei der Evaluierung der Daten abgegrenzt werden (engl. *gating*), und somit als Subpopulation definiert werden. In Abb. 4 (C) sind beispielhaft ein polygonales Gate und ein Quadranten-Gate zur Abgrenzung der detektierten Zellen dargestellt. Nachfolgend können die abgegrenzten Zellen separat in einem Diagramm dargestellt werden und hinsichtlich der Intensität der weiteren parallel erfassten Messparameter untersucht werden und statistisch beschrieben werden. Wiederum können in dieser Darstellung Zellen mit vergleichbaren Lichtintensitäten abgegrenzt werden. Regionen sowie Gates können gemäß Boolescher Funktionen mittels „and“, „or“ and „not“ kombiniert werden. Die Anwendung solcher Kombinationen erlaubt die Einteilung der Gesamtzellpopulation in Subpopulationen gemäß der Messparameter des Datensatzes (Rothe 2009).

Mithilfe der durchflusszytometrischen Auswertungssoftware kann die statistische Beschreibung der Gesamtzellpopulation, aber auch der abgegrenzten Subpopulationen, erfolgen. Zur Verfügung stehen u.a. Algorithmen zur Bestimmung der mittleren Streulicht- bzw. Fluoreszenzlichtintensität (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*) aus der Verteilung der Intensität der einzelnen Messparameter. In Abhängigkeit von der Art der Verteilung der Intensitätswerte können arithmetischer Mittelwert, geometrischer Mittelwert, Median oder Modalwert gewählt werden. Zudem kann für die Verteilung der Variationskoeffizient (CV, engl. *coefficient of variation*) berechnet werden.

Darüber hinaus werden für jede Probe die absolute Anzahl an Zellen, die den Laser durchquerten, sowie die Anzahl an der durch Regionen oder Gates abgegrenzten Zellen von Subpopulationen ausgegeben. Basierend auf diesen Werten kann mithilfe der Auswertungssoftware die prozentuale relative Häufigkeit einer abgegrenzten Subpopulation an der Gesamtanzahl der gemessenen Ereignisse bzw. der Zellen (engl. *frequency of total events / frequency of total cells*) und an der Anzahl der Zellen einer ein-Ebene- oder zwei-Ebenen-höher-liegenden Subpopulation (engl. *frequency of parent / frequency of grandparent*) berechnet werden.

Im Falle von Durchflusszytometern, die die Analyse eines definiertes Probenvolumens erlauben, kann die absolute Partikelanzahl zur Quantifizierung von Zellen, z.B. zur Bestimmung der Zellkonzentration, verwendet werden.

Bei mehrfacher Markierung der Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist bei gleichzeitiger Anregung eine spektrale Überlappung der Farbstoffe in der Emission im Wellenlängenbereich der Detektoren sehr wahrscheinlich. Bei Anregung werden in den betreffenden Detektoren Mischsignale zusammengesetzt aus unterschiedlichen Anteilen der Signale der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe gemessen. Die einzelnen Fluoreszenzsignale können anhand geeigneter Verfahren zur Datenkompensation dem jeweiligen Detektor eindeutig zugeordnet werden (Abb. 6). Hierbei wird vom Fluoreszenzsignal eines Fluoreszenzfarbstoffs in dem betreffenden Detektor das überlappende Fluoreszenzsignal eines anderen Fluoreszenzfarbstoffs subtrahiert. Berechnungsgrundlage ist die Ermittlung der Fluoreszenzsignale der überlappenden Fluoreszenzfarbstoffe bei Einzelfärbung in dem jeweiligen Detektor.

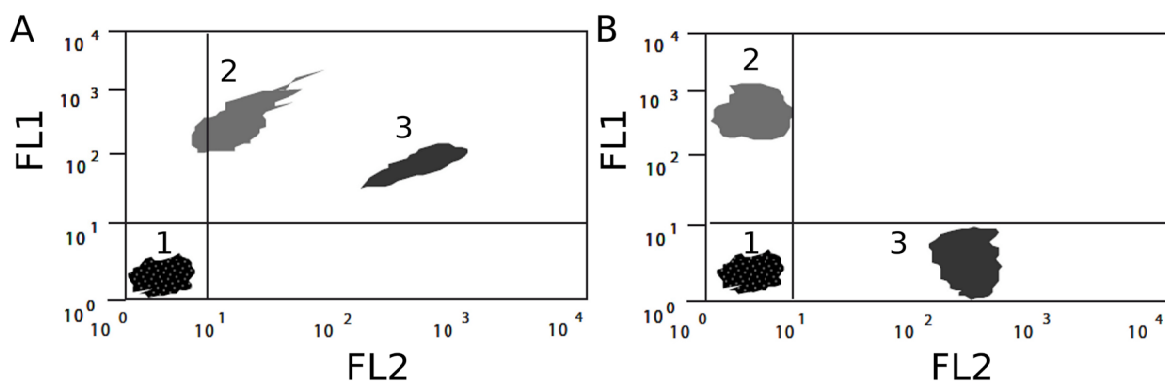


Abb. 6 Prinzip der Datenkompensation in der durchflusszytometrischen Analyse ((Rothe 2009), modifiziert).

Fluoreszenzdetektion von Zellen markiert mit spektral überlappenden Fluoreszenzfarbstoffen mittels DZM. Dargestellt sind die Verteilung der in den PMT1 (FL1) und PMT2 (FL2) detektierten Fluoreszenzintensitäten ungefärbter (1), mit grünem Fluoreszenzfarbstoff markierter (2) und mit rotem Fluoreszenzfarbstoff markierter Zellen (3). **(A)** Daten unkompensiert: Unzureichende optische Trennung der Signale durch spektrale Überlappung des grünen und roten Farbstoffes in den für die Detektion im PMT1 (FL1) und PMT2 (FL2) relevanten Wellenlängenbereichen. **(B)** Daten kompensiert: Eindeutige Trennung der Signale der jeweils unterschiedlich angewandten Fluoreszenzfärbung durch Korrektur der Daten mittels Kompensation.

Die Datenkompensation kann mit Durchflusszytometern in der Regel nach der Analyse mithilfe der gerätespezifischen oder einer eigenständigen

Auswertungssoftware erfolgen. Voraussetzung ist die Vermessung einzelner mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbter Proben (Kompensationskontrollen). Durch Auswertung dieser Signale berechnet die Auswertungssoftware eine Kompensationsmatrix für die betreffenden Messkanäle (Detektoren). Unter Anwendung dieser Matrix können alle relevanten Datenreihen mehrfach fluoreszenzgefärbter Zellen kompensiert werden. Die Generierung sowie Vermessung von Kontrollproben unter mit den realen Proben vergleichbaren Bedingungen (z.B. Zellen suspendiert im gleichen Puffer sowie identische Vorspannung an PMTs des Zytometers) begünstigen eine ordentliche Kompensation. Im Resultat der Kompensation können die Signale unterschiedlicher Fluoreszenzfärbung, wie beispielhaft in Abb. 6 (B) dargestellt, eindeutig voneinander getrennt werden.

In der bestehenden Literatur sind durchflusszytometrische Experimente häufig unzureichend hinsichtlich der Bedingungen bei der Durchführung, der Datenaufzeichnung (inklusive Datendarstellung) sowie Datenevaluierung beschrieben. Fehlende Angaben zum Experiment, zur Probe, zu gerätespezifischen Messeinstellungen und zu Software-spezifischen Einstellungen zur Darstellung der Daten im Diagramm sowie zur Auswertung erschweren den Lesern das Nachvollziehen veröffentlichter durchflusszytometrischer Daten.

Zur eindeutigen Interpretation sowie Reproduzierbarkeit durchflusszytometrischer Daten ist der Anwender bei der Veröffentlichung der Ergebnisse seiner Experimente angehalten, umfassende Angaben zur Analyse gemäß der von der Internationalen Gesellschaft zur Weiterentwicklung der Zytometrie (ISAC, engl. *International Society for Advancement of Cytometry*) veröffentlichten Anleitung „Mindestangaben eines Durchflusszytometrie-Experiments zur Dokumentation“ (MIFlowCyt, engl. *minimum information about a flow cytometry experiment required for documentation*, (Lee et al. 2008)) zu machen. In Tab. 1 sind die Mindestangaben zu DZM-Experimenten aufgelistet.

Tab. 1 Mindestangaben eines DZM-Experiments.

Zusammenfassung der von der ISAC veröffentlichten Anleitung MIFlowCyt (Lee et al. 2008).

Betreff	Informationen
Experiment	Zielsetzung / Hypothesen Experimentelle Variablen (bedingte / manipulierte Unterschiede), z.B. Spezies A versus Spezies B, Reinkultur versus Mischkultur Qualitätskontrollen, z.B. Replikate, Kalibrierproben, Kontrollproben
Probe	Biologisches Material / Isolat / Umweltprobe / klinische Probe Suspension Herkunft / Stamm / Lagerung / Stammbank / Kultivierung Probebehandlung / Färbung Fluoreszenzreagenzien (Merkmale oder Funktion/ Analyt / Detektor Reporter, Reagenzien-Hersteller)
Durchflusszytometer	Hersteller, Typ, Gerätekonfiguration (Laser / Filter / Detektoren) Einstellungen (Probestromgeschwindigkeit oder Partikelrate / Signalverstärkung und –umwandlung: linear oder logarithmisch / Diskriminator / Gesamtpartikelanzahl oder Gesamtprobevolumen) Software zur Datenaufzeichnung
Datenauswertung	FCS-Format (<i>listmode</i>) Software für Datendarstellung und –auswertung Datenkompensation bei spektraler Überlappung von Farbstoffen Gating (manuelle oder automatisierte Regionen bzw. Gates / Kontrollproben / Algorithmen für automatisiertes Gating) Statistische Auswertung (MFI mittels Mittelwert, Median oder Mode / relative Häufigkeit von abgegrenzten Zellen mit Berechnungsbezug z.B. <i>frequency of total cells</i> oder <i>of parent</i>)

2.2.3. Detektion von Bakterien mittels Fluoreszenzmarkierung

Bakterien können im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen aufgrund ihrer geringen Größe in der Regel nicht allein durch Streulichtmessung (FSC, SSC) mittels DZM detektiert werden. Das kann vor allem auf die deutlich geringeren Signalintensitäten in Kombination mit einer unzureichenden Empfindlichkeit der Detektoren von kommerziell verfügbaren Serien-Durchflusszytometern, die vorrangig für die Analyse eukaryotischer Zellen konzipiert wurden, zurückgeführt werden. Im Vergleich zu tierischen Zellen ist der Durchmesser von Bakterien in etwa um ein Zehnfaches kleiner und die bakterielle Oberfläche bzw. das Volumen um ein Hundertfaches bzw. Tausendfaches kleiner (Müller and Nebe-von-Caron 2010).

Eine Detektion von Bakterien mittels DZM kann in der Regel jedoch über die Fluoreszenzmessung bzw. Kombination der Streulicht- und Fluoreszenzmessung erfolgen. Voraussetzung ist die Markierung von Bakterien mit Fluoreszenzfarbstoffen (auch Fluorophore genannt) oder mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Molekülen

oder Partikeln vor der Analyse. Ausnahmen stellen photosynthetisch aktive, meist im Wasser vorkommende Bakterien mit Eigenfluoreszenz, wie z.B. Cyanobakterien, dar. Diese Bakterien können aufgrund des hohen Gehalts an fluoreszierenden Pigmenten, z.B. Chlorophyll a, mittels DZM detektiert werden.

Zur Detektion von Bakterien stehen zahlreiche Methoden zur Fluoreszenzmarkierung zur Verfügung. Die Markierung kann intrazellulär oder extrazellulär erfolgen.

Bei der intrazellulären Markierung müssen die Farbstoffe die Zellwand und Zytoplasmamembran durchdringen, wobei die Membran im Wesentlichen ein Hindernis für die Penetration von Farbstoffen darstellt. Für kleine lipophile (hydrophobe) Moleküle ist die Membran selektiv permeabel. Diese diffundieren in Abhängigkeit eines Konzentrationsgradienten durch die Membran (Sträuber and Müller 2010). Hydrophile (lipophile) Farbstoffe dagegen werden in der Regel von einer intakten Zellmembran ausgeschlossen. Da viele Bakterienarten über Efflux-Pumpensysteme in Membranen verfügen (Van Bambeke et al. 2003), ist darüber hinaus bei der Etablierung einer intrazellulären Fluoreszenzmarkierung ein mögliches Auspumpen der meist xenobiotischen Farbstoffe zu berücksichtigen. Mithilfe von Zellfixierungsmethoden können Membranen permeabilisiert werden und aktive Efflux-Pumpensysteme inhibiert werden (Davey and Kell 1996).

Eine extrazelluläre Markierung der Bakterien wird in der Regel mittels mit Fluoreszenzfarbstoffen-konjugierter Marker, insbesondere Biomoleküle wie z.B. Antikörper oder Lektine, durch kovalente Bindung an Moleküle der Zelloberfläche erreicht. Charakteristisch für jeden Fluoreszenzfarbstoff sind das Absorptions- und Emissionsspektrum. Je nach optischer Konfiguration des Durchflusszytometers, vor allem der Laser mit definierter Anregungswellenlänge sowie die für definierte Wellenlängenbereiche vorgesehenen Messkanäle (Farbteiler, Filter vor PMT), stellen die Wellenlängen der Absorptions- und Emissionsmaxima entscheidende Kriterien für die Auswahl eines für die jeweilige Anwendung optimalen Fluoreszenzfarbstoffs dar. Vorzugsweise sind Farbstoffe mit hohen molaren Absorptionskoeffizienten und hoher Quantenausbeute einzusetzen, damit hohe Zell-assoziierte Fluoreszenzintensitäten bei Einsatz geringer Mengen erreicht werden können (Davey and Kell 1996). Der molare Absorptionskoeffizient ϵ gibt an, wie viel Licht eine gelöste Substanz bei einer bestimmten Wellenlänge, bezogen auf die Schichtdicke der bei der Bestimmung verwendeten Küvette (in cm), absorbiert ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, (Fischer 1998)). Die Quantenausbeute Φ entspricht der relativen Häufigkeit der Anzahl der emittierten

Photonen zur Anzahl der absorbierten Photonen (Schiemann and Busch 2009). Die Fluoreszenzfarbstoffe sollten darüber hinaus photostabil, biologisch inert, wasserlöslich sowie ungiftig bis schwach giftig sein (Díaz et al. 2010). Bei gleichzeitiger Anwendung mehrerer Farbstoffe sind vorzugsweise Substanzen, die Fluoreszenz in unterschiedlichen voneinander unterscheidbaren Wellenlängenbereichen emittieren, zu wählen. Im Speziellen sind bei Anregung mit einem Laser Farbstoffe einzusetzen, die Licht bei gleicher Wellenlänge absorbieren aber Fluoreszenz bei unterschiedlich längeren Wellenlängen emittieren (Givan 2001). Durch diese Auswahl kann das spektrale Überlappen von Fluoreszenz in Messkanälen verhindert bzw. verringert werden, welche die eindeutige Unterscheidung der Signale der einzelnen Farbstoffe begünstigt. Aus technischer Sicht können Zellen im optimalen Fall gleichzeitig mit genauso vielen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden wie Fluoreszenzmesskanäle im Durchflusszytometer vorhanden sind. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Anzahl gleichzeitig angewandter Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von Bakterien begrenzt ist. Insbesondere in Hinblick auf die Vitalität der Bakterien ist die Anzahl intrazellulärer Farbstoffe auf ein Minimum zu begrenzen. Toxische Effekte sind durch die kommerziell zur Verfügung stehenden Fluoreszenzfarbstoffe, die in der Regel xenobiotisch sind, denkbar.

Aufgrund der großen Anzahl an Farbstoffen und Verfahren ist eine vollständige Darstellung der Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von Bakterien im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Hierzu sei auf Veröffentlichungen in der Literatur verwiesen, die umfassende Übersichten zu Methoden der Fluoreszenzmarkierung von Bakterien für die Anwendung der DZM präsentieren (Davey and Kell 1996; Díaz et al. 2010; Lloyd 1993; Müller and Nebe-von-Caron 2010).

Nachfolgend wird eine Auswahl von häufig angewandten Färbemethoden zur fluoreszenzbasierten Detektion von Bakterien genauer beschrieben. In Abschnitt 2.2.4 werden darüber hinaus Fluoreszenzfarbstoffe für die DZM zur Bestimmung der Vitalität vorgestellt.

2.2.3.1. Intrazelluläre Fluoreszenzmarkierungen

Voraussetzung für die Detektion ist die Diskriminierung der Bakterien von Hintergrundsignalen in der durchflusszytometrischen Analyse (siehe 2.2.2). Dazu

eignen sich insbesondere Markierungen mit membranpermeablen Desoxyribonukleinsäure- (DNS-) Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch oder mit hoher Affinität an doppelsträngige (ds) DNS (dsDNS) binden (Shapiro 2003). Die Bindung erfolgt durch Einlagerung in die Doppelhelix (Interkalation) oder durch Bindung an deren Furchen. Infolge der Bindung wird die Fluoreszenz der Farbstoffe verstärkt. Bakterien lassen sich am besten durch simultane Messung von Streulichtsignalen und der durch DNS-Markierung hervorgerufenen Fluoreszenzsignalen von Hintergrundsignalen diskriminieren (Nebe-von-Caron et al. 2000). Zur Detektion von Bakterien mittels DZM findet der Farbstoff 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) häufig Anwendung. Dieser bindet mit hoher Affinität an Adenin- und Thymin-(A-T-) reiche Furchen der DNS (Shapiro 2000b). Für DAPI charakteristisch sind die Maxima der Absorption und der Emission, die bei Bindung mit dsDNS im Bereich von ultraviolettem- (UV-) bzw. blauem Licht bei etwa 350 nm bzw. 450 nm liegen (Kapuscinski 1995). Zur Erzielung hoher Zell-assoziiierter Fluoreszenzintensitäten ist die hohe Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs mit $\Phi=0,92$ im Komplex mit dsDNS von großem Vorteil (Kapuscinski 1995). Darüber hinaus ist die sehr gute Kombinierbarkeit von DAPI mit einer Vielzahl anderer kommerziell zur Verfügung stehender Fluoreszenzfarbstoffe vorteilhaft (Müller and Nebe-von-Caron 2010). Ein Großteil der verfügbaren Farbstoffe muss im Vergleich zu DAPI durch Licht mit höheren Wellenlängen angeregt werden (länger als die Emissionswellenlängen von DAPI). Die Eignung von DAPI zur Detektion von Bakterien mittels DZM wurde von zahlreichen Autoren bei der Analyse isolierter Spezies aus Reinkultur (Robertson and Button 1989) aber auch bei der Analyse von Wasser- oder Aerosolproben aus der Umwelt (Button and Robertson 2001; Duhamel et al. 2008; Heddal et al. 1994; Monfort and Baleux 1992) gezeigt. Der Nachweis von DAPI-markierten *S. aureus* sowie von *P. aeruginosa* mittels DZM wird in der Literatur beschrieben (Lange et al. 1997; Walberg et al. 1999).

Neben DAPI ist die Anwendung des membranpermeablen Nukleinsäurefarbstoffs SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA) zur durchflusszytometrischen Detektion von Bakterien hervorzuheben. Auch wenn SYBR Green I an einzelsträngige (ss, engl. *single stranded*) DNS (ssDNS) und RNS bindet, bevorzugt es die Bindung mit dsDNS (Dragan et al. 2012). Bei Einsatz überschüssiger Farbstoffmengen im Vergleich zum DNS-Gehalt bindet der Farbstoff selektiv an dsDNS, vorzugsweise an A-T-reiche Furchen (Zipper et al. 2004).

Die Absorptions- und Emissionsmaxima von SYBR Green I liegen im Komplex mit dsDNS bei etwa 497 nm bzw. bei etwa 520 nm (Angaben des Herstellers). Das Cyaninderivat ist zudem durch hohe Photostabilität und große Fluoreszenzverstärkung durch Bindung an dsDNS gekennzeichnet (Vitzthum et al. 1999). Bei Anregung mit blauem Licht können aufgrund eines hohen molaren Absorptionskoeffizienten sowie einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute (Zipper et al. 2004) intensive Zell-assoziierte grüne Fluoreszenzsignale erreicht werden. SYBR Green I wurde bereits in einer Vielzahl von Studien erfolgreich in der DZM zur Detektion von Bakterien eingesetzt, u.a. bei der Analyse isoliert betrachtender Spezies in Reinkultur (Assunção et al. 2007; Lebaron et al. 1998; Mason et al. 2001) sowie bei der Analyse von Wasserproben aus der Trinkwasseraufbereitung bzw. der Umwelt (Hammes et al. 2008; Marie et al. 1997). In der Literatur wird der Einsatz von SYBR Green I zur Detektion der in dieser Arbeit relevanten Spezies *P. aeruginosa* beschrieben (Baldock et al. 2013).

Bei Anwendung der benannten DNS-Farbstoffe zur Markierung von Bakterien kann durch die durchflusszytometrische Analyse die Verteilung des DNS-Gehalts der untersuchten Zellpopulation anhand der aufgezeichneten Fluoreszenzverteilung im Histogramm (Anzahl der Ereignisse über DNS-Fluoreszenz) oder im Punktdiagramm (Streulichtsignal über DNS-Fluoreszenz) erfasst werden. Die Darstellung der Verteilung der DNS-Fluoreszenz wird nachfolgend als DNS-Muster bezeichnet. Müller *et al.* zufolge variiert der DNS-Gehalt während des Lebenszyklus eines Bakteriums in Abhängigkeit vom Stadium im Zellzyklus, von der Wachstumsrate und den Kultivierungsbedingungen (Umweltbedingungen), aber auch zwischen verschiedenen Spezies aufgrund unterschiedlicher genetischer Herkunft (Müller 2007). Für verschiedene einzelne Bakterienpezies wurde eine Änderung der DNS-Muster in Abhängigkeit vom Wachstum und von Kultivierungsbedingungen durch die durchflusszytometrische Analyse DAPI- oder SYBR Green I-gefärbter Bakterien nachgewiesen (Ackermann et al. 1995; Müller and Babel 2003; Müller et al. 1999; Müller et al. 2001; Müller et al. 2000b; Neumeyer et al. 2013; Pennebaker et al. 2010; Wiacek et al. 2006). Aus den charakteristischen DNS-Mustern können ferner Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität (einzelner Zellen oder der Bakterienpopulation) sowie auf den Modus des Zellzykluses gezogen werden (Müller 2007). Letzteres setzt eine hohe Auflösung der aufgezeichneten DNS-Fluoreszenzsignale voraus, die eine Aufteilung der Signale nach Intensität in

Subpopulationen mit unterschiedlicher Chromosomenzahl erlaubt. Solche Signalaufösungen können in der Regel nur durch Einsatz von technisch hochwertigen Durchflusszytometern für die Messung erzielt werden. Die hohe Signalaufösung wird im Wesentlichen durch einen leistungsstarken Festkörperlaser ($P > 100 \text{ mW}$) zur Anregung des DNS-Fluoreszenzfarbstoffs sowie durch einen hochempfindlichen PMT zur Detektion der Fluoreszenz erreicht.

In Hinblick auf Untersuchungen von Mischkulturen, u.a. zur Bestimmung der Spezies-spezifischen Vitalität mittels DZM, ist die Detektion einzelner Spezies bzw. eine eindeutige Diskriminierung zwischen den Spezies maßgebend. Dafür eignen sich in der Regel keine DNS- oder Nukleinsäurefarbstoffe.

Zur Spezies-spezifischen Detektion stellt die Markierung von 16S rRNA mittels fluoreszenzkonjugierter zur Sequenz komplementärer synthetisierter Oligonukleotide durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eine geeignete Methode für die DZM dar (Amann et al. 1990), da sich Bakterienarten in der Sequenz der 16S rRNA voneinander unterscheiden. Diese Methodik eignet sich jedoch nicht für die Anwendung zur Bestimmung der Vitalität, da die Zellmembran der Bakterien zur Markierung permeabilisiert werden muss. Zur Spezies-spezifischen Vitalitätsbestimmung in Mischkulturen sind extrazelluläre Fluoreszenzmarkierungen zur Diskriminierung der Spezies einzusetzen.

2.2.3.2. Extrazelluläre Fluoreszenzmarkierungen

Zur Spezies-spezifischen Detektion von Bakterien eignen sich für die DZM fluoreszenzkonjugierte Antikörper (Immunfluoreszenzdetektion) und Lektine. Voraussetzung ist die spezifische Bindung der Marker an der Zelloberfläche der Bakterien, an Spezies-eigene Proteine bzw., im Fall von Lektinen, an Zuckerstrukturen.

Zur Immunfluoreszenzdetektion können sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper eingesetzt werden. Monoklonale Antikörper zeichnen sich besonders durch ihre hohe Spezifität gegenüber der Ziel-Proteine (Antigene) für den Spezies-spezifischen Nachweis aus. Eine Kreuzreaktivität gegen eine andere Spezies ist dennoch denkbar und deshalb bei der Etablierung eines Färbeprotokolls zur Mischkulturanalyse zu berücksichtigen. Der Antikörper ist daher gegen alle für die Mischkultur relevanten Spezies einzeln zu testen.

Der Fakt, dass für Bakterien kommerziell nur wenige oder keine Spezies-spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen, erschwert die Etablierung von Methoden zur Spezies-spezifischen Immunfluoreszenzdetektion von Bakterien. Die wenigen zur Verfügung stehenden Antikörper wurden zudem meist nicht auf deren Eignung für die DZM getestet. In der Mehrzahl der in der Literatur vorhandenen Studien wurden die Antikörper eigens zur Analyse durch Immunisierung von Mäusen mit Spezies-spezifischen Antigenen und anschließender Aufreinigung hergestellt. So testete Hughes *et al.* verschiedene polyklonale Antikörper (Maus-anti *P. aeruginosa* Protein F-Sera) zur Immunfluoreszenzmarkierung von *P. aeruginosa* hinsichtlich ihrer Eignung zur durchflusszytometrischen Detektion (Hughes *et al.* 1996). Auch wenn vier polyklonale Antikörper nachweislich die Bakterien markierten, konnte mit keinem Antikörper eine effiziente Markierung zur Detektion erzielt werden. Im besten Fall betrug die relative Häufigkeit positiv gefärbter Bakterien 37 %. Die Autoren vermuteten eine stark eingeschränkte Zugänglichkeit der Antikörper zu den Epitopen des Außenmembran-Zielproteins (Hughes *et al.* 1996).

Die Eignung fluoreszenzkonjugierter Spezies-spezifischer Antikörper für die DZM zur Immunfluoreszenzdetektion belegen mitunter Studien zum Nachweis pathogener Bakterienarten und -stämme in Kulturen (Evans *et al.* 1990; Phillips and Martin 1983; Tomaso *et al.* 2007), in Lebensmitteln und Getränken (Donnelly and Baigent 1986; Pinder and McClelland 1994; Subires *et al.* 2014; Tortorello *et al.* 1997; Yamaguchi *et al.* 2003), in Trinkwasser, Abwasser und natürlichen Gewässern (Füchslin *et al.* 2010; Porter *et al.* 1995; Tyndall *et al.* 1985; Vital *et al.* 2007) sowie in klinischen Proben (Faria-Ramos *et al.* 2012; Sahar *et al.* 1983). Darüber hinaus sind Anwendungen zur Charakterisierung von definierten bakteriellen Mischkulturen beschrieben (Barnett *et al.* 1984; Nebe-von-Caron and Badley 1995; Pawelczyk *et al.* 2008; Wallner *et al.* 1996).

Aus der Literatur ist bekannt, dass allgemein Antikörper des Typs Immunglobulin G (IgG) an der Zelloberfläche von *S. aureus* an Protein A binden können (Ljungberg *et al.* 1993). In der Studie von Diaper und Edwards 1994 wurde erstmalig die Eignung fluoreszenzkonjugierter IgG-Antikörper für die durchflusszytometrische Detektion von *S. aureus* demonstriert (Diaper and Edwards 1994).

Der Fakt, dass Antikörper des Typs IgG an Protein A von *S. aureus* binden können ist bei der Etablierung von Färbemethoden zur Spezies-spezifischen Immunfluoreszenzdetektion von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* für die in der Arbeit

relevante Mischkultur zu berücksichtigen. Der Test der zur Verfügung stehenden Antikörper auf Kreuzreaktivität ist unverzichtbar.

Neben Antikörpern können fluoreszenzkonjugierte Lektine zur extrazellulären Markierung von Bakterien eingesetzt werden. Lektine sind Glykoproteine und binden spezifisch an Zuckerstrukturen, beispielweise an Glukose, Mannose oder an deren Derivate N-Acetylglucosamin sowie N-Acetylgalactosamin (Goldstein and Hayes 1978). Solche Strukturen kommen vorwiegend in der Peptidoglykanschicht der Zellwand, aber auch in der Lipopolysaccharidschicht (LPS-Schicht) der äußeren Zellmembran sowie in der Exopolysaccharidschicht (EPS-Schicht) von Bakterien vor. Zur Markierung stellen sie somit ein sehr gutes Angriffsziel dar. Lektine können mit den für die Proteinmarkierung einschlägigen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert werden (Müller and Nebe-von-Caron 2010). In der Literatur wurde die Detektion Gram-positiver Bakterienspezies mittels fluoreszenzkonjugiertem WGA beschrieben (Sizemore et al. 1990). Untersuchungen von Debray *et al.* zufolge bindet WGA spezifisch an N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure-Reste der Peptidoglykanschicht (Debray et al. 1981). Da die Peptidoglykanschicht Gram-negativer Bakterien von einer äußeren Membran abgeschirmt ist, bindet WGA ausschließlich an Gram-positive Bakterien. Fluoreszenzkonjugiertes WGA wurde bereits erfolgreich zur Detektion von *S. aureus* in Milchproben mittels DZM angewandt (Holm and Jespersen 2003). Der Einsatz einer Kombination von fluoreszenzkonjugiertem WGA mit einem DNS-Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung erlaubte darüber hinaus die Diskriminierung zwischen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien in Mischkulturproben in der durchflusszytometrischen Analyse (Holm et al. 2004). Weitere Studien belegen die hervorragende Eignung anderer fluoreszenzkonjugierter Lektine in Kombination mit DNS-Färbungen in der DZM zur Speziesdiskriminierung, u.a. bei der Charakterisierung definierter Mischkulturen (Müller et al. 2000a; Müller et al. 2002).

Der Einsatz fluoreszenzkonjugierter Lektine zur durchflusszytometrischen Detektion von *B. cepacia* und *P. aeruginosa* ist nicht bekannt. Für *P. aeruginosa* wurden allerdings verschiedene Lektine, u.a. *Griffonia simplicifolia* Lektin 1 (BS-1), Phytohämagglutinin (PHA-P), Concanavalin A (Con A) und *Ulex europeus* Lektin I (UEA-1) zur fluoreszenzmikroskopischen Charakterisierung der Zelloberfläche sowie Detektion beschrieben (Bejarano and Schneider 2004; Klebensberger et al. 2007; Strathmann et al. 2002).

Der Einsatz von Antikörper und Lektinen kann zur extrazellulären Fluoreszenzmarkierung von Bakterien für die DZM miteinander kombiniert werden (Wallner et al. 1996). Die Anwendung beider Markierungsverfahren für die Mischkulturanalyse (einzeln oder in Kombination) ist jedoch nur für kultivierbare Bakterien zu empfehlen, da die Eignung der Marker für die Spezies- oder Gram-spezifische Detektion nur in Reinkulturproben festgestellt werden kann. Der Test der Marker auf Kreuzreaktivität kann zudem auch nur in Reinkulturproben durchgeführt werden.

2.2.4. Fluoreszenzbasierte Vitalitätsanalyse von Bakterien

2.2.4.1. Welche zellulären Vorgänge bestimmen die Vitalität?

(Wann ist ein Bakterium tot?)

Unter Vitalität (oder auch Viabilität) kann die Fähigkeit eines Bakteriums zum Überleben bei gegebenen Umweltbedingungen (u.a. pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Substratangebot) verstanden werden. In Anlehnung an die Arbeiten von Breeuwer und Abee sowie von Hammes *et al.* sind zum Überleben, wie im Folgenden beschrieben, drei Bedingungen maßgebend (Breeuwer and Abee 2000; Hammes et al. 2011). Erstens muss der intrazelluläre Raum durch eine intakte und funktionsfähige Zytoplasmamembran von der Umwelt zur Erhaltung einzigartiger intrazellulärer Bedingungen abgegrenzt sein. Zweitens müssen in der Zelle funktionsfähige Nukleinsäuren vorliegen, welche die Transkription der DNS, die Translation der RNS sowie die Replikation der DNS erlauben. Drittens muss die Zelle zur Aufrechterhaltung zellulärer Vorgänge über ein Minimum an Energie verfügen, bzw. in der Lage sein Energie, zu gewinnen (Breeuwer and Abee 2000; Hammes et al. 2011). Die angeführten Bedingungen stehen in wechselseitiger Beziehung zueinander bzw. sind über zelluläre Vorgänge miteinander verknüpft. Ist eine Bedingung bzw. einer der Vorgänge nicht erfüllt bzw. geschädigt, kann das Bakterium nicht als überlebensfähig charakterisiert werden (Hammes et al. 2011). In der Regel ist dieses Bakterium zugleich nicht vermehrungsfähig.

Die Integrität der Zytoplasmamembran (Membranintegrität) stellt für Bakterien die Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Bedingungen, transmembraner Transportvorgänge sowie des Membranpotenzials dar. Es ist davon auszugehen, dass der Verlust der Membranintegrität irreversibel ist und mit dem

Erliegen aller aktiven Transportvorgänge durch die Membran (Joux and Lebaron 2000) und der Energiegewinnung einhergeht. Letztendlich führt dieser Zustand zum Tod des Bakteriums (Nebe-von-Caron and Badley 1995). Der Verlust der Membranintegrität kann zugleich mit fehlendem Wachstum, fehlender Vermehrungsfähigkeit und erloschener metabolischer Aktivität assoziiert werden. Deshalb stellt die Membranintegrität einen geeigneten Indikator für die Bestimmung der Vitalität dar. Erfasste Bakterien mit vollständig permeabilisierter Membran wurden in dieser Arbeit deshalb als tot charakterisiert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Zellen mit einer intakten Zytoplasmamembran nicht unmittelbar mit überlebensfähigen Zellen gleichgesetzt werden können, da die Membranintegrität keinen Hinweis auf die Aufrechterhaltung weiterer überlebensnotwendiger Vorgänge in der Zelle (siehe oben) liefert. So können u.a. Zellen mit einer intakten Zytoplasmamembran sowohl metabolisch aktiv als auch inaktiv sein. Die in der Analyse erfassten Bakterien mit intakter Membran wurden in der vorliegenden Arbeit deshalb als vital charakterisiert.

2.2.4.2. Fluoreszenzfärbemethoden zur Vitalitätsbestimmung

Für Bakterien stehen zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe kommerziell zur Verfügung, welche gezielt oder indirekt spezifische zelluläre Vorgänge bzw. physiologische Merkmale anzeigen können. Diese erlauben in Kombination mit der Anwendung der DZM die Charakterisierung der Vitalität einzelner Bakterien. Für eine umfangreiche Übersicht der zur Verfügung stehenden Vitalitätsfarbstoffe wird der Leser auf die Veröffentlichung von Tracy *et al.* verwiesen (Tracy et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Membranintegrität zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der Vitalität der hier relevanten Bakterienspezies angewandt. Im Folgenden werden daher nur Fluoreszenzfärbemethoden zur Erfassung der Membranintegrität beschrieben. Daneben können durch Fluoreszenzmarkierung auch die Aktivität von Enzymen, die Efflux-Aktivität von Membranpumpen, die Aufnahme eines bestimmten Substrats oder das Membranpotenzial bestimmt werden (Hammes et al. 2011). Umfassende Darstellungen dieser Färbemethoden findet der Leser in der Literatur (Hammes et al. 2011; Joux and Lebaron 2000; Sträuber and Müller 2010).

Der Verlust der Membranintegrität ist in der Regel irreversibel und führt letztendlich zum Tod des Bakteriums (siehe 2.2.4.1). Bakterien mit vollständig permeabilisierter

Zytoplasmamembran sind als tot zu betrachten. Bakterien mit intakter Membran dagegen sind als vital einzustufen. Zum Nachweis toter Bakterien werden häufig membranimpermeable Nukleinsäuren-Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Solche Farbstoffe interkalieren mit oder binden selektiv an Nukleinsäuren, wodurch die Fluoreszenz verstärkt wird. Während diese Farbstoffe von einer intakten Membran aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaft, Ladung oder Größe ausgeschlossen werden (Hewitt and Nebe-Von-Caron 2004; Schumann et al. 2003; Sträuber and Müller 2010), durchdringen diese die permeabilisierte Membran toter Zellen. Bei solchen Nachweismethoden ist zu beachten, dass die Zytoplasmamembran von Bakterien zeitweilig aufgrund von Zellteilung oder während der Zellwandsynthese partiell permeabilisiert werden kann (Sträuber and Müller 2010). In diesem Fall würden die Fluoreszenzmoleküle in die Zelle eindringen und diese anfärben. Eine falsch-positive Zuordnung der Bakterien in der Analyse wäre die Folge (Shi et al. 2007).

Propidiumiodid (PI) stellt den am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung toter Bakterien dar. Aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaft wird PI von der intakten Membran vitaler Zellen ausgeschlossen (Horobin et al. 2006). Die Membran toter Zellen wird dagegen von PI penetriert. In der Zelle interkaliert PI mit dsDNS, kann aber auch an ssDNS und RNS binden (Shapiro 2003). Bei Anregung dieser Komplexe mit blauen bis grünen Licht fluoresziert PI im roten Wellenlängenbereich. Die Absorption von PI ist bei 535 nm maximal (Sträuber and Müller 2010) und bei 488 nm passabel.

Zur gleichzeitigen Detektion von toten und vitalen Bakterien wird PI häufig in Kombination mit einem lipophilen Nukleinsäuren-Fluoreszenzfarbstoff, welcher alle Zellen färbt, eingesetzt. Im Gegensatz zu PI penetrieren solche Farbstoffe intakte Membranen. Hierbei ist insbesondere die Anwendung des kommerziell erhältlichen LIVE/DEAD BacLight™ Kits (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) hervorzuheben, welches PI mit dem grün fluoreszierenden Nukleinsäurenfarbstoff SYTO 9 kombiniert. Zahlreiche Studien demonstrieren den Einsatz des Kits in Verbindung mit der DZM zur Charakterisierung der Vitalität von Bakterien, Quantifizierung toter Bakterien sowie der Gesamtbakterienanzahl, u.a. bei der Untersuchung von Trink- und Frischwasserproben (Berney et al. 2007; Boulos et al. 1999; Hoefel et al. 2003), von Milch, Molkereiprodukten (Bunthof et al. 2001a; Kramer et al. 2009; Lahtinen et al. 2006) und von Wein (Bouix and Ghorbal 2013) auf Kontaminationen; aber auch bei der Überwachung von Bioproduktionsprozessen (Christiansen et al. 2003; David

et al. 2012) sowie von Prozessen zur Herstellung von Getränken und Lebensmitteln (Baena-Ruano et al. 2006; Bunthof et al. 2001b).

Alternativ wird häufig die Kombination des ebenfalls grün fluoreszierenden SYBR Green I mit PI eingesetzt, die auch als Nukleinsäuren-Doppelfärbemethode bekannt ist (NADS, engl. *nucleic acid double staining*) (Barbesti et al. 2000; Gregori et al. 2001).

Sowohl SYTO9 als auch SYBR Green I binden selektiv an dsDNS (Haugland 2002; Zipper et al. 2004) und verstärken im Komplex die Fluoreszenz. Aufgrund des Absorptionsmaximums von SYTO9 und SYBR Green I bei 483 nm bzw. 497 nm (Angaben des Herstellers) können diese Farbstoffe wie PI mit einem 488 nm Laser angeregt werden. Die simultane Detektion der grünen und roten Fluoreszenz im Durchflusszytometer bei der Anwendung dieser Doppelfärbung erlaubt den Nachweis sowohl vitaler als auch toter Bakterien.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz von SYBR Green I gegenüber SYTO 9 aufgrund der vom Hersteller berichteten höheren Quantum-Ausbeute, bei Anregung im Komplex mit dsDNS (Haugland 2002) und der geringeren Kosten bevorzugt. Zudem wurde die erfolgreiche Anwendung der Färbekombination SYBR Green I mit PI bereits in der Literatur zur Untersuchung der Vitalität von bakteriellen Mischgemeinschaften beschrieben (Alonso-Sáez et al. 2006; Berney et al. 2007; Falcioni et al. 2006; Falcioni et al. 2008; Foladori et al. 2010; Johnson et al. 2009; Ziglio et al. 2002).

2.2.4.3. Bestimmung der Vitalität in Mischkulturen

Zur Bestimmung der Vitalität einzelner Spezies in bakteriellen Mischkulturen mittels DZM bietet sich der Einsatz einer Kombination von extrazellulärer Färbung zur Spezies-spezifischen Detektion mit intrazellulärer Färbung zur Anzeige zellulärer Vorgänge / Funktionen an.

In der Fachliteratur gibt es jedoch bisher nur wenige Vitalitätsstudien bakterieller Mischgemeinschaften bei denen eine Diskriminierung nach Spezies durchgeführt wurde (Übersicht in (Müller and Nebe-von-Caron 2010)). Einerseits ist das darauf zurückzuführen, dass für Bakterien nur wenige Spezies-spezifische fluoreszenzkonjugierte Marker, u.a. monoklonale Antikörper, zur Immunfluoreszenzdetektion kommerziell zur Verfügung stehen. Andererseits geht die

Etablierung solcher durchflusszytometrischer Methoden mit einem erheblichen experimentellen und zeitlichen Aufwand einher, da die Färbungen für jede einzelne Spezies wegen der Unterschiede im Aufbau der Zellwand sowie in den metabolischen Fähigkeiten getestet bzw. angepasst werden müssen.

Aufgrund der hohen Spezifität monoklonaler Antikörper gegen Spezies-spezifische Zielproteine auf der Bakterienoberfläche werden diese vorwiegend zur Charakterisierung einzelner Spezies in bakteriellen Mischgemeinschaften in Kombination mit Vitalitätsfarbstoffen eingesetzt. Die in der Fachliteratur beschriebenen Methoden (Ackermann et al. 1995) kamen bisher eher zum Nachweis sowie zur Quantifizierung einzelner Vitalitätspopulationen einer Spezies als zur Charakterisierung der Vitalität mehrerer einzelner Spezies in Mischgemeinschaften zum Einsatz. In der Literatur finden sich Studien zur Spezies-spezifischen Detektion metabolisch-aktiver oder enzymatisch-aktiver (Esterase-Aktivität im Zytosol) Bakterien oder auch von Bakterien mit intakter Membran in Mischgemeinschaften bzw. in komplexen Proben (Clarke and Pinder 1998; Henningson et al. 1998; Nebe-von-Caron et al. 2000; Tebaldi et al. 2010).

3. Material und Methoden

3.1. Herstellung von Lösungen, Puffer und Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die in der Arbeit hergestellten Lösungen, Puffer und Medien mit Reinstwasser (MilliQ) aus einer Milli-Q Biocel A10 Anlage (Merck Millipore, Schwalbach, D) hergestellt.

3.1.1. Arbeitslösungen und Puffer

Die hier in den nachfolgenden Tabellen aufgeführten Lösungen und Puffer (Tab. 2 - 20) wurden nach der Herstellung in einer Sterilbank (Herasafe KS 15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) steril filtriert (0,2 μm , Nalgene Rapid Flow Filter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Lagerung erfolgte in Duran® Borosilikat-Glasflaschen unterschiedlicher Volumina (Duran Group GmbH, Mainz, D), verschlossen und bei Raumtemperatur (RT).

Tab. 2 Herstellung von Di-Natriumhydrogen-Phosphatlösung (0,4 M).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 400 mL MilliQ
Na_2HPO_4	$141,95 \text{ g mol}^{-1}$	22,7 g

Tab. 3 Herstellung von Natriumdihydrogen-Phosphatlösung (0,4 M).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 200 mL MilliQ
NaH_2PO_4	$137,99 \text{ g mol}^{-1}$	11,04 g

Tab. 4 Herstellung Natriumchlorid-Phosphatpuffer (NaCl-P-Puffer, pH=7,2).

Die Zusammensetzung ist angelehnt an die Zubereitung nach Müller *et al.* (Müller *et al.* 2000a).

Substanz	Zugabe/ Einwaage auf 500 mL	Endkonzentration
Na_2HPO_4 (Tab. 2)	100 mL (Richtwert)	
NaH_2PO_4 (Tab. 3)	400 mL (Richtwert)	
NaCl	4,38 g	0,15 M

Die Na_2HPO_4 -Lösung wurde gegen die NaH_2PO_4 -Lösung titriert bis ein pH-Wert von 7,2 erreicht wurde. Nach der Zugabe der NaCl-Lösung wurde der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls nochmal mit den Arbeitslösungen eingestellt.

Tab. 5 Herstellung von NaCl-P-Puffer mit Rinderalbumin.
(BSA, engl. *bovine serum albumin*)

Substanz	Zugabe/ Einwaage auf 500 mL	Endkonzentration
Na ₂ HPO ₄ (Tab. 2)	100 mL (Richtwert)	
NaH ₂ PO ₄ (Tab. 3)	400 mL (Richtwert)	
NaCl	4,38 g	0,15 M
BSA	250 mg	0,05 % (Masse-%)

Die Herstellung erfolgte wie oben. Der pH-Wert blieb nach Zugabe von BSA unverändert.

Tab. 6 Herstellung von NaCl-P-Puffer mit BSA und Tween 20.

Substanz	Zugabe/ Einwaage auf 500 mL	Endkonzentration
Na ₂ HPO ₄ (Tab. 2)	100 mL (Richtwert)	
NaH ₂ PO ₄ (Tab. 3)	400 mL (Richtwert)	
NaCl	4,38 g	0,15 M
BSA	0,25 mg	0,05 % (Masse-%)
Tween 20	5 mL	1 % (Volumen-%)

Die Herstellung erfolgte wie oben. Der pH-Wert blieb nach Zugabe von BSA und Tween 20 unverändert.

Tab. 7 Herstellung von Ringerlösung (Ringerlösung A, pH 7,2).

Die Zusammensetzung ist identisch mit der Herstellung nach Bast (Bast 2001).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 1 L MilliQ
NaCl	58,44 g mol ⁻¹	9,00 g
KCl	74,55 g mol ⁻¹	0,42 g
NaHCO ₃	84,01 g mol ⁻¹	0,20 g
CaCl*2H ₂ O	146,98 g mol ⁻¹	0,32 g

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCL eingestellt.

Tab. 8 Herstellung von 1/4 Ringerlösung (Ringerlösung B, pH 7,2).

Die Zusammensetzung ist identisch mit der Herstellung nach Bast (Bast 2001).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 1 L MilliQ
NaCl	58,44 g mol ⁻¹	2,250 g
KCl	74,55 g mol ⁻¹	0,105 g
NaHCO ₃	84,01 g mol ⁻¹	0,050 g
CaCl*2H ₂ O	146,98 g mol ⁻¹	0,081 g

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt.

Tab. 9 Herstellung von Magnesiumsulfatlösung (pH 7,2, 10 mM).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 500 mL MilliQ
MgSO ₄	120,37 g mol ⁻¹	0,602 g

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH eingestellt.

Tab. 10 Herstellung von Dulbecco-Puffer (mit Dulbecco's buffered saline, pH 7,2).

Die Herstellung erfolgte gemäß der Beschreibung von Shapiro und Nebe-von-Caron (Shapiro and Nebe-von-Caron 2004).

Substanz	Masse-% an Gesamtvolumen	Einwaage auf 100 mL Dulbecco's buffered saline
Pepton aus Casein	0,1 %	1,00 g
Bernsteinsäure Dinatrium-Salz	0,1 %	1,00 g
Glukose	0,2 %	2,00 g
EDTA	0,15 %	1,49 g

Die aufgeführten Substanzen wurden in 100 mL einer 10-fach konzentrierten Stammlösung von Dulbecco's buffered saline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) gelöst und auf 1 L MilliQ aufgefüllt.

Tab. 11 Herstellung von Phosphat gepufferter NaCl-Lösung (PBS).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 1 L MilliQ
NaCl	58,44 g mol ⁻¹	8,00 g
KCl	74,55 g mol ⁻¹	0,20 g
NaH ₂ PO ₄	137,99 g mol ⁻¹	1,15 g
K ₂ HPO ₄	174,18 g mol ⁻¹	0,20 g

Der pH-Wert lag nach Herstellung zwischen 7,4 und 7,6. Der Puffer wurde danach für 20 min bei 121°C autoklaviert.

Tab. 12 Herstellung von Lösungen und Puffer mit 0,05 mg mL⁻¹ Glutaraldehyd (GTA).

Substanz	Zugabe auf 500 mL	Endkonzentration
GTA (500 mg mL ⁻¹)	50 µL	0,05 mg mL ⁻¹

Zur Vitalitätsanalyse der Bakterien wurde GTA in den Lösungen bzw. Puffern zugegeben. Der pH-Wert musste gegebenenfalls nach GTA-Zugabe mit 1 M NaOH eingestellt werden.

Tab. 13 Herstellung von Ringerlösung B mit 0,05 mg mL⁻¹ GTA, 3 M KCl und 0,05 % BSA (Ringerlösung B_{opt}, pH 7,2).

Substanz	Zugabe / Einwaage auf 500 mL	Endkonzentration
GTA (500 mg mL ⁻¹)	50 µL	0,05 mg mL ⁻¹
KCl	111,83 g	3 M
BSA	0,25 g	0,05 % (Masse-%)

Zur Vitalitätsanalyse der Bakterien in Mischkultur wurde GTA, KCl und BSA der Ringerlösung B (Tab. 8) in der angegebenen Reihenfolge hinzugefügt. Der pH Wert wurde nach Zugabe von GTA und KCl mit 1 M NaOH erneut eingestellt. BSA wurde immer erst am Versuchstag hinzugefügt.

Tab. 14 Herstellung von Natriumdihydrogen-Phosphatlösung (1,5 M).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 200 mL MilliQ
NaH ₂ PO ₄	137,99 g mol ⁻¹	41,4 g

Tab. 15 Herstellung von Di-Kaliumhydrogen-Phosphatlösung (1,5 M).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 400 mL MilliQ
K ₂ HPO ₄	174,18 g mol ⁻¹	104,51 g

Tab. 16 Herstellung von Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (1,5 M, pH=7,0).

Substanz	Zugabe auf 600 mL
NaH ₂ PO ₄ (Tab. 14)	200 mL
K ₂ HPO ₄ (Tab. 15)	400 mL

Tab. 17 Herstellung von Natriumhydroxidlösung (0,6 M).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 200 mL MilliQ
NaOH	40,0 g mol ⁻¹	4,78 g

Tab. 18 Herstellung von Nitrilotriessigsäure-Lösung (NTA, 0,25 M).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage auf 100 mL 0,6 M NaOH (Tab. 17)
NTA	191,2 g mol ⁻¹	4,78 g

Tab. 19 Herstellung von TRIS-Phosphat-EDTA-Puffer (TPE-Puffer, pH 7,5).

Substanz	Molekulargewicht	Einwaage / Zugabe auf 2 L MilliQ
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	121,14 g mol ⁻¹	216,000 g
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	292,25 g mol ⁻¹	1,488 g
H ₃ PO ₄ (85 Vol.-%)	98,00 g mol ⁻¹ (Richtwert)	50 mL (Richtwert)

Der pH-Wert von 7,5 wurde mithilfe von 85 %-iger *ortho*-Phosphorsäure H₃PO₄ (Volumen-%) eingestellt.

Tab. 20 Herstellung von 10 %-iger Natriumazidlösung (NaN₃-Fixierlösung, Masse-%).

Substanz	Einwaage auf 100 mL Milli Q
NaN ₃	10 g

Tab. 21 Herstellung von 1%-iger Agarose für Objektträger für Mikroskopie (Masse-%).

Substanz	Einwaage auf 100 mL 10 %-igen TPE-Puffer (Volumen-%)
Agarose	1 g

Der TPE-Puffer wurde zuvor 1:10 mit Milli Q verdünnt. Nach der Zugabe von Agarose wurde die Lösung in einer Mikrowelle für 3 min bei 800 W erhitzt. Das Volumen, welches durch das Verdampfen verloren ging, wurde mit MilliQ aufgefüllt.

3.1.2. Medien

Zur Kultivierung der Bakterien in Schüttelkolben wurde das kommerziell verfügbare Medium M199, Gibco® cell culture basal medium powder, (ohne NaCO₃, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA) gepuffert mit Phosphat eingesetzt. Zur Vermeidung von Ausfällungen im Medium wurde zusätzlich Nitrilotriessigsäure (NTA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) hinzugefügt. Die Herstellung erfolgte gemäß der Angaben in Tab. 22 in der dargestellten Reihenfolge. Das Medium wurde im Anschluss in einer Sterilbank (Herasafe KS 15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) steril filtriert (0,2 µm, Nalgene Rapid Flow Filter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und verschlossen bei 4°C gelagert.

Tab. 22 Herstellung des Kultivierungsmediums (M199-NTA-P, pH 7,0).

Substanz	Menge / Zugabe auf 1 L MilliQ	Endkonzentration
Medium M199	16,06 g (Angabe des Herstellers)	-
NTA (0,25 M) (Tab. 18)	16 mL	4 µM
Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer (Tab. 16)	25 mL	37,5 mM

Zur Kultivierung der Bakterien auf Agarplatten wurde Luriani Bertani-Agar (LB-Agar) hergestellt. Die Bestandteile wurden gemäß der Angaben in Tab. 23 in 0,5 L MilliQ gelöst. Diese Lösung wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert und unter Rühren abgekühlt. Nach 10 bis 15 min wurden in einer Sterilbank (Herasafe KS 15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) jeweils 20 mL der Lösung in eine sterile Petrischale (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D) gegossen. Der Agar kühlte nach weiteren

15 min ab. Danach wurden die Schalen mit einem Deckel verschlossen und bei 4°C gelagert.

Tab. 23 Herstellung des LB-Agars.

Substanz	Einwaage auf 1 L MilliQ
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

3.1.3. Farbstofflösungen für die Fluoreszenzmarkierung

Tab. 24 Herstellung der SYBR Green I-Arbeitslösung.

Substanz	Zugabe auf 100 µL MilliQ	Verdünnung
SYBR Green I	1 µL	1:100

Hier wird die Verdünnung der Stammlösung (10,000X Konzentrat in DMSO, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA) angegeben, da der Hersteller keine Angaben zur Konzentration macht. Die SYBR Green I-Arbeitslösung wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt. Die Lösung wurde bis zur Anwendung im Dunkeln bei RT gelagert.

Tab. 25 Herstellung der PI-Arbeitslösung.

Substanz	Einwaage auf 100 µL MilliQ	Endkonzentration
PI	1 mg	1 mg mL ⁻¹

Die PI-Arbeitslösung wurde nach der Herstellung mittels einem 0,2 µm Spritzenfilter (Spartan 13/RC, Whatman GmbH, Dassel, D) filtriert. Die Lösung wurde bis zur Anwendung im Dunkeln bei RT gelagert.

Tab. 26 Herstellung der DAPI-Arbeitslösung.

Substanz	Einwaage / Zugabe auf 74 mL MilliQ	Endkonzentration
DAPI (M=350,25 g mol ⁻¹)	3,7 mg	143 µM
Dimethylformamid (M=73,10 g mol ⁻¹)	740 µL	130 µM

Die DAPI-Arbeitslösung wurde nach der Herstellung mittels einem 0,2 µm Spritzenfilter (Spartan 13/RC, Whatman GmbH, Dassel, D) filtriert. Die Lösung wurde bis zur Anwendung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

3.1.4. Weizenkeimagglutinin für die Fluoreszenzmarkierung

Soweit nicht anders angegeben, wurden die WGA-Suspensionen in speziellen Reaktionsgefäßen (1,5 mL Protein LoBind-Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, D) hergestellt, nachfolgend in einer Sterilbank (Herasafe KS 15, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, USA) steril filtriert (0,2 µm Spritzenfilter, Spartan 13/RC, Whatman GmbH, Dassel, D) und verschlossen bei 4°C gelagert.

Tab. 27 Herstellung der WGA-Stammsuspension.

Substanz	Einwaage auf 1 mL MilliQ	Endkonzentration
NaHCO ₃	8,4 mg	0,1 M
WGA	1,5 mg	1,5 mg mL ⁻¹

Tab. 28 Herstellung der WGA-Alexa Fluor 488-Stammsuspension.

Substanz	Einwaage auf 1 mL MilliQ	Endkonzentration
NaHCO ₃	8,4 mg	0,1 M
WGA-Alexa Fluor®488	1,0 mg	1,0 mg mL ⁻¹

Die Suspension wurde bis zur Anwendung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Für den gleichzeitigen Einsatz von WGA und SYBR Green I / PI wurde WGA mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Die Markierung erfolgte mittels des Mix-n-Stain™CF405S Antikörper-Markierungs-Kits (für 50 - 100 µg mL⁻¹ Protein, Biotium Inc., Hayward, USA) in einer Sterilbank (Herasafe KS 15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Dazu wurden 100 µL einer mit MilliQ 1:1 verdünnten WGA-Suspension (50 %, Volumen-%, Tab. 28) mit 11,1 µL Mix-n-Stain Reaktionspuffer in einem Reaktionsgefäß (1,5 mL Protein LoBind-Tube, Eppendorf AG, Hamburg, D) vermischt. Danach wurde die gesamte Suspension in die vom Hersteller gelieferte Ampulle mit CF405S überführt, durchmischt und anschließend für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden 300 µL Mix-n-Stain Reaktionspuffer hinzugegeben und gut durchmischt. Die finale Suspension enthielt 0,182 mg mL⁻¹ CF405S markiertes WGA, die bis zur Anwendung im Dunkeln bei 4°C gelagert wurde.

3.1.5. Antikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung

Zur Spezies-spezifischen Detektion von *P. aeruginosa* bzw. *B. cepacia* wurden verschiedene kommerziell verfügbare, spezifische monoklonale Maus-Antikörper (mMAK) des Typs IgG auf deren Eignung zur Immunfluoreszenzdetektion mittels DZM und Fluoreszenzmikroskopie getestet (Tab. 29). Darüber hinaus wurden von AuCoin *et al.* hergestellte, für *B. cepacia*-spezifische mMAK getestet (mAb 5D8, bereitgestellt durch Prof. David AuCoin, University of Nevada, Reno, USA, (AuCoin *et al.* 2009)). Die Fluoreszenzmarkierung der Bakterien erfolgte anhand

einer indirekten Immunfluoreszenzmarkierung durch simultanen Einsatz fluoreszenz-konjugierter Maus-spezifischer Sekundärantikörper des Typs IgG (SAK, goat anti-mouse IgG mit R-Phycoerithrin (R-PE), Life Technologies, Carlsbad, USA), die an der Fragment-kristallisierbaren Region (Fc-Region) der Spezies-spezifischen mMAK (Primärantikörper, PAK) binden.

Die Antikörper-Stammsuspensionen wurden mit den jeweils für die Proben verwendeten Puffer bzw. Lösungen entsprechend der einzusetzenden Konzentration verdünnt. Diese Arbeitssuspensionen wurden an jedem Versuchstag frisch hergestellt (in 1,5 mL Protein LoBind Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, D), anschließend in einer Sterilbank (Herasafe KS 15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) steril filtriert (0,2 µm Spritzenfilter, Spartan 13/RC, Whatman GmbH, Dassel, D) und verschlossen bei 4°C gelagert.

Tab. 29 Getestete Spezies-spezifische mMAK des Typs IgG.

Primärantikörper zur indirekten Immunfluoreszenzdetektion von *P. aeruginosa* (A-C) und *B. cepacia* (D, E) mittels DZM und Fluoreszenzmikroskopie. Angaben des Herstellers u.a. zur Reaktivität des mMAK, zum Produktionsstamm (Hybridomazelllinie = Klon) sowie zur Konzentration der Stammsuspension. Lagerung bei 4°C.

	Immunogen anti ...	Reaktivität	Klon	Konzentration	Hersteller / Bestellnummer
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B11	0,1 mg mL ⁻¹	Acris Antibodies GmbH, Herford, D, AM00420PU-N
B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Serotyp 5c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Serotyp 5c	SD6930	1,0 mg mL ⁻¹	ImmuQuest Ltd, Cleveland, UK, IQ372
C	Lipoprotein H2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	MA 1-6	5,0 mg mL ⁻¹	Millipore, Temecula, USA, MAB 10225
D	<i>Pseudomonas cepacia</i> (anti <i>B. cepacia</i>)	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i>	1144/ 209	1,0 mg mL ⁻¹	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, D, BT78-8993-09
E	<i>Burkholderia cepacia</i> BTS 13 (mAb 5D8)	<i>Burkholderia cepacia</i> complex: u.a. <i>B. cepacia</i>	5D8	5,0 mg mL ⁻¹	AuCoin <i>et al.</i> (AuCoin <i>et al.</i> 2009) bereitgestellt von University of Nevada, School of Medicine, USA

3.2. Bakterienstämme

Pseudomonas aeruginosa PAO1 wurde von Kathrin Riedel (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Technische Universität, München, D) bereitgestellt. *Burkholderia cepacia* DSM 7288 wurde von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (DSMZ, Braunschweig, D) bezogen. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 wurde von Prof. Brigitte König (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg, D) bereitgestellt.

Diese Stämme wurden in 800 µL sterilen 87 %-igen Glycerin (Volumen-%) in Kryogefäßen (Cryo.sTM, 2 mL, Greiner bio-one GmbH; Frickenhausen, D) bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

Für die qT-RFLP-Analyse wurde als interner Quantifizierungsstandard (IQS) ein klinisches Isolat von *Cambylobacter jejuni* verwendet.

Das Isolat wurde von Prof. Brigitte König (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Otto-von-GuerickeUniversität, Magdeburg, D) bereitgestellt.

Die Stammhaltung von *C. jejuni* erfolgte in Mikrobanken (Microbank organism storage system, Pro-Lab Diagnostics Inc., Round Rock, USA) bei einer Temperatur von -80°C.

3.3. Kultivierung von Bakterien

Die nachfolgend beschriebenen Vorgänge der Kultivierung sowie der Probenahme und Ernte erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Herasafe KS 15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3.3.1. Kultivierung auf Agarplatten

Für jeden Stamm wurde Zellmaterial mittels einer sterilen Impföse (Einmal-Impföse, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D) aus einem aufgetauten Kryogefäß entnommen und jeweils auf eine sterile LB-Agarplatte im Drei-Ösen-Ausstrich-Verfahren ausgestrichen. Die Bebrütung der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Inkubationsschrank (Heraeus Hera@Cell, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Die Platten wurden bei 4°C gelagert und alle 14 Tage erneuert.

3.3.2. Kultivierung in Schüttelkolben

Die Bakterien wurden in M199-NTA-P-Medium (Tab. 22) in 250 mL sterilen Weithals-Erlenmeyer Kolben ohne Schikanen (Duran Group GmbH, Mainz, D), verschlossen mit luftdurchlässigen Wattestopfen, bei einer Temperatur von 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 80 % und einer Umdrehungszahl von 200 min⁻¹ (Inkubationsschüttler Kühner Shaker ISF-1-W, Kühner AG, Birsfelden, CH) kultiviert.

Für die Untersuchungen wurden Kultivierungen sowohl in Rein- als auch in Mischkulturen durchgeführt. Inokula der Hauptkulturen wurden jeweils aus Reinkulturen mit exponentiell wachsenden Bakterien, wie in der Dissertation von Riedele beschrieben (Riedele 2013), gewonnen. Dazu wurde Zellmaterial mittels einer sterilen Impföse von der LB-Platte entnommen und zur Kultivierung zu 20 mL M199-NTA-P-Medium im Kolben zugegeben.

Nach der Kultivierung über Nacht wurde die gesamte Suspension in ein 50 mL Reaktionsgefäß (Falcon, Greiner bio-one GmbH; Frickenhausen, D) überführt, anschließend für 10 min bei 4°C und 3522 x g zentrifugiert (Heraeus® Multifuge 1S-R, Thermo Scientific, Waltham, USA) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde danach mit PBS gewaschen, d.h. in PBS resuspendiert, zentrifugiert (10 min, 4°C, 3522 x g) und den Überstand verworfen. Das Pellet wurde danach in 20 mL frisches, auf 37°C vorgewärmtes M199-NTA-P-Medium resuspendiert und die Suspension in einen sterilen Kolben zur weiteren Kultivierung überführt. Nach 1,5 h Kultivierung wurde ein definiertes Volumen an Suspension zur Inokulation der Hauptkulturen entnommen und in 50 mL frisches, auf 37°C vorgewärmtes M199-NTA-P-Medium im Kolben überführt. Mit diesem Volumen wurde in der Hauptkultur die optische Dichte, gemessen bei 650 nm (OD₆₅₀, siehe 3.5.1), so eingestellt, dass die Startgesamtzellkonzentration in jeder Kultur 1 x 10⁷ Zellen mL⁻¹ betrug (Rein- und Mischkultur). Die Einstellung der OD erfolgte für jede Spezies basierend auf der linearen Korrelation zwischen der mittels DZM ermittelten Zellkonzentration und der OD₆₅₀ bei der Analyse von Reinkulturproben (Abb. 7). Die Konzentrationen wurden durch durchflusszytometrische Zählung DAPI-markierter Bakterien, wie nachfolgend unter 3.4.2 - 3.4.3 beschrieben, ermittelt. Das Inokulationsvolumen einer Spezies *i* (V_{RK,i} bzw. V_{MK,i}) wurde mit Gl. 1 durch Multiplikation des Gesamtvolumens der Kultur (V_{Kultur} = 50 mL) mit dem Verhältnis der für die Spezies einzustellenden OD₆₅₀ zum Startzeitpunkt (OD_{650,ref,i}) und der OD₆₅₀ der Vorkultur nach 1,5 h Kultivierung

($OD_{650,VK,i}$) berechnet. Damit die Startgesamtzellkonzentration in Mischkulturen mit der in Reinkulturen übereinstimmte, wurde zur Berechnung des Inokulationsvolumens ($V_{MK,i}$) für Zwei-Spezies-Mischkulturen ein Faktor von 0,5 (Gl. 2) bzw. für Drei-Spezies-Mischkulturen ein Faktor von 1/3 (Gl. 3) eingeführt. Die Kultivierung der Hauptkulturen, der Rein- sowie Mischkulturen, erfolgte über eine Dauer von 32 h.

$$V_{RK,i} = V_{Kultur} \cdot \frac{OD_{650,ref,i}}{OD_{650,VK,i}} \quad \text{Gl. 1}$$

$$V_{2-MK,i} = V_{Kultur} \cdot 0,5 \cdot \frac{OD_{650,ref,i}}{OD_{650,VK,i}} \quad \text{Gl. 2}$$

$$V_{3-MK,i} = V_{Kultur} \cdot \frac{1}{3} \cdot \frac{OD_{650,ref,i}}{OD_{650,VK,i}} \quad \text{Gl. 3}$$

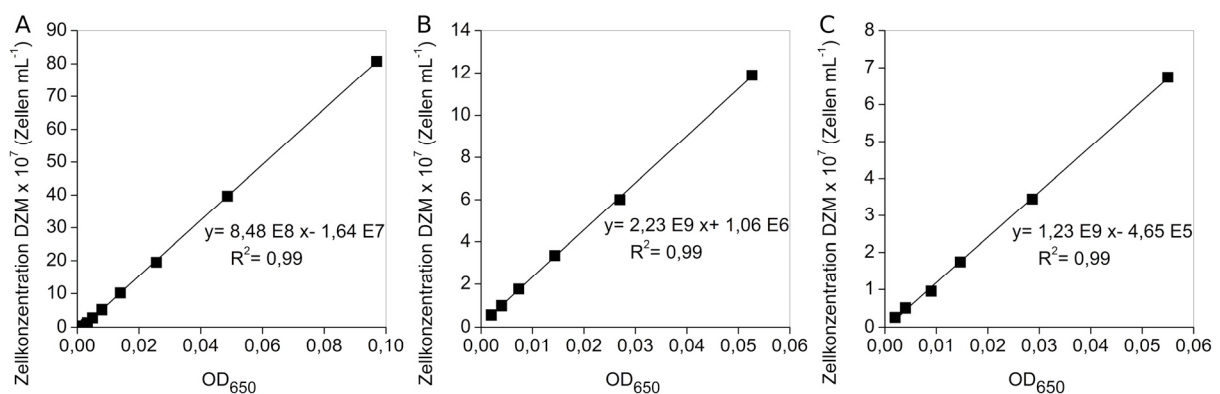


Abb. 7 Lineare Korrelation zwischen OD₆₅₀ und der Zellkonzentration.

Analyse von Reinkulturproben von (A) *P. aeruginosa*, (B) *B. cepacia* und (C) *S. aureus*. Konzentrationen wurden mittels DZM durch Zählung DAPI-markierter Bakterien ermittelt. Auftragung Konzentrationswerte der DZM über OD₆₅₀-Werte sowie Darstellung der linearen Regression einschließlich Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2).

Zur Etablierung der Färbemethoden für die durchflusszytometrische Analyse wurden Reinkulturen verwendet, welche im Unterschied zu den Hauptkulturen wie die Vorkulturen kultiviert wurden: Zellen wurden über Nacht in 20 mL M199-NTA-P-Medium kultiviert, geerntet, mit PBS gewaschen und in 20 mL M199-NTA-P-Medium über 5 h rekultiviert. Alle Kultivierungen inklusive der Vorkulturen wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt (biologische Replikate).

Für Probenahmen wurden die Kolben aus dem Schüttler entnommen und in einer Sterilbank geöffnet. Das jeweilige Volumen an Suspension wurde mittels Pipette in

ein steriles 2 mL Röhrchen (Greiner bio-one GmbH; Frickenhausen, D) überführt. Die Kolben kamen unmittelbar danach zurück in den Schüttler.

3.3.3. Kultivierung von *Campylobacter jejuni* für qT-RFLP

Für die qT-RFLP-Analyse wurde als IQS eine *C. jejuni*-Suspension verwendet. Dazu wurde eine Kugel aus der Mikrobank (siehe 3.2) auf eine sterile Kohle-Agar-Platte (Selektivagar, CCDA blutfrei, Oxoid GmbH, Wedel, D) ausgerollt. Die Bebrütung der Platten erfolgte in einem 2,5 L Anaerobiertopf mit einem Beutel Campygen^{TN} (Campygen^{TN}, Oxoid GmbH, Wedel, D) für drei Tage bei 37°C. Nach Entnahme der Platten aus dem Topf wurden die gewachsenen Kulturen auf der Platte mit einer sterilen Impföse verteilt und die Platte über Nacht im Schrank (Heraeus Hera®Cell, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bei 37°C bebrütet. Danach wurde auf die Platte 1,5 mL steril filtriertes PBS gegeben. Im Anschluss wurde das Zellmaterial von der Platte mittels einem sterilen Spatels abgelöst und in ein steriles 50 mL Reaktionsgefäß (Falcon, Greiner Bio-one, Frickenhausen, D) überführt, für 10 min bei 4°C mit 3000 x g zentrifugiert (Heraeus® Multifuge 1S-R, Thermo Scientific, Waltham, USA), mit PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 1,5 mL Glycerinhaltiger PBS (90 %, Volumen-%, Tab. 11) resuspendiert und es wurde eine OD₆₀₀ von 0,4 ± 0,05 eingestellt. Den Ergebnissen aus Plattenzählungen mit *C. jejuni* zufolge, entspricht eine OD₆₀₀ von 0,4 ± 0,05 einer Konzentration von 4 x 10⁵ KBE mL⁻¹. Die Suspension wurde anschließend zu je 100 µL in sterilen 2 mL Reaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, D) aliquotiert und bis zur Anwendung bei -80°C gelagert.

3.4. Durchflusszytometrische Analyse

In dieser Arbeit wurde für die Analysen ein Durchflusszytometer des Typs CyFlow® space (Partec GmbH, Münster, D) eingesetzt. Die Färbemethoden zur Fluoreszenzmarkierung der Bakterien wurden basierend auf der technischen Ausstattung des Zytometers (Tab. 30) etabliert. So wurden, z.B. für die Fluoreszenzmesskanäle passende Farbstoffe ausgewählt. Prinzipiell sind die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden auch für andere Durchflusszytometer mit Multifluoreszenzbasierter Technik einsetzbar.

Zur Bestimmung der Vitalität wurden die Bakterien mit den Fluoreszenzfarbstofflösungen PI und SYBR Green I inkubiert. Die Identifizierung toter Zellen mit PI und die Färbung aller Zellen mit SYBR Green I erlaubte die gleichzeitige Detektion von toten und vitalen Bakterien. Diese Färbung wurde mit der Markierung von *S. aureus* mittels fluoreszenzkonjugiertem WGA und der Markierung von *B. cepacia* mittels Immunfluoreszenz kombiniert. Aus der Etablierung ging ein Vierfarbenprotokoll für die DZM hervor, das die Spezies-spezifische Bestimmung der Vitalität von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Misch- und Reinkulturen erlaubte.

Im Zuge der Etablierung der (Spezies)-spezifischen Fluoreszenzmarker für die DZM wurde darüber hinaus ein Dreifarbenprotokoll zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration der drei relevanten Bakterienspezies in Misch- und Reinkultur entwickelt.

Da die Entwicklung und Optimierung der Färbemethoden Teil der Aufgabenstellung dieser Arbeit waren, wird darauf nicht in diesem Kapitel, sondern in den folgenden Kapiteln „Ergebnisse“ und „Diskussion“ (Kapitel 4 und 5) eingegangen.

Tab. 30 Technische Ausstattung des Durchflusszytometers CyFlow® Space (Partec GmbH, Münster, D).

Komponente	Spezifikation
Optisches System	
Laser	Argon-Ionen-Laser, 20 mW, 488 nm (Laserprofil 15 x 30 µm elliptisch) UV-Diodenlaser, 16 mW, 375 nm
Objektiv	40 x, Apertur 1,25
Messparameter	
- Streulichtkanäle	FSC: Vorwärtsstreulicht bei 488 nm SSC: Seitwärtsstreulicht bei 488 nm
- Fluoreszenzkanäle / Emissionsfilter	FL1: BP 527/15 nm (grün) FL2: BP 590/25 nm (orange) FL3: LP 630 nm (rot) FL4: BP 455/25 nm (blau)
Fluidisches System	
Flusszelle	Quartzmessküvette maximale Partikeldurchmesser: 200 µm
Probezufuhr	Probenvolumen: 800 – 1200 µL Regelbare Proberate: 0 – 50 µL/s
Messeinheit mit definierten Volumen	Messeinheit zur absoluten, volumetrischen Partikelzählung mit 200 µL Zählvolumen
Elektronisches System	
Signaldetektion	Photomultiplier tube (PMT, ein pro Kanal)
Signalverstärkung	linear oder logarithmisch (3-4 Dekaden)
Signalverarbeitung und –aufzeichnung	16 bit A/D Wandler, parallele Datenverarbeitung in Echtzeit Messsignale: Pulshöhe, -fläche, -breite 2-wavelength signal delay (t = 50 ms) bei simultaner Verwendung beider Laser
Software	
zur Steuerung, Regelung und Datenaufzeichnung	FloMax Version 2.70

3.4.1. Messprozedur

Als Hüllflüssigkeit wurde entgastes und steril filtriertes Reinstwasser (MilliQ) verwendet. Die Steuerung und Regelung des Durchflusszytometers sowie die Datenaufzeichnung erfolgte mittels der Gerätesoftware (FloMax Version 2.70, Partec GmbH, Münster, D). Zur Messung wurden jeweils 1 mL Probe (Bakteriensuspension) in 3 mL Analyseröhrchen (3,5 mL, Sartstedt AG & Co., Nürnberg, D) eingesetzt. Die Proberate wurde auf einen festen Wert geregelt, sodass die Partikelrate während der Analyse in einem Bereich von 100 bis 1000 Partikel s⁻¹ lag. Beide Laser waren zugeschaltet (Anregung mit 375 nm und mit 488 nm). Während der Messung wurden in jedem Messkanal jeweils die Pulshöhen als Signale abgegriffen. Diese Signale wurden logarithmisch verstärkt (4 Dekaden). Alle aufgezeichneten Daten wurden mit

der Software im Format des DZM-Standards 3.0 (FCS) gespeichert. In der Regel wurden die Proben unmittelbar vor der Messung mit MilliQ verdünnt und anhand eines Vortexers (Reax top, Heidolph instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D) durchmischt. Zur Gewährleistung einer hohen statistischen Sicherheit wurde die Gesamtanzahl der aufgezeichneten Ereignisse auf 20.000 Partikel pro Messung festgelegt, welche somit das Stopp-Kriterium der Messung vorgab (Funktion *stop event* in Partec FloMax Software, *stop event* = 20.000). Bei der Messung von Mischkulturproben wurde zur Erzielung einer höheren Datendichte teilweise eine Gesamtanzahl von mehr als 20.000 Partikel pro Messung (z.B. *stop event* = 50.000) festgelegt.

Bei der Anwendung der DZM zur Bestimmung der Zellkonzentration der Bakteriensuspensionen wurde in der Gerätesoftware der Zählmodus eingestellt. Dazu wurde die Funktion *stop event* deaktiviert und die Einstellung, dass nur Ereignisse im Zählanalysevolumen (200 µL) aufgezeichnet werden (Einstellung *only events in counting volume* in Partec FloMax Software unter Ansicht) vorgenommen. Das Zählanalysevolumen von konstant 200 µL ist vom Durchflusszytometer durch das technische Design der Proben-Anschluss-Einheit vorgegeben.

Zur Reduzierung des elektronischen Hintergrundrauschens in der Analyse wurde in der Regel das SSC-Messsignal als Diskriminator mit einem definierten unteren Schwellenwert (L-L, engl. *lower limit*) festgelegt. Darüber hinaus musste für jeden Messkanal die Spannung am PMT (Verstärkung, Einstellung *gain* in Partec FloMax Software) in Abhängigkeit vom angewandten Fluoreszenzfärbeprotokoll sowie von den detektierten Intensitäten angepasst werden. In Tab. 31 sind die optimierten Messeinstellungen am Durchflusszytometer für die Vitalitätsbestimmung von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Rein- und Mischkulturproben bei Anwendung des Vierfarbenprotokolls (siehe 3.4.2, Protokoll A, Abb. 9 (A)) zusammengefasst. Diese Einstellungen waren hinsichtlich der Detektion und der Datenaufzeichnung optimal. Die an den PMTs eingestellten Spannungen wurden darüber hinaus auch für die Messungen im Zählmodus für die Bestimmung der Zellkonzentration von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* bei Anwendung des Dreifarbenprotokolls (siehe 3.4.2, Protokoll B, Abb. 9 (B)) gewählt.

Tab. 31 Messeinstellungen am Durchflusszytometer zur Vitalitätsbestimmung.

Bestimmung der Vitalität von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Rein- und Mischkulturproben. Als Stopp-Kriterium der Messung wurde in der Gerätesoftware die Gesamtanzahl an aufgezeichneten Ereignissen mit mindestens 20.000 Partikel pro Messung definiert (*stop event* ≥ 20.000). Für jeden Messkanal ist die eingestellte Spannung am PMT (Verstärkung) angegeben.

Messkanal (Messparameter)	Spannung am PMT (mV)
FSC	173
SSC (Diskriminator, L-L)	260
FL1	460
FL2	408
FL3	500
FL4	437
Unterer Schwellenwert im SSC (L-L)	30,0 %

Vor der Analyse der Proben wurde täglich die Messperformance des Durchflusszytometers anhand von Referenzmessungen mit Beadstandard-suspensionen überprüft. Dabei wurden für jeden Messparameter die mittlere Lichtintensität (Streulicht- bzw. Fluoreszenzintensität, MFI) sowie der Variationskoeffizient (CV) bestimmt und protokolliert. Die mittlere Lichtintensität der erfassten Signalintensitäten (einer Verteilung oder Population) \bar{z} im entsprechenden Messkanal *c* (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 oder FL4) wurde durch Berechnung des geometrischen Mittelwerts aus der Intensität eines jeden Partikels $z_{c,k}$ bestimmt (Gl. 4). Die Intensitäten (Fluoreszenz) sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU, engl. *relative fluorescence units*) angegeben. Der geometrische Mittelwert wurde aufgrund der logarithmischen Verstärkung sowie der Darstellung der Signale gewählt.

$$\bar{z}_c = \left(\prod_{k=1}^n z_{c,k} \right)^{\frac{1}{n}} \quad \text{Gl. 4}$$

Die Berechnung des CV der erfassten Signalintensitäten im entsprechenden Messkanal *c* erfolgte gemäß Gl. 6, durch Division der Standardabweichung $s_{D,c}$ (Gl. 5) der erfassten Signalintensitäten durch den geometrischen Mittelwert \bar{z}_c (Gl. 4).

$$s_{D,c} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (z_{c,k} - \bar{z}_c)^2}{n-1}} \quad \text{Gl. 5}$$

$$CV_c = \frac{S_{D,c}}{\bar{Z}_c} \cdot 100$$

Gl. 6

Zur Bestimmung der mittleren Lichtintensitäten und der CV wurden für jeden Parameter definierte Regionen, wie beispielhaft in Abb. 8 gezeigt, angewandt. Die Messperformance in den Kanälen FSC, SSC, FL1, FL2 sowie FL3 wurde anhand von Messungen mit Multifluoreszenz-Kalibrierbeads (CytoCal Alignment Beads 480 nm, d=3,5 µm, Thermo Fisher Scientific Inc., Fremont, USA) bei einer Anregung mit 488 nm überprüft. Die Performance war für Messungen geeignet, wenn mittlere Intensitäten \bar{Z} von 100 ± 5 RFU bzw. für FSC von 10 ± 1 RFU erzielt wurden und der jeweilige $CV \leq 5 \%$ war (Abb. 8). Die Messperformance im Kanal FL4, sowie in den Kanälen FSC und SSC wurde anhand von Messungen mit blau fluoreszierenden Kalibrierbeads (Blue Fluorescence Polymer Microspheres, d=1 µm; Duke Scientific Corporation, Palo Alto, USA) bei Anregung mit 375 nm und 488 nm überprüft. Die Performance war für Messungen geeignet, wenn mittlere Intensitäten \bar{Z} von 100 ± 5 RFU und ein CV von $\leq 6 \%$ bzw. bei FL4 ein $CV < 10 \%$ erzielt wurden. In Tab. 32 sind die Messeinstellungen am Durchflusszytometer für die Beadreferenz-Messungen zusammengefasst.

Tab. 32 Messeinstellungen am Durchflusszytometer bei Bead-Referenzmessungen

Überprüfung der Messperformance des Durchflusszytometers in den Kanälen FSC, SSC, FL1, FL2 und FL3 mit Multifluoreszenz-Beads (CytoCal Alignment Beads 480 nm, d=3,5 µm, Thermo Fisher Scientific Inc., Fremont, USA) sowie in den Kanälen FL4, SSC und FSC mit blau fluoreszierenden Beads (Blue Fluorescence Polymer Microspheres, d=1 µm; Duke Scientific Corporation, Palo Alto, USA). Als Stopp-Kriterium der Messung wurde in der Gerätesoftware die Gesamtanzahl an aufgezeichneten Ereignissen auf 5.000 Partikel pro Messung festgelegt (*stop event* = 5.000). Die Proberate wurde auf einen festen Wert von $0,4 \mu\text{L s}^{-1}$ geregelt. Für jeden Messkanal ist die eingestellte Spannung am PMT (Verstärkung) angegeben.

	Multifluoreszenz-Kalibrierbeads 488 nm Anregung	Blau fluoreszierende Kalibrierbeads 375 nm + 488 nm Anregung
Messkanal (Messparameter)	Spannung am PMT (mV)	Spannung am PMT (mV)
FSC	105,5	139,0
SSC (Diskriminator, L-L)	191,0	254,0
FL1	527,0	variabel
FL2	396,0	variabel
FL3	424,0	variabel
FL4	variabel	379,0
Unterer Schwellenwert im SSC (L-L)	37,5 %	50,0 %

Lag die mittlere Intensität oder der CV eines Messsignals außerhalb des oben angegebenen Bereichs, wurde das Gerät nochmal mit Hüllflüssigkeit oder mit dem vom Hersteller empfohlenen Reinigungslösungen (Cleaning solution, Decontamination solution, Partec GmbH, Münster, D) gespült. Im äußersten Falle wurde die Position der Durchflusszelle anhand der Stellschrauben in X- oder Y-Richtung neu justiert.

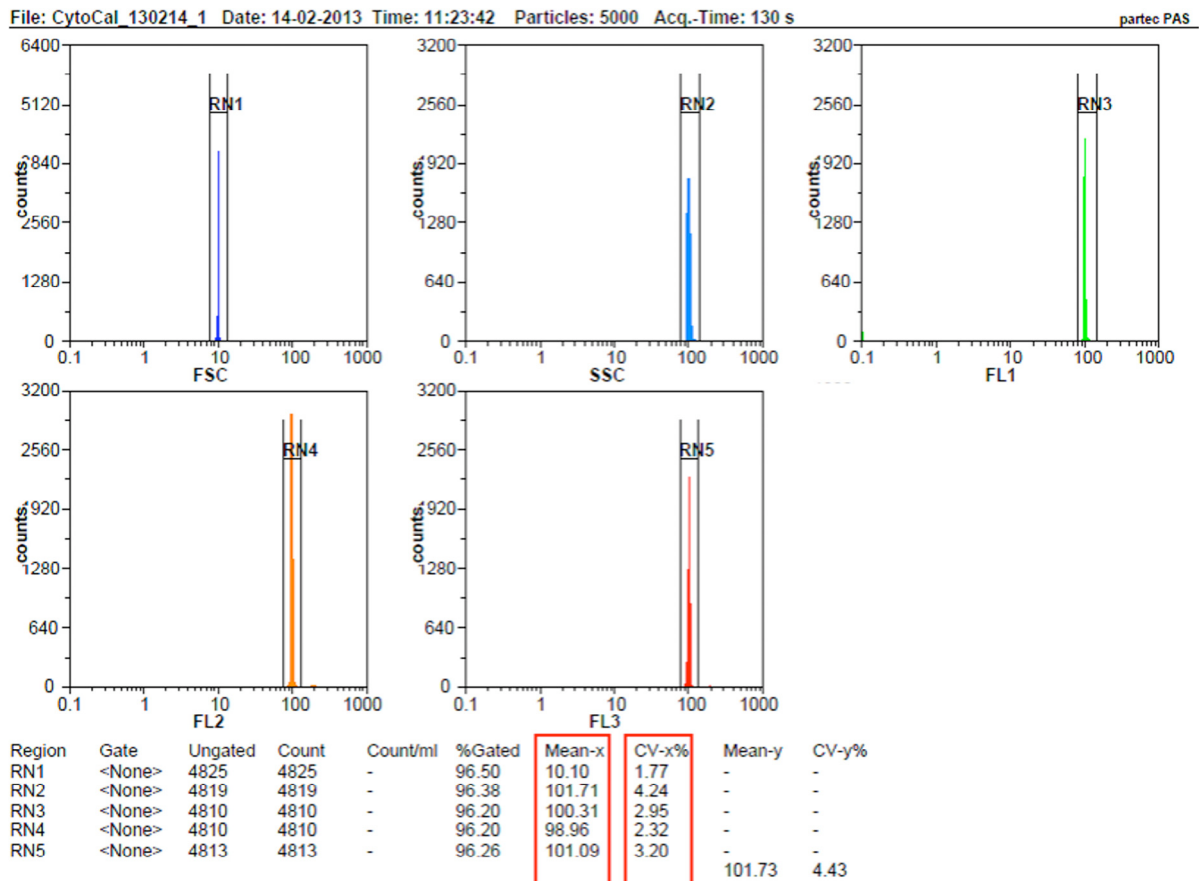


Abb. 8 Ergebnis einer Bead-Referenzmessung mit Multifluoreszenz-Kalibrierbeads.

Überprüfung der Messperformance des Durchflusszytometers in den Kanälen FSC, SSC, FL1, FL2 sowie FL3 mit CytoCal Alignment Beads (480 nm, d=3,5 µm, Thermo Fisher Scientific Inc., Fremont, USA) bei Anregung mit 488 nm. RN1 – RN5 repräsentieren die definierten Regionen zur Bestimmung der mittleren Streulicht- bzw. Fluoreszenzintensität (Mean-x) und des Variationskoeffizienten CV (CV-x). Visualisierung der Daten sowie Bestimmung der Werte mittels Gerätesoftware (FloMax Version 2.70, Partec GmbH, Münster, D).

3.4.2. Probenbehandlung und Färbung

In Abb. 9 sind die wesentlichen Schritte der Behandlung sowie Färbung der Proben der für die Arbeit relevanten Bakterienspezies aus Misch- und Reinkultur zur durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. Hierbei wird zwischen Protokoll A, dem Vierfarbenprotokoll für die Spezies-spezifische Vitalitätsbestimmung (Abb. 9 (A)), und Protokoll B, dem Dreifarbenprotokoll zur Bestimmung der Konzentration der Bakterien nach Spezies (Abb. 9 (B)), unterschieden. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Vitalitätsbestimmung lag, wird nachfolgend ausführlich auf das Protokoll A eingegangen. Im Anschluss werden die Unterschiede von Protokoll A zu B kurz dargelegt.

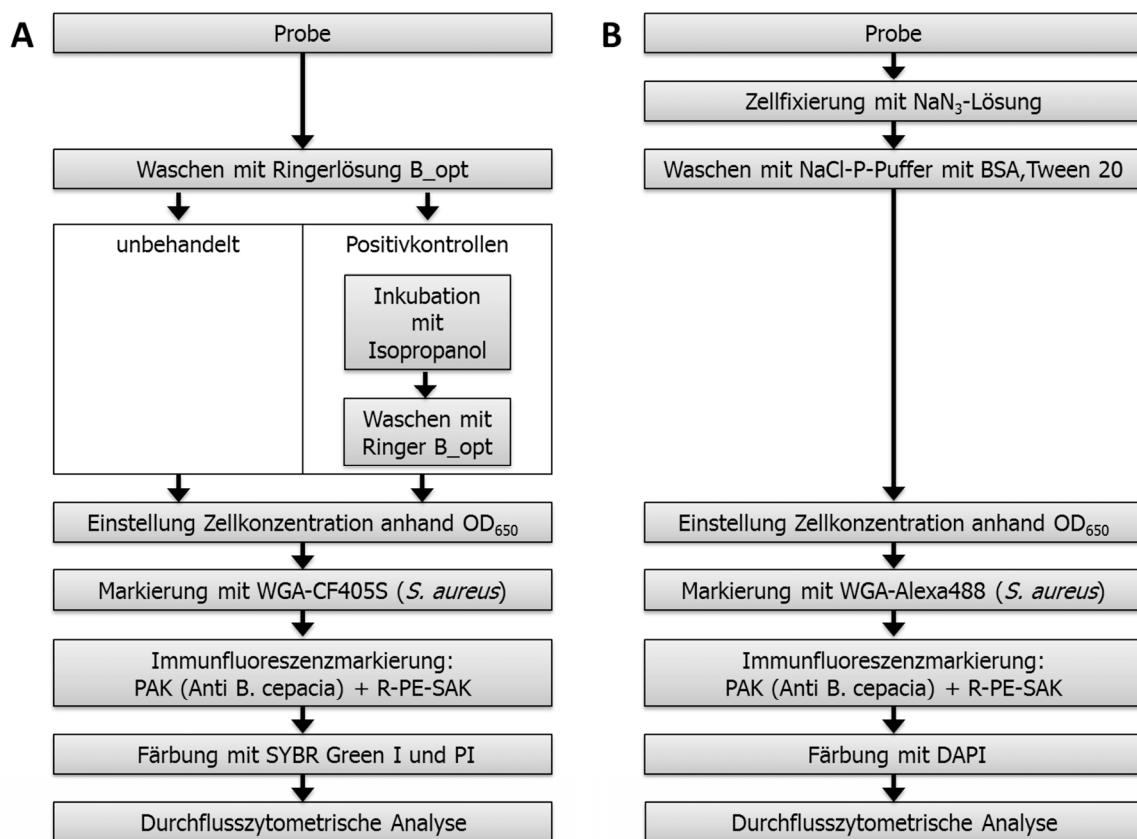


Abb. 9 Schemata zur Behandlung / Färbung von Proben aus Misch- und Reinkulturen zur durchflusszytometrischen Analyse.

(A) Vierfarbenprotokoll für die Spezies-spezifische Vitalitätsbestimmung und **(B)** Dreifarbenprotokoll für die Bestimmung der Zellkonzentration der Bakterien nach Spezies.

Für durchflusszytometrische Analysen wurden mindestens 0,5 mL Suspension aus jeder Schüttelkolbenkultur eines jeden Zeitpunktes aufbereitet. Die Probe wurde zunächst gewaschen, d.h. 10 min mit 4.700 X g bei 4°C zentrifugiert (Heraeus® Fresco, Thermo Scientific, Waltham, USA), der Überstand wurde mittels

Pipette abgezogen, verworfen und das Pellet in Ringerlösung B_opt (Tab. 13) resuspendiert. Soweit nicht anders angegeben, stimmte das Volumen einer Lösung bzw. eines Puffers zur Resuspension des Pellets mit dem Ausgangsvolumen der Probe, nach Entnahme aus der Kultur bzw. nach einer Aliquotierung, überein. Zur Verifizierung der Fluoreszenzfärbung toter Bakterien wurden für jede Spezies an jedem Versuchstag zusätzlich Positivkontrollen, d.h. Zellen mit permeabilisierter Membran, mittels Isopropanol-Behandlung generiert. Dazu wurden Proben aus zwei unterschiedlichen Wachstumsphasen der Kultur, in der Regel nach 4 h und 12 h Kultivierungsdauer, verwendet. Im Falle von Mischkulturversuchen wurden für jede Spezies Positivkontrollen aus Proben aus den zur Mischkultur parallellaufenden Reinkulturen generiert. Nach der Resuspension in Ringerlösung B_opt wurde die Probe mit 70 %-igem Isopropanol (Volumen-%, Merck KgaA, Darmstadt, D) mit identischem Volumen (1:1 Verdünnung) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension zweimal mit Ringerlösung B_opt gemäß der oben bereits aufgeführten Abfolge gewaschen (Zentrifugation, Überstand abziehen, verworfen und Pellet in Ringerlösung B_opt resuspendieren). Nachfolgend wurde die OD₆₅₀ der Suspension gemessen. Zur Einstellung einer für die Fluoreszenzfärbung geeigneten Zellkonzentration wurde die Suspension bei Bedarf mit Ringerlösung B_opt verdünnt. Es wurden OD₆₅₀-Werte von 0,01 bis 0,04 eingestellt, sodass die Zellkonzentrationen jeder Spezies im Bereich von 10⁶– 10⁷ Zellen mL⁻¹ lag. Zum gleichzeitigen Prozessieren mehrerer Ansätze einer Probe, u.a. zur Herstellung von Färbe- und Positivkontrollen, wurden diese zu je 100 µL in 500 µL Reaktionsgefäße (Protein LoBind Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, D) aliquotiert. Zur Spezies-spezifischen fluoreszenzbasierten Detektion folgten die Markierungen mit WGA-CF405S und mit R-PE konjugierten Antikörpern (PAK + SAK-R-PE Konjugat). Die Suspension wurde für 15 min bei RT mit 20 µg mL⁻¹ WGA-CF405S im Dunkeln inkubiert (Zugabe von 11 µL Arbeitslösung auf 100 µL Suspension, 3.1.4), im Anschluss mit Ringerlösung B_opt gewaschen und erneut für 10 min mit 4.700 X g bei 4°C zentrifugiert (Heraeus® Fresco, Thermo Scientific, Waltham, USA). Nach Abziehen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µL einer PAK D-Arbeitslösung (10 µg mL⁻¹, Maus anti B. cepacia IgG, Tab. 29) resuspendiert. Die Inkubation mit den PAK erfolgte für 1 h auf Eis im Dunkeln. Danach wurde die Suspension mit Ringerlösung B_opt gewaschen und für 10 min mit 4.700 X g bei 4°C zentrifugiert (Heraeus® Fresco, Thermo Scientific, Waltham, USA). Nach Abziehen des

Überstandes wurde das Pellet in 100 μL einer SAK-R-PE-Arbeitslösung ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$, R-PE-konjugiert anti Mouse IgG, 3.1.5) resuspendiert. Die Inkubation mit den SAK erfolgte für 1 h auf Eis im Dunkeln. Danach wurde die Suspension zweimal mit Ringerlösung B_opt gewaschen. Zur Bestimmung der Vitalität wurde die Probe final mit den Farbstoffen SYBR Green I und PI inkubiert. Die Zugaben von 2 μL einer SYBR Green I-Arbeitslösung (finale Verdünnung von 5×10^3 , Tab. 24) und 0,5 μL einer PI-Arbeitslösung (final $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Tab. 25) erfolgten unmittelbar nacheinander. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT im Dunkeln erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Probe.

Darüber hinaus wurden zur Datenevaluierung, insbesondere zur Datenkompensation und zur Festlegung von Regionen (siehe 2.2.2, Abb. 4, Abb. 6), Kontrollen generiert, welche ungefärbt (Negativkontrolle), ausschließlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff sowie mit SYBR Green I und PI markiert waren. Positivkontrollen (mit Isopropanol behandelt) wurden sowohl einzeln mit PI als auch mit SYBR Green I und PI gefärbt. Alle Kontrollproben wurden einer im Vergleich zu oben identischen Waschprozedur unterzogen.

Wenn es das Handling der Proben, abhängig von der Anzahl, erlaubte, erfolgte die Messung einer Probe unmittelbar nach der Inkubation mit SYBR Green I und PI, ansonsten innerhalb einer Stunde inklusive der Inkubationszeit. Davon ausgenommen waren die Positivkontrollen.

In Abb. 9 (B) sind die wesentlichen Schritte der Behandlung sowie Färbung der Proben bei Anwendung des Dreifarbenprotokolls zur Bestimmung der Zellkonzentration schematisch dargestellt. Im Gegensatz zu den Proben für die durchflusszytometrische Vitalitätsbestimmung (Vierfarbenprotokoll, Abb. 9 (A)) wurden die Bakterien zur Zellkonzentrationsbestimmung nach der Entnahme aus der Kultur fixiert. Dazu wurde die Bakteriensuspension in ein steriles verschließbares 12 mL Glaszentrifugenröhrchen überführt. Die Probe wurde für 10 min bei 4°C mit $3500 \times g$ zentrifugiert (Heraeus® Multifuge 1S-R, Thermo Scientific, Waltham, USA, mit Schwingrotor und Becher inklusive Einsätze), der Überstand mittels Pipette abgezogen und verworfen. Danach wurde das Pellet in NaN_3 -Fixierlösung (Tab. 20) resuspendiert und für ein bis zwei Tage bei 4°C gelagert. Diese Probe wurde dann, wie für das Vierfarbenprotokoll oben beschrieben aufbereitet und behandelt. Zur Fluoreszenzmarkierung der Bakterien wurden identische Mengen an

fluoreszenzmarkiertem WGA, PAK und R-PE konjugierter SAK eingesetzt. Dabei stimmten auch die jeweilige Inkubationsdauer und die Anzahl der Waschschritte mit dem Vierfarbenprotokoll überein. Im Unterschied zum Vierfarbenprotokoll wurde jedoch NaCl-P-Puffer mit BSA und Tween 20 (Tab. 6, Abb. 9 (B)) für das Waschen und Verdünnen der Probe anstelle von Ringerlösung B_{opt} (Abb. 9 (A)) verwendet. Für das Dreifarbenprotokoll wurden die PAK- und SAK-Arbeitslösungen entsprechend mit NaCl-P-Puffer hergestellt. Ein weiterer Unterschied zum Vierfarbenprotokoll war die Markierung der Bakterien mit DAPI anstelle von SYBR Green I und PI (Abb. 9 (B)). Die Suspension wurde final mit 14 µL der DAPI-Stammlösung (final 7 µg mL⁻¹, Tab. 26) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Aufgrund der Anwendung von blau fluoreszierendem DAPI zur Markierung der Bakterien wurde zur spezifischen Markierung von *S. aureus* grün fluoreszierendes WGA-Alexa Fluor 488 (Tab. 28) anstelle von WGA CF405S eingesetzt.

3.4.3. Evaluierung durchflusszytometrischer Daten

Zur Visualisierung und Evaluierung der durchflusszytometrischen Daten wurde die Software FlowJo (Version 7.6.4, Tree Star, Ashland, USA) eingesetzt. Davon ausgenommen waren die Daten, die mit dem Zählmodus des Durchflusszytometers zur Ermittlung von Zellkonzentrationen generiert wurden. Diese Daten konnten nicht fehlerfrei von der Gerätesoftware (FloMax Version 2.70, Partec GmbH, Münster, D) nach FlowJo importiert werden.

Bei der Analyse mehrfach fluoreszenzmarkierter Bakterien erfolgte eine Kompensation der Daten gemäß der Beschreibung im Kapitel 2 (siehe 2.2.2), aufgrund des spektralen Überlappens der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in der Emission im Wellenlängenbereich der Detektoren. Dies betraf im Wesentlichen die Kombination der Farbstoffe: SYBR Green I, R-PE und PI. Die Kompensation erfolgte mit der Software FlowJo nach der Analyse. Voraussetzung war die Erfassung von Kompensationskontrollen. Dazu wurden in jedem Experiment einfach-gefärbte Kontrollproben für jede zu untersuchende Bakterienspezies mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff in der jeweiligen Konzentration generiert und unter Anwendung identischer Messeinstellungen mit dem Durchflusszytometer vermessen. Im Fall von PI, wurde die Kompensationskontrolle mit Isopropanol-behandelten Bakterien erzeugt. Aus den Daten der Kompensationskontrollproben wurden dann mit der

Software die jeweiligen Kompensationsfaktoren automatisch berechnet und nachfolgend auf die Daten aus der Analyse mehrfach-fluoreszenzgefärbter Bakterien angewandt.

In der vorliegenden Arbeit werden durchflusszytometrische Daten entweder in Histogrammen oder in 2-D Punktdiagrammen präsentiert. Bei letzteren wurden die Daten zur besseren Veranschaulichung entweder als Pseudocolor-Punktdiagrammen oder als 5 %-Quantil-Konturdiagramme dargestellt (siehe 2.2.2). Die Intensitäten der Fluoreszenz- und Streulichtsignale sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben.

Durch Einzeichnen von Regionen oder Fenstern (Gates) in Histogramme bzw. in 2-D Punktdiagramme wurden bei der Datenevaluierung Zellen mit vergleichbarer Lichtintensität abgegrenzt (siehe 2.2.2). Jede in der Arbeit verwendete Abgrenzung einer Subpopulation wurde anhand von Signalen aus Messungen mit Kontrollproben manuell definiert. So wurde zum Beispiel das Gate zur Abgrenzung einzeln-gefärbter Populationen vom Hintergrund anhand der Signale der jeweiligen ungefärbten Probe (Negativkontrolle) definiert. Die Gates zur Diskriminierung der einzelnen Spezies in Mischkulturproben wurden in Anlehnung an die Signale aus Messungen mit Proben aus Reinkulturen, gefärbt mit der zu verwendenden Farbstoffkombination, festgelegt. In der Vitalitätsbestimmung der Bakterien erfolgte eine Diskriminierung in vital und tot bzw. vital, beschädigt und tot in der Auftragung der SYBR Green I- über der PI-Fluoreszenzintensitäten. Zur Festlegung der Gates dienten Kontrollproben mit Isopropanol-behandelten Bakterien. Diese Zellen zeigten bei Doppelfärbung identische Signale wie die als tot definierten Zellen. Zur Diskriminierung der Vitalitätssubpopulationen wurden Kontrollproben separat für Bakterien einer Spezies aus zwei unterschiedlichen Wachstumsphasen erzeugt, vermessen und für das Festlegen der Gates angewandt. Für jede analysierte Probe wurde die absolute Anzahl an Partikel bzw. Zellen, welche den Laser durchquerten sowie der mittels Gates abgegrenzten Zellen von Subpopulationen erfasst. Mithilfe der Software wurde aus diesen Werten die prozentuale Häufigkeit einer abgegrenzten Subpopulation an der Gesamtanzahl der Ereignisse bzw. der Zellen oder an der Anzahl der Zellen einer ein Ebene oder zwei Ebenen höherliegenden Subpopulation berechnet (siehe 2.2.2). Des Weiteren wurde für jeden Fluoreszenzparameter die MFI einer abgegrenzten Population mithilfe der Software, gemäß der vorn angeführten Berechnung (Gl. 4), bestimmt.

Bei Anwendung des Zählmodus des Durchflusszytometers wurde in der Messung die Anzahl an Partikeln (Ereignisse) im definierten Zählanalysevolumen ($V_{\text{Analyse}} = 200 \mu\text{L}$) bestimmt. Die dabei gemessene Anzahl an DAPI-positiven Ereignissen entsprach der Anzahl an Bakterien in $200 \mu\text{L}$ Probe. Mithilfe dieser Anzahl ($N_{\text{DAPI+}}$) wurde die Gesamtzellkonzentration (GZK) der Probe aus der Kultur (C_{total}) in Anwendung der Gl. 7 berechnet. In der Berechnung wurde die Verdünnung der Probe durch die Behandlung / Färbung (Verdünnungsfaktor $VF_{\text{Färbung}}$) und die Verdünnung für die Analyse (Verdünnungsfaktor VF_{Analyse}) berücksichtigt.

$$C_{\text{total}} = \frac{N_{\text{DAPI+}}}{V_{\text{Analyse}}} \cdot VF_{\text{Färbung}} \cdot VF_{\text{Analyse}} \quad \text{Gl. 7}$$

3.5. Weitere analytische Methoden

3.5.1. Optische Dichte mittels Spektrophotometrie

Mithilfe eines Spektrophotometers (Ultraspec 3000, Amersham Biosciences, Otelfingen, CH) wurde die Extinktion (optische Dichte, OD) in den Bakteriensuspensionen in UV-Halbmikroküvetten mit 1 cm Wanddicke (Plastibrand® UV, 1,5 mL, Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, D) bei 650 nm (OD_{650}) bzw. im Fall von *C. jejuni* - Proben bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Zum Nullabgleich (Extinktion = 0) diente PBS bzw. die jeweils eingesetzte Lösung oder der Puffer als Referenz. Proben mit einer Extinktion $> 0,4$ wurden mit der jeweils eingesetzten Lösung bzw. dem Puffer verdünnt. In solchen Fällen berechnete sich die OD aus der Multiplikation der gemessenen Extinktion und dem Verdünnungsfaktor.

3.5.2. Spezies-spezifische Konzentration mittels qT-RFLP-Analyse

Zur Ermittlung des Wachstums der Bakterien in Rein- und Mischkultur erfolgte die Bestimmung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration mittels qT-RFLP-Analyse. Diese Methode wurde im Rahmen einer Dissertation von Schmidt etabliert und validiert (Schmidt 2008). In Tab. 33 sind die wesentlichen von Schmidt ermittelten Validierungskenngrößen der qT-RFLP-Methode zusammengefasst. Die Konzentrationen sind mit der Einheit Genomäquivalente pro mL (ge mL^{-1}) angegeben.

Tab. 33 Validierungskenngrößen der qT-RFLP-Methode.

Die Kenngrößen wurden in der Arbeit von Schmidt ermittelt (Schmidt 2008).

Spezies	Quantifizierungsbereich		Versuchsstandardabweichung
	unteres Limit (ge mL ⁻¹)	oberes Limit (ge mL ⁻¹)	Log ₁₀ (ge mL ⁻¹)
<i>P. aeruginosa</i>	10 ⁵	10 ¹⁰	0,39
<i>B. cepacia</i>	10 ⁴	10 ⁹	0,39
<i>S. aureus</i>	10 ⁶	10 ¹⁰	0,39

Für jeden Probenahmezeitpunkt wurden jeweils zwei Proben prozessiert und parallel vermessen (technische Replikate). Zur Quantifizierung wurde die Probesuspension unmittelbar vor Behandlung zum IQS (siehe 3.3.3) zugegeben. Zur Entfernung von freier DNS und RNS wurde die Suspension zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurden die Bakterien enzymatisch lysiert und die DNA durch eine Proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, D) und RNase A (Qiagen, Hilden, D) extrahiert und anschließend mit einem kommerziell verfügbaren Kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Hilden, D) aufgereinigt. Daraufhin wurde für alle Spezies das jeweilige 16S rRNA Gen (16S rDNA) durch Anwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Primer mittels Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Im Anschluss erfolgte die Isolierung und Aufreinigung des Amplikons mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese und eines kommerziell verfügbaren Kits (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, D). Infolgedessen wurde das Amplikon mittels einer Restriktionsendonuklease (Hha I, New England Biolabs, Ipswich, USA) verdaut.

Die Trennung der fluoreszenzmarkierten Spezies-spezifischen 16S rDNA-Fragmente erfolgte nach der Basenpaarlänge mittels automatisierter Kapillargelelektrophorese mit einem Sequenziergerät (Genetic Analyzer ABI Prism 3100 Avant, Life Technologies, Carlsbad, USA). Die Detektion der Fragmente erfolgte simultan durch Laser-induzierte Fluoreszenz. Aus dem Elektropherogramm wurden die Peakflächen der einzelnen Spezies-spezifischen DNA-Fragmente ausgelesen und zur Bestimmung der absoluten Zellzahl der einzelnen Spezies i ($N_{T-RFLP, i}$) herangezogen. Die Berechnung von $N_{T-RFLP, i}$ erfolgte mittels Gl. 8 aus dem Verhältnis der Peakflächen der jeweiligen Spezies A_i und des IQS A_{IQS} , aus der Anzahl der PCR Zyklen n , dem Verhältnis der Effizienzparameter der PCR der jeweiligen Spezies f_i und des IQS f_{IQS} , aus der absoluten Zellzahl des IQS N_{IQS} sowie aus der Anzahl der

Genkopien im Genom der jeweiligen Spezies p_i und des IQS p_{IQS} (Schmidt et al. 2007).

$$N_{T-RFLP,i} = \frac{e^{\ln\left(\frac{A_i}{A_{IQS}}\right) - n \left[\ln\left(\frac{f_i}{f_{IQS}}\right) \right] + \ln(N_{IQS} \cdot p_{IQS})}}{p_i} \quad \text{Gl. 8}$$

Zur Berechnung wurden gemäß der Methode von Schmidt *et al.* für p_i bzw. p_{IQS} für *P. aeruginosa* vier, für *B. cepacia* sechs, für *S. aureus* fünf und den IQS (*C. jejuni*) drei Kopien eingesetzt sowie folgende Werte für die Verhältnisse der PCR-

Effizienzparameter verwendet: $\frac{f_{Pa}}{f_{IQS}} = 0,9363$, $\frac{f_{Bc}}{f_{IQS}} = 0,9522$ und $\frac{f_{Sa}}{f_{IQS}} = 0,8777$

(Schmidt et al. 2007). Die Spezies-spezifische Zellkonzentration $C_{T-RFLP,i}$ ergibt sich aus der Division von $N_{T-RFLP,i}$ durch das eingesetzte Probevolumen V_{T-RFLP} . Diese Konzentration wurde in $ge\ mL^{-1}$ angegeben.

3.5.3. Lebendzellkonzentration mittels Plattenausstrich

Die Lebendzellkonzentration (LZK) wurde anhand der Plattenausstrichmethode bestimmt und entspricht der Konzentration koloniebildender Einheiten (KBE mL^{-1}). Zur Bestimmung wurden 0,5 mL Probe aus der Schüttelkolbenkultur steril entnommen. Danach wurde die Suspension für 10 min mit 4.700 X g bei 4°C zentrifugiert (Heraeus® Fresco, Thermo Scientific, Waltham, USA) und anschließend das Pellet in Ringerlösung B resuspendiert. Zur Einhaltung des Auszählkriteriums von maximal 500 KBE pro Agarplatte wurde die Suspension seriell im Verhältnis von 1:10 mit Ringerlösung B bis zu einer Konzentration im Bereich von $10^0 - 10^2$ KBE mL^{-1} verdünnt. Davon wurden jeweils 0,1 mL auf eine LB-Agarplatte mittels eines Drigalskispatels ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend für 24 h bei 37°C im Brutschrank (Heraeus Hera®Cell, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) inkubiert. Danach wurden die KBE auf den Platten gezählt. Die LZK einer Spezies i ($C_{lebend,i}$) wurde mittels Gl. 9 bestimmt. Dabei entsprachen $VF_{seriell}$ dem Verdünnungsfaktor durch die serielle Verdünnung und V_{Probe} dem ausgestrichenen Probevolumen.

$$C_{lebend,i} = \frac{KBE}{VF_{seriell} \cdot V_{Probe}} \quad \text{Gl. 9}$$

Die in der Arbeit präsentierten LZK sind Mittelwerte aus zwei Konzentrationen, welche aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen bestimmt wurden. Eine Bestimmung der LZK erfolgte nur für Reinkulturproben mit *S. aureus*. Für *B. cepacia* und *P. aeruginosa* war aufgrund des Schwärmens der Bakterien auf der Oberfläche des Agars keine Zählung möglich (für *P. aeruginosa* siehe (Morris et al. 2011)).

3.5.4. Bestimmung von Substrat- und Metabolitkonzentrationen

Zur Quantifizierung der extrazellulären Konzentration wichtiger Substrate und Metabolite im Medium während der Kultivierung wurden eine HPLC-Methode und eine enzymatische Methode mittels einem Bioprofile-Messgerät (Bioprofile 100 Plus, Nova Biomedical, Waltham, USA) eingesetzt. Für beide Methoden wurden die Proben einheitlich aufbereitet.

Zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt wurden 1,2 mL Bakteriensuspension aus dem Schüttelkolben steril entnommen und anschließend für 10 min bei 4°C und 16.200 X g zentrifugiert (Heraeus® Fresco, Thermo Scientific, Waltham, USA). Danach wurde der Überstand mittels Pipette abgezogen und durch Verwendung einer Spritze (Injekt 2 mL, B. Braun AG, Melsungen, D) mit einem 0,2 µm Filter (Spartan 13/RC, Whatman GmbH, Dassel, D) filtriert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

Quantitative HPLC-Methode

Die Bestimmung der extrazellulären Konzentrationen von 2-keto-D-gluconat (2-KDG) und Gluconat erfolgte mittels einer in der Fachgruppe im Rahmen der Dissertation von Riedele etablierten und validierten HPLC-Quantifizierungsmethode (Riedele 2013). Zur Analyse wurde ein HPLC-System des Typs Agilent series 1200 der Fa. Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA), ausgestattet mit einer 300 x 7,6 mm Rezex-ROA Säule für organische Säuren (Phenomenex, Aschaffenburg, D), verwendet. Als Eluent wurde 0,075 M H₂SO₄ verwendet und die Durchflussrate betrug 0,5 mL/min. Aus den filtrierten Proben wurden je 10 µL injiziert und die Trennung erfolgte bei einer Säulentemperatur von 45°C. Die Metabolite wurden mittels eines Diodenarray-Detektors (DAD G1315B, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) bei einer Wellenlänge von 210 nm nachgewiesen und anschließend

wurden die Konzentrationen anhand der Peakflächen im Chromatogramm quantifiziert.

In Tab. 34 sind die wesentlichen Kenngrößen der Validierung aus der Dissertation von Riedele zusammengefasst (Riedele 2013).

Tab. 34 Validierungskenngrößen der quantitativen HPLC-Methode.

Die Kenngrößen wurden in der Dissertation von Riedele ermittelt (Riedele 2013).

Metabolit	Detektionslimit	Quantifizierungslimit	Versuchsstandardabweichung
2-KDG	0,052 nM	0,155 nM	0,016 nM
Gluconat	0,087 nM	0,267 nM	0,026 nM

Enzymatische Quantifizierungsmethode mittels Bioprofile

Die Bestimmung der extrazellulären Konzentrationen von Glukose, Glutamat und Glutamin erfolgte mit einer in der Dissertation von Riedele validierten enzymatischen Quantifizierungsmethode (Riedele 2013) unter Anwendung eines Bioprofile 100 Plus Messgerätes (Nova Biomedical, Waltham, USA). Der Messung der Proben ging die Vermessung von Standardproben der jeweiligen Substanzen zur Ermittlung einer Kalibriergeraden, aus den jeweiligen Maximalwerten (Glukose: 5,56 mM, Glutamat: 0,46 mM, Glutamin: 0,69 mM) und Nullwerten, zur Korrektur der Messwerte voraus.

In Tab. 35 sind die wesentlichen Kenngrößen von der Validierung aus der Dissertation von Riedele zusammengefasst (Riedele 2013).

Tab. 35 Validierungskenngrößen der enzymatischen Quantifizierungsmethode.

Quantifizierung erfolgt mittels Bioprofile 100 Plus (Nova Biomedical, Waltham, USA). Die Kenngrößen wurden in der Dissertation von Riedele ermittelt (Riedele 2013).

Analyt	Detektionslimit	Quantifizierungslimit	Versuchsstandardabweichung	Linearer Bereich
Glukose	0,339 mM	1,022 mM	0,100 mM	1,022 – 5,560 mM
Glutamat	0,084 mM	0,254 mM	0,025 mM	0,254 – 0,460 mM
Glutamin	0,053 mM	0,162 mM	0,016 mM	0,162 – 0,690 mM

3.6. Fluoreszenzmikroskopie von Bakterien

Zur Kontrolle der Markierung von Bakterien bei der Etablierung der Färbemethoden für die durchflusszytometrische Analyse wurden Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Proben wurden auf Objektträgern (Glas, 76 x 26 mm, 1 mm dick, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D) mit 1 % Agarose (Masse-%, Tab. 21) fixiert. Dazu wurden 600 µL flüssige

Agarose (erhitzt in einer Mikrowelle für 3 min bei 800 W) auf einem Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen (Borosilikat, 24 x 50 mm, 0,16 mm dick, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D) bedeckt. Die Träger wurden bis zur Anwendung für mindestens 30 min in feuchter Umgebung gelagert. Unmittelbar vor dem Auftragen der Probe wurde das Deckgläschen vorsichtig vom Träger abgehoben, sodass die Agarose auf dem Träger blieb. Anschließend wurden 10 µL Bakteriensuspension auf die Agaroseschicht pipettiert und mit einem Deckgläschen (Borosilikat, 18 x 18 mm, 0,16 mm dick, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D) bedeckt.

3.6.1. Aufnahmen mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510

Die Untersuchung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM, engl. *laser scanning microscope*) des Typs LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D, Tab. 36). Die Aufnahmen erfolgten mit folgenden in der Gerätesoftware (LSM 510 Version 3.2 SP2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) definierten Scaneinstellungen: linearer Scan im *frame*-Modus, Scangeschwindigkeit 9, Format 512 x 512 mit einer Auflösung (Einstellung *data depth* in Software) von 8 bit. Die Anregung der Proben erfolgte mit einem Argon-Ionen-Laser (488 nm) und / oder einem Helium-Neon-Laser (543 nm), wobei deren Leistungen auf einen Wert von max. 25 % der Nennleistung (Tab. 36) geregelt waren. In Abhängigkeit der zu untersuchenden Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Fluoreszenzfarbstoffkombination wurden die optische Konfiguration, u.a. die Anzahl an Detektoren, der Einsatz von Spiegeln sowie die Auswahl der Emissionsfilter vor den Detektoren, in der Gerätesoftware festgelegt. Die in der Arbeit angewandten Konfigurationen können der Abb. 10 entnommen werden. Darüber hinaus wurden für jede Probe die Messeinstellungen des verwendeten Kanals zur Optimierung der Detektion der Fluoreszenzsignale sowie für Bildaufnahmen mittels der Gerätesoftware angepasst. Im Wesentlichen beeinflussten die Spannung an den Detektoren (Einstellung *detector gain* in Software) sowie der *offset*-Wert an den Verstärkern (Einstellung *amplifier offset* in Software) die Detektion. Die Öffnung der Lochblende (Einstellung *pinhole* in Software) dagegen beeinflusste die Schärfe der Bildaufnahme (Kontrastierung).

Nach Aufnahme der Bilder erfolgte die Bildbearbeitung mit einer LSM-Software (Image Browser Software, Version: 4.2.0, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D).

Tab. 36 Technische Ausstattung des LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D).

Komponente	Spezifikation
Laser	
Argon-Ionen-Laser	25 mW Nennleistung Wellenlänge 488 nm
Helium-Neon-Laser	1 mW Nennleistung Wellenlänge 543 nm
Objektiv	Achroplan/ 100 x /1,25/ Oil/ Ph3
Emissionsfilter	LP 585 nm BP 505 – 550 nm
Dichroitische Farbteiler (Anregungsfilter)	Hauptfarbteiler (HFT) 488 nm Hauptfarbteiler (HFT) 488 nm / 543 nm
Software	
zur Steuerung und Bildaufnahme	LSM 510 Version 3.2 SP2

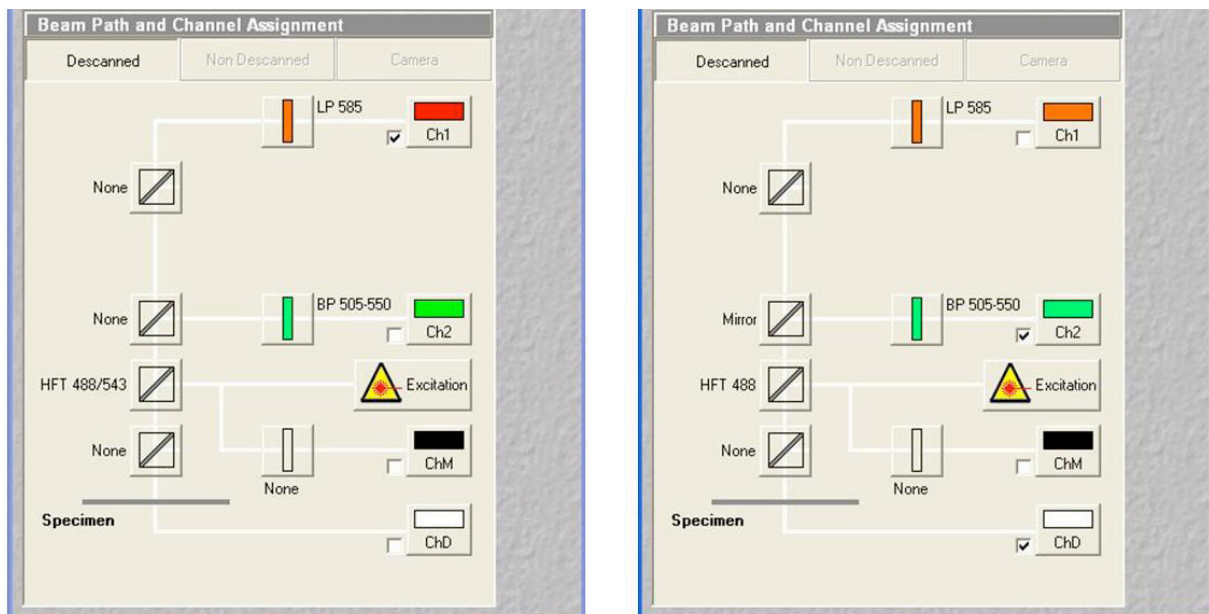


Abb. 10 Optische Konfiguration des LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) für die fluoreszenzmikroskopische Analyse.

Einzelkanal-Aufnahmemodus (Einstellung *single track mode* in Gerätesoftware LSM 510 Version 3.2 SP) zur Aufnahme von (A) PI-gefärbte oder R-PE-Immunfluoreszenzmarkierte Bakterien und (B) von SYBR Green I-gefärbte oder WGA-Alexa Fluor 488-markierte Bakterien. Bei der Detektion von zwei Farbstoffen mit roter und grüner Fluoreszenz wurde der Mehrkanal-Aufnahmemodus (Einstellung *multi track mode* in Gerätesoftware) verwendet, wobei die beiden dargestellten Konfigurationen miteinander kombiniert wurden. In beiden Modi kann auch zusätzlich das Hellfeld (ChD) mit aufgenommen werden.

3.6.2. Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135

Die Untersuchung der Färbung von Bakterien, insbesondere mit blauen Fluoreszenzfarbstoffen (DAPI, WGA-CF405S), erfolgte darüber hinaus mit einem Fluoreszenzmikroskop des Typs Axiovert 135 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D), ausgestattet mit einer Kamera (Tab. 37). Zur Anregung bzw. Emission verschiedener

Fluoreszenzen standen drei unterschiedliche Filterblöcke (Kanäle) zur Verfügung: Kanal I zum Nachweis von SYBR Green I, Kanal II zum Nachweis von DAPI oder WGA-CF405S und Kanal III zum Nachweis von PI (Tab. 37). Zur Darstellung mehrerer Fluoreszenzen in einem Bild wurde die Funktion „manuelle Farbaufnahme“ in der Gerätesoftware (AxioVision Version 4.8, AxioVision Fluorescence Lite, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) verwendet. Somit wurden die einzeln aufgenommenen Bilder der jeweiligen Kanäle automatisch übereinander dargestellt. In Einzelfällen wurden die einzelnen Bilder zur exakten Überlagerung hinsichtlich der X- bzw. Y-Position mittels der Funktion „Verschieben“ in der Gerätesoftware modifiziert.

Tab. 37 Technische Ausstattung des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 135 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D).

Komponente	Spezifikation
Lichtquelle	HBO 50 Quecksilberdampf Lampe
Objektiv	Achroplan/ 100 x /1,25/ Oil/ Ph3
Filter	
Anregung/Farbteiler/Emission	Kanal I 450-490/FT510/LP 520 (grüne Fluoreszenz) Kanal II G365/FT 395/LP 420 (Hellfeld) Kanal II modifiziert G365/FT 395/BP 445/50 (blaue Fluoreszenz) Kanal III BP 546/FT 580/LP 590 (rote Fluoreszenz)
Kamera	AxioCam MRm Rev. 3
Adapter für Kamera	Video-Adapter 60 C 2/3" 0,63 x
Software	
zur Bildaufnahme	AxioVision Version 4.8, erweitert mit AxioVision Fluorescence Lite

3.7. Statistische Prüfverfahren

Die betrachteten Daten wurden als normalverteilt angenommen.

3.7.1. F-test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen

Die Homogenität der Varianzen zweier Stichprobenreihen ($s_{D,1}^2, s_{D,2}^2$) wurde anhand des F-Tests mit der Gl. 10 bestimmt. Bei Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % waren die Varianzen homogen, wenn der F-Wert kleiner als der entsprechende Wert aus einer F-Wert Tabelle mit den Freiheitsgraden f_1 und f_2 war. Der Freiheitsgrad (f_m) wurde mit Gl. 11 aus der Anzahl der Messwerte einer Stichprobenreihe (N_m) berechnet.

$$F = \frac{s_{D,1}^2}{s_{D,2}^2} (s_{D,1} > s_{D,2}) \quad \text{Gl. 10}$$

$$f_m = N_m - 1 \quad \text{Gl. 11}$$

3.7.2. t-Test zum Vergleich von Mittelwerten

Zum Vergleich von ausgewählten Versuchsergebnissen, wurde die Signifikanz des Unterschieds zwischen den Mittelwerten aus zwei Stichprobenreihen ($N_1=N_2=3$) anhand von t-Tests bestimmt. Die Varianzen der jeweils miteinander zu vergleichenden Stichprobenreihen wurden als homogen angenommen (Berechnung, siehe 3.7.1). Beim Vergleich von Mittelwerten aus zwei unterschiedlichen Stichprobenreihen wurde die Prüfgröße t_p mit Gl. 12 aus den Mittelwerten (\bar{x}_1, \bar{x}_2), der Varianzen ($s_{D,1}^2, s_{D,2}^2$) sowie der Anzahl der Messwerte der beiden Messreihen (N_1, N_2) berechnet. Hier betrug der Freiheitsgrad $f = 4$ ($f = N_1+N_2-2$). Beim Vergleich von Mittelwerten aus zwei gepaarten Stichprobenreihen dagegen wurde t_p mit Gl. 13 aus dem Mittelwert der Differenzen \bar{d} (Gl. 14), der Stichprobenpaare (x_m, y_m), der Standardabweichung s_D (Gl. 15) sowie der Gesamtanzahl aller Stichproben n berechnet. In diesem Fall betrug $f = 5$ ($f = n-1$). Bei Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % war der Unterschied signifikant, wenn t_p größer als der entsprechende Wert aus der zweiseitigen t-Tabelle mit dem jeweiligen f war ($p < 0,05$).

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_{D,1}^2 \cdot (N_1 - 1) + s_{D,2}^2 \cdot (N_2 - 1)}{N_1 + N_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}} \quad \text{Gl. 12}$$

$$t = \frac{|\bar{d}|}{s_D} \sqrt{n} \quad \text{Gl. 13}$$

$$\bar{d} = \frac{\sum_{m=1}^2 x_m - y_m}{n} \quad \text{Gl. 14}$$

$$s_D = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^2 (x_m - y_m - \bar{d})^2}{n - 1}} \quad \text{Gl. 15}$$

3.8. Chemikalienliste

Tab. 38 Übersicht der in der Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	6335.1
Agar (für Objektträger)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	5210.2
Agar (für Plattenkulturen)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D	091193
Bacto Tryptone	Becton, Dickinson und Co., Heidelberg, D	211705
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson und Co., Heidelberg, D	212750
Bernsteinsäure Dinatriumsalz wasserfrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D	14160
Blue Fluorescence Polymer Microspheres, 1 µm	Duke Scientific Corporation, Palo Alto, USA	B0100
Calciumchloriddihydroxid (CaCl ₂ *2H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	HN04.1
Cyto-Cal™ Alignment Beads 488 nm, 3 µm	Thermo Fisher Scientific, Microgenics Corp., Fremont, USA	FA30
Dekontaminationslösung für Durchflusszytometer	Partec GmbH, Münster, D	04-4010
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	P479.2
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	P030.2
Dulbecco buffered saline (10x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D	D1283
Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D	59H0359
Gibco® cell culture basal medium powder M199	Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA	10012-037
Glutaraldehyd (GTA), 50 % Grade I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D	G7651
Immersionsöl 518N	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D	0-444950
Hypochloridlösung für Durchflusszytometer	Partec GmbH, Münster, D	04-4012
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	CP41.2
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	6781.3

Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	0261.1
Mix-n-Stain™CF405S	Biotium, Inc., Hayward, CA, USA	92231
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D	S2002-25G
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	P029.3
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	K300.2
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	6885.2
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	6771.1
Nitrilotriessigsäure (NTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D	N9877
Pepton (aus Casein)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	8952.1
o-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	6366.2
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	81845
SYBR Green I (10,000X Konzentrat DMSO)	Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA	S7563
Reinigungslösung für Durchflusszytometer	Partec GmbH, Münster, D	04-4009
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan, ≥99,9 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	5429.1
Tween®20	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	9127.1
Weizenkeimagglutinin (WGA)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA	L-1020
WGA-Alexa Fluor®488	Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, USA	W11261

3.9. Geräte- und Materialienliste

Zusätzlich zu den im Folgenden aufgelisteten Geräten und Materialien wurden Materialien des alltäglichen Laborbedarfs, wie z.B. Pipetten, Pipettenspitzen, Einmalspritzen oder Einwegimpfösen, verwendet.

Tab. 39 Übersicht der in der Arbeit verwendeten Chemikalien.

Gerätebezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Anaerobiertopf 2,5 L, Campygen TM	Oxoid GmbH, Wedel, D	CN0025A
Analysetubes (3,5 mL)	Sartstedt AG & Co., Nürnberg, D	55.484
Autoklav	Systemec GmbH, Wetzlar, D	
Axiovert 135 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D	
Deckgläschen (24 x 24 mm), (24 x 50 mm)	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, D	0101060 0100222
Duran®Borosilikat-Glasflaschen (verschiedene Größen)	Duran Group GmbH, Mainz, D	
Durchflusszytometer CyFlow® space	Partec GmbH, Münster, D	
Weithals Erlenmeyer-Kolben (250 und 300 mL) ohne Schikanen	Duran Group GmbH, Mainz, D	
Falcontubes 15 mL, 50 mL, PP	Greiner bio-one GmbH; Frickenhausen, D	188271 / 210270
Feinwaage AG 204 Delta Range®	Mettler Toledo, Giessen, D	
Inkubationsschrank Modell 400	Memmert GmbH & Co. KG, Nürnberg, D	
Kohle-Agar-Platte (<i>Campylobacter</i> -Selektivagar, CCDA blutfrei)	Oxoid GmbH, Wedel, D	PO5091A
Kryogefäße Cryo.s TM 2 mL	Greiner bio-one GmbH; Frickenhausen, D	121261
Laser Scanning Mikroskop LSM510	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D	
Magnetrührer RCT basic, Color Squid	IKA®-Werke GmbH & CO.KG, Staufen, D	
Messzylinder, Glas (verschiedene Größen)	IsoLab Laborgeräte GmbH, Wertheim, D	
Microbank organism storage system	Pro-Lab Diagnostics Inc., Round Rock, USA	PL.170
Mikrowelle 800 W	Bosch Hausgeräte GmbH, Gerlingen, D	

MilliQ-Anlage, biocel A10	Merck Millipore, Schwallbach, D	
Nalgene®Sterilfilter Poren 0,2µm, 500 mL, 250 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Objektträger, Glas	Paul Marienfeld GmbH, Lauda- königshofen, D	1000004
PCR-Tubes (200 µL)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D	82-0620
Photometer Ultraspec 3000	Amersham Biosciences, Otelfingen, CH	
pH-Meter PB-11	Sartorius AG, Göttingen, D	
Plastibrand® UV, 1,5 mL Halbmikroküvette	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D	759150
Protein LoBind Tube (500µL, 1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, D	0030108094 / 0030108116
Reaktionsgefäße (2 mL)	Greiner bio-one GmbH; Frickenhausen, D	623201
Schüttler Kühner Shaker ISF-1-W	Adolf Kühner AG, Birsfelden, CH	
Spritzenfilter Spartan13 mm 13/RC, Poren 0,2µm	Whatman GmbH, Dassel, D (GE Healthcare Lifescience)	10463102
Sterilbank Herasafe KS 15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	50125873
Vakuumpumpe N86 KT 18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D	
Verschlussstopfen für Analysetubes	Sartstedt AG & Co., Nürnberg, D	65.809
Vortexer REAXtop	Heidolph Instruments, Kelheim, D	
Zentrifuge Heraeus® Fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Zentrifuge Heraeus® Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Zentrifugenschwingrotor inklusive Becher für Heraeus® Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	7500200, 75002002 G

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung durchflusszytometrischer Methoden

Anhand der gemessenen Streulichtsignale (FSC und SSC) war, wie zuvor erwähnt, die Detektion von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* mit dem in der Arbeit verwendeten Durchflusszytometer nicht allein möglich. Bakterien konnten in der Analyse nicht vom Hintergrundsignal diskriminiert werden. Voraussetzung für die durchflusszytometrische Detektion der in der Arbeit relevanten Spezies war daher die Fluoreszenzmarkierung der Bakterien vor der Analyse. Die intrazelluläre Markierung der Zellen durch Einsatz Nukleinsäuren-bindender Fluoreszenzfarbstoffe, wie SYBR Green I bei der Vitalitätsbestimmung oder DAPI bei der Zellkonzentrationsbestimmung, erlaubte die Detektion der Bakterien aller drei relevanten Spezies. *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* konnten in der Analyse anhand der erfassten Fluoreszenzsignale eindeutig als Population vom Hintergrundsignal diskriminiert werden. Am Beispiel von SYBR Green I gefärbten Bakterien aus stationären Kulturen kann in Abb. 11 für jede einzelne Spezies die eindeutige Abgrenzung der Population mit positiv gefärbten Zellen (SYBR Green I + Ereignisse) vom Hintergrundsignal (SYBR Green I-Ereignisse) ausgemacht werden.

Bei der Etablierung der intrazellulären Färbemethoden für die DZM wurde zusätzlich das Färbeergebnis durch Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FLM) überprüft. Die in der Arbeit etablierten Färbungen unter Einsatz von SYBR Green I und DAPI führten mikroskopischen Beobachtungen zufolge zur Färbung aller Bakterien. Alle im Hellfeld beobachteten Zellen wurden auch im jeweiligen Fluoreszenzkanal wiedergefunden, wie in Abb. 12 beispielhaft für SYBR Green I gefärbte Bakterien aus stationären Kulturen dargestellt ist.

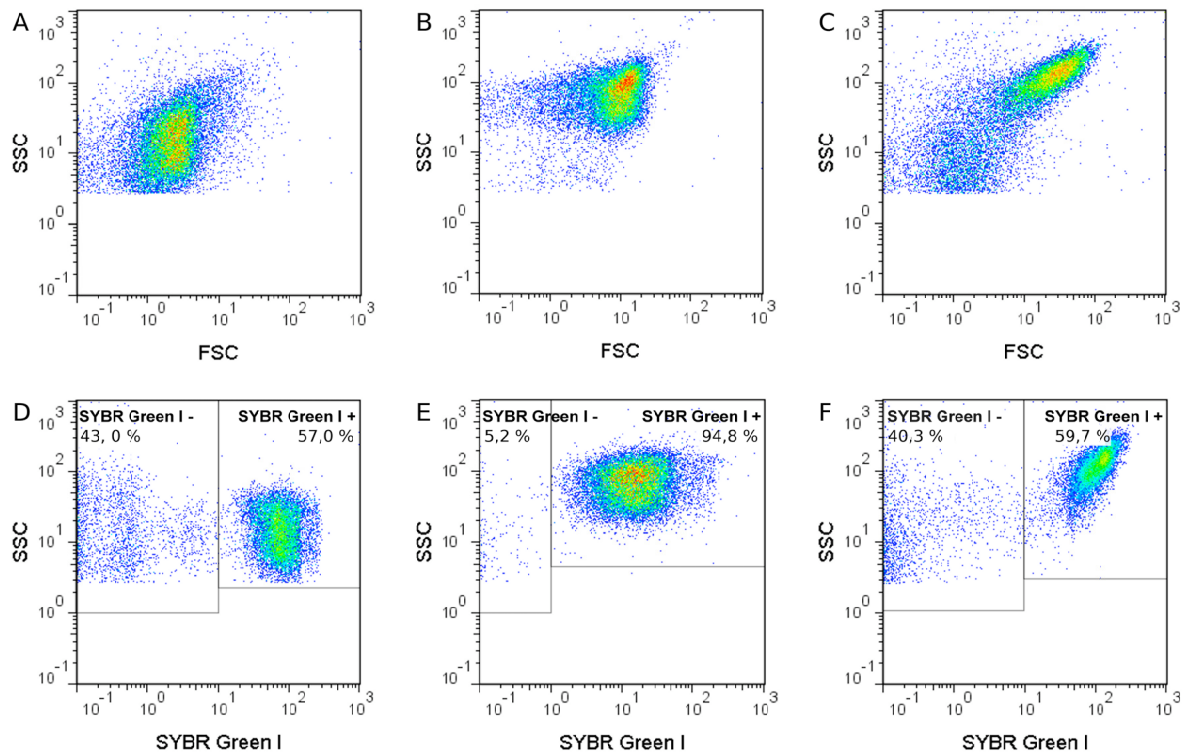


Abb. 11 Detektion von Bakterien mittels DZM durch Färbung mit SYBR Green I.

Darstellung von 2D-Pseudofarben-Punktdiagramme mit Bakterien aus stationärer Wachstumsphase aus Reinkulturen. **Oben:** Auftragung Streulichtparameter SSC über FSC, **unten:** Auftragung SSC über SYBR Green I-Fluoreszenz. **(A, D)** *P. aeruginosa*, **(B, E)** *B. cepacia* und **(C, F)** *S. aureus*. Färbung der Bakterien vor Analyse mit SYBR Green I (Verdünnung von 5×10^3). Probenbehandlung in NaCl-P-Puffer bzw. bei *B. cepacia* in NaCl-P-Puffer mit $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA. Regionen wurden manuell festgelegt. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen auf die Gesamtanzahl an Ereignissen angegeben.

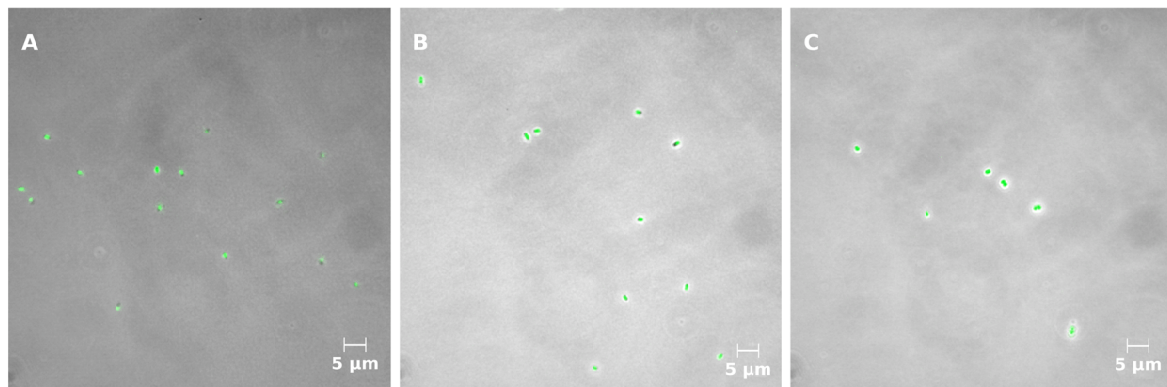


Abb. 12 Überprüfung der SYBR-Green I Färbung von Bakterien mittels FLM.

Einsatz von SYBR Green I (Verdünnung von 5×10^3) zur Färbung von: **(A)** *P. aeruginosa*, **(B)** *B. cepacia* und **(C)** *S. aureus*. Mikroskopische Bilder von Bakterien aus der stationären Wachstumsphase (*P. aeruginosa* aus exponentieller Wachstumsphase) aufgenommen mit dem Laser Scanning Mikroskop LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) mit 1.000-facher Vergrößerung. Hellfeld und SYBR Green I-Fluoreszenz überlagert dargestellt.

Darüber hinaus wurde die DZM mit der von Schmidt etablierten und validierten qT-RFLP-Methode (Schmidt 2008), in der Bestimmung der Zellkonzentration von Reinkulturproben verglichen. Mit beiden Methoden wurden für jede Spezies die Konzentrationen einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10) einer aus einer Reinkultur stammenden Bakteriensuspension bestimmt. Zur Minimierung des Einflusses des Pipettierfehlers wurden aus der einen Probe acht serielle Verdünnungsreihen unabhängig voneinander hergestellt. Anschließend wurden die einzelnen Proben einer Verdünnungsstufe zu einer Probe vereint und vermessen. Die Proben wurden jeweils einfach bestimmt. Für die DZM wurden die Bakterien gemäß dem unter 3.4.2 beschriebenen Färbeprotokoll nach der Probenahme fixiert, mit NaCl-P-Puffer mit BSA und Tween 20 gewaschen und vor der Analyse mit $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI angefärbt (Abb. 9 (B)). Zur Konzentrationsbestimmung wurde der Zählmodus des Durchflusszytometers genutzt, der die Zählung von Partikeln bzw. Zellen in einem fixen Analysevolumen von $200 \mu\text{L}$ erlaubt. Anhand der gemessenen Anzahl an DAPI-positiven Ereignissen in $200 \mu\text{L}$ wurde für jede Spezies die GZK in der Reinkultur, wie unter 3.4.3 beschrieben, mit Gl. 7 berechnet. Das Vorgehen bei der Bestimmung der Zellkonzentration mittels qT-RFLP-Analyse ist unter 3.5.2 beschrieben.

Beim Vergleich der Zellkonzentrationswerte beider Methoden wurde für jede Spezies, wie in Abb. 13 dargestellt, eine gute Übereinstimmung über einen Konzentrationsbereich von mehreren Log-Stufen erzielt. Die mittels DZM ermittelten Werte korrelierten linear, nahe der Ausgleichsgeraden, zu den Werten der qT-RFLP-Bestimmung über folgenden Konzentrationsbereich (Log transformiert angegeben): bei *P. aeruginosa* von $4,08 \text{ ge mL}^{-1}$ bis $6,64 \text{ ge mL}^{-1}$ (Abb. 13 (A)), bei *B. cepacia* von $3,35 \text{ ge mL}^{-1}$ bis $6,04 \text{ ge mL}^{-1}$ (Abb. 13 (B)) und bei *S. aureus* von $5,35 \text{ ge mL}^{-1}$ bis $7,10 \text{ ge mL}^{-1}$ (Abb. 13 (C)). Bei der Bestimmung von Proben mit *S. aureus* fiel auf, dass die DZM bei Konzentrationen $< 5,35 \text{ ge mL}^{-1}$ geringere Konzentrationswerte im Vergleich zur qT-RFLP lieferte (Abb. 13 (C)).

Jeder für die Mischkulturanalyse etablierten durchflusszytometrischen Methode wurde eine Fluoreszenzmarkierung der Zellen mit DAPI oder auch SYBR Green I (bei Vitalitätsfärbung) zugrunde gelegt. Anhand der in der Arbeit angewandten intrazellulären Fluoreszenzmarkierung war jedoch die Diskriminierung der Bakterien nach Spezies in Mischkulturproben nicht allein möglich. Zur Erfüllung dieser Voraussetzung, insbesondere für die durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturen, wurden

Färbungen für die DZM etabliert, bei der die intrazelluläre Fluoreszenzzellmarkierung mit dem Einsatz von extrazellulär (Spezies-) spezifisch-bindenden Fluoreszenzzellmarkern kombiniert wurde.

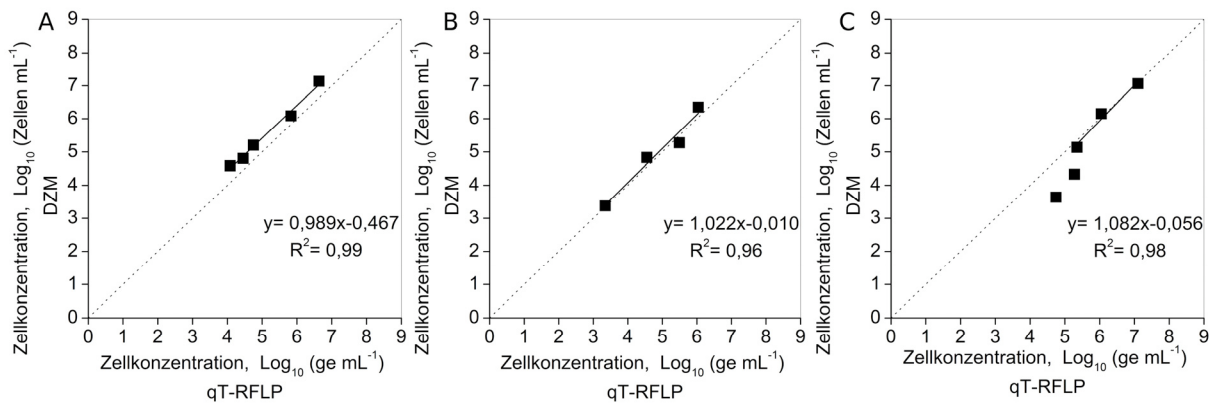


Abb. 13 Vergleich DZM mit qT-RFLP-Methode in der Zellkonzentrationsbestimmung.

Bestimmung der Konzentrationen einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10) einer aus einer Reinkultur stammenden Bakterien suspension, jede Konzentration wurde einfach bestimmt: **(A) *P. aeruginosa* (B) *B. cepacia* (C) *S. aureus*.** Auftragung Konzentrationswerte der DZM über Werte der qT-RFLP sowie Darstellung der linearen Regression einschließlich Geradengleichung. Konzentrationen sind jeweils logarithmisch transformiert (Log_{10}) dargestellt. Für die DZM wurden die Bakterien vor der Analyse mit $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI angefärbt. In den Tests wurde ein Dreifarbenprotokoll unter Einsatz von DAPI, Alexa 488 Fluor-markiertem WGA ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) und R-PE-markierter Antikörper ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE SAK) angewandt (siehe 3.4.2). Mittels DZM wurde die Anzahl der DAPI-fluoreszierenden Ereignisse bestimmt und daraus die Zellkonzentration ermittelt.

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Etablierung der Färbemethoden zur Spezies- bzw. Gram-spezifischen Fluoreszenzdetektion der Bakterien durch Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper bzw. Lektine beschrieben.

4.1.1. Immunfluoreszenz zur Spezies-spezifischen Detektion

Zur Spezies-spezifischen Detektion der relevanten Bakterien wurden verschiedene Spezies-spezifische mMAK des Typs IgG (PAK) hinsichtlich ihrer Eignung zur Immunfluoreszenzdetektion für die DZM getestet (Tab. 29). Ziel war die Etablierung einer fluoreszenzbasierten Spezies-spezifischen Detektion mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung durch gleichzeitigen Einsatz von PAK (mMAK des Typs IgG) und fluoreszenzkonjugierter SAK (anti-Maus Antikörper des Typs IgG). Zur Detektion von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* wurden als PAK die Antikörper A, B und C bzw. D und E getestet (Tab. 29). Als SAK kamen R-PE-konjugierte Antikörper

zum Einsatz (siehe 3.1.5). Die Bakterien wurden in NaCl-P-Puffer mit BSA-Zusatz verdünnt und behandelt (Tab. 5).

In Tab. 40 sind die Ergebnisse der Eignungstests der PAK für die durchflusszytometrische Immunfluoreszenzdetektion zusammengefasst. Parallel dazu wurde die Immunfluoreszenz der Bakterien mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen überprüft. Beide Methoden zeigten übereinstimmend, dass keine der hier getesteten *P. aeruginosa*-spezifischen PAK die Immunfluoreszenzmarkierung der Zellen des getesteten *P. aeruginosa*-Stammes erlaubten. Dabei wurden PAK A und B in Konzentrationen von 5 bis 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bei Anwendung von 10 bzw. 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SAK getestet. PAK C wurde in Konzentrationen von 5 bis 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, durch serielle Verdünnung der Stammlösung (1:10), mit 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SAK getestet. Die Verwendung der beiden *B. cepacia*-spezifischen PAK, D und E, resultierte dagegen in einer Immunfluoreszenzmarkierung der Zellen des relevanten *B. cepacia*-Stammes.

Tab. 40 Test verschiedener PAK auf Eignung zur Immunfluoreszenzdetektion von *P. aeruginosa* bzw. *B. cepacia* mittels DZM.

Gleichzeitig wurden R-PE-konjugierte SAK (indirekte Immunfluoreszenzmarkierung) eingesetzt. PAK A - C für *P. aeruginosa* und PAK D und E für *B. cepacia* (Spezifikation siehe Tab. 29). PAK A, B und D in Konzentrationen von 5 bis 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mit 10 bzw. 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SAK getestet. PAK C und E in Konzentrationen von 5 bis 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mit 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SAK getestet. Nachweis von Immunfluoreszenz (R-PE) sowie Beurteilung der erfassten Signalintensitäten hinsichtlich Diskriminierbarkeit der Bakterien vom Hintergrundsignal. Immunfluoreszenz zusätzlich mittels FLM überprüft.

Spezies	PAK	Immunfluoreszenz		Diskriminierbarkeit
		DZM	FLM	DZM
<i>P. aeruginosa</i>	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	n.t.	-
<i>B. cepacia</i>	D	+	+	+
	E	+	+	-

n.t. nicht überprüft

Hierbei erlaubte der Einsatz der PAK D in der durchflusszytometrischen Analyse eine eindeutige Diskriminierung von Bakterien vom Hintergrundsignal anhand der R-PE-Fluoreszenz bei Anwendung von 5 bis 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und 10 bzw. 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SAK (Tab. 40, Abb. 14 (A)). Mikroskopische Untersuchungen von mit PAK D behandelte

B. cepacia zeigten eine deutliche R-PE-Fluoreszenzfärbung aller betrachteter Zellen (Abb. 15 (A)). Die Anwendung der PAK des Typs E resultierte in der durchflusszytometrischen Analyse ebenfalls in der Detektion einer R-PE-positiven Population, jedoch wurden im Vergleich zum Einsatz von PAK D geringere Fluoreszenzintensitäten erreicht. Dabei wurden PAK E in Konzentrationen von 5 bis 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, durch serielle Verdünnung der Stammlösung (1:10), mit 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SAK getestet. Hierbei blieben die in der durchflusszytometrischen Analyse erfassten Intensitäten der R-PE-positiven Population in etwa gleich (Daten nicht gezeigt). Die intensitätsschwachen R-PE-Signale bei Einsatz von PAK E erlaubten in der Analyse keine Diskriminierung von Bakterien vom Hintergrundsignal. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von mit PAK E behandelte *B. cepacia* wiesen darüber hinaus nur wenige Zellen eine R-PE-Fluoreszenz auf (Daten nicht gezeigt). Aus den Tests ging der PAK D als geeigneter Antikörper für die Immunfluoreszenzdetektion von *B. cepacia* mittels DZM hervor.

In Hinblick auf die Spezies-spezifische Detektion von *B. cepacia* durch Immunfluoreszenz in Drei-Spezies-Mischkulturproben wurden PAK D auf Kreuzreaktivität gegen *P. aeruginosa* und *S. aureus* getestet. Zusätzlich wurde der alleinige Einsatz des R-PE-markierten SAK für alle drei Spezies auch in Reinkulturen getestet. In Abb. 14 sind die wesentlichen Ergebnisse der Tests beispielhaft für Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase dargestellt. Der Einsatz von PAK D mit R-PE-SAK sowie der alleinige Einsatz der SAK führten bei *S. aureus* zur Detektion zahlreicher positiver Fluoreszenzsignale (Abb. 14 (C), Abb. 14 (E)). Für *P. aeruginosa* konnten bei Einsatz beider Anwendungen keine R-PE-positiven Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abb. 14 (B)). Im Falle von *B. cepacia* wurden beim alleinigen Einsatz von R-PE-SAK interessanterweise keine positiven Fluoreszenzsignale detektiert (Abb. 14 (D)). Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit PAK D und / oder R-PE-SAK behandelten Proben für jede Spezies aus der Reinkultur bestätigt (Abb. 15). Aufgrund der festgestellten Bindung von PAK D sowie der SAK an *S. aureus* war eine Überlagerung der Signale von immunfluoreszenzmarkierten *B. cepacia* und *S. aureus* in der Analyse von Mischkulturproben zu erwarten. Zur eindeutigen Diskriminierung beider Spezies in der durchflusszytometrischen Analyse musste somit, neben der Immunfluoreszenzmarkierung von *B. cepacia*, eine für *S. aureus*-spezifische Fluoreszenzmarkierung gefunden werden.

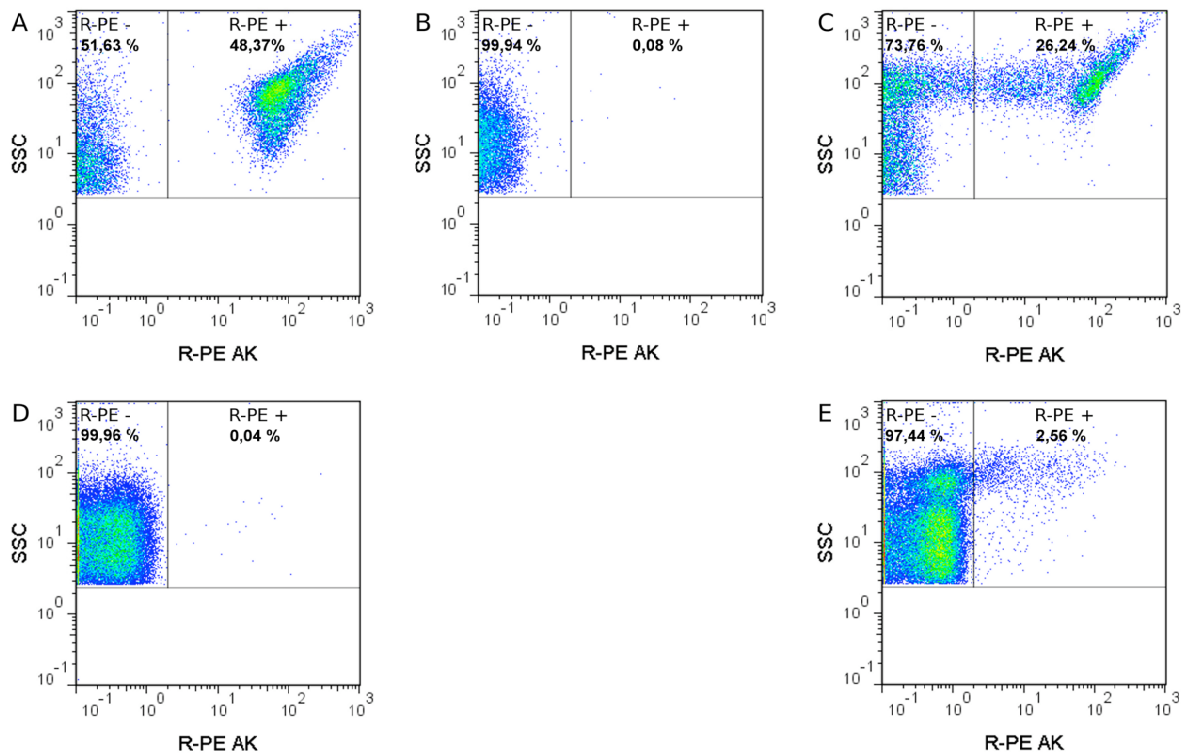


Abb. 14 Überprüfung der Spezifität der Immunfluoreszenzmarkierung mit PAK D mittels DZM.

Darstellung von 2D-Pseudofarben-Punktdiagramme mit Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase. Test von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE SAK mit (A) *B. cepacia*, (B) *P. aeruginosa* und (C) *S. aureus*. Für Spezies mit positivem Immunfluoreszenzsignal wurde zusätzlich die alleinige Anwendung von SAK überprüft: (D) *B. cepacia* und (E) *S. aureus*. Regionen wurden manuell festgelegt. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen auf die Gesamtanzahl an Ereignissen angegeben.

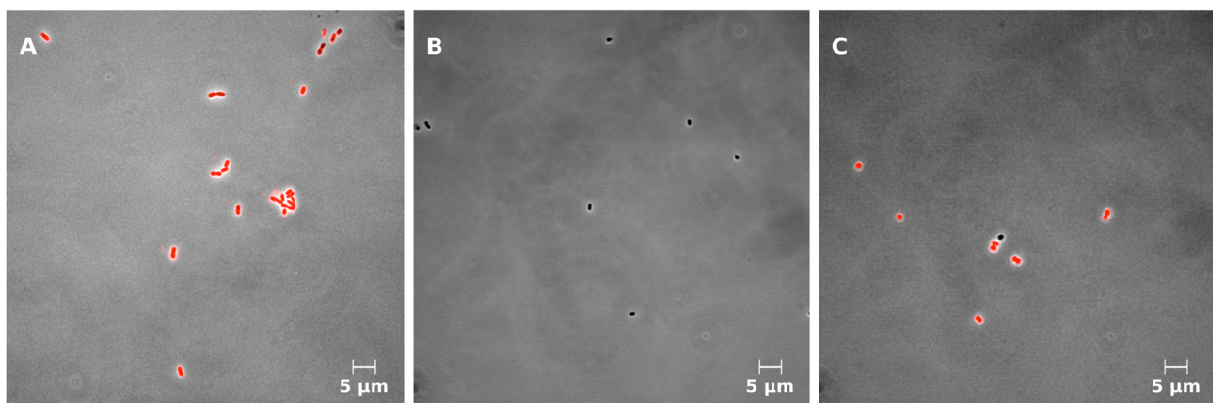


Abb. 15 Überprüfung der Spezifität der Immunfluoreszenzmarkierung mit PAK D mittels FLM.

Test von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE SAK mit (A) *B. cepacia*, (B) *P. aeruginosa* und (C) *S. aureus*. Mikroskopische Bilder von Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase aufgenommen mit Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) mit 1000-facher Vergrößerung. Hellfeld und R-PE Fluoreszenz überlagert dargestellt.

Zur Erzielung optimaler Fluoreszenzsignale in der durchflusszytometrischen Analyse zur Immunfluoreszenzdetektion von *B. cepacia* wurden die PAK D- sowie SAK-Konzentrationen in der Färbemethode angepasst. Dazu wurde der Einsatz verschiedener Konzentrationsverhältnisse SAK zu PAK zur Detektion von Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase getestet. In Abb. 14 (A) ist beispielhaft die Detektion immunfluoreszierender *B. cepacia*-Zellen für ein Verhältnis von 4 dargestellt. Für jedes Konzentrationsverhältnis wurde die MFI der positiv R-PE-fluoreszierenden Population bestimmt. Die MFI korrelierte dabei gut mit der Qualität der Diskriminierbarkeit der Bakterien vom Hintergrundsignal. Je höher die MFI umso besser war die Trennung zwischen Fluoreszenzsignalen markierter Zellen und denen des Hintergrunds (Daten nicht gezeigt). Zunächst wurde die PAK D-Konzentration konstant bei $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ gehalten und die SAK-Konzentration variiert. Mit zunehmendem Konzentrationsverhältnis SAK zu PAK erhöhte sich die Diskriminierbarkeit (Abb. 16 (A)). Für Verhältnisse SAK zu PAK von 1 bis 4 war die Trennung der Signale fluoreszenzmarkierter Bakterien von Signalen des Hintergrunds eindeutig. Bei einem Verhältnis SAK zu PAK von 4 war die Diskriminierbarkeit maximal (Abb. 16 (A)). Angelehnt daran wurde nachfolgend die SAK-Konzentration konstant bei $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ gehalten und die PAK D-Konzentration variiert. Dabei wurden Konzentrationsverhältnisse SAK zu PAK von 1 bis 40 getestet. Die Diskriminierbarkeit der gefärbten Bakterien vom Hintergrundsignal war bei Verhältnissen SAK zu PAK von 1 bis 4 maximal (Abb. 16 (A)). Für Verhältnisse SAK zu PAK > 4 nahm die Diskriminierbarkeit bis zu einem Verhältnis von 40 ab (Daten nicht gezeigt). Dennoch führten alle getesteten Konzentrationsverhältnisse bei Einsatz von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ SAK zu einer eindeutigen Trennung zwischen Signalen fluoreszenzmarkierter Bakterien und denen des Hintergrunds.

Den Ergebnissen zufolge sind zur Erzielung optimaler Fluoreszenzsignale in der DZM 5 – $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK mit mindestens $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-SAK zur Markierung von *B. cepacia* einzusetzen.

In weiteren Versuchen wurde für die Immunfluoreszenzdetektionsmethode die Wiederfindungsrate von *B. cepacia* (relative Häufigkeit R-PE-markierter Bakterien an der Gesamtanzahl der untersuchten Bakterien) bei Einsatz von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-SAK bestimmt. Dazu wurden Proben mit *B. cepacia* mit PAK und R-PE-SAK inkubiert und zusätzlich mit DAPI ($7 \mu\text{g mL}^{-1}$) angefärbt. Da DAPI spezifisch gegen DNS bindet (Kapuscinski 1995; Shapiro 2003) und die Färbung

erfahrungsgemäß, wie oben beschrieben, alle Bakterien in Reinkulturproben mit den hier eingestellten Zellkonzentrationen erfasst (Abb. 13 (B)), wurde die Gesamtzahl der DAPI-fluoreszierenden Ereignisse mit der Gesamtzahl der Bakterien gleichgesetzt. In Abb. 16 (B) ist beispielhaft die Detektion von DAPI-positiv gefärbten Bakterien dargestellt. Anhand der durchflusszytometrischen Immunfluoreszenzdetektion wurden mehr als 95 % der Bakterien (Mittelwert aus drei biologischen Replikaten), sowohl aus der exponentiellen (Abb. 16 (B)) als auch aus der stationären Wachstumsphase (Daten nicht gezeigt), wiedergefunden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit diesen Proben bestätigten die hohe Wiederfindung. Alle beobachteten *B. cepacia*-Zellen wiesen eine R-PE Fluoreszenzfärbung, wie beispielhaft in Abb. 15 (A) für Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase dargestellt ist, auf.

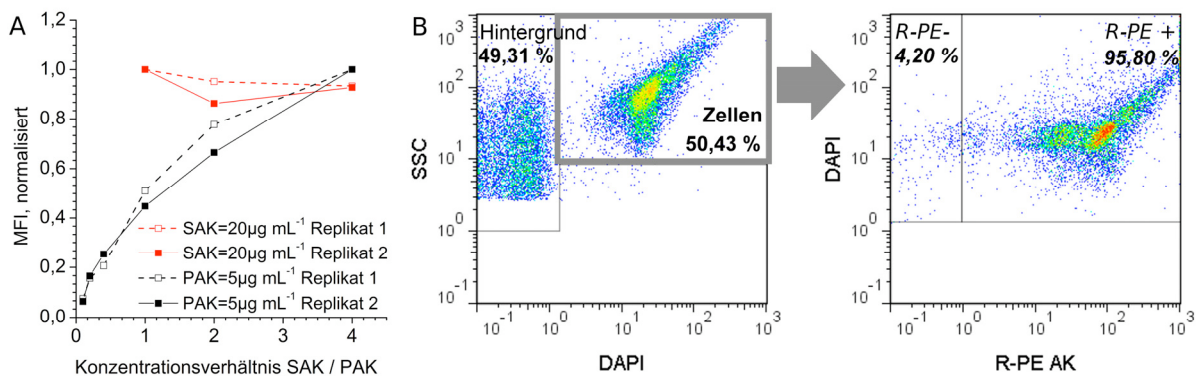


Abb. 16 Optimierung der PAK D- und SAK-Konzentration zur durchflusszytometrischen Immunfluoreszenzdetektion von *B. cepacia*.

(A) Einfluss des Konzentrationsverhältnisses R-PE konjugierter SAK zu PAK D auf MFI von R-PE-positiven Bakterien. Zum Vergleich von MFI an unterschiedlichen Versuchstagen wurde MFI jeweils auf maximalen Wert normalisiert. Darstellung von zwei Versuchsreihen (biologische Replikate). (B) 2D-Pseudofarben-Punktdiagramme von *B. cepacia* inkubiert mit 5 µg mL⁻¹ PAK D, 20 µg mL⁻¹ R-PE SAK (R-PE AK) und 7 µg mL⁻¹ DAPI. Regionen wurden manuell festgelegt. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen auf Gesamtanzahl an Ereignissen bzw. an Zellen (kursiv) angegeben.

4.1.2. WGA zur Gram-spezifischen Detektion von *S. aureus*

Zur Diskriminierung von *S. aureus* von den beiden anderen Spezies *P. aeruginosa* und *B. cepacia* in der durchflusszytometrischen Analyse von Mischkulturproben wurde der Einsatz von fluoreszenzmarkiertem WGA zur Gram-Färbung in Reinkulturen getestet. Zum Einsatz kamen grün fluoreszierendes Alexa488 Fluor-konjugiertes WGA sowie blau fluoreszierendes CF405S-konjugiertes WGA. Ersteres wurde als Fluoreszenzkonjugat direkt vom Hersteller bezogen. Letzteres wurde in

Anwendung des kommerziell zur Verfügung stehenden Mix-n-Stain™CF405S Kits fluoreszenzmarkiert (siehe 3.1.4). Mit Alexa488 Fluor-konjugiertem WGA wurden Tests mit beiden Gram-negativen Spezies zur Überprüfung von WGA auf unspezifische Bindung sowie Tests zur Optimierung der Färbekonditionen zur Diskriminierung von gefärbten *S. aureus* vom Hintergrundsignal durchgeführt. Der Einsatz von fluoreszenzmarkiertem WGA im Test mit Reinkulturen führte den Analysen, der DZM und FLM, zufolge übereinstimmend zur Markierung von *S. aureus*. Die Zellen von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* wiesen dagegen keine Fluoreszenzmarkierung auf. In Abb. 17 und Abb. 18 sind für jede Spezies die Ergebnisse der DZM und FLM beispielhaft dargestellt.

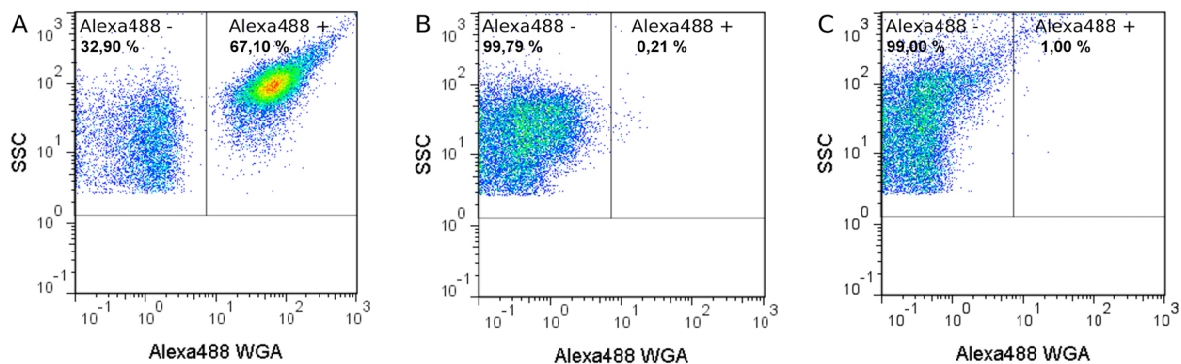


Abb. 17 Test von Alexa488 Fluor WGA zur Detektion von *S. aureus* mittels DZM.

2D-Pseudofarben-Punktdiagramme exponentiell gewachsener (A) *S. aureus*, (B) *P. aeruginosa* und (C) *B. cepacia* aus der Reinkultur, behandelt mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Alexa488 Fluor WGA. Regionen wurden manuell festgelegt. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen auf die Gesamtanzahl an Ereignissen angegeben.

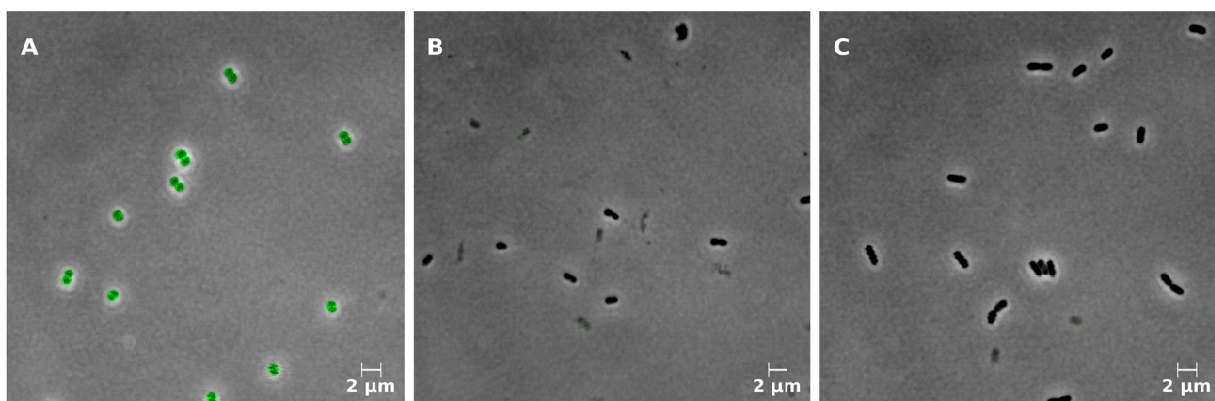


Abb. 18 Überprüfung Alexa488 Fluor WGA zur Detektion von *S. aureus* mittels FLM.

Mikroskopische Bilder exponentiell gewachsener (A) *S. aureus* (B) *P. aeruginosa* und (C) *B. cepacia* aus der Reinkultur, behandelt mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Alexa488 Fluor WGA, aufgenommen mit Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) mit 2000-facher Vergrößerung. Hellfeld und Alexa488 Fluor-Fluoreszenz überlagert dargestellt.

Zur Untersuchung des Einflusses der WGA-Konzentration auf die zu erzielenden Fluoreszenzsignale mit *S. aureus*, insbesondere in Hinblick auf eine eindeutige Diskriminierbarkeit vom Hintergrundsignal, wurde der Einsatz verschiedener Konzentrationen von 10 bis 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ getestet. Für jede Konzentrationsstufe wurde die MFI der positiven Alexa488 Fluor-fluoreszierenden Population (Abb. 17 (C), Region Alexa488 +) sowie der Signale des Hintergrundsignals (Abb. 17 (C), Region Alexa488 -) bestimmt. Als Maß für die Diskriminierbarkeit galt das Verhältnis der MFI der gefärbten Bakterien zur MFI des Hintergrundsignals. Je größer der Wert desto besser war die Trennung zwischen Signalen der Bakterien und des Hintergrundsignals. Im Ergebnis der Untersuchungen wurde kein Einfluss der WGA-Konzentration auf die Diskriminierbarkeit festgestellt, weder in der Analyse von Proben aus exponentiell gewachsenen Kulturen noch aus stationär gewachsenen Kulturen. Die Werte für Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase waren im Trend höher als die für stationäre Bakterien (Abb. 19 (A)). Die Diskriminierung fluoreszenzmarkierter Bakterien vom Hintergrundsignal war für alle getesteten Konzentrationen eindeutig möglich.

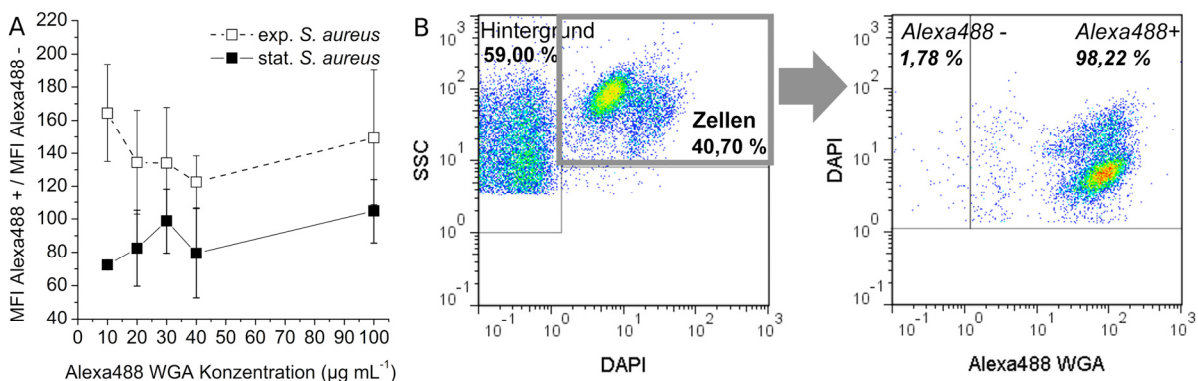


Abb. 19 Optimierung der Gram-spezifischen Detektion von *S. aureus* unter Einsatz von Alexa488 Fluor WGA für DZM.

(A) Einfluss der WGA Konzentration auf Diskriminierbarkeit gefärbter Zellen vom Hintergrundsignal, Verhältnis MFI gefärbter Zellen (Alexa488 +) zu MFI des Hintergrunds (Alexa488 -), bei der Färbung von Bakterien aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Fehlerbalken repräsentieren drei biologische Replikate. **(B)** 2D-Pseudofarben-Punktdiagramme von *S. aureus* aus der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert mit 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Alexa488 Fluor WGA und 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI. Regionen wurden manuell festgelegt. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen auf Gesamtanzahl an Ereignissen bzw. an Zellen (kursiv) angegeben.

In der Folge wurden 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ WGA zur Detektion von *S. aureus* eingesetzt, womit eine hohe Wiederfindung der Zellen bei der Detektion erzielt werden konnte. Die Wiederfindung wurde durch die Analyse von doppelt-gefärbten Proben mit *S. aureus*

aus Reinkulturen mit DAPI und Alexa488 Fluor WGA bestimmt. Durch Gram-spezifische Detektion wurden mehr als 97 % (Mittelwert aus drei biologischen Replikaten) der Bakterien, sowohl aus exponentiell als auch stationär gewachsenen Reinkulturen, wiedergefunden (relative Häufigkeit an DAPI-positiven Ereignissen). In Abb. 19 (B) sind beispielhaft die Diagramme aus der Analyse exponentiell gewachsener Reinkulturen zur Ermittlung der Wiederfindung von WGA-markierten Bakterien dargestellt. In Übereinstimmung mit Ergebnissen der DZM wurden in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von WGA-behandelten Proben mit *S. aureus* ausschließlich grün fluoreszierende Zellen beobachtet (Abb. 18 (A)). In Hinblick auf den gemeinsamen Einsatz der Gram-Färbung mit der Vitalitätsfärbung in der durchflusszytometrischen Analyse von Mischkulturproben (u.a. mit dem grün fluoreszierendem SYBR Green I) wurde blau fluoreszierendes CF405S-konjugiertes WGA eingeführt und getestet. Der Einsatz von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ CF405S WGA für die DZM erlaubte wie Alexa488 Fluor WGA die eindeutige Diskriminierung von *S. aureus* vom Hintergrundsignal (Abb. 20 (A)). Beim Test mit *P. aeruginosa* und *B. cepacia* wurden keine positiven Fluoreszenzsignale detektiert (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit Ergebnissen der DZM wurden in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von WGA-behandelten Proben mit *S. aureus* ausschließlich Zellen mit blauer Fluoreszenz beobachtet (Abb. 20 (B)).

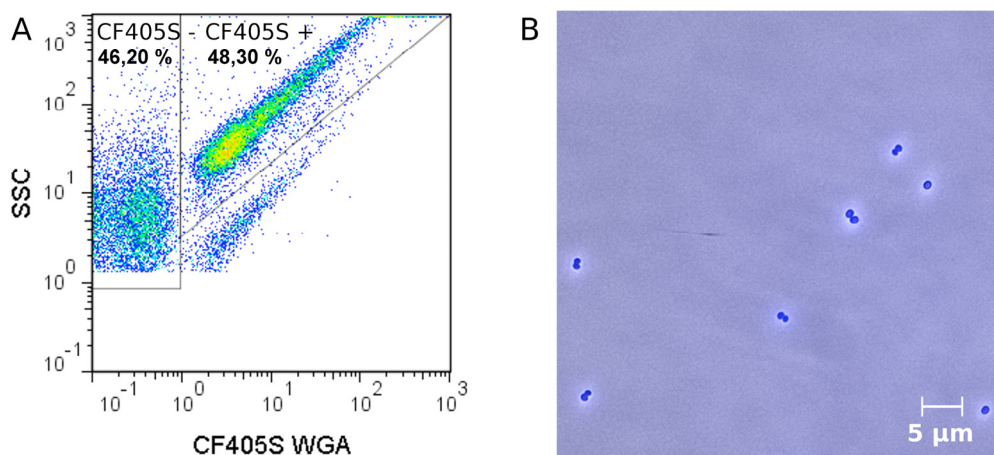


Abb. 20 Test von CF405S-markiertem WGA zur Detektion von *S. aureus*.

S. aureus aus exponentieller Wachstumsphase aus der Reinkultur, behandelt mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ CF405S WGA. **(A)** 2D-Pseudofarben-Punktdiagramm aus durchflusszytometrischer Analyse. Regionen wurden manuell festgelegt. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen auf die Gesamtanzahl an Ereignissen angegeben. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit Axiovert 135 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) mit 1000-facher Vergrößerung. Hellfeld und CF405S-Fluoreszenz überlagert dargestellt.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde für die DZM auch die spezifische Detektion von *P. aeruginosa* mittels fluoreszenzkonjugierter Lektine in Betracht gezogen. Nach eingehender Recherche in der Literatur wurde festgestellt, dass keine der zur Fluoreszenzmarkierung von *P. aeruginosa* getesteten Lektine BS-1, PHA-P, Con A und *Ulex* UEA-1 aufgrund von Kreuzreaktionen mit anderen Bakterienarten (Akiyama et al. 2002; Bejarano and Schneider 2004), insbesondere gegen *S. aureus*, zur Diskriminierung in Mischkulturen mit *S. aureus* und *B. cepacia* geeignet sind.

4.1.3. Methode zur Bestimmung der Vitalität

Zur Bestimmung der Vitalität der Bakterien wurde die durchflusszytometrische Analyse der Membranintegrität durch Anwendung der Färbung mit SYBR Green I und PI etabliert. Da sich Bakterien sowohl im Aufbau der Zellwand sowie -membran als auch in ihren Stoffwechselfunktionen unterscheiden, ist das Eindringen der Fluoreszenzfarbstoffe in den intrazellulären Raum aber auch die Wechselwirkung des Farbstoffes mit dem Zielmolekül abhängig von der Spezies und vom physiologischen Zustand des Bakteriums (Comas and Vives-Rego 1998).

Aus den genannten Gründen wurde bei der Etablierung der Färbemethoden zur Vitalitätsbestimmung zunächst jede Spezies einzeln betrachtet. Es wurden Tests mit Reinkulturproben durchgeführt. Somit konnten die Färbekonditionen an die Spezies angepasst werden. Dabei wurden jeweils Suspensionen aus Kulturen aus der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase verwendet.

Als Resultat der Doppelfärbung der Bakterien mit SYBR Green I und PI wurden für jede Spezies in der durchflusszytometrischen Analyse charakteristische Verteilungen von Ereignissen mit grüner zu roter Fluoreszenz detektiert. Bei Anwendung geeigneter Färbekonditionen konnten für jede Spezies zwei voneinander getrennte Populationen ausgemacht werden: Ereignisse mit ausschließlich grüner Fluoreszenz und Ereignisse mit intensiver roter Fluoreszenz sowie grüner Fluoreszenz (Abb. 24). Letztere Population wurde für jede Spezies ausschließlich bei der Analyse von mit Isopropanol-behandelten SYBR Green I / PI gefärbten Bakterien (Positivkontrollen) detektiert. Dieser Nachweis über das Vorkommen toter Bakterien erlaubte die eindeutige Zuordnung der Population zum Vitalitätsstatus. Ereignisse mit grüner Fluoreszenz wurden Bakterien mit intakter Membran (vitaler Bakterien) zugeordnet. Ereignisse mit intensiver roter Fluoreszenz und grüner Fluoreszenz wurden hingegen

Bakterien mit permeabilisierter Membran (toter Bakterien) zugeordnet. Für *S. aureus* wurde zusätzlich, neben den vitalen und toten Bakterien, eine Population mit intensivem SYBR Green I und PI Signal detektiert (Abb. 24 (D)). In Anlehnung an Veröffentlichungen anderer Autoren (Barbesti et al. 2000; Gregori et al. 2001) wurde diese Population „Bakterien mit einer leicht beschädigten Membran“ zugeordnet, die nachfolgend als beschädigt bezeichnet wird.

4.1.3.1. Optimierung der Vitalitätsfärbung für einzelne Spezies

Aufgrund der Eignung des NaCl-P-Puffers für die Spezies- und Gram-spezifische Markierung von *B. cepacia* bzw. *S. aureus* für die DZM und der möglichen Anwendung für die Mischkulturanalyse wurde für die Vitalitätsfärbung zunächst der Einsatz dieses Puffers verfolgt. Der NaCl-P-Puffer eignete sich für die Vitalitätsbestimmung von *B. cepacia* und *S. aureus*, jedoch nicht für *P. aeruginosa*. Bei Anwendung der PI-Einzelfärbung mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ für *P. aeruginosa* in NaCl-P-Puffer wurden nahezu alle betrachteten Bakterien mit PI gefärbt (Abb. 21 (A), (B), (C)). Es musste ein Puffer bzw. eine Lösung für die Färbung gefunden werden, der keine Permeabilisierung der Membran der Bakterien gegenüber PI begünstigt bzw. herbeiführt. Deshalb wurden verschiedene Puffer bzw. Lösungen hinsichtlich ihrer Eignung für *P. aeruginosa* durch PI-Einzelfärbungstests, mit Proben aus stationär gewachsenen Kulturen, untersucht. In der Analyse wurde für jede(n) Puffer bzw. Lösung die relative Häufigkeit der PI-fluoreszierenden Zellen von der Gesamtbakterienzahl bei variierender Inkubationsdauer von 5 bis 30 min ermittelt (Abb. 21). 100 % Färbung entsprachen der relativen Häufigkeit PI-fluoreszierender Ereignisse, die bei der Vermessung mit Isopropanol-behandelter Bakterien in NaCl-P-Puffer (Referenz / Positivkontrolle) ermittelt wurde. Als optimal wurde der Puffer bzw. die Lösung angesehen, bei dem bzw. bei der der geringste Anteil PI-fluoreszierender Zellen detektiert wurde. Bei Einsatz des von den Wissenschaftlern Shapiro und Nebe-von-Caron für Gram-negative Bakterien empfohlenen Dulbecco-Puffers (Shapiro and Nebe-von-Caron 2004) wiesen in etwa 20 % der Bakterien eine positive PI-Fluoreszenz, unabhängig von der Inkubationsdauer, auf (Abb. 21 (C)). Im Gegensatz dazu lag der Anteil PI-positiver Zellen an der Gesamtbakterienanzahl bei Anwendung der beiden getesteten Ringerlösungen A und B sowie der von Williams *et al.* empfohlenen MgSO_4 -Lösung (Williams et al. 1998) für jede

Inkubationsdauer bei weniger als 1 % (Abb. 21 (C)). Zur Bestimmung der Diskriminierbarkeit der PI gefärbten Bakterien vom Hintergrund wurde das Verhältnis der MFI der PI-positiven Population zu MFI der PI-negativen Population bestimmt. Je größer der Wert desto größer war die Trennung zwischen dem PI-positiven Signal und dem Hintergrundsignal. Die Regionen zur Bestimmung der MFI sind beispielhaft in Abb. 21 (B) dargestellt. Aufgrund der besseren Diskriminierbarkeit, insbesondere im Test mit Isopropanol behandelten Bakterien, wurde die Anwendung der Ringerlösung B gegenüber den anderen beiden bevorzugt (Abb. 21 (D)).

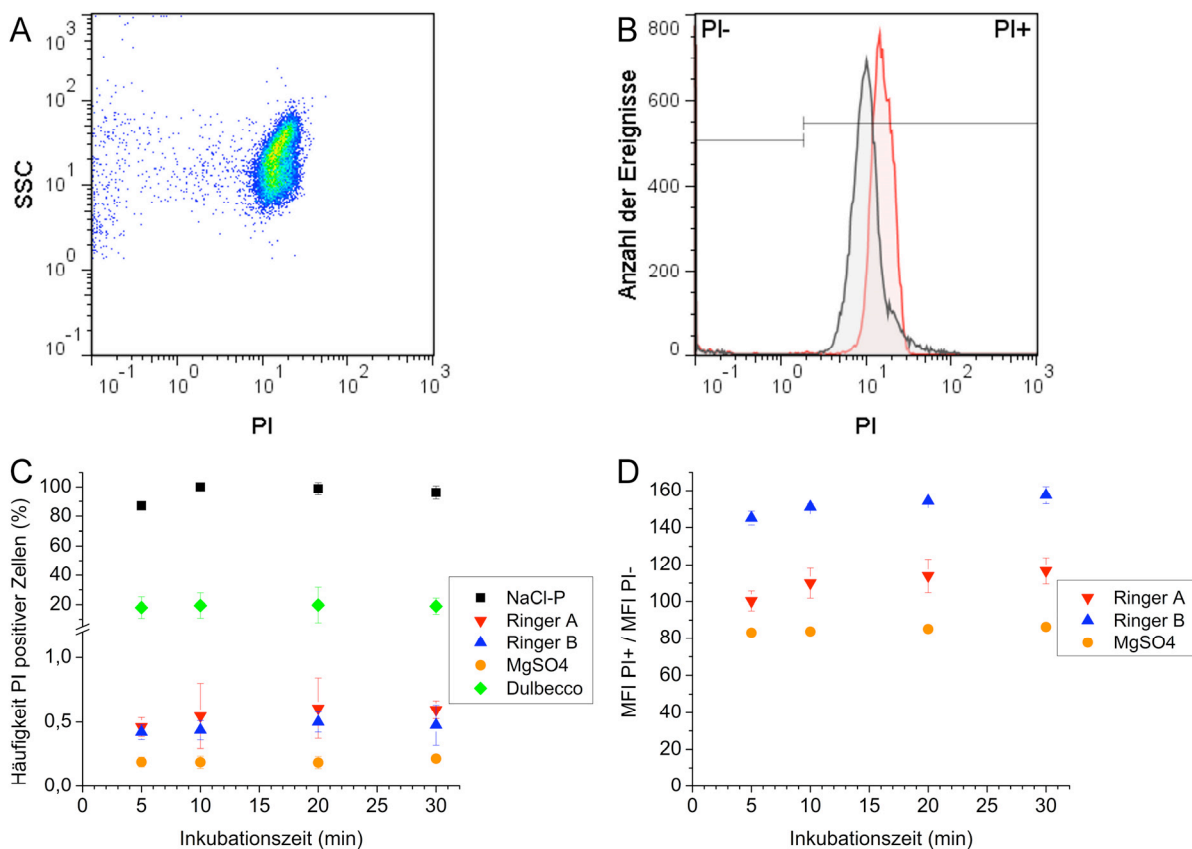


Abb. 21 Test verschiedener Puffer und Lösungen für Vitalitätsfärbung von *P. aeruginosa* für DZM.

Bakterien aus stationären Reinkulturen inkubiert mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI bei Anwendung unterschiedlich langer Inkubationsdauer. **(A)** 2D-Pseudofarben-Punktdiagramm von PI-gefärbten *P. aeruginosa* in NaCl-P-Puffer nach einer PI-Inkubationsdauer von 5 min. **(B)** Histogramme PI-gefärbter *P. aeruginosa* in NaCl-P-Puffer nach einer Inkubationsdauer von 5 min: unbehandelte Bakterien (rot) und mit Isopropanol behandelten Bakterien (grau). Regionen wurden manuell festgelegt. **(C)** Einfluss des Puffers bzw. der Lösung auf relative Häufigkeit PI-gefärbter Bakterien. Einer Häufigkeit von 100 % entspricht die relative Häufigkeit PI-fluoreszierender Ereignisse, die bei der Vermessung mit Isopropanol-behandelten Bakterien in NaCl-P-Puffer ermittelt wurde. **(D)** Einfluss des Puffers bzw. der Lösung auf Diskriminierbarkeit PI gefärbter Zellen vom Hintergrundsignal bei der Färbung mit Isopropanol-behandelten Bakterien. Dargestellt ist das Verhältnis zwischen MFI PI-positiver und PI-negativer Ereignisse. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus drei biologischen Replikaten.

Zur Erzielung optimaler Fluoreszenzsignale bei der Färbung der Bakterien mit SYBR Green I, die die eindeutige Diskriminierbarkeit vom Hintergrundsignal ermöglichen, wurde für jede Spezies die SYBR Green I-Konzentration (Verdünnung der SYBR Green I-Stammlösung) variiert.

Im Falle von *B. cepacia* musste dem Puffer zur Färbung der Bakterien mit SYBR Green I GTA zugegeben werden. Unter Berücksichtigung des Faktes, dass GTA die Vitalität bei zu hohen Mengen beeinträchtigen kann (Miyana et al. 2007), wurden verschiedene GTA-Konzentrationen im Puffer in Anwendung einer PI-Einzelfärbung getestet. Als Referenz wurden mit Isopropanol behandelte Bakterien im jeweils gleichen Puffer (Positivkontrolle) vermessen (Abb. 22 (A)). 100 % Färbung entsprachen der relativen Häufigkeit PI-fluoreszierender Ereignisse der Positivkontrolle. Für Proben mit $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ und $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA sowie für unbehandelte Proben (ohne GTA) wurden in etwa vergleichbare relative Häufigkeiten an PI-gefärbten Zellen bestimmt (Abb. 22 (B)). Nachfolgend wurden für die Färbung $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA im NaCl-P-Puffer eingesetzt.

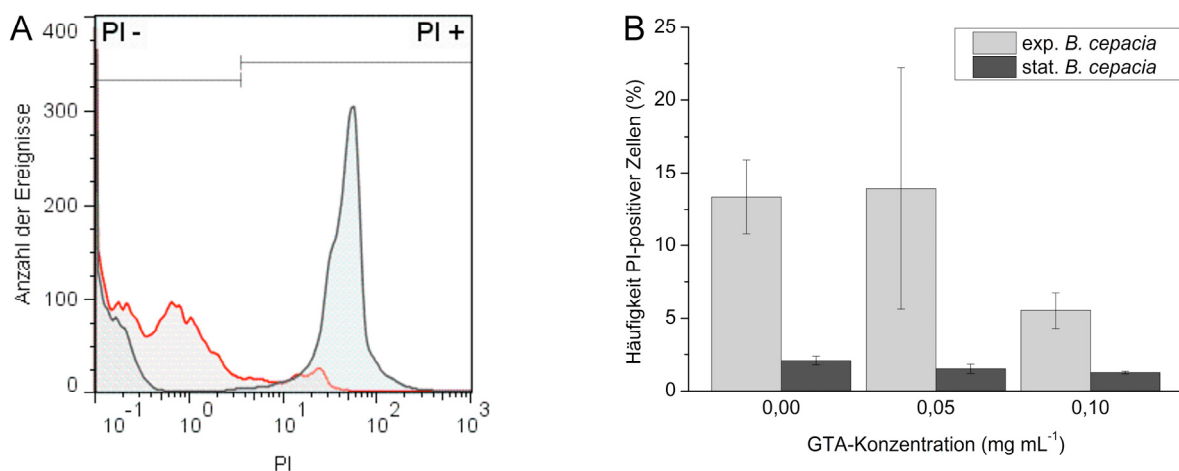


Abb. 22 Einfluss von GTA im Puffer auf Permeabilität gegenüber PI von *B. cepacia*.

Bestimmung mittels durchflusszytometrischer Analyse. Test von $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ und $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA in NaCl-P-Puffer bei Anwendung einer Einzelfärbung mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI. Untersuchungen mit Bakterien aus Reinkulturen. **(A)** Histogramme PI-gefärbter *B. cepacia* aus stationärer Wachstumsphase nach einer 20 minütigen Inkubation mit PI: unbehandelte Bakterien (grau) und mit $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA behandelte Bakterien (rot). Regionen wurden manuell festgelegt. **(B)** Darstellung der relativen Häufigkeit PI-fluoreszierender Bakterien über der eingesetzten GTA Konzentration. Eine Häufigkeit von 100 % entspricht der relativen Häufigkeit PI-fluoreszierender Ereignisse, die bei der Vermessung mit Isopropanol behandelten Bakterien ermittelt wurden. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus drei biologischen Replikaten.

Für jede Spezies wurden durch Färbung mit SYBR Green I in der Analyse grün fluoreszierende Bakterien detektiert, die wenn möglich als Population vom Hintergrundsignal abgegrenzt werden konnten. In Abb. 23 (A) ist beispielhaft die Region SYBR Green I-positiver Zellen (SYBR Green I +) aus der Analyse von *B. cepacia* aus der exponentiellen Wachstumsphase dargestellt. Von dieser Population wurde die MFI bestimmt. Die MFI korrelierte gut mit der Diskriminierbarkeit der gefärbten Bakterien vom Hintergrundsignal, dem Verhältnis der MFI SYBR Green I-positiver Population zu SYBR Green I-negativer Population. Je intensiver die Fluoreszenzintensitäten der erfassten Ereignisse desto größer war die Trennung zwischen beiden Populationen (Abb. 23 (B)). Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Spezies wurde jedoch die MFI über die eingesetzte SYBR Green I Verdünnung dargestellt (Abb. 24 (A, B, C)).

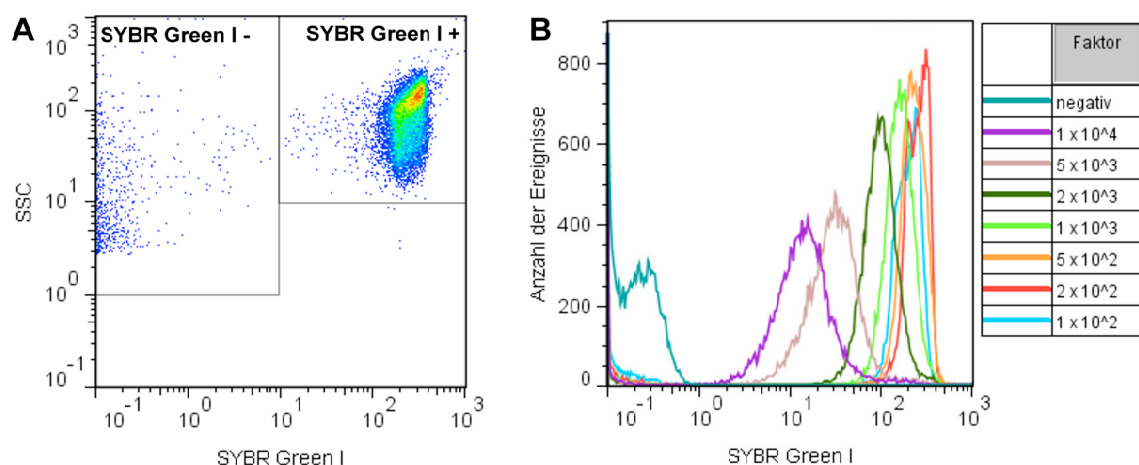


Abb. 23 Färbung von *B. cepacia* mit SYBR Green I zur Detektion in der durchflusszytometrischen Analyse.

Untersuchung von *B. cepacia* aus exponentiell gewachsener Reinkultur. (A) 2D-Pseudofarben-Punktdiagramm bei Einsatz von SYBR Green I-Verdünnung von 2×10^2 . Regionen wurden manuell festgelegt. (B) Histogramme zu Tests verschiedener SYBR Green I-Verdünnungen (Verdünnungsfaktor angegeben). Als Referenz wurde auch das Ergebnis aus der Analyse einer unbehandelten Probe (SYBR Green I-negativ) dargestellt.

Im Falle von *B. cepacia* führten Verdünnungen von 5×10^3 bis 1×10^2 zur eindeutigen Diskriminierung der gefärbten Bakterien vom Hintergrundsignal. Für gefärbte Bakterien beider Wachstumsstadien war die MFI bei Einsatz einer SYBR Green I-Verdünnung von 2×10^2 maximal (Abb. 24 (B)). Verdünnungen kleiner als 2×10^2 führten zur Abnahme der MFI. Für exponentiell gewachsene *B. cepacia*

war die MFI bei Einsatz von Verdünnungen von 5×10^3 bis 2×10^2 fast doppelt so intensiv wie für Bakterien aus der stationären Wachstumsphase (Abb. 24 (B)). Zur Überprüfung der Färbung von *B. cepacia* mit SYBR Green I wurden zusätzlich fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen von Proben mit einer Verdünnung von 2×10^2 durchgeführt. Dabei wurden ausschliesslich Bakterien mit grüner Fluoreszenz beobachtet (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz einer SYBR Green I-Verdünnung von 2×10^2 wurde als optimal erachtet.

Im Falle von *S. aureus* führten alle getesteten SYBR Green I-Verdünnungen zu einer eindeutigen Diskriminierung der gefärbten Bakterien vom Hintergrundsignal. Die für die grün-fluoreszierende Population ermittelten MFI-Werte waren für Bakterien aus exponentieller und stationärer Phase miteinander vergleichbar (Abb. 24 (A)). Bei Verdünnungen von 1×10^5 bis 1×10^4 waren die MFI maximal. Die Färbung von *S. aureus* mit diesen Verdünnungen wurde zusätzlich durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen überprüft. Im Ergebnis wurden ausschließlich grün-fluoreszierende Bakterien beobachtet (Daten nicht gezeigt). Für *S. aureus* wurden Färbungen mit SYBR Green I-Verdünnungen von 1×10^5 bis 1×10^4 als optimal erachtet.

Bei der Färbung von *P. aeruginosa* führten SYBR Green I Verdünnungen von 5×10^3 bis 5×10^1 zur eindeutigen Diskriminierung der gefärbten Zellen vom Hintergrundsignal. Für exponentiell gewachsene *P. aeruginosa* war die MFI bei Einsatz von Verdünnungen von 5×10^3 bis 1×10^2 deutlich größer als für *P. aeruginosa* aus der stationären Wachstumsphase (Abb. 24 (C)). Die ermittelte MFI war für exponentiell gewachsene Zellen bei einer SYBR Green I-Verdünnung von 2×10^2 maximal (Abb. 24 (C)). Verdünnungen kleiner als 2×10^2 führten zur Abnahme der MFI. Für Bakterien aus der stationären Wachstumsphase wurde bei einer SYBR Green I-Verdünnung von 1×10^2 die größte MFI ermittelt (Abb. 24 (C)). Zur Überprüfung der Färbung von *P. aeruginosa* mit SYBR Green I wurden zusätzlich Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Bei Einsatz von SYBR Green I-Verdünnungen von 5×10^3 bis 2×10^2 wiesen alle Bakterien eine grüne Fluoreszenzfärbung auf. Für *P. aeruginosa* wurde für die Färbung mit SYBR Green I eine Verdünnung von 2×10^2 als optimal erachtet.

Über alle Spezies betrachtet, mussten für *B. cepacia* und *P. aeruginosa* größere Mengen an SYBR Green I als für *S. aureus* zur optimalen Färbung der Bakterien eingesetzt werden.

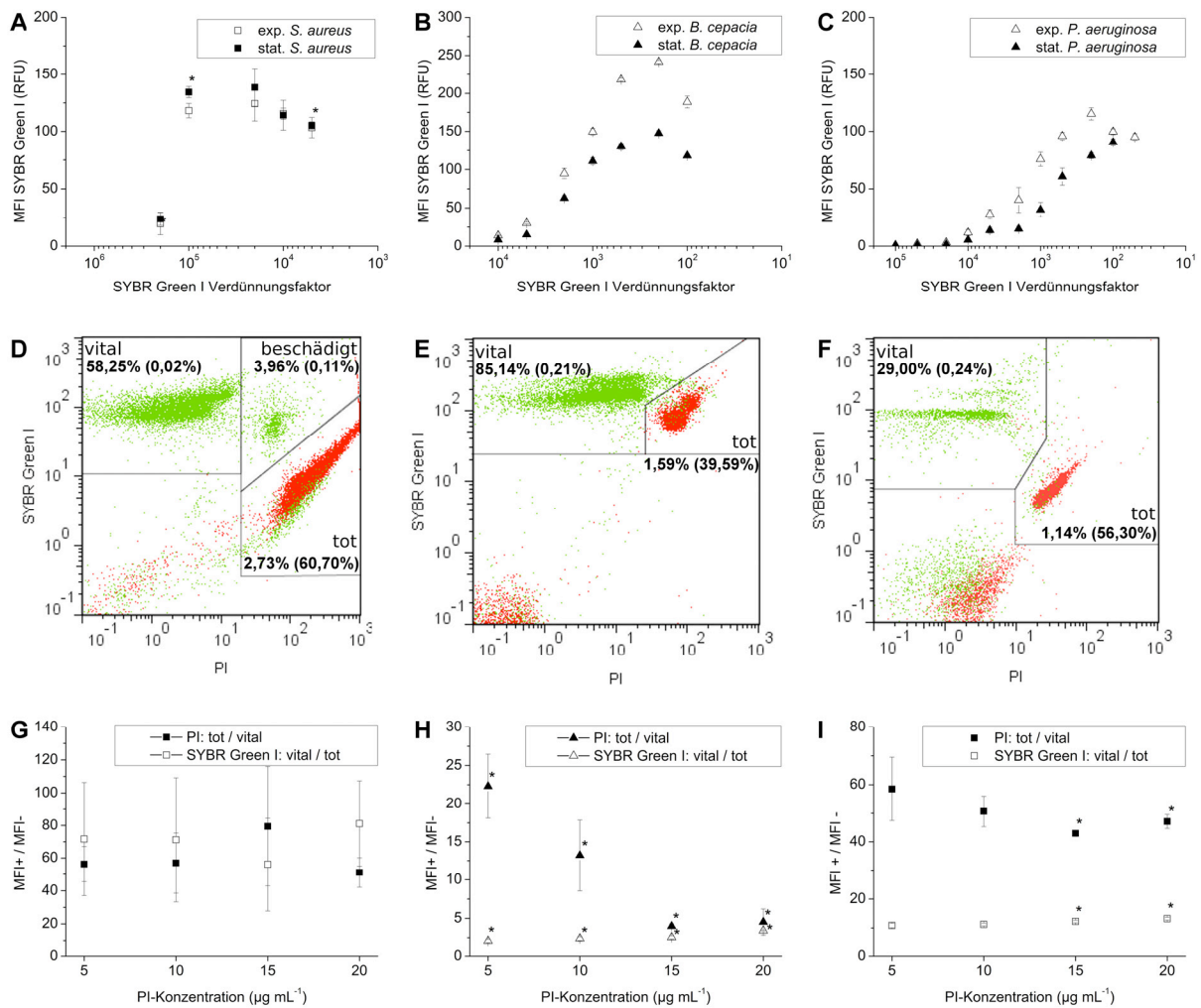


Abb. 24 Optimierung des SYBR Green I- / PI- Färbeprotokolls für DZM zur Vitalitätsbestimmung, separat für jede Spezies.

Tests mit Reinkulturen von: (A, D, G) *S. aureus*, (B, E, H) *B. cepacia* und (C, F, I) *P. aeruginosa*. Proben wurden in NaCl-P-Puffer (*S. aureus*) oder in Ringerlösung B (*B. cepacia*, *P. aeruginosa*) verdünnt und gefärbt. (A-C) Anpassung SYBR Green I-Einzelfärbung: Einfluss der Menge an SYBR Green I (Verdünnungsfaktor der Stammlösung angegeben) auf MFI gefärbter Bakterien bei der Untersuchung von Bakterien aus exponentieller und stationärer Wachstumsphase. (D-F) Doppelfärbung mit SYBR Green I und PI. Überlagerte Darstellung von 2D-Punktdiagrammen von unbehandelten (grün) und mit Isopropanol behandelten Bakterien (rot, Positivkontrolle) aus der stationären Wachstumsphase. Dabei wurden folgende SYBR Green I-Verdünnung (Faktor) und PI-Konzentration angewandt: für *S. aureus* 1×10^4 und $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, für *B. cepacia* und *P. aeruginosa* 2×10^2 und $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Abgrenzung von Vitalitätspopulationen durch Regionen, die in Anlehnung an die Fluoreszenzsignale der Positivkontrolle manuell gesetzt wurden. Für jede Region ist die relative Häufigkeit der Gesamtereignisse unbehandelter und mit Isopropanol behandelter Zellen (in Klammern) angegeben. (G-I) Einfluss der PI-Konzentration auf die Diskriminierbarkeit zwischen vitalen und toten Bakterien bei Anwendung der Doppelfärbung für Proben aus der stationären Wachstumsphase. PI-Konzentration wurde variiert und SYBR Green I-Verdünnung wurde konstant gehalten: für *S. aureus* bei 1×10^4 , für *B. cepacia* und *P. aeruginosa* bei 2×10^2 . Darstellung des Verhältnisses zwischen MFI von SYBR Green I der vitalen und toten Population und zwischen MFI von PI der toten und vitalen Population jeweils über der getesteten PI-Konzentration. Zur Ermittlung der Verhältnisse wurden Regionen wie in (D-F) dargestellt angewandt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei (*) bzw. drei biologischen Replikaten.

Danach wurde für jede Spezies die PI-Konzentration in der Doppelfärbung mit SYBR Green I mit dem Ziel einer eindeutigen Diskriminierbarkeit der Fluoreszenzsignale toter von vitaler Bakterien angepasst. Das erfolgte gemäß der von Barbesti *et al.* beschriebenen Vorgehensweise beim Test unterschiedlicher PI-Konzentrationen bei gleichzeitiger Anwendung von SYBR Green I mit einer konstanten Menge (der zuvor als optimal ermittelten Verdünnung) (Barbesti *et al.* 2000). Dazu wurde das Verhältnis der MFI vitaler zu toter Bakterienpopulation im SYBR Green I-Kanal (MFI + / MFI -) sowie das Verhältnis der MFI toter zu vitaler Bakterienpopulation im PI-Kanal (MFI + / MFI -) bestimmt. Je größer das ermittelte Verhältnis desto besser war die Diskriminierbarkeit zwischen vitalen und toten Bakterien im jeweiligen Kanal. Es wurden vier unterschiedliche PI-Konzentrationen, 5 bis 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, getestet. Für *S. aureus* wurde eine SYBR Green I-Verdünnung von 1×10^4 , für *B. cepacia* und *P. aeruginosa* eine Verdünnung von 2×10^2 eingesetzt. Im Falle von *S. aureus* wurden für alle getesteten PI-Konzentrationen hohe Werte für MFI + / MFI - in beiden Fluoreszenzkanälen ermittelt. Das galt für Bakterien aus exponentieller (Daten nicht gezeigt) und stationärer Wachstumsphase (Abb. 24 (G)). Die ermittelten Werte waren durch eine sehr gute Trennung der Fluoreszenzsignale vitaler zu toter Population in beiden betrachteten Messkanälen gekennzeichnet. Zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen PI-Konzentrationen gab es im Wesentlichen keine Unterschiede.

Im Gegensatz zu *S. aureus*, nahm im Test mit *B. cepacia* das Verhältnis MFI + / MFI - im PI-Kanal mit steigender PI-Konzentration ab. Das Verhältnis MFI + / MFI - im SYBR Green I-Kanal blieb dagegen unverändert. In Abb. 24 (H) können diese Ergebnisse für Bakterien aus stationärer Wachstumsphase nachvollzogen werden. In der Doppelfärbung von *B. cepacia* wurde die beste Diskriminierbarkeit zwischen vitaler und toter Population für Proben beider Wachstumsphasen durch Einsatz von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI erzielt.

Im Falle von *P. aeruginosa* wurde für das Verhältnis MFI + / MFI - im PI-Kanal mit steigender PI-Konzentration ein abnehmender Trend verzeichnet. Das Verhältnis MFI + / MFI - im SYBR Green I-Kanal blieb unverändert. In Abb. 24 (I) sind die Ergebnisse für stationär gewachsene Bakterien dargestellt. Aufgrund der relativ hohen Verhältnisse MFI + / MFI - im PI-Kanal war eine sehr gute Trennung zwischen vitaler und toter Population bei Anwendung aller getesteter PI-Konzentrationen möglich.

Da höhere PI-Konzentrationen zur Permeabilisierung der Bakterien führen können (Williams et al. 1998), wurde zusätzlich der Einfluss der PI-Konzentration auf die Vitalität untersucht. Dazu wurden für alle Spezies die relativen Häufigkeiten der Vitalitätspopulationen vital und tot bzw. vital, beschädigt und tot (*S. aureus*) ermittelt. Für *S. aureus* blieb die Vitalität der Bakterien bei allen getesteten PI-Konzentrationen vergleichbar hoch, wohingegen die Vitalität von *B. cepacia*, insbesondere exponentiell gewachsener Bakterien, mit steigender PI-Konzentration reduziert wurde (Daten nicht gezeigt). Während die relative Häufigkeit toter *B. cepacia* von 5 bis 10 µg mL⁻¹ PI konstant bei etwa 3 % lag, nahm diese bei höheren PI-Konzentrationen um das Eineinhalb- bis Dreifache zu. Bei Untersuchungen mit *P. aeruginosa* war im Vergleich zu *B. cepacia* kein abnehmender Trend der Vitalität mit steigender PI-Konzentration zu erkennen. Jedoch war die Vitalität von *P. aeruginosa* aus der exponentiellen Wachstumsphase bei PI-Konzentrationen > 5 µg mL⁻¹ im Vergleich zur Vitalität bei 5 µg mL⁻¹ PI geringer. Zudem wurde beim Test der Bakterien aus der stationären Wachstumsphase bei einer PI-Konzentration von 10 µg mL⁻¹ der niedrigste Vitalitätswert bestimmt (Daten nicht gezeigt).

In Tab. 41 sind für alle Spezies die im Ergebnis der Konzentrationstests als optimal ermittelten SYBR Green I- und PI-Zugaben für die Vitalitätsfärbung zusammengefasst.

Tab. 41 Optimale SYBR Green I- und PI-Zugaben für die Färbung zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Vitalität, separat für jede Spezies.

Verdünnung sowie Färbung von *S. aureus* und *B. cepacia* in NaCl-P-Puffer und *P. aeruginosa* in Ringerlösung B. Zur Fluoreszenzfärbung von *B. cepacia* mit SYBR Green I wurde dem Puffer GTA zugegeben. Angegeben sind die finale Konzentration bzw. Verdünnung (SYBR Green I) in der Probe.

Spezies	SYBR Green I- Verdünnung	PI- Konzentration µg mL ⁻¹	Zugabe GTA Konzentration mg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i>	1 x 10 ⁴	5 - 20	-
<i>B. cepacia</i>	2 x 10 ²	5	0,05
<i>P. aeruginosa</i>	2 x 10 ²	5	-

4.1.3.2. Etablierung einer einheitlichen Färbemethode für die Vitalitätsbestimmung in Mischkulturen

Zur Bestimmung der Vitalität in Mischkulturen mit einem einheitlichen Protokoll musste aufgrund der Variation der ermittelten optimalen Färbeparameter zwischen den Spezies ein Kompromiss in den Färbebedingungen gefunden und für jede Spezies verifiziert werden. Für jede Spezies erlaubte der Einsatz einer Reihe von SYBR Green I-Verdünnungen in der Analyse von Reinkulturen eine eindeutige Diskriminierung der gefärbten Bakterien vom Hintergrundsignal. Dieses Ergebnis wurde für alle Spezies bei der Färbung mit einer SYBR Green I-Verdünnung von 5×10^3 erreicht. Deshalb wurde im Folgenden diese Verdünnung für die Etablierung eines einheitlichen Färbeprotokolls für die Mischkulturanalyse gewählt. Für die Doppelfärbung wurde PI mit einer Konzentration von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ eingesetzt, da diese Konzentration für jede Spezies erstens zur optimalen Detektion der Vitalitätspopulationen führte und zweitens die Vitalität der Bakterien nicht beeinträchtigte.

Da sich der NaCl-P-Puffer nicht für die Vitalitätsbestimmung von *P. aeruginosa* eignete und eine gute Färbung von *B. cepacia* mit SYBR Green I nur unter Zugabe von GTA im Puffer möglich war, wurde für das einheitliche Protokoll die Ringerlösung B mit $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA eingesetzt. Vorausgegangen waren Untersuchungen zum Einfluss der einzusetzenden GTA-Konzentration auf die Permeabilität der Zellmembran von *P. aeruginosa* und *S. aureus* gegenüber PI. In PI-Einzelfärbungstests wurde für beide Spezies nachgewiesen, dass die Zugabe von $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA zu keiner Erhöhung der Anzahl PI-markierter Bakterien führte. Die relativen Häufigkeiten an PI-gefärbten Zellen wurden in Proben bei Anwendung von GTA im Vergleich zur unbehandelten Probe wieder gefunden (Abb. 25). Bei exponentiell gewachsenen *P. aeruginosa* war sogar der Anteil PI-markierter Bakterien bei Anwendung von GTA kleiner (Abb. 25 (A)).

Für alle drei Spezies erwiesen sich die einheitlichen Färbebedingungen für die Vitalitätsfärbung mit SYBR Green I und PI, wie im Folgenden dargelegt, als geeignet.

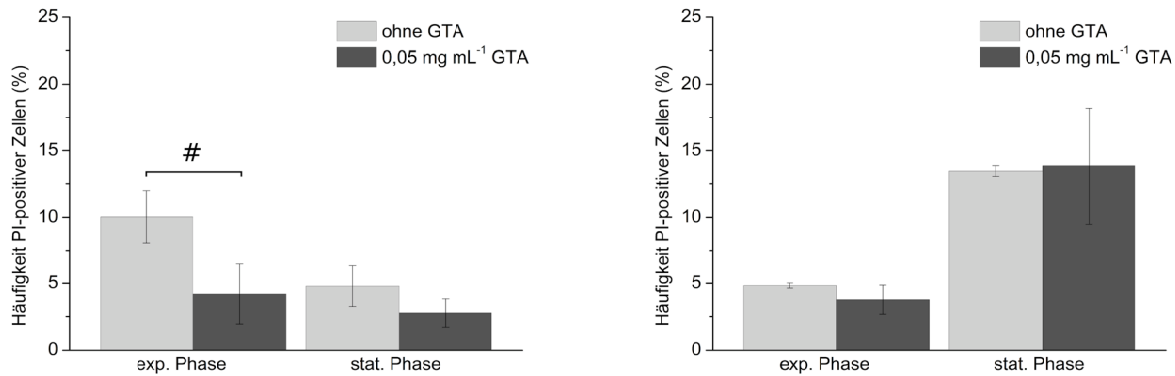


Abb. 25 Untersuchung des Einflusses von GTA auf die Permeabilität der Zellmembran von *P. aeruginosa* und *S. aureus* gegenüber PI.

Bestimmung mittels durchflusszytometrischer Analyse. Test in Ringerlösung B ohne und mit 0,05 mg mL⁻¹ GTA bei Anwendung einer Einzelfärbung mit 5 µg mL⁻¹ PI. Untersuchungen mit Reinkulturproben aus exponentieller und stationärer Wachstumsphase. Darstellungen der ermittelten relativen Häufigkeit PI-fluoreszierender Bakterien in Abhängigkeit von der Wachstumsphase: **(A)** *P. aeruginosa* und **(B)** *S. aureus*. Eine Häufigkeit von 100 % entspricht der relativen Häufigkeit PI-fluoreszierender Ereignisse, die bei der Vermessung mit Isopropanol behandelten Bakterien in NaCl-P-Puffer ermittelt wurden. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus drei biologischen Replikaten, # kennzeichnet die Werte mit signifikantem Unterschied ($p < 0,05$, gepaarter t-Test).

In Hinblick auf die Vitalitätsbestimmung von Mischkulturproben durch gemeinsamen Einsatz der Vitalitätsfärbung mit den spezifischen Fluoreszenzmarkern wurden die Immunfluoreszenzmarkierung von *B. cepacia* und die Gram-spezifische Markierung von *S. aureus* bei Verwendung von Ringerlösung B mit 0,05 mg mL⁻¹ GTA verifiziert. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei Einsatz von 20 µg mL⁻¹ WGA-CF405S eine Diskriminierung der WGA-CF405S markierten *S. aureus*-Zellen vom Hintergrundsignal (Abb. 26 (A)) sowie in Mischkulturen von Signalen von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* (Daten nicht gezeigt) in der Analyse nur schwer bzw. nicht möglich war. In Anlehnung an die Studie von Holm und Jespersen wurde der Ringerlösung B mit GTA zusätzlich Kaliumchlorid (KCl) zugegeben (Holm and Jespersen 2003). Mit dieser Zugabe wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der oben genannten Arbeit von Holm und Jespersen eine Verstärkung der Intensität des blauen Fluoreszenzsignals der mit WGA-markierten Gram-positiven Bakterien herbeigeführt. Eine Erhöhung der KCl-Konzentration in der Lösung auf 3 M erlaubte die eindeutige Diskriminierung der WGA-CF405S-gefärbten *S. aureus* vom Hintergrundsignal (Abb. 26 (B)) bzw. von ungefärbten Bakterien, so auch von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* in Mischkulturen (Abb. 31 (B, C)). Neben GTA und KCl enthielt die angepasste Ringerlösung B in Hinblick auf eine effiziente

Immunfluoreszenzmarkierung von *B. cepacia*, aufgrund der guten Ergebnisse bei der Etablierung (siehe 4.1.1), noch BSA (0,05 %, Masse-%, Tab. 13). In dieser Ringerlösung, nachfolgend als Ringerlösung B_opt bezeichnet, wurde mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D und $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-konjugierter SAK eine gute Fluoreszenzmarkierung von *B. cepacia* erzielt. Wie in Abb. 26 (C) und in Abb. 31 (B, C) dargestellt, erlaubte diese Prozedur für die DZM in der Analyse eine eindeutige Diskriminierung von *B. cepacia* vom Hintergrundsignal bzw. in Mischkulturen von Signalen von *S. aureus* und *P. aeruginosa*.

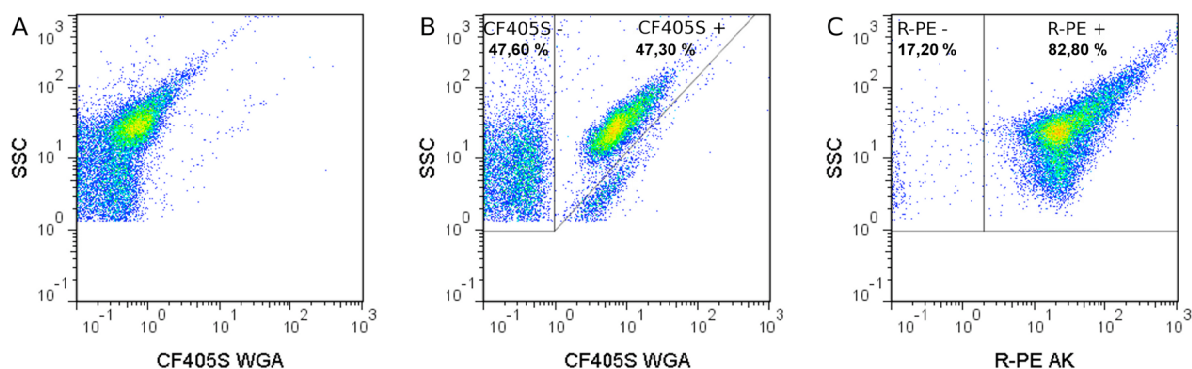


Abb. 26 Verifizierung der spezifischen Fluoreszenzmarkierung für die DZM bei Anwendung der Ringerlösung B_opt.

Test der Gram-spezifischen Detektion von *S. aureus* und Immunfluoreszenzdetektion von *B. cepacia*. Darstellung 2D-Pseudofarben-Punktdiagrammen aus Analyse von Proben aus stationär gewachsenen Reinkulturen: **(A, B)** *S. aureus* inkubiert mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ CF405S-WGA bei Verdünnung und Färbung der Proben in **(A)** Ringerlösung B mit $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA und **(B)** Ringerlösung B_opt (mit GTA, KCl, BSA). **(C)** *B. cepacia* inkubiert mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D und $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-konjugierter SAK bei Behandlung der Proben in Ringerlösung B_opt. Regionen wurden manuell festgelegt. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen auf die Gesamtanzahl an Ereignissen angegeben.

Als Nachweis zur Eignung der angepassten Färbebedingungen (Kompromissbedingungen) für die Vitalitätsbestimmung wurden zusätzlich Untersuchungen mit Reinkulturproben unternommen, die zeigten, dass die Umstellung von NaCl-P Puffer auf Ringerlösung B_opt und die Anpassung der Farbstoffmengen zu keiner Reduzierung der Vitalität der einzelnen Spezies führte. Für Proben aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase wurde die Vitalität zum einen in Anwendung des für die Spezies in der Reinkultur optimalen Färbeprotokolls und zum anderen in Anwendung des einheitlichen Färbeprotokolls zur Mischkulturanalyse bestimmt. Diese Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Für alle Spezies wurden im Wesentlichen miteinander vergleichbare relative Häufigkeiten vitaler und toter bzw. vitaler, beschädigter und toter Zellen ermittelt (Abb. 27).

Die einheitliche Vitalitätsfärbemethode für die DZM zur Analyse von Mischkulturproben erlaubte für jede Spezies die Detektion der Vitalitätspopulationen sowie die eindeutige Diskriminierbarkeit zwischen vitalen und toten bzw. zwischen vitalen, beschädigten und toten Bakterien (Abb. 28).

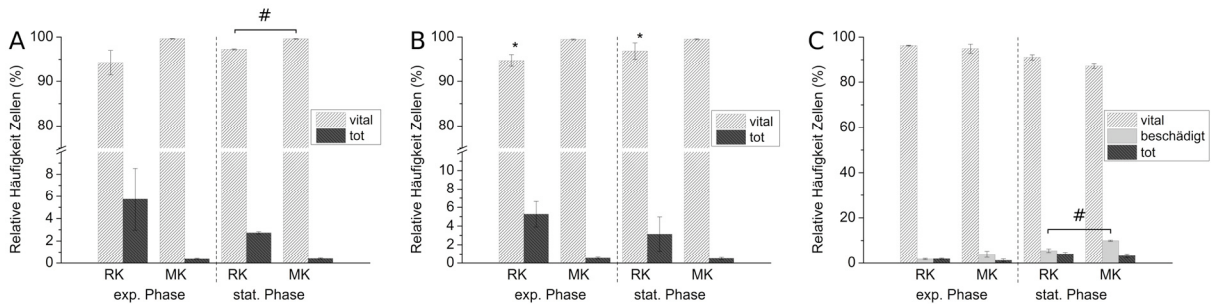


Abb. 27 Vergleich von Färbemethoden zur Vitalitätsbestimmung für die DZM.

Bestimmung der Vitalität von Reinkulturproben mit zwei Methoden. Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der Anwendung der für die Spezies optimalen Färbebedingungen für die Reinkulturanalyse (RK) mit denen aus der Anwendung des einheitlichen Vitalitätsfärbeprotokolls für die Mischkulturanalyse (MK; SYBR Green I-Verdünnung von 5×10^3 , $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI, Ringerlösung B_opt). Darstellung ermittelter relativer Häufigkeiten vitaler und toter bzw. vitaler, beschädigter und toter Bakterien aus exponentieller und stationärer Wachstumsphase. (A) *P. aeruginosa*: RK (SYBR Green I-Verdünnung von 2×10^2 , $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI, Ringerlösung B) versus MK. (B) *B. cepacia*: RK (SYBR Green I-Verdünnung von 2×10^2 , $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI, NaCl-P-Puffer mit $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA) versus MK. (C) *S. aureus*: RK (SYBR Green I-Verdünnung von 1×10^4 , $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI, NaCl-P-Puffer) versus MK. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei (*) bzw. drei biologischen Replikaten, # kennzeichnet die Werte mit signifikantem Unterschied ($p < 0,05$, gepaarter t-Test).

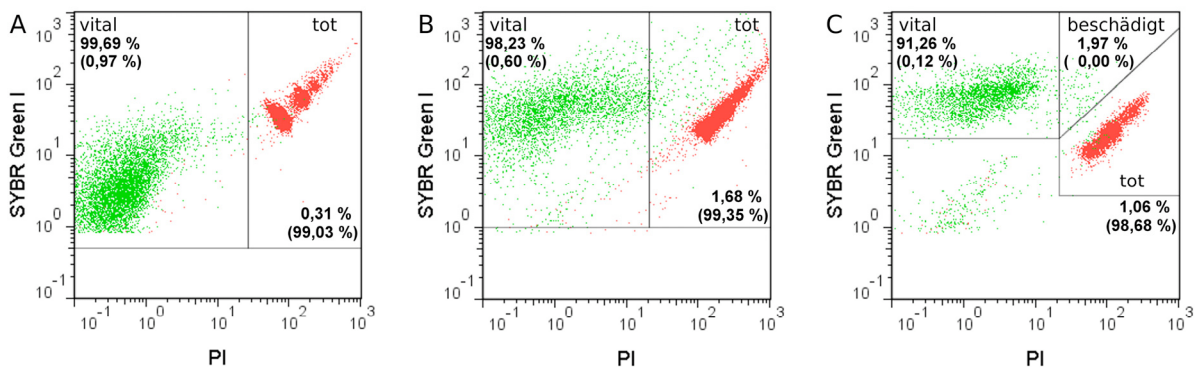


Abb. 28 Anwendung der einheitlichen Vitalitätsfärbemethode für die DZM.

Anwendung von SYBR Green I-Verdünnung von 5×10^3 , $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI sowie Verdünnung und Färbung in Ringerlösung B_opt. Überlagerte Darstellung von 2D-Punktdiagrammen einer unbehandelten (grün) und mit Isopropanol behandelten Probe (rot, Positivkontrolle) aus einer Reinkultur, jeweils aus der stationären Wachstumsphase: (A) *P. aeruginosa*, (B) *B. cepacia* und (C) *S. aureus*. Abgrenzung der Vitalitätspopulationen durch Regionen, die in Anlehnung an das Fluoreszenzsignal der Positivkontrolle manuell gesetzt wurden (vital, tot bzw. vital, beschädigt, tot). Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen auf die Gesamtanzahl an Zellen in unbehandelter und in mit Isopropanol behandelter Probe (in Klammern) angegeben.

Das einheitliche Färbeprotokoll wurde zudem für jede Spezies auf Richtigkeit in der Bestimmung der relativen Häufigkeit vitaler Zellen überprüft. Dazu wurde eine Validierung der Methode durchgeführt. Es wurden Proben vitaler Bakterien mit Proben toter Bakterien (mit Isopropanol behandelte Bakterien) aus Reinkulturen aus der stationären Wachstumsphase in definierten Anteilen miteinander vermischt und anschließend vermessen. Zur Minimierung des Einflusses des Pipettierfehlers wurde jedes Mischverhältnis unabhängig voneinander achtfach hergestellt. Anschließend wurden die einzelnen Proben eines Mischverhältnisses zu einer Probe vereint und mit SYBR Green I und PI gefärbt. Die Proben des oberen und unteren Grenzwerts wurden jeweils achtfach analysiert. Wohingegen die restlichen Proben jeweils nur einmal analysiert wurden. In Abb. 29 sind für jede Spezies die ermittelten relativen Häufigkeiten vitaler Zellen ($X_{\text{vital}, i}$) über den eingestellten theoretischen Häufigkeiten ($X_{\text{vital, theoretisch}, i}$) dargestellt. Die theoretische Häufigkeit entspricht der definierten relativen Häufigkeit vitaler Zellen im Probengemisch. Im Falle von *S. aureus* war die gemessene relative Häufigkeit vitaler Zellen ($X_{\text{vital, Sa}}$) in der unbehandelten Probe kleiner als 95 %. In der Annahme, dass die tatsächliche relative Häufigkeit vitaler Zellen bei Einstellung einer definierten relativen Häufigkeit vitaler Zellen von 100 % auch kleiner 95 % war, wurde die theoretische relative Häufigkeit von *S. aureus* ($X_{\text{vital, theoretisch, Sa}}$) auf die gemessene Häufigkeit vitaler Zellen in der unbehandelten Probe normiert und wie folgt mit Gl. 16 berechnet:

$$X_{\text{vital, theoretisch, Sa}} = \frac{X_{\text{vital, definiert, Sa}}}{X_{\text{vital, definiert, Sa}} + X_{\text{tot, definiert, Sa}}} \cdot X_{\text{vital, Sa}} \quad \text{Gl. 16}$$

Hier entspricht $X_{\text{vital, definiert, Sa}}$ sowie $X_{\text{tot, definiert, Sa}}$ der definierten relativen Häufigkeit vitaler bzw. toter *S. aureus* im Probengemisch.

Die Varianzen der 8 Replikate des unteren und oberen Validierungsbereiches waren für *P. aeruginosa* und *B. cepacia* gering und homogen verteilt (F-test; $f_1, f_2=7$; 95%). Für beide Spezies stimmte die relative Häufigkeit vitaler Zellen ($X_{\text{vital}, i}$) mit der eingestellten theoretischen Häufigkeit vitaler Zellen ($X_{\text{vital, theoretisch}, i}$) (lineare Regression, Abb. 29 (A), Abb. 29 (B)) sehr gut überein. Im Falle von *S. aureus* waren die Varianzen der 8 Replikate des unteren und oberen Validierungsbereiches trotz geringer Werte inhomogen verteilt (F-test; $f_1, f_2=7$; 95%). Demzufolge wurde für *S. aureus* eine gewichtete lineare Regression nach der Methode der gewichteten kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Dazu wurde die

Standardvalidierungsberechnung für lineare gewichtete Regression der Gruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut Magdeburg (Version 1.7) verwendet. Die Regressionsgerade für *S. aureus* in Abb. 29 (C) zeigt deutlich die Übereinstimmung der theoretischen mit den gemessenen Werten. In Tab. 42 sind für jede Spezies das untere Nachweis- und Quantifizierungslimit und die Verfahrensstandardabweichung der Methode angegeben.

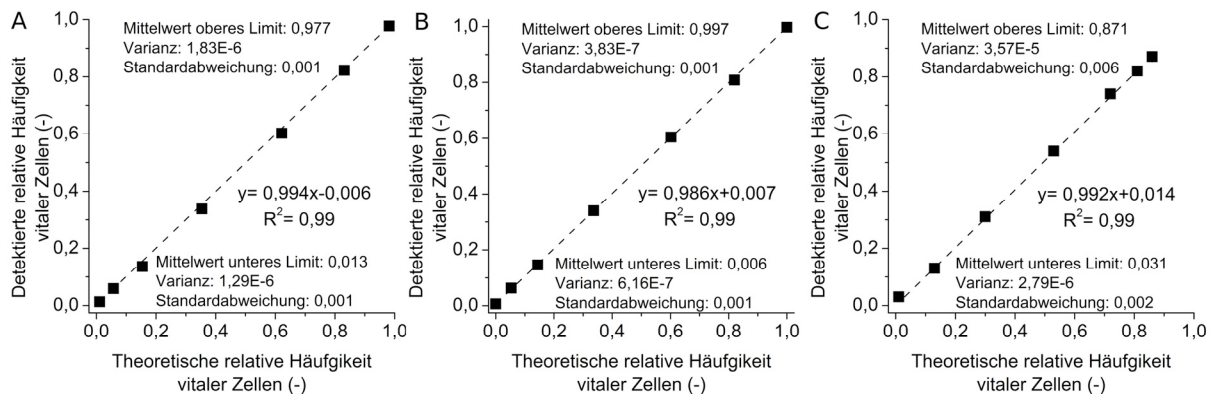


Abb. 29 Validierung des einheitlichen SYBR Green I- / PI- Färbeprotokolls für die DZM zur Bestimmung der relativen Häufigkeit vitaler Bakterien.

(A) *P. aeruginosa*, (B) *B. cepacia* und (C) *S. aureus*. Proben vitaler Bakterien sind mit Proben toter Bakterien (mit Isopropanol behandelt) aus Reinkulturen aus stationärer Wachstumsphase in definierten Anteilen miteinander vermischt und wurden anschließend vermessen. Darstellung der detektierten relativen Häufigkeit vitaler Zellen über der theoretischen (eingestellten) relativen Häufigkeit vitaler Zellen (geteilt durch 100 %). Jedes Verhältnis einfach bzw. obere und untere Werte achtfach bestimmt (Varianz und Standardabweichung angegeben). Geradengleichung der linearen Regression bzw. für *S. aureus* der gewichteten linearen Regression dargestellt. Lineare gewichtete Regression wurde nach der Methode der gewichteten kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt.

Tab. 42 Kenngrößen aus der Validierung des einheitlichen SYBR Green I- / PI- Färbeprotokolls für die DZM.

Angabe der ermittelten Nachweis- und Quantifizierungslimits und der Verfahrensstandardabweichung bei der Bestimmung der relativen Häufigkeit vitaler Bakterien in Reinkulturproben für *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus*.

Spezies	Nachweislimit (%)	Quantifizierungslimit (%)	Verfahrensstandardabweichung (%)
<i>P. aeruginosa</i> ¹	3,2	9,7	1,0
<i>B. cepacia</i> ¹	1,6	4,9	0,5
<i>S. aureus</i> ²	3,4	10,4	1,0

¹ Kenngrößen ermittelt gemäß Standardvalidierungsberechnung für lineare Regression bzw.

² gemäß Standardvalidierungsberechnung für lineare gewichtete Regression (Methode der gewichteten kleinsten Fehlerquadrate) der Gruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut Magdeburg (beide Version 1.7)

4.1.4. Sind Bakterien mit intakter Membran vermehrungsfähig?

Die Membranintegrität einer Bakterienzelle ist Voraussetzung für die Vermehrungsfähigkeit, jedoch muss nicht jede Zelle mit intakter Membran vermehrungsfähig sein. So müssen weitere Voraussetzungen für ein Bakterium zum Vermehren, wie das Vorkommen funktionsfähiger Nukleinsäuren in der Zelle und ein aktiver Metabolismus, erfüllt sein (siehe 2.2.4.2). Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Membranintegrität und Vermehrungsfähigkeit der relevanten Bakterienspezies wurde die etablierte durchflusszytometrische Methode zur Bestimmung der Vitalität unter Einsatz des einheitlichen SYBR Green I- / PI-Färbeprotokolls mit der Plattenausstrichmethode verglichen. Dazu wurden Reinkulturen untersucht. Aufgrund der für *B. cepacia* und *P. aeruginosa* nicht durchführbaren Bestimmung der LZK mittels Plattenausstrich (siehe 3.5.3), erfolgten die Versuche ausschließlich mit *S. aureus*. Mit der durchflusszytometrischen Methode wurden die vitale Zellkonzentration (VZK) sowie die GZK unter Anwendung des Zählmodus (siehe 3.4.2) ermittelt. Die GZK (C_{Sa}) wurde aus der Gesamtzellanzahl an *S. aureus*, d.h. der Anzahl der SYBR Green I-fluoreszierenden Ereignisse (N_{SYBR}), mittels Gl. 17 berechnet. In der Berechnung wurden die Verdünnung der Probe während der Behandlung / Färbung (Verdünnungsfaktor $VF_{Färbung}$) und die Verdünnung für die Analyse (Verdünnungsfaktor $VF_{Analyse}$) berücksichtigt.

$$C_{Sa} = \frac{N_{SYBR}}{0,200 \text{ mL}} \cdot VF_{Färbung} \cdot VF_{Analyse} \quad \text{Gl. 17}$$

Durch Verwendung der in der Analyse jeweils gemessenen relativen Häufigkeit vitaler *S. aureus*-Zellen ($X_{vital, Sa}$) und der GZK wurde die VZK ($C_{vital, Sa}$) mittels Gl. 18 berechnet.

$$C_{vital, Sa} = X_{vital, Sa} \cdot C_{Sa} \quad \text{Gl. 18}$$

Das Vorgehen bei der Plattenausstrichmethode sowie die Bestimmung der LZK ($C_{lebend, Sa}$) aus der KBE-Anzahl wurden im Kapitel 3 unter 3.5.3 beschrieben. In Abb. 30 (A) sind die zeitlichen Verläufe der VZK, GZK und LZK während der Kultivierung von *S. aureus* in Reinkultur dargestellt. Darüber hinaus sind in Abb. 30 (B) die mittels DZM ermittelten zeitlichen Verläufe der relativen Häufigkeiten vitaler, beschädigter und toter *S. aureus* aufgetragen. Die VZK (DZM) und LZK (Plattenausstrichmethode) korrelierten über die gesamte Kultivierungsdauer miteinander. Auffällig war, dass die

ermittelten Werte der LZK von 8 h bis 32 h stets geringer als die der VZK waren, jedoch nicht signifikant verschieden voneinander waren ($p < 0,05$, ungepaarter Student t -test). Des Weiteren korrelierten die VZK und LZK mit der GZK über die ersten 12 h der Kultivierung. Von 12 h bis 32 h nahm die GZK weiter zu, wohingegen die VZK und LZK abnahmen und dabei über 50 % der Zellen verloren gingen (Abb. 30 (A)). Interessanterweise ging diese zeitliche Zunahme der GZK mit der Zunahme der relativen Häufigkeit beschädigter und toter Zellen von 12 h bis 24 h bzw. von 12 h bis 32 h einher (Abb. 30 (B)).

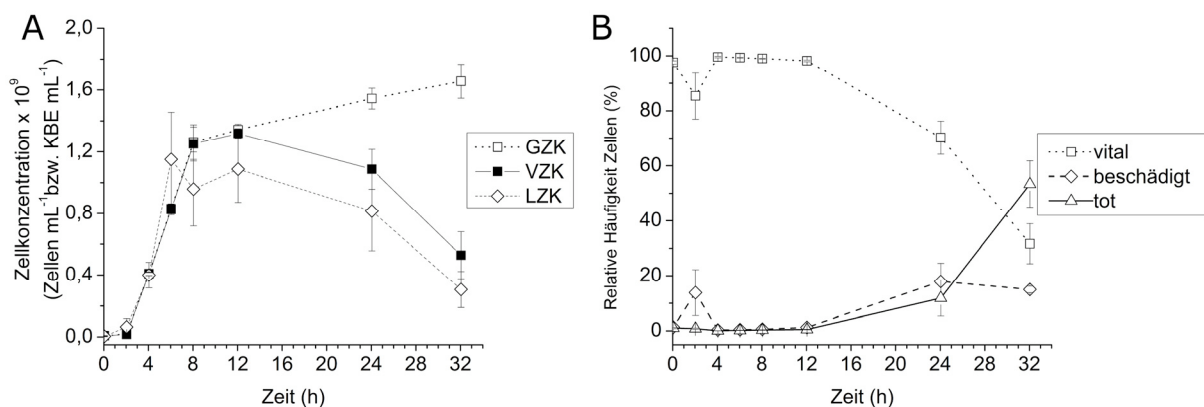


Abb. 30 Vergleich DZM mit Plattenausstrichmethode für Reinkultur mit *S. aureus*.

(A) Zeitverläufe der mittels DZM ermittelten VZK ($C_{\text{vital, Sa}}$) sowie der GZK (C_{Sa}) und der mittels Plattenausstrichmethode ermittelten LZK ($C_{\text{lebend, Sa}}$ in KBE mL^{-1}) während der Kultivierung. **(B)** Zeitverläufe der mittels DZM ermittelten relativen Häufigkeit vitaler, beschädigter und toter *S. aureus* während der Kultivierung. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus drei biologischen Replikaten.

4.1.5. Spezies-spezifische Vitalitätsbestimmung in Mischkulturen

Zur Spezies-spezifischen Bestimmung der Vitalität in den betrachteten Mischkulturen wurde das einheitliche Vitalitätsfärbeprotokoll mit den (Spezies-) spezifischen Fluoreszenzmarkern gegen *B. cepacia* und *S. aureus* kombiniert. Aufgrund der Bindung des PAKs und SAKs mit *S. aureus* (siehe 4.1.1) erfolgte die Erhöhung der eingesetzten AK-Konzentrationen in der Färbung der Drei-Spezies-Mischkulturproben hinsichtlich ausreichend zur Immunfluoreszenz-markierung von *B. cepacia* verfügbarer Mengen. Das etablierte Vierfarbenprotokoll für die DZM zur Analyse von Drei-Spezies-Mischkulturen umfasste die Immunfluoreszenzmarkierung von *B. cepacia* mit $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D und $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-konjugierter SAK, die Gram-spezifische Markierung von *S. aureus* mittels $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-CF405S sowie die intrazelluläre Färbung der Bakterien jeder Spezies mit SYBR Green I

(Verdünnung von 5×10^3) und PI ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Bei der Analyse der Daten wurden nur Ereignisse mit SYBR Green I-positiver Fluoreszenz mit erhöhtem SSC-Signal (Region Zellen), wie beispielhaft in Abb. 31 (A) dargestellt ist, betrachtet. Trotz der Erfassung von überlagerten R-PE Fluoreszenzsignalen immunmarkierter *B. cepacia* und *S. aureus* (wie zu erwarten, siehe 4.1.1, Abb. 14) war in der Analyse von Mischkulturproben eine eindeutige Diskriminierung der drei Spezies voneinander möglich. Abb. 31 (C) veranschaulicht diese Diskriminierung zwischen den Spezies am Beispiel einer Mischkulturprobe in der Auftragung der detektierten blauen (CF405S) über der orangenen Fluoreszenz (R-PE). Zu diesem Resultat trug insbesondere die effiziente Gram-spezifische Markierung von *S. aureus* mit WGA-CF405S bei. Mit diesem Fluoreszenzmarker wurden bei Einsatz des Vierfarbenprotokolls für Proben aus Reinkulturen ausschließlich Bakterien der Spezies *S. aureus*, wie in Abb. 31 (B) beispielhaft dargestellt ist, angefärbt. Zur reproduzierbaren Datenanalyse wurde für die Detektion der Spezies in Mischkulturproben ein einheitliches Gate mit drei Regionen (für jede Spezies eine) definiert und für alle Proben angewandt. Mithilfe der Abb. 31 (B) kann die Definition des einheitlichen Gates anhand der blauen und orangenen Fluoreszenzsignale, die bei Reinkulturuntersuchungen bei Anwendung des Vierfarbenprotokolls aufgenommen wurden, nachvollzogen werden. Unter Anwendung des definierten Gates wurde auch die Wiederfindung für jede Spezies durch durchflusszytometrische Detektion durch Einsatz des Vierfarbenprotokolls in der Analyse von Reinkulturproben ermittelt. Für jede Spezies wurden hohe Wiederfindungsraten für Proben aus unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten von 0 h bis 32 h erzielt. Im Falle von *P. aeruginosa* wurden mehr als 98 %, für *S. aureus* mehr als 94 % und für *B. cepacia* mehr als 93 % der untersuchten Bakterien wiedergefunden (Mittelwert aus Mittelwerten unterschiedlicher Probenahmezeitpunkte, die jeweils aus drei biologischen Replikaten gebildet worden). Davon ausgenommen waren Proben mit *B. cepacia* nach 4 h Kultivierung aus der exponentiellen Wachstumsphase. Für diese Proben lag die Wiederfindung nur bei etwa 78 % (Mittelwert aus drei biologischen Replikaten). Die verbleibenden Bakterien in den Proben fanden sich in der Analyse in den Regionen der jeweils anderen beiden Spezies wieder. Dabei war der größte Fremdanteil in der Region von *P. aeruginosa* zu verzeichnen. In Abb. 31 (B) kann die Wiederfindung für jede Spezies am Beispiel von Reinkulturproben aus der exponentiellen Wachstumsphase nachvollzogen werden.

Über alles betrachtet erlaubte der Einsatz des Vierfarbenprotokolls in der durchflusszytometrischen Analyse von Drei-Spezies-Mischkulturproben die zuverlässige Bestimmung der Vitalität von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Anwendung des definierten einheitlichen Gates (CF405S- über R-PE-Fluoreszenz). Bei der Bestimmung der Vitalität in Mischkulturproben wurden für jede Spezies ausschließlich die Bakterien betrachtet, die in der jeweils für die Spezies zugeteilten Region (einheitliches Gate) detektiert wurden. Anhand der hier detektierten SYBR Green I- und PI-Fluoreszenzsignale wurde die Vitalität der Spezies bestimmt. In Anwendung der zuvor in Reinkultur definierten Spezies-spezifischen Regionen (Abb. 28) wurde die relative Häufigkeit vitaler und toter bzw. vitaler, beschädigter und toter Bakterien ermittelt.

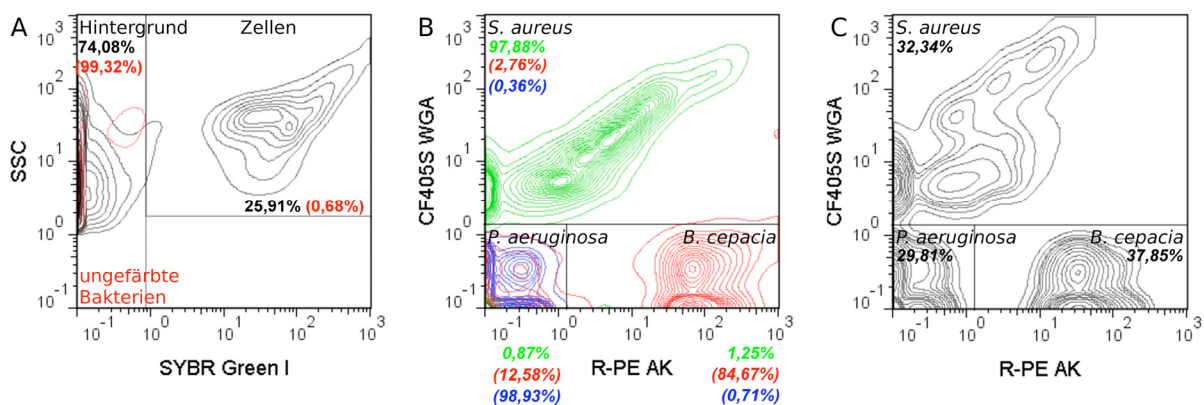


Abb. 31 Speziesdiskriminierung in der durchflusszytometrischen Analyse von Drei-Spezies-Mischkulturproben bei Anwendung des Vierfarbenprotokolls.

Proben wurden mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-CF405S, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D und $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-SAK, sowie mit SYBR Green I (Verdünnung von 5×10^3) und $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI inkubiert. **(A)** Detektion von Bakterien in einer Mischkulturprobe, unmittelbar nach der Inokulation, Abgrenzung der Ereignisse mit SYBR Green I-positiver Fluoreszenz und erhöhtem SSC-Signal (Region Zellen) vom Hintergrundsignal. Überlagerte Darstellung von 2D-Konturdiagrammen SSC über SYBR Green I von ungefärbter (rot) und gefärbter Probe (schwarz). Regionen wurden manuell gesetzt. **(B)** Definition eines einheitlichen Gates zur Speziesdiskriminierung für Datenanalyse von Mischkulturproben durch Analyse von Reinkulturproben. Regionen wurden anhand der WGA-CF405S- und R-PE-Fluoreszenzsignale einer jeden Spezies bei Einsatz des Vierfarbenprotokolls definiert. Hierbei wurden ausschließlich Ereignisse aus der Zellen-Region berücksichtigt. Überlagerte Darstellung von 2D-Konturdiagrammen von *P. aeruginosa* (blau), *B. cepacia* (rot) und *S. aureus* (grün) aus der exponentiellen Wachstumsphase. **(C)** Anwendung des definierten Gates in der Mischkulturanalyse zur Speziesdiskriminierung, ausschließlich für Ereignisse der Zellen-Region. Darstellung 2D-Konturdiagramm CF405S- über R-PE-Fluoreszenz einer Mischkulturprobe, unmittelbar nach der Inokulation. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen in **(A)** auf Gesamtanzahl an Ereignissen und in **(B-C)** auf Gesamtanzahl an Zellen (kursiv) angegeben.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse von Zwei-Spezies-Mischkulturen kamen Dreifarbenprotokolle zum Einsatz. Mit diesem Vorgehen konnte der Verbrauch der

teuren Fluoreszenzmarker, insbesondere der AK reduziert werden. Für die Zwei-Spezies-Mischkulturen mit *P. aeruginosa* und *B. cepacia* wurden die Proben mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D und $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-konjugierter SAK sowie mit SYBR Green I (Verdünnung von 5×10^3) und PI ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) inkubiert. Für die Zwei-Spezies-Mischkulturen mit *S. aureus* wurden die Proben mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-CF405S, mit SYBR Green I (Verdünnung von 5×10^3) und PI ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) inkubiert.

4.2. Vitalität und Wachstum in Rein- und Mischkulturen

Zur Untersuchung des Effekts der Mischkultivierung auf die Vitalität und das Wachstum von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* wurden Reinkultur- und Mischkultur-Kultivierungen, bestehend aus zwei bzw. drei Spezies, durchgeführt, analysiert und miteinander verglichen. Dabei wurde die Vitalität Spezies-spezifisch durch Einsatz der in der Arbeit etablierten durchflusszytometrischen Methode (siehe 4.1.5) bestimmt. Parallel dazu wurde das Wachstum der einzelnen Spezies durch Quantifizierung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration durch Anwendung der qT-RFLP-Methode ermittelt (siehe 3.5.2). Darüber hinaus wurden in Reinkulturen und in der Drei-Spezies-Mischkultur die extrazellulären Konzentrationen wichtiger Substrate und Metabolite im Medium mittels HPLC bzw. einer enzymatischen Methode bestimmt (siehe 3.5.4). Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus der Analyse von Reinkulturen und von der Drei-Spezies-Mischkultur sowie deren Vergleich für jede Spezies dargestellt. Danach werden die Ergebnisse der Zwei-Spezies-Mischkultur mit denen der Drei-Spezies-Mischkultur verglichen.

4.2.1. Drei-Spezies-Mischkultur

Durch Vergleich der ermittelten zeitlichen Verläufe der Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen zwischen Rein- und Mischkultur wurden deutliche Unterschiede im Wachstum festgestellt (Abb. 32 (A, C, E)). Im Falle von *P. aeruginosa* war das Wachstum in der Mischkultur gegenüber der Reinkultur erhöht. Bakterien wuchsen schneller mit einer signifikant höheren Rate μ_{max} von $1,22 \text{ h}^{-1}$ ($p < 0,05$, ungepaarter Student *t*-test; Tab. 43). Des Weiteren wurde eine längere exponentielle Wachstumsphase in der Mischkultur mit über 6 h im Vergleich zu 4 h in der Reinkultur beobachtet. Demzufolge wurde in der Mischkultur eine höhere maximale Zellkonzentration ($\log_{10} 8,47 \pm 0,23 \text{ ge mL}^{-1}$) erreicht (Abb. 32 (A)). Im Falle von

B. cepacia waren die Wachstumsverläufe der ersten 6 h in der Misch- und Reinkultur miteinander vergleichbar (Abb. 32 (C)). Zudem wurden in beiden Kulturen nahezu der gleiche Wert für μ_{\max} mit etwa $0,8 \text{ h}^{-1}$ ermittelt (Tab. 43). Nach 6 h Kultivierung unterschieden sich jedoch die Wachstumsverläufe in Misch- und Reinkultur deutlich voneinander. Das Wachstum von *B. cepacia* blieb in der Mischkultur unmittelbar nach der exponentiellen Wachstumsphase nach 6 h aus. Die Zellkonzentration blieb bis 12 h konstant. Danach nahm die Konzentration in der Mischkultur bis zum Kultivierungsende nach 32 h leicht ab. Im Gegensatz dazu wuchs *B. cepacia* in der Reinkultur bis 8 h und nach kurzer Stagnation mit einer niedrigen Wachstumsrate von 10 h bis 32 h. Somit wurde in der Reinkultur nahezu eine um zwei Log-Stufen höhere maximale Zellkonzentration ($\log_{10} 8,20 \pm 0,20 \text{ ge mL}^{-1}$) als in der Mischkultur erreicht (Abb. 32 (C)).

Im Falle von *S. aureus* waren die Wachstumsverläufe der ersten 12 h in der Misch- und Reinkultur miteinander vergleichbar (Abb. 32 (E)). In beiden Kulturen waren die Werte von μ_{\max} mit $1,08 \pm 0,37 \text{ h}^{-1}$ in der Reinkultur und mit $1,29 \pm 0,31 \text{ h}^{-1}$ in der Mischkultur (Tab. 43) miteinander vergleichbar. Zudem wurden in etwa gleiche Werte für die maximale Zellkonzentration von in etwa $\log_{10} 8,2 \text{ ge mL}^{-1}$ erreicht (Abb. 32 (E)). Von 12 h bis 32 h hingegen wurden unterschiedliche Konzentrationen zwischen der Misch- und Reinkultur festgestellt. Während die Zellkonzentration in der Mischkultur mit der Zeit leicht abnahm, blieb die Konzentration in der Reinkultur konstant (Abb. 32 (E)).

Tab. 43 Werte für μ_{\max} in Reinkulturen und in der Drei-Spezies-Mischkultur.

Raten ermittelt aus qT-RFLP-Konzentrationswerte für *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus*. Bestimmung während exponentieller Phase (Δt) durch lineare Regression der Auftragung der \ln transformierten Zellkonzentration über die Zeit. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

Spezies	Reinkultur		Mischkultur	
	$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	$\Delta t (\text{h})$	$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	$\Delta t (\text{h})$
<i>P. aeruginosa</i>	$0,88 \pm 0,11$	0 - 4	$1,22 \pm 0,05^{\text{P}}$	0 - 6
<i>B. cepacia</i>	$0,77 \pm 0,02$	0 - 6	$0,86 \pm 0,09$	0 - 6
<i>S. aureus</i>	$1,08 \pm 0,37$	0 - 4	$1,29 \pm 0,31$	0 - 4

^P Rate in Mischkultur signifikant verschieden von Rate in Reinkultur ($p < 0,05$, ungepaarter Student t -test)

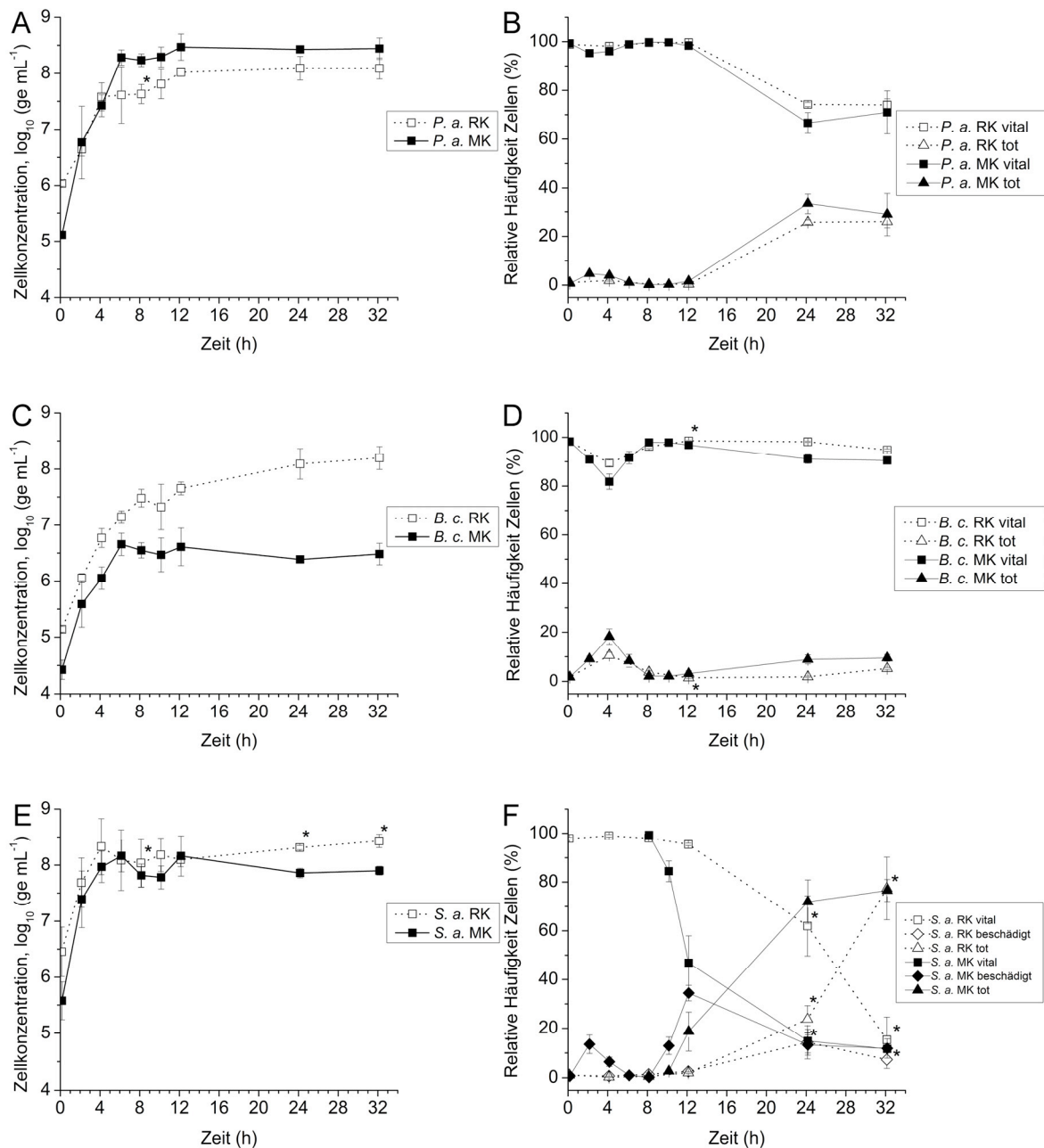


Abb. 32 Wachstum und Vitalität in Reinkulturen und in der Drei-Spezies-Mischkultur.

Gegenüberstellung der Ergebnisse der Reinkultur (RK, leere Symbole) mit denen der Mischkultur (MK, ausgefüllte Symbole). **Links:** Zeitverläufe der mittels qT-RFLP ermittelten Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen von (A) *P. aeruginosa*, (C) *B. cepacia* und (E) *S. aureus*, logarithmisch transformiert (log₁₀) dargestellt. **Rechts:** Zeitverläufe der relativen Häufigkeit (B) vitaler und toter *P. aeruginosa*, (D) vitaler und toter *B. cepacia* und (F) vitaler, beschädigter und toter *S. aureus* Zellen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei (*) oder drei biologischen Replikaten.

Bei der Bestimmung der Vitalität der einzelnen Spezies in den Kulturen wurden Änderungen über die Kultivierungszeit in Abhängigkeit der Wachstumsphase sowie Variationen zwischen Reinkultur und Mischkultur festgestellt. Zur Beschreibung der

Zeitverläufe werden im Folgenden Werte für die Vitalität angegeben, die mit den ermittelten relativen Häufigkeiten vitaler Bakterien gleichzusetzen sind.

Für *P. aeruginosa* war der zeitliche Verlauf der Vitalität in Rein- und Mischkultur über die gesamte Kultivierungsdauer miteinander vergleichbar. Zum Startzeitpunkt wurde eine hohe Vitalität von ca. 99 % (Abb. 32 (B)) ermittelt. Dieser Wert blieb in etwa bis 12 h konstant. Danach wurde die Vitalität deutlich bis zum Ende der Kultivierung bis auf ca. 73 % reduziert (Abb. 32 (B)).

Im Falle von *B. cepacia*, lag die anfängliche Vitalität in Rein- und Mischkultur auch bei ca. 99 %. Die Vitalität wurde jedoch in der exponentiellen Phase nach 4 h Kultivierung reduziert, bis zu einem Wert von 80 % in der Mischkultur bzw. 89 % in der Reinkultur. Im Anschluss daran nahm die Vitalität in beiden Kulturen wieder mit der Zeit zu, erreichte nach 8 h Kultivierung einen Wert von ca. 98 % und blieb bis 12 h konstant (Abb. 32 (D)). Im weiteren Kultivierungsverlauf wurden für *B. cepacia* geringe Unterschiede zwischen der Vitalität in Misch- und Reinkultur verzeichnet. Von 12 h bis 32 h wurde die Vitalität in der Mischkultur bis zu einem Wert von 91 % reduziert. In der Reinkultur hingegen blieb die hohe Vitalität von ca. 98 % bis 24 h konstant. Von 24 h bis 32 h wurde eine geringe Abnahme der Vitalität um 5 % ermittelt (Abb. 32 (D)).

Für *S. aureus* lag die anfängliche Vitalität in Misch- und Reinkultur bei einem vergleichbaren Wert wie bei den Gram-negativen Bakterien (Abb. 32 (F)). Während der exponentiellen Phase (0 - 4 h) variierten die Vitalitätswerte zwischen Misch- und Reinkultur. Zum Zeitpunkt 8 h wurde wiederum für *S. aureus* in beiden Kulturen eine hohe Vitalität von ca. 98 % ermittelt (Abb. 32 (F)). Von 8 h bis 32 h waren für *S. aureus* deutliche Unterschiede in den zeitlichen Verläufen der Vitalität in Rein- und Mischkultur zu erkennen. Obwohl die Vitalität in beiden Kulturen bis zum Ende der Kultivierung reduziert wurde, nahm die relative Häufigkeit vitaler *S. aureus* in der Mischkultur deutlich eher und mit einer höheren Rate als in der Reinkultur ab (Abb. 32 (F)). Die Vitalität wurde in der Mischkultur von 8 h bis 12 h um mehr als 50 % reduziert, wohingegen die Vitalität in der Reinkultur in etwa bei dem Ausgangswert von ca. 98 % blieb. Nach 12 h der Kultivierung wurde die Vitalität in beiden Kulturen bis zum Ende stark reduziert, bis zu einer relativen Häufigkeit vitaler Bakterien von ca. 11 % in der Mischkultur bzw. 15 % in der Reinkultur. Bei der Betrachtung des Zeitverlaufs der relativen Häufigkeit beschädigter *S. aureus* wurde eine Korrelation mit dem Verlauf der Häufigkeit vitaler Bakterien, über eine Kultivierungsdauer von

12 h in der Mischkultur bzw. 24 h in der Reinkultur, festgestellt (Abb. 32 (F)). Über einen Kultivierungszeitraum von 8 h bis 32 h variierte die Dynamik der beschädigten Bakterien zwischen Rein- und Mischkultur. In der Mischkultur wurde ein höherer maximaler Anteil an beschädigten Zellen festgestellt. Interessanterweise wurde in beiden Kulturen die Reduzierung der Vitalität zunächst ausschließlich in den Anteilen der beschädigten Zellen wiedergefunden. Die relative Häufigkeit toter *S. aureus* nahm erst ab 10 h in der Mischkultur bzw. ab 12 h in der Reinkultur zu (Abb. 32 (F)). In beiden Kulturen nahm die relative Häufigkeit toter Zellen im weiteren Kultivierungsverlauf zu, während die der beschädigten Zellen abnahm. Am Ende der Kultivierung war jeweils die relative Häufigkeit toter Bakterien höher als die der beschädigten Bakterien (Abb. 32 (F)).

Zur Untersuchung des Einflusses des Substratangebots auf das Wachstum und die Vitalität der Bakterienspezies, wurden die wichtigsten extrazellulären Substrat- und Metabolitkonzentrationen in Reinkulturen und in der Mischkultur über einen Kultivierungszeitraum von 12 h bestimmt. In allen Kulturen nahmen die Glukose-, Glutamin- und Glutamatkonzentrationen bis unterhalb der Nachweisgrenze nach 8 h bzw. nach 12 h ab (Abb. 33). Hierbei nahm die Glutamin- und Glutamatkonzentration in der Reinkultur mit *P. aeruginosa* schneller als in den Reinkulturen mit *B. cepacia* bzw. mit *S. aureus* ab. In der Mischkultur war die zeitliche Abnahme der Konzentration an Glutamin mit der in der Reinkultur mit *P. aeruginosa* vergleichbar (Abb. 33 (A)). Die Bildung von Gluconat und 2-KDG wurde sowohl in der Mischkultur als auch in den Reinkulturen mit *P. aeruginosa* bzw. *B. cepacia* nachgewiesen. Die Konzentration dieser Metabolite nahm während der Kultivierung von 0 h bis 8 h zu. Interessanterweise nahm die Konzentration von Gluconat und 2-KDG in den genannten Kulturen von 8 h bis 12 h bis unterhalb der Nachweisgrenze ab (Abb. 33 (B)).

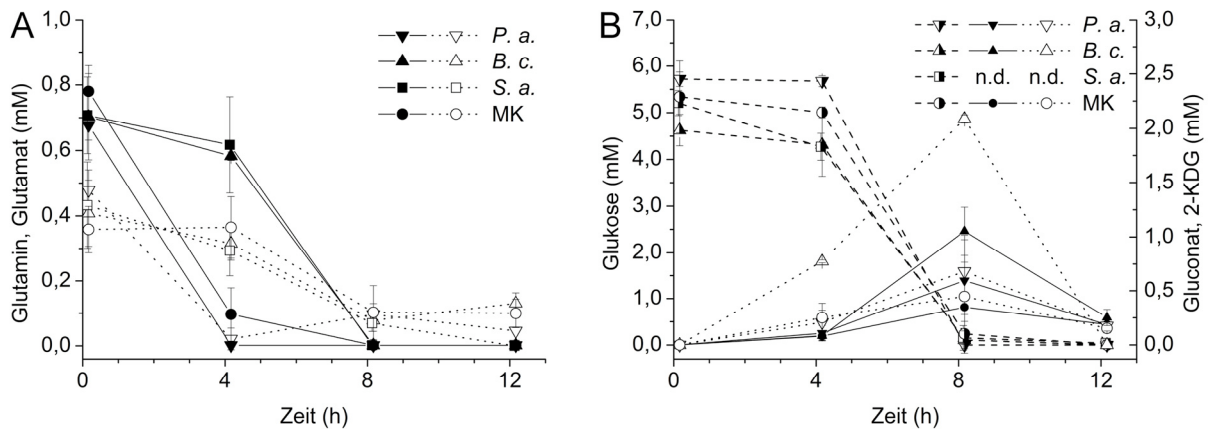


Abb. 33 Zeitverläufe der extrazellulären Substrat- und Metabolitkonzentrationen in Reinkulturen und in der Drei-Spezies-Mischkultur (MK).

Zeitverläufe (A) von Glutamin (ausgefüllte Symbole) und Glutamat (leere Symbole), und (B) von Glukose (halb-ausgefüllte Symbole), 2-KDG (ausgefüllte Symbole) und Gluconat (leere Symbole). In der Reinkultur mit *S. aureus* wurden weder Gluconat noch 2-KDG detektiert (n.d.). Die Quantifizierung von Glutamin, Glutamat sowie Glukose erfolgte mittels einer enzymatischen Methode mit einem Bioprofile 100 Plus-Messgerät. Die Quantifizierung von Gluconat und 2-KDG erfolgte mittels HPLC. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus drei biologischen Replikaten.

Bei der Ermittlung der Zellkonzentration von *B. cepacia* in Rein- und Mischkultur mittels der qT-RFLP-Methode ist es wahrscheinlich zu einer Unterbestimmung gekommen, insbesondere zum Zeitpunkt der Inokulation der Kulturen. Trotz der Einstellung der Bakterienkonzentrationen zum Startzeitpunkt (siehe 3.3.2) wurden für *B. cepacia* geringere Konzentrationen im Vergleich zu *P. aeruginosa* und *S. aureus* mit bis zu einer Log-Stufe Unterschied ermittelt. Im Gegensatz dazu spiegelten die Ergebnisse der DZM, bei der Ermittlung der relativen Häufigkeit der jeweiligen Spezies an der Gesamtbakterienanzahl in der Mischkultur, miteinander vergleichbare Startzellkonzentrationen zwischen den Spezies wider. Unmittelbar nach der Inokulation wurde in der Mischkultur das eingestellte Verhältnis zwischen den Spezies von 1:1:1 wiedergefunden (Abb. 31 (C)).

4.2.2. Zwei-Spezies-Mischkulturen

In diesem Abschnitt wird der Vergleich der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Zwei-Spezies-Mischkulturen mit den Ergebnissen der Drei-Spezies-Mischkultur dargestellt. Zu jedem Mischkulturversuch wurden parallel Reinkulturversuche durchgeführt. Soweit nicht anders aufgeführt, waren für jede Spezies die zeitlichen Verläufe der Zellkonzentrationen sowie der Vitalität in Reinkultur zwischen den

einzelnen Versuchstagen in etwa miteinander vergleichbar und folgten in etwa den oben beschriebenen Verläufen (siehe 4.2.1). Jedoch gab es einzelne Werte, die an unterschiedlichen Tagen eine hohe Varianz aufwiesen. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen Rein- und Mischkultur wurden daher die Ergebnisse der Wachstums- und Vitalitätsanalyse der Mischkultur jeweils mit den Ergebnissen der am selben Tag durchgeführten Reinkultur verglichen.

P. aeruginosa

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Drei-Spezies-Mischkultur war das Wachstum von *P. aeruginosa* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *B. cepacia* im Vergleich zur Reinkultur erhöht (Abb. 34 (A)). Die Bakterien wuchsen in der Mischkultur mit einer signifikant höheren Rate μ_{\max} von $1,27 \text{ h}^{-1}$ ($p < 0,05$, ungepaarter Student *t*-test; Tab. 44). In der Mischkultur wurde zudem auch eine höhere maximale Zellkonzentration ($\log_{10} 8,67 \pm 0,07 \text{ ge mL}^{-1}$) als in der Reinkultur erreicht (Abb. 34 (A)). Der Wachstumsverlauf von *P. aeruginosa* in der Zwei-Spezies-Mischkultur stimmte im Wesentlichen mit dem für die Drei-Spezies-Mischkultur beschriebenen Verlauf überein (Abb. 32 (A)). In beiden Kulturen wurden nahezu identische Werte sowohl für μ_{\max} (Tab. 43, Tab. 44) als auch für die maximale Zellkonzentration ermittelt (Abb. 34 (A), Abb. 32 (A)).

Im Unterschied zu den Ergebnissen der Drei-Spezies-Mischkultur war der zeitliche Verlauf der Zellkonzentration von *P. aeruginosa* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *S. aureus* mit dem Verlauf in der Reinkultur über die gesamte Kultivierungsdauer vergleichbar (Abb. 34 (C)). Für die Misch- und Reinkultur wurden nahezu gleiche Werte für μ_{\max} mit etwa $0,87 \text{ h}^{-1}$ (Tab. 44 (B)) und die maximale Zellkonzentration (ca. $\log_{10} 8,4 \text{ ge mL}^{-1}$) ermittelt. Das Wachstum von *P. aeruginosa* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *S. aureus* (Abb. 34 (C)) unterschied sich deutlich vom Wachstum in der Drei-Spezies-Mischkultur (Abb. 32 (A)) sowie in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *B. cepacia* (Abb. 34 (A)). So war μ_{\max} von *P. aeruginosa* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *S. aureus* Tab. 44 (B) sowie in der Mischkultur mit *B. cepacia* Tab. 44 (A) signifikant kleiner als in der Drei-Spezies-Mischkultur ($p < 0,05$, ungepaarter Student *t*-test, Tab. 44). Auffällig war, dass die ermittelten Konzentrationen für *P. aeruginosa* in der hier betrachteten Reinkultur während der stationären Phase (Abb. 34 (C)) im Vergleich zu den an den anderen Versuchstagen

durchgeführten Reinkulturen um etwa $\log_{10} 0,4 \text{ ge mL}^{-1}$ höher lagen (Abb. 32 (A),(Abb. 34 (A)).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Drei-Spezies-Mischkultur war der zeitliche Verlauf der Vitalität von *P. aeruginosa* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *B. cepacia* mit dem der Reinkultur über die ersten 12 h der Kultivierung vergleichbar (Abb. 34 (B)). Zum Zeitpunkt 24 h sowie 32 h war jedoch die relative Häufigkeit an vitalen *P. aeruginosa* in der Reinkultur geringer als in der Zwei-Spezies-Mischkultur (Abb. 34 (B)) aber auch geringer als in der Reinkultur der anderen Versuchstage (Abb. 32 (A), Abb. 34 (D)).

Der zeitliche Verlauf der Vitalität von *P. aeruginosa* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *S. aureus* (Abb. 34 (D)) stimmte mit dem Verlauf der Reinkultur von 6 h bis 32 h, wie bereits bei den Untersuchungen mit Drei-Spezies-Mischkulturen beobachtet (Abb. 32 (B)), überein. Im Unterschied zur Drei-Spezies-Mischkultur nahm die Vitalität von *P. aeruginosa* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *S. aureus* während der exponentiellen Wachstumsphase, trotz eines vergleichbar hohen Vitalitätswertes zum Startzeitpunkt von ca. 99 %, um mehr als 20 % ab (Abb. 34 (D)). Von 3 h bis 6 h nahm die Vitalität von *P. aeruginosa* in der Mischkultur wieder zu und erreichte in etwa einen Wert von 99 % (Abb. 34 (D)).

Über alle Kulturen mit *P. aeruginosa* betrachtet wurde für *P. aeruginosa* ein erhöhtes Wachstum in der Co-Kultur mit *B. cepacia*, sowohl in der Zwei- als auch Drei-Spezies-Mischkultur, festgestellt. Die Vitalitätszeitverläufe von *P. aeruginosa* waren in allen Kulturen im Wesentlichen miteinander vergleichbar.

Tab. 44 Werte für μ_{\max} von *P. aeruginosa* in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen.

Raten ermittelt aus qT-RFLP-Konzentrationswerte. (A) μ_{\max} in Mischkultur mit *B. cepacia* und (B) μ_{\max} in Mischkultur mit *S. aureus*, jeweils angegeben mit Wert aus Reinkultur des gleichen Versuchstages. Bestimmung während exponentieller Phase (Δt) durch lineare Regression der Auftragung der ln transformierten Zellkonzentration über die Zeit. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

<i>P. aeruginosa</i>	Reinkultur		Mischkultur	
	$\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$\Delta t \text{ (h)}$	$\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$\Delta t \text{ (h)}$
(A)	$0,88 \pm 0,07$	0 - 4	$1,27 \pm 0,11^P$	0 - 4 mit <i>B. c.</i>
(B)	$0,89 \pm 0,20$	0 - 4	$0,86 \pm 0,14^*$	0 - 4 mit <i>S. a.</i>

^P Rate in Mischkultur signifikant verschieden von Rate in Reinkultur ($p < 0,05$, ungepaarter Student *t*-test)

* Bestimmtheitsmaß R^2 bei mindestens einem Replikat $< 0,90$

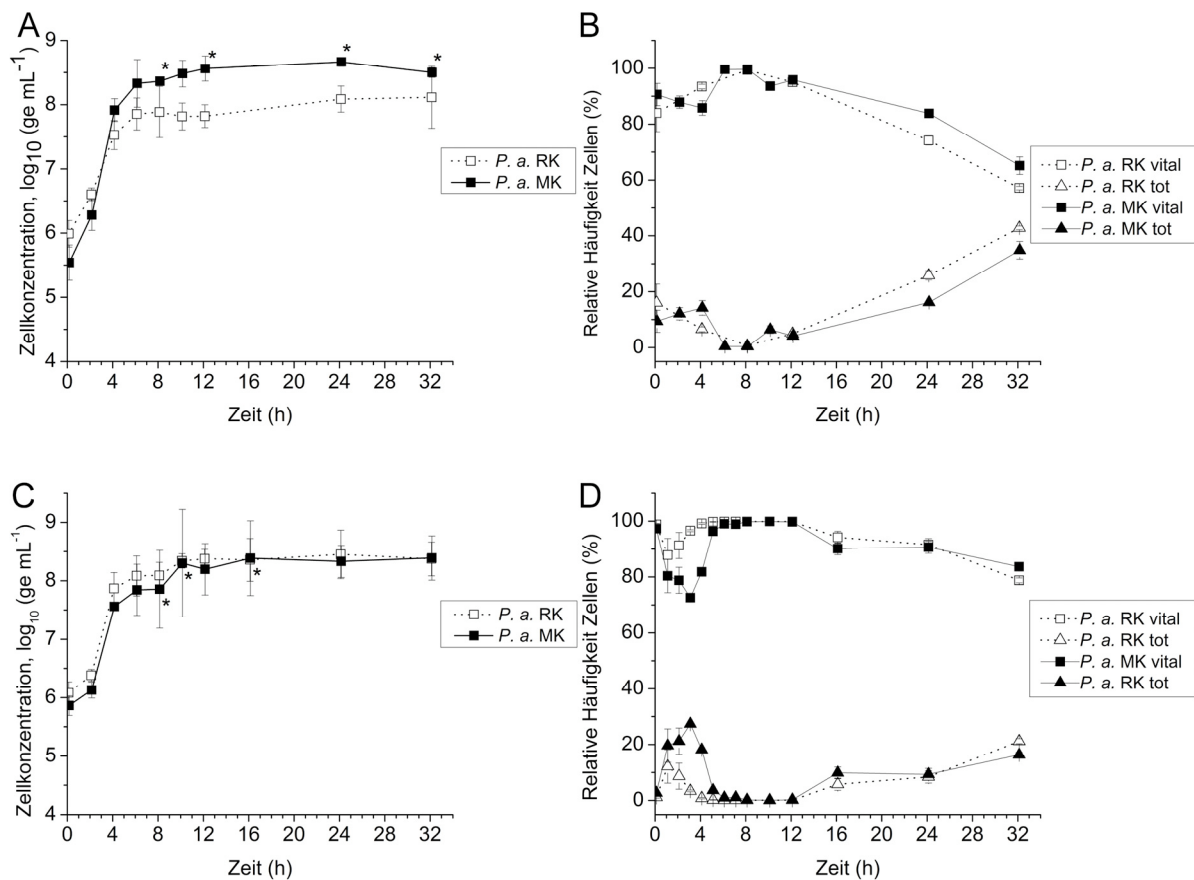


Abb. 34 Wachstum und Vitalität von *P. aeruginosa* in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen.

(A, B) *P. aeruginosa* mit *B. cepacia* bzw. mit (C, D) *S. aureus*. Vergleich von Misch- (ausgefüllte Symbole) und Reinkulturergebnisse (leere Symbole). (A, C) Zeitverläufe der mittels qT-RFLP ermittelten Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen von *P. aeruginosa*, logarithmisch transformiert (\log_{10}) dargestellt. (B, D) Zeitverläufe der relativen Häufigkeit vitaler und toter *P. aeruginosa*. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei (*) oder drei biologischen Replikaten.

B. cepacia

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Drei-Spezies-Mischkultur war das Wachstum von *B. cepacia* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *P. aeruginosa* mit dem der Reinkultur innerhalb der ersten 6 h der Kultivierung vergleichbar. Für die Misch- und Reinkultur wurde ein vergleichbarer Wert für μ_{\max} mit etwa $0,8 \text{ h}^{-1}$ (Tab. 45 (A)) ermittelt. Darüber hinaus stimmten der für *B. cepacia* in der Drei-Spezies-Mischkultur ermittelte Wert für μ_{\max} mit dem der Zwei-Spezies-Kultur nahezu überein (Tab. 45 (A), Tab. 43). Während *B. cepacia* in der Reinkultur von 6 h bis 32 h mit niedriger Rate weiter wuchs, wurde das Wachstum in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *P. aeruginosa*, wie in der Drei-Spezies-Mischkultur bereits festgestellt wurde

(Abb. 32 (C)), gestoppt. Im Unterschied zur Drei-Spezies-Mischkultur trat dieses Ereignis nicht in der Zwei-Spezies-Mischkultur nach 6 h, sondern nach 8 h ein (Abb. 35 (A)). Darüber hinaus wurde für *B. cepacia* in der Zwei-Spezies-Mischkultur ebenfalls ein abnehmender Trend der Konzentration zum Ende der Kultivierung hin verzeichnet.

Im Gegensatz zu Ergebnissen der Drei-Spezies-Mischkultur war die Wachstumsdynamik von *B. cepacia* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *S. aureus* mit der in der Reinkultur von 10 h bis 32 h vergleichbar (Abb. 35 (C)). In Rein- und Mischkultur wurde zum Ende der Kultivierung hin ein zunehmender Trend der Konzentration erkannt. Ein weiterer Unterschied zur Drei-Spezies-Mischkultur stellte die tendenziell höhere Wachstumsrate von *B. cepacia* in der Mischkultur im Vergleich zur Reinkultur dar (Tab. 45 (B)). Somit wurden höhere Konzentrationen in der Zwei-Spezies-Mischkultur im Vergleich zur Reinkultur ermittelt. Auffällig war, dass die Startzellkonzentrationen von *B. cepacia* in der betrachteten Reinkultur höher als an den anderen Versuchstagen lag.

Die zeitlichen Verläufe der Vitalität von *B. cepacia* in Zwei-Spezies-Mischkulturen, mit *P. aeruginosa* bzw. *S. aureus* (Abb. 35 (B), (D)), stimmten im Wesentlichen mit denen der jeweiligen Reinkultur am Versuchstag, wie auch bei der Drei-Spezies-Mischkultur festgestellt wurde (Abb. 32 (D)), überein. Einzelne Variationen traten in den relativen Häufigkeiten vitaler *B. cepacia* während der exponentiellen Wachstumsphase, insbesondere zwischen den Reinkulturen an unterschiedlichen Versuchstagen, auf.

Über alle Kulturen betrachtet, war deutlich zu erkennen, dass bei Co-Kultivierung mit *P. aeruginosa* das Wachstum von *B. cepacia* beeinträchtigt wurde sowie zum Ende der Kultivierung hin auch die Zellkonzentration von *B. cepacia* abnahm. Die Vitalitätszeitverläufe von *B. cepacia* waren dagegen in allen Kulturen im Wesentlichen miteinander vergleichbar.

Tab. 45 Werte für μ_{\max} von *B. cepacia* in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen.

Raten ermittelt aus qT-RFLP-Konzentrationswerte. **(A)** μ_{\max} in Mischkultur mit *P. aeruginosa* und **(B)** μ_{\max} in Mischkultur mit *S. aureus*, jeweils angegeben mit Wert aus Reinkultur des gleichen Versuchstages. Bestimmung während exponentieller Phase (Δt) durch lineare Regression der Auftragung der ln transformierten Zellkonzentration über die Zeit. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

<i>B. cepacia</i>	Reinkultur		Mischkultur	
	μ_{\max} (h^{-1})	Δt (h)	μ_{\max} (h^{-1})	Δt (h)
(A)	0,77 \pm 0,22	0 - 6	0,84 \pm 0,08	0 - 6 mit <i>P. a.</i>
(B)	0,58 \pm 0,10	0 - 7	0,79 \pm 0,19*	0 - 7 mit <i>S. a.</i>

* Bestimmtheitsmaß R^2 bei mindestens einem Replikat $< 0,90$

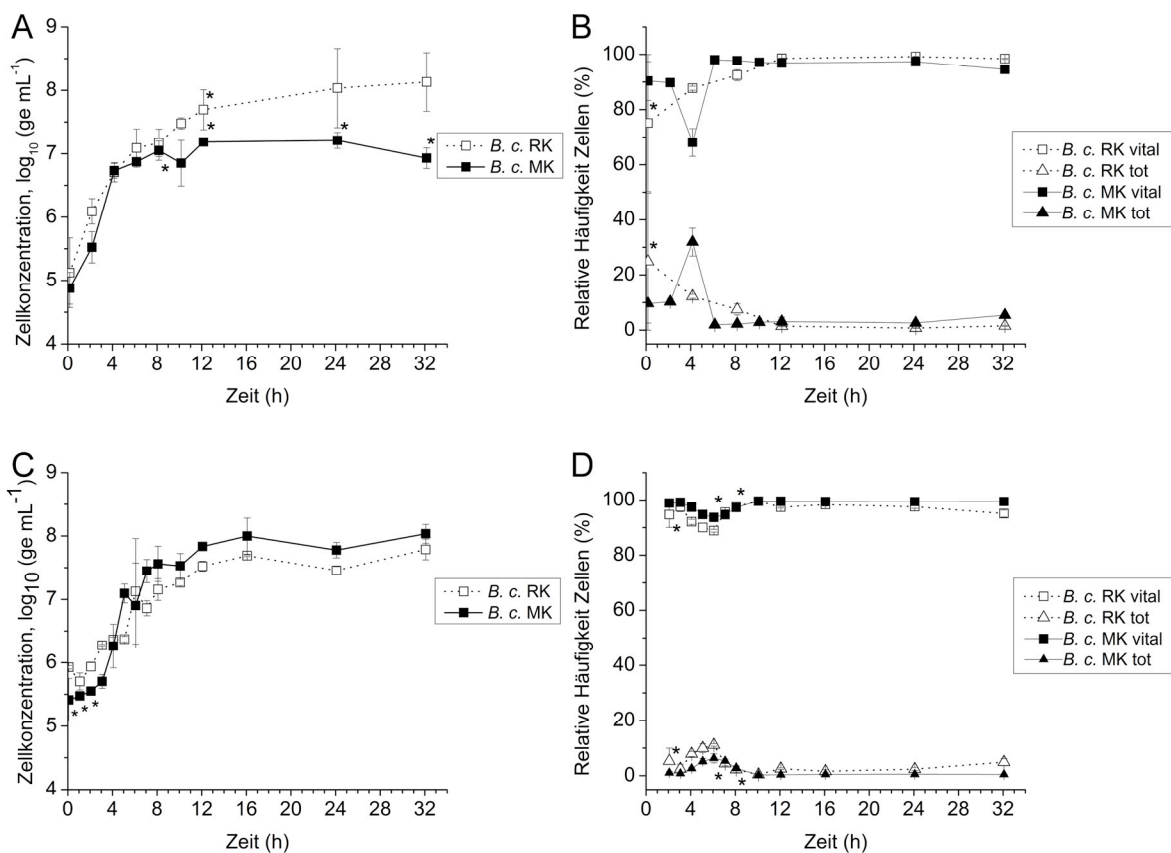


Abb. 35 Wachstum und Vitalität von *B. cepacia* in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen.

(A, B) *B. cepacia* mit *P. aeruginosa* bzw. mit **(C, D)** *S. aureus*. Vergleich von Misch- (ausgefüllte Symbole) und Reinkulturergebnisse (leere Symbole). **(A, C)** Zeitverläufe der mittels qT-RFLP ermittelten Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen von *B. cepacia*, logarithmisch transformiert (\log_{10}) dargestellt. **(B, D)** Zeitverläufe der relativen Häufigkeit vitaler und toter *B. cepacia*. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei (*) oder drei biologischen Replikaten.

S. aureus

Im Gegensatz zu Ergebnissen der Drei-Spezies-Mischkultur (Abb. 32 (E)) nahm die Zellkonzentration von *S. aureus* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *P. aeruginosa*

bereits nach 4 h Kultivierung ab (Abb. 36 (A)). Die Zellkonzentration nahm um über die Hälfte auf $\log_{10} 7,08 \pm 0,38 \text{ ge mL}^{-1}$ nach 10 h ab, wohingegen die Konzentration in der Reinkultur (Abb. 36 (A)) aber auch in der Drei-Spezies-Mischkultur maximal war ($\log_{10} 8,2 \text{ ge mL}^{-1}$ - $\log_{10} 8,4 \text{ ge mL}^{-1}$, Abb. 32 (E)). Da die hier betrachtete Reinkultur mit *S. aureus* nach 12 h mit *P. aeruginosa* kontaminiert war, wird hier ab diesem Zeitpunkt der Vergleich der Zwei-Spezies-Mischkultur zu den an den anderen Versuchstagen durchgeführten Reinkulturen (Abb. 32 (E), Abb. 36 (C)) gezogen. Die Verläufe der Zellkonzentration variierten zwar etwas zwischen den Versuchstagen, waren aber im Wesentlichen bei allen Reinkulturen gleich. Die Bakterien wuchsen zunächst exponentiell bis sie nach 4 h bzw. 6 h in die stationäre Phase übergingen (Abb. 32 (E), Abb. 36 (C)). Die Zellkonzentrationen blieben bis zum Ende relativ konstant. Dabei wurden miteinander vergleichbare maximale Zellkonzentrationen erreicht (Abb. 32 (E), Abb. 36 (C)). In der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *P. aeruginosa* blieb die Zellkonzentration von *S. aureus* von 12 h bis 32 h relativ konstant (Abb. 36 (A)), wohingegen die Konzentration in der Drei-Spezies-Mischkultur leicht abnahm (Abb. 32 (E)). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Standardabweichungen der Zellkonzentrationen von *S. aureus* in der Zwei-Spezies-Mischkultur im Bereich von 8 h bis 32 h relativ groß waren (Abb. 36 (A)). Im Vergleich zu den Reinkulturen (Abb. 32 (E), Abb. 36 (C)) waren die Konzentrationen von *S. aureus* in den beiden Mischkulturen am Ende der Kultivierung kleiner, wobei die Konzentration in der Zwei-Spezies-Mischkultur niedriger als die in der Drei-Spezies-Mischkultur war. Auffällig war, dass die Startzellkonzentration von *S. aureus* in der Misch- und Reinkultur an diesem Versuchstag (Abb. 36 (A)) höher als an den anderen Versuchstagen (Abb. 32 (E), (Abb. 36 (C)) war, wohingegen die ermittelten Werte für μ_{\max} geringer waren (Tab. 43, Tab. 46).

Das Wachstumsverhalten von *S. aureus* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *B. cepacia* unterschied sich aufgrund der zur Reinkultur um 2 h verlängerten exponentiellen Wachstumsphase, der höheren maximalen Zellkonzentration sowie der mit der Reinkultur vergleichbaren stationären Phase (Abb. 36 (C)) deutlich vom Wachstumsverlauf in der Drei-Spezies-Mischkultur (Abb. 32 (E)). Auffällig an diesem Versuchstag war, dass für *B. cepacia* höhere Zellkonzentrationen in der Mischkultur im Vergleich zur Reinkultur ermittelt wurden (Abb. 35 (C)).

Tab. 46 Werte für μ_{\max} von *S. aureus* in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen.

Raten ermittelt aus qT-RFLP-Konzentrationswerte. **(A)** μ_{\max} in Mischkultur mit *P. aeruginosa* und **(B)** in Mischkultur mit *B. cepacia*, jeweils angegeben mit Wert aus Reinkultur des gleichen Versuchstags. Bestimmung während exponentieller Phase (Δt) durch lineare Regression der Auftragung der ln transformierten Zellkonzentration über die Zeit. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

<i>S. aureus</i>	Reinkultur		Mischkultur	
	μ_{\max} (h^{-1})	Δt (h)	μ_{\max} (h^{-1})	Δt (h)
(A)	0,70 \pm 0,19*	0 - 4	0,73 \pm 0,15*	0 - 4 mit <i>P. a.</i>
(B)	0,95 \pm 0,11	0 - 4	0,96 \pm 0,11*	0 - 6 mit <i>B. c.</i>

* Bestimmtheitsmaß R^2 bei mindestens einen Replikat $< 0,90$

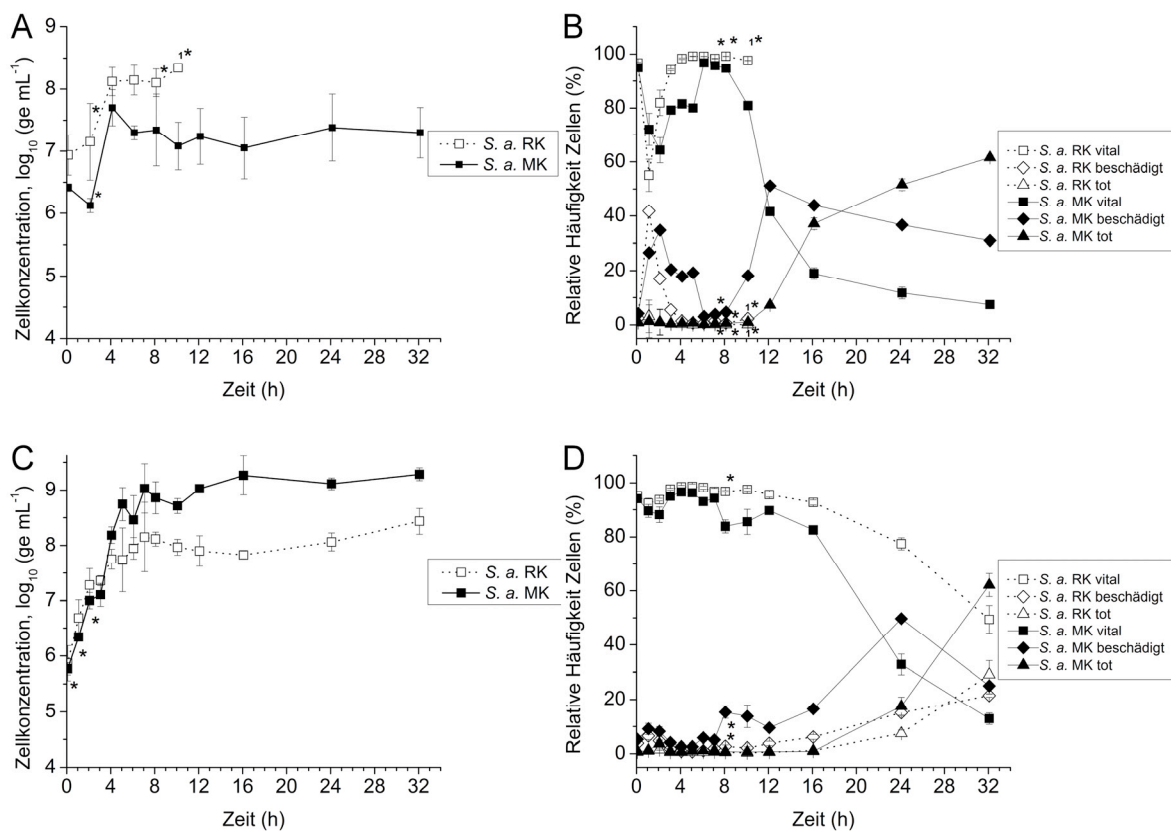


Abb. 36 Wachstum und Vitalität von *S. aureus* in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen.

(A, B) *S. aureus* mit *P. aeruginosa* bzw. mit **(C, D)** *B. cepacia*. Vergleich von Misch- (ausgefüllte Symbole) und Reinkulturergebnisse (leere Symbole). **(A, C)** Zeitverläufe der mittels qT-RFLP ermittelten Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen von *S. aureus*, logarithmisch transformiert (\log_{10}) dargestellt. **(B, D)** Zeitverläufe der relativen Häufigkeit vitaler, beschädigter und toter *S. aureus*. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei (*) oder drei biologischen Replikaten. **(A)** und **(B)** Kontamination der *S. aureus* Reinkultur zum Zeitpunkt 10 h bzw. 12 h. Bei $t = 10$ h ist nur ein Replikat (1*) dargestellt (aus Kultur ohne Kontamination).

Die Vitalitätszeitverläufe der drei, an unterschiedlichen Tagen, durchgeführten Reinkulturen von *S. aureus* weisen teilweise starke Variationen in den relativen Häufigkeiten vitaler und beschädigter Bakterien, während der exponentiellen Wachstumsphase von 0 h bis 4 h sowie von 12 h bis 32 h, auf. Dennoch sind im Wesentlichen Parallelen im zeitlichen Verlauf zu erkennen (Abb. 36 (B), Abb. 36 (D), Abb. 32 (F)). In allen Kulturen wurden nahezu ausschließlich vitale Bakterien zum Startzeitpunkt sowie bei Übergang der Wachstumsphase der Bakterien vom exponentiellen zum stationären Status detektiert. Darüber hinaus wurde in allen Kulturen von 12 h bis 32 h eine Reduzierung der relativen Häufigkeit vitaler *S. aureus* um mehr als 50 % festgestellt, die mit einer zeitlichen Zunahme der relativen Häufigkeit beschädigter und toter Bakterien einherging.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Drei-Spezies-Mischkultur wurde die Vitalität von *S. aureus* in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *P. aeruginosa* im Vergleich zur Reinkultur zeitiger, auch nach 8 h, und anfänglich mit einer höheren Rate reduziert (Abb. 36 (B)). Dabei war in beiden Mischkulturen der zeitliche Verlauf der relativen Häufigkeit vitaler *S. aureus* von 8 h bis 32 h exponentiell. Für den genannten Zeitraum wurden mittels Regression folgende Kurvengleichungen ermittelt: $y = 264,55 e^{(-0,13 t)} + 7,44$ ($R^2 = 0,99$) für die Drei-Spezies-Mischkultur und $y = 493,32 e^{-0,20 t} + 5,76$, ($R^2 = 0,96$) für die Zwei-Spezies-Mischkultur. Zudem stimmten für *S. aureus* die zeitlichen Verläufe der relativen Häufigkeit beschädigter und toter Bakterien im Wesentlichen zwischen beiden Kultivierungen überein (Abb. 36 (B), Abb. 32 (F)). In beiden Mischkulturen waren am Ende der Kultivierung mehr als 60 % aller detektierter Bakterien tot und die relative Häufigkeit vitaler Zellen niedriger (7 %, Abb. 36 (B) bzw. 11 % Abb. 32 (F)) als in den Reinkulturen (15 %, Abb. 32 (F) bzw. 49 %, Abb. 36 (D)).

Die Vitalität von *S. aureus* wurde in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *B. cepacia* ebenfalls wie in den Mischkulturen mit *P. aeruginosa* zeitiger als in der Reinkultur reduziert (Abb. 36 (D)). Im Gegensatz zu den Mischkulturen mit *P. aeruginosa* folgte die Abnahme der relativen Häufigkeit vitaler *S. aureus* jedoch keinem exponentiellen Verlauf (siehe oben, Abb. 32 (E)), sondern eher einem linearen Verlauf (Abb. 36 (D)). Von 12 h bis 32 h nahm die relative Häufigkeit vitaler *S. aureus* von ca. 90 % auf ca. 13 % ab ($y = -4,15 t + 142,02$, $R^2 = 0,96$). Zwischen der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *B. cepacia* und den Mischkulturen mit *P. aeruginosa* wiesen darüber hinaus die zeitlichen Verläufe der relativen Häufigkeiten beschädigter und toter *S. aureus*

Unterschiede zueinander auf. Dennoch wurde in allen Rein- und Mischkulturen bei Vitalitätsverlust von *S. aureus*, die Abnahme der Anzahl vitaler Bakterien zunächst in den Anteilen beschädigter Bakterien wiedergefunden, bevor die Anzahl toter Bakterien zunahm. Zum Kultivierungsende hin nahm in den Mischkulturen die relative Häufigkeit beschädigter *S. aureus* ab (Abb. 32 (E), Abb. 36 (B), (D)). In der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *B. cepacia* war am Ende der Kultivierung der Anteil vitaler *S. aureus* mit etwa 13 % geringer als in der Reinkultur (49 %, Abb. 36 (D)).

Über alle Kulturen mit *S. aureus* betrachtet, führte die Co-Kultivierung mit *P. aeruginosa* zu einer Reduzierung der Zellkonzentration, in der Zwei-Spezies-Mischkultur bereits nach 4 h und in der Drei-Spezies-Mischkultur nach 10 h. Darüber hinaus wurde die Vitalität von *S. aureus* in Mischkulturen im Vergleich zur Reinkultur zeitiger und anfänglich mit einer höheren Rate reduziert. Zudem deuteten Vitalitätswerte zum Kultivierungsende auf eine im Vergleich zur Reinkultur größere finale Reduzierung der Vitalität in der Mischkultur hin. Für *S. aureus* waren Unterschiede in der Dynamik der Vitalitätspopulationen zwischen Misch- und Reinkulturen sowie zwischen der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *B. cepacia* und den Mischkulturen mit *P. aeruginosa* zu erkennen.

4.2.3. Wachstumsanalyse mittels quantitativer DZM

Für die Spezies *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* wurde die Eignung der DZM zur Ermittlung der Zellkonzentration in der Analyse von Reinkulturproben durch Zählung DAPI-angefärbter fixierter Bakterien ($7 \mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI), wie unter 4.1 beschrieben, demonstriert. Die mittels DZM ermittelten Zellkonzentrationen stimmten gut mit den mittels qT-RFLP ermittelten Konzentrationen überein (Abb. 13). Durch Erweiterung des Färbeprotokolls, um die Inkubation der Bakterien mit Alexa 488 Fluor-markiertem WGA ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) und R-PE-markierter Antikörper ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-SAK), war die Quantifizierung der Zellzahlen von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturproben durch Einsatz der DZM möglich (Methode siehe 3.4.2, Abb. 9 (B)).

Dabei wurde prinzipiell, wie unter 3.4.2 und 3.4.3 beschrieben, die Anzahl an Bakterien in $200 \mu\text{L}$ über die Anzahl an DAPI-positiven Ereignissen durch Verwendung des Zählmodus des Zytometers bestimmt. Zur Ermittlung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration in Mischkulturproben wurde konkret die Anzahl an

DAPI-positiven Ereignissen einer jeden Spezies i ($N_{\text{DAPI}+,i}$) bestimmt. Dazu wurden alle Ereignisse mit DAPI-positiver Fluoreszenz, wie in Abb. 37 (A) dargestellt, durch eine Region (Region Zellen) abgegrenzt.

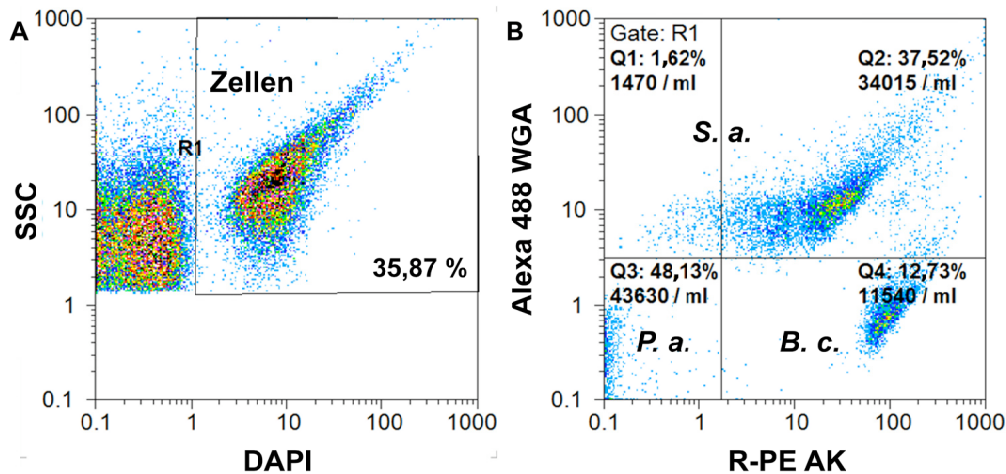


Abb. 37 Speziesdiskriminierung in der durchflusszytometrischen Analyse von Mischkulturproben zur Bestimmung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration.

Proben wurden mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ WGA-Alexa488 Fluor, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D und $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-SAK und $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI inkubiert. 2-D Pseudocolor-Punktdiagramme aus der Analyse von Drei-Spezies-Mischkulturproben, nach 4 h Kultivierung. Darstellung und Auswertung mit der Gerätesoftware (Partec FloMax Version 2.70). **(A)** Detektion von Bakterien, Abgrenzung der Ereignisse mit DAPI-positiver Fluoreszenz vom Hintergrundsignal. Die Region Zellen wurde manuell gesetzt. **(B)** Definition eines Quadranten-Gate zur Speziesdiskriminierung anhand der Alexa488 Fluor- und R-PE-Fluoreszenzsignale (Gate manuell gesetzt): *S. aureus* (Q1+Q2), *P. aeruginosa* (Q3) und *B. cepacia* (Q4). Hierbei wurden ausschließlich Ereignisse aus Region Zellen berücksichtigt. Für jede Region ist die relative Häufigkeit bezogen in **(A)** auf die Gesamtanzahl an Ereignissen und in **(B)** auf Gesamtanzahl an Zellen angegeben. Für Regionen in **(B)** sind die aus der Zählung ermittelten Zellkonzentrationen (ohne Berücksichtigung der Verdünnung) angegeben.

Die Zellen konnten dann aufgrund Ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung in der Auftragung der Signale der WGA-Fluoreszenz (Alexa488 Fluor) über der Immunfluoreszenz (R-PE) den einzelnen Spezies zugeordnet werden. So konnten bei Proben aus der Drei-Spezies-Mischkultur drei Populationen, die deutlich voneinander diskriminierbar waren, ausgemacht werden (Abb. 37 (B)). Während der Spezies *B. cepacia* Zellen mit ausschließlich R-PE-Fluoreszenz zugeordnet worden, wurden der Spezies *S. aureus* Zellen mit Alexa488 Fluor-Fluoreszenz mit R-PE-Fluoreszenz unterschiedlicher Intensitäten zugeordnet. Der Spezies *P. aeruginosa* dagegen wurden Zellen ohne Alexa488 Fluor- und R-PE-Fluoreszenz zugeordnet. Durch Anwendung eines Quadranten-Gates wurde für jede Spezies die Anzahl an Zellen ($N_{\text{DAPI}+}$) bestimmt (Q1+Q2: *S. aureus*, Q3: *P. aeruginosa*, Q4: *B. cepacia*, Abb.

37 (B)). Die Ermittlung der Zellkonzentration der Spezies in der Mischkultur (C_i) erfolgte analog zur Ermittlung der GZK mit Gl. 7, jedoch wurde $N_{\text{DAPI+,i}}$ anstelle von $N_{\text{DAPI+}}$ eingesetzt (Gl. 19).

$$C_i = \frac{N_{\text{DAPI+,i}} \cdot VF_{\text{Färbung}} \cdot VF_{\text{Analyse}}}{V_{\text{Analyse}}} \quad \text{Gl. 19}$$

Durch Einsatz dieser quantitativen DZM-Methode wurden die Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen, zusätzlich zur Bestimmung mittels qT-RFLP-Methode, in den in der Arbeit untersuchten Drei-Spezies-Mischkulturen ermittelt. In Abb. 38 sind die zeitlichen Verläufe der Zellkonzentrationen von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* während der Mischkultur-Kultivierung, die mittels DZM (Abb. 38 (A)) und qT-RFLP-Methode (Abb. 38 (B)) bestimmt wurden, dargestellt.

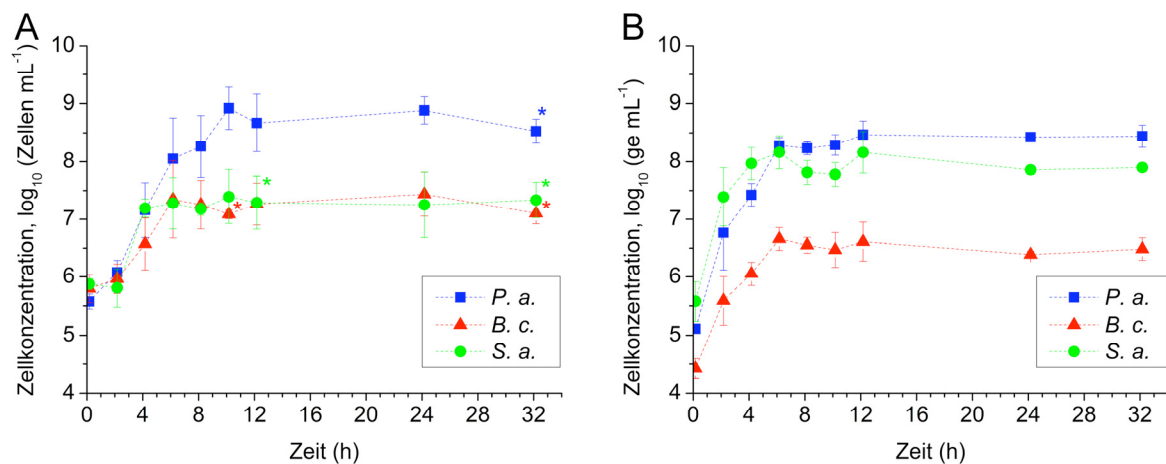


Abb. 38 Quantitative DZM zur Wachstumsanalyse der Drei-Spezies-Mischkultur.

(A) Zeitverläufe der mittels DZM ermittelten Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus*, logarithmisch transformiert (\log_{10}) dargestellt. Proben wurden fixiert, in NaCl-P-Puffer verdünnt und mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Alexa 488 Fluor WGA, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D und $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-SAK und $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI inkubiert. (B) Ergebnisse aus Bestimmung mittels qT-RFLP-Methode zum Vergleich. Alternative Darstellung zu Abb. 32. Zeitverläufe der ermittelten Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen, logarithmisch transformiert (\log_{10}) dargestellt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei (*) oder drei biologischen Replikaten.

Mit beiden Methoden wurden für *P. aeruginosa* in der Drei-Spezies-Mischkultur im Wesentlichen miteinander vergleichbare Wachstumsdynamiken erfasst (Abb. 38). Im Unterschied zu den Ergebnissen der q-TRLP-Methode wurden mit der DZM für *P. aeruginosa* höhere Werte für die Zellkonzentration, für die Zeitpunkte von 8 h bis 32 h sowie unmittelbar nach Inokulation der Kultur, ermittelt (in etwa eine halbe Log-Stufe größer). Im Falle von *B. cepacia* wurde mit der DZM in der Mischkultur in

Übereinstimmung mit den qT-RFLP-Ergebnissen ein Wachstumsstopp nach 6 h (unmittelbar nach der exponentiellen Wachstumsphase) erfasst (Abb. 38). Während die mittels qT-RFLP-Methode ermittelten Konzentrationen nach 12 h leicht abnahmen, zeichneten sich bei den mittels DZM ermittelten Konzentrationen eher konstante Werte ab. Im Unterschied zu den Ergebnissen der qT-RFLP-Methode war das mit der DZM ermittelte Wachstum für *B. cepacia* langsamer. Für μ_{\max} wurde ein Wert von $0,63 \pm 0,14 \text{ h}^{-1}$ (0 h - 6 h), anstelle von $0,86 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$ (Tab. 43), ermittelt. Interessanterweise war der mittels DZM ermittelte Wert für die Startzellkonzentration um eine Log-Stufe größer als der mittels qT-RFLP-Methode ermittelte Wert (Abb. 38).

Im Falle von *S. aureus* war das mittels DZM ermittelte Wachstum in der Mischkultur im Vergleich zu den Ergebnissen der q-T-RFLP-Analyse ebenfalls langsamer (Abb. 38). Für μ_{\max} wurde ein Wert von $0,83 \pm 0,26 \text{ h}^{-1}$ (2 h - 6 h), anstelle von $1,29 \pm 0,31 \text{ h}^{-1}$ (Tab. 43), ermittelt. Zudem wurden anhand der durchflusszytometrischen Analyse für *S. aureus* niedrigere Zellkonzentrationen bestimmt. Die Konzentrationen lagen von 6 h bis 32 h in etwa um eine halbe bis eine Log-Stufe niedriger als die Konzentrationen aus der qT-RFLP-Bestimmung (Abb. 38). Während mit der qT-RFLP-Methode für die Konzentrationen von 12 h bis 32 h ein abnehmender Trend verzeichnet wurde, blieben die Konzentrationen der durchflusszytometrischen Bestimmung von 6 h bis 32 h relativ konstant. Da die DZM-Konzentrationswerte der Dreifachbestimmung (biologische Replikate), insbesondere für die Zeitpunkte von 10 h bis 32 h, stark variierten (Abb. 38 (A)), sollte der durch die qT-RFLP-Methode ermittelte Konzentrationsverlauf als wahrscheinlicher eingeschätzt werden.

Den Ergebnissen beider Methoden ist gemein, dass die Spezies *P. aeruginosa* die Drei-Spezies-Mischkultur nach 8 h zahlenmäßig dominierte. In der Mischkultur wurden mit der DZM jedoch deutlich geringere *S. aureus*-Zellkonzentrationen als mit der qT-RFLP-Methode ermittelt. Die für *S. aureus* ermittelten Zellkonzentrationen waren für die Zeitpunkte von 6 h bis 32 h in etwa mit den Konzentrationen von *B. cepacia* vergleichbar (Abb. 38 (B)).

5. Diskussion

5.1. Methode zur Vitalitätsbestimmung in Mischkulturen

Mit der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass die DZM unter Einsatz eines neu etablierten Färbeprotokolls eine leistungsfähige und valide Methode zur Bestimmung der Spezies-spezifischen Vitalität von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturproben darstellt.

Auch wenn die in dieser Arbeit zur Ermittlung der Spezies-spezifischen Zellkonzentrationen angewandte q-T-RFLP-Methode in Kombination mit einer Vorbehandlung der Bakterien mit Propidiummonoazid (PMA) vielleicht auch eine Detektion der vitalen Bakterien erlaubt hätte (Rogers et al. 2008), wurde hier der Einsatz der DZM für die Vitalitätsanalyse bevorzugt. Ausschlaggebend für diese Wahl waren zwei Einschränkungen in der Anwendung der PMA-T-RFLP-Methode. Mit dieser Methode können zum einen keine Bakterien mit leicht beschädigter Membran, wie sie in der durchflusszytometrischen Analyse von Bakterien, wie hier bei *S. aureus* oder in einer anderen Studie bei *Lactobacillus plantarum* (Bensch et al. 2014) vorkommen können, detektiert werden. Zum anderen ist aus der Literatur bekannt, dass die Quantifizierung vitaler Bakterien durch das Vorkommen toter Bakterien in der Probe verfälscht werden kann (Fittipaldi et al. 2012). Insbesondere wurden Konzentrationen von toten Bakterien von größer als 10^4 Zellen ml^{-1} als kritisch angegeben (Gensberger et al. 2013; Løvdal et al. 2011; Pan and Breidt 2007; Yáñez et al. 2011).

Zur Bestimmung der Vitalität der Bakterien wurde die durchflusszytometrische Analyse der Membranintegrität durch Anwendung der Doppelfärbung SYBR Green I und PI etabliert. PI wurde zur Identifizierung von toten Bakterien und SYBR Green I zur Detektion aller Bakterien eingesetzt. Das etablierte einheitliche Färbeprotokoll erlaubte für jede Spezies die Detektion von vitalen und toten Bakterien mit intakter bzw. permeabilisierter Membran.

Der Verlust der Membranintegrität eines Bakteriums geht mit dem Erliegen aller aktiven Transportvorgänge durch die Membran (Joux and Lebaron 2000) und der Energiegewinnung einher und führt letztendlich zum Zelltod (Nebe-von-Caron and Badley 1995). Bei der Doppelfärbung der Bakterien mit SYBR Green I und PI begünstigte die erhöhte PI-Fluoreszenzintensität toter Zellen die Diskriminierung der Vitalitätspopulation in der Analyse. Diese Erhöhung der PI-Intensität ist

höchstwahrscheinlich auf einen Fluoreszenz (Förster)-Resonanz-Energie-Transfer- (FRET-) Effekt von SYBR Green I zu PI (Barbesti et al. 2000) durch die räumliche Nähe von SYBR Green I zu PI-Molekülen an der dsDNS zurückzuführen. Gleichzeitig ist eine Verdrängung von SYBR Green I an der DNS durch PI aufgrund einer höheren Bindungsaffinität denkbar. Hinweise dazu lieferte eine Studie von Stocks 2004, in der für PI im Vergleich zu SYTO9 eine höhere Bindungsaffinität gegenüber Nukleinsäuren festgestellt worden war (Stocks 2004). Im Falle von *S. aureus*, war die Detektion einer zusätzlichen Population möglich. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren können dieser Population Bakterien mit einer partiell beschädigten Membran zugeordnet werden (Gregori et al. 2001; Ziglio et al. 2002). Im Vergleich zu toten Zellen penetrierte PI vermutlich in geringeren Mengen in die beschädigten Zellen, sodass ein geringerer FRET-Effekt von SYBR Green I zu PI eintrat (Barbesti et al. 2000).

Voraussetzung für die Differenzierung von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturproben in der durchflusszytometrischen Analyse war die Etablierung von Färbemethoden zur Spezies-spezifischen Detektion. Die Immunfluoreszenzdetektion von *B. cepacia* wurde für die DZM durch Einsatz spezifisch gegen *B. cepacia* bindender PAK (mMAK), die mit fluoreszenzkonjugierten SAK (anti-Maus AK) kombiniert wurden, etabliert. Darüber hinaus wurde fluoreszenzkonjugiertes WGA für die DZM für die Gram-spezifische Detektion von *S. aureus* erfolgreich eingesetzt. Die Methoden der Spezies- und Gram-spezifischen Detektion wurden mit der SYBR Green I- / PI-Vitalitätsfärbung erfolgreich kombiniert. Da jede einzelne Färbebedingung für jede Bakterienspezies zunächst separat getestet bzw. optimiert werden musste, war die Entwicklung der Vierfarbenmethode für die Spezies-spezifische Vitalitätsbestimmung in Mischkulturproben sehr zeitaufwendig. Darüber hinaus kann eine solche Methode nur für Bakterien, die in Reinkultur kultivierbar sind, etabliert werden, da die Fluoreszenzmarker und Vitalitätsfarbstoffe von vornherein für jede Spezies separat getestet werden müssen. Nachfolgend werden die Ergebnisse bei der Etablierung der Färbemethode diskutiert.

5.1.1. Spezies-spezifische Detektion für die Mischkulturanalyse

Aus den Tests der zur Verfügung stehenden verschiedenen PAK zur Immunfluoreszenzdetektion ging hervor, dass der PAK D (anti-Pseudomonas

cepacia) als einziger Antikörper für die Detektion von *B. cepacia* geeignet war (siehe Tab. 40). Zur Immunfluoreszenzdetektion von *P. aeruginosa* eignete sich dagegen keiner der getesteten spezifischen Antikörper.

Da R-PE-fluoreszierende *B. cepacia* ausschließlich bei Einsatz von PAK D mit SAK detektiert wurden (keine Fluoreszenz bei alleinigem Einsatz von SAK), kann von einer spezifischen Bindung von PAK D an der Zelloberfläche des verwendeten *B. cepacia*-Stammes ausgegangen werden.

Darüber hinaus wurde eine Bindung von PAK D an *S. aureus* festgestellt. Diese Kreuzreaktion kann sehr wahrscheinlich durch eine Expression von Protein A-Molekülen in der Zellwand von *S. aureus* erklärt werden (Forsgren and Sjöquist 1966; Inganäs et al. 1980). Protein A ist bekannt für seine unspezifische Reaktion mit Antikörpern, insbesondere mit hoher Affinität gegen den Typ IgG (Ljungberg et al. 1993). Mit diesen Erkenntnissen kann dann auch die festgestellte Bindung des SAK an den Zellen von *S. aureus* erklärt werden. Im Falle von *P. aeruginosa* konnten Kreuzreaktionen mit PAK D bzw. Reaktionen mit SAK ausgeschlossen werden.

Die an Antikörpern zuzugebende Menge hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Intensität des in der Analyse detektierten Immunfluoreszenzsignals. Dabei war das Verhältnis SAK zu PAK maßgebend. Das Fluoreszenzsignal markierter Bakterien konnte durch Erhöhung der SAK-Konzentration bei gleichbleibender PAK-Konzentration bis zur Sättigung des Fluoreszenzsignals intensiviert werden. Je größer der Überschuss an SAK gegenüber PAK desto größer ist der erzielte Verstärkungseffekt. Dieser Effekt der Signalverstärkung ist für indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen allgemein bekannt und kann damit erklärt werden, dass mehr als ein SAK an jeden PAK binden kann, d.h. mehr Fluorophore an einem Antigen binden (Odell and Cook 2013; Shapiro 2003). Das Fluoreszenzsignal ist gesättigt, wenn die maximale Anzahl an Fluorophoren über die Bindung der SAK an PAK erreicht wird. Optimal ist die Verstärkung, wenn die dabei eingesetzte PAK-Konzentration die vollständige Besetzung der Zelloberfläche des Bakteriums ermöglicht (Bindung eines jeden (zugänglichen) Antigens mit einem PAK). Diese Konzentration für PAK konnte nicht aus der begrenzten Datenlage der durchgeführten Experimente eindeutig festgestellt werden. Hinsichtlich der Diskriminierbarkeit der Immunfluoreszenzsignale vom Hintergrundsignal in der Analyse sowie einer hohen Wiederfindung der Zellen (nahe 100 %) wurde ein Verhältnis SAK zu PAK von 4 bei einer Mindestkonzentration von PAK von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$

als geeignet festgestellt. Des Weiteren zeigten die Versuche keine negativen Effekte beim Einsatz höherer AK-Mengen, insbesondere in der Analyse von Mischkulturproben.

Die Eignung von WGA für die DZM zur Gram-spezifischen Detektion von *S. aureus* wurde demonstriert. Es wurde eine Bindung von WGA ausschliesslich an *S. aureus* nachgewiesen. Die Bindung des Lektins erfolgte höchstwahrscheinlich an der äußeren Peptidoglykanschicht der Bakterienzellwand, da WGA spezifisch an N-Acetylglucosaminen und N-Acetylneuraminsäure-Reste bindet (Debray et al. 1981). Die Tatsache, dass WGA nicht an der Oberfläche von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* band, kann höchstwahrscheinlich auf die äußere Membran dieser Gram-negativen Bakterien zurückgeführt werden, die die Peptidoglykanschicht nach außen abschirmt (Sizemore et al. 1990).

Die Intensität der Fluoreszenzsignale WGA-markierter *S. aureus* variierte in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, was eventuell auf unterschiedliche Mengen an Zuckerresten in der Zellwand aufgrund des unterschiedlichen Fortschritts der Peptidoglykansynthese zurückzuführen ist (Scheffers and Pinho 2005). Unabhängig davon war eine effiziente Detektion von *S. aureus* mittels WGA-CF405S für Proben aller Kultivierungszeitpunkte gewährleistet.

Von einer spezifischen Detektion von *P. aeruginosa* mittels Lektinen wurde hingegen abgesehen. Veröffentlichte Ergebnisse mit den Lektinen BS-1, PHA-P, ConA sowie UEA-1 (Bejarano and Schneider 2004; Klebensberger et al. 2007; Strathmann et al. 2002) lassen vor allem auf eine geringe Färbeeffizienz schließen. Gegen diese Markierungsmethode sprach des Weiteren der Fakt, dass die relevanten Lektine auch an Zuckerstrukturen an der Zelloberfläche Gram-positiver Spezies binden können. Insbesondere wurde gezeigt, dass ConA und PHA-P auch an N-Acetylglucosaminen (Bejarano and Schneider 2004; Goldstein et al. 1965a; Goldstein et al. 1965b) binden können, welche in der Peptidoglykanschicht von *S. aureus* vorkommen.

5.1.2. Anpassung der Vitalitätsfärbebedingungen an die Spezies

Die Fluoreszenzfärbung mit SYBR Green I und PI wurde zunächst für jede Spezies in Reinkultur hinsichtlich einzusetzender Farbstoffkonzentrationen getestet und optimiert. Dabei wurden für Bakterien unterschiedliche physiologische Zustände

durch Verwendung von Proben aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase betrachtet. Mit diesem Vorgehen wurde den Unterschieden zwischen den Spezies im Zellwand- bzw. Zellmembranaufbau sowie in deren metabolischen Fähigkeiten Rechnung getragen.

Der für die spezifische Fluoreszenzmarkierung von *B. cepacia* (Immunfluoreszenz) und *S. aureus* (WGA) ausgewählte NaCl-P-Puffer war nicht für die Vitalitätsbestimmung von *P. aeruginosa* geeignet, da der Einsatz dieses Puffers zur vollständigen Permeabilisierung der Zellmembran bei PI-Färbungen führte. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sowie der Literatur kann geschlossen werden, dass die Auswahl von Puffer bzw. Lösungen, in denen die Bakterien während der Behandlung und Färbung suspendiert sind, ein wichtiges Kriterium in der Etablierung einer Vitalitätsfärbung mit PI darstellt. So zeigte Bouhdid *et al.* für Übernachtskulturen mit *P. aeruginosa*, dass bei PI-Färbung in Ringerlösung weniger als 10 % der Bakterien gegenüber PI permeabel waren (Bouhdid *et al.* 2010; Bouhdid *et al.* 2009). Es sind daher Puffer bzw. Lösungen für die Färbung zu wählen, die keine Permeabilisierung der Membranen der Bakterien begünstigen bzw. hervorrufen. Beim Test von Ringerlösungen (A und B) sowie der ebenfalls getesteten MgSO₄-Lösung wurde nachgewiesen, dass weniger als 1 % der Bakterien gegenüber PI permeabel waren. Dies kann vermutlich dadurch erklärt werden, dass im Vergleich zum NaCl-P-Puffer, in dem alle Bakterien mit PI penetriert wurden, herstellungsbedingt zweiwertige Kationen (wie z.B. Mg²⁺ oder Ca²⁺) in der Ringerlösung vorkamen. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Vorkommen zweiwertiger Kationen in Lösung die Außenmembran Gram-negativer Bakterien, konkret die LPS-Schicht, stabilisiert (Nikaido 2003). Interessanterweise wurde beim Einsatz von Dulbecco-Puffer, in dem auch zweiwertige Kationen vorkommen, wiederum eine erhöhte PI-Permeabilität der Bakterien festgestellt. Das kann bei diesem Puffer eventuell durch den Inhaltsstoff EDTA erklärt werden. Für EDTA ist der Effekt einer Permeabilisierung der Membran durch Destabilisierung der LPS-Schicht bekannt (Leive 1965; Vaara 1992).

Aufgrund der besseren Diskriminierbarkeit PI gefärbter Bakterien vom Hintergrundsignal in der Analyse wurde für *P. aeruginosa* der Einsatz der Ringerlösung B gegenüber der Ringerlösung A und der MgSO₄-Lösung bevorzugt. Nachfolgend werden für jede Spezies die Ergebnisse aus der Optimierung der Färbebedingungen für die durchflusszytometrische Analyse diskutiert.

Ziel der Optimierung der SYBR Green I-Konzentration war die Sättigung der Zellen mit dem Farbstoff, d.h. eine gleichmäßige Färbung aller Bakterien, die eine eindeutige Diskriminierbarkeit vom Hintergrundsignal in der Analyse erlaubte. Im Falle von *B. cepacia* musste dazu die Außenmembran permeabilisiert werden. Es ist bekannt, dass die Außenmembran dieser Gram-negativen Bakterien eine Barriere für hydrophobe Substanzen darstellen kann (Shapiro 2000a). Die Zugabe von GTA im Puffer führte für *B. cepacia* zur besseren Penetration von SYBR Green I in die Zellen. Diese Erhöhung der Permeabilität gegenüber des hydrophoben Farbstoffs ist vermutlich auf die Quervernetzung von Proteinen der Außenmembran durch GTA unter Bindung hydrophiler freier Aminogruppen zurückzuführen (Reinhart A.F and Bragg 1977; Richards and Knowles 1968). Den gleichen Schluss zogen Morono *et al.* aus den Ergebnissen ihrer Studie, bei der die Fluoreszenzfärbung Gram-negativer Bakterien mit hydrophobem Carboxyfluoreszeindiazetat (CFDA) durch Einsatz von GTA deutlich verbessert werden konnte (Morono *et al.* 2004). Gleichzeitig kann der Einsatz hoher GTA-Mengen die Vitalität beeinträchtigen, wie von Miyanaga *et al.* für *E. coli* und *S. aureus* für Konzentrationen ab 1 mg mL^{-1} beschrieben wurde (Miyanaga *et al.* 2007). Im Falle von *B. cepacia* wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass der Einsatz von $0,05\text{ mg mL}^{-1}$ GTA keinen Einfluss auf die Membranintegrität hatte und zugleich eine optimale Färbung mit SYBR Green I erlaubte.

Für alle Spezies nahm mit steigender SYBR Green I-Konzentration die MFI grün fluoreszierender Bakterien zu, bis das Fluoreszenzsignal gesättigt war (*S. aureus*) bzw. ein Optimum (*P. aeruginosa* und *B. cepacia*) erreichte, was auf eine maximale Bindung des Farbstoffs an die Nukleinsäuren hindeutete. Aufgrund der hier eingesetzten Farbstoffmengen, kann für jede Spezies angenommen werden, dass SYBR Green I selektiv an dsDNS bindet (Zipper *et al.* 2004). Dass ein Teil der detektierten Gesamtfluoreszenz aus der Fluoreszenz durch Bindung von SYBR Green I zu RNA oder zu ssDNS gespeist wurde, kann somit vernachlässigt werden. Die Abnahme der MFI bei Anwendung hoher Konzentrationen, wie bei *P. aeruginosa* und *B. cepacia* festgestellt wurde, kann möglicherweise auf ein aktives Auspumpen von SYBR Green I aus den Zellen zurückgeführt werden. Für beide Spezies ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Multi-Efflux-Pumpsystemen beschrieben (Li *et al.* 1994; Poole 2001; Rushton *et al.* 2013). Als weitere Ursache ist eine Auslöschung der

Fluoreszenz (Fluoreszenzquenching) der an der DNS-gebundenen SYBR Green I-Moleküle aufgrund von räumlicher Nähe denkbar.

Die Feststellung von höheren MFI-Werten bei der Färbung von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* mit SYBR Green I aus der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zu denen aus der stationären Phase deutet auf eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom physiologischen Zustand der Bakterien hin. Dies kann eventuell durch die hohe Proliferationsaktivität exponentiell wachsender Bakterien erklärt werden, bei der Zellen eine größere Anzahl von Genomen enthalten (nach DNS-Replikation, vor Zellteilung) können (Müller 2007). Bakterien, die ihr Wachstum eingestellt haben (stationäre Bakterien) hingegen enthalten die Mindestanzahl an Genomen.

Zur optimalen Färbung von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* waren im Vergleich zu *S. aureus* erheblich größere SYBR Green I-Mengen notwendig. Das kann wahrscheinlich auf das aktive Auspumpen von SYBR Green I aus den Zellen der Gram-negativen Bakterien, wie bereits weiter vorn beschrieben, zurückgeführt werden. Als mögliche weitere Erklärung kommen Unterschiede im DNS-Gehalt und / oder in der Basenpaar- (Bp-) Komposition der DNS zwischen den Spezies in Frage (Van Dilla et al. 1983). Das ist sehr wahrscheinlich, da die Menge an DNS bindender SYBR Green I-Fluoreszenzmoleküle begrenzt ist, was im Wesentlichen wegen der bevorzugten Bindung von SYBR Green I an A-T-reiche Regionen der DNS (Zipper et al. 2004) durch den DNS-Gehalt und durch die Bp-Zusammensetzung der DNS bestimmt wird. Der *Integrated Microbial Genome*-Datenbank (<https://img.jgi.doe.gov>) zufolge verfügt das Genom von *P. aeruginosa* (PAO1) über 6,3 Mio. Bp bei einem A-T-Anteil von etwa 33 % (NCBI Taxon ID 208964), von *B. cepacia* über 8,7 Mio. Bp bei einem A-T-Anteil von etwa 33 % (NCBI Taxon ID 269483) und *S. aureus* über 2,8 Mio. Bp bei einem A-T-Anteil von etwa 66 % (NCBI Taxon ID 703339). Aus diesem Vergleich kann geschlussfolgert werden, dass in den Gram-negativen Bakterien eine größere Menge an SYBR Green I-Moleküle im Vergleich zu *S. aureus* an der DNS binden kann, bis das Maximum oder die Sättigung des Fluoreszenzsignals erreicht wird.

In Anwendung der optimierten SYBR Green I-Konzentrationen wurde nun eine geeignete PI-Konzentration ermittelt, die die eindeutige Diskriminierung von vitalen und toten Bakterien in der Analyse ermöglichte. PI durfte in der eingesetzten Menge gleichzeitig zu keiner Reduzierung der Vitalität der Bakterien führen. Im Falle von

P. aeruginosa und *B. cepacia* wurde ein Einfluss der variierenden PI-Konzentration bei Doppelfärbung mit SYBR Green I auf die Trennbarkeit zwischen vitaler und toter Population, insbesondere im PI-Fluoreszenzkanal, festgestellt. Für diese Phänomene sind vermutlich die Relation der Mengen SYBR Green I zu PI sowie SYBR Green I bzw. PI zu DNS hinsichtlich des FRET-Effekts von SYBR Green I zu PI und möglicher Verdrängungseffekte an der DNS bestimmend (Barbesti et al. 2000; Stocks 2004). Bei *P. aeruginosa* führten in der Analyse alle getesteten PI-Konzentrationen zu einer ausreichend hohen Diskriminierbarkeit zwischen vitalen und toten Bakterien. Bei *B. cepacia* resultierte der Einsatz von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI zu einer eindeutigen Diskriminierbarkeit zwischen vitalen und toten Bakterien. Da PI-Konzentrationen größer als $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ sowohl bei *P. aeruginosa* als auch *B. cepacia* zu einer Beeinträchtigung der Vitalität, insbesondere bei stationären Zellen, führte, wurde diese Konzentration als optimal festgelegt. Die Reduzierung der Vitalität der Bakterien infolge größerer PI-Mengen geht eventuell auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber PI durch Reduktion des Stoffwechsels und der damit einhergehenden verminderten Reparaturmechanismen zurück (Hewitt et al. 1999).

Bei *S. aureus* erlaubten in der Analyse alle getesteten PI-Konzentrationen vergleichbar hohe Diskriminierbarkeiten zwischen vitalen und toten Bakterien. Die Vitalität blieb dabei unverändert auf einem hohen Niveau. Darüber hinaus konnte die Population der Bakterien mit partiell beschädigter Membran eindeutig von den anderen beiden Populationen getrennt werden.

5.1.3. Vierfarbenprotokoll für die Spezies-spezifische Bestimmung

Zur Etablierung eines einheitlichen SYBR Green I- / PI-Färbeprotokolls zur Vitalitätsbestimmung in Mischkulturproben wurde durch Festlegung von Kompromissfärbebedingungen der Unterschiede zwischen den Spezies in den optimalen Färbebedingungen (Tab. 41) Rechnung getragen. Die definierten Färbebedingungen mussten für jede Spezies verifiziert werden. Anstelle des NaCl-P-Puffers bzw. der Ringerlösung B wurde eine Ringerlösung B mit GTA, KCl und BSA (Ringerlösung B_{opt}) eingesetzt. Die an SYBR Green I und PI zuzugebende Menge wurde ebenfalls angepasst. Zum Einsatz kamen eine SYBR Green I-Verdünnung von 5×10^3 und eine PI-Konzentration von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Das einheitliche Färbeprotokoll erlaubte für jede Spezies die Detektion vitaler und toter Bakterien und zusätzlich für

S. aureus die Detektion beschädigter Bakterien. Eine eindeutige Diskriminierung der Populationen voneinander wurde erzielt. Die Modifizierung bei der Behandlung und Färbung hatte keine negativen Effekte auf die Vitalität der einzelnen Spezies. So wurde für alle drei Spezies nachgewiesen, dass die Zugabe von $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ GTA in der Ringerlösung keinen Einfluss auf die Vitalität hatte. Dass GTA die Vitalität beeinträchtigen kann, zeigen Miyanaga *et al.* für *E. coli* und *S. aureus* bei Einsatz von GTA-Konzentration ab 1 mg mL^{-1} (Miyanaga *et al.* 2007).

Darüber hinaus waren die Kompromissfärbebedingungen mit der Anwendung der Markierung von *S. aureus* mit WGA-CF405S und der Immunfluoreszenzmarkierung von *B. cepacia* mit PAK D und R-PE-SAK kompatibel. Mit der Zugabe von 3 M KCl in der Ringerlösung B wurden bei der Markierung von *S. aureus* mit WGA-CF405S höhere blaue Fluoreszenzintensitäten erzielt, die eine eindeutige Diskriminierung von *S. aureus* von *P. aeruginosa* und *B. cepacia* in Mischkulturproben erlaubten. Über die gesamte betrachtete Kultivierungsdauer war die Wiederfindung von *S. aureus* durch die Detektion von mit WGA-CF405S markierten Zellen hoch. Das beschriebene Vorgehen zur Optimierung des Färbesignals von WGA ist aus der Literatur bekannt (Holm and Jespersen 2003). Der Effekt der Erhöhung der CF405S-Fluoreszenzintensität bei Markierung von *S. aureus* durch zusätzliches KCl in der Ringerlösung B ist vermutlich auf die Konformation von Teichonsäuren zurückzuführen (Holm and Jespersen 2003). Teichonsäuren kommen auf der Zellwand Gram-positiver Bakterien vor und sind in der Regel senkrecht zur Peptidoglykanschicht nach außen gerichtet (Fuchs and Schlegel 2007). Holm und Jespersen vermuteten, dass mit der Erhöhung der Kalium-Konzentration, Kalium-Ionen die negativen Ladungen der Teichonsäuren neutralisieren und somit die meist starre Struktur der Teichonsäuren (infolge der schwächeren Wechselwirkungen mit anderen geladenen Peptidoglykanbestandteilen in Zellwand) aufgelöst wird. Infolgedessen wäre eine bessere Zugänglichkeit von WGA an die Peptidoglykanschicht der Zellwand zur Bindung gegeben (Holm and Jespersen 2003). Dass die Bindung von Salz-Ionen an Teichonsäuren einen Einfluss auf deren Struktur haben kann, ist in der Literatur für Spezies Gram-positiver Bakterien beschrieben (Brown *et al.* 2013; Doyle *et al.* 1974; Garimella *et al.* 2009). Die Erhöhung der Osmolarität in der Ringerlösung durch Zugabe von KCl führte für keine Spezies zur Reduzierung der Vitalität. Das kann vermutlich auf die die im Vergleich

zu tierischen Zellen höhere Kapazität der Bakterien zur Anpassung der internen Osmolarität zurückgeführt werden (Neidhardt et al. 1990).

Da Antikörper unspezifisch gegen *S. aureus* banden, wurden für Proben aus Drei-Spezies-Mischkulturen im Vierfarbenprotokoll erhöhte AK-Konzentrationen eingesetzt ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAK D und $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ R-PE-konjugierter SAK). Unter Einsatz des Vierfarbenprotokolls war die spezifische durchflusszytometrische Detektion von *B. cepacia* im Wesentlichen sehr effizient und reproduzierbar. Die verringerte Wiederfindung für Bakterien aus exponentiell wachsenden Kulturen, kann vermutlich durch eine verringerte Zugänglichkeit der an der Zelloberfläche exponierten Epitope während hoher Proliferationsraten erklärt werden. Hughes *et al.* 1996 vermuteten in ihrer Studie, bei der Bakterien von *P. aeruginosa* unzureichend mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern gefärbt werden konnten, dass das Exponieren der Zielproteine an der Zelloberfläche von der Phase des Zellzyklus abhängt (Hughes et al. 1996).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das etablierte Vierfarbenprotokoll für die DZM die spezifische Detektion von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Proben aus Drei-Spezies-Mischkulturen und die anschließende Bestimmung der Vitalität jeder Spezies erlaubte. Über alle gemessenen Kultivierungszeitpunkte betrachtet, war die Wiederfindung der einzelnen Bakterienspezies durch die durchflusszytometrische Detektion bei Anwendung der Vierfarbenmethode sehr hoch. Da dennoch weniger als 100 % einer Spezies durch Spezies- bzw. Gram-spezifischer Markierung wiedergefunden worden, kann eine Unterbestimmung der Anzahl von *B. cepacia* und *S. aureus* in den Mischkulturproben mittels DZM nicht vollständig ausgeschlossen werden. Im Falle der Vitalitätsbestimmung könnte dies einen geringen Einfluss auf die erfassten relativen Häufigkeiten vitaler und toter *P. aeruginosa* haben. Für den Zweck der Untersuchungen in dieser Arbeit, die Beschreibung der zeitlichen Veränderung der Vitalität in Zwei- und Drei-Spezies Mischkulturen, war die Spezifität des etablierten Färbeprotokolls jedoch ausreichend hoch. Für andere Zwecke ist die Einführung eines dritten Spezies-spezifischen Fluoreszenzmarkers gegen *P. aeruginosa* gegebenenfalls in Betracht zu ziehen.

5.2. Effekte der Mischkultivierung auf die Vitalität und das Wachstum von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus*

Zur Untersuchung des Einflusses der Mischkultivierung auf die Vitalität und das Wachstum von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* wurden Experimente mit Mischkulturen, bestehend aus zwei und drei Bakterienspezies, und parallel dazu mit Reinkulturen durchgeführt. Zur Analyse der Vitalität und des Wachstums während der Kultivierungen wurde die in der Arbeit etablierte Vierfarbenmethode für die DZM sowie die bereits etablierte qT-RFLP-Methode zur Quantifizierung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration eingesetzt. Darüber hinaus wurden die extrazellulären Konzentrationen wichtiger Substrate und Metabolite im Medium in Reinkulturen und in der Drei-Spezies-Mischkultur mittels HPLC bzw. einer enzymatischen Methode bestimmt (siehe 3.5.4).

Über alle Kulturen mit *P. aeruginosa* betrachtet, führte die Co-Kultivierung mit *B. cepacia* zur Verbesserung des Wachstums von *P. aeruginosa* im Vergleich zu den Reinkulturen (schnelleres Wachstum und höhere maximale Zellkonzentrationen). Die höhere spezifische Wachstumsrate von *P. aeruginosa* in den Mischkulturen mit *B. cepacia* kann derzeit nicht ausreichend erklärt werden. Möglicherweise trug die Produktion von 2-KDG und Gluconat durch *B. cepacia* und deren Verbrauch in der Mischkultur durch *P. aeruginosa* zur Erhöhung des Wachstums in der Mischkultur bei. Diese Nahrungskette zwischen den beiden Spezies wurde bereits durch Riedele und Reichl bei Untersuchungen ähnlicher Drei-Spezies-Mischkulturen aufgezeigt (Riedele and Reichl 2012). Darüber hinaus könnte das Wachstum von *P. aeruginosa* in den Mischkulturen mit *B. cepacia* durch die versuchsbedingte verringerte Startzellkonzentration und damit verbunden durch das höhere Verhältnis Substrat zu Biomasse begünstigt worden sein (Kovárová-Kovar and Egli 1998). Einen Hinweis darauf gibt die im Vergleich zur Reinkultur verlängerte Wachstumsphase von *P. aeruginosa* in der Drei-Spezies-Mischkultur. Zudem wurden in der Drei-Spezies-Mischkultur und in den Reinkulturen miteinander vergleichbare Konzentrationszeitverläufe für Glutamin und Glukose erfasst. Dass *P. aeruginosa* in den Mischkulturen den anderen beiden Spezies im Wachstum überlegen war (schnelleres Wachstum und höhere maximale Zellkonzentrationen), kann sehr wahrscheinlich auf Substratkonkurrenz zurückgeführt werden. Ein deutlicher Hinweis auf eine

Konkurrenz um Glutamin war, dass Glutamin in der Drei-Spezies-Mischkultur deutlich schneller als in der Reinkultur mit *B. cepacia* sowie in der Reinkultur mit *S. aureus* verbraucht wurde. Darüber hinaus war die Rate des Glutaminverbrauchs bei *P. aeruginosa* in der Reinkultur mit der in der Mischkultur vergleichbar.

Für *B. cepacia* führte die Co-Kultivierung mit *P. aeruginosa* zu einem Wachstumsstopp unmittelbar nach der exponentiellen Wachstumsphase. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf eine Inhibierung durch *P. aeruginosa* durch das Freisetzen von Pyozinen zurückzuführen. Für den in den Untersuchungen eingesetzten PAO1-Stamm ist bekannt, dass er Pyozine produziert (Michel-Briand and Baysse 2002; Nakayama et al. 2000; Waite and Curtis 2009), die die Synthese von DNS, RNS und Proteinen in Bakterien anderer Spezies inhibieren können (Kaziro and Tanaka 1965a; Kaziro and Tanaka 1965b). Zudem stellten Bakkal *et al.* in ihrer Studie fest, dass Pyozine von *P. aeruginosa* eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von *B. cepacia* hatten (Bakkal et al. 2010). Für die in dieser Arbeit betrachtete Mischkultur ist ein Nachweis über die Bildung von Pyozinen und deren Effekte auf *B. cepacia* noch zu erbringen.

Die Abnahme der Zellkonzentration von *B. cepacia* in Mischkulturen mit *P. aeruginosa* zum Ende der Kultivierung, die mittels qT-RFLP erfasst wurde, kann eventuell durch eine Induzierung der Autolyse von *B. cepacia* durch Pyozin erklärt werden. In Anbetracht dessen, dass für die Drei-Spezies-Mischkultur mit der DZM für *B. cepacia* kein abnehmender Trend bei den Konzentrationen verzeichnet wurde, sind weitere Versuche zur Verifizierung der Konzentrationsverläufe in diesen Mischkulturen durchzuführen.

Über alle Kulturen mit *S. aureus* betrachtet, waren das Wachstum und die Phasen des Wachstums dieser Spezies in Misch- und Reinkultur im Wesentlichen miteinander vergleichbar. Eine Wachstumsinhibierung in Mischkulturen mit *P. aeruginosa* und *B. cepacia*, wie in vorausgegangenen Studien in der Fachgruppe in ähnlichen Drei-Spezies-Mischkulturen festgestellt wurde (Kluge et al. 2012; Riedele and Reichl 2011), war nicht zu verzeichnen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen wurden im Unterschied zu denen von Riedele und Reichl (Riedele and Reichl 2011) mit den Spezies mit jeweils einer um eine Log-Stufe verringerten Startzellkonzentration inokuliert. Das in den Mischkulturen eingestellte Verhältnis zwischen den Spezies (1:1:1 bzw. 1:1) stimmte wiederum überein. Das bessere Wachstum von *S. aureus* in den hier durchgeführten

Mischkulturen ist daher wahrscheinlich auf die niedrigere Startzellkonzentration und damit verbunden auf das höhere Verhältnis Substrat zu Biomasse zurückzuführen (Kovárová-Kovar and Egli 1998).

Im weiteren Kultivierungsverlauf hatte die Co-Kultivierung von *S. aureus* mit *P. aeruginosa* eine Reduzierung der Zellkonzentration von *S. aureus* mit der Zeit, nach der Wachstumsphase, zur Folge. Diese Abnahme der Zellkonzentration ist wahrscheinlich auf den Effekt von bakteriziden oder lytisch-aktiven Substanzen, die von der konkurrierenden Spezies *P. aeruginosa* freigesetzt wurden, zurückzuführen. *P. aeruginosa* ist für die Produktion solcher Virulenzfaktoren bekannt. Hervorzuheben sind Phenazine, die eine bakterizide Wirkung auf *S. aureus* haben (Baron and Rowe 1981; Biswas et al. 2009) und die Protease LasA, die zur Lyse von *S. aureus* führen kann (Kessler et al. 1993). Ferner können Peptidoglycan-Fragmente aus der Zellwand von *S. aureus*, die eventuell infolge von Lyse im Kulturmedium angereichert wurden, *P. aeruginosa* zur Bildung von N-Acyl-Homoserin-Lactone (AHLs) stimuliert haben (Korgaonkar et al. 2013; Korgaonkar and Whiteley 2011). AHLs sind wiederum für ihre lytische Wirkung gegenüber *S. aureus* bekannt (Machan et al. 1992; Voggu et al. 2006). Des Weiteren weisen auch die Ergebnisse aus der Proteomics-Studie von Kluge et al. auf eine Verdrängung von *S. aureus* in Mischkulturen durch *P. aeruginosa* hin (Kluge et al. 2012). Die in der Mischkultur für *P. aeruginosa* als erhöht nachgewiesenen Expressionslevel von PhenazinS, PhenazinD und PhenazinG2 deuten auf die Induktion der Phenazinsynthese in der Mischkultur hin (Kluge et al. 2012). Zudem wiesen die Autoren für *S. aureus* eine erhöhte Expression einer Alkylhydroperoxid-Reduktase in der Mischkultur nach, die bei dieser Spezies in der Regel zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber oxidativen Stress beiträgt (Kluge et al. 2012).

Darüber hinaus ist in der Drei-Spezies-Mischkultur vorstellbar, dass *B. cepacia* durch Freisetzung von Virulenzfaktoren ebenfalls zur Lyse von *S. aureus* beitragen könnte. Aus der Untersuchung der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *S. aureus* gingen jedoch keine Hinweise auf derartige Effekte hervor.

Im Ergebnis der durchflusszytometrischen Bestimmung der Vitalität der einzelnen Spezies in Rein- und Mischkulturen wurden für die Spezies Variationen in der Vitalität in Abhängigkeit von der Wachstumsphase sowie zwischen Misch- und Reinkulturen festgestellt.

Die Reduzierung der Vitalität der Bakterien in Reinkultur während der stationären Wachstumsphase, wie für *P. aeruginosa* und *S. aureus* nachgewiesen wurde, kann höchstwahrscheinlich auf die Erschöpfung von Substraten im Kulturmedium, einschließlich freigesetzter verwertbarer Metabolite, zurückgeführt werden. Einen starken Hinweis darauf geben die gemessene Abnahme der Glukose-, Glutamin- und Glutamatkonzentration von 0 h bis 8 h sowie die Abnahme der Konzentration an Gluconat- und 2-KDG von 8 h bis 12 h, jeweils bis unterhalb der Nachweisgrenze. Mit der Erschöpfung von Substraten kommt die metabolische Aktivität bzw. die Energiegewinnung der Bakterien zum Erliegen, was letztendlich mit fortlaufender Zeit zur Permeabilisierung der Zellmembranen der Bakterien führen kann (Nebe-von-Caron and Badley 1995). Die Abnahme der Anzahl vermehrungsfähiger Bakterien mit der Erschöpfung von Substraten wurde bei Untersuchungen mit *S. aureus* deutlich. Während der Kultivierung in Reinkultur nahm nach 12 h die LZK ab. Gleichzeitig nahm auch die VZK mit vergleichbarer Rate ab. Da die VZK stets höher als die LZK war, kann auf eine gleichzeitige Abnahme vitaler aber nicht kultivierbarer Bakterien (auch VBNC-Bakterien genannt, engl. *viable but not culturable bacteria*, siehe (Oliver 2005)), u.a. metabolisch aktiver aber nicht vermehrungsfähiger Zellen, geschlossen werden.

Im Falle von *B. cepacia* blieb die Vitalität in der Reinkultur trotz Erschöpfung von Glukose, Glutamin und Glutamat sowie von Gluconat- und 2-KDG im Kulturmedium über die gesamte Kultivierungszeit nahezu konstant auf einem hohen Niveau. Die Aufrechterhaltung eines hohen Anteils an vitalen Bakterien in der Population kann vermutlich durch das Wachstum von *B. cepacia* über die gesamte betrachtete Kultivierungsdauer, wie mittels qT RFLP-Analyse festgestellt wurde, erklärt werden. *B. cepacia* ist für seine hohe Vielseitigkeit hinsichtlich der zu verwertenden organischen Verbindungen zum Wachstum bekannt (Madigan and Martinko 2006). Daher ist die Erklärung naheliegend, dass für *B. cepacia* neben Glutamin und Glutamat auch andere Aminosäuren im Kulturmedium als Substratquelle dienen.

Die für alle Spezies erfasste Reduzierung der Vitalität der Bakterien während der exponentiellen Wachstumsphase in Reinkulturen kann durch falsch-positive mit PI gefärbte Bakterien erklärt werden. Solche Färbungen sind vermutlich auf die Penetration von PI in die Zelle, bei kurzzeitiger Perforation der Zellmembranen, während der Zellteilung und der Zellwandsynthese zurückzuführen (David et al. 2012; Sträuber and Müller 2010).

Die Detektion einer zusätzlichen Population für *S. aureus*, der Bakterien mit partiell beschädigter Membran zugeordnet wurden, spiegelt vermutlich einen Übergangszustand beim Verlust der Membranintegrität wider. Des Weiteren deutet dies bei *S. aureus* auf einen im Vergleich zu *P. aeruginosa* und *B. cepacia* langsameren Prozess, bei dem die Zytoplasmamembran vollständig permeabilisiert wird, hin. Diese Unterschiede sind höchstwahrscheinlich auf die Unterschiede zwischen der Zellwandstruktur Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien zurückzuführen.

Für *S. aureus* war typisch, dass die Reduzierung der Anzahl vitaler Bakterien in Kulturen zunächst mit der Zunahme der relativen Häufigkeit beschädigter Bakterien einherging und erst später die relative Häufigkeit toter Bakterien zunahm. Die relative Häufigkeit beschädigter Bakterien nahm wiederum gegen Ende der Kultivierungen ab. Dieses Ergebnis passt sehr gut zu den Einschätzungen anderer Autoren bei der Vitalitätsuntersuchung von Bakterien, dass nach einer Schädigung der Zelle der Verlust der Membranintegrität das letzte zu detektierende Vitalitätsmerkmal darstellt (Berney et al. 2006; Lisle et al. 1999).

Die Mischkultivierung hatte keinen Effekt auf die Vitalität von *P. aeruginosa*. Das mit der Reinkultur vergleichbar hohe Vitalitätslevel der Bakterien, über die gesamte Kultivierungsdauer, ist vermutlich auf die sehr guten Wachstumsbedingungen in den Mischkulturen zurückzuführen.

In Übereinstimmung mit *P. aeruginosa* wurde für *B. cepacia* auch kein Effekt der Mischkultivierung auf die Vitalität festgestellt. Dies unterstützt die weiter vorn gemachte Vermutung, dass die Abnahme der Zellkonzentration von *B. cepacia* durch Autolyse hervorgerufen wurde.

Die im Vergleich zur Reinkultur deutlich frühere Reduzierung der Vitalität von *S. aureus* sowie das final niedrigere Vitalitätslevel bei Co-Kultivierung mit *P. aeruginosa* und *B. cepacia* (in Zwei- und Drei-Spezies-Mischkultur) resultierten höchstwahrscheinlich aus antagonistischen Spezies-zu-Spezies-Interaktionen der Gram-negativen Bakterien auf *S. aureus*. Konkret kann der in der Mischkultur verstärkte Effekt der Reduzierung der Membranintegrität durch Permeabilisierung der Membran durch von *P. aeruginosa* freigesetzte Phenazine, wie bereits weiter vorn im Text beschrieben wurde, eventuell aber auch durch von *B. cepacia* freigesetzte Peptidoglycan-Hydrolasen (Allan et al. 2003) erklärt werden.

Die für *S. aureus* gemessene Zunahme der relativen Häufigkeit toter Bakterien und gleichzeitige Abnahme der Zellkonzentration in der Zwei-Spezies-Mischkultur sowie in der Drei-Spezies-Mischkultur mit *P. aeruginosa* ist ein Hinweis darauf, dass *S. aureus*-Zellen durch *P. aeruginosa* lysiert wurden. Durch *P. aeruginosa* freigesetzte Proteasen LasA und AHLs führten vermutlich, wie bereits vorn erläutert, zur Lyse der Gram-positiven Bakterien.

Dagegen ergaben sich aus Untersuchungen keine Hinweise auf eine Lyse von *S. aureus* durch *B. cepacia*.

Das Ergebnis, dass für *S. aureus* während der Kultivierung die zeitliche Entwicklung der Anteile vitaler, beschädigter und toter Zellen in der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *P. aeruginosa* und der Drei-Spezies-Mischkultur vergleichbar war, ist ein weiterer Hinweis auf einen vorherrschenden Antagonismus in der Drei-Spezies-Mischkultur von *P. aeruginosa* auf *S. aureus*.

Darüber hinaus deuten die ermittelten Unterschiede in der Dynamik der Vitalitätspopulationen von *S. aureus* zwischen der Zwei-Spezies-Mischkultur mit *P. aeruginosa* und der mit *B. cepacia* auf Variationen im Zellbeschädigungsprozess von *S. aureus* durch *P. aeruginosa* und *B. cepacia*. Insbesondere können daraus Variationen in der Dauer des Beschädigungsvorgangs, bis zur vollständigen Permeabilisierung der Zellmembran von *S. aureus*, abgeleitet werden.

Während die Wachstumsdynamik und die Zeitverläufe von Gluconat und 2-KDG in der Drei-Spezies-Mischkultur auf eine Nahrungskette zwischen *B. cepacia* und *P. aeruginosa*, wie vorn beschrieben, hindeuteten, lieferten die Daten aus der Wachstums-, Vitalitäts- und Metabolismusanalyse keine Hinweise auf Interspezies-Interaktionen mit der Charakteristik einer Probiose oder einer Symbiose.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch den Vergleich der Ergebnisse zwischen Reinkultur- und Mischkulturexperimenten deutliche Unterschiede für jede Spezies im Wachstumsverhalten sowie für *S. aureus* in der zeitlichen Entwicklung der Vitalität aufgezeigt wurden, die auf Interspezies-Interaktionen in den Mischkulturen schließen ließen. Diese wurden von Substratkonkurrenz und Antagonismus bestimmt. *P. aeruginosa* war den anderen beiden Spezies in den untersuchten Mischkulturen unter den gewählten Kultivierungsbedingungen überlegen. Insbesondere dominierte *P. aeruginosa* nach 8 h Kultivierung

zahlenmäßig die betreffenden Mischkulturen. Zur Überlegenheit von *P. aeruginosa* gegenüber den anderen beiden Spezies trugen im Wesentlichen das bessere Wachstum, eine schnellere Substrataufnahme und antagonistische Effekte von *P. aeruginosa* auf *B. cepacia* und *S. aureus* bei. Diese Effekte können höchstwahrscheinlich auf die Bildung bzw. Freisetzung von Virulenzfaktoren zurückgeführt werden, die mit fortschreitender Kultivierungsdauer zur Wachstumsinhibierung von *B. cepacia* sowie zur Verdrängung von *S. aureus* aus der Kultur führten. Interessanterweise wurde bei Patienten mit CF häufig ebenfalls festgestellt, dass in fortgeschrittenen Lungeninfektionen Bakterien der Spezies *P. aeruginosa* die Mischgemeinschaft zahlenmäßig dominieren (Cox et al. 2010; Hauser et al. 2011; Yang et al. 2011). *P. aeruginosa* scheint somit den Spezies *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturen unter variierenden Wachstumsbedingungen überlegen zu sein.

6. Zusammenfassung

Die bereits etablierte und validierte qT-RFLP-Methode erlaubt die Quantifizierung absoluter Zellzahlen der Bakterienspezies *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in für Lungeninfektionen von CF-Patienten relevanten Modell-Mischkulturen. Diese Methode liefert jedoch keine Vitalitätsdaten, die bei der Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika auf CF-relevante bakterielle Mischgemeinschaften von großem Interesse sind, insbesondere wenn die Zellschäden nicht zur Lyse, sondern zum Verlust wesentlicher zellulärer Funktionen, wie z.B. der Membranintegrität, führen.

In der vorgelegten Arbeit wurde eine Methode zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Spezies-spezifischen Vitalität von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturen etabliert. Die Vitalität der Bakterien wurde durch den Nachweis der Membranintegrität der Zellen durch Einsatz der Nukleinsäurenbindenden Farbstoffe SYBR Green I und PI bestimmt. PI diente zur Identifikation toter Bakterien und SYBR Green I zur Markierung aller Bakterien. Diese Doppelfärbung erlaubte somit den gleichzeitigen Nachweis von toten und vitalen Bakterien mit permeabilisierter bzw. intakter Membran. Voraussetzung für die Vitalitätsbestimmung von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturen war die Etablierung fluoreszenzbasierter Färbemethoden zur Spezies-spezifischen durchflusszytometrischen Detektion. Durch Einsatz spezifisch gegen *B. cepacia* bindender PAK in Kombination mit fluoreszenzkonjugierter SAK wurde die Detektion von *B. cepacia* mittels Immunfluoreszenz etabliert. Zusätzlich wurde die Gram-spezifische Detektion von *S. aureus* mittels WGA-vermittelter Fluoreszenz erarbeitet. Die Kombination beider Methoden mit der SYBR Green I- / PI-Färbemethode erlaubte in der durchflusszytometrischen Analyse von Mischkulturproben die eindeutige Diskriminierung der drei Spezies voneinander und die Bestimmung der Spezies-spezifischen Vitalität. Vorausgegangen waren Einzelfärbetests separat für jede Spezies, in denen die Färbebedingungen angepasst wurden. Für jede Spezies wurden optimale Färbeergebnisse durch Auswahl von Puffern und Lösungen, in denen die Bakterien suspendiert, verdünnt und gefärbt wurden und durch die Anpassung der eingesetzten Menge an Farbstoff bzw. fluoreszenzkonjugiertem Protein (WGA bzw. AK) erzielt. Da die optimierten Bedingungen für die Färbung mit SYBR Green I und PI zwischen den Spezies teilweise variierten, wurden zur Vereinheitlichung des Färbeprotokolls zur Vitalitätsbestimmung von

Mischkulturproben Kompromissfärbebedingungen definiert. Der Einsatz von Ringerlösung mit GTA, KCl und BSA sowie von SYBR Green I mit einer Verdünnung von 5×10^3 und PI mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ wurde erfolgreich für jede Spezies für die Vitalitätsfärbung, Gram-Färbung von *S. aureus* (WGA CF405 S) und Immunfluoreszenzmarkierung von *B. cepacia* (R-PE AK) verifiziert. Durch Einsatz der etablierten Vierfarbenmethode in der DZM wurde die Vitalität von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Modell-Mischkulturen, bestehend aus zwei bzw. drei Spezies, während 32-stündiger Kultivierungen bestimmt. Zusätzlich wurde das Wachstum der Spezies durch Bestimmung der Zellkonzentration mittels der qT-RFLP-Methode erfasst. Anhand des Vergleichs der Ergebnisse von Rein- und Mischkulturen wurden Co-Kultivierungseffekte durch deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten jeder Spezies sowie für *S. aureus* in der zeitlichen Entwicklung der Vitalität nachgewiesen. Dabei konnte in den Mischkulturen auf Spezies-zu-Spezies-Interaktionen geschlossen werden, die von Substratkonkurrenz und Antagonismus bestimmt wurden. Insbesondere in Mischkulturen mit *B. cepacia* wuchs *P. aeruginosa* im Vergleich zu den Reinkulturen schneller und über längere Zeiträume. Zudem deuteten die Ergebnisse der Wachstums- und Vitalitätsanalyse der untersuchten Mischkulturen auf eine Verdrängung von *B. cepacia* und *S. aureus* aus den Kulturen hin. Während das Wachstum von *B. cepacia* in Mischkulturen durch *P. aeruginosa* inhibiert wurde, wurden Zellen von *S. aureus* durch *P. aeruginosa* beschädigt. Beides ist höchstwahrscheinlich auf die Freisetzung von Virulenzfaktoren durch *P. aeruginosa* zurückzuführen, die im Falle von *S. aureus* zur Permeabilisierung der Zellmembran aber auch zur Zellyse führten. Über alle Mischkulturen betrachtet, war *P. aeruginosa* den anderen beiden Spezies unter den gewählten Kultivierungsbedingungen überlegen und dominierte nach 8 h zahlenmäßig die Kulturen.

Der Einsatz der in dieser Arbeit etablierten Vierfarbenmethode für die DZM erlaubte zum ersten Mal die Beschreibung der Vitalitätsdynamik von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in Mischkulturen. Die Vitalitätsergebnisse trugen zum besseren Verständnis der zwischen den Spezies auftretenden Wechselbeziehungen bei. Darüber hinaus wurde mit der Arbeit das Potenzial der DZM für die quantitative Analyse von bakteriellen Mischkulturen mit der Bestimmung der Zellkonzentrationen in der Drei-Spezies-Mischkultur aufgezeigt.

7. Ausblick

Mit der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass sich die neu etablierte durchflusszytometrische Methode und die qT-RFLP-Methode bei gleichzeitiger Anwendung bestens für das Erfassen der Spezies-Verteilung, des Wachstums und der Vitalität der einzelnen Spezies in den CF-relevanten Modell-Mischkulturen eignen. In Anlehnung an die *time-kill*-Experimente von Riedele (Riedele 2013) könnte mit beiden Methoden der Effekt einer Behandlung der Mischkultur mit Antibiotika auf die einzelnen Spezies systematisch untersucht werden. Insbesondere könnten mit der erweiterten Mischkulturanalytik (DZM und qT-RFLP) jetzt auch Effekte von Antibiotika, die nicht zur Lyse oder zur Inhibierung des Wachstums sondern ausschließlich zum Verlust der Membranintegrität führen, nachgewiesen werden (Nachweis toter Bakterien). Da die von Riedele beschriebene Ceftazidim-Behandlung im Fall von *P. aeruginosa* mit morphologischen Veränderungen einherging (Kettenbildung, (Riedele 2013)), die die DZM-Analyse erschweren bzw. die Vitalitätsergebnisse verfälschen könnten, sind bei den Untersuchungen relevante Antibiotika mit anderen Wirkmechanismen einzusetzen.

Durch Vergleich von Mischkultur- mit Reinkulturexperimenten konnten anhand der für die Spezies festgestellten Variationen in der Wachstums- und Vitalitätsdynamik neue Erkenntnisse zu Interspezies-Interaktionen in der Mischkultur gewonnen werden. Zur besseren Auflösung der Mechanismen der gefundenen antagonistischen Interspezies-Effekte in den Mischkulturen, die zur Beschädigung der Bakterien führten, ist neben der Analyse der Membranintegrität der Nachweis weiterer Vitalitätsmerkmale zielführend. Durch Modifizierung der etablierten Vitalitätsfärbung könnte die bestehende DZM-Analytik um weitere Methoden für Untersuchungen der gleichen Mischkulturen erweitert werden. In Hinblick auf eine gute Vergleichbarkeit mit der bereits etablierten Methode sollte an der PI-Färbung zur Identifizierung toter Bakterien festgehalten werden. SYBR Green I müsste dann durch einen grün-fluoreszierenden Vitalitätsfarbstoff ersetzt werden. Hierbei sind insbesondere die Farbstoffe CFDA und bis-(1,3-Dibutyl-Barbitursäure) Trimethinoxonol (DiBAC₄(3)) in Betracht zu ziehen, die den Nachweis metabolisch aktiver Bakterien (Färbung durch intrazelluläre Esterasen-Aktivität) bzw. von Bakterien mit depolarisierter Membran, erlauben (Amor et al. 2002; Bunthof et al. 2001a; David et al. 2012; Papadimitriou et al. 2006). In diesem Zuge müssten für die neu zu etablierenden Vitalitätsfärbungen

geeignete Positiv- und Negativkontrollen, entsprechend dem mittels Färbung anzuzeigendem Vitalitätsmerkmal, erarbeitet werden (siehe Übersichten (Hammes et al. 2011; Joux and Lebaron 2000)).

Die Mechanismen der gefundenen antagonistischen Interspezies-Effekte könnten auf Basis der Erkenntnis von Mashburn *et al.*, dass *P. aeruginosa* *S. aureus* zur Gewinnung von Eisen lysieren kann (Mashburn et al. 2005), weiter ergründet werden. Dazu sollte in zukünftigen Studien der Einfluss von frei verfügbarem Eisen im Kulturmedium (durch Variation der Konzentration im Medium) auf das Wachstum und die Vitalität der einzelnen Spezies untersucht werden.

In der vorgelegten Arbeit konnte das Potenzial der DZM für die quantitative Analyse von bakteriellen Mischkulturen mit der Bestimmung der Zellkonzentrationen von *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* in der Drei-Spezies-Mischkultur aufgezeigt werden. Eine Optimierung und Validierung dieser schnellen DZM-Bestimmungsmethode (1 - 2 Tage) wäre in Anbetracht des bisherigen hohen zeitlichen Aufwandes bei der Durchführung von qT-RFLP-Analysen (2 - 3 Wochen) von großem Nutzen.

Für die Etablierung von neuen fluoreszenzbasierten Färbemethoden für die DZM-Analyse von Mischkulturen kann sich der in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Vorgehensweise zur Methodenentwicklung, ausgehend von Einzelfärbetests über Optimierungen bis zur Vereinheitlichung der Methode, prinzipiell bedient werden. Voraussetzung für die Etablierung einer leistungsfähigen Methode mit der präsentierten Vorgehensweise ist, dass die Spezies der Mischkulturen isoliert in Kulturen kultivierbar sind, damit die Fluoreszenzfarbstoffe und -marker einzeln für jede Spezies getestet werden können. Für andere (auch komplexere) Mischkulturen ist eine Spezies-spezifische Charakterisierung mittels DZM problematisch. Für solche Kulturen liegt das Potenzial der DZM eher in der Überwachung der Struktur der Mischgemeinschaft, in Abhängigkeit von der Zeit oder den Versuchsbedingungen, durch Erfassung der Änderung von Fluoreszenzsignalverteilungen bzw. -muster der markierten Gesamtpopulation (Fluoreszenzmustervergleiche, (Bombach et al. 2011; Koch et al. 2014). Hierbei scheint insbesondere der Ansatz des Bildvergleichs der zytometrischen Histogramme von Koch unter Anwendung einer automatischen Auswertesoftware zur Interpretation von Dynamiken in bakteriellen Mischkulturen (auch CHIC genannt, engl. *Cytometric Histogram Image Comparison*, (Koch et al. 2013)) vielversprechend zu sein.

Literaturverzeichnis

- Ackermann J, Müller S, Lösche A, Bley T, Babel W. 1995. *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. *Journal of Biotechnology* 39(1):9-20.
- Akiyama H, Huh WK, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. 2002. Confocal laser microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in vitro. *Journal of Dermatological Science* 29(1):54-61.
- Allan ND, Kooi C, Sokol PA, Beveridge TJ. 2003. Putative virulence factors are released in association with membrane vesicles from *Burkholderia cepacia*. *Canadian Journal of Microbiology* 49(10):613-624.
- Alonso-Sáez L, Gasol JM, Lefort T, Hofer J, Sommaruga R. 2006. Effect of Natural Sunlight on Bacterial Activity and Differential Sensitivity of Natural Bacterioplankton Groups in Northwestern Mediterranean Coastal Waters. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9):5806-5813.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6):1919-1925.
- Amor KB, Breeuwer P, Verbaarschot P, Rombouts FM, Akkermans ADL, De Vos WM, Abee T. 2002. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Applied and Environmental Microbiology* 68(11):5209-5216.
- Assunção P, Antunes NT, Rosales RS, Poveda C, De La Fe C, Poveda JB, Davey HM. 2007. Application of flow cytometry for the determination of minimal inhibitory concentration of several antibacterial agents on *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology* 102(4):1132-1137.
- AuCoin DP, Crump R, Thorkildson P, Nuti D, LiPuma J, Kozel T. 2009. Identification of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) bacteria with a lipopolysaccharide specific monoclonal antibody. *Journal of Medical Microbiology* 59 (Pt1):41-47.
- Baena-Ruano S, Jiménez-Ot C, Santos-Dueñas IM, Cantero-Moreno D, Barja F, García-García I. 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry* 41(5):1160-1164.
- Bakkal S, Robinson SM, Ordonez CL, Waltz DA, Riley MA. 2010. Role of bacteriocins in mediating interactions of bacterial isolates taken from cystic fibrosis patients. *Microbiology* 156(7):2058-2067.
- Baldock D, Nebe-von-Caron G, Bongaerts R, Nocker A. 2013. Effect of acidic pH on flow cytometric detection of bacteria stained with SYBR Green I and their distinction from background. *Methods and Applications in Fluorescence* 1(4):045001.
- Barbesti S, Citterio S, Labra M, Baroni MD, Neri MG, Sgorbati S. 2000. Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. *Cytometry* 40(3):214-218.
- Barnett JM, Cuchens MA, Buchanan W. 1984. Automated Immunofluorescent Speciation of Oral Bacteria Using Flow Cytometry. *Journal of Dental Research* 63(8):1040-1042.
- Baron SS, Rowe JJ. 1981. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 20(6):814-820.

- Bast E. 2001. Mikrobiologische Methoden. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 492 p.
- Bejarano EM, Schneider RP. 2004. Use of fluorescent lectin probes for analysis of footprints from *Pseudomonas aeruginosa* MDC on hydrophilic and hydrophobic glass substrata. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7):4356-4362.
- Bensch G, Rüger M, Wassermann M, Weinholz S, Reichl U, Cordes C. 2014. Flow cytometric viability assessment of lactic acid bacteria starter cultures produced by fluidized bed drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*:1-13.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann H-U, Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 73(10):3283-3290.
- Berney M, Weilenmann H-U, Egli T. 2006. Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Microbiology* 152(6):1719-1729.
- Biswas L, Biswas R, Schlag M, Bertram R, Götz F. 2009. Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 75(21):6910-6912.
- Bombach P, Hübschmann T, Fetzer I, Kleinstaub S, Geyer R, Harms H, Müller S. 2011. Resolution of natural microbial community dynamics by community fingerprinting, flow cytometry, and trend interpretation analysis. In: Müller S, Bley T, editors. High resolution microbial single cell analytics. Berlin / Heidelberg: Springer. p 151-181.
- Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 109(4):1139-1149.
- Bouhdid S, Abrini J, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 106(5):1558-1568.
- Bouix M, Ghorbal S. 2013. Rapid enumeration of *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation by flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology* 114(4):1075-1081.
- Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37(1):77-86.
- Breeuwer P, Abee T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology* 55(1-3):193-200.
- Brown S, Santa Maria JP, Walker S. 2013. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 67:1-28.
- Bunthof CJ, Bloemen K, Breeuwer P, Rombouts FM, Abee T. 2001a. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67(5):2326-2335.

- Bunthof CJ, van Schalkwijk S, Meijer W, Abee T, Hugenholtz J. 2001b. Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. *Applied and Environmental Microbiology* 67(9):4264-4271.
- Button DK, Robertson BR. 2001. Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4):1636-1645.
- Cheung KC, Di Berardino M, Schade-Kampmann G, Hebeisen M, Pierzchalski A, Bocsi J, Mittag A, Tárnok A. 2010. Microfluidic impedance-based flow cytometry. *Cytometry Part A* 77A(7):648-666.
- Christiansen T, Michaelsen S, Wümpelmann M, Nielsen J. 2003. Production of savinase and population viability of *Bacillus clausii* during high-cell-density fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* 83(3):344-352.
- Clarke RG, Pinder AC. 1998. Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. *Journal of Applied Microbiology* 84(4):577-584.
- Comas J, Vives-Rego J. 1998. Enumeration, viability and heterogeneity in *Staphylococcus aureus* cultures by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* 32(1):45-53.
- Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly RA, Karaoz U, Andersen GL, Brown R, Fujimura KE and others. 2010. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* 5(6):e11044.
- Davey HM, Kell DB. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews* 60(4):641-696.
- David F, Hebeisen M, Schade G, Franco-Lara E, Di Berardino M. 2012. Viability and membrane potential analysis of *Bacillus megaterium* cells by impedance flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering* 109(2):483-492.
- Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J. 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry* 117(1):41-51.
- Diaper JP, Edwards C. 1994. Survival of *Staphylococcus aureus* in lakewater monitored by flow cytometry. *Microbiology* 140(1):35-42.
- Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48(3):385-407.
- Doig P, Smith NR, Todd T, Irvin RT. 1987. Characterization of the binding of *Pseudomonas aeruginosa* alginate to human epithelial cells. *Infection and Immunity* 55(6):1517-1522.
- Donnelly CW, Baigent GJ. 1986. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 52(4):689-695.
- Döring G. 1987. Significance of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors for acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Infection* 15(1):47-50.
- Döring G, Gulbins E. 2009. Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cellular Microbiology* 11(2):208-216.
- Doyle RJ, McDannel ML, Streips UN, Birdsell DC, Young FE. 1974. Polyelectrolyte nature of bacterial teichoic acids. *Journal of Bacteriology* 118(2):606-615.
- Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. 2012. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence* 22(4):1189-1199.

- Drevinek P, Mahenthiralingam E. 2013. Burkholderia. In: de Filippis I, McKee ML, editors. Molecular typing in bacterial infections. Totowa NJ: Humana Press p301-308.
- Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui L-C, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM. 1990. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62(6):1227-1233.
- Duhamel S, Gregori G, Van Wambeke F, Mauriac R, Nedoma J. 2008. A method for analysing phosphatase activity in aquatic bacteria at the single cell level using flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* 75(2):269-278.
- Evans ME, Pollack M, Hardegen NJ, Koles NL, Guelde G, Chia JKS. 1990. Fluorescence-activated cell sorter analysis of binding by lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies to gram-negative bacteria. *Journal of Infectious Diseases* 162(1):148-155.
- Falcioni T, Manti A, Boi P, Canonico B, Balsamo M, Papa S. 2006. Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 70B(3):149-153.
- Falcioni T, Papa S, Gasol JM. 2008. Evaluating the flow-cytometric nucleic acid double-staining protocol in realistic situations of planktonic bacterial death. *Applied and Environmental Microbiology* 74(6):1767-1779.
- Faria-Ramos I, Costa-de-Oliveira S, Barbosa J, Cardoso A, Santos-Antunes J, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. 2012. Detection of Legionella pneumophila on clinical samples and susceptibility assessment by flow cytometry. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31(12):3351-3357.
- Ferreira MT, Manso AS, Gaspar P, Pinho MG, Neves AR. 2013. Effect of oxygen on glucose metabolism: utilization of lactate in Staphylococcus aureus as revealed by in vivo NMR studies. *PLoS ONE* 8(3):e58277.
- Fischer L. 1998. Proteinbestimmungen. In: Lottspeich F, Zorbas H, editors. Bioanalytik. Heidelberg / Berlin: Spektrum Akademischer Verlag. p 35-48.
- Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods* 91(2):276-289.
- Foladori P, Bruni L, Tamburini S, Ziglio G. 2010. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Research* 44(13):3807-3818.
- Forsgren A, Sjöquist J. 1966. "Protein A" from S. aureus: I. pseudo-immune reaction with human γ -globulin. *The Journal of Immunology* 97(6):822-827.
- Frizzell RA, Rechkemmer G, Shoemaker RL. 1986. Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. *Science* 233(4763):558-560.
- Fuchs G, Schlegel HG. 2007. Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 678 p.
- Füchslin HP, Kötzsch S, Keserue H-A, Egli T. 2010. Rapid and quantitative detection of Legionella pneumophila applying immunomagnetic separation and flow cytometry. *Cytometry Part A* 77A(3):264-274.
- Gardner JF, Lascelles J. 1962. The requirement for acetate of a Streptomycin-resistant strain of Staphylococcus aureus. *Journal of General Microbiology* 29(1):157-164.
- Garimella R, Halye JL, Harrison W, Klebba PE, Rice CV. 2009. Conformation of the phosphate D-alanine zwitterion in bacterial teichoic acid from nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 48(39):9242-9249.

- Gatermann S. 2009. Staphylokokken. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin / Heidelberg: Springer. p 187-197.
- Gensberger ET, Sessitsch A, Kostić T. 2013. Propidium monoazide–quantitative polymerase chain reaction for viable *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* detection from abundant background microflora. *Analytical Biochemistry* 441(1):69-72.
- George AM, Jones PM, Middleton PG. 2009. Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiology Letters* 300(2):153-164.
- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168(8):918-951.
- Gilligan PH. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4(1):35-51.
- Givan AL. 2001. *Flow Cytometry: First Principles*. New York: 2nd edition, John Wiley & Sons. 261 p.
- Goldstein IJ, Hayes CE. 1978. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. In: Tipson RS, Derek H, editors. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*: Academic Press. p 127-340.
- Goldstein IJ, Hollerman CE, Merrick JM. 1965a. Protein-carbohydrate interaction I. the interaction of polysaccharides with concanavalin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 97(1):68-76.
- Goldstein IJ, Hollerman CE, Smith EE. 1965b. Protein-carbohydrate interaction. II. inhibition studies on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides. *Biochemistry* 4(5):876-883.
- Govan JR, Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews* 60(3):539-574.
- Govan JRW, Hughes JE, Vandamme P. 1996. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *Journal of Medical Microbiology* 45(6):395-407.
- Greger R, Mall M, Bleich M, Ecke D, Warth R, Riedemann N, Kunzelmann K. 1996. Regulation of epithelial ion channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Journal of Molecular Medicine* 74(9):527-534.
- Gregori G, Citterio S, Ghiani A, Labra M, Sgorbati S, Brown S, Denis M. 2001. Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10):4662-4670.
- Hammes F, Berney M, Egli T. 2011. Cultivation-independent assessment of bacterial viability. In: Müller S, Bley T, editors. *High resolution microbial single cell analytics*. Berlin / Heidelberg: Springer. p 123-150.
- Hammes F, Berney M, Wang Y, Vital M, Köster O, Egli T. 2008. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research* 42(1–2):269-277.
- Harris JK, De Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, Kaess H, Deterding RR, Accurso FJ, Pace NR. 2007. Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(51):20529-20533.
- Harrison F. 2007. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153(4):917-923.

- Haugland RP. 2002. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Eugene: Molecular Probes, Inc. 966 p.
- Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 24(1):29-70.
- Hedal M, Norland S, Bratback G, Riemann B. 1994. Determination of bacterial cell number and cell volume by means of flow cytometry, transmission electron microscopy, and epifluorescence microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 20(4):255-263.
- Henningson EW, Krocova Z, Sandström G, Forsman M. 1998. Flow cytometric assessment of the survival ratio of *Francisella tularensis* in aerobiological samples. *FEMS Microbiology Ecology* 25(3):241-249.
- Hewitt CJ, Nebe-Von-Caron G. 2004. The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state. Physiological stress responses in bioprocesses. Berlin / Heidelberg: Springer p197-223.
- Hewitt CJ, Nebe-Von Caron G, Nienow AW, McFarlane CM. 1999. Use of multi-staining flow cytometry to characterise the physiological state of *Escherichia coli* W3110 in high cell density fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 63(6):705-711.
- Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP. 2003. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods* 55(3):585-597.
- Holm C, Jespersen L. 2003. A flow-cytometric gram-staining technique for milk-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69(5):2857-2863.
- Holm C, Mathiasen T, Jespersen L. 2004. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *Journal of Applied Microbiology* 97(5):935-941.
- Horobin R, Stockert J, Rashid-Doubell F. 2006. Fluorescent cationic probes for nuclei of living cells: why are they selective? A quantitative structure–activity relations analysis. *Histochemistry and Cell Biology* 126(2):165-175.
- Hughes EE, Gilleland Jr HE, Matthews-Greer JM. 1996. Analysis by flow cytometry of surface-exposed epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology* 42(8):859-862.
- Hullar MAJ, Kaplan LA, Stahl DA. 2006. Recurring seasonal dynamics of microbial communities in stream habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1):713-722.
- Iandolo JJ. 2000. Staphylococcus. In: Lederberg J, editor. *Encyclopedia of microbiology*, volume 4, 2nd edition. San Diego: Academic Press. p 387-393.
- Inganäs M, Johansson SGO, Bennich HH. 1980. Interaction of human polyclonal IgE and IgG from different species with protein A from *Staphylococcus aureus*: demonstration of Protein-A-reactive sites located in the Fab2 fragment of human IgG. *Scandinavian Journal of Immunology* 12(1):23-31.
- Johnson DR, Czechowska K, Chèvre N, Van Der Meer JR. 2009. Toxicity of triclosan, penconazole and metalaxyl on *Caulobacter crescentus* and a freshwater microbial community as assessed by flow cytometry. *Environmental Microbiology* 11(7):1682-1691.
- Joux F, Lebaron P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* 2(12):1523-1535.

- Kapuscinski J. 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70(5):220-233.
- Katsivela E, Moore E, Maroukli D, Strömpl C, Pieper D, Kalogerakis N. 2005. Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. *Biodegradation* 16(2):169-180.
- Kaziro Y, Tanaka M. 1965a. Studies on the mode of action of pyocin: I. inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Journal of Biochemistry* 57(5):689-695.
- Kaziro Y, Tanaka M. 1965b. Studies on the mode of action of pyocin: II. inactivation of ribosomes. *Journal of Biochemistry* 58(4):357-363.
- Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE. 1993. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *Journal of Biological Chemistry* 268(10):7503-7508.
- Klebensberger J, Lautenschlager K, Bressler D, Wingender J, Philipp B. 2007. Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy. *Environmental Microbiology* 9(9):2247-2259.
- Kleinstaub S, Schleinitz KM, Breifeld J, Harms H, Richnow HH, Vogt C. 2008. Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 66(1):143-157.
- Klepac-Ceraj V, Lemon KP, Martin TR, Allgaier M, Kembel SW, Knapp AA, Lory S, Brodie EL, Lynch SV, Bohannon BJM and others. 2010. Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 12(5):1293-1303.
- Kluge S, Hoffmann M, Benndorf D, Rapp E, Reichl U. 2012. Proteomic tracking and analysis of a bacterial mixed culture. *PROTEOMICS* 12(12):1893-1901.
- Knowles MR, Boucher RC. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of Clinical Investigation* 109(5):571-577.
- Koch C, Fetzer I, Harms H, Müller S. 2013. CHIC—an automated approach for the detection of dynamic variations in complex microbial communities. *Cytometry Part A* 83A(6):561-567.
- Koch C, Harnisch F, Schröder U, Müller S. 2014. Cytometric fingerprints: evaluation of new tools for analyzing microbial community dynamics. *Frontiers in Microbiology* 5:article 273: 1-12.
- Korgaonkar A, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M. 2013. Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(3):1059-1064.
- Korgaonkar AK, Whiteley M. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* enhances production of an antimicrobial in response to N-acetylglucosamine and peptidoglycan. *Journal of Bacteriology* 193(4):909-917.
- Kovárová-Kovar K, Egli T. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3):646-666.
- Kramer M, Obermajer N, Bogovič Matijašić B, Rogelj I, Kmetec V. 2009. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(6):1137-1147.

- Lahtinen SJ, Gueimonde M, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Salminen SJ. 2006. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiology* 23(6):571-577.
- Lange JL, Thorne PS, Lynch N. 1997. Application of flow cytometry and fluorescent in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4):1557-1563.
- Lebaron P, Parthuisot N, Catala P. 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology* 64(5):1725-1730.
- Lee JA, Spidlen J, Boyce K, Cai J, Crosbie N, Dalphin M, Furlong J, Gasparetto M, Goldberg M, Goralczyk EM and others. 2008. MIFlowCyt: The minimum information about a flow cytometry experiment. *Cytometry Part A* 73A(10):926-930.
- Leive L. 1965. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 21(4):290-296.
- Lessie TG, Phibbs PV. 1984. Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annual Review of Microbiology* 38(1):359-388.
- Li XZ, Livermore DM, Nikaido H. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(8):1732-1741.
- LiPuma JJ. 1998. *Burkholderia cepacia* epidemiology and pathogenesis: Implications for infection control. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 4(6):337-341.
- Lisle JT, Pyle BH, McFeters GA. 1999. The use of multiple indices of physiological activity to assess viability in chlorine disinfected *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 29(1):42-47.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63(11):4516-4522.
- Ljungberg UK, Jansson B, Niss U, Nilsson R, Sandberg BEB, Nilsson B. 1993. The interaction between different domains of staphylococcal protein a and human polyclonal IgG, IgA, IgM and F(ab')₂: Separation of affinity from specificity. *Molecular Immunology* 30(14):1279-1285.
- Lloyd D. 1993. *Flow cytometry in microbiology*. London: Springer-Verlag Ltd. 188 p.
- Løvdaal T, Hovda MB, Björkblom B, Møller SG. 2011. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *Journal of Microbiological Methods* 85(2):164-169.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2002. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 15(2):194-222.
- Machan ZA, Taylor GW, Pitt TL, Cole PJ, Wilson R. 1992. 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30(5):615-623.
- Madigan MT, Martinko JM. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edition. Upper Saddle River: Pearson Education, Inc. 1056 p.
- Mahenthalingam E, Urban TA, Goldberg JB. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Micro* 3(2):144-156.
- Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaulot D. 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using

- the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology* 63(1):186-193.
- Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, Whiteley M. 2005. *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *Journal of Bacteriology* 187(2):554-566.
- Mason DJ, Mortimer FC, Gant VA. 2001. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *Current protocols in cytometry*: John Wiley & Sons, Inc.
- Michel-Briand Y, Baysse C. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84(5-6):499-510.
- Miyayama K, Takano S, Morono Y, Hori K, Unno H, Tanji Y. 2007. Optimization of distinction between viable and dead cells by fluorescent staining method and its application to bacterial consortia. *Biochemical Engineering Journal* 37(1):56-61.
- Monfort P, Baleux B. 1992. Comparison of flow cytometry and epifluorescence microscopy for counting bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry* 13(2):188-192.
- Morono Y, Takano S, Miyayama K, Tanji Y, Unno H, Hori K. 2004. Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. *Biotechnology Letters* 26(5):379-383.
- Morris JD, Hewitt JL, Wolfe LG, Kamatkar NG, Chapman SM, Diener JM, Courtney AJ, Leevy WM, ShROUT JD. 2011. Imaging and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* swarming and rhamnolipid production. *Applied and Environmental Microbiology* 77(23):8310-8317.
- Müller S. 2007. Modes of cytometric bacterial DNA pattern: a tool for pursuing growth. *Cell Proliferation* 40(5):621-639.
- Müller S, Babel W. 2003. Analysis of bacterial DNA patterns—an approach for controlling biotechnological processes. *Journal of Microbiological Methods* 55(3):851-858.
- Müller S, Bley T. 1999. Flow cytometry. In: Flickinger M, Drew S, editors. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*. New York: John Wiley & Sons. p 1226-1238.
- Müller S, Bley T, Babel W. 1999. Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine conditions analysed by flow cytometry. *Journal of Biotechnology* 75(2-3):81-97.
- Müller S, Kiesel B, Berthe-Corti L. 2001. *Muricauda ruestringensis* Has an Asymmetric Cell Cycle. *Acta Biotechnologica* 21(4):343-357.
- Müller S, Lösche A, Merting H, Beisker W, Babel W. 2000a. Flow cytometric monitoring of *Rhodococcus erythropolis* and *Ochrobactrum anthropi* in a mixed culture. *Acta Biotechnologica* 20(3-4):219-233.
- Müller S, Nebe-von-Caron G. 2010. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4):554-587.
- Müller S, Sträuber H, Lösche A, Babel W. 2002. Population analysis of a binary bacterial culture by multi-parametric flow cytometry. *Journal of Biotechnology* 97(2):163-176.
- Müller S, Ullrich S, Lösche A, Loffhagen N, Babel W. 2000b. Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Microbiological Methods* 40(1):67-77.
- Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, Shinomiya T, Kageyama M, Kanaya S, Ohnishi M, Murata T, Mori H, Hayashi T. 2000. The R-type pyocin of

- Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Molecular Microbiology* 38(2):213-231.
- Navarre WW, Schneewind O. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(1):174-229.
- Nebe-von-Caron G. 2009. Standardization in microbial cytometry. *Cytometry Part A* 75A(2):86-89.
- Nebe-von-Caron G, Badley RA. 1995. Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *Journal of Microscopy* 179(1):55-66.
- Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods* 42(1):97-114.
- Neidhardt F, Ingraham JL, Schaechter M. 1990. *Physiology of the bacterial cell* Sunderland (MA, USA): Sinauer Associates, Inc. 506 p.
- Neumeyer A, Hübschmann T, Müller S, Frunzke J. 2013. Monitoring of population dynamics of *Corynebacterium glutamicum* by multiparameter flow cytometry. *Microbial Biotechnology* 6(2):157-167.
- Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4):593-656.
- Odell ID, Cook D. 2013. Immunofluorescence techniques. *Journal of Investigative Dermatology* 133(Januar, 1):1-4.
- Oliver J. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* 43 Spec No:93-100.
- Pan Y, Breidt F. 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology* 73(24):8028-8031.
- Papadimitriou K, Pratsinis H, Nebe-von-Caron G, Klekas D, Tsakalidou E. 2006. Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *International Journal of Food Microbiology* 111(3):197-205.
- Pawelczyk S, Abraham W-R, Harms H, Müller S. 2008. Community-based degradation of 4-chlorosalicylate tracked on the single cell level. *Journal of Microbiological Methods* 75(1):117-126.
- Pennebaker K, Mackey KRM, Smith RM, Williams SB, Zehr JP. 2010. Diel cycling of DNA staining and *nifH* gene regulation in the unicellular cyanobacterium *Crocospaera watsonii* strain WH 8501 (Cyanophyta). *Environmental Microbiology* 12(4):1001-1010.
- Phillips AP, Martin KL. 1983. Immunofluorescence analysis of bacillus spores and vegetative cells by flow cytometry. *Cytometry* 4(2):123-131.
- Pinder AC, McClelland RG. 1994. Rapid assay for pathogenic salmonella organisms by immunofluorescence flow cytometry. *Journal of Microscopy* 176(1):17-22.
- Poole K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3(2):255-263.
- Porter J, Robinson J, Pickup R, Edwards C. 1995. Recovery of a bacterial sub-population from sewage using immunofluorescent flow cytometry and cell sorting. *FEMS Microbiology Letters* 133(1-2):195-199.
- Puchelle E, Bajolet O, Abély M. 2002. Airway mucus in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews* 3(2):115-119.

- Ramphal R, Pier GB. 1985. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infection and Immunity* 47(1):1-4.
- Reinhardt D, Götz M, Kraemer R, Schöni MH. 2001. *Cystische Fibrose*: Springer Berlin Heidelberg. 611 p.
- Reinhart A.F R, Bragg PD. 1977. Cross-linking of the proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 466(2):245-256.
- Renders N, Verbrugh H, Van Belkum A. 2001. Dynamics of bacterial colonisation in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Infection, Genetics and Evolution* 1(1):29-39.
- Richards FM, Knowles JR. 1968. Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. *Journal of Molecular Biology* 37(1):231-233.
- Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Høiby N, Givskov M, Molin S, Eberl L. 2001. N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147(12):3249-3262.
- Riedele C. 2013. Spezies-Interaktionen in einer definierten bakteriellen Mischkultur mit und ohne Antibiotikumbehandlung [Dissertation]: Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. 125 p.
- Riedele C, Reichl U. 2011. Interspecies effects in a ceftazidime-treated mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus*: analysis at the single-species level. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(1):138-145.
- Riedele C, Reichl U. 2012. Time-kill studies with a ceftazidime-treated mixed culture consisting of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus*. *Engineering in Life Sciences* 12(2):188-197.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL and others. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922):1066-1073.
- Roberts BK, Midgley M, Dawes EA. 1973. The Metabolism of 2-Oxogluconate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology* 78(2):319-329.
- Robertson BR, Button DK. 1989. Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry* 10(1):70-76.
- Rogers GB, Hart CA, Mason JR, Hughes M, Walshaw MJ, Bruce KD. 2003. Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8):3548-3558.
- Rogers GB, Skelton S, Serisier DJ, van der Gast CJ, Bruce KD. 2010. Determining cystic fibrosis-affected lung microbiology: comparison of spontaneous and serially induced sputum samples by use of terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Journal of Clinical Microbiology* 48(1):78-86.
- Rogers GB, Stressmann FA, Koller G, Daniels T, Carroll MP, Bruce KD. 2008. Assessing the diagnostic importance of nonviable bacterial cells in respiratory infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 62(2):133-141.
- Rothe G. 2009. Technical background and methodological principles of flow cytometry. In: Sack U, Tarnok A, Rothe G, editors. *Cellular diagnostics*.

- basics, methods and clinical applications of flow cytometry. Freiburg / Basel: Karger. p 53-88.
- Rüger M, Ackermann M, Reichl U. 2014. Species-specific viability analysis of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus* in mixed culture by flow cytometry. *BMC Microbiology* 14(1):56.
- Rüger M, Bensch G, Tüngler R, Reichl U. 2012. A flow cytometric method for viability assessment of *Staphylococcus aureus* and *Burkholderia cepacia* in mixed culture. *Cytometry Part A* 81A(12):1055-1066.
- Rushton L, Sass A, Baldwin A, Dowson CG, Donoghue D, Mahenthiralingam E. 2013. Key role for efflux in the preservative susceptibility and adaptive resistance of *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(7):2972-2980.
- Sahar E, Lamed R, Ofek I. 1983. Rapid identification of *Streptococcus pyogenes* by flow cytometry. *European Journal of Clinical Microbiology* 2(3):192-195.
- Scheffers D-J, Pinho MG. 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(4):585-607.
- Schiemann M, Busch DH. 2009. Selection and combination of fluorescent dyes. In: Sack U, Tarnok A, Rothe G, editors. *Cellular diagnostics. basics, methods and clinical applications of flow cytometry*. Freiburg / Basel: Karger. p 107-140.
- Schmidt JK. 2008. Quantitative experimental characterization and mathematical modeling of mixed culture dynamics [Dissertation]: Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. 180 p.
- Schmidt JK, König B, Reichl U. 2007. Characterization of a three bacteria mixed culture in a chemostat: Evaluation and application of a quantitative terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for absolute and species specific cell enumeration. *Biotechnology and Bioengineering* 96(4):738-756.
- Schmidt JK, Riedele C, Regestein L, Rausenberger J, Reichl U. 2011. A novel concept combining experimental and mathematical analysis for the identification of unknown interspecies effects in a mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering* 108(8):1900-1911.
- Schulze-Horsel J. 2011. Zellphysiologische Charakterisierung von Zellkulturen in der Influenza-Impfstoffproduktion [Dissertation]: Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. 178 p.
- Schumann R, Schiewer U, Karsten U, Rieling T. 2003. Viability of bacteria from different aquatic habitats. II. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity. *Aquatic Microbial Ecology* 32(2):137-150.
- Seamer LC, Bagwell CB, Barden L, Redelman D, Salzman GC, Wood JCS, Murphy RF. 1997. Proposed new data file standard for flow cytometry, version FCS 3.0. *Cytometry* 28(2):118-122.
- Shapiro H, Nebe-von-Caron G. 2004. Multiparameter flow cytometry of bacteria. In: Hawley T, Hawley R, editors. *Flow cytometry protocols*: Humana Press. p 33-43.
- Shapiro HM. 2000a. Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods* 21(3):271-279.
- Shapiro HM. 2000b. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *Journal of Microbiological Methods* 42(1):3-16.
- Shapiro HM. 2001. Multiparameter flow cytometry of bacteria: Implications for diagnostics and therapeutics. *Cytometry* 43(3):223-226.

- Shapiro HM. 2003. Practical flow cytometry New York: 4th edition, John Wiley & Sons. 654 p.
- Shi L, Günther S, Hübschmann T, Wick LY, Harms H, Müller S. 2007. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry Part A* 71A(8):592-598.
- Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Duan K, Norgaard JC, Surette MG. 2008. A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(39):15070-15075.
- Simpson JA, Smith SE, Dean RT. 1988. Alginate inhibition of the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages. *Journal of General Microbiology* 134(1):29-36.
- Simpson JA, Smith SE, Dean RT. 1989. Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 6(4):347-353.
- Sizemore RK, Caldwell JJ, Kendrick AS. 1990. Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin. *Applied and Environmental Microbiology* 56(7):2245-2247.
- Somerville GA, Saïd-Salim B, Wickman JM, Raffel SJ, Kreiswirth BN, Musser JM. 2003. Correlation of acetate catabolism and growth yield in *Staphylococcus aureus*: implications for host-pathogen interactions. *Infection and Immunity* 71(8):4724-4732.
- Steinmetz I. 2009. Nichtfermentierende Bakterien (Nonfermenter): *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin / Heidelberg: Springer p275-285.
- Stocks SM. 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry Part A* 61A(2):189-195.
- Strasters KC, Winkler KC. 1963. Carbohydrate metabolism of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 33(2):213-229.
- Strathmann M, Wingender J, Flemming H-C. 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods* 50(3):237-248.
- Sträuber H, Müller S. 2010. Viability states of bacteria—Specific mechanisms of selected probes. *Cytometry Part A* 77A(7):623-634.
- Subires A, Yuste J, Capellas M. 2014. Flow cytometry immunodetection and membrane integrity assessment of *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat pasta salad during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 168–169(0):47-56.
- Tebaldi ND, Peters J, Souza RM, Chitarra LG, van der Zouwen P, Bergervoet J, van der Wolf J. 2010. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. *Tropical Plant Pathology* 35:213-222.
- Thies FL, König W, König B. 2007. Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *Journal of Medical Microbiology* 56(6):755-761.
- Tomaso H, Thullier P, Seibold E, Guglielmo V, Buckendahl A, Rahalison L, Neubauer H, Scholz HC, Splettstoesser WD. 2007. Comparison of hand-held test kits, immunofluorescence microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, and

- flow cytometric analysis for rapid presumptive identification of *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology* 45(10):3404-3407.
- Tortorello ML, Stewart DS, Raybourne RB. 1997. Quantitative analysis and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 in a food matrix using flow cytometry and cell sorting. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 19(4):267-274.
- Tracy BP, Gaida SM, Papoutsakis ET. 2010. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Current Opinion in Biotechnology* 21(1):85-99.
- Trotha R, Reichl U, Thies FL, Sperling D, König W, König B. 2002. Adaption of a fragment analysis technique to an automated high-throughput multicapillary electrophoresis device for the precise qualitative and quantitative characterization of microbial communities. *Electrophoresis* 23(7-8):1070-1079.
- Tümmler B, Kiewitz C. 1999. Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Molecular Medicine Today* 5(8):351-358.
- Tyndall RL, Hand RE, Mann RC, Evans C, Jernigan R. 1985. Application of flow cytometry to detection and characterization of *Legionella* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 49(4):852-857.
- Ulrich M, Herbert S, Berger J, Bellon G, Louis D, Münker G, Döring G. 1998. Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19(1):83-91.
- Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56(3):395-411.
- Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, Riccardi G, Boon N, Nelis H, Mahenthalingam E, Coenye T. 2013. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLoS ONE* 8(3):e58943.
- Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plésiat P, Pechère JC, Tulkens PM. 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(5):1055-1065.
- Van Dilla MA, Langlois RG, Pinkel D, Yajko D, Hadley WK. 1983. Bacterial characterization by flow cytometry. *Science* 220(4597):620-622.
- Venturi V, Friscina A, Bertani I, Devescovi G, Aguilar C. 2004. Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Research in Microbiology* 155(4):238-244.
- Vinion-Dubiel AD, Goldberg JB. 2003. Review: Lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Endotoxin Research* 9(4):201-213.
- Vital M, Fuchslin HP, Hammes F, Egli T. 2007. Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater. *Microbiology* 153(7):1993-2001.
- Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J. 1999. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Analytical Biochemistry* 276(1):59-64.
- Voggu L, Schlag S, Biswas R, Rosenstein R, Rausch C, Götz F. 2006. Microevolution of cytochrome bd oxidase in staphylococci and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology* 188(23):8079-8086.
- Waite RD, Curtis MA. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pyocin production affects population dynamics within mixed-culture biofilms. *Journal of Bacteriology* 191(4):1349-1354.

- Walberg M, Gaustad P, Steen HB. 1999. Uptake kinetics of nucleic acid targeting dyes in *S. aureus*, *E. faecalis* and *B. cereus*: a flow cytometric study. *Journal of Microbiological Methods* 35(2):167-176.
- Wallner G, Steinmetz I, Bitter-Suermann D, Amann R. 1996. Combination of rRNA-targeted hybridization probes and immuno-probes for the identification of bacteria by flow cytometry. *Systematic and Applied Microbiology* 19(4):569-576.
- Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, Simpson NJL, Salmond GPC. 2001. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25(4):365-404.
- WHO Report. 2002. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis: report of a joint meeting of WHO/IECFTN/ICF(M)/A/ECFS, Genoa, Italy, 19 June 2002. <http://www.who.int/iris/handle/10665/68702#sthash.NHNQXCmO.dpuf>.
- Wiacek C, Müller S, Benndorf D. 2006. A cytomic approach reveals population heterogeneity of *Cupriavidus necator* in response to harmful phenol concentrations. *PROTEOMICS* 6(22):5983-5994.
- Williams SC, Hong Y, Danavall DCA, Howard-Jones MH, Gibson D, Frischer ME, Verity PG. 1998. Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods* 32(3):225-236.
- Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, xFc and others. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of Clinical Investigation* 109(3):317-325.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 36(12):1251-1275.
- Yamaguchi N, Sasada M, Yamanaka M, Nasu M. 2003. Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry. *Cytometry Part A* 54A(1):27-35.
- Yáñez MA, Nocker A, Soria-Soria E, Múrtula R, Martínez L, Catalán V. 2011. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 85(2):124-130.
- Yang L, Jelsbak L, Molin S. 2011. Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. *Environmental Microbiology* 13(7):1682-1689.
- Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK. 2011. The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Current Opinion in Pediatrics* 23(3).
- Ziglio G, Andreottola G, Barbetti S, Boschetti G, Bruni L, Foladori P, Villa R. 2002. Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. *Water Research* 36(2):460-468.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32(12):e103, 1-10.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zellwand von <i>S. aureus</i>	10
Abb. 2 Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.....	14
Abb. 3 Detektion eines Spannungspulses mittels PMT in der DZM.....	17
Abb. 4 Visualisierung durchflusszytometrischer Daten ((Rothe 2009), modifiziert). .	20
Abb. 5 Biparametrische Darstellung durchflusszytometrischer Daten.	20
Abb. 6 Prinzip der Datenkompensation in der durchflusszytometrischen Analyse ((Rothe 2009), modifiziert).	22
Abb. 7 Lineare Korrelation zwischen OD ₆₅₀ und der Zellkonzentration.....	47
Abb. 8 Ergebnis einer Bead-Referenzmessung mit Multifluoreszenz- Kalibrierbeads.....	54
Abb. 9 Schemata zur Behandlung / Färbung von Proben aus Misch- und Reinkulturen zur durchflusszytometrischen Analyse.	55
Abb. 10 Optische Konfiguration des LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) für die fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	66
Abb. 11 Detektion von Bakterien mittels DZM durch Färbung mit SYBR Green I.....	74
Abb. 12 Überprüfung der SYBR-Green I Färbung von Bakterien mittels FLM.....	74
Abb. 13 Vergleich DZM mit qT-RFLP-Methode in der Zellkonzentrationsbestimmung.	76
Abb. 14 Überprüfung der Spezifität der Immunfluoreszenzmarkierung mit PAK D mittels DZM.....	79
Abb. 15 Überprüfung der Spezifität der Immunfluoreszenzmarkierung mit PAK D mittels FLM.	79
Abb. 16 Optimierung der PAK D- und SAK-Konzentration zur durchfluss- zytometrischen Immunfluoreszenzdetektion von <i>B. cepacia</i>	81
Abb. 17 Test von Alexa488 Fluor WGA zur Detektion von <i>S. aureus</i> mittels DZM...	82
Abb. 18 Überprüfung Alexa488 Fluor WGA zur Detektion von <i>S. aureus</i> mittels FLM.....	82
Abb. 19 Optimierung der Gram-spezifischen Detektion von <i>S. aureus</i> unter Einsatz von Alexa488 Fluor WGA für DZM.	83
Abb. 20 Test von CF405S-markiertem WGA zur Detektion von <i>S. aureus</i>	84
Abb. 21 Test verschiedener Puffer und Lösungen für Vitalitätsfärbung von <i>P. aeruginosa</i> für DZM.....	87

Abb. 22 Einfluss von GTA im Puffer auf Permeabilität gegenüber PI von <i>B. cepacia</i>	88
Abb. 23 Färbung von <i>B. cepacia</i> mit SYBR Green I zur Detektion in der durchflusszytometrischen Analyse.	89
Abb. 24 Optimierung des SYBR Green I- / PI- Färbeprotokolls für DZM zur Vitalitätsbestimmung, separat für jede Spezies.....	91
Abb. 25 Untersuchung des Einflusses von GTA auf die Permeabilität der Zellmembran von <i>P. aeruginosa</i> und <i>S. aureus</i> gegenüber PI.....	95
Abb. 26 Verifizierung der spezifischen Fluoreszenzmarkierung für die DZM bei Anwendung der Ringerlösung B_opt.....	96
Abb. 27 Vergleich von Färbemethoden zur Vitalitätsbestimmung für die DZM.....	97
Abb. 28 Anwendung der einheitlichen Vitalitätsfärbemethode für die DZM.....	97
Abb. 29 Validierung des einheitlichen SYBR Green I- / PI- Färbeprotokolls für die DZM zur Bestimmung der relativen Häufigkeit vitaler Bakterien.	99
Abb. 30 Vergleich DZM mit Plattenausstrichmethode für Reinkultur mit <i>S. aureus</i>	101
Abb. 31 Speziesdiskriminierung in der durchflusszytometrischen Analyse von Drei-Spezies-Mischkulturproben bei Anwendung des Vierfarbenprotokolls.....	103
Abb. 32 Wachstum und Vitalität in Reinkulturen und in der Drei-Spezies- Mischkultur.....	106
Abb. 33 Zeitverläufe der extrazellulären Substrat- und Metabolitkonzentrationen in Reinkulturen und in der Drei-Spezies-Mischkultur (MK).....	109
Abb. 34 Wachstum und Vitalität von <i>P. aeruginosa</i> in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen.....	112
Abb. 35 Wachstum und Vitalität von <i>B. cepacia</i> in Rein- und Zwei-Spezies- Mischkulturen.....	114
Abb. 36 Wachstum und Vitalität von <i>S. aureus</i> in Rein- und Zwei-Spezies- Mischkulturen.....	116
Abb. 37 Speziesdiskriminierung in der durchflusszytometrischen Analyse von Mischkulturproben zur Bestimmung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration.	119
Abb. 38 Quantitative DZM zur Wachstumsanalyse der Drei-Spezies-Mischkultur..	120

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Mindestangaben eines DZM-Experiments.	24
Tab. 2 Herstellung von Di-Natriumhydrogen-Phosphatlösung (0,4 M).....	37
Tab. 3 Herstellung von Natriumdihydrogen-Phosphatlösung (0,4 M).	37
Tab. 4 Herstellung Natriumchlorid-Phosphatpuffer (NaCl-P-Puffer, pH=7,2).....	37
Tab. 5 Herstellung von NaCl-P-Puffer mit Rinderalbumin.....	38
Tab. 6 Herstellung von NaCl-P-Puffer mit BSA und Tween 20.	38
Tab. 7 Herstellung von Ringerlösung (Ringerlösung A, pH 7,2).	38
Tab. 8 Herstellung von 1/4 Ringerlösung (Ringerlösung B, pH 7,2).	38
Tab. 9 Herstellung von Magnesiumsulfatlösung (pH 7,2, 10 mM).	39
Tab. 10 Herstellung von Dulbecco-Puffer (mit Dulbecco's buffered saline, pH 7,2).	39
Tab. 11 Herstellung von Phosphat gepufferter NaCl-Lösung (PBS).	39
Tab. 12 Herstellung von Lösungen und Puffer mit 0,05 mg mL ⁻¹ Glutaraldehyd (GTA).	39
Tab. 13 Herstellung von Ringerlösung B mit 0,05 mg mL ⁻¹ GTA, 3 M KCl und 0,05 % BSA (Ringerlösung B_opt, pH 7,2).	40
Tab. 14 Herstellung von Natriumdihydrogen-Phosphatlösung (1,5 M).	40
Tab. 15 Herstellung von Di-Kaliumhydrogen-Phosphatlösung (1,5 M).	40
Tab. 16 Herstellung von Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (1,5 M, pH=7,0).....	40
Tab. 17 Herstellung von Natriumhydroxidlösung (0,6 M).	40
Tab. 18 Herstellung von Nitrilotriessigsäure-Lösung (NTA, 0,25 M).	40
Tab. 19 Herstellung von TRIS-Phosphat-EDTA-Puffer (TPE-Puffer, pH 7,5).	40
Tab. 20 Herstellung von 10 %-iger Natriumazidlösung (NaN ₃ -Fixierlösung, Masse-%).....	41
Tab. 21 Herstellung von 1%-iger Agarose für Objektträger für Mikroskopie (Masse-%).	41
Tab. 22 Herstellung des Kultivierungsmediums (M199-NTA-P, pH 7,0).	41
Tab. 23 Herstellung des LB-Agars.	42
Tab. 24 Herstellung der SYBR Green I-Arbeitslösung.	42
Tab. 25 Herstellung der PI-Arbeitslösung.	42
Tab. 26 Herstellung der DAPI-Arbeitslösung.	42
Tab. 27 Herstellung der WGA-Stammsuspension.	43
Tab. 28 Herstellung der WGA-Alexa Fluor 488-Stammsuspension.	43

Tab. 29	Getestete Spezies-spezifische mMAK des Typs IgG.....	44
Tab. 30	Technische Ausstattung des Durchflusszytometers CyFlow® Space (Partec GmbH, Münster, D).	50
Tab. 31	Messeinstellungen am Durchflusszytometer zur Vitalitätsbestimmung.	52
Tab. 32	Messeinstellungen am Durchflusszytometer bei Bead- Referenzmessungen.....	53
Tab. 33	Validierungskenngrößen der qT-RFLP-Methode.	61
Tab. 34	Validierungskenngrößen der quantitativen HPLC-Methode.	64
Tab. 35	Validierungskenngrößen der enzymatischen Quantifizierungsmethode.	64
Tab. 36	Technische Ausstattung des LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D).....	66
Tab. 37	Technische Ausstattung des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 135 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D).	67
Tab. 38	Übersicht der in der Arbeit verwendeten Chemikalien.	69
Tab. 39	Übersicht der in der Arbeit verwendeten Chemikalien.	71
Tab. 40	Test verschiedener PAK auf Eignung zur Immunfluoreszenzdetektion von <i>P. aeruginosa</i> bzw. <i>B. cepacia</i> mittels DZM.	77
Tab. 41	Optimale SYBR Green I- und PI-Zugaben für die Färbung zur durchfluss- zytometrischen Bestimmung der Vitalität, separat für jede Spezies.	93
Tab. 42	Kenngrößen aus der Validierung des einheitlichen SYBR Green I- / PI- Färbeprotokolls für die DZM.	99
Tab. 43	Werte für μ_{\max} in Reinkulturen und in der Drei-Spezies-Mischkultur.	105
Tab. 44	Werte für μ_{\max} von <i>P. aeruginosa</i> in Rein- und Zwei-Spezies- Mischkulturen.....	111
Tab. 45	Werte für μ_{\max} von <i>B. cepacia</i> in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen. .	114
Tab. 46	Werte für μ_{\max} von <i>S. aureus</i> in Rein- und Zwei-Spezies-Mischkulturen. ..	116

Anhang

A1 Eigene Publikationen und sonstige Beiträge

A1.1 Publikationen in Fachmagazinen

Die vorgelegte Dissertationsschrift gibt Inhalte wieder, die bereits vorab in begutachteten internationalen Fachmagazinen in englischer Sprache veröffentlicht wurden. Im Folgenden sind die Publikationen, einschließlich unter Angabe des Beitrags des Autors an der Studie und des Manuskripts, aufgelistet.

- (1) Rüger M., Ackermann. M, Reichl U. 2014. *Species-specific viability analysis of Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia and Staphylococcus aureus in mixed culture by flow cytometry*. BMC Microbiology 14(1):56.

Der Autor erarbeitete das Konzept der Studie, führte die wesentlichen experimentellen Versuche durch, evaluierte und interpretierte die Versuchsdaten und schrieb das Manuskript. Mandy Ackermann trug mit vorbereitenden Versuchen und der Auswertung dieser Daten zur Studie bei. Prof. Udo Reichl betreute die Studie und half beim Entwurf des finalen Manuskripts.

- (2) Rüger M., Bensch G., Tüngler R., Reichl U. 2012. *A flow cytometric method for viability assessment of Staphylococcus aureus and Burkholderia cepacia in mixed culture*. Cytometry Part A 81A(12):1055-1066.

Der Autor erarbeitete das Konzept der Studie, führte die wesentlichen experimentellen Versuche durch, evaluierte und interpretierte die Versuchsdaten und schrieb das Manuskript. Gerald Bensch und Ralf Tüngler führten einzelne Färbetests mit Reinkulturproben durch und werteten die Daten dieser Untersuchungen aus. Prof. Udo Reichl betreute die Studie und half beim Entwurf des finalen Manuskripts.

Weitere Publikation

- (3) Bensch G.*, Rüger M.*, Wassermann M., Weinholz S., Reichl U., Cordes C. 2014. *Flow cytometric viability assessment of lactic acid bacteria starter cultures produced by fluidized bed drying*. Applied Microbiology and Biotechnology: 1-13. *Geteilte Erst-Autorenschaft.

Marc Rüger erarbeitete das Konzept der Studie. Gerald Bensch führte die wesentlichen experimentellen Versuche durch. Gerald Bensch und Marc Rüger evaluierten und interpretierten die Versuchsdaten und schrieben das Manuskript. Magdalena Wassermann und Susann Weinholz halfen bei den Experimenten, sowohl in der Durchführung als auch bei der Evaluierung der Daten und Interpretierung der Ergebnisse. Prof. Udo Reichl und Prof. Christiana Cordes betreuten die Studie und halfen beim Entwurf des finalen Manuskripts.

A1.2 Konferenzbeiträge

Im Folgenden sind relevante Konferenzbeiträge des Autors, unterteilt in Fachvorträge und Poster-Präsentationen, chronologisch aufgelistet.

Fachvorträge

- (1) Rüger M. und Reichl U. 2012. Charakterisierung medizinisch-relevanter bakterieller Mischkulturen mittels T-RFLP und Durchflusszytometrie. 30. Jahrestagung der Biotechnologen / *ProcessNet* (Deutsche Gesellschaft für chemische Technik und Biotechnologie e.V., DECHEMA) in Karlsruhe (D).
- (2) Rüger M., Weinholz S., Wassermann M., Cordes C., Reichl U. 2012. *Viability analysis of Lactobacillus plantarum by flow cytometry*. ACHEMA 2012 Kongress, Frankfurt (D).
- (3) Rüger M., Siewert C., Kluge S., Hoffmann M., Benndorf D., Rapp E., Reichl U. 2011. *Flow cytometric monitoring of a three-species mixed bacterial community relevant for Cystic Fibrosis. 5th International Conference on Analysis of Microbial Cells at the Single Cell Level* in Carry-le-Rouet (F).

Poster-Präsentationen

- (1) Rüger M., Siewert C., Tüngler R., Reichl U. 2011. *Viability analysis of Staphylococcus aureus and Burkholderia cepacia in mixed culture by flow cytometry. 4th Congress of European Microbiologists (Federation of Microbiological Societies, FEMS)* in Genf (CH).
- (2) Rüger M. und Reichl U. 2010. *Flow cytometric analysis of Staphylococcus aureus in a medically relevant mixed culture*. 29. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie (DGFZ) in Leipzig.
- (3) Rüger M. und Reichl U. 2009. *Flow cytometric analysis of a medically relevant microbial community using species-specific immunofluorescence probes and DNA staining*. 28. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie (DGFZ) in Leipzig.
- (4) Rüger M. und Reichl U. 2009. *Single cell analysis of a cystic fibrosis relevant bacterial community using immunofluorescent detection by flow cytometry. FlowCytometryUK 2009* in Oxford (GB).

A1.3 Betreute wissenschaftliche Arbeiten

B.Sc.-Abschlussarbeiten

(1) Mandy Ackermann (03/2011 – 10/2011)

(2) Ralf Tüngler (10/2010 – 04/2011)

(3) Gerald Bensch (11/2009 – 07/2010)

M.Sc.-Abschlussarbeit

(1) Gerald Bensch (04/2012 – 12/2012)

A2 Arbeitsanweisungen

A2.1 Arbeitsanweisungen

- Bakterienstammhaltung, Version 1
- Herstellung Interner Quantifizierungsstandard für qT-RFLP, Version 1
- Methoden zur quantitativen T-RFLP-Analyse, Version 8.
- Herstellung von Standards für die HPLC-Methode, Version 2
- Standardmethode zur Bestimmung von Gluconat und 2-Ketogluconat mittels HPLC, Version 5.
- Substrat- und Metabolitmessung am Bioprofile, Version 2.

Das sind Arbeitsanweisungen des Lehrstuhls für Bioprozesstechnik an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Anfrage über Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl).

A2.2 Eigene Arbeitsanweisungen

Nachfolgend sind die Arbeitsanweisungen, die im Rahmen der Dissertation vom Autor erarbeitet wurden, aufgelistet.

- Schüttelkolbenkultivierungen bei Mischkulturversuchen, Version 3.
- Zusammensetzung von Puffer und Lösungen für die Färbung von Bakterien für die Durchflusszytometrie, Version 3.
- Indirektes Labeling von *B. cepacia* für Immunfluoreszenzdetektion mittels Durchflusszytometrie, Version 4.
- WGA-Labeling mittels Mix-n-Stain CF405S Kits zur Gram-spezifischen Detektion von *S. aureus* u.a. in der Durchflusszytometrie, Version 1.
- SYBR Green I- / PI-Protokoll zur Vitalitätsbestimmung Cystischer Fibrose-relevanter Bakterien in Reinkultur mittels Durchflusszytometrie, Version 1.
- SYBR Green I- / PI-Protokoll zur Vitalitätsbestimmung Cystischer Fibrose-relevanter Bakterien in Reinkultur mittels Durchflusszytometrie unter Anwendung eines NaCl-Phosphatpuffers, Version 1.

- 4-Farbenprotokoll zur Vitalitätsbestimmung Cystischer Fibrose relevanter Bakterien in Mischkulturen mittels Durchflusszytometrie, Version 3.
- 3-Farbenprotokoll zur Bestimmung der Spezies-spezifischen Zellkonzentration Cystischer Fibrose relevanter Bakterien in Mischkultur mittels Durchflusszytometrie, Version 3.

Das sind Arbeitsanweisungen des Lehrstuhls für Bioprozesstechnik an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Anfrage über Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl).