

Prof. Dr. Ulf Karsten
Universität Rostock
Institut für Biowissenschaften
Albert-Einstein-Strasse 3
18059 Rostock

Abschlussbericht (Kennziffer 2643)

Einleitung

Bakterien, die die Oberflächen von Werkstoffen besiedeln, tragen zur Materialzerstörung bei, stellen eine Infektionsquelle, bilden häufig Biofilme mit hohen Zelldichten, besitzen vielfältige metabolische Leistungs- und Anpassungsfähigkeiten und sind durch die Schleimmatrix des Biofilms gegenüber chemischen und mechanischen Einflüssen geschützt. Dieses Mikrohabitat behindert die Keimisolierung und -untersuchung vor allem durch den sogenannten VBNC-Zustand (Viable But Not Culturable), in dem sich viele Zellen befinden. Deshalb sollten in diesem Projekt kultivierungsunabhängige Nachweise von umweltrelevanten und Oberflächen besiedelnden Bakterien überprüft werden. Besonderes Augenmerk wurde auf den Einfluss ihres physiologischen Zustands auf die zelluläre Fluoreszenzmarkierung gelegt.

Es gibt verschiedene an Nucleinsäuren bindende Fluoreszenzmarker, die zur Anfärbung von Bakterien geeignet und verbreitet sind (Haugland 2008). Einige Fluorochrome dringen jedoch nicht in alle Zellen ein (Zellwandmorphologie, Membrandurchlässigkeit) oder werden durch die mucoide Biofilmmatrix behindert. Es gibt auch Einflüsse der Fixierungsmittel auf die Fluoreszenzmarkierung. Deshalb wurden mehrere Nucleinsäuremarker unter verschiedenen Bedingungen ausprobiert und der für die meisten Anwendungen geeignete ermittelt. Ein bedeutendes Kriterium für den physiologischen Zustand von Mikroorganismen ist deren Membranintegrität, die mit einer Kombination aus einem permeanten und einem impermeanten Nucleinsäuremarker untersucht wird (LIVE/DEAD® *BacLight*TM Kit, Invitrogen). Um dessen allgemeine Anwendbarkeit zu prüfen, wurde der Anteil permeabilisierter Zellen in ungestörten Kulturen, in Abhängigkeit vom Kulturalter, von der Substratversorgung und unter Umweltstress ermittelt. Der Anteil permeabilisierter Zellen kann als Maß für die Wirksamkeit und Nachhaltigkeit von Desinfektions- und Konservierungsmaßnahmen dienen.

Ergebnisse

Gesamtzellzahl

Die beiden gebräuchlichsten Fluorochrome für Bakterien sind das UV-anregbare 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) und blau-anregbare Acridinorange oder dessen Derivate. Neuere ebenfalls blau-anregbare Farbstoffe fluoreszieren besonders stark (SYBR® Green und Gold, Noble & Fuhrman 1998, Freese et al. 2006), werden deshalb in geringerer Konzentration angewendet und sind weniger giftig als ältere Produkte. Es gab nur selten signifikante Unterschiede in der quantitativen Erfassbarkeit von Zellkulturen mit SYBR Gold

und dem Live/Dead-Kit (Tab. 1). Das im Live/Dead-Kit als allgemeiner Zellmarker enthaltene SYTO 9 markierte nicht immer alle Zellen natürlicher Konsortien. Das eigentlich für Nucleinsäuregele entwickelte SYBR Gold war den beiden anderen Farbstoffen an natürlichen Gemeinschaften deutlich überlegen.

Eine Substratlimitation und UV-Strahlung beeinflusste die Anfärbeeigenschaften sowohl desselben als auch verschiedener Fluorochrome im Vergleich zueinander (Tab. 1). Dabei bleibt unklar, ob sich die Membrandurchlässigkeit für bestimmte Farbstoffe verändert und / oder ob sich die DNA-Menge je Zelle und damit die Fluoreszenzintensität verändert. Damit muss die Wahl eines bestimmten Fluorochroms nicht nur gut begründet, sondern auch unter den jeweils gegebenen Bedingungen überprüft werden.

Tabelle 1. Anteil (%) der SYBR Gold und dem Live/Dead Kit insgesamt erfassten unfixierten Zellen im Vergleich zum Referenzmarker DAPI sowie nur schwach mit DAPI angefärbter Zellen. Hunger- und UV-Stress am Isolat OW144 geprüft.

Isolate/Arten	SYBR	Live/Dead-Kit	schwach DAPI
Süßwasserisolat OW 144	76-107	65-131	25-35
Brackwasserisolat UW 145	97-119	102-126	
<i>Paracoccus denitrificans</i> DSM 1408	73-121	82-90	
<i>Escherichia coli</i> k12	105	95	
<i>Bacillus subtilis</i> 8563	89	64	
Median	101	99	
Hungerstress	n.d.	49-125	64-79
UV-A-Strahlung (bis 8 W m ⁻²)		11-122	48-66
Fassadenbiofilm	122	127	
Bakterioplankton eines Flusses	51-327	9-60	

Einige organische Partikel, die ebenfalls DNA oder Polyanionen enthalten (Freese et al. 2006), und sehr stark Licht streuende Nano- und Mikrostrukturen behindern die Auswertung gerade von Materialoberflächen. Je langwelliger das Anregungslicht ist, desto geringer wird allerdings dieser Effekt (Abb. 1 a), was die Eignung blau- und grün-anregbarer Farbstoffe unterstützt.

In Bakterienkulturen kam es nach der Anwendung von Fixierungsmittel häufig zu einem Ausfallen der Zellen mit Proteinen, so dass die Zellzahl unterbestimmt wird. Dieses Problem ist für Biofilmproben dann relevant, wenn die Gesamtzellzahl in daraus gewonnenen Suspensionen quantifiziert werden sollen. Einige Arten waren jedoch in fixiertem Zustand deutlich besser zu zählen, weil die Formlösung die Membran durchlässiger machte. Eine andere Störung ergibt sich aus der oxidierenden Wirkung des Formols gegenüber den in Medien (und ggf. Umweltproben) enthaltenen Fe²⁺ zu störenden Fe³⁺ und den entsprechenden Salzen bzw. Hydroxiden, die jegliche (gelb-grüne) Fluoreszenz löschen. Glutardialdehyd senkte als Fixierungsmittel die Fluoreszenz des SYBR.

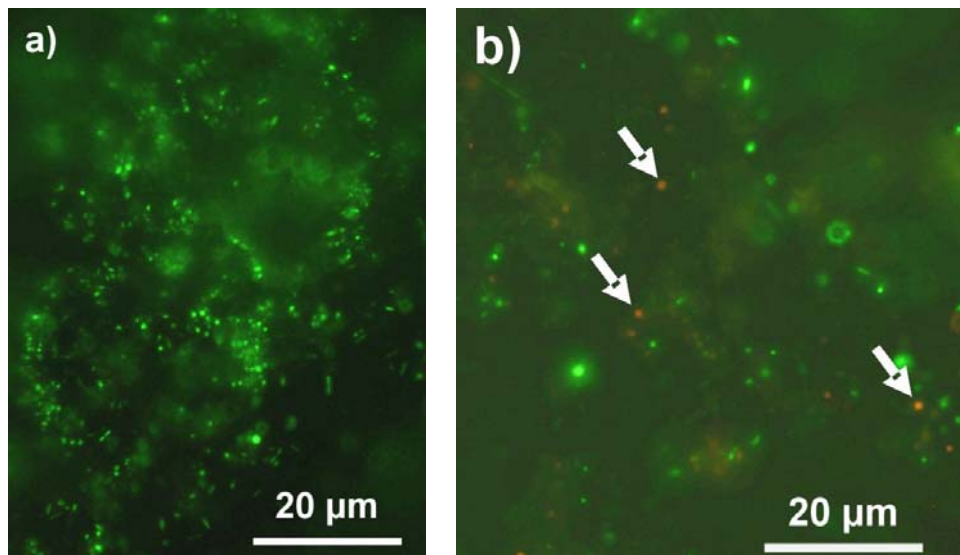


Abb. 1 Bakterien auf Aktivkohle aus Filtern der Trinkwasseraufbereitung markiert mit SYBR® Gold (a) und dem LIVE/DEAD® BacLight™ Kit (b). Rote Zellen (Pfeile) sind permeabilisiert. Olympus IX70 in Leitungswasser auf Deckgläschen, WB, Objektiv 20x, Prisma 1,5x, ColorView12, AnalySIS 3.2.

Anteil intakter Zellen

Einige Isolate waren eher robust mit einem durchschnittlichen Anteil intakter (nicht permeabilisierter) Zellen von 95% (Minimum 73%) (Abb. 2). Es bleibt jedoch noch unklar, warum manchmal in diesen log-Phase-Kulturen unter optimalen Bedingungen immerhin bis zu $\frac{1}{4}$ der Zellen permeabilisiert waren. Andere Stämme waren sehr empfindlich mit sehr hohen Anteilen geschädigter Zellen (OS 9145) oder reagierten schon auf evtl. kleinste (unbeabsichtigte bzw. unbemerkte) Änderungen in den Kultivierungsbedingungen (C-Quelle, Kulturalter) mit enormen Schwankungen des Anteils intakter Zellen (UW 145, *Bacillus subtilis*). Letzterer reagierte schnell mit Sporenbildung, was zu einer Nichtanfärbbarkeit führte. Häufig werden solche Arten aus Toxizitätsuntersuchungen ausgeschlossen, mögen aber in der Natur beim Wiederbesiedeln von Habitaten (Oberflächen) auch und insbesondere nach Desinfektionsmaßnahmen eine große Rolle spielen.

Anteil intakter Zellen unter Stressbedingungen

Nach Umsetzen eines Isolates in C-freies Medium reagierte die Membranintegrität nur langsam. Erst nach einer zweitägigen Hungerphase erhöhte sich der Anteil permeabilisierter Zellen eines recht robusten Isolats etwas (Abb. 3). Die Gesamtatmung der Population (nicht dargestellt) änderte sich ebenfalls nicht signifikant, obwohl der Anteil der Zellen mit einer so hohen Respiationsleistung, dass aus CTC ein intrazellulärer Formazankristall gebildet wurde (Rodriguez 1992), bereits nach 24 h deutlich gesunken war. Erst nach 5-7 Tagen Inkubation unter vergleichsweise geringen oder schwer verwertbaren Substratmengen (steriles Biotopwasser) kam es bei einigen Isolaten zu einer deutlichen Abnahme des Anteils intakter Zellen auf 64% (OW 144, vgl. Abb. 3) und 9-44% (OW3/15-5, OW3/RT5, vgl. Abb. 2). Auch UVA-Strahlung bis 8 W m^{-2}

erhöhte den Anteil der geschädigten Zellen nicht signifikant. Somit ist die Membranintegrität wohl weniger vom Aktivitätszustand abhängig und eher tatsächlich ein Kriterium der Unversehrtheit der Zellen.

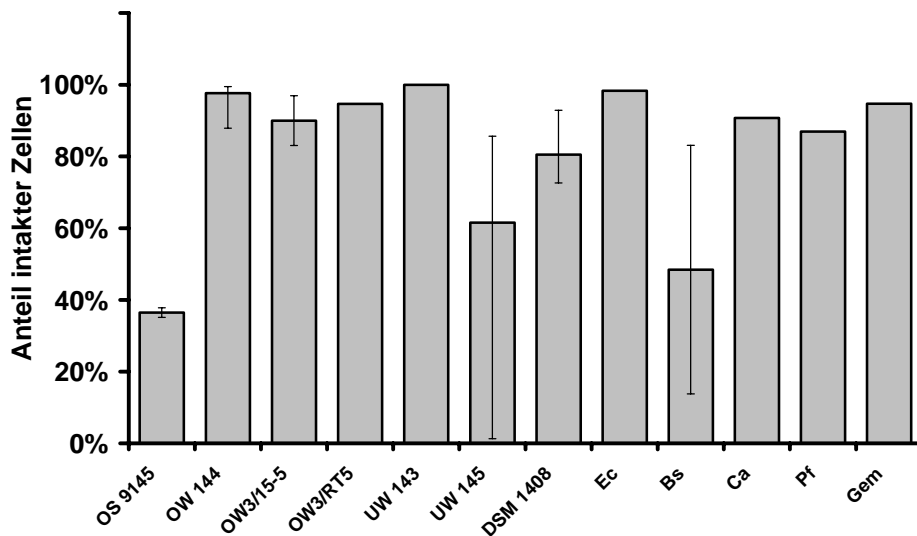


Abb. 2 nächste Seite. Anteil permeabilisierter Zellen (%) in einem Ostseeisolat (OS 9145), in Süßwasserisolaten (OW 144 bis OW3/RT5), Brackwasserisolaten (UW 143 und 145), Bodenbakterien (Gram-negative *Paracoccus denitrificans* DSM 1408 und Gram-positive *Bacillus subtilis* Bs, *Clostridium acetobutylicum* Ca), einem Enterobakterium (*Escherichia coli* Ec), dem Gram-negativen *Pseudomonas fluorescens* Pf und einer Fassaden-Biofilmgemeinschaft (Gem).

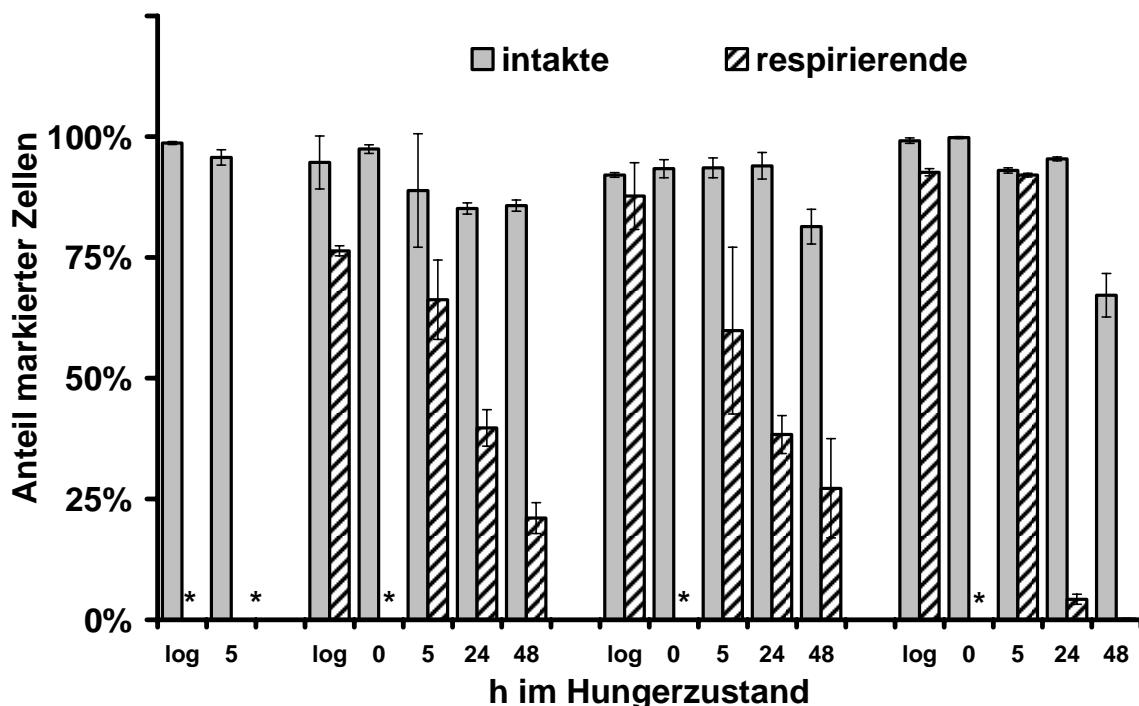


Abb. 3. Anteil permeabilisierter Zellen im Live/Dead-Kit (%) und respirierender Zellen (CTC+, %) in einem Süßwasserisolat (OW 144) in einer log-Phasekultur (12 h, 20°C, Minimalmedium mit 0,5% Acetat oder Glucose) und einer über 5, 24 und 48 h "gehungerten" Kultur (Minimalmedium ohne C-Quelle). * nicht gemessen.

Anwendung von Fluoreszenzmarkern an Biofilmgemeinschaften

Zunächst sollten Einarten-Biofilme direkt auf Objektträgern angezüchtet werden, wobei es immer wieder zu einem sehr geringen oder gar keinem Wachstum kam.

Auch zunächst in Suspension angezogene Isolate konnten sich nicht dauerhaft anheften und Biofilme von mehr als einer Zellschicht bilden. Auch verschiedenste Aufkonzentrierungen an Oberflächen (Antrocknen, Filtrieren) und anschließendes Einbetten in Agarose (Low Gelling Temperature) bleiben erfolglos, weil es hierbei im Gegensatz zur sonstigen Robustheit der Stämme (s.o.) zur Permeabilisierung des überwiegenden Anteils der Zellen kam.

In Biofilmgemeinschaften von Fassaden gab es ebenfalls keine signifikant abweichenden Gesamtzellzahlen durch unterschiedliche Farbstoffe, was die Eignung aller verwendeten Marker unterstützt. Im Gegensatz zu den in aquatischen Systemen stets hohen Anteilen permeabilisierter Zellen (ca. 50%, Schumann et al. 2003, Freese et al. 2006), waren aus natürlichen Biofilmen stammende Bakterien fast alle intakt (Abb. 2).

Fazit für die Anwendung fluoreszierender Vitalitätsmarker

1. Für Proben unbekannter Zusammensetzung und chemischer Bedingungen ist DAPI das universell anwendbare Fluorochrom, mit dem die meisten Erfahrungen vorliegen.
2. Neue Fluoreszenzmarker (z. B. SYBR Gold) mit besseren bzw. passenderen spektralen Eigenschaften sind dem DAPI aber teilweise überlegen, da sie eine stärkere Fluoreszenz aufweisen, geringer dosiert werden müssen und weniger Streulicht verursachen.
3. Einige Arten und natürliche Gemeinschaften wiesen auch ohne mikrobizide Behandlung einen sehr hohen Anteil zerstörter Zellen auf, was beim Nachweis von Biozidwirkungen ein sorgfältiges Experimentdesign, d. h. geeignete Negativ- und Positivkontrollen, erfordert.
4. Substratmangel oder UV-Strahlung als natürliche Stressfaktoren schädigten die Membranen robuster Arten wenig bzw. selten, was eine gute Voraussetzung für den Nachweis der Membranen angreifender Desinfektions- und Konservierungsmittel ist.
5. Überraschenderweise führte aber schon sehr kurzfristiger Trockenstress bei den Isolaten zu einer hohen Permeabilisierungs- bzw. Absterberate, was in natürlichen Gemeinschaften nicht beobachtet wurde. Auch diesbezüglich müssen hinreichend Positiv- und Negativkontrollen in die Biozidtests integriert werden.

Ausblick

Der Einfluss weiterer natürlicher bzw. an und in Werkstoffen vorkommender Stressfaktoren, z. B. ungünstige Redoxverhältnisse (Trocknung, anoxische Bedingungen, Suspensionen mit aggressiven Chemikalien), auf die Membranintegrität muss jeweils überprüft werden, damit diese Faktoren von Auswirkungen der Materialeigenschaften sowie von Desinfektions- und Konservierungsmaßnahmen getrennt werden können. Daraus ergeben sich auch Einblicke in die Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber Mikrobiziden bei entsprechender Vorschädigung der Zellen sowie ggf. eine Reduzierung des

Mikrobizideinsatzes. Da sich die **Membranintegrität** (noch) **nicht als universell geeignetes Vitalitätsmerkmal** herausstellen ließ, sollten auch weitere zellbiologische Eigenschaften (Zellatmung, Stoffaufnahme) als Vitalitätsparameter in Betracht gezogen und vor allem mit der Teilungsaktivität unter *in situ* Bedingungen verglichen werden.

Die **Anwendung an intakten Biofilmen birgt zusätzliche Probleme**: die Mikroheterogenität der Verteilung der Zellen und die mucoide Matrix, die ein Erreichen der Zellen durch den Fluorosensor erschwert. Die geplanten Tests an künstlichen Biofilmen (Mikroheterogenität und auszuzählendes Mindestareal, Passage durch proteinogene und kohlenhydratreiche Gallerten bzw. Schleime, chemische Gradienten) konnten nicht durchgeführt werden, weil es nicht gelang, mit den verfügbaren umweltrelevanten Bakterien reproduzierbare und stabile Biofilme zu erzeugen. Auf natürliche Biofilme konnte nicht ausgewichen werden, weil aufgrund fehlender Referenzparameter deren physiologischer Zustand nicht hinreichend beschrieben werden konnte. An diesen wissenschaftlichen Fragen wird aber zukünftig weiter geforscht werden.

Diskussion

Schon viele natürliche Stressfaktoren führen bei Bakterien, auch bei Pathogenen oder sonstigen schädlichen Keimen, zum sogenannten VBNC-Zustand (Viable But Not Culturable), der die in der Hygiene und Materialkunde immer noch üblichen und fast ausschließlich angewendeten kulturabhängigen falsch-negativ ausgehen lässt (z. B. Kell et al. 1998). Ob diese Zellen nur inaktiv sind oder später unter günstigeren Bedingungen sich wieder teilen können, lässt sich mit den vorhandenen kulturabhängigen Methoden gar nicht und den hier beschriebenen Methoden erst grob abschätzen. Ein guter Kompromiss, die Teilungsfähigkeit unter *in situ* Bedingungen zu ermitteln, ist die "Direct Viable Count"-Methode (DVC, Kogure et al. 1979), die für Gewässer- und Trinkwasseruntersuchungen entwickelt wurde. Hier werden die Zellen mit einem Teilungshemmer versetzt und im natürlichen Medium weiter inkubiert, so dass teilungsfähige Zellen deutlich größer werden. Allerdings sind viele Biofilmbildner vergleichsweise groß, so dass die Größenzunahme aktiver Zellen wahrscheinlich nicht ausreichend sein wird. Alternativ kann der Anteil sich aktuell teilender Zellen elektronenmikroskopisch ohne Kultivierungsschritt ermittelt (Frequency of Dividing Cells, FDC, Hagström et al. 1979) und daraus eine Teilungsrate abgeleitet werden. Jedoch kann man hierbei die Aktivität nicht den entsprechenden Arten (Pathogenen, Schädlingen) zuordnen.

Die hier dargestellten und weiteren biochemischen (z. B. Antikörper) und molekularbiologischen Methoden (z. B. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) kultivierungsunabhängigen Nachweismethoden für bestimmte Arten sind in der aquatischen mikrobiellen Ökologie und der medizinischen Forschung schon sehr weit verbreitet. In der Materialwissenschaft (Biokorrosion), anderen angewandten Wissenschaften sowie der Routineüberwachung von Gewässern und der Hygiene sind diese Methoden erst vereinzelt angewendet worden. Die in

diesem Projekt untersuchten Tests zum Nachweis der Gesamtkeimzahl sowie zur Beschreibung ihres physiologischen Zustands bieten gerade auch hierbei eine gute Untersuchungsstrategie. Wenn in einer Probe viele (intakte) Bakterien gefunden wurden, können weitere (aufwendigere) Nachweise der entsprechenden Arten eingeleitet werden. Außerdem eignen sich die Methoden hervorragend zur Untersuchung der Wirkung antimikrobieller Substanzen und Beschichtungen oder von Desinfektionsmaßnahmen. Dabei ist der Zeitgewinn gegenüber kultivierungsabhängigen Methoden von entscheidendem Vorteil.

Referenzen

- Freese HM, Karsten U, Schumann R (2006) Bacterial biomass, activity and viability in the eutrophic river Warnow, Northeast Germany. *Microb Ecol* 51:117-127
- Hagström A, Larsson U, Hörstedt P, Normark S (1979) Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 35:805-812
- Haugland RP (2008) The handbook - A guide to fluorescent probes and labeling technologies. 10. Web Edition
- Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR, Barer MR (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169-187
- Kogure K, Simidu U, Taga N (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol* 25:415-420
- Noble RT, Fuhrman JA (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 14:113-118
- Rodriguez GG, Phipps D, Ishiguro K, Ridgway HF (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58:1801-1808
- Schumann R, Karsten U, Schiewer U, Rieling T (2003) Viability of pelagic bacteria from freshwater, estuarine and Baltic Sea habitats. II. Application of cellular fluorescent markers for membrane integrity, respiration activity and hydrolytic enzymes. *Aquat Microb Ecol* 32:137-150